

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-550419

(P2023-550419A)

(43)公表日 令和5年12月1日(2023.12.1)

(51)国際特許分類		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 Z N A	4 B 0 6 4
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46		4 B 0 6 5
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00		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
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全148頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2023-530164(P2023-530164)	(71)出願人	522458778		
(86)(22)出願日	令和3年11月18日(2021.11.18)		スーチョウ・トランスセンタ・セラピューティクス・カンパニー・リミテッド		
(85)翻訳文提出日	令和5年7月18日(2023.7.18)		中華人民共和国 ジャンスー 2 1 5 1 2		
(86)国際出願番号	PCT/CN2021/131389		3, スーチョウ, シンファー・ストリート		
(87)国際公開番号	WO2022/105817		2 1 8, ビー6-5 0 1		
(87)国際公開日	令和4年5月27日(2022.5.27)	(74)代理人	100118902		
(31)優先権主張番号	PCT/CN2020/129918		弁理士 山本 修		
(32)優先日	令和2年11月18日(2020.11.18)	(74)代理人	100106208		
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)		弁理士 宮前 徹		
(31)優先権主張番号	PCT/CN2021/073341	(74)代理人	100196508		
(32)優先日	令和3年1月22日(2021.1.22)		弁理士 松尾 淳一		
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)	(74)代理人	100188374		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA	(72)発明者	キアン, シュエミン		
				最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 二機能性分子

(57)【要約】

T G F β結合性部分、I L - 1 結合性部分、免疫賦活性ポリペプチド（例えば、可溶性 L A G 3 もしくは可溶性 C D 4）または C D 4 7 結合性部分に連結された P D - L 1 結合性部分を含むタンパク質、それをコードする単離されたポリヌクレオチド、それを含む医薬組成物およびこれらの使用が提供される。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

免疫チェックポイント分子に結合する第 1 の部分、およびインターロイキン-1 (IL-1) の活性を遮断する第 2 の部分を含む、二機能性分子。

【請求項 2】

第 1 の部分が、CD27、CD70、CD28、CD80 (B7-1)、CD86 (B7-2)、CD40、CD40L (CD154)、CD122、CD137、CD137L、OX40 (CD134)、OX40L (CD252)、GITR、ICOS (CD278) および ICOSLG (CD275)、CD2、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、CD30、BAFFR、HVEM、CD7、LIGHT、NKG2C、SLAMF7、NKP80、CD160 および CD83 からなる群から任意選択で選択される、免疫賦活性チェックポイント分子のアゴニストを含む、請求項 1 に記載の二機能性分子。

10

【請求項 3】

第 1 の部分が、A2AR、B7-H3 (CD276)、B7-H4 (VTCN1)、BTLA (CD272)、CTLA-4 (CD152)、IDO1、IDO2、TDO、KIR、LAG3、NOX2、PD-1、PD-L1、PD-L2、TIM-3、VISTA、SIGLEC7 (CD328)、TIGIT、PVR (CD155)、SIGLEC9 (CD329)、CD160、LAIR1、2B4 (CD244)、CD47、B7-H5 からなる群から任意選択で選択される、免疫阻害性チェックポイント分子のアンタゴニストを含む、請求項 1 に記載の二機能性分子。

20

【請求項 4】

免疫チェックポイント分子が PD-L1 である、請求項 3 に記載の二機能性分子。

【請求項 5】

第 1 の部分が PD-L1 に対する抗体またはその抗原結合性断片を含み、第 2 の部分が IL-1 結合性部分または IL-1 受容体 (IL-1R) 結合性部分を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の二機能性分子。

【請求項 6】

IL-1 結合性部分が、IL-1R またはその断片もしくはバリエーション、あるいは IL-1 に対する抗体またはその抗原結合性断片を含む、請求項 5 に記載の二機能性分子。

30

【請求項 7】

IL-1 に対する抗体またはその抗原結合性断片が、XB2001、ルチキズマブ、LY2189102 および ベルメキマブ からなる群から選択される抗 IL-1 α 抗体由来、または SSGJ-613、CDP484、カナキヌマブ および ゲボキズマブ からなる群から選択される抗 IL-1 β 抗体由来の重鎖可変領域および／または軽鎖可変領域を含む、請求項 6 に記載の二機能性分子。

【請求項 8】

IL-1 に対する抗体またはその抗原結合性断片が、配列番号 104 もしくは配列番号 112 の配列を含む HCDR1、配列番号 105 もしくは配列番号 113 の配列を含む HCDR2、および配列番号 106 もしくは配列番号 114 の配列を含む HCDR3 を含む重鎖可変領域、ならびに／または配列番号 107 もしくは配列番号 115 の配列を含む LCDR1、配列番号 108 もしくは配列番号 116 の配列を含む LCDR2、および配列番号 109 もしくは配列番号 117 の配列を含む LCDR3 を含む軽鎖可変領域を含む、請求項 6 に記載の二機能性分子。

40

【請求項 9】

IL-1 に対する抗体またはその抗原結合性断片が、配列番号 104 の配列を含む HCDR1、配列番号 105 の配列を含む HCDR2、および配列番号 106 の配列を含む HCDR3 を含む重鎖可変領域、ならびに／または配列番号 107 の配列を含む LCDR1、配列番号 108 の配列を含む LCDR2、および配列番号 109 の配列を含む LCDR3 を含む軽鎖可変領域を含む、請求項 6 に記載の二機能性分子。

50

【請求項 10】

IL-1 に対する抗体またはその抗原結合性断片が、配列番号 112 の配列を含む HCDR1、配列番号 113 の配列を含む HCDR2、および配列番号 114 の配列を含む HCDR3 を含む重鎖可変領域、ならびに／または配列番号 115 の配列を含む LCDR1、配列番号 116 の配列を含む LCDR2、および配列番号 117 の配列を含む LCDR3 を含む軽鎖可変領域を含む、請求項 6 に記載の二機能性分子。

【請求項 11】

IL-1 に対する抗体またはその抗原結合性断片が、配列番号 102、配列番号 110、およびこれらに少なくとも 80% の配列同一性を有するその相同性配列からなる群から選択される配列を含む重鎖可変領域、ならびに／または配列番号 103、配列番号 111、およびこれらに少なくとも 80% の配列同一性を有するその相同性配列からなる群から選択される配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項 6 に記載の二機能性分子。

10

【請求項 12】

IL-1 に対する抗体またはその抗原結合性断片が、配列番号 102、およびこれに少なくとも 80% の配列同一性を有するその相同性配列からなる群から選択される配列を含む重鎖可変領域、ならびに／または配列番号 103、およびこれに少なくとも 80% の配列同一性を有するその相同性配列からなる群から選択される配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項 6 に記載の二機能性分子。

【請求項 13】

IL-1 に対する抗体またはその抗原結合性断片が、配列番号 110、およびこれに少なくとも 80% の配列同一性を有するその相同性配列からなる群から選択される配列を含む重鎖可変領域、ならびに／または配列番号 111、およびこれに少なくとも 80% の配列同一性を有するその相同性配列からなる群から選択される配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項 6 に記載の二機能性分子。

20

【請求項 14】

IL-1R 結合性部分が、インターロイキン-1 受容体アンタゴニストまたはその断片もしくはバリエーション、あるいは IL-1R に対する抗体またはその抗原結合性断片を含む、請求項 5 に記載の二機能性分子。

【請求項 15】

IL-1R に対する抗体またはその抗原結合性断片が、スベソリマブ、アステゴリマブ、イムシドリマブ、AMG108、メルリリマブ、ニダニリマブ、MED18968、REGN6490、HB0034 および CSC012 からなる群から選択される抗体由来の重鎖可変領域および／または軽鎖可変領域を含む、請求項 14 に記載の二機能性分子。

30

【請求項 16】

PD-L1 に結合する第 1 の部分、および a) 免疫抑制性サイトカインの活性を遮断する、または b) 免疫を刺激する第 2 の部分を含む二機能性分子であって、第 1 の部分が、重鎖可変 (VH) 領域および／または軽鎖可変 (VL) 領域を含む、PD-L1 に対する抗体またはその抗原結合性断片を含み、重鎖可変領域が、

a) DYYMN (配列番号 1) もしくはこれに少なくとも 80% の配列同一性のある相同性配列を含む HCDR1、

40

b) DINPNX₁X₂TX₃YNHKFKG (配列番号 19) もしくはこれに少なくとも 80% の配列同一性のある相同性配列を含む HCDR2、および

c) WGDGPFAY (配列番号 3) もしくはこれに少なくとも 80% の配列同一性のある相同性配列を含む HCDR3

を含み、かつ／または

軽鎖可変領域が、

d) KASQNVX₄X₅X₆VA (配列番号 20) もしくはこれに少なくとも 80% の配列同一性のある相同性配列からなる群から選択される配列を含む LCDR1、

e) SX₇SX₈RYT (配列番号 21) もしくはこれに少なくとも 80% の配列同一性のある相同性配列からなる群から選択される配列を含む LCDR2、および

50

f) Q Q Y S N Y P T (配列番号 6) もしくはこれに少なくとも 80% の配列同一性のある相同性配列からなる群から選択される配列を含む L C D R 3 を含み、

式中、 X_1 が G または A であり、 X_2 が G または D または Q または E または L であり、 X_3 が S または M または Q または L または V であり、 X_4 が G または P または K であり、 X_5 が A または G であり、 X_6 が A または I であり、 X_7 が A または N または R または V であり、かつ X_8 が N または H または V または D である、二機能性分子。

【請求項 17】

重鎖可変領域が、

- a) 配列番号 1 の配列を含む H C D R 1、
 - b) 配列番号 2、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 17 および配列番号 18 からなる群から選択される配列を含む H C D R 2、ならびに
 - c) 配列番号 3 の配列を含む H C D R 3、
- を含み、かつ／または
- 軽鎖可変領域が、
- d) 配列番号 4、配列番号 7、配列番号 8 および配列番号 9 からなる群から選択される配列を含む L C D R 1、
 - e) 配列番号 5、配列番号 10、配列番号 11 および配列番号 12 からなる群から選択される配列を含む L C D R 2、ならびに
 - f) 配列番号 6 の配列を含む L C D R 3
- を含む、請求項 16 に記載の二機能性分子。

10

20

【請求項 18】

重鎖可変領域が、

- a) 配列番号 1 の配列を含む H C D R 1、配列番号 2 の配列を含む H C D R 2、および配列番号 3 の配列を含む H C D R 3 を含む重鎖可変領域；
 - b) 配列番号 1 の配列を含む H C D R 1、配列番号 13 の配列を含む H C D R 2、および配列番号 3 の配列を含む H C D R 3 を含む重鎖可変領域；
 - c) 配列番号 1 の配列を含む H C D R 1、配列番号 14 の配列を含む H C D R 2、および配列番号 3 の配列を含む H C D R 3 を含む重鎖可変領域；
 - d) 配列番号 1 の配列を含む H C D R 1、配列番号 15 の配列を含む H C D R 2、および配列番号 3 の配列を含む H C D R 3 を含む重鎖可変領域；ならびに
 - e) 配列番号 1 の配列を含む H C D R 1、配列番号 17 の配列を含む H C D R 2、および配列番号 3 の配列を含む H C D R 3 を含む重鎖可変領域
- からなる群から選択される、請求項 17 に記載の二機能性分子。

30

【請求項 19】

軽鎖可変領域が、

- a) 配列番号 4 の配列を含む L C D R 1、配列番号 5 の配列を含む L C D R 2、および配列番号 6 の配列を含む L C D R 3 を含む軽鎖可変領域；
 - b) 配列番号 9 の配列を含む L C D R 1、配列番号 5 の配列を含む L C D R 2、および配列番号 6 の配列を含む L C D R 3 を含む軽鎖可変領域；
 - c) 配列番号 8 の配列を含む L C D R 1、配列番号 5 の配列を含む L C D R 2、および配列番号 6 の配列を含む L C D R 3 を含む軽鎖可変領域；
 - d) 配列番号 4 の配列を含む L C D R 1、配列番号 12 の配列を含む L C D R 2、および配列番号 6 の配列を含む L C D R 3 を含む軽鎖可変領域；ならびに
 - e) 配列番号 4 の配列を含む L C D R 1、配列番号 11 の配列を含む L C D R 2、および配列番号 6 の配列を含む L C D R 3 を含む軽鎖可変領域
- からなる群から選択される、請求項 17 または 18 に記載の二機能性分子。

40

【請求項 20】

P D - L 1 に対する抗体もしくはその抗原結合性断片が、重鎖 H F R 1、H F R 2、H F R 3 および H F R 4 の 1 つもしくは複数、ならびに／または軽鎖 L F R 1、L F R 2、

50

LFR3およびLFR4の1つもしくは複数をさらに含み、

a) HFR1が、QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYX₉FT (配列番号40) またはこれに少なくとも80%の配列同一性のある相同性配列を含み、

b) HFR2が、WVRQAPGQX₁₀LEWMG (配列番号41) またはこれに少なくとも80%の配列同一性のある相同性配列を含み、

c) HFR3配列が、RVTX₁₆TVDX₁₁SISTAYMELSR₁LRSDDTAVYYCX₁₂X₁₃ (配列番号42) またはこれに少なくとも80%の配列同一性のある相同性配列を含み、

d) HFR4が、WGQGT₁LVTVSS (配列番号25) またはこれに少なくとも80%の配列同一性のある相同性配列を含み、

e) LFR1が、DIQMTQSPSSLSASVGD₁RVITTC (配列番号26) またはこれに少なくとも80%の配列同一性のある相同性配列を含み、

f) LFR2が、WYQQKPGKX₁₄PKLLIY (配列番号43) またはこれに少なくとも80%の配列同一性のある相同性配列を含み、

g) LFR3が、GVPX₁₅RFSGSGSGTDFTX₁₇TIS₁SLQPEDIATYYC (配列番号44) またはこれに少なくとも80%の配列同一性のある相同性配列を含み、

h) LFR4が、FGQGT₁KLEIK (配列番号29) またはこれに少なくとも80%の配列同一性のある相同性配列を含み、

式中、X₉がTまたはVであり、X₁₀がGまたはSであり、X₁₁がTまたはKであり、X₁₂がAまたはVであり、X₁₃がRまたはKであり、X₁₄がAまたはSであり、X₁₅がSまたはDであり、X₁₆がMまたはVであり、かつX₁₇がFまたはLである、請求項16から19のいずれかに記載の二機能性分子。

【請求項21】

HFR1が、配列番号22および30からなる群から選択される配列を含み、

HFR2が、配列番号23および31からなる群から選択される配列を含み、

HFR3が、配列番号24および32～35からなる群から選択される配列を含み、

HFR4が、配列番号25の配列を含み、

LFR1が、配列番号26からなる群からの配列を含み、

LFR2が、配列番号27および36からなる群から選択される配列を含み、

LFR3が、配列番号28、および37～38、39、45からなる群から選択される配列を含み、

LFR4が、配列番号29の配列を含む、請求項20に記載の二機能性分子。

【請求項22】

重鎖可変領域が、配列番号46、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52、配列番号56、配列番号57、配列番号58、配列番号59、配列番号60、およびこれらに少なくとも80%の配列同一性を有するその相同性配列からなる群から選択される配列を含む、請求項16から21のいずれかに記載の二機能性分子。

【請求項23】

軽鎖可変領域が、配列番号47、配列番号54、配列番号55、配列番号61、配列番号62、配列番号63、配列番号64、配列番号65、およびこれらに少なくとも80%の配列同一性を有するその相同性配列からなる群から選択される配列を含む、請求項16から22のいずれかに記載の二機能性分子。

【請求項24】

PD-L1に対する抗体またはその抗原結合性断片が、配列番号49/54、50/54、51/54、52/54、49/55、50/55、51/55、52/55、58/62、58/63、58/64、58/65、59/62、59/63、59/64、59/65、60/62、60/63、60/64および60/65からなる群から選択される重鎖可変領域配列と軽鎖可変領域配列との対を含む、請求項16に記載の二機能性分子。

【請求項 25】

P D - L 1 に対する抗体またはその抗原結合性断片が、P D - L 1 への特異的結合特異性および／または親和性を依然として保持する1つまたは複数のアミノ酸残基置換または改変をさらに含む、請求項 16 から 24 のいずれかに記載の二機能性分子。

【請求項 26】

置換または改変の少なくとも1つが、V H または V L 配列の C D R 配列の1つもしくは複数、および／または非 C D R 領域の1つもしくは複数にある、請求項 25 に記載の二機能性分子。

【請求項 27】

P D - L 1 に対する抗体またはその抗原結合性断片が、免疫グロブリン定常領域、任意選択でヒト I g の定常領域、または任意選択でヒト I g G の定常領域をさらに含む、請求項 16 から 26 のいずれかに記載の二機能性分子。

10

【請求項 28】

定常領域が、ヒト I g G 1、I g G 2、I g G 3 または I g G 4 の F c 領域を含む、請求項 27 に記載の二機能性分子。

【請求項 29】

定常領域が、対応する野生型 F c 領域と比べて低下したエフェクター機能を有する F c バリエーションを含む、請求項 28 に記載の二機能性分子。

【請求項 30】

F c バリエーションが、220S、226S、228P、229S、233P、234V、234G、234A、234F、234A、235A、235G、235E、236E、236R、237A、237K、238S、267R、268A、268Q、269R、297A、297Q、297G、309L、318A、322A、325L、328R、330S、331S およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される1つまたは複数のアミノ酸残基置換を含み、F c 領域中の残基の番号付けが K a b a t にあるとおりの E U インデックスのものである、請求項 29 に記載の二機能性分子。

20

【請求項 31】

F c バリエーションが、a) K 322A、L 234A および L 235A；b) P 331S、L 234F および L 235E；c) L 234A および L 235A；c) N 297A；d) N 297Q；e) N 297G；f) L 235E；g) L 234A および L 235A (I g G 1)；h) F 234A および L 235A (I g G 4)；i) H 268Q、V 309L、A 330S および P 331S (I g G 2)；j) V 234A、G 237A、P 238S、H 268A、V 309L、A 330S および P 331S (I g G 2) からなる群から選択される変異の組合せを含み、F c 領域中の残基の番号付けが K a b a t にあるとおりの E U インデックスのものである、請求項 29 から 30 のいずれかに記載の二機能性分子。

30

【請求項 32】

F c バリエーションが、配列番号 81 のアミノ酸配列を含む、請求項 29 から 31 のいずれかに記載の二機能性分子。

【請求項 33】

P D - L 1 に対する抗体またはその抗原結合性断片がヒト化されている、請求項 16 から 32 のいずれかに記載の二機能性分子。

40

【請求項 34】

抗原結合性断片が、ダイアボディ、F a b、F a b'、F (a b')₂、F d、F v 断片、ジスルフィド安定化 F v 断片 (d s F v)、(d s F v)₂、二特異性 d s F v (d s F v - d s F v')、ジスルフィド安定化ダイアボディ (d s ダイアボディ)、1 本鎖抗体分子 (s c F v)、s c F v 二量体 (二価ダイアボディ)、多特異性抗体、ラクダ化単ドメイン抗体、ナノボディ、ドメイン抗体および二価ドメイン抗体である、請求項 16 から 33 のいずれかに記載の二機能性分子。

【請求項 35】

抗体またはその抗原結合性断片が、ヒト P D - L 1 および カニクイザル P D - L 1 の両

50

方に結合することが可能である、請求項 16 から 34 のいずれかに記載の二機能性分子。

【請求項 36】

第 1 の部分が、PD-L1 への結合について、請求項 16 から 35 のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合性断片と競合する抗体またはその抗原結合性断片を含む、請求項 1 から 15 のいずれかに記載の二機能性分子。

【請求項 37】

免疫抑制性サイトカインが、トランスフォーミング増殖因子ベータ (TGF- β) スーパーファミリー中のサイトカイン、IL-1、または血管内皮増殖因子 (VEGF) を含む、請求項 16 から 36 のいずれかに記載の二機能性分子。

【請求項 38】

TGF- β スーパーファミリー中の免疫抑制性サイトカインが、TGF- β 、骨形成タンパク質 (BMP)、アクチビン、NODAL、および増殖分化因子 (GDF) を含む、請求項 37 に記載の二機能性分子。

【請求項 39】

免疫抑制性サイトカインが TGF- β である、請求項 16 から 38 のいずれか一項に記載の二機能性分子。

【請求項 40】

第 2 の部分が TGF- β 結合性部分を含む、請求項 16 から 39 に記載の二機能性分子。

【請求項 41】

TGF- β 結合性部分が、可溶性 TGF β 受容体 (TGF β R) またはその TGF- β 結合性断片もしくはバリエーション、あるいは TGF β に対する抗体およびその抗原結合性断片を含む、請求項 40 に記載の二機能性分子。

【請求項 42】

可溶性 TGF β R が、TGF β R の細胞外ドメイン (ECD) またはその TGF- β 結合性断片もしくはバリエーションを含む、請求項 41 に記載の二機能性分子。

【請求項 43】

TGF β R が、TGF β 受容体 I (TGF β RI)、TGF β 受容体 II (TGF β RII)、TGF β 受容体 III (TGF β RIII)、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される、請求項 42 に記載の二機能性分子。

【請求項 44】

TGF β R が TGF β RII である、請求項 42 に記載の二機能性分子。

【請求項 45】

TGF β RII が、TGF β 2 および TGF β 3 よりも TGF β 1 に選択的に結合する、請求項 44 に記載の二機能性分子。

【請求項 46】

TGF β 1 が、ヒト TGF β 1 またはマウス TGF β 1 である、請求項 45 に記載の二機能性分子。

【請求項 47】

TGF β R の ECD が、配列番号 66、79、78、77 のアミノ酸配列、または TGF- β への特異的結合特異性および／または親和性を依然として保持する、これらに少なくとも 80% の配列同一性を有する配列を含む、請求項 42 から 46 のいずれかに記載の二機能性分子。

【請求項 48】

第 2 の部分が、IL-1 結合性部分または IL-1 受容体 (IL-1R) 結合性部分を含む、請求項 36 に記載の二機能性分子。

【請求項 49】

IL-1 結合性部分が、可溶性 IL-1R、IL-1R の IL-1 結合性断片もしくはバリエーション、または IL-1 に対する抗体もしくはその抗原結合性断片を含む、請求項 48 に記載の二機能性分子。

10

20

30

40

50

【請求項 5 0】

IL-1 に対する抗体またはその抗原結合性断片が、XB2001、ルチキズマブ、LY2189102 およびベルメキマブからなる群から選択される抗 IL-1 α 抗体由来、または SSGJ-613、CDP484、カナキヌマブおよびゲボキズマブからなる群から選択される抗 IL-1 β 抗体由来の重鎖可変領域および／または軽鎖可変領域を含む、請求項 49 に記載の二機能性分子。

【請求項 5 1】

IL-1 に対する抗体またはその抗原結合性断片が、配列番号 104 もしくは配列番号 112 の配列を含む HCDR1、配列番号 105 もしくは配列番号 113 の配列を含む HCDR2、および配列番号 106 もしくは配列番号 114 の配列を含む HCDR3 を含む重鎖可変領域、ならびに／または配列番号 107 もしくは配列番号 115 の配列を含む LCDR1、配列番号 108 もしくは配列番号 116 の配列を含む LCDR2、および配列番号 109 もしくは配列番号 117 の配列を含む LCDR3 を含む軽鎖可変領域を含む、請求項 49 に記載の二機能性分子。

10

【請求項 5 2】

IL-1 に対する抗体またはその抗原結合性断片が、配列番号 104 の配列を含む HCDR1、配列番号 105 の配列を含む HCDR2、および配列番号 106 の配列を含む HCDR3 を含む重鎖可変領域、ならびに／または配列番号 107 の配列を含む LCDR1、配列番号 108 の配列を含む LCDR2、および配列番号 109 の配列を含む LCDR3 を含む軽鎖可変領域を含む、請求項 49 に記載の二機能性分子。

20

【請求項 5 3】

IL-1 に対する抗体またはその抗原結合性断片が、配列番号 112 の配列を含む HCDR1、配列番号 113 の配列を含む HCDR2 および配列番号 114 の配列を含む HCDR3 を含む重鎖可変領域、ならびに／または配列番号 115 の配列を含む LCDR1、配列番号 116 の配列を含む LCDR2 および配列番号 117 の配列を含む LCDR3 を含む軽鎖可変領域を含む、請求項 49 に記載の二機能性分子。

【請求項 5 4】

IL-1 に対する抗体またはその抗原結合性断片が、配列番号 102、配列番号 110 およびこれらに少なくとも 80% の配列同一性を有するその相同性配列からなる群から選択される配列を含む重鎖可変領域、ならびに／または配列番号 103、配列番号 111 およびこれらに少なくとも 80% の配列同一性を有するその相同性配列からなる群から選択される配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項 49 に記載の二機能性分子。

30

【請求項 5 5】

IL-1 に対する抗体またはその抗原結合性断片が、配列番号 102 およびこれに少なくとも 80% の配列同一性を有するその相同性配列からなる群から選択される配列を含む重鎖可変領域、ならびに／または配列番号 103 およびこれに少なくとも 80% の配列同一性を有するその相同性配列からなる群から選択される配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項 49 に記載の二機能性分子。

【請求項 5 6】

IL-1 に対する抗体またはその抗原結合性断片が、配列番号 110、およびこれに少なくとも 80% の配列同一性を有するその相同性配列からなる群から選択される配列を含む重鎖可変領域、ならびに／または配列番号 111、およびこれに少なくとも 80% の配列同一性を有するその相同性配列からなる群から選択される配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項 49 に記載の二機能性分子。

40

【請求項 5 7】

配列番号 118 もしくは配列番号 120 のアミノ酸配列を含む重鎖、および／または配列番号 119 もしくは配列番号 121 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、請求項 49 に記載の二機能性分子。

【請求項 5 8】

IL-1 結合性部分が、IL-1RI の細胞外ドメイン (ECD)、IL-1RI、I

50

IL-1RIのECD、IL-1RII、またはIL-1RIIのECD、またはIL-1RAP、またはIL-1RAPのECD、IL-1sRIまたはIL-1sRIIのいずれかのIL-1結合性断片またはバリエントを含む、請求項49に記載の二機能性分子。

【請求項59】

IL-1R結合性部分が、IL-1RaまたはそのIL-1結合性断片もしくはバリエント、あるいはIL-1Rに対する抗体またはその抗原結合性断片を含む、請求項48に記載の二機能性分子。

【請求項60】

IL-1Rに対する抗体またはその抗原結合性断片が、スペソリマブ、アステゴリマブ、イムシドリマブ、AMG108、メルリリマブ、ニダニリマブ、MED18968、REGN6490、HB0034およびCSC012からなる群から選択される抗体由来の重鎖可変領域および／または軽鎖可変領域を含む、請求項59に記載の二機能性分子。

【請求項61】

IL-1R結合性部分が、配列番号67もしくは76のアミノ酸配列、または配列番号67もしくは76に少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列、またはそのIL-1結合性断片もしくはバリエントを含む、請求項60に記載の二機能性分子。

【請求項62】

IL-1が、IL-1αまたはIL-1βである、請求項48から49のいずれかに記載の二機能性分子。

【請求項63】

IL-1βがヒトIL-1βである、請求項62に記載の二機能性分子。

【請求項64】

第2の部分が、抗腫瘍免疫を刺激し、かつ免疫賦活性ポリペプチドを含む、請求項16から36のいずれかに記載の二機能性分子。

【請求項65】

免疫賦活性ポリペプチドが、インターロイキン(IL)-2(IL-2)、IL-15、IL-21、IL-10、IL-12、IL-23、IL-27、IL-35、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、可溶性CD4、可溶性LAG-3、IFN-α、またはこれらの機能性等価物を含む、請求項64に記載の二機能性分子。

【請求項66】

可溶性LAG-3が、LAG-3の細胞外ドメイン(ECD)またはそのMHCI結合性バリエントを含む、請求項65に記載の二機能性分子。

【請求項67】

第2の部分が、抗腫瘍免疫を刺激し、かつ免疫阻害性受容体シグナル伝達のアнтаゴニストを含む、請求項16から36のいずれかに記載の二機能性分子。

【請求項68】

免疫阻害性受容体が、シグナル制御タンパク質アルファ(SIRPα)である、請求項67に記載の二機能性分子。

【請求項69】

第2の部分が、CD47とSIRPαとの間の相互作用を遮断する、請求項68に記載の二機能性分子。

【請求項70】

第2の部分が、CD47結合性ドメインまたはSIRPα結合性ドメインを含む、請求項69に記載の二機能性分子。

【請求項71】

CD47結合性ドメインが、可溶性SIRPαまたはそのCD47結合性断片もしくはバリエント、あるいは抗CD47抗体またはその抗原結合性断片を含む、請求項70に記載の二機能性分子。

【請求項72】

可溶性SIRPαが、SIRPαの細胞外ドメイン(ECD)またはそのCD47結合

10

20

30

40

50

性バリエーションを含む、請求項 7 1 に記載の二機能性分子。

【請求項 7 3】

C D 4 7 結合性ドメインが、配列番号 8 4 のアミノ酸配列、または C D 4 7 に対する結合特異性を依然として保持する、これに少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 7 0 に記載の二機能性分子。

【請求項 7 4】

S I R P α 結合性ドメインが、可溶性 C D 4 7 またはその S I R P α 結合性断片もしくはバリエーション、あるいは抗 S I R P α 抗体またはその抗原結合性断片を含む、請求項 7 0 に記載の二機能性分子。

【請求項 7 5】

可溶性 C D 4 7 が、C D 4 7 の細胞外ドメイン (E C D) またはその S I R P α 結合性断片もしくはバリエーション、抗 S I R P α 抗体またはその抗原結合性断片を含む、請求項 7 4 に記載の二機能性分子。

【請求項 7 6】

第 1 の部分と第 2 の部分とを繋ぐリンカーをさらに含む、請求項 1 ~ 7 5 のいずれかに記載の二機能性分子。

【請求項 7 7】

リンカーが、切断性リンカー、非切断性リンカー、ペプチドリンカー、可動性リンカー、剛性リンカー、ヘリックスリンカー、および非ヘリックスリンカーからなる群から選択される、請求項 7 6 に記載の二機能性分子。

【請求項 7 8】

リンカーが ((G) n S) m のアミノ酸配列を含み、式中、 m および n が独立的に 0 から 3 0 から選択される整数である、請求項 7 7 に記載の二機能性分子。

【請求項 7 9】

1 つまたは複数の第 2 の部分を含む、請求項 1 6 から 7 8 のいずれかに記載の二機能性分子。

【請求項 8 0】

第 2 の部分の少なくとも 1 つが、第 1 の部分のポリペプチド鎖の N 末端または C 末端に連結されている、請求項 7 9 に記載の二機能性分子。

【請求項 8 1】

第 2 の部分の少なくとも 1 つが、a) 第 1 の部分の重鎖の N 末端もしくは C 末端、または b) 第 1 の部分の軽鎖の N 末端もしくは C 末端に連結されている、請求項 7 9 に記載の二機能性分子。

【請求項 8 2】

第 2 の部分の少なくとも 1 つが、第 1 の部分の重鎖定常領域の C 末端に連結されている、請求項 7 9 に記載の二機能性分子。

【請求項 8 3】

第 2 の部分のそれぞれが、第 1 の部分の各重鎖定常領域の C 末端にそれぞれ連結されている、請求項 7 9 に記載の二機能性分子。

【請求項 8 4】

第 1 の部分の重鎖の N 末端、第 1 の部分の重鎖の C 末端、第 1 の部分の軽鎖の N 末端、第 1 の部分の軽鎖の C 末端、またはこれらの任意の組合せにそれぞれ連結された 1 つより多い第 2 の部分を含む、請求項 7 9 に記載の二機能性分子。

【請求項 8 5】

ホモ二量体重鎖またはヘテロ二量体重鎖を含む、請求項 7 9 から 8 4 のいずれか一項に記載の二機能性分子。

【請求項 8 6】

重鎖が、第 2 の部分の存在または位置に関してヘテロ二量体性である、請求項 7 9 から 8 4 のいずれか一項に記載の二機能性分子。

【請求項 8 7】

ヘテロ二量体重鎖が、第 2 の部分を有する一方の重鎖およびそれを有さない他方の重鎖を含む、請求項 86 に記載の二機能性分子。

【請求項 88】

ヘテロ二量体重鎖が、ホモ二量体化を防止する、および／またはヘテロ二量体化を支持するように関連するヘテロ二量体 F c 領域をさらに含む、請求項 86 に記載の二機能性分子。

【請求項 89】

ヘテロ二量体 F c 領域が、ノブイントゥーホール、疎水性相互作用、静電相互作用、親水性相互作用、または可動性の増加を介してヘテロ二量体に会合することが可能である、請求項 86 に記載の二機能性分子。

10

【請求項 90】

ヘテロ二量体 F c 領域が、1 つの F c ポリペプチド鎖中に Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A もしくは Y 4 0 7 V またはこれらの任意の組合せ、および別の F c ポリペプチド鎖中に S 3 5 4 C もしくは T 3 6 6 W またはこれらの組合せを含み、F c ポリペプチド鎖中の残基の番号付けが K a b a t にあるとおりの E U インデックスのものである、請求項 88 から 89 のいずれかに記載の二機能性分子。

【請求項 91】

1 つまたは複数のコンジュゲート部分にさらに連結されている、請求項 1 ～ 90 いずれかに記載の二機能性分子。

【請求項 92】

コンジュゲート部分が、クリアランス改変剤、化学療法剤、毒素、放射性同位元素、ランタニド、発光標識、蛍光標識、酵素基質標識、DNA アルキル化剤、トポイソメラーゼ阻害剤、チューブリン結合剤、またはアンドロゲン受容体阻害剤などの他の抗がん薬物を含む、請求項 91 に記載の二機能性分子。

20

【請求項 93】

請求項 1 ～ 92 のいずれかに記載の二機能性分子、および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物またはキット。

【請求項 94】

請求項 16 から 92 のいずれか一項に記載の二機能性分子をコードする単離されたポリヌクレオチド。

30

【請求項 95】

請求項 94 に記載の単離されたポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 96】

請求項 95 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 97】

請求項 95 に記載のベクターが発現される条件下で請求項 96 に記載の宿主細胞を培養するステップを含む、請求項 16 から 92 のいずれか一項に記載の二機能性分子を発現させる方法。

【請求項 98】

請求項 16 から 92 のいずれか一項に記載の二機能性分子、および／または請求項 93 に記載の医薬組成物もしくはキットの治療有効量を対象に投与するステップを含む、対象において PD-L1 関連疾患を処置する、予防するまたは軽減する方法。

40

【請求項 99】

疾患が、免疫関連疾患もしくは障害、がん、または感染性疾患である、請求項 98 に記載の方法。

【請求項 100】

がんが、肺がん（例えば、非小細胞肺がん）、肝臓がん、膵臓がん、乳がん、気管支がん、骨がん、肝臓および胆管がん、卵巣がん、精巣がん、腎臓がん、膀胱がん、頭頸部がん、脊椎がん、脳がん、子宮頸がん、子宮がん、子宮内膜がん、結腸がん、結腸直腸がん、前立腺がん、胃－食道がん、直腸がん、肛門がん、胃腸がん、皮膚がん、下垂体がん、

50

胃がん、膵がん、甲状腺がん、神経膠芽腫、星状細胞腫、黒色腫、骨髄異形成症候群、肉腫、奇形腫、神経膠腫ならびに腺癌からなる群から選択される、請求項 99 に記載の方法。

【請求項 101】

対象が、PD-L1 発現がん細胞を有すると同定されている、請求項 98 から 100 のいずれかに記載の方法。

【請求項 102】

PD-L1 関連疾患が、PD-L1 / PD-1 単剤治療に抵抗性である、請求項 98 から 101 のいずれかに記載の方法。

【請求項 103】

対象がヒトである、請求項 98 から 102 のいずれかに記載の方法。

【請求項 104】

第 2 の治療剤の治療有効量を投与するステップをさらに含む、請求項 98 から 103 のいずれかに記載の方法。

【請求項 105】

第 2 の治療剤が、化学療法剤、抗がん薬物、放射線療法、免疫療法剤、血管新生抑制剤、標的療法剤、細胞療法剤、遺伝子療法剤、ホルモン療法剤、またはサイトカインから選択される、請求項 104 に記載の方法。

【請求項 106】

対象における PD-L1 関連疾患または状態を処置するための医薬の製造における、請求項 16 から 92 のいずれかに記載の二機能性分子の使用。

【請求項 107】

対象において、免疫抑制性サイトカインの抑制から、持続性免疫応答の誘導から、または抗腫瘍免疫の刺激から利益を受ける疾患または状態を処置する、予防する、または軽減する方法であって、請求項 16 から 92 のいずれかに記載の二機能性分子の有効量を投与するステップを含む方法。

【請求項 108】

免疫抑制性サイトカインが TGF β である、請求項 107 に記載の方法。

【請求項 109】

疾患または状態が、TGF- β 関連疾患または状態である、請求項 108 に記載の方法。

【請求項 110】

TGF- β 関連疾患が、がん、線維性疾患、または腎疾患である、請求項 109 に記載の方法。

【請求項 111】

免疫抑制性サイトカインが IL-1 である、請求項 107 に記載の方法。

【請求項 112】

疾患または状態が、IL-1 関連疾患または状態である、請求項 111 に記載の方法。

【請求項 113】

疾患または状態が、免疫賦活性ポリペプチドを用いて MHC II シグナル伝達を刺激することによる持続性免疫応答の誘導から利益を受ける、請求項 107 に記載の方法。

【請求項 114】

免疫賦活性ポリペプチドが可溶性 LAG-3 である、請求項 113 に記載の方法。

【請求項 115】

疾患または状態が、免疫阻害性受容体シグナル伝達を阻害することによる抗腫瘍免疫の刺激から利益を受ける、請求項 107 に記載の方法。

【請求項 116】

免疫阻害性受容体が SIRP α である、請求項 115 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

20

30

40

50

【0001】

【001】本開示は、一般に、免疫チェックポイント分子（例えば、PD-L1）を標的化し、抗腫瘍免疫抑制（ATIS）サイトカイン（例えば、IL-1またはTGFβ）の活性を遮断するかまたは免疫を刺激する新規二機能性分子に関する。

【背景技術】

【0002】

【002】プログラム死1（PD-1）ならびにそのリガンドPD-L1およびPD-L2は、T細胞媒介性免疫応答の調節における重要な共抑制分子である。PD-1は、末梢組織の活性化T細胞の表面で発現される単一の細胞外免疫グロブリンスーパーファミリー（IgSF）V-セットドメインを含むI型膜タンパク質である（Zhang Xら、Immunity、2004、20（3）：337～347）。PD-L1およびPD-L2は、樹状細胞およびマクロファージで一般に発現され、それらの外部ドメインは、膜遠位IgSF V-セットおよび膜近位IgSF C-セットドメインから構成される（Latchman Yら、Nature immunology、2001、2（3）：261～268）。PD-1とその2つのリガンドとのライゲーシオンは、免疫受容体チロシンベース阻害モチーフおよび免疫受容体チロシンベーススイッチモチーフを含有するPD-1の細胞質ドメインを通じて共抑制シグナル伝達を開始し、それにより、シグナル伝達に関与するエフェクター分子を脱リン酸化することによってTCRシグナル伝達を下方制御するSHPホスファターゼの活性化をもたらす（Chemnitz J Mら、J. Immunol.、2004、173（2）：945～954）。結果として、PD-1シグナル伝達は、過剰なまたは有害な炎症を予防し、正常な状態での自己抗原への免疫寛容を維持する（Collins A Vら、Immunity、2002、17（2）：201～210）。

【0003】

【003】PD-L1は、別の受容体、B7.1（B7-1またはCD80としても知られる）との相互作用を通じてT細胞機能を負に制御する。PD-L1/PD-1およびPD-L1/B7.1複合体の形成は、T細胞受容体シグナル伝達を負に制御し、続くT細胞活性化の下方制御および抗腫瘍免疫活性の抑制を生じる（Butte M Jら、Immunity、2007、27（1）：111～122）。

【0004】

【004】PD-L1は、さまざまな腫瘍においてしばしば過剰発現され、T細胞でのPD-1とのその相互作用は、がん細胞がT細胞媒介免疫応答を回避できるようにする（Okazaki Tら、Nature immunology、2013、14（12）：1212～1218）。これにより、PD-1/PD-L1相互作用を遮断することは、T細胞活性化および抗腫瘍応答を回復できる（Callahan M Kら、Immunity、2016、44（5）：1069～1078）。アテゾリズマブ（Tecentriq（登録商標））（Rittmeyer Aら、The Lancet、2017、389（10066）：255～265）、アベルマブ（Bavencio（登録商標））（Hamilton Gら、Expert Opinion on Biological Therapy、2017、17（4）：515～523）およびデュルバルマブ（Imfinzi（登録商標））（Brower V、The Lancet Oncology、2016、17（7）：e275）などの抗体ベースのPD-1/PD-L1遮断療法の成功は、ヒトのがん、特に、固形腫瘍との闘いに大きな進歩をもたらした。腫瘍細胞および／または浸潤性免疫細胞によるPD-L1発現とPD-1/PD-L1標的療法への臨床応答との間に関連が示されたが、この関連は完璧ではない（Herbst Rら、Nature 515、563～567（2014）；Taube J Mら、Clinical cancer research、2014、20（19）：5064～5074）。PD-L1陽性腫瘍のごく一部だけがこれらの処置に応答し、ある種のPD-L1陰性腫瘍は、それにもかかわらず、処置に応答性である。このことは、追加的な因子がPD-1/PD-L1標的療法への患者の応答を決定し、追加的な予測バイオマー

10

20

30

40

50

カーがこれらの薬剤の臨床使用を改善するために同定されなければならない可能性を生じる。

【0005】

【005】Mar i a t h a s a n Sらは、応答の欠如が線維芽細胞におけるトランスフォーミング増殖因子 β (TGF- β) シグナル伝達のシグネチャーと関連することを見出した (Mar i a t h a s a n Sら、Nature、2018、554 (7693) : 544~548)。David JMらも上皮間葉転換 (EMT) を誘導し、抗腫瘍免疫を抑制するとして知られる多面的サイトカインとして、TGF- β が、いくつかの上皮 NSCLC 細胞系において腫瘍 PD-L1 発現を上方制御でき、上方制御は、TGF- β シグナル伝達の重要な下流エフェクターである Smad2 のリン酸化と関連することを見出した (David J Mら、Oncoimmunology、2017、6 (10) : e1349589)。マウスでは、抗 PD-L1 と合わせた TGF- β 遮断抗体の治療用投与は、間質細胞において TGF- β シグナル伝達を低減し、腫瘍の中心への T 細胞進入を促進し、活発な抗腫瘍免疫および腫瘍退縮を誘発した (Mar i a t h a s a n Sら、Nature、2018、554 (7693) : 544~548)。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

【006】しかし、抗 PD-L1 抗体の低い親和性は、高い処置有効性および低い毒性の副作用を達成するための課題をいまだ提示している。

20

【0007】

【007】したがって、PD-L1 への高い結合親和性を有し、治療有効性が改善され、毒性の副作用が低減された治療用分子が必要である。

【課題を解決するための手段】

【0008】

【008】本開示を通じて、冠詞「a」、「an」および「the」は、冠詞の文法上の目的語の1つまたは1つより多く（すなわち、少なくとも1つ）を指して本明細書において使用される。例として「抗体 (an antibody)」は、1つの抗体または1つより多い抗体を意味する。

【0009】

30

【009】一態様では、本開示は、免疫チェックポイント分子に結合する第1の部分、およびインターロイキン-1 (IL-1) の活性を遮断する第2の部分を含む、二機能性分子を提供する。

【0010】

【0010】ある特定の実施形態では、第1の部分は、CD27、CD70、CD28、CD80 (B7-1)、CD86 (B7-2)、CD40、CD40L (CD154)、CD122、CD137、CD137L、OX40 (CD134)、OX40L (CD252)、GITR、ICOS (CD278)、およびICOSLG (CD275)、CD2、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、CD30、BAFFR、HVE M、CD7、LIGHT、NKG2C、SLAMF7、NKP80、CD160およびCD83からなる群から任意選択で選択される、免疫賦活性チェックポイント分子のアゴニストを含む。

40

【0011】

【0011】ある特定の実施形態では、第1の部分は、A2AR、B7-H3 (CD276)、B7-H4 (VTCN1)、BTLA (CD272)、CTLA-4 (CD152)、IDO1、IDO2、TDO、KIR、LAG3、NOX2、PD-1、PD-L1、PD-L2、TIM-3、VISTA、SIGLEC7 (CD328)、TIGIT、PVR (CD155)、SIGLEC9 (CD329)、CD160、LAIR1、2B4 (CD244)、CD47およびB7-H5からなる群から任意選択で選択される、免疫阻害性チェックポイント分子のアンタゴニストを含む。

50

【0012】

【0012】ある特定の実施形態では、免疫チェックポイント分子はPD-L1である。

【0013】

【0013】ある特定の実施形態では、第1の部分はPD-L1に対する抗体またはその抗原結合性断片を含み、第2の部分はIL-1結合性部分またはIL-1受容体(IL-1R)結合性部分を含む。

【0014】

【0014】ある特定の実施形態では、IL-1結合性部分は、IL-1RまたはそのIL-1結合性断片もしくはバリエーション、あるいはIL-1に対する抗体またはその抗原結合性断片を含む。

【0015】

【0015】ある特定の実施形態では、IL-1に対する抗体またはその抗原結合性断片は、XB2001、ルチキズマブ、LY2189102およびベルメキマブからなる群から選択される抗IL-1 α 抗体由来、またはSSGJ-613、CDP484、カナキヌマブおよびゲボキズマブからなる群から選択される抗IL-1 β 抗体由来の重鎖可変領域および／または軽鎖可変領域を含む。

【0016】

【0016】ある特定の実施形態では、IL-1に対する抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号104もしくは配列番号112の配列を含むHCDR1、配列番号105もしくは配列番号113の配列を含むHCDR2、および配列番号106もしくは配列番号114の配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域、ならびに／または配列番号107もしくは配列番号115の配列を含むLCDR1、配列番号108もしくは配列番号116の配列を含むLCDR2、および配列番号109もしくは配列番号117の配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域を含む。

【0017】

【0017】ある特定の実施形態では、IL-1に対する抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号104の配列を含むHCDR1、配列番号105の配列を含むHCDR2、および配列番号106の配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域、ならびに／または配列番号107の配列を含むLCDR1、配列番号108の配列を含むLCDR2、および配列番号109の配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域を含む。

【0018】

【0018】ある特定の実施形態では、IL-1に対する抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号112の配列を含むHCDR1、配列番号113の配列を含むHCDR2、および配列番号114の配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域、ならびに／または配列番号115の配列を含むLCDR1、配列番号116の配列を含むLCDR2、および配列番号117の配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域を含む。

【0019】

【0019】ある特定の実施形態では、IL-1に対する抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号102、配列番号110、およびこれらに少なくとも80%の配列同一性を有するその相同性配列からなる群から選択される配列を含む重鎖可変領域、ならびに／または配列番号103、配列番号111、およびこれらに少なくとも80%の配列同一性を有するその相同性配列からなる群から選択される配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0020】

【0020】ある特定の実施形態では、IL-1に対する抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号102、およびこれに少なくとも80%の配列同一性を有するその相同性配列からなる群から選択される配列を含む重鎖可変領域、ならびに／または配列番号103、およびこれに少なくとも80%の配列同一性を有するその相同性配列からなる群から選択される配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0021】

【0021】ある特定の実施形態では、IL-1に対する抗体またはその抗原結合性断片は

、配列番号 110、およびこれに少なくとも 80% の配列同一性を有するその相同性配列からなる群から選択される配列を含む重鎖可変領域、ならびに／または配列番号 111、およびこれに少なくとも 80% の配列同一性を有するその相同性配列からなる群から選択される配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0022】

【0022】ある特定の実施形態では、IL-1R 結合性部分は、インターロイキン-1 受容体アンタゴニストまたはその断片もしくはバリエント、あるいは IL-1R に対する抗体またはその抗原結合性断片を含む。

【0023】

【0023】ある特定の実施形態では、IL-1R に対する抗体またはその抗原結合性断片は、スペソリマブ、アステゴリマブ、イムシドリマブ、AMG108、メルリリマブ (melrilimab)、ニダニリマブ (nidanilimab)、MED18968、REGN6490、HB0034 および CSC012 からなる群から選択される抗体由来の重鎖可変領域および／または軽鎖可変領域を含む。

【0024】

【0024】別の態様では、二機能性分子は、PD-L1 に結合する第 1 の部分、および a) 免疫抑制性サイトカインの活性を遮断する、または b) 免疫を刺激する第 2 の部分を含み、第 1 の部分は、重鎖可変 (VH) 領域および／または軽鎖可変 (VL) 領域を含む、PD-L1 に対する抗体またはその抗原結合性断片を含み、重鎖可変領域は、

a) DYYMN (配列番号 1) もしくはこれに少なくとも 80% の配列同一性のある相同性配列を含む HCDR1、

b) DINPNX₁X₂TX₃YNHKFKG (配列番号 19) もしくはこれに少なくとも 80% の配列同一性のある相同性配列を含む HCDR2、および

c) WGDGPFA Y (配列番号 3) もしくはこれに少なくとも 80% の配列同一性のある相同性配列を含む HCDR3

を含み、かつ／または

軽鎖可変領域は、

d) KASQNVX₄X₅X₆VA (配列番号 20) もしくはこれに少なくとも 80% の配列同一性のある相同性配列からなる群から選択される配列を含む LCDR1、

e) SX₇SX₈RYT (配列番号 21) もしくはこれに少なくとも 80% の配列同一性のある相同性配列からなる群から選択される配列を含む LCDR2、および

f) QQYSNYPT (配列番号 6) もしくはこれに少なくとも 80% の配列同一性のある相同性配列からなる群から選択される配列を含む LCDR3

を含み、

式中、X₁ は G または A であり、X₂ は G または D または Q または E または L であり、X₃ は S または M または Q または L または V であり、X₄ は G または P または K であり、X₅ は A または G であり、X₆ は A または I であり、X₇ は A または N または R または V であり、かつ X₈ は N または H または V または D である。

【0025】

【0025】ある特定の実施形態では、重鎖可変領域は、

a) 配列番号 1 の配列を含む HCDR1、

b) 配列番号 2、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 17 および配列番号 18 からなる群から選択される配列を含む HCDR2、ならびに

c) 配列番号 3 の配列を含む HCDR3、

を含み、かつ／または

軽鎖可変領域は、

d) 配列番号 4、配列番号 7、配列番号 8 および配列番号 9 からなる群から選択される配列を含む LCDR1、

e) 配列番号 5、配列番号 10、配列番号 11 および配列番号 12 からなる群から選択される配列を含む LCDR2、ならびに

10

20

30

40

50

f) 配列番号 6 の配列を含む L C D R 3
を含む。

【0026】

【0026】ある特定の実施形態では、重鎖可変領域は、

- a) 配列番号 1 の配列を含む H C D R 1、配列番号 2 の配列を含む H C D R 2、および配列番号 3 の配列を含む H C D R 3 を含む重鎖可変領域；
 - b) 配列番号 1 の配列を含む H C D R 1、配列番号 13 の配列を含む H C D R 2、および配列番号 3 の配列を含む H C D R 3 を含む重鎖可変領域；
 - c) 配列番号 1 の配列を含む H C D R 1、配列番号 14 の配列を含む H C D R 2、および配列番号 3 の配列を含む H C D R 3 を含む重鎖可変領域；
 - d) 配列番号 1 の配列を含む H C D R 1、配列番号 15 の配列を含む H C D R 2、および配列番号 3 の配列を含む H C D R 3 を含む重鎖可変領域；
 - e) 配列番号 1 の配列を含む H C D R 1、配列番号 17 の配列を含む H C D R 2、および配列番号 3 の配列を含む H C D R 3 を含む重鎖可変領域；ならびに
 - f) 配列番号 1 の配列を含む H C D R 1、配列番号 18 の配列を含む H C D R 2、および配列番号 3 の配列を含む H C D R 3 を含む重鎖可変領域
- からなる群から選択される。

10

【0027】

【0027】ある特定の実施形態では、軽鎖可変領域は、

- a) 配列番号 4 の配列を含む L C D R 1、配列番号 5 の配列を含む L C D R 2、および配列番号 6 の配列を含む L C D R 3 を含む軽鎖可変領域；
 - b) 配列番号 9 の配列を含む L C D R 1、配列番号 5 の配列を含む L C D R 2、および配列番号 6 の配列を含む L C D R 3 を含む軽鎖可変領域；
 - c) 配列番号 8 の配列を含む L C D R 1、配列番号 5 の配列を含む L C D R 2、および配列番号 6 の配列を含む L C D R 3 を含む軽鎖可変領域；
 - d) 配列番号 4 の配列を含む L C D R 1、配列番号 12 の配列を含む L C D R 2、および配列番号 6 の配列を含む L C D R 3 を含む軽鎖可変領域；ならびに
 - e) 配列番号 4 の配列を含む L C D R 1、配列番号 11 の配列を含む L C D R 2、および配列番号 6 の配列を含む L C D R 3 を含む軽鎖可変領域
- からなる群から選択される。

20

30

【0028】

【0028】ある特定の実施形態では、P D - L 1 に対する抗体もしくはその抗原結合性断片は、重鎖 H F R 1、H F R 2、H F R 3 および H F R 4 の 1 つもしくは複数、ならびに／または軽鎖 L F R 1、L F R 2、L F R 3 および L F R 4 の 1 つもしくは複数を含み、

- a) H F R 1 は、Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y X₉ F T (配列番号 40) のアミノ酸配列またはこれに少なくとも 80% の配列同一性のある相同性配列を含み、
- b) H F R 2 は、W V R Q A P G Q X₁₀ L E W M G (配列番号 41) のアミノ酸配列またはこれに少なくとも 80% の配列同一性のある相同性配列を含み、
- c) H F R 3 配列は、R V T X₁₆ T V D X₁₁ S I S T A Y M E L S R L R S D D T A V Y Y C X₁₂ X₁₃ (配列番号 42) のアミノ酸配列またはこれに少なくとも 80% の配列同一性のある相同性配列を含み、
- d) H F R 4 は、W G Q G T L V T V S S (配列番号 25) のアミノ酸配列またはこれに少なくとも 80% の配列同一性のある相同性配列を含み、
- e) L F R 1 は、D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C (配列番号 26) のアミノ酸配列またはこれに少なくとも 80% の配列同一性のある相同性配列を含み、
- f) L F R 2 は、W Y Q Q K P G K X₁₄ P K L L I Y (配列番号 43) のアミノ酸配列またはこれに少なくとも 80% の配列同一性のある相同性配列を含み、
- g) L F R 3 は、G V P X₁₅ R F S G S G S G T D F T X₁₇ T I S S L Q P E D I A

40

50

TTYC（配列番号44）のアミノ酸配列またはこれに少なくとも80%の配列同一性のある相同性配列を含み、

h) LFR4は、FGQGTKLEIK（配列番号29）のアミノ酸配列またはこれに少なくとも80%の配列同一性のある相同性配列を含み、

式中、X₉はTまたはVであり、X₁₀はGまたはSであり、X₁₁はTまたはKであり、X₁₂はAまたはVであり、X₁₃はRまたはKであり、X₁₄はAまたはSであり、X₁₅はSまたはDであり、X₁₆はMまたはVであり、X₁₇はFまたはLである。

【0029】

【0029】ある特定の実施形態では、

HFR1は、配列番号22および30からなる群から選択される配列を含み、

10

HFR2は、配列番号23および31からなる群から選択される配列を含み、

HFR3は、配列番号24および32～35からなる群から選択される配列を含み、

HFR4は、配列番号25の配列を含み、

LFR1は、配列番号26からなる群からの配列を含み、

LFR2は、配列番号27および36からなる群から選択される配列を含み、

LFR3は、配列番号28、および37～38、39、45からなる群から選択される配列を含み、

LFR4は、配列番号29の配列を含む。

【0030】

【0030】ある特定の実施形態では、重鎖可変領域は、配列番号46、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52、配列番号56、配列番号57、配列番号58、配列番号59、配列番号60、およびこれらに少なくとも80%の配列同一性を有するその相同性配列からなる群から選択される配列を含む。

20

【0031】

【0031】ある特定の実施形態では、軽鎖可変領域は、配列番号47、配列番号54、配列番号55、配列番号61、配列番号62、配列番号63、配列番号64、配列番号65、およびこれらに少なくとも80%の配列同一性を有するその相同性配列からなる群から選択される配列を含む。

【0032】

【0032】ある特定の実施形態では、PD-L1に対する抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号49/54、50/54、51/54、52/54、49/55、50/55、51/55、52/55、58/62、58/63、58/64、58/65、59/62、59/63、59/64、59/65、60/62、60/63、60/64および60/65からなる群から選択される重鎖可変領域配列と軽鎖可変領域配列との対を含む。

30

【0033】

【0033】ある特定の実施形態では、PD-L1に対する抗体またはその抗原結合性断片は、PD-L1への特異的結合特異性および／または親和性を依然として保持する、1つまたは複数のアミノ酸残基置換または改変をさらに含む。

【0034】

【0034】ある特定の実施形態では、置換または改変の少なくとも1つは、VHまたはVL配列のCDR配列の1つもしくは複数、および／または非CDR領域の1つもしくは複数にある。

40

【0035】

【0035】ある特定の実施形態では、PD-L1に対する抗体またはその抗原結合性断片は、免疫グロブリン定常領域、任意選択でヒトIgの定常領域、または任意選択でヒトIgGの定常領域をさらに含む。

