

(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2017-532037

(P2017-532037A)

(43) 公表日 平成29年11月2日 (2017.11.2)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 6 4
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28	4 B O 6 5
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 C O 8 5
C 1 2 N 5/0783 (2010.01)	C 1 2 N 5/0783	4 H O 4 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 143 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2017-518907 (P2017-518907)
 (86) (22) 出願日 平成27年10月7日 (2015.10.7)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年5月18日 (2017.5.18)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/054490
 (87) 国際公開番号 W02016/057667
 (87) 国際公開日 平成28年4月14日 (2016.4.14)
 (31) 優先権主張番号 62/062, 431
 (32) 優先日 平成26年10月10日 (2014.10.10)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 504333972
 メディミュン, エルエルシー
 アメリカ合衆国 20878 メリーランド州, ゲイサーズバーグ, ワン メディミュン ウェイ
 (74) 代理人 110002572
 特許業務法人平木国際特許事務所
 (72) 発明者 ハモンド, スコット エー.
 アメリカ合衆国 20878 メリーランド州, ゲイサーズバーグ, ワン メディミュン ウェイ, メディミュン, エルエルシー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト化抗OX40抗体及びその使用

(57) 【要約】

本開示は、ヒト化抗OX40抗体を提供する。また、かかる抗体の作製方法、及び例えば癌の治療など、使用方法も提供される。

【選択図】 図 1

FIGURE 1

9B12VH mutant variants pairing with humanized VL										
Clone ID	VH mutant (nick name)	VH mutation position						Removing Sequence		
		27D	39K	47Y	48M	71R	78Y	81F	NG (CDR2H)	RYDYG (CDR3H)
OX40mAb1	9B12 chimera	D	K	Y	M	R	Y	F		
OX40mAb2	9B12 mouse VH	D	K	Y	M	R	Y	F		
OX40mAb5	hu	G	Q	W	I	P	F	Y	NG	RYDYG
OX40mAb6	huKR	G	K	W	I	R	F	Y		
OX40mAb10	m1	D	Q	W	I	P	F	Y		
OX40mAb11	m2	G	K	Y	M	P	F	Y		
OX40mAb12	m3	G	Q	W	I	R	Y	F		
OX40mAb13	KR-DYMYF	D	K	Y	M	R	Y	F		
OX40mAb14	KR-DYMYF	D	K	Y	I	R	Y	F		
OX40mAb15	KR-DYMYF	D	K	Y	I	R	F	F		
OX40mAb16	KR-DYMYF	D	K	Y	I	R	Y	Y		
OX40mAb17	KR-DYMYF	D	K	Y	I	R	F	Y		
OX40mAb18	KYFY	G	K	Y	I	R	Y	F		
OX40mAb19	KYRY	G	K	Y	I	R	Y	F		
OX40mAb20	KYRY	G	K	Y	I	R	Y	Y	NG	RYDYG
OX40mAb21	KYY	G	K	Y	I	R	Y	Y		
OX40mAb22	56A, 98K-A	G	K	Y	I	R	Y	Y	NA	KYDYG
OX40mAb23	56A	G	K	Y	I	R	Y	Y	NA	RYDYG
OX40mAb24	98K	G	K	Y	I	R	Y	Y	NG	KYDYG
OX40mAb25	54S	G	K	Y	I	R	Y	Y	SG	RYDYG
OX40mAb25a	54S, 98K	G	K	Y	I	R	Y	Y	SG	KYDYG
OX40mAb26	mouseVH-56A	D	K	Y	M	R	Y	F	NA	RYDYG
OX40mAb27	56A, 98K	G	K	Y	I	R	Y	Y	NA	KYDYG
OX40mAb28	huIgG1TM	G	K	Y	I	R	Y	Y	NG	KYDYG
OX40mAb29	huIgG1TM	G	K	Y	I	R	Y	Y	NG	KYDYG
OX40mAb30	huIgG1	G	K	Y	I	R	Y	Y	NG	KYDYG
OX40mAb31	huIgG4P	G	K	Y	I	R	Y	Y	NA	KYDYG
OX40mAb32	huIgG1TM	G	K	Y	I	R	Y	Y	NA	KYDYG
OX40mAb37	huIgG1	G	K	Y	I	R	Y	Y	NA	KYDYG

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ヒト化重鎖可変領域（VH）とヒト化軽鎖可変領域（VL）とを含む抗体又はその抗原結合断片であって、

前記 VH が、式：

HFW1 - HCDR1 - HFW2 - HCDR2 - HFW3 - HCDR3 - HFW4

（式中、HFW1 は配列番号 6 又は配列番号 7 であり、HCDR1 は配列番号 8 であり、HFW2 は配列番号 9 であり、HCDR2 は配列番号 14、配列番号 15 又は配列番号 16 であり、HFW3 は配列番号 17 であり、HCDR3 は配列番号 25、配列番号 26、又は配列番号 27 であり、及び HFW4 は配列番号 28 である）を有するアミノ酸配列を含み、

前記 VL がアミノ酸配列、配列番号 29 又は配列番号 32 を含み、及びヒト OX40 に特異的に結合することができる抗体又はその断片。

【請求項 2】

前記 HFW2 のアミノ酸配列が、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、又は配列番号 13 である、請求項 1 に記載の抗体又はその断片。

【請求項 3】

前記 HFW3 のアミノ酸配列が、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 21、配列番号 22、配列番号 23、又は配列番号 24 である、請求項 1 又は 2 に記載の抗体又はその断片。

【請求項 4】

前記 VH がアミノ酸配列、配列番号 33、配列番号 35、配列番号 37、配列番号 39、配列番号 41、配列番号 43、配列番号 45、配列番号 47、配列番号 49、配列番号 51、配列番号 53、配列番号 55、配列番号 57、配列番号 59、配列番号 61、配列番号 63、配列番号 65、又は配列番号 67 を含む、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の抗体又はその断片。

【請求項 5】

前記 VL がアミノ酸配列、配列番号 29 を含み、且つ前記 VH がアミノ酸配列、配列番号 59 を含む、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の抗体又はその断片。

【請求項 6】

前記 VL の C 末端に融合した軽鎖定常領域又はその断片を更に含む、請求項 1～5 のいずれか一項に記載の抗体又はその断片。

【請求項 7】

前記軽鎖定常領域がヒト κ 定常領域である、請求項 6 に記載の抗体又はその断片。

【請求項 8】

前記 VH の C 末端に融合した重鎖定常領域又はその断片を更に含む、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の抗体又はその断片。

【請求項 9】

前記重鎖定常領域が、ヒト IgG1 定常領域、ヒト IgG4P 定常領域、ヒト IgG1T M 定常領域又はマウス IgG1 定常領域である、請求項 8 に記載の抗体又はその断片。

【請求項 10】

前記重鎖定常領域がヒト IgG1 定常領域である、請求項 9 に記載の抗体又はその断片。

【請求項 11】

重鎖アミノ酸配列、配列番号 71 及び軽鎖アミノ酸配列、配列番号 30 を含む、請求項 1～10 のいずれか一項に記載の抗体又はその断片。

【請求項 12】

前記抗原結合断片が、Fv 断片、Fab 断片、F(ab')₂ 断片、Fab' 断片、dsFv 断片、scFv 断片、又は sc(Fv)₂ 断片、又はこれらの任意の組み合わせである、請求項 1～11 のいずれか一項に記載の抗体又は断片。

【請求項 13】

カニクイザル、又はアカゲザル O X 40 に特異的に結合することができる、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の抗体又はその断片。

【請求項 14】

ヒト、カニクイザル、アカゲザル、又はこれらの任意の組み合わせ由来のジャーカット細胞、初代活性化 C D 4 ⁺ 又は C D 8 ⁺ T 細胞上に発現するとおりの O X 40 に特異的に結合することができる、請求項 13 に記載の抗体又はその断片。

【請求項 15】

マウス又はラット O X 40 に結合しない、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の抗体又はその断片。

10

【請求項 16】

関連する腫瘍壊死因子レセプタースーパーファミリー (T N F R S F) タンパク質と交差反応しない、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の抗体又はその断片。

【請求項 17】

初代活性化ヒト C D 4 ⁺ T 細胞上に発現するヒト O X 40 に対する結合親和性が、フローサイトメトリーによって計測するとき約 250 p M ~ 約 370 p M である、請求項 14 に記載の抗体又はその断片。

【請求項 18】

前記結合親和性が約 312 p M である、請求項 17 に記載の抗体又はその断片。

【請求項 19】

フローサイトメトリーによって計測するとき、初代活性化ヒト C D 4 ⁺ T 細胞に対する 20 % レセプター占有率 (E C ₂₀) を約 63 ~ 約 93 p M で、初代活性化ヒト C D 4 ⁺ T 細胞に対する 50 % レセプター占有率 (E C ₅₀) を約 250 ~ 約 370 p M で、及び初代活性化ヒト C D 4 ⁺ T 細胞に対する 90 % レセプター占有率 (E C ₉₀) を約 2290 ~ 約 3330 p M で実現することができる、請求項 17 又は 18 に記載の抗体又はその断片。

20

【請求項 20】

E C ₂₀ が約 78 p M であり、E C ₅₀ が約 312 p M であり、及び E C ₉₀ が約 2810 p M である、請求項 19 に記載の抗体又はその断片。

【請求項 21】

O X 40 過剰発現ジャーカット細胞上に発現するヒト O X 40 に対する結合親和性が、フローサイトメトリーによって計測するとき約 250 p M ~ 約 600 p M である、請求項 14 に記載の抗体又はその断片。

30

【請求項 22】

前記結合親和性が約 424 p M である、請求項 21 に記載の抗体又はその断片。

【請求項 23】

フローサイトメトリーによって計測するとき、O X 40 過剰発現ジャーカット細胞に対する E C ₂₀ を約 60 ~ 約 150 p M で、O X 40 過剰発現ジャーカット細胞に対する E C ₅₀ を約 250 ~ 約 600 p M で、及び O X 40 過剰発現ジャーカット細胞に対する E C ₉₀ を約 2260 ~ 約 4380 p M で実現することができる、請求項 21 又は 22 に記載の抗体又はその断片。

40

【請求項 24】

E C ₂₀ が約 106 p M であり、E C ₅₀ が約 424 p M であり、及び E C ₉₀ が約 3820 p M である、請求項 23 に記載の抗体又はその断片。

【請求項 25】

初代活性化カニクイザル C D 4 ⁺ T 細胞上に発現するカニクイザル O X 40 に対する結合親和性が、フローサイトメトリーによって計測するとき約 340 p M ~ 約 820 p M である、請求項 14 に記載の抗体又はその断片。

【請求項 26】

前記結合親和性が約 580 p M である、請求項 25 に記載の抗体又はその断片。

50

【請求項 27】

初代活性化アカゲザルCD4⁺T細胞上に発現するアカゲザルOX40に対する結合親和性が、フローサイトメトリーによって計測するとき約130pM～約600pMである、請求項14に記載の抗体又はその断片。

【請求項 28】

前記結合親和性が約370pMである、請求項27に記載の抗体又はその断片。

【請求項 29】

プレートベースのアッセイにおいて活性化CD4⁺T細胞の用量依存的増殖及び初代活性化ヒトCD4⁺T細胞における用量依存的サイトカイン放出を誘導することができる、請求項1～28のいずれか一項に記載の抗体又はその断片。

10

【請求項 30】

全てフローサイトメトリーによって計測するとき、20%最大増殖応答(EC₂₀)を初代活性化ヒトCD4⁺T細胞において約14pM～約28pMの抗体濃度で実現することができ、50%最大増殖応答(EC₅₀)を初代活性化ヒトCD4⁺T細胞において約0.3pM～約130pMの抗体濃度で実現することができ、及び90%最大増殖応答(EC₉₀)を初代活性化ヒトCD4⁺T細胞において約50pM～約90pMの抗体濃度で実現することができる、請求項29に記載の抗体又はその断片。

【請求項 31】

EC₂₀が約21pMであり、EC₅₀が約28pMであり、及びEC₉₀が約72pMである、請求項30に記載の抗体又はその断片。

20

【請求項 32】

前記サイトカインが、IFN γ 、TNF α 、IL-5、IL-10、IL-2、IL-4、IL-13、IL-8、IL-12 p70、IL-1 β 、又はこれらの任意の組み合わせである、請求項29～31のいずれか一項に記載の抗体又はその断片。

【請求項 33】

前記サイトカインが、IFN γ 、TNF α 、IL-5、IL-10、IL-13、又はこれらの任意の組み合わせである、請求項32に記載の抗体又はその断片。

【請求項 34】

初代活性化カニクイザルCD4⁺T細胞及び初代活性化アカゲザルCD4⁺T細胞においてCD4⁺T細胞増殖及びサイトカイン放出を実現することができる、請求項1～28のいずれか一項に記載の抗体又はその断片。

30

【請求項 35】

Fc γ R発現細胞の存在下でOX40発現T細胞のNF κ B経路を活性化させることができる、請求項1～34のいずれか一項に記載の抗体又はその断片。

【請求項 36】

前記OX40発現T細胞が、NF κ Bシグナル伝達経路の刺激に応答してルシフェラーゼを産生するOX40発現ジャーカットNF κ B-ルシフェラーゼレポーター細胞である、請求項35に記載の抗体又はその断片。

【請求項 37】

OX40発現細胞に対する補体依存性又は抗体依存性細胞傷害を惹起することができる、請求項1～36のいずれか一項に記載の抗体又はその断片。

40

【請求項 38】

C1qに結合して、前記OX40発現細胞に対するNK媒介性抗体依存性細胞傷害を惹起することができる、請求項37に記載の抗体又はその断片。

【請求項 39】

癌治療を必要としている対象に有効用量を投与すると、前記対象の腫瘍成長を阻害することができる、請求項1～38のいずれか一項に記載の抗体又はその断片。

【請求項 40】

前記腫瘍成長阻害がT細胞の存在下で実現する、請求項39に記載の抗体又はその断片。

50

【請求項 4 1】

アイソタイプ対照抗体又はその断片の投与と比較して、腫瘍成長が少なくとも 10 %、少なくとも 20 %、少なくとも 30 %、少なくとも 40 %、少なくとも 50 %、少なくとも 60 %、又は少なくとも 70 % 阻害される、請求項 3 9 又は 4 0 に記載の抗体又はその断片。

【請求項 4 2】

請求項 1 ~ 4 1 のいずれか一項に記載の抗体又はその断片と担体とを含む組成物。

【請求項 4 3】

請求項 1 ~ 4 1 のいずれか一項に記載の抗体又はその断片、又は請求項 1 ~ 4 1 のいずれか一項に記載の抗体又はその断片のポリペプチドサブユニットをコードする核酸を含むポリヌクレオチド。

10

【請求項 4 4】

配列番号 6 0 の核酸、配列番号 3 1 の核酸、配列番号 7 2 の核酸、又はこれらの任意の組み合わせを含む、請求項 4 3 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 4 5】

請求項 4 3 又は請求項 4 4 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 4 6】

請求項 4 3 又は請求項 4 4 に記載のポリヌクレオチド又は請求項 4 5 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 4 7】

抗体又はその断片の作製方法であって、前記ポリヌクレオチドによってコードされる前記抗体又はその断片が発現する条件下で請求項 4 6 に記載の宿主細胞を培養するステップと、前記抗体又はその断片を回収するステップとを含む方法。

20

【請求項 4 8】

活性化 T 細胞の生存又は増殖を促進する方法であって、請求項 1 ~ 4 1 のいずれか一項に記載の抗体又はその断片を活性化 T 細胞と接触させるステップを含み、前記抗体又はその断片が前記 T 細胞の表面上の O X 4 0 に特異的に結合することができる、方法。

【請求項 4 9】

活性化 T 細胞からのサイトカイン放出を誘導する方法であって、請求項 1 ~ 4 1 のいずれか一項に記載の抗体又はその断片を活性化 T 細胞と接触させるステップを含み、前記抗体又はその断片が前記 T 細胞の表面上の O X 4 0 に特異的に結合することができる、方法。

30

【請求項 5 0】

前記サイトカインが、I F N γ 、T N F α 、I L - 5、I L - 1 0、I L - 2、I L - 4、I L - 1 3、I L - 8、I L - 1 2 p 7 0、I L - 1 β 、又はこれらの任意の組み合わせである、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記サイトカインが、I F N γ 、T N F α 、I L - 5、I L - 1 0、I L - 1 3、又はこれらの任意の組み合わせである、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記活性化 T 細胞が、活性化 C D 4 ⁺ T 細胞、活性化 C D 8 ⁺ T 細胞、又はこれらの組み合わせである、請求項 4 8 ~ 5 1 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 5 3】

前記活性化 C D 4 ⁺ T 細胞が、ヒト C D 4 ⁺ T 細胞、カニクイザル C D 4 ⁺ T 細胞、アカゲザル C D 4 ⁺ T 細胞、又はこれらの組み合わせである、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 4】

T 細胞活性化を促進する方法であって、請求項 1 ~ 4 1 のいずれか一項に記載の抗体又はその断片を T 細胞と接触させるステップを含み、前記抗体又はその断片が前記 T 細胞の表面上の O X 4 0 に特異的に結合することができる、方法。

【請求項 5 5】

50

N F κ B シグナル伝達経路の刺激によって T 細胞活性化を計測することができる、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記 T 細胞が、活性化 C D 4 ⁺ T 細胞、活性化 C D 8 ⁺ T 細胞、又はこれらの組み合わせである、請求項 5 4 又は 5 5 に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記活性化 C D 4 ⁺ T 細胞が、ヒト C D 4 ⁺ T 細胞、カニクイザル C D 4 ⁺ T 細胞、アカゲザル C D 4 ⁺ T 細胞、又はこれらの組み合わせである、請求項 5 6 に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記接触させるステップが、対象に前記抗体又はその断片の有効量を投与するステップを含む、請求項 5 4 ~ 5 7 のいずれか一項に記載の方法。 10

【請求項 5 9】

対象の癌を治療する方法であって、治療を必要としている対象に、請求項 1 ~ 4 1 のいずれか一項に記載の抗体若しくはその断片又は請求項 4 2 に記載の組成物の有効量を投与するステップを含む方法。

【請求項 6 0】

前記癌が固形腫瘍である、請求項 5 9 に記載の方法。

【請求項 6 1】

前記抗体若しくはその断片又は組成物の投与により腫瘍成長を阻害することができるか、腫瘍縮小を促進することができるか、又は両方である、請求項 5 9 又は 6 0 に記載の方法。 20

【請求項 6 2】

腫瘍成長阻害が T 細胞の存在下で実現する、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 3】

対象の免疫応答を増強する方法であって、それを必要としている対象に、請求項 1 ~ 4 1 のいずれか一項に記載の抗体若しくはその断片、又は請求項 4 2 に記載の組成物の治療有効量を投与するステップを含む方法。

【請求項 6 4】

前記対象がヒト対象である、請求項 5 9 ~ 6 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 5】

配列番号 9 1 のアミノ酸 1 0 8 ~ 1 4 6 の範囲内にあるヒト O X 4 0 のエピトープに結合する、請求項 1 ~ 4 1 のいずれか一項に記載の抗体又はその断片。 30

【請求項 6 6】

前記エピトープが少なくとも配列番号 9 1 のアミノ酸ロイシン 1 1 6 及びアラニン 1 2 6 を含む、請求項 6 5 に記載の抗体又はその断片。

【請求項 6 7】

Q 1 1 3 L 突然変異及び V 1 2 4 A 突然変異を除いて配列番号 9 2 を含むマウス O X 4 0 変異体に結合する、請求項 1 ~ 4 1 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 6 8】

1 0 0 アミノ酸以下からなる単離ペプチドであって、請求項 1 ~ 4 1 のいずれか一項に記載の抗体又はその断片が特異的に結合することのできるペプチド。 40

【請求項 6 9】

配列番号 9 1 のアミノ酸 1 1 6 ~ 1 2 6 を含む、請求項 6 8 に記載のペプチド。

【請求項 7 0】

L 1 1 6 及び A 1 2 6 を除く任意の位置における 1、2、3、4、5、又は 6 個の単一アミノ酸置換、欠失、又は挿入を除いて配列番号 9 1 のアミノ酸 1 0 8 ~ 1 4 6 を含む、請求項 6 8 又は 6 9 に記載のペプチド。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0 0 0 1】

OX40 (CD134; TNFRSF4) は、主に活性化CD4⁺ 及びCD8⁺ T細胞、調節性T (Treg) 細胞及びナチュラルキラー (NK) 細胞に見られる腫瘍壊死因子レセプターである (Croft et al., 2009, Immunol Rev. 229: 173 - 91)。OX40は1つの既知の内因性リガンド、OX40リガンド (OX40L; CD152; TNFSF4) を有し、OX40リガンドは三量体形態で存在し、これがOX40をクラスター化すると、T細胞内に強力な細胞シグナル伝達イベントが生じ得る (同上)。活性化CD4⁺ 及びCD8⁺ T細胞上のOX40を介したシグナル伝達により、サイトカイン産生、グランザイム及びパーフォリン放出、並びにエフェクター及びメモリーT細胞プールの拡大が増強される (Jensen et al., 2010, Semin Oncol. 37: 524 - 32)。加えて、Treg細胞上のOX40シグナル伝達は、Tregの拡大を阻害し、Tregの誘導を終了させ、及びTreg抑制機能を遮断する (Voo et al., 2013, J Immunol. 191: 3641 - 50; Vu et al., 2007, Blood. 110: 2501 - 10)。

10

【0002】

免疫組織化学研究及び初期のフローサイトメトリー解析により、OX40は、幅広い種類のヒト癌に浸潤するT細胞上に発現することが明らかになった (Baruah et al., 2011, Immunobiology 217: 668 - 675; Curti et al., 2013, Cancer Res. 73: 7189 - 98; Ladanyi et al., 2004, Clin Cancer Res. 10: 521 - 30; Petty et al., 2002, Am J Surg. 183: 512 - 8; Ramsdell et al., 2000, Am J Surg. 179: 400 - 6; Sarff et al., 2008, Am J Surg. 195: 621 - 5; discussion 625; Vetto et al., 1997, Am J Surg. 174: 258 - 65)。理論によって拘束されることを望むものではないが、腫瘍浸潤リンパ球上のOX40発現は幾つかのヒト癌における長期生存に相関することから、OX40シグナルが抗腫瘍免疫応答の確立において役割を果たし得ることが示唆される (Ladanyi et al., 2004, Clin Cancer Res. 10: 521 - 30; Petty et al., 2002, Am J Surg. 183: 512 - 8)。

20

【0003】

種々の非臨床マウス腫瘍モデルでは、抗体及びOX40リガンド融合タンパク質を含め、OX40のアゴニストの使用が成功を収めており、有望な結果が得られている (Kjergaard et al., 2000, Cancer Res. 60: 5514 - 21; Ndhlovu et al., 2001, J Immunol. 167: 2991 - 9; Weinberg et al., 2000, J Immunol. 164: 2160 - 9)。OX40を介してT細胞を共刺激すると、抗腫瘍活性が促進され (これは場合によっては耐久性があった)、続く腫瘍チャレンジに対して持続的な保護が提供された (Weinberg et al., 2000, J Immunol. 164: 2160 - 9)。OX40アゴニストの腫瘍成長阻害には、Treg細胞阻害及びエフェクターT細胞の共刺激が必須であることが示された (Picconese et al., 2008, J Exp Med. 205: 825 - 39)。ワクチン、化学療法、放射線療法、及び免疫療法との併用によってOX40アゴニスト療法の抗腫瘍効果を増強しようと、多くの戦略及び技術が調査されている (Jensen et al., 2010, Semin Oncol. 37: 524 - 32; Melerio et al., 2013, Clin Cancer Res. 19: 997 - 1008)。

30

40

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】Croft et al., 2009, Immunol Rev. 229: 173 - 91

50

- 【非特許文献2】Jensen et al., 2010, Semin Oncol. 37: 524 - 32
- 【非特許文献3】Voo et al., 2013, J Immunol. 191: 3641 - 50
- 【非特許文献4】Vu et al., 2007, Blood. 110: 2501 - 10
- 【非特許文献5】Baruah et al., 2011, Immunobiology 217: 668 - 675
- 【非特許文献6】Curti et al., 2013, Cancer Res. 73: 7189 - 98
- 【非特許文献7】Ladanyi et al., 2004, Clin Cancer Res. 10: 521 - 30 10
- 【非特許文献8】Petty et al., 2002, Am J Surg. 183: 512 - 8
- 【非特許文献9】Ramstad et al., 2000, Am J Surg. 179: 400 - 6
- 【非特許文献10】Sarff et al., 2008, Am J Surg. 195: 621 - 5; discussion 625
- 【非特許文献11】Vetto et al., 1997, Am J Surg. 174: 258 - 65
- 【非特許文献12】Kjaergaard et al., 2000, Cancer Res. 60: 5514 - 21 20
- 【非特許文献13】Ndhlovu et al., 2001, J Immunol. 167: 2991 - 9
- 【非特許文献14】Weinberg et al., 2000, J Immunol. 164: 2160 - 9
- 【非特許文献15】Piconese et al., 2008, J Exp Med. 205: 825 - 39
- 【非特許文献16】Melerio et al., 2013, Clin Cancer Res. 19: 997 - 1008

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

本開示は、OX40、例えばヒトOX40に結合する抗体を提供する。特定の態様において、提供される抗体はヒト化抗体である。例えば、本開示は、ヒト化重鎖可変領域（VH）とヒト化軽鎖可変領域（VL）とを含む抗体又はその抗原結合断片を提供し、ここでVHは、式：

