

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-520993

(P2018-520993A)

(43) 公表日 平成30年8月2日(2018.8.2)

| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|-----------------------------|----------------|-------------|
| C07K 16/28 (2006.01) | C07K 16/28 | 4B064 |
| C12N 15/13 (2006.01) | C12N 15/13 ZNA | 4B065 |
| C12N 1/15 (2006.01) | C12N 1/15 | 4C084 |
| C12N 1/19 (2006.01) | C12N 1/19 | 4C085 |
| C12N 1/21 (2006.01) | C12N 1/21 | 4C086 |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 174 頁) 最終頁に続く

| | | | |
|---------------|------------------------------|----------|---------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2017-557938 (P2017-557938) | (71) 出願人 | 515124598 |
| (86) (22) 出願日 | 平成28年5月6日 (2016.5.6) | | アジェナス インコーポレイテッド |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成29年12月27日 (2017.12.27) | | アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02 |
| (86) 国際出願番号 | PCT/US2016/031257 | | 421, レキシントン, フォーブス |
| (87) 国際公開番号 | W02016/179517 | | ロード 3 |
| (87) 国際公開日 | 平成28年11月10日 (2016.11.10) | (71) 出願人 | 516029470 |
| (31) 優先権主張番号 | 62/158, 515 | | ルドウイグ インスティテュート フォー |
| (32) 優先日 | 平成27年5月7日 (2015.5.7) | | キャンサー リサーチ エルティーデー |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | ー |
| (31) 優先権主張番号 | 62/161, 198 | | スイス国 シーエイチ-8001 チュー |
| (32) 優先日 | 平成27年5月13日 (2015.5.13) | | リッヒ スタデルホフェルストラッセ 2 |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | 2 |
| (31) 優先権主張番号 | 62/262, 373 | | |
| (32) 優先日 | 平成27年12月2日 (2015.12.2) | | |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗OX40抗体及びその使用方法

(57) 【要約】

本開示は、ヒトOX40受容体(OX40)に特異的に結合する抗体及びかかる抗体を含む組成物を提供する。ある具体的な態様において、この抗体はヒトOX40に特異的に結合し、且つOX40活性を調節する、例えば、OX40活性を増強するか、活性化するか、若しくは誘導し、又はOX40活性を低下させるか、不活性化するか、若しくは阻害する。本開示はまた、ヒトOX40に特異的に結合し、且つOX40活性を調節する、例えば、OX40活性を増強するか、活性化するか、又は誘導する抗体を投与することにより、癌などの障害を治療する方法も提供する。また、ヒトOX40に特異的に結合し、且つOX40活性を調節する、例えば、OX40活性を低下させるか、不活性化するか、又は阻害する抗体を投与することにより、自己免疫性又は炎症性疾患又は障害を治療する方法も提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト O X 4 0 に特異的に結合する単離抗体であって、

(a) 重鎖可変領域であって、

G S A M H (配列番号 4) のアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域 1 (C D R 1) と

、

R I R S K A N S Y A T A Y A A S V K G (配列番号 5) のアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 2 と、

G I Y D S S G Y D Y (配列番号 6) のアミノ酸配列を含む重鎖 C D R 3 と

を含む重鎖可変領域と、

(b) 軽鎖可変領域であって、

R S S Q S L L H S N G Y N Y L D (配列番号 1) のアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 1 と、

L G S N R A S (配列番号 2) のアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 2 と、

M Q A L Q T P L T (配列番号 3) のアミノ酸配列を含む軽鎖 C D R 3 と

を含む軽鎖可変領域と

を含む単離抗体。

【請求項 2】

前記重鎖可変領域が配列番号 1 6 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

配列番号 6 0 ~ 6 3 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖配列を含む、請求項 1 又は 2 に記載の抗体。

【請求項 4】

前記軽鎖可変領域が配列番号 1 5 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 5】

配列番号 2 0 のアミノ酸配列を含む軽鎖配列を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 6】

ヒト O X 4 0 に特異的に結合する単離抗体であって、重鎖可変領域と軽鎖可変領域とを含み、前記重鎖可変領域が配列番号 1 6 のアミノ酸配列を含む、単離抗体。

【請求項 7】

ヒト O X 4 0 に特異的に結合する単離抗体であって、重鎖可変領域と軽鎖可変領域とを含み、前記軽鎖可変領域が配列番号 1 5 のアミノ酸配列を含む、単離抗体。

【請求項 8】

ヒト O X 4 0 に特異的に結合する単離抗体であって、

(a) 配列番号 1 6 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、

(b) 配列番号 1 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と

を含む単離抗体。

【請求項 9】

(a) 配列番号 6 0 のアミノ酸配列を含む重鎖と、

(b) 配列番号 2 0 のアミノ酸配列を含む軽鎖と

を含む、請求項 8 に記載の抗体。

【請求項 10】

(a) 配列番号 6 1 のアミノ酸配列を含む重鎖と、

(b) 配列番号 2 0 のアミノ酸配列を含む軽鎖と

を含む、請求項 8 に記載の抗体。

【請求項 11】

(a) 配列番号 6 2 又は 6 3 のアミノ酸配列を含む重鎖と、

(b) 配列番号 2 0 のアミノ酸配列を含む軽鎖と

を含む単離抗体。

10

20

30

40

50

を含む、請求項 8 に記載の抗体。

【請求項 1 2】

重鎖及び / 又は軽鎖定常領域を更に含む、請求項 1、2、4、又は 6 ~ 8 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 1 3】

前記重鎖定常領域が、ヒト免疫グロブリン I g G₁、I g G₂、I g G₃、I g G₄、I g A₁、及び I g A₂ からなる群から選択される、請求項 1 2 に記載の抗体。

【請求項 1 4】

前記 I g G₁ が非フコシル化 I g G₁ である、請求項 1 3 に記載の抗体。

【請求項 1 5】

I g G₁ のアミノ酸配列が N 2 9 7 A 突然変異又は D 2 6 5 A、P 3 2 9 A、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される突然変異を含む、請求項 1 3 に記載の抗体。

【請求項 1 6】

I g G₁ のアミノ酸配列が N 2 9 7 Q 突然変異を含む、請求項 1 3 に記載の抗体。

【請求項 1 7】

I g G₄ のアミノ酸配列が S 2 2 8 P 突然変異を含む、請求項 1 3 に記載の抗体。

【請求項 1 8】

I g G₂ のアミノ酸配列が C 1 2 7 S 突然変異を含む、請求項 1 3 に記載の抗体。

【請求項 1 9】

前記重鎖定常領域が、配列番号 6 4 ~ 7 1 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 3 に記載の抗体。

【請求項 2 0】

前記軽鎖定常領域が、ヒト免疫グロブリン I g G₁ 及び I g G₂ からなる群から選択される、請求項 1 2 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 2 1】

ヒト抗体である、請求項 1 ~ 2 0 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 2 2】

請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の抗体と同じヒト O X 4 0 のエピトープに結合する単離抗体。

【請求項 2 3】

アゴニスト性である、請求項 1 ~ 2 2 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 2 4】

ヒト O X 4 0 の活性を活性化するか、増強するか、又は誘導する、請求項 1 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 2 5】

C D 4 + T 細胞増殖を誘導する、請求項 1 ~ 2 4 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 2 6】

前記 C D 4 + T 細胞増殖が前記抗体の濃度の実質的増加関数である、請求項 2 5 に記載の抗体。

【請求項 2 7】

前記 C D 4 + T 細胞増殖がシグモイド用量反応曲線を示す、請求項 2 5 に記載の抗体。

【請求項 2 8】

抗 C D 3 刺激末梢血単核細胞 (P B M C) による T N F α 、T N F β 、I F N γ 、G M - C S F、I L - 2、I L - 4、I L - 1 0、I L - 1 3、又はこれらの組み合わせの産生を誘導する、請求項 1 ~ 2 7 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 2 9】

抗 C D 3 刺激 P B M C による T N F α 、T N F β 、I F N γ 、G M - C S F、I L - 2、I L - 1 0、又は I L - 1 3 の産生を誘導し、前記 T N F α 、T N F β 、I F N γ 、G M - C S F、I L - 2、I L - 1 0、又は I L - 1 3 の産生が前記抗体の前記濃度の実質

10

20

30

40

50

的增加関数である、請求項 1 ~ 28 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 30】

抗 CD3 刺激 P B M C による T N F 、 T N F 、 I F N 、 G M - C S F、 I L - 2、 I L - 10、又は I L - 13 の産生を誘導し、前記 T N F 、 T N F 、 I F N 、 G M - C S F、 I L - 2、 I L - 10、又は I L - 13 の産生がシグモイド用量反応曲線を示す、請求項 1 ~ 28 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 31】

S E A 刺激末梢血単核細胞 (P B M C) による I L - 2 産生を誘導し、且つ S E A 刺激 P B M C による I L - 10 産生を抑制する、請求項 1 ~ 30 のいずれか一項に記載の抗体。

10

【請求項 32】

S E A 刺激 P B M C による I L - 2 産生を誘導し、前記 I L - 2 産生が前記抗体の前記濃度の実質的增加関数である、請求項 1 ~ 31 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 33】

S E A 刺激 P B M C による I L - 2 産生を誘導し、前記 I L - 2 産生がシグモイド用量反応曲線を示す、請求項 1 ~ 31 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 34】

調節性 T 細胞によるエフェクター T 細胞の抑制を軽減する、請求項 1 ~ 33 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 35】

エフェクター T 細胞と調節性 T 細胞との共培養による I L - 2 産生を誘導し、且つエフェクター T 細胞と調節性 T 細胞との共培養による I L - 10 産生を抑制する、請求項 1 ~ 34 のいずれか一項に記載の抗体。

20

【請求項 36】

検出可能標識を更に含む、請求項 1 ~ 35 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 37】

請求項 1 ~ 36 のいずれか一項に記載の抗体の前記重鎖可変領域又は重鎖をコードする単離核酸分子。

【請求項 38】

請求項 1 ~ 36 のいずれか一項に記載の抗体の前記軽鎖可変領域又は軽鎖をコードする単離核酸分子。

30

【請求項 39】

請求項 1 ~ 36 のいずれか一項に記載の抗体の前記重鎖可変領域又は重鎖と、請求項 1 ~ 36 のいずれか一項に記載の抗体の前記軽鎖可変領域又は軽鎖とをコードする単離核酸分子。

【請求項 40】

配列番号 16 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域をコードする、請求項 37 又は 39 に記載の単離核酸分子。

【請求項 41】

配列番号 15 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域をコードする、請求項 38 又は 39 に記載の単離核酸分子。

40

【請求項 42】

請求項 37 ~ 41 のいずれか一項に記載の核酸分子を含む単離ベクター。

【請求項 43】

請求項 37 ~ 41 のいずれか一項に記載の核酸分子、請求項 42 に記載のベクター、又は請求項 37 若しくは 40 に記載の核酸を含む第 1 のベクター及び請求項 38 若しくは 41 に記載の核酸を含む第 2 のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 44】

大腸菌 (E . c o l i)、シュードモナス属 (P s e u d o m o n a s)、バチルス属 (B a c i l l u s)、ストレプトミセス属 (S t r e p t o m y c e s)、酵母、C H

50

O、YB/20、NS0、PER-C6、HEK-293T、NIH-3T3、HeLa、BHK、Hep G2、SP2/0、R1.1、B-W、L-M、COS1、COS7、BSC1、BSC40、BMT10細胞、植物細胞、昆虫細胞、及び組織培養下のヒト細胞からなる群から選択される、請求項43に記載の宿主細胞。

【請求項45】

ヒトOX40に結合する抗体を作製する方法であって、請求項43又は44に記載の宿主細胞を、前記核酸分子が発現され、及び前記抗体が産生されるように培養するステップを含む方法。

【請求項46】

ヒトOX40に特異的に結合し、且つ請求項37～41のいずれか一項に記載の単離核酸分子によってコードされる単離抗体。

10

【請求項47】

請求項1～36又は46のいずれか一項に記載の抗体と、薬学的に許容可能な賦形剤とを含む医薬組成物。

【請求項48】

請求項1～36又は46のいずれか一項に記載の抗体、請求項37～41のいずれか一項に記載の核酸分子、請求項42に記載のベクター、又は請求項43若しくは44に記載の宿主細胞と、薬学的に許容可能な賦形剤とを含む医薬組成物。

【請求項49】

対象の免疫応答を調節する方法であって、請求項1～36若しくは46のいずれか一項に記載の抗体、請求項37～41のいずれか一項に記載の核酸分子、請求項42に記載のベクター、請求項43若しくは44に記載の宿主細胞、又は請求項47若しくは48に記載の医薬組成物の有効量を前記対象に投与するステップを含む方法。

20

【請求項50】

免疫応答を調節することが、前記対象の前記免疫応答を増強又は誘導することを含む、請求項49に記載の方法。

【請求項51】

対象のT細胞拡大及びT細胞エフェクター機能を増強する方法であって、請求項1～36若しくは46のいずれか一項に記載の抗体、請求項37～41のいずれか一項に記載の核酸分子、請求項42に記載のベクター、請求項43若しくは44に記載の宿主細胞、又は請求項47若しくは48に記載の医薬組成物の有効量を前記対象に投与するステップを含む方法。

30

【請求項52】

対象の癌を治療する方法であって、請求項1～36若しくは46のいずれか一項に記載の抗体、請求項37～41のいずれか一項に記載の核酸分子、請求項42に記載のベクター、請求項43若しくは44に記載の宿主細胞、又は請求項47若しくは48に記載の医薬組成物の有効量を前記対象に投与するステップを含む方法。

【請求項53】

前記癌が、黒色腫、腎癌、前立腺癌、結腸癌、及び肺癌からなる群から選択される、請求項52に記載の方法。

40

【請求項54】

インドールアミン-2,3-ジオキシゲナーゼ(IDO)の阻害薬を前記対象に投与するステップを更に含む、請求項52又は53に記載の方法。

【請求項55】

前記阻害薬が、エパカドスタット、F001287、インドキシモド、及びNLG919からなる群から選択される、請求項54に記載の方法。

【請求項56】

前記阻害薬がエパカドスタットである、請求項55に記載の方法。

【請求項57】

前記阻害薬がF001287である、請求項55に記載の方法。

50

- 【請求項 58】
前記阻害薬がインドキシモドである、請求項 55 に記載の方法。
- 【請求項 59】
前記阻害薬が N L G 9 1 9 である、請求項 55 に記載の方法。
- 【請求項 60】
前記対象にワクチンを投与するステップを更に含む、請求項 52 又は 53 に記載の方法。
- 【請求項 61】
前記ワクチンが、抗原ペプチドと複合体を形成している熱ショックタンパク質を含む熱ショックタンパク質ペプチド複合体 (H S P P C) を含む、請求項 60 に記載の方法。 10
- 【請求項 62】
前記熱ショックタンパク質が g p 9 6 タンパク質であり、且つ腫瘍関連抗原ペプチドと複合体を形成しており、前記 H S P P C が、対象から得られた腫瘍に由来する、請求項 61 に記載の方法。
- 【請求項 63】
前記熱ショックタンパク質が h s p 7 0 又は h s c 7 0 タンパク質であり、且つ腫瘍関連抗原ペプチドと複合体を形成している、請求項 61 に記載の方法。
- 【請求項 64】
前記対象がヒトである、請求項 49 ~ 63 のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 65】 20
試料中の O X 4 0 を検出する方法であって、請求項 1 ~ 36 又は 46 のいずれか一項に記載の抗体に前記試料を接触させるステップを含む方法。
- 【請求項 66】
請求項 1 ~ 36 若しくは 46 のいずれか一項に記載の抗体、請求項 37 ~ 41 のいずれか一項に記載の核酸分子、請求項 42 に記載のベクター、請求項 43 若しくは 44 に記載の宿主細胞、又は請求項 47 若しくは 48 に記載の医薬組成物と、a) 検出試薬、b) O X 4 0 抗原、c) ヒト投与への使用若しくは販売の認可を反映する通知、又は d) これらの組み合わせとを含むキット。
- 【請求項 67】 30
ヒト免疫グロブリン I g G ₁ 重鎖定常領域を含み、前記 I g G ₁ 重鎖定常領域のアミノ酸配列が、N 2 9 7 A、N 2 9 7 Q、D 2 6 5 A、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される突然変異又は D 2 6 5 A、P 3 2 9 A、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される突然変異を含む、請求項 12、13、20 ~ 22、36、又は 46 のいずれか一項に記載の抗体。
- 【請求項 68】
前記抗体と変異 O X 4 0 との間の結合が、前記抗体と配列番号 55 のヒト O X 4 0 配列との間の結合と比べて実質的に弱まり、前記変異 O X 4 0 が、N 6 0 A、R 6 2 A、R 8 0 A、L 8 8 A、P 9 3 A、P 9 9 A、P 1 1 5 A、及びこれらの組み合わせからなる群から選択されるアミノ酸突然変異を除いて、配列番号 55 の配列を含む、請求項 1 ~ 36 又は 46 のいずれか一項に記載の抗体。 40
- 【請求項 69】
ヒト O X 4 0 に特異的に結合する単離抗体であって、前記抗体と変異 O X 4 0 との間の結合が、前記抗体と配列番号 55 のヒト O X 4 0 配列との間の結合と比べて実質的に弱まり、前記変異 O X 4 0 が、N 6 0 A、R 6 2 A、R 8 0 A、L 8 8 A、P 9 3 A、P 9 9 A、P 1 1 5 A、及びこれらの組み合わせからなる群から選択されるアミノ酸突然変異を除いて、配列番号 55 の配列を含む、単離抗体。
- 【請求項 70】
ヒト O X 4 0 に特異的に結合する単離抗体であって、前記抗体と変異 O X 4 0 との間の結合が、前記抗体と配列番号 55 のヒト O X 4 0 配列との間の結合と比べて実質的に弱まり、前記変異 O X 4 0 が、アミノ酸突然変異 W 5 8 A、N 6 0 A、R 6 2 A、R 8 0 A、 50

L 8 8 A、P 9 3 A、P 9 9 A、及び P 1 1 5 A を除いて、配列番号 5 5 の配列を含む、単離抗体。

【請求項 7 1】

配列番号 5 5 のヒト O X 4 0 配列への結合と比較して、N 6 0 A、R 6 2 A、R 8 0 A、L 8 8 A、P 9 3 A、P 9 9 A、P 1 1 5 A、及びこれらの組み合わせからなる群から選択されるアミノ酸突然変異の存在を除いて、配列番号 5 5 と同一のタンパク質への結合の低下又は欠如を呈する、請求項 1 ~ 3 6 又は 4 6 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 7 2】

ヒト O X 4 0 に特異的に結合する単離抗体であって、配列番号 5 5 のヒト O X 4 0 配列への結合と比較して、N 6 0 A、R 6 2 A、R 8 0 A、L 8 8 A、P 9 3 A、P 9 9 A、P 1 1 5 A、及びこれらの組み合わせからなる群から選択されるアミノ酸突然変異の存在を除いて、配列番号 5 5 と同一のタンパク質への結合の低下又は欠如を呈する単離抗体。

10

【請求項 7 3】

ヒト O X 4 0 に特異的に結合する単離抗体であって、配列番号 5 5 のヒト O X 4 0 配列への結合と比較して、アミノ酸突然変異 W 5 8 A、N 6 0 A、R 6 2 A、R 8 0 A、L 8 8 A、P 9 3 A、P 9 9 A、及び P 1 1 5 A の存在を除いて、配列番号 5 5 と同一のタンパク質への結合の低下又は欠如を呈する単離抗体。

【請求項 7 4】

6 0、6 2、8 0、8 8、9 3、9 9、1 1 5、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される配列番号 5 5 の残基を含むヒト O X 4 0 配列のエピトープに特異的に結合する、請求項 1 ~ 3 6 又は 4 6 のいずれか一項に記載の抗体。

20

【請求項 7 5】

ヒト O X 4 0 に特異的に結合する単離抗体であって、6 0、6 2、8 0、8 8、9 3、9 9、1 1 5、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される配列番号 5 5 の残基を含むヒト O X 4 0 配列のエピトープに特異的に結合する単離抗体。

【請求項 7 6】

ヒト O X 4 0 に特異的に結合する単離抗体であって、配列番号 5 5 の残基 5 8、6 0、6 2、8 0、8 8、9 3、9 9、及び 1 1 5 を含むヒト O X 4 0 配列のエピトープに特異的に結合する単離抗体。

【請求項 7 7】

6 0、6 2、8 0、8 8、9 3、9 9、1 1 5、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される配列番号 5 5 の少なくとも 1 つの残基に特異的に結合する、請求項 1 ~ 3 6 又は 4 6 のいずれか一項に記載の抗体。

30

【請求項 7 8】

ヒト O X 4 0 に特異的に結合する単離抗体であって、6 0、6 2、8 0、8 8、9 3、9 9、1 1 5、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される配列番号 5 5 の少なくとも 1 つの残基に特異的に結合する単離抗体。

【請求項 7 9】

配列番号 5 5 の残基 5 8、6 0、6 2、8 0、8 8、9 3、9 9、及び 1 1 5 に特異的に結合する、請求項 1 ~ 3 6 又は 4 6 のいずれか一項に記載の抗体。

40

【請求項 8 0】

ヒト免疫グロブリン I g G₁ 重鎖定常領域を含み、前記 I g G₁ 重鎖定常領域のアミノ酸配列が、N 2 9 7 A、N 2 9 7 Q、D 2 6 5 A、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される突然変異又は D 2 6 5 A、P 3 2 9 A、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される突然変異を含む、請求項 6 8 ~ 7 9 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 8 1】

請求項 1、2、4、6 ~ 8、2 1、2 2、又は 6 8 ~ 7 9 のいずれか一項に記載の重鎖可変領域配列及び軽鎖可変領域配列を含む、ヒト O X 4 0 に特異的に結合する単離抗体であって、F a b、F a b'、F (a b')₂、及び s c F v 断片からなる群から選択される単離抗体。

50

【請求項 8 2】

1つの重鎖及び1つの軽鎖を含む、ヒトOX40に特異的に結合する単離抗体であって、前記重鎖及び軽鎖が、それぞれ請求項1、2、4、6～8、21、22、又は68～79のいずれか一項に記載の重鎖可変領域配列及び軽鎖可変領域配列を含む、単離抗体。

【請求項 8 3】

ヒト免疫グロブリンIgG₁重鎖定常領域を更に含み、前記IgG₁重鎖定常領域のアミノ酸配列が、N297A、N297Q、D265A、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される突然変異又はD265A、P329A、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される突然変異を含む、請求項82に記載の抗体。

【請求項 8 4】

ヒトOX40に特異的に結合する単離抗体であって、
 (a) ヒトOX40に特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、
 (b) ヒト免疫細胞によって発現される抗原に特異的に結合しない第2の抗原結合ドメインと
 を含む単離抗体。

10

【請求項 8 5】

ヒトOX40に特異的に結合する前記抗原結合ドメインが、
 (a) GSAMH(配列番号4)のアミノ酸配列を含むVH相補性決定領域(CDR)1と、RIRSKANSYATAYAAASVKG(配列番号5)のアミノ酸配列を含むVH-CDR2と、GIYDSSGYDY(配列番号6)のアミノ酸配列を含むVH-CDR3とを含む第1の重鎖可変ドメイン(VH)と、
 (b) RSSQSLLHSNGYNYLD(配列番号1)のアミノ酸配列を含むVL-CDR1と、LGSNRAS(配列番号2)のアミノ酸配列を含むVL-CDR2と、MQALQTPLT(配列番号3)のアミノ酸配列を含むVL-CDR3とを含む第1の軽鎖可変ドメイン(VL)と
 を含む、請求項84に記載の抗体。

20

【請求項 8 6】

ヒトOX40に特異的に結合する前記抗原結合ドメインが、配列番号16のアミノ酸配列を含むVH及び配列番号15のアミノ酸配列を含むVLを含む抗体と同じヒトOX40のエピトープに特異的に結合する、請求項84に記載の抗体。

30

【請求項 8 7】

ヒトOX40に特異的に結合する前記抗原結合ドメインが、配列番号55のヒトOX40配列への結合と比較して、N60A、R62A、R80A、L88A、P93A、P99A、P115A、及びこれらの組み合わせからなる群から選択されるアミノ酸突然変異の存在を除いて、配列番号55と同一のタンパク質への結合の低下又は欠如を呈する、請求項84に記載の抗体。

【請求項 8 8】

ヒトOX40に特異的に結合する前記抗原結合ドメインがVHとVLとを含み、前記VHが配列番号16のアミノ酸配列を含む、請求項84に記載の抗体。

【請求項 8 9】

ヒトOX40に特異的に結合する前記抗原結合ドメインがVHとVLとを含み、前記VLが配列番号15のアミノ酸配列を含む、請求項84に記載の抗体。

40

【請求項 9 0】

前記第2の抗原結合ドメインが非ヒト抗原に特異的に結合する、請求項84～89のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 9 1】

前記第2の抗原結合ドメインがウイルス抗原に特異的に結合する、請求項84～89のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 9 2】

前記ウイルス抗原がHIV抗原である、請求項91に記載の抗体。

50

【請求項 93】

前記第2の抗原結合ドメインがニワトリアルブミン又は鶏卵リゾチームに特異的に結合する、請求項84～90のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 94】

OX40に特異的に結合する単離抗体であって、

(a)第1の重鎖と軽鎖とを含む、ヒトOX40に特異的に結合する抗原結合ドメインと、

(b)第2の重鎖又はその断片とを含む単離抗体。

【請求項 95】

ヒトOX40に特異的に結合する前記抗原結合ドメインが、

(a)GSAMH(配列番号4)のアミノ酸配列を含むVH相補性決定領域(CDR)1と、RIRSKANSYATAYAAASVKG(配列番号5)のアミノ酸配列を含むVH-CDR2と、GIYDSSGYDY(配列番号6)のアミノ酸配列を含むVH-CDR3とを含む第1の重鎖可変ドメイン(VH)と、

(b)RSSQSLLHSNGYNYLD(配列番号1)のアミノ酸配列を含むVL-CDR1と、LGSNRAS(配列番号2)のアミノ酸配列を含むVL-CDR2と、MQALQTPLT(配列番号3)のアミノ酸配列を含むVL-CDR3とを含む第1の軽鎖可変ドメイン(VL)と

を含む、請求項94に記載の抗体。

【請求項 96】

ヒトOX40に特異的に結合する前記抗原結合ドメインが、配列番号16のアミノ酸配列を含むVH及び配列番号15のアミノ酸配列を含むVLを含む抗体と同じヒトOX40のエピトープに特異的に結合する、請求項94に記載の抗体。

【請求項 97】

ヒトOX40に特異的に結合する前記抗原結合ドメインが、配列番号55のヒトOX40配列への結合と比較して、N60A、R62A、R80A、L88A、P93A、P99A、P115A、及びこれらの組み合わせからなる群から選択されるアミノ酸突然変異の存在を除いて、配列番号55と同一のタンパク質への結合の低下又は欠如を呈する、請求項94に記載の抗体。

【請求項 98】

ヒトOX40に特異的に結合する前記抗原結合ドメインがVHとVLとを含み、前記VHが配列番号16のアミノ酸配列を含む、請求項94に記載の抗体。

【請求項 99】

ヒトOX40に特異的に結合する前記抗原結合ドメインがVHとVLとを含み、前記VLが配列番号15のアミノ酸配列を含む、請求項94に記載の抗体。

【請求項 100】

前記第2の重鎖の前記断片がFc断片である、請求項94～99のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 101】

ヒトOX40に特異的に結合する前記抗原結合ドメインが、配列番号16のアミノ酸配列と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、又は99%同一のアミノ酸配列を含むVHを含む、請求項84～100のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 102】

ヒトOX40に特異的に結合する前記抗原結合ドメインが、配列番号16のアミノ酸配列を含むVHを含む、請求項84～101のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 103】

ヒトOX40に特異的に結合する前記抗原結合ドメインが、ヒトIGHV3-73生殖系列配列に由来するアミノ酸配列を含むVHを含む、請求項84～101のいずれか一項に記載の抗体。

10

20

30

40

50

【請求項 104】

ヒトOX40に特異的に結合する前記抗原結合ドメインが、配列番号15のアミノ酸配列と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、又は99%同一のアミノ酸配列を含むVLを含む、請求項84～103のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 105】

ヒトOX40に特異的に結合する前記抗原結合ドメインが、配列番号3のアミノ酸配列を含むVL-CDR3を含む、請求項84～104のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 106】

ヒトOX40に特異的に結合する前記抗原結合ドメインが、配列番号15のアミノ酸配列を含むVLを含む、請求項84～105のいずれか一項に記載の抗体。

10

【請求項 107】

ヒトOX40に特異的に結合する前記抗原結合ドメインが、配列番号20のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、請求項84～106のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 108】

ヒトOX40に特異的に結合する前記抗原結合ドメインが、配列番号50のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、請求項84～107のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 109】

ヒトOX40に特異的に結合する前記抗原結合ドメインが、ヒトIGKV2-28生殖系列配列に由来するアミノ酸配列を含むVLを含む、請求項84～103のいずれか一項に記載の抗体。

20

【請求項 110】

ヒトOX40に特異的に結合する前記抗原結合ドメインが、それぞれ配列番号16及び15に示されるVH及びVL配列を含む、請求項84～102のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 111】

ヒトOX40に特異的に結合する前記抗原結合ドメインが、配列番号60のアミノ酸配列を含む重鎖を含む、請求項84～110のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 112】

前記第1の抗原結合ドメイン及び前記第2の抗原結合ドメインが、N297A、N297Q、D265A、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される同一の突然変異又はD265A、P329A、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される同一の突然変異を含む、請求項84～93又は101～111のいずれか一項に記載の抗体。

30

【請求項 113】

ヒトOX40に特異的に結合する前記抗原結合ドメイン及び前記第2の重鎖又はその断片が、N297A、N297Q、D265A、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される同一の突然変異又はD265A、P329A、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される同一の突然変異を含む、請求項94～111のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 114】

ヒトOX40に対してアンタゴニスト性である、請求項67又は80～113のいずれか一項に記載の抗体。

40

【請求項 115】

ヒトOX40の活性を不活性化するか、低下させるか、又は阻害する、請求項67又は80～114のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 116】

ヒトOX40のヒトOX40リガンドへの結合を阻害するか又は低下させる、請求項67又は80～115のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 117】

ヒトOX40シグナル伝達を阻害するか又は低下させる、請求項67又は80～116のいずれか一項に記載の抗体。

50

【請求項 118】

ヒトOX40リガンドによって誘導されるヒトOX40シグナル伝達を阻害するか又は低下させる、請求項67又は80～117のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 119】

検出可能標識を更に含む、請求項67又は80～118のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 120】

請求項67又は80～119のいずれか一項に記載の抗体と、薬学的に許容可能な賦形剤とを含む医薬組成物。

【請求項 121】

対象の免疫応答を調節する方法であって、請求項1～36若しくは46、67若しくは80～119のいずれか一項に記載の抗体又は請求項120に記載の医薬組成物の有効量を前記対象に投与するステップを含む方法。

10

【請求項 122】

免疫応答を調節することが、前記対象の前記免疫応答を低下させるか又は阻害することを含む、請求項120に記載の方法。

【請求項 123】

対象の自己免疫性又は炎症性疾患又は障害を治療する方法であって、請求項1～36若しくは46、67若しくは80～119のいずれか一項に記載の抗体又は請求項118に記載の医薬組成物の有効量を前記対象に投与するステップを含む方法。

【請求項 124】

前記疾患又は障害が、移植片拒絶反応、脈管炎、喘息、関節リウマチ、皮膚炎、炎症性腸疾患、ブドウ膜炎、及びループスからなる群から選択される、請求項123に記載の方法。

20

【請求項 125】

前記対象がヒトである、請求項121～124のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 126】

対象の感染症を治療する方法であって、請求項1～36若しくは46、67若しくは80～119のいずれか一項に記載の抗体、請求項37～41のいずれか一項に記載の核酸分子、請求項42に記載のベクター、請求項43若しくは44に記載の宿主細胞、又は請求項47、48若しくは120のいずれか一項に記載の医薬組成物の有効量を前記対象に投与するステップを含む方法。

30

【請求項 127】

チェックポイントターゲティング剤を前記対象に投与するステップを更に含む、請求項52又は53に記載の方法。

【請求項 128】

前記チェックポイントターゲティング剤が、アンタゴニスト抗PD-1抗体、アンタゴニスト抗PD-L1抗体、アンタゴニスト抗PD-L2抗体、アンタゴニスト抗CTLA-4抗体、アンタゴニスト抗TIM-3抗体、アンタゴニスト抗LAG-3抗体、アンタゴニスト抗CEACAM1抗体、アゴニスト抗GITR抗体、アゴニスト抗CD137抗体、及びアゴニスト抗OX40抗体からなる群から選択される、請求項127に記載の方法。

40

【請求項 129】

試料中のOX40を検出する方法であって、請求項67又は80～119のいずれか一項に記載の抗体に前記試料を接触させるステップを含む方法。

【請求項 130】

請求項67若しくは80～119のいずれか一項に記載の抗体又は請求項118に記載の医薬組成物と、a)検出試薬、b)OX40抗原、c)ヒト投与への使用若しくは販売の認可を反映する通知、又はd)これらの組み合わせとを含むキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

【0001】

配列表

本願は、ASCII形式で電子的に提出された配列表を含み、この配列表は本明細書によって全体として参照により援用される(2016年5月5日に作成された前記ASCII複製物は、名称3617_003PC04_ST25.txt、サイズが120,927バイトである)。

【0002】

本開示は、ヒトOX40受容体(「OX40」)に特異的に結合する抗体、かかる抗体を含む組成物、並びにOX40に特異的に結合する抗体を作製及び使用方法に関する。

10

【背景技術】

【0003】

ヒト腫瘍成長の制御における自然及び適応免疫応答の寄与は十分に特徴付けられている(Vesely MD et al., (2011) Annu Rev Immunol 29:235-271)。結果として、T細胞が発現する刺激受容体をアゴニスト抗体で標的化したり、又は抑制性受容体を機能性アンタゴニストで標的化したりするなど、癌療法のためにT細胞応答を増強することを目的とした抗体ベースの戦略が出現している(Mellman I et al., (2011) Nature 480:480-489)。抗体介在性アゴニスト及びアンタゴニスト手法は、前臨床活性及び最近では臨床活性を示している。T細胞、ナチュラルキラーT(NKT)細胞、及びNK細胞機能を調節する重要な刺激受容体は、OX40受容体である(OX40、CD134、TNFRSF4、TXGP1L、ACT35、及びACT-4としても知られる)(Sugamura K et al., (2004) Nat Rev Immunol 4:420-431)。OX40は腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー(TNFRSF)のメンバーであり、OX40を介したシグナル伝達は重要な免疫機能を調節し得る。

20

【0004】

OX40は、コグネイトペプチドが負荷されたMHCクラスI又はII分子を提示するプロフェッショナル抗原提示細胞(APC)によるT細胞受容体(TCR)刺激後に抗原特異的T細胞によって上方制御され得る(Sugamura K et al., (2004) Nat Rev Immunol 4:420-431)。樹状細胞(DC)などのAPCは、成熟すると、刺激B7ファミリーメンバー(例えば、CD80及びCD86)、並びにOX40リガンド(OX40L)を含めたアクセサリー共刺激分子(T細胞免疫応答の反応速度及び規模並びに有効な記憶細胞分化を整えることを促進する)を上方制御する。特に、他の細胞型、例えば、B細胞、血管内皮細胞、マスト細胞、及び場合により活性化T細胞も構成的及び/又は誘導的レベルのOX40Lを発現し得る(Soroosh P et al., (2006) J Immunol 176:5975-5987)。OX40:OX40L共会合は、より高次の受容体三量体クラスター形成及び続くシグナル伝達を駆動すると考えられている(Compaan DM et al., (2006) Structure 14:1321-1330)。

30

【0005】

腫瘍微小環境内のT細胞によるOX40発現がマウス及びヒト腫瘍組織で観察されている(Bulliard Y et al., (2014) Immunol Cell Biol 92:475-480及びPiconese S et al., (2014) Hepatology 60:1494-1507)。OX40は、従来のT細胞集団と比べて腫瘍内の調節性T細胞(Treg)集団に高度に発現し、それらの増殖状態に帰される特徴である(Waight JD et al., (2015) J Immunol 194:878-882及びBulliard Y et al., (2014) Immunol Cell Biol 92:475-480)。初期の研究において、OX40アゴニスト抗体がマウスモデルにおいて腫瘍拒絶を誘発可能であることが実証された(Weinberg AD et al., (2000) J Immunol 164:

40

50

2160 - 2169 及び Piconese S et al. , (2008) J Exp Med 205 : 825 - 839)。ヒトOX40シグナル伝達をアゴナイズするマウス抗体も癌患者の免疫機能を増強することが示されている (Curti BD et al. , (2013) Cancer Res 73 : 7189 - 7198)。

OX40及びOX40L相互作用はまた、喘息/アトピー、脳脊髄炎、関節リウマチ、大腸炎/炎症性腸疾患、移植片対宿主病(例えば、移植片拒絶反応)、非肥満糖尿病マウスにおける糖尿病、及びアテローム性動脈硬化症のマウスモデルを含め、炎症性及び自己免疫性の疾患及び障害における免疫応答とも関連付けられている (Croft M et al. , (2009) Immunol Rev 229 (1) : 173 - 191、及びそこに引用される文献)。OX40欠損及びOX40L欠損マウス、細胞増殖抑制薬を負荷した抗OX40リポソームの投与を受けたマウス、及び抗OX40L遮断抗体又はヒト免疫グロブリンのFc部分と融合した組換えOX40でOX40及びOX40L相互作用が遮断されたマウスにおいて、これらの疾患及び障害に関連する症候の低減が報告されている (Croft M et al. ; Boot EPJ et al. , (2005) Arthritis Res Ther 7 : R604 - 615 ; Weinberg A D et al. , (1999) J Immunol 162 : 1818 - 1826)。遮断抗OX40L抗体による治療はまた、アカゲザル喘息モデルにおいてTh2炎症を阻害することも示された (Croft M et al. ; Seshasayee D et al. , (2007) J Clin Invest 117 : 3868 - 3878)。加えて、OX40Lの多型がループスと関連付けられている (Croft M et al.)。

10

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Vesely MD et al. , (2011) Annu Rev Immunol 29 : 235 - 271

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

免疫応答の調節におけるヒトOX40の役割を所与として、本明細書には、OX40に特異的に結合する抗体及びOX40活性を調節するためのこれらの抗体の使用が提供される。

30

【課題を解決するための手段】

【0008】

一態様において、本明細書には、OX40(例えば、ヒトOX40)に特異的に結合する抗体が提供される。

【0009】

一実施形態において、OX40に特異的に結合する抗体は、配列番号16のVH CDR1を含む重鎖可変領域(VH)CDR1と、配列番号16のVH CDR2を含むVH CDR2と、配列番号16のVH CDR3を含むVH CDR3と、配列番号15のVL CDR1を含む軽鎖可変領域(VL)CDR1と、配列番号15のVL CDR2を含むVL CDR2と、配列番号15のVL CDR3を含むVL CDR3とを含み、ここで、各CDRは、Kabata定義、Chothia定義、Kabata定義とChothia定義との組み合わせ、IMGT付番方式、AbM定義、又はCDRのコンタクト定義に従い定義される。

40

【0010】

一実施形態において、OX40に特異的に結合する抗体は、(a)GSAMH(配列番号4)のアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域1(CDR1)と、RIRSKANSYATA Y A A S V K G(配列番号5)のアミノ酸配列を含む重鎖CDR2と、GIYDS S G Y D Y(配列番号6)のアミノ酸配列を含む重鎖CDR3とを含む重鎖可変領域と、

50

(b) RSSQSLLHSNGYNYLD (配列番号1)のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1と、LGSNRAS (配列番号2)のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2と、MQALQPLT (配列番号3)のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3とを含む軽鎖可変領域を含む。

【0011】

一実施形態において、OX40に特異的に結合する抗体は、(a)GFTFSGSA (配列番号47)のアミノ酸配列を含む重鎖CDR1と、IRSKANSYAT (配列番号48)のアミノ酸配列を含む重鎖CDR2と、TSGIYDSSGYDY (配列番号49)のアミノ酸配列を含む重鎖CDR3とを含む重鎖可変領域と、(b)QSLLHSNGYNY (配列番号44)のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1と、LGS (配列番号45)のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2と、MQALQPLT (配列番号46)のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3とを含む軽鎖可変領域を含む。

10

【0012】

一実施形態において、本抗体は、ヒト又はヒト由来フレームワーク領域を有する重鎖可変領域を含む。

【0013】

一実施形態において、本抗体は、ヒト遺伝子によってコードされるアミノ酸配列に由来する重鎖可変フレームワーク領域を含み、前記アミノ酸配列はIGHV3-73*01 (配列番号19)を含む。

20

【0014】

一実施形態において、本抗体は、ヒト又はヒト由来フレームワーク領域を有する軽鎖可変配列を含む。

【0015】

一実施形態において、本抗体は、ヒト遺伝子によってコードされるアミノ酸配列に由来する軽鎖可変フレームワーク領域を含み、前記アミノ酸配列はIGKV2-28*01 (配列番号18)を含む。

【0016】

一実施形態において、本抗体は、配列番号16のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域配列を含む。

30

【0017】

一実施形態において、本抗体は、配列番号21、23、51、及び52からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖配列を含む。一実施形態において、本抗体は、配列番号60~63からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖配列を含む。

【0018】

一実施形態において、本抗体は、配列番号15のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域配列を含む。

【0019】

一実施形態において、本抗体は、配列番号20のアミノ酸配列を含む軽鎖配列を含む。

【0020】

一実施形態において、OX40に特異的に結合する抗体は重鎖可変領域と軽鎖可変領域とを含み、重鎖可変領域は配列番号16のアミノ酸配列を含む。

40

【0021】

一実施形態において、OX40に特異的に結合する抗体は重鎖可変領域と軽鎖可変領域とを含み、軽鎖可変領域は配列番号15のアミノ酸配列を含む。

【0022】

一実施形態において、OX40に特異的に結合する抗体は、配列番号16のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号15のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む。

【0023】

一実施形態において、本抗体は、配列番号21のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号20のアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む。一実施形態において、本抗体は、配列番号60

50

のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号 20 のアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む。

【0024】

一実施形態において、本抗体は、配列番号 23 のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号 20 のアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む。一実施形態において、本抗体は、配列番号 61 のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号 20 のアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む。

【0025】

一実施形態において、本抗体は、配列番号 51 又は 52 のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号 20 のアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む。一実施形態において、本抗体は、配列番号 62 又は 63 のアミノ酸配列を含む重鎖と、配列番号 20 のアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む。

【0026】

一実施形態において、本抗体は重鎖及び / 又は軽鎖定常領域を含む。一実施形態において、重鎖定常領域は、ヒト免疫グロブリン I g G₁、I g G₂、I g G₃、I g G₄、I g A₁、及び I g A₂ からなる群から選択される。一実施形態において、I g G₁ は非フコシル化 I g G₁ である。一実施形態において、I g G₁ のアミノ酸配列は N 2 9 7 A 突然変異を含む。一実施形態において、I g G₁ のアミノ酸配列は、D 2 6 5 A、P 3 2 9 A、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される突然変異を含む。一実施形態において、I g G₁ のアミノ酸配列は N 2 9 7 Q 突然変異を含む。一実施形態において、I g G₄ のアミノ酸配列は S 2 2 8 P 突然変異を含む。一実施形態において、I g G₂ のアミノ酸配列は C 1 2 7 S 突然変異を含む。一実施形態において、重鎖定常領域は、配列番号 3 2 ~ 3 7、5 3 ~ 5 4、及び 6 4 ~ 7 1 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一実施形態において、軽鎖定常領域は、ヒト免疫グロブリン I g G₁ 及び I g G₂ からなる群から選択される。

【0027】

一実施形態において、本抗体はヒト抗体である。

【0028】

一実施形態において、O X 4 0 に特異的に結合する抗体は、G S A M H (配列番号 4) のアミノ酸配列を含む V H C D R 1 と、R I R S K A N S Y A T A Y A A S V K G (配列番号 5) のアミノ酸配列を含む V H C D R 2 と、G I Y D S S G Y D Y (配列番号 6) のアミノ酸配列を含む V H C D R 3 と、R S S Q S L L H S N G Y N Y L D (配列番号 1) のアミノ酸配列を含む V L C D R 1 と、L G S N R A S (配列番号 2) のアミノ酸配列を含む V L C D R 2 と、M Q A L Q T P L T (配列番号 3) のアミノ酸配列を含む V L C D R 3 とを含む抗体と同じヒト O X 4 0 のエピトープに結合する。一実施形態において、O X 4 0 に特異的に結合する抗体は、G F T F S G S A (配列番号 47) のアミノ酸配列を含む V H C D R 1 と、I R S K A N S Y A T (配列番号 48) のアミノ酸配列を含む V H C D R 2 と、T S G I Y D S S G Y D Y (配列番号 49) のアミノ酸配列を含む V H C D R 3 と、Q S L L H S N G Y N Y (配列番号 44) のアミノ酸配列を含む V L C D R 1 と、L G S (配列番号 45) のアミノ酸配列を含む V L C D R 2 と、M Q A L Q T P L T (配列番号 46) のアミノ酸配列を含む V L C D R 3 とを含む抗体と同じヒト O X 4 0 のエピトープに結合する。一実施形態において、O X 4 0 に特異的に結合する抗体は、配列番号 16 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号 15 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む抗体と同じヒト O X 4 0 のエピトープに結合する。

【0029】

一実施形態において、本抗体はアゴニスト性である。一実施形態において、本抗体はヒト O X 4 0 の活性を活性化するか、増強するか、又は誘導する。一実施形態において、本抗体は C D 4 + T 細胞増殖を誘導する。一実施形態において、C D 4 + T 細胞増殖は抗体の濃度の実質的増加関数である。一実施形態において、C D 4 + T 細胞増殖はシグモイド用量反応曲線を示す。一実施形態において、本抗体は、抗 C D 3 刺激 T 細胞による I L - 2、T N F、I F N、I L - 4、I L - 1 0、I L - 1 3、又はこれらの組み

10

20

30

40

50

合わせの産生を誘導する。一実施形態において、本抗体は、抗CD3刺激末梢血単核細胞(PBMC)によるTNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-4、IL-10、IL-13、又はこれらの組み合わせの産生を誘導する。一実施形態において、本抗体は、抗CD3刺激PBMCによるTNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生を誘導し、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13のこの産生は抗体の濃度の実質的増加関数である。一実施形態において、本抗体は、抗CD3刺激PBMCによるTNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生を誘導し、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13のこの産生は、シグモイド用量反応曲線を示す。一実施形態において、本抗体はSEA刺激T細胞によるIL-2の産生を誘導し、且つSEA刺激T細胞によるIL-10の産生を抑制する。一実施形態において、本抗体はSEA刺激末梢血単核細胞(PBMC)によるIL-2産生を誘導し、且つSEA刺激PBMCによるIL-2産生を抑制する。一実施形態において、本抗体はSEA刺激PBMCによるIL-2産生を誘導し、このIL-2産生は抗体の濃度の実質的増加関数である。一実施形態において、本抗体はSEA刺激PBMCによるIL-2産生を誘導し、このIL-2産生はシグモイド用量反応曲線を示す。

10

【0030】

一実施形態において、本抗体は調節性T細胞によるエフェクターT細胞の抑制を軽減する。

20

【0031】

一実施形態において、本抗体はエフェクターT細胞と調節性T細胞との共培養によるIL-2産生を誘導し、且つエフェクターT細胞と調節性T細胞との共培養によるIL-10産生を抑制する。

【0032】

一実施形態において、OX40に特異的に結合する抗体は、GSAMH(配列番号4)のアミノ酸配列を含むVH CDR1と、RIRSKANSYATAYAAASVKG(配列番号5)のアミノ酸配列を含むVH CDR2と、GIYDSSGYDY(配列番号6)のアミノ酸配列を含むVH CDR3と、RSSQSLLHSNGYNYLD(配列番号1)のアミノ酸配列を含むVL CDR1と、LGSNRAS(配列番号2)のアミノ酸配列を含むVL CDR2と、MQALQTPLT(配列番号3)のアミノ酸配列を含むVL CDR3とを含み、この抗体は、ブドウ球菌(*Staphylococcus*)エンテロトキシンA(SEA)(例えば、100ng/ml)との組み合わせで、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)によって計測されるとおり、例えば37、5%CO₂、及び97%湿度における例えば5日間の刺激時に例えばPBMCにおいてIL-2産生を誘導し、このIL-2産生は、例えば、0.032µg/ml~20µg/ml、0.16µg/ml~20µg/ml、0.8µg/ml~20µg/ml、4µg/ml~20µg/ml、0.032µg/ml~4µg/ml、0.16µg/ml~4µg/ml、又は0.8µg/ml~4µg/mlにおいて抗体濃度の実質的増加関数である。IL-2産生は、例えば、以下のステップ:(a)種々の濃度(例えば、20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、及び0.000256µg/ml)の抗体、及び例えば100ng/mlのSEAの非存在下又は存在下でPBMC(例えば、1ウェル10⁵細胞)を例えば37、5%CO₂、及び97%湿度において例えば5日間培養するステップ;及び(b)清澄化した上清を収集し、IL-2の力価を、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)によって計測するステップを含むアッセイで評価することができる。一実施形態において、OX40に特異的に結合する抗体は、GSAMH(配列番号4)のアミノ酸配列を含むVH CDR1と、RIRSKANSYATAYAAASVKG(配列番号5)のアミノ酸配列を含むVH CDR2と、GIYDS

30

40

50

S G Y D Y (配列番号6)のアミノ酸配列を含むVH CDR3と、R S S Q S L L H S N G Y N Y L D (配列番号1)のアミノ酸配列を含むVL CDR1と、L G S N R A S (配列番号2)のアミノ酸配列を含むVL CDR2と、M Q A L Q T P L T (配列番号3)のアミノ酸配列を含むVL CDR3とを含み、この抗体は、ブドウ球菌 (*Staphylococcus*) エンテロトキシンA (SEA) (例えば、100 ng/ml)との組み合わせで、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット (Meso Scale Discovery) によって計測されるとおり、例えば37℃、5% CO₂、及び97%湿度における例えば5日間の刺激時に例えばPBMCにおいてIL-2産生を誘導し、このIL-2産生は、抗OX40抗体濃度が例えば0.032 µg/ml ~ 20 µg/ml、0.16 µg/ml ~ 20 µg/ml、0.8 µg/ml ~ 20 µg/ml、4 µg/ml ~ 20 µg/ml、0.032 µg/ml ~ 4 µg/ml、0.16 µg/ml ~ 4 µg/ml、又は0.8 µg/ml ~ 4 µg/mlのとき、例えば、以下のステップ：(a)種々の濃度(例えば、20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、及び0.000256 µg/ml)の抗体、及び例えば100 ng/mlのSEAの非存在下又は存在下でPBMC(例えば、1ウェル10⁵細胞)を例えば37℃、5% CO₂、及び97%湿度において例えば5日間培養するステップ；及び(b)清澄化した上清を収集し、IL-2の力価を、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット (Meso Scale Discovery) によって計測するステップを含むアッセイで評価されるとおり、シグモイド用量反応曲線を示す。

10

20

【0033】

一実施形態において、OX40に特異的に結合する抗体は、G S A M H (配列番号4)のアミノ酸配列を含むVH CDR1と、R I R S K A N S Y A T A Y A A S V K G (配列番号5)のアミノ酸配列を含むVH CDR2と、G I Y D S S G Y D Y (配列番号6)のアミノ酸配列を含むVH CDR3と、R S S Q S L L H S N G Y N Y L D (配列番号1)のアミノ酸配列を含むVL CDR1と、L G S N R A S (配列番号2)のアミノ酸配列を含むVL CDR2と、M Q A L Q T P L T (配列番号3)のアミノ酸配列を含むVL CDR3とを含み、この抗体は、ブドウ球菌 (*Staphylococcus*) エンテロトキシンA (SEA) (例えば、100 ng/ml)との組み合わせで、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット (Meso Scale Discovery) によって計測されるとおり、例えば37℃、5% CO₂、及び97%湿度における例えば5日間の刺激時に例えばPBMCにおいてIL-2産生を誘導し、このIL-2産生は0.032 µg/mlの抗体の存在下と比べて4 µg/mlの抗体の存在下においてより高い。IL-2産生は、例えば、以下のステップ：(a)種々の濃度(例えば、20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、及び0.000256 µg/ml)の抗体、及び例えば100 ng/mlのSEAの非存在下又は存在下でPBMC(例えば、1ウェル10⁵細胞)を例えば37℃、5% CO₂、及び97%湿度において例えば5日間培養するステップ；及び(b)清澄化した上清を収集し、IL-2の力価を、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット (Meso Scale Discovery) によって計測するステップを含むアッセイで評価することができる。

30

40

【0034】

一実施形態において、OX40に特異的に結合する抗体は、G S A M H (配列番号4)のアミノ酸配列を含むVH CDR1と、R I R S K A N S Y A T A Y A A S V K G (配列番号5)のアミノ酸配列を含むVH CDR2と、G I Y D S S G Y D Y (配列番号6)のアミノ酸配列を含むVH CDR3と、R S S Q S L L H S N G Y N Y L D (配列番号1)のアミノ酸配列を含むVL CDR1と、L G S N R A S (配列番号2)のアミノ酸配列を含むVL CDR2と、M Q A L Q T P L T (配列番号3)のアミノ酸配列を含むVL CDR3とを含み、この抗体は、プレート結合時、プレート結合抗CD3抗体(例えば、0.8 µg/ml)との組み合わせで、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1

50

/ TH2 10 - Plex 組織培養キット (Meso Scale Discovery) 又は非ヒト霊長類 (NHP) V - Plex アッセイキット (Meso Scale Discovery) によって計測されるとおり、例えば 37 及び 5% CO₂ における例えば 4 日間の刺激時に例えば PBMC 又は T 細胞において 1 つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又は IL-13 の産生を誘導し、この 1 つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又は IL-13 の産生は、例えば、以下のステップ: (a) プレート結合抗 CD3 抗体 (例えば、0.8 µg/ml) 及び種々の濃度 (例えば、0、0.3、1、3、6、12、25、及び 50 µg/ml; 又は 0、0.7、1.6、3.1、6.3、12.5、25、又は 50 µg/ml) のプレート結合抗体の存在下で PBMC を例えば 37 及び 5% CO₂ において例えば 4 日間培養するステップ; 及び (b) 上清を収集し、1 つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又は IL-13 の産生を、例えば電気化学発光、例えばヒト TH1/TH2 10 - Plex 組織培養キット (Meso Scale Discovery) 又は非ヒト霊長類 (NHP) V - Plex アッセイキット (Meso Scale Discovery) によって計測するステップを含むアッセイで評価されるとおり、例えば、0.7 µg/ml ~ 50 µg/ml、1.6 µg/ml ~ 50 µg/ml、3.1 µg/ml ~ 50 µg/ml、又は 6.3 µg/ml ~ 50 µg/ml において抗体の濃度の実質的増加関数である。一実施形態において、OX40 に特異的に結合する抗体は、GSAMH (配列番号 4) のアミノ酸配列を含む VH CDR1 と、RIRSKANSYATAYAA SVKG (配列番号 5) のアミノ酸配列を含む VH CDR2 と、GIYDSSGYDY (配列番号 6) のアミノ酸配列を含む VH CDR3 と、RSSQSLLSNGYNYLD (配列番号 1) のアミノ酸配列を含む VL CDR1 と、LGSNRAS (配列番号 2) のアミノ酸配列を含む VL CDR2 と、MQALQPLT (配列番号 3) のアミノ酸配列を含む VL CDR3 とを含み、この抗体は、プレート結合時、プレート結合抗 CD3 抗体 (例えば、0.8 µg/ml) との組み合わせで、例えば電気化学発光、例えばヒト TH1/TH2 10 - Plex 組織培養キット (Meso Scale Discovery) 又は非ヒト霊長類 (NHP) V - Plex アッセイキット (Meso Scale Discovery) によって計測されるとおり、例えば 37 及び 5% CO₂ における例えば 4 日間の刺激時に例えば PBMC 又は T 細胞において 1 つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又は IL-13 の産生を誘導し、この 1 つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又は IL-13 の産生は、抗 OX40 抗体濃度が例えば 0.7 µg/ml ~ 50 µg/ml、1.6 µg/ml ~ 50 µg/ml、3.1 µg/ml ~ 50 µg/ml、又は 6.3 µg/ml ~ 50 µg/ml のとき、例えば、以下のステップ: (a) プレート結合抗 CD3 抗体 (例えば、0.8 µg/ml) 及び種々の濃度 (例えば、0、0.3、1、3、6、12、25、及び 50 µg/ml; 又は 0、0.7、1.6、3.1、6.3、12.5、25、又は 50 µg/ml) のプレート結合抗体の存在下で PBMC を例えば 37 及び 5% CO₂ において例えば 4 日間培養するステップ; 及び (b) 上清を収集し、1 つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又は IL-13 の産生を、例えば電気化学発光、例えばヒト TH1/TH2 10 - Plex 組織培養キット (Meso Scale Discovery) 又は非ヒト霊長類 (NHP) V - Plex アッセイキット (Meso Scale Discovery) によって計測するステップを含むアッセイで評価されるとおり、シグモイド用量反応曲線を示す。

【0035】

一実施形態において、OX40 に特異的に結合する抗体は、GSAMH (配列番号 4) のアミノ酸配列を含む VH CDR1 と、RIRSKANSYATAYAA SVKG (配列番号 5) のアミノ酸配列を含む VH CDR2 と、GIYDSSGYDY (配列番号 6

) のアミノ酸配列を含む V H C D R 3 と、 R S S Q S L L H S N G Y N Y L D (配列番号 1) のアミノ酸配列を含む V L C D R 1 と、 L G S N R A S (配列番号 2) のアミノ酸配列を含む V L C D R 2 と、 M Q A L Q T P L T (配列番号 3) のアミノ酸配列を含む V L C D R 3 とを含み、この抗体は C D 4 + T 細胞増殖を増加させ、この C D 4 + T 細胞増殖は、例えば、以下のステップ： (a) 例えばエンリッチド C D 4 + T 細胞を例えば 1 0 μ M カルボキシフルオレセイン二酢酸スクシンイミジルエステル (C F S E) によって例えば 3 7 で例えば 7 分間標識するステップ； (b) 綿密に洗浄した後、細胞 (例えば、 1 ウェル 1 0 ⁵ 細胞) を例えば 3 μ g / m l の例えばプレート結合抗 C D 3 抗体及び種々の濃度 (例えば、 0 . 0 0 2、 0 . 0 2、 0 . 2、 2、及び 2 0 μ g / m l) の例えば本明細書に記載されるプレート結合抗体によって例えば 3 7 及び 5 % C O ₂ で刺激するステップ；及び (c) 例えば 4 日目に、細胞を例えば抗 C D 4 抗体で染色し、例えばフローサイトメトリーによって C F S E 低 C D 4 + 細胞の割合を計測することにより C D 4 + T 細胞増殖を調べるステップを含むアッセイで評価されるとおり、例えば 0 . 2 μ g / m l ~ 2 0 μ g / m l、又は 2 μ g / m l ~ 2 0 μ g / m l において抗体の濃度の実質的増加関数である。一実施形態において、 O X 4 0 に特異的に結合する抗体は、 G S A M H (配列番号 4) のアミノ酸配列を含む V H C D R 1 と、 R I R S K A N S Y A T A Y A A S V K G (配列番号 5) のアミノ酸配列を含む V H C D R 2 と、 G I Y D S S G Y D Y (配列番号 6) のアミノ酸配列を含む V H C D R 3 と、 R S S Q S L L H S N G Y N Y L D (配列番号 1) のアミノ酸配列を含む V L C D R 1 と、 L G S N R A S (配列番号 2) のアミノ酸配列を含む V L C D R 2 と、 M Q A L Q T P L T (配列番号 3) のアミノ酸配列を含む V L C D R 3 とを含み、この抗体は C D 4 + T 細胞増殖を増加させ、この C D 4 + T 細胞増殖は、抗 O X 4 0 抗体濃度が例えば 0 . 2 μ g / m l ~ 2 0 μ g / m l、又は 2 μ g / m l ~ 2 0 μ g / m l のとき、例えば、以下のステップ： (a) 例えばエンリッチド C D 4 + T 細胞を例えば 1 0 μ M カルボキシフルオレセイン二酢酸スクシンイミジルエステル (C F S E) によって例えば 3 7 で例えば 7 分間標識するステップ； (b) 綿密に洗浄した後、細胞 (例えば、 1 ウェル 1 0 ⁵ 細胞) を例えば 3 μ g / m l の例えばプレート結合抗 C D 3 抗体及び種々の濃度 (例えば、 0 . 0 0 2、 0 . 0 2、 0 . 2、 2、及び 2 0 μ g / m l) の例えば本明細書に記載されるプレート結合抗体によって例えば 3 7 及び 5 % C O ₂ で刺激するステップ；及び (c) 例えば 4 日目に、細胞を例えば抗 C D 4 抗体で染色し、例えばフローサイトメトリーによって C F S E 低 C D 4 + 細胞の割合を計測することにより C D 4 + T 細胞増殖を調べるステップを含むアッセイで評価されるとおり、シグモイド用量反応曲線を示す。

【 0 0 3 6 】

一実施形態において、 O X 4 0 に特異的に結合する抗体は、 G S A M H (配列番号 4) のアミノ酸配列を含む V H C D R 1 と、 R I R S K A N S Y A T A Y A A S V K G (配列番号 5) のアミノ酸配列を含む V H C D R 2 と、 G I Y D S S G Y D Y (配列番号 6) のアミノ酸配列を含む V H C D R 3 と、 R S S Q S L L H S N G Y N Y L D (配列番号 1) のアミノ酸配列を含む V L C D R 1 と、 L G S N R A S (配列番号 2) のアミノ酸配列を含む V L C D R 2 と、 M Q A L Q T P L T (配列番号 3) のアミノ酸配列を含む V L C D R 3 とを含み、この抗体は、例えば、以下のステップ： (a) 例えばエンリッチド C D 4 + T 細胞を例えば 1 0 μ M カルボキシフルオレセイン二酢酸スクシンイミジルエステル (C F S E) によって例えば 3 7 で例えば 7 分間標識するステップ； (b) 綿密に洗浄した後、細胞 (例えば、 1 ウェル 1 0 ⁵ 細胞) を例えば 3 μ g / m l の例えばプレート結合抗 C D 3 抗体及び種々の濃度 (例えば、 0 . 0 0 2、 0 . 0 2、 0 . 2、 2、及び 2 0 μ g / m l) の例えば本明細書に記載されるプレート結合抗体によって例えば 3 7 及び 5 % C O ₂ で刺激するステップ；及び (c) 例えば 4 日目に、細胞を例えば抗 C D 4 抗体で染色し、例えばフローサイトメトリーによって C F S E 低 C D 4 + 細胞の割合を計測することにより C D 4 + T 細胞増殖を調べるステップを含むアッセイで評価されるとおり、抗体が 2 μ g / m l の濃度よりも 2 0 μ g / m l の濃度で存在するときに C D 4 + T 細胞増殖の増加が大きくなる。

【0037】

一実施形態において、抗体は、配列番号15のアミノ酸配列と少なくとも70%の同一性を有するVLDメインと、配列番号16のアミノ酸配列と少なくとも70%の同一性を有するVHドメインとを含み、この抗体は、ブドウ球菌 (*Staphylococcus*) エンテロトキシンA (SEA) (例えば、100 ng/ml) との組み合わせで、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット (Meso Scale Discovery) によって計測されるとおり、例えば37、5% CO₂、及び97%湿度における例えば5日間の刺激時に例えばPBMCにおいてIL-2産生を誘導し、このIL-2産生は、例えば、0.032 µg/ml ~ 20 µg/ml、0.16 µg/ml ~ 20 µg/ml、0.8 µg/ml ~ 20 µg/ml、4 µg/ml ~ 20 µg/ml、0.032 µg/ml ~ 4 µg/ml、0.16 µg/ml ~ 4 µg/ml、又は0.8 µg/ml ~ 4 µg/mlにおいて抗体濃度の実質的増加関数である。IL-2産生は、例えば、以下のステップ：(a) 種々の濃度 (例えば、20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、及び0.000256 µg/ml) の抗体、及び例えば100 ng/mlのSEAの非存在下又は存在下でPBMC (例えば、1ウェル10⁵細胞) を例えば37、5% CO₂、及び97%湿度において例えば5日間培養するステップ；及び(b) 清澄化した上清を収集し、IL-2の力価を、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット (Meso Scale Discovery) によって計測するステップを含むアッセイで評価することができる。一実施形態において、抗体は、配列番号15のアミノ酸配列と少なくとも70%の同一性を有するVLDメインと、配列番号16のアミノ酸配列と少なくとも70%の同一性を有するVHドメインとを含み、この抗体は、ブドウ球菌 (*Staphylococcus*) エンテロトキシンA (SEA) (例えば、100 ng/ml) との組み合わせで、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット (Meso Scale Discovery) によって計測されるとおり、例えば37、5% CO₂、及び97%湿度における例えば5日間の刺激時に例えばPBMCにおいてIL-2産生を誘導し、このIL-2産生は、抗OX40抗体濃度が例えば0.032 µg/ml ~ 20 µg/ml、0.16 µg/ml ~ 20 µg/ml、0.8 µg/ml ~ 20 µg/ml、4 µg/ml ~ 20 µg/ml、0.032 µg/ml ~ 4 µg/ml、0.16 µg/ml ~ 4 µg/ml、又は0.8 µg/ml ~ 4 µg/mlのとき、例えば、以下のステップ：(a) 種々の濃度 (例えば、20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、及び0.000256 µg/ml) の抗体、及び例えば100 ng/mlのSEAの非存在下又は存在下でPBMC (例えば、1ウェル10⁵細胞) を例えば37、5% CO₂、及び97%湿度において例えば5日間培養するステップ；及び(b) 清澄化した上清を収集し、IL-2の力価を、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット (Meso Scale Discovery) によって計測するステップを含むアッセイで評価されるとおり、シグモイド用量反応曲線を示す。

【0038】

一実施形態において、抗体は、配列番号15のアミノ酸配列と少なくとも70%の同一性を有するVLDメインと、配列番号16のアミノ酸配列と少なくとも70%の同一性を有するVHドメインとを含み、この抗体は、ブドウ球菌 (*Staphylococcus*) エンテロトキシンA (SEA) (例えば、100 ng/ml) との組み合わせで、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット (Meso Scale Discovery) によって計測されるとおり、例えば37、5% CO₂、及び97%湿度における例えば5日間の刺激時に例えばPBMCにおいてIL-2産生を誘導し、このIL-2産生は0.032 µg/mlの抗体の存在下と比べて4 µg/mlの抗体の存在下においてより高い。IL-2産生は、例えば、以下のステップ：(a) 種々の濃度 (例えば、20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、及び0.000256 µg/ml) の抗体、及び例えば100 ng/ml

の S E A の非存在下又は存在下で P B M C (例 えば、 1 ウェル 10^5 細胞) を 例 えば 37、 5 % CO_2 、 及 び 97 % 湿 度 に お い て 例 えば 5 日 間 培 養 す る ス テ ッ プ ; 及 び (b) 清 澄 化 し た 上 清 を 収 集 し、 I L - 2 の 力 価 を、 例 えば 電 気 化 学 発 光、 例 えば ヒ ト T H 1 / T H 2 10 - P l e x 組 織 培 養 キ ャ ッ ト (M e s o S c a l e D i s c o v e r y) に よ っ て 計 測 す る ス テ ッ プ を 含 む ア ッ セ イ で 評 価 す る こ と が で き る。

【 0 0 3 9 】

一 実 施 形 態 に お い て、 抗 体 は、 配 列 番 号 1 5 の ア ミ ノ 酸 配 列 と 少 なく とも 7 5 % の 同 一 性 を 有 す る V L ド メ イ ン と、 配 列 番 号 1 6 の ア ミ ノ 酸 配 列 と 少 なく とも 7 5 % の 同 一 性 を 有 す る V H ド メ イ ン と を 含 み、 こ の 抗 体 は、 ブ ド ウ 球 菌 (S t a p h y l o c o c c u s) エ ン テ ロ ト キ シ ン A (S E A) (例 えば、 100 ng/ml) と の 組 み 合 わ せ で、 例 えば 電 気 化 学 発 光、 例 えば ヒ ト T H 1 / T H 2 10 - P l e x 組 織 培 養 キ ャ ッ ト (M e s o S c a l e D i s c o v e r y) に よ っ て 計 測 さ れ る と お り、 例 えば 37、 5 % CO_2 、 及 び 97 % 湿 度 に お け る 例 えば 5 日 間 の 刺 激 時 に 例 えば P B M C に お い て I L - 2 産 生 を 誘 導 し、 こ の I L - 2 産 生 は、 例 えば、 $0.032\text{ }\mu\text{g/ml} \sim 20\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、 $0.16\text{ }\mu\text{g/ml} \sim 20\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、 $0.8\text{ }\mu\text{g/ml} \sim 20\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、 $4\text{ }\mu\text{g/ml} \sim 20\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、 $0.032\text{ }\mu\text{g/ml} \sim 4\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、 $0.16\text{ }\mu\text{g/ml} \sim 4\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、 又 は $0.8\text{ }\mu\text{g/ml} \sim 4\text{ }\mu\text{g/ml}$ に お い て 抗 体 濃 度 の 実 質 的 増 加 関 数 で あ る。 I L - 2 産 生 は、 例 えば、 以 下 の ス テ ッ プ : (a) 種 々 の 濃 度 (例 えば、 20、 4、 0.8、 0.16、 0.032、 0.0064、 0.00128、 及 び 0.000256 $\mu\text{g/ml}$) の 抗 体、 及 び 例 えば 100 ng/ml の S E A の 非 存 在 下 又 は 存 在 下 で P B M C (例 えば、 1 ウェル 10^5 細胞) を 例 えば 37、 5 % CO_2 、 及 び 97 % 湿 度 に お い て 例 えば 5 日 間 培 養 す る ス テ ッ プ ; 及 び (b) 清 澄 化 し た 上 清 を 収 集 し、 I L - 2 の 力 価 を、 例 えば 電 気 化 学 発 光、 例 えば ヒ ト T H 1 / T H 2 10 - P l e x 組 織 培 養 キ ャ ッ ト (M e s o S c a l e D i s c o v e r y) に よ っ て 計 測 す る ス テ ッ プ を 含 む ア ッ セ イ で 評 価 す る こ と が で き る。 一 実 施 形 態 に お い て、 抗 体 は、 配 列 番 号 1 5 の ア ミ ノ 酸 配 列 と 少 なく とも 7 5 % の 同 一 性 を 有 す る V L ド メ イ ン と、 配 列 番 号 1 6 の ア ミ ノ 酸 配 列 と 少 なく とも 7 5 % の 同 一 性 を 有 す る V H ド メ イ ン と を 含 み、 こ の 抗 体 は、 ブ ド ウ 球 菌 (S t a p h y l o c o c c u s) エ ン テ ロ ト キ シ ン A (S E A) (例 えば、 100 ng/ml) と の 組 み 合 わ せ で、 例 えば 電 気 化 学 発 光、 例 えば ヒ ト T H 1 / T H 2 10 - P l e x 組 織 培 養 キ ャ ッ ト (M e s o S c a l e D i s c o v e r y) に よ っ て 計 測 さ れ る と お り、 例 えば 37、 5 % CO_2 、 及 び 97 % 湿 度 に お け る 例 えば 5 日 間 の 刺 激 時 に 例 えば P B M C に お い て I L - 2 産 生 を 誘 導 し、 こ の I L - 2 産 生 は、 抗 O X 40 抗 体 濃 度 が 例 えば $0.032\text{ }\mu\text{g/ml} \sim 20\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、 $0.16\text{ }\mu\text{g/ml} \sim 20\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、 $0.8\text{ }\mu\text{g/ml} \sim 20\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、 $4\text{ }\mu\text{g/ml} \sim 20\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、 $0.032\text{ }\mu\text{g/ml} \sim 4\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、 $0.16\text{ }\mu\text{g/ml} \sim 4\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、 又 は $0.8\text{ }\mu\text{g/ml} \sim 4\text{ }\mu\text{g/ml}$ の と き、 例 えば、 以 下 の ス テ ッ プ : (a) 種 々 の 濃 度 (例 えば、 20、 4、 0.8、 0.16、 0.032、 0.0064、 0.00128、 及 び 0.000256 $\mu\text{g/ml}$) の 抗 体、 及 び 例 えば 100 ng/ml の S E A の 非 存 在 下 又 は 存 在 下 で P B M C (例 えば、 1 ウェル 10^5 細胞) を 例 えば 37、 5 % CO_2 、 及 び 97 % 湿 度 に お い て 例 えば 5 日 間 培 養 す る ス テ ッ プ ; 及 び (b) 清 澄 化 し た 上 清 を 収 集 し、 I L - 2 の 力 価 を、 例 えば 電 気 化 学 発 光、 例 えば ヒ ト T H 1 / T H 2 10 - P l e x 組 織 培 養 キ ャ ッ ト (M e s o S c a l e D i s c o v e r y) に よ っ て 計 測 す る ス テ ッ プ を 含 む ア ッ セ イ で 評 価 さ れ る と お り、 シ グ モ イ ド 用 量 反 応 曲 線 を 示 す。

【 0 0 4 0 】

一 実 施 形 態 に お い て、 抗 体 は、 配 列 番 号 1 5 の ア ミ ノ 酸 配 列 と 少 なく とも 7 5 % の 同 一 性 を 有 す る V L ド メ イ ン と、 配 列 番 号 1 6 の ア ミ ノ 酸 配 列 と 少 なく とも 7 5 % の 同 一 性 を 有 す る V H ド メ イ ン と を 含 み、 こ の 抗 体 は、 ブ ド ウ 球 菌 (S t a p h y l o c o c c u s) エ ン テ ロ ト キ シ ン A (S E A) (例 えば、 100 ng/ml) と の 組 み 合 わ せ で、 例 えば 電 気 化 学 発 光、 例 えば ヒ ト T H 1 / T H 2 10 - P l e x 組 織 培 養 キ ャ ッ ト (M e s o S c a l e D i s c o v e r y) に よ っ て 計 測 さ れ る と お り、 例 えば 37、 5 % C

10

20

30

40

50

O_2 、及び97%湿度における例えば5日間の刺激時に例えばPBM CにおいてIL - 2産生を誘導し、このIL - 2産生は0.032 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗体の存在下と比べて4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗体の存在下においてより高い。IL - 2産生は、例えば、以下のステップ：(a)種々の濃度(例えば、20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、及び0.000256 $\mu\text{g}/\text{ml}$)の抗体、及び例えば100 ng/mlのSEAの非存在下又は存在下でPBM C(例えば、1ウェル 10^5 細胞)を例えば37、5% CO_2 、及び97%湿度において例えば5日間培養するステップ；及び(b)清澄化した上清を収集し、IL - 2の力価を、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10 - Plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)によって計測するステップを含むアッセイで評価することができる。

10

【0041】

一実施形態において、抗体は、配列番号15のアミノ酸配列と少なくとも80%の同一性を有するVLDメインと、配列番号16のアミノ酸配列と少なくとも80%の同一性を有するVHドメインとを含み、この抗体は、ブドウ球菌(*Staphylococcus*)エンテロトキシンA(SEA)(例えば、100 ng/ml)との組み合わせで、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10 - Plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)によって計測されたとおり、例えば37、5% CO_2 、及び97%湿度における例えば5日間の刺激時に例えばPBM CにおいてIL - 2産生を誘導し、このIL - 2産生は、例えば、0.032 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.032 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、又は0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ において抗体濃度の実質的増加関数である。IL - 2産生は、例えば、以下のステップ：(a)種々の濃度(例えば、20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、及び0.000256 $\mu\text{g}/\text{ml}$)の抗体、及び例えば100 ng/mlのSEAの非存在下又は存在下でPBM C(例えば、1ウェル 10^5 細胞)を例えば37、5% CO_2 、及び97%湿度において例えば5日間培養するステップ；及び(b)清澄化した上清を収集し、IL - 2の力価を、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10 - Plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)によって計測するステップを含むアッセイで評価することができる。一実施形態において、抗体は、配列番号15のアミノ酸配列と少なくとも80%の同一性を有するVLDメインと、配列番号16のアミノ酸配列と少なくとも80%の同一性を有するVHドメインとを含み、この抗体は、ブドウ球菌(*Staphylococcus*)エンテロトキシンA(SEA)(例えば、100 ng/ml)との組み合わせで、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10 - Plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)によって計測されたとおり、例えば37、5% CO_2 、及び97%湿度における例えば5日間の刺激時に例えばPBM CにおいてIL - 2産生を誘導し、このIL - 2産生は、抗OX40抗体濃度が例えば0.032 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.032 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、又は0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のとき、例えば、以下のステップ：(a)種々の濃度(例えば、20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、及び0.000256 $\mu\text{g}/\text{ml}$)の抗体、及び例えば100 ng/mlのSEAの非存在下又は存在下でPBM C(例えば、1ウェル 10^5 細胞)を例えば37、5% CO_2 、及び97%湿度において例えば5日間培養するステップ；及び(b)清澄化した上清を収集し、IL - 2の力価を、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10 - Plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)によって計測するステップを含むアッセイで評価されたとおり、シグモイド用量反応曲線を示す。

20

30

40

【0042】

一実施形態において、抗体は、配列番号15のアミノ酸配列と少なくとも80%の同一

50

性を有するVLDメインと、配列番号16のアミノ酸配列と少なくとも80%の同一性を有するVHドメインとを含み、この抗体は、ブドウ球菌 (*Staphylococcus*) エンテロトキシンA (SEA) (例えば、100 ng/ml) との組み合わせで、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット (Meso Scale Discovery) によって計測されるとおり、例えば37、5% CO₂、及び97%湿度における例えば5日間の刺激時に例えばPBMCにおいてIL-2産生を誘導し、このIL-2産生は0.032 µg/mlの抗体の存在下と比べて4 µg/mlの抗体の存在下においてより高い。IL-2産生は、例えば、以下のステップ：(a) 種々の濃度 (例えば、20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、及び0.000256 µg/ml) の抗体、及び例えば100 ng/mlのSEAの非存在下又は存在下でPBMC (例えば、1ウェル10⁵細胞) を例えば37、5% CO₂、及び97%湿度において例えば5日間培養するステップ；及び(b) 清澄化した上清を収集し、IL-2の力価を、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット (Meso Scale Discovery) によって計測するステップを含むアッセイで評価することができる。

【0043】

一実施形態において、抗体は、配列番号15のアミノ酸配列と少なくとも85%の同一性を有するVLDメインと、配列番号16のアミノ酸配列と少なくとも85%の同一性を有するVHドメインとを含み、この抗体は、ブドウ球菌 (*Staphylococcus*) エンテロトキシンA (SEA) (例えば、100 ng/ml) との組み合わせで、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット (Meso Scale Discovery) によって計測されるとおり、例えば37、5% CO₂、及び97%湿度における例えば5日間の刺激時に例えばPBMCにおいてIL-2産生を誘導し、このIL-2産生は、例えば、0.032 µg/ml ~ 20 µg/ml、0.16 µg/ml ~ 20 µg/ml、0.8 µg/ml ~ 20 µg/ml、4 µg/ml ~ 20 µg/ml、0.032 µg/ml ~ 4 µg/ml、0.16 µg/ml ~ 4 µg/ml、又は0.8 µg/ml ~ 4 µg/mlにおいて抗体濃度の実質的増加関数である。IL-2産生は、例えば、以下のステップ：(a) 種々の濃度 (例えば、20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、及び0.000256 µg/ml) の抗体、及び例えば100 ng/mlのSEAの非存在下又は存在下でPBMC (例えば、1ウェル10⁵細胞) を例えば37、5% CO₂、及び97%湿度において例えば5日間培養するステップ；及び(b) 清澄化した上清を収集し、IL-2の力価を、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット (Meso Scale Discovery) によって計測するステップを含むアッセイで評価することができる。一実施形態において、抗体は、配列番号15のアミノ酸配列と少なくとも85%の同一性を有するVLDメインと、配列番号16のアミノ酸配列と少なくとも85%の同一性を有するVHドメインとを含み、この抗体は、ブドウ球菌 (*Staphylococcus*) エンテロトキシンA (SEA) (例えば、100 ng/ml) との組み合わせで、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット (Meso Scale Discovery) によって計測されるとおり、例えば37、5% CO₂、及び97%湿度における例えば5日間の刺激時に例えばPBMCにおいてIL-2産生を誘導し、このIL-2産生は、抗OX40抗体濃度が例えば0.032 µg/ml ~ 20 µg/ml、0.16 µg/ml ~ 20 µg/ml、0.8 µg/ml ~ 20 µg/ml、4 µg/ml ~ 20 µg/ml、0.032 µg/ml ~ 4 µg/ml、0.16 µg/ml ~ 4 µg/ml、又は0.8 µg/ml ~ 4 µg/mlのとき、例えば、以下のステップ：(a) 種々の濃度 (例えば、20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、及び0.000256 µg/ml) の抗体、及び例えば100 ng/mlのSEAの非存在下又は存在下でPBMC (例えば、1ウェル10⁵細胞) を例えば37、5% CO₂、及び97%湿度において例えば5日間培養するステップ；及び(b) 清澄化した上清を収集し、IL-2の力価を、

