

(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2018-512137
(P2018-512137A)

(43) 公表日 平成30年5月17日(2018.5.17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	4B064
C07K 16/46 (2006.01)	C07K 16/46	4B065
C07K 16/28 (2006.01)	C07K 16/28	4C085
C07K 16/18 (2006.01)	C07K 16/18	4H045
C07K 16/40 (2006.01)	C07K 16/40	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 196 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-550554 (P2017-550554)
 (86) (22) 出願日 平成28年3月29日 (2016. 3. 29)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年11月21日 (2017. 11. 21)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2016/056765
 (87) 国際公開番号 W02016/156291
 (87) 国際公開日 平成28年10月6日 (2016. 10. 6)
 (31) 優先権主張番号 15161880.8
 (32) 優先日 平成27年3月31日 (2015. 3. 31)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 306021192
 エフ・ホフマン・ラ・ロシュ・アクチュエン
 ゲゼルシャフト
 スイス、ツェハーー 4070 パーゼル、グ
 レンツァッハーシュトラッセ 124 番
 (74) 代理人 110002077
 園田・小林特許業務法人
 (72) 発明者 アマン, マリア
 スイス国 8600 デューベンドルフ,
 ノイグートシュトラッセ 55
 (72) 発明者 ブルエンカー, ペーター
 スイス国 8335 ヒットナウ, ブル
 クヴィーゼンシュトラッセ 3 ツェー

最終頁に続く

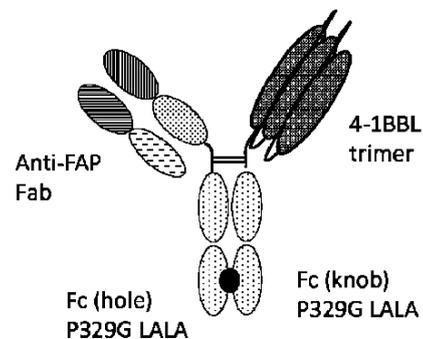
(54) 【発明の名称】 三量体TNFファミリーリガンドを含む抗原結合分子

(57) 【要約】

本出願は、(a) 標的細胞抗原に特異的に結合することができる少なくとも1つの部分、(b) (c) ペプチドリンカー (例えばFcドメイン) によって互いに連結されたTNFリガンドファミリーメンバー、好ましくはOX40L又は4-1BBLの3つの細胞外部分を含むポリペプチドを含むTNFファミリーリガンド三量体に関する。またこれらの分子を製造する方法及びその使用方法も特許請求される。

【選択図】 3A

Fig. 3A



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- (a) 標的細胞抗原に特異的に結合することができる少なくとも 1 つの部分、
- (b) 任意選択的にペプチドリンカーによって、互いに連結された T N F リガンドファミリーメンバーの 3 つのエクトドメイン又はその断片を含むポリペプチド、及び
- (c) 安定な会合が可能な第 1 及び第 2 のサブユニットから構成される F c ドメインを含む、T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

【請求項 2】

- (a) 標的細胞抗原に特異的に結合することができる少なくとも 1 つの部分、
- (b) ペプチドリンカーによって互いに連結された T N F リガンドファミリーメンバーの 3 つのエクトドメイン又はその断片を含むポリペプチド、及び
- (c) 安定な会合が可能な第 1 及び第 2 のサブユニットから構成される F c ドメインを含む、請求項 1 に記載の T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

10

【請求項 3】

- (a) 標的細胞抗原に特異的に結合することができる少なくとも 1 つの部分、
- (b) ペプチドリンカーによって互いに連結された T N F リガンドファミリーメンバーの 3 つのエクトドメイン又はその断片を含むポリペプチド、及び
- (c) 安定な会合が可能な第 1 及び第 2 のサブユニットから構成される F c ドメインを含む、T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子であって、ペプチドリンカーによって互いに連結された T N F リガンドファミリーメンバーの 3 つのエクトドメイン又はその断片を含むポリペプチドが、任意選択的にペプチドリンカーを介して、F c ドメインの 2 つのサブユニットの 1 つの N 末端又は C 末端のアミノ酸に融合される、請求項 1 又は 2 に記載の T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

20

【請求項 4】

T N F リガンドファミリーメンバーがヒト T 細胞活性化を共刺激する、請求項 1 から 3 の何れか一項に記載の T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

【請求項 5】

T N F リガンドファミリーメンバーが 4 - 1 B B L 及び O X 4 0 L から選択される、請求項 1 から 4 の何れか一項に記載の T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

【請求項 6】

T N F リガンドファミリーメンバーが 4 - 1 B B L である、請求項 1 から 5 の何れか一項に記載の T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

30

【請求項 7】

T N F リガンドファミリーメンバーのエクトドメインが、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 9 9、配列番号 1 0 0、配列番号 1 0 1、及び配列番号 1 0 2 からなる群から選択されるアミノ酸配列、特に配列番号 1 又は配列番号 9 9 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 から 6 の何れか一項に記載の T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

【請求項 8】

- (a) 標的細胞抗原に特異的に結合することができる少なくとも 1 つの部分、
- (b) 配列番号 5 又は配列番号 1 0 3 のアミノ酸配列を含むポリペプチド、及び
- (c) 安定な会合が可能な第 1 及び第 2 のサブユニットから構成される F c ドメインを含む、請求項 1 から 6 の何れか一項に記載の T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

40

【請求項 9】

T N F リガンドファミリーメンバーが O X 4 0 L である、請求項 1 から 5 の何れか一項に記載の T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

【請求項 1 0】

T N F リガンドファミリーメンバーのエクトドメインが、配列番号 6 及び配列番号 7 からなる群から選択されるアミノ酸配列、特に配列番号 6 のアミノ酸配列を含む、請求項 1

50

から 5 又は 9 の何れか一項に記載の T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

【請求項 1 1】

(a) 標的細胞抗原に特異的に結合することができる少なくとも 1 つの部分、
 (b) 配列番号 8 のアミノ酸配列を含むポリペプチド、及び
 (c) 安定な会合が可能な第 1 及び第 2 のサブユニットから構成される F c ドメイン
 を含む、請求項 1 から 5 又は 9 又は 1 0 の何れか一項に記載の T N F ファミリーリガンド
 三量体含有抗原結合分子。

【請求項 1 2】

T N F リガンドファミリーメンバーの 3 つのエクトドメイン又はその断片を含むポリペ
 プチドが、F c ドメインのサブユニットの 1 つの N 末端アミノ酸に C 末端アミノ酸で融合
 される、請求項 1 から 1 1 の何れか一項に記載の T N F ファミリーリガンド三量体含有抗
 原結合分子。

10

【請求項 1 3】

T N F リガンドファミリーメンバーの 3 つのエクトドメイン又はその断片を含むポリペ
 プチドが、F c ドメインのサブユニットの 1 つの C 末端アミノ酸に N 末端アミノ酸で融合
 される、請求項 1 から 1 1 の何れか一項に記載の T N F ファミリーリガンド三量体含有抗
 原結合分子。

【請求項 1 4】

標的細胞抗原に特異的に結合することができる部分が、抗体断片、F a b 分子、クロス
 オーバー F a b 分子、単鎖 F a b 分子、F v 分子、s c F v 分子、単ドメイン抗体、a
 V H、及び足場抗原結合タンパク質からなる群から選択される、請求項 1 から 1 3 の何れ
 か一項に記載の T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

20

【請求項 1 5】

標的細胞抗原に特異的に結合することができる部分が、標的細胞抗原に特異的に結合す
 ることができる F a b 分子である、請求項 1 から 1 4 の何れか一項に記載の T N F ファミ
 リーリガンド三量体含有抗原結合分子。

【請求項 1 6】

標的細胞抗原が、線維芽細胞活性化タンパク質 (F A P)、メラノーマ関連コンドロイ
 チン硫酸プロテオグリカン (M C S P)、上皮増殖因子受容体 (E G F R)、がん胎児性
 抗原 (C E A)、C D 1 9、C D 2 0、及び C D 3 3 からなる群から選択される、請求項
 1 から 1 5 の何れか一項に記載の T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

30

【請求項 1 7】

標的細胞抗原が線維芽細胞活性化タンパク質 (F A P) である、請求項 1 から 1 6 の何
 れか一項に記載の T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

【請求項 1 8】

F A P に特異的に結合することができる部分が、
 (a) (i) 配列番号 9 のアミノ酸配列を含む C D R - H 1、(i i) 配列番号 1 0 の
 アミノ酸配列を含む C D R - H 2、及び (i i i) 配列番号 1 1 のアミノ酸配列を含む C
 D R - H 3 を含む V H ドメイン、並びに (i v) 配列番号 1 2 のアミノ酸配列を含む C D
 R - L 1、(v) 配列番号 1 3 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2、及び (v i) 配列番
 号 1 4 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3 を含む V L ドメイン、又は
 (b) (i) 配列番号 1 0 4 のアミノ酸配列を含む C D R - H 1、(i i) 配列番号 1
 0 5 のアミノ酸配列を含む C D R - H 2、及び (i i i) 配列番号 1 0 6 のアミノ酸配列
 を含む C D R - H 3 を含む V H ドメイン、並びに (i v) 配列番号 1 0 7 のアミノ酸配列
 を含む C D R - L 1、(v) 配列番号 1 0 8 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2、及び (v
 i) 配列番号 1 0 9 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3 を含む V L ドメインを含む、請
 求項 1 から 1 7 の何れか一項に記載の T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子
 。

40

【請求項 1 9】

F A P に特異的に結合することができる部分が、配列番号 1 6 のアミノ酸配列を含む可

50

変重鎖及び配列番号17のアミノ酸配列を含む可変軽鎖を含み、又はFAPに特異的に結合することができる部分が、配列番号110のアミノ酸配列を含む可変重鎖及び配列番号111のアミノ酸配列を含む可変軽鎖を含む、請求項1から18の何れか一項に記載のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

【請求項20】

標的細胞抗原がCEAである、請求項1から16の何れか一項に記載のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

【請求項21】

CEAに特異的に結合することができる部分が、(i)配列番号112のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii)配列番号113のアミノ酸配列を含むCDR-H2、及び(iii)配列番号114のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含むVHドメイン、並びに(iv)配列番号115のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(v)配列番号116のアミノ酸配列を含むCDR-L2、及び(vi)配列番号117のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含むVLドメインを含む、請求項1から16又は20の何れか一項に記載のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

10

【請求項22】

CEAに特異的に結合することができる部分が、配列番号118のアミノ酸配列を含む可変重鎖及び配列番号119のアミノ酸配列を含む可変軽鎖を含む、請求項1から16又は20又は21の何れか一項に記載のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

20

【請求項23】

標的細胞抗原がCD19である、請求項1から16の何れか一項に記載のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

【請求項24】

CD19に特異的に結合することができる部分が、

(a) (i)配列番号120のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii)配列番号121のアミノ酸配列を含むCDR-H2、及び(iii)配列番号122のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含むVHドメイン、並びに(iv)配列番号123のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(v)配列番号124のアミノ酸配列を含むCDR-L2、及び(vi)配列番号125のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含むVLドメイン、又は

30

(b) (i)配列番号128のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii)配列番号129のアミノ酸配列を含むCDR-H2、及び(iii)配列番号130のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含むVHドメイン、並びに(iv)配列番号131のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(v)配列番号132のアミノ酸配列を含むCDR-L2、及び(vi)配列番号133のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含むVLドメインを含む、請求項1から16又は23の何れか一項に記載のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

【請求項25】

CD19に特異的に結合することができる部分が、配列番号126のアミノ酸配列を含む可変重鎖及び配列番号127のアミノ酸配列を含む可変軽鎖を含み、又はFAPに特異的に結合することができる部分が、配列番号134のアミノ酸配列を含む可変重鎖及び配列番号135のアミノ酸配列を含む可変軽鎖を含む、請求項1から16又は23又は24の何れか一項に記載のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

40

【請求項26】

Fcドメインが、IgG、特にIgG1 Fcドメイン又はIgG4 Fcドメインである、請求項1から25の何れか一項に記載のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

【請求項27】

Fcドメインが、位置234及び235(EU番号付け)及び/又は329(EU番号付け)にアミノ酸置換を含むIgG1 Fcドメインである、請求項26に記載のTNF

50

ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

【請求項 28】

標的細胞抗原に特異的に結合することができる1つの部分を含む、請求項1から27の何れか一項に記載のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

【請求項 29】

(i) 標的細胞抗原に特異的に結合することができるFab分子のVHドメインを含む第1の重鎖、

(ii) 標的細胞抗原に特異的に結合することができるFab分子のVLドメインを含む軽鎖、及び

(iii) 配列番号5又は配列番号103又は配列番号8のアミノ酸配列を含む第2の重鎖

を含む、請求項1から28の何れか一項に記載のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

【請求項 30】

(i) 配列番号16のアミノ酸配列を含むVHドメイン又は配列番号110のアミノ酸配列を含むVHドメインを含む第1の重鎖、

(ii) 配列番号17のアミノ酸配列を含むVLドメイン又は配列番号111のアミノ酸配列を含むVLドメインを含む軽鎖、及び

(iii) 配列番号5又は配列番号103又は配列番号8のアミノ酸配列を含む第2の重鎖

を含む、請求項1から29の何れか一項に記載のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

【請求項 31】

(i) 配列番号118のアミノ酸配列を含むVHドメインを含む第1の重鎖、

(ii) 配列番号119のアミノ酸配列を含むVLドメインを含む軽鎖、及び

(iii) 配列番号5又は配列番号103又は配列番号8のアミノ酸配列を含む第2の重鎖

を含む、請求項1から29の何れか一項に記載のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

【請求項 32】

(i) 配列番号126のアミノ酸配列を含むVHドメイン又は配列番号134のアミノ酸配列を含むVHドメインを含む第1の重鎖、

(ii) 配列番号127のアミノ酸配列を含むVLドメイン又は配列番号135のアミノ酸配列を含むVLドメインを含む軽鎖、及び

(iii) 配列番号5又は配列番号103又は配列番号8のアミノ酸配列を含む第2の重鎖

を含む、請求項1から29の何れか一項に記載のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

【請求項 33】

標的細胞抗原に特異的に結合することができる2つの部分を含む、請求項1から27の何れか一項に記載のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

【請求項 34】

(i) 標的細胞抗原に特異的に結合することができるFab分子のVHドメインを含む第1の重鎖、

(ii) 標的細胞抗原に特異的に結合することができるFab分子のVLドメインをそれぞれが含む2つの軽鎖、並びに

(iii) 標的細胞抗原に特異的に結合することができるFab分子のVHドメイン、及び配列番号5又は配列番号103又は配列番号8のアミノ酸配列を含む第2の重鎖

を含む、請求項1から27又は33の何れか一項に記載のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

10

20

30

40

50

【請求項 35】

(i) 配列番号 16 のアミノ酸配列を含む V H ドメイン又は配列番号 110 のアミノ酸配列を含む V H ドメインを含む第 1 の重鎖、

(ii) 配列番号 17 のアミノ酸配列を含む V L ドメイン又は配列番号 111 のアミノ酸配列を含む V L ドメインをそれぞれ含む 2 つの軽鎖、並びに

(iii) 配列番号 16 のアミノ酸配列を含む V H ドメイン又は配列番号 110 のアミノ酸配列を含む V H ドメイン、及び配列番号 5 又は配列番号 103 又は配列番号 8 のアミノ酸配列を含む第 2 の重鎖

を含む、請求項 34 に記載の T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

【請求項 36】

(i) 配列番号 118 のアミノ酸配列を含む V H ドメインを含む第 1 の重鎖、

(ii) 配列番号 119 のアミノ酸配列を含む V L ドメインをそれぞれが含む 2 つの軽鎖、並びに

(iii) 配列番号 118 のアミノ酸配列を含む V H ドメイン、及び配列番号 5 又は配列番号 103 又は配列番号 8 のアミノ酸配列を含む第 2 の重鎖

を含む、請求項 34 に記載の T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

【請求項 37】

(i) 配列番号 126 のアミノ酸配列を含む V H ドメイン又は配列番号 134 のアミノ酸配列を含む V H ドメインを含む第 1 の重鎖、

(ii) 配列番号 127 のアミノ酸配列を含む V L ドメイン又は配列番号 135 のアミノ酸配列を含む V L ドメインを含む 2 つの軽鎖、並びに

(iii) 配列番号 126 のアミノ酸配列を含む V H ドメイン又は配列番号 134 のアミノ酸配列を含む V H ドメイン、及び配列番号 5 又は配列番号 103 又は配列番号 8 のアミノ酸配列を含む第 2 の重鎖

を含む、請求項 34 に記載の T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

【請求項 38】

請求項 1 から 37 の何れか一項に記載の T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子をコードする、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 39】

請求項 38 に記載の単離されたポリヌクレオチドを含むベクター、特に発現ベクター。

【請求項 40】

請求項 38 に記載の単離されたポリヌクレオチド又は請求項 39 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 41】

(i) 抗原結合分子の発現に適した条件下で、請求項 40 に記載の宿主細胞を培養する工程、及び

(ii) 抗原結合分子を回収する工程

を含む、請求項 1 から 37 の何れか一項に記載の T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を製造するための方法。

【請求項 42】

請求項 1 から 37 の何れか一項に記載の T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子と、少なくとも 1 つの薬学的に許容される賦形剤とを含む薬学的組成物。

【請求項 43】

医薬として使用のための、請求項 1 から 37 の何れか一項に記載の T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子、又は請求項 38 に記載の薬学的組成物。

【請求項 44】

がんの治療における使用のための、請求項 1 から 37 の何れか一項に記載の T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子、又は請求項 42 に記載の薬学的組成物。

【請求項 45】

がんの治療のための医薬の製造のための、請求項 1 から 37 の何れか一項に記載の T N

10

20

30

40

50

Fファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子の使用。

【請求項 46】

個体における疾患を治療する方法であって、薬学的に許容される形態の、請求項 1 から 37 の何れか一項に記載の TNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を含む組成物の治療的有効量を前記個体に投与することを含む、方法。

【請求項 47】

前記疾患ががんである、請求項 46 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、(a) 標的細胞抗原に特異的に結合することができる少なくとも 1 つの部分、(b) ペプチドリンカーによって互いに連結された TNF リガンドファミリーメンバーの 3 つのエクトドメイン又はその断片を含むポリペプチド、及び(c) 安定な会合が可能な第 1 及び第 2 のサブユニットから構成される Fc ドメインを含む新規 TNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子に関する。本発明は更に、これらの分子を製造する方法及びその使用方法に関する。

【背景技術】

【0002】

TNF (腫瘍壊死因子) 受容体スーパーファミリーの分子と相互作用するリガンドは、免疫系の機構及び機能において重要な役割を果たしている。TNFファミリーのリガンド(サイトカインとも呼ばれる)は、免疫応答、造血及び形態形成などの正常な機能を調節する一方、腫瘍形成、移植拒絶、敗血症ショック、ウイルス複製、骨吸収、関節リウマチ、及び糖尿病において役割を果たしている (Aggarwal, 2003)。免疫におけるそれらの多様かつ重要な役割は、それらのがん免疫療法の開発にとって興味深いものにしてしている (Bremer, 2013)。TNF リガンドファミリーは、「TNF 相同ドメイン」(THD) を作り出す保存された C 末端ドメインの存在を特徴とする、19 型 II (すなわち、細胞内 N 末端及び細胞外 C 末端) 膜貫通タンパク質をコードする 18 の遺伝子を含む。このドメインは受容体結合に関与し、従って TNF リガンドファミリーメンバーの生物学的活性にとって重要である。ファミリー間の配列同一性は ~ 20 - 30 % である (Bodmer, 2002)。TNF リガンドファミリーのメンバーは、自己集合性の非共有結合三量体としてのその生物学的機能を発揮する (Banner et al., 1993)。従って、TNFファミリーのリガンドは、TNFRスーパーファミリーの対応する受容体に結合してこれを活性化することができる三量体を形成する。TNF リガンドファミリーの幾つかのメンバーは、T 細胞に対する共刺激効果を有しており、それらが T 細胞の初期活性化後に T 細胞応答を維持することを意味している (Watts, 2005)。4 - 1 BBL、OX40L、GIRL、CD70、CD30L、及び LIGHT は、この共刺激 TNFファミリーリガンドのグループに属する。

【0003】

幾つかの共刺激分子の中で、腫瘍壊死因子 (TNF) 受容体ファミリーメンバー OX40 (CD134) は、エフェクター及び記憶 T 細胞の生存及び恒常性において重要な役割を果たしている (Croft et al., 2009)。OX40 (CD134) は、感染、腫瘍、及び自己抗原に対する免疫応答を調節し、T 細胞、NK 細胞、及び NK 細胞ならびに好中球の表面上でその発現が実証されており (Baumann et al., 2004)、種々の刺激シグナルに応答して厳密に誘導可能であるか、又は強力に上方調節されることが示されている。T 細胞受容体の誘発と組み合わせると、その天然リガンド又はアゴニスト抗体による T 細胞に対する OX40 の関与は、PI3K 及び NF- κ B シグナル伝達経路の相乗的活性化をもたらしている (Song et al., 2008)。次に、これは増殖の亢進、サイトカイン受容体及びサイトカイン産生の増加、及び活性化 T 細胞のより良好な生存をもたらす。

【0004】

TNF 受容体スーパーファミリーのメンバーである 4 - 1 BB (CD137) は、その

10

20

30

40

50

発現が T 細胞活性化によって誘導される分子として最初に同定されている (Kwon and Weissman, 1989)。その後の研究は、T リンパ球及び B リンパ球 (Snell et al., 2011; Zhang et al., 2010)、NK 細胞 (Lin et al., 2008)、NK T 細胞 (Kim et al., 2008)、単球 (Kienzle and von Kempis, 2000; Schwarz et al., 1995)、好中球 (Heinisch et al., 2000)、マスト細胞 (Nishimoto et al., 2005) 及び樹状細胞並びに非造血起源の細胞、例えば内皮及び平滑筋細胞 (Broll et al., 2001; Olofsson et al., 2008) の発現を実証した。異なる細胞型における 4 - 1 B B の発現は、主に誘導性であり、T 細胞受容体 (TCR) 又は B 細胞受容体の誘発、並びに炎症誘発性サイトカインの共刺激分子又は受容体を介して誘導されるシグナル伝達などの様々な刺激シグナルによって駆動される (Diehl et al., 2002; von Kempis et al., 1997; Zhang et al., 2010)。

10

【0005】

4 - 1 B B リガンド (4 - 1 B B L 又は CD 1 3 7 L) の発現はより制限され、B 細胞、樹状細胞 (DC) 及びマクロファージなどのプロフェッショナルな抗原提示細胞 (APC) で観察される。4 - 1 B B L の誘導性発現は、及び T 細胞サブセット、及び内皮細胞の両方を含む T 細胞に特徴的である (Shao and Schwarz, 2011 に総説される)。

【0006】

CD 1 3 7 シグナル伝達は、NK 細胞の IFN 分泌及び増殖を刺激するだけでなく (Buechele et al., 2012; Lin et al., 2008; Melero et al., 1998)、それらの生存の増加並びにサイトカインの分泌及び共刺激分子の上方制御によって示される DC 活性化を促進することが知られている (Choi et al., 2009; Futagawa et al., 2002; Wilcox et al., 2002)。しかし、CD 1 3 7 は、T 細胞の CD 4 + サブセット及び CD 8 + サブセットの両方において TCR 誘導活性化を調節する共刺激分子として最もよく特徴づけられる。TCR 誘発と組み合わせて、アゴニスト 4 - 1 B B 特異的抗体は、T 細胞の増殖を増強し、リンホカイン分泌を刺激し、活性化誘導細胞死に対する T リンパ球の感受性を低下させる (Snell et al., 2011 に総説される)。

20

【0007】

インビトロでの T 細胞に対する 4 - 1 B B 抗体のこれらの共刺激効果に沿って、腫瘍担持マウスへのそれらの投与は、多くの実験的腫瘍モデルにおいて強力な抗腫瘍効果をもたらす (Melero et al., 1997; Narazaki et al., 2010)。しかしながら、4 - 1 B B は、通常、他の免疫調節化合物 (Curran et al., 2011; Guo et al., 2013; Morales-Kastresana et al., 2013; Teng et al., 2009; Wei et al., 2013)、化学療法剤 (Ju et al., 2008; Kim et al., 2009)、腫瘍特異的ワクチン接種 (Cuadros et al., 2005; Lee et al., 2011)、又は放射線療法 (Shi and Siemann, 2006) と組み合わせて投与された場合にのみ、抗腫瘍剤としての効力を示す。インビボ枯渇実験は、4 - 1 B B 特異的抗体の抗腫瘍効果において、CD 8 + T 細胞が最も重要な役割を果たすことを実証した。しかし、腫瘍モデル又は抗 4 - 1 B B を含む併用療法に依存して、DC、NK 細胞又は CD 4 + T 細胞などの他の型の細胞の寄与が報告されている (Melero et al., 1997; Murillo et al., 2009; Narazaki et al., 2010; Stagg et al., 2011)。

30

【0008】

異なるリンパ球サブセットに対するそれらの直接的な効果に加えて、4 - 1 B B アゴニストはまた、腫瘍血管内皮上の細胞間接着分子 1 (ICAM 1) 及び血管細胞接着分子 1 (VCAM 1) の 4 - 1 B B 媒介性上方制御を介して腫瘍における活性化 T 細胞の浸潤及び保持を誘導することができる (Palazon et al., 2011)。

40

【0009】

4 - 1 B B の誘発はまた、腫瘍微小環境又は慢性感染の際の免疫寛容の破壊に寄与し得る可溶性抗原への曝露によって誘導される T 細胞アネルギーの状態を逆転させ得る (Wilcox et al., 2004)。

【0010】

これは、TNFR - スーパーファミリーの他のアポトーシス誘導性又は免疫調節性メンバーに特異的なアゴニスト抗体について記載されているように、インビボでの 4 - 1 B B

50

アゴニスト抗体の免疫調節特性は、抗体分子上の野生型 Fc 部分の存在を必要とし、それにより、そのような試薬の薬理的活性に必要な重要な事象としての Fc 受容体結合を示唆していると思われる (Li and Ravetch, 2011; Teng et al., 2009)。しかしながら、機能的に活性な Fc ドメインを有する 4 - 1 B B 特異的アゴニスト抗体の全身投与はまた、マウスにおいて機能的 Fc 受容体が存在しない場合に、減少されるか又は有意に改善される肝臓毒性に関連する CD8 + T 細胞の増殖を誘導し得る。ヒト臨床試験 (Clinical Trials.gov, NCT00309023) では、3 週間に 1 回 12 週間投与された Fc - コンピテント 4 - 1 B B アゴニスト抗体 (BMS - 663513) は、メラノーマ、卵巣癌、又は腎細胞癌の患者の疾患の安定化を誘導した。しかし、別の試験 (NCT00612664) で与えられた同じ抗体は、試験の終了につながるグレード 4 の肝炎を引き起こした (Simeone and Ascierto, 2012)。

10

【0011】

まとめると、利用可能な前臨床及び臨床データは、効果的な 4 - 1 B B アゴニストに対する高い臨床的必要性があることを明確に示している。しかしながら、新世代の薬物候補は、4 - 1 B B を造血細胞及び内皮細胞の表面に効果的に結合するだけでなく、制御不能な副作用を避けるために Fc 受容体に結合する以外のメカニズムによっても達成できるはずである。後者は、腫瘍特異的又は腫瘍関連部分に対する優先的結合及びオリゴマー化によって達成され得る。

【0012】

4 - 1 B B リガンドの 1 つの細胞外ドメイン (Mueller et al., 2008; Hornig et al., 2012, Kermer et al., 2014) と、重鎖の C 末端に融合した単鎖抗体断片又は単一の 4 - 1 B B リガンド (Zhang et al., 2007) とからなる融合タンパク質が作製されている。欧州特許第 1736482 号 (A1) は、天然の 4 - 1 B B L の全細胞外ドメイン及び架橋可能なペプチドドメインを含む組換え 4 - 1 B B L ポリペプチドに関する。国際公開第 2010/010051 号は、互いに連結され、抗体部分に融合された 3 つの TNF リガンドエクトドメインからなる融合タンパク質の生成を開示している。

20

【0013】

しかしながら、腫瘍特異的又は腫瘍関連標的に好ましい結合が可能な部分を、共刺激 TNF ファミリーリガンド三量体を形成することができる部分と組み合わせ、薬学的に有用であるために十分な安定性を有する新しい抗原結合分子が必要である。本発明の抗原結合分子は両方を含み、従って TNF 受容体を、効果的に誘発するだけでなく、所望の部位で非常に選択的に誘発することができ、それにより副作用を低減する。

30

【発明の概要】

【0014】

発明の要旨

この発明は、

- (a) 標的細胞抗原に特異的に結合することができる少なくとも 1 つの部分、
- (b) 任意選択的にペプチドリンカーによって互いに連結された TNF リガンドファミリーメンバーの 3 つのエクトドメイン又はその断片を含むポリペプチド、及び
- (c) 安定な会合が可能な第 1 及び第 2 のサブユニットから構成される Fc ドメインを含む、TNF ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供する。

40

【0015】

一態様では、本発明は、

- (a) 標的細胞抗原に特異的に結合することができる少なくとも 1 つの部分、
- (b) ペプチドリンカーによって互いに連結された TNF リガンドファミリーメンバーの 3 つのエクトドメイン又はその断片を含むポリペプチド、及び
- (c) 安定な会合が可能な第 1 及び第 2 のサブユニットから構成される Fc ドメインを含む、TNF ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供する。

【0016】

別の態様では、TNF ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、

50

- (a) 標的細胞抗原に特異的に結合することができる少なくとも1つの部分、
- (b) ペプチドリンカーによって互いに連結されたTNFリガンドファミリーメンバーの3つのエクドメイン又はその断片を含むポリペプチド、及び
- (c) 安定な会合が可能な第1及び第2のサブユニットから構成されるFcドメインを含み、

ここで、ペプチドリンカーによって互いに連結されたTNFリガンドファミリーメンバーの3つのエクドメイン又はその断片を含むポリペプチドは、任意選択的にペプチドリンカーを介して、Fcドメインの2つのサブユニットの1つのN末端又はC末端のアミノ酸に融合される。

【0017】

特定の態様では、TNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、(a) 標的細胞抗原に特異的に結合することができる少なくとも1つの部分、(b) ペプチドリンカーによって互いに連結されたTNFリガンドファミリーメンバーの3つのエクドメイン又はその断片を含むポリペプチド、及び(c) 安定な会合が可能な第1及び第2のサブユニットから構成されるFcドメインを含み、ここで、TNFリガンドファミリーメンバーは、ヒトT細胞活性化を共刺激する。従って、TNFリガンドファミリーメンバーは共刺激TNFファミリーリガンドである。特に、共刺激TNFファミリーリガンドは、4-1BBL、OX40L、GITRL、CD70、CD30L、及びLIGHTからなる群から選択され、より具体的には、共刺激TNFファミリーリガンドは、4-1BBL及びOX40Lから選択される。

【0018】

一態様では、TNFリガンドファミリーメンバーは4-1BBLである。

【0019】

更なる態様では、TNFリガンドファミリーメンバーのエクドメインは、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号99、配列番号100、配列番号101、及び配列番号102からなる群から選択されるアミノ酸配列、特に配列番号1又は配列番号99のアミノ酸配列を含む。

【0020】

特定の態様では、TNFリガンドファミリーメンバーのエクドメイン又はその断片は、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4からなる群から選択されるアミノ酸配列、特に配列番号1のアミノ酸配列を含む。

【0021】

更なる態様では、本発明のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、(a) 標的細胞抗原に特異的に結合することができる少なくとも1つの部分、(b) 配列番号5又は配列番号103のアミノ酸配列を含むポリペプチド、及び(c) 安定な会合が可能な第1及び第2のサブユニットから構成されるFcドメインを含む。より具体的には、ポリペプチドは配列番号5のアミノ酸配列を含む。

【0022】

別の態様では、TNFリガンドファミリーメンバーはOX40Lである。

【0023】

特定の態様では、TNFリガンドファミリーメンバーのエクドメインは、配列番号6及び配列番号7からなる群から選択されるアミノ酸配列、特に配列番号6のアミノ酸配列を含む。

【0024】

更なる態様では、本発明のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、(a) 標的細胞抗原に特異的に結合することができる少なくとも1つの部分、(b) 配列番号8のアミノ酸配列を含むポリペプチド、及び(c) 安定な会合が可能な第1及び第2のサブユニットから構成されるFcドメインを含む。

【0025】

10

20

30

40

50

一態様では、本発明は、本明細書中で前に記載したTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子に関し、ここで、TNFリガンドファミリーメンバーの3つのエクドメイン又はその断片を含むポリペプチドは、Fcドメインのサブユニットの1つのN末端アミノ酸にC末端アミノ酸で融合される。特に、

- (a) 標的細胞抗原に特異的に結合することができる少なくとも1つの部分、
- (b) ペプチドリンカーによって互いに連結されたTNFリガンドファミリーメンバーの3つのエクドメイン又はその断片を含むポリペプチド、及び
- (c) 安定な会合が可能な第1及び第2のサブユニットから構成されるFcドメインを含むTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供され、

ここで、TNFリガンドファミリーメンバーの3つのエクドメイン又はその断片を含むポリペプチドは、Fcドメイン中のCH₂ドメインのN末端アミノ酸にC末端アミノ酸で融合される。

【0026】

別の態様では、TNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、TNFリガンドファミリーメンバーの3つのエクドメイン又はその断片を含むポリペプチドが、Fcドメインのサブユニットの1つのC末端アミノ酸にN末端アミノ酸で融合され、例えば、TNFリガンドファミリーメンバーの3つのエクドメイン又はその断片を含むポリペプチドが、Fcドメイン中のCH₃ドメインのC末端アミノ酸にN末端アミノ酸で融合される分子である。

【0027】

別の態様では、本発明は、

- (a) 標的細胞抗原に特異的に結合することができる少なくとも1つの部分、(b) ペプチドリンカーによって互いに連結されたTNFリガンドファミリーメンバーの3つのエクドメイン又はその断片を含むポリペプチド、及び(c) 安定な会合が可能な第1及び第2のサブユニットから構成されるFcドメインを含むTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子に関し、

ここで、標的細胞抗原に特異的に結合することができる部分は、TNFリガンドファミリーメンバーの3つのエクドメイン又はその断片を含むポリペプチドに融合されない。

【0028】

更なる態様では、本発明は、本明細書中で先に定義したTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供し、ここで、標的細胞抗原に特異的に結合することができる部分は、抗体、抗体断片、及び足場抗原結合タンパク質からなる群から選択される。

【0029】

一態様では、本発明は、本明細書中で先に定義したTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供し、ここで、標的細胞抗原に特異的に結合することができる部分は抗体である。

【0030】

別の態様では、本発明は、本明細書中で先に定義したTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供し、ここで、標的細胞抗原に特異的に結合することができる部分は抗体断片である。特に、抗体断片は、Fab分子、クロスオーバーFab分子、単鎖Fab分子、Fv分子、scFv分子、単ドメイン抗体、及びaVHからなる群より選択される。

【0031】

更なる態様では、本発明は、本明細書中で先に定義したTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供し、ここで、標的細胞抗原に特異的に結合することができる部分は足場抗原結合タンパク質である。

【0032】

従って、更なる態様では、本発明は、本明細書中で前に定義したTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子に関し、ここで、標的細胞抗原に特異的に結合することができる部分は、抗体断片、Fab分子、クロスオーバーFab分子、単鎖Fab分子、Fv

10

20

30

40

50

分子、s c F v分子、単一ドメイン抗体、a V H、及び足場抗原結合タンパク質からなる群から選択される。

【0033】

特定の態様では、本発明は、上記に定義したT N Fファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子に関し、ここで、標的細胞抗原に特異的に結合することができる部分は、標的細胞抗原に特異的に結合することができるF a b分子である。

【0034】

別の態様では、本発明のT N Fファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供され、ここで標的細胞抗原は、線維芽細胞活性化タンパク質(F A P)、がん胎児性抗原(C E A)、メラノーマ関連コンドロイチン硫酸プロテオグリカン(M C S P)、上皮増殖因子受容体(E G F R)、C D 1 9、C D 2 0、及びC D 3 3からなる群から選択される。

10

【0035】

特定の態様では、標的細胞抗原は線維芽細胞活性化タンパク質(F A P)である。一態様では、本発明は、本明細書中で前に記載したT N Fファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供し、ここで、F A Pに特異的に結合することができる部分は、

(a) (i) 配列番号9のアミノ酸配列を含むC D R - H 1、(i i) 配列番号10のアミノ酸配列を含むC D R - H 2、及び(i i i) 配列番号11のアミノ酸配列を含むC D R - H 3を含むV Hドメイン、並びに(i v) 配列番号12のアミノ酸配列を含むC D R - L 1、(v) 配列番号13のアミノ酸配列を含むC D R - L 2、及び(v i) 配列番号14のアミノ酸配列を含むC D R - L 3を含むV Lドメイン、又は

20

(b) (i) 配列番号104のアミノ酸配列を含むC D R - H 1、(i i) 配列番号105のアミノ酸配列を含むC D R - H 2、及び(i i i) 配列番号106のアミノ酸配列を含むC D R - H 3を含むV Hドメイン、並びに(i v) 配列番号107のアミノ酸配列を含むC D R - L 1、(v) 配列番号108のアミノ酸配列を含むC D R - L 2、及び(v i) 配列番号109のアミノ酸配列を含むC D R - L 3を含むV Lドメインを含む。

【0036】

一態様では、F A Pに特異的に結合することができる部分は、

(i) 配列番号9のアミノ酸配列を含むC D R - H 1、(i i) 配列番号10のアミノ酸配列を含むC D R - H 2、及び(i i i) 配列番号11のアミノ酸配列を含むC D R - H 3を含むV Hドメイン、並びに(i v) 配列番号12のアミノ酸配列を含むC D R - L 1、(v) 配列番号13のアミノ酸配列を含むC D R - L 2、及び(v i) 配列番号14のアミノ酸配列を含むC D R - L 3を含むV Lドメインを含む。別の特定の態様では、F A Pに特異的に結合することができる部分は、(i) 配列番号104のアミノ酸配列を含むC D R - H 1、(i i) 配列番号105のアミノ酸配列を含むC D R - H 2、及び(i i i) 配列番号106のアミノ酸配列を含むC D R - H 3を含むV Hドメイン、並びに(i v) 配列番号107のアミノ酸配列を含むC D R - L 1、(v) 配列番号108のアミノ酸配列を含むC D R - L 2、及び(v i) 配列番号109のアミノ酸配列を含むC D R - L 3を含むV Lドメインを含む。

30

【0037】

更なる態様では、F A Pに特異的に結合することができる部分は、配列番号16のアミノ酸配列を含む可変重鎖及び配列番号17のアミノ酸配列を含む可変軽鎖を含み、又はF A Pに特異的に結合することができる部分は、配列番号110のアミノ酸配列を含む可変重鎖及び配列番号111のアミノ酸配列を含む可変軽鎖を含む。

40

【0038】

別の態様では、標的細胞抗原はC E Aである。一態様では、本発明は、本明細書中で前に記載したT N Fファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供し、ここで、C E Aに特異的に結合することができる部分は、(i) 配列番号112のアミノ酸配列を含むC D R - H 1、(i i) 配列番号113のアミノ酸配列を含むC D R - H 2、及び(i i i) 配列番号114のアミノ酸配列を含むC D R - H 3を含むV Hドメイン、並びに(i v) 配列番号115のアミノ酸配列を含むC D R - L 1、(v) 配列番号116のアミノ酸

50

配列を含む C D R - L 2、及び (v i) 配列番号 1 1 7 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3 を含む V L ドメインを含む。特に、C E A に特異的に結合することができる部分は、配列番号 1 1 8 のアミノ酸配列を含む可変重鎖及び配列番号 1 1 9 のアミノ酸配列を含む可変軽鎖を含む。

【 0 0 3 9 】

更に別の態様では、標的細胞抗原は C D 1 9 である。一態様では、本発明は、本明細書中で前に記載した T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供し、ここで、C D 1 9 に特異的に結合することができる部分は、(a) (i) 配列番号 1 2 0 のアミノ酸配列を含む C D R - H 1、(i i) 配列番号 1 2 1 のアミノ酸配列を含む C D R - H 2、及び (i i i) 配列番号 1 2 2 のアミノ酸配列を含む C D R - H 3 を含む V H ドメイン、並びに (i v) 配列番号 1 2 3 のアミノ酸配列を含む C D R - L 1、(v) 配列番号 1 2 4 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2、及び (v i) 配列番号 1 2 5 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3 を含む V L ドメイン、又は (b) (i) 配列番号 1 2 8 のアミノ酸配列を含む C D R - H 1、(i i) 配列番号 1 2 9 のアミノ酸配列を含む C D R - H 2、及び (i i i) 配列番号 1 3 0 のアミノ酸配列を含む C D R - H 3 を含む V H ドメイン、並びに (i v) 配列番号 1 3 1 のアミノ酸配列を含む C D R - L 1、(v) 配列番号 1 3 2 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2、及び (v i) 配列番号 1 3 3 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3 を含む V L ドメインを含む。特に、C D 1 9 に特異的に結合することができる部分は、配列番号 1 2 6 のアミノ酸配列を含む可変重鎖及び配列番号 1 2 7 のアミノ酸配列を含む可変軽鎖を含み、又は F A P に特異的に結合することができる部分は、配列番号 1 3 4 のアミノ酸配列を含む可変重鎖及び配列番号 1 3 5 のアミノ酸配列を含む可変軽鎖を含む。

10

20

【 0 0 4 0 】

更なる態様では、本明細書中で前に記載した T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供され、ここで、安定な会合が可能な第 1 及び第 2 のサブユニットから構成される F c ドメインは、I g G、特に I g G 1 F c ドメイン又は I g G 4 F c ドメインである。

特に、安定な会合が可能な第 1 及び第 2 のサブユニットから構成される F c ドメインは、I g G 1 F c ドメインである。

【 0 0 4 1 】

別の態様では、本発明は、(c) 安定な会合が可能な第 1 及び第 2 のサブユニットから構成される F c ドメインを含む、本明細書中で先に定義した T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子に関し、ここで、F c ドメインは、F c 受容体、特に F c 受容体への結合を低減させる一又は複数のアミノ酸置換を含む。

30

【 0 0 4 2 】

特に、F c ドメインは、位置 2 3 4 及び 2 3 5 (E U 番号付け) 並びに / 又は 3 2 9 (E U 番号付け) にアミノ酸置換を含む。より具体的には、I g G 重鎖中のアミノ酸置換 L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、及び P 3 2 9 G (E U 番号付け) を有する F c ドメインを含む、本発明による三量体 T N F ファミリーリガンド含有抗原結合分子が提供される。

【 0 0 4 3 】

特定の態様では、本発明は、本明細書中で前に記載した T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供し、ここで、F c ドメインは I g G 1 F c ドメインであり、かつ I g G 重鎖の位置 2 3 4 及び 2 3 5 (E U 番号付け) 及び 3 2 9 (E U 番号付け) にアミノ酸置換を含む。

40

【 0 0 4 4 】

別の態様では、標的細胞抗原に特異的に結合することができる 1 つの部分を含む、本明細書中で前に記載した一価 T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。

【 0 0 4 5 】

特に、(c) 安定な会合が可能な第 1 及び第 2 のサブユニットから構成される F c ドメ

50

インを含む、本発明の T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、(a) 標的細胞抗原に特異的に結合することができる F a b 分子を更に含み、ここで、F a b 重鎖は、F c ドメイン中の C H 2 ドメインの N 末端に C 末端で融合される。

【 0 0 4 6 】

更に、本発明は、本明細書中で前に記載した T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供し、ここで抗原結合分子は、

(a) 標的細胞抗原に特異的に結合することができる F a b 分子を双方が含む、重鎖及び軽鎖、及び

(b) 配列番号 1 5 のアミノ酸配列を含む融合タンパク質を含む。

【 0 0 4 7 】

別の態様では、本明細書中で前に記載した T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供され、ここで抗原結合分子は、

(a) 標的細胞抗原に特異的に結合することができる F a b 分子を双方が含む、重鎖及び軽鎖、及び

(b) 配列番号 2 0 のアミノ酸配列を含む融合タンパク質を含む。

【 0 0 4 8 】

更なる態様では、T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、

(i) 標的細胞抗原に特異的に結合することができる F a b 分子の V H ドメインを含む第 1 の重鎖、

(i i) 標的細胞抗原に特異的に結合することができる F a b 分子の V L ドメインを含む軽鎖、及び

(i i i) 配列番号 5 又は配列番号 1 0 3 又は配列番号 8 のアミノ酸配列を含む第 2 の重鎖を含む。

【 0 0 4 9 】

特定の態様では、T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、(i) 配列番号 1 6 のアミノ酸配列を含む V H ドメイン又は配列番号 1 1 0 のアミノ酸配列を含む V H ドメインを含む第 1 の重鎖、(i i) 配列番号 1 7 のアミノ酸配列を含む V L ドメイン又は配列番号 1 1 1 のアミノ酸配列を含む V L ドメインを含む軽鎖、及び(i i i) 配列番号 5 又は配列番号 1 0 3 又は配列番号 8 のアミノ酸配列を含む第 2 の重鎖を含む。別の態様では、T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、(i) 配列番号 1 1 8 のアミノ酸配列を含む V H ドメインを含む第 1 の重鎖、(i i) 配列番号 1 1 9 のアミノ酸配列を含む V L ドメインを含む軽鎖、及び(i i i) 配列番号 5 又は配列番号 1 0 3 又は配列番号 8 のアミノ酸配列を含む第 2 の重鎖を含む。更なる態様では、T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、

(i) 配列番号 1 2 6 のアミノ酸配列を含む V H ドメイン又は配列番号 1 3 4 のアミノ酸配列を含む V H ドメインを含む第 1 の重鎖、(i i) 配列番号 1 2 7 のアミノ酸配列を含む V L ドメイン又は配列番号 1 3 5 のアミノ酸配列を含む V L ドメインを含む軽鎖、及び(i i i) 配列番号 5 又は配列番号 1 0 3 又は配列番号 8 のアミノ酸配列を含む第 2 の重鎖を含む。

【 0 0 5 0 】

別の態様では、標的細胞抗原に特異的に結合することができる 2 つの部分を含む、二価 T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。

【 0 0 5 1 】

一態様では、T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、

(i) 標的細胞抗原に特異的に結合することができる F a b 分子の V H ドメインを含む第 1 の重鎖、

(i i) 標的細胞抗原に特異的に結合することができる F a b 分子の V L ドメインをそれぞれが含む 2 つの軽鎖、並びに

(i i i) 標的細胞抗原に特異的に結合することができる F a b 分子の V H ドメイン、及び配列番号 5 又は配列番号 1 0 3 又は配列番号 8 のアミノ酸配列を含む第 2 の重鎖を含む

10

20

30

40

50

。

【 0 0 5 2 】

特定の態様では、TNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、(i)配列番号16のアミノ酸配列を含むVHドメイン又は配列番号110のアミノ酸配列を含むVHドメインを含む第1の重鎖、(ii)配列番号17のアミノ酸配列を含むVLドメイン又は配列番号111のアミノ酸配列を含むVLドメインをそれぞれが含む2つの軽鎖、並びに(iii)配列番号16のアミノ酸配列を含むVHドメイン又は配列番号110のアミノ酸配列を含むVHドメイン、及び配列番号5又は配列番号103又は配列番号8のアミノ酸配列を含む第2の重鎖を含む。別の態様では、TNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、(i)配列番号118のアミノ酸配列を含むVHドメインを含む第1の重鎖、(ii)配列番号119のアミノ酸配列を含むVLドメインをそれぞれが含む2つの軽鎖、並びに(iii)配列番号118のアミノ酸配列を含むVHドメイン、及び配列番号5又は配列番号103又は配列番号8のアミノ酸配列を含む第2の重鎖を含む。更に別の態様では、TNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、(i)配列番号126のアミノ酸配列を含むVHドメイン又は配列番号134のアミノ酸配列を含むVHドメインを含む第1の重鎖、(ii)配列番号127のアミノ酸配列を含むVLドメイン又は配列番号135のアミノ酸配列を含むVLドメインを含む2つの軽鎖、並びに(iii)配列番号126のアミノ酸配列を含むVHドメイン又は配列番号134のアミノ酸配列を含むVHドメイン、及び配列番号5又は配列番号103又は配列番号8のアミノ酸配列を含む第2の重鎖を含む。

10

20

【 0 0 5 3 】

特定の態様では、本明細書中で前に記載したTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供され、ここで抗原結合分子は、(i)配列番号16のアミノ酸配列を含む可変重鎖、(ii)配列番号17のアミノ酸配列を含む可変軽鎖、及び(iii)配列番号5のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。

【 0 0 5 4 】

より具体的には、本明細書中で前に記載したTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供され、ここで抗原結合分子は、(i)配列番号18のアミノ酸配列を含む重鎖、(ii)配列番号19のアミノ酸配列を含む軽鎖、及び(iii)配列番号15のアミノ酸配列を含む融合タンパク質を含む。

30

【 0 0 5 5 】

特定の態様では、本明細書中で前に記載したTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供され、ここで抗原結合分子は、(i)配列番号16のアミノ酸配列を含む可変重鎖、(ii)配列番号17のアミノ酸配列を含む可変軽鎖、及び(iii)配列番号8のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。

【 0 0 5 6 】

より具体的には、本明細書中で前に記載したTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供され、ここで抗原結合分子は、(i)配列番号18のアミノ酸配列を含む重鎖、(ii)配列番号19のアミノ酸配列を含む軽鎖、及び(iii)配列番号20のアミノ酸配列を含む融合タンパク質を含む。

40

【 0 0 5 7 】

本発明の別の態様によれば、本明細書中で先に定義したTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子をコードする単離されたポリヌクレオチドが提供される。本発明は更に、本発明の単離されたポリヌクレオチド及び本発明の単離されたポリヌクレオチド又はベクターを含む宿主細胞を含むベクター、特に発現ベクターを提供する。幾つかの実施態様では、宿主細胞は真核細胞、特に哺乳動物細胞である。

【 0 0 5 8 】

別の態様では、本発明のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を製造するための方法であって、(i)抗原結合分子の発現に適した条件下で本発明の宿主細胞を培養する工程、及び(ii)抗原結合分子を回収する工程を含む方法が提供される。本発明

50

はまた、本発明の方法によって製造されたTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を包含する。

【0059】

本発明は更に、本発明のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子、及び少なくとも1つの薬学的に許容される賦形剤を含む薬学的組成物を提供する。

【0060】

本発明にはまた、医薬として使用のための、本発明のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子、又は本発明の薬学的組成物が包含される。一態様では、必要とする個体における疾患の治療における使用のための、本発明のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子、又は本発明の薬学的組成物が提供される。特定の実施態様では、がんの治療における使用のための、本発明のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子、又は本発明の薬学的組成物が提供される。

10

【0061】

また、必要とする個体における疾患の治療のための医薬の製造のための、特に、がんの治療のための医薬の製造のための、本発明のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子の使用、並びに薬学的に許容される形態の本発明のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を含む組成物の治療的有効量を前記個体に投与することを含む個体における疾患を治療する方法が提供される。特定の実施態様では、疾患はがんである。上記の実施態様の何れかにおいて、個体は、好ましくは哺乳動物、特にヒトである。

20

【図面の簡単な説明】

【0062】

【図1】図1A及び1Bは、ペプチドリンカーによって互いに連結された、TNFリガンドファミリーメンバーの3つのエクトドメイン又はその断片を含むポリペプチドを示す。図(1A)は、ペプチドリンカーによって互いに連結された4-1BBLの3つのエクトドメインを含むポリペプチドを示し、図(1B)は、ペプチドリンカーによって互いに連結されたOX40Lの3つのエクトドメインを含むポリペプチドを示す。

【図2】図2A及び2Bは、本発明の一価TNFリガンド三量体含有抗原結合分子の変異体(2A)及び(2B)を模式的に示す。3つのTNFリガンドは、白色点を有する灰色の領域によって象徴される。黒い点を有する白い部分はFc部分を表し、太い黒い点はノブ・イントゥー・ホール修飾を象徴する。

30

【図3】本発明のTNFリガンド三量体含有抗原結合分子の代表例は、図3Aに示すようなFAP標的化三量体4-1BBリガンドFc(kih)P329GLALA融合抗原結合分子である。その調製は、実施例1.1及び1.3に記載されている。図3Bは、実施例2で調製したDP47Fab分子及び単鎖三量体4-1BBリガンドFc(kih)P329GLALA融合抗原結合分子を含む「非標的化」変異体(対照1)を示す。図3Cは、実施例4で調製した単量体4-1BBFc(kih)構築物の図である。

【図4】本発明のTNFリガンド三量体含有抗原結合分子の別の例は、図4Aに示すようなFAP標的化三量体OX40リガンドFc(kih)P329GLALA融合抗原結合分子である。その調製は、実施例6に記載されている。図4Bは、実施例7で調製したDP47Fab分子及び単鎖三量体OX40リガンドFc(kih)P329GLALA融合分子を含む「非標的化」変異体を示す。図4Cは、実施例8で調製した単量体OX40Fc(kih)構築物の図である。

40

【図5】図5は、表面プラズモン共鳴によって評価したFAP標的化4-1BBリガンド三量体含有Fc(kih)融合分子(化合物S1)の組換え4-1BBFc(kih)受容体への結合を示す。図5Aではアッセイの設定が示され、4-1BBFc(kih)はSAチップ上に固定される。図5Bはヒト4-1BBFc(kih)への結合、図5Cはカニクイザル4-1BBFc(kih)への結合、及び図5Dはマウス4-1BBFc(kih)への結合を示す。

【図6】DP47含有4-1BBリガンド三量体含有Fc(kih)融合抗原結合分子(対照1)の組換え4-1BBFc(kih)受容体への結合を図6に示す。4-1BB

50

Fc(kih)はSAチップ上に固定される。図6Aはヒト4-1BB Fc(kih)への結合、図6Bはカニクイザル4-1BB Fc(kih)への結合、及び図6Cはマウス4-1BB Fc(kih)への結合を示す。

【図7】図7は、FAP標的化4-1BBリガンド三量体含有Fc(kih)融合抗原結合分子(化合物S1)への組換えヒト4-1BBの結合を示す。図7Aでは、親和性測定の設定が示される。図7B及び7Cは、FAP標的化4-1BBリガンド三量体含有Fc(kih)融合抗原結合分子(FAP標的化単鎖三量体4-1BB L)へのヒト4-1BB avi-Hisタグの結合を示し、図7D及び7Eは、DP47含有4-1BBリガンド三量体含有Fc(kih)融合抗原結合分子(DP47含有単鎖三量体4-1BB L分子)へのヒト4-1BB avi-Hisタグの結合を示す。

10

【図8】図8は、表面プラズモン共鳴によって評価したFAP標的化OX40リガンド三量体含有Fc(kih)融合抗原結合分子(化合物S10)の組換えOX40 Fc(kih)受容体への結合を示す。図8Aではアッセイの設定が示され、OX40 Fc(kih)はSAチップ上に固定される。図8BはヒトOX40 Fc(kih)への結合、図8CはカニクイザルOX40 Fc(kih)への結合、及び図8DはマウスOX40 Fc(kih)への結合を示す。

【図9】図9では、DP47含有OX40リガンド三量体含有Fc(kih)融合分子(対照3)の組換えOX40 Fc(kih)受容体への結合を示す。OX40 Fc(kih)はSAチップ上に固定される。図9AはヒトOX40 Fc(kih)への結合、図9BはカニクイザルOX40 Fc(kih)への結合、及び図9CはマウスOX40 Fc(kih)への結合を示す。

20

【図10】図10は、FAP標的化OX40リガンド三量体含有Fc(kih)融合抗原結合分子(化合物S10)への組換えヒトOX40の結合を示す。図10Aでは、親和性測定の設定が示される。図10Bでは、FAP標的化OX40リガンド三量体含有Fc(kih)融合抗原結合分子(FAP標的化単鎖OX40リガンド)へのヒトOX40 avi-Hisタグの結合が示され、図10Cは、DP47含有OX40リガンド三量体含有Fc(kih)融合分子(DP47含有単鎖三量体OX40 L)へのヒト4-1BB avi-Hisタグの結合を示す。

【図11-12】4-1BB及びOX40は、静止(ナイーブ)ヒトPBMC上では発現されない(図11A、11C、11E、及び11G、図12A及び12C)。ヒトPBMCの活性化後、4-1BB及びOX40は、CD4⁺及びCD8⁺T細胞上で上方制御され、一方、ヒトCD8⁺T細胞(図11B、11F、11K、及び11M、及び12B)は、CD4⁺T細胞よりも10倍高い4-1BBの上方制御を示すが、4倍低いOX40の上方制御を示す(図11D、11H、11J、及び11L、及び12D)。示されているように、FAP標的化単鎖三量体4-1BB L又はOX40 L Fc(kih)融合抗原結合分子(黒丸)及びDP47含有(「非標的化」)単鎖三量体4-1BB L及びOX40 L(白丸、点線)は、活性化CD4⁺及びCD8⁺T細胞と同様の結合を示すが、ナイーブなヒトT細胞との結合は示されない。従って、FAP結合又はDP47結合とは無関係に、単鎖三量体4-1BB L及び単鎖三量体OX40 Lの両方が、ヒト4-1BB又はOX40発現細胞に対して同様の結合を示す。ヒト4-1BB又はOX40発現細胞の非存在下では、結合は観察されない(静止、ナイーブ細胞)。示されるのは、二次検出抗体として使用されるred macrophytic藻類フィコエリトリン(R-PE)-又はフルオレセインイソチオシアネート(FITC)コンジュゲート抗ヒトIgG Fc 特異的ヤギIgG F(ab')₂断片の蛍光強度の中央値(MFI)としての結合である。MFIをフローサイトメトリーで測定し、ブランク対照のMFIを差し引くことによってベースライン補正した。x軸は、FAP又はDP47含有単鎖三量体4-1BB L又はOX40 L Fc(kih)融合分子の濃度を示す。

30

40

【図11A-D】図11Aから11Dは、FAP標的化4-1BBリガンド三量体含有Fc(kih)融合抗原結合分子(化合物S1、黒丸)又はDP47含有4-1BBリガンド三量体含有Fc(kih)融合分子(対照1、白丸)の静止(ナイーブ)ヒトPBMC

50

又は活性化ヒトPMBcへの結合に関する。具体的には、静止(ナイーブ)又は活性化ヒトCD8⁺ T細胞への結合は、上の2つのグラフに示され、静止(ナイーブ)又は活性化ヒトCD4⁺ T細胞への結合は下の2つのグラフにそれぞれ示される。

【図11E-H】図11Eから11Hは、一価標的化単鎖三量体4-1BBリガンドFc(kih)融合抗原結合分子の休止及び活性化ヒトT細胞への結合を示す。4-1BBは、健常なドナーの血液から単離した休止(ナイーブ)CD4又はCD8 T細胞上には発現しない。活性化後、4-1BBはCD4⁺ T細胞(下のグラフを参照)及びCD8⁺ T細胞(上のグラフを参照)上で上方制御されるが、一方、CD8⁺ T細胞は、CD4⁺ T細胞よりも5~10倍高い4-1BB発現を示す(ドナーに依存する)。示されるように、全ての一価標的化単鎖三量体4-1BB L Fc(kih)融合分子は、それらの標的化とは無関係に、4-1BB⁺ヒトT細胞に類似して結合する。y軸上には、R-PEコンジュゲート抗ヒトIgG Fc断片特異的F(ab')₂ヤギIgG断片の蛍光強度の平均(MFI)が示される。x軸上には、異なる標的化の単鎖三量体4-1BBリガンドFc(kih)融合抗原結合分子(化合物S1、S3及びS5)の試験濃度が示される。値は、ブランク対照のMFIを差し引くことによってベースライン補正した。

【図11J-M】図11Jから11Mは、一価対二価の標的化単鎖三量体4-1BBリガンドFc(kih)融合抗原結合分子の活性化ヒトT細胞への結合を示す。活性化後、4-1BBはCD4⁺ T細胞(左側)及びCD8⁺ T細胞(右側)上で上方制御される。示されるように、全ての一価及び二価の標的化単鎖三量体4-1BB L Fc(kih)融合抗原結合分子は、それらの標的化とは無関係に、4-1BB⁺ヒトT細胞に類似して結合する。y軸上には、R-PEコンジュゲート抗ヒトIgG Fc断片特異的F(ab')₂ヤギIgG断片の蛍光強度の平均(MFI)が示される。x軸上には、異なる標的化の単鎖三量体4-1BBリガンドFc(kih)融合抗原結合分子(化合物S1、S3、S2及びS4)の試験濃度が示される。値は、ブランク対照のMFIを差し引くことによってベースライン補正した。

【図12A-D】図12Aから12Dは、FAP標的化OX40リガンド三量体含有Fc(kih)融合抗原結合分子(化合物S10、黒丸)又はDP47含有OX40リガンド三量体含有Fc(kih)融合分子(DP47単鎖OX40L三量体、対照3、白丸)の静止(ナイーブ)ヒトPMBc又は活性化ヒトPMBcへの結合を示す。具体的には、静止(ナイーブ)又は活性化ヒトCD8⁺ T細胞への結合は、図12A及び12Bに示され、静止(ナイーブ)又は活性化ヒトCD4⁺ T細胞への結合は図12C及び12Dにそれぞれ示される。DP47ヒトIgG1 P329G LALAの結合は、黒の菱形(陰性対照)によって象徴される。

【図13A-B】図13は、単鎖TNFリガンド三量体含有Fc(kih)融合抗原結合分子(それぞれ化合物S1及びS10)のトランスジェニック改変マウス胚線維芽細胞NIH/3T3-huFAPクローン39(図13A)又は線維芽細胞活性化タンパク質(FAP)発現ヒトWM266-4細胞株(図13B)への結合を示す。これらの細胞は、高レベルのヒト線維芽細胞活性化タンパク質(huFAP)を発現する。示されるのは、二次検出抗体として使用されるフルオレセインイソチオシアネート(FITC)標識化抗ヒトIgG Fc特異的ヤギIgG F(ab')₂断片の蛍光強度の中央値(MFI)としての結合である。MFIはフローサイトメトリーによって測定された。x軸は、FAP標的化又はDP47標的化(「非標的化」)単鎖三量体4-1BB L又はOX40L抗原結合分子の濃度を示す。図13Aでは、DP47含有単鎖三量体4-1BB L抗原結合分子(白丸、点線)ではなく、FAP標的化単鎖三量体4-1BB L分子(化合物S1、黒丸)のみがNIH/3T3-huFAPクローン39細胞に結合することを示している。図13Bは、DP47含有単鎖三量体OX40抗原結合分子(白丸、点線)ではなく、FAP標的化単鎖三量体OX40L抗原結合分子(化合物S10、黒丸)のみがWM266-4細胞に結合することを実証する。陰性対照として、黒い菱形によって象徴されるヒトIgG1 P329G LALAもまた結合しなかった。

【図13C-D】図13Cから13Dは、一価対二価のFAP(4B9又は28H1)標

10

20

30

40

50

的化単鎖三量体 4 - 1 B B リガンド F c (k i h) 融合抗原結合分子の F A P 発現腫瘍細胞への結合を示す。示されるように、F A P (4 B 9) 標的化分子は、より低い E C ₅₀ 値で F A P に対する最も強い結合を示す。強力な F A P (4 B 9) 結合剤では、一価及び二価を標的とした単鎖三量体 4 - 1 B B リガンド (k i h) 融合抗原分子 (それぞれ化合物 S 3 及び S 2) 間の M F I 又は E C ₅₀ にはごくわずかな差異しか見られない。これは、より弱い F A P 結合剤 2 8 H 1 (化合物 S 1) とは異なる。ここで、二価の結合 (二価結合 F A P (2 8 H 1) 標的化 h u I g G 1 P 3 2 9 G L A L A で示される) は、より低い M F I を与える。D P 4 7 非標的化分子は、F A P + 腫瘍細胞に結合せず、従って真に標的化されていない。y 軸上には、R - P E コンジュゲート抗ヒト I g G F c 断片特異的 F (a b ') ₂ ヤギ I g G 断片の蛍光強度の平均 (M F I) が示される。x 軸上には、異なる標的化単鎖三量体 4 - 1 B B リガンド F c (k i h) 融合抗原結合分子の試験濃度が示される。

10

【図 1 3 E】図 1 3 E は、一価対二価の C E A 標的化単鎖三量体 4 - 1 B B リガンド F c (k i h) 融合抗原結合分子の C E A 発現腫瘍細胞株への結合を示す。二価 C E A 標的化単鎖三量体 4 - 1 B B リガンド F c (k i h) 融合抗原結合分子 (化合物 S 4) の結合は、一価 C E A 標的化単鎖三量体 4 - 1 B B リガンド F c (k i h) 融合抗原結合分子 (化合物 S 5) の結合よりも低い M F I を与える。これは、腫瘍細胞の表面上の 2 つの C E A 分子の同時の占有によって説明することができる。D P 4 7 非標的化分子 (それぞれ対照 1 及び 2) は、C E A + M K N 4 5 腫瘍細胞に結合せず、従って真に標的化されていない。y 軸上には、P E コンジュゲート抗ヒト I g G F c 断片特異的 F (a b ') ₂ ヤギ I g G 断片の蛍光強度の平均 (M F I) が示される。x 軸上には、異なる標的化単鎖三量体 4 - 1 B B リガンド F c (k i h) 融合抗原結合分子の試験濃度が示される。

20

【図 1 4 A - B】図 1 4 A 及び 1 4 B では、F A P 標的化 4 - 1 B B リガンド三量体含有 F c (k i h) 融合抗原結合分子 (化合物 S 1、黒丸) 又は D P 4 7 含有 4 - 1 B B リガンド三量体含有 F c (k i h) 融合抗原結合分子 (対照 1 ; 白丸) は、活性化マウス脾細胞を発現するマウス 4 - 1 B B に結合しないことが示されている。抗マウス C D 1 3 7 特異的ヒト I g G 1 P 3 2 9 G L A L A 抗体 (クローン L o b 1 2 . 3) を陽性対照 (三角) として用いた。結合は、試験された一次 4 - 1 B B L 三量体抗原結合分子の n M 濃度に対する二次検出抗体として使用される R - P E 標識抗ヒト I g G F c 特異的ヤギ I g G F (a b ') ₂ 断片の M F I をプロットすることによって特徴づけられた。M F I をフローサイトメトリーで測定し、ブランク対照の M F I を差し引くことによってベースライン補正した。

30

【図 1 5】図 1 5 のスキームは、レポーター細胞株を使用する実施例 1 1 . 1 . 2 に記載された N F B 活性アッセイの一般原則を示す。ヒト 4 - 1 B B リガンド三量体含有 F c (k i h) 融合抗原結合分子に対する抗 h u I g G 1 F c 特異的抗体の比は 1 ~ 4 であった。

【図 1 6】図 1 6 では、二次抗体架橋 F A P 標的化単鎖三量体 4 - 1 B B L 抗原結合分子 (化合物 S 1、黒丸) 又は二次抗体架橋 D P 4 7 含有単鎖三量体 4 - 1 B B L 分子 (対照 1、白丸、点線) によるレポーター細胞株における N F B シグナル伝達経路の活性化が示されている。レポーター細胞を、示された濃度の単鎖 4 - 1 B B L 三量体含有抗原結合分子と架橋二次ポリクローナル抗 h u I g G 1 F c 特異的ヤギ I g G F (a b) ₂ 断片の 1 : 4 の比率での存在下で 6 時間培養した。ルシフェラーゼ活性を実施例 1 1 . 1 . 1 に記載のように評価した。活性は、試験した一本鎖ヒト 4 - 1 B B L 三量体抗原結合分子の n M の濃度に対して、0 . 5 秒間に測定された放出光の単位 (U R L) をプロットすることによって特徴づけられる。U R L はルシフェリンのオキシルシフェリンへのルシフェラーゼ媒介酸化に起因して放出される。

40

【図 1 7】図 1 7 のスキームは、レポーター細胞株として H e L a - h u 4 - 1 B B - N F k B - l u c クローン 2 6 を使用する実施例 1 1 . 1 . 3 に記載される N F B 媒介ルシフェラーゼ活性アッセイの一般原則を示す。ヒト 4 - 1 B B 発現レポーター細胞に対する F A P 発現腫瘍細胞の使用された比率は 5 対 1 であった。

50

【図18A-D】図18Aから18Dは、FAP発現腫瘍細胞株架橋FAP標的化単鎖三量体4-1BB L Fc (k i h)融合抗原結合分子(化合物S1、黒丸)を介したレポーター細胞におけるNF- κ Bシグナル伝達経路の活性化を示す。架橋されていないDP47含有単鎖三量体4-1BB L分子のデータは陰性対照として示されている(対照1、白丸、点線)。レポーター細胞を、滴定したFAP標的化又はDP47含有単鎖三量体4-1BB L分子及び架橋FAP⁺腫瘍細胞株の存在下で6時間培養した。レポーター細胞とFAP発現腫瘍細胞との比は1対5であった。NF- κ B媒介ルシフェラーゼ活性は、試験した単鎖三量体4-1BB L抗原結合分子のnMの濃度に対して、0.5秒間に測定された放出光の単位(URL)をプロットングすることによって特徴づけられる。URLはルシフェリンのオキシルシフェリンへのルシフェラーゼ媒介酸化に起因して放出される。値は、ブランク対照のURLを差し引くことによってベースライン補正する。図18Aは、標的細胞としてのMV3細胞株による活性化を示し、細胞株NIH/3T3-ヒトFAPクローン39を図18Bの標的細胞として使用した。図18Cは、標的細胞としてのWM-266-4細胞株による活性化を示し、図18Dは、FAP⁺標的細胞が存在しない場合の測定データを示す。

10

【図19】図19は、単鎖三量体4-1BBリガンドFc (k i h)融合抗原結合分子のFAP標的化架橋によって媒介される4-1BB活性化によるNK-Bの活性化を示す。示されるのは、FAP発現腫瘍細胞株架橋FAP標的化単鎖三量体4-1BBリガンドFc (k i h)融合分子を介した、HeLa-hu4-1BB-NF κ B-lucクローン26レポーター細胞におけるNF- κ Bシグナル伝達経路の活性化である。DP47非標的化単鎖三量体4-1BBリガンドFc (k i h)融合分子は、NK-B活性化を誘導しない(対照1及び2)。一価FAP標的化単鎖三量体4-1BBリガンドFc (k i h)融合抗原結合分子(化合物S1及びS3)は、二価FAP標的化単鎖三量体4-1BBリガンドFc (k i h)融合分子(化合物S2)より強いNF- κ B活性化を誘導する。HeLa-hu4-1BB-NF- κ Bレポーター細胞を、滴定したFAP標的化又はDP47-非標的化単鎖三量体4-1BBリガンドFc (k i h)融合抗原結合分子及び架橋FAP⁺腫瘍細胞株の存在下で6時間培養した。レポーター細胞とFAP発現腫瘍細胞との比は1:5であった。NF- κ B媒介ルシフェラーゼ活性は、試験した単鎖三量体4-1BBリガンドのnMの濃度に対して、0.5秒間に測定された放出光の単位(URL)をプロットングすることによって特徴づけられる。URLはルシフェリンのオキシルシフェリンへのルシフェラーゼ媒介酸化に起因して放出される。値は、ブランク対照のURLを差し引くことによってベースライン補正する。図19Aは、標的細胞としてのMV3細胞株による活性化を示し、図19Bは、標的細胞としてのWM-266-4細胞株による活性化を示す。図19Cは、FAP⁺標的細胞が存在しない場合の測定データを示す。

20

30

【図20】図20には、CEA発現腫瘍細胞株架橋CEA (s m 9 b)標的化単鎖三量体4-1BBリガンドFc (k i h)融合抗原結合分子(化合物S4及びS5)を介した、HeLa-hu4-1BB-NF κ B-lucクローン26レポーター細胞におけるNF- κ Bシグナル伝達経路の活性化である。DP47非標的化単鎖三量体4-1BBリガンドFc (k i h)融合分子は、NK-B活性化を誘導しない(対照1及び2)。一価CEA (s m 9 b)標的化単鎖三量体4-1BBリガンドFc (k i h)融合抗原分子(化合物S5)は、二価CEA (s m 9 b)標的化単鎖三量体4-1BBリガンドFc (k i h)融合抗原結合分子(化合物S4)より強いNF- κ B活性化を誘導する。HeLa-hu4-1BB-NF- κ Bレポーター細胞を、滴定したCEA (s m 9 b)標的化又はDP47-非標的化単鎖三量体4-1BBリガンドFc (k i h)融合分子及び架橋CEA⁺MKN45腫瘍細胞株の存在下で6時間培養した。レポーター細胞とCEA発現MKN45腫瘍細胞との比は1:5であった。NF- κ B媒介ルシフェラーゼ活性は、試験した単鎖三量体4-1BBリガンドのnMの濃度に対して、0.5秒間に測定された放出光の単位(URL)をプロットングすることによって特徴づけられる。URLはルシフェリンのオキシルシフェリンへのルシフェラーゼ媒介酸化に起因して放出される。値は、ブ

40

50

ランク対照のURLを差し引くことによってベースライン補正する。図20Aは、標的細胞としてのMKN45細胞株による活性化を示し、図20Bは、CEA⁺標的細胞が存在しない場合の測定データを示す。

【図21】FAP発現WM266-4腫瘍細胞株架橋FAP標的化単鎖三量体OX40L分子（黒丸、化合物S10）を介したHeLa-huOX40-NFκB-luc1レポーター細胞におけるNF-κBシグナル伝達経路の活性化を図21Bに示す。架橋されていないDP47含有単鎖三量体OX40L分子（白丸、点線、対照3）は陰性対照として示されている。レポーター細胞を、滴定したFAP標的化又はDP47含有単鎖三量体OX40L分子及び架橋FAP⁺腫瘍細胞株の存在下で6時間培養した。レポーター細胞とFAP発現腫瘍細胞との比は1対2.5であった。NF-κB媒介ルシフェラーゼ活性は、試験した単鎖三量体OX40L抗原結合分子のnMの濃度に対して、0.5秒間に測定された放出光の単位（URL）をプロットングすることによって特徴づけられる。URLはルシフェリンのオキシルシフェリンへのルシフェラーゼ媒介酸化に起因して放出される。値は、ランク対照のURLを差し引くことによってベースライン補正する。図21Aに示すように、FAP標的化単鎖三量体OX40L分子（化合物S10、黒丸）及びDP47含有単鎖三量体OX40L抗原結合分子（対照3）は、FAP⁺標的細胞が存在せず、従って架橋が起こらない場合には、既に一定量のNF-κB活性化を誘導する。

