(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2019-33743
(P2019-33743A)
(43)公開日　平成31年3月7日(2019.3.7)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/24	(2006.01)	C12N	15/24	ZNA	4B064
A61K 47/65	(2017.01)	A61K	47/65		4B065
A61K 47/64	(2017.01)	A61K	47/64		4C076
A61K 47/68	(2017.01)	A61K	47/68		4C084
A61K 38/20	(2006.01)	A61K	38/20		4C085

審査請求 未請求　請求項の数 59　ＯＬ　外国語出願　（全 145 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2018-146505 (P2018-146505)
(22)出願日　平成30年8月3日 (2018.8.3)
(31)優先権主張番号　62/540,692
(32)優先日　平成29年8月3日 (2017.8.3)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　62/616,733
(32)優先日　平成30年1月12日 (2018.1.12)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　500049716
アムジエン・インコーポレーテツド
アメリカ合衆国　カリフォルニア州　９１３２０，サウザンド　オークス，ワン　アムジエン　センター　ドライブ
(74)代理人　110001173
特許業務法人川口國際特許事務所
(72)発明者　ハレド・エム・ケイ・ゼット・アリ
アメリカ合衆国、カリフォルニア・９４０３０、ミルブレー、マグノリア・アベニュー・１００７
(72)発明者　ニーラジ・ジャグディシュ・アグラワル
アメリカ合衆国、カリフォルニア・９１３２０、ニューベリー・パーク、カミノ・オリモ・１６１０、アパートメント・ケイ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】インターロイキン－２１ムテイン及び治療方法

(57)【要約】　（修正有）
【課題】疾患を治療する方法において使用されるＩＬ－２１ムテイン、及び、前記ＩＬ－２１ムテインを含む融合タンパク質の提供。
【解決手段】特定の配列を有するＩＬ－２１ムテイン、及び／又は、前記ＩＬ－２１ムテインがリンカーを介して抗ＰＤ－１抗体と結合されている融合タンパク質又はコンジュゲート。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号２
ＱＧＱＤＸ　ＨＭＸＸＭ　ＸＸＸＸＸ　ＸＶＤＸＬ　ＫＮＸＶＮ　ＤＬＶＰＥ　ＦＬＰＡＰ　ＥＤＶＥＴ　ＮＣＥＷＳ　ＡＦＳＣＦ　ＱＫＡＱＬ　ＫＳＡＮＴ　ＧＮＮＥＸ　ＸＩＸＸＸ　ＸＸＸＬＸ　ＸＸＸＸＸ　ＴＮＡＧＲ　ＲＱＫＨＲ　ＬＴＣＰＳ　ＣＤＳＹＥ　ＫＫＰＰＫ　ＥＦＬＸＸ　ＦＸＸＬＬ　ＸＸＭＸＸ　ＱＨＸＳＳ　ＲＴＨＧＳ　ＥＤＳ（配列番号２）
のアミノ酸配列を含む、ＩＬ－２１ムテインであって、
配列中、「Ｘ」は、任意のアミノ酸を表し、
前記ＩＬ－２１ムテインアミノ酸配列は、ヒトＩＬ－２１のアミノ酸配列（配列番号１）と少なくとも１アミノ酸異なる、前記ＩＬ－２１ムテイン。
【請求項２】
ヒトＩＬ－２１のアミノ酸配列（配列番号１）と７アミノ酸を超えない異なるアミノ酸配列を含む、請求項１に記載のＩＬ－２１ムテイン。
【請求項３】
ヒトＩＬ－２１のアミノ酸配列（配列番号１）と３、４、５または６アミノ酸異なるアミノ酸配列を含む、請求項２に記載のＩＬ－２１ムテイン。
【請求項４】
ヒトＩＬ－２１のアミノ酸配列（配列番号１）と１または２アミノ酸異なるアミノ酸配列を含む、請求項３に記載のＩＬ－２１ムテイン。
【請求項５】
前記ＩＬ－２１ムテインのアミノ酸配列と配列番号１のアミノ酸配列との間の相違（複数可）が、配列番号２のアミノ酸１０～１５（両端を含む）またはアミノ酸１０５～１２３（両端を含む）内に存在し、任意選択により、前記相違（複数可）は、配列番号２のアミノ酸１１、１４、１５、１０９、１１０、１１２、１１３、１１６、１１９、１２０及び／または１２３に存在する、請求項１～４のいずれか一項に記載のＩＬ－２１ムテイン。
【請求項６】
前記ＩＬ－２１ムテインのアミノ酸配列と配列番号１のアミノ酸配列との間の相違（複数可）が、配列番号２のアミノ酸５～２５（両端を含む）またはアミノ酸６５～８０（両端を含む）内にあり、任意選択により、前記相違（複数可）は、配列番号２のアミノ酸５、８、９、１２、１３、１６、１９、２３、６５、６６、６９、７０、７２、７３、７５、７６、７７、７８、７９及び／または８０に存在する、請求項１～４のいずれか一項に記載のＩＬ－２１ムテイン。
【請求項７】
ヒトＩＬ－２１のアミノ酸配列（配列番号１）と比較して、１つのアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含む、請求項４～６のいずれか一項に記載のＩＬ－２１ムテイン。
【請求項８】
前記アミノ酸置換が、配列番号１の位置５、８、９、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１９、２３、６５、６６、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７５、７６、７７、７８、７９、８０、１０９、１１０、１１２、１１３、１１６、１１７、１１９、１２０または１２３に存在する、請求項７に記載のＩＬ－２１ムテイン。
【請求項９】
前記アミノ酸置換が、配列番号１の位置５、８、９、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１９、２３、６５、６６、６８、６９、７０、７２、７３、７５、７６、７７、７８、７９、８０、１０９、１１０、１１２、１１３、１１６、１１７、１１９、１２０または１２３に存在する、請求項８に記載のＩＬ－２１ムテイン。
【請求項１０】
ａ．配列番号１の位置５、８、９、１２、１４、１５、６５、６６、６９、７０、７２

、７３、７５、７６、７７、８０、１１６もしくは１１９にアミノ酸置換を含み、前記置換アミノ酸は、脂肪族アミノ酸であるか、
ｂ．配列番号１の位置５、８、９、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１９、２３、６５、６６、６９、７０、７２、７３、７５、７６、７７、７８、７９、１１０、１１２、１１６、１１７、１１９、１２０もしくは１２３にアミノ酸置換を含み、前記置換アミノ酸は、酸性アミノ酸であるか、
ｃ．配列番号１の位置５、９、７３、７６、１０９、１１３もしくは１１６にアミノ酸置換を含み、前記置換アミノ酸は、塩基性アミノ酸であるか、
ｄ．配列番号１の位置５、８、９、７０もしくは７６にアミノ酸置換を含み、前記置換アミノ酸は、芳香族アミノ酸であるか、
ｅ．配列番号１の位置５、８、９、１２、１５、７３、７６、１１６もしくは１１９にアミノ酸置換を含み、前記置換アミノ酸は、側鎖アミドを含有するアミノ酸であるか、
ｆ．配列番号１の位置５、８、９、１１、１２、１４、１５、７３、７６、１１６もしくは１１９にアミノ酸置換を含み、前記置換アミノ酸は、側鎖ヒドロキシルを含む非芳香族アミノ酸であるか、
ｇ．配列番号１の位置６５、６６、６９、７０、７２、７３、７５、７６、７７もしくは８０にアミノ酸置換を含み、前記置換アミノ酸は、イミノ酸であるか、
ｈ．配列番号１の位置５、９、１５、７６、１１６もしくは１１９にアミノ酸置換を含み、前記置換アミノ酸は、イオウ含有側鎖を含むアミノ酸であるか、
ｉ．これらの組み合わせのアミノ酸置換を含む、
請求項９に記載のＩＬ－２１ムテイン。
【請求項１１】
前記置換アミノ酸が天然アミノ酸である、請求項１０に記載のＩＬ－２１ムテイン。
【請求項１２】
表Ａに従った位置にアミノ酸によるアミノ酸置換を含む、請求項７に記載のＩＬ－２１ムテイン。

【表１】

表Ａ

配列番号１のアミノ酸位置	アミノ酸（１文字コード）	配列番号１のアミノ酸位置	アミノ酸（１文字コード）
５	Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｑ、Ｓ、Ｔ、ＶまたはＹ	７２	Ｄ、ＧまたはＰ
８	Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｎ、Ｓ、Ｔ、ＶまたはＹ	７３	Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、ＳまたはＶ
９	Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｑ、Ｓ、Ｔ、ＶまたはＹ	７５	Ｄ、ＧまたはＰ
１１	ＤまたはＳ	７６	Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｓ、Ｔ、ＶまたはＹ
１２	Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｎ、Ｓ、ＴまたはＶ	７７	Ｄ、ＧまたはＰ
１３	Ｄ	７８	Ｄ
１４	Ａ、ＤまたはＳ	７９	Ｄ
１５	Ａ、Ｅ、Ｉ、Ｍ、Ｎ、Ｑ、Ｓ、ＴまたはＶ	８０	ＧまたはＰ
１６	ＤまたはＥ	１０９	Ｋ
１９	Ｄ	１１０	Ｄ
２３	Ｄ	１１２	Ｄ
６５	Ｄ、ＧまたはＰ	１１３	Ｋ
６６	Ｄ、ＧまたはＰ	１１６	Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｓ、ＴまたはＶ
６８	Ｑ	１１７	Ｄ
６９	Ｄ、ＧまたはＰ	１１９	Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｍ、Ｎ、Ｑ、ＳまたはＴ
７０	Ｅ、Ｇ、ＰまたはＹ	１２０	Ｄ
７１	Ｌ	１２３	Ｄ

【請求項１３】

配列番号３～２１、２３～５６、５８～１１２、１１４～１９８、２４９～２５４及び２８３のいずれか１つのアミノ酸配列を含む、ＩＬ－２１ムテイン。

【請求項１４】

ヒトＩＬ－２１のアミノ酸配列（配列番号１）と比較して、２つのアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含む、請求項４～６のいずれか一項に記載のＩＬ－２１ムテイン。

【請求項１５】

前記アミノ酸置換が、配列番号１の位置５、８、９、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１９、２３、６５、６６、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７５、７６、７７、７８、７９、８０、１０９、１１０、１１２、１１３、１１６、１１７、１１９、１２０または１２３のうちの２つに存在する、請求項１４に記載のＩＬ－２１ムテイン。

【請求項１６】
前記アミノ酸置換が、配列番号１の位置５、９、１５、７０、７１、７２、７３及び７６のうちの２つに存在する、請求項１５に記載のＩＬ－２１ムテイン。
【請求項１７】
前記アミノ酸置換が、配列番号１の位置５、９、７３及び７６のうちの２つに存在する、請求項１６に記載のＩＬ－２１ムテイン。
【請求項１８】
前記置換のうちの１つが、配列番号１の位置７６に存在する、請求項１７に記載のＩＬ－２１ムテイン。
【請求項１９】
配列番号１の位置７６の前記置換アミノ酸が、脂肪族アミノ酸または酸性アミノ酸である、請求項１８に記載のＩＬ－２１ムテイン。
【請求項２０】
配列番号１の位置５、９または７３にアミノ酸置換を含み、前記置換アミノ酸は、脂肪族アミノ酸または酸性アミノ酸である、請求項１５～１９のいずれか一項に記載のＩＬ－２１ムテイン。
【請求項２１】
配列番号１の位置５にアミノ酸置換を含み、前記置換アミノ酸は、側鎖アミドを含むアミノ酸である、請求項１５～１９のいずれか一項に記載のＩＬ－２１ムテイン。
【請求項２２】
前記脂肪族アミノ酸がアラニンである、請求項１９または２０に記載のＩＬ－２１ムテイン。
【請求項２３】
前記酸性アミノ酸がグルタミン酸である、請求項１９または２０に記載のＩＬ－２１ムテイン。
【請求項２４】
側鎖アミドを含む前記アミノ酸がグルタミンである、請求項２１に記載のＩＬ－２１ムテイン。
【請求項２５】
配列番号１９９～２０８、２１０～２２２、２２４～２４８及び２５５からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、ＩＬ－２１ムテイン。
【請求項２６】
ＩＬ－２１受容体に対する野生型ＩＬ－２１の親和性と比較して低い親和性で前記ＩＬ－２１受容体に結合する、先行請求項のいずれか一項に記載のＩＬ－２１ムテイン。
【請求項２７】
配列番号２５６のアミノ酸配列を有するＩＬ－２１受容体に結合する、先行請求項のいずれか一項に記載のＩＬ－２１ムテイン。
【請求項２８】
配列番号２５７のアミノ酸配列を有するＩＬ－２１受容体γ鎖に結合する、先行請求項のいずれか一項に記載のＩＬ－２１ムテイン。
【請求項２９】
０．０４ｎＭよりも高いＫｄ、または約０．０４ｎＭのＫｄで、ヒトＩＬ－２１受容体に結合する、先行請求項のいずれか一項に記載のＩＬ－２１ムテイン。
【請求項３０】
先行請求項のいずれか一項に記載のＩＬ－２１ムテインと、
異種部分とを含む、コンジュゲート。
【請求項３１】
前記ＩＬ－２１ムテインが、前記異種部分に直接結合されている、請求項３０に記載のコンジュゲート。
【請求項３２】

前記ＩＬ－２１ムテインが、前記異種部分にリンカーを介して結合されている、請求項３０に記載のコンジュゲート。
【請求項３３】
前記リンカーがペプチドを含む、請求項３２に記載のコンジュゲート。
【請求項３４】
前記ペプチドが、Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒのアミノ酸配列（配列番号２６２）を含む、請求項３３に記載のコンジュゲート。
【請求項３５】
前記異種部分がポリペプチドである、請求項３０～３４のいずれか一項に記載のコンジュゲート。
【請求項３６】
前記ポリペプチドが抗原結合タンパク質である、請求項３５に記載のコンジュゲート。
【請求項３７】
前記抗原結合タンパク質が、抗体またはその抗原結合抗体断片である、請求項３６に記載のコンジュゲート。
【請求項３８】
前記抗体が抗ＰＤ－１抗体である、請求項３７に記載のコンジュゲート。
【請求項３９】
前記抗ＰＤ－１抗体が、配列番号２６５～２６７、２８２、２８４～３１１のいずれか１つのアミノ酸配列を含む定常領域を含む、請求項３０～３８のいずれか一項に記載のコンジュゲート。
【請求項４０】
前記ＩＬ－２１ムテインが、前記抗体のＦｃに直接結合されている、請求項３０～３９のいずれか一項に記載のコンジュゲート。
【請求項４１】
前記ＩＬ－２１ムテインが、前記抗体のＦｃにリンカーを介して結合されている、請求項４０に記載のコンジュゲート。
【請求項４２】
単一のＩＬ－２１ムテインを含み、前記単一のＩＬ－２１ムテインは、２つの抗体重鎖のうちの一方のＣ末端に連結されている、請求項４０または４１に記載のコンジュゲート。
【請求項４３】
２つのＩＬ－２１ムテインを含み、第１のＩＬ－２１ムテインは、第１の抗体重鎖のＣ末端に連結され、第２のＩＬ－２１ムテインは、第２の抗体重鎖のＣ末端に連結されている、請求項４０または４１に記載のコンジュゲート。
【請求項４４】
前記第１のＩＬ－２１ムテインが、前記第２のＩＬ－２１ムテインと同じアミノ酸配列を有する、請求項４３に記載のコンジュゲート。
【請求項４５】
前記第１のＩＬ－２１ムテインが、前記第２のＩＬ－２１ムテインと異なるアミノ酸配列を有する、請求項４３に記載のコンジュゲート。
【請求項４６】
前記抗体重鎖が電荷対変異を含む、請求項３０～４５のいずれか一項に記載のコンジュゲート。
【請求項４７】
前記ＩＬ－２１ムテインが、配列番号１の位置５、９、７３及び７６のうちの２つにアミノ酸置換を含む、請求項３０～４６のいずれか一項に記載のコンジュゲート。
【請求項４８】
配列番号１のアミノ酸配列を含むＩＬ－２１ムテインと、
抗ＰＤ－１抗体とを含み、

ただし、前記ＩＬ－２１ムテインは、配列番号１の位置５、９、７３及び７６のうちの任意の２つにアミノ酸置換を含み、前記ＩＬ－２１ムテインは、前記抗ＰＤ－１抗体のＣ末端に連結されている、コンジュゲート。
【請求項４９】
前記抗ＰＤ－１抗体が、配列番号２６５～２６７、２８２、２８４～３１１のいずれか１つのアミノ酸配列を含む定常領域を含む、請求項４８に記載のコンジュゲート。
【請求項５０】
先行請求項のいずれか一項に記載のＩＬ－２１ムテインと、異種ポリペプチドまたはペプチドとを含む、融合ポリペプチドまたは融合タンパク質。
【請求項５１】
免疫グロブリンまたはその抗原結合抗体断片を含む、請求項５０に記載の融合ポリペプチドまたは融合タンパク質。
【請求項５２】
先行請求項のいずれか一項に記載のＩＬ－２１ムテインをコードするヌクレオチド配列を含む、核酸。
【請求項５３】
請求項５２に記載の核酸を含む、ベクター。
【請求項５４】
請求項５２に記載の核酸または請求項５３に記載のベクターを含む、宿主細胞。
【請求項５５】
先行請求項のいずれか一項に記載のＩＬ－２１ムテイン、核酸、ベクター、宿主細胞、コンジュゲート、融合ペプチドもしくは融合タンパク質、またはこれらの組み合わせと、容器とを含む、キット。
【請求項５６】
先行請求項のいずれか一項に記載のＩＬ－２１ムテイン、核酸、ベクター、宿主細胞、コンジュゲート、融合ポリペプチドもしくは融合タンパク質、またはこれらの組み合わせと、薬学的に許容される担体、賦形剤または希釈剤とを含む、医薬組成物。
【請求項５７】
ＩＬ－２１ムテインの作製方法であって、請求項５４に記載の宿主細胞を、前記ＩＬ－２１ムテインを発現するように培養することと、前記発現されたＩＬ－２１ムテインを回収することとを含む、前記方法。
【請求項５８】
治療を必要とする対象を治療する方法であって、前記治療を必要とする対象に、請求項５６に記載の医薬組成物を、前記対象を治療するのに有効な量で投与することを含む、前記方法。
【請求項５９】
前記対象が、固形腫瘍を有し、前記医薬組成物が、前記対象の前記固形腫瘍を治療するのに有効な量で、前記対象に投与される、請求項５８に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の相互参照
米国特許法第１１９条（ｅ）に基づき、２０１７年８月３日に出願された米国仮特許出願第６２／５４０，６９２号、及び２０１８年１月１２日に出願された米国仮特許出願第６２／６１６，７３３号の利益が主張され、その開示は、参照により本明細書に援用される。
【０００２】
電子的に提出された書面の参照による援用
本明細書とともに同時に提出されたコンピュータ読み取り可能なヌクレオチド／アミノ酸配列表は、２０１８年７月２５日に「５１６３３＿Ｓｅｑｌｉｓｔｉｎｇ．ｔｘｔ」と

いう名称で作成された９７５，０００バイトのＡＳＣＩＩ（テキスト）ファイルであり、その全体が参照により援用される。

【背景技術】

【０００３】

ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１軸は、がんにおいて、Ｔ細胞免疫応答の抑制に関与している。この経路のアンタゴニストは、固形腫瘍の多くの適応症に対して、臨床的に検証されている。ニボルマブ及びペンブロリズマブは、このような阻害薬の２つであり、ＰＤ－１経路を標的にし、転移性黒色腫の治療に対して、それぞれ米国食品医薬品局（ＦＤＡ）から承認されている。最近、研究者らは、他の腫瘍種の環境でのチェックポイント阻害パラダイムを試験している。ある程度の進歩があったが、チェックポイント阻害療法は、依然として、他の癌治療選択肢の影に隠れたままである。

【０００４】

他の薬剤と組み合わせたチェックポイント阻害薬の研究は、進行中のものもあれば、最近、終了したものもある。例えば、ニボルマブと、イピリムマブ（ＣＴＬＡ－４受容体遮断抗体）の組み合わせが、切除不能なステージＩＩＩまたはＩＶの黒色腫患者に対する第３相臨床試験で試験された。当該試験において、完全奏効に達した患者のパーセンテージは、ニボルマブとイピリムマブの組み合わせを投与した患者で最も高く、いずれかの薬物のみを投与した群が示した結果を凌駕した。他の組み合わせも現在探究されている。

【０００５】

インターロイキン－２１（ＩＬ－２１）は、Ｔ細胞に由来する多機能性サイトカインであり、自然免疫細胞及び適応免疫細胞の両方の活性を制御する。ＩＬ－２１は、Ｔ細胞の生存及びエフェクター機能を高めることができる。ＩＬ－２１は、自己免疫疾患及び炎症性疾患の発症につながる炎症応答に大きな影響を及ぼすことに加え、抗腫瘍応答及び抗ウイルス応答において重要な役割を果たすことから、いくつかの治療法にとって、魅力的なターゲットとなっている。

【０００６】

しかしながら、ＩＬ－２１をベースにした治療法の開発は複雑である。複数の研究で、わかりづらいことに、ＩＬ－２１の作用を増強しても、阻害しても、治療効果がもたらされることが示されているために、研究が複雑になっている。また、ＩＬ－２１受容体（ＩＬ－２１Ｒ）が広範に発現していることにより、更なる課題がある。ＩＬ－２１Ｒは、Ｔ細胞だけでなく、Ｂ細胞、ＮＫ細胞及び骨髄細胞上にも発現している。したがって、白血球における広範なＩＬ－２１活性化を制限し、毒性に対する可能性を回避するように注意を払う必要がある。ＩＬ－２１シグナル伝達の制限は、均衡が取れたものであり、選択的である必要がある。ＩＬ－２１の作用誘発は、適切な時間と場所で生じるように設計する必要がある。

【０００７】

実際、いかなる成功も示されておらず、特に、単剤療法またはチェックポイント阻害薬との併用としてのＩＬ－２１部分による臨床上の成功は、示されていない。したがって、ＩＬ－２１を利用した治療モダリティが、ＩＬ－２１部分とチェックポイント阻害薬とを組み合わせたモダリティを含め、依然として必要とされている。また、免疫チェックポイント阻害と組み合わせたＩＬ－２１療法も依然として必要とされている。

【発明の概要】

【０００８】

本開示は、配列番号２のアミノ酸配列を含むＩＬ－２１ムテインを提供し、ここで、配列番号２は、

ＱＧＱＤＸ　ＨＭＸＸＭ　ＸＸＸＸＸ　ＸＶＤＸＬ　ＫＮＸＶＮ　ＤＬＶＰＥ　ＦＬＰＡＰ　ＥＤＶＥＴ　ＮＣＥＷＳ　ＡＦＳＣＦ　ＱＫＡＱＬ　ＫＳＡＮＴ　ＧＮＮＥＸ　ＸＩＸＸＸ　ＸＸＸＬＸ　ＸＸＸＸＸ　ＴＮＡＧＲ　ＲＱＫＨＲ　ＬＴＣＰＳ　ＣＤＳＹＥ　ＫＫＰＰＫ　ＥＦＬＸＸ　ＦＸＸＬＬ　ＸＸＭＸＸ　ＱＨＸＳＳ　ＲＴＨＧＳ　ＥＤＳ（配列番号２）であり、Ｘは、任意のアミノ酸であり、ＩＬ－２１ムテインアミノ酸配列は

、ヒトＩＬ－２１のアミノ酸配列（配列番号１）と少なくとも１アミノ酸異なる。
【０００９】
したがって、一態様において、本開示はまた、配列番号１として本明細書に記載される野生型ＩＬ－２１アミノ酸配列と比較して、アミノ酸置換を１つのみ含む、ＩＬ－２１ムテインを提供する。例示的な態様において、アミノ酸置換は、配列番号１のアミノ酸位置ナンバリングに従って、５、８、９、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１９、２３、６５、６６、６８、６９、７０、７２、７３、７５、７６、７７、７８、７９、８０、１０９、１１０、１１２、１１３、１１６、１１７、１１９、１２０または１２３からなる群から選択される１つのアミノ酸位置に位置する。
【００１０】
本開示は、更に、配列番号１と比較してアミノ酸置換を２つのみ含む、ＩＬ－２１ムテインを提供する。例示的な態様において、アミノ酸置換は、配列番号１のアミノ酸位置ナンバリングに従って、５、９、１５、７０、７１、７２、７３及び７６からなる群から選択される２つのアミノ酸位置に位置する。
【００１１】
例示的な実施形態において、ＩＬ－２１ムテインは、ＩＬ－２１受容体に対する野生型ＩＬ－２１の親和性と比較して低い親和性でＩＬ－２１受容体（ＩＬ－２１Ｒ）に結合する。例示的な態様において、ＩＬ－２１ムテインは、０．０４ｎＭよりも高いK_D、または約０．０４ｎＭのK_Dで、ヒトＩＬ－２１Ｒに結合する。例示的な態様において、ＩＬ－２１ムテインは、０．０５５ｎＭよりも高いK_D、または約０．０５５ｎＭのK_Dで、カニクイザルＩＬ－２１Ｒに結合する。
【００１２】
本開示はまた、異種部分に連結された本開示のＩＬ－２１ムテインを含む、コンジュゲートを提供する。例示的な態様において、異種部分は、ポリペプチドであり、そのため、コンジュゲートは、融合タンパク質である。したがって、本開示は、本開示のＩＬ－２１ムテインを含む融合タンパク質を提供する。例示的な態様において、融合タンパク質は、抗体などの抗原結合タンパク質またはその抗原結合抗体断片に連結された本開示のＩＬ－２１ムテインを含む。
【００１３】
特定の実施形態において、融合タンパク質は、本開示のＰＤ－１抗原結合タンパク質（例えば、ＰＤ－１抗原結合抗体）に連結されたＩＬ－２１ムテインを含む。
【００１４】
本開示はまた、ＰＤ－１抗原結合タンパク質及びコンジュゲート及びＰＤ－１抗原結合タンパク質を含む融合タンパク質を提供する。
【００１５】
本開示は、本開示のＩＬ－２１ムテイン、ＰＤ－１抗原結合タンパク質（例えば、ＰＤ－１抗原結合抗体）、またはＩＬ－２１ムテインとＰＤ－１抗原結合タンパク質（例えば、ＰＤ－１抗原結合抗体）とを含む融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、核酸を更に提供する。例示的な態様において、核酸分子は、本開示のコンジュゲートまたは融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。本開示の核酸を含むベクター及び本開示の核酸を含む宿主細胞もまた更に、本明細書で提供される。
【００１６】
本開示は、本開示のＩＬ－２１ムテイン、ＰＤ－１抗原結合タンパク質（例えば、ＰＤ－１抗原結合抗体）、コンジュゲート、融合タンパク質（例えば、ＩＬ－２１ムテイン及びＰＤ－１抗原結合タンパク質（例えば、ＰＤ－１抗原結合抗体）を含む融合タンパク質）、核酸、ベクターもしくは宿主細胞、またはこれらの組み合わせを含むキットを更に提供する。
【００１７】
本開示のＩＬ－２１ムテイン、ＰＤ－１抗原結合タンパク質（例えば、ＰＤ－１抗原結合抗体）、コンジュゲート、融合タンパク質（例えば、ＩＬ－２１ムテインとＰＤ－１抗

原結合タンパク質（例えば、ＰＤ－１抗原結合抗体）とを含む融合タンパク質）、核酸、ベクターもしくは宿主細胞、またはこれらの組み合わせを含む、医薬組成物が本明細書で提供される。

【００１８】

ＩＬ－２１ムテイン、ＰＤ－１抗原結合タンパク質（例えば、ＰＤ－１抗原結合抗体）、及びＩＬ－２１ムテインとＰＤ－１抗原結合タンパク質（例えば、ＰＤ－１抗原結合抗体）とを含む融合タンパク質を作製する方法が本明細書で提供される。例示的な実施形態において、当該方法は、本開示の宿主細胞を培養して、ＩＬ－２１ムテイン、ＰＤ－１抗原結合タンパク質（例えば、ＰＤ－１抗原結合抗体）またはＩＬ－２１ムテインとＰＤ－１抗原結合タンパク質（例えば、ＰＤ－１抗原結合抗体）とを含む融合タンパク質を発現させることと、発現されたＩＬ－２１ムテイン、ＰＤ－１抗原結合タンパク質（例えば、ＰＤ－１抗原結合抗体）、またはＩＬ－２１ムテインとＰＤ－１抗原結合タンパク質（例えば、ＰＤ－１抗原結合抗体）とを含む融合タンパク質を回収することとを含む。

【００１９】

治療方法が本開示によって更に提供される。例示的な実施形態において、当該方法は、治療を必要とする対象を治療する方法であって、治療を必要とする対象に、本開示の医薬組成物を、当該対象を治療するのに有効な量で投与することを含む、方法である。例示的な態様において、対象は、腫瘍（例えば、固形腫瘍、血液悪性腫瘍またはリンパ系悪性腫瘍）を有し、医薬組成物は、対象の腫瘍を治療するのに有効な量で、対象に投与される。他の例示的な態様において、腫瘍は、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）（例えば、ステージＩＩまたはＩＶのＮＳＣＬＣ）、小細胞肺癌（ＳＣＬＣ）、頭頸部癌、腎癌、乳癌、黒色腫、卵巣癌、肝癌、膵癌、大腸癌、前立腺癌、胃癌、膀胱癌、肝細胞癌、マイクロサテライト不安定性の高いがん（すなわち、高ＭＳＩがん）、リンパ腫または白血病である。

【図面の簡単な説明】

【００２０】

【図１】図１Ａは、ＣＴ２６／３Ｅ５結腸癌細胞を移植したＢＡＬＢ／ｃマウスの腫瘍体積（mm^3）を時間（日数）に対して示すグラフである。１２日目に腫瘍を測定し、１２、１５及び１８日目にアイソタイプ対照抗体（ｍＩｇＧ１）３００μｇの腹腔内（ＩＰ）注射をマウスに投与した。図１Ｂは、ＣＴ２６／３Ｅ５結腸癌細胞を移植したＢＡＬＢ／ｃマウスの腫瘍体積（mm^3）を時間（日数）に対して示すグラフである。１２日目に腫瘍を測定し、１２、１５及び１８日目に抗ＰＤ－１抗体３００μｇのＩＰ注射をマウスに投与した。図１Ｃは、ＣＴ２６／３Ｅ５結腸癌細胞を移植したＢＡＬＢ／ｃマウスの腫瘍体積（mm^3）を時間（日数）に対して示すグラフである。１２日目に腫瘍を測定し、組み換えマウスＩＬ－２１（ｒｍＩＬ－２１）５０μｇを週３回、３週間、マウスに投与した。３３日目に投薬を終了した。図１Ｄは、ＣＴ２６／３Ｅ５結腸癌細胞を移植したＢＡＬＢ／ｃマウスの腫瘍体積（mm^3）を時間（日数）に対して示すグラフである。１２日目に腫瘍を測定し、１２、１５及び１８日目に抗ＰＤ－１抗体３００μｇと、ｒｍＩＬ－２１　５０μｇを週３回、３週間、マウスに投与した。３３日目に投薬を終了した。

【図２】ＣＴ２６／３Ｅ５結腸癌細胞を移植したＢＡＬＢ／ｃマウス４群の生存率を示すグラフである。群１のマウスには、１２、１５及び１８日目に、アイソタイプ対照抗体（ｍＩｇＧ１）３００μｇの腹腔内（ＩＰ）注射を投与した。群２のマウスには、１２、１５及び１８日目に、抗ＰＤ－１抗体３００μｇのＩＰ注射を投与した。群３のマウスには、ｒｍＩＬ－２１　５０μｇを週３回、３週間、投与した。群４のマウスには、１２、１５及び１８日目に、抗ＰＤ－１抗体３００μｇと、ｒｍＩＬ－２１　５０μｇを週３回、３週間、投与した。抗ＰＤ－１とｒｍＩＬ－２１の組み合わせの投与は、ｒｍＩＬ－２１または抗ＰＤ－１の単剤療法と比較して、生存を大幅に延長する。

【図３】ＩＬ－２１ムテインに融合されたＰＤ－１阻害抗体を含む融合タンパク質（αＰＤ－１：ＩＬ－２１ムテイン）の作用機序の仮説を示す図である。特定の理論に束縛されるものではないが、融合体は、ＣＤ８＋Ｔ細胞上のＩＬ－２１Ｒに結合しつつ、ＰＤ－１とＰＤ－Ｌ１との間のシグナル伝達を同時に阻害すると考えられる。

【図４】図４Ａは、ＩＬ－２１ムテインホモ二量体に融合された抗ＰＤ－１抗体を含む融合タンパク質を示す図である。この融合タンパク質は、リンカーを有しない。抗体は、Ｆｃ関連エフェクター結合及びその機能を低下または排除する定常領域を含み得る（例えば、Ｆｃγ受容体（例えば、ＳＥＦＬ２－２）と相互作用する能力を欠く）。図４Ｂは、ＩＬ－２１ムテインホモ二量体に融合された抗ＰＤ－１抗体を含む融合タンパク質を示す図である。この融合タンパク質は、抗体の重鎖定常領域とＩＬ－２１ムテインとの間にＧＧＧＧＳ（Ｇ４Ｓ）リンカーを含み得る。抗体はまた、ＳＥＦＬ２－２修飾を含み得る。図４Ｃは、ＩＬ－２１ムテインホモ単量体に融合された抗ＰＤ－１抗体を含む融合タンパク質を示す図である。この融合タンパク質は、抗体の重鎖定常領域とＩＬ－２１ムテインとの間にＧ４Ｓリンカーを含み得る。抗体重鎖は、ヘテロ二量体Ｆｃ領域の優先的会合を助けるために、電荷対変異（ｃｐｍ；例えば、Ｖ１、Ｖ４、Ｖ１０３またはＶ１３１）を含む。抗体はまた、ＳＥＦＬ２－２修飾を含み得る。

【図５】図５Ａは、（ｉ）組み換えヒトＩＬ－２１（ｒｈＩＬ－２１）単独（黒丸の付いた実線）、（ｉｉ）抗ＰＤ－１　ｍＡｂ単独（黒い菱形の付いた実線）、（ｉｉｉ）リンカーを含まない、ＩＬ－２１ホモ二量体に融合された抗ＰＤ－１　ｍＡｂ、（黒い三角の付いた実線）、（ｉｖ）リンカーを含む、ＩＬ－２１ホモ二量体に融合された抗ＰＤ－１　ｍＡｂ、（白い三角の付いた破線）、（ｖ）リンカーを含まない、ＩＬ－２１単量体に融合された抗ＰＤ－１　ｍＡｂ、（黒い四角の付いた実線）、または（ｖｉ）リンカーを含む、ＩＬ－２１単量体に融合された抗ＰＤ－１　ｍＡｂ（白い四角の付いた破線）に曝露されたＰＤ－１^{陰性}Ｈｕｔ７８Ｔ細胞におけるＳＴＡＴ３シグナル伝達を示すグラフである。図５Ｂは、（ｉ）組み換えヒトＩＬ－２１（ｒｈＩＬ－２１）単独（黒丸の付いた実線）、（ｉｉ）抗ＰＤ－１　ｍＡｂ単独（黒い菱形の付いた実線）、（ｉｉｉ）リンカーを含まない、ＩＬ－２１ホモ二量体に融合された抗ＰＤ－１　ｍＡｂ、（黒い三角の付いた実線）、（ｉｖ）リンカーを含む、ＩＬ－２１ホモ二量体に融合された抗ＰＤ－１　ｍＡｂ、（白い三角の付いた破線）、（ｖ）リンカーを含まない、ＩＬ－２１単量体に融合された抗ＰＤ－１　ｍＡｂ、（黒い四角の付いた実線）、または（ｖｉ）リンカーを含む、ＩＬ－２１単量体に融合された抗ＰＤ－１　ｍＡｂ（白い四角の付いた破線）に曝露されたＰＤ－１^{陽性}Ｈｕｔ７８Ｔ細胞におけるＳＴＡＴ３シグナル伝達を示すグラフである。

【図６】低用量（２５０μｇ／ｋｇ）または高用量（１０００μｇ／ｋｇ）のいずれかで６匹の動物に静脈内投与した、抗ＰＤ－１　ｍＡｂに融合されたＷＴ　ＩＬ－２１を含むホモ二量体融合タンパク質の血清中濃度を示すグラフである。対照として、ＩｇＧ抗体ドメイン（１５０μｇ／ｋｇ）を使用した。

【図７】ＩＬ－２１Ｒαに対する親和性が低減したＩＬ－２１ムテインに曝露された、ＰＤ－１^{陰性}Ｈｕｔ７８細胞（白い棒）またはＰＤ－１^{陽性}Ｈｕｔ７８細胞（黒い棒）によるＩＬ－２１活性の減少倍数（ｒｈＩＬ－２１活性を基準とする）を示すグラフである。

【図８】ＩＬ－２１Ｒγに対する親和性が低減したＩＬ－２１ムテインに曝露された、ＰＤ－１^{陰性}Ｈｕｔ７８細胞（白い棒）またはＰＤ－１^{陽性}Ｈｕｔ７８細胞（黒い棒）によるＩＬ－２１活性の減少倍数（ｒｈＩＬ－２１活性を基準とする）を示すグラフである。

【図９】図９Ａは、（ｉ）組み換えヒトＩＬ－２１（ｒｈＩＬ－２１）単独（黒丸の付いた実線）、（ｉｉ）ＷＴ　ＩＬ－２１ホモ二量体に融合された抗ＰＤ－１　ｍＡｂ（白丸の付いた破線）、（ｉｉｉ）ＷＴ　ＩＬ－２１単量体に融合された抗ＰＤ－１　ｍＡｂ（黒丸の付いた破線）、及び（ｉｖ）ＩＬ－２１ムテイン５１ホモ二量体（Ｒ６５Ｐ）に融合された抗ＰＤ－１　ｍＡｂ（黒い三角の付いた点線）に曝露されたＰＤ－１^{陰性}Ｈｕｔ７８Ｔ細胞におけるＳＴＡＴ３シグナル伝達を示すグラフである。図９Ｂは、（ｉ）組み換えヒトＩＬ－２１（ｒｈＩＬ－２１）単独（黒丸の付いた実線）、（ｉｉ）ＷＴ　ＩＬ－２１ホモ二量体に融合された抗ＰＤ－１　ｍＡｂ（白丸の付いた破線）、（ｉｉｉ）ＷＴ　ＩＬ－２１単量体に融合された抗ＰＤ－１　ｍＡｂ（黒丸の付いた破線）、及び（ｉｖ）ＩＬ－２１ムテイン５１ホモ二量体（Ｒ６５Ｐ）に融合された抗ＰＤ－１　ｍＡｂ（黒い三角の付いた点線）に曝露されたＰＤ－１^{陽性}Ｈｕｔ７８Ｔ細胞におけるＳＴＡＴ３

シグナル伝達を示すグラフである。
【図１０】（ｉ）ＩＬ－２１　Ｒ７６Ｅムテインホモ二量体に融合された抗ＰＤ－１　ｍＡｂ（黒丸の付いた点線）、（ｉｉ）ＩＬ－２１　Ｒ７６Ａムテインホモ二量体に融合された抗ＰＤ－１　ｍＡｂ（黒い三角の付いた破線）、（ｉｉｉ）ＩＬ－２１　Ｄ１５Ｎムテインホモ二量体に融合された抗ＰＤ－１　ｍＡｂ（Ｘの付いた破線）、（ｉｖ）抗ＰＤ－１抗体（８．２５ｍｇ／ｋｇ；白い菱形の付いた破線）、及び（ｖ）ＷＴ　ＩＬ－２１ムテインホモ二量体に融合された抗ＰＤ－１　ｍＡｂ（黒い四角の付いた実線）を含む融合タンパク質の血清中濃度を示すグラフである。
【図１１】（ｉ）抗ＰＤ－１抗体（黒丸の付いた実線）、（ｉｉ）ＩＬ－２１　Ｒ５Ｑ／Ｒ７６Ｅダブルムテインホモ二量体を含む融合タンパク質（白丸の付いた破線）、（ｉｉｉ）抗ＰＤ－１　ｍＡｂとｒｈＩＬ－２１の組み合わせ（白い四角の付いた点線）、（ｉｖ）ＩＬ－２１　Ｒ７６Ｅシングルムテインホモ二量体を含む融合タンパク質（黒い四角）、（ｖ）ＩｇＧ対照（白い菱形の付いた点線）、及び（ｖｉ）ｒｈＩＬ－２１（白い三角の付いた破線）の抗体濃度に対する、混合リンパ球反応の細胞によって分泌されたＩＬ－２（ｐｇ／ｍＬ）を示すグラフである。
【図１２】図１２Ａは、（ｉ）ＩＬ－２１　Ｒ５Ｅ／Ｒ７６Ａダブルムテインを含む融合タンパク質（白い三角の付いた線）、（ｉｉ）ＩｇＧ１対照（黒い菱形の付いた点線）、（ｉｉｉ）ｒｈＩＬ－２１（白い四角の付いた破線）、（ｉｖ）抗ＰＤ－１　ｍＡｂ（白い楕円の付いた実線）、（ｖ）ｒｈＩＬ－２１と抗ＰＤ－１　ｍＡｂの組み合わせ（黒い楕円の付いた破線）、または（ｖｉ）ＩＬ－２１　Ｒ７６Ｅシングルムテインを含む融合タンパク質（白い菱形の付いた線）に曝露された細胞のＳＴＡＴ３活性の平均蛍光強度（ＭＦＩ）に対する倍数変化を示すグラフである。図１２Ｂは、（ｉ）ＩＬ－２１　Ｒ５Ｑ／Ｒ７６Ｅダブルムテインを含む融合タンパク質（白い三角の付いた線）、（ｉｉ）ＩｇＧ１対照（黒い菱形の付いた点線）、（ｉｉｉ）ｒｈＩＬ－２１（白い四角の付いた破線）、（ｉｖ）抗ＰＤ－１　ｍＡｂ（白い楕円の付いた実線）、（ｖ）ｒｈＩＬ－２１と抗ＰＤ－１　ｍＡｂの組み合わせ（黒い楕円の付いた破線）、または（ｖｉ）ＩＬ－２１　Ｒ７６Ｅシングルムテインを含む融合タンパク質（白い菱形の付いた線）に曝露された細胞のＳＴＡＴ３活性のＭＦＩに対する倍数変化を示すグラフである。図１２Ｃは、（ｉ）ＩＬ－２１　Ｒ９Ｅ／Ｒ７６Ａダブルムテインを含む融合タンパク質（白い三角の付いた線）、（ｉｉ）ＩｇＧ１対照（黒い菱形の付いた点線）、（ｉｉｉ）ｒｈＩＬ－２１（白い四角の付いた破線）、（ｉｖ）抗ＰＤ－１　ｍＡｂ（白い楕円の付いた実線）、（ｖ）ｒｈＩＬ－２１と抗ＰＤ－１　ｍＡｂの組み合わせ（黒い楕円の付いた破線）、または（ｖｉ）ＩＬ－２１　Ｒ７６Ｅシングルムテインを含む融合タンパク質（白い菱形の付いた線）に曝露された細胞のＳＴＡＴ３活性のＭＦＩに対する倍数変化を示すグラフである。
【図１３】図１３Ａは、（ｉ）ｒｈＩＬ－２１（黒丸の付いた実線）、（ｉｉ）ｈＩｇＧ４対照抗体（白丸の付いた破線）、（ｉｉｉ）抗ＰＤ－１　ｍＡｂ（黒い三角の付いた破線）、（ｉｖ）ｒｈＩＬ－２１と抗ＰＤ－１　ｍＡｂの組み合わせ（白い三角の付いた点線）、または（ｖ）ＩＬ－２１　Ｒ５Ｅ／Ｒ７６Ａを含む融合タンパク質（Ｘの付いた破線）に曝露されたＣＴＬによる特異的溶解率（％）（ｙ軸）をエフェクター細胞：標的細胞比（ｘ軸）に対して示すグラフである。図１３Ｂは、（ｉ）ｒｈＩＬ－２１（黒丸の付いた実線）、（ｉｉ）ｈＩｇＧ４対照抗体（白丸の付いた破線）、（ｉｉｉ）抗ＰＤ－１　ｍＡｂ（黒い三角の付いた破線）、（ｉｖ）ｒｈＩＬ－２１と抗ＰＤ－１　ｍＡｂの組み合わせ（白い三角の付いた点線）、または（ｖ）ＩＬ－２１　Ｒ５Ｑ／Ｒ７６Ｅを含む融合タンパク質（Ｘの付いた破線）に曝露されたＣＴＬによる特異的溶解率（％）を示すグラフである。図１３Ｃは、（ｉ）ｒｈＩＬ－２１（黒丸の付いた実線）、（ｉｉ）ｈＩｇＧ４対照抗体（白丸の付いた破線）、（ｉｉｉ）抗ＰＤ－１　ｍＡｂ（黒い三角の付いた破線）、（ｉｖ）ｒｈＩＬ－２１と抗ＰＤ－１　ｍＡｂの組み合わせ（白い三角の付いた点線）、または（ｖ）ＩＬ－２１　Ｒ９Ｅ／Ｒ７６Ａを含む融合タンパク質（Ｘの付いた破線）に曝露されたＣＴＬによる特異的溶解率（％）を示すグラフである。
【図１４】（ｉ）抗ＰＤ－１　ｍＡｂ（黒い四角の付いた実線）、（ｉｉ）抗ＰＤ－１

ｍＡｂ及びＩＬ－２１　Ｒ５Ｑ／Ｒ７６Ｅホモ二量体を含む融合タンパク質（黒丸の付いた実線）、（ｉｉｉ）抗ＰＤ－１　ｍＡｂ及びＩＬ－２１　Ｒ７６Ｅホモ二量体を含む融合タンパク質（実線）、（ｉｖ）抗ＰＤ－１　ｍＡｂ及びＩＬ－２１　Ｒ５Ｅ／Ｒ７６Ａホモ二量体を含む融合タンパク質（Ｘの付いた破線）、（ｖ）抗ＰＤ－１　ｍＡｂ及びＩＬ－２１　Ｒ７６Ａホモ二量体を含む融合タンパク質（黒い菱形の付いた破線）、または（ｖｉ）抗ＰＤ－１　ｍＡｂ及びＩＬ－２１　Ｒ７６Ｅ単量体を含む融合タンパク質（黒い三角の付いた実線）の血清中濃度を表す。

【図１５】図１５Ａは、細胞サンプリング（白矢印）及び投与（黒矢印）の時系列を示す。図１５Ｂは、ある用量の（ｉ）抗ＰＤ－１　ｍＡｂ及びＩＬ－２１　Ｒ７６Ｅムテインを含む融合タンパク質（横線の付いた棒）、（ｉｉ）抗ＰＤ－１　ｍＡｂ及びＩＬ－２１　Ｒ７６Ｅシングルムテイン単量体を含む融合タンパク質（縦線の付いた棒）、または（ｉｉｉ）抗ＰＤ－１　ｍＡｂ及びＩＬ－２１　Ｒ５Ｑ／Ｒ７６Ｅダブルムテインホモ二量体を含む融合タンパク質（白い棒）を投与した動物（それぞれ０日目に投与）において、７日目に測定したときのＰＤ－１$^{+}$／ＣＤ４$^{+}$細胞の倍数変化（－５日目と比較）を示すグラフである。図１５Ｃは、ある用量の（ｉ）抗ＰＤ－１　ｍＡｂ及びＩＬ－２１　Ｒ７６Ｅムテインを含む融合タンパク質（横線の付いた棒）、（ｉｉ）抗ＰＤ－１　ｍＡｂ及びＩＬ－２１　Ｒ７６Ｅシングルムテイン単量体を含む融合タンパク質（縦線の付いた棒）、または（ｉｉｉ）抗ＰＤ－１　ｍＡｂ及びＩＬ－２１　Ｒ５Ｑ／Ｒ７６Ｅダブルムテインホモ二量体を含む融合タンパク質（白い棒）を投与した動物（それぞれ０日目に投与）において、７日目に測定したときのＰＤ－１$^{+}$／ＣＤ８$^{+}$細胞の倍数変化（－５日目と比較）を示すグラフである。図１５Ｄは、（ｉ）抗ＰＤ－１　ｍＡｂ及びＩＬ－２１　Ｒ７６Ｅムテインを含む融合タンパク質（横線の付いた棒）、（ｉｉ）抗ＰＤ－１　ｍＡｂ及びＩＬ－２１　Ｒ７６Ｅシングルムテイン単量体を含む融合タンパク質（縦線の付いた棒）、または（ｉｉｉ）抗ＰＤ－１　ｍＡｂ及びＩＬ－２１　Ｒ５Ｑ／Ｒ７６Ｅダブルムテインホモ二量体を含む融合タンパク質（白い棒）の初回用量を投与した動物（初回用量を０日目に投与し、２回目の用量を８日目に投与）において、２１日目に測定したときのＰＤ－１$^{+}$／ＣＤ８$^{+}$細胞の倍数変化（－５日目と比較）を示すグラフである。

【図１６】ＰＤ－１$^{+}$／ＣＤ８$^{+}$細胞の増大（－５日目と比較）をＰＤ－１$^{+}$／ＣＤ８$^{+}$細胞のＰＤ－１受容体占有率（ＲＯ）に対して示すグラフである。ＩＬ－２１単一変異体（８０１、８０２、８０７及び８０８）は、青色の円内に示され、ＩＬ－２１二重変異体（８０３、８０４、８０５及び８０６）は、ピンク色の円内に示されている。これらのデータは、ＰＤ－１$^{+}$標的集団の増大によって測定したとき、二重変異体の優れた薬物動態特性により良好な標的範囲が可能となり、良好な薬力学応答と相関することを示している。青線は、単一変異体と二重変異体との大まかな線引きを示す。

【図１７】単一変異体ホモ二量体構築物（動物８０１及び８０２）、二重変異体ホモ二量体構築物（動物８０３～８０６）、または単一変異体単量体構築物（動物８０７及び８０８）のいずれかで処置した個々の動物のフロープロットを示す。ＰＤ－１$^{+}$Ｔ細胞を非競合検出抗体または競合検出抗体によって検出した。標的範囲パーセントは、競合ＰＤ－１抗体と非競合ＰＤ－１抗体との間の比率として算出している。データは、全ての構築物が、反復投与後の２１日目に、強力な標的範囲を表すことを示している。

【図１８】図１８Ａは、１０個の異なる抗ＰＤ－１　ｍＡｂのうちの１つと、ＩＬ－２１　Ｒ５Ｑ／Ｒ７６Ｅムテインホモ二量体とを含む融合タンパク質に曝露されたＰＤ－１^{陰性}ＨｕｔＴ７８細胞のＳＴＡＴ３活性の倍数変化（ｒｈＩＬ－２１（円中にＸの付いた実線）と比較）を示すグラフである。１０個の抗ＰＤ－１　ｍＡｂには、２０Ａ２．００３（菱形の付いた線）、２０Ｃ１．００６（赤い四角）、２０Ｃ１．００９（三角の付いた線）及び２２Ｄ４．００６（白丸の付いた線）が含まれた。図１８Ｂは、１０個の異なる抗ＰＤ－１　ｍＡｂのうちの１つと、ＩＬ－２１　Ｒ５Ｑ／Ｒ７６Ｅムテインホモ二量体とを含む融合タンパク質に曝露されたＰＤ－１^{陽性}ＨｕｔＴ７８細胞のＳＴＡＴ３活性の倍数変化（ｒｈＩＬ－２１（円中にＸの付いた実線）と比較）を示すグラフである。１０個の抗ＰＤ－１　ｍＡｂには、２０Ａ２．００３（菱形の付いた線）、２０Ｃ１．００６

（赤い四角）、２０Ｃ１．００９（三角の付いた線）及び２２Ｄ４．００６（白丸の付いた線）が含まれた。図１８Ａと図１８Ｂを比較すると、ｐＳＴＡＴ３シグナル伝達にはＰＤ－１標的化が必要であり、ムテインの活性は、異なる抗ＰＤ－１　ｍＡｂに融合された場合、同様であることが示される。

【図１９】図１９Ａは、７個の異なる抗ＰＤ－１　ｍＡｂのうちの１つと、ＩＬ－２１　Ｒ９Ｅ／Ｒ７６Ａムテインホモ二量体とを含む融合タンパク質に曝露されたＰＤ－１^{陰性}Ｈｕｔ７８Ｔ細胞のＳＴＡＴ３活性の倍数変化（ｒｈＩＬ－２１（円中にＸの付いた実線）と比較）を示すグラフである。７個の抗ＰＤ－１　ｍＡｂには、２０Ａ２．００３（白い三角の付いた線）、２０Ｃ１．００６（白い四角の付いた線）、２０Ｃ１．００９（白い菱形の付いた線）及び２２Ｄ４．００６（白丸の付いた線）が含まれた。図１９Ｂは、７個の異なる抗ＰＤ－１　ｍＡｂのうちの１つと、ＩＬ－２１　Ｒ９Ｅ／Ｒ７６Ａムテインホモ二量体とを含む融合タンパク質に曝露されたＰＤ－１^{陽性}Ｈｕｔ７８Ｔ細胞のＳＴＡＴ３活性の倍数変化（ｒｈＩＬ－２１（円中にＸの付いた実線）と比較）を示すグラフである。図１９Ａと図１９Ｂを比較すると、ｐＳＴＡＴ３シグナル伝達にはＰＤ－１標的化が必要であり、ムテインの活性は、異なる抗ＰＤ－１　ｍＡｂに融合された場合、同様であることが示される。７個の抗ＰＤ－１　ｍＡｂには、２０Ａ２．００３（白い三角の付いた線）、２０Ｃ１．００６（白い四角の付いた線）、２０Ｃ１．００９（白い菱形の付いた線）及び２２Ｄ４．００６（白丸の付いた線）が含まれた。

【図２０】図２０Ａ～２０Ｄは、いくつかの抗ＰＤ－１　ｍＡｂ－ＩＬ－２１単量体または二量体ダブルムテイン融合体を用いて観察されたｐＳＴＡＴ３シグナル伝達の量を示す。黒丸の付いた実線（グラフ上部）は、ｒｈＩＬ－２１であり、白丸の付いた破線（グラフ下部）は、ＩｇＧ１対照であり、Ｘの付いた線（グラフ下部）は、ＩｇＧ２対照であり、黒い四角の付いた点線（グラフ下部）は、ＩＬ－２１ムテイン融合体に使用された２２Ｄ４．００６抗ＰＤ－１　ｍＡｂであり（ｍＡｂとして存在；すなわち、融合体ではない）、白い四角の付いた破線及び白い菱形の付いた点線（グラフ下部）は、対照抗ＰＤ－１　ｍＡｂであり、残りの線は、抗ＰＤ－１　ｍＡｂ（２２Ｄ４．００６）－ＩＬ－２１単量体または二量体ダブルムテイン融合体（各種電荷対変異を含む）である（二重変異体は、Ｒ５Ｅ／Ｒ７６Ａ；Ｒ９Ｅ／Ｒ７６Ａ；Ｒ５Ａ／Ｒ７６ＥまたはＲ５Ｑ／Ｒ７６Ｅである）。ｒｈＩＬ－２１は、ＰＤ－１^{陰性}細胞とＰＤ－１^{陽性}細胞の両方の細胞で活性を示し、単量体及びホモ二量体ダブルムテイン融合体は、ＰＤ－１^{陰性}細胞では、ｐＳＴＡＴ３活性（ＩＬ－２１に基づく）を示すことができず、単量体及びホモ二量体ダブルムテイン融合体は、ＰＤ－１^{陽性}細胞において、ｐＳＴＡＴ３活性（ＩＬ－２１に基づく）を示すことができる。したがって、ＩＬ－２１二重変異体を含む単量体融合体のＰＤ－１^{陰性}細胞におけるＩＬ－２１活性の減衰レベルは、対応する二量体融合体と同様のレベルを示し、ＩＬ－２１活性は、対応する二量体融合体と同様に、ＰＤ－１^{陽性}細胞で救済される。図２０Ａ及び２０Ｂは、ＰＤ－１^{陰性}細胞におけるｐＳＴＡＴ３アッセイの２連実験である。図２０Ｃ及び２０Ｄは、ＰＤ－１^{陽性}細胞におけるｐＳＴＡＴ３アッセイの２連実験である。

【図２１－１】図２１Ａ～２１Ｄは、図２０Ａ～２０Ｄで評価したものと同じ抗ＰＤ－１　ｍＡｂ（２２Ｄ４．００６）－ＩＬ－２１単量体または二量体ダブルムテイン融合体を用いた、ＰＤ－１レポーター遺伝子アッセイ（ＲＧＡ；図２１Ａ及び２１Ｂ）及びＭＬＲアッセイ（図２１Ｃ及び２１Ｄ）の結果を示す。図２１Ａ～２１Ｄは、抗ＰＤ－１　ｍＡｂ（２２Ｄ４．００６）－ＩＬ－２１単量体及び二量体ダブルムテイン融合体がＰＤ－１活性を誘導できることを実証している。黒丸の付いた実線（グラフ下部）は、ｒｈＩＬ－２１であり、白丸の付いた線（グラフ下部）は、ＩｇＧ１対照であり、Ｘの付いた線（グラフ下部）は、ＩｇＧ２対照であり、黒い四角の付いた破線（グラフ上部）は、ＩＬ－２１ムテイン融合体に使用された２２Ｄ４．００６抗ＰＤ－１　ｍＡｂであり（ｍＡｂとして存在；すなわち、融合体ではない）、白い四角の付いた破線及び白い菱形の付いた点線（グラフ上部）は、対照抗ＰＤ－１　ｍＡｂであり、残りの線は、抗ＰＤ－１　ｍＡｂ－ＩＬ－２１単量体または二量体ダブルムテイン融合体である。図２１Ａ及び２１Ｂは、Ｐ

Ｄ－１　ＲＧＡアッセイの２連実験である。図２０Ｃ及び２０Ｄは、ＭＬＲアッセイの２連実験である。

【図２１－２】図２１Ａ～２１Ｄは、図２０Ａ～２０Ｄで評価したものと同じ抗ＰＤ－１　ｍＡｂ（２２Ｄ４．００６）－ＩＬ－２１単量体または二量体ダブルムテイン融合体を用いた、ＰＤ－１レポーター遺伝子アッセイ（ＲＧＡ；図２１Ａ及び２１Ｂ）及びＭＬＲアッセイ（図２１Ｃ及び２１Ｄ）の結果を示す。図２１Ａ～２１Ｄは、抗ＰＤ－１　ｍＡｂ（２２Ｄ４．００６）－ＩＬ－２１単量体及び二量体ダブルムテイン融合体がＰＤ－１活性を誘導できることを実証している。黒丸の付いた実線（グラフ下部）は、ｒｈＩＬ－２１であり、白丸の付いた線（グラフ下部）は、ＩｇＧ１対照であり、Ｘの付いた線（グラフ下部）は、ＩｇＧ２対照であり、黒い四角の付いた破線（グラフ上部）は、ＩＬ－２１ムテイン融合体に使用された２２Ｄ４．００６抗ＰＤ－１　ｍＡｂであり（ｍＡｂとして存在；すなわち、融合体ではない）、白い四角の付いた破線及び白い菱形の付いた点線（グラフ上部）は、対照抗ＰＤ－１　ｍＡｂであり、残りの線は、抗ＰＤ－１　ｍＡｂ－ＩＬ－２１単量体または二量体ダブルムテイン融合体である。図２１Ａ及び２１Ｂは、ＰＤ－１　ＲＧＡアッセイの２連実験である。図２０Ｃ及び２０Ｄは、ＭＬＲアッセイの２連実験である。

【図２２】図２２Ａ～２２Ｄは、抗ＰＤ－１　ｍＡｂ－ＩＬ－２１単量体及び二量体ダブルムテイン融合体に異なる抗ＰＤ－１　ｍＡｂ（２０Ａ２．００３）を使用した点を除き、図２０Ａ～２０Ｄの構築物と同じ構築物を試験したｐＳＴＡＴ３アッセイの結果を表す。図２２Ａ～２２Ｄの結果は、図２０Ａ～２０Ｄで認められた結果と同様である。黒丸の付いた実線（グラフ上部）は、ｒｈＩＬ－２１であり、白丸の付いた破線（グラフ下部）は、ＩｇＧ１対照であり、Ｘの付いた線（グラフ下部）は、ＩｇＧ２対照であり、黒い四角の付いた点線（グラフ下部）は、ＩＬ－２１ムテイン融合体に使用された２２Ｄ４．００３抗ＰＤ－１　ｍＡｂであり（ｍＡｂとして存在；すなわち、融合体ではない）、白い四角の付いた破線及び白い菱形の付いた点線（グラフ下部）は、対照抗ＰＤ－１　ｍＡｂであり、残りの線は、抗ＰＤ－１　ｍＡｂ（２２Ｄ４．００３）－ＩＬ－２１単量体または二量体ダブルムテイン融合体（各種電荷対変異を含む）である（二重変異体は、Ｒ５Ｅ／Ｒ７６Ａ；Ｒ９Ｅ／Ｒ７６Ａ；Ｒ５Ａ／Ｒ７６ＥまたはＲ５Ｑ／Ｒ７６Ｅである）。図２２Ａ及び２２Ｂは、ＰＤ－１^{陰性}細胞におけるｐＳＴＡＴ３アッセイの２連実験である。図２２Ｃ及び２２Ｄは、ＰＤ－１^{陽性}細胞におけるｐＳＴＡＴ３アッセイの２連実験である。

【図２３－１】図２３Ａ～２３Ｄは、抗ＰＤ－１　ｍＡｂ－ＩＬ－２１単量体及び二量体ダブルムテイン融合体に異なる抗ＰＤ－１　ｍＡｂ（２０Ａ２．００３）を使用した点を除き、図２１Ａ～２１Ｄの構築物と同じ構築物を試験した、ＰＤ－１レポーター遺伝子アッセイ（図２３Ａ及び２３Ｂ）及びＭＬＲアッセイ（図２３Ｃ及び２３Ｄ）の結果を示す。図２３Ａ～２３Ｄの結果は、図２１Ａ～２１Ｄで認められた結果と同様である。黒丸の付いた実線（グラフ下部）は、ｒｈＩＬ－２１であり、白丸の付いた破線（グラフ下部）は、ＩｇＧ１対照であり、Ｘの付いた線（グラフ下部）は、ＩｇＧ２対照であり、点線（グラフ上部）は、ＩＬ－２１ムテイン融合体に使用された２０Ａ２．００３抗ＰＤ－１　ｍＡｂであり（ｍＡｂとして存在；すなわち、融合体ではない）、白い四角の付いた破線及び白い菱形の付いた点線（グラフ上部）は、対照抗ＰＤ－１　ｍＡｂであり、残りの線は、抗ＰＤ－１　ｍＡｂ（２０Ａ２．００３）－ＩＬ－２１単量体または二量体ダブルムテイン融合体である。図２３Ａ及び２３Ｂは、ＰＤ－１　ＲＧＡアッセイの２連実験である。図２３Ｃ及び２３Ｄは、ＭＬＲアッセイの２連実験である。

【図２３－２】図２３Ａ～２３Ｄは、抗ＰＤ－１　ｍＡｂ－ＩＬ－２１単量体及び二量体ダブルムテイン融合体に異なる抗ＰＤ－１　ｍＡｂ（２０Ａ２．００３）を使用した点を除き、図２１Ａ～２１Ｄの構築物と同じ構築物を試験した、ＰＤ－１レポーター遺伝子アッセイ（図２３Ａ及び２３Ｂ）及びＭＬＲアッセイ（図２３Ｃ及び２３Ｄ）の結果を示す。図２３Ａ～２３Ｄの結果は、図２１Ａ～２１Ｄで認められた結果と同様である。黒丸の付いた実線（グラフ下部）は、ｒｈＩＬ－２１であり、白丸の付いた破線（グラフ下部）

は、ＩｇＧ１対照であり、Ｘの付いた線（グラフ下部）は、ＩｇＧ２対照であり、点線（グラフ上部）は、ＩＬ－２１ムテイン融合体に使用された２０Ａ２．００３抗ＰＤ－１ｍＡｂであり（ｍＡｂとして存在；すなわち、融合体ではない）、白い四角の付いた破線及び白い菱形の付いた点線（グラフ上部）は、対照抗ＰＤ－１　ｍＡｂであり、残りの線は、抗ＰＤ－１　ｍＡｂ（２０Ａ２．００３）－ＩＬ－２１単量体または二量体ダブルムテイン融合体である。図２３Ａ及び２３Ｂは、ＰＤ－１　ＲＧＡアッセイの２連実験である。図２３Ｃ及び２３Ｄは、ＭＬＲアッセイの２連実験である。

【図２４】精製された抗ＰＤ－１抗体のＮＦＡＴ／ルシフェラーゼ活性をｍＡｂ濃度に対して示すグラフである。

【図２５】図２５Ａは、融合タンパク質［２２Ｄ４．０１７］－［Ｒ９Ｅ：Ｒ７６Ａ］（単量体）または抗ＰＤ－１抗体［２２Ｄ４．０１７］に曝露された際のＫｉ６７$^{+}$／ＣＤ３$^{+}$／ＣＤ４$^{+}$細胞の数のベースラインに対する倍数変化を示すグラフである。図２５Ｂは、融合タンパク質［２２Ｄ４．０１７］－［Ｒ９Ｅ：Ｒ７６Ａ］（単量体）または抗ＰＤ－１抗体［２２Ｄ４．０１７］に曝露された際のＫｉ６７$^{+}$／ＣＤ３$^{+}$／ＣＤ８$^{+}$細胞の数のベースラインに対する倍数変化を示すグラフである。図２５Ｃは、融合タンパク質［２２Ｄ４．０１７］－［Ｒ９Ｅ：Ｒ７６Ａ］（単量体）または抗ＰＤ－１抗体［２２Ｄ４．０１７］に曝露された際のｐＳＴＡＴ３$^{+}$／ＣＤ３$^{+}$／ＣＤ４$^{+}$細胞の数のベースラインに対する倍数変化を示すグラフである。図２５Ｄは、融合タンパク質［２２Ｄ４．０１７］－［Ｒ９Ｅ：Ｒ７６Ａ］（単量体）または抗ＰＤ－１抗体［２２Ｄ４．０１７］に曝露された際のｐＳＴＡＴ３$^{+}$／ＣＤ３$^{+}$／ＣＤ８$^{+}$細胞の数のベースラインに対する倍数変化を示すグラフである。図２５Ｅは、融合タンパク質［２２Ｄ４．０１７］－［Ｒ９Ｅ：Ｒ７６Ａ］（単量体）または抗ＰＤ－１抗体［２２Ｄ４．０１７］に曝露された際のＣＤ３$^{+}$／ＣＤ４$^{+}$細胞の数のベースラインに対する倍数変化を示すグラフである。図２５Ｆは、融合タンパク質［２２Ｄ４．０１７］－［Ｒ９Ｅ：Ｒ７６Ａ］（単量体）または抗ＰＤ－１抗体［２２Ｄ４．０１７］に曝露された際のＣＤ３$^{+}$／ＣＤ８$^{+}$細胞の数のベースラインに対する倍数変化を示すグラフである。図２５Ｇは、融合タンパク質［２２Ｄ４．０１７］－［Ｒ９Ｅ：Ｒ７６Ａ］（単量体）または抗ＰＤ－１抗体［２２Ｄ４．０１７］に曝露された際のＰＤ－１$^{+}$／ＣＤ３$^{+}$／ＣＤ４$^{+}$細胞の数のベースラインに対する倍数変化を示すグラフである。図２５Ｈは、融合タンパク質［２２Ｄ４．０１７］－［Ｒ９Ｅ：Ｒ７６Ａ］（単量体）または抗ＰＤ－１抗体［２２Ｄ４．０１７］に曝露された際のＰＤ－１$^{+}$／ＣＤ３$^{+}$／Ｃ８４$^{+}$細胞の数のベースラインに対する倍数変化を示すグラフである。図２５Ｉは、融合タンパク質［２２Ｄ４．０１７］－［Ｒ９Ｅ：Ｒ７６Ａ］（単量体）または抗ＰＤ－１抗体［２２Ｄ４．０１７］への７２時間の曝露における血清パーフォリンの量のベースラインに対する倍数変化を示すグラフである。図２５Ｊは、融合タンパク質［２２Ｄ４．０１７］－［Ｒ９Ｅ：Ｒ７６Ａ］（単量体）または抗ＰＤ－１抗体［２２Ｄ４．０１７］への７２時間曝露における、ベースラインに対するパーフォリンの倍数増加の関数としてのＫｉ６７$^{+}$細胞（％）を示すグラフである。

【図２６】図２６Ａは、ヒトＰＤ－１抗原に対する抗体２２Ｄ４．０１７について指定されたK_Dを決定するために使用した、時間（秒）の関数としての吸光度（ｎｍ）を示すグラフである。図２６Ｂは、ヒトＰＤ－１抗原に対する抗体２０Ｃ１．００９について指定されたK_Dを決定するために使用した、時間（秒）の関数としての吸光度（ｎｍ）を示すグラフである。図２６Ｃは、ヒトＰＤ－１抗原に対する抗体２０Ａ２．００３について指定されたK_Dを決定するために使用した、時間（秒）の関数としての吸光度（ｎｍ）を示すグラフである。図２６Ｄは、ヒトＰＤ－１抗原に対するＩｇＧ１抗ＰＤ－１　ｍＡｂについて指定されたK_Dを決定するために使用した、時間（秒）の関数としての吸光度（ｎｍ）を示すグラフである。図２６Ｅは、ヒトＰＤ－１抗原に対するＩｇＧ４　ＰＤ－１ｍＡｂについて指定されたK_Dを決定するために使用した、時間（秒）の関数としての吸光度（ｎｍ）を示すグラフである。図２６Ｆは、カニクイザルＰＤ－１抗原に対する２２Ｄ４．０１７について指定されたK_Dを決定するために使用した、時間（秒）の関数としての吸光度（ｎｍ）を示すグラフである。図２６Ｇは、カニクイザルＰＤ－１抗原に対す

る抗体２０Ｃ１．００９について指定されたＫ$_D$を決定するために使用した、時間（秒）の関数としての吸光度（ｎｍ）を示すグラフである。図２６Ｈは、カニクイザルＰＤ－１抗原に対する抗体２０Ａ２．００３について指定されたＫ$_D$を決定するために使用した、時間（秒）の関数としての吸光度（ｎｍ）を示すグラフである。図２６Ｉは、カニクイザルＰＤ－１抗原に対するＩｇＧ１抗ＰＤ－１　ｍＡｂについて指定されたＫ$_D$を決定するために使用した、時間（秒）の関数としての吸光度（ｎｍ）を示すグラフである。図２６Ｊは、カニクイザルＰＤ－１抗原に対するＩｇＧ４抗ＰＤ－１　ｍＡｂについて指定されたＫ$_D$を決定するために使用した、時間（秒）の関数としての吸光度（ｎｍ）を示すグラフである。

【図２７】抗ＰＤ－１抗体２２Ｄ４．０１７及び２０Ｃ１．００９のＣｐ（ｋｃａｌ／ｍｏｌｅ／℃）を温度の関数として示すグラフである。

【図２８】抗ＰＤ－１抗体２２Ｄ４．０１７及び２０Ｃ１．００９について、剪断速度に対してプロットした粘度を示すグラフである。

【図２９】図２９Ａ～２９Ｄは、（図２９Ａ）ＰＤ－１陽性であるバリアントＨｕｔ７８　Ｔ細胞株、（図２９Ｂ）ＴＩＧＩＴ陽性であるバリアントＨｕｔ７８　Ｔ細胞株、（図２９Ｃ）ＬＡＧ３陽性であるバリアントＨｕｔ７８　Ｔ細胞株、及び（図２９Ｄ）ＰＤ－１、ＴＩＧＩＴまたはＬＡＧ３を内因的に発現しない親のＨｕｔ７８　Ｔ細胞株の抗体濃度の関数としてシグナルをプロットした一連のグラフである。