10

20

30

40

50

例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)によって計測するステップを含むアッセイで評価されるとおり、シグモイド用量反応曲線を示す。

【0044】

一実施形態において、抗体は、配列番号15のアミノ酸配列と少なくとも85%の同一性を有するVLDメインと、配列番号16のアミノ酸配列と少なくとも85%の同一性を有するVHドメインとを含み、この抗体は、ブドウ球菌(*Staphylococcus*)エンテロトキシンA(SEA)(例えば、100ng/ml)との組み合わせで、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)によって計測されるとおり、例えば37、5%CO₂、及び97%湿度における例えば5日間の刺激時に例えばPBMCにおいてIL-2産生を誘導し、このIL-2産生は0.032µg/mlの抗体の存在下と比べて4µg/mlの抗体の存在下においてより高い。IL-2産生は、例えば、以下のステップ:(a)種々の濃度(例えば、20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、及び0.000256µg/ml)の抗体、及び例えば100ng/mlのSEAの非存在下又は存在下でPBMC(例えば、1ウェル10⁵細胞)を例えば37、5%CO₂、及び97%湿度において例えば5日間培養するステップ;及び(b)清澄化した上清を収集し、IL-2の力価を、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)によって計測するステップを含むアッセイで評価することができる。

10

20

【0045】

一実施形態において、抗体は、配列番号15のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有するVLDメインと、配列番号16のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有するVHドメインとを含み、この抗体は、ブドウ球菌(*Staphylococcus*)エンテロトキシンA(SEA)(例えば、100ng/ml)との組み合わせで、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)によって計測されるとおり、例えば37、5%CO₂、及び97%湿度における例えば5日間の刺激時に例えばPBMCにおいてIL-2産生を誘導し、このIL-2産生は、例えば、0.032µg/ml~20µg/ml、0.16µg/ml~20µg/ml、0.8µg/ml~20µg/ml、4µg/ml~20µg/ml、0.032µg/ml~4µg/ml、0.16µg/ml~4µg/ml、又は0.8µg/ml~4µg/mlにおいて抗体濃度の実質的増加関数である。IL-2産生は、例えば、以下のステップ:(a)種々の濃度(例えば、20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、及び0.000256µg/ml)の抗体、及び例えば100ng/mlのSEAの非存在下又は存在下でPBMC(例えば、1ウェル10⁵細胞)を例えば37、5%CO₂、及び97%湿度において例えば5日間培養するステップ;及び(b)清澄化した上清を収集し、IL-2の力価を、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)によって計測するステップを含むアッセイで評価することができる。一実施形態において、抗体は、配列番号15のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有するVLDメインと、配列番号16のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有するVHドメインとを含み、この抗体は、ブドウ球菌(*Staphylococcus*)エンテロトキシンA(SEA)(例えば、100ng/ml)との組み合わせで、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)によって計測されるとおり、例えば37、5%CO₂、及び97%湿度における例えば5日間の刺激時に例えばPBMCにおいてIL-2産生を誘導し、このIL-2産生は、抗OX40抗体濃度が例えば0.032µg/ml~20µg/ml、0.16µg/ml~20µg/ml、0.8µg/ml~20µg/ml、4µg/ml~20µg/ml、0.032µg/ml~4µg/ml、0.16µg/ml~4µg/ml、又は0.8µg/ml~4µg

30

40

50

/ml のとき、例えば、以下のステップ：(a) 種々の濃度（例えば、20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、及び0.000256 µg/ml）の抗体、及び例えば100 ng/mlのSEAの非存在下又は存在下でPBM C（例えば、1ウェル10⁵細胞）を例えば37、5%CO₂、及び97%湿度において例えば5日間培養するステップ；及び(b) 清澄化した上清を収集し、IL-2の力価を、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット（Meso Scale Discovery）によって計測するステップを含むアッセイで評価されるとおり、シグモイド用量反応曲線を示す。

【0046】

一実施形態において、抗体は、配列番号15のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有するVLDメインと、配列番号16のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有するVHドメインとを含み、この抗体は、ブドウ球菌（Staphylococcus）エンテロトキシンA（SEA）（例えば、100 ng/ml）との組み合わせで、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット（Meso Scale Discovery）によって計測されるとおり、例えば37、5%CO₂、及び97%湿度における例えば5日間の刺激時に例えばPBM CにおいてIL-2産生を誘導し、このIL-2産生は0.032 µg/mlの抗体の存在下と比べて4 µg/mlの抗体の存在下においてより高い。IL-2産生は、例えば、以下のステップ：(a) 種々の濃度（例えば、20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、及び0.000256 µg/ml）の抗体、及び例えば100 ng/mlのSEAの非存在下又は存在下でPBM C（例えば、1ウェル10⁵細胞）を例えば37、5%CO₂、及び97%湿度において例えば5日間培養するステップ；及び(b) 清澄化した上清を収集し、IL-2の力価を、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット（Meso Scale Discovery）によって計測するステップを含むアッセイで評価することができる。

【0047】

一実施形態において、抗体は、配列番号15のアミノ酸配列と少なくとも95%の同一性を有するVLDメインと、配列番号16のアミノ酸配列と少なくとも95%の同一性を有するVHドメインとを含み、この抗体は、ブドウ球菌（Staphylococcus）エンテロトキシンA（SEA）（例えば、100 ng/ml）との組み合わせで、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット（Meso Scale Discovery）によって計測されるとおり、例えば37、5%CO₂、及び97%湿度における例えば5日間の刺激時に例えばPBM CにおいてIL-2産生を誘導し、このIL-2産生は、例えば、0.032 µg/ml ~ 20 µg/ml、0.16 µg/ml ~ 20 µg/ml、0.8 µg/ml ~ 20 µg/ml、4 µg/ml ~ 20 µg/ml、0.032 µg/ml ~ 4 µg/ml、0.16 µg/ml ~ 4 µg/ml、又は0.8 µg/ml ~ 4 µg/mlにおいて抗体濃度の実質的増加関数である。IL-2産生は、例えば、以下のステップ：(a) 種々の濃度（例えば、20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、及び0.000256 µg/ml）の抗体、及び例えば100 ng/mlのSEAの非存在下又は存在下でPBM C（例えば、1ウェル10⁵細胞）を例えば37、5%CO₂、及び97%湿度において例えば5日間培養するステップ；及び(b) 清澄化した上清を収集し、IL-2の力価を、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット（Meso Scale Discovery）によって計測するステップを含むアッセイで評価することができる。一実施形態において、抗体は、配列番号15のアミノ酸配列と少なくとも95%の同一性を有するVLDメインと、配列番号16のアミノ酸配列と少なくとも95%の同一性を有するVHドメインとを含み、この抗体は、ブドウ球菌（Staphylococcus）エンテロトキシンA（SEA）（例えば、100 ng/ml）との組み合わせで、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット（Meso Scale Discovery）によって計測されるとお

10

20

30

40

50

り、例えば37℃、5%CO₂、及び97%湿度における例えば5日間の刺激時に例えばPBMCにおいてIL-2産生を誘導し、このIL-2産生は、抗OX40抗体濃度が例えば0.032µg/ml~20µg/ml、0.16µg/ml~20µg/ml、0.8µg/ml~20µg/ml、4µg/ml~20µg/ml、0.032µg/ml~4µg/ml、0.16µg/ml~4µg/ml、又は0.8µg/ml~4µg/mlのとき、例えば、以下のステップ：(a)種々の濃度(例えば、20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、及び0.000256µg/ml)の抗体、及び例えば100ng/mlのSEAの非存在下又は存在下でPBMC(例えば、1ウェル10⁵細胞)を例えば37℃、5%CO₂、及び97%湿度において例えば5日間培養するステップ；及び(b)清澄化した上清を収集し、IL-2の力価を、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)によって計測するステップを含むアッセイで評価されるとおり、シグモイド用量反応曲線を示す。

【0048】

一実施形態において、抗体は、配列番号15のアミノ酸配列と少なくとも95%の同一性を有するVLドメインと、配列番号16のアミノ酸配列と少なくとも95%の同一性を有するVHドメインとを含み、この抗体は、ブドウ球菌(*Staphylococcus*)エンテロトキシンA(SEA)(例えば、100ng/ml)との組み合わせで、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)によって計測されるとおり、例えば37℃、5%CO₂、及び97%湿度における例えば5日間の刺激時に例えばPBMCにおいてIL-2産生を誘導し、このIL-2産生は0.032µg/mlの抗体の存在下と比べて4µg/mlの抗体の存在下においてより高い。IL-2産生は、例えば、以下のステップ：(a)種々の濃度(例えば、20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、及び0.000256µg/ml)の抗体、及び例えば100ng/mlのSEAの非存在下又は存在下でPBMC(例えば、1ウェル10⁵細胞)を例えば37℃、5%CO₂、及び97%湿度において例えば5日間培養するステップ；及び(b)清澄化した上清を収集し、IL-2の力価を、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)によって計測するステップを含むアッセイで評価することができる。

【0049】

一実施形態において、抗体は、配列番号15のアミノ酸配列と少なくとも98%の同一性を有するVLドメインと、配列番号16のアミノ酸配列と少なくとも98%の同一性を有するVHドメインとを含み、この抗体は、ブドウ球菌(*Staphylococcus*)エンテロトキシンA(SEA)(例えば、100ng/ml)との組み合わせで、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)によって計測されるとおり、例えば37℃、5%CO₂、及び97%湿度における例えば5日間の刺激時に例えばPBMCにおいてIL-2産生を誘導し、このIL-2産生は、例えば、0.032µg/ml~20µg/ml、0.16µg/ml~20µg/ml、0.8µg/ml~20µg/ml、4µg/ml~20µg/ml、0.032µg/ml~4µg/ml、0.16µg/ml~4µg/ml、又は0.8µg/ml~4µg/mlにおいて抗体濃度の実質的増加関数である。IL-2産生は、例えば、以下のステップ：(a)種々の濃度(例えば、20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、及び0.000256µg/ml)の抗体、及び例えば100ng/mlのSEAの非存在下又は存在下でPBMC(例えば、1ウェル10⁵細胞)を例えば37℃、5%CO₂、及び97%湿度において例えば5日間培養するステップ；及び(b)清澄化した上清を収集し、IL-2の力価を、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)によって計測するステップを含むアッセイで評価することができる。一実施形態において、抗体は、配列番号15のアミノ酸配列

10

20

30

40

50

と少なくとも98%の同一性を有するVLDメインと、配列番号16のアミノ酸配列と少なくとも98%の同一性を有するVHドメインとを含み、この抗体は、ブドウ球菌 (*Staphylococcus*) エンテロトキシンA (SEA) (例えば、100 ng/ml) との組み合わせで、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex 組織培養キット (Meso Scale Discovery) によって計測されるとおり、例えば37、5% CO₂、及び97%湿度における例えば5日間の刺激時に例えばPBMCにおいてIL-2産生を誘導し、このIL-2産生は、抗OX40抗体濃度が例えば0.032 µg/ml ~ 20 µg/ml、0.16 µg/ml ~ 20 µg/ml、0.8 µg/ml ~ 20 µg/ml、4 µg/ml ~ 20 µg/ml、0.032 µg/ml ~ 4 µg/ml、0.16 µg/ml ~ 4 µg/ml、又は0.8 µg/ml ~ 4 µg/ml のとき、例えば、以下のステップ：(a) 種々の濃度 (例えば、20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、及び0.000256 µg/ml) の抗体、及び例えば100 ng/mlのSEAの非存在下又は存在下でPBMC (例えば、1ウェル10⁵細胞) を例えば37、5% CO₂、及び97%湿度において例えば5日間培養するステップ；及び(b) 清澄化した上清を収集し、IL-2の力価を、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex 組織培養キット (Meso Scale Discovery) によって計測するステップを含むアッセイで評価されるとおり、シグモイド用量反応曲線を示す。

【0050】

一実施形態において、抗体は、配列番号15のアミノ酸配列と少なくとも98%の同一性を有するVLDメインと、配列番号16のアミノ酸配列と少なくとも98%の同一性を有するVHドメインとを含み、この抗体は、ブドウ球菌 (*Staphylococcus*) エンテロトキシンA (SEA) (例えば、100 ng/ml) との組み合わせで、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex 組織培養キット (Meso Scale Discovery) によって計測されるとおり、例えば37、5% CO₂、及び97%湿度における例えば5日間の刺激時に例えばPBMCにおいてIL-2産生を誘導し、このIL-2産生は0.032 µg/mlの抗体の存在下と比べて4 µg/mlの抗体の存在下においてより高い。IL-2産生は、例えば、以下のステップ：(a) 種々の濃度 (例えば、20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、及び0.000256 µg/ml) の抗体、及び例えば100 ng/mlのSEAの非存在下又は存在下でPBMC (例えば、1ウェル10⁵細胞) を例えば37、5% CO₂、及び97%湿度において例えば5日間培養するステップ；及び(b) 清澄化した上清を収集し、IL-2の力価を、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex 組織培養キット (Meso Scale Discovery) によって計測するステップを含むアッセイで評価することができる。

【0051】

一実施形態において、抗体は、配列番号15のアミノ酸配列と少なくとも70%の同一性を有するVLDメインと、配列番号16のアミノ酸配列と少なくとも70%の同一性を有するVHドメインとを含み、この抗体は、プレート結合時、プレート結合抗CD3抗体 (例えば、0.8 µg/ml) との組み合わせで、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex 組織培養キット (Meso Scale Discovery) 又は非ヒト霊長類 (NHP) V-plex アッセイキット (Meso Scale Discovery) によって計測されるとおり、例えば37及び5% CO₂における例えば4日間の刺激時に例えばPBMC又はT細胞において1つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生を誘導し、この1つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生は、例えば、以下のステップ：(a) プレート結合抗CD3抗体 (例えば、0.8 µg/ml) 及び種々の濃度 (例えば、0、0.3、1、3、6、12、25、及び50 µg/ml；又は0、0.7、1.6、3.1、6.3、12.5、25、又は50 µg/ml) のプレート結合

10

20

30

40

50

抗体の存在下でP B M Cを例えば37 及び5%CO₂において例えば4日間培養するステップ;及び(b)上清を収集し、1つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生を、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-Plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)又は非ヒト霊長類(NHP)V-Plexアッセイキット(Meso Scale Discovery)によって計測するステップを含むアッセイで評価されたとおり、例えば、0.7µg/ml~50µg/ml、1.6µg/ml~50µg/ml、3.1µg/ml~50µg/ml、又は6.3µg/ml~50µg/mlにおいて抗体の濃度の実質的増加関数である。一実施形態において、抗体は、配列番号15のアミノ酸配列と少なくとも70%の同一性を有するVLDメインと、配列番号16のアミノ酸配列と少なくとも70%の同一性を有するVHドメインとを含み、この抗体は、プレート結合時、プレート結合抗CD3抗体(例えば、0.8µg/ml)との組み合わせで、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-Plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)又は非ヒト霊長類(NHP)V-Plexアッセイキット(Meso Scale Discovery)によって計測されたとおり、例えば37 及び5%CO₂における例えば4日間の刺激時に例えばP B M C又はT細胞において1つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生を誘導し、この1つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生は、抗OX40抗体濃度が例えば0.7µg/ml~50µg/ml、1.6µg/ml~50µg/ml、3.1µg/ml~50µg/ml、又は6.3µg/ml~50µg/mlのとき、例えば、以下のステップ:(a)プレート結合抗CD3抗体(例えば、0.8µg/ml)及び種々の濃度(例えば、0、0.3、1、3、6、12、25、及び50µg/ml;又は0、0.7、1.6、3.1、6.3、12.5、25、又は50µg/ml)のプレート結合抗体の存在下でP B M Cを例えば37 及び5%CO₂において例えば4日間培養するステップ;及び(b)上清を収集し、1つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生を、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-Plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)又は非ヒト霊長類(NHP)V-Plexアッセイキット(Meso Scale Discovery)によって計測するステップを含むアッセイで評価されたとおり、シグモイド用量反応曲線を示す。

【0052】

一実施形態において、抗体は、配列番号15のアミノ酸配列と少なくとも75%の同一性を有するVLDメインと、配列番号16のアミノ酸配列と少なくとも75%の同一性を有するVHドメインとを含み、この抗体は、プレート結合時、プレート結合抗CD3抗体(例えば、0.8µg/ml)との組み合わせで、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-Plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)又は非ヒト霊長類(NHP)V-Plexアッセイキット(Meso Scale Discovery)によって計測されたとおり、例えば37 及び5%CO₂における例えば4日間の刺激時に例えばP B M C又はT細胞において1つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生を誘導し、この1つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生は、例えば、以下のステップ:(a)プレート結合抗CD3抗体(例えば、0.8µg/ml)及び種々の濃度(例えば、0、0.3、1、3、6、12、25、及び50µg/ml;又は0、0.7、1.6、3.1、6.3、12.5、25、又は50µg/ml)のプレート結合抗体の存在下でP B M Cを例えば37 及び5%CO₂において例えば4日間培養するステップ;及び(b)上清を収集し、1つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生を、例えば

10

20

30

40

50

電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-Plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)又は非ヒト霊長類(NHP)V-Plexアッセイキット(Meso Scale Discovery)によって計測するステップを含むアッセイで評価されるとおり、例えば、0.7µg/ml~50µg/ml、1.6µg/ml~50µg/ml、3.1µg/ml~50µg/ml、又は6.3µg/ml~50µg/mlにおいて抗体の濃度の実質的増加関数である。一実施形態において、抗体は、配列番号15のアミノ酸配列と少なくとも75%の同一性を有するVLDドメインと、配列番号16のアミノ酸配列と少なくとも75%の同一性を有するVHDドメインとを含み、この抗体は、プレート結合時、プレート結合抗CD3抗体(例えば、0.8µg/ml)との組み合わせで、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-Plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)又は非ヒト霊長類(NHP)V-Plexアッセイキット(Meso Scale Discovery)によって計測されるとおり、例えば37及び5%CO₂における例えば4日間の刺激時に例えばPBMC又はT細胞において1つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生を誘導し、この1つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生は、抗OX40抗体濃度が例えば0.7µg/ml~50µg/ml、1.6µg/ml~50µg/ml、3.1µg/ml~50µg/ml、又は6.3µg/ml~50µg/mlのとき、例えば、以下のステップ:(a)プレート結合抗CD3抗体(例えば、0.8µg/ml)及び種々の濃度(例えば、0、0.3、1、3、6、12、25、及び50µg/ml;又は0、0.7、1.6、3.1、6.3、12.5、25、又は50µg/ml)のプレート結合抗体の存在下でPBMCを例えば37及び5%CO₂において例えば4日間培養するステップ;及び(b)上清を収集し、1つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生を、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-Plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)又は非ヒト霊長類(NHP)V-Plexアッセイキット(Meso Scale Discovery)によって計測するステップを含むアッセイで評価されるとおり、シグモイド用量反応曲線を示す。

【0053】

一実施形態において、抗体は、配列番号15のアミノ酸配列と少なくとも80%の同一性を有するVLDドメインと、配列番号16のアミノ酸配列と少なくとも80%の同一性を有するVHDドメインとを含み、この抗体は、プレート結合時、プレート結合抗CD3抗体(例えば、0.8µg/ml)との組み合わせで、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-Plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)又は非ヒト霊長類(NHP)V-Plexアッセイキット(Meso Scale Discovery)によって計測されるとおり、例えば37及び5%CO₂における例えば4日間の刺激時に例えばPBMC又はT細胞において1つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生を誘導し、この1つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生は、例えば、以下のステップ:(a)プレート結合抗CD3抗体(例えば、0.8µg/ml)及び種々の濃度(例えば、0、0.3、1、3、6、12、25、及び50µg/ml;又は0、0.7、1.6、3.1、6.3、12.5、25、又は50µg/ml)のプレート結合抗体の存在下でPBMCを例えば37及び5%CO₂において例えば4日間培養するステップ;及び(b)上清を収集し、1つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生を、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-Plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)又は非ヒト霊長類(NHP)V-Plexアッセイキット(Meso Scale Discovery)によって計測するステップを含むア

ッセイで評価されるとおり、例えば、 $0.7 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $1.6 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $3.1 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、又は $6.3 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 50 \mu\text{g}/\text{ml}$ において抗体の濃度の実質的増加関数である。一実施形態において、抗体は、配列番号15のアミノ酸配列と少なくとも80%の同一性を有するVLDメインと、配列番号16のアミノ酸配列と少なくとも80%の同一性を有するVHドメインとを含み、この抗体は、プレート結合時、プレート結合抗CD3抗体（例えば、 $0.8 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）との組み合わせで、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-Plex組織培養キット（Meso Scale Discovery）又は非ヒト霊長類（NHP）V-Plexアッセイキット（Meso Scale Discovery）によって計測されるとおり、例えば37及び5%CO₂における例えば4日間の刺激時に例えばPBMC又はT細胞において1つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生を誘導し、この1つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生は、抗OX40抗体濃度が例えば $0.7 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $1.6 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $3.1 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、又は $6.3 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 50 \mu\text{g}/\text{ml}$ のとき、例えば、以下のステップ：（a）プレート結合抗CD3抗体（例えば、 $0.8 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）及び種々の濃度（例えば、0、0.3、1、3、6、12、25、及び $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ；又は0、0.7、1.6、3.1、6.3、12.5、25、又は $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）のプレート結合抗体の存在下でPBMCを例えば37及び5%CO₂において例えば4日間培養するステップ；及び（b）上清を収集し、1つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生を、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-Plex組織培養キット（Meso Scale Discovery）又は非ヒト霊長類（NHP）V-Plexアッセイキット（Meso Scale Discovery）によって計測するステップを含むアッセイで評価されるとおり、シグモイド用量反応曲線を示す。

【0054】

一実施形態において、抗体は、配列番号15のアミノ酸配列と少なくとも85%の同一性を有するVLDメインと、配列番号16のアミノ酸配列と少なくとも85%の同一性を有するVHドメインとを含み、この抗体は、プレート結合時、プレート結合抗CD3抗体（例えば、 $0.8 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）との組み合わせで、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-Plex組織培養キット（Meso Scale Discovery）又は非ヒト霊長類（NHP）V-Plexアッセイキット（Meso Scale Discovery）によって計測されるとおり、例えば37及び5%CO₂における例えば4日間の刺激時に例えばPBMC又はT細胞において1つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生を誘導し、この1つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生は、例えば、以下のステップ：（a）プレート結合抗CD3抗体（例えば、 $0.8 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）及び種々の濃度（例えば、0、0.3、1、3、6、12、25、及び $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ；又は0、0.7、1.6、3.1、6.3、12.5、25、又は $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）のプレート結合抗体の存在下でPBMCを例えば37及び5%CO₂において例えば4日間培養するステップ；及び（b）上清を収集し、1つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生を、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-Plex組織培養キット（Meso Scale Discovery）又は非ヒト霊長類（NHP）V-Plexアッセイキット（Meso Scale Discovery）によって計測するステップを含むアッセイで評価されるとおり、例えば、 $0.7 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $1.6 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $3.1 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、又は $6.3 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 50 \mu\text{g}/\text{ml}$ において抗体の濃度の実質的増加関数である。一実施形態において、抗体は

、配列番号15のアミノ酸配列と少なくとも85%の同一性を有するVLDメインと、配列番号16のアミノ酸配列と少なくとも85%の同一性を有するVHドメインとを含み、この抗体は、プレート結合時、プレート結合抗CD3抗体(例えば、0.8 μg/ml)との組み合わせで、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)又は非ヒト霊長類(NHP)V-plexアッセイキット(Meso Scale Discovery)によって計測されるとおり、例えば37及び5%CO₂における例えば4日間の刺激時に例えばPBMC又はT細胞において1つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生を誘導し、この1つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生は、抗OX40抗体濃度が例えば0.7 μg/ml~50 μg/ml、1.6 μg/ml~50 μg/ml、3.1 μg/ml~50 μg/ml、又は6.3 μg/ml~50 μg/mlのとき、例えば、以下のステップ:(a)プレート結合抗CD3抗体(例えば、0.8 μg/ml)及び種々の濃度(例えば、0、0.3、1、3、6、12、25、及び50 μg/ml;又は0、0.7、1.6、3.1、6.3、12.5、25、又は50 μg/ml)のプレート結合抗体の存在下でPBMCを例えば37及び5%CO₂において例えば4日間培養するステップ;及び(b)上清を収集し、1つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生を、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)又は非ヒト霊長類(NHP)V-plexアッセイキット(Meso Scale Discovery)によって計測するステップを含むアッセイで評価されるとおり、シグモイド用量反応曲線を示す。

【0055】

一実施形態において、抗体は、配列番号15のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有するVLDメインと、配列番号16のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有するVHドメインとを含み、この抗体は、プレート結合時、プレート結合抗CD3抗体(例えば、0.8 μg/ml)との組み合わせで、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)又は非ヒト霊長類(NHP)V-plexアッセイキット(Meso Scale Discovery)によって計測されるとおり、例えば37及び5%CO₂における例えば4日間の刺激時に例えばPBMC又はT細胞において1つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生を誘導し、この1つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生は、例えば、以下のステップ:(a)プレート結合抗CD3抗体(例えば、0.8 μg/ml)及び種々の濃度(例えば、0、0.3、1、3、6、12、25、及び50 μg/ml;又は0、0.7、1.6、3.1、6.3、12.5、25、又は50 μg/ml)のプレート結合抗体の存在下でPBMCを例えば37及び5%CO₂において例えば4日間培養するステップ;及び(b)上清を収集し、1つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生を、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)又は非ヒト霊長類(NHP)V-plexアッセイキット(Meso Scale Discovery)によって計測するステップを含むアッセイで評価されるとおり、例えば、0.7 μg/ml~50 μg/ml、1.6 μg/ml~50 μg/ml、3.1 μg/ml~50 μg/ml、又は6.3 μg/ml~50 μg/mlにおいて抗体の濃度の実質的増加関数である。一実施形態において、抗体は、配列番号15のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有するVLDメインと、配列番号16のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有するVHドメインとを含み、この抗体は、プレート結合時、プレート結合抗CD3抗体(例えば、0.8 μg/ml)

との組み合わせで、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-Plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)又は非ヒト霊長類(NHP)V-Plexアッセイキット(Meso Scale Discovery)によって計測されるとおり、例えば37及び5%CO₂における例えば4日間の刺激時に例えばPBMC又はT細胞において1つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生を誘導し、この1つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生は、抗OX40抗体濃度が例えば0.7µg/ml~50µg/ml、1.6µg/ml~50µg/ml、3.1µg/ml~50µg/ml、又は6.3µg/ml~50µg/mlのとき、例えば、以下のステップ：(a)プレート結合抗CD3抗体(例えば、0.8µg/ml)及び種々の濃度(例えば、0、0.3、1、3、6、12、25、及び50µg/ml；又は0、0.7、1.6、3.1、6.3、12.5、25、又は50µg/ml)のプレート結合抗体の存在下でPBMCを例えば37及び5%CO₂において例えば4日間培養するステップ；及び(b)上清を収集し、1つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生を、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-Plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)又は非ヒト霊長類(NHP)V-Plexアッセイキット(Meso Scale Discovery)によって計測するステップを含むアッセイで評価されるとおり、シグモイド用量反応曲線を示す。

10

20

【0056】

一実施形態において、抗体は、配列番号15のアミノ酸配列と少なくとも95%の同一性を有するVLDメインと、配列番号16のアミノ酸配列と少なくとも95%の同一性を有するVHドメインとを含み、この抗体は、プレート結合時、プレート結合抗CD3抗体(例えば、0.8µg/ml)との組み合わせで、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-Plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)又は非ヒト霊長類(NHP)V-Plexアッセイキット(Meso Scale Discovery)によって計測されるとおり、例えば37及び5%CO₂における例えば4日間の刺激時に例えばPBMC又はT細胞において1つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生を誘導し、この1つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生は、例えば、以下のステップ：(a)プレート結合抗CD3抗体(例えば、0.8µg/ml)及び種々の濃度(例えば、0、0.3、1、3、6、12、25、及び50µg/ml；又は0、0.7、1.6、3.1、6.3、12.5、25、又は50µg/ml)のプレート結合抗体の存在下でPBMCを例えば37及び5%CO₂において例えば4日間培養するステップ；及び(b)上清を収集し、1つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生を、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-Plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)又は非ヒト霊長類(NHP)V-Plexアッセイキット(Meso Scale Discovery)によって計測するステップを含むアッセイで評価されるとおり、例えば、0.7µg/ml~50µg/ml、1.6µg/ml~50µg/ml、3.1µg/ml~50µg/ml、又は6.3µg/ml~50µg/mlにおいて抗体の濃度の実質的増加関数である。一実施形態において、抗体は、配列番号15のアミノ酸配列と少なくとも95%の同一性を有するVLDメインと、配列番号16のアミノ酸配列と少なくとも95%の同一性を有するVHドメインとを含み、この抗体は、プレート結合時、プレート結合抗CD3抗体(例えば、0.8µg/ml)との組み合わせで、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-Plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)又は非ヒト霊長類(NHP)V-Plexアッセイキット(Meso Scale Discovery)によって

30

40

50

計測されたとおり、例えば37及び5%CO₂における例えば4日間の刺激時に例えばPBMC又はT細胞において1つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生を誘導し、この1つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生は、抗OX40抗体濃度が例えば0.7µg/ml~50µg/ml、1.6µg/ml~50µg/ml、3.1µg/ml~50µg/ml、又は6.3µg/ml~50µg/mlのとき、例えば、以下のステップ：(a)プレート結合抗CD3抗体(例えば、0.8µg/ml)及び種々の濃度(例えば、0、0.3、1、3、6、12、25、及び50µg/ml；又は0、0.7、1.6、3.1、6.3、12.5、25、又は50µg/ml)のプレート結合抗体の存在下でPBMCを例えば37及び5%CO₂において例えば4日間培養するステップ；及び(b)上清を収集し、1つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生を、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)又は非ヒト霊長類(NHP)V-plexアッセイキット(Meso Scale Discovery)によって計測するステップを含むアッセイで評価されたとおり、シグモイド用量反応曲線を示す。

【0057】

一実施形態において、抗体は、配列番号15のアミノ酸配列と少なくとも98%の同一性を有するVLDメインと、配列番号16のアミノ酸配列と少なくとも98%の同一性を有するVHドメインとを含み、この抗体は、プレート結合時、プレート結合抗CD3抗体(例えば、0.8µg/ml)との組み合わせで、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)又は非ヒト霊長類(NHP)V-plexアッセイキット(Meso Scale Discovery)によって計測されたとおり、例えば37及び5%CO₂における例えば4日間の刺激時に例えばPBMC又はT細胞において1つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生を誘導し、この1つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生は、例えば、以下のステップ：(a)プレート結合抗CD3抗体(例えば、0.8µg/ml)及び種々の濃度(例えば、0、0.3、1、3、6、12、25、及び50µg/ml；又は0、0.7、1.6、3.1、6.3、12.5、25、又は50µg/ml)のプレート結合抗体の存在下でPBMCを例えば37及び5%CO₂において例えば4日間培養するステップ；及び(b)上清を収集し、1つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生を、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)又は非ヒト霊長類(NHP)V-plexアッセイキット(Meso Scale Discovery)によって計測するステップを含むアッセイで評価されたとおり、例えば、0.7µg/ml~50µg/ml、1.6µg/ml~50µg/ml、3.1µg/ml~50µg/ml、又は6.3µg/ml~50µg/mlにおいて抗体の濃度の実質的増加関数である。一実施形態において、抗体は、配列番号15のアミノ酸配列と少なくとも98%の同一性を有するVLDメインと、配列番号16のアミノ酸配列と少なくとも98%の同一性を有するVHドメインとを含み、この抗体は、プレート結合時、プレート結合抗CD3抗体(例えば、0.8µg/ml)との組み合わせで、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)又は非ヒト霊長類(NHP)V-plexアッセイキット(Meso Scale Discovery)によって計測されたとおり、例えば37及び5%CO₂における例えば4日間の刺激時に例えばPBMC又はT細胞において1つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生を誘導し、この1

10

20

30

40

50

つ以上のサイトカイン、例えば、TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生は、抗OX40抗体濃度が例えば0.7 μ g/ml~50 μ g/ml、1.6 μ g/ml~50 μ g/ml、3.1 μ g/ml~50 μ g/ml、又は6.3 μ g/ml~50 μ g/mlのとき、例えば、以下のステップ：(a)プレート結合抗CD3抗体(例えば、0.8 μ g/ml)及び種々の濃度(例えば、0、0.3、1、3、6、12、25、及び50 μ g/ml；又は0、0.7、1.6、3.1、6.3、12.5、25、又は50 μ g/ml)のプレート結合抗体の存在下でPBMCを例えば37 $^{\circ}$ C及び5%CO $_2$ において例えば4日間培養するステップ；及び(b)上清を収集し、1つ以上のサイトカイン、例えば、TNF α 、TNF β 、IFN γ 、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生を、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)又は非ヒト霊長類(NHP)V-plexアッセイキット(Meso Scale Discovery)によって計測するステップを含むアッセイで評価されるとおり、シグモイド用量反応曲線を示す。

【0058】

一実施形態において、抗体は、配列番号15のアミノ酸配列と少なくとも70%の同一性を有するVLドメインと、配列番号16のアミノ酸配列と少なくとも70%の同一性を有するVHドメインとを含み、この抗体はCD4 $^{+}$ T細胞増殖を増加させ、このCD4 $^{+}$ T細胞増殖は、例えば、以下のステップ：(a)例えばエンリッチドCD4 $^{+}$ T細胞を例えば10 μ Mカルボキシフルオレセイン二酢酸スクシンイミジルエステル(CFSE)によって例えば37 $^{\circ}$ Cで例えば7分間標識するステップ；(b)綿密に洗浄した後、細胞(例えば、1ウェル10 5 細胞)を例えば3 μ g/mlの例えばプレート結合抗CD3抗体及び種々の濃度(例えば、0.002、0.02、0.2、2、及び20 μ g/ml)の例えば本明細書に記載されるプレート結合抗体によって例えば37 $^{\circ}$ C及び5%CO $_2$ で刺激するステップ；及び(c)例えば4日目に、細胞を例えば抗CD4抗体で染色し、例えばフローサイトメトリーによってCFSE低CD4 $^{+}$ 細胞の割合を計測することによりCD4 $^{+}$ T細胞増殖を調べるステップを含むアッセイで評価されるとおり、例えば0.2 μ g/ml~20 μ g/ml、又は2 μ g/ml~20 μ g/mlにおいて抗体の濃度の実質的増加関数である。一実施形態において、抗体は、配列番号15のアミノ酸配列と少なくとも70%の同一性を有するVLドメインと、配列番号16のアミノ酸配列と少なくとも70%の同一性を有するVHドメインとを含み、この抗体はCD4 $^{+}$ T細胞増殖を増加させ、このCD4 $^{+}$ T細胞増殖は、抗OX40抗体濃度が例えば0.2 μ g/ml~20 μ g/ml、又は2 μ g/ml~20 μ g/mlのとき、例えば、以下のステップ：(a)例えばエンリッチドCD4 $^{+}$ T細胞を例えば10 μ Mカルボキシフルオレセイン二酢酸スクシンイミジルエステル(CFSE)によって例えば37 $^{\circ}$ Cで例えば7分間標識するステップ；(b)綿密に洗浄した後、細胞(例えば、1ウェル10 5 細胞)を例えば3 μ g/mlの例えばプレート結合抗CD3抗体及び種々の濃度(例えば、0.002、0.02、0.2、2、及び20 μ g/ml)の例えば本明細書に記載されるプレート結合抗体によって例えば37 $^{\circ}$ C及び5%CO $_2$ で刺激するステップ；及び(c)例えば4日目に、細胞を例えば抗CD4抗体で染色し、例えばフローサイトメトリーによってCFSE低CD4 $^{+}$ 細胞の割合を計測することによりCD4 $^{+}$ T細胞増殖を調べるステップを含むアッセイで評価されるとおり、シグモイド用量反応曲線を示す。

【0059】

一実施形態において、抗体は、配列番号15のアミノ酸配列と少なくとも70%の同一性を有するVLドメインと、配列番号16のアミノ酸配列と少なくとも70%の同一性を有するVHドメインとを含み、この抗体は、例えば、以下のステップ：(a)例えばエンリッチドCD4 $^{+}$ T細胞を例えば10 μ Mカルボキシフルオレセイン二酢酸スクシンイミジルエステル(CFSE)によって例えば37 $^{\circ}$ Cで例えば7分間標識するステップ；(b)綿密に洗浄した後、細胞(例えば、1ウェル10 5 細胞)を例えば3 μ g/mlの例えばプレート結合抗CD3抗体及び種々の濃度(例えば、0.002、0.02、0.2

10

20

30

40

50

、2、及び20 µg/ml)の例えば本明細書に記載されるプレート結合抗体によって例えば37 及び5% CO₂で刺激するステップ;及び(c)例えば4日目に、細胞を例えば抗CD4抗体で染色し、例えばフローサイトメトリーによってCFSE低CD4+ 細胞の割合を計測することによりCD4+ T細胞増殖を調べるステップを含むアッセイで評価されるとおり、抗体が2 µg/mlの濃度よりも20 µg/mlの濃度で存在するときにCD4+ T細胞増殖の増加が大きくなる。

【0060】

一実施形態において、抗体は、配列番号15のアミノ酸配列と少なくとも75%の同一性を有するVLDメインと、配列番号16のアミノ酸配列と少なくとも75%の同一性を有するVHドメインとを含み、この抗体はCD4+ T細胞増殖を増加させ、このCD4+ T細胞増殖は、例えば、以下のステップ:(a)例えばエンリッチドCD4+ T細胞を例えば10 µMカルボキシフルオレセイン二酢酸スクシンイミジルエステル(CFSE)によって例えば37 で例えば7分間標識するステップ;(b)綿密に洗浄した後、細胞(例えば、1ウェル10⁵細胞)を例えば3 µg/mlの例えばプレート結合抗CD3抗体及び種々の濃度(例えば、0.002、0.02、0.2、2、及び20 µg/ml)の例えば本明細書に記載されるプレート結合抗体によって例えば37 及び5% CO₂で刺激するステップ;及び(c)例えば4日目に、細胞を例えば抗CD4抗体で染色し、例えばフローサイトメトリーによってCFSE低CD4+ 細胞の割合を計測することによりCD4+ T細胞増殖を調べるステップを含むアッセイで評価されるとおり、例えば0.2 µg/ml~20 µg/ml、又は2 µg/ml~20 µg/mlにおいて抗体の濃度の実質的増加関数である。一実施形態において、抗体は、配列番号15のアミノ酸配列と少なくとも75%の同一性を有するVLDメインと、配列番号16のアミノ酸配列と少なくとも75%の同一性を有するVHドメインとを含み、この抗体はCD4+ T細胞増殖を増加させ、このCD4+ T細胞増殖は、抗OX40抗体濃度が例えば0.2 µg/ml~20 µg/ml、又は2 µg/ml~20 µg/mlのとき、例えば、以下のステップ:(a)例えばエンリッチドCD4+ T細胞を例えば10 µMカルボキシフルオレセイン二酢酸スクシンイミジルエステル(CFSE)によって例えば37 で例えば7分間標識するステップ;(b)綿密に洗浄した後、細胞(例えば、1ウェル10⁵細胞)を例えば3 µg/mlの例えばプレート結合抗CD3抗体及び種々の濃度(例えば、0.002、0.02、0.2、2、及び20 µg/ml)の例えば本明細書に記載されるプレート結合抗体によって例えば37 及び5% CO₂で刺激するステップ;及び(c)例えば4日目に、細胞を例えば抗CD4抗体で染色し、例えばフローサイトメトリーによってCFSE低CD4+ 細胞の割合を計測することによりCD4+ T細胞増殖を調べるステップを含むアッセイで評価されるとおり、シグモイド用量反応曲線を示す。

【0061】

一実施形態において、抗体は、配列番号15のアミノ酸配列と少なくとも75%の同一性を有するVLDメインと、配列番号16のアミノ酸配列と少なくとも75%の同一性を有するVHドメインとを含み、この抗体は、例えば、以下のステップ:(a)例えばエンリッチドCD4+ T細胞を例えば10 µMカルボキシフルオレセイン二酢酸スクシンイミジルエステル(CFSE)によって例えば37 で例えば7分間標識するステップ;(b)綿密に洗浄した後、細胞(例えば、1ウェル10⁵細胞)を例えば3 µg/mlの例えばプレート結合抗CD3抗体及び種々の濃度(例えば、0.002、0.02、0.2、2、及び20 µg/ml)の例えば本明細書に記載されるプレート結合抗体によって例えば37 及び5% CO₂で刺激するステップ;及び(c)例えば4日目に、細胞を例えば抗CD4抗体で染色し、例えばフローサイトメトリーによってCFSE低CD4+ 細胞の割合を計測することによりCD4+ T細胞増殖を調べるステップを含むアッセイで評価されるとおり、抗体が2 µg/mlの濃度よりも20 µg/mlの濃度で存在するときにCD4+ T細胞増殖の増加が大きくなる。

【0062】

一実施形態において、抗体は、配列番号15のアミノ酸配列と少なくとも80%の同一

10

20

30

40

50

性を有するVLDメインと、配列番号16のアミノ酸配列と少なくとも80%の同一性を有するVHドメインとを含み、この抗体はCD4+ T細胞増殖を増加させ、このCD4+ T細胞増殖は、例えば、以下のステップ：(a)例えばエンリッチドCD4+ T細胞を例えば10 μ Mカルボキシフルオレセイン二酢酸スクシンイミジルエステル(CFSE)によって例えば37で例えば7分間標識するステップ；(b)綿密に洗浄した後、細胞(例えば、1ウェル10⁵細胞)を例えば3 μ g/mlの例えばプレート結合抗CD3抗体及び種々の濃度(例えば、0.002、0.02、0.2、2、及び20 μ g/ml)の例えば本明細書に記載されるプレート結合抗体によって例えば37及び5%CO₂で刺激するステップ；及び(c)例えば4日目に、細胞を例えば抗CD4抗体で染色し、例えばフローサイトメトリーによってCFSE低CD4+細胞の割合を計測することによりCD4+ T細胞増殖を調べるステップを含むアッセイで評価されるとおり、例えば0.2 μ g/ml~20 μ g/ml、又は2 μ g/ml~20 μ g/mlにおいて抗体の濃度の実質的増加関数である。一実施形態において、抗体は、配列番号15のアミノ酸配列と少なくとも80%の同一性を有するVLDメインと、配列番号16のアミノ酸配列と少なくとも80%の同一性を有するVHドメインとを含み、この抗体はCD4+ T細胞増殖を増加させ、このCD4+ T細胞増殖は、抗OX40抗体濃度が例えば0.2 μ g/ml~20 μ g/ml、又は2 μ g/ml~20 μ g/mlのとき、例えば、以下のステップ：(a)例えばエンリッチドCD4+ T細胞を例えば10 μ Mカルボキシフルオレセイン二酢酸スクシンイミジルエステル(CFSE)によって例えば37で例えば7分間標識するステップ；(b)綿密に洗浄した後、細胞(例えば、1ウェル10⁵細胞)を例えば3 μ g/mlの例えばプレート結合抗CD3抗体及び種々の濃度(例えば、0.002、0.02、0.2、2、及び20 μ g/ml)の例えば本明細書に記載されるプレート結合抗体によって例えば37及び5%CO₂で刺激するステップ；及び(c)例えば4日目に、細胞を例えば抗CD4抗体で染色し、例えばフローサイトメトリーによってCFSE低CD4+細胞の割合を計測することによりCD4+ T細胞増殖を調べるステップを含むアッセイで評価されるとおり、シグモイド用量反応曲線を示す。

【0063】

一実施形態において、抗体は、配列番号15のアミノ酸配列と少なくとも80%の同一性を有するVLDメインと、配列番号16のアミノ酸配列と少なくとも80%の同一性を有するVHドメインとを含み、この抗体は、例えば、以下のステップ：(a)例えばエンリッチドCD4+ T細胞を例えば10 μ Mカルボキシフルオレセイン二酢酸スクシンイミジルエステル(CFSE)によって例えば37で例えば7分間標識するステップ；(b)綿密に洗浄した後、細胞(例えば、1ウェル10⁵細胞)を例えば3 μ g/mlの例えばプレート結合抗CD3抗体及び種々の濃度(例えば、0.002、0.02、0.2、2、及び20 μ g/ml)の例えば本明細書に記載されるプレート結合抗体によって例えば37及び5%CO₂で刺激するステップ；及び(c)例えば4日目に、細胞を例えば抗CD4抗体で染色し、例えばフローサイトメトリーによってCFSE低CD4+細胞の割合を計測することによりCD4+ T細胞増殖を調べるステップを含むアッセイで評価されるとおり、抗体が2 μ g/mlの濃度よりも20 μ g/mlの濃度で存在するときにCD4+ T細胞増殖の増加が大きくなる。

【0064】

一実施形態において、抗体は、配列番号15のアミノ酸配列と少なくとも85%の同一性を有するVLDメインと、配列番号16のアミノ酸配列と少なくとも85%の同一性を有するVHドメインとを含み、この抗体はCD4+ T細胞増殖を増加させ、このCD4+ T細胞増殖は、例えば、以下のステップ：(a)例えばエンリッチドCD4+ T細胞を例えば10 μ Mカルボキシフルオレセイン二酢酸スクシンイミジルエステル(CFSE)によって例えば37で例えば7分間標識するステップ；(b)綿密に洗浄した後、細胞(例えば、1ウェル10⁵細胞)を例えば3 μ g/mlの例えばプレート結合抗CD3抗体及び種々の濃度(例えば、0.002、0.02、0.2、2、及び20 μ g/ml)の例えば本明細書に記載されるプレート結合抗体によって例えば37及び5%CO

10

20

30

40

50

2で刺激するステップ；及び(c)例えば4日目に、細胞を例えば抗CD4抗体で染色し、例えばフローサイトメトリーによってCFSE低CD4+細胞の割合を計測することによりCD4+T細胞増殖を調べるステップを含むアッセイで評価されるとおり、例えば0.2µg/ml~20µg/ml、又は2µg/ml~20µg/mlにおいて抗体の濃度の実質的増加関数である。一実施形態において、抗体は、配列番号15のアミノ酸配列と少なくとも85%の同一性を有するVLDメインと、配列番号16のアミノ酸配列と少なくとも85%の同一性を有するVHドメインとを含み、この抗体はCD4+T細胞増殖を増加させ、このCD4+T細胞増殖は、抗OX40抗体濃度が例えば0.2µg/ml~20µg/ml、又は2µg/ml~20µg/mlのとき、例えば、以下のステップ：(a)例えばエンリッチドCD4+T細胞を例えば10µMカルボキシフルオレセイン二酢酸スクシンイミジルエステル(CFSE)によって例えば37で例えば7分間標識するステップ；(b)綿密に洗浄した後、細胞(例えば、1ウェル10⁵細胞)を例えば3µg/mlの例えばプレート結合抗CD3抗体及び種々の濃度(例えば、0.002、0.02、0.2、2、及び20µg/ml)の例えば本明細書に記載されるプレート結合抗体によって例えば37及び5%CO₂で刺激するステップ；及び(c)例えば4日目に、細胞を例えば抗CD4抗体で染色し、例えばフローサイトメトリーによってCFSE低CD4+細胞の割合を計測することによりCD4+T細胞増殖を調べるステップを含むアッセイで評価されるとおり、シグモイド用量反応曲線を示す。

10

【0065】

一実施形態において、抗体は、配列番号15のアミノ酸配列と少なくとも85%の同一性を有するVLDメインと、配列番号16のアミノ酸配列と少なくとも85%の同一性を有するVHドメインとを含み、この抗体は、例えば、以下のステップ：(a)例えばエンリッチドCD4+T細胞を例えば10µMカルボキシフルオレセイン二酢酸スクシンイミジルエステル(CFSE)によって例えば37で例えば7分間標識するステップ；(b)綿密に洗浄した後、細胞(例えば、1ウェル10⁵細胞)を例えば3µg/mlの例えばプレート結合抗CD3抗体及び種々の濃度(例えば、0.002、0.02、0.2、2、及び20µg/ml)の例えば本明細書に記載されるプレート結合抗体によって例えば37及び5%CO₂で刺激するステップ；及び(c)例えば4日目に、細胞を例えば抗CD4抗体で染色し、例えばフローサイトメトリーによってCFSE低CD4+細胞の割合を計測することによりCD4+T細胞増殖を調べるステップを含むアッセイで評価されるとおり、抗体が2µg/mlの濃度よりも20µg/mlの濃度で存在するときにCD4+T細胞増殖の増加が大きくなる。

20

30

【0066】

一実施形態において、抗体は、配列番号15のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有するVLDメインと、配列番号16のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有するVHドメインとを含み、この抗体はCD4+T細胞増殖を増加させ、このCD4+T細胞増殖は、例えば、以下のステップ：(a)例えばエンリッチドCD4+T細胞を例えば10µMカルボキシフルオレセイン二酢酸スクシンイミジルエステル(CFSE)によって例えば37で例えば7分間標識するステップ；(b)綿密に洗浄した後、細胞(例えば、1ウェル10⁵細胞)を例えば3µg/mlの例えばプレート結合抗CD3抗体及び種々の濃度(例えば、0.002、0.02、0.2、2、及び20µg/ml)の例えば本明細書に記載されるプレート結合抗体によって例えば37及び5%CO₂で刺激するステップ；及び(c)例えば4日目に、細胞を例えば抗CD4抗体で染色し、例えばフローサイトメトリーによってCFSE低CD4+細胞の割合を計測することによりCD4+T細胞増殖を調べるステップを含むアッセイで評価されるとおり、例えば0.2µg/ml~20µg/ml、又は2µg/ml~20µg/mlにおいて抗体の濃度の実質的増加関数である。一実施形態において、抗体は、配列番号15のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有するVLDメインと、配列番号16のアミノ酸配列と少なくとも90%の同一性を有するVHドメインとを含み、この抗体はCD4+T細胞増殖を増加させ、このCD4+T細胞増殖は、抗OX40抗体濃度が例えば0.2µ

40

50

g / m l ~ 2 0 μ g / m l、又は 2 μ g / m l ~ 2 0 μ g / m l のとき、例えば、以下のステップ：(a) 例えばエンリッチド C D 4 + T 細胞を例えば 1 0 μ M カルボキシフルオレセイン二酢酸スクシンイミジルエステル (C F S E) によって例えば 3 7 で例えば 7 分間標識するステップ；(b) 綿密に洗浄した後、細胞 (例えば、1 ウェル 1 0 ⁵ 細胞) を例えば 3 μ g / m l の例えばプレート結合抗 C D 3 抗体及び種々の濃度 (例えば、0 . 0 0 2、0 . 0 2、0 . 2、2、及び 2 0 μ g / m l) の例えば本明細書に記載されるプレート結合抗体によって例えば 3 7 及び 5 % C O ₂ で刺激するステップ；及び (c) 例えば 4 日目に、細胞を例えば抗 C D 4 抗体で染色し、例えばフローサイトメトリーによって C F S E 低 C D 4 + 細胞の割合を計測することにより C D 4 + T 細胞増殖を調べるステップを含むアッセイで評価されるとおり、シグモイド用量反応曲線を示す。

10

【 0 0 6 7 】

一実施形態において、抗体は、配列番号 1 5 のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % の同一性を有する V L ドメインと、配列番号 1 6 のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % の同一性を有する V H ドメインとを含み、この抗体は、例えば、以下のステップ：(a) 例えばエンリッチド C D 4 + T 細胞を例えば 1 0 μ M カルボキシフルオレセイン二酢酸スクシンイミジルエステル (C F S E) によって例えば 3 7 で例えば 7 分間標識するステップ；(b) 綿密に洗浄した後、細胞 (例えば、1 ウェル 1 0 ⁵ 細胞) を例えば 3 μ g / m l の例えばプレート結合抗 C D 3 抗体及び種々の濃度 (例えば、0 . 0 0 2、0 . 0 2、0 . 2、2、及び 2 0 μ g / m l) の例えば本明細書に記載されるプレート結合抗体によって例えば 3 7 及び 5 % C O ₂ で刺激するステップ；及び (c) 例えば 4 日目に、細胞を例えば抗 C D 4 抗体で染色し、例えばフローサイトメトリーによって C F S E 低 C D 4 + 細胞の割合を計測することにより C D 4 + T 細胞増殖を調べるステップを含むアッセイで評価されるとおり、抗体が 2 μ g / m l の濃度よりも 2 0 μ g / m l の濃度で存在するときに C D 4 + T 細胞増殖の増加が大きくなる。

20

【 0 0 6 8 】

一実施形態において、抗体は、配列番号 1 5 のアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % の同一性を有する V L ドメインと、配列番号 1 6 のアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % の同一性を有する V H ドメインとを含み、この抗体は C D 4 + T 細胞増殖を増加させ、この C D 4 + T 細胞増殖は、例えば、以下のステップ：(a) 例えばエンリッチド C D 4 + T 細胞を例えば 1 0 μ M カルボキシフルオレセイン二酢酸スクシンイミジルエステル (C F S E) によって例えば 3 7 で例えば 7 分間標識するステップ；(b) 綿密に洗浄した後、細胞 (例えば、1 ウェル 1 0 ⁵ 細胞) を例えば 3 μ g / m l の例えばプレート結合抗 C D 3 抗体及び種々の濃度 (例えば、0 . 0 0 2、0 . 0 2、0 . 2、2、及び 2 0 μ g / m l) の例えば本明細書に記載されるプレート結合抗体によって例えば 3 7 及び 5 % C O ₂ で刺激するステップ；及び (c) 例えば 4 日目に、細胞を例えば抗 C D 4 抗体で染色し、例えばフローサイトメトリーによって C F S E 低 C D 4 + 細胞の割合を計測することにより C D 4 + T 細胞増殖を調べるステップを含むアッセイで評価されるとおり、例えば 0 . 2 μ g / m l ~ 2 0 μ g / m l、又は 2 μ g / m l ~ 2 0 μ g / m l において抗体の濃度の実質的増加関数である。一実施形態において、抗体は、配列番号 1 5 のアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % の同一性を有する V L ドメインと、配列番号 1 6 のアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % の同一性を有する V H ドメインとを含み、この抗体は C D 4 + T 細胞増殖を増加させ、この C D 4 + T 細胞増殖は、抗 O X 4 0 抗体濃度が例えば 0 . 2 μ g / m l ~ 2 0 μ g / m l、又は 2 μ g / m l ~ 2 0 μ g / m l のとき、例えば、以下のステップ：(a) 例えばエンリッチド C D 4 + T 細胞を例えば 1 0 μ M カルボキシフルオレセイン二酢酸スクシンイミジルエステル (C F S E) によって例えば 3 7 で例えば 7 分間標識するステップ；(b) 綿密に洗浄した後、細胞 (例えば、1 ウェル 1 0 ⁵ 細胞) を例えば 3 μ g / m l の例えばプレート結合抗 C D 3 抗体及び種々の濃度 (例えば、0 . 0 0 2、0 . 0 2、0 . 2、2、及び 2 0 μ g / m l) の例えば本明細書に記載されるプレート結合抗体によって例えば 3 7 及び 5 % C O ₂ で刺激するステップ；及び (c) 例えば 4 日目に、細胞を例えば抗 C D 4 抗体で染色し、例えばフローサイトメトリーによ

30

40

50

ってCFSE低CD4+ 細胞の割合を計測することによりCD4+ T細胞増殖を調べるステップを含むアッセイで評価されるとおり、シグモイド用量反応曲線を示す。

【0069】

一実施形態において、抗体は、配列番号15のアミノ酸配列と少なくとも95%の同一性を有するVLDメインと、配列番号16のアミノ酸配列と少なくとも95%の同一性を有するVHドメインとを含み、この抗体は、例えば、以下のステップ：(a)例えばエンリッチドCD4+ T細胞を例えば10μMカルボキシフルオレセイン二酢酸スクシンイミジルエステル(CFSE)によって例えば37で例えば7分間標識するステップ；(b)綿密に洗浄した後、細胞(例えば、1ウェル10⁵細胞)を例えば3μg/mlの例えばプレート結合抗CD3抗体及び種々の濃度(例えば、0.002、0.02、0.2、2、及び20μg/ml)の例えば本明細書に記載されるプレート結合抗体によって例えば37及び5%CO₂で刺激するステップ；及び(c)例えば4日目に、細胞を例えば抗CD4抗体で染色し、例えばフローサイトメトリーによってCFSE低CD4+ 細胞の割合を計測することによりCD4+ T細胞増殖を調べるステップを含むアッセイで評価されるとおり、抗体が2μg/mlの濃度よりも20μg/mlの濃度で存在するときにCD4+ T細胞増殖の増加が大きくなる。

10

【0070】

一実施形態において、抗体は、配列番号15のアミノ酸配列と少なくとも98%の同一性を有するVLDメインと、配列番号16のアミノ酸配列と少なくとも98%の同一性を有するVHドメインとを含み、この抗体はCD4+ T細胞増殖を増加させ、このCD4+ T細胞増殖は、例えば、以下のステップ：(a)例えばエンリッチドCD4+ T細胞を例えば10μMカルボキシフルオレセイン二酢酸スクシンイミジルエステル(CFSE)によって例えば37で例えば7分間標識するステップ；(b)綿密に洗浄した後、細胞(例えば、1ウェル10⁵細胞)を例えば3μg/mlの例えばプレート結合抗CD3抗体及び種々の濃度(例えば、0.002、0.02、0.2、2、及び20μg/ml)の例えば本明細書に記載されるプレート結合抗体によって例えば37及び5%CO₂で刺激するステップ；及び(c)例えば4日目に、細胞を例えば抗CD4抗体で染色し、例えばフローサイトメトリーによってCFSE低CD4+ 細胞の割合を計測することによりCD4+ T細胞増殖を調べるステップを含むアッセイで評価されるとおり、例えば0.2μg/ml~20μg/ml、又は2μg/ml~20μg/mlにおいて抗体の濃度の実質的増加関数である。一実施形態において、抗体は、配列番号15のアミノ酸配列と少なくとも98%の同一性を有するVLDメインと、配列番号16のアミノ酸配列と少なくとも98%の同一性を有するVHドメインとを含み、この抗体はCD4+ T細胞増殖を増加させ、このCD4+ T細胞増殖は、抗OX40抗体濃度が例えば0.2μg/ml~20μg/ml、又は2μg/ml~20μg/mlのとき、例えば、以下のステップ：(a)例えばエンリッチドCD4+ T細胞を例えば10μMカルボキシフルオレセイン二酢酸スクシンイミジルエステル(CFSE)によって例えば37で例えば7分間標識するステップ；(b)綿密に洗浄した後、細胞(例えば、1ウェル10⁵細胞)を例えば3μg/mlの例えばプレート結合抗CD3抗体及び種々の濃度(例えば、0.002、0.02、0.2、2、及び20μg/ml)の例えば本明細書に記載されるプレート結合抗体によって例えば37及び5%CO₂で刺激するステップ；及び(c)例えば4日目に、細胞を例えば抗CD4抗体で染色し、例えばフローサイトメトリーによってCFSE低CD4+ 細胞の割合を計測することによりCD4+ T細胞増殖を調べるステップを含むアッセイで評価されるとおり、シグモイド用量反応曲線を示す。

20

30

40

【0071】

一実施形態において、抗体は、配列番号15のアミノ酸配列と少なくとも98%の同一性を有するVLDメインと、配列番号16のアミノ酸配列と少なくとも98%の同一性を有するVHドメインとを含み、この抗体は、例えば、以下のステップ：(a)例えばエンリッチドCD4+ T細胞を例えば10μMカルボキシフルオレセイン二酢酸スクシンイミジルエステル(CFSE)によって例えば37で例えば7分間標識するステップ；(

50

b) 綿密に洗浄した後、細胞（例えば、1 ウェル 10^5 細胞）を例えば $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ の例えばプレート結合抗 CD 3 抗体及び種々の濃度（例えば、 0.002 、 0.02 、 0.2 、 2 、及び $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）の例えば本明細書に記載されるプレート結合抗体によって例えば 37 及び 5% CO_2 で刺激するステップ；及び (c) 例えば 4 日目に、細胞を例えば抗 CD 4 抗体で染色し、例えばフローサイトメトリーによって CFSE 低 CD 4 + 細胞の割合を計測することにより CD 4 + T 細胞増殖を調べるステップを含むアッセイで評価されるとおり、抗体が $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度よりも $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で存在するときに CD 4 + T 細胞増殖の増加が大きくなる。

【0072】

一実施形態において、抗体はヒト免疫グロブリン IgG_1 重鎖定常領域を含み、この IgG_1 重鎖定常領域のアミノ酸配列は、N297A、N297Q、D265A、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される突然変異を含む。一実施形態において、本抗体は IgG_1 重鎖定常領域を含み、この IgG_1 重鎖定常領域のアミノ酸配列は、D265A、P329A、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される突然変異を含む。

10

【0073】

一実施形態において、ヒト OX 40 に特異的に結合する抗体は、抗体と変異 OX 40 との間の結合が抗体と配列番号 55 のヒト OX 40 配列との間の結合と比べて実質的に弱まっている抗体であり、この変異 OX 40 は、N60A、R62A、R80A、L88A、P93A、P99A、P115A、及びこれらの組み合わせからなる群から選択されるアミノ酸突然変異を除いて、配列番号 55 の配列を含む。

20

【0074】

一実施形態において、ヒト OX 40 に特異的に結合する抗体は、抗体と変異 OX 40 との間の結合が抗体と配列番号 55 のヒト OX 40 配列との間の結合と比べて実質的に弱まっている抗体であり、この変異 OX 40 は、アミノ酸突然変異 W58A、N60A、R62A、R80A、L88A、P93A、P99A、及び P115A を除いて、配列番号 55 の配列を含む。

【0075】

一実施形態において、ヒト OX 40 に特異的に結合する抗体は、配列番号 55 のヒト OX 40 配列への結合と比較して、N60A、R62A、R80A、L88A、P93A、P99A、P115A、及びこれらの組み合わせからなる群から選択されるアミノ酸突然変異の存在を除いて、配列番号 55 と同一のタンパク質への結合の低下又は欠如を呈する抗体である。

30

【0076】

一実施形態において、ヒト OX 40 に特異的に結合する抗体である。ヒト OX 40 に特異的に結合する単離抗体であり、この抗体は、配列番号 55 のヒト OX 40 配列への結合と比較して、アミノ酸突然変異 W58A、N60A、R62A、R80A、L88A、P93A、P99A、及び P115A の存在を除いて、配列番号 55 と同一のタンパク質への結合の低下又は欠如を呈する。

【0077】

一実施形態において、ヒト OX 40 に特異的に結合する抗体は、60、62、80、88、93、99、115、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される配列番号 55 の残基を含むヒト OX 40 配列のエピトープに特異的に結合する抗体である。

40

【0078】

一実施形態において、ヒト OX 40 に特異的に結合する抗体は、配列番号 55 の残基 58、60、62、80、88、93、99、及び 115 を含むヒト OX 40 配列のエピトープに特異的に結合する抗体である。

【0079】

一実施形態において、ヒト OX 40 に特異的に結合する抗体は、60、62、80、88、93、99、115、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される配列番号 55 の少なくとも 1 つの残基に特異的に結合する抗体である。

50

【0080】

一実施形態において、抗体は、本明細書に提供される抗体の重鎖可変領域配列及び軽鎖可変領域配列を含み、Fab、Fab'、F(ab')₂、及びscFv断片からなる群から選択される。

【0081】

一実施形態において、抗体はヒト免疫グロブリンIgG₁重鎖定常領域を含み、このIgG₁重鎖定常領域のアミノ酸配列は、N297A、N297Q、D265A、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される突然変異を含む。一実施形態において、本抗体はIgG₁重鎖定常領域を含み、このIgG₁重鎖定常領域のアミノ酸配列は、D265A、P329A、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される突然変異を含む。

10

【0082】

一実施形態において、ヒトOX40に特異的に結合する抗体は、(a)ヒトOX40に特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、(b)ヒト免疫細胞が発現する抗原に特異的に結合しない第2の抗原結合ドメインとを含む。

【0083】

一実施形態において、ヒトOX40に特異的に結合する抗原結合ドメインは、(a)GSAMH(配列番号4)のアミノ酸配列を含むVH相補性決定領域(CDR)1と、RIRSKANSYATAYAA SVKG(配列番号5)のアミノ酸配列を含むVH-CDR2と、GIYDSSGYDY(配列番号6)のアミノ酸配列を含むVH-CDR3とを含む第1の重鎖可変ドメイン(VH)と、(b)RSSQSLLHSNGYNYLD(配列番号1)のアミノ酸配列を含むVL-CDR1と、LGSNRAS(配列番号2)のアミノ酸配列を含むVL-CDR2と、MQALQTPLT(配列番号3)のアミノ酸配列を含むVL-CDR3とを含む第1の軽鎖可変ドメイン(VL)を含む。一実施形態において、ヒトOX40に特異的に結合する抗原結合ドメインは、配列番号16のアミノ酸配列を含むVHと配列番号15のアミノ酸配列を含むVLとを含む抗体と同じヒトOX40のエピトープに特異的に結合する。一実施形態において、ヒトOX40に特異的に結合する抗原結合ドメインは、配列番号55のヒトOX40配列への結合と比較して、N60A、R62A、R80A、L88A、P93A、P99A、P115A、及びこれらの組み合わせからなる群から選択されるアミノ酸突然変異の存在を除いて、配列番号55と同一のタンパク質への結合の低下又は欠如を呈する。一実施形態において、ヒトOX40に特異的に結合する抗原結合ドメインはVHとVLとを含み、このVHは配列番号16のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、ヒトOX40に特異的に結合する抗原結合ドメインはVHとVLとを含み、このVLは配列番号15のアミノ酸配列を含む。

20

30

【0084】

一実施形態において、第2の抗原結合ドメインは非ヒト抗原に特異的に結合する。一実施形態において、第2の抗原結合ドメインはウイルス抗原に特異的に結合する。一実施形態において、ウイルス抗原はHIV抗原である。一実施形態において、第2の抗原結合ドメインはニワトリアルブミン又は鶏卵リゾチームに特異的に結合する。

【0085】

一実施形態において、ヒトOX40に特異的に結合する抗体は、(a)GSAMH(配列番号4)のアミノ酸配列を含むVH相補性決定領域(CDR)1と、RIRSKANSYATAYAA SVKG(配列番号5)のアミノ酸配列を含むVH-CDR2と、GIYDSSGYDY(配列番号6)のアミノ酸配列を含むVH-CDR3とを含む第1の重鎖可変ドメイン(VH)と、(b)RSSQSLLHSNGYNYLD(配列番号1)のアミノ酸配列を含むVL-CDR1と、LGSNRAS(配列番号2)のアミノ酸配列を含むVL-CDR2と、MQALQTPLT(配列番号3)のアミノ酸配列を含むVL-CDR3とを含む第1の軽鎖可変ドメイン(VL)を含む。一実施形態において、ヒトOX40に特異的に結合する抗原結合ドメインは、配列番号16のアミノ酸配列を含むVHと配列番号15のアミノ酸配列を含むVLとを含む抗体と同じヒトOX40のエピトープに特異的に結合する。一実施形態において、ヒトOX40に特異的に結合する抗原結合ドメ

40

50

インは、配列番号55のヒトOX40配列への結合と比較して、N60A、R62A、R80A、L88A、P93A、P99A、P115A、及びこれらの組み合わせからなる群から選択されるアミノ酸突然変異の存在を除いて、配列番号55と同一のタンパク質への結合の低下又は欠如を呈する。一実施形態において、ヒトOX40に特異的に結合する抗原結合ドメインはVHとVLとを含み、このVHは配列番号16のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、ヒトOX40に特異的に結合する抗原結合ドメインはVHとVLとを含み、このVLは配列番号15のアミノ酸配列を含む。

【0086】

一実施形態において、第2の重鎖はFc断片である。

【0087】

一実施形態において、ヒトOX40に特異的に結合する抗原結合ドメインは、配列番号16のアミノ酸配列と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、又は99%同一のアミノ酸配列を含むVHを含む。一実施形態において、ヒトOX40に特異的に結合する抗原結合ドメインは、配列番号16のアミノ酸配列を含むVHを含む。一実施形態において、ヒトOX40に特異的に結合する抗原結合ドメインは、ヒトIGHV3-73生殖系列配列に由来するアミノ酸配列を含むVHを含む。

【0088】

一実施形態において、ヒトOX40に特異的に結合する抗原結合ドメインは、配列番号15のアミノ酸配列と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、又は99%同一のアミノ酸配列を含むVLを含む。一実施形態において、ヒトOX40に特異的に結合する抗原結合ドメインは、配列番号3のアミノ酸配列を含むVL-CDR3を含む。一実施形態において、ヒトOX40に特異的に結合する抗原結合ドメインは、配列番号15のアミノ酸配列を含むVLを含む。一実施形態において、ヒトOX40に特異的に結合する抗原結合ドメインは、配列番号20のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。一実施形態において、ヒトOX40に特異的に結合する抗原結合ドメインは、配列番号50のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。一実施形態において、ヒトOX40に特異的に結合する抗原結合ドメインは、ヒトIGKV2-28生殖系列配列に由来するアミノ酸配列を含むVLを含む。

【0089】

一実施形態において、ヒトOX40に特異的に結合する抗原結合ドメインは、それぞれ配列番号16及び15に示されるVH及びVL配列を含む。一実施形態において、ヒトOX40に特異的に結合する抗原結合ドメインは、配列番号21のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。一実施形態において、ヒトOX40に特異的に結合する抗原結合ドメインは、配列番号60のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。

【0090】

一実施形態において、第1の抗原結合ドメイン及び第2の抗原結合ドメインは、N297A、N297Q、D265A、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される同一の突然変異を含む。一実施形態において、第1の抗原結合ドメイン及び第2の抗原結合ドメインは、D265A、P329A、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される同一の突然変異を含む。一実施形態において、ヒトOX40に特異的に結合する抗原結合ドメイン及び第2の重鎖又はその断片は、N297A、N297Q、D265A、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される同一の突然変異を含む。一実施形態において、ヒトOX40に特異的に結合する抗原結合ドメイン及び第2の重鎖又はその断片は、D265A、P329A、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される同一の突然変異を含む。

【0091】

一実施形態において、本抗体はヒトOX40に対してアンタゴニスト性である。一実施形態において、本抗体はヒトOX40の活性を不活性化するか、低下させるか、又は阻害する。一実施形態において、本抗体はヒトOX40のヒトOX40リガンドへの結合を阻害するか又は低下させる。一実施形態において、本抗体はヒトOX40シグナル伝達を阻

10

20

30

40

50

害するか又は低下させる。一実施形態において、本抗体は、ヒトOX40リガンドによって誘導されるヒトOX40シグナル伝達を阻害するか又は低下させる。

【0092】

一実施形態において、本抗体は検出可能標識を含む。

【0093】

一実施形態において、本発明は、医薬として用いられる本発明の抗体に関する。

【0094】

一実施形態において、本発明は、診断薬として用いられる本発明の抗体に関する。

【0095】

一実施形態において、本発明は、試料中のOX40をインビトロ検出するための本発明の抗体の使用に関する。一実施形態において、OX40はヒトOX40である。

10

【0096】

一実施形態において、本発明は、インビトロでヒトOX40の活性を活性化するか、増強するか、又は誘導するための本発明の抗体の使用に関する。一実施形態において、本抗体はインビトロでCD4+ T細胞増殖を誘導する。

【0097】

一態様において、本明細書には、OX40（例えば、ヒトOX40）に特異的に結合する抗体をコードする単離核酸分子が提供される。一実施形態において、本核酸分子は、本明細書に提供される抗OX40抗体の重鎖可変領域又は重鎖をコードする。一実施形態において、本核酸分子は、本明細書に提供される抗OX40抗体の軽鎖可変領域又は軽鎖をコードする。一実施形態において、本核酸分子は、本明細書に提供される抗OX40抗体の重鎖可変領域又は重鎖及びこの抗体の軽鎖可変領域又は軽鎖をコードする。一実施形態において、本核酸分子は、配列番号16のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域をコードする。一実施形態において、本核酸分子は、配列番号15のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域をコードする。かかる核酸分子によってコードされる単離抗体も本明細書に提供される。

20

【0098】

一態様において、本明細書には、かかる核酸分子を含むベクターが提供される。

【0099】

一態様において、本明細書には、かかる核酸分子又はかかるベクターを含む宿主細胞が提供される。一実施形態において、本宿主細胞は、大腸菌（*E. coli*）、シュードモナス属（*Pseudomonas*）、バチルス属（*Bacillus*）、ストレプトミセス属（*Streptomyces*）、酵母、CHO、YB/20、NS0、PER-C6、HEK-293T、NIH-3T3、HeLa、BHK、Hep G2、SP2/0、R1.1、B-W、L-M、COS1、COS7、BSC1、BSC40、BMT10細胞、植物細胞、昆虫細胞、及び組織培養下のヒト細胞からなる群から選択される。

30

【0100】

一態様において、本明細書には、OX40（例えば、ヒトOX40）に特異的に結合する抗体を作製する方法が提供され、この方法は、かかる宿主細胞を、核酸分子が発現され、及び抗体が産生されるように培養するステップを含む。

【0101】

一実施形態において、本発明は、医薬として用いられる本発明の抗体、本発明の核酸分子、本発明のベクター、及び/又は本発明の宿主細胞に関する。

40

【0102】

一実施形態において、本発明は、診断薬として用いられる本発明の抗体、本発明の核酸分子、本発明のベクター、及び/又は本発明の宿主細胞に関する。

【0103】

一実施形態において、本発明は、試料中のOX40をインビトロ検出するための本発明の抗体、本発明の核酸分子、本発明のベクター、及び/又は本発明の宿主細胞の使用に関する。一実施形態において、OX40はヒトOX40である。

【0104】

50

一実施形態において、本発明は、インビトロでヒトOX40の活性を活性化するか、増強するか、又は誘導するための本発明の抗体の使用に関する。一実施形態において、本抗体はインビトロでCD4+ T細胞増殖を誘導する。

【0105】

一態様において、本明細書には、本明細書に提供されるOX40に特異的に結合する抗体を含む医薬組成物、OX40（例えば、ヒトOX40）に特異的に結合する抗体をコードする核酸分子、かかる核酸分子を含むベクター、又はかかる核酸分子若しくはベクターを含む宿主細胞が提供される。

【0106】

一態様において、本明細書には、医薬として用いられる、本明細書に提供されるOX40に特異的に結合する抗体を含む医薬組成物、OX40、例えばヒトOX40に特異的に結合する抗体をコードする核酸分子、かかる核酸分子を含むベクター、又はかかる核酸分子若しくはベクターを含む宿主細胞が提供される。

10

【0107】

一態様において、本明細書には、診断薬として用いられる、本明細書に提供されるOX40に特異的に結合する抗体を含む医薬組成物、OX40、例えばヒトOX40に特異的に結合する抗体をコードする核酸分子、かかる核酸分子を含むベクター、又はかかる核酸分子若しくはベクターを含む宿主細胞が提供される。

【0108】

一態様において、本明細書には、対象の免疫応答を調節する方法が提供され、この方法は、本明細書に提供される抗体、核酸、ベクター、宿主細胞、又は医薬組成物の有効量を対象に投与するステップを含む。一実施形態において、本方法は、対象の免疫応答を増強又は誘導する方法である。一実施形態において、免疫応答を調節することは、対象の免疫応答を増強又は誘導することを含む。

20

【0109】

一態様において、本発明は、免疫応答を調節する方法に用いられる本発明の抗体、核酸、ベクター、宿主細胞、及び/又は医薬組成物に関する。

【0110】

一態様において、本発明は、免疫応答を増強又は誘導する方法に用いられる本発明の抗体、核酸、ベクター、宿主細胞、及び/又は医薬組成物に関する。一実施形態において、本抗体はアゴニスト性である。

30

【0111】

一態様において、本発明は、対象の免疫応答を調節する方法に用いられる本発明の抗体、核酸、ベクター、宿主細胞、及び/又は医薬組成物に関する。

【0112】

一態様において、本発明は、対象の免疫応答を増強又は誘導する方法に用いられる本発明の抗体、核酸、ベクター、宿主細胞、及び/又は医薬組成物に関する。一実施形態において、本抗体はアゴニスト性である。

【0113】

一態様において、本発明は、対象の免疫応答を調節する方法であって、本発明の抗体、核酸、ベクター、宿主細胞、又は医薬組成物の有効量を対象に投与するステップを含む方法に用いられる本発明の抗体、核酸、ベクター、宿主細胞、及び/又は医薬組成物に関する。

40

【0114】

一態様において、本発明は、対象の免疫応答を増強又は誘導する方法であって、本発明の抗体、核酸、ベクター、宿主細胞、又は医薬組成物の有効量を対象に投与するステップを含む方法に用いられる本発明の抗体、核酸、ベクター、宿主細胞、及び/又は医薬組成物に関する。一実施形態において、本抗体はアゴニスト性である。

【0115】

一態様において、本明細書には、対象のT細胞拡大及びT細胞エフェクター機能を増強

50

する方法が提供され、この方法は、本明細書に提供される抗体、核酸、ベクター、宿主細胞、又は医薬組成物の有効量を対象に投与するステップを含む。

【0116】

一態様において、本発明は、T細胞拡大及びT細胞エフェクター機能を増強する方法に用いられる本発明の抗体、核酸、ベクター、宿主細胞、及び/又は医薬組成物に関する。一実施形態において、本抗体はアゴニスト性である。

【0117】

一態様において、本発明は、対象のT細胞拡大及びT細胞エフェクター機能を増強する方法に用いられる、本発明の抗体、核酸、ベクター、宿主細胞、及び/又は医薬組成物に関する。一実施形態において、本抗体はアゴニスト性である。

10

【0118】

一態様において、本発明は、対象のT細胞拡大及びT細胞エフェクター機能を増強する方法であって、本発明の抗体、核酸、ベクター、宿主細胞、及び/又は医薬組成物の有効量を対象に投与するステップを含む方法に用いられる本発明の抗体、核酸、ベクター、宿主細胞、及び/又は医薬組成物に関する。一実施形態において、本抗体はアゴニスト性である。

【0119】

一態様において、本明細書には、対象の癌を治療する方法が提供され、この方法は、本明細書に提供される抗体、核酸、ベクター、宿主細胞、又は医薬組成物の有効量を対象に投与するステップを含む。一部の実施形態において、癌は、黒色腫、腎癌、及び前立腺癌からなる群から選択される。一部の実施形態において、癌は、黒色腫、腎癌、前立腺癌、結腸癌、及び肺癌からなる群から選択される。一部の実施形態において、肺癌は非小細胞肺癌(NSCLC)である。一例では、本方法は、チェックポイントターゲティング剤を対象に投与するステップを更に含む。一例では、チェックポイントターゲティング剤は、アンタゴニスト抗PD-1抗体、アンタゴニスト抗PD-L1抗体、アンタゴニスト抗PD-L2抗体、アンタゴニスト抗CTLA-4抗体、アンタゴニスト抗TIM-3抗体、アンタゴニスト抗LAG-3抗体、アンタゴニスト抗CEACAM1抗体、アゴニスト抗GITR抗体、アゴニスト抗CD137抗体、及びアゴニスト抗OX40抗体からなる群から選択される。