【図22】図22のスキームは、実施例10.2.2に記載された抗原特異的CD8⁺T細胞活性化アッセイの一般原則を示す。

【図23-24】図23及び24は、NLV特異的CD8⁺T細胞のCD137発現に対する（図23）又はNLV特異的CD8⁺T細胞のIFN分泌に対する（図24）単鎖三量体4-1BBL抗原結合分子の効果を示す。NLV特異的CD8⁺T細胞の持続的IFN分泌及びCD137発現は、NLV-HLA-A2複合体の認識によるT細胞の同時活性化（シグナル1、図A及びB）及びFAP標的化単鎖三量体4-1BBL抗原結合分子による4-1BB誘発（シグナル2、図C~F）に厳密に依存する。黒丸：FAP標的化単鎖三量体4-1BBL分子（化合物S1）；白丸：DP47含有単鎖三量体4-1BBL分子（対照3）。4-1BBの上方制御の効果を図23A~23Fに示し、一方CD8⁺T細胞のINF発現の効果を図24A~24Fに示す。示されるのは常に、CD8⁺T細胞集団全体における蛍光強度の中央値（左パネル）及び陽性細胞の頻度のパーセンテージ（右パネル）である。

【図25-26】図25及び26には、NLV-HLA-A2複合体の認識によるT細胞の同時活性化（シグナル1、図A及びB）及びFAP標的化単鎖三量体4-1BBリガンドによる4-1BB誘発（シグナル2、図C~F）に厳密に依存するNLV特異的CD8⁺T細胞の持続的IFN分泌及びCD137発現が示される。4-1BBの上方制御の効果を図25A~25Fに示し、一方INF発現の効果を図26A~26Fに示す。示されるのは常に、一価若しくは二価のFAP（28H1又は4B9）標的化又はDP47非標的化単鎖三量体4-1BBリガンド（kih）融合抗原結合分子の使用濃度に対する、CD8⁺T細胞集団全体における蛍光強度の中央値（左パネル）及び陽性細胞の頻度のパーセンテージ（右パネル）である。

【図27A-F】図27A~図27Fは、DP47含有三量体単鎖OX40L分子（白丸、点線、対照3）を用いた共刺激はほんのわずかに増殖を促進し、抗ヒトCD3抗体で準最適に刺激されたヒトCD4⁺（左側）及びCD8⁺T細胞（右側）において活性化表現型（CD25発現）の増強を誘導した。本発明のNIH/3T3-huFAPクローン39細胞によるFAP標的化三量体単鎖OX40L分子の過架橋は、この効果を強く増加させた（黒丸、化合物S10）。示されるのは、事象数、増殖性（CFSE-低）細胞のパーセンテージ、又は生存CD4⁺及びCD8⁺T細胞上のCD25-PerCP-Cy5.5のMFIの何れかである。抗ヒトCD3（クローンV9、huIgG1）、休止ヒトPBMC及びNIH/3T3-huFAPクローン39のみを含有するランク試料のベースライン値を試験化合物試料から差し引いた。従ってここでは、OX40L共刺激の増強効果は示されるが、準最適の抗CD3刺激そのものの効果は示されていない。

10

20

30

40

50

【図28】図28Aは、ペプチドリンカーによって互いに連結された4-1BBLの3つのエクドメインを含むポリペプチドを示す。図28Bは、図28Aのポリペプチドを含む本発明の二価TNFリガンド三量体含有抗原結合分子の代表例を示す。3つのTNFリガンドは、下部の灰色の領域によって象徴される。黒い点を有する白い部分はFc部分を表し、太い黒い点はノブ・イントゥー・ホール修飾を象徴する。

【0063】

発明の詳細な説明
定義

特に定義されない限り、本明細書中で使用される技術用語及び科学用語は、本発明が属する分野において一般的に使用されるのと同じ意味を有する。本明細書を解釈する目的で、以下の定義が適用され、適切な場合はいつでも、単数形で使用される用語は複数形を含み、その逆もまた同様である。

10

【0064】

本明細書において使用される用語「抗原結合分子」は、その最も広い意味において、抗原決定基に特異的に結合する分子を指す。抗原結合分子の例は、抗体、抗体断片、及び足場抗原結合タンパク質である。

【0065】

本明細書で使用される用語「標的細胞抗原に特異的に結合することができる部分」とは、抗原決定基に特異的に結合するポリペプチド分子を指す。一態様では、抗原結合部分は、その標的細胞抗原を介してシグナル伝達を活性化することができる。特定の態様では、抗原結合部分は、それが結合するエンティティ（例えば、TNFファミリーリガンド三量体）を標的部位、例えば抗原決定基を有する特定の型の腫瘍細胞又は腫瘍間質に導くことができる。標的細胞抗原に特異的に結合することができる部分には、本明細書において更に定義される抗体及びその断片が含まれる。更に、標的細胞抗原に特異的に結合することができる部分としては、本明細書で更に定義される足場抗原結合タンパク質、例えば、設計された反復タンパク質又は設計された反復ドメインに基づく結合ドメインが挙げられる（例えば、国際公開第2002/020565号を参照のこと）。

20

【0066】

抗体又はその断片に関して、「標的細胞抗原に特異的に結合することができる部分」という用語は、抗原の一部又は全部に特異的に結合し、かつ抗原の一部又は全部に相補的な領域を含む分子の部分の部分を指す。特異的抗原結合が可能な部分は、例えば、一又は複数の抗体可変ドメイン（抗体可変領域とも呼ばれる）によって提供され得る。特に、特異的抗原結合が可能な部分は、抗体軽鎖可変領域（VL）及び抗体重鎖可変領域（VH）を含む。

30

【0067】

用語「抗体」は最も広い意味で用いられ、様々な抗体構造を包含し、限定しないが、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、単一特異性及び多重特異性抗体（例えば二重特異性抗体）、及び、所望の抗原結合活性を示す限り、抗体断片を含む。

【0068】

本明細書で使用される用語「モノクローナル抗体」とは、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を意味し、すなわち、例えば、天然に生じる変異を含むか又はモノクローナル抗体調製物の製造時に発生し、一般的に少量で存在している可能性のある変異体抗体を除き、集団を構成する個々の抗体は同一であり、及び/又は同じエピトープに結合する。異なる決定基（エピトープ）に対する異なる抗体を通常含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対するものである。

40

【0069】

本明細書で使用される用語「単一特異性」抗体は、それぞれが同じ抗原の同じエピトープに結合する一又は複数の結合部位を有する抗体を意味する。用語「二重特異性」は、抗原結合分子が少なくとも2つの異なる抗原決定基に特異的に結合することができることを意味する。典型的には、二重特異性抗原結合分子は2つの抗原結合部位を含み、その各々は

50

異なる抗原決定基に特異的である。特定の実施態様では、二重特異性抗原結合分子は、2つの抗原決定基、特に2つの異なる細胞上に発現される2つの抗原決定基に同時に結合することができる。

【0070】

本出願において使用される用語「価」は、抗原結合分子内における特定数の抗原結合部位の存在を示す。そのようなものとして、用語「二価」、「四価」、及び「六価」は、抗原結合分子中にそれぞれ2つの結合部位、4つの結合部位、及び6つの結合部位の存在を示す。

【0071】

用語「完全長抗体」、「インタクトな抗体」、及び「全抗体」は、本明細書中で互換的に使用され、天然型抗体構造と実質的に類似の構造を有する抗体を指す。「天然型抗体」は、様々な構造を有する天然に存在する免疫グロブリン分子を指す。例えば、天然型IgGクラスの抗体は、ジスルフィド結合している2つの軽鎖及び2つの重鎖からなる約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。N末端からC末端に、各重鎖は可変重鎖ドメイン又は重鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域(VH)を有し、その後には重鎖定常領域とも呼ばれる3つの定常ドメイン(CH1、CH2及びCH3)が続いている。同様に、N末端からC末端まで、各軽鎖は、可変軽鎖ドメイン又は軽鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域(VL)を有し、続いて軽鎖定常領域とも呼ばれる軽鎖定常ドメイン(CL)を有する。免疫グロブリンの重鎖は、(IgA)、(IgD)、(IgE)、(IgG)、又は μ (IgM)と呼ばれる5つの種類のうちの1つに割り当てることができ、それらの幾つかは更にサブタイプ、例えば1(IgG1)、2(IgG2)、3(IgG3)、4(IgG4)、1(IgA1)及び2(IgA2)に分けられる。抗体の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ()とラムダ()と呼ばれる、2つの種類のうちの1つに割り当てることができる。

【0072】

「抗体断片」とは、インタクトな抗体が結合する抗原に結合するインタクトな抗体の一部を含む、インタクトな抗体以外の分子を指す。抗体断片の例には、限定されないが、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂；ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、直鎖状抗体、単鎖抗体分子(例えばscFv)；及び単ドメイン抗体が含まれる。特定の抗体断片の総説については、Hudson et al. Nat. Med. 9:129-134 (2003)を参照。scFv断片の総説については、例えば、Pluckthuen, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994)を参照；また、国際公開第93/16185号；及び米国特許第5571894号及び第5587458号も参照。サルベージ受容体結合エピソード残基を含み、インピボでの半減期を増加させたFab及びF(ab')₂断片の議論については、米国特許第5869046号を参照されたい。ダイアボディは、二価又は二重特異性であり得る2つの抗原結合部位を有する抗体断片であり、例えば、EP404097号；国際公開第1993/01161号；Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003)；及びHollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)を参照のこと。トリアボディ及びテトラボディもHudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003)に記載されている。単ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインの全て若しくは一部、又は軽鎖可変ドメインの全て若しくは一部を含む抗体断片である。特定の実施態様では、単ドメイン抗体は、ヒト単ドメイン抗体である(Domantis, Inc.、Walsham, MA；例えば、米国特許第6248516号(B1)を参照)。抗体断片は様々な技術で作成することができ、限定されないが、インタクトな抗体のタンパク質消化、並びに組換え宿主細胞(例えば、大腸菌又はファージ)による産生を含む。

【0073】

インタクトな抗体のパパイン消化は、重鎖及び軽鎖可変ドメイン並びに軽鎖の定常ドメイン及び重鎖の第1の定常ドメイン(CH1)をそれぞれ含む「Fab」断片と呼ばれる2つの同一の抗原結合断片を産生する。本明細書で使用される場合、従って、用語「Fa

10

20

30

40

50

b」とは、V Lドメイン及び軽鎖の定常ドメイン(C L)を含む軽鎖断片と、重鎖のV Hドメイン及び第1の定常ドメイン(C H 1)とを含む抗体断片を指す。F a b'断片は、抗体ヒンジ領域由来の1つ以上のシステインを含む重鎖C H 1ドメインのカルボキシ末端に数個の残基が付加されている点でF a b断片とは異なる。F a b' - S Hは、定常ドメインのシステイン残基が遊離チオール基を有するF a b'断片である。ペプシン処理により、2つの抗原結合部位(2つのF a b断片)及びF c領域の一部を有するF (a b')₂断片が得られる。

【0074】

「クロスF a b断片」又は「x F a b断片」又は「クロスオーバーF a b断片」という用語は、重鎖及び軽鎖の可変領域又は定常領域の何れかが交換されるF a b断片を指す。クロスオーバーF a b分子の2つの異なる鎖組成が可能であり、本発明の二重特異性抗体に含まれる：一方では、F a b重鎖及び軽鎖の可変領域が交換され、すなわち、クロスオーバーF a b分子は、軽鎖可変領域(V L)及び重鎖定常領域(C H 1)からなるペプチド鎖並びに重鎖可変領域(V H)及び軽鎖定常領域(C L)からなるペプチド鎖を含む。このクロスオーバーF a b分子は、C r o s s F a b (v l v h)とも呼ばれる。一方では、F a b重鎖及び軽鎖の定常領域が交換され、クロスオーバーF a b分子は、重鎖可変領域(V H)及び軽鎖定常領域(C L)からなるペプチド鎖並びに軽鎖可変領域(V L)及び重鎖定常領域(C H 1)からなるペプチド鎖を含む。このクロスオーバーF a b分子は、C r o s s F a b (c l c h 1)とも呼ばれる。

【0075】

「単鎖F a b断片」又は「s c F a b」は、抗体重鎖可変ドメイン(V H)、抗体定常ドメイン1(C H 1)、抗体軽鎖可変ドメイン(V L)、抗体軽鎖定常ドメイン(C L)及びリンカーからなるポリペプチドであり、ここで前記抗体ドメイン及び前記リンカーはN末端からC末端方向に次の順序：a) V H - C H 1 - リンカー - V L - C L、b) V L - C L - リンカー - V H - C H 1、c) V H - C L - リンカー - V L - C H 1又はd) V L - C H 1 - リンカー - V H - C Lの1つを有し；前記リンカーは、少なくとも30アミノ酸、好ましくは32~50アミノ酸のポリペプチドである。前記単鎖F a b断片は、C LドメインとC H 1ドメインとの間の天然のジスルフィド結合を介して安定化される。更に、これらの単鎖F a b分子は、システイン残基の挿入(例えば、K a b a t番号付けによる可変重鎖の位置44及び可変軽鎖の位置100)を介した鎖間ジスルフィド結合の生成によって更に安定化され得る。

【0076】

「クロスオーバー単鎖F a b断片」又は「x - s c F a b」は、抗体重鎖可変ドメイン(V H)、抗体定常ドメイン1(C H 1)、抗体軽鎖可変ドメイン(V L)、抗体軽鎖定常ドメイン(C L)及びリンカーからなるポリペプチドであり、ここで前記抗体ドメイン及び前記リンカーはN末端からC末端方向に次の順序：a) V H - C L - リンカー - V L - C H 1及びb) V L - C H 1 - リンカー - V H - C Lの1つを有し；ここでV H及びV Lは、抗原に特異的に結合する抗原結合部位と一緒に形成し、前記リンカーは少なくとも30アミノ酸のポリペプチドである。更に、これらのx - s c F a b分子は、システイン残基の挿入(例えば、K a b a t番号付けによる可変重鎖の位置44及び可変軽鎖の位置100)を介した鎖間ジスルフィド結合の生成によって更に安定化され得る。

【0077】

「単鎖可変断片(s c F v)」は、約10個~約25個のアミノ酸の短いリンカーペプチドにより連結された抗体の重鎖(V H)及び軽鎖(V L)の可変領域の融合タンパク質である。リンカーは通常、柔軟性のためにグリシンが、並びに溶解性のためにセリン又はスレオニンが豊富であり、V_HのN末端をV_LのC末端に接続するか、又はその逆に接続することができる。このタンパク質は、定常領域の除去及びリンカーの導入にもかかわらず、元の抗体の特異性を保持する。s c F v抗体は、例えば、Houston, J.S., Methods in Enzymol. 203 (1991) 46-96)に記載される。更に抗体断片は、V Hドメインの特性、すなわちV Lドメインと一緒に機能的抗原結合部位へと組み立てられることが可能である

10

20

30

40

50

特性、又はV Lドメインの特性、すなわちV Hドメインと一緒に機能的抗原結合部位へと組み立てられることが可能である特性を有し、それにより全長抗体の抗原結合特性を提供する単鎖ポリペプチドを含む。

【0078】

「足場抗原結合タンパク質」は当該技術分野で周知であり、例えば、フィブロネクチン及び設計されたアンキリンリピートタンパク質(DARPin s)が、抗原結合ドメインのための代替の足場として使用されており、例えばGebauer and Skerra, Engineered protein scaffolds as next-generation antibody therapeutics. *Curr Opin Chem Biol* 13: 245-255 (2009) 及び Stumpp et al., Darpins: A new generation of protein therapeutics. *Drug Discovery Today* 13: 695-701 (2008)を参照。本発明の一態様では、足場抗原結合タンパク質は、CTLA-4 (Evi body)、リポカリン(アンチカリン)、プロテインAのZドメイン(アフィボディ(Affibody)などのプロテインA由来分子、A-ドメイン(アビマー(Avimer)/マキシボディ(Maxibody)、血清トランスフェリン(トランスボディ);設計されたアンキリンリピートタンパク質(DARPin)、抗体軽鎖又は重鎖の可変ドメイン(単ドメイン抗体、sdAb)、抗体重鎖の可変ドメイン(ナノボディ、aVH)、VNAR断片、フィブロネクチン(AdNectin)、C型レクチンドメイン(テトラネクチン(Tetranectin));新規抗原受容体 -ラクターゼの可変ドメイン(VNAR断片)、ヒト -クリスタリン又はユビキチン(アフィリン分子);ヒトプロテアーゼ阻害剤のクニッツ型ドメイン、ノッチンファミリー由来のタンパク質などのマイクロボディー、ペプチドアプタマー及びフィブロネクチン(アドネクチン)からなる群から選択される。

10

20

【0079】

CTLA-4(細胞傷害性Tリンパ球関連抗原4)は、主にCD4+ T細胞上に発現するCD28ファミリーの受容体である。その細胞外ドメインは可変ドメイン様のIgフォールドを有する。抗体のCDRに対応するループを異種配列で置換して、異なる結合特性を付与することができる。異なる結合特異性を有するように操作されたCTLA-4分子は、エビボディー(Evi bodies)としても知られている(例えば、US7166697B1)。エボビディーは、抗体の単離された可変領域(例えば、ドメイン抗体)とほぼ同じサイズである。更なる詳細については、*Journal of Immunological Methods* 248(1-2), 31-45(2001)を参照。

30

【0080】

リポカリンは、ステロイド、ピリン、レチノイド及び脂質などの小さな疎水性分子を輸送する細胞外タンパク質のファミリーである。それらは、異なる標的抗原に結合するように操作することができる円錐構造の開放端に多数のループを有する強固なシート二次構造を有する。アンチカリンは、160~180アミノ酸のサイズであり、リポカリンに由来する。更なる詳細は、*Biochim Biophys Acta* 1482: 337-350(2000)、米国特許第7250297号(B1)及び米国特許出願公開第20070224633号を参照。

【0081】

アフィボディは、抗原に結合するように操作することができる、スタフィロコッカス・アウレウス(*Staphylococcus aureus*)のプロテインAに由来する足場である。そのドメインは、約58個のアミノ酸の3つのらせん状の束からなる。ライブラリーは表面残基のランダム化によって作成されている。更なる詳細は、*Protein Eng. Des. Sel.* 2004, 17, 455-462及び欧州特許第1641818号(A1)を参照。

40

【0082】

アビマーは、Aドメインスキャフォールドファミリー由来のマルチドメインタンパク質である。約35アミノ酸の天然ドメインは、定義されたジスルフィド結合構造をとる。多様性は、Aドメインのファミリーによって示される自然のバリエーションをシャッフルすることによって生成される。更なる詳細は、*Nature Biotechnology* 23(12), 1556 - 1561(2005) 及び *Expert Opinion on Investigational Drugs* 16(6), 909-917 (June 2007)を参照。

50

【0083】

トランスフェリンは単量体の血清輸送糖タンパク質である。トランスフェリンは、許容される表面ループにペプチド配列を挿入することによって、異なる標的抗原に結合するように操作することができる。操作されたトランスフェリン足場の例にはトランスポディが含まれる。更なる詳細は、J. Biol. Chem 274, 24066-24073 (1999)を参照。

【0084】

設計されたアンキリンリピートタンパク質 (DARPin s) は、内在性膜タンパク質の細胞骨格への付着を媒介するタンパク質のファミリーであるアンキリン (Ankyrin) に由来する。単一のアンキリンリピートは、2つのヘリックス及びターンからなる33残基のモチーフである。それらは、第1のヘリックス及び各リピートのターンの残基をランダム化することによって、異なる標的抗原に結合するように操作することができる。それらの結合界面は、モジュールの数を増加させることによって増加させることができる (親和性成熟の方法)。更なる詳細は、J. Mol. Biol. 332, 489-503 (2003), PNAS 100(4), 1700-1705 (2003) 及び J. Mol. Biol. 369, 1015-1028 (2007) 及び米国特許出願公開第20040132028号 (A1) を参照。

10

【0085】

単一ドメイン抗体は、単一の単量体可変抗体ドメインからなる抗体断片である。第1の単一ドメインは、ラクダ科動物由来の抗体重鎖の可変ドメイン (ナノポディ又はV_HH断片) に由来した。更に、単一ドメイン抗体という用語は、自律性ヒト重鎖可変ドメイン (aVH) 又はサメ由来のV_{NAR}断片を含む。

20

【0086】

フィブロネクチンは、抗原に結合するように操作することができる足場である。アドネクチンは、ヒトフィブロネクチンIII型 (FN3) の15個の反復単位の第10ドメインの天然のアミノ酸配列の骨格からなる。 - サンドイッチの一端の3つのループは、アドネクチンが関心のある治療標的を特異的に認識することを可能にするように操作することができる。更なる詳細は、Protein Eng. Des. Sel. 18, 435- 444 (2005)、米国特許出願公開第20080139791号、国際公開第2005056764号及び米国特許第6818418号 (B1) を参照。

【0087】

ペプチドアプタマーは、定常性の足場タンパク質、典型的には活性部位に挿入された拘束可変ペプチドループを含むチオレドキシニン (TrxA) からなるコンビナトリアル認識分子である。更なる詳細は、Expert Opin. Biol. Ther. 5, 783-797 (2005) を参照。

30

【0088】

マイクロポディーは、3~4個のシステイン架橋を含む長さが25~50アミノ酸の天然に存在する微小タンパク質 (microprotein) に由来し、微小タンパク質の例には、KalataBI及びコノトキシニン及びノッチンが含まれる。微小タンパク質は、その微小タンパク質の全体的な折り畳みに影響を与えることなく最大25個のアミノ酸を含むように操作することができるループを有する。操作されたノッチンドメインの更なる詳細については、国際公開第2008098796号を参照。

【0089】

参照分子と同じエピトープに結合する「抗原結合分子」とは、競合アッセイにおいて参照分子とその抗原との結合を50%以上遮断する抗原結合分子を指し、逆に参照分子は、競合アッセイにおいて抗原結合分子のその抗原に対する結合を50%以上遮断する。

40

【0090】

用語「抗原結合ドメイン」は、抗原の一部又は全部に特異的に結合し、かつ相補的である領域を含む抗原結合分子の部分を目指す。抗原が大きい場合、抗原結合分子は抗原の特定の部分にのみ結合することができ、その部分はエピトープと呼ばれる。抗原結合ドメインは、例えば、一又は複数の可変ドメイン (可変領域とも呼ばれる) によって提供され得る。好ましくは、抗原結合ドメインは、抗体軽鎖可変領域 (VL) 及び抗体重鎖可変領域 (VH) を含む。

50

【0091】

本明細書において使用される用語「抗原決定基」は、「抗原」及び「エピトープ」と同義であり、抗原結合部分が結合し、抗原結合部分 - 抗原複合体を形成するポリペプチド巨大分子上の部位（例えば、アミノ酸の連続的広がり又は非連続的アミノ酸の異なる領域から形成される立体配座構造）を指す。有用な抗原決定基は、例えば、腫瘍細胞の表面に、ウイルス感染細胞の表面に、他の疾患細胞の表面に、免疫細胞の表面に、血清中に遊離した状態で、及び/又は細胞外基質（ECM）に見出すことができる。本明細書の抗原として有用なタンパク質は、他に指示がない限り、霊長類（例えば、ヒト）及びげっ歯類（例えば、マウス及びラット）などの哺乳類を含む、任意の脊椎動物源由来のタンパク質の任意の天然型であり得る。特定の実施態様では、抗原はヒトタンパク質である。本明細書において特定のタンパク質が言及される場合、その用語は「完全長」の未処理のタンパク質、並びに細胞内でのプロセッシングから生じる任意の形態のタンパク質を包含する。その用語はまた、天然に存在するタンパク質の変異体、例えば、スプライス変異体又は対立遺伝子変異体を包含する。

10

【0092】

「特異的に結合」とは、結合が、抗原について選択的であり、望ましくない相互作用又は非特異的相互作用とは区別可能であることを意味する。抗原結合分子の、特定の抗原への結合能は、酵素結合免疫吸着法（ELISA）又は当業者によく知られた他の技術、例えば表面プラズモン共鳴（SPR）技術（BIACORE計器上での解析）（Liljeblad et al., Glyco J 17, 323-329 (2000)）、及び古典的結合アッセイ（Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002)）により測定することができる。一実施態様では、抗原結合分子の無関係なタンパク質への結合の程度は、例えばSPRによって測定した場合、抗原結合分子の抗原への結合の約10%未満である。特定の実施態様では、抗原に結合する分子は、 $1\ \mu\text{M}$ 、 $100\ \text{nM}$ 、 $10\ \text{nM}$ 、 $1\ \text{nM}$ 、 $0.1\ \text{nM}$ 、 $0.01\ \text{nM}$ 、又は $0.001\ \text{nM}$ （例えば $10^{-8}\ \text{M}$ 以下、例えば $10^{-8}\ \text{M} \sim 10^{-13}\ \text{M}$ 、例えば $10^{-9}\ \text{M} \sim 10^{-13}\ \text{M}$ ）の解離定数（Kd）を有する。

20

【0093】

「親和性」又は「結合親和性」は、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）との間の非共有相互作用の総和の強度を指す。本明細書で使用する場合、特に断らない限り、「結合親和性」は、結合対（例えば、抗体と抗原）のメンバー間の1:1の相互作用を反映する固有の結合親和性を指す。分子Xの、そのパートナーYに対する親和性は、通常、解離定数（Kd）によって表される。この解離定数（Kd）は、解離速度定数と会合速度定数（それぞれ、 k_{off} 及び k_{on} ）の比である。従って、等価な親和性は、速度定数の比が同じままである限り、異なる速度定数を含み得る。親和性は、本明細書中に記載のものを含む当該技術分野で周知の一般的な方法により測定することができる。親和性を測定するための特定の方法は、表面プラズモン共鳴（SPR）である。

30

【0094】

本明細書において使用される「標的細胞抗原」は、標的細胞、例えばがん細胞又は腫瘍間質の細胞といった腫瘍内細胞の表面に提示される抗原決定基を指す。特定の実施態様では、標的細胞抗原は、腫瘍細胞の表面上の抗原である。一実施態様では、標的細胞抗原は、線維芽細胞活性化タンパク質（FAP）、がん胎児性抗原（CEA）、メラノーマ関連コンドロイチン硫酸プロテオグリカン（MCSP）、上皮増殖因子受容体（EGFR）、CD19、CD20、及びCD33からなる群から選択される。特に、標的細胞抗原は線維芽細胞活性化タンパク質（FAP）である。

40

【0095】

特に断りのない限り、プロリルエンドペプチダーゼFAP又はセプラーゼ（EC 3.4.21）としても知られている用語「線維芽細胞活性化タンパク質（FAP）」は、霊長類（例えば、ヒト）、非ヒト霊長類（例えば、カニクイザル）及びげっ歯類（例えば、マウス及びラット）などの哺乳類を含む任意の脊椎動物源由来の任意の天然型FAPを指

50

す。その用語は、「完全長」の未処理のFAP並びに細胞内でのプロセッシングから生じた任意の形態のFAPを包含する。その用語はまた、天然に存在するFAPの変異体、例えばスプライスバリエント又は対立遺伝子変異体をも包含する。一実施態様では、本発明の抗原結合分子は、ヒト、マウス及び/又はカニクイザルFAPに特異的に結合することができる。ヒトFAPのアミノ酸配列はUniProt (www.uniprot.org) アクセション番号Q12884 (バージョン149、配列番号21)、又はNCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/) RefSeq NP_004451.2 に示されている。ヒトFAPの細胞外ドメイン(ECD)は、アミノ酸位置26から760に及ぶ。Hisタグ付きヒトFAP ECDのアミノ酸配列及びヌクレオチド配列をそれぞれ配列番号22及び23に示す。マウスFAPのアミノ酸配列はUniProt アクセション番号P97321 (バージョン126、配列番号24)、又はNCBI RefSeq NP_032012.1 に示されている。マウスFAPの細胞外ドメイン(ECD)は、アミノ酸位置26から761に及ぶ。配列番号25及び26は、それぞれ、Hisタグ付きマウスFAP ECDのアミノ酸配列及びヌクレオチド配列を示す。配列番号27及び28は、それぞれ、Hisタグ付きカニクイザルFAP ECDのアミノ酸配列及びヌクレオチド配列を示す。好ましくは、本発明の抗FAP結合分子は、FAPの細胞外ドメインに結合する。例示的な抗FAP結合分子は、国際特許出願番号WO2002/20006号(A2)号に記載されている。

10

【0096】

特に断りのない限り、がん胎児性抗原関連細胞接着分子5 (CEACAM5) としても知られている用語「がん胎児性抗原(CEA)」は、霊長類(例えば、ヒト)、非ヒト霊長類(例えば、カニクイザル)及びげっ歯類(例えば、マウス及びラット)などの哺乳類を含む任意の脊椎動物由来の任意の天然型CEAを指す。ヒトCEAのアミノ酸配列はUniProt アクセション番号P06731 (バージョン151、配列番号29) に示されている。CEAは、腫瘍関連抗原として長い間同定されている(Gold and Freedman, J Exp Med., 121:439-462, 1965; Berinstein N. L., J Clin Oncol., 20:2197-2207, 2002)。もともと、胎児組織においてのみ発現されるタンパク質として分類されたCEAは、幾つかの正常な成体組織において同定されている。これらの組織は起源は上皮由来であり、胃腸管、呼吸器管及び泌尿生殖器管の細胞、並びに大腸、子宮頸部、汗腺及び前立腺の細胞を含む(Nap et al., Tumour Biol., 9(2-3):145-53, 1988; Nap et al., Cancer Res., 52(8):2329-23339, 1992)。上皮起源の腫瘍及びそれらの転移は、腫瘍関連抗原としてCEAを含む。CEA自体の存在はがん性細胞への形質転換を示さないが、CEAの分布は指標となる。正常組織では、CEAは一般に細胞の頂端表面上に発現され(Hammarstroem S., Semin Cancer Biol. 9(2):67-81 (1999))、血流中の抗体に到達できなくなる。正常組織とは対照的に、CEAは、がん細胞の表面全体にわたって発現される傾向にある(Hammarstroem S., Semin Cancer Biol. 9(2):67-81 (1999))。発現パターンのこの変化は、CEAをがん細胞における抗体結合に到達可能にする。更に、CEA発現はがん性細胞において増加する。更に、CEA発現の増加は、細胞間癒着の増加を促進し、これは転移をもたらす得る(Marshall J., Semin Oncol., 30(a Suppl. 8):30-6, 2003)。種々の腫瘍実体におけるCEA発現の有病率は一般に非常に高い。公表されたデータと一致して、組織試料で行われる独自の分析は、その高い有病率を確認し、結腸直腸癌(CRC)で約95%、膵臓がん約90%、胃がん約80%、非小細胞肺癌(NSCLC、HER3と同時発現している)で約60%、乳がん約40%であり;小細胞肺癌及び神経膠芽腫において低発現が見られた。CEAは細胞表面から容易に切断され、腫瘍からの血流に、直接的に又はリンパ管を介して流出する。この性質のために、血清CEAのレベルは、がんの診断、及びがん、特に結腸直腸がんの再発のスクリーニングのための臨床マーカーとして使用されている(Goldenberg D M., The International Journal of Biological Markers, 7:183-188, 1992; Chau I., et al., J Clin Oncol., 22:1420-1429, 2004; Flamini et al., Clin Cancer Res; 12(23):6985-6988, 2006)。

20

30

40

【0097】

50

特に断りのない限り、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン4 (CSPG4) としても知られている用語「メラノーマ関連コンドロイチン硫酸プロテオグリカン (MCSP)」は、霊長類 (例えば、ヒト)、非ヒト霊長類 (例えば、カニクイザル) 及びげっ歯類 (例えば、マウス及びラット) などの哺乳類を含む任意の脊椎動物源由来の任意の天然型MCSPを指す。ヒトMCSPのアミノ酸配列はUniProtアクセッション番号Q6UVK1 (バージョン103、配列番号30) に示されている。特に断りのない限り、プロトオンコジーンc-ErbB-1又は受容体チロシントランスクリプターErbB-1とも呼ばれる用語「上皮増殖因子受容体 (EGFR)」は、霊長類 (例えば、ヒト)、非ヒト霊長類 (例えば、カニクイザル) 及びげっ歯類 (例えば、マウス及びラット) などの哺乳類を含む任意の脊椎動物源由来の任意の天然型EGFRを指す。ヒトEGFRのアミノ酸配列はUniProtアクセッション番号P00533 (バージョン211、配列番号31) に示されている。

10

【0098】

特に断りのない限り、用語「CD19」は、Bリンパ球表面抗原B4又はT細胞表面抗原Leu-12としても知られているBリンパ球抗原CD19を指し、霊長類 (例えば、ヒト)、非ヒト霊長類 (例えば、カニクイザル) 及びげっ歯類 (例えば、マウス及びラット) などの哺乳類を含む任意の脊椎動物源由来の任意の天然型CD19を含む。ヒトCD19のアミノ酸配列はUniProtアクセッション番号P15391 (バージョン160、配列番号32) に示されている。この用語は、「完全長」未処理のヒトCD19並びに本明細書中に報告される抗体がそれに結合する限り、細胞内でのプロセッシングに起因する任意の形態のヒトCD19を含む。CD19は、ヒトB細胞の表面上に発現される構造的に異なる細胞表面受容体であり、限定されないが、プレB細胞、発生初期のB細胞 (すなわち未成熟B細胞) 形質細胞への最終分化を介した成熟B細胞、及び悪性B細胞が含まれる。CD19は、ほとんどのプレB急性リンパ性白血病 (ALL)、非ホジキンリンパ腫、B細胞慢性リンパ球性白血病 (CLL)、前リンパ球性白血病、ヘアリーセル白血病、一般的な急性リンパ球性白血病、一部のNull急性リンパ芽球性白血病によって発現される。形質細胞上でのCD19の発現は、多発性骨髄腫のような分化したB細胞腫瘍上で発現され得ることを更に示唆する。従って、CD19抗原は、非ホジキンリンパ腫、慢性リンパ球性白血病及び/又は急性リンパ芽球性白血病の治療における免疫療法の標的である。

20

30

【0099】

特に断りのない限り、「CD20」は、膜貫通型4ドメインサブファミリーメンバー1 (MS4A1)、Bリンパ球表面抗原B1又は白血球表面抗原Leu-16としても知られているBリンパ球抗原CD20を指し、霊長類 (例えば、ヒト)、非ヒト霊長類 (例えば、カニクイザル) 及びげっ歯類 (例えば、マウス及びラット) などの哺乳類を含む任意の脊椎動物源由来の任意の天然型CD20を含む。ヒトCD20のアミノ酸配列はUniProtアクセッション番号P11836 (バージョン149、配列番号33) に示されている。特に断りのない限り、「CD33」は、SIGLEC3又はgp67としても知られる骨髄細胞表面抗原CD33を指し、霊長類 (例えば、ヒト)、非ヒト霊長類 (例えば、カニクイザル) 及びげっ歯類 (例えば、マウス及びラット) などの哺乳類を含む任意の脊椎動物源由来の任意の天然型CD33を含む。ヒトCD33のアミノ酸配列はUniProtアクセッション番号P20138 (バージョン157、配列番号34) に示されている。

40

【0100】

用語「可変領域」又は「可変ドメイン」は、抗原結合分子の抗原への結合に關与する抗体の重鎖又は軽鎖のドメインを指す。天然型抗体の重鎖及び軽鎖の可変ドメイン (それぞれVH及びVL) は、一般に類似の構造を有し、各ドメインは4つの保存されたフレームワーク領域 (FR) 及び3つの超可変領域 (HVR) を含む。例えば、Kindt et al., *Kuby Immunology*, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007) を参照。抗原結合特異性を付与するには、単一のVH又はVLドメインで十分である。

50

【 0 1 0 1 】

本明細書で使用される用語「超可変領域」又は「HVR」は、配列が超可変であるか、及び/又は構造的に定義されたループ（「超可変ループ」）を形成する抗体可変ドメインの各領域を指す。一般的に、天然型4鎖抗体は、VHに3つ（H1、H2、H3）、及びVLに3つ（L1、L2、L3）、計6つのHVRSを含む。HVRは、一般的に超可変ループ由来及び/又は「相補性決定領域」（CDR）由来のアミノ酸残基を含み、後者は、最高の配列可変性を有し、及び/又は抗原認識に関与している。例示的な超可変ループはアミノ酸残基26-32（L1）、50-52（L2）、91-96（L3）、26-32（H1）、53-55（H2）、及び96-101（H3）で生じる（Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)）。例示的なCDR（CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2、及びCDR-H3）は、アミノ酸残基L1の24-34、L2の50-56、L3の89-97、H1の31-35B、H2の50-65、及びH3の95-102に生じる。（Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)）。超可変領域（HVR）はまた、相補性決定領域（CDR）とも呼ばれ、これらの用語は、抗原結合領域を形成する可変領域の部分に関して本明細書中で交換可能に使用される。この特定の領域は、Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, Sequences of Proteins of Immunological Interest (1983) and by Chothia et al., J Mol Biol 196:901-917 (1987)に記載されており、その定義には、互いに比較されたときのアミノ酸残基の重複又はサブセットが含まれる。それにもかかわらず、抗体又はその変異体のCDRを指すために何れかの定義を適用することは、本明細書で定義及び使用される用語の範囲内にあることが意図される。上記引用文献の各々によって定義されるようなCDRを包含する適切なアミノ酸残基は、以下の表Aに比較として記載される。特定のCDRを包含する正確な残基番号は、CDRの配列及びサイズに依存して変化するであろう。当業者であれば、抗体の可変領域のアミノ酸配列を前提に、いずれの残基が特定のCDRを含むかを、常套的に決定することができる。

表 A:CDR の定義¹

CDR	Kabat	Chothia	AbM ²
V _H CDR1	31-35	26-32	26-35
V _H CDR2	50-65	52-58	50-58
V _H CDR3	95-102	95-102	95-102
V _L CDR1	24-34	26-32	24-34
V _L CDR2	50-56	50-52	50-56
V _L CDR3	89-97	91-96	89-97

¹ 表 A の全ての CDR の定義の番号付けは、Kabat ら(以下参照)によって記載された番号付けの慣習に従っている。

² 表 A において使用されている小文字の「b」を含む「AbM」は、Oxford Molecular の「AbM」抗体モデル化ソフトウェアによって定義される CDR を指す。

【 0 1 0 2 】

K a b a t らは、あらゆる抗体に適用可能な可変領域配列の番号付けシステムも定義した。当業者であれば、配列自体を超える実験データに頼らなくとも、この「K a b a t 番号付け」のシステムを任意の可変領域配列に明確に割り当てることができる。本明細書で使用される「K a b a t 番号付け」は、Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human

Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983)によって記載された番号付けシステムを指す。特に明記しない限り、抗体可変領域内における特定のアミノ酸残基の位置の番号付けへの言及は、K a b a t 番号付けシステムに従っている。

【0103】

VHのCDR1の例外を除いて、CDRは一般的に超可変ループを形成するアミノ酸残基を含む。CDRは、抗原に接触する残基である「特異性決定残基」又は「SDR」を含む。SDRは、短縮(abbreviated-)CDR、又はa-CDRと呼ばれるCDRの領域内に含まれている。例示的なa-CDR(a-CDR-L1、a-CDR-L2、a-CDR-L3、a-CDR-H1、a-CDR-H2、及びa-CDR-H3)は、アミノ酸残基L1の31-34、L2の50-55、L3の89-96、H1の31-35B、H2の50-58、及びH3の95-102に生じる。(Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)を参照)。特に明記しない限り、可変ドメイン内のHVR残基及び他の残基(例えば、FR残基)は、本明細書では、上掲のK a b a tらに従って番号付けされる。

10

【0104】

本明細書中で使用される場合、抗原結合分子(例えば、抗体)の文脈における「親和性成熟」という用語は、参照抗原結合分子に由来し(例えば変異による)、参照抗体と同じ抗原に結合し、好ましくは同じエピトープに結合し;参照抗原結合分子のそれよりも抗原に対して高い親和性を有する抗原結合分子を指す。親和性成熟は、一般に、抗原結合分子の一又は複数のCDRにおける一又は複数のアミノ酸残基の修飾を含む。典型的には、親和性成熟抗原結合分子は、最初の参照抗原結合分子と同じエピトープに結合する。

20

【0105】

「フレームワーク」又は「FR」は、超可変領域(HVR)残基以外の可変ドメイン残基を指す。可変ドメインのFRは、一般に4つのFRドメイン:FR1、FR2、FR3、及びFR4からなる。従って、HVR及びFR配列は一般にVH(又はVL)の以下の配列に現れる:FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

【0106】

本明細書における目的のための「アクセプターヒトフレームワーク」とは、下記に定義されるように、ヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワークから得られる軽鎖可変ドメイン(VL)フレームワーク又は重鎖可変ドメイン(VH)フレームワークのアミノ酸配列を含むフレームワークである。ヒト免疫グロブリンのフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワーク「に由来する」アクセプターヒトフレームワークは、その同一のアミノ酸配列を含んでもよく、又はアミノ酸配列の変化を含んでもよい。幾つかの実施態様では、アミノ酸変化の数は、10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下、又は2以下である。幾つかの実施態様では、VLアクセプターヒトフレームワークは、VLヒト免疫グロブリンフレームワーク配列又はヒトコンセンサスフレームワーク配列と配列が同一である。

30

【0107】

用語「キメラ」抗体は、重鎖及び/又は軽鎖の一部が特定の起源又は種に由来し、一方重鎖及び/又は軽鎖の残りは異なる起源又は種に由来する抗体を指す。

40

【0108】

抗体の「クラス」は、その重鎖が保有する定常ドメイン又は定常領域のタイプを指す。抗体には5つの主要なクラス、すなわちIgA、IgD、IgE、IgG、及びIgMがあり、これらの幾つかは、更にサブクラス(アイソタイプ)、例えばIgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IGA₁、及びIgA₂に分けることができる。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、 μ 、 δ 、 ϵ 、 γ 、及び α と呼ばれる。

【0109】

「ヒト化」抗体は、非ヒトHVR由来のアミノ酸残基及びヒトFR由来のアミノ酸残基

50

を含むキメラ抗体を指す。特定の実施態様では、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含み、ここではHVR（例えば、CDR）の全て又は実質的に全てが非ヒト抗体のものに対応し、FRの全て又は実質的に全てがヒト抗体のものに対応する。ヒト化抗体は、任意選択的に、ヒト抗体由来の抗体定常領域の少なくとも一部を含んでもよい。抗体の「ヒト化型」、例えば、非ヒト抗体は、ヒト化を遂げた抗体を指す。本発明に包含される他の型の「ヒト化抗体」は、特にC1q結合及び/又はFc受容体（FcR）結合に関して本発明による特性を生成するために、定常領域が元の抗体のそれから更に修飾されるか又は変更されているものである。

【0110】

「ヒト」抗体は、ヒト又はヒト細胞により産生されるか、又はヒト抗体のレパートリーや他のヒト抗体をコードする配列を利用した非ヒト起源に由来する抗体のそれに対応するアミノ酸配列を有するものである。ヒト抗体のこの定義は、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を特に除外する。

10

【0111】

本明細書の用語「Fcドメイン」又は「Fc領域」は、定常領域の少なくとも一部を含む、抗体重鎖のC末端領域を定義するために使用される。この用語は、天然配列Fc領域及び変異体Fc領域を含む。IgG Fc領域はIgG CH2及びIgG CH3ドメインを含む。ヒトIgG Fc領域の「CH2ドメイン」は、通常、約231位のアミノ酸残基から約340位のアミノ酸残基に及ぶ。一実施態様では、糖鎖がCH2ドメインに結合される。本明細書のCH2ドメインは、天然配列CH2ドメイン又は変異体CH2ドメインであり得る。「CH3ドメイン」は、Fc領域のCH2ドメインのC末端の残基（すなわち、IgGの約341位のアミノ酸残基から約447位のアミノ酸残基まで）のストレッチを含む。本明細書のCH3領域は、天然配列CH3ドメイン又は変異体CH3ドメインであり得る（例えば、1つの鎖に導入された「隆起」（「ノブ」）を有するCH3ドメイン及び他の鎖の対応する導入された「空洞」（「ホール」）を有するもの；参照により本明細書に明確に組み込まれる米国特許第5,821,333号を参照）。そのような変異体CH3ドメインは、本明細書に記載の2つの同一でない抗体重鎖のヘテロ二量体を促進するために使用され得る。一実施態様では、ヒトIgG重鎖Fc領域は、Cys226又はPro230から重鎖のカルボキシル末端にまで及ぶ。しかしながら、Fc領域のC末端リジン（Lys447）は、存在しても存在しなくてもよい。本明細書において他に特定されない限り、Fc領域又は定常領域内のアミノ酸残基の番号付けは、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991に記載されるように、EUインデックスとも呼ばれるEU番号付けシステムに従う。

20

30

【0112】

ノブ-イントゥ-ホール技術は、例えば、米国特許第5731168号；同第7695936号；Ridgway et al., Prot Eng 9, 617-621 (1996) and Carter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001)に記載されている。通常、方法は、隆起がそれに対応する空洞内に位置できるように、第1のポリペプチドの接触面に隆起（「ノブ」）を、及び第2のポリペプチドの接触面に対応する空洞（「ホール」）を、それぞれ導入することにより、ヘテロ二量体形成を促進し、かつホモ二量体形成を妨害することを伴う。隆起は、第1のポリペプチドの接触面由来の小さなアミノ酸側鎖を大きな側鎖（例えば、チロシン又はトリプトファン）で置換することにより構築される。隆起と同じか又は同様のサイズの相補的空洞は、大きなアミノ酸側鎖を小さいもの（例えばアラニン又はスレオニン）で置換することにより、第2のポリペプチドの接触面に作り出される。隆起と空洞は、ポリペプチドをコードする核酸を、例えば部位特異的変異誘発により、又はペプチド合成により、変化させることにより作り出すことができる。特定の実施形態では、ノブ修飾は、Fcドメインの2つのサブユニットの1つにアミノ酸置換T366Wを含み、ホール修飾は、Fcドメインの2つのサブユニットのうち他方にアミノ酸置換T366S、L368A及びY407Vを含む。更なる特定の実施形態では、ノブ修飾を含むFcドメインのサブユニットは

40

50

、アミノ酸置換 S 3 5 4 C を更に含み、ホール修飾を含む F c ドメインのサブユニットは、アミノ酸置換 Y 3 4 9 C を更に含む。これら 2 つのシステイン残基の導入は、F c 領域の 2 つのサブユニット間のジスルフィド架橋の形成をもたらし、従って二量体を更に安定化する (Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001))。残基番号付けは、Kabat et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991 の E U インデックスに従う。

【 0 1 1 3 】

「免疫グロブリンの F c 領域と等価な領域」は、免疫グロブリンの F c 領域の天然に存在する対立遺伝子変異体、並びに置換、付加又は欠失を生じるが、エフェクター機能 (抗体依存性細胞傷害など) を媒介する免疫グロブリンの能力を実質的に低下させない改変を有する変異体を含むように意図されている。例えば、一又は複数のアミノ酸を、免疫グロブリンの F c 領域の N 末端又は C 末端から、生物学的機能を実質的に失うことなく欠失させることができる。そのような変異体は、活性に対して最小の影響を有するように、当該技術分野で周知の一般的な規則に従って選択することができる (例えば、Bowie, J. U. et al., Science 247:1306-10 (1990) を参照)。

10

【 0 1 1 4 】

用語「エフェクター機能」は、抗体のアイソタイプにより変わる、抗体の F c 領域に起因する生物学的活性を指す。抗体エフェクター機能の例には、C 1 q 結合及び補体依存性細胞傷害 (C D C)、F c 受容体結合、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (A D C C)、抗体依存性細胞貪食 (A D C P)、サイトカイン分泌、抗原提示細胞による免疫複合体媒介抗原取り込み、細胞表面受容体 (例えば、B 細胞受容体) のダウンレギュレーション、及び B 細胞の活性化が含まれる。

20

【 0 1 1 5 】

「活性化 F c 受容体」は、抗体の F c 領域の結合に続いて、エフェクター機能を実行するように受容体保有細胞を刺激するシグナル伝達現象を生じさせる F c 受容体である。活性化 F c 受容体には、F c R I I I a (C D 1 6 a)、F c R I (C D 6 4)、F c R I I a (C D 3 2)、及び F c R I (C D 8 9) が含まれる。特定の活性化 F c 受容体は、ヒト F c R I I I a である (UniProt アクセッション番号 P 0 8 6 3 7、バージョン 1 4 1 参照)。

【 0 1 1 6 】

用語「TNF リガンドファミリーメンバー」又は「TNF ファミリーリガンド」は、炎症誘発性サイトカインを指す。一般的なサイトカイン、特に TNF リガンドファミリーのメンバーは、免疫系の刺激及び協調に重要な役割を果たす。現在、19 のサイトカインが、配列、機能的及び構造的類似性に基づいて TNF (腫瘍壊死因子) リガンドスーパーファミリーのメンバーとして同定されている。これらのリガンドは全て、C 末端細胞外ドメイン (外部ドメイン)、N 末端細胞内ドメイン及び単一膜貫通ドメインを有する I I 型膜貫通タンパク質である。TNF 相同ドメイン (T H A T) として知られる C 末端細胞外ドメインは、スーパーファミリーメンバー間で 2 0 ~ 3 0 % のアミノ酸同一性を有し、受容体への結合を担う。TNF 外部ドメインはまた、それらの特異的受容体によって認識される三量体複合体を形成する TNF リガンドに関与している。

30

40

【 0 1 1 7 】

TNF リガンドファミリーのメンバーは、リンパ毒素 (L T A 又は TNF S F 1 としても知られている)、TNF (TNF S F 2 としても知られている)、L T (TNF S F 3 としても知られている)、O X 4 0 L (TNF S F 4 としても知られている)、C D 4 0 L (C D 1 5 4 又は TNF S F 5 としても知られている)、F a s L (C D 9 5 L、C D 1 7 8 又は TNF S F 6 としても知られている)、C D 2 7 L (C D 7 0 又は TNF S F 7 としても知られている)、C D 3 0 L (C D 1 5 3 又は TNF S F 8 としても知られている)、4 - 1 B B L (TNF S F 9 としても知られている)、T R A I L (A P O 2 L、C D 2 5 3 又は TNF S F 1 0 としても知られている)、R A N K L (C D 2 5 4 又は TNF S F 1 1 としても知られている)、T W E A K (TNF S F 1 2 としても知ら

50

れている)、A P R I L (C D 2 5 6 又は T N F S F 1 3 としても知られている)、B A F F (C D 2 5 7 又は T N F S F 1 3 B としても知られている)、L I G H T (C D 2 5 8 又は T N F S F 1 4 としても知られている)、T L 1 A (V E G I 又は T N F S F 1 5 としても知られている)、G I T R L (T N F S F 1 8 としても知られている)、E D A - A 1 (e c t o d y s p l a s i n A 1 としても知られている)及びE D A - A 2 (エクトジスプラシンA 2 としても知られている)からなる群から選択される。この用語は、特に断らない限り、霊長類(例えばヒト)、非ヒト霊長類(例えばカニクイザル)及びげっ歯類(例えば、マウス、ラット)などの哺乳動物を含む任意の脊椎動物由来の任意の天然TNFファミリーリガンドを指す。本発明の特定の実施態様では、TNFリガンドファミリーメンバーは、4 - 1 B B L、O X 4 0 L、G I T R L、C D 7 0、C D 3 0 L、C D 4 0 L 及び L I G H T からなる群から選択される。特定の実施態様では、TNFリガンドファミリーメンバーは、4 - 1 B B L 及び O X 4 0 L から選択される。

10

20

30

40

50

【0118】

TNFリガンドファミリーメンバーの更なる情報、特に配列は、UniProt (www.uniprot.org) のような公的に入手可能なデータベースから得ることができる。例えば、ヒトTNFリガンドは、以下のアミノ酸配列を有する：ヒトリンフォトキシン (UniProtアクセッション番号P01374、配列番号35)、ヒトTNF (UniProtアクセッション番号P01375、配列番号36)、ヒトリンホトキシン (UniProtアクセッション番号Q06643、配列番号37)、ヒトOX40L (UniProtアクセッション番号P23510、配列番号38)、ヒトCD40L (UniProtアクセッション番号P29965、配列番号39)、ヒトFasL (UniProtアクセッション番号P48023、配列番号40)、ヒトCD27L (UniProtアクセッション番号P32970、配列番号41)、ヒトCD30L (UniProtアクセッション番号P32971、配列番号42)、4 - 1 B B L (ユニプロ受託番号P41273、配列番号43)、T R A I L (UniProtアクセッション番号P50591、配列番号44)、R A N K L (UniProtアクセッション番号O14788、配列番号45)、T W E A K (UniProtアクセッション番号O43508、配列番号46)、A P R I L (UniProtアクセッション番号O75888、配列番号47)、B A F F (UniProtアクセッション番号Q9Y275、配列番号48)、L I G H T (UniProtアクセッション番号O43557、配列番号49)、T L 1 A (UniProtアクセッション番号O95150、配列番号50)、G I T R L (UniProtアクセッション番号Q9UNG2、配列番号51)及びエクトジスプラシンA (UniProtアクセッション番号Q92838、配列番号52)。

【0119】

「外部ドメイン」は、細胞外空間(すなわち、標的細胞の外側の空間)に広がる膜タンパク質のドメインである。エクトドメインは、通常、表面との接触を開始するタンパク質の一部であり、シグナル伝達につながる。従って、本明細書で定義されるTNFリガンドファミリーメンバーのエクトドメインは、細胞外空間(細胞外ドメイン)に伸びるTNFリガンドタンパク質の部分を指すが、三量体化及び対応するTNF受容体への結合の原因となるより短い部分又はその断片も含む。従って、用語「TNFリガンドファミリーメンバーのエクトドメイン又はその断片」は、細胞外ドメインを形成するTNFリガンドファミリーメンバーの細胞外ドメイン、又は受容体に依然として結合することができるそれらの部分(受容体結合ドメイン)を指す。

【0120】

「共刺激TNFリガンドファミリーメンバー」又は「共刺激TNFファミリーリガンド」という用語は、T細胞の増殖及びサイトカイン産生を共刺激することができるTNFリガンドファミリーメンバーのサブグループを指す。これらのTNFファミリーリガンドは、対応するTNF受容体との相互作用時にTCRシグナルを共刺激ことができ、その受容体との相互作用は、T細胞活性化をもたらすシグナル伝達カスケードを開始するTNF関連因子(TRAF)の動員につながる。共刺激TNFファミリーリガンドは、4 -

1 B B L、O X 4 0 L、G I T R L、C D 7 0、C D 3 0 L、及びL I G H Tからなる群から選択され、より具体的には、共刺激T N Fリガンドファミリーのメンバーは、4 - 1 B B L及びO X 4 0 Lから選択される。

【0121】

本明細書において前述されるように、4 - 1 B B LはI I型膜貫通タンパク質であり、T N Fリガンドファミリーの1メンバーである。配列番号43のアミノ酸配列を有する完全長又は全長4 - 1 B B Lは、細胞の表面上に三量体を形成することが記載されている。三量体の形成は、4 - 1 B B Lの外部ドメインの特定のモチーフ(m o t i v e s)によって可能になる。前記モチーフは、本明細書では「三量化領域」と指定される。ヒト4 - 1 B B L配列(配列番号53)のアミノ酸50 - 254は、4 - 1 B B Lの細胞外ドメインを形成するが、その断片でさえも三量体を形成することができる。本発明の特定の実施態様では、用語「4 - 1 B B Lのエクトドメイン又はその断片」は、配列番号4(ヒト4 - 1 B B Lのアミノ酸52 - 254)、配列番号1(ヒト4 - 1 B B Lのアミノ酸71 - 254)、配列番号3(ヒト4 - 1 B B Lのアミノ酸80 - 254)、配列番号2(ヒト4 - 1 B B Lのアミノ酸85 - 254)、配列番号99(ヒト4 - 1 B B Lのアミノ酸71 - 248)、配列番号100(ヒト4 - 1 B B Lのアミノ酸85 - 248)、配列番号101(ヒト4 - 1 B B Lのアミノ酸80 - 248)及び配列番号102(ヒト4 - 1 B B Lのアミノ酸52 - 254)から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを指し、また三量体形成能を有するエクトドメインの他の断片も指す。

10

【0122】

本明細書において前述されるように、O X 4 0 Lは別のI I型膜貫通タンパク質であり、T N Fリガンドファミリーの更なるメンバーである。完全長又は全長ヒトO X 4 0 Lは、配列番号38のアミノ酸配列を有する。ヒトO X 4 0 L配列(配列番号6)のアミノ酸51 - 183は、O X 4 0 Lの細胞外ドメインを形成するが、その断片でさえも三量体を形成することができる。本発明の特定の実施態様では、用語「O X 4 0 Lのエクトドメイン又はその断片」は、配列番号6(ヒトO X 4 0 Lのアミノ酸51 - 183)又は配列番号7(ヒトO X 4 0 Lのアミノ酸52 - 183)から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを指すが、三量体形成能を有するエクトドメインの他の断片も本明細書に含まれる。

20

【0123】

用語「ペプチドリンカー」は、一又は複数のアミノ酸を含むペプチドを指す。ペプチドリンカーは、1 ~ 44個のアミノ酸、より具体的には2 ~ 20個のアミノ酸を含む。ペプチドリンカーは当該技術分野において周知であり、本願明細書に記載される。適切な非免疫原性リンカーペプチドは、例えば(G_4S)_n、(SG_4)_n又は $G_4(SG_4)_n$ のペプチドリンカーであり、ここで「n」は、一般に1 ~ 10の数、典型的には2 ~ 4の間の数、特に2であり、すなわち、ペプチドはGGGG S(配列番号136)、GGGG SGGGG S(配列番号54)、SGGGGS SGGGG(配列番号55)及びGGGG SGGGG SGGGG SGGGG(配列番号56)からなる群から選択されるが、配列GSPGSSSS SGG S(配列番号57)、GSGSGSG S(配列番号58)、GSGSGNGS(配列番号59)、GSGSGSG S(配列番号60)、GSGSG S(配列番号61)、GGS G(配列番号62)、GSGSGNGS S(配列番号63)、GNGSGSG S(配列番号64)及びGGNGS S(配列番号65)も含む。特に興味のあるペプチドリンカーは、(G_4S)₁又はGGGG S(配列番号136)、(G_4S)₂又はGGGG SGGGG S(配列番号54)及びGSPGSSSS SGG S(配列番号57)であり、より具体的には(G_4S)₂又はGGGG SGGGG S(配列番号54)及びGSPGSSSS SGG S(配列番号57)である。

30

40

【0124】

本願内で使用される場合、用語「アミノ酸」は、アラニン(3文字コード: a l a、1文字コード: A)、アルギニン(a r g、R)、アスパラギン(a s n、N)、アスパラギン酸(a s p、D)、システイン(c y s、C)、グルタミン(g l n、Q)、グルタ

50

ミン酸 (g l u、E)、グリシン (g l y、G)、ヒスチジン (h i s、H)、イソロイシン (i l e、I)、ロイシン (l e u、L)、リジン (l y s、K)、メチオニン (m e t、M)、フェニルアラニン (p h e、F)、プロリン (p r o、P)、セリン (s e r、S)、スレオニン (t h r、T)、トリプトファン (t r p、W)、チロシン (t y r、Y)、及びバリン (v a l、V)を含む天然に存在するカルボキシ アミノ酸の群を意味する。

【 0 1 2 5 】

本明細書で使用される「単鎖融合タンパク質」は、抗原結合部分又は F c 部分の一部に融合された前記 T N F リガンドファミリーメンバーの 1 つ又は 2 つの外部ドメインからなる単鎖ポリペプチドを指す。融合は、抗原結合部分の N 又は C 末端アミノ酸を、ペプチドリンカーを介して、前記 T N F リガンドファミリーメンバーのエクトドメインの C 末端又は N 末端アミノ酸に直接的に連結することによって生じ得る。

10

【 0 1 2 6 】

「融合された」又は「連結された」とは、構成要素 (例えば、前記 T N F リガンドファミリーメンバーのポリペプチド及び外部ドメイン) が、直接的に又は 1 つ以上のペプチドリンカーを介してペプチド結合によって連結されることを意味する。

【 0 1 2 7 】

参照ポリペプチド (タンパク質) 配列に対する「アミノ酸配列同一性パーセント (%)」は、最大の配列同一性パーセントを得るように配列を整列させ、必要に応じてギャップを導入した後の、いかなる保存的置換も配列同一性の一部とみなさない、参照ポリペプチドのアミノ酸残基と同一である候補配列のアミノ酸残基の百分率として定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを決定する目的のためのアラインメントは、当分野の技術の範囲内にある種々の方法、例えば B L A S T、B L A S T - 2、A L I G N . S A W I 又は M e g a l i g n (D N A S T A R) ソフトウェアのような公的に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用して達成することができる。当業者であれば、比較する配列の全長にわたって最大のアラインメントを達成するのに必要な任意のアルゴリズムを含めた、配列を整列させるための適切なパラメータを決定することができる。しかしながら、本明細書において、%アミノ酸配列同一性の値は、配列比較コンピュータプログラム A L I G N - 2 を使用して生成される。A L I G N - 2 配列比較コンピュータプログラムはジェネテック社によって作製され、ソースコードは米国著作権庁、ワシントン D . C . , 2 0 5 5 9 に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号 T X U 5 1 0 0 8 7 の下で登録されている。また、A L I G N - 2 は、ジェネテック社 (S o u t h S a n F r a n c i s c o、C a l i f o r n i a) から公的に入手可能であり、又はそのソースコードからコンパイルしてもよい。A L I G N - 2 プログラムは、デジタル U N I X (登録商標) の V 4 . 0 D を含む、U N I X (登録商標) オペレーティングシステム上での使用のためにコンパイルされるべきである。全ての配列比較パラメータは、A L I G N - 2 プログラムによって設定されて変動しない。アミノ酸配列比較に A L I G N - 2 が用いられる状況では、所与のアミノ酸配列 A の、所与のアミノ酸配列 B との、又はそれに対するアミノ酸配列同一性 (あるいは、所与のアミノ酸配列 B と、又はそれに対して特定の %アミノ酸配列同一性を有する又は含む所与のアミノ酸配列 A と言うこともできる) は次のように計算される：

20

30

40

分率 X / Y の 1 0 0 倍

ここで、X は配列アラインメントプログラム A L I G N - 2 により、そのプログラムの A 及び B のアラインメントにおいて完全に一致するとされたアミノ酸残基の数であり、Y は B の全アミノ酸残基数である。アミノ酸配列 A の長さがアミノ酸配列 B の長さとは異なる場合、A の B に対する %アミノ酸配列同一性は、B の A に対する %アミノ酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。特に断らない限り、本明細書で使用される全ての %アミノ酸配列同一性値は、A L I G N - 2 コンピュータプログラムを使用して、直前の段落で説明したように得られる。

【 0 1 2 8 】

50

特定の実施態様では、本明細書で提供されるTNFリガンド三量体含有抗原結合分子のアミノ酸配列変異体が企図される。例えば、TNFリガンド三量体含有抗原結合分子の結合親和性及び/又は他の生物学的特性を改善することが望ましい場合がある。TNFリガンド三量体含有抗原結合分子のアミノ酸配列変異体は、分子をコードするヌクレオチド配列に適切な修飾を導入することによって、又はペプチド合成によって調製することができる。そのような修飾には、例えば抗体のアミノ酸配列内の残基からの欠失、及び/又はそれへの挿入、及び/又はその置換を含む。最終構築物が所望の特性、例えば抗原結合を有することを条件として、欠失、挿入、及び置換の任意の組み合わせを最終構築物に到達させることができる。置換変異誘発のための目的の部位には、HVR及びフレームワーク(FR)が含まれる。保存的置換は表Bの「好ましい置換」という見出しの下に提供され、アミノ酸側鎖クラス(1)~(6)を参照して以下で更に説明する。アミノ酸置換は、目的の分子に導入することができ、その産物は、所望の活性、例えば、抗原結合の保持/改善、免疫原性の低下、又はADCC又はCDCの改善についてスクリーニングされる。

10

表B

元の残基	例示的置換	好ましい置換
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; ノルロイシン	Leu
Leu (L)	ノルロイシン; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; ノルロイシン	Leu

20

30

40

【0129】

アミノ酸は、共通の側鎖特性に従ってグループ分けすることができる：

50

- (1) 疎水性：ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- (2) 中性の親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；
- (3) 酸性：Asp、Glu；
- (4) 塩基性：His、Lys、Arg；
- (5) 鎖配向に影響する残基：Gly、Pro；
- (6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe

【0130】

非保存的置換は、これらのクラスのうちの1つのメンバーを別のクラスに交換することを伴うこととなる。

【0131】

用語「アミノ酸配列変異体」は、親抗原結合分子（例えば、ヒト化抗体又はヒト抗体）の一又は複数の超可変領域残基にアミノ酸置換が存在する実質的な変異体を含む。一般に、更なる研究のために選択された得られた変異体は、親抗原結合分子と比較して、特定の生物学的特性の修飾（例えば、改善）（例えば、親和性の増加、免疫原性の低下）を有し、かつ/又は親抗原結合分子の特定の生物学的特性を実質的に保持するであろう。例示的な置換変異体は、親和性成熟抗体であり、例えば、本明細書に記載のものなどのファージディスプレイに基づく親和性成熟技術を用いて簡便に作成することができる。簡潔には、一又は複数のHVR残基が変異され、変異体抗原結合分子がファージ上に提示され、特定の生物学的活性（例えば結合親和性）についてスクリーニングされる。特定の実施態様では、抗原結合分子が抗原に結合する能力を実質的に低減させない限り、一又は複数のHVR内に置換、挿入又は欠失が生じ得る。例えば、実質的に結合親和性を低減させない保存的改変（例えば本明細書において提供される保存的置換）をHVR内で行うことができる。変異誘発の標的となり得る抗体の残基又は領域の同定のための有用な方法は、Cunningham and Wells (1989) Science, 244:1081-1085に記載されているように「アラニンスクヤニング変異誘発」と呼ばれる。この方法では、標的残基の残基又は群（例えば、Arg、Asp、His、Lys及びGluのような荷電残基）が同定され、抗原と抗体との相互作用が影響を受けるかどうかを決定するために、中性又は負に荷電したアミノ酸（例えば、アラニン又はポリアラニン）により置換される。更なる置換が、最初の置換に対する機能的感受性を示すアミノ酸位置に導入され得る。あるいは又は更に、抗原抗体複合体の結晶構造が、抗体と抗原との接触点を同定するために使用される。そのような接触残基及び隣接残基は、置換の候補として標的とされてもよいし、又は排除されてもよい。変異体は、所望の特性を含むかどうかを決定するためにスクリーニングされ得る。

【0132】

アミノ酸配列挿入には、1残基から100以上の残基を含むポリペプチドまでの長さの範囲のアミノ末端及び/又はカルボキシル末端融合、並びに単一又は複数のアミノ酸残基の配列内挿入が含まれる。末端挿入の例には、N末端メチオニル残基を有するTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が含まれる。分子の他の挿入変異体には、TNFリガンド三量体含有抗原結合分子の血清半減期を増加させるポリペプチドへのN末端又はC末端への融合が含まれる。

【0133】

特定の実施態様では、本明細書で提供されるTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、抗体がグリコシル化される程度を増加又は減少させるように改変される。分子のグリコシル化変異体は、一又は複数のグリコシル化部位が生成又は除去されるようにアミノ酸配列を改変することによって簡便に得ることができる。TNFリガンド三量体含有抗原結合分子がFc領域を含む場合、それに結合した糖は改変され得る。哺乳類細胞によって産生される天然型抗体は、典型的には、Fc領域のCH2ドメインのAsn297にN結合によって一般に結合される分枝鎖の二分岐オリゴ糖を含む。例えばWright et al. TIBTECH 15:26-32 (1997)を参照。オリゴ糖は、様々な炭水化物、例えば、マンノース、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)、ガラクトース、及びシアル酸、並びに二分岐糖鎖構造の「幹」のGlcNAcに結合したフコースを含む。幾つかの実施態様では

10

20

30

40

50

、 T N Fファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子におけるオリゴ糖の修飾が、特定の改善された特性を有する抗体変異体を作製するために行われ得る。一態様では、 F c領域に（直接的又は間接的に）結合したフコースを欠く糖鎖構造を有する T N Fファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子の変異体が提供される。そのようなフコシル化変異体は、改善された A D C C機能を有し得る。例えば、米国特許出願公開第 2 0 0 3 / 0 1 5 7 1 0 8号（Presta, L.）又は米国特許出願公開第 2 0 0 4 / 0 0 9 3 6 2 1号（協和発酵工業株式会社）を参照。本発明の T N Fファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子の更なる変異体には、例えば、 F c領域に結合した二分岐オリゴ糖が G l c N A cによって二分されている、二分されたオリゴ糖を有するものが含まれる。そのような変異体は、フコシル化及び/又は改善された A D C C機能を有する可能性がある。例えば、国際公開第 2 0 0 3 / 0 1 1 8 7 8号（Jean-Mairet et al.）；米国特許第 6 6 0 2 6 8 4号（Umana et al.）；及び米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 1 2 3 5 4 6号（Umana et al.）を参照。 F c領域に結合したオリゴ糖中に少なくとも1つのガラクトース残基を有する変異体もまた提供される。そのような抗体変異体は、改善された C D C機能を有してもよく、例えば国際公開第 1 9 9 7 / 3 0 0 8 7号（Patel et al.）；国際公開第 1 9 9 8 / 5 8 9 6 4号（Raju, S.）；及び国際公開第 1 9 9 9 / 2 2 7 6 4号（Raju, S.）に記載されている。

10

20

30

40

50

【 0 1 3 4 】

特定の実施態様では、本発明の T N Fファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子のシステイン改変変異体（cysteine engineered variants）、例えば分子の一又は複数の残基がシステイン残基で置換された「 t h i o M A b 」を作ることが望ましい場合がある。特定の実施態様では、置換される残基は抗体の接近可能な部位で生じる。これらの残基をシステインで置換することによって、反応性チオール基が抗体の接近可能部位に配置され、抗体を他の部分、例えば薬物部分又はリンカー - 薬剤部分にコンジュゲートさせ、イムノコンジュゲートを作るために使用することができる。特定の実施態様では、以下の残基のうちの一つ又は複数がシステインで置換される：軽鎖の V 2 0 5（ K a b a tの番号付け）；重鎖の A 1 1 8（ E U番号付け）；及び重鎖 F c領域の S 4 0 0（ E U番号付け）。システイン改変抗原結合分子は、例えば、米国特許第 7 5 2 1 5 4 1号に記載のように生成され得る。

【 0 1 3 5 】

本明細書で提供される T N Fファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、当該技術分野において周知であり、容易に入手可能な更なる非タンパク質性部分を含有するように更に修飾することができる。抗体の誘導体化に適した部分は、限定されるものではないが、水溶性ポリマーを含む。水溶性ポリマーの非限定的な例は、限定されないが、ポリエチレングリコール（ P E G ）、エチレングリコール/プロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ - 1, 3 - ジオキソラン、ポリ - 1, 3, 6 - トリオキサン、エチレン/無水マレイン酸コポリマー、ポリアミノ酸（ホモポリマー又はランダムコポリマーの何れか）、及びデキストラン又はポリ（ n - ビニルピロリドン）ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレン（ p r o l y p r o p y l e n e ）オキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール（例えばグリセロール）、ポリビニルアルコール、並びにそれらの混合物を含む。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは、水中でのその安定性のために製造上の利点を有し得る。ポリマーは、任意の分子量であってもよく、分枝状又は非分枝状であってもよい。抗体に結合するポリマーの数は変化してもよく、複数のポリマーが結合する場合、それらは同一又は異なる分子であってもよい。一般に、誘導体化に使用されるポリマーの数及び/又は型は、限定されるものではないが、改善されるべき抗体の特定の特性又は機能、その抗体誘導体が定まった条件下で治療に使用されるかどうかを含む考慮事項に基づいて決定することができる。別の態様では、放射線に曝露することによって選択的に加熱することができる抗体と非タンパク質性部分とのコンジュゲートが提供される。一実施態様では、非タンパク質部

分はカーボンナノチューブである (Kam, N.W. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (2005) 11600-11605)。放射線は、任意の波長であってよく、限定されないものの、通常の細胞に害を及ぼさないが、非タンパク質性部分を、抗体 - 非タンパク質性部分に近接する細胞が死滅する温度にまで加熱する波長を含む。

【 0 1 3 6 】

別の態様では、本明細書で提供される T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子のイムノコンジュゲートを得ることができる「イムノコンジュゲート」とは、細胞傷害性剤を含むがそれに限定されない、一又は複数の異種分子にコンジュゲートした抗体である。

【 0 1 3 7 】

用語「ポリヌクレオチド」は、単離された核酸分子又は構築物、例えば、メッセンジャー RNA (m R N A)、ウイルス由来の RNA、又はプラスミド DNA (p D N A) を指す。ポリヌクレオチドは、一般的なホスホジエステル結合又は非一般的結合 (例えば、ペプチド核酸 (P N A) に見られるようなアミド結合) を含み得る。用語「核酸分子」は、ポリヌクレオチド中に存在する、任意の一又は複数の核酸セグメント、例えば DNA 又は RNA 断片を指す。

【 0 1 3 8 】

「単離された」核酸分子又はポリヌクレオチドは、その天然環境から除去された目的の核酸分子、DNA 又は RNA である。例えば、ベクターに含有されるポリペプチドをコードする組換えポリヌクレオチドを、本発明の目的のために単離することが考慮される。単離されたポリヌクレオチドの更なる例には、異種宿主細胞内に維持される組換えポリヌクレオチド、又は溶液中の精製された (部分的に又は実質的に) ポリヌクレオチドが含まれる。単離されたポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチド分子を通常含む細胞に含まれるポリヌクレオチド分子を含むが、そのポリヌクレオチド分子は、染色体外又はその自然の染色体上の位置とは異なる染色体位置に存在している。単離された RNA 分子は、インビボ又はインビトロの本発明の RNA 転写物、並びにポジティブ及びネガティブな鎖形式、及び二重鎖形式を含む。本発明の単離されたポリヌクレオチド又は核酸は、更に合成により製造されたそのような分子を含む。加えて、ポリヌクレオチド又は核酸は、プロモーター、リボソーム結合部位、又は転写ターミネーターといった制御要素を含んでも含まなくてもよい。