【0036】

【0036】ある特定の実施形態では、定常領域は、ヒトIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4のFc領域を含む。

50

【0037】

【0037】ある特定の実施形態では、ヒトIgG1のFc領域は、配列番号80、またはこれに少なくとも80%（例えば、少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%）の配列同一性を有するそのバリエーションを含む。

【0038】

【0038】ある特定の実施形態では、定常領域は、対応する野生型Fc領域と比べて低下したエフェクター機能を有するFcバリエーションを含む。ある特定の実施形態では、Fc領域は、配列番号80と比べて低下したエフェクター機能を生じる1つまたは複数のアミノ酸残基改変または置換を含む。

【0039】

【0039】ある特定の実施形態では、Fc領域は、220S、226S、228P、229S、233P、234V、234G、234A、234F、234A、235A、235G、235E、236E、236R、237A、237K、238S、267R、268A、268Q、269R、297A、297Q、297G、309L、318A、322A、325L、328R、330S、331Sおよびこれらの任意の組合せからなる群から選択される1つまたは複数のアミノ酸残基置換を含み、Fc領域中の残基の番号付けはKababtにあるとおりのEUインデックスのものである。

【0040】

【0040】ある特定の実施形態では、Fc領域は、a) K322A、L234AおよびL235A；b) P331S、L234FおよびL235E；c) L234AおよびL235A；c) N297A；d) N297Q；e) N297G；f) L235E；g) L234AおよびL235A（IgG1）；h) F234AおよびL235A（IgG4）；i) H268Q、V309L、A330SおよびP331S（IgG2）；j) V234A、G237A、P238S、H268A、V309L、A330SおよびP331S（IgG2）からなる群から選択される変異の組合せを含み、Fc領域中の残基の番号付けはKababtにあるとおりのEUインデックスのものである。

【0041】

【0041】ある特定の実施形態では、Fcバリエーションは、配列番号81のアミノ酸配列を含む。

【0042】

【0042】ある特定の実施形態では、PD-L1に対する抗体またはその抗原結合性断片はヒト化されている。

【0043】

【0043】ある特定の実施形態では、抗原結合性断片は、ダイアボディ、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv断片、ジスルフィド安定化Fv断片(dsFv)、(dsFv)₂、二特異性dsFv(dsFv-dsFv')、ジスルフィド安定化ダイアボディ(dsダイアボディ)、1本鎖抗体分子(scFv)、scFv二量体(二価ダイアボディ)、多特異性抗体、ラクダ化単ドメイン抗体、ナノボディ、ドメイン抗体および二価ドメイン抗体である。

【0044】

【0044】ある特定の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、ヒトPD-L1およびカニクイザルPD-L1の両方に結合することが可能である。

【0045】

【0045】ある特定の実施形態では、第1の部分は、PD-L1への結合について、本明細書において提供される抗体またはその抗原結合性断片と競合する抗体またはその抗原結合性断片を含む。

【0046】

【0046】ある特定の実施形態では、免疫抑制性サイトカインは、トランスフォーミング増殖因子ベータ(TGF-β)スーパーファミリー中のサイトカイン、IL-1、または血管内皮増殖因子(VEGF)を含む。

10

20

30

40

50

【0047】

【0047】ある特定の実施形態では、 $TGF-\beta$ スーパーファミリー中の免疫抑制性サイトカインは、 $TGF-\beta$ 、骨形成タンパク質（BMP）、アクチビン、NODAL、および増殖分化因子（growth and differentiation factor）（GDF）を含む。

【0048】

【0048】ある特定の実施形態では、免疫抑制性サイトカインは $TGF-\beta$ である。

【0049】

【0049】ある特定の実施形態では、第2の部分は $TGF-\beta$ 結合性部分を含む。

【0050】

【0050】ある特定の実施形態では、 $TGF-\beta$ 結合性部分は、可溶性 $TGF\beta$ 受容体（ $TGF\beta R$ ）またはその $TGF-\beta$ 結合性断片もしくはバリエント、あるいは $TGF\beta$ に対する抗体およびその抗原結合性断片を含む。

【0051】

【0051】ある特定の実施形態では、可溶性 $TGF\beta R$ は、 $TGF\beta R$ の細胞外ドメイン（ECD）またはその $TGF-\beta$ 結合性断片もしくはバリエントを含む。

【0052】

【0052】ある特定の実施形態では、 $TGF\beta R$ は、 $TGF\beta$ 受容体I（ $TGF\beta RI$ ）、 $TGF\beta$ 受容体II（ $TGF\beta RII$ ）、 $TGF\beta$ 受容体III（ $TGF\beta RIII$ ）、およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される。

【0053】

【0053】ある特定の実施形態では、 $TGF\beta R$ は $TGF\beta RII$ である。

【0054】

【0054】ある特定の実施形態では、 $TGF\beta RII$ は、 $TGF\beta 2$ および $TGF\beta 3$ よりも $TGF\beta 1$ に選択的に結合する。

【0055】

【0055】ある特定の実施形態では、 $TGF\beta 1$ は、ヒト $TGF\beta 1$ またはマウス $TGF\beta 1$ である。

【0056】

【0056】ある特定の実施形態では、 $TGF\beta R$ のECDは、配列番号66、79、78、77のアミノ酸配列、または $TGF-\beta$ への特異的結合特異性および／または親和性を依然として保持する、これらに少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む。

【0057】

【0057】ある特定の実施形態では、第2の部分は、IL-1結合性部分またはIL-1受容体（IL-1R）結合性部分を含む。

【0058】

【0058】ある特定の実施形態では、IL-1結合性部分は、可溶性IL-1R、IL-1RのIL-1結合性断片もしくはバリエント、またはIL-1に対する抗体もしくはその抗原結合性断片を含む。

【0059】

【0059】ある特定の実施形態では、IL-1結合性部分は、IL-1RIの細胞外ドメイン（ECD）、IL-1RI、IL-1RIのECD、IL-1RII、またはIL-1RIIのECD、またはIL-1RAP、またはIL-1RAPのECD、IL-1sRIまたはIL-1sRIIのいずれかのIL-1結合性断片またはバリエントを含む。

【0060】

【0060】ある特定の実施形態では、IL-1R結合性部分が、IL-1RaまたはそのIL-1結合性断片もしくはバリエント、あるいはIL-1Rに対する抗体またはその抗原結合性断片を含む。

【0061】

【0061】ある特定の実施形態では、IL-1Rに対する抗体またはその抗原結合性断片

10

20

30

40

50

は、スペソリマブ、アステゴリマブ、イムシドリマブ、AMG108、メルリリマブ、ニダニリマブ、MEDI8968、REGN6490、HB0034およびCSC012からなる群から選択される抗体由来の重鎖可変領域および／または軽鎖可変領域を含む。

【0062】

【0062】ある特定の実施形態では、IL-1R結合性部分は、配列番号67もしくは76のアミノ酸配列、または配列番号67もしくは76に少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列、またはそのIL-1結合性断片もしくはバリエーションを含む。

【0063】

【0063】ある特定の実施形態では、IL-1は、IL-1 α またはIL-1 β である。

【0064】

【0064】ある特定の実施形態では、IL-1 β はヒトIL-1 β である。

【0065】

【0065】ある特定の実施形態では、IL-1に対する抗体またはその抗原結合性断片は、XB2001、ルチキズマブ、LY2189102およびベルメキマブからなる群から選択される抗IL-1 α 抗体由来、またはSSGJ-613、CDP484、カナキヌマブおよびゲボキズマブからなる群から選択される抗IL-1 β 抗体由来の重鎖可変領域および／または軽鎖可変領域を含む。

【0066】

【0066】ある特定の実施形態では、IL-1に対する抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号104もしくは配列番号112の配列を含むHCDR1、配列番号105もしくは配列番号113の配列を含むHCDR2、および配列番号106もしくは配列番号114の配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域、ならびに／または配列番号107もしくは配列番号115の配列を含むLCDR1、配列番号108もしくは配列番号116の配列を含むLCDR2、および配列番号109もしくは配列番号117の配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域を含む。

【0067】

【0067】ある特定の実施形態では、IL-1に対する抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号104の配列を含むHCDR1、配列番号105の配列を含むHCDR2、および配列番号106の配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域、ならびに／または配列番号107の配列を含むLCDR1、配列番号108の配列を含むLCDR2、および配列番号109の配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域を含む。

【0068】

【0068】ある特定の実施形態では、IL-1に対する抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号112の配列を含むHCDR1、配列番号113の配列を含むHCDR2、および配列番号114の配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域、ならびに／または配列番号115の配列を含むLCDR1、配列番号116の配列を含むLCDR2、および配列番号117の配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域を含む。

【0069】

【0069】ある特定の実施形態では、IL-1に対する抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号102、配列番号110、およびこれらに少なくとも80%の配列同一性を有するその相同性配列からなる群から選択される配列を含む重鎖可変領域、ならびに／または配列番号103、配列番号111、およびこれらに少なくとも80%の配列同一性を有するその相同性配列からなる群から選択される配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0070】

【0070】ある特定の実施形態では、IL-1に対する抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号102、およびこれに少なくとも80%の配列同一性を有するその相同性配列からなる群から選択される配列を含む重鎖可変領域、ならびに／または配列番号103、およびこれに少なくとも80%の配列同一性を有するその相同性配列からなる群から選択される配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0071】

10

20

30

40

50

【0071】ある特定の実施形態では、IL-1に対する抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号110、およびこれに少なくとも80%の配列同一性を有するその相同性配列からなる群から選択される配列を含む重鎖可変領域、ならびに／または配列番号111、およびこれに少なくとも80%の配列同一性を有するその相同性配列からなる群から選択される配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0072】

【0072】ある特定の実施形態では、二機能性分子は、配列番号118もしくは配列番号120のアミノ酸配列を含む重鎖、および／または配列番号119もしくは配列番号121のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【0073】

【0073】ある特定の実施形態では、第2の部分は、抗腫瘍免疫を刺激し、かつ免疫賦活性ポリペプチドを含む。

【0074】

【0074】ある特定の実施形態では、免疫賦活性ポリペプチドは、インターロイキン（IL）-2（IL-2）、IL-15、IL-21、IL-10、IL-12、IL-23、IL-27、IL-35、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、可溶性CD4、可溶性LAG-3、もしくはIFN- α 、またはこれらの機能性等価物を含む。

【0075】

【0075】ある特定の実施形態では、可溶性LAG-3は、LAG-3の細胞外ドメイン（ECD）またはそのMHCII結合性断片もしくはバリエントを含む。

【0076】

【0076】ある特定の実施形態では、第2の部分は、抗腫瘍免疫を刺激し、かつ免疫阻害性受容体シグナル伝達のアンタゴニストを含む。

【0077】

【0077】ある特定の実施形態では、免疫阻害性受容体は、シグナル制御タンパク質アルファ（SIRP α ）である。

【0078】

【0078】ある特定の実施形態では、第2の部分は、CD47とSIRP α との間の相互作用を遮断する。

【0079】

【0079】ある特定の実施形態では、第2の部分は、CD47結合性ドメインまたはSIRP α 結合性ドメインを含む。

【0080】

【0080】ある特定の実施形態では、CD47結合性ドメインは、可溶性SIRP α またはそのCD47結合性断片もしくはバリエント、あるいは抗CD47抗体またはその抗原結合性断片を含む。

【0081】

【0081】ある特定の実施形態では、可溶性SIRP α は、SIRP α の細胞外ドメイン（ECD）またはそのCD47結合性断片もしくはバリエントを含む。

【0082】

【0082】ある特定の実施形態では、可溶性SIRP α は、配列番号84のアミノ酸配列、またはCD47に対する結合特異性を依然として保持する、これに少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0083】

【0083】ある特定の実施形態では、SIRP α 結合性ドメインは、可溶性CD47またはそのSIRP α 結合性断片もしくはバリエント、あるいは抗SIRP α 抗体またはその抗原結合性断片を含む。

【0084】

【0084】ある特定の実施形態では、可溶性CD47は、CD47の細胞外ドメイン（E

10

20

30

40

50

C D) またはその S I R P α 結合性断片もしくはバリエント、抗 S I R P α 抗体またはその抗原結合性断片を含む。

【0085】

【0085】ある特定の実施形態では、二機能性分子は、第1の部分と第2の部分とを繋ぐリンカーをさらに含む。

【0086】

【0086】ある特定の実施形態では、リンカーは、切断性リンカー、非切断性リンカー、ペプチドリinker、可動性リンカー、剛性リンカー、ヘリックスリンカー、および非ヘリックスリンカーからなる群から選択される。

【0087】

【0087】ある特定の実施形態では、リンカーは、 $((G)_n S)_m$ のアミノ酸配列を含み、式中、 m および n は、独立的に 0 から 30 から選択される整数（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10）である。ある特定の実施形態では、 n は、2、3、4 または 5 であり、 m は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 である。ある特定の実施形態では、リンカーは、配列番号 68 のアミノ酸配列を含む。

【0088】

【0088】ある特定の実施形態では、二機能性分子は、1 つまたは複数の第2の部分を含む。

【0089】

【0089】ある特定の実施形態では、第2の部分の少なくとも1つは、第1の部分のポリペプチド鎖の N 末端または C 末端に連結されている。

【0090】

【0090】ある特定の実施形態では、第2の部分の少なくとも1つは、a) 第1の部分の重鎖の N 末端もしくは C 末端、または b) 第1の部分の軽鎖の N 末端もしくは C 末端に連結されている。

【0091】

【0091】ある特定の実施形態では、第2の部分の少なくとも1つは、第1の部分の重鎖定常領域の C 末端に連結されている。

【0092】

【0092】ある特定の実施形態では、第2の部分のそれぞれは、第1の部分の各重鎖定常領域の C 末端にそれぞれ連結されている。

【0093】

【0093】ある特定の実施形態では、二機能性分子は、第1の部分の重鎖の N 末端、第1の部分の重鎖の C 末端、第1の部分の軽鎖の N 末端、第1の部分の軽鎖の C 末端、またはこれらの任意の組合せにそれぞれ連結された1つより多い第2の部分を含む。

【0094】

【0094】ある特定の実施形態では、二機能性分子は、ホモ二量体重鎖またはヘテロ二量体重鎖を含む。

【0095】

【0095】ある特定の実施形態では、重鎖は、第2の部分の存在または位置に関してヘテロ二量体性である。

【0096】

【0096】ある特定の実施形態では、ヘテロ二量体重鎖は、第2部分を有する一方の重鎖およびそれを有さない他方の重鎖を含む。

【0097】

【0097】ある特定の実施形態では、ヘテロ二量体重鎖は、ホモ二量体化を防止する、および／またはヘテロ二量体化を支持するように関連するヘテロ二量体 F c 領域をさらに含む。

【0098】

【0098】ある特定の実施形態では、第1のおよびヘテロ二量体 F c 領域は、ノブイント

10

20

30

40

50

ウーホール、疎水性相互作用、静電相互作用、親水性相互作用、または可動性の増加を介してヘテロ二量体に会合することが可能である。

【0099】

【0099】ある特定の実施形態では、ヘテロ二量体Fc領域は、1つのFc領域中にY349C、T366S、L368AもしくはY407Vまたはこれらの任意の組合せ、および別のFc領域中にS354CもしくはT366Wまたはこれらの組合せを含み、Fc領域中の残基の番号付けはKabataにあるとおりのEUIンデックスのものである。

【0100】

【0100】ある特定の実施形態では、二機能性分子は、1つまたは複数のコンジュゲート部分にさらに連結されている。

【0101】

【0101】ある特定の実施形態では、コンジュゲート部分は、クリアランス改変剤(clearance-modifying agent)、化学療法剤、毒素、放射性同位元素、ランタニド、発光標識、蛍光標識、酵素基質標識、DNAアルキル化剤、トポイソメラーゼ阻害剤、チューブリン結合剤、またはアンドロゲン受容体阻害剤などの他の抗がん薬物を含む。

【0102】

【0102】別の態様では、本開示は、本明細書において提供される二機能性分子および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物またはキットをさらに提供する。

【0103】

【0103】別の態様では、本開示は、本明細書において提供される二機能性分子をコードする単離されたポリヌクレオチドをさらに提供する。

【0104】

【0104】別の態様では、本開示は、本明細書において提供される単離されたポリヌクレオチドを含むベクターをさらに提供する。

【0105】

【0105】別の態様では、本開示は、本明細書において提供されるベクターを含む宿主細胞をさらに提供する。

【0106】

【0106】別の態様では、本開示は、ベクターが発現される条件下で本明細書において提供される宿主細胞を培養するステップを含む、本明細書において提供される二機能性分子を発現させる方法をさらに提供する。

【0107】

【0107】別の態様では、本開示は、本明細書において提供される二機能性分子、および／または本明細書において提供される医薬組成物もしくはキットの治療有効量を対象に投与するステップを含む、対象においてPD-L1関連疾患を処置する、予防するまたは軽減する方法をさらに提供する。

【0108】

【0108】ある特定の実施形態では、疾患は、免疫関連疾患もしくは障害、がん、自己免疫疾患、または感染性疾患である。

【0109】

【0109】ある特定の実施形態では、がんは、肺がん（例えば、非小細胞肺がん）、肝臓がん、膵臓がん、乳がん、気管支がん、骨がん、肝臓および胆管がん、卵巣がん、精巣がん、腎臓がん、膀胱がん、頭頸部がん、脊椎がん、脳がん、子宮頸がん、子宮がん、子宮内膜がん、結腸がん、結腸直腸がん、前立腺がん、胃-食道がん、直腸がん、肛門がん、胃腸がん、皮膚がん、下垂体がん、胃がん、膣がん、甲状腺がん、神経膠芽腫、星状細胞腫、黒色腫、骨髄異形成症候群、肉腫、奇形腫、神経膠腫ならびに腺癌からなる群から選択される。

【0110】

【0110】ある特定の実施形態では、対象は、PD-L1発現がん細胞を有すると同定

10

20

30

40

50

されている。

【0111】

[00111]ある特定の実施形態では、対象はヒトである。

【0112】

[00112]ある特定の実施形態では、方法は、第2の治療剤の治療有効量を投与するステップをさらに含む。

【0113】

[00113]ある特定の実施形態では、第2の治療剤は、化学療法剤、抗がん薬物、放射線療法、免疫療法剤、血管新生抑制剤、標的療法剤、細胞療法剤、遺伝子療法剤、ホルモン療法剤、またはサイトカインから選択される。

【0114】

[00114]別の態様では、本開示は、対象におけるPD-L1関連疾患または状態を処置するための医薬の製造における本明細書において提供される二機能性分子の使用を提供する。

【0115】

[00115]別の態様では、本開示は、対象において、免疫抑制性サイトカインの抑制から、持続性免疫応答の誘導から、または抗腫瘍免疫の刺激から利益を受ける疾患または状態を処置する、予防する、または軽減する方法であって、本明細書において提供される二機能性分子の有効量を投与するステップを含む方法を提供する。

【0116】

[00116]ある特定の実施形態では、免疫抑制性サイトカインはTGFβである。

【0117】

[00117]ある特定の実施形態では、疾患または状態は、TGF-β関連疾患または状態である。

【0118】

[00118]ある特定の実施形態では、TGF-β関連疾患は、がん、線維性疾患、または腎疾患である。

【0119】

[00119]ある特定の実施形態では、免疫抑制性サイトカインはIL-1である。

【0120】

[00120]ある特定の実施形態では、疾患または状態は、IL-1関連疾患または状態である。

【0121】

[00121]ある特定の実施形態では、疾患または状態は、免疫阻害性受容体シグナル伝達、例えば、SIRPαシグナル伝達を阻害することによる抗腫瘍免疫の刺激から利益を受ける。

【図面の簡単な説明】

【0122】

【図1】[00122]図1は、ELISAによるヒトPD-L1へのヒト化4B6抗体の結合を示す。

【図2】[00123]図2は、ELISAによるヒトPD-L1へのHu4B6-HgLaの結合を示す。

【図3】[00124]図3A～図3Cは、ELISAによるPD-L1へのAM-4B6-IgG1-TGFβRIIバリエントの結合を示す。

【図4】[00125]図4は、フローサイトメトリーを使用するAM-4B6-IgG1-TGFβIIバリエントの親和性ランキングを示す。

【図5】[00126]図5Aおよび図5Bは、AM-4B6-IgG1-TGFβIIバリエントによるPD-L1/PD-1またはPD-L1/B7-1の遮断を示す。

【図6】[00127]図6は、細胞ベースのアッセイを使用するAM-4B6-IgG1-TGFβIIバリエントによるPD-L1/PD-1の遮断を示す。

10

20

30

40

50

【図 7】[00128]図 7 は、安定な細胞系を用いて発現された AM 4 B 6 _ h I g G 1 _ T B R I I (2 0 - 1 3 6) の S D S - P A G E を示す。

【図 8】[00129]図 8 A および図 8 B は、E L I S A 分析によるヒト P D - L 1 または カニクイザル P D - L 1 への結合を示す。

【図 9 - 1】[00130]図 9 A ~ 図 9 C は、E L I S A 分析によるヒト P D - L 1 および B 7 ファミリーの他のメンバーならびに T G F β スーパーファミリーの他のメンバーへの結合を示す。

【図 9 - 2】[00130]図 9 A ~ 図 9 C は、E L I S A 分析によるヒト P D - L 1 および B 7 ファミリーの他のメンバーならびに T G F β スーパーファミリーの他のメンバーへの結合を示す。

【図 10 - 1】[00131]図 10 A ~ 図 10 F は、F A C S 解析による P D - L 1 発現細胞への結合を示す。

【図 10 - 2】[00131]図 10 A ~ 図 10 F は、F A C S 解析による P D - L 1 発現細胞への結合を示す。

【図 10 - 3】[00131]図 10 A ~ 図 10 F は、F A C S 解析による P D - L 1 発現細胞への結合を示す。

【図 11】[00132]図 11 は、F A C S 解析による活性化ヒト T 細胞上のヒト P D - L 1 への結合を示す。

【図 12】[00133]図 12 A ~ 図 12 B は、E L I S A 分析によるヒト P D - 1 へのヒト P D - L 1 の結合またはカニクイザル P D - 1 へのカニクイザル P D - L 1 の結合の遮断を示す。

【図 13】[00134]図 13 は、E L I S A 分析による h P D - L 1 および T G F β 1 への同時的結合を示す。

【図 14】[00135]図 14 は、レポーターアッセイを使用する h P D - L 1 / h P D - 1 の遮断を示す。

【図 15】[00136]図 15 は、T G F - β レポーター H E K - 2 9 3 細胞系を使用する T G F β 1 シグナル伝達の遮断を示す。

【図 16】[00137]図 16 は、ツベルクリン (T B) により刺激された P B M C の I F N γ 放出に対する AM 4 B 6 - h I g G 1 - T G F β R I I ' の効果を示す。

【図 17】[00138]図 17 A ~ 図 17 B は、M C 3 8 - h P D - L 1 腫瘍モデルにおける抗腫瘍活性を示す。

【図 18】[00139]図 18 A ~ 図 18 B は、H 4 6 0 腫瘍モデルにおける抗腫瘍活性を示す。

【図 19】[00140]図 19 A ~ 図 19 B は、E M T 6 - h P D - L 1 腫瘍モデルにおける抗腫瘍活性を示す。

【図 20】[00141]図 20 A ~ 図 20 C は、i n v i v o での AM 4 B 6 - h I g G 1 - T G F β I I の薬物動態および薬力学試験を示す。

【図 21】[00142]図 21 は、E L I S A によるヒト P D - L 1 に対する AM 4 B 6 - h I g G 1 - I L - 1 R A の結合活性を示す。

【図 22】[00143]図 22 は、F A C S 解析によるヒト P D - L 1 に対する AM 4 B 6 - h I g G 1 - I L - 1 R A の結合活性を示す。

【図 23】[00144]図 23 は、細胞ベースのアッセイを使用する AM 4 B 6 - h I g G 1 - I L - 1 R A による P D - L 1 / P D - 1 の遮断を示す。

【図 24】[00145]図 24 は、E L I S A によるヒト I L - 1 β に対する AM 4 B 6 - I g G 1 - I L - 1 R A の遮断活性を示す。

【図 25】[00146]図 25 は、レポーター細胞上でのヒト I L - 1 β に対する AM 4 B 6 - h I g G 1 - I L - 1 R A の遮断活性を示す。

【図 26】[00147]図 26 は、非対称性二機能性抗体の S E C - H P L C 純度を示す。

【図 27】[00148]図 27 は、E L I S A によって測定されたヒト P D - L 1 への二機能性分子の結合を示す。

10

20

30

40

50

【図28】[00149]図28は、ELISAによって測定されたヒトCD47への二機能性分子の結合を示す。

【図29】[00150]図29は、hIL-1 β タンパク質へのIgG-scFv-ACZ885-AM4B6およびIgG-scFv-XOMA052-AM4B6 bsAbのELISAでの結合活性を示す。

【図30】[00151]図30は、hPD-L1タンパク質へのIgG-scFv-ACZ885-AM4B6およびIgG-scFv-XOMA052-AM4B6 bsAbのELISAでの結合活性を示す。

【図31】[00152]図31は、FACS法による、PD-L1を発現する293T細胞へのIgG-scFv-ACZ885-AM4B6およびIgG-scFv-XOMA052-AM4B6の結合を示す。 10

【図32】[00153]図32は、IgG-scFv-ACZ885-AM4B6およびIgG-scFv-XOMA052-AM4B6の細胞ベースのPD1/PD-L1遮断活性を示す。

【図33】[00154]図33は、HDF細胞上でのヒトIL-1 β に対するIgG-scFv-XOMA052-AM4B6の遮断活性を示す。

【図34】[00155]図34は、レポーター細胞上でのhIL-1 β に対するIgG-scFv-ACZ885-AM4B6の遮断活性を示す。

【発明を実施するための形態】

【0123】 20

【00156】本開示の以下の記載は、本開示の種々の実施形態を例示することを単に目的とする。このように、考察される具体的な改変は、本開示の範囲の限定として解釈されない。種々の等価物、変更および改変が、本開示の範囲から逸脱することなく行われ得ることは当業者に明らかであり、そのような等価の実施形態が本明細書に含まれることは理解される。刊行物、特許および特許出願を含む、本明細書に引用されるすべての参考文献は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0124】

定義

【00157】本明細書で使用される場合、用語「抗体」は、特定の抗原に結合する任意の免疫グロブリン、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多価抗体、二価抗体、一価抗体、多特異性抗体または二特異性抗体を含む。天然の無傷抗体は、2つの重(H)鎖および2つの軽(L)鎖を含む。哺乳動物の重鎖は、アルファ、デルタ、イプシロン、ガンマおよびミューとして分類され、各重鎖は、可変領域(VH)ならびに第1の、第2の、第3のおよび任意選択で第4の定常領域(それぞれCH1、CH2、CH3、CH4)からなり；哺乳動物の軽鎖は、各軽鎖が、可変領域(VL)および定常領域からなり、 λ または κ として分類される。抗体は、ジスルフィド結合を介して共に結合された2本の重鎖の第2のおよび第3の定常領域からなるYのステムを含んで「Y」形を有する。Yの各アームは、単一の軽鎖の可変および定常領域に結合した単一の重鎖の可変領域および第1の定常領域を含む。軽鎖および重鎖の可変領域は、抗原結合に関与する。両方の鎖の可変領域は、相補性決定領域(CDR)と呼ばれる3つの高度に可変性のループを一般に含有する(軽鎖CDRはLCDR1、LCDR2およびLCDR3を含み、重鎖CDRはHCDR1、HCDR2、HCDR3を含む)。本明細書において開示される抗体および抗原結合性断片についてのCDR境界は、Kabata、IMGT、Chothia、またはAl-Lazikaniの慣例によって定義されるか、または同定され得る(Al-Lazikani, B., Chothia, C., Lesk, A. M., J. Mol. Biol., 273(4), 927(1997); Chothia, C.ら, J. Mol. Biol., Dec 5; 186(3): 651~63(1985); Chothia, C. および Lesk, A. M., J. Mol. Biol., 196, 901(1987); Chothia, C.ら, Nature, Dec 21~28; 342(6252): 877~83(1989); Kabata E. A.ら, Sequences of Protein 30 40 50

s of immunological Interest、第5版、Public Health Service、National Institutes of Health、Bethesda、Md. (1991) ; Marie-Paule Lefrancら、Developmental and Comparative Immunology、27:55~77 (2003) ; Marie-Paule Lefrancら、Immunome Research、1 (3)、(2005) ; Marie-Paule Lefranc、Molecular Biology of B cells (第2版)、chapter 26、481~514、(2015))。3つのCDRは、CDRよりも高く保存され、高度に可変性のループを支えるスキャホールドを形成するフレームワーク領域 (FR) (LFR1、LFR2、LFR3およびLFR4を含む軽鎖FR、HFR1、HFR2、HFR3およびHFR4を含む重鎖FR) として知られる隣接するストレッチの間に挿入される。重鎖および軽鎖の定常領域は、抗原結合には関与しないが、種々のエフェクター機能を示す。本明細書で使用される場合、用語「エフェクター機能」は、抗体のFc領域と免疫細胞上のC1q補体タンパク質またはFc受容体 (FcR) との間の相互作用によってもたらされる細胞媒介または補体媒介細胞障害性作用を指す。例示的なエフェクター機能として、限定することなく、抗体依存性細胞傷害 (ADCC)、抗体依存性細胞媒介ファゴサイトーシス (ADCP) および補体依存性細胞傷害 (CDC) 効果が挙げられる。抗体は、それらの重鎖の定常領域のアミノ酸配列に基づいてクラスに割り当てられる。抗体の5つの主なクラスまたはアイソタイプは、IgA、IgD、IgE、IgGおよびIgMであり、アルファ、デルタ、イプシロン、ガンマおよびミュー重鎖の存在によってそれぞれ特徴付けられる。いくつかの主な抗体のクラスは、IgG1 (ガンマ1重鎖)、IgG2 (ガンマ2重鎖)、IgG3 (ガンマ3重鎖)、IgG4 (ガンマ4重鎖)、IgA1 (アルファ1重鎖) またはIgA2 (アルファ2重鎖) などのサブクラスに分けられる。

10

20

30

40

50

【0125】

【00158】ある特定の実施形態では、本明細書において提供される抗体は、その任意の抗原結合性断片を包含する。本明細書で使用される場合、用語「抗原結合性断片」は、1つもしくは複数のCDRを含む抗体の一部分から形成される抗体断片、または抗原に結合するが無傷の天然抗体構造を含まない任意の他の抗体断片を指す。抗原結合性断片の例として、限定することなく、ダイアボディ、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv断片、ジスルフィド安定化Fv断片 (dsFv)、(dsFv)₂、二特異性dsFv (dsFv-dsFv')、ジスルフィド安定化ダイアボディ (dsダイアボディ)、1本鎖抗体分子 (scFv)、scFv二量体 (二価ダイアボディ)、二特異性抗体、多特異性抗体、ラクダ化単ドメイン抗体、ナノボディ、ドメイン抗体および二価ドメイン抗体が挙げられる。抗原結合性断片は、親抗体が結合する同じ抗原に結合することが可能である。

【0126】

【00159】抗体に関して、「Fab」は、ジスルフィド結合によって単一の重鎖の可変領域および第1の定常領域に結合された単一の軽鎖 (可変性および定常領域の両方) からなる抗体の一部分を指す。

【0127】

【00160】「Fab'」は、ヒンジ領域の一部分を含むFab断片を指す。

【0128】

【00161】「F(ab')₂」は、Fab'の二量体を指す。

【0129】

【00162】抗体 (例えば、IgG、IgAまたはIgDアイソタイプの) に関して、「Fc」は、ジスルフィド結合を介して第2の重鎖の第2のおよび第3の定常ドメインに結合した第1の重鎖の第2のおよび第3の定常ドメインからなる抗体の一部分を指す。IgMおよびIgEアイソタイプの抗体に関するFcは、第4の定常ドメインをさらに含む。抗体のFcの一部分は、抗体依存性細胞媒介細胞傷害 (ADCC)、および補体依存性細胞傷害 (CDC) などの種々のエフェクター機能に関与するが、抗原結合には機能しない

。

【0130】

【00163】抗体に関して、「Fv」は完全な抗原結合部位を保有する抗体の最小の断片を指す。Fv断片は、単一の重鎖の可変領域に結合された単一の軽鎖の可変領域からなる。

。

【0131】

【00164】「1本鎖Fv抗体」または「scFv」は、直接またはペプチドリンカー配列を介して互いに繋がれた軽鎖可変領域および重鎖可変領域からなる操作された抗体を指す（Huston JSら、Proc Natl Acad Sci USA、85:5879（1988））。

【0132】

【00165】「1本鎖Fv-Fc抗体」または「scFv-Fc」は、抗体のFc領域に繋がれたscFvからなる操作された抗体を指す。

【0133】

【00166】「ラクダ化単ドメイン抗体」、「重鎖抗体」または「HCAb」は、2つのV_Hドメインを含有するが軽鎖を含有しない抗体を指す（Riechmann L. および Muyldermans S.、J Immunol Methods. Dec 10; 231（1-2）: 25~38（1999）; Muyldermans S.、J Biotechnol. Jun; 74（4）: 277~302（2001）; WO94/04678; WO94/25591; 米国特許第6,005,079号）。重鎖抗体は、元はラクダ科（ラクダ、ヒトコブラクダおよびラマ）に由来した。軽鎖を欠いているが、ラクダ化抗体は、標準の抗原結合レパートリーを有する（Hamers-Casterman C.ら、Nature. Jun 3; 363（6428）: 446~8（1993）; Nguyen VK.ら、Immunogenetics. Apr; 54（1）: 39~47（2002）; Nguyen VK.ら、Immunology. May; 109（1）: 93~101（2003））。重鎖抗体の可変ドメイン（V_HHドメイン）は、適応免疫応答によって生じる最小の公知の抗原結合単位を表す（Koch-Nolte F.ら、FASEB J. Nov; 21（13）: 3490~8. Epub 2007 Jun 15（2007））。

【0134】

【00167】「ナノボディ」は、重鎖抗体由来のV_HHドメインならびに2つの定常ドメイン、CH2およびCH3からなる抗体断片を指す。

【0135】

【00168】「ダイアボディ」または「dAb」は、2つの抗原結合部位を有する小さな抗体断片を含み、断片は同じペプチド鎖中でV_Lドメインに繋がれたV_Hドメインを含む（V_H-V_LまたはV_L-V_H）（例えば、Holliger P.ら、Proc Natl Acad Sci USA. Jul 15; 90（14）: 6444~8（1993）; EP404097; WO93/11161を参照されたい）。同じ鎖上の2つのドメイン間での対合を可能にするには短すぎるリンカーを使用することによって、ドメインは、別の鎖の相補性ドメインと対合するように仕向けられ、それにより2つの抗原結合部位を創出する。抗原結合部位は、同じまたは異なる抗原（またはエピトープ）を標的にし得る。ある特定の実施形態では、「二特異性dsダイアボディ」は、2つの異なる抗原（またはエピトープ）を標的にするダイアボディである。

【0136】

【00169】「ドメイン抗体」は、重鎖の可変領域または軽鎖の可変領域だけを含有する抗体断片を指す。ある特定の場合では、2つ以上のV_Hドメインは、二価または多価ドメイン抗体を創出するようにペプチドリンカーを用いて共有結合される。二価のドメイン抗体2つのV_Hドメインは、同じまたは異なる抗原を標的にし得る。

【0137】

【00170】本明細書で使用される場合、用語「価」は、所与の分子中の指定の数の抗原

10

20

30

40

50

結合部位の存在を指す。用語「一価」はただ1つの抗原結合部位を有する抗体または抗原結合性断片を指し；用語「多価」は複数の抗原結合部位を有する抗体または抗原結合性断片を指す。このように用語「二価」、「四価」および「六価」は、抗原結合分子中の2つの結合部位、4つの結合部位および6つの結合部位の存在をそれぞれ記す。一部の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は二価である。

【0138】

【00171】本明細書で使用される場合、「二特異性」抗体は、2つの異なるモノクローナル抗体由来の断片を有し、2つの異なるエピトープに結合することが可能である人工抗体を指す。2つのエピソードは同じ抗原上に存在していてよく、またはそれらは2つの異なる抗原上に存在してもよい。

【0139】

【00172】ある特定の実施形態では、「s c F v 二量体」は、一方の部分のV H ' が他方の部分のV L ' と合わせられ、同じ抗原（もしくはエピトープ）または異なる抗原（もしくはエピトープ）を標的にできる2つの結合部位を形成するように別のV H - V L 部分と二量体化されたV H - V L （ペプチドリンカーによって連結されている）を含む二価ダイアボディまたは二特異性s c F v （B s F v ）である。他の実施形態では、「s c F v 二量体」は、V H 1 とV L 1 とが合わせられ、V H 2 とV L 2 とが合わせられ、合わせられた各対が異なる抗原特異性を有するように、V L 1 - V H 2 （ペプチドリンカーによって連結されている）と合わせられたV H 1 - V L 2 （同様に、ペプチドリンカーによって連結されている）を含む二特異性ダイアボディである。

【0140】

【00173】「d s F v 」は、単一の軽鎖の可変領域と単一の重鎖の可変領域との間の連結がジスルフィド結合であるジスルフィド安定化F v 断片を指す。一部の実施形態では、「（d s F v ）2」または「（d s F v - d s F v ' ）」は、3つのペプチド鎖を含む：ペプチドリンカー（例えば、長い可動性リンカー）によって連結され、2つのV L 部分にそれぞれジスルフィド架橋を介して結合された2つのV H 部分。一部の実施形態では、d s F v - d s F v ' は、それぞれジスルフィド結合で対合した重鎖および軽鎖が異なる抗原特異性を有して二特異性である。

【0141】

【00174】本明細書で使用される場合、用語「キメラ」は、ある種由来の重鎖および／または軽鎖の一部分ならびに別の種由来の重鎖および／または軽鎖の残りの部分を有する抗体または抗原結合性断片を意味する。例示的な例では、キメラ抗体は、ヒト由来の定常領域およびマウス由来などの非ヒト動物由来の可変領域を含み得る。一部の実施形態では、非ヒト動物は、哺乳動物、例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、モルモットまたはハムスターである。

【0142】

【00175】本明細書で使用される場合、用語「ヒト化」は、抗体または抗原結合性断片が非ヒト動物由来のC D R、ヒト由来のF R 領域および適用可能な場合はヒト由来の定常領域を含むことを意味する。

【0143】

【00176】本明細書で使用される場合、用語「親和性」は、免疫グロブリン分子（すなわち、抗体）またはその断片と抗原との間の非共有結合相互作用の強さを指す。

【0144】

【00177】本明細書で使用される場合、用語「特異的結合」または「特異的に結合する」は、2つの分子、例えば、抗体と抗原の間の非無作為結合反応を指す。特異的結合は、例えば、抗原と抗原結合分子との間の結合が平衡に達したときのK_D値、すなわち、解離速度の会合速度に対する比（k_{off} / k_{on}）によって表される結合親和性において特徴付けられ得る。K_Dは、これだけに限らないが、表面プラズモン共鳴法、オクテット法、マイクロスケール熱泳動法、HPLC-MS法およびFACSアッセイ法が挙げられる当技術分野において公知の任意の従来の方法を使用することによって決定され得る。≤1

10

20

30

40

50

$0 - 6 \text{ M}$ （例えば、 $\leq 5 \times 10^{-7} \text{ M}$ 、 $\leq 2 \times 10^{-7} \text{ M}$ 、 $\leq 10^{-7} \text{ M}$ 、 $\leq 5 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、 $\leq 2 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、 $\leq 10^{-8} \text{ M}$ 、 $\leq 5 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、 $\leq 4 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、 $\leq 3 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、 $\leq 2 \times 10^{-9} \text{ M}$ または $\leq 10^{-9} \text{ M}$ ）の K_D 値は、抗体またはその抗原結合性断片とPD-L1（例えば、ヒトPD-L1またはカニクイザルPD-L1）との間の特異的結合を示すことができる。

【0145】

【00178】本明細書で使用される場合、「PD-L1への結合について競合」する能力は、PD-L1と第2の抗PD-L1抗体との結合相互作用を任意の検出可能な程度に阻害する第1の抗体または抗原結合性断片の能力を指す。ある特定の実施形態では、PD-L1への結合について競合する抗体または抗原結合性断片は、PD-L1と第2の抗PD-L1抗体との結合相互作用を少なくとも85%、または少なくとも90%阻害する。ある特定の実施形態では、この阻害は、95%より大きい、または99%より大きい場合がある。

10

【0146】

【00179】本明細書で使用される場合、用語「アミノ酸」は、各アミノ酸に特異的な側鎖と共にアミン（ $-NH_2$ ）およびカルボキシル（ $-COOH$ ）官能基を含有する有機化合物を指す。本開示においてアミノ酸の名称は、以下にまとめられている標準的な1文字または3文字コードとしても表される。

【0147】

【表1】

20

名称	3文字コード	1文字コード
アラニン	Ala	A
アルギニン	Arg	R
アスパラギン	Asn	N
アスパラギン酸	Asp	D
システイン	Cys	C
グルタミン酸	Glu	E
グルタミン	Gln	Q
グリシン	Gly	G
ヒスチジン	His	H
イソロイシン	Ile	I
ロイシン	Leu	L
リシン	Lys	K
メチオニン	Met	M
フェニルアラニン	Phe	F
プロリン	Pro	P
セリン	Ser	S
スレオニン	Thr	T
トリプトファン	Trp	W
チロシン	Tyr	Y
バリン	Val	V

30

40

【0148】

【00180】用語「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」は、アミノ酸残基のポリマーを指して本明細書において互換的に使用される。用語は、1つまたは複数のアミノ酸残基が対応する天然に存在するアミノ酸の人工的な化学的模倣物であるアミノ酸

50

ポリマー、ならびに天然に存在するアミノ酸ポリマーおよび天然に存在しないアミノ酸ポリマーにも適用される。

【0149】

【00181】アミノ酸配列に関連する「保存的置換」は、同様の生理化学的特性を有する側鎖を有する異なるアミノ酸残基を用いてアミノ酸残基を置き換えることを指す。例えば、保存的置換は、疎水性側鎖を有するアミノ酸残基の中（例えば、Met、Ala、Val、LeuおよびIle）、中性親水性側鎖を有するアミノ酸残基の中（例えば、Cys、Ser、Thr、AsnおよびGln）、酸性側鎖を有するアミノ酸残基の中（例えば、Asp、Glu）、塩基性側鎖を有するアミノ酸残基の中（例えば、His、LysおよびArg）、または芳香族側鎖を有するアミノ酸残基の中（例えば、Trp、TyrおよびPhe）で行われ得る。当技術分野において公知のとおり、保存的置換は、タンパク質の立体配置的構造に顕著な変化を通常生じず、それによりタンパク質の生物活性を保持できる。

10

【0150】

【00182】アミノ酸配列（または核酸配列）に関して、「パーセント（%）配列同一性」は、最大の一致を達成するように任意選択でギャップを導入して配列をアラインした後に、参照配列中のアミノ酸（または核酸）残基と同一である候補配列中のアミノ酸（または核酸）残基のパーセンテージとして定義される。アミノ酸（または核酸）配列同一性のパーセントを決定する目的のためのアライメントは、BLASTN、BLASTp（U. S. National Center for Biotechnology Information（NCBI）のウェブサイトで利用可能、Altschul S. F. ら、J. Mol. Biol.、215：403～410（1990）；Stephen F. ら、Nucleic Acids Res.、25：3389～3402（1997）も参照されたい）、ClustalW2（European Bioinformatics Instituteのウェブサイトで利用可能、Higgins D. G. ら、Methods in Enzymology、266：383～402（1996）；Larkin M. A. ら、Bioinformatics（Oxford, England）、23（21）：2947～8（2007）も参照されたい）およびALIGNまたはMegalign（DNASTAR）ソフトウェアなどの公的に入手可能なツールを使用して達成され得る。当業者は、ツールによって提供される初期パラメーターを使用できる、または例えば、好適なアルゴリズムを選択することによってなどアライメントの任意選択でパラメーターをカスタマイズできる。ある特定の実施形態では、同一でない残基位置は保存的アミノ酸置換によって異なっている場合がある。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が類似の化学的特性（例えば、電荷または疎水性）を有する側鎖（R基）を有する別のアミノ酸によって置換されているものである。一般に、保存的アミノ酸置換は、タンパク質の機能的特性を実質的に変更しない。保存的置換によって2つ以上のアミノ酸配列が互いに異なっている場合、類似性のパーセントまたは程度は、置換の保存的性質を補正するように上方に調整される場合がある。この調整を行うための手段は、当業者に周知である。例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Pearson（1994）Methods Mol. Biol. 24：307～331を参照されたい。

20

30

40

【0151】

【00183】本明細書で使用される場合、「相同性配列」は、任意選択でアラインされた場合に別の配列に少なくとも80%（例えば、少なくとも85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%）の配列同一性を有するポリヌクレオチド配列（もしくはその相補鎖）またはアミノ酸配列を指す。

【0152】

【00184】「単離された」物質は、天然の状態から人工的に変更されている。「単離された」組成物または物質が天然に存在する場合、それは、その元の環境から変更されているか、もしくは除去されているか、または両方である。例えば、生きている動物において天然に存在するポリヌクレオチドまたはポリペプチドは「単離されて」いないが、実質的

50

に純粋な状態で存在するように、それが天然状態で共存する材料から十分に分離された場合は、同じポリヌクレオチドまたはポリペプチドは「単離されて」いる。単離された「核酸」または「ポリヌクレオチド」は、互換的に使用され、単離された核酸分子の配列を指す。ある特定の実施形態では、「単離された抗体またはその抗原結合性断片」は、電気泳動的方法（例えば、SDS-PAGE、等電点電気泳動、キャピラリー電気泳動）またはクロマトグラフィー法（例えば、イオン交換クロマトグラフィーもしくは逆相HPLC）によって決定されて、少なくとも60%、70%、75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の純度を有する抗体または抗原結合性断片を指す。

10

【0153】

[00185]用語「対象」は、ヒトおよび非ヒト動物を含む。非ヒト動物は、すべての脊椎動物、例えば哺乳動物および非哺乳動物、例えば非ヒト霊長類、マウス、ラット、ネコ、ウサギ、ヒツジ、イヌ、ウシ、ニワトリ、両生類および爬虫類を含む。記した場合を除いて、用語「患者」または「対象」は、本明細書において互換的に使用される。

【0154】

[00186]本明細書で使用される場合、状態を「処置すること」またはその「処置」は、状態を予防するもしくは軽減すること、状態の開始もしくは発達の速度を遅らせること、状態を発症するリスクを低減すること、状態に関連する症状の発症を予防するもしくは遅らせること、状態に関連する症状を低減するもしくは終わらせること、状態の完全なもしくは部分的な退縮を生じさせること、状態を治癒すること、またはこれらの何らかの組合せを含む。

20

【0155】

[00187]本明細書で使用される場合、用語「ベクター」は、遺伝的エレメントによってコードされたタンパク質、RNAもしくはDNAを産生するように、または遺伝的エレメントを複製するように、遺伝的エレメントの発現をもたらすように遺伝的エレメントが作動可能に挿入され得るビヒクルを指す。ベクターは、宿主細胞内にそれが保有する遺伝的エレメントの発現をもたらすように宿主細胞を形質転換、形質導入またはトランスフェクトするために使用され得る。ベクターの例として、プラスミド、ファージミド、コスミド、人工染色体、例えば、酵母人工染色体（YAC）、細菌バクテリア人工染色体（BAC）、またはP1由来人工染色体（PAC）、バクテリオファージ、例えば、ラムダファージまたはM13ファージ、および動物ウイルスが挙げられる。ベクターは、プロモーター配列、転写開始配列、エンハンサー配列、選択可能エレメントおよびレポーター遺伝子が挙げられる、発現を調節するための種々のエレメントを含有し得る。加えて、ベクターは、複製開始点を含有し得る。ベクターは、これだけに限らないが、ウイルス粒子、リポソームまたはタンパク質コーティングが挙げられる細胞へのその進入を補助する材料も含み得る。ベクターは、発現ベクターまたはクローニングベクターであり得る。本開示は、抗体またはその抗原結合性断片、核酸配列に作動可能に連結した少なくとも1つのプロモーター（例えば、SV40、CMV、EF-1 α ）、および少なくとも1つの選択マーカーをコードする本明細書において提供される核酸配列を含有するベクター（例えば、発現ベクター）を提供する。

30

40

【0156】

[00188]本明細書で使用される場合、「宿主細胞」は、外因性ポリヌクレオチドおよび／またはベクターが導入された細胞を指す。

【0157】

[00189]本明細書で使用される場合、用語「可溶性」は、液体および水性の環境などの溶媒に溶解される分子（例えば、タンパク質）の能力を指す。

【0158】

[00190]本明細書で使用される場合、用語「トランスフォーミング増殖因子ベータ」および「TGF β 」は、前駆体および成熟TGF β （「潜在型TGF β 」）の潜在型形態

50

および会合または非会合複合体を含んで、対象（例えば、ヒト）由来の TGF-β のいずれかの全長、天然アミノ酸配列のいずれかを有する任意の TGFβ ファミリータンパク質を指す。本明細書においてそのような TGFβ を参照することは、TGFβ 1、TGFβ 2、TGFβ 3 アイソフォームおよびこれらの潜在型バージョンが挙げられる現在同定されている形態、ならびに、任意の公知の TGFβ の配列に由来し、配列に少なくとも約 75%、好ましくは少なくとも約 80%、より好ましくは少なくとも約 85%、さらにより好ましくは少なくとも約 90%、またさらに好ましくは少なくとも約 95% 相同性であるポリペプチドを含む今後同定されるヒト TGFβ 種のいずれか 1 つを参照すると理解される。具体的な用語「TGFβ 1」、「TGFβ 2」および「TGFβ 3」は、文献、例えば、Derynck ら、Nature、Cancer Res.、47:707 (1987)；Seyedin ら、J. Biol. Chem.、261:5693~5695 (1986)；de Martin ら、EMBO J.、6:3673 (1987)；Kupfer ら、Int. J. Cancer、42:562 (1988) において定義される TGF-β を指す。用語「トランスフォーミング増殖因子 β」、「TGFβ」、「TGFβ 1」、「TGFβ 2」、「TGFβ 3」および「TGFβ 受容体」は、本開示において互換的に使用される。

10

【0159】

【00191】本明細書で使用される場合、用語「ヒト TGFβ 1」は、ヒト TGFβ 1 遺伝子（例えば、野生型ヒト TGFβ 1 遺伝子）によってコードされる TGFβ 1 タンパク質を指す。例示的な野生型ヒト TGFβ 1 タンパク質は、GenBank 受託番号 NP_000651.3 によって提供される。本明細書で使用される場合、用語「ヒト TGFβ 2」は、ヒト TGFβ 2 遺伝子（例えば、野生型ヒト TGFβ 2 遺伝子）によってコードされる TGFβ 2 タンパク質を指す。例示的な野生型ヒト TGFβ 2 タンパク質は、GenBank 受託番号 NP_001129071.1 および NP_003229.1 によって提供される。本明細書で使用される場合、用語「ヒト TGFβ 3」は、ヒト TGFβ 3 遺伝子（例えば、野生型ヒト TGFβ 3 遺伝子）によってコードされる TGFβ 3 タンパク質を指す。例示的な野生型ヒト TGFβ 3 タンパク質は、GenBank 受託番号 NP_003230.1、NP_001316868.1 および NP_001316867.1 によって提供される。

20

【0160】

【00192】本明細書で使用される場合、用語「マウス TGFβ 1」、「マウス TGFβ 2」および「マウス TGFβ 3」は、マウス TGFβ 1 遺伝子（例えば、野生型マウス TGFβ 1 遺伝子）、マウス TGFβ 2 遺伝子（例えば、野生型マウス TGFβ 2 遺伝子）およびマウス TGFβ 3 遺伝子（例えば、野生型マウス TGFβ 3 遺伝子）によってそれぞれコードされる TGFβ 1 タンパク質、TGFβ 2 タンパク質および TGFβ 3 タンパク質を指す。例示的な野生型マウス (*Mus musculus*) TGFβ 1 タンパク質は、GenBank 受託番号 NP_035707.1 および CAA08900.1 によって提供される。例示的な野生型マウス TGFβ 2 タンパク質は、GenBank 受託番号 NP_033393.2 によって提供される。例示的な野生型マウス TGFβ 3 タンパク質は、GenBank 受託番号 AAA40422.1 によって提供される。

30

40

【0161】

【00193】本明細書で使用される場合、用語「TGFβ 受容体」は、少なくとも 1 つの TGFβ アイソフォームに結合する任意の受容体を指す。一般に、TGFβ 受容体として、TGFβ 受容体 I (TGFβ RI)、TGFβ 受容体 II (TGFβ RII) または TGFβ 受容体 III (TGFβ RIII) が挙げられる。

【0162】

【00194】ヒトに関して、用語「TGFβ 受容体 I」または「TGFβ RI」は、野生型 TGFβ RI、ならびに、少なくとも 1 つの TGFβ アイソフォームに結合することが可能であることが公知であるそのすべてのアイソフォームおよびバリエーションが挙げられるヒト TGFβ 受容体 1 型配列を指す。野生型 TGFβ RI の例示的なアミノ酸配列は、G

50

enBank 受託番号 ABD46753.1 の下で、または UniProtKB-P36897 の下で入手可能であり、本明細書にも配列番号 69 として含まれる。バリエーション TGFβRI は、配列番号 69 のアミノ酸配列に少なくとも 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% の配列同一性のある配列を有し、野生型配列（例えば、配列番号 69）の少なくとも 25%、35%、50%、75%、90%、95% または 99% の TGFβ 結合活性を保持し得る。

【0163】

【00195】ヒトに関して、用語「TGFβ受容体II」または「TGFβRII」は、野生型 TGFβRII、ならびに、少なくとも 1 つの TGFβアイソフォームに結合することが可能であることが公知であるそのすべてのアイソフォームおよびバリエーションを含んでヒト TGFβ受容体 2 型アイソフォーム A 配列を指す。野生型 TGFβRII アイソフォーム A またはアイソフォーム 1 の例示的なアミノ酸配列は、GenBank 受託番号 NP_001020018.1 の下または UniProtKB-P37173-1 の下で入手可能であり、本明細書にも配列番号 70 として含まれ、野生型 TGFβRII アイソフォーム B は、GenBank 受託番号 NP_003233.4 または UniProtKB-P37173-2 の下で入手可能であり、本明細書にも配列番号 71 として含まれる。バリエーション TGFβRII は、配列番号 70 または 71 に少なくとも 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% の配列同一性のある配列を有し、野生型配列（例えば、配列番号 70 または 71）の少なくとも 25%、35%、50%、75%、90%、95% または 99% の TGFβ 結合活性を保持し得る。

10

20

【0164】

【00196】ヒトに関して、用語「TGFβ受容体III」または「TGFβRIII」は、野生型 TGFβRII ならびにすべてのアイソフォームおよびバリエーションを含んでヒト TGFβ受容体 3 型配列を指す。野生型 TGFβRIII の例示的なアミノ酸配列は、GenBank 受託番号 NP_003234.2 の下または UniProtKB-Q03167 の下で入手可能であり、本明細書にも配列番号 72 として含まれる。

【0165】

【00197】本明細書で使用される場合、ある特定の参照タンパク質またはペプチドに関して、用語「バリエーション」は、参照配列に少なくとも 70%（例えば、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%）の配列同一性のあるアミノ酸配列を有し、参照配列（例えば、野生型配列）の少なくとも 25%（例えば、35%、50%、75%、90%、95% または 99%）の生物活性または結合活性を保持する参照タンパク質またはペプチドの改変バージョン、例えば機能性等価物、断片、融合物、誘導体、模倣物、またはこれらの任意の組合せを意味する。バリエーションは、参照タンパク質またはペプチドの断片、変異体、融合物、短縮物またはこれらの任意の組合せであり得る。

30

【0166】

【00198】本明細書で使用される場合、用語「インターロイキン-1」または「IL-1」は、IL-1α および IL-1β、それらの前駆体（例えば、プロIL-1α および プロIL-1β）、アイソフォームならびにバリエーションを含む。

40

【0167】

【00199】本明細書で使用される場合、用語「ヒト IL-1α」は、ヒト IL1A 遺伝子（例えば、野生型ヒト IL1A 遺伝子）によってコードされる IL-1α タンパク質、およびアイソフォームおよびバリエーションを指す。例示的な野生型ヒト IL1α タンパク質は、UniProtKB-P01583 によって提供される。

【0168】

【00200】本明細書で使用される場合、用語「ヒト IL-1β」は、ヒト IL1B 遺伝子（例えば、野生型ヒト IL1B 遺伝子）によってコードされる IL-1β タンパク質を指す。例示的な野生型ヒト IL1β タンパク質は、GenBank 受託番号 NP_000

50

567.1によって、またはUniProtKB-C9JVK0の下で提供される。

【0169】

【00201】本明細書で使用される場合、用語「IL-1受容体」または「IL-1R」は、IL-1に結合することができるそのすべての野生型受容体、アイソフォームおよびバリエーションを含む、IL-1に結合することが可能である受容体を指す。一般に、2つの種類のIL-1受容体、すなわち、IL-1受容体I (IL-1RI)、およびIL-1受容体II (IL-1RII)がある。IL-1RIIは、シグナルを伝達することなくリガンドに結合するデコイ受容体として作用する。IL-1RIIのタンパク分解性切断は、シグナルを伝達することなくリガンドに結合する可溶性受容体、例えば、IL-1sRIおよびIL-1sRIIの形成を生じる（詳細には、Thomas G. Kennedy、Chapter V. B. 2.、Encyclopedia of Hormones、2003を参照されたい）。IL-1sRIおよびIL-1sRIIは、IL-1RIIのタンパク分解性切断生成物であり、IL-1RIIの細胞外ドメイン断片の群であり得る。用語、IL-1Rは、NF-カッパー-Bおよび他の経路のインターロイキン-1依存性活性化を媒介する高親和性インターロイキン-1受容体複合体を形成するようにIL-1βに結合したIL-1RIと会合できる共受容体IL-1RAPを包含することも意図する。