20

【0120】

一態様において、本発明は、癌を治療する方法に用いられる本発明の抗体、核酸、ベクター、宿主細胞、及び/又は医薬組成物に関する。一実施形態において、本抗体はアゴニスト性である。

30

【0121】

一態様において、本発明は、対象の癌を治療する方法に用いられる本発明の抗体、核酸、ベクター、宿主細胞、及び/又は医薬組成物に関する。一実施形態において、本抗体はアゴニスト性である。

【0122】

一態様において、本発明は、対象の癌を治療する方法であって、本発明の抗体、核酸、ベクター、宿主細胞、及び/又は医薬組成物の有効量を対象に投与するステップを含む方法に用いられる本発明の抗体、核酸、ベクター、宿主細胞、及び/又は医薬組成物に関する。一実施形態において、本抗体はアゴニスト性である。

40

【0123】

一態様において、本発明は、医薬として用いられる、(a)本発明の抗体、核酸、ベクター、宿主細胞、及び/又は医薬組成物、並びに(b)チェックポイントターゲティング剤に関する。一実施形態において、本抗体はアゴニスト性である。

【0124】

一態様において、本発明は、癌を治療する方法に用いられる、(a)本発明の抗体、核酸、ベクター、宿主細胞、及び/又は医薬組成物、並びに(b)チェックポイントターゲティング剤に関する。一実施形態において、本抗体はアゴニスト性である。

50

【0125】

一態様において、本発明は、(a)本発明の抗体、核酸、ベクター、宿主細胞、及び/又は医薬組成物、並びに(b)チェックポイントターゲティング剤を含む医薬組成物、キット又はキットオブパーツに関する。

【0126】

本明細書に記載されるとおりの抗体は、癌の治療用のIDO阻害薬と併用して使用することができる。一実施形態において、本方法は、インドールアミン-2,3-ジオキシゲナーゼ(IDO)阻害薬を対象に投与するステップを更に含む。癌の治療に用いられる本明細書に記載されるとおりのIDO阻害薬は、錠剤、丸薬又はカプセルなどの固形剤形の医薬組成物で存在し、この医薬組成物はIDO阻害薬と薬学的に許容可能な賦形剤とを含む。そのため、本明細書に記載されるとおりの抗体と本明細書に記載されるとおりのIDO阻害薬とは、別個の剤形として別個に、逐次的に又は同時に投与することができる。一実施形態において、本抗体は非経口投与され、IDO阻害薬は経口投与される。詳細な実施形態において、この阻害薬は、エパカドスタット(Incyte Corporation)、F001287(Flexus Biosciences)、インドキシモド(NewLink Genetics)、及びNLG919(NewLink Genetics)からなる群から選択される。エパカドスタットについては、国際公開第2010/005958号パンフレット(あらゆる目的のために全体として参照により本明細書に援用される)に記載されている。一実施形態において、阻害薬はエパカドスタットである。別の実施形態において、阻害薬はF001287である。別の実施形態において、阻害薬はインドキシモドである。別の実施形態において、阻害薬はNLG919である。

10

20

【0127】

一態様において、本発明は、医薬として用いられる、(a)本発明の抗体、核酸、ベクター、宿主細胞、及び/又は医薬組成物、並びに(b)IDO阻害薬に関する。

【0128】

一態様において、本発明は、癌を治療する方法に用いられる、(a)本発明の抗体、核酸、ベクター、宿主細胞、及び/又は医薬組成物、並びに(b)IDO阻害薬に関する。一態様において、本発明は、(a)本発明の抗体、核酸、ベクター、宿主細胞、及び/又は医薬組成物、並びに(b)IDO阻害薬を含む組成物、キット又はキットオブパーツに関する。

30

【0129】

本明細書に記載される抗体は、ワクチンと併用して使用することができる。詳細な実施形態において、ワクチンは熱ショックタンパク質ペプチド複合体(HSPPC)を含み、このHSPPCは、1つ以上の抗原ペプチド(例えば、腫瘍関連抗原ペプチド)と複合体を形成している熱ショックタンパク質(例えば、gp96タンパク質、hsp70タンパク質、又はhsc70タンパク質)を含む。一実施形態において、熱ショックタンパク質はgp96タンパク質であり、腫瘍関連抗原ペプチドと複合体を形成する。一実施形態において、熱ショックタンパク質はhsp70又はhsc70タンパク質であり、腫瘍関連抗原ペプチドと複合体を形成する。一実施形態において、熱ショックタンパク質はgp96タンパク質であり、腫瘍関連抗原ペプチドと複合体を形成し、ここで、HSPPCは、対象から得られた腫瘍に由来する。一実施形態において、熱ショックタンパク質はhsp70又はhsc70タンパク質であり、腫瘍関連抗原ペプチドと複合体を形成し、ここで、HSPPCは、対象から得られた腫瘍に由来する。

40

【0130】

一態様において、本発明は、医薬として用いられる、(a)本発明の抗体、核酸、ベクター、宿主細胞、及び/又は医薬組成物、並びに(b)ワクチンに関する。一実施形態において、本抗体はアゴニスト性である。

【0131】

一態様において、本発明は、癌を治療する方法に用いられる、(a)本発明の抗体、核酸、ベクター、宿主細胞、及び/又は医薬組成物、並びに(b)ワクチンに関する。一実

50

施形態において、本抗体はアゴニスト性である。

【0132】

一態様において、本発明は、(a)本発明の抗体、核酸、ベクター、宿主細胞、及び/又は医薬組成物、並びに(b)ワクチンを含む組成物、キット又はキットパーツに関する。一実施形態において、本抗体はアゴニスト性である。

【0133】

一部の実施形態において、本開示は、癌の治療用医薬の製造における本明細書に記載されるとおりの抗体の使用を提供する。特定の実施形態において、本開示は、癌の治療に用いられる本明細書に記載されるとおりの抗体を提供する。特定の実施形態において、本開示は、癌の治療用医薬の製造における本明細書に記載されるとおりの医薬組成物の使用を提供する。特定の実施形態において、本開示は、癌の治療に用いられる本明細書に記載されるとおりの医薬組成物を提供する。

10

【0134】

一態様において、本明細書には、対象の自己免疫性又は炎症性疾患又は障害を治療する方法が提供され、この方法は、本明細書に提供される抗体、核酸、ベクター、宿主細胞、又は医薬組成物の有効量を対象に投与するステップを含む。一部の実施形態において、疾患又は障害は、移植片拒絶反応、脈管炎、喘息、関節リウマチ、皮膚炎、炎症性腸疾患、ブドウ膜炎、及びループスからなる群から選択される。

【0135】

一態様において、本発明は、自己免疫性又は炎症性疾患又は障害を治療する方法に用いられる本発明の抗体、核酸、ベクター、宿主細胞、及び/又は医薬組成物に関する。一実施形態において、本抗体はアンタゴニスト性である。

20

【0136】

一態様において、本発明は、対象の自己免疫性又は炎症性疾患又は障害を治療する方法に用いられる本発明の抗体、核酸、ベクター、宿主細胞、及び/又は医薬組成物に関する。一実施形態において、本抗体はアンタゴニスト性である。

【0137】

一態様において、本発明は、対象の自己免疫性又は炎症性疾患又は障害を治療する方法であって、本発明の抗体、核酸、ベクター、宿主細胞、及び/又は医薬組成物の有効量を対象に投与するステップを含む方法に用いられる本発明の抗体、核酸、ベクター、宿主細胞、及び/又は医薬組成物に関する。一実施形態において、本抗体はアンタゴニスト性である。

30

【0138】

一態様において、本明細書には、対象の感染症を治療する方法が提供され、この方法は、本明細書に提供される抗体、核酸、ベクター、宿主細胞、又は医薬組成物の有効量を対象に投与するステップを含む。

【0139】

一態様において、本発明は、感染症を治療する方法に用いられる本発明の抗体、核酸、ベクター、宿主細胞、及び/又は医薬組成物に関する。一実施形態において、本抗体はアゴニスト性である。一実施形態において、本抗体はアンタゴニスト性である。

40

【0140】

一態様において、本発明は、対象の感染症を治療する方法に用いられる本発明の抗体、核酸、ベクター、宿主細胞、及び/又は医薬組成物に関する。一実施形態において、本抗体はアゴニスト性である。一実施形態において、本抗体はアンタゴニスト性である。

【0141】

一態様において、本発明は、対象の感染症を治療する方法であって、本発明の抗体、核酸、ベクター、宿主細胞、及び/又は医薬組成物の有効量を対象に投与するステップを含む方法に用いられる本発明の抗体、核酸、ベクター、宿主細胞、及び/又は医薬組成物に関する。一実施形態において、本抗体はアゴニスト性である。一実施形態において、本抗体はアンタゴニスト性である。

50

【0142】

本明細書に提供される方法の一実施形態において、対象はヒトである。

【0143】

一態様において、本明細書には、試料中のOX40を検出する方法が提供され、この方法は、本明細書に提供される抗体に前記試料を接触させるステップを含む。

【0144】

一態様において、本明細書には、試料中のOX40をインビトロで検出する方法が提供され、この方法は、本明細書に提供される抗体に前記試料を接触させるステップを含む。一実施形態において、OX40はヒトOX40である。

【0145】

一態様において、本明細書には、試料中のOX40をインビトロで検出する方法が提供され、この方法は、本明細書に提供される抗体、核酸、ベクター、宿主細胞、及び/又は医薬組成物に前記試料を接触させるステップを含む。一実施形態において、OX40はヒトOX40である。

10

【0146】

一態様において、本明細書には、試料中のOX40のインビトロ検出のための本明細書に提供される抗体、核酸、ベクター、宿主細胞、及び/又は医薬組成物の使用、好ましくは本明細書に提供される抗体の使用が提供される。

【0147】

一態様において、本明細書には、対象のOX40の検出に用いられる本明細書に提供される抗体、核酸、ベクター、宿主細胞、及び/又は医薬組成物、好ましくは本明細書に提供される抗体が提供される。一実施形態において、対象はヒトである。

20

【0148】

一態様において、本明細書には、本明細書に提供されるOX40に特異的に結合する抗体、OX40(例えば、ヒトOX40)に特異的に結合する抗体をコードする核酸分子、かかる核酸分子を含むベクター、かかる核酸分子若しくはベクターを含む宿主細胞、又はかかる抗体、核酸分子、ベクター、若しくは宿主細胞を含む医薬組成物と、a)検出試薬、b)OX40抗原、c)ヒト投与への使用若しくは販売の認可を反映する通知、又はd)これらの組み合わせとを含むキットが提供される。

【図面の簡単な説明】

30

【0149】

【図1AB】図1Aは、活性化ヒトCD4+ T細胞及びCD8+ T細胞に対する抗OX40抗体pab1949及びアイソタイプ対照の結合を示すヒストグラムの対である。図1Bは、非刺激及び(抗CD3抗体を使用した)刺激CD4+ T細胞に対するpab1949-1及びアイソタイプ対照の結合を示すヒストグラムの対である。図1Cは、活性化ヒトCD4+ T細胞に対するpab1949-1又はアイソタイプ対照の用量タイトレーションの結合を示すグラフである。図1Dは、ヒト非刺激血液由来免疫細胞集団に対するpab1949-1及びアイソタイプ対照の結合を計測するヒストグラムの組である。図1Eは、活性化カニクイザル(マカカ・ファスシキュリス(Macaca fascicularis))CD4+ T細胞に対するpab1949及びアイソタイプ対照の結合のヒストグラムである。

40

【図1C】図1Aは、活性化ヒトCD4+ T細胞及びCD8+ T細胞に対する抗OX40抗体pab1949及びアイソタイプ対照の結合を示すヒストグラムの対である。図1Bは、非刺激及び(抗CD3抗体を使用した)刺激CD4+ T細胞に対するpab1949-1及びアイソタイプ対照の結合を示すヒストグラムの対である。図1Cは、活性化ヒトCD4+ T細胞に対するpab1949-1又はアイソタイプ対照の用量タイトレーションの結合を示すグラフである。図1Dは、ヒト非刺激血液由来免疫細胞集団に対するpab1949-1及びアイソタイプ対照の結合を計測するヒストグラムの組である。図1Eは、活性化カニクイザル(マカカ・ファスシキュリス(Macaca fascicularis))CD4+ T細胞に対するpab1949及びアイソタイプ対照

50

の結合のヒストグラムである。

【図1DE】図1Aは、活性化ヒトCD4+ T細胞及びCD8+ T細胞に対する抗OX40抗体pab1949及びアイソタイプ対照の結合を示すヒストグラムの対である。図1Bは、非刺激及び(抗CD3抗体を使用した)刺激CD4+ T細胞に対するpab1949-1及びアイソタイプ対照の結合を示すヒストグラムの対である。図1Cは、活性化ヒトCD4+ T細胞に対するpab1949-1又はアイソタイプ対照の用量タイトレーションの結合を示すグラフである。図1Dは、ヒト非刺激血液由来免疫細胞集団に対するpab1949-1及びアイソタイプ対照の結合を計測するヒストグラムの組である。図1Eは、活性化カニクイザル(マカカ・ファスシキュラリス(Macaca fascicularis))CD4+ T細胞に対するpab1949及びアイソタイプ対照の結合のヒストグラムである。

10

【図2AB】抗OX40抗体pab1949(図2A及び図2C)及びpab2044(図2B)の刺激がエンリッチドCD4+ T細胞増殖に及ぼす効果を評価する準最適CD3刺激アッセイの結果のグラフである。抗体pab1949はヒトIgG₁抗体である。抗体pab2044はpab1949と同じ重鎖可変領域及び同じ軽鎖を共有するが、ヒトIgG₄定常領域を含む。試験した各抗体について(図2AではIgG₁アイソタイプ対照、pab1949、及び陽性対照としての抗CD28抗体;及び図2BではIgG₄アイソタイプ対照、pab2044、及び抗CD28抗体)、細胞増殖(CFSE;x軸)が示される。図2Cは、抗OX40抗体pab1949のタイトレーション(0.002、0.02、0.2、2、及び20µg/ml)及び抗体が準最適抗CD3刺激下でエンリッチドCD4+ T細胞増殖に及ぼす効果を示す折れ線グラフである。

20

【図2C】抗OX40抗体pab1949(図2A及び図2C)及びpab2044(図2B)の刺激がエンリッチドCD4+ T細胞増殖に及ぼす効果を評価する準最適CD3刺激アッセイの結果のグラフである。抗体pab1949はヒトIgG₁抗体である。抗体pab2044はpab1949と同じ重鎖可変領域及び同じ軽鎖を共有するが、ヒトIgG₄定常領域を含む。試験した各抗体について(図2AではIgG₁アイソタイプ対照、pab1949、及び陽性対照としての抗CD28抗体;及び図2BではIgG₄アイソタイプ対照、pab2044、及び抗CD28抗体)、細胞増殖(CFSE;x軸)が示される。図2Cは、抗OX40抗体pab1949のタイトレーション(0.002、0.02、0.2、2、及び20µg/ml)及び抗体が準最適抗CD3刺激下でエンリッチドCD4+ T細胞増殖に及ぼす効果を示す折れ線グラフである。

30

【図3AB】種々の準最適濃度の抗CD3抗体及びIL-2との併用で抗OX40抗体pab1949又はpab1949-1によって誘導されたIFN及びTNFサイトカインの産生の代表的な分析結果である。図3A~図3Cにおいて、異なる4ドナー:ドナーKM、ドナーTM、ドナーGS、及びドナーSBからのPBMCを試験した。図3A及び図3Bは、ドナーSB(図3A)及びドナーGS(図3B)からのCD4+ T細胞及びCD8+ T細胞の細胞内サイトカイン染色(IFN及びTNF)を示すプロットである。抗OX40抗体pab1949又はアイソタイプ対照について、IFN+TNF+多機能性CD4+ T細胞及びCD8+ T細胞又はTNF+単機能性CD4+ T細胞及びCD8+ T細胞のパーセンテージをプロットする(図3C)。図3Cに示されるパーセンテージは、3つの異なる抗CD3抗体濃度下で生じた最も高い応答に相当する。エラーバーは標準偏差を表す(n=2)。図3D、図3E、及び図3Fは、同様の準最適抗CD3刺激アッセイでドナーGSのPBMCに由来する細胞において抗OX40抗体pab1949-1又はIgG₁アイソタイプ対照抗体の用量タイトレーションによって誘導されたTNF+CD4+ T細胞(図3D)、IFN+TNF+多機能性CD8+ T細胞(図3E)、及びIFN+CD8+ T細胞(図3F)のパーセンテージを示すグラフの組である。

40

【図3C】種々の準最適濃度の抗CD3抗体及びIL-2との併用で抗OX40抗体pab1949又はpab1949-1によって誘導されたIFN及びTNFサイトカインの産生の代表的な分析結果である。図3A~図3Cにおいて、異なる4ドナー:ドナー

50

K M、ドナー T M、ドナー G S、及びドナー S B からの P B M C を試験した。図 3 A 及び図 3 B は、ドナー S B (図 3 A) 及びドナー G S (図 3 B) からの C D 4 + T 細胞及び C D 8 + T 細胞の細胞内サイトカイン染色 (I F N 及び T N F) を示すプロットである。抗 O X 4 0 抗体 p a b 1 9 4 9 又はアイソタイプ対照について、 I F N + T N F + 多機能性 C D 4 + T 細胞及び C D 8 + T 細胞又は T N F + 単機能性 C D 4 + T 細胞及び C D 8 + T 細胞のパーセンテージをプロットする (図 3 C)。図 3 C に示されるパーセンテージは、3 つの異なる抗 C D 3 抗体濃度下で生じた最も高い応答に相当する。エラーバーは標準偏差を表す (n = 2)。図 3 D、図 3 E、及び図 3 F は、同様の準最適抗 C D 3 刺激アッセイでドナー G S の P B M C に由来する細胞において抗 O X 4 0 抗体 p a b 1 9 4 9 - 1 又は I g G₁ アイソタイプ対照抗体の用量タイトレーションによって誘導された T N F + C D 4 + T 細胞 (図 3 D)、 I F N + T N F + 多機能性 C D 8 + T 細胞 (図 3 E)、及び I F N + C D 8 + T 細胞 (図 3 F) のパーセンテージを示すグラフの組である。

10

【図 3 D - F】種々の準最適濃度の抗 C D 3 抗体及び I L - 2 との併用で抗 O X 4 0 抗体 p a b 1 9 4 9 又は p a b 1 9 4 9 - 1 によって誘導された I F N 及び T N F サイトカインの産生の代表的な分析結果である。図 3 A ~ 図 3 C において、異なる 4 ドナー：ドナー K M、ドナー T M、ドナー G S、及びドナー S B からの P B M C を試験した。図 3 A 及び図 3 B は、ドナー S B (図 3 A) 及びドナー G S (図 3 B) からの C D 4 + T 細胞及び C D 8 + T 細胞の細胞内サイトカイン染色 (I F N 及び T N F) を示すプロットである。抗 O X 4 0 抗体 p a b 1 9 4 9 又はアイソタイプ対照について、 I F N + T N F + 多機能性 C D 4 + T 細胞及び C D 8 + T 細胞又は T N F + 単機能性 C D 4 + T 細胞及び C D 8 + T 細胞のパーセンテージをプロットする (図 3 C)。図 3 C に示されるパーセンテージは、3 つの異なる抗 C D 3 抗体濃度下で生じた最も高い応答に相当する。エラーバーは標準偏差を表す (n = 2)。図 3 D、図 3 E、及び図 3 F は、同様の準最適抗 C D 3 刺激アッセイでドナー G S の P B M C に由来する細胞において抗 O X 4 0 抗体 p a b 1 9 4 9 - 1 又は I g G₁ アイソタイプ対照抗体の用量タイトレーションによって誘導された T N F + C D 4 + T 細胞 (図 3 D)、 I F N + T N F + 多機能性 C D 8 + T 細胞 (図 3 E)、及び I F N + C D 8 + T 細胞 (図 3 F) のパーセンテージを示すグラフの組である。

20

【図 4 A】ドナー 1、2、4、5、7、8、9、及び 10 の P B M C に由来する細胞を使用した準最適抗 C D 3 刺激アッセイの結果を示すグラフの組である。 I F N +、 T N F +、又は I F N + T N F + 多機能性 C D 4 + 又は C D 8 + T 細胞のパーセンテージをある抗体濃度範囲の p a b 1 9 4 9 - 1 又は I g G₁ アイソタイプ対照抗体に対してプロットする。

30

【図 4 B】ドナー 1、2、4、5、7、8、9、及び 10 の P B M C に由来する細胞を使用した準最適抗 C D 3 刺激アッセイの結果を示すグラフの組である。 I F N +、 T N F +、又は I F N + T N F + 多機能性 C D 4 + 又は C D 8 + T 細胞のパーセンテージをある抗体濃度範囲の p a b 1 9 4 9 - 1 又は I g G₁ アイソタイプ対照抗体に対してプロットする。

【図 4 C】ドナー 1、2、4、5、7、8、9、及び 10 の P B M C に由来する細胞を使用した準最適抗 C D 3 刺激アッセイの結果を示すグラフの組である。 I F N +、 T N F +、又は I F N + T N F + 多機能性 C D 4 + 又は C D 8 + T 細胞のパーセンテージをある抗体濃度範囲の p a b 1 9 4 9 - 1 又は I g G₁ アイソタイプ対照抗体に対してプロットする。

40

【図 5 A】図 5 A は、ドナー S B 及びドナー G S からの P B M C を使用した準最適抗 C D 3 刺激アッセイで抗 O X 4 0 抗体 p a b 1 9 4 9 又はアイソタイプ対照がサイトカインパネル (I L - 2、 T N F、 I L - 1 0、 I L - 4、及び I L - 1 3) の分泌に及ぼす効果を示す棒グラフの組である。健常ドナーからの P B M C を様々な準最適濃度の抗 C D 3 抗体 (クローン S P 3 4)、 I L 2 (2 0 U / m l)、及び 5 μ g / m l の抗 O X 4 0 抗体又は I g G₁ アイソタイプ対照を使用して活性化し、刺激後 4 日 (S B # 1 A) 又は 3

50

日 (S B # 1 B、S B # 2、及び G S) のいずれかにサイトカインを計測した。図 5 A のバーは、5 μ g / m l の抗 O X 4 0 抗体濃度で試験した全ての抗 C D 3 濃度によって誘導された最も高いサイトカイン分泌を表す。エラーバーは標準偏差を表す (n = 2)。図 5 B、図 5 C、及び図 5 D は、準最適濃度の抗 C D 3 抗体の存在下でドナー G S の P B M C に由来する細胞において様々な濃度の p a b 1 9 4 9 - 1 又は I g G ₁ アイソタイプ対照抗体によって誘導された分泌サイトカイン (T N F、I L - 1 0、又は I L - 1 3) の量を示すグラフの組である。

【図 5 B - D】図 5 A は、ドナー S B 及びドナー G S からの P B M C を使用した準最適抗 C D 3 刺激アッセイで抗 O X 4 0 抗体 p a b 1 9 4 9 又はアイソタイプ対照がサイトカインパネル (I L - 2、T N F、I L - 1 0、I L - 4、及び I L - 1 3) の分泌に及ぼす効果を示す棒グラフの組である。健常ドナーからの P B M C を様々な準最適濃度の抗 C D 3 抗体 (クローン S P 3 4)、I L 2 (2 0 U / m l)、及び 5 μ g / m l の抗 O X 4 0 抗体又は I g G ₁ アイソタイプ対照を使用して活性化し、刺激後 4 日 (S B # 1 A) 又は 3 日 (S B # 1 B、S B # 2、及び G S) のいずれかにサイトカインを計測した。図 5 A のバーは、5 μ g / m l の抗 O X 4 0 抗体濃度で試験した全ての抗 C D 3 濃度によって誘導された最も高いサイトカイン分泌を表す。エラーバーは標準偏差を表す (n = 2)。図 5 B、図 5 C、及び図 5 D は、準最適濃度の抗 C D 3 抗体の存在下でドナー G S の P B M C に由来する細胞において様々な濃度の p a b 1 9 4 9 - 1 又は I g G ₁ アイソタイプ対照抗体によって誘導された分泌サイトカイン (T N F、I L - 1 0、又は I L - 1 3) の量を示すグラフの組である。

【図 6 A】準最適抗 C D 3 刺激アッセイでドナー 1 ~ 1 0 の P B M C に由来する細胞において p a b 1 9 4 9 - 1 又は I g G ₁ アイソタイプ対照抗体の用量タイトレーションによって誘導された分泌 G M - C S F の量を示すグラフの組である。E C L は電気化学発光を指す。

【図 6 B】準最適抗 C D 3 刺激アッセイでドナー 1 ~ 1 0 の P B M C に由来する細胞において p a b 1 9 4 9 - 1 又は I g G ₁ アイソタイプ対照抗体の用量タイトレーションによって誘導された分泌 G M - C S F の量を示すグラフの組である。E C L は電気化学発光を指す。

【図 6 C】準最適抗 C D 3 刺激アッセイでドナー 1 ~ 1 0 の P B M C に由来する細胞において p a b 1 9 4 9 - 1 又は I g G ₁ アイソタイプ対照抗体の用量タイトレーションによって誘導された分泌 G M - C S F の量を示すグラフの組である。E C L は電気化学発光を指す。

【図 7 A】図 6 A、図 6 B、及び図 6 C と同様であり、p a b 1 9 4 9 - 1 又は I g G ₁ アイソタイプ対照抗体の用量タイトレーションによって誘導された分泌 I L - 2 の量を示す。E C L は電気化学発光を指す。

【図 7 B】図 6 A、図 6 B、及び図 6 C と同様であり、p a b 1 9 4 9 - 1 又は I g G ₁ アイソタイプ対照抗体の用量タイトレーションによって誘導された分泌 I L - 2 の量を示す。E C L は電気化学発光を指す。

【図 7 C】図 6 A、図 6 B、及び図 6 C と同様であり、p a b 1 9 4 9 - 1 又は I g G ₁ アイソタイプ対照抗体の用量タイトレーションによって誘導された分泌 I L - 2 の量を示す。E C L は電気化学発光を指す。

【図 8 A】図 6 A、図 6 B、及び図 6 C と同様であり、p a b 1 9 4 9 - 1 又は I g G ₁ アイソタイプ対照抗体の用量タイトレーションによって誘導された分泌 T N F の量を示す。

【図 8 B】図 6 A、図 6 B、及び図 6 C と同様であり、p a b 1 9 4 9 - 1 又は I g G ₁ アイソタイプ対照抗体の用量タイトレーションによって誘導された分泌 T N F の量を示す。

【図 8 C】図 6 A、図 6 B、及び図 6 C と同様であり、p a b 1 9 4 9 - 1 又は I g G ₁ アイソタイプ対照抗体の用量タイトレーションによって誘導された分泌 T N F の量を示す。

10

20

30

40

50

【図9】1:3 (Treg: T eff) の比で共培養した調節性T細胞 (Treg) 及びエフェクターT細胞 (T eff) において可溶性又は架橋 (抗Fc F(ab')₂ を使用した) のいずれかの pab1949-1 又は IgG₁ アイソタイプ対照抗体によって誘導された IL-2 (図9A) 及び IL-10 (図9B) の産生を示す棒グラフである。

【図10A-D】ブドウ球菌 (Staphylococcus) エンテロトキシンA (SEA) 刺激時の初代ヒトPBMCに対する抗OX40抗体の機能的活性を示すグラフである。一定濃度 (10 µg/ml) 又は種々の濃度の抗OX40抗体又はアイソタイプ対照の非存在下又は存在下でヒトPBMCをSEAで刺激し、IL-2 又はIL-10 サイトカイン分泌に関して分析した。試験した抗OX40抗体には、pab1949、pab1949-1、pab2193-1、pab1949-1-N297A、及び参照抗体 pab1784 及び pab2045 が含まれる。試験抗体に関して、10 µg/ml の抗OX40抗体濃度におけるIL-2 (図10A) 及びIL-10 (図10B) の倍数変化をプロットする。図10C、図10D、及び図10Eは、異なるpab1949、pab1949-1、又は参照抗体 pab1784 及び pab2045 濃度におけるIL-2産生の倍数変化を示す用量反応曲線である。統計的有意性は、アスタリスクによって示されるアイソタイプ対照試料と比較した学生t検定によって決定した。エラーバーはトリPLICATEリピートからの標準偏差を表す。図10Aの*はp < 0.001を表す。図10Bの*はp < 0.01を表す。図10Fは、pab1949-1、pab2193-1、IgG₁ アイソタイプ対照抗体、又はIgG₂ アイソタイプ対照抗体の用量タイトレーションによって誘導されたIL-2産生を示すグラフである。図10Gは、pab1949-1、pab1949-1-N297A、又はIgG₁ アイソタイプ対照抗体の用量タイトレーションに回答したIL-2産生を示すグラフである。

【図10EF】ブドウ球菌 (Staphylococcus) エンテロトキシンA (SEA) 刺激時の初代ヒトPBMCに対する抗OX40抗体の機能的活性を示すグラフである。一定濃度 (10 µg/ml) 又は種々の濃度の抗OX40抗体又はアイソタイプ対照の非存在下又は存在下でヒトPBMCをSEAで刺激し、IL-2 又はIL-10 サイトカイン分泌に関して分析した。試験した抗OX40抗体には、pab1949、pab1949-1、pab2193-1、pab1949-1-N297A、及び参照抗体 pab1784 及び pab2045 が含まれる。試験抗体に関して、10 µg/ml の抗OX40抗体濃度におけるIL-2 (図10A) 及びIL-10 (図10B) の倍数変化をプロットする。図10C、図10D、及び図10Eは、異なるpab1949、pab1949-1、又は参照抗体 pab1784 及び pab2045 濃度におけるIL-2産生の倍数変化を示す用量反応曲線である。統計的有意性は、アスタリスクによって示されるアイソタイプ対照試料と比較した学生t検定によって決定した。エラーバーはトリPLICATEリピートからの標準偏差を表す。図10Aの*はp < 0.001を表す。図10Bの*はp < 0.01を表す。図10Fは、pab1949-1、pab2193-1、IgG₁ アイソタイプ対照抗体、又はIgG₂ アイソタイプ対照抗体の用量タイトレーションによって誘導されたIL-2産生を示すグラフである。図10Gは、pab1949-1、pab1949-1-N297A、又はIgG₁ アイソタイプ対照抗体の用量タイトレーションに回答したIL-2産生を示すグラフである。

【図10G】ブドウ球菌 (Staphylococcus) エンテロトキシンA (SEA) 刺激時の初代ヒトPBMCに対する抗OX40抗体の機能的活性を示すグラフである。一定濃度 (10 µg/ml) 又は種々の濃度の抗OX40抗体又はアイソタイプ対照の非存在下又は存在下でヒトPBMCをSEAで刺激し、IL-2 又はIL-10 サイトカイン分泌に関して分析した。試験した抗OX40抗体には、pab1949、pab1949-1、pab2193-1、pab1949-1-N297A、及び参照抗体 pab1784 及び pab2045 が含まれる。試験抗体に関して、10 µg/ml の抗OX40抗体濃度におけるIL-2 (図10A) 及びIL-10 (図10B) の倍数変化をプロットする。図10C、図10D、及び図10Eは、異なるpab1949、pab1949-1、又は参照抗体 pab1784 及び pab2045 濃度におけるIL-2産生の倍数

10

20

30

40

50

変化を示す用量反応曲線である。統計的有意性は、アスタリスクによって示されるアイソタイプ対照試料と比較したスチューデント t 検定によって決定した。エラーバーはトリプレットリピートからの標準偏差を表す。図 10 A の * は $p < 0.001$ を表す。図 10 B の * は $p < 0.01$ を表す。図 10 F は、 $pab1949-1$ 、 $pab2193-1$ 、 IgG_1 アイソタイプ対照抗体、又は IgG_2 アイソタイプ対照抗体の用量タイトレーションによって誘導された IL-2 産生を示すグラフである。図 10 G は、 $pab1949-1$ 、 $pab1949-1-N297A$ 、又は IgG_1 アイソタイプ対照抗体の用量タイトレーションに応答した IL-2 産生を示すグラフである。

【図 11】OX40 NF- κ B-ルシフェラーゼレポーター細胞株を使用して可溶性の（可溶性条件、図 11 A）又は架橋した（複合体化条件、図 11 B） $pab1949-1$ 又は IgG_1 アイソタイプ対照抗体を試験したアッセイの結果である。試験した種々の抗体濃度に対する相対発光単位（RLU）をプロットする。

【図 12】OX40 を発現する標的細胞に抗体が結合したとき Fc RIIIA（図 12 A）又は Fc RIIA^{H131} 変異体（図 12 B）を発現するレポーター細胞を活性化その能力に関して抗 OX40 抗体を試験したレポーターアッセイの結果である。図 12 A では、種々の $pab1949-1$ 及び $pab2044-1$ 濃度に対する RLU 値をプロットする。RLU は、抗 OX40 抗体の RLU からアイソタイプ対照の RLU を差し引いたものを表す。図 12 B では、 $pab1949-1$ 、 $pab1949-1-S267E/L328F$ 、 $pab2193-1$ 、 IgG_1 アイソタイプ対照抗体、又は IgG_2 アイソタイプ対照抗体の漸増濃度に対する RLU 値をプロットする。

【図 13 A B】図 13 A は、フローサイトメトリーによって計測したときの、抗 CD3 / 抗 CD28 ビーズによって活性化した健常ドナーの nTreg、CD4+ T 細胞又は CD8+ T 細胞上のヒト OX40 の MFI を示す棒グラフである。MFI は抗 OX40 抗体の MFI からアイソタイプ対照の MFI を差し引いたものを表す。使用した抗 OX40 抗体は、PE コンジュゲートマウス抗ヒト OX40 抗体（Biolegend: ACT35; カタログ: 350004; ロット: B181090）であった。図 13 B は、2 人の健常ドナーの活性化 nTreg 及びエフェクター T 細胞上のヒト OX40 の MFI を示す棒グラフである。細胞を市販の抗 OX40 抗体（BER-ACT35 クローン）又はアイソタイプ対照抗体で染色し、フローサイトメトリーを用いて分析した。図 13 C は、Fc ガンマ受容体 RIIIA（Fc RIIIA）レポーター細胞株を使用して抗 OX40 抗体 $pab1949$ を調べたグラフである。Fc RIIIA（158V/V 多型）を過剰発現するジャーカット NFAT-ルシフェラーゼレポーター細胞を活性化初代 nTreg 及びエフェクター T 細胞と共に $pab1949$ 又はアイソタイプ対照の存在下において 37 °C で 20 時間共培養した。20 時間後、Fc RIIIA 結合を表す相対発光単位（RLU）を記録した。RLU は、抗 OX40 抗体の RLU からアイソタイプ対照の RLU を差し引いたものを表す。エラーバーは標準偏差を表す（ $n = 2$ ）。示されるデータは、3 ドナーの細胞を使用した実験の代表である。図 13 D は図 13 C と同様であり、修正プロトコルを使用して $pab1949-1$ を試験した研究の結果を示す。

【図 13 C D】図 13 A は、フローサイトメトリーによって計測したときの、抗 CD3 / 抗 CD28 ビーズによって活性化した健常ドナーの nTreg、CD4+ T 細胞又は CD8+ T 細胞上のヒト OX40 の MFI を示す棒グラフである。MFI は抗 OX40 抗体の MFI からアイソタイプ対照の MFI を差し引いたものを表す。使用した抗 OX40 抗体は、PE コンジュゲートマウス抗ヒト OX40 抗体（Biolegend: ACT35; カタログ: 350004; ロット: B181090）であった。図 13 B は、2 人の健常ドナーの活性化 nTreg 及びエフェクター T 細胞上のヒト OX40 の MFI を示す棒グラフである。細胞を市販の抗 OX40 抗体（BER-ACT35 クローン）又はアイソタイプ対照抗体で染色し、フローサイトメトリーを用いて分析した。図 13 C は、Fc ガンマ受容体 RIIIA（Fc RIIIA）レポーター細胞株を使用して抗 OX40 抗体 $pab1949$ を調べたグラフである。Fc RIIIA（158V/V 多型）を過剰発現するジャーカット NFAT-ルシフェラーゼレポーター細胞を活性化初代 nTreg

10

20

30

40

50

e g 及びエフェクター T 細胞と共に p a b 1 9 4 9 又はアイソタイプ対照の存在下において 3 7 で 2 0 時間共培養した。2 0 時間後、F c R I I I A 結合を表す相対発光単位 (R L U) を記録した。R L U は、抗 O X 4 0 抗体の R L U からアイソタイプ対照の R L U を差し引いたものを表す。エラーバーは標準偏差を表す (n = 2)。示されるデータは、3 ドナーの細胞を使用した実験の代表である。図 1 3 D は図 1 3 C と同様であり、修正プロトコルを使用して p a b 1 9 4 9 - 1 を試験した研究の結果を示す。

【図 1 4 A B】図 1 4 A は、フローサイトメトリーによって計測した O X 4 0 の表面発現を示すヒストグラムの組である。健康ヒトドナー (a ~ c、n = 3) の血液又は非小細胞肺癌患者 (N S C L C) (d ~ f、n = 3) の腫瘍組織から試料を収集した。細胞集団は、T c o n v (C D 3 +、C D 4 +、C D 8 a -、C D 2 5 低、及び F O X P 3 -) 又は T r e g (C D 3 +、C D 4 +、C D 8 a -、C D 2 5 高、及び F O X P 3 +) として定義した。図 1 4 B は、図 1 4 A に示すものと同様の研究のヒストグラムの対であり、子宮内膜癌試料の C D 8 + 又は C D 4 + T 細胞、又は T r e g 細胞における表面 O X 4 0 発現を計測する。図 1 4 C は、様々な腫瘍型にわたる T r e g 細胞及び T e f f 細胞上の O X 4 0 発現を示す棒グラフである。図 1 4 D は、腫瘍関連 C D 4 + T e f f 細胞及び T r e g 細胞における O X 4 0 発現を要約する表である。「 - 」は陰性発現 / 発現欠如を表し、「 + 」は弱い発現を表し、「 + + 」は中程度の発現を表し、及び「 + + + 」は高発現を表す。

【図 1 4 C】図 1 4 A は、フローサイトメトリーによって計測した O X 4 0 の表面発現を示すヒストグラムの組である。健康ヒトドナー (a ~ c、n = 3) の血液又は非小細胞肺癌患者 (N S C L C) (d ~ f、n = 3) の腫瘍組織から試料を収集した。細胞集団は、T c o n v (C D 3 +、C D 4 +、C D 8 a -、C D 2 5 低、及び F O X P 3 -) 又は T r e g (C D 3 +、C D 4 +、C D 8 a -、C D 2 5 高、及び F O X P 3 +) として定義した。図 1 4 B は、図 1 4 A に示すものと同様の研究のヒストグラムの対であり、子宮内膜癌試料の C D 8 + 又は C D 4 + T 細胞、又は T r e g 細胞における表面 O X 4 0 発現を計測する。図 1 4 C は、様々な腫瘍型にわたる T r e g 細胞及び T e f f 細胞上の O X 4 0 発現を示す棒グラフである。図 1 4 D は、腫瘍関連 C D 4 + T e f f 細胞及び T r e g 細胞における O X 4 0 発現を要約する表である。「 - 」は陰性発現 / 発現欠如を表し、「 + 」は弱い発現を表し、「 + + 」は中程度の発現を表し、及び「 + + + 」は高発現を表す。

【図 1 4 D】図 1 4 A は、フローサイトメトリーによって計測した O X 4 0 の表面発現を示すヒストグラムの組である。健康ヒトドナー (a ~ c、n = 3) の血液又は非小細胞肺癌患者 (N S C L C) (d ~ f、n = 3) の腫瘍組織から試料を収集した。細胞集団は、T c o n v (C D 3 +、C D 4 +、C D 8 a -、C D 2 5 低、及び F O X P 3 -) 又は T r e g (C D 3 +、C D 4 +、C D 8 a -、C D 2 5 高、及び F O X P 3 +) として定義した。図 1 4 B は、図 1 4 A に示すものと同様の研究のヒストグラムの対であり、子宮内膜癌試料の C D 8 + 又は C D 4 + T 細胞、又は T r e g 細胞における表面 O X 4 0 発現を計測する。図 1 4 C は、様々な腫瘍型にわたる T r e g 細胞及び T e f f 細胞上の O X 4 0 発現を示す棒グラフである。図 1 4 D は、腫瘍関連 C D 4 + T e f f 細胞及び T r e g 細胞における O X 4 0 発現を要約する表である。「 - 」は陰性発現 / 発現欠如を表し、「 + 」は弱い発現を表し、「 + + 」は中程度の発現を表し、及び「 + + + 」は高発現を表す。

【図 1 5 A】カニクイザル P B M C に由来する細胞において p a b 1 9 4 9 - 1 又は I g G₁ アイソタイプ対照抗体の用量タイトレーションによって誘導された分泌 G M - C S F の量を示すグラフの組である。C y n o 2 及び C y n o 9 は、独立した実験で試験した同じカニクイザルの P B M C を指すことに留意されたい。他の P B M C 試料は全て異なるカニクイザルドナーから収集した。

【図 1 5 B】カニクイザル P B M C に由来する細胞において p a b 1 9 4 9 - 1 又は I g G₁ アイソタイプ対照抗体の用量タイトレーションによって誘導された分泌 G M - C S F の量を示すグラフの組である。C y n o 2 及び C y n o 9 は、独立した実験で試験し

10

20

30

40

50

た同じカニクイザルのP B M Cを指すことに留意されたい。他のP B M C試料は全て異なるカニクイザルドナーから収集した。

【図16A】図15A及び図15Bと同様であり、p a b 1 9 4 9 - 1又はI g G₁アイソタイプ対照抗体の用量タイトレーションによって誘導された分泌I L - 17の量を示す。

【図16B】図15A及び図15Bと同様であり、p a b 1 9 4 9 - 1又はI g G₁アイソタイプ対照抗体の用量タイトレーションによって誘導された分泌I L - 17の量を示す。

【図17A】図15A及び図15Bと同様であり、p a b 1 9 4 9 - 1又はI g G₁アイソタイプ対照抗体の用量タイトレーションによって誘導された分泌T N F の量を示す。

【図17B】図15A及び図15Bと同様であり、p a b 1 9 4 9 - 1又はI g G₁アイソタイプ対照抗体の用量タイトレーションによって誘導された分泌T N F の量を示す。

【図18A】図15A及び図15Bと同様であり、p a b 1 9 4 9 - 1又はI g G₁アイソタイプ対照抗体の用量タイトレーションによって誘導された分泌I L - 5の量を示す。

【図18B】図15A及び図15Bと同様であり、p a b 1 9 4 9 - 1又はI g G₁アイソタイプ対照抗体の用量タイトレーションによって誘導された分泌I L - 5の量を示す。

【図19A】図15A及び図15Bと同様であり、p a b 1 9 4 9 - 1又はI g G₁アイソタイプ対照抗体の用量タイトレーションによって誘導された分泌I L - 10の量を示す。

【図19B】図15A及び図15Bと同様であり、p a b 1 9 4 9 - 1又はI g G₁アイソタイプ対照抗体の用量タイトレーションによって誘導された分泌I L - 10の量を示す。

【図20】ブドウ球菌(Staphylococcus)エンテロトキシンA(SEA)刺激時の初代カニクイザルP B M Cに対する抗O X 4 0抗体p a b 1 9 4 9 - 1の機能的活性を調べたアッセイの結果を示すグラフの対である。2匹のカニクイザルドナーのP B M Cによって分泌されたI L - 2の量をp a b 1 9 4 9 - 1又はI g G₁アイソタイプ対照抗体の用量タイトレーションに対してプロットする。

【図21】ヒトO X 4 0アラニン突然変異体を発現する1624-5細胞に対するモノクローナル抗O X 4 0抗体p a b 1 9 4 9 - 1及びp a b 1 9 2 8の結合を要約する表である。

【発明を実施するための形態】

【0150】

本明細書には、O X 4 0(例えば、ヒトO X 4 0)に特異的に結合し、且つO X 4 0活性を調節する抗体(例えば、モノクローナル抗体)が提供される。例えば、一態様において、本明細書には、O X 4 0に特異的に結合し、且つ1つ以上のO X 4 0活性を増強するか、誘導するか、又は増加させる抗体が提供される。例えば、別の態様において、本明細書には、O X 4 0(例えば、ヒトO X 4 0)に特異的に結合し、且つ1つ以上のO X 4 0活性を不活性化するか、低下させるか、又は阻害する抗体が提供される。具体的な実施形態において、本抗体は単離されている。

【0151】

また、かかる抗体をコードする相補D N A(c D N A)などの単離核酸(ポリヌクレオチド)も提供される。更に、かかる抗体をコードする核酸(ポリヌクレオチド)を含むベクター(例えば、発現ベクター)及び細胞(例えば、宿主細胞)が提供される。また、かかる抗体を作製する方法も提供される。他の態様において、本明細書には、O X 4 0活性を誘導するか、増加させるか、又は増強し、及び癌など、ある種の病態を治療するための方法及び使用が提供される。更に、O X 4 0(例えば、ヒトO X 4 0)活性を不活性化するか、低下させるか、又は阻害し、及び炎症性又は自己免疫性疾患及び障害など、ある種の病態を治療するための方法及び使用が提供される。関連する組成物(例えば、医薬組成物)、キット、及び検出方法も提供される。

【0152】

5.1 用語

本明細書で使用されるとき、用語「約」及び「近似的」は、数値又は数値範囲を修飾して用いられるとき、その値又は範囲よりも5%~10%上方及び5%~10%下方の偏差が、記載される値又は範囲の意図された意味の範囲内に留まることを示す。

【0153】

本明細書で使用されるとき、例えば所与の実験において、又は複数回の実験からの平均値を用いたとき、指定される定義域にわたってAの増加に伴いBが実質的に増加する場合、BはA値の指定される定義域にわたってAの「実質的増加関数」である。この定義は、指定されるAの値に対応するBの値が、任意のより低いAの値に対応するBの値と比べて最大1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、又は20%低いことを許容する。

10

【0154】

本明細書で使用されるとき、用語「抗体 (antibody)」及び「抗体 (antibodies)」は専門用語であり、本明細書では同義的に使用することができ、ある抗原と特異的に結合する抗原結合部位を有する分子を指す。

【0155】

抗体には、例えば、モノクローナル抗体、組換え産生抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、リサーフェシング抗体、キメラ抗体、免疫グロブリン、合成抗体、2つの重鎖及び2つの軽鎖分子を含む四量体抗体、抗体軽鎖単量体、抗体重鎖単量体、抗体軽鎖二量体、抗体重鎖二量体、抗体軽鎖-抗体重鎖対、イントラボディ、ヘテロコンジュゲート抗体、シングルドメイン抗体、一価抗体、一本鎖抗体又は単鎖Fv (scFv)、ラクダ化抗体、アフィボディ、Fab断片、F(ab')₂断片、ジスルフィド結合Fv (sdFv)、抗イデオタイプ (抗Id) 抗体 (例えば、抗抗Id抗体を含む)、二重特異性抗体、及び多重特異性抗体が含まれ得る。特定の実施形態において、本明細書に記載される抗体はポリクローナル抗体集団を指す。抗体は、任意のタイプ (例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、又はIgY)、任意のクラス (例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、又はIgA₂)、又は任意のサブクラス (例えば、IgG_{2a}又はIgG_{2b}) の免疫グロブリン分子であってよい。特定の実施形態において、本明細書に記載される抗体はIgG抗体、又はそのクラス (例えば、ヒトIgG₁、IgG₂、又はIgG₄) 又はサブクラスである。具体的な実施形態において、本抗体はヒトモノクローナル抗体である。別の具体的な実施形態において、本抗体は、例えば免疫グロブリンであるヒトモノクローナル抗体である。特定の実施形態において、本明細書に記載される抗体は、IgG₁、IgG₂、又はIgG₄抗体である。

20

30

【0156】

本明細書で使用されるとき、用語「抗原結合ドメイン」、「抗原結合領域」、「抗原結合部位」、及び類似の用語は、抗体分子のうち、抗体分子に抗原に対するその特異性を付与するアミノ酸残基 (例えば、相補性決定領域 (CDR)) を含む部分を指す。抗原結合領域は、げっ歯類 (例えば、マウス、ラット、又はハムスター) 及びヒトなど、任意の動物種に由来し得る。

【0157】

本明細書で使用されるとき、用語「可変領域」又は「可変ドメイン」は同義的に使用され、当該技術分野において一般的である。可変領域は、典型的には、抗体間で配列が広範に異なり、且つ特定の抗体のその特定の抗原に対する結合及び特異性に用いられる抗体の一部分、概して軽鎖又は重鎖の一部分、典型的には成熟重鎖におけるアミノ末端約110~120アミノ酸又は110~125アミノ酸及び成熟軽鎖における約90~115アミノ酸を指す。配列の変異性は相補性決定領域 (CDR) と呼ばれる領域に集中している一方、可変ドメイン中のより高度に保存された領域はフレームワーク領域 (FR) と呼ばれる。いかなる特定の機構又は理論によっても拘束されることを望むものではないが、軽鎖及び重鎖のCDRが抗体の抗原との相互作用及び特異性に主として関与するものと考えられる。特定の実施形態において、可変領域はヒト可変領域である。特定の実施形態において、可変領域はげっ歯類又はマウスCDRとヒトフレームワーク領域 (FR) とを含む。

40

50

詳細な実施形態において、可変領域は霊長類（例えば、非ヒト霊長類）可変領域である。特定の実施形態において、可変領域はげっ歯類又はマウスCDRと霊長類（例えば、非ヒト霊長類）フレームワーク領域（FR）とを含む。

【0158】

用語「VL」及び「VLドメイン」は、抗体の軽鎖可変領域を指して同義的に使用される。

【0159】

用語「VH」及び「VHドメイン」は、抗体の重鎖可変領域を指して同義的に使用される。

【0160】

用語「Kabab付番」及び同様の用語は当該技術分野において認識されており、抗体の重鎖及び軽鎖可変領域、又はその抗原結合部分のアミノ酸残基の付番方式を指す。特定の態様において、抗体のCDRはKabab付番方式に従い決定することができる（例えば、Kabab EA&Wu TT (1971) Ann NY Acad Sci 190:382-391及びKabab EA et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242を参照されたい）。Kabab付番方式を用いると、抗体重鎖分子内のCDRは、典型的にはアミノ酸位置31~35（任意選択で35の後に1つ又は2つの追加的なアミノ酸（Kabab付番スキームで35A及び35Bと称される）が含まれ得る）（CDR1）、アミノ酸位置50~65（CDR2）、及びアミノ酸位置95~102（CDR3）に存在する。Kabab付番方式を用いると、抗体軽鎖分子内のCDRは、典型的にはアミノ酸位置24~34（CDR1）、アミノ酸位置50~56（CDR2）、及びアミノ酸位置89~97（CDR3）に存在する。具体的な実施形態において、本明細書に記載される抗体のCDRはKabab付番スキームにより決定される。

【0161】

本明細書で使用されるとき、用語「定常領域」又は「定常ドメイン」は同義的であり、その当該技術分野で一般的な意味を有する。定常領域は、抗体の抗原への結合に直接は関与しないが、Fc受容体との相互作用など、様々なエフェクター機能を呈し得る抗体部分、例えば軽鎖及び/又は重鎖のカルボキシル末端部分である。免疫グロブリン分子の定常領域は、概して免疫グロブリン可変ドメインと比べてより保存されたアミノ酸配列を有する。

【0162】

本明細書で使用されるとき、用語「重鎖」は、抗体に関連して使用されるとき、定常ドメインのアミノ酸配列に基づき任意の異なるタイプ、例えば、アルファ（ α ）、デルタ（ δ ）、イプシロン（ ϵ ）、ガンマ（ γ ）、及びミュー（ μ ）を指すことができ、これは、IgGのサブクラス、例えばIgG₁、IgG₂、IgG₃、及びIgG₄を含めた、それぞれ抗体のIgA、IgD、IgE、IgG、及びIgMクラスを生じさせる。

【0163】

本明細書で使用されるとき、用語「軽鎖」は、抗体に関連して使用されるとき、定常ドメインのアミノ酸配列に基づき任意の異なるタイプ、例えば、カッパ（ κ ）又はラムダ（ λ ）を指すことができる。軽鎖アミノ酸配列は当該技術分野において周知である。具体的な実施形態において、軽鎖はヒト軽鎖である。

【0164】

「結合親和性」は、概して、分子（例えば、抗体）の単一の結合部位とその結合パートナー（例えば、抗原）との間の非共有結合性相互作用の総和の強度を指す。特に指示がない限り、本明細書で使用されるとき、「結合親和性」は、結合対のメンバー（例えば、抗体及び抗原）間の1:1相互作用を反映する固有結合親和性を指す。分子XのそのパートナーYに対する親和性は、概して解離定数（ K_D ）によって表され得る。親和性は、限定

10

20

30

40

50

はされないが、平衡解離定数 (K_D)、及び平衡会合定数 (K_A) を含め、当該技術分野において公知の幾つもの方法で計測及び/又は表現することができる。 K_D は k_{off} / k_{on} の商から計算され、一方、 K_A は k_{on} / k_{off} の商から計算される。 k_{on} は (例えば、抗原に対する抗体の) 会合速度定数を指し、 k_{off} は (例えば、抗原に対する抗体の) 解離を指す。 k_{on} 及び k_{off} は、B I A c o r e (登録商標) 又は K i n E x A などの当業者に公知の技法によって決定することができる。

【0165】

本明細書で使用される時、「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が同様の側鎖を有するアミノ酸残基に置き換えられているものである。側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーが当該技術分野において定義されている。これらのファミリーには、塩基性側鎖 (例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖 (例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、非荷電極性側鎖 (例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン)、非極性側鎖 (例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン)、分枝側鎖 (例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン) 及び芳香族側鎖 (例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン) を有するアミノ酸が含まれる。特定の実施形態では、抗体のCDR内又はフレームワーク領域内の1つ以上のアミノ酸残基を同様の側鎖を有するアミノ酸残基に置き換えることができる。

【0166】

本明細書で使用される時、「エピトープ」は専門用語であり、抗体が特異的に結合することのできる抗原の限局的な領域を指す。エピトープは、例えば、ポリペプチドの連続するアミノ酸であってもよく (線状又は連続エピトープ)、又はエピトープは、例えば、1つ又は複数のポリペプチドの2つ以上の非連続的な領域が一体となってもよい (立体、非線状、不連続、又は非隣接エピトープ)。特定の実施形態において、抗体が結合するエピトープは、例えば、NMR分光法、X線回折結晶学的研究、ELISAアッセイ、質量分析法 (例えば、液体クロマトグラフィー-エレクトロスプレー質量分析法) と併せた水素/重水素交換、アレイベースのオリゴ-ペプチドスキャンニングアッセイ、及び/又は突然変異誘発マッピング (例えば、部位特異的突然変異誘発マッピング) により決定することができる。X線結晶学については、当該技術分野における公知の方法のいずれを用いて結晶化を達成してもよい (例えば、Giege R et al., (1994) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 50 (Pt 4) : 339 - 350; McPherson A (1990) Eur J Biochem 189 : 1 - 23; Chayen NE (1997) Structure 5 : 1269 - 1274; McPherson A (1976) J Biol Chem 251 : 6300 - 6303)。抗体: 抗原結晶は周知のX線回折技法を用いて研究することができる (Yale University, 1992, 配布元 Molecular Simulations, Inc.; 例えば、Meth Enzymol (1985) volumes 114 & 115, eds Wyckoff HW et al., ; 米国特許出願公開第 2004/0014194号明細書を参照されたい)、及びBUSTER (Bricogne G (1993) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 49 (Pt 1) : 37 - 60; Bricogne G (1997) Meth Enzymol 276A : 361 - 423, ed Carter CW; Roversi P et al., (2000) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 56 (Pt 10) : 1316 - 1323)。突然変異誘発マッピング研究は、当業者に公知の任意の方法を用いて達成することができる。アラニンスキャンニング突然変異誘発法を含めた突然変異誘発法の説明については、例えば、Champe M et al., (1995) J Biol Chem 270 : 1388 - 1394 及びCunningham BC & Wells JA (1989) Science 244 : 1081 - 1085を参照されたい。具体的な実施形態において、抗体

10

20

30

40

50

のエピトープはアラニンスキャニング突然変異誘発研究を用いて決定される。

【0167】

本明細書で使用されるとき、用語「免疫特異的に結合する」、「免疫特異的に認識する」、「特異的に結合する」、及び「特異的に認識する」は、抗体の二関連して、類似の用語であり、抗原（例えば、エピトープ又は免疫複合体）に結合する分子を（かかる結合が当業者によって理解されるとおり）指す。例えば、ある抗原に特異的に結合する分子は、他のペプチド又はポリペプチドに対して、例えばイムノアッセイ、BIAcore（登録商標）、KinExA 3000機器（Sapidyne Instruments、Boise, ID）、又は当該技術分野において公知の他のアッセイによって決定するとき、概してより低い親和性で結合し得る。具体的な実施形態において、ある抗原に免疫特異的に結合する分子は、その分子が別の抗原に非特異的に結合するときの K_A よりも少なくとも2対数、2.5対数、3対数、4対数又はそれを超えて高い K_A でその抗原に結合する。抗OX40抗原結合ドメインとヒト免疫細胞が発現する抗原に特異的に結合しない第2の抗原結合ドメインとを有する抗体に関連して、用語「免疫特異的に結合する」、「免疫特異的に認識する」、「特異的に結合する」、及び「特異的に認識する」は、2つ以上の抗原（即ち、OX40及び第2の抗原結合ドメインに関連する抗原）に対して個別的特異性を有する抗体を指す。

10

【0168】

別の具体的な実施形態において、抗原に免疫特異的に結合する分子は、同様の結合条件下で他のタンパク質と交差反応しない。別の具体的な実施形態において、抗原に免疫特異的に結合する分子は他の非OX40タンパク質と交差反応しない。具体的な実施形態において、本明細書には、別の無関係の抗原に対するよりも高い親和性でOX40に結合する抗体が提供される。特定の実施形態において、本明細書には、例えばラジオイムノアッセイ、表面プラズモン共鳴、又は結合平衡除外アッセイによって計測したとき、別の無関係の抗原に対するよりも20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%又はそれを超えて高い親和性でOX40（例えば、ヒトOX40）に結合する抗体が提供される。具体的な実施形態において、無関係の非OX40タンパク質に対する本明細書に記載される抗OX40抗体の結合程度は、例えばラジオイムノアッセイによって計測したとき、OX40タンパク質に対する抗体の結合の10%、15%、又は20%未満である。

20

30

【0169】

具体的な実施形態において、本明細書には、別のOX40種に対するよりも高い親和性でヒトOX40に結合する抗体が提供される。特定の実施形態において、本明細書には、例えばラジオイムノアッセイ、表面プラズモン共鳴、又は結合平衡除外アッセイによって計測したとき、別のOX40種に対するよりも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%又はそれを超えて高い親和性でヒトOX40に結合する抗体が提供される。具体的な実施形態において、ヒトOX40に結合する本明細書に記載される抗体は、別のOX40タンパク質種に対して、例えばラジオイムノアッセイ、表面プラズモン共鳴、又は結合平衡除外アッセイによって計測したとき、ヒトOX40タンパク質に対する抗体の結合の10%、15%、又は20%未満で結合し得る。

40

【0170】

本明細書で使用されるとき、用語「OX40受容体」又は「OX40」又は「OX40ポリペプチド」は、限定はされないが、天然OX40、OX40のアイソフォーム、又はOX40の種間OX40ホモログを含めたOX40を指す。OX40は、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー4（TNFRSF4）、ACT35、CD134、IMD16、及びTXGP1Lとしても知られる。GenBank（商標）受託番号BC105070及びBC105072がヒトOX40核酸配列を提供する。Refseq番号NP_003318.1がヒトOX40のアミノ酸配列を提供する。ヒトOX40の未成熟アミノ酸配列は配列番号17として提供される。ヒトOX40の成熟アミノ酸配列は配列

50

番号55として提供される。ヒトOX40はEntrez GeneによってGene ID: 7293と指定される。RefSeq番号XM_005545122.1及びXP_005545179.1は、それぞれ予想カニクイザルOX40核酸配列及びアミノ酸配列を提供する。ヒトOX40の可溶性アイソフォームも報告されている(Taylor et al., (2001) J Immunol Methods 255:67-72)。本明細書で使用されるとき、用語「ヒトOX40」は、配列番号55のポリペプチド配列を含むOX40を指す。

【0171】

本明細書で使用されるとき、用語「OX40リガンド」及び「OX40L」は、腫瘍壊死因子リガンドスーパーファミリーメンバー4(TNFSF4)を指す。OX40Lは、別名CD252、GP34、TXGP1、及びCD134Lとして知られる。GenBank(商標)受託番号D90224.1及びAK297932.1が例示的ヒトOX40L核酸配列を提供する。RefSeq番号NP_003317.1及びSwiss-Prot受託番号P23510-1がアイソフォーム1の例示的ヒトOX40Lアミノ酸配列を提供する。RefSeq番号NP_001284491.1及びSwiss-Prot受託番号P23510-2がアイソフォーム2の例示的ヒトOX40Lアミノ酸配列を提供する。ヒトOX40LはEntrez GeneによってGene ID: 7292と指定される。詳細な実施形態において、OX40Lは配列番号42のヒトOX40Lアイソフォーム1又は配列番号43のアイソフォーム2である。

10

【0172】

本明細書で使用されるとき、用語「宿主細胞」は、任意のタイプの細胞、例えば、初代細胞、培養下の細胞、又は細胞株由来の細胞であってよい。具体的な実施形態において、用語「宿主細胞」は、核酸分子がトランスフェクトされた細胞及びかかる細胞の子孫又は潜在的子孫を指す。かかる細胞の子孫は、例えば後続の世代で起こり得る突然変異若しくは環境の影響、又は宿主細胞ゲノムへの核酸分子の組み込みに起因して、核酸分子をトランスフェクトされた親細胞と同一ではないこともある。

20

【0173】

本明細書で使用されるとき、用語「有効量」は、対象への療法薬投与に関連して、所望の予防又は治療効果を実現する療法薬の量を指す。有効量の例は以下の第5.5.1.3節に提供される。

30

【0174】

本明細書で使用されるとき、用語「対象」と「患者」とは同義的に使用される。対象は動物であってもよい。一部の実施形態において、対象は、非霊長類(例えば、雌ウシ、ブタ、ウマ、ネコ、イヌ、ラット等)又は霊長類(例えば、サル又はヒト)、最も好ましくはヒトなどの哺乳動物である。一部の実施形態において、対象はカニクイザルである。特定の実施形態において、かかる用語は非ヒト動物(例えば、ブタ、ウマ、雌ウシ、ネコ、又はイヌなどの非ヒト動物)を指す。一部の実施形態において、かかる用語はペット又は農業動物を指す。具体的な実施形態において、かかる用語はヒトを指す。

【0175】

本明細書で使用されるとき、試験抗体と第1の抗原との間の結合は、試験抗体と第1の抗原との間の結合が、例えばフローサイトメトリー分析で計測したとき、試験抗体と第2の抗原との間の結合と比べて少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、又は80%低下する場合、試験抗体と第2の抗原との間の結合と比べて「実質的に弱まっている」。

40

【0176】

2つの配列(例えば、アミノ酸配列又は核酸配列)間の「同一性パーセント」の決定はまた、数学的アルゴリズムを用いて達成することもできる。2つの配列の比較に利用される数学的アルゴリズムの具体的な非限定例は、Karlin S & Altschul SF(1993)PNAS 90:5873-5877にあるとおり修正した、Karlin S & Altschul SF(1990)PNAS 87:2264-2268のア

50

ルゴリズムである。かかるアルゴリズムは、Altschul SF et al., (1990) J Mol Biol 215:403のNBLAST及びXBLASTプログラムに組み込まれている。BLASTヌクレオチド検索は、NBLASTヌクレオチドプログラムパラメータを例えばスコア = 100、ワード長 = 12に設定して実施することにより、本明細書に記載される核酸分子と相同なヌクレオチド配列を得ることができる。BLASTタンパク質検索は、XBLASTプログラムパラメータを例えばスコア50、ワード長 = 3に設定して実施することにより、本明細書に記載されるタンパク質分子と相同なアミノ酸配列を得ることができる。比較のためギャップ付きアラインメントを達成するには、Altschul SF et al., (1997) Nuc Acids Res 25:3389-3402に記載されるとおりのギャップ付きBLASTを利用することができる。或いは、PSI-BLASTを用いて、分子間の距離関係を検出する反復検索を実施することができる(同上)。BLAST、ギャップ付きBLAST、及びPSI-BLASTプログラムを利用する場合、それぞれのプログラムの(例えば、XBLAST及びNBLASTの)デフォルトパラメータを使用することができる(例えば、ワールドワイドウェブ、ncbi.nlm.nih.gov上の国立バイオテクノロジー情報センター(NCBI)を参照されたい)。配列の比較に利用される数学的アルゴリズムの別の具体的な非限定例は、Myers and Miller, 1988, CABIOS 4:11-17のアルゴリズムである。かかるアルゴリズムは、GC G配列アラインメントソフトウェアパッケージの一部であるALIGNプログラム(バージョン2.0)に組み込まれている。アミノ酸配列の比較にALIGNプログラムを利用する場合、PAM120重み付け残基表、12のギャップ長ペナルティ、及び4のギャップペナルティを使用することができる。

【0177】

2つの配列間の同一性パーセントは、上記に記載されるものと同様の技法を、ギャップを許容して又は許容せずに用いて決定することができる。同一性パーセントの計算では、典型的には完全な一致のみがカウントされる。

【0178】

本明細書で使用されるとき、用語「ヒト免疫細胞が発現する抗原に結合しない抗原結合ドメイン」は、免疫応答において役割を果たす造血由来の任意のヒト細胞が発現する抗原に抗原結合ドメインが結合しないことを意味する。免疫細胞には、B細胞及びT細胞などのリンパ球；ナチュラルキラー細胞；並びに単球、マクロファージ、好酸球、マスト細胞、好塩基球、及び顆粒球などの骨髄性細胞が含まれる。例えば、かかる結合ドメインであれば、OX40、又はヒト免疫細胞が発現するTNF受容体スーパーファミリーの任意の他のメンバーに結合しないであろう。しかしながら、抗原結合ドメインは、限定はされないが、他の生物及び非ヒトで発現する抗原(即ち、非ヒト抗原)；野生型ヒト細胞が発現しない抗原；又はウイルス抗原、限定はされないが、ヒト細胞に感染しないウイルスの抗原、又は非感染ヒト免疫細胞に存在しないウイルス抗原などの抗原に結合することができる。

【0179】

5.2 抗体

ある具体的な態様において、本明細書には、OX40(例えば、ヒトOX40)に特異的に結合する抗体(例えば、モノクローナル抗体、例えば、キメラ、ヒト化、又はヒト抗体など)が提供される。

【0180】

特定の実施形態において、本明細書に記載される抗体はヒトCD4+ T細胞及びヒトCD8+ T細胞に結合する。特定の実施形態において、本明細書に記載される抗体はヒトCD4+ 細胞及びカニクイザルCD4+ T細胞に結合する。

【0181】

詳細な実施形態において、OX40(例えば、ヒトOX40)に特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、表1に示されるとおりの、

10

20

30

40

50

(a) アミノ酸配列 RSSQSLLHSNGYNYLD (配列番号1) を含むか、それからなるか、又はそれから本質的になる VL CDR1 と、
 (b) アミノ酸配列 LGSNRAS (配列番号2) を含むか、それからなるか、又はそれから本質的になる VL CDR2 と、
 (c) アミノ酸配列 MQALQTPLT (配列番号3) を含むか、それからなるか、又はそれから本質的になる VL CDR3 と
 を含む軽鎖可変領域 (VL) を含む。

【0182】

一部の実施形態において、本抗体は、本明細書に記載される VL フレームワーク領域を含む。具体的な実施形態において、本抗体は、表3に示される抗体の VL フレームワーク領域 (FR) を含む。

10

【0183】

別の実施形態において、OX40 (例えば、ヒトOX40) に特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、表2に示されるとおりの、

(a) アミノ酸配列 GSAMH (配列番号4) を含むか、それからなるか、又はそれから本質的になる VH CDR1 と、
 (b) アミノ酸配列 RIRSKANSYATAYAASVKG (配列番号5) を含むか、それからなるか、又はそれから本質的になる VH CDR2 と、
 (c) アミノ酸配列 GIYDSSGYDY (配列番号6) を含むか、それからなるか、又はそれから本質的になる VH CDR3 と
 を含む重鎖可変領域 (VH) を含む。

20

【0184】

一部の実施形態において、本抗体は、本明細書に記載される VH フレームワークを含む。具体的な実施形態において、本抗体は、表4に示される抗体の VH フレームワーク領域を含む。

【0185】

【表1】

表1. VL CDRアミノ酸配列¹

| 抗体 | VL CDR1 (配列番号) | VL CDR2 (配列番号) | VL CDR3 (配列番号) |
|---------|----------------------|----------------|----------------|
| pab1949 | RSSQSLLHSNGYNYLD (1) | LGSNRAS (2) | MQALQTPLT (3) |

30

¹表1の VL CDR は Kabat に従い決定される。

【0186】

【表2】

表2. VH CDRアミノ酸配列²

| 抗体 | VH CDR1 (配列番号) | VH CDR2 (配列番号) | VH CDR3 (配列番号) |
|---------|----------------|-------------------------|----------------|
| pab1949 | GSAMH (4) | RIRSKANSYATAYAASVKG (5) | GIYDSSGYDY (6) |

40

²表2の VH CDR は Kabat に従い決定される。

【0187】

【表 3】

表3. VL FRアミノ酸配列³

| 抗体 | VL FR1 (配列番号) | VL FR2 (配列番号) | VL FR3 (配列番号) | VL FR4 (配列番号) |
|---------|-------------------------------|-------------------------|-------------------------------------|----------------------------|
| pab1949 | DIVMTQSPLSLPVT EPASISC (7) | WYLQKPGQSP QLLIY (8) | GVPDRFSGSGSGTDF RVEAEDVGVYYC (9) | TKIS FGGGTKVEIK (10) |

³表 3 に記載される VL フレームワーク領域は、Kabat 付番方式による CDR の境界に基づき決定される。換言すれば、これらの VL CDR は Kabat により決定され、フレームワーク領域は、フォーマット FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、及び FR4 の可変領域において CDR を取り囲むアミノ酸残基である。

10

【 0 1 8 8 】

【表 4】

表 4. VH FRアミノ酸配列⁴

| 抗体 | VH FR1 (配列番号) | VH FR2 (配列番号) | VH FR3 (配列番号) | VH FR4 (配列番号) |
|---------|-------------------------------------|-------------------------|---------------------------------------|------------------|
| pab1949 | EVQLVESGGGLVQP KLSCAASGFTFS (11) | WVRQASGKGLE WVG (12) | RFTISRDDSKNTAYL LKTEDTAVYYCTS (13) | QMNS (14) |

⁴表 4 に記載される VH フレームワーク領域は、Kabat 付番方式による CDR の境界に基づき決定される。換言すれば、これらの VH CDR は Kabat により決定され、フレームワーク領域は、フォーマット FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、及び FR4 の可変領域において CDR を取り囲むアミノ酸残基である。

20

【 0 1 8 9 】

具体的な実施形態において、本抗体は、表 3 に示される 4 つの VL フレームワーク領域 (FR) と表 4 に示される 4 つの VH フレームワーク領域 (FR) とを含む。

【 0 1 9 0 】

特定の実施形態において、本明細書には、OX40 (例えば、ヒトOX40) に特異的に結合し、且つ例えば表 1 及び表 2 に示されるとおりの (即ち、配列番号 1 ~ 6)、pab1949 又は pab2044 の軽鎖可変領域 (VL) CDR 及び重鎖可変領域 (VH) CDR を含む抗体が提供される。特定の実施形態において、本明細書には、OX40 (例えば、ヒトOX40) に特異的に結合し、且つ例えば表 1 及び表 2 に示されるとおりの (即ち、配列番号 1 ~ 6)、pab1949 又は pab2044 の軽鎖可変領域 (VL) CDR 及び重鎖可変領域 (VH) CDR と表 3 及び表 4 に示される VL フレームワーク領域及び VH フレームワーク領域とを含む抗体が提供される。

30

【 0 1 9 1 】

詳細な実施形態において、OX40 (例えば、ヒトOX40) に特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、表 1 に示されるとおりの VL CDR 1、VL CDR 2、及び VL CDR 3 を含む軽鎖可変領域 (VL) と表 3 に示される VL フレームワーク領域とを含む。

40

【 0 1 9 2 】

特定の実施形態において、抗体は、ヒト遺伝子によってコードされるアミノ酸配列に由来する軽鎖可変フレームワーク領域を含み、このアミノ酸配列は I G K V 2 - 2 8 * 0 1 (配列番号 1 8) のものである。

【 0 1 9 3 】

詳細な実施形態において、OX40 (例えば、ヒトOX40) に特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、表 2 に示されるとおりの VH CDR 1、VH CDR 2、及び VH CDR 3 を含む重鎖可変領域 (VH) と表 4 に示される VH フレームワーク領域とを含む。

【 0 1 9 4 】

50

特定の実施形態において、本抗体は、ヒト遺伝子によってコードされるアミノ酸配列に由来する重鎖可変フレームワーク領域を含み、このアミノ酸配列はIGHV3-73*01（配列番号19）のものである。

【0195】

具体的な実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に特異的に結合する抗体は、配列番号15のアミノ酸配列を含むVLDメインを含む。具体的な実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に特異的に結合する抗体は、配列番号15のアミノ酸配列からなるか又はそれから本質的になるVLDメインを含む。

【0196】

特定の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に特異的に結合する抗体は、配列番号16のアミノ酸配列を含むVHドメインを含む。一部の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に特異的に結合する抗体は、配列番号16のアミノ酸配列からなるか又はそれから本質的になるVHドメインを含む。

10

【0197】

特定の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に特異的に結合する抗体はVHドメインとVLDメインとを含み、このVHドメイン及びVLDメインは、それぞれ配列番号16及び配列番号15のアミノ酸配列を含む。特定の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に特異的に結合する抗体はVHドメインとVLDメインとを含み、このVHドメイン及びVLDメインは、それぞれ配列番号16及び配列番号15のアミノ酸配列からなるか又はそれから本質的になる。

20

【0198】

特定の態様において、本明細書に記載される抗体は、そのVLDメイン単独、又はそのVHドメイン単独によるか、又はその3つのVLCDR単独、又はその3つのVHCDR単独によって記載し得る。例えば、ヒト軽鎖又は重鎖ライブラリからそれぞれ相補的軽鎖又は重鎖を同定して、元の抗体と同程度か又はそれより高い親和性を有するヒト抗体変異体を得ることによるマウス抗v3抗体のヒト化について記載しているRadet al., (1998) PNAS 95: 8910-8915（全体として参照により本明細書に援用される）を参照されたい。また、特定のVLDメイン（又はVHドメイン）を使用し且つ相補的可変ドメインに関してライブラリをスクリーニングすることによる特異的抗原に結合する抗体を作製する方法について記載しているClackson T et al., (1991) Nature 352: 624-628（全体として参照により本明細書に援用される）も参照されたい。このスクリーンにより、特定のVHドメインに対する14個の新規パートナー及び特定のVLDメインに対する13個の新規パートナーが生じ、これらは、ELISAによって決定するとき、強力な結合剤であった。また、特定のVHドメインを使用し且つ相補的VLDメインに関してライブラリ（例えば、ヒトVLライブラリ）をスクリーニングすることによる特異的抗原に結合する抗体を作製する方法について記載しているKim SJ & Hong HJ, (2007) J Microbiol 45: 572-577（全体として参照により本明細書に援用される）も参照されたい。これらの選択されたVLDメインを使用して、次に追加の相補的（例えば、ヒト）VHドメインの選択をガイドし得る。

30

40

【0199】

特定の態様において、抗体のCDRは、免疫グロブリン構造ループの位置を参照するChothia付番スキームに従い決定することができる（例えば、Chothia C & Lesk AM, (1987), J Mol Biol 196: 901-917; Al-Lazikani B et al., (1997) J Mol Biol 273: 927-948; Chothia C et al., (1992) J Mol Biol 227: 799-817; Tramontano A et al., (1990) J Mol Biol 215(1): 175-82; 及び米国特許第7,709,226号明細書を参照されたい）。典型的には、Kabatt付番慣習を使用するとき、Chothia CDR-H1ループは重鎖アミノ酸26~32、33、又は34に位置し、C

50

h o t h i a C D R - H 2 ループは重鎖アミノ酸 5 2 ~ 5 6 に位置し、及び C h o t h i a C D R - H 3 ループは重鎖アミノ酸 9 5 ~ 1 0 2 に位置する一方、C h o t h i a C D R - L 1 ループは軽鎖アミノ酸 2 4 ~ 3 4 に位置し、C h o t h i a C D R - L 2 ループは軽鎖アミノ酸 5 0 ~ 5 6 に位置し、及び C h o t h i a C D R - L 3 ループは軽鎖アミノ酸 8 9 ~ 9 7 に位置する。K a b a t 付番慣習を使用して付番したときの C h o t h i a C D R ~ H 1 ループの終わりは、ループの長さに応じて H 3 2 ~ H 3 4 で異なる（これは、K a b a t 付番スキームが H 3 5 A 及び H 3 5 B に挿入を置くためである；3 5 A も 3 5 B も存在しない場合、ループは 3 2 で終わる；3 5 A のみが存在する場合、ループは 3 3 で終わる；3 5 A 及び 3 5 B の両方が存在する場合、ループは 3 4 で終わる）。

10

【0200】

特定の態様において、本明細書には、O X 4 0（例えば、ヒト O X 4 0）に特異的に結合し、且つ p a b 1 9 4 9 又は p a b 2 0 4 4 の V L の C h o t h i a V L C D R を含む抗体が提供される。特定の態様において、本明細書には、O X 4 0（例えば、ヒト O X 4 0）に特異的に結合し、且つ p a b 1 9 4 9 又は p a b 2 0 4 4 の V H の C h o t h i a V H C D R を含む抗体が提供される。特定の態様において、本明細書には、O X 4 0（例えば、ヒト O X 4 0）に特異的に結合し、且つ p a b 1 9 4 9 又は p a b 2 0 4 4 の V L の C h o t h i a V L C D R を含み、p a b 1 9 4 9 又は p a b 2 0 4 4 の V H の C h o t h i a V H C D R を含む抗体が提供される。特定の実施形態において、O X 4 0（例えば、ヒト O X 4 0）に特異的に結合する抗体は 1 つ以上の C D R を含み、ここで、C h o t h i a 及び K a b a t C D R は同じアミノ酸配列を有する。特定の実施形態において、本明細書には、O X 4 0（例えば、ヒト O X 4 0）に特異的に結合し、且つ K a b a t C D R と C h o t h i a C D R との組み合わせを含む抗体が提供される。

20

【0201】

特定の態様において、抗体の C D R は、L e f r a n c M - P , (1 9 9 9) T h e I m m u n o l o g i s t 7 : 1 3 2 - 1 3 6 及び L e f r a n c M - P e t a l . , (1 9 9 9) N u c l e i c A c i d s R e s 2 7 : 2 0 9 - 2 1 2 に記載されるとおりの I M G T 付番方式に従い決定することができる。I M G T 付番スキームによれば、V H - C D R 1 は 2 6 ~ 3 5 位にあり、V H - C D R 2 は 5 1 ~ 5 7 位にあり、V H - C D R 3 は 9 3 ~ 1 0 2 位にあり、V L - C D R 1 は 2 7 ~ 3 2 位にあり、V L - C D R 2 は 5 0 ~ 5 2 位にあり、及び V L - C D R 3 は 8 9 ~ 9 7 位にある。詳細な実施形態において、本明細書には、O X 4 0（例えば、ヒト O X 4 0）に特異的に結合し、且つ I M G T 付番方式によって決定されるとおりの、例えば、L e f r a n c M - P (1 9 9 9) 前掲及び L e f r a n c M - P e t a l . , (1 9 9 9) 前掲に記載されるとおりの p a b 1 9 4 9 又は p a b 2 0 4 4 の C D R を含む抗体が提供される。