【発明を実施するための形態】

【００２１】

現在の免疫療法アプローチが少数の患者にしか有効でなく、重大かつしばしば予測不可能な毒性を有することがあるという事実を特に鑑み、がん細胞に対して安全かつ有効に免疫系を展開することができる、新しい免疫強化アプローチが依然として必要とされている。一態様において、本明細書で開示される操作された親和性減衰型インターロイキン－２１ムテインに融合された、ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１相互作用を遮断することができるＰＤ－１標的抗体を含む、新しい種類の二機能性融合分子は、この必要性に対処するものである。本明細書に記載される抗体／サイトカイン融合体は、サイトカイン療法に付随する大きな障壁を克服するものであり、とりわけ、ＰＤ－１を標的にしたＩＬ－２１サイトカインの抗体と同様の投与及び選択的送達を可能にする。ＩＬ－２１ムテインは、抗ＰＤ－１抗体に融合された場合、ＰＤ－１発現Ｔ細胞をｉｎ　ｖｉｖｏで選択的に活性化させ、増殖させることができる。したがって、本明細書に記載される抗体／サイトカイン融合体は、現在臨床で試験が行われている抗ＰＤ－１療法を改善し、その有用性を広げることができる。

【００２２】

サイトカインと共阻害性受容体アゴニストまたはアンタゴニストとの組み合わせは、毒性が増大するリスクがあり、複雑な臨床試験設計を要することから、依然として困難である（例えば、Ｏｔｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ　Ｃａｎｃｅｒ　５，１６（２０１７）、及びＨｅｒｍｅｌ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｍｅｔａｓｔａｓｉｓ　Ｒｅｖ　３６，４３－５０（２０１７）参照）。サイトカインに関しては、免疫抑制につながり得る阻害性フィードバック経路の活性化の可能性もある（例えば、Ｐｏｒｔｉｅｌｊｅ　ｅｔ　ａｌ，Ｃｌｉｎ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ　９，７６－８３（２００３）；Ｗａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｉｔｙ　３８，５１４－５２７（２０１３）；及びＭｏｏｒａｄｉａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｏｎｃｏｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　７，ｅ１４２３１７２（２０１８）参照）。インターロイキン－２１（ＩＬ－２１）は、Ｉ型サイトカインであり、共通サイトカイン受容体γ鎖（ｃｇ鎖）サイトカインファミリーのメンバーであり、がん治療に対する有望な免疫療法として浮上してきている。ＩＬ－２１は、活性化ＣＤ４　Ｔ細胞及びナチュラルキラーＴ（ＮＫＴ）細胞によって産生され、共通γ鎖と会合する別個のＩＬ－２１受容体（ＩＬ－２１Ｒ）サブユニットからなるヘテロ二量体受容体複合体を介してシグナルを伝達する（例えば、Ｓｐｏｌｓｋｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ　Ｒｅｖ　Ｄｒｕｇ　Ｄｉｓｃｏｖ　１３，３７９－３９５（２０１４）参照）。ＩＬ－２

１Ｒ複合体の活性化は、ＪＡＫ／ＳＴＡＴシグナル伝達経路の活性化につながる。ＩＬ－２１Ｒは、Ｔリンパ球及びＢリンパ球を含む造血細胞、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞ならびに骨髄細胞で広く発現している。ＩＬ－２１は、必須の成長因子または分化因子ではないが、ＮＫ細胞及び活性化Ｔ細胞にとって、強力なマイトジェンであり、生存因子である。ＩＬ－２１は、ＣＤ４（＋）Ｔヘルパー１７（Ｔｈ１７）及び濾胞性ヘルパーＴ細胞（Ｔｆｈ）の分化を支援することができ、制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）の分化に拮抗することができる。更に、ＩＬ－２１は、ＣＤ８　Ｔ細胞の生存を増強し、活性化の程度は低いがより持続的なＴ細胞表現型を維持することができ、これにより、高度な腫瘍制御及びウイルス制御が可能となる。

【００２３】

サイトカイン免疫療法の難しい側面は、免疫応答を強化するために免疫細胞を活性化するだけでなく、同じサイトカインが逆の抑制性経路も同様に活性化し得ることである。例えば、ＩＬ－２及びＩＦＮγは、防御免疫応答ならびに制御性Ｔ細胞応答及び抑制性経路（ＰＤ－Ｌ１経路）をそれぞれ活性化することができる。樹状細胞（ＤＣ）において、ＩＬ－２１は、ＤＣの成熟と活性化の両方を阻害することができ、通常型ＤＣのアポトーシスを誘導することができ、混合培養物中のＴ細胞のプライミングを強力に阻害することができ、耐性の誘導に役割を果たす可能性がある。ヒトにおいて、ＩＬ－２１は、いくつかのがんの適応症で標的化されていないフリーのサイトカインとして試験されているが、このアプローチの開発は、有望な前臨床データ及び初期第Ｉ相臨床データにもかかわらず、第ＩＩ相試験以降進んでいない。（例えば、Ｔｈｏｍｐｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｃｌｉｎ　Ｏｎｃｏｌ　２６，２０３４－２０３９（２００８）；及びＤａｖｉｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｌｉｎ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ　１５，２１２３－２１２９（２００９）参照）。より最近の前臨床モデルでは、組み換えＩＬ－２１サイトカインと共抑制性受容体アンタゴニスト（例えば、抗ＣＴＬＡ－４及び抗ＰＤ－１）とを組み合わせると、ＩＬ－２１により、これらの治療の有効性が拡大し得ることが示された。かかる組み合わせは、現在、臨床試験中であるが、臨床的有効性は未だ示されていない（Ｌｅｗｉｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｏｎｃｏｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　７，ｅ１３７７８７３（２０１７））。

【００２４】

理論に束縛されるものではないが、本明細書に記載される抗体／サイトカイン融合体は、ＩＬ－２１の免疫強化活性を利用して有効性を最大にし（毒性及びオフターゲット免疫抑制に対応するために必要不可欠であり得る）、診療所での投与の実行可能性を改善するように設計される。

【００２５】

ＩＬ－２１及びＩＬ－２１ムテイン

インターロイキン－２１（ＩＬ－２１）は、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ＮＫ細胞及び骨髄細胞によって発現されるサイトカインであり、自然免疫細胞及び適応免疫細胞の両方の活性を制御し、Ｔ細胞の生存及びエフェクター機能を改善する。いくつかの第Ｉ相及び第ＩＩ相臨床試験は、黒色腫、腎細胞癌、急性骨髄性白血病、非ホジキンリンパ腫、卵巣癌、大腸癌、全身性エリテマトーデス、クローン病及び関節リウマチを含む、がん、炎症性疾患及び自己免疫疾患の治療に対する治験薬として、ＩＬ－２１を含んでいる。

【００２６】

ＩＬ－２１は、４ヘリックスバンドル構造を有し、単量体として存在する。ヒトにおいて、ＩＬ－２１には、２つのアイソフォームが知られており、そのそれぞれは、１つの前駆体分子に由来する。第１のＩＬ－２１アイソフォームは、１６２アミノ酸（ａａ）を含み、そのうちの最初の２９アミノ酸がシグナルペプチドを構成し、第２のＩＬ－２１アイソフォームは、１５３アミノ酸を含み、第１のアイソフォームと同様に、そのうちの最初の２９アミノ酸がシグナルペプチドを構成する。第１及び第２のＩＬ－２１アイソフォームのアミノ酸配列（シグナルペプチドを含む）は、それぞれ、配列番号２５８及び配列番号２５９として本明細書に記載される。

【００２７】

ＩＬ－２１は、Ｔ細胞、Ｂ細胞及びＮＫ細胞の表面上に発現されるヘテロ二量体ＩＬ－２１受容体（ＩＬ－２１Ｒ）に結合する。ＩＬ－２１Ｒは、ＩＬ－２受容体及びＩＬ－１５受容体と類似の構造であり、これは、これらのサイトカイン受容体のそれぞれが共通γ鎖（γｃ）を含むという点で類似している。γｃに加えて、ＩＬ－２１Ｒは、ＩＬ－２１への結合に重要なα鎖を含む。ヒトＩＬ－２１受容体α鎖には、アイソフォーム１とアイソフォーム２の２つのアイソフォームがある。アイソフォーム１及びアイソフォーム２のアミノ酸配列は、それぞれ配列番号２５６及び２６１として本明細書に記載される。ヒト共通γ鎖のアミノ酸配列は、配列番号２５７として本明細書に記載される。

【００２８】

ＩＬ－２１がＩＬ－２１Ｒに結合すると、Ｊａｋ／ＳＴＡＴシグナル伝達経路が活性化されて、標的遺伝子を活性化する。ＩＬ－２１により誘導されるシグナル伝達は、治療上望ましいものであり得るが、ＩＬ－２１が広範な発現プロファイルを有し、ＩＬ－２１がＣＤ８　Ｔ細胞応答を強化する能力と、抗原提示及びＴ細胞プライミングを抑制する能力とを有するという事実から、シグナル伝達のタイミングと場所に対する熟慮が必要である。本明細書で初めて記載されるデータは、適切な時間と場所でＩＬ－２１シグナル伝達を達成するように慎重に設計されたＩＬ－２１ムテインの使用を支持するものである。

【００２９】

本開示は、配列番号１として本明細書に記載される野生型ＩＬ－２１アミノ酸配列と比較して、少なくとも１つのアミノ酸置換を含む、ＩＬ－２１ムテインを提供する。例えば、ＩＬ－２１ムテインは、少なくとも１つ、かつ３４を超えないアミノ酸置換を含む。例示的な態様において、ＩＬ－２１ムテインは、少なくとも１つ、かつＸを超えないアミノ酸置換を含み、ここで、Ｘは、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３または３４である。例示的な実施形態において、ＩＬ－２１ムテインは、ヒトＩＬ－２１のアミノ酸配列（配列番号１）と１０アミノ酸を超えない、１５アミノ酸を超えない、２０アミノ酸を超えないまたは２５アミノ酸を超えない異なるアミノ酸配列を含む。例示的な実施形態において、ＩＬ－２１ムテインは、ヒトＩＬ－２１のアミノ酸配列（配列番号１）と７アミノ酸を超えないまたは５アミノ酸を超えない異なるアミノ酸配列を含む。例示的な実施形態において、ＩＬ－２１ムテインは、ヒトＩＬ－２１のアミノ酸配列（配列番号１）と３、４、５または６アミノ酸異なるアミノ酸配列を含む。例示的な実施形態において、ＩＬ－２１ムテインは、ヒトＩＬ－２１のアミノ酸配列（配列番号１）と３～６アミノ酸または１～５アミノ酸異なるアミノ酸配列を含む。例示的な実施形態において、ＩＬ－２１ムテインは、ヒトＩＬ－２１のアミノ酸配列（配列番号１）と１または２アミノ酸異なるアミノ酸配列を含む。

【００３０】

例示的な態様において、ＩＬ－２１ムテインは、配列番号２のアミノ酸配列を含み、ここで、配列番号２は、
ＱＧＱＤＸ　ＨＭＸＸＭ　ＸＸＸＸＸ　ＸＶＤＸＬ　ＫＮＸＶＮ　ＤＬＶＰＥ　ＦＬＰＡＰ　ＥＤＶＥＴ　ＮＣＥＷＳ　ＡＦＳＣＦ　ＱＫＡＱＬ　ＫＳＡＮＴ　ＧＮＮＥＸ　ＸＩＸＸＸ　ＸＸＸＬＸ　ＸＸＸＸＸ　ＴＮＡＧＲ　ＲＱＫＨＲ　ＬＴＣＰＳ　ＣＤＳＹＥ　ＫＫＰＰＫ　ＥＦＬＸＸ　ＦＸＸＬＬ　ＸＸＭＸＸ　ＱＨＸＳＳ　ＲＴＨＧＳ　ＥＤＳ（配列番号２）であり、配列中、Ｘは、任意のアミノ酸を表し、ＩＬ－２１ムテインアミノ酸配列は、ヒトＩＬ－２１のアミノ酸配列（配列番号１）と少なくとも１アミノ酸異なる。

【００３１】

したがって、例示的な態様において、ＩＬ－２１ムテインは、配列番号２の配列を含み、ここで、配列番号２は、配列番号２中Ｘで指定される位置の少なくとも１つのアミノ酸が配列番号１と異なる。例示的な態様において、配列番号２を含むＩＬ－２１ムテインは、配列番号１に対して、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％

、少なくとも約９０％の配列同一性を有するか、約９０％を超える（例えば、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％または約９９％を超える）配列同一性を有する。例示的な態様において、ＩＬ－２１ムテインは、配列番号１に対して、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％の配列同一性を有するか、約９０％を超える（例えば、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％または約９９％を超える）配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【００３２】

例示的な実施形態において、ＩＬ－２１ムテインは、野生型ＩＬ－２１アミノ酸配列と比較して少なくとも１つのアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含み、アミノ酸置換（複数可）は、アミノ酸配列のＮ末端の半分以内に存在する。例えば、アミノ酸置換（複数可）は、配列番号１のアミノ酸位置ナンバリングに従って、位置５～２５または８～２３（両端点を含む）以内の位置に存在する。

【００３３】

例示的な実施形態において、ＩＬ－２１ムテインは、野生型ＩＬ－２１アミノ酸配列と比較して少なくとも１つのアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含み、アミノ酸置換（複数可）は、アミノ酸配列のＣ末端の半分以内に存在する。例えば、アミノ酸置換（複数可）は、配列番号１のアミノ酸位置ナンバリングに従って、位置１００～１３３または１０９～１２３（両端点を含む）以内の位置に存在する。

【００３４】

例示的な実施形態において、ＩＬ－２１ムテインは、野生型ＩＬ－２１アミノ酸配列と比較して少なくとも１つのアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含み、アミノ酸置換（複数可）は、アミノ酸配列の中央の１／３に存在する。例えば、アミノ酸置換（複数可）は、配列番号１のアミノ酸位置ナンバリングに従って、位置５５～８５または６５～８０（両端点を含む）以内の位置に存在する。

【００３５】

本開示はまた、配列番号１として本明細書に記載される野生型ＩＬ－２１アミノ酸配列と比較して、アミノ酸置換を１つのみ含む、ＩＬ－２１ムテインを提供する。例示的な態様において、アミノ酸置換は、配列番号１のアミノ酸位置ナンバリングに従って、５、８、９、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１９、２３、６５、６６、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７５、７６、７７、７８、７９、８０、１０９、１１０、１１２、１１３、１１６、１１７、１１９、１２０または１２３からなる群から選択される１つのアミノ酸位置に位置する。他の例示的な態様において、アミノ酸置換は、配列番号１のアミノ酸位置ナンバリングに従って、５、８、９、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１９、２３、６５、６６、６８、６９、７０、７２、７３、７５、７６、７７、７８、７９、８０、１０９、１１０、１１２、１１３、１１６、１１７、１１９、１２０または１２３からなる群から選択される１つのアミノ酸位置に位置する。更に他の例示的な態様において、ＩＬ－２１ムテインは、配列番号３～２１及び２３～３７のアミノ酸配列のいずれか１つを含む。

【００３６】

本開示は、更に、配列番号１と比較してアミノ酸置換を２つのみ含む、ＩＬ－２１ムテインを提供する。例示的な態様において、アミノ酸置換は、配列番号１のアミノ酸位置ナンバリングに従って、５、８、９、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１９、２３、６５、６６、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７５、７６、７７、７８、７９、８０、１０９、１１０、１１２、１１３、１１６、１１７、１１９、１２０または１２３からなる群から選択される２つのアミノ酸位置に位置する。他の例示的な態様において、アミノ酸置換は、配列番号１のアミノ酸位置ナンバリングに従って、５、９、１５、７０、７１、７２、７３及び７６からなる群から選択される２つのアミノ酸位置に位置する。更に他の例示的な態様において、アミノ酸置換は、配列番号１のアミノ酸位置ナンバリング

に従って、５、９、７３及び７６からなる群から選択される２つのアミノ酸位置に位置する。例示的な態様において、２つのアミノ酸置換のうちの少なくとも１つは、配列番号１のアミノ酸位置ナンバリングに従って、位置７６に位置する。例示的な態様において、ＩＬ－２１ムテインは、配列番号１９９～２０８及び２１０～２１２のアミノ酸配列のいずれか１つを含む。

【００３７】

例示的な実施形態において、ＩＬ－２１ムテインは、野生型ＩＬ－２１アミノ酸配列と比較して少なくとも１つのアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含み、アミノ酸置換（複数可）は、保存的アミノ酸置換（複数可）である。本明細書で使用されるとき、「保存的アミノ酸置換」という用語は、あるアミノ酸を、類似した性質（例えば、大きさ、電荷、疎水性、親水性及び／または芳香族性）を有する、別のアミノ酸で置換することを指し、次の５つの群のうちの１つのなかでの入れ替えを含む。

Ｉ．非極性またはわずかに極性の小さな脂肪族残基：Ａｌａ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ｐｒｏ、Ｇｌｙ；

ＩＩ．負の電荷を持つ極性残基ならびにそれらのアミド及びエステル：Ａｓｐ、Ａｓｎ、Ｇｌｕ、Ｇｌｎ、システイン酸及びホモシステイン酸；

ＩＩＩ．正の電荷を持つ極性残基：Ｈｉｓ、Ａｒｇ、Ｌｙｓ；オルニチン（Ｏｒｎ）

ＩＶ．非極性の大きな脂肪族残基：Ｍｅｔ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、Ｖａｌ、Ｃｙｓ、ノルロイシン（Ｎｌｅ）、ホモシステイン

Ｖ．大きな芳香族残基：Ｐｈｅ、Ｔｙｒ、Ｔｒｐ、アセチルフェニルアラニン。

【００３８】

例示的な実施形態において、ＩＬ－２１ムテインは、野生型ＩＬ－２１アミノ酸配列と比較して少なくとも１つのアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含み、アミノ酸置換（複数可）は、非保存的アミノ酸置換（複数可）である。本明細書で使用されるとき、「非保存的アミノ酸置換」という用語は、本明細書中、あるアミノ酸を、異なる性質（例えば、大きさ、電荷、疎水性、親水性及び／または芳香族性）を有する、別のアミノ酸で置換することと定義され、上の５つの群から外れる入れ替えを含む。

【００３９】

例示的な態様において、ＩＬ－２１ムテインは、野生型ＩＬ－２１アミノ酸配列と比較して少なくとも１つのアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含み、置換アミノ酸は、天然アミノ酸である。「天然アミノ酸」または「標準アミノ酸」または「カノニカルアミノ酸」とは、真核生物で認められる、普遍的遺伝暗号のコドンによって直接コードされる２０個のαアミノ酸（Ａｌａ、Ｖａｌ、Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、Ｍｅｔ、Ｐｈｅ、Ｔｙｒ、Ｔｒｐ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ、Ｃｙｓ、Ｇｌｙ、Ｐｒｏ、Ａｒｇ、Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ａｓｐ、Ｇｌｕ）のうちの１つを意味する。例示的な態様において、ＩＬ－２１ムテインは、野生型ＩＬ－２１アミノ酸配列と比較して少なくとも１つのアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含み、置換アミノ酸は、非標準アミノ酸であるか、翻訳中にタンパク質に組み込まれないアミノ酸である。非標準アミノ酸には、セレノシステイン、ピロリシン、オルニチン、ノルロイシン、β－アミノ酸（例えば、β－アラニン、β－アミノイソ酪酸、β－フェニルアラニン、β－ホモフェニルアラニン、β－グルタミン酸、β－グルタミン、β－ホモトリプトファン、β－ロイシン、β－リシン）、ホモアミノ酸（例えば、ホモフェニルアラニン、ホモセリン、ホモアルギニン、モノシステイン、ホモシスチン）、Ｎ－メチルアミノ酸（例えば、Ｌ－アブリン、Ｎ－メチル－アラニン、Ｎ－メチル－イソロイシン、Ｎ－メチル－ロイシン）、２－アミノカプリル酸、７－アミノセファロスポラン酸、４－アミノケイ皮酸、α－アミノシクロヘキサンプロピオン酸、アミノ－（４－ヒドロキシフェニル）酢酸、４－アミノ－ニコチン酸、３－アミノフェニル酢酸などが挙げられるが、これらに限定されない。

【００４０】

例示的な態様において、本開示のＩＬ－２１ムテインは、ヒトＩＬ－２１のアミノ酸配列（配列番号１）と比較して少なくとも１つのアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含み、

アミノ酸置換は、配列番号１の位置５、８、９、１２、１４、１５、６５、６６、６９、７０、７２、７３、７５、７６、７７、８０、１１６及び１１９のうちの１つ以上にあり、置換アミノ酸（複数可）は、脂肪族アミノ酸である。例示的な態様において、本開示のＩＬ－２１ムテインは、配列番号１と比較してアミノ酸置換を１つのみ含むアミノ酸配列を含み、アミノ酸置換は、配列番号１の位置５、８、９、１２、１４、１５、６５、６６、６９、７０、７２、７３、７５、７６、７７、８０、１１６または１１９にあり、置換アミノ酸は、脂肪族アミノ酸である。

【００４１】

例示的な態様において、本開示のＩＬ－２１ムテインは、ヒトＩＬ－２１のアミノ酸配列（配列番号１）と比較して少なくとも１つのアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含み、アミノ酸置換は、配列番号１の位置５、８、９、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１９、２３、６５、６６、６９、７０、７２、７３、７５、７６、７７、７８、７９、１１０、１１２、１１６、１１７、１１９、１２０または１２３のうちの１つ以上にあり、置換アミノ酸（複数可）は、酸性アミノ酸である。例示的な態様において、本開示のＩＬ－２１ムテインは、配列番号１と比較してアミノ酸置換を１つのみ含むアミノ酸配列を含み、アミノ酸置換は、配列番号１の位置５、８、９、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１９、２３、６５、６６、６９、７０、７２、７３、７５、７６、７７、７８、７９、１１０、１１２、１１６、１１７、１１９、１２０または１２３にあり、置換アミノ酸は、酸性アミノ酸である。

【００４２】

例示的な態様において、本開示のＩＬ－２１ムテインは、ヒトＩＬ－２１のアミノ酸配列（配列番号１）と比較して少なくとも１つのアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含み、アミノ酸置換は、配列番号１の位置５、９、７３、７６、１０９、１１３または１１６のうちの１つ以上にあり、置換アミノ酸（複数可）は、塩基性アミノ酸である。例示的な態様において、本開示のＩＬ－２１ムテインは、配列番号１と比較してアミノ酸置換を１つのみ含むアミノ酸配列を含み、配列番号１の位置５、９、７３、７６、１０９、１１３または１１６のアミノ酸は、塩基性アミノ酸である。

【００４３】

例示的な態様において、本開示のＩＬ－２１ムテインは、ヒトＩＬ－２１のアミノ酸配列（配列番号１）と比較して少なくとも１つのアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含み、アミノ酸置換は、配列番号１の位置５、８、９、７０または７６のうちの１つ以上にあり、置換アミノ酸（複数可）は、芳香族アミノ酸である。例示的な態様において、本開示のＩＬ－２１ムテインは、配列番号１と比較してアミノ酸置換を１つのみ含むアミノ酸配列を含み、アミノ酸置換は、配列番号１の位置５、８、９、７０または７６にあり、置換アミノ酸は、芳香族アミノ酸である。

【００４４】

例示的な態様において、本開示のＩＬ－２１ムテインは、ヒトＩＬ－２１のアミノ酸配列（配列番号１）と比較して少なくとも１つのアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含み、アミノ酸置換は、配列番号１の位置５、８、９、１２、１５、７３、７６、１１６または１１９のうちの１つ以上にあり、置換アミノ酸（複数可）は、側鎖アミドを含むアミノ酸である。例示的な態様において、本開示のＩＬ－２１ムテインは、配列番号１と比較してアミノ酸置換を１つのみ含むアミノ酸配列を含み、アミノ酸置換は、配列番号１の位置５、８、９、１２、１５、７３、７６、１１６または１１９にあり、置換アミノ酸は、側鎖アミドを含むアミノ酸である。

【００４５】

例示的な態様において、本開示のＩＬ－２１ムテインは、ヒトＩＬ－２１のアミノ酸配列（配列番号１）と比較して少なくとも１つのアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含み、アミノ酸置換は、配列番号１の位置５、８、９、１１、１２、１４、１５、７３、７６、１１６または１１９のうちの１つ以上にあり、置換アミノ酸（複数可）は、側鎖ヒドロキシルを含むアミノ酸である。例示的な態様において、本開示のＩＬ－２１ムテインは、配

列番号１と比較してアミノ酸置換を１つのみ含むアミノ酸配列を含み、アミノ酸置換は、配列番号１の位置５、８、９、１１、１２、１４、１５、７３、７６、１１６または１１９にあり、置換アミノ酸は、側鎖ヒドロキシルを含むアミノ酸である。

【００４６】

例示的な態様において、本開示のＩＬ－２１ムテインは、ヒトＩＬ－２１のアミノ酸配列（配列番号１）と比較して少なくとも１つのアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含み、アミノ酸置換は、配列番号１の位置６５、６６、６９、７０、７２、７３、７５、７６、７７または８０のうちの１つ以上にあり、置換アミノ酸（複数可）は、イミノ酸である。例示的な態様において、本開示のＩＬ－２１ムテインは、配列番号１と比較してアミノ酸置換を１つのみ含むアミノ酸配列を含み、アミノ酸置換は、配列番号１の位置６５、６６、６９、７０、７２、７３、７５、７６、７７または８０にあり、置換アミノ酸は、イミノ酸を含むアミノ酸である。

【００４７】

例示的な態様において、本開示のＩＬ－２１ムテインは、ヒトＩＬ－２１のアミノ酸配列（配列番号１）と比較して少なくとも１つのアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含み、アミノ酸置換は、配列番号１の位置５、９、１５、７６、１１６または１１９のうちの１つ以上にあり、置換アミノ酸（複数可）は、イオウ含有側鎖を含むアミノ酸である。例示的な態様において、本開示のＩＬ－２１ムテインは、配列番号１と比較してアミノ酸置換を１つのみ含むアミノ酸配列を含み、アミノ酸置換は、配列番号１の位置５、９、１５、７６、１１６または１１９にあり、置換アミノ酸は、イオウ含有側鎖を含むアミノ酸を含むアミノ酸である。

【００４８】

例示的な態様において、本開示のＩＬ－２１ムテインは、ヒトＩＬ－２１のアミノ酸配列（配列番号１）と比較して少なくとも１つのアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含み、少なくとも１つのアミノ酸置換は、表Ａに示されるものである。

【表１】

表Ａ

配列番号１のアミノ酸位置	置換アミノ酸の例（１文字コード）	例示的な配列番号
5	Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｑ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｙ	３８
8	Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｇ、Ｎ、Ｓ	３９
9	Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｑ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｙ	４０
１１	Ｄ、Ｓ	４１
１２	Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｎ、Ｓ、Ｔ、Ｖ	４２
１３	Ｄ	４３
１４	Ａ、Ｄ、Ｓ	４４
１５	Ａ、Ｅ、Ｉ、Ｍ、Ｎ、Ｑ、Ｓ、Ｔ、Ｖ	４５
１６	Ｄ、Ｅ	４６
１９	Ｄ	４７
２３	Ｄ	４８
６５	Ｄ、Ｇ、Ｐ	４９
６６	Ｄ、Ｇ、Ｐ	５０
６８	Ｑ	５１
６９	Ｄ、Ｇ、Ｐ	５２
７０	Ｅ、Ｇ、Ｐ、Ｙ、Ｔ	５３
７１	Ｌ	５４
７２	Ａ、Ｄ、Ｇ、Ｐ	５５
７３	Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｓ、Ｖ	５６
７５	Ｄ、Ｇ、Ｐ	５８

配列番号１のアミノ酸位置	置換アミノ酸の例（１文字コード）	例示的な配列番号
７６	Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｓ、Ｔ、Ｖ、Ｙ	５９
７７	Ｄ、Ｇ、Ｐ	６０
７８	Ｄ	６１
７９	Ｄ	６２
８０	Ｇ、Ｐ	６３
１０９	Ｋ	６４
１１０	Ｄ	６５
１１２	Ｄ	６６
１１３	Ｋ	６７
１１６	Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｓ、Ｔ、Ｖ	６８
１１７	Ｄ	６９
１１９	Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｍ、Ｎ、Ｑ、Ｓ、Ｔ	７０
１２０	Ｄ	７１
１２３	Ｄ	７２

【００４９】

例示的な態様において、本開示のＩＬ－２１ムテインは、配列番号１と比較してアミノ酸置換を１つのみ含むアミノ酸配列を含み、アミノ酸置換は、表Ａに示されるものである。他の実施形態において、本開示のＩＬ－２１ムテインは、配列番号１と比較して２つのアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含み、アミノ酸置換は、表Ａに示されるもののうちの２つである。

【００５０】

例示的な態様において、本開示のＩＬ－２１ムテインは、表Ｂに示されるアミノ酸配列を含む。

【表２】

表Ｂ

アミノ酸置換	配列番号１のアミノ酸位置	置換アミノ酸	配列番号		アミノ酸置換	配列番号１のアミノ酸位置	置換アミノ酸	配列番号
Ｒ５Ａ	５	Ａ	７３		Ｓ７０Ｅ	７０	Ｅ	１３６
Ｒ５Ｄ	５	Ｄ	７４		Ｓ７０Ｇ	７０	Ｇ	１３７
Ｒ５Ｅ	５	Ｅ	７５		Ｓ７０Ｐ	７０	Ｐ	１３８
Ｒ５Ｇ	５	Ｇ	７６		Ｓ７０Ｙ	７０	Ｙ	１３９
Ｒ５Ｈ	５	Ｈ	７７		Ｓ７０Ｔ	７０	Ｔ	１４０
Ｒ５Ｉ	５	Ｉ	７８		Ｋ７２Ｄ	７２	Ｄ	１４１
Ｒ５Ｋ	５	Ｋ	７９		Ｋ７２Ｇ	７２	Ｇ	１４２
Ｒ５Ｌ	５	Ｌ	８０		Ｋ７２Ｐ	７２	Ｐ	１４３
Ｒ５Ｍ	５	Ｍ	８１		Ｋ７２Ａ	７２	Ａ	１４４
Ｒ５Ｎ	５	Ｎ	８２		Ｋ７３Ａ	７３	Ａ	１４５

アミノ酸置換	配列番号１のアミノ酸位置	置換アミノ酸	配列番号	アミノ酸置換	配列番号１のアミノ酸位置	置換アミノ酸	配列番号
Ｒ５Ｑ	５	Ｑ	８３	Ｋ７３Ｄ	７３	Ｄ	１４６
Ｒ５Ｓ	５	Ｓ	８４	Ｋ７３Ｅ	７３	Ｅ	１４７
Ｒ５Ｔ	５	Ｔ	８５	Ｋ７３Ｇ	７３	Ｇ	１４８
Ｒ５Ｖ	５	Ｖ	８６	Ｋ７３Ｈ	７３	Ｈ	１４９
Ｒ５Ｙ	５	Ｙ	８７	Ｋ７３Ｉ	７３	Ｉ	１５０
Ｉ８Ａ	８	Ａ	８８	Ｋ７３Ｎ	７３	Ｎ	１５１
Ｉ８Ｄ	８	Ｄ	８９	Ｋ７３Ｐ	７３	Ｐ	１５２
Ｉ８Ｅ	８	Ｅ	９０	Ｋ７３Ｑ	７３	Ｑ	１５３
Ｉ８Ｇ	８	Ｇ	９１	Ｋ７３Ｓ	７３	Ｓ	１５４
Ｉ８Ｎ	８	Ｎ	９２	Ｋ７３Ｖ	７３	Ｖ	１５５
Ｉ８Ｓ	８	Ｓ	９３	Ｋ７５Ｄ	７５	Ｄ	１５６
Ｒ９Ａ	９	Ａ	９４	Ｋ７５Ｇ	７５	Ｇ	１５７
Ｒ９Ｄ	９	Ｄ	９５	Ｋ７５Ｐ	７５	Ｐ	１５８
Ｒ９Ｅ	９	Ｅ	９６	Ｒ７６Ａ	７６	Ａ	１５９
Ｒ９Ｇ	９	Ｇ	９７	Ｒ７６Ｄ	７６	Ｄ	１６０
Ｒ９Ｈ	９	Ｈ	９８	Ｒ７６Ｅ	７６	Ｅ	１６１
Ｒ９Ｉ	９	Ｉ	９９	Ｒ７６Ｇ	７６	Ｇ	１６２
Ｒ９Ｋ	９	Ｋ	１００	Ｒ７６Ｈ	７６	Ｈ	１６３
Ｒ９Ｌ	９	Ｌ	１０１	Ｒ７６Ｉ	７６	Ｉ	１６４
Ｒ９Ｍ	９	Ｍ	１０２	Ｒ７６Ｋ	７６	Ｋ	１６５
Ｒ９Ｎ	９	Ｎ	１０３	Ｒ７６Ｌ	７６	Ｌ	１６６
Ｒ９Ｑ	９	Ｑ	１０４	Ｒ７６Ｍ	７６	Ｍ	１６７
Ｒ９Ｓ	９	Ｓ	１０５	Ｒ７６Ｎ	７６	Ｎ	１６８
Ｒ９Ｔ	９	Ｔ	１０６	Ｒ７６Ｐ	７６	Ｐ	１６９
Ｒ９Ｖ	９	Ｖ	１０７	Ｒ７６Ｑ	７６	Ｑ	１７０
Ｒ９Ｙ	９	Ｙ	１０８	Ｒ７６Ｓ	７６	Ｓ	１７１
Ｒ１１Ｄ	１１	Ｄ	１０９	Ｒ７６Ｔ	７６	Ｔ	１７２

アミノ酸置換	配列番号１のアミノ酸位置	置換アミノ酸	配列番号	アミノ酸置換	配列番号１のアミノ酸位置	置換アミノ酸	配列番号
Ｒ１１Ｓ	１１	Ｓ	１１０	Ｒ７６Ｖ	７６	Ｖ	１７３
Ｑ１２Ａ	１２	Ａ	１１１	Ｒ７６Ｙ	７６	Ｙ	１７４
Ｑ１２Ｄ	１２	Ｄ	２４９	Ｋ７７Ｄ	７７	Ｄ	１７５
Ｑ１２Ｅ	１２	Ｅ	２５０	Ｋ７７Ｇ	７７	Ｇ	１７６
Ｑ１２Ｎ	１２	Ｎ	２５１	Ｋ７７Ｐ	７７	Ｐ	１７７
Ｑ１２Ｓ	１２	Ｓ	２５２	Ｐ７８Ｄ	７８	Ｄ	６１
Ｑ１２Ｔ	１２	Ｔ	２５３	Ｐ７９Ｄ	７９	Ｄ	６２
Ｑ１２Ｖ	１２	Ｖ	２５４	Ｓ８０Ｇ	８０	Ｇ	１７８
Ｌ１３Ｄ	１３	Ｄ	１１２	Ｓ８０Ｐ	８０	Ｐ	１７９
Ｉ１４Ａ	１４	Ａ	１１４	Ｅ１０９Ｋ	１０９	Ｋ	６４
Ｉ１４Ｄ	１４	Ｄ	１１５	Ｒ１１０Ｄ	１１０	Ｄ	６５
Ｉ１４Ｓ	１４	Ｓ	１１６	Ｋ１１２Ｄ	１１２	Ｄ	６６
Ｄ１５Ａ	１５	Ａ	１１７	Ｓ１１３Ｋ	１１３	Ｋ	６７
Ｄ１５Ｅ	１５	Ｅ	１１８	Ｑ１１６Ａ	１１６	Ａ	１８０
Ｄ１５Ｉ	１５	Ｉ	１１９	Ｑ１１６Ｄ	１１６	Ｄ	１８１
Ｄ１５Ｍ	１５	Ｍ	１２０	Ｑ１１６Ｅ	１１６	Ｅ	１８２
Ｄ１５Ｎ	１５	Ｎ	１２１	Ｑ１１６Ｉ	１１６	Ｉ	１８３
Ｄ１５Ｑ	１５	Ｑ	１２２	Ｑ１１６Ｋ	１１６	Ｋ	１８４
Ｄ１５Ｓ	１５	Ｓ	１２３	Ｑ１１６Ｌ	１１６	Ｌ	１８５

アミノ酸置換	配列番号１のアミノ酸位置	置換アミノ酸	配列番号	アミノ酸置換	配列番号１のアミノ酸位置	置換アミノ酸	配列番号
Ｄ１５Ｔ	１５	Ｔ	２８３	Ｑ１１６Ｍ	１１６	Ｍ	１８６
Ｄ１５Ｖ	１５	Ｖ	１２４	Ｑ１１６Ｎ	１１６	Ｎ	１８７
Ｉ１６Ｄ	１６	Ｄ	１２５	Ｑ１１６Ｓ	１１６	Ｓ	１８８
Ｉ１６Ｅ	１６	Ｅ	１２６	Ｑ１１６Ｔ	１１６	Ｔ	１８９
Ｑ１９Ｄ	１９	Ｄ	４７	Ｑ１１６Ｖ	１１６	Ｖ	１９０
Ｙ２３Ｄ	２３	Ｄ	４８	Ｋ１１７Ｄ	１１７	Ｄ	６９
Ｒ６５Ｄ	６５	Ｄ	１２７	Ｉ１１９Ａ	１１９	Ａ	１９１
Ｒ６５Ｇ	６５	Ｇ	１２８	Ｉ１１９Ｄ	１１９	Ｄ	１９２
Ｒ６５Ｐ	６５	Ｐ	１２９	Ｉ１１９Ｅ	１１９	Ｅ	１９３
Ｉ６６Ｄ	６６	Ｄ	１３０	Ｉ１１９Ｍ	１１９	Ｍ	１９４
Ｉ６６Ｇ	６６	Ｇ	１３１	Ｉ１１９Ｎ	１１９	Ｎ	１９５
Ｉ６６Ｐ	６６	Ｐ	１３２	Ｉ１１９Ｑ	１１９	Ｑ	１９６
Ｎ６８Ｑ	６８	Ｑ	５１	Ｉ１１９Ｓ	１１９	Ｓ	１９７
Ｖ６９Ｄ	６９	Ｄ	１３３	Ｉ１１９Ｔ	１１９	Ｔ	１９８
Ｖ６９Ｇ	６９	Ｇ	１３４	Ｈ１２０Ｄ	１２０	Ｄ	７１
Ｖ６９Ｐ	６９	Ｐ	１３５	Ｌ１２３Ｄ	１２３	Ｄ	７２

【００５１】

例示的な実施形態において、本開示のＩＬ－２１ムテインは、配列番号４７、４８、５１、６１、６２、６４～６７、６９、７１～１１２、１１４～１９８、２４９～２５４または２８３のうちのいずれかのアミノ酸配列を含む。例示的な態様において、ＩＬ－２１ムテインは、配列番号４７、４８、５１、６１、６２、６４～６７、６９、７１～１１２、１１４～１９８、２４９～２５４または２８３のうちの１つに対して、少なくとも少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少な

くとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％の配列同一性であるか、９０％を超える（例えば、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％または約９９％を超える）配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【００５２】

本開示は、配列番号１と比較してアミノ酸置換を２つのみ含むＩＬ－２１ムテインを更に提供し、２つのアミノ酸置換は、配列番号１の位置５、９、１５、７０、７１、７２、７３及び７６のうちの２つに存在する。例示的な態様において、ＩＬ－２１ムテインは、配列番号１と比較してアミノ酸置換を２つのみ含み、２つの置換は、５と７６；９と７６；１５と７０；１５と７１；１５と７２；１５と７３；７０と７３；７０と７６；７１と７３；７１と７６；７２と７３；７２と７６；及び７３と７６からなる群から選択されるアミノ酸位置の対に存在する。例示的な態様において、ＩＬ－２１は、配列番号１９９～２０８及び２１０～２１２のアミノ酸配列のいずれか１つを含む。他の態様において、本開示は、配列番号１と比較してアミノ酸置換を２つのみ含むＩＬ－２１ムテインを更に提供し、２つのアミノ酸置換は、位置５、９、７３及び７６または配列番号１のうちの２つに存在する。例示的な態様において，置換のうちの１つは、配列番号１の位置７６に存在する。例示的な態様において、配列番号１の位置７６の置換アミノ酸は、脂肪族アミノ酸または酸性アミノ酸である。例示的な態様において、脂肪族アミノ酸は、アラニンである。例示的な態様において、酸性アミノ酸は、アスパラギン酸またはグルタミン酸である。例示的な態様において、酸性アミノ酸は、グルタミン酸である。例示的な態様において、ＩＬ－２１ムテインは、配列番号１の位置７６にある置換アミノ酸と、位置５、９または７３にある脂肪族アミノ酸または酸性アミノ酸とを含む。例示的な態様において、位置５、９または７３にある置換アミノ酸は、脂肪族アミノ酸、酸性アミノ酸、または側鎖アミドを含むアミノ酸である。例示的な態様において、脂肪族アミノ酸は、アラニンであり、酸性アミノ酸は、グルタミン酸であり、側鎖アミドを含むアミノ酸は、グルタミンである。例示的な態様において、ＩＬ－２１ムテインは、配列番号１の位置７６にある置換アミノ酸（任意選択により脂肪族アミノ酸または酸性アミノ酸）と、位置５または９にある置換アミノ酸とを含む（配列番号１のナンバリングに従う）。

【００５３】

例示的な態様において、本開示のＩＬ－２１ムテインは、表Ｃに示される配列番号のいずれか１つのアミノ酸配列を含む。

【表３】
表Ｃ

アミノ酸置換	配列番号１の第１のアミノ酸位置	第１の置換アミノ酸	配列番号１の第２のアミノ酸位置	第２の置換アミノ酸	配列番号
Ｒ５Ｅ、Ｒ７６Ｅ	５	Ｅ	７６	Ｅ	２３９
Ｒ５Ｅ、Ｒ７６Ａ	５	Ｅ	７６	Ａ	２３８
Ｒ５Ａ、Ｒ７６Ａ	５	Ａ	７６	Ａ	２３６
Ｒ５Ｑ、Ｒ７６Ａ	５	Ｑ	７６	Ａ	２４０
Ｒ５Ａ、Ｒ７６Ｅ	５	Ａ	７６	Ｅ	２３７
Ｒ５Ｑ、Ｒ７６Ｅ	５	Ｑ	７６	Ｅ	２４１
Ｒ９Ｅ、Ｒ７６Ｅ	９	Ｅ	７６	Ｅ	２４５
Ｒ９Ａ、Ｒ７６Ｅ	９	Ａ	７６	Ｅ	２４３
Ｒ９Ｅ、Ｒ７６Ａ	９	Ｅ	７６	Ａ	２４４
Ｒ９Ａ、Ｒ７６Ａ	９	Ａ	７６	Ａ	２４２
Ｄ１５Ｎ、Ｓ７０Ｔ	１５	Ｎ	７０	Ｔ	２１３
Ｄ１５Ｎ、Ｉ７１Ｌ	１５	Ｎ	７１	Ｌ	２１４
Ｄ１５Ｎ、Ｋ７２Ａ	１５	Ｎ	７２	Ａ	２１５
Ｄ１５Ｎ、Ｋ７３Ａ	１５	Ｎ	７３	Ａ	２１６
Ｓ７０Ｔ、Ｋ７３Ｑ	７０	Ｔ	７３	Ｑ	２１９
Ｓ７０Ｔ、Ｒ７６Ａ	７０	Ｔ	７６	Ａ	２４６
Ｓ７０Ｔ、Ｒ７６Ｄ	７０	Ｔ	７６	Ｄ	２４７
Ｓ７０Ｔ、Ｒ７６Ｅ	７０	Ｔ	７６	Ｅ	２４８
Ｉ７１Ｌ、Ｋ７３Ｑ	７１	Ｌ	７３	Ｑ	２１７
Ｉ７１Ｌ、Ｒ７６Ａ	７１	Ｌ	７６	Ａ	２２７
Ｉ７１Ｌ、Ｒ７６Ｄ	７１	Ｌ	７６	Ｄ	２２８
Ｉ７１Ｌ、Ｒ７６Ｅ	７１	Ｌ	７６	Ｅ	２２９
Ｋ７２Ａ、Ｋ７３Ｑ	７２	Ａ	７３	Ｑ	２１８
Ｋ７２Ａ、Ｒ７６Ａ	７２	Ａ	７６	Ａ	２３０
Ｋ７２Ａ、Ｒ７６Ｄ	７２	Ａ	７６	Ｄ	２３１
Ｋ７２Ａ、Ｒ７６Ｅ	７２	Ａ	７６	Ｅ	２３２
Ｋ７３Ａ、Ｒ７６Ａ	７３	Ａ	７６	Ａ	２３３
Ｋ７３Ａ、Ｒ７６Ｄ	７３	Ａ	７６	Ｄ	２３４
Ｋ７３Ａ、Ｒ７６Ｅ	７３	Ａ	７６	Ｅ	２３５

【００５４】
例示的な態様において、ＩＬ－２１ムテインは、配列番号２１３～２１９及び２２７～２４８からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。例示的な態様において、ＩＬ－２１は、配列番号２１３～２１９及び２２７～２４８のうちの１つに対して、少なくとも少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％の配列同一性であるか、約９０％を超える（例えば、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％または約９９％を超える）配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。
【００５５】

ペプチド長

本明細書に記載されるＩＬ－２１ムテインは、任意数のアミノ酸ペプチド骨格を含むことができ、すなわち、任意のペプチド長であってよい。いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるペプチドは、配列番号１とほぼ同じ長さであり、すなわち、１３３（±約１～約２０、±約１～約１５、±約１～約１０または±約１～約５）アミノ酸長である。いくつかの実施形態において、本開示のペプチドは、本明細書に更に記載されるように、別のポリペプチド鎖、例えば、約４００～約６００アミノ酸を含む抗体重鎖、約１５０～約３００アミノ酸を含む抗体軽鎖に融合されることにより、１３３アミノ酸長よりも長い。

【００５６】

追加のペプチド修飾

本開示の代替的または追加的実施形態において、ＩＬ－２１ムテインは、本明細書に更に記載されるように、脂質化（例えば、ミリトイル化、パルミトイル化）、グリコシル化、アミド化、カルボキシル化、リン酸化、エステル化、アシル化、アセチル化、環化もしくは酸付加塩への変換、かつ／または任意選択により二量体化もしくは重合体化もしくはコンジュゲート化される。

【００５７】

薬学的に許容される塩

例示的な態様において、ＩＬ－２１ムテインは、塩、例えば、薬学的に許容される塩の形態である。そのような塩は、ＩＬ－２１ムテインの最終的な単離及び精製中にｉｎ　ｓｉｔｕで調製することもできるし、遊離塩基官能基を適切な酸と反応させることによって別々に調製することもできる。薬学的に許容される酸付加塩を形成するために利用することができる酸の例には、例えば、無機酸（例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸及びリン酸）及び有機酸（例えば、シュウ酸、マレイン酸、コハク酸及びクエン酸）が挙げられる。

【００５８】

代表的な酸付加塩には、酢酸塩、アジピン酸塩、アルギン酸塩、クエン酸塩、アスパラギン酸塩、安息香酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、硫酸水素塩、酪酸塩、ショウノウ酸塩、カンファースルホン酸塩、ジグルコン酸塩、グリセロリン酸塩、ヘミ硫酸塩、ヘプタン酸塩、ヘキサン酸塩、フマル酸塩、塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、２－ヒドロキシエタンスルホン酸塩（イソチオン酸塩）、乳酸塩、マレイン酸塩、メタンスルホン酸塩、ニコチン酸塩、２－ナフタレンスルホン酸塩、シュウ酸塩、パルミチン酸塩、ペクチン酸塩、過硫酸塩、３－フェニルプロピオン酸塩、ピクリン酸塩、ピバル酸塩、プロピオン酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、チオシアン酸、リン酸塩、グルタミン酸塩、炭酸水素塩、ｐ－トルエンスルホン酸塩及びウンデカン酸塩が挙げられるが、これらに限定されない。

【００５９】

塩基性付加塩もまた、ＩＬ－２１ムテインの最終的な単離及び精製中にｉｎ　ｓｉｔｕで調製することもできるし、カルボン酸含有部分を、薬学的に許容される金属カチオンの水酸化物、炭酸塩もしくは炭酸水素塩などの好適な塩基と、またはアンモニアもしくは有機一級、二級もしくは三級アミンと反応させることによって調製することもできる。薬学的に許容される塩には、とりわけ、リチウム、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム及びアルミニウム塩などのアルカリ金属またはアルカリ土類金属、ならびにアンモニウム、テトラメチルアンモニウム、テトラエチルアンモニウム、メチルアンモニウム、ジメチルアンモニウム、トリメチルアンモニウム、トリエチルアンモニウム、ジエチルアンモニウム及びエチルアンモニウムを含む、非毒性四級アンモニア及びアミンカチオンに基づくカチオンが挙げられるが、これらに限定されない。塩基付加塩の形成に有用な他の代表的な有機アミンには、例えば、エチレンジアミン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、ピペリジン、ピペラジンなどが挙げられる。

【００６０】

更に、塩基性窒素含有基は、塩化、臭化及びヨウ化メチル、エチル、プロピル及びブチルなどのハロゲン化低級アルキル；塩化、臭化及びヨウ化デシル、ラウリル、ミリスチル

及びステアリルなどの長鎖ハロゲン化物；臭化ベンジル及び臭化フェネチルなどのハロゲン化アリールアルキルなどの活性化剤で四級化することができる。これにより、水溶性または油溶性または分散性の生成物が得られる。

【００６１】

精製

本開示のＩＬ－２１ムテインは、精製することができる。本明細書で使用される「精製された」という用語は、純度が高められたことを意味し、「純度」は、相対的な用語であり、必ずしも完全に純粋であると解釈されるものではない。例示的な態様において、化合物の純度（例えば、組成物内）は、少なくとも５０％もしくは約５０％、少なくとも６０％もしくは約６０％、少なくとも７０％もしくは約７０％、少なくとも８０％もしくは約８０％、少なくとも９０％もしくは約９０％、少なくとも９５％もしくは約９５％、または少なくとも９８％もしくは約９８％であるか、約１００％である。

【００６２】

ペプチド模倣物

いくつかの態様において、ＩＬ－２１ムテインは、ペプチド模倣物であるか、ムテインの少なくとも一部は、ペプチド模倣物である。ペプチド模倣物及びその作製方法は、当該技術分野において知られている。例えば、Ａｄｖａｎｃｅｓ ｉｎ Ａｍｉｎｏ Ａｃｉｄ Ｍｉｍｅｔｉｃｓ ａｎｄ Ｐｅｐｔｉｄｏｍｉｍｅｔｉｃｓ，Ｖｏｌｕｍｅｓ １ ａｎｄ ２，ｅｄ.，Ａｂｅｌｌ，Ａ.，ＪＡＩ Ｐｒｅｓｓ Ｉｎｃ.，Ｇｒｅｅｎｗｉｃｈ，ＣＴ，２００６を参照されたい。いくつかの態様において、ペプチド模倣物は、Ｄ－異性体アミノ酸を含むＤ－ペプチドのペプチド模倣物である。いくつかの態様において、ペプチド模倣物は、アミノ酸の側鎖がペプチド骨格のα窒素原子に接続している、ペプトイドである。ペプトイドの作製方法は、当該技術分野において知られている。例えば、Ｚｕｃｋｅｒｍａｎｎ ｅｔ ａｌ.，ＪＡＣＳ １１４（２６）：１０６４６－１０６４７（１９９２）及びＤｅｓｉｇｎ，Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，ａｎｄ Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ ｏｆ Ｎｏｖｅｌ Ｐｅｐｔｏｉｄｓ，Ｆｏｗｌｅｒ，Ｓａｒａｈ，Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ－Ｍａｄｉｓｏｎ，２００８を参照されたい。いくつかの態様において、ペプチド模倣物は、α炭素ではなくβ炭素に結合したアミノ基を有するβアミノ酸を含む、β－ペプチドである。β－ペプチドの作製方法は、当該技術分野において知られている。例えば、Ｓｅｅｂａｃｈ ｅｔ ａｌ.，Ｈｅｌｖｅｔｉｃａ Ｃｈｉｍｉｃａ Ａｃｔａ ７９（４）：９１３－９４１（１９９６）を参照されたい。

【００６３】

結合特性

例示的な実施形態において、ＩＬ－２１ムテインは、ＩＬ－２１受容体（ＩＬ－２１Ｒ）に対する野生型ＩＬ－２１の親和性と比較して低い親和性でＩＬ－２１Ｒに結合する。例示的な実施形態において、ＩＬ－２１ムテインは、ヒトＩＬ－２１Ｒに対する野生型ヒトＩＬ－２１の親和性と比較して低い親和性でヒトＩＬ－２１Ｒに結合する。例示的な実施形態において、ＩＬ－２１ムテインは、ヒトＩＬ－２１Ｒのα鎖に対する野生型ヒトＩＬ－２１の親和性と比較して低い親和性でヒトＩＬ－２１Ｒのα鎖に結合する。具体的な実施形態において、ヒトＩＬ－２１Ｒのα鎖に対する野生型ヒトＩＬ－２１の親和性と比較して低い親和性でヒトＩＬ－２１Ｒのα鎖に結合するＩＬ－２１ムテインは、配列番号１のアミノ酸位置ナンバリングに従って、５、８、９、１２、１３、１６、１９、２３、６５、６６、６９、７０、７２、７３、７５、７６、７７、７８、７９及び８０からなる群から選択されるアミノ酸位置に位置する１つ、２つまたはそれ以上の置換を含有する。当該位置に行うことができる具体的なアミノ酸置換は、本明細書で記載されている（例えば、表Ａ、Ｂ及びＣ参照）。

【００６４】

例示的な実施形態において、ＩＬ－２１ムテインは、ヒトＩＬ－２１Ｒのγ鎖に対する野生型ヒトＩＬ－２１の親和性と比較して低い親和性でヒトＩＬ－２１Ｒのγ鎖に結合す

る。具体的な実施形態において、ヒトＩＬ－２１Ｒのγ鎖に対する野生型ヒトＩＬ－２１の親和性と比較して低い親和性でヒトＩＬ－２１Ｒのγ鎖に結合するＩＬ－２１ムテインは、配列番号１のアミノ酸位置ナンバリングに従って、１１、１４、１５、１０９、１１０、１１２、１１３、１１６、１１７、１１９、１２０及び１２３からなる群から選択されるアミノ酸位置に位置する１つ、２つまたはそれ以上の置換を含有する。当該位置に行うことができる具体的なアミノ酸置換は、本明細書で記載されている（例えば、表Ａ、Ｂ及びＣ参照）。

【００６５】

例示的な実施形態において、ＩＬ－２１ムテインは、ヒトＩＬ－２１Ｒのα鎖に対する野生型ヒトＩＬ－２１の親和性と比較して低い親和性でヒトＩＬ－２１Ｒのγ鎖に結合する。例示的な実施形態において、ＩＬ－２１ムテインは、カニクイザルＩＬ－２１Ｒに対する野生型カニクイザルＩＬ－２１の親和性と比較して低い親和性でカニクイザルＩＬ－２１Ｒに結合する。例示的な実施形態において、ＩＬ－２１ムテインは、カニクイザルＩＬ－２１Ｒのα鎖に対する野生型カニクイザルＩＬ－２１の親和性と比較して低い親和性でカニクイザルＩＬ－２１Ｒのα鎖に結合する。例示的な実施形態において、ＩＬ－２１ムテインは、カニクイザルＩＬ－２１Ｒのγ鎖に対する野生型カニクイザルＩＬ－２１の親和性と比較して低い親和性でカニクイザルＩＬ－２１Ｒのγ鎖に結合する。例示的な実施形態において、ＩＬ－２１ムテインは、カニクイザルＩＬ－２１Ｒのα鎖に対する野生型カニクイザルＩＬ－２１の親和性と比較して低い親和性でカニクイザルＩＬ－２１Ｒのγ鎖に結合する。

【００６６】

本明細書で提供されるＩＬ－２１ムテインは、非共有結合的かつ可逆的にＩＬ－２１Ｒに結合する。例示的な実施形態において、ＩＬ－２１Ｒに対するムテインの結合の強さは、その親和性、すなわち、ムテインの結合部位とＩＬ－２１Ｒとの間の相互作用の強さの尺度で表すことができる。例示的な態様において、本明細書で提供されるＩＬ－２１ムテインは、ＩＬ－２１Ｒに対して高親和性を有し、したがって、低親和性のＩＬ－２１ムテインよりも短い時間でより多量のＩＬ－２１Ｒに結合する。例示的な態様において、本明細書で提供されるＩＬ－２１ムテインは、ＩＬ－２１Ｒに対して低親和性を有し、したがって、高親和性ＩＬ－２１ムテインよりも長い時間でより少量のＩＬ－２１Ｒに結合する。例示的な態様において、ＩＬ－２１ムテインは、少なくとも$10^{5}M^{-1}$、少なくとも$10^{6}M^{-1}$、少なくとも$10^{7}M^{-1}$、少なくとも$10^{8}M^{-1}$、少なくとも$10^{9}M^{-1}$、または少なくとも$10^{10}M^{-1}$である平衡結合定数ＫＡを有する。当業者によって理解されるように、ＫＡは、ｐＨ、温度及び緩衝液の組成などの因子による影響を受け得る。

【００６７】

例示的な実施形態において、ＩＬ－２１Ｒに対するＩＬ－２１ムテインの結合の強さは、感度で表すことができる。K_Dは、ＩＬ－２１ムテイン及びＩＬ－２１Ｒとの間のk_{off}/k_{on}の比である平衡解離定数である。K_D及びＫＡは、逆の関係にある。K_D値は、ムテインの濃度（特定の実験に必要とされるムテインの量）に関係することから、K_D値が小さいほど（必要とされる濃度が低いほど）ムテインの親和性は高くなる。例示的な態様において、ＩＬ－２１Ｒに対するＩＬ－２１ムテインの結合の強さは、K_Dで記述することができる。例示的な態様において、本明細書で提供されるＩＬ－２１ムテインのK_Dは、約10^{-1}Ｍ、約10^{-2}Ｍ、約10^{-3}Ｍ、約10^{-4}Ｍ、約10^{-5}Ｍ、約10^{-6}Ｍまたはそれ以下である。例示的な態様において、本明細書で提供されるＩＬ－２１ムテインのK_Dは、マイクロモル、ナノモル、ピコモルまたはフェムトモルである。例示的な態様において、本明細書で提供されるＩＬ－２１ムテインのK_Dは、約10^{-4}～10^{-6}Ｍ、または10^{-7}～10^{-9}Ｍ、または10^{-10}～10^{-12}Ｍ、または10^{-13}～10^{-15}Ｍの範囲内である。例示的な態様において、ＩＬ－２１ムテインは、０．０４ｎＭよりも高いK_D、または約０．０４ｎＭのK_Dで、ヒトＩＬ－２１Ｒに結合する。例示的な態様において、ＩＬ－２１ムテインは、約０．０１ｎＭ～約２０ｎＭ

、０．０２ｎＭ～２０ｎＭ、０．０５ｎＭ～２０ｎＭ、０．０５ｎＭ～１５ｎＭ、０．１ｎＭ～１５ｎＭ、０．１ｎＭ～１０ｎＭ、１ｎＭ～１０ｎＭ、または５ｎＭ～１０ｎＭのK_DでヒトＩＬ－２１Ｒに結合する。例示的な態様において、ＩＬ－２１ムテインは、０．０５５ｎＭよりも高いK_D、または約０．０５５ｎＭのK_Dで、カニクイザルＩＬ－２１Ｒに結合する。例示的な態様において、ＩＬ－２１ムテインは、約０．０１ｎＭ～約２０ｎＭ、０．０２ｎＭ～２０ｎＭ、０．０５ｎＭ～２０ｎＭ、０．０５ｎＭ～１５ｎＭ、０．１ｎＭ～１５ｎＭ、０．１ｎＭ～１０ｎＭ、１ｎＭ～１０ｎＭ、または５ｎＭ～１０ｎＭのK_DでカニクイザルＩＬ－２１Ｒに結合する。

【００６８】

例示的な実施形態において、ＩＬ－２１ムテインは、ＩＬ－２１Ｒα鎖に対する結合親和性の低下を示す。例示的な態様において、ＩＬ－２１ムテインは、ＩＬ－２１Ｒα鎖に対する結合親和性が約２、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１０５、１１０、１１５、１２０、１２５、１３０、１３５、１４０、１４５、１５０、１７５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３２５、３５０、３７５、４００、４２５、４５０、４７５、５００、５２５、５５０、５７５、６００、６２５、６５０、６７５、７００、７２５、７５０、７７５、８００、８２５、８５０、８７５、９００、９２５、９５０、９７５倍、１０００倍またはそれ以上の低下を示すムテイン（例えば、シングルまたはダブル）である。例示的な態様において、ＩＬ－２１ムテインは、ＩＬ－２１Ｒα鎖に対する結合親和性の低下を示す、ダブルムテインである。

【００６９】

例示的な態様において、上記のＩＬ－２１ムテイン（例えば、シングルまたはダブルムテイン）の結合親和性の低下は、ＩＬ－２１Ｒα鎖に対する野生型ヒトＩＬ－２１の約０．０２５ｎＭの親和性と比較して、ＩＬ－２１Ｒα鎖に対する親和性の低下をもたらす。したがって、上に記載した２倍の親和性の低下は、ＩＬ－２１Ｒα鎖に対するＩＬ－２１ムテインの親和性が約０．０５ｎＭになることとなる。そのため、例示的な実施形態において、ＩＬ－２１ムテイン（例えば、シングルまたはダブル）は、ＩＬ－２１Ｒα鎖に対して、約０．０５、０．１２５、０．２５、０．３７５、０．５、０．６２５、０．７５、０．８７５、１．０、１．１２５、１．２５、１．３７５、１．５、１．６２５、１．７５、１．８７５、２．０、２．１２５、２．２５、２．３７５、２．５、２．６２５、２．７５、２．８７５、３．０、３．１２５、３．２５、３．３７５、３．５、３．６２５、３．７５、４．３７５、５、５．６２５、６．２５、６．８７５、７．５、８．１２５、８．７５、９．３７５、１０．０、１０．６２５、１１．２５、１１．８７５、１２．５、１３．１２５、１３．７５、１４．３７５、１５．０、１５．６２５、１６．２５、１６．８７５、１７．５、１８．１２５、１８．７５、１９．３７５、２０．０、２０．６２５、２１．２５、２１．８７５、２２．５、２３．１２５、２３．７５、２４．３７５、２５ｎＭ、またはそれ以上の親和性を有する。例示的な態様において、ＩＬ－２１ムテインは、ＩＬ－２１Ｒα鎖に対する結合親和性の低下を示す、ダブルムテインである。

【００７０】

例示的な実施形態において、ＩＬ－２１ムテインは、ｉｎ ｖｉｔｒｏ ＳＴＡＴ３リン酸化アッセイによって測定したとき、活性の低下を示す。例示的な態様において、ＩＬ－２１ムテインは、ＳＴＡＴ３リン酸化アッセイによって測定したとき、約２、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、１００、１０５、１１０、１１５、１２０、１２５、１３０、１３５、１４０、１４５、１５０、１７５、２００、２２５、２５０、２７５、３００、３２５、３５０、３７５、４００、４２５、４５０、４７５、５００、５２５、５５０、５７５、６００、６２５、６５０、６７５、７００、７２５、７５０、７７５、８００、８２５、８５０、８７５、９００、９２５、９５０、９７５倍、１０００倍またはそれ以上の活性の低下を示すムテイン（例えば、シングルまたはダブル）である。例示的な態様

において、ＩＬ－２１ムテインは、ＳＴＡＴ３リン酸化アッセイによって測定したとき、活性の低下を示す、ダブルムテインである。

【００７１】

ＩＬ－２１ムテインコンジュゲート

本開示はまた、異種部分に連結された本開示のＩＬ－２１ムテインのうちの１つ以上を含む、コンジュゲートを提供する。本明細書で使用されるとき、「異種部分」という用語は、「コンジュゲート部分」という用語と同義であり、本明細書に記載されるＩＬ－２１ムテインとは異なる任意の分子（化学的もしくは生化学的、天然または非コード分子）を指す。本明細書に記載されるＩＬ－２１ムテインのいずれかに連結することができる例示的なコンジュゲート部分には、異種ペプチドもしくはポリペプチド（例えば、免疫グロブリンまたはその一部（例えば、可変領域、ＣＤＲまたはＦｃ領域）を含む）、標的化因子、診断標識（放射性同位体、フルオロフォアまたは酵素標識など）、水溶性ポリマーを含むポリマー、または他の治療薬もしくは診断薬が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、本開示のＩＬ－２１ムテインと、免疫グロブリンとを含むコンジュゲートが提供される。コンジュゲートは、いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるＩＬ－２１ムテインのうちの１つ以上と、ペプチド（本明細書に記載されるＩＬ－２１ムテインとは別のもの）、ポリペプチド、核酸分子、抗体またはその断片、ポリマー、量子ドット、小分子、毒素、診断薬、炭水化物、アミノ酸のうちの１つ以上とを含む。

【００７２】

例示的な実施形態において、本開示のコンジュゲートは、本明細書に記載されるＩＬ－２１ムテインと、ポリペプチド（例えば、本明細書に記載されるＩＬ－２１ムテインのいずれとも異なるポリペプチド）である異種部分とを含み、コンジュゲートは、融合ポリペプチドもしくは融合タンパク質またはキメラタンパク質もしくはキメラポリペプチドである。このようなコンジュゲートについての更なる記載は、「融合タンパク質」以下に本明細書で提供される。

【００７３】

いくつかの実施形態において、異種部分は、非共有結合または共有結合を介して、本開示のＩＬ－２１ムテインに結合される。例示的な態様において、ＩＬ－２１ムテインと異種部分との間の連結は、共有化学結合、例えば、ペプチド結合、ジスルフィド結合などを介して、または物理的な力、静電気、水素、イオン、ファンデルワールスもしくは疎水性もしくは親水性相互作用を介して、達成される。例えば、ビオチン－アビジン、リガンド／受容体、酵素／基質、核酸／核酸結合タンパク質、脂質／脂質結合タンパク質、細胞接着分子パートナー；または互いに親和性を有する任意の結合パートナーもしくはその断片を含む、様々な非共有結合型の結合系を使用することができる。

【００７４】

ＩＬ－２１ムテインは、例示的な実施形態において、ＩＬ－２１ムテインの標的アミノ酸残基を、これらの標的アミノ酸のうちの選択された側鎖またはＮ末端もしくはＣ末端残基と反応することができる有機誘導体化剤と反応させることによる、直接的な共有結合を介して、コンジュゲート部分に連結される。ＩＬ－２１ムテインまたはコンジュゲート部分上の反応性基には、例えば、アルデヒド基、アミノ基、エステル基、チオール基、α－ハロアセチル基、マレイミド基またはヒドラジノ基が挙げられる。誘導体化剤には、例えば、マレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル（システイン残基を介するコンジュゲート）、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（リシン残基を介する）、グルタルアルデヒド、無水コハク酸または当該技術分野において知られている他の剤が挙げられる。あるいは、コンジュゲート部分は、多糖担体またはポリペプチド担体などの中間担体を介して間接的にＩＬ－２１ムテインに連結することができる。多糖担体の例には、アミノデキストランが挙げられる。好適なポリペプチド担体の例には、ポリリシン、ポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸、これらのコポリマー、及びこれらのアミノ酸と他のアミノ酸（例えば、セリン）との混合ポリマーが挙げられ、得られる担持担体に望ましい溶解特性を与

える。
【００７５】
システイニル残基は、クロロ酢酸、クロロアセトアミドなどのα－ハロアセテート（及び対応するアミン）と最も一般的に反応して、カルボキシメチル誘導体またはカルボキシアミドメチル誘導体を与える。システイニル残基はまた、ブロモトリフルオロアセトン、α－ブロモ－β－（５－イミドゾイル）プロピオン酸、クロロアセチルホスフェート、Ｎ－アルキルマレイミド、３－ニトロ－２－ピリジルジスルフィド、メチル２－ピリジルジスルフィド、ｐ－クロロ安息香酸水銀、２－クロロ水銀－４－ニトロフェノール、またはクロロ－７－ニトロベンゾ－２－オキサ－１，３－ジアゾールとの反応により誘導体化される。
【００７６】
ヒスチジル残基は、ｐＨ５．５～７．０でジエチルピロカーボネートとの反応により誘導体化される。これは、この剤がヒスチジル側鎖に対して比較的に特異的であるためである。パラ－ブロモフェナシルブロミドもまた有用であり、この反応は、好ましくは、０．１Ｍカコジル酸ナトリウム中ｐＨ６．０で実施される。
【００７７】
リシニル残基及びアミノ端末残基は、コハク酸または他のカルボン酸無水物と反応する。これらの剤による誘導体化は、リシニル残基の電荷を逆転させる効果がある。α－アミノ含有残基を誘導体化するのに好適な他の試薬には、ピコリンイミド酸メチルなどのイミドエステル、ピリドキサールリン酸、ピリドキサール、クロロボロヒドリド、トリニトロベンゼンスルホン酸、Ｏ－メチルイソ尿素、２，４－ペンタンジオン、及びグリオキシル酸とのアミノ基転移酵素触媒反応が挙げられる。
【００７８】
アルギニル残基は、１つまたは複数の従来の試薬、とりわけ、フェニルグリオキサール、２，３－ブタンジオン、１，２－シクロヘキサンジオン及びニンヒドリンとの反応によって修飾される。アルギニン残基の誘導体化は、グアニジン官能基のｐＫａが高いので、反応をアルカリ条件で実施する必要がある。更に、これらの試薬は、リシンの各基及びアルギニンのε－アミノ基と反応し得る。
【００７９】
チロシル残基に対して特定の修飾を行ってもよく、特に興味深いものは、芳香族ジアゾニウム化合物またはテトラニトロメタンとの反応によって、チロシル残基にスペクトル標識を導入することである。最も一般的には、Ｏ－アセチルチロシル種及び３－ニトロ誘導体を形成するために、Ｎ－アセチルイミダゾール及びテトラニトロメタンがそれぞれ使用される。
【００８０】
カルボキシル側基（アスパルチルまたはグルタミル）は、カルボジイミド（Ｒ－Ｎ＝Ｃ＝Ｎ－Ｒ’）（式中、Ｒ及びＲ’は、異なるアルキル基、例えば、１－シクロヘキシル－３－（２－モルホリニル－４－エチル）カルボジイミドまたは１－エチル－３－（４－アゾニア－４，４－ジメチルペンチル）カルボジイミドなど）との反応によって、選択的に修飾される。更に、アスパルチル残基及びグルタミル残基は、アンモニウムイオンとの反応によって、アスパラギニル残基及びグルタミニル残基に変換される。
【００８１】
他の修飾には、プロリン及びリシンのヒドロキシル化、セリル残基もしくはスレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リシン、アルギニン及びヒスチジン側鎖のα－アミノ基のメチル化（Ｔ．Ｅ．Ｃｒｅｉｇｈｔｏｎ，Ｐｒｏｔｅｉｎｓ：Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ，Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ ＆ Ｃｏ．，Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，ｐｐ．７９－８６（１９８３））、アスパラギンもしくはグルタミンの脱アミド化、Ｎ末端アミンのアセチル化、ならびに／またはＣ末端カルボン酸基のアミド化もしくはエステル化が挙げられる。
【００８２】