10

【0170】

【00202】本明細書で使用される場合、用語「IL-1RI」は、野生型IL-1RIならびにIL-1αおよび／またはIL-1βに結合することが可能であるそのすべてのアイソフォームおよびバリエーションを含む。野生型IL-1RIの例示的なアミノ酸配列は、UniProtKB-P14778の下で入手可能であり、本明細書にも配列番号73として含まれる。

20

【0171】

【00203】本明細書で使用される場合、用語「IL-1RII」は、野生型IL-1RII、ならびに、IL-1αおよび／またはIL-1βに結合することが可能であるそのすべてのアイソフォームおよびバリエーションを含む。野生型IL-1RIIの例示的なアミノ酸配列は、UniProtKB-P27930の下で入手可能であり、本明細書にも配列番号75として含まれる。

30

【0172】

【00204】本明細書で使用される場合、用語「IL-1RAP」は、野生型IL-1RAP、ならびに、IL-1βに結合したIL-1Rに結合することが可能であるそのすべてのアイソフォームおよびバリエーションを含む。野生型IL-1RAPの例示的なアミノ酸配列は、UniProtKB-Q9NPH3の下で入手可能であり、本明細書にも配列番号74として含まれる。

【0173】

【00205】本明細書で使用される場合、用語「IL-1sRI」は、メタロプロテイナーゼが関与するタンパク分解性切断によって産生され得るIL-1RIのすべての可溶性形態を含む。天然に存在するIL-1sRIは、約45kDaから60kDaの範囲の分子量を有し得る。この用語は、IL-1αおよび／またはIL-1βに結合することが可能であるIL-1sRIのすべてのアイソフォームおよびバリエーションも包含し得る。

40

【0174】

【00206】本明細書で使用される場合、用語「IL-1sRII」は、メタロプロテイナーゼが関与するタンパク分解性切断によって産生され得るIL-1RIIのすべての可溶性形態を含む。天然に存在するIL-1sRIIは、約45kDaから60kDaの範囲の分子量を有し得る。この用語は、IL-1αおよび／またはIL-1βに結合することが可能であるIL-1sRIIのすべてのアイソフォームおよびバリエーションも包含し得る。

【0175】

【00207】本明細書で使用される場合、用語「IL-1受容体アンタゴニスト」は、I

50

IL-1 受容体への結合について IL-1 α または IL-1 β と競合でき、IL-1 α または IL-1 β の活性を阻害する任意のタンパク質を一般に含む。IL-1 受容体アンタゴニストは、IL-1Ra、IL-1sRI および IL-1sRII などの天然に存在するアンタゴニスト、ならびに、IL-1 受容体、特に IL-1RI への結合について IL-1 α または IL-1 β の結合を遮断できる他の人工アンタゴニストを含み得る。

【0176】

【00208】本明細書で使用される場合、用語「IL-1Ra」は、野生型 IL-1Ra、ならびに、IL-1 α および／または IL-1 β に結合することが可能であるそのすべてのアイソフォームおよびバリエーションを含む。野生型 IL-1Ra の例示的なアミノ酸配列は、UniProtKB-P18510 の下で入手可能であり、本明細書にも配列番号 76 として含まれる。

10

【0177】

【00209】本明細書で使用される場合、「がん」は、悪性の細胞増殖または新生物、異常な増殖、浸潤または転移によって特徴付けられる任意の医学的状態を指し、良性または悪性である場合があり、固形腫瘍および、白血病などの非固形がん（例えば、血液悪性腫瘍）の両方を含む。本明細書で使用される場合、「固形腫瘍」は、新生物、および／または悪性細胞の固形塊を指す。

【0178】

【00210】用語「薬学的に許容される」は、指定の担体、ビヒクル、希釈剤、賦形剤（複数可）および／または塩が、製剤中に含まれる他の成分と一般に化学的におよび／または物理的に適合性であり、そのレシピエントと生理学的に適合性であることを示す。

20

【0179】

【00211】本明細書において「約」の値またはパラメーターを参照することは、その値またはパラメーターそれ自体に方向付けられる実施形態を含む（および記載する）。例えば、「約 X」を参照する記載は、「X」の記載を含む。数値範囲は、範囲を定義する数について包括的である。一般に述べると、用語「約」は、変数の指定の値、および指定の値の実験誤差の内（例えば、平均について 95% 信頼区間内）または指定の値の 10 パーセント内のいずれかが大きい方での変数のすべての値を指す。

【0180】

【00212】アミノ酸配列（例えば、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質）に関して使用される場合、用語「融合」または「融合された」は、例えば、化学結合または組換え手段による 2 つ以上のアミノ酸配列の天然では存在しない単一のアミノ酸配列への組合せを指す。融合アミノ酸配列は、2 つのコードポリヌクレオチド配列の遺伝的組換えによって産生され得、組換えポリヌクレオチドを含有する構築物を宿主細胞に導入する方法によって発現され得る。

30

【0181】

【00213】用語「薬学的に許容される」は、指定の担体、ビヒクル、希釈剤、賦形剤（複数可）および／または塩が、製剤中に含まれる他の成分と一般に化学的におよび／または物理的に適合性であり、そのレシピエントと生理学的に適合性であることを示す。

【0182】

40

I. 免疫チェックポイント分子を標的化し、IL-1 活性を遮断する二機能性分子

【00214】本開示は、免疫チェックポイント分子に結合する第 1 の部分、およびインターロイキン-1 (IL-1) の活性を遮断する第 2 の部分を含む二機能性分子を提供する。本明細書において提供される二機能性分子は、IL-1 と、IL-1 結合性部分または IL-1 受容体 (IL-1R) 結合性部分（すなわち、二機能性分子の第 2 の部分）のいずれかを含む IL-1 受容体との間の相互作用を遮断することによって腫瘍微小環境での IL-1 活性の遮断および／または低減を可能にする。IL-1 結合性部分および／または IL-1R 結合性部分は、ある特定の腫瘍細胞または免疫細胞の表面に見出され得る免疫チェックポイント分子を標的化する部分（すなわち、二機能性分子の第 1 の部分）に連結され得る。

50

【0183】

[00215]IL-1は、炎症性サイトカインである。炎症は、腫瘍微小環境の重要な構成要素であり、IL-1は、発癌および腫瘍進行において重要な役割を果たす（A. Mantovaniら、Immunol Rev. 2018 Jan; 281(1): 57～61.）。IL-1は、慢性の治療抵抗性炎症の駆動、腫瘍血管新生、IL-17経路の活性化、骨髄系由来サプレッサー細胞（MDSC）およびマクロファージリクルートメントの誘導、侵入および転移を含む、腫瘍開始および進行のさまざまなレベルで作用する（同上）。

【0184】

[00216]免疫チェックポイント分子は、T細胞、ナチュラルキラー細胞などのある特定の免疫細胞上で発現される。一部のがん細胞はまた、免疫チェックポイントの活性化を遮断でき、それにより、がん細胞が免疫系のサーベイランスを回避できるようにするある特定の免疫チェックポイント分子を発現する。

【0185】

[00217]腫瘍微小環境中のIL-1を低減し、チェックポイント遮断を低減することによって、本開示は、がん、自己免疫疾患、感染性疾患などの免疫チェックポイント関連疾患を処置するために有用であり得る新規二機能性分子を提供する。

【0186】

[00218]ある特定の実施形態では、第1の部分は、免疫賦活または同時刺激活性を有する免疫チェックポイント分子のアゴニストを含む。そのような免疫賦活性チェックポイント分子として、限定することなく、CD27、CD70、CD28、CD80（B7-1）、CD86（B7-2）、CD40、CD40L（CD154）、CD122、CD137、CD137L、OX40（CD134）、OX40L（CD252）、GITR、ICOS（CD278）およびICOSLG（CD275）、CD2、ICAM-1、LFA-1（CD11a/CD18）、CD30、BAFFR、HVEM、CD7、LIGHT、NKG2C、SLAMF7、NKP80、CD160およびCD83を挙げることができる。

【0187】

[00219]ある特定の実施形態では、第1の部分は、免疫阻害性または共抑制活性を有するチェックポイント分子の阻害剤を含む。そのような免疫阻害チェックポイント分子として、限定することなく、A2AR、B7-H3（CD276）、B7-H4（VTCN1）、BTLA（CD272）、CTLA-4（CD152）、IDO1、IDO2、TDO、KIR、LAG3、NOX2、PD-1、PD-L1、PD-L2、TIM-3、VISTA、SIGLEC7（CD328）、TIGIT、PVR（CD155）、SIGLEC9（CD329）、CD160、LAIR1、2B4（CD244）、CD47およびB7-H5を挙げることができる。

【0188】

[00220]ある特定の実施形態では、免疫チェックポイント分子は、PD-L1である。ある特定の実施形態では、第1の部分は、PD-L1に対する抗体部分またはその抗原結合性断片を含む。ある特定の実施形態では、第1の部分は、PD-L1に対するアンタゴニスト抗体部分またはその抗原結合性断片を含む。

【0189】

[00221]ある特定の実施形態では、第2の部分は、IL-1結合性部分またはIL-1受容体（IL-1R）結合性部分を含む。

【0190】

[00222]IL-1 α およびIL-1 β の両方は、炎症誘発性であり、IL-1Rに結合する。IL-1 α またはIL-1 β への結合で、IL-1Rは、IL-1Rアクセサリタンパク質およびアダプタータンパク質MyD88の両方を受容体複合体にリクルートでき、下流シグナル伝達カスケードの活性化および、最終的には多種多様な免疫および炎症遺伝子の活性化を生じる。IL-1の活性またはIL-1Rへのその結合を遮断するこ

10

20

30

40

50

とは、免疫チェックポイント分子の調節との組合せで有用であることが本発明者らによって見出された。

【0191】

【00223】ある特定の実施形態では、IL-1は、IL-1 α またはIL-1 β である。ある特定の実施形態では、IL-1 β はヒトIL-1 β である。

【0192】

【00224】ある特定の実施形態では、第2の部分は、IL-1結合性部分を含む。ある特定の実施形態では、IL-1結合性部分は、IL-1 α またはIL-1 β に特異的に結合する。ある特定の実施形態では、IL-1結合性部分は、可溶性IL-1R、IL-1RのIL-1結合性断片もしくはバリエーション、またはIL-1に対する抗体もしくはその抗原結合性断片を含む。

10

【0193】

【00225】可溶性IL-1Rは、IL-1Rのドメインまたは断片、例えば、IL-1Rの細胞外ドメイン（ECD）であり得る。代替的に、可溶性IL-1Rはまた、天然で可溶性であり、IL-1に結合することが可能であるアイソフォームであるIL-1sRIまたはIL-1sRIIであり得る。

【0194】

【00226】当業者は、IL-1RIの短縮化断片、またはIL-1RIのECD、またはIL-1RII、またはIL-1RIIのECD、またはIL-1RAP、またはIL-1RAPのECD、またはIL-1sRIまたはIL-1sRIIは、そのような断片がIL-1結合性ドメインを含有する限り、IL-1（例えば、IL-1 α またはIL-1 β ）に結合するために十分であり得ることを理解するだろう。したがって、本開示はまた、IL-1RI、IL-1RIのECD、またはIL-1RII、またはIL-1RIIのECD、またはIL-1RAP、またはIL-1RAPのECD、IL-1sRIおよびIL-1sRIIのいずれかのすべてのIL-1結合性断片またはバリエーションを含む。ある特定の実施形態では、IL-1結合性部分は、配列番号73、74もしくは75のアミノ酸配列またはそのIL-1結合性断片もしくはバリエーションを含む。ある特定の実施形態では、IL-1結合性部分は、配列番号73、74および75のいずれかに少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列、またはそのIL-1結合性断片もしくはバリエーションを含む。

20

30

【0195】

【00227】ある特定の実施形態では、IL-1結合性部分は、IL-1に対する抗体またはその抗原結合性断片を含む。IL-1に対する抗体またはその抗原結合性断片も、そのような抗体または抗原結合性断片が、IL-1（例えば、IL-1 α またはIL-1 β ）のIL-1Rへの結合に干渉できる限り、使用され得る。

【0196】

【00228】ある特定の実施形態では、IL-1に対する抗体またはその抗原結合性断片は、XB2001、ルチキズマブ、LY2189102およびベルメキマブからなる群から選択される抗IL-1 α 抗体由来、またはSSGJ-613、CDP484、カナキマブおよびゲボキズマブからなる群から選択される抗IL-1 β 抗体由来の重鎖可変領域および／または軽鎖可変領域を含む。

40

【0197】

【00229】ある特定の実施形態では、IL-1に対する抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号104もしくは配列番号112の配列を含むHCDR1、配列番号105もしくは配列番号113の配列を含むHCDR2、および配列番号106もしくは配列番号114の配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域、ならびに／または配列番号107もしくは配列番号115の配列を含むLCDR1、配列番号108もしくは配列番号116の配列を含むLCDR2、および配列番号109もしくは配列番号117の配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域を含む。

【0198】

50

【00230】ある特定の実施形態では、I L - 1 に対する抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号 1 0 4 の配列を含む H C D R 1、配列番号 1 0 5 の配列を含む H C D R 2、および配列番号 1 0 6 の配列を含む H C D R 3 を含む重鎖可変領域、ならびに／または配列番号 1 0 7 の配列を含む L C D R 1、配列番号 1 0 8 の配列を含む L C D R 2、および配列番号 1 0 9 の配列を含む L C D R 3 を含む軽鎖可変領域を含む。

【0199】

【00231】ある特定の実施形態では、I L - 1 に対する抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号 1 1 2 の配列を含む H C D R 1、配列番号 1 1 3 の配列を含む H C D R 2、および配列番号 1 1 4 の配列を含む H C D R 3 を含む重鎖可変領域、ならびに／または配列番号 1 1 5 の配列を含む L C D R 1、配列番号 1 1 6 の配列を含む L C D R 2、および配列番号 1 1 7 の配列を含む L C D R 3 を含む軽鎖可変領域を含む。

10

【0200】

【00232】ある特定の実施形態では、I L - 1 に対する抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号 1 0 2、配列番号 1 1 0、およびこれらに少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するその相同性配列からなる群から選択される配列を含む重鎖可変領域、ならびに／または配列番号 1 0 3、配列番号 1 1 1、およびこれらに少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するその相同性配列からなる群から選択される配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0201】

【00233】ある特定の実施形態では、I L - 1 に対する抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号 1 0 2、およびこれに少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するその相同性配列からなる群から選択される配列を含む重鎖可変領域、ならびに／または配列番号 1 0 3、およびこれに少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するその相同性配列からなる群から選択される配列を含む軽鎖可変領域を含む。

20

【0202】

【00234】ある特定の実施形態では、I L - 1 に対する抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号 1 1 0、およびこれに少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するその相同性配列からなる群から選択される配列を含む重鎖可変領域、ならびに／または配列番号 1 1 1、およびこれに少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するその相同性配列からなる群から選択される配列を含む軽鎖可変領域を含む。ある特定の実施形態では、第 2 の部分は I L - 1 R 結合性部分を含む。

30

【0203】

【00235】ある特定の実施形態では、I L - 1 R 結合性部分は、I L - 1 R a またはその I L - 1 R 結合性断片もしくはバリエーションを含む。I L - 1 R a は、I L - 1 R のアンタゴニストであり、I L - 1 R への結合について I L - 1 α または I L - 1 β と競合できる。同様に当業者は、I L - 1 R への結合において、および／または I L - 1 α もしくは I L - 1 β との競合において有用であることに I L - 1 R a の短縮化断片が十分であり得ることを理解するだろう。ある特定の実施形態では、I L - 1 R 結合性部分は、I L - 1 R a の短縮形態を含む。ある特定の実施形態では、I L - 1 R 結合性部分は、配列番号 6 7 もしくは 7 6 のアミノ酸配列、またはこれらの任意の I L - 1 結合性断片もしくはバリエーションを含む。ある特定の実施形態では、I L - 1 R 結合性部分は、配列番号 6 7 もしくは 7 6 に少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列、またはこれらの任意の I L - 1 結合性断片もしくはバリエーションを含む。当業者は、野生型 I L - 1 R a のバリエーションも、そのようなバリエーションが I L - 1 R との結合について I L - 1 α または I L - 1 β と競合することができる限り、本開示において有用であり得ることを理解するだろう。

40

【0204】

【00236】ある特定の実施形態では、I L - 1 R 結合性部分は、I L - 1 R に対する抗体またはその抗原結合性断片を含む。I L - 1 R に対する抗体またはその抗原結合性断片も、そのような抗体または抗原結合性断片が I L - 1 R との結合について I L - 1 α または I L - 1 β と競合することが可能である限り使用され得る。

【0205】

50

【00237】ある特定の実施形態では、IL-1Rに対する抗体またはその抗原結合性断片は、スベソリマブ、アステゴリマブ、イムシドリマブ、AMG108、メルリリマブ、ニダニリマブ、MEDI8968、REGN6490、HB0034およびCSC012からなる群から選択される抗体由来の重鎖可変領域および／または軽鎖可変領域を含む。

【0206】

II. PD-L1を標的化する二機能性分子および第2の部分

【00238】PD-1／PD-L1軸チェックポイント阻害剤（例えば、PD-L1抗体）の治療有効性は、腫瘍微小環境（「TME」）が免疫抑制性サイトカインに富む場合に限定され得る。局在化された微小環境でのそのような免疫抑制性サイトカインのシグナル伝達は、腫瘍浸潤T細胞を低減しそれらをTregに傾け、免疫エフェクター細胞の活性化を減弱する場合がある。

10

【0207】

【00239】一態様では、本開示は、PD-L1に結合する第1の部分、およびa)免疫抑制性サイトカインの活性を遮断する、またはb)抗腫瘍免疫を刺激する第2の部分を含む新規二機能性分子を提供する。分子は、化合物、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質またはこれらの任意の組合せであり得る。第2の部分は、免疫抑制性活性もしくはサイトカインを遮断することによって、または免疫を増加させるもしくは刺激することのいずれかによって腫瘍微小環境において免疫応答を回復させ得る。

【0208】

【00240】ある特定の実施形態では、本明細書において提供される二機能性分子は、PD-L1に結合する第1の部分（すなわち、PD-L1結合性部分）、および免疫抑制性サイトカインの活性を遮断する第2の部分を含む。

20

【0209】

【00241】ある特定の実施形態では、免疫抑制性サイトカインは、トランスフォーミング増殖因子ベータ（TGF- β ）スーパーファミリー中のサイトカイン、IL-1、または血管内皮増殖因子（VEGF）を含む。ある特定の実施形態では、TGF- β スーパーファミリー中の免疫抑制性サイトカインは、骨形成タンパク質（BMP）、アクチビン、NODAL、および増殖分化因子（GDF）を含む。

【0210】

【00242】ある特定の実施形態では、免疫抑制性サイトカインはTGF- β である。ある特定の実施形態では、免疫抑制性サイトカインはIL-1である。

30

【0211】

【00243】ある特定の実施形態では、第2の部分はTGF β 結合性部分を含む。ある特定の実施形態では、第2の部分はIL-1結合性部分を含む。本明細書で使用される場合、用語「結合性部分」、「結合性断片」は、標的分子または複合体に特異的に結合する能力を有する部分または断片を指す。用語「TGF β 結合性部分」は、TGF β ファミリー（例えば、TGF β 1、TGF β 2もしくはTGF β 3）の1つまたは複数のファミリーメンバーまたはアイソフォームに特異的に結合する能力を有する部分を指す。同様に、用語「IL-1結合性部分」は、IL-1ファミリー（例えば、IL-1 α 、IL-1 β ）の1つまたは複数のファミリーメンバーに特異的に結合する能力を有する部分を指す。

40

【0212】

【00244】ある特定の実施形態では、本明細書において提供される二機能性分子は、PD-L1に結合する第1の部分（すなわち、PD-L1結合性部分）、および抗腫瘍免疫を刺激する第2の部分を含む。ある特定の実施形態では、第2の部分は、免疫賦活性ポリペプチドまたはその機能性等価物またはそのバリエーションを含む。ある特定の実施形態では、免疫賦活性ポリペプチドは、インターロイキン（IL）-2（IL-2）、IL-15、IL-21、IL-10、IL-12、IL-23、IL-27、IL-35、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、可溶性CD4、可溶性LAG-3もしくはIFN- α 、またはこれらの機能性等価物である。

【0213】

50

[00245]ある特定の実施形態では、第2の部分、免疫阻害性受容体シグナル伝達のアンタゴニストを含む。ある特定の実施形態では、免疫阻害性受容体はSIRP α である。

[0214]

[00246]ある特定の実施形態では、二機能性分子は1つまたは複数の第2の部分を含む。ある特定の実施形態では、第2の部分の1つまたは複数のものは同じ種類のものであり得る、例えばそれらそれぞれは、免疫抑制性サイトカインの活性を遮断できる、またはそれらそれぞれは抗腫瘍免疫を刺激できる。ある特定の実施形態では、第2の部分の1つまたは複数のものは異なる種類のものであり得る。ある特定の実施形態では、第2の部分のそれぞれは同じ配列を有し得る、またはアミノ酸配列中に差異を有し得る。

10

[0215]

i. TGF β 結合性部分

[00247]ある特定の実施形態では、TGF β 結合性部分は、可溶性TGF β 受容体(TGF β R)またはそのTGF β 結合性断片もしくはバリエーション、あるいはTGF β に対する抗体およびその抗原結合性断片を含む。

[0216]

[00248]「TGF β 結合性部分」は、本開示において「TGF β Trap」として参照される場合もある。したがって、PD-L1およびTGF β の両方を標的化するタンパク質は、本開示において「抗PD-L1/TGF β Trap」として参照される場合もある。

20

[0217]

[00249]ある特定の実施形態では、TGF β 結合性部分は、ヒトおよび／またはマウスTGF β に結合する。ある特定の実施形態では、TGF β 結合性部分は、TGF β シグナル伝達経路をアンタゴナイズおよび／または阻害することが可能である。ある特定の実施形態では、TGF β 結合性部分はTGF β をアンタゴナイズおよび／または阻害することが可能である。

[0218]

[00250]本開示では、TGF β 結合性部分は、TGF β ファミリーの1つまたは複数のファミリーメンバーまたはアイソフォームに特異的に結合する任意の部分を含み得る。ある特定の実施形態では、TGF β 結合性部分は、TGF β 1（例えば、ヒトTGF β 1）、TGF β 2（例えば、ヒトTGF β 2）、および／もしくはTGF β 3（例えば、ヒトTGF β 3）に結合する部分、または同様のもしくは改善されたTGF β 結合親和性を有するそのバリエーションを含む。ある特定の実施形態では、TGF β 結合性部分は、TGF β 1（例えば、ヒトTGF β 1）に結合する部分を含む。ある特定の実施形態では、TGF β 結合性部分は、TGF β 2（例えば、ヒトTGF β 2）に結合する部分を含む。ある特定の実施形態では、TGF β 結合性部分は、TGF β 3（例えば、ヒトTGF β 3）に結合する部分を含む。ある特定の実施形態では、TGF β 結合性部分は、TGF β 1（例えば、ヒトTGF β 1）およびTGF β 2（例えば、ヒトTGF β 2）の両方に特異的に結合する部分を含む。ある特定の実施形態では、TGF β 結合性部分は、TGF β 1（例えば、ヒトTGF β 1）およびTGF β 3（例えば、ヒトTGF β 3）の両方に特異的に結合する部分を含む。ある特定の実施形態では、TGF β 結合性部分は、TGF β 2（例えば、ヒトTGF β 2）およびTGF β 3（例えば、ヒトTGF β 3）の両方に特異的に結合する部分を含む。ある特定の実施形態では、TGF β 結合性部分は、TGF β 1（例えば、ヒトTGF β 1）、TGF β 2（例えば、ヒトTGF β 2）およびTGF β 3（例えば、ヒトTGF β 3）のそれぞれに特異的に結合する部分を含む。当業者は、TGF β ファミリーの1つのファミリーメンバーまたはアイソフォームに結合するTGF β 結合性部分が、TGF β ファミリーの1つまたは複数の他のファミリーメンバーまたはアイソフォームに同様のまたはより高い親和性で結合することが可能であり得ることを理解するだろう。

30

40

[0219]

50

【00251】ある特定の実施形態では、TGFβ結合性部分は、TGFβ2よりも、および／またはTGFβ3よりもTGFβ1に選択的に結合する部分を含む。

【0220】

【00252】ある特定の実施形態では、TGFβ結合性部分は、同様の親和性でヒトTGFβ1およびマウスTGFβ1に特異的に結合する部分を含む。

【0221】

【00253】ある特定の実施形態では、本開示のTGFβ結合性部分は、可溶性TGFβ受容体（TGFβR）またはそのTGFβ結合性断片もしくはバリエーションを含む。

【0222】

【00254】例示的なTGFβ受容体として、TGFβRI、TGFβRIIおよびTGFβRIIIが挙げられる。ある特定の実施形態では、TGFβ受容体は、TGFβ受容体I（TGFβRI）、TGFβ受容体II（TGFβRII）、TGFβ受容体III（TGFβRIII）およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される。ある特定の実施形態では、TGFβ受容体はTGFβRI（例えば、ヒトTGFβRI）である。ある特定の実施形態では、TGFβ受容体はTGFβRII（例えば、ヒトTGFβRII）である。ある特定の実施形態では、TGFβ受容体はTGFβRIII（例えば、ヒトTGFβRIII）である。

10

【0223】

【00255】ある特定の実施形態では、TGFβ結合性部分は、TGFβ受容体（例えば、ヒトTGFβ受容体）の細胞外ドメイン（ECD）またはそのTGFβ結合性断片もしくはバリエーションを含む。ある特定の実施形態では、TGFβ受容体のECDは、TGFβRI（例えば、ヒトTGFβRI）のECD、TGFβRII（例えば、ヒトTGFβRII）のECD、TGFβRIII（例えば、ヒトTGFβRIII）のECDまたはこれらの任意の組合せを含む。ある特定の実施形態では、TGFβRIIのECDは、配列番号66、79のアミノ酸配列、またはTGFβへの結合特異性を依然として保持する、これらに少なくとも80%（例えば、少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%）の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態では、TGFβRIのECDは、配列番号77のアミノ酸配列、またはTGFβへの結合特異性を依然として保持する、これに少なくとも80%（例えば、少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%）の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態では、TGFβRIIIのECDは、配列番号78のアミノ酸配列、またはTGFβへの結合特異性を依然として保持する、これに少なくとも80%（例えば、少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%）の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

20

30

【0224】

【00256】ある特定の実施形態では、TGFβ結合性部分は、TGFβに対する抗体およびその抗原結合性断片を含む。例示的な抗TGFβ抗体として、フレソリムマブおよびメテリムマブ、ならびに、例えば、それぞれその全体が本明細書に参照により組み込まれるUS7494651B2、US8383780B2、US8012482B2、WO2017141208A1に記載されている抗TGFβ抗体またはその抗原結合性断片を含む。

40

【0225】

【00257】ある特定の実施形態では、TGFβ結合性部分は、1つもしくは複数のTGFβ受容体の1つもしくは複数のECD、および／または1つまたは複数の抗TGFβ抗体もしくはその抗原結合性断片の組合せを含む。

【0226】

【00258】1つまたは複数のECDは、同じでも異なってもよい。例えば、TGF

50

β 結合性部分は、TGFβ 受容体のECDの同一のリピートを含み得る、または代替的に同じTGFβ 受容体の異なるECD配列の組合せを含み得る、または代替的に異なるTGFβ 受容体由来の異なるECDの組合せを含み得る。同様に、1つまたは複数の抗TGFβ 抗体は、同じでも異なってもよい。

【0227】

【00259】ある特定の実施形態では、TGFβ 結合性部分は、TGFβRI（例えば、ヒトTGFβRI）のECD、TGFβRII（例えば、ヒトTGFβRII）のECD、TGFβRIII（例えば、ヒトTGFβRIII）のECDまたはこれらの任意の組合せからなる群から選択されるECDの組合せ（または融合物）を含む。

【0228】

【00260】ある特定の実施形態では、TGFβ 結合性部分は、1つまたは複数の抗TGFβ 抗体またはその抗原結合性断片の組合せ（または融合物）を含む。

【0229】

【00261】ある特定の実施形態では、TGFβ 結合性部分は、TGFβRI（例えば、ヒトTGFβRI）のECD、TGFβRII（例えば、ヒトTGFβRII）のECD、TGFβRIII（例えば、ヒトTGFβRIII）のECD、1つもしくは複数の抗TGFβ 抗体もしくはその抗原結合性断片、またはこれらの任意の組合せからなる群から選択されるECDの組合せ（または融合物）を含む。

【0230】

i i. IL 結合性部分

【00262】ある特定の実施形態では、第2の部分はIL-1 結合性部分を含む。ある特定の実施形態では、IL-1 はIL-1 αまたはIL-1 βである。ある特定の実施形態では、IL-1 βはヒトIL-1 βである。

【0231】

【00263】ある特定の実施形態では、IL-1 結合性部分は、IL-1 αまたはIL-1 βに特異的に結合する。ある特定の実施形態では、IL-1 結合性部分は、IL-1 αよりもIL-1 βに選択的に結合する、またはIL-1 βよりもIL-1 αに選択的に結合する部分を含む。

【0232】

【00264】ある特定の実施形態では、IL-1 結合性部分は、可溶性IL-1R、IL-1RのIL-1 結合性断片もしくはバリエント、またはIL-1 に対する抗体もしくはその抗原結合性断片を含む。

【0233】

【00265】可溶性IL-1Rは、IL-1Rのドメインまたは断片またはバリエント、例えば、IL-1Rの細胞外ドメイン（ECD）を含み得る。代替的に、可溶性IL-1Rは、天然で可溶性であり、IL-1 に結合することが可能であるアイソフォームであるIL-1 sRIまたはIL-1 sRIIも含み得る。

【0234】

【00266】当業者は、IL-1Rの短縮化断片、またはIL-1RのECD、またはIL-1 sRIまたはIL-1 sRIIは、そのような断片がIL-1 結合性ドメインを含む限り、IL-1（例えば、IL-1 αまたはIL-1 β）に結合するために十分であり得ることを理解するだろう。したがって、本明細書において提供されるIL-1 結合性部分は、IL-1R、IL-1RのECD、IL-1 sRIおよびIL-1 sRIIのいずれかのIL-1 結合性断片も含み得る。ある特定の実施形態では、IL-1 結合性部分は、配列番号73、74もしくは75のアミノ酸配列またはそのIL-1 結合性断片もしくはバリエントを含む。ある特定の実施形態では、IL-1 結合性部分は、配列番号73、74および75のいずれかに少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列またはそのIL-1 結合性断片もしくはバリエントを含む。

【0235】

【00267】ある特定の実施形態では、IL-1 結合性部分は、IL-1 に対する抗体ま

10

20

30

40

50

たはその抗原結合性断片を含む。IL-1に対する抗体またはその抗原結合性断片も、そのような抗体または抗原結合性断片がIL-1（例えば、IL-1 α またはIL-1 β ）のIL-1Rへの結合に干渉できる限り使用され得る。

【0236】

【00268】ある特定の実施形態では、IL-1に対する抗体またはその抗原結合性断片は、XB2001、ルチキズマブ、LY2189102およびベルメキマブからなる群から選択される抗IL-1 α 抗体由来、またはSSGJ-613、CDP484、カナキマブおよびゲボキズマブからなる群から選択される抗IL-1 β 抗体由来の重鎖可変領域および／または軽鎖可変領域を含む。

【0237】

【00269】ある特定の実施形態では、IL-1に対する抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号104もしくは配列番号112の配列を含むHCDR1、配列番号105もしくは配列番号113の配列を含むHCDR2、および配列番号106もしくは配列番号114の配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域、ならびに／または配列番号107もしくは配列番号115の配列を含むLCDR1、配列番号108もしくは配列番号116の配列を含むLCDR2、および配列番号109もしくは配列番号117の配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域を含む。

【0238】

【00270】ある特定の実施形態では、IL-1に対する抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号104の配列を含むHCDR1、配列番号105の配列を含むHCDR2、および配列番号106の配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域、ならびに／または配列番号107の配列を含むLCDR1、配列番号108の配列を含むLCDR2、および配列番号109の配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域を含む。

【0239】

【00271】ある特定の実施形態では、IL-1に対する抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号112の配列を含むHCDR1、配列番号113の配列を含むHCDR2、および配列番号114の配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域、ならびに／または配列番号115の配列を含むLCDR1、配列番号116の配列を含むLCDR2、および配列番号117の配列を含むLCDR3を含む軽鎖可変領域を含む。

【0240】

【00272】ある特定の実施形態では、IL-1に対する抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号102、配列番号110、およびこれらに少なくとも80%の配列同一性を有するその相同性配列からなる群から選択される配列を含む重鎖可変領域、ならびに／または配列番号103、配列番号111、およびこれらに少なくとも80%の配列同一性を有するその相同性配列からなる群から選択される配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0241】

【00273】ある特定の実施形態では、IL-1に対する抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号102、およびこれに少なくとも80%の配列同一性を有するその相同性配列からなる群から選択される配列を含む重鎖可変領域、ならびに／または配列番号103、およびこれに少なくとも80%の配列同一性を有するその相同性配列からなる群から選択される配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0242】

【00274】ある特定の実施形態では、IL-1に対する抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号110、およびこれに少なくとも80%の配列同一性を有するその相同性配列からなる群から選択される配列を含む重鎖可変領域、ならびに／または配列番号111、およびこれに少なくとも80%の配列同一性を有するその相同性配列からなる群から選択される配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0243】

【00275】ある特定の実施形態では、IL-1結合性部分は、IL-1R、IL-1RのECD、IL-1sRI、IL-1sRII、IL-1に対する抗体、これらの任意の

10

20

30

40

50

IL-1 結合性断片およびこれらの任意の組合せからなる群から選択される1つまたは複数の部分の組合せを含む。そのような1つまたは複数の部分は、直接結合によって連結され得る、または適切なリンカーによって連結され得る。

【0244】

【00276】ある特定の実施形態では、IL-1 R 結合性部分は、IL-1 R a またはそのIL-1 R 結合性断片もしくはバリエーションを含む。IL-1 R a は、IL-1 R のアンタゴニストであり、IL-1 R への結合についてIL-1 αまたはIL-1 βと競合できる。同様に、当業者は、IL-1 R への結合において、および／またはIL-1 αもしくはIL-1 βとの競合において有用であることにIL-1 R a の短縮化断片が十分であり得ることを理解するだろう。ある特定の実施形態では、IL-1 R 結合性部分は、IL-1 R a の短縮形態を含む。ある特定の実施形態では、IL-1 R 結合性部分は、配列番号67のアミノ酸配列、またはその任意のIL-1 結合性断片もしくはバリエーションを含む。ある特定の実施形態では、IL-1 R 結合性部分は、配列番号67に少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列、またはその任意のIL-1 結合性断片もしくはバリエーションを含む。当業者は、野生型IL-1 R a のバリエーションも、そのようなバリエーションがIL-1 R との結合についてIL-1 αまたはIL-1 βと競合することが可能である限り、本開示において有用であり得ることを理解するだろう。

10

【0245】

【00277】ある特定の実施形態では、IL-1 R 結合性部分は、IL-1 R に対する抗体またはその抗原結合性断片を含む。IL-1 R に対する抗体またはその抗原結合性断片も、そのような抗体または抗原結合性断片がIL-1 R との結合についてIL-1 αまたはIL-1 βと競合できる限り使用され得る。

20

【0246】

【00278】ある特定の実施形態では、IL-1 R 結合性部分は、IL-1 R a 、IL-1 R に対する抗体、その任意のIL-1 R 結合性断片またはバリエーションおよびこれらの任意の組合せからなる群から選択される1つまたは複数の部分の組合せを含む。そのような1つまたは複数の部分は、直接結合によって連結され得る、または適切なリンカーによって連結され得る。

【0247】

【00279】ある特定の実施形態では、IL-1 R に対する抗体またはその抗原結合性断片は、スベソリマブ、アステゴリマブ、イムシドリマブ、AMG108、メルリリマブ、ニダニリマブ、MED18968、REGN6490、HB0034およびCSC012からなる群から選択される抗体由来の重鎖可変領域および／または軽鎖可変領域を含む。

30

【0248】

i i i . 免疫賦活性ポリペプチド

【00280】ある特定の実施形態では、第2の部分は、免疫賦活性ポリペプチドまたはその機能性等価物またはそのバリエーションを含む。ある特定の実施形態では、免疫賦活性ポリペプチドは、可溶性CD4、可溶性LAG-3またはこれらの機能性等価物である。

【0249】

【00281】ある特定の実施形態では、可溶性LAG-3は、LAG-3の細胞外ドメイン(ECD)もしくはMHCクラスII(MHCI)結合性断片またはそのバリエーションを含む。

40

【0250】

【00282】LAG-3(Uniprot番号:Q61790)は、免疫グロブリン(Ig)スーパーファミリーに属し、503アミノ酸を含むI型膜貫通タンパク質である。LAG-3は、細胞内ドメイン(ICD)、膜貫通ドメイン(TMD)および細胞外ドメイン(ECD)を含む。ECDは、4つのIg様ドメイン、すなわち、D1からD4を含み、ここで、D1は、9個のβ鎖、A、B、C、C'、C''、D、E、FおよびG鎖を含む。C鎖とC'鎖との間には、「エクストラループ」を形成する約30アミノ酸を有する追加的配列がある。そのような「エクストラループ」は、LAG-3とMHCIとの間の

50

相互作用に關与すると報告されている。ある特定の実施形態では、可溶性LAG-3は、エクストラープ、D1ドメイン、D1プラスD2ドメイン、またはこれらの任意のMHC II結合性断片もしくはバリエーションのアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態では、可溶性LAG-3は、配列番号99、配列番号100、配列番号101またはこれらの任意のMHC II結合性断片もしくはバリエーションのアミノ酸配列を含む。

【0251】

【00283】LAG-3は、活性化T細胞、ナチュラルキラー細胞、B細胞および形質細胞様樹状細胞で発現される。その主要なリガンドは、MHCクラスIIであり、CD4よりも高い親和性を有してそれに結合する。接続ペプチド(CP)は、LAG-3のD4とTMDとの間に存在し、ここでメタロプロテイナーゼADAM10および／またはADAM17の存在で切断が生じ、切断された可溶性LAG-3を産生する。例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Huardら、Proc Natl Acad Sci U S A 1997; 94: 5744~9.; Workmanら、J Immunol 2002; 169: 5392~5. doi: 10. 4049/ jimmunol. 169. 10. 5392; およびLawrenceら、J Immunother Cancer. 2015; 3 (Suppl 2): P216を参照されたい。

【0252】

【00284】LAG-3は、LAG-3の可溶性形態に翻訳される代替的スプライスバリエーションもコードする。可溶性LAG-3は、MHC IIシグナル伝達を通じて抗原提示細胞(APC)を活性化し、in vivoで抗原特異的T細胞応答の増加をもたらす。例えば、可溶性LAG-3は、樹状細胞(DC)を活性化し、サイトカイン活性化(例えば、TNF-αおよび／またはIL-12活性化)バイスタンダーT細胞の炎症誘発活性に關与することが報告されており、DCを直接活性化し得る。例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Triebel、Trends Immunol.、2003、24: 619~622を参照されたい。

【0253】

【00285】ある特定の実施形態では、可溶性LAG-3は、エフチラギモドアルファ(IMP321)またはそのMHC II結合性断片もしくはバリエーションを含む。IMP321は、LAG-3の可溶性二量体組換え形態である。IMP321は、MHC II分子を通じて樹状細胞を刺激することによって持続性の免疫応答を誘導する。MP321と抗PD-1抗体または抗PD-L1抗体との組合せ療法は、T細胞を相乗的に活性化することが示されている(特に、CD8+T細胞)。例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Lucら、Future Oncol Actions Search in PubMed Search in NLM Catalog Add to Search. 2019 Jun; 15 (17): 1963~1973. doi: 10. 2217/ fon-2018-0807. Epub 2019 Apr 12.; Julioら、Journal of Clinical Oncology, Volume 37, Issue 15; およびUS10874713Bを参照されたい。

【0254】

i v. 免疫阻害性受容体シグナル伝達のアнтаゴニスト

【00286】ある特定の実施形態では、第2の部分は、免疫阻害性受容体シグナル伝達のアнтаゴニストを含む。ある特定の実施形態では、免疫阻害性受容体は、SIRPαである。

【0255】

【00287】本明細書で使用される場合、用語「SIRPα」は、用語「シグナル制御タンパク質アルファ」と互換的に、主に骨髓性細胞および樹状細胞上で発現される阻害性受容体を指す。SIRPαは、SIRPβおよびSIRPγが挙げられるいくつかの他の膜貫通糖タンパク質も含むSIRPファミリーに属する。SIRPファミリーの各メンバーは、3つの同様の細胞外Ig様ドメインと共に別個の膜貫通および細胞質ドメインを含有する。

10

20

30

40

50

【0256】

[00288] S I R P α は、ファゴサイトーシスを抑制するように「私を食べないで (don't eat me)」シグナルを送達する C D 4 7 に結合でき、貪食細胞上の S I R P α の C D 4 7 媒介係合を遮断することは「私を食べて (eat me)」シグナルを保有する生細胞の除去を生じ得る。C D 4 7 は、細胞外 N 末端 I g V ドメイン、5 つの膜貫通ドメインおよび短い C 末端細胞内テールを有する広範に発現される膜貫通糖タンパク質である。C D 4 7 は、S I R P α についての細胞性リガンドとして機能する。腫瘍細胞は、マクロファージ媒介破壊を回避するために C D 4 7 をしばしば過剰発現する。C D 4 7 と S I R P α との相互作用は、マクロファージ媒介ファゴサイトーシスの制御に関与することが示されている (Takenaka ら、Nature Immunol.、8 (12) : 1313 ~ 1323、2007)。

10

【0257】

[00289] ある特定の実施形態では、第 2 の部分は、C D 4 7 と S I R P α との間の相互作用を遮断する。さまざまな前臨床モデルにおいて、C D 4 7 と S I R P α との相互作用を遮断する治療は、in vitro でがん細胞のファゴサイトーシスおよび in vivo で抗腫瘍免疫応答を刺激する。

【0258】

[00290] 第 2 の部分は、C D 4 7 結合性ドメインまたは S I R P α 結合性ドメインを含み得る。ある特定の実施形態では、免疫阻害性受容体は、シグナル制御タンパク質アルファ (S I R P α) である。ある特定の実施形態では、第 2 の部分は、C D 4 7 と S I R P α との間の相互作用を遮断する。ある特定の実施形態では、第 2 の部分は、C D 4 7 結合性ドメインまたは S I R P α 結合性ドメインを含む。ある特定の実施形態では、C D 4 7 結合性ドメインは、可溶性 S I R P α もしくはその C D 4 7 結合性断片、または抗 C D 4 7 抗体もしくはその抗原結合性断片を含む。

20

【0259】

[00291] ある特定の実施形態では、可溶性 S I R P α は、S I R P α の細胞外ドメイン (E C D) またはその C D 4 7 結合性断片もしくはバリエーションを含む。ある特定の実施形態では、可溶性 S I R P は、配列番号 84 のアミノ酸配列、または C D 4 7 に対する結合特異性を依然として保持する、少なくとも 80 % (例えば、少なくとも 85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 % または 99 %) の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。任意選択で、可溶性 S I R P は、操作された高親和性 S I R P バリエーションであり、がん細胞で C D 4 7 を強くアンタゴナイズしたが、それ自体はマクロファージファゴサイトーシスを誘導しない。ある特定の実施形態では、S I R P バリエーションは、配列番号 98 と比較して、L 4 V、L 4 I、V 6 I、V 6 L、A 21 V、V 27 I、V 27 L、I 31 T、I 31 S、I 31 F、E 47 V、E 47 L、K 53 R、E 54 Q、H 56 P、H 56 R、V 63 I、S 66 T、S 66 G、K 68 R、V 92 I、F 94 L、F 94 V および F 103 V からなる群から選択される 1 つまたは複数の変異を含む。ある特定の実施形態では、S I R P α バリエーションは、1) V 27 I、K 53 R、S 66 T、K 68 R、F 103 V ; 2) L 4 V、V 27 L、E 47 V、K 53 R、E 54 Q、S 66 G、K 68 R、V 92 I ; 3) L 4 V、V 6 I、A 21 V、V 27 I、I 31 T、E 47 L、K 53 R、H 56 P、S 66 T、K 68 R、F 94 L ; 4) V 6 I、V 27 I、I 31 S、E 47 V、K 53 R、E 54 Q、H 56 P、S 66 G、V 92 I、F 94 L ; 5) L 4 I、A 21 V、V 27 I、I 31 F、E 47 V、K 53 R、E 54 Q、H 56 R、S 66 G、F 94 V、F 103 V ; 6) L 4 V、V 6 I、V 27 I、I 31 F、E 47 V、K 53 R、H 56 R、S 66 G、K 68 R、V 92 I、F 94 L ; 7) L 4 V、V 6 L、I 31 F、E 47 V、K 53 R、H 56 P、S 66 G、V 92 I、F 103 V ; 8) V 6 I、V 27 I、I 31 F、E 47 L、K 53 R、E 54 Q、H 56 P、S 66 T ; 9) L 4 V、V 6 I、V 27 I、I 31 F、E 47 V、K 53 R、E 54 Q、H 56 P、V 63、S 66 T、K 68 R、V 92 I ; 10) V 6 I、V 27 I、I 31 T、E 47 V、K 53 R、E 54 Q、H 56 P

30

40

50

、S 6 6 G、K 6 8 R、V 9 2 I、F 1 0 3 V；および 1 1) V 6 I、V 2 7 I、I 3 1 F、E 4 7 V、K 5 3 R、E 5 4 Q、H 5 6 P、S 6 6 T、V 9 2 I からなる群から選択される変異の組合せを含む。例えば、参照により本明細書に組み込まれる、K i p p W e i s k o p f ら、S c i e n c e 3 4 1、8 8 (2 0 1 3) を参照されたい。

【0260】

【00292】ある特定の実施形態では、S I R P α 結合性ドメインは、可溶性 C D 4 7 もしくはその S I R P α 結合性断片、または抗 S I R P α 抗体もしくはその抗原結合性断片を含む。ある特定の実施形態では、可溶性 C D 4 7 は、C D 4 7 の細胞外ドメイン (E C D) またはその S I R P α 結合性断片、抗 S I R P α 抗体またはその抗原結合性断片を含む。

10

【0261】

【00293】ある特定の実施形態では、C D 4 7 結合性ドメインは、抗 C D 4 7 抗体およびその抗原結合性断片を含む。例示的な抗 C D 4 7 抗体として、限定することなく、ヒト化 5 F 9 抗体、B 6 H 1 2 抗体および Z F 1 抗体が挙げられる。参照により本明細書に組み込まれる、L u ら、O n c o T a r g e t s a n d T h e r a p y、V o l u m e 1 3、D O I <https://doi.org/10.2147/OTT.S249822> を参照されたい。ある特定の実施形態では、S I R P α 結合性ドメインは、抗 S I R P α 抗体またはその抗原結合性断片を含む。例示的な抗 S I R P α 抗体として、限定することなく B I 7 6 5 0 6 4 および A L 0 0 8 が挙げられる。例えば、参照により本明細書に組み込まれる、W O 2 0 1 9 0 7 3 0 8 0 A 1、W O 2 0 1 9 1 7 5 2 1 8 A 1 および W O 2 0 1 8 1 0 7 0 5 8 A 1 を参照されたい。

20

【0262】

【00294】ある特定の実施形態では、C D 4 7 結合性ドメインは、1 つもしくは複数の S I R P α 、S I R P β もしくは S I R P γ および／または 1 つもしくは複数の抗 C D 4 7 抗体もしくはその抗原結合性断片の 1 つまたは複数の E C D の組合せを含む。

【0263】

【00295】1 つまたは複数の E C D は、同じでも異なってもよい。例えば、C D 4 7 結合性ドメインは、S I R P α 、S I R P β もしくは S I R P γ の E C D の同一の反復を含み得る、または代替的に、同じ S I R P α 、S I R P β もしくは S I R P γ の異なる E C D 配列の組合せを含み得る、または代替的に異なる S I R P α 、S I R P β もしくは S I R P γ 由来の異なる E C D の組合せを含み得る。同様に、1 つまたは複数の抗 C D 4 7 抗体は、同じでも異なってもよい。

30

【0264】

【00296】ある特定の実施形態では、C D 4 7 結合性ドメインは、S I R P α の E C D、S I R P β の E C D、S I R P γ の E C D、またはこれらの任意の組合せからなる群から選択される E C D の組合せ（または融合物）を含む。

【0265】

【00297】ある特定の実施形態では、C D 4 7 結合性ドメインは、1 つまたは複数の抗 C D 4 7 抗体またはその抗原結合性断片の組合せ（または融合物）を含む。

【0266】

【00298】ある特定の実施形態では、C D 4 7 結合性ドメインは、S I R P α の E C D、S I R P β の E C D、S I R P γ の E C D、1 つもしくは複数の抗 C D 4 7 抗体もしくはその抗原結合性断片、またはこれらの任意の組合せからなる群から選択される E C D の組合せ（または融合物）を含む。

40

【0267】

v. P D - L 1 結合性部分

【00299】ある特定の実施形態では、本明細書において提供される二機能性分子は、P D - L 1 結合性部分である第 1 の部分を含む。

【0268】

【00300】ある特定の実施形態では、本開示の P D - L 1 結合性部分は、P D - L 1 (

50

例えば、ヒトPD-L1またはカニクイザルPD-L1)に結合する。ある特定の実施形態では、本開示のPD-L1結合性部分は、ヒトPD-L1に結合する。ある特定の実施形態では、本開示のPD-L1結合性部分は、カニクイザルPD-L1に結合する。

【0269】

【00301】ある特定の実施形態では、本開示のPD-L1結合性部分は、抗PD-L1抗体部分を含む。ある特定の実施形態では、例示的な抗PD-L1抗体は、本開示の抗PD-L1抗体の章および例示的な抗PD-L1抗体の章に開示される。

【0270】

【00302】ある特定の実施形態では、抗PD-L1抗体部分は、1つまたは複数のCDRを含む。ある特定の実施形態では、抗PD-L1抗体部分は、本開示の例示的な抗PD-L1抗体の章に開示される1つまたは複数のCDRを含む。ある特定の実施形態では、抗PD-L1抗体部分は、重鎖可変領域(VH)および軽鎖可変領域(VL)を含む。ある特定の実施形態では、抗PD-L1抗体部分は、本開示の例示的な抗PD-L1抗体の章に開示される抗PD-L1抗体のVHおよびVLを含む。

【0271】

【00303】ある特定の実施形態では、抗PD-L1抗体部分は、重鎖可変領域のカルボキシル末端に付加された重鎖定常ドメインをさらに含む。ある特定の実施形態では、重鎖定常領域は、IgA、IgGおよびIgMからなる群由来である。ある特定の実施形態では、重鎖定常領域は、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2またはIgM由来である。ある特定の実施形態では、抗PD-L1抗体部分は、軽鎖可変領域のカルボキシル末端に付加された軽鎖定常ドメインをさらに含む。ある特定の実施形態では、軽鎖定常領域は、カッパ軽鎖またはラムダ軽鎖由来である。ある特定の実施形態では、重鎖定常領域は、配列番号80または81のアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態では、軽鎖定常領域は、配列番号82のアミノ酸配列を含む。

【0272】

v i . 第1の部分と第2の部分との間の連結

【00304】本開示では、第2の部分は、第1の部分の任意の一部分に連結され得る。例えば、TGFβ結合性部分またはIL-1結合性部分などの第2の部分は、PD-L1結合性部分(例えば、抗PD-L1抗体部分)などの第1の部分の任意の好適な一部分に連結され得る。

【0273】

【00305】ある特定の実施形態では、PD-L1結合性部分は、抗体重鎖および軽鎖などの1つまたは複数のポリペプチド鎖を含む。

【0274】

【00306】ある特定の実施形態では、二機能性分子は、1つまたは複数の第2の部分を含む。ある特定の実施形態では、第2の部分の少なくとも1つは第1の部分のポリペプチド鎖のアミノ末端(N末端)またはカルボキシル(C末端)に連結される。ある特定の実施形態では、第2の部分の少なくとも1つは第1の部分の重鎖のN末端もしくはC末端に連結される、または第1の部分の軽鎖のN末端もしくはC末端に連結される。

【0275】

【00307】ある特定の実施形態では、第2の部分の少なくとも1つは第1の部分の重鎖定常領域のC末端に連結される。ある特定の実施形態では、第2の部分のそれぞれは、第1の部分の各重鎖定常領域のC末端にそれぞれ連結される。

【0276】

【00308】ある特定の実施形態では、二機能性分子は、第2の部分の少なくとも2つを含み、そのそれぞれは、第1の部分の各重鎖のC末端にそれぞれ連結されるか、または第1の部分の各軽鎖のC末端にそれぞれ連結される。ある特定の実施形態では、二機能性分子は、第2の部分の少なくとも2つを含み、そのそれぞれは、第1の部分の各重鎖のN末端にそれぞれ連結されるか、または第1の部分の各軽鎖のN末端にそれぞれ連結される。

【0277】

[00309]ある特定の実施形態では、二機能性分子は、第1の部分の重鎖のN末端、第1の部分の重鎖のC末端、第1の部分の軽鎖のN末端、第1の部分の軽鎖のC末端、またはこれらの任意の組合せにそれぞれ連結された第2の部分の1つより多くを含む。例えば、二機能性分子は、第2の部分の少なくとも2つを含んでよく、その一方は第1の部分の重鎖のC末端に連結され、他方は第1の部分の軽鎖のC末端に連結される。例えば、二機能性分子は、第2の部分の少なくとも2つを含んでよく、その一方は第1の部分の重鎖のN末端に連結され、他方は第1の部分の軽鎖のN末端に連結される。

[0278]

[00310]ある特定の実施形態では、1つまたは複数のTGFβ結合性部分、1つもしくは複数のIL-1結合性部分、1つもしくは複数の免疫賦活性ポリペプチド（例えば、可溶性LAG3もしくは可溶性CD4）または1つもしくは複数のCD47結合性部分は、抗PD-L1抗体部分に、抗PD-L1抗体部分の1）重鎖可変領域のN末端、2）軽鎖可変領域のN末端、3）重鎖可変領域のC末端；4）軽鎖可変領域のC末端；5）重鎖定常領域のC末端；6）軽鎖定常領域のC末端、および7）これらの任意の組合せからなる群から選択される1つまたは複数の位置で連結される。

10

[0279]

[00311]ある特定の実施形態では、二機能性分子はホモ二量体重鎖を含む。ある特定の実施形態では、二機能性分子はヘテロ二量体重鎖を含む。重鎖は、第2の部分の存在または位置に関してヘテロ二量体性である。ある特定の実施形態では、ヘテロ二量体重鎖は、第2の部分の有する一方の重鎖およびそれを有さない他方の重鎖を含む。

20

[0280]

v i i . リンカー

[00312]第2の部分は、第1の部分に直接またはリンカーを介して連結され得る。直接の連結は、化学的連結（共有結合など）であり得る。

[0281]

[00313]ある特定の実施形態では、二機能性分子は、第1の部分と第2の部分とを繋ぐリンカーをさらに含む。本明細書で使用される場合、用語「リンカー」は、連結される少なくとも2つの実体と反応し、それにより1つの分子を形成するように実体を結合する、または十分に近い近接で実体の会合を維持することが可能である任意の好適な二機能性部分であり得る。リンカーは、反応したその官能基と共にまたはこれを伴わずに、生じた連結された分子または構造中に組み込まれ得る。

30

[0282]

[00314]ある特定の実施形態では、リンカーは、切断性リンカー、非切断性リンカー、ペプチドリinker、可動性リンカー、剛性リンカー、ヘリックスリンカー、および非ヘリックスリンカーからなる群から選択される。

[0283]

[00315]ある特定の実施形態では、リンカーはペプチドリinkerを含む。ペプチドリinkerは、ペプチド結合によって互いに連結されたアミノ酸残基から作られていてよい。ある特定の実施形態では、ペプチドリinkerは、1つまたは複数の非天然アミノ酸をさらに含み得る。ある特定の実施形態では、ペプチドリinkerは、ペプチド結合によって繋がれ、2つ以上のポリペプチドを連結することが可能である少なくとも1、2、3、4、5、8、10、15、20、30、50またはこれを超えるアミノ酸残基を有するアミノ酸配列を含む。ペプチドリinkerは、二次構造を有する場合と有さない場合がある。

40

[0284]

[00316]任意の好適なペプチドリinkerは使用され得る。多数のペプチドリinker配列が当技術分野において公知である、例えば、Holligerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444~6448 (1993); Poljakら、Structure 2: 1121~1123 (1994)を参照されたい。ある特定の実施形態では、ペプチドリinkerは、アミノ酸グリシン、セリン、アラニン、メチオニン、アスパラギンおよびグルタミンから選択されるアミノ酸残基を含み得るか、またはこ