30

【0202】

特定の態様において、抗体の C D R は、M a c C a l l u m R M e t a l . , (1 9 9 6) J M o l B i o l 2 6 2 : 7 3 2 - 7 4 5 に従い決定することができる。例えば、M a r t i n A . " P r o t e i n S e q u e n c e a n d S t r u c t u r e A n a l y s i s o f A n t i b o d y V a r i a b l e D o m a i n s , " i n A n t i b o d y E n g i n e e r i n g , K o n t e r m a n n a n d D u e b e l , e d s . , C h a p t e r 3 1 , p p . 4 2 2 - 4 3 9 , S p r i n g e r - V e r l a g , B e r l i n (2 0 0 1) も参照されたい。詳細な実施形態において、本明細書には、O X 4 0（例えば、ヒト O X 4 0）に特異的に結合し、且つ M a c C a l l u m R M e t a l の方法によって決定されるとおりの p a b 1 9 4 9 又は p a b 2 0 4 4 の C D R を含む抗体が提供される。

40

【0203】

特定の態様において、抗体の C D R は、K a b a t C D R と C h o t h i a 構造ループとの間の組み合わせに相当し、且つ O x f o r d M o l e c u l a r の A b M 抗体モ

50

デル化ソフトウェア (Oxford Molecular Group, Inc.) によって用いられている AbM 超可変領域を参照する AbM 付番スキームに従い決定することができる。詳細な実施形態において、本明細書には、OX40 (例えば、ヒトOX40) に特異的に結合し、且つ AbM 付番スキームによって決定されるとおりの pab1949 又は pab2044 の CDR を含む抗体が提供される。

【0204】

具体的な実施形態において、本明細書に記載される抗体の VH (例えば、CDR1、CDR2、又は CDR3) 及び / 又は VL (例えば、CDR1、CDR2、又は CDR3) 領域に沿った 1 つ以上の CDR の位置は、OX40 (例えば、ヒトOX40) に対する免疫特異的結合が維持されている (例えば、実質的に、例えば、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 90%、少なくとも 95% 維持されている) 限り、1、2、3、4、5、又は 6 アミノ酸位置だけ異なってもよい。例えば、一実施形態において、本明細書に記載される抗体の CDR を定義する位置は、OX40 (例えば、ヒトOX40) に対する免疫特異的結合が維持されている (例えば、実質的に、例えば、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 90%、少なくとも 95% 維持されている) 限り、本明細書に記載される抗体 (例えば、pab1949 又は pab2044) の CDR 位置と比べて CDR の N 末端及び / 又は C 末端境界を 1、2、3、4、5、又は 6 アミノ酸だけシフトすることにより異なってもよい。別の実施形態において、本明細書に記載される抗体の VH (例えば、CDR1、CDR2、又は CDR3) 及び / 又は VL (例えば、CDR1、CDR2、又は CDR3) 領域に沿った 1 つ以上の CDR の長さは、OX40 (例えば、ヒトOX40) に対する免疫特異的結合が維持されている (例えば、実質的に、例えば、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 90%、少なくとも 95% 維持されている) 限り、1、2、3、4、5 アミノ酸、又はそれを超えて異なってもよい (例えば、短くても又は長くてもよい)。

【0205】

一実施形態において、本明細書に記載される VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR1、VH CDR2、及び / 又は VH CDR3 は、OX40 (例えば、ヒトOX40) に対する免疫特異的結合が維持されている (例えば、実質的に、例えば、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 90%、少なくとも 95% 維持されている) 限り、本明細書に記載される CDR (例えば、配列番号 1~6) の 1 つ以上と比べて 1、2、3、4、5 アミノ酸又はそれを超えて短くてもよい。別の実施形態において、本明細書に記載される VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR1、VH CDR2、及び / 又は VH CDR3 は、OX40 (例えば、ヒトOX40) に対する免疫特異的結合が維持されている (例えば、実質的に、例えば、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 90%、少なくとも 95% 維持されている) 限り、本明細書に記載される CDR (例えば、配列番号 1~6) の 1 つ以上と比べて 1、2、3、4、5 アミノ酸又はそれを超えて長くてもよい。別の実施形態において、本明細書に記載される VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR1、VH CDR2、及び / 又は VH CDR3 のアミノ末端は、OX40 (例えば、ヒトOX40) に対する免疫特異的結合が維持されている (例えば、実質的に、例えば、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 90%、少なくとも 95% 維持されている) 限り、本明細書に記載される CDR (例えば、配列番号 1~6) の 1 つ以上と比較して 1、2、3、4、5 アミノ酸又はそれを超えて延長されてもよい。別の実施形態において、本明細書に記載される VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR1、VH CDR2、及び / 又は VH CDR3 のカルボキシル末端は、OX40 (例えば、ヒトOX40) に対する免疫特異的結合が維持されている (例えば、実質的に、例えば、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 90%、少なくとも 95% 維持されている) 限り、本明

10

20

30

40

50

細書に記載されるCDR（例えば、配列番号1～6）の1つ以上と比較して1、2、3、4、5アミノ酸又はそれを超えて延長されてもよい。別の実施形態において、本明細書に記載されるVL CDR1、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR1、VH CDR2、及び/又はVH CDR3のアミノ末端は、OX40（例えば、ヒトOX40）に対する免疫特異的結合が維持されている（例えば、実質的に、例えば、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90%、少なくとも95%維持されている）限り、本明細書に記載されるCDR（例えば、配列番号1～6）の1つ以上と比較して1、2、3、4、5アミノ酸又はそれを超えて短縮されてもよい。一実施形態において、本明細書に記載されるVL CDR1、VL CDR2、VL CDR3、VH CDR1、VH CDR2、及び/又はVH CDR3のカルボキシ末端は、OX40（例えば、ヒトOX40）に対する免疫特異的結合が維持されている（例えば、実質的に、例えば、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90%、少なくとも95%維持されている）限り、本明細書に記載されるCDR（例えば、配列番号1～6）の1つ以上と比較して1、2、3、4、5アミノ酸又はそれを超えて短縮されてもよい。当該技術分野において公知の任意の方法、例えば本明細書に提供される「実施例」の節（第6節）に記載される結合アッセイ及び条件を用いて、OX40（例えば、ヒトOX40）に対する免疫特異的結合が維持されているかどうかを確かめることができる。

10

【0206】

具体的な態様において、本明細書には、抗体軽鎖及び重鎖、例えば別個の軽鎖及び重鎖を含む抗体が提供される。軽鎖に関して、具体的な実施形態では、本明細書に記載される抗体の軽鎖は軽鎖である。別の具体的な実施形態では、本明細書に記載される抗体の軽鎖は軽鎖である。更に別の具体的な実施形態では、本明細書に記載される抗体の軽鎖はヒト軽鎖又はヒト軽鎖である。詳細な実施形態では、OX40ポリペプチド（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、VLドメインのアミノ酸配列が配列番号15に示される配列を含む軽鎖であって、且つ軽鎖の定常領域がヒト軽鎖定常領域のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。別の詳細な実施形態では、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、VLドメインのアミノ酸配列が配列番号15に示される配列を含む軽鎖であって、且つ軽鎖の定常領域がヒト軽鎖定常領域のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。具体的な実施形態では、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、VLドメインのアミノ酸配列が配列番号15に示される配列を含む軽鎖であって、且つ軽鎖の定常領域がヒト又は軽鎖定常領域のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。ヒト定常領域配列の非限定的な例は当該技術分野において記載されており、例えば、米国特許第5,693,780号明細書及びKabata E A et al., (1991)前掲を参照されたい。

20

30

【0207】

詳細な実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、配列番号20に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【0208】

重鎖に関して、具体的な実施形態では、本明細書に記載される抗体の重鎖は、アルファ（ α ）、デルタ（ δ ）、イプシロン（ ϵ ）、ガンマ（ γ ）又はミュー（ μ ）重鎖であり得る。別の具体的な実施形態では、記載される抗体の重鎖は、ヒトアルファ（ α ）、デルタ（ δ ）、イプシロン（ ϵ ）、ガンマ（ γ ）又はミュー（ μ ）重鎖を含み得る。詳細な実施形態では、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、VHドメインのアミノ酸配列が配列番号16に示される配列を含み得る重鎖であって、重鎖の定常領域がヒトガンマ（ γ ）重鎖定常領域のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。具体的な実施形態では、OX40（例えば、ヒトOX40）に特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、VHドメインのアミノ酸配列が配列番号16に示される配列を含む重鎖であって、重鎖の定常領域が本明細書に記載される又は当該技術分野において

40

50

公知のヒト重鎖のアミノ酸を含む重鎖を含む。ヒト定常領域配列の非限定的な例は当該技術分野において記載されており、例えば、米国特許第5,693,780号明細書及びKabata EA et al., (1991)前掲を参照されたい。

【0209】

詳細な実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、配列番号21に示されるアミノ酸配列を含む重鎖を含む。詳細な実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、配列番号60に示されるアミノ酸配列を含む重鎖を含む。別の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、配列番号23に示されるアミノ酸配列を含む重鎖を含む。別の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、配列番号61に示されるアミノ酸配列を含む重鎖を含む。別の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、配列番号51に示されるアミノ酸配列を含む重鎖を含む。別の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、配列番号62に示されるアミノ酸配列を含む重鎖を含む。別の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、配列番号52に示されるアミノ酸配列を含む重鎖を含む。別の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、配列番号63に示されるアミノ酸配列を含む重鎖を含む。

10

20

【0210】

具体的な実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、本明細書に記載される任意のアミノ酸配列を含むVLDメイン及びVHドメインを含み、定常領域がIgG、IgE、IgM、IgD、IgA、又はIgY免疫グロブリン分子、又はヒトIgG、IgE、IgM、IgD、IgA、又はIgY免疫グロブリン分子の定常領域のアミノ酸配列を含む。別の具体的な実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、本明細書に記載される任意のアミノ酸配列を含むVLDメイン及びVHドメインを含み、定常領域が、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、又はIgY免疫グロブリン分子、任意のクラス（例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、及びIgA₂）、又は任意のサブクラス（例えば、IgG_{2a}及びIgG_{2b}）の免疫グロブリン分子の定常領域のアミノ酸配列を含む。詳細な実施形態において、定常領域は、ヒトIgG、IgE、IgM、IgD、IgA、又はIgY免疫グロブリン分子、任意のクラス（例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、及びIgA₂）、又は任意のサブクラス（例えば、IgG_{2a}及びIgG_{2b}）の免疫グロブリン分子の定常領域のアミノ酸配列を含む。

30

【0211】

別の具体的な実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、本明細書に記載される任意のアミノ酸配列を含むVLDメイン及びVHドメインを含み、定常領域が、ヒトIgG₁（例えば、アロタイプG1m3、G1m17,1又はG1m17,1,2）、ヒトIgG₂、又はヒトIgG₄の定常領域のアミノ酸配列を含む。詳細な実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、本明細書に記載される任意のアミノ酸配列を含むVLDメイン及びVHドメインを含み、定常領域が、ヒトIgG₁（アロタイプG1m3）の定常領域のアミノ酸配列を含む。ヒト定常領域の非限定的な例は当該技術分野において記載されており、例えば、Kabata EA et al., (1991)前掲を参照されたい。

40

【0212】

別の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、配列番号20に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖と配列番号21

50

に示されるアミノ酸配列を含む重鎖とを含む。別の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、配列番号20に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖と配列番号60に示されるアミノ酸配列を含む重鎖とを含む。別の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、配列番号20に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖と配列番号23に示されるアミノ酸配列を含む重鎖とを含む。別の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、配列番号20に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖と配列番号61に示されるアミノ酸配列を含む重鎖とを含む。別の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、配列番号20に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖と配列番号51
10
又は52に示されるアミノ酸配列を含む重鎖とを含む。別の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、配列番号20に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖と配列番号62又は63に示されるアミノ酸配列を含む重鎖とを含む。

【0213】

特定の実施形態では、本明細書に記載される抗体のFc領域（例えば、CH2ドメイン（ヒトIgG₁の残基231～340）及び/又はCH3ドメイン（ヒトIgG₁の残基341～447）及び/又はヒンジ領域（Kabab付番方式（例えば、KababのEUIンデックス）に従う付番による））に1、2個、又はそれを超える突然変異（例えば、アミノ酸置換）を導入して、血清中半減期、補体結合、Fc受容体結合及び/又は抗原
20
依存性細胞傷害など、抗体の1つ以上の機能特性を改変する。

【0214】

特定の実施形態では、例えば米国特許第5,677,425号明細書に記載されるとおり、Fc領域（CH1ドメイン）のヒンジ領域に1、2個、又はそれを超える突然変異（例えば、アミノ酸置換）を導入して、ヒンジ領域におけるシステイン残基の数を改変する（例えば、増加又は減少させる）。CH1ドメインのヒンジ領域におけるシステイン残基の数を改変すると、例えば、軽鎖及び重鎖のアセンブリが促進され、又は抗体の安定性が改変され得る（例えば、増加又は減少し得る）。

【0215】

一部の実施形態では、本明細書に記載される抗体のFc領域（例えば、CH2ドメイン（ヒトIgG₁の残基231～340）及び/又はCH3ドメイン（ヒトIgG₁の残基341～447）及び/又はヒンジ領域（Kabab付番方式（例えば、KababのEUIンデックス）に従う付番による））に1、2個、又はそれを超える突然変異（例えば、アミノ酸置換）を導入して、エフェクター細胞の表面上のFc受容体（例えば、活性化Fc受容体）に対する抗体の親和性を増加又は低下させる。Fc受容体に対する抗体の親和性を低下又は増加させる抗体のFc領域の突然変異及びFc受容体又はその断片へのかかる突然変異の導入技法は当業者に公知である。Fc受容体に対する抗体の親和性を改変するために作製し得る抗体のFc受容体における突然変異の例は、例えば、Smith
30
Pet al., (2012) PNAS 109: 6181-6186、米国特許第6,737,056号明細書、及び国際公開第02/060919号パンフレット；同第9
40
8/23289号パンフレット；及び同第97/34631号パンフレット（これらは参照により本明細書に援用される）に記載されている。

【0216】

具体的な実施形態では、IgG定常ドメイン、又はそのFcRn結合断片（好ましくはFc又はヒンジ-Fcドメイン断片）に1、2個、又はそれを超えるアミノ酸突然変異（即ち、置換、挿入又は欠失）を導入して、抗体のインビボ半減期を改変する（例えば、低下又は増加させる）。抗体のインビボ半減期を改変し得る（例えば、低下又は増加させ得る）突然変異の例については、例えば、国際公開第02/060919号パンフレット；同第98/23289号パンフレット；及び同第97/34631号パンフレット；及び
50
米国特許第5,869,046号明細書、同第6,121,022号明細書、同第6,2

77, 375号明細書及び同第6, 165, 745号明細書を参照されたい。一部の実施形態では、IgG定常ドメイン、又はそのFcRn結合断片（好ましくはFc又はヒンジ-Fcドメイン断片）に1、2個又はそれを超えるアミノ酸突然変異（即ち、置換、挿入、又は欠失）を導入して、抗体のインビボ半減期を減少させる。他の実施形態では、IgG定常ドメイン、又はそのFcRn結合断片（好ましくはFc又はヒンジ-Fcドメイン断片）に1、2個又はそれを超えるアミノ酸突然変異（即ち、置換、挿入又は欠失）を導入して、抗体のインビボ半減期を増加させる。具体的な実施形態では、本抗体は第2の定常（CH2）ドメイン（ヒトIgG₁の残基231~340）及び/又は第3の定常（CH3）ドメイン（ヒトIgG₁の残基341~447）（KabataのEUインデックス（Kabata EA et al., (1991)前掲）に従う付番による）に1つ以上のアミノ酸突然変異（例えば、置換）を有し得る。具体的な実施形態において、本明細書に記載される抗体のIgG₁の定常領域は、252位におけるメチオニン（M）からチロシン（Y）への置換、254位におけるセリン（S）からスレオニン（T）への置換、及び256位におけるスレオニン（T）からグルタミン酸（E）への置換（KabataにあるとおりのEUインデックスに従い付番する）を含む。米国特許第7, 658, 921号明細書（参照により本明細書に援用される）を参照されたい。「YTE突然変異体」と称されるこのタイプの突然変異IgGは、野生型バージョンの同じ抗体と比較して4倍増加した半減期を呈することが示されている（Dall'Acqua WF et al., (2006) J Biol Chem 281:23514-24を参照されたい）。特定の実施形態において、抗体は、251~257、285~290、308~314、385~389、及び428~436位（KabataにあるとおりのEUインデックスに従い付番する）にアミノ酸残基の1、2、3個又はそれを超えるアミノ酸置換を含むIgG定常ドメインを含む。

【0217】

更なる実施形態では、IgG定常ドメインFc領域に1、2個、又はそれを超えるアミノ酸置換を導入して、抗体の1つ又は複数のエフェクター機能を改変する。例えば、アミノ酸残基234、235、236、237、297、318、320及び322（KabataにあるとおりのEUインデックスに従い付番する）から選択される1つ以上のアミノ酸を異なるアミノ酸残基に置き換えて、抗体がエフェクターリガンドに対して改変された親和性を有するが、親抗体の抗原結合能力は保持したままとなるようにし得る。親和性改変の対象となるエフェクターリガンドは、例えば、Fc受容体又は補体のC1成分であり得る。この手法は、米国特許第5, 624, 821号明細書及び同第5, 648, 260号明細書に更に詳細に記載されている。一部の実施形態では、定常領域ドメインの欠失又は不活性化（点突然変異又は他の手段による）により循環抗体のFc受容体結合を低下させて、それにより腫瘍局在を増加させ得る。定常ドメインを欠失又は活性化させて、それにより腫瘍局在を増加させる突然変異の説明については、例えば、米国特許第5, 585, 097号明細書及び同第8, 591, 886号明細書を参照されたい。特定の実施形態では、本明細書に記載される抗体のFc領域に1つ以上のアミノ酸置換を導入してFc領域上の潜在的グリコシル化部位を除去してもよく、これによりFc受容体結合を低下させ得る（例えば、Shields RL et al., (2001) J Biol Chem 276:6591-604を参照されたい）。様々な実施形態において、本明細書に記載される抗体の定常領域に、以下の突然変異のうちの1つ以上を作製し得る：N297A置換；N297Q置換；L235A置換及びL237A置換；L234A置換及びL235A置換；E233P置換；L234V置換；L235A置換；C236欠失；P238A置換；D265A置換；A327Q置換；又はP329A置換（KabataにあるとおりのEUインデックスに従い付番する）。特定の実施形態では、本明細書に記載される抗体の定常領域に、D265A、P329A、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される突然変異を作製し得る。

【0218】

具体的な実施形態において、本明細書に記載される抗体は、N297Q又はN297A

アミノ酸置換を含む I g G₁ の定常ドメインを含む。一実施形態において、本明細書に記載される抗体は、D 2 6 5 A、P 3 2 9 A、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される突然変異を含む I g G₁ の定常ドメインを含む。

【0219】

特定の実施形態において、本明細書に記載される抗体の定常領域におけるアミノ酸残基 3 2 9、3 3 1、及び 3 2 2 から選択される 1 つ以上のアミノ酸 (K a b a t にあるとおりの E U インデックスに従い付番する) は、抗体が改変された C 1 q 結合及び / 又は低下若しくは消失した補体依存性細胞傷害 (C D C) を有するように異なるアミノ酸残基に置き換えることができる。この手法については、米国特許第 6 , 1 9 4 , 5 5 1 号明細書 (I d u s o g i e e t a l) に更に詳細に記載されている。一部の実施形態では、本明細書に記載される抗体の C H 2 ドメインの N 末端領域におけるアミノ酸位置 2 3 1 ~ 2 3 8 内にある 1 つ以上のアミノ酸残基を改変して、それにより抗体の補体結合能力を改変する。この手法については、国際公開第 9 4 / 2 9 3 5 1 号パンフレットに更に記載されている。特定の実施形態では、以下の位置 : 2 3 8、2 3 9、2 4 8、2 4 9、2 5 2、2 5 4、2 5 5、2 5 6、2 5 8、2 6 5、2 6 7、2 6 8、2 6 9、2 7 0、2 7 2、2 7 6、2 7 8、2 8 0、2 8 3、2 8 5、2 8 6、2 8 9、2 9 0、2 9 2、2 9 3、2 9 4、2 9 5、2 9 6、2 9 8、3 0 1、3 0 3、3 0 5、3 0 7、3 0 9、3 1 2、3 1 5、3 2 0、3 2 2、3 2 4、3 2 6、3 2 7、3 2 8、3 2 9、3 3 0、3 3 1、3 3 3、3 3 4、3 3 5、3 3 7、3 3 8、3 4 0、3 6 0、3 7 3、3 7 6、3 7 8、3 8 2、3 8 8、3 8 9、3 9 8、4 1 4、4 1 6、4 1 9、4 3 0、4 3 4、4 3 5、4 3 7、4 3 8、又は 4 3 9 (K a b a t にあるとおりの E U インデックスに従い付番する) にある 1 つ以上のアミノ酸を突然変異させる (例えば、アミノ酸置換を導入する) ことにより、本明細書に記載される抗体の F c 領域を修飾して、抗体が抗体依存性細胞傷害 (A D C C) を媒介する能力を増加させ、及び / 又は F c 受容体に対する抗体の親和性を増加させる。この手法については、国際公開第 0 0 / 4 2 0 7 2 号パンフレットに更に記載されている。

10

20

【0220】

特定の実施形態において、本明細書に記載される抗体は、2 6 7、3 2 8 位、又はこれらの組み合わせ (K a b a t にあるとおりの E U インデックスに従い付番する) に突然変異 (例えば、置換) を含む I g G₁ の定常ドメインを含む。特定の実施形態において、本明細書に記載される抗体は、S 2 6 7 E、L 3 2 8 F、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される突然変異 (例えば、置換) を含む I g G₁ の定常ドメインを含む。特定の実施形態において、本明細書に記載される抗体は、S 2 6 7 E / L 3 2 8 F 突然変異 (例えば、置換) を含む I g G₁ の定常ドメインを含む。特定の実施形態において、S 2 6 7 E / L 3 2 8 F 突然変異 (例えば、置換) を含む I g G₁ の定常ドメインを含む本明細書に記載される抗体は、F c R I I A、F c R I I B、又は F c R I I A 及び F c R I I B に対して増加した結合親和性を有する。

30

【0221】

特定の実施形態において、本明細書に記載される抗体は I g G₄ 抗体の定常領域を含み、且つ重鎖のアミノ酸残基 2 2 8 におけるセリン (K a b a t にあるとおりの E U インデックスに従い付番する) がプロリンに置換されている。

40

【0222】

特定の実施形態において、本明細書に記載される抗体は I g G₂ 抗体の定常領域を含み、且つ重鎖のアミノ酸残基 1 2 7 におけるシステイン (K a b a t に従い付番する) がセリンに置換されている。

【0223】

フコース含量が低下した抗体は、例えば F c R I I I A などの F c 受容体に対して増加した親和性を有することが報告されている。従って、特定の実施形態において、本明細書に記載される抗体は低下したフコース含量を有するか、又はフコース含量を有しない。かかる抗体は、当業者に公知の技法を用いて作製することができる。例えば、フコシル化

50

能が欠損又は欠如した細胞において抗体を発現させることができる。具体的な例では、1, 6 - フコシルトランスフェラーゼの両方の対立遺伝子のノックアウトを有する細胞株を使用して、フコース含量が低下した抗体を作製することができる。Potelligent (登録商標) システム (Lonza) は、フコース含量が低下した抗体の作製に使用し得るかかるシステムの一例である。或いは、フコース含量が低下した又はフコース含量を有しない抗体は、例えば、(i) フコシル化を妨げ又は低下させる条件下で細胞を培養すること；(ii) 翻訳後のフコース除去 (例えば、フコシダーゼ酵素による)；(iii) 翻訳後の所望の炭水化物の付加、例えば非グリコシル化糖タンパク質の組換え発現後；又は(iv) 糖タンパク質の精製による、フコシル化されていないその抗体の選択により、作製することができる。フコース含量を有しない又はフコース含量が低下したその抗体を作製する方法については、例えば、Longmore GD & Schachter H (1982) Carbohydr Res 100:365-92 及び Imai-Nishiyama H et al., (2007) BMC Biotechnol. 7:84 を参照されたい。

10

20

30

40

50

【0224】

操作されたグリコフォームが、限定はされないがエフェクター機能の増強又は低下を含めた種々の目的に有用であり得る。本明細書に記載される抗体に操作されたグリコフォームを生成する方法としては、限定はされないが、例えば、Umana P et al., (1999) Nat Biotechnol 17:176-180; Davies J et al., (2001) Biotechnol Bioeng 74:288-294; Shields RL et al., (2002) J Biol Chem 277:26733-26740; Shinkawa T et al., (2003) J Biol Chem 278:3466-3473; Niwa R et al., (2004) Clin Cancer Res 1:6248-6255; Presta LG et al., (2002) Biochem Soc Trans 30:487-490; Kanda Y et al., (2007) Glycobiology 17:104-118; 米国特許第6,602,684号明細書；同第6,946,292号明細書；及び同第7,214,775号明細書；米国特許出願公開第2007/0248600号明細書；同第2007/0178551号明細書；同第2008/0060092号明細書；及び同第2006/0253928号明細書；国際公開第00/61739号パンフレット；同第01/292246号パンフレット；同第02/311140号パンフレット；及び同第02/30954号パンフレット；Potillegent (商標) 技術 (Biowa, Inc. Princeton, N.J.)；及び GlycoMAb (登録商標) グリコシル化操作技術 (Glycart biotechnology AG, Zurich, Switzerland) に記載されるものが挙げられる。例えば、Ferrara C et al., (2006) Biotechnol Bioeng 93:851-861；国際公開第07/039818号パンフレット；同第12/130831号パンフレット；同第99/054342号パンフレット；同第03/011878号パンフレット；及び同第04/065540号パンフレットも参照されたい。

【0225】

特定の実施形態において、本明細書に記載される抗体のFcドメインの操作に用いられる技術は、Xencor (Monrovia, CA) の XmaB (登録商標) 技術である。例えば、米国特許第8,367,805号明細書；同第8,039,592号明細書；同第8,124,731号明細書；同第8,188,231号明細書；米国特許出願公開第2006/0235208号明細書；国際公開第05/077981号パンフレット；同第11/097527号パンフレット；及び Richards JO et al., (2008) Mol Cancer Ther 7:2517-2527 を参照されたい。

【0226】

特定の実施形態において、ヒトIgG1重鎖のL234、L235、及びD265位に対応する位置にある本明細書に記載される抗体の定常領域におけるアミノ酸残基（EU付番インデックスに従い付番する）は、それぞれL、L、及びDでない。この手法については、国際公開第14/108483号パンフレットに詳細に記載されている。詳細な実施形態において、ヒトIgG1重鎖のL234、L235、及びD265位に対応するアミノ酸は、それぞれF、E、及びA；又はA、A、及びAである。

【0227】

特定の実施形態において、本明細書に記載される任意の定常領域突然変異又は修飾が、2つの重鎖定常領域を有する本明細書に記載される抗体の一方又は両方の重鎖定常領域に導入されてもよい。

10

【0228】

別の詳細な実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は軽鎖と重鎖とを含み、(i)軽鎖は、配列番号1～3に示されるVL CDR1、VL CDR2、及びVL CDR3アミノ酸配列（例えば、表1に掲載されるもの）を含むVLDメインを含み；(ii)重鎖は、配列番号4～6に示されるVH CDR1、VH CDR2、及びVH CDR3アミノ酸配列（例えば、表2に掲載されるもの）を含むVHDメインを含み；(iii)軽鎖は、ヒト軽鎖の定常ドメインのアミノ酸配列を含む定常軽鎖ドメインを更に含み；及び(iv)重鎖は、ヒトIgG₁（任意選択でIgG₁（アロタイプG1m3））重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列を含む定常重鎖ドメインを更に含む。

20

【0229】

別の詳細な実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は軽鎖と重鎖とを含み、(i)軽鎖は、配列番号15に示されるアミノ酸を含むVLDメインを含み；(ii)重鎖は、配列番号16に示されるアミノ酸配列を含むVHDメインを含み；(iii)軽鎖は、ヒト軽鎖の定常ドメインのアミノ酸配列を含む定常ドメインを更に含み；及び(iv)重鎖は、ヒトIgG₁（任意選択でIgG₁（アロタイプG1m3））重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列を含む定常ドメインを更に含む。

【0230】

別の詳細な実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は軽鎖と重鎖とを含み、(i)軽鎖は、配列番号1～3に示されるVL CDR1、VL CDR2、及びVL CDR3アミノ酸配列（例えば、表1に掲載されるもの）を含むVLDメインを含み；(ii)重鎖は、配列番号4～6に示されるVH CDR1、VH CDR2、及びVH CDR3アミノ酸配列（例えば、表2に掲載されるもの）を含むVHDメインを含み；(iii)軽鎖は、ヒト軽鎖の定常ドメインのアミノ酸配列を含む定常軽鎖ドメインを更に含み；及び(iv)重鎖は、ヒトIgG₄重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列を含む定常重鎖ドメインを更に含む。

30

【0231】

別の詳細な実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は軽鎖と重鎖とを含み、(i)軽鎖は、配列番号15のアミノ酸配列を含むVLDメインを含み；(ii)重鎖は、配列番号16のアミノ酸配列を含むVHDメインを含み；(iii)軽鎖は、ヒト軽鎖の定常ドメインのアミノ酸配列を含む定常ドメインを更に含み；及び(iv)重鎖は、ヒトIgG₄重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列を含む定常ドメインを更に含む。

40

【0232】

別の詳細な実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は軽鎖と重鎖とを含み、(i)軽鎖は、配列番号1～3に示されるVL CDR1、VL CDR2、及びVL CDR3アミノ酸配列（例えば、表1に掲載されるもの）を含むVLDメインを含み；(ii)重鎖は、配列番号4～6に示されるVH CDR1、VH CDR2、及びVH CDR3アミノ酸配列（例えば、

50

表 2 に掲載されるもの)を含む V H ドメインを含み; (i i i) 軽鎖は、ヒト 軽鎖の定常ドメインのアミノ酸配列を含む定常軽鎖ドメインを更に含み; 及び (i v) 重鎖は、ヒト I g G₂ 重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列を含む定常重鎖ドメインを更に含む。

【 0 2 3 3 】

別の詳細な実施形態において、O X 4 0 (例えば、ヒト O X 4 0) に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は軽鎖と重鎖とを含み、(i) 軽鎖は、配列番号 1 5 のアミノ酸配列を含む V L ドメインを含み; (i i) 重鎖は、配列番号 1 6 のアミノ酸配列を含む V H ドメインを含み; (i i i) 軽鎖は、ヒト 軽鎖の定常ドメインのアミノ酸配列を含む定常ドメインを更に含み; 及び (i v) 重鎖は、ヒト I g G₂ 重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列を含む定常ドメインを更に含む。特定の実施形態において、軽鎖は配列番号 5 0 のアミノ酸配列を含み、且つ重鎖は配列番号 5 1 のアミノ酸配列を含む。特定の実施形態において、軽鎖は配列番号 5 0 のアミノ酸配列を含み、且つ重鎖は配列番号 6 2 のアミノ酸配列を含む。特定の実施形態において、軽鎖は配列番号 2 0 のアミノ酸配列を含み、且つ重鎖は配列番号 5 1 のアミノ酸配列を含む。特定の実施形態において、軽鎖は配列番号 2 0 のアミノ酸配列を含み、且つ重鎖は配列番号 6 2 のアミノ酸配列を含む。

10

【 0 2 3 4 】

別の具体的な実施形態において、O X 4 0 (例えば、ヒト O X 4 0) に特異的に結合する本明細書に提供される抗体は、(a) アミノ酸位置 2 9 7 に N から A 又は Q へのアミノ酸置換を有する配列番号 2 1 のアミノ酸配列を含む重鎖と、(b) 配列番号 2 0 のアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む。別の具体的な実施形態において、O X 4 0 (例えば、ヒト O X 4 0) に特異的に結合する本明細書に提供される抗体は、(a) アミノ酸位置 2 9 7 に N から A 又は Q へのアミノ酸置換を有する配列番号 6 0 のアミノ酸配列を含む重鎖と、(b) 配列番号 2 0 のアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む。

20

【 0 2 3 5 】

別の具体的な実施形態において、O X 4 0 (例えば、ヒト O X 4 0) に特異的に結合する本明細書に提供される抗体は、(a) アミノ酸位置 2 6 7 における S から E、アミノ酸位置 3 2 8 における L から F、及びアミノ酸位置 2 6 7 における S から E とアミノ酸位置 3 2 8 における L から F との両方からなる群から選択されるアミノ酸置換を有する配列番号 2 1 のアミノ酸配列を含む重鎖と、(b) 配列番号 2 0 のアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む。別の具体的な実施形態において、O X 4 0 (例えば、ヒト O X 4 0) に特異的に結合する本明細書に提供される抗体は、(a) アミノ酸位置 2 6 7 における S から E、アミノ酸位置 3 2 8 における L から F、及びアミノ酸位置 2 6 7 における S から E とアミノ酸位置 3 2 8 における L から F との両方からなる群から選択されるアミノ酸置換を有する配列番号 6 0 のアミノ酸配列を含む重鎖と、(b) 配列番号 2 0 のアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む。

30

【 0 2 3 6 】

具体的な実施形態において、O X 4 0 (例えば、ヒト O X 4 0) に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、抗体依存性細胞傷害 (A D C C) 活性を呈する。具体的な実施形態において、O X 4 0 (例えば、ヒト O X 4 0) に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、ナチュラルキラー細胞媒介性細胞枯渇を惹起する。具体的な実施形態において、O X 4 0 (例えば、ヒト O X 4 0) に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、ナチュラルキラー細胞による浸潤した腫瘍の治療に用いられる。具体的な実施形態において、O X 4 0 (例えば、ヒト O X 4 0) に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、抗体依存性細胞食作用 (A D C P) 活性を呈する。具体的な実施形態において、O X 4 0 (例えば、ヒト O X 4 0) に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、マクロファージ媒介性細胞枯渇を惹起する。具体的な実施形態において、O X 4 0 (例えば、ヒト O X 4 0) に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、マクロファージによる浸潤した腫瘍の治療に用いられる。具体的な実施形態において、O X 4 0 (例えば、ヒト O X 4 0) に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、腫瘍内調節性 T 細胞を選択的に枯渇させる。

40

50

【0237】

具体的な実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、ヒトフレームワーク領域であるか又はヒトフレームワーク領域に由来するフレームワーク領域（例えば、VLドメイン及び/又はVHドメインのフレームワーク領域）を含む。ヒトフレームワーク領域の非限定的な例は当該技術分野において記載されており、例えば、Kabata EA et al., (1991) 前掲）を参照されたい。特定の実施形態において、本明細書に記載される抗体は、霊長類（例えば、非ヒト霊長類）フレームワーク領域であるか又は霊長類（例えば、非ヒト霊長類）フレームワーク領域に由来するフレームワーク領域（例えば、VLドメイン及び/又はVHドメインのフレームワーク領域）を含む。

10

【0238】

例えば、典型的にはげっ歯類（例えば、マウス又はラット）由来の抗原特異的非ヒト抗体のCDRが相同ヒト又は非ヒト霊長類アクセプターフレームワークにグラフトされる。一実施形態において、非ヒト霊長類アクセプターフレームワークは旧世界類人猿のものである。具体的な実施形態において、旧世界類人猿アクセプターフレームワークは、パン・トログロディテス（Pan troglodytes）、パン・パニスクス（Pan paniscus）又はゴリラ・ゴリラ（Gorilla gorilla）のものである。詳細な実施形態において、非ヒト霊長類アクセプターフレームワークはチンパンジー（パン・トログロディテス（Pan troglodytes））のものである。詳細な実施形態において、非ヒト霊長類アクセプターフレームワークは旧世界ザルアクセプターフレームワークである。具体的な実施形態において、旧世界ザルアクセプターフレームワークはマカク属（Macaca）のものである。特定の実施形態において、非ヒト霊長類アクセプターフレームワークはカニクイザル（マカカ・シノモルグス（Macaca cynomolgus））に由来する。非ヒト霊長類フレームワーク配列については、米国特許出願公開第2005/0208625号明細書に記載されている。

20

【0239】

特定の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、前掲表3に示される本明細書に抗体に関して記載されるアミノ酸配列を有する1、2個、又はそれを超えるVLフレームワーク領域（FR）を含む。一部の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、前掲表4に示される本明細書に抗体に関して記載されるアミノ酸配列を有する1、2個、又はそれを超えるVHフレームワーク領域（FR）を含む。具体的な実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、前掲表3に示される本明細書に抗体に関して記載されるアミノ酸配列を有する1、2個、又はそれを超えるVLフレームワーク領域と、前掲表4に示される本明細書に抗体に関して記載されるアミノ酸配列を有する1、2個、又はそれを超えるVHフレームワーク領域とを含む。

30

【0240】

一部の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、1、2、3、4、5、6、7、8、9個又はそれを超えるアミノ酸突然変異（例えば、保存的アミノ酸置換などのアミノ酸置換）を含むpab1949又はpab2044のアミノ酸配列（例えば、配列番号7～10）を有するVLドメインの1、2、3、又は4個のフレームワーク領域及び/又はpab1949又はpab2044のアミノ酸配列（例えば、配列番号11～14）を有するVHドメインのフレームワーク領域を含む。特定の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、1、2、3、4、5、6、7、8、9個又はそれを超えるアミノ酸突然変異（例えば、保存的アミノ酸置換などのアミノ酸置換）を含むpab1949又はpab2044のアミノ酸配列（例えば、配列番号11～14）を有するVHドメインの1、2、3、又は4個のフレームワーク領域及び/又はpab1949又はpab2044のアミノ酸配列（例えば、配列番号7～10）を有するVLドメ

40

50

ンのフレームワーク領域を含む。

【0241】

特定の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、本明細書の前掲表3に記載されるVLフレームワーク領域と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%の配列同一性を有するVLフレームワーク領域（FR）を含む。特定の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、本明細書の前掲表4に記載されるVHフレームワーク領域と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%の配列同一性を有するVHフレームワーク領域（FR）を含む。一部の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、本明細書の前掲表4に記載されるVHフレームワーク領域と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%の配列同一性を有するVHフレームワーク領域（FR）と、本明細書の前掲表3に記載されるVLフレームワーク領域と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%の配列同一性を有するVLフレームワーク領域（FR）とを含む。

10

【0242】

2つの配列（例えば、アミノ酸配列又は核酸配列）間の同一性パーセントの決定はまた、数学的アルゴリズムを用いて達成することもできる。2つの配列の比較に利用される数学的アルゴリズムの具体的な非限定例は、Karlin S & Altschul SF (1993) PNAS 90:5873-5877にあるとおり修正した、Karlin S & Altschul SF (1990) PNAS 87:2264-2268のアルゴリズムである。かかるアルゴリズムは、Altschul SF et al., (1990) J Mol Biol 215:403のNBLAST及びXBLASTプログラムに組み込まれている。BLASTヌクレオチド検索は、NBLASTヌクレオチドプログラムパラメータを例えばスコア=100、ワード長=12に設定して実施することにより、本明細書に記載される核酸分子と相同なヌクレオチド配列を得ることができる。BLASTタンパク質検索は、XBLASTプログラムパラメータを例えばスコア50、ワード長=3に設定して実施することにより、本明細書に記載されるタンパク質分子と相同なアミノ酸配列を得ることができる。比較のためギャップ付きアラインメントを達成するには、Altschul SF et al., (1997) Nuc Acids Res 25:3389-3402に記載されるとおりのギャップ付きBLASTを利用することができる。或いは、PSI-BLASTを用いて、分子間の距離関係を検出する反復検索を実施することができる（同上）。BLAST、ギャップ付きBLAST、及びPSI-BLASTプログラムを利用する場合、それぞれのプログラムの（例えば、XBLAST及びNBLASTの）デフォルトパラメータを使用することができる（例えば、ワールドワイドウェブ、ncbi.nlm.nih.gov上の国立バイオテクノロジー情報センター（NCBI）を参照されたい）。配列の比較に利用される数学的アルゴリズムの別の具体的な非限定例は、Myers and Miller, 1988, CABIOS 4:11-17のアルゴリズムである。かかるアルゴリズムは、GC配列アラインメントソフトウェアパッケージの一部であるALIGNプログラム（バージョン2.0）に組み込まれている。アミノ酸配列の比較にALIGNプログラムを利用する場合、PAM120重み付け残基表、12のギャップ長ペナルティ、及び4のギャップペナルティを使用することができる。

20

30

40

【0243】

2つの配列間の同一性パーセントは、上記に記載されるものと同様の技法を、ギャップを許容して又は許容せずに用いて決定することができる。同一性パーセントの計算では、典型的には完全な一致のみがカウントされる。

50

【0244】

特定の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、pab1949又はpab2044のVLドメインのアミノ酸配列（例えば、配列番号15）と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%の配列同一性を有するVLドメインを含み、この抗体は、pab1949又はpab2044のVL CDRと同一のVL CDRを含む。

【0245】

特定の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、pab1949又はpab2044のVHドメインのアミノ酸配列（例えば、配列番号16）と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%の配列同一性を有するVHドメインを含み、この抗体は、pab1949又はpab2044のVH CDRと同一のVH CDRを含む。

10

【0246】

特定の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、(i) pab1949又はpab2044のVLドメインのアミノ酸配列（例えば、配列番号15）と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%の配列同一性を有するVLドメインと、(ii) pab1949又はpab2044のVHドメインのアミノ酸配列（例えば、配列番号16）と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%の配列同一性を有するVHドメインとを含み、この抗体は、pab1949又はpab2044のVL CDR及びVH CDRと同一のVL CDR及びVH CDRを含む。

20

【0247】

特定の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、pab1949又はpab2044のVLドメインのアミノ酸配列（例えば、配列番号15）と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%の配列同一性を有するVLドメインを含み、この抗体は、ブドウ球菌（*Staphylococcus*）エンテロトキシンA（SEA）（例えば、100 ng/ml）との組み合わせで、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット（Meso Scale Discovery）によって計測されるとおり、例えば37、5% CO₂、及び97%湿度における例えば5日間の刺激時に例えばPBMCにおいてIL-2産生を誘導し、このIL-2産生は、例えば、0.032 µg/ml ~ 20 µg/ml、0.16 µg/ml ~ 20 µg/ml、0.8 µg/ml ~ 20 µg/ml、4 µg/ml ~ 20 µg/ml、0.032 µg/ml ~ 4 µg/ml、0.16 µg/ml ~ 4 µg/ml、又は0.8 µg/ml ~ 4 µg/mlにおいて抗体濃度の実質的増加関数である。特定の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、pab1949又はpab2044のVLドメインのアミノ酸配列（例えば、配列番号15）と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%の配列同一性を有するVLドメインを含み、この抗体は、ブドウ球菌（*Staphylococcus*）エンテロトキシンA（SEA）との組み合わせで、例えばPBMCにおいてIL-2産生を誘導し、このIL-2産生は、例えば、以下のステップ：(a) 種々の濃度（例えば、20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、及び0.000256 µg/ml）の抗体、及び例えば100 ng/mlのSEAの非存在下又は存在下でPBMC（例えば、1ウェル10⁵細胞）を例えば37、5% CO₂、及び97%湿度において例えば5日間培養するステップ；及び

30

40

50

(b) 清澄化した上清を収集し、IL-2の力価を、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)によって計測するステップを含むアッセイで評価されるとおり、例えば、 $0.032 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.16 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.8 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $4 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.032 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 4 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.16 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 4 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、又は $0.8 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 4 \mu\text{g}/\text{ml}$ において抗体濃度の実質的増加関数である。

【0248】

特定の実施形態において、OX40(例えば、ヒトOX40)に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、pab1949又はpab2044のVLドメインのアミノ酸配列(例えば、配列番号15)と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%の配列同一性を有するVLドメインを含み、この抗体は、ブドウ球菌(*Staphylococcus*)エンテロトキシンA(SEA)(例えば、 $100 \text{ng}/\text{ml}$)との組み合わせで、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)によって計測されるとおり、例えば37、5%CO₂、及び97%湿度における例えば5日間の刺激時に例えばPBM CにおいてIL-2産生を誘導し、このIL-2産生は、抗OX40抗体が例えば $0.032 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.16 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.8 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $4 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.032 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 4 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.16 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 4 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、又は $0.8 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 4 \mu\text{g}/\text{ml}$ のとき、シグモイド用量反応曲線を示す。特定の実施形態において、OX40(例えば、ヒトOX40)に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、pab1949又はpab2044のVLドメインのアミノ酸配列(例えば、配列番号15)と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%の配列同一性を有するVLドメインを含み、この抗体は、ブドウ球菌(*Staphylococcus*)エンテロトキシンA(SEA)との組み合わせで、例えばPBM CにおいてIL-2産生を誘導し、このIL-2産生は、抗OX40抗体が例えば $0.032 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.16 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.8 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $4 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.032 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 4 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.16 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 4 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、又は $0.8 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 4 \mu\text{g}/\text{ml}$ のとき、例えば、以下のステップ：(a)種々の濃度(例えば、20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、及び0.000256 $\mu\text{g}/\text{ml}$)の抗体、及び例えば $100 \text{ng}/\text{ml}$ のSEAの非存在下又は存在下でPBM C(例えば、1ウェル 10^5 細胞)を例えば37、5%CO₂、及び97%湿度において例えば5日間培養するステップ；及び(b)清澄化した上清を収集し、IL-2の力価を、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)によって計測するステップを含むアッセイで評価されるとおり、シグモイド用量反応曲線を示す。

【0249】

特定の実施形態において、OX40(例えば、ヒトOX40)に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、pab1949又はpab2044のVHドメインのアミノ酸配列(例えば、配列番号16)と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%の配列同一性を有するVHドメインを含み、この抗体は、ブドウ球菌(*Staphylococcus*)エンテロトキシンA(SEA)(例えば、 $100 \text{ng}/\text{ml}$)との組み合わせで、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)によって計測されるとおり、例えば37、5%CO₂、及び97%湿度における例えば5日間の刺激時に例えばPBM CにおいてIL-2産生を誘導し、このIL-2産生は、例えば、 $0.032 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 2$

10

20

30

40

50

0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.032 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、又は0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ において抗体濃度の実質的増加関数である。特定の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、pab1949又はpab2044のVHドメインのアミノ酸配列（例えば、配列番号16）と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%の配列同一性を有するVHドメインを含み、この抗体は、ブドウ球菌（*Staphylococcus*）エンテロトキシンA（SEA）との組み合わせで、例えばPBMCにおいてIL-2産生を誘導し、このIL-2産生は、例えば、以下のステップ：（a）種々の濃度（例えば、20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、及び0.000256 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）の抗体、及び例えば100 ng/mlのSEAの非存在下又は存在下でPBMC（例えば、1ウェル10⁵細胞）を例えば37、5%CO₂、及び97%湿度において例えば5日間培養するステップ；及び（b）清澄化した上清を収集し、IL-2の力価を、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット（Meso Scale Discovery）によって計測するステップを含むアッセイで評価されるとおり、例えば、0.032 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.032 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、又は0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ において抗体濃度の実質的増加関数である。

【0250】

特定の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、pab1949又はpab2044のVHドメインのアミノ酸配列（例えば、配列番号16）と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%の配列同一性を有するVHドメインを含み、この抗体は、ブドウ球菌（*Staphylococcus*）エンテロトキシンA（SEA）（例えば、100 ng/ml）との組み合わせで、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット（Meso Scale Discovery）によって計測されるとおり、例えば37、5%CO₂、及び97%湿度における例えば5日間の刺激時に例えばPBMCにおいてIL-2産生を誘導し、このIL-2産生は、抗OX40抗体が例えば0.032 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.032 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、又は0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のとき、シグモイド用量反応曲線を示す。特定の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、pab1949又はpab2044のVHドメインのアミノ酸配列（例えば、配列番号16）と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%の配列同一性を有するVHドメインを含み、この抗体は、ブドウ球菌（*Staphylococcus*）エンテロトキシンA（SEA）との組み合わせで、例えばPBMCにおいてIL-2産生を誘導し、このIL-2産生は、抗OX40抗体が例えば0.032 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.032 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、又は0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のとき、例えば、以下のステップ：（a）種々の濃度（例えば、20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、及び0.000256 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）の抗体、及び例えば100 ng/mlのSEAの非存在下又は存在下でPBMC（例えば、1ウェル10⁵細胞）を例えば37、5%CO₂、及び97%湿度において例えば5日間培養するステップ；及び（b）清澄化した上清を収集し、IL-

2の力価を、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)によって計測するステップを含むアッセイで評価されるとおり、シグモイド用量反応曲線を示す。

【0251】

特定の実施形態において、OX40(例えば、ヒトOX40)に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、(i)pab1949又はpab2044のVLドメインのアミノ酸配列(例えば、配列番号15)と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%の配列同一性を有するVLドメインと、(ii)pab1949又はpab2044のVHドメインのアミノ酸配列(例えば、配列番号16)と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%の配列同一性を有するVHドメインとを含み、この抗体は、ブドウ球菌(*Staphylococcus*)エンテロトキシンA(SEA)(例えば、100ng/ml)との組み合わせで、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)によって計測されるとおり、例えば37、5%CO₂、及び97%湿度における例えば5日間の刺激時に例えばPBMCにおいてIL-2産生を誘導し、このIL-2産生は、例えば、0.032µg/ml~20µg/ml、0.16µg/ml~20µg/ml、0.8µg/ml~20µg/ml、4µg/ml~20µg/ml、0.032µg/ml~4µg/ml、0.16µg/ml~4µg/ml、又は0.8µg/ml~4µg/mlにおいて抗体濃度の実質的増加関数である。特定の実施形態において、OX40(例えば、ヒトOX40)に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、(i)pab1949又はpab2044のVLドメインのアミノ酸配列(例えば、配列番号15)と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%の配列同一性を有するVLドメインと、(ii)pab1949又はpab2044のVHドメインのアミノ酸配列(例えば、配列番号16)と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%の配列同一性を有するVHドメインとを含み、この抗体は、ブドウ球菌(*Staphylococcus*)エンテロトキシンA(SEA)との組み合わせで、例えばPBMCにおいてIL-2産生を誘導し、このIL-2産生は、例えば、以下のステップ:(a)種々の濃度(例えば、20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、及び0.000256µg/ml)の抗体、及び例えば100ng/mlのSEAの非存在下又は存在下でPBMC(例えば、1ウェル10⁵細胞)を例えば37、5%CO₂、及び97%湿度において例えば5日間培養するステップ;及び(b)清澄化した上清を収集し、IL-2の力価を、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)によって計測するステップを含むアッセイで評価されるとおり、例えば、0.032µg/ml~20µg/ml、0.16µg/ml~20µg/ml、0.8µg/ml~20µg/ml、4µg/ml~20µg/ml、0.032µg/ml~4µg/ml、0.16µg/ml~4µg/ml、又は0.8µg/ml~4µg/mlにおいて抗体濃度の実質的増加関数である。

【0252】

特定の実施形態において、OX40(例えば、ヒトOX40)に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、(i)pab1949又はpab2044のVLドメインのアミノ酸配列(例えば、配列番号15)と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%の配列同一性を有するVLドメインと、(ii)pab1949又はpab2044のVHドメインのアミノ酸配列(例えば、配列番号16)と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも9

10

20

30

40

50

5%、又は少なくとも98%の配列同一性を有するVHドメインとを含み、この抗体は、ブドウ球菌 (*Staphylococcus*) エンテロトキシンA (SEA) (例えば、100 ng/ml) との組み合わせで、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット (Meso Scale Discovery) によって計測されるとおり、例えば37、5% CO₂、及び97%湿度における例えば5日間の刺激時に例えばPBM CにおいてIL-2産生を誘導し、このIL-2産生は、抗OX40抗体が例えば0.032 µg/ml ~ 20 µg/ml、0.16 µg/ml ~ 20 µg/ml、0.8 µg/ml ~ 20 µg/ml、4 µg/ml ~ 20 µg/ml、0.032 µg/ml ~ 4 µg/ml、0.16 µg/ml ~ 4 µg/ml、又は0.8 µg/ml ~ 4 µg/ml のとき、シグモイド用量反応曲線を示す。特定の実施形態において、OX40 (例えば、ヒトOX40) に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、(i) pab1949又はpab2044のVLドメインのアミノ酸配列 (例えば、配列番号15) と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%の配列同一性を有するVLドメインと、(ii) pab1949又はpab2044のVHドメインのアミノ酸配列 (例えば、配列番号16) と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%の配列同一性を有するVHドメインとを含み、この抗体は、ブドウ球菌 (*Staphylococcus*) エンテロトキシンA (SEA) との組み合わせで、例えばPBM CにおいてIL-2産生を誘導し、このIL-2産生は、抗OX40抗体が例えば0.032 µg/ml ~ 20 µg/ml、0.16 µg/ml ~ 20 µg/ml、0.8 µg/ml ~ 20 µg/ml、4 µg/ml ~ 20 µg/ml、0.032 µg/ml ~ 4 µg/ml、0.16 µg/ml ~ 4 µg/ml、又は0.8 µg/ml ~ 4 µg/ml のとき、例えば、以下のステップ：(a) 種々の濃度 (例えば、20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、及び0.000256 µg/ml) の抗体、及び例えば100 ng/mlのSEAの非存在下又は存在下でPBM C (例えば、1ウェル10⁵細胞) を例えば37、5% CO₂、及び97%湿度において例えば5日間培養するステップ；及び(b) 清澄化した上清を収集し、IL-2の力価を、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット (Meso Scale Discovery) によって計測するステップを含むアッセイで評価されるとおり、シグモイド用量反応曲線を示す。

【0253】

特定の実施形態において、OX40 (例えば、ヒトOX40) に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、pab1949又はpab2044のVLドメインのアミノ酸配列 (例えば、配列番号15) と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%の配列同一性を有するVLドメインを含み、この抗体は、プレート結合時、プレート結合抗CD3抗体 (例えば、0.8 µg/ml) との組み合わせで、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット (Meso Scale Discovery) 又は非ヒト霊長類 (NHP) V-plexアッセイキット (Meso Scale Discovery) によって計測されるとおり、例えば37及び5% CO₂における例えば4日間の刺激時に例えばPBM C又はT細胞において1つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生を誘導し、この1つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生は、例えば、以下のステップ：(a) プレート結合抗CD3抗体 (例えば、0.8 µg/ml) 及び種々の濃度 (例えば、0、0.3、1、3、6、12、25、及び50 µg/ml；又は0、0.7、1.6、3.1、6.3、12.5、25、又は50 µg/ml) のプレート結合抗体の存在下でPBM Cを例えば37及び5% CO₂において例えば4日間培養するステップ；及び(b) 上清を収集し、1つ以上のサイトカイン、例えば、T

10

20

30

40

50

NF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生を、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)又は非ヒト霊長類(NHP)V-plexアッセイキット(Meso Scale Discovery)によって計測するステップを含むアッセイで評価されるとおり、例えば、 $0.7\mu\text{g/ml} \sim 50\mu\text{g/ml}$ 、 $1.6\mu\text{g/ml} \sim 50\mu\text{g/ml}$ 、 $3.1\mu\text{g/ml} \sim 50\mu\text{g/ml}$ 、又は $6.3\mu\text{g/ml} \sim 50\mu\text{g/ml}$ において抗体の濃度の実質的増加関数である。特定の実施形態において、OX40(例えば、ヒトOX40)に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、pab1949又はpab2044のVLDメインのアミノ酸配列(例えば、配列番号15)と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%の配列同一性を有するVLDメインを含み、この抗体は、プレート結合時、プレート結合抗CD3抗体(例えば、 $0.8\mu\text{g/ml}$)との組み合わせで、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)又は非ヒト霊長類(NHP)V-plexアッセイキット(Meso Scale Discovery)によって計測されるとおり、例えば37及び5%CO₂における例えば4日間の刺激時に例えばPBMC又はT細胞において1つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生を誘導し、この1つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生は、抗OX40抗体濃度が例えば $0.7\mu\text{g/ml} \sim 50\mu\text{g/ml}$ 、 $1.6\mu\text{g/ml} \sim 50\mu\text{g/ml}$ 、 $3.1\mu\text{g/ml} \sim 50\mu\text{g/ml}$ 、又は $6.3\mu\text{g/ml} \sim 50\mu\text{g/ml}$ のとき、例えば、以下のステップ：(a)プレート結合抗CD3抗体(例えば、 $0.8\mu\text{g/ml}$)及び種々の濃度(例えば、0、0.3、1、3、6、12、25、及び $50\mu\text{g/ml}$ ；又は0、0.7、1.6、3.1、6.3、12.5、25、又は $50\mu\text{g/ml}$)のプレート結合抗体の存在下でPBMCを例えば37及び5%CO₂において例えば4日間培養するステップ；及び(b)上清を収集し、1つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生を、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)又は非ヒト霊長類(NHP)V-plexアッセイキット(Meso Scale Discovery)によって計測するステップを含むアッセイで評価されるとおり、シグモイド用量反応曲線を示す。

【0254】

特定の実施形態において、OX40(例えば、ヒトOX40)に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、pab1949又はpab2044のVLDメインのアミノ酸配列(例えば、配列番号16)と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%の配列同一性を有するVLDメインを含み、この抗体は、プレート結合時、プレート結合抗CD3抗体(例えば、 $0.8\mu\text{g/ml}$)との組み合わせで、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)又は非ヒト霊長類(NHP)V-plexアッセイキット(Meso Scale Discovery)によって計測されるとおり、例えば37及び5%CO₂における例えば4日間の刺激時に例えばPBMC又はT細胞において1つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生を誘導し、この1つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生は、例えば、以下のステップ：(a)プレート結合抗CD3抗体(例えば、 $0.8\mu\text{g/ml}$)及び種々の濃度(例えば、0、0.3、1、3、6、12、25、及び $50\mu\text{g/ml}$ ；又は0、0.7、1.6、3.1、6.3、12.5、25、又は $50\mu\text{g/ml}$)のプレート結合抗体の存在下でPBMCを例えば37及び5%CO₂において例えば4

日間培養するステップ；及び（b）上清を収集し、1つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生を、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-Plex組織培養キット（Meso Scale Discovery）又は非ヒト霊長類（NHP）V-Plexアッセイキット（Meso Scale Discovery）によって計測するステップを含むアッセイで評価されるとおり、例えば、0.7 µg/ml ~ 50 µg/ml、1.6 µg/ml ~ 50 µg/ml、3.1 µg/ml ~ 50 µg/ml、又は6.3 µg/ml ~ 50 µg/mlにおいて抗体の濃度の実質的増加関数である。特定の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、pab1949又はpab2044のVHドメインのアミノ酸配列（例えば、配列番号16）と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%の配列同一性を有するVHドメインを含み、この抗体は、プレート結合時、プレート結合抗CD3抗体（例えば、0.8 µg/ml）との組み合わせで、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-Plex組織培養キット（Meso Scale Discovery）又は非ヒト霊長類（NHP）V-Plexアッセイキット（Meso Scale Discovery）によって計測されるとおり、例えば37及び5%CO₂における例えば4日間の刺激時に例えばPBMC又はT細胞において1つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生を誘導し、この1つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生は、抗OX40抗体濃度が例えば0.7 µg/ml ~ 50 µg/ml、1.6 µg/ml ~ 50 µg/ml、3.1 µg/ml ~ 50 µg/ml、又は6.3 µg/ml ~ 50 µg/mlのとき、例えば、以下のステップ：（a）プレート結合抗CD3抗体（例えば、0.8 µg/ml）及び種々の濃度（例えば、0、0.3、1、3、6、12、25、及び50 µg/ml；又は0、0.7、1.6、3.1、6.3、12.5、25、又は50 µg/ml）のプレート結合抗体の存在下でPBMCを例えば37及び5%CO₂において例えば4日間培養するステップ；及び（b）上清を収集し、1つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生を、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-Plex組織培養キット（Meso Scale Discovery）又は非ヒト霊長類（NHP）V-Plexアッセイキット（Meso Scale Discovery）によって計測するステップを含むアッセイで評価されるとおり、シグモイド用量反応曲線を示す。

【0255】

特定の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、（i）pab1949又はpab2044のVLドメインのアミノ酸配列（例えば、配列番号15）と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%の配列同一性を有するVLドメインと、（ii）pab1949又はpab2044のVHドメインのアミノ酸配列（例えば、配列番号16）と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%の配列同一性を有するVHドメインとを含み、この抗体は、プレート結合時、プレート結合抗CD3抗体（例えば、0.8 µg/ml）との組み合わせで、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-Plex組織培養キット（Meso Scale Discovery）又は非ヒト霊長類（NHP）V-Plexアッセイキット（Meso Scale Discovery）によって計測されるとおり、例えば37及び5%CO₂における例えば4日間の刺激時に例えばPBMC又はT細胞において1つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生を誘導し、この1つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-1

10

20

30

40

50

0、又はIL-13の産生は、例えば、以下のステップ：(a)プレート結合抗CD3抗体（例えば、0.8 μg/ml）及び種々の濃度（例えば、0、0.3、1、3、6、12、25、及び50 μg/ml；又は0、0.7、1.6、3.1、6.3、12.5、25、又は50 μg/ml）のプレート結合抗体の存在下でPBMCを例えば37及び5%CO₂において例えば4日間培養するステップ；及び(b)上清を収集し、1つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生を、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-Plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)又は非ヒト霊長類(NHP)V-Plexアッセイキット(Meso Scale Discovery)によって計測するステップを含むアッセイで評価されたとおり、例えば、0.7 μg/ml~50 μg/ml、1.6 μg/ml~50 μg/ml、3.1 μg/ml~50 μg/ml、又は6.3 μg/ml~50 μg/mlにおいて抗体の濃度の実質的増加関数である。特定の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、(i) pab1949又はpab2044のVLドメインのアミノ酸配列（例えば、配列番号15）と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%の配列同一性を有するVLドメインと、(ii) pab1949又はpab2044のVHドメインのアミノ酸配列（例えば、配列番号16）と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%の配列同一性を有するVHドメインとを含み、この抗体は、プレート結合時、プレート結合抗CD3抗体（例えば、0.8 μg/ml）との組み合わせで、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-Plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)又は非ヒト霊長類(NHP)V-Plexアッセイキット(Meso Scale Discovery)によって計測されたとおり、例えば37及び5%CO₂における例えば4日間の刺激時に例えばPBMC又はT細胞において1つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生を誘導し、この1つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生は、抗OX40抗体濃度が例えば0.7 μg/ml~50 μg/ml、1.6 μg/ml~50 μg/ml、3.1 μg/ml~50 μg/ml、又は6.3 μg/ml~50 μg/mlのとき、例えば、以下のステップ：(a)プレート結合抗CD3抗体（例えば、0.8 μg/ml）及び種々の濃度（例えば、0、0.3、1、3、6、12、25、及び50 μg/ml；又は0、0.7、1.6、3.1、6.3、12.5、25、又は50 μg/ml）のプレート結合抗体の存在下でPBMCを例えば37及び5%CO₂において例えば4日間培養するステップ；及び(b)上清を収集し、1つ以上のサイトカイン、例えば、TNF、TNF、IFN、GM-CSF、IL-2、IL-10、又はIL-13の産生を、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-Plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)又は非ヒト霊長類(NHP)V-Plexアッセイキット(Meso Scale Discovery)によって計測するステップを含むアッセイで評価されたとおり、シグモイド用量反応曲線を示す。

【0256】

特定の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、pab1949又はpab2044のVLドメインのアミノ酸配列（例えば、配列番号15）と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%の配列同一性を有するVLドメインを含み、この抗体はCD4+ T細胞増殖を増加させ、このCD4+ T細胞増殖は、例えば、以下のステップ：(a)例えばエンリッチドCD4+ T細胞を例えば10 μMカルボキシフルオレセイン二酢酸スクシンイミジルエステル(CFSE)によって例えば37で例えば7分間標識するステップ；(b)綿密

に洗浄した後、細胞（例えば、1ウェル 10^5 細胞）を例えば $3\mu\text{g}/\text{ml}$ の例えばプレート結合抗CD3抗体及び種々の濃度（例えば、 0.002 、 0.02 、 0.2 、 2 、及び $20\mu\text{g}/\text{ml}$ ）の例えば本明細書に記載されるプレート結合抗体によって例えば37及び5% CO_2 で刺激するステップ；及び（c）例えば4日目に、細胞を例えば抗CD4抗体で染色し、例えばフローサイトメトリーによってCFSE低CD4+細胞の割合を計測することによりCD4+T細胞増殖を調べるステップを含むアッセイで評価されるとおり、例えば $0.2\mu\text{g}/\text{ml} \sim 20\mu\text{g}/\text{ml}$ 、又は $2\mu\text{g}/\text{ml} \sim 20\mu\text{g}/\text{ml}$ において抗体の濃度の実質的増加関数である。特定の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、pab1949又はpab2044のVLドメインのアミノ酸配列（例えば、配列番号15）と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%の配列同一性を有するVLドメインを含み、この抗体は、例えば、以下のステップ：（a）例えばエンリッチドCD4+T細胞を例えば $10\mu\text{M}$ カルボキシフルオレセイン二酢酸スクシンイミジルエステル（CFSE）によって例えば37で例えば7分間標識するステップ；（b）綿密に洗浄した後、細胞（例えば、1ウェル 10^5 細胞）を例えば $3\mu\text{g}/\text{ml}$ の例えばプレート結合抗CD3抗体及び種々の濃度（例えば、 0.002 、 0.02 、 0.2 、 2 、及び $20\mu\text{g}/\text{ml}$ ）の例えば本明細書に記載されるプレート結合抗体によって例えば37及び5% CO_2 で刺激するステップ；及び（c）例えば4日目に、細胞を例えば抗CD4抗体で染色し、例えばフローサイトメトリーによってCFSE低CD4+細胞の割合を計測することによりCD4+T細胞増殖を調べるステップを含むアッセイで評価されるとおり、抗体が $2\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度よりも $20\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で存在するときにCD4+T細胞増殖の増加が大きくなる。

【0257】

特定の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、pab1949又はpab2044のVLドメインのアミノ酸配列（例えば、配列番号15）と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%の配列同一性を有するVLドメインを含み、この抗体はCD4+T細胞増殖を増加させ、このCD4+T細胞増殖は、抗OX40抗体濃度が例えば $0.2\mu\text{g}/\text{ml} \sim 20\mu\text{g}/\text{ml}$ 、又は $2\mu\text{g}/\text{ml} \sim 20\mu\text{g}/\text{ml}$ のとき、例えば、以下のステップ：（a）例えばエンリッチドCD4+T細胞を例えば $10\mu\text{M}$ カルボキシフルオレセイン二酢酸スクシンイミジルエステル（CFSE）によって例えば37で例えば7分間標識するステップ；（b）綿密に洗浄した後、細胞（例えば、1ウェル 10^5 細胞）を例えば $3\mu\text{g}/\text{ml}$ の例えばプレート結合抗CD3抗体及び種々の濃度（例えば、 0.002 、 0.02 、 0.2 、 2 、及び $20\mu\text{g}/\text{ml}$ ）の例えば本明細書に記載されるプレート結合抗体によって例えば37及び5% CO_2 で刺激するステップ；及び（c）例えば4日目に、細胞を例えば抗CD4抗体で染色し、例えばフローサイトメトリーによってCFSE低CD4+細胞の割合を計測することによりCD4+T細胞増殖を調べるステップを含むアッセイで評価されるとおり、シグモイド用量反応曲線を示す。

【0258】

特定の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、pab1949又はpab2044のVHドメインのアミノ酸配列（例えば、配列番号16）と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%の配列同一性を有するVHドメインを含み、この抗体はCD4+T細胞増殖を増加させ、このCD4+T細胞増殖は、例えば、以下のステップ：（a）例えばエンリッチドCD4+T細胞を例えば $10\mu\text{M}$ カルボキシフルオレセイン二酢酸スクシンイミジルエステル（CFSE）によって例えば37で例えば7分間標識するステップ；（b）綿密に洗浄した後、細胞（例えば、1ウェル 10^5 細胞）を例えば $3\mu\text{g}/\text{ml}$ の例えばプレ

10

20

30

40

50

ート結合抗CD3抗体及び種々の濃度（例えば、0.002、0.02、0.2、2、及び20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）の例えば本明細書に記載されるプレート結合抗体によって例えば37及び5% CO_2 で刺激するステップ；及び（c）例えば4日目に、細胞を例えば抗CD4抗体で染色し、例えばフローサイトメトリーによってCFSE低CD4+細胞の割合を計測することによりCD4+ T細胞増殖を調べるステップを含むアッセイで評価されるとおり、例えば0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、又は2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ において抗体の濃度の実質的増加関数である。特定の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、pab1949又はpab2044のVHドメインのアミノ酸配列（例えば、配列番号16）と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%の配列同一性を有するVHドメインを含み、この抗体は、例えば、以下のステップ：（a）例えばエンリッチドCD4+ T細胞を例えば10 μM カルボキシフルオレセイン二酢酸スクシンイミジルエステル（CFSE）によって例えば37で例えば7分間標識するステップ；（b）綿密に洗浄した後、細胞（例えば、1ウェル 10^5 細胞）を例えば3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の例えばプレート結合抗CD3抗体及び種々の濃度（例えば、0.002、0.02、0.2、2、及び20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）の例えば本明細書に記載されるプレート結合抗体によって例えば37及び5% CO_2 で刺激するステップ；及び（c）例えば4日目に、細胞を例えば抗CD4抗体で染色し、例えばフローサイトメトリーによってCFSE低CD4+細胞の割合を計測することによりCD4+ T細胞増殖を調べるステップを含むアッセイで評価されるとおり、抗体が2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度よりも20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で存在するときにCD4+ T細胞増殖の増加が大きくなる。

【0259】

特定の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、pab1949又はpab2044のVHドメインのアミノ酸配列（例えば、配列番号16）と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%の配列同一性を有するVHドメインを含み、この抗体はCD4+ T細胞増殖を増加させ、このCD4+ T細胞増殖は、抗OX40抗体濃度が例えば0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、又は2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~ 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のとき、例えば、以下のステップ：（a）例えばエンリッチドCD4+ T細胞を例えば10 μM カルボキシフルオレセイン二酢酸スクシンイミジルエステル（CFSE）によって例えば37で例えば7分間標識するステップ；（b）綿密に洗浄した後、細胞（例えば、1ウェル 10^5 細胞）を例えば3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の例えばプレート結合抗CD3抗体及び種々の濃度（例えば、0.002、0.02、0.2、2、及び20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）の例えば本明細書に記載されるプレート結合抗体によって例えば37及び5% CO_2 で刺激するステップ；及び（c）例えば4日目に、細胞を例えば抗CD4抗体で染色し、例えばフローサイトメトリーによってCFSE低CD4+細胞の割合を計測することによりCD4+ T細胞増殖を調べるステップを含むアッセイで評価されるとおり、シグモイド用量反応曲線を示す。

【0260】

特定の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、（i）pab1949又はpab2044のVLドメインのアミノ酸配列（例えば、配列番号15）と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%の配列同一性を有するVLドメインと、（ii）pab1949又はpab2044のVHドメインのアミノ酸配列（例えば、配列番号16）と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも98%の配列同一性を有するVHドメインとを含み、この抗体はCD4+ T細胞増殖を増加させ、このCD4+ T細胞増殖は、例えば、以下のステップ：（a）例えばエンリッチドCD4+ T細胞を例えば10 μM カルボキシフルオレセイ

10

20

30

40

50

ン二酢酸スクシンイミジルエステル (CFSE) によって例えば 37 で例えば 7 分間標識するステップ; (b) 綿密に洗浄した後、細胞 (例えば、1 ウェル 10^5 細胞) を例えば $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ の例えばプレート結合抗 CD 3 抗体及び種々の濃度 (例えば、0.002、0.02、0.2、2、及び $20 \mu\text{g}/\text{ml}$) の例えば本明細書に記載されるプレート結合抗体によって例えば 37 及び 5% CO_2 で刺激するステップ; 及び (c) 例えば 4 日目に、細胞を例えば抗 CD 4 抗体で染色し、例えばフローサイトメトリーによって CFSE 低 CD 4 + 細胞の割合を計測することにより CD 4 + T 細胞増殖を調べるステップを含むアッセイで評価されるとおり、例えば $0.2 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、又は $2 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 20 \mu\text{g}/\text{ml}$ において抗体の濃度の実質的増加関数である。特定の実施形態において、OX 40 (例えば、ヒト OX 40) に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、(i) p a b 1 9 4 9 又は p a b 2 0 4 4 の V L ドメインのアミノ酸配列 (例えば、配列番号 15) と少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、又は少なくとも 98% の配列同一性を有する V L ドメインと、(i i) p a b 1 9 4 9 又は p a b 2 0 4 4 の V H ドメインのアミノ酸配列 (例えば、配列番号 16) と少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、又は少なくとも 98% の配列同一性を有する V H ドメインとを含み、この抗体は、例えば、以下のステップ: (a) 例えばエンリッチド CD 4 + T 細胞を例えば $10 \mu\text{M}$ カルボキシフルオレセイン二酢酸スクシンイミジルエステル (CFSE) によって例えば 37 で例えば 7 分間標識するステップ; (b) 綿密に洗浄した後、細胞 (例えば、1 ウェル 10^5 細胞) を例えば $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ の例えばプレート結合抗 CD 3 抗体及び種々の濃度 (例えば、0.002、0.02、0.2、2、及び $20 \mu\text{g}/\text{ml}$) の例えば本明細書に記載されるプレート結合抗体によって例えば 37 及び 5% CO_2 で刺激するステップ; 及び (c) 例えば 4 日目に、細胞を例えば抗 CD 4 抗体で染色し、例えばフローサイトメトリーによって CFSE 低 CD 4 + 細胞の割合を計測することにより CD 4 + T 細胞増殖を調べるステップを含むアッセイで評価されるとおり、抗体が $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度よりも $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で存在するときに CD 4 + T 細胞増殖の増加が大きくなる。

【0261】

特定の実施形態において、OX 40 (例えば、ヒト OX 40) に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、(i) p a b 1 9 4 9 又は p a b 2 0 4 4 の V L ドメインのアミノ酸配列 (例えば、配列番号 15) と少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、又は少なくとも 98% の配列同一性を有する V L ドメインと、(i i) p a b 1 9 4 9 又は p a b 2 0 4 4 の V H ドメインのアミノ酸配列 (例えば、配列番号 16) と少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、又は少なくとも 98% の配列同一性を有する V H ドメインとを含み、この抗体は CD 4 + T 細胞増殖を増加させ、この CD 4 + T 細胞増殖は、抗 OX 40 抗体濃度が例えば $0.2 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、又は $2 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 20 \mu\text{g}/\text{ml}$ のとき、例えば、以下のステップ: (a) 例えばエンリッチド CD 4 + T 細胞を例えば $10 \mu\text{M}$ カルボキシフルオレセイン二酢酸スクシンイミジルエステル (CFSE) によって例えば 37 で例えば 7 分間標識するステップ; (b) 綿密に洗浄した後、細胞 (例えば、1 ウェル 10^5 細胞) を例えば $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ の例えばプレート結合抗 CD 3 抗体及び種々の濃度 (例えば、0.002、0.02、0.2、2、及び $20 \mu\text{g}/\text{ml}$) の例えば本明細書に記載されるプレート結合抗体によって例えば 37 及び 5% CO_2 で刺激するステップ; 及び (c) 例えば 4 日目に、細胞を例えば抗 CD 4 抗体で染色し、例えばフローサイトメトリーによって CFSE 低 CD 4 + 細胞の割合を計測することにより CD 4 + T 細胞増殖を調べるステップを含むアッセイで評価されるとおり、シグモイド用量反応曲線を示す。

【0262】

別の態様において、本明細書には、本明細書に記載される抗体 (例えば、p a b 1 9 4

10

20

30

40

50

9又はp a b 2 0 4 4)と同じ又は重複するOX 4 0のエピトープ(例えば、ヒトOX 4 0のエピトープ)に結合する抗体が提供される。特定の実施形態において、抗体のエピトープは、例えば、NMR分光法、X線回折結晶学的研究、ELISAアッセイ、質量分析法(例えば、液体クロマトグラフィー-エレクトロスプレー質量分析法)と併せた水素/重水素交換、アレイベースのオリゴ-ペプチドスクリーニングアッセイ、及び/又は突然変異誘発マッピング(例えば、部位特異的突然変異誘発マッピング)により決定することができる。X線結晶学については、当該技術分野における公知の方法のいずれを用いて結晶化を達成してもよい(例えば、Giege R et al., (1994) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 50 (Pt 4): 339 - 350; McPherson A (1990) Eur J Biochem 189: 1 - 23; Chayen NE (1997) Structure 5: 1269 - 1274; McPherson A (1976) J Biol Chem 251: 6300 - 6303)。抗体: 抗原結晶は周知のX線回折技法を用いて研究することができ、X-PLORなどのコンピュータソフトウェアを使用して精密化し得る(Yale University, 1992, 配布元Molecular Simulations, Inc.; 例えば、Meth Enzymol (1985) volumes 114 & 115, eds Wyckoff HW et al.; 米国特許出願公開第2004/0014194号明細書)、及びBUSTER (Bricogne G (1993) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 49 (Pt 1): 37 - 60; Bricogne G (1997) Meth Enzymol 276A: 361 - 423, ed Carter CW; Roversi P et al., (2000) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 56 (Pt 10): 1316 - 1323を参照されたい)。突然変異誘発マッピング研究は、当業者に公知の任意の方法を用いて達成し得る。アラニンスクリーニング突然変異誘発法を含めた突然変異誘発法の説明については、例えば、Champe M et al., (1995) 前掲及びCunningham BC & Wells JA (1989) 前掲を参照されたい。具体的な実施形態において、抗体のエピトープはアラニンスクリーニング突然変異誘発研究を用いて決定される。加えて、OX 4 0(例えば、ヒトOX 4 0)の同じ又は重複するエピトープを認識してそれに結合する抗体は、イムノアッセイなどのルーチンの技法を用いて、例えばある抗体が別の抗体の標的抗原への結合を阻止する能力を示すこと、即ち競合的結合アッセイにより同定することができる。競合結合アッセイはまた、2つの抗体があるエピトープに対して同様の結合特異性を有するかどうかの決定にも用いることができる。競合的結合は、試験下の免疫グロブリンがOX 4 0などの共通抗原に対する参照抗体の特異的結合を阻害するアッセイにおいて決定することができる。数多くの種類の競合的結合アッセイが公知であり、例えば、固相直接又は間接ラジオイムノアッセイ(RIA)、固相直接又は間接酵素イムノアッセイ(EIA)、サンドイッチ競合アッセイ(Stahli C et al., (1983) Methods Enzymol 9: 242 - 253を参照されたい); 固相直接ビオチン-アビジンEIA (Kirkland TN et al., (1986) J Immunol 137: 3614 - 9を参照されたい); 固相直接標識アッセイ、固相直接標識サンドイッチアッセイ(Harlow E & Lane D, (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Pressを参照されたい); I-125標識を使用した固相直接標識RIA (Morel GA et al., (1988) Mol Immunol 25 (1): 7 - 15を参照されたい); 固相直接ビオチン-アビジンEIA (Cheung RC et al., (1990) Virology 176: 546 - 52); 及び直接標識RIA (Moldenhauer G et al., (1990) Scand J Immunol 32: 77 - 82)がある。典型的には、かかるアッセイは、固体表面に結合した精製抗原(例えば、ヒトOX 4 0などのOX 4 0)又はこれらの非標識試験免疫グロブリン及び標識参照免疫グロブリンのいずれかを担持する細胞の使用を伴う。競合阻害は、試験免疫グロブリ

ンの存在下で固体表面又は細胞に結合した標識の量を決定することにより計測し得る。通常、試験免疫グロブリンは過剰に存在する。通常、競合抗体が過剰に存在するとき、それが共通抗原に対する参照抗体の特異的結合を少なくとも50～55%、55～60%、60～65%、65～70%、70～75%又はそれを超えて阻害することになる。競合結合アッセイは、標識抗原又は標識抗体のいずれかを使用して数多くの異なるフォーマットで構成することができる。このアッセイの一般的な形では、抗原が96ウェルプレート上に固定化される。次に、非標識抗体が標識抗体の抗原への結合を遮断する能力が、放射性標識又は酵素標識を用いて計測される。更なる詳細については、例えば、Wagener C et al., (1983) J Immunol 130:2308-2315; Wagener C et al., (1984) J Immunol Methods 68:269-274; Kuroki M et al., (1990) Cancer Res 50:4872-4879; Kuroki M et al., (1992) Immunol Invest 21:523-538; Kuroki M et al., (1992) Hybridoma 11:391-407及びAntibodies: A Laboratory Manual, Ed Harlow E & Lane D editors supra, pp. 386-389を参照されたい。