HFW1 - HCDR1 - HFW2 - HCDR2 - HFW3 - HCDR3 - HFW4

[式中、HFW1は配列番号6又は配列番号7であり、HCDR1は配列番号8であり、HFW2は配列番号9（WIRX₃₉HPGKGLEX₄₇X₄₈G；式中、X₃₉はQ又はKであり、X₄₇はW又はYであり、及びX₄₈はI又はMである）であり、HCDR2は、配列番号14、配列番号15又は配列番号16であり、HFW3は配列番号17（RITINX₇₁DTSKNQX₇₈SLQLNSVTPEDTAVYX₉₁CAR；式中、X₇₁はP又はRであり、X₇₈はF又はYであり、及びX₉₁はY又はFである）であり、HCDR3は、配列番号25、配列番号26、又は配列番号27であり、及びHFW4は配列番号28である]を有するアミノ酸配列を含み、VLはアミノ酸配列、配列番号29又は配列番号32を含み；及び抗体又はその断片はヒトOX40に特異的に結合することができる。特定の態様において、HFW2のアミノ酸配列は、配列番号10、配列番号11、配列番号12、又は配列番号1であり、特定の態様において、HFW3のアミノ酸配列は、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、又は配列番号24である。

30

40

50

【 0 0 0 6 】

特定の態様において、提供される抗体又はその断片のV Hは、アミノ酸配列、配列番号33、配列番号35、配列番号37、配列番号39、配列番号41、配列番号43、配列番号45、配列番号47、配列番号49、配列番号51、配列番号53、配列番号55、配列番号57、配列番号59、配列番号61、配列番号63、配列番号65、又は配列番号67を含む。特定の態様において、提供される抗体又はその断片のV Lはアミノ酸配列、配列番号29を含み、V Hはアミノ酸配列、配列番号59を含む。

【 0 0 0 7 】

特定の態様において、提供される抗体又はその断片は、V LのC末端に融合した軽鎖定常領域又はその断片、例えばヒトκ定常領域又はヒトλ定常領域を更に含む。特定の態様において、提供される抗体又はその断片は、V HのC末端に融合した重鎖定常領域又はその断片、例えば、ヒトI g G 1定常領域、ヒトI g G 4 P定常領域、ヒトI g G 1 T M定常領域又はマウスI g G 1定常領域を更に含む。特定の態様において、重鎖定常領域はヒトI g G 1定常領域である。特定の態様において、提供される抗体又はその断片は、重鎖アミノ酸配列、配列番号71と軽鎖アミノ酸配列、配列番号30とを含む。本開示によって提供されるとおりの抗体の抗原結合断片は、例えば、F v断片、F a b断片、F (a b ') 2断片、F a b '断片、d s F v断片、s c F v断片、又はs c (F v) 2断片、又はこれらの任意の組み合わせであり得る。

【 0 0 0 8 】

特定の態様において、提供される抗体又はその断片は、ヒト、カニクイザル、又はアカゲザルO X 4 0に特異的に結合することができ、例えば、ヒト、カニクイザル、アカゲザル、又はこれらの任意の組み合わせ由来のジャーカット細胞、初代活性化C D 4 +又はC D 8 + T細胞上に発現するとおりのO X 4 0に特異的に結合することができる。特定の態様において、提供される抗体又はその断片はマウス又はラットO X 4 0に結合しない。特定の態様において、提供される抗体又はその断片は関連T N F R S Fタンパク質と交差反応しない。

【 0 0 0 9 】

特定の態様において、提供される抗体又はその断片は初代活性化ヒトC D 4 + T細胞上に発現するヒトO X 4 0に対し、フローサイトメトリーによって計測するとき約250 p M ~ 約370 p M、例えば約312 p Mの結合親和性を有し得る。特定の態様において、提供される抗体又はその断片は、フローサイトメトリーによって計測するとき、初代活性化ヒトC D 4 + T細胞に対する20%レセプター占有率(E C ₂₀)を約63 ~ 約93 p Mで、初代活性化ヒトC D 4 + T細胞に対する50%レセプター占有率(E C ₅₀)を約250 ~ 約370 p Mで、及び初代活性化ヒトC D 4 + T細胞に対する90%レセプター占有率(E C ₉₀)を約2290 ~ 約3330 p Mで実現することができる。例えば、特定の態様において、E C ₂₀は約78 p Mであり、E C ₅₀は約312 p Mであり、及びE C ₉₀は約2810 p Mである。

【 0 0 1 0 】

特定の態様において、提供される抗体又はその断片は、O X 4 0過剰発現ジャーカット細胞上に発現するヒトO X 4 0に対し、フローサイトメトリーによって計測するとき約250 p M ~ 約600 p M、例えば約424 p Mの結合親和性を有し得る。特定の態様において、提供される抗体又はその断片は、フローサイトメトリーによって計測するとき、O X 4 0過剰発現ジャーカット細胞に対するE C ₂₀を約60 ~ 約150 p Mで、O X 4 0過剰発現ジャーカット細胞に対するE C ₅₀を約250 ~ 約600 p Mで、及びO X 4 0過剰発現ジャーカット細胞に対するE C ₉₀を約2260 ~ 約4380 p Mで実現することができる。例えば、特定の態様において、E C ₂₀は約106 p Mであり、E C ₅₀は約424 p Mであり、及びE C ₉₀は約3820 p Mである。

【 0 0 1 1 】

特定の態様において、提供される抗体又はその断片は、初代活性化カニクイザルC D 4 + T細胞上に発現するカニクイザルO X 4 0に対し、フローサイトメトリーによって計測

10

20

30

40

50

するとき約340 pM～約820 pM、例えば約580 pMの結合親和性を有し得る。特定の態様において、提供される抗体又はその断片は、初代活性化アカゲザルCD4⁺T細胞上に発現するアカゲザルOX40に対し、フローサイトメトリーによって計測するとき約130 pM～約600 pM、例えば約370 pMの結合親和性を有し得る。

【0012】

特定の態様において、提供される抗体又はその断片は、プレートベースのアッセイで活性化CD4⁺T細胞の用量依存的増殖及び初代活性化CD4⁺T細胞における用量依存的サイトカイン放出を誘導し得る。例えば、特定の態様において、全てフローサイトメトリーによって計測するとき20%最大増殖応答(EC₂₀)は初代活性化ヒトCD4⁺T細胞において約14 pM～約28 pMの抗体濃度で実現することができ、50%最大増殖応答(EC₅₀)は初代活性化ヒトCD4⁺T細胞において約0.3 pM～約130 pMの抗体濃度で実現することができ、及び90%最大増殖応答(EC₉₀)は初代活性化ヒトCD4⁺T細胞において約50 pM～約90 pMの抗体濃度で実現することができる。特定の態様において、EC₂₀は約21 pMであり、EC₅₀は約28 pMであり、及びEC₉₀は約72 pMである。初代活性化ヒトCD4⁺T細胞における放出サイトカインは、限定なしに、IFN γ 、TNF α 、IL-5、IL-10、IL-2、IL-4、IL-13、IL-8、IL-12 p70、IL-1 β 、又はこれらの任意の組み合わせ、例えば、IFN γ 、TNF α 、IL-5、IL-10、IL-13、又はこれらの任意の組み合わせのうちの1つ、2つ、3つ又はそれ以上であり得る。特定の態様において、提供される抗体又はその断片は、初代活性化カニクイザルCD4⁺T細胞及び初代活性化アカゲザルCD4⁺T細胞におけるCD4⁺T細胞増殖及びサイトカイン放出を実現することができる。

10

20

30

【0013】

特定の態様において、提供される抗体又はその断片は、Fc γ R発現細胞の存在下でOX40発現T細胞のNF κ B経路を活性化させることができる。例えば、OX40発現T細胞は、NF κ Bシグナル伝達経路の刺激に応答してルシフェラーゼを産生するOX40過剰発現ジャーカットNF κ B-ルシフェラーゼレポーター細胞であり得る。特定の態様において、提供される抗体又はその断片は、OX40発現細胞に対する補体依存性又は抗体依存性細胞傷害を惹起することができる。特定の態様において、提供される抗体又はその断片は、ヒトC1qに結合して、OX40発現細胞に対するNK媒介性抗体依存性細胞傷害を惹起することができる。

30

40

50

【0014】

特定の態様において、癌治療を必要としている対象に、提供される抗体又はその断片の有効用量を投与すると、対象の腫瘍成長を阻害することができる。例えば、腫瘍成長阻害はT細胞の存在下で実現し得る。特定の態様において、腫瘍成長は、アイソタイプ対照抗体又はその断片の投与と比較して少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、又は少なくとも70%阻害される。

【0015】

本開示は、上記に記載したとおりの抗体又はその断片と担体とを含む組成物を更に提供する。

【0016】

本開示は、提供される抗体又はその断片をコードするか、或いは提供される抗体又はその断片のポリペプチドサブユニットをコードする核酸を含むポリヌクレオチドを更に提供する。特定の態様において、提供されるポリヌクレオチドは、配列番号60の核酸、配列番号31の核酸、配列番号72の核酸、又はこれらの任意の組み合わせを含む。本開示は、提供されるポリヌクレオチドを含むベクター、及び提供されるポリヌクレオチド又は提供されるベクターを含む宿主細胞を更に提供する。別の態様において、本開示は、抗体又はその断片の作製方法を提供し、この方法は、ポリヌクレオチドによってコードされる抗体又はその断片が発現する条件下で、提供される宿主細胞を培養するステップと、抗体又

はその断片を回収するステップとを含む。

【0017】

更なる態様において、本開示は、活性化T細胞の生存又は増殖を促進する方法を提供し、この方法は、提供される抗体又はその断片を活性化T細胞と接触させるステップを含み、ここで抗体又はその断片は、T細胞の表面上のOX40に特異的に結合することができる。

【0018】

更なる態様において、本開示は、活性化T細胞からのサイトカイン放出を誘導する方法を提供し、この方法は、提供される抗体又はその断片を活性化T細胞と接触させるステップを含み、ここで抗体又はその断片は、T細胞の表面上のOX40に特異的に結合することができる。特定の態様において、放出されるサイトカインは、限定なしに、IFN γ 、TNF α 、IL-5、IL-10、IL-2、IL-4、IL-13、IL-8、IL-12 p70、IL-1 β 、又はこれらの任意の組み合わせ、例えば、IFN γ 、TNF α 、IL-5、IL-10、IL-13、又はこれらの任意の組み合わせのうちの1つ、2つ、3つ又はそれ以上であり得る。特定の態様において、活性化T細胞は、活性化CD4⁺T細胞、活性化CD8⁺T細胞、又はこれらの組み合わせである。特定の態様において、活性化CD4⁺T細胞は、ヒトCD4⁺T細胞、カニクイザルCD4⁺T細胞、アカゲザルCD4⁺T細胞、又はこれらの組み合わせである。

【0019】

更なる態様において、本開示は、T細胞活性化を促進する方法を提供し、この方法は、提供される抗体又はその断片をT細胞と接触させるステップを含み、ここで抗体又はその断片は、T細胞の表面上のOX40に特異的に結合することができる。特定の態様において、T細胞活性化は、NF κ Bシグナル伝達経路の刺激によって計測することができる。特定の態様において、T細胞は、活性化CD4⁺T細胞、活性化CD8⁺T細胞、又はこれらの組み合わせである。特定の態様において、活性化CD4⁺T細胞は、ヒトCD4⁺T細胞、カニクイザルCD4⁺T細胞、アカゲザルCD4⁺T細胞、又はこれらの組み合わせである。特定の態様において、接触させるステップは、対象に抗体又はその断片の有効量を投与するステップを含む。

【0020】

更なる態様において、本開示は、対象の癌を治療する方法を提供し、この方法は、治療を必要としている対象に、提供される抗体若しくはその断片、又は提供される組成物の有効量を投与するステップを含む。特定の態様において、癌は固形腫瘍である。特定の態様において、抗体若しくはその断片又は組成物の投与は、腫瘍成長を阻害することができるか、腫瘍縮小を促進することができるか、又は両方である。特定の態様において、腫瘍成長阻害はT細胞の存在下で実現する。

【0021】

更なる態様において、本開示は、対象の免疫応答を増強する方法を提供し、この方法は、それを必要としている対象に、提供される抗体若しくはその断片、又は提供される組成物の治療有効量を投与するステップを含む。

【0022】

本開示によって提供される治療方法において、治療される対象はヒト対象であり得る。

【0023】

特定の態様において、提供される抗体又はその断片は、配列番号91のアミノ酸108～146の範囲内にあるヒトOX40のエピトープに結合することができる。特定の態様において、エピトープは、少なくとも、配列番号91のアミノ酸ロイシン116(L116)及びアラニン126(A126)を含む。特定の態様において、提供される抗体又はその断片は、Q113L突然変異及びV124A突然変異を除いて配列番号92のアミノ酸配列を有するマウスOX40変異体に結合することができる。

【0024】

本開示は、100アミノ酸以下からなる単離ペプチドを更に提供し、このペプチドには

10

20

30

40

50

、提供される抗体又はその断片が特異的に結合し得る。特定の態様において、ペプチドは配列番号 91 のアミノ酸 116 ~ 126 を含む。特定の態様において、ペプチドは、L116 及び A126 を除く任意の位置における 1、2、3、4、5、又は 6 個の単一アミノ酸置換、欠失、又は挿入を除いて配列番号 91 のアミノ酸 108 ~ 146 を含む。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図 1】ヒト化 9B12 V_H 領域の突然変異：クローンニックネームの数字は、Kabat 付番による V_H 中のアミノ酸の位置を表す。Mab1、2、5 及び 8 は、ヒト化 VL と対の V_H キメラ変異体である。Mab10 ~ 17 は、マウス復帰突然変異を有するヒト化 V_H 変異体である。Mab18 ~ 27 は、潜在的な配列易障害性 (sequence liabilities) が除去されるように操作した変異体である。Mab24 及び mAb27 の可変領域を種々の重鎖定常領域にグラフトし、得られたアイソタイプ変異体について、それぞれ mAb28 ~ 30 及び mAb31 ~ 32、mAb37 と命名した。

【図 2A - B】初代活性化ヒト CD4⁺ T 細胞の表面上に発現する OX40 に対する OX40 mAb24 及び 9B12 の結合。初代ヒト CD4⁺ T 細胞上の OX40 mAb24 に結合する AlexaFluor (登録商標) 647 標識二次抗ヒト抗体 (図 2A ~ 図 2B) の MFI = 平均蛍光強度。

【図 2C - D】初代活性化ヒト CD4⁺ T 細胞の表面上に発現する OX40 に対する OX40 mAb24 及び 9B12 の結合。初代ヒト CD4⁺ T 細胞上の 9B12 に結合する AlexaFluor (登録商標) 488 標識抗マウス二次抗体 (図 2C ~ 図 2D) の MFI = 平均蛍光強度。

【図 3A - C】ジャーカット T 細胞上に発現するヒト OX40 に対する OX40 mAb24 及び 9B12 の結合。ジャーカット T 細胞上の OX40 mAb24 に結合する AlexaFluor (登録商標) 647 標識二次抗ヒト抗体 (図 3A ~ 図 3C) の MFI = 平均蛍光強度。

【図 3D - F】ジャーカット T 細胞上に発現するヒト OX40 に対する OX40 mAb24 及び 9B12 の結合。ジャーカット T 細胞上の 9B12 に結合する AlexaFluor (登録商標) 488 標識抗マウス二次抗体 (図 3D ~ 図 3F) の MFI = 平均蛍光強度。

【図 4A - B - 1】TNFRSF 発現 HEK293 細胞及び OX40 発現ジャーカット T 細胞に対する OX40 mAb24 の結合。(図 4A) HEK293 細胞における TNFRSF メンバー (ヒストグラムの上に示されるとおり) の一過性発現、及び TNFRSF 特異的 mAb 又は OX40 mAb24 (ヒストグラムの上に示されるとおり) に対する結合。灰色のヒストグラム、TNFRSF 特異的 mAb に対する蛍光色素コンジュゲートアイソタイプ対照抗体結合、又は OX40 mAb24 に対するヤギ抗ヒト AlexaFluor (登録商標) 647 二次抗体結合対照；白色のヒストグラム、TNFRSF 特異的 mAb 結合又は OX40 mAb24 結合。

【図 4A - B - 2】TNFRSF 発現 HEK293 細胞及び OX40 発現ジャーカット T 細胞に対する OX40 mAb24 の結合。(図 4A) HEK293 細胞における TNFRSF メンバー (ヒストグラムの上に示されるとおり) の一過性発現、及び TNFRSF 特異的 mAb 又は OX40 mAb24 (ヒストグラムの上に示されるとおり) に対する結合。灰色のヒストグラム、TNFRSF 特異的 mAb に対する蛍光色素コンジュゲートアイソタイプ対照抗体結合、又は OX40 mAb24 に対するヤギ抗ヒト AlexaFluor (登録商標) 647 二次抗体結合対照；白色のヒストグラム、TNFRSF 特異的 mAb 結合又は OX40 mAb24 結合。(図 4B)：陽性対照としての OX40 発現ジャーカットに対する OX40 mAb24 の結合。灰色のヒストグラム、ヤギ抗ヒト AlexaFluor (登録商標) 647 二次抗体結合対照；白色のヒストグラム、OX40 mAb24 結合。

【図 5A - B】ELISA による組換えヒト TNFRSF メンバーに対する OX40 mAb24 (OX40 mAb29) (相補性決定領域) CDR 及び 9B12 の結合。OX40

m A b 2 9 (図 5 A) 及び 9 B 1 2 (図 5 B) による O X 4 0 の特異的結合を実証する E L I S A アッセイの結果。O X 4 0 m A b 2 9 は O X 4 0 m A b 2 4 の C D R を含む。O X 4 0 の抗体結合を他のヒト T N F R S F タンパク質の結合と比較した。

【図 6】O X 4 0 m A b 2 4 プレート結合生物活性アッセイの概略図。Q = O X 4 0 m A b 2 4 ; ¥ = 抗ヒト C D 3 抗体クローン O K T 3 。

【図 7 A - C】O X 4 0 m A b 2 4 及び 9 B 1 2 に応答したヒト C D 4 ⁺ T 細胞増殖。(図 7 A) サブマイトジェニックな T C R 刺激 (抗 C D 3) と組み合わせたプレート固定化 O X 4 0 m A b 2 4 によって媒介される独立した 4 ドナーの C D 4 T 細胞増殖。データ点は、各応答のダイナミックレンジの可視化を増強するため、グラフ化前にローデータ曲線 10
の下方漸近値に対して正規化した。(図 7 B) O X 4 0 m A b 2 4 + サブマイトジェニックな T C R 刺激 (抗 C D 3) によって駆動される増殖、及び R 3 4 7 ヒト I g G 1 対照 m A b、同時の T C R シグナル伝達の存在下又は非存在下での可溶性 O X 4 0 m A b 2 4、O X 4 0 m A b 2 4 のない抗 C D 3 m A b 単独、及び抗 C D 3 m A b の非存在下でのプレート固定化 O X 4 0 m A b 2 4 によって媒介される増殖の相対的欠如を実証するドナ
ー 6 5 1 の代表的なローデータ。(図 7 C) サブマイトジェニックな T C R 刺激と組み合わせたプレート固定化 9 B 1 2 によって媒介される独立した 4 ドナーの C D 4 T 細胞増殖。記号、平均値；エラーバー、平均値の標準偏差；全て抗 C D 3 と組み合わせた O X 4 0 m A b 2 4、R 3 4 7 ヒト I g G 1 対照 m A b、及び 9 B 1 2 について n = 3 テクニカルレプリケート；可溶性 O X 4 0 m A b 2 4、及び O X 4 0 m A b 2 4 の非存在下での C D 3、抗 C D 3 のないプレート結合 O X 4 0 m A b 2 4、及び抗 C D 3 のない可溶性 O X 4
0 m A b 2 4 について n = 2 テクニカルレプリケート。 20

【図 8 A - C】O X 4 0 m A b 2 4 に応答したヒト C D 4 ⁺ T 細胞サイトカイン放出。(図 8 A) I F N γ、(図 8 B) T N F α 及び (図 8 C) I L - 1 0 を含めた、ドナー 6 5 1 についての代表的な O X 4 0 m A b 2 4 誘導ヒト C D 4 T 細胞サイトカイン放出。記号、平均値；エラーバー、平均値の標準偏差；両方ともに抗 C D 3 と組み合わせた O X 4 0 m A b 2 4 及び R 3 4 7 ヒト I g G 1 対照 m A b について n = 3 テクニカルレプリケート；可溶性 O X 4 0 m A b 2 4、抗 C D 3 のない可溶性 O X 4 0 m A b 2 4、及び O X 4 0 m A b 2 4 の非存在下での抗 C D 3 について n = 2 テクニカルレプリケート。

【図 8 D - E】O X 4 0 m A b 2 4 に応答したヒト C D 4 ⁺ T 細胞サイトカイン放出。(図 8 D) I L - 1 3、及び (図 8 E) I L - 5 を含めた、ドナー 6 5 1 についての代表的 30
な O X 4 0 m A b 2 4 誘導ヒト C D 4 T 細胞サイトカイン放出。記号、平均値；エラーバー、平均値の標準偏差；両方ともに抗 C D 3 と組み合わせた O X 4 0 m A b 2 4 及び R 3 4 7 ヒト I g G 1 対照 m A b について n = 3 テクニカルレプリケート；可溶性 O X 4 0 m A b 2 4、抗 C D 3 のない可溶性 O X 4 0 m A b 2 4、及び O X 4 0 m A b 2 4 の非存在下での抗 C D 3 について n = 2 テクニカルレプリケート。

【図 9 A - C】9 B 1 2 に応答したヒト C D 4 ⁺ T 細胞サイトカイン放出。(図 9 A) I F N γ、(図 9 B) T N F α 及び (図 9 C) I L - 1 0 を含めた、ドナー 6 5 1 についての代表的な 9 B 1 2 誘導ヒト C D 4 T 細胞サイトカイン放出。記号、平均値；エラーバー、平均値の標準偏差；両方ともに抗 C D 3 と組み合わせた 9 B 1 2 及びマウス I g G 1 対照 m A b について n = 3 テクニカルレプリケート；可溶性 9 B 1 2、抗 C D 3 のない可溶性 9 B 1 2、及び 9 B 1 2 の非存在下での抗 C D 3 について n = 2 テクニカルレプリケート。 40

【図 9 D - E】9 B 1 2 に応答したヒト C D 4 ⁺ T 細胞サイトカイン放出。(図 9 D) I L - 1 3、及び (図 9 E) I L - 5 を含めた、ドナー 6 5 1 についての代表的な 9 B 1 2 誘導ヒト C D 4 T 細胞サイトカイン放出。記号、平均値；エラーバー、平均値の標準偏差；両方ともに抗 C D 3 と組み合わせた 9 B 1 2 及びマウス I g G 1 対照 m A b について n = 3 テクニカルレプリケート；可溶性 9 B 1 2、抗 C D 3 のない可溶性 9 B 1 2、及び 9 B 1 2 の非存在下での抗 C D 3 について n = 2 テクニカルレプリケート。

【図 1 0】O X 4 0 m A b 2 4 及び 9 B 1 2 生物活性の計測に用いられる細胞システムを示す概略図である。F c γ R 発現細胞による O X 4 0 m A b 2 4 架橋結合が O X 4 0 発現 50

ジャーカットNFκB - ルシフェラーゼレポーター細胞株の細胞表面上のOX40のクラスター化及び活性化を媒介するとNFκB媒介性のルシフェラーゼ産生が生じ、これをOX40活性化の代用として計測することができる。FcγR = 断片結晶化可能γレセプター；NFκB = 核内因子κB。

【図11A - D】FcγRによる架橋結合を有する及び有しないOX40発現ジャーカットNFκBレポーター細胞におけるOX40mAb24の生物活性。2細胞バイオアッセイにおけるジャーカットNFκB - ルシフェラーゼレポーター細胞株の細胞表面上に発現するヒトOX40を介したOX40mAb24誘導シグナル伝達の濃度依存的活性(RLU単位)。(図11A)CD32A発現HEK293細胞、及びHEK293親細胞(HEK)による、又は(図11B)CD32B発現HEK293細胞、(図11C)Raji B細胞、又は(図11D)原発肺腫瘍から単離したCD45⁺細胞の存在下でのOX40mAb24の架橋結合後のレポーター活性。データは、表5-2に掲載する他の結果を代表するものである。mAb = モノクローナル抗体、RLU = 相対発光単位。

10

【図12A - B】2細胞生物活性アッセイにおける種々の細胞型によるFcγR架橋結合を使用したOX40発現ジャーカットNFκBレポーター細胞における9B12の生物活性。2細胞バイオアッセイにおけるジャーカットNFκB - ルシフェラーゼレポーター細胞株の細胞表面上に発現するヒトOX40を介した9B12誘導シグナル伝達の濃度依存的活性(RLU単位)。(図12A)CD32A発現HEK293細胞、又は(図12B)CD32B発現HEK293細胞による9B12の架橋結合後のレポーター活性。データは、表5-3に掲載する他の結果を代表するものである。mAb = モノクローナル抗体；RLU = 相対発光単位。

20

【図12C - D】2細胞生物活性アッセイにおける種々の細胞型によるFcγR架橋結合を使用したOX40発現ジャーカットNFκBレポーター細胞における9B12の生物活性。2細胞バイオアッセイにおけるジャーカットNFκB - ルシフェラーゼレポーター細胞株の細胞表面上に発現するヒトOX40を介した9B12誘導シグナル伝達の濃度依存的活性(RLU単位)。(図12C)Raji B細胞、又は(図12D)原発肺腫瘍から単離したCD45⁺細胞による9B12の架橋結合後のレポーター活性。データは、表5-3に掲載する他の結果を代表するものである。mAb = モノクローナル抗体；RLU = 相対発光単位。