50

れからなり得る。一部の実施形態では、ペプチドリンカーは、グリシンおよびアラニンなどの立体障害のないアミノ酸が大部分で作製され得る。一部の実施形態では、リンカーは、ポリグリシン、ポリアラニン、グリシンとアラニンとの組合せ（例えば、ポリ（G l y - A l a））またはグリシンとセリンとの組合せ（例えば、ポリ（G l y - S e r））である。

【0285】

【00317】ある特定の実施形態では、リンカーは、（（G）*n*S）*m*のアミノ酸配列を含み、式中、*m*および*n*は、独立的に0から30、1から29、2から28、3から27、4から26、5から25、6から24、7から23、8から22、9から21、10から20、11から19、12から18、13から17、14から16または5から選択される整数である。ある特定の実施形態では、*m*は4であり、*n*は4である。

10

【0286】

【00318】ある特定の実施形態では、リンカーは、配列番号68のアミノ酸配列を含む。ある特定の実施形態では、リンカーは、配列番号68に少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0287】

v i i i . 抗PD-L1抗体およびその抗原結合性断片

【00319】ある特定の実施形態では、本明細書において提供される二機能性分子のPD-L1結合性部分は、抗PD-L1抗体またはその抗原結合性断片を含む部分を含む。ある特定の実施形態では、抗PD-L1抗体およびその抗原結合性断片は、PD-L1に特異的に結合することが可能である。

20

【0288】

【00320】ある特定の実施形態では、本明細書において提供される抗PD-L1抗体およびその抗原結合性断片は、Biacoreアッセイによる測定で、ヒトPD-L1に0.8 nM以下、0.7 nM以下、0.6 nM以下、0.5 nM以下、または0.4 nM以下のK_D値で特異的に結合する。Biacoreアッセイは、表面プラズモン共鳴技術に基づく、例えば、Murphy, M.ら、Current protocols in protein science、Chapter 19、unit 19.14、2006を参照されたい。ある特定の実施形態では、K_D値は、本開示の実施例6に記載の方法によって測定される。

30

【0289】

【00321】本明細書において提供される抗体またはその抗原結合性断片のヒトPD-L1への結合は、その最大結合の50%が観察される抗体の濃度を指す「最大半量有効濃度」（EC₅₀）値によっても表され得る。EC₅₀値は、当技術分野において公知の結合アッセイ、例えば、酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）、蛍光励起細胞選別（FACS）アッセイおよび他の結合アッセイなどの直接的または間接的結合アッセイによって測定され得る。ある特定の実施形態では、本明細書において提供される抗体およびその抗原結合性断片は、ELISAによる測定で0.3 nM以下、0.2 nM以下、0.1 nM以下または0.09 nM以下のEC₅₀（すなわち、50%結合濃度）でPD-L1に特異的に結合する。ある特定の実施形態では、本明細書において提供される抗体またはその抗原結合性断片は、FACSアッセイによる測定で1.4 nM以下、1.3 nM以下、1.2 nM以下、1.1 nM以下、1.0 nM以下、0.3 nM以下、0.25 nM以下または0.21 nM以下のEC₅₀（すなわち、50%結合濃度）でPD-L1に特異的に結合する。

40

【0290】

【00322】一部の実施形態では、本明細書において提供される抗PD-L1抗体またはその抗原結合性断片は、PD-L1に特異的に結合する。一部の実施形態では、本明細書において提供される抗PD-L1抗体またはその抗原結合性断片は、B7ファミリーの他

50

のメンバーに結合しない。

【0291】

【00323】ある特定の実施形態では、本明細書において提供される抗PD-L1抗体およびその抗原結合性断片は、PD-L1とその結合パートナー（例えば、PD-1およびB7-1）との間の相互作用を、ELISAによる測定で2.2、2.1、2.0、1.9、1.8または1.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下のIC50を有して遮断することが可能である。

【0292】

【00324】ある特定の実施形態では、本明細書において提供される抗PD-L1抗体およびその抗原結合性断片は、PD-L1とその結合パートナー（例えば、PD-1、）との間の相互作用を、細胞ベースのアッセイによる測定で1.3、1.2、1.1、1.0、0.9または0.8 nM以下のEC50を有して遮断することが可能である。

【0293】

i x. 例示的な抗PD-L1抗体およびその抗原結合性断片

【00325】ある特定の実施形態では、本開示の抗PD-L1抗体（すなわち、PD-L1に対する抗体）およびその抗原結合性断片は、DY Y M N（配列番号1）、D I N P N N X₁ X₂ T X₃ Y N H K F K G（配列番号19）、W G D G P F A Y（配列番号3）、K A S Q N V X₄ X₅ X₆ V A（配列番号20）、S X₇ S X₈ R Y T（配列番号21）、Q Q Y S N Y P T（配列番号6）からなる群から選択される配列を含む1つまたは複数（例えば、1、2、3、4、5または6つ）のCDRを含み、式中、X₁はGまたはAであり、X₂はGまたはDまたはQまたはEまたはLであり、X₃はSまたはMまたはQまたはLまたはVであり、X₄はGまたはPまたはKであり、X₅はAまたはGであり、X₆はAまたはIであり、X₇はAまたはNまたはRまたはVであり、X₈はNまたはHまたはVまたはDである。

【0294】

【00326】ある特定の実施形態では、重鎖可変領域は、

- a) 配列番号1の配列を含むHCDR1、
 - b) 配列番号2、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号17および配列番号18からなる群から選択される配列を含むHCDR2、ならびに
 - c) 配列番号3の配列を含むHCDR3、
- を含み、かつ／または
- d) 配列番号4、配列番号7、配列番号8および配列番号9からなる群から選択される配列を含むLCDR1、
 - e) 配列番号5、配列番号10、配列番号11および配列番号12からなる群から選択される配列を含むLCDR2、ならびに
 - f) 配列番号6の配列を含むLCDR3
- を含む。

【0295】

【00327】ある特定の実施形態では、重鎖可変領域は、

- g) 配列番号1の配列を含むHCDR1、配列番号2の配列を含むHCDR2、および配列番号3の配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域；
- h) 配列番号1の配列を含むHCDR1、配列番号13の配列を含むHCDR2、および配列番号3の配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域；
- i) 配列番号1の配列を含むHCDR1、配列番号14の配列を含むHCDR2、および配列番号3の配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域；
- j) 配列番号1の配列を含むHCDR1、配列番号15の配列を含むHCDR2、および配列番号3の配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域；ならびに
- k) 配列番号1の配列を含むHCDR1、配列番号17の配列を含むHCDR2、および配列番号3の配列を含むHCDR3を含む重鎖可変領域；ならびに
- l) 配列番号1の配列を含むHCDR1、配列番号18の配列を含むHCDR2、および

配列番号 3 の配列を含む H C D R 3 を含む重鎖可変領域
からなる群から選択される。

【0296】

【00328】ある特定の実施形態では、軽鎖可変領域は、

- a) 配列番号 4 の配列を含む L C D R 1、配列番号 5 の配列を含む L C D R 2、および配列番号 6 の配列を含む L C D R 3 を含む軽鎖可変領域；
 - b) 配列番号 9 の配列を含む L C D R 1、配列番号 5 の配列を含む L C D R 2、および配列番号 6 の配列を含む L C D R 3 を含む軽鎖可変領域；
 - c) 配列番号 8 の配列を含む L C D R 1、配列番号 5 の配列を含む L C D R 2、および配列番号 6 の配列を含む L C D R 3 を含む軽鎖可変領域；
 - d) 配列番号 4 の配列を含む L C D R 1、配列番号 12 の配列を含む L C D R 2、および配列番号 6 の配列を含む L C D R 3 を含む軽鎖可変領域；ならびに
 - e) 配列番号 4 の配列を含む L C D R 1、配列番号 11 の配列を含む L C D R 2、および配列番号 6 の配列を含む L C D R 3 を含む軽鎖可変領域
- からなる群から選択される。

【0297】

【00329】本明細書で使用される場合、抗体「4B6」は、配列番号 46 の配列を有する重鎖可変領域、および配列番号 47 の配列を有する軽鎖可変領域を含むモノクローナル抗体を指す。

【0298】

【00330】ある特定の実施形態では、本開示は、抗体 4B6 または抗体 4B6 のバリエーションの 1 つまたは複数（例えば、1、2、3、4、5 または 6 つ）の C D R 配列を含む抗 P D - L 1 抗体およびその抗原結合性断片を提供する。C D R 境界は、K a b a t の慣例によって定義されたか、または同定された。

【0299】

【00331】ある特定の実施形態では、本開示は、配列番号 1 のアミノ酸配列を含む H C D R 1、配列番号 2、13、14、15、17 および 18 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む H C D R 2、ならびに配列番号 3 のアミノ酸配列を含む H C D R 3、ならびに／または配列番号 4、7、8～9 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む L C D R 1、配列番号 5、10、11～12 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む L C D R 2、ならびに配列番号 6 のアミノ酸配列を含む L C D R 3 を含む抗 P D - L 1 抗体およびその抗原結合性断片を提供する。

【0300】

【00332】

【0301】

【表 2】

表 1. 抗体 4B6 の CDR アミノ酸配列

抗体	領域	CDR1	CDR2	CDR3
4B6	HCDR	配列番号 1 DYVMN	配列番号 2 DINPNNGGTSYNHKE KG	配列番号 3 WGDGPFAY
	LCDR	配列番号 4 KASQNVGAAVA	配列番号 5 SASNRYT	配列番号 6 QQYSNYPT

【0302】

【00333】

【0303】

【表 3】

表 2. 抗体 4B6 の可変領域アミノ酸配列

抗体	VH	VL
4B6	配列番号 46 EVQLQQSGPELVKPGASVKISC KASGYVFTDYIMNWVKQSHG KSLEWIGDINPNNGGTSYNHKF KGKATVTVDKSSRTAYMELLSL TSEDSAVYYCVKWGDGPFAYW GQGTLVTVSA	配列番号 47 DIVMTQSQKFMSTSVGDRVS ITCKASQNVGA AVAWYQQK PGQSPKLLIYSASNRYTGVP DRFTGSGSGTDFTLTISNMQS EDLADYFCQQYSNYPTFGSG TKLGIK

10

【0304】

【00334】CDRは、抗原結合に関与することが公知である。しかし、6つのCDRのすべてが不可欠または変更不能であるのではないことが見出された。言い換えると、抗PD-L1抗体4B6中の1つまたは複数のCDRは、PD-L1への特異的結合親和性を実質的に依然として保持して置き換えるか、変更するか、または改変することが可能である。

20

【0305】

【00335】ある特定の実施形態では、本明細書において提供される抗体およびその抗原結合性断片は、抗体およびその抗原結合性断片がPD-L1に特異的に結合できる限り、好適なフレームワーク領域（FR）配列を含む。上の表1に提供されるCDR配列は、マウス抗体から得られるが、それらは、組換え技術などの当技術分野において公知の好適な方法を使用して、特にマウス、ヒト、ラット、ウサギなどの任意の好適な種の任意の好適なFR配列に移植され得る。

【0306】

【00336】ある特定の実施形態では、本明細書において提供される抗体およびその抗原結合性断片は、ヒト化されている。ヒト化抗体またはその抗原結合性断片は、ヒトでのその免疫原性の低減において望ましい。ヒト化抗体は、非ヒトCDR配列がヒトまたは実質的にヒトのFR配列に移植されていることから、その可変領域においてキメラである。抗体または抗原結合性断片のヒト化は、非ヒト（例えば、マウス）CDR遺伝子でヒト免疫グロブリン遺伝子中の対応するヒトCDR遺伝子を置換することによって基本的な実施され得る（例えば、Jonesら、（1986）Nature 321:522~525; Riechmannら、（1988）Nature 332:323~327; Verhoevenら、（1988）Science 239:1534~1536を参照されたい）。

30

【0307】

【00337】好適なヒト重鎖および軽鎖可変ドメインは、当技術分野において公知の方法を使用してこの目的を達成するために選択され得る。例示的な例では、「ベストフィット」アプローチは、使用されてよく、ここで、非ヒト（例えば、げっ歯類）抗体可変ドメイン配列は、公知のヒト可変ドメイン配列のデータベースに対してスクリーニングされるかまたはBLASTされ、非ヒトクエリー配列に最も近いヒト配列が非ヒトCDR配列を移植するためのヒトスキャホールドとして同定され、使用される（例えば、Simsら、（1993）J. Immunol. 151:2296; Chothiaら、（1987）J. Mol. Biol. 196:901を参照されたい）。代替的に、すべてのヒト抗体のコンセンサス配列由来のフレームワークは、非ヒトCDRの移植のために使用され得る（例えば、Carterら、（1992）Proc. Natl. Acad. Sci. USA

40

50

、89:4285; Prestaら、(1993) J. Immunol.、151:2623を参照されたい)。

【0308】

【00338】一部の実施形態では、本開示は、4B6の12個のヒト化抗体を提供し、それらはそれぞれ、Hu4B6__Hg.2La.1、Hu4B6__Hg.2La.2、Hu4B6__Hg.2La.4、Hu4B6__Hg.2La.6、Hu4B6__Hg.3La.1、Hu4B6__Hg.3La.2、Hu4B6__Hg.3La.4、Hu4B6__Hg.3La.6、Hu4B6__Hg.5La.1、Hu4B6__Hg.5La.2、Hu4B6__Hg.5La.4およびHu4B6__Hg.5La.6と名付けられる。4B6の各ヒト化抗体の重鎖および軽鎖可変領域の配列番号は、表5に示される。4B6の12個のヒト化抗体それぞれのCDRは、表5（下線付き配列）に示される。CDR境界は、Kabattの慣例によって定義されたか、または同定された。

10

【0309】

【00339】下の表3aは、ヒト化4B6についてのバリエーションCDRのアミノ酸配列を示し、下の表3bは、ヒト化4B6重鎖および軽鎖可変領域についてのFRを示す。下の表4は、キメラ抗体4B6についての12個のヒト化抗体の各重鎖および軽鎖についてのFRアミノ酸配列を示し、それらはそれぞれ、Hu4B6__Hg.2La.1、Hu4B6__Hg.2La.2、Hu4B6__Hg.2La.4、Hu4B6__Hg.2La.6、Hu4B6__Hg.3La.1、Hu4B6__Hg.3La.2、Hu4B6__Hg.3La.4、Hu4B6__Hg.3La.6、Hu4B6__Hg.5La.1、Hu4B6__Hg.5La.2、Hu4B6__Hg.5La.4およびHu4B6__Hg.5La.6と名付けられる。これら12個のヒト化抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域は表5に示される。

20

【0310】

【00340】

【0311】

【表4】

表 3a. 4B6 のヒト化抗体についての CDR バリエーションのアミノ酸配列

配列番号	配列	注釈
7	KASQNVGAIVA	4B6-L-CDR1-1
8	KASQNVPAAVA	4B6-L-CDR1-2
9	KASQNVKGAVA	4B6-L-CDR1-3
10	SNSHRYT	4B6-L-CDR2-1
11	SRSVRYT	4B6-L-CDR2-2
12	SVSDRYT	4B6-L-CDR2-3
13	DINPNNADTMYNHKFKG	4B6-H-CDR2-1
14	DINPNNAQTYNHNKFKG	4B6-H-CDR2-2
15	DINPNNATLYNHNKFKG	4B6-H-CDR2-3
16	DINPNNGLTSYNHNKFKG	4B6-H-CDR2-4
17	DINPNNAQTVYNHNKFKG	4B6-H-CDR2-5
18	DINPNNAGTSYNHNKFKG	H-CDR2-WT (G55A)

30

40

【0312】

【00341】

【0313】

50

【表 5】

表 3b. 4B6 および 4B6 のヒト化抗体についての FR 配列のアミノ酸配列

配列番号	配列	注釈
22	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT	ヒト生殖系列配列の HFR1
23	WVRQAPGQGLEWMG	ヒト生殖系列配列の HFR2
24	RVTMTRDTSISTAYMELSRSRSDDTAVYYCAR	ヒト生殖系列配列の HFR3
25	WGQGTLLTVSS	ヒト生殖系列配列の HFR4
26	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	ヒト生殖系列配列の LFR1
27	WYQQKPGKAPKLLIY	ヒト生殖系列配列の LFR2
28	GVPSRFSGSGSGTDFTFTISLQPEDATYYC	ヒト生殖系列配列の LFR3
29	FGQGTKLEIK	ヒト生殖系列配列の LFR4
30	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYVFT	HFR1 バリエント
31	WVRQAPGQSLEWMG	HFR2 バリエント
32	RVTVTVDTSISTAYMELSRSRSDDTAVYYCAR	HFR3 バリエント 1
33	RVTVTVDTSISTAYMELSRSRSDDTAVYYCVK	HFR3 バリエント 2
34	RVTVTVDKSISTAYMELSRSRSDDTAVYYCAR	HFR3 バリエント 3
35	RVTVTVDKSISTAYMELSRSRSDDTAVYYCVK	HFR3 バリエント 4
36	WYQQKPGKSPKLLIY	LFR2 バリエント
37	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDATYYC	LFR3 バリエント 1
38	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDATYYC	LFR3 バリエント 2
39	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDATYYC	バリエント 1-FR3 についての F73L 変異
45	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDATYYC	LC バリエント 2-FR3 についての F73L、A43S、S60D

【 0 3 1 4 】

[0 0 3 4 2]

【 0 3 1 5 】

10

20

30

40

50

【表 6】

表 4. 4B6 のヒト化抗体についての各ヒト化重鎖および軽鎖可変領域の FR アミノ酸配列

VH または VL 名称	FR1 (配列番号)	FR2 (配列番号)	FR3 (配列番号)	FR4 (配列番号)
Hu4B6_Hg.2	30	31	35	25
AM4B6_Hg.3	30	31	35	25
AM4B6_Hg.5	30	31	35	25
AM4B6_La.1	26	27	37	29
AM4B6_La.2	26	27	37	29
AM4B6_La.4	26	27	37	29
AM4B6_La.6	30	31	35	25

10

20

【0316】

【00343】下の表 5 は、ヒト化 4 B 6 重鎖可変領域の 3 個のバリエント（すなわち、H u 4 B 6 _ H g . 2、H u 4 B 6 _ H g . 3 および H u 4 B 6 _ H g . 5）ならびにヒト化 4 B 6 軽鎖可変領域の 4 個のバリエント（すなわち、A M 4 B 6 _ L a . 1、A M 4 B 6 _ L a . 2、A M 4 B 6 _ L a . 4、A M 4 B 6 _ L a . 6）を示す。

【0317】

30

40

50

【表 7 - 1】

表 5. 4B6 のヒト化抗体についての可変領域のアミノ酸配列

抗体	VH	VL
AM4B6_Hg. 2La.1	Hu4B6_Hg.2、配列番号 58 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YVFTDYYMNWVRQAPGQSLEWMGDIN PNNAQTQYNHKEFKGRVTVTVDKSIST AYMELSRRLRSDDTAVYYCVKWGDGPF AYWGQGTLLTVSS	AM4B6_La.1、配列番号 62 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKA SQNVKGAWAWYQQKPGKAPKLLIYS ASNRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDIAITYYCQQYSNYPTFGQG TKLEIK
AM4B6_Hg. 2La.2	Hu4B6_Hg.2、配列番号 58 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YVFTDYYMNWVRQAPGQSLEWMGDIN PNNAQTQYNHKEFKGRVTVTVDKSIST AYMELSRRLRSDDTAVYYCVKWGDGPF AYWGQGTLLTVSS	AM4B6_La.2、配列番号 63 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKA SQNVPAAWAWYQQKPGKAPKLLIYS ASNRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDIAITYYCQQYSNYPTFGQG TKLEIK
AM4B6_Hg. 2La.4	Hu4B6_Hg.2、配列番号 58 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YVFTDYYMNWVRQAPGQSLEWMGDIN PNNAQTQYNHKEFKGRVTVTVDKSIST AYMELSRRLRSDDTAVYYCVKWGDGPF AYWGQGTLLTVSS	AM4B6_La.4、配列番号 64 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKA SQNVGAAWAWYQQKPGKAPKLLIYS VSDRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDIAITYYCQQYSNYPTFGQG TKLEIK
AM4B6_Hg. 2La.6	Hu4B6_Hg.2、配列番号 58 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YVFTDYYMNWVRQAPGQSLEWMGDIN PNNAQTQYNHKEFKGRVTVTVDKSIST AYMELSRRLRSDDTAVYYCVKWGDGPF AYWGQGTLLTVSS	AM4B6_La.6、配列番号 65 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKA SQNVGAAWAWYQQKPGKAPKLLIYS RSVRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDIAITYYCQQYSNYPTFGQG TKLEIK
AM4B6_Hg. 3La.1	AM4B6_Hg.3、配列番号 59 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YVFTDYYMNWVRQAPGQSLEWMGDIN PNNAETLYNHKEFKGRVTVTVDKSIST AYMELSRRLRSDDTAVYYCVKWGDGPF AYWGQGTLLTVSS	AM4B6_La.1、配列番号 62 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKA SQNVKGAWAWYQQKPGKAPKLLIYS ASNRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDIAITYYCQQYSNYPTFGQG TKLEIK
AM4B6_Hg. 3La.2	AM4B6_Hg.3、配列番号 59 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YVFTDYYMNWVRQAPGQSLEWMGDIN PNNAETLYNHKEFKGRVTVTVDKSIST AYMELSRRLRSDDTAVYYCVKWGDGPF AYWGQGTLLTVSS	AM4B6_La.2、配列番号 63 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKA SQNVPAAWAWYQQKPGKAPKLLIYS ASNRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDIAITYYCQQYSNYPTFGQG TKLEIK

【 0 3 1 8 】

10

20

30

40

50

【表 7 - 2】

AM4B6_Hg. 3La.4	AM4B6_Hg.3、配列番号 59 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YVFTDYIMNWVRQAPGQSLEWMGDIN PNNAETLYNHKFKGRVTVTVDKSIST AYMELSRLRSDDTAVYYCVKWDGPF AYWGQGTLLVTVSS	AM4B6_La.4、配列番号 64 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKA SQNVGA AA VAWYQQKPGKAPKLLIYS VSDRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPED IA TY YC QQYSNYPTFGQG TKLEIK
AM4B6_Hg. 3La.6	AM4B6_Hg.3、配列番号 59 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YVFTDYIMNWVRQAPGQSLEWMGDIN PNNAETLYNHKFKGRVTVTVDKSIST AYMELSRLRSDDTAVYYCVKWDGPF AYWGQGTLLVTVSS	AM4B6_La.6、配列番号 65 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYVFTDYIMNWVRQAPGQSLEWMGD INPNNA AG TSYNHKFKGRVTVTVDKS ISTAYMELSRLRSDDTAVYYCVKWDG DGPFA Y WGQGTLLVTVSS
AM4B6_Hg. 5La.1	AM4B6_Hg.5、配列番号 60 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YVFTDYIMNWVRQAPGQSLEWMGDIN PNNAQT VY NHKFKGRVTVTVDKSIST AYMELSRLRSDDTAVYYCVKWDGPF AYWGQGTLLVTVSS	AM4B6_La.1、配列番号 62 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKA SQNVK G AAVAWYQQKPGKAPKLLIYS ASNRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPED IA TY YC QQYSNYPTFGQG TKLEIK
AM4B6_Hg. 5La.2	AM4B6_Hg.5、配列番号 60 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YVFTDYIMNWVRQAPGQSLEWMGDIN PNNAQT VY NHKFKGRVTVTVDKSIST AYMELSRLRSDDTAVYYCVKWDGPF AYWGQGTLLVTVSS	AM4B6_La.2、配列番号 63 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKA SQNV PA AAVAWYQQKPGKAPKLLIYS ASNRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPED IA TY YC QQYSNYPTFGQG TKLEIK
AM4B6_Hg. 5La.4	AM4B6_Hg.5、配列番号 60 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YVFTDYIMNWVRQAPGQSLEWMGDIN PNNAQT VY NHKFKGRVTVTVDKSIST AYMELSRLRSDDTAVYYCVKWDGPF AYWGQGTLLVTVSS	AM4B6_La.4、配列番号 64 DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCKA SQNVGA AA VAWYQQKPGKAPKLLIYS VSDRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPED IA TY YC QQYSNYPTFGQG TKLEIK
AM4B6_Hg. 5La.6	AM4B6_Hg.5、配列番号 60 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YVFTDYIMNWVRQAPGQSLEWMGDIN PNNAQT VY NHKFKGRVTVTVDKSIST AYMELSRLRSDDTAVYYCVKWDGPF AYWGQGTLLVTVSS	AM4B6_La.6、配列番号 65 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYVFTDYIMNWVRQAPGQSLEWMGD INPNNA AG TSYNHKFKGRVTVTVDKS ISTAYMELSRLRSDDTAVYYCVKWDG DGPFA Y WGQGTLLVTVSS

10

20

30

40

【0319】

【00344】ある特定の実施形態では、本明細書において提供されるヒト化抗PD-L1抗体またはその抗原結合性断片は、非ヒトであるCDR配列を除いて実質的にすべてのヒト配列から構成される。一部の実施形態では、可変領域FRおよび、存在する場合、定常領域は、完全にまたは実質的にヒト免疫グロブリン配列由来である。ヒトFR配列およびヒト定常領域配列は、異なるヒト免疫グロブリン遺伝子由来、例えば、1つのヒト抗体由来のFR配列および別のヒト抗体由来の定常領域であってよい。一部の実施形態では、ヒト化抗体またはその抗原結合性断片は、ヒト重鎖HFR1-4、および／または軽鎖LFR1-4を含む。

50

【0320】

【00345】一部の実施形態では、ヒト由来のFR領域は、それが由来するヒト免疫グロブリンと同じアミノ酸配列を含み得る。一部の実施形態では、ヒトFRの1つまたは複数のアミノ酸残基は、親非ヒト抗体由来の対応する残基で置換される。これは、非ヒト親抗体構造に非常に近いヒト化抗体またはその断片を作るため、それにより結合特徴を最適化する（例えば、結合親和性を増加させる）ためにある特定の実施形態では望ましい場合がある。ある特定の実施形態では、本明細書において提供されるヒト化抗体またはその抗原結合性断片は、ヒトFR配列のそれぞれにおいて10個、9個、8個、7個、6個、5個、4個、3個、2個もしくは1個以下のアミノ酸残基置換、または重鎖もしくは軽鎖可変ドメインのすべてのFR配列中に10個、9個、8個、7個、6個、5個、4個、3個、2個もしくは1個以下のアミノ酸残基置換を含む。一部の実施形態では、アミノ酸残基におけるそのような変更は、重鎖FR領域にだけ、軽鎖FR領域にだけ、または両方の鎖に存在し得る。ある特定の実施形態では、ヒトFR配列の1つまたは複数のアミノ酸は、結合親和性を増加させるために無作為に変異される。ある特定の実施形態では、ヒトFR配列の1つまたは複数のアミノ酸は、結合親和性を増加させるように親非ヒト抗体の対応するアミノ酸（複数可）に復帰変異される。

10

【0321】

【00346】ある特定の実施形態では、本開示のヒト化抗PD-L1抗体およびその抗原結合性断片は、QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYX₉FT（配列番号40）の配列またはこれに少なくとも80%の配列同一性のある相同性配列を含む重鎖HFR1、WVRQAPGQX₁₀LEWMG（配列番号41）の配列またはこれに少なくとも80%の配列同一性のある相同性配列を含む重鎖HFR2、RVTX₁₆TVDX₁₁SISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCX₁₂X₁₃（配列番号42）の配列またはこれに少なくとも80%の配列同一性のある相同性配列を含む重鎖HFR3、およびWGQGTLVTVSS（配列番号25）の配列またはこれに少なくとも80%の配列同一性のある相同性配列を含む重鎖HFR4を含み、式中、X₉はTまたはVであり、X₁₀はGまたはSであり、X₁₁はTまたはKであり、X₁₂はAまたはVであり、X₁₃はRまたはKである。

20

【0322】

【00347】ある特定の実施形態では、本開示のヒト化抗PD-L1抗体およびその抗原結合性断片は、DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC（配列番号26）の配列またはこれに少なくとも80%の配列同一性のある相同性配列を含む軽鎖LFR1、WYQQKPGKX₁₄PKLLIY（配列番号43）の配列またはこれに少なくとも80%の配列同一性のある相同性配列を含む軽鎖LFR2、GVPX₁₅RFSGSGSGTDFTX₁₇TISSLQPEDIATYYC（配列番号44）の配列またはこれに少なくとも80%の配列同一性のある相同性配列を含む軽鎖LFR3、およびFGQGTKLEIK（配列番号29）の配列またはこれに少なくとも80%の配列同一性のある相同性配列を含む軽鎖LFR4を含み、式中、X₁₄はAまたはSであり、X₁₅はSまたはDであり、X₁₆はMまたはVであり、X₁₇はFまたはLである。

30

【0323】

【00348】ある特定の実施形態では、HFR1は配列番号22および30からなる群から選択される配列を含み、HFR2は配列番号23および31からなる群から選択される配列を含み、HFR3は配列番号24および32～35からなる群から選択される配列を含み、HFR4は配列番号25の配列を含み、LFR1は配列番号26からなる群からの配列を含み、LFR2は配列番号27および36からなる群から選択される配列を含み、LFR3は配列番号28、および37～38、39、45からなる群から選択される配列を含み、LFR4は配列番号29の配列を含む。

40

【0324】

【00349】ある特定の実施形態では、本開示のヒト化抗PD-L1抗体およびその抗原結合性断片は、Hu4B6__Hg.2（配列番号58）、AM4B6__Hg.3（配列番

50

号 59)、AM4B6__Hg.5(配列番号60)からなる群から選択される重鎖可変領域中に含有されるHFR1、HFR2、HFR3、および／またはHFR4配列を含む。

【0325】

【00350】ある特定の実施形態では、本開示のヒト化抗PD-L1抗体およびその抗原結合性断片は、AM4B6__La.1(配列番号62)、AM4B6__La.2(配列番号63)、AM4B6__La.4(配列番号64)、およびAM4B6__La.6(配列番号65)からなる群から選択される軽鎖可変領域に含有されるLFR1、LFR2、LFR3、および／またはLFR4配列を含む。

【0326】

【00351】ある特定の実施形態では、重鎖可変領域は、配列番号46、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52、配列番号56、配列番号57、配列番号58、配列番号59、配列番号60、およびこれらに少なくとも80%の配列同一性を有するその相同性配列からなる群から選択される配列を含む。ある特定の実施形態では、軽鎖可変領域は、配列番号47、配列番号54、配列番号55、配列番号61、配列番号62、配列番号63、配列番号64、配列番号65、およびこれらに少なくとも80%の配列同一性を有するその相同性配列からなる群から選択される配列を含む。ある特定の実施形態では、PD-L1に対する抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号49/54、50/54、51/54、52/54、49/55、50/55、51/55、52/55、58/62、58/63、58/64、58/65、59/62、59/63、59/64、59/65、60/62、60/63、60/64および60/65からなる群から選択される重鎖可変領域配列と軽鎖可変領域配列との対を含む。

【0327】

【00352】これらの例示的なヒト化抗PD-L1抗体は、PD-L1への特異的結合能力または親和性を保持し、その態様においては親マウス抗体4B6より良好である。

【0328】

【00353】一部の実施形態では、本明細書において提供される抗PD-L1抗体または抗原結合性断片は、重鎖可変ドメインのすべてもしくは一部分および／または軽鎖可変ドメインのすべてもしくは一部分を含む。一実施形態では、本明細書において提供される抗PD-L1抗体またはその抗原結合性断片は、本明細書において提供される重鎖可変ドメインのすべてまたは一部分からなる単ドメイン抗体である。そのような単ドメイン抗体についてのさらなる情報は、当技術分野において入手可能である(例えば、米国特許第6,248,516号を参照されたい)。

【0329】

【00354】ある特定の実施形態では、本明細書において提供される抗PD-L1抗体またはその抗原結合性断片は、重鎖および／または軽鎖定常領域を任意選択でさらに含む免疫グロブリン(Ig)定常領域をさらに含む。ある特定の実施形態では、重鎖定常領域は、CH1、ヒンジおよび／またはCH2-CH3領域(または、任意選択でCH2-CH3-CH4領域)を含む。ある特定の実施形態では、本明細書において提供される抗PD-L1抗体またはその抗原結合性断片は、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2またはIgMの重鎖定常領域を含む。ある特定の実施形態では、軽鎖定常領域は、CκまたはCλを含む。本明細書において提供される抗PD-L1抗体またはその抗原結合性断片の定常領域は、野生型定常領域配列と同一であってよい、または1つまたは複数の変異において異なっていてよい。

【0330】

【00355】ある特定の実施形態では、本明細書において提供される抗PD-L1抗体またはその抗原結合性断片は、診断および／または治療的使用を提供するために十分である、ヒトPD-L1への特異的結合親和性を有する。

【0331】

【00356】本明細書において提供される抗PD-L1抗体またはその抗原結合性断片は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、組換え抗体、二

特異性抗体、多特異性抗体、標識抗体、二価抗体、抗イディオタイプ抗体または融合タンパク質であり得る。組換え抗体は、動物においてよりも組換え法を使用して *in vitro* で調製された抗体である。

【0332】

【00357】ある特定の実施形態では、PD-L1 結合性部分は、配列番号 49/54、50/54、51/54、52/54、49/55、50/55、51/55、52/55、58/62、58/63、58/64、58/65、59/62、59/63、59/64、59/65、60/62、60/63、60/64 および 60/65 からなる群から選択される重鎖可変領域配列と軽鎖可変領域配列との対を含む抗体またはその抗原結合性断片と、PD-L1 への結合について競合する抗 PD-L1 抗体またはその抗原結合性断片を含む。

10

【0333】

x. 抗体バリエーション

【00358】本明細書において提供される抗 PD-L1 抗体およびその抗原結合性断片は、本明細書において提供される抗体配列の種々のバリエーションも包含する。

【0334】

【00359】ある特定の実施形態では、抗体バリエーションは、上の表 1 に提供される CDR 配列の 1 つまたは複数に、上の表 3 a、3 b および 5 に提供される重鎖可変領域もしくは軽鎖可変領域の非 CDR 配列の 1 つまたは複数に、ならびに／または定常領域（例えば、Fc 領域）に 1 つまたは複数の改変または置換を含む。そのようなバリエーションは、それらの親抗体の PD-L1 への結合特異性を保持しているが、改変（複数可）または置換（複数可）によって付与される 1 つまたは複数の望ましい特性を有する。例えば、抗体バリエーションは、改善された抗原結合親和性、改善されたグリコシル化パターン、グリコシル化のリスクの低減、脱アミノ化の低減、エフェクター機能（複数可）の低減もしくは枯渇、FcRn 受容体結合の改善、薬物動態学的半減期、pH 感度、および／またはコンジュゲーションへの適合性（例えば、1 つまたは複数のシステイン残基の導入）の増加を有し得る。

20

【0335】

【00360】親抗体配列は、当技術分野において公知の方法、例えば「アラニンスクランニング変異誘発法」（例えば、Cunningham および Wells (1989) Science, 244:1081~1085 を参照されたい）を使用して、改変または置換されるのに好適または好ましい残基を同定するためにスクリーニングされ得る。簡潔には、標的残基（例えば、Arg、Asp、His、Lys および Glu などの荷電残基）は、同定され、中性または負に荷電したアミノ酸（例えば、アラニンまたはポリアラニン）によって置き換えられ得、改変された抗体は産生され、目的の特性についてスクリーニングされる。特定のアミノ酸位置での置換が目的の機能的変化を実証する場合、次に位置は、改変または置換のための有望な残基として同定され得る。有望な残基は、異なる種類の残基（例えば、システイン残基、正に荷電した残基など）を用いて置換することによってさらに評価され得る。

30

【0336】

x i. 親和性バリエーション

【00361】抗体の親和性バリエーションは、上の表 1 に提供される 1 つもしくは複数の CDR 配列に、上の表 3 b および 4 に提供される 1 つもしくは複数の FR 配列に、または上の表 5 に提供される重鎖もしくは軽鎖可変領域配列に改変または置換を含有し得る。FR 配列は、CDR 領域が可変領域中で 2 つの FR 領域によって隣接されていることが当技術分野において周知であることから、上の表 1 の CDR 配列および上の表 5 の可変領域配列に基づいて当業者によって容易に同定され得る。親和性バリエーションは、親抗体の PD-L1 への特異的結合親和性を保持しているか、またはさらに親抗体を超える改善された PD-L1 特異的結合親和性を有する。ある特定の実施形態では、CDR 配列、FR 配列または可変領域配列中の少なくとも 1 つ（またはすべて）の置換（複数可）は、保存的置換を含

40

50

む。

【0337】

【00362】当業者は、上の表1および3aで提供されるCDR配列および上の表5で提供される可変領域配列において、1つまたは複数のアミノ酸残基は生じた抗体または抗原結合性断片が、PD-L1への結合親和性もしくは結合能力を依然として保持するか、またはさらに改善された結合親和性もしくは能力を有して置換され得ることを理解する。当技術分野において公知の種々の方法がこの目的を達成するために使用され得る。例えば、抗体バリエーション（FabまたはscFvバリエーションなど）のライブラリーは、ファージディスプレイ技術を用いて作製および発現され得、次に、PD-L1への結合親和性についてスクリーニングされ得る。別の例として、コンピューターソフトウェアは、PD-L1への抗体の結合を実質的にシミュレートし、結合境界面を形成する抗体上のアミノ酸残基を同定するために使用され得る。そのような残基は、結合親和性の低下を予防するために置換を回避されるか、またはより強力な結合を提供するために置換の標的にされるかのいずれかであり得る。

10

【0338】

【00363】ある特定の実施形態では、本明細書において提供されるヒト化抗PD-L1抗体またはその抗原結合性断片は、1つもしくは複数のCDR配列および／または1つもしくは複数のFR配列に、1つまたは複数のアミノ酸残基置換を含む。ある特定の実施形態では、親和性バリエーションは、CDR配列および／またはFR配列に合計で20個、15個、10個、9個、8個、7個、6個、5個、4個、3個、2個または1個以下の置換を含む。

20

【0339】

【00364】ある特定の実施形態では、抗PD-L1抗体またはその抗原結合性断片は、PD-L1への特異的結合親和性をその親抗体と同様のまたはそれよりも高くさえあるレベルで依然として保持する、上の表1および3aに列挙されたもの（複数可）に少なくとも80%（例えば、少なくとも85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%）の配列同一性を有する1個、2個、または3個のCDR配列を含む。

【0340】

【00365】ある特定の実施形態では、抗PD-L1抗体またはその抗原結合性断片は、PD-L1への特異的結合親和性をその親抗体と同様のまたはそれよりも高くさえあるレベルで依然として保持する、上の表5に列挙されたもの（複数可）に少なくとも80%（例えば、少なくとも85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%）の配列同一性を有する1つまたは複数の可変領域配列を含む。一部の実施形態では、上の表5に列挙された可変領域配列で合計1から10個のアミノ酸が置換されるか、挿入されるかまたは欠失されている。一部の実施形態では、置換、挿入または欠失はCDRの外の領域で（例えば、FRにおいて）生じる。

30

【0341】

x i i . グリコシル化バリエーション

【00366】本明細書において提供される抗PD-L1抗体またはその抗原結合性断片は、抗体またはその結合性断片のグリコシル化の程度を増加させるか、または減少させるかのいずれかのために得られ得るグリコシル化バリエーションも包含する。

40

【0342】

【00367】抗PD-L1抗体またはその抗原結合性断片は、グリコシル化部位を導入するか、または除去する1つまたは複数の改変を含み得る。グリコシル化部位は、炭水化物部分（例えば、オリゴ糖構造）が結合され得る側鎖を有するアミノ酸残基である。抗体のグリコシル化は、典型的にはN結合またはO結合のいずれかである。N結合は、アスパラギン残基、例えば、アスパラギン-X-セリンおよびアスパラギン-X-スレオニンなどのトリペプチド配列中のアスパラギン残基の側鎖への炭水化物部分の結合を指し、ここでXは、プロリンを除く任意のアミノ酸である。O結合グリコシル化は、糖N-アセチルガ

50

ラクトサミン、ガラクトースまたはキシロースの内の1つのヒドロキシアミノ酸、最も一般的にはセリンまたはスレオニンへの結合を指す。天然グリコシル化部位の除去は、例えば、配列中に存在する上に記載されたトリペプチド配列（N結合グリコシル化部位について）またはセリンもしくはスレオニン残基（O結合グリコシル化部位について）の1つが置換されるようにアミノ酸配列を変更することによって好都合に達成され得る。新規グリコシル化部位は、そのようなトリペプチド配列またはセリンもしくはスレオニン残基を導入することによって同様の方法において創出され得る。

【0343】

【00368】ある特定の実施形態では、本明細書において提供される抗PD-L1抗体または抗原結合性断片は、1つまたは複数の脱アミド化部位を除去するような1つまたは複数の変異を含む。ある特定の実施形態では、本明細書において提供される抗PD-L1抗体または抗原結合性断片は、重鎖中のG55に変異（例えば、G55A）を含む。これらの変異は、検査され、本明細書において提供される抗体の結合親和性に悪影響を与えないと考えられる。

10

【0344】

x i i i . システインが操作されたバリエーション

【00369】本明細書において提供される抗PD-L1抗体またはその抗原結合性断片は、1つまたは複数の導入された遊離システインアミノ酸残基を含む、システインが操作されたバリエーションも包含する。

【0345】

20

【00370】遊離システイン残基は、ジスルフィド結合の一部ではないものである。システインが操作されたバリエーションは、例えば、特に細胞傷害性および／またはイメージング化合物、標識、または放射性同位元素（radioisotope）などとの、操作されたシステインの部位での、例えば、マレイミドまたはハロアセチルを通じたコンジュゲーションのために有用である。遊離システイン残基を導入するために抗体またはその抗原結合性断片を操作するための方法は、当技術分野において公知である、例えば、WO2006/034488を参照されたい。

【0346】

x i v . Fcバリエーション

【00371】本明細書において提供される抗PD-L1抗体またはその抗原結合性断片は、例えば、ADCCおよびCDCなどエフェクター機能の変化を提供するように、Fc領域および／またはヒンジ領域に1つまたは複数のアミノ酸残基改変または置換を含むFcバリエーションも包含する。抗体を操作することによってADCC活性を変化させる方法は、当技術分野において記載されている、例えば、Shields RL. ら、J Biol Chem. 2001. 276 (9) : 6591~604; Idusogie EE. ら、J Immunol. 2000. 164 (8) : 4178~84; Steurer W. ら、J Immunol. 1995. 155 (3) : 1165~74; Idusogie EE. ら、J Immunol. 2001. 166 (4) : 2571~5; Lazar GA. ら、PNAS. 2006. 103 (11) : 4005~4010; Ryan MC. ら、Mol. Cancer Ther. 2007. 6 : 3009~3018; Richards JO. ら、Mol Cancer Ther. 2008. 7 (8) : 2517~27; Shields R. L. ら、J. Biol. Chem. 2002. 277 : 26733~26740; Shinkawa T. ら、J. Biol. Chem. 2003. 278 : 3466~3473を参照されたい。

30

40

【0347】

【00372】本明細書において提供される抗体または抗原結合性断片のCDC活性は、例えば、C1q結合および／またはCDCを改善するか、または弱めることによって変更され得る（例えば、WO99/51642; Duncan & Winter Nature 322 : 738~40 (1988) ; 米国特許第5,648,260号; 米国特許第5,624,821号を参照されたい）; およびFc領域バリエーションの他の例に関してW

50

WO 94 / 29351。Fc領域のアミノ酸残基329、331および322から選択される1つまたは複数のアミノ酸は、C1q結合を変更させる、および／または補体依存性細胞傷害(CDC)を低減もしくは消失させるように異なるアミノ酸残基で置き換えられ得る(Indusogieらによる、米国特許第6,194,551号を参照されたい)。1つまたは複数のアミノ酸置換(複数可)も、補体を固定する抗体の能力を変化させるために導入され得る(BodmerらによるPCT公開WO 94 / 29351を参照されたい)。

【0348】

[00373]ある特定の実施形態では、本明細書において提供されるFcバリエーションは、野生型Fc(例えば、IgG1のFc)と比較して低減したエフェクター機能を有し、Fc領域の220、226、228、229、233、234、235、236、237、238、267、268、269、270、297、309、318、320、322、325、328、329、330、331および332からなる群から選択される位置に1つまたは複数のアミノ酸置換(複数可)を含む(WO 2016 / 196228; Richardsら、(2008) Mol. Cancer Therap. 7:2517; Mooreら、(2010) mAbs 2:181; および Strohl (2009) Current Opinion in Biotechnology 20:685~691を参照されたい)、ここで、Fc領域中の残基の番号付けはKabatにあるとおりのEUIンデックスのものである。低減したエフェクター機能についての例示的な置換として、限定することなく、220S、226S、228P、229S、233P、234V、234G、234A、234F、234A、235A、235G、235E、236E、236R、237A、237K、238S、267R、268A、268Q、269R、297A、297Q、297G、309L、318A、322A、325L、328R、330S、331Sまたはこれらの任意の組合せが挙げられる(WO 2016 / 196228; および Strohl (2009) Current Opinion in Biotechnology 20:685~691を参照されたい)。

【0349】

[00374]ある特定の実施形態では、本明細書において提供される抗PD-L1抗体またはその抗原結合性断片は、エフェクター機能が低減しており、234、235、237、238、268、297、309、330および331からなる群から選択される位置でIgG1中に1つまたは複数のアミノ酸置換(複数可)を含む。ある特定の実施形態では、本明細書において提供される抗PD-L1抗体またはその抗原結合性断片は、IgG1アイソタイプのものであり、N297A、N297Q、N297G、L235E、L234A、L235A、L234F、L235E、P331Sおよびこれらの任意の組合せからなる群から選択される1つまたは複数のアミノ酸置換(複数可)を含む。

【0350】

[00375]ある特定の実施形態では、本明細書において提供される抗PD-L1抗体またはその抗原結合性断片は、IgG1アイソタイプのものであり、L234AおよびL235A変異を含む。ある特定の実施形態では、本明細書において提供される抗PD-L1抗体またはその抗原結合性断片は、IgG1アイソタイプのものであり、L234F、L235EおよびP331Sを含む。FcドメインのCH2領域に位置する、置換のL234F、L235EおよびP331Sのセット(FES三重変異とも称される)は、FCγRおよびC1q結合を抑止し、ADCCまたはCDCを誘発できない抗体を生じる(Oganesyanら、Acta Crystallogr. D 64:700~704 (2008))。PCT / US 2013 / 36872は、バリエーションFcドメイン、例えば、抗体のバリエーションFcドメインにおいてこれらの変異を組み合わせることが、野生型親分子、例えば、野生型IgG1 Fcと比べて低下した熱安定性を有するFcドメインを生じることを示した。ある特定の実施形態では、Fcバリエーションは、配列番号81のアミノ酸配列を含む。

【0351】

[00376]ある特定の実施形態では、本明細書において提供される抗PD-L1抗体またはその抗原結合性断片は、IgG2アイソタイプのものであり、H268Q、V309L、A330S、P331S、V234A、G237A、P238S、H268Aおよびこれらの任意の組合せ（例えば、H268Q/V309L/A330S/P331S、V234A/G237A/P238S/H268A/V309L/A330S/P331S）からなる群から選択される1つまたは複数のアミノ酸置換（複数可）を含む。ある特定の実施形態では、本明細書において提供される抗PD-L1抗体またはその抗原結合性断片は、IgG4アイソタイプのものであり、S228P、N297A、N297Q、N297G、L235E、F234A、L235Aおよびこれらの任意の組合せからなる群から選択される1つまたは複数のアミノ酸置換（複数可）を含む。ある特定の実施形態では、本明細書において提供される抗PD-L1抗体またはその抗原結合性断片は、IgG2/IgG4クロスアイソタイプのものである。IgG2/IgG4クロスアイソタイプの例は、Rother RPら、Nat Biotechnol 25:1256~1264 (2007)に記載されている。

10

[0352]

[00377]ある特定の実施形態では、抗PD-L1抗体またはその抗原結合性断片は、新生児期Fc受容体（FcRn）へのpH依存性結合を改善する1つまたは複数のアミノ酸置換（複数可）を含む。そのようなバリエーションは、それが酸性pHでFcRnに結合し、そのことがリソソームでの分解から逃れ、次いで細胞外に移動および放出されることから、薬物動態学的半減期の延長を有し得る。FcRnとの結合親和性を改善するように抗体またはその抗原結合性断片を操作する方法は、当技術分野において周知である、例えば、Vaughn, D.ら、Structure, 6(1):63~73, 1998; Kontermann, R.ら、Antibody Engineering, Volume 1, Chapter 27: Engineering of the Fc region for improved PK, Springerにより公開、2010; Yeung, Y.ら、Cancer Research, 70:3269~3277 (2010); およびHinton, P.ら、J. Immunology, 176:346~356 (2006)を参照されたい。

20

[0353]

[00378]ある特定の実施形態では、抗PD-L1抗体またはその抗原結合性断片は、ヘテロ二量体化を促進するおよび／またはプロモートするためにFc領域の境界面に1つまたは複数のアミノ酸置換（複数可）を含む。これらの改変は、第1のFcポリペプチドへの隆起、および第2のFcポリペプチドへの空洞の導入を含み、ここで隆起は、ヘテロ二量体または複合体を形成するための第1のおよび第2のFcポリペプチドの相互作用をプロモートするように空洞中に位置付けられ得る。これらの改変を有する抗体を生成する方法は、例えば米国特許第5,731,168号に記載されているとおり当技術分野において公知である。

30

[0354]

xv. 抗原結合性断片

[00379]本明細書において提供される二機能性分子中のPD-L1結合性部分は、抗PD-L1抗原結合性断片も包含する。さまざまな種類の抗原結合性断片が当技術分野において公知であり、例えば、そのCDRが上の表1および3aに示されており、可変配列が表2および5に示されている例示的な抗体およびそれらのさまざまなバリエーション（例えば、親和性バリエーション、グリコシル化バリエーション、Fcバリエーション、システインが操作されたバリエーションなど）を含んで、本明細書において提供される抗PD-L1抗体に基づいて開発され得る。

40

[0355]

[00380]ある特定の実施形態では、本明細書において提供される抗PD-L1抗原結合性断片は、ダイアボディ、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv断片、ジスルフィド安定化Fv断片(dsFv)、(dsFv)₂、二特異性dsFv(dsFv-d

50

s F v')、ジスルフィド安定化ダイアボディ (dsダイアボディ)、1本鎖抗体分子 (sc F v)、sc F v二量体 (二価ダイアボディ)、多特異性抗体、ラクダ化単ドメイン抗体、ナノボディ、ドメイン抗体および二価ドメイン抗体である。

【0356】

【00381】種々の技術が、そのような抗原結合性断片の産生のために使用され得る。例示的な方法として、無傷抗体の酵素消化 (例えば、Morimotoら、Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107~117 (1992); およびBrennanら、Science、229:81 (1985)を参照されたい)、E. Coliなどの宿主細胞による組換え発現 (例えば、Fab、FvおよびSc F v抗体断片について)、上に考察されたファージディスプレイライブラリーからのスクリーニング (例えば、Sc F vについて) およびF (ab')₂断片を形成するような2つのFab'-SH断片の化学的カップリング (Carteら、Bio/Technology 10:163~167 (1992)) が挙げられる。抗体断片の産生のための他の技術は、当業者に明らかである。

10

【0357】

【00382】ある特定の実施形態では、抗原結合性断片はsc F vである。sc F vの生成は、例えば、WO93/16185; 米国特許第5,571,894号; および第5,587,458号に記載されている。Sc F vは、融合タンパク質を提供するようにアミノまたはカルボキシル末端のいずれかでエフェクタータンパク質に融合され得る (例えば、Antibody Engineering、Borrebaeck編を参照されたい)。

20

【0358】

【00383】ある特定の実施形態では、本明細書において提供される抗PD-L1抗体またはその抗原結合性断片は、二価、四価、六価または多価である。二価より多い任意の分子は、例えば、三価、四価、六価などを包含して多価とみなされる。

【0359】

【00384】二価分子は、2つの結合部位が同じ抗原または同じエピトープへの結合に対して両方とも特異的である場合は、単一特異性であり得る。ある特定の実施形態では、これは、一価のカウンターパートよりも抗原またはエピトープに対するより強力な結合を提供する。同様に、多価分子も単一特異性であり得る。ある特定の実施形態では、二価または多価抗原結合性部分において、結合部位の第1の価および結合部位の第2の価は、構造的に同一である (すなわち、同じ配列を有する) または構造的に異なっている (すなわち、同じ特異性を有するが異なる配列を有する)。

30

【0360】

【00385】二価は、2つの結合部位が異なる抗原またはエピトープに対して特異的である場合に、二特異性でもあり得る。これは、多価分子にも適用される。例えば、三価分子は、2つの結合部位が第1の抗原 (またはエピトープ) に単一特異性であり、第3の結合部位が第2の抗原 (またはエピトープ) に特異的である場合に、二特異性であり得る。

【0361】

x v i . 二特異性抗体

40

【00386】ある特定の実施形態では、抗PD-L1抗体またはその抗原結合性断片は二特異性である。ある特定の実施形態では、本明細書において提供される第2の部分とは別に、PD-L1結合抗体またはその抗原結合性断片は、前記抗PD-L1抗体またはその抗原結合性断片由来の異なる結合特異性を有する追加的な機能的ドメインにさらに連結される。

【0362】

【00387】ある特定の実施形態では、本明細書において提供される二特異性抗体またはその抗原結合性断片は、PD-L1以外 (および、第2の部分によって結合される標的以外) の第2の抗原、またはPD-L1上の第2のエピトープ (もしくは、第2の部分によって結合される標的上の第2のエピトープ) に特異的に結合することが可能である。

50

【0363】

x v i i . 二機能性分子

[00388]ある特定の実施形態では、本明細書において提供される二機能性分子は、第2の部分によって結合されたPD-L1および標的の両方に結合することが可能である。ある特定の実施形態では、本明細書において提供される二機能性分子は、PD-L1およびTGFβの両方に結合する、またはPD-L1およびIL-1の両方に結合する、またはPD-L1およびIL-1Rの両方に結合する、またはPD-L1およびMHCIの両方に結合する、またはPD-L1およびCD47の両方に結合する、またはPD-L1およびSIRPαの両方に結合することが可能である。

【0364】

[00389]ある特定の実施形態では、本開示のPD-L1およびTGFβを標的化する二機能性分子は、ELISAアッセイによる測定で2.0 nM以下（例えば、2.0 nM以下、1.2 nM以下、1.1 nM以下、1.0 nM以下、0.9 nM以下、0.8 nM以下）のEC₅₀でヒトTGFβ1に特異的に結合する。ある特定の実施形態では、本開示のPD-L1およびTGFβを標的化するタンパク質は、ELISAアッセイによる測定でPD-L1およびTGFβに同時に結合することが可能である。ある特定の実施形態では、本開示のPD-L1およびTGFβを標的化する二機能性分子は、Biacoreアッセイによる測定で0.8 nM以下、0.7 nM以下、0.6 nM以下、0.5 nM以下または0.4 nM以下のK_D値でヒトPD-L1に特異的に結合することが可能である。ある特定の実施形態では、本開示のPD-L1およびTGFβを標的化する二機能性分子は、ELISAアッセイによる測定で2.0 nM以下（例えば、2.0 nM以下、1.2 nM以下、1.1 nM以下、1.0 nM以下、0.9 nM以下、0.8 nM以下）のK_D値でヒトTGFβ1に特異的に結合することが可能である。

【0365】

[00390]ある特定の実施形態では、本開示のPD-L1およびTGFβを標的化する二機能性分子は、用量依存的様式で腫瘍成長阻害に相乗効果を示すことが可能である。

【0366】

[00391]ある特定の実施形態では、本開示のPD-L1およびTGFβを標的化する二機能性分子は、免疫チェックポイント分子のみを含む分子と比較して、腫瘍微小環境への抗腫瘍免疫細胞の浸潤の増強を示すことが可能である。

【0367】

[00392]ある特定の実施形態では、本開示のPD-L1およびTGFβを標的化する二機能性分子は、血漿中のTGFβ1を少なくとも90%（例えば、少なくとも80%、70%、60%、50%、40%、30%または20%）選択的に低減することが可能であり、そのような低減は、少なくとも10、14または21日間維持され得る。

【0368】

[00393]ある特定の実施形態では、二機能性分子は、ヘテロ二量体重鎖を含む。重鎖は、第2の部分の存在または位置に関してヘテロ二量体性である。ある特定の実施形態では、ヘテロ二量体重鎖は、第2の部分の有する1つの重鎖と有さない他の重鎖とを含み、ここで第2の部分は、CD47結合性ドメイン（例えば、可溶性SIRPα）またはSIRPα結合性ドメインを含む。

【0369】

[00394]二機能性分子では、ヘテロ二量体重鎖は、第2の部分の有する1つの重鎖と有さない他の重鎖とを含む。ヘテロ二量体重鎖は、ホモ二量体化を防止する、および／またはヘテロ二量体化を支持するように関連するヘテロ二量体Fc領域をさらに含み得る。例えば、ヘテロ二量体Fc領域は、それらが同一ではなく、それらの中でホモ二量体を形成するよりも互いの間で優先的にヘテロ二量体を形成するように選択され得る。ある特定の実施形態では、ヘテロ二量体Fc領域は、ノブイントゥーホールの形成、疎水性相互作用、静電相互作用、親水性相互作用、または可動性の増加を介してヘテロ二量体に会合することが可能である。ある特定の実施形態では、ヘテロ二量体Fc領域は、ノブイントゥー