【0263】

一実施形態において、競合アッセイは、表面プラズモン共鳴(BIACore(登録商標))を用いて、例えば、Abdiche YN et al., (2009) Analytical Biochem 386:172-180により記載されるものなどの「インタンデム手法」によって実施され、これはOX40抗原をチップ表面、例えばCM5センサーチップ上に固定化し、次に抗OX40抗体をチップ上に流すものである。抗体が本明細書に記載される抗OX40抗体と競合するかどうかを決定するため、最初に抗OX40抗体をチップ表面上に流して飽和を達成してから潜在的競合抗体を加える。次に競合抗体の結合を決定し、非競合対照と比べて定量化することができる。

【0264】

特定の態様では、競合ELISAアッセイなどの競合結合アッセイ(これは、標識抗原又は標識抗体のいずれかを使用して、あらゆる異なるフォーマットで構成され得る)において2つの抗体が同一の又は立体的に重複するエピトープを認識するとき、競合結合アッセイを用いることにより、ある抗体が別の抗体、例えば参照抗体と本質的に同じエピトープ又は重複するエピトープに結合する抗体によって例えば用量依存的様式で競合的に遮断されるかどうかを決定することができる。詳細な実施形態において、抗体は、本明細書に記載される抗体(例えば、抗体pab1949又はpab2044)、又はそのキメラ若しくはFab抗体、又は本明細書に記載される抗体(例えば、pab1949又はpab2044)のVH CDR及びVL CDRを含む抗体との競合結合アッセイで試験することができる。

【0265】

別の態様において、本明細書には、当業者に公知の又は本明細書に記載されるアッセイ(例えば、ELISA競合アッセイ又は表面プラズモン共鳴)を用いて決定するとき、OX40(例えば、ヒトOX40)への結合に関して本明細書に記載される抗体(例えば、pab1949又はpab2044)と(例えば、用量依存的様式で)競合する抗体が提供される。別の態様において、本明細書には、当業者に公知の又は本明細書に記載されるアッセイ(例えば、ELISA競合アッセイ、又はサスペンションアレイ又は表面プラズモン共鳴アッセイ)を用いて決定するとき、本明細書に記載される抗体(例えば、pab1949又はpab2044)がOX40(例えば、ヒトOX40)に結合するのを競合的に(例えば、用量依存的様式で)阻害する抗体が提供される。詳細な実施形態において、かかる競合的遮断抗体は、1つ以上のOX40活性を活性化するか、誘導するか、又は増強する。具体的な態様において、本明細書には、当業者に公知の又は本明細書に記載されるアッセイ(例えば、ELISA競合アッセイ、又はサスペンションアレイ又は表面プラズモン共鳴アッセイ)を用いて決定するとき、OX40(例えば、ヒトOX40)への

特異的結合に関して本明細書に記載されるアミノ酸配列（例えば、抗体 p a b 1 9 4 9 又は p a b 2 0 4 4 の V L 及び / 又は V H アミノ酸配列）を含む抗体と（例えば、用量依存的様式で）競合する抗体が提供される。

【 0 2 6 6 】

特定の実施形態において、本明細書には、本明細書に記載される抗体が O X 4 0（例えば、ヒト O X 4 0）への結合に関して自己競合するのと同じ程度に O X 4 0（例えば、ヒト O X 4 0）への結合に関して本明細書に記載される抗体と競合する抗体が提供される。一部の実施形態において、本明細書には、O X 4 0（例えば、ヒト O X 4 0）への結合に関して本明細書に記載される抗体と競合する第 1 の抗体が提供され、この第 1 の抗体は、以下のステップ：（ a ）容器内で O X 4 0 トランスフェクト細胞を非標識形態の第 1 の抗体と共にインキュベートするステップ；及び（ b ）容器に標識形態の本明細書に記載される抗体を加えて容器内の細胞をインキュベートするステップ；及び（ c ）標識形態の本明細書に記載される抗体と細胞との結合を検出するステップを含むアッセイにおいて結合に関して競合する。特定の実施形態において、本明細書には、O X 4 0（例えば、ヒト O X 4 0）への結合に関して本明細書に記載される抗体と競合する第 1 の抗体が提供され、この競合は、O X 4 0 への第 1 の抗体の結合の 8 0 % 超（例えば、8 5 %、9 0 %、9 5 %、又は 9 8 %、又は 8 0 % ~ 8 5 %、8 0 % ~ 9 0 %、8 5 % ~ 9 0 %、又は 8 5 % ~ 9 5 %）の低下として示される。

10

【 0 2 6 7 】

具体的な態様において、本明細書には、O X 4 0（例えば、ヒト O X 4 0）への特異的結合に関して、配列番号 1 5 に示されるアミノ酸配列を有する V L ドメインと配列番号 1 6 に示されるアミノ酸配列を有する V H ドメインとを含む抗体と（例えば、用量依存的様式で）競合する抗体が提供される。

20

【 0 2 6 8 】

具体的な態様において、本明細書には、O X 4 0（例えば、ヒト O X 4 0）への特異的結合に関して、（ i ）表 1 に掲載される V L C D R のアミノ酸配列を有する V L C D R 1、V L C D R 2、及び V L C D R 3 を含む V L ドメインと、（ i i ）表 2 に掲載される C D R のアミノ酸配列を有する V H C D R 1、V H C D R 2、及び V H C D R 3 を含む V H ドメインとを含む抗体と（例えば、用量依存的様式で）競合する抗体が提供される。

30

【 0 2 6 9 】

具体的な実施形態において、本明細書に記載される抗体は、O X 4 0（例えば、ヒト O X 4 0）への特異的結合に関して配列番号 1 5 に示されるアミノ酸配列を有する V L ドメインと配列番号 1 6 に示されるアミノ酸配列を有する V H ドメインとを含む抗体によって（例えば、用量依存的様式で）競合的に遮断されるものである。

【 0 2 7 0 】

別の具体的な実施形態において、本明細書に記載される抗体は、（ i ）表 1 に掲載される C D R のアミノ酸配列を有する V L C D R 1、V L C D R 2、及び V L C D R 3 を含む V L ドメインと、（ i i ）表 2 に掲載される C D R のアミノ酸配列を有する V H C D R 1、V H C D R 2、及び V H C D R 3 を含む V H ドメインとを含む抗体によって（例えば、用量依存的様式で）競合的に遮断されるものである。

40

【 0 2 7 1 】

具体的な態様において、本明細書には、O X 4 0（例えば、ヒト O X 4 0）への特異的結合に関して p a b 1 9 4 9 又は p a b 2 0 4 4 と同じエピトープに免疫特異的に結合する抗体が提供される。2 つの抗体が同じエピトープに結合するかどうかは、当業者に公知の又は本明細書に記載されるアッセイ（例えば、X 線結晶学、質量分析法（例えば、液体クロマトグラフィー-エレクトロスプレー質量分析法）と併せた水素 / 重水素交換、アラニンスキャニング、E L I S A アッセイ等）を用いて決定することができる。

【 0 2 7 2 】

具体的な実施形態において、本明細書に記載される抗体は、p a b 1 9 4 9 又は p a b

50

2044が結合するエピトープ又はそのエピトープと重複するエピトープと同じエピトープに免疫特異的に結合する。

【0273】

別の具体的な実施形態において、本明細書に記載される抗体は、(i)表1に掲載されるCDRのアミノ酸配列を有するVL CDR1、VL CDR2、及びVL CDR3を含むVLDメイン及び(ii)表2に掲載されるCDRのアミノ酸配列を有するVH CDR1、VH CDR2、及びVH CDR3を含むVHドメインを含む抗体と同じエピトープに免疫特異的に結合する。

【0274】

ある具体的な態様において、本明細書に記載される抗体と変異OX40との間の結合は、この抗体と配列番号55のヒトOX40配列との間の結合と比べて実質的に弱まり、この変異OX40は、N60A、R62A、R80A、L88A、P93A、P99A、P115A、及びこれらの組み合わせからなる群から選択されるアミノ酸突然変異(例えば、置換)を除いて、配列番号55の配列を含む。一部の実施形態において、変異OX40は、N60A、R62A、R80A、L88A、P93A、P99A、及びP115Aからなる群から選択される任意の1つの突然変異を除いて、配列番号55の配列を含む。一部の実施形態において、変異OX40は、W58A、N60A、R62A、R80A、L88A、P93A、P99A、及びP115Aからなる群から選択される任意の2、3、4、5、6、又は7つの突然変異を除いて、配列番号55の配列を含む。一部の実施形態において、変異OX40は、アミノ酸突然変異W58A、N60A、R62A、R80A、L88A、P93A、P99A、及びP115Aを除いて、配列番号55の配列を含む。

10

20

【0275】

ある具体的な態様において、本明細書に記載される抗体は、60、62、80、88、93、99、115、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される配列番号55の残基を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなるヒトOX40配列のエピトープに特異的に結合する。一部の実施形態において、エピトープは、配列番号55の60、62、80、88、93、99、及び115からなる群から選択される任意の1つの残基を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる。一部の実施形態において、エピトープは、配列番号55の58、60、62、80、88、93、99、及び115からなる群から選択される任意の2、3、4、5、6、又は7つの残基を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる。一部の実施形態において、エピトープは、配列番号55の残基58、60、62、80、88、93、99、及び115を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる。

30

【0276】

具体的な実施形態において、本明細書に記載される抗体は、60、62、80、88、93、99、115、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される残基を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる配列番号55のエピトープに特異的に結合する。一部の実施形態において、エピトープは、配列番号55の60、62、80、88、93、99、及び115からなる群から選択される任意の1つの残基を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる。一部の実施形態において、エピトープは、配列番号55の58、60、62、80、88、93、99、及び115からなる群から選択される任意の2、3、4、5、6、又は7つの残基を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる。一部の実施形態において、エピトープは、配列番号55の残基58、60、62、80、88、93、99、及び115を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる。

40

【0277】

ある具体的な態様において、本明細書に記載される抗体は、60、62、80、88、93、99、115、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される配列番号55の少なくとも1つの残基に特異的に結合する。一部の実施形態において、本明細書に記載さ

50

れる抗体は、配列番号55の60、62、80、88、93、99、及び115からなる群から選択される任意の1つの残基、又は任意の2、3、4、5、6、又は7つの残基に特異的に結合する。一部の実施形態において、本明細書に記載される抗体は、配列番号55の58、60、62、80、88、93、99、及び115からなる群から選択される任意の2、3、4、5、6、又は7つの残基に特異的に結合する。一部の実施形態において、本明細書に記載される抗体は、配列番号55の残基58、60、62、80、88、93、99、115に特異的に結合する。

【0278】

ある具体的な態様において、本明細書に記載される抗体は、配列番号55のヒトOX40配列への結合と比較して、N60A、R62A、R80A、L88A、P93A、P99A、P115A、及びこれらの組み合わせからなる群から選択されるアミノ酸突然変異（例えば、置換）の存在を除いて、配列番号55と同一のタンパク質への結合の低下又は欠如を呈する。一部の実施形態において、このタンパク質は、N60A、R62A、R80A、L88A、P93A、P99A、及びP115Aからなる群から選択される任意の1つの突然変異、又は任意の2、3、4、5、6、又は7つの突然変異を含むアミノ酸突然変異の存在を除いて、配列番号55と同一である。一部の実施形態において、このタンパク質は、W58A、N60A、R62A、R80A、L88A、P93A、P99A、及びP115Aからなる群から選択される任意の2、3、4、5、6、又は7つの突然変異を含むアミノ酸突然変異の存在を除いて、配列番号55と同一である。一部の実施形態において、このタンパク質は、突然変異W58A、N60A、R62A、R80A、L88A、P93A、P99A、及びP115Aを含むアミノ酸置換の存在を除いて、配列番号55と同一である。

10

20

【0279】

特定の実施形態において、本明細書に記載される抗体のエピトープは、抗体を作製するための免疫原として使用される。抗体を作製する方法については、例えば以下の第5.3節を参照されたい。

【0280】

具体的な態様において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、アゴニストとして機能する。

【0281】

特定の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、本明細書に記載される及び/又は当業者に公知の方法によって評価されるとおり、いかなる抗体も伴わないか又は無関係の抗体（例えば、OX40に免疫特異的に結合しない抗体）を伴う場合のOX40（例えば、ヒトOX40）活性と比べてOX40（例えば、ヒトOX40）活性を少なくとも約1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、又は100倍増加させる。特定の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、本明細書に記載される及び/又は当業者に公知の方法によって評価されるとおり、いかなる抗体も伴わないか又は無関係の抗体（例えば、OX40に免疫特異的に結合しない抗体）を伴う場合のOX40（例えば、ヒトOX40）活性と比べてOX40（例えば、ヒトOX40）活性を少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、又は99%増加させる。OX40（例えば、ヒトOX40）活性の非限定的な例には、OX40（例えば、ヒトOX40）シグナル伝達、細胞増殖、細胞生存、及びサイトカイン産生（例えば、IL-2、TNF-、IFN-、IL-4、IL-10、及び/又はIL-13）が含まれ得る。特定の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、OX40（例えば、ヒトOX40）活性を誘導するか、増強するか、又は増加させる。具体的な実施形態におい

30

40

50

て、OX40活性の増加は、以下の実施例に記載されるとおり評価される。

【0282】

特定の態様において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、OX40を発現し且つOX40シグナル伝達に応答する細胞（例えば、T細胞など、OX40刺激及びOX40シグナル伝達に応答して増殖する細胞）の細胞増殖を誘導するか、増強するか、又は増加させる。細胞増殖アッセイは、³H-チミジン取込みアッセイ、BrdU取込みアッセイ、又は実施例2に記載されるようなCFSEアッセイなど、当該技術分野において記載されており、当業者は容易に実施し得る。具体的な実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体の存在下でT細胞マイトジェン又はT細胞受容体複合体刺激剤（例えば、フィットヘマグルチニン（PHA）及び/又はホルボールミリスレートアセテート（PMA）、又はTCR複合体刺激抗体、例えば抗CD3抗体及び抗CD28抗体）によって刺激したT細胞（例えば、CD4⁺又はCD8⁺エフェクターT細胞）は、フィットヘマグルチニン（PHA）及び/又はホルボールミリスレートアセテート（PMA）、又はTCR複合体刺激抗体、例えば抗CD3抗体及び抗CD28抗体などのT細胞マイトジェン又はT細胞受容体複合体刺激剤による刺激のみのT細胞と比べて細胞増殖が増加する。

10

【0283】

具体的な実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、本明細書に記載される又は当業者に公知の方法（例えば、³H-チミジン取込みアッセイ、BrdU取込みアッセイ又は以下の実施例2に記載されるようなCFSEアッセイ）によって評価されるとおり、いかなる抗体も伴わないか又は無関係の抗体（例えば、OX40に免疫特異的に結合しない抗体）を伴う場合のOX40（例えば、ヒトOX40）活性刺激と比べて細胞増殖（例えば、CD4及びCD8エフェクターT細胞などのT細胞）を少なくとも約1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、又は100倍増加させる。具体的な実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、本明細書に記載される又は当業者に公知の方法（例えば、³H-チミジン取込みアッセイ、BrdU取込みアッセイ、又は以下の実施例2に記載されるようなCFSEアッセイ）によって評価されるとおり、いかなる抗体も伴わないか又は無関係の抗体（例えば、OX40に免疫特異的に結合しない抗体）を伴う場合のOX40（例えば、ヒトOX40）活性と比べて細胞増殖（例えば、CD4及びCD8エフェクターT細胞などのT細胞）を少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、又は99%増加させる。具体的な実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体はCD4⁺T細胞増殖を増加させ、このCD4⁺T細胞増殖は、例えば、以下のステップ：（a）例えばエンリッチドCD4⁺T細胞を例えば10μMカルボキシフルオレセイン二酢酸スクシンイミジルエステル（CFSE）によって例えば37℃で例えば7分間標識するステップ；（b）綿密に洗浄した後、細胞（例えば、1ウェル10⁵細胞）を例えば3μg/mlの例えばプレート結合抗CD3抗体及び種々の濃度（例えば、0.002、0.02、0.2、2、及び20μg/ml）の例えば本明細書に記載されるプレート結合抗体によって例えば37℃及び5%CO₂で刺激するステップ；及び（c）例えば4日目に、細胞を例えば抗CD4抗体で染色し、例えばフローサイトメトリーによってCFSE低CD4⁺細胞の割合を計測することによりCD4⁺T細胞増殖を調べるステップを含むアッセイで評価されるとおり、例えば0.2μg/ml～20μg/mlにおいて抗体の濃度の実質的増加関数である。具体的な実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体はCD4⁺T細胞増殖を増加させ、このCD4⁺T細胞増殖は、例えば、

20

30

40

50

以下のステップ：(a) 例えばエンリッチド CD4⁺ T細胞を例えば 10 μM カルボキシフルオレセイン二酢酸スクシンイミジルエステル (CFSE) によって例えば 37 で例えば 7 分間標識するステップ；(b) 綿密に洗浄した後、細胞（例えば、1 ウェル 10⁵ 細胞）を例えば 3 μg/ml の例えばプレート結合抗 CD3 抗体及び種々の濃度（例えば、0.002、0.02、0.2、2、及び 20 μg/ml）の例えば本明細書に記載されるプレート結合抗体によって例えば 37 及び 5% CO₂ で刺激するステップ；及び (c) 例えば 4 日目に、細胞を例えば抗 CD4 抗体で染色し、例えばフローサイトメトリーによって CFSE 低 CD4⁺ 細胞の割合を計測することにより CD4⁺ T細胞増殖を調べるステップを含むアッセイで評価されたとおり、例えば、2 μg/ml ~ 20 μg/ml において抗体の濃度の実質的増加関数である。具体的な実施形態において、OX40（例えば、ヒト OX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は CD4⁺ T細胞増殖を増加させ、この CD4⁺ T細胞増殖は、抗 OX40 抗体濃度が例えば 0.2 μg/ml ~ 20 μg/ml のとき、例えば、以下のステップ：(a) 例えばエンリッチド CD4⁺ T細胞を例えば 10 μM カルボキシフルオレセイン二酢酸スクシンイミジルエステル (CFSE) によって例えば 37 で例えば 7 分間標識するステップ；(b) 綿密に洗浄した後、細胞（例えば、1 ウェル 10⁵ 細胞）を例えば 3 μg/ml の例えばプレート結合抗 CD3 抗体及び種々の濃度（例えば、0.002、0.02、0.2、2、及び 20 μg/ml）の例えば本明細書に記載されるプレート結合抗体によって例えば 37 及び 5% CO₂ で刺激するステップ；及び (c) 例えば 4 日目に、細胞を例えば抗 CD4 抗体で染色し、例えばフローサイトメトリーによって CFSE 低 CD4⁺ 細胞の割合を計測することにより CD4⁺ T細胞増殖を調べるステップを含むアッセイで評価されたとおり、シグモイド用量反応曲線を示す。具体的な実施形態において、OX40（例えば、ヒト OX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は CD4⁺ T細胞増殖を増加させ、この CD4⁺ T細胞増殖は、抗 OX40 抗体濃度が例えば 2 μg/ml ~ 20 μg/ml のとき、例えば、以下のステップ：(a) 例えばエンリッチド CD4⁺ T細胞を例えば 10 μM カルボキシフルオレセイン二酢酸スクシンイミジルエステル (CFSE) によって例えば 37 で例えば 7 分間標識するステップ；(b) 綿密に洗浄した後、細胞（例えば、1 ウェル 10⁵ 細胞）を例えば 3 μg/ml の例えばプレート結合抗 CD3 抗体及び種々の濃度（例えば、0.002、0.02、0.2、2、及び 20 μg/ml）の例えば本明細書に記載されるプレート結合抗体によって例えば 37 及び 5% CO₂ で刺激するステップ；及び (c) 例えば 4 日目に、細胞を例えば抗 CD4 抗体で染色し、例えばフローサイトメトリーによって CFSE 低 CD4⁺ 細胞の割合を計測することにより CD4⁺ T細胞増殖を調べるステップを含むアッセイで評価されたとおり、シグモイド用量反応曲線を示す。具体的な実施形態において、OX40（例えば、ヒト OX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、例えば、以下のステップ：(a) 例えばエンリッチド CD4⁺ T細胞を例えば 10 μM カルボキシフルオレセイン二酢酸スクシンイミジルエステル (CFSE) によって例えば 37 で例えば 7 分間標識するステップ；(b) 綿密に洗浄した後、細胞（例えば、1 ウェル 10⁵ 細胞）を例えば 3 μg/ml の例えばプレート結合抗 CD3 抗体及び種々の濃度（例えば、0.002、0.02、0.2、2、及び 20 μg/ml）の例えば本明細書に記載されるそのプレート結合抗体によって例えば 37 及び 5% CO₂ で刺激するステップ；及び (c) 例えば 4 日目に、細胞を例えば抗 CD4 抗体で染色し、例えばフローサイトメトリーによって CFSE 低 CD4⁺ 細胞の割合を計測することにより CD4⁺ T細胞増殖を調べるステップを含むアッセイで評価されたとおり、抗体が 2 μg/ml の濃度よりも 20 μg/ml の濃度で存在するときに CD4⁺ T細胞増殖の増加が大きくなる。

【0284】

一部の実施形態において、OX40（例えば、ヒト OX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体の存在下で T細胞マイトジェン（例えば、抗 CD3 抗体又はホルポールエステル）によって刺激した T細胞（例えば、CD4⁺ 又は CD8⁺ エフェクター T細胞）は、本明細書に記載される又は当業者に公知の方法（例えば、³H - チミジン

取込みアッセイ、BrdU取込みアッセイ、又は以下の実施例2に記載されるようなCFSEアッセイ)によって評価されるとおり、T細胞マイトジェンによる刺激のみのT細胞と比べて細胞増殖が少なくとも約1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、又は100倍増加する。一部の実施形態において、OX40(例えば、ヒトOX40)に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体の存在下でT細胞マイトジェン又はT細胞受容体複合体刺激剤(例えば、フィトヘマグルチニン(PHA)及び/又はホルポールミリステートアセテート(PMA)、又はTCR複合体刺激剤、例えば抗CD3抗体及び抗CD28抗体)によって刺激したT細胞(例えば、CD4⁺又はCD8⁺エフェクターT細胞)は、本明細書に記載される又は当業者に公知の方法(例えば、³H-チミジン取込みアッセイ、BrdU取込みアッセイ、又は以下の実施例2に記載されるようなCFSEアッセイ)によって評価されるとおり、T細胞マイトジェン又はT細胞受容体複合体刺激剤(例えば、フィトヘマグルチニン(PHA)及び/又はホルポールミリステートアセテート(PMA)、又はTCR複合体刺激剤、例えば抗CD3抗体及び抗CD28抗体)による刺激のみのT細胞と比べて細胞増殖が少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、又は99%増加する。具体的な実施形態において、細胞増殖は以下の実施例2に記載されるとおり評価される。具体的な実施形態において、5µg/mlの本明細書に記載されるOX40抗体が、3µg/ml抗CD3抗体で処理したヒトCD4⁺T細胞の増殖を少なくとも20%増加させる。具体的な実施形態において、5µg/mlの本明細書に記載されるOX40抗体が、3µg/ml抗CD3抗体で処理したヒトCD4⁺T細胞の増殖を少なくとも30%増加させる。具体的な実施形態において、5µg/mlの本明細書に記載されるOX40抗体が、3µg/ml抗CD3抗体で処理したヒトCD4⁺T細胞の増殖を少なくとも40%増加させる。具体的な実施形態において、5µg/mlの本明細書に記載されるOX40抗体が、3µg/ml抗CD3抗体で処理したヒトCD4⁺T細胞の増殖を少なくとも50%増加させる。

【0285】

特定の態様において、OX40(例えば、ヒトOX40)に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、細胞(例えば、CD4及びCD8エフェクターT細胞などのT細胞)の生存を増加させる。具体的な実施形態において、OX40(例えば、ヒトOX40)に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体の存在下でT細胞マイトジェン又はT細胞受容体複合体刺激剤(例えば、フィトヘマグルチニン(PHA)及び/又はホルポールミリステートアセテート(PMA)、又はTCR複合体刺激剤、例えば抗CD3抗体及び抗CD28抗体)によって刺激したT細胞(例えば、CD4⁺又はCD8⁺エフェクターT細胞)は、T細胞マイトジェンによる刺激のみのT細胞と比べて生存が増加する。細胞生存アッセイについては当該技術分野において記載されており(例えば、トリパンプルー色素排除アッセイ)、当業者は容易に実施し得る。

【0286】

具体的な実施形態において、OX40(例えば、ヒトOX40)に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、細胞生存(例えば、CD4及びCD8エフェクターT細胞などのT細胞)を、本明細書に記載される又は当業者に公知の方法(例えば、トリパンプルー色素排除アッセイ)によって評価されるとおり、いかなる抗体も伴わないか又は無関係の抗体(例えば、OX40に免疫特異的に結合しない抗体)を伴う場合の少なくとも約1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、又は100倍増加させる。具体的な実施形態において、OX40(例えば、ヒトOX40)に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、本明細書に記載される又は当業者に公知の方法(例えば、トリパンプルー色素排除アッセイ)によって評価されるとおり、いかなる抗体も伴わないか又は無関係の抗

体（例えば、OX40に免疫特異的に結合しない抗体）を伴う場合のOX40（例えば、ヒトOX40）活性と比べて細胞生存（例えば、CD4及びCD8エフェクターT細胞などのT細胞）を少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、又は99%増加させる。

【0287】

一部の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体の存在下でT細胞マイトジェン（例えば、抗CD3抗体又はホルポールエステル）によって刺激したT細胞（例えば、CD4⁺又はCD8⁺エフェクターT細胞）は、本明細書に記載される又は当業者に公知の方法（例えば、トリパンブルー色素排除アッセイ）によって評価されるとおり、T細胞マイトジェン又はT細胞受容体複合体刺激剤（例えば、フィットヘマグルチニン（PHA）及び/又はホルポールミリスレートアセテート（PMA）、又はTCR複合体刺激抗体、例えば抗CD3抗体及び抗CD28抗体）による刺激のみのT細胞と比べて細胞生存が少なくとも約1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、又は100倍増加する。一部の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体の存在下でT細胞マイトジェン又はT細胞受容体複合体刺激剤（例えば、フィットヘマグルチニン（PHA）及び/又はホルポールミリスレートアセテート（PMA）、又はTCR複合体刺激抗体、例えば抗CD3抗体及び抗CD28抗体）によって刺激したT細胞（例えば、CD4⁺又はCD8⁺エフェクターT細胞）は、本明細書に記載される又は当業者に公知の方法（例えば、トリパンブルー色素排除アッセイ）によって評価されるとおり、T細胞マイトジェンによる刺激のみのT細胞と比べて細胞生存が少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、又は99%増加する。

10

20

【0288】

特定の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、エフェクターT細胞（例えば、CD4⁺及びCD8⁺エフェクターT細胞）を活性化誘導性細胞死から保護する。

30

【0289】

具体的な実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、本明細書に記載される（実施例2など、以下の実施例を参照されたい）又は当業者に公知の方法によって評価されるとおり、いかなる抗体も伴わないか又は無関係の抗体（例えば、OX40に免疫特異的に結合しない抗体）を伴う場合のOX40L（例えば、ヒトOX40L）刺激の存在下又は非存在下でのサイトカイン産生と比べてサイトカイン産生（例えば、IL-2、TNF- α 、IFN- γ 、IL-4、IL-10、及び/又はIL-13）を少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、又は99%誘導し、又は増加させる。具体的な実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、本明細書に記載される（実施例2など、以下の実施例を参照されたい）又は当業者に公知の方法によって評価されるとおり、いかなる抗体も伴わないか又は無関係の抗体（例えば、OX40に免疫特異的に結合しない抗体）を伴う場合のOX40L（例えば、ヒトOX40L）刺激の存在下又は非存在下でのサイトカイン産生と比べてサイトカイン産生（例えば、IL-2、TNF- α 、IFN- γ 、IL-4、IL-10、及び/又はIL-13）を少なくとも約1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、又は100倍誘導又は増強する。

40

50

【0290】

特定の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体の存在下でT細胞マイトジェン又はT細胞受容体複合体刺激剤（例えば、フィトヘマグルチニン（PHA）及び/又はホルボールミリステートアセテート（PMA）、又はTCR複合体刺激抗体、例えば抗CD3抗体及び抗CD28抗体）によって刺激したT細胞（例えば、CD4⁺又はCD8⁺エフェクターT細胞）は、本明細書に記載される又は当業者に公知の方法（例えば、ELISAアッセイ又は以下の実施例に記載されるとおりのもの）によって評価されるとおり、T細胞マイトジェン又はT細胞受容体複合体刺激剤（例えば、フィトヘマグルチニン（PHA）及び/又はホルボールミリステートアセテート（PMA）、又はTCR複合体刺激抗体、例えば抗CD3抗体及び抗CD28抗体）による刺激のみのT細胞と比べてサイトカイン産生（例えば、IL-2、TNF- α 、IFN- γ 、IL-4、IL-10、及び/又はIL-13）が少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、又は99%増加する。一部の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体の存在下でT細胞マイトジェン又はT細胞受容体複合体刺激剤（例えば、フィトヘマグルチニン（PHA）及び/又はホルボールミリステートアセテート（PMA）、又はTCR複合体刺激抗体、例えば抗CD3抗体及び抗CD28抗体）によって刺激したT細胞（例えば、CD4⁺又はCD8⁺エフェクターT細胞）は、本明細書に記載される又は当業者に公知の方法（例えば、ELISAアッセイ又は以下の実施例に記載されるとおりのもの）によって評価されるとおり、T細胞マイトジェン又はT細胞受容体複合体刺激剤（例えば、フィトヘマグルチニン（PHA）及び/又はホルボールミリステートアセテート（PMA）、又はTCR複合体刺激抗体、例えば抗CD3抗体及び抗CD28抗体）による刺激のみのT細胞と比べてサイトカイン産生（例えば、IL-2、TNF- α 、IFN- γ 、IL-4、IL-10、及び/又はIL-13）が少なくとも約1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、又は100倍増加する。

10

20

30

【0291】

具体的な実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、本明細書に記載される（実施例2など、以下の実施例を参照されたい）又は当業者に公知の方法によって評価されるとおり、いかなる抗体も伴わないか又は無関係の抗体（例えば、OX40に免疫特異的に結合しない抗体）を伴う場合のIL-2産生と比べてブドウ球菌（*Staphylococcus*）エンテロトキシンA（SEA）刺激に应答したIL-2産生を少なくとも約1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、又は100倍増加させる。

40

【0292】

特定の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体の存在下でブドウ球菌（*Staphylococcus*）エンテロトキシンA（SEA）刺激によって刺激したT細胞（例えば、CD4⁺又はCD8⁺T細胞）は、本明細書に記載される又は当業者に公知の方法（例えば、ELISAアッセイ又は以下の実施例に記載されるとおりのもの）によって評価されるとおり、SEAによる刺激のみのT細胞と比べてIL-2産生が少なくとも約1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、又は100倍増加する。

50

【0293】

具体的な実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、ブドウ球菌（*Staphylococcus*）エンテロトキシンA（SEA）（例えば、100 ng/ml）との組み合わせで、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット（Meso Scale Discovery）によって計測されるとおり、例えば37、5%CO₂、及び97%湿度における例えば5日間の刺激時に例えばPBMCにおいてIL-2産生を誘導し、このIL-2産生は、例えば0.032 µg/ml～20 µg/mlにおいて抗体濃度の実質的増加関数である。特定の実施形態において、SEAとの組み合わせで抗体によって誘導されるIL-2産生は、例えば0.16 µg/ml～20 µg/ml、0.8 µg/ml～20 µg/ml、4 µg/ml～20 µg/ml、0.032 µg/ml～4 µg/ml、0.16 µg/ml～4 µg/ml、又は0.8 µg/ml～4 µg/mlにおいて抗体濃度の実質的増加関数である。別の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、ブドウ球菌（*Staphylococcus*）エンテロトキシンA（SEA）との組み合わせで、例えばPBMCにおいてIL-2産生を誘導し、このIL-2産生は、例えば、以下のステップ：（a）種々の濃度（例えば、20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、及び0.000256 µg/ml）の抗体、及び例えば100 ng/mlのSEAの非存在下又は存在下でPBMC（例えば、1ウェル10⁵細胞）を例えば37、5%CO₂、及び97%湿度において例えば5日間培養するステップ；及び（b）清澄化した上清を収集し、IL-2の力価を、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット（Meso Scale Discovery）によって計測するステップを含むアッセイで評価されるとおり、例えば0.032 µg/ml～20 µg/mlにおいて抗体濃度の実質的増加関数である。特定の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、ブドウ球菌（*Staphylococcus*）エンテロトキシンA（SEA）との組み合わせで、例えばPBMCにおいてIL-2産生を誘導し、このIL-2産生は、例えば、以下のステップ：（a）種々の濃度（例えば、20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、及び0.000256 µg/ml）の抗体、及び例えば100 ng/mlのSEAの非存在下又は存在下でPBMC（例えば、1ウェル10⁵細胞）を例えば37、5%CO₂、及び97%湿度において例えば5日間培養するステップ；及び（b）清澄化した上清を収集し、IL-2の力価を、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-plex組織培養キット（Meso Scale Discovery）によって計測するステップを含むアッセイで評価されるとおり、例えば0.16 µg/ml～20 µg/ml、0.8 µg/ml～20 µg/ml、4 µg/ml～20 µg/ml、0.032 µg/ml～4 µg/ml、0.16 µg/ml～4 µg/ml、又は0.8 µg/ml～4 µg/mlにおいて抗体濃度の実質的増加関数である。具体的な実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、抗体が0.032 µg/mlの濃度よりも20 µg/mlの濃度で存在するときに、例えば37、5%CO₂、及び97%湿度における例えば5日間の刺激時のブドウ球菌（*Staphylococcus*）エンテロトキシンA（SEA）（例えば、100 ng/ml）に応答したIL-2産生が高くなる。詳細な実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、抗体が0.16 µg/mlの濃度よりも20 µg/mlの濃度で存在するときに、例えば37、5%CO₂、及び97%湿度における例えば5日間の刺激時のブドウ球菌（*Staphylococcus*）エンテロトキシンA（SEA）（例えば、100 ng/ml）に応答したIL-2産生が高くなる。

【0294】

具体的な実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、ブドウ球菌（*Staphylococcus*）エンテロトキシンA（SEA）（例えば、100 ng/ml）との組み合わせで、例えば電気化学

発光、例えばヒトTH1/TH2 10-Plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)によって計測されるとおり、例えば37、5%CO₂、及び97%湿度における例えば5日間の刺激時に例えばPBM CにおいてIL-2産生を誘導し、このIL-2産生は、抗OX40抗体濃度が例えば0.032µg/ml~20µg/mlのとき、シグモイド用量反応曲線を示す。特定の実施形態において、SEAとの組み合わせで抗体によって誘導されたIL-2産生は、抗OX40抗体濃度が例えば0.16µg/ml~20µg/ml、0.8µg/ml~20µg/ml、4µg/ml~20µg/ml、0.032µg/ml~4µg/ml、0.16µg/ml~4µg/ml、又は0.8µg/ml~4µg/mlのとき、シグモイド用量反応曲線を示す。別の実施形態において、OX40(例えば、ヒトOX40)に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、ブドウ球菌(Staphylococcus)エンテロトキシンA(SEA)との組み合わせで、例えばPBM CにおいてIL-2産生を誘導し、このIL-2産生は、抗OX40抗体濃度が例えば0.032µg/ml~20µg/mlのとき、例えば、以下のステップ:(a)種々の濃度(例えば、20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、及び0.000256µg/ml)の抗体、及び例えば100ng/mlのSEAの非存在下又は存在下でPBM C(例えば、1ウェル10⁵細胞)を例えば37、5%CO₂、及び97%湿度において例えば5日間培養するステップ;及び(b)清澄化した上清を収集し、IL-2の力価を、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-Plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)によって計測するステップを含むアッセイで評価されるとおり、シグモイド用量反応曲線を示す。特定の実施形態において、OX40(例えば、ヒトOX40)に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、ブドウ球菌(Staphylococcus)エンテロトキシンA(SEA)との組み合わせで、例えばPBM CにおいてIL-2産生を誘導し、このIL-2産生は、抗OX40抗体濃度が例えば0.16µg/ml~20µg/ml、0.8µg/ml~20µg/ml、4µg/ml~20µg/ml、0.032µg/ml~4µg/ml、0.16µg/ml~4µg/ml、又は0.8µg/ml~4µg/mlのとき、例えば、以下のステップ:(a)種々の濃度(例えば、20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、0.00128、及び0.000256µg/ml)の抗体、及び例えば100ng/mlのSEAの非存在下又は存在下でPBM C(例えば、1ウェル10⁵細胞)を例えば37、5%CO₂、及び97%湿度において例えば5日間培養するステップ;及び(b)清澄化した上清を収集し、IL-2の力価を、例えば電気化学発光、例えばヒトTH1/TH2 10-Plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)によって計測するステップを含むアッセイで評価されるとおり、シグモイド用量反応曲線を示す。具体的な実施形態において、OX40(例えば、ヒトOX40)に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、抗体が0.032µg/mlの濃度よりも20µg/mlの濃度で存在するときに、例えば37、5%CO₂、及び97%湿度における例えば5日間の刺激時のブドウ球菌(Staphylococcus)エンテロトキシンA(SEA)(例えば、100ng/ml)に応答したIL-2産生が高くなる。詳細な実施形態において、OX40(例えば、ヒトOX40)に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、抗体が0.16µg/mlの濃度よりも20µg/mlの濃度で存在するときに、例えば37、5%CO₂、及び97%湿度における例えば5日間の刺激時のブドウ球菌(Staphylococcus)エンテロトキシンA(SEA)(例えば、100ng/ml)に応答したIL-2産生が高くなる。

【0295】

具体的な実施形態において、OX40(例えば、ヒトOX40)に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、本明細書に記載される(実施例2など、以下の実施例を参照されたい)又は当業者に公知の方法によって評価されるとおり、いかなる抗体も伴わないか又は無関係の抗体(例えば、OX40に免疫特異的に結合しない抗体)を伴う場合のIL-10産生と比べてブドウ球菌(Staphylococcus)エンテロトキシ

ン A (S E A) 刺激に应答した I L - 1 0 産生を少なくとも約 5 %、1 0 %、1 5 %、2 0 %、2 5 %、3 0 %、3 5 %、4 0 %、4 5 %、又は 5 0 % 低下させる。

【 0 2 9 6 】

特定の実施形態において、O X 4 0 (例えば、ヒト O X 4 0) に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体の存在下でブドウ球菌 (S t a p h y l o c o c c u s) エンテロトキシン A (S E A) 刺激によって刺激した T 細胞 (例えば、C D 4 + 又は C D 8 + T 細胞) は、本明細書に記載される又は当業者に公知の方法 (例えば、E L I S A アッセイ又は以下の実施例に記載されるとおりのもの) によって評価されるとおり、S E A による刺激のみの T 細胞と比べて I L - 1 0 産生が少なくとも約 5 %、1 0 %、1 5 %、2 0 %、2 5 %、3 0 %、3 5 %、4 0 %、4 5 %、又は 5 0 % 低下する。

10

【 0 2 9 7 】

具体的な実施形態において、O X 4 0 (例えば、ヒト O X 4 0) に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、本明細書に記載される又は当業者に公知の方法 (例えば、F c ガンマ受容体 I I I A (C D 1 6) レポーターアッセイ又は以下の実施例に記載されるとおりのもの) によって評価されるとおり、活性化調節性 T 細胞に結合したとき、C D 1 6、C D 3 2 A 及び C D 6 4 からなる群から選択される活性化 F c ガンマ受容体に対し、その抗体が活性化エフェクター T 細胞に結合したときに C D 1 6、C D 3 2 A 及び C D 6 4 からなる群から選択される活性化 F c ガンマ受容体に結合するよりも大きい程度に (例えば、1 . 2 倍、1 . 3 倍、1 . 4 倍、1 . 5 倍、2 倍、2 . 5 倍、3 倍、3 . 5 倍、4 倍、4 . 5 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、1 0 倍、1 5 倍、2 0 倍、3 0 倍、4 0 倍、5 0 倍、6 0 倍、7 0 倍、8 0 倍、9 0 倍、又は 1 0 0 倍) 結合する。具体的な実施形態において、活性化 F c ガンマ受容体は、骨髄由来のエフェクター細胞及びリンパ球由来のエフェクター細胞からなる群から選択される細胞上で発現する。詳細な実施形態において、活性化 F c ガンマ受容体は C D 1 6 である。

20

【 0 2 9 8 】

具体的な実施形態において、O X 4 0 (例えば、ヒト O X 4 0) に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体は、活性化調節性 T 細胞に結合したとき、C D 1 6、C D 3 2 A 及び C D 6 4 からなる群から選択される活性化 F c ガンマ受容体の活性化を、その抗体が活性化エフェクター T 細胞に結合したときに C D 1 6、C D 3 2 A 及び C D 6 4 からなる群から選択される活性化 F c ガンマ受容体の活性化を生じさせるよりも強力に生じさせる。詳細な実施形態において、活性化 F c ガンマ受容体の活性化は、O X 4 0 (例えば、ヒト O X 4 0) に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体が活性化調節性 T 細胞に結合したとき、本明細書に記載される又は当業者に公知の方法 (例えば、F c ガンマ受容体 I I I A (C D 1 6) レポーターアッセイ又は以下の実施例に記載されるとおりのもの) によって評価されるとおり、O X 4 0 (例えば、ヒト O X 4 0) に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体が活性化エフェクター T 細胞に結合したときの活性化 F c ガンマ受容体の活性化よりも少なくとも約 1 . 2 倍、1 . 3 倍、1 . 4 倍、1 . 5 倍、2 倍、2 . 5 倍、3 倍、3 . 5 倍、4 倍、4 . 5 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、1 0 倍、1 5 倍、2 0 倍、3 0 倍、4 0 倍、5 0 倍、6 0 倍、7 0 倍、8 0 倍、9 0 倍、又は 1 0 0 倍強力である。具体的な実施形態において、活性化 F c ガンマ受容体は、骨髄由来のエフェクター細胞及びリンパ球由来のエフェクター細胞からなる群から選択される細胞上で発現する。詳細な実施形態において、活性化 F c ガンマ受容体は C D 1 6 である。

30

40

【 0 2 9 9 】

ある具体的な態様において、本明細書には、O X 4 0 (例えば、ヒト O X 4 0) に免疫特異的に結合するアンタゴニスト抗体が提供される。

【 0 3 0 0 】

O X 4 0 シグナル伝達の活性化は、頂端のアダプタータンパク質を効率的に動員して細胞内シグナル伝達を駆動する高次の受容体複合体を形成する受容体クラスター形成に依存する。理論によって拘束されるものではないが、抗 O X 4 0 アゴニスト抗体は二価抗体アーム (即ち、各々が O X 4 0 抗原に結合する 2 本の抗体アーム) を介して、及び / 又はア

50

クセサリー骨髄系又はリンパ系細胞上のFc-Fc受容体(FcR)共会合を介して受容体クラスター形成を媒介し得る。結果的に、抗OX40アンタゴニスト抗体を開発する1つの手法は、OX40への結合に関してOX40リガンド(OX40L)と競合する抗体を選択し、Fc受容体に対する抗体のFc領域の結合を減弱又は消失させ、及び/又は一価抗体フォーマットを採用することである。一価抗体フォーマットには、構造的に一価の抗体、限定はされないが、1つの抗原結合ドメインのみ(例えば、1本のFabアームのみ)を含む抗OX40抗体、又は重鎖と対をなすか、又は重鎖の断片(例えば、Fc断片)と対をなすOX40(例えば、ヒトOX40)に結合する1つの抗原結合ドメインのみを含む抗体が含まれ得る。一価抗体フォーマットにはまた、機能的に一価の抗体、例えば、ヒト免疫細胞が発現する抗原に結合しない第2の抗原結合ドメインと対をなすOX40(例えば、ヒトOX40)に結合する1つの抗原結合ドメインのみを含む抗体(即ち、この抗体は2つの抗原結合ドメインを含むが、1つの抗原結合ドメインのみがOX40に結合する)も含まれ得る。

【0301】

上記では、Fc受容体結合を低下させる、又は潜在的なグリコシル化部位を除去し得るIgG定常ドメインFc領域の突然変異の例が考察される。特定の実施形態において、OX40(例えば、ヒトOX40)に免疫特異的に結合する本明細書に記載されるとおりの抗体の重鎖定常領域は、N297A、N297Q、D265A、C127S、S228P、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される突然変異を含む。特定の実施形態において、この突然変異はN297A、N297Q、D265A、又はこれらの組み合わせである。特定の実施形態において、この突然変異はC127Sである。特定の実施形態において、この突然変異はS228Pである。一実施形態において、OX40(例えば、ヒトOX40)に免疫特異的に結合する本明細書に記載されるとおりの抗体の重鎖定常領域は、D265A、P329A、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される突然変異を含む。特定の実施形態において、重鎖定常領域は、免疫グロブリンIgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、及びIgA₂からなる群から選択される。特定の実施形態において、免疫グロブリンはヒト免疫グロブリンである。突然変異(例えば、置換)を含有するヒト免疫グロブリンも本明細書ではヒト免疫グロブリンと称される。ある具体的な態様において、OX40(例えば、ヒトOX40)に免疫特異的に結合する本明細書に記載されるとおりの抗体は免疫グロブリンIgG₁重鎖定常領域を含み、このIgG₁重鎖定常領域のアミノ酸配列は、N297A、N297Q、D265A、又はこれらの組み合わせからなる群から選択される突然変異を含む。一態様において、OX40(例えば、ヒトOX40)に免疫特異的に結合する本明細書に記載されるとおりの抗体は免疫グロブリンIgG₁重鎖定常領域を含み、このIgG₁重鎖定常領域のアミノ酸配列は、D265A、P329A、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される突然変異を含む。ある具体的な態様において、OX40(例えば、ヒトOX40)に免疫特異的に結合する本明細書に記載されるとおりの抗体は免疫グロブリンIgG₂重鎖定常領域を含み、このIgG₂重鎖定常領域のアミノ酸配列はC127S突然変異を含む。ある具体的な態様において、OX40(例えば、ヒトOX40)に免疫特異的に結合する本明細書に記載されるとおりの抗体は免疫グロブリンIgG₄重鎖定常領域を含み、このIgG₄重鎖定常領域のアミノ酸配列はS228P突然変異を含む。特定の実施形態において、本抗体はアンタゴニスト性である。

【0302】

ある具体的な態様において、OX40(例えば、ヒトOX40)に免疫特異的に結合する本明細書に記載されるとおりの抗体は、Fab、Fab'、F(ab')₂、及びscFv断片からなる群から選択され、このFab、Fab'、F(ab')₂、又はscFv断片は本明細書に記載されるとおりの抗OX40抗原結合ドメイン又は抗体の重鎖可変領域配列と軽鎖可変領域配列とを含む。Fab、Fab'、F(ab')₂、又はscFv断片は、限定はされないが、以下の第5.3節で考察するものを含め、当業者に公知の任意の技法によって作製することができる。特定の実施形態において、Fab、Fab'

10

20

30

40

50

、 $F(ab')_2$ 、又は $scFv$ 断片は、抗体のインビボ半減期を延長させる部分を更に含む。この部分はまた、「半減期延長部分」とも称される。 Fab 、 Fab' 、 $F(ab')_2$ 、又は $scFv$ 断片のインビボ半減期を延長させることが当業者に公知の任意の部分を使用することができる。例えば、半減期延長部分には、 Fc 領域、ポリマー、アルブミン、又はアルブミン結合タンパク質又は化合物が含まれ得る。ポリマーには、天然又は合成の、任意選択で置換されている直鎖又は分枝鎖ポリアルキレン、ポリアルケニレン、ポリオキシルアルキレン、多糖、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリビニルアルコール、メトキシポリエチレングリコール、ラクトース、アミロース、デキストラン、グリコーゲン、又はその誘導体が含まれ得る。置換基には、1つ以上のヒドロキシ、メチル、又はメトキシ基が含まれ得る。特定の実施形態において、 Fab 、 Fab' 、 $F(ab')_2$ 、又は $scFv$ 断片は、半減期延長部分を付加するための1つ以上のC末端アミノ酸を加えることにより修飾されてもよい。特定の実施形態において、半減期延長部分はポリエチレングリコール又はヒト血清アルブミンである。特定の実施形態において、 Fab 、 Fab' 、 $F(ab')_2$ 、又は $scFv$ 断片は Fc 領域に融合する。特定の実施形態において、本抗体はアンタゴニスト性である。

10

【0303】

ある具体的な態様において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する抗体は1つの重鎖と1つの軽鎖とを含み（即ち、この抗体はいかなる追加の重鎖又は軽鎖も含まず、単一の重鎖-軽鎖対を含むか、それから本質的になるか、又はそれからなる）、この重鎖及び軽鎖は、本明細書に記載されるとおりの抗OX40抗原結合ドメイン又は抗体のそれぞれ重鎖可変領域配列及び軽鎖可変領域配列を含む。特定の実施形態において、重鎖は、N297A、N297Q、D265A、C127S、S228P、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される突然変異を含む。特定の実施形態において、この突然変異は、N297A、N297Q、D265A、又はこれらの組み合わせである。特定の実施形態において、この突然変異はC127Sである。特定の実施形態において、この突然変異はS228Pである。特定の実施形態において、重鎖は、D265A、P329A、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される突然変異を含む。特定の実施形態において、重鎖は、免疫グロブリンIgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、及びIgA₂からなる群から選択される。特定の実施形態において、免疫グロブリンはヒト免疫グロブリンである。特定の実施形態において、重鎖は、N297A、N297Q、D265A、又はこれらの組み合わせからなる群から選択される突然変異を含むIgG₁重鎖である。特定の実施形態において、重鎖は、C127S突然変異を含むIgG₂重鎖である。特定の実施形態において、重鎖は、S228P突然変異を含むIgG₄重鎖である。特定の実施形態において、重鎖は、D265A、P329A及びこれらの組み合わせからなる群から選択される突然変異を含むIgG₁重鎖である。特定の実施形態において、本抗体はアンタゴニスト性である。

20

30

【0304】

ある具体的な態様において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載されるとおりの抗体は、本明細書に記載されるとおりの、OX40に結合する第1の抗原結合ドメインと、本明細書に記載されるとおりの、ヒト免疫細胞が発現する抗原に特異的に結合しない第2の抗原結合ドメイン（即ち、第2の抗原結合ドメインはヒト免疫細胞が発現するOX40又は任意の他の抗原に結合しない）とを含む。特定の実施形態において、第1及び第2の抗原結合ドメインは相補的CH3ドメインを含む。例えば、相補的CH3ドメインは、それぞれの抗原結合ドメインのホモ二量体化よりむしろ、第1の抗原結合ドメインの重鎖と第2の抗原結合ドメインの重鎖との間のヘテロ二量体化を優先的に生じさせる。相補的CH3ドメインの作製には、限定はされないが、Ridgway JBB et al., (1996) Protein Eng 9(7): 617-621及びMerchant M et al.に記載されるとおりのノブイントゥホール技術を含め、当業者に公知の任意の技法を用いることができる。例えば、ノブイントゥホール技術では、第1のCH3ドメインにおいて小さいアミノ酸をより大きいアミ

40

50

ノ酸（即ち、「ノブ」）に置き換え、第2のCH3ドメインにおいて大きいアミノ酸をより小さいアミノ酸（即ち、「ホール」）に置き換える。従って、これらのCH3ドメインを含むポリペプチドがノブとホールとの相互作用に基づき二量体化することができる。特定の実施形態において、抗原結合ドメインの一方が、T366Y及びT366Wからなる群から選択される置換を含む第1のIgG₁ CH3ドメインを含み、他方の抗原結合ドメインが、Y407T、T366S、L368A、及びY407Vからなる群から選択される置換を含む第2のIgG₁ CH3ドメインを含む。特定の実施形態において、第2の抗原結合ドメインが結合する抗原は、天然でヒト免疫細胞によって発現されないものである。特定の実施形態において、免疫細胞は、T細胞（例えば、CD4+ T細胞又はCD8+ T細胞）、B細胞、ナチュラルキラー細胞、樹状細胞、マクロファージ、及び好酸球からなる群から選択される。特定の実施形態において、OX40に特異的に結合する抗原結合ドメインは第1のVHと第1のVLとを含み、且つ第2の抗原結合ドメインは第2のVHと第2のVLとを含む。特定の実施形態において、OX40に特異的に結合する抗原結合ドメインは第1の重鎖と第1の軽鎖とを含み、且つ第2の抗原結合ドメインは第2の重鎖と第2の軽鎖とを含む。特定の実施形態において、本抗体は、第2の抗原結合ドメインが非反応性の試料又は対象（即ち、第2の抗原結合ドメインが結合する抗原がその試料又は対象に存在しない）に投与されるものである。特定の実施形態において、第2の抗原結合ドメインは、OX40を発現する細胞上の抗原に特異的に結合しない（例えば、第2の抗原結合ドメインは、OX40を発現する細胞が天然に発現する抗原に結合しない）。特定の実施形態において、本抗体は、試料又は対象において一価抗体（即ち、抗OX40一価抗体）として機能し、ここで、抗体の第1の抗原結合ドメインはOX40に結合し、一方、第2の抗原結合ドメインは試料又は対象において非反応性である（例えば、第2の抗原結合ドメインが結合する抗原がその試料又は対象に存在しないため）。特定の実施形態において、第2の抗原結合ドメインは非ヒト抗原（即ち、他の生物において発現し、ヒトでは発現しない抗原）に特異的に結合する。特定の実施形態において、第2の抗原結合ドメインはウイルス抗原に特異的に結合する。特定の実施形態において、ウイルス抗原は、ヒトに感染しないウイルス（即ち、非ヒトウイルス）のものである。特定の実施形態において、このウイルス抗原はヒト免疫細胞に存在しない（例えば、ヒト免疫細胞は、そのウイルス抗原に関連するウイルスに非感染性である）。特定の実施形態において、ウイルス抗原はHIV抗原である。特定の実施形態において、第2の抗原結合ドメインはニワトリアルブミン又は鶏卵リゾチームに特異的に結合する。特定の実施形態において、第2の抗原結合ドメインは、野生型細胞（例えば、野生型ヒト細胞）が発現しない（即ち、それに存在しない）抗原に特異的に結合する。特定の実施形態において、第2の抗原結合ドメインは、正常細胞（例えば、野生型細胞、例えば野生型ヒト細胞）が発現しない（即ち、それに存在しない）腫瘍関連抗原に特異的に結合する。特定の実施形態において、腫瘍関連抗原は、ヒト細胞が発現しない（即ち、それに存在しない）。特定の実施形態において、第2の抗原結合ドメインの重鎖定常領域は、N297A、N297Q、D265A、C127S、S228P、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される突然変異を含む。特定の実施形態において、この突然変異は、N297A、N297Q、D265A、又はこれらの組み合わせである。特定の実施形態において、この突然変異はC127Sである。特定の実施形態において、この突然変異はS228Pである。特定の実施形態において、第2の抗原結合ドメインの重鎖定常領域は、D265A、P329A、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される突然変異を含む。特定の実施形態において、第1及び第2の抗原結合ドメインの重鎖定常領域は、免疫グロブリンIgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、及びIgA₂からなる群から選択される。特定の実施形態において、免疫グロブリンはヒト免疫グロブリンである。特定の実施形態において、第1及び第2の抗原結合ドメインの重鎖定常領域は同じアイソタイプである。特定の実施形態において、第1の抗原結合ドメインが第1のIgG₁重鎖定常領域を含み、且つ第2の抗原結合ドメインが第2のIgG₁重鎖定常領域を含み、ここで、第1及び第2の重鎖定常領域は、N297A、N297Q、D265A、又はこれらの組み合わせからなる群

10

20

30

40

50

から選択される同一の突然変異を含む。特定の実施形態において、第1の抗原結合ドメインが第1のIgG₁重鎖定常領域を含み、且つ第2の抗原結合ドメインが第2のIgG₁重鎖定常領域を含み、ここで、第1及び第2の重鎖定常領域は、D265A、P329A、又はこれらの組み合わせからなる群から選択される同一の突然変異を含む。特定の実施形態において、第1の抗原結合ドメインが第1のIgG₂重鎖定常領域を含み、且つ第2の抗原結合ドメインが第2のIgG₂重鎖定常領域を含み、ここで、第1及び第2の重鎖定常領域はC127S突然変異を含む。特定の実施形態において、第1の抗原結合ドメインが第1のIgG₄重鎖定常領域を含み、且つ第2の抗原結合ドメインが第2のIgG₄重鎖定常領域を含み、ここで、第1及び第2の重鎖定常領域はS228P突然変異を含む。特定の実施形態において、本抗体はアンタゴニスト性である。

10

【0305】

ある具体的な態様において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載されるとおりの抗体は、第1の重鎖及び第1の軽鎖と、及び第2の重鎖又はその断片とを含む、OX40に特異的に結合する第1の抗原結合ドメインを含む。特定の実施形態において、第1及び第2の重鎖、又は第2の重鎖の断片は、相補的CH3ドメインを含む。例えば、相補的CH3ドメインは、それぞれの重鎖のホモ二量体化よりむしろ、重鎖間におけるヘテロ二量体化を優先的に生じさせる。特定の実施形態において、重鎖の一方が、T366Y及びT366Wからなる群から選択される置換を含む第1のIgG₁ CH3ドメインを含み、且つ他方の重鎖が、Y407T、T366S、L368A、Y407Vからなる群から選択される置換を含む第2のIgG₁ CH3ドメインを含む。一部の実施形態において、第2の重鎖の断片はFc断片である。特定の実施形態において、第2の重鎖又はその断片は、非ヒト抗原（即ち、他の生物で発現し、ヒトでは発現しない抗原）に特異的に結合する抗原結合ドメインのものである。特定の実施形態において、第2の重鎖又はその断片は、ウイルス抗原に特異的に結合する抗原結合ドメインのものである。特定の実施形態において、このウイルス抗原はヒト免疫細胞に存在しない（例えば、ヒト免疫細胞は、そのウイルス抗原に関連するウイルスに非感染性である）。特定の実施形態において、ウイルス抗原はHIV抗原である。特定の実施形態において、第2の重鎖又はその断片は、ニワトリアルブミン又は鶏卵リゾチームに特異的に結合する抗原結合ドメインのものである。特定の実施形態において、第2の重鎖又はその断片は、野生型細胞（例えば、野生型ヒト細胞）が発現しない（即ち、それに存在しない）抗原に特異的に結合する抗原結合ドメインのものである。特定の実施形態において、第2の重鎖又はその断片は、正常細胞（例えば、野生型細胞、例えば野生型ヒト細胞）が発現しない（即ち、それに存在しない）腫瘍関連抗原に特異的に結合する抗原結合ドメインのものである。特定の実施形態において、腫瘍関連抗原は、ヒト細胞が発現しない（即ち、それに存在しない）。特定の実施形態において、第2の重鎖又はその断片は、N297A、N297Q、D265A、C127S、S228P、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される突然変異を含む。特定の実施形態において、この突然変異は、N297A、N297Q、D265A、又はこれらの組み合わせである。特定の実施形態において、この突然変異はC127Sである。特定の実施形態において、この突然変異はS228Pである。特定の実施形態において、第2の重鎖又はその断片は、D265A、P329A、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される突然変異を含む。特定の実施形態において、第1及び第2の重鎖定常領域は、免疫グロブリンIgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、及びIgA₂からなる群から選択される。特定の実施形態において、免疫グロブリンはヒト免疫グロブリンである。特定の実施形態において、第1及び第2の重鎖定常領域は同じアイソタイプである。特定の実施形態において、第1及び第2の重鎖定常領域はIgG₁定常領域であり、N297A、N297Q、D265A、又はこれらの組み合わせからなる群から選択される同一の突然変異を含む。特定の実施形態において、第1及び第2の重鎖定常領域はIgG₁定常領域であり、D265A、P329A、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される同一の突然変異を含む。特定の実施形態において、第1及び第2の重鎖定常領域はIgG₂重鎖定常領域であり、C127S突然変

20

30

40

50

異を含む。特定の実施形態において、第1及び第2の重鎖定常領域はIgG₄重鎖定常領域であり、S228P突然変異を含む。特定の実施形態において、本抗体はアンタゴニスト性である。

【0306】

OX40（例えば、ヒトOX40）に特異的に結合する抗原結合ドメインと第2の抗原結合ドメイン又は第2の重鎖若しくはその断片のいずれかを含む抗体に関する上記の態様において、抗原結合ドメインは、本明細書に記載される任意の抗OX40配列を含み得る。特定の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に特異的に結合する抗原結合ドメインは、(a)GSAMH（配列番号4）のアミノ酸配列を含むVH相補性決定領域（CDR）1と、RIRSKANSYATAYAAASVKG（配列番号5）のアミノ酸配列を含むVH-CDR2と、GIYDSSGYDY（配列番号6）のアミノ酸配列を含むVH-CDR3とを含む第1の重鎖可変ドメイン（VH）と、(b)RSSQSL LHSNGYNYLD（配列番号1）のアミノ酸配列を含むVL-CDR1と、LGSNRAS（配列番号2）のアミノ酸配列を含むVL-CDR2と、MQALQTPLT（配列番号3）のアミノ酸配列を含むVL-CDR3とを含む第1の軽鎖可変ドメイン（VL）を含む。特定の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に特異的に結合する抗原結合ドメインは、配列番号16のアミノ酸配列を含むVH及び配列番号15のアミノ酸配列を含むVLを含む抗体とOX40（例えば、ヒトOX40）の同じエピトープに特異的に結合する。特定の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に特異的に結合する抗原結合ドメインは、配列番号55のヒトOX40配列への結合と比較して、N60A、R62A、R80A、L88A、P93A、P99A、P115A、及びこれらの組み合わせからなる群から選択されるアミノ酸突然変異の存在を除いて、配列番号55と同一のタンパク質への結合の低下又は欠如を呈する。特定の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に特異的に結合する抗原結合ドメインはVHとVLとを含み、このVHは配列番号16のアミノ酸配列を含む。特定の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に特異的に結合する抗原結合ドメインはVHとVLとを含み、このVLは配列番号15のアミノ酸配列を含む。特定の実施形態において、OX40に結合する抗原結合ドメインは、配列番号16のアミノ酸配列と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、又は99%同一のアミノ酸配列を含むVHを含む。特定の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に特異的に結合する抗原結合ドメインは、配列番号16のアミノ酸配列を含むVHを含む。特定の実施形態において、OX40に結合する抗原結合ドメインは、ヒトIGHV3-73生殖系列配列（例えば、IGHV3-73*01、例えば配列番号19のアミノ酸配列を有するもの）に由来するアミノ酸配列を含むVHを含む。特定の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に特異的に結合する抗原結合ドメインは、配列番号15のアミノ酸配列と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、又は99%同一のアミノ酸配列を含むVLを含む。特定の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に特異的に結合する抗原結合ドメインは、アミノ酸配列の配列番号3を含むVL-CDR3を含む。特定の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に特異的に結合する抗原結合ドメインは、配列番号15のアミノ酸配列を含むVLを含む。特定の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に特異的に結合する抗原結合ドメインは、配列番号20のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。特定の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に特異的に結合する抗原結合ドメインは、配列番号50のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。特定の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に特異的に結合する抗原結合ドメインは、ヒトIGKV2-28生殖系列配列（例えば、IGKV2-28*01、例えば配列番号18のアミノ酸配列を有するもの）に由来するアミノ酸配列を含むVLを含む。特定の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に特異的に結合する抗原結合ドメインは、それぞれ配列番号16及び15に示されるVH及びVL配列を含む。特定の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に特異的に結合する抗原結合ドメインは、配列番号21のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。特定の実施形態に

10

20

30

40

50

において、OX40（例えば、ヒトOX40）に特異的に結合する抗原結合ドメインは、配列番号60のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。特定の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に特異的に結合する抗原結合ドメインは、N297A、N297Q、D265A突然変異からなる群から選択される突然変異、又はこれらの組み合わせを含む。特定の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に特異的に結合する抗原結合ドメインは、D265A、P329A及びこれらの組み合わせからなる群から選択される突然変異を含む。

【0307】

特定の実施形態において、本明細書に記載されるアンタゴニスト抗体は、OX40（例えば、ヒトOX40）に対してアンタゴニスト性である。特定の実施形態において、本抗体はOX40（例えば、ヒトOX40）の活性を不活性化するか、低下させるか、又は阻害する。特定の実施形態において、本抗体はOX40リガンド（例えば、ヒトOX40リガンド）へのOX40（例えば、ヒトOX40）の結合を阻害するか又は低下させる。特定の実施形態において、本抗体はOX40（例えば、ヒトOX40）シグナル伝達を阻害するか又は低下させる。特定の実施形態において、本抗体は、OX40リガンド（例えば、ヒトOX40リガンド）によって誘導されるOX40（例えば、ヒトOX40）活性（例えば、OX40シグナル伝達）を阻害するか又は低下させる。特定の実施形態において、本明細書に記載されるアンタゴニスト抗体はT細胞増殖を阻害するか又は低下させる。特定の実施形態において、本明細書に記載されるアンタゴニスト抗体はT細胞増殖を阻害するか又は低下させる。特定の実施形態において、本明細書に記載されるアンタゴニスト抗体はサイトカイン産生を阻害するか又は低下させる（例えば、刺激されたT細胞によるIL-2、TNF、IFN、IL-4、IL-10、IL-13、又はこれらの組み合わせの産生を阻害するか又は低下させる）。特定の実施形態において、本明細書に記載されるアンタゴニスト抗体はSEA刺激T細胞によるIL-2産生を阻害するか又は低下させる。特定の実施形態において、本明細書に記載されるアンタゴニスト抗体はOX40とOX40Lとの相互作用を遮断する（例えば、OX40LとOX40との互いの結合を遮断し、例えばヒトOX40リガンドとヒトOX40との結合を遮断する）。

【0308】

特定の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載されるアンタゴニスト抗体は、本明細書に記載される及び/又は当業者に公知の方法によって評価されるとおり、いかなる抗体も伴わないか又は無関係の抗体（例えば、OX40に免疫特異的に結合しない抗体）を伴う場合のOX40（例えば、ヒトOX40）活性と比べてOX40（例えば、ヒトOX40）活性を少なくとも約1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、又は100倍減少させる。特定の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載されるアンタゴニスト抗体は、本明細書に記載される及び/又は当業者に公知の方法によって評価されるとおり、いかなる抗体も伴わないか又は無関係の抗体（例えば、OX40に免疫特異的に結合しない抗体）を伴う場合のOX40（例えば、ヒトOX40）活性と比べてOX40（例えば、ヒトOX40）活性を少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、又は99%減少させる。OX40（例えば、ヒトOX40）活性の非限定的な例には、OX40（例えば、ヒトOX40）シグナル伝達、細胞増殖、細胞生存、及びサイトカイン産生（例えば、IL-2、TNF、IFN、IL-4、IL-10、及び/又はIL-13）が含まれ得る。特定の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載されるアンタゴニスト抗体は、OX40（例えば、ヒトOX40）活性を阻害するか、低下させるか、又は不活性化する。具体的な実施形態において、OX40活性は、以下の実施例に記載されるとおり評価される。

【0309】

特定の態様において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載されるアンタゴニスト抗体は、OX40を発現し且つOX40シグナル伝達に応答する細胞（例えば、T細胞など、OX40刺激及びOX40シグナル伝達に応答して増殖する細胞）の細胞増殖を阻害するか、低下させるか、又は不活性化する。細胞増殖アッセイは、³H-チミジン取込みアッセイ、BrdU取込みアッセイ、又は以下の実施例に記載されるようなCFSEアッセイなど、当該技術分野において記載されており、当業者は容易に実施し得る。具体的な実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載されるアンタゴニスト抗体の存在下でT細胞マイトジェン又はT細胞受容体複合体刺激剤（例えば、フィットヘマグルチニン（PHA）及び/又はホルポールミリスレートアセテート（PMA）、又はTCR複合体刺激抗体、例えば抗CD3抗体及び抗CD28抗体）によって刺激したT細胞（例えば、CD4⁺又はCD8⁺エフェクターT細胞）は、フィットヘマグルチニン（PHA）及び/又はホルポールミリスレートアセテート（PMA）、又はTCR複合体刺激抗体、例えば抗CD3抗体及び抗CD28抗体などのT細胞マイトジェン又はT細胞受容体複合体刺激剤による刺激のみのT細胞と比べて細胞増殖が減少する。

10

【0310】

特定の態様において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載されるアンタゴニスト抗体は、細胞（例えば、CD4及びCD8エフェクターT細胞などのT細胞）の生存を減少させる。具体的な実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載されるアンタゴニスト抗体の存在下でT細胞マイトジェン又はT細胞受容体複合体刺激剤（例えば、フィットヘマグルチニン（PHA）及び/又はホルポールミリスレートアセテート（PMA）、又はTCR複合体刺激抗体、例えば抗CD3抗体及び抗CD28抗体）によって刺激したT細胞（例えば、CD4⁺又はCD8⁺エフェクターT細胞）は、T細胞マイトジェンによる刺激のみのT細胞と比べて生存が減少する。細胞生存アッセイについては当該技術分野において記載されており（例えば、トリパンプルー色素排除アッセイ）、当業者は容易に実施し得る。

20

【0311】

具体的な実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載されるアンタゴニスト抗体は、細胞生存（例えば、CD4及びCD8エフェクターT細胞などのT細胞）を、本明細書に記載される又は当業者に公知の方法（例えば、トリパンプルー色素排除アッセイ）によって評価されるとおり、いかなる抗体も伴わないか又は無関係の抗体（例えば、OX40に免疫特異的に結合しない抗体）を伴う場合の少なくとも約1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、又は100倍減少させる。具体的な実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載されるアンタゴニスト抗体は、本明細書に記載される又は当業者に公知の方法（例えば、トリパンプルー色素排除アッセイ）によって評価されるとおり、いかなる抗体も伴わないか又は無関係の抗体（例えば、OX40に免疫特異的に結合しない抗体）を伴う場合のOX40（例えば、ヒトOX40）活性と比べて細胞生存（例えば、CD4及びCD8エフェクターT細胞などのT細胞）を少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、又は99%減少させる。

30

40

【0312】

一部の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載されるアンタゴニスト抗体の存在下でT細胞マイトジェン（例えば、抗CD3抗体又はホルポールエステル）によって刺激したT細胞（例えば、CD4⁺又はCD8⁺エフェクターT細胞）は、本明細書に記載される又は当業者に公知の方法（例えば、

50

トリパンブルー色素排除アッセイ)によって評価されるとおり、T細胞マイトジェン又はT細胞受容体複合体刺激剤(例えば、フィットヘマグルチニン(PHA)及び/又はホルボールミリステートアセテート(PMA)、又はTCR複合体刺激抗体、例えば抗CD3抗体及び抗CD28抗体)による刺激のみのT細胞と比べて細胞生存を少なくとも約1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、又は100倍減少させる。一部の実施形態において、OX40(例えば、ヒトOX40)に免疫特異的に結合する本明細書に記載されるアンタゴニスト抗体の存在下でT細胞マイトジェン又はT細胞受容体複合体刺激剤(例えば、フィットヘマグルチニン(PHA)及び/又はホルボールミリステートアセテート(PMA)、又はTCR複合体刺激抗体、例えば抗CD3抗体及び抗CD28抗体)によって刺激したT細胞(例えば、CD4⁺又はCD8⁺エフェクターT細胞)は、本明細書に記載される又は当業者に公知の方法(例えば、トリパンブルー色素排除アッセイ)によって評価されるとおり、T細胞マイトジェンによる刺激のみのT細胞と比べて細胞生存を少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、又は99%減少させる。

【0313】

特定の実施形態において、OX40(例えば、ヒトOX40)に免疫特異的に結合する本明細書に記載されるアンタゴニスト抗体は、エフェクターT細胞(例えば、CD4⁺及びCD8⁺エフェクターT細胞)を活性化誘導性細胞死から保護しない。

【0314】

具体的な実施形態において、OX40(例えば、ヒトOX40)に免疫特異的に結合する本明細書に記載されるアンタゴニスト抗体は、本明細書に記載される(以下の実施例を参照されたい)又は当業者に公知の方法によって評価されるとおり、いかなる抗体も伴わないか又は無関係の抗体(例えば、OX40に免疫特異的に結合しない抗体)を伴う場合のOX40L(例えば、ヒトOX40L)刺激の存在下又は非存在下でのサイトカイン産生と比べてサイトカイン産生(例えば、IL-2、TNF-、IFN-、IL-4、IL-10、及び/又はIL-13)を少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、又は99%阻害するか、低下させるか、又は不活性化する。具体的な実施形態において、OX40(例えば、ヒトOX40)に免疫特異的に結合する本明細書に記載されるアンタゴニスト抗体は、本明細書に記載される(実施例2など、以下の実施例を参照されたい)又は当業者に公知の方法によって評価されるとおり、いかなる抗体も伴わないか又は無関係の抗体(例えば、OX40に免疫特異的に結合しない抗体)を伴う場合のOX40L(例えば、ヒトOX40L)刺激の存在下又は非存在下でのサイトカイン産生と比べてサイトカイン産生(例えば、IL-2、TNF-、IFN-、IL-4、IL-10、及び/又はIL-13)を少なくとも約1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、又は100倍阻害するか又は低下させる。

【0315】

特定の実施形態において、OX40(例えば、ヒトOX40)に免疫特異的に結合する本明細書に記載されるアンタゴニスト抗体の存在下でT細胞マイトジェン又はT細胞受容体複合体刺激剤(例えば、フィットヘマグルチニン(PHA)及び/又はホルボールミリステートアセテート(PMA)、又はTCR複合体刺激抗体、例えば抗CD3抗体及び抗CD28抗体)によって刺激したT細胞(例えば、CD4⁺又はCD8⁺エフェクターT細胞)は、本明細書に記載される又は当業者に公知の方法(例えば、ELISAアッセイ又は以下の実施例に記載されるとおりのもの)によって評価されるとおり、T細胞マイトジェン又はT細胞受容体複合体刺激剤(例えば、フィットヘマグルチニン(PHA)及び/又

10

20

30

40

50

はホルボールミリスレートアセテート（PMA）、又はTCR複合体刺激抗体、例えば抗CD3抗体及び抗CD28抗体）による刺激のみのT細胞と比べてサイトカイン産生（例えば、IL-2、TNF- α 、IFN- γ 、IL-4、IL-10、及び/又はIL-13）が少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、又は99%減少する。一部の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載されるアンタゴニスト抗体の存在下でT細胞マイトジェン又はT細胞受容体複合体刺激剤（例えば、フィトヘマグルチニン（PHA）及び/又はホルボールミリスレートアセテート（PMA）、又はTCR複合体刺激抗体、例えば抗CD3抗体及び抗CD28抗体）によって刺激したT細胞（例えば、CD4⁺又はCD8⁺エフェクターT細胞）は、本明細書に記載される又は当業者に公知の方法（例えば、ELISAアッセイ又は以下の実施例に記載されるとおりのもの）によって評価されるとおり、T細胞マイトジェン又はT細胞受容体複合体刺激剤（例えば、フィトヘマグルチニン（PHA）及び/又はホルボールミリスレートアセテート（PMA）、又はTCR複合体刺激抗体、例えば抗CD3抗体及び抗CD28抗体）による刺激のみのT細胞と比べてサイトカイン産生（例えば、IL-2、TNF- α 、IFN- γ 、IL-4、IL-10、及び/又はIL-13）が少なくとも約1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、又は100倍減少する。

10

20

【0316】

具体的な実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載されるアンタゴニスト抗体は、本明細書に記載される（実施例2など、以下の実施例を参照されたい）又は当業者に公知の方法によって評価されるとおり、いかなる抗体も伴わないか又は無関係の抗体（例えば、OX40に免疫特異的に結合しない抗体）を伴う場合のIL-2産生と比べてブドウ球菌（*Staphylococcus*）エンテロトキシンA（SEA）刺激に应答したIL-2産生を少なくとも約1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、又は100倍減少させる。

30

【0317】

特定の実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載されるアンタゴニスト抗体の存在下でブドウ球菌（*Staphylococcus*）エンテロトキシンA（SEA）刺激によって刺激したT細胞（例えば、CD4⁺又はCD8⁺T細胞）は、本明細書に記載される又は当業者に公知の方法（例えば、ELISAアッセイ又は以下の実施例に記載されるとおりのもの）によって評価されるとおり、SEAによる刺激のみのT細胞と比べてIL-2産生が少なくとも約1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、又は100倍減少する。

40

【0318】

抗OX40抗体は、検出可能標識又は物質に融合又はコンジュゲート（例えば、共有結合的又は非共有結合的に連結）されてもよい。検出可能標識又は物質の例としては、グルコースオキシダーゼなどの酵素標識；ヨウ素（¹²⁵I、¹²¹I）、炭素（¹⁴C）、硫黄（³⁵S）、トリチウム（³H）、インジウム（¹²¹In）、及びテクネチウム（⁹⁹Tc）などの放射性同位元素；ルミノールなどの発光標識；及びフルオレセイン及びローダミンなどの蛍光標識、及びビオチンが挙げられる。かかる標識抗体を使用すると、OX40（例えば、ヒトOX40）タンパク質を検出することができる。例えば、以下の第5.5.2節を参照されたい。

【0319】

50

5.3 抗体産生

OX40 (例えば、ヒトOX40)に免疫特異的に結合する抗体は、当該技術分野において公知の任意の抗体合成方法、例えば、化学合成によるか、又は組換え発現技術によって作製することができる。本明細書に記載される方法は、特に指示されない限り、分子生物学、微生物学、遺伝子解析、組換えDNA、有機化学、生化学、PCR、オリゴヌクレオチド合成及び修飾、核酸ハイブリダイゼーション、及び当該技術分野の技能の範囲内にある関連分野の従来技術を用いる。これらの技術については、例えば、本明細書に引用される参考文献に記載されており、文献に十全に説明されている。例えば、Maniatis T et al., (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J et al., (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J et al., (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel FM et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1987及び年次更新版); *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons (1987及び年次更新版) Gait (ed.) (1984) *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press; Eckstein (ed.) (1991) *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, IRL Press; Birren B et al., (eds.) (1999) *Genome Analysis: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Pressを参照されたい。

10

20

【0320】

具体的な実施形態において、本明細書に記載される抗体は、DNA配列の例えば合成、遺伝子操作による作成に関わる任意の手段によって調製され、発現し、作成され又は単離された抗体 (例えば、組換え抗体) である。特定の実施形態において、かかる抗体は、インビボで動物又は哺乳類 (例えば、ヒト) の抗体生殖細胞系列レパトリー内に天然には存在しない配列 (例えば、DNA配列又はアミノ酸配列) を含む。

30

【0321】

特定の態様において、本明細書には、OX40 (例えば、ヒトOX40) に免疫特異的に結合する抗体を作成する方法であって、本明細書に記載される細胞又は宿主細胞を培養するステップを含む方法が提供される。特定の態様において、本明細書には、OX40 (例えば、ヒトOX40) に免疫特異的に結合する抗体を作成する方法であって、本明細書に記載される細胞又は宿主細胞 (例えば、本明細書に記載される抗体をコードするポリヌクレオチドを含む細胞又は宿主細胞) を使用して抗体を発現させる (例えば、組換え発現させる) ステップを含む方法が提供される。詳細な実施形態において、細胞は単離細胞である。詳細な実施形態において、細胞に外因性ポリヌクレオチドが導入される。詳細な実施形態において、本方法は、細胞又は宿主細胞から得られた抗体を精製するステップを更に含む。

40

【0322】

ポリクローナル抗体を作製する方法は、当該技術分野において公知である (例えば、*Short Protocols in Molecular Biology*, (2002) 5th Ed., Ausubel FM et al., eds., John Wiley and Sons, New YorkのChapter 11を参照されたい)。