【 0 1 3 9 】

少なくとも、例えば、本発明の参照ヌクレオチド配列と少なくとも例えば 95% 「同一」であるヌクレオチド配列を有する核酸又はポリヌクレオチドにより、ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が参照配列と、ポリヌクレオチド配列が参照ヌクレオチド配列のそれぞれ 100 のヌクレオチドにつき最大 5 つの点変異を含み得るということ以外は同一であることが意図される。換言すれば、参照ヌクレオチド配列と少なくとも 95% 同一であるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを得るために、参照配列中最大 5% のヌクレオチドが削除又は別のヌクレオチドで置換されてよいが、又は参照配列に含まれる全てのヌクレオチドの最大 5% まで複数のヌクレオチドが参照配列に挿入されてよい。参照配列のこれらの改変は、参照ヌクレオチド配列の 5' 又は 3' 末端の位置で、又はこれら末端位置の間どこかで、参照配列に含まれる残基中において個々に散在して、又は参照配列内部の一又は複数の連続する群において、発生してよい。特定の事項として、何れか特定のポリヌクレオチド配列が、本発明のヌクレオチド配列と少なくとも 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 又は 99% 同一であるかどうかは、ポリペプチドについて上述したもの (例えば ALIGN - 2) などの既知のコンピュータープログラムを用いて常套的に決定することができる。

【 0 1 4 0 】

用語「発現カセット」は、組換えにより又は合成により、標的細胞内の一連の特定の核酸の転写を許可する特定の核酸要素を用いて生成されたポリヌクレオチドを指す。組換え発現カセットは、プラスミド、染色体、ミトコンドリア DNA、プラスチド DNA、ウイ

10

20

30

40

50

ルス、又は核酸断片中に取り込むことができる。典型的には、発現ベクターの組換え発現カセット部分には、他の配列の中でも、転写される核酸配列及びプロモーターが含まれる。特定の実施態様では、本発明の発現カセットは、本発明の二重特異性抗原結合分子をコードするポリヌクレオチド配列又はその断片を含む。

【0141】

用語「ベクター」又は「発現ベクター」は、「発現構築物」と同義であり、標的細胞内においてそれが作用可能に結合する特定の遺伝子の発現を導入及び方向付けするために使用されるDNA分子を指す。この用語は、自己複製核酸構造としてのベクター、並びにそれが導入された宿主細胞のゲノムに組み込まれたベクターを含む。本発明の発現ベクターは、発現カセットを含む。発現ベクターは、大量の安定なmRNAの転写を可能にする。発現ベクターが標的細胞内部に入ると、遺伝子によってコードされるリボ核酸分子又はタンパク質が、細胞性転写及び/又は翻訳機構により産生される。一実施態様では、本発明の発現ベクターは、本発明の二重特異性抗原結合分子をコードするポリヌクレオチド配列又はその断片を含む発現カセットを含む。

10

【0142】

用語「宿主細胞」、「宿主細胞株」及び「宿主細胞培養」は、互換的に使用され、外因性の核酸が導入された細胞を指し、そのような細胞の子孫を含む。宿主細胞は、「形質転換体」及び「形質転換細胞」を含み、それには初代形質転換細胞及び、継代の数に関係なく、それに由来する子孫が含まれる。子孫は親細胞と核酸含量が完全に同一でなくてもよく、変異を含んでいてもよい。最初に形質転換された細胞においてスクリーニング又は選択されたものと同じ機能又は生物活性を有する変異型子孫が本明細書において含まれる。宿主細胞は、本発明の二重特異性抗原結合分子を生成するために使用することができる何れかの種類の細胞系である。宿主細胞は、培養細胞、例えば幾つか例を挙げると、CHO細胞、BHK細胞、NS0細胞、SP2/0細胞、YO骨髓腫細胞、P3X63マウス骨髓腫細胞、PER細胞、PER.C6細胞、又はハイブリドーマ細胞といった哺乳動物の培養細胞、酵母細胞、昆虫細胞、及び植物細胞を含み、更には、トランスジェニック動物、トランスジェニック植物、又は培養された植物若しくは動物組織内部に含まれる細胞も含む。

20

【0143】

「有効量の」薬剤は、それが投与される細胞又は組織中に生理的变化をもたらすために必要な量を指す。

30

【0144】

薬剤、例えば、薬学的組成物の「治療的有效量」とは、所望の治療的又予防的結果を達成するために必要な用量及び期間での、有効な量を指す。治療的有效量の薬剤は、疾患の有害作用を、例えば、排除する、減少させる、遅延させる、最小化する、又は防止する。

【0145】

「個体」又は「対象」とは、哺乳動物である。哺乳動物には、限定されないが、家畜動物（例えば、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ、ウマ）、霊長類（例えば、ヒト、及びサルなどの非ヒト霊長類）、ウサギ、げっ歯類（例えば、マウス及びラット）が含まれる。特に、個体又は対象はヒトである。

40

【0146】

用語「薬学的組成物」は、その中に有効で含有される活性成分の生物学的活性を許容するような形態であって、製剤が投与される対象にとって許容できない毒性を有する他の成分を含まない調製物を指す。

【0147】

「薬学的に許容される賦形剤」は、対象に非毒性である、有効成分以外の薬学的組成物の成分を指す。薬学的に許容される賦形剤は、限定されるものではないが、緩衝液、賦形剤、安定剤又は保存剤を含む。

【0148】

「添付文書」という用語は、治療製品の商品包装に通例含まれる説明書を指すのに用い

50

られ、適応症、用法、用量、投与、併用療法、当該治療製品の使用に関する禁忌及び／又は注意事項についての情報を含む。

【0149】

本明細書で用いられる場合、「治療 (treatment)」（及び「治療する (treat)」又は「治療すること (treating)」など、その文法的変形)は、治療されている個体の自然経過を変えようと試みる臨床的介入を指し、予防のため、又は臨床病理の過程において実施され得る。治療の望ましい効果には、限定されないが、疾患の発症又は再発を予防すること、症状の緩和、疾患の直接的又は間接的な病理学的帰結の縮小、転移を予防すること、疾患の進行の速度を遅らせること、疾患状態の改善又は緩和、及び寛解又は予後の改善が含まれる。幾つかの実施態様では、本発明の抗体は、疾患の発症を遅延させるか、又は疾患の進行を遅らせるために使用される。

10

【0150】

本明細書で使用する用語「がん」は、例えば、リンパ腫、癌腫、リンパ腫、芽腫、肉腫、白血病、リンパ性白血病、肺がん、非小細胞肺 (NSCL) がん、細気管支肺胞性細胞肺がん、骨がん、膵臓がん、皮膚がん、頭部又は頸部のがん、皮膚黒色腫又は眼球内黒色腫、子宮がん、卵巣がん、直腸がん、肛門領域のがん、胃がん (stomach cancer)、胃がん (gastric cancer)、結腸直腸がん (CRC)、膵臓がん、乳がん、トリプルネガティブ乳がん、子宮がん、卵管の癌、子宮内膜癌、子宮頸部癌、膣の癌、外陰部の癌、ホジキン病、食道のがん、小腸のがん、内分泌系のがん、甲状腺のがん、副甲状腺のがん、副腎のがん、軟組織の肉腫、尿道のがん、陰茎のがん、前立腺がん、膀胱のがん、腎臓又は尿管のがん、腎細胞癌、腎盂の癌、中皮腫、肝細胞がん、胆管がん、中枢神経系 (CNS) の新生物、脊髄軸腫瘍、脳幹グリオーマ、多形性膠芽腫、星状細胞腫、シュワン腫、上衣腫、髄芽腫、髄膜腫、扁平上皮癌、下垂体腺腫、及びユーイング肉腫、黒色腫、多発性骨髄腫、B細胞がん (リンパ腫)、慢性リンパ性白血病 (CLL)、急性リンパ芽球性白血病 (ALL)、ヘアリーセル白血病、慢性骨髄芽球性白血病などの増殖性疾患を指し、任意の上記がんの難治性型、又は上記がんの一又は複数の組み合わせを含む。

20

【0151】

本発明の TNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子

本発明は、生産性、安定性、結合親和性、生物学的活性、標的化効率、及び低減された毒性などの特に有利な特性を有する新規な TNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供する。

30

【0152】

従って、本発明は、

- (a) 標的細胞抗原に特異的に結合することができる少なくとも1つの部分、
- (b) 任意選択的にペプチドリンカーによって互いに連結された TNFリガンドファミリーメンバーの3つのエクトドメイン又はその断片を含むポリペプチド、及び
- (c) 安定な会合が可能な第1及び第2のサブユニットから構成される Fcドメインを含む、TNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子に関する。

【0153】

一態様では、本発明は、

- (a) 標的細胞抗原に特異的に結合することができる少なくとも1つの部分、
- (b) ペプチドリンカーによって互いに連結された TNFリガンドファミリーメンバーの3つのエクトドメイン又はその断片を含むポリペプチド、及び
- (c) 安定な会合が可能な第1及び第2のサブユニットから構成される Fcドメインを含む、TNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供する。

40

【0154】

別の態様では、TNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、

- (a) 標的細胞抗原に特異的に結合することができる少なくとも1つの部分、
- (b) ペプチドリンカーによって互いに連結された TNFリガンドファミリーメンバーの3つのエクトドメイン又はその断片を含むポリペプチド、及び

50

(c) 安定な会合が可能な第1及び第2のサブユニットから構成されるFcドメインを含み、

ここで、ペプチドリンカーによって互いに連結されたTNFリガンドファミリーメンバーの3つのエクドメイン又はその断片を含むポリペプチドは、任意選択的にペプチドリンカーを介して、Fcドメインの2つのサブユニットの1つのN末端又はC末端のアミノ酸に融合される。

【0155】

特定の態様では、TNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、(a) 標的細胞抗原に特異的に結合することができる少なくとも1つの部分、(b) ペプチドリンカーによって互いに連結されたTNFリガンドファミリーメンバーの3つのエクドメイン又はその断片を含むポリペプチド、及び(c) 安定な会合が可能な第1及び第2のサブユニットから構成されるFcドメインを含み、ここで、TNFリガンドファミリーメンバーは、ヒトT細胞活性化を共刺激する。従って、TNFリガンドファミリーメンバーは共刺激TNFファミリーリガンドである。特に、共刺激TNFファミリーリガンドは、4-1BBL、OX40L、GITRL、CD70、CD30L、及びLIGHTからなる群から選択され、より具体的には、共刺激TNFファミリーリガンドは、4-1BBL及びOX40Lから選択される。

【0156】

一態様では、TNFリガンドファミリーメンバーは4-1BBLである。

【0157】

更なる態様では、TNFリガンドファミリーメンバーのエクドメインは、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号99、配列番号100、配列番号101、及び配列番号102からなる群から選択されるアミノ酸配列、特に配列番号1又は配列番号99のアミノ酸配列を含む。

【0158】

特定の態様では、TNFリガンドファミリーメンバーのエクドメイン又はその断片は、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4からなる群から選択されるアミノ酸配列、特に配列番号1のアミノ酸配列を含む。

【0159】

更なる態様では、本発明のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、(a) 標的細胞抗原に特異的に結合することができる少なくとも1つの部分、(b) 配列番号5又は配列番号103のアミノ酸配列を含むポリペプチド、及び(c) 安定な会合が可能な第1及び第2のサブユニットから構成されるFcドメインを含む。より具体的には、ポリペプチドは配列番号5のアミノ酸配列を含む。

【0160】

別の態様では、TNFリガンドファミリーメンバーはOX40Lである。

【0161】

別の態様では、TNFリガンドファミリーメンバーのエクドメインは、配列番号6及び配列番号7からなる群から選択されるアミノ酸配列、特に配列番号6のアミノ酸配列を含む。

【0162】

更なる態様では、本発明のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、(a) 標的細胞抗原に特異的に結合することができる少なくとも1つの部分、(b) 配列番号8のアミノ酸配列を含むポリペプチド、及び(c) 安定な会合が可能な第1及び第2のサブユニットから構成されるFcドメインを含む。

【0163】

一態様では、TNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、(a) 標的細胞抗原に特異的に結合することができる少なくとも1つの部分、(b) 互いに連結されたTNFリガンドファミリーメンバーの3つのエクドメイン又はその断片を含むポリペプチド

10

20

30

40

50

、及び(c)安定な会合が可能な第1及び第2のサブユニットから構成されるFcドメインを含み、ここで、TNFリガンドファミリーメンバーの3つの外部ドメイン又はその断片は、互いに直接的に、又はジスルフィド、エステル若しくはエーテル架橋などの適切な化学リンカーで連結される。

【0164】

別の態様では、TNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、
 (a) 標的細胞抗原に特異的に結合することができる少なくとも1つの部分、
 (b) ペプチドリinkerによって互いに連結されたTNFリガンドファミリーメンバーの3つのエクトドメイン又はその断片を含むポリペプチド、及び
 (c) 安定な会合が可能な第1及び第2のサブユニットから構成されるFcドメインを含み、

ここで、ペプチドリinkerによって互いに連結されたTNFリガンドファミリーメンバーの3つのエクトドメイン又はその断片は、同一又は異なるものであって、

GGGGSGGGGS (配列番号54)、SGGGGS (配列番号55)及びGGGGSGGGGS (配列番号56)からなる群から選択されるが、配列GSPGSSSSGS (配列番号57)、GSGSGSGS (配列番号58)、GSGSGNGS (配列番号59)、GSGSGSGS (配列番号60)、GSGSGS (配列番号61)、GSGS (配列番号62)、GSGNGSGS (配列番号63)、GNGSGSGS (配列番号64)及びGGNGSGS (配列番号65)をも含むペプチドリinkerによって互いに連結される。特に、ペプチドリinkerは同一であり、 $(G_4S)_2$ (配列番号54)及びGSPGSSSSGS (配列番号57)からなる群から選択される。より詳細には、本発明は、TNFリガンドファミリーメンバーの3つの外部ドメイン又はその断片が $m(G_4S)_2$ リンカーによって互いに連結される、上で定義したTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子に関する。

【0165】

別の態様では、本発明のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、(a) 標的細胞抗原に特異的に結合することができる少なくとも1つの部分、(b) ペプチドリinkerによって互いに連結されたTNFリガンドファミリーメンバーの3つのエクトドメイン又はその断片を含むポリペプチド、及び(c) 安定な会合が可能な第1及び第2のサブユニットから構成されるFcドメインを含み、ここで、TNFリガンドファミリーメンバーの3つのエクトドメイン又はその断片を含むポリペプチドは、Fcドメインのサブユニットの1つのN末端アミノ酸にC末端アミノ酸で融合される。特定の態様では、TNFリガンドファミリーメンバーの3つの外部ドメイン又はその断片を含むポリペプチドは、FcドメインのCH₂ドメインのN末端アミノ酸にC末端アミノ酸で融合される。更なる態様では、TNFリガンドファミリーメンバーの3つの外部ドメイン又はその断片を含むポリペプチドは、FcドメインのCH₂ドメインのN末端アミノ酸にペプチドリinkerによってC末端アミノ酸で連結される。

【0166】

別の態様では、本発明のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、(a) 標的細胞抗原に特異的に結合することができる少なくとも1つの部分、(b) ペプチドリinkerによって互いに連結されたTNFリガンドファミリーメンバーの3つのエクトドメイン又はその断片を含むポリペプチド、及び(c) 安定な会合が可能な第1及び第2のサブユニットから構成されるFcドメインを含み、ここで、TNFリガンドファミリーメンバーの3つのエクトドメイン又はその断片を含むポリペプチドは、FcドメインのC末端アミノ酸にN末端アミノ酸で融合される。特定の態様では、TNFリガンドファミリーメンバーの3つの外部ドメイン又はその断片を含むポリペプチドは、FcドメインのCH₃ドメインのC末端アミノ酸にN末端アミノ酸で融合される。更なる態様では、TNFリガンドファミリーメンバーの3つの外部ドメイン又はその断片を含むポリペプチドは、FcドメインのCH₂ドメインのC末端アミノ酸にペプチドリinkerによってN末端アミノ酸

10

20

30

40

50

で連結される。

【0167】

別の態様では、TNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、
(a) 標的細胞抗原に特異的に結合することができる少なくとも1つの部分、(b) ペプチドリンカーによって互いに連結されたTNFリガンドファミリーメンバーの3つのエクストドメイン又はその断片を含むポリペプチド、及び(c) 安定な会合が可能な第1及び第2のサブユニットから構成されるFcドメインを含み、ここで、標的細胞抗原に特異的に結合することができる部分は、TNFリガンドファミリーメンバーの3つのエクストドメイン又はその断片を含むポリペプチドに融合されない。

【0168】

更なる態様では、本発明は、本明細書中で先に定義したTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供し、ここで、標的細胞抗原に特異的に結合することができる部分は、抗体、抗体断片、及び足場抗原結合タンパク質からなる群から選択される。

【0169】

一態様では、本発明は、本明細書中で先に定義したTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供し、ここで、標的細胞抗原に特異的に結合することができる部分は抗体である。

【0170】

別の態様では、本発明は、本明細書中で先に定義したTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供し、ここで、標的細胞抗原に特異的に結合することができる部分は抗体断片である。特に、抗体断片は、Fab分子、クロスオーバーFab分子、単鎖Fab分子、Fv分子、scFv分子、単ドメイン抗体、及びaVHからなる群より選択される。

【0171】

更なる態様では、本発明は、本明細書中で先に定義したTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供し、ここで、標的細胞抗原に特異的に結合することができる部分は足場抗原結合タンパク質である。

【0172】

従って、更なる態様では、本発明は、本明細書中で先に定義したTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子に関し、ここで、標的細胞抗原に特異的に結合することができる部分は、抗体断片、Fab分子、クロスオーバーFab分子、単鎖Fab分子、Fv分子、scFv分子、単ドメイン抗体、aVH、足場抗原結合タンパク質からなる群から選択される。従って特定の態様では、本発明は、(a) Fab分子、クロスオーバーFab分子、単鎖Fab分子、Fv分子、scFv分子、単ドメイン抗体、aVH、及び足場抗原結合タンパク質からなる群から選択される標的細胞抗原に特異的に結合することができる少なくとも1つの抗体断片、(b) ペプチドリンカーによって互いに連結されたTNFリガンドファミリーメンバーの3つのエクストドメイン又はその断片を含むポリペプチド、及び(c) 安定な会合が可能な第1及び第2のサブユニットから構成されるFcドメインを含む、TNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供する。一態様では、TNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、(a) Fab分子、クロスオーバーFab分子、単鎖Fab分子、Fv分子、scFv分子、単ドメイン抗体、aVH、及び足場抗原結合タンパク質からなる群から選択される標的細胞抗原に特異的に結合することができる一つの抗体断片を含む。

【0173】

特定の態様では、本発明は、上記に定義したTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子に関し、ここで、標的細胞抗原に特異的に結合することができる部分は、標的細胞抗原に特異的に結合することができるFab分子である。従って、本発明は、
(a) 標的細胞抗原に特異的に結合することができる少なくとも1つのFab分子、
(b) ペプチドリンカーによって互いに連結されたTNFリガンドファミリーメンバーの3つのエクストドメイン又はその断片を含むポリペプチド、及び

10

20

30

40

50

(c) 安定な会合が可能な第1及び第2のサブユニットから構成されるFcドメインを含む、TNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供する。

【0174】

別の態様では、本発明のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供され、ここで標的細胞抗原は、線維芽細胞活性化タンパク質(FAP)、がん胎児性抗原(CEA)、メラノーマ関連コンドロイチン硫酸プロテオグリカン(MCSP)、上皮増殖因子受容体(EGFR)、CD19、CD20、及びCD33からなる群から選択される。

【0175】

更なる態様では、本明細書中で前に記載したTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供され、ここで、安定な会合が可能な第1及び第2のサブユニットから構成されるFcドメインは、IgG Fcドメイン、特にIgG1 Fcドメイン又はIgG4 Fcドメインである。特に、安定な会合が可能な第1及び第2のサブユニットから構成されるFcドメインは、IgG1 Fcドメインである。特定の態様では、Fcドメインは、Fcドメインの第1及び第2のサブユニットの会合を促進する修飾を含む。

10

【0176】

Fc受容体結合及び/又はエフェクター機能を低減させるFcドメイン修飾

本発明のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子のFcドメインは、免疫グロブリン分子の重鎖ドメインを含む一对のポリペプチド鎖からなる。例えば、免疫グロブリンG(IgG)分子のFcドメインは二量体であり、その各々のサブユニットはCH2及びCH3 IgG重鎖定常ドメインを含む。Fcドメインの2つのサブユニットは、互いに安定に会合することができる。

20

【0177】

Fcドメインは、標的組織中への良好な蓄積に寄与する長い血清半減期、及び望ましい組織-血液分布比を含む、本発明の抗原結合分子に望ましい薬物動態特性を付与する。従って、Fcドメインは、クリアランス、分布の体積又は消失半減期($t_{1/2}$)などの抗原結合分子の薬物動態パラメータ(PKデータ)に有利に寄与する。しかし同時に、好ましい抗原担持細胞ではなくFc受容体を発現する細胞への本発明の二重特異性抗体の望ましくない標的化を導く可能性がある。従って、特定の態様において、本発明のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子のFcドメインは、天然IgG1 Fcドメインと比較して、Fc受容体に対する減少した結合親和性及び/又は減少したエフェクター機能を示す。一態様では、FcはFc受容体に実質的に結合せず、及び/又はエフェクター機能を誘導しない。特定の態様では、Fc受容体はFc受容体である。一態様では、Fc受容体はヒトFc受容体である。特定の態様では、Fc受容体は活性化ヒトFc受容体であり、より具体的にはヒトFcRIIIa、FcRI又はFcRIIIa、最も具体的にはヒトFcRIIIaである。一態様では、Fcドメインはエフェクター機能を誘導しない。エフェクター機能の低減は、限定しないが、補体依存性細胞傷害(CDC)の低減、抗体依存性T細胞媒介性細胞傷害(ADCC)の低減、抗体依存性細胞貪食(ADCP)の低減、サイトカイン分泌の低減、抗原提示細胞による免疫複合体媒介性抗原取り込みの低減、NK細胞に対する結合の低減、マクロファージに対する結合の低減、単球に対する結合の低減、多形核細胞に対する結合の低減、アポトーシスを誘導する直接的シグナル伝達の低減、樹状細胞成熟の低減、又はT細胞プライミングの低減のうちの一又は複数を含むことができる。

30

40

【0178】

特定の態様では、本明細書で提供されるTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子のFc領域に一又は複数のアミノ酸修飾を導入し、それによりFc領域変異体を生成することができる。Fc領域変異体は、一又は複数のアミノ酸位置にアミノ酸修飾(例えば、置換)を含むヒトFc領域配列(例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4 Fc領域)を含み得る。

【0179】

一態様では、本発明は、

50

(a) 標的細胞抗原に特異的に結合することができる少なくとも1つの部分、
 (b) ペプチドリンカーによって互いに連結されたTNFリガンドファミリーメンバーの3つのエクトドメイン又はその断片を含むポリペプチド、及び
 (c) 安定な会合が可能な第1及び第2のサブユニットから構成されるFcドメインを含む、本明細書中で先に定義したTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子に関し、ここで、Fcドメインは、Fc受容体、特にFc受容体への結合を低減させる一又は複数のアミノ酸置換を含む。

【0180】

一態様では、本発明のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子のFcドメインは、FcドメインのFc受容体に対する結合親和性及び/又はエフェクター機能を低減させる一又は複数のアミノ酸変異を含む。典型的には、Fcドメインの2つのサブユニットのそれぞれに同じ一又は複数のアミノ酸変異が存在する。特に、Fcドメインは、E233、L234、L235、N297、P331及びP329(EU番号付け)の位置にアミノ酸置換を含む。特に、Fcドメインは、IgG重鎖の位置234及び235(EU番号付け)並びに/又は329(EU番号付け)にアミノ酸置換を含む。より具体的には、IgG重鎖中のアミノ酸置換L234A、L235A、及びP329G(「P329GLALA」、EU番号付け)を有するFcドメインを含む、本発明による三量体TNFファミリーリガンド含有抗原結合分子が提供される。アミノ酸置換L234A及びL235Aは、いわゆるLALA変異を指す。アミノ酸置換の「P329GLALA」の組み合わせは、ヒトIgG1FcドメインのFc受容体結合をほぼ完全に破壊し、国際特許出願公開番号WO2012/130831(A1)に記載されており、これはそのような変異体Fcドメインを調製する方法、及びFc受容体結合又はエフェクター機能などのその特性を決定する方法も記載している。「EU番号付け」は、Kabat et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991のEUインデックスに従う番号付けを指す。

【0181】

Fc受容体結合及び/又はエフェクター機能が低減したFcドメインは、Fcドメイン残基238、265、269、270、297、327、及び329のうちの一又は複数の置換を伴うものを含む(米国特許第6737056号)。そのようなFc変異体は、残基265及び297のアラニンへの置換を有するいわゆる「DANA」Fc変異体を含めた、アミノ酸位置265、269、270、297、及び327のうち二以上において置換を有するFc変異体を含む(米国特許第7332581号)。

【0182】

別の態様では、FcドメインはIgG4のFcドメインである。IgG4抗体は、IgG1抗体と比較して、Fc受容体に対する結合親和性の低減及びエフェクター機能の低減を示す。更に特定の態様では、Fcドメインは、S228(Kabat番号付け)の位置にアミノ酸置換を、特にアミノ酸置換S228Pを含む、IgG4Fcドメインである。更に特定の態様では、Fcドメインは、アミノ酸置換L235E及びS228P及びP329G(EU番号付け)を含む、IgG4Fcドメインである。そのようなIgG4Fcドメイン変異体及びそれらのFc受容体結合特性はまた、国際公開第2012/130831号に記載されている。

【0183】

変異体Fcドメインは、当該技術分野で周知の遺伝学的又は化学的方法を用いたアミノ酸の欠失、置換、挿入、又は修飾により調製することができる。遺伝学的方法は、コード化DNA配列の部位特異的変異、PCR、遺伝子合成などを含み得る。正確なヌクレオチドの変化は、例えば配列決定により検証することができる。

【0184】

Fc受容体に対する結合は、例えばELISAにより、又はBIACore器具(GE Healthcare)のような標準の器具類を用いた表面プラズモン共鳴(SPR)により容易に決定することができ、このようなFc受容体は組換え発現により得ることが

できる。このような適切な結合アッセイは本明細書に記載される。代替的に、Fcドメイン、又はFcドメインを含む細胞活性化二重特異性抗原結合分子のFc受容体に対する結合親和性は、特定のFc受容体を発現することが知られている細胞株、例えばFcγRIIa受容体を発現するNK細胞を用いて評価してもよい。

【0185】

Fcドメイン、又はFcドメインを含む本発明の二重特異性抗体のエフェクター機能は、当該技術分野で周知の方法により測定することができる。ADCCを測定するための適切なアッセイは本明細書に記載される。目的の分子のADCC活性を評価するためのインビトロアッセイの他の例が、米国特許第5500362号；Hellstrom et al. Proc Natl Acad Sci USA 83, 7059-7063 (1986)及びHellstrom et al., Proc Natl Acad Sci USA 82, 1499-1502 (1985)；米国特許第5821337号；Bruggemann et al., J Exp Med 166, 1351-1361 (1987)に記載されている。あるいは、非放射性アッセイ法を用いてもよい（例えばフローサイトメトリー用のACTI™非放射性細胞傷害性アッセイ（Cell Technology, Inc. Mountain View, CA；及びCytotoxic 96（登録商標）非放射性細胞傷害性アッセイ（Promega, Madison, WI）参照）。このようなアッセイに有用なエフェクター細胞には、末梢血単核球（PBMC）及びナチュラルキラー（NK）細胞が含まれる。あるいは、又は更に、目的の分子のADCC活性は、例えばClynes et al., Proc Natl Acad Sci USA 95, 652-656 (1998)に開示される動物モデルにおいてインビボで評価することができる。

【0186】

幾つかの実施態様では、補体成分に対するFcドメインの結合、特にC1qに対する結合が低減する。従って、Fcドメインがエフェクター機能が低下するように改変されている幾つかの実施態様では、前記エフェクター機能の低減はCDCの低減を含む。C1q結合アッセイは、本発明の二重特異性抗体がC1qに結合できるかどうか、それによりCDC活性を有するかどうかを決定するために実行される。例えば、国際公開第2006/029879号及び国際公開第2005/100402号のC1q及びC3c結合ELISAを参照。補体活性化を評価するために、CDCアッセイを行ってもよい（例えば、Gazzano-Santoro et al., J Immunol Methods 202, 163 (1996)；Cragg et al., Blood 101, 1045-1052 (2003)；及びCragg and Glennie, Blood 103, 2738-2743 (2004)を参照）。

【0187】

特定の態様では、Fcドメインは、Fcドメインの第1及び第2のサブユニットの会合を促進する修飾を含む。

【0188】

ヘテロ二量体化を促すFcドメインの修飾

Fcドメインは、典型的には2つの非同ーポリペプチド鎖（「重鎖」）に含まれるFcドメインの2つのサブユニットの一方又は他方に融合された異なる部分を含む。これらのポリペプチドの組換え同時発現とそれに続く二量体化は、2つのポリペプチドの複数の可能な組み合わせをもたらす。従って、組換え産生におけるTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子の収率及び純度を改善するために、本発明のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子のFcドメイン内に所望のポリペプチドの会合を促す修飾を導入することが有利であろう。

【0189】

従って、本発明のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子のFcドメインは、Fcドメインの第1及び第2サブユニットの会合を促進する修飾を含む。ヒトIgGFcドメインの2つのサブユニット間の最も広範なタンパク質-タンパク質相互作用の部位は、FcドメインのCH3ドメインにある。従って、前記修飾は、特にFcドメインのCH3ドメインにある。

【0190】

特定の態様では、前記修飾は、Fcドメインの2つのサブユニットの一方に「ノブ」修飾を含み、Fcドメインの2つのサブユニットの他方に「ホール」修飾を含む、いわゆる

10

20

30

40

50

「ノブ・イントゥー・ホール」修飾である。従って、特定の態様において、本発明は、IgG分子を含む、本明細書中で前に記載したTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子に関し、ここで、第1の重鎖のFc部分は第1の二量化モジュールを含み、第2の重鎖のFc部分は第2の二量化モジュールを含み、IgG分子の2つの重鎖のヘテロ二量化を可能とし、かつノブ・イントゥー・ホール技術に従って、第1の二量化モジュールはノブを含み、第2の二量化モジュールはホールを含む。

【0191】

ノブ・イントゥー・ホール技術は、例えば、米国特許第5731168号；同第7695936号；Ridgway et al., Prot Eng 9, 617-621 (1996)及びCarter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001)に記載されている。通常、方法は、隆起がそれに対応する空洞内に位置できるように、第1のポリペプチドの接触面に隆起（「ノブ」）を、及び第2のポリペプチドの接触面に対応する空洞を、それぞれ導入することにより、ヘテロ二量体形成を促進し、かつホモ二量体形成を妨害することを伴う。隆起は、第1のポリペプチドの接触面由来の小さなアミノ酸側鎖を大きな側鎖（例えば、チロシン又はトリプトファン）で置換することにより構築される。隆起と同じか又は同様のサイズの相補的空洞は、大きなアミノ酸側鎖を小さいもの（例えばアラニン又はスレオニン）で置換することにより、第2のポリペプチドの接触面に作り出される。

10

【0192】

従って、特定の態様では、本発明のTNFファミリーのリガンド三量体含有抗原結合分子のFcドメインの第1のサブユニットのCH3ドメインにおいて、アミノ酸残基がそれよりも大きな側鎖体積を有するアミノ酸残基で置換され、それにより、第1のサブユニットのCH3ドメイン内部に、第2のサブユニットのCH3ドメイン内部の空洞内に配置可能な隆起が生成され、かつFcドメインの第2のサブユニットのCH3ドメイン内において、アミノ酸残基がそれよりも小さな側鎖体積を有するアミノ酸残基で置換され、それにより、第2のサブユニットのCH3ドメイン内部に、第1のサブユニットのCH3ドメイン内部の隆起を配置可能な空洞が生成される。

20

【0193】

隆起と空洞は、ポリペプチドをコードする核酸を、例えば部位特異的変異誘発により、又はペプチド合成により、変化させることにより作り出すことができる。

【0194】

特定の態様では、Fcドメインの第1のサブユニットのCH3ドメインにおいて、366の位置のスレオニン残基がトリプトファン残基で置換され（T366W）、Fcドメインの第2のサブユニットのCH3ドメインにおいて、407の位置のチロシン残基がバリン残基で置換される（Y407V）。より具体的には、Fcドメインの第2のサブユニットにおいて更に、366の位置のスレオニン残基がセリン残基で置換され（T366S）、368の位置のロイシン残基がアラニン残基で置換される（L368A）。より具体的には、Fcドメインの第1のサブユニットにおいて更に、354の位置のセリン残基がシステイン残基で置換され（S354C）、Fcドメインの第2のサブユニットにおいて更に、349の位置のチロシン残基がシステイン残基で置換される（Y349C）。これらの2つのシステイン残基の導入は、Fcドメインの2つのサブユニット間のジスルフィド架橋の形成をもたらす。ジスルフィド架橋は二量体を更に安定化させる（Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001)）。

30

40

【0195】

代わりの態様では、Fcドメインの第一及び第二サブユニットの会合を促進する修飾は、PCT出願公開WO2009/089004に記載されるように、静電的ステアリング効果を媒介する修飾を含む。一般に、この方法は、ホモ二量体形成は静電的に不利になるが、ヘテロ二量体は静電的に有利になるように、2つのFcドメインサブユニットの界面にて、荷電したアミノ酸残基による一又は複数のアミノ酸残基の置換を含む。

【0196】

特定のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子

50

別の態様では、標的細胞抗原に特異的に結合することができる1つの部分を含む、本明細書中で前に記載した一価TNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。

【0197】

特に、(c) 安定な会合が可能な第1及び第2のサブユニットから構成されるFcドメインを含む、本発明のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、(a) 標的細胞抗原に特異的に結合することができるFab分子を更に含み、ここで、Fab重鎖は、Fcドメイン中のCH2ドメインのN末端にC末端で融合される。

【0198】

更に、本発明は、本明細書中で前に記載したTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供し、ここで抗原結合分子は、

(a) 標的細胞抗原に特異的に結合することができるFab分子を双方が含む、重鎖及び軽鎖、及び

(b) 配列番号15のアミノ酸配列を含む融合タンパク質を含む。

【0199】

更なる態様では、TNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、

(i) 標的細胞抗原に特異的に結合することができるFab分子のVHドメインを含む第1の重鎖、

(ii) 標的細胞抗原に特異的に結合することができるFab分子のVLドメインを含む軽鎖、及び

(iii) 配列番号5又は配列番号103又は配列番号8のアミノ酸配列を含む第2の重鎖を含む。

【0200】

特定の態様では、TNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、

(i) 配列番号16のアミノ酸配列を含むVHドメイン又は配列番号110のアミノ酸配列を含むVHドメインを含む第1の重鎖、(ii) 配列番号17のアミノ酸配列を含むVLドメイン又は配列番号111のアミノ酸配列を含むVLドメインを含む軽鎖、及び(iii) 配列番号5又は配列番号103又は配列番号8のアミノ酸配列を含む第2の重鎖を含む。別の態様では、TNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、(i) 配列番号118のアミノ酸配列を含むVHドメインを含む第1の重鎖、(ii) 配列番号119のアミノ酸配列を含むVLドメインを含む軽鎖、及び(iii) 配列番号5又は配列番号103又は配列番号8のアミノ酸配列を含む第2の重鎖を含む。更なる態様では、TNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、(i) 配列番号126のアミノ酸配列を含むVHドメイン又は配列番号134のアミノ酸配列を含むVHドメインを含む第1の重鎖、(ii) 配列番号127のアミノ酸配列を含むVLドメイン又は配列番号135のアミノ酸配列を含むVLドメインを含む軽鎖、及び(iii) 配列番号5又は配列番号103又は配列番号8のアミノ酸配列を含む第2の重鎖を含む。

【0201】

別の態様では、標的細胞抗原に特異的に結合することができる2つの部分を含む、二価TNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。

【0202】

一態様では、TNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、

(i) 標的細胞抗原に特異的に結合することができるFab分子のVHドメイン又はVLドメインを含む第1の重鎖、

(ii) 標的細胞抗原に特異的に結合することができるFab分子のVLドメイン又はVHドメインをそれぞれが含む2つの軽鎖、並びに

(iii) 標的細胞抗原に特異的に結合することができるFab分子のVHドメイン又はVLドメイン、及び配列番号5又は配列番号103又は配列番号8のアミノ酸配列を含む第2の重鎖を含む。

【0203】

10

20

30

40

50

一態様では、TNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、
 (i) 標的細胞抗原に特異的に結合することができるFab分子のVHドメインを含む第1の重鎖、
 (ii) 標的細胞抗原に特異的に結合することができるFab分子のVLドメインをそれぞれが含む2つの軽鎖、並びに
 (iii) 標的細胞抗原に特異的に結合することができるFab分子のVHドメイン、及び配列番号5又は配列番号103又は配列番号8のアミノ酸配列を含む第2の重鎖を含む。

【0204】

特定の態様では、TNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、(i) 配列番号16のアミノ酸配列を含むVHドメイン又は配列番号110のアミノ酸配列を含むVHドメインを含む第1の重鎖、(ii) 配列番号17のアミノ酸配列を含むVLドメイン又は配列番号111のアミノ酸配列を含むVLドメインをそれぞれ含む2つの軽鎖、並びに(iii) 配列番号16のアミノ酸配列を含むVHドメイン又は配列番号110のアミノ酸配列を含むVHドメイン、及び配列番号5又は配列番号103又は配列番号8のアミノ酸配列を含む第2の重鎖を含む。別の態様では、TNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、(i) 配列番号118のアミノ酸配列を含むVHドメインを含む第1の重鎖、(ii) 配列番号119のアミノ酸配列を含むVLドメインをそれぞれが含む2つの軽鎖、並びに(iii) 配列番号118のアミノ酸配列を含むVHドメイン、及び配列番号5又は配列番号103又は配列番号8のアミノ酸配列を含む第2の重鎖を含む。更に別の態様では、TNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、(i) 配列番号126のアミノ酸配列を含むVHドメイン又は配列番号134のアミノ酸配列を含むVHドメインを含む第1の重鎖、(ii) 配列番号127のアミノ酸配列を含むVLドメイン又は配列番号135のアミノ酸配列を含むVLドメインを含む2つの軽鎖、並びに(iii) 配列番号126のアミノ酸配列を含むVHドメイン又は配列番号134のアミノ酸配列を含むVHドメイン、及び配列番号5又は配列番号103又は配列番号8のアミノ酸配列を含む第2の重鎖を含む。

【0205】

一態様では、本発明は、本明細書に記載したTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供し、ここで抗原結合分子は、(a) (i) 配列番号9のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii) 配列番号10のアミノ酸配列を含むCDR-H2、及び(iii) 配列番号11のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含むVHドメインを含む重鎖、並びに(iv) 配列番号12のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(v) 配列番号13のアミノ酸配列を含むCDR-L2、及び(vi) 配列番号14のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含むVLドメインを含む軽鎖、及び(b) 配列番号15のアミノ酸配列を含む融合タンパク質を含む。

【0206】

更なる態様において、本発明は、本発明によるTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供し、ここで抗原結合分子は、(a) 配列番号16のアミノ酸配列を含むVHドメイン及び配列番号17のアミノ酸配列を含むVLドメインを含むFAPに特異的に結合することができる部分、並びに(b) 配列番号15のアミノ酸配列を含む融合タンパク質を含む。

【0207】

特定の態様では、本明細書中で前に記載したTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供され、ここで抗原結合分子は、(i) 配列番号16のアミノ酸配列を含む可変重鎖、(ii) 配列番号17のアミノ酸配列を含む可変軽鎖、及び(iii) 配列番号5のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。

【0208】

特定の態様では、本明細書中で前に記載したTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供され、ここで抗原結合分子は、(i) 配列番号16のアミノ酸配列を含む

10

20

30

40

50

重鎖、(i i) 配列番号 17 のアミノ酸配列を含む軽鎖、及び (i i i) 配列番号 15 のアミノ酸配列を含む融合タンパク質を含む。

【 0 2 0 9 】

別の態様では、本明細書中で前に記載した T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供され、ここで抗原結合分子は、

(a) 標的細胞抗原に特異的に結合することができる F a b 分子を双方が含む、重鎖及び軽鎖、及び

(b) 配列番号 20 のアミノ酸配列を含む融合タンパク質を含む。

【 0 2 1 0 】

一態様では、本発明は、本明細書に記載した T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供し、ここで抗原結合分子は、

(a) (i) 配列番号 9 のアミノ酸配列を含む C D R - H 1、(i i) 配列番号 10 のアミノ酸配列を含む C D R - H 2、及び (i i i) 配列番号 11 のアミノ酸配列を含む C D R - H 3 を含む V H ドメインを含む重鎖、並びに (i v) 配列番号 12 のアミノ酸配列を含む C D R - L 1、(v) 配列番号 13 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2、及び (v i) 配列番号 14 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3 を含む V L ドメインを含む軽鎖、及び (b) 配列番号 20 のアミノ酸配列を含む融合タンパク質を含む。

【 0 2 1 1 】

更なる態様において、本発明は、本発明による T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供し、ここで抗原結合分子は、

(a) 配列番号 16 のアミノ酸配列を含む V H ドメイン及び配列番号 17 のアミノ酸配列を含む V L ドメインを含む F A P に特異的に結合することができる部分、並びに

(b) 配列番号 20 のアミノ酸配列を含む融合タンパク質を含む。

【 0 2 1 2 】

特定の態様では、本明細書中で前に記載した T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供され、ここで抗原結合分子は、

(i) 配列番号 16 のアミノ酸配列を含む可変重鎖、
 (i i) 配列番号 17 のアミノ酸配列を含む可変軽鎖、及び
 (i i i) 配列番号 8 のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。

【 0 2 1 3 】

特定の態様では、本明細書中で前に記載した T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供され、ここで抗原結合分子は、

(i) 配列番号 16 のアミノ酸配列を含む重鎖、
 (i i) 配列番号 17 のアミノ酸配列を含む軽鎖、及び
 (i i i) 配列番号 20 のアミノ酸配列を含む融合タンパク質を含む。

【 0 2 1 4 】

標的細胞抗原が F A P である T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子

特定の態様では、標的細胞抗原は線維芽細胞活性化タンパク質 (F A P) である。一態様では、本発明は、本明細書中で前に記載した T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供し、ここで、F A P に特異的に結合することができる部分は、

(a) (i) 配列番号 9 のアミノ酸配列を含む C D R - H 1、(i i) 配列番号 10 のアミノ酸配列を含む C D R - H 2、及び (i i i) 配列番号 11 のアミノ酸配列を含む C D R - H 3 を含む V H ドメイン、並びに (i v) 配列番号 12 のアミノ酸配列を含む C D R - L 1、(v) 配列番号 13 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2、及び (v i) 配列番号 14 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3 を含む V L ドメイン、又は

(b) (i) 配列番号 104 のアミノ酸配列を含む C D R - H 1、(i i) 配列番号 105 のアミノ酸配列を含む C D R - H 2、及び (i i i) 配列番号 106 のアミノ酸配列を含む C D R - H 3 を含む V H ドメイン、並びに (i v) 配列番号 107 のアミノ酸配列を含む C D R - L 1、(v) 配列番号 108 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2、及び (v i) 配列番号 109 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3 を含む V L ドメインを含む。

10

20

30

40

50

【0215】

一態様では、FAPに特異的に結合することができる部分は、(i)配列番号9のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii)配列番号10のアミノ酸配列を含むCDR-H2、及び(iii)配列番号11のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含むVHドメイン、並びに(iv)配列番号12のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(v)配列番号13のアミノ酸配列を含むCDR-L2、及び(vi)配列番号14のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含むVLドメインを含む。別の特定の態様では、FAPに特異的に結合することができる部分は、(i)配列番号104のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii)配列番号105のアミノ酸配列を含むCDR-H2、及び(iii)配列番号106のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含むVHドメイン、並びに(iv)配列番号107のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(v)配列番号108のアミノ酸配列を含むCDR-L2、及び(vi)配列番号109のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含むVLドメインを含む。

10

【0216】

更なる態様では、FAPに特異的に結合することができる部分は、配列番号16のアミノ酸配列と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号17のアミノ酸配列と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。特定の態様では、FAPに特異的に結合することができる部分は、配列番号16のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号17のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。特定の態様では、FAPに特異的に結合することができる部分は、配列番号16のアミノ酸配列からなるVHドメイン及び配列番号17のアミノ酸配列からなるVLドメインを含む。

20

【0217】

更なる特定の態様では、本発明のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、配列番号18のアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号19のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。特定の態様では、TNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、配列番号18のアミノ酸配列からなる重鎖及び配列番号19のアミノ酸配列からなる軽鎖を含む。

【0218】

別の態様では、FAPに特異的に結合することができる部分は、配列番号110のアミノ酸配列と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号111のアミノ酸配列と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。特定の態様では、FAPに特異的に結合することができる部分は、配列番号110のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号111のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。特定の態様では、FAPに特異的に結合することができる部分は、配列番号110のアミノ酸配列からなるVHドメイン及び配列番号111のアミノ酸配列からなるVLドメインを含む。

30

【0219】

一態様では、FAPに特異的に結合することができる1つの部分を含む、本明細書中で前に記載した一価TNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。

40

【0220】

特定の態様では、本明細書中で前に記載したTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供され、ここで抗原結合分子は、(i)配列番号18のアミノ酸配列を含む可変重鎖、(ii)配列番号19のアミノ酸配列を含む可変軽鎖、及び(iii)配列番号15のアミノ酸配列を含む融合タンパク質を含む。

【0221】

更なる態様では、本明細書中で前に記載したTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供され、ここで抗原結合分子は、(i)配列番号140のアミノ酸配列を含む可変重鎖、(ii)配列番号142のアミノ酸配列を含む可変軽鎖、及び(iii)配

50

列番号 15 のアミノ酸配列を含む融合タンパク質を含む。

【0222】

別の特定の態様では、本明細書中で前に記載した TNF ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供され、ここで抗原結合分子は、

- (i) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む可変重鎖、
- (ii) 配列番号 19 のアミノ酸配列を含む可変軽鎖、及び
- (iii) 配列番号 20 のアミノ酸配列を含む融合タンパク質を含む。

【0223】

別の態様では、FAP に特異的に結合することができる 2 つの部分を含む、本明細書中で前に記載した二価 TNF ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。

10

【0224】

特定の態様では、本明細書中で前に記載した TNF ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供され、ここで抗原結合分子は、

- (i) 配列番号 140 のアミノ酸配列を含む可変重鎖、
- (ii) 配列番号 142 のアミノ酸配列を含む可変軽鎖、及び
- (iii) 配列番号 141 のアミノ酸配列を含む融合タンパク質を含む。

【0225】

標的細胞抗原が CEA である TNF ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子

別の態様では、標的細胞抗原は CEA である。一態様では、本発明は、本明細書中で前に記載した TNF ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供し、ここで、CEA に特異的に結合することができる部分は、(i) 配列番号 112 のアミノ酸配列を含む CDR - H1、(ii) 配列番号 113 のアミノ酸配列を含む CDR - H2、及び (iii) 配列番号 114 のアミノ酸配列を含む CDR - H3 を含む VH ドメイン、並びに (iv) 配列番号 115 のアミノ酸配列を含む CDR - L1、(v) 配列番号 116 のアミノ酸配列を含む CDR - L2、及び (vi) 配列番号 117 のアミノ酸配列を含む CDR - L3 を含む VL ドメインを含む。

20

【0226】

更なる態様では、CEA に特異的に結合することができる部分は、配列番号 118 のアミノ酸配列と少なくとも約 95%、96%、97%、98%、99% 又は 100% 同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号 119 のアミノ酸配列と少なくとも約 95%、96%、97%、98%、99% 又は 100% 同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。特定の態様では、CEA に特異的に結合することができる部分は、配列番号 118 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号 119 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。特定の態様では、FAP に特異的に結合することができる部分は、配列番号 118 のアミノ酸配列からなる VH ドメイン及び配列番号 119 のアミノ酸配列からなる VL ドメインを含む。

30

【0227】

一態様では、CEA に特異的に結合することができる 1 つの部分を含む、本明細書中で前に記載した一価 TNF ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。

【0228】

特定の態様では、本明細書中で前に記載した TNF ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供され、ここで抗原結合分子は、(i) 配列番号 146 のアミノ酸配列を含む可変重鎖、(ii) 配列番号 148 のアミノ酸配列を含む可変軽鎖、及び (iii) 配列番号 15 のアミノ酸配列を含む融合タンパク質を含む。

40

【0229】

別の態様では、CEA に特異的に結合することができる 2 つの部分を含む、本明細書中で前に記載した二価 TNF ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。

【0230】

特定の態様では、本明細書中で前に記載した TNF ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供され、ここで抗原結合分子は、(i) 配列番号 146 のアミノ酸配列を含

50

む可変重鎖、(i i) 配列番号 1 4 8 のアミノ酸配列を含む可変軽鎖、及び(i i i) 配列番号 1 4 7 のアミノ酸配列を含む融合タンパク質を含む。

【 0 2 3 1 】

標的細胞抗原が C D 1 9 である T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子

更に別の態様では、標的細胞抗原は C D 1 9 である。一態様では、本発明は、本明細書中で前に記載した T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供し、ここで、C D 1 9 に特異的に結合することができる部分は、(a) (i) 配列番号 1 2 0 のアミノ酸配列を含む C D R - H 1、(i i) 配列番号 1 2 1 のアミノ酸配列を含む C D R - H 2、及び(i i i) 配列番号 1 2 2 のアミノ酸配列を含む C D R - H 3 を含む V H ドメイン、並びに(i v) 配列番号 1 2 3 のアミノ酸配列を含む C D R - L 1、(v) 配列番号 1 2 4 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2、及び(v i) 配列番号 1 2 5 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3 を含む V L ドメイン、又は(b) (i) 配列番号 1 2 8 のアミノ酸配列を含む C D R - H 1、(i i) 配列番号 1 2 9 のアミノ酸配列を含む C D R - H 2、及び(i i i) 配列番号 1 3 0 のアミノ酸配列を含む C D R - H 3 を含む V H ドメイン、並びに(i v) 配列番号 1 3 1 のアミノ酸配列を含む C D R - L 1、(v) 配列番号 1 3 2 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2、(v i) 配列番号 1 3 3 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3 を含む V L ドメインを含む。

10

【 0 2 3 2 】

更なる態様では、C D 1 9 に特異的に結合することができる部分は、配列番号 1 2 6 のアミノ酸配列と少なくとも約 9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 又は 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号 1 2 7 のアミノ酸配列と少なくとも約 9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 又は 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。別の態様では、C D 1 9 に特異的に結合することができる部分は、配列番号 1 3 4 のアミノ酸配列と少なくとも約 9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 又は 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号 1 3 5 のアミノ酸配列と少なくとも約 9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 又は 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。特定の態様では、C D 1 9 に特異的に結合することができる部分は、配列番号 1 2 6 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号 1 2 7 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。特定の態様では、F A P に特異的に結合することができる部分は、配列番号 1 1 8 のアミノ酸配列からなる V H ドメイン及び配列番号 1 1 9 のアミノ酸配列からなる V L ドメインを含む。別の特定の態様では、C D 1 9 に特異的に結合することができる部分は、配列番号 1 3 4 のアミノ酸配列を含む可変重鎖及び配列番号 1 3 5 のアミノ酸配列を含む可変軽鎖を含む。特定の態様では、F A P に特異的に結合することができる部分は、配列番号 1 3 4 のアミノ酸配列からなる V H ドメイン及び配列番号 1 3 5 のアミノ酸配列からなる V L ドメインを含む。

20

30

【 0 2 3 3 】

一態様では、C D 1 9 に特異的に結合することができる 1 つの部分を含む、本明細書中で前に記載した一価 T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。

【 0 2 3 4 】

特定の態様では、本明細書中で前に記載した T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供され、ここで抗原結合分子は、

40

- (i) 配列番号 1 5 2 のアミノ酸配列を含む可変重鎖、
- (i i) 配列番号 1 5 4 のアミノ酸配列を含む可変軽鎖、及び
- (i i i) 配列番号 1 5 のアミノ酸配列を含む融合タンパク質を含む。

【 0 2 3 5 】

更なる態様では、本明細書中で前に記載した T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供され、ここで抗原結合分子は、

- (i) 配列番号 1 5 8 のアミノ酸配列を含む可変重鎖、
- (i i) 配列番号 1 6 0 のアミノ酸配列を含む可変軽鎖、及び
- (i i i) 配列番号 1 5 のアミノ酸配列を含む融合タンパク質を含む。

50

【0236】

別の態様では、CD19に特異的に結合することができる2つの部分を含む、本明細書中で前に記載した二価TNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。

【0237】

特定の態様では、本明細書中で前に記載したTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供され、ここで抗原結合分子は、

- (i) 配列番号152のアミノ酸配列を含む可変重鎖、
- (ii) 配列番号154のアミノ酸配列を含む可変軽鎖、及び
- (iii) 配列番号153のアミノ酸配列を含む融合タンパク質を含む。

【0238】

更なる態様では、本明細書中で前に記載したTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供され、ここで抗原結合分子は、

- (i) 配列番号158のアミノ酸配列を含む可変重鎖、
- (ii) 配列番号160のアミノ酸配列を含む可変軽鎖、及び
- (iii) 配列番号159のアミノ酸配列を含む融合タンパク質を含む。

【0239】

ポリヌクレオチド

本発明は更に、本明細書に記載のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子又はその断片をコードする単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0240】

本発明のTNFリガンド三量体含有抗原結合分子をコードする単離されたポリヌクレオチドは、抗原結合分子全体をコードする単一のポリヌクレオチドとして、又は同時発現される複数の(例えば2つ以上の)ポリヌクレオチドとして発現され得る。同時発現されるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドは、例えば、ジスルフィド結合又は他の手段を介して会合して、機能的抗原結合分子を形成し得る。例えば、免疫グロブリンの軽鎖部分は、免疫グロブリンの重鎖部分からの別個のポリヌクレオチドによってコードされ得る。同時発現されると、重鎖ポリペプチドは軽鎖ポリペプチドと会合して免疫グロブリンを形成する。

【0241】

幾つかの態様では、単離されたポリヌクレオチドは、本明細書に記載の本発明のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子全体をコードする。他の実施態様では、単離されたポリヌクレオチドは、本明細書に記載の本発明のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子に含まれるポリペプチドをコードする。

【0242】

一態様では、本発明は、TNFファミリーリガンド三量体を含む抗原結合分子をコードする単離されたポリヌクレオチドを対象とし、ここで該ポリヌクレオチドは、(a) 標的細胞抗原に特異的に結合することができる少なくとも1つの部分をコードする配列、(b) ペプチドリンカーによって互いに連結されたTNFリガンドファミリーメンバーの3つのエクドメイン又はその断片を含むポリペプチドをコードする配列、及び(c) 安定な会合が可能な第1及び第2のサブユニットから構成されるFcドメインをコードする配列を含む。

【0243】

別の態様では、4-1BBリガンド三量体含有抗原結合分子をコードする単離されたポリヌクレオチドが提供され、ここで該ポリヌクレオチドは、(a) 標的細胞抗原に特異的に結合することができる部分をコードする配列、(b) ペプチドリンカーによって互いに連結された4-1BBLの3つの外部ドメイン又はその断片を含むポリペプチドをコードする配列、及び(c) 安定な会合が可能な第1及び第2のサブユニットから構成されるFcドメインをコードする配列を含む。

【0244】

更なる態様では、本発明は、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列

10

20

30

40

50

番号 99、配列番号 100、配列番号 101 及び配列番号 102 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 90%、95%、98% 又は 100% 同一であるアミノ酸配列を含む 3 つの 4-1BB 断片を含むポリペプチドをコードする配列を含む単離されたポリヌクレオチドを対象とする。一態様では、配列番号 5 又は配列番号 103 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする配列を含む単離されたポリヌクレオチドが提供される。

【0245】

別の態様では、OX40 リガンド三量体含有抗原結合分子をコードする単離されたポリヌクレオチドが提供され、ここで該ポリヌクレオチドは、(a) 標的細胞抗原に特異的に結合することができる部分をコードする配列、(b) ペプチドリンカーによって互いに連結された OX40L の 3 つの外部ドメイン又はその断片を含むポリペプチドをコードする配列、及び (c) 安定な会合が可能な第 1 及び第 2 のサブユニットから構成される Fc ドメインをコードする配列を含む。

10

【0246】

更なる態様では、本発明は、配列番号 6 又は配列番号 7 に示されるアミノ酸配列と少なくとも約 90%、95%、98% 又は 100% 同一であるアミノ酸配列を含む 3 つの OX40L 断片を含むポリペプチドをコードする配列を含む単離されたポリヌクレオチドを対象とする。一態様では、配列番号 8 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする配列を含む単離されたポリヌクレオチドが提供される。

【0247】

別の態様では、TNF ファミリーリガンド三量体を含む抗原結合分子をコードする単離されたポリヌクレオチドが提供され、ここで該ポリヌクレオチドは、(a) 標的細胞抗原に特異的に結合することができる少なくとも 1 つの部分にコードする配列、(b) ペプチドリンカーによって互いに連結され、かつ Fc ドメイン中の CH2 ドメインの N 末端アミノ酸に C 末端アミノ酸で融合される TNF リガンドファミリーメンバーの 3 つのエクトドメイン又はその断片を含むポリペプチドをコードする配列、及び (c) 安定な会合が可能な第 1 及び第 2 のサブユニットから構成される Fc ドメインをコードする配列を含む。更なる態様では、TNF ファミリーリガンド三量体を含む抗原結合分子をコードする単離されたポリヌクレオチドが提供され、ここで該ポリヌクレオチドは、(a) 標的細胞抗原に特異的に結合することができる少なくとも 1 つの部分にコードする配列、(b) ペプチドリンカーによって互いに連結され、かつ Fc ドメイン中の CH2 ドメインの C 末端アミノ酸に N 末端アミノ酸で融合される TNF リガンドファミリーメンバーの 3 つのエクトドメイン又はその断片を含むポリペプチドをコードする配列、及び (c) 安定な会合が可能な第 1 及び第 2 のサブユニットから構成される Fc ドメインをコードする配列を含む。

20

30

【0248】

一態様では、本発明は、IgG1 Fc ドメインをコードする配列を含む単離されたポリヌクレオチドに関する。特定の態様では、単離されたポリヌクレオチドは、位置 234、235 及び / 又は 329 (EU 番号付け) にアミノ酸置換を有する Fc ドメインをコードする配列を含む。

【0249】

別の態様では、本発明は、配列番号 66 に示される核酸配列と少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は 99% 同一である配列を含む単離されたポリヌクレオチドを対象とする。更なる態様では、配列番号 87 に示される核酸配列と少なくとも約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は 99% 同一である配列を含む単離されたポリヌクレオチドが提供される。

40

【0250】

更なる態様では、本発明は、TNF ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子をコードする単離されたポリヌクレオチドを対象とし、該ポリヌクレオチドは、標的細胞抗原に特異的に結合することができる Fab 分子と、配列番号 66 の核酸配列との両方を含む、重鎖及び軽鎖をコードする配列を含む。更なる態様では、本発明は、TNF ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子をコードする単離されたポリヌクレオチドを対象とし、該

50

ポリヌクレオチドは、標的細胞抗原に特異的に結合することができる F a b 分子と、配列番号 87 の核酸配列との両方を含む、重鎖及び軽鎖をコードする配列を含む。

【0251】

一態様では、4 - 1 B B L 三量体含有抗原結合分子をコードする単離されたポリヌクレオチドが提供され、ここでポリヌクレオチドは、(a) (i) 配列番号 9 のアミノ酸配列を含む C D R - H 1、(i i) 配列番号 10 のアミノ酸配列を含む C D R - H 2、及び(i i i) 配列番号 11 のアミノ酸配列を含む C D R - H 3 を含む V H ドメインを含む重鎖、並びに(i v) 配列番号 12 のアミノ酸配列を含む C D R - L 1、(v) 配列番号 13 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2、及び(v i) 配列番号 14 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3 を含む V L ドメインを含む軽鎖、及び(b) 配列番号 5 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする配列を含む。

10

【0252】

別の態様では、4 - 1 B B L 三量体含有抗原結合分子をコードする単離されたポリヌクレオチドが提供され、ここでポリヌクレオチドは、(a) (i) 配列番号 104 のアミノ酸配列を含む C D R - H 1、(i i) 配列番号 105 のアミノ酸配列を含む C D R - H 2、及び(i i i) 配列番号 106 のアミノ酸配列を含む C D R - H 3 を含む V H ドメインを含む重鎖、並びに(i v) 配列番号 107 のアミノ酸配列を含む C D R - L 1、(v) 配列番号 108 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2、及び(v i) 配列番号 109 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3 を含む V L ドメインを含む軽鎖、及び(b) 配列番号 5 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする配列を含む。

20

【0253】

更なる態様では、4 - 1 B B L 三量体含有抗原結合分子をコードする単離されたポリヌクレオチドが提供され、ここでポリヌクレオチドは、(a) (i) 配列番号 112 のアミノ酸配列を含む C D R - H 1、(i i) 配列番号 113 のアミノ酸配列を含む C D R - H 2、及び(i i i) 配列番号 114 のアミノ酸配列を含む C D R - H 3 を含む V H ドメインを含む重鎖、並びに(i v) 配列番号 115 のアミノ酸配列を含む C D R - L 1、(v) 配列番号 116 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2、及び(v i) 配列番号 117 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3 を含む V L ドメインを含む軽鎖、及び(b) 配列番号 5 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする配列を含む。

30

【0254】

更に別の態様では、4 - 1 B B L 三量体含有抗原結合分子をコードする単離されたポリヌクレオチドが提供され、ここでポリヌクレオチドは、(a) (i) 配列番号 120 のアミノ酸配列を含む C D R - H 1、(i i) 配列番号 121 のアミノ酸配列を含む C D R - H 2、及び(i i i) 配列番号 122 のアミノ酸配列を含む C D R - H 3 を含む V H ドメインを含む重鎖、並びに(i v) 配列番号 123 のアミノ酸配列を含む C D R - L 1、(v) 配列番号 124 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2、及び(v i) 配列番号 125 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3 を含む V L ドメインを含む軽鎖、及び(b) 配列番号 5 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする配列を含む。

40

【0255】

更なる態様では、4 - 1 B B L 三量体含有抗原結合分子をコードする単離されたポリヌクレオチドが提供され、ここでポリヌクレオチドは、(a) (i) 配列番号 128 のアミノ酸配列を含む C D R - H 1、(i i) 配列番号 129 のアミノ酸配列を含む C D R - H 2、及び(i i i) 配列番号 130 のアミノ酸配列を含む C D R - H 3 を含む V H ドメインを含む重鎖、並びに(i v) 配列番号 131 のアミノ酸配列を含む C D R - L 1、(v) 配列番号 132 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2、及び(v i) 配列番号 133 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3 を含む V L ドメインを含む軽鎖、及び(b) 配列番号 5 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする配列を含む。

40

【0256】

更なる態様では、本発明は、4 - 1 B B L 三量体含有抗原結合分子をコードする単離されたポリヌクレオチドを提供し、ここでポリヌクレオチドは、(a) 配列番号 16 のアミ

50

ノ酸配列からなるVHドメイン及び配列番号17のアミノ酸配列からなるVLドメインを含むFAPに特異的に結合することができる部分、並びに(b)配列番号5のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする配列を含む。

【0257】

特定の態様では、本発明は、4-1BBL三量体含有抗原結合分子をコードする単離されたポリヌクレオチドが提供され、ここでポリヌクレオチドは、(i)配列番号16のアミノ酸配列を含む重鎖、(ii)配列番号17のアミノ酸配列を含む軽鎖、及び(iii)配列番号15のアミノ酸配列を含む融合タンパク質をコードする配列を含む。

【0258】

更なる態様では、本発明は、4-1BBL三量体含有抗原結合分子をコードする単離されたポリヌクレオチドを提供し、ここでポリヌクレオチドは、(a)配列番号110のアミノ酸配列からなるVHドメイン及び配列番号111のアミノ酸配列からなるVLドメインを含むFAPに特異的に結合することができる部分、並びに(b)配列番号5のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする配列を含む。

10

【0259】

特定の態様では、本発明は、4-1BBL三量体含有抗原結合分子をコードする単離されたポリヌクレオチドが提供され、ここでポリヌクレオチドは、(i)配列番号110のアミノ酸配列を含む重鎖、(ii)配列番号111のアミノ酸配列を含む軽鎖、及び(iii)配列番号15のアミノ酸配列を含む融合タンパク質をコードする配列を含む。

【0260】

別の態様では、OX40L三量体含有抗原結合分子をコードする単離されたポリヌクレオチドが提供され、ここでポリヌクレオチドは、(a)(i)配列番号9のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii)配列番号10のアミノ酸配列を含むCDR-H2、及び(iii)配列番号11のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含むVHドメインを含む重鎖、並びに(iv)配列番号12のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(v)配列番号13のアミノ酸配列を含むCDR-L2、及び(vi)配列番号14のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含むVLドメインを含む軽鎖、及び(b)配列番号8のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする配列を含む。

20

【0261】

更なる態様では、本発明は、OX40L三量体含有抗原結合分子をコードする単離されたポリヌクレオチドを提供し、ここでポリヌクレオチドは、(a)配列番号16のアミノ酸配列からなるVHドメイン及び配列番号17のアミノ酸配列からなるVLドメインを含むFAPに特異的に結合することができる部分、並びに(b)配列番号8のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする配列を含む。

30

【0262】

特定の態様では、本発明は、OX40L三量体含有抗原結合分子をコードする単離されたポリヌクレオチドが提供され、ここでポリヌクレオチドは、(i)配列番号16のアミノ酸配列を含む重鎖、(ii)配列番号17のアミノ酸配列を含む軽鎖、及び(iii)配列番号20のアミノ酸配列を含む融合タンパク質をコードする配列を含む。

【0263】

特定の実施形態では、ポリヌクレオチド又は核酸はDNAである。他の実施態様では、本発明のポリヌクレオチドは、例えばメッセンジャーRNA(mRNA)の形態のRNAである。本発明のRNAは一本鎖又は二本鎖であり得る。

40

【0264】

組換え法

本発明のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、例えば、固相ペプチド合成(例えば、メリフィールド固相合成)又は組換え産生によって得ることができる。組換え産生のために、TNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子又はそのポリペプチド断片をコードする一又は複数のポリヌクレオチドを、例えば上記のように単離し、宿主細胞における更なるクローニング及び/又は発現のために一又は複数のベクターに挿入

50

する。このようなポリヌクレオチドは、従来の手順を用いて容易に単離し、配列決定することができる。本発明の一態様では、本発明のポリヌクレオチドの一又は複数を含むベクター、好ましくは発現ベクターが提供される。当業者に周知の方法を用いて、適切な転写／翻訳制御シグナルとともにTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子（断片）のコード配列を含む発現ベクターを構築することができる。これらの方法には、インビトロ組換えDNA技術、合成技術、及びインビボ組換え／遺伝子組換えが含まれる。例えば、Maniatis et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989); 及びAusubel et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989)に記載される技術を参照。発現ベクターはプラスミド、又はウイルスの一部とすることができるか、又は核酸断片でよい。発現ベクターは、TNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子又はそのポリペプチド断片（すなわちコード領域）をコードするポリヌクレオチドが、プロモーター及び／又は他の転写若しくは翻訳制御エレメントと作動可能に結合してクロニングされる発現カセットを含む。本発明で使用される場合、「コード領域」は、アミノ酸に翻訳されるコドンからなる核酸の一部である。「終止コドン」（TAG、TGA、又はTAA）はアミノ酸に翻訳されないが、存在する場合にはコード領域の一部と考えられ、しかし、任意の隣接配列、例えばプロモーター、リボソーム結合部位、転写ターミネーター、イントロン、5'及び3'非翻訳領域などはコード領域の一部ではない。2つ以上のコード領域が、単一のポリヌクレオチド構築物、例えば単一のベクター上に、又は別々のポリヌクレオチド構築物の中に、例えば別の（異なる）ベクター上に存在することができる。更に、任意のベクターは、単一のコード領域を含んでいてもよいし、2つ以上のコード領域を含んでいてもよく、例えば本発明のベクターは、タンパク質分解性切断を介して、最終タンパク質中に翻訳後又は翻訳と同時に分離された一又は複数のポリペプチドをコードしてもよい。加えて、本発明のベクター、ポリヌクレオチド、又は核酸は、本発明のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子若しくはそのポリペプチド断片、又はその変異体若しくは誘導体をコードするポリヌクレオチドに融合又は非融合された異種コード領域をコードし得る。異種コード領域は、限定しないが、特殊化要素又はモチーフ、例えば分泌シグナルペプチド又は異種機能ドメインを含む。作動可能に結合とは、ポリペプチドなどの遺伝子産物のコード領域が、制御配列の影響下又は制御下において遺伝子産物の発現を配置するように、一又は複数の制御配列と結合するときである。（ポリペプチドコード領域及びそれに結合するプロモーターのような）2つのDNA断片は、プロモーター機能の誘導が所望の遺伝子産物をコードするmRNAの転写をもたらす場合、及び2つのDNA断片間の連結の性質が、遺伝子産物の発現を導く発現制御配列の能力を妨げないか又は転写されるべきDNA鋳型の能力を妨げない場合、「作動可能に結合している」。従って、プロモーター領域は、プロモーターがその核酸の転写をもたらすことができる場合にポリペプチドをコードする核酸に作動可能に結合される。プロモーターは所定の細胞においてのみDNAの実質的な転写を導く細胞特異的プロモーターであってもよい。プロモーターの他に他の転写制御エレメント、例えばエンハンサー、オペレーター、リプレッサー、及び転写終結シグナルが、細胞特異的転写を導くポリヌクレオチドと作動可能に結合することができる。

【0265】

適切なプロモーター及び他の転写制御領域は本明細書に開示されている。種々の転写制御領域が当業者に知られている。これらには、限定されないが、脊椎動物細胞において機能する転写制御領域、例えば、限定されないが、サイトメガロウイルス由来のプロモーター及びエンハンサーセグメント（例えばイントロン-Aと連動した即初期プロモーター）、サルウイルス40（例えば初期プロモーター）、及びレトロウイルス（例えばラウス肉腫ウイルスなど）が含まれる。他の転写制御領域は、脊椎動物の遺伝子、例えばアクチン、熱ショックタンパク質、ウシ成長ホルモン及びウサギ-グロビン、並びに、真核細胞における遺伝子発現を制御することができる他の配列に由来するものを含む。更なる適切な転写制御領域は、組織特異的プロモーター及びエンハンサー並びに誘導性プロモーター

10

20

30

40

50

(例えば、プロモーター誘導性テトラサイクリン)を含む。同様に、種々の翻訳制御エレメントが当業者に知られている。これらには、限定されないが、リボソーム結合部位、翻訳開始及び終結コドン、及びウイルス系由来の要素(特に、配列内リボソーム進入部位、又はCITE配列とも呼ばれるIRES)が含まれる。発現カセットはまた、例えば、複製起点、及び/又はレトロウイルスの長い末端反復配列(LTR)又はアデノ随伴ウイルス(AAV)の末端反転型配列(ITR)など染色体組み込み要素といった他の特徴を含んでいてもよい。

【0266】

本発明のポリヌクレオチド及び核酸コード領域は、本発明のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの分泌を指示する分泌ペプチド又はシグナルペプチドをコードする更なるコード領域と結合させることができる。例えば、TNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子又はそのポリペプチド断片の分泌が望まれる場合、シグナル配列をコードするDNAが、本発明のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子又はそのポリペプチド断片をコードする核酸の上流に配置され得る。シグナル仮説によると、哺乳類細胞によって分泌されるタンパク質はシグナルペプチド又は分泌リーダー配列を有し、これは粗面小胞体上で成長するタンパク質鎖の排出が開始されると成熟タンパク質から切断される。当業者は、脊椎動物細胞によって分泌されるポリペプチドが通常、ポリペプチドの分泌型又は「成熟」型を生成するために翻訳されたポリペプチドから切断されるポリペプチドのN末端に融合されたシグナルペプチドを有することを認識している。特定の実施態様では、天然のシグナルペプチド、例えば免疫グロブリン重鎖又は軽鎖シグナルペプチド又は作動可能に結合しているポリペプチドの分泌を指示する能力を保持するその配列の機能的誘導体を使用される。或いは、異種哺乳動物シグナルペプチド、又はその機能的誘導体を使用することができる。例えば、野生型リーダー配列は、ヒト組織プラスミノゲン活性化因子(TPA)又はマウス - グルクロニダーゼのリーダー配列で置換されてもよい。

【0267】

後の精製を容易にするため(例えば、ヒスチジンタグ)、又は融合タンパク質を標識するのを補助するために使用され得る短いタンパク質配列をコードするDNAは、本発明のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子又はそのポリペプチド断片をコードするポリヌクレオチドの内部又は末端に含まれ得る。

【0268】

本発明の更なる態様では、本発明の一又は複数のポリヌクレオチドを含む宿主細胞が提供される。特定の実施態様では、本発明の一又は複数のベクターを含む宿主細胞が提供される。ポリヌクレオチド及びベクターは、ポリヌクレオチド及びベクターそれぞれに関連して本明細書に記載される特徴の何れかを単独で又は組み合わせて組み込むことができる。一態様では、宿主細胞は、本発明のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子(の一部)をコードするポリヌクレオチドを含むベクターを含む(例えば該ベクターで形質転換又はトランスフェクトされている)。本明細書で使用される場合、「宿主細胞」なる用語は、本発明の融合タンパク質又はその断片を生成するよう改変できる何れかの種類の細胞系を指す。抗原結合分子の複製及び発現の補助に適切な宿主細胞は当該技術分野で周知である。このような細胞は特定の発現ベクターで適切にトランスフェクト又は形質導入することができ、大量のベクター含有細胞を、臨床利用のための十分な量の抗原結合分子を得るために、大規模発酵槽での播種用に増殖させることができる。適切な宿主細胞は、原核生物微生物、例えば大腸菌、又は様々な真核生物細胞、例えばチャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)、昆虫細胞などを含む。例えば、特に、グリコシル化が必要でない場合には、ポリペプチドは細菌中で生成することができる。発現の後、ポリペプチドは可溶性画分において細菌の細胞ペーストから単離され得、更に精製することができる。原核生物に加えて、糸状菌又は酵母菌のような真核微生物は、菌類や酵母菌株を含むポリペプチドをコードするベクターのための適切なクローニング宿主又は発現宿主であり、そのグリコシル化経路は「ヒト化」されており、部分的又は完全なヒトのグリコシル化パター