【図13A - B】OX40mAb24のナチュラルキラー細胞媒介性抗体依存性細胞傷害、実験1。(図13A)10μ/mLの9B12、OX40mAb24、又はIgG1三重突然変異体(mAb29)若しくはヒトIgG4P(mAb28)バージョンのOX40mAb24を使用した同種(左)又は自己(右)NK及びCD4⁺T細胞ドナー対由来のヒトNK細胞によるOX40発現活性化CD4⁺T細胞の特異的死滅。(図13B)リツキシマブの存在下における、しかしR347ヒトIgG1アイソタイプ対照抗体の存在下においては、ドナー350及び351由来のNK細胞によるToledo B細胞の溶解。テクニカルレプリケートはトリプリケートで行った。エラーバーは平均値の標準誤差を表す。ADCC = 抗体薬物依存性細胞傷害；mAb = モノクローナル抗体；NK = ナチュラルキラー。

30

【図14A - B】OX40mAb24のナチュラルキラー細胞媒介性抗体依存性細胞傷害、実験2。(図14A)10μ/mLの対照R347ヒトIgG1、9B12、OX40mAb24、ヒトIgG4P(mAb28)又はIgG1三重突然変異体(mAb29)バージョンのOX40mAb24を使用した同種(左)又は自己(右)NK及びCD4⁺T細胞ドナー対由来のヒトNK細胞によるOX40発現活性化CD4⁺T細胞の特異的死滅。(図14B)リツキシマブの存在下における、しかしR347ヒトIgG1アイソタイプ対照抗体の存在下においては、ドナー558及び589由来のNK細胞によるToledo B細胞の溶解。テクニカルレプリケートはトリプリケートで行った。エラーバーは平均値の標準誤差を表す。ADCC = 抗体薬物依存性細胞傷害；mAb = モノクローナル抗体；NK = ナチュラルキラー。

40

【図15A - D】OX40mAb24及び9B12のナチュラルキラー細胞媒介性抗体依

50

存性細胞傷害の評価、実験3。(図15A~図15B)指示されるとおりの2人の別個のドナー由来の初代ヒトNK細胞を使用した、OX40mAb24によって媒介されるが9B12によっては媒介されないOX40発現ヒトCD4T細胞の特異的死滅。(図15C~図15D)リツキシマブの存在下における、しかしR347ヒトIgG1アイソタイプ対照抗体の存在下においては、ドナー363及び504由来のNK細胞によるToledo B細胞の溶解。テクニカルレプリケートはデュプリケートで行った。エラーバーは平均値の標準誤差を表す。ADCC = 抗体薬物依存性細胞傷害; mAb = モノクローナル抗体; NK = ナチュラルキラー。

【図16A-D】OX40mAb24のナチュラルキラー細胞媒介性抗体依存性細胞傷害の評価、実験4。(図16A~図16B)指示されるとおりの2人の別個のドナー由来の初代ヒトNK細胞を使用した、OX40mAb24によって媒介されるOX40発現ヒトCD4T細胞の特異的死滅。(図16C~図16D)リツキシマブの存在下における、しかしR347ヒトIgG1アイソタイプ対照抗体においては、ドナー464及び532由来のNK細胞によるToledo B細胞の溶解。テクニカルレプリケートはデュプリケートで行った。エラーバーは平均値の標準誤差を表す。ADCC = 抗体薬物依存性細胞傷害; mAb = モノクローナル抗体; NK = ナチュラルキラー。

【図17A-B】OX40mAb24のナチュラルキラー細胞媒介性抗体依存性細胞傷害の評価、実験(Experiment)5。指示されるとおりのドナー601(パネルA)及び602(パネルB)由来の初代ヒトNK細胞を使用した、OX40mAb24によって媒介されるOX40発現ヒトCD4⁺T細胞の特異的死滅。エラーバーは平均値の標準誤差を表す。ADCC = 抗体薬物依存性細胞傷害; mAb = モノクローナル抗体; NK = ナチュラルキラー。

【図18A-B】精製ヒトC1qタンパク質に対するOX40mAb24及び9B12結合の評価。指示濃度の精製ヒトC1qタンパク質をバイオセンサーチップに注入した。ブランクは、PBS/0.005%Tween 20媒体単独の注入を表す。パネルA: 精製ヒトC1qに対するOX40mAb24結合。パネルB: 精製ヒトC1qに対する9B12結合。

【図19A-B】カニクイザル/アカゲザルOX40発現ジャーカットNFκB-ルシフェラーゼクローンB2及びLC18664アカゲザルB細胞生物活性アッセイにおけるOX40mAb24活性。アカゲザルB細胞株LC18664と組み合わせたカニクイザル/アカゲザルOX40発現ジャーカットNFκB-ルシフェラーゼレポーター細胞株におけるOX40mAb24によるNFκB活性の濃度依存的誘導(RLU単位)。データは2つの独立したアッセイについて示し、各データ点につき4レプリケートである。エラーバーは平均値の標準誤差を表し、目盛が原因で見えない。RLU = 相対発光単位。

【図20A-B】カニクイザル/アカゲザルOX40発現ジャーカットNFκB-ルシフェラーゼクローンB2及びLC18664アカゲザルB細胞生物活性アッセイにおける9B12活性。アカゲザルB細胞株LC18664と組み合わせたカニクイザル/アカゲザルOX40発現ジャーカットNFκB-ルシフェラーゼレポーター細胞株における9B12によるNFκB活性の濃度依存的誘導(RLU単位)。データは2つの独立したアッセイについて示し、各データ点につき4レプリケートである。エラーバーは平均値の標準誤差を表す。RLU = 相対発光単位。

【図21A-B】カニクイザル/アカゲザルOX40発現ジャーカットNFκB-ルシフェラーゼクローンB2及びFcγレセプター発現アカゲザル免疫細胞生物活性アッセイにおけるOX40mAb24及び9B12活性。Fcγレセプター発現アカゲザル免疫細胞と組み合わせたカニクイザル/アカゲザルOX40発現ジャーカットNFκB-ルシフェラーゼレポーター細胞株におけるOX40mAb24(パネルA)及び9B12(パネルB)によるNFκB活性の濃度依存的誘導(RLU単位)。データ点につき2レプリケート。RLU = 相対発光単位。

【図22A-B】OX40mAb24及び9B12は初代アカゲザルCD4T細胞の増殖を引き起こす。初代活性化アカゲザルCD4⁺T細胞におけるOX40mAb24(図2

10

20

30

40

50

2 A ~ 図 2 2 B) 誘導性細胞分裂。トリプリケートウェルでの 2 つの独立したアッセイのデータを示す。エラーバーは平均値の標準誤差を表す。

【図 2 2 C - D】OX 4 0 m A b 2 4 及び 9 B 1 2 は初代アカゲザル C D 4 T 細胞の増殖を引き起こす。初代活性化アカゲザル C D 4 + T 細胞における 9 B 1 2 (図 2 2 C ~ 図 2 2 D) 誘導性細胞分裂。トリプリケートウェルでの 2 つの独立したアッセイのデータを示す。エラーバーは平均値の標準誤差を表す。

【図 2 3 A - B】マウス異種移植モデルにおいて O X 4 0 m A b 2 4 及び 9 B 1 2 が A 3 7 5 細胞の成長に及ぼす効果 - 実験 1。1 日目に、E : T 比 1 : 6 でアロ反応性ヒト C D 4 + 及び C D 8 + T 細胞株と混合した A 3 7 5 細胞を各群 6 匹の N O D / S C I D マウスに S C 移植した。3、5、7、10 及び 12 日目に O X 4 0 m A b 2 4 (図 2 3 A) 及び 9 B 1 2 (図 2 3 B) 及びアイソタイプ対照 (図 2 3 A ~ 図 2 3 B) を I P 投与した。腫瘍容積の平均値を示す。それぞれ 25 及び 18 日目に O X 4 0 m A b 2 4 処置動物 (図 2 3 A) 又は 9 B 1 2 処置動物 (図 2 3 B) とアイソタイプ対照処置動物との比較を行い、マン・ホイットニー順位和検定による統計的有意性について群間差を分析した。エラーバーは平均値の標準誤差を表す。* : T G I > 68 %、P 0.05 対アイソタイプ対照群。E : T = エフェクター対標的比 ; I P 腹腔内 ; N O D / S C I D = 非肥満糖尿病 / 重症複合免疫不全 ; S C = 皮下 ; T G I = 腫瘍成長阻害。

【図 2 4 A - B】マウス異種移植モデルにおいて O X 4 0 m A b 2 4 及び 9 B 1 2 が A 3 7 5 細胞の成長に及ぼす効果 - 実験 2。1 日目に、E : T 比 1 : 6 でアロ反応性ヒト C D 4 + 及び C D 8 + T 細胞株と混合した A 3 7 5 細胞を各群 6 匹の N O D / S C I D マウスに S C 移植した。3、5、7、10 及び 12 日目に O X 4 0 m A b 2 4 (図 2 4 A) 及び 9 B 1 2 (図 2 4 B) 及びアイソタイプ対照 (図 2 4 A - 2 4 B) を I P 投与した。腫瘍容積の平均値を示す。18 日目に O X 4 0 m A b 2 4 処置動物 (図 1 2 A) 又は 9 B 1 2 処置動物 (図 1 2 B) とアイソタイプ対照処置動物との比較を行い、マン・ホイットニー順位和検定による統計的有意性について群間差を分析した。エラーバーは平均値の標準誤差を表す。# : T G I 75 %、P 0.0004 対アイソタイプ対照群。* : T G I = 53 %、P 0.05 対アイソタイプ対照群。E : T = エフェクター対標的比 ; I P = 腹腔内 ; N O D / S C I D = 非肥満糖尿病 / 重症複合免疫不全 ; S C = 皮下 ; T G I = 腫瘍成長阻害。

【図 2 5】マウス異種移植モデルにおいて O X 4 0 m A b 2 4 が A 3 7 5 細胞の成長に及ぼす効果 - 実験 3。1 日目に、E : T 比 1 : 6 でアロ反応性ヒト C D 4 + 及び C D 8 + T 細胞株と混合した A 3 7 5 細胞を各群 6 匹の N O D / S C I D マウスに S C 移植した。3、6、8、10 及び 13 日目に O X 4 0 m A b 2 4 を I P 投与した。腫瘍容積の平均値を示す。28 日目に O X 4 0 m A b 2 4 処置動物とアイソタイプ対照処置動物との比較を行い、マン・ホイットニー順位和検定による統計的有意性について群間差を分析した。エラーバーは平均値の標準誤差を表す。* : T G I = 75 %、P 0.05 対アイソタイプ対照群 ; E : T = エフェクター対標的比 ; I P = 腹腔内 ; N O D / S C I D = 非肥満糖尿病 / 重症複合免疫不全 ; S C = 皮下 ; T G I = 腫瘍成長阻害。

【図 2 6 A - B】マウス同系モデルにおいて O X 8 6 m I g G 2 a が C T 2 6 細胞株の成長に及ぼす効果。1 日目に各群 10 匹の B A L B / c マウスに C T 2 6 細胞を S C 接種した。9 及び 12 日目 ((図 2 6 A) の矢印) に対照 (陰性対照) 及び被験物質 (O X 8 6 m I g G 2 a) を I P 投与した。腫瘍容積の平均値 (図 2 6 A) 及び個々の値 (図 2 6 B) を示す。O X 8 6 m I g G 2 a 処置動物と陰性対照処置動物との比較を行い、G r a p h P a d P r i s m 6.0 ソフトウェアを使用して一元配置 A N O V A による統計的有意性について群間差を分析した。エラーバーは平均値の標準誤差を表す。* : T G I > 50 %、P 0.0001 対 21 日目のアイソタイプ対照群。I P = 腹腔内 ; S C = 皮下 ; T G I = 腫瘍成長阻害。

【図 2 7 A - B】マウス同系モデルにおいて O X 8 6 m I g G 2 a が C T 2 6 細胞株の成長に及ぼす効果。1 日目に各群 12 匹の B A L B / c マウスに C T 2 6 細胞を S C 接種した。13 及び 16 日目 ((図 2 7 A) の矢印) に被験物質 (O X 8 6 m I g G 2 a)

を I P 投与した。腫瘍容積の平均値 (図 2 7 A) 及び個々の値 (図 2 7 B) を示す。O X 8 6 m I g G 2 a 処置動物と未処置対照動物との比較を行い、G r a p h P a d P r i s m 6 . 0 ソフトウェアを使用して一元配置 A N O V A による統計的有意性について群間差を分析した。エラーバーは平均値の標準誤差を表す。* : T G I > 5 0 %、P 0 . 0 0 0 1 対 2 4 日目の未処置対照群。I P = 腹腔内 ; S C = 皮下 ; T G I = 腫瘍成長阻害。

【図 2 8 A - B】マウス同系モデルにおいて O X 8 6 m I g G 2 a が M C A 2 0 5 細胞株に及ぼす効果。1 日目に各群 1 4 匹の C 5 7 B L / 6 マウスに M C A 2 0 5 細胞を S C 接種した。1 1 及び 1 4 日目に対照物質 (アイソタイプ対照) 及び被験物質 (O X 8 6 m I g G 2 a) を I P 投与した。腫瘍容積の平均値 (図 2 8 A) 及び個々の値 (図 2 8 B) を示す。O X 8 6 m I g G 2 a 処置動物とアイソタイプ対照処置動物との比較を行い、G r a p h P a d P r i s m 6 . 0 ソフトウェアを使用して一元配置 A N O V A による統計的有意性について群間差を分析した。エラーバーは平均値の標準誤差を表す。* : T G I > 5 0 %、P 0 . 0 0 0 1 対 2 7 日目のアイソタイプ対照群。I P = 腹腔内 ; S C = 皮下 ; T G I = 腫瘍成長阻害。

【図 2 9 A - B】マウス同系モデルにおいて O X 8 6 m I g G 2 a が 4 T 1 細胞株の成長に及ぼす効果。1 日目に各群 1 2 匹の B A L B / c マウスに 4 T 1 細胞を S 接種した。1 3、1 6、2 0、及び 2 3 日目に対照物質 (アイソタイプ対照) 及び被験物質 (O X 8 6 m I g G 2 a) を I P 投与した。腫瘍容積の平均値 (図 2 9 A) 及び個々の値 (図 2 9 B) を示す。O X 8 6 m I g G 2 a 処置動物とアイソタイプ対照処置動物との比較を行い、G r a p h P a d P r i s m 6 . 0 ソフトウェアを使用して一元配置 A N O V A による統計的有意性について群間差を分析した。エラーバーは平均値の標準誤差を表す。I P = 腹腔内 ; S C = 皮下 ; T G I = 腫瘍成長阻害。

【図 3 0】ヒト及びマウス O X 4 0 分子の細胞外ドメインのアミノ酸アラインメント。ヒト O X 4 0 (N C B I 参照配列 N P _ 0 0 3 3 1 8 . 1) はマウス O X 4 0 (N C B I 参照配列 N P _ 0 3 5 7 8 9 . 1) と 6 0 % の配列同一性を共有する。アラインメントは C l u s t a l W 法を用いて実施した。O X 4 0 の細胞外ドメインを詳細に示す。C R D 3 ドメインにおいてヒトとマウスとの間で異なるアミノ酸を矢印で示す。2 つの必須エピトープ残基 L 1 1 6 及び A 1 2 6 を枠で囲む。C R D = システインリッチドメイン。

【図 3 1】キメラヒト / マウス O X 4 0 変異体の命名及び概略図。マウス O X 4 0 (白抜き) の様々なドメイン又は残基をヒト (塗り潰し) に (K O)、又はヒト O X 4 0 アミノ酸のそれをマウス O X 4 0 に (K I) スワップイン又はスワップアウトすることにより、キメラヒト / マウス O X 4 0 変異体を構築した。個々のアミノ酸又は組み合わせの突然変異を赤色 (K O) 及び緑色 (K I) の矢印で示す。C R D = システインリッチドメイン ; K I = ノックイン ; K O = ノックアウト ; T M = 膜貫通ドメイン。

【図 3 2 A - 1】キメラヒト / マウス O X 4 0 変異体に対する O X 4 0 m A b 2 4 の結合の F A C S 分析。O X 4 0 m A b 2 4 及びその親マウス m A b、9 B 1 2 を使用した F A C S 分析による結合特性決定のため、2 9 3 F 細胞を使用して全ての変異体を一過性に発現させた。抗ヒト及びマウス O X 4 0 ポリクローナル抗体を使用して発現レベルをモニタした。(A) ドメインスワップキメラ変異体を使用すると、C R D 3 ドメインがエピトープ含有ドメインと同定された。O X 4 0 m A b 2 4 及び 9 B 1 2 は、マウス C R D 3 ドメインをコードする K O 変異体 (K O _ C R D 3 及び K O _ C R D 3 + 4) と結合せず、ヒト C R D 3 ドメインをコードする K I 変異体 (K I _ C R D 3) を認識する。

【図 3 2 A - 2】図 3 2 A - 1 の続きである。

【図 3 2 B - 1】キメラヒト / マウス O X 4 0 変異体に対する O X 4 0 m A b 2 4 の結合の F A C S 分析。O X 4 0 m A b 2 4 及びその親マウス m A b、9 B 1 2 を使用した F A C S 分析による結合特性決定のため、2 9 3 F 細胞を使用して全ての変異体を一過性に発現させた。抗ヒト及びマウス O X 4 0 ポリクローナル抗体を使用して発現レベルをモニタした。(B) 加えて、個々の又は組み合わせのアミノ酸を突然変異させることにより、C R D 3 ドメインにおいてヒトとマウスとの間で異なる必須エピトープ残基が C R D 3 ドメ

インの L 1 1 6 及び A 1 2 6 と決定された (図 1 1 - 1) 。 ヒト残基 L 1 1 6 及び A 1 2 6 をマウス対応物によって置き換えると (K O _ L 1 1 6 + A 1 2 6) 、 O X 4 0 m A b 2 4 及び 9 B 1 2 の結合性は消失した。

【図 3 2 B - 2】図 3 2 B - 1 の続きである。

【図 3 2 B - 3】図 3 2 B - 2 の続きである。

【図 3 2 C - 1】キメラヒト / マウス O X 4 0 変異体に対する O X 4 0 m A b 2 4 の結合の F A C S 分析。 O X 4 0 m A b 2 4 及びその親マウス m A b 、 9 B 1 2 を使用した F A C S 分析による結合特性決定のため、 2 9 3 F 細胞を使用して全ての変異体を一過性に発現させた。抗ヒト及びマウス O X 4 0 ポリクローナル抗体を使用して発現レベルをモニタした。 (C) K I / 機能獲得型変異体は、これらの 2 つの必須残基の重要性を裏付ける。 L 1 1 6 、 A 1 2 6 、 又は組み合わせをマウス O X 4 0 にグラフトすると、 O X 4 0 m A b 2 4 及び 9 B 1 2 の結合性がもたらされた。

10

【図 3 2 C - 2】図 3 2 C - 1 の続きである。

【図 3 3 A - D】ナイーブマウスに O X 8 6 m I g G 2 a を投与した後の末梢血及び脾臓 C D 4 + T 細胞上の K i 6 7 及び I C O S の発現レベル。 1 日目に各群 7 匹のナイーブ B A L B / c マウスに对照物質 (生理食塩水及び N I P 2 2 8 I g G 2 a アイソタイプ对照) 及び被験物質 (O X 8 6 m I g G 2 a) を指示用量レベルで腹腔内接種した。指示日に血液 (パネル A 及び C) を採取し、 1 0 日目に 5 群から脾臓を摘出した。 C D 4 + T 細胞上の K i 6 7 (パネル A 及び B) 及び I C O S (パネル C 及び D) の発現レベルをフローサイトメトリーによって計測した。各群について、 K i 6 7 (パネル A) 及び I C O S (パネル C) を発現する血中の C D 4 細胞の割合の平均値を示す。個々の群の各動物について、 K i 6 7 (パネル B) 及び I C O S (パネル D) を発現する脾臓中の C D 4 細胞の割合をプロットした。エラーバーは平均値の標準誤差を表す。 * : パネル A 及び C において P 0 . 0 5 を示す ; パネル B 及び D では有意性のある各群について P 値を掲載する。

20

【図 3 4 A - B】ナイーブマウスに O X 8 6 m I g G 2 a を投与した後の末梢血及び脾臓 C D 4 + T 細胞上の K i 6 7 及び I C O S 発現の相関。指示用量レベルの对照物質 (生理食塩水及び N I P 2 2 8 I g G 2 a アイソタイプ对照) 及び被験物質 (O X 8 6 m I g G 2 a) による処置から 1 0 日後の図 1 2 - 1 に示す個々の動物の末梢血 (パネル A) 及び脾臓 (パネル B) から単離された K i 6 7 及び I C O S 陽性 C D 4 T 細胞の割合の間の比較を行った。個々のマウスについて計測値をプロットした。得られた一群のデータセットに対し、 G r a p h P a d P r i s m 6 . 0 ソフトウェアを使用して線形回帰分析を実施し、このデータの最良適合線を決定した。決定係数 (r 2) 及び傾きがゼロでない有意性 (P 値) を各グラフについて提供する。

30

【図 3 5 A - D】ナイーブマウスに O X 8 6 m I g G 2 a を投与した後の末梢血及び脾臓 C D 8 + T 細胞上の K i 6 7 及び I C O S の発現レベル。 1 日目に各群 7 匹のナイーブ B A L B / c マウスに对照物質 (生理食塩水及び N I P 2 2 8 I g G 2 a アイソタイプ对照) 及び被験物質 (O X 8 6 m I g G 2 a) を指示用量レベルで腹腔内接種した。指示日に血液 (パネル A 及び C) を採取し、 1 0 日目に 5 群から脾臓を摘出した。 C D 8 + T 細胞上の K i 6 7 (パネル A 及び B) 及び I C O S (パネル C 及び D) の発現レベルをフローサイトメトリーによって計測した。各群について、 K i 6 7 (パネル A) 及び I C O S (パネル C) を発現する血中の C D 8 細胞の割合の平均値を示す。個々の群の各動物について、 K i 6 7 (パネル B) 及び I C O S (パネル D) を発現する脾臓中の C D 8 細胞の割合をプロットした。エラーバーは平均値の標準誤差を表す。 * : パネル A 及び C において P 0 . 0 5 を示す ; パネル B 及び D では有意性のある各群について P 値を掲載する。

40

【図 3 6 A - B】ナイーブマウスに O X 8 6 m I g G 2 a を投与した後の末梢血及び脾臓 C D 8 + T 細胞上の K i 6 7 及び I C O S 発現の相関。指示用量レベルの对照物質 (生理食塩水及び N I P 2 2 8 I g G 2 a アイソタイプ对照) 及び被験物質 (O X 8 6 m I g G 2 a) による処置から 1 0 日後の図 1 2 - 1 に示す個々の動物の末梢血 (パネル A

50

）及び脾臓（パネルB）から単離したK i 6 7及びI C O S陽性C D 8⁺ T細胞の割合の間の比較を行った。個々のマウスについて計測値をプロットした。得られた一群のデータセットに対し、G r a p h P a d P r i s m 6.0ソフトウェアを使用して線形回帰分析を実施し、このデータの最良適合線を決定した。決定係数（ r^2 ）及び傾きがゼロでない有意性（P値）を各グラフについて提供する。

【図37A-D】阻害性（F c g r 2 b - / - ）又は活性化（F c e r 1 g - / - ）F c yレセプターが欠損した同系マウスモデルにおけるマウスO X 8 6 I g G 2 aがC T 2 6細胞株の成長に及ぼす効果。1日目に、阻害性F c yレセプターI I b（F c g r 2 b - / - ；パネルA及びB）又は活性化F c yレセプター（F c e r 1 g - / - ；パネルC及びD）が欠損するように遺伝子操作された8匹のB A L B / cマウスの群にC T 2 6細胞をS C接種した。4及び7日目に対照物質（生理食塩水／未処置及びO X 8 6 m I g G 1 D 2 6 5 A突然変異体／アイソタイプ対照）及び被験物質（O X 8 6 m I g G 2 a）をI P投与した。平均（パネルA及びC）及び個々の（パネルB及びD）腫瘍容積を示す。O X 8 6 m I g G 2 a処置動物と未処置とアイソタイプ対照処置動物との比較を行い、G r a p h P a d P r i s m 6.0ソフトウェアを使用して一元配置A N O V Aによる統計的有意性について群間差を分析した。エラーバーは平均値の標準誤差を表す。S C = 皮下；I P = 腹腔内；T G I = 腫瘍成長阻害

【図38A-D】阻害性（F c g r 2 b - / - ）又は活性化（F c e r 1 g - / - ）F c yレセプターが欠損した同系マウスモデルにおいてマウスO X 8 6 I g G 2 aがM C A 2 0 5細胞株の成長に及ぼす効果。1日目に、阻害性F c yレセプターI I b（F c g r 2 b - / - ；パネルA及びB）又は活性化F c yレセプター（F c e r 1 g - / - ；パネルC及びD）が欠損するように遺伝的に突然変異させた8匹のC 5 7 B L / 6マウスの群にM C A 2 0 5細胞をS C接種した。4及び7日目に対照物質（生理食塩水／未処置及びO X 8 6 m I g G 1 D 2 6 5 A突然変異体／アイソタイプ対照）及び被験物質（m O X 4 0 L F P）をI P投与した。平均（パネルA及びC）及び個々の（パネルB及びD）腫瘍容積を示す。m O X 4 0 L F P処置動物と未処置及びアイソタイプ対照処置動物との比較を行い、G r a p h P a d P r i s m 6.0ソフトウェアを使用して一元配置A N O V Aによる統計的有意性について群間差を分析した。エラーバーは平均値の標準誤差を表す。*：T G I 95%、P 0.023 対試験20日目の未処置及びアイソタイプ対照群。S C = 皮下；I P = 腹腔内；T G I = 腫瘍成長阻害