10

20

30

40

50

ーホールを形成することが可能であるようにそれぞれ変異されているCH₂および／またはCH₃ドメインを含む。ノブは、第1のCH₂/CH₃ポリペプチド中の小さなアミノ酸残基の大きなものの置き換えによって得ることができ、ホールは、大きな残基の小さなものの置き換えによって得ることができる。ある特定の実施形態では、ヘテロ二量体Fc領域は、S354CおよびT366W置換を含有するIgG1アイソタイプの第1のCH₃ドメイン（配列番号96、ノブ）ならびにY349C、T366S、L368AおよびY407V置換を含有するIgG1アイソタイプの第2のCH₃ドメイン（配列番号97、ホール）を含む。

【0370】

【00395】ある特定の実施形態では、二機能性分子は、配列番号118もしくは配列番号120のアミノ酸配列を含む重鎖、および／または配列番号119もしくは配列番号121のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【0371】

xviii. コンジュゲート

【00396】一部の実施形態では、二機能性分子は、1つまたは複数のコンジュゲート部分をさらに含む。コンジュゲート部分は、二機能性分子に連結され得る。コンジュゲート部分は、二機能性分子に結合され得る部分である。種々のコンジュゲート部分が、本明細書において提供される二機能性分子に連結され得ることは検討されている（例えば、「Conjugate Vaccines」、Contributions to Microbiology and Immunology、J. M. CruseおよびR. E. Lewis, Jr.（編）、Carger Press、New York、（1989）を参照されたい）。これらのコンジュゲート部分は、他にも方法はあるが、共有結合、親和性結合、インターカレーション、配位結合、複合体化、会合、混合または付加によって二機能性分子に連結され得る。一部の実施形態では、二機能性分子は、リンカーを介して1つまたは複数のコンジュゲートに連結され得る。

【0372】

【00397】ある特定の実施形態では、本明細書において提供される二機能性分子は、エピトープ結合性部分の外に、1つまたは複数のコンジュゲート部分への結合のために利用され得る特異的部位を含有するように操作され得る。例えば、そのような部位は、コンジュゲート部分への共有結合を促進するための1つまたは複数の反応性アミノ酸残基、例えば、システインまたはヒスチジン残基などを含み得る。

【0373】

【00398】ある特定の実施形態では、二機能性分子は、コンジュゲート部分に間接的にまたは別のコンジュゲート部分を通じて連結され得る。例えば、本明細書において提供される二機能性分子は、ビオチンにコンジュゲートされてよく、次いで、アビジンにコンジュゲートされる第2のコンジュゲートに間接的にコンジュゲートされてよい。一部の実施形態では、コンジュゲート部分は、クリアランス改変剤（例えば、半減期を延長するPEGなどのポリマー）、化学療法剤、毒素、放射性同位元素、ランタニド、検出可能な標識（例えば、発光標識、蛍光標識、酵素基質標識）、DNAアルキル化剤、トポイソメラーゼ阻害剤、チューブリン結合剤、精製のための部分または他の抗がん薬物を含む。

【0374】

【00399】「毒素」は、細胞に有害である、または細胞を損傷もしくは死滅させることができる任意の薬剤であり得る。毒素の例として、限定することなく、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、エチジウムブロマイド、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、MMAE、MMAF、DM1、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミスラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、ピューロマイシンおよびそのアナログ、代謝拮抗薬（例えば、メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルダカルバジン（fl

10

20

30

40

50

uorouracil decarbazine)、アルキル化剤(例えば、メクロレタミン、チオテパクロラムブシル(thioepa chlorambucil)、メルファラン、カルムスチン(BSNU)およびロムスチン(CCNU)、シクロホスファミド(cyclophosphamide)、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾチン、マイトマイシンCおよびcis-ジクロロジアミン白金(II)(DDP)シスプラチン)、アントラサイクリン(例えば、ダウノルビシン(以前は、ダウノマイシン)およびドキソルビシン)、抗生物質(例えば、ダクチノマイシン(以前は、アクチノマイシン)、ブレオマイシン、ミスラマイシンおよびアントラマイシン(AMC))、有糸分裂阻害薬(例えば、ビンクリスチンおよびビンブラスチン)、トポイソメラーゼ阻害薬ならびにチューブリン結合剤が挙げられる。

10

【0375】

【00400】検出可能な標識の例として、蛍光標識(例えば、フルオレセイン、ローダミン、ダンシル、フィコエリトリンまたはテキサスレッド)、酵素基質標識(例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ルシフェラーゼ(luciferase)、グルコアミラーゼ、リゾチーム、糖質酸化酵素または β -D-ガラクトシダーゼ)、放射性同位元素(例えば、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、 ^3H 、 ^{111}In 、 ^{112}In 、 ^{14}C 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{86}Y 、 ^{88}Y 、 ^{90}Y 、 ^{177}Lu 、 ^{211}At 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{153}Sm 、 ^{212}Bi および ^{32}P 、他のランタニド)、発光標識、発色部分、ジゴキシゲニン、ビオチン/アビジン、検出用DNA分子または金を挙げるができる。

20

【0376】

【00401】ある特定の実施形態では、コンジュゲート部分は、二機能性分子の半減期の増加を助けるクリアランス改変剤であってもよい。例示的な例として、水溶性ポリマー、例えばPEG、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、エチレングリコール/プロピレングリコールのコポリマーなどが挙げられる。ポリマーは、任意の分子量のものであってよく、分岐または未分岐であってもよい。抗体に結合しているポリマーの数は変動する場合があります、1つより多いポリマーが結合している場合、それらは同じまたは異なる分子であってもよい。

【0377】

【00402】ある特定の実施形態では、コンジュゲート部分は、磁気ビーズなどの精製のための部分であり得る。

30

【0378】

【00403】ある特定の実施形態では、本明細書において提供される二機能性分子は、コンジュゲートのためのベースとして使用される。

【0379】

III. ポリヌクレオチドおよび組換え法

【00404】本開示は、本明細書において提供される二機能性分子をコードする単離されたポリヌクレオチドを提供する。本明細書で使用される場合、用語「核酸」または「ポリヌクレオチド」は、1本鎖形態または2本鎖形態のいずれかでのデオキシリボ核酸(DNA)またはリボ核酸(RNA)およびこれらのポリマーを指す。他に示さない限り、具体的なポリヌクレオチド配列は、その保存的に改変されたバリエーション(例えば、縮重コドン置換)、対立遺伝子、オルソログ、SNPおよび相補配列も、明確に示された配列と同様に非明示的に包含する。具体的には、縮重コドン置換は、1つまたは複数の選択された(または、すべての)コドンの3番目の位置が、混合塩基および/またはデオキシイノシン残基で置換されている配列を生成することによって達成され得る(Batzerら、Nucleic Acid Res. 19:5081(1991); Ohtsukaら、J. Biol. Chem. 260:2605~2608(1985); およびRossoliniら、Mol. Cell. Probes 8:91~98(1994)を参照されたい)。

40

【0380】

50

[00405]モノクローナル抗体をコードするDNAは、従来の手順を使用して（例えば、抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することが可能であるオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって）容易に単離および配列決定される。コードDNAは、合成法によっても得られ得る。

【0381】

[00406]二機能性分子をコードする単離されたポリヌクレオチドは、当技術分野において公知の組換え技術を使用して、さらなるクローニング（DNAの増幅）のために、または発現のためにベクターに挿入され得る。多数のベクターが入手可能である。ベクター構成要素として、これだけに限らないが、次の、単一配列、複製開始点、1つまたは複数のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター（例えば、SV40、CMV、EF-1 α ）および転写終結配列の1つまたは複数が一般に挙げられる。

10

【0382】

[00407]本開示は、本明細書において提供される単離されたポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。ある特定の実施形態では、本明細書において提供されるポリヌクレオチドは、二機能性分子、核酸配列に作動可能に連結された少なくとも1つのプロモーター（例えば、SV40、CMV、EF-1 α ）および少なくとも1つの選択マーカーをコードする。ベクターの例として、これだけに限らないが、レトロウイルス（レンチウイルスを含む）、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス（例えば、単純ヘルペスウイルス）、ポックスウイルス、バキュロウイルス、パピローマウイルス、パポバウイルス（例えば、SV40）、ラムダファージおよびM13ファージ、プラスミドpcDNA3.3、pMD18-T、pOptivect、pCMV、pEGFP、pIRES、pQD-Hyg-GSeu、pALTER、pBAD、pcDNA、pCal、pL、pET、pGEMEX、pGEX、pCI、pEGFT、pSV2、pFUSE、pVITRO、pVIVO、pMAL、pMONO、pSELECT、pUNO、pDUO、Psg5L、pBABE、pWPXL、pBI、p15TV-L、pPro18、pTD、pRS10、pLexA、pACT2.2、pCMV-SCRIPT.RTM.、pCDM8、pCDNA1.1/amp、pcDNA3.1、pRc/RSV、PCR2.1、pEF-1、pFB、pSG5、pXT1、pCDEF3、pSVSPORT、pEF-Bosなどが挙げられる。

20

【0383】

[00408]二機能性分子をコードするポリヌクレオチド配列を含むベクターは、クローニングおよび遺伝子発現のために宿主細胞に導入され得る。本明細書におけるベクター中のDNAをクローニングまたは発現するために好適な宿主細胞は、上に記載される原核生物、酵母または高等真核生物細胞である。この目的のために好適な原核生物として、例えばグラム陰性またはグラム陽性生物などの真正細菌、例えば、大腸菌属などの腸内細菌科、例えば、*E. coli*、エンテロバクター属、エルウィニア属、クレブシエラ属、プロテウス属、サルモネラ属、例えば、*Salmonella typhimurium*、セラチア属、例えば、*Serratia marcescans*および赤痢菌属ならびに、*B. subtilis*および*B. licheniformis*などの杆菌、*P. aeruginosa*などのシュードモナス属ならびにストレプトマイセス属が挙げられる。

30

40

【0384】

[00409]原核生物に加えて、糸状菌類または酵母などの真核性微生物は、二機能性分子をコードするベクターのための好適なクローニングまたは発現宿主である。*Saccharomyces cerevisiae*または一般的なパン酵母は、下等真核性宿主微生物では最も一般的に使用される。しかし、多数の他の属、種および株は、本明細書において一般に入手可能であり、有用である、例えば、*Schizosaccharomyces pombe*；クリベロミセス属宿主、例えば、*K. lactis*、*K. fragilis* (ATCC12, 424)、*K. bulgaricus* (ATCC16, 045)、*K. wickerhamii* (ATCC24, 178)、*K. waltii* (ATCC56, 500)、*K. drosophilae* (ATCC36, 906)、*K. the*

50

rmotolerans および *K. marxianus* など；ヤロウイア属 (*EP 402, 226*)；*Pichia pastoris* (*EP 183, 070*)；カンジダ属；*Trichoderma reesia* (*EP 244, 234*)；*Neurospora crassa*；シュワンニオミセス属、例えば、*Schwanniomyces occidentalis*；ならびに糸状菌類、例えば、ニューロスポラ属、ペニシリウム属、トリボクラジウム属など、およびアスペルギルス属宿主、例えば、*A. nidulans* および *A. niger* など。

【0385】

【00410】本明細書において提供されるグリコシル化された二機能性分子の発現のために好適な宿主細胞は、多細胞生物由来である。無脊椎動物細胞の例として、植物および昆虫細胞が挙げられる。多数のバキュロウイルス株およびバリエーションならびに、*Spodoptera frugiperda* (イモムシ)、*Aedes aegypti* (カ)、*Aedes albopictus* (カ)、*Drosophila melanogaster* (ショウジョウバエ (*fruit fly*))、および *Bombyx mori* などの宿主由来の対応する許容的昆虫宿主細胞が同定されている。トランスフェクションのための種々のウイルス株、例えば、*Autographa californica NPV* の L-1 バリエーションおよび *Bombyx mori NPV* の Bm-5 株は公的に入手可能であり、そのようなウイルスは、本発明による本明細書のウイルスとして、特に *Spodoptera frugiperda* 細胞のトランスフェクションのために使用され得る。ワタ、トウモロコシ、ジャガイモ、ダイズ、ペチュニア、トマトおよびタバコの植物細胞培養物も宿主として利用され得る。

【0386】

【00411】しかし、関心は脊椎動物細胞において最も大きく、培養（組織培養）での脊椎動物細胞の増殖は、日常的手順である。有用な哺乳動物宿主細胞系の例は、SV40 によって形質転換されたサル腎臓 CV1 系 (*COS-7*、*ATCC CRL 1651*)；ヒト胚性腎臓系 (293 または懸濁培養での増殖のためにサブクローニングされた 293 細胞、*Graham* ら、*J. Gen Virol.* 36:59 (1977))；ベビーハムスター腎臓細胞 (*BHK*、*ATCC CCL 10*)；チャイニーズハムスター卵巣細胞／*-DHFR* (*CHO*、*Urlaub* ら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980))；マウスセルトリ細胞 (*TM4*、*Mather*、*Biol. Reprod.* 23:243~251 (1980))；サル腎臓細胞 (*CV1* *ATCC CCL 70*)；アフリカミドリザル腎臓細胞 (*VERO-76*、*ATCC CRL-1587*)；ヒト子宮頸癌細胞 (*HELA*、*ATCC CCL 2*)；イヌ腎臓細胞 (*MDCK*、*ATCC CCL 34*)；バッファローラット肝臓細胞 (*BRL 3 A*、*ATCC CRL 1442*)；ヒト肺細胞 (*W138*、*ATCC CCL 75*)；ヒト肝臓細胞 (*Hep G2*、*HB 8065*)；マウス乳房腫瘍 (*MMT 0605 62*、*ATCC CCL 51*)；*TRI* 細胞 (*Mather* ら、*Annals N. Y. Acad. Sci.* 383:44~68 (1982))；*MRC5* 細胞；*FS4* 細胞；およびヒト肝細胞腫系 (*Hep G2*) である。一部の実施形態では、宿主細胞は、*CHO*、*BHK*、*NS0*、293 およびそれらの派生物などの哺乳動物培養細胞系である。

【0387】

【00412】宿主細胞は、二機能性分子の産生のための上に記載された発現またはクローニングベクターを用いて形質転換され、プロモーターを誘導する、形質転換体を選択する、または所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために適宜改変された従来の栄養培地で培養される。別の実施形態では、二機能性分子は、当技術分野において公知の相同組換えによって産生され得る。ある特定の実施形態では、宿主細胞は、本明細書において提供される二機能性分子を産生することが可能である。

【0388】

【00413】本開示は、本明細書において提供される宿主細胞を本開示のベクターが発現される条件下で培養することを含む、本明細書において提供される二機能性分子を発現す

10

20

30

40

50

る方法も提供する。本明細書において提供される二機能性分子を産生するために使用される宿主細胞は、種々の培地において培養され得る。Ham's F10 (Sigma)、Minimal Essential Medium (MEM)、(Sigma)、RPMI-1640 (Sigma) および Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)、Sigma) などの市販で入手可能である培地は、宿主細胞を培養するために好適である。加えて、Hamら、Meth. Enz. 58: 44 (1979)、Barnesら、Anal. Biochem. 102: 255 (1980)、米国特許第4,767,704号;第4,657,866号;第4,927,762号;第4,560,655号;または第5,122,469号;WO90/03430;WO87/00195または米国特許再発行第30,985号に記載されている任意の培地も宿主細胞のための培養培地として使用され得る。これらの培地のいずれも必要に応じて、ホルモン、および/または他の増殖因子(インスリン、トランスフェリンもしくは上皮増殖因子など)、塩(塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウムおよびリン酸塩など)、緩衝剤(HEPESなど)、ヌクレオチド(アデノシンおよびチミジンなど)、抗生物質(GENTAMYCINTM薬など)、微量元素(マイクロモル範囲の最終濃度で通常存在する無機化合物として定義される)、およびグルコースまたは等価のエネルギー源を補充され得る。任意の他の必要な補充物は、当業者に公知と思われる適切な濃度で含まれてもよい。温度、pHなどの培養条件は、発現のために選択された宿主細胞を用いて以前使用されたものであり、当業者に明らかである。

10

20

30

40

50

【0389】

[00414]組換え技術を使用する場合、二機能性分子は、細胞内で、細胞膜周辺腔において、または培地に直接分泌されて産生され得る。二機能性分子が細胞内で産生される場合、第1のステップとして、宿主細胞または溶解された断片のいずれかの粒子性のデブリが、例えば、遠心分離または限外濾過によって除去される。Carterら、Bio/Technology 10:163~167 (1992)は、E. coliの細胞膜周辺腔に分泌される抗体を単離するための手順を記載している。簡潔には細胞ペーストは、酢酸ナトリウム(pH3.5)、EDTAおよびフッ化フェニルメチルスルホニル(PMSF)の存在下で約30分間かけて解凍される。細胞デブリは、遠心分離によって除去され得る。二機能性分子が培地に分泌される場合、そのような発現系由来の上清は、市販で入手可能なタンパク質濃縮フィルター、例えば、AmiconまたはMillipore Pellicon限外濾過装置を使用して、一般に最初に濃縮される。PMSFなどのプロテアーゼ阻害剤は、タンパク質分解を阻害するために上記のステップのいずれにも含まれてよく、抗生物質は、外来性の夾雑物の増殖を予防するために含まれてよい。

【0390】

[00415]細胞から調製された二機能性分子は、例えば、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、DEAEセルロースイオン交換クロマトグラフィー、硫酸アンモニウム沈殿、塩析および親和性クロマトグラフィーを使用して精製され得るが、親和性クロマトグラフィーが好ましい精製技術である。

【0391】

[00416]ある特定の実施形態では、固相に固定されたプロテインAは、抗体およびその抗原結合性断片の免疫親和性精製のために使用される。親和性リガンドとしてのプロテインAの適合性は、二機能性分子中に存在する任意の免疫グロブリンFcドメインの種およびアイソタイプに依存する。プロテインAは、ヒトガンマ1、ガンマ2またはガンマ4重鎖に基づく抗体を精製するために使用され得る(Lindmarkら、J. Immunol. Meth. 62:1~13 (1983))。プロテインGは、すべてのマウスアイソタイプについて、およびヒトガンマ3について推奨される(Gussら、EMBO J. 5:1567 1575 (1986))。親和性リガンドが結合するマトリックスは、ほとんどの場合アガロースであるが、他のマトリックスも利用可能である。制御された多孔性ガラスまたはポリ(スチレンジビニル)ベンゼンなどの機械的に安定なマトリックスは、速い流速およびアガロースを用いて達成され得るよりも短い処理時間を可能にする。

抗体がCH₃ドメインを含む場合、Bakerbond ABXTM樹脂（J. T. Baker、Phillipsburg、N. J.）は、精製のために有用である。タンパク質精製のための他の技術、例えば、イオン交換カラム、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカ上でのクロマトグラフィー、ヘパリンSEPHAROSE TM上でのクロマトグラフィー、アニオンまたはカチオン交換樹脂（ポリアスパラギン酸カラムなど）でのクロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE、および硫酸アンモニウム沈殿などでの分画も回収される抗体に応じて利用可能である。

【0392】

【00417】任意の予備精製ステップ（複数可）に続いて、目的の抗体および夾雑物を含む混合物は、約2.5～4.5の間のpHの溶出緩衝液を使用して、好ましくは低塩濃度（例えば、約0～0.25 Mの塩）で実施される低pH疎水性相互作用クロマトグラフィーに供され得る。

【0393】

IV. 医薬組成物

【00418】本開示は、二機能性分子および1つまたは複数の薬学的に許容される担体を含む医薬組成物をさらに提供する。

【0394】

【00419】本明細書において開示される医薬組成物における使用のための薬学的に許容される担体として、例えば、薬学的に許容される液体、ゲルまたは固形担体、水性ビヒクル、非水性ビヒクル、抗菌剤、等張剤、緩衝剤、抗酸化剤、麻酔薬、懸濁化／ディスペンディング（dispensing）剤、捕捉もしくはキレート剤、希釈剤、アジュバント、賦形剤、または非毒性補助物質、当技術分野において公知の他の構成要素、またはこれらの種々の組合せを挙げることができる。

【0395】

【00420】好適な構成要素として、例えば、抗酸化剤、注入剤、結合剤、崩壊剤、緩衝剤、保存剤、潤滑剤、香味剤、増粘剤、着色剤、乳化剤、または糖類およびシクロデキストリンなどの安定化剤を挙げることができる。好適な抗酸化剤として、例えば、メチオニン、アスコルビン酸、EDTA、チオ硫酸ナトリウム、白金、カタラーゼ、クエン酸、システイン、チオグリセロール、チオグリコール酸、チオソルビトール、ブチル化ヒドロキシアニソール、ブチル化ヒドロキシトルエンおよび／または没食子酸プロピルを挙げることができる。本明細書に開示されるとおり、本明細書において提供される二機能性分子およびコンジュゲートを含む組成物中でのメチオニンなどの1つまたは複数の抗酸化剤の含有は、二機能性分子の酸化を減少させる。酸化のこの低減は、結合親和性の減少を防止または低減し、それにより抗体安定性を改善し、有効期間を最大化する。したがってある特定の実施形態では、医薬組成物は、本明細書において開示される1つまたは複数の二機能性分子およびメチオニンなどの1つまたは複数の抗酸化剤を含んで提供される。さらに提供されるのは、二機能性分子をメチオニンなどの1つまたは複数の抗酸化剤と混合することによって、本明細書において提供される二機能性分子の酸化を防止する、有効期間を延長するおよび／または有効性を改善するための方法である。

【0396】

【00421】さらに例示するために、薬学的に許容される担体として、例えば、水性ビヒクル、例えば、塩化ナトリウム注射剤、リンゲル注射剤、等張デキストロース注射剤、無菌水注射剤、またはデキストロースおよび乳糖リンゲル注射剤、非水性ビヒクル、例えば、植物由来の固定油、綿実油、トウモロコシ油、ゴマ油またはピーナッツ油、静菌性または静真菌性濃度の抗菌薬、等張剤、例えば、塩化ナトリウムまたはデキストロース、緩衝剤、例えばリン酸またはクエン酸緩衝剤、抗酸化剤、例えば重硫酸ナトリウム、局所麻酔薬、例えば、プロカイン塩酸塩、懸濁化剤および分散剤、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシプロピルメチルセルロースもしくはポリビニルピロリドン、乳化剤、例えば、ポリソルベート80（TWEEN（登録商標）-80）、捕捉もしくはキレート剤、例えば、EDTA（エチレンジアミン四酢酸）もしくはEGTA（エチレン

グリコール四酢酸)、エチルアルコール、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、水酸化ナトリウム、塩酸、クエン酸または乳酸を挙げることができる。担体として利用される抗菌薬は、フェノールまたはクレゾール、水銀、ベンジルアルコール、クロロブタノール、メチルおよびプロピル p-ヒドロキシ安息香酸エステル、チメロサル、塩化ベンザルコニウムならびにベンゼトニウム塩化物が挙げられて、複数用量容器中の医薬組成物に添加され得る。好適な賦形剤として、例えば、水、生理食塩水、デキストロース、グリセロールまたはエタノールを挙げることができる。好適な非毒性補助物質として、例えば、湿潤または乳化剤、pH緩衝剤、安定化剤、溶解性促進剤、または酢酸ナトリウム、ソルビタンモノラウレート、トリエタノールアミンオレエートもしくはシクロデキストリンなどの薬剤を挙げることができる。

10

【0397】

【00422】医薬組成物は、液体溶液剤、懸濁剤、乳剤、丸剤、カプセル剤、錠剤、徐放製剤または粉末剤でありうる。経口製剤として、医薬品グレードのマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン (polyvinyl pyrrolidone)、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどの標準的担体を挙げることができる。

【0398】

【00423】ある特定の実施形態では、医薬組成物は、注射可能組成物に製剤化され得る。注射可能医薬組成物は、任意の従来の形態、例えば、液体溶液剤、懸濁剤、乳剤または液体溶液剤、懸濁剤、乳剤を生成するために好適な固形形態に調製され得る。注射のための調製物として、注射のために準備された無菌および／または非発熱性溶液、無菌乾燥可溶性生成物、例えば、皮下組織用錠剤を含む使用直前に溶媒と合わせられるように準備された凍結乾燥粉末剤、注射のために準備された無菌懸濁剤、使用直前にビヒクルと合わせられるように準備された無菌乾燥不溶性生成物、ならびに無菌および／または非発熱性乳剤を挙げることができる。溶液は、水性または非水性のいずれであってもよい。

20

【0399】

【00424】ある特定の実施形態では、単位用量非経口調製物は、アンプル、バイアルまたは針付きシリンジに包装される。非経口投与のためのすべての調製物は、当技術分野において公知であり、実行されるとおり無菌および非発熱性である必要がある。

【0400】

30

【00425】ある特定の実施形態では、無菌凍結乾燥粉末剤は、本明細書において開示される二機能性分子を好適な溶媒に溶解することによって調製される。溶媒は、粉末から調製された粉末剤または再構成溶液の安定性または他の薬理学的構成要素を改善する賦形剤を含有し得る。使用され得る賦形剤として、これだけに限らないが、水、デキストロース、ソルビトール (sorbitol)、果糖、コーンシロップ、キシリトール、グリセリン、グルコース、ショ糖または他の好適な薬剤が挙げられる。溶媒は、緩衝剤、例えば、クエン酸塩、リン酸ナトリウムもしくはリン酸カリウムまたは当業者に公知であり、一実施形態ではほぼ中性のpHであるそのような他の緩衝剤を含んでよい。溶液の続く無菌濾過後の、当業者に公知の標準条件下での凍結乾燥は、所望の製剤を提供する。一実施形態では、生じた溶液は、凍結乾燥のためにバイアルに分配される。各バイアルは、二機能性分子またはその組成物の単一投薬量または複数の投薬量を含有し得る。1用量または用量セットのために必要なものを少量 (例えば、約10%) 超えて含む過剰充填バイアルは、正確な試料退薬および正確な投薬を容易にするために許容される。凍結乾燥粉末剤は、約4℃から室温などの適切な条件下で保存され得る。

40

【0401】

【00426】注射用水を用いた凍結乾燥粉末剤の再構成は、非経口投与における使用のための製剤を提供する。一実施形態では、再構成のために、無菌および／または非発熱性水または他の液体の好適な担体が凍結乾燥粉末剤に添加される。正確な量は、与えられる選択された治療に応じて、経験的に決定され得る。

【0402】

50

V. キット

[00427]ある特定の実施形態では、本開示は、本明細書において提供される二機能性分子および／または本明細書において提供される医薬組成物を含むキットを提供する。ある特定の実施形態では、本開示は、本明細書において提供される二機能性分子および第2の治療剤を含むキットを提供する。ある特定の実施形態では、第2の治療剤は、化学療法剤、抗がん薬物、放射線療法、免疫療法剤、血管新生抑制剤、標的療法、細胞療法、遺伝子療法、ホルモン療法、抗ウイルス剤、抗菌薬、鎮痛薬、抗酸化剤、金属キレーターおよびサイトカインからなる群から選択される。

[0403]

[00428]そのようなキットは、当業者に容易に明らかであるとおり、所望により、1つまたは複数の種々の従来の医薬品キット構成要素、例えば、1つまたは複数の薬学的に許容される担体を含む容器、追加的容器などをさらに含む場合がある。投与される構成要素の量、投与の指針および／または構成要素を混合するための指針を示す使用説明書も、挿入物またはラベルとしてのいずれかでキットに含まれてよい。

[0404]

VI. 使用方法

[00429]別の態様では、本開示は、対象におけるPD-L1関連疾患を処置する、防止する、または軽減する方法であって、対象に、治療有効量の本明細書において提供される二機能性分子、または本明細書において提供される医薬組成物もしくはキットを投与することを含む、方法を提供する。

[0405]

[00430]ある特定の実施形態では、対象は、ヒトである。

[0406]

[00431]PD-1関連状態および障害は、免疫関連疾患もしくは障害、がん、自己免疫疾患、または感染症であってもよい。

[0407]

[00432]ある特定の実施形態では、PD-1関連状態および障害としては、がん、例えば、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、腎細胞がん、結腸直腸がん、卵巣がん、乳がん、膵臓がん、胃癌、膀胱がん、食道がん、中皮腫、黒色腫、頭頸部がん、甲状腺がん、肉腫、前立腺がん、神経膠芽腫、子宮頸がん、胸腺癌、白血病、リンパ腫、骨髄腫、菌状息肉症、メルケル細胞がん、ならびに他の血液悪性腫瘍、例えば、古典的ホジキンリンパ腫（CHL）、縦隔原発大細胞型B細胞リンパ腫、T細胞／組織球豊富型B細胞リンパ腫、EBV陽性および陰性PTLD、ならびにEBV関連びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）、形質芽球性リンパ腫、節外性NK／T細胞リンパ腫、上咽頭癌、およびHHV8関連原発性滲出液リンパ腫、ホジキンリンパ腫、中枢神経系（CNS）の新生物、例えば、原発性CNSリンパ腫、脊髄軸腫瘍、脳幹グリオーマが挙げられる。ある特定の実施形態では、腫瘍およびがんは、転移性、特に、PD-L1を発現する転移性腫瘍である。

[0408]

[00433]ある特定の実施形態では、PD-1関連状態および障害としては、自己免疫疾患が挙げられる。自己免疫疾患としては、限定されるものではないが、後天性免疫不全症候群（AIDS、自己免疫成分を含むウイルス疾患である）、円形脱毛症、強直性脊椎炎、抗リン脂質症候群、自己免疫性アジソン病、自己免疫性糖尿病、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性肝炎、自己免疫性内耳疾患（AIED）、自己免疫性リンパ増殖症候群（ALPS）、自己免疫性血小板減少性紫斑病（ATP）、ベーチェット病、心筋症、セリアック病－疱疹状皮膚炎（dermatitis herpetiformis）；慢性疲労免疫機能障害症候群（CFIDS）、慢性炎症性脱髄性多発性神経障害（CIPD）、瘢痕性類天疱瘡（cicatricial pemphigoid）、寒冷凝集素症、クレスト症候群、クローン病、デゴス病、若年性皮膚筋炎、円板状ループス、本態性混合型クリオグロブリン血症、線維筋痛－線維筋炎、グレーブス病、ギラン・バレー症候群、橋

本甲状腺炎、特発性肺線維症、特発性血小板減少性紫斑病（ITP）、IgA腎症、インスリン依存性糖尿病、若年性慢性関節炎（スティル病）、若年性関節リウマチ、メニエール病、混合性結合組織疾患、多発性硬化症、重症筋無力症、悪性貧血（*pemaciously anemia*）、結節性多発動脈炎、多発性軟骨炎、多腺性症候群、リウマチ性多発筋痛、多発筋炎および皮膚筋炎、原発性無ガンマグロブリン血症、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、乾癬性関節炎、レイノー現象、ライター症候群、リウマチ熱、リウマチ性関節炎、サルコイドーシス、強皮症（全身性進行性硬化症（*PPSS*）、全身性硬化症（*SS*）としても知られる）、シェーグレン症候群、スティフマン症候群、全身性エリテマトーデス、高安動脈炎、側頭動脈炎／巨細胞動脈炎、潰瘍性大腸炎、ブドウ膜炎、白斑およびウェグナー肉芽腫症が挙げられる。

10

【0409】

【00434】ある特定の実施形態では、PD-1 関連状態および障害としては、感染症が挙げられる。感染症としては、例えば、慢性ウイルス感染、例えば、真菌感染、寄生虫／原虫感染または慢性ウイルス感染、例えば、マラリア、コクシジオイデス症（*coccidioiodycosis immitis*）、ヒストプラズマ症、爪甲真菌症、アスペルギルス症（*aspergillosis*）、プラストミセス症、カンジダ症（*candidiasis albicans*）、パラコクシジオイデス症（*paracoccidioiodycosis*）、微孢子虫症、アカントアメーバ角膜炎、アメーバ症、回虫症、バベシア症、バランチジウム症、アライグマ回虫症、シャーガス病、肝吸虫症、ラセンウジバエ症（*Cochliomyia*）、クリプトスポリジウム症、裂頭条虫症、メジナ虫症、エキノコックス症、象皮病、蟻虫症、肝蛭症、肥大吸虫症、フィラリア症、ランブル鞭毛虫症、顎口虫症、膜様条虫症、イソスポーラ症、片山熱、リーシュマニア症、ライム病、メタゴニムス症、ハエウジ症、オンコセルカ症、シラミ寄生症、疥癬、住血吸虫症、睡眠病、ふん線虫症、条虫症、トキソカラ症、トキソプラズマ症、旋毛虫病、鞭虫症、トリパノソーマ症、蠕虫感染、B型肝炎（HBV）、C型肝炎（HCV）、ヘルペスウイルス、エプスタイン・バーウイルス、HIV-1、HIV-2、サイトメガロウイルス、単純ヘルペスウイルスI型、単純ヘルペスウイルスII型、ヒトパピローマウイルス、アデノウイルス、カポジ西肉腫関連ヘルペスウイルス伝染病、シンリングウイルス（トルクテノウイルス）、ヒトTリンパ向性ウイルスI、ヒトTリンパ向性ウイルスII、水痘帯状疱疹ウイルス、JCウイルスまたはBKウイルスの感染が挙げられる。

20

30

【0410】

【00435】ある特定の実施形態では、PD-L1 関連疾患は、PD-L1を発現するがん、またはPD-L1を過剰発現するがんである。「PD-L1を発現するがん」は、細胞表面上にPD-L1タンパク質が存在するがん細胞または腫瘍細胞を含むものである。「PD-L1を過剰発現するがん」は、同じ組織型の非がん性細胞と比較して、がんまたは腫瘍細胞の細胞表面に、有意に高いレベルのPD-L1を有するものである。

【0411】

【00436】PD-L1の発現または過剰発現を、細胞の表面上に存在するPD-L1のレベルの上昇を評価することによる（例えば、免疫組織化学アッセイ；IHCによる）、診断または予後診断アッセイにおいて決定することができる。あるいは、またはさらに、当業者であれば、例えば、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション（FISH；1998年10月に公開されたWO98／45479を参照されたい）、サザンブロッティング、またはポリメラーゼ連鎖反応（PCR）技術、例えば、リアルタイム定量的PCR（RT-PCR）などによって、細胞中のPD-L1をコードする核酸のレベルを測定することができる。また、当業者であれば、血清などの生体液中の脱落抗原（例えば、PD-L1細胞外ドメインまたは可溶性PD-L1）を測定することによって、PD-L1の過剰発現を試験することもできる。上記アッセイの他に、種々の *in vivo* アッセイが当業者には利用可能である。例えば、当業者であれば、患者の体内の細胞を、任意選択で検出可能標識、例えば、放射性同位体で標識された抗PD-L1抗体に曝露し、患者内の細胞への抗体の結合を、例えば、放射活性に関する外部走査によって、または抗体に予め

40

50

曝露した患者から採取した生検を分析することによって評価することができる。

【0412】

【00437】一部の実施形態では、対象は、PD-1アンタゴニストに応答する可能性が高いと同定されている。目的の生体試料上のPD-L1の存在またはレベルは、生体試料が誘導される対象がPD-1アンタゴニストに応答する可能性があるかどうかを示し得る。一部の実施形態では、試験試料は、がん細胞もしくは組織、または腫瘍浸潤性免疫細胞に由来する。ある特定の実施形態では、試験生体試料中のPD-L1の存在または上方調節されたレベルは、応答性の尤度を示す。本明細書で使用される場合、用語「上方調節された」とは、同じ抗体を使用して検出された参照試料中のPD-L1タンパク質レベルと比較して、試験試料中のPD-L1のタンパク質レベルにおける、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%以上の、またはそれより高い全体的な増加を指す。参照試料は、健康な、もしくは非疾患の個体から得られた対照試料、または試験試料が得られるのと同じ個体から得られた健康な、もしくは非疾患の試料であってもよい。例えば、参照試料は、試験試料（例えば、腫瘍）に隣接する、またはその近隣にある非疾患の試料であってもよい。

10

【0413】

【00438】ある特定の実施形態では、PD-L1関連疾患は、PD-L1/PD-1単剤療法に耐性である。本明細書で使用される場合、「PD-L1/PD-1単剤療法」とは、PD-L1およびPD-1相互作用またはシグナル伝達を阻害するか、または低減させることによって作用する単剤療法を指す。例示的なPD-L1/PD-1単剤療法は、抗PD-L1抗体療法、抗PD-1抗体療法、またはPD-1もしくはPD-L1に対する低分子阻害剤を含む単剤療法を含んでもよい。「耐性」とは、疾患がPD-L1/PD-1単剤療法に対する応答性または感受性がないか、または低減していることを意味する。低減した応答性は、例えば、所与の有効性を達成するための用量の増加の要求によって示され得る。ある特定の実施形態では、疾患は、PD-L1/PD-1単剤療法に対して非応答性であり得る。例えば、がん細胞または腫瘍サイズは、PD-L1/PD-1単剤療法を用いた処置にも拘わらず増加するか、または疾患は、その以前の状態に戻る退縮、例えば、部分的回復後の以前の症状の復帰を示した。PD-L1/PD-1単剤療法に対する耐性は、*de novo*であるか、または後天性であってもよい。

20

30

【0414】

【00439】別の態様では、本開示は、免疫抑制性サイトカインの抑制、持続的免疫応答の誘導、または抗腫瘍免疫の刺激から利益を受ける疾患または状態を対象において処置する、防止する、または軽減する方法であって、有効量の本明細書において提供される二機能性分子、または本明細書において提供される医薬組成物を投与することを含む、方法を提供する。

【0415】

【00440】一部の実施形態では、免疫抑制性サイトカインは、TGFβまたはIL-1である。一部の実施形態では、免疫抑制性サイトカインは、TGFβ1またはIL-1βである。

40

【0416】

【00441】一部の実施形態では、疾患または状態は、TGFβ関連疾患または状態である。一部の実施形態では、TGFβ関連疾患は、がん、線維性疾患、または腎臓病である。

【0417】

【00442】ある特定の実施形態では、TGFβ関連疾患は、がんである。ある特定の実施形態では、がんは、結腸直腸がん、乳がん、卵巣がん、膵がん、胃がん、前立腺がん、腎がん、子宮頸がん、骨髄腫、リンパ腫、白血病、甲状腺がん、子宮内膜がん、子宮がん、膀胱がん、神経内分泌がん、頭頸部がん、肝臓がん、上咽頭がん、精巣がん、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、黒色腫、基底細胞がん、皮膚がん、皮膚扁平上皮がん、隆起性皮

50

膚線維肉腫、メルケル細胞癌、神経膠芽腫、神経膠腫、肉腫、中皮腫、および骨髄異形成症候群からなる群から選択される。

【0418】

【00443】ある特定の実施形態では、TGFβ関連疾患は、線維性疾患である。線維性疾患は、線維症を含む疾患または状態である。線維症は、例えば、肺、肝臓、腎臓、皮膚、心臓、腸または筋肉における、慢性臓器傷害の一般的な特徴である瘢痕化プロセスである。線維症は、トランスフォーミング増殖因子-β（TGF-β）の活性の上昇を特徴とし、細胞外マトリックスおよび他の線維症関連タンパク質の沈着の増加または変化をもたらす。

【0419】

【00444】線維性疾患は、肺、肝臓、腎臓、眼、皮膚、心臓、腸または筋肉における線維性疾患を含んでもよい。肺における線維性疾患の例としては、肺線維症、嚢胞性線維症、肺高血圧、進行性塊状線維症、閉塞性細気管支炎、慢性喘息と関連する気道再モデリングまたは特発性肺線維症（idiopathic pulmonary）が挙げられる。肝臓における線維性疾患の例としては、肝硬変または非アルコール性脂肪性肝炎が挙げられる。腎臓における線維性疾患の例としては、腎線維症、虚血性腎傷害、尿細管間質性線維症、糖尿病性ネフロパシー、腎硬化症、または腎臓毒性などが挙げられる。眼における線維性疾患の例としては、角膜線維症、網膜下線維症などが挙げられる。皮膚における線維性疾患の例としては、腎性全身性線維症、ケロイドまたは強皮症などが挙げられる。心臓における線維性疾患の例としては、心内膜心筋線維症または陳旧性心筋梗塞が挙げられる。

【0420】

【00445】一部の実施形態では、疾患または状態は、IL-1関連疾患または状態である。一部の実施形態では、IL-1関連疾患は、自己炎症疾患、代謝症候群、急性炎症、慢性炎症または悪性腫瘍である。

【0421】

【00446】一部の実施形態では、疾患または状態は、免疫賦活性ポリペプチド、例えば、可溶性LAG-3を用いてMHCIIシグナル伝達を刺激することによる持続的免疫応答の誘導から利益を受ける。一部の実施形態では、疾患または状態は、がん、ウイルス感染、寄生虫感染、またはその組合せである。

【0422】

【00447】一部の実施形態では、疾患または状態は、免疫阻害性受容体シグナル伝達を阻害することによる抗腫瘍免疫の刺激から利益を受ける。一部の実施形態では、免疫阻害性受容体は、SIRPαである。ある特定の実施形態では、疾患、障害または状態は、がん、固形腫瘍、慢性感染、炎症疾患、多発性硬化症、自己免疫疾患、神経疾患、脳傷害、神経傷害、多血症、ヘモクロマトーシス、外傷、敗血性ショック、線維症、アテローム性動脈硬化症、肥満、II型糖尿病、移植片機能障害、または関節炎などの、SIRPα関連である。一部の実施形態では、がんは、肛門がん、虫垂がん、星状細胞腫、基底細胞癌、胆嚢がん、胃がん、肺がん、気管支がん、骨がん、肝臓および胆管がん、膵がん、乳がん、肝臓がん、卵巣がん、精巣がん、腎臓がん、腎盂および尿管がん、唾液腺がん、小腸がん、尿道がん、膀胱がん、頭頸部がん、脊椎がん、脳がん、子宮頸がん、子宮がん、子宮内膜がん、結腸がん、結腸直腸がん、直腸がん、肛門がん、食道がん、胃腸がん、皮膚がん、前立腺がん、下垂体がん、膣がん、甲状腺がん、咽頭がん、神経膠芽腫、黒色腫、骨髄異形成症候群、肉腫、奇形腫、慢性リンパ球性白血病（CLL）、慢性骨髄性白血病（CML）、急性リンパ球性白血病（ALL）、急性骨髄性白血病（AML）、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、TまたはB細胞リンパ腫、GI臓器間質腫瘍、軟部組織腫瘍、肝細胞癌、および腺癌である。一部の実施形態では、がんは、CD47を発現するがん、またはCD47を過剰発現するがんである。

【0423】

【00448】本明細書において提供される二機能性分子の治療有効量は、例えば、対象の

体重、年齢、過去の病歴、現在の薬剤、健康状態および交差反応の可能性、アレルギー、感度および有害な副作用、ならびに投与経路および疾患発生の程度などの、当技術分野で公知の種々の因子に依存するであろう。これらの、および他の環境または要件によって示されるように、当業者（例えば、医師または獣医師）であれば、投薬量を比例的に減少または増加させることができる。

【0424】

【00449】ある特定の実施形態では、本明細書において提供される二機能性分子を、約 0.01 mg/kg ～ 約 100 mg/kg の治療有効投薬量で投与することができる。ある特定の実施形態では、投与量は、処置の経過にわたって変化してもよい。例えば、ある特定の実施形態では、初期投与量は、その後の投与量よりも高くてもよい。ある特定の

10

実施形態では、投与量は、対象の反応に応じて処置の経過にわたって変化してもよい。

【0425】

【00450】投薬量レジメンを、最適な望ましい応答（例えば、治療応答）を提供するために調整することができる。例えば、単回用量を投与するか、またはいくつかの分割された用量を経時的に投与することができる。

【0426】

【00451】本明細書において提供される二機能性分子を、例えば、非経口（例えば、皮下、腹腔内、静脈内輸注を含む静脈内、筋肉内、もしくは皮内注射）または非-非経口（例えば、経口、鼻内、眼内、舌下、直腸、もしくは局所）経路などの、当技術分野で公知の任意の経路によって投与することができる。

20

【0427】

【00452】一部の実施形態では、本明細書において提供される二機能性分子を、単独で、または治療有効量の第2の治療剤と組み合わせて投与することができる。例えば、本明細書において開示される二機能性分子を、第2の治療剤、例えば、化学療法剤、抗がん薬物、放射線療法、免疫療法剤、抗血管新生剤、標的療法、細胞療法、遺伝子療法、ホルモン療法、抗ウイルス剤、抗生物質、鎮痛剤、酸化防止剤、金属キレート剤、またはサイトカインと組み合わせて投与することができる。

【0428】

【00453】本明細書で使用される場合、用語「免疫療法」とは、がんなどの疾患に対して戦うために免疫系を刺激するか、または一般的な方法で免疫系を促進する療法の型を指す。免疫療法の例としては、限定されるものではないが、チェックポイントモジュレーター、養子細胞移入、サイトカイン、腫瘍溶解性ウイルスおよび治療ワクチンが挙げられる。

30

【0429】

【00454】「標的療法」は、正常細胞ではなく、がん細胞中に存在する、もしくはがん細胞中により豊富に存在する特定のタンパク質などの、がんに関連する特定の分子、またはがんの成長および生存に寄与するがん微小環境中の標的分子に対して作用する療法の型である。標的療法は、治療剤を腫瘍に標的化することによって、正常組織に治療剤の効果が及ばないようにする。

【0430】

【00455】ある特定のこれらの実施形態では、1つまたは複数のさらなる治療剤と組み合わせて投与される本明細書において提供される二機能性分子を、1つまたは複数のさらなる治療剤と同時に投与することができ、ある特定のこれらの実施形態では、二機能性分子およびさらなる治療剤を、同じ医薬組成物の一部として投与することができる。しかしながら、別の治療剤と「組み合わせて」投与される二機能性分子は、その薬剤と同時に、またはその薬剤と同じ組成物中で投与する必要はない。別の薬剤の前に、またはその後に投与される二機能性分子は、抗体または抗原結合性断片と第2の薬剤とが異なる経路によって投与される場合であっても、その語句が本明細書で使用される場合、その薬剤と「組み合わせて」投与されると考えられる。可能な場合、本明細書において開示される抗体またはその抗原結合性断片と組み合わせて投与されるさらなる治療剤は、さらなる治療剤の

40

50

製品情報シートに列挙されたスケジュールに従って、またはPhysicians' Desk Reference 2003 (Physicians' Desk Reference、第57版、Medical Economics Company; ISBN: 1563634457; 第57版(2002年11月))もしくは当技術分野で周知のプロトコルに従って投与される。

【0431】

【00456】別の態様では、本開示はまた、対象におけるPD-L1関連疾患および／またはTGF-β関連疾患および／またはIL-1関連疾患および／またはCD47関連疾患を処置するために医薬の製造における、本明細書において提供される二機能性分子および／または本明細書において提供される医薬組成物の使用も提供する。

10

【0432】

【00457】以下の実施例は、特許請求される発明をより良好に例示するために提供され、本発明の範囲を限定すると解釈されるべきではない。以下に記載される全ての特定の組成物、材料、および方法は、全体として、または部分的に、本発明の範囲内にある。これらの特定の組成物、材料、および方法は、本発明を限定することを意図するものではなく、単に本発明の範囲内にある特定の実施形態を例示することを意図するものである。当業者であれば、発明能力を行使することなく、また、本発明の範囲から逸脱することなく、等価な組成物、材料、および方法を開発することができる。本発明の範囲内に依然としてありながら、記載される本明細書の手順に多くの変更を加えることができることが理解されるであろう。そのような変更が本発明の範囲内に含まれることは、本発明者らの意図するところである。

20

【実施例】

【0433】

実施例1

ヒト化4B6抗体の生成、発現および精製

【00458】以下に示される配列番号46のVH配列および配列番号47のVL配列を含む、特許WO2017161976A1に由来する抗PD-L1 mAb 4B6は、強力なPD-1/PD-L1遮断剤であった。この抗体は、マウスハイブリドーマ抗体から生成され、したがって、それは適切なヒト化を必要とした。マウス抗体4B6の可変ドメインの配列を使用して、その対応するマウスフレームワークと最も高い相同性を有する生殖系列配列を同定した。相補性決定領域(CDR)移植および復帰変異を有するヒト化バリエーションを設計するために、コンピューターモデリングを使用した。

30

【0434】

【00459】マウス／キメラ重鎖可変領域(配列番号46)：

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYVFTDYYMNWVKQSHGKSLIEWIGDINPNNGGTSYNHKFKGKATVTVDKSSRTAYMELLSLTSEDSAVYYCVKWGDGPFAYWGQGTLLVTVSA

【00460】マウス／キメラ軽鎖可変領域(配列番号47)：

DIIVMTQSQKFMSTSVGDRVSI TCKASQNVGA AVAWYQQKPGQSPKLLIY SASNRYTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNMQSEDLADYFCQQYSNYPTFGSGTKLG I K

40

【00461】注記：斜体部分はフレームワーク(FR)を表し、下線付き部分はCDR配列を表す。順序は、FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4である。

【0435】

【00462】軽鎖についてはVK／1-33および重鎖についてはVH／1-2のヒト生殖系列フレームワーク配列を、それぞれ、CDR移植のために使用した。

【0436】

【00463】重鎖バリエーション1、2、3および4(すなわち、VHバリエーション1、2、3および4)を、3個のCDRをVH生殖系列配列(配列番号48)に直接移植することに

50

よって、さらに、それぞれ、VHバリエーション1（配列番号49）についてはM69V、R71Vの、VHバリエーション2（配列番号50）についてはM69V、R71V、A93V、R94の、VHバリエーション3（配列番号51）についてはM69V、R71V、T73K、T28Vの、およびVHバリエーション4（配列番号52）についてはM69V、R71V、A93V、R94K、T73K、T28V、G44Sの復帰変異によって得た。

【0437】

[00464] 4B6 VHの生殖系列配列：

[00465] VH／1－2（4B6－VH生殖系列、配列番号48）：

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTTRDTSISTAY
MELSLRLRSDDTAVYYCAR

10

[00466] VH／1－2バリエーション1（4B6__Ha、配列番号49）：

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQGLEWMGDINPNNGGTSYNHKFKGRVTVTVDTSISTAY
MELSLRLRSDDTAVYYCARWGDGPFAYWQGQGTLLVTVSS

[00467] VH／1－2バリエーション2（4B6__Hb、配列番号50）：

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCCKASGYTFTDYYMNWVRQAPGQGLEWMGDINPNNGGTSYNHKFKGRVTVTVDTSISTAY
MELSLRLRSDDTAVYYCVKWGDGPFAYWQGQGTLLVTVSS

[00468] VH／1－2バリエーション3（Hu4B6__Hc、配列番号51）：

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCCKASGYVFTDYYMNWVRQAPGQGLEWMGDINPNNGGTSYNHKFKGRVTVTVDKTSISTAY
MELSLRLRSDDTAVYYCARWGDGPFAYWQGQGTLLVTVSS

20

[00469] VH／1－2バリエーション4（Hu4B6__Hd、配列番号52）：

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCCKASGYVFTDYYMNWVRQAPGQSLEWMGDINPNNGGTSYNHKFKGRVTVTVDKTSISTAY
MELSLRLRSDDTAVYYCVKWGDGPFAYWQGQGTLLVTVSS

[00470] 軽鎖バリエーション1および2（VLバリエーション1および2）を、3個のCDRを生殖系列配列（配列番号53）に直接移植することによって、さらに、それぞれ、VLバリエーション1（配列番号54）についてはF73L変異の、およびVLバリエーション2（配列番号55）についてはF73L、A43S、S60D変異の復帰変異によって得た。

30

【0438】

[00471] 4B6 VLの生殖系列配列：

[00472] VK／1－33（4B6－VL－生殖系列、配列番号53）：

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITTCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSSLQPEDIATYYCQQYDNLP

[00473] VK／1－33バリエーション1（Hu4B6__La、配列番号54）：

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITTCCKASQNVGA AVAWYQQKPGKAPKLLIYSASNRYTGVP SRFSGSGSGTDFTLT ISSSLQPEDIATYYCQQYSNYPTFGQGGTKLEIK

40

[00474] VK／1－33バリエーション2（Hu4B6__Lb、配列番号55）：

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITTCCKASQNVGA AVAWYQQKPGKSPKLLIYSASNRYTGVPDRFSGSGSGTDFTLT ISSSLQPEDIATYYCQQYSNYPTFGQGGTKLEIK

[00475] 上の重鎖および軽鎖の可変領域のcDNAを合成した後、ヒトIgG1およびヒトカッパの定常領域の配列を融合した。得られた抗体遺伝子配列を、発現ベクター中にクローニングした。表6に示されるように、ヒト化4B6バリエーション発現のためにQiagenからのPlasmid Maxiprep Systemを使用することによって大規模DNAを調製し、製造業者のプロトコールに従ってInvitrogenからの

50

ExpiFectamine (商標) CHO Reagent を使用して細胞トランスフェクションを実行した。細胞生存能力が 60 % を超えた場合、上清を採取し、0.22 μm の濾過カプセルを通して濾過して、細胞デブリを除去した。次いで、濾過された上清を、予め平衡化させたプロテイン A 親和性カラム上にロードした。プロテイン A 樹脂を、平衡化緩衝液 (PBS) で洗浄した後、25 mM クエン酸 (pH 3.5) を使用して抗体を溶出させた。精製された抗体溶液を、1 M Tris 塩基 (pH 9.0) を使用することによって pH 6.0 ~ 7.0 に調整した。内毒素を 1 EU/mg より下に制御した。最後に、精製された抗体を、SDS-PAGE によって特徴付けた。

【0439】

【00476】

【0440】

【表 8】

表 6. ヒト化 4B6 バリエーションの発現

マウス抗体 4B6 のヒト化配列の組合せ			
	Hu4B6_L0	Hu4B6_La (配列番号 54)	Hu4B6_Lb (配列番号 55)
Hu4B6_H0			
Hu4B6_Ha (配列番号 49)		Hu4B6_HaLa	Hu4B6_HaLb
Hu4B6_Hb (配列番号 50)		Hu4B6_HbLa	Hu4B6_HbLb
Hu4B6_Hc (配列番号 51)		Hu4B6_HcLa	Hu4B6_HcLb
Hu4B6_Hd (配列番号 52)		Hu4B6_HdLa	Hu4B6_HdLb

【0441】

【00477】注記：この表は、異なる変異の種々の配列組合せを示す。例えば、Hu4B6_HaLa は、2 種類の変異（重鎖 Hu4B6_Ha および軽鎖 Hu4B6_La）がヒト化マウス抗体 Hu4B6_HaLa 上に存在することなどを示す。Hu4B6_L0 および Hu4B6_H0 は、CDR 移植によって得られ、これらは重要な復帰変異を欠き、したがって、それらは発現のために使用されない。

【0442】

実施例 2

ELISA アッセイによるヒト PD-L1 への結合

【00478】ヒト化抗体の結合を、ELISA 法によって評価した。簡単に述べると、ヒト PD-L1-His を、プレート上に固定した。表 6 に記載のヒト化 4B6 抗体を、PBS 中で連続希釈し、1 h のインキュベーションのために添加した。次に、ヒト IgG-HRP に対するヤギ pAb および TMB を、OD 450 nm で結合の検出のために添加した。

【0443】

【00479】図 1 に示されるように、全てのヒト化バリエーションを、最良のものをスクリー

ニングするために試験した。全てのバリエーションがその結合活性を保持しHu4B6-HdLaは他のものよりも良好な結合活性を示した。

【0444】

【00480】本発明者らは、この抗体のCDR配列を分析し、重鎖のCDR2中にNGモチーフが存在することを見出した。発現および精製においては、脱アミノ化 (deamination) のリスクがあり得る。脱アミド化ホットスポットを除去するために、本発明者らは、Hu4B6-Hd中にG55A（以下で太字で拡大される）の変異を導入した。次いで、Hu4B6-Hg（配列番号56）を得て、図2に示されるように、ヒトPD-L1に対する親和性は影響されなかった。

【0445】

【00481】Hu4B6-Hg（配列番号56）：

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVFTDYVMNWVRQA
PGQSL EWMGDINPNNAGTSYNHKFKGRVTVTVDKSI STAY
MELSLRLRSDDTAVYYCVKWGDGPFAYWGQGTLVTVSS

実施例3

モノクローナルファージELISAおよび配列分析

【00482】Hu4B6-HgLaは、アンタゴニスト薬物としてのキメラ4B6に由来する活性を保持したが、より高い親和性が好ましかった。Hu4B6-HgLa配列に基づいて、CDR中の部位特異的変異誘発およびin vitroでの解離速度依存的選択のための数サイクルのパンニングを親和性成熟のためにさらに使用した。まず第1に、4B6-HgLaのVLおよびVHドメインを増幅し、ペプチドリンカー（G₄S）3によって結合させて、重複PCRによりscFvを形成させた後、SfiI切断部位を介して親和性成熟のための野生型配列としてのファージミドベクターpComb3x（Wuhan Miaoling Bio、P0862）中にサブクローニングした。

【0446】

【00483】重鎖と軽鎖との両方の抗体CDR3は通常、抗原結合において重要な役割を果たすため、両鎖のCDR1およびCDR2の4B6親和性成熟への個々の寄与を調査するために、上記のそれぞれのCDRについて1つのSPM（小摂動変異誘発）ファージライブラリーを構築する。両鎖のCDR1およびCDR2配列を生殖系列配列と整列させ、重鎖および軽鎖の可変領域の生殖系列は、それぞれ、IGHV1-2およびIGKV1-33であった。生殖系列CDR配列のバイオインフォマティクス分析結果を使用して、ライブラリーの設計を指導する。