10

20

30

40

50

ンを有するポリペプチドの産生をもたらす。Gerngross, Nat Biotech 22, 1409-1414 (2004)、及びLi et al., Nat Biotech 24, 210-215 (2006)を参照。

【0269】

(グリコシル化)ポリペプチドの発現に適した宿主細胞はまた、多細胞生物(無脊椎動物と脊椎動物)から派生している。無脊椎動物細胞の例としては、植物及び昆虫細胞が挙げられる。多数のバキュロウイルス株が同定されており、これらは特にスポドブレタ・フルギベルダ細胞のトランスフェクションのために、昆虫細胞と組み合わせて使用することができる。植物細胞培養を宿主として利用することができる。例えば、米国特許第5959177号、第6040498号、第6420548号、第7125978号及び第6417429号(トランスジェニック植物における抗体生成に関するPLANTIBODIESTM技術を記載)を参照。脊椎動物細胞も宿主として用いることができる。例えば、懸濁液中で増殖するように適合されている哺乳動物細胞株は有用であり得る。有用な哺乳動物宿主細胞株の他の例は、SV40(COS-7)で形質転換されたサル腎臓CV1株、ヒト胚腎臓株(Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)に記載された293細胞又は293T細胞)、ベビーハムスター腎臓細胞(BHK)、マウスのセルトリ細胞(例えば、Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)に記載されるTM4細胞)、サル腎臓細胞(CV1)、アフリカミドリザル腎臓細胞(VERO-76)、ヒト子宮頸癌細胞(HELA)、イヌ腎臓細胞(MDCK)、パッファローラット肝臓細胞(BRL 3A)、ヒト肺細胞(W138)、ヒト肝臓細胞(He p G 2)、マウス乳腺腫瘍細胞(MMT060562)、(例えばMather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)に記載される)TRI細胞、MRC5細胞、及びFS4細胞である。他の有用な哺乳動物宿主細胞株は、dhfr-CHO細胞(Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980))を含むチャニーズハムスター卵巣(CHO)細胞;及びYO、NS0、P3X63及びSp2/0などの骨髄腫細胞株を含む。タンパク質産生に適した特定の哺乳動物宿主細胞系の総説については、例えば、Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003)を参照。宿主細胞は、培養細胞、例えば幾つか挙げると、哺乳動物の培養細胞、酵母細胞、昆虫細胞、細菌細胞及び植物細胞、並びにトランスジェニック動物、トランスジェニック植物又は培養植物又は動物組織内部に含まれる細胞を含む。一実施態様において、宿主細胞は、真核生物細胞、好ましくは哺乳動物細胞、例えばチャニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、ヒト胎児腎臓(HEK)細胞、又はリンパ系細胞(例えば、YO、NS0、Sp20細胞)である。これらの系において外来遺伝子を発現する標準的な技術が当技術分野で知られている。免疫グロブリンの重鎖又は軽鎖を含むポリペプチドを発現する細胞は、発現された生成物が重鎖及び軽鎖の両方を有する免疫グロブリンであるように、免疫グロブリン鎖の他方を発現するように改変することができる。

【0270】

一態様では、本発明のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子又はそのポリペプチド断片を産生する方法が提供され、ここで方法は、本明細書で提供される本発明のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子又はそのポリペプチド断片をコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞を、本発明のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子又はそのポリペプチド断片の発現に適した条件下で培養すること、及び本発明のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子又はそのポリペプチド断片を宿主細胞(又は宿主細胞培養培地)から回収することを含む。

【0271】

本発明のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子において、構成要素(標的細胞抗原に特異的に結合することができる少なくとも1つの部分、TNFリガンドファミリーメンバーの3つの外部ドメインを含む1つのポリペプチド又はその断片、及びFcドメイン)が全て遺伝的に融合されているわけではない。ポリペプチドは、その構成要素(TNFリガンドファミリーメンバーの3つの外部ドメイン又はその断片、並びにFcドメインのCH2及びCH3などの他の構成要素)が互いに直接又はリンカー配列を介して融

合するように設計される。リンカーの組成及び長さは、当該技術分野で周知の方法に従って決定することができ、有効性について試験することができる。抗原結合分子の異なる構成要素間のリンカー配列の例は、本明細書に提供される配列に見出される。必要に応じて、融合タンパク質の個々の成分を分離するための切断部位を組み込むための付加的な配列、例えばエンドペプチダーゼ認識配列を含めることができる。

【0272】

特定の実施態様では、抗原結合分子の一部を形成する標的細胞抗原（例えばFab断片）に特異的に結合することができる部分は、少なくとも抗原に結合することができる免疫グロブリン可変領域を含む。可変領域は、天然に又は非天然に存在する抗体及びその断片の一部を形成することができ、かつそのような抗体及び断片から誘導することができる。ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体を生成する方法は、当該技術分野で周知である（例えば、Harlow and Lane, "Antibodies, a laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1988）。非天然に存在する抗体は、固相-ペプチド合成を使用して構築されるか、組換え的に産生されるか（例えば米国特許第4186567号に記載のように）、又は例えば可変重鎖及び可変軽鎖を含むコンビナトリアルライブラリーのスクリーニング（例えばMcCaffertyの米国特許第5969108号を参照）によって得ることができる。

10

【0273】

免疫グロブリンの任意の動物種を本発明において使用することができる。本発明において有用な非限定的な免疫グロブリンは、マウス、霊長類、又はヒト起源のものであり得る。融合タンパク質がヒトでの使用を意図する場合、免疫グロブリンの定常領域がヒトに由来する免疫グロブリンのキメラ形態を使用することができる。ヒト化又は完全ヒト形態の免疫グロブリンも、当分野でよく知られている方法に従って調製されうる（例えばWinterの米国特許第5565332号を参照）。ヒト化は、様々な方法によって達成することができ、それら方法には、限定されないが、（a）非ヒト（例えば、ドナー抗体）のCDRを、重要なフレームワーク残基（例えば、良好な抗原結合親和性又は抗体機能を維持するために重要であるもの）の保持を伴う又は伴わないヒト（例えば、レシピエント抗体）のフレームワーク領域及び定常領域の上に移植すること、（b）非ヒト特異性決定領域（SDR又はa-CDR；抗体-抗原相互作用に重要な残基）のみをヒトフレームワーク領域及び定常領域上に移植すること、又は（c）非ヒト可変ドメイン全体を移植するが、表面残基の置換によってヒト様切片で「覆い隠す」ことが含まれる。ヒト化抗体及びそれらの製造方法は、例えばAlmagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008) に総説され、更に例えばRiechmann et al., *Nature* 332, 323-329 (1988); Queen et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 10029-10033 (1989); 米国特許第5821337号、同第7527791号、同第6982321号、及び同第7087409号; Jones et al., *Nature* 321, 522-525 (1986); Morrison et al., *Proc Natl Acad Sci* 81, 6851-6855 (1984); Morrison and Oi, *Adv Immunol* 44, 65-92 (1988); Verhoeyen et al., *Science* 239, 1534-1536 (1988); Padlan, *Molec Immun* 31(3), 169-217 (1994); Kashmiri et al., *Methods* 36, 25-34 (2005) (SDR (a-CDR) 移植を記述する); Padlan, *Mol Immunol* 28, 489-498 (1991) (「リサーフェシング」を記述する); Dall'Acqua et al., *Methods* 36, 43-60 (2005) (「FRシャッフリング」を記述する); 並びにOsborn et al., *Methods* 36, 61-68 (2005)及びKlimka et al., *Br J Cancer* 83, 252-260 (2000) (FRシャッフリングに対する「誘導選択 (guided selection)」アプローチを記述する)に記載されている。本発明による特定の免疫グロブリンはヒト免疫グロブリンである。ヒト抗体及びヒト可変領域は、当該技術分野において周知の様々な技術を用いて生産することができる。ヒト抗体は一般的にvan Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368-74 (2001) 及びLonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008)に記載されている。ヒト可変領域は、ハイブリドーマ法によって作製されたヒトモノクローナル抗体の一部を形成することができ、かつそのような抗体から誘導することができる（例えば、*Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (M

20

30

40

50

arcel Dekker, Inc., New York, 1987) を参照)。ヒト抗体及びヒト可変領域は、抗原チャレンジに应答して、インタクトなヒト抗体又はヒト可変領域を持つインタクトな抗体を生産するように改変されたトランスジェニック動物に免疫原を投与することによって調製され得る(例えば、Lonberg, Nat Biotech 23, 1117-1125 (2005)を参照)。ヒト抗体及びヒト可変領域はまた、ヒト由来のファージディスプレイライブラリーから選択されたFvクローン可変領域配列を単離することによって生成することができる(例えば、Hoogenboom et al. in Methods in Molecular Biology 178, 1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001); 及びMcCafferty et al., Nature 348, 552-554; Clackson et al., Nature 352, 624-628 (1991))。ファージは、典型的には、単鎖Fv (scFv)断片又はFab断片の何れかとして、抗体断片を提示する。

10

【0274】

特定の態様では、本発明の抗原結合分子に含まれる標的細胞抗原に特異的に結合することができる部分(例えば、Fab断片)は、例えばPCT公開国際公開第2002/20006号(親和性成熟に関連する実施例を参照)又は米国特許出願公開第2004/0132066号に開示された方法に従って、結合親和性を増強させるように改変される。特定の抗原決定基に結合する本発明の抗原結合分子の能力は、酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)又は当業者によく知られている他の技術、例えば表面プラズモン共鳴技術(Liljeblad, et al., Glyco. J. 17:323-329(2000))及び古典的な結合アッセイ(Heeley, R.P., Endocr. Res. 28:217-229(2002))によって測定することができる。競合アッセイを使用して、特定の抗原への結合について参照抗体と競合する抗原結合分子を同定することができる。特定の実施態様では、このような競合する抗原結合分子は、参照抗原結合分子によって結合される同じエピトープ(例えば直鎖状又は立体構造エピトープ)に結合する。抗原結合分子が結合するエピトープをマッピングするための典型的な方法の詳細が、Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," in Methods in Molecular Biology vol. 66 (Human a Press, Totowa, NJ)に提供されている。例示的な競合アッセイでは、抗原に結合する第一の標識抗原結合分子と、抗原への結合について第一の抗原結合分子と競合する能力について試験する第二の非標識抗原結合分子とを含む溶液中で固定化した抗原をインキュベートする。第二の抗原結合分子はハイブリドーマ上清に存在してもよい。対照として、固定化抗原が、第一の標識抗原結合分子を含むが第二の未標識抗原結合分子は含まない溶液中でインキュベートされる。第一の抗体の抗原への結合を許容する条件下でインキュベートした後、過剰な未結合抗体が除去され、固定化された抗原に結合した標識の量が測定される。固定化抗原に結合した標識の量が、対照試料と比較して試験試料中で実質的に減少している場合、それは、第二の抗原結合分子が、抗原への結合について第一の抗原結合分子と競合していることを示している。Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)を参照。

20

30

【0275】

本明細書で記載のように調製される本発明のTNFリガンド三量体含有抗原結合分子は、当分野で知られている技術、例えば高速液体クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、アフィニティークロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィーなどによって精製され得る。特定のタンパク質を精製するために使用される実際の条件は、一部には正味荷電、疎水性、親水性などの要因に依存し、当業者に明瞭であろう。アフィニティークロマトグラフィー精製では、TNFリガンド三量体含有抗原結合分子が結合する抗体、リガンド、受容体又は抗原が使用され得る。例えば、本発明の融合タンパク質のアフィニティークロマトグラフィー精製では、プロテインA又はプロテインGを伴うマトリックスが使用され得る。逐次的なプロテインA又はGアフィニティークロマトグラフィー及びサイズ排除クロマトグラフィーを、基本的に実施例に記載されるように抗原結合分子を単離するために使用することができる。TNFリガンド三量体含有抗原結合分子又はその断片の純度は、ゲル電気泳動、高圧液体クロマトグラフィーなどを含む様々な周知の分析方法の何れかによって決定することができる。例えば、実施例に記載されるように発現されたTNFリガンド三量体含有抗原結合分子は、還元及び非還元SDS-

40

50

PAGEによって示されるようにインタクトであり、正しく組み立てられていることが示された。

【0276】

アッセイ

本明細書で提供される抗原結合分子が、同定され、当該技術分野で周知の様々なアッセイによってその物理的/化学的性質及び/又は生物学的活性についてスクリーニングされ、又は特徴づけられる。

【0277】

1. 親和性アッセイ

本明細書で提供されるTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子の、その対応するTNF受容体に対する親和性を、実施例に説明される方法に従い、BIAcore機器(GE Healthcare)のような標準的器具類と、組換え発現により得られるような受容体又は標的タンパク質とを用いて、表面プラズモン共鳴アッセイ(SPR)により決定することができる。TNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子の、その標的細胞抗原に対する親和性も、実施例に説明される方法に従い、BIAcore機器(GE Healthcare)のような標準的器具類と、組換え発現により得られるような受容体又は標的タンパク質とを用いて、表面プラズモン共鳴アッセイ(SPR)により決定することができる。結合親和性を測定するための具体的な例示であって例示的な実施態様は、実施例4で説明される。一態様によれば、 K_D は、25でBIAcore(登録商標)T100装置(GE Healthcare)を用いる表面プラズモン共鳴により測定される。

10

20

【0278】

2. 結合アッセイ及びその他のアッセイ

本明細書で提供されるTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子の対応する受容体発現細胞への結合は、特定の受容体又は標的抗原を発現する細胞株を用いて、例えばフローサイトメトリー(FACS)により、評価することができる。一態様では、TNF受容体を発現する新鮮な末梢血単核細胞(PBMC)が結合アッセイに使用される。これらの細胞は、単離直後(ナイーブPBMC)又は刺激後(活性化PBMC)に使用される。別の態様では、活性化マウス脾細胞(TNF受容体分子を発現する)を用いて、本発明のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子の対応するTNF受容体発現細胞への結合を実証した。

30

【0279】

更なる態様では、標的細胞抗原、例えばFAPを発現するがん細胞株を用いて、抗原結合分子の標的細胞抗原への結合を実証した。

【0280】

別の態様では、競合アッセイを使用して、標的又はTNF受容体にそれぞれ結合する特異的抗体又は抗原結合分子と競合する抗原結合分子を同定することができる。特定の実施態様では、このような競合する抗原結合分子は、特異的抗標的抗体又は特異的抗TNF受容体抗体によって結合される同じエピトープ(例えば直鎖状又は立体構造エピトープ)に結合する。抗体が結合するエピトープをマッピングするための代表的な方法が、Morris(1996) "Epitope Mapping Protocols," in Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ)に詳細に示されている。

40

【0281】

3. 活性のアッセイ

一態様では、特異的標的細胞抗原及び生物学的活性を有する特異的TNF受容体に結合するTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を同定するためのアッセイが提供される。生物学的活性は、例えば、標的細胞抗原を発現する細胞上のTNF受容体を介したアゴニストシグナル伝達を含み得る。インビトロでこのような生物学的活性を有するものとして本アッセイによって同定されたTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子も提供される。

50

【0282】

特定の態様において、本発明のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、そのような生物学的活性について試験される。本発明の分子の生物学的活性を検出するためのアッセイは、実施例6に記載のアッセイである。更に、細胞溶解を検出するためのアッセイ（例えば、LDH放出の測定による）、誘導性アポトーシスキネティクスを検出するためのアッセイ（例えば、カスパーゼ3/7活性の測定による）又はアポトーシスを検出するためのアッセイ（例えば、TUNELアッセイを用いる）は、当該技術分野において周知である。加えて、そのような複合体の生物学的活性は、NK細胞、NKT細胞又はT細胞などの様々なリンパ球サブセットの生存、増殖及びリンホカイン分泌に対するそれらの効果を評価することによって、又は樹状細胞、単球/マクロファージ若しくはB細胞などの抗原提示細胞の表現型及び機能を調節するそれらの能力を評価することによって評価することができる。

10

【0283】

薬学的組成物、製剤、及び投与経路

更なる態様において、本発明は、例えば下記の治療法の何れかに使用される、本明細書で提供されるTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子の何れかを含む薬学的組成物を提供する。一実施態様では、本明細書で提供されるTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子の何れかと、少なくとも1つの薬学的に許容される賦形剤とを含む薬学的組成物を提供する。別の実施態様では、薬学的組成物は、本明細書で提供されるTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子の何れかと、少なくとも1つの追加的治療剤とを、例えば後述するように含む。

20

【0284】

本発明の薬学的組成物は、薬学的に許容される賦形剤中に溶解又は分散された一又は複数のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子の治療的有効量を含む。「薬学的に許容される又は薬理的に許容される」という句は、用いられる用量及び濃度においてレシピエントに非毒性であり、すなわち、例えばヒトなどの動物に必要なに応じて投与されたとき、副作用、アレルギー反応、又は他の望ましくない応答を生じさせない分子の実態及び組成物を指す。少なくとも一つのTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子と、任意選択的に追加的な活性成分とを含む薬学的組成物の調製物は、参照により本明細書に組み込まれる、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990によって例示されているように、本開示に照らして当業者には既知であろう。特に、組成物は、凍結乾燥製剤又は水溶液である。本明細書中で使用される場合、「薬学的に許容される賦形剤」は、当業者には周知であるように、任意の及び全ての溶媒、緩衝液、分散媒、コーティング、界面活性剤、酸化防止剤、防腐剤（例えば抗菌剤、抗真菌剤）、等張剤、塩、安定剤及びそれらの組み合わせを含む。

30

【0285】

非経口組成物には、注射による投与、例えば皮下、皮内、病巣内、静脈内、動脈内、筋肉内、髄腔内又は腹腔内への注射用に設計されたものが含まれる。注射の場合、本発明のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、水溶液、好ましくはハックス液、リンゲル液、又は生理食塩水緩衝液などの生理的に適合性の緩衝液中において製剤化され得る。溶液は、懸濁化剤、安定剤、及び/又は分散剤といった製剤関連薬剤を含有することができる。あるいは、融合タンパク質は、使用前に適切なビヒクル、例えば、発熱物質を含まない滅菌水を用いた組成用の粉末形態であってもよい。滅菌注射溶液は、本発明の融合タンパク質を、必要に応じて、以下に列挙する様々な他の成分と共に適切な溶媒中に必要量で組み込むことによって調製される。無菌性は、例えば、滅菌濾過膜を通す濾過によって容易に達成することができる。通常、分散液は、基本的な分散媒質及び/又は他の成分を含有する滅菌ビヒクル中に、滅菌された様々な活性成分を取り込むことにより調製される。滅菌注射溶液、懸濁液、又は乳濁液を調製するための無菌粉末の場合、好ましい調製方法は、予め滅菌濾過された液体媒質からの活性成分+任意の追加の所望の成分の粉末を生じる真空乾燥又は凍結乾燥技術である。液体媒質は、必要であれば適切にバッファ

40

50

ーリングされなければならない、十分な生理食塩水又はグルコースを注射される前に、液体はまず希釈されて等張性にされる。組成物は、製造及び貯蔵条件下で安定でなければならない。エンドトキシンの汚染が安全レベル、例えばタンパク質 1 mg あたり 0.5 ng 未満で最小限に保たなければならない。適切な薬学的に許容される賦形剤は、限定されるものではないが、緩衝剤、例えばリン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸；アスコルビン酸及びメチオニンを含む抗酸化剤；保存料（例えば、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロライド；ヘキサメトニウムクロライド；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、フェノール、ブチル又はベンジルアルコール；アルキルパラベン、例えばメチル又はプロピルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及び m-クレゾール）；低分子量（約 10 残基未満）ポリペプチド；タンパク質、例えば、血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン又はリジン；グルコース、マンノース又はデキストリンを含む単糖類、二糖類、他の炭水化物；キレート剤、例えば、EDTA；糖、例えば、スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトール；塩形成対イオン、例えば、ナトリウム、金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）；及びノ又はポリエチレングリコール（PEG）等の非イオン性界面活性剤が挙げられる。水性注射懸濁液には、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、デキストランなどの懸濁液の粘度を上昇させる化合物が含有されていてよい。任意選択的に、懸濁液は、適切な安定剤、又は化合物の溶解度を上昇させて高濃度の溶液の調製を可能にする薬剤も含有することができる。加えて、活性化合物の懸濁液は、適切な油性注射懸濁液として調製することができる。好適な親油性溶媒又はビヒクルは、ゴマ油などの脂肪油、又はエチルクリート若しくはトリグリセリドなどの合成脂肪酸エステル、又はリポソームを含む。

10

20

30

40

50

【0286】

活性成分は、例えばコアセルベーション技術又は界面重合法によって調製されたマイクロカプセル、例えばそれぞれヒドロキシメチルセルロースマイクロカプセル又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ-（メチルメタクリレート（*methyl methacrylate*））マイクロカプセルに、コロイド薬物送達システム（例えばリポソーム、アルブミンマイクロスフィア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、及びナノカプセル）に、又はマク

【0287】

本明細書における例示的な薬学的に許容される賦形剤は、可溶性の中性活性ヒアルロニダーゼ糖タンパク質（*sHASEGP*）などの介在性薬物分散剤、例えば *rHuPH20*（*HYLENE X*（登録商標）、*Baxter International, Inc.*）などのヒト可溶性 PH-20 ヒアルロニダーゼ糖タンパク質を更に含む。*rHuPH20* を含む特定の典型的な *sHASEGP* 及び使用法は、米国特許出願公開第 2005/0260186 号及び同第 2006/0104968 号に記載されている。一態様では、*sHASEGP* は、コンドロイチナーゼ等の一又は複数の追加的グルコサミノグリカナーゼと組み合わせられる。

【0288】

例示的な凍結乾燥抗体製剤は、米国特許第 6267958 号に記載されている。水性抗体製剤は、米国特許第 6171586 号及び国際公開第 2006/044908 号に記載されているものを含み、後者の製剤はヒスチジン-酢酸緩衝液を含む。

【0289】

前に記載した組成物に加えて、融合タンパク質はデポー製剤としても製剤化することができる。このような長時間作用型の製剤は、注入（例えば、皮下若しくは筋肉内）により、又は筋肉内注射により投与することができる。従って、例えば、融合タンパク質は、適切なポリマー性若しくは疎水性物質（例えば、許容可能な油中のエマルジョン）又はイオン交換樹脂を用いて、又は難溶性の誘導体として、例えば難溶性の塩として製剤化することができる。

【0290】

本発明の融合タンパク質を含む薬学的組成物は、一般的な混合、溶解、乳化、カプセル化、封入、又は凍結乾燥方法により製造することができる。薬学的組成物は、一又は複数の生理的に許容される担体、希釈剤、賦形剤、又は薬学的に使用可能な調製物へのタンパク質の処理を容易にする補助剤を用いる従来の方式で製剤化することができる。適当な製剤は、選択される投与経路によって決定する。

10

【0291】

TNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、遊離酸又は遊離塩基の、天然又は塩の形態の組成物に製剤化することができる。薬学的に許容される塩は、遊離酸又は遊離塩基の生物活性を実質的に保持する塩である。これらには、酸付加塩、例えば、タンパク質性組成物の遊離アミノ基で形成されたもの、又は例えば塩酸若しくはリン酸といった無機酸、又は酢酸、シュウ酸、酒石酸若しくはマンデル酸といった有機酸で形成されたものが含まれる。また、遊離カルボキシル基で形成される塩は、例えばナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、又は水酸化第二鉄といった無機塩基；又はイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、又はプロカインといった有機塩基から誘導することができる。薬学的塩は、対応する遊離塩基形態より、水性及び他のプロトン性溶媒に溶解易い。

20

【0292】

本明細書中の組成物はまた、治療される特定の適応症に必要な一を超える活性成分、好ましくは互いに悪影響を及ぼさない相補的な活性を有するものを含んでもよい。そのような活性成分は、意図された目的に有効な量で組み合わせ適切に存在する。

【0293】

インビボ投与のために使用される製剤は、一般的に無菌である。無菌性は、例えば、滅菌濾過膜を通す濾過によって容易に達成することができる。

30

【0294】

治療的方法及び組成物

本明細書において提供される何れのTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子も、治療法に使用することができる。

【0295】

治療法における使用のために、本発明のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、良好な医療行為と一致する様式で処方され、投薬され、投与され得る。この観点において考慮すべき要因は、治療される特定の障害、治療される特定の哺乳動物、個々の患者の臨床状態、障害の原因、薬剤送達部位、投与方法、投与スケジュール及び医療従事者に既知の他の要因を含む。

40

【0296】

一態様では、医薬としての使用のための本発明のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。更なる態様では、疾患の治療、特にがんの治療における使用のための、本発明のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。特定の態様では、治療の方法における使用のための本発明のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。一態様では、本発明は、必要とする個体における疾患の治療における使用のための、本明細書に記載のT細胞活性化二重特異性抗原結合分子を提供する。特定の態様では、本発明は、融合タンパク質の治療的有効量を個体に投与することを含む、疾患を有する個体を治療する方法における使用のためのTNFファミリーリ

50

ガンド三量体含有抗原結合分子を提供する。特定の態様では、治療される疾患はがんである。がんの例には、固形腫瘍、膀胱がん、腎細胞癌、脳のがん、頭部及び頸部のがん、膵臓がん、肺がん、乳がん、卵巣がん、子宮がん、子宮頸がん、子宮内膜がん、食道がん、結腸がん、結腸直腸がん、直腸がん、胃がん、前立腺がん、血液がん、皮膚がん、扁平上皮癌、骨のがん、及び腎臓がん、メラノーマ、B細胞リンパ腫、B細胞白血病、非ホジキンリンパ腫及び急性リンパ芽球性白血病が含まれる。従って、がんの治療に使用のための本明細書に記載のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。治療を必要とする対象、患者、又は個体は、典型的には哺乳動物であり、具体的にはヒトである。

【0297】

別の態様では、感染症の治療における使用のための、特にウイルス感染症の治療のための、本明細書に記載のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。更なる態様では、例えば、ループス疾患のような自己免疫疾患の治療における使用のための、本明細書に記載のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。

【0298】

一態様では、頭頸部扁平上皮癌(HNSCC)、乳がん、結腸直腸がん(CRC)、膵臓がん(PAC)、胃がん、非小細胞肺癌(NSCLC)及び中皮腫の治療における使用のための、本発明によるTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供され、ここでその標的細胞抗原はFAPである。

【0299】

更なる態様では、本発明は、必要とする個体における疾患の治療のための医薬の製造又は調製におけるTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子の使用に関する。一態様では、本医薬は、疾患を有する個体に対し、医薬の治療的有効量を投与することを含む、疾患を治療する方法で使用するためのものである。特定の実施態様では、治療される疾患は増殖性疾患、特にがんである。従って、一態様では、本発明は、がんの治療用の医薬の製造又は調製における本発明のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子の使用に関する。がんの例には、固形腫瘍、膀胱がん、腎細胞癌、脳のがん、頭部及び頸部のがん、膵臓がん、肺がん、乳がん、卵巣がん、子宮がん、子宮頸がん、子宮内膜がん、食道がん、結腸がん、結腸直腸がん、直腸がん、胃がん、前立腺がん、血液がん、皮膚がん、扁平上皮癌、骨のがん、及び腎臓がん、メラノーマ、B細胞リンパ腫、B細胞白血病、非ホジキンリンパ腫及び急性リンパ芽球性白血病が含まれる。本発明のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を用いて治療することができる他の細胞増殖性疾患には、限定されないが、腹部、骨、乳房、消化器系、肝臓、膵臓、腹膜、内分泌腺(副腎、副甲状腺、下垂体、睾丸、卵巣、胸腺、甲状腺)、眼、頭部及び頸部、神経系(中枢及び末梢)、リンパ系、骨盤、皮膚、軟組織、脾臓、胸部、及び泌尿生殖器系に位置する腫瘍が含まれる。前がん性の状態又は病変及びがん転移も含まれる。特定の実施態様では、がんは、腎細胞がん、皮膚がん、肺がん、結腸直腸がん、乳がん、脳のがん、頭部及び頸部のがんからなる群より選択される。当業者は、場合によっては、TNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は治癒をもたらすことはできず、部分的な利益を提供し得るのみであることを認識し得る。幾つかの態様では、何らかの利益を有する生理学的変化も、治療的に有益であると考えられる。従って、幾つかの態様では、生理学的変化をもたらすTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子の量は、「有効量」又は「治療的有效量」と考えられる。

【0300】

更なる態様では、本発明は、感染症の治療のための、特にウイルス感染症の治療のための、又は自己免疫疾患、例えばループス疾患の治療のための医薬の製造又は調製における本明細書に記載のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子の使用に関する。

【0301】

更なる態様では、本発明は、本発明のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子の治療的有効量を前記個体に投与することを含む、個体における疾患を治療するための

10

20

30

40

50

方法を提供する。一態様では、薬学的に許容される形態の本発明の融合タンパク質を含む組成物が、前記個体に対して投与される。特定の態様では、治療される疾患は増殖性疾患である。特定の態様では、疾患はがんである。別の態様では、疾患は感染症又は自己免疫疾患である。特定の態様では、方法は更に、個体に対して少なくとも1つの追加的治療剤、例えば、治療される疾患ががんであれば抗がん剤の治療的有効量を投与することを含む。上記実施態様の何れかによる「個体」は、哺乳動物、好ましくはヒトであり得る。

【0302】

疾患の予防又は治療のために、本発明のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子の適切な用量は（単独で使用されるか、又は1つ以上の他の追加的治療剤との組み合わせで使用される時）、治療される疾患の種類、投与経路、患者の体重、融合タンパク質の種類、疾患の重症度及び経過、融合タンパク質が予防又は治療いずれの目的で投与されるか、以前又は同時の治療的介入、患者の病歴及び融合タンパク質に対する応答、並びに主治医の裁量に依存するであろう。いずれの場合にも、投与の責任を負う施術者は、組成物中の活性成分の濃度及び個々の対象のための適切な用量を決定するであろう。限定されないが、様々な時点にわたる、単一又は複数回投与、ボラス投与、パルス注入を含む様々な投与スケジュールが本明細書で考慮される。

10

【0303】

TNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、患者に対して、単回、又は一連の治療にわたって適切に投与される。疾患の種類及び重症度に応じて、例えば一回以上の別個の投与によるか、連続注入によるかに関わらず、約 $1\mu\text{g}/\text{kg} \sim 15\text{mg}/\text{kg}$ （例えば $0.1\text{mg}/\text{kg} \sim 10\text{mg}/\text{kg}$ ）のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が患者への投与のための初期候補用量となり得る。一つの典型的な一日の投与量は、上記の要因に応じて、約 $1\mu\text{g}/\text{kg} \sim 100\text{mg}/\text{kg}$ 以上の範囲であろう。数日間以上にわたる反復投与の場合には、状態に応じて、治療は疾患症状の望まれる抑制が起こるまで一般に持続されるであろう。融合タンパク質の一つの例示的な投与量は、約 $0.005\text{mg}/\text{kg} \sim 約10\text{mg}/\text{kg}$ の範囲であろう。他の例では、用量は、一回の投与につき、体重 1kg あたり約 $1\mu\text{g}$ 、体重 1kg あたり約 $5\mu\text{g}$ 、体重 1kg あたり約 $10\mu\text{g}$ 、体重 1kg あたり約 $50\mu\text{g}$ 、体重 1kg あたり約 $100\mu\text{g}$ 、体重 1kg あたり約 $200\mu\text{g}$ 、体重 1kg あたり約 $350\mu\text{g}$ 、体重 1kg あたり約 $500\mu\text{g}$ 、体重 1kg あたり約 1mg 、体重 1kg あたり約 5mg 、体重 1kg あたり約 10mg 、体重 1kg あたり約 50mg 、体重 1kg あたり約 100mg 、体重 1kg あたり約 200mg 、体重 1kg あたり約 350mg 、体重 1kg あたり約 500mg 、体重 1kg あたり約 1000mg 以上及びそこから導かれるあらゆる範囲を含み得る。本明細書に列挙した数値からの誘導可能な範囲の例では、上記の数値に基づいて、体重 1kg あたり約 $5\text{mg} \sim 体重1\text{kg}$ あたり約 100mg 、体重 1kg あたり約 $5\mu\text{g} \sim 体重1\text{kg}$ あたり約 500mg などを投与することができる。従って、約 $0.5\text{mg}/\text{kg}$ 、 $2.0\text{mg}/\text{kg}$ 、 $5.0\text{mg}/\text{kg}$ 又は $10\text{mg}/\text{kg}$ の一又は複数の用量（又はこれらの何れかの組み合わせ）を患者に投与してよい。このような用量は、断続的に、例えば毎週又は3週毎に（例えば患者が融合タンパク質の約2から約20用量、例えば約6用量を受けるように）投与され得る。初期の高負荷用量の後、一つ以上の低用量を投与してよい。しかしながら、他の投与レジメンも有用であり得る。この治療法の進行は、従来技術及びアッセイによって容易にモニターされる。

20

30

40

【0304】

本発明のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、一般に、意図された目的を達成するのに有効な量で使用される。疾患状態を治療又は予防するための使用のために、本発明のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子又はその薬学的組成物は、治療的有効量で投与又は適用される。治療上有効な量の決定は、特に本明細書で提供される詳細な開示を考慮すると、十分に当業者の能力の範囲内である。

【0305】

全身投与の場合、治療的有効量は、細胞培養アッセイのようなインビトロアッセイから

50

最初に推定することができる。次いで用量を、細胞培養物において決定される IC_{50} を含む循環濃度範囲を達成するために、動物モデルにおいて製剤化することができる。このような情報は、ヒトにおいて有用な用量を更に正確に決定するために使用することができる。

【0306】

初期投与量はまた、当技術分野で周知の技術を用いて、インビボデータ、例えば動物モデルから推定することもできる。当業者であれば、動物データに基づいて、ヒトへの投与を容易に最適化することができるであろう。

【0307】

投与量及び間隔は、治療効果を維持するのに十分な TNF ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子の血漿レベルを提供するために個々に調整されてもよい。注射による投与のための通常の患者投与量は、約 $0.1 \sim 50 \text{ mg/kg/day}$ 、典型的には約 $0.5 \sim 1 \text{ mg/kg/day}$ の範囲である。治療的に有効な血漿レベルは、毎日複数の用量を投与することにより達成することができる。血漿中のレベルは、例えば HPLC により測定することができる。

10

【0308】

局所投与又は選択的取り込みの場合、TNF ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子の有効な局所濃度は血漿濃度に関連していてもよい。当業者であれば、過度の実験をしなくとも、治療的に有効な局所投与量を最適化することができるであろう。

【0309】

本明細書に記載される TNF ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子の治療的に有効な用量は、一般に、実質的な毒性を引き起こすことなく治療上の利益を提供する。融合タンパク質の毒性及び治療効果は、細胞培養又は実験動物における標準の薬学的手順により決定することができる。LD₅₀ (集団の 50% に致死的な用量) 及び ED₅₀ (集団の 50% において治療的に有効な用量) を決定するために、細胞培養アッセイ及び動物試験を使用することができる。毒性効果と治療効果との間の用量比は、LD₅₀ / ED₅₀ の比として表すことができる治療指数である。大きな治療指数を示す TNF ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が好ましい。一実施態様では、本発明による TNF ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は高い治療指数を示す。細胞培養アッセイ及び動物研究から得られたデータは、ヒトにおける使用に適した一定範囲の投与量の製剤化に使用

20

30

【0310】

本発明の融合タンパク質を用いて治療される患者の主治医には、毒性、器官不全などにより、いつ及びどのようにして投与を終了、中断、又は調整するかが分かるであろう。逆に、主治医は、臨床応答が十分でなかった場合には (毒性なしで)、治療をより高いレベルに調整することも分かっているであろう。関心のある障害の管理において投与される用量の大きさは、治療される状態の重症度、投与経路などによって変動するであろう。例えば、状態の重症度は、部分的には標準の予後評価方法により評価される。更に、用量及び恐らくは投薬回数も、個々の患者の年齢、体重、及び応答に応じて変動するであろう。

40

【0311】

その他の薬剤及び治療

本発明の TNF ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、治療法において一又は複数の他の薬剤と組み合わせて投与され得る。例えば、本発明の融合タンパク質は、少なくとも 1 つの追加的治療剤と組み合わせて投与され得る。用語「治療剤」は、症状又は疾患を治療するために、そのような治療を必要とする個体に投与することができる任意の薬

50

剤を包含する。このような追加的治療剤は、治療される特定の徴候に適した任意の活性成分、好ましくは互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を有するものを含み得る。特定の実施態様では、追加的治療剤は別の抗がん剤である。

【0312】

このような他の薬剤は、好適には、意図した目的に有効な量で組み合わせられて存在する。このような他の薬剤の有効量は、製剤中に存在するタンパク質の量、疾患又は治療の種類、及び上記以外の要因に依存する。TNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、一般的に、本明細書に記載されるものと同じ用量及び投与経路において、又は本明細書に記載された用量の1%~99%で、又は経験的に/臨床的に妥当であると決定された任意の用量及び任意の経路により使用される。

10

【0313】

上記のこうした併用療法は、併用投与(2つ以上の治療剤が、同一又は別々の組成物に含まれている)、及び本発明のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子の投与が、追加の治療剤及び/又はアジュバントの投与の前、投与と同時、及び/又は投与の後に起こり得る個別投与を包含する。

【0314】

製造品

本発明の別の態様では、上述の障害の治療、予防及び/又は診断に有用な物質を含有する製品が提供される。製造品は、容器、及び容器表面の若しくは容器に付随するラベル又は添付文書を含む。好適な容器は、例としてボトル、バイアル、シリンジ、IV輸液バッグなどを含む。容器はガラス又はプラスチックなどの様々な材料から形成され得る。容器は、症状の治療、予防、及び/又は診断に有効な、単独の又はその他の組成物と併用される化合物を収容し、無菌のアクセスポートを有することができる(例えば、容器は皮下注射針により穿孔可能なストッパーを有する静脈内溶液のバッグ又はバイアルであってよい)。組成物中の少なくとも一つの活性な薬剤は、本発明のTNFリガンド三量体含有抗原結合分子である。

20

【0315】

ラベル又は添付文書は、組成物が選択された症状を治療するために使用されることを示している。更に、製造品は、(a)本発明のTNFリガンド三量体含有抗原結合分子を含有する組成物の中に含む第1の容器;及び(b)更なる細胞障害性又はその他の治療的薬剤の中に含む組成物を含む第2の容器を含み得る。本発明の本実施態様における製造品は、組成物を特定の症状を治療するために使用することができることを示す添付文書を更に含み得る。

30

【0316】

代替的に又は追加的に、製造品は、薬学的に許容される緩衝液、例えば注射用静菌水(BWFI)、リン酸緩衝生理食塩水、リンガー溶液、及びデキストロース溶液を含む第二(又は第三)の容器を更に含んでもよい。製造品は、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針及びシリンジを含む、商業的及び使用者の観点から望まれる他の材料を更に含んでもよい。

表 C(配列):

配列番号	名称	配列	
1	ヒト(hu)4-1BBL(71-254)	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSW YSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYVFFQLE LRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPP ASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHA WQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE	10
2	hu 4-1BBL (85-254)	LDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGG LSYKEDTKELVVAKAGVYVFFQLELRRVVAGEGSGSVS LALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQG RLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRV TPEIPAGLPSRSE	10
3	hu 4-1BBL (80-254)	DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGV SLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYVFFQLELRRVVAGEG SGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSA FGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATV LGLFRVTPEIPAGLPSRSE	20
4	hu 4-1BBL (52-254)	PWAVSGARASPGSAASPRREGPELSPDDPAGLLDLRQ GMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKE DTKELVVAKAGVYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHL QPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHL SAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIP AGLPSRSE	20
5	(G4S) ₂ リンカーにより連結 された三量体 hu 4-1BBL (71-254)	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSW YSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYVFFQLE LRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPP ASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHA WQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSEGGGGSGGGGS REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSW YSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYVFFQLE LRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPP ASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHA WQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSEGGGGSGGGGS REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSW YSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYVFFQLE LRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPP ASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHA WQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE	30
6	hu OX40L (51-183)	QVSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFILTSQKEDEIMKVQNN SVIINCDFYLISLKGYSQEVNISLHYQKDEEPLFQLKKVR SVNSLMVASLTYKDKVYLVNVTDDNTSLDDFHVNGGELILI HQNPGFCVL	40
7	hu OX40L (52-183)	VSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFILTSQKEDEIMKVQNN VIINCDFYLISLKGYSQEVNISLHYQKDEEPLFQLKKVRS VNSLMVASLTYKDKVYLVNVTDDNTSLDDFHVNGGELILIH QNPGEFCVL	40

配列番号	名称	配列
8	(G4S) ₂ リンカーにより連結された三量体 hu OX40L (51-183)	QVSHRYPRIQSIKVFTEYKKEKGFILTSQKEDEIMKVQNN SVIINCDFYLI SLKGYFSQEVNISLHYQKDEEPLFQLKKVR SVNSLMVASLTYKDKVYLVNVTDDNTSLDDFHVNGGELILI HQNPGEFCVLGGGGSGGGGSQVSHRYPRIQSIKVFTEY KKEKGFILTSQKEDEIMKVQNN SVIINCDFYLI SLKGYFSQ EVNISLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVASLTYKDKVYL NVTDDNTSLDDFHVNGGELILIHQNPGEFCVLGGGGSGG GGSQVSHRYPRIQSIKVFTEYKKEKGFILTSQKEDEIMKV QNN SVIINCDFYLI SLKGYFSQEVNISLHYQKDEEPLFQL KKVRSVNSLMVASLTYKDKVYLVNVTDDNTSLDDFHVNGG ELILIHQNPGEFCVL
9	FAP(28H1) CDR-H1	SHAMS
10	FAP(28H1) CDR-H2	AIWASGEQYYADSVKG
11	FAP(28H1) CDR-H3	GWLG NFDY
12	FAP(28H1) CDR-L1	RASQSVRSYLA
13	FAP(28H1) CDR-L2	GASTRAT
14	FAP(28H1) CDR-L3	QQGQVIPPT
15	三量体 hu 4-1BBL(71-254)Fc ノブ鎖	表 1 を参照
16	FAP(28H1) VH	EVQLLES GGLVQP GGLRLSCAASGFT FSSHAMS WVRQAPGKGLEWVSAIWASGEQYYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGLGNFDYW GQGT LVT VSS
17	FAP(28H1) VL	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVRSYLA W YQQKPGQAPRLLIIGASTRATGIPDRFSGSGSGTDFT LTISRLEPEDFAVYYCQQGQVIPPTFGQGTKVEIK
18	FAP(28H1) Fc ホール鎖	表 1 を参照
19	FAP(28H1) 軽鎖	表 1 を参照
20	三量体 hu OX40L(51-183)-Fc ノブ鎖	表 27 を参照
21	ヒト(hu) FAP	UniProt 番号 Q12884
22	hu FAP エクトドメイン+ポリlys タグ+his ₆ タグ	RPSRVHNSEENTMRALTLKDILNGTFSYKTFPPNWISGQE YLHQ SADNNIVLYNIETGQSYTILSNRTMKS VNASNYGLS PDRQFVYLESDYSKLWRYSYTATYYIDL SNGEFV RGNEL PRPIQYL CWSPV GSKLAYVYQNNIYLKQRPGDPPFQITFN GRENKIFNGIPDWVYEEEMLATKYALWSPNGKFLAYAEF NDTDIPVIAYSYYGDEQYPR TINIPY PKAGAKNPVVRIFIIDT TYPAYVGPQEVVPAMIASSDYF SWL TWV TDERVCLQW LKR VQNVSVLSICDFREDWQ TWDCPKTQEHIIESRTGWA GGFFVSTPVFSYDAISYYKIFSDKDG YKHIHYIKDTVENAIQ ITSGKWEAINIFRVTQDSL FYSSNEFEEYPGRRNIYRISIGSY PPSKKCVTCHLRKERCQYYTASFSDYAKYYALVCYGP GI PISTLHDGR TDQEIKILEENKELENALKNIQLPKEEIKKLEVD EITLWYKMILPPQFDRSKYPLLIQVYGGPCSQSVRSVFA

10

20

30

40

配列番号	名称	配列
		VNWISYLASKEGMVIALVDGRGTAFFQGDKLLYAVYRKLGV YEVEDQITAVRKFIEMGFIDEKRIAIWGSYGGYVSSSLALA SGTGLFKCGIAPVSSWEYASVYTERFMGLPTKDDNL EHYKNSTVMARAEYFRNVDYLLIHGTADDNVHFQNSAQIA KALVNAQVDFQAMWYSQNHGLSGLSTNHLYTHMTHFL KQCFSLSDGKKKKKKGHHHHHH
23	hu FAP エクトドメイン+ポリ lys タグ+his ₆ タグのヌクレオ チド配列	CGCCCTTCAAGAGTTCATAACTCTGAAGAAAATACAA TGAGAGCACTCACACTGAAGGATATTTTAAATG GAACATTTTCTTATAAAACATTTTTTCCAACTGGATT TCAGGACAAGAATATCTTCATCAATCTGCAGATAACAA TATAGTACTTTATAATATTGAAACAGGACAATCATATA CCATTTTGAGTAATAGAACCATGAAAAGTGTGAATGCT TCAAATTACGGCTTATCACCTGATCGGCAATTTGTATA TCTAGAAAGTGATTATTCAAAGCTTTGGAGATACTCTT ACACAGCAACATATTACATCTATGACCTTAGCAATGG AGAATTTGTAAGAGGAAAATGAGCTTCCTCGTCCAATT CAGTATTTATGCTGGTCGCCTGTTGGGAGTAAATTAG CATATGTCTATCAAACAATATCTATTTGAAACAAAGA CCAGGAGATCCACCTTTTCAAATAACATTTAATGGAAG AGAAAATAAAATATTTAATGGAATCCCAGACTGGGTTT ATGAAGAGGAAATGCTTGCTACAAAATATGCTCTCTG GTGGTCTCCTAATGGAAAATTTTTGGCATATGCGGAAT TTAATGATACGGATATAACCAGTTATTGCCTATTCTAT TATGGCGATGAACAATATCCTAGAACAATAAATATTCC ATACCCAAAGGCTGGAGCTAAGAATCCCGTTGTTCCGG ATATTTATTATCGATACCACTTACCCTGCGTATGTAGG TCCCAGGAAGTGCCTGTTCCAGCAATGATAGCCTCA AGTGATTATTATTTAGTTGGCTCACGTGGGTTACTGA TGAACGAGTATGTTTGCAGTGGCTAAAAAGAGTCCAG AATGTTTCGGTCTGTCTATATGTGACTTCAGGGAAGA CTGGCAGACATGGGATTGTCCAAAGACCCAGGAGCAT ATAGAAGAAAGCAGAACTGGATGGGCTGGTGGATTCT TTGTTTCAACACCAGTTTTTCACTATGATGCCATTTTCG TACTACAAAATATTTAGTGACAAGGATGGCTACAAACA TATTCATATATCAAAGACACTGTGAAAATGCTATTC AAATTACAAGTGGCAAGTGGGAGGCCATAAATATATT CAGAGTAACACAGGATTCAGTGTATTTATTCTAGCAATG AATTTGAAGAATACCCTGGAAGAAGAAACATCTACAG AATTAGCATTGGAAGCTATCCTCCAAGCAAGAAGTGT GTTACTTGCCATCTAAGGAAAGAAAGGTGCCAATATT ACACAGCAAGTTTACGCGACTACGCCAAGTACTATGC ACTTGTCTGCTACGGCCCAGGCATCCCCATTTCCACC CTTTCATGATGGACGCACTGATCAAGAAATTAATAATCCT GGAAGAAAACAAGGAATTGAAAATGCTTTGAAAAT ATCCAGCTGCCTAAAGAGGAAATTAAGAACTTGAAG TAGATGAAATTACTTTATGGTACAAGATGATTCTTCTCCT

10

20

30

40

配列番号	名称	配列
		CCTCAATTTGACAGATCAAAGAAGTATCCCTTGCTAAT TCAAGTGTATGGTGGTCCCTGCAGTCAGAGTGAAGG TCTGTATTTGCTGTTAATTGGATATCTTATCTTGCAAG TAAGGAAGGGATGGTCATTGCCTTGGTGGATGGTCGA GGAACAGCTTTCCAAGGTGACAAACTCCTCTATGCAG TGTATCGAAAGCTGGGTGTTTATGAAGTTGAAGACCA GATTACAGCTGTCAGAAAATTCATAGAAATGGGTTTCA TTGATGAAAAAAGAATAGCCATATGGGGCTGGTCCTA TGGAGGATACGTTTCATCACTGGCCCTTGCATCTGGA ACTGGTCTTTTCAAATGTGGTATAGCAGTGGCTCCAG TCTCCAGCTGGGAATATTACGCGTCTGTCTACACAGA GAGATTCATGGGTCTCCAACAAAGGATGATAATCTT GAGCACTATAAGAATTCAACTGTGATGGCAAGAGCAG AATATTTAGAAAATGTAGACTATCTTCTCATCCACGGA ACAGCAGATGATAATGTGCACTTTCAAAACCTCAGCAC AGATTGCTAAAGCTCTGGTTAATGCACAAGTGGATTTT CAGGCAATGTGGTACTCTGACCAGAACCACGGCTTAT CCGGCCTGTCCACGAACCACTTATACACCCACATGAC CCACTTCTAAAGCAGTGTCTTCTTTGTGACACGGC AAAAAGAAAAAGAAAAAGGGCCACCACCATCACCATC AC
24	マウス FAP	UniProt 番号 P97321
25	マウス FAP エクトドメイン+ ポリ lys タグ+his ₆ タグ	RPSRVYKPEGNTKRALTLKDILNGTFSYKTYFPNWISEQE YLHQSEDDNIVFYNIETRESYIILSNSTMKSVNATDYGLSP DRQFVYLESDYSKLRYSYATYYYIYDLQNGEFVRYGELP RPIQYLCWSPVGSKLAYVYQNNIYLKQRPDPPFQITYTG RENRIFNGIPDWVYEEEMLATKYALWWSPDGKFLAYVEFN DSDIPIIAYSYYGDGQYPRITINIPYKAGAKNPVVRVIVDT TYPHHVGPMEVPPEMIASSDYFWSLWVSSERVCLQW LKRVQNVSVLSICDFREDWHAWCEPKNQEHEVESRTGWA GGFFVSTPAFSQDATSYKIFSDKDGKHIHYIKDTVENAI QITSGKWEAIYIFRVTQDSLFISSNEFEGYPGRRNIYRISIG NSPPSKKCVTCHLRKERCQYYTASFYKAKYYALVCYGP GLPISTLHDGRTDQEIQVLEENKELENSLRNIQLPKVEIKKL KDGGLTFWYKMLPPQFDRSKKYPLLIQVYGGPCSQSVKS VFAVNWITYLASKEGIVIALVDGRGTAFGQDKFLHAVYRK LGVYEVEDQLTAVRKFIEMGFIDEERIAIWGWSYGGYVSSL ALASGTGLFKCGIAPVSSWEYASIYSERFMGLPTKDD NLEHYKNSTVMARAEYFRNVDYLLIHGTADDNVHFQNSA QIAKALVNAQVDFQAMWYSQNHGILSGRSQNHLYTHMT HFLKQCFSLSDGKKKKKKGHHHHHH
26	マウス FAP エクトドメイン+ ポリ lys タグ+his ₆ タグのヌク レオチド配列	CGTCCCTCAAGAGTTTACAAACCTGAAGGAAACACAA AGAGAGCTCTTACCTTGAAGGATATTTTAAATG GAACATTCTCATATAAAACATATTTTCCAACCTGGATT TCAGAACAAGAATATCTTCATCAATCTGAGGATGATAA CATAGTATTTTATAATATTGAAACAAGAGAATCATATA

10

20

30

40

配列番号	名称	配列
		TCATTTTGAGTAATAGCACCATGAAAAGTGTGAATGCT ACAGATTATGGTTTGTACCTGATCGGCAATTTGTGTA TCTAGAAAGTGATTATTCAAAGCTCTGGCGATATTCAT ACACAGCGACATACTACATCTACGACCTCAGAATGG GGAATTTGTAAGAGG ATACGAGCTCCCTCGTCCAATTCAGTATCTATGCTGG TCGCCTGTTGGGAGTAAATTAGCATATGTATATCAAAA CAATATTTATTTGAAACAAAGACCAGGAGATCCACCTT TTCAAATAACTTATACTGGAAGAGAAAATAGAATATTT AATGGAATACCAGACTGGGTTTATGAAGAGGAAATGC TTGCCACAAAATATGCTCTTTGGTGGTCTCCAGATGG AAAATTTTTGGCATATGTAGAATTTAATGATTCAGATA TACCAATTATTGCCTATTCTTATTATGGTGATGGACAG TATCCTAGAACTATAAATATTCCATATCCAAAGGCTGG GGCTAAGAATCCGGTTGTTGTTGTTTTATTGTTGACA CCACCTACCTCACCACGTGGGCCAATGGAAGTGCC AGTTCCAGAAATGATAGCCTCAAGTACTATTATTTCA GCTGGCTCACATGGGTGTCCAGTGAACGAGTATGCTT GCAGTGGCTAAAAAGAGTGCAGAATGTCTCAGTCTG TCTATATGTGATTTTCAAGGAAGACTGGCATGCATGGG AATGTCCAAAGAACCAGGAGCATGTAGAAGAAAGCAG AACAGGATGGGCTGGTGGATTCTTTGTTTCGACACCA GCTTTTAGCCAGGATGCCACTTCTTACTACAAAATATT TAGCGACAAGGATGGTTACAAACATATTCACTACATC AAAGACACTGTGGAAAATGCTATTCAAATTACAAGTG GCAAGTGGGAGGCCATATATATATTCCGCGTAACACA GGATTCACTGTTTTATTCTAGCAATGAATTTGAAGTT ACCCTGGAAGAAGAAACATCTACAGAATTAGCATTGG AAATCTCCTCCGAGCAAGAAGTGTGTTACTTGCCAT CTAAGGAAAGAAAGGTGCCAATATTACACAGCAAGTT TCAGCTACAAAGCCAAGTACTATGCACTCGTCTGCTA TGGCCCTGGCCTCCCCATTTCCACCCTCCATGATGGC CGCACAGACCAAGAAATACAAGTATTAGAAGAAAACA AAGAACTGGAAAATTCTCTGAGAAATATCCAGCTGCC TAAAGTGGAGATTAAGAAGCTCAAAGACGGGGGACTG ACTTTCTGGTACAAGATGATTCTGCCTCCTCAGTTTGA CAGATCAAAGAAGTACCCTTTGCTAATTC AAGTGTATG GTGGTCTTGTAGCCAGAGTGTTAAGTCTGTGTTTGT GTTAATTGGATAACTTATCTCGCAAGTAAGGAGGGGA TAGTCATTGCCCTGGTAGATGGTCCGGGCACTGCTTT CCAAGGTGACAAATTCCTGCATGCCGTGTATCGAAAA CTGGGTGTATATGAAGTTGAGGACCAGCTCACAGCTG TCAGAAAATTCATAGAAATGGGTTTTATTGATGAAGAA AGAATAGCCATATGGGGCTGGTCTACGGAGGTTATG TTTTCATCCCTGGCCCTTGCATCTGGAAGTGGTCTTTTC AAATGTGGCATAGCAGTGGCTCCAGTCTCCAGCTGGG

10

20

30

40

配列番号	名称	配列
		AATATTACGCATCTATCTACTCAGAGAGATTCATGGGC CTCCCAACAAAGGACGACAATCTCGAACACTATAAAA ATTCAACTGTGATGGCAAGAGCAGAATATTTTCAGAAAT GTAGACTATCTTCTCATCCACGGAACAGCAGATGATA ATGTGCACTTTCAGAACTCAGCACAGATTGCTAAAGC TTTGGTTAATGCACAAGTGGATTTCCAGGCGATGTGG TACTCTGACCAGAACCATGGTATATTATCTGGGCGCT CCCAGAATCATTTATATACCCACATGACGCACTTCT CAAGCAATGCTTTTTCTTTATCAGACGGCAAAAAGAAA AAGAAAAAGGGCCACCACCATCACCATCAC
27	カニクイザル FAP エクトドメイン+ポリ lys タグ+his ₆ タグ	RPPRVHNSEENTMRALTKDILNGTFSYKTFNPNWISGQE YLHQSadNNIVLYNIETGQSYTILSNRTMKSvNASNYGLS PDRQFVYLESDYskLWRYSYtATYYIYDLsNGEFVrgNEL PRPIQYLcWSPVgSKLayVYqNNIYLKQRPGDPPFQITFN GREnkIFngIPDwVYEEeMLATkYALwWSPngKFLayAEf NDtDIPvIAYSyYGdEQYPRtINIPYpKAGAKNPFVRIFIIDT TYPAYVGPQEVpPAMIAsSDYYfSWLtwVtDERVclQw LKRvQNVsvLSiCdfREDwQtwDcPKtQEHIEESRTGWA GGfFvStPvFSyDAISyYkIFsDKDgYkHIHYIKDtvENAIQ ITSGkWEAINIFrvtQdSLfYSSNEfEDYpGRrNIYrISIGS YPPSKKcvtChLRkERCqYYtAsfSDYakYYALvcYgPg IPIStLHDgrtdQEIKILEENKELENAlkNIQLPKEEIKKLEv DEITLWYkMILPPqFDRsKkYPLLIQVYGGpCSQSVrSVf AVNWISyLAsKEGMvIALvDGRgtAFqGDKLLyAVYrKlG VYEVeDQITAVrKfIEMGFIDeKRIAIWGSyGGYvSSLAL ASGTGLfKCGIaVAPvSSWEyYASvYTERfMGLpTKDDN LEHYKNStVMARAEYFRnVDYLLIHGTADDNVHFQNSAQI AKALVNAQVDFQAMWYSdQNHGLSGLSTNHLYTHMTHf LKQCfSLSDGKkkkkkKghHHHHH
28	カニクイザル FAP エクトドメイン+ポリ lys タグ+his ₆ タグのヌクレオチド配列	CGCCCTCCAAGAGTTCATAACTCTGAAGAAAATACAA TGAGAGCACTCACACTGAAGGATATTTTAAATG GGACATTTTCTTATAAAACATTTTTTCCAACTGGATT TCAGGACAAGAATATCTTCATCAATCTGCAGATAACAA TATAGTACTTTATAATATTGAAACAGGACAATCATATA CCATTTTGAGTAACAGAACCATGAAAAGTGTGAATGC TTCAAATTATGGCTTATCACCTGATCGGCAATTTGTAT ATCTAGAAAGTGATTATTCAAAGCTTTGGAGATACTCT TACACAGCAACATATTACATCTATGACCTTAGCAATGG AGAATTTGTAAGAGGAAATGAGCTTCTCGTCCAATT CAGTATTTATGCTGGTCGCCTGTTGGGAGTAAATTAG CATATGTCTATCAAAACAATATCTATTTGAAACAAAGA CCAGGAGATCCACCTTTTCAAATAACATTTAATGGAAG AGAAAATAAAATATTTAATGGAATCCCAGACTGGGTTT ATGAAGAGGAAATGCTTGCTACAAAATATGCTCTCTG GTGGTCTCCTAATGGAAAATTTTTGGCATATGCGGAAT TTAATGATACAGATATACCAGTTATTGCCTATTCCTAT

10

20

30

40

配列番号	名称	配列
		<p>TATGGCGATGAACAATATCCCAGAACAATAAATATTCC ATACCCAAAGGCCGGAGCTAAGAATCCTTTTGTTCGG ATATTTATTATCGATACCACTTACCCTGCGTATGTAGG TCCCAGGAAGTGCCTGTTCCAGCAATGATAGCCTCA AGTGATTATTATTTAGTTGGCTCACGTGGGTTACTGA TGAACGAGTATGTTTGCAGTGGCTAAAAGAGTCCAG AATGTTTCGGTCTTGTCTATATGTGATTTTCAGGGAAGA CTGGCAGACATGGGATTGTCCAAAGACCCAGGAGCAT ATAGAAGAAAGCAGAACTGGATGGGCTGGTGGATTCT TTGTTTCAACACCAGTTTTTCAGCTATGATGCCATTTCA TACTACAAAATATTTAGTGACAAGGATGGCTACAAACA TATTCATATATCAAAGACACTGTGGAAAATGCTATTC AAATTACAAGTGGCAAGTGGGAGGCCATAAATATATT CAGAGTAACACAGGATTCACTGTTTTATTCTAGCAATG AATTTGAAGATTACCCTGGAAGAAGAAACATCTACAG AATTAGCATTGGAAGCTATCCTCCAAGCAAGAAGTGT GTTACTTGCCATCTAAGGAAAGAAAGGTGCCAATATT ACACAGCAAGTTTCAGCGACTACGCCAAGTACTATGC ACTTGTCTGCTATGGCCCAGGCATCCCATTTCCACC CTTCATGACGGACGCACTGATCAAGAAATTTAAATCC TGGAAGAAAACAAGGAATTGAAAATGCTTTGAAAAA TATCCAGCTGCCTAAAGAGGAAATTAAGAACTTGAA GTAGATGAAATTACTTTATGGTACAAGATGATTCTTCC TCCTCAATTTGACAGATCAAAGAAGTATCCCTTGCTAA TTCAAGTGTATGGTGGTCCCTGCAGTCAGAGTGTAAG GTCTGTATTTGCTGTTAATTGGATATCTTATCTTGCAA GTAAGGAAGGGATGGTCATTGCCTTGGTGGATGGTCG GGGAACAGCTTTCCAAGGTGACAACTCCTGTATGCA GTGTATCGAAAGCTGGGTGTTTATGAAGTTGAAGACC AGATTACAGCTGTCAGAAAATTCATAGAAATGGGTTTT ATTGATGAAAAAGAATAGCCATATGGGGCTGGTCCT ATGGAGGATATGTTTCATCACTGGCCCTTGCATCTGG AACTGGTCTTTTCAAATGTGGGATAGCAGTGGCTCCA GTCTCCAGCTGGGAATATTACGCGTCTGTCTACACAG AGAGATTCATGGGTCTCCCAACAAAGGATGATAATCT TGAGCACTATAAGAATTCAACTGTGATGGCAAGAGCA GAATATTTTCAGAAATGTAGACTATCTTCTCATCCACGG AACAGCAGATGATAATGTGCACTTTCAAACACTCAGCA CAGATTGCTAAAGCTCTGGTTAATGCACAAGTGGATTT CCAGGCAATGTGGTACTCTGACCAGAACCACGGCTTA TCCGGCCTGTCCACGAACCACTTATACACCCACATGA CCCCTTCTAAAGCAGTGTCTTCTTTGTCAGACGG CAAAAAGAAAAAGAAAAAGGGCCACCACCATCACCAT CAC</p>
29	ヒト CEA	UniProt 番号 P06731
30	ヒト MCSP	UniProt 番号 Q6UVK1

10

20

30

40

配列番号	名称	配列
31	ヒト EGFR	UniProt 番号 P00533
32	ヒト CD19	UniProt 番号 P15391
33	ヒト CD20	UniProt 番号 P11836
34	ヒト CD33	UniProt 番号 P20138
35	ヒトリンホトキシン β	UniProt 番号 P01374
36	ヒト TNF	UniProt 番号 P01375
37	ヒトリンホトキシン β	UniProt 番号 Q06643
38	ヒト OX40L	UniProt 番号 P23510
39	ヒト CD40L	UniProt 番号 P29965
40	ヒト FasL	UniProt 番号 P48023
41	ヒト CD27L	UniProt 番号 P32970
42	ヒト CD30L	UniProt 番号 P32971
43	ヒト 4-1BBL	UniProt 番号 P41273
44	ヒト TRAIL	UniProt 番号 P50591
45	ヒト RANKL	UniProt 番号 O14788
46	ヒト TWEAK	UniProt 番号 O43508
47	ヒト TWEAK	UniProt 番号 O75888
48	ヒト BAFF	UniProt 番号 Q9Y275
49	ヒト LIGHT	UniProt 番号 O43557
50	ヒト TL1A	UniProt 番号 O95150
51	ヒト GITRL	UniProt 番号 Q9UNG2
52	ヒトエクトジスプラシン A	UniProt 番号 Q92838
53	hu 4-1BBL (50-254)	ACPWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDL RQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSY KEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLAL HLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLL HLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVGLGFRVTP EIPAGLPSRSE
54	ペプチドリンカー-(G4S) ₂	GGGGSGGGGS
55	ペプチドリンカー-(SG4) ₂	SGGGGSGGGG
56	ペプチドリンカー-G4(SG4) ₂	GGGGSGGGGSGGGG
57	ペプチドリンカー	GSPGSSSSGS
58	ペプチドリンカー-(G4S) ₄	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
59	ペプチドリンカー	GSGSGNGS
60	ペプチドリンカー	GGSGSGSG
61	ペプチドリンカー	GGSGSG
62	ペプチドリンカー	GGSG
63	ペプチドリンカー	GGSGNGSG
64	ペプチドリンカー	GGNGSGSG
65	ペプチドリンカー	GGNGSG
66	三量体 hu 4-1BBL(71-	表 1 を参照

10

20

30

40

配列番号	名称	配列
	254)Fc ノブ鎖のヌクレオチド配列	
67	FAP(28H1) Fc ホール鎖のヌクレオチド配列	表 1 を参照
68	FAP(28H1)軽鎖のヌクレオチド配列	表 1 を参照
69	DP47 Fc ホール鎖のヌクレオチド配列	表 19 を参照
70	ヌクレオチド配列 DP47 軽鎖	表 19 を参照
71	DP47 Fc ホール鎖	表 19 を参照
72	DP47 軽鎖	表 19 を参照
73	ヒト 4-1BB ECD	Uniprot 番号 Q07011、aa24-186
74	カニクイザル 4-1BB ECD	aa 24-186
75	マウス 4-1BB ECD	Uniprot 番号 P20334、aa24-187
76	Fc ホール鎖のヌクレオチド配列	表 24 を参照
77	ヒト 4-1BB Fc ノブ鎖のヌクレオチド配列	表 24 を参照
78	カニクイザル 4-1BB Fc ノブ鎖のヌクレオチド配列	表 24 を参照
79	マウス 4-1BB Fc ノブ鎖のヌクレオチド配列	表 24 を参照
80	Fc ホール鎖	表 24 を参照
81	ヒト 4-1BB Fc ノブ鎖	表 24 を参照
82	カニクイザル 4-1BB Fc ノブ鎖	表 24 を参照
83	マウス 4-1BB Fc ノブ鎖	表 24 を参照
84	Avi タグ	GLNDI FEAQK IEWHE
85	ヒト 4-1BB His のヌクレオチド配列	表 25 を参照
86	ヒト 4-1BB His	表 25 を参照
87	三量体 hu OX40L(51-183) Fc ノブ鎖のヌクレオチド配列	表 27 を参照
88	ヒト OX40 ECD	Uniprot 番号 P43489、aa29-214
89	カニクイザル OX40 ECD	aa 29-214
90	マウス OX40 ECD	Uniprot 番号 P47741、aa10-211
91	ヒト OX40 Fc ノブ鎖のヌクレオチド配列	表 30 を参照
92	カニクイザル OX40 Fc ノブ	表 30 を参照

10

20

30

40

配列番号	名称	配列
	鎖のヌクレオチド配列	
93	マウス OX40 Fc ノブ鎖のヌクレオチド配列	表 30 を参照
94	ヒト OX40 Fc ノブ鎖	表 30 を参照
95	カニクイザル OX40 Fc ノブ鎖	表 30 を参照
96	マウス OX40 Fc ノブ鎖	表 30 を参照
97	ヒト OX40 His のヌクレオチド配列	表 31 を参照
98	ヒト OX40 His	表 31 を参照
99	ヒト(hu) 4-1BBL (71-248)	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSW YSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYVFFQLE LRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPP ASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHA WQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
100	hu 4-1BBL (85-248)	LDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGL SYKEDTKELVVAKAGVYVFFQLELRRVVAGEGSGSVS LALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGR LLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRV TPEIPAGL
101	hu 4-1BBL (80-248)	DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGV SLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYVFFQLELRRVVAGEG SGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSA FGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATV LGLFRVTPEIPAGL
102	hu 4-1BBL (52-248)	PWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQ GMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKE DTKELVVAKAGVYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHL QPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHL SAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIP AGL
103	(G4S) ₂ リンカーにより連結された三量体 hu 4-1BBL (71-248)	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSW YSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYVFFQLE LRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPP ASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHA WQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLEGGGGSGGGGSREGPE LSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPG LAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYVFFQLELRRVV AGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEA RNAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQ GATVLGLFRVTPEIPAGLGGGGSGGGGSREGPELSPDDP AGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSL TGGLSYKEDTKELVVAKAGVYVFFQLELRRVVAGEGSG SVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFG FQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLG

10

20

30

40

配列番号	名称	配列
		LFRVTPEIPAGL
104	FAP(4B9) CDR-H1	SYAMS
105	FAP(4B9) CDR-H2	AIIGSGASTYYADSVKG
106	FAP(4B9) CDR-H3	GWFGGFNY
107	FAP(4B9) CDR-L1	RASQSVTSSYLA
108	FAP(4B9) CDR-L2	VGSRRAT
109	FAP(4B9) CDR-L3	QQGIMLPPT
110	FAP(4B9) VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR QAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGTTLTVS S
111	FAP(4B9) VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAWYQQ KPGQAPRLLINVGSRRTATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIK
112	CEA(sm9b) CDR-H1	DSYMH
113	CEA(sm9b) CDR-H2	WIDPENGDEYAPKFQG
114	CEA(sm9b) CDR-H3	GTPTGPYYFDY
115	CEA(sm9b) CDR-L1	SASSVPMH
116	CEA(sm9b) CDR-L2	STSNLAS
117	CEA(sm9b) CDR-L3	QQRSSYPLT
118	CEA(sm9b) VH	QVKLEQSGAEVVKPGASVKLSCKASGFNIKDSYMHWLRQ GPGQCLEWIGWIDPENGDEYAPKFQKATFTTDSANT AYLGLSSLRPEDTAVYYCNEGTPTPGYYFDYWGQGTTLV VSS
119	CEA(sm9b) VL	ENVLTQSPSSMSVSVGDRVTIACSSASSVPMHWLQQK PGKSPKLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYSLTISSVQ PEDAATYYCQQRSSYPLTFGCGTKLEIK
120	CD19 (8B8-018) CDR-H1	DYIMH
121	CD19 (8B8-018) CDR-H2	YINPYNDGSKYTEKFQG
122	CD19 (8B8-018) CDR-H3	GTYYYGSALFDY
123	CD19 (8B8-018) CDR-L1	KSSQSLENPNGNTYLN
124	CD19 (8B8-018) CDR-L2	RVSKRFS
125	CD19 (8B8-018) CDR-L3	LQLTHVPYT
126	CD19 (8B8-018) VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVR QAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSIS TAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYSALFDYWGQGT TVTSS
127	CD19 (8B8-018) VL	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLENPNGNTYLN WYLQKPGQSPQLLIYRVSKRFSGVPDFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDVGVYYCLQLTHVPYTFGQGTKLEIK
128	CD19 (8B8-2B11) CDR-H1	DYIMH
129	CD19 (8B8-2B11) CDR-H2	YINPYNDGSKYTEKFQG
130	CD19 (8B8-2B11) CDR-H3	GTYYYGPQLFDY
131	CD19 (8B8-2B11) CDR-L1	KSSQSLETSTGTTYLN
132	CD19 (8B8-2B11) CDR-L2	RVSKRFS

10

20

30

40

配列番号	名称	配列
133	CD19 (8B8-2B11) CDR-L3	LQLLEDPYT
134	CD19 (8B8-2B11) VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDYIMHWVR QAPGGGLEWWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSIS TAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGPQLFDYWGGGT TVTSS
135	CD19 (8B8-2B11) VL	DIVMTQTPLSLSVTPGGQPASISCKSSQSLETSTGTTYLNW YLQKPGQSPQLLIYRVSKRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCLQLLEDPYTFGQGTKLEIK
136	G4S	GGGGS
137	抗 FAP(4B9) Fc ホール鎖 のヌクレオチド配列	表 3
138	三量体 hu 4-1BBL(71- 254)に融合した抗 FAP (4B9)Fc ノブ鎖のヌクレオ チド配列	表 3
139	抗 FAP(4B9) 軽鎖のヌクレ オチド配列	表 3
140	抗 FAP(4B9) Fc ホール鎖	表 3
141	三量体 hu 4-1BBL(71- 254)に融合した抗 FAP (4B9)Fc ノブ鎖	表 3
142	抗 FAP(4B9) 軽鎖	表 3
143	抗 CEA(sm9b) Fc ホール鎖 のヌクレオチド配列	表 5
144	三量体 hu 4-1BBL(71- 254)に融合した抗 CEA (sm9b)Fc ノブ鎖のヌクレオ チド配列	表 5
145	抗 CEA(sm9b) 軽鎖のヌク レオチド配列	表 5
146	抗 CEA(sm9b) Fc ホール鎖	表 5
147	三量体 hu 4-1BBL(71- 254)に融合した抗 CEA (sm9b)Fc ノブ鎖	表 5
148	抗 CEA(sm9b) 軽鎖	表 5
149	抗 CD19(8B8-018) Fc ホー ル鎖のヌクレオチド配列	表 7
150	三量体 hu 4-1BBL(71- 254)に融合した抗 CD19 (8B8-018)Fc ノブ鎖のヌク レオチド配列	表 7
151	抗 CD19(8B8-018) 軽鎖の	表 7