共有結合修飾の別の種類は、グリコシドをＩＬ－２１ムテインに化学的または酵素的にカップリングすることを伴う。糖（複数可）は、（ａ）アルギニン及びヒスチジン、（ｂ）遊離カルボキシル基、（ｃ）遊離スルフヒドリル基、例えば、システインのものなど、（ｄ）遊離ヒドロキシル基、例えば、セリン、トレオニンもしくはヒドロキシプロリンのものなど、（ｅ）芳香族残基、例えば、チロシンもしくはトリプトファンのものなど、または（ｆ）グルタミンのアミド基に結合され得る。これらの方法は、１９８７年９月１１日に公開されたＷＯ８７／０５３３０及びＡｐｌｉｎ ａｎｄ Ｗｒｉｓｔｏｎ，ＣＲＣ Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，ｐｐ．２５９－３０６（１９８１）に記載されている。

【００８３】

例示的な態様において、異種部分は、本開示のＩＬ－２１ムテインにリンカーを介して結合される。いくつかの態様において、リンカーは、１～約６０個、または１～３０個より長い原子、２～５個の原子、２～１０個の原子、５～１０個の原子、または１０～２０個の長さの原子の原子鎖を含む。いくつかの実施形態において、鎖原子は、全て炭素原子である。いくつかの実施形態において、リンカー主鎖中の鎖原子は、Ｃ、Ｏ、Ｎ及びＳからなる群から選択される。鎖原子及びリンカーは、溶解性のより高いコンジュゲートをもたらすように、予想される溶解性（親水性）に従って選択することができる。いくつかの実施形態において、リンカーは、標的の組織または器官または細胞で認められる、酵素または他の触媒または加水分解条件による切断を受ける官能基を提供する。いくつかの実施形態において、リンカーの長さは、立体障害となる可能性を低減するのに十分な長さである。リンカーが共有結合またはペプチジル結合であり、コンジュゲートがポリペプチドである場合、そのコンジュゲート全体は、融合タンパク質であり得る。そのようなペプチジルリンカーは、任意の長さであってよい。例示的なペプチジルリンカーは、約１～５０アミノ酸長、５～５０、３～５、５～１０、５～１５、または１０～３０アミノ酸長であり、柔軟性または剛直性である。例示的な態様において、リンカーは、約２～約２０アミノ酸を含むペプチドである。例示的な態様において、リンカーは、約２～約１５アミノ酸、約２～約１０アミノ酸、または約２～約５アミノ酸を含むペプチドである。好適なペプチドリンカーは、当該技術分野において知られている。例えば、Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ａｄｖ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｒｅｖｉｅｗｓ ６５（１０）：１３５７－１３６９（２０１３）；Ａｒａｉ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ Ｄｅｓ Ｓｅｌ １４（８）：５２９－５３２（２００１）；及びＷｒｉｇｇｅｒｓ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ Ｔｒｅｎｄｓ ｉｎ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ８０（６）：７３６－７４６（２００５）を参照されたい。例示的な態様において、リンカーは、アミノ酸配列ＧＧＧＧＳ（配列番号２６２）を含むペプチドである。

【００８４】

融合タンパク質

例示的な実施形態において、ＩＬ－２１ムテインは、本明細書に記載されるＩＬ－２１ムテインのいずれとも異なるポリペプチドに連結され、コンジュゲートは、融合ポリペプチドもしくは融合タンパク質またはキメラタンパク質もしくはキメラポリペプチドである。したがって、本開示は、本開示のＩＬ－２１ムテインと、異種ポリペプチドまたはペプチドとを含む、融合ポリペプチドまたは融合タンパク質を提供する。例示的な態様において、本開示の融合タンパク質は、抗原結合タンパク質に連結された本開示のＩＬ－２１ムテインを含む。例示的な態様において、抗原結合タンパク質は、抗体もしくは免疫グロブリン、またはその抗原結合抗体断片、または抗体タンパク質生成物である。

【００８５】

集合的に、抗体は、免疫グロブリンとして知られる血漿タンパク質ファミリーを形成し、免疫グロブリンドメインから構成される（Ｊａｎｅｗａｙ ｅｔ ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｂｉｏｌｏｇｙ：Ｔｈｅ Ｉｍｍｕｎｅ Ｓｙｓｔｅｍ ｉｎ Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｄｉｓｅａｓｅ，４^{ｔｈ} ｅｄ．，Ｅｌｓｅｖｉｅｒ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｌｔｄ．／Ｇａｒｌａｎｄ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ，１９９９。本明細書で使用されるとき、「抗体」

という用語は、重鎖及び軽鎖を含み、かつ可変領域及び定常領域を含む、従来の免疫グロブリン型を有するタンパク質を指す。例えば、抗体は、２つの同一のポリペプチド鎖の対である「Ｙ型」構造であり、各対が１つの「軽鎖」（典型的に約２５ｋＤａの分子量を有する）と、１つの「重鎖」（典型的に約５０～７０ｋＤａａの分子量を有する）とを有する、ＩｇＧであってよい。抗体は、可変領域及び定常領域を有する。ＩｇＧ型において、可変領域は、一般に、約１００～１１０またはそれ以上のアミノ酸であり、３つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を含み、抗原認識を主に担い、異なる抗原に結合する他の抗体とは実質的に異なっている。定常領域は、抗体が免疫系の細胞及び分子を動員するのを可能にする。可変領域は、軽鎖及び重鎖のそれぞれのＮ末端領域からなり、定常領域は、重鎖及び軽鎖のそれぞれのＣ末端部分からなる（Ｊａｎｅｗａｙ ｅｔ ａｌ．，“Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ｏｆ ｔｈｅ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｍｏｌｅｃｕｌｅ ａｎｄ ｔｈｅ Ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ Ｇｅｎｅｓ”，Ｉｍｍｕｎｏｂｉｏｌｏｇｙ：Ｔｈｅ Ｉｍｍｕｎｅ Ｓｙｓｔｅｍ ｉｎ Ｈｅａｌｔｈ ａｎｄ Ｄｉｓｅａｓｅ，４ｔｈ ｅｄ．Ｅｌｓｅｖｉｅｒ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｌｔｄ．／Ｇａｒｌａｎｄ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ，（１９９９））。

【００８６】

抗体のＣＤＲの一般構造及び性質は、当該技術分野において記載されている。簡潔に述べれば、抗体足場中、ＣＤＲは、重鎖及び軽鎖可変領域のフレームワーク内に埋め込まれ、抗原結合及び抗原認識を主に担う領域を構成する。可変領域は、典型的に、フレームワーク領域内に少なくとも3つの重鎖または軽鎖ＣＤＲを含む（Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，１９９１，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ Ｎ．Ｉ．Ｈ．，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，Ｍｄ．、また、Ｃｈｏｔｈｉａ ａｎｄ Ｌｅｓｋ，１９８７，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６：９０１－９１７；Ｃｈｏｔｈｉａ ｅｔ ａｌ．，１９８９，Ｎａｔｕｒｅ ３４２：８７７－８８３も参照のこと）（フレームワーク領域は、Ｋａｂａｔ ｅｔ ａｌ．，１９９１によりフレームワーク領域１～４、ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ及びＦＲ４と命名されている；上掲のＣｈｏｔｈｉａ ａｎｄ Ｌｅｓｋ，１９８７も参照のこと）。

【００８７】

抗体は、当該技術分野において知られる任意の定常領域を含み得る。ヒト軽鎖は、κ軽鎖及びλ軽鎖に分類される。重鎖は、μ、δ、γ、αまたはεに分類され、それぞれ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＧ、ＩｇＡ及びＩｇＥという抗体アイソタイプを定義する。ＩｇＧは、限定するものではないが、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３及びＩｇＧ４を含む複数のサブクラスを有する。ＩｇＭは、限定するものではないが、ＩｇＭ１及びＩｇＭ２を含むサブクラスを有する。本開示の実施形態は、抗体のそのようなクラスまたはアイソタイプを全て含む。軽鎖定常領域は、例えば、κ型またはλ型の軽鎖定常領域、例えば、ヒトκ型またはλ型の軽鎖定常領域であり得る。重鎖定常領域は、例えば、α型、δ型、ε型、γ型またはμ型の重鎖定常領域、例えば、ヒトα型、δ型、ε型、γ型またはμ型の重鎖定常領域であり得る。したがって、例示的な実施形態において、抗体は、アイソタイプＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧまたはＩｇＭの抗体であり、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３またはＩｇＧ４のいずれか１つを含む。

【００８８】

抗体は、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体であり得る。いくつかの実施形態において、抗体は、哺乳動物、例えば、マウス、ウサギ、ヤギ、ウマ、ニワトリ、ハムスター、ヒトなどによって産生される天然抗体に実質的に類似する配列を含む。この点に関して、抗体は、哺乳動物抗体、例えば、マウス抗体、ウサギ抗体、ヤギ抗体、ウマ抗体、ニワトリ抗体、ハムスター抗体、ヒト抗体などとみなすことができる。ある特定の態様において、抗体は、ヒト抗体である。ある特定の態様において、抗体は、キメラ抗体またはヒト化抗体である。「キメラ抗体」という用語は、２つ以上の異なる抗体に由来するドメインを含有する抗体を指す。キメラ抗体は、例えば、１つの種に由来する定常ドメイン

と、第２の種に由来する可変ドメインとを含有することができ、あるいは、より一般的には、少なくとも２つの種に由来するアミノ酸配列のストレッチを含有することができる。キメラ抗体はまた、同じ種内の２つ以上の異なる抗体のドメインを含有することができる。「ヒト化」という用語は、抗体に関して使用される場合、元の供給源の抗体よりも本物のヒト抗体に類似した構造及び免疫機能を有するように操作された、非ヒト供給源に由来するＣＤＲ領域を少なくとも有する抗体を指す。例えば、ヒト化は、マウス抗体などの非ヒト抗体に由来するＣＤＲをヒト抗体にグラフト化することを伴い得る。ヒト化はまた、非ヒト配列がヒト配列により類似するようにアミノ酸置換を選択することを伴い得る。

【００８９】

抗体は、例えば、パパイン及びペプシンなどの酵素によって断片に切断することができる。パパインは、２つのＦａｂ断片及び１つのＦｃ断片を与えるように抗体を切断する。ペプシンは、Ｆ（ａｂ’）$_2$断片及びｐＦｃ’断片を与えるように抗体を切断する。本開示の例示的な態様において、本開示の融合タンパク質は、抗原結合抗体断片を含む。本明細書で使用されるとき、「抗原結合抗体断片」という用語は、抗体の抗原に結合することができる抗体分子の一部を指し、「抗原結合断片」または「抗原結合部分」としても知られる。例示的な場合において、抗原結合抗体断片は、Ｆａｂ断片またはＦ（ａｂ’）$_2$断片である。

【００９０】

抗体の構造は、少なくとも約１２～１５０ｋＤａの分子量範囲に及び、単量体（ｎ＝１）から二量体（ｎ＝２）、三量体（ｎ＝３）、四量体（ｎ＝４）まで、また場合によっては更に高次の価数（ｎ）範囲を有する、広範な代替形態を創出するために利用されており、このような代替形態は、本明細書中、「抗体タンパク質生成物」と呼ばれる。抗体タンパク質生成物には、完全な抗体構造をベースにするもの、及び完全な抗原結合能力を保持する抗体断片を模倣するもの、例えば、ｓｃＦｖ、Ｆａｂ及びＶＨＨ／ＶＨ（後述）が挙げられる。完全な抗原結合部位を保持する最小の抗原結合抗体断片は、可変（Ｖ）領域から完全になるＦｖ断片である。分子を安定化させるには、柔軟性のある可溶性アミノ酸ペプチドリンカーを使用して各Ｖ領域を接続してｓｃＦｖ（一本鎖可変部）にするか、定常（Ｃ）ドメインをＶ領域に付加してＦａｂ断片［抗原結合断片］を生成する。ｓｃＦｖ断片とＦａｂ断片はいずれも、宿主細胞、例えば、原核生物の宿主細胞で容易に産生することができる。他の抗体タンパク質生成物には、ジスルフィド結合により安定化されたｓｃＦｖ（ｄｓ－ｓｃＦｖ）、一本鎖Ｆａｂ（ｓｃＦａｂ）、ならびにダイアボディ、トリアボディ及びテトラボディのような二量体及び多量体抗体の形態、またはオリゴマー形成ドメインに連結されたｓｃＦｖからなる異なる形態を含むミニボディ（ｍｉｎｉＡｂ）が挙げられる。最小断片は、ラクダ化重鎖ＡｂのＶＨＨ／ＶＨ及び単一ドメインＡｂ（ｓｄＡｂ）である。新規抗体フォーマットを創出するために最も頻繁に使用される構成単位は、一本鎖可変（Ｖ）ドメイン抗体断片（ｓｃＦｖ）であり、この断片は、約１５アミノ酸残基のペプチドリンカーによって連結された、重鎖及び軽鎖に由来するＶドメイン（ＶＨ及びＶＬドメイン）を含む。ペプチボディまたはペプチドＦｃ融合体は、更に、別の抗体タンパク質生成物である。ペプチボディの構造は、Ｆｃドメインにグラフト化された生物学的に活性なペプチドから構成される。ペプチボディは、当該技術分野において十分に記載されている。例えば、Ｓｈｉｍａｍｏｔｏ ｅｔ ａｌ．，ｍＡｂｓ ４（５）：５８６－５９１（２０１２）を参照されたい。

【００９１】

他の抗体タンパク質生成物には、一本鎖抗体（ＳＣＡ）、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、二重特異性抗体または三重特異性抗体などが含まれる。二重特異性抗体は、５つの主要なクラス、すなわちＢｓＩｇＧ、付加ＩｇＧ、ＢｓＡｂ断片、二重特異性融合タンパク質及びＢｓＡｂコンジュゲートに分けることができる。例えば、Ｓｐｉｅｓｓ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ６７（２）ＰａｒｔＡ：９７－１０６（２０１５）を参照されたい。

【００９２】

例示的な態様において、本開示の融合タンパク質は、これらの抗体タンパク質生成物のいずれか１つを含む。例示的な態様において、本開示の融合タンパク質は、ｓｃＦｖ、Ｆａｂ　ＶＨＨ／ＶＨ、Ｆｖ断片、ｄｓ－ｓｃＦｖ、ｓｃＦａｂ、二量体抗体、多量体抗体（例えば、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ）、ｍｉｎｉＡｂ、ペプチボディラクダ化重鎖抗体のＶＨＨ／ＶＨ、ｓｄＡｂ、ダイアボディ；トリアボディ；テトラボディ；二重特異性抗体または三重特異性抗体、ＢｓＩｇＧ、付加ＩｇＧ、ＢｓＡｂ断片、二重特異性融合タンパク質及びＢｓＡｂコンジュゲートのいずれか１つを含む。

【００９３】

例示的な場合において、本開示の融合タンパク質は、単量体、または高分子体、オリゴマー体もしくは多量体である抗体タンパク質生成物を含む。抗体が２つ以上の異なる抗原結合領域断片を含むある特定の実施形態において、抗体は、抗体によって認識され、結合される別個のエピトープの数に応じて、二重特異性、三重特異性もしくは多重特異性、または二価、三価もしくは多価とみなされる。

【００９４】

例示的な実施形態において、抗体、抗原結合抗体断片または抗体タンパク質生成物は、腫瘍抗原に結合する。例示的な態様において、腫瘍抗原は、ウイルスタンパク質に由来する抗原、点変異に由来する抗原、またはがん生殖細胞遺伝子によってコードされる抗原である。例示的な態様において、腫瘍抗原は、ｐ５３、ＫＲＡＳ、ＮＲＡＳ、ＭＡＧＥＡ、ＭＡＧＥＢ、ＭＡＧＥＣ、ＢＡＧＥ、ＧＡＧＥ、ＬＡＧＥ／ＮＹ－ＥＳＯ１、ＳＳＸ、チロシナーゼ、ｇｐ１００／ｐｍｅｌ１７、Ｍｅｌａｎ－Ａ／ＭＡＲＴ－１、ｇｐ７５／ＴＲＰ１、ＴＲＰ２、ＣＥＡ、ＲＡＧＥ－１、ＨＥＲ２／ＮＥＵ、ＷＴ１である。例示的な態様において、本開示の融合タンパク質の抗体、抗原結合抗体断片または抗体タンパク質生成物は、本明細書に記載される免疫療法薬に結合するか、免疫療法薬である。例示的な態様において、本開示の融合タンパク質の抗体、抗原結合抗体断片または抗体タンパク質生成物は、本明細書に記載されるサイトカイン、リンフォカイン、成長因子または造血因子に結合する。

【００９５】

例示的な実施形態において、本開示の融合タンパク質は、サイトカイン（例えば、本明細書に記載されるＩＬ－２１ムテイン）と、免疫チェックポイント経路のタンパク質、腫瘍抗原、サイトカイン、リンフォカイン、成長因子または他の造血因子（限定するものではないが、本明細書に記載されるもののいずれかが挙げられる）に結合する抗体、その抗原結合抗体断片または抗体タンパク質生成物とを含む。例示的な実施形態において、本開示の融合タンパク質は、サイトカイン（例えば、本明細書に記載されるＩＬ－２１ムテイン）と、ＣＴＬＡ－４、ＰＤ－１、ＰＤ－Ｌ１、ＰＤ－Ｌ２、Ｂ７－Ｈ３、Ｂ７－Ｈ４、ＣＥＡＣＡＭ－１、ＴＩＧＩＴ、ＬＡＧ３、ＣＤ１１２、ＣＤ１１２Ｒ、ＣＤ９６、ＴＩＭ３、ＢＴＬＡまたは共刺激受容体：ＩＣＯＳ、ＯＸ４０、４１ＢＢ、ＣＤ２７、ＧＩＴＲからなる群から選択される免疫チェックポイント経路のタンパク質に結合する抗体、その抗原結合抗体断片または抗体タンパク質生成物とを含む。

【００９６】

他の実施形態において、本開示の融合タンパク質は、サイトカインと、免疫チェックポイント経路のタンパク質に結合する抗体（または抗原結合抗体その断片）とを含む。好適なサイトカインには、例えば、ＴＨ－１型応答を高めるサイトカイン；及びＳＴＡＴ１、３、４または５を活性化するサイトカインが挙げられる。いくつかの実施形態において、サイトカインは、インターロイキンである。他の実施形態において、サイトカインは、例えば、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５またはＩＬ－２１などのＴ細胞の活性を高めるインターロイキンである。そのようなサイトカインは、修飾され（例えば、変異により）、対応する受容体に対する親和性を弱めることができる。そのようなムテインは、オフターゲット及び不要な相互作用を低減させることによって、安全性プロファイルの改善を示し得る。したがって、サイトカインを修飾することで、ＩＬ－２、ＩＬ－７、ＩＬ－１０、ＩＬ－１２、ＩＬ－１５またはＩＬ－２１ムテインを生成する

ことができる。特定の実施形態において、サイトカインは、本明細書に記載されるＩＬ－２１ムテインである。免疫チェックポイント経路のタンパク質に結合する好適な抗体（またはその抗原結合抗体断片）には、例えば、ＣＴＬＡ－４、ＰＤ－１、ＰＤ－Ｌ１、ＰＤ－Ｌ２、Ｂ７－Ｈ３、Ｂ７－Ｈ４、ＴＩＧＩＴ、ＬＡＧ３、ＣＤ１１２、ＴＩＭ３、ＢＴＬＡまたは共刺激受容体：ＩＣＯＳ、ＯＸ４０、４１ＢＢもしくはＧＩＴＲに結合するものが挙げられる。特定の実施形態において、抗体（またはその抗原結合抗体断片）は、ＰＤ－１（例えば、ヒトＰＤ－１）に結合する。

【００９７】

他の実施形態において、本開示の融合タンパク質は、サイトカインと、抗体（またはその抗原結合抗体断片）と、少なくとも１つの追加の標的化部分とを含む、多重特異性融合タンパク質である。例えば、本開示の融合タンパク質は、サイトカインと、抗体（またはその抗原結合抗体断片）と、１つの追加の標的化部分とを含む、三重特異性融合タンパク質であり得る。

【００９８】

例示的な実施形態において、本開示の融合タンパク質は、本明細書に記載されるＩＬ－２１ムテインと、ＰＤ－１結合アンタゴニストとを含む。「ＰＤ－１結合アンタゴニスト」という用語は、ＰＤ－１と、その結合パートナー（ＰＤ－Ｌ１、ＰＤ－Ｌ２など）のうちの１つ以上との相互作用から生じるシグナル伝達を減少、遮断、阻害、無効または妨害する分子を指す。いくつかの実施形態において、ＰＤ－１結合アンタゴニストは、ＰＤ－１のその結合パートナーのうちの１つ以上への結合を阻害する分子である。具体的な態様において、ＰＤ－１結合アンタゴニストは、ＰＤ－１がＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２に結合するのを阻害する。例えば、ＰＤ－１結合アンタゴニストには、ＰＤ－１と、ＰＤ－Ｌ１及び／またはＰＤ－Ｌ２との相互作用から生じるシグナル伝達を減少、遮断、阻害、無効または妨害する、抗ＰＤ－１抗体、その抗原結合抗体断片、イムノアドヘシン、融合タンパク質、オリゴペプチド及び他の分子が挙げられる。一実施形態において、ＰＤ－１結合アンタゴニストは、ＰＤ－１を介したシグナル伝達により媒介される、Ｔリンパ球上に発現された細胞表面タンパク質によって、または当該タンパク質を介して媒介される、負の共刺激シグナルを低減させるものであり、これにより、正常に機能していないＴ細胞の機能障害を小さくする（例えば、抗原認識に対するエフェクター反応を高める）。いくつかの実施形態において、ＰＤ－１結合アンタゴニストは、抗ＰＤ－１抗体である。抗ＰＤ－１抗体の例には、ニボルマブ（ＢＭＳ－９３６５５８）、ペンブロリズマブ（ＭＫ－３４７５）、ＢＭＳ９３６５５８、ＢＭＳ－９３６５５９、ＴＳＲ－０４２（Ｔｅｓａｒｏ）、ｅＰＤＲ００１（Ｎｏｖａｒｔｉｓ）及びピジリズマブ（ＣＴ－０１１）が挙げられる。ＰＤ－１結合アンタゴニストの更なる具体例は、以下に記載される。

【００９９】

例示的な実施形態において、ＰＤ－１結合アンタゴニストは、ＰＤ－１に結合する抗原結合タンパク質を含むか、当該タンパク質から実質的になるか、当該タンパク質からなる。例示的な態様において、抗原結合タンパク質は、ＰＤ－１に結合する、抗体、その抗原結合抗体断片または抗体タンパク質生成物である。

【０１００】

例示的な態様において、本開示の融合タンパク質は、本明細書に記載されるＩＬ－２１ムテインと、抗ＰＤ－１抗体（本明細書に記載されるもの）、その抗原結合抗体断片または抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物とを含む。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、モノクローナルＩｇＧである。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体、その抗原結合抗体断片または抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物は、一価または二価である。例示的な態様において、抗ＰＤ－１抗体、その抗原結合抗体断片または抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物は、配列番号２６３のアミノ酸配列を有するヒトＰＤ－１に結合する。例示的な態様において、抗ＰＤ－１抗体、その抗原結合抗体断片または抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物は、配列番号２６４のアミノ酸配列を有するカニクイザルＰＤ－１に結合する。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体、その抗原結合抗体断片または抗ＰＤ－１抗体タンパク

質生成物は、ヒトＰＤ－１とカニクイザルＰＤ－１の両方に結合する。例示的な場合において、本開示の融合タンパク質は、ＩＬ－２１ムテイン（本明細書に記載されるもの）と、抗ＰＤ－１抗体（本明細書に記載されるもの）とを含む。

【０１０１】

例示的な実施形態において、ＰＤ－１に対する抗ＰＤ－１抗体、その抗原結合抗体断片または抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物の結合の強さは、K_Dで記述することができる。例示的な態様において、本明細書で提供される抗ＰＤ－１抗体、その抗原結合抗体断片または抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物のK_Dは、約10^{-1}Ｍ、約10^{-2}Ｍ、約10^{-3}Ｍ、約10^{-4}Ｍ、約10^{-5}Ｍ、約10^{-6}Ｍ、約10^{-7}Ｍ、約10^{-8}Ｍ、約10^{-9}Ｍまたはそれ以下である。例示的な態様において、本明細書で提供される抗ＰＤ－１抗体、その抗原結合抗体断片または抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物のK_Dは、マイクロモル、ナノモル、ピコモルまたはフェムトモルである。例示的な態様において、本明細書で提供される抗ＰＤ－１抗体、その抗原結合抗体断片または抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物のK_Dは、約10^{-4}～10^{-6}Ｍ、または10^{-7}～10^{-9}Ｍ、または10^{-10}～10^{-12}Ｍ、または10^{-13}～10^{-15}Ｍの範囲内である。例示的な態様において、抗ＰＤ－１抗体、その抗原結合抗体断片または抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物は、ヒトＰＤ－１、カニクイザルＰＤ－１またはその両方に対して、高い親和性を有する。例示的な態様において、抗ＰＤ－１抗体、その抗原結合抗体断片または抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物は、ヒトＰＤ－１に対して、１００ｐＭ未満、任意選択により約１ｐＭ～約５０ｐＭのK_Dを有する。例示的な態様において、抗ＰＤ－１抗体、その抗原結合抗体断片または抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物は、ヒトＰＤ－１に対して、約１ｐＭ～約２０ｐＭ以内、または約１０ｐＭ未満のK_Dを有する。例示的な態様において、抗ＰＤ－１抗体、その抗原結合抗体断片または抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物は、カニクイザルＰＤ－１に対して、１００ｐＭ未満、任意選択により約１ｐＭ～約７５ｐＭのK_Dを有する。例示的な態様において、抗ＰＤ－１抗体、その抗原結合抗体断片または抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物は、カニクイザルＰＤ－１に対して、約１ｐＭ～約２０ｐＭ以内、または１０ｐＭ未満のK_Dを有する。

【０１０２】

例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体、その抗原結合抗体断片または抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物は、ＰＤ－１と、その結合パートナー（ＰＤ－Ｌ１、ＰＤ－Ｌ２など）のうちの１つ以上との相互作用から生じるシグナル伝達を減少、遮断、阻害、無効または妨害するＰＤ－１結合アンタゴニストである。例示的な態様において、抗ＰＤ－１抗体、その抗原結合抗体断片または抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物は、ＰＤ－１がそのリガンドＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２に結合するのを遮断する。例示的な態様において、抗ＰＤ－１抗体、その抗原結合抗体断片または抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物は、ＰＤ－１とＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２との間の結合相互作用の少なくとも５０％を阻害する。例示的な態様において、抗ＰＤ－１抗体、その抗原結合抗体断片または抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物は、ＰＤ－１とＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２との間の結合相互作用の少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、または少なくとも約７０％の阻害を示す。

【０１０３】

例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体、その抗原結合抗体断片または抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物は、混合リンパ球反応（ＭＬＲ）において、Ｔ細胞によるＰＤ－１を介したＩＬ－２産生を阻害する。例示的な態様において、ＭＬＲにおける抗ＰＤ－１抗体、その抗原結合抗体断片または抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物のIC_{50}は、約０．１ｎＭ～約５ｎＭ以内である。例示的な態様において、ＭＬＲにおける抗ＰＤ－１抗体、その抗原結合抗体断片または抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物のIC_{50}は、２ｎＭ未満または１ｎＭ未満である。例示的な態様において、ＭＬＲにおける抗ＰＤ－１抗体、その抗原結合抗体断片または抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物のIC_{50}は、約０．５ｎＭ～約２ｎＭである。

【０１０４】

例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体（またはその抗原結合抗体断片）は、（ａ）配列番号３１２、３２２、３３２、３４２、３５２、３６２、３７２及び３８２からなる群から選択される重鎖（ＨＣ）相補性決定領域（ＣＤＲ）１アミノ酸配列（表Ｄ参照）、または１アミノ酸もしくは２アミノ酸のみ異なるか、少なくとも７０％もしくは約７０％の配列同一性を有する、そのバリアント配列を含むか、（ｂ）配列番号３１３、３２３、３３３、３４３、３５３、３６３、３７３及び３８３からなる群から選択されるＨＣ　ＣＤＲ２アミノ酸配列（表Ｄ参照）、または１アミノ酸もしくは２アミノ酸のみ異なるか、少なくとも７０％もしくは約７０％の配列同一性を有する、そのバリアント配列を含むか、（ｃ）配列番号３１４、３２４、３３４、３４４、３５４５、３６４、３７４及び３８４からなる群から選択されるＨＣ　ＣＤＲ３アミノ酸配列（表Ｄ参照）、または１アミノ酸もしくは２アミノ酸のみ異なるか、少なくとも７０％もしくは約７０％の配列同一性を有する、そのバリアント配列を含むか、（ｄ）３１５、３２５、３３５、３４５、３５５、３６５、３７５及び３８５からなる群から選択される軽鎖（ＬＣ）ＣＤＲ１アミノ酸配列（表Ｄ参照）、または１アミノ酸もしくは２アミノ酸のみ異なるか、少なくとも７０％もしくは約７０％の配列同一性を有する、そのバリアント配列を含むか、（ｅ）３１６、３２６、３３６、３４６、３５６、３６６、３７６及び３８６からなる群から選択されるＬＣ　ＣＤＲ２アミノ酸配列（表Ｄ参照）、または１アミノ酸もしくは２アミノ酸のみ異なるか、少なくとも７０％もしくは約７０％の配列同一性を有する、そのバリアント配列を含むか、（ｆ）３１７、３２７、３３７、３４７、３５７、３６７、３７７及び３８７からなる群から選択されるＬＣ　ＣＤＲ３アミノ酸配列（表Ｄ参照）、または１アミノ酸もしくは２アミノ酸のみ異なるか、少なくとも７０％もしくは約７０％の配列同一性を有する、そのバリアント配列を含むか、（ｇ）（ａ）～（ｆ）のいずれか２つ、３つ、４つ、５つまたは６つの組み合わせを含む。いくつかの実施形態において、抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物は、そのようなＣＤＲを含む。

【表４】

表Ｄ

	20A2	20C1	22D4	20C1.006	20C1.009	20A2.003	22D4.006	22D4.017
HC CDR1	312	322	332	342	352	362	372	382
HC CDR2	313	323	333	343	353	363	373	383
HC CDR3	314	324	334	344	354	364	374	384
LC CDR1	315	325	335	345	355	365	375	385
LC CDR2	316	326	336	346	356	366	376	386
LC CDR3	317	327	337	347	357	367	377	387

番号は、関係する配列番号を表す。

【０１０５】

例示的な態様において、抗ＰＤ－１抗体（またはその抗原結合抗体断片）は、表Ｄに記載されるＬＣ　ＣＤＲ１アミノ酸配列、ＬＣ　ＣＤＲ２アミノ酸配列及びＬＣ　ＣＤＲ３アミノ酸配列と、表Ｄに記載されるＨＣ　ＣＤＲアミノ酸配列のうちの少なくとも１つまたは２つとを含む。例示的な態様において、抗ＰＤ－１抗体（またはその抗原結合抗体断片）は、表Ｄに記載されるＨＣ　ＣＤＲ１アミノ酸配列、ＨＣ　ＣＤＲ２アミノ酸配列及びＨＣ　ＣＤＲ３アミノ酸配列と、表Ｄに記載されるＬＣ　ＣＤＲアミノ酸配列のうちの少なくとも１つまたは２つとを含む。いくつかの実施形態において、抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物は、そのようなＣＤＲを含む。

【０１０６】

例示的な実施形態において、抗ＰＤ－１抗体（またはその抗原結合抗体断片）は、表Ｄの１つの縦列中に配列番号で指定されるアミノ酸配列のうちの３つ、４つ、５つまたは６つ全てを含む。例示的な実施形態において、抗ＰＤ－１抗体（またはその抗原結合抗体断片）は、表Ｄの１つの縦列中に配列番号で指定されるＬＣ　ＣＤＲアミノ酸配列のそれぞ

れと、表Ｄの同じ１つの縦列中または別の縦列中に配列番号で指定されるＨＣ　ＣＤＲアミノ酸配列のうちの少なくとも１つまたは２つとを含む。例示的な実施形態において、抗ＰＤ－１抗体（またはその抗原結合抗体断片）は、表Ｄの１つの縦列中に配列番号で指定されるＨＣ　ＣＤＲアミノ酸配列のそれぞれと、表Ｄの同じ１つの縦列中または別の縦列中に配列番号で指定されるＬＣ　ＣＤＲアミノ酸配列のうちの少なくとも１つまたは２つとを含む。例示的な実施形態において、抗ＰＤ－１抗体（またはその抗原結合抗体断片）は、（ａ）配列番号３１２～３１７、（ｂ）配列番号３２２～３２７、（ｃ）配列番号３３２～３３７、（ｄ）配列番号３４２～３４７、（ｅ）配列番号３５２～３５７、（ｆ）配列番号３６２～３６７、（ｇ）配列番号３７２～３７７、及び（ｈ）配列番号３８２～３８７からなる群から選択される６つのＣＤＲアミノ酸配列を含む。具体的な実施形態において、抗ＰＤ－１抗体（またはその抗原結合抗体断片）は、表Ｄ中の２０Ａ２、２０Ｃ１、２２Ｄ４、２０Ｃ１．００６、２０Ｃ１．００９、２０Ａ２．００３、２２Ｄ４．００６または２２Ｄ４．０１７抗体のいずれか１つのＣＤＲアミノ酸配列のうちの６つ全てを含む。いくつかの実施形態において、抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物は、そのようなＣＤＲを含む。

【０１０７】

例示的な場合において、表Ｄのアミノ酸配列は、少なくとも１つまたはそれ以上（例えば、少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０またはそれ以上）の介在アミノ酸（複数可）によって隔てられる。例示的な場合において、ＬＣ　ＣＤＲ１とＬＣ　ＣＤＲ２の配列間に約１０～約２０アミノ酸があり、ＬＣ　ＣＤＲ２とＬＣ　ＣＤＲ３の配列間に約２５～約４０アミノ酸がある。例示的な場合において、ＬＣ　ＣＤＲ１とＬＣ　ＣＤＲ２の配列間に約１４～約１６アミノ酸があり、ＬＣ　ＣＤＲ２とＬＣ　ＣＤＲ３の配列間に約３０～約３５アミノ酸がある。例示的な場合において、ＨＣ　ＣＤＲ１とＨＣ　ＣＤＲ２の配列間に約１０～約２０アミノ酸があり、ＨＣ　ＣＤＲ２とＨＣ　ＣＤＲ３の配列間に約２５～約４０アミノ酸がある。例示的な場合において、ＨＣ　ＣＤＲ１とＨＣ　ＣＤＲ２の配列間に約１４～約１６アミノ酸があり、ＨＣ　ＣＤＲ２とＨＣ　ＣＤＲ３の配列間に約３０～約３５アミノ酸がある。

【０１０８】

例示的な実施形態において、抗ＰＤ－１抗体（またはその抗原結合抗体断片）は、（ａ）３１８、３２８、３３８、３４８、３５８、３６８、３７８及び３８８からなる群から選択される重鎖可変領域アミノ酸配列（表Ｅ参照）、または１アミノ酸もしくは２アミノ酸のみ異なるか、少なくとも７０％もしくは約７０％の配列同一性を有する、そのバリアント配列を含むか、（ｂ）３１９、３２９、３３９、３４９、３５９、３６９、３７９及び３８９からなる群から選択される軽鎖可変領域アミノ酸配列（表Ｅ参照）、または１アミノ酸もしくは２アミノ酸のみ異なるか、少なくとも７０％もしくは約７０％の配列同一性を有する、そのバリアント配列を含むか、（ｃ）（ａ）と（ｂ）の両方を含む。いくつかの実施形態において、抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物は、そのような可変領域を含む。

【表５】

表Ｅ

	20A2	20C1	22D4	20C1.006	20C1.009	20A2.003	22D4.006	22D4.017
ＨＣ可変	318	328	338	348	358	368	378	388
ＬＣ可変	319	329	339	349	359	369	379	389
ＨＣ（完全長）	320	330	340	350	360	370	380	390
ＬＣ（完全長）	321	331	341	351	361	371	381	391

番号は、関係する配列番号を表す。

【０１０９】

例示的な実施形態において、抗ＰＤ－１抗体（またはその抗原結合抗体断片）は、（ａ）配列番号３１８と３１９、（ｂ）配列番号３２８と３２９、（ｃ）配列番号３３８と３３９、（ｄ）配列番号３４８と３４９、（ｅ）配列番号３５８と３５９、（ｆ）配列番号３６８と３６９、（ｇ）配列番号３７８と３７９、及び（ｈ）配列番号３８８と３８９からなる群から選択されるアミノ酸配列対を含む。

【０１１０】

例示的な実施形態において、抗ＰＤ－１抗体（またはその抗原結合抗体断片）は、（ａ）３２０、３３０、３４０、３５０、３６０、３７０、３８０、及び３９０からなる群から選択される重鎖アミノ酸配列（表Ｅ参照）、または１アミノ酸もしくは２アミノ酸のみ異なるか、少なくとも７０％もしくは約７０％の配列同一性を有する、そのバリアント配列を含むか、（ｂ）３２１、３３１、３４１、３５１、３６１、３７１、３８１及び３９１からなる群から選択される軽鎖アミノ酸配列（表Ｅ参照）、または１アミノ酸もしくは２アミノ酸のみ異なるか、少なくとも７０％もしくは約７０％の配列同一性を有する、そのバリアント配列を含むか、（ｃ）（ａ）と（ｂ）の両方を含む。いくつかの実施形態において、抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物は、そのような可変領域を含む。

【０１１１】

例示的な実施形態において、抗ＰＤ－１抗体（またはその抗原結合抗体断片）は、（ａ）配列番号３２０と３２１、（ｂ）配列番号３３０と３３１、（ｃ）配列番号３４０と３４１、（ｄ）配列番号３５０と３５１、（ｅ）配列番号３６０と３６１、（ｆ）配列番号３７０と３７１、（ｇ）配列番号３８０と３８１、及び（ｈ）配列番号３９０と３９１からなる群から選択されるアミノ酸配列対を含む。いくつかの実施形態において、抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物は、そのような領域を含む。

【０１１２】

例示的な態様において、抗ＰＤ－１抗体（またはその抗原結合抗体断片）重鎖アミノ酸配列は、本明細書に記載される電荷対変異セットを含む。特定の態様において、抗ＰＤ－１抗体（またはその抗原結合抗体断片）重鎖アミノ酸配列は、Ｖ１、Ｖ１０３及びＶ１３１の電荷対変異から選択される電荷対変異を含む。

【０１１３】

例示的な態様において、抗ＰＤ－１抗体、その抗原結合抗体断片または抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物は、上述のアミノ酸配列に類似するアミノ酸配列を含むが、その抗原結合タンパク質は、その生物学的機能、例えば、ＰＤ－１（例えば、ヒトＰＤ－１、カニクイザルＰＤ－１）に結合する能力、またはＰＤ－１と、その結合パートナー（ＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２など）のうちの１つ以上との相互作用から生じるシグナル伝達を減少、遮断、阻害、無効もしくは妨害する能力を実質的に保持している。

【０１１４】

例示的な態様において、抗ＰＤ－１抗体、その抗原結合抗体断片または抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物は、上記のアミノ酸配列（複数可）と比較して、１、２、３、４、５、６アミノ酸のみまたはそれ以上異なるアミノ酸配列を含む。例示的な態様において、抗ＰＤ－１抗体、その抗原結合抗体断片または抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物は、参照配列のバリアント配列を含み、バリアント配列は、参照配列と比較して、１または２アミノ酸のみ異なる。例示的な態様において、抗原結合タンパク質は、ＣＤＲ以外に存在する１つ以上のアミノ酸置換を含み、例えば、１つ以上のアミノ酸置換は、重鎖または軽鎖のフレームワーク領域（複数可）内に存在する。例示的な態様において、抗ＰＤ－１抗体、その抗原結合抗体断片または抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物は、１つ以上のアミノ酸置換を含むが、その抗原結合タンパク質は、６つのＣＤＲのアミノ酸配列を保持している。例示的な態様において、抗ＰＤ－１抗体、その抗原結合抗体断片または抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物は、上述のアミノ酸配列（複数可）と比較して、１、２、３、４、５、６つのみまたはそれ以上の保存的アミノ酸置換を有するアミノ酸配列を含む。

【０１１５】
例示的な態様において、抗ＰＤ－１抗体、その抗原結合抗体断片または抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物は、上述のアミノ酸配列（複数可）に対して、３０％超もしくは約３０％、５０％超もしくは約５０％、または７０％超もしくは約７０％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。例示的な態様において、抗原結合タンパク質は、上述のアミノ酸配列に対して、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％の配列同一性を有するか、９０％を超える配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。例示的な態様において、抗原結合タンパク質は、上述のアミノ酸配列の完全長に沿って、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％の配列同一性を有するか、９０％を超える配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。例示的な態様において、抗原結合タンパク質は、上述のアミノ酸配列の完全長に沿って、少なくとも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。

【０１１６】
例示的な態様において、抗ＰＤ－１抗体、その抗原結合抗体断片または抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物は、参照配列のバリアント配列を含み、バリアント配列は、上述の配列と比較して、少なくとも７０％または約７０％の配列同一性を有する。例示的な態様において、抗ＰＤ－１抗体、その抗原結合抗体断片または抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物は、参照配列のバリアント配列を含み、バリアント配列は、上述の配列と比較して、少なくとも８０％または約８０％の配列同一性を有する。例示的な態様において、抗ＰＤ－１抗体、その抗原結合抗体断片または抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物は、参照配列のバリアント配列を含み、バリアント配列は、上述の配列と比較して、少なくとも９０％または約９０％の配列同一性を有する。例示的な態様において、抗ＰＤ－１抗体、その抗原結合抗体断片または抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物は、参照配列のバリアント配列を含み、バリアント配列は、上述の配列と比較して、少なくとも９５％または約９５％の配列同一性を有する。

【０１１７】
例示的な実施形態において、抗ＰＤ－１抗体（またはその抗原結合抗体断片）は、表Ｄの１つの縦列中の配列番号のうちの１つ、２つ、３つ、４つまたは５つの配列と、配列番号３１２～３８７のいずれに対して、少なくとも７０％または約７０％（例えば、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％）の配列同一性を有する少なくとも１つのバリアント配列とを含む。例示的な実施形態において、抗ＰＤ～１抗体（またはその抗原結合抗体断片）は、（ａ）配列番号３１２～３１７、（ｂ）配列番号３２２～３２７、（ｃ）配列番号３３２～３３７、（ｄ）配列番号３４２～３４７、（ｅ）配列番号３５２～３５７、（ｆ）配列番号３６２～３６７、（ｇ）配列番号３７２～３７７、及び（ｈ）配列番号３８２～３８７から選択される一連の配列のうちの１つ、２つ、３つ、４つまたは５つの配列を含み、抗体またはその断片は、一連の配列のうちの少なくとも１つに対して、少なくとも７０％または約７０％（例えば、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％）の配列同一性を有する、少なくとも１つのバリアント配列を更に含む。例えば、例示的な態様において、抗ＰＤ～１抗体（またはその抗原結合抗体断片）は、配列番号３１２～３１７のうちの４つの配列、すなわち、配列番号３１２～３１５を含み、抗体またはその断片は、２つのバリアント配列、すなわち配列番号３１６に対して、少なくとも７０％または約７０％（例えば、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％）の配列同一性を有する１つのバリアント配列と、配列番号３１７に対して、少なくとも７０％または約７０％（例えば、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％）の配列同一性を有するもう１つのバリアント配列とを含む。いくつかの実施形態において、抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物は、そのような領域を含む。

【０１１８】
例示的な実施形態において、抗ＰＤ－１抗体（またはその抗原結合抗体断片）生成物は、配列番号３１８、３１９、３２８、３２９、３３８、３３９、３４８、３４９、３５８

、３５９、３６８、３６９、３７８、３７９、３８８及び３８９のいずれかに対して、少なくとも７０％または約７０％（例えば、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％）の配列同一性を有するバリアント配列対を含む。例示的な場合において、抗体またはその断片は、（ａ）配列番号３１８と３１９、（ｂ）配列番号３２８と３２９、（ｃ）配列番号３３８と３３９、（ｄ）配列番号３４８と３４９、（ｅ）配列番号３５８と３５９、（ｆ）配列番号３６８と３６９、（ｇ）配列番号３７８と３７９、及び（ｈ）配列番号３８８と３８９に対して、少なくとも７０％または約７０％（例えば、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％）の配列同一性を有するバリアント配列対を含む。例示的な実施形態において、抗ＰＤ－１抗体（またはその抗原結合抗体断片）は、表Ｅのうちの１つの配列と、配列番号３１８、３１９、３２８、３２９、３３８、３３９、３４８、３４９、３５８、３５９、３６８、３６９、３７８、３７９、３８８及び３８９のいずれかに対して、少なくとも７０％または約７０％（例えば、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％）の配列同一性を有するバリアント配列であるもう１つの配列との配列対を含む。例示的な実施形態において、抗ＰＤ－１抗体（またはその抗原結合抗体断片）は、（ａ）配列番号３１８と３１９、（ｂ）配列番号３２８と３２９、（ｃ）配列番号３３８と３３９、（ｄ）配列番号３４８と３４９、（ｅ）配列番号３５８と３５９、（ｆ）配列番号３６８と３６９、（ｇ）配列番号３７８と３７９、及び（ｈ）配列番号３８８と３８９から選択される１つの配列と、（ａ）～（ｕ）の１つの配列に対して、少なくとも７０％または約７０％（例えば、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％）の配列同一性を有するバリアント配列であるもう１つの配列との配列対を含む。例えば、例示的な態様において、抗ＰＤ－１抗体（またはその抗原結合抗体断片）は、配列番号３１８の配列を含み、更に、配列番号３１９に対して、少なくとも７０％または約７０％（例えば、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％）の配列同一性を有するバリアント配列を含む。いくつかの実施形態において、抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物は、そのような領域を含む。

【０１１９】

例示的な実施形態において、抗ＰＤ－１抗体（またはその抗原結合抗体断片）は、配列番号３２０、３２１、３３０、３３１、３４０、３４１、３５０、３５１、３６０、３６１、３７０、３７１、３８０、３８１、３９０及び３９１のいずれかに対して、少なくとも７０％または約７０％（例えば、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％）の配列同一性を有するバリアント配列対を含む。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体（またはその抗原結合抗体断片）は、（ａ）配列番号３２０と３２１、（ｂ）配列番号３３０と３３１、（ｃ）配列番号３４０と３４１、（ｄ）配列番号３５０と３５１、（ｅ）配列番号３６０と３６１、（ｆ）配列番号３７０と３７１、（ｇ）配列番号３８０と３８１、及び（ｈ）配列番号３９０と３９１に対して、少なくとも７０％または約７０％（例えば、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％）の配列同一性を有するバリアント配列対を含む。例示的な実施形態において、抗ＰＤ－１抗体（またはその抗原結合抗体断片）は、表Ｅのうちの１つの配列と、配列番号３２０、３２１、３３０、３３１、３４０、３４１、３５０、３５１、３６０、３６１、３７０、３７１、３８０、３８１、３９０及び３９１のいずれかに対して、少なくとも７０％または約７０％（例えば、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％）の配列同一性を有するバリアント配列であるもう１つの配列との配列対を含む。例示的な実施形態において、抗ＰＤ－１抗体（またはその抗原結合抗体断片）は、（ａ）配列番号３２０と３２１、（ｂ）配列番号３３０と３３１、（ｃ）配列番号３４０と３４１、（ｄ）配列番号３５０と３５１、（ｅ）配列番号３６０と３６１、（ｆ）配列番号３７０と３７１、（ｇ）配列番号３８０と３８１、及び（ｈ）配列番号３９０と３９１から選択される１つの配列と、（ａ）～（ｕ）の１つの配列に対して、少なくとも７０％または約７０％（例えば、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％）の配列同一性を有するバリアント配列であるもう１つの配列との配列対を含む。例えば、例示的な態

様において、抗ＰＤ－１抗体（またはその抗原結合抗体断片）は、配列番号３２０の配列を含み、更に、配列番号３２１に対して、少なくとも７０％または約７０％（例えば、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％）の配列同一性を有するバリアント配列を含む。いくつかの実施形態において、抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物は、そのような領域を含む。

【０１２０】

追加の例示的な態様において、抗ＰＤ－１抗体、その抗原結合抗体断片または抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物は、天然の同等物と比較して、半減期／安定性を向上させるか、抗体の発現／製造性をより適切なものにするため（例えば、ＩＬ－２１ムテインを含む融合タンパク質として）の、１つ以上のアミノ酸修飾を含む。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、抗ＰＤ－１抗体とＦｃ受容体との間の相互作用を妨害または低減させるように設計される。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、定常領域を含むが、Ｆｃγ受容体と相互作用する能力に欠く、エフェクター機能不含安定（ＳＥＦＬ）抗体である。ＳＥＦＬ抗体は、当該技術分野において知られている。例えば、Ｌｉｕ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ　２９２：１８７６－１８８３（２０１６）；及びＪａｃｏｂｓｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２９２：１８６５－１８７５（２０１７）を参照されたい。例示的な態様において、ＳＥＦＬ抗体は、次の変異のうちの１つ以上を含む（ＥＵシステムに従ったナンバリング）：Ｌ２４２Ｃ、Ａ２８７Ｃ、Ｒ２９２Ｃ、Ｎ２９７Ｇ、Ｖ３０２Ｃ、Ｌ３０６Ｃ及び／またはＫ３３４Ｃ。例示的な態様において、ＳＥＦＬ抗体は、Ｎ２９７Ｇを含む。例示的な態様において、ＳＥＦＬ抗体は、Ａ２８７Ｃ、Ｎ２９７Ｇ及びＬ３０６Ｃを含む。他の例示的な態様において、ＳＥＦＬ抗体は、Ｒ２９２Ｃ、Ｎ２９７Ｇ及びＶ３０２Ｃ（すなわち、ＳＥＦＬ２－２）を含む。

【０１２１】

抗ＰＤ－１抗体、その抗原結合抗体断片または抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物は、他の半減期延長（ＨＬＥ）修飾を含み得る。例示的な場合において、ＨＬＥ修飾は、重鎖定常領域内に存在し、次の変異のうちの１つ以上を含む（ＥＵシステムに従ったナンバリング）：Ｍ２５２Ｙ、Ｓ２５４Ｔ及びＴ２５６Ｅ。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体、その抗原結合抗体断片または抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物は、Ｍ２５２Ｙ、Ｓ２５４Ｔ及びＴ２５６Ｅのうちの１つまたは２つを含む。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体、その抗原結合抗体断片または抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物は、Ｍ２５２Ｙ、Ｓ２５４Ｔ及びＴ２５６Ｅのうちの３つ全てを含む。例示的な態様において、重鎖定常領域は、配列番号５４５もしくは配列番号５４７もしくは配列番号５４９のアミノ酸配列、または配列番号５４５もしくは配列番号５４７もしくは配列番号５４９に対して、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％の配列同一性を有するか、約９０％を超える（例えば、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％または約９９％を超える）配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。例示的な場合において、ＨＬＥ修飾は、重鎖定常領域内に存在し、次の変異のうちの１つ以上を含む（ＥＵシステムに従ったナンバリング）：Ｌ３０９Ｄ、Ｑ３１１Ｈ及びＮ４３４Ｓ。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体、その抗原結合抗体断片または抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物は、Ｌ３０９Ｄ、Ｑ３１１Ｈ及びＮ４３４Ｓのうちの１つ、２つまたは３つ全てを含む。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体、その抗原結合抗体断片または抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物は、Ｌ３０９Ｄ、Ｑ３１１Ｈ及びＮ４３４Ｓのうちの３つ全てを含む。例示的な態様において、重鎖定常領域は、配列番号５４４もしくは配列番号５４６もしくは配列番号５４８のアミノ酸配列、または配列番号５４４もしくは配列番号５４６もしくは配列番号５４８に対して、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％の配列同一性を有するか、約９０％を超える（例えば、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％または約９９％を超える）配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０１２２】
例示的な態様において、抗ＰＤ－１抗体、その抗原結合抗体断片または抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物は、ＳＥＦＬ２－２修飾及びＨＬＥ修飾を含む。いくつかの場合において、ＨＬＥ修飾は、Ｍ２５２Ｙ、Ｓ２５４Ｔ及びＴ２５６Ｅのうちの１つまたは２つまたは３つ全てを含む。例示的な態様において、重鎖定常領域は、配列番号５５１もしくは配列番号５５３もしくは配列番号５５５のアミノ酸配列、または配列番号５５１もしくは配列番号５５３もしくは配列番号５５５に対して、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％の配列同一性を有するか、約９０％を超える（例えば、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％または約９９％を超える）配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。いくつかの場合において、ＨＬＥ修飾は、Ｌ３０９Ｄ、Ｑ３１１Ｈ及びＮ４３４Ｓのうちの１つまたは２つまたは３つ全てを含む。例示的な態様において、重鎖定常領域は、配列番号５５０もしくは配列番号５５２もしくは配列番号５５４のアミノ酸配列、または配列番号５５０もしくは配列番号５５２もしくは配列番号５５４に対して、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％の配列同一性を有するか、約９０％を超える（例えば、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％または約９９％を超える）配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。例示的な態様において、重鎖は、以下に記載される電荷対変異を追加で含む。

【０１２３】
真核細胞では、（１）グリカンが認識配列Ａｓｎ－Ｘ－Ｔｈｒ／Ｓｅｒ（配列中、「Ｘ」は、プロリンを除く任意のアミノ酸）のアスパラギンに結合する、Ｎ－結合グリコシル化と、（２）グリカンがセリンまたはトレオニンに結合する、Ｏ－結合グリコシル化の２つの種類のグリコシル化反応が生じる。Ｎ－結合グリコシル化は、小胞体（ＥＲ）で開始し、ＥＲにおける一連の複雑な反応により、２つのＧｌｃＮＡｃ残基及び３つのＭａｎ残基から本質的になるコアグリカン構造が結合される。ＥＲで形成されるグリカン複合体は、ゴルジ体において、酵素作用によって修飾される。糖が酵素に比較的接近できない場合、その糖は、典型的に、元のＨＭ型のままである。酵素が糖に接近できる場合には、Ｍａｎ残基の多くが切断され、糖が更に修飾されて、複合型Ｎ－グリカン構造が生じる。例えば、シスゴルジ体に位置するマンノシダーゼ－１は、ＨＭグリカンを切断または加水分解できるのに対し、中間ゴルジ体に位置するフコシルトランスフェラーゼＦＵＴ－８は、グリカンをフコシル化する（Ｈａｎｒｕｅ　Ｉｍａｉ－　Ｎｉｓｈｉｙａ（２００７），ＢＭＣ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，７：８４）。例示的な態様において、抗ＰＤ－１抗体は、Ｎ－グリコシル化され、例えば、重鎖の特定のアミノ酸に共有結合された１つ以上の糖部分（例えば、グリカン、糖）を含む。代替的態様において、抗ＰＤ－１抗体は、グリコシル化されないか、重鎖の特定のアミノ酸に共有結合された任意の糖部分（例えば、グリカン、糖）を含まない。

【０１２４】
例示的な態様において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号２８４のアミノ酸配列、または配列番号２８４に対して、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％の配列同一性を有するか、約９０％を超える（例えば、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％または約９９％を超える）配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、重鎖定常領域を含む。例示的な態様において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号２８４のアミノ酸配列、または配列番号２８４に対して、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％の配列同一性を有するか、約９０％を超える（例えば、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％または約９９％を超える）配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、重鎖定常領域を含み、更にリンカーを含む。例示的な場合において、リンカーは、配列番号２６２のアミノ酸配列を含む。したがって、

いくつかの例示的な態様において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号２８７の重鎖定常領域アミノ酸配列、または配列番号２８７に対して、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％の配列同一性を有するか、約９０％を超える（例えば、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％または約９９％を超える）配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。例示的な態様において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号２８４のアミノ酸配列、または配列番号２８４に対して、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％の配列同一性を有するか、約９０％を超える（例えば、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％または約９９％を超える）配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、重鎖定常領域を含み、Ｃ末端Ｌｙｓは、クリッピングまたは除去される。この点に関して、いくつかの態様において、抗ＰＤ－１抗体は、Ｃ末端Ｌｙｓを欠く重鎖定常領域を含み、配列番号２８５のアミノ酸配列、または配列番号２８５に対して、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％の配列同一性を有するか、約９０％を超える（例えば、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％または約９９％を超える）配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一般に、抗体のＣ末端リシンは、発現中、カルボキシペプチダーゼによる切断を受ける。Ｃ末端Ｌｙｓを欠く重鎖定常領域は、有利には、抗ＰＤ－１抗体の重鎖にカルボキシペプチダーゼが作用するのを防ぐ。例示的な態様において、抗ＰＤ－１抗体は、Ｃ末端Ｌｙｓを欠く重鎖定常領域を含み、更にリンカーを含む。例示的な場合において、リンカーは、配列番号２６２のアミノ酸配列を含む。したがって、いくつかの例示的な態様において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号２８６の重鎖定常領域アミノ酸配列、または配列番号２８６に対して、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％の配列同一性を有するか、約９０％を超える（例えば、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％または約９９％を超える）配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。例示的な態様において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号２８４のアミノ酸配列、または配列番号２８４に対して、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％の配列同一性を有するか、約９０％を超える（例えば、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％または約９９％を超える）配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、重鎖定常領域を含み、抗ＰＤ－１抗体とＦｃ受容体と間の相互作用を妨害または低減させる１つ以上のＳＥＦＬ変異を含み、この変異には、Ｌ２４２Ｃ、Ａ２８７Ｃ、Ｒ２９２Ｃ、Ｎ２９７Ｇ、Ｖ３０２Ｃ、Ｌ３０６Ｃ及び／またはＫ３３４Ｃが挙げられるが、これらに限定されない。例示的な態様において、ＳＥＦＬ変異は、ＳＥＦＬ２－２変異：Ｒ２９２Ｃ、Ｎ２９７Ｇ及びＶ３０２Ｃであり、したがって、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号２６５の重鎖定常領域アミノ酸配列、または配列番号２６５に対して、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％の配列同一性を有するか、約９０％を超える（例えば、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％または約９９％を超える）配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。例示的な態様において、抗ＰＤ－１抗体は、ＳＥＦＬ２－２変異を有し、Ｃ末端Ｌｙｓがクリッピングまたは除去された重鎖定常領域を含む。そのような重鎖定常領域は、配列番号２６６の配列を含み得る。例示的な態様において、抗ＰＤ－１抗体は、ＳＥＦＬ２－２変異を有し、Ｃ末端Ｌｙｓがクリッピングまたは除去され、リンカーを含む重鎖定常領域を含む。そのような重鎖定常領域は、配列番号２６７の配列を含み得る。例示的な態様において、抗ＰＤ－１抗体は、ＳＥＦＬ２－２変異及びリンカーを有し、Ｃ末端Ｌｙｓがクリッピングされていない重鎖定常領域を含む。そのような重鎖定常領域は、配列番号２８２の配列を含み得る。

【０１２５】
例示的な態様において、ＩＬ－２１ムテインは、抗ＰＤ－１抗体のＦｃに結合される。例示的な態様において、ＩＬ－２１ムテインは、抗体の２つの重鎖のうちの一方に結合される。例示的な態様において、ＩＬ－２１ムテインは、抗体の２つの重鎖のうちの一方のＣ末端に結合される。
【０１２６】
例示的な態様において、融合タンパク質は、ＩＬ－２１ムテインを１つしか含まない（すなわち、融合タンパク質は、ＩＬ－２１ムテイン単量体を含む）。例示的な態様において、ＩＬ－２１ムテインは、抗体の２つの重鎖のうちの一方のＣ末端に結合される。例示的な態様において、融合タンパク質がＩＬ－２１ムテインを１つのみ含む場合、抗体のＦｃは、２つの重鎖（ＩＬ－２１ムテインに融合された１つの重鎖と、ＩＬ－２１ムテインを欠く１つの重鎖）のヘテロ二量体化をもたらすように設計された修飾を含む。そのような修飾には、ノブ・イントゥ・ホール、ＤｕｏＢｏｄｙ、Ａｚｙｍｅｔｒｉｃ、電荷対、ＨＡ－ＴＦ、ＳＥＥＤｂｏｄｙ、及び異なるプロテインＡ親和性を有する修飾などのＦｃ変異が挙げられる。例えば、Ｓｐｉｅｓｓ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，６７（２，Ｐａｒｔ Ａ），２０１５，ｐｐ．９５－１０６を参照されたい。ノブ・イントゥ・ホール変異は、第１の重鎖中のＴ３６６Ｗと、第２の重鎖中のＴ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ及び／またはＹ４０７Ｖとを含む。例えば、Ｒｉｄｇｗａｙ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ．，９（１９９６），ｐｐ．６１７－６２１；及びＡｔｗｅｌｌ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２７０（１９９７），ｐｐ．２６－３５を参照されたい。ＤｕｏＢｏｄｙ変異は、第１の重鎖中のＦ４０５Ｌと、第２の重鎖中のＫ４０９Ｒとを含む。例えば、Ｌａｂｒｉｊｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．，１１０（２０１３），ｐｐ．５１４５－５１５０を参照されたい。Ａｚｙｍｅｔｒｉｃ変異は、第１の重鎖中のＴ３５０Ｖ、Ｌ３５１Ｙ、Ｆ４０５Ａ及び／またはＹ４０７Ｖと、第２の重鎖中のＴ３５０Ｖ、Ｔ３６６Ｌ、Ｋ３９２Ｌ及び／またはＴ３９４Ｗとを含む。例えば、Ｖｏｎ Ｋｒｅｕｄｅｎｓｔｅｉｎ ｅｔ ａｌ．，ｍＡｂｓ，５（２０１３），ｐｐ．６４６－６５４を参照されたい。ＨＡ－ＴＦ変異は、第１の重鎖中のＳ３６４Ｈ及び／またはＦ４０５Ａと、第２の重鎖中のＹ３４９Ｔ及び／またはＴ３９４Ｆとを含む。例えば、Ｍｏｏｒｅ ｅｔ ａｌ．，ｍＡｂｓ，３（２０１１），ｐｐ．５４６－５５７を参照されたい。ＳＥＥＤｂｏｄｙ変異は、第１の重鎖中のＩｇＧ／Ａキメラ変異と、第２の重鎖中のＩｇＧ／Ａキメラ変異とを含む。例えば、Ｄａｖｉｓ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ．Ｄｅｓ．Ｓｅｌ．，２３（２０１０），ｐｐ．１９５－２０２を参照されたい。プロテインＡ親和性が異なる変異は、一方の重鎖中にＨ４３５Ｒを含み、他方の重鎖には変異がない。例えば、米国特許第８，５８６，７１３号を参照されたい。
【０１２７】
特定の例において、変異は、電荷対変異である。このような電荷対変異の例は、次のとおりである（ＥＵシステムのナンバリングに従う）。電荷対変異は、第１の重鎖中のＫ４０９Ｄと第２の重鎖中のＤ３９９Ｋ、第１の重鎖中のＫ３９２Ｄと第２の重鎖中のＥ３５６Ｋ、または第１の重鎖中のＫ４０９Ｄ及びＫ３９２Ｄの両方と第２の重鎖中のＤ３９９Ｋ及びＥ３５６Ｋの両方を含む（後者は、本明細書中、「Ｖ１」と称される）。例えば、Ｇｕｎａｓｅｋａｒａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ２８５：１９６３７－１９６４６（２０１０）を参照されたい。別の特定の例において、電荷対変異は、第１の重鎖中のＫ４３９Ｄ、Ｋ３９２Ｄ及びＫ４０９Ｄと、第２の重鎖中のＥ３５６Ｋ及びＤ３９９Ｋとを含む（本明細書中、「Ｖ１０３」と称される）。更に別の特定の例において、電荷対変異は、第１の重鎖中のＫ３６０Ｅ、Ｋ３７０Ｅ、Ｋ３９２Ｅ及びＫ４０９Ｄと、第２の重鎖中のＥ３５７Ｋ及びＤ３９９Ｋとを含む（本明細書中、「Ｖ１３１」と称される）。電荷対変異は、第１の重鎖中のＫ３７０Ｄと第２の重鎖中のＥ３５７Ｋ、または第１の重鎖中のＫ４０９Ｄ、Ｋ３９２Ｄ及びＫ３７０Ｄの３つ全てと第２の重鎖中のＤ３９９Ｋ、Ｅ３５７Ｋ及びＥ３５６Ｋの３つ全てを含んでもよい（後者は、本明細書中、「

Ｖ４」と称される）。更なる電荷対変異は、第１の重鎖中のＤ２２１Ｅ、Ｐ２２８Ｅ及び／またはＬ３６８Ｅと、第２の重鎖中のＤ２２１Ｒ、Ｐ２２８Ｒ及び／またはＫ４０９Ｒとをも含む。例えば、Ｓｔｒｏｐ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，４２０（２０１２），ｐｐ．２０４－２１９を参照されたい。

【０１２８】

融合タンパク質がＩＬ－２１ムテインを１つのみ含み（すなわち、融合タンパク質は、ＩＬ－２１ムテイン単量体を含む）、重鎖がＶ１電荷対変異を含有する、実施形態において、ＩＬ－２１ムテインは、Ｋ４０９Ｄ及びＫ３９２Ｄ変異を含有する重鎖に結合され得る（例えば、ＩＬ－２１ムテインは、配列番号２９４、２９６または２９８を含む重鎖に結合される）か、Ｄ３９９Ｋ及びＥ３５６Ｋ変異を含有する重鎖に結合され得る（例えば、ＩＬ－２１ムテインは、配列番号２９５、２９７または２９９を含む重鎖に結合される）。具体的な実施形態において、ＩＬ－２１ムテインは、Ｄ３９９Ｋ及びＥ３５６Ｋ変異を含有する重鎖に結合される。

【０１２９】

融合タンパク質がＩＬ－２１ムテインを１つのみ含み（すなわち、融合タンパク質は、ＩＬ－２１ムテイン単量体を含む）、重鎖がＶ４電荷対変異を含有する、実施形態において、ＩＬ－２１ムテインは、Ｋ４０９Ｄ、Ｋ３９２Ｄ及びＫ３７０Ｄ変異を含有する重鎖に結合され得る（例えば、ＩＬ－２１ムテインは、配列番号２８８、２９０または２９２を含む重鎖に結合される）か、Ｄ３９９Ｋ、Ｅ３５７Ｋ及びＥ３５６Ｋ変異を含有する重鎖に結合され得る（例えば、ＩＬ－２１ムテインは、配列番号２８９、２９１または２９３を含む重鎖に結合される）。具体的な実施形態において、ＩＬ－２１ムテインは、Ｄ３９９Ｋ、Ｅ３５７Ｋ及びＥ３５６Ｋ変異を含有する重鎖に結合される。

【０１３０】

融合タンパク質がＩＬ－２１ムテインを１つのみ含み（すなわち、融合タンパク質は、ＩＬ－２１ムテイン単量体を含む）、重鎖がＶ１０３電荷対変異を含有する、実施形態において、ＩＬ－２１ムテインは、Ｋ４３９Ｄ、Ｋ３９２Ｄ及びＫ４０９Ｄ変異を含有する重鎖に結合され得る（例えば、ＩＬ－２１ムテインは、配列番号４７２、４７４または４７６を含む重鎖に結合される）か、Ｅ３５６Ｋ及びＤ３９９Ｋ変異を含有する重鎖に結合され得る（例えば、ＩＬ－２１ムテインは、配列番号４７３、４７５または４７７を含む重鎖に結合される）。具体的な実施形態において、ＩＬ－２１ムテインは、Ｅ３５６Ｋ及びＤ３９９Ｋ変異を含有する重鎖に結合される。

【０１３１】

融合タンパク質がＩＬ－２１ムテインを１つのみ含み（すなわち、融合タンパク質は、ＩＬ－２１ムテイン単量体を含む）、重鎖がＶ１３１電荷対変異を含有する、実施形態において、ＩＬ－２１ムテインは、Ｋ３６０Ｅ、Ｋ３７０Ｅ、Ｋ３９２Ｅ及びＫ４０９Ｄ変異を含有する重鎖に結合され得る（例えば、ＩＬ－２１ムテインは、配列番号４７８、４８０または４８２を含む重鎖に結合される）か、Ｅ３５７Ｋ及びＤ３９９Ｋ変異を含有する重鎖に結合され得る（例えば、ＩＬ－２１ムテインは、配列番号４７９、４８１または４８３を含む重鎖に結合される）。具体的な実施形態において、ＩＬ－２１ムテインは、Ｅ３５７Ｋ及びＤ３９９Ｋ変異を含有する重鎖に結合される。

【０１３２】

したがって、例示的な態様において、抗ＰＤ－１抗体（またはその抗原結合抗体断片）は、本明細書に記載される電荷対変異セットを含む。特定の態様において、抗ＰＤ－１抗体（またはその抗原結合抗体断片）は、Ｖ１、Ｖ１０３及びＶ１３１の電荷対変異から選択される電荷対変異を含む。

【０１３３】

例示的な態様において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号２８４のアミノ酸配列、または配列番号２８４に対して、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％の配列同一性を有するか、約９０％を超える（例えば、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、

約９６％、約９７％、約９８％または約９９％を超える）配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、１つ以上の電荷対変異、例えば、Ｖ１、Ｖ４、Ｖ１０３またはＶ１３１の電荷対変異を含む、重鎖定常領域を含む。例示的な態様において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号２８４のアミノ酸配列、または配列番号２８４に対して、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％の配列同一性を有するか、約９０％を超える（例えば、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％または約９９％を超える）配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、Ｖ１電荷対変異を含む、重鎖定常領域を含み、第１の重鎖定常領域は、Ｋ４０９及びＫ３９２Ｄ変異を含み、第２の重鎖定常領域は、Ｄ３９９Ｋ及びＥ３５６Ｋ変異を含む。そのような第１の重鎖定常領域は、配列番号２９４の配列を含み得、そのような第２の重鎖定常領域は、配列番号２９５の配列を含み得る。そのような第１及び第２の重鎖定常領域は、Ｃ末端Ｌｙｓがクリッピングまたは除去されてもよく、これにより、第１及び第２の重鎖定常領域は、それぞれ配列番号２９６及び２９７を含み得る。そのような第１及び第２の重鎖定常領域は、Ｃ末端Ｌｙｓがクリッピングまたは除去され、かつリンカーを有してもよく、これにより、第１及び第２の重鎖定常領域は、それぞれ配列番号２９８及び２９９を含み得る。例示的な態様において、抗ＰＤ－１抗体は、Ｖ１電荷対変異及びＳＥＦＬ２－２変異を含む、重鎖定常領域を含む。Ｖ１電荷対変異及びＳＥＦＬ２－２変異を含むそのような第１の重鎖定常領域は、配列番号３０６の配列を含み得、Ｖ１電荷対変異及びＳＥＦＬ２－２変異を含むそのような第２の重鎖定常領域は、配列番号３０７の配列を含み得る。そのような第１及び第２の重鎖の更なる変形形態、例えば、Ｃ末端Ｌｙｓがクリッピングまたは除去された重鎖（配列番号３０８及び３０９）及びＣ末端Ｌｙｓがクリッピングまたは除去され、かつリンカーを含む重鎖（配列番号３１０及び３１１）も企図される。