【0447】

【00484】アミノ酸変異部位および置換配列を決定した後、変異ライブラリーの多様性を増大させるために縮重プライマーを設計した。多様化されたCDR断片を増幅して、4B6 scFv遺伝子変異体ライブラリーを構築した。scFv遺伝子を、pComb3XSSファージディスプレイベクターとライゲーションして、scFvライブラリーを生成した。それぞれのCDR（表2に列挙された、HCDR1、HCDR2、LCDR1およびLCDR2を含む）のコドンに基づくプライマーを、独立したライブラリーとして確立し、4B6親和性成熟ライブラリーを4つのライブラリーに分割した。その能力は、HCDR1については 1.76×10^8 CFM、HCDR2については 1.81×10^8 CFM、LCDR1については 2.34×10^8 CFMおよびLCDR2については 2.00×10^8 CFMであった。それぞれのライブラリーの5または6個のクローンを、コロニーの配列決定のために無作為に拾った。その結果、構築されたライブラリーの挿入率は100%であることが示された。

【0448】

【00485】 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のhPD-L1（Acro Biosystems、PD1-H5229）抗原を、ELISAプレートにコーティングし、 37°C で1h、 $200 \mu\text{L}$ のファージ（ 1×10^{10} pfu/mlのファージディスプレイライブラリー）と反応させた。洗浄後、約0.5のOD₆₀₀を有するTG1（Lucigen、60502-

2) を、感染のために直接ウェルに添加し、ファージと共に 15 min インキュベートした。ライブラリーファージミドレスキューのための対数中期培養物に対する十分な体積の M13KO7 ヘルパーファージ (NEB、N0315S)、およびファージを生成し、次のラウンドのスクリーニングのために精製した。スクリーニングプロセスを 3 ラウンドにわたって繰り返し、抗原の濃度を、2 回目のラウンドについては $2.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ に、3 回目のラウンドについては $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ に減少させた。

【0449】

[00486] これらのポリクローナルファージバリエーションの力価を検出するために、ELISA 結合アッセイを実行した。3 ラウンドのパンニングの後、4B6-H-CDR2、4B6-L-CDR1 および 4B6-L-CDR2 を含む 3 つのライブラリーが明らかに富化されている。

10

【0450】

[00487] これらの 3 つのライブラリーについて、各ライブラリーの 96 個のクローンを拾い、ファージ ELISA にかけて、その結合活性を検出した。簡単に述べると、 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ の hPD-L1 (Acro Biosystems、PD1-H5229) 抗原を ELISA プレートにコーティングし、 4°C で一晩静置した。次いで、 $300 \mu\text{L}$ の 3% (w/v) スkimミルクを、室温で 1 h、ブロックのために添加した。1 h 後、モノクローナル抗体断片ファージを含有する $100 \mu\text{L}$ の上清を、陰性対照として PBS と共に添加し、 37°C で 1 h インキュベートした。3 回洗浄するために 0.5% PBS + Tween (登録商標) -20 を使用し、 $100 \mu\text{L}$ の HRP 結合抗 M13 mAb (1:20000、Sino Biological、11973-MM05T-H) を添加した。室温で 1 h インキュベートした後、混合 TMB (InnoReagents、TMB-S-003) 基質試薬を添加し、プレートを室温で 5 min インキュベートした。反応を停止させるために 0.1 M の H_2SO_4 を添加した後、OD_{450 nm} を記録した。Genewiz (Suzhou, China) による DNA 配列決定のために陽性クローンを拾った。配列を表 7 に示した。

20

【0451】

[00488]

【0452】

30

40

50

【表 9】

表 7. 4B6 scFv ファージライブラリーの陽性クローンの配列

AM4B6_ Hg		QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVFTDYYMNWVRQAPGQSL EWMGDINPNNA <u>AGT</u> SYNHKFKGRVT <u>VTVDK</u> SI STAYMELSRLRSDD TAVYYC <u>VKWGDGPFAYWGQ</u> GLVTVSS(配列番号 56)
Hu4B6_ Hg.2	G57Q、 S59Q	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVFTDYYMNWVRQAPGQSL EWMGDINPNNA <u>AQTQ</u> YNHKFKGRVT <u>VTVDK</u> SI STAYMELSRLRSDD TAVYYC <u>VKWGDGPFAYWGQ</u> GLVTVSS(配列番号 58)
AM4B6_ Hg.3	G57E、S59L	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVFTDYYMNWVRQAPGQSL EWMGDINPNNA <u>AETL</u> YNHKFKGRVT <u>VTVDK</u> SI STAYMELSRLRSDD TAVYYC <u>VKWGDGPFAYWGQ</u> GLVTVSS(配列番号 59)
AM4B6_ Hg.5	G57Q、 S59V	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVFTDYYMNWVRQAPGQSL EWMGDINPNNA <u>AQT</u> VYNHKFKGRVT <u>VTVDK</u> SI STAYMELSRLRSDD TAVYYC <u>VKWGDGPFAYWGQ</u> GLVTVSS(配列番号 60)
Hu4B6_ La		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGA AA VAWYQQKPGKAPK LLIYSASNRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDIA TY YC <u>QQ</u> YSNYPTFGQGTKLEIK(配列番号 61)
AM4B6_ La.1	G30K、 A31G	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVKGA AA VAWYQQKPGKAPK LLIYSASNRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDIA TY YC <u>QQ</u> YSNYPTFGQGTKLEIK(配列番号 62)
AM4B6_ La.2	G30P	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVPA AA VAWYQQKPGKAPK LLIYSASNRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDIA TY YC <u>QQ</u> YSNYPTFGQGTKLEIK(配列番号 63)
AM4B6_ La.4	A51V、 N53D	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGA AA VAWYQQKPGKAPK LLIYSVSDRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDIA TY YC <u>QQ</u> YSNYPTFGQGTKLEIK(配列番号 64)

注: 下線付きの配列は CDR 配列を指し、太字のアミノ酸は変異アミノ酸を指す。

【0453】

実施例 4

結合親和性の検出のためのバイオレイヤー干渉法 (BLI)

[00489] ヒト PD-L1-Fc (Sino Biological、70110-D02H) 抗原に対する 4B6 scFv バリエーションの結合親和性を試験するために、バイオレイヤー干渉法 (BLI) を使用した。材料および手順を、それぞれ、表 8 および表 9 に示した。その結果を、表 10～12 に示した。結合親和性の結果に従って、4つの軽鎖バリエーション (L-CDR1-2、L-CDR1-3、L-CDR2-2、L-CDR2-3) および 3つの重鎖バリエーション (H-CDR2-2、H-CDR2-3、H-CDR2-5) を、将来の構築のために選択した。

【0454】

[00490]

【0455】

10

20

30

40

50

【表 10】

表 8. BLI アッセイにおいて使用した試料および材料

ウェルの型	試料 ID
ベースライン	KD 緩衝液
ロード	PD-L1-FC (3.25 µg/ml)
ベースライン 2	KD 緩衝液
試料	4B6 scFv (5.2 µg/ml)
参照ウェル	KD 緩衝液
再生	再生緩衝液
中和	KD 緩衝液

10

【0456】

[00491]

【0457】

【表 11】

表 9. BLI アッセイの手順

ステップの型	アッセイ時間
ベースライン	60s
ローディング	180s
ベースライン 2	120s
結合	180s
解離	240s
再生	5s

20

【0458】

[00492]

30

【0459】

【表 12】

表 10. 4B6-L-CDR1 変異バリエーションの結合親和性のランキング

試料番号	配列	$K_{on}(\times 10^5 M^{-1} s^{-1})$	$K_{off}(\times 10^{-3} M^{-1} s^{-1})$	$K_d(\times 10^{-9} M)$	増加倍率
L-CDR1-WT	KASQNVGAAVA (配列番号 4)	0.358	1.01	28.2	----
L-CDR1-1	KASQNVGAIVA (配列番号 7)	0.412	0.285	6.91	4.08
L-CDR1-2	KASQNVPAAVA (配列番号 8)	2.71	1.54	5.68	4.96
L-CDR1-3	KASQNVKGAVA (配列番号 9)	0.911	0.253	2.78	10.14

40

【0460】

[00493]

【0461】

50

【表 1 3】

表 11. 4B6-L-CDR2 変異バリエーションの結合親和性のランキング

試料番号	配列	$K_{on}(\times 10^5 M^{-1} s^{-1})$	$K_{off}(\times 10^{-3} M^{-1} s^{-1})$	$K_d(\times 10^{-9} M)$	増加倍率
L-CDR2-WT	SASNRYT (配列番号 5)	0.381	1.05	27.6	----
L-CDR2-1	SNSHRYT (配列番号 10)	0.468	0.377	8.06	3.42
L-CDR2-2	SRSVRYT (配列番号 11)	1.62	0.540	3.34	8.26
L-CDR2-3	SVSDRYT (配列番号 12)	1.24	0.543	4.37	6.32

10

【0 4 6 2】

[0 0 4 9 4]

【0 4 6 3】

【表 1 4】

表 12. 4B6-H-CDR2 変異バリエーションの結合親和性のランキング

20

試料番号	配列	$K_{on}(\times 10^5 M^{-1} s^{-1})$	$K_{off}(\times 10^{-3} M^{-1} s^{-1})$	$K_d(\times 10^{-9} M)$	増加倍率
H-CDR2-WT (G55A)	DINPNNAGTSYNHKFKG (配列番号 18)	0.463	1.24	26.7	----
H-CDR2-1	DINPNNADTMYNHHKFKG (配列番号 13)	1.41	0.495	3.52	7.6
H-CDR2-2	DINPNNAQTYNHHKFKG (配列番号 14)	1.01	0.244	2.42	11.03
H-CDR2-3	DINPNNAAETLYNHHKFKG (配列番号 15)	1.16	0.283	2.43	10.99
H-CDR2-4	DINPNNGLTSYNHHKFKG (配列番号 16)	1.17	0.517	4.43	6.03
H-CDR2-5	DINPNNAAQTVYNHHKFKG (配列番号 17)	1.02	0.245	2.40	11.13

30

【0 4 6 4】

実施例 5

AM-4B6-hIgG1-TGFβRII (1-136) 融合タンパク質の構築および発現

40

[00495] 選択された重鎖および軽鎖バリエーションを交差混合し、hIgG1-TGFβRII (1-136) 融合タンパク質と共に発現させた。TGFβRII (1-136) は、配列番号 79 に記載されるアミノ酸配列を有する：

TIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFRFSSTCD
NQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVC
HDPKLPYHDFILEDAA SPKCI MKEKKKPGETFFMCSCSSDE
CNDNIIFSEEYNTSNPD

hIgG1 のアミノ酸配列は、以下の通りである（配列番号 80）：

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVS

50

WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVSVTVPSSSLGTQT
 YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
 PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
 YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
 EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
 LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPV
 LDSDGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYT
 QKSLSLSPGK

TGFβRII (1-136) を、ペプチドリンカー (G4S)₄G (配列番号 68) を介して hIgG1 のカルボキシル末端に連結した。

【0465】

hKappa のアミノ酸配列は、以下の通りである (配列番号 82) :

RTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ
 WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYE
 KHKVYACEVTHQGLSSSPVTKSFNRGEC

[00496] 無傷抗体バリエーションの前に AM (親和性成熟した) を付した。重鎖および軽鎖の配列構築物を表 13 に示し、無傷抗体の設計を表 14 に示した。例えば、表 13 および表 14 に示されるように、二機能性分子「AM-4B6-hIgG1-TGFβRII バリエーション 1」は、重鎖および軽鎖を有し、重鎖は、N 末端から C 末端に向かって、Hu4B6_{Hg.2}-hIgG1-(G4S)₄G-TGFβRII (1-136) を含み、軽鎖は、N 末端から C 末端に向かって、Hu4B6_{La.1}-hKappa を含む。同じ命名法が表 14 中の他のバリエーションにも適用される。

【0466】

[00497] 重鎖および軽鎖の同時トランスフェクションを、製造業者のプロトコールに従って Invitrogen からの ExpiFectamine (商標) CHO Reagent (Thermo、A29129) を使用して実行した。上清を 10 日目に採取し、親和性クロマトグラフィーによって精製した。

【0467】

[00498]

【0468】

【表 15】

表 13. AM-4B6-hIgG1-TGFβRII 重鎖および軽鎖バリエーションの一覧

名称	変異部位	領域	配列
Hu4B6 _{Hg.2} -hIgG1-(G4S) ₄ G-TGFβRII	G57Q、S59Q	H-CDR2-2	DINPNNAQTQYNHKFKG
Hu4B6 _{Hg.3} -hIgG1-(G4S) ₄ G-TGFβRII	G57E、S59L	H-CDR2-3	DINPNNAETLYNHHKFKG
Hu4B6 _{Hg.5} -hIgG1-(G4S) ₄ G-TGFβRII	G57Q、S59V	H-CDR2-5	DINPNNAQTVYNHKFKG
Hu4B6 _{La.1} -hKappa	G30K、A31G	L-CDR1-3	KASQNVKGAVA
Hu4B6 _{La.2} -hKappa	G30P	L-CDR1-2	KASQNVPAAVA
Hu4B6 _{La.4} -hKappa	A51V、N53D	L-CDR2-2	SRSVRYT
Hu4B6 _{La.6} -hKappa	A51R、N53V	L-CDR2-3	SVSDRYT

【0469】

[00499]

【0470】

10

20

30

40

50

【表 16】

表 14. AM-4B6-hIgG1-TGFβRII 抗体バリエーションの一覧

試料番号	重鎖	軽鎖
AM-4B6-hIgG1-TGFβRII バリエーション 1	Hu4B6_Hg.2 (配列番号 58)	Hu4B6_La.1 (配列番号 62)
AM-4B6-hIgG1-TGFβRII バリエーション 2		Hu4B6_La.2 (配列番号 63)
AM-4B6-hIgG1-TGFβRII バリエーション 3		Hu4B6_La.4 (配列番号 64)
AM-4B6-hIgG1-TGFβRII バリエーション 4		Hu4B6_La.6 (配列番号 66)
AM-4B6-hIgG1-TGFβRII バリエーション 5	Hu4B6_Hg.3 (配列番号 59)	Hu4B6_La.1 (配列番号 62)
AM-4B6-hIgG1-TGFβRII バリエーション 6		Hu4B6_La.2 (配列番号 63)
AM-4B6-hIgG1-TGFβRII バリエーション 7		Hu4B6_La.4 (配列番号 64)
AM-4B6-hIgG1-TGFβRII バリエーション 8		Hu4B6_La.6 (配列番号 65)
AM-4B6-hIgG1-TGFβRII バリエーション 9	Hu4B6_Hg.5 (配列番号 60)	Hu4B6_La.1 (配列番号 62)
AM-4B6-hIgG1-TGFβRII バリエーション 10		Hu4B6_La.2 (配列番号 63)
AM-4B6-hIgG1-TGFβRII バリエーション 11		Hu4B6_La.4 (配列番号 64)
AM-4B6-hIgG1-TGFβRII バリエーション 12		Hu4B6_La.6 (配列番号 65)

【0471】

実施例 6

hPD-L1 に対する AM-4B6-hIgG1-TGFβRII バリエーションの結合親和性

[00500] ELISA アッセイによる hPD-L1 への結合

[00501] 1 μg/ml の hPD-L1 (Acro Biosystems、PD1-H5229) 抗原を ELISA プレートにコーティングし、4℃で一晩静置した。次いで、300 μl の 3% (w/v) スキムミルクを、室温で 1 h、ブロッキングのために添加した。1 h 後、100 nM ~ 0.006 nM (4 倍連続希釈) の範囲の濃度の AM-4B

6-hIgG1-TGFβRIIバリエントまたは元の4B6-hIgG1-TGFβRIIの100μlを、陰性対照としてPBSと共に添加し、室温で1hインキュベートした。0.5%PBS+Tween（登録商標）-20を、3回の洗浄のために使用し、100μlのHRPコンジュゲート化抗ヒトFc抗体（1:20000、Abcam、ab98624）を添加した。室温で1hインキュベートした後、混合TMB基質試薬（InnoReagents、TMB-S-003）を添加し、室温で5minインキュベートした後、0.1M H₂SO₄を添加することによって停止させた。OD450nmを、マイクロプレートリーダーによって記録した。

【0472】

【00502】図3A～図3Cに示されるように、元の4B6-hIgG1-TGFβRIIと比較した場合、全てのバリエントが、増強された結合シグナルおよび親和性を有していた。これらのバリエント間の限られた差異を考慮して、その結合親和性のさらなる評価のために表面プラズモン共鳴技術を使用した。

【0473】

【00503】BiacoreによるhPD-L1への結合

【00504】4μg/mlのAM-4B6-hIgG1-TGFβRIIバリエントまたは元の4B6-hIgG1-TGFβRIIを、SシリーズのプロテインAチップの表面上に固定した。ヒトPD-L1を適切な濃度勾配（0nM、1.875nM、3.75nM、7.5nM、15nM、30nM、60nM）に希釈し、Biacore 2000の試料チャンネルに注入した。その結果を、表15に示す。ヒトPD-L1に対するAM-4B6-hIgG1-TGFβRIIバリエント7の結合親和性は、元の4B6-hIgG1-TGFβRIIのものよりも約15倍改善された。

【0474】

【00505】

【0475】

【表17】

表 15. Biacore による hPD-L1 に対する AM-4B6-hIgG1-TGFβRII の結合親和性

分析物	試料番号	試料名	ka(1/Ms)	kd(1/s)	KD(M)
PD-L1 his	1	AM-4B6-hIgG1-TGFβRII バリエント5	2.060E+5	1.487E-4	7.218E-10
	2	AM-4B6-hIgG1-TGFβRII バリエント7	3.815E+5	1.479E-4	3.876E-10
	3	AM-4B6-hIgG1-TGFβRII バリエント2	3.231E+5	1.676E-4	5.189E-10
	4	AM-4B6-hIgG1-TGFβRII バリエント10	2.444E+5	1.476E-4	6.039E-10
	5	AM-4B6-hIgG1-TGFβRII バリエント11	2.688E+5	1.366E-4	5.083E-10
	6	4B6-hIgG1-TGFβRII	2.107E+5	0.001156	5.489E-9

【0476】

【00506】FACSアッセイによる細胞表面上に発現するPD-L1への結合

【00507】293T-PD-L1-CD3L細胞を、PD-L1抗体の特性評価のためにMabSpace Bioscienceによって生成した。細胞に、ヒトPD-L1と抗CD3 scFvとの両方をトランスフェクトした。AM-4B6-hIgG1-TGFβRIIバリエントまたは元の4B6-hIgG1-TGFβRIIを連続希釈（5倍希釈）して、希釈緩衝液（2%BSAを含むPBS）中で8つの濃度を得た。293T

－PD－L1－CD3 L細胞を採取し、遠心分離した。それらを、 2×10^6 細胞／m lの密度でPBS中に再懸濁した後、ウェルあたり100 μ lでプレートに添加した。遠心分離および上清の除去後、希釈した抗体をプレートに添加し、4℃で30 minインキュベートした。希釈緩衝液で2回洗浄した後、PEコンジュゲート化ロバ抗ヒトIg G (H + L) (Jackson immuno、709－116－149)をプレートに添加し、4℃で30 minインキュベートした。洗浄後、細胞を200 μ lのPBS中に再懸濁し、フローサイトメトリーによって分析した。

【0477】

【00508】図4に示されるように、これらの5つのバリエーションは、類似するEC50で293T－PD－L1－CD3 L細胞の表面上に発現されたPD－L1に結合した。バリエーション7は、他のものよりもわずかに低いEC50を有し、これはBiacoreによって測定された結合親和性の結果と一致していた。

10

【0478】

実施例7

AM－4B6－hIgG1－TGFBRIIバリエーションのPD－1／PD－L1遮断活性

【00509】ELISAアッセイによるPD－1／PD－L1およびB7－1／PD－L1遮断

リガンド／受容体遮断活性を試験するために、0.5 μ g／m lのhPD－L1－Fc抗原をELISAプレートにコーティングし、4℃で一晩静置した。300 μ lのブロッキング緩衝液を、室温で1 h、ブロッキングのために添加した。1 h後、100 nM～0.024 nM (4倍連続希釈)の範囲の濃度のAM－4B6－hIgG1－TGFBRIIバリエーション7または元の4B6－hIgG1－TGFBRIIの50 μ lを、1 μ g／m lの濃度のPD－L1－hisの50 μ lと共に添加し、室温で1 hインキュベートした。0.5% PBS + Tween (登録商標)－20を3回洗浄するために使用し、100 μ lのHRPコンジュゲート化ストレプトアビジン (1：5000、Abcam、カタログ番号ab7403)を添加した。室温で1.5 hインキュベートした後、混合TMB基質試薬を添加し、室温で5 minインキュベートした後、0.1 M H₂SO₄を添加することによって停止させた。OD450 nmを、マイクロプレートリーダーによって記録した。図5A～図5Bに示されるように、両試料はPD－L1／PD－1またはPD－L1／B7－1を遮断することができたが、AM－4B6－hIgG1－TGFBRIIバリエーション7はより低いIC50を有し、これはバリエーション7が改善された活性を有することを示している。

20

30

【0479】

【00510】細胞ベースのアッセイによるPD－1／PD－L1遮断

【00511】このアッセイでは、293T－PD－L1－CD3 L細胞はPD－L1および抗CD3 s c Fvを発現し、Jurkat－NFAT－Luc－PD1細胞はPD－1を発現し、CD3刺激によって活性化することができるNFATシグナルを担持する。NFAT活性化は、下流のルシフェラーゼ遺伝子の転写および発現をもたらす、その基質によって検出することができる。2つの細胞を、MabSpace Bioscienceによって生成した。

40

【0480】

【00512】簡単に述べると、293T－PD－L1－CD3 L細胞を採取し、 2×10^6 細胞／m lの密度で再懸濁した。ウェルあたり20 μ lの細胞を、ハーフウェルプレートに添加した。AM－4B6－hIgG1－TGFBRIIバリエーションまたは元の4B6－hIgG1－TGFBRIIを連続希釈 (3倍希釈)して、2% FBSを含むRPMI培地中で8つの濃度を得た。ウェルあたり20 μ lの抗体をハーフウェルプレートに添加し、プレートを37℃、5% CO₂で30 minインキュベートした。Jurkat－NFAT－Luc－PD1細胞を採取し、2% FBSを含むRPMI培地中に 4×10^6 細胞／m lの密度で再懸濁した。最後に、ウェルあたり20 μ lの細胞を、5 ng／m lの

50

TGF- β ベータ (R&D、240-B-010) と共にハーフウェルプレートに添加し、37℃、5%CO₂で5hインキュベートした。60 μ lのOneGlo検出試薬 (Promega、E6120) を各ウェルに添加し、室温で5分間インキュベートした。発光シグナルをマイクロプレートリーダーによって読み取った。データをGraphPad Prismによって分析した。

【0481】

【00513】図6に示されるように、以前のELISAの結果と一致して、バリエーション7が、他のバリエーションと比較してこの細胞ベースのアッセイにおいて最も強力な遮断活性を有していた。したがって、AM-4B6-hIgG1-TGF β RIIバリエーション7の4B6 Fab部分をAM4B6と省略し、AM-4B6-hIgG1-TGF β RII融合タンパク質を以下の実験においてさらに評価した。

10

【0482】

実施例8

in vitroでのAM4B6-hIgG1-TGF β RII'の生成および特性評価

【00514】AM4B6-hIgG1-TGF β RIIのクローニングおよび発現

【00515】短縮型TGF β RII ECD__20-136は可溶性であり、TGF β 1に結合する能力を保持することが報告された (Kim-Ming Loら、US9676863B2、2017; Christian C.ら、Protein Expression and Purification、2000、20:98~104)。次に、本発明者らは、TGF β RII__1-136の細胞外ドメインの完全長を、短縮型のものとして置き換え、開発可能性および安定性を評価した。安定な細胞系からのSDS-PAGEの結果により、タンパク質発現が短縮型と完全長との両方のTGF β RII ECDについて良好であるが、タンパク質安定性は完全長TGF β RII ECDよりも短縮型TGF β RII ECD__20-136の方がはるかに良好であることが示された (図7)。短縮型TGF β RII ECD__20-136の配列は、以下の通りである：

20

【00516】安定なTGF- β トラップ、TGF- β RII細胞外ドメイン (20-136) の配列

GAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITTSICEKPKQEV
CVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAASPCKIM
KEKKKPGETFFMCSSSDECNDNIIFSEEEYNTSNPD

30

(配列番号66)

【00517】短縮型TGF- β RII (すなわち、TGF- β RII (20-136)、配列番号66) を含む二機能性分子を、本実施例において、また、実施例9~11においても使用した。そのような二機能性分子の名称を、TGF- β RII (1-136) と区別するために、TGF β RII'で示した。例えば、AM4B6-hIgG1-TGF β RII'は、TGF- β RII (20-136) を有する分子を示す。

【0483】

【00518】ELISAアッセイによる様々な種に由来するPD-L1への結合

【00519】1 μ g/mlのヒトPD-L1 (Acro Biosystems、PD1-H5229) またはカニクイザルPD-L1抗原をELISAプレートにコーティングし、4℃で一晩静置した。次いで、300 μ Lの3% (w/v) スキムミルクを、室温で1h、ブロッキングのために添加した。1h後、100nM~0.02nM (4倍連続希釈) の範囲の濃度のAM4B6-hIgG1-TGF β RII'または対照hIgG1-TGF β RII'の100 μ Lを添加し、室温で1hインキュベートした。0.5% PBS+Tween (登録商標)-20を、3回の洗浄のために使用し、100 μ LのHRPコンジュゲート化抗ヒトFc抗体 (1:20000、Abcam、ab98624) を添加した。室温で1hインキュベートした後、混合TMB基質試薬 (InnoReagents、TMB-S-003) を添加し、室温で5minインキュベートした後、0.1MH₂SO₄を添加することによって停止させた。OD450nmを、マイクロプレートリーダーによって記録した。

40

50

【0484】

[00520]図8Aおよび図8Bに示されるように、AM4B6-hIgG1-TGFβRII'は、ヒトPD-L1と類似するEC50でカニクイザルPD-L1と交差反応した。

【0485】

[00521]ELISAによる様々な種に由来するTGFβ1、TGFβ2およびTGFβ3への結合

[00522]Uniprotのウェブサイト(<https://www.uniprot.org/>)上に公開された、4つの一般的な種：ヒト、カニクイザル、マウスおよびラットに由来するTGFβ1、TGFβ2およびTGFβ3の配列によれば、TGFβメンバ

10

。【0486】

[00523]TGFβ1およびTGFβ3について、手順は以下の通りである：0.5 μg/mlのヒトTGFβ1(Sino Biological、10804-HNAC)またはマウスTGFβ1(Novoprotein、CK33)またはヒトTGFβ3(Genscript、Z03430)またはラットTGFβ3(Novoprotein、CJ44)抗原をELISAプレートにコーティングし、4℃で一晩静置した。次いで、300 μLの3% (w/v) スキムミルクを、室温で1 h、ブロッキングのために添加した。1 h後、100 nM~0.006 nM (4倍連続希釈) の範囲の濃度のAM4B6-hIgG1-TGFβRII'または対照hIgG1-TGFβRII'の100 μLを添加し、室温で1 hインキュベートした。0.5% PBS+Tween (登録商標)-20を、3回の洗浄のために使用し、100 μLのHRPコンジュゲート化抗ヒトFc抗体(1:20000、Abcam、ab98624)を添加した。室温で1 hインキュベートした後、混合TMB基質試薬(InnoReagents、TMB-S-003)を添加し、室温で5 minインキュベートした後、0.1 M H₂SO₄を添加することによって停止させた。OD_{450 nm}を、マイクロプレートリーダーによって記録した。

20

30

【0487】

[00524]TGFβ2については、試験手順が異なる：2 μg/mlのAM4B6-hIgG1-TGFβRII'または対照hIgG1-TGFβRII'をELISAプレートにコーティングし、4℃で一晩静置した。次いで、300 μLの3% (w/v) スキムミルクを、室温で1 h、ブロッキングのために添加した。1 h後、39.4 nM~0.3 nM (2倍連続希釈) の範囲の濃度のヒトTGFβ2またはマウスTGFβ2の100 μLを添加し、室温で1 hインキュベートした。0.5% PBS+Tween (登録商標)-20を3回の洗浄のために使用し、100 μLのTGFβ2ビオチン化抗体(1:10000、R&D、BAF302)を添加した。室温で1 hインキュベートし、洗浄した後、100 μLのHRP-ストレプトアビジン(1:5000、Abcam、ab7403)を添加し、プレートを室温で1 hインキュベートした。洗浄後、混合TMB基質試薬(InnoReagents、TMB-S-003)を添加し、室温で5 minインキュベートし、0.1 M H₂SO₄を添加することによって停止させた。OD_{450 nm}を、マイクロプレートリーダーによって記録した。

40

【0488】

[00525]結果を、表16にまとめた。TGFβ1に対する結合親和性について、EC50値は、異なる種の間で非常に類似していた。さらに、TGFβ1およびTGFβ3に対する結合親和性はTGFβ2よりも有意に高かったが、これは、TGFβ1およびTGFβ3に対する遮断活性がTGFβ2よりも強力であり得ることを示している。

【0489】

50

[00526]

[0490]

【表18】

表 16. TGFβ1、TGFβ2 および TGFβ3 に対する AM4B6-hIgG1-TGFβRII'の結合

ELISA による様々な種に由来する TGFβ1、TGFβ2 および TGFβ3 への結合(EC ₅₀ 、nM)					
TGFβ1		TGFβ2		TGFβ3	
ヒト	マウス	ヒト	マウス	ヒト	ラット
0.748	0.800	8.459	8.884	5.257	3.733

10

[0491]

[00527] ELISA アッセイによる B7 ファミリーまたは TGFβ スーパーファミリー内の他のメンバーへの結合

[00528] B7 ファミリーについては、0.5 μg/ml の hPD-L1 (Acro Biosystems、PD1-H5229) または hPD-L2 または B7-2 または B7-1 または B7-H2 または B7-H3 または B7-H4 または VISTA を ELISA プレートにコーティングし、4℃で一晩静置した。TGFβ スーパーファミリーについては、0.5 μg/ml のヒトアクチビンA、BMP-2、LAP または TGFβ1 を 4℃で一晩コーティングした。次いで、300 μL の 3% (w/v) スキムミルクを、室温で1h、ブロッキングのために添加した。1h後、100 nM~0.006 nM (連続希釈) の範囲の濃度の AM4B6-hIgG1-TGFβRII' の 100 μL を添加し、室温で1hインキュベートした。0.5% PBS+Tween (登録商標)-20 を、3回の洗浄のために使用し、100 μL の HRP コンジュゲート化抗ヒトFc抗体 (1:20000、Abcam、ab98624) を添加した。室温で1hインキュベートした後、混合 TMB 基質試薬 (InnoReagents、TMB-S-003) を添加し、室温で5minインキュベートした後、0.1M H₂SO₄ を添加することによって停止させた。OD_{450nm} を、マイクロプレートリーダーによって記録した。

20

30

[0492]

[00529] 図9A~図9Bに示されるように、AM4B6-hIgG1-TGFβRII' は、B7 ファミリーにも属する他の抗原よりもむしろ、PD-L1 に特異的に結合した。図9Cに示されるように、AM4B6-hIgG1-TGFβRII' は、TGFβ スーパーファミリーにも属する他の抗原よりもむしろ TGFβ1 に特異的に結合した。

[0493]

[00530] AM4B6-hIgG1-TGFβRII' の PD-L1 発現細胞への結合

[00531] CRISPR-Cas9 系による mPD-L1 の欠失、次いで、レンチウイルスを使用した hPD-L1 の形質導入によって、MC38/hPD-L1 を生成した。この細胞系は、Center of Systems Medicine、Chinese Academy of Medical Sciences Suzhou Institute of Systems Medicine の Professor Qin Xiaofeng の研究室の厚意によるものであった (Huang、Anfei ら、Scientific Reports 7 (2017): 42687)。MC-38/hPD-L1 細胞を、RPMI 1640+10% FBS 中で培養した。EMT-6/hPD-L1 は、トランスフェクトされたヒト PD-L1 遺伝子を安定に発現するマウス乳がん細胞系である。EMT-6/hPD-L1 細胞を、Waymouth's (1x) MB752/1+15% FBS 中で培養した。NCI-H460 細胞を、COBIOER Ltd から購入した。それは、PD-L1 発現を示すヒト肺上皮腫瘍細胞系である。NCI-

40

50

H460細胞を、RPMI1640+10%FBS中で培養した。NCI-H292細胞を、COBIOER Ltd. から購入した。それは、PD-L1発現を示すヒト肺上皮腫瘍細胞系である。NCI-H292細胞をRPMI1640+10%FBS+1nMピルビン酸ナトリウム溶液中で培養した。FACS解析のプロトコールは、実施例6のセクション3と同じであった。

【0494】

【00532】ヒトまたはカニクイザルPBMC (TPCS、カタログ番号PB025C) を、液体窒素から回収し、10%FBSを含むRPMI1640中に再懸濁した。5 µg/mlのPHA (Sigma、カタログ番号L8902) を添加して、PBMC活性化を刺激し、細胞を3日間培養した。活性化されたPBMCを採取し、遠心分離し、 2×10^6 細胞/mlの密度でPBS中に再懸濁し、ウェルあたり100 µlでプレートに添加した。AM4B6-hIgG1-TGFβRII' またはAM4B6または対照hIgG1-TGFβRII' を連続希釈 (5倍希釈) して、希釈緩衝液 (2%BSAを含むPBS) 中で10種の濃度を得た。遠心分離し、プレート中の上清を除去した後、希釈した抗体を、活性化されたPBMCと共にプレートに添加し、4℃で1時間インキュベートした。希釈緩衝液で2回洗浄した後、Alexa488標識されたマウス抗ヒトCD3 (Biolegend、カタログ番号300320) およびAPC標識された抗ヒトIgG二次抗体 (BD、カタログ番号550931) を添加し、4℃で30minインキュベートした。洗浄後、細胞を150 µlのPBS中に再懸濁し、フローサイトメトリーによって分析した。

10

20

【0495】

【00533】図10A～図10Fに示されるように、AM4B6-hIgG1-TGFβRII' は、AM4B6 mAb単独と類似する親和性で、これらのがん細胞系および活性化されたヒトまたはカニクイザルT細胞上に発現されるPD-L1に結合することができた。

【0496】

【00534】活性化されたヒトT細胞への結合

【00535】ヒトPBMC (TPCS、カタログ番号PB025C) を、液体窒素から回収し、10%FBSを含むRPMI1640中に再懸濁した。5 µg/mlのPHA (Sigma、カタログ番号L8902) を添加して、PBMC活性化を刺激し、細胞を3日間培養した。活性化されたPBMCを採取し、遠心分離し、 2×10^6 細胞/mlの密度でPBS中に再懸濁し、ウェルあたり100 µlでプレートに添加した。AM4B6-hIgG1-TGFβRII' またはAM4B6または対照hIgG1-TGFβRII' を連続希釈 (5倍希釈) して、希釈緩衝液 (2%BSAを含むPBS) 中で10種の濃度を得た。遠心分離し、プレート中の上清を除去した後、希釈した抗体を、活性化されたPBMCと共にプレートに添加し、4℃で1時間インキュベートした。希釈緩衝液で2回洗浄した後、Alexa488標識されたマウス抗ヒトCD3 (Biolegend、カタログ番号300320) およびAPC標識された抗ヒトIgG二次抗体 (BD、カタログ番号550931) を添加し、4℃で30minインキュベートした。洗浄後、細胞を150 µlのPBS中に再懸濁し、フローサイトメトリーによって分析した。

30

40

【0497】

【00536】図11に示されるように、AM4B6-hIgG1-TGFβRII' は、活性化されたヒトT細胞上に発現されるPD-L1に結合することができた。

【0498】

【00537】ELISAアッセイによるhPD-L1/hPD-1およびカニクイザルPD-L1/カニクイザルPD-1の遮断

【00538】0.5 µg/mlのhPD-L1-Fcまたは0.5 µg/mlのカニクイザルPD-L1-FcをELISAプレートにコーティングし、4℃で一晩静置した。300 µlの3% (w/v) スキムミルクを、室温で1h、ブロッキングのために添加した。1h後、100 nM～0.02 nM (4倍連続希釈) の範囲の濃度のAM4B6-hI

50

g G 1 - T G F β R I I ' または A M 4 B 6 の 1 0 0 μ l を、0 . 5 μ g / m l の h P D - 1 - F c - ビオチンまたはカニクイザル P D - 1 - F c - ビオチンと共に添加し、室温で 1 h インキュベートした。0 . 5 % P B S + T w e e n (登録商標) - 2 0 を 3 回洗浄するために使用し、1 0 0 μ l の H R P コンジュゲート化ストレプトアビジン (1 : 5 0 0 0) を添加した。室温で 1 h インキュベートした後、混合 T M B 基質試薬を添加し、室温で 5 m i n インキュベートした後、0 . 1 M H_2SO_4 を添加することによって停止させた。O D 4 5 0 n m を、マイクロプレートリーダーによって記録した。

【0499】

【00539】図 1 2 A ~ 図 1 2 B に示されるように、A M 4 B 6 - h I g G 1 - T G F β R I I ' は、ヒト P D - L 1 / ヒト P D - 1 の遮断のものと類似する I C 5 0 でカニクイザル P D - L 1 / カニクイザル P D - 1 を完全に遮断することもできた。

10

【0500】

【00540】h P D - L 1 および h T G F β 1 への同時的結合

【00541】0 . 5 μ g / m l の h T G F β - 1 を E L I S A プレートにコーティングし、4 $^{\circ}$ C で一晩静置した。次いで、3 0 0 μ l のブロッキング緩衝液を、室温で 1 h、ブロッキングのために添加した。1 h 後、1 0 0 n M ~ 0 . 0 2 n M (4 倍連続希釈) の範囲の濃度の A M 4 B 6 - h I g G 1 - T G F β R I I ' または A M 4 B 6 または対照 h I g G 1 - T G F β R I I ' の 1 0 0 μ l を添加し、室温で 1 h インキュベートした。0 . 5 % P B S + T w e e n (登録商標) - 2 0 を 3 回洗浄するために使用し、次いで、0 . 5 μ g / m l の h P D - L 1 - ビオチンを各ウェルに添加した。1 h 後、1 0 0 μ l の H R P コンジュゲート化ストレプトアビジン (1 : 5 0 0 0) を添加した。室温で 1 h インキュベートした後、混合 T M B 基質試薬 (I n n o R e a g e n t s、T M B - S - 0 0 3) を添加し、室温で 5 m i n インキュベートした後、0 . 1 M H_2SO_4 を添加することによって停止させた。O D 4 5 0 n m を、マイクロプレートリーダーによって記録した。

20

【0501】

【00542】図 1 3 に示されるように、抗 P D - L 1 抗体 A M 4 B 6 および T G F β R I I ' から構成される A M 4 B 6 - h I g G 1 - T G F β R I I ' は、同時に 2 つの標的に結合することができたが、これは、その二特異性または二機能性特性を示している。

30

【0502】

【00543】レポーター細胞アッセイによる h P D - L 1 / h P D - 1 の遮断

【00544】プロトコールは、実施例 1 5 のセクション 2 と同じであった。図 1 4 に示されるように、A M 4 B 6 - h I g G 1 - T G F β R I I は、A M 4 B 6 m A b 単独と同じく、P D - L 1 / P D - 1 の阻害効果を遮断し、続いて、シグナル伝達活性化を逆転させることができた。

【0503】

【00545】レポーター細胞アッセイによる T G F β 1 シグナル伝達の遮断

【00546】T G F β レポーター H E K - 2 9 3 細胞系を、G e n o m e d i t e c h (カタログ番号 G M - C 0 5 3 4 6) から購入し、5 % 二酸化炭素を含む 3 7 $^{\circ}$ C インキュベーター中、1 0 % F B S、4 μ g / m l プラスチジン、4 0 0 μ g / m l ネオマイシン、1 2 5 μ g / m l ハイグロマイシン、0 . 7 5 μ g / m l ピューロマイシン、および 1 % P e n / S t r e p を含有する D M E M 培地中で培養した。

40

【0504】

【00547】細胞を、対数増殖期で収集し、D M E M 培地中に再懸濁し、ウェルあたり 2 x 1 0 ⁴ 細胞 / 1 0 0 μ l の密度で 9 6 ウェルプレート中に播種した。細胞を一晩培養した後、培地を、1 0 n g / m l のヒト T G F β 1 を含有する 7 5 μ l の培養培地と置き換えた。1 0 0 n M ~ 0 . 0 2 n M (3 倍連続希釈) の範囲の最終濃度で、7 5 μ l の A M 4 B 6 - h I g G 1 - T G F β R I I ' または A M 4 B 6 を添加した。プレートを 3 7 $^{\circ}$ C インキュベーターで 1 6 時間インキュベートした。O N E - G l o (商標) ルシフェラーゼアッセイシステムを 1 5 0 μ l / ウェルで添加し、室温で 1 0 分間インキュベートした

50

後、プレートを、マイクロプレートリーダーを用いて読み取った。

【0505】

【00548】図15に示されるように、AM4B6-hIgG1-TGFβRII'は、0.35nMのIC50でTGFβ1シグナル伝達に対する強力な遮断活性を示したが、AM4B6 mAb単独では遮断活性を有しなかった。これは、遮断活性がTGFβ1特異的であることを示している。

【0506】

【00549】ツベルクリン(TB)により刺激されたPBMCのIFN-γ放出に対するAM4B6-hIgG1-TGFβRII'の効果

【00550】ヒトPBMCを、液体窒素から回収し、 2×10^6 個/mLの密度で細胞を再懸濁した。TBを $1.33 \mu\text{g/mL}$ の最終濃度で添加し、 37°C で5日間培養する。6日目に、誘導されたPBMCを収集し、遠心分離し、PBSで1回洗浄し、新鮮な培地中に再懸濁し、 1×10^6 /mLの密度に調整し、 $180 \mu\text{L}$ /ウェルで96ウェル細胞プレート中に播種した。 $20 \mu\text{L}$ /ウェルの希釈した抗体を96ウェル細胞培養プレートに添加する。対照群およびブランク群を $20 \mu\text{L}$ のPBSと共に添加した。細胞培養プレートを、5%CO₂インキュベーター中、 37°C で3日間インキュベートした。インキュベーションの終わりに、細胞上清を10倍希釈し、IFNγの分泌レベルを、IFN-γ ELISA検出キット(R&D、DY285B)で検出した。

【0507】

【00551】図16に示されるように、AM4B6-hIgG1-TGFβRII'は、AM4B6 mAb単独よりも有意に高いレベルのIFN-γ放出を誘導したが、これは、その活性化活性がその二特異的結合および遮断活性に起因してより強力であることを示している。

【0508】

【00552】AM4B6-hIgG1-TGFβRII'のADCC/CDC活性

【00553】ADCCアッセイについて、エフェクター細胞: Jurkat-NFAT Luc-FcγRIIIa-158V細胞系を、Mabspace Biosciences (Suzhou) Co., Limitedによって構築した。標的細胞: HEK-293T-hPD-L1細胞(Crown Biosciences Inc.、カタログ番号2005から購入)。

【0509】

【00554】HEK-293T-hPD-L1細胞を、ウェルあたり10,000個の細胞/ $12.5 \mu\text{L}$ で細胞培養プレートに添加した。次いで、 $200 \text{ nM} \sim 0.003 \text{ nM}$ の範囲の最終濃度のAM4B6-hIgG1-TGFβRII'希釈液を、 $12.5 \mu\text{L}$ /ウェルで添加した。次いで、プレートを 37°C でインキュベーターに入れて、抗体および細胞を30分間インキュベートした。次いで、Jurkat-NFAT Luc-FcγRIIIa-158V細胞を、ウェルあたり60,000個の細胞/ $25 \mu\text{L}$ でウェルに添加した。次いで、プレートを 37°C で6時間、インキュベーターに入れた。ONE-Glo(商標)ルシフェラーゼアッセイシステムを $50 \mu\text{L}$ /ウェルで添加し、室温で10分間インキュベートした後、プレートを、マイクロプレートリーダーを用いて読み取った。

【0510】

【00555】CDCアッセイについても、標的細胞はHEK-293T-hPD-L1細胞である。HEK-293T-hPD-L1細胞を、ウェルあたり10,000個の細胞/ $25 \mu\text{L}$ で細胞培養プレートに添加した。次いで、 $200 \text{ nM} \sim 0.3 \text{ nM}$ の範囲の最終濃度のAM4B6-hIgG1-TGFβRII'希釈液を、 $12.5 \mu\text{L}$ /ウェルで添加した。次いで、プレートを 37°C でインキュベーターに入れて、抗体および細胞を30分間インキュベートした。HEK-293T-hPD-L1細胞を、 $50 \mu\text{L}$ /ウェルで、40%補体で処理した後(最終濃度は20%)、 37°C で80minインキュベートした。ONE-Glo(商標)ルシフェラーゼアッセイシステムを $100 \mu\text{L}$ /ウェルで添加

し、室温で10分間インキュベートした後、プレートを、マイクロプレートリーダーを用いて読み取った。

【0511】

【00556】その結果、AM4B6-hIgG1-TGFβRII'はHEK-293T-hPD-L1細胞に対するADCC活性もCDC活性も有しないことが示唆された（データは示さない）。

【0512】

実施例9

in vivoでのAM4B6-hIgG1-TGFβRII'の有効性

【00557】C57BL/6マウス上でのMC38-hPD-L1腫瘍モデル

【00558】マウス腫瘍細胞系MC38(ATCC)における内因性マウスPD-L1を、本発明者らが最近開発した非常に効率的なCRISPR/Cas系を使用してノックアウトした。簡単に述べると、マウスPD-L1遺伝子の第1のコードエクソンを標的とするsgRNAを設計し、ヒットエンドランCRISPR/Cas9+sgRNA構築物によって細胞をトランスフェクトし、ノックアウト細胞について選択した。内因性マウスPD-L1が完全にノックアウトされた細胞を、定常状態でのPD-L1の細胞表面発現についてFACS解析によって同定したか、またはインターフェロンガンマによって刺激した後、標的としたゲノム領域のTAクローニングおよび配列決定によって検証した。ヒトPD-L1置き換え細胞系を生成するために、ヒトPD-L1 cDNAのコード配列を、FG12由来レンチウイルスベクター中にクローニングした。次いで、マウスPD-L1ノックアウト細胞に、ヒトPD-L1を発現するレンチウイルスを感染させ、確立された細胞系におけるヒトPD-L1の高レベルかつ安定な発現をFACS解析によって確認した。MC38のこの操作された細胞を、MC38-hPD-L1と命名した。

【0513】

【00559】MC38-hPD-L1細胞を、10%熱不活化ウシ胎仔血清を補充したRPMI1640培地中、空気中に5%CO₂を含む雰囲気中で37℃にて、単層培養物としてin vitroで維持した。指数増殖期で増殖している腫瘍細胞を採取し、腫瘍接種のために計数した。それぞれのメスSPF等級C57BL/6マウスに、50%マトリゲルを含む混合した2×10⁶個のMC38-hPD-L1細胞を接種した。腫瘍サイズが約90mm³になった時、腫瘍を担持するマウスを選択し、5つの群に無作為化した(n=8)。動物を、2.5mg/kgのアイソタイプ対照、3mg/kgのアイソタイプ対照-TGFβRII'、2.5mg/kgのAM4B6、0.3mg/kgのAM4B6-hIgG1-TGFβRII'、1mg/kgのAM4B6-hIgG1-TGFβRII'および3mg/kgのAM4B6-hIgG1-TGFβRII'で処置した。全ての抗体を、i.p.注射によって4週間にわたって週2回投与した。腫瘍サイズを、ノギス(INSIZE)を使用して2次元で週2回または3回測定し、式： $V = 0.5 \times a \times b^2$ (式中、aおよびbは、それぞれ、腫瘍の長い直径および短い直径である)を使用してmm³で体積を表した。結果を、Prism GraphPadを使用して分析し、平均±S.E.M.として表した。2群間の比較を、T検定によって行ったが、pが* < 0.05かつ** < 0.01である場合、差異が有意であると考えられる。

【0514】

【00560】図17A～図17Bに示されるように、3mg/kgのアイソタイプ対照-TGFβRII'は、腫瘍成長を全く阻害しなかったが、これは、TGFβRII'単独では有効性が低かったことを示している。2.5mg/kgのAM4B6は、0.3mg/kgのAM4B6-hIgG1-TGFβRII'のものと同様、部分的な阻害効果のみ有していたが、これは腫瘍成長を制御するには不十分であると考えられた。投薬量の増加と共に、腫瘍体積は徐々に小さくなっていった。3mg/kgのAM4B6-hIgG1-TGFβRII'は、腫瘍成長をほぼ完全に停止させ、そのTGIは84%であった(表17)。

【0515】

10

20

30

40

50

[00561]
 【0516】
 【表19】

表17. 32日目でのMC38-hPD-L1腫瘍モデルにおける抗体の腫瘍成長阻害(TGI) (平均±S.E.M., n=8)

処置	腫瘍サイズ (±SEM、mm ³)	TGI (%)	アイソタイプ 対照に対する p 値
アイソタイプ対照 2.5 mg/kg	3877.77±712.67		
アイソタイプ対照-TGFβRII' 3 mg/kg	3489.60±880.53	10.01	0.6713
AM4B6 2.5 mg/kg	2105.51±443.56	45.70	0.0183
AM4B6-hIgG1-TGFβRII' 0.3 mg/kg	2411.61±742.60	37.81	0.0931
AM4B6-hIgG1-TGFβRII' 1 mg/kg	1646.12±517.06	57.55	0.0063
AM4B6-hIgG1-TGFβRII' 3 mg/kg	601.31±197.10	84.49	0.00006

10

20

【0517】

【00562】NOD-SCIDマウス上でのH460腫瘍およびヒトPBMC同時接種モデル

【00563】H460細胞を、COBIOER Ltd. から購入した。H460細胞を、10%熱不活化ウシ胎仔血清を補充したRPMI1640培地中、空気中に5%CO₂を含む雰囲気中で37℃にて、単層培養物として*in vitro*で維持した。指数増殖期で増殖している腫瘍細胞を採取し、腫瘍接種のために計数した。それぞれのメスSPF等級NOD-SCIDマウスに、混合した3×10⁶個のH460細胞（モデル群）または1.5×10⁶個のヒトPBMCと混合した3×10⁶個のH460細胞を接種した。全ての細胞懸濁液を、接種前に1:1比としてマトリゲルとよく混合した。接種の約4時間後、動物を7群に分け（n=10）、示差的に投与した。動物を、16.7mg/kgの対照hIgG1、または20mg/kgの対照hIgG1-TGFβRII'、または16.7mg/kgのAM4B6、または5mg/kgのAM4B6-hIgG1-TGFβRII'、または10mg/kgのAM4B6-hIgG1-TGFβRII'、または20mg/kgのAM4B6-hIgG1-TGFβRII'のいずれかで処置した。モデル群は何も処置しなかった。全ての抗体を、i.p.注射によって5週間にわたって週2回投与した。腫瘍サイズを、ノギス（INSIZE）を使用して2次元で週2回または3回測定し、式： $V = 0.5 a \times b^2$ （式中、aおよびbは、それぞれ、腫瘍の長い直径および短い直径である）を使用してmm³で体積を表した。結果を、GraphPad Prismを使用して分析し、平均±S.E.M.として表した。2群間の比較を、T検定によって行ったが、pが* < 0.05かつ** < 0.01である場合、差異が有意であると考えられる。

30

40

【0518】

【00564】図18A～図18Bに示されるように、20mg/kgのアイソタイプ対照-TGFβRII'は腫瘍成長を全く阻害しなかった。5mg/kgのAM4B6-hIgG1-TGFβRII'が既に有意により良好な腫瘍阻害を有していた一方、16.7mg/kgのAM4B6は部分的な阻害効果のみ有していたが、これは、TGFβRII融合物がAM4B6 mAb単独の抗腫瘍有効性を増加させたことを示している。さらに

50

、AM4B6-hIgG1-TGFβRII'の明らかな用量応答がこのモデルにおいて観察されたが、これは再度、有効性がAM4B6-hIgG1-TGFβRII'に依存していることを示唆している。

【0519】

[00565]C57BL/6マウス上でのEMT6-hPD-L1腫瘍モデル

[00566]マウス腫瘍細胞系EMT6(ATCC)中の内因性マウスPD-L1をノックアウトし、ヒトPD-L1を細胞中にノックインし、EMT6の操作された細胞をEMT6-hPD-L1と命名した。

【0520】

[00567]マウスに、EMT6/hPD-L1腫瘍細胞を皮下接種し、7つの群に無作為に分割した後、腫瘍体積に応じて1群あたり10匹のマウスにした。グループ分けの後、第1群～第7群の動物に、それぞれ、24.9mg/kgの対照hIgG1、30mg/kgの対照hIgG1-TGFβRII'、24.9mg/kgのAM4B6、3mg/kgのAM4B6-hIgG1-TGFβRII'、10mg/kgのAM4B6-hIgG1-TGFβRII'または30mg/kgのAM4B6-hIgG1-TGFβRII'を、4週間にわたって週2回、腹腔内注射によって投与した。腫瘍担持マウスの腫瘍体積および体重を週2回観察した。図19A～図19Bに示されるように、AM4B6-hIgG1-TGFβRII'は、投与後29日目で、3、10および30mg/kgでそれぞれ21.43%、46.83%および79.39%のTGIで腫瘍成長を用量依存的に阻害した。等モル量で、30mg/kgでのAM4B6-hIgG1-TGFβRII'の抗腫瘍活性は、24.9mg/kgでAM4B6よりも顕著であり、その群において、TGIは29日目で29.67%であった。

【0521】

実施例10

MC38-hPD-L1腫瘍モデルにおける腫瘍浸潤リンパ球(TIL)に対するAM4B6-hIgG1-TGFβRII'処置の影響

[00568]MC38-hPD-L1腫瘍細胞を培養し、実施例9の同じプロセスに従って接種した。腫瘍サイズが250～300mm³になった時、腫瘍担持マウスを選択し、4つの群(n=6)に無作為化した。動物を、PBS、または3mg/kgのアイソタイプ対照-TGFβRII'、または2.5mg/kgのAM4B6、または3mg/kgのAM4B6-hIgG1-TGFβRII'で処置した。全ての抗体を、i.v.注射によって1または2週間にわたって週2回投与した。腫瘍を、それぞれ、2回目の投薬の24時間後および4回目の投薬の24時間後に採取した後、穏やかなMACSDissociator(Miltenyi Biotec、130-093-235)を用いて解離し、37℃で40min、マウス腫瘍解離キット(Miltenyi Biotec、130-096-730)で消化した。各群の単離された単一腫瘍細胞懸濁液を、表18および表19に示されるように、PE抗マウスCD45(BD bioscience、カタログ番号553081)、APC抗マウスCD8a(Biolegend、カタログ番号100712)、APC抗マウスNK1.1(Biolegend、カタログ番号108710)、FITC抗マウスグランザイムB(Biolegend、カタログ番号515403)およびFITC抗マウスIFNガンマ(Invitrogen、カタログ番号11-7311-82)によって染色した後、FACSを使用してTILサブ集団のパーセンテージについて分析した。

【0522】

[00569]

【0523】

10

20

30

40

50

【表 2 0】

表 18. 2 回目の投薬の 24 時間後の MC38-hPD-L1 腫瘍モデルにおける TIL 分析

TILs のサブ 集団(%) 群(n=3)	CD8+/CD45+	CD8+GZMB+ /CD45+	NK1.1+/CD45+	NK1.1+GZM B+ /CD45+	CD8+IFNg+ /CD45+	NK1.1+IFNg+ /CD45+
PBS	11.77%±0.95 %	1.18%±0.00%	1.78%±0.57%	0.40%±0.07%	0.31%±0.03%	0.32%±0.03%
アイソタイプ 対照 -TGFβRII' 3mpk	13.53%±3.64 %	0.91%±0.36%	2.02%±0.48%	0.44%±0.14%	0.22%±0.02%	0.21%±0.02%
AM4B6 2.5mpk	13.80%±4.88 %	1.26%±0.49%	2.70%±0.35%	0.63%±0.06%	0.30%±0.06%	0.27%±0.06%
AM4B6-hIgG1 -TGFβRII' 3mpk	11.32%±2.97 %	1.11%±0.31%	2.59%±0.39%	0.72%±0.21%	0.26%±0.06%	0.27%±0.05%

10

20

【 0 5 2 4】

【 0 0 5 7 0】

【 0 5 2 5】

30

40

50

【表 2 1】

表 19. 4 回目の投薬の 24 時間後の MC38-hPD-L1 腫瘍モデルにおける TIL 分析

TIL のサブ 集団(%) 群(n=3)	CD8+/CD45+	CD8+GZMB +/CD45+	NK1.1+/CD45+	NK1.1+GZMB +/CD45+	CD8+IFN γ +/CD45+	NK1.1+IFN γ +/CD45+
PBS	9.36% $\pm$ 3.79%	0.72% $\pm$ 0.07%	1.54% $\pm$ 0.21%	0.31% $\pm$ 0.05%	0.30% $\pm$ 0.07%	0.31% $\pm$ 0.05%
アイソタイプ 対照 -TGF β RII' 3mpk	10.53% $\pm$ 1.86%	0.66% $\pm$ 0.10%	1.90% $\pm$ 0.14%	0.27% $\pm$ 0.05%	0.21% $\pm$ 0.05%	0.20% $\pm$ 0.06%
AM4B6 2.5mpk	17.36% $\pm$ 3.16%	1.03% $\pm$ 0.24%	2.73% $\pm$ 0.46%	0.33% $\pm$ 0.02%	0.26% $\pm$ 0.04%	0.21% $\pm$ 0.03%
AM4B6-hIgG1 -TGF β RII' 3mpk	17.77% $\pm$ 0.88%	1.37% $\pm$ 0.15%	4.19% $\pm$ 1.12%	0.62% $\pm$ 0.16%	0.24% $\pm$ 0.04%	0.30% $\pm$ 0.04%