10

20

30

40

配列番号	名称	配列
	ヌクレオチド配列	
152	抗 CD19(8B8-018) Fc ホール鎖	表 7
153	三量体 hu 4-1BBL(71-254)に融合した抗 CD19(8B8-018)Fc ノブ鎖	表 7
154	抗 CD19(8B8-018) 軽鎖	表 7
155	抗 CD19(8B8-2B11) Fc ホール鎖のヌクレオチド配列	表 8
156	三量体 hu 4-1BBL(71-254)に融合した抗 CD19(8B8-2B11)Fc ノブ鎖のヌクレオチド配列	表 8
157	抗 CD19(8B8-2B11) 軽鎖のヌクレオチド配列	表 8
158	抗 CD19(8B8-2B11) Fc ホール鎖	表 8
159	三量体 hu 4-1BBL(71-254)に融合した抗 CD19(8B8-2B11)Fc ノブ鎖	表 8
160	抗 CD19(8B8-2B11) 軽鎖	表 8
161	HVR-L1 抗 CD19(8B8)	NSNGNT
162	HVR-H2 抗 CD19(8B8)	KFNG
163	HYRF 変異を有する Fc ホール鎖のヌクレオチド配列	表 13
164	ヒト CD19 抗原 Fc ノブ鎖の avi タグのヌクレオチド配列	表 13
165	HYRF 変異を有する Fc ホール鎖	表 13
166	ヒト CD19 抗原 Fc ノブ鎖の avi タグ	表 13
167	カニクイザル CD19 抗原 Fc ノブ鎖の avi タグのヌクレオチド配列	表 13
168	カニクイザル CD19 抗原 Fc ノブ鎖の avi タグ	表 13
169	CD19 (8B8) VH のヌクレオチド配列 親クローン	GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAA AGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGGCCTGCAAGGCTTC TGGATACACATTCAGTACTATATTATGCACTGGGTGA AGCAGAAGACTGGGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATA TATTAATCCTTACAATGATGGTTCTAAGTACACTGAGA AGTTCAACGGCAAGGCCCACTGACTTCAGACAAATC

10

20

30

40

配列番号	名称	配列
		TTCCATCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGACC TCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGAGGGA CCTATTATTATGGTAGCGCCCTCTTTGACTACTGGGG CCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCG
170	CD19 (8B8) VL のヌクレオチド配列 親クローン	GATGCTGTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTG TCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGGTC TAGTCAGAGCCTTGAAAACAGTAATGGAAAACACCTAT TTGAACTGGTACCTCCAGAAAACCAGGCCAGTCTCCAC AACTCCTGATCTACAGGGTTTCCAAACGATTTTCTGG GGTCCTAGACAGGTTTCAGTGGTAGTGGATCAGGGACA GATTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGG ATTTGGGAGTTTATTTCTGCCTACAACCTTACACATGTC CCGTACACGTTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAATAA AA
171	CD19 L1 リバースランダム	表 15 を参照
172	CD19 L2 フォワードランダム	表 15 を参照
173	CD19 H1 リバースランダム	表 15 を参照
174	CD19 H2 フォワードランダム	表 15 を参照
175	CD19 H3 リバースコンスタント	表 15 を参照
176	LMB3	表 15 を参照
177	CD19 L1 フォワードコンスタント	表 16 を参照
178	CD19 L3 リバースランダム	表 16 を参照
179	CD19 L3 フォワードコンスタント	表 16 を参照
180	CD19 H3 リバースランダム	表 16 を参照
181	三量体 hu 4-1BBL(71-254)に融合した DP47 Fc ノブのヌクレオチド配列	表 21 を参照
182	三量体 hu 4-1BBL(71-254)に融合した DP47 Fc ノブ	表 21 を参照
183	CMV 由来ペプチド	NLVPMVATV

10

20

30

40

【 0 3 1 7 】

以下において、本発明の特定の実施態様が列挙される：

- (a) 標的細胞抗原に特異的に結合することができる少なくとも 1 つの部分、
- (b) 任意選択的にペプチドリンカーによって互いに連結された T N F リガンドファミリーメンバーの 3 つのエクトドメイン又はその断片を含むポリペプチド、及び
- (c) 安定な会合が可能な第 1 及び第 2 のサブユニットから構成される F c ドメインを含む、 T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

50

【0318】

(a) 標的細胞抗原に特異的に結合することができる少なくとも1つの部分、
(b) ペプチドリンカーによって互いに連結されたTNFリガンドファミリーメンバーの3つのエクドメイン又はその断片を含むポリペプチド、及び
(c) 安定な会合が可能な第1及び第2のサブユニットから構成されるFcドメインを含む、TNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

【0319】

(a) 標的細胞抗原に特異的に結合することができる少なくとも1つの部分、
(b) ペプチドリンカーによって互いに連結されたTNFリガンドファミリーメンバーの3つのエクドメイン又はその断片を含むポリペプチド、及び
(c) 安定な会合が可能な第1及び第2のサブユニットから構成されるFcドメインを含む、前に記載したTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子であって、ペプチドリンカーによって互いに連結されたTNFリガンドファミリーメンバーの3つのエクドメイン又はその断片を含むポリペプチドは、任意選択的にペプチドリンカーを介して、Fcドメインの2つのサブユニットの1つのN末端又はC末端のアミノ酸に融合される、TNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

10

【0320】

TNFリガンドファミリーメンバーがヒトT細胞活性化を共刺激する、前に記載したTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

【0321】

TNFリガンドファミリーメンバーが4-1BBL及びOX40Lから選択される、前に記載したTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

20

【0322】

TNFリガンドファミリーメンバーが4-1BBLである、前に記載したTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

【0323】

TNFリガンドファミリーメンバーのエクドメインが、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号99、配列番号100、配列番号101、及び配列番号102からなる群から選択されるアミノ酸配列、特に配列番号1又は配列番号99のアミノ酸配列を含む、前に記載したTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

30

【0324】

TNFリガンドファミリーメンバーのエクドメインが、配列番号1、配列番号2、配列番号3、及び配列番号4からなる群から選択されるアミノ酸配列、特に配列番号1のアミノ酸配列を含む、前に記載したTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

【0325】

(a) 標的細胞抗原に特異的に結合することができる少なくとも1つの部分、
(b) 配列番号5又は配列番号103のアミノ酸配列を含むポリペプチド、及び
(c) 安定な会合が可能な第1及び第2のサブユニットから構成されるFcドメインを含む、前に記載したTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

【0326】

(a) 標的細胞抗原に特異的に結合することができる少なくとも1つの部分、
(b) 配列番号5のアミノ酸配列を含むポリペプチド、及び
(c) 安定な会合が可能な第1及び第2のサブユニットから構成されるFcドメインを含む、前に記載したTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

40

【0327】

TNFリガンドファミリーメンバーがOX40Lである、前に記載したTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

【0328】

TNFリガンドファミリーメンバーのエクドメインが、配列番号6及び配列番号7からなる群から選択されるアミノ酸配列、特に配列番号6のアミノ酸配列を含む、前に記載

50

したTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

【0329】

(a) 標的細胞抗原に特異的に結合することができる少なくとも1つの部分、
 (b) 配列番号8のアミノ酸配列を含むポリペプチド、及び
 (c) 安定な会合が可能な第1及び第2のサブユニットから構成されるFcドメイン
 を含む、前に記載したTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

【0330】

TNFリガンドファミリーメンバーの3つのエクトドメイン又はその断片を含むポリペ
 プチドが、Fcドメインのサブユニットの1つのN末端アミノ酸にC末端アミノ酸で融合
 される、前に記載したTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

10

【0331】

TNFリガンドファミリーメンバーの3つのエクトドメイン又はその断片を含むポリペ
 プチドが、Fcドメインのサブユニットの1つのC末端アミノ酸にN末端アミノ酸で融合
 される、前に記載したTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

【0332】

標的細胞抗原に特異的に結合することができる部分が、抗体断片、Fab分子、クロス
 オーバーFab分子、単鎖Fab分子、Fv分子、scFv分子、単ドメイン抗体、a
 VH、及び足場抗原結合タンパク質からなる群から選択される、前に記載したTNFファ
 ミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

【0333】

標的細胞抗原に特異的に結合することができる部分が、標的細胞抗原に特異的に結合す
 ることができるFab分子である、前に記載したTNFファミリーリガンド三量体含有抗
 原結合分子。

20

【0334】

標的細胞抗原が、線維芽細胞活性化タンパク質(FAP)、メラノーマ関連コンドロイ
 チン硫酸プロテオグリカン(MCSP)、上皮増殖因子受容体(EGFR)、がん胎児性
 抗原(CEA)、CD19、CD20、及びCD33からなる群から選択される、前に記
 載したTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

【0335】

標的細胞抗原が線維芽細胞活性化タンパク質(FAP)である、前に記載したTNFフ
 アミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

30

【0336】

FAPに特異的に結合することができる部分が、(i)配列番号9のアミノ酸配列を含
 むCDR-H1、(ii)配列番号10のアミノ酸配列を含むCDR-H2、及び(iii)
 配列番号11のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含むVHドメイン、並びに(iv)
 配列番号12のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(v)配列番号13のアミノ酸配列
 を含むCDR-L2、及び(vi)配列番号14のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含
 むVLドメインを含む、前に記載したTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子
 。

【0337】

FAPに特異的に結合することができる部分が、(i)配列番号104のアミノ酸配列
 を含むCDR-H1、(ii)配列番号105のアミノ酸配列を含むCDR-H2、及び
 (iii)配列番号106のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含むVHドメイン、並び
 に(iv)配列番号107のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(v)配列番号108の
 アミノ酸配列を含むCDR-L2、及び(vi)配列番号109のアミノ酸配列を含むC
 DR-L3を含むVLドメインを含む、前に記載したTNFファミリーリガンド三量体含
 有抗原結合分子。

40

【0338】

FAPに特異的に結合することができる部分が、配列番号16のアミノ酸配列を含む可
 変重鎖及び配列番号17のアミノ酸配列を含む可変軽鎖を含み、又はFAPに特異的に結

50

合することができる部分が、配列番号 110 のアミノ酸配列を含む可変重鎖及び配列番号 111 のアミノ酸配列を含む可変軽鎖を含む、本明細書中で前に記載した TNF ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

【0339】

標的細胞抗原が CEA である、請求項 1 から 15 の何れか一項に記載の TNF ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

【0340】

CEA に特異的に結合することができる部分が、(i) 配列番号 112 のアミノ酸配列を含む CDR - H1、(ii) 配列番号 113 のアミノ酸配列を含む CDR - H2、及び (iii) 配列番号 114 のアミノ酸配列を含む CDR - H3 を含む VH ドメイン、並びに (iv) 配列番号 115 のアミノ酸配列を含む CDR - L1、(v) 配列番号 116 のアミノ酸配列を含む CDR - L2、及び (vi) 配列番号 117 のアミノ酸配列を含む CDR - L3 を含む VL ドメインを含む、本明細書中で前に記載した TNF ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

10

【0341】

CEA に特異的に結合することができる部分が、配列番号 118 のアミノ酸配列を含む可変重鎖及び配列番号 119 のアミノ酸配列を含む可変軽鎖を含む、本明細書中で前に記載した TNF ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

【0342】

標的細胞抗原が CD19 である、本明細書中で前に記載した TNF ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

20

【0343】

CD19 に特異的に結合することができる部分が、(a) (i) 配列番号 120 のアミノ酸配列を含む CDR - H1、(ii) 配列番号 121 のアミノ酸配列を含む CDR - H2、及び (iii) 配列番号 122 のアミノ酸配列を含む CDR - H3 を含む VH ドメイン、並びに (iv) 配列番号 123 のアミノ酸配列を含む CDR - L1、(v) 配列番号 124 のアミノ酸配列を含む CDR - L2、及び (vi) 配列番号 125 のアミノ酸配列を含む CDR - L3

を含む VL ドメイン、又は

(b) (i) 配列番号 128 のアミノ酸配列を含む CDR - H1、(ii) 配列番号 129 のアミノ酸配列を含む CDR - H2、及び (iii) 配列番号 130 のアミノ酸配列を含む CDR - H3 を含む VH ドメイン、並びに (iv) 配列番号 131 のアミノ酸配列を含む CDR - L1、(v) 配列番号 132 のアミノ酸配列を含む CDR - L2、及び (vi) 配列番号 133 のアミノ酸配列を含む CDR - L3 を含む VL ドメインを含む、本明細書中で前に記載した TNF ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

30

【0344】

CD19 に特異的に結合することができる部分が、配列番号 126 のアミノ酸配列を含む可変重鎖及び配列番号 127 のアミノ酸配列を含む可変軽鎖を含み、又は FAP に特異的に結合することができる部分が、配列番号 134 のアミノ酸配列を含む可変重鎖及び配列番号 135 のアミノ酸配列を含む可変軽鎖を含む、本明細書中で前に記載した TNF

40

【0345】

Fc ドメインが、IgG、特に IgG1 Fc ドメイン又は IgG4 Fc ドメインである、前に記載した TNF ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

【0346】

Fc ドメインが IgG1 Fc ドメインであり、かつ IgG 重鎖の位置 234 及び 235 (EU 番号付け) 及び / 又は 329 (EU 番号付け) にアミノ酸置換を含む、前に記載した TNF ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

【0347】

標的細胞抗原に特異的に結合することができる 1 つの部分を含む、本明細書中で前に記

50

載した T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

【 0 3 4 8 】

(i) 標的細胞抗原に特異的に結合することができる F a b 分子の V H ドメインを含む第 1 の重鎖、

(i i) 標的細胞抗原に特異的に結合することができる F a b 分子の V L ドメインを含む軽鎖、及び

(i i i) 配列番号 5 又は配列番号 1 0 3 又は配列番号 8 のアミノ酸配列を含む第 2 の重鎖を含む、本明細書中で前に記載した T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

【 0 3 4 9 】

抗原結合分子が、

(i) 配列番号 1 6 のアミノ酸配列を含む V H ドメイン又は配列番号 1 1 0 のアミノ酸配列を含む V H ドメインを含む第 1 の重鎖、

(i i) 配列番号 1 7 のアミノ酸配列を含む V L ドメイン又は配列番号 1 1 1 のアミノ酸配列を含む V L ドメインを含む軽鎖、及び

(i i i) 配列番号 5 又は配列番号 1 0 3 又は配列番号 8 のアミノ酸配列を含む第 2 の重鎖を含む、本明細書中で前に記載した T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

【 0 3 5 0 】

抗原結合分子が、

(i) 配列番号 1 1 8 のアミノ酸配列を含む V H ドメインを含む第 1 の重鎖、

(i i) 配列番号 1 1 9 のアミノ酸配列を含む V L ドメインを含む軽鎖、及び

(i i i) 配列番号 5 又は配列番号 1 0 3 又は配列番号 8 のアミノ酸配列を含む第 2 の重鎖を含む、本明細書中で前に記載した T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

【 0 3 5 1 】

抗原結合分子が、

(i) 配列番号 1 2 6 のアミノ酸配列を含む V H ドメイン又は配列番号 1 3 4 のアミノ酸配列を含む V H ドメインを含む第 1 の重鎖、

(i i) 配列番号 1 2 7 のアミノ酸配列を含む V L ドメイン又は配列番号 1 3 5 のアミノ酸配列を含む V L ドメインを含む軽鎖、及び

(i i i) 配列番号 5 又は配列番号 1 0 3 又は配列番号 8 のアミノ酸配列を含む第 2 の重鎖を含む、本明細書中で前に記載した T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

【 0 3 5 2 】

標的細胞抗原に特異的に結合することができる 2 つの部分を含む、本明細書中で前に記載した T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

【 0 3 5 3 】

抗原結合分子が、

(i) 標的細胞抗原に特異的に結合することができる F a b 分子の V H ドメインを含む第 1 の重鎖、

(i i) 標的細胞抗原に特異的に結合することができる F a b 分子の V L ドメインをそれぞれが含む 2 つの軽鎖、並びに

(i i i) 標的細胞抗原に特異的に結合することができる F a b 分子の V H ドメイン、及び配列番号 5 又は配列番号 1 0 3 又は配列番号 8 のアミノ酸配列を含む第 2 の重鎖を含む、本明細書中で前に記載した T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

【 0 3 5 4 】

抗原結合分子が、

(i) 配列番号 1 6 のアミノ酸配列を含む V H ドメイン又は配列番号 1 1 0 のアミノ酸配列を含む V H ドメインを含む第 1 の重鎖、

10

20

30

40

50

(i i) 配列番号 17 のアミノ酸配列を含む V L ドメイン又は配列番号 111 のアミノ酸配列を含む V L ドメインをそれぞれ含む 2 つの軽鎖、並びに

(i i i) 配列番号 16 のアミノ酸配列を含む V H ドメイン又は配列番号 110 のアミノ酸配列を含む V H ドメイン、及び配列番号 5 又は配列番号 103 又は配列番号 8 のアミノ酸配列を含む第 2 の重鎖を含む、本明細書中で前に記載した T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

【 0355 】

抗原結合分子が、

(i) 配列番号 118 のアミノ酸配列を含む V H ドメインを含む第 1 の重鎖、

(i i) 配列番号 119 のアミノ酸配列を含む V L ドメインをそれぞれが含む 2 つの軽鎖、並びに

(i i i) 配列番号 118 のアミノ酸配列を含む V H ドメイン、及び配列番号 5 又は配列番号 103 又は配列番号 8 のアミノ酸配列を含む第 2 の重鎖を含む、本明細書中で前に記載した T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

【 0356 】

抗原結合分子が、

(i) 配列番号 126 のアミノ酸配列を含む V H ドメイン又は配列番号 134 のアミノ酸配列を含む V H ドメインを含む第 1 の重鎖、

(i i) 配列番号 127 のアミノ酸配列を含む V L ドメイン又は配列番号 135 のアミノ酸配列を含む V L ドメインを含む 2 つの軽鎖、並びに

(i i i) 配列番号 126 のアミノ酸配列を含む V H ドメイン又は配列番号 134 のアミノ酸配列を含む V H ドメイン、及び配列番号 5 又は配列番号 103 又は配列番号 8 のアミノ酸配列を含む第 2 の重鎖を含む、本明細書中で前に記載した T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

【 0357 】

抗原結合分子が、

(a) 標的細胞抗原に特異的に結合することができる F a b 分子を双方が含む、重鎖及び軽鎖、及び

(b) F c ドメインと、配列番号 5 のアミノ酸配列を含むポリペプチドとを含む融合タンパク質を含む、前に記載した T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

【 0358 】

抗原結合分子が、

(a) 標的細胞抗原に特異的に結合することができる F a b 分子を双方が含む、重鎖及び軽鎖、及び

(b) 配列番号 15 のアミノ酸配列を含む融合タンパク質を含む、前に記載した T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

【 0359 】

抗原結合分子が、

(i) 配列番号 16 のアミノ酸配列を含む可変重鎖、

(i i) 配列番号 17 のアミノ酸配列を含む可変軽鎖、及び

(i i i) 配列番号 5 のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む、前に記載した T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

【 0360 】

抗原結合分子が、

(a) 標的細胞抗原に特異的に結合することができる F a b 分子を双方が含む、重鎖及び軽鎖、及び

(b) F c ドメインと、配列番号 8 のアミノ酸配列を含むポリペプチドとを含む融合タンパク質を含む、前に記載した T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

【 0361 】

抗原結合分子が、

10

20

30

40

50

(a) 標的細胞抗原に特異的に結合することができる F a b 分子を双方が含む、重鎖及び軽鎖、及び

(b) 配列番号 2 0 のアミノ酸配列を含む融合タンパク質を含む、前に記載した T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

【 0 3 6 2 】

抗原結合分子が、

(i) 配列番号 1 6 のアミノ酸配列を含む可変重鎖、

(i i) 配列番号 1 7 のアミノ酸配列を含む可変軽鎖、及び

(i i i) 配列番号 8 のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む、前に記載した T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。

10

【 0 3 6 3 】

T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子をコードする単離されたポリヌクレオチド。

【 0 3 6 4 】

前に記載した単離されたポリヌクレオチドを含むベクター、特に発現ベクター。

【 0 3 6 5 】

前に記載した単離されたポリヌクレオチド又は前に記載したベクターを含む宿主細胞。

【 0 3 6 6 】

前に記載した T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を製造するための方法であって、

20

(i) 抗原結合分子の発現に適した条件下で、前に記載した宿主細胞を培養する工程、及び

(i i) 抗原結合分子を回収する工程を含む方法。

【 0 3 6 7 】

前に記載した T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子と、少なくとも 1 つの薬学的に許容される賦形剤とを含む薬学的組成物。

【 0 3 6 8 】

医薬として使用のための、前に記載した T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子、又は前に記載した薬学的組成物。

【 0 3 6 9 】

がんの治療における使用のための、前に記載した T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子、又は前に記載した薬学的組成物。

30

【 0 3 7 0 】

がんの治療のための医薬の製造のための、前に記載した T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子の使用。

【 0 3 7 1 】

個体における疾患を治療する方法であって、薬学的に許容される形態の、前に記載した T N F ファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を含む組成物の治療的有効量を前記個体に投与することを含む、方法。

【 0 3 7 2 】

前記疾患ががんである、前記疾患を治療する方法。

40

【実施例】

【 0 3 7 3 】

以下は本発明の方法及び組成物の実施例である。上記に提供された一般的な説明を考慮すると、様々な他の実施態様が実施され得ることが理解される。

【 0 3 7 4 】

組換え D N A 技術

標準的な方法を使用して、Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989に記載されているように D N A を操作した。分子生物学的試薬を、製造業者の指示に従って使用した。ヒト免疫グ

50

ロブリン軽鎖及び重鎖のヌクレオチド配列に関する一般的な情報は、Kabat, E.A. et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Ed., NIH Publication No 91-3242に与えられている。

【0375】

DNA配列決定

DNA配列は、二本鎖配列決定により決定された。

【0376】

遺伝子合成

所望の遺伝子セグメントは、適切な鋳型を用いたPCRによって生成されるか、Geneart AG (Regensburg, Germany)によって合成オリゴヌクレオチド及びPCR産物から自動遺伝子合成によって合成された。正確な遺伝子配列が入手可能でない場合、最も近いホモログ由来の配列に基づいてオリゴヌクレオチドプライマーを設計し、適切な組織を起源とするRNAからRT-PCRによって遺伝子を単離した。特異的な制限エンドヌクレアーゼ切断部位に隣接する遺伝子セグメントを、標準のクローニング/シーケンシングベクター中にクローニングした。形質転換した細菌からプラスミドDNAを精製し、UV分光法により濃度を決定した。サブクローニングされた遺伝子断片のDNA配列を、DNA配列決定によって確認した。遺伝子セグメントは、それぞれの発現ベクター中へのサブクローニングを可能にする適切な制限部位を用いて設計された。全ての構築物は、真核細胞内の分泌のためにタンパク質を標的とするリーダーペプチドをコードする5'末端DNA配列を含むように設計された。

10

20

【0377】

細胞培養技術

Current Protocols in Cell Biology (2000), Bonifacino, J.S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J. and Yamada, K.M. (eds.), John Wiley & Sons, Inc に記載されているように、標準的な細胞培養技術を使用した。

【0378】

タンパク質の精製

標準プロトコルを参照して、濾過した細胞培養上清からタンパク質を精製した。簡潔には、抗体をプロテインAセファロースカラム (GE Healthcare) に適用し、PBSで洗浄した。抗体の溶出は、pH 2.8で達成され、続いて試料を直ちに中和した。凝集したタンパク質をPBS又は20mMヒスチジン、150mMのNaCl (pH 6.0) 中のサイズ排除クロマトグラフィー (Superdex 200, GE Healthcare) により単量体抗体から分離した。単量体抗体画分をプールし、例えばMILLIPORE Amicon Ultra (30 MWCO) 遠心濃縮器を用いて濃縮し (必要に応じて)、-20 又は -80 で凍結保存した。試料の一部が、例えばSDS-PAGE、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 又は質量分析法によるその後のタンパク質分析及び分析的特徴づけのために提供された。

30

【0379】

SDS-PAGE

NuPAGE (登録商標) Pre-Castゲルシステム (Invitrogen) を製造業者の指示に従って使用した。特に、10%又は4~12%のNuPAGE (登録商標) Novex (登録商標) Bis-TRIS Pre-Castゲル (pH 6.4) 及びNuPAGE (登録商標) MES (還元ゲル、NuPAGE (登録商標) 酸化防止剤ランニングバッファー添加剤を含む) 又はMOPS (非還元ゲル) ランニングバッファーを使用した。

40

【0380】

分析用サイズ排除クロマトグラフィー

抗体の凝集及びオリゴマー状態の測定のためのサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) は、HPLCクロマトグラフィーによって行った。簡潔には、プロテインA精製抗体を、Agilent HPLC 1100システム上の300mMのNaCl、50mMの

50

KH₂PO₄ / K₂HPO₄、pH 7.5 中の Tosoh TSK gel G3000S Wカラムに又は Dionex HPLC システム上の 2xPBS 中の Superdex 200 カラム (GE Healthcare) に適用した。溶出したタンパク質を、UV 吸光度及びピーク面積の積分によって定量した。BioRad ゲルろ過スタンダード 151-1901 が標準の役割を果たした。

【0381】

質量分析

この節では、正しい組み立てに重点を置いて、VH/VL 交換 (VH/VL Cross Mab) を用いた多重特異性抗体の特徴づけについて説明する。期待される一次構造は、脱グリコシル化されたインタクトな Cross Mab、及び脱グリコシル化/プラスミン消化 Cross Mab 又は代わりに脱グリコシル化/限定された Lys C 消化 Cross Mab のエレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-MS) によって分析された。

10

【0382】

VH/VL Cross Mab を、1 mg/ml のタンパク質濃度で 37 °C で最大 17 時間、リン酸又はトリス緩衝液中で N-グリコシダーゼ F で脱グリコシル化した。プラスミン又は限定された Lys C (Roche) 消化は、脱グリコシル化 VH/VL Cross Mab 100 µg を用いて、トリス緩衝液 pH 8 中で室温で 120 時間、37 °C で 40 分間、それぞれ行った。質量分析に先立ち、Sephadex G25 カラム (GE Healthcare) 上で HPLC により試料を脱塩した。TriVersa NanoMate 源 (Advion) を備えた maxis 4G UHR-QTOF MS システム (Bruker Daltonik) 上で ESI-MS によって全質量を測定した。

20

【0383】

実施例 1

標的化単鎖 4-1BB リガンド三量体含有 Fc 融合抗原結合分子の調製及び精製

1.1. 一価 FAP (28H1) 標的化単鎖 4-1BB リガンド三量体含有 Fc (kih) 融合抗原結合分子 (化合物 S1)

ヒト 4-1BB リガンドの外部ドメインの一部 (アミノ酸 71-254 又は 71-248) をコードする DNA 配列を、UniProt アクセッション番号 P41273 (配列番号 43) に従って合成した。

30

【0384】

それぞれ (G₄S)₂ リンカー (配列番号 54) によって分離された 4-1BB リガンドの 3 つの外部ドメインを含むポリペプチドを図 1A: ヒト 4-1BB リガンド、(G₄S)₂ コネクタ、ヒト 4-1BB リガンド、(G₄S)₂ コネクタ、ヒト 4-1BB リガンドに記載のようにクローニングした。

【0385】

単鎖三量体 4-1BB リガンドをコードするポリペプチドを、配列番号 57 のリンカー (GSPGSSSSGS) を用いて、ノブの ヒト IgG1 重鎖 CH2 及び CH3 ドメインとともにフレーム内にサブクローニングした (Merchant, Zhu et al., 1998)。

【0386】

線維芽細胞活性化タンパク質 (FAP) (クローン 28H1) に特異的な結合剤をコードする重鎖及び軽鎖 DNA 配列の可変領域を、ヒト IgG1 のホールの定常重鎖 (Carter, 2001) 又はヒト IgG1 の定常軽鎖のどちらかとともにフレーム内にサブクローニングした。FAP 結合剤の生成及び調製は、国際公開第 2012/020006 号 (A2) に記載されており、これは参照により本明細書に組み込まれる。

40

【0387】

国際特許出願番号 WO2012/130831 (A1) に記載される方法に従って、Pro329Gly、Leu234Ala 及び Leu235Ala 変異をノブ及びホール重鎖の定常領域に導入し、Fc ガンマ受容体への結合を抑制した。

【0388】

50

S 3 5 4 C / T 3 6 6 W 変異を含む単鎖リガンド - F c ノブ鎖の、Y 3 4 9 C / T 3 6 6 S / L 3 6 8 A / Y 4 0 7 V 変異を含む標的とされた抗 F A P - F c ホール鎖及び抗 F A P 軽鎖との組み合わせは、単鎖 4 - 1 B B リガンド三量体及び F A P 結合 F a b を含むヘテロ二量体の生成を可能にする (図 3 A) 。

【 0 3 8 9 】

表 1 は、F A P (2 8 H 1) 標的化単鎖 4 - 1 B B リガンド三量体含有 F c (k i h) 融合抗原結合分子の c D N A 及びアミノ酸配列をそれぞれ示す。

表 1:FAP(28H1)標的化ヒト 4-1BB リガンド三量体含有 Fc(kih)融合分子(FAP 単鎖 4-1BBL 三量体)(化合物 S1)の配列

配列番号	記述	配列	
66	三量体 hu 4-1BBL (71-254)-Fc ノブ 鎖のヌクレオチド配 列	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGGACT GCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGTGGCCC AGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGC GATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAG CTACAAAGAGGACACCAAAGAAGCTGGTGGTGGCCAAGGCCG GCGTGTACTACGTGTTCTTTTCAGCTGGAAGTGCAGAGAGTG GTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCA TCTGCAGCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCTGG CACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCTCCGAGGCCCGG AATAGCGCATTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTC TGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCC AGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAG TGCTGGGCCTGTTTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCCGGC CTGCCTTCTCCAAGAAGCGAAGGCGGAGGCGGATCTGGCG GCGGAGGATCTAGAGAGGGACCCGAAGTGTCCCCTGACGAT CCAGCCGGGCTGCTGGATCTGAGACAGGGAATGTTCCGCCCA GCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGCTGATTGACGGACCTCTGA GCTGGTACTCCGACCCAGGGCTGGCAGGGGTGTCCCTGACT GGGGGACTGTCCTACAAAGAAGATACAAAGAAGTGGTGGT GGCTAAAGCTGGGGTGTACTATGTGTTTTTTCAGCTGGAAC TGAGGCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGCTCAGGATCTGTGTC CCTGGCTCTGCATCTGCAGCCACTGCGCTCTGCTGCTGGCG CAGCTGCACTGGCTCTGACTGTGGACCTGCCACCAGCCTCT AGCGAGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCCAAGGACGCC TGCTGCATCTGAGCGCCGGACAGCGCCTGGGAGTGCATCTG CATACTGAAGCCAGAGCCCGGCATGCTTGGCAGCTGACTCA GGGGGCAACTGTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACACCTGAGA TCCCTGCCGGACTGCCAAGCCCTAGATCAGAAGGGGGCGG AGGAAGCGGAGGGGGAGGAAGTAGAGAAGGACCAGAGCTG TCTCCAGATGACCCCGCAGGACTGCTGGACCTGAGACAGGG CATGTTTCGACAGCTGGTGGCCCAGAATGTGCTGCTGATCG ACGGGCCACTGTCTTGGTATTCCGATCCCGCCTGGCCGGC GTGTCCCTGACCGGCGGACTGAGTTACAAAGAGGATACAAA AGAAGTGGTGGTGGCAAAGGCAGGGGTGACTATGTGTTCT TTCAGCTGGAAGTGAAGGGTGGTGGCCGGCGAGGGAAG CGGATCAGTGTCACTGGCACTGCATCTGCAGCCCCTGAGAT CCGCTGCAGGGGCCGCTGCTCTGGCCCTGACCGTGGACCT GCCCCCTGCTTCTCCGAGGCTAGAACTCTGCATTTGGGT TTCAAGGACGCCTGCTGCATCTGTCAGCCGGGCAGAGACTG GGAGTGCATCTGCATACCGAGGCTCGCGCCAGACATGCATG GCAGCTGACCCAGGGCGCCACCGTGTGGGACTGTTTAGAG TGACTCCAGAAATCCCCGCTGGCCTGCCAGCCCAAGATCC GAGGGATCTCCTGGCAGCAGCTCTAGCGGATCCGACAAAAC	10 20 30 40

		<p>TCACACATGCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGG GGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACAC CCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGG TGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGG TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCC GCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC GTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGA GTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCA TCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAA CCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATGCCGGGATGAGCTGAC CAAGAACCAGGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCT ATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA GCCGGAGAACAACACTACAAGACCAGCCTCCCGTGTGGACT CCGACGGCTCCTTCTTCTTCTACAGCAAGCTCACCGTGGAC AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGT GATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC TCTCCCTGTCTCCGGGTAAA</p>	10
67	抗 FAP(28H1) Fc ホール鎖	<p>GAAGTGCAGCTGCTGGAATCCGGCGGAGGCCTGGTGCAGC CTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTGCGCCGCTCCGGCTTC ACOTTCTCCTCCCACGCCATGTCTGGGTCCGACAGGCTCC TGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGTCCGCCATCTGGGCCTCCG GCGAGCAGTACTACGCCGACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACC ATCTCCCGGGACAACCTCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGAT GAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTG CCAAGGGCTGGCTGGGCAACTTCGACTACTGGGGACAGGG CACCTGGTCAACCGTGTCCAGCGCTAGCACCAAGGGCCCCT CCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCCAGCGG CGGCACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCC CCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGAC CTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTG GCCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTACCGTGCCTTCTAGC AGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAA GCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAG AGCTGCGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCAGCACC TGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAA AACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGT CAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG CCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTA CCGTGTGGTCAAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGC TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCC CTCGGCGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGG GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCATCC CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTCTCGTGCAG AGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG AGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACTACAAGACCACGCCT CCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCGTGTAGCAA GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTC</p>	20 30 40

		TTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTA CACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA	
68	抗 FAP(28H1)軽鎖	GAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCGGCACCCCTGTCTCTGAG CCCTGGCGAGAGAGCCACCCTGTCTGAGAGCCTCCCAG TCCGTGTCCCGGTCTACCTCGCCTGGTATCAGCAGAAGCC CGGCCAGGCCCTCGGCTGCTGATCATCGGCGCCTCTACCA GAGCCACCGGCATCCCTGACCGGTTCTCCGGCTCTGGCTCC GGCACCGACTTACCCTGACCATCTCCCGGCTGGAACCCGA GGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGGGCCAGGTCATCC CTCCACCTTTGGCCAGGGCACCAAGGTGAAATCAAGCGT ACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGA TGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGC TGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAG GTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGT CACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGC AGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAA AGTCTACGCTGCGAAGTCAACCATCAGGGCCTGAGCTCGC CCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT	10
15	三量体 hu 4- 1BBL(71-254)- Fc ノブ鎖	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDP GLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGE GSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGF QGRLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVT PEIPAGLPSRSEGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQG MFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKEL VVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGA AALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLHLSAGQRLGVHLHTE ARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSEGGGGSGGG GSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYS DPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVA GEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAF GFQGRLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFR VTPEIPAGLPSRSEGGSGSSSSGSDKHTCPPCPAPEAAGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	20 30
18	抗 FAP(28H1) Fc ホール鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQAPG KGLEWVSAIWASGEQYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKGWLNFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKE PKSCDKHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ	40

		VCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGDFLVSCLTVDKSRWQQGNVDFSCVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
19	抗 FAP(28H1)軽鎖	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSRSYLAWYQQKPGQ APRLLIIGASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQGQVIPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

【0390】

標的化単鎖 TNFリガンド三量体含有 Fc(kih) 融合抗原結合分子をコードする配列を、MPSVプロモーターからのインサートの発現を駆動し、CDSの3'末端に位置する合成ポリA配列を含むプラスミドベクターにクローニングした。更に、ベクターはプラスミドのエピソーム維持のためのEBV OriP配列を含んでいた。

【0391】

標的化単鎖 4-1BBL含有 Fc(kih) 融合抗原結合分子は、ポリエチレンイミンを用いてHEK293-EBNA細胞を哺乳動物発現ベクターと同時トランスフェクトすることによって産生された。細胞は、対応する発現ベクターを1:1:1の比(「ベクターノブ鎖」:「ベクターホール鎖」:「ベクター軽鎖」)でトランスフェクトした。

20

【0392】

500mL振盪フラスコ中での産生のために、トランスフェクションの24時間前に4億個のHEK293-EBNA細胞を播種した。トランスフェクションのために、細胞を210xgで5分間遠心分離し、上清を予め温めたCD CHO培地と交換した。発現ベクターを、DNAの量が最終的に200µgになるまで20mLのCD CHO培地中で混合した。540µLのPEIの添加後、溶液を15秒間混合し、室温で10分間インキュベートした。その後細胞を、DNA/PEI溶液と混合し、500mLの振盪フラスコに移し、5%のCO₂雰囲気インキュベーター内において37°Cで3時間インキュベートした。インキュベーションの後、160mLのF17培地を加え、細胞を24時間培養した。トランスフェクションの1日後、1mMのバルプロ酸及び7%のFeedをサプリメントとともに加えた。7日間培養した後、210xgで15分間遠心分離して上清を回収した。溶液を滅菌濾過し(0.22µmフィルター)、アジ化ナトリウムを0.01%(w/v)の最終濃度になるように添加し、4°Cに保った。

30

【0393】

標的化 4-1BBL三量体含有 Fc(kih) 融合抗原結合分子を、プロテインAを用いたアフィニティークロマトグラフィー、次いでサイズ排除クロマトグラフィーにより細胞培養上清から精製した。アフィニティークロマトグラフィーのために、20mMリン酸ナトリウム、20mMクエン酸ナトリウム、0.5M塩化ナトリウム、0.01%(v/v) Tween-20含有緩衝液(pH7.5)で平衡化したHiTrap Protein A HPカラム(CV=5mL, GE Healthcare)に上清をロードした。未結合のタンパク質を、少なくとも10カラム容量の同じ緩衝液で洗浄することによって除去した。結合したタンパク質を、100%の20mMクエン酸ナトリウム、0.5M塩化ナトリウム、0.01%(v/v)のTween-20含有緩衝液(pH2.5)までの20カラム容量に対する直線的なpH勾配を用いて溶出した。次にカラムを、10カラム容量の20mMクエン酸ナトリウム、0.5M塩化ナトリウム、0.01% Tween-20緩衝液(pH2.5)で洗浄した。

40

【0394】

収集した画分のpHを、1/40(v/v)の2MのTris(pH8.0)を加えることによって調整した。タンパク質を、濃縮し、20mMヒスチジン、150mM塩化ナ

50

トリウム、0.01% (v/v) Tween / 20 溶液 (pH 6.0) で平衡化した Hi Load Superdex 200 カラム (GE Healthcare) 上にロードした。

【0395】

タンパク質濃度は、アミノ酸配列に基づいて計算したモル吸光係数を用いて 280 nm での光学密度 (OD) を測定することによって決定した。標的化 TNF リガンド三量体含有 Fc(kih) 融合抗原結合分子の純度及び分子量を、SDS-PAGE により、還元剤 (5 mM の 1,4-ジチオトレイトール) の存在下及び非存在下で、Coomassie Simple BlueTM Safe Stain (Invitrogen USA) により染色して分析した。試料の凝集物含有量を、25 mM の K₂HPO₄、125 mM の NaCl、200 mM の L-アルギニン塩酸塩、0.02% (w/v) NaN₃、pH 6.7 のランニングバッファー中で、25 において平衡化された TSK gel G3000 SW XL 分析的サイズ除外カラム (Tosoh) を用いて分析した。

10

【0396】

表 2 は、FAP 標的化 4-1BBL 三量体含有 Fc(kih) 融合抗原結合分子の収率及び最終の単量体含有量をまとめたものである。

表 2: FAP 標的化 4-1BBL 三量体含有 Fc(kih) 融合抗原結合分子の産生の概要

構築物	収率 [mg/l]	単量体[%] [%] (SEC)	LC/MS (non red)
FAP 標的化 4-1BBL 三量体含有 Fc(kih) 融合抗原結合分子 (FAP 標的化単鎖 4-1BBL 三量体) 化合物 S1	14	100	理論値*: 157358.6 Da 実験値: 157384 Da * 末端リジン 無し

20

30

【0397】

1.2. 二価 FAP (4B9) 標的化単鎖 4-1BBL リガンド三量体含有 Fc(kih) 融合抗原結合分子 (化合物 S2)

図 28A に示されるように、(G4S)₂ リンカーによって分離された 4-1BBL リガンドの 3 つの外部ドメインを含有するポリペプチド (P41273 に従って合成された 71-254 又は 71-248) を、ヒト IgG1 Fc ノブ鎖の C 末端でフレーム内にサブクロニングした (Merchant, Zhu et al., 1998): ヒト IgG1 Fc ノブ、(G4S)₂ コネクタ、ヒト 4-1BBL リガンド、(G4S)₂ コネクタ、ヒト 4-1BBL リガンド、(G4S)₂ コネクタ、ヒト 4-1BBL リガンド。

【0398】

40

線維芽細胞活性化タンパク質 (FAP) (クローン 4B9) に特異的な結合剤をコードする重鎖及び軽鎖 DNA 配列の可変領域を、ヒト IgG1 のホール、ノブの定常重鎖又はヒト IgG1 の定常軽鎖のどちらかとともにフレーム内にサブクロニングした。FAP 結合剤の生成及び調製は、国際公開第 2012/020006 号 (A2) に記載されており、これは参照により本明細書に組み込まれる。

【0399】

国際公開第 2012/130831 号 (A1) に記載されるように、Fc ガンマ受容体への結合を抑制するために、Pro329Gly、Leu234Ala 及び Leu235Ala 変異がノブ及びホール重鎖の定常領域に導入されている。

【0400】

50

Y349C/T366S/L368A/Y407V変異を含む抗FAP huIgG1
ホール鎖、S354C/T366W変異を含む抗FAP huIgG1ノブ三量体リガン
ド鎖、及び抗FAP軽鎖の組み合わせは、組み立てられた三量体4-1BBリガンド及び
2つのFAP結合Fabを含むヘテロ二量体の生成を可能にする(図28B)。

【0401】

表3は、二価FAP標的化単鎖4-1BBリガンド三量体含有Fc(kih)融合抗原
結合分子のcDNA及びアミノ酸配列をそれぞれ示す。

	<p>CTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGAC TACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGC CCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGT CCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCC TCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAA TCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGC CCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCA GCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCC CCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTG AGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCT GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGAC TGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA AGCCCTCGGCGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCA AAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCC CTGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGT GCCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAA TGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACCTACAAGACCA CCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCTGTAC TCCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCA ACGTGTTCACTGCAGCGTGTATGCACGAGGCCCTGCACAAC CACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCTGGCGGAG GCGGAGGATCTGGCGGGGGAGGATCTAGAGAGGGCCCTGA GCTGTCCCCGATGATCCTGCTGGACTGCTGGACCTGCGGC AGGGCATGTTTGCTCAGCTGGTGGCCAGAACGTGCTGCTG ATCGACGGCCCTCTGAGCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGC TGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGACA CCAAAGAAGTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTG TTCTTTCAGCTGGAACCTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAGGG ATCTGGATCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCCCTGA GATCAGCTGCTGGCGCTGCTGCTCTGGCTCTGACAGTGGAT CTGCCTCCTGCCAGCAGCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGG GTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGC TGGGAGTGCATCTGCACACAGAAGCCAGAGCCAGGCACGCT TGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGTGGCCTGTTTCCAG AGTGACCCCCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAA GCGAAGGCGGCGGAGGCTCCGGAGGAGGCGGCTCTAGAGA AGGACCTGAACTGAGCCCAGACGACCCCCGAGGGCTGCTG GATCTGAGACAGGGAATGTTCCGCCAGCTGGTGGCTCAGAA TGTGCTGCTGATTGATGGACCCCTGCTCTGGTACTCCGACC CAGGGCTGGCAGGGGTGTCCCTGACTGGCGGACTGTCTTAC AAAGAAGATACAAAAGAACTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGT GACTATGTGTTTTTTCAGCTGGAACCTGAGGCGGGTGGTGG CTGGGGAAGGCAGTGGCTCTGTGTCCCTGGCACTGCATCTG CAGCCTCTGCGCAGTGCTGCAGGCGCAGCCGCACTGGCAC TGACTGTGGACCTGCCCCAGCTTCCAGCGAGGCTAGAAAC AGCGCCTTCGGGTTTTCAAGGACGCCTGCTGCATCTGAGCGC</p>
--	--

10

20

30

40

		<p>CGGACAGCGCCTGGGAGTGCATCTGCATACTGAGGCTAGGG CCAGACATGCCTGGCAGCTGACCCAGGGGCAACTGTGCT GGGACTGTTTCGCGTGACACCTGAGATCCCCGCTGGCCTGC CAAGCCCTAGATCAGAAGGCGGAGGGGATCAGGGGGAGG CGGATCCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCT GCTGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGTCTCAGCT GGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCT GGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGC GGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGC CAAGGCCGCGCTGTACTACGTGTTCTTTTCAGCTGGAAGTGC GGAGAGTGGTGGCCGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTG GCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGC AGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCTCCG AGGCCCGGAATAGCGCATTGTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTG CACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCACAC AGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGC GCTACAGTGTGGGCCTGTTTCAGAGTGACCCCCGAGATTCC AGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAA</p>	10
139	抗 FAP(4B9) 軽鎖のヌクレオチド配列	<p>GAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCGGCACCCCTGTCTCTGAG CCCTGGCGAGAGAGCCACCCTGTCCTGCAGAGCCTCCCAG TCCGTGACCTCCTCCTACCTCGCCTGGTATCAGCAGAAGCC CGGCCAGGCCCTCGGCTGCTGATCAACGTGGGCAGTCGG AGAGCCACCGGCATCCCTGACCGTTCCTCCGGCTCTGGCTC CGGCACCGACTTCACCCTGACCATCTCCCGGCTGGAACCCG AGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGGGCATCATGCTG CCCCCACCTTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAATCAAGCG TACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTG ATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTG CTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAA GGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTG TCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGC AGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAA AGTCTACGCCTGCCAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGC CCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT</p>	20 30
140	抗 FAP(4B9) Fc ホール鎖	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVE PKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK</p>	40
141	三量体 4 hu 4-1BBL (71-254) に	<p>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLA</p>	

6 S / L 3 6 8 A / Y 4 0 7 V 変異を含む標的とされた抗 F A P - F c ホール鎖及び抗 F A P 軽鎖との組み合わせは、単鎖 4 - 1 B B リガンド三量体及び F A P 結合 F a b を含むヘテロ二量体の生成を可能にする (図 3 A) 。

【 0 4 0 7 】

表 4 は、一価 F A P (4 B 9) 標的化単鎖 4 - 1 B B リガンド三量体含有 F c (k i h) 融合抗原結合分子の c D N A 及びアミノ酸配列をそれぞれ示す。

表 4: 一価 FAP(4B9)標的化単鎖 4-1BBL(71-254)三量体含有 Fc(kih)融合抗原結合分子 (化合物 S3)

配列番号	記述	配列
137	抗 FAP(4B9) Fc ホール鎖のヌクレオチド配列	表 3 を参照
66	三量体 hu 4-1BBL(71-254)Fc ノブ鎖のヌクレオチド配列	表 1 を参照
139	抗 FAP(4B9) 軽鎖のヌクレオチド配列	表 3 を参照
140	抗 FAP(4B9) Fc ホール鎖	表 3 を参照
15	三量体 hu 4-1BBL(71-254)Fc ノブ鎖	表 1 を参照
142	抗 FAP(4B9)軽鎖	表 3 を参照

10

20

【 0 4 0 8 】

1 . 4 . 二価 C E A 標的化単鎖 4 - 1 B B リガンド三量体含有 F c (k i h) 融合抗原結合分子 (化合物 S 4)

この分子は、二価 F A P (4 B 9) 標的化構築物について 1 . 2 に記載されるように調製されており、その唯一の違いは抗 F A P 結合剤が抗 C E A 結合剤で置換されたことである。

【 0 4 0 9 】

がん胎児性抗原 (C E A) (クローン s m 9 b) に特異的な結合剤をコードする重鎖及び軽鎖 D N A 配列の可変領域を、ヒト I g G 1 のホール、ノブの定常重鎖又はヒト I g G 1 の定常軽鎖のどちらかとともにフレーム内にサブクロニングした。クローン s m 9 b は、2004 年の G r a f f らの米国特許出願公開第 2005 / 0147614 号及び国際公開第 2014 / 00446 号 (A 1) に更に記載されており、これらは参照により本明細書に組み込まれる。

30

【 0 4 1 0 】

国際公開第 2012 / 130831 号 (A 1) に記載されるように、F c ガンマ受容体への結合を抑制するために、P r o 3 2 9 G l y、L e u 2 3 4 A l a 及び L e u 2 3 5 A l a 変異がノブ及びホール重鎖の定常領域に導入されている。

40

【 0 4 1 1 】

Y 3 4 9 C / T 3 6 6 S / L 3 6 8 A / Y 4 0 7 V 変異を含む抗 C E A h u I g G 1 ホール鎖、S 3 5 4 C / T 3 6 6 W 変異を含む抗 C E A h u I g G 1 ノブ三量体リガンド鎖、及び抗 C E A 軽鎖の組み合わせは、組み立てられた三量体 4 - 1 B B リガンド及び 2 つの C E A 結合 F a b を含むヘテロ二量体の生成を可能にする (図 2 8 B) 。

【 0 4 1 2 】

表 5 は、二価 C E A (s m 9 b) 標的化単鎖 4 - 1 B B リガンド三量体含有 F c (k i h) 融合抗原結合分子の c D N A 及びアミノ酸配列をそれぞれ示す。

	<p>CAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGA GCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAA GGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAG GCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTA CAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGT GCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACG TGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTT GAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTG CCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCTCT TCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACC CCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGA CCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGG TGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAAC AGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCA GGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCA ACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC CCCCCTGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTG TGGTGCCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGT GGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCCGAGAACAACACTACAAG ACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCTCT GTACTIONCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAG GGCAACGTGTTGAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCA CAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCTGGCG GAGGCGGAGGATCTGGCGGGGGAGGATCTAGAGAGGGCCC TGAGCTGTCCCCGATGATCCTGCTGGACTGCTGGACCTGC GGCAGGGCATGTTTGTCTCAGCTGGTGGCCOCAGAACGTGCTG CTGATCGACGGCCCTCTGAGCTGGTACAGCGATCCTGGACT GGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAG GACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTA CGTGTTCTTTCAGCTGGAACCTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCG AGGGATCTGGATCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCC CTGAGATCAGCTGCTGGCGCTGCTGCTCTGGCTCTGACAGT GGATCTGCCTCCTGCCAGCAGCGAGGCCCGGAATAGCGCA TTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCA GAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACAGAAGCCAGAGCCAGG CACGCTTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCT GTTTCAAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTC CAAGAAGCGAAGGCGGCGGAGGCTCCGGAGGAGGCGGCTC TAGAGAAGGACCTGAACTGAGCCCAGACGACCCCGCAGGG CTGCTGGATCTGAGACAGGGAATGTTCCGCCAGCTGGTGGC TCAGAATGTGCTGCTGATTGATGGACCCCTGTCTGCTGACT CCGACCCAGGGCTGGCAGGGGTGTCCCTGACTGGCGGACT GTCTTACAAAGAAGATACAAAAGAAGTGGTGGTGGCTAAAG CTGGGGTGTACTATGTGTTTTTTCAGCTGGAACCTGAGGCGG GTGGTGGCTGGGGAAGGCAGTGGCTCTGTGTCCCTGGCACT GCATCTGCAGCCTCTGCGCAGTGCTGCAGGGCGCAGCCGCA CTGGCACTGACTGTGGACCTGCCCCAGCTTCCAGCGAGGC</p>
--	--

10

20

30

40

		TAGAAACAGCGCCTTCGGGTTTCAAGGACGCCTGCTGCATC TGAGCGCCGGACAGCGCCTGGGAGTGCATCTGCATACTGAG GCTAGGGCCAGACATGCCTGGCAGCTGACCCAGGGGGCAA CTGTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACACCTGAGATCCCCGCT GGCCTGCCAAGCCCTAGATCAGAAGGCGGAGGGGGATCAG GGGAGGCGGATCCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGA TGATCCTGCTGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTG CTCAGCTGGTGGCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCC CTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACT GACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTG GTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTAGCT GGAAGTCCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCT GTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGCTGC TGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTG CCAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGC AGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGCCAGAGGCTGGGAGTGC ATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCT GACACAGGGCGCTACAGTGTGGCCCTGTTAGAGTGACCC CCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAA	10
145	抗 CEA(sm9b) 軽鎖のヌクレオチド配列	GAGAACGTGCTGACCCAGAGCCCCTCCTCTATGTGAGTCAG CGTGGGCGACAGGGTCACAATCGCCTGCTCCGCTTCTAGTA GCGTGCCTTACATGCACTGGCTCCAGCAGAAGCCAGGGAAA TCCCCAAGCTGCTTATTTATTCTACCTCAAATCTGGCAAGC GGAGTTCCTAGCAGATTCTCTGGCAGTGGTAGCGGGACTGA TACTCCCTCACAATCTCAAGTGTGCAGCCAGAAGACGCCG CTACCTATTACTGTCAACAGCGCAGCTCCTACCCCTGACT TTTGGCTGTGGCACCAAGTTGGAGATTAACGTACGGTGGC TGCACCATCTGTCTTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGT TGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAAC TTCTATCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAA CGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGC AGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCT GACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACG CCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACA AAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT	20 30
146	抗 CEA(sm9b) Fc ホール鎖	QVKLEQSGAEVVKPGASVKLSCKASGFNIKDSYMHWLRQGP QCLEWIGWIDPENGDEYAPKFQGKATFTTDT SANTAYLGLSSL RPEDTAVYYCNEGTPTPGYFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT EVTQVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKISKAKGQPR EPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	40
147	三量体 hu 4-	QVKLEQSGAEVVKPGASVKLSCKASGFNIKDSYMHWLRQGP QCLEWIGWIDPENGDEYAPKFQGKATFTTDT SANTAYLGLSSL	

	1BBL(71-254)に融合した抗 CEA (sm9b)Fc ノブ鎖	RPEDTAVYYCNEGTPPTGPYYFDYWGGQTLVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDL RQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDT KELVVAKAGVYYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSA AGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHL HTEARARHAWQLTQGATV LGLFRVTPEIPAGLPSRSEGGGGG GGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLS WYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRR VVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARN SAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATV LGL LFRVTPEIPAGLPSRSEGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLL DLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKE DTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLR SAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGV HLHTEARARHAWQLTQGATV LGLFRVTPEIPAGLPSRSE	10
148	抗 CEA(sm9b) 軽鎖	ENVLTQSPSSMSVSVGDRVTIACSASSSVPYMHWLQKPKGKSP KLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYSLTISSVQPEDAATYYC QQRSSYPLTFGCGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	20

【 0 4 1 3 】

1 . 5 . 一価 C E A (s m 9 b) 標的化単鎖 4 - 1 B B リガンド三量体含有 F c (k i h) 融合抗原結合分子 (化合物 S 5)

30

この分子は、一価 F A P 標的化構築物について 1 . 3 に記載されるように調製されており、その唯一の違いは抗 F A P 結合剤が抗 C E A 結合剤で置換されたことである。

【 0 4 1 4 】

線維芽細胞活性化タンパク質 (C E A) (クローン s m 9 b) に特異的な結合剤をコードする重鎖及び軽鎖 D N A 配列の可変領域を、ヒト I g G 1 のホールの定常重鎖 (Carter , 2001) 又はヒト I g G 1 の定常軽鎖のどちらかとともにフレーム内にサブクローニングした。

【 0 4 1 5 】

Y 3 4 9 C / T 3 6 6 S / L 3 6 8 A / Y 4 0 7 V 変異を含む抗 C E A h u I g G 1 ホール鎖、S 3 5 4 C / T 3 6 6 W 変異を含む単鎖リガンド h u I g G 1 ノブ鎖、及び抗 C E A 軽鎖の組み合わせは、組み立てられた三量体 4 - 1 B B リガンド及び 1 つの C E A 結合 F a b を含むヘテロ二量体の生成を可能にする (図 2 A) 。

40

【 0 4 1 6 】

表 6 は、一価 C E A (s m 9 b) 標的化単鎖 4 - 1 B B リガンド三量体含有 F c (k i h) 融合抗原結合分子の c D N A 及びアミノ酸配列をそれぞれ示す。

表 6: 一価 CEA(sm9b) 標的化単鎖 4-1BBL(71-254)三量体含有 Fc(kih) 融合抗原結合分子
(化合物 S5)

配列番号	記述	配列
143	抗 CEA(sm9b) Fc ホール鎖のヌクレオチド配列	表 5 を参照
66	三量体 hu 4-1BBL(71-254)Fc ノブ鎖のヌクレオチド配列	表 1 を参照
145	抗 CEA(sm9b) 軽鎖のヌクレオチド配列	表 5 を参照
146	抗 CEA(sm9b) Fc ホール鎖	表 5 を参照
15	三量体 hu 4-1BBL(71-254)Fc ノブ鎖	表 1 を参照
148	抗 CEA(sm9b)軽鎖	表 5 を参照

10

【 0 4 1 7 】

20

1 . 6 . 二価 C D 1 9 標的化単鎖 4 - 1 B B リガンド三量体含有 F c (k i h) 融合抗原結合分子 (化合物 S 6 及び S 7)

この分子は、二価 F A P (4 B 9) 標的化構築物について 1 . 2 に記載されるように調製され、その唯一の違いは抗 F A P 結合剤が抗 C D 1 9 結合剤で置換されることである。C D 1 9 クロンの生成は実施例 1 . 8 に記載されている。

【 0 4 1 8 】

C D 1 9 、すなわちクローン 8 B 8 - 0 1 8 及び 8 B 8 - 2 B 1 1 に特異的な結合剤をコードする重鎖及び軽鎖 D N A 配列の可変領域を、ヒト I g G 1 のホール、ノブの定常重鎖又はヒト I g G 1 の定常軽鎖のどちらかとともにフレーム内にサブクロニングする。

【 0 4 1 9 】

Y 3 4 9 C / T 3 6 6 S / L 3 6 8 A / Y 4 0 7 V 変異を含む抗 C D 1 9 h u I g G 1 ホール鎖、S 3 5 4 C / T 3 6 6 W 変異を含む抗 C D 1 9 h u I g G 1 ノブ三量体リガンド鎖、及び抗 C D 1 9 軽鎖の組み合わせは、組み立てられた三量体 4 - 1 B B リガンド及び 2 つの C D 1 9 結合 F a b を含むヘテロ二量体の生成を可能にする (図 2 8 B) 。国際公開第 2 0 1 2 / 1 3 0 8 3 1 号 (A 1) に記載されるように、F c ガンマ受容体への結合を抑制するために、P r o 3 2 9 G l y 、 L e u 2 3 4 A l a 及び L e u 2 3 5 A l a 変異がノブ及びホール重鎖の定常領域に導入される。

30

【 0 4 2 0 】

表 7 は、二価 C D 1 9 (8 B 8 - 0 1 8) 標的化単鎖 4 - 1 B B リガンド三量体含有 F c (k i h) 融合抗原結合分子の c D N A 及びアミノ酸配列をそれぞれ示す。

40

		<p>AGGCTAGAAACAGCGCCTTCGGGTTTTCAAGGACGCCTGCTG CATCTGAGCGCCGGACAGCGCCTGGGAGTGCATCTGCATAC TGAGGCTAGGGCCAGACATGCCTGGCAGCTGACCCAGGGG GCAACTGTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACACCTGAGATCCC CGCTGGCCTGCCAAGCCCTAGATCAGAAGGCGGAGGGGGA TCAGGGGGAGGCGGATCCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCC CCGATGATCCTGCTGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATG TTTGCTCAGCTGGTGGCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGG CCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGT CACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAA CTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCA GCTGGAAGTGGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGC TCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGC TGCTGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTC CTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCGCATTGGGTTTTCAA GGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAG TGATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCA GCTGACACAGGGCGCTACAGTGTGGGCCTGTTAGAGTGA CCCCCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAA</p>	10
151	抗 CD19(8B8-018) 軽鎖のヌクレオチド配列	<p>GACATCGTCATGACCCAGACACCCCTGTCCCTCTCTGTGAC CCCTGGCCAGCCAGCCTCAATTAGCTGCAAGTCCCTCTCAA GTCTGGAGAACCCCAATGGGAACACTTACCTTAATTGGTAT CTGCAGAAACCCGGACAATCCCTCAACTCCTGATCTACAG GGTCTCTAAGAGATTCTCAGGCGTGCCAGATCGTTTTAGCG GTTCCGGGTCTGGCACAGACTTCACCTTGAAGATTAGTCGG GTTGAAGCTGAGGATGTGGGAGTCTATTACTGTCTGCAGCT CACTCATGTGCCCTACACCTTTGGTCAGGGCACAAAAGTGG AGATCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTTCATCTTC CCACCCTCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCCGCCAGCG TGGTGTGCCTGCTGAACAATTCTACCCCGCGAGGCCAAG GTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTC CCAGGAATCCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACC TACTCCCTGTCTCCACCCTGACCCTGTCCAAGGCCGACTA CGAGAAGCACAAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAG GGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGTCTTCAACCGGGGCG AGTGC</p>	20 30
152	抗 CD19(8B8-018) Fc ホール鎖	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQAPG QGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRL RSDDTAVYYCARGTYYYGSALFDYWQGTTTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKG QPREEQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	40

153	三量体 hu 4-1BBL(71-254)に融合した抗 CD19(8B8-018)Fcノブ鎖	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQAPG QGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFGQGRVTMTSDTSISTAYMELSRL RSDDTAVYYCARGTYYYYGSALFDYWGGTTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCV MHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAG LLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSY KEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRRVVAGEGSGSVSLALHLQP LRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRL GVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSEG GGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLID GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQL ELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASS EARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGA TVLGLFRVTPEIPAGLPSRSEGGGGSGGGGSREGPELSPDDP AGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGL SYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRRVVAGEGSGSVSLALHL QPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQ RLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRS E</p>	10
154	抗 CD19(8B8-018)軽鎖	<p>DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLENPNGNTYLNWYLQK PGQSPQLLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEADV GVYYCLQLTHVPYTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C</p>	30

【 0 4 2 1 】

表 8 は、二価 CD 1 9 (8 B 8 - 2 B 1 1) 標的化単鎖 4 - 1 B B リガンド三量体含有 Fc (kih) 融合抗原結合分子の c D N A 及びアミノ酸配列をそれぞれ示す。

	<p>CCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAG AGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCA AGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTTCGTGGA ACTCA GGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCC TACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACC GTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAA CGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAG TTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCG TGCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCT CTTCCCCC AAAACCCAAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGA CCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAA GACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACA ACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCAC CAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTC CAACAAAGCCCTCGGCGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCA AAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCT GCCCCCTGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCC TGTGGTGCCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCC GTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACA ACTACA AGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTC CTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCA GGGCAACGTGTTCACTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGC ACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCTGGC GGAGGCGGAGGATCTGGCGGGGGAGGATCTAGAGAGGGCC CTGAGCTGTCCCCGATGATCCTGCTGGACTGCTGGACCTG CGGCAGGGCATGTTTGGCTCAGCTGGTGGCCAGAACGTGCT GCTGATCGACGGCCCTCTGAGCTGGTACAGCGATCCTGGAC TGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAG GACACCAAGA ACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTA CGTGTTCTTTCAGCTGGA ACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCG AGGGATCTGGATCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCC CTGAGATCAGCTGCTGGCGCTGCTGCTCTGGCTCTGACAGT GGATCTGCCTCCTGCCAGCAGCGAGGCCCGGAATAGCGCA TTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCA GAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACAGAAGCCAGAGCCAGG CACGCTTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCT GTTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTC CAAGAAGCGAAGGCGGCGGAGGCTCCGGAGGAGGCGGCTC TAGAGAAGGACCTGA ACTGAGCCCAGACGACCCCCGACGGG CTGCTGGATCTGAGACAGGGAATGTTCCGCCAGCTGGTGGC TCAGAATGTGCTGCTGATTGATGGACCCCTGTCTGGTACT CCGACCCAGGGCTGGCAGGGGTGTCCCTGACTGGC GGACT GTCTTACAAAGAAGATACAAAAGA ACTGGTGGTGGCTAAAG CTGGGGTGTACTATGTGTTTTTTCAGCTGGA ACTGAGGCGG GTGGTGGCTGGGGAAGGCAGTGGCTCTGTGTCCCTGGCACT GCATCTGCAGCCTCTGCGCAGTGCTGCAGGCGCAGCCGCA CTGGCACTGACTGTGGACCTGCCCCAGCTTCCAGCGAGGC</p>
--	--

10

20

30

40

		<p>TAGAAACAGCGCCTTCGGGTTTCAAGGACGCCTGCTGCATC TGAGCGCCGGACAGCGCCTGGGAGTGCATCTGCATACTGAG GCTAGGGCCAGACATGCCTGGCAGCTGACCCAGGGGGCAA CTGTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACACCTGAGATCCCCGCT GGCTGCCAAGCCCTAGATCAGAAGGCGGAGGGGGATCAG GGGAGGCGGATCCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGA TGATCCTGCTGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTG CTCAGCTGGTGGCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCC CTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACT GACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTG GTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCT GGAAGTGC GGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCT GTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGCTGC TGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTG CCAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGC AGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGC ATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCT GACACAGGGCGCTACAGTGTGGGCCTGTTCAAGTGACCC CCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAA</p>	10
157	抗 CD19(8B8-2B11) 軽鎖のヌクレオチド配列	<p>GATATTGTCATGACTCAAACCTCCACTGTCTCTGTCCGTGAC CCCGGGTCAGCCAGCGAGCATTTCTTGCAAATCCAGCCAAT CTCTGGAAACCTCCACCGGCACCACGTACCTGAAGTGGTAT CTCCAGAAACCGGGTCAGAGCCCGCAGCTGCTGATCTACCG TGTATCTAAGCGCTTCTCCGGCGTTCTGATCGTTTTACGCG GTTCTGGATCCGGCACCGACTTTACTCTGAAAATCAGCCGT GTGGAAGCTGAAGACGTTGGCGTCTACTATTGTCTGCAGCT GCTGGAAGATCCATACACCTTCGGTCAAGGAACGAAACTGG AAATTAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCC CGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTT GTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGT ACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCC AGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTA CAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACG AGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGC CTGAGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTG T</p>	20 30
158	抗 CD19(8B8-2B11) Fc ホール鎖	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYIMHWVRQAPG QGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRL RSDDTAVYYCARGTYYYGPQLFDYWGQGTTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKG QPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCVSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	40

159	三量体 hu 4-1BBL(71-254)に融合した抗 CD19(8B8-2B11)Fc ノブ鎖	<p>QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQAPG QGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRL RSDDTAVYYCARGTYYYGPQLFDYWGGTTVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKG QPREEQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCV MHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAG LLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSY KEDTKELVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQP LRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRL GVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSEG GGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLID GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVAKAGVYYVFFQLE ELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASS EARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGA TVLGLFRVTPEIPAGLPSRSEGSGGGGSREGPELSPDDP AGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGL SYKEDTKELVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHL QPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQ RLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE E</p>	10 20
160	抗 CD19(8B8-2B11)軽鎖	<p>DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETSTGTTYLNWYLQK PGQSPQLLIYRVSKRFSQVDFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV GVYYCLQLLEDPTTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C</p>	30

【 0 4 2 2 】

1 . 7 . 一価 C D 1 9 標的化単鎖 4 - 1 B B リガンド三量体含有 F c (k i h) 融合抗原結合分子 (化合物 S 8 及び S 9)

この分子は、一価 F A P 標的化構築物について 1 . 3 に記載されるように調製され、その唯一の違いは抗 F A P 結合剤が抗 C D 1 9 結合剤で置換されることである。

【 0 4 2 3 】

C D 1 9 、 すなわちクローン 8 B 8 - 0 1 8 又は 8 B 8 - 2 B 1 1 に特異的な結合剤をコードする重鎖及び軽鎖 D N A 配列の可変領域を、ヒト I g G 1 のホール (Carter , 2001) の定常重鎖又はヒト I g G 1 の定常軽鎖のどちらかとともにフレーム内にサブクローニングする。

【 0 4 2 4 】

Y 3 4 9 C / T 3 6 6 S / L 3 6 8 A / Y 4 0 7 V 変異を含む抗 C D 1 9 h u I g G 1 ホール鎖、 S 3 5 4 C / T 3 6 6 W 変異を含む単鎖リガンド h u I g G 1 ノブ鎖、及び抗 C D 1 9 軽鎖の組み合わせは、組み立てられた三量体 4 - 1 B B リガンド及び 1 つの C D 1 9 結合 F a b を含むヘテロ二量体の生成を可能にする (図 2 A) 。

【 0 4 2 5 】

表 9 は、一価 C D 1 9 (8 B 8 - 0 1 8) 標的化単鎖 4 - 1 B B リガンド三量体含有 F c (k i h) 融合抗原結合分子の c D N A 及びアミノ酸配列をそれぞれ示す。

10

20

30

40

表 9: 一価 CD19(8B8-018)標的化単鎖 4-1BBL(71-254)三量体含有 Fc(kih)融合抗原結合分子(化合物 S8)

配列番号	記述	配列
149	抗 CD19(8B8-018) Fc ホール鎖のヌクレオチド配列	表 7 を参照
66	三量体 hu 4-1BBL(71-254)Fc ノブ鎖のヌクレオチド配列	表 1 を参照
151	抗 CD19(8B8-018) 軽鎖のヌクレオチド配列	表 7 を参照
152	抗 CD19(8B8-018) Fc ホール鎖	表 7 を参照
15	三量体 hu 4-1BBL(71-254)Fc ノブ鎖	表 1 を参照
154	抗 CD19(8B8-018)軽鎖	表 7 を参照

10

【 0 4 2 6 】

表 10 は、一価 CD 19 (8 B 8 - 2 B 1 1) 標的化単鎖 4 - 1 B B リガンド三量体含有 F c (k i h) 融合抗原結合分子の c D N A 及びアミノ酸配列をそれぞれ示す。

20

表 10: 一価 CD19(8B8-2B11)標的化単鎖 4-1BBL(71-254)三量体含有 Fc(kih)融合抗原結合分子(化合物 S9)

配列番号	記述	配列
155	抗 CD19(8B8-2B11) Fc ホール鎖のヌクレオチド配列	表 8 を参照
66	三量体 hu 4-1BBL(71-254)Fc ノブ鎖のヌクレオチド配列	表 1 を参照
157	抗 CD19(8B8-2B11) 軽鎖のヌクレオチド配列	表 8 を参照
158	抗 CD19(8B8-2B11) Fc ホール鎖	表 8 を参照
15	三量体 hu 4-1BBL(71-254)Fc ノブ鎖	表 1 を参照
160	抗 CD19(8B8-2B11)軽鎖	表 8 を参照

30

【 0 4 2 7 】

1 . 8 . 抗 C D 1 9 結合剤 8 B 8 - 0 1 8 及び 8 B 8 - 2 B 1 1 の生成

1 . 8 . 1 抗 C D 1 9 クローン 8 B 8 - 0 1 8 の生成

a) マウス抗ヒト C D 1 9 抗体 (ハイブリドーマ) の免疫化及び生成

40

B a l b / c マウスを 6 回免疫化し、C D 1 9 - トランスフェクト H E K 2 9 3 細胞 (細胞あたり平均受容体密度 3 5 , 0 0 0) で追加免疫した。免疫応答は、ヒト C D 1 9 - トランスフェクト N I H - 3 T 3 細胞において C D 1 9 - 細胞 - E L I S A を用いて血清試料を試験することによってモニターした。十分な力価の抗ヒト C D 1 9 抗体を有するマウスからの脾臓細胞を、マウスミエローマ細胞株 P 3 X 6 3 A g 8 . 6 5 3 との融合による不死化に使用した。3 回の融合を行い、ハイブリドーマ上清を、ヒト C D 1 9 - トランスフェクト N I H - 3 T 3 細胞上の細胞 - E L I S A 及び抗ヒト C D 1 9 特異的抗体用の D a u d i (C D 1 9 +) 及び C D 1 9 - 細胞を用いた F A C S 結合アッセイによりスクリーニングした (国際公開第 2 0 1 1 / 1 4 7 8 3 4 号の実施例 1 を参照) 。

b) 抗 C D 1 9 抗体のハイブリドーマスクリーニング及び細胞生物学的機能評価

50

ヒトCD19に対する抗体を分泌するハイブリドーマを同定するためのハイブリドーマのスクリーニングのために細胞ELISAを適用した。ヒトCD19によりトランスフェクトされたNIH3T3細胞を陽性細胞として使用した。トランスフェクトされていないNIH3T3細胞を陰性対照細胞として使用した。陽性ハイブリドーマの評価のために、トランスフェクションされたNIH3T3細胞とトランスフェクトされていないNIH3T3細胞との間のOD比を定量した。

- 培養培地：DMEM高グルコース(4.5mg/ml)、10%FCS、Na-ピルビン酸塩、NEAA、グルタミン

- 陽性対照抗体：抗CD19モノクローナル抗体(IgG1)Pharmingen Cat#555409 c=1mg/ml

- 検出抗体：ヤギ抗マウスIgG(H+L)HRPコンジュゲートBio-Rad Cat#170-06516

- 希釈 1xELISAブロッキング試薬で1:2000

- 他の試薬：フィブロネクチン Roche Cat#838039 c=1mg/ml

- グルタルジアルデヒド：25%原液//Grade Agar Scientific #R102 最終濃度：PBS中0.05%

- ELISAブロッキング試薬：10x原液//Roche Cat#1112589

- TMB基質：Roche Cat#11432559

- 停止液：1MのH₂SO₄

- BioRad Cat#170-6516 希釈 1xELISAブロッキング試薬で1:2000

1日目：

- フィブロネクチンコーティング：PBS中5μg/cm²；96ウェルプレート=32cm²；6ml中160μg/プレート

- PBS、50μl/ウェル

- 室温で45分間インキュベートし、コーティング溶液を吸引する

- 96ウェルプレート中の50μlの培養培地中に1.25×10⁴細胞/ウェルで播種する

- 37℃で40時間インキュベートする

- プレートの上半分に加える：CD19を発現するNIH3T3細胞

- プレートの下半分に加える：トランスフェクトされていないNIH3T3細胞

3日目：

- 50μlの培養培地中に陽性対照抗体又は試料(上清又はマウス血清)の添加

- 4℃で2時間インキュベートする

- 培地を除去し、100μlのグルタルジアルデヒド(PBS中0.05%)で細胞を固定する

- 200μlのPBSで2回洗浄する

- 検出抗体1:2000、50μl/ウェルの添加

- 室温で2時間インキュベートする

- 200μlのPBSで3回洗浄する

- 50μlのTMBを添加し、室温で30分間インキュベートする

- 25μlの1MのH₂SO₄を添加することにより停止する；450nm/620nmで吸光度を読み取る

- 結果の計算：OD NIH3T3 CD19 : OD NIH3T3 (トランスフェクトされていない)の比

選択された抗体は、トランスフェクトされていないNIH3T3細胞と比較して、CD19トランスフェクトNIH3T3細胞に特異的結合を示した(国際公開第2011/147834号の実施例2を参照)。