【０１３４】

例示的な態様において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号２８４のアミノ酸配列、または配列番号２８４に対して、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％の配列同一性を有するか、約９０％を超える（例えば、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％または約９９％を超える）配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、Ｖ４電荷対変異を含む、重鎖定常領域を含み、第１の重鎖定常領域は、Ｋ４０９、Ｋ３９２Ｄ及びＫ３７０Ｄ変異を含み、第２の重鎖定常領域は、Ｄ３９９Ｋ、Ｅ３５６Ｋ及びＥ３５７Ｋ変異を含む。そのような第１の重鎖定常領域は、配列番号２８８の配列を含み得、そのような第２の重鎖定常領域は、配列番号２８９の配列を含み得る。そのような第１及び第２の重鎖定常領域は、Ｃ末端Ｌｙｓがクリッピングまたは除去されてもよく、これにより、第１及び第２の重鎖定常領域は、それぞれ配列番号２９０及び２９１を含み得る。そのような第１及び第２の重鎖定常領域は、Ｃ末端Ｌｙｓがクリッピングまたは除去され、かつリンカーを有してもよく、これにより、第１及び第２の重鎖定常領域は、それぞれ配列番号２９２及び２９３を含み得る。例示的な態様において、抗ＰＤ－１抗体は、Ｖ４電荷対変異及びＳＥＦＬ２－２変異を含む、重鎖定常領域を含む。Ｖ４電荷対変異及びＳＥＦＬ２－２変異を含むそのような第１の重鎖定常領域は、配列番号３００の配列を含み得、Ｖ４電荷対変異及びＳＥＦＬ２－２変異を含むそのような第２の重鎖定常領域は、配列番号３０１の配列を含み得る。そのような第１及び第２の重鎖の更なる変形形態、例えば、Ｃ末端Ｌｙｓがクリッピングされた重鎖（配列番号３０２及び３０３）及びＣ末端Ｌｙｓがクリッピングまたは除去され、かつリンカーを含む重鎖（配列番号３０４及び３０５）も企図される。

【０１３５】

例示的な態様において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号２８４のアミノ酸配列、または配列番号２８４に対して、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％の配列同一性を有するか、約９０％を超える（例えば、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、

約９６％、約９７％、約９８％または約９９％を超える）配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、Ｖ１０３電荷対変異を含む、重鎖定常領域を含み、第１の重鎖定常領域は、配列番号４８４の配列を含み、第２の重鎖定常領域は、配列番号４８５の配列を含む。そのような第１及び第２の重鎖定常領域は、Ｃ末端Ｌｙｓがクリッピングまたは除去されてもよく、これにより、第１及び第２の重鎖定常領域は、それぞれ配列番号４８６及び４８７を含み得る。そのような第１及び第２の重鎖定常領域は、Ｃ末端Ｌｙｓがクリッピングまたは除去され、かつリンカーを有してもよく、これにより、第１及び第２の重鎖定常領域は、それぞれ配列番号４８８及び４８９を含み得る。例示的な態様において、抗ＰＤ－１抗体は、Ｖ１０３電荷対変異及びＳＥＦＬ２－２変異を含む、重鎖定常領域を含む。Ｖ１０３電荷対変異及びＳＥＦＬ２－２変異を含むそのような第１の重鎖定常領域は、配列番号４８４の配列を含み得、Ｖ１０３電荷対変異及びＳＥＦＬ２－２変異を含むそのような第２の重鎖定常領域は、配列番号４８５の配列を含み得る。そのような第１及び第２の重鎖の更なる変形形態、例えば、Ｃ末端Ｌｙｓがクリッピングされた重鎖（配列番号４８６及び４８７）及びＣ末端Ｌｙｓがクリッピングまたは除去され、かつリンカーを含む重鎖（配列番号４８８及び４８９）も企図される。

【０１３６】

例示的な態様において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号２８４のアミノ酸配列、または配列番号２８４に対して、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％の配列同一性を有するか、約９０％を超える（例えば、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％または約９９％を超える）配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、Ｖ１３１電荷対変異を含む、重鎖定常領域を含み、第１の重鎖定常領域は、配列番号４７８の配列を含み、第２の重鎖定常領域は、配列番号４７９の配列を含む。そのような第１及び第２の重鎖定常領域は、Ｃ末端Ｌｙｓがクリッピングまたは除去されてもよく、これにより、第１及び第２の重鎖定常領域は、それぞれ配列番号４８０及び４８１を含み得る。そのような第１及び第２の重鎖定常領域は、Ｃ末端Ｌｙｓがクリッピングまたは除去され、かつリンカーを有してもよく、これにより、第１及び第２の重鎖定常領域は、それぞれ配列番号４８２及び４８３を含み得る。例示的な態様において、抗ＰＤ－１抗体は、Ｖ１３１電荷対変異及びＳＥＦＬ２－２変異を含む、重鎖定常領域を含む。Ｖ１３１電荷対変異及びＳＥＦＬ２－２変異を含むそのような第１の重鎖定常領域は、配列番号４９０の配列を含み得、Ｖ１３１電荷対変異及びＳＥＦＬ２－２変異を含むそのような第２の重鎖定常領域は、配列番号４９１の配列を含み得る。そのような第１及び第２の重鎖の更なる変形形態、例えば、Ｃ末端Ｌｙｓがクリッピングされた重鎖（配列番号４９２及び４９３）及びＣ末端Ｌｙｓがクリッピングまたは除去され、かつリンカーを含む重鎖（配列番号４９４及び４９５）も企図される。

【０１３７】

代替的態様において、融合タンパク質は、２つ以上のＩＬ－２１ムテインを含む（すなわち、融合タンパク質は、ＩＬ－２１ムテイン二量体またはＩＬ－２１ムテイン多量体を含む）。例示的な代替的態様において、融合タンパク質は、２、３または４つ（またはそれ以上）のＩＬ－２１ムテインを含む。例示的な態様において、融合タンパク質が２つ以上のＩＬ－２１ムテインを含む場合、各ＩＬ－２１ムテインは、同じ構造、例えば、同じアミノ酸配列を含む。例示的な場合において、融合タンパク質は、ＩＬ－２１ホモ二量体またはＩＬ－２１ホモ多量体を含む。代替的態様において、融合タンパク質の各ＩＬ－２１ムテインは、異なる構造、例えば、異なるアミノ酸配列を含む。例示的な場合において、融合タンパク質は、ＩＬ－２１ヘテロ二量体またはＩＬ－２１ヘテロ多量体を含む。例示的な場合において、融合タンパク質は、２つのＩＬ－２１ムテインを含み、第１のＩＬ－２１ムテインは、第１の抗体重鎖のＣ末端に連結され、第２のＩＬ－２１ムテインは、第２の抗体重鎖のＣ末端に連結される。例示的な態様において、各ＩＬ－２１ムテインは、同じアミノ酸配列を有する（例えば、ＩＬ－２１ムテインホモ二量体である）。例示的な態様において、第１のＩＬ－２１ムテインは、第２のＩＬ－２１ムテインと比較して異

なるアミノ酸配列を有する（例えば、ＩＬ－２１ムテインヘテロ二量体である）。
【０１３８】
１つ以上のＩＬ－２１ムテインを含む融合タンパク質に関して、各ＩＬ－２１ムテインは、リンカーありまたはリンカーなしで、抗体の重鎖のうちの１つに結合され得る。例示的な態様において、ＩＬ－２１ムテインは、抗体重鎖のうちの１つのＣ末端にリンカーを介して結合され、リンカーは、ペプチドである。例示的な場合において、ペプチドは、ＧＧＧＧＳのアミノ酸配列（配列番号２６２）を含む。代替的態様において、ＩＬ－２１ムテインは、リンカーなしで、抗体の重鎖のうちの１つのＣ末端に直接結合される。
【０１３９】
例示的な態様において、融合タンパク質は、抗ＰＤ－１抗体の重鎖のうちの１つのＣ末端に直接結合されたＩＬ－２１ムテインを１つのみ含む。例示的な態様において、ＩＬ－２１ムテインは、表４に列挙されるアミノ酸置換または表４に列挙される配列番号の配列を含む。例示的な態様において、ＩＬ－２１ムテインは、表５に列挙されるアミノ酸置換または表５に列挙される配列番号の配列を含む。例示的な態様において、ＩＬ－２１ムテインは、表７に列挙されるアミノ酸置換または表７に列挙される配列番号の配列を含む。例示的な態様において、ＩＬ－２１ムテインは、表６及び８～１４のいずれか１つに列挙されるアミノ酸置換またはこれらの表に列挙される配列番号の配列を含む。例示的な態様において、ＩＬ－２１ムテインは、配列番号１５９、１６１、２３８、２４１、２４２または２４４のいずれかのアミノ酸配列を含む。例示的な態様において、ＩＬ－２１ムテインは、抗ＰＤ－１抗体に直接結合され、ペプチドリンカーを含まない。
【０１４０】
例示的な態様において、融合タンパク質は、２つのＩＬ－２１ムテインを含み、そのそれぞれは、抗ＰＤ－１抗体の重鎖のＣ末端に直接結合され、そのそれぞれは、同じアミノ酸配列を有する。例示的な態様において、ＩＬ－２１ムテインは、表４に列挙されるアミノ酸置換または表４に列挙される配列番号の配列を含む。例示的な態様において、ＩＬ－２１ムテインは、表５に列挙されるアミノ酸置換または表５に列挙される配列番号の配列を含む。例示的な態様において、ＩＬ－２１ムテインは、表７に列挙されるアミノ酸置換または表７に列挙される配列番号の配列を含む。例示的な態様において、ＩＬ－２１ムテインは、表６及び８～１４のいずれか１つに列挙されるアミノ酸置換またはこれらの表に列挙される配列番号の配列を含む。例示的な態様において、ＩＬ－２１ムテインは、配列番号１５９、１６１、２３７、２３８、２４１及び２４４のいずれかのアミノ酸配列を含む。例示的な態様において、ＩＬ－２１ムテインは、抗ＰＤ－１抗体に直接結合され、ペプチドリンカーを含まない。
【０１４１】
例示的な態様において、融合タンパク質は、本明細書に記載される任意のＩＬ－２１ムテインのアミノ酸配列に融合された、本明細書に記載される抗体定常領域のアミノ酸配列を含む。例示的な態様において、融合タンパク質は、本明細書に記載される任意のＩＬ－２１ムテインのアミノ酸配列に融合された、グリコシル化されていない、本明細書に記載される抗体定常領域のアミノ酸配列を含む。例示的な場合において、融合タンパク質は、配列番号３～２１、２３～５６、５８～１１２、１１４～２０８、２１０～２２２、２２４～２５５及び２８３のいずれか１つ、または配列番号３～２１、２３～５６、５８～１１２、１１４～２０８、２１０～２２２、２２４～２５５及び２８３に対して、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％の配列同一性を有するか、約９０％を超える（例えば、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％または約９９％を超える）配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ＩＬ－２１ムテインに融合された、配列番号２６５～２６７、２８２、２８４～３１１、４７２～４９５及び５４４～５５５のいずれか１つのアミノ酸配列、または配列番号２６５～２６７、２８２、２８４～３１１、４７２～４９５及び５４４～５５５のいずれか１つに対して、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくと

も約８５％、少なくとも約９０％の配列同一性を有するか、約９０％を超える（例えば、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％または約９９％を超える）配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、定常領域を含む。例示的な態様において、融合タンパク質は、配列番号２６８～２８１のいずれか１つのアミノ酸配列、または配列番号２６８～２８１に対して、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％の配列同一性を有するか、約９０％を超える（例えば、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％または約９９％を超える）配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０１４２】

例示的な実施形態において、融合タンパク質は、図４Ａ、４Ｂまたは４Ｃに記載される構築物を含む。例示的な実施形態において、融合タンパク質は、（ｉ）本明細書に記載される抗ＰＤ－１抗体（またはその抗原結合抗体断片）と、（ｉｉ）本明細書に記載されるＩＬ－２１ムテインとを含む。追加の例示的な実施形態において、融合タンパク質は、（ｉ）本明細書に記載される抗ＰＤ－１抗体（またはその抗原結合抗体断片）と、（ｉｉ）本明細書に記載される電荷対変異と、（ｉｉｉ）本明細書に記載されるＩＬ－２１ムテインとを含む（例えば、図４Ｃ参照）。他の例示的な実施形態において、融合タンパク質は、（ｉ）本明細書に記載される抗ＰＤ－１抗体（またはその抗原結合抗体断片）であって、当該抗ＰＤ－１抗体（またはその抗原結合抗体断片）の重鎖配列は、Ｃ末端リシンを含まない抗ＰＤ－１抗体（またはその抗原結合抗体断片）と、（ｉｉ）本明細書に記載される電荷対変異と、（ｉｉｉ）本明細書に記載されるＩＬ－２１ムテインとを含む。

【０１４３】

例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体（またはその抗原結合抗体断片）は、（ａ）表Ｄに記載される重鎖（ＨＣ）相補性決定領域（ＣＤＲ）１アミノ酸配列、すなわち、配列番号３１２、３２２、３３２、３４２、３５２、３６２、３７２及び３８２からなる群から選択される配列、または１アミノ酸もしくは２アミノ酸のみ異なるか、少なくとも７０％もしくは約７０％の配列同一性を有する、そのバリアント配列を含むか、（ｂ）表Ｄに記載されるＨＣ　ＣＤＲ２アミノ酸配列、すなわち、配列番号３１３、３２３、３３３、３４３、３５３、３６３、３７３及び３８３からなる群から選択される配列、または１アミノ酸もしくは２アミノ酸のみ異なるか、少なくとも７０％もしくは約７０％の配列同一性を有する、そのバリアント配列を含むか、（ｃ）表Ｄに記載されるＨＣ　ＣＤＲ３アミノ酸配列、すなわち、配列番号３１４、３２４、３３４、３４４、３５４５、３６４、３７４及び３８４からなる群から選択される配列、または１アミノ酸もしくは２アミノ酸のみ異なるか、少なくとも７０％もしくは約７０％の配列同一性を有する、そのバリアント配列を含むか、（ｄ）表Ｄに記載される軽鎖（ＬＣ）ＣＤＲ１アミノ酸配列、すなわち、３１５、３２５、３３５、３４５、３５５、３６５、３７５及び３８５からなる群から選択される配列、または１アミノ酸もしくは２アミノ酸のみ異なるか、少なくとも７０％もしくは約７０％の配列同一性を有する、そのバリアント配列を含むか、（ｅ）表Ｄに記載されるＬＣ　ＣＤＲ２アミノ酸配列、すなわち、３１６、３２６、３３６、３４６、３５６、３６６、３７６及び３８６からなる群から選択される配列、または１アミノ酸もしくは２アミノ酸のみ異なるか、少なくとも７０％もしくは約７０％の配列同一性を有する、そのバリアント配列を含むか、（ｆ）表Ｄに記載されるＬＣ　ＣＤＲ３アミノ酸配列、すなわち、３１７、３２７、３３７、３４７、３５７、３６７、３７７及び３８７からなる群から選択される配列、または１アミノ酸もしくは２アミノ酸のみ異なるか、少なくとも７０％もしくは約７０％の配列同一性を有する、そのバリアント配列を含むか、（ｇ）（ａ）～（ｆ）のうちの任意の２つまたはそれ以上の組み合わせを含む。例示的な態様において、抗ＰＤ－１抗体（またはその抗原結合抗体断片）は、表Ｄに記載されるＬＣ　ＣＤＲ１アミノ酸配列、ＬＣ　ＣＤＲ２アミノ酸配列及びＬＣ　ＣＤＲ３アミノ酸配列と、表Ｄに記載されるＨＣ　ＣＤＲアミノ酸配列のうちの少なくとも１つまたは２つとを含む。例示的な実施形態において、抗原結合タンパク質は、表Ｄの１つの縦列中に配列番号で指

定されるアミノ酸配列のうちの３つ、４つ、５つまたは６つを含む。例示的な実施形態において、抗ＰＤ－１抗体、その抗原結合抗体断片または抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物は、（ａ）配列番号３１２～３１７、（ｂ）配列番号３２２～３２７、（ｃ）配列番号３３２～３３７、（ｄ）配列番号３４２～３４７、（ｅ）配列番号３５２～３５７、（ｆ）配列番号３６２～３６７、（ｇ）配列番号３７２～３７７、及び（ｈ）配列番号３８２～３８７からなる群から選択される６つのＣＤＲアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物は、そのような領域を含む。

【０１４４】

例示的な実施形態において、抗ＰＤ－１抗体（またはその抗原結合抗体断片）は、（ａ）表Ｅに記載される重鎖可変領域アミノ酸配列、すなわち、３１８、３２８、３３８、３４８、３５８、３６８、３７８及び３８８からなる群から選択される配列、または１アミノ酸もしくは２アミノ酸のみ異なるか、少なくとも７０％もしくは約７０％の配列同一性を有する、そのバリアント配列を含むか、（ｂ）表Ｅに記載される軽鎖可変領域アミノ酸配列、すなわち、３１９、３２９、３３９、３４９、３５９、３６９、３７９及び３８９からなる群から選択される配列、または１アミノ酸もしくは２アミノ酸のみ異なるか、少なくとも７０％もしくは約７０％の配列同一性を有する、そのバリアント配列を含むか、（ｃ）（ａ）と（ｂ）の両方を含む。例示的な実施形態において、抗ＰＤ－１抗体（またはその抗原結合抗体断片）は、（ａ）配列番号３１８と３１９、（ｂ）配列番号３２８と３２９、（ｃ）配列番号３３８と３３９、（ｄ）配列番号３４８と３４９、（ｅ）配列番号３５８と３５９、（ｆ）配列番号３６８と３６９、（ｇ）配列番号３７８と３７９、及び（ｈ）配列番号３８８と３８９からなる群から選択されるアミノ酸配列対を含む。例示的な場合において、抗体定常領域は、配列番号３～２１、２３～５６、５８～１１２、１１４～２０８、２１０～２２２、２２４～２５５及び２８３のいずれか１つ、または配列番号３～２１、２３～５６、５８～１１２、１１４～２０８、２１０～２２２、２２４～２５５及び２８３に対して、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％の配列同一性を有するか、約９０％を超える（例えば、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％または約９９％を超える）配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ＩＬ－２１ムテインに融合された、配列番号２６５～２６７、２８２及び２８４～３１１のいずれか１つのアミノ酸配列、または配列番号２６５～２６７、２８２及び２８４～３１１のいずれか１つに対して、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％の配列同一性を有するか、約９０％を超える（例えば、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％または約９９％を超える）配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。例示的な実施形態において、抗原結合タンパク質は、（ａ）配列番号３２０と３２１、（ｂ）配列番号３３０と３３１、（ｃ）配列番号３４０と３４１、（ｄ）配列番号３５０と３５１、（ｅ）配列番号３６０と３６１、（ｆ）配列番号３７０と３７１、（ｇ）配列番号３８０と３８１、及び（ｈ）配列番号３９０と３９１からなる群から選択されるアミノ酸配列対を含む。例示的な実施形態において、融合タンパク質は、（Ｉ）（ａ）配列番号３２０と３２１、（ｂ）配列番号３３０と３３１、（ｃ）配列番号３４０と３４１、（ｄ）配列番号３５０と３５１、（ｅ）配列番号３６０と３６１、（ｆ）配列番号３７０と３７１、（ｇ）配列番号３８０と３８１、及び（ｈ）配列番号３９０と３９１からなる群から選択されるアミノ酸配列対と、（ＩＩ）配列番号３～２１、２３～５６、５８～１１２、１１４～２０８、２１０～２２２、２２４～２５５及び２８３のいずれか１つ、または配列番号３～２１、２３～５６、５８～１１２、１１４～２０８、２１０～２２２、２２４～２５５及び２８３に対して、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％の配列同一性を有するか、約９０％を超える（例えば、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％または約９９％を超える）配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ＩＬ－２１ムテインとを含む。

【０１４５】
例示的な場合において、融合タンパク質は、図４Ａに示されるホモ二量体を含み、抗ＰＤ－１抗体は、抗体２０Ｃ１．００９の３つの軽鎖ＣＤＲ（配列番号３５５～３５７）、抗体２０Ｃ１．００９の３つの重鎖ＣＤＲ（配列番号３５２～３５４）を含み、各重鎖は、ＳＥＦＬ２－２変異を含む定常領域配列（例えば、配列番号２６５または２６６）を含み、２つのＩＬ－２１ムテインのそれぞれは、アミノ酸置換Ｒ９Ｅ及びＲ７６Ａを含む（すなわち、どちらも配列番号２４４の配列を含む）。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３５８の重鎖可変領域と、配列番号３５９の軽鎖可変領域とを含む。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３６０の重鎖または配列番号３６１の軽鎖を含む。例示的な場合において、融合タンパク質は、配列番号３６１及び５６２または配列番号３６１及び５６３のアミノ酸配列を含む、ホモ二量体を含む。例示的な態様において、融合タンパク質は、２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３６１のアミノ酸配列を含む）と、２つの抗体重鎖（いずれもＩＬ－２１ムテインに融合され、各重鎖－ＩＬ－２１ムテイン融合体は、配列番号５６２のアミノ酸配列を含む）とを含む、ホモ二量体を含む。例示的な態様において、融合タンパク質は、２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３６１のアミノ酸配列を含む）と、２つの抗体重鎖（いずれもＩＬ－２１ムテインに融合され、各重鎖－ＩＬ－２１ムテイン融合体は、配列番号５６３のアミノ酸配列を含む）とを含む、ホモ二量体を含む。

【０１４６】
例示的な場合において、融合タンパク質は、図４Ａに示されるホモ二量体を含み、抗ＰＤ－１抗体は、抗体２０Ｃ１．００９の３つの軽鎖ＣＤＲ（配列番号３５５～３５７）、抗体２０Ｃ１．００９の３つの重鎖ＣＤＲ（配列番号３５２～３５４）を含み、各重鎖は、ＳＥＦＬ２－２変異を含む定常領域配列（例えば、配列番号２６５または２６６）を含み、２つのＩＬ－２１ムテインのそれぞれは、アミノ酸置換Ｒ９Ｅ及びＲ７６Ｅを含む（すなわち、どちらも配列番号２４５の配列を含む）。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３５８の重鎖可変領域と、配列番号３５９の軽鎖可変領域とを含む。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３６０の重鎖または配列番号３６１の軽鎖を含む。例示的な場合において、融合タンパク質は、配列番号３６１及び５６４または配列番号３６１及び５６５のアミノ酸配列を含む、ホモ二量体を含む。例示的な態様において、融合タンパク質は、２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３６１のアミノ酸配列を含む）と、２つの抗体重鎖（いずれもＩＬ－２１ムテインに融合され、各重鎖－ＩＬ－２１ムテイン融合体は、配列番号５６４のアミノ酸配列を含む）とを含む、ホモ二量体を含む。例示的な態様において、融合タンパク質は、２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３６１のアミノ酸配列を含む）と、２つの抗体重鎖（いずれもＩＬ－２１ムテインに融合され、各重鎖－ＩＬ－２１ムテイン融合体は、配列番号５６５のアミノ酸配列を含む）とを含む、ホモ二量体を含む。

【０１４７】
例示的な場合において、融合タンパク質は、図４Ｂに示されるホモ二量体を含み、抗ＰＤ－１抗体は、抗体２０Ｃ１．００９の３つの軽鎖ＣＤＲ（配列番号３５５～３５７）、抗体２０Ｃ１．００９の３つの重鎖ＣＤＲ（配列番号３５２～３５４）を含み、各重鎖は、ＳＥＦＬ２－２変異及びリンカーを含む定常領域配列（例えば、配列番号２６７）を含み、２つのＩＬ－２１ムテインのそれぞれは、アミノ酸置換Ｒ９Ｅ及びＲ７６Ａを含む（すなわち、どちらも配列番号２４４の配列を含む）。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３５８の重鎖可変領域と、配列番号３５９の軽鎖可変領域とを含む。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３６０の重鎖または配列番号３６１の軽鎖を含む。例示的な場合において、融合タンパク質は、配列番号３６１及び５６６のアミノ酸配列を含む、ホモ二量体を含む。例示的な態様において、融合タンパク質は、２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３６１のアミノ酸配列を含む）と、２つの抗体重鎖（いずれもＩＬ－２１ムテインに融合され、各重鎖－ＩＬ－２１ムテイン融合体は、配列番号５６６のアミノ酸配列を含む）とを含む、ホモ二量体を含む。

【０１４８】
例示的な場合において、融合タンパク質は、図４Ｂに示されるホモ二量体を含み、抗ＰＤ－１抗体は、抗体２０Ｃ１．００９の３つの軽鎖ＣＤＲ（配列番号３５５～３５７）、抗体２０Ｃ１．００９の３つの重鎖ＣＤＲ（配列番号３５２～３５４）を含み、各重鎖は、ＳＥＦＬ２－２変異及びリンカーを含む定常領域配列（例えば、配列番号２６７）を含み、２つのＩＬ－２１ムテインのそれぞれは、アミノ酸置換Ｒ９Ｅ及びＲ７６Ｅを含む（すなわち、どちらも配列番号２４５の配列を含む）。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３５８の重鎖可変領域と、配列番号３５９の軽鎖可変領域とを含む。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３６０の重鎖または配列番号３６１の軽鎖を含む。例示的な場合において、融合タンパク質は、配列番号３６１及び５６７のアミノ酸配列を含む、ホモ二量体を含む。例示的な態様において、融合タンパク質は、２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３６１のアミノ酸配列を含む）と、２つの抗体重鎖（いずれもＩＬ－２１ムテインに融合され、各重鎖－ＩＬ－２１ムテイン融合体は、配列番号５６７のアミノ酸配列を含む）とを含む、ホモ二量体を含む。

【０１４９】
例示的な場合において、融合タンパク質は、図４Ｃに示されるＩＬ－２１ムテイン単量体を含み、抗ＰＤ－１抗体は、抗体２０Ｃ１．００９の３つの軽鎖ＣＤＲ（配列番号３５５～３５７）と、抗体２０Ｃ１．００９の３つの重鎖ＣＤＲ（配列番号３５２～３５４）と、ＳＥＦＬ２－２変異及びＶ１電荷対変異を含む定常領域配列を含む重鎖対（例えば、配列番号３０６と３０７または配列番号３０８と３０９）とを含み、ＩＬ－２１ムテイン単量体は、Ｅ３５６Ｋ及びＤ３９９Ｋ　Ｖ１電荷対変異を含有する重鎖に結合され（例えば、ＩＬ－２１ムテイン単量体は、配列番号３０９のいずれか１つを含む重鎖に結合される）、ＩＬ－２１ムテインは、アミノ酸置換Ｒ９Ｅ及びＲ７６Ａを含む（すなわち、配列番号２４４の配列を含む）。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３５８の重鎖可変領域と、配列番号３５９の軽鎖可変領域とを含む。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３６０の重鎖または配列番号３６１の軽鎖を含む。例示的な場合において、融合タンパク質は、配列番号３６１及び５６８のアミノ酸配列を含む、単量体を含む。例示的な態様において、融合タンパク質は、２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３６１のアミノ酸配列を含む）と、２つの異なる抗体重鎖（一方は、ＩＬ－２１ムテインに融合され、配列番号５６８のアミノ酸配列を含み、他方は、ＩＬ－２１ムテインに融合しておらず、配列番号５７４のアミノ酸配列を含む）とを含む、単量体を含む。

【０１５０】
例示的な場合において、融合タンパク質は、図４Ｃに示されるＩＬ－２１ムテイン単量体を含み、抗ＰＤ－１抗体は、抗体２０Ｃ１．００９の３つの軽鎖ＣＤＲ（配列番号３５５～３５７）と、抗体２０Ｃ１．００９の３つの重鎖ＣＤＲ（配列番号３５２～３５４）と、ＳＥＦＬ２－２変異及びＶ１０３電荷対変異を含む定常領域配列を含む重鎖対（例えば、配列番号４８４と４８５または配列番号４８６と４８７）とを含み、ＩＬ－２１ムテイン単量体は、Ｅ３５６Ｋ及びＤ３９９Ｋ　Ｖ１０３電荷対変異を含有する重鎖に結合され（例えば、すなわち、ＩＬ－２１ムテイン単量体は、配列番号４８７を含む重鎖に結合される）、ＩＬ－２１ムテインは、アミノ酸置換Ｒ９Ｅ及びＲ７６Ａを含む（すなわち、配列番号２４４の配列を含む）。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３５８の重鎖可変領域と、配列番号３５９の軽鎖可変領域とを含む。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３６０の重鎖または配列番号３６１の軽鎖を含む。例示的な場合において、融合タンパク質は、配列番号３６１及び５６９のアミノ酸配列を含む、単量体を含む。例示的な態様において、融合タンパク質は、２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３６１のアミノ酸配列を含む）と、２つの異なる抗体重鎖（一方は、ＩＬ－２１ムテインに融合され、配列番号５６９のアミノ酸配列を含み、他方は、ＩＬ－２１ムテインに融合しておらず、配列番号５７５のアミノ酸配列を含む）とを含む、単量体を含む。

【０１５１】
例示的な場合において、融合タンパク質は、図４Ｃに示されるＩＬ－２１ムテイン単量

体を含み、抗ＰＤ－１抗体は、抗体２０Ｃ１．００９の３つの軽鎖ＣＤＲ（配列番号３５５～３５７）と、抗体２０Ｃ１．００９の３つの重鎖ＣＤＲ（配列番号３５２～３５４）と、ＳＥＦＬ２－２変異及びＶ１３１電荷対変異を含む定常領域配列を含む重鎖対（例えば、配列番号４９０と４９１または配列番号４９２と４９３）とを含み、ＩＬ－２１ムテイン単量体は、Ｅ３５７Ｋ及びＤ３９９Ｋ　Ｖ１３１電荷対変異を含有する重鎖に結合され（例えば、ＩＬ－２１ムテイン単量体は、配列番号４９３を含む重鎖に結合される）、ＩＬ－２１ムテインは、アミノ酸置換Ｒ９Ｅ及びＲ７６Ａを含む（すなわち、配列番号２４４の配列を含む）。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３５８の重鎖可変領域と、配列番号３５９の軽鎖可変領域とを含む。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３６０の重鎖または配列番号３６１の軽鎖を含む。例示的な場合において、融合タンパク質は、配列番号３６１及び５７０のアミノ酸配列を含む、単量体を含む。例示的な態様において、融合タンパク質は、２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３６１のアミノ酸配列を含む）と、２つの異なる抗体重鎖（一方は、ＩＬ－２１ムテインに融合され、配列番号５７０のアミノ酸配列を含み、他方は、ＩＬ－２１ムテインに融合しておらず、配列番号５７６のアミノ酸配列を含む）とを含む、単量体を含む。

【０１５２】

例示的な場合において、融合タンパク質は、図４Ｃに示されるＩＬ－２１ムテイン単量体を含み、抗ＰＤ－１抗体は、抗体２０Ｃ１．００９の３つの軽鎖ＣＤＲ（配列番号３５５～３５７）と、抗体２０Ｃ１．００９の３つの重鎖ＣＤＲ（配列番号３５２～３５４）と、ＳＥＦＬ２－２変異及びＶ１電荷対変異を含む定常領域配列を含む重鎖対（例えば、配列番号３０６と３０７または配列番号３０８と３０９）とを含み、ＩＬ－２１ムテイン単量体は、Ｅ３５６Ｋ及びＤ３９９Ｋ　Ｖ１電荷対変異を含有する重鎖に結合され（例えば、ＩＬ－２１ムテイン単量体は、配列番号３０９を含む重鎖に結合される）、ＩＬ－２１ムテインは、アミノ酸置換Ｒ９Ｅ及びＲ７６Ｅを含む（すなわち、配列番号２４５の配列を含む）。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３５８の重鎖可変領域と、配列番号３５９の軽鎖可変領域とを含む。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３６０の重鎖または配列番号３６１の軽鎖を含む。例示的な場合において、融合タンパク質は、配列番号３６１及び５７１のアミノ酸配列を含む、単量体を含む。例示的な態様において、融合タンパク質は、２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３６１のアミノ酸配列を含む）と、２つの異なる抗体重鎖（一方は、ＩＬ－２１ムテインに融合され、配列番号５７１のアミノ酸配列を含み、他方は、ＩＬ－２１ムテインに融合しておらず、配列番号５７４のアミノ酸配列を含む）とを含む、単量体を含む。

【０１５３】

例示的な場合において、融合タンパク質は、図４Ｃに示されるＩＬ－２１ムテイン単量体を含み、抗ＰＤ－１抗体は、抗体２０Ｃ１．００９の３つの軽鎖ＣＤＲ（配列番号３５５～３５７）と、抗体２０Ｃ１．００９の３つの重鎖ＣＤＲ（配列番号３５２～３５４）と、ＳＥＦＬ２－２変異及びＶ１０３電荷対変異を含む定常領域配列を含む重鎖対（例えば、配列番号４８４と４８５または配列番号４８６と４８７）とを含み、ＩＬ－２１ムテイン単量体は、Ｅ３５６Ｋ及びＤ３９９Ｋ　Ｖ１０３電荷対変異を含有する重鎖に結合され（例えば、ＩＬ－２１ムテイン単量体は、配列番号４８７を含む重鎖に結合される）、ＩＬ－２１ムテインは、アミノ酸置換Ｒ９Ｅ及びＲ７６Ｅを含む（すなわち、配列番号２４５の配列を含む）。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３５８の重鎖可変領域と、配列番号３５９の軽鎖可変領域とを含む。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３６０の重鎖または配列番号３６１の軽鎖を含む。例示的な場合において、融合タンパク質は、配列番号３６１及び５７２のアミノ酸配列を含む、単量体を含む。例示的な態様において、融合タンパク質は、２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３６１のアミノ酸配列を含む）と、２つの異なる抗体重鎖（一方は、ＩＬ－２１ムテインに融合され、配列番号５７２のアミノ酸配列を含み、他方は、ＩＬ－２１ムテインに融合しておらず、配列番号５７５のアミノ酸配列を含む）とを含む、単量体を含む。

【０１５４】

例示的な場合において、融合タンパク質は、図４Ｃに示されるＩＬ－２１ムテイン単量体を含み、抗ＰＤ－１抗体は、抗体２０Ｃ１．００９の３つの軽鎖ＣＤＲ（配列番号３５５～３５７）と、抗体２０Ｃ１．００９の３つの重鎖ＣＤＲ（配列番号３５２～３５４）と、ＳＥＦＬ２－２変異及びＶ１３１電荷対変異を含む定常領域配列を含む重鎖対（例えば、配列番号４９０と４９１または配列番号４９２と４９３）とを含み、ＩＬ－２１ムテイン単量体は、Ｅ３５７Ｋ及びＤ３９９Ｋ　Ｖ１電荷対変異を含有する重鎖に結合され（例えば、ＩＬ－２１ムテイン単量体は、配列番号４９３を含む重鎖に結合される）、ＩＬ－２１ムテインは、アミノ酸置換Ｒ９Ｅ及びＲ７６Ｅを含む（すなわち、配列番号２４５の配列を含む）。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３５８の重鎖可変領域と、配列番号３５９の軽鎖可変領域とを含む。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３６０の重鎖または配列番号３６１の軽鎖を含む。例示的な場合において、融合タンパク質は、配列番号３６１及び５７３のアミノ酸配列を含む、単量体を含む。例示的な態様において、融合タンパク質は、２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３７１のアミノ酸配列を含む）と、２つの異なる抗体重鎖（一方は、ＩＬ－２１ムテインに融合され、配列番号５７３のアミノ酸配列を含み、他方は、ＩＬ－２１ムテインに融合しておらず、配列番号５７６のアミノ酸配列を含む）とを含む、単量体を含む。

【０１５５】

例示的な場合において、融合タンパク質は、図４Ａに示されるホモ二量体を含み、抗ＰＤ－１抗体は、抗体２２Ｄ４．０１７の３つの軽鎖ＣＤＲ（配列番号３８５～３８７）、抗体２２Ｄ４．０１７の３つの重鎖ＣＤＲ（配列番号３８２～３８４）を含み、各重鎖は、ＳＥＦＬ２－２変異を含む定常領域配列（例えば、配列番号２６５または２６６）を含み、２つのＩＬ－２１ムテインのそれぞれは、アミノ酸置換Ｒ９Ｅ及びＲ７６Ａを含む（すなわち、どちらも配列番号２４４の配列を含む）。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３８８の重鎖可変領域と、配列番号３８９の軽鎖可変領域とを含む。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３９０の重鎖または配列番号３９１の軽鎖を含む。例示的な場合において、融合タンパク質は、配列番号３８９及び４９６または配列番号３８９及び５１９のアミノ酸配列を含む、ホモ二量体を含む。例示的な態様において、融合タンパク質は、２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３９１のアミノ酸配列を含む）と、２つの抗体重鎖（いずれもＩＬ－２１ムテインに融合され、各重鎖－ＩＬ－２１ムテイン融合体は、配列番号４９６のアミノ酸配列を含む）とを含む、ホモ二量体を含む。例示的な態様において、融合タンパク質は、２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３９１のアミノ酸配列を含む）と、２つの抗体重鎖（いずれもＩＬ－２１ムテインに融合され、各重鎖－ＩＬ－２１ムテイン融合体は、配列番号５１９のアミノ酸配列を含む）とを含む、ホモ二量体を含む。

【０１５６】

例示的な場合において、融合タンパク質は、図４Ａに示されるホモ二量体を含み、抗ＰＤ－１抗体は、抗体２２Ｄ４．０１７の３つの軽鎖ＣＤＲ（配列番号３８５～３８７）、抗体２２Ｄ４．０１７の３つの重鎖ＣＤＲ（配列番号３８２～３８４）を含み、各重鎖は、ＳＥＦＬ２－２変異を含む定常領域配列（例えば、配列番号２６５または２６６）を含み、２つのＩＬ－２１ムテインのそれぞれは、アミノ酸置換Ｒ９Ｅ及びＲ７６Ｅを含む（すなわち、どちらも配列番号２４５の配列を含む）。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３８８の重鎖可変領域と、配列番号３８９の軽鎖可変領域とを含む。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３９０の重鎖または配列番号３９１の軽鎖を含む。例示的な場合において、融合タンパク質は、配列番号３８９及び４９７または配列番号３８９及び４９８のアミノ酸配列を含む、ホモ二量体を含む。例示的な態様において、融合タンパク質は、２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３９１のアミノ酸配列を含む）と、２つの抗体重鎖（いずれもＩＬ－２１ムテインに融合され、融合された重鎖－ＩＬ－２１ムテインは、配列番号４９７のアミノ酸配列を含む）とを含む、ホモ二量体を含む。例示的な態様において、融合タンパク質は、２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３９１のアミノ酸配列を含む）と、２つの抗体重鎖（いずれもＩＬ－２１ムテインに融合さ

れ、各重鎖－ＩＬ－２１ムテイン融合体は、配列番号４９８のアミノ酸配列を含む）とを含む、ホモ二量体を含む。

【０１５７】

例示的な場合において、融合タンパク質は、図４Ｂに示されるホモ二量体を含み、抗ＰＤ－１抗体は、抗体２２Ｄ４．０１７の３つの軽鎖ＣＤＲ（配列番号３８５～３８７）、抗体２２Ｄ４．０１７の３つの重鎖ＣＤＲ（配列番号３８２～３８４）を含み、各重鎖は、ＳＥＦＬ２－２変異及びリンカーを含む定常領域配列（例えば、配列番号２６７）を含み、２つのＩＬ－２１ムテインのそれぞれは、アミノ酸置換Ｒ９Ｅ及びＲ７６Ａを含む（すなわち、どちらも配列番号２４４の配列を含む）。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３８８の重鎖可変領域と、配列番号３８９の軽鎖可変領域とを含む。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３９０の重鎖または配列番号３９１の軽鎖を含む。例示的な場合において、融合タンパク質は、配列番号３８９及び４９９のアミノ酸配列を含む、ホモ二量体を含む。例示的な態様において、融合タンパク質は、２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３９１のアミノ酸配列を含む）と、２つの抗体重鎖（いずれもＩＬ－２１ムテインに融合され、各重鎖－ＩＬ－２１ムテイン融合体は、配列番号４９９のアミノ酸配列を含む）とを含む、ホモ二量体を含む。

【０１５８】

例示的な場合において、融合タンパク質は、図４Ｂに示されるホモ二量体を含み、抗ＰＤ－１抗体は、抗体２２Ｄ４．０１７の３つの軽鎖ＣＤＲ（配列番号３８５～３８７）、抗体２２Ｄ４．０１７の３つの重鎖ＣＤＲ（配列番号３８２～３８４）を含み、各重鎖は、ＳＥＦＬ２－２変異及びリンカーを含む定常領域配列（例えば、配列番号２６７）を含み、２つのＩＬ－２１ムテインのそれぞれは、アミノ酸置換Ｒ９Ｅ及びＲ７６Ｅを含む（すなわち、どちらも配列番号２４５の配列を含む）。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３８８の重鎖可変領域と、配列番号３８９の軽鎖可変領域とを含む。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３９０の重鎖または配列番号３９１の軽鎖を含む。例示的な場合において、融合タンパク質は、配列番号３８９及び５００のアミノ酸配列を含む、ホモ二量体を含む。例示的な態様において、融合タンパク質は、２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３９１のアミノ酸配列を含む）と、２つの抗体重鎖（いずれもＩＬ－２１ムテインに融合され、各重鎖－ＩＬ－２１ムテイン融合体は、配列番号５００のアミノ酸配列を含む）とを含む、ホモ二量体を含む。

【０１５９】

例示的な場合において、融合タンパク質は、図４Ｃに示されるＩＬ－２１ムテイン単量体を含み、抗ＰＤ－１抗体は、抗体２２Ｄ４．０１７の３つの軽鎖ＣＤＲ（配列番号３８５～３８７）と、抗体２２Ｄ４．０１７の３つの重鎖ＣＤＲ（配列番号３８２～３８４）と、ＳＥＦＬ２－２変異及びＶ１電荷対変異を含む定常領域配列を含む重鎖対（例えば、配列番号３０６と３０７または配列番号３０８と３０９）とを含み、ＩＬ－２１ムテイン単量体は、Ｅ３５６Ｋ及びＤ３９９Ｋ　Ｖ１電荷対変異を含有する重鎖に結合され（例えば、ＩＬ－２１ムテイン単量体は、配列番号３０９を含む重鎖に結合される）、ＩＬ－２１ムテインは、アミノ酸置換Ｒ９Ｅ及びＲ７６Ａを含む（すなわち、配列番号２４４の配列を含む）。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３８８の重鎖可変領域と、配列番号３８９の軽鎖可変領域とを含む。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３９０の重鎖または配列番号３９１の軽鎖を含む。例示的な場合において、融合タンパク質は、配列番号３８９及び５０１のアミノ酸配列を含む、単量体を含む。例示的な態様において、融合タンパク質は、２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３９１のアミノ酸配列を含む）と、２つの異なる抗体重鎖（一方は、ＩＬ－２１ムテインに融合され、配列番号５０１のアミノ酸配列を含み、他方は、ＩＬ－２１ムテインに融合しておらず、配列番号５５６のアミノ酸配列を含む）とを含む、単量体を含む。

【０１６０】

例示的な場合において、融合タンパク質は、図４Ｃに示されるＩＬ－２１ムテイン単量体を含み、抗ＰＤ－１抗体は、抗体２２Ｄ４．０１７の３つの軽鎖ＣＤＲ（配列番号３８

５～３８７）と、抗体２２Ｄ４．０１７の３つの重鎖ＣＤＲ（配列番号３８２～３８４）と、ＳＥＦＬ２－２変異及びＶ１０３電荷対変異を含む定常領域配列を含む重鎖対（例えば、配列番号４８４と４８５または配列番号４８６と４８７）とを含み、ＩＬ－２１ムテイン単量体は、Ｅ３５６Ｋ及びＤ３９９Ｋ　Ｖ１０３電荷対変異を含有する重鎖に結合され（例えば、ＩＬ－２１ムテイン単量体は、配列番号４８７を含む重鎖に結合される）、ＩＬ－２１ムテインは、アミノ酸置換Ｒ９Ｅ及びＲ７６Ａを含む（すなわち、配列番号２４４の配列を含む）。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３８８の重鎖可変領域と、配列番号３８９の軽鎖可変領域とを含む。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３９０の重鎖または配列番号３９１の軽鎖を含む。例示的な場合において、融合タンパク質は、配列番号３８９及び５０２のアミノ酸配列を含む、単量体を含む。例示的な態様において、融合タンパク質は、２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３９１のアミノ酸配列を含む）と、２つの異なる抗体重鎖（一方は、ＩＬ－２１ムテインに融合され、配列番号５０２のアミノ酸配列を含み、他方は、ＩＬ－２１ムテインに融合しておらず、配列番号５５７のアミノ酸配列を含む）とを含む、単量体を含む。

【０１６１】

例示的な場合において、融合タンパク質は、図４Ｃに示されるＩＬ－２１ムテイン単量体を含み、抗ＰＤ－１抗体は、抗体２２Ｄ４．０１７の３つの軽鎖ＣＤＲ（配列番号３８５～３８７）と、抗体２２Ｄ４．０１７の３つの重鎖ＣＤＲ（配列番号３８２～３８４）と、ＳＥＦＬ２－２変異及びＶ１３１電荷対変異を含む定常領域配列を含む重鎖対（例えば、配列番号４９０と４９１または配列番号４９２と４９３）とを含み、ＩＬ－２１ムテイン単量体は、Ｅ３５７Ｋ及びＤ３９９Ｋ　Ｖ１３１電荷対変異を含有する重鎖に結合され（例えば、ＩＬ－２１ムテイン単量体は、配列番号４９３を含む重鎖に結合される）、ＩＬ－２１ムテインは、アミノ酸置換Ｒ９Ｅ及びＲ７６Ａを含む（すなわち、配列番号２４４の配列を含む）。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３８８の重鎖可変領域と、配列番号３８９の軽鎖可変領域とを含む。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３９０の重鎖または配列番号３９１の軽鎖を含む。例示的な場合において、融合タンパク質は、配列番号３８９及び５０３のアミノ酸配列を含む、単量体を含む。例示的な態様において、融合タンパク質は、２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３９１のアミノ酸配列を含む）と、２つの異なる抗体重鎖（一方は、ＩＬ－２１ムテインに融合され、配列番号５０３のアミノ酸配列を含み、他方は、ＩＬ－２１ムテインに融合しておらず、配列番号５５８のアミノ酸配列を含む）とを含む、単量体を含む。

【０１６２】

例示的な場合において、融合タンパク質は、図４Ｃに示されるＩＬ－２１ムテイン単量体を含み、抗ＰＤ－１抗体は、抗体２２Ｄ４．０１７の３つの軽鎖ＣＤＲ（配列番号３８５～３８７）と、抗体２２Ｄ４．０１７の３つの重鎖ＣＤＲ（配列番号３８２～３８４）と、ＳＥＦＬ２－２変異及びＶ１電荷対変異を含む定常領域配列を含む重鎖対（例えば、配列番号３０６と３０７または配列番号３０８と３０９）とを含み、ＩＬ－２１ムテイン単量体は、Ｅ３５６Ｋ及びＤ３９９Ｋ　Ｖ１電荷対変異を含有する重鎖に結合され（例えば、ＩＬ－２１ムテイン単量体は、配列番号３０９を含む重鎖に結合される）、ＩＬ－２１ムテインは、アミノ酸置換Ｒ９Ｅ及びＲ７６Ｅを含む（すなわち、配列番号２４５の配列を含む）。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３８８の重鎖可変領域と、配列番号３８９の軽鎖可変領域とを含む。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３９０の重鎖または配列番号３９１の軽鎖を含む。例示的な場合において、融合タンパク質は、配列番号３８９及び５０４のアミノ酸配列を含む、単量体を含む。例示的な態様において、融合タンパク質は、２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３９１のアミノ酸配列を含む）と、２つの異なる抗体重鎖（一方は、ＩＬ－２１ムテインに融合され、配列番号５０４のアミノ酸配列を含み、他方は、ＩＬ－２１ムテインに融合しておらず、配列番号５５６のアミノ酸配列を含む）とを含む、単量体を含む。

【０１６３】

例示的な場合において、融合タンパク質は、図４Ｃに示されるＩＬ－２１ムテイン単量

体を含み、抗ＰＤ－１抗体は、抗体２２Ｄ４．０１７の３つの軽鎖ＣＤＲ（配列番号３８５～３８７）と、抗体２２Ｄ４．０１７の３つの重鎖ＣＤＲ（配列番号３８２～３８４）と、ＳＥＦＬ２－２変異及びＶ１０３電荷対変異を含む定常領域配列を含む重鎖対（例えば、配列番号４８４と４８５または配列番号４８６と４８７）とを含み、ＩＬ－２１ムテイン単量体は、Ｅ３５６Ｋ及びＤ３９９Ｋ　Ｖ１０３電荷対変異を含有する重鎖に結合され（例えば、ＩＬ－２１ムテイン単量体は、配列番号４８７を含む重鎖に結合される）、ＩＬ－２１ムテインは、アミノ酸置換Ｒ９Ｅ及びＲ７６Ｅを含む（すなわち、配列番号２４５の配列を含む）。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３８８の重鎖可変領域と、配列番号３８９の軽鎖可変領域とを含む。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３９０の重鎖または配列番号３９１の軽鎖を含む。例示的な場合において、融合タンパク質は、配列番号３８９及び５０５のアミノ酸配列を含む、単量体を含む。例示的な態様において、融合タンパク質は、２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３９１のアミノ酸配列を含む）と、２つの異なる抗体重鎖（一方は、ＩＬ－２１ムテインに融合され、配列番号５０５のアミノ酸配列を含み、他方は、ＩＬ－２１ムテインに融合しておらず、配列番号５５７のアミノ酸配列を含む）とを含む、単量体を含む。

【０１６４】

例示的な場合において、融合タンパク質は、図４Ｃに示されるＩＬ－２１ムテイン単量体を含み、抗ＰＤ－１抗体は、抗体２２Ｄ４．０１７の３つの軽鎖ＣＤＲ（配列番号３８５～３８７）と、抗体２２Ｄ４．０１７の３つの重鎖ＣＤＲ（配列番号３８２～３８４）と、ＳＥＦＬ２－２変異及びＶ１３１電荷対変異を含む定常領域配列を含む重鎖対（例えば、配列番号４９０と４９１または配列番号４９２と４９３）とを含み、ＩＬ－２１ムテイン単量体は、Ｅ３５７Ｋ及びＤ３９９Ｋ　Ｖ１３１電荷対変異を含有する重鎖に結合され（例えば、ＩＬ－２１ムテイン単量体は、配列番号４９３のいずれか１つを含む重鎖に結合される）、ＩＬ－２１ムテインは、アミノ酸置換Ｒ９Ｅ及びＲ７６Ｅを含む（すなわち、配列番号２４５の配列を含む）。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３８８の重鎖可変領域と、配列番号３８９の軽鎖可変領域とを含む。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３９０の重鎖または配列番号３９１の軽鎖を含む。例示的な場合において、融合タンパク質は、配列番号３８９及び５０６のアミノ酸配列を含む、単量体を含む。例示的な態様において、融合タンパク質は、２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３９１のアミノ酸配列を含む）と、２つの異なる抗体重鎖（一方は、ＩＬ－２１ムテインに融合され、配列番号５０６のアミノ酸配列を含み、他方は、ＩＬ－２１ムテインに融合しておらず、配列番号５５８のアミノ酸配列を含む）とを含む、単量体を含む。

【０１６５】

例示的な場合において、融合タンパク質は、図４Ａに示されるホモ二量体を含み、抗ＰＤ－１抗体は、抗体２０Ａ２．００３の３つの軽鎖ＣＤＲ（配列番号３６５～３６７）、抗体２０Ａ２．００３の３つの重鎖ＣＤＲ（配列番号３６２～３６４）を含み、各重鎖は、ＳＥＦＬ２－２変異を含む定常領域配列（例えば、配列番号２６５または２６６）を含み、２つのＩＬ－２１ムテインのそれぞれは、アミノ酸置換Ｒ９Ｅ及びＲ７６Ａを含む（すなわち、どちらも配列番号２４４の配列を含む）。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３６８の重鎖可変領域と、配列番号３６９の軽鎖可変領域とを含む。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３７０の重鎖または配列番号３７１の軽鎖を含む。例示的な場合において、融合タンパク質は、配列番号３６９及び５０７または配列番号３６９及び５０８のアミノ酸配列を含む、ホモ二量体を含む。例示的な態様において、融合タンパク質は、２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３７１のアミノ酸配列を含む）と、２つの抗体重鎖（いずれもＩＬ－２１ムテインに融合され、各重鎖－ＩＬ－２１ムテイン融合体は、配列番号５０７のアミノ酸配列を含む）とを含む、ホモ二量体を含む。例示的な態様において、融合タンパク質は、２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３７１のアミノ酸配列を含む）と、２つの抗体重鎖（いずれもＩＬ－２１ムテインに融合され、各重鎖－ＩＬ－２１ムテイン融合体は、配列番号５０８のアミノ酸配列を含む）とを含

む、ホモ二量体を含む。

【０１６６】

例示的な場合において、融合タンパク質は、図４Ａに示されるホモ二量体を含み、抗ＰＤ－１抗体は、抗体２０Ａ２．００３の３つの軽鎖ＣＤＲ（配列番号３６５～３６７）、抗体２０Ａ２．００３の３つの重鎖ＣＤＲ（配列番号３６２～３６４）を含み、各重鎖は、ＳＥＦＬ２－２変異を含む定常領域配列（例えば、配列番号２６５または２６６）を含み、２つのＩＬ－２１ムテインのそれぞれは、アミノ酸置換Ｒ９Ｅ及びＲ７６Ｅを含む（すなわち、どちらも配列番号２４５の配列を含む）。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３６８の重鎖可変領域と、配列番号３６９の軽鎖可変領域とを含む。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３７０の重鎖または配列番号３７１の軽鎖を含む。例示的な場合において、融合タンパク質は、配列番号３６９及び５０９または配列番号３６９及び５１０のアミノ酸配列を含む、ホモ二量体を含む。例示的な態様において、融合タンパク質は、２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３７１のアミノ酸配列を含む）と、２つの抗体重鎖（いずれもＩＬ－２１ムテインに融合され、各重鎖－ＩＬ－２１ムテイン融合体は、配列番号５０９のアミノ酸配列を含む）とを含む、ホモ二量体を含む。例示的な態様において、融合タンパク質は、２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３７１のアミノ酸配列を含む）と、２つの抗体重鎖（いずれもＩＬ－２１ムテインに融合され、各重鎖－ＩＬ－２１ムテイン融合体は、配列番号５１０のアミノ酸配列を含む）とを含む、ホモ二量体を含む。

【０１６７】

例示的な場合において、融合タンパク質は、図４Ｂに示されるホモ二量体を含み、抗ＰＤ－１抗体は、抗体２０Ａ２．００３の３つの軽鎖ＣＤＲ（配列番号３６５～３６７）、抗体２０Ａ２．００３の３つの重鎖ＣＤＲ（配列番号３６２～３６４）を含み、各重鎖は、ＳＥＦＬ２－２変異及びリンカーを含む定常領域配列（例えば、配列番号２６７）を含み、２つのＩＬ－２１ムテインのそれぞれは、アミノ酸置換Ｒ９Ｅ及びＲ７６Ａを含む（すなわち、どちらも配列番号２４４の配列を含む）。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３６８の重鎖可変領域と、配列番号３６９の軽鎖可変領域とを含む。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３７０の重鎖または配列番号３７１の軽鎖を含む。例示的な場合において、融合タンパク質は、配列番号３６９及び５１１のアミノ酸配列を含む、ホモ二量体を含む。例示的な態様において、融合タンパク質は、２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３７１のアミノ酸配列を含む）と、２つの抗体重鎖（いずれもＩＬ－２１ムテインに融合され、各重鎖－ＩＬ－２１ムテイン融合体は、配列番号５１１のアミノ酸配列を含む）とを含む、ホモ二量体を含む。

【０１６８】

例示的な場合において、融合タンパク質は、図４Ｂに示されるホモ二量体を含み、抗ＰＤ－１抗体は、抗体２０Ａ２．００３の３つの軽鎖ＣＤＲ（配列番号３６５～３６７）、抗体２０Ａ２．００３の３つの重鎖ＣＤＲ（配列番号３６２～３６４）を含み、各重鎖は、ＳＥＦＬ２－２変異及びリンカーを含む定常領域配列（例えば、配列番号２６７）を含み、２つのＩＬ－２１ムテインのそれぞれは、アミノ酸置換Ｒ９Ｅ及びＲ７６Ｅを含む（すなわち、どちらも配列番号２４５の配列を含む）。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３６８の重鎖可変領域と、配列番号３６９の軽鎖可変領域とを含む。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３７０の重鎖または配列番号３７１の軽鎖を含む。例示的な場合において、融合タンパク質は、配列番号３６９及び５１２のアミノ酸配列を含む、ホモ二量体を含む。例示的な態様において、融合タンパク質は、２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３７１のアミノ酸配列を含む）と、２つの抗体重鎖（いずれもＩＬ－２１ムテインに融合され、各重鎖－ＩＬ－２１ムテイン融合体は、配列番号５１２のアミノ酸配列を含む）とを含む、ホモ二量体を含む。

【０１６９】

例示的な場合において、融合タンパク質は、図４Ｃに示されるＩＬ－２１ムテイン単量体を含み、抗ＰＤ－１抗体は、抗体２０Ａ２．００３の３つの軽鎖ＣＤＲ（配列番号３６

５～３６７）と、抗体２０Ａ２．００３の３つの重鎖ＣＤＲ（配列番号３６２～３６４）と、ＳＥＦＬ２－２変異及びＶ１電荷対変異を含む定常領域配列を含む重鎖対（例えば、配列番号３０６と３０７または配列番号３０８と３０９）とを含み、ＩＬ－２１ムテイン単量体は、Ｅ３５６Ｋ及びＤ３９９Ｋ　Ｖ１電荷対変異を含有する重鎖に結合され（例えば、ＩＬ－２１ムテイン単量体は、配列番号３０９のいずれか１つを含む重鎖に結合される）、ＩＬ－２１ムテインは、アミノ酸置換Ｒ９Ｅ及びＲ７６Ａを含む（すなわち、配列番号２４４の配列を含む）。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３６８の重鎖可変領域と、配列番号３６９の軽鎖可変領域とを含む。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３７０の重鎖または配列番号３７１の軽鎖を含む。例示的な場合において、融合タンパク質は、配列番号３６９及び５１３のアミノ酸配列を含む、単量体を含む。例示的な態様において、融合タンパク質は、２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３７１のアミノ酸配列を含む）と、２つの異なる抗体重鎖（一方は、ＩＬ－２１ムテインに融合され、配列番号５１３のアミノ酸配列を含み、他方は、ＩＬ－２１ムテインに融合しておらず、配列番号５５９のアミノ酸配列を含む）とを含む、単量体を含む。

【０１７０】

例示的な場合において、融合タンパク質は、図４Ｃに示されるＩＬ－２１ムテイン単量体を含み、抗ＰＤ－１抗体は、抗体２０Ａ２．００３の３つの軽鎖ＣＤＲ（配列番号３６５～３６７）と、抗体２０Ａ２．００３の３つの重鎖ＣＤＲ（配列番号３６２～３６４）と、ＳＥＦＬ２－２変異及びＶ１０３電荷対変異を含む定常領域配列を含む重鎖対（例えば、配列番号４８４と４８５または配列番号４８６と４８７）とを含み、ＩＬ－２１ムテイン単量体は、Ｅ３５６Ｋ及びＤ３９９Ｋ　Ｖ１０３電荷対変異を含有する重鎖に結合され（例えば、ＩＬ－２１ムテイン単量体は、配列番号４８７を含む重鎖に結合される）、ＩＬ－２１ムテインは、アミノ酸置換Ｒ９Ｅ及びＲ７６Ａを含む（すなわち、配列番号２４４の配列を含む）。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３６８の重鎖可変領域と、配列番号３６９の軽鎖可変領域とを含む。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３７０の重鎖または配列番号３７１の軽鎖を含む。例示的な場合において、融合タンパク質は、配列番号３６９及び５１４のアミノ酸配列を含む、単量体を含む。例示的な態様において、融合タンパク質は、２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３７１のアミノ酸配列を含む）と、２つの異なる抗体重鎖（一方は、ＩＬ－２１ムテインに融合され、配列番号５１４のアミノ酸配列を含み、他方は、ＩＬ－２１ムテインに融合しておらず、配列番号５６０のアミノ酸配列を含む）とを含む、単量体を含む。

【０１７１】

例示的な場合において、融合タンパク質は、図４Ｃに示されるＩＬ－２１ムテイン単量体を含み、抗ＰＤ－１抗体は、抗体２０Ａ２．００３の３つの軽鎖ＣＤＲ（配列番号３６５～３６７）と、抗体２０Ａ２．００３の３つの重鎖ＣＤＲ（配列番号３６２～３６４）と、ＳＥＦＬ２－２変異及びＶ１３１電荷対変異を含む定常領域配列を含む重鎖対（例えば、配列番号４９０と４９１または配列番号４９２と４９３）とを含み、ＩＬ－２１ムテイン単量体は、Ｅ３５７Ｋ及びＤ３９９Ｋ　Ｖ１３１電荷対変異を含有する重鎖に結合され（例えば、ＩＬ－２１ムテイン単量体は、配列番号４９３を含む重鎖に結合される）、ＩＬ－２１ムテインは、アミノ酸置換Ｒ９Ｅ及びＲ７６Ａを含む（すなわち、配列番号２４４の配列を含む）。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３６８の重鎖可変領域と、配列番号３６９の軽鎖可変領域とを含む。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３７０の重鎖または配列番号３７１の軽鎖を含む。例示的な場合において、融合タンパク質は、配列番号３６９及び５１５のアミノ酸配列を含む、単量体を含む。例示的な態様において、融合タンパク質は、２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３７１のアミノ酸配列を含む）と、２つの異なる抗体重鎖（一方は、ＩＬ－２１ムテインに融合され、配列番号５１５のアミノ酸配列を含み、他方は、ＩＬ－２１ムテインに融合しておらず、配列番号５６１のアミノ酸配列を含む）とを含む、単量体を含む。

【０１７２】

例示的な場合において、融合タンパク質は、図４Ｃに示されるＩＬ－２１ムテイン単量

体を含み、抗ＰＤ－１抗体は、抗体２０Ａ２．００３の３つの軽鎖ＣＤＲ（配列番号３６５～３６７）と、抗体２０Ａ２．００３の３つの重鎖ＣＤＲ（配列番号３６２～３６４）と、ＳＥＦＬ２－２変異及びＶ１電荷対変異を含む定常領域配列を含む重鎖対（例えば、配列番号３０６と３０７または配列番号３０８と３０９）とを含み、ＩＬ－２１ムテイン単量体は、Ｅ３５６Ｋ及びＤ３９９Ｋ　Ｖ１電荷対変異を含有する重鎖に結合され（例えば、ＩＬ－２１ムテイン単量体は、配列番号３０９を含む重鎖に結合される）、ＩＬ－２１ムテインは、アミノ酸置換Ｒ９Ｅ及びＲ７６Ｅを含む（すなわち、配列番号２４５の配列を含む）。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３６８の重鎖可変領域と、配列番号３６９の軽鎖可変領域とを含む。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３７０の重鎖または配列番号３７１の軽鎖を含む。例示的な場合において、融合タンパク質は、配列番号３６９及び５１６のアミノ酸配列を含む、単量体を含む。例示的な態様において、融合タンパク質は、２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３７１のアミノ酸配列を含む）と、２つの異なる抗体重鎖（一方は、ＩＬ－２１ムテインに融合され、配列番号５１６のアミノ酸配列を含み、他方は、ＩＬ－２１ムテインに融合しておらず、配列番号５５９のアミノ酸配列を含む）とを含む、単量体を含む。

【０１７３】

例示的な場合において、融合タンパク質は、図４Ｃに示されるＩＬ－２１ムテイン単量体を含み、抗ＰＤ－１抗体は、抗体２０Ａ２．００３の３つの軽鎖ＣＤＲ（配列番号３６５～３６７）と、抗体２０Ａ２．００３の３つの重鎖ＣＤＲ（配列番号３６２～３６４）と、ＳＥＦＬ２－２変異及びＶ１０３電荷対変異を含む定常領域配列を含む重鎖対（例えば、配列番号４８４と４８５または配列番号４８６と４８７）とを含み、ＩＬ－２１ムテイン単量体は、Ｅ３５６Ｋ及びＤ３９９Ｋ　Ｖ１０３電荷対変異を含有する重鎖に結合され（例えば、ＩＬ－２１ムテイン単量体は、配列番号４８７を含む重鎖に結合される）、ＩＬ－２１ムテインは、アミノ酸置換Ｒ９Ｅ及びＲ７６Ｅを含む（すなわち、配列番号２４５の配列を含む）。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３６８の重鎖可変領域と、配列番号３６９の軽鎖可変領域とを含む。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３７０の重鎖または配列番号３７１の軽鎖を含む。例示的な場合において、融合タンパク質は、配列番号３６９及び５１７のアミノ酸配列を含む、単量体を含む。例示的な態様において、融合タンパク質は、２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３７１のアミノ酸配列を含む）と、２つの異なる抗体重鎖（一方は、ＩＬ－２１ムテインに融合され、配列番号５１７のアミノ酸配列を含み、他方は、ＩＬ－２１ムテインに融合しておらず、配列番号５６０のアミノ酸配列を含む）とを含む、単量体を含む。

【０１７４】

例示的な場合において、融合タンパク質は、図４Ｃに示されるＩＬ－２１ムテイン単量体を含み、抗ＰＤ－１抗体は、抗体２０Ａ２．００３の３つの軽鎖ＣＤＲ（配列番号３６５～３６７）と、抗体２０Ａ２．００３の３つの重鎖ＣＤＲ（配列番号３６２～３６４）と、ＳＥＦＬ２－２変異及びＶ１３１電荷対変異を含む定常領域配列を含む重鎖対（例えば、配列番号４９０と４９１または配列番号４９２と４９３）とを含み、ＩＬ－２１ムテイン単量体は、Ｅ３５７Ｋ及びＤ３９９Ｋ　Ｖ１電荷対変異を含有する重鎖に結合され（例えば、ＩＬ－２１ムテイン単量体は、配列番号４９３を含む重鎖に結合される）、ＩＬ－２１ムテインは、アミノ酸置換Ｒ９Ｅ及びＲ７６Ｅを含む（すなわち、配列番号２４５の配列を含む）。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３６８の重鎖可変領域と、配列番号３６９の軽鎖可変領域とを含む。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号３７０の重鎖または配列番号３７１の軽鎖を含む。例示的な場合において、融合タンパク質は、配列番号３６９及び５１８のアミノ酸配列を含む、単量体を含む。例示的な態様において、融合タンパク質は、２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３７１のアミノ酸配列を含む）と、２つの異なる抗体重鎖（一方は、ＩＬ－２１ムテインに融合され、配列番号５１８のアミノ酸配列を含み、他方は、ＩＬ－２１ムテインに融合しておらず、配列番号５６１のアミノ酸配列を含む）とを含む、単量体を含む。

【０１７５】

例示的な場合において、融合タンパク質は、図４Ａもしくは４Ｂに示されるＩＬ－２１ムテインホモ二量体または図４Ｃに示されるＩＬ－２１ムテイン単量体と、抗体２０Ａ２．００３の３つの軽鎖ＣＤＲ（配列番号３６５～３６７）、抗体２０Ａ２．００３の３つの重鎖ＣＤＲ（配列番号３６２～３６４）、及び配列番号５４４～５５５のいずれか１つを含む重鎖定常領域配列を含む抗ＰＤ－１抗体とを含む。例示的な場合において、融合タンパク質は、図４Ａもしくは４Ｂに示されるＩＬ－２１ムテインホモ二量体または図４Ｃに示されるＩＬ－２１ムテイン単量体を含み、抗ＰＤ－１抗体は、抗体２０Ａ２．００３の３つの軽鎖ＣＤＲ（配列番号３６５～３６７）と、抗体２０Ａ２．００３の３つの重鎖ＣＤＲ（配列番号３６２～３６４）と、配列番号５２５または５２７の重鎖定常領域配列とを含む。

【０１７６】

例示的な場合において、融合タンパク質は、図４Ａもしくは４Ｂに示されるＩＬ－２１ムテインホモ二量体または図４Ｃに示されるＩＬ－２１ムテイン単量体を含み、抗ＰＤ－１抗体は、抗体２２Ｄ４．０１７の３つの軽鎖ＣＤＲ（配列番号３８５～３８７）と、抗体２２Ｄ４．０１７の３つの重鎖ＣＤＲ（配列番号３８２～３８４）と、配列番号５４４～５５５のいずれか１つを含む重鎖定常領域配列とを含む。例示的な場合において、融合タンパク質は、図４Ａもしくは４Ｂに示されるＩＬ－２１ムテインホモ二量体または図４に示されるＩＬ－２１ムテイン単量体を含み、抗ＰＤ－１抗体は、抗体２２Ｄ４．０１７の３つの軽鎖ＣＤＲ（配列番号３８５～３８７）と、抗体２２Ｄ４．０１７の３つの重鎖ＣＤＲ（配列番号３８２～３８４）と、配列番号５２９または５３１の重鎖定常領域配列とを含む。

【０１７７】

例示的な場合において、融合タンパク質は、図４Ａもしくは４Ｂに示されるＩＬ－２１ムテインホモ二量体または図４Ｃに示されるＩＬ－２１ムテイン単量体を含み、抗ＰＤ－１抗体は、抗体２０Ｃ１．００９の３つの軽鎖ＣＤＲ（配列番号３５５～３５７）と、抗体２０Ｃ１．００９の３つの重鎖ＣＤＲ（配列番号３５２～３５４）と、配列番号５４４～５５５のいずれか１つを含む重鎖定常領域配列とを含む。例示的な場合において、融合タンパク質は、図４Ａもしくは４Ｂに示されるＩＬ－２１ムテインホモ二量体または図４Ｃに示されるＩＬ－２１ムテイン単量体を含み、抗ＰＤ－１抗体は、抗体２０Ｃ１．００９の３つの軽鎖ＣＤＲ（配列番号３５５～３５７）と、抗体２０Ｃ１．００９の３つの重鎖ＣＤＲ（配列番号３５２～３５４）と、配列番号５２１または５２３の重鎖定常領域配列とを含む。

【０１７８】

抗原結合タンパク質

本開示は、ＰＤ－１抗原結合タンパク質を提供する。例示的な態様において、ＰＤ－１抗原結合タンパク質は、本明細書に記載される抗ＰＤ－１抗体、その抗原結合抗体断片または抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物である。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体、その抗原結合抗体断片または抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物は、（ａ）表Ｄに記載される重鎖（ＨＣ）相補性決定領域（ＣＤＲ）１アミノ酸配列、すなわち、配列番号３１２、３２２、３３２、３４２、３５２、３６２、３７２及び３８２からなる群から選択される配列、または１アミノ酸もしくは２アミノ酸のみ異なるか、少なくとも７０％もしくは約７０％の配列同一性を有する、そのバリアント配列を含むか、（ｂ）表Ｄに記載されるＨＣ　ＣＤＲ２アミノ酸配列、すなわち、配列番号３１３、３２３、３３３、３４３、３５３、３６３、３７３及び３８３からなる群から選択される配列、または１アミノ酸もしくは２アミノ酸のみ異なるか、少なくとも７０％もしくは約７０％の配列同一性を有する、そのバリアント配列を含むか、（ｃ）表Ｄに記載されるＨＣ　ＣＤＲ３アミノ酸配列、すなわち、配列番号３１４、３２４、３３４、３４４、３５４５、３６４、３７４及び３８４からなる群から選択される配列、または１アミノ酸もしくは２アミノ酸のみ異なるか、少なくとも７０％もしくは約７０％の配列同一性を有する、そのバリアント配列を含むか、（ｄ）表Ｄに記載される軽鎖（ＬＣ）ＣＤＲ１アミノ酸配列、すなわち、３１５、３２