50

【0323】

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ技術、組換え技術、及びファージディスプレイ技術の使用、又はこれらの組み合わせを含めた、当該技術分野において公知の多様な技法を用いて調製することができる。例えば、モノクローナル抗体は、当該技術分野において公知のもの及び例えば、Harlow E & Lane D, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling G J et al., in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981) に教示されるものを含め、ハイブリドーマ法を用いて作製することができる。用語「モノクローナル抗体」は、本明細書で使用されるとき、ハイブリドーマ技術によって作製された抗体に限定されない。例えば、モノクローナル抗体は、本明細書に記載される抗体を外因的に発現する宿主細胞から組換えによって作製することができる。

10

【0324】

具体的な実施形態において、「モノクローナル抗体」は、本明細書で使用されるとき、単一細胞（例えば、組換え抗体を産生するハイブリドーマ又は宿主細胞）によって産生された抗体であり、この抗体は、例えば、ELISA又は当該技術分野において公知の若しくは本明細書に提供される実施例における他の抗原結合又は競合結合アッセイによって決定するとき、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する。詳細な実施形態において、モノクローナル抗体はキメラ抗体又はヒト化抗体であり得る。特定の実施形態において、モノクローナル抗体は一価抗体又は多価（例えば、二価）抗体である。特定の実施形態において、モノクローナル抗体はFab断片又はF(ab')₂断片であり得る。本明細書に記載されるモノクローナル抗体は、例えば、Kohler G & Milstein C (1975) *Nature* 256: 495に記載されるとおりのハイブリドーマ方法によって作成することができ、又は例えば、ファージライブラリから例えば本明細書に記載されるとおりの技法を用いて単離することができる。クローン細胞株及びそれが発現するモノクローナル抗体を調製する他の方法が、当該技術分野において周知である（例えば、Short Protocols in Molecular Biology, (2002) 5th Ed., Ausubel FM et al., 前掲のChapter 11を参照されたい）。

20

30

【0325】

ハイブリドーマ法を用いた特異抗体の作製及びスクリーニング方法はルーチンであり、当該技術分野において周知である。例えば、ハイブリドーマ方法では、マウス又は他の適切な宿主動物、例えば、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、ラット、ハムスター又はマカクザルを免疫して、免疫化に用いたタンパク質（例えば、OX40（例えば、ヒトOX40））に特異的に結合する抗体を産生する又はその産生能を有するリンパ球を誘発する。或いは、リンパ球はインビトロで免疫されてもよい。次にリンパ球を好適な融合剤、例えばポリエチレングリコールを使用して骨髄腫細胞と融合し、ハイブリドーマ細胞を形成する（Goding JW (Ed), *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)）。加えて、RIMMS（反復多重部位免疫化）法を用いて動物を免疫してもよい（Kilpatrick KE et al., (1997) *Hybridoma* 16: 381-9（全体として参照により援用される））。

40

【0326】

一部の実施形態では、マウス（又はラット、サル、ロバ、ブタ、ヒツジ、ハムスター、又はイヌなどの他の動物）を抗原（例えば、OX40（例えば、ヒトOX40））で免疫することができ、免疫応答が検出されると、マウス血清中に例えば抗原に特異的な抗体が検出され、マウス脾臓を採取して脾細胞を単離する。次に脾細胞を周知の技法によって任意の好適な骨髄腫細胞、例えばAmerican Type Culture Collection (ATCC (登録商標)) (Manassas, VA) から入手可能な細胞

50

株 S P 2 0 の細胞と融合させてハイブリドーマを形成する。ハイブリドーマを選択し、限界希釈によってクローニングする。特定の実施形態では、免疫化マウスのリンパ節を採取し、NS0 骨髄腫細胞と融合させる。

【0327】

このように調製したハイブリドーマ細胞は、融合していない親骨髄腫細胞の成長又は生存を阻害する1つ以上の物質を好ましくは含有する好適な培養培地に播種して成長させる。例えば、親骨髄腫細胞が酵素ヒポキサンチンデアミンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HGPRT 又は HPR T) を欠いている場合、ハイブリドーマ用の培養培地は、典型的には、ヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジンを含むことになり (HAT 培地)、これらの物質が HGPRT 欠損細胞の成長を妨げる。

10

【0328】

具体的な実施形態では、効率的に融合し、選択の抗体産生細胞による安定した高度な抗体産生を補助し、且つ HAT 培地などの培地に感受性を示す骨髄腫細胞が用いられる。これらの骨髄腫細胞株の中には、NS0 細胞株などのマウス骨髄腫株、又はソーグ研究所分配センター (Salk Institute Cell Distribution Center)、San Diego, CA, USA から入手可能な MOPC - 21 及び M P C - 11 マウス腫瘍に由来するもの、及びアメリカンタイプカルチャーコレクション (American Type Culture Collection)、Rockville, MD, USA から入手可能な SP - 2 又は X 63 - Ag 8 . 653 細胞がある。ヒト骨髄腫及びマウス - ヒトヘテロ骨髄腫細胞株もヒトモノクローナル抗体の産生について記載されている (Kozbor D (1984) J Immunol 133:3001-5; Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

20

【0329】

ハイブリドーマ細胞が成長している培養培地は、OX40 (例えば、ヒト OX40) に特異的なモノクローナル抗体の産生に関してアッセイされる。ハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、当該技術分野において公知の方法、例えば免疫沈降によるか、又はラジオイムノアッセイ (RIA) 若しくは酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) などのインビトロ結合アッセイによって決定される。

30

【0330】

所望の特異性、親和性、及び/又は活性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞の同定後、それらのクローンを限界希釈手順によってサブクローニングし、標準方法によって成長させることができる (Goding JW (Ed), Monoclonal Antibodies: Principles and Practice、前掲)。この目的に好適な培養培地としては、例えば、D-MEM 又は RPMI 1640 培地が挙げられる。加えて、ハイブリドーマ細胞は動物において腹水腫瘍としてインビボで成長させてもよい。

40

【0331】

サブクローンによって分泌されたモノクローナル抗体は、例えば、プロテイン A - セファロース、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、又はアフィニティークロマトグラフィーなどの従来の免疫グロブリン精製手順によって培養培地、腹水、又は血清から好適に分離される。

【0332】

本明細書に記載される抗体は、当業者に公知の任意の技法によって生成することができる。例えば、本明細書に記載される Fab 及び F (a b ')₂ 断片は、パパイン (Fab 断片の作製用) 又はペプシン (F (a b ')₂ 断片の作製用) などの酵素を使用して、免疫グロブリン分子のタンパク質分解切断により作製することができる。Fab 断片は、四量体抗体分子の2本の同一のアームのうち的一方に対応し、重鎖の VH 及び CH1 ドメイ

50

ンと対をなす完全な軽鎖を含有する。F (a b ')₂断片は、ヒンジ領域でジスルフィド結合によって連結した、四量体抗体分子のうちの2本の抗原結合アームを含有する。

【0333】

更に、本明細書に記載される抗体はまた、当該技術分野において公知の様々なファージディスプレイ方法を用いて生成することもできる。ファージディスプレイ方法では、タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を有するファージ粒子の表面上にタンパク質を提示する。詳細には、VH及びVLドメインをコードするDNA配列を動物cDNAライブラリ(例えば、罹患組織のヒト又はマウスcDNAライブラリ)から増幅する。VH及びVLドメインをコードするDNAをscFvリンカーと共にPCRによって組み換え、ファージミドベクターにクローニングする。このベクターを大腸菌(E. coli)に電気穿孔処理し、この大腸菌(E. coli)をヘルパーファージに感染させる。これらの方法に用いられるファージは、典型的にはfd及びM13を含む繊維状ファージであり、VH及びVLドメインは通常ファージ遺伝子III又は遺伝子VIIのいずれかと組換えにより融合する。抗原、例えば標識抗原又は固体表面若しくはビーズに結合し若しくは捕捉された抗原を用いて、特定の抗原に結合する抗体を発現するファージを選択又は同定することができる。本明細書に記載される抗体の作成に用いることのできるファージディスプレイ方法の例としては、Brinkman U et al., (1995) J Immunol Methods 182:41-50; Ames RS et al., (1995) J Immunol Methods 184:177-186; Kettleborough CA et al., (1994) Eur J Immunol 24:952-958; Persic L et al., (1997) Gene 187:9-18; Burton DR & Barbas CF (1994) Advan Immunol 57:191-280; PCT出願PCT/英国特許第91/001134号明細書; 国際公開第90/02809号パンフレット、同第91/10737号パンフレット、同第92/01047号パンフレット、同第92/18619号パンフレット、同第93/11236号パンフレット、同第95/15982号パンフレット、同第95/20401号パンフレット、及び同第97/13844号パンフレット; 及び米国特許第5,698,426号明細書、同第5,223,409号明細書、同第5,403,484号明細書、同第5,580,717号明細書、同第5,427,908号明細書、同第5,750,753号明細書、同第5,821,047号明細書、同第5,571,698号明細書、同第5,427,908号明細書、同第5,516,637号明細書、同第5,780,225号明細書、同第5,658,727号明細書、同第5,733,743号明細書、及び同第5,969,108号明細書に開示されるものが挙げられる。

【0334】

上記の参考文献に記載されるとおり、ファージ選択後、ファージから抗体コード領域を単離し、それを使用してヒト抗体を含めた抗体を生成し、例えば、以下に記載するとおり、哺乳類細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母、及び細菌を含めた任意の所望の宿主において発現させることができる。Fab、Fab'及びF(a b')₂断片などの抗体を組み換えにより作製する技法も、国際公開第92/22324号パンフレット; Mullina x RL et al., (1992) BioTechniques 12(6):864-9; Sawai H et al., (1995) Am J Reprod Immunol 34:26-34; 及びBetter M et al., (1988) Science 240:1041-1043に開示されるものなど、当該技術分野において公知の方法を用いて利用することができる。

【0335】

一態様において、抗体の生成には、VH又はVLヌクレオチド配列、制限部位、及び制限部位を保護するフランキング配列を含むPCRプライマーを使用して鋳型、例えばscFvクローンからVH又はVL配列を増幅し得る。当業者に公知のクローニング技術を利用して、VH定常領域を発現するベクターにこのPCR増幅したVHドメインをクローニングすることができ、及び例えばヒト又は定常領域など、VL定常領域を発現するべ

クターにこのPCR増幅したVLDメインをクローニングすることができる。VH及びVLDメインはまた、必要な定常領域を発現する1つのベクターにクローニングすることもできる。次に、当業者に公知の技法を用いて、この重鎖転換ベクター及び軽鎖転換ベクターを細胞株にコトランスフェクトすると、抗体、例えばIgGを発現する安定した又は一過性の細胞株が生成される。

【0336】

キメラ抗体は、抗体の異なる部分が異なる免疫グロブリン分子に由来する分子である。例えば、キメラ抗体は、ヒト抗体の定常領域に融合したマウス又はラットモノクローナル抗体の可変領域を含有し得る。キメラ抗体を作製する方法は当該技術分野において公知である。例えば、Morrisson SL (1985) Science 229:1202-7; Oi VT & Morrisson SL (1986) BioTechniques 4:214-221; Gillies SD et al., (1989) J Immunol Methods 125:191-202; 及び米国特許第5,807,715号明細書、同第4,816,567号明細書、同第4,816,397号明細書、及び同第6,331,415号明細書を参照されたい。

10

【0337】

ヒト化抗体は所定の抗原との結合能を有し、実質的にヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有するフレームワーク領域と実質的に非ヒト免疫グロブリン(例えば、マウス免疫グロブリン)のアミノ酸配列を有するCDRとを含むものである。詳細な実施形態において、ヒト化抗体はまた、典型的にはヒト免疫グロブリンのものである免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部も含む。抗体はまた、重鎖のCH1、ヒンジ、CH2、CH3、及びCH4領域も含み得る。ヒト化抗体は、IgM、IgG、IgD、IgA及びIgEを含めた任意の免疫グロブリンクラス、及びIgG₁、IgG₂、IgG₃及びIgG₄を含めた任意のアイソタイプから選択することができる。ヒト化抗体は、限定はされないが、CDRグラフティング(欧州特許第239400号明細書;国際公開第91/09967号パンフレット;及び米国特許第5,225,539号明細書、同第5,530,101号明細書、及び同第5,585,089号明細書)、ペニヤリング又はリサーフェシング(欧州特許第592106号明細書及び欧州特許第519596号明細書; Padlan EA (1991) Mol Immunol 28(4/5):489-498; Studnicka GM et al., (1994) Prot Engineering 7(6):805-814; 及び Roguska MA et al., (1994) PNAS 91:969-973)、チェインシャッフリング(米国特許第5,565,332号明細書)、及び例えば、米国特許第6,407,213号明細書、米国特許第5,766,886号明細書、国際公開第93/17105号パンフレット; Tan P et al., (2002) J Immunol 169:1119-25; Caldas C et al., (2000) Protein Eng. 13(5):353-60; Morea V et al., (2000) Methods 20(3):267-79; Baca M et al., (1997) J Biol Chem 272(16):10678-84; Roguska MA et al., (1996) Protein Eng 9(10):895-904; Couto JR et al., (1995) Cancer Res. 55(23 Supp):5973s-5977s; Couto JR et al., (1995) Cancer Res 55(8):1717-22; Sandhu JS (1994) Gene 150(2):409-10及びPedersen JT et al., (1994) J Mol Biol 235(3):959-73に開示される技法を含め、当該技術分野において公知の種々の技法を用いて作製することができる。米国特許出願公開第2005/0042664 A1号明細書(2005年2月24日)(参照により全体として本明細書に援用される)も参照されたい。

20

30

40

【0338】

シングルドメイン抗体、例えば軽鎖を欠く抗体は、当該技術分野において周知の方法に

50

よって作製することができる。Riechmann L & Muyldermans S (1999) J Immunol 231: 25-38; Nuttall SD et al., (2000) Curr Pharm Biotechnol 1(3): 253-263; Muyldermans S, (2001) J Biotechnol 74(4): 277-302; 米国特許第6,005,079号明細書; 及び国際公開第94/04678号パンフレット、同第94/25591号パンフレット及び同第01/44301号パンフレットを参照されたい。

【0339】

更に、OX40抗原に免疫特異的に結合する抗体は、次に、当業者に周知の技法を用いて、抗原を「模倣」する抗イディオタイプ抗体の生成に利用することができる。(例えば、Greenspan NS & Bona CA (1989) FASEB J 7(5): 437-444; 及びNissinoff A (1991) J Immunol 147(8): 2429-2438を参照されたい)。

10

【0340】

詳細な実施形態において、本明細書に記載される抗OX40抗体とOX40(例えば、ヒトOX40)の同じエピトープに結合する本明細書に記載される抗体は、ヒト抗体である。詳細な実施形態において、本明細書に記載される抗体(例えば、pab1949又はpab2044)のいずれか1つがOX40(例えば、ヒトOX40)に結合するのを(例えば、用量依存的様式で)競合的に阻止する本明細書に記載される抗体は、ヒト抗体である。ヒト抗体は、当該技術分野において公知の任意の方法を用いて作製することができる。例えば、機能性の内因性免疫グロブリンの発現能を有しないが、ヒト免疫グロブリン遺伝子は発現することができるトランスジェニックマウスを用いることができる。詳細には、ヒト重鎖及び軽鎖免疫グロブリン遺伝子複合体をランダムに、又は相同組換えにより、マウス胚性幹細胞に導入することができる。或いは、ヒト重鎖及び軽鎖遺伝子に加えて、ヒト可変領域、定常領域、及び多様性領域をマウス胚性幹細胞に導入することができる。マウス重鎖及び軽鎖免疫グロブリン遺伝子は、相同組換えによるヒト免疫グロブリン遺伝子座の導入とは別に、又はそれと同時に非機能性に行うことができる。詳細には、J_H領域のホモ接合性欠失が内因性抗体産生を妨げる。修飾された胚性幹細胞を拡大し、胚盤胞にマイクロインジェクションしてキメラマウスを作製する。次にこのキメラマウスを繁殖させて、ヒト抗体を発現するホモ接合子孫を作製する。トランスジェニックマウスを通常の方法によって選択の抗原、例えば抗原(例えば、OX40)の全て又は一部で免疫する。これらの免疫したトランスジェニックマウスから、従来のハイブリドーマ法を用いて抗原に特異的なモノクローナル抗体を得ることができる。トランスジェニックマウスが担持するヒト免疫グロブリン遺伝子はB細胞分化中に再配列し、続いてクラススイッチ及び体細胞突然変異を起こす。従って、かかる技法を用いると、治療上有用なIgG、IgA、IgM及びIgE抗体を作製することが可能である。このヒト抗体作製技術の概要については、Lonberg N & Huszar D (1995) Int Rev Immunol 13: 65-93を参照されたい。このヒト抗体及びヒトモノクローナル抗体の作製技術並びにかかる抗体の作製プロトコルの詳細な考察については、例えば、国際公開第98/24893号パンフレット、同第96/34096号パンフレット及び同第96/33735号パンフレット; 及び米国特許第5,413,923号明細書、同第5,625,126号明細書、同第5,633,425号明細書、同第5,569,825号明細書、同第5,661,016号明細書、同第5,545,806号明細書、同第5,814,318号明細書及び同第5,939,598号明細書を参照されたい。ヒト抗体の産生能を有するマウスの例としては、Xenomouse(商標)(Abgenix, Inc.; 米国特許第6,075,181号明細書及び同第6,150,184号明細書)、HuAb-Mouse(商標)(Medarex, Inc./Gen Pharm; 米国特許第5,545,806号明細書及び同第5,569,825号明細書)、Trans Chromo Mouse(商標)(Kirin)及びKM Mouse(商標)(Medarex/Kirin)が挙げられる。

20

30

40

50

【0341】

OX40（例えば、ヒトOX40）に特異的に結合するヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン配列に由来する抗体ライブラリを用いた上記に記載するファージディスプレイ方法を含め、当該技術分野において公知の種々の方法によって作成することができる。米国特許第4,444,887号明細書、同第4,716,111号明細書及び同第5,885,793号明細書；及び国際公開第98/46645号パンフレット、同第98/50433号パンフレット、同第98/24893号パンフレット、同第98/16654号パンフレット、同第96/34096号パンフレット、同第96/33735号パンフレット、及び同第91/10741号パンフレットも参照されたい。

【0342】

一部の実施形態において、ヒト抗体はマウス-ヒトハイブリドーマを用いて作製することができる。例えば、エプスタイン・バーウイルス（EBV）で形質転換したヒト末梢血リンパ球をマウス骨髄腫細胞と融合させて、ヒトモノクローナル抗体を分泌するマウス-ヒトハイブリドーマを作製することができ、これらのマウス-ヒトハイブリドーマをスクリーニングすることにより、標的抗原（例えば、OX40（例えば、ヒトOX40））に免疫特異的に結合するヒトモノクローナル抗体を分泌するものを決定することができる。かかる方法は公知であり、当該技術分野において記載されており、例えば、Shinmoto H et al., (2004) Cytotechnology 46:19-23; Naganawa Y et al., (2005) Human Antibodies 14:27-31を参照されたい。

【0343】

5.3.1 ポリヌクレオチド

特定の態様において、本明細書には、OX40（例えば、ヒトOX40）抗原に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体又はその断片（例えば、可変軽鎖領域及び/又は可変重鎖領域）をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、及びベクター、例えば、宿主細胞（例えば、大腸菌（E. coli）及び哺乳類細胞）における組換え発現用の、かかるポリヌクレオチドを含むベクターが提供される。本明細書には、本明細書に提供される抗体のいずれかをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、並びにかかるポリヌクレオチド配列を含むベクター、例えば、それらを宿主細胞、例えば哺乳類細胞において効率的に発現させるための発現ベクターが提供される。

【0344】

本明細書で使用されるとき、「単離された」ポリヌクレオチド又は核酸分子は、核酸分子の天然の供給源に（例えば、マウス又はヒトに）存在する他の核酸分子から分離されているものである。更に、「単離された」核酸分子、例えばcDNA分子は、他の細胞材料、又は組換え技術によって産生される場合に培養培地を実質的に含まないか、又は化学的に合成される場合に化学的前駆体又は他の化学物質を実質的に含まないものであってよい。例えば、語句「実質的に含まない」には、他の材料、例えば、細胞材料、培養培地、他の核酸分子、化学的前駆体及び/又は他の化学物質が約15%、10%、5%、2%、1%、0.5%、又は0.1%未満（詳細には約10%未満）であるポリヌクレオチド又は核酸分子の調製物が含まれる。具体的な実施形態において、本明細書に記載される抗体をコードする1つ又は複数の核酸分子は単離又は精製されている。

【0345】

詳細な態様では、本明細書には、OX40ポリペプチド（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合し、且つ本明細書に記載されるとおりのアミノ酸配列を含む抗体をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、並びにOX40ポリペプチドへの結合に関してかかる抗体と（例えば、用量依存的様式で）競合するか、又はかかる抗体と同じエピトープに結合する抗体が提供される。

【0346】

特定の態様において、本明細書には、本明細書に記載される抗体の軽鎖又は重鎖をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドが提供される。本ポリヌクレオチドは、

10

20

30

40

50

本明細書に記載される抗体のV L F R及びC D R（例えば、表1及び表3を参照されたい）を含む軽鎖をコードするヌクレオチド配列を含み得る。本ポリヌクレオチドは、本明細書に記載される抗体のV H F R及びC D R（例えば、表2及び表4を参照されたい）を含む重鎖をコードするヌクレオチド配列を含み得る。具体的な実施形態において、本明細書に記載されるポリヌクレオチドは、配列番号15に示されるアミノ酸配列を含むV Lドメインをコードする。具体的な実施形態において、本明細書に記載されるポリヌクレオチドは、配列番号16に示されるアミノ酸配列を含むV Hドメインをコードする。

【0347】

詳細な実施形態において、本明細書には、3つのV L鎖C D Rを含む、例えば、本明細書に記載される抗体のいずれか1つのV L C D R 1、V L C D R 2、及びV L C D R 3（例えば、表1を参照されたい）を含有する抗O X 40抗体をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドが提供される。具体的な実施形態において、本明細書には、3つのV H鎖C D Rを含む、例えば、本明細書に記載される抗体のいずれか1つのV H C D R 1、V H C D R 2、及びV H C D R 3（例えば、表2を参照されたい）を含有するポリヌクレオチドが提供される。具体的な実施形態において、本明細書には、3つのV H鎖C D Rを含み、例えば、本明細書に記載される抗体のいずれか1つのV L C D R 1、V L C D R 2、及びV L C D R 3（例えば、表1を参照されたい）を含有し、且つ3つのV H鎖C D Rを含む、例えば、本明細書に記載される抗体のいずれか1つのV H C D R 1、V H C D R 2、及びV H C D R 3（例えば、表2を参照されたい）を含有する抗O X 40抗体をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドが提供される。

10

20

【0348】

詳細な実施形態において、本明細書には、本明細書に記載されるアミノ酸配列（例えば、表1及び表3を参照、例えばこれらの表に名指しで同定される特定の抗体のV L C D R及びV L F R）を含むV Lドメインを含む、例えばF R 1 - C D R 1 - F R 2 - C D R 2 - F R 3 - C D R 3 - F R 4を含有する抗O X 40抗体又はその断片をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドが提供される。具体的な実施形態において、本明細書には、本明細書に記載されるアミノ酸配列（例えば、表2及び表4を参照、例えば、これらの表に名指しで同定される特定の抗体のV H C D R及びV H F R）を含むV Hドメインを含む、例えばF R 1 - C D R 1 - F R 2 - C D R 2 - F R 3 - C D R 3 - F R 4を含有する抗O X 40抗体又はその断片をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドが提供される。

30

【0349】

特定の実施形態において、本明細書に記載されるポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるアミノ酸配列（例えば、配列番号15）を含む軽鎖可変領域を含む本明細書に提供される抗体をコードするヌクレオチド配列を含み、この抗体はO X 40（例えば、ヒトO X 40）に免疫特異的に結合する。特定の実施形態において、本明細書に記載されるポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるアミノ酸配列（例えば、配列番号15）を含む軽鎖可変領域を含む本明細書に提供される抗体p a b 1 9 4 9又はp a b 2 0 4 4又はその断片をコードするヌクレオチド配列を含む。

40

【0350】

特定の実施形態において、本明細書に記載されるポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるアミノ酸配列（例えば、配列番号16）を含む重鎖可変領域を含む本明細書に提供される抗体をコードするヌクレオチド配列を含み、この抗体はO X 40（例えば、ヒトO X 40）に免疫特異的に結合する。特定の実施形態において、本明細書に記載されるポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるアミノ酸配列（例えば、配列番号16）を含む重鎖可変領域を含む本明細書に提供される抗体p a b 1 9 4 9又はp a b 2 0 4 4又はその断片をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0351】

特定の態様において、ポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるアミノ酸配列を有す

50

る1つ以上のV L F R（例えば、表3を参照されたい）を含むV Lドメインを含む本明細書に記載される抗体又はその断片をコードするヌクレオチド配列を含み、この抗体はO X 4 0（例えば、ヒトO X 4 0）に免疫特異的に結合する。特定の態様において、ポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるアミノ酸配列を有する1つ以上のV H F R（例えば、表4を参照されたい）を含むV Hドメインを含む本明細書に記載される抗体又はその断片をコードするヌクレオチド配列を含み、この抗体はO X 4 0（例えば、ヒトO X 4 0）に免疫特異的に結合する。

【0352】

具体的な実施形態において、本明細書に提供されるポリヌクレオチドは、ヒトフレームワーク領域であるフレームワーク領域（例えば、V Lドメイン及びV Hドメインのフレームワーク領域）を含む本明細書に記載される抗体又はその断片をコードするヌクレオチド配列を含み、この抗体はO X 4 0（例えば、ヒトO X 4 0）に免疫特異的に結合する。特定の実施形態において、本明細書に提供されるポリヌクレオチドは、上記の第5.2節に記載される抗体又はその断片（例えば、C D R又は可変ドメイン）をコードするヌクレオチド配列を含む。

10

【0353】

具体的な態様において、本明細書には、軽鎖及び重鎖、例えば別個の軽鎖及び重鎖を含む抗体をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドが提供される。軽鎖に関して、具体的な実施形態では、本明細書に提供されるポリヌクレオチドは、軽鎖をコードするヌクレオチド配列を含む。別の具体的な実施形態では、本明細書に提供されるポリヌクレオチドは、軽鎖をコードするヌクレオチド配列を含む。更に別の具体的な実施形態において、本明細書に提供されるポリヌクレオチドは、ヒト軽鎖又はヒト軽鎖を含む本明細書に記載される抗体をコードするヌクレオチド配列を含む。詳細な実施形態において、本明細書に提供されるポリヌクレオチドは、O X 4 0（例えば、ヒトO X 4 0）に免疫特異的に結合する抗体をコードするヌクレオチド配列を含み、この抗体は軽鎖を含み、及びV Lドメインのアミノ酸配列が配列番号15に示されるアミノ酸配列を含んでもよく、及び軽鎖の定常領域がヒト軽鎖定常領域のアミノ酸配列を含む。別の詳細な実施形態において、本明細書に提供されるポリヌクレオチドは、O X 4 0（例えば、ヒトO X 4 0）に免疫特異的に結合し、且つ軽鎖を含む抗体をコードするヌクレオチド配列を含み、V Lドメインのアミノ酸配列が配列番号15に示されるアミノ酸配列を含んでもよく、及び軽鎖の定常領域がヒト軽鎖定常領域のアミノ酸配列を含む。例えば、ヒト定常領域配列は、米国特許第5,693,780号明細書に記載されるものであってもよい。

20

30

【0354】

詳細な実施形態において、本明細書に提供されるポリヌクレオチドは、O X 4 0（例えば、ヒトO X 4 0）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体をコードするヌクレオチド配列を含み、この抗体は重鎖を含み、V Hドメインのアミノ酸配列が配列番号16に示されるアミノ酸配列を含んでもよく、及び重鎖の定常領域がヒトガンマ（ γ ）重鎖定常領域のアミノ酸配列を含む。

【0355】

特定の実施形態において、本明細書に提供されるポリヌクレオチドは、O X 4 0（例えば、ヒトO X 4 0）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体（例えば、V Hドメインが配列番号16又はV Lドメインが配列番号15などのp a 9 1 9 4 9又はp a b 2 0 4 4）のV Hドメイン及び/又はV Lドメインをコードする1つ又は複数のヌクレオチド配列を含む。

40

【0356】

更に別の具体的な実施形態において、本明細書に提供されるポリヌクレオチドは、O X 4 0（例えば、ヒトO X 4 0）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体をコードするヌクレオチド配列を含み、この抗体は、本明細書に記載される任意のアミノ酸配列を含むV Lドメイン及びV Hドメインを含み、及び定常領域が、ヒトI g G₁（例えば、アロタイプ1、17、又は3）、ヒトI g G₂、又はヒトI g G₄の定常領域のアミノ酸

50

配列を含む。

【0357】

具体的な実施形態において、本明細書には、抗OX40抗体又は本明細書において指定されるそのドメイン（例えば、表1～表4を参照されたい）、例えば抗体pab1949又はpab2044をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドが提供される。

【0358】

また、本明細書には、例えば、コドン/RNA最適化、異種シグナル配列による置換、及びmRNA不安定性エレメントの除去によって最適化された、抗OX40抗体又はその断片をコードするポリヌクレオチドも提供される。mRNAにおけるコドン変化の導入及び/又は阻害領域の除去による組換え発現のための抗OX40抗体又はその断片（例えば、軽鎖、重鎖、VHドメイン、又はVLドメイン）をコードする最適化された核酸の生成方法は、例えば米国特許第5,965,726号明細書；同第6,174,666号明細書；同第6,291,664号明細書；同第6,414,132号明細書；及び同第6,794,498号明細書に記載される最適化方法を適宜応用することにより実施し得る。例えば、RNA内にある潜在的なスプライス部位及び不安定性エレメント（例えば、A/T又はA/Uリッチエレメント）を、核酸配列によってコードされるアミノ酸を変えことなく突然変異させて、組換え発現用のRNAの安定性を高めることができる。これらの改変は遺伝子コードの縮重を利用するものであり、例えば、同一のアミノ酸に対する代替コドンを使用する。一部の実施形態において、保存された突然変異、例えば元のアミノ酸と同様の化学構造及び特性及び/又は機能を有する同様のアミノ酸をコードするように1つ以上のコドンを変えることが望ましいこともある。

10

20

【0359】

特定の実施形態において、本明細書に記載される抗OX40抗体又はその断片（例えば、VLドメイン又はVHドメイン）をコードする最適化されたポリヌクレオチド配列は、本明細書に記載される抗OX40抗体又はその断片（例えば、VLドメイン又はVHドメイン）をコードする最適化されていないポリヌクレオチド配列のアンチセンス（例えば、相補的）ポリヌクレオチドとハイブリダイズすることができる。具体的な実施形態において、本明細書に記載される抗OX40抗体又は断片をコードする最適化されたヌクレオチド配列は、本明細書に記載される抗OX40抗体又はその断片をコードする最適化されていないポリヌクレオチド配列のアンチセンスポリヌクレオチドと高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズする。具体的な実施形態において、本明細書に記載される抗OX40抗体又はその断片をコードする最適化されたヌクレオチド配列は、本明細書に記載される抗OX40抗体又はその断片をコードする最適化されていないヌクレオチド配列のアンチセンスポリヌクレオチドと高ストリンジェンシー、中程度の又はより低いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする。ハイブリダイゼーション条件に関する情報は記載されており、例えば、米国特許出願公開第2005/0048549号明細書（例えば、パラグラフ72～73）（参照により本明細書に援用される）を参照されたい。

30

40

【0360】

当該技術分野において公知の任意の方法により、ポリヌクレオチドを得ることができ、及びポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を決定することができる。本明細書に記載される抗体、例えば表1～表4に記載される抗体、及びこれらの抗体の修飾されたバージョンをコードするヌクレオチド配列は、当該技術分野において周知の方法を用いて決定することができ、即ち、その抗体をコードする核酸が生成されるような方法で、特定のアミノ酸をコードすることが分かっているヌクレオチドコドンがアセンブルされる。抗体をコードするかかるポリヌクレオチドは、化学的に合成したオリゴヌクレオチドからアセンブルすることができ（例えば、Kutmeier *et al.*, (1994), *BioTechniques* 17:242-246に記載されるとおり）、これは、簡潔に言えば、抗体をコードする配列の各部分を含有する重複オリゴヌクレオチドの合成、それらの

50

オリゴヌクレオチドのアニーリング及びライゲーション、及び次にライゲートしたオリゴヌクレオチドのPCR増幅を伴うものである。

【0361】

或いは、本明細書に記載される抗体又はその断片をコードするポリヌクレオチドは、当該技術分野において周知の方法（例えば、PCR及び他の分子クローニング方法）を用いて好適な供給源（例えば、ハイブリドーマ）由来の核酸から生成することができる。例えば、目的の抗体を産生するハイブリドーマ細胞から得られたゲノムDNAを使用して、既知の配列の3'末端及び5'末端にハイブリダイズ可能な合成プライマーを使用したPCR増幅を実施することができる。かかるPCR増幅方法を用いることにより、抗体の軽鎖及び/又は重鎖をコードする配列を含む核酸を得ることができる。かかるPCR増幅方法を用いることにより、抗体の可変軽鎖領域及び/又は可変重鎖領域をコードする配列を含む核酸を得ることができる。増幅した核酸を宿主細胞における発現用及び更なるクローニング用のベクターにクローニングすると、例えば、キメラ抗体及びヒト化抗体を生成することができる。

10

【0362】

特定の抗体又はその断片をコードする核酸を含有するクローンが利用可能でなく、しかし、抗体分子又はその断片の配列が既知である場合、免疫グロブリン又は断片をコードする核酸は、化学的に合成することができ、又は好適な供給源（例えば、抗体cDNAライブラリ、又は本明細書に記載される抗体の発現に選択されたハイブリドーマ細胞など、抗体を発現する任意の組織又は細胞から生成されたcDNAライブラリ、又はそれから単離された核酸、好ましくはポリA+RNA）から、配列の3'末端及び5'末端にハイブリダイズ可能な合成プライマーを使用したPCR増幅によるか、又は特定の遺伝子配列に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを使用したクローニングにより、例えば、抗体をコードするcDNAライブラリからcDNAクローンを同定することによって得ることができる。PCRによって生成された増幅核酸は、次に、当該技術分野において周知の任意の方法を用いて複製可能なクローニングベクターにクローニングすることができる。

20

【0363】

本明細書に記載される抗OX40抗体をコードするDNAは、従来の手順を用いて（例えば、抗OX40抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子との特異的結合能を有するオリゴヌクレオチドプローブを使用することにより）容易に単離し、配列決定することができる。ハイブリドーマ細胞はかかるDNAの供給源として働き得る。単離後、このDNAを発現ベクターに置くことができ、次にそれを大腸菌（*E. coli*）細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞（例えば、CHO GS System（商標）（Lonza）のCHO細胞）、又は本来免疫グロブリンタンパク質を産生しない骨髓腫細胞などの宿主細胞にトランスフェクトすることにより、組換え宿主細胞における抗OX40抗体の合成が達成される。

30

【0364】

抗体の生成には、VH又はVLヌクレオチド配列、制限部位、及び制限部位を保護するフランキング配列を含むPCRプライマーを使用して、scFvクローンにおいてVH又はVL配列を増幅し得る。当業者に公知のクローニング技術を利用して、重鎖定常領域、例えばヒト4定常領域を発現するベクターにこのPCR増幅したVHドメインをクローニングすることができ、及び軽鎖定常領域、例えばヒト又は4定常領域を発現するベクターにこのPCR増幅したVLドメインをクローニングすることができる。特定の実施形態において、VH又はVLドメインの発現用のベクターは、EF-1プロモーター、分泌シグナル、可変ドメイン用のクローニング部位、定常ドメイン、及びネオマイシンなどの選択マーカを含む。VH及びVLドメインはまた、必要な定常領域を発現する1つのベクターにクローニングすることもできる。次に、当業者に公知の技法を用いて、この重鎖転換ベクター及び軽鎖転換ベクターを細胞株にコトランスフェクトすると、完全長抗体、例えばIgGを発現する安定した又は一過性の細胞株が生成される。

40

【0365】

50

DNAはまた、例えば、ヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインのコード配列をマウス配列の代わりに置換することによるか、又は免疫グロブリンコード配列に非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の全て又は一部を共有結合的につなぎ合わせるにより、修飾することもできる。

【0366】

また、本明細書に記載される抗体をコードするポリヌクレオチドと高ストリンジェンシー、中程度の又はより低いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドも提供される。具体的な実施形態において、本明細書に記載されるポリヌクレオチドは、本明細書に提供されるVHドメイン（例えば、配列番号16）及び/又はVLドメイン（例えば、配列番号15）をコードするポリヌクレオチドと高ストリンジェンシー、中程度の又はより低いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする。

10

【0367】

ハイブリダイゼーション条件については当該技術分野において記載されており、当業者には周知である。例えば、ストリンジェントな条件下でのハイブリダイゼーションは、 $6 \times$ 塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)中約45におけるフィルタ結合DNAへのハイブリダイゼーションと、続く $0.2 \times$ SSC/ 0.1% SDS中約50~65における1回以上の洗浄を伴うものであってもよく；高度にストリンジェントな条件下でのハイブリダイゼーションは、 $6 \times$ SSC中約45におけるフィルタ結合核酸へのハイブリダイゼーションと、続く $0.1 \times$ SSC/ 0.2% SDS中約68における1回以上の洗浄を伴うものであってもよい。他のストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でのハイブリダイゼーションが当業者に公知であって、記載されており、例えば、Ausubel FM et al., eds., (1989) Current Protocols in Molecular Biology, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., New York 6.3.1~6.3.6頁及び2.10.3頁を参照されたい。

20

【0368】

5.3.2 細胞及びベクター

特定の態様において、本明細書には、OX40（例えば、ヒトOX40）に特異的に結合する本明細書に記載される抗体を（例えば、組換え）発現する細胞（例えば、宿主細胞）並びに関連するポリヌクレオチド及び発現ベクターが提供される。本明細書には、宿主細胞、好ましくは哺乳類細胞における組換え発現のための抗OX40抗体又は断片をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを含むベクター（例えば、発現ベクター）が提供される。また、本明細書には、本明細書に記載される抗OX40抗体（例えば、ヒト又はヒト化抗体）の組換え発現のためのかかるベクターを含む宿主細胞も提供される。詳細な態様において、本明細書には、本明細書に記載される抗体を作製する方法が提供され、この方法は、宿主細胞においてかかる抗体を発現させるステップを含む。

30

【0369】

OX40（例えば、ヒトOX40）に特異的に結合する本明細書に記載される抗体又はその断片（例えば、本明細書に記載される抗体の重鎖又は軽鎖）の組換え発現は、抗体又は断片をコードするポリヌクレオチドを含有する発現ベクターの構築を伴う。本明細書に記載される抗体又はその断片（例えば、重鎖又は軽鎖可変ドメイン）をコードするポリヌクレオチドが得られると、抗体分子の産生のためのベクターを当該技術分野において周知の技法を用いた組換えDNA技術によって作製することができる。従って、抗体又は抗体断片（例えば、軽鎖又は重鎖）のコードヌクレオチド配列を含有するポリヌクレオチドを発現させることによるタンパク質の調製方法が、本明細書に記載される。当業者に周知の方法を用いて、抗体又は抗体断片（例えば、軽鎖又は重鎖）コード配列並びに適切な転写及び翻訳制御シグナルを含有する発現ベクターを構築することができる。これらの方法としては、例えば、インビトロ組換えDNA法、合成法、及びインビボ遺伝子組換えが挙げ

40

50

られる。また、プロモーターに作動可能に連結された、本明細書に記載される抗体分子、抗体の重鎖若しくは軽鎖、抗体若しくはその断片の重鎖若しくは軽鎖可変ドメイン、又は重鎖若しくは軽鎖CDRをコードするヌクレオチド配列を含む複製可能なベクターも提供される。かかるベクターは、例えば、抗体分子の定常領域をコードするヌクレオチド配列を含むことができ（例えば、国際公開第86/05807号パンフレット及び同第89/01036号パンフレット；及び米国特許第5,122,464号明細書を参照されたい）、及び抗体の可変ドメインを、全重鎖、全軽鎖、又は全重鎖及び全軽鎖の両方の発現のためかかるベクターにクローニングすることができる。

【0370】

発現ベクターは従来技術によって細胞（例えば、宿主細胞）に移入することができ、次に得られた細胞を従来技術によって培養することにより、本明細書に記載される抗体（例えば、pab1949又はpab2044のCDRを含む抗体）又はその断片を作製することができる。従って、本明細書には、宿主細胞においてかかる配列を発現させるためのプロモーターに作動可能に連結された、本明細書に記載される抗体（例えば、pab1949又はpab2044のCDRを含む抗体）又はその断片（例えば、その重鎖又は軽鎖、又はその断片）をコードするポリヌクレオチドを含有する宿主細胞が提供される。特定の実施形態において、二重鎖抗体の発現には、以下に詳述するとおり、全免疫グロブリン分子の発現のため宿主細胞において重鎖及び軽鎖の両方を個々にコードするベクターを発現させることができる。特定の実施形態において、宿主細胞は、本明細書に記載される抗体（例えば、pab1949又はpab2044のCDRを含む抗体）の重鎖及び軽鎖の両方、又はその断片をコードするポリヌクレオチドを含むベクターを含有する。具体的な実施形態において、宿主細胞は2つの異なるベクターを含有し、第1のベクターが、本明細書に記載される抗体（例えば、pab1949又はpab2044のCDRを含む抗体）の重鎖又は重鎖可変領域、又はその断片をコードするポリヌクレオチドを含み、且つ第2のベクターが、本明細書に記載される抗体（例えば、pab1949又はpab2044のCDRを含む抗体）の軽鎖又は軽鎖可変領域、又はその断片をコードするポリヌクレオチドを含む。他の実施形態では、第1の宿主細胞が、本明細書に記載される抗体（例えば、pab1949又はpab2044のCDRを含む抗体）の重鎖又は重鎖可変領域、又はその断片をコードするポリヌクレオチドを含む第1のベクターを含み、且つ第2の宿主細胞が、本明細書に記載される抗体（例えば、pab1949又はpab2044のCDRを含む抗体）の軽鎖又は軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドを含む第2のベクターを含む。具体的な実施形態において、第1の細胞が発現する重鎖/重鎖可変領域が第2の細胞の軽鎖/軽鎖可変領域と結び付くことにより、本明細書に記載される抗OX40抗体（例えば、pab1949又はpab2044のCDRを含む抗体）を形成する。特定の実施形態において、本明細書には、かかる第1の宿主細胞とかかる第2の宿主細胞とを含む宿主細胞集団が提供される。

【0371】

詳細な実施形態において、本明細書には、本明細書に記載される抗OX40抗体（例えば、pab1949又はpab2044のCDRを含む抗体）の軽鎖/軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドを含む第1のベクターと、本明細書に記載される抗OX40抗体（例えば、pab1949又はpab2044のCDRを含む抗体）の重鎖/重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドを含む第2のベクターとを含むベクター集団が提供される。

【0372】

種々の宿主-発現ベクター系を利用して、本明細書に記載される抗体分子（例えば、pab1949又はpab2044のCDRを含む抗体）を発現させることができる（例えば、米国特許第5,807,715号明細書を参照されたい）。かかる宿主-発現系は、目的のコード配列の産生及び続く精製を可能にする媒体に相当し、しかしまた、適切なヌクレオチドコード配列で形質転換又はトランスフェクトされるとき、本明細書に記載される抗体分子をインサイチュで発現する細胞にも相当する。これらとしては、限定はされ

10

20

30

40

50

ないが、例えば、抗体コード配列を含有する組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNA又はコスミドDNA発現ベクターで形質転換された細菌（例えば、大腸菌（*E. coli*）及び枯草菌（*B. subtilis*））；抗体コード配列を含有する組換え酵母発現ベクターで形質転換された酵母（例えば、サッカロミセス属（*Saccharomyces*）ピキア属（*Pichia*））；抗体コード配列を含有する組換えウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）に感染した昆虫細胞系；抗体コード配列を含有する組換えウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV；タバコモザイクウイルス、TMV）に感染しているか、又は組換えプラスミド発現ベクター（例えば、Tiプラスミド）で形質転換された植物細胞系（例えば、*Chlamydomonas reinhardtii*）などの緑藻類）；又は哺乳類細胞のゲノムに由来するプロモーター（例えば、メタロチオネインプロモーター）又は哺乳類ウイルスに由来するプロモーター（例えば、アデノウイルス後期プロモーター；ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター）を含有する組換え発現コンストラクトを担持する哺乳類細胞系（例えば、COS（例えば、COS1又はCOS）、CHO、BHK、MDC K、HEK 293、NS0、PER.C6、VERO、CRL7030、HsS78Bst、HeLa、及びNIH 3T3、HEK-293T、HepG2、SP210、R1.1、B-W、L-M、BSC1、BSC40、YB/20及びBMT10細胞）が挙げられる。具体的な実施形態において、本明細書に記載される抗体（例えば、抗体pab1949又はpab2044のいずれか1つのCDRを含む抗体）を発現させるための細胞は、CHO細胞、例えばCHO GS System（商標）（Lonza）のCHO細胞である。詳細な実施形態において、本明細書に記載される抗体を発現させるための細胞は、ヒト細胞、例えばヒト細胞株である。具体的な実施形態において、哺乳類発現ベクターはpOptiVEC（商標）又はpcDNA3.3である。詳細な実施形態において、特に全組換え抗体分子を発現させるための大腸菌（*Escherichia coli*）などの細菌細胞又は真核細胞（例えば、哺乳類細胞）が、組換え抗体分子の発現に用いられる。例えば、ヒトサイトメガロウイルス由来の主要中間体初期遺伝子プロモーターエレメントなどのベクターと併せたチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞などの哺乳類細胞が抗体に有効な発現系である（Foelking MK&Hofstetter H（1986）Gene 45：101-105；及びCockett MI et al.,（1990）Biotechnology 8：662-667）。特定の実施形態において、本明細書に記載される抗体はCHO細胞又はNS0細胞によって産生される。具体的な実施形態において、OX40（例えば、ヒトOX40）に免疫特異的に結合する本明細書に記載される抗体をコードするヌクレオチド配列の発現は、構成的プロモーター、誘導性プロモーター又は組織特異的プロモーターによって調節される。

10

20

30

【0373】

細菌系では、発現させる抗体分子の意図される用途に応じて幾つもの発現ベクターを有利に選択することができる。例えば、抗体分子の医薬組成物の生成のため、かかる抗体を多量に作製しようとする場合、精製が容易である、高レベルの融合タンパク質産物の発現を導くベクターが望ましいことになり得る。かかるベクターとしては、限定はされないが、大腸菌（*E. coli*）発現ベクターpUR278（Ruetter U&Mueller-Hill B（1983）EMBO J 2：1791-1794）（ここで、抗体コード配列を、融合タンパク質が作製されるように、個々にベクターへとlacZコード領域と共にインフレームでライゲートすることができる）；pINベクター（Inouye S&Inouye M（1985）Nuc Acids Res 13：3101-3109；Van Heeke G&Schuster SM（1989）J Biol Chem 24：5503-5509）などが挙げられる。例えば、pGEXベクターもグルタチオン5-トランスフェラーゼ（GST）との融合タンパク質としての外来性ポリペプチドの発現に使用することができる。一般に、かかる融合タンパク質は可溶性であり、マトリックスグルタチオンアガロースビーズに対する吸着及び結合と、続く遊離グルタチオンの存在下における溶出とによって溶解細胞から容易に精製することができる

40

50

。pGEXベクターは、クローニングされた標的遺伝子産物をGST部分から放出させることを可能にするためトロンピン又は第Xa因子プロテアーゼ切断部位を含むように設計される。

【0374】

昆虫系では、例えば、オートグラフィカリフォルニカ核多角体病ウイルス(AcNPV)をベクターとして使用して、外来性遺伝子を発現させることができる。このウイルスはスポドプテラ・フルギベルダ(Spodoptera frugiperda)細胞で成長する。抗体コード配列をウイルスの非必須領域(例えば、ポリヘドリン遺伝子)に個々にクローニングして、AcNPVプロモーター(例えば、ポリヘドリンプロモーター)の制御下に置くことができる。

10

【0375】

哺乳類宿主細胞では、幾つものウイルスベースの発現系を利用することができる。発現ベクターとしてアデノウイルスが使用される場合、目的の抗体コード配列をアデノウイルス転写/翻訳制御複合体、例えば、後期プロモーター及びトリパルタイト(tripartite)リーダー配列にライゲートすることができる。次にこのキメラ遺伝子をインビトロ又はインビボ組換えによってアデノウイルスゲノムに挿入することができる。ウイルスゲノムの非必須領域(例えば、領域E1又はE3)における挿入は、生存可能であり且つ感染宿主において抗体分子の発現能を有する組換えウイルスをもたらし得る(例えば、Logan J & Shenk T (1984) PNAS 81:3655-3659を参照されたい)。特定の開始シグナルも、挿入された抗体コード配列の効率的な翻訳に必要となり得る。これらのシグナルとしては、ATG開始コドン及び隣接配列が挙げられる。更には、挿入物全体の翻訳を確実にするため、開始コドンは所望のコード配列のリーディングフレームとインフェーズ(in phase)でなければならない。これらの外因性翻訳制御シグナル及び開始コドンは、天然及び合成の両方の、種々の起源であってよい。発現の効率は、適切な転写エンハンサーエレメント、転写ターミネーター等を含めることによって増強し得る(例えば、Bitter G et al., (1987) Methods Enzymol 153:516-544を参照されたい)。

20

【0376】

加えて、挿入された配列の発現を調節するか、又は遺伝子産物を所望の特定の方法で修飾及びプロセッシングする宿主細胞株を選択することができる。タンパク質産物のかかる修飾(例えば、グリコシル化)及びプロセッシング(例えば、切断)は、タンパク質の機能にとって重要であり得る。異なる宿主細胞は、タンパク質及び遺伝子産物の翻訳後プロセッシング及び修飾に関して特徴的且つ特異的な機構を有する。適切な細胞株又は宿主系を選択することにより、発現した外来性タンパク質の正しい修飾及びプロセッシングを確実にすることができる。このため、一次転写物を適切にプロセッシングし、グリコシル化し、且つ遺伝子産物をリン酸化する細胞機構を有する真核生物宿主細胞を使用することができる。かかる哺乳類宿主細胞としては、限定はされないが、CHO、VERO、BHK、HeLa、MDCK、HEK 293、NIH 3T3、W138、BT483、Hs578T、HTB2、BT20及びT47D、NS0(いかなる免疫グロブリン鎖も内因的に産生しないマウス骨髄腫細胞株)、CRL7030、COS(例えば、COS1又はCOS)、PER.C6、VERO、HsS78Bst、HEK-293T、HepG2、SP210、R1.1、B-W、L-M、BSC1、BSC40、YB/20、BMT10及びHsS78Bst細胞が挙げられる。特定の実施形態において、本明細書に記載される抗OX40抗体(例えば、pab1949又はpab2044のCDRを含む抗体)は、CHO細胞などの哺乳類細胞において作製される。

30

40

【0377】

具体的な実施形態において、本明細書に記載される抗体は低下したフコース含量を有するか、又はフコース含量を有しない。かかる抗体は、当業者に公知の技法を用いて作製することができる。例えば、フコシル化の能力が欠損又は欠如した細胞において抗体を発現させることができる。具体的な例では、1,6-フコシルトランスフェラーゼの両方の

50

対立遺伝子のノックアウトを有する細胞株を使用して、フコース含量が低下した抗体を製することができる。Potelligent（登録商標）システム（Lonza）は、フコース含量が低下した抗体の作製に使用し得るかかるシステムの一例である。

【0378】

組換えタンパク質を長期にわたって高収率で産生させるには、安定発現細胞を生成することができる。例えば、本明細書に記載される抗OX40抗体（例えば、pab1949又はpab2044のCDRを含む抗体）を安定に発現する細胞株を操作することができる。具体的な実施形態において、本明細書に提供される細胞は、会合することにより本明細書に記載される抗体（例えば、pab1949又はpab2044のCDRを含む抗体）を形成する軽鎖/軽鎖可変ドメイン及び重鎖/重鎖可変ドメインを安定に発現する。

10

【0379】

特定の態様において、ウイルス複製起点を含有する発現ベクターを使用するよりむしろ、宿主細胞を、適切な発現制御エレメント（例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位等）によって制御されるDNA、及び選択可能マーカで形質転換することができる。外来DNA/ポリヌクレオチドの導入後、操作された細胞を強化培地で1～2日成長させることができ、次に選択培地に切り換える。組換えプラスミド中の選択可能マーカが選択に対する耐性を付与し、且つ細胞によるその染色体へのプラスミドの安定した組み込み、成長によるフォーカス形成を可能にし、次にそれを細胞株にクローニングして拡大することができる。この方法を用いて、有利には、本明細書に記載される抗OX40抗体又はその断片を発現する細胞株を操作することができる。かかる操作された細胞株は、抗体分子と直接又は間接的に相互作用する組成物のスクリーニング及び評価に特に有用であり得る。

20

【0380】

幾つもの選択系を用いることができ、限定はされないが、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（Wigler M et al., (1977) Cell 11(1): 223-232）、ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（Szybalska EH & Szybalski W (1962) PNAS 48(12): 2026-2034）及びアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（Lowy I et al., (1980) Cell 22(3): 817-823）遺伝子を、それぞれ tk⁻、hgprt⁻ 又は aprt⁻ 細胞において利用することができる。また、以下の遺伝子について、代謝拮抗薬耐性も選択基準として用いることができる：dhfr（メトトレキサート耐性を付与する）（Wigler M et al., (1980) PNAS 77(6): 3567-3570；O'Hare K et al., (1981) PNAS 78: 1527-1531）；gpt（ミコフェノール酸耐性を付与する）（Mulligan RC & Berg P (1981) PNAS 78(4): 2072-2076）；neo（アミノグリコシド G-418 耐性を付与する）（Wu GY & Wu CH (1991) Biotherapy 3: 87-95；Tolstoshev P (1993) Ann Rev Pharmacol Toxicol 32: 573-596；Mulligan RC (1993) Science 260: 926-932；及び Morgan RA & Anderson WF (1993) Ann Rev Biochem 62: 191-217；Nabel GJ & Felgner PL (1993) Trends Biotechnol 11(5): 211-215）；及び hygromycin（ハイグロマイシン耐性を付与する）（Santerre RF et al., (1984) Gene 30(1-3): 147-156）。組換えDNA技術分野において一般に知られている方法をルーチンで適用して所望の組換えクローンを選択することができ、かかる方法については、例えば、Ausubel FM et al., (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993)；Kriegler M, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990)；及び Chapters

30

40

50

12 and 13, Dracopoli NC et al., (eds.), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); Colbere-Garapin F et al., (1981) J Mol Biol 150:1-14 (全体として参照によって本明細書に援用される)に記載されている。

【0381】

抗体分子の発現レベルは、ベクター増幅によって増加させることができる(レビューについては、Bebbington CR&Hentschel CCG, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol. 3 (Academic Press, New York, 1987)を参照されたい)。抗体を発現するベクター系中のマーカーが増幅可能である場合、宿主細胞の培養物中に存在する阻害薬レベルが増加すると、マーカー遺伝子のコピー数が増加することになる。増幅領域は抗体遺伝子に関連付けられているため、抗体の産生も増加することになる(Crouse GF et al., (1983) Mol Cell Biol 3:257-66)。

10

【0382】

宿主細胞には、本明細書に記載される2つ以上の発現ベクター、重鎖由来のポリペプチドをコードする第1のベクターと軽鎖由来のポリペプチドをコードする第2のベクターとをコトランスフェクトすることができる。これらの2つのベクターは同一の選択可能マーカーを含有してもよく、これにより重鎖及び軽鎖ポリペプチドの等しい発現が可能となる。宿主細胞には、異なる量の2つ以上の発現ベクターをコトランスフェクトすることができる。例えば、宿主細胞には、以下の比: 1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:12、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35、1:40、1:45、又は1:50のうちのいずれか1つの第1の発現ベクターと第2の発現ベクターとをトランスフェクトすることができる。

20

【0383】

或いは、重鎖及び軽鎖ポリペプチドの両方をコードし、且つその発現能を有する単一のベクターを使用してもよい。かかる状況では、過剰な無毒重鎖を回避するため、軽鎖は重鎖よりも前に置かれるべきである(Proudford NJ (1986) Nature 322:562-565; 及びKoehler G (1980) PNAS 77:2197-2199)。重鎖及び軽鎖のコード配列はcDNA又はゲノムDNAを含み得る。発現ベクターは単シストロン性又は多シストロン性であってもよい。多シストロン性核酸コンストラクトは、2、3、4、5、6、7、8、9、10個又はそれを超える、又は2~5、5~10又は10~20個の範囲の遺伝子/ヌクレオチド配列をコードすることができる。例えば、二シストロン性核酸コンストラクトは、プロモーター、第1の遺伝子(例えば、本明細書に記載される抗体の重鎖)、及び第2の遺伝子(例えば、本明細書に記載される抗体の軽鎖)をこの順序で含み得る。かかる発現ベクターでは、両方の遺伝子の転写がこのプロモーターによって駆動されることができ、一方、第1の遺伝子からのmRNAの翻訳はcap依存性スキャニング機構によることができ、第2の遺伝子からのmRNAの翻訳はcap非依存性機構、例えばIRESによることができる。

30

40

【0384】

本明細書に記載される抗体分子が組換え発現によって作製されると、これを免疫グロブリン分子の精製に関して当該技術分野において公知の任意の方法、例えば、クロマトグラフィー(例えば、イオン交換、親和性、特にプロテインA後の特異的抗原に対する親和性によるもの、及びサイズ排除カラムクロマトグラフィー)、遠心、溶解度差によるか、又はタンパク質の精製に関する任意の他の標準的な技法により精製することができる。更に、本明細書に記載される抗体は、本明細書に記載される又はその他、当該技術分野において精製を促進することが公知の異種ポリペプチド配列に融合させることができる。

【0385】

50

具体的な実施形態において、本明細書に記載される抗体は単離又は精製されている。概して、単離抗体とは、その単離抗体と異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まないものである。例えば、詳細な実施形態において、本明細書に記載される抗体の調製物は細胞材料及び/又は化学的前駆体を実質的に含まない。語句「細胞材料を実質的に含まない」には、それが単離され又は組換え産生される元となった細胞の細胞成分から抗体が分離されている抗体の調製物が含まれる。従って、細胞材料を実質的に含まない抗体には、異種タンパク質（本明細書では「夾雑タンパク質」とも称される）及び/又は抗体の変異体、例えば異なる翻訳後修飾形態の抗体が約30%、20%、10%、5%、2%、1%、0.5%、又は0.1%未満（乾燥重量基準）である抗体の調製物が含まれる。抗体又は断片が組換えによって作製される場合、それはまた、概して培養培地も実質的に含まず、即ち、培養培地がタンパク質調製物の容積の約20%、10%、2%、1%、0.5%、又は0.1%未満を占める。抗体又は断片が化学合成によって作製される場合、それは概して化学的前駆体又は他の化学物質を実質的に含まず、即ち、それはタンパク質の合成に関わる化学的前駆体又は他の化学物質と分離されている。従って、抗体又は断片のかかる調製物は、目的の抗体又は断片以外の化学的前駆体又は化合物が約30%、20%、10%、又は5%（乾燥重量基準）未満である。具体的な実施形態において、本明細書に記載される抗体は単離又は精製されている。

10

【0386】

5.4 医薬組成物

本明細書には、生理学的に許容可能な担体、賦形剤又は安定剤（Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA）中において所望の程度の純度を有する本明細書に記載される抗体を含む組成物が提供される。許容可能な担体、賦形剤、又は安定剤は、用いられる投薬量及び濃度でレシピエントにとって非毒性である。

20

【0387】

本明細書に記載される医薬組成物は、OX40活性の増強、誘導、又は活性化、並びに癌又は感染症などの病態の治療において有用であり得る。本明細書に記載される方法により治療し得る癌の例としては、限定はされないが、B細胞リンパ腫（例えば、B細胞慢性リンパ性白血病、B細胞非ホジキンリンパ腫、皮膚B細胞リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫）、基底細胞癌、膀胱癌、芽細胞腫、脳転移、乳癌、パーキットリンパ腫、癌腫（例えば、腺癌（例えば、胃食道接合部腺癌））、子宮頸癌、結腸癌、結腸直腸癌（結腸癌及び直腸癌）、子宮内膜癌、食道癌、ユーイング肉腫、濾胞性リンパ腫、胃癌、胃食道接合部癌、消化管癌、膠芽腫（例えば、多形性膠芽腫、例えば、新しく診断されたもの又は再発性）、神経膠腫、頭頸部癌（例えば、頭頸部扁平上皮癌）、肝転移、ホジキン及び非ホジキンリンパ腫、腎癌（例えば、腎細胞癌及びウィルムス腫瘍）、喉頭癌、白血病（例えば、慢性骨髄球性白血病、ヘアリー細胞白血病）、肝臓癌（例えば、肝癌及びヘパトーマ）、肺癌（例えば、非小細胞肺癌及び小細胞肺癌）、リンパ芽球性リンパ腫、リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、転移性脳腫瘍、転移性癌、骨髄腫（例えば、多発性骨髄腫）、神経芽細胞腫、眼メラノーマ、中咽頭癌、骨肉腫、卵巣癌、膵癌（例えば、膵管腺癌）、前立腺癌（例えば、ホルモン不応性（例えば、去勢抵抗性）、転移性、転移性ホルモン不応性（例えば、去勢抵抗性、アンドロゲン非依存性））、腎細胞癌（例えば、転移性）、唾液腺癌、肉腫（例えば、横紋筋肉腫）、皮膚癌（例えば、黒色腫（例えば、転移性黒色腫））、軟部組織肉腫、固形腫瘍、扁平上皮癌、滑膜肉腫、精巣癌、甲状腺癌、移行上皮癌（尿路上皮細胞癌）、ぶどう膜黒色腫（例えば、転移性）、いぼ状癌、外陰癌、及びワルデンシュトレームマクログロブリン血症が挙げられる。一実施形態において、本明細書に記載される方法により治療し得る癌の例としては、限定はされないが、進行性、再発性、又は転移性固形腫瘍、リンパ腫（例えば、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫又はパーキットリンパ腫）、乳癌、前立腺癌、頭頸部癌、結腸直腸癌、結腸癌、黒色腫（例えば、転移性黒色腫）、子宮内膜癌、腎細胞癌、腎明細胞癌、肺癌（例えば、非小細胞肺癌又は肺腺癌）、卵巣癌、胃癌（gastric cancer）、膀胱癌、胃癌（sto

30

40

50

mach cancer)、子宮癌、褐色細胞腫、転移性皮膚扁平上皮癌(例えば、移植患者における)、メルケル細胞癌、皮膚T細胞リンパ腫、神経内分泌腫瘍、骨由来腫瘍(例えば、骨肉腫)、血管外皮細胞腫、遺伝的症候群(NF1又はVHL)に関連する腫瘍、脊索腫、上衣腫、髄芽腫、胚細胞腫、小腸腫瘍、虫垂癌、及びウイルス関連腫瘍(例えば、カポジ肉腫)が挙げられる。本明細書に記載される医薬組成物は、一実施形態において、医薬又は診断薬として用いられるものである。本明細書に記載されるアゴニスト抗体を含む医薬組成物は、一実施形態において、癌を治療する方法に用いられるものである。

【0388】

本明細書に記載されるアンタゴニスト抗体を含む本明細書に記載される医薬組成物は、OX40活性を低下させるか、阻害するか又は不活性化させ、及び炎症性若しくは自己免疫性疾患若しくは障害又は感染症などの病態を治療するのに有用であり得る。本明細書に記載されるアンタゴニスト抗体を含む医薬組成物は、一実施形態において、炎症性若しくは自己免疫性疾患若しくは障害又は感染症を治療する方法に用いられるものである。

10

【0389】

本明細書に記載されるアンタゴニスト抗体を含む本明細書に記載される医薬組成物は、OX40活性を低下させるか、不活性化するか、又は阻害し、及び感染(ウイルス、細菌、真菌及び寄生虫)、感染に関連するエンドキシンショック、関節炎、関節リウマチ、喘息、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、骨盤内炎症性疾患、アルツハイマー病、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、ペイロニー病、セリアック病、胆嚢疾患、毛巣病、腹膜炎、乾癬、脈管炎、外科的癒着、脳卒中、I型糖尿病、ライム病、関節炎、髄膜脳炎、ブドウ膜炎、自己免疫性ブドウ膜炎、中枢及び末梢神経系の免疫介在性炎症性障害(多発性硬化症、ループス(全身性エリテマトーデスなど)及びギラン・バレー症候群など)、皮膚炎、アトピー性皮膚炎、自己免疫性肝炎、線維性胞隔炎、グレーブス病、IgA腎症、特発性血小板減少性紫斑病、メニエール病、天疱瘡、原発性胆汁性肝硬変、サルコイドーシス、強皮症、ウェゲナー肉芽腫症、睪炎、外傷(外科的)、移植片対宿主病、移植片拒絶反応、心筋梗塞並びにアテローム性動脈硬化症などの虚血性疾患を含めた心疾患(即ち、心血管疾患)、血管内凝固、骨吸収、骨粗鬆症、骨関節炎、歯周炎、低酸症、視神経脊髄炎、セリアック病、結合組織障害(例えば、ループス)、感染後炎症性障害(例えば、ギラン・バレー症候群)、及び腫瘍随伴症候群からなる群から選択される病態を治療するのに有用であり得る。

20

30

【0390】

生体内投与に用いられる組成物は無菌であり得る。これは、例えば滅菌ろ過膜によるろ過によって容易に達成される。

【0391】

5.5 使用及び方法

5.5.1 治療的使用及び方法

一態様において、本明細書には、対象の1つ以上の免疫機能又は免疫応答を調節する方法が提供され、この方法は、それを必要としている対象に、本明細書に記載される抗OX40抗体、又はその組成物を投与するステップを含む。ある具体的な態様において、本明細書には、対象の1つ以上の免疫機能又は免疫応答を活性化するか、増強するか、又は誘導する方法が提供され、この方法は、それを必要としている対象に抗OX40抗体又はその組成物を投与するステップを含む。具体的な実施形態において、本明細書には、1つ以上の免疫機能又は免疫応答を活性化するか又増強することが望ましい疾患を予防及び/又は治療する方法が提供され、この方法は、それを必要としている対象に、本明細書に記載される抗OX40抗体又はその組成物を投与するステップを含む。特定の実施形態において、本明細書には感染症を治療する方法が提供され、この方法は、それを必要としている対象に抗OX40抗体又はその組成物を投与するステップを含む。特定の実施形態において、本明細書には癌を治療する方法が提供され、この方法は、それを必要としている対象に抗OX40抗体又はその組成物を投与するステップを含む。癌は、黒色腫、腎癌、及び前立腺癌からなる群から選択され得る。癌は、黒色腫、腎癌、前立腺癌、結腸癌、及び肺

40

50

癌からなる群から選択され得る。特定の実施形態において、本明細書には黒色腫を治療する方法が提供され、この方法は、それを必要としている対象に抗OX40抗体又はその組成物を投与するステップを含む。特定の実施形態において、本明細書には腎癌を治療する方法が提供され、この方法は、それを必要としている対象に抗OX40抗体又はその組成物を投与するステップを含む。特定の実施形態において、本明細書には前立腺癌を治療する方法が提供され、この方法は、それを必要としている対象に抗OX40抗体又はその組成物を投与するステップを含む。特定の実施形態において、本明細書には結腸癌を治療する方法が提供され、この方法は、それを必要としている対象に抗OX40抗体又はその組成物を投与するステップを含む。特定の実施形態において、本明細書には肺癌を治療する方法が提供され、この方法は、それを必要としている対象に抗OX40抗体又はその組成物を投与するステップを含む。特定の実施形態において、本明細書には非小細胞肺癌（NSCLC）を治療する方法が提供され、この方法は、それを必要としている対象に抗OX40抗体又はその組成物を投与するステップを含む。一例では、本方法は、チェックポイントターゲットング剤を対象に投与するステップを更に含む。一例では、チェックポイントターゲットング剤は、アンタゴニスト抗PD-1抗体、アンタゴニスト抗PD-L1抗体、アンタゴニスト抗PD-L2抗体、アンタゴニスト抗CTLA-4抗体、アンタゴニスト抗TIM-3抗体、アンタゴニスト抗LAG-3抗体、アンタゴニスト抗CEACAM1抗体、アゴニスト抗GITR抗体、アゴニスト抗CD137抗体、及びアゴニスト抗OX40抗体からなる群から選択される。特定の実施形態において、チェックポイントターゲットング剤はアンタゴニスト抗PD-1抗体である。特定の実施形態において、チェックポイントターゲットング剤はアンタゴニスト抗PD-L1抗体である。特定の実施形態において、チェックポイントターゲットング剤はアゴニスト抗GITR抗体である。特定の実施形態において、チェックポイントターゲットング剤はアゴニスト抗CD137抗体である。

10

20

【0392】

特定の実施形態では、本明細書に開示される方法において抗PD-1抗体が使用される。特定の実施形態において、抗PD-1抗体は、Bristol-Myers Squibbによって開発された、BMS-936558又はMDX1106としても知られるニボルマブである。特定の実施形態において、抗PD-1抗体は、Merck & Coによって開発された、ランプロリズマブ又はMK-3475としても知られるペンプロリズマブである。特定の実施形態において、抗PD-1抗体は、CureTechによって開発された、CT-011としても知られるピジリズマブである。特定の実施形態において、抗PD-1抗体は、Medimmuneによって開発された、AMP-514としても知られるMED10680である。特定の実施形態において、抗PD-1抗体は、Novartis Pharmaceuticalsによって開発されたPDR001である。特定の実施形態において、抗PD-1抗体は、Regeneron Pharmaceuticalsによって開発されたREGN2810である。特定の実施形態において、抗PD-1抗体は、Pfizerによって開発されたPF-06801591である。特定の実施形態において、抗PD-1抗体は、BeiGeneによって開発されたBGB-A317である。特定の実施形態において、抗PD-1抗体は、AnaptysBio及びTesarroによって開発されたTSR-042である。特定の実施形態において、抗PD-1抗体は、Hengruiによって開発されたSHR-1210である。

30

40

【0393】

本明細書に開示される治療方法において使用し得る抗PD-1抗体の更なる非限定的な例が、以下の特許及び特許出願（これらは、あらゆる目的のために全体として参照により本明細書に援用される）に開示されている：米国特許第6,808,710号明細書；米国特許第7,332,582号明細書；米国特許第7,488,802号明細書；米国特許第8,008,449号明細書；米国特許第8,114,845号明細書；米国特許第8,168,757号明細書；米国特許第8,354,509号明細書；米国特許第8,686,119号明細書；米国特許第8,735,553号明細書；米国特許第8,74

50

7, 847号明細書；米国特許第8, 779, 105号明細書；米国特許第8, 927, 697号明細書；米国特許第8, 993, 731号明細書；米国特許第9, 102, 727号明細書；米国特許第9, 205, 148号明細書；米国特許出願公開第2013/0202623 A1号明細書；米国特許出願公開第2013/0291136 A1号明細書；米国特許出願公開第2014/0044738 A1号明細書；米国特許出願公開第2014/0356363 A1号明細書；米国特許出願公開第2016/0075783 A1号明細書；及び国際公開第2013/033091 A1号パンフレット；国際公開第2015/036394 A1号パンフレット；国際公開第2014/179664 A2号パンフレット；国際公開第2014/209804 A1号パンフレット；国際公開第2014/206107 A1号パンフレット；国際公開第2015/058573 A1号パンフレット；国際公開第2015/085847 A1号パンフレット；国際公開第2015/200119 A1号パンフレット；国際公開第2016/015685 A1号パンフレット；及び国際公開第2016/020856 A1号パンフレット。

【0394】

特定の実施形態では、本明細書に開示される方法において抗PD-L1抗体が使用される。特定の実施形態において、抗PD-L1抗体は、Genentechによって開発されたアテゾリズマブである。特定の実施形態において、抗PD-L1抗体は、AstraZeneca、Celgene及びMedimmuneによって開発されたデュルバルマブである。特定の実施形態において、抗PD-L1抗体は、Merck Serono及びPfizerによって開発された、MSB0010718Cとしても知られるアベルマブである。特定の実施形態において、抗PD-L1抗体は、Bristol-Myers Squibbによって開発されたMDX-1105である。特定の実施形態において、抗PD-L1抗体は、Amplimmune及びGSKによって開発されたAMP-224である。

【0395】

本明細書に開示される治療方法において使用し得る抗PD-L1抗体の非限定的な例は、以下の特許及び特許出願（これらは、あらゆる目的のために全体として参照により本明細書に援用される）に開示されている：米国特許第7, 943, 743号明細書；米国特許第8, 168, 179号明細書；米国特許第8, 217, 149号明細書；米国特許第8, 552, 154号明細書；米国特許第8, 779, 108号明細書；米国特許第8, 981, 063号明細書；米国特許第9, 175, 082号明細書；米国特許出願公開第2010/0203056 A1号明細書；米国特許出願公開第2003/0232323 A1号明細書；米国特許出願公開第2013/0323249 A1号明細書；米国特許出願公開第2014/0341917 A1号明細書；米国特許出願公開第2014/0044738 A1号明細書；米国特許出願公開第2015/0203580 A1号明細書；米国特許出願公開第2015/0225483 A1号明細書；米国特許出願公開第2015/0346208 A1号明細書；米国特許出願公開第2015/0355184 A1号明細書；及び国際公開第2014/100079 A1号パンフレット；国際公開第2014/022758 A1号パンフレット；国際公開第2014/055897 A2号パンフレット；国際公開第2015/061668 A1号パンフレット；国際公開第2015/109124 A1号パンフレット；国際公開第2015/195163 A1号パンフレット；国際公開第2016/000619 A1号パンフレット；及び国際公開第2016/030350 A1号パンフレット。

【0396】

特定の実施形態において、本明細書には、B細胞リンパ腫（例えば、B細胞慢性リンパ性白血病、B細胞非ホジキンリンパ腫、皮膚B細胞リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫）、基底細胞癌、膀胱癌、芽細胞腫、脳転移、乳癌、パーキットリンパ腫、癌腫（例えば、腺癌（例えば、胃食道接合部腺癌））、子宮頸癌、結腸癌、結腸直腸癌（結腸癌及び直腸癌）、子宮内膜癌、食道癌、ユーイング肉腫、濾胞性リンパ腫、胃癌、胃食道接

10

20

30

40

50

合部癌、消化管癌、膠芽腫（例えば、多形性膠芽腫、例えば、新しく診断されたもの又は再発性）、神経膠腫、頭頸部癌（例えば、頭頸部扁平上皮癌）、肝転移、ホジキン及び非ホジキンリンパ腫、腎癌（例えば、腎細胞癌及びウィルムス腫瘍）、喉頭癌、白血病（例えば、慢性骨髄球性白血病、ヘアリー細胞白血病）、肝臓癌（例えば、肝癌及びヘパトーマ）、肺癌（例えば、非小細胞肺癌及び小細胞肺癌）、リンパ芽球性リンパ腫、リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、転移性脳腫瘍、転移性癌、骨髄腫（例えば、多発性骨髄腫）、神経芽細胞腫、眼メラノーマ、中咽頭癌、骨肉腫、卵巣癌、膵癌（例えば、膵管腺癌）、前立腺癌（例えば、ホルモン不応性（例えば、去勢抵抗性）、転移性、転移性ホルモン不応性（例えば、去勢抵抗性、アンドロゲン非依存性））、腎細胞癌（例えば、転移性）、唾液腺癌、肉腫（例えば、横紋筋肉腫）、皮膚癌（例えば、黒色腫（例えば、転移性黒色腫））、軟部組織肉腫、固形腫瘍、扁平上皮癌、滑膜肉腫、精巣癌、甲状腺癌、移行上皮癌（尿路上皮細胞癌）、ぶどう膜黒色腫（例えば、転移性）、いぼ状癌、外陰癌、及びワルデンシュトレームマクログロブリン血症からなる群から選択される癌を治療する方法が提供される。特定の実施形態において、本明細書には、進行性、再発性、又は転移性固形腫瘍、リンパ腫（例えば、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫又はパーキットリンパ腫）、乳癌、前立腺癌、頭頸部癌、結腸直腸癌、結腸癌、黒色腫（例えば、転移性黒色腫）、子宮内膜癌、腎細胞癌、腎明細胞癌、肺癌（例えば、非小細胞肺癌又は肺腺癌）、卵巣癌、胃癌（gastric cancer）、膀胱癌、胃癌（stomach cancer）、子宮癌、褐色細胞腫、転移性皮膚扁平上皮癌（例えば、移植患者における）、メルケル細胞癌、皮膚T細胞リンパ腫、神経内分泌腫瘍、骨由来腫瘍（例えば、骨肉腫）、血管外皮細胞腫、遺伝的症候群（NF1又はVHL）に関連する腫瘍、脊索腫、上衣腫、髓芽腫、胚細胞腫、小腸腫瘍、虫垂癌、及びウイルス関連腫瘍（例えば、カボジ肉腫）からなる群から選択される癌を治療する方法が提供される。

10

20

30

40

50

【0397】

別の実施形態において、癌と診断された患者に対し、患者における1つ以上の免疫細胞集団（例えば、CD4⁺及びCD8⁺T細胞などのT細胞エフェクター細胞）の増殖及び/又はエフェクター機能を増加させるため抗OX40抗体が投与される。

【0398】

具体的な実施形態において、本明細書に記載される抗OX40抗体は、当該技術分野において周知のアッセイ、例えば、ELISPOT、ELISA、及び細胞増殖アッセイを用いると、本明細書に記載される抗OX40抗体を投与されない対象の免疫機能と比べて対象の1つ以上の免疫機能又は免疫応答を少なくとも99%、少なくとも98%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、少なくとも45%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも35%、少なくとも30%、少なくとも25%、少なくとも20%、又は少なくとも10%、又は10%~25%、25%~50%、50%~75%、又は75%~95%の範囲で活性化するか、又は増強するか、又は誘導する。具体的な実施形態において、免疫機能はサイトカイン産生（例えば、IL-2、TNF-、IFN-、IL-4、IL-10、及び/又はIL-13産生）である。別の実施形態において、免疫機能はT細胞増殖/拡大であり、これは、例えばフローサイトメトリーにより、T細胞のマーカー（例えば、CD3、CD4、又はCD8）を発現する細胞数を検出してアッセイすることができる。別の実施形態において、免疫機能は抗体産生であり、これは、例えばELISAによってアッセイすることができる。一部の実施形態において、免疫機能はエフェクター機能であり、これは、例えば細胞傷害性アッセイ又は当該技術分野において周知の他のアッセイによってアッセイすることができる。別の実施形態において、免疫機能はTh1応答である。別の実施形態において、免疫機能はTh2応答である。別の実施形態において、免疫機能はメモリー応答である。

【0399】

具体的な実施形態において、抗OX40抗体によって増強又は誘導することのできる免疫機能の非限定的な例は、エフェクターリンパ球の増殖/拡大（例えば、エフェクターT

リンパ球数の増加)、及びエフェクターリンパ球(例えば、エフェクターTリンパ球)のアポトーシスの阻害である。詳細な実施形態において、本明細書に記載される抗OX40抗体によって増強又は誘導される免疫機能は、CD4⁺ T細胞(例えば、Th1及びTh2ヘルパーT細胞)、CD8⁺ T細胞(例えば、細胞傷害性Tリンパ球、 γ T細胞、及び δ T細胞)、B細胞(例えば、形質細胞)、メモリーT細胞、メモリーB細胞、腫瘍常在性T細胞、CD122⁺ T細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞)、マクロファージ、単球、樹状細胞、マスト細胞、好酸球、好塩基球又は多核白血球の数の増殖/拡大又はその活性化である。一実施形態において、本明細書に記載される抗OX40抗体は、リンパ球前駆体の増殖/拡大又は数を活性化するか又は増強する。一部の実施形態において、本明細書に記載される抗OX40抗体は、陰性対照(例えば、本明細書に記載される抗OX40抗体によって治療されず、それと共に培養されず、又はそれと接触していないそれぞれの細胞の数)と比べて、CD4⁺ T細胞(例えば、Th1及びTh2ヘルパーT細胞)、CD8⁺ T細胞(例えば、細胞傷害性Tリンパ球、 γ T細胞、及び δ T細胞)、B細胞(例えば、形質細胞)、メモリーT細胞、メモリーB細胞、腫瘍常在性T細胞、CD122⁺ T細胞、ナチュラルキラー細胞(NK細胞)、マクロファージ、単球、樹状細胞、マスト細胞、好酸球、好塩基球又は多核白血球の数をおよそ少なくとも99%、少なくとも98%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、少なくとも45%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも35%、少なくとも30%、少なくとも25%、少なくとも20%、又は少なくとも10%、又は10%~25%、25%~50%、50%~75%、又は75%~95%の範囲で増加させる。