10

20

30

40

50

c) 抗CD19抗体のヒト化

【0428】

マウス抗体のCD19結合特異性をヒトアクセプターフレームワークに移し、人体が異物と認識する配列伸長から生じる可能性のある免疫原性の問題を排除した。これは、マウス(ドナー)抗体の相補性決定領域(CDR)全体をヒト(アクセプター)抗体フレームワークに移植することによって行われ、CDR移植又は抗体ヒト化と呼ばれている。

【0429】

マウスのアミノ酸配列を、ヒト生殖系列抗体V遺伝子のコレクションと整列させ、配列同一性及び相同性に従って分類した。1つの特定のアクセプター配列を選択する前に、ドナー抗体のいわゆるカノニカルループ構造を決定しなければならない(Morea, V., et al., Methods, Vol 20, Issue 3 (2000) 267-279)。これらのカノニカルループ構造は、いわゆるカノニカル位置に存在する残基の種類によって決定される。これらの位置は、(部分的に)CDR領域の外側にあり、親(ドナー)抗体のCDRコンフォメーションを保持するために最終構築物において機能的に等価に保たなければならない。ヒト生殖系列配列V B A S E __ V H 1 __ 1を重鎖のためのアクセプターとして選択し、配列V B A S E __ V K 2 __ 5を軽鎖のために選択した。

【0430】

野生型ヒト化抗ヒトCD19抗体8B8はHVR-L1:N S N G N T(配列番号161)に3つの脱アミノ化ホットスポットを有することが見出された。更に、HVR-H2において、更なる脱アミノ化ホットスポットが存在することが見出された:K F N G(配列番号162)。HVR-H2の脱アミド化ホットスポットに対処するために、位置64のN(Asn)からQ(Gln)への点変異(Kabatによる番号づけ)が導入されている。軽鎖の脱アミド化ホットスポットに対処し、改善された脱アミド化安定性を有するヒト化抗ヒトCD19抗体を得るために、S(セリン)からP(プロリン)までの27e位での単一変異(Kabatによる番号づけ)を導入した。従って、以下の表18に示すCDRを有するクローン8B8-018が生成された。

表 11: 8B8-018 とヒト化野生型 CD19 抗体 8B8 との比較

変異体→	wt 8B8	8B8-018
↓パラメーター		
K _D (BIAcore) [nM]	5	6
t _{1/2} [分]	-	43.6
pH7.4でのインキュベーション後のヒトCD19の結合 [%]	46	95
pH6.0でのインキュベーション後のヒトCD19の結合 [%]	90	99
インキュベーション後のSECメインピーク [%]	>95	>95

【0431】

更に、8B8-018は、以下の表12に示すように、カニクイザルCD19に対する交差反応性を維持する。

EC50 [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	wt 8B8	8B8-018
huCD19 ECD	0.087	0.084
cyCD19 ECD	0.313	0.255

【 0 4 3 2 】

1 . 8 . 2 ファージディスプレイキャンペーンのためのCD19抗原Fc融合体の調製、精製及び特徴づけ

単量体状態のヒト及びカニクイザルCD19外部ドメイン（ヒトCD19は配列番号32参照）を発現及び精製するために、それぞれのDNA断片を「ノブ」変異を含むヒトIgG1 Fc遺伝子セグメントに融合させ（ヒト：配列番号163；カニクイザル：配列番号165）、「Fc-ホール」（配列番号76）対応物によりトランスフェクトした（Merchant et al., 1998）。IgA切断部位（PTPPTP）を抗原外部ドメインとFcノブ鎖との間に導入した。定方向のビオチン化のためのAviタグを抗原-Fcノブ鎖のC末端に導入し、変異H435R及びY436Fを精製目的のためにFcホールに導入した（Jendeberg L. et al, J. Immunological methods, 1997）。S354C/T366W変異（ヒト：配列番号164；カニクイザル：配列番号166）を含む抗原-Fcノブ鎖と、Y349C/T366S/L368A/Y407V変異（配列番号80）を含むFcホール鎖との組み合わせは、CD19外部ドメインの単一コピーを含むヘテロ二量体Fc融合断片の生成を可能にする（図3Cの4-1BB構築物と同様に）。表13は、抗原Fc融合構築物のcDNA及びアミノ酸配列を列挙する。

10

20

表 13: 単量体ヒト及びカニクイザル CD19 抗原 Fc(kih) 融合分子の cDNA 及びアミノ酸配列

配列番号	抗原	配列
163	HYRF 変異を有する Fc ホール鎖のヌクレオチド配列	<p>GACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCTG CAGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCTTCCCCCAAACCCAAGGA CACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTG GTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCGTGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGC GGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCT CACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG TGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAA CCATCTCCAAGGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGT GCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGG TCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACAT CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATA CAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA ACCGCTTCACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA</p>
164	ヒト CD19 抗原 Fc ノブ鎖の avi タグのヌクレオチド配列	<p>CCCGAGGAACCCCTGGTCGTGAAGGTGGAAGAGGGCGACAAT GCCGTGCTGCAGTGCCTGAAGGGCACCTCCGATGGCCCTACC CAGCAGCTGACCTGGTCCAGAGAGAGCCCCCTGAAGCCCTTCC TGAAGCTGTCTCTGGGCCTGCCTGGCCTGGGCATCCATATGAG GCCTCTGGCCATCTGGCTGTTTCATCTTCAACGTGTCCAGCAG ATGGGCGGCTTCTACCTGTGTGAGCCTGGCCCCCATCTGAGA AGGCTTGGCAGCCTGGCTGGACCGTGAACGTGGAAGGATCCG GCGAGCTGTTCCGGTGAACGTGTCCGATCTGGGCGGCCTGG GATGCGGCCTGAAGAACAGATCTAGCGAGGGCCCCAGCAGCC CCAGCGGCAAACTGATGAGCCCCAAGCTGTACGTGTGGGCCAA GGACAGACCCGAGATCTGGGAGGGCGAGCCTCCTTGCCTGCC CCCTAGAGACAGCCTGAACCAGAGCCTGAGCCAGGACCTGAC AATGGCCCCTGGCAGCACACTGTGGCTGAGCTGTGGCGTGCCA CCCGACTCTGTGTCTAGAGGCCCTCTGAGCTGGACCCACGTGC ACCCTAAGGGCCCTAAGAGCCTGCTGAGCCTGGAAGTGAAGGA CGACAGGCCCGCCAGAGATATGTGGGTGATGGAACCGGCCT GCTGCTGCCTAGAGCCACAGCCCAGGATGCCGGCAAGTACTAC TGCCACAGAGGCAACCTGACCATGAGCTTCCACCTGGAATCA CCGCCAGACCCGTGCTGTGGCACTGGCTGCTGAGAACAGGCG GCTGGAAGGTGACGCTAGCGGTGGTAGTCCGACACCTCCGA CACCCGGGGGTGGTTCTGCAGACAAAACCTCACACATGCCACC GTGCCAGCACCTGAAGCCGAGGGGGACCGTCAGTCTTCTCT CTTCCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACC CCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC GTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGG</p>

10

20

30

40

		CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC TCGGAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCA GCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATGCCGGGA TGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTCAA GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG GGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGG ACTCCGACGGCTCCTTCTTCCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGA CAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCT CCCTGTCTCCGGGTAATCCGGAGGCCTGAACGACATCTTCGA GGCCCAGAAGATTGAATGGCACGAG	10
165	HYRF 変異を 有する Fc ホ ール鎖	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRD ELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALHNRFQKSLSLSPG K	
166	ヒト CD19 抗 原 Fc ノブ鎖 の avi タグ	PEEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTS DGPTQQLTWSRESPLKPFKL SLGLPGLGIHMRPLAIWLFIFNVSQMGGFYLCQPGPPSEKAWQPG WTVNVEGSGELFRWNVSDLGGLGCGLKNRSSEGPSSPSGKLMSP KLYVWAKDRPEIWEGEPPCLPPRDSL NQSLSQDLTMAPGSTLWLS CGVPPDSVSRGPLSWTHVHPKGPKSLLSLELKDDRPARDMWVME TGLLLPRATAQDAGKYYCHRGNTMSFHLEITARPVLWHLLRTG GWKVDASGGSPPTPGGGGSADKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGLNDIFEAQKIEWHE	20
167	カニクイザル CD19 抗原 Fc ノブ鎖の avi タグのヌ クレオチド配 列	CCCCAGGAACCCCTGGTTCGTGAAGGTGGAAGAGGGCGACAAT GCCGTGCTCCAGTGCCTGGAAGGCACCTCCGATGGCCCTACAC AGCAGCTCGTGTGGTGCAGAGACAGCCCCTTCGAGCCCTTCT GAACCTGTCTCTGGGCCTGCCTGGCATGGGCATCAGAATGGGC CCTCTGGGCATCTGGCTGCTGATCTTCAACGTGTCCAACCAGA CCGGCGGCTTCTACCTGTGTGACGCTGGCCTGCCAAGCGAGAA GGCTTGGCAGCCTGGATGGACCGTGTCCGTGGAAGGATCTGGC GAGCTGTTCCGGTGAACGTGTCCGATCTGGGCGGCCTGGGAT GCGGCCTGAAGAACAGAAGCAGCGAGGGCCCTAGCAGCCCCA GCGGCAAGCTGAATAGCAGCCAGCTGTACGTGTGGCCAAAGG ACAGACCCGAGATGTGGGAGGGCGAGCCTGTGTGTGGCCCC CTAGAGATAGCCTGAACCAGAGCCTGAGCCAGGACCTGACAAT GGCCCCTGGCAGCACACTGTGGCTGAGCTGTGGCGTGCCACC CGACTCTGTGTCCAGAGGCCCTCTGAGCTGGACACACGTGCGG CCAAAGGGCCCTAAGAGCAGCCTGCTGAGCCTGGAAGTGAAG GACGACCGGCCCGACCGGATATGTGGGTGGTGGATACAGGC CTGCTGCTGACCAGAGCCACAGCCCAGGATGCCGGCAAGTACT ACTGCCACAGAGGCAACTGGACCAAGAGCTTTTACCTGGAAAT CACCGCCAGACCCGCCCTGTGGCACTGGCTGCTGAGAATCGG	30 40

		<p>AGGCTGGAAGGTCGACGCTAGCGGTGGTAGTCCGACACCTCC GACACCCGGGGTGGTTCTGCAGACAAAACCTCACACATGCCCA CCGTGCCCAGCACCTGAAGCCGAGGGGGACCGTCAGTCTTC CTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGA CCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGA CCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTG GCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCC CTCGGAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGC AGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATGCCGGG ATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGTGGTGCCTGGTCAA AGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT GGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTG GACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGG ACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGT GATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTC TCCCTGTCTCCGGTAAATCCGGAGGCCTGAACGACATCTTCG AGGCCAGAAGATTGAATGGCACGAG</p>	10
168	<p>カニクイザル CD19 抗原 Fc ノブ鎖の avi タグ</p>	<p>PQEPLVVKVEEGDNAVLQCLEGTSDGPTQQQLVWCRDSPFEPFLNL SLGLPGMGIRMGPLGIWLLIFNVSNTGGFYLCQPGLPSEKAWQPG WTVSVEGSGELFRWNVSDLGGLGCGLKNRSSEGPSSPSGKLNSSQ LYVWAKDRPEMWEWEGEPVCGPPRDSLNLQSLSQDLTMAPGSTLWLS CGVPPDSVSRGPLSWTHVRPKGPKSSLLSLELKDDRPDRDMWVV DTGLLLTRATAQDAGKYCHRGNWTKSFYLEITARPALWHWLLRIG GWKVDASGGSPPTPGGGSADKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGLNDIFEAQKIEWHE</p>	20 30

【 0 4 3 3 】

単量体抗原 / Fc 融合分子の産生のために、指数関数的に増殖する懸濁 CHO 細胞を、標準的な方法を用いて融合タンパク質の 2 つの成分 (ノブ及びホール鎖) をコードする 2 つのプラスミドで同時トランスフェクトした。

【 0 4 3 4 】

分泌されたタンパク質を、プロテイン A を用いたアフィニティークロマトグラフィー、次いでサイズ排除クロマトグラフィーにより細胞培養上清から精製した。アフィニティークロマトグラフィーのために、上清を、リン酸ナトリウム (20 mM)、クエン酸ナトリウム (20 mM)、0.5 M 塩化ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) で平衡化した Mab Select Sure カラム容量 (CV) = 5 ~ 15 mL、GE Healthcare 製の樹脂にロードした。未結合のタンパク質を、少なくとも 6 カラム容量の同じ緩衝液で洗浄することによって除去した。直線勾配を用いて結合したタンパク質を溶出した。工程 1、0 ~ 60 % 溶出緩衝液 (20 mM クエン酸ナトリウム、500 mM 塩化ナトリウム緩衝液 (pH 2.5)) から 10 CV ; 工程 2、60 ~ 100 % 溶出緩衝液から 2 CV。直線勾配のために、100 % 溶出緩衝液を用いて更なる 2 カラム容積の段階溶出を適用した。

【 0 4 3 5 】

収集した画分の pH を、1 / 40 (v / v) の 2 M の Tris (pH 8.0) を加えることによって調整した。タンパク質を、濃縮し、濾過し、2 mM の MOPS、150 mM

10

20

30

40

50

塩化ナトリウム、0.02% (w/v) アジ化ナトリウム溶液 (pH 7.4) で平衡化した Hi Load Superdex 200 カラム (GE Healthcare) 上にロードした。

【0436】

表14は、単量体ヒト及びカニクイザルCD19抗原Fc(kih)融合タンパク質の収率及び最終単量体含有量をまとめたものである。

表14-単量体ヒト及びカニクイザルCD19抗原Fc(kih)融合タンパク質の生化学的分析

構築物	単量体[%] (SEC)	収率 [mg/l]
単量体ヒトCD19Fc(kih)融合タンパク質	91	0.2
単量体カニクイザルCD19Fc(kih)融合タンパク質	95	3.56

10

【0437】

精製された抗原の一部を、BirAピオチン-タンパク質リガーゼ標準反応キット (Avidity, Cat. # BirA500) を用いて製造業者の説明書に従ってインピットでピオチン化した。ヒトCD19含有融合体のピオチン化の程度は94%、それぞれのカニクイザルCD19構築物について100%であった。次いで、ピオチン化タンパク質を、脱アミド化ホットスポットN27d及びN28を欠く親和性成熟8B8由来クローンの選択、スクリーニング及び特徴づけに使用した。a) 2つのファージディスプレイライブラリーが作成され、a) 位置27d及び28のアスパラギン残基が両方とも除去され、b) 改善された親和性を有する8B8変異体を選択するために重鎖及び軽鎖の更なるCDRが無作為化された。

20

【0438】

1.8.3 CDR-L1ホットスポットを欠く8B8親和性成熟ライブラリーの作成
CDR-L1に位置する脱アミド部位N27d及びN28を持たない親和性成熟8B8由来抗体の生成は、標準的なプロトコル (Silacci et al, 2005) を用いてファージディスプレイによって行った。第1の工程では、ヒト化親クローン8B8 (配列番号169及び配列番号170) のVL及びVH DNA配列をファージミドにクローニングし、次いで無作為化のための鋳型として使用した。次の工程では、ファージディスプレイによる好ましいクローンの選択のための2つのライブラリーを作成した。上記のホットスポット位置を除去するために、位置27d及び28のアミノ酸S T Q Eのみを許容したLCDR1無作為化プライマー (配列番号171) を両方のライブラリーに使用した。成熟ライブラリー1は、軽鎖及び重鎖の両方のCDR1及び2において無作為化された一方、成熟ライブラリー2は、軽鎖のCDR1及びCDR3並びに重鎖のCDR3において無作為化された。軽鎖及び重鎖の両方のCDR1及びCDR2において無作為化された成熟ライブラリー1の作成のために、3つの断片を「重複伸長によるスプライシング」(SOE) PCRによって構築し、ファージベクターにクローニングした。以下のプライマーの組み合わせを使用して、ライブラリー断片を生成した：断片1 (LMB3 (配列番号176) 及びCD19 L1リバースランダム (配列番号171))、断片2 (CD19 L2フォワードランダム (配列番号172) 及びCD19 H1リバースランダム (配列番号173))、及び断片3 (CD19 H2フォワードランダム (配列番号174) 及びCD19 H3リバースランダム (配列番号175)) (表15)。十分な量の全長無作為化断片を集めた後、それを同様に処理したアクセプターファージミドベクターと一緒にNcoI/NheIで消化した。3倍モル過剰のライブラリーインサートを10µgのファージミドベクターと連結した。精製されたライゲーションを20回の形質転換に用い、2x10exp9の形質転換体を得た。8B8親和性成熟ライブラリーを示すファージミド粒子を回収し、PEG/NaCl精製によって精製し、選択に使用した。

30

40

【0439】

50

軽鎖のCDR1及びCDR3並びに重鎖のCDR3において無作為化された第2のライブラリーの作成も同様に行われた。以下のプライマーの組み合わせを使用して、ライブラリー断片を生成した：断片1（LMB3（配列番号176）及びCD19 L1リバースランダム（配列番号171））、断片2（CD19 L1フォワードコンスタント（配列番号177）及びCD19 L3リバースランダム（配列番号178））、及び断片3（CD19 L3フォワードコンスタント（配列番号179）及びCD19 H3リバースランダム（配列番号180））（表16）。十分な量の全長無作為化断片を集めた後、それを同様に処理したアクセプターファージミドベクターと一緒にNcoI/KpnIで消化した。3倍モル過剰のライブラリーインサートを20ugのファージミドベクターと連結した。精製されたライゲーションを40回の形質転換に用い、2x10exp9の形質転換体を得た。8B8親和性成熟ライブラリーを示すファージミド粒子を回収し、PEG/NaCl精製によって精製し、選択に使用した。

表 15: 8B8 親和性成熟及びホットスポット除去ライブラリーL1_L2 / H1_H2 のためのプライマー

配列番号	名称	配列
171	CD19 L1 リバース ランダム	CAG CTG CGG GCT CTG ACC CGG TTT CTG GAG ATA CCA GTT CAG 1 CGT 2 GCC 3 GGA 4 TTC CAG AGA TTG GCT GGA TTT GCA AGA AAT G 1.40% Y, 6% A/S/T/G/P/D/N/E/Q/V, 2: 40% N, 6% A/S/T/Y/G/P/D/E/Q/V, 3: 25% S/T/Q/E, 4: 25% S/T/Q/E
172	CD19 L2 フォワード ランダム	CTC CAG AAA CCG GGT CAG AGC CCG CAG CTG CTG ATC TAC 5 GTA TCT 6 CGC 7 8 GGC GTT 9 GAT CGT TTC AGC GGT TCT GGA TCC GGC ACC 5.30% R, 20% E, 5% A/S/T/Y/G/P/D/N/Q/V.6.30% K, 20% S, 5% A/N/T/Y/G/P/D/E/Q/V, 7: 40% F, 5% A/S/T/Y/G/P/D/E/Q/V/I/L, 8: 40% S, 6.6% A/T/Y/G/P/D/E/Q/V, 9: 50% P, 50% L
173	CD19 H1 リバース ランダム	CAT CCA CTC CAG ACC CTG GCC CGG GGC CTG ACG AAC CCA 10 CAT 11 12 13 14 GAA 15 GTA ACC AGA TGC TTT GCA GCT CAC TTT AAC GGA AGC 10.52% H, 4% G/A/S/P/T/N/Y/D/E/Q/V/I,11: 30% I, 15% Y, 5% G/A/S/T/P/N/H/D/E/Q/V,12: 52% Y, 4% G/A/S/P/T/N/H/D/E/Q/V/I,13: 30% D, 15% G, 5% A/S/P/Y/N/H/D/E/Q/V/I, 14: 52% T, 4% G/A/S/P/Y/N/H/D/E/Q/V/I, 15: 52% T, 4% G/A/S/P/Y/N/H/D/E/Q/V/I
174	CD19 H2 フォワード ランダム	CAG GCC CCG GGC CAG GGT CTG GAG TGG ATG GGC 16 ATT 17 CCA 18 19 20 21 TCC 22 TAT ACC 23 AAA TTC CAG GGC CGC GTC ACG ATG ACC 16.45% Y, 5% A/S/P/T/N/H/D/E/Q/V/I, 17: 52% N, 4% G/A/S/P/Y/T/H/D/E/Q/V/I, 18: 40% Y, 5% G/A/S/P/T/N/H/D/E/Q/V/I, 19: 30% N, 15% S, 5% G/A/T/P/Y/H/D/E/Q/V/I, 20: 30% D, 15% G, 5% A/S/T/P/Y/N/H/E/Q/V/I, 21: 52% G, 4% N/A/S/P/Y/T/H/D/E/Q/V/I, 22: 30% K, 15% N, 4% G/A/S/P/Y/T/H/D/E/Q/V/I, 23: 30% E, 15% Q, 5% G/A/S/T/P/Y/N/H/D/V/I
175	CD19 H3 リバース コンスタント	CGTCACCGGTTCCGGGAAGTAGTCCTTGACCAG
176	LMB3	CAGGAAACAGCTATGACCATGATTAC

10

20

30

40

表 16: 8B8 親和性成熟およびホットスポット除去ライブラリーL1_L3 / H3 のためのプライマー

配列番号	名称	配列
177	CD19 L1 フォワード コンスタント	TGGTATCTCCAGAAACCGGGTCAGAGCCCGCAG
171	CD19 L1 リバー ランダム	表 15 を参照
178	CD19 L3 リバー ランダム	TTT AAT TTC CAG TTT AGT TCC TTG ACC GAA GGT 24 25 26 27 28 29 CTG CAG ACA ATA GTA GAC GCC AAC GTC TTC AGC 24.52% Y, 4% G/A/S/T/N/P/D/E/Q/V/L/I, 25: 52% P, 4% G/A/S/T/Y/N/H/D/E/Q/V/I, 26: 42% V, 10% L, 4% G/A/S/T/Y/N/P/D/E/Q/V/I, 27: 52% H, 4% G/A/S/T/Y/N/P/D/E/Q/V/I, 28: 42% T, 10% I, 4% G/A/S/T/Y/N/P/D/E/Q/V/L, 29: 45% L, 11% G, 4% A/S/T/Y/N/P/D/E/Q/V/I
179	CD19 L3 フォワード コンスタント	ACCTTCGGTCAAGGAACTAAACTGGAAATTAACG
180	CD19 H3 リバー ランダム	TT GGT GCT AGC AGA GCT TAC GGT CAC CGT GGT ACC TTG GCC CCA GTA ATC AAA 30 31 32 33 34 35 36 37 38 GCG TGC ACA ATA GTA AAC AGC GGT GTC 30.50% L, 3.8% G/A/S/T/P/H/Y/N/D/E/Q/V/I, 31: 50% A, 4.2% G/S/T/P/H/Y/N/D/E/Q/V/I, 32: 50% S, 4.2% G/A/T/P/H/Y/N/D/E/Q/V/I, 33: 50% G, 4.2% S/A/T/P/H/Y/N/D/E/Q/V/I, 34: 50% Y, 4.2% G/A/T/P/H/S/N/D/E/Q/V/I, 35: 50% Y, 4.2% G/A/T/P/H/S/N/D/E/Q/V/I, 36: 50% Y, 4.2% G/A/T/P/H/S/N/D/E/Q/V/I, 37: 50% T, 4.2% G/A/Y/P/H/S/N/D/E/Q/V/I, 38: 50% G, 4.2% Y/A/T/P/H/S/N/D/E/Q/V/I
176	LMB3	表 15 を参照

10

20

30

40

【 0 4 4 0 】

1 . 8 . 4 CDR - L 1 ホットスポット N 2 7 d 及び N 2 8 を欠いている親和性成熟 8 B 8 由来クローンの選択

CDR - L 1 ホットスポット N 2 7 d 及び N 2 8 を欠く親和性成熟クローンの選択のために、ファージディスプレイによる 2 つの選択アプローチを実施した :

【 0 4 4 1 】

第 1 のアプローチでは、両方のファージディスプレイライブラリーを用いて、ヒト CD 19 - Fc 融合タンパク質において選択を実施した。パニングラウンドは、次のパターンに従って溶液中で実施した : 1 . 約 10^{12} 個のファージミド粒子を、30 nM のビオチン化 CD 19 - Fc タンパク質に 1 ml の総体積において 0 . 5 時間で結合させ、 2 . ビ

50

オチン化CD19-Fcタンパク質及び特異的に結合したファージ粒子を、 5.4×10^7 個のストレプトアビジン被覆磁気ビーズを10分間加えることにより捕捉し、3.ビーズを、 $5 \times 1 \text{ ml}$ のPBS/Tween20及び $5 \times 1 \text{ ml}$ のPBSを用いて洗浄し、4.ファージ粒子を、 1 ml の 100 mM のTEAを加えることにより10分間溶出し、 500 ul の 1 M のTris/HCl (pH7.4)を加えることにより中和し、5.指数関数的に増殖する大腸菌TG1細菌を再感染させ、6.ヘルパーファージVCSM13で感染させ、その後ファージミド粒子をPEG/NaCl沈降させて次の選択ラウンドに使用する。減少する抗原濃度($30 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、 $10 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、及び $3 \times 10^{-9} \text{ M}$)を用いて3ラウンドにわたって選択を行った。ラウンド2及び3において、ストレプトアビジンビーズの代わりにニュートラアビジンプレートを用いて抗原：ファージ複合体の捕捉を行った。ニュートラアビジンプレートを $5 \times \text{PBS/Tween20}$ 及び $5 \times \text{PBS}$ により洗浄した。ラウンド3では、ファージがプレートから溶出される前に、「オフレート(off-rate)」選択のために、ニュートラアビジンプレートを2リットルのPBS中で一晩インキュベートした。更に、カニクイザルCD19-Fcタンパク質を、交差反応性結合剤を濃縮するためにラウンド2で使用した。

【0442】

第2の選択アプローチでは、細胞表面上にヒト又はカニクイザルCD19 ECDの何れかを一過性に発現する細胞でファージパニングを実施した。HEK細胞の一過性トランスフェクションのために、以下のタンパク質セグメントについてDNA配列(5' 3')を保有する発現プラスミドを生成した：Flaタグ、SNAPタグ、ヒト又はカニクイザル起源のどちらかのCD19 ECD、及び血小板由来増殖因子受容体(PDGFR)の膜貫通領域(配列番号227及び228)。細胞表面上のそれぞれのタンパク質(配列番号229及び230)の発現は、検出のために抗Fla抗体を用いたフローサイトメトリーによって確認した。両方のライブラリーを、ヒト又はカニクイザルCD19 ECD含有タンパク質融合体を発現する細胞に最初の選択ラウンドで曝露した。その後のパニングラウンドでは、CD19 ECDの種はそれに応じて交互にされた。無関係の膜タンパク質で一時的にトランスフェクトされた細胞を、前もってはっきりさせるために使用した。

【0443】

パニングラウンドは、次のパターンに従って実施した：

1. 上記の標準的な手順に従って、CD19 ECD又は無関係の膜貫通タンパク質の何れかを発現する構築物によるHEK細胞のトランスフェクション、
2. $5\% \text{ CO}_2$ 雰囲気をもつインキュベーター内で、 37°C で合計48時間の細胞のインキュベーション、
3. 遠心分離($250 \times g$ で3分間)による細胞の単離、並びにPBS/ $5\% \text{ BSA}$ 中の 1×10^7 CD19 ECD陽性細胞及び 1×10^7 陰性細胞のそれぞれの再懸濁、
4. 穏やかに回転するチューブローターを用いてファージライブラリーを 4°C で60分間、 1×10^7 CD19陰性細胞と共にインキュベートすることによる非特異的ファージの予備洗浄、
5. $250 \times g$ で3分間の細胞の遠心分離、新鮮なチューブへの上清の移入、 1×10^7 CD19陽性細胞の添加、及びチューブローター上における穏やかな回転により 4°C で60分間のインキュベーション、
6. $250 \times g$ で1分間の遠心分離による細胞の洗浄、上清の吸引、及び 1 ml のPBS中に再懸濁(8回)、
7. 1 ml の 100 mM のTEAを用いたファージ溶出、室温で5分間のインキュベーション、及び 500 ul の 1 M のTris-HCl、pH7.6での溶出液の中和、
8. 指数関数的に増殖する大腸菌TG1細菌の再感染、及び
9. ヘルパーファージVCSM13による感染とその後の選択ラウンドで使用されるファージミド粒子のPEG/NaCl沈殿。選択は3ラウンドにわたって行われた。

【0444】

両方の選択アプローチについて、特異的結合剤を以下のようにELISAによって同定した：ウェルあたり30 nMのビオチン化CD19-Fcタンパク質100 μlをニュートラアビジンプレートにコーティングした。Fab含有細菌上清を添加し、抗Flag/HRP二次抗体を用いて、結合するFabをそれらのFlagタグにより検出した。

【0445】

組換えヒトCD19についてELISA陽性であったクローンを、ヒトCD19 EC D含有発現プラスミド（配列番号227）で一過的にトランスフェクトした細胞を用いた細胞ベースのELISAで更に試験した。この分析は以下のように実施した：トランスフェクションの48時間後、HEK細胞を回収し、250 x gで5分間遠心分離した。次いで、細胞を氷冷PBS BSA 2%に再懸濁し、4 x 10⁶細胞/mlとし、氷上で20分間インキュベートして、非特異的結合部位をブロックした。100 u l中4 x 10⁵細胞を96ウェルプレートの各ウェルに分配し、250 x g及び4 で3分間遠心分離した。上清を吸引除去し、可溶性Fab断片を含む50 u lの細菌上清を50 u lの氷冷PBS / BSA 2%で希釈し、プレートに添加し、細胞と混合し、4 で1時間インキュベートした。その後、細胞を氷冷PBSにより3回洗浄した後、抗Fab-HRP抗体の1：2000希釈物を含む、ウェルあたり100 u lのPBS BSA 2%を添加した。1時間のインキュベーション時間の後、細胞を氷冷PBSで3回洗浄した。現象のために、1ウェルあたり100 u lの「1-step ultra TMB-ELISA」基質を添加した。10分間のインキュベーション時間の後、ウェルあたり40 u lのH₂SO₄ (1 M)を含有する新しい96ウェルプレートに上清を移し、吸光度を450 nMで測定した。バックグラウンドを超えて有意なシグナルを示すクローンを、ProteOn XPR36を用いたSPR分析によって動力学的スクリーニング実験に供した。

【0446】

1.8.5 SPRによる親和性成熟8B8由来変異体の同定

ELISA陽性クローンを更に特徴づけるために、オフ速度を表面プラズモン共鳴によって測定し、親のヒト化クローン8B8と比較した。

【0447】

この実験のために、7000 RUのポリクローナル抗ヒトFab抗体を、アミンカップリングによって、GLMチップの6つのチャンネル全てに固定化した（酢酸ナトリウムpH 4.5、25 μl / 分、240 s）（垂直配向）。それぞれの抗体含有細菌上清を濾過し、PBSで2倍に希釈し、次に垂直配向で100 ~ 400 応答単位（RU）の固定レベルを達成するように25 μl / 分で360秒間注入した。単量体CD19-Fcの注入：ワンショットキネティクス（one-shot kinetics）測定のために、注入方向を水平配向に変更し、精製単量体CD19-Fcの3倍希釈シリーズ（150 ~ 6 nMで濃度範囲を可変させる）を、50 μl / 分で別々のチャンネル1 - 4に沿って180秒の会合時間及び300秒の解離時間で同時に注入した。参照用に「インライン」ブランクを提供するために、第6チャンネルにおけるPBS注入と共に、親和性成熟CD19変異体への特異的結合のための陰性対照として、チャンネル5にヒトIgG Fc断片（150 nM）を注入した。再生は、10 mMグリシンpH 1.5及び50 mMのNaOHの2つのパルスにより30秒間90 u l / 分（水平配向）で行った。解離速度定数（k_{off}）は、センサーグラムを同時にフィッティングすることにより、ProteOn Manager v3.1ソフトウェアの単純な1対1ラングミュア結合モデルを用いて計算した。最も遅い解離速度定数を有するFabを発現するクローンを同定した。対応するファージミドの可変ドメインを配列決定した。重要なことは、CDR-L1中のアスパラギン残基（位置27 d及び28）の両方がセリン又はスレオニンにより置換され、両方の脱アミド化部位が除去されたことを示している。

表 17: 細菌上清を用いたスクリーニング分析で得られた親 8B8 及び選択されたクローン 2B11 の解離定数

クローン	解離定数 k_d (1/s)
親 8B8	3.01E-4
2B11	4.37E-6

10

【 0 4 4 8 】

表 18 は、クローン 8 B 8 - 0 1 8 及び 8 B 8 - 2 B 1 1 それぞれの C D R 並びに可変領域 V H 及び V L のアミノ酸配列を示す。

表 18: クローン 8B8-018 及び 8B8-2B11 の CDR 並びに可変領域 VH 及び VL のアミノ酸配列

配列番号	記述	配列
120	CD19 (8B8-018) CDR-H1	DYIMH
121	CD19 (8B8-018) CDR-H2	YINPYNDGSKYTEKFQG
122	CD19 (8B8-018) CDR-H3	GTYYYGSALFDY
123	CD19 (8B8-018) CDR-L1	KSSQSLENPNGNTYLN
124	CD19 (8B8-018) CDR-L2	RVSKRFS
125	CD19 (8B8-018) CDR-L3	LQLTHVPYT
126	CD19 (8B8-018) VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYIMHWVR QAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSIS TAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGSALFDYWGGGT TVTSS
127	CD19 (8B8-018) VL	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLENPNGNTYLN WYLQKPGQSPQLLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGGTDFTL KISRVEAEDVGVYYCLQLTHVPYTFGGGTKLEIK
128	CD19 (8B8-2B11) CDR-H1	DYIMH
129	CD19 (8B8-2B11) CDR-H2	YINPYNDGSKYTEKFQG
130	CD19 (8B8-2B11) CDR-H3	GTYYYGPQLFDY
131	CD19 (8B8-2B11) CDR-L1	KSSQSLETSTGTTYLN
132	CD19 (8B8-2B11) CDR-L2	RVSKRFS
133	CD19 (8B8-2B11) CDR-L3	LQLLEDPTY
134	CD19 (8B8-018) VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDYIMHWVR QAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSIS TAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGPQLFDYWGGGT TVTSS
135	CD19 (8B8-018) VL	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETSTGTTYLNW YLQKPGQSPQLLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCLQLLEDPTYTFGGGTKLEIK

20

30

40

【 0 4 4 9 】

実施例 2

「非標的化」単鎖 4 - 1 B B リガンド三量体含有 F c 融合抗原結合分子の調製及び精製
単鎖三量体リガンドをコードするポリペプチド鎖 (図 1 A) を用いて、非標的化 (生殖
系列対照、D P 4 7) 4 - 1 B B リガンド三量体含有 F c 融合抗原結合分子 (例えば図 3
B に示す一価対照) を F A P 標的化構築物について上述したように調製した。

50

【0450】

F A P 結合剤の重鎖及び軽鎖の可変領域の D N A 配列を、生殖系列コントロール (D P 4 7) のもと置換し、ヒト I g G 1 のホールの定常重鎖又はヒト I g G 1 の定常軽鎖のどちらかとともにフレーム内にサブクロニングした。

【0451】

非標的化単鎖 4 - 1 B B リガンド三量体含有 F c (k i h) 融合抗原結合分子を、F A P 標的化構築物について上述したように産生した。細胞は、対応する発現ベクターを 1 : 1 : 1 の比 (「ベクター三量体リガンド - ノブ鎖」 : 「ベクター D P 4 7 F a b - ホール鎖」 : 「ベクター D P 4 7 軽鎖」) でトランスフェクトした。

【0452】

表 1 9 は、一価 D P 4 7 含有 4 - 1 B B リガンド三量体含有 F c (k i h) 融合抗原結合分子の c D N A 及びアミノ酸配列をそれぞれ示す。

表 19: 一価 DP47 含有単鎖 4-1BB リガンド三量体含有 Fc(kih) 融合抗原結合分子 (DP47 単鎖 4-1BBL 三量体) の配列 (対照 1)

配列番号	記述	配列
66	三量体 hu 4-1BBL (71-254)-Fc ノブ鎖のヌクレオチド配列	表 1 を参照
69	DP47 Fc ホール鎖のヌクレオチド配列	<p>GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGC CTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT CACCTTTAGCAGTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCT CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTA GTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCG GTTCCACCATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGCTGTAT CTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTAT ATTACTGTGCGAAAGGCAGCGGATTTGACTACTGGGGCCA AGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGTGCTAGCACCAAGGGC CCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCT CTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACT ACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGC CCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAG TCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGC CCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGT GAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTT GAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGT GCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGACCGTCAGTCTTCCT CTCCCCC AAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGG ACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACG AAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCGCGGGAGGAGCA GTACAACAGCACGTACCGTGTGGTGCAGCGTCTCACCGTC CTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCATCGAGAAAAC CATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGT GTGCACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAAC CAGGTCAGCCTCTCGTGCAGTCAAAGGCTTCTATCCCA GCGACATCGCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG AGAACA ACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGA CGGCTCCTTCTTCTCGTGCAGCAAGCTCACCGTGGACAAG AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGA TGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCT CTCCCTGTCTCCGGGTAAA</p>

10

20

30

40

70	DP47 軽鎖のヌクレオチド配列	GAAATCGTGTTAACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCTTGCAGGGCCAGTCA GAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAA CCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGAGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTG GATCCGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGA GCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTA GCTCACCGCTGACGTTCCGGCCAGGGGACCAAAGTGGAAAT CAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCG CCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTG TGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAAGT ACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACC TACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACT ACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCATCA GGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGG AGAGTGT	10
15	三量体 hu 4-1BBL(71-254)-Fc ノブ鎖	表 1 を参照	20
71	DP47 Fc ホール鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAP GKGLEWVSAISGSGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKGSDFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKA KGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEW ESNQGPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	30
72	DP47 軽鎖	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPG QAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAV YYCQQYGGSSPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC	40

【 0 4 5 3 】

表 20 は、DP47 含有単鎖 4 - 1 B B リガンド三量体含有 Fc (kih) 融合分子の収率及び最終の単量体含有量をまとめたものである。

表 20: DP47 含有 4-1BBL 三量体含有 Fc(kih) 融合分子の産生の概要

構築物	単量体[%] [%] (SEC)	収率[mg/l]	LC/MS (non red)
DP47 含有 4-1BBL 三量体含有 Fc(kih) 融合分子 (DP47 単鎖 4-1BBL 三量体) 対照 1	100	8	理論値*: 156912.9 Da 実験値: 156937.5 Da * 末端リジン無し

10

【 0 4 5 4 】

表 2 1 は、二価 DP 4 7 含有 4 - 1 B B リガンド三量体含有 F c (k i h) 融合抗原結合分子 (対照 2) の c D N A 及びアミノ酸配列をそれぞれ示す。

表 21: 二価 DP47 含有単鎖 4-1BB リガンド三量体含有 Fc(kih) 融合抗原結合分子 (DP47 単鎖 4-1BBL 三量体) の配列 (対照 2)

配列番号	記述	配列
69	DP47 Fc ホール鎖のヌクレオチド配列	表 19 を参照
181	三量体 hu 4-1BBL(71-254) に融合した DP47 Fc ノブのヌクレオチド配列	<p>GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGC CTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT CACCTTTAGCAGTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCT CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTA GTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCG GTTCAACCATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGCTGTAT CTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTAT ATTACTGTGCGAAAGGCAGCGGATTTGACTACTGGGGCCA AGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGTGCTAGCACCAAGGGC CCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCT CTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACT ACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGC CCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAG TCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGC CCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGT GAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTT GAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGT GCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCT CTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGG ACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGG AAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCA GTACAACAGCACGTACCGTGTGGTACCGTCTCACCGTCT CTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCATCGAGAAAAC CATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGT GTACACCCTGCCCCCTGCAGAGATGAGCTGACCAAGAAC CAGGTGTCCCTGTGGTGCCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCT CCGATATCGCCGTGGAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCG AGAACAACACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGA CGGCTCATTCTTCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAG AGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCTGCAGCGTG ATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACCCAGAAGTCCC TGAGCCTGAGCCCTGGCGGAGGCGGAGGATCTGGCGGGG GAGGATCTAGAGAGGGCCCTGAGCTGTCCCCGATGATCC TGCTGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAG CTGGTGGCCAGAACGTGCTGCTGATCGACGGCCCTCTGA</p>

10

20

30

40

		<p>GCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGAC AGGCGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTG GTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTTCAGCTGG AACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAGGGATCTGGATCTGT GTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCCCTGAGATCAGCTGCT GGCGCTGCTGCTCTGGCTCTGACAGTGGATCTGCCTCCTG CCAGCAGCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGG CAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGT GCATCTGCACACAGAAGCCAGAGCCAGGCACGCTTGGCA GCTGACACAGGGCGCTACAGTGTGGCCTGTTTCAGAGTG ACCCCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCG AAGGCGGCGGAGGCTCCGGAGGAGGCGGCTCTAGAGAAG GACCTGAACTGAGCCCAGACGACCCCGCAGGGCTGCTGG ATCTGAGACAGGGAATGTTCCGCCAGCTGGTGGCTCAGAA TGTGCTGCTGATTGATGGACCCCTGTCTGGTACTCCGAC CCAGGGCTGGCAGGGGTGTCCCTGACTGGCGGACTGTCTT ACAAAGAAGATACAAAAGAACTGGTGGTGGCTAAAGCTGG GGTGTACTATGTGTTTTTTTCAGCTGGAAGTGGCGGGTG GTGGCTGGGGAAGGCAGTGGCTCTGTGTCCCTGGCACTGC ATCTGCAGCCTCTGCGCAGTGTGCAGGCGCAGCCGCACT GGCACTGACTGTGGACCTGCCCCAGCTTCCAGCGAGGCT AGAAACAGCGCCTTCGGGTTTCAAGGACGCCTGCTGCATC TGAGCGCCGGACAGCGCCTGGGAGTGCATCTGCATACTGA GGCTAGGGCCAGACATGCCTGGCAGCTGACCCAGGGGGC AACTGTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACACCTGAGATCCCC GCTGGCCTGCCAAGCCCTAGATCAGAAGGCGGAGGGGGA TCAGGGGGAGGCGGATCCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGC CCCGATGATCCTGCTGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCA TGTTTGCTCAGCTGGTGGCCAGAACGTGCTGCTGATCGA TGGCCCCCTGTCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGC GTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCA AAGAAGTGGTGGTGGCCAAGGCCGCGTGTACTACGTGTT CTTTCAGCTGGAAGTGCAGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGA TCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGA GAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGACAGTGG TCTGCCTCCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCGCATTT GGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGA GGCTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGAC ACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGTGGGCC TGTTTCAGAGTGACCCCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTTC TCCAAGAAGCGAA</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p> <p>40</p>
70	DP47 軽鎖のヌクレオチド配列	表 19 を参照	
71	DP47 Fc ホール	表 19 を参照	

	鎖	
182	三量体 hu 4-1BBL(71-254)に融合した DP47 Fc ノブ	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAP GKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKGSDFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNYHTQKSLSLSPGGGGGGSGGGGSREGPELSP DDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSL TGGLSYKEDTKELVAKAGVYYVFFQLELRRV VAGEGSGSVS LALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLL HLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATV LGLFRVTPEIPA GLPSRSEGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFA QLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELV AKAGVYYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAA ALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTE ARARHAWQLTQGATV LGLFRVTPEIPAGLPSRSEGGGGSGG GGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSW YSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVAKAGVYYVFFQLELRR V VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEAR NSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATV LGLFRVTPEIPAGLPSRSE
72	DP47 軽鎖	表 19 を参照

10

20

30

40

50

【 0 4 5 5 】

実施例 3

標的化単鎖 4 - 1 B B リガンド三量体含有 F c (k i h) 融合抗原結合分子及びそれらの対照の産生

本明細書中に先に記載したような標的化及び非標的化三量体 4 - 1 B B リガンド F c (k i h) 融合抗原結合分子のコード配列を、M P S V プロモーターからのインサートの発現を駆動し、C D S の 3 ' 末端に位置する合成ポリ A 配列を含むプラスミドベクターにクローニングした。更に、ベクターはプラスミドのエピソーム維持のための E B V O r i P 配列を含む。

【 0 4 5 6 】

標的化及び非標的化単鎖三量体 4 - 1 B B リガンド F c (k i h) 融合抗原結合分子は、ポリエチレンイミンを用いて H E K 2 9 3 - E B N A 細胞を哺乳動物発現ベクターと同時トランスフェクトすることによって産生された。細胞は、対応する発現ベクターを 1 : 1 : 1 の比 (「ベクターノブ鎖」 : 「ベクターホール鎖」 : 「ベクター軽鎖」) でトランスフェクトした。

【 0 4 5 7 】

5 0 0 m L 振盪フラスコ中での産生のために、トランスフェクションの 2 4 時間前に 3 億個の H E K 2 9 3 E B N A 細胞を播種した。トランスフェクションのために、細胞を 2 1 0 × g で 1 0 分間遠心分離し、上清を 2 0 m L の予め温めた C D C H O 培地と交換した。発現ベクター (2 0 0 μ g の全 D N A) を C D C H O 培地 2 0 m L 中で混合した

。540 μ LのPEIの添加後、溶液を15秒間混合し、室温で10分間インキュベートした。その後細胞を、DNA/PEI溶液と混合し、500 mLの振盪フラスコに移し、5%のCO₂雰囲気インキュベーター内において37℃で3時間インキュベートした。インキュベーション後、6 mMのL-グルタミン、5 g/LのPEPSOY及び1.2 mMバルプロ酸を補充したExcel培地160 mLを加え、細胞を24時間培養した。トランスフェクションの1日後、12%のFeedを加えた。7日間培養した後、少なくとも400 \times gで30~40分間遠心分離して上清を回収した。溶液を滅菌濾過し(0.22 μ mフィルター)、アジ化ナトリウムを0.01% (w/v)の最終濃度になるように添加し、4℃に保った。

【0458】

分泌されたタンパク質を、プロテインAを用いたアフィニティークロマトグラフィー、次いでサイズ排除クロマトグラフィーにより細胞培養上清から精製した。アフィニティークロマトグラフィーのために、上清を、リン酸ナトリウム(20 mM)、クエン酸ナトリウム(20 mM)緩衝液(pH 7.5)で平衡化したMab Select Sureカラム(CV = 5~15 mL、GE Healthcare製の樹脂にロードした。未結合のタンパク質を、少なくとも6カラム容量の同じ緩衝液で洗浄することによって除去した。結合したタンパク質を、20 mMクエン酸ナトリウム、100 mM塩化ナトリウム、100 mMグリシン緩衝液(pH 3.0)を用いた直線勾配(20 CV)又は段階溶出(8 CV)の何れかを用いて溶出させた。直線勾配のために、更なる4カラム容積の段階溶出を適用した。

【0459】

収集した画分のpHを、1/10 (v/v)の0.5 Mリン酸ナトリウム(pH 8.0)を加えることによって調整した。タンパク質を、濃縮し、20 mMヒスチジン、150 mM塩化ナトリウム、0.01% (v/v) Tween 20溶液(pH 6.0)で平衡化したHi Load Superdex 200カラム(GE Healthcare)上にロードした。

【0460】

タンパク質濃度は、アミノ酸配列に基づいて計算したモル吸光係数を用いて280 nmでの光学密度(OD)を測定することによって決定した。標的化三量体4-1BBリガンドFc(kih)融合体の純度及び分子量を、還元剤(5 mMの1,4-ジチオトレイトール)の存在下及び非存在下で、SDS-PAGEにより、Coomassie Simple BlueTM Safe Stain (Invitrogen USA)により染色して、又はCaliper Lab Chip GXII (Perkin Elmer)を使用してCE-SDSにより分析した。試料の凝集物含有量を、25 mMのK₂HPO₄、125 mMのNaCl、200 mMのL-アルギニン塩酸塩、0.02% (w/v) NaN₃、pH 6.7のランニングバッファー中で、25℃において平衡化されたTSK gel G3000 SW XL分析的サイズ除外カラム(Tosoh)を用いて分析した。

【0461】

表22は、標的化及び非標的化鎖三量体4-1BBリガンドFc(kih)融合抗原結合分子の収率及び最終の単量体含有量をまとめたものである。

10

20

30

40

表 22: 標的化及び非標的化単鎖 4-1BB リガンド三量体含有 Fc(kih) 融合抗原結合分子の生化学的分析

構築物	単量体[%] (SEC)	収率 [mg/l]
二価 FAP(4B9) 標的化単鎖三量体 4-1BB リガンド Fc(kih) 融合抗原結合分子 化合物 S2	92.2	2.7
二価 CEA(sm9b) 標的化単鎖三量体 4-1BB リガンド Fc(kih) 融合抗原結合分子 化合物 S4	98.9	3.9
対照抗原結合分子としての二価非標的化三量体 4-1BB 単鎖リガンド Fc 融合体 対照 2	89	2.0
一価 FAP(4B9) 標的化単鎖三量体 4-1BB リガンド Fc(kih) 融合抗原結合分子 化合物 S3	97.5	21.2
一価 CEA(sm9b) 標的化単鎖三量体 4-1BB リガンド Fc(kih) 融合抗原結合分子 化合物 S5	94.5	4.7

10

20

【 0 4 6 2 】

実施例 4

4 - 1 B B の調製、精製及び特徴づけ

ヒト、マウス又はカニクイザル 4 - 1 B B の外部ドメインをコードする DNA 配列 (表 2 3) を、ノブ上のヒト I g G 1 重鎖 C H 2 及び C H 3 ドメインとともにフレーム内にサブクロニングした (Merchant et al., 1998)。A c T E V プロテアーゼ切断部位を、抗原外部ドメインとヒト I g G 1 の F c との間に導入した。定方向のビオチン化のための A v i タグを抗原 - F c ノブの C 末端に導入した。S 3 5 4 C / T 3 6 6 W 変異を含む抗原 - F c ノブ鎖と、Y 3 4 9 C / T 3 6 6 S / L 3 6 8 A / Y 4 0 7 V 変異を含む F c ホール鎖との組み合わせは、4 - 1 B B 外部ドメイン含有鎖の単一コピーを含むヘテロ二量体の生成を可能にし、従って F c 結合抗原の単量体型を作り出す (図 3 C) 表 2 4 は、図 3 C に示される単量体抗原 F c (k i h) 融合分子の c D N A 及びアミノ酸配列を列挙する。

30

表 23: 抗原エクトドメイン (ECD) のアミノ酸番号付けとその起源

配列番号	構築物	起源	ECD
73	ヒト 4-1BB ECD	Q07011 に従って合成されたもの	aa 24-186
74	カニクイザル 4-1BB ECD	カニクイザルの血液から単離されたもの	aa 24-186
75	マウス 4-1BB ECD	P20334 に従って合成されたもの	aa 24-187

40

表 24: 単量体抗原 Fc(kih) 融合分子 (1 つの Fc ホール鎖と 1 つの抗原 Fc ノブ鎖との組み合わせによって産生される) の cDNA 及びアミノ酸配列

配列番号	抗原	配列	
76	Fc ホール鎖のヌクレオチド配列	<p>GACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACT CCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCA AGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGC GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTT CAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTGCATAATGCCAAGA CAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGT GGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATG GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCA GCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCATCCCGGGAT GAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAA AGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA ATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGT GCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCGTGAGCAAGCTCA CCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA</p>	10 20
77	ヒト 4-1BB 抗原 Fc ノブ鎖のヌクレオチド配列	<p>CTGCAGGACCCCTGCAGCAACTGCCCTGCCGGCACCTTCTG CGACAACAACCGGAACCAGATCTGCAGCCCCTGCCCCCC AACAGCTTCAGCTCTGCCGGCGGACAGCGGACCTGCGACAT CTGCAGACAGTGCAAGGGCGTGTTTCAAGACCCCGAAAGAGT GCAGCAGCACCCAGCAACGCCGAGTGCGACTGCACCCCGG CTTCCATTGTCTGGGAGCCGGCTGCAGCATGTGCGAGCAGG ACTGCAAGCAGGGCCAGGAACTGACCAAGAAGGGCTGCAA GGACTGCTGCTTCGGCACCTTCAACGACCAGAAGCGGGGCA TCTGCCGGCCCTGGACCAACTGTAGCCTGGACGGCAAGAG CGTGCTGGTCAACGGCACCAAGAACGGGACGTCTGTGTGC GGCCCCAGCCCTGCTGATCTGTCTCCTGGGGCCAGCAGCGT GACCCCTCCTGCCCTGCCAGAGAGCCTGGCCACTCTCCTC AGGTGACGAACAGTTATATTTTCAGGGCGGCTCACCCAAA TCTGCAGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACC TGAACCTCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAA AACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGT CAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTGCATAATG CCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTA CCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGC TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCC CTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGG GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATGC CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGTGGTGCCT GGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG AGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCT</p>	30 40

		CCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCCTCTACAGCAA GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTC TTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTA CACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATCCGGAG GCCTGAACGACATCTTCGAGGCCAGAAGATTGAATGGCAC GAG	
78	カニクイザル 4- 1BB 抗原 Fc ノブ 鎖のヌクレオチド 配列	TTGCAGGATCTGTGTAGTAACTGCCCAGCTGGTACATTCTG TGATAATAACAGGAGTCAGATTTGCAGTCCCTGTCTCCAA ATAGTTTCTCCAGCGCAGGTGGACAAAGGACCTGTGACATA TGCAGGCAGTGTAAGGTGTTTTCAAGACCAGGAAGGAGTG TTCTCCACCAGCAATGCAGAGTGTGACTGCATTTAGGGT ATCACTGCCTGGGGCAGAGTGCAGCATGTGTGAACAGGAT TGTAACAAGGTCAAGAATTGACAAAAAAGGTTGTAAAGA CTGTTGCTTTGGGACATTTAATGACCAGAAACGTGGCATCT GTCGCCCTGGACAACTGTTCTTTGGATGGAAAGTCTGTG CTTGTGAATGGGACGAAGGAGAGGGACGTGGTCTGCGGACC ATCTCCAGCCGACCTCTCTCCAGGAGCATCCTCTGCGACCC CGCCTGCCCTGCGAGAGAGCCAGGACACTCTCCGCAGGT CGACGAACAGTTATATTTTCAGGGCGGCTCACCCAAATCTG CAGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAA CTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACC CAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACAT GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAA GTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCA AGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCG TGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGA ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTC CCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCA GCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATGCCGG GATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGTGGTGCCTGGT CAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACATAAGACCACGCCTCC CGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGC TCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTC TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACAC GCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATCCGGAGGCC TGAACGACATCTTCGAGGCCAGAAGATTGAATGGCACGAG	10 20 30
79	マウス 4-1BB 抗 原 Fc ノブ鎖	GTGCAGAACAGCTGCGACAACCTGCCAGCCCGGCACCTTCTG CCGGAAGTACAACCCCGTGTGCAAGAGCTGCCCCCAGC ACCTTCAGCAGCATCGGGGCCAGCCAACTGCAACATCTG CAGAGTGTGCGCCGGCTACTTCCGGTTCAAGAAGTTCTGCA GCAGCACCCACAACGCCGAGTGCAGTGCATCGAGGGCTT CCTACTGCCTGGGCCCCAGTGCACCAGATGCGAGAAGGAC TGCAGACCCGGCCAGGAACCTGACCAAGCAGGGCTGTAAGA CCTGCAGCCTGGGCACCTTCAACGACCAGAACGGGACCGG CGTGTGCCGGCCTTGGACCAATTGCAGCCTGGACGGGAGAA GCGTGCTGAAAACCGGCACCACCGAGAAGGACGTGCTGTG CGGCCCTCCCGTGGTGTCTTTCAGCCCTAGCACCACCATCA	40

		GCGTGACCCCTGAAGGCGGCCCTGGCGGACACTCTCTGCA GGTCCTGGTCGACGAACAGTTATATTTTCAGGGCGGCTCAC CCAAATCTGCAGACAAAACACTCACACATGCCACCGTGCCCA GCACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCC CCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTG AGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCT GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA CGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTGCACCAGGAC TGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA AGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCA AAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCC ATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGACCCCTGTGGT GCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAG TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACATAAGACCA CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTAC AGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGA ACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAC CACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATC CGGAGGCCTGAACGACATCTTCGAGGCCAGAAGATTGAAT GGCACGAG	10 20
80	Fc ホール鎖	DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTL PPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKLSLSLSPGK	
81	ヒト 4-1BB 抗原 Fc ノブ鎖	LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICR QCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQ GQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGT KERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQVDEQLYF QGGSPKSADKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM HEALHNHYTQKLSLSLSPGKSGGLNDFEAQKIEWHE	30
82	カニクイザル 4- 1BB 抗原 Fc ノブ 鎖	LQDLCSNCPAGTFCDNNRSQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICR QCKGVFKTRKECSSTSNAECDGISGYHCLGAECMCEQDCKQ GQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGT KERDVVCGPSPADLSPGASSATPPAPAREPGHSPQVDEQLYF QGGSPKSADKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM HEALHNHYTQKLSLSLSPGKSGGLNDFEAQKIEWHE	40

83	マウス 4-1BB 抗原 Fc ノブ鎖	VQNSCDNCQPGTFCRKYNPVCKSCPPSTFSSIGGQPNCNICRV CAGYFRFKKFCSSTHNAECECIEGFHCLGPQCTRCEKDCRPGQ ELTKQGCKTCSLGTENDQNGTGVCRPWTNCSLDGRSVLKTGT TEKDVVCGPPVVSFSPSTTISVTPEGGPGGHSLLQVLVDEQLYF QGGSPKSADKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDMLISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSV HEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGLNDIFEAQKIEWHE
----	---------------------	--

10

【0463】

4-1BB-Fc融合体をコードする全ての配列を、MPSVプロモーターからのインサートの発現を駆動し、CDSの3'末端に位置する合成ポリAシグナル配列を含むプラスミドベクターにクローニングした。更に、ベクターはプラスミドのエピソーム維持のためのEBV OriP配列を含む。

【0464】

ビオチン化単量体抗原/Fc融合分子の調製のために、指数関数的に増殖する懸濁HEK293 EBNA細胞を、融合タンパク質の2つの成分(ノブ及びホール鎖)、並びにビオチン化反応に必要な酵素であるBirAをコードする3つのプラスミドで同時トランスフェクトした。対応するベクターを2:1:0.05比(「抗原ECD-AcTEV-Fcノブ」:「Fcホール」:「BirA」)で使用した。

20

【0465】

500mlの振盪フラスコ中でのタンパク質産生のために、4億個のHEK293 EBNA細胞を、トランスフェクションの24時間前に播種した。トランスフェクションのために、細胞を210gで5分間遠心分離し、予め温めた20mlのCD CHO培地により上清を置き換えた。発現ベクターを200µgのベクターDNAを含有する20mlのCD CHO培地に再懸濁した。540µLのポリエチレンイミン(PEI)の添加後、溶液を15秒間混合し、室温で10分間インキュベートした。その後細胞を、DNA/PEI溶液と混合し、500mlの振盪フラスコに移し、5%のCO₂雰囲気インキュベーター内において37°Cで3時間インキュベートした。インキュベーションの後、160mlのF17培地を加え、細胞を24時間培養した。トランスフェクションの一日後、1mMのバルプロ酸及び7%のFeedを培地に加えた。培養の7日後、細胞を210gで15分間スピンドウンすることによって細胞上清を回収した。溶液を滅菌濾過し(0.22µmフィルター)、アジ化ナトリウムを0.01%(w/v)の最終濃度になるように添加し、4°Cに保った。

30

【0466】

分泌されたタンパク質を、プロテインAを用いたアフィニティークロマトグラフィー、次いでサイズ排除クロマトグラフィーにより細胞培養上清から精製した。アフィニティークロマトグラフィーのために、40mlの20mMリン酸ナトリウム、20mMクエン酸ナトリウム、pH7.5で平衡化したHiTrap Protein A HPカラム(CV=5ml、GE Healthcare)に上清をロードした。未結合タンパク質を、少なくとも10カラム容量の20mMリン酸ナトリウム、20mMクエン酸ナトリウム、0.5M塩化ナトリウム含有緩衝液(pH7.5)で洗浄することにより除去した。結合したタンパク質を、20カラム容量の20mMクエン酸ナトリウム、0.01%(v/v)Tween-20、pH3.0に対して作製された塩化ナトリウムの線形pH勾配(0~500mM)を用いて溶出させた。次にカラムを、10カラム容量の20mMクエン酸ナトリウム、500mM塩化ナトリウム、0.01%(v/v)Tween-20、pH3.0で洗浄した。

40

【0467】

50

収集した画分の pH を、1/40 (v/v) の 2 M の Tris (pH 8.0) を加えることによって調整した。タンパク質を、濃縮し、濾過し、2 mM の MOPS、150 mM 塩化ナトリウム、0.02% (w/v) アジ化ナトリウム溶液 (pH 7.4) で平衡化した HiLoad Superdex 200 カラム (GE Healthcare) 上にロードした。

【0468】

ヒト受容体に対する親和性決定のために、ヒト 4-1BB の外部ドメインも、avi (GLNDIFEAQKIEWHE、配列番号 84) 及びヘキサヒスチジンタグとともにフレーム内にサブクロニングした。タンパク質の産生を、Fc 融合タンパク質について上記のように行った。分泌されたタンパク質は、キレートクロマトグラフィー、続いてサイズ排除クロマトグラフィーによって細胞培養上清から精製された。最初のクロマトグラフィー工程は、20 mM リン酸ナトリウム、500 nM 塩化ナトリウム、pH 7.4 で平衡化した NiNTA Superflow Cartridge (5 ml、Qiagen) で行った。溶出は、5% ~ 45% の溶出緩衝液 (20 mM リン酸ナトリウム、500 nM 塩化ナトリウム、500 mM イミダゾール、pH 7.4) からの 12 カラム容量に対する勾配を適用することによって行った。タンパク質を、濃縮し、濾過し、2 mM の MOPS、150 mM 塩化ナトリウム、0.02% (w/v) アジ化ナトリウム溶液 (pH 7.4) で平衡化した HiLoad Superdex 75 カラム (GE Healthcare) 上にロードした。

表 25: 単量体ヒト 4-1BB His 分子の配列

配列番号	抗原	配列
85	ヌクレオチド配列 ヒト 4-1BB His	CTGCAGGACCCCTGCAGCAACTGCCCTGCCGGCACCTTCTGC GACAACAACCGGAACCAGATCTGCAGCCCCTGCCCCCAAC AGCTTCAGCTCTGCCGGCGACAGCGGACCTGCGACATCTGC AGACAGTGCAAGGGCGTGTTTCAGAACCCGAAAGAGTGACGCA GCACCAGCAACGCCGAGTGCGACTGCACCCCGGCTTCCATT GTCTGGGAGCCGGCTGCAGCATGTGCGAGCAGGACTGCAAGC AGGGCCAGGAACTGACCAAGAAGGGCTGCAAGGACTGCTGCTT CGGCACCTTCAACGACCAGAAGCGGGGCATCTGCCGGCCCTG GACCAACTGTAGCCTGGACGGCAAGAGCGTGCTGGTCAACGG CACCAAAGAACGGGACGTCGTGTGCGGCCCCAGCCCTGCTGA TCTGTCTCCTGGGGCCAGCAGCGTGACCCCTCCTGCCCTGCC AGAGAGCCTGGCCACTCTCCTCAGGTCGACGAACAGTTATATT TTCAGGGCGGCTCAGGCCTGAACGACATCTTCGAGGCCAGAA GATCGAGTGGCAGGAGCTCGAGCTCACCACCATCACCATCAC
86	ヒト 4-1BB His	LQDPCSNCPAGTFCDNRRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQC KGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQEL TKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVV CGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQVDEQLYFQGGSGLNDI FEAQKIEWHEARAHHHHHH

【0469】

実施例 5

表面プラズモン共鳴による FAP 標的化単鎖 4-1BB リガンド三量体含有 Fc 融合抗原結合分子の生化学的特徴づけ

FAP 標的化単鎖 4-1BB リガンド三量体含有 Fc (kih) 融合抗原結合分子の組換え 4-1BB への結合を、表面プラズモン共鳴 (SPR) によって評価した。全ての SPR 実験は、ランニングバッファーとして HBS-E (0.01 M の HEPES pH

7.4、0.15 MのNaCl、3 mMのEDTA、0.005%の界面活性剤P20、Biacore、Freiburg/Germany)を用いて25で行った。

【0470】

FAP標的化又は「非標的化」4-1BBリガンド三量体含有Fc(kih)融合抗原結合分子と組換え4-1BB(ヒト、カニクイザル及びマウス)との間の相互作用のアビディティを図5Aに示すように決定した。データは、4-1BBリガンド三量体含有Fc(kih)融合抗原結合分子の全ての変異体(例えば、図5のFAP(28H1)単鎖4-1BBL三量体(化合物S1)及び図6の「非標的化」DP47単鎖4-1BBL三量体(対照A)の曲線を参照)は、ヒト及びカニクイザル4-1BBに対して同程度のアビディティで結合するが、マウス相同体に対しては無視し得ることを実証した。

10

【0471】

組換えビオチン化ヒト、カニクイザル及びマウス4-1BB Fc(kih)融合分子を、標準カップリング指示(Biacore、Freiburg/Germany)を用いてSAチップ上で直接カップリングさせた。固定化レベルは約30共鳴単位(RU)であった。FAP標的化4-1BBリガンド三量体含有Fc(kih)融合抗原結合分子(化合物S1)又はDP47含有対照を、0.9~500 nMの濃度範囲で、30 µL/分の流速で、180秒にわたってフローセルを通過させた。解離を180秒間モニターした。バルク屈折率の差は、基準の空のフローセルで得られた応答を差し引くことによって補正した。

20

【0472】

親和性測定(図7)のために、抗ヒトFc特異的抗体の約7200共鳴単位(RU)の直接カップリングを、標準アミンカップリングキット(GE Healthcare)を用いてpH5.0でCM5チップで行った。50 nMでのFAP標的化又は非標的化単鎖4-1BBリガンド三量体含有Fc(kih)融合抗原結合分子をフローセル2で60秒間30 µL/分の流速で捕捉した。hu4-1BB avi Hisの希釈シリーズ(1.95~1000 nM)を両方のフローセルに30 µL/分で120秒間通過させ、結合相を記録した。解離相を180秒間モニターし、試料溶液からHBS-EPに切り替えることによってトリガーした。60秒間の3 MのMgCl₂の二重注入を用いて、各サイクル後にチップ表面を再生した。バルク屈折率の差は、基準フローセル1で得られた応答を差し引くことによって補正した。標的化単鎖三量体4-1BBリガンドFc(kih)融合抗原結合分子とhu4-1BB avi Hisとの間の相互作用のために、親和定数は、Biaevalソフトウェア(GE Healthcare)を用いて1:1ラングミュア結合に適合させることによって速度定数から誘導された。解離定数は表26に見出すことができる。

30

表 26: 1:1 ラングミュア結合へのフィッティング及び親和性定数

リガンド	分析物	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
FAP 単鎖 4-1BBL 三量体 化合物 S1	Hu 4-1BB avi His	6.2E+04	3.3E-02	5.4E-07
DP47 単鎖 4-1BBL 三量体 対照 1	Hu 4-1BB avi His	6.2E+04	3.3E-02	5.2E-07

40

【0473】

実施例 6

標的化単鎖OX40リガンド三量体含有Fc融合抗原結合分子の調製及び精製

50

ヒトOX40リガンドの外部ドメインの一部(アミノ酸51-183)をコードするDNA配列を、UniProtアクセッション番号P23510(配列番号38)に従って合成した。2つのAsn-結合グリコシル化部位(N90及びN114)を変異誘発によってアスパラギン酸(Asp)に置換した。

【0474】

(G4S)₂リンカーによって分離されたOX40リガンドの3つの外部ドメインを含むポリペプチドを図1B:ヒトOX40リガンド、(G4S)₂コネクタ、ヒトOX40リガンド、(G4S)₂コネクタ、ヒトOX40リガンドに記載のようにクローニングした。

【0475】

単鎖三量体OX40リガンドをコードするポリペプチドを、配列番号57のリンカー(GSPGSSSSGS)を用いて、ノブのヒトIgG1重鎖CH2及びCH3ドメインとともにフレーム内にサブクローニングした(Merchant, Zhu et al. 1998)。

【0476】

線維芽細胞活性化タンパク質(FAP)に特異的な結合剤をコードする重鎖及び軽鎖DNA配列の可変領域を、ヒトIgG1のホールの定常重鎖(Carter, 2001)又はヒトIgG1の定常軽鎖のどちらかとともにフレーム内にサブクローニングした。

【0477】

国際特許出願番号WO2012/130831A1に記載される方法に従って、Fcガンマ受容体への結合を抑制するために、Pro329Gly、Leu234Ala及びLeu235Ala変異がノブ及びホール重鎖の定常領域に導入されている。

【0478】

S354C/T366W変異を含む単鎖リガンド-Fcノブ鎖の、Y349C/T366S/L368A/Y407V変異を含む標的とされた抗FAP-Fcホール鎖及び抗FAP軽鎖との組み合わせは、単鎖三量体OX40リガンド及びFAP結合Fabを含むヘテロ二量体の生成を可能にする(図4A)。

【0479】

表27は、FAP標的化単鎖OX40リガンド三量体含有Fc(kih)融合抗原結合分子のcDNA及びアミノ酸配列をそれぞれ示す。単鎖三量体OX40リガンドをコードするポリペプチドを、配列番号57のリンカー(GSPGSSSSGS)を用いて、ノブのヒトIgG1重鎖CH2及びCH3ドメインとともにフレーム内にサブクローニングした(Merchant, Zhu et al. 1998)。

10

20

30

表 27:FAP(28H1)標的化ヒト OX40 リガンド三量体含有 Fc(kih)融合分子(FAP 単鎖 OX40L 三量体)の配列(化合物 S10)

配列番号	記述	配列
87	三量体 hu OX40L (51-183)-Fc ノブ 鎖のヌクレオチド配 列	<p>CAGGTGTCCCACAGATACCCAGAAATCCAGAGCATCAAGGT GCAGTTCACCGAGTACAAGAAAGAGAAGGGCTTCATCCTGA CCAGCCAGAAAGAGGACGAGATCATGAAGGTGCAGGACAAC AGCGTGATCATCAACTGCGACGGCTTCTACCTGATCAGCCT GAAGGGCTACTTCAGCCAGGAAGTGGACATCAGCCTGCACT ACCAGAAGGACGAGGAACCCCTGTTCCAGCTGAAGAAAGTG CGGAGCGTGAACAGCCTGATGGTGGCCAGCCTGACCTACAA GGACAAGGTGTACCTGAACGTGACCACCGACAACACCAGCC TGGACGACTTCCACGTGAACGGCGGCGAGCTGATCCTGATT CACCAGAACCCCGGCGAGTTCTGCGTGCTGGGAGGCGGAG GATCTGGCGGAGGCGGATCTCAGGTGTCACACCGCTACCCC CGGATTCAGTCCATTAAGGTGCAGTTTACAGAGTATAAGAA AGAAAAAGGCTTTATTCTGACTTCCCAGAAAGAAGATGAGA TTATGAAGGTGCAGGATAATTCTGTGATCATCAATTGTGATG GGTTTTATCTGATCTCCCTGAAAGGATACTTTAGTCAGGAAG TGGATATTTCTCTGCACTATCAGAAAGATGAAGAACCTCTGT TCCAGCTGAAAAAAGTGCCTCCGTGAATTCTCTGATGGTG GCTTCCCTGACATACAAAGACAAAGTGTATCTGAATGTGAC AACAGATAATACCTCCCTGGATGATTTCCATGTGAATGGGG GGGAAGTATTCTGATCCATCAGAACCCTGGGGAATTTTGT GTGCTGGGCGGAGGGGGAAGTGGCGGCGGAGGCAGTCAGG TGTCCCATCGGTATCCTAGAATCCAGTCTATCAAAGTGCAG TTTACTGAGTACAAAAAAGAGAAAGGATTCATTCTGACCTCT CAGAAAGAGGACGAAATTATGAAGGTGCAGGATAACAGTGT GATTATTAAGTGTGATGGGTTCTACCTGATTTCTCTGAAGGG ATATTTCAAGTCAGGAAGTGGACATCTCACTGCATTACCAGA AGGATGAAGAACCCTGTTCCAGCTGAAGAAAGTGCCTCT GTGAATAGCCTGATGGTGGCCTCTCTGACTTATAAGGATAA GGTGTACCTGAATGTGACAACTGACAATACTTCTCTGGACG ACTTTCATGTGAACGGGGGAGAGCTGATTCTGATCCACCAG AATCCAGGCGAGTTTTGTGTGCTGGGAAGCCCGGCAGCAG CAGCTCTGGATCCGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCC CAGCACCTGAAGCTGCAGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTC CCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCC TGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAG CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGACCAGG ACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAC AAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGC CAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCC CCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGTG GTGCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGG</p>