５、３３５、３４５、３５５、３６５、３７５及び３８５からなる群から選択される配列、または１アミノ酸もしくは２アミノ酸のみ異なるか、少なくとも７０％もしくは約７０％の配列同一性を有する、そのバリアント配列を含むか、（ｅ）表Ｄに記載されるＬＣ　ＣＤＲ２アミノ酸配列、すなわち、３１６、３２６、３３６、３４６、３５６、３６６、３７６及び３８６からなる群から選択される配列、または１アミノ酸もしくは２アミノ酸のみ異なるか、少なくとも７０％もしくは約７０％の配列同一性を有する、そのバリアント配列を含むか、（ｆ）表Ｄに記載されるＬＣ　ＣＤＲ３アミノ酸配列、すなわち、３１７、３２７、３３７、３４７、３５７、３６７、３７７及び３８７からなる群から選択される配列、または１アミノ酸もしくは２アミノ酸のみ異なるか、少なくとも７０％もしくは約７０％の配列同一性を有する、そのバリアント配列を含むか、（ｇ）（ａ）～（ｆ）のうちの任意の２つまたはそれ以上の組み合わせを含む。例示的な態様において、抗ＰＤ－１抗体、その抗原結合抗体断片または抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物は、表Ｄに記載されるＬＣ　ＣＤＲ１アミノ酸配列、ＬＣ　ＣＤＲ２アミノ酸配列及びＬＣ　ＣＤＲ３アミノ酸配列と、表Ｄに記載されるＨＣ　ＣＤＲアミノ酸配列のうちの少なくとも１つまたは２つとを含む。例示的な実施形態において、抗原結合タンパク質は、表Ｄの１つの縦列中に配列番号で指定されるアミノ酸配列のうちの少なくとも３つ、４つまたは５つを含む。

【０１７９】

例示的な実施形態において、抗ＰＤ－１抗体、その抗原結合抗体断片または抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物は、（ａ）配列番号３１２～３１７、（ｂ）配列番号３２２～３２７、（ｃ）配列番号３３２～３３７、（ｄ）配列番号３４２～３４７、（ｅ）配列番号３５２～３５７、（ｆ）配列番号３６２～３６７、（ｇ）配列番号３７２～３７７、及び（ｈ）配列番号３８２～３８７からなる群から選択される６つのＣＤＲアミノ酸配列を含む。例示的な場合において、表Ｄのアミノ酸配列は、少なくとも１つまたはそれ以上（例えば、少なくとも２、３、４、５、６、７、８、９、１０またはそれ以上）の介在アミノ酸（複数可）によって隔てられる。例示的な実施形態において、抗ＰＤ－１抗体、その抗原結合抗体断片または抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物は、（ａ）表Ｅに記載される重鎖可変領域アミノ酸配列、すなわち、３１８、３２８、３３８、３４８、３５８、３６８、３７８及び３８８からなる群から選択される配列、または１アミノ酸もしくは２アミノ酸のみ異なるか、少なくとも７０％もしくは約７０％の配列同一性を有する、そのバリアント配列を含むか、（ｂ）表Ｅに記載される軽鎖可変領域アミノ酸配列、すなわち、３１９、３２９、３３９、３４９、３５９、３６９、３７９及び３８９からなる群から選択される配列、または１アミノ酸もしくは２アミノ酸のみ異なるか、少なくとも７０％もしくは約７０％の配列同一性を有する、そのバリアント配列を含むか、（ｃ）（ａ）と（ｂ）の両方を含む。例示的な実施形態において、抗ＰＤ－１抗体、その抗原結合抗体断片または抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物は、（ａ）配列番号３１８と３１９、（ｂ）配列番号３２８と３２９、（ｃ）配列番号３３８と３３９、（ｄ）配列番号３４８と３４９、（ｅ）配列番号３５８と３５９、（ｆ）配列番号３６８と３６９、（ｇ）配列番号３７８と３７９、及び（ｈ）配列番号３８８と３８９からなる群から選択されるアミノ酸配列対を含む。例示的な態様において、抗ＰＤ－１抗体、その抗原結合抗体断片または抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物は、（Ｉ）（ａ）配列番号３１８と３１９、（ｂ）配列番号３２８と３２９、（ｃ）配列番号３３８と３３９、（ｄ）配列番号３４８と３４９、（ｅ）配列番号３５８と３５９、（ｆ）配列番号３６８と３６９、（ｇ）配列番号３７８と３７９、及び（ｈ）配列番号３８８と３８９からなる群から選択されるアミノ酸配列対と、（ＩＩ）配列番号２６５～２６７、２８２、２８４～３１１、４７２～４９５及び５４４～５５５のいずれか１つを含む定常領域とを含む。例示的な実施形態において、抗原結合タンパク質は、（ａ）配列番号３２０と３２１、（ｂ）配列番号３３０と３３１、（ｃ）配列番号３４０と３４１、（ｄ）配列番号３５０と３５１、（ｅ）配列番号３６０と３６１、（ｆ）配列番号３７０と３７１、（ｇ）配列番号３８０と３８１、及び（ｈ）配列番号３９０と３９１からなる群から選択されるアミノ酸配列対を含む。例示的な実施形態において、抗原

結合タンパク質は、上の配列番号のうちの１つ以上に対して、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％の配列同一性を有するか、約９０％を超える（例えば、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％または約９９％を超える）配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【０１８０】

いくつかの実施形態において、上記の抗原結合タンパク質は、抗ＰＤ－１抗体またはその抗原結合抗体断片である。

【０１８１】

本開示は、更に、本明細書に記載されるＰＤ－１抗原結合タンパク質と、異種部分とを含む、コンジュゲートを提供する。異種部分は、本明細書に記載されるＰＤ－１抗原結合タンパク質とは異なる任意の分子であり得る。異種部分は、例示的な態様において、異種ペプチドもしくはポリペプチド、標的化因子、診断標識、ポリマー、核酸、量子ドット、小分子、毒素、炭水化物、アミノ酸または他の治療薬もしくは診断薬である。例示的な態様において、異種部分は、本明細書に記載されるＩＬ－２１ムテインである。

【０１８２】

本開示は、更に、本明細書に記載されるＰＤ－１抗原結合タンパク質と、異種ポリペプチドまたはペプチドとを含む、融合タンパク質を提供する。例示的な態様において、異種ポリペプチドは、本明細書に記載されるＩＬ－２１ムテインである。

【０１８３】

抗体の作製方法

抗体、抗原結合抗体断片及び抗体タンパク質生成物の好適な作製方法は、当該技術分野において知られている。例えば、抗体を産生するための標準的なハイブリドーマ法は、例えば、Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｌａｎｅ（ｅｄｓ．），Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，ＣＳＨ Ｐｒｅｓｓ（１９８８）及びＣＡ．Ｊａｎｅｗａｙ ｅｔ ａｌ．（ｅｄｓ．），Ｉｍｍｕｎｏｂｉｏｌｏｇｙ，５^{ｔｈ} Ｅｄ．，Ｇａｒｌａｎｄ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ＮＹ（２００１））に記載されている。抗ＰＤ－１モノクローナル抗体または本開示の例示的な調製方法は、本明細書の実施例に記載される。

【０１８４】

宿主種に応じて、種々のアジュバントを使用して、免疫応答を増大させ、宿主による抗体産生をより大きくすることができる。そのようなアジュバントには、フロイント、水酸化アルミニウムなどの鉱物ゲル、ならびに界面活性物質、例えば、リゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油型乳剤、キーホールリンペットヘモシアニン及びジニトロフェノールが挙げられるが、これらに限定されない。ＢＣＧ（カルメット・ゲラン桿菌）及びコリネバクテリウム・パルヴムは、有用である可能性があるヒトアジュバントである。

【０１８５】

抗体産生の他の方法について、表Ｆにまとめる。

【表６】

表Ｆ

技術	例示的な参照文献
ＥＢＶ－ハイブリドーマ法及びバクテリオファージベクター発現系	Ｈａｓｋａｒｄ ａｎｄ Ａｒｃｈｅｒ，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ，７４（２），３６１－６７（１９８４）、Ｒｏｄｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．，１２１，１４０－６７（１９８６）及びＨｕｓｅ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２４６，１２７５－８１（１９８９））
非ヒト動物における抗体産生法	米国特許第５，５４５，８０６号、同第５，５６９，８２５号及び同第５，７１４，３５２号、ならびに米国特許出願公開第２００２／０１９７２６６号
リンパ球集団においてｉｎ ｖｉｖｏ産生を誘導するか、組み換え免疫グロブリンライブラリーまたは高度に特異的な結合試薬のパネルをスクリーニングすることによる	Ｏｒｌａｎｄｉ ｅｔ ａｌ（Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ８６：３８３３－３８３７；１９８９）及びＷｉｎｔｅｒ Ｇ ａｎｄ Ｍｉｌｓｔｅｉｎ Ｃ（Ｎａｔｕｒｅ ３４９：２９３－２９９，１９９１）
組み換えタンパク質の産生方法	Ｐｒｏｔｅｉｎ ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ａｎｄ ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ” Ｎａｔ Ｍｅｔｈｏｄｓ ５（２）：１３５－１４６（２００８）
ファージディスプレイ	Ｊａｎｅｗａｙ ｅｔ ａｌ．（上掲）、Ｈｕｓｅ ｅｔ ａｌ．（上掲）及び米国特許第６，２６５，１５０号）。関連手法はまた、米国特許第５，４０３，４８４号、米国特許第５，５７１，６９８号、米国特許第５，８３７，５００号、米国特許第５，７０２，８９２号に記載されている。米国特許第５，７８０，２７９号；米国特許第５，８２１，０４７号；米国特許第５，８２４，５２０号；米国特許第５，８５５，８８５号；米国特許第５，８５８，６５７号；米国特許第５，８７１，９０７号；米国特許第５，９６９，１０８号；米国特許第６，０５７，０９８号；及び米国特許第６，２２５，４４７号に記載の技術
抗体は、トランスジェニックマウスによって産生され得る。	米国特許第５，５４５，８０６号及び同第５，５６９，８２５号、ならびにＪａｎｅｗａｙ ｅｔ ａｌ．（上掲）

【０１８６】

ＰＤ－１に対する結合能力について抗体を試験する方法は、抗体の産生方法にかかわら

ず、当該技術分野において知られており、例えば、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）、ＥＬＩＳＡ、ウェスタンブロット、免疫沈降、ＳＰＲ及び競合阻害アッセイなどの任意の抗体－抗原結合アッセイが挙げられる（例えば、Ｊａｎｅｗａｙ ｅｔ ａｌ．（後述）、及び米国特許出願公開第２００２／０１９７２６６号、及び競合アッセイに関する上のセクション参照）。抗原またはそのエピトープへの結合に関して第２の抗体と競合する抗体の能力を試験する、他の結合アッセイ、例えば、競合結合アッセイまたは競合アッセイは、当該技術分野において知られており、抗体のＰＤ－１結合能力を試験するために使用することができる。例えば、米国特許出願公開第ＵＳ２０１４０１７８９０５号，Ｃｈａｎｄ ｅｔ ａｌ．，Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ ４６：１６８－１７１（２０１７）；Ｌｉｕ ｅｔ ａｌ．，Ａｎａｌ Ｂｉｏｃｈｅｍ ５２５：８９－９１（２０１７）；及びＧｏｏｌｉａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｖｅｔ Ｄｉａｇｎ Ｉｎｖｅｓｔ ２９（２）：２５０－２５３（２０１７）を参照されたい。また、２つの抗体を比較する他の方法は、当該技術分野において知られており、例えば、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）が挙げられる。ＳＰＲは、抗体と第２の抗体の結合定数を求めるために使用することができ、２つの結合定数を比較することができる。

【０１８７】

異種部分：ポリマー、炭水化物、脂質及び治療薬

例示的な実施形態において、本開示のコンジュゲートは、ポリマーに連結されたＩＬ－２１ムテインを含む。いくつかの実施形態において、ポリマーは、ポリアミド、ポリカーボネート、ポリアルキレン及びその誘導体、例えば、ポリアルキレングリコール、ポリアルキレンオキシド、ポリアルキレンテレフタレート、アクリル酸エステル及びメタクリル酸エステルのポリマー、例えば、ポリ（メチルメタクリレート）、ポリ（エチルメタクリレート）、ポリ（ブチルメタクリレート）、ポリ（イソブチルメタクリレート）、ポリ（ヘキシルメタクリレート）、ポリ（イソデシルメタクリレート）、ポリ（ラウリルメタクリレート）、ポリ（フェニルメタクリレート）、ポリ（メチルアクリレート）、ポリ（イソプロピルアクリレート）、ポリ（イソブチルアクリレート）及びポリ（オクタデシルアクリレート）、ポリビニルポリマー、例えば、ポリビニルアルコール、ポリビニルエーテル、ポリビニルエステル、ポリビニルハライド、ポリ（ビニルアセテート）及びポリビニルピロリドン、ポリグリコリド、ポリシロキサン、ポリウレタン及びこれらのコポリマー、セルロース、例えば、アルキルセルロース、ヒドロキシアルキルセルロース、セルロースエーテル、セルロースエステル、ニトロセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシ－プロピルメチルセルロース、ヒドロキシブチルメチルセルロース、酢酸セルロース、プロピオン酸セルロース、酢酸酪酸セルロース、酢酸フタル酸セルロース、カルボキシルエチルセルロース、三酢酸セルロース及びセルロース硫酸ナトリウム塩、ポリプロピレン、ポリエチレン、例えば、ポリ（エチレングリコール）、ポリ（エチレンオキシド）及びポリ（エチレンテレフタレート）、ならびにポリスチレンからなる群から選択される。具体的な実施形態において、ポリマーは、ポリアルキレングリコールであり、例えば、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）が挙げられる。

【０１８８】

例示的な実施形態において、本開示のコンジュゲートは、炭水化物に連結されたＩＬ－２１ムテインを含む。いくつかの実施形態において、炭水化物は、単糖（例えば、グルコース、ガラクトース、フルクトース）、二糖（例えば、スクロース、ラクトース、マルトース）、オリゴ糖（例えば、ラフィノース、スタキオース）、またはポリ糖（例えば、デンプン、アミラーゼ、アミロペクチン、セルロース、キチン、カロース、ラミナリン、キシラン、マンナン、フコイダンまたはガラクトマンナン）である。

【０１８９】

いくつかの実施形態において、異種部分は、脂質である。脂質は、いくつかの実施形態において、脂肪酸、エイコサノイド、プロスタグランジン、ロイコトリエン、トロンボキサン、Ｎ－アシルエタノールアミン）、グリセロ脂質（例えば、一置換、二置換、三置換

グリセロール）、グリセロリン脂質（例えば、ホスファチジルコリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン）、スフィンゴ脂質（例えば、スフィンゴシン、セラミド）、ステロール脂質（例えば、ステロイド、コレステロール）、プレノール脂質、サッカロ脂質、またはポリケチド、油、ワックス、コレステロール、ステロール、脂溶性ビタミン、モノグリセリド、ジグリセリド、トリグリセリド、リン脂質である。

【０１９０】

例示的な実施形態において、本開示のコンジュゲートは、治療薬に連結されたＩＬ－２１ムテインを含む。治療薬は、当該技術分野において知られている治療薬のいずれかであり得る。例示的な態様において、治療薬は、その薬剤が免疫応答を刺激する限り、免疫療法薬である。例示的な態様において、免疫療法薬は、がんワクチンである。例示的な態様において、免疫療法薬は、モノクローナル抗体である。例示的な態様において、免疫療法薬は、免疫チェックポイント阻害薬、例えば、ＣＴＬＡ４、ＰＤ－１、ＰＤ－Ｌ１の阻害薬である。例示的な場合において、モノクローナル抗体は、免疫チェックポイント経路中のタンパク質に対して特異的である。免疫チェックポイント経路のタンパク質は、例えば、ＣＴＬＡ４、ＰＤ－１、ＰＤ－Ｌ１、Ｂ７－Ｈ３、Ｂ７Ｈ４またはＴＩＭ３であり得る。例えば、本開示の抗原結合タンパク質は、アテゾリズマブ、アベルマブ、イピリムマブ、トレメリムマブ、ＢＭＳ－９３６５５８、ＭＫ３４７５、ＣＴ－０１１、ＡＭ－２２４、ＭＤＸ－１１０５、ＩＭＰ３２１、ＭＧＡ２７１にコンジュゲートされ得る。

【０１９１】

例示的な態様において、治療薬は、腫瘍転移の阻害に有効であり、かつ／または少なくとも１つの細胞集団に対して抗増殖作用を有する、サイトカイン、リンフォカイン、成長因子または造血因子である。そのようなサイトカイン、リンフォカイン、成長因子または他の造血因子には、Ｍ－ＣＳＦ、ＧＭ－ＣＳＦ、ＴＮＦ、ＩＬ－１、ＩＬ－２、ＩＬ－３、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－７、ＩＬ－８、ＩＬ－９、ＩＬ－１０、ＩＬ－１１、ＩＬ－１２、ＩＬ－１３、ＩＬ－１４、ＩＬ－１５、ＩＬ－１６、ＩＬ－１７、ＩＬ－１８、ＩＦＮ、ＴＮＦα、ＴＮＦ１、ＴＮＦ２、Ｇ－ＣＳＦ、Ｍｅｇ－ＣＳＦ、ＧＭ－ＣＳＦ、トロンボポエチン、幹細胞因子及びエリスロポエチンが挙げられるが、これらに限定されない。本明細書で使用される更なる成長因子には、アンジオジェニン、骨形成タンパク質１、骨形成タンパク質２、骨形成タンパク質３、骨形成タンパク質４、骨形成タンパク質５、骨形成タンパク質６、骨形成タンパク質７、骨形成タンパク質８、骨形成タンパク質９、骨形成タンパク質１０、骨形成タンパク質１１、骨形成タンパク質１２、骨形成タンパク質１３、骨形成タンパク質１４、骨形成タンパク質１５、骨形成タンパク質受容体ＩＡ、骨形成タンパク質受容体ＩＢ、脳由来神経栄養因子、毛様体神経栄養因子、毛様体神経栄養因子受容体α、サイトカイン誘導性好中球遊走因子１、サイトカイン誘導性好中球遊走因子２α、サイトカイン誘導性好中球遊走因子２β、β内皮細胞成長因子、エンドセリン１、上皮由来好中球誘引物質、グリア細胞株由来神経栄養因子受容体α１、グリア細胞株由来神経栄養因子受容体α２、成長関連タンパク質、成長関連タンパク質α、成長関連タンパク質β、成長関連タンパク質γ、ヘパリン結合上皮成長因子、肝細胞成長因子、肝細胞成長因子受容体、インスリン様成長因子Ｉ、インスリン様成長因子受容体、インスリン様成長因子ＩＩ、インスリン様成長因子結合タンパク質、ケラチノサイト成長因子、白血病抑制因子、白血病抑制因子受容体α、神経成長因子　神経成長因子受容体、ニューロトロフィン－３、ニューロトロフィン－４、Ｂ細胞前駆体成長刺激因子、幹細胞因子、幹細胞因子受容体、トランスフォーミング増殖因子α、トランスフォーミング増殖因子β、トランスフォーミング増殖因子β１、トランスフォーミング増殖因子β１．２、トランスフォーミング増殖因子β２、トランスフォーミング増殖因子β３、トランスフォーミング増殖因子β５、潜在型トランスフォーミング増殖因子β１、トランスフォーミング増殖因子β結合タンパク質Ｉ、トランスフォーミング増殖因子β結合タンパク質ＩＩ、トランスフォーミング増殖因子β結合タンパク質ＩＩＩ、Ｉ型腫瘍壊死因子受容体、ＩＩ型腫瘍壊死因子受容体、ウロキナーゼ型プラスミノーゲン活性化因子受容体、ならび

にこれらのキメラタンパク質及び生物学的または免疫学的に活性な断片が挙げられる。例示的な実施形態において、治療薬は、上述したサイトカイン、リンフォカイン、成長因子または他の造血因子のいずれか１つに対して特異的な抗体を含む。

【０１９２】

核酸

本開示は、更に、本開示のＩＬ－２１ムテイン、ＩＬ－２１ムテインを含むコンジュゲート、またはＩＬ－２１ムテインを含む融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、核酸を提供する。例えば、核酸は、抗ＰＤ－１抗体の重鎖をコードするヌクレオチド配列と、それに続く、本開示のＩＬ－２１ムテインをコードするヌクレオチド配列を含み得る。重鎖をコードするヌクレオチド配列とＩＬ－２１ムテインをコードするヌクレオチド配列は、ＧＧＧＧＳのアミノ酸配列（配列番号２６２）を含むペプチドリンカーをコードするヌクレオチド配列と隣接してもよい。代替的態様において、核酸は、ペプチドリンカーをコードするヌクレオチド配列を含まず、抗ＰＤ－１抗体の重鎖をコードするヌクレオチド配列は、本開示のＩＬ－２１ムテインをコードするヌクレオチド配列にタンデムに並んでいる。

【０１９３】

例示的な態様において、核酸は、配列番号３～２１、２３～５６、５８～１１２、１１４～２０８、２１０～２２２、２２４～２５５及び２８３のアミノ酸配列、または配列番号３～２１、２３～５６、５８～１１２、１１４～２０８、２１０～２２２、２２４～２５５及び２８３のアミノ酸配列に対して、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％の配列同一性を有するか、約９０％を超える（例えば、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％または約９９％を超える）配列同一性を有するアミノ酸配列を含むＩＬ－２１ムテインをコードする、ヌクレオチド配列を含む。

【０１９４】

例示的な態様において、核酸は、配列番号２６２のペプチドリンカー、または配列番号２６２に対して、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％の配列同一性を有するか、約９０％を超える（例えば、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％または約９９％を超える）配列同一性を有するアミノ酸配列をコードする、ヌクレオチド配列を含む。

【０１９５】

例示的な態様において、核酸は、本明細書に記載される任意のＩＬ－２１ムテインのアミノ酸配列に融合された、本明細書に記載される抗体定常領域のアミノ酸配列を含む融合タンパク質をコードする、ヌクレオチド配列を含む。例示的な場合において、核酸は、配列番号３～２１、２３～５６、５８～１１２、１１４～２０８、２１０～２２２、２２４～２５５及び２８３のいずれか１つ、または配列番号３～２１、２３～５６、５８～１１２、１１４～２０８、２１０～２２２、２２４～２５５及び２８３に対して、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％の配列同一性を有するか、約９０％を超える（例えば、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％または約９９％を超える）の配列同一性を有するアミノ酸配列に融合された、配列番号２６５～２６７及び２８２のいずれか１つのアミノ酸配列、または配列番号２６５～２６７及び２８２のいずれか１つに対して、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％の配列同一性を有するか、約９０％を超える（例えば、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％または約９９％を超える）配列同一性を有するアミノ酸配列を含む融合タンパク質をコードする、ヌクレオチド配列を含む。例示的な態様において、核酸は、配列番号２６８～２８１のいずれか１つのアミノ酸配列、または配列番号２６８～２８１に対して、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約

７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％の配列同一性を有するか約９０％を超える（例えば、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％または約９９％を超える）配列同一性を有するアミノ酸配列を含む融合タンパク質をコードする、ヌクレオチド配列を含む。

【０１９６】

例示的な態様において、核酸は、配列番号２６５～２６７、２８２、２８４～３１１、４７２～４９５及び５４４～５５５のいずれか１つの重鎖定常領域アミノ酸配列、または配列番号２６５～２６７、２８２、２８４～３１１、４７２～４９５及び５４４～５５５のいずれか１つに対して、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％の配列同一性を有するか、約９０％を超える（例えば、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％または約９９％を超える）配列同一性を有するアミノ酸配列を含む抗ＰＤ－１抗体をコードする、ヌクレオチド配列を含む。

【０１９７】

本開示は、更に、本開示のＰＤ－１抗原結合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、核酸を提供する。例示的な態様において、ヌクレオチド配列は、重鎖ＣＤＲもしくは軽鎖ＣＤＲ、重鎖可変領域もしくは軽鎖可変領域、または重鎖配列もしくは軽鎖配列をコードする配列を含む。以下の表Ｇを参照されたい。例示的な場合において、ヌクレオチド配列は、配列番号３９２～４７１のいずれか１つを含む。本開示は、更に、（ａ）配列番号３９８と３９９、（ｂ）配列番号４０８と４０９、（ｃ）配列番号４１８と４１９、（ｄ）配列番号４２８と４２９、（ｅ）配列番号４３８と４３９、（ｆ）配列番号４４８と４４９、（ｇ）配列番号４５８と４５９、または（ｈ）配列番号４６８と４６９を含む、ヌクレオチド配列対を提供する。本開示は、更に、（ａ）配列番号４００と４０１、（ｂ）配列番号４１０と４１１、（ｃ）配列番号４２０と４２１、（ｄ）配列番号４３０と４３１、（ｅ）配列番号４４０と４４１、（ｆ）配列番号４５０と４５１、（ｇ）配列番号４６０と４６１、または（ｈ）配列番号４７０と４７１を含む、ヌクレオチド配列対を提供する。

【表７】
表Ｇ

	20A2	20C1	22D4	20C1.006	20C1.009	20A2.003	22D4.006	22D4.017
HC CDR1	392	402	412	422	432	442	452	462
HC CDR2	393	403	413	423	433	443	453	463
HC CDR3	394	404	414	424	434	444	454	464
LC CDR1	395	405	415	425	435	445	455	465
LC CDR2	396	406	416	426	436	446	456	466
LC CDR3	397	407	417	427	437	447	457	467
HC 可変	398	408	418	428	438	448	458	468
LC 可変	399	409	419	429	439	449	459	469
HC 完全長	400	410	420	430	440	450	460	470
LC 完全長	401	411	421	431	441	451	461	471

【０１９８】
例示的な態様において、核酸分子は、本開示のコンジュゲートまたは融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む。本明細書で使用される「核酸」には、「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」及び「核酸分子」が含まれ、概して、ＤＮＡもしくはＲＮＡの重合体またはそれらの修飾型を意味する。これらは、一本鎖であっても二本鎖であってもよく、合成されたものであっても天然源から得られたもの（例えば、単離及び／または精製）であってもよく、天然、非天然または改変ヌクレオチドを含有し得、天然、非天然または改変ヌクレオチド間結合（非修飾オリゴヌクレオチドのヌクレオチド間にみられるホスホジエステルではなく、ホスホロアミデート結合またはホスホロチオエート結合など）を含有し得る。核酸は、本開示の抗原結合タンパク質またはポリペプチドのいずれかをコードする任意のヌクレオチド配列を含み得る。いくつかの実施形態において、核酸は、いかなる挿入、欠失、逆位及び／または置換も含まない。他の実施形態において、核酸は、１つ以上の挿入、欠失、逆位及び／または置換を含む。
【０１９９】
いくつかの態様において、本開示の核酸は、組み換えである。本明細書で使用されるとき、「組み換え」という用語は、（ｉ）生細胞内で複製できる核酸分子に天然もしくは合成の核酸セグメントを接続することによって、生細胞の外で構築される分子、または（ｉｉ）先の（ｉ）に記載される分子の複製から生じる分子を指す。本明細書の目的では、複製は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ複製またはｉｎ　ｖｉｖｏ複製であり得る。
【０２００】

核酸は、いくつかの態様において、化学合成及び／または酵素的ライゲーション反応に基づいて、当技術分野において知られている手順を使用して、構築することができる。例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．（上掲）、及びＡｕｓｕｂｅｌ　ｅｔ　ａｌ．（上掲）を参照されたい。例えば、核酸は、天然ヌクレオチド、または分子の生物学的安定性を高めるか、ハイブリダイゼーション時に形成される二本鎖の物理的安定性を高めるように設計された種々の修飾ヌクレオチド（例えば、ホスホロチオエート誘導体及びアクリジン置換ヌクレオチド）を使用して、化学的に合成することができる。核酸の作製に使用することができる修飾ヌクレオチドの例には、５－フルオロウラシル、５－ブロモウラシル、５－クロロウラシル、５－ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、４－アセチルシトシン、５－（カルボキシヒドロキシメチル）ウラシル、５－カルボキシメチルアミノメチル－２－チオウリドメ、５－カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、β－Ｄ－ガラクトシルクエオシン、イノシン、N^6－イソペンテニルアデニン、１－メチルグアニン、１－メチルイノシン、２，２－ジメチルグアニン、２－メチルアデニン、２－メチルグアニン、３－メチルシトシン、５－メチルシトシン、Ｎ－置換アデニン、７－メチルグアニン、５－メチルアンモメチルウラシル、５－メトキシアミノメチル－２－チオウラシル、β－Ｄ－マンノシルクエオシン、５’－メトキシカルボキシメチルウラシル、５－メトキシウラシル、２－メチルチオ－N^6－イソペンテニルアデニン、ウラシル－５－オキシ酢酸（ｖ）、ワイブトキソシン、プソイドウラチル、クエオシン、２－チオシトシン、５－メチル－２－チオウラシル、２－チオウラシル、４－チオウラシル、５－メチルウラシル、ウラシル－５－オキシ酢酸メチルエステル、３－（３－アミノ－３－Ｎ－２－カルボキシプロピル）ウラシル及び２，６－ジアミノプリンが挙げられるが、これらに限定されない。あるいは、本開示の核酸のうちの１つ以上は、Ｍａｃｒｏｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｒｅｓｏｕｒｃｅｓ（Ｆｏｒｔ　Ｃｏｌｌｉｎｓ，ＣＯ）及びＳｙｎｔｈｅｇｅｎ（Ｈｏｕｓｔｏｎ，ＴＸ）などの企業から購入することができる。

【０２０１】

ベクター

本開示の核酸は、いくつかの態様において、ベクターに組み込まれる。この点に関して、本開示は、本開示の核酸のいずれかを含むベクターを提供する。例示的な態様において、ベクターは、組み換え発現ベクターである。本明細書の目的では、「組み換え発現ベクター」という用語は、宿主細胞によるｍＲＮＡ、タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドの発現を可能にする、遺伝子修飾されたオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド構築物であって、当該構築物がｍＲＮＡ、タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドをコードするヌクレオチド配列を含み、当該ｍＲＮＡ、タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドが細胞内で発現されるのに十分な条件下でベクターが細胞と接触しているとき、その発現が可能になる、構築物を意味する。本開示のベクターは、全体として、天然ではない。しかしながら、ベクターの一部は、天然であり得る。本開示のベクターは、限定するものではないが、ＤＮＡ及びＲＮＡを含む、任意の種類のヌクレオチドを含み得、これらは、一本鎖であっても二本鎖であってもよく、合成されたものであっても部分的に天然源から得られたものであってもよく、天然、非天然または改変ヌクレオチドを含有し得る。ベクターは、天然もしくは非天然のヌクレオチド間結合、または両方の種類の結合を含み得る。いくつかの態様において、改変ヌクレオチドまたは非天然ヌクレオチド間結合は、ベクターの転写または複製を妨げない。

【０２０２】

本開示のベクターは、任意の好適なベクターであってよく、任意の好適な宿主に形質転換またはトランスフェクトするために使用することができる。好適なベクターには、プラスミド及びウイルスなどの、伝播及び増大もしくは発現、またはその両方を行うために設計されたものが含まれる。ベクターは、ｐＵＣ系（Ｆｅｒｍｅｎｔａｓ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ系（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ（ＬａＪｏＩＩａ，ＣＡ））、ｐＥＴ系（Ｎｏｖａｇｅｎ（Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ））、ｐＧＥＸ系（Ｐｈａｒｍａｃｉａ　Ｂｉｏｔｅｃｈ（Ｕｐｐｓａｌａ，Ｓｗｅｄｅｎ））、及びｐＥＸ系（Ｃ

ｌｏｎｔｅｃｈ（Ｐａｌｏ　Ａｌｔｏ，ＣＡ））からなる群から選択することができる。λＧＴＩＯ、λＧＴｌ１、λＺａｐＩＩ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）、λＥＭＢＬ４及びλＮＭｌ１４９などのバクテリオファージベクターも使用することができる。植物発現ベクターの例には、ｐＢＩＯｌ、ｐＢＩ１０１．２、ｐＢＩ１０１．３、ｐＢＩ１２１及びｐＢＩＮ１９（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）が挙げられる。動物発現ベクターの例には、ｐＥＵＫ－Ｃｌ、ｐＭＡＭ及びｐＭＡＭｎｅｏ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）が挙げられる。いくつかの態様において、ベクターは、ウイルスベクター、例えば、レトロウイルスベクターである。

【０２０３】

本開示のベクターは、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ　ｅｔ　ａｌ．（上掲）及びＡｕｓｕｂｅｌ　ｅｔ　ａｌ．（上掲）に記載されている標準的な組み換えＤＮＡ技術を使用して調製することができる。発現ベクター構築物は、環状または線状であり、原核生物または真核生物の宿主細胞内で機能する複製系を含有するように調製され得る。複製系は、例えば、ＣｏＩＥｌ、２μプラスミド、λ、ＳＶ４０、ウシパピローマウイルスなどに由来し得る。

【０２０４】

いくつかの態様において、ベクターは、適切に、またベクターがＤＮＡベースであるか、ＲＮＡベースであるかを考慮して、ベクターが導入される宿主の種類（例えば、細菌、真菌、植物または動物）に特異的である、転写及び翻訳の開始コドン及び終止コドンなどの制御配列を含む。

【０２０５】

ベクターは、形質転換された宿主またはトランスフェクトされた宿主の選択を可能にする、１つ以上のマーカー遺伝子を含み得る。マーカー遺伝子には、殺生物薬耐性、例えば、抗生物質、重金属などに対する耐性、栄養要求性宿主に原栄養性などを与えるための相補物が含まれる。本開示の発現ベクターに好適なマーカー遺伝子には、例えば、ネオマイシン／Ｇ４１８耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ヒスチジノール耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子及びアンピシリン耐性遺伝子が挙げられる。

【０２０６】

ベクターは、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列（その機能的部分及び機能性バリアントを含む）、またはＩＬ－２１、コンジュゲートもしくは融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列に対して相補的であるか、ハイブリダイズする、ヌクレオチド配列に作動可能に連結された、天然または標準プロモーターを含み得る。プロモーターの選択、例えば、強い、弱い、誘導性、組織特異的及び発生特異的の選択は、当業者の技術範囲内である。同様に、ヌクレオチド配列とプロモーターの組み合わせも当業者の技術範囲内である。プロモーターは、非ウイルスプロモーターまたはウイルスプロモーター、例えば、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）プロモーター、ＳＶ４０プロモーター、ＲＳＶプロモーター及びマウス幹細胞ウイルスの長い末端反復中にみられるプロモーターであってよい。

【０２０７】

宿主細胞

本開示の核酸またはベクターを含む宿主細胞が本明細書で提供される。本明細書で使用されるとき、「宿主細胞」という用語は、本開示のベクターを含有することができ、核酸（例えば、ｍＲＮＡ、タンパク質）によってコードされる発現産物を産生することができる任意の種類の細胞を指す。宿主細胞は、いくつかの態様において、付着細胞または浮遊細胞（すなわち、浮遊状態で成長する細胞）である。宿主細胞は、例示的な態様において、培養細胞または初代細胞であり、すなわち、生物（例えば、ヒト）から直接単離される。宿主細胞は、任意の細胞種のものであってよく、任意の種類の組織に由来するものであってよく、任意の発生段階であってよい。

【０２０８】

例示的な態様において、細胞は、酵母細胞、糸状菌細胞、原生動物細胞、藻類細胞、昆虫細胞または哺乳動物細胞を含むがこれらに限定されない、真核細胞である。このような

宿主細胞は、当該技術分野において記載されている。例えば、Ｆｒｅｎｚｅｌ，ｅｔ ａｌ．，Ｆｒｏｎｔ Ｉｍｍｕｎｏｌ ４：２１７（２０１３）を参照されたい。例示的な態様において、真核細胞は、哺乳動物細胞である。例示的な態様において、哺乳動物細胞は、非ヒト哺乳動物細胞である。いくつかの態様において、細胞は、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞及びその誘導体（例えば、ＣＨＯ－Ｋ１、ＣＨＯ ｐｒｏ－３、ＣＳ９）、マウス骨髄腫細胞（例えば、ＮＳ０、ＧＳ－ＮＳ０、Ｓｐ２／０）、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（ＤＨＦＲ）活性を欠失するように操作された細胞（例えば、ＤＵＫＸ－Ｘ１１、ＤＧ４４）、ヒト胎児由来腎臓２９３（ＨＥＫ２９３）細胞またはその誘導体（例えば、ＨＥＫ２９３Ｔ、ＨＥＫ２９３－ＥＢＮＡ）、アフリカミドリザル腎細胞（例えば、ＣＯＳ細胞、ＶＥＲＯ細胞）、ヒト子宮頸癌細胞（例えば、ＨｅＬａ）、ヒト骨肉腫上皮細胞Ｕ２－ＯＳ、ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞Ａ５４９、ヒト線維肉腫細胞ＨＴ１０８０、マウス脳腫瘍細胞ＣＡＤ、胚性癌腫細胞Ｐ１９、マウス胎児線維芽細胞ＮＩＨ ３Ｔ３、マウス線維芽細胞Ｌ９２９、マウス神経芽細胞腫細胞Ｎ２ａ、ヒト乳癌細胞ＭＣＦ－７、網膜芽細胞腫細胞Ｙ７９、ヒト網膜芽細胞腫細胞ＳＯ－Ｒｂ５０、ヒト肝癌細胞ＨｅｐＧ２、マウスＢ骨髄腫細胞Ｊ５５８Ｌ、またはベビーハムスター腎臓（ＢＨＫ）細胞（Ｇａｉｌｌｅｔ ｅｔ ａｌ．２００７；Ｋｈａｎ，Ａｄｖ Ｐｈａｒｍ Ｂｕｌｌ ３（２）：２５７－２６３（２０１３））である。特定の実施形態において、宿主細胞は、ＣＳ９（ＣＨＯ細胞株）である。

【０２０９】

ベクターを増幅または複製する上で、宿主細胞は、いくつかの態様において、原核細胞、例えば、細菌細胞である。

【０２１０】

本明細書に記載される少なくとも１つの宿主細胞を含む細胞集団もまた本開示によって提供される。細胞集団は、いくつかの態様において、いずれのベクターも含まない少なくとも１つの他の細胞に加えて、記載のベクターを含む宿主細胞を含む、不均質な集団である。あるいは、いくつかの態様において、細胞集団は、実質的に均質な集団であり、集団は、主に、ベクターを含む宿主細胞を含む（例えば、本質的になる）。集団は、いくつかの態様において、クローン細胞集団であり、集団の全ての細胞は、ベクターを含む単一の宿主細胞のクローンであり、そのため、集団の全ての細胞は、ベクターを含む。本開示の例示的な実施形態において、細胞集団は、本明細書に記載されるベクターを含む宿主細胞を含む、クローン集団である。

【０２１１】

医薬組成物

本開示のＩＬ－２１ムテイン、ＩＬ－２１ムテインを含むコンジュゲート、ＩＬ－２１ムテイン及びポリペプチドを含む融合タンパク質、ＰＤ－１抗原結合タンパク質（例えば、抗ＰＤ－１抗体）、ＰＤ－１抗原結合タンパク質（例えば、抗ＰＤ－１抗体）を含むコンジュゲート、ＰＤ－１抗原結合タンパク質（例えば、抗ＰＤ－１抗体）を含む融合タンパク質、核酸、ベクターもしくは宿主細胞、またはこれらの組み合わせを含む、組成物が本明細書で提供される。組成物は、いくつかの態様において、単離及び／または精製された状態の本開示のＩＬ－２１ムテイン、ＰＤ－１抗原結合タンパク質（例えば、抗ＰＤ－１抗体）、コンジュゲート、融合タンパク質、核酸、ベクターもしくは宿主細胞、またはこれらの組み合わせを含む。いくつかの態様において、組成物は、本開示の単一の種類（例えば、構造）のＩＬ－２１ムテイン、ＰＤ－１抗原結合タンパク質（例えば、抗ＰＤ－１抗体）、コンジュゲート、融合タンパク質、核酸、ベクターまたは宿主細胞を含むか、本開示の２つ以上の異なる種類（例えば、異なる構造）の組み合わせのＩＬ－２１ムテイン、ＰＤ－１抗原結合タンパク質、コンジュゲート、融合タンパク質、核酸、ベクターまたは宿主細胞を含む。

【０２１２】

例示的な態様において、組成物は、例えば、ある特定の温度（例えば、室温）において、例えば、ＩＬ－２１ムテインまたは融合タンパク質を安定化させること、貯蔵寿命を延

ばすこと、分解（例えば、酸化プロテアーゼによる分解）を減らすこと、例えば、ＩＬ－２１ムテインまたは融合タンパク質などの半減期を延ばすことにより、ＩＬ－２１ムテイン、ＰＤ－１抗原結合タンパク質（例えば、抗ＰＤ－１抗体）、コンジュゲート、融合タンパク質、核酸、ベクターまたは宿主細胞の化学物理的特徴を向上させる、作用物質を含む。いくつかの態様において、組成物は、本明細書で開示される作用物質のいずれかを、異種部分またはコンジュゲート部分として、任意選択により、本開示のＩＬ－２１ムテイン、コンジュゲート、融合タンパク質、核酸、ベクターまたは宿主細胞との混合で含む。

【０２１３】

本開示の例示的な態様において、組成物は、薬学的に許容される担体、希釈剤または賦形剤を追加で含む。いくつかの実施形態において、本開示のＩＬ－２１ムテイン、ＰＤ－１抗原結合タンパク質（例えば、抗ＰＤ－１抗体）、コンジュゲート、融合タンパク質、核酸、ベクターまたは宿主細胞（以後、「活性剤」と称される）は、当該活性剤を薬学的に許容される担体、希釈剤または賦形剤とともに含む、医薬組成物に製剤化される。この点に関して、本開示は、更に、活性剤（すなわち、本開示のＩＬ－２１ムテイン、ＰＤ－１抗原結合タンパク質（例えば、抗ＰＤ－１抗体）、コンジュゲート、融合タンパク質、核酸、ベクターまたは宿主細胞のいずれか）を含む、医薬組成物であって、対象、例えば、哺乳動物への投与が意図される、医薬組成物を提供する。

【０２１４】

いくつかの実施形態において、活性剤は、患者への投与に適した純度レベルで医薬組成物中に存在する。いくつかの実施形態において、活性剤は、少なくとも約９０％、約９１％、約９２％、約９３％、約９４％、約９５％、約９６％、約９７％、約９８％または約９９％の純度レベルと、薬学的に許容される希釈剤、担体または賦形剤とを有する。いくつかの実施形態において、組成物は、約０．００１～約３０．０ｍｇ／ｍｌの濃度で、活性剤を含有する。

【０２１５】

例示的な態様において、医薬組成物は、薬学的に許容される担体を含む。本明細書で使用されるとき、「薬学的に許容される担体」という用語には、リン酸緩衝生理食塩水、水、水中油型または油中水型乳剤などの乳剤、及び様々な種類の湿潤剤などの標準的な薬学的担体のいずれかが含まれる。本用語はまた、ヒトを含む動物における使用に対して、米国連邦政府の規制機関によって認可されているか、米国薬局方に記載されているあらゆる作用物質を包含する。

【０２１６】

医薬組成物は、任意の薬学的に許容される成分、例えば、酸性化剤、添加剤、吸着剤、エアゾール噴射剤、空気置換剤、アルカリ化剤、固化防止剤、抗凝固剤、抗菌性保存剤、抗酸化剤、防腐剤、基剤、結合剤、緩衝剤、キレート剤、コーティング剤、着色剤、乾燥剤、洗剤、希釈剤、消毒剤、崩壊剤、分散剤、溶解向上剤、色素、皮膚軟化剤、乳化剤、乳化安定剤、充填剤、フィルム形成剤、風味向上剤、矯味剤、流動促進剤、ゲル化剤、造粒剤、保湿剤、滑沢剤、粘膜付着剤、軟膏基剤、軟膏剤、油性ビヒクル、有機基剤、錠剤基剤、顔料、可塑剤、研磨剤、保存剤、金属イオン封鎖剤、皮膚浸透剤、可溶化剤、溶媒、安定化剤、坐剤基剤、表面活性剤、界面活性剤、懸濁化剤、甘味剤、治療薬、粘稠化剤、等張化剤、毒剤、増粘剤、吸水剤、水混和性共溶媒、硬水軟化剤または湿潤剤を含み得る。例えば、Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｅｘｃｉｐｉｅｎｔｓ，Ｔｈｉｒｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ａ．Ｈ．Ｋｉｂｂｅ（Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｐｒｅｓｓ，Ｌｏｎｄｏｎ，ＵＫ，２０００）を参照されたい（その全体を参照により援用する）。Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｓｉｘｔｅｅｎｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｅ．Ｗ．Ｍａｒｔｉｎ（Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ．，Ｅａｓｔｏｎ，Ｐａ．，１９８０）（その全体を参照により援用する）。

【０２１７】

例示的な態様において、医薬組成物は、採用される用量及び濃度でレシピエントに対し

て無毒である、製剤化材料を含む。具体的な実施形態において、活性剤及び１つ以上の薬学的に許容される塩、ポリオール、界面活性剤、浸透圧調整剤、等張化剤、抗酸化剤、抗生物質、抗真菌剤、増量剤、凍結乾燥保護剤、消泡剤、キレート剤、保存剤、着色剤、鎮痛薬または追加の医薬品を含む、医薬組成物。例示的な態様において、医薬組成物は、薬学的に許容される塩、浸透圧調整剤（等張化剤）、抗酸化剤、抗生物質、抗真菌剤、増量剤、凍結乾燥保護剤、消泡剤、キレート剤、保存剤、着色剤及び鎮痛薬を含むがこれらに限定されない１つ以上の賦形剤に加えて、任意選択により、１つ以上のポリオール及び／または１つ以上の界面活性剤を含む。

【０２１８】

ある特定の実施形態において、医薬組成物は、例えば、組成物のｐＨ、浸透圧モル濃度、粘性、透明度、色、等張性、匂い、無菌性、安定性、溶解もしくは放出速度、吸着、または浸透を改変、維持または保持するための製剤化材料を含んでもよい。そのような実施形態において、好適な製剤化材料には、アミノ酸（グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリシンなど）、抗菌剤、抗酸化剤（アスコルビン酸、亜硫酸ナトリウムまたは亜硫酸水素ナトリウムなど）、緩衝剤（ホウ酸、重炭酸、Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、クエン酸、リン酸または他の有機酸など）、増量剤（マンニトールまたはグリシンなど）、キレート剤（エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）など）、錯化剤（カフェイン、ポリビニルピロリドン、β－シクロデキストリンまたはヒドロキシプロピル－β－シクロデキストリンなど）、充填剤、単糖、二糖及び他の炭水化物（グルコース、マンノースまたはデキストリンなど）、タンパク質（血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリンなど）、着色剤、矯味剤及び希釈剤、乳化剤、親水性ポリマー（ポリビニルピロリドンなど）、低分子量ポリペプチド、塩生成対イオン（ナトリウムなど）、保存剤（塩化ベンザルコニウム、安息香酸、サリチル酸、チメロサール、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロルヘキシジン、ソルビン酸または過酸化水素など）、溶媒（グリセリン、プロピレングリコールまたはポリエチレングリコールなど）、糖アルコール（マンニトールまたはソルビトールなど）、懸濁剤、界面活性剤または湿潤剤（プルロニック、ＰＥＧ、ソルビタンエステル、ポリソルベート２０などのポリソルベート、ポリソルベート、トリトン、トロメタミン、レシチン、コレステロール、チロキサパルなど）、安定性向上剤（スクロースまたはソルビトールなど）、張性向上剤（アルカリ金属ハロゲン化物、好ましくは塩化ナトリウムまたは塩化カリウム、マンニトールソルビトールなど）、送達ビヒクル、希釈剤、賦形剤及び／または医薬品アジュバントが挙げられるが、これらに限定されない。ＲＥＭＩＮＧＴＯＮ’Ｓ ＰＨＡＲＭＡＣＥＵＴＩＣＡＬ ＳＣＩＥＮＣＥＳ，１８″ Ｅｄｉｔｉｏｎ，（Ａ．Ｒ．Ｇｅｎｒｍｏ，ｅｄ．），１９９０，Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏｍｐａｎｙを参照されたい。

【０２１９】

医薬組成物は、生理学的に適合するｐＨを達成するように製剤化することができる。いくつかの実施形態において、医薬組成物のｐＨは、例えば、約４または約５～約８．０または約４．５～約７．５または約５．０～約７．５であり得る。例示的な実施形態において、医薬組成物のｐＨは、５．５～７．５である。

【０２２０】

投与経路

本開示に関して、活性剤、または活性剤を含む医薬組成物は、任意の好適な投与経路を介して対象に投与することができる。例えば、活性剤は、非経口、経鼻、経口、経肺、局所、経膣または経直腸の投与を介して対象に投与することができる。投与経路に関する以下の記述は、例示的な実施形態を単に例示するために提供されるものであり、如何様にも、本範囲を限定するものと解釈されるべきではない。

【０２２１】

非経口投与に好適な製剤には、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤及び製剤を対象のレシピエントの血液と等張にする溶質を含有し得る、水性及び非水性の等張性無菌注射剤と、懸濁化剤、可溶化剤、粘稠化剤、安定剤及び保存剤を含み得る、水性及び非水性の無菌懸濁剤と

が含まれる。「非経口」という用語は、消化管を介するものではなく、皮下、筋肉内、脊髄内または静脈内などの他のいくつかの経路によることを意味する。本開示の活性剤は、薬学的担体中、生理学的に許容される希釈剤（無菌液体または液体混合物など）とともに投与することができ、希釈剤には、水、生理食塩水、デキストロース水溶液及び関連糖溶液、エタノールまたはヘキサデシルアルコールなどのアルコール、プロピレングリコールまたはポリエチレングリコールなどのグリコール、ジメチルスルホキシド、グリセロール、２，２－ジメチル－１５３－ジオキソラン－４－メタノールなどのケタール、エーテル、ポリ（エチレングリコール）４００、油、脂肪酸、脂肪酸エステルもしくは脂肪酸グリセリド、またはアセチル化脂肪酸グリセリドが挙げられ、また、希釈剤は、石鹸もしくは洗浄剤などの薬学的に許容される界面活性剤、ペクチン、カルボマー、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースもしくはカルボキシメチルセルロースなどの懸濁化剤、または乳化剤及び他の医薬品アジュバントを含んでも、含まなくてもよい。

【０２２２】

非経口製剤に使用することができる油には、鉱油、動物油、植物油または合成油が挙げられる。油の具体例には、ピーナッツ油、大豆油、ゴマ油、綿実油、トウモロコシ油、オリーブ油、鉱油及び鉱物が挙げられる。非経口製剤での使用に好適な脂肪酸には、オレイン酸、ステアリン酸及びイソステアリン酸が挙げられる。オレイン酸エチル及びミリスチン酸イソプロピルは、好適な脂肪酸エステルの例である。

【０２２３】

非経口製剤での使用に好適な石けんには、脂肪酸のアルカリ金属、アンモニウム及びトリエタノールアミン塩が挙げられ、好適な洗剤には、（ａ）カチオン性洗剤、例えば、ハロゲン化ジメチルジアルキルアンモニウム及びハロゲン化アルキルピリジニウムなど、（ｂ）アニオン性洗剤、例えば、アルキル、アリール及びオレフィンのスルホン酸塩、アルキル、オレフィン、エーテル及びモノグリセリドの硫酸塩、ならびにスルホコハク酸塩など、（ｃ）非イオン性洗剤、例えば、脂肪族アミンオキシド、脂肪酸アルカノールアミド及びポリオキシエチレンポリプロピレンコポリマーなど、（ｄ）両性洗剤、例えば、アルキル－β－アミノプロピオン酸塩及び２－アルキル－イミダゾリン第四級アンモニウム塩、ならびに（ｅ）これらの混合物が挙げられる。

【０２２４】

非経口製剤は、いくつかの実施形態において、溶液中に、約０．５重量％～約２５重量％の本開示の活性剤を含有する。保存剤及び緩衝剤を使用することができる。注射部位の刺激を最小限に抑えるか、排除するために、かかる組成物は、約１２～約１７の親水性親油性比（ＨＬＢ）を有する１つ以上の非イオン性界面活性剤を含有し得る。かかる製剤中の界面活性剤の量は、典型的に、約５重量％～約１５重量％の範囲である。好適な界面活性剤には、モノオレイン酸ソルビタンなどのポリエチレングリコールソルビタン脂肪酸エステル、プロピレンオキシドとプロピレングリコールの縮合によって形成される、エチレンオキシドと疎水性塩基との高分子量付加物が挙げられる。非経口製剤は、いくつかの態様において、アンプル及びバイアルなどの単位用量または複数回用量の密封容器で提供することができ、使用直前に注射剤用の無菌液状賦形剤（例えば、水）を添加するだけでよいフリーズドライ（凍結乾燥）状態で保存することができる。即時注射用液剤及び懸濁剤は、いくつかの態様において、前述の種類の滅菌した散剤、顆粒剤及び錠剤から調製することができる。

【０２２５】

注射用製剤は、本開示に従う。注射用組成物に有効な薬学的担体の要件は、当業者によく知られている。（例えば、Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃｓ ａｎｄ Ｐｈａｒｍａｃｙ Ｐｒａｃｔｉｃｅ，Ｊ．Ｂ．Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ，ＰＡ，Ｂａｎｋｅｒ ａｎｄ Ｃｈａｌｍｅｒｓ，ｅｄｓ．，ｐａｇｅｓ ２３８－２５０（１９８２）及びＡＳＨＰ Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｎ Ｉｎｊｅｃｔａｂｌｅ Ｄｒｕｇｓ，Ｔｏｉｓｓｅｌ，４ｔｈ ｅｄ．，ｐａｇｅｓ ６２２－６３０（１９８６）参照）。

【０２２６】
用量
本開示の活性剤は、本明細書に記載されるように、ＰＤ－１シグナル伝達を阻害すると同時にＩＬ－２１シグナル伝達をもたらす方法に有用であると考えられ、したがって、１つ以上の疾患（例えば、がん）を治療または予防する方法に有用であると考えられる。本開示の目的では、投与される活性剤の量または用量は、対象または動物において、妥当な時間枠にわたり、例えば、治療応答または予防応答を生じさせるのに十分なものであるべきである。例えば、本開示の活性剤の用量は、投与時から約１～４分、１～４時間または１～４週間以上、例えば、５～２０週間以上の期間における、本明細書に記載されるがんの治療に十分なものであるべきである。ある特定の実施形態において、期間は、更に長くてもよい。用量は、特定の活性剤の有効性、ならびに治療がなされる動物（例えば、ヒト）の状態及び動物（例えば、ヒト）の体重によって決定される。
【０２２７】
投与量を決定するための多くのアッセイが当該技術分野において知られている。本明細書の目的では、本開示の活性剤の所定用量を哺乳動物に投与した際にどの程度がんが治療されるかを、異なる用量の活性剤を各哺乳動物群に投与して、哺乳動物群間で比較することを含むアッセイを使用して、哺乳動物に投与される出発用量を決定することができる。ある特定の用量を投与した際にどの程度がんが治療されるかは、例えば、活性剤を用いてマウス異種移植モデルで達成される、活性剤の細胞毒性または腫瘍退縮の程度によって表すことができる。融合タンパク質の細胞毒性を測定する方法、及び腫瘍退縮を評価する方法は、当該技術分野において知られている。
【０２２８】
本開示の活性剤の用量はまた、本開示の特定の活性剤の投与に伴い得る、あらゆる有害な副作用の存在、その性質及び程度によって決定される。典型的に、主治医は、年齢、体重、全般的な健康、食生活、性別、投与される本開示の活性剤、投与経路、治療がなされる病態の重症度などの様々な要因を考慮に入れて、個々の患者を治療するための本開示の活性剤の用量を決定する。例として、本開示を限定するものではないが、本開示の活性剤の用量は、治療がなされる対象の体重１ｋｇに対して、１日当たり約０．０００１～約１ｇ（ｇ／ｋｇ体重／日）、約０．０００１～約０．００１ｇ／ｋｇ体重／日、または約０．０１ｍｇ～約１ｇ／ｋｇ体重／日であり得る。
【０２２９】
制御放出製剤
いくつかの実施形態において、本明細書に記載される活性剤は、デポー製剤に変更することができ、これにより、本開示の活性剤が投与先の体内で放出される様式を、時間及び体内の位置に関して制御することができる（例えば、米国特許第４，４５０，１５０号参照）。本開示の活性剤のデポー製剤は、例えば、活性剤と、多孔質材料またはポリマーなどの非多孔質材料とを含む、埋め込み可能な組成物であり得、活性剤は、当該材料によってカプセル化されるか、当該材料全体に分散されるか、かつ／または非多孔質材料の分解物である。次いで、デポーは、対象の体内の所望の位置に埋め込むことができ、活性剤は、その埋め込み物から所定の速度で放出される。
【０２３０】
活性剤を含む医薬組成物は、ある特定の態様において、任意のタイプのｉｎ　ｖｉｖｏ放出プロファイルを有するように変更される。いくつかの態様において、医薬組成物は、即時放出製剤、制御放出製剤、持続放出製剤、長期放出製剤、遅延放出製剤または二相放出製剤である。制御放出用ペプチドの製剤化方法は、当該技術分野において知られている。例えば、Ｑｉａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ　Ｐｈａｒｍ　３７４：４６－５２（２００９）ならびに国際特許出願公開第ＷＯ２００８／１３０１５８号、同第ＷＯ２００４／０３３０３６号、同第ＷＯ２０００／０３２２１８号及び同第ＷＯ１９９９／０４０９４２号を参照されたい。
【０２３１】

本発明の組成物は、更に、例えば、ミセルもしくはリポソーム、または他の何らかのカプセル化形態を備えてもよいし、長期保存及び／または長期送達効果をもたらすために、長期放出型で投与することができる。

【０２３２】

併用

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される融合タンパク質または抗原結合タンパク質（例えば、抗ＰＤ－１抗体、その抗原結合抗体断片または抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物）は、単独で投与され、また、代替的実施形態において、別の治療薬、例えば、本発明の異なる種類（例えば、構造）の別の活性剤と組み合わせて投与される。いくつかの態様において、他の治療薬は、がんの治療または予防を目的にする。いくつかの実施形態において、他の治療薬は、化学療法薬である。いくつかの実施形態において、他の治療薬は、がん治療のための放射線療法に使用される薬剤である。したがって、いくつかの態様において、本明細書に記載される融合タンパク質または抗原結合タンパク質（例えば、抗ＰＤ－１抗体、その抗原結合抗体断片または抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物）は、白金錯体化合物、トポイソメラーゼ阻害薬、抗生物質、抗有糸分裂性アルカロイド及びジフルオロヌクレオシドのうちの１つ以上と組み合わせて投与される。例示的な態様において、本明細書に記載されるＩＬ－２１融合タンパク質（例えば、ＩＬ－２１ムテインに融合された抗ＰＤ－１抗体）は、抗原結合タンパク質（例えば、抗ＰＤ－１抗体、その抗原結合抗体断片または抗ＰＤ－１抗体タンパク質生成物）と組み合わせられる。

【０２３３】

具体的な実施形態において、抗体２０Ａ２、２０Ｃ１、２２Ｄ４、２０Ｃ１．００６、２０Ｃ１．００９、２０Ａ２．００３、２２Ｄ４．００６、２２Ｄ４．０１７のいずれかが、本明細書に記載されるＩＬ－２１融合タンパク質と組み合わせて投与され、融合タンパク質は、例えば、以下から選択されるホモ二量体または単量体を含む融合タンパク質を含む。

２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３９１のアミノ酸配列を含む）と、２つの抗体重鎖（いずれもＩＬ－２１ムテインに融合され、各重鎖－ＩＬ－２１ムテイン融合体は、配列番号４９６のアミノ酸配列を含む）とを含む、ホモ二量体；

２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３９１のアミノ酸配列を含む）と、２つの抗体重鎖（いずれもＩＬ－２１ムテインに融合され、融合された重鎖－ＩＬ－２１ムテインは、配列番号４９７のアミノ酸配列を含む）とを含む、ホモ二量体；

２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３９１のアミノ酸配列を含む）と、２つの抗体重鎖（いずれもＩＬ－２１ムテインに融合され、各重鎖－ＩＬ－２１ムテイン融合体は、配列番号４９８のアミノ酸配列を含む）とを含む、ホモ二量体；

２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３９１のアミノ酸配列を含む）と、２つの抗体重鎖（いずれもＩＬ－２１ムテインに融合され、各重鎖－ＩＬ－２１ムテイン融合体は、配列番号４９９のアミノ酸配列を含む）とを含む、ホモ二量体；

２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３９１のアミノ酸配列を含む）と、２つの抗体重鎖（いずれもＩＬ－２１ムテインに融合され、各重鎖－ＩＬ－２１ムテイン融合体は、配列番号５００のアミノ酸配列を含む）とを含む、ホモ二量体；

２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３９１のアミノ酸配列を含む）と、２つの異なる抗体重鎖（一方は、ＩＬ－２１ムテインに融合され、配列番号５０１のアミノ酸配列を含み、他方は、ＩＬ－２１ムテインに融合しておらず、配列番号５５５のアミノ酸配列を含む）とを含む、単量体；

２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３９１のアミノ酸配列を含む）と、２つの異なる抗体重鎖（一方は、ＩＬ－２１ムテインに融合され、配列番号５０２のアミノ酸配列を含み、他方は、ＩＬ－２１ムテインに融合しておらず、配列番号５５６のアミノ酸配列を含む）とを含む、単量体；

２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３９１のアミノ酸配列を含む）と、２つの異なる抗体重鎖（一方は、ＩＬ－２１ムテインに融合され、配列番号５０３のアミノ酸配列を含み、

他方は、ＩＬ－２１ムテインに融合しておらず、配列番号５５７のアミノ酸配列を含む）とを含む、単量体；
２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３９１のアミノ酸配列を含む）と、２つの異なる抗体重鎖（一方は、ＩＬ－２１ムテインに融合され、配列番号５０４のアミノ酸配列を含み、他方は、ＩＬ－２１ムテインに融合しておらず、配列番号５５５のアミノ酸配列を含む）とを含む、単量体；
２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３９１のアミノ酸配列を含む）と、２つの異なる抗体重鎖（一方は、ＩＬ－２１ムテインに融合され、配列番号５０５のアミノ酸配列を含み、他方は、ＩＬ－２１ムテインに融合しておらず、配列番号５５６のアミノ酸配列を含む）とを含む、単量体；
２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３９１のアミノ酸配列を含む）と、２つの異なる抗体重鎖（一方は、ＩＬ－２１ムテインに融合され、配列番号５０６のアミノ酸配列を含み、他方は、ＩＬ－２１ムテインに融合しておらず、配列番号５５７のアミノ酸配列を含む）とを含む、単量体；
２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３７１のアミノ酸配列を含む）と、２つの抗体重鎖（いずれもＩＬ－２１ムテインに融合され、各重鎖－ＩＬ－２１ムテイン融合体は、配列番号５０７のアミノ酸配列を含む）とを含む、ホモ二量体；
２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３７１のアミノ酸配列を含む）と、２つの抗体重鎖（いずれもＩＬ－２１ムテインに融合され、各重鎖－ＩＬ－２１ムテイン融合体は、配列番号５０８のアミノ酸配列を含む）とを含む、ホモ二量体；
２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３７１のアミノ酸配列を含む）と、２つの抗体重鎖（いずれもＩＬ－２１ムテインに融合され、各重鎖－ＩＬ－２１ムテイン融合体は、配列番号５０９のアミノ酸配列を含む）とを含む、ホモ二量体；
２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３７１のアミノ酸配列を含む）と、２つの抗体重鎖（いずれもＩＬ－２１ムテインに融合され、各重鎖－ＩＬ－２１ムテイン融合体は、配列番号５１０のアミノ酸配列を含む）とを含む、ホモ二量体；
２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３７１のアミノ酸配列を含む）と、２つの抗体重鎖（いずれもＩＬ－２１ムテインに融合され、各重鎖－ＩＬ－２１ムテイン融合体は、配列番号５１１のアミノ酸配列を含む）とを含む、ホモ二量体；
２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３７１のアミノ酸配列を含む）と、２つの抗体重鎖（いずれもＩＬ－２１ムテインに融合され、各重鎖－ＩＬ－２１ムテイン融合体は、配列番号５１２のアミノ酸配列を含む）とを含む、ホモ二量体；
２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３７１のアミノ酸配列を含む）と、２つの異なる抗体重鎖（一方は、ＩＬ－２１ムテインに融合され、配列番号５１３のアミノ酸配列を含み、他方は、ＩＬ－２１ムテインに融合しておらず、配列番号５５８のアミノ酸配列を含む）とを含む、単量体；
２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３７１のアミノ酸配列を含む）と、２つの異なる抗体重鎖（一方は、ＩＬ－２１ムテインに融合され、配列番号５１４のアミノ酸配列を含み、他方は、ＩＬ－２１ムテインに融合しておらず、配列番号５５９のアミノ酸配列を含む）とを含む、単量体；
２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３７１のアミノ酸配列を含む）と、２つの異なる抗体重鎖（一方は、ＩＬ－２１ムテインに融合され、配列番号５１５のアミノ酸配列を含み、他方は、ＩＬ－２１ムテインに融合しておらず、配列番号５６０のアミノ酸配列を含む）とを含む、単量体；
２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３７１のアミノ酸配列を含む）と、２つの異なる抗体重鎖（一方は、ＩＬ－２１ムテインに融合され、配列番号５１６のアミノ酸配列を含み、他方は、ＩＬ－２１ムテインに融合しておらず、配列番号５５８のアミノ酸配列を含む）とを含む、単量体；
２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３７１のアミノ酸配列を含む）と、２つの異なる抗体重鎖（一方は、ＩＬ－２１ムテインに融合され、配列番号５１７のアミノ酸配列を含み、

他方は、ＩＬ－２１ムテインに融合しておらず、配列番号５５９のアミノ酸配列を含む）とを含む、単量体；または
２つの抗体軽鎖（いずれも配列番号３７１のアミノ酸配列を含む）と、２つの異なる抗体重鎖（一方は、ＩＬ－２１ムテインに融合され、配列番号５１８のアミノ酸配列を含み、他方は、ＩＬ－２１ムテインに融合しておらず、配列番号５６０のアミノ酸配列を含む）とを含む、単量体。

【０２３４】

キット

本開示は、本開示のＩＬ－２１ムテイン、ＰＤ－１抗原結合タンパク質（例えば、抗ＰＤ－１抗体）、コンジュゲート、融合タンパク質、核酸、ベクターもしくは宿主細胞、またはこれらの組み合わせを含むキットを更に提供する。キットは、例示的な態様において、１つの容器内に、本開示の少なくとも１つのＩＬ－２１ムテイン、ＰＤ－１抗原結合タンパク質（例えば、抗ＰＤ－１抗体）、コンジュゲート、融合タンパク質、核酸、ベクターもしくは宿主細胞、またはこれらの組み合わせを含む。例示的な態様において、本開示の少なくとも１つのＩＬ－２１ムテイン、ＰＤ－１抗原結合タンパク質（例えば、抗ＰＤ－１抗体）、コンジュゲート、融合タンパク質、核酸、ベクターまたは宿主細胞は、キット中、単位用量で提供される。本明細書の目的では、「単位用量」は、好適な担体中に分散された別個の量を指す。例示的な態様において、単位用量は、所望の効果、例えば、がん治療を対象にもたらすのに十分な量である。例示的な態様において、キットは、複数の単位用量、例えば、１週間分または１ヶ月分の単位用量を含み、任意選択により、各単位用量は、個別に包装されるか、他の単位用量とは別々になっている。いくつかの実施形態において、キット／単位用量の構成要素は、患者への投与に関する説明書とともに包装される。いくつかの実施形態において、キットは、患者への投与のための１つ以上のデバイス、例えば、針及び注射器などを含む。いくつかの態様において、本開示の少なくとも１つのＩＬ－２１ムテイン、ＰＤ－１抗原結合タンパク質（例えば、抗ＰＤ－１抗体）、コンジュゲート、融合タンパク質、核酸、ベクターもしくは宿主細胞、またはこれらの組み合わせは、即時使用形態、例えば、注射器、静注バッグなどに予め包装されている。例示的な態様において、即時使用形態は、単回用である。例示的な態様において、キットは、本開示の少なくとも１つのＩＬ－２１ムテイン、ＰＤ－１抗原結合タンパク質（例えば、抗ＰＤ－１抗体）、コンジュゲート、融合タンパク質、核酸、ベクターまたは宿主細胞の複数の単回用の即時使用形態を含む。いくつかの態様において、キットは、本明細書に記載されるもののいずれかを含む、他の治療薬もしくは診断薬または薬学的に許容される担体（例えば、溶媒、緩衝剤、希釈剤など）を更に含む。

【０２３５】

製造方法

本開示のＩＬ－２１ムテインは、当該技術分野において知られている方法によって得ることができる。ポリペプチドのｄｅ　ｎｏｖｏ合成に好適な方法は、例えば、Ｃｈａｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｆｍｏｃ　Ｓｏｌｉｄ　Ｐｈａｓｅ　Ｐｅｐｔｉｄｅ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，Ｏｘｆｏｒｄ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　Ｐｒｅｓｓ，Ｏｘｆｏｒｄ，Ｕｎｉｔｅｄ　Ｋｉｎｇｄｏｍ，２００５；Ｐｅｐｔｉｄｅ　ａｎｄ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｄｒｕｇ　Ａｎａｌｙｓｉｓ，ｅｄ．Ｒｅｉｄ，Ｒ．，Ｍａｒｃｅｌ　Ｄｅｋｋｅｒ，Ｉｎｃ．，２０００；Ｅｐｉｔｏｐｅ　Ｍａｐｐｉｎｇ，ｅｄ．Ｗｅｓｔｗｏｏｄ　ｅｔ　ａｌ．，Ｏｘｆｏｒｄ　Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　Ｐｒｅｓｓ，Ｏｘｆｏｒｄ，Ｕｎｉｔｅｄ　Ｋｉｎｇｄｏｍ，２０００；及び米国特許第５，４４９，７５２号に記載されている。本発明のペプチドの更なる例示的な作製方法は、本明細書に記載される。

【０２３６】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載されるＩＬ－２１ムテインは、Ｓｙｎｐｅｐ（Ｄｕｂｌｉｎ，ＣＡ）、Ｐｅｐｔｉｄｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｃｏｒｐ．（Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ，ＭＤ）、Ｍｕｌｔｉｐｌｅ　Ｐｅｐｔｉｄｅ　Ｓｙｓｔｅｍｓ（Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）、Ｐｅｐｔｉｄｅ　２．０　Ｉｎｃ．（Ｃｈａｎｔｉ

ｌｌｙ，ＶＡ）、及びＡｍｅｒｉｃａｎ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｃｏ.（Ｓｕｎｎｙｖａｌｅ，ＣＡ）などの企業によって、商業的に合成される。この点において、ＩＬ－２１ムテインは、合成、組み換え、単離及び／または精製され得る。

【０２３７】

また、いくつかの態様において、ＩＬ－２１ムテインは、当該ペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸を用いて、標準的な組み換え法を使用して、組み換え的に産生される。例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ.，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ.３ｒｄ ｅｄ.，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ ２００１；及びＡｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ.，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｇｒｅｅｎｅ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ ａｎｄ Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ&Ｓｏｎｓ，ＮＹ，１９９４を参照されたい。

【０２３８】

ＩＬ－２１ムテインの作製方法が本明細書で提供される。当該方法は、例示的な実施形態において、本開示の宿主細胞を培養してＩＬ－２１ムテインを発現させることと、発現されたＩＬ－２１ムテインを回収することとを含む。