【図39A-B】阻害性（F c g r 2 b - / - ）又は活性化（F c e r 1 g - / - ）F c yレセプターが欠損したマウスにO X 8 6マウスI g G 2 aを投与した後の末梢血、脾臓及びC T 2 6腫瘍から単離されたC D 4⁺ T細胞におけるK i 6 7の発現レベル。1日目に、阻害性F c yレセプターI I b（F c g r 2 b - / - ；パネルA）又は活性化F c yレセプター（F c e r 1 g - / - ；パネルB）が欠損するように遺伝子操作された4匹のB a l b / cマウスの群にC T 2 6細胞をS C接種した；この試験は図12-5に提供する試験と独立しているが、それと同様に行われた。4及び7日目に対照物質（生理食塩水／未処置及びO X 8 6 m I g G 1 D 2 6 5 A突然変異体／アイソタイプ対照）及び被験物質（O X 8 6 m I g G 2 a）をI P投与した。パネルAについては14日目に、及びパネルBについては13日目に、血液、脾臓及び腫瘍を採取した。C D 4⁺ T細胞におけるK i 6 7の発現レベルをフローサイトメトリーによって計測した。記号は、個々のマウスの各組織からのK i 6 7陽性C D 4⁺ T細胞の割合を表す；水平のバーは各群の平均値を表す。G r a p h P a d P r i s m 6.0ソフトウェアを使用して一元配置A N O V Aによる統計的有意性について群間差を分析し、計算P値と共に水平のバーで示した。S C = 皮下；I P = 腹腔内

【図40A-B】阻害性（F c g r 2 b - / - ）又は活性化（F c e r 1 g - / - ）F c yレセプターが欠損したマウスにO X 8 6マウスI g G 2 aを投与した後の末梢血、脾臓及びC T 2 6腫瘍から単離されたC D 8⁺ T細胞におけるK i 6 7の発現レベル。1日目に、阻害性F c yレセプターI I b（F c g r 2 b - / - ；パネルA）又は活性化F c yレセプター（F c e r 1 g - / - ；パネルB）が欠損するように遺伝子操作された4匹の

B a l b / c マウスの群に C T 2 6 細胞を S C 接種した；この試験は図 1 2 - 5 に提供する試験と独立しているが、それと同様に行われた。4 及び 7 日目に対照物質（生理食塩水 / 未処置及び O X 8 6 m I g G 1 D 2 6 5 A 突然変異体 / アイソタイプ対照）及び被験物質（O X 8 6 m I g G 2 a）を I P 投与した。パネル A については 1 4 日目に、及びパネル B については 1 3 日目に、血液、脾臓及び腫瘍を採取した。C D 8 ⁺ T 細胞の K i 6 7 の発現レベルをフローサイトメトリーによって計測した。記号は、個々のマウスの各組織からの K i 6 7 陽性 C D 8 ⁺ T 細胞の割合を表す；水平のバーは平均値を表す。G r a p h P a d P r i s m 6 . 0 ソフトウェアを使用して一元配置 A N O V A による統計的有意性について群間差を分析し、計算 P 値と共に水平のバーで示した。S C = 皮下；I P = 腹腔内

10

【図 4 1 A - B】阻害性（F c g r 2 b - / - ）又は活性化（F c e r 1 g - / - ）F c γ レセプターが欠損したマウスに O X 8 6 マウス I g G 2 a を投与した後の流入領域リンパ節、脾臓及び M C A 2 0 5 腫瘍から単離された C D 4 T 細胞における K i 6 7 の発現レベル。1 日目に、阻害性 F c γ レセプター I I b（F c g r 2 b - / - ；パネル A）又は活性化 F c γ レセプター（F c e r 1 g - / - ；パネル B）が欠損するように遺伝子操作された 4 匹の C 5 7 B L / 6 マウスの群に M C A 2 0 5 細胞を S C 接種した；試験は独立しているが、図 1 2 - 6 に提供する試験と同様に行う。4 及び 7 日目に対照物質（生理食塩水 / 未処置及び O X 8 6 m I g G 1 D 2 6 5 A 突然変異体 / アイソタイプ対照）及び被験物質（O X 8 6 m I g G 2 a）を I P 投与した。パネル B について、2 0 日目に流入領域リンパ節、脾臓及び腫瘍を摘出した。C D 4 ⁺ T 細胞における K i 6 7 の発現レベルをフローサイトメトリーによって計測した。記号は、個々のマウスの各組織からの K i 6 7 陽性 C D 4 ⁺ T 細胞の割合を表す；水平のバーは平均値を表す。G r a p h P a d P r i s m 6 . 0 ソフトウェアを使用して一元配置 A N O V A による統計的有意性について群間差を分析し、計算 P 値と共に水平のバーで示した。S C = 皮下；I P = 腹腔内

20

【図 4 2 A - B】阻害性（F c g r 2 b - / - ）又は活性化（F c e r 1 g - / - ）F c γ レセプターが欠損したマウスに O X 8 6 マウス I g G 2 a を投与した後の流入領域リンパ節、脾臓及び M C A 2 0 5 腫瘍から単離された C D 8 T 細胞における K i 6 7 の発現レベル。1 日目に、阻害性 F c γ レセプター I I b（F c g r 2 b - / - ；パネル A）又は活性化 F c γ レセプター（F c e r 1 g - / - ；パネル B）が欠損するように遺伝子操作された 4 匹の C 5 7 B L / 6 マウスの群に M C A 2 0 5 細胞を S C 接種した；この試験は図 1 2 - 6 に提供される試験と独立しているが、それと同様に行われた。4 及び 7 日目に対照物質（生理食塩水及び m O X 4 0 L F P D 2 6 5 A 突然変異体対照）及び被験物質（O X 8 6 m I g G 2 a）を I P 投与した。2 0 日目に流入領域リンパ節、脾臓及び腫瘍を摘出した。C D 8 ⁺ T 細胞上の K i 6 7 の発現レベルをフローサイトメトリーによって計測した。記号は、個々のマウスの各組織からの K i 6 7 陽性 C D 8 ⁺ T 細胞の割合を表す；水平のバーは平均値を表す。G r a p h P a d P r i s m 6 . 0 ソフトウェアを使用して一元配置 A N O V A による統計的有意性について群間差を分析し、計算 P 値と共に水平のバーで示した。S C = 皮下；I P = 腹腔内

30

【図 4 3 A - B】O X 4 0 m A b 2 4 による調節性 T 細胞の減少。パネル A：K L H 免疫化及び N I P 2 2 8 h u I g G 1 対照（h u I g G 1）又は O X 4 0 m A b 2 4 による処置の直前にヒト免疫細胞を移植したマウスの末梢血において計測したヒト C D 4 ⁺ F o x p 3 ⁺ T r e g 細胞の割合。m A b 無しは、免疫化がなく、且つ m A b 処置がないことを意味する。パネル B：免疫化及び m A b による処置後の同じ群内のマウスの末梢血中におけるヒト C D 4 ⁺ F o x p 3 ⁺ T r e g 細胞の割合。統計学的 p 値は一元配置 A N O V A による。H u = ヒト；m A b = モノクローナル抗体；T r e g = 調節性 T 細胞

40

【図 4 4 A - D】O X 4 0 m A b 2 4 処置後の調節性 T 細胞と比べたエフェクター及びメモリー C D 4 T 細胞の拡大。全 C D 4 ⁺（パネル A）；C D 4 ⁺ エフェクター細胞（T e f f）（パネル B）；C D 4 ⁺ エフェクターメモリー細胞（T e m）（パネル C）；及び C D 4 ⁺ セントラルメモリー T 細胞（T c m）（パネル D）について、K L H 免疫化と、続く指示されるとおりの N I P 2 2 8 h u I g G 1 m A b（h u I g G 1）又は O X

50

40 mAb 24 による処置前（左）又は処置後（右）のいずれかの、ヒト免疫細胞を移植したマウスの末梢血中におけるヒト T r e g 細胞に対するヒト C D 4⁺ T 細胞の比。mAb 無しは、免疫化がないとともに mAb 処置もないことを意味する。統計学的 p 値は一元配置 A N O V A による。Hu = ヒト；mAb = モノクローナル抗体；T c m = セントラルメモリー T 細胞；T e f f = エフェクター T 細胞；T e m = エフェクターメモリー T 細胞

【図 45 A - B】OX 40 mAb 24 で処置したマウスにおける調節性 T 細胞に対する C D 8⁺ エフェクターの比の増加。K L H 免疫化と、続く指示されるとおりの N I P 228 h u I g G 1 mAb (h u I g G 1) 又は O X 40 mAb 24 による処置前（左）又は処置後（右）のいずれかの、ヒト免疫細胞を移植したマウスの末梢血中におけるヒト T r e g 細胞に対するヒト C D 8⁺ エフェクター T 細胞の比。mAb 無しは、免疫化がないとともに mAb 処置もないことを意味する。全ての群を比較する一元配置 A N O V A による統計学的 p 値を示す。Hu = ヒト；mAb = モノクローナル抗体；T e f f = エフェクター T 細胞；T r e g = 調節性 T 細胞

10

【図 46 A - C】OX 40 mAb 24 で処置したマウスにおける C D 8⁺ T 細胞上の C D 25 (I L - 2 レセプター) レベルの増加。(A) 全 C D 8⁺、(B) C D 8⁺ エフェクター (T e f f)、(C) C D 8⁺ エフェクターメモリー (T e m) T 細胞について、処置無し (mAb 無し)、又は K L H 免疫化と、続く指示されるとおりの N I P 228 h u I g G 1 mAb (h u I g G 1) 又は O X 40 M A B 24 による処置後（左）又は処置前（右）のいずれかの、ヒト免疫細胞を移植したマウスの末梢血中におけるヒト C D 8⁺ T 細胞中のヒト C D 25 (I L - 2 レセプター) 陽性細胞の割合。mAb 無しは、免疫化がないとともに mAb 処置もないことを意味する。統計学的 p 値は一元配置 A N O V A による。Hu = ヒト；mAb = モノクローナル抗体；T e f f = エフェクター T 細胞；T e m = エフェクターメモリー T 細胞。

20

【発明を実施するための形態】

【0026】

抗原によるプライミング中、又はその直後には、T 細胞、例えば C D 4⁺ T 細胞上の O X 40 レセプターが会合することにより、抗原に対する T 細胞、例えば C D 4⁺ T 細胞の応答が増加する。本開示の文脈では、用語「会合」は、O X 40 レセプターとの結合及びそれによって媒介される少なくとも 1 つの活性の刺激を指す。例えば、抗原特異的 T 細胞、例えば C D 4⁺ T 細胞上の O X 40 レセプターの会合により、単独での抗原に対する応答と比較したとき T 細胞増殖が増加し、サイトカイン産生が増加し得る。抗原に対する応答の上昇は、O X 40 レセプター会合がない場合と比べて実質的に長い期間維持され得る。このように、O X 40 レセプターを介した刺激は、抗原、例えば腫瘍抗原の T 細胞認識をブーストすることによって抗原特異的免疫応答を増強する。

30

【0027】

O X 40 アゴニストは、抗原による T 細胞のプライミング中、又はその直後に対象に投与されるとき、ヒト対象などの対象の抗原特異的免疫応答を増強し得る。O X 40 アゴニストには、O X 40 リガンド (「O X 40 L」)、例えば可溶性 O X 40 L 融合タンパク質及び抗 O X 40 抗体又はその断片が含まれる。具体的な例は、O X 40 に特異的に結合して、それによりシグナル伝達を惹起するヒト化抗体である。本開示により、一群のヒト化抗 O X 40 モノクローナル抗体が提供される。また、かかる抗体をコードするポリヌクレオチド配列を含む核酸も記載される。本開示はまた、ヒト化抗 O X 40 モノクローナル抗体を使用して対象の抗原特異的免疫応答を増強する方法も提供する。

40

【0028】

定義

用語「一つの (a)」又は「一つの (a n)」実体とは、当該の実体の 1 つ以上を指し；例えば、「一つの結合分子 (a b i n d i n g m o l e c u l e)」は、1 つ以上の結合分子を表すものと理解されることに留意すべきである。従って、用語「一つの (a)」(又は「一つの (a n)」)、「1 つ以上」、及び「少なくとも 1 つ」は、本明細書では同義的に用いられ得る。

50

【0029】

更に、「及び／又は」は、本明細書で使用される場合、2つの指定される特徴又は構成要素の各々の、他方を伴う又は伴わない具体的な開示であると解釈されるべきである。従って、用語「及び／又は」は、本明細書において「A及び／又はB」などの語句で用いられるとき、「A及びB」、「A又はB」、「A」（単独）、及び「B」（単独）を含むことが意図される。同様に、用語「及び／又は」は、「A、B、及び／又はC」などの語句で用いられるとき、以下の実施形態：A、B、及びC；A、B、又はC；A又はC；A又はB；B又はC；A及びC；A及びB；B及びC；A（単独）；B（単独）；及びC（単独）の各々を包含することが意図される。

【0030】

特に定義されない限り、本明細書で使用される科学技術用語は、本開示が関係する技術分野の当業者が一般に理解するのと同じ意味を有する。例えば、Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei - Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; 及び the Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press が、本開示で使用される用語の多くの一般的な辞書を当業者に提供する。

【0031】

単位、接頭辞、及び記号は、それらの国際単位系（SI）で認められている形式で示される。数値範囲は、その範囲を定義する数を含む。特に指示されない限り、アミノ酸配列は左から右にアミノからカルボキシ方向に記載する。本明細書に提供される見出しは、本明細書を全体として参照することによって有され得る様々な態様又は本開示の態様の限定ではない。従って、このすぐ下に定義する用語は、本明細書を全体として参照することによって更に十全に定義される。

【0032】

本明細書で使用される時、用語「天然に存在しない」物質、組成物、実体、及び／又は物質、組成物、若しくは実体の任意の組み合わせ、又はその任意の文法上の変形は、裁判官又は行政若しくは司法機関によって「天然に存在する」と判断又は解釈されるか、又はいかなる時でもそのように判断又は解釈されるであろう形態の物質、組成物、実体、及び／又は物質、組成物、若しくは実体の任意の組み合わせを明示的に除外するが、但しそれらを除外するのみである条件付きの用語である。

【0033】

本明細書で使用される時、用語「ポリペプチド」は、単数形「ポリペプチド」並びに複数形「ポリペプチド」を包含することが意図され、アミド結合（ペプチド結合としても知られる）によって線状に連結されている単量体（アミノ酸）で構成される分子を指す。用語「ポリペプチド」は2つ以上のアミノ酸の任意の1つ又は複数の鎖を指し、特定の長さの産物を指すものではない。従って、2つ以上のアミノ酸の1つ又は複数の鎖を指すために用いられるペプチド、ジペプチド、トリペプチド、オリゴペプチド、「タンパク質」、「アミノ酸鎖」、又は任意の他の用語が「ポリペプチド」の定義の範囲内に含まれ、用語「ポリペプチド」はこれらの用語のいずれかの代わりに、又はそれと同義的に用いることができる。用語「ポリペプチド」はまた、限定なしに、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、及び既知の保護基／ブロック基による誘導体化、タンパク質分解切断、又は天然に存在しないアミノ酸による修飾を含め、ポリペプチドの発現後修飾の産物を指すことも意図される。ポリペプチドは生物学的供給源から得られてもよく、又は組換え技術によって作製されてもよいが、必ずしも指定の核酸配列から翻訳されなくてもよい。ポリペプチドは、化学合成によることを含め、任意の方法で作成することができる。

【0034】

本明細書に開示されるとおりのポリペプチドは、約 3 以上、5 以上、10 以上、20 以上、25 以上、50 以上、75 以上、100 以上、200 以上、500 以上、1,000 以上、又は 2,000 以上のアミノ酸サイズのものであり得る。ポリペプチドは定義付けられた三次元構造を有し得るが、必ずしもかかる構造を有しなくてもよい。定義付けられた三次元構造を有するポリペプチドは、折り畳まれたと称され、定義付けられた三次元構造を有さず、むしろ多数の異なるコンホメーションをとることのできるポリペプチドは、折り畳まれていないと称される。本明細書で使用されるとき、用語の糖タンパク質は、アミノ酸、例えばセリン又はアスパラギンの酸素含有又は窒素含有側鎖を介してタンパク質に結合している少なくとも 1 つの炭水化物部分にカップリングしたタンパク質を指す。

【0035】

「単離」ポリペプチド又はその断片、変異体、若しくは誘導体とは、その自然環境にないポリペプチドが意図される。特別な精製レベルは要求されない。例えば、単離ポリペプチドは、その天然又は自然環境から取り出され得る。宿主細胞において発現した組換え産生ポリペプチド及びタンパク質は、任意の好適な技術によって分離され、分画され、又は部分的若しくは実質的に精製されている天然又は組換えポリペプチドと同じく、本明細書に開示されるとおり単離されていると見なされる。

【0036】

本明細書で使用されるとき、用語「天然に存在しない」ポリペプチド、又はその任意の文法上の変形は、裁判官又は行政若しくは司法機関によって「天然に存在する」と判断又は解釈されるか、又はいかなる時でもそのように判断又は解釈されるであろう形態のポリペプチドを明示的に除外するが、但しそれらを除外するのみである条件付きの用語である。

【0037】

本明細書に開示される他のポリペプチドは、前述のポリペプチドの断片、誘導体、類似体、又は変異体、及びこれらの任意の組み合わせである。用語「断片」、「変異体」、「誘導体」及び「類似体」は、本明細書に開示されるとき、対応する天然抗体又はポリペプチドの特性、例えば抗原との特異的結合性の少なくとも一部を保持する任意のポリペプチドを含む。ポリペプチドの断片には、本明細書の他の部分で考察される具体的な抗体断片に加えて、例えば、タンパク質分解性断片、並びに欠失断片が含まれる。例えばポリペプチドの変異体には、上記に記載したとおりの断片が含まれ、また、アミノ酸置換、欠失、又は挿入によって改変されたアミノ酸配列を有するポリペプチドも含まれる。特定の態様において、変異体は天然に存在しないものであってもよい。天然に存在しない変異体は、当該技術分野において公知の突然変異誘発技術を用いて作製することができる。変異ポリペプチドは、保存的又は非保存的アミノ酸置換、欠失又は付加を含み得る。誘導体は、元のポリペプチドに見られない追加的な特徴を呈するように改変されているポリペプチドである。例としては、融合タンパク質が挙げられる。変異ポリペプチドまた、本明細書では「ポリペプチド類似体」とも称される。本明細書で使用されるとき、ポリペプチドの「誘導体」はまた、官能性側基の反応によって化学的に誘導体化された 1 つ以上のアミノ酸を有する対象ポリペプチドも指し得る。また、「誘導体」としては、20 個の標準的なアミノ酸の 1 つ以上の誘導体を含むペプチドも含まれる。例えば、4 - ヒドロキシプロリンをプロリンに代えることができ；5 - ヒドロキシリジンをリジンに代えることができ；3 - メチルヒスチジンをヒスチジンに代えることができ；ホモセリンをセリンに代えることができ；及びオルニチンをリジンに代えることができる。

【0038】

「保存的アミノ酸置換」は、あるアミノ酸が、同様の側鎖を有する別のアミノ酸に置き換えられているものである。同様の側鎖を有するアミノ酸のファミリーは当該技術分野において定義されており、塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、

10

20

30

40

50

メチオニン、トリプトファン)、 β 分枝側鎖(例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン)及び芳香族側鎖(例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)が挙げられる。例えば、フェニルアラニンとチロシンの置換は保存的置換である。特定の実施形態では、アミノ酸配列を含有するポリペプチド又は抗体の、その結合分子が結合する抗原との結合性が、本開示のポリペプチド及び抗体の配列中の保存的置換によって無効になることはない。抗原結合性が消失しないヌクレオチド及びアミノ酸保存的置換を同定する方法は、当該技術分野において周知である(例えば、Brummell et al., Biochem. 32: 1180-1187 (1993); Kobayashi et al., Protein Eng. 12(10): 879-884 (1999); 及びBurks et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 412-417 (1997)を参照のこと)。

10

【0039】

用語「ポリヌクレオチド」は、単数形の核酸並びに複数形の核酸を包含することが意図され、単離核酸分子又はコンストラクト、例えば、メッセンジャーRNA(mRNA)、cDNA、又はプラスミドDNA(pDNA)を指す。ポリヌクレオチドは、従来のリン酸ジエステル結合又は非従来の結合(例えば、ペプチド核酸(PNA)に見られるようなアミド結合)を含み得る。用語「核酸」又は「核酸配列」は、ポリヌクレオチド中に存在する任意の1つ以上の核酸セグメント、例えばDNA又はRNA断片を指す。

【0040】

「単離」核酸又はポリヌクレオチドとは、その天然環境から分離されている任意の形態の核酸又はポリヌクレオチドが意図される。例えば、ゲル精製ポリヌクレオチド、又はベクターに含ま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であれば、「単離されている」と見なされる。また、クローニング用の制限部位を有するように操作されているポリヌクレオチドセグメント、例えばPCR産物も、「単離されている」と見なされる。単離ポリヌクレオチドの更なる例としては、異種宿主細胞に維持される組換えポリヌクレオチド、又は緩衝液若しくは生理食塩水などの非天然溶液中の(部分的に若しくは実質的に)精製されたポリヌクレオチドが挙げられる。単離RNA分子には、ポリヌクレオチドのインビボ又はインビトロRNA転写物が含まれ、ここで転写物は自然中に見出されるものではない。単離ポリヌクレオチド又は核酸には、合成的に作製されたかか分子が更に含まれる。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などの調節エレメントであってもよく、又はそれを含んでもよい。

20

30

【0041】

本明細書で使用されるとき、「天然に存在しない」ポリヌクレオチド、又はその任意の文法上の変形は、裁判官又は行政若しくは司法機関によって「天然に存在する」と判断又は解釈されるか、又はいかなる時でもそのように判断又は解釈されるであろう形態のポリヌクレオチドを明示的に除外するが、但しそれらを除外するのみである条件付きの定義である。

【0042】

本明細書で使用されるとき、「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分である。「終止コドン」(TAG、TGA、又はTAA)はアミノ酸に翻訳されないものの、コード領域の一部であると見なすことができ、しかし任意のフランキング配列、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コンストラクト内、例えば単一のベクター上、又は別個のポリヌクレオチドコンストラクト内、例えば別個の(異なる)ベクター上に存在し得る。更に、任意のベクターが単一のコード領域を含有してもよく、又は2つ以上のコード領域を含んでもよく、例えば、単一のベクターが免疫グロブリン重鎖可変領域と免疫グロブリン軽鎖可変領域とを別個にコードすることができる。加えて、ベクター、ポリヌクレオチド、又は核酸は、別のコード領域と融合した又は融合していない異種コード領域を含むことができる。異種コード領域とし

40

50

ては、限定なしに、分泌シグナルペプチド又は異種機能ドメインなどの特別なエレメント又はモチーフをコードするものが挙げられる。

【0043】

特定の実施形態において、ポリヌクレオチド又は核酸はDNAである。DNAの場合、ポリペプチドをコードする核酸を含むポリヌクレオチドは通常、1つ以上のコード領域と作動可能に結合したプロモーター及び/又は他の転写若しくは翻訳制御エレメントを含み得る。遺伝子産物の発現が1つ又は複数の調節配列の影響下又は制御下に置かれるようにして遺伝子産物、例えばポリペプチドのコード領域が1つ以上の調節配列と結合しているときが、作動可能な結合である。2つのDNA断片(ポリペプチドコード領域及びそれと結合したプロモーターなど)は、所望の遺伝子産物をコードするmRNAの転写がプロモーター機能の誘導によってもたらされる場合、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調節配列の能力に干渉しないか、又はDNA鋳型が転写される能力に干渉しない場合、「作動可能に結合している」。従って、プロモーター領域は、そのプロモーターが当該核酸の転写を生じさせる能力を有したならば、ポリペプチドをコードする核酸と作動可能に結合していると言える。プロモーターは、所定の細胞においてDNAの実質的な転写を導く細胞特異的プロモーターであり得る。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ためポリヌクレオチドと結合され得る。

10

【0044】

種々の転写制御領域が当業者に公知である。それらとしては、限定なしに、脊椎動物細胞において機能する転写制御領域、例えば、限定はされないが、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(イントロンAと併せた前初期プロモーター)、シミアンウイルス40(初期プロモーター)、及びレトロウイルス(ラウス肉腫ウイルスなど)が挙げられる。他の転写制御領域としては、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β-グロビンなどの脊椎動物遺伝子に由来するもの、並びに真核細胞における遺伝子発現を制御する能力を有する他の配列が挙げられる。更なる好適な転写制御領域としては、組織特異的プロモーター及びエンハンサー並びにリンホカイン誘導性プロモーター(例えば、インターフェロン類又はインターロイキン類によって誘導可能なプロモーター)が挙げられる。

20

【0045】

同様に、種々の翻訳制御エレメントが当業者に公知である。それらとしては、限定はされないが、リボソーム結合部位、翻訳開始及び終止コドン、及びピコルナウイルスに由来するエレメント(特に配列内リボソーム進入部位、即ちIRES、別名CITE配列)が挙げられる。

30

【0046】

他の実施形態において、ポリヌクレオチドはRNA、例えば、メッセンジャーRNA(mRNA)、トランスファーRNA、又はリボソームRNAの形態のRNAであり得る。

【0047】

ポリヌクレオチド及び核酸コード領域は、本明細書に開示されるとおり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導く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することができる。シグナル仮説によれば、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、粗面小胞体を通じた成長タンパク質鎖の運び出しが始まると、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、ポリペプチドのN末端に融合したシグナルペプチドを有することができ、それが完成した又は「完全長」ポリペプチドから切断されて分泌形態又は「成熟」形態のポリペプチドが産生されることを認識している。特定の実施形態では、天然シグナルペプチド、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たポリペプチドの分泌を導く能力を保持している当該配列の機能性誘導体が用いられる。或いは、異種哺乳類シグナルペプチド、又はその機能性誘導体が用いられてもよい。例えば、野生型リーダー配列をヒト組

40

50

織プラスミノーゲンアクチベーター (T P A) 又はマウス β - グルクロニダーゼのリーダー配列に置換することができる。

【 0 0 4 8 】

本明細書には、ある種の結合分子、又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体が開示される。具体的にフルサイズの抗体と言及しない限り、用語「結合分子」は、フルサイズの抗体並びにかかる抗体の抗原結合サブユニット、断片、変異体、類似体、又は誘導体、例えば、改変抗体分子、又は抗体分子と同じように抗原と結合するが異なる足場を使用する断片を包含する。