10

20

30

40

		AGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGAC CACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCT ACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGG GAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA ACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA	
67	抗 FAP(28H1) Fc ホール鎖のヌクレ オチド配列	GAAGTGCAGCTGCTGGAATCCGGCGGAGGCCTGGTGCAGC CTGGCGGATCTCTGAGACTGTCCTGCGCCGCCTCCGGCTTC ACCTTCTCCTCCCACGCCATGTCCTGGGTCCGACAGGCTCC TGGCAAAGGCCTGGAATGGGTGTCCGCCATCTGGGCCTCCG GCGAGCAGTACTACGCCGACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACC ATCTCCCGGGACAACCTCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGAT GAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTG CCAAGGGCTGGCTGGGCAACTTCGACTACTGGGGACAGGG CACCCCTGGTCACCGTGTCCAGCGCTAGCACCAAGGGCCCCT CCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGG CGGCACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCC CCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGAC CTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTG GCCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCTAGC AGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAA GCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAG AGCTGCGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCAGCACC TGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAA AACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC ACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGT CAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG CCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTA CCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGC TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCC CTCGGCGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGG GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCATCC CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTCTCGTGCAG AGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGG AGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCT CCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTCGTGCAGAA GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTC TTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTA CACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA	10 20 30
68	抗 FAP(28H1) 軽 鎖のヌクレオチド 配列	GAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCGGCACCCCTGTCTCTGAG CCCTGGCGAGAGAGCCACCCTGTCTGAGAGCCTCCCAG TCCGTGTCCCGGTCTACCTCGCCTGGTATCAGCAGAAGCC CGGCCAGGCCCTCGGCTGCTGATCATCGGCGCCTCTACCA GAGCCACCGGCATCCCTGACCGGTTCTCCGGCTCTGGCTCC GGCACCGACTTACCCTGACCATCTCCCGGCTGGAACCCGA GGACTTCGCCGTGACTACTGCCAGCAGGGCCAGGTGATCC CTCCACCTTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAATCAAGCGT ACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTTCATCTTCCCGCCATCTGA	40

ベクターノブ鎖」：「ベクターホール鎖」：「ベクター軽鎖」) でトランスフェクトした。

【0482】

500 mL 振盪フラスコ中での産生のために、トランスフェクションの24時間前に4億個のHEK293 EBNA細胞を播種した。トランスフェクションのために、細胞を210 × gで5分間遠心分離し、上清を予め温めたCD CHO培地と交換した。発現ベクターを、DNAの量が最終的に200 μgになるまで20 mLのCD CHO培地中で混合した。540 μLのPEIの添加後、溶液を15秒間混合し、室温で10分間インキュベートした。その後細胞を、DNA/PEI溶液と混合し、500 mLの振盪フラスコに移し、5%のCO₂雰囲気インキュベーター内において37 °Cで3時間インキュベートした。インキュベーションの後、160 mLのF17培地を加え、細胞を24時間培養した。トランスフェクションの一日後、1 mMのバルプロ酸及び7%のFeedをサプリメントとともに加えた。7日間培養した後、210 × gで15分間遠心分離して上清を回収した。溶液を滅菌濾過し(0.22 μmフィルター)、アジ化ナトリウムを0.01% (w/v)の最終濃度になるように添加し、4 °Cに保った。

10

【0483】

標的化単鎖OX40リガンド三量体含有Fc(kih)融合抗原結合分子を、プロテインAを用いたアフィニティークロマトグラフィー、次いでサイズ排除クロマトグラフィーにより細胞培養上清から精製した。アフィニティークロマトグラフィーのために、20 mMリン酸ナトリウム、20 mMクエン酸ナトリウム、0.5 M塩化ナトリウム、0.01% (v/v) Tween-20含有緩衝液(pH 7.5)で平衡化したHiTrap Protein A HPカラム(CV = 5 mL, GE Healthcare)に上清をロードした。未結合のタンパク質を、少なくとも10カラム容量の同じ緩衝液で洗浄することによって除去した。結合したタンパク質を、100%の20 mMクエン酸ナトリウム、0.5 M塩化ナトリウム、0.01% (v/v)のTween-20含有緩衝液(pH 2.5)までの20カラム容量に対する直線的なpH勾配を用いて溶出した。次にカラムを、10カラム容量の20 mMクエン酸ナトリウム、0.5 M塩化ナトリウム、0.01% Tween-20緩衝液(pH 2.5)で洗浄した。

20

【0484】

収集した画分のpHを、1/40 (v/v)の2 MのTris(pH 8.0)を加えることによって調整した。タンパク質を、濃縮し、20 mMヒスチジン、150 mM塩化ナトリウム、0.01% (v/v) Tween-20溶液(pH 6.0)で平衡化したHiLoad Superdex 200カラム(GE Healthcare)上にロードした。

30

【0485】

タンパク質濃度は、アミノ酸配列に基づいて計算したモル吸光係数を用いて280 nmでの光学密度(OD)を測定することによって決定した。標的化OX40リガンド三量体含有Fc(kih)融合抗原結合分子の純度及び分子量を、SDS-PAGEにより、還元剤(5 mMの1,4-ジチオトレイトール)の存在下及び非存在下で、Coomassie Simple BlueTM Safe Stain(Invitrogen USA)により染色して分析した。試料の凝集物含有量を、25 mMのK₂HPO₄、125 mM塩化ナトリウム、200 mMのL-アルギニン塩酸塩、0.02% (w/v) NaN₃、pH 6.7のランニングバッファー中で、25 °Cにおいて平衡化されたTSK gel G3000 SW XL分析的サイズ除外カラム(Tosoh)を用いて分析した。

40

【0486】

標的化単鎖OX40リガンド三量体含有Fc(kih)融合抗原結合分子(化合物SC-10)を収率9.1 mg/ml及び最終単量体含量87% (SEC)で得た。

【0487】

実施例 7

「非標的化」単鎖OX40リガンド三量体含有Fc融合抗原結合分子の調製及び精製

50

「非標的化」構築物は、1 : 1 : 1の比率（「ベクターノブ鎖」：「ベクターホール鎖」：「ベクター軽鎖」）で同時トランスフェクトされた上記のOx40リガンド-Fcノブ鎖、DP47生殖系列コントロール-Fcホール鎖及びDP47軽鎖によって構成された（図4B）。

【0488】

標的化単鎖Ox40リガンド三量体含有Fc(kih)融合抗原結合分子の産生及び精製は、上記のように行われた。FAP結合剤の重鎖及び軽鎖の可変領域のDNA配列を、生殖系列コントロール(DP47)のもと置換し、ヒトIgG1のホールの定常重鎖又はヒトIgG1の定常軽鎖のどちらかとともにフレーム内にサブクローニングした。

【0489】

表28は、DP47含有4-1BBリガンド三量体含有Fc(kih)融合抗原結合分子のcDNA及びアミノ酸配列をそれぞれ示す。

表 28: DP47 含有単鎖 OX40 リガンド三量体含有 Fc(kih) 融合分子 (DP47 単鎖 OX40L 三量体) の配列 (対照 3)

配列番号	記述	配列
87	三量体 hu OX40L (51-183)-Fc ノブ鎖のヌクレオチド配列	表 27 を参照。
69	DP47 Fc ホール鎖のヌクレオチド配列	<p>GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGC CTGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATT CACCTTTAGCAGTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCT CCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTA GTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCG GTTACCCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT CTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTAT ATTACTGTGCGAAAGGCAGCGGATTTGACTACTGGGGCCA AGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGTGCTAGCACCAAGGGC CCATCGGTCTTCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCT CTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACT ACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGC CCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAG TCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGC CCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGT GAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTT GAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGT GCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCT CTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGG ACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACG AAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCA GTACAACAGCACGTACCGTGTGGTACGCTCCTCACCGTC CTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAAC CATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGT GTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAAC CAGGTACGCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCCA GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG AGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGA CGGCTCCTTCTTCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAG AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGA TGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCT CTCCCTGTCTCCGGGTTAA</p>

10

20

30

40

70	DP47 軽鎖のヌクレオチド配列	GAAATCGTGTAAACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCTTGCAGGGCCAGTCA GAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAA CCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGAGCATCCA GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTG GATCCGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGA GCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTA GCTCACCGCTGACGTTCCGGCCAGGGACCAAAGTGGAAAT CAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCG CCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTG TGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGT ACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACC TACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACT ACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCATCA GGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGG AGAGTGT	10
20	三量体 hu OX40L(51-183)-Fc ノブ鎖	表 27 を参照。	20
71	DP47 Fc ホール鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAP GKGLEWVSAISGSGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKGSDFDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKA KGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEW ESNQGPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	30
72	DP47 軽鎖	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPG QAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAV YYCQQYQSSPLTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC	40

【0490】

DP47 含有単鎖 OX40 リガンド三量体含有 Fc (kih) 融合抗原結合分子 (対照 3) を収率 7 mg/ml 及び最終単量体含量 100% (SEC) で得た。

【0491】

実施例 8

OX40 の調製、精製及び特徴づけ

ヒト、マウス又はカニクイザル OX40 の外部ドメインをコードする DNA 配列 (表 1) を、ノブ上のヒト IgG1 重鎖 CH2 及び CH3 ドメインとともにフレーム内にサブクローニングした (Merchant et al., 1998)。ACTEV プロテアーゼ切断部位を、抗

原外部ドメインとヒト IgG1 の Fc との間に導入した。定方向のビオチン化のための Avi タグを抗原 - Fc ノブの C 末端に導入した。S354C / T366W 変異を含む抗原 - Fc ノブ鎖と、Y349C / T366S / L368A / Y407V 変異を含む Fc ホール鎖との組み合わせは、OX40 外部ドメイン含有鎖の単一コピーを含むヘテロ二量体の生成を可能にし、従って Fc 結合抗原の単量体型を作り出す (図 4 C) 表 29 は、様々な OX40 外部ドメインのアミノ酸配列を示す。表 30 は、図 4 C に示される単量体抗原 Fc (kih) 融合分子の cDNA 及びアミノ酸配列を示す。

表 29: 抗原エクトドメイン (ECD) のアミノ酸番号付けとその起源

配列番号	構築物	起源	ECD
88	ヒト Ox40 ECD	P43489 に従って合成されたもの	aa 29-214
89	カニクイザル Ox40 ECD	カニクイザルの血液から単離されたもの	aa 29-214
90	マウス Ox40 ECD	P47741 に従って合成されたもの	aa 10-211

表 30: 単量体抗原 Fc(kih)融合分子(1つの Fc ホール鎖と1つの抗原 Fc ノブ鎖との組み合わせによって産生される)の cDNA 及びアミノ酸配列

配列番号	抗原	配列	
76	Fc ホール鎖のヌクレオチド配列	<p>GACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCAGCACCTGAACT CCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCA AGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGC GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTT CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGA CAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGT GGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATG GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCA GCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCATCCCGGGAT GAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTCTCGTGCGCAGTCAA AGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA ATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGT GCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCA CCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA</p>	10 20
91	ヒト OX40 抗原 Fc ノブ鎖のヌクレオチド配列	<p>CTGCACTGCGTGGGCGACACCTACCCCAGCAACGACCGGT GCTGCCACGAGTGCAGACCCGGCAACGGCATGGTGTCCCG GTGCAGCCGGTCCCAGAACACCGTGTGCAGACCTTGCGGC CCTGGCTTCTACAACGACGTGGTGTCCAGCAAGCCCTGCAA GCCTTGTACCTGGTGAACCTGCGGAGCGGCAGCGAGCGG AAGCAGCTGTGTACCGCCACCCAGGATACCGTGTGCCGGTG TAGAGCCGGCACCCAGCCCCTGGACAGCTACAAACCCGGC GTGGACTGCGCCCTTGCCCTCCTGGCCACTTCAGCCCTGG CGACAACCAGGCCTGCAAGCCTTGGACCAACTGCACCCTGG CCGGCAAGCACACCCTGCAGCCCAGCAATAGCAGCGA CGCCATCTGCGAGGACCGGGATCCTCCTGCCACCCAGCCT CAGGAAACCCAGGGCCCTCCCGCCAGACCCATCACCGTGC AGCCTACAGAGGCCTGGCCCAGAACCAGCCAGGGGCCTAG CACCAGACCCGTGGAAGTGCCTGGCGGCAGAGCCGTCGAC GAACAGTTATATTTTCAGGGCGGCTCACCCAAATCTGCAGA CAAACTCACACATGCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCC TGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAG GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGT GGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCA ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACA AAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGG TCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGC CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCC GAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATGCCGGGATGA</p>	30 40

		<p>CAGCGGCTACAAGCTGGGCGTGGACTGCGTGCCCTGCCCT CCTGGCCACTTCAGCCCCGGCAACAACCAGGCCTGCAAGC CCTGGACCAACTGCACCCTGAGCGGCAAGCAGACCAGACA CCCCGCCAGCGACAGCCTGGATGCCGTGTGCGAGGACAGA AGCCTGCTGGCCACCCTGCTGTGGGAGACACAGCGGCCCA CCTTCAGACCCACCACCGTGCAGAGCACCACCGTGTGGCC CAGAACCAGCGAGCTGCCAGTCCTCCTACCCTCGTGACAC CTGAGGGCCCCGTGACGAACAGTTATATTTTCAGGGCGGC TCACCCAAATCTGCAGACAAAACCTCACACATGCCACCGTG CCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCT TCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACC CCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGA CCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGG TGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAAC AGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCA GGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCA ACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC CCCCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCT GTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCG TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACATAAA GACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC TCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCA CAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTA AATCCGGAGGCCTGAACGACATCTTCGAGGCCAGAAGATT GAATGGCACGAG</p>	10
80	Fc ホール鎖	<p>DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVCTL PPSRDELTKNQVSLVSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK</p>	20
80	Fc ホール鎖	<p>DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVCTL PPSRDELTKNQVSLVSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK</p>	30
94	ヒト OX40 抗原 Fc ノブ鎖	<p>LHCVGDTYPSNDRCCHECRPGNGMVSRCRSRQNTVCRPCGP GFYNDVVSSKPCPKPCTWCNLRSGSERKQLCTATQDTVCRORA GTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGKH TLQPASNSSDAICEDRPPATQPQETQGPPARPITVQPTEAWP RTSQGPSTRPVEVPGGRAVDEQLYFQGGSPKSADKHTCPCP PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPCRDEL KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GKSGGLNDIFEAQKIEWHE</p>	40
95	カニクイザル OX40 抗原 Fc ノ	<p>LHCVGDTYPSNDRCCQECRPGNGMVSRCNRSRQNTVCRPCGP GFYNDVVSAKPCKACTWCNLRSGSERKQPCTATQDTVCRORA GTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGKH TLQPASNSSDAICEDRPPPTQPQETQGPPARPTTVQPTEAWP</p>	

	ブ鎖	RTSQRPSTRPVEVPRGPAVDEQLYFQGGSPKSADKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDEL KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GKSGGLNDIFEAQKIEWHE
96	マウス OX40 抗 原 Fc ノブ鎖	VTARRLNCVKHTYPSGHKCCRECQPGHGMVSRCDHTRDTLCH PCETGFYNEAVNYDTCKQCTQCNHRSGSELKQNCPTPTQDTV RCRPGTQPRQDSGYKLGVDVCPVPPGHFSPGNNQACKPWTN CTLSGKQTRHPASDSLDAVCEDRSLLATLLWETQRPTFRPTTV QSTTVWPRTSELPSPTLVTPPEGPVDEQLYFQGGSPKSADKTH TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCR DELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGKSGGLNDIFEAQKIEWHE

10

【0492】

20

OX40-Fc融合体をコードする全ての配列を、MPSVプロモーターからのインサートの発現を駆動し、CDSの3'末端に位置する合成ポリAシグナル配列を含むプラスミドベクターにクローニングした。更に、ベクターはプラスミドのエピソーム維持のためのEBV OriP配列を含んでいた。

【0493】

ビオチン化単量体抗原/Fc融合分子の調製のために、指数関数的に増殖する懸濁HEK293EBNA細胞を、融合タンパク質の2つの成分(ノブ及びホール鎖)、並びにビオチン化反応に必要な酵素であるBirAをコードする3つのプラスミドで同時トランスフェクトした。対応するベクターを2:1:0.05比(「抗原ECD-AcTEV-Fcノブ」:「Fcホール」:「BirA」)で使用した。

30

【0494】

500mlの振盪フラスコ中でのタンパク質産生のために、4億個のHEK293EBNA細胞を、トランスフェクションの24時間前に播種した。トランスフェクションのために、細胞を210gで5分間遠心分離し、予め温めた20mlのCDCHO培地により上清を置き換えた。発現ベクターを200μgのベクターDNAを含有する20mlのCDCHO培地に再懸濁した。540μLのポリエチレンイミン(PEI)の添加後、溶液を15秒間混合し、室温で10分間インキュベートした。その後細胞を、DNA/PEI溶液と混合し、500mlの振盪フラスコに移し、5%のCO₂雰囲気インキュベーター内において37°Cで3時間インキュベートした。インキュベーションの後、160mlのF17培地を加え、細胞を24時間培養した。トランスフェクションの一日後、1mMのバルプロ酸及び7%のFeedを培地に加えた。培養の7日後、細胞を210gで15分間スピンドウすることによって細胞上清を回収した。溶液を滅菌濾過し(0.22μmフィルター)、アジ化ナトリウムを0.01%(w/v)の最終濃度になるように添加し、4°Cに保った。

40

【0495】

分泌されたタンパク質を、プロテインAを用いたアフィニティークロマトグラフィー、次いでサイズ排除クロマトグラフィーにより細胞培養上清から精製した。アフィニティークロマトグラフィーのために、20mMリン酸ナトリウム、20mMクエン酸ナトリウム、0.5M塩化ナトリウム、0.01%(v/v)Tween-20含有緩衝液(pH7.5)で平衡化したHiTrap ProteinA HPカラム(CV=5mL、GE

50

Healthcare) に上清をロードした。未結合のタンパク質を、少なくとも10カラム容量の同じ緩衝液で洗浄することによって除去した。結合したタンパク質を、100%の20mMクエン酸ナトリウム、0.5M塩化ナトリウム、0.01%(v/v)のTween-20含有緩衝液(pH2.5)までの12カラム容量に対する直線的なpH勾配を用いて溶出した。次にカラムを、10カラム容量の20mMクエン酸ナトリウム、0.5M塩化ナトリウム、0.01% Tween-20緩衝液(pH2.5)で洗浄した。

【0496】

収集した画分のpHを、1/40(v/v)の2MのTris(pH8.0)を加えることによって調整した。タンパク質を、濃縮し、濾過し、2mMのMOPS、150mM塩化ナトリウム、0.02%(w/v)アジ化ナトリウム溶液(pH7.4)で平衡化したHiLoad Superdex 200カラム(GE Healthcare)上にロードした。

10

【0497】

ヒト受容体に対する親和性決定のために、ヒトOX40の外部ドメインも、avi(GLNDIFEAQKIEWHE、配列番号84)及びヘキサヒスチジンタグとともにフレーム内にサブクローニングした。配列を31に示す。

【0498】

タンパク質の産生を、Fc融合タンパク質について上記のように行った。分泌されたタンパク質は、キレートクロマトグラフィー、続いてサイズ排除クロマトグラフィーによって細胞培養上清から精製された。最初のクロマトグラフィー工程は、20mMリン酸ナトリウム、500nM塩化ナトリウム、pH7.4の溶液で平衡化したNiNTA Superflow Cartridge(5ml、Qiagen)で行った。溶出は、20mMリン酸ナトリウム、500nM塩化ナトリウム、500mMイミダゾール(pH7.4)を含有する5%~45%の溶出緩衝液からの12カラム容量に対する勾配を適用することによって行った。タンパク質を、濃縮し、濾過し、2mMのMOPS、150mM塩化ナトリウム、0.02%(w/v)アジ化ナトリウムの溶液(pH7.4)で平衡化したHiLoad Superdex 75カラム(GE Healthcare)上にロードした。

20

表 31: 単量体ヒト OX40 His 分子の配列

配列番号	抗原	配列
97	ヒト OX40 His のヌクレオチド配列	CTGCACTGCGTGGGCGACACCTACCCAGCAACGACCGGTGC TGCCACGAGTGCAGACCCGGCAACGGCATGGTGTCCCGGTGC AGCCGGTCCCAGAACACCGTGTGCAGACCTTGGCGCCCTGGC TTCTACAACGACGTGGTGTCCAGCAAGCCCTGCAAGCCTTGTA CCTGGTGCAACCTGCGGAGCGGCAGCGAGCGGAAGCAGCTGT GTACCGCCACCCAGGATACCGTGTGCCGGTGTAGAGCCGGCA CCCAGCCCCTGGACAGCTACAAACCCGGCGTGGACTGCGCCC CTTGCCCTCCTGGCCACTTCAGCCCTGGCGACAACCAGGCCTG CAAGCCTTGGACCAACTGCACCCTGGCCGGCAAGCACACCCT GCAGCCCGCCAGCAATAGCAGCGACGCCATCTGCGAGGACCG GGATCCTCCTGCCACCCAGCCTCAGGAAACCCAGGGCCCTCC CGCCAGACCCATCACCGTGCAGCCTACAGAGGCCTGGCCAG AACCAGCCAGGGGCCTAGCACCAGACCCGTGGAAGTGCCTGG CGGCAGAGCCGTGACGAACAGTTATATTTTCAGGGCGGCTCA GGCTGAACGACATCTTCGAGGCCAGAAAGATCGAGTGGCAC GAGGCTCGAGCTCACACCATCACCATCAC
98	ヒト OX40 His	LHCVGDTYPSNDRRCHECRPGNGMVSRCRSRQNTVCRPCGPGFY NDVVSSKPKPCTWCNLRSGSERKQLCTATQDTCRCRAGTQPL DSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGKHTLQPASN SSSDAICEDRDPPATQPQETQGPPARPITVQPTEAWPRTSQGPSTR PVEVPGGRAVDEQLYFQGGSGLNDIFEAQKIEWHEARAHHHHH

10

20

30

40

50

【 0 4 9 9 】

実施例 9

表面プラズモン共鳴による F A P 標的化単鎖 O X 4 0 リガンド三量体含有 F c 融合抗原結合分子の生化学的特徴づけ

F A P 標的化単鎖 O X 4 0 リガンド三量体含有 F c (k i h) 融合抗原結合分子の組換え O X 4 0 への結合を、表面プラズモン共鳴 (S P R) によって評価した。全ての S P R 実験は、ランニングバッファーとして H B S - E P (0 . 0 1 M の H E P E S p H 7 . 4 、 0 . 1 5 M の N a C l 、 3 m M の E D T A 、 0 . 0 0 5 % の界面活性剤 P 2 0 、 B i a c o r e 、 F r e i b u r g / G e r m a n y) を用いて 2 5 で行った。

【 0 5 0 0 】

F A P 標的化又は非標的化 O X 4 0 リガンド三量体含有 F c (k i h) 融合抗原結合分子と組換え O X 4 0 (ヒト、カニクイザル及びマウス) との間の相互作用のアビディティを図 8 A に示すように決定した。データは、O X 4 0 リガンド三量体含有 F c (k i h) 融合抗原結合分子の両方の変異体 (F A P 単鎖 O X 4 0 三量体 (図 8 の化合物 S 1 0) 、及び図 9 の D P 4 7 含有単鎖 O X 4 0 三量体 (対照 3) は、ヒト及びカニクイザル O X 4 0 に対して同程度のアビディティで結合するが、マウス相同体に対しては無視し得ることを実証した。

【 0 5 0 1 】

組換えビオチン化ヒト、カニクイザル及びマウス O X 4 0 F c (k i h) 融合分子を、標準カップリング指示 (B i a c o r e 、 F r e i b u r g / G e r m a n y) を用いて S A チップ上で直接カップリングさせた。固定化レベルは約 6 0 0 共鳴単位 (R U) であった。F A P 標的化 O X 4 0 リガンド三量体含有 F c (k i h) 融合抗原結合分子又は D P 4 7 含有対照を、0 . 2 ~ 5 0 0 n M の濃度範囲で、3 0 μ L / 分の流速で、1 2 0 秒にわたってフローセルを通過させた。解離を 2 2 0 秒間モニターした。バルク屈折率の

差は、基準の空のフローセルで得られた応答を差し引くことによって補正した。

【0502】

親和性測定(図10)のために、抗ヒトFc特異的抗体の約7200共鳴単位(RU)の直接カップリングを、標準アミンカップリングキット(GE Healthcare)を用いてpH5.0でCM5チップ上で行った。200nMでのFAP標的化又は非標的化単鎖三量体OX40リガンドFc(kih)融合分子をフローセル2で60秒間30μl/分の流速で捕捉した。huOX40 avi Hisの希釈シリーズ(31~2000nM)を両方のフローセルに30μl/分で120秒間通過させ、結合相を記録した。解離相を180秒間モニターし、試料溶液からHBS-Epに切り替えることによってトリガーした。60秒間の3MのMgCl₂の二重注入を用いて、各サイクル後にチップ表面を再生した。バルク屈折率の差は、基準フローセル1で得られた応答を差し引くことによって補正した。標的化単鎖三量体OX40リガンドFc(kih)融合分子とhuOX40 avi Hisとの間の相互作用のために、親和定数は、Biaevalソフトウェア(GE Healthcare)を用いて1:1ラングミュア結合に適合させることによって速度定数から誘導された。解離定数は表32に見出すことができる。

10

表 32:1:1 ラングミュア結合へのフィッティング及び親和性定数

リガンド	分析物	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
FAP 単鎖 OX40 三量体化合物 S10	Hu OX40 avi His	1.8E+05	1.3E-01	7.5E-07

20

【0503】

実施例 10

標的化4-1BBリガンド又はOX40リガンド三量体含有Fc融合抗原結合分子の機能的特徴づけ

10.1. FAP標的化4-1BBリガンド又はOX40リガンド三量体含有Fc(kih)融合抗原結合分子のナイーブ対活性化ヒトPMBc上への結合

30

パフィーコートはチューリッヒ献血センターから入手した。新鮮な末梢血単核細胞(PBMC)を単離するために、パフィーコートを同じ容量のDPBS(Gibco by Life Technologies、カタログ番号14190326)で希釈した。50mLのポリプロピレン遠心分離管(TPP、カタログ番号91050)に、15mLのHistopaque 1077(SIGMA Life Science、カタログ番号10771、ポリスクロース及びジアトリゾ酸ナトリウム、1.077g/mLの密度に調整)が供給され、パフィーコート溶液をそのHistopaque 1077の上に重ねた。チューブを450×gで30分間遠心分離した。PBMCを界面から採取し、DPBSで3回洗浄し、10%ウシ胎仔血清(FBS、Gibco by Life Technology、カタログ番号16000-044、ロット941273、ガンマ線照射、マイコプラズマフリー、及び56で35分間の熱不活性化)を含むRPMI 1640培地(Gibco by Life Technology、カタログ番号42401-042)、1%(v/v)GlutaMAX I(GIBCO by Life Technologies、カタログ番号3505038)、1mMのSodium-Pyruvate(SIGMA、カタログ番号S8636)、1%(v/v)のMEM非必須アミノ酸(SIGMA、カタログ番号M7145)及び50μMのメルカプトエタノール(SIGMA、M3148)からなるT細胞培地に再懸濁した。

40

【0504】

PBMCは単離直後に使用されたか(ナイーブで休止しているPBMC)、又は以下のようにそれらを刺激してT細胞の細胞表面上における4-1BB及びOX40の発現を誘

50

導した（活性化PBM C）：ナイーブPBM Cを、6ウェル組織培養プレート中で200 U/mLのProleukin及び2 µg/mLのPHA-Lを補充したT細胞培地で4日間培養した。再活性化のために、細胞を、10 µg/mLの抗ヒトCD3（クローンOKT3）及び2 µg/mLの抗ヒトCD28（クローンCD28.2）で被覆した6ウェル組織培養プレート上で、200 U/mLのProleukinを補充したT細胞培地中で、37 °C、5%CO₂で更に1日間活性化した。

【0505】

4-1BB結合の検出のために、96ウェルプレート（グライナー・バイオ・ワン、セルスター、カタログ番号650185）の丸底懸濁細胞の各ウェルに、 0.1×10^6 個のナイーブPBM C又は活性化PBM Cを加えた。OX40の検出のために、ナイーブヒトPBM Cと活性化ヒトPBM Cとを混合した。ナイーブで活性化されたヒトPBM Cの識別を可能にするために、ナイーブな細胞を、eFluor670細胞増殖色素（eBioscience、カタログ番号65-0840-85）を用いた結合アッセイの前に標識した。

10

【0506】

eFluor670細胞増殖色素標識のために、細胞を回収し、予熱した（37 °C）DPBSで洗浄し、DPBS中で 1×10^7 細胞/mLの細胞密度に調整した。eFluor670細胞増殖色素（eBioscience、カタログ番号65-0840-85）を最終濃度2.5 mM及びDPBS中の最終細胞密度 0.5×10^7 細胞/mLでナイーブなヒトPBM Cに添加した。次いで、細胞を暗所で室温で10分間インキュベートした。標識反応を停止させるために、2 mLのFBSを添加し、細胞をT細胞培地で3回洗浄した。 1×10^5 個のナイーブ、eFluor670標識ヒトPBM Cと非標識活性化ヒトPBM Cとの1:1混合物を丸底懸濁細胞96ウェルプレートの各ウェルに添加した（グライナー・バイオ・ワン、セルスター、カタログ番号650185）。

20

【0507】

プレートを4 °Cで400 × gで4分間遠心分離し、上清を払い落とした。細胞を、4 °Cの冷FACS緩衝液（2%FBS、5 mMのEDTA pH8（Amresco、カタログ番号E177）及び7.5 mMアジ化ナトリウム（Sigma-Aldrichカタログ番号S2002）を供給したDPBS）200 µLで1回洗浄した。細胞を、4 °Cで120分間、滴定FAP標的化又はDP47非標的化単鎖4-1BB又はOX40リガンド三量体含有Fc融合抗原結合分子を含有する4 °Cの冷FACSの50 µL/ウェル中でインキュベートした。プレートを200 µL/ウェルの4 °CのFACS緩衝液で4回洗浄した。

30

【0508】

4-1BB結合の検出のために、細胞を、 $0.125 \mu\text{g/mL}$ の抗ヒトCD4-BV421（クローンRPA-T4、マウスIgG1k、BioLegend、カタログ番号300532）、 $20 \mu\text{L/mL}$ の抗ヒトCD3-PerCP/Cy5.5（クローンSK7、マウスIgG1k、BD Bioscience、カタログ番号332771）、 $0.25 \mu\text{g/mL}$ の抗ヒトCD8a-APC（クローンRPA-T8、マウスIgG1k、BioLegend、カタログ番号301014）、 $0.25 \mu\text{g/mL}$ の抗ヒトCD56-AF488（クローンHCD56、マウスIgG1k、BD Pharmingen、カタログ番号318310）、 $2.5 \mu\text{g/mL}$ の抗ヒトFc 特異的ヤギIgG F(ab)₂断片-PE（Jackson ImmunoResearch、カタログ番号109116098又は109-116-170）を含む50 µL/ウェルの4 °Cの冷FACS緩衝液に再懸濁し、暗所で4 °Cで30分間インキュベートした。

40

【0509】

OX40結合の検出のために、細胞を、 $0.255 \mu\text{g/mL}$ の抗ヒトCD4-BV421（クローンRPA-T4、マウスIgG1k、BioLegend、カタログ番号300532）、 $0.250 \mu\text{g/mL}$ の抗ヒトCD8-BV711（クローンRPa-T8、マウスIgG1k、BioLegend、カタログ番号3010441）、 0.25

50

0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の抗ヒトCD45 - PerCP Cy5.5 (クローンHI30、マウスIgG1k、BioLegend、カタログ番号304028)、及び30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ フルオレセインイソチオシアネート (FITC) コンジュゲートAffiniPure抗ヒトIgG Fc断片特異的ヤギIgG F(ab')₂断片 (Jackson ImmunoResearch、カタログ番号109096098)を含む50 μL /ウェルの4の冷FACS緩衝液に再懸濁し、暗所で4で30分間インキュベートした。

【0510】

次いでプレートを200 μL /ウェルの4のFACS緩衝液で2回洗浄し、0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のDAPI (Santa Cruz Biotech、カタログ番号Sc-3598)を含む80 μL /ウェルのFACS緩衝液に細胞を最終的に再懸濁し、5レーザーLSR-Fortessa (BD Bioscience、DIVAソフトウェアを備える)を使用して同日に取得した。

10

【0511】

場合によっては、細胞を固定して翌日取得した。この方法のために、細胞を更に染色し、UV励起用の1:1000希釈LIVE/DEAD Fixable Blue Dead Cell Stain Kit (Life Technologies、Molecular Probes、カタログ番号L-23105)を含む100 μL /ウェルのDPBSを用いて一次抗体と暗所で4で30分間インキュベートした。二次抗体カクテルとのインキュベーション後、プレートを200 μL /ウェルの4のFACS緩衝液で2回洗浄し、1%ホルムアルデヒド (Sigma、HT501320-9.5L)を含有する50 μL /ウェルのDPBSで固定し、4で一晩インキュベートした。フローサイトメトリー分析のために、細胞を80 μL /ウェルのFACS緩衝液に再懸濁した。

20

【0512】

図11A~11D及び図12A~12Dに示されるように、FAP標的化又はDP47含有単鎖4-1BBL及びOX40L三量体含有Fc(kih)融合抗原結合分子のいずれも、休止中のヒトCD4⁺T細胞又はCD8⁺T細胞に結合しなかった。対照的に、全ての構築物は活性化CD8⁺又はCD4⁺T細胞に強く結合した。単鎖4-1BBL三量体含有分子は、CD8⁺T細胞と比較してCD4⁺に対する結合が約10倍低いことを示した。対照的に、単鎖OX40L三量体含有分子は、CD8⁺T細胞と比較してCD4⁺に結合すると特異的蛍光の約4倍高い強度を示した。これらの差異は、CD4⁺T細胞と比較してCD8⁺ヒトT細胞上の4-1BB発現の10-20倍高いレベルと非常に良く一致するが、後者はCD8⁺サブセットと比較して約4倍高いレベルのOX40を発現する。図11E~11Hに示すように、一価及び二価のFAP(28H1又は4B9)標的化又はCEA(sm9b)標的化又はDP47非標的化単鎖三量体4-1BBリガンドFc(kih)融合分子は休止中のヒトCD4⁺又はCD8⁺T細胞には結合しなかったが活性化CD8⁺T細胞には強く結合し、活性化CD4⁺T細胞には比較的低い程度で結合した。図11J~11Mに見られるように、結合は標的化又は二価性とは無関係であって、例えば単鎖三量体4-1BBリガンドの融合位置とは無関係である。

30

【0513】

10.2. FAP発現腫瘍細胞への結合

40

FAP発現細胞に対する結合アッセイのために、ヒト線維芽細胞活性化タンパク質(huFAP)発現細胞NIH/3T3-huFAPクローン39又はWM266-4細胞(ATCC、カタログ番号CRL-1676)を使用した。NIH/3T3-huFAPクローン39は、マウス胎仔線維芽細胞NIH/3T3細胞株(ATCC、カタログ番号CRL-1658)を発現ベクターpETR4921でトランスフェクションし、1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のピューロマイシン選択下でhuFAPを発現させることによって生成された。

【0514】

DPBS中に0.1 $\times 10^6$ 個のNIH/3T3-huFAPクローン39(4-1BBL)又は5 $\times 10^4$ 個のWM266-4細胞(OX40L)を、丸底懸濁細胞96ウェルプレートの各ウェルに添加した。プレートを4で400 $\times g$ で4分間遠心分離し、上

50

清を払い落としした。細胞を200 μ LのDPBSで1回洗浄し、ペレットを短時間の穏やかなボルテックスで再懸濁した。4-1BBL三量体含有Fc(kih)融合抗原結合分子の結合分析のために、1:5000希釈Fixable Viability Dye eFluor 450 (eBioscience、カタログ番号65086318)を含む4の冷DPBS緩衝液100 μ L/ウェルを添加し、プレートを4で30分間インキュベートした。細胞を200 μ Lの4の冷DPBS緩衝液で1回洗浄した。示された範囲のコセンテートで、全ての試料を、FAP標的化又はDP47含有単鎖4-1BBL又はOX40L三量体含有分子を含有する4の冷FACS緩衝液50 μ L/ウェルに、示された範囲の濃度で再懸濁し、4で1時間インキュベートした。その後、細胞を200 μ Lの4のFACS緩衝液で5回洗浄し、短時間のボルテックスで再懸濁した。細胞を、30 μ g/mLのフルオレセインイソチオシアネート(FITC)-コンジュゲートAffiniPure抗ヒトIgG Fc断片特異的ヤギIgG F(ab')₂断片(Jackson ImmunoResearch、カタログ番号109096098)を含む50 μ L/ウェルの4の冷FACS緩衝液で4で30分間更に染色した。細胞を200 μ Lの4のFACS緩衝液で2回洗浄した。OX40L三量体含有分子で染色した細胞を、0.2 μ g/mLのDAPI(Santa Cruz Biotech、カタログ番号Sc-3598)を含有する80 μ L/ウェルのFACS緩衝液に最終的に再懸濁し、5レーザーLSR-Fortessa(BD Bioscience、DIVAソフトウェアを備える)を使用して同日に取得した。

10

【0515】

20

細胞を4-1BBL三量体含有抗原結合分子で染色し、細胞を1%ホルムアルデヒドを含有する50 μ L/ウェルのDPBS中での再懸濁により固定した。翌日、細胞を100 μ LのFACS緩衝液に再懸濁し、5レーザーLSR-Fortessa(BD Bioscience、DIVAソフトウェアを備える)を用いて取得した。

【0516】

図13に示すように、単鎖三量体4-1BBL(化合物S1、図13A)又はOX40L(化合物S10、図13B)の何れかを含むFAP標的化分子は、ヒトFAP-発現細胞に効率的に結合した。対照的に、DP47抗体を含有するそれらの対応物(対照1及び3)は、そのような結合を示さなかった(図13A及び13B)。従って、FAP標的化単鎖三量体4-1BBL又はOX40L含有分子のみが腫瘍標的化特性を示した。図13C及び13Dに示されるように、DP47非標的化でなく一価及び二価FAP(28H1又は4B9)標的化単鎖三量体4-1BBL Fc(kih)融合抗原結合分子は、FAP発現ヒトメラノーマ細胞株MV-3及びWM-266-4に結合することができる。FAP結合クローン4B9は最も強い結合を示すが、一方クローン28H1はFAP発現腫瘍細胞に対してより低い親和性を示す。より低い親和性のために、一価FAP(28H1)標的化単鎖三量体4-1BBL(kih)融合分子と二価結合FAP(28H1)標的化hu IgG1 P329G LALA対照分子との間の差異がより明らかになる。二価結合FAP(28H1)標的化hu IgG1 P329G LALA対照分子は、より低いMFI(FAP分子の二価占有)及びより低いEC₅₀値を示す。

30

【0517】

40

10.3. CEA発現腫瘍細胞への結合

CEA発現腫瘍細胞に対する結合アッセイのために、肝転移MKN45(DMSZ、No. ACC409)から得たヒト胃(gastric)がん(胃(stomach))細胞株である以下のヒトCEA発現腫瘍細胞株を使用した。このアッセイは、実施例10.2のFAP発現MV-3及びWM-266-4腫瘍細胞株について記載したように実施した。

【0518】

図13Eに示されるように、DP47非標的化でなく一価及び二価CEA(sm9b)標的化単鎖4-1BBLリガンド三量体含有Fc(kih)融合抗原結合分子は、CEA発現ヒト胃がん細胞株MKN45に結合することができる。一価CEA(sm9b)標的化単鎖三量体4-1BBL Fc(kih)融合分子(化合物S5)と二価CEA(sm9

50

b) 標的化単鎖三量体 4 - 1 B B L F c (k i h) 融合分子 (化合物 S 4) との間の差異は、より低い M F I (C E A 分子の二価占有) に示されている。

【 0 5 1 9 】

10 . 4 . マウス 4 - 1 B B を発現する活性化マウス脾細胞への結合

マウス脾臓を 3 m L の P B S に集め、 g e n t l e M A C S チューブ (M i l t e n y i B i o t e c カタログ番号 1 3 0 - 0 9 6 - 3 3 4) 及び g e n t l e M A C S O c t o D i s s o c i a t o r (M i l t e n y i B i o t e c) を用いて単細胞懸濁液を生成した。その後、脾細胞を 7 0 μ m の前分離 (p r e - s e p a r a t i o n) フィルター (M i l t e n y i B i o t e c カタログ番号 1 3 0 - 0 4 1 - 4 0 7) に通して濾過し、 4 、 3 5 0 x g で 7 分間遠心分離した。上清を吸引し、細胞を 1 0 % (v / v) F B S 、 1 % (v / v) G l u t a M A X I 、 1 m M ピルビン酸ナトリウム、 1 % (v / v) M E M 非必須アミノ酸、 5 0 μ M の -メルカプトエタノール及び 1 0 % ペニシリン - ストレプトマイシン (S I G M A 、 カタログ番号 P 4 3 3 3) を供給した R P M I 1 6 4 0 培地に再懸濁した。 1 0 ⁶ 細胞 / m L を、 1 0 μ g / m L の抗マウス C D 3 アルメニアハムスター I g G (クローン 1 4 5 - 2 C 1 1 、 B i o L e g e n d 、 カタログ番号 1 0 0 3 3 1) 及び 2 μ g / m L の抗マウス C D 2 8 シリアンハムスター I g G (クローン 3 7 . 5 1 、 B i o L e g e n d 、 カタログ番号 1 0 2 1 0 2) をコーティングした 6 ウェル組織培養プレート中で 2 日間培養した。活性化されたマウス脾細胞を回収し、 D P B S で洗浄し、計数し、 0 . 1 x 1 0 ⁶ 個の細胞を 9 6 個の U 底非組織培養処理ウェルプレートの各ウェルに移した。上清を除去し、細胞を 4 で 3 0 分間、 1 : 5 0 0 0 希釈 F i x a b l e V i a b i l i t y D y e e F 6 6 0 (B i o s c i e n c e 、 カタログ番号 6 5 - 0 8 6 4 - 1 8) を含む 1 0 0 μ L / ウェルの D P B S 中で染色した。細胞を D P B S で洗浄し、異なる濃度の F A P 標的化若しくは D P 4 7 標的化単鎖三量体 4 - 1 B B L 抗原結合分子又は抗マウス C D 1 3 7 ヒト I g G 1 P 3 2 9 G L A L A m A b (クローン L o b . 1 2 . 3) を含む 5 0 u L の F A C S 緩衝液中で染色した。細胞を 4 で 6 0 分間インキュベートした。次いで、細胞を F A C S 緩衝液で 4 回洗浄し、 1 0 μ g / m L 精製抗マウス C D 1 6 / C D 3 2 ラット I g G - F c - B l o c k (B D P h a r m i n g e n 、 カタログ番号 5 5 3 1 4 2 クローン 2 . 4 G 2) 、 5 μ g / m L 抗マウス C D 8 b ラット I g G 2 b - F I T C (B i o L e g e n d 、 カタログ番号 1 2 6 6 0 6 、 クローン Y T S 1 5 6 . 7 . 7) 、 0 . 6 7 μ g / m L 抗マウス C D 3 ラット I g G 2 b - A P C - C y 7 (B i o L e g e n d 、 カタログ番号 1 0 0 2 2 2 、 クローン 1 7 A 2) 、 0 . 6 7 μ g / m L 抗マウス C D 4 ラット I g G 2 b - P E - C y 7 (B i o L e g e n d 、 カタログ番号 1 0 0 4 2 2 、 クローン G K 1 . 5) 、 2 μ g / m L 抗マウス N K 1 . 1 マウス (C 3 H x B A L B / c) I g G 2 a - P e r C p - C y 5 . 5 (B i o L e g e n d 、 カタログ番号 1 0 8 7 2 8 、 クローン P K 1 3 6) 及び 1 0 μ g / m L の P E コンジュゲート A f f i n i P u r e ポリクローナル F (a b ') ₂ 断片ヤギ抗ヒト I g G 、 F c 断片特異的、ウシ、マウス及びウサギ血清タンパク質に対して最小交差反応性 (J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h 、 カタログ番号 1 0 9 - 1 1 6 - 1 7 0) を含有する 5 0 μ L / ウェルの F A C S 緩衝液中で 4 で 3 0 分間染色した。細胞を 2 0 0 μ L / ウェルの冷 F A C S 緩衝液で 2 回洗浄し、 1 % ホルムアルデヒドを含む 5 0 μ L / ウェルの D P B S で固定し、 4 で一晩保存した。翌日、細胞を F A C S 緩衝液に再懸濁し、 3 レーザー C a n t o I I フローサイトメーター (B D B i o s c i e n c e 、 D I V A ソフトウェアを備える) を用いて取得した。

【 0 5 2 0 】

図 1 4 に示すように、 F A P 標的化又は D P 4 7 含有単鎖三量体ヒト 4 - 1 B B L 分子 (化合物 S 1 及び対照 1) はマウス 4 - 1 B B に結合しない。従って、それらの活性は、免疫コンピテントマウスにおいて試験することはできない。インビボ作用機序の研究のために、ヒト化マウスモデル又は単鎖三量体マウス 4 - 1 B B L を含む代理動物の何れかを使用しなければならない。

10

20

30

40

50

【0521】

実施例11

標的化4-1BBリガンド又はOX40リガンド三量体含有Fc融合抗原結合分子の生物学的活性

11.1. ヒト4-1BB又はOX40を発現するHeLa細胞におけるNF- κ B活性化11.1.1 NF- κ Bエンハンサー領域の制御下でのヒト4-1BB及びルシフェラーゼを発現するHeLa細胞の生成

ヒトパピローマウイルス18誘導子宮頸癌細胞株HeLa(ATCC、カタログ番号CL-2)は、CMV-プロモーター及びピューロマイシン耐性遺伝子の制御下で、4-1BBのヒト配列(Uniprotアクセッション番号Q07011、配列番号99)を含む発現ベクターpETR10829により形質導入された。細胞を、10%FBS、1%GlutaMAX-1及び3 μ g/mLのピューロマイシン(InvivoGen、Cat-No. ant-pr)を供給したDMEM培地で培養した。4-1BB形質導入HeLa細胞を、フローサイトメトリーによる4-1BB発現について試験した: 0.2×10^6 個の生存細胞を、0.1 μ gのPerCP/Cy5.5コンジュゲート抗ヒト4-1BBマウスIgG1クローン4B4-1(BioLegendカタログ番号309814)又はそのアイソタイプ対照(PerCP/Cy5.5コンジュゲートマウスIgG1アイソタイプコントロール抗体クローンMOPC21、BioLegendカタログ番号400150)を含有する100 μ LのFACS緩衝液に再懸濁し、4で30分間インキュベートした。細胞をFACS緩衝液で2回洗浄し、0.06 μ gのDAPIを含有する300 μ LのFACS緩衝液に再懸濁し、同日に5レーザーLSR-Fortessaを使用して取得した。単一のクローンが限界希釈によって生成された。この目的のために、生きたヒト4-1BB形質導入HeLa細胞を、10、5及び2.5細胞/mLの密度まで培地に再懸濁し、これらの細胞懸濁液200 μ Lを丸底組織培養処理96ウェルプレート(6プレート/細胞濃度、TPPカタログ番号92697)に移した。単一のクローンを回収し、増やし、上記のように4-1BB発現について試験した。Rocheで作成されたNF- κ B-ルシフェラーゼ発現ベクター5495p Translucent HygBによる更なるトランスフェクションのために、4-1BB(クローン5)の最高発現を有するクローンを選択した。発現ベクター5495p Translucent HygBは、ハイグロマイシンB耐性をNF- κ B(1)ルシフェラーゼレポーターベクター(Panomics、カタログ番号LR0051)に組み合わせる。ヒト4-1BB HeLaクローン5細胞を70%のコンフルエントになるまで培養した。50 μ g(40 μ L)の直線化した(制限酵素AseI及びSalI)5495p Translucent HygB発現ベクターDNAを滅菌0.4cm Gene Pulser/Micro Pulser Cuvette(Biorad、カタログ番号165-2081)に添加した。400 μ Lの無添加DMEM中の 2.5×10^6 個のヒト4-1BB HeLaクローン5細胞を添加し、プラスミド溶液と注意深く混合した。キュベットをGene Pulser Xcellトータルシステム(Biorad、カタログ番号1652660)に実装し、以下の設定で電圧ポレーショントランスフェクションを行った: 指数パルス、容量500 μ F、電圧160V、抵抗。パルスの直後に、トランスフェクトされた細胞を、10%FBS及び1%GlutaMAX-1を供給された37 $^{\circ}$ Cの温DMEM培地15mLを含む組織培養フラスコ75cm²(TPP、カタログ番号90075)に移した。播種の24時間後、3 μ g/mLのピューロマイシン及び200 μ g/mLのハイグロマイシンB(Roche、カタログ番号10843555001)を含む選択培地を添加した。その後、生存細胞を増殖させ、上記のように限界希釈を行って単一のクローンを生成した。

【0522】

クローンを上記のように4-1BB発現及び以下のようにNF- κ B-ルシフェラーゼ活性について試験した: クローンを選択培地で回収し、Cell Counter Vi-cell xr2.03(Beckman Coulter、カタログ番号73105

10

20

30

40

50

0)を用いて計数した。細胞を 0.33×10^6 細胞/mLの細胞密度に設定し、この細胞懸濁液 $150 \mu\text{L}$ を蓋付きの無菌白色96ウェル平底組織培養プレート(グライナー・バイオ・ワン、カタログ番号655083)の各ウェルに移し、対照として、翌日の生存及び細胞密度を試験するために、従来96ウェル平底組織培養プレート(TPPカタログ番号92096)に移した。細胞を37及び5%CO₂で一晩インキュベートした。翌日、異なる濃度の組換えヒト腫瘍壊死因子アルファ(rhTNF、PeproTech、カタログ番号30001A)を含有する培地 $50 \mu\text{L}$ を白色96ウェルプレートの各ウェルに添加し、100、50、25、12.5、6.25及び0ng/ウェルのrhTNFの最終濃度が得られた。細胞を37及び5%CO₂で6時間インキュベートし、その後 $200 \mu\text{L}$ /ウェルのDPBSで3回洗浄した。 $30 \mu\text{L}$ の新たに調製したReporter Lysis Buffer(Promega、カタログ番号E3971)を各ウェルに添加し、プレートを-20で一晩保存した。翌日、凍結細胞プレート及び検出緩衝液(ルシフェラーゼ1000アッセイシステム、Promega、カタログ番号E4550)を室温まで解凍した。 $100 \mu\text{L}$ の検出緩衝液を各ウェルに添加し、SpectraMax M5/M5eマイクロプレートリーダー及びSoftMax Pro Software(Molecular Devices)を用いて以下の設定を用いてプレートを直ちに測定した:ルシフェラーゼ(RLU)については、500msの積分時間、フィルターなし、全ての波長及びトップの読み取り値を集める。対照(rhTNFを添加していない)より上の測定されたURLをルシフェラーゼ活性とした。最も高いルシフェラーゼ活性及び妥当な4-1BB発現を示す更なる使用のために、NF-B-1uc-4-1BB-HeLaクローン26を選択した。

【0523】

11.12 架橋抗ヒトIgG1Fc断片特異的ヤギIgG F(ab')₂断片と共培養したヒト4-1BBを発現するHeLa細胞におけるNF-B活性化

NF-B-ルシフェラーゼヒト4-1BB HeLa細胞を回収し、10%ウシ胎仔血清及び1%GlutaMAX Iを供給されたDMEM培地に 0.8×10^6 細胞/mLの濃度で再懸濁した。この細胞懸濁液 $100 \mu\text{L}$ (8×10^4 細胞)を蓋付きの滅菌白色96ウェル平底組織培養プレート(グライナー・バイオ・ワン、カタログ番号655083)の各ウェルに移し、プレートを37及び5%CO₂で一晩インキュベートした。翌日、滴定FAP又はDP47標的化単鎖三量体ヒト4-1BB L抗原結合分子を含有する $50 \mu\text{L}$ /ウェルの培地を添加した。架橋のために、二次抗体抗ヒトIgG Fc断片特異的ヤギIgG F(ab')₂断片(Jackson ImmunoResearch、カタログ番号109-006-098)を含有する $50 \mu\text{L}$ /ウェルの培地を1:4比(一次単鎖三量体ヒト4-1BB L抗原結合分子よりも4倍多くの二次抗体)で添加した。

【0524】

プレートを37及び5%CO₂で6時間インキュベートした。ルシフェラーゼ活性を実施例11.1.1に記載されるように測定した。このアッセイの原理を図15に図解する。

【0525】

図16に示されるように、FAP標的化単鎖三量体ヒト4-1BB L(黒丸)の二次ポリクローナル抗huIgG1 Fc特異的ヤギIgG F(ab')₂断片又はDP47含有単鎖三量体ヒト4-1BB L(白丸、点線)を介する架橋は、レポーター細胞株におけるルシフェラーゼ発現のレベルによって評価されるように、NF-Bプロモーターの同様の活性化を導く。従って、人為的に誘発された非特異的オリゴマー化後、DP47-コーティング及びFAP標的化単鎖三量体ヒト4-1BB L分子は、細胞表面で4-1BBと作動的に関与する同等の能力を示す。

【0526】

11.13 FAP発現腫瘍細胞によるヒト4-1BBを発現するHeLa細胞におけるNF-B活性化

10

20

30

40

50

NF - B - ルシフェラーゼヒト4 - 1BB HeLa細胞を回収し、10% FBS及び1% Glutamax Iを供給されたDMEM培地に 0.2×10^6 細胞/mLの濃度で再懸濁した。この細胞懸濁液100 μ L (2×10^4 細胞)を蓋付きの滅菌白色96ウェル平底組織培養プレート(グライナー・パイオ・ワン、カタログ番号655083)の各ウェルに移し、プレートを37 $^{\circ}$ C及び5% CO₂で一晩インキュベートした。翌日、滴定FAP又はDP47標的化単鎖三量体ヒト4 - 1BB L抗原結合分子を含有する50 μ Lの培地を添加した。

【0527】

以下のヒトFAP発現腫瘍細胞を、10% FBS及び1% Glutamax Iを供給されたDMEMに 2×10^6 細胞/mLの濃度で再懸濁した：

- ヒトメラノーマ細胞株MV3(最初にvan Muijen GN et al. 1991に公開)、
 - ヒトメスのメラノーマWM - 266 - 4細胞株(ATCC番号CRL - 1676)
- 、及び

- ヒトFAP及びビユーロマイシン耐性を発現する発現ベクターpETR4921でトランスフェクトしたマウス胚線維芽細胞NIH/3T3(ATCC番号CRL - 1658)：実施例10.2に記載されるNIH/3T3 - huFAPクローン39。

【0528】

50 μ LのFAP発現腫瘍細胞懸濁液を各ウェルに添加した。架橋FAP発現腫瘍細胞又は培地(架橋なし)を添加した後、プレートを37 $^{\circ}$ C及び5% CO₂で6時間インキュベートした。ルシフェラーゼ活性を実施例11.1.1に記載されるように測定した。NF - B - ルシフェラーゼヒトCD137 HeLa細胞と3T3 - ヒトFAPクローン39細胞とのインキュベーション時間及び比を滴定し、時間及び比をルシフェラーゼ活性化プラトーに到達する値に設定した。このアッセイの原理を図17に示す。

【0529】

図18A ~ 18Dに示すように、FAP標的化単鎖4 - 1BB L三量体含有Fc(kih)融合抗原結合分子(化合物S1)(黒丸)は、FAPを発現する腫瘍細胞を介して架橋することができ、これはレポーター細胞株におけるNF - B媒介ルシフェラーゼ活性化を濃度依存的に引き起こす。対照的に、DP47含有単鎖三量体ヒト4 - 1BB L(対照1)は、同じ実験条件下でレポーター細胞株を活性化することができない。架橋がない場合(FAP発現腫瘍細胞を添加していない場合)、両分子はレポーター細胞株においてNF - B媒介ルシフェラーゼ活性化を誘導することができない。

【0530】

図19A ~ 19Cに示されるように、一価又は二価のFAP(4B9又は28H1)標的化単鎖三量体4 - 1BB L Fc(kih)融合抗原結合分子は、FAP発現腫瘍細胞を介して架橋することができ、従って、レポーター細胞株HeLa - hu4 - 1BB - NF - B - lucにおいてNF - B媒介ルシフェラーゼ活性化を濃度依存的に誘導することができる。対照的に、一価又は二価DP47 - 非標的単鎖三量体4 - 1BB L Fc(kih)融合分子(対照1及び2)は、架橋なしにレポーター細胞株を活性化することができない。架橋がない場合(FAP発現腫瘍細胞を添加していない場合)、全ての分子はレポーター細胞株においてNF - B媒介ルシフェラーゼ活性化を誘導することができない。一価FAP標的化単鎖三量体4 - 1BB L Fc(kih)融合抗原結合分子は、二価FAP(4B9)標的単鎖三量体4 - 1BB Lリガンド(kih)融合分子よりも強力な活性化を誘導し、これはFAP発現腫瘍細胞への結合も反映する。しかしながら、4B9と28H1のFAP結合クローン間の違いは、FAP発現腫瘍細胞に対する結合アッセイにおけるほど強くはない。依然として、一価FAP(4B9)標的化単鎖三量体4 - 1BB Lリガンド(kih)融合分子は、わずかに低いEC₅₀値を示し、これはFAPに対するより高い親和性によって説明することができる。

【0531】

11.14CEA発現腫瘍細胞によるヒト4 - 1BBを発現するHeLa細胞におけるNF - B活性化

10

20

30

40

50

HeLa - ヒト 4 - 1 BB - NF - B - luc レポーター細胞とCEA発現腫瘍細胞株とを用いたNF - B活性化アッセイは、11.1.3.に記載されているのと同じ方法で実施されたが、FAP発現腫瘍細胞を、本出願の実施例10.3に既に記載したCEA発現MKN45腫瘍細胞株と交換した。

【0532】

図20Aと20Bに示されるように、一価又は二価のCEA (sm9b) 標的化単鎖三量体4-1BB L Fc (kih) 融合抗原結合分子は、CEA発現腫瘍細胞を介して架橋することができ、従って、レポーター細胞株HeLa-hu4-1BB-NF-B-lucにおいてNF-B媒介ルシフェラーゼ活性化を濃度依存的に誘導することができる。対照的に、一価又は二価DP47-非標的単鎖三量体4-1BB L Fc (kih) 融合分子(対照1及び2)は、架橋なしにレポーター細胞株を活性化することができない。架橋がない場合(CEA発現腫瘍細胞株MKN45を添加していない場合)、全ての分子はレポーター細胞株においてNF-B媒介ルシフェラーゼ活性化を誘導することができない。一価CEA (sm9b) 標的単鎖三量体4-1BBリガンド(kih)融合分子(化合物S5)は、二価CEA (sm9b) 標的化単鎖三量体4-1BBリガンド(kih)融合分子(化合物S4)よりも強い活性化を誘導し、これは図13Eに示されるCEA発現ヒトMKN45腫瘍細胞株への結合のMFIも反映する。

【0533】

11.15ヒトOX40及びレポーター遺伝子NF-B-ルシフェラーゼを発現するHeLa細胞

OX40のそのリガンドへのアゴニスト結合は、NF-Bの活性化を介した下流シグナル伝達を誘導する(Weinberg et al., 2004)。組換えレポーター細胞株HeLa-hOX40-NFB-Luc1を作成し、その表面にヒトOX40を発現させた。更に、それはNF-B感受性エンハンサー領域の制御下にルシフェラーゼ遺伝子を含むレポータープラスミドを保持している。OX40の誘発は、NF-Bの用量依存的活性化を誘導し、NF-Bは核に転座し、レポータープラスミドのNF-B感受性エンハンサーに結合して、ルシフェラーゼタンパク質の発現を増加させる。ルシフェラーゼはルシフェリン酸化を触媒し、光を放出するオキシルシフェリンを生じる。これは、ルミノメーターで定量することができる。1つの実験の範囲は、単鎖三量体ヒトOX40L抗原結合分子が、HeLa-hOX40-NFB-Luc1細胞においてNF-B活性化を誘導する能力を試験することであった。

【0534】

Morrisらは、従来の抗OX40抗体によるアゴニスト共刺激が表面固定化に依存することを示した(Morris et al., 2007)。従って、OX40のより高度な過架橋を達成するために、FAP標的化単鎖三量体ヒトOX40L抗原結合分子を、FAPを天然に発現するWM-266-4腫瘍細胞で過架橋させた。

【0535】

11.16FAP発現腫瘍細胞によるヒトOX40を発現するHeLa細胞におけるNF-B活性化

全ての遠心分離は、4、350×gで5分間行った。細胞を洗浄するために、チューブ又はウェルを指示された緩衝液で満たした。遠心分離後、上清を吸引し、細胞ペレットを指示された緩衝液に再懸濁した。

【0536】

接着性HeLa-hOX40-NFB-Luc1細胞及びWM-266-4細胞を、細胞解離緩衝液(Invitrogen、カタログ番号13151-014)を用いて37で10分間回収した。細胞をDPBSで1回洗浄した。HeLa-hOX40-NFB-Luc1細胞を、MEM(Invitrogen、カタログ番号22561-021)、10%(v/v)熱不活性化FBS、1mMピルビン酸ナトリウム及び1%(v/v)の非必須アミノ酸を含むアッセイ培地中で 2×10^5 細胞/mLの細胞密度に調整した。細胞を、蓋付きの滅菌白色96ウェル平底組織培養プレート(グライナー・バイオ・

10

20

30

40

50

ワン、カタログ番号655083)にウェルあたり 0.3×10^5 細胞の密度で播種し、インキュベーター(Hera Cell 150)中、37及び5%CO₂で一晩維持した。翌日、HeLa_hOX40_NF B_Luc1を、滴定したFAP標的化又はDP47含有単鎖三量体ヒトOX40L抗原結合分子を含有するアッセイ培地を添加して6時間刺激した。超架橋のために、ヒトFAP発現WM266-4腫瘍細胞を、アッセイ培地中で 3×10^6 細胞/mLの細胞密度に調整し、細胞を 0.75×10^5 細胞/ウェルの最終密度まで添加した。

【0537】

インキュベーター中で37及び5%CO₂で6時間インキュベートした後、上清を吸引し、プレートをDPBSで2回洗浄した。ルシフェラーゼ100アッセイ系及びレポーター溶解緩衝液(両方ともPromegaであり、カタログ番号E4550及びカタログ番号E3971)を製造業者の指示に従って使用して、発光の定量化を行った。

10

【0538】

放出された相対光単位(URL)を、HeLa_hOX40_NF B_Luc1細胞の基底発光によって補正し、Prism4(GraphPad Software、USA)を用いて対数一次抗体濃度に対してプロットした。曲線は、作り付けのシグモイド用量応答を使用してフィットさせた。

【0539】

図21に示すように、FAP標的化及びDP47含有単鎖三量体ヒトOX40L Fc(kih)融合分子(黒丸及び白丸)の両方が検出可能なNF B活性化を誘導した。これは、二次抗体を介して過架橋することなくNF B誘導活性を示さなかった単鎖三量体ヒト4-1BBL分子で観察されたものとは対照的である。FAP発現腫瘍細胞WM-266-4による過架橋は、FAP標的化単鎖三量体ヒトOX40L Fc(kih)融合抗原結合分子によって濃度依存的にNF B媒介性ルシフェラーゼ発現の誘導を強く増加させた(化合物S10、黒丸)。DP47含有単鎖三量体ヒトOX40L Fc(kih)融合分子を使用した場合、そのような効果は見られなかった。

20

【0540】

11.2 抗原特異的CD8⁺ T細胞に基づくアッセイ

11.2.1 抗原特異的CD8⁺ T細胞の単離及び培養

新鮮な血液をHLA-A2+ CMV感染ボランティアから得た。PBMCを、フィコール密度遠心分離によって実施例10.1に記載のように単離した。CD8⁺ T細胞は、製造業者の推奨に従ってネガティブ選択ヒトCD8⁺ T細胞単離キット(Miltenyi Biotec、カタログ番号130-094-156)を用いてPBMCから精製した。1000万の単離されたCD8⁺ T細胞を、CMV由来のNLVPMVATVペプチドを含有する50µLのPE標識HLA-A2-ペンタマー(ProImmune、カタログ番号F008-2B、配列番号183)と共に、1%(v/v)FBSを補充した1mLの滅菌DPBS中に再懸濁し、室温で10分間インキュベートした。細胞を、1%(v/v)FBSを供給された3mLの滅菌DPBSで2回洗浄した。1µg/mLの抗ヒトCD8-FITC(クローンLT8、Abcam、カタログ番号Ab28010)を含む1%(v/v)FBSを供給された1mLのDPBSに細胞を再懸濁し、4で30分間インキュベートした。次いで、細胞を2回洗浄し、1%(v/v)FBSを供給されたDPBS中に 5×10^6 細胞/mLの濃度に再懸濁し、30µmの前分離ナイロン-ネットセルストレーナー(Miltenyi Biotec、カタログ番号130-041-407)を通して濾過した。NLVペプチド特異的CD8⁺ T細胞を、以下の設定でARIA細胞選別機(BD Bioscience、DIVAソフトウェアを備える)を用いたFACS選別によって単離した: 100µmのノズルと純度ソートマスク。選別した細胞を、10%(v/v)FBS、1%(v/v)GlutaMAX-1及び400U/mLのProleukinを供給されたRPMI1640培地5mLを含む15mLのポリプロピレン製遠心チューブ(TPP、カタログ番号91015)に集めた。選別した細胞を室温で350×gで7分間遠心分離し、 0.53×10^6 細胞/mLの濃度になるよ

30

40

50

うに同培地に再懸濁した。100 μ L / ウェルのこの細胞懸濁液を、PHA-L 活性化照射同種異系支持細胞を用いて予め調製したプレートの各ウェルに添加した。支持細胞は、以前に記載されているように (Levitskyら、1998)、PBMC から調製し、1 ウェル当たり 2×10^5 個の支持細胞を用いて96ウェル培養プレートに分配した。

【0541】

培養の1日後、100 μ L の培地を各ウェルから取り出し、10% (v/v) FBS 及び1% (v/v) GlutaMAX-1 及び400 U/mL の Proleukin を補充した新しいRPMI 1640 培地で置き換えた。これは培養中に定期的に(2~4日ごとに)繰り返した。NLV 特異的 CD8⁺ T細胞が増殖し始めるとすぐに、それらを24ウェル平底組織培養プレート(TPP、92024)に移した。細胞を増殖/分裂させ、定期的に新しい支持細胞調製物で再活性化した。

10

【0542】

11.2.2. 抗原特異的 CD8⁺ T細胞の単離及び培養

ヒトFAP 発現メラノーマ細胞株MV3細胞株(実施例11.1.3に記載)の細胞を回収し、DPBSで洗浄し、 2×10^7 個の細胞を、PKH-26 Red Fluorescence Cell linker Kit (Sigma、カタログ番号PKH26GL)の250 μ L のC希釈液に再懸濁した。1 μ L のPKH26-赤色染色溶液を250 μ L のC希釈液で希釈し、MV3細胞の懸濁液に添加し、次いでこれを暗所で室温で5分間インキュベートした。0.5 mL のFBSを加え、細胞を1分間インキュベートし、10% (v/v) FBS、1% (v/v) GlutaMAX-1、1 mM ピルビン酸ナトリウム、1% (v/v) のMEM 非必須アミノ酸及び50 μ M の β -メルカプトエタノールを補充したRPMI 1640 培地からなるT細胞培地で1回洗浄した。 1×10^6 個のMV3細胞/mLをT細胞培地に再懸濁し、3本のチューブに分けた。合成NLV PMVATVペプチド(think peptide、配列番号181から得た)を 1×10^{-9} M又は 1×10^{-8} Mの最終濃度に加え、細胞を37[°]及び5% CO₂での回転下で90分間インキュベートした。MV3細胞をT細胞培地で1回洗浄し、 0.5×10^6 細胞/mLの密度に再懸濁し、96ウェル丸底細胞懸濁プレート(グライナー・バイオ・ワン、セルスター、カタログ番号650185)に分配し(100 μ L / ウェル)、37[°]及び5% CO₂ 下で一晩インキュベートした。

20

【0543】

翌日、指示された最終濃度を達成するために、FAP 標的化及びDP47含有単鎖三量体ヒト4-1BBL分子を50 μ L のT細胞培地で添加した。NLV 特異的 CD8⁺ T細胞を回収し、洗浄し、50 μ L の培地で各ウェルに加えた(最終の腫瘍: CD8⁺ T細胞比は0.125)。細胞を24時間インキュベートし、2.64 μ L / mL のGolgi stop (Monesinを含むタンパク質輸送阻害剤、BD Bioscience、カタログ番号554724)を含有する50 μ L / ウェルのT細胞培地を各ウェルに添加した。細胞を更に4時間インキュベートし、200 μ L / ウェルのDPBSで洗浄し、4[°]で30分間、1:5000希釈のFixable Viability Dye-eF450 (eBioscience、カタログ番号65-0864)を含有する100 μ L のDPBSで染色した。細胞をDPBSで洗浄し、以下の蛍光色素コンジュゲート抗体を含む40 μ L / ウェルのFACS 緩衝液で染色した: 抗ヒトCD137-PerCP/Cy5.5 (クローン4B4-1、マウスIgG1、BioLegend、カタログ番号309814)、抗ヒトCD8-BV605 (クローンRPA T8、マウスIgG1、BioLegend、カタログ番号301012) 及び抗ヒトCD25-PE/Cy7 (クローンBC96、マウスIgG1、BioLegend、カタログ番号302612)。4[°]で30分間インキュベートした後、細胞を200 μ L / ウェルのFACS 緩衝液で2回洗浄し、50 μ L / ウェルの新たに調製したFoxP3 Fix/Perm 緩衝液(eBioscience カタログ番号00-5123及び00-5223)に再懸濁し、4[°]で30分間インキュベートした。プレートを200 μ L / ウェルのPerm-Buffer (2% (v/v) FBS、1% (w/v) サポニン (Sigma Lif

30

40

50

e Science、S7900)及び1%(w/v)アジ化ナトリウム(Sigma-Aldrich、S2002)を供給されたDPBS)で2回洗浄し、0.25µg/mL抗ヒトIFN-APC(クローンB27、マウスIgG1、BioLegend、カタログ番号506510)を含有する50µL/ウェルのPerm-Buffer(e Bioscience、カタログ番号00-8333-56)で染色した。プレートを4で1時間インキュベートし、200µL/ウェルのPerm-Bufferで2回洗浄した。固定のために、1%ホルムアルデヒドを含有する50µL/ウェルのDPBSを添加し、細胞を4で一晩保存した。翌日、細胞を100µL/ウェルのFACS緩衝液に再懸濁し、5レーザーFortessaフローサイトメーター(BD Bioscience、DIVAソフトウェアを備える)を用いて取得した。このアッセイの原理を図22に示す。

10

【0544】

図23A~23Fに示されるように、抗原特異的刺戟CD8⁺T細胞(刺戟されていない対照ではない)は、FAP標的化単鎖三量体ヒト4-1BBL Fc(kih)融合抗原の存在下で表面4-1BB発現レベルの増加を示した(化合物S1、黒丸)。この三量体ヒト4-1BBLのこの効果は用量依存性であり、非標的対照分子(対照1)の添加は4-1BB発現のレベルに影響しなかったため、FAP標的化を必要とした。更に、より高いペプチド濃度(1×10⁻⁸M)で活性化されたT細胞は、FAP標的化単鎖三量体ヒト4-1BBLの存在下でINFの持続的分泌を示した(図24A~24F)。特に、この効果は、4-1BBの上方制御に対するFAP標的化単鎖三量体ヒト4-1BBLの効果と比較して、より強い一次TCR誘発を必要とした。なぜなら、後者はペプチドの低濃度においても明確に観察されたからである。まとめると、これらのデータは、FAP標的化単鎖三量体ヒト4-1BBL Fc(kih)融合抗原結合分子は、標的的特異的に抗原特異的T細胞の表面表現型及び応答性を調節することを実証する。

20

【0545】

図25及び図26に示すように、NLVペプチド(活性化シグナル1)及び架橋された一価又は二価のFAP(28H1又は4B9)標的化単鎖三量体4-1BBL Fc(kih)融合抗原結合分子(活性化シグナル2)により共刺戟された抗原特異的CD8⁺T細胞(刺戟されていない対照ではない)は、増加したレベルの表面4-1BB発現及びINF分泌を示した。この効果は、NLVペプチド濃度並びにFAP標的化単鎖三量体4-1BBL Fc(kih)融合抗原結合分子の濃度について用量依存性であった。まとめると、これらのデータは、FAP標的化単鎖三量体4-1BBL Fc(kih)融合抗原結合分子は、標的的特異的に抗原特異的T細胞の表面表現型及び応答性を調節することを実証する。一価FAP(28H1)標的化とFAP(4B9)標的化単鎖三量体4-1BBリガンド(kih)融合分子との間の同じ差異は、HeLa-hu4-1BB-NK-B-lucレポーター細胞株を用いた活性化アッセイにおいて見られ、例えば一価FAP(4B9)標的化単鎖三量体4-1BBL Fc(kih)融合抗原結合分子はより低いEC₅₀値を示す。HeLa-hu4-1BB-NK-B-lucレポーター細胞株活性化アッセイとは異なり、一価と二価のFAP(4B9)標的化単鎖三量体4-1BBリガンド(kih)融合分子の間に大きな違いは見られない。高いNLVペプチド濃度(10⁻⁸M)では、二価FAP(4B9)標的化単鎖三量体4-1BBL Fc(kih)融合抗原結合分子は、一価FAP(4B9)標的化単鎖三量体4-1BBL Fc(kih)融合抗原結合分子よりも優れた活性化を生じるようにさえ見える。

30

40

【0546】

11.3. 最適以下でのTCR誘発性休止ヒトPBMCのOX40媒介共刺戟

ヒトPBMC調製物は、(1)休止中のOX40陰性CD4⁺及びCD8⁺T細胞、並びに(2)それらの細胞表面上に種々のFc受容体分子を有する抗原提示細胞、例えばB細胞及び単球を含む。ヒトIgG1アイソタイプの抗ヒトCD3抗体は、そのFc部分とFc受容体分子に結合し、数時間以内にOX40を発現し始める休止中のOX40陰性CD4⁺及びCD8⁺T細胞上においてTCR誘発を媒介することができる。OX

50

40に対する機能的アゴニスト化合物は、活性化CD8⁺及びCD4⁺ T細胞上に存在するOX40受容体を介してシグナル伝達することができ、TCR媒介刺激を支持し、より顕著な表現型変化（例えば、より高いCD25発現レベル）、生存CD4⁺及びCD8⁺ T細胞の増強された増殖と数の増加とをもたらす。

【0547】

HeLa_{OX40}-NF_B-Luc1レポーター細胞株を用いた実験は、NF_B発現を誘導するための三量体単鎖OX40L分子の特定の固有の能力を示唆した（実施例11.1.5を参照のこと）。アゴニスト効果は、FAP発現腫瘍細胞を介したFAP標的化合物の更なる過架橋によって大幅に増加した。従って、休止中のヒトPBMCの最適以下のTCR刺激を、NIH/3T3-huFAPクローン39細胞とDP47含有（非標的化）及びFAP標的化三量体単鎖OX40L分子との存在下で行い、更なる過架橋が有る場合と無い場合の共刺激活性を試験した。

10

【0548】

マウス胚線維芽細胞NIH/3T3-huFAPクローン39細胞（実施例9.2参照）を、細胞解離緩衝液（Invitrogen、カタログ番号13151-014）を用いて37℃で10分間回収した。細胞をDPBSで1回洗浄した。NIH/3T3-huFAPクローン39細胞をT細胞培地中で 1.6×10^5 の細胞密度に調整し、滅菌96ウェル丸底接着組織培養プレート（TPP、カタログ番号92097）中に 0.2×10^5 細胞/ウェルの密度で播種した。プレートをインキュベーター（Hera Cell 150）中で37℃及び5%CO₂で一晩保存した後、翌日、細胞株によるヒトPBMCのその後の過剰増殖を防ぐために、X線照射器で4500radの用量を用いて照射した。

20

【0549】

ヒトPBMCを、9.1に記載されているようにフィコール（ficoll）密度遠心分離によって単離し、CFSEで標識した。細胞を、最終濃度[50nM]のCFDA-SE（Sigma-Aldrich、カタログ番号2188）を用いて 1×10^6 細胞/mLの細胞密度で37℃で10分間染色した。その後、細胞をFBS（10%v/v）を含む過剰のDPBSで2回洗浄した。標識された細胞を、37℃で30分間T細胞培地中で休ませた。その後、DPBSを用いた2回の更なる洗浄工程によって、非変換CFDA-SEを除去した。CFSE標識休止ヒトPBMCをT細胞培地中 3×10^6 細胞/mLの細胞密度に調整し、各ウェルに 0.75×10^5 細胞/ウェルの密度で添加した。FAP標的化及びDP47含有単鎖三量体OX40L抗原結合分子を示された濃度で加え、抗ヒトCD3抗体（クローンV9、ヒトIgG1）を最終濃度10nMで加えた。プレートを37℃、5%CO₂で4日間保持した。48時間後、半分の培地交換を行った。

30

【0550】

4日後、細胞をDPBSで洗浄し、次いで蛍光色素コンジュゲート抗体： $0.250 \mu\text{g/mL}$ の抗ヒトCD4-BV421（クローンRPA-T4、マウスIgG1、BioLegend、カタログ番号300532）、 $0.250 \mu\text{g/mL}$ のCD8-BV711（クローンRPA-T8、マウスIgG1、BioLegend、カタログ番号3010441）、 $0.250 \mu\text{g/mL}$ の抗ヒトCD25-PerCP-Cy5.5（クローンM-A251、マウスIgG1、BioLegend、カタログ番号356112）を含む25 μL /ウェルのFACS緩衝液で染色した。4℃で30分間インキュベートした後、細胞を200 μL /ウェルのFACS緩衝液で2回洗浄し、50 μL /ウェルの新たに調製したFoxP3-Fix/Perm緩衝液（eBioscience、カタログ番号00-5123及び00-5223）に再懸濁し、暗所で室温で45分間インキュベートした。プレートを200 μL /ウェルのPerm-Wash-（eBioscience、カタログ番号00-8333-56）で3回洗浄し、次いで $0.25 \mu\text{g/mL}$ の抗ヒトグランザイムB-PE（クローンGB-11、マウスIgG1、BD Bioscience、カタログ番号561142）及び $0.60 \mu\text{g/mL}$ の抗ヒトEomes-eFluor670（クローンWD2918、マウスIgG1、eBioscience

40

50

n ce、カタログ番号 50 - 4877 - 42) を含有する 25 μ L / ウェルの Perm - Buffer (e Bioscience、カタログ番号 00 - 8333 - 56) で染色した。プレートを室温で 1 時間暗所でインキュベートし、200 μ L / ウェルの Perm - Buffer で 2 回洗浄した。細胞を 85 μ L / ウェルの FACS 緩衝液に再懸濁し、5 レーザー Fortessa フローサイトメーター (BD Bioscience、DIVA ソフトウェアを備える) を用いて取得した。

【0551】

図 27 に示すように、DP47 含有三量体単鎖 OX40L 抗原結合分子による共刺激は、ほんのわずかに増殖を促進し、抗ヒト CD3 抗体で最適以下に刺激されたヒト CD4⁺ (左側) 及び CD8⁺ T 細胞 (右側) において活性化細胞表現型 (CD25 発現) を増強した。NIH/3T3-huFAP クローン 39 細胞による FAP 標的化三量体単鎖 OX40L の過架橋は、この効果を強く増加させた。これは、HeLa_{hOX40}-NFkB_{Luc1} 細胞の所見とは対照的であり (図 21)、三量体単鎖 OX40L 分子それ自体はすでに強くアゴニスト的であった。これは、レポーター細胞株における OX40 の非生理的な高発現に起因するかもしれない、これは低シグナル伝達 OX40R オリゴマーユニットの事前組み立てをもたらす可能性が最も高く、そのためその OX40⁺ T 細胞と比較して、アゴニストシグナル伝達のための閾値を低下させるのはレポーター細胞株である。更に、OX40 関与の影響を観察するために、TCR を介した随伴性シグナル伝達が T 細胞では必要であるが、レポーター細胞株では必要でないため、細胞の状況が OX40 誘発の結果を決定する可能性が高い。

10

20

【0552】

引用文献

Aggarwal B.B.(2003)、Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword.Nat. Rev. Immunol.3(9),745-56.