【０２３９】

ＩＬ－２１ムテインを含む融合タンパク質の作製方法もまた本明細書で提供される。当該方法は、例示的な実施形態において、本開示の宿主細胞を培養して融合タンパク質を発現させることと、発現された融合タンパク質を回収することとを含む。

【０２４０】

例示的な実施形態において、方法は、本明細書に記載されるＩＬ－２１ムテインまたは融合タンパク質をコードする核酸を含む宿主細胞を、ＩＬ－２１ムテインまたは融合タンパク質を発現するように培養することを含む。宿主細胞は、本明細書に記載される宿主細胞のいずれかであり得る。例示的な態様において、宿主細胞は、ＣＨＯ細胞、ＮＳ０細胞、ＣＯＳ細胞、ＶＥＲＯ細胞及びＢＨＫ細胞からなる群から選択される。例示的な態様において、宿主細胞を培養するステップは、宿主細胞の成長及び増殖を支持する成長培地中で、宿主細胞を培養することを含む。例示的な態様において、成長培地は、細胞密度、培養物の生存率及び生産性を適時に高める。例示的な態様において、成長培地は、アミノ酸、ビタミン、無機塩、グルコース、ならびに成長因子、ホルモン及び接着因子の供給源としての血清を含む。例示的な態様において、成長培地は、アミノ酸、ビタミン、微量元素、無機塩、脂質及びインスリンまたはインスリン様成長因子からなる、完全に化学的に成分が明らかな培地である。栄養素に加えて、成長培地はまた、ｐＨ及び浸透圧を維持するのを助ける。一部の成長培地は、市販されており、当該技術分野において記載されている。例えば、Ａｒｏｒａ，“Ｃｅｌｌ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｍｅｄｉａ：Ａ Ｒｅｖｉｅｗ” ＭＡＴＥＲ ＭＥＴＨＯＤＳ ３：１７５（２０１３）を参照されたい。

【０２４１】

例示的な態様において、本開示のＩＬ－２１ムテインまたは融合タンパク質の作製方法は、フィード培地中で宿主細胞を培養することを含む。例示的な態様において、方法は、流加方式でフィード培地中で培養することを含む。組み換えタンパク質の産生方法は、当該技術分野において知られている。例えば、Ｌｉ ｅｔ ａｌ.，“Ｃｅｌｌ ｃｕｌｔｕｒｅ ｐｒｏｃｅｓｓｅｓ ｆｏｒ ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ ａｎｔｉｂｏｄｙ ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ” ＭＡｂｓ ２（５）：４６６－４７７（２０１０）を参照されたい。

【０２４２】

ＩＬ－２１ムテインまたは融合タンパク質の作製方法は、細胞培養またはその上清からムテインまたはタンパク質を精製し、好ましくは、精製されたタンパク質を回収するための１つ以上のステップを含み得る。例示的な態様において、方法は、１つ以上のクロマトグラフィーステップ、例えば、親和性クロマトグラフィー（例えば、プロテインＡアフィニティークロマトグラフィー）、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマ

トグラフィーを含む。例示的な態様において、方法は、プロテインＡアフィニティークロマトグラフィー樹脂を使用して、タンパク質を精製することを含む。

【０２４３】

例示的な実施形態において、方法は、精製されたタンパク質を製剤化するステップなどを更に含み、これにより、精製されたタンパク質を含む製剤が得られる。このようなステップは、Ｆｏｒｍｕｌａｔｉｏｎ ａｎｄ Ｐｒｏｃｅｓｓ Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ Ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ ｆｏｒ Ｍａｎｕｆａｃｔｕｒｉｎｇ，ｅｄｓ．Ｊａｍｅｅｌ ａｎｄ Ｈｅｒｓｈｅｎｓｏｎ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．（Ｈｏｂｏｋｅｎ，ＮＪ），２０１０に記載されている。

【０２４４】

使用方法

治療方法が本開示によって更に提供される。例示的な実施形態において、当該方法は、治療を必要とする対象を治療する方法であって、治療を必要とする対象に、本開示の医薬組成物を、当該対象を治療するのに有効な量で投与することを含む、方法である。

【０２４５】

本開示の医薬組成物は、ＰＤ－１シグナル伝達の阻害及び／またはＩＬ－２１シグナル伝達の活性化に有用である。特定の理論に拘束されるものではないが、［１］本明細書で提供される組成物のＰＤ－１阻害活性により、当該実体は、Ｔ細胞活性を増強し、免疫応答（特に、腫瘍またはがんに対する免疫応答）を増強する方法に有用となり得、かつ／または［２］本明細書で提供される組成物のＩＬ－２１活性化活性により、当該実体は、Ｔ細胞の生存及びエフェクター機能を増強し、最終分化及び複製能の喪失を制限し、活性化エフェクター細胞をナイーブＴ細胞に近い表現型にシフトすることによって（例えば、ＣＣＲ７発現を増強することによって）Ｔ細胞の長寿化を促進し、標的細胞（例えば、がん細胞）に対する細胞毒性を（例えば、ＩＦＮγ及びグランザイムＢの産生を増大させることによって）増強することができる。

【０２４６】

したがって、対象のＴ細胞活性を増強し、Ｔ細胞の生存及びエフェクター機能を増強し、最終分化及び複製能の喪失を制限し、Ｔ細胞の長寿化を促進し、標的細胞（例えば、がん細胞）に対する細胞毒性を増強する方法が本明細書で提供される。例示的な実施形態において、方法は、本開示の医薬組成物を有効な量で対象に投与することを含む。例示的な態様において、Ｔ細胞活性または免疫応答は、がん細胞もしくはがん組織または腫瘍細胞もしくは腫瘍に対するものである。例示的な態様において、免疫応答は、体液性免疫応答である。例示的な態様において、免疫応答は、自然免疫応答である。例示的な態様において、増強される免疫応答は、Ｔ細胞媒介性免疫応答である。

【０２４７】

本明細書で使用されるとき、「増強する」という用語及びそれに派生する語は、１００％または完全な増強または増大でなくてもよい。むしろ、増強には、当業者が潜在的な利益または治療効果があると認識する、様々な程度がある。この点において、本開示の医薬組成物は、任意の量またはレベルまで、例えば、Ｔ細胞活性を増強し得るか、免疫応答を増強し得る。例示的な実施形態において、本開示の方法によってもたらされる増強は、少なくとも１０％または約１０％の増強（例えば、少なくとも２０％または約２０％の増強、少なくとも３０％または約３０％の増強、少なくとも４０％または約４０％の増強、少なくとも５０％または約５０％の増強、少なくとも６０％または約６０％の増強、少なくとも７０％または約７０％の増強、少なくとも８０％または約８０％の増強、少なくとも９０％または約９０％の増強、少なくとも９５％または約９５％の増強、少なくとも９８％または約９８％の増強）である。

【０２４８】

Ｔ細胞活性及び免疫応答の測定方法は、当該技術分野において知られている。Ｔ細胞活性は、例えば、Ｆｕ ｅｔ ａｌ．，ＰＬｏＳ ＯＮＥ ５（７）：ｅ１１８６７（２０１０）に記載されているものなどの細胞毒性アッセイによって測定することができる。他

のＴ細胞活性アッセイは、Ｂｅｒｃｏｖｉｃｉ ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ Ｄｉａｇｎ Ｌａｂ Ｉｍｍｕｎｏｌ．７（６）：８５９－８６４（２０００）に記載されている。免疫応答の測定方法は、例えば、Ｍａｃａｔａｎｇａｙ ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ Ｖａｃｃｉｎｅ Ｉｍｍｕｎｏｌ １７（９）：１４５２－１４５９（２０１０）及びＣｌａｙ ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．７（５）：１１２７－３５（２００１）に記載されている。

【０２４９】

更に、がんを有する対象を治療する方法、及び固形腫瘍を有する対象を治療する方法も本明細書で提供される。例示的な実施形態において、方法は、本開示の医薬組成物を、対象のがんまたは固形腫瘍を治療するのに有効な量で、対象に投与することを含む。本明細書で開示される方法によって治療できるがんは、任意のがんであり得、例えば、リンパ系または血流を介して身体の他の部分に伝播する可能性のある、制御不能な異常な細胞分裂によって引き起こされる任意の悪性増殖または悪性腫瘍であり得る。がんは、いくつかの態様において、急性リンパ性がん、急性骨髄性白血病、胞巣型横紋筋肉腫、骨癌、脳癌、乳癌、肛門、肛門管または肛門直腸の癌、眼癌、肝内胆管腺癌、関節癌、頸部、胆嚢または胸膜の癌、鼻、鼻腔または中耳の癌、口腔癌、外陰癌、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄癌、結腸癌、食道癌、子宮頸癌、消化管カルチノイド腫瘍、ホジキンリンパ腫、下咽頭癌、腎癌、喉頭癌、肝癌、肺癌、悪性中皮腫、黒色腫、多発性骨髄腫、鼻咽頭癌、非ホジキンリンパ腫、卵巣癌、膵癌、腹膜、網及び腸間膜の癌、咽頭癌、前立腺癌、直腸癌、腎癌（例えば、腎細胞癌（ＲＣＣ））、小腸癌、軟組織癌、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、尿管癌、ならびに膀胱癌からなる群から選択されるものである。特定の態様において、がんは、頭頸部癌、卵巣癌、子宮頸癌、膀胱癌、食道癌、膵癌、消化管癌、胃癌、乳癌、子宮内膜癌、大腸癌、肝細胞癌、膠芽腫、膀胱癌、肺癌、例えば、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、細気管支肺胞上皮癌からなる群から選択される。特定の実施形態において、腫瘍は、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、頭頸部癌、腎癌、トリプルネガティブ乳癌及び胃癌である。例示的な態様において、対象は、腫瘍（例えば、固形腫瘍、血液悪性腫瘍またはリンパ系悪性腫瘍）を有し、医薬組成物は、対象の腫瘍を治療するのに有効な量で、対象に投与される。他の例示的な態様において、腫瘍は、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、小細胞肺癌（ＳＣＬＣ）、頭頸部癌、腎癌、乳癌、黒色腫、卵巣癌、肝癌、膵癌、大腸癌、前立腺癌、胃癌、リンパ腫または白血病であり、医薬組成物は、対象の腫瘍を治療するのに有効な量で、対象に投与される。

【０２５０】

本明細書で使用されるとき、「治療する」という用語及びそれに関連する語は、必ずしも１００％または完全な治療を意味するものではない。むしろ、治療には、当業者が潜在的な利益または治療効果があると認識する、様々な程度がある。この点において、本開示のがんの治療方法は、任意の治療量または任意の治療レベルを提供することができる。更に、本開示の方法によって提供される治療は、治療がなされるがんの１つ以上の状態または症状または徴候の治療を含み得る。また、本開示の方法によって提供される治療は、がんの進行を遅らせることを包含し得る。例えば、方法は、がんに対するＴ細胞活性または免疫応答を増強すること、腫瘍またはがんの成長を低減させること、腫瘍細胞の転移を減少させること、腫瘍細胞またはがん細胞の細胞死を増加させることなどによって、がんを治療することができる。例示的な態様において、方法は、がんの発生または再発を１日、２日、４日、６日、８日、１０日、１５日、３０日、２ヶ月、４ヶ月、６ヶ月、１年、２年、４年またはそれ以上遅らせることによって、治療する。例示的な態様において、方法は、対象の生存率を増加させることによって、治療する。

【０２５１】

対象

本開示いくつかの実施形態において、対象は、哺乳動物であり、マウス及びハムスターなどのネズミ目の哺乳動物、ならびにウサギなどのウサギ目の哺乳動物、ネコ科（ネコ）を含むネコ目及びイヌ科（イヌ）に由来する哺乳動物、ウシ科（ウシ）及びイノシシ科（

ブタ）を含むウシ目、またはウマ科（ウマ）を含むウマ目に由来する哺乳動物が挙げられるがこれらに限定されない。いくつかの態様において、哺乳動物は、霊長目、セボイド目（Ｃｅｂｏｉｄｓ）またはシモイド目（Ｓｉｍｏｉｄｓ）（サル）由来であるか、真猿亜目（ヒト及び類人猿）由来である。いくつかの態様において、哺乳動物は、ヒトである。

【０２５２】

例示的な実施形態

例示的な実施形態において、本開示は、配列番号２のアミノ酸配列：

ＱＧＱＤＸ　ＨＭＸＸＭ　ＸＸＸＸＸ　ＸＶＤＸＬ　ＫＮＸＶＮ　ＤＬＶＰＥ　ＦＬＰＡＰ　ＥＤＶＥＴ　ＮＣＥＷＳ　ＡＦＳＣＦ　ＱＫＡＱＬ　ＫＳＡＮＴ　ＧＮＮＥＸ　ＸＩＸＸＸ　ＸＸＸＬＸ　ＸＸＸＸＸ　ＴＮＡＧＲ　ＲＱＫＨＲ　ＬＴＣＰＳ　ＣＤＳＹＥ　ＫＫＰＰＫ　ＥＦＬＸＸ　ＦＸＸＬＬ　ＸＸＭＸＸ　ＱＨＸＳＳ　ＲＴＨＧＳ　ＥＤＳ（配列番号２）

を含むＩＬ－２１ムテインを提供し、

配列中、「Ｘ」は、任意のアミノ酸を表し、ＩＬ－２１ムテインアミノ酸配列は、ヒトＩＬ－２１のアミノ酸配列（配列番号１）と少なくとも１アミノ酸異なる。

【０２５３】

例示的な態様において、ＩＬ－２１ムテインは、ヒトＩＬ－２１のアミノ酸配列（配列番号１）と７アミノ酸を超えない異なるアミノ酸配列を含む。例示的な態様において、ＩＬ－２１ムテインは、ヒトＩＬ－２１のアミノ酸配列（配列番号１）と３、４、５または６アミノ酸異なるアミノ酸配列を含む。例示的な場合において、ＩＬ－２１ムテインは、ヒトＩＬ－２１のアミノ酸配列（配列番号１）と１または２アミノ酸異なるアミノ酸配列を含む。例示的な態様において、ＩＬ－２１ムテインのアミノ酸配列と配列番号１のアミノ酸配列との間の相違（複数可）は、配列番号２のアミノ酸１０～１５（両端を含む）またはアミノ酸１０５～１２３（両端を含む）内にあり、任意選択により、この相違（複数可）は、配列番号２のアミノ酸１１、１４、１５、１０９、１１０、１１２、１１３、１１６、１１９、１２０及び／または１２３に存在する。例示的な態様において、ＩＬ－２１ムテインのアミノ酸配列と配列番号１のアミノ酸配列との間の相違（複数可）は、配列番号２のアミノ酸５～２５（両端を含む）またはアミノ酸６５～８０（両端を含む）内にあり、任意選択により、この相違（複数可）は、配列番号２のアミノ酸５、８、９、１２、１３、１６、１９、２３、６５、６６、６９、７０、７２、７３、７５、７６、７７、７８、７９及び／または８０に存在する。

【０２５４】

いくつかの態様において、ＩＬ－２１ムテインは、ヒトＩＬ－２１のアミノ酸配列（配列番号１）と比較して、１つのアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含む。いくつかの場合において、アミノ酸置換は、配列番号１の位置５、８、９、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１９、２３、６５、６６、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７５、７６、７７、７８、７９、８０、１０９、１１０、１１２、１１３、１１６、１１７、１１９、１２０または１２３に存在する。例示的な態様において、アミノ酸置換は、配列番号１の位置５、８、９、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１９、２３、６５、６６、６８、６９、７０、７２、７３、７５、７６、７７、７８、７９、８０、１０９、１１０、１１２、１１３、１１６、１１７、１１９、１２０または１２３に存在する。例示的な場合において、ＩＬ－２１ムテインは、

ａ．配列番号１の位置５、８、９、１２、１４、１５、６５、６６、６９、７０、７２、７３、７５、７６、７７、８０、１１６もしくは１１９にアミノ酸置換を含み、当該置換アミノ酸は、脂肪族アミノ酸であるか、

ｂ．配列番号１の位置５、８、９、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１９、２３、６５、６６、６９、７０、７２、７３、７５、７６、７７、７８、７９、１１０、１１２、１１６、１１７、１１９、１２０もしくは１２３にアミノ酸置換を含み、当該置換アミノ酸は、酸性アミノ酸であるか、

ｃ．配列番号１の位置５、９、７３、７６、１０９、１１３もしくは１１６にアミノ酸置

換を含み、当該置換アミノ酸は、塩基性アミノ酸であるか、
ｄ．配列番号１の位置５、８、９、７０もしくは７６にアミノ酸置換を含み、当該置換アミノ酸は、芳香族アミノ酸であるか、
ｅ．配列番号１の位置５、８、９、１２、１５、７３、７６、１１６もしくは１１９にアミノ酸置換を含み、当該置換アミノ酸は、側鎖アミドを含有するアミノ酸であるか、
ｆ．配列番号１の位置５、８、９、１１、１２、１４、１５、７３、７６、１１６もしくは１１９にアミノ酸置換を含み、当該置換アミノ酸は、側鎖ヒドロキシルを含む非芳香族アミノ酸であるか、
ｇ．配列番号１の位置６５、６６、６９、７０、７２、７３、７５、７６、７７もしくは８０にアミノ酸置換を含み、当該置換アミノ酸は、イミノ酸であるか、
ｈ．配列番号１の位置５、９、１５、７６、１１６もしくは１１９にアミノ酸置換を含み、当該置換アミノ酸は、イオウ含有側鎖を含むアミノ酸であるか、
ｉ。またはこれらの組み合わせのアミノ酸置換を含む。

【０２５５】

例示的な態様において、置換アミノ酸は、天然アミノ酸である。いくつかの場合において、ＩＬ－２１ムテインは、表Ａに従った位置にアミノ酸によるアミノ酸置換を含む。表Ａを以下に示す。

【表８】

表Ａ

配列番号１のアミノ酸位置	アミノ酸（１文字コード）	配列番号１のアミノ酸位置	アミノ酸（１文字コード）
５	Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｑ、Ｓ、Ｔ、ＶまたはＹ	７２	Ｄ、ＧまたはＰ
８	Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｎ、Ｓ、Ｔ、ＶまたはＹ	７３	Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、ＳまたはＶ
９	Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｑ、Ｓ、Ｔ、ＶまたはＹ	７５	Ｄ、ＧまたはＰ
１１	ＤまたはＳ	７６	Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｇ、Ｈ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｐ、Ｑ、Ｓ、Ｔ、ＶまたはＹ
１２	Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｎ、Ｓ、ＴまたはＶ	７７	Ｄ、ＧまたはＰ
１３	Ｄ	７８	Ｄ
１４	Ａ、ＤまたはＳ	７９	Ｄ
１５	Ａ、Ｅ、Ｉ、Ｍ、Ｎ、Ｑ、Ｓ、ＴまたはＶ	８０	ＧまたはＰ
１６	ＤまたはＥ	１０９	Ｋ
１９	Ｄ	１１０	Ｄ
２３	Ｄ	１１２	Ｄ
６５	Ｄ、ＧまたはＰ	１１３	Ｋ
６６	Ｄ、ＧまたはＰ	１１６	Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｉ、Ｋ、Ｌ、Ｍ、Ｎ、Ｓ、ＴまたはＶ
６８	Ｑ	１１７	Ｄ
６９	Ｄ、ＧまたはＰ	１１９	Ａ、Ｄ、Ｅ、Ｍ、Ｎ、Ｑ、ＳまたはＴ
７０	Ｅ、Ｇ、ＰまたはＹ	１２０	Ｄ
７１	Ｌ	１２３	Ｄ

【０２５６】

例示的な実施形態において、本開示は、配列番号３～２１、２３～５６、５８～１１２、１１４～２０８、２１０～２２２、２２４～２５５及び２８３のいずれか１つのアミノ酸配列を含む、ＩＬ－２１ムテインを提供する。

【０２５７】

例示的な態様において、ＩＬ－２１ムテインは、ヒトＩＬ－２１のアミノ酸配列（配列番号１）と比較して、２つのアミノ酸置換を含むアミノ酸配列を含む。例示的な態様において、アミノ酸置換は、配列番号１の位置５、８、９、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１９、２３、６５、６６、６８、６９、７０、７１、７２、７３、７５、７６、７７、７８、７９、８０、１０９、１１０、１１２、１１３、１１６、１１７、１１９、１２０または１２３のうちの２つに存在する。例示的な場合において、アミノ酸置換は、配

列番号１の位置５、９、１５、７０、７１、７２、７３及び７６のうちの２つに存在する。任意選択により、アミノ酸置換は、位置５、９、７３及び７６または配列番号１のうちの２つに存在する。いくつかの態様において、置換のうちの１つは、配列番号１の位置７６に存在する。例示的な場合において、配列番号１の位置７６の置換アミノ酸は、脂肪族アミノ酸または酸性アミノ酸である。例示的な態様において、ＩＬ－２１ムテインは、配列番号１の位置５、９または７３にアミノ酸置換を含み、置換アミノ酸は、脂肪族アミノ酸または酸性アミノ酸である。いくつかの態様において、ＩＬ－２１ムテインは、配列番号１の位置５にアミノ酸置換を含み、置換アミノ酸は、側鎖アミドを含むアミノ酸である。いくつかの場合において、脂肪族アミノ酸はアラニンであるか、酸性アミノ酸はグルタミン酸であるか、側鎖アミドを含むアミノ酸はグルタミンである。本開示は、例示的な実施形態において、配列番号２０８、２１０～２２２、２２４～２４８及び２５５からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＩＬ－２１ムテインを提供する。

【０２５８】

上の態様のいずれにおいても、ＩＬ－２１ムテインは、ＩＬ－２１受容体に対する野生型ＩＬ－２１の親和性と比較して低い親和性でＩＬ－２１受容体に結合することができる。いくつかの態様において、ＩＬ－２１受容体は、配列番号２５６または２６１のアミノ酸配列を有する。いくつかの場合において、ＩＬ－２１ムテインは、配列番号２５７のアミノ酸配列を有するＩＬ－２１受容体γ鎖に結合する。例示的な場合において、本開示のＩＬ－２１ムテインは、０．０４ｎＭよりも高いＫｄ、または約０．０４ｎＭのＫｄで、ヒトＩＬ－２１受容体に結合する。

【０２５９】

更に、コンジュゲートが提供される。例示的な態様において、コンジュゲートは、前述の段落のいずれか１つのＩＬ－２１ムテインと、異種部分とを含む。例示的な場合において、ＩＬ－２１は、異種部分に直接結合される。代替的な場合において、ＩＬ－２１は、異種部分にリンカーを介して結合される。いくつかの態様において、リンカーは、例えば、Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｓｅｒのアミノ酸配列（配列番号２６２）を含む、ペプチドを含む。例示的な態様において、異種部分は、ポリペプチドであり、任意選択により、ポリペプチドは、抗原結合タンパク質である。いくつかの場合において、異種ポリペプチドは、抗体またはその抗原結合抗体断片である。例示的な実施形態において、抗体は、抗ＰＤ－１抗体である。いくつかの態様において、ＩＬ－２１ムテインは、抗体のＦｃに直接結合される。例示的な態様において、ＩＬ－２１ムテインは、抗体のＦｃにリンカーを介して結合される。コンジュゲートは、いくつかの態様において、単一のＩＬ－２１ムテインを含み、当該単一のＩＬ－２１ムテインは、２つの抗体重鎖のうちの一方のＣ末端に連結される。例示的な場合において、コンジュゲートは、２つのＩＬ－２１ムテインを含み、第１のＩＬ－２１ムテインは、第１の抗体重鎖のＣ末端に連結され、第２のＩＬ－２１ムテインは、第２の抗体重鎖のＣ末端に連結される。任意選択により、第１のＩＬ－２１は、第２のＩＬ－２１ムテインと同じアミノ酸配列を有する。あるいは、第１のＩＬ－２１は、第２のＩＬ－２１ムテインと異なるアミノ酸配列を有する。例示的な態様において、抗体重鎖は、電荷対変異（例えば、Ｖ１、Ｖ４、Ｖ１０３またはＶ１３１変異）を含む。前述の段落のいずれか１つのコンジュゲートに関する例示的な態様において、ＩＬ－２１ムテインは、配列番号１の位置５、９、７３及び７６のうちの２つにアミノ酸置換を含む。例示的な態様において、コンジュゲートは、配列番号１のアミノ酸配列を含むＩＬ－２１ムテインと、抗ＰＤ－１抗体とを含み、ただし、当該ＩＬ－２１ムテインは、配列番号１の位置５、９、７３及び７６のうちの任意の２つにアミノ酸置換を含み、ＩＬ－２１ムテインは、抗ＰＤ－１抗体のＣ末端に連結される。例示的な態様において、コンジュゲートは、（ａ）表Ｄに記載される重鎖（ＨＣ）相補性決定領域（ＣＤＲ）１アミノ酸配列、すなわち、配列番号３１２、３２２、３３２、３４２、３５２、３６２、３７２及び３８２からなる群から選択される配列、または１アミノ酸もしくは２アミノ酸のみ異なるか、少なくとも７０％もしくは約７０％の配列同一性を有する、そのバリアント配列を含むか、（ｂ）表Ｄに記載されるＨＣ　ＣＤＲ２アミノ酸配列、すなわち、配列番号

３１３、３２３、３３３、３４３、３５３、３６３、３７３及び３８３からなる群から選択される配列、または１アミノ酸もしくは２アミノ酸のみ異なるか、少なくとも７０％もしくは約７０％の配列同一性を有する、そのバリアント配列を含むか、（ｃ）表Ｄに記載されるＨＣ　ＣＤＲ３アミノ酸配列、すなわち、配列番号３１４、３２４、３３４、３４４、３５４５、３６４、３７４及び３８４からなる群から選択される配列、または１アミノ酸もしくは２アミノ酸のみ異なるか、少なくとも７０％もしくは約７０％の配列同一性を有する、そのバリアント配列を含むか、（ｄ）表Ｄに記載される軽鎖（ＬＣ）ＣＤＲ１アミノ酸配列、すなわち、３１５、３２５、３３５、３４５、３５５、３６５、３７５及び３８５からなる群から選択される配列、または１アミノ酸もしくは２アミノ酸のみ異なるか、少なくとも７０％もしくは約７０％の配列同一性を有する、そのバリアント配列を含むか、（ｅ）表Ｄに記載されるＬＣ　ＣＤＲ２アミノ酸配列、すなわち、３１６、３２６、３３６、３４６、３５６、３６６、３７６及び３８６からなる群から選択される配列、または１アミノ酸もしくは２アミノ酸のみ異なるか、少なくとも７０％もしくは約７０％の配列同一性を有する、そのバリアント配列を含むか、（ｆ）表Ｄに記載されるＬＣ　ＣＤＲ３アミノ酸配列、すなわち、３１７、３２７、３３７、３４７、３５７、３６７、３７７及び３８７からなる群から選択される配列、または１アミノ酸もしくは２アミノ酸のみ異なるか、少なくとも７０％もしくは約７０％の配列同一性を有する、そのバリアント配列を含むか、（ｇ）（ａ）～（ｆ）のうちの任意の２つまたはそれ以上の組み合わせを含む、抗ＰＤ－１抗体を含む。例示的な場合において、抗ＰＤ－１抗体は、（ａ）配列番号３１２～３１７、（ｂ）配列番号３２２～３２７、（ｃ）配列番号３３２～３３７、（ｄ）配列番号３４２～３４７、（ｅ）配列番号３５２～３５７、（ｆ）配列番号３６２～３６７、（ｇ）配列番号３７２～３７７、及び（ｈ）配列番号３８２～３８７からなる群から選択される６つのＣＤＲアミノ酸配列を含む。いくつかの態様において、抗ＰＤ－１抗体は、（ａ）配列番号３１８と３１９、（ｂ）配列番号３２８と３２９、（ｃ）配列番号３３８と３３９、（ｄ）配列番号３４８と３４９、（ｅ）配列番号３５８と３５９、（ｆ）配列番号３６８と３６９、（ｇ）配列番号３７８と３７９、及び（ｈ）配列番号３８８と３８９からなる群から選択されるアミノ酸配列対を含む。例示的な態様において、抗ＰＤ－１抗体は、配列番号２６５～２６７、２８２、２８４～３１１のいずれか１つのアミノ酸配列を含む、定常領域を含む。ある特定の場合において、抗ＰＤ－１抗体は、（ａ）配列番号３２０と３２１、（ｂ）配列番号３３０と３３１、（ｃ）配列番号３４０と３４１、（ｄ）配列番号３５０と３５１、（ｅ）配列番号３６０と３６１、（ｆ）配列番号３７０と３７１、（ｇ）配列番号３８０と３８１、及び（ｈ）配列番号３９０と３９１からなる群から選択されるアミノ酸配列対を含む。

【０２６０】

例示的な実施形態において、本開示は、本明細書に記載されるＩＬ－２１ムテインと、異種ポリペプチドまたはペプチドとを含む、融合ポリペプチドまたは融合タンパク質を提供する。いくつかの態様において、融合ポリペプチドまたは融合タンパク質は、免疫グロブリンまたはその抗原結合抗体断片を含む。例示的な実施形態において、本開示は、本明細書に記載されるＩＬ－２１ムテインをコードするヌクレオチド配列を含む、核酸を提供する。例示的な実施形態において、本開示は、本明細書に記載される核酸を含む、ベクターを提供する。例示的な実施形態において、本開示は、本明細書に記載される核酸またはベクターを含む、宿主細胞を提供する。例示的な実施形態において、本開示は、本明細書に記載されるＩＬ－２１ムテイン、核酸、ベクター、宿主細胞、コンジュゲート、融合タンパク質またはこれらの組み合わせと、容器とを含むキットを提供する。

【０２６１】

更に、本開示のＩＬ－２１ムテイン、核酸、ベクター、宿主細胞、コンジュゲート、融合タンパク質またはこれらの組み合わせと、薬学的に許容される担体、賦形剤または希釈剤とを含む、医薬組成物が提供される。

【０２６２】

本開示の宿主細胞をＩＬ－２１ムテインを発現するように培養することと、発現された

ＩＬ－２１ムテインを回収することとを含む、ＩＬ－２１ムテインの作製方法もまた提供される。更に、治療を必要とする対象を治療する方法が提供される。方法は、治療を必要とする対象に、本開示の医薬組成物を、当該対象を治療するのに有効な量で投与することを含む。例示的な態様において、対象は、固形腫瘍を有し、医薬組成物は、対象の固形腫瘍を治療するのに有効な量で、対象に投与される。任意選択により、固形腫瘍は、頭頸部癌、卵巣癌、子宮頸癌、膀胱癌、食道癌、膵癌、消化管癌、胃癌、乳癌、子宮内膜癌、大腸癌、肝細胞癌、膠芽腫、膀胱癌、肺癌、例えば、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、細気管支肺胞上皮癌からなる群から選択される。

【０２６３】

例示的な実施形態において、本開示は、（ａ）表Ｄに記載される重鎖（ＨＣ）相補性決定領域（ＣＤＲ）１アミノ酸配列、すなわち、配列番号３１２、３２２、３３２、３４２、３５２、３６２、３７２及び３８２からなる群から選択される配列、または１アミノ酸もしくは２アミノ酸のみ異なるか、少なくとも７０％もしくは約７０％の配列同一性を有する、そのバリアント配列を含むか、（ｂ）表Ｄに記載されるＨＣ　ＣＤＲ２アミノ酸配列、すなわち、配列番号３１３、３２３、３３３、３４３、３５３、３６３、３７３及び３８３からなる群から選択される配列、または１アミノ酸もしくは２アミノ酸のみ異なるか、少なくとも７０％もしくは約７０％の配列同一性を有する、そのバリアント配列を含むか、（ｃ）表Ｄに記載されるＨＣ　ＣＤＲ３アミノ酸配列、すなわち、配列番号３１４、３２４、３３４、３４４、３５４５、３６４、３７４及び３８４からなる群から選択される配列、または１アミノ酸もしくは２アミノ酸のみ異なるか、少なくとも７０％もしくは約７０％の配列同一性を有する、そのバリアント配列を含むか、（ｄ）表Ｄに記載される軽鎖（ＬＣ）ＣＤＲ１アミノ酸配列、すなわち、３１５、３２５、３３５、３４５、３５５、３６５、３７５及び３８５からなる群から選択される配列、または１アミノ酸もしくは２アミノ酸のみ異なるか、少なくとも７０％もしくは約７０％の配列同一性を有する、そのバリアント配列を含むか、（ｅ）表Ｄに記載されるＬＣ　ＣＤＲ２アミノ酸配列、すなわち、３１６、３２６、３３６、３４６、３５６、３６６、３７６及び３８６からなる群から選択される配列、または１アミノ酸もしくは２アミノ酸のみ異なるか、少なくとも７０％もしくは約７０％の配列同一性を有する、そのバリアント配列を含むか、（ｆ）表Ｄに記載されるＬＣ　ＣＤＲ３アミノ酸配列、すなわち、３１７、３２７、３３７、３４７、３５７、３６７、３７７及び３８７からなる群から選択される配列、または１アミノ酸もしくは２アミノ酸のみ異なるか、少なくとも７０％もしくは約７０％の配列同一性を有する、そのバリアント配列を含むか、（ｇ）（ａ）～（ｆ）のうちの任意の２つまたはそれ以上の組み合わせを含む、ＰＤ－１抗原結合タンパク質を提供する。例示的な場合において、ＰＤ－１抗原結合タンパク質は、（ａ）配列番号３１２～３１７、（ｂ）配列番号３２２～３２７、（ｃ）配列番号３３２～３３７、（ｄ）配列番号３４２～３４７、（ｅ）配列番号３５２～３５７、（ｆ）配列番号３６２～３６７、（ｇ）配列番号３７２～３７７、及び（ｈ）配列番号３８２～３８７からなる群から選択される６つのＣＤＲアミノ酸配列を含む。ある特定の態様において、ＰＤ－１抗原結合タンパク質は、（ａ）配列番号３１８と３１９、（ｂ）配列番号３２８と３２９、（ｃ）配列番号３３８と３３９、（ｄ）配列番号３４８と３４９、（ｅ）配列番号３５８と３５９、（ｆ）配列番号３６８と３６９、（ｇ）配列番号３７８と３７９、及び（ｈ）配列番号３８８と３８９からなる群から選択されるアミノ酸配列対を含む。例示的な場合において、ＰＤ－１抗原結合タンパク質は、配列番号２６５～２６７、２８２、２８４～３１１のいずれか１つのアミノ酸配列を含む定常領域を含む。いくつかの態様において、ＰＤ－１抗原結合タンパク質は、（ａ）配列番号３２０と３２１、（ｂ）配列番号３３０と３３１、（ｃ）配列番号３４０と３４１、（ｄ）配列番号３５０と３５１、（ｅ）配列番号３６０と３６１、（ｆ）配列番号３７０と３７１、（ｇ）配列番号３８０と３８１、及び（ｈ）配列番号３９０と３９１からなる群から選択されるアミノ酸配列対を含む。

【０２６４】

例示的な実施形態において、本開示は、前述の段落に記載されるＰＤ－１抗原結合タン

パク質と、異種部分とを含む、コンジュゲートを提供する。例示的な実施形態において、本開示は、前述の段落に記載されるＰＤ－１抗原結合タンパク質と、異種ポリペプチドまたはペプチドとを含む、融合ポリペプチドまたは融合タンパク質を提供する。例示的な実施形態において、本開示は、前述の段落に記載されるＰＤ－１抗原結合タンパク質、コンジュゲートまたは融合ポリペプチドもしくは融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、核酸を提供する。例示的な場合において、核酸は、配列番号３９２～４７１のいずれか１つの配列を含む。本開示は、例示的な実施形態において、上述の核酸を含むベクター、及び上述の核酸または上述のベクターを含む宿主細胞を提供する。前述の段落に記載されるＰＤ－１抗原結合タンパク質もしくはコンジュゲート、融合ポリペプチド、融合タンパク質、核酸、ベクターもしくは宿主細胞、またはこれらの組み合わせと、容器とを含む、キットも提供される。本開示は、例示的な実施形態において、前述の段落に記載されるＰＤ－１抗原結合タンパク質もしくはコンジュゲート、融合ポリペプチド、融合タンパク質、核酸、ベクターもしくは宿主細胞、またはこれらの組み合わせと、薬学的に許容される担体、賦形剤または希釈剤とを含む、医薬組成物を提供する。本開示は、更に、ＰＤ－１抗原結合タンパク質の作製方法を提供し、例示的な実施形態において、当該方法は、本段落に記載される宿主細胞をＰＤ－１抗原結合タンパク質を発現するように培養することと、発現されたＰＤ－１抗原結合タンパク質を回収することとを含む。本開示は、更に、治療を必要とする対象を治療する方法を提供し、例示的な実施形態において、当該方法は、治療を必要とする対象に、本段落に記載される医薬組成物を、当該対象を治療するのに有効な量で投与することを含む。例示的な態様において、対象は、固形腫瘍を有し、医薬組成物は、対象の固形腫瘍を治療するのに有効な量で、対象に投与される。任意選択により、固形腫瘍は、頭頸部癌、卵巣癌、子宮頸癌、膀胱癌、食道癌、膵癌、消化管癌、胃癌、乳癌、子宮内膜癌、大腸癌、肝細胞癌、膠芽腫、膀胱癌、肺癌、例えば、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）、細気管支肺胞上皮癌からなる群から選択される。

【０２６５】

以下の実施例は、本開示を例示するためだけに提供されるものであり、本開示の範囲を限定するものではない。

【実施例】

【０２６６】

実施例１

本実施例は、ＰＤ－１阻害抗体及び組み換えＩＬ－２１を含む併用療法が、対応する単剤療法よりも優れていることを示す。

【０２６７】

前臨床研究において、モノクローナルＰＤ－１阻害抗体と組み換えマウスＩＬ－２１（ｒｍＩＬ－２１）の併用治療の効果を、ＰＤ－１阻害抗体またはｒｍＩＬ－２１のいずれかの単剤療法による治療効果と比較した。

【０２６８】

１日目に、ＣＴ２６／３Ｅ５結腸癌細胞をＢＡＬＢ／ｃマウスに移植して、腫瘍成長を開始した。１２日目に、腫瘍を測定し、マウスを４群（マウス１０匹／群）に無作為割り当てした。群１は、アイソタイプ対照抗体（ｍＩｇＧ１）３００μｇの腹腔内（ＩＰ）注射を受け、群２は、ＰＤ－１阻害抗体３００μｇのＩＰ注射を受け、群３は、５０μｇのｒｍＩＬ－２１を受け、及び群４は,ＰＤ－１阻害抗体（３００μｇ）とｒｍＩＬ－２１（５０μｇ）の両方を受けた。群１、２及び４は、抗体の投与を３日ごとに１回受け、群３及び４は、ｒｍＩＬ－２１の投与を週３回で３週間受けた。３３日目に投薬を終了した。

【０２６９】

試験中、腫瘍体積を観察した。図１Ａ～１Ｄに示されるように、腫瘍サイズの増加は、群１で最も大きく、群４で最も小さかった。

【０２７０】

カプランマイヤー・ログランク・マンテルコックス解析によって評価した生存率を本試

験の主要評価項目にした。図２及び表１に示されるように、生存率（％）及び生存期間中央値は、群４で最も大きかった。注目すべきことに、群４の２匹の対象が無腫瘍であった（表１）。

【表９】

表１

群	生存期間中央値（日）	無腫瘍対象
１	２５	０
２	２９	０
３	２７	０
４	３７．５	２

【０２７１】

これらの結果は、モノクローナルＰＤ－１阻害抗体と組み換えｍＩＬ－２１の併用が、単剤療法として単独で投与されたいずれの成分よりも、より優れた生存上の利点を提供することを実証している。

【０２７２】

実施例２

本実施例は、ＰＤ－１阻害及びＩＬ－２１シグナル伝達の組み合わせを提供することを目的にした、複数のプラットフォームの設計及び構築を示す。

【０２７３】

実施例１で得られた結果は、腫瘍を有する対象の治療に対する、ＩＬ－２１シグナル伝達とＰＤ－１阻害の組み合わせアプローチの利点を示している。しかしながら、ＩＬ－２１は、ＣＤ８Ｔ細胞応答を増強する能力と、抗原提示及びＴ細胞プライミングを抑制する能力の両方を有するので、ＩＬ－２１をどのように送達するかを慎重に考慮する必要があった。加えて、ＩＬ－２１Ｒは、ヒト組織において（例えば、抗原提示細胞（ＡＰＣ）、ＮＫ細胞、Ｂ細胞及びＴ細胞によって）広く発現されることから、種々の組織の受容体と結合するので、ＩＬ－２１のオフターゲット作用（例えば、腫瘍環境外のＩＬ－２１活性）及びクリアランスを回避するために慎重な考慮が必要であった。

【０２７４】

上の検討事項に対処するために、２方面のアプローチが考案された。第１に、活性を減衰させたＩＬ－２１ムテインを（ＩＬ－２１Ｒに対するＩＬ－２１ムテインの結合を低減させることにより）作製した。そのようなＩＬ－２１ムテインは、体全体に拡散すると活性が低下するが、標的（例えば、がん）Ｔ細胞にＩＬ－２１ムテインが高濃度で存在する場合には、かかる活性は、「救済される」と想定された。すなわち、ＩＬ－２１ムテインは、標的細胞中に存在し、高濃度になった場合、凝集して、治療的ＩＬ－２１活性を示し得る。第２に、ＩＬ－２１ムテインを関連細胞（例えば、がん細胞）に対して標的化するために、モノクローナル抗体などの標的アームにＩＬ－２１ムテインを融合させた。ＩＬ－２１ムテインを標的がん細胞に送達するために、ＩＬ－２１ムテインを抗ＰＤ－１　ｍＡｂに融合させた。抗ＰＤ－１　ｍＡｂの使用は、ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１を介したシグナル伝達を妨害する更なる利点があった（したがって、チェックポイント阻害薬として作用する）。

【０２７５】

いかなる特定の理論に束縛されるものではないが、ＩＬ－２１ムテインに融合された抗ＰＤ－１抗体を含む融合タンパク質は、破壊標的の細胞に対して、より耐久性のある応答を提供することが仮定された。例えば、［１］ＰＤ－１を発現するＣＤ８＋Ｔ細胞は、融合タンパク質の抗ＰＤ－１　ｍＡｂによって結合され、［２］ＣＤ８＋Ｔ細胞によって発現されたＩＬ－２１受容体には、融合タンパク質のＩＬ－２１ムテインが同時に結合し、Ｔ細胞の増殖の増加、ならびにＴ細胞によるＩＦＮγの産生及び分泌の増加をもたらし、標的細胞に対する全体的な細胞毒性が改善し得る。更に、ＩＬ－２１によって活性化され

る細胞内シグナル伝達経路が、エフェクター機能及びアポトーシスの関連喪失を防ぐことが仮定された。図３を参照されたい。

【０２７６】

更なる設計検討事項には、ｍＡｂの価数（例えば、一価または二価のｍＡｂ）、Ｆｃエフェクター機能の必要性、サイトカインの融合部位（ｍＡｂのＣ末端またはＮ末端）、リンカーの包含、及び予測される二次修飾またはクリッピング部位の改善が含まれた。

【０２７７】

いくつかの融合タンパク質形態を検討し、概念実証実験のために、４つの融合構築物をクローニングし、発現させた。野生型（ＷＴ）ＩＬ－２１を、（１）いかなるリンカーも含まないＩＬ－２１ホモ二量体、（２）ＧＧＧＧＳ（配列番号２６２）リンカーを含むＩＬ－２１ホモ二量体、（３）いかなるリンカーも含まないが、ＩｇＧ　Ｆｃ中にヘテロ二量体化をもたらす電荷対変異を含むＩＬ－２１単量体、（４）ＧＧＧＧＳ（配列番号２６２）リンカーと電荷対変異の両方を含むＩＬ－２１単量体として、二価のＰＤ－１　ｍＡｂのＩｇＧのＣ末端に融合させた。４つ全ての融合タンパク質構築物は、ｍＡｂ　Ｆｃ領域中に次の修飾を含んだ：Ｎ２９７Ｇ、Ｒ２９２Ｃ、Ｖ３０２Ｃ（ＥＵシステムに従ったナンバリング）（ＳＥＦＬ２－２変異）。使用した電荷対変異は、Ｖ１変異（すなわち、一方の重鎖中にＫ４０９Ｄ＆Ｋ３９２Ｄ及び他方の重鎖中にＤ３９９Ｋ＆Ｅ３５６Ｋ）であった。４つ全ての融合タンパク質構築物は、クリッピングを防ぐために、Ｃ末端リシンが除去されるように設計した。

【０２７８】

ＩＬ－２１Ｒ陽性（ＩＬ－２１Ｒ＋）Ｈｕｔ７８　Ｔ細胞株の２つのバリアント（ＰＤ－１^{陽性}及びＰＤ－１^{陰性}）を使用する細胞アッセイで、融合構築物をＩＬ－２１活性についてスクリーニングした。各細胞株において、ＩＬ－２１活性の代替的測定値として、ＳＴＡＴ３リン酸化を測定した。両方のＨｕｔ７８細胞バリアントを、（ｉ）組み換えヒトＩＬ－２１（ｒｈＩＬ－２１）単独、（ｉｉ）抗ＰＤ－１　ｍＡｂ単独、（ｉｉｉ）リンカーを含む、ＩＬ－２１ホモ二量体に融合された抗ＰＤ－１　ｍＡｂ、（ｉｖ）リンカーを含まない、ＩＬ－２１ホモ二量体に融合された抗ＰＤ－１　ｍＡｂ、（ｖ）リンカーを含む、ＩＬ－２１単量体に融合された抗ＰＤ－１　ｍＡｂ、または（ｖｉ）リンカーを含まない、ＩＬ－２１単量体に融合された抗ＰＤ－１　ｍＡｂに曝露させた。ＳＴＡＴシグナル伝達に関する各分子のＳＴＡＴ３リン酸化アッセイの結果及びＥＣ５０を図５Ａ及び５Ｂならびに表２にそれぞれ示す。

【表１０】
表２

分子	ＰＤ－１陰性	ＰＤ－１陽性
	ＥＣ５０（ｐＭ）	ＥＣ５０（ｐＭ）
ｒｈＩＬ－２１	１５３	２０４
抗ＰＤ－１　ｍＡｂ	－	－
抗ＰＤ－１　ｍＡｂ＋ＩＬ－２１ホモ二量体の融合体、リンカーなし	１１８４	９７
抗ＰＤ－１　ｍＡｂ＋ＩＬ－２１ホモ二量体の融合体、リンカーあり	１８２２	６０
抗ＰＤ－１　ｍＡｂ＋ＩＬ－２１単量体の融合体、リンカーなし	５２３	７０
抗ＰＤ－１　ｍＡｂ＋ＩＬ－２１単量体の融合体、リンカーあり	３９２	５８

【０２７９】
図５Ａ及び表２（中央の列）に示されるように、ＰＤ－１陰性細胞において、ＩＬ－２１ホモ二量体を有する抗ＰＤ－１　ｍＡｂを含む融合タンパク質は、ｒｈＩＬ－２１と比較して１／１０の効力を示した。ｒｈＩＬ－２１はまた、ＩＬ－２１単量体を含む融合タンパク質と比較しても、より強力であった。単量体の融合タンパク質は、ＩＬ－２１部分を１つのみ有するが、ＩＬ－２１部分を２つ有するホモ二量体と比較して、より大きい効力を示した。これらの結果は、ＰＤ－１陰性細胞において、単量体が、より高いＩＬ－２１活性を示すことを示唆し、かつ／またはホモ二量体融合タンパク質形態が、ＩＬ－２１活性の部分的減衰を付与することができることを示唆している（例えば、おそらくＩＬ－２１部分間の立体的相互作用による）。
【０２８０】
本試験はまた、ＩＬ－２１部分とＩｇＧ　Ｃ末端との間のリンカーの評価も可能にした。表２（中央の縦列）ならびに図５Ａ及び５Ｂ（実線＝リンカーなし；点線＝リンカー）に示されるように、リンカーの存在は、ＩＬ－２１活性に影響を与えないようである。したがって、以後の構築物は全て、融合タンパク質中の非天然配列の量を減らすために、リンカーなしで作製した。
【０２８１】
ＳＴＡＴ３リン酸化アッセイの結果をＰＤ－１陰性細胞とＰＤ－１陽性細胞との間で比較することによって、ＩＬ－２１活性に対するＰＤ－１発現の効果を評価した。図５Ｂに示されるように、ＰＤ－１陽性細胞におけるＩＬ－２１ホモ二量体及び単量体融合タンパク質のそれぞれのＩＬ－２１活性は、実質的に同じであった。
【０２８２】
まとめると、これらの結果は、標的細胞にＰＤ－１発現がない場合、抗ＰＤ－１　ｍＡｂにＩＬ－２１を融合することによって、ＩＬ－２１シグナル伝達を減衰させることができることを実証している。加えて、抗ＰＤ－１　ｍＡｂに融合されたＩＬ－２１のＩＬ－２１シグナル伝達は、ＰＤ－１を発現する細胞で救済される。
【０２８３】
実施例３

本実施例は、複数のＩＬ－２１ムテインの設計、構築及び特徴付けを示す。

【０２８４】

融合タンパク質の薬物動態／薬力学（ＰＫ／ＰＤ）プロファイルを理解するために、ＷＴ　ＩＬ－２１のホモ二量体に融合されたＩｇＧを含む融合タンパク質を、カニクイザルでｉｎ　ｖｉｖｏで試験した。

【０２８５】

抗ＰＤ－１　ｍＡｂに融合されたＷＴ　ＩＬ－２１を含むホモ二量体融合タンパク質を低用量（２５０μｇ／ｋｇ）または高用量（１０００μｇ／ｋｇ）のいずれかで６匹の動物に静脈内投与した。対照として、ＩｇＧ抗体ドメイン（１５０μｇ／ｋｇ）を使用した。血清中濃度を経時的に測定し、C_{max}、$AUC_{最終}$、半減期（$t_{1/2}$）、Ｖｓｓ及びＣｌを求めた。結果を図６及び表３に示す。

【表１１】

表３

動物番号	用量（μg/kg）	C_{max}（μg/mL）	$AUC_{最終}$（hr*μg/mL）	半減期（$t_{1/2}$）（時）	Vss（mL/kg）	CL（mL/hr/kg）
979	250	78.5	331	9.99	7400	635
980	250	72.4	463	10.6	7136	521
981	250	101	429	19.6	8904	366
低用量の平均	250	84.0±15.1	408±69	13.4±5.4	7813±954	507±135
982	1000	401	3500	43	6943	281
983	1000	414	2746	21.2	6953	361
984	1000	486	4345	25.0	4996	226
高用量の平均	1000	434±45.8	3530±800	29.7±11.6	6297±1127	289±67.9

【０２８６】

ＩｇＧ対照（データ図示せず）と比較して、抗ＰＤ－１　ｍＡｂ及びＷＴ　ＩＬ－２１を含むホモ二量体融合タンパク質は、クリアランスの増加及び曝露の低下を示した。そのため、融合タンパク質の曝露を増強し、オフターゲットＩＬ－２１作用を最小限に抑えるために（すなわち、ＰＤ－１受容体を発現していない免疫細胞におけるＩＬ－２１シグナル伝達を最小限に抑えるために）、ＩＬ－２１Ｒを介するシグナル伝達を減衰させる変異をＩＬ－２１に導入することが必要であると判断した。したがって、変異ＩＬ－２１を含む融合タンパク質を、ＰＤ－１を発現していない細胞上のＩＬ－２１Ｒに強く結合しないように設計した。融合タンパク質は、最初に、高い親和性でＰＤ－１標的に結合し（抗ＰＤ－１抗体結合の結合による）、これにより、ＩＬ－２１ムテインとＩＬ－２１Ｒ（α鎖）との間の第２の低い親和性相互作用がもたらされるだろうと仮定された。ＰＤ－１受容体がない場合、融合タンパク質は、ＩＬ－２１Ｒの発現に関係なく、ＰＤ－１受容体を発現していない細胞に結合しないだろうと仮定された。

【０２８７】

構造誘導性工学を使用して、ＷＴ　ＩＬ－２１アミノ酸配列と比較して１つのアミノ酸置換をそれぞれ有する、１４１個のＩＬ－２１ムテインのパネルを作製した。各ムテインは、ＩＬ－２１ＲのαサブユニットまたはＩＬ－２１Ｒのγサブユニットのいずれかに対して、低い親和性を有するように設計した。パネルの各ムテインは、ＰＤ－１　ｍＡｂを含む融合タンパク質（ＰＤ－１×ＩＬ－２１ムテイン）として発現させた後、ＦｏｒｔｅＢｉｏ　Ｏｃｔｅｔ（登録商標）システム（Ｐａｌｌ　ＦｏｒｔｅＢｉｏ（Ｆｒｅｍｏｎｔ，ＣＡ））を使用して、ＩＬ－２１Ｒへ

の結合能力について評価し、ＩＬ－２１Ｒ＋Ｔ細胞株（Ｈｕｔ７８）を用いて、ＳＴＡＴ３リン酸化をＩＬ－２１活性の代替として使用して、活性についてスクリーニングした。オフターゲット活性の可能性が最も小さいムテインを選択するために、選択基準を、ＩＬ－２１シグナル伝達がＰＤ－１^{陰性}細胞上のｒｈＩＬ－２１（３．７ｎＭ）に対して２０倍を超えて減衰することに定めた。

【０２８８】

１４１個のムテインの完全な一覧を表４に示す。

【表１２】

表４

変異体	ＩＬ－２１アミノ酸置換	配列番号	ＩＬ－２１α鎖またはγ鎖ムテイン	ＩＬ－２１Ｒ－Ｆｃ　Ｋｄ（ｎＭ）	親和性減少倍数
１	Ｒ５Ｄ	７４	α	ＮＢ	
２	Ｒ５Ｅ	７５	α	ＮＢ	
３	Ｒ５Ｇ	７６	α	ＮＢ	
４	Ｒ５Ｈ	７７	α	ＷＢ	
５	Ｒ５Ｉ	７８	α	ＷＢ	
６	Ｒ５Ｋ	７９	α	ＷＢ	
７	Ｒ５Ｌ	８０	α	ＷＢ	
８	Ｒ５Ｍ	８１	α	ＷＢ	
９	Ｒ５Ｎ	８２	α	ＮＢ	
１１	Ｒ５Ｓ	８４	α	ＷＢ	
１２	Ｒ５Ｔ	８５	α	ＷＢ	
１３	Ｒ５Ｖ	８６	α	ＷＢ	
１４	Ｒ５Ｙ	８７	α	ＷＢ	
１５	Ｉ８Ａ	８８	α	ＷＢ	
１６	Ｉ８Ｄ	８９	α	ＷＢ	

変異体	ＩＬ－２１アミノ酸置換	配列番号	ＩＬ－２１α鎖またはγ鎖ムテイン	ＩＬ－２１Ｒ－Ｆｃ　Ｋｄ（ｎＭ）	親和性減少倍数
１７	Ｉ８Ｅ	９０	α	ＮＢ	
１８	Ｉ８Ｇ	９１	α	ＷＢ	
１９	Ｉ８Ｎ	９２	α	ＷＢ	
２２	Ｒ９Ｄ	９５	α	＞１００	
２３	Ｒ９Ｅ	９６	α	ＮＢ	
２９	Ｒ９Ｍ	１０２	α	ＷＢ	
３０	Ｒ９Ｎ	１０３	α	ＷＢ	
３１	Ｒ９Ｑ	１０４	α	ＷＢ	
３２	Ｒ９Ｓ	１０５	α	ＷＢ	
３３	Ｒ９Ｔ	１０６	α	ＷＢ	
３４	Ｒ９Ｖ	１０７	α	ＷＢ	
２４	Ｒ９Ｇ	９７	α	約４０	
７４	Ｋ７５Ｄ	１５６	α	１９．８６	
７９	Ｒ７６Ｅ	１６１	α	１８．４７	７３８．８
８６	Ｒ７６Ｎ	１６８	α	１５．３１	６１２．４
７８	Ｒ７６Ｄ	１６０	α	約１２	
７７	Ｒ７６Ａ	１５９	α	約１１	４４０
４３	Ｌ１３Ｄ	１１２	α	１１	４４０
５９	Ｓ７０Ｐ	１３８	α	約１０	
６２	Ｋ７２Ｐ	１４３	α	８．９５８	
５３	Ｉ６６Ｐ	１３２	α	７．１１	
２１	Ｒ９Ａ	９４	α	６．８３６	
２０	Ｉ８Ｓ	９３	α	約４	１６０
５２	Ｉ６６Ｇ	１３１	α	４．５５２	
９５	Ｋ７７Ｐ	１７７	α	２．０５６	
２６	Ｒ９Ｉ	９９	α	２．２	
４２	Ｑ１２Ｖ	２４９	α	＜２．２	８８
７０	Ｋ７３Ｐ	１５２	α	約２	８０
８０	Ｒ７６Ｇ	１６２	α	約２	８０
８１	Ｒ７６Ｈ	１６３	α	約２	８０
５６	Ｖ６９Ｐ	１３５	α	１．９８９	
１０	Ｒ５Ｑ	８３	α	２．１	
２７	Ｒ９Ｋ	１００	α	２	
９１	Ｒ７６Ｖ	１７３	α	１．７６５	
４７	Ｙ２３Ｄ	４８	α	１．７	６８
２８	Ｒ９Ｌ	１０１	α	１．６	
９６	Ｐ７８Ｄ	６１	α	１．２２８	

変異体	ＩＬ－２１アミノ酸置換	配列番号	ＩＬ－２１α鎖またはγ鎖ムテイン	ＩＬ－２１Ｒ－Ｆｃ　Ｋｄ（ｎＭ）	親和性減少倍数
７３	Ｋ７３Ｖ	１５５	α	１．０７１	
８９	Ｒ７６Ｓ	１７１	α	１．０５	４２
７６	Ｋ７５Ｐ	１５８	α	約１	４０
５７	Ｓ７０Ｅ	１３６	α	０．９４８１	
５０	Ｒ６５Ｐ	１２９	α	０．９	
８８	Ｒ７６Ｑ	１７０	α	０．７７０２	
５１	Ｉ６６Ｄ	１３０	α	０．６７７３	
９４	Ｋ７７Ｇ	１７６	α	０．６５８	
８５	Ｒ７６Ｍ	１６７	α	約０．６	２４
３５	Ｒ９Ｙ	１０８	α	０．６３	
５８	Ｓ７０Ｇ	１３７	α	０．５１８１	
ｃ６	Ｄ１５Ａ	１１７	γ	０．４３８９	
６４	Ｋ７３Ｄ	１４６	α	０．４３５４	
ｃ１	Ｒ１１Ｄ	１０９	γ	０．４１１３	
８７	Ｒ７６Ｐ	１６９	α	約０．４	１６
３７	Ｑ１２Ｄ	２４９	α	０．４２	
３９	Ｑ１２Ｎ	２５１	α	０．３８	
８２	Ｒ７６Ｉ	１６４	α	０．３１５９	１２．６３６
９７	Ｐ７９Ｄ	６２	α	０．３１５２	
９９	Ｓ８０Ｐ	１７９	α	０．３０８９	
４０	Ｑ１２Ｓ	２５２	α	０．３２	
９２	Ｒ７６Ｙ	１７４	α	０．２６５１	
９８	Ｓ８０Ｇ	１７８	α	０．２６５	
６６	Ｋ７３Ｇ	１４８	α	０．２５２８	
６１	Ｋ７２Ｇ	１４２	α	０．２５０２	
ｃ７	Ｄ１５Ｅ	１１８		０．２４９２	
４１	Ｑ１２Ｔ	２５３	α	＜０．２６	
１００	Ｒ５Ａ	７３	α	０．２３７５	
１０１	Ｓ７０Ｙ	１３９	α	０．２３６６	
６０	Ｋ７２Ｄ	１４１	α	０．２３５	
ｃ３	Ｉ１４Ａ	１１４	γ	０．２１５３	
ｃ８	Ｄ１５Ｉ	１１９	γ	０．２１５１	
５５	Ｖ６９Ｇ	１３４	α	０．２１４８	
３６	Ｑ１２Ａ	１１１	α	０．２３	
ｃ４	Ｉ１４Ｄ	１１５	γ	０．２０２２	
８３	Ｒ７６Ｋ	１６５	α	約０．２	８
８４	Ｒ７６Ｌ	１６６	α	約０．２	８

変異体	ＩＬ－２１アミノ酸置換	配列番号	ＩＬ－２１α鎖またはγ鎖ムテイン	ＩＬ－２１Ｒ－Ｆｃ　Ｋｄ（ｎＭ）	親和性減少倍数
６７	Ｋ７３Ｈ	１４９	α	０．１９０１	
７２	Ｋ７３Ｓ	１５４	α	０．１６６７	
ｃ５	Ｉ１４Ｓ	１１６	γ	０．１６５８	
ｃ９	Ｄ１５Ｍ	１２０	γ	０．１６３３	
７５	Ｋ７５Ｇ	１５７	α	０．１６２７	
４６	Ｑ１９Ｄ	４７	α	０．１７	
ｃ２	Ｒ１１Ｓ	１１０	γ	０．１３４６	
４９	Ｒ６５Ｇ	１２８	α	０．１３	
９０	Ｒ７６Ｔ	１７２	α	０．１０５	
４４	Ｉ１６Ｄ	１２５	α	０．０９４	
抗ＰＤ－１Ａｂ*	－－			約０．０７～０．０９２	
４８	Ｒ６５Ｄ	１２７	α	０．０８８	
２５	Ｒ９Ｈ	９８	α	０．０８４	
６９	Ｋ７３Ｎ	１５１	α	０．０７３６８	
６５	Ｋ７３Ｅ	１４７	α	０．０７２６２	
４５	Ｉ１６Ｅ	１２６	α	０．０７６	
７１	Ｋ７３Ｑ	１５３	α	０．０６９１９	
６３	Ｋ７３Ａ	１４５	α	０．０５２５	
６８	Ｋ７３Ｉ	１５０	α	０．１７２４	
５４	Ｖ６９Ｄ	１３３	α	０．０３９５２	
３８	Ｑ１２Ｅ	２５０	α	０．０３１	
ｈｕＩＬ－２１**	－－			０．０２５～０．０２７	
ＰＤ－１Ａｂ***	－－			ＮＢ	

ＮＢ＝検出可能な結合なし

ＷＢ＝弱い結合（信頼性のある定量下限未満）

ＩＬ－２１アミノ酸置換は、配列番号１のアミノ酸位置ナンバリングに従う。

*ヒトＩＬ－２１に融合された抗ＰＤ－１　ｍＡｂ（変異なし）

**融合なし；ヒトＩＬ－２１のみ存在

***融合なし；ＰＤ－１　Ａｂのみ存在

【０２８９】

ＩＬ－２１ムテインを使用したＳＴＡＴ３リン酸化アッセイの例示的な結果を図７（Ｉ

Ｌ－２１Ｒαにする親和性が低いムテイン）及び図８（ＩＬ－２１Ｒγにする親和性が低いムテイン）に示す。これらの図に示されるように、いくつかのムテインは、ＰＤ－１陰性細胞でのＩＬ－２１活性が２０倍を超えて減衰されるが、ＰＤ－１陽性細胞での活性は維持することを示した。図９Ａ～９Ｂに示されるように、変異体５１（Ｒ６５Ｐ）（青丸）は、ＰＤ陰性細胞でのＩＬ－２１活性が２０倍を超える減少を示すが、ＰＤ－１発現細胞でｒｈＩＬ－２１によって達成されるものと同等のＩＬ－２１活性レベルを示した変異体の１つであった。ＰＤ－１低／陰性細胞におけるＳＴＡＴ３シグナルが２０倍を超えて減衰するという点で選択した例示的なムテインの一覧を表５に記載する。

【表１３】

表５

変異体番号	アミノ酸置換	配列番号	IL-21R に対する親和性 (K_D(nM))	親和性減少倍数[1]	N1		N2	
					PD-1陰性 減少倍数 (rhIL-21)	PD-1陽性 減少倍数 (rhIL-21)	PD-1陰性 減少倍数 (rhIL-21)	PD-1陽性 減少倍数 (rhIL-21)
20	I8S	93	約４	160	38.1	4.4	58.8	5.7
42	Q12V	249	<2.2	88	80	2.4	44	6.9
43	L13D	112	11	440	83.8	2.3	25.7	2.6
47	Y23D	48	1.7	68	35.6	1.4	13.7	1.4
70	K73P	152	約２	80	46.4	1.8	21	1.7
76	K75P	158	約１	40	25.1	1.7	36	1.6
77	R76A	159	約 11	440	29.9	2.6	20	3
79	R76E	161	18.47	738.8	40.2	2.6	23.2	2.5
80	R76G	162	約２	80	31.4	1.5	17	1.6
81	R76H	163	約２	80	23.4	1.5	38.6	1.8
82	R76I	164	0.3159	12.636	25.1	1.5	28.2	1.6
83	R76K	165	約 0.2	8	19.3	1.7	27.4	1.4
84	R76L	166	約 0.2	8	24.4	1.6	29.1	1.5
85	R76M	167	約 0.6	24	21.8	1.4	28.2	1.4
86	R76N	168	15.31	612.4	30.1	3	21.1	4.2
87	R76P	169	約 0.4	16	26.5	1.7	34.4	1.6
89	R76S	171	1.05	42	32.7	1.3	28.9	1.1
C10	D15N	121	11	87.3	16.9	4.1	39.7	4.7
C12	D15S	123	6.6	52.4	16.4	3.2	36.4	3.5
C14	D15V	124	5.471	43.4	20.1	4.7	35	5.7
C18	S113K	67	8.098	64.3	20.8	3.2	42	3.9
C21	Q116E	182	7.949	63.1	26.9	5.4	52.1	6.5

[1] ｒｈＩＬ－２１に対する

【０２９０】

実施例４

本実施例は、融合タンパク質の構築に使用するためのＩＬ－２１ムテイン候補の選択及びそのｉｎ　ｖｉｖｏ試験を示す。

【０２９１】

最も性能の高い２２個のＩＬ－２１ムテインを更なる試験のためにスケールアップした。この更なる試験（本明細書に記載されるＨｕｔ７８　ｐＳＴＡＴ３アッセイ）に基づいて、４つの融合タンパク質候補を、４つを有する集まりが、様々な減衰（Ｈｕｔ７８　ｐ

ＳＴＡＴ３アッセイにおけるｒｈＩＬ－２１と比較した効力シフト）を示すように、選択した。変異体Ｃ１０（Ｄ１５Ｎ）は、低減衰のムテインであり、変異体７７（Ｒ７６Ａ）は、中程度の減衰のムテインであり、変異体７９及び７８（それぞれＲ７６Ｅ及びＲ７６Ｄ）は、高減衰のムテインであった。４つのうち３つをカニクイザルでのｉｎ　ｖｉｖｏ試験のためにスケールアップして、ムテイン融合タンパク質構築物の薬物動態特性を評価した。変異体７９（Ｒ７６Ｅ）、変異体７７（Ｒ７６Ａ）または変異体Ｃ１０（Ｄ１５Ｎ）の単回投与（１０ｍｇ／ｋｇ）をナイーブカニクイザルに静脈内（ボーラス）投与し、１０日の期間にわたって血清中濃度を収集した。比較のために、抗ＰＤ－１　ｍＡｂと、抗ＰＤ－１　ｍＡｂ及びＷＴ　ＩＬ－２１を含む融合タンパク質を、静脈内ボーラス投与によってカニクイザルに投与した（個別に）。試験は、２つの対照，すなわち抗ＰＤ－１　ｍＡｂ単独と、抗ＰＤ－１　ｍＡｂ及びＷＴ　ＩＬ－２１を含む融合タンパク質構築物とを用いて実施した。図１０に示されるように、抗ＰＤ－１　ｍＡｂ－ＩＬ－２１ムテイン融合タンパク質のそれぞれは、親の抗ＰＤ－１　ｍＡｂ（黒三角）と比較して、薬物動態プロファイルの変化を示した。表６は、ノンコンパートメント解析により適合した薬物動態特性を示す。

【表１４】

表６

構築物	用量(mg/kg)	$C_{15分}$(μg/mL)	$AUC_{最終}$(hr*μg/mL)	Vss(mL/kg)	CL(mL/hr/kg)	半減期(時)
抗PD-1 mAb:IL-21(R76E)[a、b]	10	53 ± 7	309 ± 50	210 ± 30	33 ± 5	26 ± 13
抗PD-1 mAb:IL-21(R76A)[a、b]	10	4.7 ± 1.4	28.2 ± 9.3	2900 ± 700	380 ± 110	21 ± 14
抗PD-1 mAb:IL-21(D15N)[a、b]	10	2.4 ± 1	8.0 ± 2.8	10000 ± 4000	1400 ± 600	15 ± 9
抗PD-1 mAb[a、c]	8.25	200 ± 9	23600 ± 1500	56 ± 5	0.20 ± 0.01	200 ± 18
抗PD-1 mAb:IL-21[c、d]	1.0	0.27 ± 0.02	0.32 ± .02	5600 ± 800	2900 ± 200	2.8 ± 0.2

[a] 非ヒト霊長類試験

[b] ヒトＦｃ検出によるヒトＩＬ２１捕捉

[c] ヒトＦｃ検出によるヒトＦｃ捕捉

[d] 非ヒト霊長類試験

【０２９２】

実施例５

本実施例は、ＩＬ－２１二重変異体パネルの作製、ならびにＩＬ－２１二重変異体ホモ二量体（特に明記しない限り）を含む融合タンパク質の発現及び特徴付けを示す。

【０２９３】

更なる工学操作のために、細胞活性データ（例えば、ＰＤ－１^{陰性}Ｈｕｔ７８　Ｔ細胞における活性の最大減衰）及び製造性に基づいて、変異体番号７７（Ｒ７６Ａ）及び変異体番号７９（Ｒ７６Ｅ）を含む１つのアミノ酸置換を有する３つのムテインを選択した。ＩＬ－２１Ｒ（ＩＬ－２１Ｒα）のα鎖に対するサイトカイン結合を更に減衰させるために、構造誘導性工学を使用して、ＩＬ－２１単一変異体配列内に更なる変異をもたらした（すなわち、二重変異体を作製した）。二重変異体の配列を抗ＰＤ－１　ｍＡｂの配列に

融合し、融合タンパク質を発現させ、細胞アッセイで試験した。作製及び試験した二重変異体融合タンパク質の一覧を表７に記載する。

【表１５】

表７

ダブルムテイン番号	アミノ酸置換	配列番号
１	Ｄ１５Ｎ、Ｉ７１Ｌ	２１４
２	Ｄ１５Ｎ、Ｋ７２Ａ	２１５
３	Ｄ１５Ｎ、Ｋ７３Ａ	２１６
４	Ｄ１５Ｎ、Ｓ７０Ｔ	２１３
５	Ｉ７１Ｌ、Ｋ７３Ｑ	２１７
６	Ｉ７１Ｌ、Ｒ７６Ａ	２２７
７	Ｉ７１Ｌ、Ｒ７６Ｄ	２２８
８	Ｉ７１Ｌ、Ｒ７６Ｅ	２２９
９	Ｋ７２Ａ、Ｋ７３Ｑ	２１８
１０	Ｋ７２Ａ、Ｒ７６Ａ	２３０
１１	Ｋ７２Ａ、Ｒ７６Ｄ	２３１
１２	Ｋ７２Ａ、Ｒ７６Ｅ	２３２
１３	Ｋ７３Ａ、Ｒ７６Ａ	２３３
１４	Ｋ７３Ａ、Ｒ７６Ｄ	２３４
１５	Ｋ７３Ａ、Ｒ７６Ｅ	２３５
１７	Ｓ７０Ｔ、Ｋ７３Ｑ	２５５
１８	Ｓ７０Ｔ、Ｒ７６Ａ	２４６
１９	Ｓ７０Ｔ、Ｒ７６Ｄ	２４７
２０	Ｓ７０Ｔ、Ｒ７６Ｅ	２４８
２１	Ｒ９Ｅ、Ｒ７６Ｅ	２４５
２２	Ｒ９Ａ、Ｒ７６Ｅ	２４３
２３	Ｒ５Ｅ、Ｒ７６Ｅ	２３９
２４	Ｒ５Ａ、Ｒ７６Ｅ	２３７
２５	Ｒ５Ｑ、Ｒ７６Ｅ	２４１
２６	Ｒ９Ｅ、Ｒ７６Ａ	２４４
２７	Ｒ９Ａ、Ｒ７６Ａ	２４２
２８	Ｒ５Ｅ、Ｒ７６Ａ	２３８
２９	Ｒ５Ａ、Ｒ７６Ａ	２３６
３０	Ｒ５Ｑ、Ｒ７６Ａ	２４０