10

20

30

40

50

【0400】

一部の実施形態において、本明細書に記載される抗OX40抗体は、IDO(インドールアミン-(2,3)-ジオキシゲナーゼ)及びTDO(トリプトファン2,3-ジオキシゲナーゼ)などの1つ又は複数の免疫調節酵素を標的とする化合物と併用して対象に投与される。詳細な実施形態において、かかる化合物は、エパカドスタット(Incyte Corp)、F001287(Flexus Biosciences)、インドキシモド(NewLink Genetics)、及びNLG919(NewLink Genetics)からなる群から選択される。一実施形態において、化合物はエパカドスタットである。別の実施形態において、化合物はF001287である。別の実施形態において、化合物はインドキシモドである。別の実施形態において、化合物はNLG919である。

【0401】

一部の実施形態において、本明細書に記載される抗OX40抗体は、ワクチンと併用して対象に投与される。

【0402】

一部の実施形態において、本明細書に記載される抗OX40抗体は、抗CD137抗体、リツキシマブ、シクロホスファミド、化学療法、又は放射線療法と併用して対象に投与される。

【0403】

一部の実施形態において、本明細書に記載される抗OX40抗体は、熱ショックタンパク質ベースの腫瘍ワクチン又は熱ショックタンパク質ベースの病原体ワクチンと併用して対象に投与される。具体的な実施形態において、抗OX40抗体は、熱ショックタンパク質ベースの腫瘍ワクチンと併用して対象に投与される。熱ショックタンパク質(HSP)は、あらゆる種に遍在的に存在する高度に保存されたタンパク質ファミリーである。その発現は、熱ショック又は他の形態の、毒素への曝露、酸化ストレス若しくはグルコース欠乏を含めたストレスの結果として極めて高いレベルに強力に誘導され得る。分子量によって5つのファミリーに分類されている: HSP-110、-90、-70、-60及び-28。HSPはマクロファージ及び樹状細胞(DC)などの抗原提示細胞(APC)の

交差提示経路を介して免疫原性ペプチドを送達し、T細胞活性化をもたらす。HSPは腫瘍関連抗原ペプチドのシャペロン担体として機能し、腫瘍特異的免疫を誘導することが可能な複合体を形成する。瀕死の腫瘍細胞から放出されると、このHSP-抗原複合体は抗原提示細胞（APC）に取り込まれ、ここで、抗原が、MHCクラスI及びクラスII分子に結合するペプチドにプロセッシングされて、抗腫瘍CD8+及びCD4+ T細胞の活性化をもたらされる。腫瘍調製物に由来するHSP複合体によって誘発された免疫は、各対象の癌が発現するユニークな抗原ペプチドレパートリーを特異的に標的とする。

【0404】

熱ショックタンパク質ペプチド複合体（HSPPC）は、抗原ペプチドと非共有結合的に複合体化した熱ショックタンパク質からなるタンパク質ペプチド複合体である。HSPPCは自然免疫応答及び適応免疫応答の両方を誘発する。具体的な実施形態において、この抗原ペプチドは治療下の癌に対して抗原性を示す。HSPPCはAPCによって膜受容体（主にCD91）を介して又はToll様受容体への結合によって効率的に捕捉される。HSPPCのインターナリゼーションにより、ケモカイン及びサイトカイン産生を伴うAPCの機能的成熟が起こり、ナチュラルキラー細胞（NK）、単球並びにTh1及びTh-2介在性免疫応答の活性化をもたらされる。一部の実施形態において、本明細書に開示される方法に用いられるHSPPCは、抗原ペプチドと複合体化したストレスタンパク質のhsp60、hsp70、又はhsp90ファミリーからの1つ以上の熱ショックタンパク質を含む。一部の実施形態において、HSPPCは、hsc70、hsp70、hsp90、hsp110、grp170、gp96、カルレティキュリン、又はこれらの2つ以上の組み合わせを含む。

10

20

【0405】

具体的な実施形態において、抗OX40抗体は、癌の治療のため熱ショックタンパク質ペプチド複合体（HSPPC）、例えば熱ショックタンパク質ペプチド複合体-96（HSPPC-96）と併用して対象に投与される。HSPPC-96は、抗原ペプチドと複合体化した96kDa熱ショックタンパク質（Hsp）、gp96を含む。HSPPC-96は、対象の腫瘍から製造される癌免疫療法薬であり、癌の抗原性「フィンガープリント」を含む。一部の実施形態において、このフィンガープリントは、その特定の対象の特異的癌細胞のみに存在するユニークな抗原を含み、ワクチンの注射が対象の免疫系を刺激して、特異的癌フィンガープリントを有する任意の細胞を認識して攻撃することが意図される。

30

【0406】

一部の実施形態において、HSPPC、例えばHSPPC-96は、対象の腫瘍組織から作製される。具体的な実施形態において、HSPPC（例えば、HSPPC-96）は、治療下の癌又はその転移のタイプの腫瘍から作製される。別の具体的な実施形態において、HSPPC（例えば、HSPPC-96）は、治療下の対象にとって自己である。一部の実施形態において、腫瘍組織は非壊死腫瘍組織である。一部の実施形態において、少なくとも1グラム（例えば、少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、又は少なくとも10グラム）の非壊死腫瘍組織が、ワクチンレジメンの作製に使用される。一部の実施形態において、外科的切除後、ワクチン製剤における使用前に非壊死腫瘍組織は凍結される。一部の実施形態において、HSPPC、例えばHSPPC-96は、腫瘍組織から精製技法によって単離され、ろ過され、及び注射ワクチン用に調製される。一部の実施形態において、対象には6~12用量のHSPPC、例えばHSPCC-96が投与される。かかる実施形態において、HSPPC、例えば、HSPPC-96用量は、初めの4用量が毎週投与され、次に追加の2~8用量が隔週で投与される。

40

【0407】

本明細書に記載される方法において使用し得るHSPPCの更なる例が、以下の特許及び特許出願（これらは、あらゆる目的のために全体として参照により本明細書に援用される）、米国特許第6,391,306号明細書、同第6,383,492号明細書、同第

50

6, 403, 095号明細書、同第6, 410, 026号明細書、同第6, 436, 404号明細書、同第6, 447, 780号明細書、同第6, 447, 781号明細書及び同第6, 610, 659号明細書に開示されている。

【0408】

一部の実施形態では、本発明は、医薬として用いられる本発明の抗体又は医薬組成物に関する。一部の態様において、本発明は、癌を治療する方法に用いられる本発明の抗体又は医薬組成物に関する。一部の態様において、本発明は、対象の癌を治療する方法であって、本発明の抗体又は医薬組成物の有効量を対象に投与するステップを含む方法に用いられる本発明の抗体又は医薬組成物に関する。一部の態様において、本発明は、医薬として用いられる(a)本発明の抗体又は医薬組成物及び(b)チェックポイントターゲティング剤に関する。一部の態様において、本発明は、癌を治療する方法に用いられる(a)本発明の抗体又は医薬組成物及び(b)チェックポイントターゲティング剤に関する。一部の態様において、本発明は、(a)本発明の抗体又は医薬組成物及び(b)チェックポイントターゲティング剤を含む組成物、キット又はキットオブパーツに関する。一態様において、本発明は、医薬として用いられる(a)本発明の抗体又は医薬組成物及び(b)IDO阻害薬に関する。一部の態様において、本発明は、癌を治療する方法に用いられる(a)本発明の抗体又は医薬組成物及び(b)IDO阻害薬に関する。一部の態様において、本発明は、(a)本発明の抗体又は医薬組成物及び(b)IDO阻害薬を含む組成物、キット又はキットオブパーツに関する。一部の態様において、本発明は、医薬として用いられる(a)本発明の抗体又は医薬組成物及び(b)ワクチンに関する。一部の態様において、本発明は、癌を治療する方法に用いられる(a)本発明の抗体又は医薬組成物及び(b)ワクチンに関する。一部の態様において、本発明は、(a)本発明の抗体又は医薬組成物及び(b)ワクチンを含む組成物、キット又はキットオブパーツに関する。癌を治療する方法に用いられる抗体又は医薬組成物の好ましい実施形態において、抗体はアゴニスト性である。

10

20

【0409】

一態様において、本明細書に提供されるとおりの対象の1つ以上の免疫機能又は免疫応答を調節する方法は、対象の1つ以上の免疫機能又は免疫応答を不活性化するか、低下させるか、又は阻害する方法であり、この方法は、それを必要としている対象に、抗OX40アンタゴニスト抗体又はその組成物を投与するステップを含む。具体的な実施形態において、本明細書には、1つ以上の免疫機能又は免疫応答を不活性化するか、低下させるか、又は阻害することが望ましい疾患を予防及び/又は治療する方法が提供され、この方法は、それを必要としている対象に、本明細書に記載される抗OX40アンタゴニスト抗体又はその組成物を投与するステップを含む。特定の実施形態において、本明細書には、自己免疫性又は炎症性疾患又は障害を治療する方法が提供され、この方法は、それを必要としている対象に抗OX40アンタゴニスト抗体又はその組成物の有効量を投与するステップを含む。特定の実施形態において、対象はヒトである。特定の実施形態において、疾患又は障害は、感染(ウイルス、細菌、真菌及び寄生虫)、感染に関連するエンドトキシンショック、関節炎、関節リウマチ、喘息、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、骨盤内炎症性疾患、アルツハイマー病、炎症性腸疾患、クローン病、潰瘍性大腸炎、ペイロニー病、セリアック病、胆嚢疾患、毛巣病、腹膜炎、乾癬、脈管炎、外科的癒着、脳卒中、I型糖尿病、ライム病、関節炎、髄膜脳炎、ブドウ膜炎、自己免疫性ブドウ膜炎、中枢及び末梢神経系の免疫介在性炎症性障害(多発性硬化症、ループス(全身性エリテマトーデスなど)及びギラン・バレー症候群など)、皮膚炎、アトピー性皮膚炎、自己免疫性肝炎、線維性胞隔炎、グレーブス病、IgA腎症、特発性血小板減少性紫斑病、メニエール病、天疱瘡、原発性胆汁性肝硬変、サルコイドーシス、強皮症、ウェゲナー肉芽腫症、腓炎、外傷(外科的)、移植片対宿主病、移植片拒絶反応、心筋梗塞並びにアテローム性動脈硬化症などの虚血性疾患を含めた心疾患(即ち、心血管疾患)、血管内凝固、骨吸収、骨粗鬆症、骨関節炎、歯周炎、低酸症、視神経脊髄炎、セリアック病、結合組織障害(例えば、ループス)、感染後炎症性障害(例えば、ギラン・バレー症候群)、及び腫瘍随伴症候群から

30

40

50

なる群から選択される。特定の実施形態において、疾患又は障害は、移植片拒絶反応、脈管炎、喘息、関節リウマチ、皮膚炎、炎症性腸疾患、ブドウ膜炎、及びループスからなる群から選択される。特定の実施形態において、本明細書における任意の方法（例えば、感染症を治療する方法、又は自己免疫性又は炎症性疾患又は障害を治療する方法）が、本明細書に記載されるとおりの抗体とチェックポイントターゲティング剤との対象への投与を含む。特定の実施形態において、チェックポイントターゲティング剤は抗体（例えば、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗PD-L2抗体、抗CTLA-4抗体、抗TIM-3抗体、抗LAG-3抗体、抗CEACAM1抗体、抗GITR抗体、抗CD137抗体、又は抗OX40抗体）である。特定の実施形態において、チェックポイントターゲティング剤はアンタゴニスト抗体又はアゴニスト抗体である。特定の実施形態において、チェックポイントターゲティング剤は抗PD-1抗体である。特定の実施形態において、チェックポイントターゲティング剤は抗GITR抗体である。特定の実施形態において、チェックポイントターゲティング剤は抗CD137抗体である。

10

【0410】

別の実施形態において、自己免疫性又は炎症性疾患又は障害と診断された患者に対し、患者における1つ以上の免疫細胞集団（例えば、CD4⁺及びCD8⁺T細胞などのT細胞エフェクター細胞）の増殖及び/又はエフェクター機能を減少させるため抗OX40アンタゴニスト抗体が投与される。

【0411】

具体的な実施形態において、本明細書に記載される抗OX40アンタゴニスト抗体は、当該技術分野において周知のアッセイ、例えば、ELISPOT、ELISA、及び細胞増殖アッセイを用いると、本明細書に記載される抗OX40アンタゴニスト抗体を投与されない対象の免疫機能と比べて対象の1つ以上の免疫機能又は免疫応答を少なくとも99%、少なくとも98%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、少なくとも45%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも35%、少なくとも30%、少なくとも25%、少なくとも20%、又は少なくとも10%、又は10%~25%、25%~50%、50%~75%、又は75%~95%の範囲で不活性化するか、又は低下させるか、又は阻害する。具体的な実施形態において、免疫機能はサイトカイン産生（例えば、IL-2、TNF-、IFN-、IL-4、IL-10、及び/又はIL-13産生）である。別の実施形態において、免疫機能はT細胞増殖/拡大であり、これは、例えばフローサイトメトリーにより、T細胞のマーカー（例えば、CD3、CD4、又はCD8）を発現する細胞数を検出してアッセイすることができる。別の実施形態において、免疫機能は抗体産生であり、これは、例えばELISAによってアッセイすることができる。一部の実施形態において、免疫機能はエフェクター機能であり、これは、例えば細胞傷害性アッセイ又は当該技術分野において周知の他のアッセイによってアッセイすることができる。別の実施形態において、免疫機能はTh1応答である。別の実施形態において、免疫機能はTh2応答である。別の実施形態において、免疫機能はメモリー応答である。

20

30

【0412】

具体的な実施形態において、抗OX40アンタゴニスト抗体によって低下させるか又は阻害することのできる免疫機能の非限定的な例は、エフェクターリンパ球の増殖/拡大（例えば、エフェクターTリンパ球数の減少）、及びエフェクターリンパ球（例えば、エフェクターTリンパ球）のアポトーシスの刺激である。詳細な実施形態において、本明細書に記載される抗OX40アンタゴニスト抗体によって低下又は阻害される免疫機能は、CD4⁺T細胞（例えば、Th1及びTh2ヘルパーT細胞）、CD8⁺T細胞（例えば、細胞傷害性Tリンパ球、/T細胞、及び/T細胞）、B細胞（例えば、形質細胞）、メモリーT細胞、メモリーB細胞、腫瘍常在性T細胞、CD122⁺T細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞）、マクロファージ、単球、樹状細胞、マスト細胞、好酸球、好塩基球又は多核白血球の数の増殖/拡大又はその活性化である。一実施形態におい

40

50

て、本明細書に記載される抗OX40アンタゴニスト抗体は、リンパ球前駆体の増殖/拡大又は数を不活性化するか、又は低下させるか、又は阻害する。一部の実施形態において、本明細書に記載される抗OX40アンタゴニスト抗体は、陰性対照（例えば、本明細書に記載される抗OX40アンタゴニスト抗体によって治療されず、それと共に培養されず、又はそれと接触していないそれぞれの細胞の数）と比べて、CD4⁺ T細胞（例えば、Th1及びTh2ヘルパーT細胞）、CD8⁺ T細胞（例えば、細胞傷害性Tリンパ球、 γ T細胞、及び δ T細胞）、B細胞（例えば、形質細胞）、メモリーT細胞、メモリーB細胞、腫瘍常在性T細胞、CD122⁺ T細胞、ナチュラルキラー細胞（NK細胞）、マクロファージ、単球、樹状細胞、マスト細胞、好酸球、好塩基球又は多核白血球の数をおよそ少なくとも99%、少なくとも98%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、少なくとも45%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも35%、少なくとも30%、少なくとも25%、少なくとも20%、又は少なくとも10%、又は10%~25%、25%~50%、50%~75%、又は75%~95%の範囲で減少させる。

10

【0413】

一部の態様において、本発明は、自己免疫性又は炎症性疾患又は障害を治療する方法に用いられる本発明の抗体又は医薬組成物に関する。一態様において、本発明は、感染症を治療する方法に用いられる本発明の抗体又は医薬組成物に関する。自己免疫性若しくは炎症性疾患若しくは障害、又は感染症を治療する方法に用いられる抗体又は医薬組成物の好ましい実施形態において、抗体はアンタゴニスト性である。

20

【0414】

5.5.1.1 投与経路及び投薬量

本明細書に記載される抗体又は組成物は、非経口、皮下、静脈内、皮内、経皮、鼻腔内、腫瘍内、及び腫瘍流入領域リンパ節への投与など、種々の経路によって対象に送達することができる。一実施形態において、本抗体又は組成物は静脈内又は腫瘍内経路によって投与される。

【0415】

病態の治療及び/又は予防において有効となり得る抗体又は組成物の量は疾患の性質に依存することになり、標準的な臨床技術によって決定することができる。

30

【0416】

組成物中に用いられる正確な用量も投与経路、及び疾患の重症度に依存することになり、専門家の判断及び各対象の状況に応じて決定されなければならない。例えば、有効用量はまた、投与手段、標的部位、患者の生理学的状態（年齢、体重及び健康を含む）、患者がヒト又は動物か、投与されている他の薬物療法、又は治療が予防的又は療法的かによっても異なり得る。通常、患者はヒトであるが、トランスジェニック哺乳動物を含めた非ヒト哺乳動物も治療することができる。治療投薬量は、安全性及び有効性が最適となるように最適にタイトレーションされる。

【0417】

特定の実施形態において、最適投薬量範囲の同定を促進するため、インビトロアッセイが用いられる。有効用量は、インビトロ又は動物モデル試験系から得られた用量反応曲線から推定することができる。

40

【0418】

概して、ヒト抗体は、外来性ポリペプチドに対する免疫応答に起因して、他の種からの抗体よりもヒト体内でより長い半減期を有する。従って、より低い投薬量のヒト抗体及びより少ない頻度の投与が可能であることが多い。

【0419】

5.5.2 検出及び診断的使用

本明細書に記載される抗OX40抗体（例えば、第5.2節を参照されたい）を使用することにより、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、免疫沈降、又はウエスタンブ

50

ロッキングなどのイムノアッセイを含めた当業者に公知の古典的な免疫組織学的方法を用いて生体試料中のOX40タンパク質レベルをアッセイすることができる。好適な抗体アッセイ標識は当該技術分野において公知であり、グルコースオキシダーゼなどの酵素標識；ヨウ素（ ^{125}I 、 ^{121}I ）、炭素（ ^{14}C ）、硫黄（ ^{35}S ）、トリチウム（ ^3H ）、インジウム（ ^{121}In ）、及びテクネチウム（ ^{99}Tc ）などの放射性同位元素；ルミノールなどの発光標識；及びフルオレセイン及びローダミンなどの蛍光標識、及びビオチンが挙げられる。かかる標識は、本明細書に記載される抗体の標識に使用することができる。或いは、本明細書に記載される抗OX40抗体を認識する二次抗体を標識し、これを抗OX40抗体と組み合わせることで用いることにより、OX40タンパク質レベルを検出してもよい。

10

【0420】

OX40タンパク質の発現レベルのアッセイは、第1の生体試料中のOX40タンパク質レベルを直接（例えば、絶対タンパク質レベルを決定又は推定することによる）、又は相対的に（例えば、第2の生体試料中の疾患関連タンパク質レベルと比較することによる）、定性的又は定量的に計測又は推定することを含むものと意図される。第1の生体試料中のOX40ポリペプチド発現レベルは、計測又は推定し、標準OX40タンパク質レベルと比較することができ、この標準は、障害を有しない個体から得られた第2の生体試料から採取されるか、又は障害を有しない個体集団からのレベルを平均することによって決定される。当該技術分野では理解されるであろうとおり、「標準」OX40ポリペプチドレベルが既知となれば、それを比較用の標準として繰り返し使用することができる。

20

【0421】

本明細書で使用されるとき、用語「生体試料」は、対象から得られた任意の生体試料、細胞株、組織、又は潜在的にOX40を発現する細胞の他の供給源を指す。動物（例えば、ヒト）から組織生検及び体液を入手する方法は、当該技術分野において周知である。生体試料には、末梢単核血球が含まれる。

【0422】

本明細書に記載される抗OX40抗体は、当業者に周知の標準的であり且つ本記載に基づくインビトロ及びインビボ適用を含め、予後判定、診断、モニタリング及びスクリーニング適用に使用することができる。免疫系の状態及び/又は免疫応答のインビトロ評価及び判定用の予後判定、診断、モニタリング及びスクリーニングアッセイ及びキットを利用して予測、診断及びモニタすることにより、免疫系機能不全を有することが分かっているか、又はそれを有する疑いがあるものを含めた患者試料を、又は予想される又は所望の免疫系応答、抗原応答又はワクチン応答に関して判定してもよい。免疫系の状態及び/又は免疫応答の評価及び判定はまた、ある薬物の臨床試験又は特定の化学療法剤若しくは抗体の投与が（これらの組み合わせを含め）別の薬剤又は抗体と比べて患者に適合するかどうかの決定においても有用である。この種の予後判定及び診断モニタリング及び評価では、既に、乳癌におけるHER2タンパク質に対する抗体（Herceptest（商標）、Dako）が実際に利用されており、このアッセイはまた、Herceptin（登録商標）を使用した抗体療法に関する患者の判定にも用いられている。インビボ適用としては、標的化細胞療法及び免疫系調節及び免疫応答の放射性イメージングが挙げられる。

30

40

【0423】

一実施形態では、抗OX40抗体は、生検試料の免疫組織化学において使用することができる。

【0424】

別の実施形態では、抗OX40抗体を使用してOX40レベル、又はその膜表面上にOX40を含有する細胞のレベルを検出し、次にそのレベルを特定の疾患症状に関係付けることができる。本明細書に記載される抗OX40抗体は検出可能標識又は機能性標識を有し得る。蛍光標識が用いられる場合、現在利用可能な顕微鏡法及び蛍光活性化セルソーター分析（FACS）又は当該技術分野において公知の両方法の組み合わせ手順を利用して特異的結合メンバーを同定し、及び定量化することができる。本明細書に記載される抗O

50

X40抗体は蛍光標識を有することができる。例示的蛍光標識としては、例えば、反応性及びコンジュゲート型プローブ、例えば、アミノクマリン、フルオレセイン及びテキサスレッド、Alexa Fluor色素、Cy色素及びDyLight色素が挙げられる。抗OX40抗体は、同位元素³H、¹⁴C、³²P、³⁵S、³⁶Cl、⁵¹Cr、⁵⁷Co、⁵⁸Co、⁵⁹Fe、⁶⁷Cu、⁹⁰Y、⁹⁹Tc、¹¹¹In、¹¹⁷Lu、¹²¹I、¹²⁴I、¹²⁵I、¹³¹I、¹⁹⁸Au、²¹¹At、²¹³Bi、²²⁵Ac及び¹⁸⁶Reなどの放射性標識を有することができる。放射性標識が用いられる場合、当該技術分野において公知の現在利用可能なカウント手順を利用してOX40（例えば、ヒトOX40）への抗OX40抗体の特異的結合を同定し、定量化し得る。標識が酵素である例では、検出は、当該技術分野において公知のとおり現在の利用されている比色分析法、分光光度法、蛍光分光光度法、電流測定法又は気体定量法のいずれかによって達成し得る。これは、抗体とOX40との間の複合体形成を可能にする条件下で試料又は対照試料を抗OX40抗体に接触させることにより実現し得る。抗体とOX40との間に形成される任意の複合体が検出され、試料及び対照において比較される。本明細書に記載される抗体のOX40に対する特異的結合を踏まえると、その抗体を使用して細胞表面上のOX40発現を特異的に検出することができる。本明細書に記載される抗体はまた、イムノアフィニティー精製によるOX40の精製にも使用することができる。

10

20

30

40

50

【0425】

また、本明細書には、例えば、OX40又はOX40/OX40L複合体の存在の程度を定量分析するための、試験キットの形態で調製されてもよいアッセイシステムも含まれる。このシステム又は試験キットは、標識された構成成分、例えば標識された抗体と、1つ以上の追加の免疫化学的試薬とを含み得る。キットに関する詳細については、例えば、以下の第5、6節を参照されたい。

【0426】

一部の態様では、試料中のOX40をインビトロで検出する方法であって、前記試料を抗体と接触させるステップを含む方法が、本明細書に提供される。一部の態様において、本明細書には、試料中のOX40のインビトロ検出のための本明細書に提供される抗体の使用が提供される。一態様において、本明細書には、対象におけるOX40の検出に用いられる本明細書に提供される抗体又は医薬組成物が提供される。一態様において、本明細書には、診断薬として用いられる本明細書に提供される抗体又は医薬組成物が提供される。好ましい一実施形態において、本抗体は検出可能標識を含む。好ましい一実施形態において、OX40はヒトOX40である。好ましい一実施形態において、対象はヒトである。

【0427】

5.6 キット

本明細書には、本明細書に記載される1つ以上の抗体又はそのコンジュゲートを含むキットが提供される。具体的な実施形態において、本明細書には、本明細書に提供される1つ以上の抗体など、本明細書に記載される医薬組成物の成分の1つ以上が充填された1つ以上の容器を含む医薬パック又はキットが提供される。一部の実施形態において、本キットには、本明細書に記載される医薬組成物と、本明細書に記載されるものなどの任意の予防剤又は治療剤とが含まれる。特定の実施形態において、本キットには、T細胞マイトジェン、例えば、フィトヘマグルチニン(PHA)及び/又はホルポールミリストアセテート(PMA)など、又はTCR複合体刺激抗体、例えば抗CD3抗体及び抗CD28抗体が含まれ得る。任意選択で、医薬品又は生物学的製剤の製造、使用又は販売を規制する行政機関が指定する様式の通知がかかる容器と関連付けられてもよく、この通知は、その機関によるヒト投与向けの製造、使用又は販売の認可を反映するものである。

【0428】

また、本明細書には、上記の方法において使用することのできるキットも提供される。一実施形態において、キットは、1つ以上の容器に本明細書に記載される抗体、好ましくは精製抗体を含む。具体的な実施形態において、本明細書に記載されるキットには、対照

として使用することのできる実質的に単離されたOX40抗原（例えば、ヒトOX40）が含まれる。別の具体的な実施形態において、本明細書に記載されるキットは、OX40抗原と反応しない対照抗体を更に含む。別の具体的な実施形態において、本明細書に記載されるキットには、OX40抗原への抗体の結合を検出するための1つ以上の要素が含まれる（例えば、抗体が、蛍光化合物、酵素基質、放射性化合物又は発光化合物などの検出可能な基質にコンジュゲートされてもよく、又は第1の抗体を認識する二次抗体を検出可能な基質にコンジュゲートしてもよい）。具体的な実施形態において、本明細書に提供されるキットは、組換え産生されるか又は化学的に合成されたOX40抗原を含み得る。キットに提供されるOX40抗原はまた、固体支持体に結合されていてもよい。より具体的な実施形態において、上述のキットの検出手段は、OX40抗原が結合する固体支持体を含む。かかるキットはまた、結合されていない、レポーターで標識された抗ヒト抗体又は抗マウス/ラット抗体も含み得る。この実施形態において、OX40抗原への抗体の結合は、前記レポーター標識抗体の結合によって検出することができる。また、(a)本発明の抗体又は医薬組成物、及び(b)チェックポイントターゲティング剤、IDO阻害薬及び/又はワクチンを含むキット又はキットオブパーツも提供される。

10

【0429】

以下の例は、限定としてではなく、例示として提供される。

【実施例】

【0430】

本節（即ち、第6節）の例は、限定としてではなく、例示として提供される。

20

【0431】

6.1 実施例1：ヒトOX40に対する新規抗体の生成

この例は、ヒトOX40に結合する抗体の生成及び特徴付けについて記載する。詳細には、この例は、ヒトOX40に特異的に結合し且つT細胞に対して共刺激効果を呈するヒト抗体の生成について記載する。

【0432】

6.1.1 ライブラリ生成

Retrocyte Display（商標）ライブラリの生成が本明細書に記載される。ライブラリ挿入の生成のため、2つの臍帯血試料に由来するFACSで分取したCD19陽性ヒトBリンパ球からフェノール/クロロホルムで全RNAを抽出した。各臍帯血試料の全RNA（1µg）を使用することにより、FermentasのRevertAid First Strand cDNA合成キット（カタログ番号K1621及びK1622）を用いて第1鎖cDNAを合成した。このcDNAからPCRによって抗体可変領域を増幅し、レトロウイルス発現ベクター（pCMA）にクローニングした。続いてこれらのコンストラクトを使用してpreB細胞を形質導入し、Retrocyte Display（商標）技術を用いて表面上に抗体を発現させた。このレトロウイルス発現ベクターは、5'及び3'LTRと、膜アンカーフラクシオン（IGHG1）を含む免疫グロブリン定常領域（IGHG1又はIGKC）と、CD4表面マーカー遺伝子とを含んだ。

30

【0433】

軽鎖可変領域（VL）は、Vファミリー特異的フォワードプライマー及びリバープライマー混合物を使用したセミヌステッドPCRによって増幅した。フォワードプライマーがHindIIIクローニング部位を導入し、リバープライマーがEco47IIIクローニング部位を導入した。

40

【0434】

重鎖可変領域（VH）は、VHファミリー特異的フォワードプライマー及びリバープライマー混合物を使用したPCRによって増幅した。フォワードプライマーがHindIIIクローニング部位を導入し、リバープライマーがEco47IIIクローニング部位を導入した。

【0435】

50

増幅したVH及びV_H領域を37℃で一晩消化した。消化後、400~450bpのサイズのバンドが得られ、これをゲル精製した(Macherrey & Nagel, Nucleospin Gel and PCR clean-up)。

【0436】

重鎖可変領域のクローニングについては、コンストラクト3181(pCMA-InsX Cg(iso3)loxP2-I-tr__huCD4-loxP)をHindIII/Eco47IIIによって37℃で4時間消化し、8362bpのサイズのバンドをゲル精製した。軽鎖可変領域のクローニングについては、コンストラクト3204(pCMA-InsX Ck-I-CD4)をHindIII/Eco47IIIによって37℃で4時間消化し、7465bpのサイズのバンドをゲル精製した。

10

【0437】

消化及び精製した抗体可変領域を適切な発現ベクターに1:3のベクター対インサート比を用いてインフレームでライゲートした。各VH及びV_Hファミリーを個別にレトロウイルス発現ベクターにライゲートし、沈殿によって10倍濃縮した。沈殿したVH及びV_Hライゲーション反応物はまた、ライブラリ生成のため個別に大腸菌(E.coli)DH10B細胞に形質転換した。各VH及びV_Hファミリーを個別にライゲートし、沈殿させ、及び形質転換することにより、ライブラリが機能性生殖系列遺伝子の天然の分布を反映することが可能になり、機能性生殖系列遺伝子の数がそれ程多くないファミリーと比較して、多数の機能性生殖系列遺伝子を有するVH又はV_Hファミリーが最終的なライブラリにおいて高度に表現されることが確実となる。形質転換後、大腸菌(E.coli)細胞を回収し、最終的なライブラリに組み合わせた。各ライブラリの品質は、診断的制限消化及びシーケンシングデータの分析によって管理した。配列解析のデータから、ライブラリの多様性を計算した。

20

【0438】

6.1.2 事前選択されたpreB細胞クローンからの重鎖及び軽鎖の回収

上記に記載したとおり生成したライブラリ材料を使用して、OX40に対する結合親和性が高い抗体を同定した。B細胞クローンを溶解させて、ゲノムDNAに安定に組み込まれた挿入レトロウイルスベクターから当該技術分野において標準的なPCR方法を用いて重鎖及び軽鎖可変領域を増幅した。続いて増幅された重鎖及び軽鎖可変領域を、ヒト重鎖及び軽鎖定常領域を含有する哺乳類発現ベクターにクローニングした。続いてDNAプラスミド調製物を使用してCHO細胞をトランスフェクトし、発現した抗体を、サスペンションアレイ技術を用いて試験した。抗体重鎖及び軽鎖をMicrosynth(Balgach, Switzerland)においてシーケンシングした。

30

【0439】

6.1.3 抗OX40抗体の生物物理学的特徴付け

pab1949と命名される抗体が選択され、これを以下に記載するとおり幾つものアッセイで特徴付けた。抗OX40抗体pab1949は、配列番号60のアミノ酸配列を含む重鎖と配列番号50のアミノ酸配列を含む軽鎖とを含む。抗体pab1949は、定常領域への可変領域のインフレームでのクローニングを容易にするT109S置換(即ち、野生型軽鎖定常ドメインと比べて、109位のスレオニンのセリンによる置換)(Kabataに従い付番)を軽鎖定常ドメインに含むヒトIgG₁抗体である。この突然変異は、抗体の結合又は機能に影響を及ぼさない保存された修飾である。pab1949-1と呼ばれる野生型対応物(これは、Kabataに従い付番して109位にスレオニンを含む)も生成した。抗体pab1949-1は、配列番号60の重鎖と配列番号20の軽鎖とを含むヒトIgG₁抗体である。

40

【0440】

6.1.3.1 バイオレイヤー干渉法による親和性測定

pab1949-1の親和性をバイオレイヤー干渉法(BLI)によって決定した。簡潔に言えば、1xPBSを使用して組換えヒトOX40抗原(OX40-Fc、R&D)を希釈することにより0.2µMの1,000µlを得て、96ウェルプレートに加えた

50

。p a b 1 9 4 9 - 1を5 0 n Mの濃度となるように1 × P B Sに希釈した。この5 0 n M溶液から1 × P B Sを使用してp a b 1 9 4 9 - 1の6ポイント段階希釈物を調製することにより5 0 n M～0 . 7 8 n Mの範囲の抗体希釈物を得て、ウェル当たり1 0 0 μ lのそれぞれの抗体段階希釈を9 6ウェルプレートに加えた。製造者の指示に従い閾値を1 . 0 n mとしてO c t e t (登録商標)の1 6チャンネルモードを用いてセンサをヒトO X 4 0抗原で2 5 において5分間被覆した。ブロックするため、0 . 5 m g / m lの非特異的I g G₁抗体を1 0分間インキュベートした。p a b 1 9 4 9 - 1の段階抗体希釈物が入ったプレートをO c t e t (登録商標)機器に置いた。製造者の指示に従いアッセイを行った。O X 4 0抗原に対するp a b 1 9 4 9 - 1の結合及び解離は、それぞれ3分間及び1 0分間記録した。データはO c t e t (登録商標)データ分析ソフトウェアを使用して分析しており、結果を表5に示す。

【0 4 4 1】

【表 5】

表 5. pab1949-1の親和性測定

| K_a (1/Ms) | K_d (1/s) | K_D (nM) |
|--------------------|-----------------------|------------|
| 1.09×10^6 | 1.26×10^{-4} | 0.11 |

【0 4 4 2】

6 . 1 . 3 . 2 活性化ヒト又はカニクイザルT細胞への抗体結合

抗O X 4 0抗体p a b 1 9 4 9及びp a b 1 9 4 9 - 1のヒト又はカニクイザルO X 4 0への結合特性をフローサイトメトリーによって分析した。

【0 4 4 3】

健常ドナーバフィーコート (R e s e a r c h B l o o d C o m p o n e n t s , L L C) から F i c o l l グラジエントで単離したヒトP B M Cについて、磁気ベースの分離 (M i l t e n y i B i o t e c) を用いて手付かずのC D 4 + 及びC D 8 + T細胞をエンリッチした。次にエンリッチされたTリンパ球集団を推奨される培養条件下でC D 3 - C D 2 8 拡大用エクспанションビーズ (M i l t e n y i B i o t e c) によって5 0 0 U r I L - 2 (R & D S y s t e m s) と共に3日間、その後は5 0 U r I L - 2 と共に活性化した。推奨される培養条件は、1 0 %ウシ胎仔血清、1 0 m M H E P E S 及び1 × P e n / S t r e p - グルタミンを補足したR P M I - 1 6 4 0 培地において3 7 及び5 % C O₂で培養される細胞として定義された。活性化後、細胞をF A C S 緩衝液 (2 % F B S 含有P B S) に希釈したC D 3 (B V 7 1 1 、 O K T 3) 、 C D 4 (B V 6 0 5 、 O K T 4) 、 C D 8 a (B V 6 5 0 、 R P A - T 8) のコンジュゲート抗体、及びプレコンジュゲート抗O X 4 0抗体又はアイソタイプ対照 (両方ともA f l u o r 4 8 8 、 1 0 μ g / m l) を含有する表面抗体カクテルと共に4 で3 0分間インキュベートした。単染色コンペンセーションコントロール (C D 4 5 - B V 6 5 0 、 C D 4 5 - A f l u o r 4 8 8 、 C D 4 5 - B V 6 0 5 、 及びC D 4 5 - B V 7 1 1) のため、更なる試料を取っておいた。次に細胞をF A C S 緩衝液で2回洗浄し、L S R F o r t e s s a フローサイトメーター (B D B i o s c i e n c e s) を使用して分析した。フローサイトメトリープロットは、F A C S D I V A 及びW E H I W e a s e l ソフトウェアの組み合わせを用いて分析した。抗O X 4 0抗体p a b 1 9 4 9 は活性化ヒトC D 4 + T細胞及びC D 8 + T細胞に結合した (図 1 A) 。

【0 4 4 4】

活性化T細胞への結合に関して一連の濃度のp a b 1 9 4 9 - 1を試験して、用量反応関係の特徴付けた。端的には、ヒト末梢血単核細胞 (P B M C) を解凍してP B Sで洗浄した。磁気ビーズ (M i l t e n y i B i o t e c) でT細胞のネガティブ単離を実施し、精製されたT細胞をR P M I + 1 0 % F B S に再懸濁し、抗C D 3 / 抗C D 2 8 ビーズによって3 7 及び5 % C O₂で7 2時間刺激した。これらの細胞を洗浄し、F c プロ

10

20

30

40

50

ッキング溶液 (Trustain, Biolegend) によって室温で15分間ブロックした。細胞を再び洗浄し、pab1949-1の段階希釈物 (10~0.00003 μg/ml) によって暗所で4において45分間染色した。細胞を洗浄し、次に抗CD3イソチオシアン酸フルオレセイン (FITC) (クローンSP34) 及び抗CD4ブリリアントバイオレット (BV) 510 (クローンOKT4) を含む系列マーカー抗体で二次抗体と共に染色してpab1949-1 (抗IgG PE) を検出した。細胞を洗浄し、1.6%パラホルムアルデヒドで固定し、Becton Dickinson Fortessaフローサイトメーターを使用して捕捉した。pab1949-1は、刺激されたT細胞にのみ結合し、しかし、非刺激T細胞には結合しないことを実証した (図1B)。pab1949-1の活性化ヒトCD4+ T細胞への結合は用量依存的であった (図1C)。

10

【0445】

次に、pab1949-1の結合に関して幾つもの静止免疫細胞サブタイプを試験した。ヒトPBMCを解凍してPBSで洗浄した。死細胞を染色するため、赤外 (IR) 生体判別色素を加え、遮光下室温で15分間インキュベートした。細胞を洗浄し、アミン色素赤外 (Life Technologies) によって室温で15分間染色した。細胞を洗浄し、室温で10分間Fcブロックした (Trustain FcX, Biolegend)。洗浄後、細胞を1 μg/mlのpab1949-1又はIgG₁アイソタイプ対照と共に遮光下4で30分間インキュベートした。細胞を洗浄し、二次試薬 (抗FcF(ab')PE、Jackson Immune Research Laboratories) で染色し、続いて、抗CD3フィコエリトリンシアニン7 (PECy7、クローンSP34.2)、抗CD8 BV510 (クローンSK1)、抗CD4ペリジニン-クロロフィル-タンパク質複合体 (PerCP) Cy5 (クローンLy200)、及び抗CD14 FITC (クローンTUK4) を含む系列マーカー抗体で染色した。細胞を洗浄し、1.6%パラホルムアルデヒドで固定して、Becton Dickinson Fortessaフローサイトメーターを使用して捕捉した。図1Dに示すとおり、抗OX40抗体pab1949-1は、CD14+ 細胞、CD4+ T細胞、CD8+ T細胞、CD20+ B細胞、又はCD3-CD20- 細胞への検出可能な結合を示さなかった。

20

【0446】

種交差反応性に関して試験するため、活性化カニクイザル (マカカ・ファスシキュリス (Macaca fascicularis)) PBMCを使用して細胞結合アッセイを実施した。簡潔に言えば、10%熱失活FBSを補足したRPMI培地中、5%CO₂加湿チャンバ内において37で生存カニクイザルPBMC (Worldwide Primate Inc.) をコンカナバリンA (Sigma Aldrich、5 μg/ml) 及び組換えIL-2 (Miltentyi、20 U/ml) と共に3日間活性化した。活性化後、細胞をヒトFc-受容体ブロック (Biolegend) と共に室温で15分間インキュベートして非特異的結合を減らした。この試料に抗OX40抗体pab1949又はヒトIgG₁アイソタイプ対照 (10 μg/ml) を加え、4で30分間インキュベートした。FACS緩衝液で1回洗浄した後、APCコンジュゲート抗ヒト抗体並びにCD4 (BV605、OKT4) 及びCD8a (PE、RPA-T8) に特異的な抗体をいずれも2.5 μg/mlで含有する抗体カクテルをFACS緩衝液 (PBS、2 mM EDTA、0.5% BSA及びpH7.2) で希釈し、各試料に加えて4で30分間インキュベートした。染色前に、単染色コンペーンションコントロール (カニクイザル反応性: CD4-BV605、CD4-PE、及びCD4-APC) のため、更なる試料を取っておいた。試料をFACS緩衝液で2回洗浄し、LSRFortessaフローサイトメーター (BD Biosciences) を用いて分析した。図1Eに示すとおり、pab1949は活性化カニクイザルCD4+ T細胞に結合した。

30

40

【0447】

6.1.3.3 OX40抗体選択性アッセイ

50

TNFRスーパーファミリーの他のメンバーに対する p a b 1 9 4 9 - 1 の O X 4 0 選択性を、多重アッセイとしてサスペンションアレイ技術を用いて評価した。標準的なNH₂-エステル化学を用いて幾つものTNFRファミリーメンバーをLuminox（登録商標）マイクロスフェアに化学的にカップリングした。p a b 1 9 4 9 - 1 の精製材料をアッセイ緩衝液（Roche 11112589001）中に10 ng/ml、100 ng/ml及び1000 ng/mlに希釈した。簡潔に言えば、25 µlの各希釈物を暗所（20、650 rpm）で5 µlアッセイ緩衝液中の1500個のLuminox（登録商標）マイクロスフェアと共に96ハーフウェルフィルタプレート（Millipore, MABVN1250）において1時間インキュベートした。Luminox（登録商標）マイクロスフェア（Luminox Corp、LC10001-01、LC10005-01、LC10010-01、LC10014-01、LC10015-01、LC10018-01、LC10022-01、LC10026-01、LC10052-01、LC10053-01及びLC10055-01）に、COOHビーズ表面とのアミンカップリングによって組換えヒトLTBR-Fc（Acros Biosystems, LTR-H5251）、抗ヒトIgG（Fab）₂ 特異的、JIR、105-006-097）、組換えヒトOX40-Fc（R&D systems、3388-OX）、組換えヒトGITR-Fc（R&D、689-GR）、組換えヒトDR6-Fc（Sino Biological、10175-H02H）、組換えヒトDR3-Fc（R&D、943-D3）、組換えヒトGITR-His（Sino Biological、13643-H08H）、組換えヒトTWEAK R-Fc（Sino Biological、10431-H01H）、組換えヒトOX40-His（Sino Biological、10481-H08H）、組換えヒト4-1BB-His（Sino Biological、10041-H08H）又は組換えヒトBAFFR-Fc（R&D、1162-BR）をカップリングした。1：3希釈系列（0.08～540 ng/ml）のデュプリケートの25 µlヒトIgG1標準（Sigma、I5154）を使用して標準曲線を生成した。検出は、R-PE（2.5 µg/ml；JIR 109-116-098、AbD Serotec Rapid RPE抗体コンジュゲーションキット、LNK022RPE）で標識した60 µlのヤギ抗ヒトIgG（Fab）₂ を使用して、更に1時間のインキュベーション時間（20、650 rpm）で行った。Luminox（登録商標）200システム（Millipore）を使用してプレートを分析した。48 µl試料容積中ウェル当たりの合計100ビーズをカウントした。PE MFI値を使用して、上述の組換えタンパク質への特異的又は非特異的結合を決定した。

10

20

30

【0448】

抗体 p a b 1 9 4 9 - 1 はヒトOX40への特異的結合を示し、試験濃度では、他のTNFRファミリーメンバーへの有意な結合は観察されなかった（データは示さず）。

【0449】

6.2 実施例2：抗OX40抗体の機能的特徴付け

この例は、上記に記載した方法によって生成された抗OX40抗体 p a b 1 9 4 9 及び p a b 1 9 4 9 - 1 がOX40のアゴニストとして機能する能力を実証する。抗体 p a b 1 9 4 9 及び p a b 1 9 4 9 - 1 をアッセイし、初代ヒトCD4⁺又はCD8⁺ T細胞を共刺激するそれらの能力を決定した。加えて、ヒトIgG₁抗体である p a b 1 9 4 9 及び p a b 1 9 4 9 - 1 をヒトIgG₄抗体、それぞれ p a b 2 0 4 4 及び p a b 2 0 4 4 - 1 に変換した。抗体 p a b 2 0 4 4 は p a b 1 9 4 9 と同じ重鎖可変領域及び同じ軽鎖を共有するが、ヒトIgG₄定常領域を含む。抗体 p a b 2 0 4 4 は配列番号61の重鎖配列と配列番号50の軽鎖配列とを含む。p a b 1 9 4 9 と同様に、p a b 2 0 4 4 は、抗体の結合又は機能に影響しない保存的修飾であるT109S単一アミノ酸置換を軽鎖定常領域に含み、クローニングを促進する。野生型対応物 p a b 2 0 4 4 - 1 は、K a b a t に従い付番して109位にスレオニンを含み、配列番号61の重鎖配列と配列番号20の軽鎖配列とを含む。同様に、p a b 1 9 4 9 及び p a b 1 9 4 9 - 1 はまた、ヒトIgG₂抗体、それぞれ p a b 2 1 9 3 及び p a b 2 1 9 3 - 1 にも変換した。抗体 p a b

40

50

2193は配列番号62の重鎖配列と配列番号50の軽鎖配列とを含む。抗体pab2193-1は配列番号62の重鎖配列と配列番号20の軽鎖配列とを含む。幾つかのアッセイにおいて、pab1949、pab1949-1、pab2044、pab2044-1、pab2193、又はpab2193-1の機能活性を調べた。

【0450】

アッセイの幾つかにおいて、本発明の抗OX40抗体のアゴニスト活性を参照抗体pab1784及びpab2045と比較した。抗体pab1784は、米国特許第7,960,515号明細書(本明細書において参照により援用される)に提供される抗体11D4の変換領域をベースとして生成された。pab1784の重鎖は11D4の重鎖可変領域(配列番号26)及び配列番号65のヒトIgG1定常領域のアミノ酸配列を含む。pab1784の軽鎖は11D4の軽鎖可変領域(配列番号24)及び配列番号25の定常領域のアミノ酸配列を含む。

10

【0451】

抗体pab2045は、国際公開第13/038191号パンフレット(本明細書において参照により援用される)に提供される抗体20E5の変換領域をベースとして生成された。pab2045の重鎖は20E5の重鎖可変領域(配列番号30)及び配列番号65のヒトIgG₁定常領域のアミノ酸配列を含む。pab2045の軽鎖は20E5の軽鎖可変領域(配列番号28)及び配列番号41の定常領域のアミノ酸配列を含む。

【0452】

6.2.1 抗OX40抗体が抗CD3刺激CD4⁺T細胞増殖に及ぼす効果
pab1949がT細胞増殖に及ぼす効果を調べるため、健常ドナーバフィーコート(Research Blood Components, LLC)からFicollグラジエントで単離したヒトPBMCについて、磁気ベースの分離(Stemcell Technologies)を用いて手付かずのCD4⁺T細胞をエンリッチした。分裂細胞内のカルボキシフルオレセイン二酢酸スクシンイミジルエステル(CFSE)色素の希釈をモニタすることにより、細胞増殖を決定した(Quah BJ et al., (2007) Nat Protoc, 2(9):2049-56)。エンリッチドCD4⁺T細胞を10 μ M CellTrace(商標)CFSE(Life Technologies)によって37 $^{\circ}$ Cで7日間標識した。綿密な洗浄後、10%熱失活FBSを補足したRPMI1640培地中に細胞を1 \times 10⁶細胞/mlで懸濁した。5 μ g/mlのpab1949、5 μ g/mlのIgG1アイソタイプ対照、又は2 μ g/mlの抗CD28抗体(BD Biosciences)のいずれかと共に、抗CD3抗体(3 μ g/ml、BD Biosciences)で予め被覆した平底96ウェルプレートの各ウェルに合計100 μ l(1 \times 10⁵細胞)を播種し、37 $^{\circ}$ C及び5%CO₂で培養した。5日目に細胞をFACS緩衝液(PBS中2%FBS)中0.5 μ l/ウェルのPerCP-Cy5.5標識抗CD4抗体によって4 $^{\circ}$ Cで30日間染色し、CFSE低CD4⁺細胞のパーセンテージをLSRFortessa(BD Biosciences)でフローサイトメトリーによって決定した。フローサイトメトリーデータはFlowJoを使用して分析した。

20

30

【0453】

上記に記載したのと同様のアッセイを用いてpab2044の活性を評価し、ここで、5 μ g/mlのpab2044、5 μ g/mlのIgG₄アイソタイプ対照(pab2031)、又は2 μ g/mlの抗CD28抗体(BD Biosciences)のいずれかと共に、抗CD3抗体(3 μ g/ml、BD Biosciences)で予め被覆した96ウェルプレートにCFSE標識CD4⁺T細胞を播種した。5日目にCFSE低CD4⁺細胞のパーセンテージをフローサイトメトリーによって決定した。

40

【0454】

図2A及び図2Bは、抗OX40抗体との共刺激によって誘導されたCD4⁺T細胞増殖の代表的なフローサイトメトリー分析のヒストグラムであり、細胞数(Y軸)及びCFSE標識CD4⁺T細胞によって放出された蛍光レベル(X軸)を示す。CFSEに

50

よって放出される蛍光レベルが減弱した細胞の割合の増加により、CD4+ T細胞増殖の増強が示される。CFSE低CD4+ 細胞のパーセンテージがヒストグラムに示される。pab1949 (図2A) 及びpab2044 (図2B) は両方ともに、プレート結合時、準最適濃度の抗CD3抗体で活性化した細胞に加えたとき、CD4+ T細胞増殖を誘導した。

【0455】

次に、T細胞増殖の誘導におけるpab1949の用量反応を計測した。健常ドナーバフィーコート (Research Blood Components, LLC) からFicollグラジエントで単離したPBMCについて、磁気ベースの分離 (Stemcell Technologies) を用いて手付かずのCD4+ T細胞をエンリッチした。次にエンリッチドCD4+ T細胞集団を10 μ M CellTrace (商標) CFSE (Life Technologies) によって37 $^{\circ}$ Cで7分間標識した。綿密な洗浄後、10%熱失活FBSを補足したRPMI1640培地中に細胞を1 \times 10⁶/mlで懸濁した。種々の濃度のpab1949又はIgG₁アイソタイプ対照と共に、抗CD3抗体 (3 μ g/ml、BD Biosciences) で予め被覆した平底96ウェルプレートの各ウェルに100 μ l (1 \times 10⁵) の細胞を播種し、37 $^{\circ}$ C及び5%CO₂で培養した。4日目に細胞をFACS緩衝液 (PBS中2%FBS) 中0.5 μ l/ウェルのAPC標識抗CD4抗体によって4 $^{\circ}$ Cで30分間染色し、CFSE低CD4+ 細胞のパーセンテージをLSRFortessa (BD Biosciences) でフローサイトメトリーによって決定した。

10

20

【0456】

図2Cに示すとおり、抗OX40抗体pab1949は、薬理的に関連性のある抗体濃度で高レベルのT細胞増殖を維持することが可能であった。CD4+ T細胞増殖は、0.2 μ g/ml~20 μ g/mlにおいてpab1949の濃度の実質的増加関数であった (図2C)。

【0457】

6.2.2 抗OX40抗体が抗CD3刺激ヒトPBMCサイトカイン産生に及ぼす効果
抗OX40抗体pab1949及びpab1949-1のアゴニスト活性の更なるエビデンスとして、準最適抗CD3刺激下のサイトカイン産生を計測した。

【0458】

細胞内サイトカイン染色実験のため、健常ドナーバフィーコート (Research Blood Components, LLC) からFicollグラジエントで単離したヒトPBMCを液体窒素中に保存し、実験当日に解凍した。細胞を細胞培養培地 (RPMI+10%FBS+20U/mlのIL-2) に再懸濁し、様々な準最適濃度のプレート結合抗CD3抗体+5 μ g/mlの抗OX40抗体pab1949又はアイソタイプ対照IgG₁抗体が入った96ウェル培養プレートに加えた。これらの試料を37 $^{\circ}$ C及び5%CO₂で3日間インキュベートした。活性化後、細胞内タンパク質輸送を阻害するため、細胞をプレフェルジンA (BD Biosciences) で製造者の指示に従い処理し、試料を37 $^{\circ}$ C及び5%CO₂で6時間インキュベートした。インキュベーション後、細胞を生死判別アミン色素 (Life technologies) で死細胞に関して染色した。FACS緩衝液 (PBS、2%FBS、pH7.2) で洗浄した後、冷FACS緩衝液で希釈したCD3 (APC Cy7、SP34.2)、CD4 (PerCP Cy5.5、L200)、及びCD8a (PE Cy7、SK1) に特異的な抗体を含有する抗体カクテルを各試料に加え、4 $^{\circ}$ Cで10分間インキュベートした。細胞を固定し、細胞内染色のためCytifix-Cytoperm (BD Biosciences) で製造者の指示に従い透過処理した。IFN γ (Alexa647、B27) 及びTNF (PE、Mab11) に特異的な抗体でPBMCを染色し、室温で10分間インキュベートした。染色前、マウスIgG抗体の軽鎖を結合するビーズを、単染色コンペンセーションコントロールを使用して細胞の染色に使用する抗体で染色した。1 \times Perm-洗浄緩衝液 (BD Biosciences) を使用して試料を洗浄し、FACS Cantof

30

40

50

ローサイトメーター (BD Biosciences) を使用して分析した。フローサイトメトリプロットはFlajoソフトウェアを使用して分析した。

【0459】

異なる4ドナーからのPBMCを試験した: ドナーKM、ドナーTM、ドナーGS、及びドナーSB。全てのドナーについて、pab1949はヒトT細胞に対する共刺激活性を実証し、IFN + TNF + 多機能性CD4+ T細胞及びCD8+ T細胞及びTNF + 単機能性CD4+ T細胞及びCD8+ T細胞を誘導した(図3A、図3B、及び図3C)。ドナーGSのPBMCでは、pab1949はまた、IFN + 単機能性T細胞の割合も増加させることが可能であった(図3B)。

【0460】

次に、上記に記載したものと同様の準最適抗CD3刺激アッセイにおいて、ドナーGSのPBMCに由来する細胞を使用して抗OX40抗体pab1949-1の用量タイトレーションを試験した。簡潔に言えば、PBMCをプレート結合抗CD3抗体(0.8 µg/ml)及びプレート結合pab1949-1又はIgG₁アイソタイプ対照抗体(0、0.3、1、3、6、12、25、又は50 µg/ml)と共に37 °C及び5%CO₂で4日間インキュベートした。活性化後、細胞内タンパク質輸送を阻害するため、細胞をプレフェルジンA(BD Biosciences)で製造者の指示に従い処理し、試料を37 °C及び5%CO₂で6時間インキュベートした。インキュベーション後、細胞をFITC生死判別アミン色素(Life technologies)で染色して生細胞と死細胞とを判別した。冷緩衝液(1xPBS+2%FBS、pH7.2)で洗浄した後、抗CD3(APCCy7、SP34.2)、抗CD4(PerCP Cy5.5、L200)、及び抗CD8a(PE Cy7、SK1)を含有する抗体カクテルを各試料に加え、4 °Cで10分間インキュベートした。細胞を固定し、細胞内染色のためCytotfix-Cytoperm(BD Biosciences)で製造者の指示に従い透過処理した。PBMCを抗IFN 抗体(Alexa647、B27)及び抗TNF 抗体(PE Mab11)で染色し、室温で10分間インキュベートした。1xPerm-洗浄緩衝液(BD Biosciences)を使用して試料を洗浄し、FACScanフローサイトメーター(BD Biosciences)を使用して捕捉した。フローサイトメトリプロットはFlajoソフトウェアを使用して分析した。図3D~図3Fに示されるとおり、抗OX40抗体pab1949-1は共刺激活性を実証し、TNF + CD4+ T細胞、IFN + TNF + 多機能性CD8+ T細胞、及びIFN + CD8+ T細胞の割合を用量依存的様式で増加させた。

【0461】

ある範囲用量のpab1949-1の共刺激活性について、上記に記載した準最適抗CD3刺激アッセイにおいて追加のドナーのPBMCに由来する細胞を使用して更に試験した。抗OX40抗体pab1949-1及びIgG₁アイソタイプ対照抗体は0、0.7、1.6、3.1、6.3、12.5、25、又は50 µg/mlで試験した。抗OX40抗体pab1949-1は、複数のドナーのPBMCにおいてIFN + 及び/又はTNF + T細胞の割合を一貫して増加させた(図4A~図4C)。

【0462】

特に、多くのドナーのPBMCについて、抗OX40抗体pab1949-1によって誘導されたIFN + 及び/又はTNF + T細胞の割合は、試験した幅広い抗体濃度にわたって抗体濃度の実質的増加関数であった(図3D~図3F及び図4A~図4C)。

【0463】

抗OX40抗体pab1949のアゴニスト活性を更に調べるため、サイトカインの分泌量を計測した。健常ドナーバフィーコート(Research Blood Components, LLC)からFicollグラジエントで単離したヒトPBMCを液体窒素中に保存し、実験当日に解凍した。細胞を細胞培養培地(RPMI+10%FBS+200 U/mlのIL-2)に再懸濁し、様々な準最適濃度のプレート結合抗CD3抗体+5 µg/mlの抗OX40抗体pab1949又はアイソタイプ対照IgG₁抗体が入った

10

20

30

40

50

96ウェル培養プレートに加えた。これらの試料を37℃及び5%CO₂でインキュベートし、4日後(SB#1A)又は3日後(SB#1B、SB#2、及びGS)のいずれかに細胞培養上清を回収した。IL-2、TNF- α 、IL-10、IL-4、及びIL-13の産生に関して、V-PLEX Proinflammatory Panel 1 (ヒト)キット(Meso Scale Discovery)を製造者の指示に従い使用して試料を試験した。

【0464】

図5Aに示されるとおり、抗OX40抗体pab1949は異なる2ドナー：ドナーSB及びドナーGSからのヒトPBMCにおけるサイトカイン産生を共刺激した。ドナーSBのPBMCのサイトカイン産生は2つの別個の実験で試験した：SB#1A及びSB#1Bは、それぞれ刺激から4日後及び3日後にサイトカインを計測した第1の実験の結果を示し；及びSB#2は、刺激から3日後にサイトカインを計測した第2の実験の結果を示す。

10

【0465】

次に、上記に記載したものと同様の準最適抗CD3刺激アッセイにおいてドナーGSのPBMCに由来する細胞を使用して、pab1949-1の用量タイトレーションによって誘導されたサイトカイン分泌を調べた。端的には、PBMCをプレート結合抗CD3抗体(0.8 μ g/ml)及びプレート結合pab1949-1又はIgG₁アイソタイプ対照抗体(0、0.3、1、3、6、12、25、又は50 μ g/ml)と共に37℃及び5%CO₂で4日間インキュベートした。活性化後、細胞培養上清を回収し、ヒトTH1/TH2-10-Plex組織培養キット(Meso Scale Discovery)を使用してサイトカインを検出した。

20

【0466】

図5B~図5Dに示されるとおり、抗OX40抗体pab1949-1はTNF- α 、IL-10、及びIL-13産生を用量依存的様式で刺激した。

【0467】

サイトカイン分泌の誘導におけるpab1949-1の共刺激活性を、追加のドナーのPBMCに由来する細胞を使用して更に確かめた。簡潔に言えば、PBMCをプレート結合抗CD3抗体(0.8 μ g/ml)及びプレート結合pab1949-1又はIgG₁アイソタイプ対照抗体(0、0.7、1.6、3.1、6.3、12.5、25、又は50 μ g/ml)と共に37℃及び5%CO₂で4日間インキュベートした。活性化後、上清に分泌されたサイトカインの量を非ヒト霊長類(NHP)V-PLEXアッセイキット(Meso Scale Discovery)を使用して計測した。

30

【0468】

試験した全てのドナーについて、pab1949-1はGM-CSF(図6A~図6C)、IL-2(図7A~図7C)、及びTNF- α (図8A~図8C)の分泌を用量依存的に増加させた。

【0469】

多くのドナーのPBMCについて、抗OX40抗体pab1949-1によって誘導されたサイトカイン(GM-CSF、IL-2、TNF- α 、TNF- β 、IL-10、及びIL-13)の分泌は、幅広い抗体濃度にわたって抗体濃度の実質的増加関数であった(図5B~図5D、図6A~図6C、図7A~図7C、及び図8A~図8C)。

40

【0470】

6.2.3 エフェクターT細胞：調節性T細胞共培養アッセイにおける抗OX40抗体の効果

次に、抗OX40抗体pab1949-1について、エフェクターT細胞(Teff)：調節性T細胞(Treg)共培養アッセイにおけるその活性を調べた。端的には、健常ドナーバフィーコート(Research Blood Components, LLC)からFicollグラジエントで単離したヒトPBMCを液体窒素中に保存し、実験当日に解凍した。調節性T細胞及びエフェクターT細胞を磁気ビーズ分離(それぞれCD4

50

+ CD25 + CD127^{dim} / - 調節性T細胞単離キットI I及びPant T細胞キット、Miltenyi Biotec) によって単離した。次に調節性T細胞を抗CD3 / 抗CD28 / 抗CD2ビーズ (Miltenyi Biotec) と共に細胞培養培地 (RPMI + 10% FBS) 中1 : 2 (T細胞 : ビーズ) の比でインキュベートすることにより2日間活性化した。活性化後、抗CD3 / 抗CD28 / 抗CD2ビーズ、可溶性又は架橋 (抗Fc F (ab')₂) を使用、Jackson ImmunoResearch) pab1949-1又はIgG₁ アイソタイプ対照 (10 µg/ml) の存在下で調節性T細胞及びエフェクターT細胞を96ウェル培養プレートに1 : 3 (Treg : Teff) の比で加えた。これらの試料を37 °C及び5% CO₂ で4日間インキュベートした。活性化後、上清を回収し、AlphaLISA (登録商標) (Perkin Elmer) を使用してIL-10又はIL-2を計測した。

【0471】

このインビトロTeff : Treg共培養アッセイにおいて、アイソタイプ処理細胞と比較したpab1949-1処理細胞によるIL-2産生の増強 (図9A) 及びIL-10産生の低下 (図9B) から明らかとなり、抗OX40抗体pab1949-1はTreg細胞によるTeff細胞集団の抑制を軽減した。

【0472】

6.2.4 ブドウ球菌 (Staphylococcus) エンテロトキシンA (SEA) 刺激時に抗OX40抗体がヒトPBMCに及ぼす効果

ブドウ球菌 (Staphylococcus) エンテロトキシンA (SEA) 刺激後、初代ヒトPBMCに対する抗OX40抗体pab1949及びpab1949-1の機能的活性を更に評価した。ペニシリン、ストレプトマイシン及び10% FBS (HyClone) を補足したRPMI 1640中の凍結保存したPBMC (10⁵細胞/ウェル) を96ウェルNUNC LON delta表面プレート (NUNC (商標)) に加えた。一定濃度 (図10A及び図10Bの10 µg/ml) 又は種々の濃度 (図10C及び図10Dの20、4、0.8、0.16、0.032、0.0064、及び0.00128 µg/ml ; 図10Eの50、10、2、0.4、0.08、0.016、及び0.0032 µg/ml) の抗OX40抗体又はアイソタイプ対照及び100 ng/mlのSEA (Toxin Technologies) の非存在下又は存在下においてこれらの細胞を37 °C、5% CO₂ 及び97%湿度で5日間培養した。清澄化した上清を回収し、分析時まで-80 °Cで保存した。IL-2及びIL-10について電気化学発光 (Meso Scale Discovery) を用いてサイトカインの力価を求めた。

【0473】

抗OX40抗体pab1949はこの初代ヒトPBMCアッセイでアゴニスト活性を示し、IL-2産生を誘導し (図10A)、及びIL-10産生を抑制した (図10B)。10 µg/mlのpab1949によるIL-2産生の増強は、参照抗OX40抗体pab1784及びpab2045で観察されるものよりも優れていた (図10A)。図10C、図10D、及び図10Eは3つの独立した実験からの用量反応曲線であり、異なる濃度のpab1949、pab1949-1、又は参照抗体pab1784及びpab2045による共刺激後のIL-2の倍数変化を示す。抗体pab1949及びpab1949-1は参照抗体と異なる用量反応関係を呈し、薬理的に関連性のある抗体濃度で高レベルのIL-2産生を誘導することが可能であった。pab1949又はpab1949-1によって誘導されたIL-2産生は、幅広い抗体濃度 (例えば、図10C及び図10Dに示されるとおり0.032 ~ 20 µg/ml、又は図10Eに示されるとおり0.0032 ~ 50 µg/ml) にわたって抗体濃度の実質的増加関数であった。

【0474】

次に、上記に記載した初代ヒトPBMCアッセイにおいて、IgG₁ 抗体pab1949-1及びIgG₂ 抗体pab2193-1の機能的活性を比較した。簡潔に言えば、96ウェルNUNC LON delta表面プレート中のNormocin (商標) (InvivoGen、#ant-nr) 及び10% 熱失活FBS (Gibco、Invitro

10

20

30

40

50

ogen Corporation)を補足したRPMI 1640培地に凍結保存ヒトPBMC (Research Blood Components)を 10^5 細胞/ウェルでプレATINGした。細胞を漸増濃度(50、10、2、0.4、0.08、0.016、及び0.0032 $\mu\text{g}/\text{ml}$)のpab1949-1、pab2193-1、IgG₁アイソタイプ対照抗体、又はIgG₂アイソタイプ対照抗体、及び100ng/ml SEAスーパー抗原(Toxin Technologies)と共に37、5%CO₂、及び97%湿度で5日間インキュベートした。清澄化した上清を回収し、分析時まで-80で保存した。IL-2の濃度をELISAによって計測した。

【0475】

図10Fに示すとおり、IgG₁抗体pab1949-1及びIgG₂抗体pab2193-1は両方ともにヒトPBMCにおいてIL-2産生を誘導した。pab1949-1と同様に、pab2193-1もIL-2産生が抗体濃度の実質的増加関数である用量反応関係を呈した。

【0476】

更に、IgG₁抗体pab1949-1を無グリコシル化変異体pab1949-1-N297Aと比較することにより、抗OX40抗体pab1949-1の機能的活性におけるFcR相互作用の役割を調べた。pab1949-1-N297Aはpab1949-1と重鎖可変領域及び軽鎖配列を共有するが、重鎖定常領域にN297A置換(EU付番方式によって付番)を含む。

【0477】

健常ドナーバフィーコート(Research Blood Components, LLC)からFicollグラジエントで単離したヒトPBMCを液体窒素中に保存し、実験当日に解凍した。細胞を細胞培養培地(RPMI+10%熱失活FBS)に再懸濁し、100ng/ml SEA(Toxin Technologies)及びpab1949-1、pab1949-1-N297A、又はIgG₁アイソタイプ対照抗体の用量タイトレーション(0~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)と共に37及び5%CO₂で5日間インキュベートした。上清を回収し、次にAlphaLISA(登録商標)(Perkin Elmer)を使用してIL-2に関して試験した。

【0478】

図10Gに示すとおり、pab1949-1及びpab1949-1-N297Aは両方ともにSEA刺激時にヒトPBMCにおいてIL-2産生を用量依存的様式で誘導した。アスパラギン297(N297)における単一のN結合型グリコシル化部位の鍵となるグリコシル化の存在がpab1949-1-N297A変異抗体では失われ、そのためそのFc断片のFcRへの結合の喪失につながる。この変異抗体は、野生型対応物と比較してアゴニスト活性の低下を呈した。

【0479】

6.2.5 アゴニスト抗OX40抗体がOX40 NF- κ B-ルシフェラーゼレポーター細胞株に及ぼす効果

抗OX40抗体pab1949-1がT細胞におけるシグナル伝達を媒介する能力を、ヒトOX40 NF- κ B-ルシフェラーゼレポーター細胞株を使用して計測した。ジャーカット細胞株を用いて生成したレポーター細胞をアッセイ培地(RPMI+10%FBS+ペニシリン/ストレプトマイシン/グルタミン酸塩+1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ピューロマイシン)に再懸濁し、抗Fc試薬の存在下(複合体化条件)又は非存在下(可溶性条件)で様々な濃度の可溶性pab1949-1(0~6 $\mu\text{g}/\text{ml}$)又はIgG₁アイソタイプ対照抗体と共にインキュベートした。プレートを37及び5%CO₂で2時間インキュベートした。インキュベーション後、プレートを室温で平衡化し、次に等容積の室温のNano-Glo試薬(Promega)を加えた。EnVisionマルチラベルリーダー2100を使用して発光を読み取った。

【0480】

架橋pab1949-1のみがOX40 NF- κ B-ルシフェラーゼレポーター細胞

10

20

30

40

50

株の有意な活性化を誘導した(図11B)。可溶性 p a b 1 9 4 9 - 1 はレポーター細胞株の最小限の活性化を誘導し、I g G₁ アイソタイプ対照抗体は検出可能なレベルのルシフェラーゼ発現を誘導しなかった(図11A及び図11B)。

【0481】

6.2.6 アゴニスト抗OX40抗体がFcガンマ受容体IIIAレポーター細胞株に及ぼす効果

この例では、Fcガンマ受容体IIIAを発現するレポーター細胞株を、ヒトOX40を発現する標的細胞と共に使用して、I g G₁ 抗体 p a b 1 9 4 9 - 1 及び I g G₄ 抗体 p a b 2 0 4 4 - 1 がOX40と共会合し、Fcガンマ受容体の活性化を介してシグナルを送る能力を判定した。Fc RIIIA(158V/V多型)(Promega)を過剰発現するジャーカットNFAT-ルシフェラーゼレポーター細胞をエフェクター細胞として使用した。抗体/抗原複合体(抗原が標的細胞の表面上に位置する)がエフェクター細胞上のFc RIIIAに結合すると、プロモーター/レポーターコンストラクトにシグナルが送られ、ルシフェラーゼ遺伝子発現がもたらされる。

【0482】

可溶性 p a b 1 9 4 9 - 1、p a b 2 0 4 4 - 1、I g G₁ アイソタイプ対照、又は I g G₂ アイソタイプ対照(0~10µg/ml)の用量タイトレーションの存在下でOX40過剰発現細胞(PHA活性化Hut102細胞)をFc RIIIAレポーター細胞と共培養した。製造者の指示に従いレポーター細胞の活性化を評価し、相対発光単位(RLU)を記録した。RLUは、抗OX40抗体のRLUからアイソタイプ対照のRLUを差し引いたものとして計算した。図12Aに示すとおり、OX40発現細胞との結合時、I g G₁ 抗体 p a b 1 9 4 9 - 1 のみがFc RIIIAレポーター細胞を活性化させた。

【0483】

6.2.7 アゴニスト抗OX40抗体がFcガンマ受容体IIAレポーター細胞株に及ぼす効果

次に、Fc RIIA(Promega)を発現するレポーター細胞株を標的細胞(ヒトOX40を発現するジャーカット細胞)と共に使用して、I g G₁ 抗体 p a b 1 9 4 9 - 1 及び p a b 1 9 4 9 - 1 - S 2 6 7 E / L 3 2 8 F 並びに I g G₂ 抗体 p a b 2 1 9 3 - 1 がOX40と共会合し、Fc RIIAを介してシグナルを送る能力を判定した。p a b 1 9 4 9 - 1 - S 2 6 7 E / L 3 2 8 F は p a b 1 9 4 9 - 1 と重鎖及び軽鎖配列を共有するが、重鎖定常領域にS267E及びL328F置換(EU付番方式によって付番)を含む。

【0484】

高親和性131H/H多型を有するFc RIIA及びホタルルシフェラーゼの発現を駆動するNFAT応答エレメントを発現するジャーカット細胞をエフェクター細胞として使用した。簡潔に言えば、25µlの標的細胞(6×10⁶細胞/ml)を25µlの段階希釈抗体と96ウェル白色アッセイプレートのデュプリケートウェルで混合した。試験した抗体は、p a b 1 9 4 9 - 1、p a b 1 9 4 9 - 1 - S 2 6 7 E / L 3 2 8 F、p a b 2 1 9 3 - 1、I g G₁ アイソタイプ対照抗体、及び I g G₂ アイソタイプ対照抗体であった。次に、25µlのエフェクター細胞(6×10⁶細胞/ml)を各ウェルに加えると、1:1のエフェクター対標的比が得られた。プレートを37℃及び5%CO₂で20時間インキュベートした。このインキュベーション後、Bio-Gloルシフェラーゼアッセイ試薬(Promega)を室温で解凍し、各ウェルに75µlを加えた。5~10分以内にEnVisionマルチラベルプレートリーダー(PerkinElmer)を使用して発光を計測した。各試料の読み取りからバックグラウンド発光を減じ、調整後相対発光単位(RLU)を記録した。

【0485】

図12Bに示すとおり、OX40を発現する細胞への結合時、I g G₂ 抗体 p a b 2 1 9 3 - 1 がFc RIIA^{H131}の最も強力な活性化を示し、p a b 1 9 4 9 - 1 - S

10

20

30

40

50

267E/L328F及びpab1949-1がそれに続いた。

【0486】

6.2.8 抗OX40抗体と調節性T細胞又はエフェクターT細胞との相互作用

この例では、活性化天然調節性T細胞(nTreg)及びTエフェクター(Teff)細胞によるヒトOX40の発現を調べた。健常ドナーから単離したPBMCについて、磁気ベースの分離を用いて手付かずのCD3+ T細胞(Teff)又はCD4+ CD25+ CD45RA+ T細胞(nTreg)をエンリッチした。Tリンパ球を抗CD3/CD28カップリングビーズによって500U rIL-2と共に4日間、及び50U rIL-2と共に更に4日間活性化させた。活性化の8日後、T細胞を回収し、PBS中の固定可能な生死判別近赤外死細胞染色によって4で20分間染色した。緩衝液(2% FBS含有PBS)中に希釈したCD4(BV605、OKT4)、CD8a(BV650、RPA-T8)、CD127(BV421、AO1905)、CD25(APC、M-A251)、及びOX-40(PE、ACT35)に対するコンジュゲート抗体を含有する表面抗体カクテルを各試料に加え、4で30分間インキュベートした。次に細胞を緩衝液で洗浄し、固定し、緩衝液中に希釈したCD3(BV711、OKT3)及びFoxp3(AF488、PCH101)に対するコンジュゲート抗体を含有する細胞内抗体カクテルで染色した。各T細胞集団から1つの試料についてはまた、マウス抗ヒトIgG1-PEアイソタイプ対照を使用してOX40に関してfluorescence minus one(FMO)対照によっても染色した。試料をフローサイトメトリーによって分析した。PEコンジュゲートQuantibriteビーズを同時にランし、これを使用して製造者の指示どおりOX40受容体密度を定量化した。

10

20

【0487】

図13Aに示すとおり、活性化nTreg細胞上のヒトOX40の表面発現は活性化CD4+又はCD8+エフェクターT細胞上のものよりも高かった。

【0488】

同様の試験において、2ドナーからの活性化nTreg及びTeffを市販の抗OX40抗体(BER-ACT35クローン)又はアイソタイプ対照抗体で染色し、フローサイトメトリーによって分析した。デルタ平均蛍光強度(MFI)は、抗OX40抗体のMFIからアイソタイプ対照のMFIを差し引いたものに相当する。結果を図13Bに示す。

30

【0489】

次に、上記に記載したFcガンマ受容体IIIA(FcRIIIA)を発現するレポーター細胞株を、記載されるとおり生成した活性化Tエフェクター(Teff)又はnTreg細胞と共に使用して、抗OX40抗体pab1949がOX40を共会合し、Fcガンマ受容体の活性化を介してシグナルを送る能力を判定した。抗OX40抗体pab1949又はIgG₁アイソタイプ対照を10µg/mlの出発最終濃度の3倍希釈物として段階希釈した。デュプリケートウェルにおいて、Teff又はnTreg細胞に25µlの各抗体希釈物を加えた。FcRIIIA(158V/V多型)を過剰発現するジャーカットNFAT-ルシフェラーゼレポーター細胞を1:1のエフェクター対標的比で加えた。プレートを20時間インキュベートし、次にBio-Gloルシフェラーゼアッセイ試薬(Promega)を使用して分析した。各試料読み取りからバックグラウンド発光(外側のブランクウェル)を減じ、調整後相対発光単位(RLU)を記録した。抗OX40抗体のRLUからアイソタイプ対照のRLUを差し引いたものに相当するRLUを図13Cに示す。

40

【0490】

少し修正したプロトコルを用いて図13Cに示す試験を繰り返した。端的には、健常ボランティアからのパフィーコート(Research Blood Components)を使用して初代調節性T細胞及びエフェクターT細胞を単離した。両方のT細胞サブセットを磁気ビーズ分離(それぞれCD4+CD25+CD127^{dim}/調節性T細胞単離キットII及びPant T細胞キット、Miltenyi Biotec)によ

50

って精製し、次に細胞培養培地 (RPMI + 10% FBS) 中で細胞を抗CD3 / 抗CD28 / 抗CD28ビーズ (Miltenyi Biotec) と共に1 : 4 (T細胞 : ビーズ) の比でインキュベートすることにより、7日間活性化した。可溶性pab1949-1又はIgG₁アイソタイプ対照抗体の用量タイトレーション (0 ~ 10 μg/ml) の存在下で、活性化したTreg細胞又はTeff細胞を上記に記載したFcRIIA発現ジャーカットNFAT-ルシフェラーゼレポーター細胞 (Promega) と共培養した。レポーター細胞の活性化を製造者の指示に従い評価しており、RLUを図13Dに示す。

【0491】

活性化nTregと活性化CD4+又はCD8+エフェクターT細胞との間の表面OX40発現差と一致して (図13A及び図13B)、抗OX40抗体pab1949 (図13C) 及びpab1949-1 (図13D) は活性化nTreg細胞を優先的に標識し、レポーター細胞株においてFcRIIA依存性シグナル伝達を誘導した。

10

【0492】

OX40の過剰発現が、腫瘍微小環境内に位置する調節性T細胞の特徴であったかどうかを判定するため、健康ヒトドナーの血液 (図14A、a~c、n=3) 又は非小細胞肺癌 (NSCLC) 患者の腫瘍組織 (図14A、d~f、n=3) から単離したT細胞でOX40発現を比較した。免疫集団に対する抗体のバックグラウンド結合を除去するため、全ての細胞を精製CD16/32抗体 (10 μg/ml、室温で20分間) と共にインキュベートしてから、細胞表面抗体及び細胞内抗体を加えた。FcRブロック後、これらの試料を全て、APCコンジュゲート抗OX40抗体 (クローンBer-Act35) 又はアイソタイプ対照及び細胞表面抗体系列カクテル (CD3-FITC、CD25-PEcy7、CD4-BV650及びCD8a-PE) と共に氷上で45分間インキュベートし (各1 μg/ml)、FACS緩衝液 (PBS、EDTA及び0.5% BSA) で3回洗浄し、続いて固定/透過処理し、パシフィックブルーコンジュゲートFOX P3と共にインキュベートした (固定/透過処理及びインキュベーション氷上各45分、1 μg/ml)。次にLSRFortessaフローサイトメーター (BD Biosciences) を使用して、染色した試料を分析した。図14Aの細胞集団は、Tconv (CD3+、CD4+、CD8a-、CD25低、FOX P3-) 又はTreg (CD3+、CD4+、CD8a-、CD25高、FOX P3+) として定義した。