Banner D. et al(1993)、Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor -human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation.Cell 73、431-445.

Baumann R.、Shida Y.、Simon D.、Russmann S.、Mueller C. and Simon H.-U.(2004)、Functional expression of CD134 by neutrophils.Eur.J. Immunol.、34、2268-2275.

Bodmer J.、Schneider P. and Tschopp、J.(2002)、The molecular architecture of the TNF superfamily.Trends in Biochemical Sciences 27(1)、19-26.

30

Bremer E.(2013)、Targeting of the tumor necrosis factor receptor superfamily for cancer immunotherapy.2013、Article ID 371854、25 pages. doi:10.1155/2013/371854

Broll K.、Richter G.、Pauly S.、Hofstaedter F. and Schwarz、H.(2001)、CD137 expression in tumor vessel walls.High correlation with malignant tumors.Am J Clin Pathol 115、543-549.

Buechele C.、Baessler T.、Schmiedel B.J.、Schumacher C.E.、Grosse-Hovest L.、Rittig K. and Salih、H.R.(2012).4-1BB ligand modulates direct and Rituximab-induced NK-cell reactivity in chronic lymphocytic leukemia.Eur J Immunol 42、737-748.

Carter P.(2001).Bispecific human IgG by design.J. Immunol.Methods 248、7-15.

40

Choi B.K.、Kim Y.H.、Kwon P.M.、Lee S.C.、Kang S.W.、Kim M.S.、Lee M.J.、and Kwon B.S.(2009).4-1BB functions as a survival factor in dendritic cells.J Immunol 182、4107-4115.

Croft M.、Song T.、Duan W. and Soroash P.(2009).The significance of OX40 and OX40L to T-cell biology and immune disease.Immunological Reviews 229、173-191.

Cuadros C.、Dominguez A.L.、Lollini P.L.、Croft M.、Mittler R.S.、Borgstrom P.、and Lustgarten J.(2005).Vaccination with dendritic cells pulsed with apoptotic tumors in combination with anti-OX40 and anti-4-1BB monoclonal antibodies induces T cell-mediated protective immunity in Her-2/neu transgenic mice.Int J Cancer 116、934-943.

50

- Curran M.A., Kim M., Montalvo W., Al-Shamkhani A., and Allison J.P. (2011). Combination CTLA-4 blockade and 4-1BB activation enhances tumor rejection by increasing T-cell infiltration, proliferation, and cytokine production. *PLoS One* 6, e19499.
- Diehl L., van Mierlo G.J., den Boer A.T., van der Voort E., Franssen M., van Bosten L., Krimpenfort P., Melief C.J., Mittler R., Toes R.E., and Offringa R. (2002). In vivo triggering through 4-1BB enables Th-independent priming of CTL in the presence of an intact CD28 costimulatory pathway. *J Immunol* 168, 3755-3762.
- Dubrot J., Milheiro F., Alfaro C., Palazon A., Martinez-Forero I., Perez-Gracia J.L., Morales-Kastresana A., Romero-Trevejo J.L., Ochoa M.C., Hervas-Stubbs S., et al. (2010). Treatment with anti-CD137 mAbs causes intense accumulations of liver T cells without selective antitumor immunotherapeutic effects in this organ. *Cancer Immunol Immunother* 59, 1223-1233.
- Futagawa T., Akiba H., Kodama T., Takeda K., Hosoda Y., Yagita H., and Okumura K. (2002). Expression and function of 4-1BB and 4-1BB ligand on murine dendritic cells. *Int Immunol* 14, 275-286.
- Graff, C.P., Chester K., Begent R. and Wittrup K.D. (2004). Directed evolution of an anti-carcinoembryonic antigen scFv with a 4-day monovalent dissociation half-time at 37 °C. *Protein Engineering, Design & Selection* 17, 293-304.
- Guo Z., Cheng D., Xia Z., Luan M., Wu L., Wang G., and Zhang S. (2013). Combined TIM-3 blockade and CD137 activation affords the long-term protection in a murine model of ovarian cancer. *J Transl Med* 11, 215.
- Heinisch I.V., Daigle I., Knopfli B., and Simon H.U. (2000). CD137 activation abrogates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-mediated anti-apoptosis in neutrophils. *Eur J Immunol* 30, 3441-3446.
- Hornig, N., Kermer, V., Frey, K., Diebolder, P., Kontermann, R.E., Mueller, D. (2012). Combination of a bispecific antibody and costimulatory antibody-ligand fusion proteins for targeted cancer immunotherapy. *J. Immunother.* 35, 418-429.
- Ju S.A., Cheon S.H., Park S.M., Tam N.Q., Kim Y.M., An W.G., and Kim B.S. (2008). Eradication of established renal cell carcinoma by a combination of 5-fluorouracil and anti-4-1BB monoclonal antibody in mice. *Int J Cancer* 122, 2784-2790.
- Kermer V., Hornig N., Harder M., Bondarieva A., Kontermann R.E., and Mueller D. (2014). Combining Antibody-directed presentation of IL-15 and 4-1BBL in a trifunctional fusion protein for Cancer Immunotherapy. *Mol. Cancer Ther.* 13, 112-121.
- Kienzle G., and von Kempis J. (2000). CD137 (ILA/4-1BB), expressed by primary human monocytes, induces monocyte activation and apoptosis of B lymphocytes. *Int Immunol* 12, 73-82.
- Kim D.H., Chang W.S., Lee Y.S., Lee K.A., Kim Y.K., Kwon B.S., and Kang C.Y. (2008). 4-1BB engagement costimulates NKT cell activation and exacerbates NKT cell ligand-induced airway hyperresponsiveness and inflammation. *J Immunol* 180, 2062-2068.
- Kim Y.H., Choi B.K., Oh H.S., Kang W.J., Mittler R.S., and Kwon B.S. (2009). Mechanisms involved in synergistic anticancer effects of anti-4-1BB and cyclophosphamide therapy. *Mol Cancer Ther* 8, 469-478.
- Kwon B.S., and Weissman S.M. (1989). cDNA sequences of two inducible T-cell genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 1963-1967.
- Lee H., Park H.J., Sohn H.J., Kim J.M., and Kim S.J. (2011). Combinatorial therapy for liver metastatic colon cancer: dendritic cell vaccine and low-dose agonistic anti-4-1BB antibody co-stimulatory signal. *J Surg Res* 169, e43-50.
- Levitsky V., de Campos-Lima P.O., Frisan T., and Masucci M.G. (1998). The clonal c

- composition of a peptide-specific oligoclonal CTL repertoire selected in response to persistent EBV infection is stable over time. *J Immunol* 161, 594-601.
- Li F., and Ravetch J.V. (2011). Inhibitory Fcγ receptor engagement drives adjuvant and anti-tumor activities of agonistic CD40 antibodies. *Science* 333, 1030-1034.
- Lin W., Voskens C.J., Zhang X., Schindler D.G., Wood A., Burch E., Wei Y., Chen L., Tian G., Tamada K., et al. (2008). Fc-dependent expression of CD137 on human NK cells: insights into "agonistic" effects of anti-CD137 monoclonal antibodies. *Blood* 112, 699-707.
- Melero I., Johnston J.V., Shufford W.W., Mittler R.S., and Chen L. (1998). NK1.1 cells express 4-1BB (CDw137) costimulatory molecule and are required for tumor immunity elicited by anti-4-1BB monoclonal antibodies. *Cell Immunol* 190, 167-172.
- Melero I., Shufford W.W., Newby S.A., Aruffo A., Ledbetter J.A., Hellstrom K.E., Mittler R.S., and Chen L. (1997). Monoclonal antibodies against the 4-1BB T-cell activation molecule eradicate established tumors. *Nat Med* 3, 682-685.
- Merchant A.M., Zhu Z., Yuan J.Q., Goddard A., Adams C.W., Presta L.G., and Carter P. (1998). An efficient route to human bispecific IgG. *Nat Biotechnol* 16, 677-681.
- Morales-Kastresana A., Sanmamed M.F., Rodriguez I., Palazon A., Martinez-Forero I., Labiano S., Hervas-Stubbs S., Sangro B., Ochoa C., Rouzaut A., et al. (2013). Combined immunostimulatory monoclonal antibodies extend survival in an aggressive transgenic hepatocellular carcinoma mouse model. *Clin Cancer Res* 19, 6151-6162.
- Morris N.P., Peters C., Montler R., Hu H-M, Curti B.D., Urba W.J., and Weinberg A.D. (2007). Development and Characterization of Recombinant Human Fc:OX40L fusion protein linked via a coiled-coil trimerization domain. *Mol. Immunol.* 44(12), 3112-3121.
- Mueller, D., Frey, K., Kontermann, R.E. (2008), A novel antibody-4-1BBI fusion protein for targeted costimulation in cancer immunotherapy, *J. Immunother.* 31, 714-722.
- Murillo O., Dubrot J., Palazon A., Arina A., Azpilikueta A., Alfaro C., Solano S., Ochoa M.C., Berasain C., Gabari I., et al. (2009). In vivo depletion of DC impairs the anti-tumor effect of agonistic anti-CD137 mAb. *Eur J Immunol* 39, 2424-2436.
- Narazaki H., Zhu Y., Luo L., Zhu G., and Chen L. (2010). CD137 agonist antibody prevents cancer recurrence: contribution of CD137 on both hematopoietic and nonhematopoietic cells. *Blood* 115, 1941-1948.
- Nishimoto H., Lee S.W., Hong H., Potter K.G., Maeda-Yamamoto M., Kinoshita T., Kawakami Y., Mittler R.S., Kwon B.S., Ware C.F., et al. (2005). Costimulation of mast cells by 4-1BB, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, with the high-affinity IgE receptor. *Blood* 106, 4241-4248.
- Olofsson P.S., Soderstrom L.A., Wagsater D., Sheikine Y., Ocaya P., Lang F., Rabuc C., Chen L., Rudling M., Aukrust P., et al. (2008). CD137 is expressed in human atherosclerosis and promotes development of plaque inflammation in hypercholesterolemic mice. *Circulation* 117, 1292-1301.
- Palazon A., Teijeira A., Martinez-Forero I., Hervas-Stubbs S., Roncal C., Penuelas I., Dubrot J., Morales-Kastresana A., Perez-Gracia J.L., Ochoa M.C., et al. (2011). Agonist anti-CD137 mAb act on tumor endothelial cells to enhance recruitment of activated T lymphocytes. *Cancer Res* 71, 801-811.
- Schwarz H., Valbracht J., Tuckwell J., von Kempis J., and Lotz M. (1995). ILA, the human 4-1BB homologue, is inducible in lymphoid and other cell lineages. *Blood* 8

5、1043-1052.

Shao, Z., and Schwarz, H.(2011).CD137 ligand, a member of the tumor necrosis factor family, regulates immune responses via reverse signal transduction.J Leukoc Biol 89、 21-29.

Shi W., and Siemann D.W.(2006).Augmented antitumor effects of radiation therapy by 4-1BB antibody(BMS-469492) treatment.Anticancer Res 26、 3445-3453.

Simeone E., and Ascierto P.A.(2012).Immunomodulating antibodies in the treatment of metastatic melanoma: the experience with anti-CTLA-4, anti-CD137, and anti-PD1.J Immunotoxicol 9、 241-247.

Snell L.M., Lin G.H., McPherson A.J., Moraes T.J., and Watts T.H.(2011).T-cell intrinsic effects of GITR and 4-1BB during viral infection and cancer immunotherapy.Immunol Rev 244、 197-217. 10

Song J., So T. and Croft M.(2008).Activation of NF- κ B1 by OX40 contributes to an antigen-driven T cell expansion and survival.J. Immunology 180(11)、 7240-7248.

Stagg J., Loi S., Divisekera U., Ngiow S.F., Duret,H., Yagita H., Teng M.W., and Smyth M.J.(2011).Anti-ErbB-2 mAb therapy requires type I and II interferons and synergizes with anti-PD-1 or anti-CD137 mAb therapy.Proc Natl Acad Sci U S A 108、 7142-7147.

Teng M.W., Sharkey J., McLaughlin N.M., Exley M.A., and Smyth M.J.(2009).CD137-based combination therapy eradicates established tumors in mice.J Immunol 183、 1911-1920. 20

van Muijen GN, Jansen KF, Cornelissen IM, Smeets DF, Beck JL and Ruiter DJ(1991).Establishment and characterization of a human melanoma cell line(MV3) which is highly metastatic in nude mice.Int J Cancer., 48(1)、 85-91.

von Kempis J., Schwarz H., and Lotz M.(1997).Differentiation-dependent and stimulus-specific expression of ILA, the human 4-1BB-homologue, in cells of mesenchymal origin.Osteoarthritis Cartilage 5、 394-406.

Watts T.H.(2005).TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses.Annu.Rev. Immunol.23、 23-68

Wei H., Zhao L., Li W., Fan K., Qian W., Hou S., Wang H., Dai M., Hellstrom I., Hellstrom K.E., and Guo Y.(2013).Combinatorial PD-1 blockade and CD137 activation has therapeutic efficacy in murine cancer models and synergizes with cisplatin.PLoS One 8、 e84927. 30

Weinberg AD, Evans DE, Thalhofer C, Shi T, Prell RA(2004).The generation of T cell memory: a review describing the molecular and cellular events following OX40(CD134) engagement.J Leukoc Biol.75(6)、 962-972.

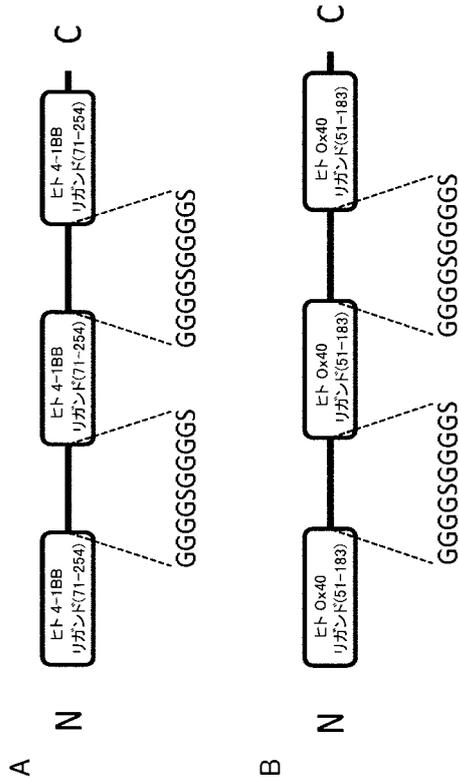
Wilcox R.A., Chapoval A.I., Gorski K.S., Otsuji M., Shin T., Flies D.B., Tamada K., Mittler R.S., Tsuchiya H., Pardoll D.M., and Chen L.(2002).Cutting edge: Expression of functional CD137 receptor by dendritic cells.J Immunol 168、 4262-4267

Wilcox R.A., Tamada K., Flies D.B., Zhu G., Chapoval A.I., Blazar B.R., Kast W.M., and Chen L.(2004).Ligation of CD137 receptor prevents and reverses established anergy of CD8+ cytolytic T lymphocytes in vivo.Blood 103、 177-184. 40

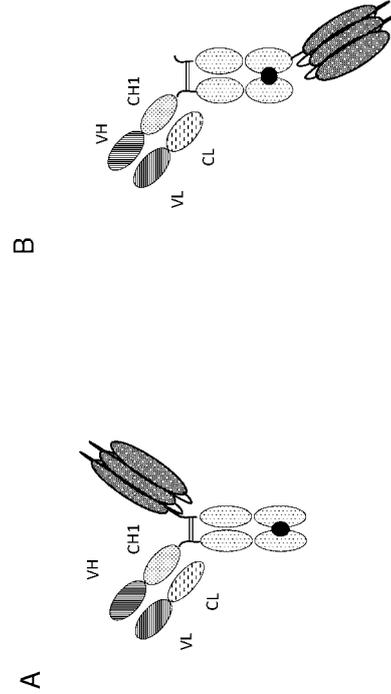
Zhang, N., Sadun, R.E., Arias, R.S., Flanagan, M.L., Sachsman, S.M., Nien, Y, Khawli, L.A., Hu, P., Epstein, A.L.(2007).Targeted and untargeted CD137L fusion proteins for the immunotherapy of experimental solid tumors.Clin.Cancer Res.13、 2758-2767.

Zhang X., Voskens C.J., Sallin M., Maniar A., Montes C.L., Zhang Y., Lin W., Li G., Burch E., Tan M., et al.(2010).CD137 promotes proliferation and survival of human B cells.J Immunol 184、 787-795. 50

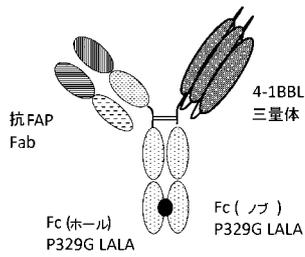
【 図 1 】



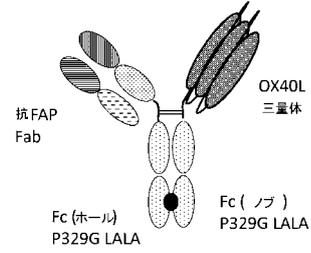
【 図 2 】



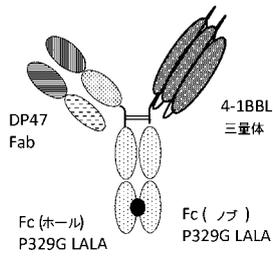
【 図 3 A 】



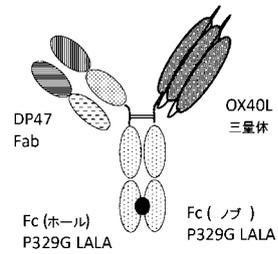
【 図 4 A 】



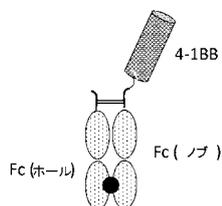
【 図 3 B 】



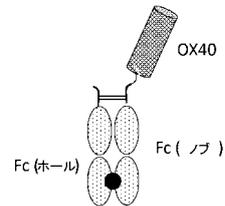
【 図 4 B 】



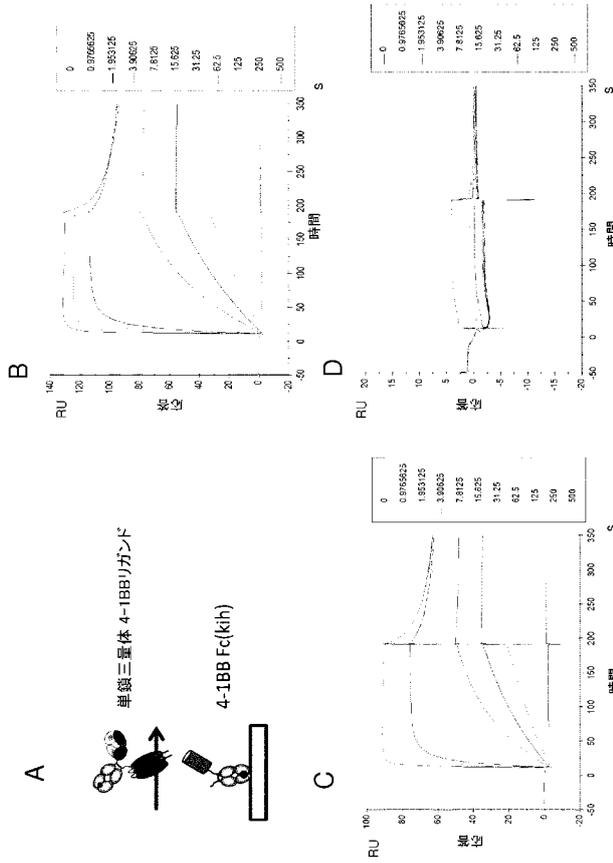
【 図 3 C 】



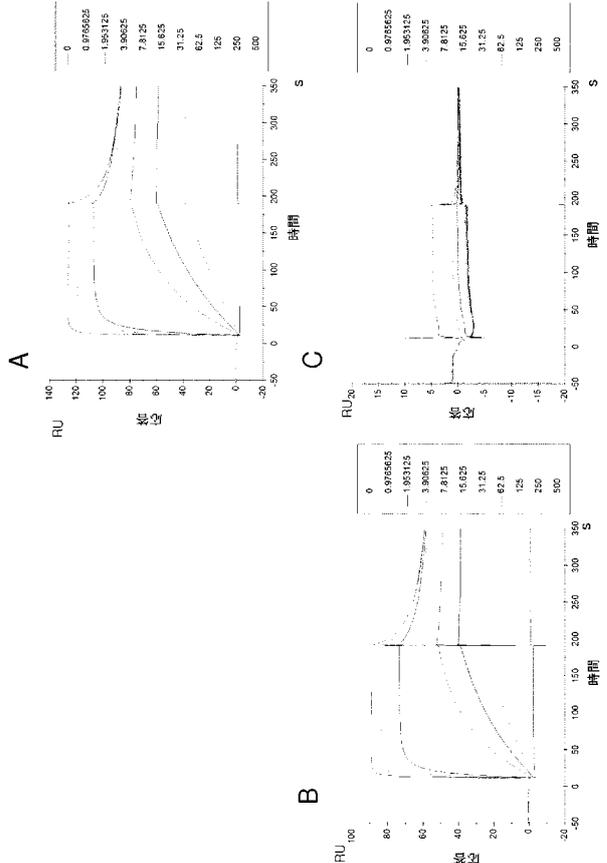
【 図 4 C 】



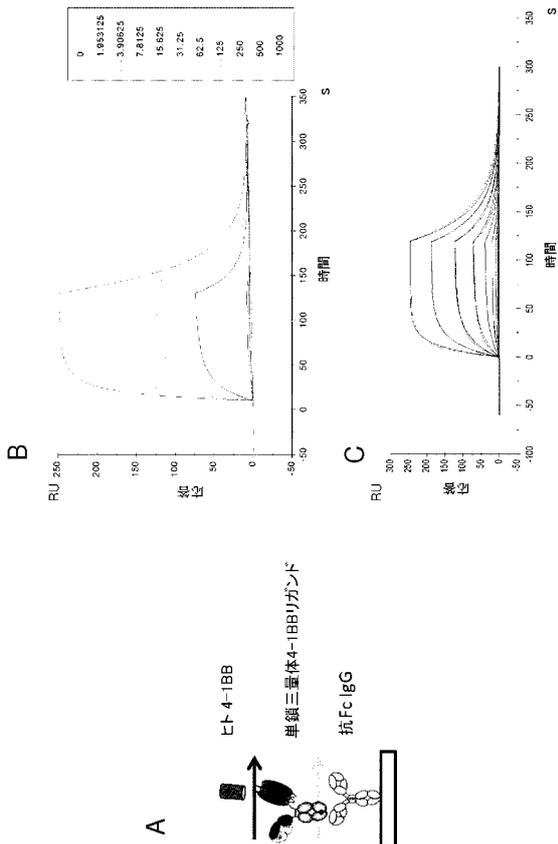
【図5】



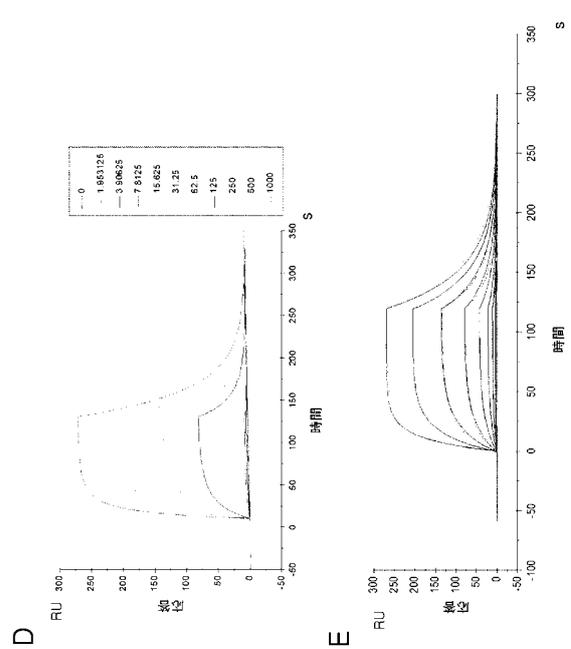
【図6】



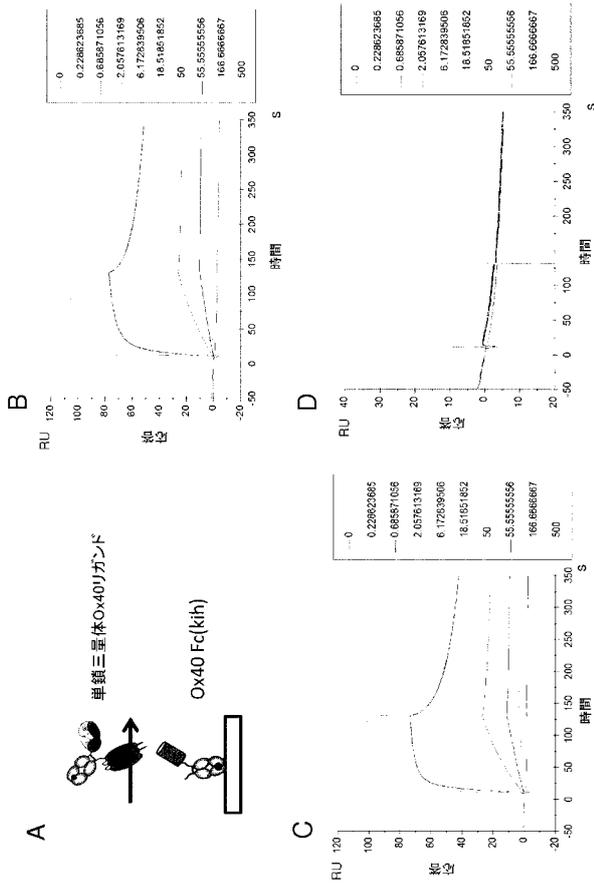
【図7 A - C】



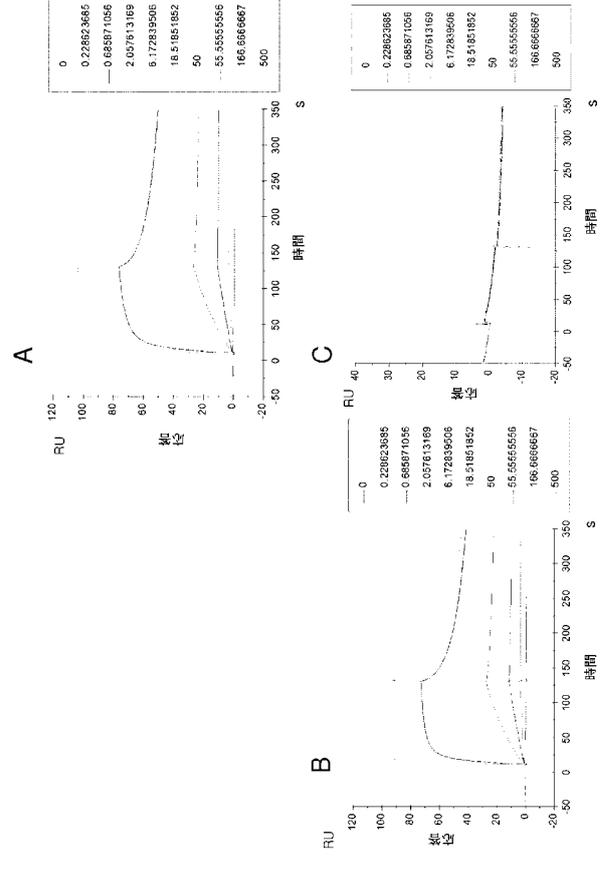
【図7 D - E】



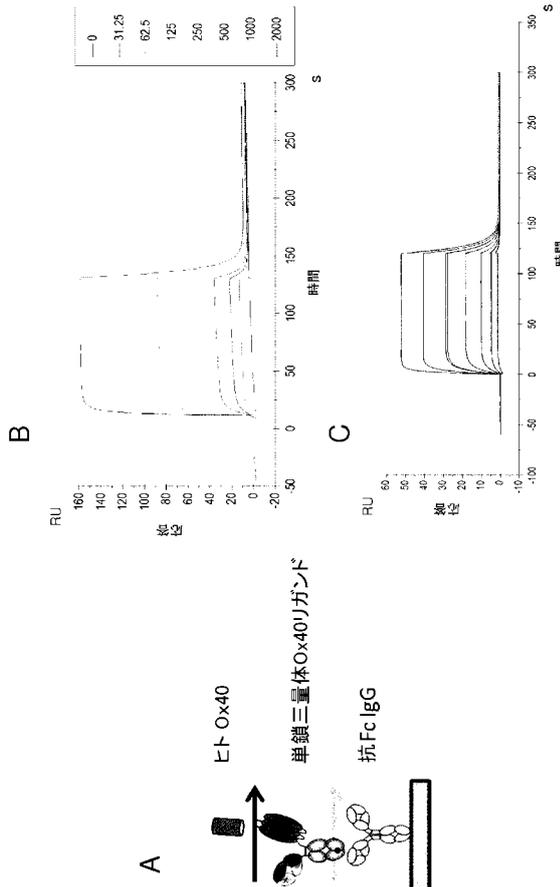
【図 8】



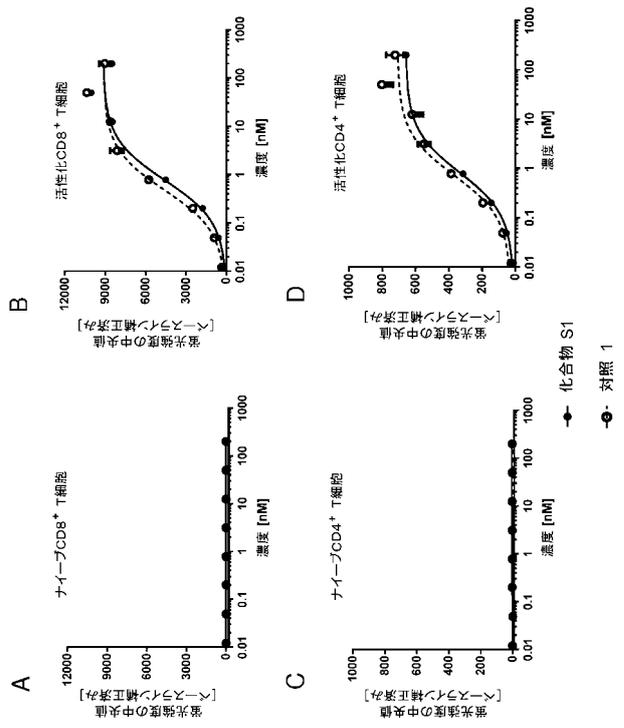
【図 9】



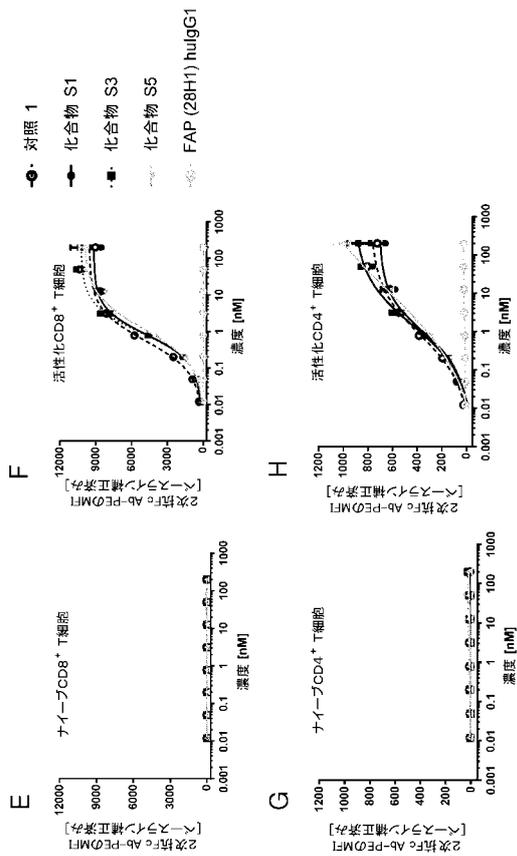
【図 10】



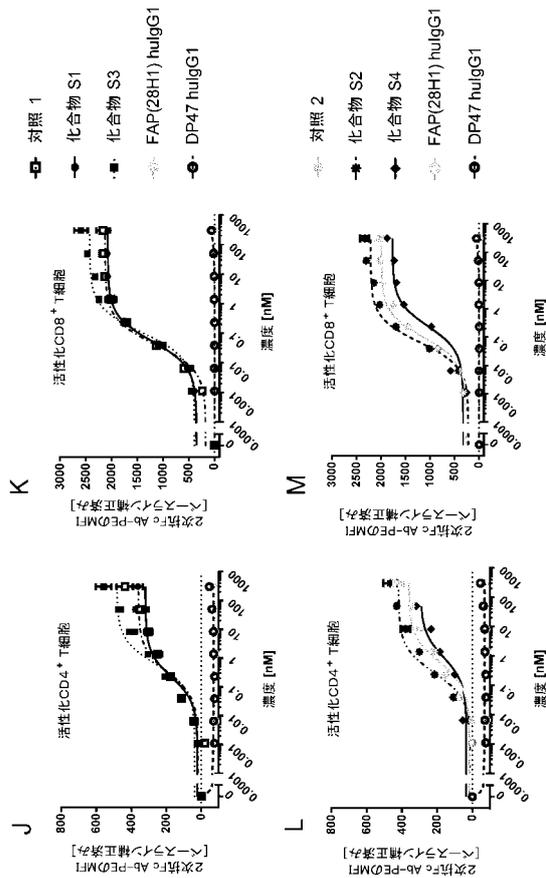
【図 11 A - D】



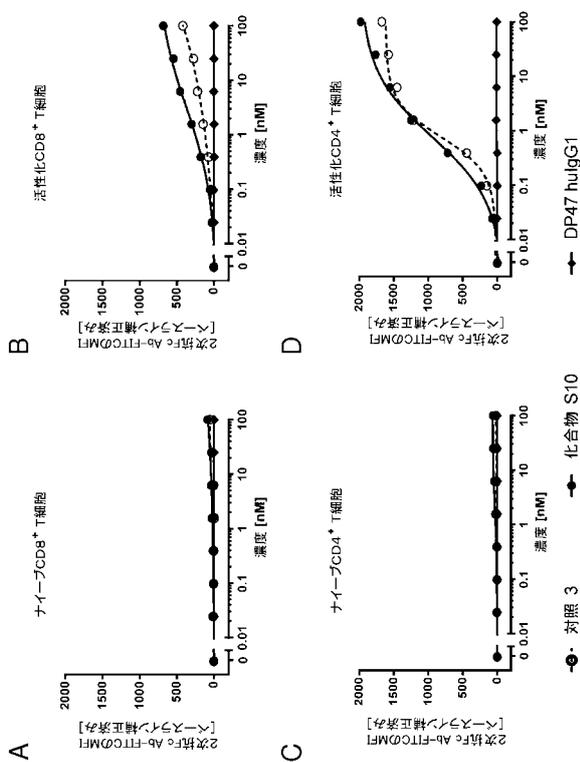
【図 1 1 E - H】



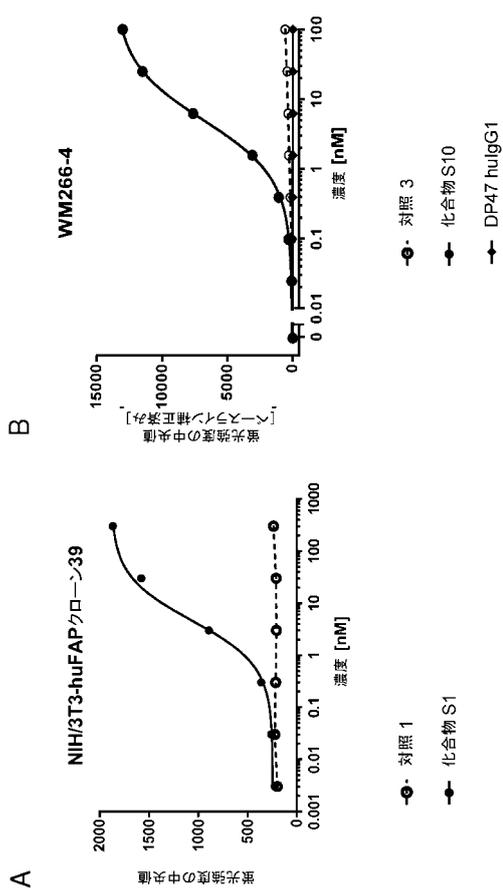
【図 1 1 J - M】



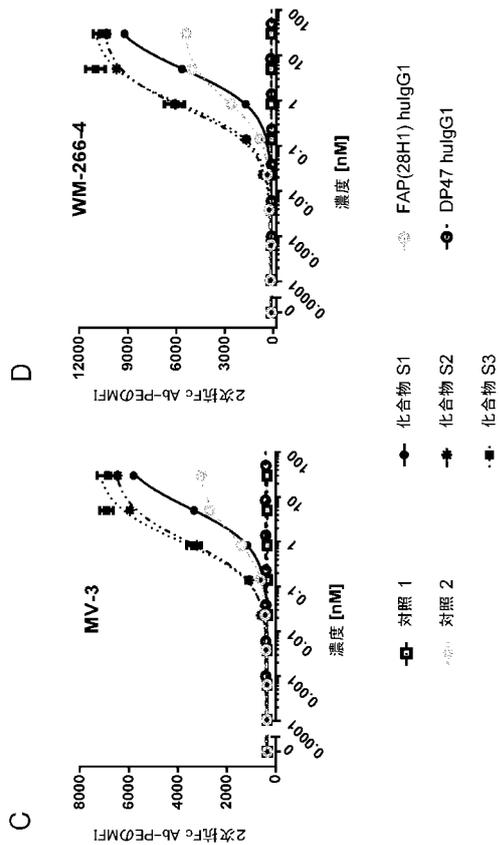
【図 1 2】



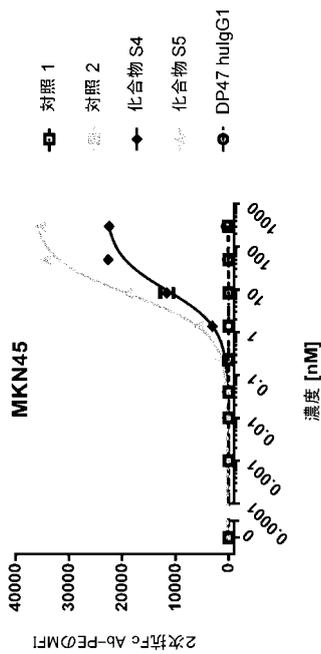
【図 1 3 A - B】



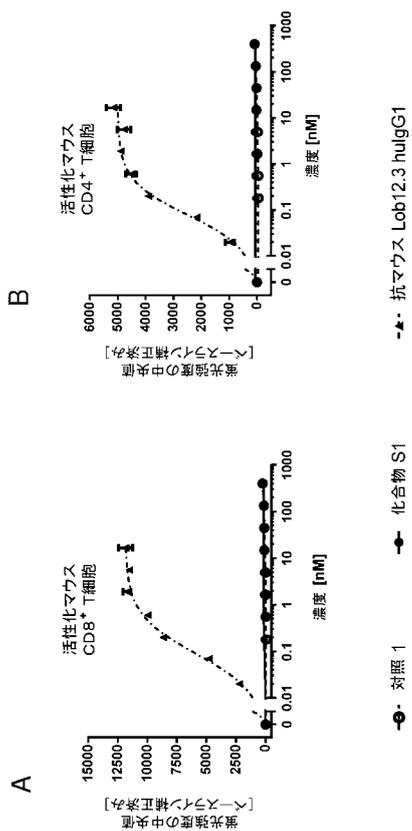
【 図 1 3 C - D 】



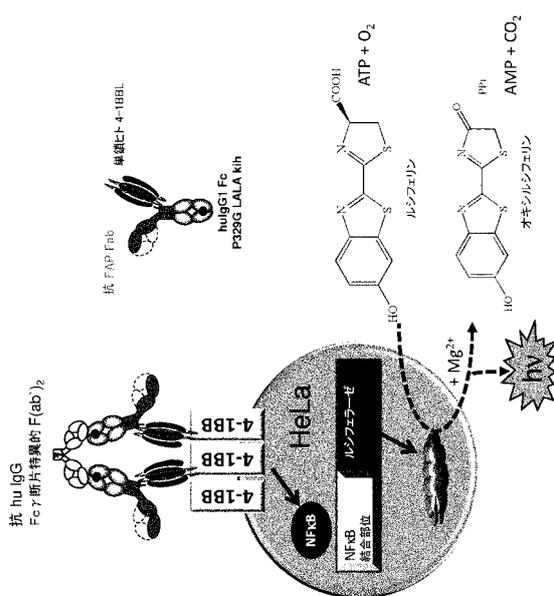
【 図 1 3 E 】



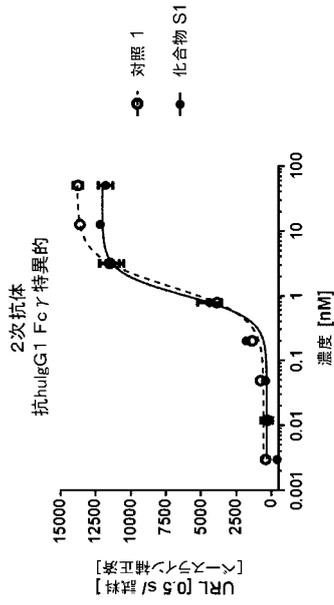
【 図 1 4 】



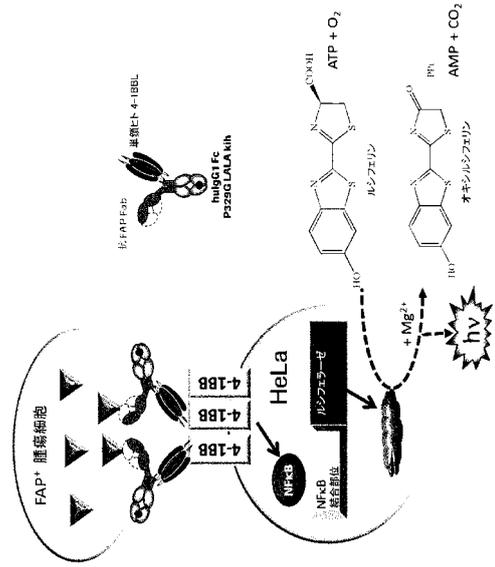
【 図 1 5 】



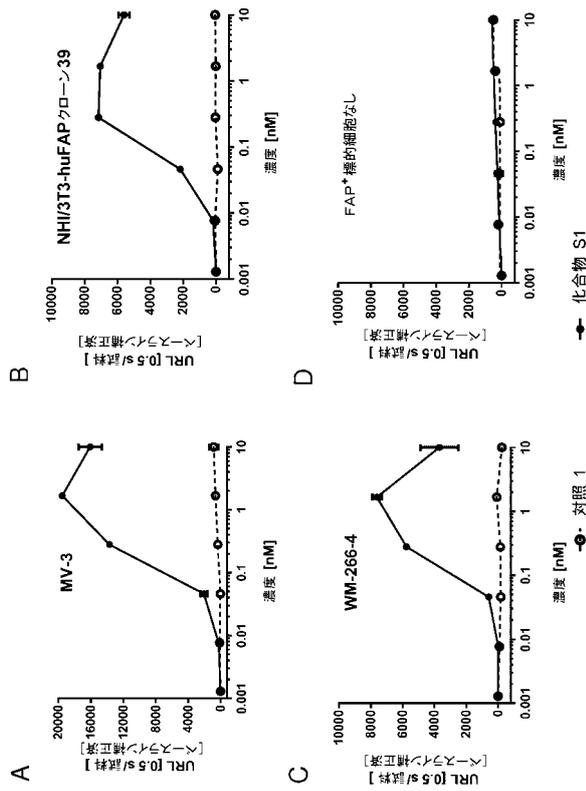
【 図 1 6 】



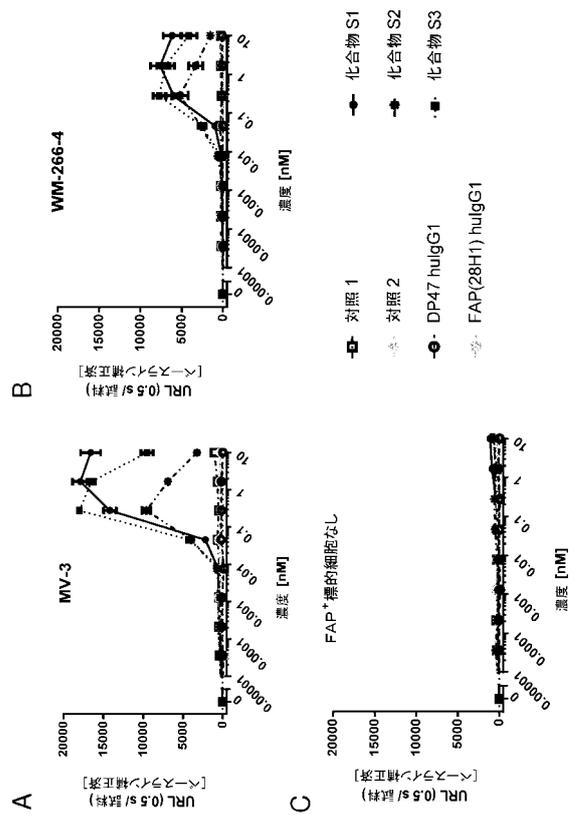
【 図 1 7 】



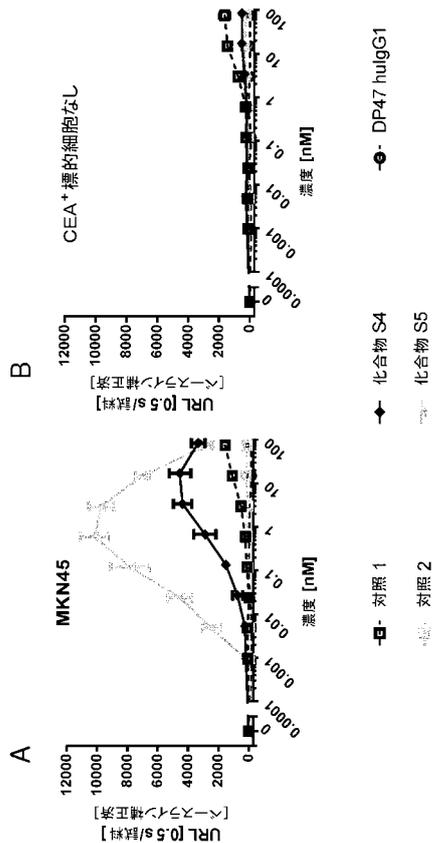
【 図 1 8 】



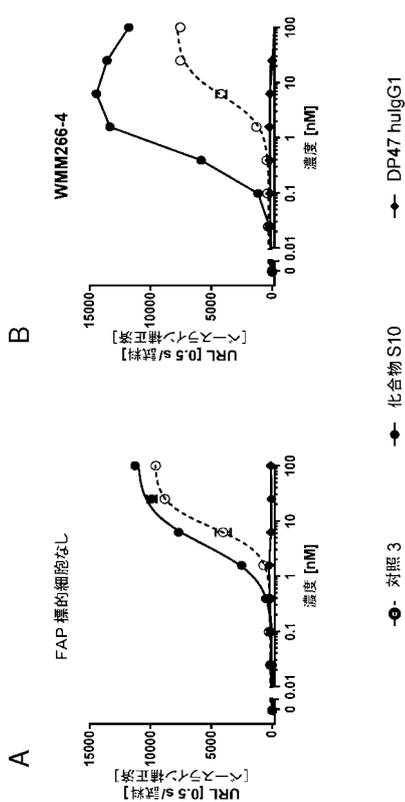
【 図 1 9 】



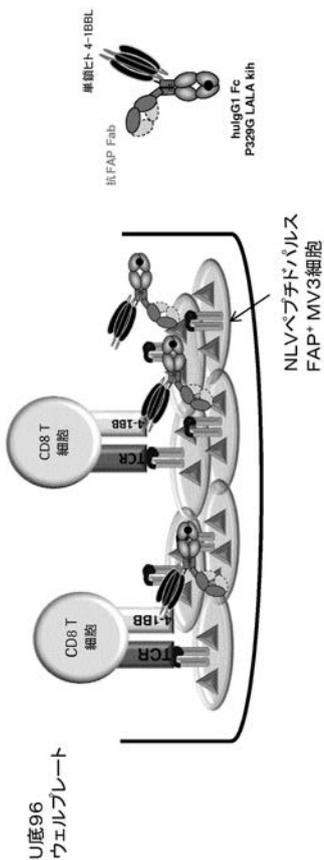
【図 2 0】



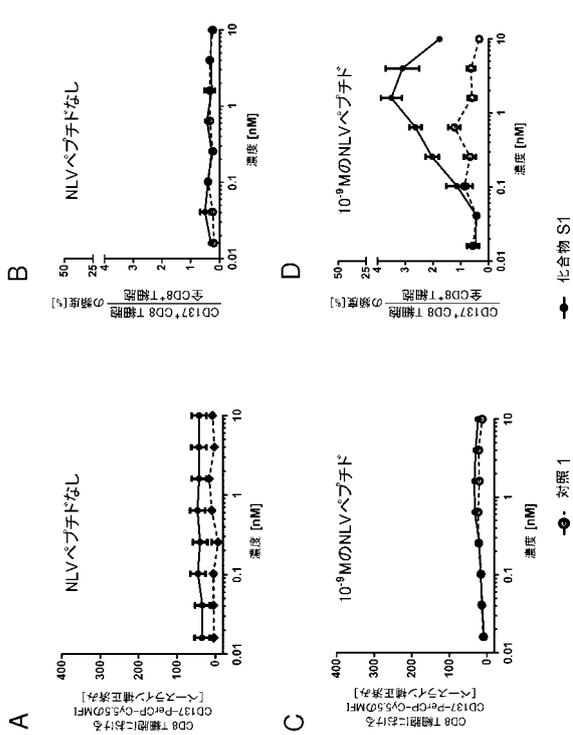
【図 2 1】



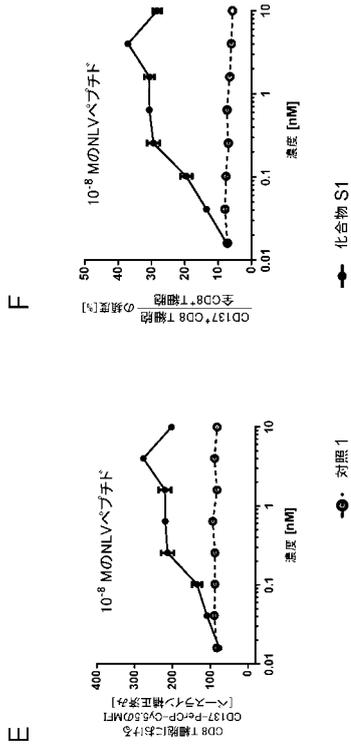
【図 2 2】



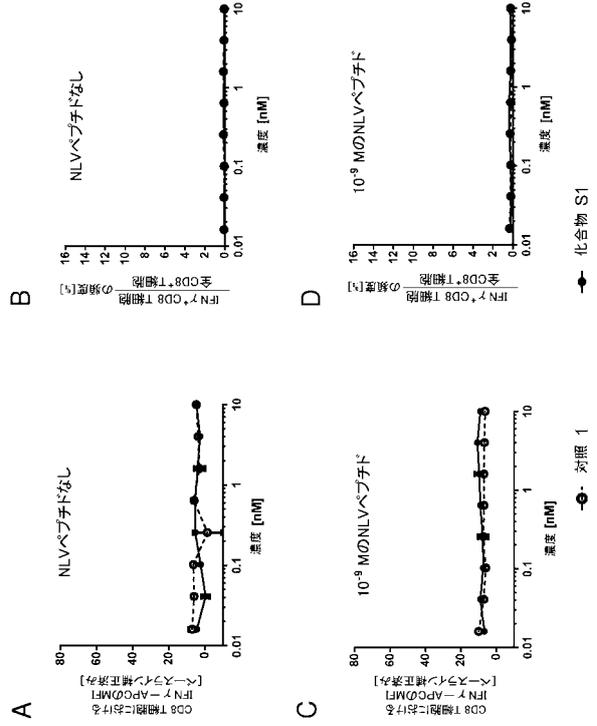
【図 2 3 A - D】



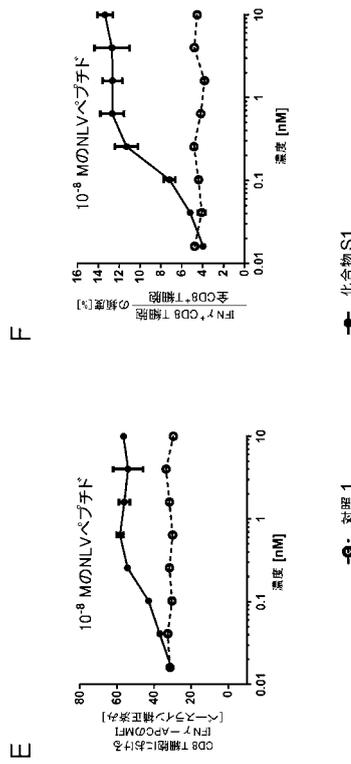
【図 2 3 E - F】



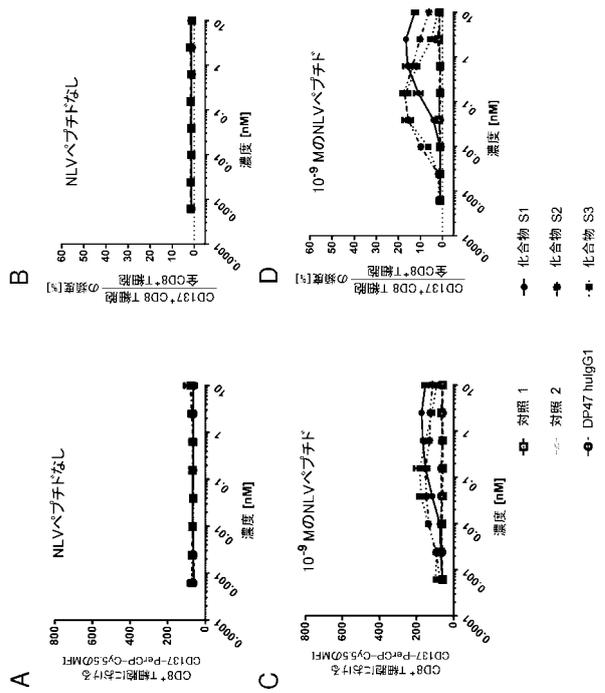
【図 2 4 A - D】



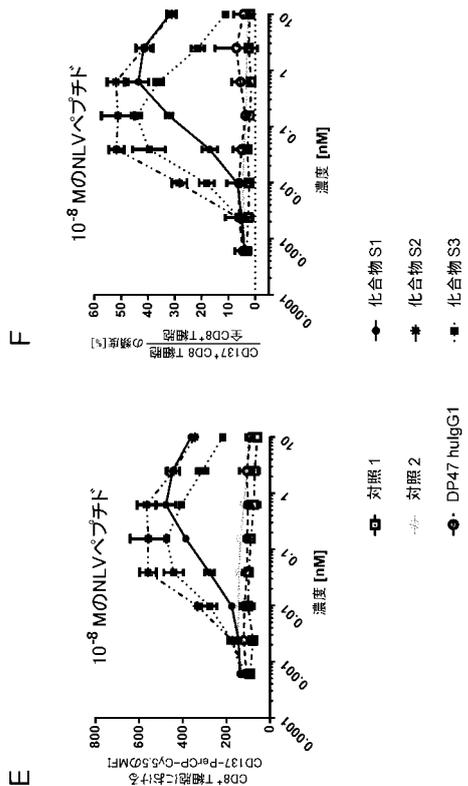
【図 2 4 E - F】



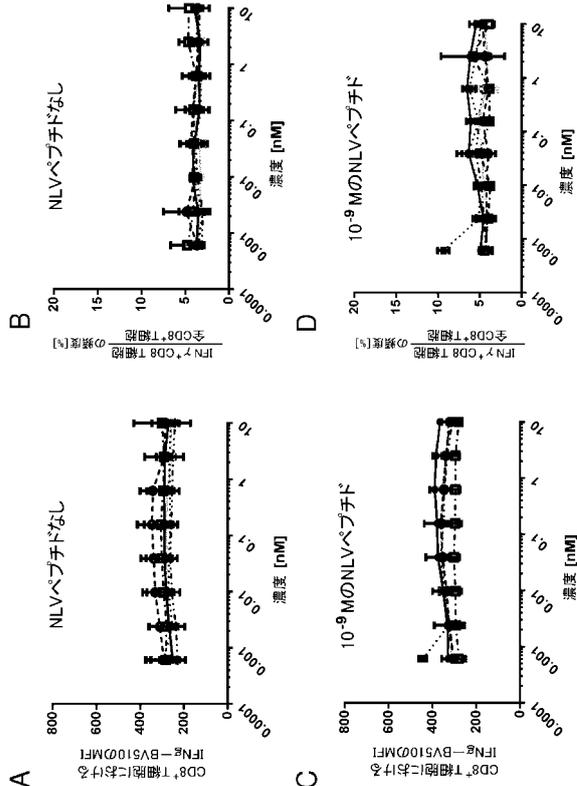
【図 2 5 A - D】



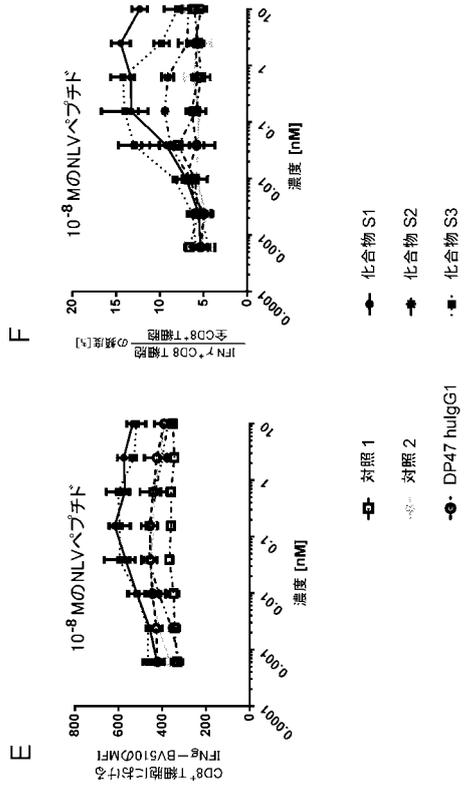
【図 25 E - F】



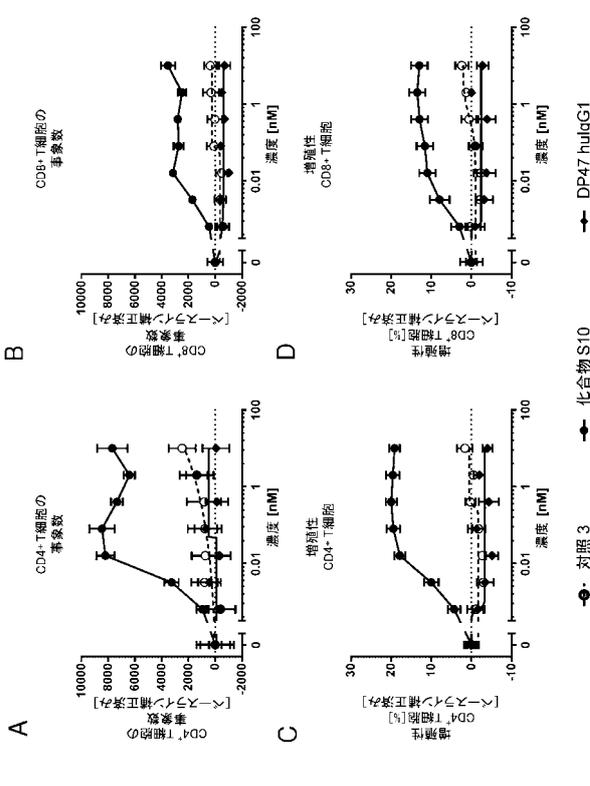
【図 26 A - D】



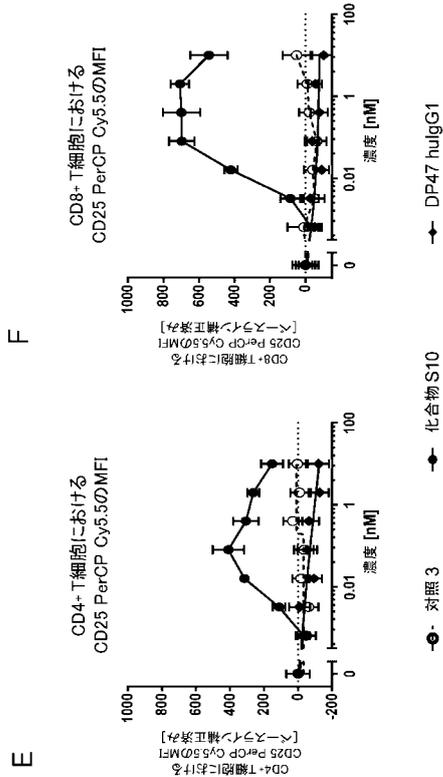
【図 26 E - F】



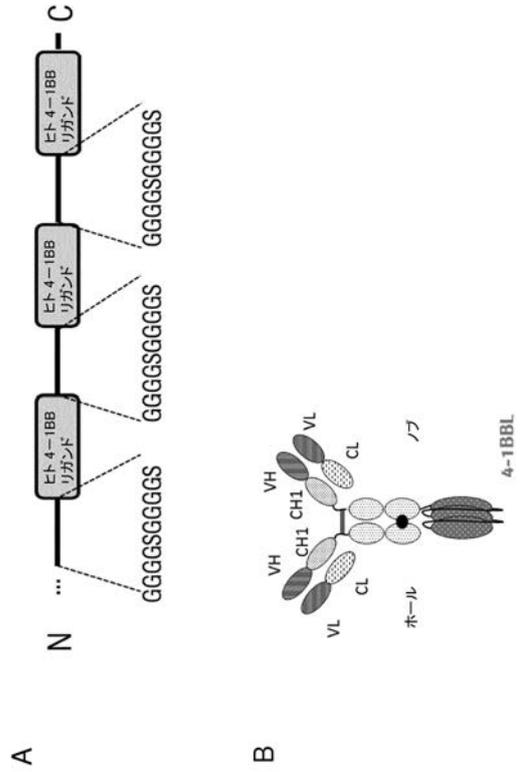
【図 27 A - D】



【 図 2 7 E - F 】



【 図 2 8 】



【 配 列 表 】

2018512137000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2016/056765

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. forming part of the international application as filed:
- in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- on paper or in the form of an image file.
- b. furnished together with the international application under PCT Rule 13~~ter~~.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13~~ter~~.1(a)).
- on paper or in the form of an image file (Rule 13~~ter~~.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2016/056765

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. A61K38/17 A61K39/395 C07K14/705 C07K16/28 C07K16/40 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) A61K 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	V. KERMER ET AL: "Combining Antibody-Directed Presentation of IL-15 and 4-1BBL in a Trifunctional Fusion Protein for Cancer Immunotherapy", MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS, vol. 13, no. 1, January 2014 (2014-01), pages 112-121, XP055200723, ISSN: 1535-7163, DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0282	1-17, 26-29, 33,34, 38-47
Y	paragraph [0008] - paragraph [0009]	18-25, 30-32, 35-37
	----- -/--	
<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 "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
17 May 2016	02/06/2016	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 6818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Nauche, Stéphane	

1

Form PCT/ISA210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2016/056765

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EDWIN BREMER: "Targeting of the Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily for Cancer Immunotherapy", ISRN ONCOLOGY, vol. 176, no. 2, January 2013 (2013-01), pages 974-25, XP055184622, ISSN: 2090-5661, DOI: 10.1186/1479-5876-9-204	1-17, 26-29, 33,34, 38-47
Y	See paragraphs "Results" and "Discussion"	18-25, 30-32, 35-37
Y	----- WO 2011/020783 A2 (ROCHE GLYCART AG [CH]; HOSSE RALF [CH]; MOESSNER EKKEHARD [CH]; SILACC) 24 February 2011 (2011-02-24) See examples 6-12, 18, claims 1-97	18,19, 25,30,35
Y	----- WO 2009/040550 A1 (CANCER REC TECH LTD [GB]; CHESTER KERRY [GB]; KOGELBERG HEIDE [GB]; MA) 2 April 2009 (2009-04-02) See examples	21,22, 31,36
Y	----- WO 2008/022152 A2 (XENCOR INC [US]; BERNETT MATTHEW J [US]; CHU SEUNG YUP [US]; DESJARLAI) 21 February 2008 (2008-02-21) See claims, paragraph "Antibody conjugates and fusions"	24,25, 32,37
A	----- EP 1 736 482 A1 (INST NAT SANTE RECH MED [FR]) 27 December 2006 (2006-12-27) See example 1,2, claims -----	1-37

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2016/056765

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011020783 A2	24-02-2011	AR 077879 A1	28-09-2011
		AU 2010285071 A1	02-02-2012
		CA 2769619 A1	24-02-2011
		CN 102573922 A	11-07-2012
		CO 6430436 A2	30-04-2012
		CR 20120042 A	22-03-2012
		EC SP12011685 A	30-03-2012
		EP 2467165 A2	27-06-2012
		ES 2534085 T3	17-04-2015
		JP 5764127 B2	12-08-2015
		JP 2013502209 A	24-01-2013
		KR 20120053042 A	24-05-2012
		KR 20150088328 A	31-07-2015
		MA 33717 B1	01-11-2012
		PE 06302012 A1	26-05-2012
		RU 2012110127 A	27-09-2013
		SG 178443 A1	27-04-2012
		TW 201119672 A	16-06-2011
		US 2011064751 A1	17-03-2011
		WO 2011020783 A2	24-02-2011
WO 2009040550 A1	02-04-2009	AU 2008303393 A1	02-04-2009
		CA 2701072 A1	02-04-2009
		EP 2201038 A1	30-06-2010
		US 2011053254 A1	03-03-2011
		US 2015291695 A1	15-10-2015
		WO 2009040550 A1	02-04-2009
WO 2008022152 A2	21-02-2008	AU 2007285976 A1	21-02-2008
		CA 2658557 A1	21-02-2008
		DK 2059536 T3	14-04-2014
		DK 2383297 T3	15-04-2013
		EP 2059536 A2	20-05-2009
		EP 2383297 A1	02-11-2011
		ES 2402591 T3	07-05-2013
		ES 2457072 T3	24-04-2014
		HK 1131168 A1	17-04-2014
		HR P20130314 T1	31-05-2013
		HR P20140331 T1	09-05-2014
		JP 5645747 B2	24-12-2014
		JP 5825756 B2	02-12-2015
		JP 2010500882 A	14-01-2010
		JP 2011182798 A	22-09-2011
		JP 2013177443 A	09-09-2013
		JP 2015221839 A	10-12-2015
		PT 2059536 E	14-04-2014
		PT 2383297 E	15-04-2013
		RS 52775 B	31-10-2013
		RS 53263 B	29-08-2014
		SI 2059536 T1	30-06-2014
		SI 2383297 T1	28-06-2013
		US 2010272723 A1	28-10-2010
		US 2012082664 A1	05-04-2012
		US 2014086906 A1	27-03-2014
		US 2014112916 A1	24-04-2014
WO 2008022152 A2	21-02-2008		
EP 1736482 A1	27-12-2006	EP 1736482 A1	27-12-2006

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2016/056765

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007000675 A2 04-01-2007			

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 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
	A 6 1 P 35/00	
	A 6 1 K 39/395	E
	A 6 1 K 39/395	T

(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

- (72) 発明者 クラウス, クリスティーナ
スイス国 5 4 0 8 エネットバーデン, リンマータウヴェーク 3
- (72) 発明者 フェッラーラ コラー, クラウディア
スイス国 6 3 0 0 ツーク, ヘンイビューエル 1 3
- (72) 発明者 グラウ-リチャーズ, ザンドラ
スイス国 8 9 0 3 ビルメンズドルフ, ブライテシュトラーク 1 6
- (72) 発明者 クライン, クリスティアン
スイス国 8 9 0 6 ボンシュテッテン, カップフシュトラーク 2 6 ベー
- (72) 発明者 レヴィツキー, ヴィクトル
スイス国 8 9 0 3 ビルメンズドルフ, ヴリカーシュトラーク 1 0
- (72) 発明者 メスナー, エッケハルト
スイス国 8 2 8 0 クロイツリンゲン, フェルゼンブルクヴェーク 5
- (72) 発明者 ウマーニャ, パプロ
スイス国 8 8 3 2 ヴォルララウ, フェルゼンラインシュトラーク 2 8

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA01 CA19 CC24 DA01 DA05
4B065 AA01X AA57X AA87X AB01 AC14 BA02 CA25 CA44
4C085 AA13 AA14 BB01 BB11 BB36 BB41 BB42 BB43 BB44 CC21
CC22 CC23 DD62 EE01 GG01 GG02 GG03 GG04 GG05 GG06
4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 DA76 EA20 FA74