【０２９４】

減衰特性の高い二重変異体融合タンパク質が望まれたので、選択基準を、ＩＬ－２１Ｒ陽性・ＰＤ－１陰性（$PD-1^{陰性}$）Ｈｕｔ７８Ｔ細胞に対する効力（EC_{50}）が、ｒｈＩＬ－２１の効力に対して、１０００ｎＭを超えるものとした。加えて、アミノ酸置換を１つ含有するムテインと同様に、二重変異体融合タンパク質のＩＬ－２１Ｒ結合を特徴付けた（ＦｏｒｔｅＢｉｏ　Ｏｃｔｅｔ）。最後に、Ｊｕｒｋａｔ　ＰＤ－１レポーター遺伝子アッセイを使用して、二重変異体融合タンパク質のＰＤ－１活性を特徴付けた。これらのアッセイの結果を表８に示す。

【表１６】

表８

試験した融合タンパク質	Hut78 PD-1^{+}T 細胞における pSTAT3 EC50(nM) (n1)	Hut78 PD-1^{+}T 細胞における pSTAT3 EC50(nM) (n2)	Hut78 PD-1^{-}T 細胞における pSTAT3 EC50(nM) (n1)	Hut78 PD-1^{-}T 細胞における pSTAT3 EC50(nM) (n2)	K_D (nM) Hu IL-21R	K_D (nM) Cyno IL-21R	K_D(nM) Hu PD-1	K_D(nM) Cyno PD-1
rhIL-21	0.085	0.053	0.056	0.050	0.028 ～ 0.037	0.019 ～ 0.051	-	-
R76A	0.341	0.147	100.277	35.477	>10 (二峰性)	>10 (二峰性)	7.5	6.4
R76E	0.744	0.376	194.523	122.87	>10 (二峰性)	>10 (二峰性)	7.2	6.0
R76E 単量体	0.197	0.136	23.516	26.965	>10 (二峰性)	>10 (二峰性)	5.8	7.3
R5E:R76A	1.979	1.487	>1000	>1000	>300	>300	7.0	5.9
R5Q:R76E	2.211	1.663	>1000	>1000	>300	>300	6.3	6.3
R9E:R76A	16.6	-	>1000	>1000	>300	>300	8.9	5.9
抗 PD-1 mAb	-	-	-	-	-	-	13.4	6.3

試験した融合タンパク質	ｈＰＤ１レポーターＮ１（ｎＭ）	ｈＰＤ１レポーターＮ２（ｎＭ）
Ｒ７６Ａ	１．４４	２．１７
Ｒ７６Ｅ	０．８５	１．６８
Ｒ７６Ｅ単量体	０．６８５	０．６３７
Ｒ５Ｑ：Ｒ７６Ｅ	０．９５４	０．９４２
抗ＰＤ－１　ｍＡｂ	１．３９	１．７７

Ｈｕ＝ヒト；Ｃｙｎｏ＝カニクイザル

ｐＳＴＡＴ３　ＥＣ５０（２．５倍の変化）

Ｏｃｔｅｔ：固定化した一価のヒト及びカニクイザルＩＬ－２１Ｒ－ｈｉｓに対する結合

【０２９５】

表８に示されるように、二重変異体融合タンパク質は、ＰＤ－１の発現レベルが低いＴ細胞に対して非常に低いＩＬ－２１活性（例えば、ＰＤ－１の検出可能レベル未満）を示したが、ＰＤ－１発現細胞に対しては顕著なＩＬ－２１活性を維持した。二重変異体融合タンパク質は、ＩＬ－２１Ｒに対して弱い結合（３００ｎＭを超えるＫｄ）を示したが、ＰＤ－１に結合し、ＰＤ－１シグナル伝達を阻害する能力を維持した。

【０２９６】

実施例６

本実施例は、抗ＰＤ－１　ｍＡｂ、及びＩＬ－２１二重変異体ホモ二量体またはＩＬ－２１単一変異体ホモ二量体のいずれかを含む融合タンパク質を比較する、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ初代細胞アッセイを示す。

【０２９７】

抗ＰＤ－１　ｍＡｂ及びＲ５ＱとＲ７６Ｅのアミノ酸置換を含むＩＬ－２１を含む融合タンパク質を、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ初代細胞アッセイ（混合リンパ球反応（ＭＬＲ））で試験した。ＭＬＲは、ＩＬ－２１Ｒを発現しているが、ＰＤ－１を発現していない樹状細胞（ＤＣ）、ＰＤ－１を発現しているＴ細胞、及びＰＤ－１を発現していないＴ細胞を含む、ＩＬ－２１Ｒ$^{+}$細胞の混合集団を含んだ。ＭＬＲを、（ｉ）Ｒ５Ｑ及びＲ７６Ｅアミノ酸置換を含む融合タンパク質、（ｉｉ）Ｒ７６Ｅアミノ酸置換のみを含む融合タンパク質、（ｉｉｉ）組み換えヒトＩＬ－２１（ｒＨｕ　ＩＬ－２１）、（ｉｖ）抗ＰＤ－１　ｍＡｂ、（ｖ）ｒＨｕ　ＩＬ－２１と抗ＰＤ－１　ｍＡｂの組み合わせ、または（ｖｉ）対照ＩｇＧに曝露した。

【０２９８】

図１１に示されるように、ｒｈＩＬ－２１は、ＤＣ機能を抑制し、共投与した場合、ＰＤ－１応答よりも優性である。活性を減衰させたＩＬ－２１ダブルムテインを含む融合タンパク質は、オフターゲット活性の低下を示した。また、ｒｈＩＬ－２１及びＲ７６Ｅアミノ酸置換のみを含む融合タンパク質のそれぞれは、ＤＣに対する著しいオフターゲット活性を示し、サイトカイン産生を抑制した。対照的に、ＰＤ－１　ｍＡｂ及びＲ５ＱとＲ７６Ｅのアミノ酸置換のみを含む融合タンパク質は、標的ＰＤ－１^{陽性}Ｔ細胞（ＰＤ－１^{陰性}樹状細胞ではない）にＩＬ－２１シグナルを送達し、サイトカイン産生を増大させる能力（ＰＤ－１アームを介する）を維持した。したがって、これらの結果は、ＩＬ－２１二重変異体を含む融合タンパク質が、免疫抑制及びＤＣプライミングに対する有害な影響を減少させ、新しいＴ細胞クローンの動員及びより耐久性のある抗腫瘍免疫応答を可能にし得ることを示唆している。

【０２９９】

実施例７

本実施例は、初代細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）に対する、ＩＬ－２１ダブルムテイン（ホモ二量体）及び抗ＰＤ－１　ｍＡｂを含む種々の融合タンパク質の活性を示す。初代ＣＴＬ（ヒトドナー由来ＣＭＶ反応性ＣＴＬ株）における内因性ＳＴＡＴ３リン酸化をＦＡＣｓによって測定し、ＩＬ－２１シグナル伝達の尺度として使用した。ＣＴＬを４８時間休ませた後（ＰＤ－１の発現を低下させるため）、細胞を（ｉ）ＩＬ－２１　Ｒ５Ｅ／Ｒ７６Ａダブルムテインを含む融合タンパク質（左のグラフ中赤色の線）、（ｉｉ）ＩＬ－２１　Ｒ５Ｑ／Ｒ７６Ｅダブルムテインを含む融合タンパク質（中央のグラフ中赤色の線）、（ｉｉｉ）ＩＬ－２１　Ｒ９Ｅ／Ｒ７６Ａダブルムテインを含む融合タンパク質（右のグラフ中赤色の線）、（ｉｖ）ＩｇＧ１対照（各グラフ中灰色の線）、（ｖ）ｒｈＩＬ－２１（各グラフ中青色の線）、（ｖｉ）抗ＰＤ－１　ｍＡｂ（各グラフ中緑色の実線）、（ｖｉｉ）ｒｈＩＬ－２１と抗ＰＤ－１　ｍＡｂの組み合わせ（各グラフ中緑色の点線）、または（ｖｉｉｉ）ＩＬ－２１　Ｒ７６Ｅシングルムテインを含む融合タンパク質（各グラフ中紫色の線）に曝露した（１０分間）。ＦＡＣｓの結果を図１２Ａ～１２Ｃに示す。ＩＬ－２１ダブルムテインを含む各融合タンパク質のＩＬ－２１活性を、（ｉｖ）ＩｇＧ１対照、（ｖ）ｒｈＩＬ－２１、（ｖｉ）抗ＰＤ－１　ｍＡｂ、（ｖｉｉ）ｒｈＩＬ－２１と抗ＰＤ－１　ｍＡｂの組み合わせ、及び（ｖｉｉｉ）ＩＬ－２１　Ｒ７６Ｅシングルムテインを含む融合タンパク質により達成された活性に対してプロットした。この初代細胞アッセイは、二重変異体融合体が、休止ＣＴＬ（ＰＤ－１を低レベルで発現する）において、ＩＬ－２１誘導性ＳＴＡＴ３シグナル伝達を弱く刺激することを示している。ＩＬ－２１活性は、ダブルムテイン融合体で最も減衰され（抗ＰＤ－１　ｍＡｂ及びＩｇＧ１対照で見られるものと同様である）、単一変異体融合体は、中程度のＩＬ－２１活性減衰を示し、ｒｈＩＬ－２１と抗ＰＤ－１　ｍＡｂの組み合わせは、ｒｈＩＬ－２１と同様の活性を有する。

【０３００】

長期的に刺激を受けた場合のＣＴＬ媒介性細胞毒性機能に対する抗ＰＤ－１　ｍＡｂ及びＩＬ－２１ダブルムテインホモ二量体を含む融合タンパク質の作用についても調べた。ＣＴＬをＣＤ３／ＣＤ２８で活性化し、（ｉ）ＩＬ－２１　Ｒ５Ｅ／Ｒ７６Ａダブルムテインを含む融合タンパク質、（ｉｉ）ＩＬ－２１　Ｒ５Ｑ／Ｒ７６Ｅダブルムテインを含む融合タンパク質、（ｉｉｉ）ＩＬ－２１　Ｒ９Ｅ／Ｒ７６Ａダブルムテインを含む融合タンパク質、（ｉｖ）ＩｇＧ４対照、（ｖ）ｒｈＩＬ－２１、（ｖｉ）抗ＰＤ－１　ｍＡｂ、または（ｖｉｉ）ｒｈＩＬ－２１と抗ＰＤ－１　ｍＡｂの組み合わせに曝露した。刺激から７日後に、細胞をＣＭＶペプチド添加黒色腫がん細胞株と共培養し、細胞毒性を測定した。本アッセイの結果を図１３Ａ～１３Ｃに示す。

【０３０１】

図１３Ａ～１３Ｃに示されるように、融合タンパク質は、抗ＰＤ－１　ｍＡｂ単剤療法と比較して、ＣＴＬ機能を良好に維持することができる。ＩＬ－２１ムテイン融合タンパク質は、長期的に刺激を受けた場合、ＣＴＬ媒介性細胞毒性機能を維持することができる。これらの結果は、がんで観察されるような長期活性化の条件下で、ＩＬ－２１がＣＴＬ機能を維持できるという考えを支持するものである。ＰＤ－１$^{+}$抗原特異的Ｔ細胞へのＩＬ－２１の送達により、治療上の有効性をもたらすＴ細胞集団の機能を選択的に維持することができる。

【０３０２】

実施例８

本実施例は、ダブルムテイン構築物によるｉｎ　ｖｉｖｏ薬物動態を示す。

【０３０３】

抗ＰＤ－１　ｍＡｂ、及びＩＬ－２１ダブルムテインまたはＩＬ－２１シングルムテインのいずれかを含む融合タンパク質を、静脈内ボーラス投与によってナイーブカニクイザルに投与して、薬物曝露を特徴付けた。表９は、動物に投与した各構築物の用量を示す。曝露を更にどのように改善できるかをよりよく理解するために、シングルムテインバリアント（ＩＬ－２１　Ｒ７６Ｅ）をホモ二量体と単量体でｉｎ　ｖｉｖｏで試験した。

【０３０４】
ナイーブカニクイザルに静脈内ボーラスを投与した後のＰＤ－１　ｍＡｂ及びＰＤ－１：ＩＬ－２１融合体の血清中濃度－時間プロファイルを、表９に列挙する投与後１週間の薬物曝露を観察して、図１４に示す。
【表１７】
表９

動物番号：	構築物：	用量 (mg/kg)	AUC_{0-168}/用量 (hr*kg*μg/mL/mg)
	PD-1 mAb[a,b]	8.25	2260±150
	PD-1:IL-21(R76A)ホモ二量体[a,c]	10	2.82±0.93
８０３＆８０４	PD-1:IL-21(R5E/R76A) ホモ二量体[d,e]	5	39.1±14.0
８０１＆８０２	PD-1:IL-21(R76E)ホモ二量体[d,e]	5	38.0±19.6
８０７＆８０８	PD-1:IL-21(R76E)一価[d,e]	5	195±4.8
８０５＆８０６	PD-1:IL-21(R5Q/R76E) ホモ二量体[c,d]	5	114±14

[a]非ヒト霊長類試験
[b]ヒトＦｃ検出によるヒトＦｃ捕捉
[c]ヒトＦｃ検出によるヒトＩＬ－２１捕捉
[d]非ヒト霊長類試験
[e]ヒトＩＬ２１検出によるＰＤ－１捕捉

【０３０５】
表９に示されるように、単量体Ｒ７６Ｅ融合タンパク質は、静脈内投与した場合、ホモ二量体Ｒ７６Ｅ融合タンパク質と比較して、優れた曝露を示した。ＩＬ－２１ダブルムテインを含む融合タンパク質（Ｒ５Ｑ／Ｒ７６Ｅ及びＲ５Ｅ／Ｒ７６Ａ）は、親のシングルムテインホモ二量体融合タンパク質構築物（それぞれＲ７６Ｅ及びＲ７６Ａ）よりも大きな曝露が観察された（図１４；表９）。
【０３０６】
薬力学（ＰＤ）パラメーターについてもカニクイザルにおいてｉｎ　ｖｉｖｏで試験した。ＰＤ－１に対する非競合抗体を使用してＰＤ－１発現を決定した。このＰＤ－１サンプリングは、－５日目、７日目及び２１日目に行った。動物に対し、（ｉ）抗ＰＤ－１　ｍＡｂとＩＬ－２１　Ｒ７６Ｅシングルムテインのホモ二量体とを含む融合タンパク質、（ｉｉ）抗ＰＤ－１　ｍＡｂとＩＬ－２１　Ｒ７６Ｅシングルムテインの単量体とを含む融合タンパク質、または（ｉｉｉ）抗ＰＤ－１　ｍＡｂとＩＬ－２１　Ｒ５Ｑ／Ｒ７６Ｅダブルムテインとを含む融合タンパク質の初回投与を１日目に投与し、２回目の投与を８日目に投与した。図１５Ａを参照されたい。
【０３０７】
図１５Ｂ～１５Ｄは、７日目に測定したときのＰＤ－１陽性／ＣＤ４陽性細胞における倍数変化（－５日目と比較）（図１５Ｂ）、７日目に測定したときのＰＤ－１陽性／ＣＤ

８陽性細胞における倍数変化（－５日目と比較）（図１５Ｃ）、及び２１日目に測定したときのＰＤ－１陽性／ＣＤ８陽性細胞における倍数変化（－５日目と比較）（図１５Ｄ）を示す。

【０３０８】

図１５Ｂ～１５Ｄに示されるように、抗ＰＤ－１　ｍＡｂ及びＩＬ－２１二重変異体を含む融合タンパク質の単回投与でも、末梢ＰＤ－１$^{+}$／ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞が増大した。本試験は、二重変異体融合タンパク質が、親のシングルムテインバリアントよりも良好に、ＰＤ－１$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞を顕著に増大できることを実証した。

【０３０９】

ＰＤバイオマーカーの差異についても調べたところ、単量体構築物は、単回投与時には、より小さい標的範囲及びＰＤ応答を有するが、複数回投与時には、ＰＤ及び標的範囲が同等の変化を有することがデータにより示唆されている。これらのデータは、融合タンパク質のＰＫ特性が単量体の形態により更に改善され得ることを示唆している。

【０３１０】

図１６に示されるように、ＣＤ８$^{+}$細胞の受容体占有率（ＲＯ）は、二重変異体（動物８０３、８０５、８０６）におけるＰＤ－１$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞の増大と概ね相関していた。単一変異体ホモ二量体構築物（動物８０１、８０２）は、おそらくその薬物動態特性が相対的に良くないことに起因して、ＰＤ－１$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞を増大しなかった。注目すべきことに、ダブルムテイン構築物は、より望ましい薬物動態特性を有し、ＰＤ－１$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞を増大させ、ＰＤ応答は標的範囲と相関した。データは、二重変異体融合タンパク質が、抗腫瘍防御免疫に関与することが知られている関連Ｔ細胞集団を増大できることを示唆している。

【０３１１】

図１７は、反復投与した場合のＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞におけるＰＤ－１の標的範囲が、抗ＰＤ－１　ｍＡｂに関して観察されるものと同様であることを示す（抗ＰＤ－１　ｍＡｂのデータは図示せず）。まとめると、二重変異体に関して、図１６及び１７は、標的集団（ＰＤ－１$^{+}$ＣＤ８Ｔ細胞）の調節には十分な標的範囲が必要であり、改善された標的範囲と改善された薬力学とが相関するという考えを支持している。

【０３１２】

実施例９

本実施例は、様々なホモ二量体ＩＬ－２１ダブルムテインに融合された種々の抗ＰＤ－１　ｍＡｂを含む融合タンパク質のパネル作製を示す。

【０３１３】

実施例１２に記載されるように抗ＰＤ－１　ｍＡｂのパネルを作製及び試験し、リードｍＡｂを特定のＩＬ－２１ダブルムテインに融合させた。ホモ二量体ＩＬ－２１ダブルムテイン及び抗ＰＤ－１　ｍＡｂを含む１２個の融合タンパク質を、ＳＴＡＴ３リン酸化アッセイを使用してＰＤ－１^{陰性}及びＰＤ－１^{陽性}の両方のＨｕｔ７８Ｔ細胞におけるＩＬ－２１活性について試験し、ＦｏｒｔｅＢｉｏ　Ｏｃｔｅｔアッセイを使用してＩＬ－２１Ｒ結合及びＰＤ－１結合について試験し、ＰＤ－１　Ｊｕｒｋａｔレポーターアッセイを使用してＰＤ－１活性について試験し、ＭＬＲ（混合リンパ球反応）アッセイを使用してｉｎ　ｖｉｔｒｏ活性について試験した。これらの実験は、先の実施例で本質的に記載されるとおりに実施した。

【０３１４】

抗ＰＤ－１　ｍＡｂ及びＩＬ－２１ダブルムテインを含む１２個の融合タンパク質の一覧と、これらのアッセイで測定された活性を表１０～１２に記載する。

【表１８】

表１０

ＳＴＡＴ３リン酸化アッセイにより測定されたＩＬ－２１活性

PD-1 mAb	IL-21 ダブルムテインのアミノ酸置換	Hut78(n1)PD-1 陽性 EC50(nM)	Hut78(n2) PD-1 陽性 EC50(nM)	Hut78(n1) PD-1 陰性 EC50(nM)	Hut78(n2) PD-1 陰性 EC50(nM)
A-1-003 (20A2.003)	(R5A, R76E)	7.55	14.74	>1000	>1000

PD-1 mAb	IL-21 ダブルムテインのアミノ酸置換	Hut78(n1)PD-1 陽性 EC50(nM)	Hut78(n2) PD-1 陽性 EC50(nM)	Hut78(n1) PD-1 陰性 EC50(nM)	Hut78(n2) PD-1 陰性 EC50(nM)
A-1-003 (20A2.003)	(R5Q, R76E)	3.37	16.9	>1000	>1000
A-1-003 (20A2.003)	(R5E, R76A)	5.70	25.07	618.28	>1000
A-1-003 (20A2.003)	(R9E, R76A)	25.26	59.10	>1000	>1000
A-4-006 (20C1.006)	(R5A, R76E)	7.40	15.33	>1000	>1000
A-3-009 (20C1.009)	(R5Q, R76E)	3.75	16.39	>1000	>1000
A-3-009 (20C1.009)	(R5E, R76A)	5.27	10.71	471.56	>1000
A-3-009 (20C1.009)	(R9E, R76A)	19.44	56.43	>1000	>1000
A-2-006 (22D4.006)	(R5A, R76E)	6.90	8.04	>1000	>1000
A-2-006 (22D4.006)	(R5Q, R76E)	4.45	10.32	>1000	>1000
A-2-006 (22D4.006)	(R5E, R76A)	5.34	13.11	652.02	826.11
A-2-006 (22D4.006)	(R9E, R76A)	17.41	45.63	>1000	>1000
rhIL-21(av)	-	0.15	0.625	0.22	0.715
抗 PD-1 mAb (IgG4 アイソタイプ)		-	-	-	-
抗 PD-1 mAb (IgG1 アイソタイプ)		-	-	-	-
第 2 の抗 PD-1 mAb (IgG4 アイソタイプ)		-	-	-	-

【表１９】

表１１

ＩＬ－２１Ｒ結合及びＰＤ－１結合

PD-1 mAb	IL-21 ダブルムテインのアミノ酸置換	IL-21R Hu Kd(nM)	IL-21R Cy Kd(nM)	hPD-1 Kd(nM)	CyPD-1 Kd(nM)
A-1-003 (20A2.003)	(R5A, R76E)	>300	>300	1.9	3.1
A-1-003 (20A2.003)	(R5Q, R76E)	>300	>300	2.4	2.6
A-1-003 (20A2.003)	(R5E, R76A)	>300	>300	4.4	4.7
A-1-003 (20A2.003)	(R9E, R76A)	>300	>300	1.5	3.3
A-4-006 (20C1.006)	(R5A, R76E)	>300	>300	0.8	1.6
A-3-009 (20C1.009)	(R5Q,R76E)	>300	>300	0.7	1.4
A-3-009 (20C1.009)	(R5E, R76A)	>300	>300	0.9	2.3
A-3-009 (20C1.009)	(R9E, R76A)	>300	>300	0.7	1.7
A-2-006 (22D4.006)	(R5A, R76E)	>300	>300	1.0	1.5
A-2-006 (22D4.006)	(R5Q, R76E)	>300	>300	1.2	1.4
A-2-006 (22D4.006)	(R5E, R76A)	>300	>300	1.2	1.0
A-2-006 (22D4.006)	(R9E, R76A)	>300	>300	1.3	1.3
rhIL-21(av)	-	0.038	<0.010	-	-
抗 PD-1 mAb (IgG4 アイソタイプ)		-	-	約 9	約 9
抗 PD-1 mAb (IgG1 アイソタイプ)		-	-	約 6	約 4
第２の抗 PD-1 mAb (IgG4 アイソタイプ)		-	-	2.4	1.0

【表２０】

表１２

ＰＤ－１活性及びＭＬＲ

PD-1 mAb	IL-21 ダブルムテインのアミノ酸置換	hPD-1 レポーター N1 (nM)	hPD-1 レポーター N1 (nM)	MLR N1 IL-2 (nM)	MLR N2 IL-2 (nM)
A-1-003 (20A2.003)	(R5A, R76E)	0.748	0.622	3.438	2.198
A-1-003 (20A2.003)	(R5Q, R76E)	0.997	0.805	4.021	1.821
A-1-003 (20A2.003)	(R5E, R76A)	0.344	0.47	2.472	1.397
A-1-003 (20A2.003)	(R9E, R76A)	0.788	0.712	2.872	1.252
A-4-006 (20C1.006)	(R5A, R76E)	-	-	-	-
A-3-009 (20C1.009)	(R5Q, R76E)	0.472	0.738	1.04	1.186
A-3-009 (20C1.009)	(R5E, R76A)	0.445	0.46	0.345	0.77
A-3-009 (20C1.009)	(R9E, R76A)	0.669	0.409	1.191	0.68
A-2-006 (22D4.006)	(R5A, R76E)	0.331	0.269	0.469	0.88
A-2-006 (22D4.006)	(R5Q, R76E)	0.369	0.255	0.769	0.458
A-2-006 (22D4.006)	(R5E, R76A)	0.281	0.177	0.59	0.31
A-2-006 (22D4.006)	(R9E, R76A)	0.429	0.112	1.042	0.446
rhIL-21(av)	-	-	-	-	-
抗 PD-1 mAb (IgG4 アイソタイプ)		1.915	2.905	1.354	3.216
抗 PD-1 mAb (IgG1 アイソタイプ)		-	-	-	-
第２の抗 PD-1 mAb (IgG4 アイソタイプ)		0.555	0.695	0.627	0.708

【０３１５】

全てではないが候補の大部分が、２つの抗ＰＤ－１　ｍＡｂより優れるものではないとしても、同様に機能した。いくつかは、ＰＤ－１活性及びＭＬＲアッセイにおいて、抗ＰＤ－１　ｍＡｂの効力以上の効力を示した。

【０３１６】

１２の候補のうち、２つを更なる試験のために選択した。２つのうち１つ目は、Ｒ５Ｑ／Ｒ７６Ｅ変異を含むＩＬ－２１ダブルムテインを有し、２つ目は、Ｒ９Ｅ／Ｒ７６Ａ変異を含むＩＬ－２１ダブルムテインを有した。ＰＤ－１　ｍＡｂパネルに由来する異なる抗ＰＤ－１　ｍＡｂを使用して、２つのＩＬ－２１ムテインのうちの１つを含む融合タンパク質を作製した。２０Ａ２．００３（オレンジの菱形）、２０Ｃ１．００６（赤い四角）、２０Ｃ１．００９（緑の三角）及び２２Ｄ４．００６（濃い紫の丸）抗ＰＤ－１　ｍＡｂを含む、１０個の抗ＰＤ－１　ｍＡｂをＲ５Ｑ／Ｒ７６Ｅ融合タンパク質に使用した。２０Ａ２．００３（紫の三角）、２０Ｃ１．００６（赤い四角）、２０Ｃ１．００９（緑の三角）及び２２Ｄ４．００６（黒丸）抗ＰＤ－１　ｍＡｂを含む、７つの抗ＰＤ－１　ｍＡｂをＲ９Ｅ／Ｒ７６Ａ融合タンパク質に使用した。本明細書に本質的に記載されるとおりに、ＳＴＡＴ３リン酸化アッセイを使用して融合タンパク質のＩＬ－２１活性について試験した。図１８Ａ～１８Ｂ及び１９Ａ～１９Ｂは、ｒｈＩＬ－２１シグナル（ショッキングピンクの線）と比較した、ＰＤ－１^{陰性}及びＰＤ－１^{陽性}ＨＵＴ７８Ｔ細胞における活性を示す。これらの図に示されるように、融合タンパク質は、ＰＤ－１^{陰性}ＨＵＴ７８Ｔ細胞において１０００倍を超える減衰を示したが、ＰＤ－１^{陽性}ＨＵＴ７８Ｔ細胞では効力を維持した。

【０３１７】

実施例１０

本実施例は、様々な単量体及びホモ二量体ＩＬ－２１ダブルムテインに融合された種々の抗ＰＤ－１　ｍＡｂを含む融合タンパク質のパネル作製を示す。

【０３１８】

抗ＰＤ－１　ｍＡｂと、単量体またはホモ二量体のいずれかのＩＬ－２１ダブルムテインとを含む融合タンパク質のパネルを作製した。抗ＰＤ－１　ｍＡｂ及びＩＬ－２１ダブルムテインを含む融合タンパク質の一覧を表１３に記載する。

【表２１】

表１３

PD-1 mAb	IL-21 ダブルムテインのアミノ酸置換	IL-21 ムテイン：ホモ二量体または単量体	融合タンパク質の IL-21 ムテイン部分の配列番号
A-2-006 V4 (22D4.006 V4)	R5E/R76A	単量体	238
A-2-006 V4 (22D4.006 V4)	R9E/R76A	単量体	244
A-2-006 V4 (22D4.006 V4)	R5A/R76E	単量体	237
A-2-006 V4 (22D4.006 V4)	R5Q/R76E	単量体	241
A-2-006 (22D4.006)	R5E/R76A	ホモ二量体	238
A-2-006 (22D4.006)	R9E/R76A	ホモ二量体	244
A-2-006 (22D4.006)	R5A/R76E	ホモ二量体	237
A-2-006 (22D4.006)	R5Q/R76E	ホモ二量体	241
A-2-006 V106 (22D4.006	R5Q/R76E	単量体	241

PD-1 mAb	IL-21 ダブルムテインのアミノ酸置換	IL-21 ムテイン：ホモ二量体または単量体	融合タンパク質のIL-21 ムテイン部分の配列番号
V106)			
A-2-006 V112	R5Q/R76E	単量体	241
A-2-006 V106 (22D4.006 V106)	R9E/R76A	単量体	244
A-2-006 V112 ((22D4.006 V112)	R9E/R76A	単量体	244
A-1-003 V4 (20A2.003 V4)	R5E/R76A	単量体	238
A-1-003 V4 (20A2.003 V4)	R9E/R76A	単量体	244
A-1-003 V4 (20A2.003 V4)	R5A/R76E	単量体	237
A-1-003 V4 (20A2.003 V4)	R5Q/R76E	単量体	241
A-1-003 (20A2.003)	R5E/R76A	ホモ二量体	238
A-1-003 (20A2.003)	R9E/R76A	ホモ二量体	244
A-1-003 (20A2.003)	R5A/R76E	ホモ二量体	237
A-1-003 (20A2.003)	R5Q/R76E	ホモ二量体	241
A-1-003 V106 (20A2.003 V106)	R5Q/R76E	単量体	241
A-1-003 V112 (20A2.003 V112)	R5Q/R76E	単量体	241
A-1-003 V106 (20A2.003 V106)	R9E/R76A	単量体	244
A-1-003 V112 (20A2.003 V112)	R9E/R76A	単量体	244
rhIL-21(av)	-		
抗 PD-1 mAb (IgG4 アイソタイプ)			
抗 PD-1 mAb (IgG1 アイソタイプ)			
第２の抗 PD-1 mAb (IgG4 アイソタイプ)			

【０３１９】

融合タンパク質を、ＳＴＡＴ３リン酸化アッセイを使用してＰＤ－１^{陰性}及びＰＤ－１^{陽性}の両方のＨｕｔ７８Ｔ細胞におけるＩＬ－２１活性について試験し、ＦｏｒｔｅＢｉｏ　Ｏｃｔｅｔアッセイを使用してＩＬ－２１Ｒ結合及びＰＤ－１結合について試験し、ＰＤ－１　Ｊｕｒｋａｔレポーターアッセイを使用してＰＤ－１活性について試験し、ＭＬＲアッセイを使用してｉｎ　ｖｉｔｒｏ活性について試験した。これらの実験は、先の実施例で本質的に記載されるとおりに実施した。これらのｉｎ　ｖｉｔｒｏアッセイで測定した活性を図２０～２３に示す。

【０３２０】

図２０Ａ～２０Ｄは、いくつかの抗ＰＤ－１　ｍＡｂ－ＩＬ－２１単量体またはホモ二量体ダブルムテイン融合体を用いて観察されたｐＳＴＡＴ３シグナル伝達の量を示す。ｒｈＩＬ－２１によって刺激されたｐＳＴＡＴ３シグナル伝達は、グラフ上部に赤色で示され、ＩｇＧ１対照によって刺激されたｐＳＴＡＴ３シグナル伝達は、灰色で示され（グラフ下部）、ＩｇＧ２対照によるものは、オレンジ色で示されている（グラフ下部）。抗ＰＤ－１　ｍＡｂ（ｍＡｂとして存在；すなわち、融合体でない）によって刺激されたｐＳＴＡＴ３シグナル伝達は、緑色で示されている（グラフ下部）。対照抗ＰＤ－１　ｍＡｂによって刺激されたｐＳＴＡＴ３シグナル伝達は、オレンジと黄色で示され（グラフ下部）、残りの線は、抗ＰＤ－１　ｍＡｂ－ＩＬ－２１単量体または二量体ダブルムテイン融合体（各種電荷対変異を含む）（二重変異体は、Ｒ５Ｅ／Ｒ７６Ａ；Ｒ９Ｅ／Ｒ７６Ａ；Ｒ５Ａ／Ｒ７６ＥまたはＲ５Ｑ／Ｒ７６Ｅである）によって刺激したときに得られたｐＳＴＡＴ３シグナル伝達を示す。この一連の図に示されるように、ｒｈＩＬ－２１は、ＰＤ－１^{陰性}細胞とＰＤ－１^{陽性}細胞の両方の細胞で活性を示す。対照的に、単量体及びホモ二量体ダブルムテイン融合体は、ｐＳＴＡＴ３活性（ＩＬ－２１に基づく）をＰＤ－１^{陽性}細胞でのみ示すことができ、ＰＤ－１^{陰性}細胞では示されない。そして、ＩＬ－２１二重変異体を含む単量体融合体のＰＤ－１^{陰性}細胞におけるＩＬ－２１活性の減衰レベルは、対応する二量体融合体と同様のレベルを示し、ＩＬ－２１活性は、対応する二量体融合体と同様に、ＰＤ－１^{陽性}細胞で救済される。

【０３２１】

図２０Ａ～２０Ｄで評価した融合タンパク質を、ＰＤ－１レポーター遺伝子アッセイ（ＲＧＡ；図２１Ａ及び２１Ｂ）及びＭＬＲアッセイ（図２１Ｃ及び２１Ｄ）で試験した。図２１Ａ～２１Ｄに示される結果は、抗ＰＤ－１　ｍＡｂ－ＩＬ－２１単量体及び二量体ダブルムテイン融合体がＰＤ－１活性を誘導できることを実証している。

【０３２２】

異なる抗ＰＤ－１　ｍＡｂを用いたことを除き、図２０Ａ～２０Ｄの構築物と同じ抗ＰＤ－１　ｍＡｂ－ＩＬ－２１単量体及び二量体ダブルムテイン融合体構築物を試験した、ｐＳＴＡＴ３アッセイの結果を図２２Ａ～２２Ｄに示す。図２２Ａ～２２Ｄの結果は、図２０Ａ～２０Ｄで認められた結果と同様である。

【０３２３】

異なる抗ＰＤ－１　ｍＡｂを用いたことを除き、図２１Ａ～２１Ｄの構築物と同じ抗ＰＤ－１　ｍＡｂ－ＩＬ－２１単量体及び二量体ダブルムテイン融合体構築物を試験した、ＰＤ－１レポーター遺伝子アッセイ及びＭＬＲアッセイの結果を図２３Ａ～２３Ｄに示す。

【０３２４】

これらのデータは、ＩＬ－２１ダブルムテインを含む融合タンパク質が、部分的な減衰のためにホモ二量体の構造を必要としない可能性があることを示している。抗ＰＤ－１　ｍＡｂに対して、以下のダブルムテイン（単量体またはホモ二量体として融合）を更なる評価のために選択した（表１４）。

【表２２】

表１４

	ＩＬ－２１ムテイン	形態
Ａ－２－０１７（２２Ｄ４．０１７）	Ｒ５Ｑ：Ｒ７６Ｅ	ホモ二量体
Ａ－２－０１７（２２Ｄ４．０１７）	Ｒ５Ｑ：Ｒ７６Ｅ	Ｖ１単量体
Ａ－２－０１７（２２Ｄ４．０１７）	Ｒ９Ｅ：Ｒ７６Ａ	ホモ二量体
Ａ－２－０１７（２２Ｄ４．０１７）	Ｒ９Ｅ：Ｒ７６Ａ	Ｖ１単量体

【０３２５】

細胞ベースのデータは、ＰＤ－１抗体に融合された場合、これらのムテインが、ＰＤ－１受容体を発現するＴ細胞を選択的に標的にできることを示唆している（Ｔ細胞株を使用

して示される）。これらの二機能性ＰＤ－１×ＩＬ－２１分子は、融合分子の各アーム（抗ＰＤ－１　ｍＡｂ及びＩＬ－２１ムテイン）から得られる独自の特性を有する。

【０３２６】

実施例１１

以下の材料及び方法を実施例で使用した。

【０３２７】

抗ＰＤ－１Ａｂ－ＩＬ－２１ムテイン融合体の作製

組み換え抗ＰＤ－１Ａｂ－ＩＬ－２１ムテイン配列を、ＨＥＫ２９３－６Ｅにおける一過性発現の場合にはｐＴＴ５にクローニングし、またはＣＨＯ－Ｋ１細胞における安定発現の場合には抗生物質選択カセットを含有するベクターにクローニングした。発現生成を３６℃で５～７日間実施し、精製するために上清を回収した。全てのタンパク質ロットをプロテインＡアフィニティークロマトグラフィー（Ｍａｂ　Ｓｅｌｅｃｔ　ＳｕＲｅ）によって精製し、続いて、カチオン交換（ＳＰ　Ｓｅｐｈａｒｏｓｅ　ＨＰ）し、Ａ５．２Ｓｕ緩衝液に緩衝液交換（ＵＦ／ＤＦ）した。ロットは全て、サイズ排除クロマトグラフィーによるメインピークが９５％を超え、エンドトキシンが０．２ＥＵ／ｍｇ未満（Ｅｎｄｏｓａｆｅ　ＬＡＬ、Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ）であった。

【０３２８】

Ｊｕｒｋａｔ　ＰＤ－１レポーター遺伝子アッセイ

ＧｌｏＲｅｓｐｏｎｓｅ　Ｊｕｒｋａｔ　ＮＦＡＴ－ｌｕｃ２／ＰＤ－１安定エフェクター細胞（Ｐｒｏｍｅｇａ、＃ＣＳ１８７１０２）及びＣＨＯ　ＰＤ－Ｌ１安定細胞株（Ｐｒｏｍｅｇａ、＃ＣＳ１７８１０３）を１．２５：１の比率で、段階希釈した抗体の存在下、３連、３７℃、５％CO^2で６時間共培養した。Ｂｉｏ－Ｇｌｏルシフェラーゼアッセイシステム（Ｐｒｏｍｅｇａ、＃Ｇ７９４０）を使用して、発光を測定した。

【０３２９】

ＳＴＡＴ３リン酸化アッセイ

ｐＳＴＡＴ３αスクリーニング。次いで、ＨｕＴ７８親細胞株及びＨｕＴ７８　ＰＤ－１安定細胞株を４０，０００細胞／ウェルで別々のプレートに、段階希釈した抗体の存在下、３連、３７℃、５％CO_2で４０分間播種した。ＡｌｐｈａＬｉｓａ　Ｓｕｒｅｆｉｒｅ　Ｕｌｔｒａ　Ｐｓｔａｔ３（Ｔｙｒ７０５）Ａｓｓａｙ　Ｋｉｔ（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ、＃ＡＬＳＵ－ＰＳＴ３－Ａ１０Ｋ）を使用して、Ｐｓｔａｔ３　Ｔｙｒ７０５レベルを測定した。

【０３３０】

ＨＴＲＦ　ホスホ－ＳＴＡＴ３アッセイ。１％Ｌ－グルタミン（ＨｙＣｌｏｎｅカタログ番号ＳＨ３００３４．０１）を添加したＲＰＭＩ　１８６０培地中で、細胞を一晩、血清飢餓状態にした。次いで、細胞をカルシウムもマグネシウムも含まないフェノールレッド不含ハンクス平衡塩類溶液（ＨＢＳＳ；ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒカタログ番号１４１７５０９５）中に2.5×10^6細胞／ｍＬで再懸濁し、８μＬ／ウェルを３８４ウェル小容量白色プレート（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒカタログ番号６００８２８９）で平板培養した。次いで、細胞を、ＨＢＳＳ中に希釈した４μＬ／ウェルのＩＬ－２１ムテイン分子により３７℃で４０分間刺激した。ＨＴＲＦ（登録商標）ホスホ－ＳＴＡＴ３（Ｔｙｒ７０５）アッセイキットを製造元の推奨（Ｃｉｓｂｉｏカタログ番号６４ＮＴ３ＰＥＨ）に従って使用して、ＳＴＡＴ３リン酸化を検出した。アッセイからのＦＲＥＴシグナルは、ＥｎＶｉｓｉｏｎ　Ｍｕｌｔｉｌａｂｌｅ　Ｐｌａｔｅ　Ｒｅａｄｅｒ（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）を使用して検出した。データの分析は、最初にＣｉｓｂｉｏの推奨に従ってＨＴＲＦ比を決定し、次いで刺激を受けていない細胞からのデータを使用してバックグラウンド値に対する倍数を算出することによって行った。各実験について、用量曲線をプロットし、所与の分子の効力を、バックグラウンド値に対して定められた倍数が観察されたときの濃度として表す。

【０３３１】

混合リンパ球反応（ＭＬＲ）

不適合ドナーペアのロイコパックをＡｌｌＣｅｌｌｓ　Ｉｎｃ．から入手した。ドナーのＴ細胞をＰａｎ　Ｔ－ｃｅｌｌ　Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（Ｍｉｌｔｅｎｙ　Ｂｉｏｔｅｃ、＃１３０－０９６－５３５）を使用して単離し、不適合ドナーの単球をＰａｎ　Ｍｏｎｏｃｙｔｅ　Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ、＃１３０－０９６－５３７）を使用して単離した。ＣｅｌｌＸＶｉｖｏ　Ｈｕｍａｎ　Ｍｏｎｏｃｙｔｅ－Ｄｅｒｉｖｅｄ　Ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ　Ｃｅｌｌ　Ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、＃ＣＤＫ００４）を使用して、単球を更に１０日間成熟させた。Ｐａｎ－Ｔ細胞と成熟した単球を、１０：１の比率で、段階希釈した抗体の存在下、３連、３７℃、５％CO_2で７２時間共培養した。上清ＩＬ－２レベルをＥＬＩＳＡ（Ｍｅｓｏｓｃａｌｅ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｉｅｓ、＃Ｋ１５１ＱＱＤ－４）によって測定した。

【０３３２】

ＩＬ－２１Ｒ及びＰＤ－１結合アッセイ

ヒト及びカニクイザルのＩＬ－２１Ｒ結合親和性：一価のＩＬ－２１Ｒ－ＦＬＡＧ－Ｈｉｓと二価のＩＬ－２１Ｒ－Ｆｃ組み換え試薬の両方を試験したが、極めて類似した結果であった（約２～３倍以内）。可溶性組み換えＩＬ－２１Ｒ試薬は、最小限にビオチン化し、Ｓｔｒｅｐｔａｖｉｄｉｎ　ＳＡＸチップ上に２．０ｎｍの添加レベルまで捕捉した。次いで、チップを、ＰＤ－１抗体－ＩＬ－２１サンプルを３倍段階希釈したウェル中でインキュベートした。野生型ＩＬ－２１融合体の場合、最大サンプル濃度は、１０ｎＭであったが、ＩＬ－２１ムテイン融合体の場合、最大サンプル濃度は、３００ｎＭであった。正確なカイネティクスフィッティングを得るために、２０分間の結合時間と１．５時間の解離時間を使用して、結合グラフの曲率を最大にした。

【０３３３】

ヒト及びカニクイザルのＰＤ－１結合親和性：ヒト及びカニクイザルのＰＤ－１結合親和性の試験は、まず、ＰＤ－１抗体－ＩＬ－２１サンプルのＡＲ２Ｇチップへの捕捉をＥＤＣ－ＮＨＳアミンカップリングを介して行った。サンプル添加は、典型的にｐＨ６で２０００秒間とし、続いて、少なくとも２ｎｍレベルで固定化するために、１Ｍエタノールアミンでクエンチした。サンプルを固定化したら、次いで、チップを、組み換え可溶性受容体ヒトＰＤ－１（１－１７０）－ＦＬＡＧ－ＨｉｓまたはカニクイザルＰＤ－１（１－１６７）－ＦＬＡＧ－Ｈｉｓの３倍段階希釈を含有するウェル中でインキュベートした。両方の場合において、ＰＤ－１の最大濃度は、３０ｎＭであった。３００秒の結合及び５００秒の解離を、それらは正確なカイネティクスフィッティングを得るのに十分な曲率を生成するので、使用した。

【０３３４】

上のヒト／カニクイザルＩＬ－２１Ｒ及びヒト／カニクイザルＰＤ－１結合親和性を、ＦｏｒｔｅＢｉｏ　Ｏｃｔｅｔ　ＨＴＸ及びＲＥＤ３８４機器を用いて定量した。全ての場合において、サンプル希釈、ならびに結合ベースライン、結合及び解離の全ステップに、標準Ｏｃｔｅｔサンプル緩衝液を使用した（１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、ｐＨ７．５、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、１ｍＭ　ＣａＣｌ２、０．１０ｍｇ．ｍｌ　ＢＳＡ、０．１３％（ｖ／ｖ）ＴｒｉｔｏｎＸ－１００）。

【０３３５】

全てのＦｏｒｔｅＢｉｏ生データは、標準機器データ解析ソフトウエア（ｖ９及びｖ１０）を使用して、次のように処理した。（ａ）標的が固定化されているが相互作用のない２つの参照チップ曲線（すなわち、緩衝液のみ）を平均し、同じカラムの残りのサンプルチップ曲線から差し引いた。（ｂ）結合曲線及び解離曲線を分離し、Ｙ軸に合わせた。（ｃ）結合及び解離のステップ間を整列させた。（ｄ）シグナルのノイズを減らすために、Ｓａｖｉｔｚｋｙ－Ｇｏｌａｙフィルタリングを実施した。（ｅ）各サンプル－標的相互作用について得られた結合曲線及び解離曲線のセットを、単一の１：１結合モデルを使用してグローバルフィッティングさせ、結合速度定数k_a及び解離速度定数k_dの測定値を求め、平衡解離定数K_Dを解離速度定数と結合速度定数の比（＝k_d／k_a）として算出

した。

【０３３６】

実施例１２

本実施例は、ＩＬ－２１ムテインを含む融合タンパク質で使用される抗ＰＤ－１　ｍＡｂの作製について記載する。

【０３３７】

抗ＰＤ－１免疫応答の生成

マウス系統

ＸＥＮＯマウス（登録商標）トランスジェニックマウスを免疫化することによって、ヒトＰＤ－１に対する完全ヒト抗体を作製した（米国特許第６，１１４，５９８号、同第６，１６２，９６３号、同第６，８３３，２６８号、同第７，０４９，４２６号、同第７，０６４，２４４号（その全体を参照により本明細書に援用する）；Ｇｒｅｅｎ ｅｔ ａｌ．，１９９４，Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ ７：１３－２１；Ｍｅｎｄｅｚ ｅｔ ａｌ．，１９９７，Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ １５：１４６－１５６；Ｇｒｅｅｎ ａｎｄ Ｊａｋｏｂｏｖｉｔｓ，１９９８，Ｊ．Ｅｘ．Ｍｅｄ，１８８：４８３－４９５；Ｋｅｌｌｅｒｍａｎ ａｎｄ Ｇｒｅｅｎ，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｏｐｉｎｉｏｎ ｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １３，５９３－５９７，２００２）。これらの免疫化には、ＸＭＧ４－Ｋ及びＸＭＧ４－ＫＬ　ＸＥＮＯマウス（登録商標）系統に由来する動物を使用した。

【０３３８】

免疫化

細胞による免疫化経路を使用して抗ヒトＰＤ－１免疫応答を引き起こした。免疫原として、Ｅ３Ｋ　Ｔ細胞エピトープタグにＧｌｙ－Ｓｅｒ－Ｓｅｒリンカーを介して融合されたヒトＰＤ－１またはカニクイザルＰＤ－１のいずれかを、ＣＨＯ－Ｓ細胞に一過性トランスフェクトした。これらの一過性トランスフェクトＣＨＯ細胞のいずれかをＣｐＧ－ＯＤＮ含有Ａｌｕｍと混合し、ＴＩＰ（尾根部及び腹腔内）注射を使用して、８週間にわたって１３回、動物を免疫化した。初回の追加免疫は、ヒトＰＤ－１を発現する４００万個の細胞からなり、それ以後の追加免疫は、ヒトまたはカニクイザルＰＤ－１を発現する２００万個の細胞を含有した。ヒトＰＤ－１を用いて合計９回の免疫化を実施し（１～６、８、１０及び１３）、残りの４回の免疫化は、カニクイザルＰＤ－１を用いて行った。ＰＤ－１特異的力価を評価するために、１０回目の追加免疫後に、動物から採血した。

【０３３９】

Ａｃｃｕｒｉフローサイトメーターでの生細胞ＦＡＣＳ解析によって、ＰＤ－１特異的血清力価をモニタリングした。簡潔に述べれば、ＨＥＫ２９３細胞に、ヒトまたはカニクイザルＰＤ－１のいずれかを用いて、モックトランスフェクトまたは一過性トランスフェクトした。免疫化動物の血清を１００倍に希釈し、トランスフェクト細胞と氷上で１時間インキュベートした。次いで、細胞を洗浄して結合していない抗体を除去し、Ｃｙ５標識二次抗ヒトＦｃ特異的抗体を細胞と４度で更に１５分間インキュベートした。細胞を１回洗浄して、結合していない二次抗体を除去し、細胞の蛍光シグナルをＦＡＣＳによって定量した。ヒト及びカニクイザルＰＤ－１に対する抗原特異的血清天然力価が最も高い動物をハイブリドーマ生成に使用した（Ｋｏｈｌｅｒ ａｎｄ Ｍｉｌｓｔｅｉｎ，１９７５）。

【表２３】

免疫原	アジュバント	株	回収
ヒトＰＤ－１またはカニクイザルＰＤ－１をＣＨＯ－Ｓに一過性トランスフェクション	Ａｌｕｍ＋ＣｐＧ ＯＤＮ	Ｇ４Ｋ	マウス４匹
		Ｇ４ＫＬ	マウス４匹

【０３４０】

モノクローナル抗体の調製
ハイブリドーマ生成
好適な血清力価を示す動物を特定し、脾臓及び／または流入領域リンパ節からリンパ球を得た。プールしたリンパ球（各回収物より）を好適な培地（例えば、ダルベッコ改変イーグル培地（ＤＭＥＭ）；Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ（Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ））中で粉砕することによって、リンパ組織から分離した。標準法を使用してＢ細胞を選択し、かつ／または増大させ、当該技術分野において知られている技術を使用して、好適な融合パートナーと融合させた。

【０３４１】

膜調製物作製：

２９３ｆｅｃｔｉｎ（商標）Ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ Ｒｅａｇｅｎｔ（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ、Ｃａｔ：１２３４７０１９）を使用して、２０００万個の２９３Ｔ細胞にｐＴＴ５－ｍｉｎｉ４：ｈｕＰＤ－１：：ＧＳＳ：Ｅ３Ｋをトランスフェクトした。トランスフェクションから２４時間後、２９３Ｔ細胞を、ＥＺ－Ｌｉｎｋ（商標）ＮＨＳ－ＬＣ－ＬＣ－ビオチン（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｃａｔ：２１３４３）含有ＰＢＳ（ｐＨ８．６）中、４００μｇ／ｍＬで３０分間インキュベーションすることによって、ビオチン化した。次いで、細胞をＰＢＳ（中性ｐＨ）で洗浄した後、これを、ＥＤＴＡ不含プロテアーゼ阻害薬及び１０％トリトンＸ１００を含有する低張緩衝液中に再懸濁した。２６ゲージの針を備える注射器により、繰り返しポンピングすることによって、細胞を破壊した。細胞断片を１２０００Ｇで２０分間の遠心分離にかけることによって、ペレット化した。次いで、膜粒子を含有する上清を回収し、Ａｍｉｃｏｎ Ｕｌｔｒａｃｅｌ １００ｋ遠心分離カラム（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、カタログ番号ＵＦＣ８１００２４）中でＰＢＳにより3回洗浄し、洗剤を除去した。次いで、膜調製物のトラッキング該当数（ＰＤ－１に対する特異性を有する陽性対照ハイブリドーマ細胞）について試験して、ＩｇＧに相関する膜調製物結合を調べた。次いで、膜調製物を等分し、使用まで、摂氏－２０度で凍結した。

【０３４２】

ハイブリドーマ細胞の抗原特異的染色：

ハイブリドーマ細胞をフラスコから取り出し、滅菌ＦＡＣＳ緩衝液（２％ＦＢＳ ＰＢＳ）中で洗浄した。次いで、細胞をＰＤ－１膜調製物（ＦＡＣＳ緩衝液中１：１０に希釈、反応体積１ｍＬ、例えば、９００μＬのＦＡＣＳ緩衝液中に１００μＬの膜調製物）と混合し、摂氏４度で１時間インキュベートした。細胞をＦＡＣＳ緩衝液で再度洗浄し、５μｇ／ｍＬのＡｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ４８８結合Ｆ（ａｂ’）$_2$断片ヤギ抗ヒトＩｇＧ Ｆｃ（Ｊａｃｋｓｏｎ、Ｃａｔ：１０９－５４６－０９８）及びＡｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ６４７結合ストレプトアビジン（Ｊａｃｋｓｏｎ、Ｃａｔ：０１６－６００－０８４）を含有する検出カクテル１ｍＬを用いて染色した後、暗所で、摂氏４度で３０分間インキュベートした。ＦＡＣＳ緩衝液で細胞を再度洗浄し、培地に再懸濁し、次いで、４０μのセルストレーナに通して凝集細胞を取り除いた。ＢＤ ＦＡＣＳＡｒｉａ ３を使用して、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ４８８とＡｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ６４７蛍光の両方を呈する集団でゲーティングすることによって、抗原特異的細胞をソーティングした（ＩｇＧ＋及び抗原結合細胞）。

【０３４３】

ソーティングした細胞をハイブリドーマ培地中で数日培養した。増大した細胞のサンプルを少量取り出し、上述と同じ染色条件を使用して、ＰＤ－１膜調製物に対する結合について試験した。ＰＤ－１特異的細胞の増大がうまくいったことを確認した後、ＢＤ ＦＡＣＳＡｒｉａ ３を使用して、ハイブリドーマを３８４ウェルマイクロタイタープレート中に単一細胞にソーティングした。２週間の培養後、マイクロタイタープレートから上清を回収し、ＰＤ－１結合についてスクリーニングした。

【０３４４】

ＰＤ－１特異的結合抗体の初期選別

ＨＥＫ２９３細胞上に一過性に発現されたヒトＰＤ－１への結合について、疲弊したハイブリドーマの上清をＣｅｌｌ　Ｉｎｓｉｇｈｔによって試験した。簡潔に述べれば、２９３Ｆｅｃｔｉｎを使用して、ＰＤ－１をコードする哺乳動物の発現構築物をＨＥＫ２９３細胞に一過性トランスフェクトした。翌日、１５μＬの疲弊ハイブリドーマ培地を３８４ウェルＦＭＡＴプレートの各ウェルに加えた。次いで、トランスフェクトしたＨＥＫ２９３細胞（２７万個／ｍＬ）、核染色Ｈｏｅｃｈｓｔ３３３４２（７．５μｇ／ｍＬ）及び二次検出抗体（０．７５μｇ／ｍＬ、ヤギ抗ヒトＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）Ａｌｅｘａ　４８８（Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ））を混合し、この混合物３０μＬを３８４ウェルＦＭＡＴプレートの各ウェルに加えた。約３時間後、ＡｑｕａＭａｘプレートリーダーを使用して上清を吸引し、マルチドロップ機器を使用して３０μＬのＦＡＣＳ緩衝液を各ウェルに加えた。プレートをＢｉｇ　Ｂｅａｒ　Ｐｌａｔｅシェーカー上に置いてウェル内の細胞を均一に分散させ、次いで、Ｃｅｌｌ　Ｈｅａｌｔｈ　Ｂｉｏ－Ａｐｐを使用して、Ｃｅｌｌ　Ｉｎｓｉｇｈｔプラットフォームで読み取った。この解析により、この回収物から３８３個の抗原特異的抗体が特定された。

【０３４５】

ＪｕｒｋａｔヒトＰＤ－１／ＮＦＡＴ－ルシフェラーゼレポーターアッセイ

ヒトＰＤ－１及びＮＦＡＴ－ルシフェラーゼレポーター（Ｐｒｏｍｅｇａ）を安定的に発現するＪｕｒｋａｔ細胞を、１０％ウシ胎児血清（Ｓｉｇｍａ）、２ｍＭ　Ｌ－グルタミン（Ｓｉｇｍａ）、１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ（Ｈｙｃｌｏｎｅ、ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）、５００μｇ／ｍＬのジェネティシン（Ｇｉｂｃｏ　Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、１００μｇ／ｍＬのハイグロマイシンＢ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を添加したＲＰＭＩ　１６４０培地（Ｓｉｇｍａ）中、３７℃／５％CO_2で培養した。カニクイザルＰＤ－１及びＮＦＡＴ－ルシフェラーゼレポーター（Ｐｒｏｍｅｇａ）を安定的に発現するＪｕｒｋａｔ細胞を、１０％ウシ胎児血清（Ｓｉｇｍａ）、２ｍＭ　Ｌ－グルタミン（Ｓｉｇｍａ）、１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ（Ｈｙｃｌｏｎｅ、ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）、２００μｇ／ｍＬのハイグロマイシンＢ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、３００μｇ／ｍＬのゼオシン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を添加したＲＰＭＩ　１６４０培地（Ｓｉｇｍａ）中、３７℃／５％CO_2で培養した。ヒトＰＤ－Ｌ１（Ｐｒｏｍｅｇａ）を安定的に発現するチャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）クローン細胞株９９を、Ｎｕｔｒｉｅｎｔ　Ｍｉｘｔｕｒｅ　Ｆ１２　ＨＡＭ（Ｓｉｇｍａ）、１０％ウシ胎児血清、１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、２５０μｇ／ｍＬのジェネティシン、２００μｇ／ｍＬのハイグロマイシンＢ中、３７℃／５％CO_2で培養した。実験日に、Ｊｕｒｋａｔ　ＮＦＡＴ－ルシフェラーゼ／ＰＤ－１細胞及びＣＨＯクローン９９　ＰＤ－Ｌ１細胞（トリプシンで剥離）を２００×ｇで５分間遠心分離にかけ、アッセイ培地（ＲＰＭＩ　１６４０培地、２％ウシ胎児血清、１５ｍＭ　ＨＥＰＥＳ）中に再懸濁した。試験分子を希釈し、３８４ウェルの黒色／透明底アッセイプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ）中でアッセイ緩衝液を使用して滴定した。最初に調製した細胞を１：１の比率で混合し、次いで、細胞混合物をアッセイプレートに添加することによって、調製した細胞を合計４０，０００細胞／ウェルで播種した。プレートを３７℃／５％CO_2で１８～２４時間インキュベートした。生成されたルシフェラーゼの量をＢｉｏ－Ｇｌｏ　Ｌｕｃｉｆｅｒａｓｅ　Ａｓｓａｙ　Ｓｙｓｔｅｍ試薬（Ｐｒｏｍｅｇａ）によって測定し、その後、プレートを室温で２０分間インキュベーションし、発光をＥｎＶｉｓｉｏｎプレートリーダー（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ）で検出した。シングルポイントアッセイでは、ＥＳＮサンプルを最初に定量し、正規化し、０．５μｇ／ｍＬで試験した。効力の測定では、ＥＳＮサンプルまたは精製抗体をアッセイ培地中３倍で連続滴定し、これを使用してヒトまたはカニクイザルＰＤ－１レポーター細胞を処理した。単一濃度スクリーニング中に所望の活性を示した抗体の数及び効力順位を表１５に示す。

【表２４】

表１５

シングルポイント	効力順位	ユニーク配列
８６／３８３	１２／８６	４／１２

【０３４６】

ヒト及びカニクイザルＰＤ－１レポーターアッセイにおける、精製された抗ＰＤ－１抗体（示されるヒトＰＤ－１アッセイについて、ｎ＝１）の活性を図２４に示し、精製された抗ＰＤ－１抗体の抗力を表１６に示す。

【表２５】

表１６

抗体ＩＤ	効力（ｎＭ）			
	ヒトＰＤ－１　ｎ＝１	ヒトＰＤ－１　ｎ＝２	カニクイザルＰＤ－１　ｎ＝１	カニクイザルＰＤ－１　ｎ＝２
Ａ－１（２０Ａ２）	３．１０	１．２７	２．３４	ＮＤ
Ａ－３（２０Ｃ１）	５．５１	１．８８	５．１７	４．１６
Ａ－２（２２Ｄ４）	２．４３	０．７１	２．７２	２．８９

【０３４７】

ＰＤ－１アンタゴニスト抗体の分子レスキュー及び配列決定

ＰＤ－１アンタゴニスト抗体産生ハイブリドーマ細胞を含有するウェルから、Ｑｉａｇｅｎ　ＲＮｅａｓｙ　ｍｉｎｉまたはＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　ｍＲＮＡキャッチャープラスキットを使用して、ＲＮＡ（ｔｏｔａｌまたはｍＲＮＡ）を精製した。精製されたＲＮＡを用いて、逆転写によるｃＤＮＡ合成と、それに続くポリメラーゼ連鎖反応（ＲＴ－ＰＣＲ）を使用して、抗体の重鎖及び軽鎖可変領域（Ｖ）の遺伝子を増幅した。Ｑｉａｇｅｎ　Ｏｎｅ　Ｓｔｅｐ　Ｒｅｖｅｒｓｅ　Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔａｓｅ　ＰＣＲキット（Ｑｉａｇｅｎ）を使用して、完全なヒト抗体γ重鎖を得た。この方法を使用して、ＲＮＡ鋳型から第１のｃＤＮＡ鎖を生成し、次いで、多重ＰＣＲを使用して、γ重鎖の可変領域を増幅した。５’γ鎖特異的プライマーを抗体重鎖のシグナル配列にアニーリングし、３’プライマーをγ定常ドメイン領域にアニーリングした。Ｑｉａｇｅｎ　Ｏｎｅ　Ｓｔｅｐ　Ｒｅｖｅｒｓｅ　Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔａｓｅ　ＰＣＲキット（Ｑｉａｇｅｎ）を使用して、完全なヒトκ軽鎖を得た。この方法を使用して、ＲＮＡ鋳型から第１のｃＤＮＡ鎖を生成し、次いで、多重ＰＣＲを使用して、κ軽鎖の可変領域を増幅した。５’κ軽鎖特異的プライマーを抗体軽鎖のシグナル配列にアニーリングし、３’プライマーをκ定常ドメイン領域にアニーリングした。Ｑｉａｇｅｎ　Ｏｎｅ　Ｓｔｅｐ　Ｒｅｖｅｒｓｅ　Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔａｓｅ　ＰＣＲキット（Ｑｉａｇｅｎ）を使用して、完全なヒトλ軽鎖を得た。この方法を使用して、ＲＮＡ鋳型から第１のｃＤＮＡ鎖を生成し、次いで、多重ＰＣＲを使用して、λ軽鎖の可変領域を増幅した。５’λ軽鎖特異的プライマーを軽鎖のシグナル配列にアニーリングし、３’プライマーをλ定常ドメイン領域にアニーリングした。

【０３４８】

増幅したｃＤＮＡをエキソヌクレアーゼＩ及びアルカリホスファターゼを使用して酵素的に精製し、精製したＰＣＲ産物を直接配列決定した。バイオインフォマティクスにより、対応する核酸配列からアミノ酸配列を推定した。観察された任意の変異がＰＣＲによる結果ではないことを確認するために、各ハイブリドーマサンプルに対して、２つの更なる独立したＲＴ－ＰＣＲ増幅及び配列決定サイクルを実施した。次いで、誘導されたアミノ酸配列を解析して抗体の生殖配列起源を決定し、生殖配列からの差を特定した。元の生殖

配列に対する重鎖配列及び軽鎖配列のそれぞれの比較が示される。配列決定された抗体の相補性決定領域（ＣＤＲ）に相当するアミノ酸配列を整列させ、これらのアライメントを使用して、クローンを類似性ごとにグループ化した。

【０３４９】

初代細胞結合アッセイ

初代ヒト及びカニクイザル細胞によって発現されたＰＤ－１に対するハイブリドーマ上清の結合を、フローサイトメトリーによって試験した。ヒト初代細胞結合アッセイでは、精製されたヒトＴ細胞（Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｓｐｅｃｉａｌｔｙ Ｃｏｒｐ.）を解凍し、２．５×１０^{6}細胞／ｍＬの濃度で懸濁した。抗マウスＩｇＧ Ｆｃ（Ｐｉｅｒｃｅ）５μｇ／ｍＬをプレコーティングしたプレート中で、５μｇ／ｍＬの抗ヒトＣＤ３クローンＯＫＴ３（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）及び１μｇ／ｍＬの抗ヒトＣＤ２８（ＢＤ Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）を用いて、３７℃／５％ＣＯ$_{2}$で７２時間、Ｔ細胞を刺激した。７２時間後、細胞を取り出し、洗浄し、０．５×１０^{6}細胞／ｍＬの濃度で、１０ｎｇ／ｍＬのＩＬ－２（Ｐｅｐｒｏ Ｔｅｃｈ）とともに懸濁した。次いで、細胞を３７℃／５％ＣＯ$_{2}$で更に４８時間インキュベートした。カニクイザル初代細胞結合アッセイでは、カニクイザルＰＢＭＣ（ＳＮＢＬ）を解凍し、４×１０^{6}～５×１０^{6}細胞／ｍＬの濃度で懸濁した。抗マウスＩｇＧ Ｆｃ（Ｐｉｅｒｃｅ）５μｇ／ｍＬをプレコーティングしたプレート中で、１μｇ／ｍＬの抗ヒトＣＤ３クローンＳＰ３４（ＢＤ Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）及び１μｇ／ｍＬの抗ヒトＣＤ２８（ＢＤ Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）を用いて、３７℃／５％ＣＯ$_{2}$で７２時間、ＰＢＭＣを刺激した。７２時間後、細胞を取り出し、洗浄し、０．５×１０^{6}細胞／ｍＬの濃度で、２０ｎｇ／ｍＬのＩＬ－２（Ｐｅｐｒｏ Ｔｅｃｈ）とともに懸濁した。次いで、細胞を３７℃／５％ＣＯ$_{2}$で更に４８時間インキュベートした。最終インキュベーション後、細胞を、最終濃度１μｇ／ｍＬで、正規化したハイブリドーマ上清、陽性対照抗体及びアイソタイプ対照抗体とともにインキュベーションすることによって、フローサイトメトリー用に調製した。二次検出にはＡｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ６４７ ＡｆｆｉｎｉＰｕｒｅＦ（ａｂ’）$_{2}$断片ヤギ抗ヒトＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）（Ｊａｃｋｓｏｎ ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅｒａｃｈ）を５μｇ／ｍＬで使用し、生死細胞染色には８．２５ｎＭ ＹｏＰｒｏ１（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を使用した。次いで、細胞をＢＤ ＦＡＣＳＣａｎｔｏ ＩＩフローサイトメーターにかけて、抗ＰＤ－１抗体結合を検出した。ＰＤ－１発現細胞のＦＡＣＳ幾何平均として結果を示し、データを表１７に示す。

【表２６】

表１７

抗体ＩＤ	初代カニクイザル（ＦＡＣＳ幾何平均）	初代ヒト（ＦＡＣＳ幾何平均）
Ａ－１（２０Ａ２）	１９４	３２６
Ａ－３（２０Ｃ１）	１８７	３１２
Ａ－２（２２Ｄ４）	１８８	３２９

【０３５０】

受容体リガンド競合アッセイ

次いで、ＰＤ－１のリガンド結合を阻害する能力について、ＰＤ－１結合ハイブリドーマ上清を試験した。以下のように、ヒトＰＤ－１を一過性に発現するＨＥＫ２９３細胞に対するＦＡＣＳを使用して、抗原特異的ハイブリドーマ上清サンプルで競合結合アッセイを実施した。ヒトＰＤ－１を発現するＨＥＫ２９３細胞を抗体サンプル（ＰＤ－１に特異的なハイブリドーマ上清）と混合し、４℃で１時間インキュベートし、次いで、２回洗浄した。次いで、結合したサンプルを含む細胞をｈｕＰＤ－Ｌ１－Ｆｃ－Ａｌｅｘａ６４７またはｈｕＰＤ－Ｌ２－Ｆｃ－Ａｌｅｘａ ６４７（Ｒ＆Ｄ ｓｙｓｔｅｍｓ（Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，ＭＮ））とともに、４℃で４５分間、インキュベートした。次いで、７

－ＡＡＤ細胞生死判別染色を加え、細胞を４℃で更に１５分間インキュベートし、２回洗浄し、ＦＡＣＳ緩衝液中に再懸濁した。ＢＤ　Ａｃｃｕｒｉ（商標）Ｆｌｏｗ　Ｃｙｔｏｍｅｔｅｒ及びＩｎｔｅｌｌｉｃｙｔ　ＨｙｐｅｒＣｙｔ　ａｕｔｏＳａｍｐｌｅｒを使用してサンプルを解析した。表１８中のデータは、１μｇ／ｍＬでのヒトＰＤ－１に対するヒトＰＤ－Ｌ１のＰＤ－Ｌ２結合の阻害パーセントを反映するものである。

【表２７】

表１８

ＰＤ－１に対するＰＤ－Ｌ１またはＰＤ－Ｌ２結合による抗ＰＤ－１抗体の競合分析

抗体ＩＤ	Ｒ－Ｌ　ＰＤ－Ｌ１（阻害パーセント）	Ｒ－Ｌ　ＰＤ－Ｌ２（阻害パーセント）
Ａ－１（２０Ａ２）	７２％	７１％
Ａ－３（２０Ｃ１）	６４％	６５％
Ａ－２（２２Ｄ４）	７１％	７２％

【０３５１】

親和性ギャップ解析

ＫｉｎＥｘＡ（登録商標）法を使用して、いくつかの抗体の動態測定値を評価した。この方法は、平衡状態における正式な親和性測定の溶液ベース測定法によって行われる。

【０３５２】

ポリ（メタクリル酸メチル）（すなわち、ＰＭＭＡ）ビーズのビオチン化ヒトＰＤ－１によるコーティングは、ＰＭＭＡビーズを、最初にビオチン化したＢＳＡ、ニュートロアビジン、次いでビオチン化したＰＤ－１で吸着コーティングすることによって行った。

【０３５３】

自動フローイムノアッセイアッセイシステムＫｉｎＥｘＡ　３２００を使用して、ＰＤ－１結合ビーズを固定相としたＫｉｎＥｘＡ実験を実施した。簡潔に述べれば、一定量の抗ｈＰＤ－１　ｍＡｂ（３ｎＭまたは１ｎＭまたは１００ｐＭ）を、サンプル緩衝液（非特異的結合を減少させるために０．１％ＢＳＡを含有するＰＢＳ）中１００ｎＭから開始する滴定濃度のｈ－ＰＤ－１またはｃｙ－ＰＤ－１とともにインキュベートした。抗原／抗体複合体を室温で４８時間～７２時間インキュベートして、平衡に達するようにした。混合物をＰＤ－１結合ビーズに通して、未結合抗体を蓄積させた。混合物の体積及び流量は、各実験で得られる特定のシグナルに応じて変動した。