20

30

【0493】

図14Aに示すとおり、OX40表面発現はNSCLC患者の腫瘍組織から単離した調節性T細胞で最も高く、健康ドナーからのTreg又は従来からのT細胞では、検出可能なレベルはほとんど又は全くなかった。

【0494】

他の腫瘍型について同様の分析を行った。端的には、凍結分離した腫瘍試料 (Conv ersant) 又はPBMCをAutoMACSリンス溶液 (洗浄緩衝液、Miltenyi Biotec) 中で解凍し、細胞をFcブロック (Trustain FcX、Biolegend) した後、細胞表面染色した。細胞を洗浄緩衝液で洗浄し、抗CD3 (クローンSP34)、抗CD4 (クローンOKT4)、抗CD8 (クローンSK1)、抗CD25 (クローンMA-251)、及び抗OX40 (クローンBER-Act35) を含む系列マーカー抗体によって4で45分間染色した。細胞を洗浄し、フォークヘッドボックスP3 (FOX P3) / 転写因子染色緩衝液セット (eBioscience) で製造者の指示に従い透過処理した。透過処理後、細胞を抗FOX P3 eFluor450 (クローンPCH101、eBioscience) で染色した。染色した試料をBD Biosciences Fortessaフローサイトメーターを使用して捕捉し、データを、Flojoソフトウェアを使用して分析した。

40

【0495】

卵巣癌、結腸直腸癌 (CRC)、子宮内膜癌、腎細胞癌 (RCC)、非小細胞癌 (NSCLC)、及び乳癌を含めた複数の腫瘍型からの試料が、腫瘍関連エフェクターT細胞と

50

比べて腫瘍関連調節性T細胞においてより高いOX40発現を実証した(図14B、図14C、及び図14D)。

【0496】

6.2.9 抗OX40抗体が抗CD3刺激カニクイザルPBMCサイトカイン産生に及ぼす効果

次に、準最適抗CD3刺激アッセイを用いてカニクイザルPBMCに対する抗OX40抗体pab1949-1のアゴニスト活性を調べた。簡潔に言えば、凍結カニクイザルPBMC(World Wide Primates)を液体窒素中に保存し、実験当日に解凍した。細胞を細胞培養培地(RPMI+10%FBS+20U/mlのIL-2)に再懸濁し、プレート結合抗CD3抗体(0.8µg/ml)及びプレート結合pab1949-1又はIgG₁アイソタイプ対照抗体(0、0.8、1.6、3.1、6.3、12.5、25、又は50µg/ml)と共に37及び5%CO₂で4日間インキュベートした。細胞培養上清を回収し、非ヒト霊長類(NHP)V-plexアッセイキット(Meso Scale Discovery)を使用して分泌サイトカインを調べた。

10

【0497】

抗OX40抗体pab1949-1は、複数のカニクイザルのPBMCにおいてGM-CSF(図15A及び図15B)、IL-17(図16A及び図16B)、TNF(図17A及び図17B)、IL-5(図18A及び図18B)、及びIL-10(図19A及び図19B)の産生を用量依存的に増強した。

【0498】

6.2.10 ブドウ球菌(Staphylococcus)エンテロトキシンA(SEA)刺激時に抗OX40抗体がカニクイザルPBMCに及ぼす効果

ブドウ球菌(Staphylococcus)エンテロトキシンA(SEA)刺激後に、pab1949-1がカニクイザルPBMCを共刺激する能力を更に分析した。凍結カニクイザルPBMC(World Wide Primates)を液体窒素中に保存し、実験当日に解凍した。細胞を細胞培養培地(RPMI+10%熱失活FBS)に再懸濁し、SEA抗原(100ng/ml)並びにpab1949-1又はIgG₁アイソタイプ対照抗体の用量タイトレーション0、0.8、1.6、3.1、6.3、12.5、25、又は50µg/ml)と共に37及び5%CO₂で5日間インキュベートした。活性化後、細胞培養上清を回収し、非ヒト霊長類(NHP)V-plexアッセイキット(Meso Scale Discovery)を使用して分泌サイトカインを調べた。

20

30

【0499】

図20A及び図20Bに示されるとおり、抗OX40抗体pab1949-1は、2ドナーからのカニクイザルPBMCにおいてIL-2産生を増加させた。

【0500】

6.3 実施例3:抗OX40抗体のエピトープマッピング

この例では、pab1949及び参照抗OX40抗体pab1928のエピトープをアラニンスキャンニングによって分析した。抗体pab1928は、米国特許出願公開第2013/0280275号明細書(本明細書において参照により援用される)に提供される抗体Hu106-122の可変領域に基づき生成した。pab1928の重鎖はHu106-122の重鎖可変領域(配列番号56)及び配列番号65のヒトIgG1定常領域のアミノ酸配列を含む。pab1928の軽鎖はHu106-122の軽鎖可変領域(配列番号57)及び配列番号25の定常領域のアミノ酸配列を含む。従って重鎖は配列番号72のアミノ酸配列を含み、軽鎖は配列番号59のアミノ酸配列を含む。

40

【0501】

6.3.1 エピトープマッピング-アラニンスキャンニング

pab1949-1及び参照抗体pab1928の結合特性をアラニンスキャンニングによって評価した。簡潔に言えば、Agilent TechnologiesのQuick Change HTタンパク質エンジニアリングシステム(G5901A)を使用して、細胞外ドメインにアラニン置換を有するヒトOX40突然変異体を生成した。標準的なト

50

ランスフェクション技法と、続いて上記に記載したとおりの形質導入を用いて、ヒトOX40突然変異体を1624-5細胞の表面上に発現させた。

【0502】

フローサイトメトリーにおけるポリクローナル抗OX40抗体への結合から明らかなおりの、正しく折り畳まれたヒトOX40突然変異体を発現する細胞について、モノクローナル抗OX40抗体pab1949-1又はpab1928に結合しなかったヒトOX40突然変異体を発現する部分集団を更に選択した。非結合細胞集団から、特異的抗体結合を呈した細胞を分取高速FACS(FACS Aria II、BD Biosciences)によって分離した。抗体反応性又は非反応性細胞プールを再び組織培養で拡大し、レトロウイルスによって形質導入した細胞は安定発現表現型のため、明確に検出可能な抗OX40抗体(pab1949-1又はpab1928)非反応性細胞集団が得られる時点まで、抗体特異的細胞選別及び組織培養拡大のサイクルを繰り返した。この抗OX40抗体非反応性細胞集団を最終的な単細胞選別ステップに供した。数日間の細胞拡大後、単細胞選別された細胞を、ポリクローナル抗OX40抗体への結合及びモノクローナル抗体pab1949-1又はpab1928への非結合に関してフローサイトメトリーを用いて再び試験した。簡潔に言えば、個々のヒトOX40アラニン突然変異体を発現する1624-5細胞をモノクローナル抗OX40抗体pab1949-1又はpab1928と共にインキュベートした。各抗体につき2つの抗体濃度を試験した(pab1949-1: 2 µg/ml及び0.5 µg/ml; pab1928: 1.1 µg/ml及び0.4 µg/ml)。APCにコンジュゲートしたポリクローナル抗OX40抗体(AF3388、R&D systems)を1:2000で希釈した。Fc受容体ブロック(1:200; BDカタログ番号553142)を加え、これらの試料を4で20分間インキュベートした。洗浄後、検出に必要であれば細胞を二次抗IgG抗体と共に(PEコンジュゲート型; BDカタログ番号109-116-097)4で20分間インキュベートした。次に細胞を洗浄し、フローサイトメーター(BD Biosciences)を使用して捕捉した。

10

20

【0503】

表現型(ポリクローナル抗OX40抗体+、モノクローナル抗OX40抗体-)を遺伝子型と関係付けるため、単細胞選別したヒトOX40突然変異体のシーケンシングを実施した。図21は、ポリクローナル抗OX40抗体とはなおも結合するが、モノクローナル抗OX40抗体pab1949-1又はpab1928とは結合しないヒトOX40アラニン突然変異体を示す表である。全ての残基はヒトOX40の成熟アミノ酸配列(配列番号55)に従い付番する。「+」はフローサイトメトリー分析に基づいた結合を示し、「-」は結合の喪失を示す。

30

【0504】

本発明は、本明細書に記載される具体的な実施形態によって範囲が限定されるべきではない。実際、当業者には、前述の説明及び添付の図から、記載されているものに加えて本発明の様々な変形形態が明らかになるであろう。かかる変形形態は、添付の特許請求の範囲内に含まれることが意図される。

【0505】

本明細書に引用される参考文献(例えば、刊行物又は特許又は特許出願)は、全て各個別の参考文献(例えば、刊行物又は特許又は特許出願)があらゆる目的のために全体として参照により援用されることが具体的且つ個別的に示されたものとみなすのと同程度に、全体として及びあらゆる目的のために参照により本明細書に援用される。

40

【0506】

他の実施形態が以下の特許請求の範囲内にある。

【 図 1 A B 】

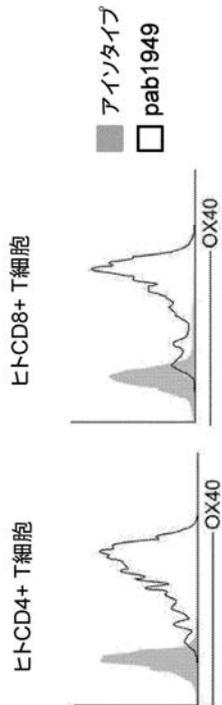


図1A

【 図 1 C 】

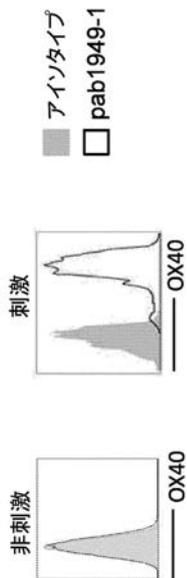


図1B

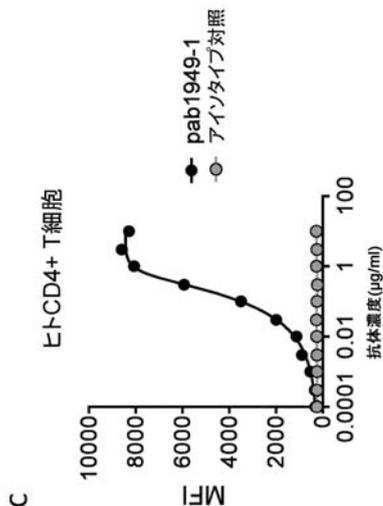


図1C

【 図 1 D E 】

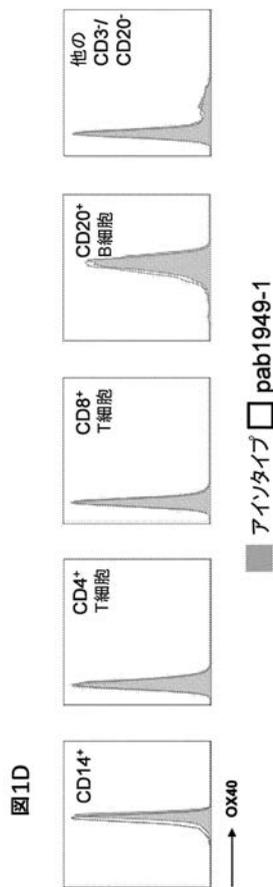


図1D

カニクイザルCD4+ T細胞

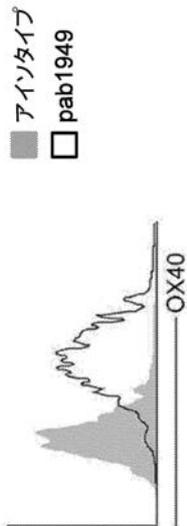


図1E

【 図 2 A B 】

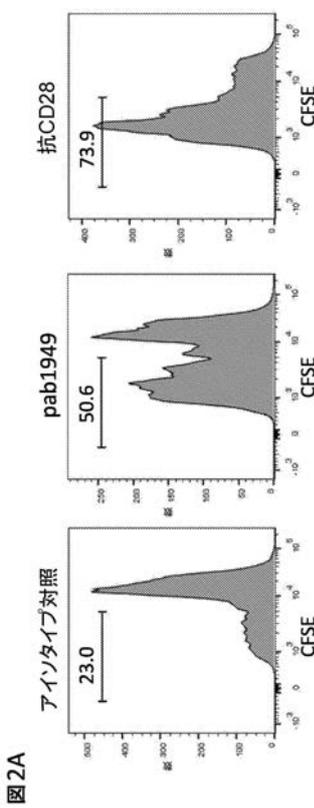


図2A

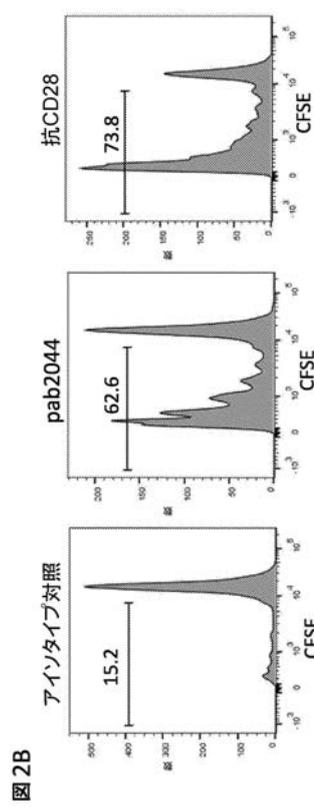


図2B

【 図 2 C 】

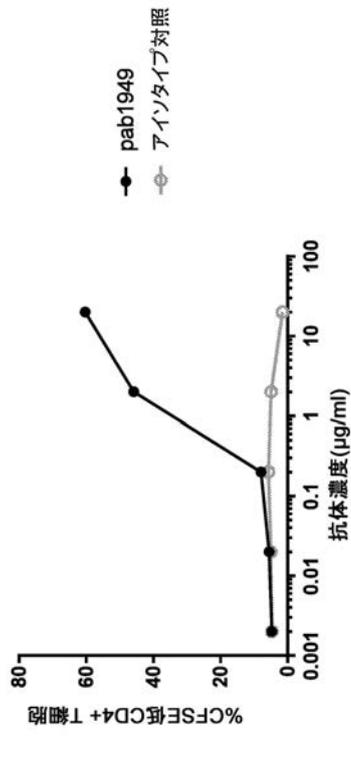


図 2C

【 図 3 A B 】

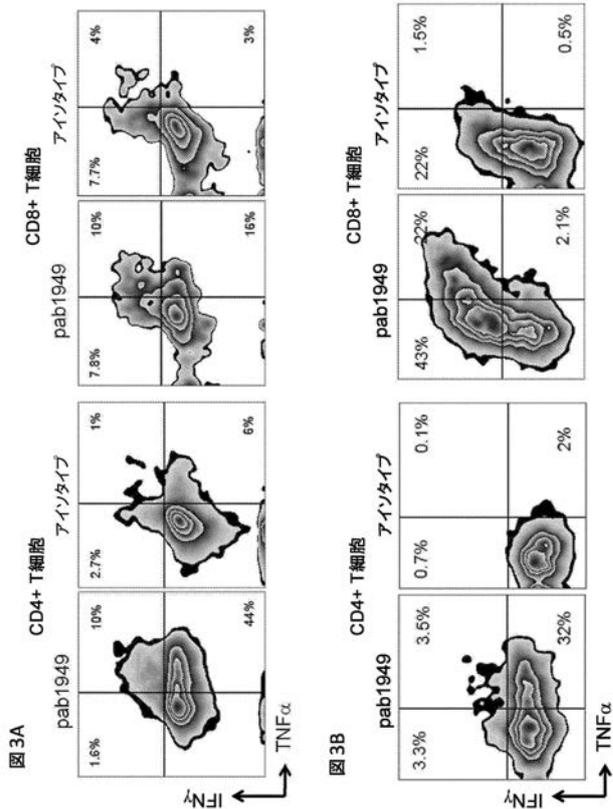


図 3A

図 3B

【 図 3 C 】

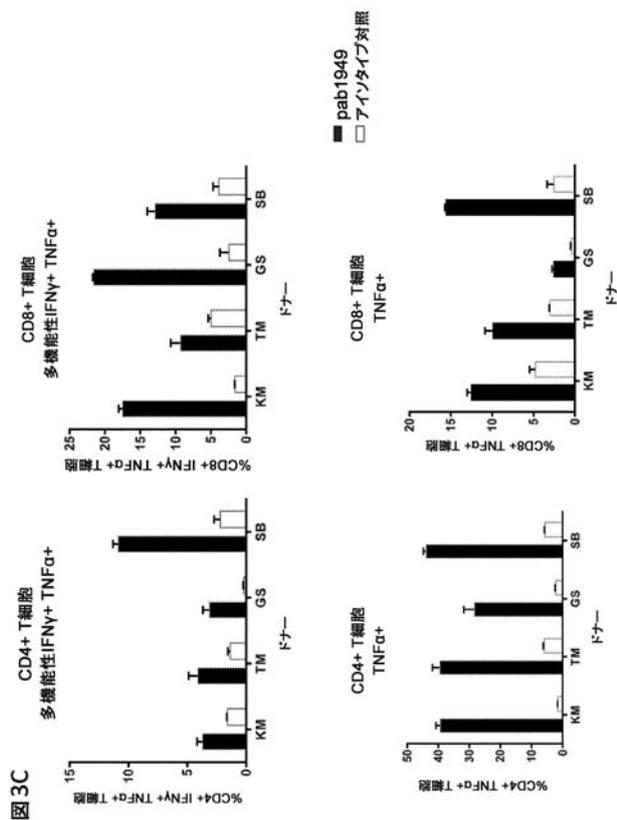


図 3C

【 図 3 D - F 】

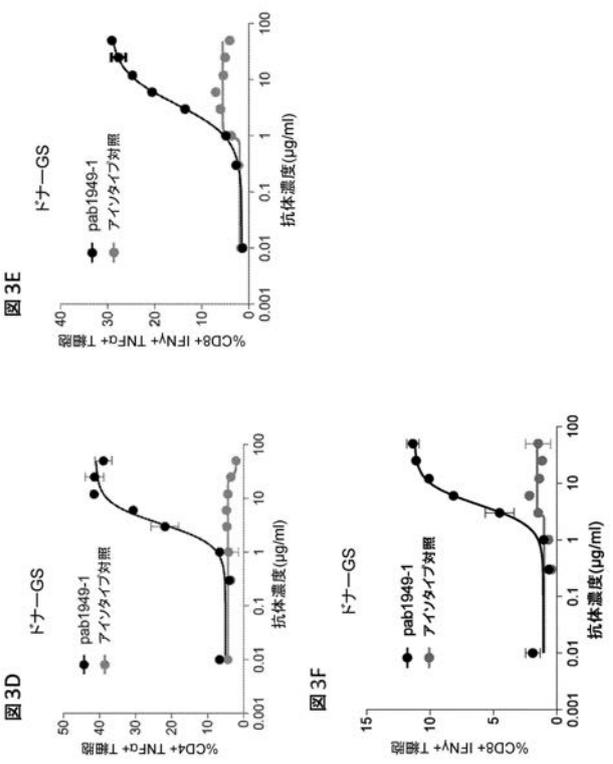


図 3D

図 3E

図 3F

【 図 4 A 】

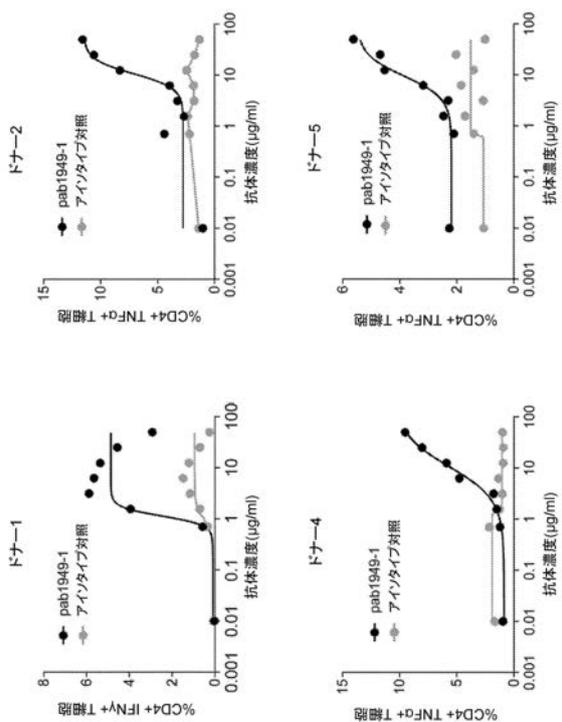


図4A

【 図 4 B 】

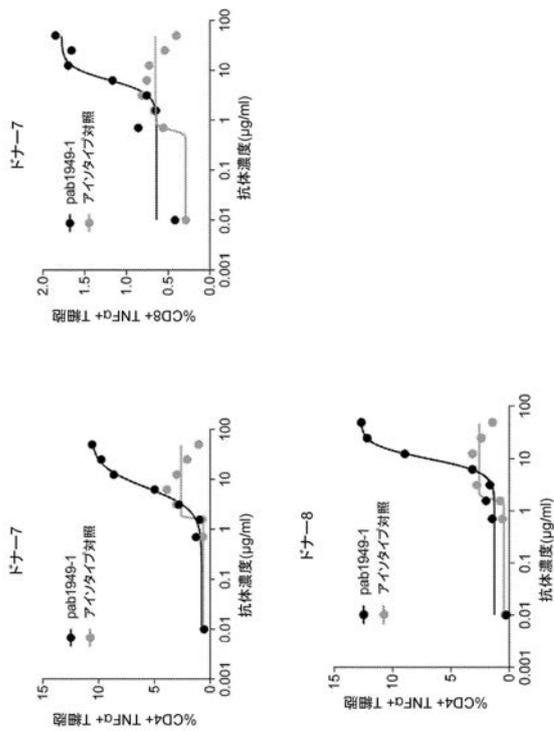


図4B

【 図 4 C 】

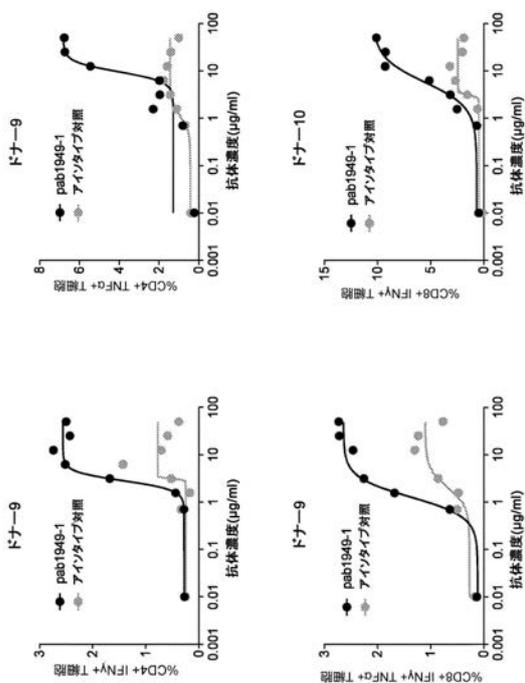


図4C

【 図 5 A 】

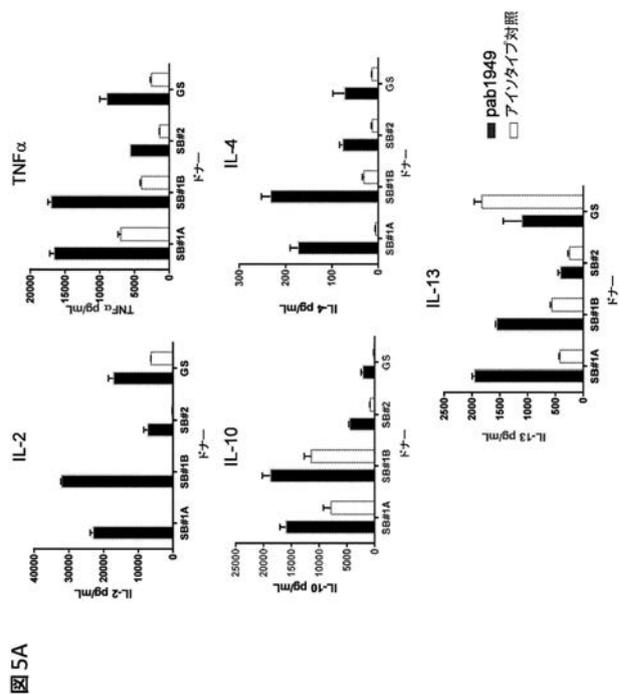


図5A

【 図 5 B - D 】

図 5B

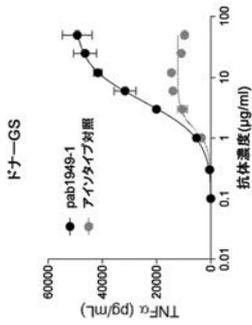


図 5C

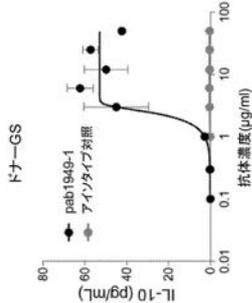
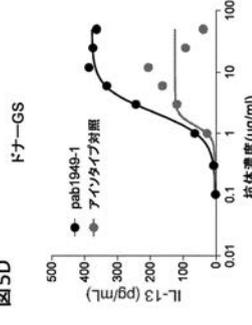
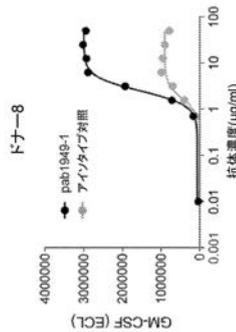
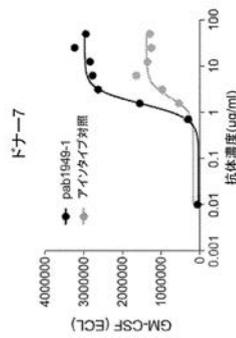
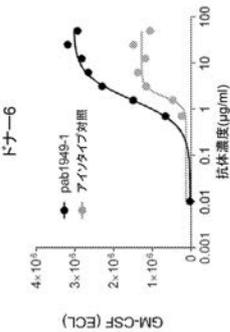
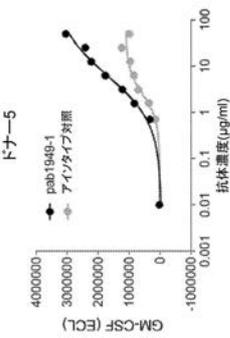


図 5D



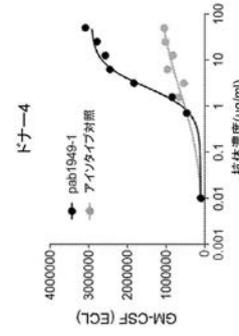
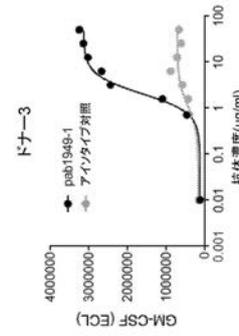
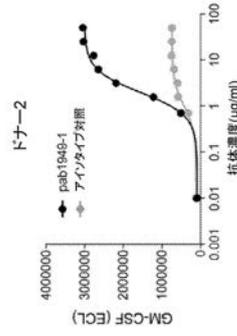
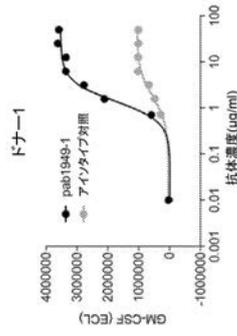
【 図 6 B 】

図 6B



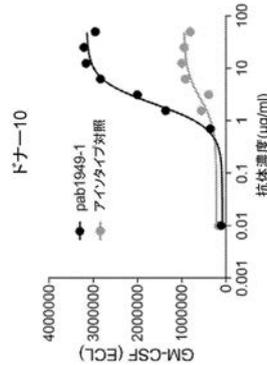
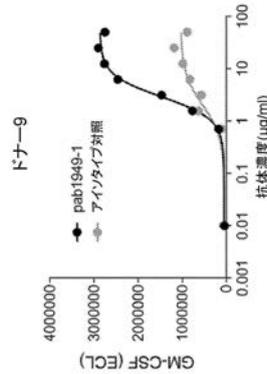
【 図 6 A 】

図 6A



【 図 6 C 】

図 6C



【 図 7 A 】

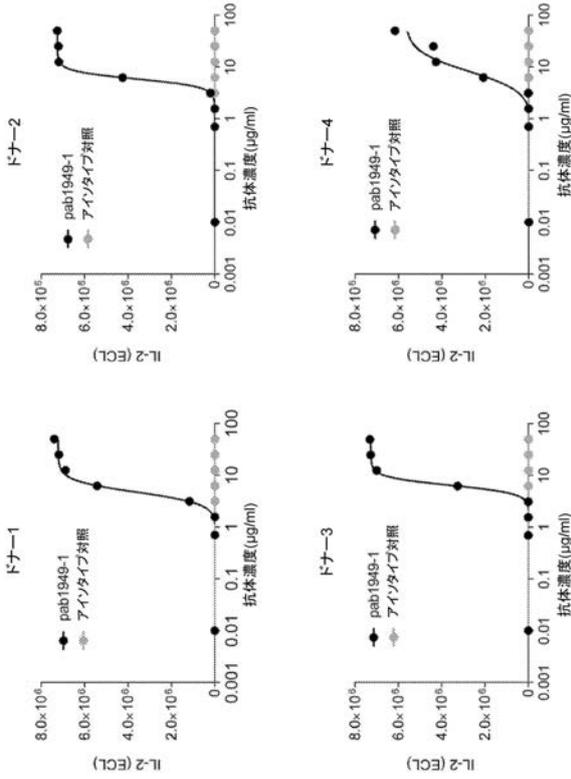


図7A

【 図 7 B 】

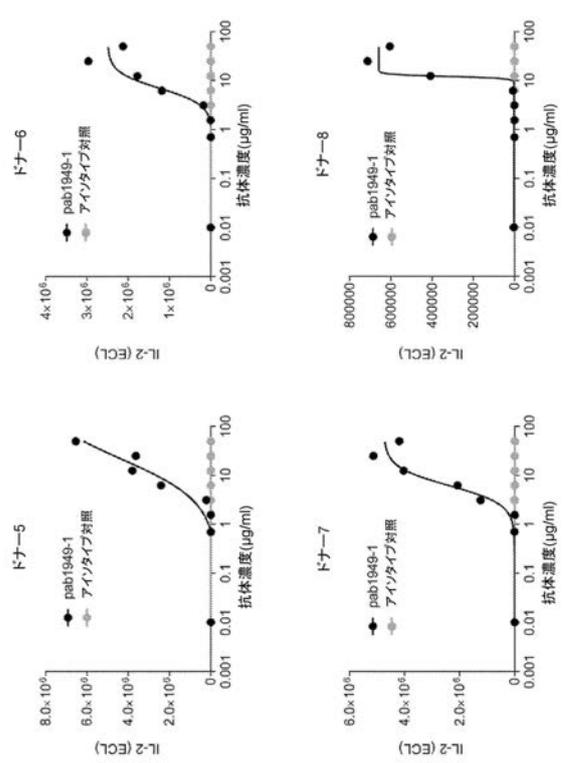


図7B

【 図 7 C 】

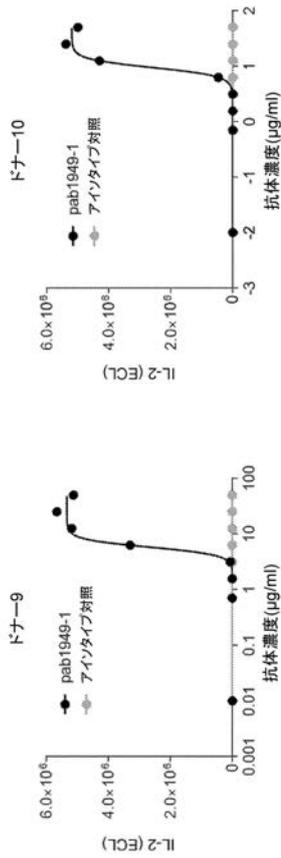


図7C

【 図 8 A 】

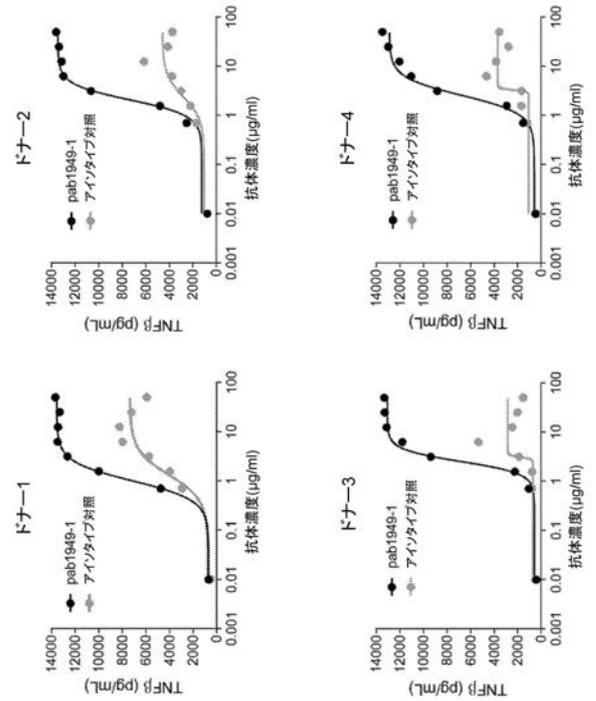


図8A

【 図 8 B 】

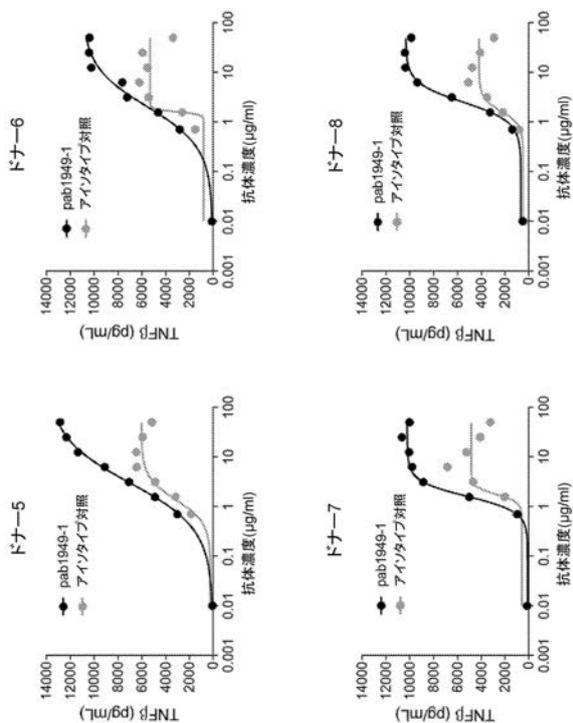


図 8B

【 図 8 C 】

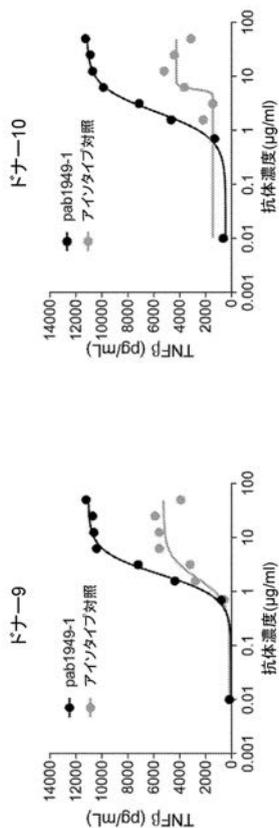


図 8C

【 図 9 】

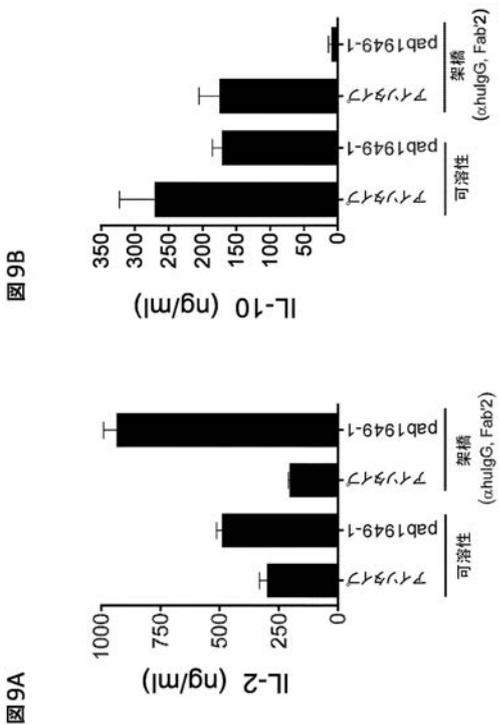


図 9B

図 9A

【 図 10 A - D 】

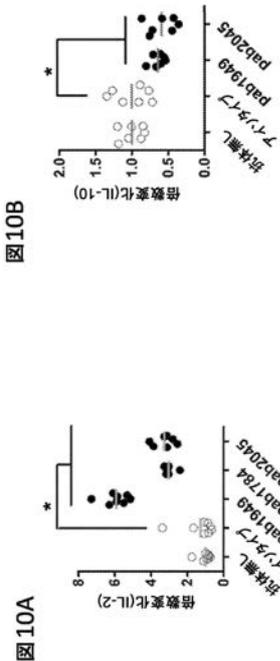


図 10B

図 10A

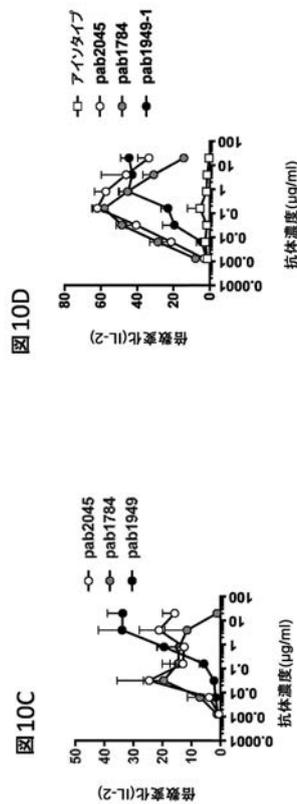
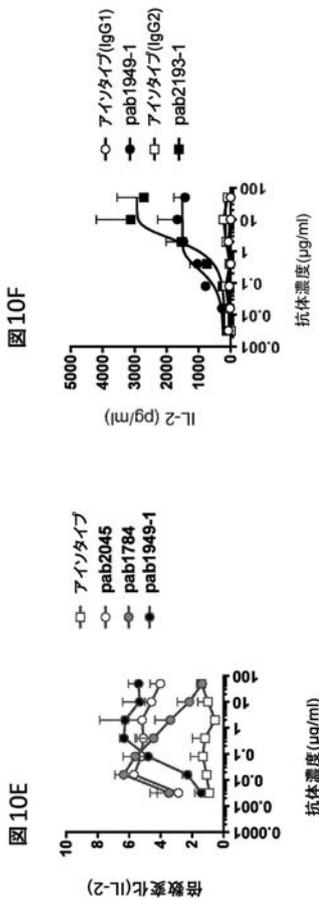


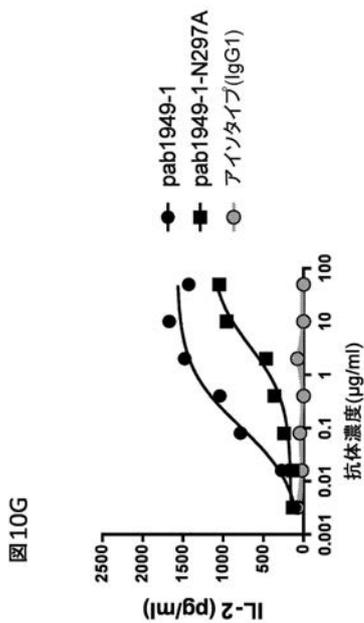
図 10D

図 10C

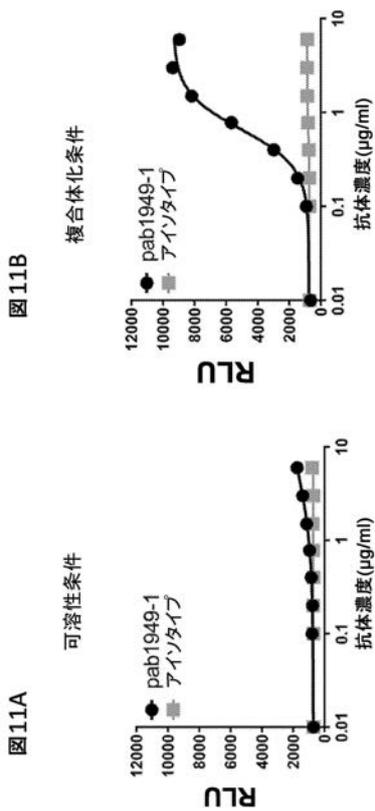
【 図 1 0 E F 】



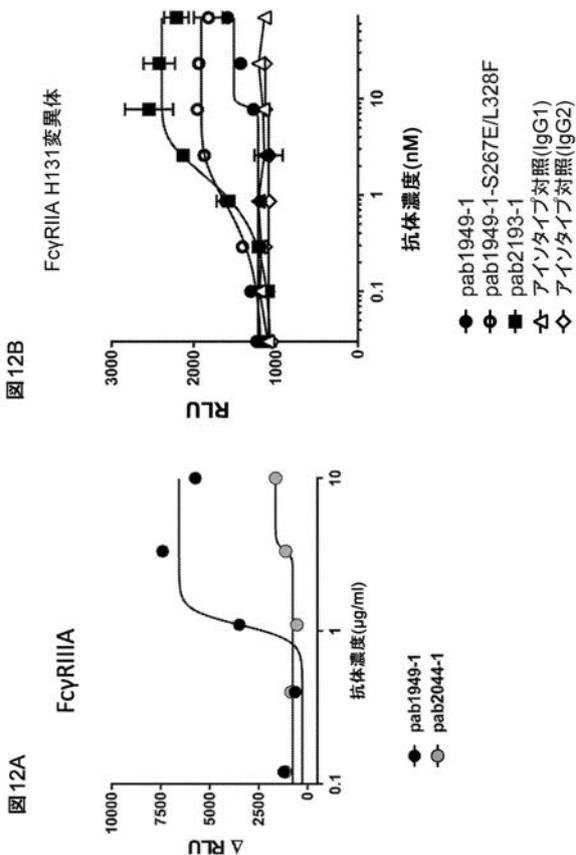
【 図 1 0 G 】



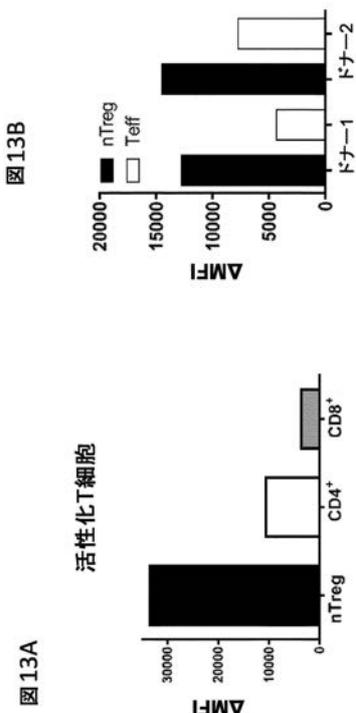
【 図 1 1 】



【 図 1 2 】

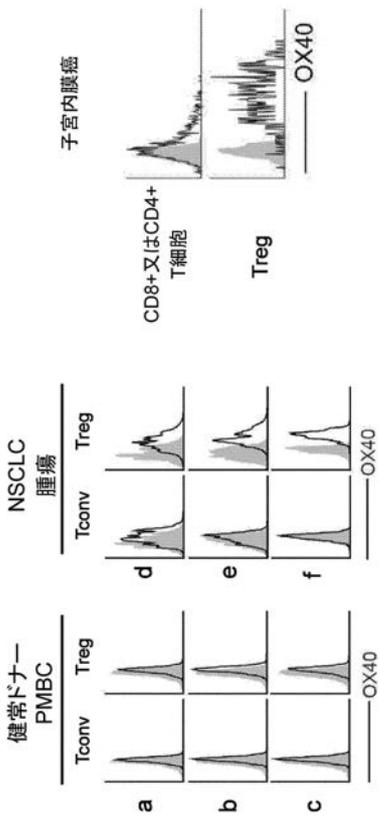


【 図 1 3 A B 】

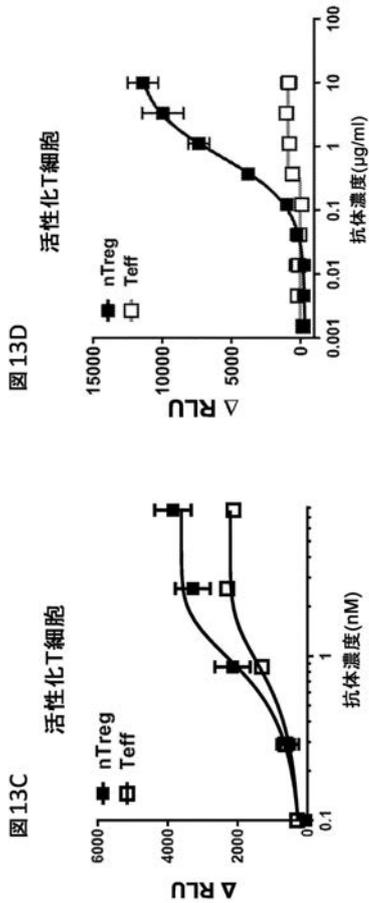


【 図 1 4 A B 】

図 14B

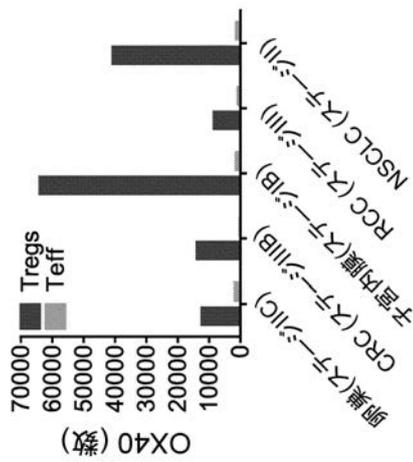


【 図 1 3 C D 】



【 図 1 4 C 】

図 14C



【 図 1 4 D 】

| 適用 | 試料(n) | CD4 ⁺ 細胞 | 調節性T細胞 |
|-------|-------|---------------------|--------|
| NSCLC | 4 | +/- | +++ |
| 子宮内膜 | 2 | +/- | +++ |
| 結腸直腸 | 2 | - | + |
| 乳房 | 2 | - | + |
| 卵巣 | 1 | - | ++ |
| 腎臓 | 1 | - | + |

図 14D

【 図 1 5 B 】

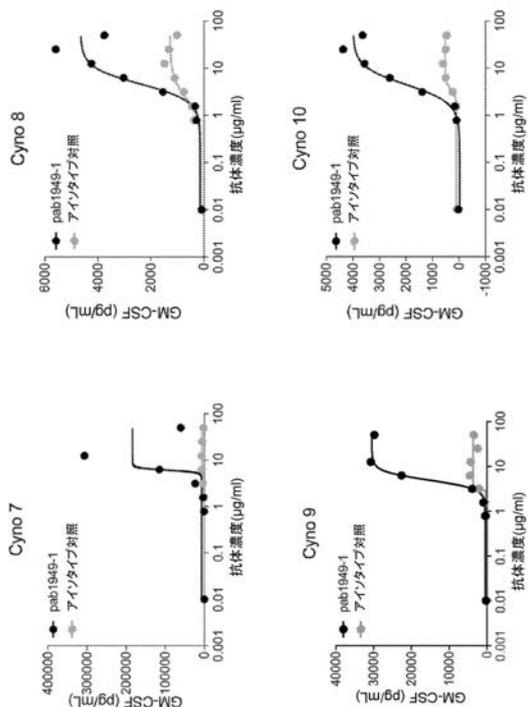


図 15B

【 図 1 5 A 】

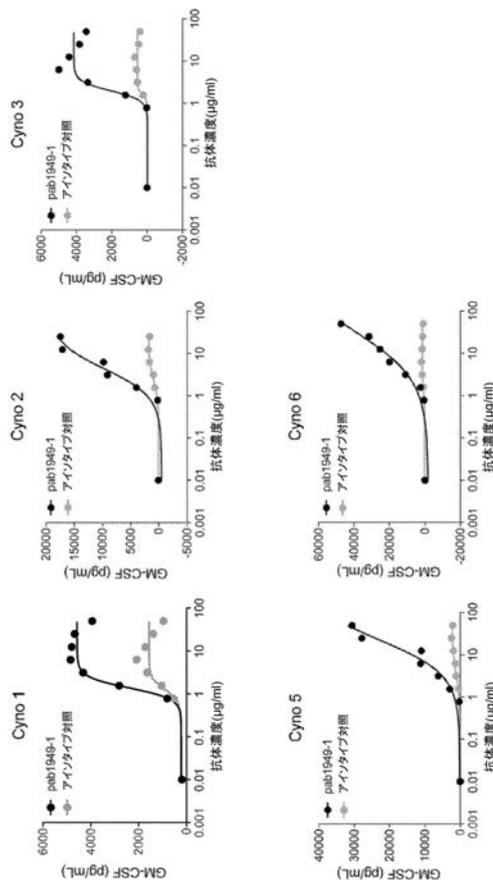


図 15A

【 図 1 6 A 】

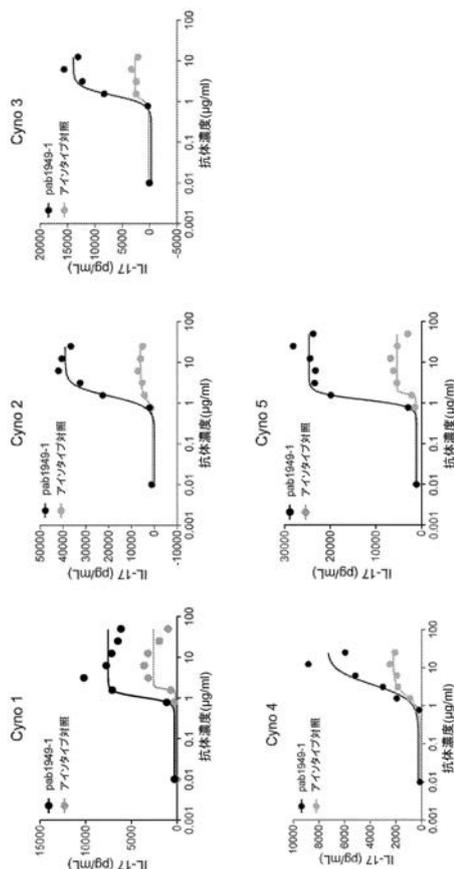


図 16A

【 図 1 6 B 】

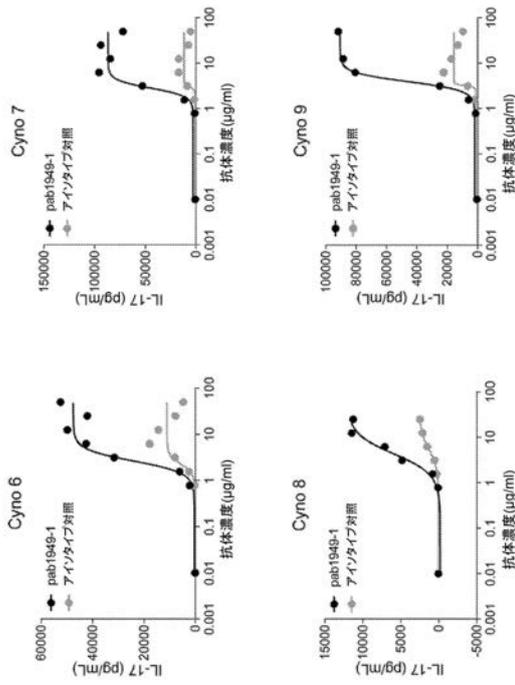


図 16B

【 図 1 7 A 】

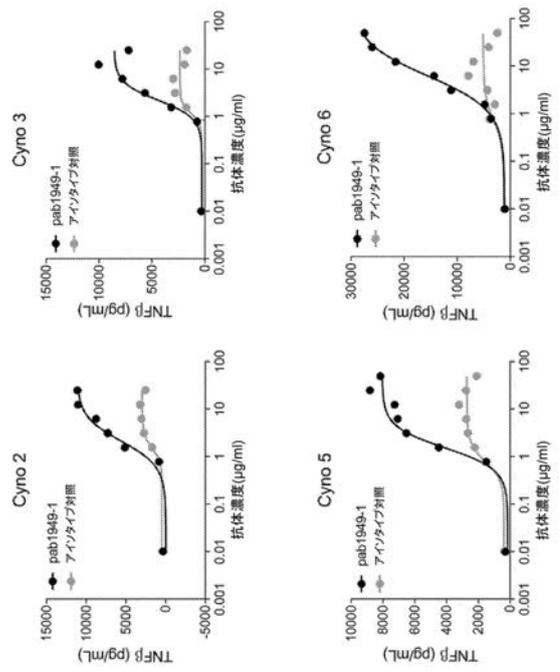


図 17A

【 図 1 7 B 】

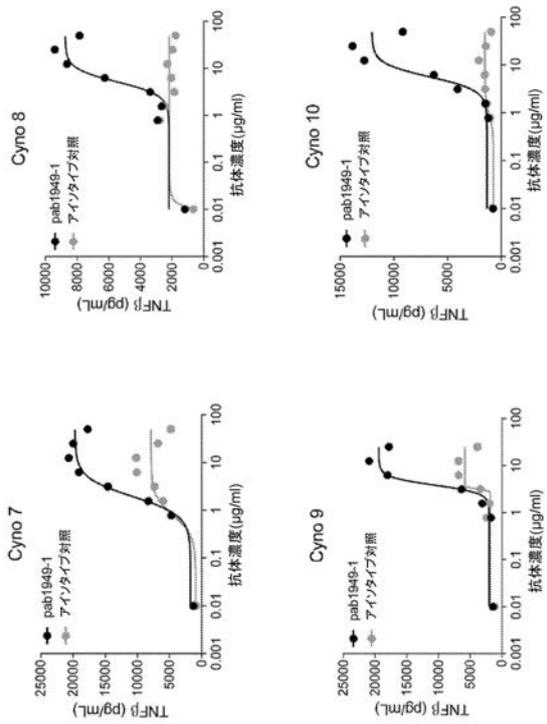


図 17B

【 図 1 8 A 】

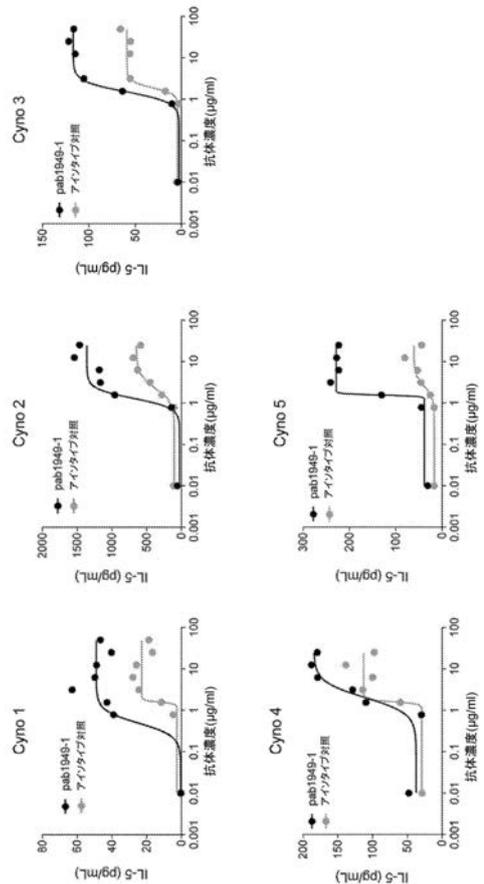


図 18A

【 図 1 8 B 】

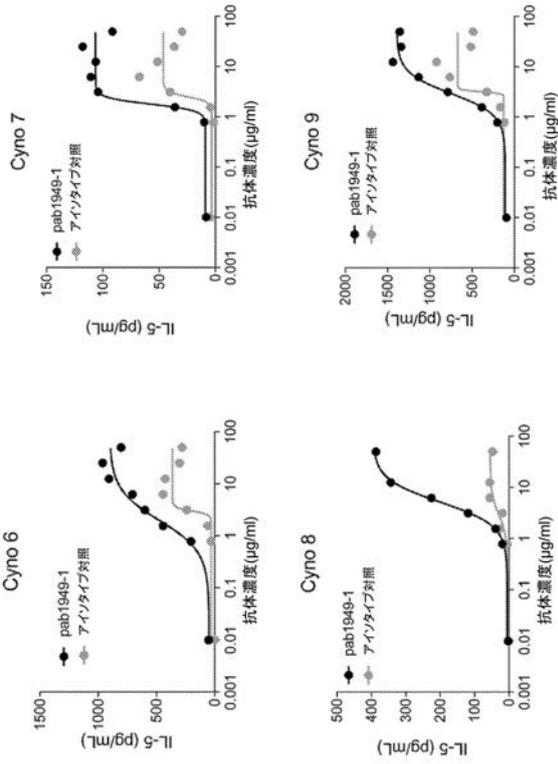


図 18B

【 図 1 9 A 】

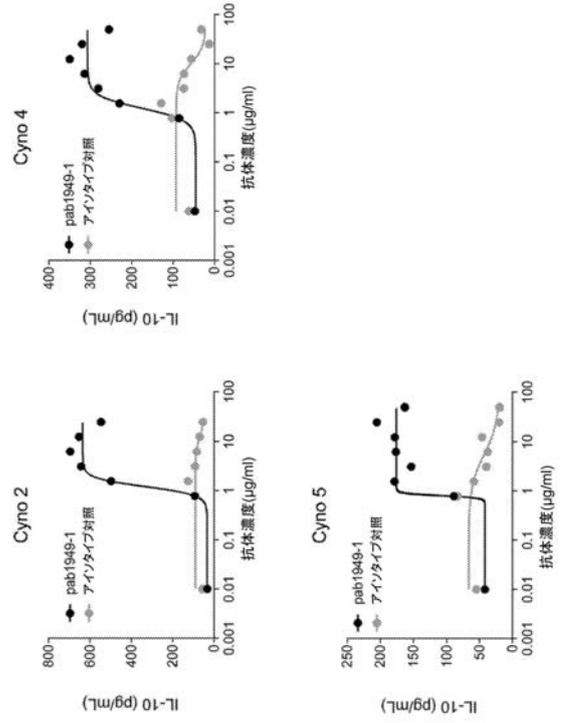


図 19A

【 図 1 9 B 】

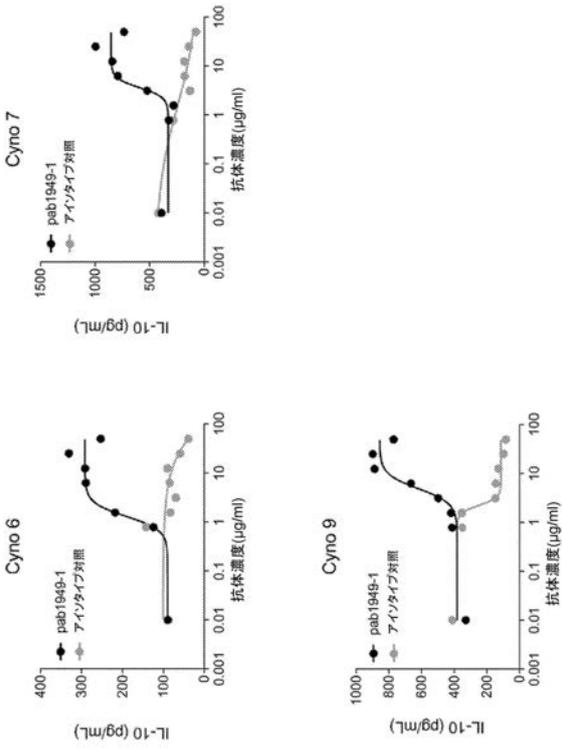


図 19B

【 図 2 0 】

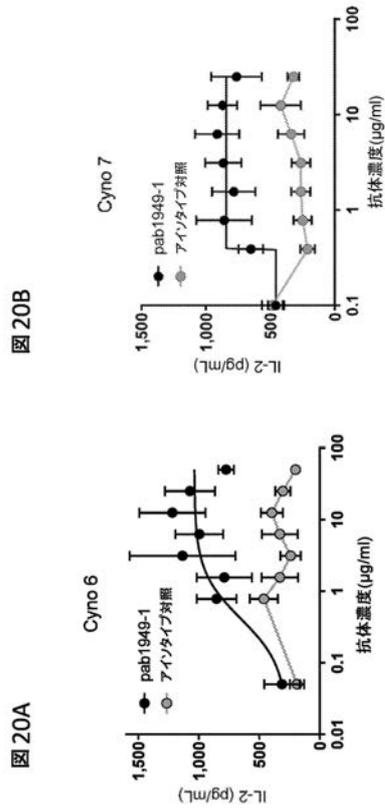


図 20B

図 20A

【 図 2 1 】

Figure 21

| | pab1949-1 | pab1928 |
|-------|-----------|---------|
| W58A | - | - |
| N60A | - | + |
| R6ZA | - | + |
| R80A | - | + |
| L88A | - | + |
| P93A | - | + |
| P99A | - | + |
| P115A | - | + |

【 配列表 】

2018520993000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|---|
| International application No PCT/US2016/031257 |
|---|

| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/28 ADD. | | |
|---|--|--|
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | WO 2013/092001 A1 (SYNIMMUNE GMBH [DE]) 27 June 2013 (2013-06-27) the whole document in particular, page 36, 99 and figures 1H-1M | 84,94 |
| X | WO 2013/068563 A2 (UCB PHARMA SA [BE]) 16 May 2013 (2013-05-16) the whole document in particular, page 3, lines 5-10 | 84 |
| Y | WO 2014/148895 A1 (BIOCEROX PRODUCTS B V [NL]; JANSSEN PHARMACEUTICALS INC [US]) 25 September 2014 (2014-09-25) the whole document in particular, pages 20, , 27, 28, 33, 34, 42, 43, 45, 53-55, 62-63 and the examples | 1-83, 85-93, 95-130 |
| | ----- -/-- | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| * Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family | | |
| Date of the actual completion of the international search | | Date of mailing of the international search report |
| 7 July 2016 | | 18/07/2016 |
| Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016 | | Authorized officer Pérez-Mato, Isabel |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2016/031257

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|--|--|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| Y | WO 2013/028231 A1 (UNIV TEXAS [US]; LIU YONG-JUN [US]; VOO KUI SHIN [US]; BOVER LAURA [US] 28 February 2013 (2013-02-28) the whole document in particular, pages 3, 30-31, 59, 42 and the examples ----- | 1-83, 85-93, 95-130 |
| Y | WO 2009/079335 A1 (MEDAREX INC [US]; PFIZER [US]; MIN JING [US]; WU YANLI [US]; FINN RORY) 25 June 2009 (2009-06-25) cited in the application the whole document in particular, pages 2, 3, 16, 17, 19-34 ----- | 1-83, 85-93, 95-130 |
| Y | WO 03/106498 A2 (CRUCCELL HOLLAND BV [NL]; BAKKER ALEXANDER BERTHOLD HEND [NL]; MEESTER-) 24 December 2003 (2003-12-24) the whole document in particular, pages 57-59 and 66-82 ----- | 1-11, 22-25, 37-53, 65,66, 121-130 |
| Y | XIE F ET AL: "Characterization and application of two novel monoclonal antibodies against human OX40: costimulation of T cells and expression on tumor as well as normal gland tissues", TISSUE ANTIGENS, MUNKSGAARD, COPENHAGEN, DK, vol. 67, no. 4, 1 April 2006 (2006-04-01), pages 307-317, XP002525127, ISSN: 0001-2815, DOI: 10.1111/J.1399-0039.2006.00584.X the whole document in particular, pages 313-314 ----- | 1-35, 67-83, 85-93, 95-119 |
| Y | SILVIA PICONESE ET AL: "OX40 triggering blocks suppression by regulatory T cells and facilitates tumor rejection", THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS, US vol. 205, no. 4 1 April 2008 (2008-04-01), pages 825-839, XP002719644, ISSN: 0022-1007, DOI: 10.1084/JEM.20071341 Retrieved from the Internet: URL:http://jem.rupress.org/content/205/4/825 [retrieved on 2008-03-24] the whole document in particular, pages 830-831 ----- | 1-35, 67-83, 85-93, 95-119 |
| | ----- -/-- | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2016/031257

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|--|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| Y | <p>K. S. VOO ET AL: "Antibodies Targeting Human OX40 Expand Effector T Cells and Block Inducible and Natural Regulatory T Cell Function", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 191, no. 7, 6 September 2013 (2013-09-06), pages 3641-3650, XP055194259, ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/jimmunol.1202752 the whole document in particular, pages 3-8 -----</p> | <p>1-35, 67-83, 85-93, 95-119</p> |
| Y | <p>B. D. CURTI ET AL: "OX40 Is a Potent Immune-Stimulating Target in Late-Stage Cancer Patients", CANCER RESEARCH, vol. 73, no. 24, 31 October 2013 (2013-10-31), pages 7189-7198, XP055194254, ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-4174 the whole document in particular, pages 7191-7195 -----</p> | <p>1-35, 67-83, 85-93, 95-119</p> |
| Y | <p>WEINBERG ANDREW D ET AL: "Anti-OX40 (CD134) administration to nonhuman primates: immunostimulatory effects and toxicokinetic study", JOURNAL OF IMMUNOTHERAPY, LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINGS INC, vol. 29, no. 6, 1 November 2006 (2006-11-01), pages 575-585, XP009115398, ISSN: 1524-9557, DOI: 10.1097/01.CJI.0000211319.00031.FC the whole document in particular, pages 578-585 -----</p> | <p>1-35, 67-83, 85-93, 95-119</p> |
| Y | <p>WO 2012/130831 A1 (ROCHE GLYCART AG [CH]; BAEHNER MONIKA [DE]; JENEWEIN STEFAN [DE]; KUBB) 4 October 2012 (2012-10-04) cited in the application the whole document for instance, page 1 -----</p> | <p>15-17</p> |
| | ----- -/-- | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|---|
| International application No PCT/US2016/031257 |
|---|

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| Y | SANDRA LIGHTLE ET AL: "Mutations within a human IgG2 antibody form distinct and homogeneous disulfide isomers but do not affect Fc gamma receptor or C1q binding", PROTEIN SCIENCE, vol. 19, no. 4, 1 April 2010 (2010-04-01), pages 753-762, XP055072622, ISSN: 0961-8368, DOI: 10.1002/pro.352 the whole document in particular, page 755 ----- | 18 |
| Y | CORMAC SHERIDAN: "IDO inhibitors move center stage in immuno-oncology", NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 33, no. 4, 7 April 2015 (2015-04-07), pages 321-322, XP055286744, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/nbt0415-321 the whole document in particular, table 1 ----- | 54-59 |
| Y | STRBO NATASA ET AL: "Secreted heat shock protein gp96-Ig: next-generation vaccines for cancer and infectious diseases", IMMUNOLOGIC RESEARCH, HUMANA PRESS, INC, US, vol. 57, no. 1, 20 November 2013 (2013-11-20), pages 311-325, XP035952374, ISSN: 0257-277X, DOI: 10.1007/S12026-013-8468-X [retrieved on 2013-11-20] the whole document ----- | 61,62 |
| Y | JIANLIN GONG ET AL: "A Heat Shock Protein 70-Based Vaccine with Enhanced Immunogenicity for Clinical Use", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 184, no. 1, 1 January 2010 (2010-01-01), pages 488-496, XP002639947, ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/JIMMUNOL.0902255 [retrieved on 2009-11-30] the whole document ----- | 63 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2016/031257

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|------------------|
| WO 2013092001 A1 | 27-06-2013 | CA 2859767 A1 | 27-06-2013 |
| | | CN 104203981 A | 10-12-2014 |
| | | EP 2794658 A1 | 29-10-2014 |
| | | JP 2015502373 A | 22-01-2015 |
| | | US 2015119555 A1 | 30-04-2015 |
| | | WO 2013092001 A1 | 27-06-2013 |
| | | ----- | ----- |
| WO 2013068563 A2 | 16-05-2013 | AR 088820 A1 | 10-07-2014 |
| | | AU 2012333997 A1 | 29-05-2014 |
| | | CA 2855174 A1 | 16-05-2013 |
| | | CL 2014001193 A1 | 26-12-2014 |
| | | CN 103946240 A | 23-07-2014 |
| | | CO 7010784 A2 | 31-07-2014 |
| | | EA 201400565 A1 | 30-12-2014 |
| | | EP 2776469 A2 | 17-09-2014 |
| | | JP 2015506910 A | 05-03-2015 |
| | | KR 20140097329 A | 06-08-2014 |
| | | MA 35724 B1 | 01-12-2014 |
| | | NZ 624583 A | 29-05-2015 |
| | | PE 19952014 A1 | 06-12-2014 |
| | | SG 11201402093R A | 27-06-2014 |
| | | TW 201326205 A | 01-07-2013 |
| | | US 2013243772 A1 | 19-09-2013 |
| | | US 2016031974 A1 | 04-02-2016 |
| WO 2013068563 A2 | 16-05-2013 | | |
| ----- | ----- | ----- | ----- |
| WO 2014148895 A1 | 25-09-2014 | AU 2014238546 A1 | 01-10-2015 |
| | | CA 2907436 A1 | 25-09-2014 |
| | | CN 105229032 A | 06-01-2016 |
| | | CR 20150498 A | 30-03-2016 |
| | | EA 201591495 A1 | 31-05-2016 |
| | | EP 2976361 A1 | 27-01-2016 |
| | | JP 2016515544 A | 30-05-2016 |
| | | KR 20160006168 A | 18-01-2016 |
| | | MD 20150102 A2 | 29-02-2016 |
| | | PH 12015502185 A1 | 25-01-2016 |
| | | SG 11201507781V A | 29-10-2015 |
| | | US 2014377284 A1 | 25-12-2014 |
| | | WO 2014148895 A1 | 25-09-2014 |
| | | ----- | ----- |
| WO 2013028231 A1 | 28-02-2013 | AU 2012299421 A1 | 06-03-2014 |
| | | AU 2016200435 A1 | 18-02-2016 |
| | | CA 2845810 A1 | 28-02-2013 |
| | | CN 103946238 A | 23-07-2014 |
| | | EP 2748199 A1 | 02-07-2014 |
| | | JP 2014526898 A | 09-10-2014 |
| | | KR 20140090976 A | 18-07-2014 |
| | | TN 2013000076 A1 | 25-06-2014 |
| | | WO 2013028231 A1 | 28-02-2013 |
| ----- | ----- | ----- | ----- |
| WO 2009079335 A1 | 25-06-2009 | AR 069681 A1 | 10-02-2010 |
| | | AU 2008338591 A1 | 25-06-2009 |
| | | BR P10820875 A2 | 16-06-2015 |
| | | CA 2707773 A1 | 25-06-2009 |
| | | CN 101918447 A | 15-12-2010 |
| | | CO 6280541 A2 | 20-05-2011 |
| | | DK 2242771 T3 | 26-08-2013 |
| | | DK 2594590 T3 | 12-01-2015 |

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2016/031257

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date | |
|--|------------------|-------------------------|-------------------|------------|
| | | EP 2242771 A1 | 27-10-2010 | |
| | | EP 2594590 A1 | 22-05-2013 | |
| | | EP 2851374 A1 | 25-03-2015 | |
| | | ES 2425269 T3 | 14-10-2013 | |
| | | ES 2526887 T3 | 16-01-2015 | |
| | | HR P20141188 T1 | 13-03-2015 | |
| | | IL 206297 A | 30-06-2016 | |
| | | JP 5761997 B2 | 12-08-2015 | |
| | | JP 2011505836 A | 03-03-2011 | |
| | | JP 2015110558 A | 18-06-2015 | |
| | | KR 20100102657 A | 24-09-2010 | |
| | | KR 20150061041 A | 03-06-2015 | |
| | | PA 8807601 A1 | 17-09-2009 | |
| | | PE 12692009 A1 | 09-09-2009 | |
| | | PH 12015500806 A1 | 02-12-2015 | |
| | | PT 2242771 E | 29-08-2013 | |
| | | PT 2594590 E | 14-01-2015 | |
| | | RU 2010129045 A | 20-01-2012 | |
| | | SG 186656 A1 | 30-01-2013 | |
| | | SI 2242771 T1 | 30-09-2013 | |
| | | SI 2594590 T1 | 31-03-2015 | |
| | | TW 200932268 A | 01-08-2009 | |
| | | US 2009214560 A1 | 27-08-2009 | |
| | | US 2011206681 A1 | 25-08-2011 | |
| | | US 2012225086 A1 | 06-09-2012 | |
| | | US 2015218279 A1 | 06-08-2015 | |
| | | UY 31533 A1 | 03-08-2009 | |
| | | WO 2009079335 A1 | 25-06-2009 | |
| ----- | | | | |
| WO 03106498 | A2 | 24-12-2003 | AU 2003257419 A1 | 31-12-2003 |
| | | | CA 2489004 A1 | 24-12-2003 |
| | | | DE 60317677 T2 | 30-10-2008 |
| | | | EP 1525223 A2 | 27-04-2005 |
| | | | ES 2295639 T3 | 16-04-2008 |
| | | | NZ 536746 A | 23-02-2007 |
| | | | US 2006281072 A1 | 14-12-2006 |
| | | | US 2011123552 A1 | 26-05-2011 |
| | | | WO 03106498 A2 | 24-12-2003 |
| ----- | | | | |
| WO 2012130831 | A1 | 04-10-2012 | AR 085741 A1 | 23-10-2013 |
| | | | AU 2012234335 A1 | 05-09-2013 |
| | | | CA 2828289 A1 | 04-10-2012 |
| | | | CN 103476795 A | 25-12-2013 |
| | | | EP 2691417 A1 | 05-02-2014 |
| | | | JP 5926791 B2 | 25-05-2016 |
| | | | JP 2014514287 A | 19-06-2014 |
| | | | KR 20130139342 A | 20-12-2013 |
| | | | KR 20160044598 A | 25-04-2016 |
| | | | NZ 614658 A | 31-07-2015 |
| | | | RU 2013145623 A | 10-05-2015 |
| | | | SG 193554 A1 | 29-11-2013 |
| | | | SG 102016023940 A | 30-05-2016 |
| | | | US 2012251531 A1 | 04-10-2012 |
| | | | US 2015239981 A1 | 27-08-2015 |
| | | | WO 2012130831 A1 | 04-10-2012 |
| ----- | | | | |

フロントページの続き

| (51) Int.Cl. | | | F I | | テーマコード(参考) |
|--------------|---------|-----------|---------|---------|------------|
| C 1 2 N | 5/10 | (2006.01) | C 1 2 N | 5/10 | 4 H 0 4 5 |
| C 0 7 K | 16/46 | (2006.01) | C 0 7 K | 16/46 | |
| C 1 2 P | 21/08 | (2006.01) | C 1 2 P | 21/08 | |
| A 6 1 K | 39/395 | (2006.01) | A 6 1 K | 39/395 | D |
| A 6 1 P | 37/02 | (2006.01) | A 6 1 K | 39/395 | N |
| A 6 1 P | 43/00 | (2006.01) | A 6 1 P | 37/02 | |
| A 6 1 P | 35/00 | (2006.01) | A 6 1 P | 43/00 | 1 0 7 |
| A 6 1 P | 1/00 | (2006.01) | A 6 1 P | 35/00 | |
| A 6 1 P | 11/00 | (2006.01) | A 6 1 P | 1/00 | |
| A 6 1 P | 13/12 | (2006.01) | A 6 1 P | 11/00 | |
| A 6 1 P | 13/08 | (2006.01) | A 6 1 P | 13/12 | |
| A 6 1 K | 45/00 | (2006.01) | A 6 1 P | 13/08 | |
| A 6 1 K | 39/00 | (2006.01) | A 6 1 K | 45/00 | |
| A 6 1 P | 37/06 | (2006.01) | A 6 1 K | 39/00 | H |
| A 6 1 P | 11/06 | (2006.01) | A 6 1 P | 37/06 | |
| A 6 1 P | 29/00 | (2006.01) | A 6 1 P | 11/06 | |
| A 6 1 P | 19/02 | (2006.01) | A 6 1 P | 29/00 | 1 0 1 |
| A 6 1 P | 1/04 | (2006.01) | A 6 1 P | 19/02 | |
| A 6 1 P | 17/00 | (2006.01) | A 6 1 P | 1/04 | |
| A 6 1 K | 31/4245 | (2006.01) | A 6 1 P | 17/00 | |
| A 6 1 K | 31/405 | (2006.01) | A 6 1 K | 31/4245 | |
| A 6 1 K | 31/41 | (2006.01) | A 6 1 K | 31/405 | |
| A 6 1 K | 31/4188 | (2006.01) | A 6 1 K | 31/41 | |
| A 6 1 K | 31/47 | (2006.01) | A 6 1 K | 31/4188 | |
| G 0 1 N | 33/53 | (2006.01) | A 6 1 K | 31/47 | |
| G 0 1 N | 33/531 | (2006.01) | G 0 1 N | 33/53 | D |
| C 1 2 N | 15/63 | (2006.01) | G 0 1 N | 33/531 | A |
| | | | C 1 2 N | 15/63 | Z |

(31)優先権主張番号 62/323,458

(32)優先日 平成28年4月15日(2016.4.15)

(33)優先権主張国 米国(US)

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

(71)出願人 500213834

メモリアル スローン ケタリング キャンサー センター

アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 0 6 5 , ニューヨーク , ヨーク アベニュー 1 2 7 5

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

- (72)発明者 ファン ダイク, マルク
オランダ国 3722ゼットエイチ ビルトホーフエン, ガーイラーン 16
- (72)発明者 ブレオス-ニストロム, エカテリーナ
スイス国 4052 バーゼル, ヴァルデンブルガーシュトラッセ 15
- (72)発明者 シーベルト, フォルカー
ドイツ国 79539 レラハ, トゥムリンガー ストラッセ 261ツェー
- (72)発明者 リッター, ゲルト
アメリカ合衆国 ニューヨーク 10017, ニューヨーク, サード アベニュー 666,
28ティーエイチ フロア
- (72)発明者 スカエル, デイビッド
アメリカ合衆国 ニューヨーク 10543, ママロネック, ショア エイカーズ ドライブ
715
- (72)発明者 ヒルシュホルン-サイマーマン, ダニエル
アメリカ合衆国 ニューヨーク 10017, ニューヨーク, イースト 49ティーエイチ
ストリート 255, 27ビー
- (72)発明者 メルゴウブ, タハ
アメリカ合衆国 ニュージャージー 07306, ジャージー シティ, ヒューロン アベニ
ュー 10, アpartment 14ケー
- (72)発明者 タン, ハオ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02421, レキシントン, パトラー アベニュー 1
0
- (72)発明者 サヴィツキー, デイビッド エー.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01921, ボックスフォード, サンライズ ロード
28
- (72)発明者 ワイト, ジェレミー
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02149, エバリット, チャールトン ストリート
25, アpartment 403
- (72)発明者 ウィルソン, ニコラス エス.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02144, サマービル, エレクトリック アベニュー
68, アpartment 1

F ターム(参考) 4B064 AG27 CA19 CC24 DA01

4B065 AA01X AA26X AA41X AA50X AA57X AA72X AA88X AA90X AA90Y AB01

AC14 BA02 CA25 CA44 CA46

4C084 AA19 NA05 ZB261 ZB262 ZC202

4C085 AA03 AA13 BB11

4C086 AA01 AA02 BC13 BC28 BC71 CB03 MA02 MA04 NA05 ZB26

4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 CA40 DA76 EA20 EA50 FA74 GA26