【 0 0 4 9 】

本明細書で使用されるとき、用語「結合分子」は、その広義の意味において、レセプター、例えばエピトープ又は抗原決定基に特異的に結合する分子を指す。本明細書に更に記載するとおり、結合分子は、本明細書に記載される 1 つ以上の「抗原結合ドメイン」を含み得る。結合分子の非限定的な例は、抗体又は抗原特異的結合を保持しているその断片である。

10

【 0 0 5 0 】

本明細書で使用されるとき、用語「結合ドメイン」、「レセプター結合ドメイン」、又は「抗原結合ドメイン」は、エピトープに特異的に結合するために必要且つ十分な結合分子の一領域を指す。例えば、「Fv」、例えば 2 つの別個のポリペプチドサブユニットとしての、或いは単鎖としての、抗体の可変重鎖及び可変軽鎖は、「結合ドメイン」と見なされる。他の結合ドメインとしては、限定なしに、ラクダ科動物種に由来する抗体の可変重鎖 (V H H)、又は異種フレームワーク、例えば異なる生殖細胞系列若しくは種、又は異なる足場、例えばフィブロネクチン足場において発現する 6 つの免疫グロブリン相補性決定領域 (C D R) が挙げられる。本明細書に記載されるとおりの「結合分子」は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 個又はそれ以上の「抗原結合ドメイン」を含み得る。

20

【 0 0 5 1 】

用語「抗体」及び「免疫グロブリン」は、本明細書では同義的に用いられ得る。抗体 (又は本明細書に開示されるとおりのその断片、変異体、又は誘導体) は、少なくとも重鎖の可変ドメイン (ラクダ科動物種について) 又は少なくとも重鎖及び軽鎖の可変ドメインを含む。脊椎動物系における基本的な免疫グロブリン構造は、比較的十分に理解されている。例えば、Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed., 1988) を参照のこと。特に指定しない限り、用語「抗体」は、抗体の小型の抗原結合断片からフルサイズの抗体、例えば 2 つの完全な重鎖と 2 つの完全な軽鎖とを含む I g G 抗体、4 つの完全な重鎖と 4 つの完全な軽鎖とを含み、且つ任意選択で J 鎖及び / 又は分泌成分を含む I g A 抗体、又は 10 若しくは 12 個の完全な重鎖と 10 若しくは 12 個の完全な軽鎖とを含み、且つ任意選択で J 鎖を含む I g M 抗体にまで及ぶ任意のものを包含する。

30

【 0 0 5 2 】

以下で更に詳細に考察するとおり、用語「免疫グロブリン」は、生化学的に区別され得る様々な幅広いクラスのポリペプチドを含む。当業者は、重鎖がガンマ、ミュー、アルファ、デルタ、又はイプシロン (γ 、 μ 、 α 、 δ 、 ϵ) に分類され、それらの間に幾つかのサブクラスが含まれる (例えば、 $\gamma 1 \sim \gamma 4$ 又は $\alpha 1 \sim \alpha 2$)) ことを理解するであろう。抗体の「クラス」をそれぞれ I g G、I g M、I g A、I g G、又は I g E と決定するのは、この鎖の性質である。免疫グロブリンサブクラス (アイソタイプ)、例えば、I g G₁、I g G₂、I g G₃、I g G₄、I g A₁、I g A₂ 等は十分に特徴付けられており、機能上の特殊化を付与することが知られている。これらのクラス及びアイソタイプの各々の修飾バージョンは、本開示に鑑みて当業者が容易に識別し得るものであり、従って本開示の範囲内にある。

40

【 0 0 5 3 】

50

軽鎖はカッパ又はラムダ (κ 、 λ) のいずれかに分類される。各重鎖クラスは、カッパ又はラムダ軽鎖のいずれかと結合し得る。一般に、ハイブリドーマ、B細胞又は遺伝子操作宿主細胞のいずれかによって免疫グロブリンを作成したとき、軽鎖と重鎖とは互いに共有結合的に結合しており、且つ2つの重鎖の「テイル」部分が互いに共有結合性のジスルフィド連結又は非共有結合性の連結によって結合している。重鎖では、アミノ酸配列がY構造の分岐の先端にあるN末端から各鎖の最末端にあるC末端まで延在する。ある種の抗体、例えばIgG抗体の基本構造は、本明細書では「H2L2」構造とも称される、ジスルフィド結合を介して共有結合的につながることによって「Y」構造を形成する2つの重鎖サブユニットと2つの軽鎖サブユニットを含む。

【0054】

軽鎖及び重鎖は、いずれも構造的及び機能的相同領域に分けられる。機能的には、用語「定常」及び「可変」が用いられる。この点で、可変軽(VL)鎖部分及び可変重(VH)鎖部分の両方の可変ドメインによって抗原認識及び特異性が決まることが理解されるであろう。逆に、軽鎖(CL)及び重鎖(CH1、CH2又はCH3)の定常ドメインは、分泌、経胎盤移動度、Fcレセプター結合、補体結合などの生物学的特性を付与する。慣習上、定常領域ドメインの付番は、抗体の抗原結合部位又はアミノ末端から遠位になる程増える。N末端部分は可変領域であり、C末端部分には定常領域があり；実際にはCH3(又はIgMの場合CH4)及びCLドメインが、それぞれ重鎖及び軽鎖のカルボキシ末端を含む。

【0055】

上記に指摘したとおり、結合ドメイン、例えば抗体可変領域によって、結合分子が抗原上のレセプター、又はエピトープを選択的に認識し、それに特異的に結合することが可能となる。即ち、結合分子、例えば抗体のVLドメイン及びVHドメイン、又は相補性決定領域(CDR)のサブセットが組み合わせになって、三次元抗原結合部位を規定する可変領域を形成する。より具体的には、抗原結合部位は、VH鎖及びVL鎖の各々にある3つのCDRによって規定される。ある種の抗体は、より大型の構造を形成する。例えば、IgAは、全てがジスルフィド結合を介して共有結合的につながった2つのH2L2単位とJ鎖と分泌成分とを含む分子を形成することができ、IgMは、ジスルフィド結合を介して共有結合的につながった5個又は6個のH2L2単位と任意選択でJ鎖とを含む五量体又は六量体分子を形成することができる。

【0056】

抗体抗原結合ドメインに存在する6つの「相補性決定領域」又は「CDR」は、抗体が水性環境中でその三次元配置をとるとき特異的な位置取りで結合ドメインを形成するアミノ酸の短い非連続配列である。「フレームワーク」領域又は「FW」領域と称される結合ドメイン中の残りのアミノ酸は、分子間のばらつきがより小さい。フレームワーク領域は概して β シートコンホメーションをとり、CDRは、その β シート構造をつなぎ合わせ、且つ場合によってはその一部を形成するループを形成する。従って、フレームワーク領域は、鎖間の非共有結合性相互作用によってCDRが正しい配向で置かれるようにするための足場を形成する働きをする。配置されたCDRによって形成される結合ドメインが、免疫反応性抗原上のエピトープと相補的な表面を規定する。この相補的な表面が、抗体とそのコグネイトエピトープとの非共有結合性の結合を促進する。当業者は所与の重鎖又は軽鎖可変領域について、それらが種々の方法で定義されていることに伴い、それぞれCDR及びフレームワーク領域を構成するアミノ酸を容易に同定することができる(“Sequences of Proteins of Immunological Interest”, Kabat, E., et al., 米国保健社会福祉省(U.S. Department of Health and Human Services), (1983); 及び Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196: 901-917 (1987) (これらは全体として参照により本明細書に援用される)を参照)。

【0057】

当該技術分野において使用される及び／又は認められている用語に２つ以上の定義がある場合、本明細書で使用されるときその用語の定義は、反する旨が明記されない限り、かかる意味の全てを含むことが意図される。具体的な例は、重鎖及び軽鎖ポリペプチドの両方の可変領域内に見られる非連続抗原結合部位を記載するための用語「相補性決定領域」（「CDR」）の使用である。これらの特定の領域は、例えば、Kabat et al., 米国保健社会福祉省（U.S. Dept. of Health and Human Services）, “Sequences of Proteins of Immunological Interest”（1983）及びChothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917（1987）（これらは参照により本明細書に援用される）によって記載されている。Kabat及びChothiaの定義は、互いに比較したときアミノ酸の重複又はサブセットを含む。それにも関わらず、抗体又はその変異体のCDRを参照するためのいずれの定義（又は当業者に公知の他の定義）の適用も、特に指示されない限り、本明細書において定義及び使用されたとおりの用語の範囲内であることが意図される。比較として、上記に引用した文献の各々によって定義されたとおりのCDRを包含する適切なアミノ酸を以下の表１に記載する。特定のCDRを包含する正確なアミノ酸番号は、CDRの配列及びサイズに応じて異なることになる。当業者は、抗体の可変領域アミノ酸配列を所与として、どのアミノ酸が特定のCDRを含むかをルーチンで決定することができる。

10

20

30

表１ CDR 定義¹

	Kabat	Chothia
VH CDR1	31-35	26-32
VH CDR2	50-65	52-58
VH CDR3	95-102	95-102
VL CDR1	24-34	26-32
VL CDR2	50-56	50-52
VL CDR3	89-97	91-96

¹表１にある全てのCDR定義の付番は、Kabatら（下記参照）により定められた付番規則に従う。

【0059】

Kabatらはまた、任意の抗体に適用可能な抗体重鎖及び軽鎖、例えば抗体可変ドメイン配列の付番方式も定義した。当業者は、配列それ自体を越えたいかなる実験データにも頼ることなく、この「Kabat付番」方式を任意の可変ドメイン配列に一義的に割り当てることができる。本明細書で使用されるとき、「Kabat付番」は、Kabat et al., 米国保健社会福祉省（U.S. Dept. of Health and Human Services）, “Sequence of Proteins of Immunological Interest”（1983）によって示される付番方式を指す。しかしながら、Kabat付番方式の使用が明示的に注記されない限り、本開示の全てのアミノ酸配列について連続番号が用いられる。

40

50

【0060】

結合分子、例えば、抗体又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体としては、限定はされないが、ポリクローナル、モノクローナル、ヒト、ヒト化、又はキメラ抗体、一本鎖抗体、エピトープ結合断片、例えば、Fab、Fab'及びF(ab')₂、Fd、Fv、単鎖Fv（scFv）、一本鎖抗体、ジスルフィド結合Fv（sdFv）、VL又

はVHドメインのいずれかを含む断片、Fab発現ライブラリによって産生される断片が挙げられる。ScFv分子は当該技術分野において公知であり、例えば米国特許第5,892,019号明細書に記載されている。本開示に包含される免疫グロブリン又は抗体分子は、任意のタイプ(例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、及びIgY)、クラス(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及びIgA2)又はサブクラスの免疫グロブリン分子であってもよい。

【0061】

「特異的に結合する」とは、概して、結合分子、例えば、抗体又はその断片、変異体、若しくは誘導体がその抗原結合ドメインを介してエピトープに結合すること、及び結合が抗原結合ドメインとエピトープとの間の何らかの相補性を伴うものであることを意味する。この定義によれば、結合分子は、それがランダムな無関係のエピトープに結合する場合と比べてより容易にその抗原結合ドメインを介して当該のエピトープに結合するとき、エピトープに「特異的に結合する」と言われる。用語「特異性」は、本明細書では、ある種の結合分子がある種のエピトープに結合する相対的親和性を評価するために用いられる。例えば、結合分子「A」は、結合分子「B」と比べて所与のエピトープに対してより高い特異性を有すると見なすことができ、又は結合分子「A」は、それが関連エピトープ「D」に対して有する特異性と比べてより高い特異性でエピトープ「C」に結合すると言うことができる。

10

【0062】

本明細書に開示される結合分子、例えば、抗体又はその断片、変異体、若しくは誘導体は、例えば、 $5 \times 10^{-2} \text{ sec}^{-1}$ 、 10^{-2} sec^{-1} 、 $5 \times 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$ 、 10^{-3} sec^{-1} 、 $5 \times 10^{-4} \text{ sec}^{-1}$ 、 10^{-4} sec^{-1} 、 $5 \times 10^{-5} \text{ sec}^{-1}$ 、又は 10^{-5} sec^{-1} 、 $5 \times 10^{-6} \text{ sec}^{-1}$ 、 10^{-6} sec^{-1} 、 $5 \times 10^{-7} \text{ sec}^{-1}$ 又は 10^{-7} sec^{-1} 以下のoff速度($k(\text{off})$)で標的抗原に結合すると言うことができる。

20

【0063】

本明細書に開示される結合分子、例えば、抗体又は抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体は、例えば、 $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 、 $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 、 $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 、 $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 、 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 、 $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 、 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 、又は $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 又は $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 以上のon速度($k(\text{on})$)で標的抗原に結合すると言うことができる。

30

【0064】

結合分子、例えば、その抗体又は断片、変異体、若しくは誘導体は、それが所与のエピトープに対する参照抗体又は抗原結合断片の結合を何らかの度合いで遮断する程度に当該エピトープに優先的に結合する場合、そのエピトープに対する参照抗体又は抗原結合断片の結合を競合的に阻害すると言われる。競合的阻害は、当該技術分野において公知の任意の方法、例えば競合ELISAアッセイによって決定することができる。結合分子は、所与のエピトープに対する参照抗体又は抗原結合断片の結合を少なくとも90%、少なくとも80%、少なくとも70%、少なくとも60%、又は少なくとも50%競合的に阻害すると言うことができる。

40

【0065】

本明細書で使用されるとき、用語「親和性」は、例えば免疫グロブリン分子の1つ以上の結合ドメインとの個々のエピトープの結合強度の尺度を指す。例えば、Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed., 1988)の27~28頁を参照のこと。本明細書で使用されるとき、用語「アビディティ」は、結合ドメインの集団と抗原との間の複合体の全体的な安定性を指す。例えば、Harlowの29~34頁を参照のこと。アビディティは、特定のエピトープに対する集団中の個々の結合ドメインの親和性と、また免疫グロブリン及び抗原の結合価との両方に関係する。例えば、二価モノクローナル抗体と、ポリマーなど、高度に反復性のある

50

エピトープ構造を有する抗原との間の相互作用は、高アビディティの一つであり得る。二価モノクローナル抗体と細胞表面上に高密度で存在するレセプターとの間の相互作用もまた、高アビディティであり得る。

【0066】

本明細書に開示されるとおりの結合分子又はその抗原結合断片、変異体若しくは誘導体はまた、その交差反応性の観点からも記載又は特定することができる。本明細書で使用されるとき、用語「交差反応性」は、ある抗原に特異的な結合分子、例えば、抗体又はその断片、変異体、若しくは誘導体が第2の抗原と反応する能力；2つの異なる抗原性物質の間の関連性の尺度を指す。従って、結合分子は、それがその形成を誘導したもの以外のエピトープに結合する場合、交差反応する。交差反応性エピトープは、概して、誘導エピトープと同じ相補的構造特徴の多くを備え、場合によっては、実に元のエピトープよりも良好に適合し得る。

10

【0067】

結合分子、例えば、抗体又はその断片、変異体、若しくは誘導体はまた、抗原へのそれらの結合親和性によっても記述又は特定が可能である。例えば、結合分子は、例えば、 5×10^{-2} M、 10^{-2} M、 5×10^{-3} M、 10^{-3} M、 5×10^{-4} M、 10^{-4} M、 5×10^{-5} M、 10^{-5} M、 5×10^{-6} M、 10^{-6} M、 5×10^{-7} M、 10^{-7} M、 5×10^{-8} M、 10^{-8} M、 5×10^{-9} M、 10^{-9} M、 5×10^{-10} M、 10^{-10} M、 5×10^{-11} M、 10^{-11} M、 5×10^{-12} M、 10^{-12} M、 5×10^{-13} M、 10^{-13} M、 5×10^{-14} M、 10^{-14} M、 5×10^{-15} M、又は 10^{-15} M以下の解離定数又は K_D で抗原に結合可能である。

20

【0068】

一本鎖抗体又は他の結合ドメインを含む抗体断片は、単独で、又は次のもの、すなわち、ヒンジ領域、CH1、CH2、CH3、若しくはCH4ドメイン、J鎖、又は分泌成分の1つ以上との組合せで、存在可能である。また、可変領域と、ヒンジ領域、CH1、CH2、CH3、若しくはCH4ドメイン、J鎖、又は分泌成分の1つ以上と、の任意の組合せを含み得る抗原結合断片も含まれる。結合分子、例えば、抗体又はその抗原結合断片は、トリヤ哺乳動物をはじめとする任意の動物起源であり得る。抗体は、ヒト、ネズミ、ロバ、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ、ラマ、ウマ、又はニワトリの抗体であり得る。別の実施形態では、可変領域は、軟骨魚 (condri c t h o i d) 起源 (例えばサメ由来) であり得る。本明細書で用いられる場合、「ヒト」抗体は、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有する抗体を含み、また、ヒト免疫グロブリンライブラリーから又は1種以上のヒト免疫グロブリンが導入されたトランスジェニック動物から単離された抗体を含み、このトランスジェニック動物の中には、以下に及び例えばK u c h e r l a p a t i らによる米国特許第5,939,598号明細書に記載されるように、内因性免疫グロブリンを発現可能なものもあればそうでないものもある。

30

【0069】

本明細書で用いられる場合、「重鎖サブユニット」という用語は、免疫グロブリン重鎖に由来するアミノ酸配列を含む。結合分子、例えば、重鎖サブユニットを含む抗体は、VHドメイン、CH1ドメイン、ヒンジ (例えば、上側、中間、及び/若しくは下側のヒンジ領域) ドメイン、CH2ドメイン、CH3ドメイン、CH4ドメイン、又はそれらの変異体若しくは断片の少なくとも1つを含む。例えば、結合分子、例えば、抗体又はその断片、変異体、若しくは誘導体は、VHドメインのほかに、CH1ドメイン、CH1ドメインとヒンジとCH2ドメイン、CH1ドメインとCH3ドメイン、CH1ドメインとヒンジとCH3ドメイン、又はCH1ドメインとヒンジドメインとCH2ドメインとCH3ドメインを含み得る。ある特定の態様では、結合分子、例えば、抗体又はその断片、変異体、若しくは誘導体は、VHドメインのほかに、CH3ドメインとCH4ドメイン、又はCH3ドメインとCH4ドメインとJ鎖を含み得る。さらに、本開示で使用するための結合分子は、ある特定の定常領域部分、例えば、CH2ドメインの全部又は一部が欠如し得る。これらのドメイン (例えば、重鎖サブユニット) を元の免疫グロブリン分子とアミノ酸

40

50

配列が異なるように修飾可能であることは、当業者であれば理解されよう。

【0070】

結合分子例えば抗体又はその断片の重鎖サブユニットは、異なる免疫グロブリン分子に由来するドメインを含み得る。例えば、ポリペプチドの重鎖サブユニットは、IgG1分子に由来するCH1ドメインとIgG3分子に由来するヒンジ領域とを含み得る。別の例では、重鎖サブユニットは、一部がIgG1分子及び一部がIgG3分子に由来するヒンジ領域を含み得る。別の例では、重鎖サブユニットは、一部がIgG1分子及び一部がIgG4分子に由来するキメラヒンジを含み得る。

【0071】

本明細書で用いられる場合、「軽鎖サブユニット」という用語は、免疫グロブリン軽鎖に由来するアミノ酸配列を含む。軽鎖サブユニットは、VL又はCL（例えばCκ若しくはCλ）ドメインの少なくとも1つを含む。

10

【0072】

結合分子、例えば、抗体又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体は、認識されるか又は特異的に結合される抗原のエピトープ又は部分により記述又は特定が可能である。抗体の抗原結合ドメインと特異的に相互作用する標的抗原の部分は、「エピトープ」又は「抗原決定基」である。標的抗原は、単一のエピトープ又は少なくとも2つのエピトープを含み得るとともに、抗原のサイズ、コンフォメーション、及びタイプに依存していずれかの数のエピトープを含み得る。

【0073】

前述したように、種々の免疫グロブリンクラスの定常領域のサブユニット構造及び三次元配置は周知である。本明細書で用いられる場合、「VHドメイン」という用語は、免疫グロブリン重鎖のアミノ末端可変ドメインを含み、「CH1ドメイン」という用語は、免疫グロブリン重鎖の第1（最もアミノ末端側）の定常領域ドメインを含む。CH1ドメインは、VHドメインに近接し、且つ典型的な免疫グロブリン重鎖分子のヒンジ領域のアミノ末端側にある。

20

【0074】

本明細書で用いられる場合、「CH2ドメイン」という用語は、例えば、従来の付番方式を用いてIgG抗体の約アミノ酸244～アミノ酸360（Kabatt付番系ではアミノ酸244～360及びEU付番系ではアミノ酸231～340、前掲文献のKabatt E A e t a l . を参照のこと）に延在する重鎖分子の部分を含む。CH3ドメインは、IgG分子のCH2ドメインからC末端まで延在し且つ約108アミノ酸を含む。ある特定の免疫グロブリンクラス例えばIgMは、CH4領域をさらに含む。

30

【0075】

明細書で用いられる場合、「ヒンジ領域」という用語は、CH1ドメインをCH2ドメインに連結する重鎖分子の部分を含む。このヒンジ領域は、約25アミノ酸を含み可撓性であるので、2つのN末端抗原結合領域の独立した運動を可能にする。

【0076】

本明細書で用いられる場合、「ジスルフィド結合」という用語は、2個の硫黄原子間に形成された共有結合を含む。アミノ酸のシステインは、第2のチオール基とジスルフィド結合又は架橋を形成可能なチオール基を含む。ある特定のIgG分子では、ジスルフィド結合によりCH1領域とCL領域とが結合され、且つKabatt付番系を用いて239及び242に対応する位置（EU付番系では226又は229の位置）で2つのジスルフィド結合により2つの重鎖が結合される。本明細書に提供されたある特定の態様では、ヒトIgG4Fcドメインは、2つのヒンジ領域間にジスルフィド結合形成が確保されるようにヒンジ領域で突然変異が可能であり、とくに位置228（EU付番による）でセリンからプロリンへの突然変異が可能である。S228P突然変異を含むヒトIgG4Fcドメインは、本明細書では「IgG4P Fcドメイン」という。

40

【0077】

本明細書で用いられる場合、「Fc-TM領域」とは、Kabattに記載のEUインデ

50

ックスによる付番でL 2 3 4 F、L 2 3 5 E、及びP 3 3 1 Sのアミノ酸置換を含むヒト I g G F c 領域のことであり、エフェクター（A D C C 及び / 又は C D C ）機能の低減若しくは破壊、F c レセプターへの結合の低減若しくは破壊、及び / 又は毒性の低減若しくは破壊を呈する。例えば、米国特許出願公開第 2 0 1 1 / 0 0 5 9 0 7 8 号明細書（その全体が参照により本明細書に組み込まれる）を参照のこと。

【 0 0 7 8 】

本明細書で用いられる場合、「キメラ抗体」という用語は、免疫反応性の領域又は部位が第 1 の種から得られるか又はそれに由来し且つ定常領域（無傷であり得るか、一部であり得るか、又は修飾され得る）が第 2 の種から得られる抗体を意味する。いくつかの実施形態では、標的結合の領域又は部位は、非ヒト源（例えば、マウス又は霊長動物）に由来するであろう。また、定常領域はヒト由来である。

10

【 0 0 7 9 】

「多重特異的抗体」又は「二重特異的抗体」という用語は、単一抗体分子内に 2 つ以上の異なるエピトープに対する結合ドメインを有する抗体を意味する。他の結合分子は、カノニカル抗体構造のほかに 2 つの結合特異性をもたせて構築可能である。二重特異的抗体又は多重特異的抗体によるエピトープ結合は、同時であり得るか又は逐次的であり得る。トリオーマ及びハイブリッドハイブリドーマは、二重特異的抗体を分泌可能な細胞系の 2 つの例である。二重特異的抗体は、組換え手段によっても構築可能である。（S t r o e h l e i n a n d H e i s s , F u t u r e O n c o l . 6 : 1 3 8 7 - 9 4 (2 0 1 0) ; M a b r y a n d S n a v e l y , I D r u g s . 1 3 : 5 4 3 - 9 (2 0 1 0) ）。二重特異的抗体はダイアボディーでもあり得る。

20

【 0 0 8 0 】

本明細書で用いられる場合、「工学操作抗体」という用語は、C D R 領域又はフレームワーク領域のいずれかで 1 アミノ酸以上の少なくとも部分的な置換えにより重鎖及び軽鎖の一方又は両方の可変ドメインが改変された抗体を意味する。ある特定の態様では、既知の特異性の抗体の全 C D R を異種抗体のフレームワーク領域にグラフト可能である。代替 C D R は、フレームワーク領域の由来源の抗体と同一のクラス又はさらにはサブクラスの抗体に由来し得るが、C D R は、異なるクラスの抗体、例えば、異なる種の抗体にも由来し得る。既知の特異性の非ヒト抗体の 1 つ以上の「ドナー」C D R をヒト重鎖又は軽鎖のフレームワーク領域にグラフトした工学操作抗体は、本明細書では「ヒト化抗体」という。ある特定の態様では、すべての C D R がドナーの可変領域の完全 C D R で置き換えられるとは限らないが、それでも依然としてドナーの抗原結合能をレシピエントの可変ドメインに導入可能である。例えば、米国特許第 5 , 5 8 5 , 0 8 9 号明細書、同第 5 , 6 9 3 , 7 6 1 号明細書、同第 5 , 6 9 3 , 7 6 2 号明細書、及び同第 6 , 1 8 0 , 3 7 0 号明細書に示される説明を考慮すれば、ルーチンの実験を行うことにより又は試行錯誤の試験により工学操作又はヒト化された機能性抗体を得ることは、十分に当業者の能力の範囲内であろう。