【0526】

【00571】2 回目の投薬の後、異なる処置群間で TIL のサブ集団のパーセンテージに有意な変化はなかった（表 18）。しかし、4 回目の投薬の後、AM4B6 群および AM4B6-hIgG1-TGF β RII' 群の CD8+/CD45+% は、アイソタイプ対照-TGF β RII' 群のものと比較して有意に増加した（表 19）。CD8+GZMB+% および NK1.1+% もまた、アイソタイプ対照-TGF β RII' 群のものと比較して、多く増加した。これらの知見は、CD8+T 細胞および NK1.1 T 細胞を、AM4B6 または AM4B6-hIgG1-TGF β RII' によって刺激して、活性化および増殖させ、また、腫瘍微小環境中で富化させて、腫瘍細胞死滅を容易にすることができることを示している。AM4B6 と比較した場合、AM4B6-hIgG1-TGF β RII' は、さらにより高い CD8+GZMB+% および NK1.1+% を有し、これは上記の TGI によって測定した場合、そのより強力な抗腫瘍活性と相関していた。

【0527】

実施例 11

in vivo での AM4B6-hIgG1-TGF β RII' の薬物動態および薬力学試験

【00572】C57BL/6 メスマウスを、6 群（n=3）に無作為化した。動物を、3 mg/kg のアイソタイプ対照-TGF β RII'、または 2.5 mg/kg の AM4B6、または 0.3 mg/kg の AM4B6-hIgG1-TGF β RII'、または 1 mg/kg の AM4B6-hIgG1-TGF β RII'、または 3 mg/kg の AM4B6-hIgG1-TGF β RII'、または 3 mg/kg の M7824-アナログで処置した。M7824-アナログを、US9676863 に開示された配列に従って MabSpace Biosciences によって生成した。全ての抗体を、i.v. 単回注射によって投与した。注射後、それぞれのマウスの血液 200 μ l を、異なる時点で収集した：投薬前、注射後 30 min、2 h、8 h、24 h、48 h、D4、D7、D10、D

14、D21。それぞれのマウスの血漿80 µlを収集し、抗体濃度を試験した。

【0528】

【00573】血漿中の抗体濃度を測定するために、2つの方法を使用した。第1のものは、AM4B6アームとTGFBRII'アームとの両方を含む全二機能性分子を検出することである。一般的には、1 µg/mlのヒトPD-L1-hisを、室温で2時間、96ウェルELISAプレート上にコーティングした。ブロッキング後、連続希釈した標準および血漿試料を添加し、1.5時間インキュベートした。洗浄後、0.1 µg/mlのビオチン化抗ヒトTGFBRII'を添加し、次いで、洗浄後、ストレプトアビジン-HRPを添加した。最後に、TMBを添加して発色させ、希硫酸によって停止させた。プレートを、マイクロプレートリーダーによってOD450 nmおよびOD620 nmについて読み取った。データをOD450 nm-OD620 nmによって分析した。

10

【0529】

【00574】第2のものは、AM4B6抗体アームのみを検出することである。上記手順と同様、1 µg/mlのヒトPD-L1-hisをコーティングし、連続希釈した標準および血漿試料を添加し、1.5時間インキュベートした。洗浄後、希釈したヤギHRPコンジュゲート化抗ヒトIgG Fc抗体を添加した。最後に、TMBを添加して発色させ、希硫酸によって停止させた。プレートを、マイクロプレートリーダーによってOD450 nmおよびOD620 nmについて読み取った。データをOD450 nm-OD620 nmによって分析した。

【0530】

20

【00575】血漿中の抗体濃度と、TGFBの変化との相関を評価するために、血漿中のTGFB1およびTGFB2の濃度変化を試験した。簡単に述べると、4 µg/mlのマウスTGFB-β1捕捉抗体または2 µg/mlのマウスTGFB-β2捕捉抗体を、室温で2時間、96ウェルELISAプレート上にコーティングした。10 µlの1N HClを、50 µlのそれぞれの血漿試料に添加し、室温で10分間インキュベートした。10 µlの1.2N NaOH/0.5M HEPESを添加して、最終pHを7.2~7.6以内に確保することによって、酸化した試料を中和した。ブロッキング後、連続希釈した標準および血漿試料を添加し、1.5時間インキュベートした。洗浄後、TGFB-β1またはTGFB-β2検出抗体を添加し、次いで、洗浄後、ストレプトアビジン-HRPを添加した。最後に、TMBを添加して発色させ、希硫酸によって停止させた。プレートを、マイクロプレートリーダーによってOD450 nmおよびOD620 nmについて読み取った。データをOD450 nm-OD620 nmによって分析した。

30

【0531】

【00576】図20Aは、血漿中の抗体濃度変化を示した。2つの方法を使用したPKプロファイルには有意な差異はなかったが、これは、全二機能性分子AM4B6-hIgG1-TGFBRII'が、AM4B6 mAbのものと同様、in vivoで異常な切断およびクリアランスを示すことなく非常に安定であったことを示している。そして同時に、AM4B6-hIgG1-TGFBRII'は、図20Bに示されるように、0.3 mg/kgの最も低い用量でも、i.v.注射後30 min以内にTGFB-β1を枯渇させた。M7824-アナログおよびアイソタイプ対照-TGFBRII'もまたTGFB-β1を枯渇させたが、M7824-アナログは2日目からその効果を維持することができなかった一方、AM4B6-hIgG1-TGFBRII'は21日目まで低レベルのTGFB-β1を維持することができた。この結果は、そのPK曝露（図20C）とも一致していたが、これは、TGFB-β1が血漿中のAM4B6-hIgG1-TGFBRII'標的係合のための良好な薬力学的マーカーとして役立ち得ることを示している。マウス血漿中でTGFB-β2の明らかな枯渇が検出された（ここではデータは示さない）。

40

【0532】

実施例12

AM4B6-hIgG1-IL-1RA融合タンパク質の構築および発現

【00577】選択された重鎖および軽鎖バリエーションを交差混合し、hIgG1-IL-1

50

RA (34-177) (UniProtKB、P18510) 融合タンパク質と共に発現させた。重鎖および軽鎖の配列を、表20に示した。

【0533】

【00578】

【0534】

【表22】

表 20. AM4B6-hIgG1-IL-1RA 重鎖および軽鎖バリエーションの一覧

名称	変異部位	領域	配列
AM4B6_Hg.3_hIgG1-(G4S)4G-IL-1RA	G57E、S59L	H-CDR2-3	DINPNNAETLYNHKFKG
AM4B6_La.4_hKappa	A51V、N53D	L-CDR2-2	SRSVRYT

10

【0535】

【00579】AM4B6-hIgG1-TGFβRII' 二機能性分子と同様、短縮型ヒトIL-1RA__34-177をAM4B6と融合させて、より良好な活性および安定性を得た。AM4B6-hIgG1-IL-1RAは、AM4B6-hIgG1-IL-1RA (34-177) の省略形であった。短縮型ヒトIL-1RA__34-177の配列は、以下の通りである：(配列番号67)

KMQAFRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLGQGNVNL EEKIDV
VPIEPHALFLGIHGGKMCLSCVKSGDETRLQLEAVNITDL
SEN RKQDKRFAFIRSDSGPTTSFESAACPGWFLCTAMEAD
QPVS LTNPMPDEGVMVTKFYFQEDE

20

【00580】重鎖および軽鎖の同時トランスフェクションを、製造業者のプロトコールに従ってInvitrogenからのExpifectamine (商標) CHO Reagent (Thermo、A29129) を使用して実行した。上清を10日目に採取し、親和性クロマトグラフィーによって精製した。

【0536】

実施例13

AM4B6-hIgG1-IL-1RA二機能性分子のhPD-L1に対する親和性

30

【00581】ELISAアッセイに基づくヒトPD-L1への結合

【00582】1μg/mlのhPD-L1 (Acro Biosystems、PD1-H5229) 抗原をELISAプレートにコーティングし、4℃で一晩コーティングした。次いで、300μLの2% (w/v) BSAを、室温で1h、ブロッキングのために添加した。1hのインキュベーション後、10nM~0.00017nM (3倍連続希釈) の範囲の濃度のAM4B6-hIgG1-IL-1RA二機能性分子またはAM4B6-hIgG1モノクローナル抗体の100μLを、陰性対照としてのPBSTと共に添加し、室温で1hインキュベートした。0.5% Tween (登録商標) -20を含むPBSを、3回の洗浄のために使用し、100μLのHRPコンジュゲート化抗ヒトFc抗体 (1:20000、Abcam、ab98624) を添加した。室温で1hインキュベートした後、混合TMB基質試薬 (InnoReagents、TMB-S-003) を添加し、室温で5minインキュベートした後、0.1M H₂SO₄を添加することによって停止させた。OD450nmを、マイクロプレートリーダーによって記録した。データをGraphPad prismによって分析した。

40

【0537】

【00583】図21に示されるように、AM4B6モノクローナル抗体と比較して、AM4B6-hIgG1-IL-1RA二機能性分子は、類似する結合シグナルおよび親和性を有する。

【0538】

【00584】FACSアッセイによるAM4B6-hIgG1-IL-1RAの細胞表面

50

上に発現するPD-L1への結合

[00585] 293T-PD-L1-CD3L細胞を、PD-L1抗体の特性評価のためにMabSpace Biosciencesによって生成した。細胞に、ヒトPD-L1と抗CD3 scFvとの両方をトランスフェクトした。AM4B6-hIgG1-IL-1RA二機能性分子またはAM4B6モノクローナル抗体を、3倍希釈によって連続希釈して、希釈緩衝液（2%BSAを含むPBS）中に11種の濃度を得た。293T-PD-L1-CD3L細胞を採取し、遠心分離した。次いで、それらを、 2×10^6 細胞/mlの密度でPBS中に再懸濁し、ウェルあたり100 μ lでプレートに添加した。遠心分離および上清の除去後、希釈した抗体をプレートに添加し、4℃で30minインキュベートした。希釈緩衝液で2回洗浄した後、PEコンジュゲート化抗ヒトIgG（H+L）（Jackson Immuno、709-116-149）をプレートに添加し、4℃で30minインキュベートした。洗浄後、細胞を200 μ lのPBS中に再懸濁し、フローサイトメトリーによって分析した。データをGraphPad Prismによって分析した。

10

[0539]

[00586] 図22に示されるように、AM4B6-hIgG1-IL-1RA二機能性分子およびAM4B6-hIgG1は、類似するEC50で細胞の表面上に発現されたPD-L1に結合することができ、これはELISAによって測定された親和性の結果と一致していた。

20

[0540]

実施例14

AM4B6-hIgG1-IL-1RAのPD1/PD-L1遮断活性

[00587] このアッセイでは、293T-PD-L1-CD3L細胞はPD-L1および抗CD3 scFvを発現し、Jurkat-NFAT-Luc-PD1細胞はPD-1を発現し、CD3刺激によって活性化することができるNFATシグナルを担持していた。NFAT活性化は、ルシフェラーゼ遺伝子の転写および発現をもたらし、その基質によって検出することができる。2つの細胞を両方とも、MabSpace Biosciencesによって生成した。

[0541]

[00588] 簡単に述べると、293T-PD-L1-CD3L細胞を採取し、 2×10^6 細胞/mlの密度で再懸濁した。ウェルあたり20 μ lの細胞を、ハーフウェルプレートに添加した。AM4B6-hIgG1-IL-1RA二機能性分子およびAM4B6-hIgG1を連続希釈（3倍希釈）して、2%FBSを含むRPMI培地中で8種の濃度を得た。ウェルあたり20 μ lの抗体をハーフウェルプレートに添加し、プレートを37℃、5%CO₂で30minインキュベートした。Jurkat-NFAT-Luc-PD1細胞を採取し、2%FBSを含むRPMI培地中に 4×10^6 細胞/mlの密度で再懸濁した。最後に、ウェルあたり20 μ lの細胞をハーフウェルプレートに添加し、37℃、5%CO₂で5hインキュベートした。60 μ lのOneGlo検出試薬（Promega、E6120）を各ウェルに添加し、室温で5分間インキュベートした。発光シグナルをマイクロプレートリーダーによって読み取った。データをGraphPad Prismによって分析した。

30

40

[0542]

[00589] 図23に示されるように、AM4B6-hIgG1-IL-1RA二機能性分子およびAM4B6-hIgG1は、この細胞ベースのアッセイにおいてPD-L1に対する類似する遮断活性を有していた。

[0543]

実施例15

ヒトIL-1 β に対するAM4B6-hIgG1-IL-1RAの遮断活性

[00590] ELISAに基づくhIL-1 β に対するAM4B6-hIgG1-IL-1RA BsAbの遮断活性

50

【00591】リガンド／受容体遮断活性を試験するために、 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ のヒトIL-1 β タンパク質（Sino Biological、カタログ番号10139）をELISAプレートにコーティングし、 4°C で一晩インキュベートした。 $300\mu\text{L}$ のブロッキング緩衝液を、室温で1h、ブロッキングのために添加した。1h後、 $200\text{nM}\sim 0.03\text{nM}$ （3倍連続希釈）の範囲の連続濃度のAM4B6-hIgG1-IL-1RA BsAbまたはIL-1RAタンパク質（Sino Biological、カタログ番号10123-HNAE）の $50\mu\text{L}$ を、 $50\mu\text{L}$ の 10nM ヒトIL-1RI-his（Sino Biological、カタログ番号10126-H08H）と共にウェルに添加し、室温で1hインキュベートした。 0.5% Tween（登録商標）-20を含むPBSを3回の洗浄のために使用し、 $100\mu\text{L}$ のHRPコンジュゲート化hisタグ抗体（1：20000希釈、Genscript、カタログ番号A00612）を添加し、室温で1hインキュベートした。次いで、混合TMB基質試薬（InnoReagents、カタログ番号TMB-S-003）を添加し、室温で5minインキュベートした後、 0.1M H_2SO_4 を添加することによって停止させた。 $OD_{450\text{nm}}$ を、マイクロプレートリーダーによって記録した。データをGraphPad Prismによって分析した。

10

【0544】

【00592】図24に示されるように、AM4B6-hIgG1-IL-1RAは、用量依存的にIL-1 β を遮断することができ、IL-1RIに対するAM4B6-hIgG1-IL-1RAの遮断活性は、IL-1RAタンパク質のものよりも良好であった。

20

【0545】

【00593】レポーター細胞上でのhIL-1 β に対するAM4B6-hIgG1-IL-1RA二機能性分子の遮断活性

【00594】このアッセイでは、HEK-Blue（商標）CD40L細胞を、InvivoGen（カタログ番号hkb-cd40）から購入した。これらの細胞は、ヒトCD40遺伝子およびNF- κ B誘導性SEAP構築物のHEK293細胞への安定なトランスフェクションによって生成された。CD40Lの、その受容体CD40への結合は、NF- κ Bの活性化およびSEAPのその後の産生をもたらすカスケードを誘発し、QUANT-Blueによってモニタリングすることができる。HEK293細胞は、CD40Lと共通のシグナル伝達経路を共有するサイトカインIL-1 β のための受容体を内因性に発現する。したがって、IL-1 β 媒介性SEAP産生を、中和抗体を使用して遮断することができる。

30

【0546】

【00595】簡単に述べると、対数期細胞でHEK293-CD40L細胞を収集し、 5×10^4 ／ウェル（ $100\mu\text{L}$ ／ウェル）の密度で細胞を96ウェルプレート中に播種して、一晩接着させる。AM4B6-hIgG1-IL-1RA二特異性抗体およびIL-1RAタンパク質を連続希釈（5倍希釈）して、完全培養培地中で10種の濃度を得た。 $50\mu\text{L}$ ／ウェルの希釈した抗体（またはIL-1RAタンパク質）および $50\mu\text{L}$ ／ウェルのヒトIL-1 β を細胞に添加し、 37°C で24hインキュベートする。次の日、 $160\mu\text{L}$ のQUANT-Blue（商標）溶液（InvivoGen、カタログ番号rep-qbs）を新しいプレートに添加し、 $40\mu\text{L}$ の細胞培養上清をプレートに添加した。プレートを 37°C で2hインキュベートする。 620nm で分光光度計を使用してSEAPレベルを決定する。データをGraphPad Prismによって分析した。

40

【0547】

【00596】図25に示されるように、AM4B6-hIgG1-IL-1RAは、用量依存的様式でIL-1 β を遮断することができ、IL-1 β に対するAM4B6-hIgG1-IL-1RAの遮断活性は、IL-1RAタンパク質よりも強力であったが、これはELISAによって測定された遮断の結果と一致していた。

【0548】

実施例16

50

AM4B6-SIRP α 二機能性抗体の構築、発現、精製

[00597] SIRP α __CV1 は、操作された高親和性 SIRP α バリエントであり、がん細胞上の CD47 と強力に拮抗したが、それ自身ではマクロファージファゴサイトーシスを誘導しなかった (Kipp Weiskopf ら、Science 341、88 (2013))。本発明者らは、対称性抗体 (AM4B6-hIgG1-SIRP α および 3280A-hIgG1-SIRP α) および非対称性抗体 (AM4B6-hIgG1-SIRP α (KIH) および 3280A-hIgG1-SIRP α (KIH)) (ここで、KIH はノブイントゥーホールの省略形である) を含む、PD-L1 と CD47 との両方を標的とする二機能性抗体を発明した。これらの分子の構築は、表 21 に記載されており、配列決定された SIRP α __CV1 は以下にも列挙される。

10

【0549】

[00598] SIRP α __CV1 配列 (配列番号 84) :

[00599] E E E L Q I I Q P D K S V L V A A G E T A T L R C T I T S L F P V G
P I Q W F R G A G P G R V L I Y N Q R Q G P F P R V T T V S D T T K R N N M D F
S I R I G N I T P A D A G T Y Y C I K F R K G S P D D V E F K S G A G T E L S V
R A K P S

[00600]

【0550】

20

30

40

50

【表 2 3】

表 21. 抗 PD-L1- SIRP α 二機能性抗体の構築

ID	軽鎖配列	重鎖配列 1	重鎖配列 2	注記
AM4B6-hIgG1-SIRP α	AM4B6-La.4-hKappa 配列番号 90	AM4B6_Hg.3_hIgG1_L234F_L235E_P331S - (G4S)4G - SIRP α _CV1 配列番号 91	NA	SIRP α _CV1 配列は Kipp Weiskopf ら、Science 341、88 (2013)に由来する
3280A-hIgG1-SIRP α	3280A-L-hKappa 配列番号 92	3280A-H-hIgG1(N297A)-(G4S)4G-SIRP α _CV1 配列番号 93	NA	3280A は Roche の抗 PD-L1 抗体であるアテゾリズマブの省略形である
AM4B6-hIgG1-SIRP α (KIH)	AM4B6-La.4-hKappa 配列番号 90	AM4B6_Hg.3_hIgG1_L234F_L235E_P331S (ノブ) - SIRP α _CV1 配列番号 94	AM4B6_Hg.3_hIgG1_L234F_L235E_P331S (ホール) 配列番号 95	ノブ: S354C、T366W ホール: Y349C、T366S、L368A、Y407V
3280A-hIgG1-SIRP α (KIH)	3280A-L-hKappa 3280A-L-hKappa 配列番号 92	3280A_H_hIgG1_L234F_L235E_P331S (ノブ) - SIRP α _CV1 配列番号 96	3280A_H_hIgG1_L234F_L235E_P331S (ホール) 配列番号 97	3280A は Roche の抗 PD-L1 抗体であるアテゾリズマブの省略形である

【0551】

【00601】4つ全部の二機能性抗体を、製造業者のプロトコールに従って E x p i - C H O 細胞を用いて発現させた。2つの対称性二機能性抗体について、1ステップの M a b s e l e c t S u R e 精製を用いて高純度の抗体が得られたが、非対称性二機能性抗体については、従来の1ステップの M a b s e l e c t S u R e 精製によって高純度抗体を得ることができない。高純度非対称性抗体を得るために、本発明者らが、H i T r a p P r i s m A 樹脂を使用して、抗体を研磨精製したところ、非対称性抗体の純度は95%よりも良好であった。研磨精製手順は、以下のように記載される。

【0552】

【00602】使用した緩衝液：

【00603】平衡化緩衝液：50mM T r i s - H A c、150mM N a C l、pH 7.4。

【0553】

【00604】洗浄緩衝液：50mM N a A c / H A c、500mM N a C l、5% P

E G、p H 5 . 5。

【 0 5 5 4 】

【 0 0 6 0 5 】溶出緩衝液： 5 0 m M H A c、 5 0 0 m M N a C l、 5 % P E G、 p H 3 . 0。

【 0 5 5 5 】

【 0 0 6 0 6 】U V ベースライン、溶離液の p H、および伝導度が変化しなくなるまで、少なくとも 5 倍カラム体積 (C V) にわたって平衡化緩衝液で H i T r a p P r i s m A カラムを平衡化させる。

【 0 5 5 6 】

【 0 0 6 0 7 】予め平衡化させた H i T r a p P r i s m A カラム上に試料をロードする。

10

【 0 5 5 7 】

【 0 0 6 0 8 】U V トレースがベースラインに戻るまで、 5 ～ 1 0 C V の洗浄緩衝液を用いて洗浄する。

【 0 5 5 8 】

【 0 0 6 0 9 】 1 0 ～ 2 0 C V 中、 0 ～ 1 0 0 % の溶出緩衝液で溶出し、いくつかのチューブを用いて 5 ～ 1 0 の画分を別々に収集する。 1 M T r i s 塩基 (p H 9 . 0) を用いて、 p H を約 6 . 0 ～ 7 . 0 に調整した。

【 0 5 5 9 】

【 0 0 6 1 0 】次いで、画分を S E C - H P L C によって特徴付けた。図 2 6 は、 3 2 8 0 A - h I g G 1 - S I R P α (K I H) および A M 4 B 6 - h I g G 1 - S I R P α (K I H) の純度が、それぞれ、 9 5 . 3 3 % および 9 6 . 5 % であることを示す。

20

【 0 5 6 0 】

【 0 0 6 1 1 】ヒト P D - L 1 またはヒト C D 4 7 に対する親和性を、 E L I S A を用いて試験した。図 2 7 および図 2 8 は、二機能性抗体の抗原に対する親和性が、親モノクローナル抗体 (4 B 6 m A b 対照) または融合タンパク質 (S I R P α - F c (F E S)) のものと同等であることを示す。

【 0 5 6 1 】

【 0 0 6 1 2 】

実施例 1 7

I g G - s c F v - A C Z 8 8 5 - A M 4 B 6 および I g G - s c F v - X O M A 0 5 2 - A M 4 B 6 二特異性抗体 (b s A b) の構築および発現

30

【 0 0 6 1 3 】単鎖断片 (s c F v) A M 4 B 6 の配列を、以下の表に示す。抗 I L - 1 β 抗体であるゲボキズマブ (X O M A 0 5 2) およびカナキヌマブ (A C Z 8 8 5) は、 N o v a r t i s からのものであった。 A M 4 B 6 の s c F v を、抗 I L - 1 β 抗体重鎖 C 末端に接続して、より良好な活性および安定性を得た。 s c F v は、 V H を V L に接続した G S リンカー (G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S) を有し、残基 H 4 4 C と L 1 0 0 C (K a b a t の番号付け) との間にドメイン間ジスルフィド結合を含有する。抗 I L - 1 β 抗体 (X O M A 0 5 2 および A C Z 8 8 5) の配列を、表 2 2 に示す。構築された二特異性抗体を、それぞれ、 I g G - s c F v - A C Z 8 8 5 - A M 4 B 6 および I g G - s c F v - X O M A 0 5 2 - A M 4 B 6 と命名した。

40

【 0 5 6 2 】

【 0 0 6 1 4 】 b s A b の重鎖および軽鎖の同時トランスフェクションを、製造業者のプロトコールに従って I n v i t r o g e n からの E x p i F e c t a m i n e (商標) C H O R e a g e n t (T h e r m o、 A 2 9 1 2 9) を使用して実行した。上清を 1 0 日目に採取し、親和性クロマトグラフィーによって精製した。

【 0 5 6 3 】

【 0 0 6 1 5 】

実施例 1 8

I g G - s c F v - A C Z 8 8 5 - A M 4 B 6 および I g G - s c F v - X O M A 0 5 2 - A M 4 B 6 b s A b の h I L - 1 β に対する結合活性

50

[00616] E L I S A アッセイに基づくヒト I L - 1 β タンパク質への結合

[00617] 100 μ L の 1 μ g / m l の h I L - 1 β タンパク質 (S i n o B i o l o g i c a l 、カタログ番号 10139-HNAE) を E L I S A プレートにコーティングし、4 $^{\circ}$ C で一晚コーティングした。次いで、200 μ L の 2 % (w / v) B S A を、室温で 2 h 、ブロッキングのために添加した。インキュベーション後、20 n M ~ 0 . 000339 n M (3 倍連続希釈) の範囲の濃度の I g G - s c F v - A C Z 885 - A M 4 B 6 、 I g G - s c F v - X O M A 052 - A M 4 B 6 b s A b 、 A C Z 885 、および X O M A 052 の 100 μ l を、陰性対照としての P B S T と共に添加し、室温で 1 h インキュベートした。0 . 5 % T w e e n (登録商標) - 20 を含む P B S を、3 回の洗浄のために使用し、100 μ l の H R P コンジュゲート化抗ヒト F c 抗体 (1 : 20000 、 A b c a m 、 a b 98624) を添加した。室温で 1 h インキュベートした後、混合 T M B 基質試薬 (I n n o R e a g e n t s 、 T M B - S - 003) を添加し、室温で 5 m i n インキュベートした後、0 . 1 M H ₂ S O ₄ を添加することによって停止させた。OD 450 nm を、マイクロプレートリーダーによって記録した。データを G r a p h P a d P r i s m によって分析した。

10

[0564]

[00618] 図 29 に示されるように、A C Z 885 および X O M A 052 モノクローナル抗体と比較して、I g G - s c F v - A C Z 885 - A M 4 B 6 および I g G - s c F v - X O M A 052 - A M 4 B 6 b s A b は、それぞれ、h I L - 1 β タンパク質に対する類似する結合活性を有する。

20

[0565]

[00619]

実施例 19

I g G - s c F v - A C Z 885 - A M 4 B 6 および I g G - s c F v - X O M A 052 - A M 4 B 6 b s A b の h P D - L 1 に対する結合活性

[00620] E L I S A アッセイに基づくヒト P D - L 1 への結合

[00621] 1 μ g / m l の h P D - L 1 (A c r o B i o s y s t e m s 、 P D 1 - H 5229) 抗原 100 μ L を E L I S A プレートにコーティングし、4 $^{\circ}$ C で一晚コーティングした。次いで、300 μ L の 2 % (w / v) B S A を、室温で 1 h 、ブロッキングのために添加した。1 h のインキュベーション後、20 n M ~ 0 . 000339 n M (3 倍連続希釈) の範囲の濃度の I g G - s c F v - A C Z 885 - A M 4 B 6 、 I g G - s c F v - X O M A 052 - A M 4 B 6 b s A b または A M 4 B 6 - h I g G 1 モノクローナル抗体 (A M 4 B 6 m A b) の 100 μ l を、陰性対照としての P B S T と共に添加し、室温で 1 h インキュベートした。0 . 5 % T w e e n (登録商標) - 20 を含む P B S を、3 回の洗浄のために使用し、100 μ l の H R P コンジュゲート化抗ヒト F c 抗体 (1 : 20000 、 A b c a m 、 a b 98624) を添加した。室温で 1 h インキュベートした後、混合 T M B 基質試薬 (I n n o R e a g e n t s 、 T M B - S - 003) を添加し、室温で 5 m i n インキュベートした後、0 . 1 M H ₂ S O ₄ を添加することによって停止させた。OD 450 nm を、マイクロプレートリーダーによって記録した。データを G r a p h P a d P r i s m によって分析した。

30

40

[0566]

[00622] 図 30 に示されるように、A M 4 B 6 モノクローナル抗体と比較して、I g G - s c F v - A C Z 885 - A M 4 B 6 、 I g G - s c F v - X O M A 052 - A M 4 B 6 b s A b は、h P D - L 1 タンパク質に対する類似する結合活性を有する。

[0567]

[00623] F A C S 法による、P D - L 1 を発現する 293 T 細胞への I g G - s c F v - A C Z 885 - A M 4 B 6 および I g G - s c F v - X O M A 052 - A M 4 B 6 の結合

[00624] 293 T - P D - L 1 - C D 3 L 細胞を、P D - L 1 抗体の特性評価のために M a b S p a c e B i o s c i e n c e s によって生成した。細胞に、ヒト P D - L

50

1と抗CD3 s c F vとの両方をトランスフェクトした。I g G - s c F v - A C Z 8 8 5 - A M 4 B 6、I g G - s c F v - X O M A 0 5 2 - A M 4 B 6またはA M 4 B 6 m A bを、4倍希釈によって連続希釈して、希釈緩衝液（2% B S Aを含むP B S）中で9種の濃度を得た。2 9 3 T - P D - L 1 - C D 3 L細胞を採取し、遠心分離した。次いで、それらを、 2×10^6 細胞／m lの密度でP B S中に再懸濁し、ウェルあたり100 μ lでプレートに添加した。遠心分離および上清の除去後、希釈した抗体をプレートに添加し、4℃で30minインキュベートした。希釈緩衝液で2回洗浄した後、P E コンジュゲート化ロバ抗ヒトI g G（H + L）（J a c k s o n i m m u n o、7 0 9 - 1 1 6 - 1 4 9）をプレートに添加し、4℃で30minインキュベートした。洗浄後、細胞を200 μ lのP B S中に再懸濁し、フローサイトメトリーによって分析した。データをG r a p h P a d P r i s mによって分析した。

10

【0568】

【00625】図31に示されるように、I g G - s c F v - A C Z 8 8 5 - A M 4 B 6およびI g G - s c F v - X O M A 0 5 2 - A M 4 B 6は、類似するE C 5 0で細胞の表面上に発現されたP D - L 1に結合することができ、これはE L I S Aによって測定された親和性の結果と一致していた。

【0569】

実施例20

I g G - s c F v - A C Z 8 8 5 - A M 4 B 6およびI g G - s c F v - X O M A 0 5 2 - A M 4 B 6のP D 1 / P D - L 1遮断活性

20

【00626】このアッセイでは、2 9 3 T - P D - L 1 - C D 3 L細胞はP D - L 1および抗CD3 s c F vを発現し、J u r k a t - N F A T - L u c - P D 1細胞はP D - 1を発現し、C D 3刺激によって活性化することができるN F A Tシグナルを担持していた。N F A T活性化は、ルシフェラーゼ遺伝子の転写および発現をもたらし、その基質によって検出することができる。2つの細胞系を、M a b S p a c e B i o s c i e n c e sによって生成した。

【0570】

【00627】簡単に述べると、2 9 3 T - P D - L 1 - C D 3 L細胞を採取し、 2×10^6 細胞／m lの密度で再懸濁した。ウェルあたり20 μ lの細胞を、ハーフウェルプレートに添加した。I g G - s c F v - A C Z 8 8 5 - A M 4 B 6、I g G - s c F v - X O M A 0 5 2 - A M 4 B 6およびA M 4 B 6 - h I g G 1を連続希釈（3倍希釈）して、2% F B Sを含むR P M I培地中で9種の濃度を得た。ウェルあたり20 μ lの抗体をハーフウェルプレートに添加し、プレートを37℃、5% C O ₂で30minインキュベートした。J u r k a t - N F A T - L u c - P D 1細胞を採取し、2% F B Sを含むR P M I培地中に 4×10^6 細胞／m lの密度で再懸濁した。最後に、ウェルあたり20 μ lの細胞をハーフウェルプレートに添加し、37℃、5% C O ₂で5hインキュベートした。60 μ lのO n e G l o検出試薬（P r o m e g a、E 6 1 2 0）を各ウェルに添加し、室温で5分間インキュベートした。発光シグナルをマイクロプレートリーダーによって読み取った。データをG r a p h P a d P r i s mによって分析した。

30

【0571】

【00628】図32に示されるように、I g G - s c F v - A C Z 8 8 5 - A M 4 B 6、I g G - s c F v - X O M A 0 5 2 - A M 4 B 6およびA M 4 B 6 - h I g G 1は、この細胞ベースのアッセイにおいてP D - L 1に対する類似する遮断活性を有していた。

40

【0572】

実施例21

ヒト皮膚線維芽（H D F）細胞上でのヒトI L - 1 β に対するI g G - s c F v - X O M A 0 5 2 - A M 4 B 6の遮断活性

【00629】H D F細胞上でのヒトI L - 1 β に対するI g G - s c F v - X O M A 0 5 2 - A M 4 B 6の遮断活性。

【0573】

50

[00630]リガンド／受容体遮断活性を試験するために、 4×10^4 個/mLのHDF細胞を、 $100 \mu\text{L}$ ／ウェルで、 50 pg/mL の組換えヒトIL-1 β (Sino Biological、カタログ番号10139)で刺激したが、陰性対照として細胞をIL-1 β で刺激しなかった。次いで、 $100 \text{ nM} \sim 0.00038 \text{ nM}$ (4倍連続希釈)の範囲の連続濃度で $100 \mu\text{L}$ ／ウェルのIgG-scfv-XOMA052-AM4B6およびXOMA052を培養物に添加し、室温で一晩 (16~17 h) インキュベートした。刺激後、細胞培養上清中のIL-6放出を、キットの使用説明書によって指導されるIL-6 ELISA Kit (R&D、DY206、P209026)を使用して検出した。

[0574]

10

[00631]図33に示されるように、IgG-scfv-XOMA052-AM4B6およびXOMA052は、IL-1 β を用量依存的に遮断することができ、IL-1 β に対するIgG-scfv-XOMA052-AM4B6の遮断活性は、HDF細胞上でのXOMA052のものと類似していた。

[0575]

[00632]レポーター細胞上でのhIL-1 β に対するIgG-scfv-ACZ885-AM4B6の遮断活性

[00633]このアッセイでは、HEK-Blue (商標) CD40L細胞を、InvivoGen (カタログ番号hkb-cd40) から購入した。これらの細胞は、ヒトCD40遺伝子およびNF- κ B誘導性SEAP構築物のHEK293細胞への安定なトランスフェクションによって生成された。CD40Lの、その受容体CD40への結合は、NF- κ Bの活性化およびSEAPのその後の産生をもたらすカスケードを誘発し、QUANT-Blueによってモニタリングすることができる。HEK293細胞は、CD40Lと共通のシグナル伝達経路を共有するサイトカインIL-1 β のための受容体を内因性に発現する。したがって、IL-1 β 媒介性SEAP産生を、中和抗体を使用して遮断することができる。

20

[0576]

[00634]簡単に述べると、対数期細胞でHEK293-CD40L細胞を収集し、 5×10^4 ／ウェル ($100 \mu\text{L}$ ／ウェル)の密度で細胞を96ウェルプレート中に播種して、一晩接着させる。IgG-scfv-ACZ885-AM4B6およびACZ885を、 100 nM から連続希釈 (4倍希釈) して、完全培養培地中で9種の濃度を得た。 $50 \mu\text{L}$ ／ウェルの希釈した抗体および $50 \mu\text{L}$ ／ウェルのヒトIL-1 β (1 ng/mL)を細胞に添加し、 37°C で24 h インキュベートする。次の日、 $160 \mu\text{L}$ のQUANT-Blue (商標) 溶液 (InvivoGen、カタログ番号rep-qbs)を新しいプレートに添加し、 $40 \mu\text{L}$ の細胞培養上清をプレートに添加した。 37°C で2 h、プレートをインキュベートする。 620 nm で分光光度計を使用してSEAPレベルを決定する。データをGraphPad Prismによって分析した。

30

[0577]

[00635]図34に示されるように、IgG-scfv-ACZ885-AM4B6およびACZ885 (カナキマブ)は、用量依存的様式でIL-1 β を遮断することができるが、IgG-scfv-ACZ885-AM4B6の遮断活性は、HEK293-CD40Lレポーター細胞上でACZ885 (カナキマブ)と類似していた。

40

[0578]

[00636]

[0579]

【表 2 4 - 1】

表 22. 本開示において言及されるアミノ酸配列

配列 番号	配列	領域
1	DYYMN	4B6_HCDR1
2	DINPNNGGTSYNHKFKG	4B6_HCDR2
3	WGDGPFAY	4B6_HCDR3
4	KASQNVGAAVA	4B6_LCDR1
5	SASNRYT	4B6_LCDR2
6	QQYSNYPT	4B6_LCDR3
7	KASQNVGAIVA	4B6-L-CDR1-1
8	KASQNVPAAVA	4B6-L-CDR1-2
9	KASQNVKGAVA	4B6-L-CDR1-3
10	SNSHRYT	4B6-L-CDR2-1
11	SRSVRYT	4B6-L-CDR2-2
12	SVSDRYT	4B6-L-CDR2-3
13	DINPNNADTMYNHKFKG	4B6-H-CDR2-1
14	DINPNNAQTTQYNHKFKG	4B6-H-CDR2-2
15	DINPNNAEPLYNHNKFKG	4B6-H-CDR2-3
16	DINPNNGLTSYNHNKFKG	4B6-H-CDR2-4
17	DINPNNAQTVYNHNKFKG	4B6-H-CDR2-5
18	DINPNNAGTSYNHNKFKG	H-CDR2-WT (G55A)
19	DINPNNX ₁ X ₂ TX ₃ YNHNKFKG	HCDR2
20	KASQNVX ₄ X ₅ X ₆ VA	LCDR1
21	SX ₇ SX ₈ RYT	LCDR2
22	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF T	HFR1
23	WVRQAPGQGLEWMG	HFR2
24	RVTMTDTSISTAYMELSRLLSDDTAVYYC AR	HFR3
25	WGQGTLLTVSS	HFR4
26	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	LFR1
27	WYQQKPKGAPKLLIY	LFR2
28	GVPSRFGSGSGTDFFTISSLPEDVATYYC	LFR3
29	FGQGTKLEIK	LFR4
30	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVF T	HFR1 バリエント
31	WVRQAPGQSLEWMG	HFR2 バリエント
32	RVTVTVDTSISTAYMELSRLLSDDTAVYYC AR	HFR3 バリエント 1

【 0 5 8 0 】

10

20

30

40

50

【表 2 4 - 2】

33	RVTVTVDTSISTAYMELSRLSDDTAVYYC VK	HFR3 バリエント 2
34	RVTVTVDKSISTAYMELSRLSDDTAVYYC AR	HFR3 バリエント 3
35	RVTVTVDKSISTAYMELSRLSDDTAVYYC VK	HFR3 バリエント 4
36	WYQQKPGKSPKLLIY	LFR2 バリエント
37	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDATYYC	LFR3 バリエント 1
38	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDATYY C	LFR3 バリエント 2
39	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDATYYC	バリエント 1-FR3 の F73L 変異
40	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYX ₉ FT	HFR1
41	WVRQAPGQX ₁₀ LEWMG	HFR2
42	RVTX ₁₆ TVDX ₁₁ SISTAYMELSRLSDDTAVY YCX ₁₂ X ₁₃	HFR3
43	WYQQKPGKX ₁₄ PKLLIY	LFR2
44	GVPX ₁₅ RFSGSGSGTDFTX ₁₇ TISSLQPEDAT YYC	LFR3
45	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDATYY C	LC バリエント 2-FR3 の F73L、A43S、S60D
46	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYVFT DYIMNWWVKQSHGKSLEWIGDINPNNGTS YNHKFKGKATVTVDKSSRTAYMELLSLTS EDSAVYYCVKWGDGPFAYWGQGTTLVTVS A	4B6_VH
47	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSITCKASQNVG AAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASNRYTGVP DRFTGSGSGTDFTLTISNMQSEDLADYFCQ QYSNYPTFGSGTKLGIK	4B6_VL
48	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTF TGYIMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSG GTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSR LSDDTAVYYCAR	ヒト化 4B6、VH 生殖 系列
49	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTF TDYIMNWWVRQAPGQGLEWMGDINPNNG GTSYNHKFKGRVTVTVDTSISTAYMELSR LSDDTAVYYCARWGDGPFAYWGQGTTLVT VSS	ヒト化 4B6、VH バリ アント 1

【 0 5 8 1 】

10

20

30

40

50

【表 2 4 - 3】

50	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF TDYYMNWVRQAPGQGLEWMGDINPNNG GTSYNHKFKGRVTVTVDTSISTAYMELSRL RSDDTAVYYCVKWGDGPFAYWGQGLVT VSS	ヒト化 4B6、VH バリ アント 2
51	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVF TDYYMNWVRQAPGQGLEWMGDINPNNG GTSYNHKFKGRVTVTVDKSISTAYMELSRL RSDDTAVYYCARWGDGPFAYWGQGLVT VSS	ヒト化 4B6、VH バリ アント 3
52	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVF TDYYMNWVRQAPGQSLEWMGDINPNNGG TSYNHKFKGRVTVTVDKSISTAYMELSRLR SDDTAVYYCVKWGDGPFAYWGQGLVT SS	ヒト化 4B6、VH バリ アント 4
53	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISN YLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPS RFSGSGSGTDFTFTISLQPEDATYYCQQY DNL	ヒト化 4B6、VL 生殖 系列
54	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVG AAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASNRYTGVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDATYYCQQ YSNYPTFGQGTKLEIK	ヒト化 4B6、VL バリ アント 1
55	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVG AAVAWYQQKPGKSPKLLIYSASNRYTGVP DRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDATYYCQQ YSNYPTFGQGTKLEIK	ヒト化 4B6、VL バリ アント 2
56	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVF TDYYMNWVRQAPGQSLEWMGDINPNNAG TSYNHKFKGRVTVTVDKSISTAYMELSRLR SDDTAVYYCVKWGDGPFAYWGQGLVT SS	Hu4B6_Hg
57	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVF TDYYMNWVRQAPGQSLEWMGDINPNNAG TSYNHKFKGRVTVTVDKSISTAYMELSRLR SDDTAVYYCVKWGDGPFAYWGQGLVT SS	AM4B6_Hg
58	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVF TDYYMNWVRQAPGQSLEWMGDINPNNAQ TQYNHKFKGRVTVTVDKSISTAYMELSRL RSDDTAVYYCVKWGDGPFAYWGQGLVT VSS	Hu4B6_Hg.2

10

20

30

40

【 0 5 8 2 】

【表 2 4 - 4】

59	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVF TDYYMNWVRQAPGQSLEWMGDINPNAE TLYNHKFKGRVTVTVDKSISTAYMELSRLR SDDTAVYYCVKWGDGPFAYWGQGTLLTV SS	AM4B6_Hg.3
60	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVF TDYYMNWVRQAPGQSLEWMGDINPNAQ TVYNHKFKGRVTVTVDKSISTAYMELSRL RSDDTAVYYCVKWGDGPFAYWGQGTLLTV VSS	AM4B6_Hg.5
61	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVG AAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASNRYTGVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDATYYCQQ YSNYPTFGQGTKLEIK	Hu4B6_La
62	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVK GAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASNRYTGVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDATYYCQQ YSNYPTFGQGTKLEIK	AM4B6_La.1
63	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVK AAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASNRYTGVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDATYYCQQ YSNYPTFGQGTKLEIK	AM4B6_La.2
64	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVG AAVAWYQQKPGKAPKLLIYSVSDRYTGVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDATYYCQQ YSNYPTFGQGTKLEIK	AM4B6_La.4
65	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVG AAVAWYQQKPGKAPKLLIYSRSVRYTGVP SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDATYYCQQ YSNYPTFGQGTKLEIK	AM4B6_La.6
66	GAVKFPQLCKFCDFRSTCDNQKSCMSNC SITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVC HDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKKKPGE TFFMCSSSDECNDNIIFSEYNTSNPD	短縮型 TGF-ベータ 受容体 II 配列 20-136
67	KMQAFRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQ GPNVNLEEKIDVVPPIEPHALFLGIHGGKMC LSCVKSGDETRLQLEAVNITDLSNRKQDK RFAFIRSDSGPTTSFESAACPGWFLCTAME ADQPVSLTNMPDEGVMVTKFYFQEDE	短縮型 IL-1 R-34-177
68	(G4S)4G	リンカー

【 0 5 8 3 】

10

20

30

40

50

【表 2 4 - 5】

69	<p>LQCFCHLCTKDNFTCVTDGLCFVSVTETTD KVIHNSMCIAEIDLIPDRPFVFCAPSSKTGS VTTYCCNQDHCNKIELPTTVKSSPGLGPV ELA AVIAGPVCFVCISLMLMVYICHNRTVI HHRVPNEEDPSLDRPFISEGTTLKDLIYDMT TSGSGSGLPLL VQRTIARTIVLQESIGKGRF GEVWRGKWRGEEVAVKIFSSREERSWFRE AEIYQTVMLRHENILGFIAADNKDNGTWT QLWLVS DYHEHGS LFDYLNRYTVTVEGMI KLALSTASGLAHLHMEIVGTQGKPAIAHRD LKSKNILVKKNGTCCIADLGLAVRHDSATD TIDIAPNHRVGTKRYMAPEVLDD SINMKHF ESFKRADIYAMGLVFWELARRCSIGGIHED YQLPYYDLVPSDPSVEEMRKVVCEQKLRP NIPNRWQSCEALRVMAKIMREC WYANGA ARLTALRIKKTLSQLSQQEGIKM</p>	TGFβRI
70	<p>TIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLC KFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQE VCVAVWRKN DENITLETVCHDPKLPYHDFI LEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDE CNDNIIFSEEYNTSNPDLLL VIFQVTGISLLP PLGVAISVIII FYCYRVNRQQKLSSTWETGK TRKLMEFSEHCAIILED RSDISSTCANNIN HNTELLPIELDTLVGKGRFAEVYKAKLKQN TSEQFETVAVKIFPYEEYASWKTEKDIFSDI NLKHENILQFLTA EERKTEL GKQYWLITAF HAKGNLQEYLTRHVISWEDLRKLGSSLAR GIAHLHSDHTPCGRPKMPIVHRDLKSSNILV KNDLTCCLCDFGLSLRLDPTLSVDDLANS QVGTARYMAPEVLES RMNLENVESFKQTD VYSMALVLWEMTSRCNAVGEVKDYEPFF GSKVREHPCVESMKDNVLRDRGRPEIPSW LNHQGIQMV CETLTECWDHDPEARLTAQC VAERFSELEHLDRLSGRSCSEEKIPEDGSLN TTK</p>	TGFβRII アイソフォーム A

【0 5 8 4】

10

20

30

40

50

【表 2 4 - 6】

71	TIPPHVQKSDVEMEAQKDEIICPSCNRTAHP LRHINNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVR FSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAV WRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAA SPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNII FSEYNTSNPDLLLVIQVGTGISLLPPLGVAI SVIIIFYCYRVNRQQKLSSTWETGKTRKLM EFSEHCAIILED RSDISSTCANNINHNTLL PIELDTLVGKGRFAEVYKAKLKQNTSEQFE TVAVKIFPYEEYASWKTEKDIFSDINLKHE NILQFLTAERKTEL GKQYWLITAFHAKGN LQEYLTRHVISWEDLRKLGSSLARGIAHLH SDHTPCGRPKMPIVHRDLKSSNILVKNDLT CCLCDFGLSLRLDPTLSVDDLANSQVGT RYMAPEVLES RMNLENVESFKQTDVYSMA LVLWEMTSRCNAVGEVKDYEPFPGSKVRE HPCVESMKDNVLRDRGRPEIPSWLNHQGI QMVCE TLTECWDHDPEARLTAQCVAERFS ELEHLDRLSGRSCSEEKIPEDGSLNTTK	TGFβRII アイソフォ ーム B
72	GPEPGALCELSPVASHPVQALMESFTVLS GCASRGTTGLPQEVHVLNLRTAGQGPGQL QREVTLHLNPISSVHIIHKSVVFLNPHPL VWHLKTERLATGVSRLFLVSEGSVVQFSSA NFSLTAETEERNFPHGNEHLLNWARKEYG AVTSFTELKIARNIYIKVGEDQVFPPKCNIG KNFLSLNYLAEYLQPKAAEGCVMSSQPQN EEVHIIELITPNSNPYSAFQVDITIDIRPSQED LEVVKNLILILKCKKSVNWVIKSFVKGSL KIIAPNSIGFGKESERSMTMTKSIRDDIPSTQ GNLVKWALDNGYSPITSYTMAPVANRFHL RLENNAEEMGD EEVHTIPPELRILLDPGALP ALQNPPIRGGEGQNGGLPFPFPDISRRVWN EEGEDGLPRPKDPVPSIQLFPGLREPEEVQ GSVDIALSVKCDNEKMIVAVEKDSFQASG YSGMDVTLLDPTCKAKMNGTHFVLESPLN GCGTRPRWSALDGVVYYNSIVIQVPALGDS SGWPDGYEDLESGDNGFPGDMDEGDASLF TRPEIVVFNC SLQQVRNPSSFQEQPHGNITF NMELYNTDLFLVPSQGVFSVPENGHVYVE VSVTKAEQELGFAIQTCFISPYSNPDRMSHY TIENICPKDES VKFYSPKRVHFPIQADMD	TGFβRIII

10

20

30

40

【 0 5 8 5 】

【表 2 4 - 7】

	KKRFSFVKPVFNTSLLFLQCELTCTKME KHPQKLPKCVPPDEACTSLDASIWAMMQ NKKTFTKPLAVIHHEAESKEKGPSMKEPNP ISPPIFHGLDTLTVMGIAFAAFVIGALLTGA LWYIYSHTGETAGRQQVPTSPPASSENSSAA HSIGSTQSTPCSSSSTA	
73	LEADKCKEREEKIILVSSANEIDVRPCPLNP NEHKGTTITWYKDDSKTPVSTEQASRIHQHK EKLWVFPAKVEDSGHYVCVVRNSSYCLRI KISAKFVENEPNLCYNAQAIFKQKLPVAGD GGLVCPYMEFFKNENNELPKLQWYKDCKP LLLDNIHFSGVKDRLIVMNVAEKHRGNYT CHASYTYLGKQYPITRVIEFITLEENKPTRP VIVSPANETMEVDLGSQIQLICNVTGQLSDI AYWKWNGSVIDEDDPVLGEDYYSVENPA NKRRSTLITVLNISEIESRFYKHPFTCFAKNT HGIDAAYIQLIYPVTNFQKHMIGICVTLTVII VCSVFIYKIFKIDIVLWYRDSCYDFLPIKAS DGKTYDAYILYPKTVGEGSTSDCDIFVKV LPEVLEKQCGYKLFYGRDDYVGEDIVEVI NENVKKSRRLLIILVRETSGFSWLGSSEEQI AMYNALVQDGIKVVLELEKIQDYEKMP SIKFIKQKHGAIRWSGDFTQGPQSAKTRFW KNVRYHMPVQRRSPSSKHQLLSPATKEKL QREAHVPLG	IL-1RI
74	SERCDDWGLDTMRQIQVFEDEPARIKCPLF EHFLKFNYSSTAHSAGLTLIWYWTRQDRDL EEPINFRLPENRISKEKDVLWFRPTLLNDTG NYTCMLRNTTYCSKVAFPLEVQKDSCFN SPMKLPVHKLYIEYGIQRITCPNVDGYFPSS VKPTITWYMGYKIQNFNNVIPEGMNLSFL IALISNNGNYTCVVITYPENGRTFHLTRTLT VKVVGSPKNAVPPVIHSPNDHVVEKEPGE ELLIPCTVYFSFLMDSRNEVWWTIDGKKPD DITIDVTINESISHSRTEDETRTQILSIKKVTS EDLKRSYVCHARSAKGEVAKAAKVQKQV PAPRYTVELACGFGATVLLVVILIVVYHVY WLEMVLFYRAHFGTDETILDGKEYDIYVS YARNAEEEEFVLLTLRGVLENEFGYKLCIF DRDSLPGGIVTDETLFSFIQKSRLLVVLSPN YVLQGTQALLELKAGLENMASRGNINVIL	IL-1RAP

10

20

30

40

【0 5 8 6】

【表 2 4 - 8】

	VQYKAVKETKVKELKRAKTVLTVIKWKG EKSYPQGRFWKQLQVAMPVKKSPRRSS DEQGLSYSSLKNV	
75	FTLQPAHTGAARSCRFRGRHYKREFRLEG EPVALRCPQVPYWLWASVSPRINLTWHKN DSARTVPGEETRMWAQDGLWLLPALQ EDSGTYVCTTRNASYCDKMSIELRVFENTD AFLPFISYPQILTLSTSGVLVCPDLSEFTRDK TDVKIQWYKDSLLLDKDNEKFLSVRGTH LLVHDVALEDAGYYRCVLTFAHEGQQYNI TRSIELRIKKKKEETIPVIISPLKTISASLGSRL TIPCKVFLGTGTPLTTLWWTANDTHIESA YPGGRVTEGPRQEYSENNENYIEVPLIFDPV TREDLHMDFKCVVHNTLSFQTLRTTVKEA SSTFSWGIVLAPLSLAFLVLGGIWMHRRCK HRTGKADGLTVLWPHHQDFQSYPK	IL-1RII
76	RPSGRKSSKMQAARIWDVNQKTFYLRNNQ LVAGYLQGPVNLEEKIDVVPIEPHALFLGI HGGKMCLSCVKSGDETRLQLEAVNITDLSE NRKQDKRFAFIRSDSGPTTSFESAACPGWF LCTAMEADQPVSILTNPDEGVMVTKFYFQ EDE	IL-1RA
77	LQCFCHLCTKDNFTCVTDGLCFVSVTETTD KVIHNSMCIAEIDLIPDRPFVCAPSSKTGS VTTYCCNQDHCNKIELPTTVKSSPGLGPV EL	ヒト TGFβRI 34-126 の ECD
78	IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKF CDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEV VAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILE DAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECN DNIIFSEEYNTSNPD	ヒト TGFβRII 24-159 の ECD
79	GPEPGALCELSPPVSASHPVQALMESFTVLS GCASRGTTGLPQEVHVLNLRTAGQGPGQL QREVTLHLNPISSVHIHHSVVFLLNSPHPL VWHLKTERLATGVSRLFLVSEGSVVQFSSA NFSLTAETEERNFPHGNEHLLNWARKEYG AVTSFTELKIARNIYIKVGEDQVFPPKCNIG KNFLSLNYLAEYLQPKAAEGCVMSSQPQN EEVHIIEITPNSNPYSAFQVDITIDIRPSQED LEVVKNLILILKCKKSVNWVIKSFVDVKGSL KIIAPNSIGFGKESERSMTMTKSIRDDIPSTQ	ヒト TGFβRIII 21-787 の ECD

10

20

30

40

【0587】

【表 2 4 - 9】

	GNLVKWALDNGYSPITSYTMAPVANRFHL RLENNAEEMGDEEVHTIPPELRILLDPGALP ALQNPPIRGGEGQNGGLPFPFPDISRRVWN EEGEDGLPRPKDPVIPSILFPGFREPEEVQ GSVDIALSVKCDNEKMIVAVEKDSFQASG YSGMDVTLLDPTCKAKMNGTHFVLESPLN GCGTRPRWSALDGVVYYNSIVIQVPALGDS SGWPDGYEDLESGDNGFPGDMDEGDASLF TRPEIVVFNCSLQQVRNPSSFQEOPHGNITF NMELYNTDLFLVPSQGVFSVPENGHVYVE VSVTKAEQELGFAIQTCFISPYSNPDRMSHY TIIENICPKDES VKFYSPKRVHFPIPADMD KKRFSFVFKPVFNTSLLFLQCELTCTCKME KHPQKLKPCVPPDEACTSLDASIHWAMMQ NKKTFKPLAVIHHEAESKEKGPSMKENP ISPIFHGLDTLTV	
80	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK	hIgG1 aa 配列:
81	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GA	hIgG1_FES (L234F/L235E/P331S)

10

20

30

40

【0 5 8 8】

【表 2 4 - 1 0】

82	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC	hKappa aa 配列
83	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTWNSGALTSGLVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG A	hIgG1_FES (L234F/L235E/P331S)
84	EEELQIIQPDKSVLVAAGETATLRCTITSLFP VGPIQWFRGAGPGRVLIYNQRQGPFRVTT VSDTTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYCYIK FRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRAKPS	SIRPa_CV1
85	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVST AVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFYSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYL YHPATFGQGTKVEIK	3280A 軽鎖可変領域
86	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS DSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTY YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAE DTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLLVTVS S	3280A 重鎖可変領域
87	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTWNSGALTSGLVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYAS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG A	hIgG1(N297A)

10

20

30

40

【 0 5 8 9 】

【表 2 4 - 1 1】

88	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDE LTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG A	hIgG1_L234F_L235E _P331S (ノブ)S354C/ T366W
89	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDEL TKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	hIgG1_L234F_L235E _P331S(ホー ル) T366S/ L368A/Y407V
90	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVG AAVAWYQQKPGKAPKLLIYSVSDRYTGVP RFGSGSGTDFTLTISLQPEDATYYCQQYS NYPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGE C	AM4B6-La.4-hKappa
91	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVF TDYYMNWVRQAPGQSLEWMGDINPNAE TLYNHKFKGRVTITVDKSISTAYMELSRLR SDDTAVYYCVKWGDGPFAYWGQGLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN	AM4B6_Hg.3_hIgG1 _L234F_L235E_P331 S-(G4S)4G-SIRPa_C V1