【０３５４】

捕捉されたｍＡｂを、サンプル緩衝液中に二次Ａｂヤギ抗Ｈｕ　ＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）－Ａｌｅｘａ６４７抗体を含有する溶液を使用して検出した。結合シグナルを、ｈｕ－ＰＤ－１またはｃｙ－ＰＤ－１の不在下における対照の比率として、相対値に変換した。全ての平衡実験は、各サンプル２連で測定した。ＫｉｎＥｘＡ　ｎ－曲線解析ソフトウエアに含まれる一部位均一結合モデルを使用して、平衡解離定数（Ｋｄ）をデータの非線形回帰分析から得た。ソフトウェアでＫｄを算出し、データ点を理論上のＫｄ曲線にフィッティングすることによって、９５％信頼区間を求めた。９５％信頼区間は、低Ｋｄ～高Ｋｄとして与える。

【表２８】

表１９

組み換えヒト及びカニクイザルＰＤ－１に対する精製抗ＰＤ－１抗体の親和性

	ヒトPD-1に対する親和性			カニクイザルPD-1に対する親和性			
mAb ID	KD(pM)	95%CI(pM)	抗体活性(%)	KD(pM)	95%CI(pM)	抗体活性(%)	Hu:Cyの倍数差
A-1(20A2)	17	13～23	25	15	12～19	21	0.9
A-3(20C1)	16	13～21	17	60	52～68	18	3.8
A-2(22D4)	4.5	3.6～5.5	27	3.7	2.7～4.8	23	0.8

Ｋｄは、ＰＤ－１濃度を既知濃度とし、ソフトウェアにＫｄ及びｍＡｂ濃度を算出させて計算した。

【０３５５】

ＭＬＲアッセイでの精製抗体の活性確認

ヒト未成熟単球由来樹状細胞（Ａｓｔａｒｔｅ）を解凍し、ＣｅｌｌＸＶｉｖｏ Ｈｕｍａｎ Ｍｏｎｏｃｙｔｅ－Ｄｅｒｉｖｅｄ Ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ Ｃｅｌｌ Ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ Ｋｉｔ（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ ＃ＣＤＫ００４）を使用して、ＩＬ－４、ＧＭ－ＣＳＦ及びＴＮＦ－ａ中で７２時間培養することにより、成熟樹状細胞に分化させた。付着していない細胞及び付着のゆるい細胞を取り除き、混合し、遠心分離にかけて、細胞をペレット化した。培地を除去したら、細胞をＸ－Ｖｉｖｏ－１５培地に４００×１０^{3}細胞／ｍＬで再懸濁し、樹状細胞を９６ウェルプレートの各細胞に加えた（５０μＬ中２０ｋ細胞）。ヒトＴ細胞（Ａｓｔａｒｔｅ）を素早く解凍し、Ｘ－Ｖｉｖｏ－１５培地で洗浄した。細胞を２×１０^{6}細胞／ｍＬで再懸濁し、１００μＬを各ウェルに加えた（２００ｋ細胞／１００μＬ）。抗体を希釈し、合計量５０μＬで各ウェルに加えた。混合物を３７℃で３日間インキュベートした。この時点で、細胞を遠心し、細胞１７５μＬを使用したＴ細胞増殖の尺度としてのＩＬ２産生の測定を、ＩＬ－２Ｖ－Ｐｌｅｘキット（ＭＳＤ）を製造元の推奨に従って使用して行った。

【表２９】

表２０

抗体ＩＤ	ＭＬＲ　ＩＣ５０（ｎＭ）	ＭＬＲ　ＩＣ５０（ｎＭ）
Ａ－１（２０Ａ２）	０．７３	０．８０
Ａ－３（２０Ｃ１）	０．９７	１．６５
Ａ－２（２２Ｄ４）	０．６５	０．５８

【０３５６】

実施例１３

可能であれば、Ａ－１（２０Ａ２）、Ａ－３（２０Ｃ１）及びＡ－２（２２Ｄ４）抗ＰＤ－１可変ドメイン配列を操作して、側鎖分解のリスクのあるモチーフを除去した。そのようなアミノ酸モチーフには、（１）アスパラギンが脱アミド化を受けやすいＣＤＲの「ＮＧ」及び「ＮＴ」配列、（２）アスパラギン酸が異性化を起こしやすいＣＤＲの「ＤＧ」、「ＤＨ」、「ＤＳ」及び「ＤＴ」配列、ならびに（３）酸化を受けやすいＣＤＲ３トリプトファンがある。典型的に、置換識別は、生殖配列に由来するか、配列関連ＰＤ－１結合ｍＡｂに由来した。バイオインフォマティクスまたは構造解析が明確な置換識別を与えない場合、親残基と化学的に類似する残基タイプを選択した。

【０３５７】

複数の配列アライメントに基づくペアワイズ残基共分散傾向に違反する可変ドメイン配列モチーフも除去された。生殖系列または生殖系列に関連する残基タイプでの置換による

ペアワイズ共分散違反の修正は、ｍＡｂ発現レベル及び生物物理学的安定性が向上することから、製造性が改善し得る。Ｋａｎｎａｎ，Ｇ．Ｍｅｔｈｏｄ ｏｆ Ｃｏｒｒｅｌａｔｅｄ Ｍｕｔａｔｉｏｎａｌ Ａｎａｌｙｓｉｓ ｔｏ Ｉｍｐｒｏｖｅ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ（２０１２年３月９日に出願された米国特許出願第ＰＣＴ／ＵＳ２０１２／０２８５９６号）を参照されたい。共分散違反の置換識別は、上記した分解部位を修正するために使用されるアプローチと類似のものを使用して選択した。

【０３５８】

２０Ａ２を操作して、２０Ａ２．００３とし、２０Ｃ１を操作して、２０Ｃ１．００６及び２０Ｃ１．００９とし、２２Ｄ４を操作して、２２Ｄ４．００６及び２２Ｄ４．０１７とした。

【０３５９】

実施例１４

Ｒ９Ｅ及びＲ７６Ａ変異を含む単量体ＩＬ－２１ダブルムテインに融合された抗ＰＤ－１抗体２２Ｄ４．０１７を含む融合タンパク質（「［２２Ｄ４．０１７］－［Ｒ９Ｅ：Ｒ７６Ａ］（単量体）」）のｉｎ ｖｉｖｏ活性を、ナイーブ非ヒトカニクイザルで評価した。第１の群のサルには、抗ＰＤ－１抗体２２Ｄ４．０１７のみ（ＩＬ－２１ムテインへの融合なし）を投与し、第２の群のサルには、融合タンパク質［２２Ｄ４．０１７］－［Ｒ９Ｅ：Ｒ７６Ａ］（単量体）を投与した。末梢血における薬力学（ＰＤ）パラメーターをＦＡＣＳの使用によりモニタリングした。パラメーターには、免疫細胞動態及びリンパ球のＳＴＡＴ３転写因子リン酸化（ｐＳＴＡＴ３）が含まれた。血清中サイトカイン及びパーフォリンについても、Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ Ｍｉｌｌｉｐｌｅｘ（登録商標）マルチアナライトプロファイリング（ＭＡＰ）マルチプレックスアッセイによって試験した。末梢血パラメーターの投与前解析を実施して、データセットのベースラインへの正規化を可能とした。投薬を１日目に開始した。血液及び血清を予め定めた時点で採取した。

【０３６０】

Ｔ細胞におけるＫｉ６７［図２５Ａ及び２５Ｂ］及びＳＴＡＴ３［図２５Ｃ及び２５Ｄ］の活性化にもかかわらず、バルクＴ細胞集団での有意な増加は、２２Ｄ４．０１７抗体または［２２Ｄ４．０１７］－［Ｒ９Ｅ：Ｒ７６Ａ］（単量体）融合タンパク質のいずれを投与した群でも観察されなかった［図２５Ａ及び２５Ｂ］。これは、これらの処置の両方がそれ自体ではバルクＴ細胞集団の増大を誘導するのには十分ではないかったことを示唆している［図２５Ｅ及び２５Ｆ］。これらのデータは、ＰＤ－１シグナル伝達の全身遮断が、ＳＴＡＴ３シグナル伝達及びＫｉ６７の活性化を含め、バルクＴ細胞集団に対してより全般的な影響を与え得るが、これらの変化は、それ自体では有意な機能的産生をもたらすには（抗ＰＤ－１単剤療法または融合タンパク質治療が全般的なＴ細胞増大を誘導しないことによっても証明されたように）不十分であり得るという考えを支持するものである。

【０３６１】

近位シグナル伝達の変化がどのようにＰＤ－１発現Ｔ細胞に特異的に影響を与え得るかをより理解するために、また、ＰＤ－１（＋）Ｔ細胞が末梢血中のバルクＴ細胞集団の一部を反映しているだけであるので、非競合ＰＤ－１検出ｍＡｂを使用して、ＰＤ－１（＋）ＣＤ４及びＣＤ８Ｔ細胞でゲーティングすることによって、これらの細胞をより直接的に調べた［図１６及び１７］。この集団は、［２２Ｄ４．０１７］抗体群において、循環ＰＤ－１（＋）細胞の絶対数が初めに若干減少した後、安定した状態を維持した。対照的に、［２２Ｄ４．０１７］－［Ｒ９Ｅ：Ｒ７６Ａ］（単量体）融合タンパク質処置群集団では、末梢血ＰＤ－１（＋）ＣＤ４及びＣＤ８Ｔ細胞の数が初めに減少したが、その後、投与から３３６時間後に観察されたＰＤ－１（＋）細胞の数は、大幅に回復した（ベースラインを超える）［図２５Ｇ］。したがって、これらのデータは、バルク集団の大きな増大がないにもかかわらず、［２２Ｄ４．０１７］－［Ｒ９Ｅ：Ｒ７６Ａ］（単量体）融合タンパク質を投与すると、ＰＤ－１（＋）Ｔ細胞数が選択的に増加することを示唆してい

る［図］。
【０３６２】
ＰＤ－１（＋）Ｔ細胞の増大に関して起こりえる機能上の影響を明確にするために、ＰＤ－１（＋）ＣＤ４／８Ｔ細胞の増大と血清パーフォリンとの間の関係を調べた。事実、データは、これらの２つのパラメーターの間には正の関係があることを示唆しており、血清パーフォリンは、末梢血ＰＤ－１（＋）Ｔ細胞が大きく増加した、［２２Ｄ４．０１７］－［Ｒ９Ｅ：Ｒ７６Ａ］（単量体）融合タンパク質を投与した動物で最も高い［図２５Ｉ］。
【０３６３】
総合的に、これらのデータは、［２２Ｄ４．０１７］－［Ｒ９Ｅ：Ｒ７６Ａ］（単量体）融合タンパク質の全身曝露ではバルクＴ細胞集団全体の増加を示さなかったが、同じ細胞（ＰＤ－１発現細胞）上のＰＤ－１の遮断及びＩＬ－２１シグナルの同時送達が集団増大を誘導するのに十分であることを示唆している。これは、血清パーフォリンの増加とも相関している［図２５Ｉ］。
【０３６４】
実施例１５
以下の実施例は、種々の抗ＰＤ－１抗体の結合親和性を示す。
【０３６５】
抗ＰＤ－１抗体：：ＰＤ－１　Ｏｃｔｅｔ結合親和性を以下のとおりに特徴付けた。抗ＰＤ－１抗体と組み換え可溶性ヒト及びカニクイザルＰＤ－１との間のK_D結合親和性（平衡解離定数）を定量するために、結合速度定数及び解離速度定数を、Ｐａｌｌ（登録商標）ＦｏｒｔｅＢｉｏ（登録商標）Ｏｃｔｅｔ（登録商標）ＲＥＤ３８４機器を１６チップモードで使用するか、Ｐａｌｌ（登録商標）Ｏｃｔｅｔ（登録商標）ＨＴＸ機器を９６チップモードで使用するかのいずれかで、測定した。全ての場合において、第２世代のアミン反応性光ファイバーバイオセンサーチップ（ＡＲ２Ｇ）を使用して、２．５～４ｎｍの最終添加レベルまで、抗体を共有結合的に捕捉した。結合アッセイ法は、以下の固定化ステップを用いた。（１）水中での平衡：６０秒、（２）Ｎ－ヒドロキシスルホスクシンイミド（スルホ－ＮＨＳ）１０ｍＭと混合した新しい１－エチル－３－［３－ジメチルアミノプロピル］カルボジイミド塩酸塩（ＥＤＣ）２０ｍＭによる活性化：６００秒、（３）ｐＨ６．０の酢酸緩衝液１０ｍＭ中に希釈した抗体２０ｎＭの固定化：２０００秒、（４）１Ｍエタノールアミンによるクエンチ；３００秒、そして最後に、（５）Ｏｃｔｅｔ泳動緩衝液（１０ｍＭ　ＴＲＩＳ　ｐＨ７．５、１５０ｍＭ　ＮａＣｌ、１ｍＭ　$CaCl_2$、０．１３％（ｖ／ｖ）ＴｒｉｔｏｎＸ－１００及び０．１０ｍｇ／ｍｌ　ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ））中でのベースラインインキュベーション：６０秒。全ての実験は、製造元推奨の３８４ウェル黒色サンプルプレート（１００μｌ体積／ウェル）を用いて、２７℃及び１０００ＲＰＭで実施した。
【０３６６】
各Ａｂ：：ＰＤ－１相互作用を得るために、上記のように、同じ抗体を用いて８つのチップのカラムを均等に固定化した。３つのチップを使用して３点希釈系列の可溶性ヒトＰＤ－１（１－１７０）－ＦＬＡＧ－Ｈｉｓに結合させ、更に３つのチップを使用して３点希釈系列の可溶性カニクイザルＰＤ－１（１－１６７）－ＦＬＡＧ－Ｈｉｓに結合させ、次いで、参照チップとなるように、残りの２つのチップ（カラムのチップの残りと同様にＡｂを固定）をＯｃｔｅｔ（登録商標）緩衝液に曝露した。全ての光ファイバーチップは１回使用したら廃棄した。すなわち、再生はしなかった。可溶性ＰＤ－１受容体をＯｃｔｅｔ泳動緩衝液中に１：３倍の連続希釈系列で作製することによって、ヒト及びカニクイザルＰＤ－１結合曲線を生成した。ＰＤ－１の最終濃度は、３０、１０及び３．３ｎＭであった（ＩｇＧ４抗ＰＤ－１　ｍＡｂは除く（ＰＤ－１濃度：３３、１１、３．７ｎＭ））。抗体を固定化した光ファイバーバイオセンサーを、ＰＤ－１連続希釈系列を含有するウェル中で３００秒間インキュベートし（結合ステップ）、次いで、泳動緩衝液のみを含むウェルに５００秒間移した（解離ステップ）。

【０３６７】
生データを機器用データ解析ソフトウエア（ｖ１０）により処理した。センサーの各カラムについて、２つの参照センサーの結合シグナルを平均し、残りの６つサンプルセンサーから差し引いた。次いで、参照を差し引いたデータを、初期値のソフトウェアオプションにより処理した。Ｙ軸をベースラインに合わせ、解離に対してステップ間補正を行い、最後にＳａｖｉｔｚｋｙ－Ｇｏｌａｙフィルターを用いて処理した。次いで、３つのヒトＰＤ－１濃度または３つのカニクイザルＰＤ－１濃度のいずれかに対する各抗体結合についての最終処理データを１：１結合モデルにグローバルフィッティングさせ、グラフ化した。全てのグラフは、両方の処理データ及び１：１結合モデルに対するフィッティングを示す。１：１結合モデルフィッティングを使用して、結合速度定数（k_a；単位M^{-1}秒$^{-1}$）及び解離速度定数（k_d；単位秒$^{-1}$）を求めた。次いで、平衡解離定数（K_D；単位ナノモル（ｎＭ）＝１×１０$^{-9}$Ｍｏｌ／Ｌ）をk_d／k_aの比として算出した。
【０３６８】
図２６は、２つの抗ＰＤ－１　ｍＡｂ（ＩｇＧ１抗ＰＤ－１　ｍＡｂ及びＩｇＧ４抗ＰＤ－１　ｍＡｂ）を用いて試験した抗ＰＤ－１抗体２２Ｄ４．０１７、２０Ｃ１．００９及び２０Ａ２．００３の結合プロファイルを並べて示す。ＦｏｒｔｅＢｉｏ　Ｏｃｔｅｔ（登録商標）システムを使用して、結合プロファイルを決定した。結合をヒト及びカニクイザルＰＤ－１受容体に対して示す。
【０３６９】
図２６Ａ～２６Ｅに示されるように、２２Ｄ４．０１７、２０Ｃ１．００９及び２０Ａ２．００３ＰＤ－１抗体は、ヒトＰＤ－１タンパク質に対して試験したとき、市販の抗体よりも２～１４倍大きいK_D値を示した。加えて、カニクイザルＰＤ－１タンパク質と２２Ｄ４．０１７、２０Ｃ１．００９及び２０Ａ２．００３抗体との交差反応性の解析は、全体的に同様の親和性を示したが、市販の抗体は、親和性に約２倍の差を示した（図２６Ｆ～２６Ｊ）。
【０３７０】
実施例１６
以下の実施例は、種々の抗ＰＤ－１抗体の安定性を示す。
【０３７１】
抗ＰＤ－１抗体の立体構造の熱安定性を以下のように特徴付けた。抗体２０Ｃ１．００９及び２２Ｄ４．０１７の熱安定性を示差走査熱量測定（ＤＳＣ）によって評価した。ＤＳＣは、熱容量を温度の関数として測定する技術である。サンプル細胞からのシグナルを、タンパク質を含まない参照細胞と比較する。細胞温度の上昇に伴い、各アンフォールディング遷移のエンタルピー及び融解温度、ピーク幅を測定する。これは、タンパク質ドメインの熱安定性を含む、タンパク質の熱安定性及び高次構造に関する情報を提供する。図２７は、Ａ５２ＳｕＴ中１ｍｇ／ｍＬの各抗ＰＤ－１抗体のＤＳＣサーモグラムを表し、表２１は、各試験抗体のＴｍを示す。
【表３０】
表２１

抗体	２０Ｃ１．００９	２２Ｄ４．０１７
ＤＳＣによるＴｍ	７５．１℃	６６．１℃

【０３７２】
更に、コーン及びプレート（ＴＡ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ（Ｎｅｗ　Ｃａｓｔｌｅ，ＤＥ））を使用して、分子間の摩擦力による流れ抵抗を測定することによって、粘度を決定した。２０ｍｍ　１．９８８°のコーンプレート及びＰｅｌｔｉｅｒプレートＳｔｅｅｌ－９９０９１８を使用して、１００～１０００ｓ$^{-1}$のフロースイープ手順を適用した。粘度をＰａ・ｓ（１ｍ　Ｐａ・ｓ＝１ｃＰ　１０００ｓ$^{-1}$）で測定した。０．０１％界面活性剤を製剤緩衝液（Ａ５２Ｓｕ）に添加して、各抗体の粘度を７０及び１５０ｍｇ

／ｍＬで測定した。全試料を室温で測定した。粘度データ（１０００の剪断速度）を図２８に示し、表２２に記載する。

【表３１】

表２２

抗体	ｃＰ　７０ｍｇ／ｍＬ	ｃＰ　１５０ｍｇ／ｍＬ
２２Ｄ４．０１７	３．４	４４．７
２０Ｃ１．００９	２．５	７．１

【０３７３】

抗体の安定性特性は、治療薬候補の開発中に考慮される重要な要因である。例えば、抗体の凝集特性（沈殿をもたらす可能性のある溶液中での大きな複合体の形成）は、貯蔵寿命、投与様式（例えば、ｉ．ｖ．対皮下）、及び分子活性に影響を与え得る。典型的に、抗体の熱安定性及び粘度特性は、高温及び高濃度で構造的完全性を維持する抗体の能力の良い指標である。上のデータが示すように、２０Ｃ１．００９は、ｉ．ｖ．及び皮下（及び高濃度）の両方の投与に適用できる治療薬として特に好適な安定性特性を示す。

【０３７４】

実施例１７

本実施例は、種々の融合タンパク質によって誘発されるＩＬ－２１活性を示す。

【０３７５】

ＩＬ－２１ムテインを含む種々の融合タンパク質を作製し、ｐＳＴＡＴ３　αＬＩＳＡ（登録商標）アッセイを使用してＩＬ－２１活性について試験した。１つ目は、抗ＴＩＧＩＴモノクローナル抗体（ｍＡｂ）を含み、２つ目は、抗ＬＡＧ３ｍＡｂを含んだ。これらの実験で使用するために、４つの細胞株を作製した。（Ａ）ＰＤ－１陽性であるバリアントＨｕｔ７８　Ｔ細胞株、（Ｂ）ＴＩＧＩＴ陽性であるバリアントＨｕｔ７８　Ｔ細胞株、（Ｃ）ＬＡＧ３陽性であるバリアントＨｕｔ７８　Ｔ細胞株、及び（Ｄ）ＰＤ－１、ＴＩＧＩＴまたはＬＡＧ３を内因的に発現しない親のＨｕｔ７８　Ｔ細胞株。４つ全ての細胞株を、（ｉ）ｒｈＩＬ－２１単独、（ｉｉ）抗ＰＤ－１　ｍＡｂ単独、（ｉｉｉ）抗ＴＩＧＩＴ　ｍＡｂ単独、（ｉｖ）抗ＬＡＧ３　ｍＡｂ単独、（ｖ）ＩＬ－２１（Ｒ５Ｑ：Ｒ７６Ｅ）ムテイン（単量体）に融合された抗ＰＤ－１　ｍＡｂ、（ｖｉ）ＩＬ－２１（Ｒ５Ｑ：Ｒ７６Ｅ）ムテイン（二量体）に融合された抗ＴＩＧＩＴ　ｍＡｂ、及び（ｖｉｉ）ＩＬ－２１（Ｒ５Ｑ：Ｒ７６Ｅ）ムテイン（二量体）に融合された抗ＬＡＧ３　ｍＡｂに曝露した。

【０３７６】

ＳＴＡＴシグナル伝達に関する各分子のＳＴＡＴ３リン酸化アッセイの結果及びＥＣ５０を図２９Ａ～２９Ｄ及び表２３にそれぞれ示す。

【表３２】
表２３

分子	親 Hut78	Hut78/PD-1	Hut78/TIGIT	Hut78/Lag3
	EC50(pM)	EC50(pM)	EC50(pM)	EC50(pM)
rhIL-21	65	59	58	68
抗 PD-1 mAb	–	–	–	–
抗 TIGIT mAb	–	–	–	–
抗 LAG3 mAb	–	–	–	–
抗 PD-1 mAb+IL-21 ムテインの融合体	–	341	–	–
抗 TIGIT mAb+IL-21 ムテインの融合体	–	–	1390	–
抗 LAG3 mAb+IL-21 ムテインの融合体	–	–	–	–

図２９Ａ～２９Ｄ及び表２３に示されるように、抗ＴＩＧＩＴ及び抗ＬＡＧ３融合タンパク質は、ｒｈＩＬ－２１と比較して、大幅に低下した効力（抗ＴＩＧＩＴ）を示すか、測定可能な効力（抗ＬＡＧ３）を示さなかった。

【０３７７】
本明細書に引用される公開物、特許出願及び特許を含む全ての参考文献は、各参考文献が参照により個別かつ具体的に援用されることが示され、その全体が本明細書に記載される場合と同様に、参照により本明細書に援用される。

【０３７８】
本開示の記載の文脈における（特に以下の特許請求の範囲の文脈における）、「ａ」及び「ａｎ」及び「ｔｈｅ」という用語、ならびに類似の指示対象の使用は、本明細書において特に指定のない限り、または文脈と明らかに矛盾しない限り、単数形及び複数形の両方を含むように解釈されるものとする。「ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ（含む）」、「ｈａｖｉｎｇ（有する）」、「ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ（含む）」及び「ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ（含有する）」という用語は、特に指定のない限り、非限定的な用語として解釈されるものとする（すなわち、「～を含むがこれらに限定されない」を意味する）。

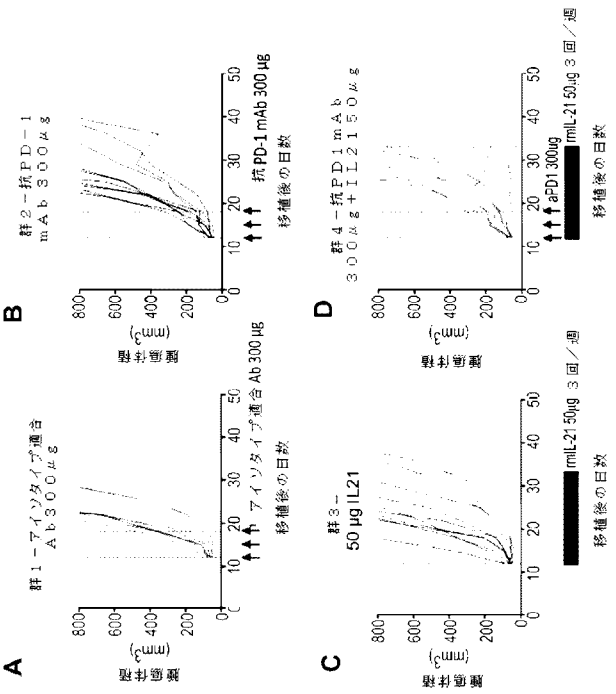
【０３７９】
本明細書における値の範囲の記述は、特に指定のない限り、その範囲及び端点内に該当する個々の各値を個別に指定するための簡便な方法として使用することを単に意図するものであり、個々の各値及び端点は、それが本明細書において個別に列挙されているかのように、本明細書に援用される。

【０３８０】
本明細書に記載される全ての方法は、本明細書において特に指定のない限り、または文脈と明らかに矛盾しない限り、任意の好適な順序で実施することができる。本明細書に記載されるあらゆる例、または例を示す文言（例えば、「など（ｓｕｃｈ　ａｓ）」）の使用は、本開示を十分に明らかにすることのみを意図しており、特に主張のない限り、本開示の範囲に限定を課すものではない。本明細書中のいかなる文言も、特許請求されていない任意の要素が本開示の実施に不可欠であることを示すものと解釈されるべきではない。

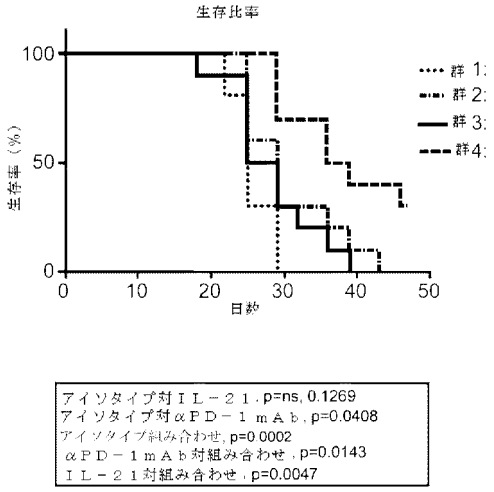
【０３８１】
本発明者らが認識している本開示を実施するための最良の形態を含め、本出願の好ましい実施形態が本明細書に記載されている。これらの好ましい実施形態の変形形態は、前述の説明を読めば、当業者には明らかとなろう。本発明者らは、当業者がこうした変形形態を適宜採用することを予想し、本発明者らは、本明細書に具体的に記載されるものとは別の方法で本開示が実施されることを企図している。したがって、本開示は、適用法で認め

られるように、本明細書に添付される特許請求の範囲において列挙される主題の全ての変更及び均等物を包含する。更に、その可能な限りの全ての変更形態における上述の要素のあらゆる組み合わせについても、本明細書中に特に指定のない限り、または文脈と明らかに矛盾しない限り、本出願に包含される。

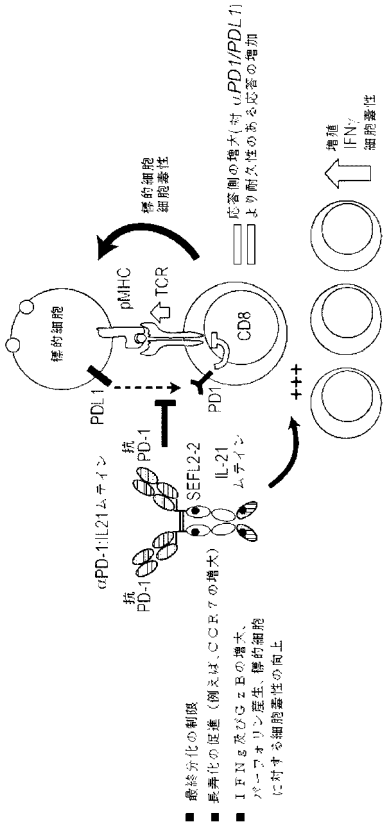
【図１】



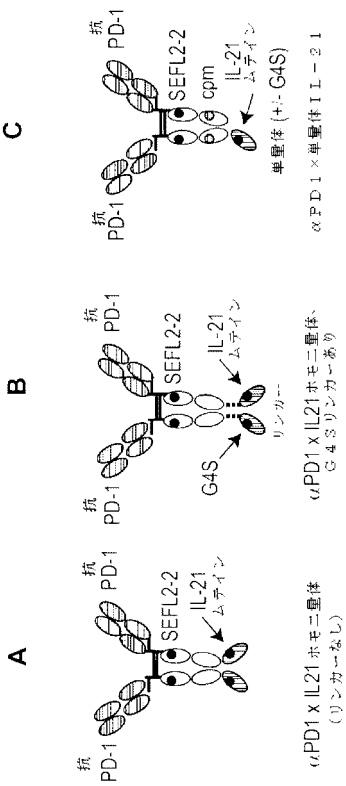
【図２】



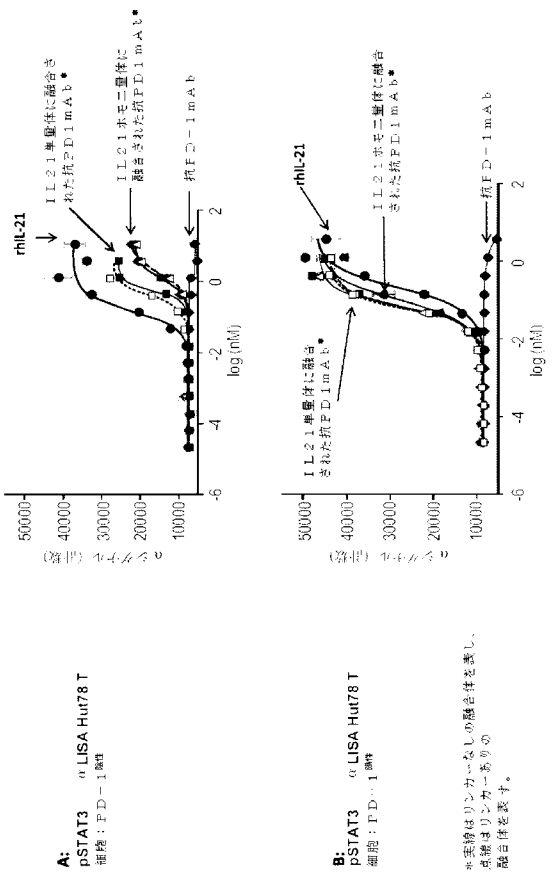
【図３】


標的細胞
pMHC
TCR
PDL1
PD1
CD8
標的細胞
細胞毒性
応答側の増大(対αPD1/PDL1)
より耐久性のある応答の増加
αPD-1:IL21ムテイン
抗PD-1
SEFL2-2
IL-21ムテイン
+++
増殖
IFNγ
細胞毒性
最終分化の制限
長寿化の促進（例えば、CCR7の増大）
IFNgおよびGzBの増大、パーフォリン産生、標的細胞に対する細胞毒性の向上

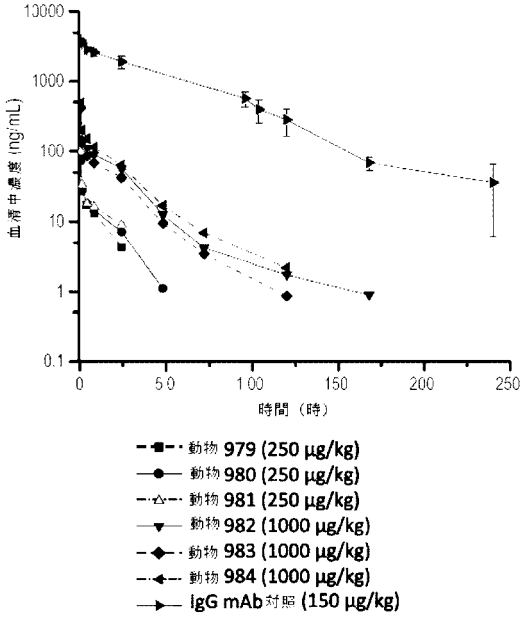
【図４】


A
B
C
抗PD-1
SEFL2-2
IL-21ムテイン
G4S
リンカー
cpm
単量体 (+/- G4S)
αPD1 x IL21ホモ二量体
(リンカーなし)
αPD1 x IL21ホモ二量体、G4Sリンカーあり
αPD1×単量体IL-21

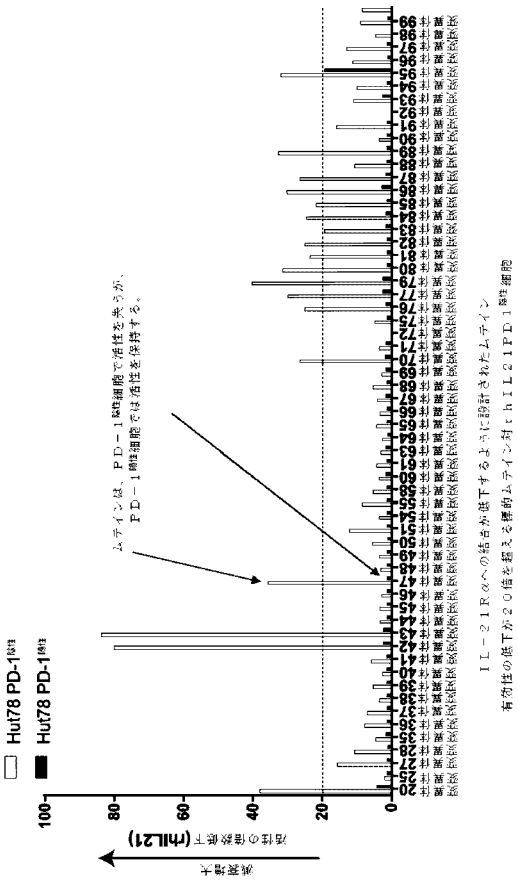
【図５】


A:
pSTAT3
細胞：PD-1陽性
αLISA Hut78 T
B:
pSTAT3
細胞：PD-1陰性
αLISA Hut78 T
rhIL-21
IL21単量体に融合された抗PD1mAb*
IL21ホモ二量体に融合された抗PD1mAb*
抗PD-1mAb
log (nM)
*実線はリンカーなしの融合体を表し、点線はリンカーありの融合体を表す。

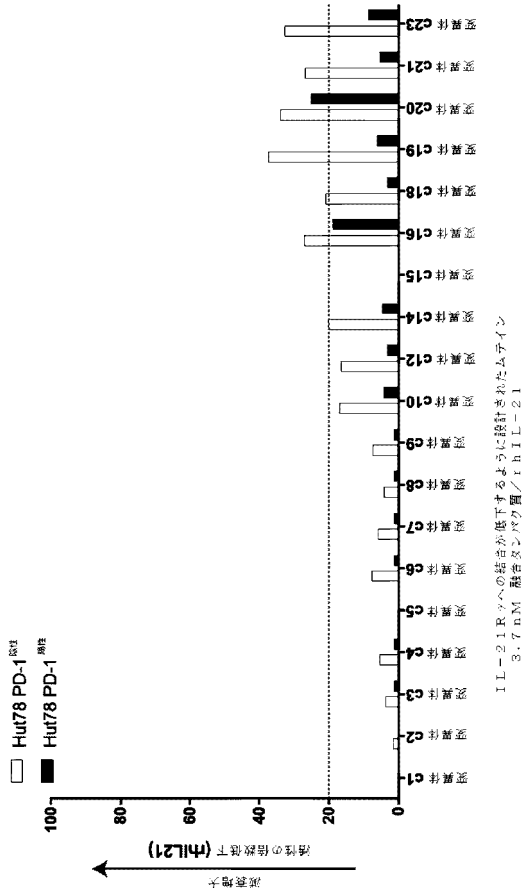
【図６】


血清中濃度 (ng/mL)
時間（時）
動物 979 (250 μg/kg)
動物 980 (250 μg/kg)
動物 981 (250 μg/kg)
動物 982 (1000 μg/kg)
動物 983 (1000 μg/kg)
動物 984 (1000 μg/kg)
IgG mAb対照 (150 μg/kg)

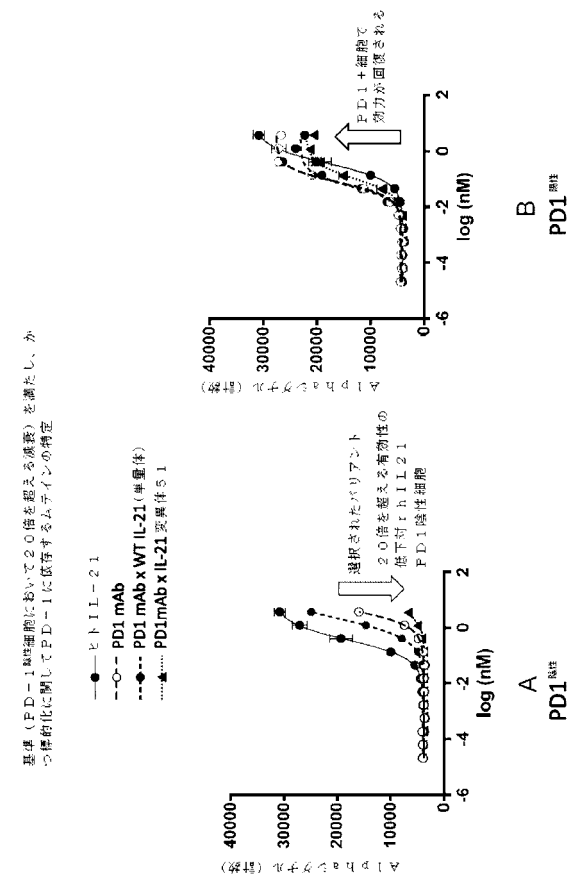
【図７】


Hut78 PD-1陰性
Hut78 PD-1陽性
活性の低下（rhIL21）
ムテインは、PD－1陰性細胞で活性を失うが、
PD－1陽性細胞では活性を保持する。
IL－21Rαへの結合が低下するように設計されたムテイン
有効性の低下が20倍を超える標的ムテイン対rhIL21PD1陰性細胞

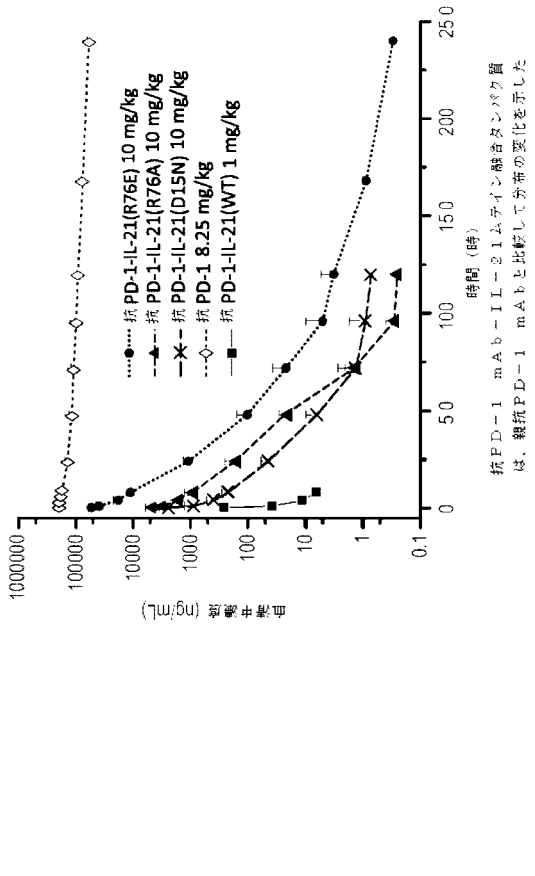
【図８】


Hut78 PD-1陰性
Hut78 PD-1陽性
活性の低下（rhIL21）
IL－21Rαへの結合が低下するように設計されたムテイン
3.7nM 融合タンパク質／rhIL－21

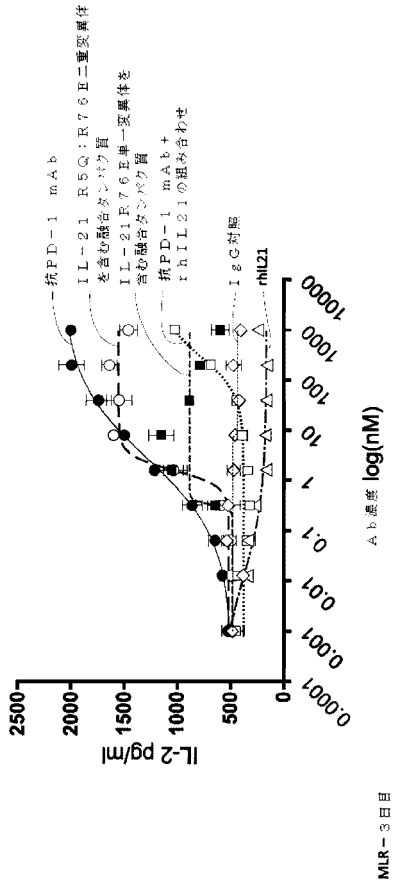
【図９】


基準（PD－1陰性細胞において20倍を超える減衰）を満たし、かつ標的化に関してPD－1に依存するムテインの特定
ヒトIL－21
PD1 mAb
PD1 mAb x WT IL-21（単量体）
PD1mAb x IL-21 変異体51
選択されたバリアント
20倍を超える有効性の低下対rhIL21
PD1陰性細胞
A
PD1陰性
PD1＋細胞で効力が回復される
B
PD1陽性

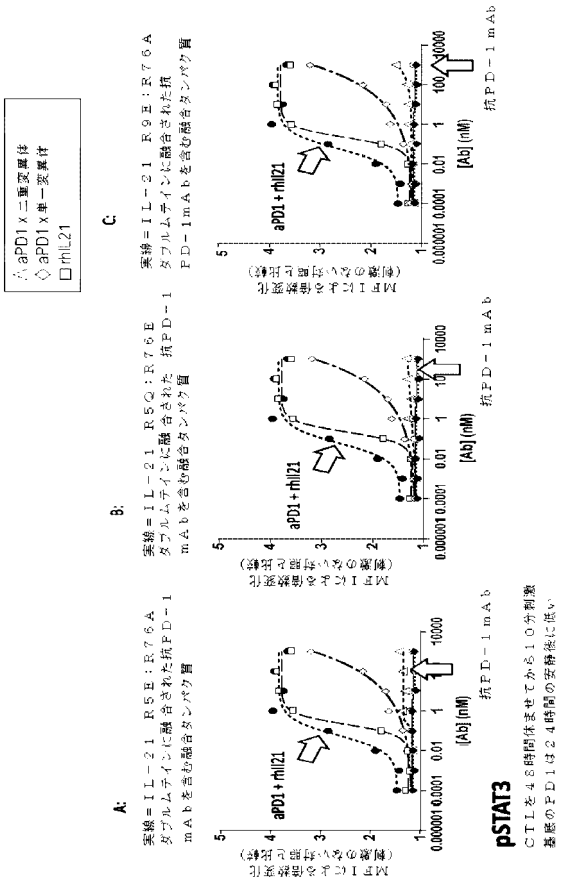
【図１０】


抗PD-1-IL-21(R76E) 10 mg/kg
抗 PD-1-IL-21(R76A) 10 mg/kg
抗 PD-1-IL-21(D15N) 10 mg/kg
抗 PD-1 8.25 mg/kg
抗 PD-1-IL-21(WT) 1 mg/kg
血清中濃度（ng/mL）
時間（時）
抗PD－1 mAb－IL－21ムテイン融合タンパク質は、親抗PD－1 mAbと比較して分布の変化を示した

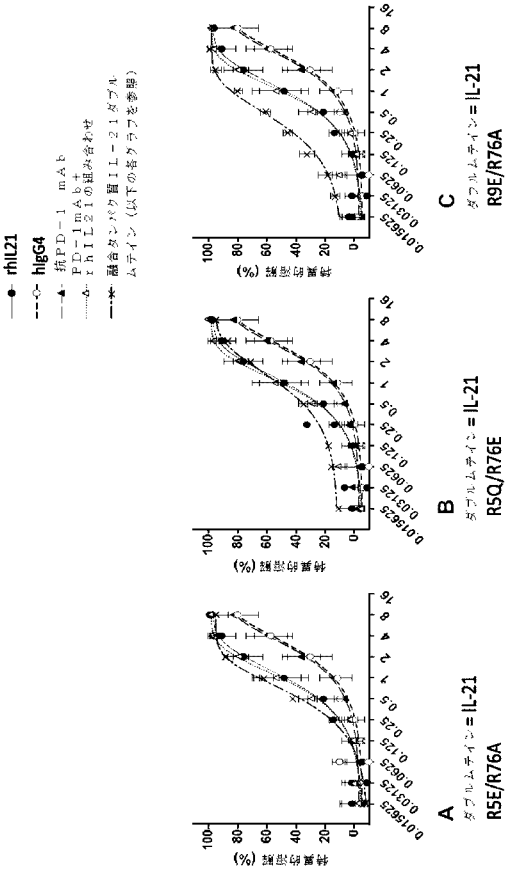
【図１１】



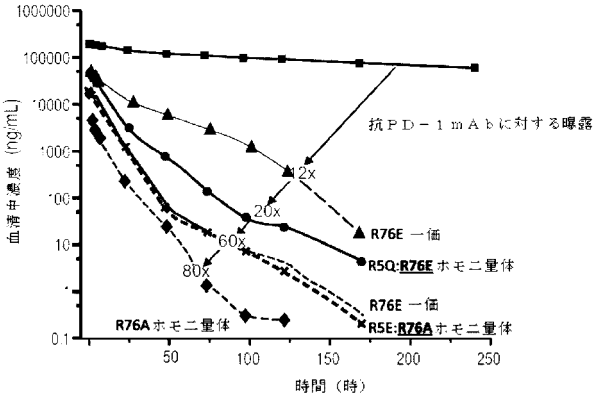
【図１２】



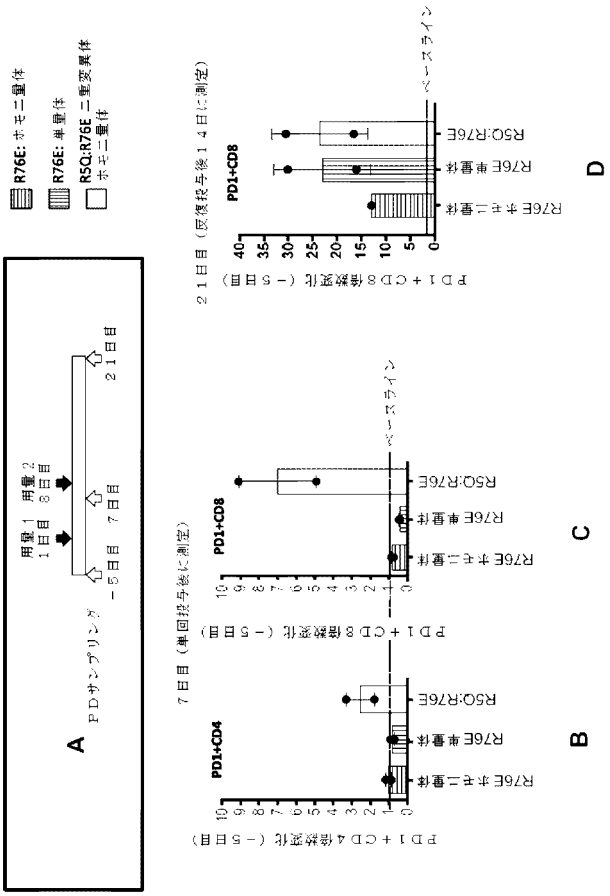
【図１３】



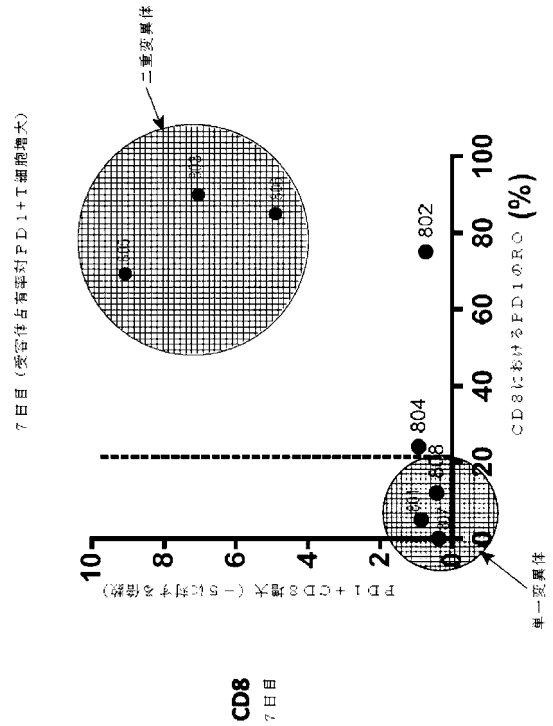
【図１４】



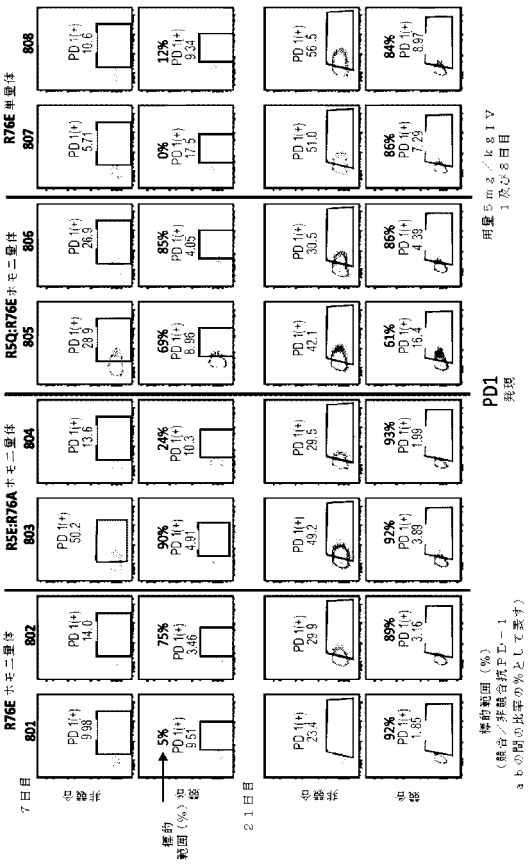
【図１５】



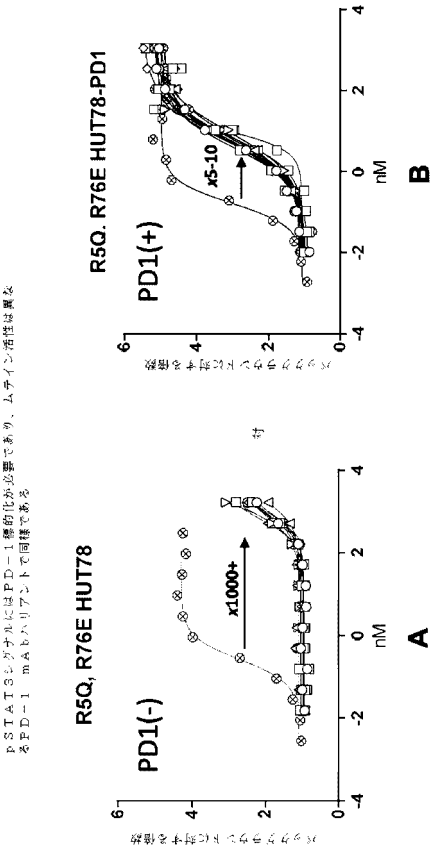
【図１６】



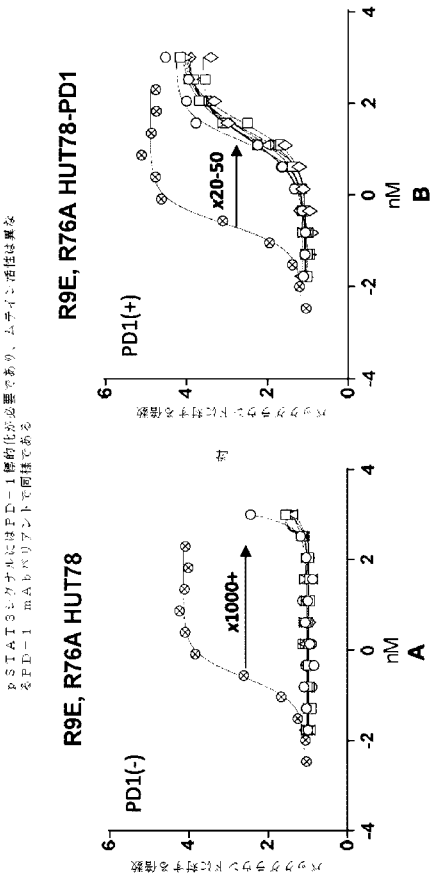
【図１７】



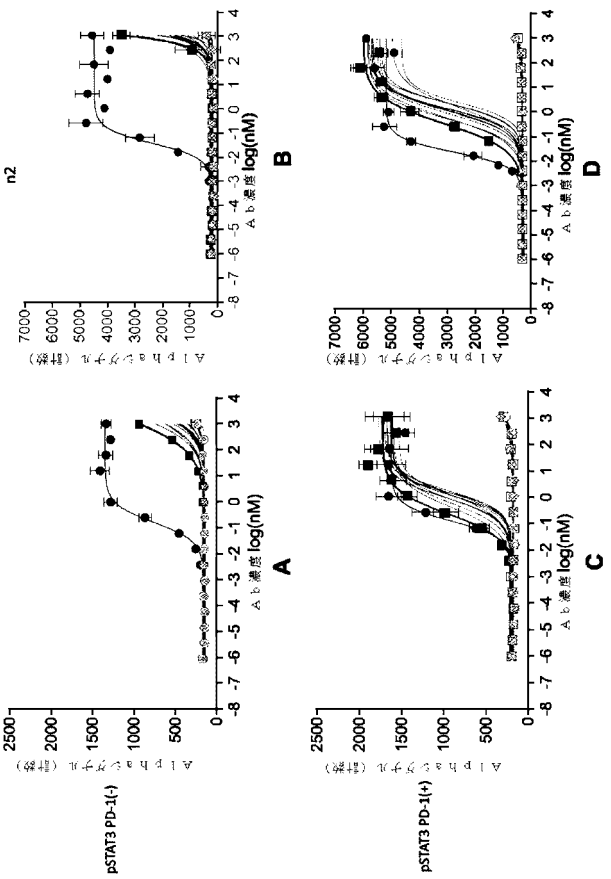
【図１８】



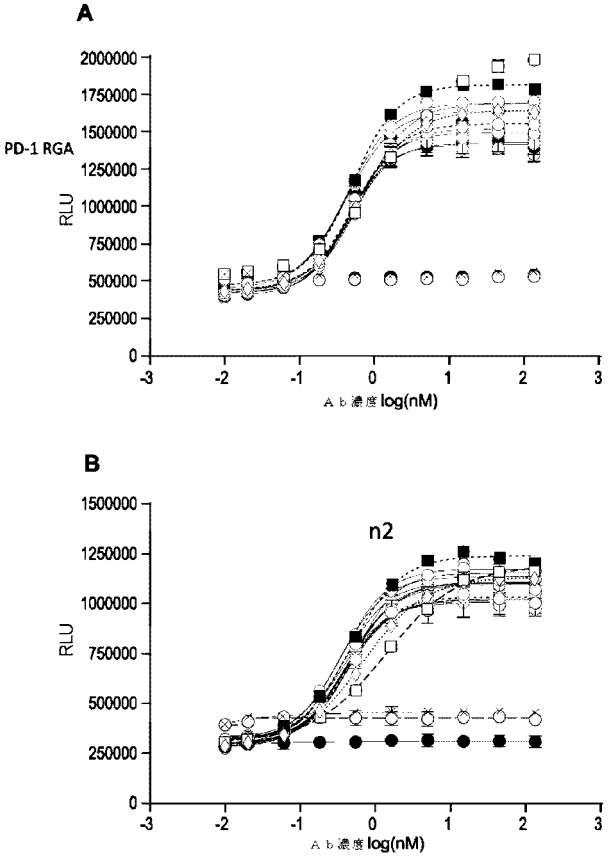
【図１９】



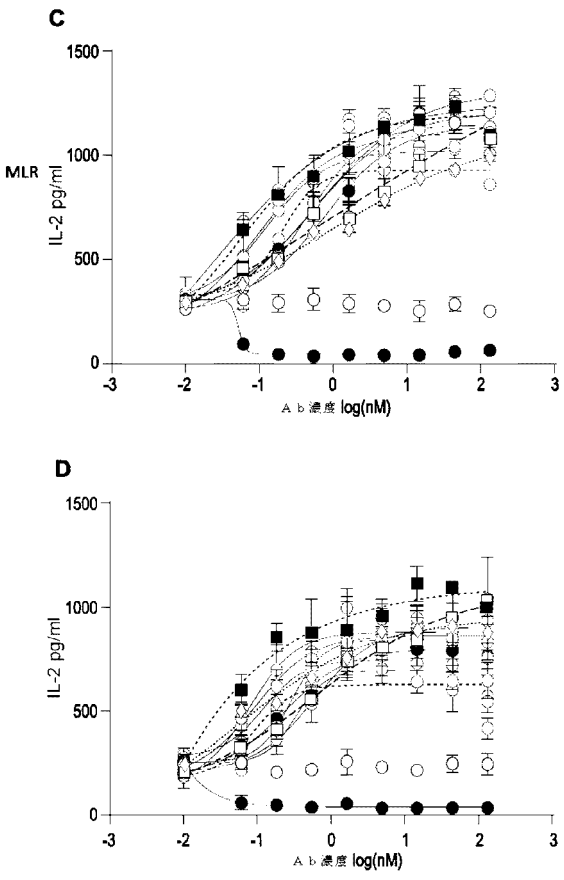
【図２０】



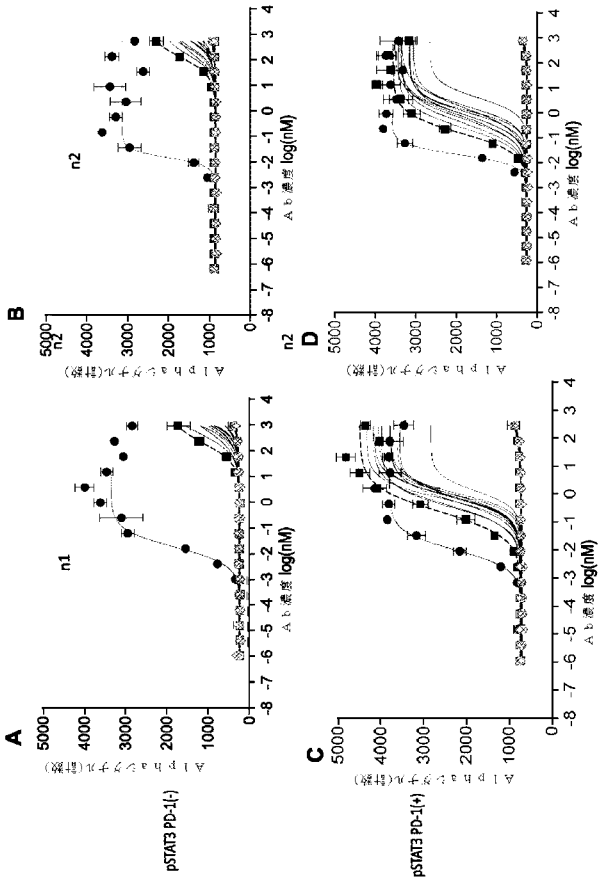
【図２１－１】



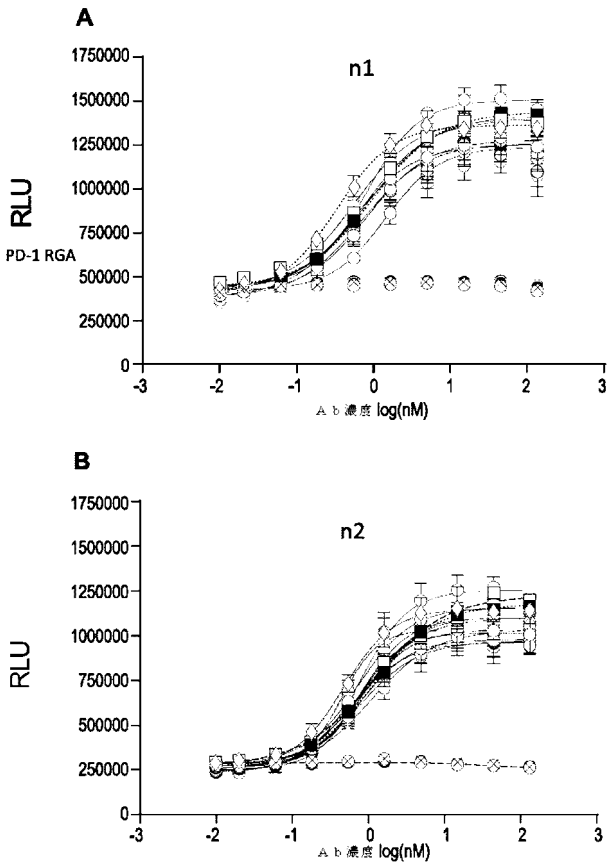
【図２１－２】



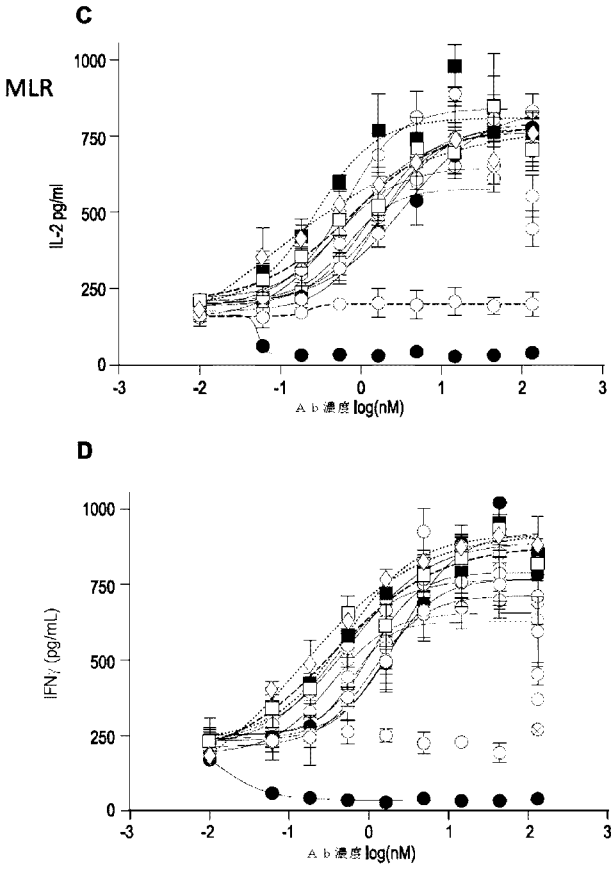
【図２２】



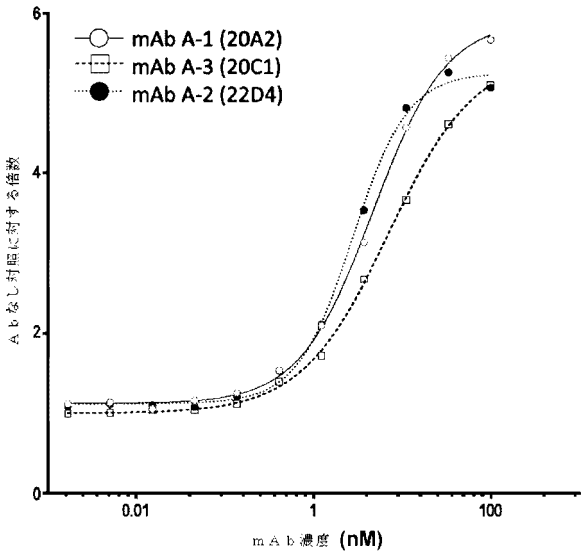
【図２３－１】



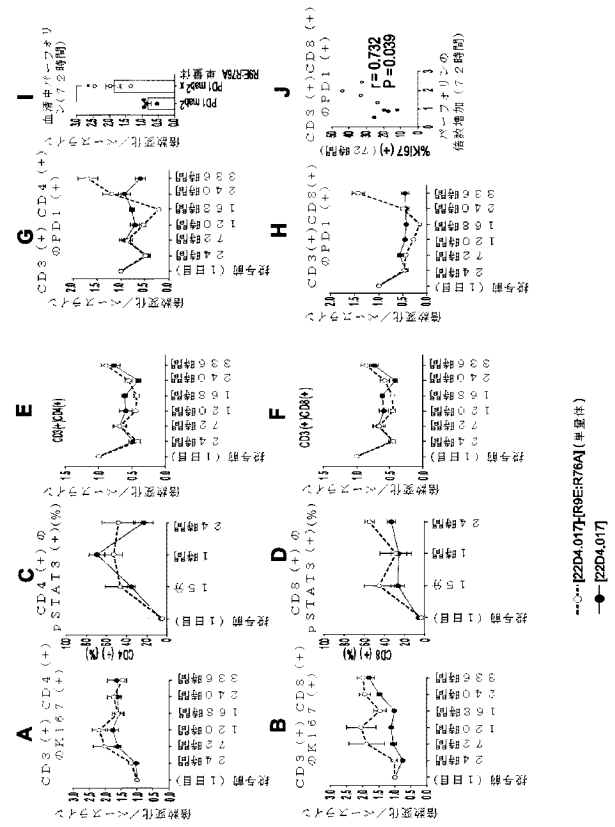
【図２３－２】



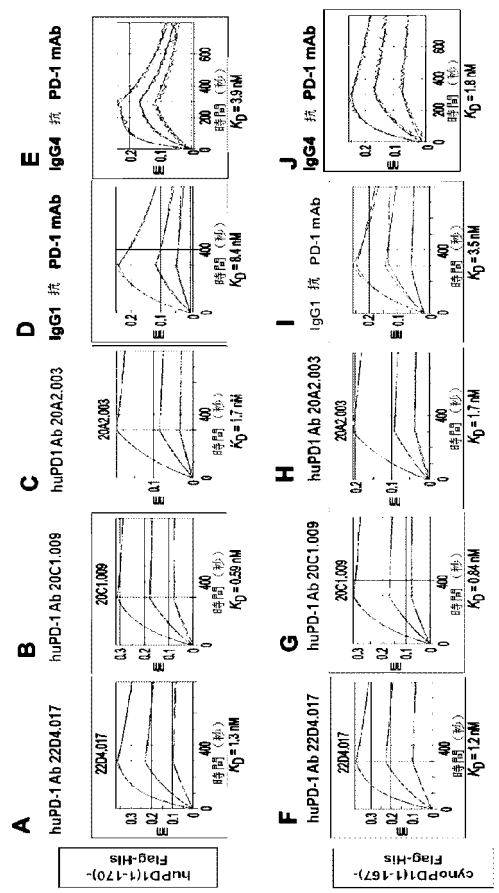
【図２４】



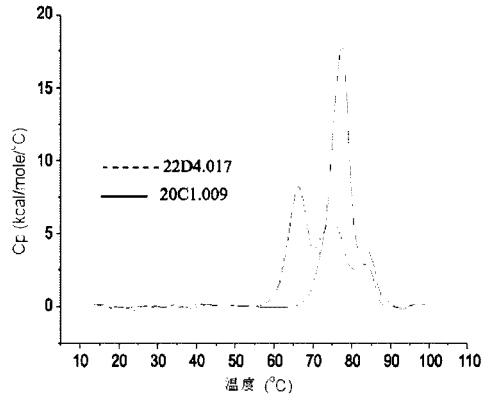
【図２５】



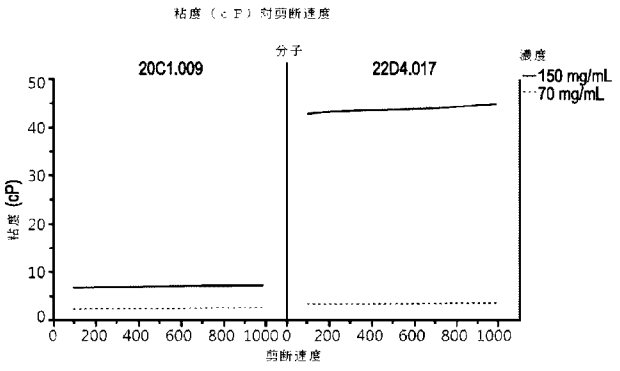
【図２６】



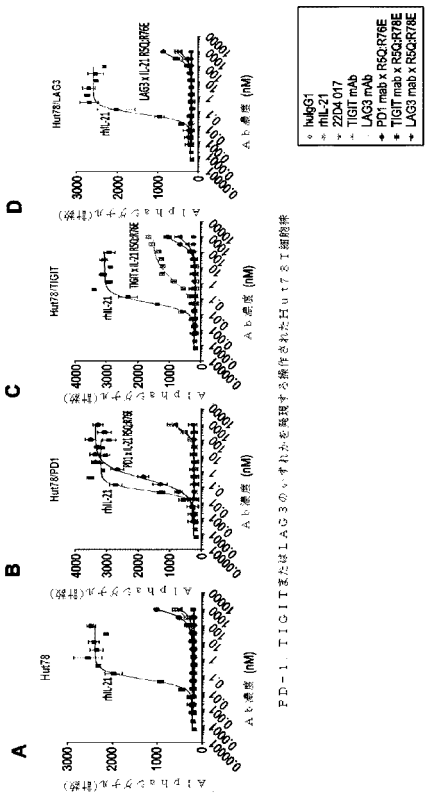
【図２７】



【図２８】



【図２９】



【配列表】
2019033743000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*31/7088*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	31/7088		４Ｃ０８６
Ａ６１Ｋ	*48/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	48/00		４Ｃ０８７
Ａ６１Ｋ	*35/76*	*(2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/76		４Ｈ０４５
Ａ６１Ｋ	*35/12*	*(2015.01)*	Ａ６１Ｋ	35/12		
Ａ６１Ｐ	*35/00*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00		
Ａ６１Ｋ	*39/395*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｙ	
Ｃ０７Ｋ	*14/54*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	14/54		
Ｃ０７Ｋ	*16/28*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	16/28		
Ｃ０７Ｋ	*19/00*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	19/00		
Ｃ０７Ｋ	*16/00*	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	16/00		
Ｃ１２Ｎ	*15/63*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/63	Ｚ	
Ｃ１２Ｎ	*15/13*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/13		
Ｃ１２Ｎ	*1/15*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/15		
Ｃ１２Ｎ	*1/19*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/19		
Ｃ１２Ｎ	*1/21*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/21		
Ｃ１２Ｎ	*5/10*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/10		
Ｃ１２Ｐ	*21/02*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｐ	21/02	Ｋ	

Ｆターム(参考) 4B064 AG03 AG26 CA19 CC24 DA01
4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA25
CA44
4C076 CC41 EE41 EE59 FF70
4C084 AA13 DA12 NA14 ZB26
4C085 AA25 BB11 EE01
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB26
4C087 AA01 AA02 BB64 BC83 CA12 NA14 ZB26
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA02 DA75 EA20
FA74

【外国語明細書】
2019033743000001.pdf