30

【 0 0 8 1 】

本明細書で用いられる場合、「工学操作」という用語は、合成手段（例えば、組換え技術、i n v i t r o ペプチド合成、ペプチドの酵素的結合若しくは化学的結合、又はこれらの技術のいくつかの組合せ）による核酸分子又はポリペプチド分子の操作を含む。

40

【 0 0 8 2 】

本明細書で用いられる場合、「結合された」、「融合された」、若しくは「融合」という用語又は他の文法的等価表現は、同義的に用いることが可能である。これらの用語は、化学的コンジュゲーション又は組換え手段を含めてどんな手段を用いるにせよ、さらに 2 つの要素又は成分を連結一体化することを意味する。「インフレーム融合」とは、元の O R F の翻訳リーディングフレームを維持するように 2 つ以上のポリヌクレオチドオープンリーディングフレーム（O R F ）を連結して連続したより長い O R F を形成することを意味する。従って、組換え融合タンパク質は、元の O R F によりコードされるポリペプチドに対応する 2 つ以上のセグメントを含有する単一のタンパク質である（それらのセグメン

50

トは天然では通常そのように連結されていない)。リーディングフレームは、このように融合セグメント全体を通じて連続した状態で作製されるが、セグメントは、例えば、インフレームリンカー配列により物理的又は空間的に分離可能である。例えば、免疫グロブリン可変領域のCDRをコードするポリヌクレオチドは、インフレームで融合可能であるが、「融合」CDRが連続したポリペプチドの一部として共翻訳される限り、少なくとも1つの免疫グロブリンフレームワーク領域又は追加のCDR領域をコードするポリヌクレオチドにより分離可能である。

【0083】

ポリペプチドとの関連では、「線状配列」又は「配列」とは、ポリペプチド中におけるアミノ末端からカルボキシル末端方向のアミノ酸の順序のことであり、この場合、配列中で互いに近接するアミノ酸は、ポリペプチドの一次構造中で隣接している。ポリペプチドの別の部分の「アミノ末端側」又は「N末端側」のポリペプチドの部分は、逐次ポリペプチド鎖中でより前にくる部分である。同様に、ポリペプチドの別の部分の「カルボキシル末端側」又は「C末端側」のポリペプチドの部分は、逐次ポリペプチド鎖中でより後にくる部分である。例えば、典型的な抗体では、可変ドメインは定常領域の「N末端側」であり、且つ定常領域は可変ドメインの「C末端側」である。

【0084】

本明細書で用いられる「発現」という用語は、遺伝子が生化学物質例えばポリペプチドを産生するプロセスを意味する。このプロセスは、限定されるものではないが、遺伝子ノックダウンさらには一過性発現及び安定発現の両方を含めて、細胞内の遺伝子機能の存在の任意の出現を含む。限定されるものではないが、メッセンジャーRNA(mRNA)への遺伝子の転写及びポリペプチドへのかかるmRNAの翻訳を含む。最終的な所望の産物が生化学物質である場合、発現は、その生化学物質及び任意の前駆体の形成を含む。遺伝子の発現により「遺伝子産物」が産生される。本明細書で用いられる場合、遺伝子産物とは、いずれかの核酸、例えば、遺伝子の転写により産生されるメッセンジャーRNA、又は転写物から翻訳されるポリペプチドのことであり得る。本明細書に記載の遺伝子産物はさらに、ポリアデニル化などの翻訳後修飾を受けた核酸、又はメチル化、グリコシル化、脂質の付加、他のタンパク質サブユニットの会合、タンパク質分解切断などの翻訳後修飾を受けたポリペプチドを含む。

【0085】

「治療」や「軽減」などの用語は、既存の診断された病理学的病態又は障害の症状の治療、遅延、低減、及び/又はその進行の停止若しくは遅延を行う治療手段を意味する。「予防」、「回避」、「抑止」などの用語は、診断されていない標的の病理学的病態又は障害の発生の予防を行う予防手段を意味する。従って、「治療が必要とされる者」は、すでに障害を有する者、障害を起こしやすい者、及び障害を予防すべき者を含み得る。

【0086】

OX40又は「OX40レセプター」は、活性化T細胞、例えば、CD4⁺及びCD8⁺T細胞の表面上、さらにはFoxp3⁺CD4⁺調節性T細胞(Treg)上に発現するタンパク質である(種々の名称があり、CD134、腫瘍壊死因子レセプタースーパーファミリーメンバー4、及びACT-35とも称される)。ナイーブCD4⁺及びCD8⁺T細胞はOX40を発現しない(Croft, M., (2010) Ann Rev Immunol 28:57-78)。

【0087】

「OX40リガンド」(「OX40L」)(種々の名称があり、腫瘍壊死因子リガンドスーパーファミリーメンバー4、gp34、TAX転写活性化糖タンパク質1、及びCD252とも称される)は、主に抗原提示細胞(APC)上に見いだされ、活性化B細胞、樹状細胞(DC)、ランゲルハンス細胞、形質細胞様DC、及びマクロファージ上に誘導され得る(同上)。活性化T細胞、NK細胞、マスト細胞、内皮細胞、及び平滑筋細胞をはじめとする他の細胞は、炎症性サイトカインに反応してOX40Lを発現可能である(同上)。OX40LはOX40レセプターに特異的に結合する。ヒトタンパク質は、PC

10

20

30

40

50

T 国際公開第 9 5 / 2 1 9 1 5 号パンフレットに記載されている。マウス O X 4 0 L は、米国特許第 5 , 4 5 7 , 0 3 5 号明細書に記載されている。O X 4 0 L は、細胞の表面上に発現され、細胞内、膜貫通、及び細胞外レセプター結合ドメインを含む。機能活性可溶性 O X 4 0 L は、例えば、米国特許第 5 , 4 5 7 , 0 3 5 号明細書及び同第 6 , 3 1 2 , 7 0 0 号明細書並びに国際公開第 9 5 / 2 1 9 1 5 号パンフレット（それらの開示はあらゆる目的で本明細書に組み込まれる）に記載されているように、細胞内ドメイン及び膜貫通ドメインを欠失させることにより産生可能である。機能活性形 O X 4 0 L は、O X 4 0 に特異的に結合する能力を保持する形態、すなわち、O X 4 0 「レセプター結合ドメイン」を有する形態である。O X 4 0 に特異的に結合する O X 4 0 L 分子又は誘導体の能力を決定する方法は以下で考察される。O X 4 0 L 及びその誘導体（例えば、O X 4 0 結合ドメインを含む誘導体）の作製方法及び使用方法は、国際公開第 9 5 / 2 1 9 1 5 号パンフレットに記載されている。そこには、ヒト免疫グロブリン（「I g」）Fc 領域などの他のペプチドに結合される可溶性 O X 4 0 L を含むタンパク質も記載されている。これは、培養細胞からの O X 4 0 リガンドの精製を容易にするために又は哺乳動物への *i n v i v o* 投与後の分子の安定性を向上させるために産生可能である（米国特許第 5 , 4 5 7 , 0 3 5 号明細書及び P C T 国際公開第 2 0 0 6 / 1 2 1 8 1 0 号パンフレット（両方ともその全体が参照により本明細書に組み込まれる）も参照されたい）。

10

【0088】

「被験体」又は「個体」又は「動物」又は「患者」又は「哺乳動物」とは、診断、予後判定、又は治療が望まれる任意の被験体とくに哺乳動物被験体を意味する。哺乳動物被験体としては、ヒト、家畜、農場動物、及び動物園用、スポーツ用、又はペット用の動物、例えば、イヌ、ネコ、モルモット、ウサギ、ラット、マウス、ウマ、イノシシ、ウシ、クマなどが挙げられる。

20

【0089】

本明細書で用いられる場合、「療法が奏効すると思われる被験体」、「治療が必要とされる動物」などの語句は、ヒト化抗 O X 4 0 抗体の投与が奏効すると思われる被験体例えば哺乳動物被験体を含む。かかる抗体は、例えば、癌などの疾患の診断手順及び/又は治療若しくは予防のために使用が可能である。

【0090】

ヒト化抗 O X 4 0 抗体及びその抗原結合断片

30

本開示は、O X 4 0 に特異的に結合する抗体例えばヒト化抗体に関する。ある特定の態様では、本明細書に提供される抗体又はその断片は単離可能である。ある特定の態様では、本明細書に提供される抗体又はその断片は実質的に純粋であり得る。ある特定の態様では、本明細書に提供される抗体又はその断片は天然に存在しえない。

【0091】

ある特定の態様では、本開示は、O X 4 0 m A b 5、O X 4 0 m A b 8、O X 4 0 m A b 1 0、O X 4 0 m A b 1 1、O X 4 0 m A b 1 2、O X 4 0 m A b 1 3、O X 4 0 m A b 1 4、O X 4 0 m A b 1 5、O X 4 0 m A b 1 6、O X 4 0 m A b 1 7、O X 4 0 m A b 1 8、O X 4 0 m A b 1 9、O X 4 0 m A b 2 0、O X 4 0 m A b 2 1、O X 4 0 m A b 2 2、O X 4 0 m A b 2 3、O X 4 0 m A b 2 4、O X 4 0 m A b 2 5、O X 4 0 m A b 2 5 a、O X 4 0 m A b 2 6、O X 4 0 m A b 2 7、O X 4 0 m A b 2 8、O X 4 0 m A b 2 9、O X 4 0 m A b 3 0、O X 4 0 m A b 3 1、O X 4 0 m A b 3 2、又は O X 4 0 m A b 3 7 の V H 及び V L を含むヒト化抗 O X 4 0 抗体又はその抗原結合断片を提供する。ある特定の態様では、本開示は、O X 4 0 m A b 5、O X 4 0 m A b 8、O X 4 0 m A b 1 0、O X 4 0 m A b 1 1、O X 4 0 m A b 1 2、O X 4 0 m A b 1 3、O X 4 0 m A b 1 4、O X 4 0 m A b 1 5、O X 4 0 m A b 1 6、O X 4 0 m A b 1 7、O X 4 0 m A b 1 8、O X 4 0 m A b 1 9、O X 4 0 m A b 2 0、O X 4 0 m A b 2 1、O X 4 0 m A b 2 2、O X 4 0 m A b 2 3、O X 4 0 m A b 2 4、O X 4 0 m A b 2 5、O X 4 0 m A b 2 5 a、O X 4 0 m A b 2 6、O X 4 0 m A b 2 7、O X 4 0 m A b 2 8、O X 4 0 m A b 2 9、O X 4 0 m A b 3 0、O X 4 0 m A b 3 1、又は O X 4 0 m A b 3 2 の重鎖

40

50

及び軽鎖を含むヒト化抗 O X 4 0 抗体又はその抗原結合断片を提供する。

【 0 0 9 2 】

ある特定の態様では、本開示は、抗体 V H 及び抗体 V L を含むヒト化抗 O X 4 0 抗体又はその抗原結合断片を提供する。ただし、V L は、参照アミノ酸配列の配列番号 2 9 又は配列番号 3 2 に対して少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、又は 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む。

【 0 0 9 3 】

ある特定の態様では、本開示は、抗体 V H 及び抗体 V L を含むヒト化抗 O X 4 0 抗体又はその抗原結合断片を提供する。ただし、V L は、配列番号 2 9 又は配列番号 3 2 を含む。

10

【 0 0 9 4 】

本開示は、抗体 V H 及び抗体 V L を含むヒト化抗 O X 4 0 抗体又はその抗原結合断片をさらに提供する。ただし、V H は、V H C D R 1 アミノ酸配列の配列番号 8、V H C D R 2 アミノ酸配列の配列番号 1 4、配列番号 1 5、若しくは配列番号 1 6、及び V H C D R 3 アミノ酸配列の配列番号 2 5、配列番号 2 6、若しくは配列番号 2 7 と同一であるか又は V H - C D R の 1 つ以上における 8、7、6、5、4、3、2、若しくは 1 つの単一アミノ酸置換、欠失、若しくは挿入を除いて同一である V H - C D R 1、V H - C D R 2、及び V H - C D R 3 アミノ酸配列を含む。

【 0 0 9 5 】

本開示は、抗体 V H 及び抗体 V L を含むヒト化抗 O X 4 0 抗体又はその抗原結合断片をさらに提供する。ただし、V H は、式：

20

H F W 1 - H C D R 1 - H F W 2 - H C D R 2 - H F W 3 - H C D R 3 - H F W 4、を有するアミノ酸配列を含む。式中、H F W 1 は配列番号 6 又は配列番号 7 であり、H C D R 1 は配列番号 8 であり、H F W 2 は配列番号 9 であり、H C D R 2 は配列番号 1 4、配列番号 1 5、又は配列番号 1 6 であり、H F W 3 は配列番号 1 7 であり、H C D R 3 は配列番号 2 5、配列番号 2 6、又は配列番号 2 7 であり、且つ H F W 4 は配列番号 2 8 である。ある特定の態様では、H F W 2 のアミノ酸配列は、配列番号 1 0、配列番号 1 1、配列番号 1 2、又は配列番号 1 3 である。ある特定の態様では、H F W 3 のアミノ酸配列は、配列番号 1 8、配列番号 1 9、配列番号 2 0、配列番号 2 1、配列番号 2 2、配列番号 2 3、又は配列番号 2 4 である。

30

【 0 0 9 6 】

さらに、本開示は、抗体 V H 及び抗体 V L を含むヒト化抗 O X 4 0 抗体又はその抗原結合断片を提供する。ただし、V H は、参照アミノ酸配列の配列番号 3 3、配列番号 3 5、配列番号 3 7、配列番号 3 9、配列番号 4 1、配列番号 4 3、配列番号 4 5、配列番号 4 7、配列番号 4 9、配列番号 5 1、配列番号 5 3、配列番号 5 5、配列番号 5 7、配列番号 5 9、配列番号 6 1、配列番号 6 3、配列番号 6 5、又は配列番号 6 7 に対して、少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、又は 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む。

【 0 0 9 7 】

一態様では、本開示は、抗体 V H 及び抗体 V L を含むヒト化抗 O X 4 0 抗体又はその抗原結合断片を提供する。ただし、V L はアミノ酸配列の配列番号 2 9 を含み、且つ V H はアミノ酸配列の配列番号 5 9 を含む。

40

【 0 0 9 8 】

本明細書に提供されるヒト化抗 O X 4 0 抗体又はその抗原結合断片は、V H 及び V L のほかに、重鎖定常領域又はその断片を含み得る。ある特定の態様では、重鎖定常領域は、ヒト重鎖定常領域、例えば、ヒト I g G 定常領域、例えば、ヒト I g G 1 定常領域又はヒト I g G 4 定常領域である。ある特定の態様では、本明細書の他の箇所に記載されるように、重鎖定常領域又はその断片、例えば、ヒト I g G 定常領域又はその断片は、野生型 I g G 定常領域に対して 1 つ以上のアミノ酸置換を含み得るとともに、この修飾 I g G は、野生型 I g G 定常領域と比較して 1 つ以上の望ましい性質を有する。例えば、ヒト I g G

50

定常領域は、本明細書の他の箇所に記載されるように、I g G 4 P 定常領域又はI g G 1 - T M 定常領域であり得る。

【0099】

本明細書に提供されるヒト化抗O X 4 0 抗体又はその抗原結合断片は、V H 及びV L のほかに、任意選択的に、重鎖定常領域又はその断片、軽鎖定常領域又はその断片を含み得る。ある特定の態様では、軽鎖定常領域は、κ 又はλ 軽鎖定常領域、例えば、ヒトκ 定常領域又はヒトλ 定常領域である。特定の態様では、軽鎖定常領域はヒトκ 定常領域である。

【0100】

ある特定の態様では、本開示は、抗体重鎖又はその断片と抗体軽鎖又はその断片とを含むヒト化抗O X 4 0 抗体又はその抗原結合断片を提供する。ただし、重鎖はアミノ酸配列の配列番号71を含み、且つ軽鎖はアミノ酸配列の配列番号30を含む。

10

【0101】

本明細書に提供されるヒト化抗O X 4 0 抗体又はその抗原結合断片は、例えば、モノクローナル、ポリクローナル、組換え、多重特異的、又はそれらの任意の組合せであり得る。ヒト化抗O X 4 0 抗体又は抗原結合断片は、例えば、F v 断片、F a b 断片、F (a b ') 2 断片、F a b ' 断片、d s F v 断片、s c F v 断片、s c (F v) 2 断片、F d 断片、ジスルフィド結合F v 断片、V - N A R ドメイン、I g N a r、イントラボディー、I g G Δ C H 2、ミニボディー、F (a b ') 3 断片、テトラボディー、トリアボディー、ダイアボディー、単ドメイン抗体、D V D - I g、F c a b 断片、m A b 2 断片、(s c F v) 2 断片、又はs c F v - F c 断片であり得る。

20

【0102】

ある特定の態様では、本明細書に提供されるヒト化抗O X 4 0 抗体又はその抗原結合断片は、ヒト、カニクイザル、又はアカゲザルO X 4 0 に特異的に結合可能である。ある特定の態様では、本明細書に提供されるヒト化抗O X 4 0 抗体又はその抗原結合断片は、一次ヒト、カニクイザル、又はアカゲザルC D 4 T 細胞又はジャーカット細胞の表面に特異的に結合可能である。ある特定の態様では、本明細書に提供されるヒト化抗O X 4 0 抗体又はその抗原結合断片は、ヒト、カニクイザル、アカゲザル、又はそれらの任意の組合せに由来する活性化C D 4 + 又はC D 8 + T 細胞上に発現されるO X 4 0 に特異的に結合可能である。ある特定の態様では、本明細書に提供されるヒト化抗O X 4 0 抗体又はその抗原結合断片は、ヒト、カニクイザル、アカゲザル、又はそれらの任意の組合せに由来する一次活性化C D 4 + T 細胞上に発現されるO X 4 0 に特異的に結合可能である。ある特定の態様では、本明細書に提供されるヒト化抗O X 4 0 抗体又はその抗原結合断片は、ネズミ又はラットO X 4 0 に結合しない。ある特定の態様では、本明細書に提供されるヒト化抗O X 4 0 抗体又はその抗原結合断片は、関連T N F R S F タンパク質、例えば、以下の実施例3の表3 - 1に列挙されたT N F R S F タンパク質と交差反応しない。

30

【0103】

本明細書に提供されるヒト化抗O X 4 0 抗体又はその抗原結合断片は、ヒト化抗O X 4 0 抗体又はその抗原結合断片の生化学的機能、例えば、O X 4 0 に特異的に結合してシグナル伝達を惹起する機能を変化させることなくポリペプチド中に変化を引き起こすことが可能であるならば、1つ以上の保存アミノ酸変化、例えば、10までの保存変化(例えば、2つの置換アミノ酸、3つの置換アミノ酸、4つの置換アミノ酸、又は5つの置換アミノ酸など)を含み得る。例えば、O X 4 0 への結合能をブロックすることなく、本明細書に提供される抗体のレセプター結合ドメイン中に1つ以上の保存変化を引き起こすことが可能である。

40

【0104】

そのほかに、ポリペプチドドメインの一部を欠失させることが可能であるが、それにより機能のすべてが損なわたり排除されたりするわけではない。同様に、以下に記載されるように、機能が損なわたり排除されたりすることなく、挿入又は付加、例えば、エピトープタグの付加をポリペプチド鎖中で行うことが可能である。ポリペプチドの1つ以上の機

50

能が実質的に損なわれることなく行い得る他の修飾としては、例えば、異常アミノ酸が取り込まれる *in vivo* 又は *in vitro* の化学的及び生化学的な修飾が挙げられる。当業者であれば容易に分かるであろうが、かかる修飾としては、例えば、アセチル化、カルボキシル化、リン酸化、グリコシル化、標識化例えば放射性核種による標識化、及び種々の酵素修飾が挙げられる。ポリペプチドの様々な標識方法及びかかる目的に有用な標識は当該技術分野で周知であり、 ^{32}P などの放射性同位体、フルオロフォア、化学発光剤、酵素、及び抗リガンドが挙げられる。

【0105】

本明細書に提供されるヒト化抗 OX40 抗体又はその抗原結合断片は、異種作用剤、例えば、安定化剤、免疫反応調整剤、又は検出可能剤をさらに含み得る。ある特定の態様では、異種作用剤は、ペプチド結合によるポリペプチドサブユニットに融合される 1 つ以上の追加のポリペプチド配列、例えば、シグナル配列（例えば、分泌シグナル配列）、リンカー配列、アミノ酸タグ若しくは標識、又は精製を容易にするペプチド配列若しくはポリペプチド配列を含む。ある特定の態様では、ドメインの機能特性が維持される限り、重鎖又は軽鎖の抗体サブユニットのいずれか又はその断片の N 末端又は C 末端に異種ポリペプチドを融合可能である。

10

【0106】

ある特定の態様では、異種作用剤は、本明細書に提供されるヒト化抗 OX40 抗体又はその抗原結合断片に化学的にコンジュゲート可能である。ポリペプチドサブユニットに化学的にコンジュゲート可能な例示的な異種作用剤としては、限定されるものではないが、リンカー、薬剤、毒素、イメージング剤、放射性化合物、有機及び無機のポリマー、並びにポリペプチドサブユニット自体により提供されない所望の活性を提供可能な任意の他の組成物が挙げられる。具体的な作用剤としては、限定されるものではないが、ポリエチレングリコール（PEG）、細胞傷害剤、放射性核種、イメージング剤、ビオチンが挙げられる。

20

【0107】

ある特定の態様では、本開示は、対照又は研究ツールとして使用されるある特定の抗 OX40 抗体を提供する。例えば、本開示は、VH 及び VL がそれぞれネズミ IgG1 重鎖及びネズミ κ 軽鎖に融合された以上に記載のヒト化抗 OX40 抗体又はその抗原結合断片を提供する。この「リバースキメラ」は、アカゲザルの *in vivo* 特徴付けに役立つ。別の例では、本明細書に提供されるヒト化抗 OX40 抗体上の VH 領域は、改変されたエフェクター機能を有する種々の重鎖定常領域に装着可能である。例えば、ヒト IgG4 P 又はヒト IgG1 TM が本明細書の他の箇所に記載されている。

30

【0108】

本明細書に提供されるヒト化抗 OX40 抗体又はその抗原結合断片は、一次活性化 T 細胞、例えば、ヒト、カニクイザル、アカゲザル、又はそれらの任意の組合せに由来する一次活性化 CD4⁺ T 細胞、一次活性化 CD8⁺ T 細胞、及び / 又は調節性 T 細胞上に発現される OX40 に特異的に結合可能である。ある特定の態様では、本明細書に提供されるヒト化抗 OX40 抗体又はその抗原結合断片、例えば OX40 mAb 24 は、すべてフローサイトメトリーにより測定したときに、約 0.01 pM ~ 約 1 nM、例えば約 1 pM ~ 約 500 pM、例えば約 100 pM ~ 約 400 pM、例えば約 250 pM ~ 約 370 pM の結合親和性で、一次活性化ヒト CD4⁺ T 細胞上に発現されるヒト OX40 に結合可能である。例えば、ヒト化抗 OX40 抗体又はその抗原結合断片は、すべてフローサイトメトリーにより測定したときに、約 0.1 pM、約 0.5 pM、約 1 pM、約 10 pM、約 50 pM、約 100 pM、約 150 pM、約 200 pM、約 250 pM、約 275 pM、約 300 pM、約 325 pM、約 350 pM、約 370 pM、約 400 pM、約 425 pM、約 450 pM、約 475 pM、約 500 pM、約 550 pM、約 600 pM、約 650 pM、約 700 pM、約 750 pM、又は約 1 nM の結合親和性で、一次活性化ヒト CD4⁺ T 細胞上に発現されるヒト OX40 に結合可能である。ある特定の態様では、本明細書に提供されるヒト化抗 OX40 抗体又はその抗原結合断片は、約 312 pM の結合親

40

50

和性で一次活性化ヒトCD4⁺T細胞上に発現されるヒトOX40に結合可能である。結合親和性は、いくつかの異なる方法及び/又は装置により測定可能であり、当業者によく理解されているように、相対結合親和性は、方法又は装置に依存して異なり得る。

【0109】

本明細書に提供されるヒト化抗OX40抗体又はその抗原結合断片は、細胞例えば一次活性化ヒトCD4⁺T細胞の表面上のOX40分子の一部又は全部を占有して架橋することが可能である。ある特定の態様では、本明細書に提供されるヒト化抗OX40抗体又はその抗原結合断片は、フローサイトメトリーにより測定したときに、約0.01pM～約1nM、例えば約0.1pM～約500pM、例えば約1pM～約200pM、例えば約10pM～約100pM、例えば約50pM～約100pM、例えば約63pM～約93pM、例えば約1pM、約10pM、約20pM、約30pM、約40pM、約50pM、約60pM、約70pM、約78pM、約80pM、約90pM、約100pM、又は約150pMの濃度で、一次活性化ヒトCD4⁺T細胞上に発現されるヒトOX40に結合可能であり、且つ一次活性化ヒトCD4⁺T細胞上で20%のレセプター占有率を達成可能である(EC₂₀)。ある特定の態様では、本明細書に提供されるヒト化抗OX40抗体又はその抗原結合断片は、フローサイトメトリーにより測定したときに約78pMの濃度で一次活性化ヒトCD4⁺T細胞上で20%のレセプター占有率を達成可能である(EC₂₀)。ある特定の態様では、本明細書に提供されるヒト化抗OX40抗体又はその抗原結合断片は、すべてフローサイトメトリーにより測定したときに、約0.01pM～約1nM、例えば約1pM～約500pM、例えば約100pM～約400pM、例えば約250pM～約370pM、例えば約100pM、約150pM、約200pM、約250pM、約275pM、約300pM、約325pM、約350pM、約370pM、約400pM、約425pM、約450pM、約475pM、又は約500pMの濃度で、一次活性化ヒトCD4⁺T細胞上に発現されるヒトOX40に結合可能であり、且つ一次活性化ヒトCD4⁺T細胞上で50%のレセプター占有率を達成可能である(EC₅₀)。ある特定の態様では、本明細書に提供されるヒト化抗OX40抗体又はその抗原結合断片は、フローサイトメトリーにより測定したときに約312pMの濃度で一次活性化ヒトCD4⁺T細胞上で50%のレセプター占有率を達成可能である(EC₅₀)。ある特定の態様では、ヒト化抗OX40抗体又はその抗原結合断片は、フローサイトメトリーにより測定したときに、約100pM～約100nM、例えば約500pM～約10nM、例えば約1nM～約500nM、例えば約2nM～約4nM、例えば約1nM、約2nM、約3nM、約4nM、又は約5nMの濃度で、一次活性化ヒトCD4⁺T細胞上に発現されるヒトOX40に結合可能であり、且つ一次活性化ヒトCD4⁺T細胞上で90%のレセプター占有率を達成可能である(EC₉₀)。ある特定の態様では、本明細書に提供されるヒト化抗OX40抗体又はその抗原結合断片は、フローサイトメトリーにより測定したときに約2290pM～約3330pM、例えば約2810pMの濃度で一次活性化ヒトCD4⁺T細胞上で90%のレセプター占有率を達成可能である(EC₉₀)。