10

20

30

40

【0590】

【表 2 4 - 1 2】

	STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG AGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGEEELQIIQ PDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWF RGAGPGRVLIYNQRQGPFPRTTVSDTTKR NNMDFSIRIGNITPADAGTYCYCIKFRKGSPD DVEFKSGAGTELSVRKPS	
92	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVST AVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYL YHPATFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC	3280A-L-hKappa
93	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS DSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTY YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAE DTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLLTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG AGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGEEELQIIQ PDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWF RGAGPGRVLIYNQRQGPFPRTTVSDTTKR NNMDFSIRIGNITPADAGTYCYCIKFRKGSPD DVEFKSGAGTELSVRKPS	3280A-H-hIgG1(N29 7A)-(G4S)4G- SIRP α _CV1

【 0 5 9 1 】

10

20

30

40

50

【表 2 4 - 1 3】

94	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVF TDYYMNWVRQAPGQSLEWMGDINPNNAE TLYNHKFKGRVTVTVDKSISTAYMELSRLR SDDTAVYYCVKWGDGPFAYWGQGTLLTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDE LTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG AGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGEEELQIIQ PDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWF RGAGPGRVLIYNQRQGPFPRTTVSDTTKR NNMDFSIRIGNITPADAGTYCYIKFRKGSPD DVEFKSGAGTELSVRAPKS	AM4B6_Hg.3_hIgG1 _L234F_L235E_P331 S(ノブ) - SIRPa_CV1
95	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVF TDYYMNWVRQAPGQSLEWMGDINPNNAE TLYNHKFKGRVTVTVDKSISTAYMELSRLR SDDTAVYYCVKWGDGPFAYWGQGTLLTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDEL TKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQ QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	AM4B6_Hg.3_hIgG1 _L234F_L235E_P331 S(ホール)
96	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS DSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTY YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAE DTAVYYCARRHWPGGFDYWGGQGTLLTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS	3280A_H_hIgG1_L23 4F_L235E_P331S(ノ ブ) - SIRPa_CV1

10

20

30

40

【0592】

【表 2 4 - 1 4】

	GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDE LTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG AGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGEEELQIIQ PDKSVLVAAGETATLRCTITSLFPVGPIQWF RGAGPGRVLIYNQRQGPFPRTTVSDTTKR NNMDFSIRIGNITPADAGTYCYCIKFRKGSPD DVEFKSGAGTELSVRKPS	
97	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS DSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTY YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAE DTAVYYCARRHWPGGFDYWGGTGLTVTS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPASIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDEL TKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	3280A_H_hIgG1_L23 4F_L235E_P331S(ホ ール)
98	EEELQVIQPDKSVLVAAGETATLRCTVTSLI PVGPIQWFRGAGPGRELIYNQKEGHFPRVT TVSDSTKRNNMDFSIRIGNITPADAGTYCY VKFRKGSPDDVEFKSGAGTELSVRKPS	SIRPa_WT 対立遺伝 子 1
99	LQPGAEPVPPVWAQEGAPAQLPCSPTIPLQD LSLLRRAGVTWQHQPDSGPPAAAPGHPLAP GPHPAAPSSWGP RP RRYTVLSVGPGLRSG RLPLQPRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRA DAGEYRAAVHLRDRALSCRLRLRLGQASM T	LAG3 D1

【0 5 9 3】

10

20

30

40

50

【表 2 4 - 1 5】

100	LQPGAEPVPPVWAQEGAPAQLPCSPTIPLQD LSLLRRAGVTWQHQPDSGPPAAAPGHPLAP GPHPAAPSSWGPRPRRYTVLSVGPGGLRSG RLPLQPRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRA DAGEYRAAVHLRDRALSCRLRLRLGQASM TASPPGSLRASDWVILNCSFSRPDRPASVH WFRNRGQGRVPVRESPPHHHLAESFLFLPQV SPMDSGPWGCILTYRDGFNVSIMYNLTVLG LEPPTPLTVYAGAGSRVGLPC	LAG3 D1+D2
101	GPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPRR	LAG3 エクストラル ープ
102	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCSFSGFSLST SGMGVGVWIRQPSGKGLEWLAHIWWDGDE SYNPSLKSRLTISKDTSKNQVSLKITSVTAA DTAVYFCARNRYDPPWFVDWGQGTLLVTVS S	XOMA052 VH
103	DIQMTQSTSSLSASVGDRVITICRASQDISN YLSWYQQKPGKAVKLLIYYTSKLHSGVPSR FSGSGSGTDYTLTISSLQQEDFATYFCLQGK MLPWTFGQGTKLEIK	XOMA052 VL
104	TSGMGVG	XOMA052 HCDR1
105	HIWWDGDESYNPSLKS	XOMA052 HCDR2
106	NRYDPPWFVD	XOMA052 HCDR3
107	RASQDISNYLS	XOMA052 LCDR1
108	YTSKLHS	XOMA052 LCDR2
109	LQGKMLPWT	XOMA052 LCDR3
110	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS VYGMNWVRQAPGKGLEWVAIIWYDGDN QYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNGL RAEDTAVYYCARDLRTGPFDDYWGQGTLLV TVSS	ACZ885 VH
111	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSS LHWYQQKPDQSPKLLIKYASQSFSGVPSRF SGSGSGTDFTLTINSLEAEDAAAYYCHQSS SLPFTFGPGTKVDIK	ACZ885 VL
112	VYGMN	ACZ885 HCDR1
113	IIWYDGDNQYYADSVKG	ACZ885 HCDR2
114	DLRTGPFDDY	ACZ885 HCDR3
115	RASQSIGSSLH	ACZ885 LCDR1
116	YASQSFS	ACZ885 LCDR2
117	HQSSSLPFT	ACZ885 LCDR3

10

20

30

40

【 0 5 9 4】

50

【表 2 4 - 1 6】

118	<p>QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCSFSGFSLST SGMGVGWIRQPSGKGLEWLAHIWWDGDE SYNPSLKSRLTISKDTSKNQVSLKITSVTAA DTAVYFCARNRYDPPWFVDWGQGTTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG AGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQS GAEVKKPGASVKVSCKASGYVFTDYYMN WVRQAPGQSLEWMGDINPNAETLYNHKF KGRVTVTVDKSISTAYMELSRLRSDDTAVY YCVKWGDGPFAYWGQGTTLTVSSGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASV GDRVITITCKASQNVGA AVAWYQQKPGKAP KLLIYSVSDRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDIATYYCQQYSNYPTFGQGTKLTVL</p>	<p>IgG-scFv-XOMA052- AM4B6 HC</p>
119	<p>DIQMTQSTSSLSASVGDRTITCRASQDISN YLSWYQQKPGKAVKLLIYYTSKLHSGVPSR FSGSGSGTDYTLTISLQEDFATYFCLQGK MLPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC</p>	<p>IgG-scFv-XOMA052- AM4B6 LC</p>
120	<p>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS VYGMNWVRQAPGKGLEWVAIIWYDGDNQ YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNGLR AEDTAVYYCARDLRTGPFDYWGQGTTLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH</p>	<p>IgG-scFv-ACZ885-A M4B6 HC</p>

10

20

30

40

【 0 5 9 5】

【表 2 4 - 1 7】

	EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQ SGAEVKKPGASVKVSCKASGYVFTDYIM NWVRQAPGQCLEWMGDINPNNAETLYNH KFKGRVTVTVDKSISTAYMELSRLRSDDTA VYYCVKWGDGPFAYWGQGTLVTVSSGGG GSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSA SVGDRVITITCKASQNVGAVAWYQQKPGK APKLLIYSVSDRYTGVPSTRFSGSGSGTDFTL TISSLQPEDIATYYCQQYSNYPTFGCGTKLT VL	
121	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSS LHWYQQKPDQSPKLLIKYASQSFSGVPSRF SGSGSGTDFTLTINSLEAEDAAAYYCHQSSS LPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSSTLSLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	IgG-scFv-ACZ885-A M4B6 LC
122	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	G4S

【図面】

【図 1】

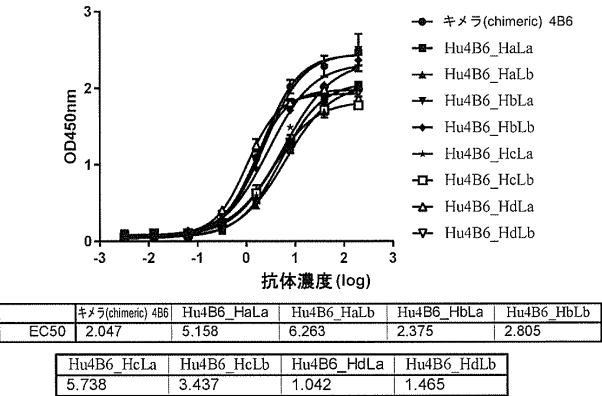


Figure 1

【図 2】

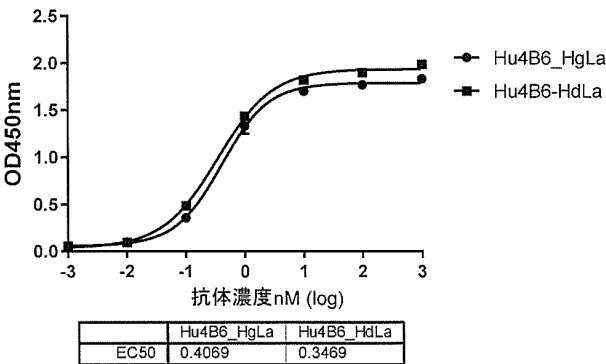


Figure 2

【図 3】

ELISAによるAM-4B6(IgG1-TGFbRII)の親和性ランキン

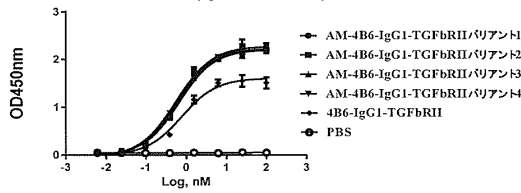


Figure 3A

ELISAによるAM-4B6(IgG1-TGFbRII)の親和性ランキン

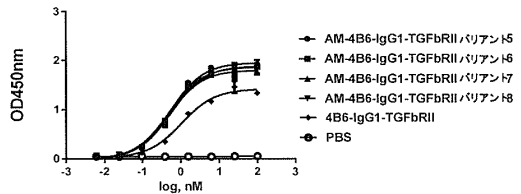


Figure 3B

ELISAによるAM-4B6(IgG1-TGFbRII)の親和性ランキン

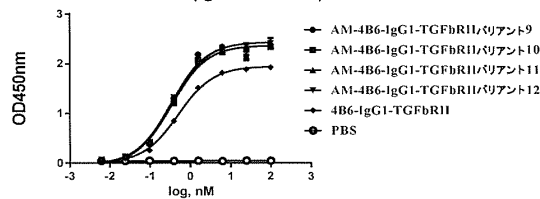
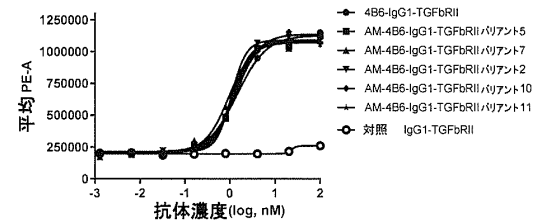


Figure 3C

【図 4】

FACS分析によるAM-4B6-IgG1-TGFbRIIバリエ



	4B6-IgG1-TGFbRII	AM-4B6-IgG1-TGFbRII/バリエント5	AM-4B6-IgG1-TGFbRII/バリエント7
EC50	1.436	1.196	0.9404

AM-4B6-IgG1-TGFbRII/バリエント2	AM-4B6-IgG1-TGFbRII/バリエント10	AM-4B6-IgG1-TGFbRII/バリエント11
1.074	1.363	1.11

AM-4B6-IgG1-TGFbRII/バリエ	AM-4B6-IgG1-TGFbRII/バリエ	AM-4B6-IgG1-TGFbRII/バリエ
1.074	1.363	1.11

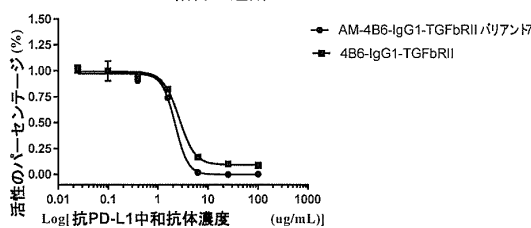
Figure 4

10

20

【図 5】

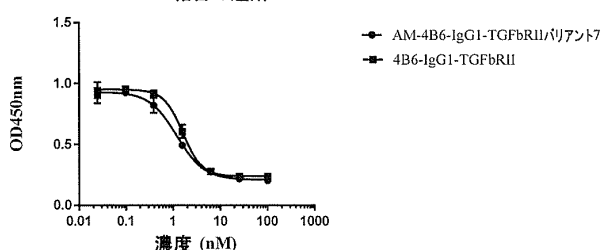
hPD-L1/PD-1結合の遮断



	AM-4B6-IgG1-TGFbRII/バリエ	4B6-IgG1-TGFbRII
IC50	2.2	2.641

Figure 5A

hPD-L1/B7-1結合の遮断

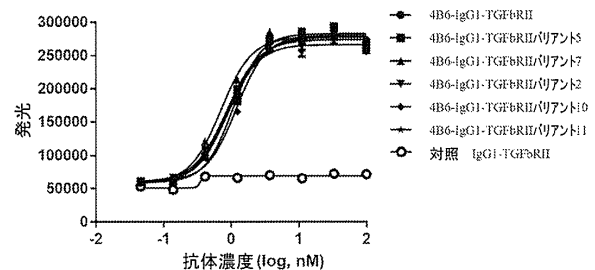


	AM-4B6-IgG1-TGFbRII/バリエ	4B6-IgG1-TGFbRII
IC50	1.194	1.608

Figure 5B

【図 6】

AM-4B6-IgG1-TGFbRIIバリエによるPD-L1/PD-1の遮断



	4B6-IgG1-TGFbRII	4B6-IgG1-TGFbRII/バリエント5	4B6-IgG1-TGFbRII/バリエント7
EC50	0.9333	1.073	0.7112

4B6-IgG1-TGFbRII/バリエ	4B6-IgG1-TGFbRII/バリエ	4B6-IgG1-TGFbRII/バリエ
0.8679	1.203	0.8934

Figure 6

30

40

50

【図 7】

Hu4B6_HgLa_hIgG1_TGFbRII (1-136) AM4B6_hIgG1_TGFbRII (20-136)
 安定な細胞系を用いて発現された 安定な細胞系を用いて発現された

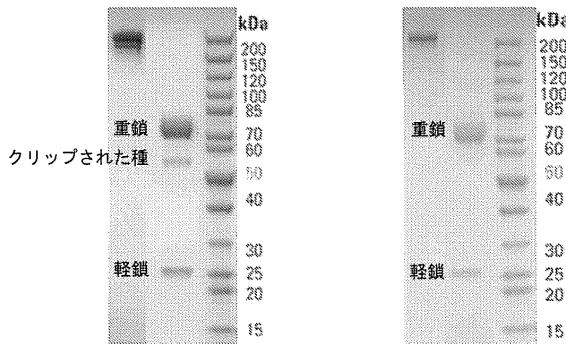


Figure 7

【図 8】

ヒトPD-L1への結合

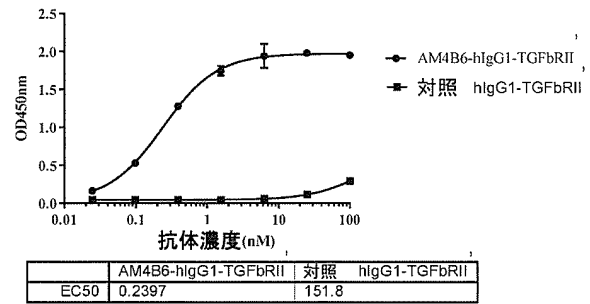


Figure 8A

カニクイザルPD-L1への結合

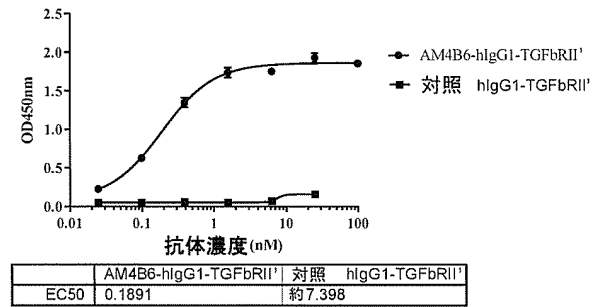


Figure 8B

【図 9 - 1】

hPD-L1およびhPD-L2への結合

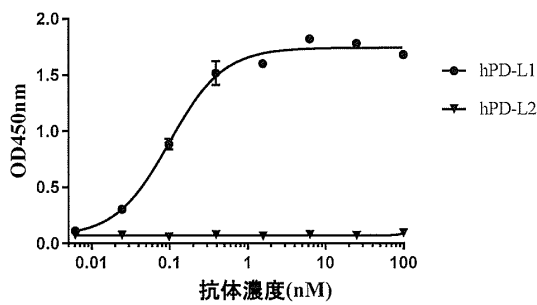


Figure 9A

【図 9 - 2】

TGFβスーパーファミリーの他のメンバーへの結合

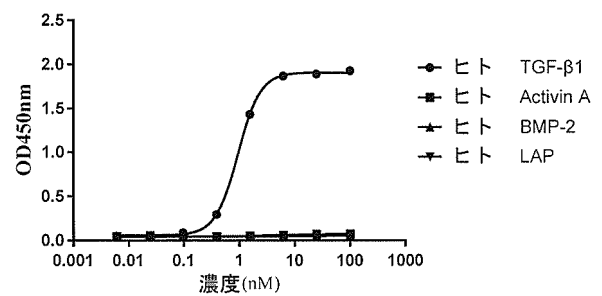


Figure 9C

hPD-L1およびB7ファミリーの他のメンバーへの結合

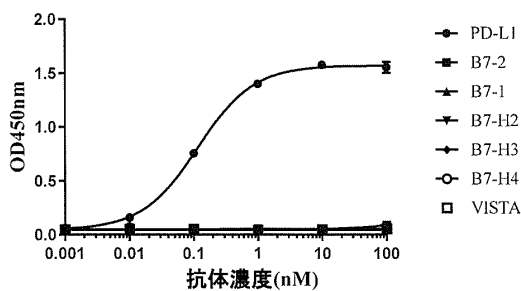


Figure 9B

10

20

30

40

50

【図 10-1】

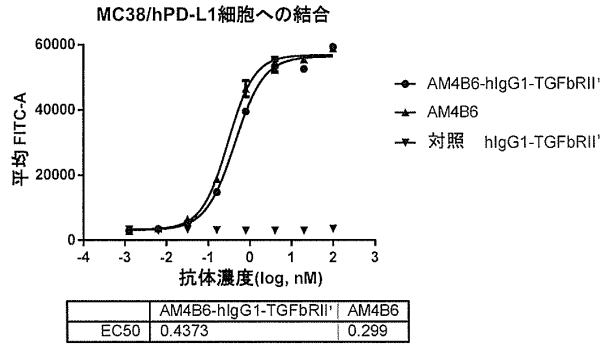


Figure 10A

【図 10-2】

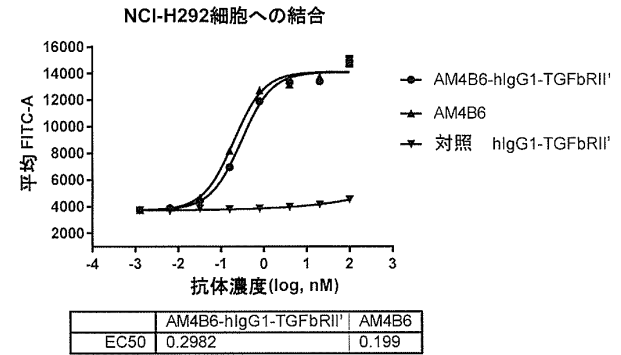


Figure 10C

10

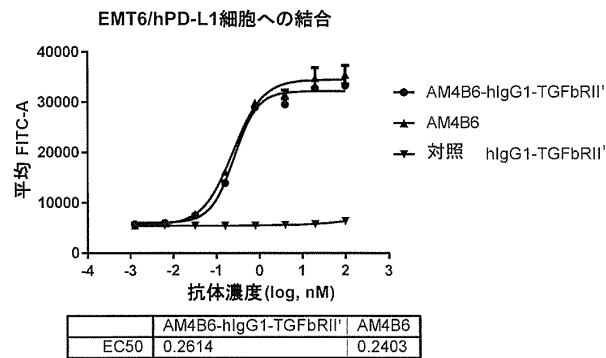


Figure 10B

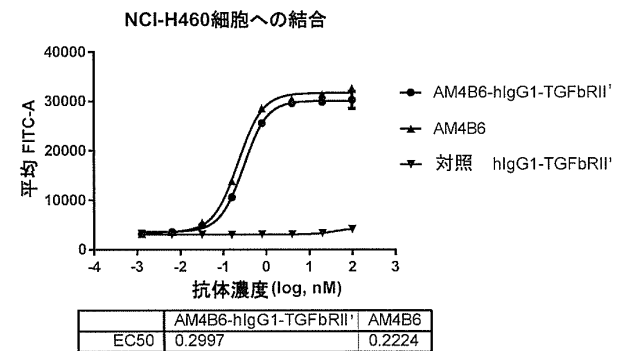


Figure 10D

20

【図 10-3】

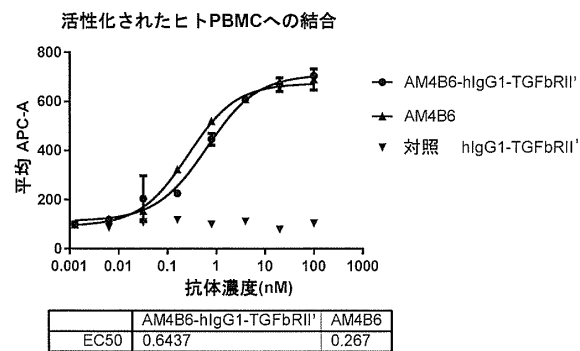


Figure 10E

【図 11】

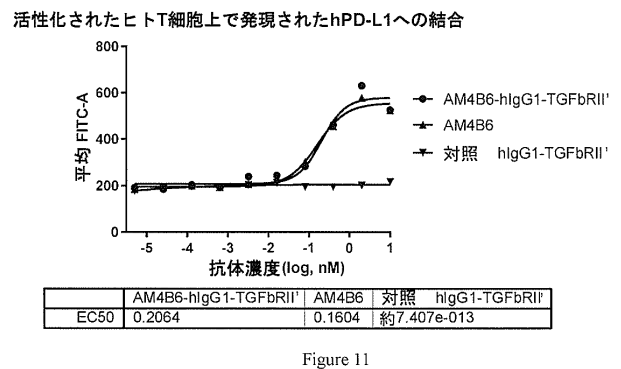


Figure 11

30

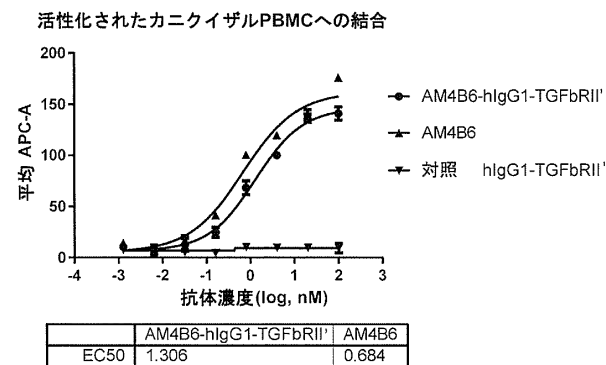


Figure 10F

40

50

【図 1 2】

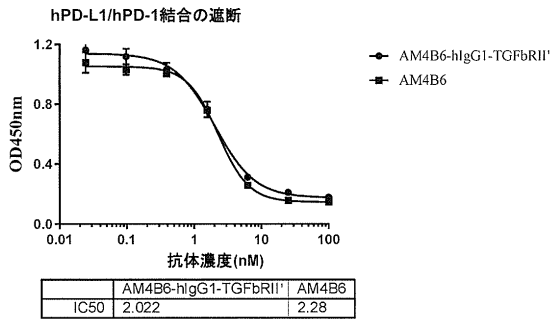


Figure 12A

カニクイザルPD-L1/カニクイザルPD-1結合の遮断

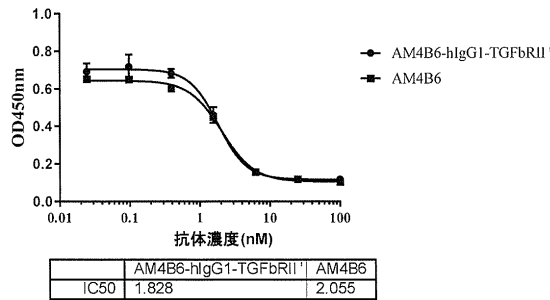


Figure 12B

【図 1 4】

レポーターアッセイを使用したhPDL1の遮断

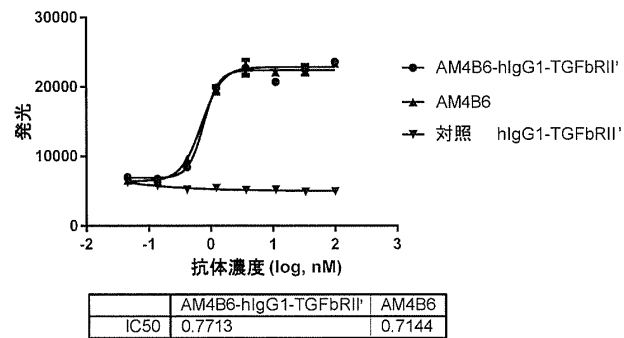


Figure 14

【図 1 3】

hPD-L1およびhTGFベータ1への同時的結合

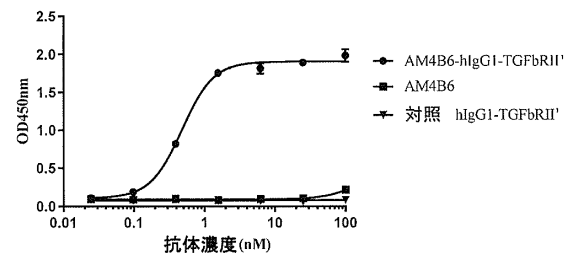


Figure 13

10

20

【図 1 5】

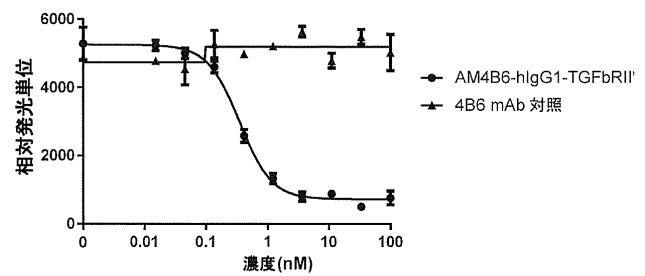


Figure 15.

30

40

50

【図 16】

ツベルクリン(TB)刺激されたPBMCに対するAM4B6-hlgG1-TGFbRII'の効果
(DCドナー:TPCS, PB025C, A10K546006)

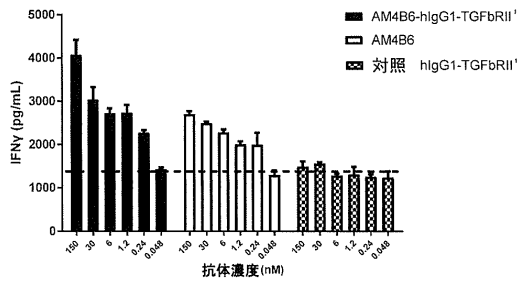


Figure 16

【図 17】

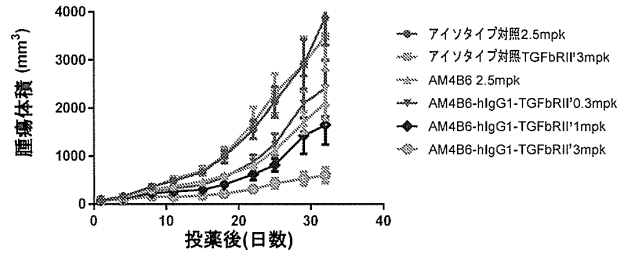


Figure 17A

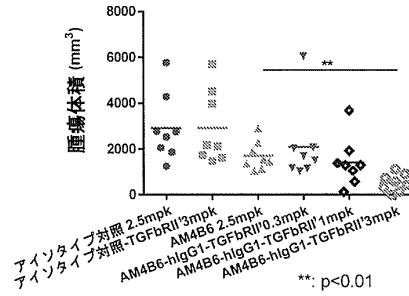


Figure 17B

【図 18】

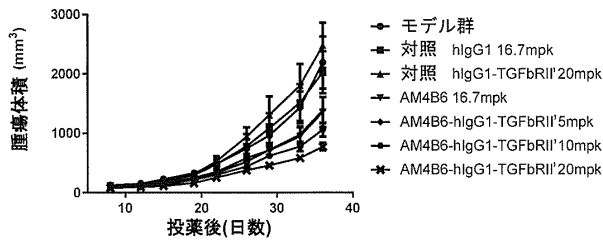


Figure 18A

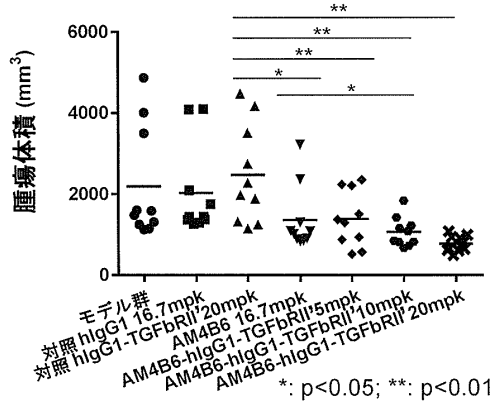


Figure 18B

【図 19】

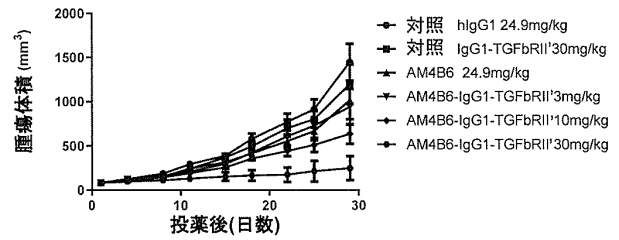


Figure 19A

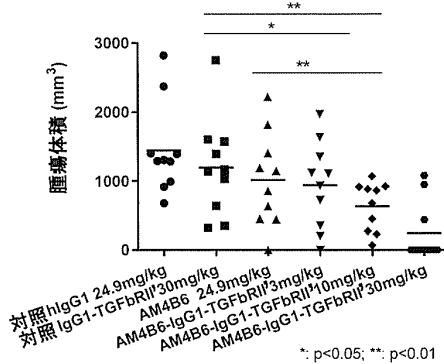


Figure 19B

10

20

30

40

50

【図 20】

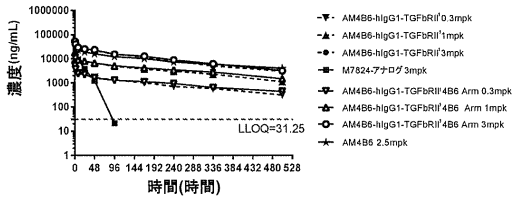


Figure 20A

C57BL/6マウスにおける血漿TGF-β1

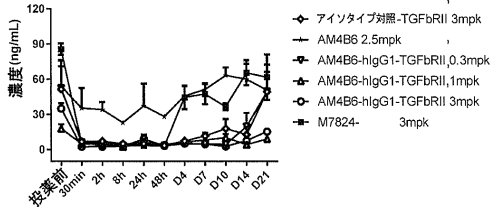


Figure 20B

PK-PD関係

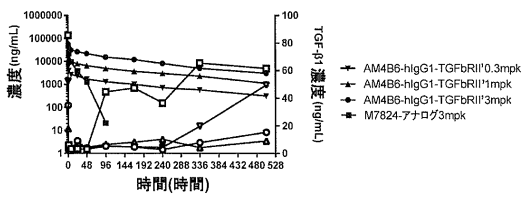
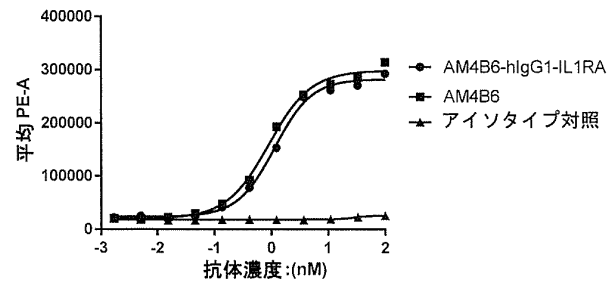


Figure 20C

【図 22】

hPDL1へのAM4B6-hlgG1-IL1RAの結合活性(FACS)

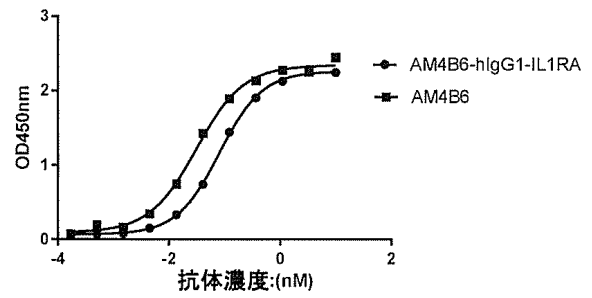


	AM4B6-hlgG1-IL1RA	AM4B6	アイソタイプ対照
EC50	1.146	0.9033	29.17

Figure 22

【図 21】

hPDL1へのAM4B6-hlgG1-IL-1RA BsAbの結合活性



	AM4B6-hlgG1-IL1RA	AM4B6
EC50	0.08154	0.03128

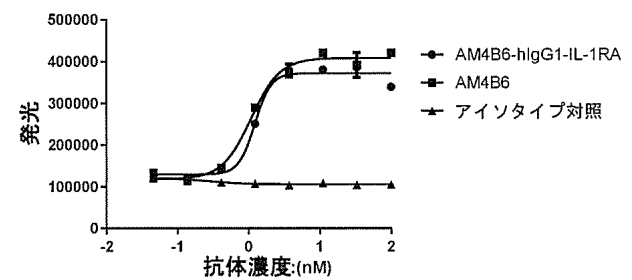
Figure 21

10

20

【図 23】

AM4B6-hlgG1-IL-1RAのPD-L1/PD-1遮断活性



	AM4B6-hlgG1-IL-1RA	AM4B6	アイソタイプ対照
IC50	1.227	1.083	0.275

Figure 23

30

40

50

【図 2 4】

AM4B6-hlgG1-IL-1RAのIL-1ベータ/IL-1R1遮断活性

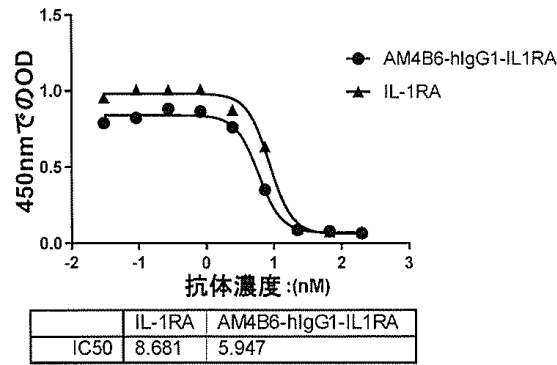


Figure 24

【図 2 5】

レポーター細胞上でのAM4B6-hlgG1-IL-1RAのIL-1ベータ遮断活性

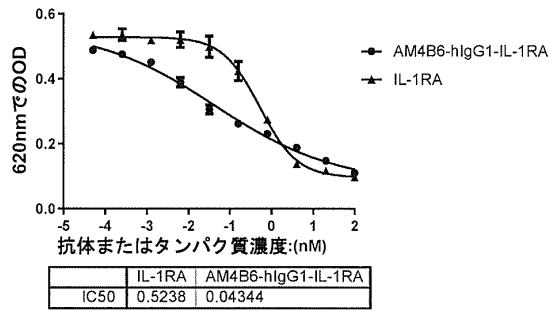


Figure 25

【図 2 6】

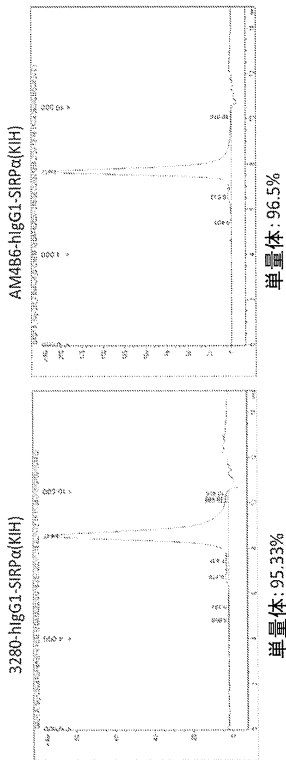


Figure 26

【図 2 7】

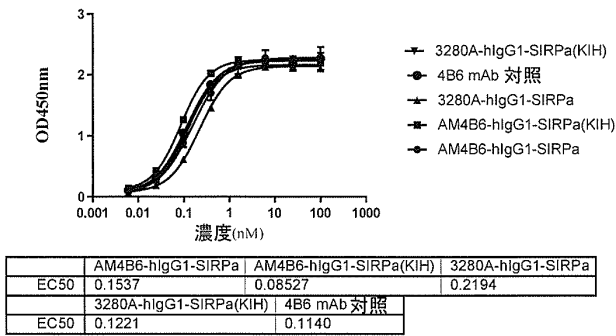


Figure 27

10

20

30

40

50

【図 2 8】

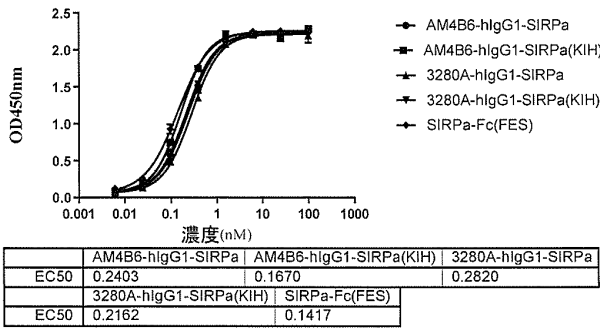


Figure 28

【図 2 9】

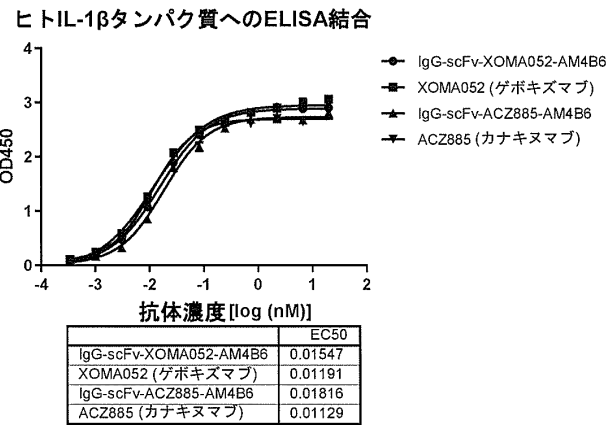


Figure 29

【図 3 0】

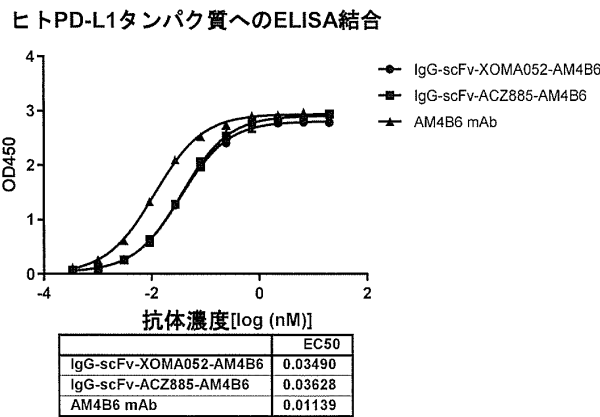


Figure 30

【図 3 1】

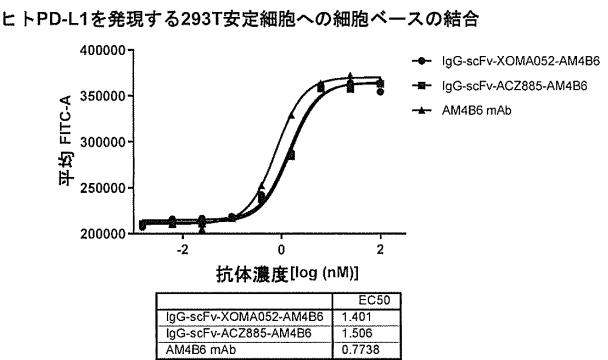


Figure 31

10

20

30

40

50

【図 3 2】

PD-1/PD-L1相互作用に対する細胞ベースの遮断

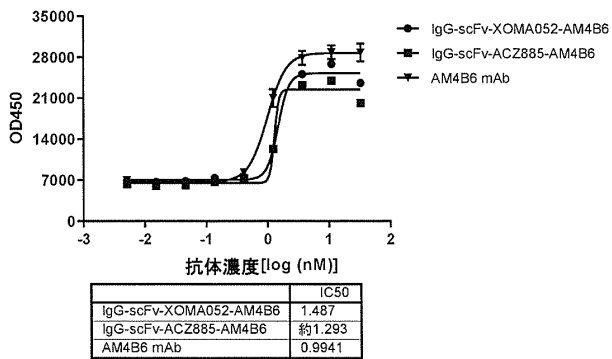


Figure 32

【図 3 3】

ヒトIL-1Rを発現するHDF細胞上での細胞ベースの遮断

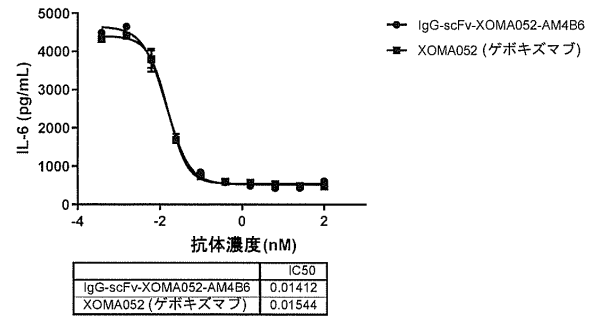


Figure 33

10

【図 3 4】

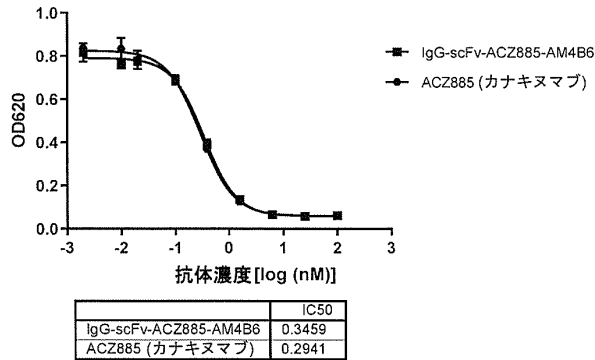
ヒトIL-1Rを発現するHEK293-CD40Lレポーター
細胞上での細胞ベースの遮断

Figure 34

20

【配列表】

2023550419000001.app

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2021/131389															
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K 39/395(2006.01)i; C07K 16/28(2006.01)i; C07K 14/47(2006.01)i; C07K 14/725(2006.01)i; C07K 16/30(2006.01)i; C12N 5/20(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i 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) A61K; C07K; C12N; A61P Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS,CNXTXT,WOTXT,USTXT,JPTXT,KRTXT,VEN,CNKI, pubmed, ISI web of science, STN: MABSPACE BIOSCIENCES, QIANXueming,PD1,PD-1, PD-1L, IL-1, IL1, IL-1b, IL-1R, INTERLEUKIN-1, BISPECIFIC, BI-SPECIFIC, BIVALENT, BI-VALENT, BI-SPECIFIC, bi-function or bifunctionSEQ ID NO:1-121, CD27, CD70, CD28, CD80,B7-1, CD86,B7-2, CD40, CD40L,CD154, CD122, CD137, CD137L, OX40,CD134, OX40L,CD252, GITR, ICOS, CD278, ICOSLG,CD275, CD2, ICAM-1, LFA-1,CD11a,CD18, CD30, BAFFR, HVEM, CD7, LIGHT, NKG2C, SLAMF7, NKp80, CD160, CD83, A2AR, B7-H3,CD276, B7-H4,VTCN1, BTLA,CD272, CTLA-4,CD152, IDO1, IDO2, TDO, KIR, LAG3, NOX2, PD-1, PD-L1, PD-L2, TIM-3, VISTA, SIGLEC7,CD328, TIGIT, PVR,CD155, SIGLEC9,CD329, CD160, LAIR1, 2B4,CD244, CD47, B7-H5																	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WO 2020205875 A1 (IMMETAS THERAPEUTICS, INC.) 08 October 2020 (2020-10-08) description pages7, 9- 10, 22 and Example 1- 2</td> <td>1, 3-7, 14, 93</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2020205875 A1 (IMMETAS THERAPEUTICS, INC.) 08 October 2020 (2020-10-08) description pages7, 9- 10, 22 and Example 1- 2</td> <td>2-3, 7-116</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2011163452 A2 (ELEVEN BIOTHERAPEUTICS, INC.) 29 December 2011 (2011-12-29) description page 5</td> <td>2-3, 7-116</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>BLECH M., et al. "One target-two different binding modes: structural insights into gevokizumab and canakinumab interactions to interleukin-1β" <i>JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY</i>, Vol. 425, No. 1, 03 October 2012 (2012-10-03), pages 94-111</td> <td>2-3, 7-116</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	WO 2020205875 A1 (IMMETAS THERAPEUTICS, INC.) 08 October 2020 (2020-10-08) description pages7, 9- 10, 22 and Example 1- 2	1, 3-7, 14, 93	Y	WO 2020205875 A1 (IMMETAS THERAPEUTICS, INC.) 08 October 2020 (2020-10-08) description pages7, 9- 10, 22 and Example 1- 2	2-3, 7-116	Y	WO 2011163452 A2 (ELEVEN BIOTHERAPEUTICS, INC.) 29 December 2011 (2011-12-29) description page 5	2-3, 7-116	Y	BLECH M., et al. "One target-two different binding modes: structural insights into gevokizumab and canakinumab interactions to interleukin-1 β " <i>JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY</i> , Vol. 425, No. 1, 03 October 2012 (2012-10-03), pages 94-111	2-3, 7-116
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.															
X	WO 2020205875 A1 (IMMETAS THERAPEUTICS, INC.) 08 October 2020 (2020-10-08) description pages7, 9- 10, 22 and Example 1- 2	1, 3-7, 14, 93															
Y	WO 2020205875 A1 (IMMETAS THERAPEUTICS, INC.) 08 October 2020 (2020-10-08) description pages7, 9- 10, 22 and Example 1- 2	2-3, 7-116															
Y	WO 2011163452 A2 (ELEVEN BIOTHERAPEUTICS, INC.) 29 December 2011 (2011-12-29) description page 5	2-3, 7-116															
Y	BLECH M., et al. "One target-two different binding modes: structural insights into gevokizumab and canakinumab interactions to interleukin-1 β " <i>JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY</i> , Vol. 425, No. 1, 03 October 2012 (2012-10-03), pages 94-111	2-3, 7-116															
☒ 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 "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 05 January 2022		Date of mailing of the international search report 26 January 2022															
Name and mailing address of the ISA/CN National Intellectual Property Administration, PRC 6, Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing 100088, China		Authorized officer SUN,Qian															
Facsimile No. (86-10)62019451		Telephone No. 86-(10)-53962101															

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/131389

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2017161976 A1 (MABSPACE BIOSCIENCES SUZHOU CO., LTD) 28 September 2017 (2017-09-28) description paragraphs 30, 32- 33, 43, 101, 162, 186	2-3, 7-116
A	WO 2014124227 A1 (IMMUNOMEDICS, INC.) 14 August 2014 (2014-08-14) the whole document	1-116
A	WO 2018014260 A1 (NANJING LEGEND BIOTECH CO., LTD.) 25 January 2018 (2018-01-25) the whole document	1-116
A	WO 2008071751 A1 (ACTOGENIX N.V.) 19 June 2008 (2008-06-19) the whole document	1-116
A	US 2014099254 A1 (IBC PHARMACEUTICALS, INC.) 10 April 2014 (2014-04-10) the whole document	1-116
A	WO 2017106656 A1 (NOVARTIS AG) 22 June 2017 (2017-06-22) the whole document	1-116

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/131389

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. ☒ forming part of the international application as filed:

☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

☐ on paper or in the form of an image file.

b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/131389

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.: **98-105**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] The subject-matter of claims 98-105 relates to a method of treating disease in a subject, therefore does not warrant an international search according to the criteria set out in Rule 39.1 (iv). However, the search has also been carried out based on the use of the bi-functional molecule of any of claims 16-92 and/or the pharmaceutical composition or kit of claim 93 for manufacturing a medicament for treating a disorder in a subject.
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.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/131389

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2020205875	A1	08 October 2020	US	2020308285	A1	01 October 2020
				TW	202102539	A	16 January 2021
WO	2011163452	A2	29 December 2011	WO	2011163452	A8	09 August 2012
				WO	2011163452	A9	12 April 2012
				US	2013195868	A1	01 August 2013
WO	2017161976	A1	28 September 2017	RU	2018124602	A	14 January 2020
				CN	108779180	B	16 October 2020
				CA	3007135	A1	28 September 2017
				RU	2018124602	A3	06 March 2020
				CN	111363041	A	03 July 2020
				US	2021009693	A1	14 January 2021
				RU	2744959	C2	17 March 2021
				KR	20180127971	A	30 November 2018
				JP	2019516394	A	20 June 2019
				RU	2021106377	A	31 March 2021
				US	10822416	B2	03 November 2020
				EP	3433277	A4	17 June 2020
				EP	3433277	A1	30 January 2019
				CN	108779180	A	09 November 2018
				US	2019330348	A1	31 October 2019
WO	2014124227	A1	14 August 2014	EP	2953645	A1	16 December 2015
				US	9694088	B2	04 July 2017
				CN	105209068	A	30 December 2015
				US	2014219956	A1	07 August 2014
				IL	238543	D0	30 June 2015
				AU	2014214843	A1	21 May 2015
				US	9283286	B2	15 March 2016
				CA	2895284	A1	14 August 2014
				US	8877202	B2	04 November 2014
				US	9486536	B2	08 November 2016
				US	2015283264	A1	08 October 2015
				IL	238543	A	30 June 2015
				JP	2016513098	A	12 May 2016
				EP	2953645	A4	28 December 2016
				US	2017266310	A1	21 September 2017
				US	2015018516	A1	15 January 2015
				US	2016166708	A1	16 June 2016
				US	9095628	B2	04 August 2015
				US	2017000896	A1	05 January 2017
WO	2018014260	A1	25 January 2018	JP	2019524693	A	05 September 2019
				MX	2019000730	A	20 June 2019
				KR	20190040483	A	18 April 2019
				US	2019202935	A1	04 July 2019
				IL	264211	D0	28 February 2019
				CN	109476762	A	15 March 2019
				AU	2017300349	A1	14 February 2019
				BR	112019000970	A2	30 April 2019
				CA	3030933	A1	25 January 2018
				SG	11201811640S	A	27 February 2019

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/131389

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2008071751	A1	19 June 2008	EP	3487887	A1	29 May 2019
				EA	201990331	A1	28 June 2019
				WO	2018014855	A1	25 January 2018
				EP	3487887	A4	25 March 2020
US	2014099254	A1	10 April 2014	CA	2672229	A1	19 June 2008
				EP	2097452	A1	09 September 2009
				US	2010303777	A1	02 December 2010
				JP	2010513245	A	30 April 2010
WO	2017106656	A1	22 June 2017	US	9682143	B2	20 June 2017
				US	10111954	B2	30 October 2018
				US	2017021017	A1	26 January 2017
				US	2018371093	A1	27 December 2018
WO	2017106656	A1	22 June 2017	JP	2020143149	A	10 September 2020
				JP	2019503349	A	07 February 2019
				MX	2018007423	A	09 November 2018
				CN	108495651	A	04 September 2018
				RU	2018125773	A3	15 May 2020
				KR	20180088907	A	07 August 2018
				EP	3389712	A1	24 October 2018
				PH	12018501206	A1	11 February 2019
				IL	259987	D0	31 July 2018
				AU	2016369537	A1	28 June 2018
				CA	3007671	A1	22 June 2017
				BR	112018012138	A2	04 December 2018
WO	2017106656	A8	28 June 2018	CL	2018001560	A1	27 July 2018
				WO	2017106656	A8	28 June 2018
				RU	2018125773	A	21 January 2020

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

4 H 0 4 5

C 1 2 N 1/19 (2006.01)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)
C 1 2 P 21/08 (2006.01)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)
A 6 1 K 51/10 (2006.01)
A 6 1 K 49/00 (2006.01)
A 6 1 K 38/16 (2006.01)
A 6 1 K 38/20 (2006.01)
A 6 1 K 38/19 (2006.01)
A 6 1 K 38/21 (2006.01)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)
A 6 1 K 47/68 (2017.01)
A 6 1 K 47/55 (2017.01)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)
A 6 1 P 37/02 (2006.01)
A 6 1 P 31/00 (2006.01)
A 6 1 P 43/00 (2006.01)
A 6 1 P 11/00 (2006.01)
A 6 1 P 1/16 (2006.01)
A 6 1 P 1/18 (2006.01)
A 6 1 P 15/00 (2006.01)
A 6 1 P 19/08 (2006.01)
A 6 1 P 13/12 (2006.01)
A 6 1 P 13/10 (2006.01)
A 6 1 P 13/08 (2006.01)
A 6 1 P 1/04 (2006.01)
A 6 1 P 1/02 (2006.01)
A 6 1 P 11/02 (2006.01)
A 6 1 P 11/04 (2006.01)
A 6 1 P 25/00 (2006.01)
A 6 1 P 21/00 (2006.01)
A 6 1 P 17/00 (2006.01)
A 6 1 P 37/04 (2006.01)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)
C 1 2 N 15/12 (2006.01)
C 0 7 K 16/28 (2006.01)
C 0 7 K 16/24 (2006.01)
C 0 7 K 14/705 (2006.01)

C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/21
C 1 2 N 5/10
C 1 2 P 21/08
A 6 1 K 39/395 N
A 6 1 K 39/395 L
A 6 1 K 51/10 2 0 0
A 6 1 K 49/00
A 6 1 K 51/10 1 0 0
A 6 1 K 38/16
A 6 1 K 38/20
A 6 1 K 38/19
A 6 1 K 38/21
A 6 1 K 45/00
A 6 1 K 47/68
A 6 1 K 47/55
A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 37/02
A 6 1 P 31/00
A 6 1 P 43/00 1 1 1
A 6 1 P 43/00 1 0 5
A 6 1 P 43/00 1 2 5
A 6 1 P 11/00
A 6 1 P 1/16
A 6 1 P 1/18
A 6 1 P 15/00
A 6 1 P 19/08
A 6 1 P 13/12
A 6 1 P 13/10
A 6 1 P 13/08
A 6 1 P 1/04
A 6 1 P 1/02
A 6 1 P 11/02
A 6 1 P 11/04
A 6 1 P 25/00
A 6 1 P 21/00
A 6 1 P 17/00
A 6 1 P 37/04
C 1 2 N 15/13
C 1 2 N 15/12
C 0 7 K 16/28
C 0 7 K 16/24
C 0 7 K 14/705

,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,D
 K,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),O
 A(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,B
 B,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,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,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,
 LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,
 RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,Z
 W

中華人民共和国 ジャンスー 2 1 5 1 2 3 , スーチョウ, シンファー・ストリート 2 1 8 , ビー 6
 - 5 0 1

(72)発明者 リー, ホンジュン

中華人民共和国 ジャンスー ２１５１２３，スーチョウ，シンファー・ストリート ２１８，ビー６
－５０１

(72)発明者 テン，フェイ
中華人民共和国 ジャンスー ２１５１２３，スーチョウ，シンファー・ストリート ２１８，ビー６
－５０１

(72)発明者 グオ，フアンフアン
中華人民共和国 ジャンスー ２１５１２３，スーチョウ，シンファー・ストリート ２１８，ビー６
－５０１

(72)発明者 ゲー，イー
中華人民共和国 ジャンスー ２１５１２３，スーチョウ，シンファー・ストリート ２１８，ビー６
－５０１

F ターム（参考） 4B064 AG27 CA19 CC24 DA01
4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44
4C076 CC07 CC27 CC31 EE41 EE59 FF34
4C084 AA02 AA12 AA17 AA19 BA01 BA08 BA22 BA23 BA41 DA01
DA12 DA14 DA19 DA22 DA47 DB63 DC50 NA05 NA14 ZA021 ZA341
ZA362 ZA591 ZA661 ZA671 ZA751 ZA811 ZA891 ZA941 ZA961 ZB022 ZB071
ZB072 ZB091 ZB211 ZB261 ZB262 ZB311 ZC032 ZC201 ZC411 ZC421 ZC711
ZC712
4C085 AA14 AA16 AA23 AA25 AA26 AA27 BB36 BB41 BB42 BB43
CC23 DD62 EE01 HH03 HH11 KA04 KA05 KA27 KA29 KB12 LL18
LL20
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA51 DA76 DA83 EA20
FA74