【0110】

ある特定の態様では、本明細書に提供されるヒト化抗OX40抗体又はその抗原結合断片は、フローサイトメトリーにより測定したときに約250pM～約600pM、例えば約424pMの結合親和性でOX40過剰発現ジャーカット細胞上に発現されるヒトOX40に結合可能である。

【0111】

ある特定の態様では、ヒト化抗OX40抗体又はその抗原結合断片は、OX40過剰発現ジャーカット細胞上に発現されるヒトOX40に結合可能であり、フローサイトメトリーにより測定したときに約60～約150pMの濃度のEC₂₀、約250～約600pMの濃度のEC₅₀、及び約2260～約4390pMの濃度のEC₉₀を達成可能である。ある特定の態様では、本明細書に提供されるヒト化抗OX40抗体又はその抗原結合断片は、OX40過剰発現ジャーカット細胞上に発現されるヒトOX40に結合可能であり、フローサイトメトリーにより測定したときに約106pMの濃度のEC₂₀、約42

4 p M の濃度の E C ₅₀、及び約 3 8 2 0 p M の濃度の E C ₉₀ を達成が可能である。

【 0 1 1 2 】

別の例では、本明細書に提供されるヒト化抗 O X 4 0 抗体又はその抗原結合断片は、フローサイトメトリーにより測定したときに約 3 4 0 p M ~ 約 8 2 0 p M、例えば約 5 8 0 p M の結合親和性で一次活性化カニクイザル C D 4 ⁺ T 細胞上に発現されるカニクイザル O X 4 0 に結合可能である。別の例では、本明細書に提供されるヒト化抗 O X 4 0 抗体又はその抗原結合断片は、フローサイトメトリーにより測定したときに約 1 3 0 p M ~ 約 6 0 0 p M、例えば約 3 7 0 p M の結合親和性で一次活性化アカゲザル C D 4 ⁺ T 細胞上に発現されるアカゲザル O X 4 0 に結合可能である。

【 0 1 1 3 】

ある特定の態様では、本明細書に提供されるヒト化抗 O X 4 0 抗体又はその抗原結合断片は、プレートベースのアッセイで活性化 C D 4 ⁺ T 細胞の用量依存性増殖を誘導可能である。例えば、本明細書に提供されるヒト化抗 O X 4 0 抗体又はその抗原結合断片、例えば O X 4 0 m A b 2 4 の i n v i t r o アッセイで、すべてフローサイトメトリーにより測定したときに、約 1 4 p M ~ 約 2 8 p M、例えば約 2 1 p M の抗体濃度で 2 0 % 最大増殖反応を一次活性化ヒト C D 4 ⁺ T 細胞で達成可能であり (E C ₂₀)、約 0 . 3 p M ~ 約 1 3 0 p M、例えば約 2 8 p M の抗体濃度で 5 0 % 最大増殖反応を一次活性化ヒト C D 4 ⁺ T 細胞で達成することが可能であり (E C ₅₀)、且つ約 5 0 p M ~ 約 9 0 p M、例えば約 7 2 p M の抗体濃度で 9 0 % 最大増殖反応を一次活性化ヒト C D 4 ⁺ T 細胞で達成可能である (E C ₉₀)。

【 0 1 1 4 】

ある特定の態様では、本明細書に提供されるヒト化抗 O X 4 0 抗体又はその抗原結合断片は、活性化 C D 4 ⁺ T 細胞、例えば、ヒト一次活性化 C D 4 ⁺ T 細胞からの用量依存性サイトカイン放出を誘導可能である。ある特定の態様では、放出サイトカインは、I F N γ 、T N F α 、I L - 5、I L - 1 0、I L - 2、I L - 4、I L - 1 3、I L - 8、I L - 1 2 p 7 0、I L - 1 β 、又はそれらの任意の組合せである。ある特定の態様では、サイトカインは、I F N γ 、T N F α 、I L - 5、I L - 1 0、I L - 1 3、又はそれらの任意の組合せである。同様に、本明細書に提供されるヒト化抗 O X 4 0 抗体又はその抗原結合断片は、一次活性化カニクイザル C D 4 ⁺ T 細胞及び一次活性化アカゲザル C D 4 ⁺ T 細胞で C D 4 ⁺ T 細胞増殖及びサイトカイン放出を達成可能である。

【 0 1 1 5 】

そのほかの態様では、本明細書に提供されるヒト化抗 O X 4 0 抗体又はその抗原結合断片は、F c γ R 発現細胞の存在下で O X 4 0 発現 T 細胞の N F κ B 経路を活性化可能である。例えば、本明細書に提供されるヒト化抗 O X 4 0 抗体又はその抗原結合断片は、N F κ B シグナル伝達経路の刺激に反応してルシフェラーゼを産生する O X 4 0 発現ジャーカット N F κ B ルシフェラーゼレポーター細胞の N F κ B 経路を活性化可能である。他の選択肢として、本明細書に提供されるヒト化抗 O X 4 0 抗体又はその抗原結合断片は、ヒト O X 4 0、カニクイザル O X 4 0、又はアカゲザル O X 4 0 を発現する細胞の N F κ B 経路を活性化可能である。

【 0 1 1 6 】

さらに別の態様では、本明細書に提供されるヒト化抗 O X 4 0 抗体又はその抗原結合断片は、癌治療が必要とされる被験体に有効用量で投与した場合、例えば、腫瘍成長を遅らせたり、腫瘍成長を停止させたり、又は存在する腫瘍のサイズを低減したりすることにより、癌治療を促進可能である。ある特定の態様では、癌治療の促進は T 細胞の存在下で達成可能である。ある特定の態様では、本明細書に提供されるヒト化抗 O X 4 0 抗体又はその抗原結合断片は、治療が必要とされる被験体に有効用量で投与した場合、アイソタイプマッチ対照抗体の投与と比較して、腫瘍成長を少なくとも 1 0 %、少なくとも 2 0 %、少なくとも 3 0 %、少なくとも 4 0 %、少なくとも 5 0 %、少なくとも 6 0 %、又は少なくとも 7 0 % 低減可能である。

【 0 1 1 7 】

このほかのさらなる態様では、本明細書に提供されるヒト化抗 O X 4 0 抗体又はその抗原結合断片は、O X 4 0 への結合により活性化 O X 4 0 発現 T 細胞の増殖を誘導可能であり、それと同時に、O X 4 0 発現 T 細胞、例えば、活性化 C D 4 ⁺ T 細胞、活性化 C D 8 ⁺ T 細胞、及び / 又は調節性 T 細胞に対して補体依存性又は抗体依存性の細胞傷害性を惹起することが可能である。さらに、ある特定の態様では、本明細書に提供されるヒト化抗 O X 4 0 抗体又はその抗原結合断片は、O X 4 0 への結合により O X 4 0 発現 T 細胞、例えば、活性化 O X 4 0 発現 C D 4 ⁺、C D 8 ⁺ T 細胞、及び / 又は調節性 T 細胞の増殖を誘導可能であり、それと同時に C 1 q に結合可能であるか、又は O X 4 0 発現 T 細胞、例えば、活性化 C D 4 ⁺ T 細胞、活性化 C D 8 ⁺ T 細胞、及び / 又は調節性 T 細胞の N K 細胞媒介抗体依存性細胞傷害性を惹起することが可能である。

10

【 0 1 1 8 】

ある特定の態様では、本開示は、ネズミ重鎖定常領域に装着されたヒト化 V H とネズミ軽鎖定常領域に装着されたヒト化 V L とを含む抗 O X 4 0 抗体又はその断片を提供する。ただし、重鎖は配列番号 8 1 を含み、且つ軽鎖は配列番号 8 3 を含む。ある特定の態様では、重鎖定常領域は、例えば、ネズミ I g G 1 定常領域であり得る。ある特定の態様では、軽鎖定常領域は、例えば、ネズミ κ 定常領域であり得る。

【 0 1 1 9 】

ある特定の態様では、本開示は、ラット V H 及びラット V L を含むラット抗マウス O X 4 0 抗体又はその抗原結合断片を提供する。ただし、V H はアミノ酸配列の配列番号 8 5 を含み、且つ V L はアミノ酸配列の配列番号 8 8 を含む。ある特定の態様では、この抗体又はその断片は、V L の C 末端に融合された軽鎖定常領域又はその断片をさらに含む。軽鎖定常領域は、例えば、ネズミ κ 定常領域であり得る。ある特定の態様では、この抗体又はその断片は、V H の C 末端に融合された重鎖定常領域又はその断片をさらに含む。重鎖定常領域は、例えば、ネズミ I g G 2 a 定常領域であり得る。ある特定の態様では、このラット抗マウス O X 4 0 抗体は、重鎖アミノ酸配列の配列番号 8 6 及び軽鎖アミノ酸配列の配列番号 8 9 を含む。ある特定の態様では、本明細書に提供されるラット抗マウス O X 4 0 抗体又はその断片は、マウス O X 4 0 に特異的に結合可能である。ある特定の態様では、本明細書に提供されるラット抗マウス O X 4 0 抗体又はその断片を有効用量でマウスに投与することにより、マウスにおいてマウス癌細胞系成長を阻害可能である。

20

【 0 1 2 0 】

ある特定の態様では、本明細書に提供されるラット抗マウス O X 4 0 抗体断片は、例えば、F v 断片、F a b 断片、F (a b ') 2 断片、F a b ' 断片、d s F v 断片、s c F v 断片、若しくは s c (F v) 2 断片、又はそれらの任意の組合せであり得る。

30

【 0 1 2 1 】

ヒト化抗 O X 4 0 抗体、断片、又はサブユニットをコードするポリヌクレオチド

本開示は、ヒト化抗 O X 4 0 抗体又はその抗原結合断片をコードする核酸配列を含むポリヌクレオチドを提供する。例えば、本開示は、ヒト化抗 O X 4 0 抗体若しくはヒト化抗 O X 4 0 抗体のサブユニットをコードするか又はかかる抗体の抗原結合断片をコードする核酸配列を含む 1 種のポリヌクレオチド又は 2 種以上のポリヌクレオチドを提供する。本開示のポリヌクレオチドは、R N A 形又は D N A 形であり得る。D N A は、c D N A、ゲノム D N A 例えば修飾ゲノム D N A、及び合成 D N A を含み、且つ二本鎖又は一本鎖であり得るとともに、一本鎖の場合、コード鎖又は非コード (アンチセンス) 鎖であり得る。

40

【 0 1 2 2 】

ある特定の態様では、ポリヌクレオチドは単離し得る。ある特定の態様では、ポリヌクレオチドは実質的に純粋であり得る。ある特定の態様では、ポリヌクレオチドは天然に存在しえない。ある特定の態様では、ポリヌクレオチドは c D N A であり得るか又は c D N A に由来し得る。ある特定の態様では、ポリヌクレオチドは組換え産生し得る。ある特定の態様では、ポリヌクレオチドは、宿主細胞からのポリペプチドの発現及び分泌を支援するポリヌクレオチド (例えば、細胞からのポリペプチドの輸送を制御するための分泌配列として機能するリーダー配列) に同一のリーディングフレームで融合された、成熟ポリペ

50

プチドに対するコード配列を含み得る。リーダー配列を有するポリペプチドはプレタンパク質であり、リーダー配列が宿主細胞により切断されてポリペプチドの成熟形を形成可能である。

【0123】

ある特定の態様では、本開示は、本明細書に提供されるヒト化抗OX40抗体若しくはその抗原結合断片又は本明細書に提供されるヒト化抗OX40抗体若しくはその抗原結合断片のポリペプチドサブユニットをコードする核酸を含むポリヌクレオチドを提供する。

【0124】

また、1つ又は少数の欠失、付加、及び/又は置換を含む核酸配列を含むポリヌクレオチドが提供される。かかる変化は隣接可能であるか、又は核酸中の様々な位置に分布可能である。実質的に同一の核酸配列は、例えば、1又は2又は3又は4又はさらにはそれ以上のヌクレオチド欠失、付加、及び/又は置換を有し得る。ある特定の態様では、修飾(「突然変異」)されるが実質的に同一のポリペプチドが核酸の発現時に産生されるように、1つ以上の欠失、付加、及び/又は置換は、ポリヌクレオチド配列によりコードされるリーディングフレームを改変しない。

【0125】

ある特定の態様では、本開示は、抗体VLをコードする核酸を含む単離されたポリヌクレオチドを提供する。ただし、VLは、参照アミノ酸配列の配列番号29又は配列番号32に対して少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、又は100%同一であるアミノ酸配列を含む。ある特定の態様では、ポリヌクレオチドは、抗体軽鎖をコードし、且つ参照核酸配列の配列番号31に対して少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、又は100%同一であるヌクレオチド配列を含む。

【0126】

ある特定の態様では、本開示は、抗体VLをコードする核酸を含む単離されたポリヌクレオチドを提供する。ただし、VLは配列番号29又は配列番号32を含む。

【0127】

本開示は、抗体VHをコードする核酸を含む単離されたポリヌクレオチドをさらに提供する。ただし、VHは、VHCDR1アミノ酸配列の配列番号8、VHCDR2アミノ酸配列の配列番号14、配列番号15、若しくは配列番号16、及びVHCDR3アミノ酸配列の配列番号25、配列番号26、若しくは配列番号27と同一であるか又はVH-CDRの1つ以上における8、7、6、5、4、3、2、若しくは1つの単一アミノ酸置換、欠失、若しくは挿入を除いて同一であるVH-CDR1、VH-CDR2、及びVH-CDR3アミノ酸配列を含む。

【0128】

本開示は、抗体VHをコードする核酸を含む単離されたポリヌクレオチドをさらに提供する。ただし、VHは、式：

HFW1-HCDR1-HFW2-HCDR2-HFW3-HCDR3-HFW4、
を有するアミノ酸配列を含む。式中、HFW1は配列番号6又は配列番号7であり、HCDR1は配列番号8であり、HFW2は配列番号9であり、HCDR2は配列番号14、配列番号15、又は配列番号16であり、HFW3は配列番号17であり、HCDR3は配列番号25、配列番号26、又は配列番号27であり、且つHFW4は配列番号28である。ある特定の態様では、HFW2のアミノ酸配列は、配列番号10、配列番号11、配列番号12、又は配列番号13である。ある特定の態様では、HFW3のアミノ酸配列は、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、又は配列番号24である。

【0129】

さらに、本開示は、抗体VHをコードする核酸を含む単離されたポリヌクレオチドを提供する。ただし、VHは、参照アミノ酸配列の配列番号33、配列番号35、配列番号37、配列番号39、配列番号41、配列番号43、配列番号45、配列番号47、配列番号49、配列番号51、配列番号53、配列番号55、配列番号57、配列番号59、配

10

20

30

40

50

列番号 6 1、配列番号 6 3、配列番号 6 5、又は配列番号 6 7 に対して少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、又は 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む。ある特定の態様では、ポリヌクレオチドは、参照核酸配列の配列番号 3 4、配列番号 3 6、配列番号 3 8、配列番号 4 0、配列番号 4 2、配列番号 4 4、配列番号 4 6、配列番号 4 8、配列番号 5 0、配列番号 5 2、配列番号 5 4、配列番号 5 6、配列番号 5 8、配列番号 6 0、配列番号 6 2、配列番号 6 4、配列番号 6 6、又は配列番号 6 8 に対して少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、又は 1 0 0 % 同一であるヌクレオチド配列を含む。

【0130】

ある特定の態様では、本開示は、配列番号 6 0 の核酸、配列番号 3 1 の核酸、配列番号 7 2 の核酸、又はそれらの任意の組合せを含むポリヌクレオチドを提供する。

10

【0131】

さらに、以上に記載のポリヌクレオチドを含むベクターが提供される。好適なベクターは本明細書の他の箇所に記載されており、当業者に公知である。

【0132】

ある特定の態様では、本開示は、以上に記載のポリヌクレオチド又はベクターを含み、任意選択的に 1 種以上の担体、希釈剤、賦形剤、又は他の添加剤をさらに含む組成物例えば医薬組成物を提供する。

【0133】

ある特定の態様では、本開示は、V H をコードする核酸を含むポリヌクレオチドと V L をコードする核酸を含むポリヌクレオチドとを含むポリヌクレオチド組成物を提供する。この態様によれば、V L 及び V H は、参照アミノ酸配列の配列番号 2 9 又は配列番号 3 2 に対して少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、又は 1 0 0 % 同一である V L アミノ酸配列と、(a) V H C D R 1 アミノ酸配列の配列番号 8、V H C D R 2 アミノ酸配列の配列番号 1 4、配列番号 1 5、若しくは配列番号 1 6、及び V H C D R 3 アミノ酸配列の配列番号 2 5、配列番号 2 6、若しくは配列番号 2 7 と同一であるか又は V H - C D R の 1 つ以上における 8、7、6、5、4、3、2、若しくは 1 つの単一アミノ酸置換、欠失、若しくは挿入を除いて同一である V H - C D R 1、V H - C D R 2、及び V H - C D R 3 アミノ酸配列、(b) 式：

20

H F W 1 - H C D R 1 - H F W 2 - H C D R 2 - H F W 3 - H C D R 3 - H F W 4、
(式中、H F W 1 は配列番号 6 又は配列番号 7 であり、H C D R 1 は配列番号 8 であり、H F W 2 は配列番号 9 であり、H C D R 2 は配列番号 1 4、配列番号 1 5、又は配列番号 1 6 であり、H F W 3 は配列番号 1 7 であり、H C D R 3 は配列番号 2 5、配列番号 2 6、又は配列番号 2 7 であり、且つ H F W 4 は配列番号 2 8 である)

30

を有するアミノ酸配列、又は (c) 参照アミノ酸配列の配列番号 3 3、配列番号 3 5、配列番号 3 7、配列番号 3 9、配列番号 4 1、配列番号 4 3、配列番号 4 5、配列番号 4 7、配列番号 4 9、配列番号 5 1、配列番号 5 3、配列番号 5 5、配列番号 5 7、配列番号 5 9、配列番号 6 1、配列番号 6 3、配列番号 6 5、又は配列番号 6 7 に対して少なくとも 7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、又は 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列、を含む V H と、を一体的に含み得る。V H (b) では、H F W 2 のアミノ酸配列は、配列番号 1 0、配列番号 1 1、配列番号 1 2、若しくは配列番号 1 3 であり得るとともに、且つ / 又は H F W 3 のアミノ酸配列は、配列番号 1 8、配列番号 1 9、配列番号 2 0、配列番号 2 1、配列番号 2 2、配列番号 2 3、若しくは配列番号 2 4 であり得る。

40

【0134】

以上に記載のポリヌクレオチド組成物では、V H をコードする核酸を含むポリヌクレオチド及び V L をコードする核酸を含むポリヌクレオチドは、単一のベクターに存在可能であるか、又は個別の同一でないベクターに存在可能である。それに応じて、本開示は、以上に記載のポリヌクレオチド組成物を含む 1 種以上のベクターを提供する。

【0135】

いくつかの場合には、以上に記載の V H 及び V L をコードするポリヌクレオチド組成物

50

は、OX40、例えば、ヒトOX40、カニクイザルOX40、及びノ又はアカゲザルOX40に特異的に結合可能なヒト化抗体又はその抗原結合断片をコード可能である。

【0136】

ある特定の態様では、本開示は、ネズミ重鎖定常領域に装着されたヒト化VHとネズミ軽鎖定常領域に装着されたヒト化VLとを含む抗OX40抗体又はその断片をコードする核酸を含む単離されたポリヌクレオチドを提供する。ただし、重鎖は配列番号81を含み、且つ軽鎖は配列番号83を含む。ある特定の態様では、重鎖定常領域は、例えば、ネズミIgG1定常領域であり得る。ある特定の態様では、軽鎖定常領域は、例えば、ネズミκ定常領域であり得る。

【0137】

ある特定の態様では、本開示は、ラットVH及びラットVLを含むラット抗マウスOX40抗体又はその抗原結合断片をコードする核酸を含む単離されたポリヌクレオチドを提供する。ただし、VHはアミノ酸配列の配列番号85を含み、且つVLはアミノ酸配列の配列番号88を含む。ある特定の態様では、この抗体又はその断片は、VLのC末端に融合された軽鎖定常領域又はその断片をさらに含む。軽鎖定常領域は、例えば、ネズミκ定常領域であり得る。ある特定の態様では、この抗体又はその断片は、VHのC末端に融合された重鎖定常領域又はその断片をさらに含む。重鎖定常領域は、例えば、ネズミIgG2a定常領域であり得る。ある特定の態様では、このラット抗マウスOX40抗体は、重鎖アミノ酸配列の配列番号86及び軽鎖アミノ酸配列の配列番号89を含む。ある特定の態様では、本明細書に提供されるラット抗マウスOX40抗体又はその断片は、マウスOX40に特異的に結合可能である。ある特定の態様では、本明細書に提供されるラット抗マウスOX40抗体又はその断片を有効用量でマウスに投与することにより、マウスにおいてマウス癌細胞系成長を阻害可能である。

【0138】

本開示は、以上に提供されるポリヌクレオチド、ポリヌクレオチド組成物、又はベクターを含む宿主細胞をさらに提供する。ただし、宿主細胞は、いくつかの場合には、OX40、例えば、ヒトOX40、カニクイザルOX40、又はアカゲザルOX40に特異的に結合する抗体又はその抗原結合断片を発現可能である。かかる宿主細胞は、本明細書に提供される抗体又はその抗原結合断片の作製方法に利用可能である。この方法は、(a)宿主細胞を培養する工程と、(b)発現された抗体又はその抗原結合断片を宿主細胞から単離する工程と、を含む。

【0139】

ポリヌクレオチド変異体も提供される。ポリヌクレオチド変異体は、コード領域、非コード領域、又はその両方に改変を含み得る。いくつかの態様では、ポリヌクレオチド変異体は、サイレント置換、付加、又は欠失を生じる改変を含むが、コードポリペプチドの性質や活性を改変しない。いくつかの態様では、ポリヌクレオチド変異体は、遺伝暗号の縮重に基づいてサイレント置換により産生される。ポリヌクレオチド変異体は、様々な理由で、例えば、特定の宿主でコドン発現を最適化するために(ヒトmRNAのコドンが大腸菌(E. coli)などの細菌宿主によるコドンに変化させるために)産生され得る。本明細書に記載のポリヌクレオチドを含むベクター及び細胞も提供される。

【0140】

いくつかの態様では、ヒト化抗OX40抗体又はその抗原結合断片をコードするDNA配列は、オリゴヌクレオチドシンセサイザーを用いて化学合成により構築可能である。かかるオリゴヌクレオチドは、所望のポリペプチドのアミノ酸配列と、対象の組換えポリペプチドを産生する宿主細胞に有利なコドンの選択と、に基づいて設計可能である。標準的方法を適用して、対象の単離ポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチド配列を合成可能である。例えば、完全アミノ酸配列を用いて逆翻訳遺伝子を構築可能である。さらに、特定の単離ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含有するDNAオリゴマーを合成可能である。例えば、所望のポリペプチドの一部をコードするいくつかの小さなオリゴヌクレオチドを合成してからライゲートすることが可能である。個別のオリゴヌクレオ

10

20

30

40

50

チドは、相補的集合のために 5' 又は 3' オーバーハングを含み得る。

【0141】

集合させた後（合成、部位指向突然変異誘発、又は別の方法により）、対象の特定の単離ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を発現ベクターに挿入し、所望の宿主でのタンパク質発現に適した発現制御配列に作動的に連結可能である。適正な集合は、例えば、ヌクレオチド配列決定、制限切断マッピング、及び/又は好適な宿主での生物学的活性ポリペプチドの発現により確認可能である。宿主でトランスフェクト遺伝子の高い発現レベルを得るために、選択された発現宿主で機能する転写・翻訳発現制御配列に遺伝子を作動的に連結したり又は関連付けしたりすることが可能である。

【0142】

ある特定の態様では、組換え発現ベクターは、ヒト化抗 OX40 抗体又はその抗原結合断片をコードする DNA の増幅及び発現のために使用される。組換え発現ベクターは、哺乳動物、微生物、ウイルス、又は昆虫の遺伝子に由来する好適な転写調節エレメント又は翻訳調節エレメントに作動的に連結された、ヒト化抗 OX40 抗体又はその抗原結合断片のポリペプチド鎖をコードする合成 DNA 断片又は cDNA 由来 DNA 断片を有する複製可能な DNA 構築物である。一例では、転写ユニットは、以下に詳細に記載されるように、（1）遺伝子エレメント又は遺伝子発現で調節的役割を担うエレメント、例えば、転写プロモーター又はエンハンサーと、（2）構造配列又は mRNA に転写されてタンパク質に翻訳されるコード配列と、（3）適切な転写及び翻訳の開始配列及び終止配列と、の集合を含み得る。かかる調節エレメントは、転写を制御するオペレーター配列を含み得る。宿主での複製能力、例えば、複製起点により付与される複製能力、及びトランスフォーマントの認識を容易にする選択遺伝子は、追加的に組み込み可能である。互いに機能的に関連付けられている場合、DNA 領域は作動的に連結されている。例えば、ポリペプチドの分泌に関与する前駆体として発現されるのであれば、シグナルペプチド（分泌リーダー）の DNA はポリペプチドの DNA に作動的に連結されており、配列の転写を制御するのであれば、プロモーターはコード配列に作動的に連結されており、又は翻訳を可能にするように配置されているのであれば、リボソーム結合部位はコード配列に作動的に連結されている。酵母発現系に使用することが意図される構造エレメントは、宿主細胞による翻訳タンパク質の細胞外分泌を可能にするリーダー配列を含む。他の選択肢として、組換えタンパク質がリーダー配列や輸送配列を含まずに発現される場合、タンパク質は N 末端メチオニンを含み得る。このメチオニンは、任意選択的に、発現された組換えタンパク質から後続的に切り離されて最終生成物を提供可能である。

【0143】

発現制御配列及び発現ベクターの選択は、宿主の選択に依存するであろう。多種多様な発現宿主/ベクターの組合せを利用可能である。真核宿主に有用な発現ベクターとしては、例えば、SV40、ウシパピローマウイルス、アデノウイルス、及びサイトメガロウイルスに由来する発現制御配列を含むベクターが挙げられる。細菌宿主に有用な発現ベクターとしては、公知の細菌プラスミド、例えば、pCR1、pBR322、pMB9、及びそれらの誘導体を含めて大腸菌（*E. coli*）由来のプラスミド、より広範な宿主域のプラスミド、例えば、M13 及び糸状一本鎖 DNA ファージが挙げられる。

【0144】

ヒト化抗 OX40 抗体又はその抗原結合断片を発現するのに好適な宿主細胞としては、適切なプロモーターの制御下にある原核細胞、酵母細胞、昆虫細胞、又は高等真核細胞が挙げられる。原核生物としては、グラム陰性又はグラム陽性の生物、例えば、大腸菌（*E. coli*）又は桿菌が挙げられる。高等真核細胞としては、以下に記載の哺乳動物起源の樹立細胞系が挙げられる。細胞フリー翻訳システムを利用することも可能である。抗体産生を含めてタンパク質産生の方法に関する追加情報は、例えば、米国特許出願公開第 2008/0187954 号明細書、米国特許第 6,413,746 号明細書及び同第 6,660,501 号明細書、並びに国際公開第 04009823 号パンフレット（それぞれその全体が本出願をもって参照により本明細書に組み込まれる）に見いだし得る。

【 0 1 4 5 】

種々の哺乳動物又は昆虫の細胞培養システムを利用してヒト化抗 O X 4 0 抗体又はその抗原結合断片を発現させることも可能である。タンパク質が一般に適正にフォールディングされ、適切に修飾され、且つ完全に機能することから、哺乳動物細胞での組換えタンパク質の発現を行うことが可能である。好適な哺乳動物宿主細胞系の例としては、H E K - 2 9 3 及び H E K - 2 9 3 T、G l u z m a n (C e l l 2 3 : 1 7 5 , 1 9 8 1) に記載のサル腎細胞の C O S - 7 系、並びに例えば L 細胞、C 1 2 7、3 T 3、チャイニーズハムスター卵巣 (C H O)、H e L a、及び B H K の細胞系をはじめとする他の細胞系が挙げられる。哺乳動物発現ベクターは、非転写エレメント、例えば、複製起点、発現される遺伝子に連結された好適なプロモーター及びエンハンサー、並びに他の 5 ' 又は 3 ' フランキング非転写配列、さらには 5 ' 又は 3 ' 非翻訳配列、例えば、リボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライスドナー部位及びスプライスアクセプター部位、並びに転写終止配列を含み得る。昆虫細胞での異種タンパク質の産生に供されるバキュロウイルスシステムは、L u c k o w a n d S u m m e r s , B i o T e c h n o l o g y 6 : 4 7 (1 9 8 8) にレビューされている。

10

【 0 1 4 6 】

トランスフォーム宿主により産生されたヒト化抗 O X 4 0 抗体又はその抗原結合断片は、任意の好適な方法に従って精製可能である。かかる標準的方法としては、クロマトグラフィー法 (例えば、イオン交換、アフィニティー、及びサイズカラムクロマトグラフィー法)、遠心分離法、溶解度差法、又は任意の他の標準的タンパク質精製技術による方法が挙げられる。適切なアフィニティークラムに通して容易に精製できるように、ヘキサヒスチジン、マルトース結合ドメイン、インフルエンザコート配列、グルタチオン - S - トランスフェラーゼなどのアフィニータグをタンパク質に装着可能である。単離タンパク質は、タンパク質分解、核磁気共鳴、X 線結晶解析などの技術を用いて物理的に特徴付けることも可能である。

20

【 0 1 4 7 】

例えば、培養培地中に組換えタンパク質を分泌するシステムの上清は、最初に、市販のタンパク質濃縮フィルター、例えば、A m i c o n 又は M i l l i p o r e P e l l i c o n 限外濾過ユニットを用いて濃縮可能である。濃縮工程に続いて、濃縮物を好適な精製マトリックスに適用可能である。他の選択肢として、陰イオン交換樹脂、例えば、ペンダントジエチルアミノエチル (D E A E) 基を有するマトリックス又は基材を利用可能である。マトリックスは、アクリルアミド、アガロース、デキストラン、セルロース、又はタンパク質精製に一般に利用される他のタイプであり得る。他の選択肢として、陽イオン交換工程を利用可能である。好適な陽イオン交換体としては、スルホプロピル基又はカルボキシメチル基を含む種々の不溶性マトリックスが挙げられる。最後に、ヒト化抗 O X 4 0 抗体又はその抗原結合断片をさらに精製するために、疎水性 R P - H P L C 媒体、例えば、ペンダントメチル基又は他の脂肪族基を有するシリカゲルを利用した 1 つ以上の逆相高性能液体クロマトグラフィー (R P - H P L C) 工程を利用可能である。均一な組換えタンパク質を提供するために、以上の精製工程の一部又は全部を種々の組合せで利用可能である。

30

40

【 0 1 4 8 】

細菌培養で産生されたヒト化抗 O X 4 0 抗体又はその抗原結合断片は、例えば、細胞ペレットからの初期抽出、1 回以上の濃縮、塩析、水性イオン交換、又はサイズ排除クロマトグラフィーの工程により、単離可能である。最終精製工程のために高性能液体クロマトグラフィー (H P L C) を使用可能である。組換えタンパク質の発現に利用された微生物細胞は、凍結 - 解凍サイクル処理、超音波処理、機械的破碎、又は細胞溶解剤の使用をはじめとする任意の便利な方法により破碎可能である。

【 0 1 4 9 】

抗体及び他のタンパク質を精製するための当該技術分野で公知の方法としては、例えば、米国特許出願公開第 2 0 0 8 / 0 3 1 2 4 2 5 号明細書、同第 2 0 0 8 / 0 1 7 7 0 4

50

8号明細書、及び同第2009/0187005号明細書（それぞれその全体が本出願をもって参照により本明細書に組み込まれる）に記載のものも挙げられる。

【0150】

医薬組成物及び投与方法

本明細書に提供されるヒト化抗OX40抗体又はその抗原結合断片を調製する方法及び必要とされる被験体に、例えば、癌患者で免疫反応を増強するために、例えば、腫瘍成長を阻害又は低減するために投与方法は、周知であるか又は当業者であれば容易に決定可能である。ヒト化抗OX40抗体又はその抗原結合断片の投与経路は、例えば、経口、非経口、吸入、又は局所であり得る。本明細書で用いられる非経口という用語は、例えば、静脈内、動脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、経直腸、又は経膈の投与を含む。これらの投与形態はすべて好適な形態として明確に企図されるが、投与形態の別の例は、とくに静脈内又は動脈内の注射又は点滴に供される注射用の溶液であろう。通常、好適な医薬組成物は、限定されるものではないが、緩衝液（例えば、酢酸緩衝液、リン酸緩衝液、又はクエン酸緩衝液）、界面活性剤（例えば、ポリソルベート）、安定化剤（例えば、ヒトアルブミン）などを含む。本明細書に記載の教示に適合可能な他の方法では、本明細書に提供されるヒト化抗OX40抗体又はその抗原結合断片を有害な細胞集団部位に直接送達することにより治療剤への疾患組織の暴露を増加させることが可能である。

10

【0151】

本明細書に提供されるある特定の医薬組成物は、例えば、カプセル剤、錠剤、水性サスペンション剤、又は溶液剤をはじめとする許容可能な剤形で経口投与可能である。ある特定の医薬組成物は、鼻エアロゾル又は吸入による投与も可能である。かかる組成物は、ベンジルアルコール若しくは他の好適な保存剤、生物学的利用率を増強する吸収促進剤、及び/又は他の従来の可溶化剤若しくは分散剤を利用して、生理食塩水中の溶液として調製可能である。

20

【0152】

単回投与製剤を作製するために担体材料と組合せ可能なヒト化抗OX40抗体又はその抗原結合断片の量は、治療される被験体及び特定の投与モードに依存して異なるであろう。組成物は、単回用量、複数回用量として、又は確立された注入時間にわたり投与可能である。最適な所望の反応（例えば、治療反応又は予防反応）を提供するために、投与レジメンを調整することも可能である。

30

【0153】

「治療上有効な用量若しくは量」又は「有効な量」とは、治療される疾患又は病態を有する患者の治療に対して投与時に陽性治療反応を引き起こすヒト化抗OX40抗体又はその抗原結合断片の量であることが意図される。

【0154】

キット

本開示は、本明細書に記載のヒト化抗OX40抗体又はその抗原結合断片を含み且つ本明細書に記載の方法を行うために使用可能なキットをさらに提供する。ある特定の実施形態では、キットは、1つ以上の容器内に少なくとも1種の精製されたヒト化抗OX40抗体又はその抗原結合断片を含む。当該技術分野で周知の確立されたキット方式の1つに開示されたヒト化抗OX40抗体を容易に組み込み可能であることは、当業者であれば容易に分かるであろう。

40

【0155】

免疫アッセイ

ヒト化抗OX40抗体又はその抗原結合断片は、当該技術分野で公知の任意の方法により特異的及び/又は選択的結合に関してアッセイ可能である。使用可能な免疫アッセイとしては、限定されるものではないが、いくつかの例として、ウェスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、ELISA（酵素結合免疫吸着アッセイ）、蛍光フォーカスアッセイ（FFA）、「サンドイッチ」免疫アッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降素反応、ゲル内拡散沈降素反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体結合アッセイ、免疫ラジオメトリッ

50

クアッセイ、蛍光免疫アッセイなどの技術を用いた競合及び非競合アッセイシステムが挙げられる。かかるアッセイはルーチンで行われており、当該技術分野で周知である（例えば、Ausubel et al., eds, (1994) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, Inc., NY) Vol. 1 (その全体が参照により本明細書に組み込まれる)を参照のこと)。

【0156】

本明細書に提供されるヒト化抗OX40抗体の結合特性の決定に好適な方法及び試薬は、当該技術分野で公知であり及び／又は入手可能である。かかる速度論的分析用として設計された装置及びソフトウェアは市販されている（例えば、BIAcore（登録商標）、BIAevaluation（登録商標）software、GE Healthcare; KINEXA（登録商標）Software、Sapidyne Instruments）。

10

【0157】

免疫増強方法及び治療方法

活性化T細胞、例えば、活性化CD4⁺T細胞及び／又は活性化CD8⁺T細胞上のOX40のエンゲージによる被験体（例えば、ヒト被験体などの哺乳動物被験体）における抗原特異的免疫反応の増強は、抗原の活性化時又は活性化後に多種多様な方法を用いて達成可能である。最適な方法は、免疫反応の増強が望まれる抗原のタイプに主に依存するであろう。また、利用可能な種々の方法は、以下で考察される。どんな方法を選択するにせよ、ヒト化抗OX40抗体又はその抗原結合断片は、抗原によるT細胞のプライミング時又はその直後に被験体のT細胞に提示されるように被験体例えばヒト患者に投与可能である。

20

【0158】

ある特定の態様では、本開示は、ヒト化抗OX40抗体がT細胞、例えば、活性化CD4⁺T細胞及び／又は活性化CD8⁺T細胞の表面上のOX40に特異的に結合可能な条件下で、活性化T細胞、例えば、活性化CD4⁺T細胞及び／又は活性化CD8⁺T細胞をヒト化抗OX40抗体又はその抗原結合断片に接触させる工程を含む、活性化T細胞、例えば、活性化CD4⁺T細胞及び／又は活性化CD8⁺T細胞の生存又は増殖の促進方法を提供する。ある特定の態様では、接触はin vitroである。ある特定の態様では、接触はin vivoであり、例えば、治療が必要とされる被験体への有効用量のヒト化抗OX40抗体の投与を介する。ある特定の態様では、接触はT細胞活性化例えば抗原活性化と同時にを行うことが可能であり、ある特定の態様では、接触はT細胞活性化後に行うことが可能である。

30

【0159】

さらなる態様では、本開示は、ヒト化抗OX40抗体が活性化T細胞、例えば、活性化CD4⁺T細胞及び／又は活性化CD8⁺T細胞の表面上のOX40に特異的に結合可能な条件下で、活性化T細胞、例えば、活性化CD4⁺T細胞及び／又は活性化CD8⁺T細胞を本明細書に提供されるヒト化抗OX40抗体又はその抗原結合断片に接触させる工程を含む、活性化T細胞、例えば、活性化CD4⁺T細胞及び／又は活性化CD8⁺T細胞からのサイトカイン放出の誘導方法を提供する。ある特定の態様では、接触はin vitroである。ある特定の態様では、接触はin vivoであり、例えば、治療が必要とされる被験体への有効用量のヒト化抗OX40抗体の投与を介する。ある特定の態様では、接触はT細胞活性化例えば抗原活性化と同時にを行うことが可能であり、ある特定の態様では、接触はT細胞活性化後に行うことが可能である。ある特定の態様では、サイトカインは、IFN γ 、TNF α 、IL-5、IL-10、IL-2、IL-4、IL-13、IL-8、IL-12p70、IL-1 β 、又はそれらの任意の組合せであり得る。ある特定の態様では、サイトカインは、IFN γ 、TNF α 、IL-5、IL-10、IL-13、又はそれらの任意の組合せである。

40

【0160】

50

ある特定の態様では、活性化T細胞、例えば、活性化CD4⁺T細胞及び/又は活性化CD8⁺T細胞は、ヒトT細胞、カニクイザルT細胞、アカゲザルT細胞、又はそれらの組合せである。

【0161】

本開示は、ヒト化抗OX40抗体がT細胞の表面上のOX40に特異的に結合可能な条件下でT細胞を本明細書に提供されるヒト化抗OX40抗体に接触させる工程を含む、T細胞活性化の促進方法をさらに提供する。ある特定の態様では、接触は抗原例えば腫瘍抗原の存在下で行われる。ある特定の態様では、この方法は、ヒト化抗OX40抗体のFcドメインと、FcγRを発現する細胞、例えば、B細胞、単球、マクロファージ、骨髓樹状細胞若しくは形質細胞様樹状細胞、濾胞樹状細胞、ランゲルハンス細胞、内皮細胞、NK細胞、活性化T細胞、好中球、好酸球、血小板、マスト細胞、一次ヒト腫瘍若しくは腫瘍流入領域若しくは非流入領域リンパ節に由来するCD45⁺細胞、他の二次若しくは三次リンパ様構造に由来するCD45⁺細胞、又はそれらの組合せと、の相互作用をさらに含む。ある特定の態様では、T細胞活性化はNFκBシグナル伝達経路の刺激を介して測定可能である。ある特定の態様では、接触は*in vitro*である。ある特定の態様では、接触は*in vivo*であり、例えば、治療が必要とされる被験体への有効用量のヒト化抗OX40抗体の投与を介する。

10

【0162】

本開示は、有効量のヒト化抗OX40抗体若しくはその抗原結合断片又はヒト化抗OX40抗体を含む組成物若しくは製剤を治療が必要とされる被験体に投与する工程を含む、被験体における癌の治療方法をさらに提供する。ある特定の態様では、癌は固形腫瘍である。この方法によれば、ヒト化抗OX40抗体又は組成物の投与により腫瘍成長の阻害、腫瘍縮小の促進、又はその両方が可能である。ある特定の態様では、腫瘍成長阻害はT細胞の存在下で達成される。

20

【0163】

「癌」、「腫瘍」、「癌性」、及び「悪性」という用語は、典型的には無制御の細胞成長により特徴付けられる哺乳動物における生理学的状態を意味するか又は記述する。癌の例としては、限定されるものではないが、腺癌をはじめとする癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、黒色腫、肉腫、及び白血病が挙げられる。かかる癌のより特定の例としては、扁平上皮細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、胃腸癌、ホジキンリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫、脾癌、膠芽細胞腫、神経膠腫、頸癌、卵巣癌、肝癌腫や肝細胞腫などの肝癌、膀胱癌、乳癌（ホルモン媒介乳癌など、例えば、Innes et al. (2006) Br. J. Cancer 94: 1057-1065を参照のこと）、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、骨髓腫（例えば多発性骨髓腫）、唾液腺癌、腎細胞癌やウィルムス腫瘍などの腎癌、基底細胞癌、黒色腫、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、精巣癌、食道癌、種々のタイプの頭頸部癌、限定されるものではないが、扁平上皮細胞癌など、並びに粘液起源の癌、例えば、卵巣粘液癌、胆管癌（肝臓）、腎乳頭状癌などが挙げられる。

30

【0164】

本開示は、有効量のヒト化抗OX40抗体若しくはその抗原結合断片、ヒト化抗OX40抗体を含む組成物若しくは製剤、又は本明細書に記載のポリヌクレオチド、ベクター、若しくは宿主細胞を被験体に投与する工程を含む、必要とされる被験体における癌の防止方法又は治療方法をさらに提供する。

40

【0165】

癌治療のための組成物の有効用量は、投与手段、標的部位、患者の生理学的状態、患者がヒトであるか又は動物であるか、投与される他の医薬、及び治療が予防的であるか又は治療的であるかをはじめとする多種多様な因子に依存して異なる。通常、患者はヒトであるが、トランスジェニック哺乳動物をはじめとする非ヒト哺乳動物も治療可能である。治療投与量は、安全性及び有効性を最適化するように当業者に公知のルーチン法を用いて設定可能である。

【0166】

50

本開示の組成物は、任意の好適な方法により、例えば、非経口、脳室内、経口、吸入スプレー、局所、経直腸、経鼻、頬腔内、経腔、又は植込みリザーバーにより投与可能である。本明細書で用いられる「非経口」という用語は、皮下、静脈内、筋肉内、関節内、滑液嚢内、胸骨内、脊髄内、肝臓内、病変内、及び頭蓋内への注射又は注入の技術を含む。

【0167】

本開示は、治療有効量のヒト化抗OX40抗体若しくはその抗原結合断片又はヒト化抗OX40抗体を含む組成物若しくは製剤を治療が必要とされる被験体に投与する工程を含む、被験体における免疫反応の増強方法をさらに提供する。

【0168】

治療される被験体は、治療が必要とされる任意の動物例えば哺乳動物であり得るとともに、ある特定の態様では、被験体はヒト被験体である。

【0169】

最も単純な形態では、被験体に投与される調製物は、本明細書の他の箇所に記載の医薬賦形剤、担体、又は希釈剤と組合せ可能な従来の剤形で投与されるヒト化抗OX40抗体又はその抗原結合断片である。

【0170】

ヒト化抗OX40抗体又はその抗原結合断片は、本明細書の他の箇所に記載の任意の好適な方法により、例えば、IV注入により投与可能である。ある特定の態様では、ヒト化抗OX40抗体又はその抗原結合断片は、腫瘍中又は腫瘍細胞の近傍に導入可能である。

【0171】

限定されるものではないが、乳癌、肺癌、膵癌、卵巣癌、腎癌、結腸癌、及び膀胱癌、さらには黒色腫、肉腫、及びリンパ腫を含めてすべてのタイプの腫瘍が、この方法による治療に潜在的に適合可能である。

【0172】

抗原によるプライミング時又はその直後に活性化T細胞、例えば、活性化CD4⁺T細胞及び/又は活性化CD8⁺T細胞上のOX40レセプターのエンゲージメントを行うと、抗原に対する活性化T細胞、例えば、活性化CD4⁺T細胞及び/又は活性化CD8⁺T細胞の反応が増加する。本開示との関連では、「エンゲージメント」という用語は、OX40レセプターへの結合及びOX40レセプターにより媒介される少なくとも1つの活性の刺激を意味する。例えば、抗原特異的活性化T細胞、例えば、活性化CD4⁺T細胞及び/又は活性化CD8⁺T細胞上のOX40レセプターのエンゲージメントを行うと、抗原単独に対する反応と比較してT細胞増殖が増加し且つサイトカイン産生が増加する。抗原に対する反応の亢進は、OX40レセプターエンゲージメントの不在下よりも実質的に長時間にわたり維持可能である。従って、OX40レセプターを介する刺激を行うと、抗原例えば腫瘍抗原のT細胞認識がブーストされて抗原特異的免疫反応が増強される。

【0173】

OX40アゴニストは、抗原によるT細胞のプライミング時又はその直後に被験体に投与した場合、被験体例えばヒト被験体における抗原特異的免疫反応を増強可能である。OX40アゴニストは、OX40リガンド(「OX40L」)、例えば、可溶性OX40L融合タンパク質及び抗OX40抗体又はその断片を含む。具体例は、OX40に特異的に結合することによりシグナル伝達を惹起するヒト化抗体である。本開示により一群のヒト化抗OX40モノクローナル抗体が提供される。また、かかる抗体をコードするポリヌクレオチド配列を含む核酸も記載されている。本開示はまた、ヒト化抗OX40モノクローナル抗体を用いて被験体において抗原特異的免疫反応を増強する方法も提供する。

【0174】

OX40エピトープ

抗体の抗原結合ドメインと特異的に相互作用する標的分子例えばOX40ポリペプチドの部分は、「エピトープ」又は「抗原決定基」である。標的分子例えばポリペプチドは、単一のエピトープであり得るが、典型的には少なくとも2つのエピトープを含み、標的分子のサイズ、コンフォメーション、及びタイプに依存して任意の数のエピトープを含み得

10

20

30

40

50

る。

【0175】

抗体により結合可能である標的ポリペプチド上のエピトープの最小サイズは、約4～5アミノ酸であると考えられる。ペプチド又はポリペプチドのエピトープは、少なくとも7、少なくとも9、少なくとも10、若しくは少なくとも約15アミノ酸以上を含有可能である。抗体は三次形態のポリペプチド抗原を認識可能であるので、エピトープを構成するアミノ酸は隣接している必要はない。本明細書に提供されるOX40例えばヒトOX40のエピトープは、OX40例えばヒトOX40の隣接又は非隣接アミノ酸を少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも15、少なくとも20、少なくとも25、又は約10～約30含み得る。ある特定の態様では、本明細書に提供されるOX40例えばヒトOX40のエピトープは、100アミノ酸以下、75アミノ酸以下、50アミノ酸以下、40アミノ酸以下、35アミノ酸以下、30アミノ酸以下、25アミノ酸以下、20アミノ酸以下、又は15アミノ酸以下のペプチドからなり、OX40例えばヒトOX40の隣接又は非隣接アミノ酸を少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも15、少なくとも20、少なくとも25、又は約10～約30含み得る。一方、本明細書に提供されるOX40例えばヒトOX40のエピトープは、OX40例えばヒトOX40の隣接又は非隣接アミノ酸を4以下、5以下、6以下、7以下、8以下、9以下、10以下、15以下、20以下、25以下、又は約10～約30含み得る。

10

20

【0176】

ある特定の態様では、本明細書に提供される抗OX40抗体又はその断片は、OX40の第3のシステインリッチドメイン(CRD3)内、例えば、ヒトOX40のアミノ酸108～146(配列番号91)内に含まれる、OX40、例えば、ヒトOX40、アカゲザルOX40、若しくはカニクイザルOX40のエピトープに結合するか、又は配列番号91のアミノ酸108～146に対して少なくとも17%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、若しくは少なくとも100%同一であるペプチドに結合する。OX40のCRD3「内に含まれる」とは、エピトープが、CRD3領域、例えば、配列番号91のアミノ酸108～146からなるOX40の領域の隣接又は非隣接アミノ酸を4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、10以上、15以上、若しくは30以上含むか、又は配列番号91のアミノ酸108～146に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、若しくは少なくとも100%同一であるペプチドを含むことを意味する。

30

【0177】

ある特定の態様では、本明細書に提供される抗体に結合するOX40 CRD3ペプチドは、配列番号91のアミノ酸116に対応する位置にロイシン、及び配列番号91のアミノ酸126に対応する位置にアラニンを保持する。例えば、本明細書に提供されるある特定の抗OX40抗体又はその断片は、ヒトOX40に結合するが、マウス又はラットOX40に結合しない。マウスOX40のCRD3領域は、配列番号92の約アミノ酸104～約アミノ酸144に延在する。マウスOX40配列番号92のアミノ酸Q113は、ヒトOX40配列番号91のアミノ酸L116に対応し、マウスOX40配列番号92のアミノ酸V124は、ヒトOX40配列番号91のアミノ酸A126に対応する。実施例10に示されるように、本明細書に提供されるOX40抗体例えばOX40 mAb 24は、Q113L突然変異及びV124Aを除いて配列番号92を含むマウスOX40の変異体に結合可能である。

40

【0178】

ある特定の態様では、本明細書に提供されるOX40抗体例えばOX40 mAb 24に特異的に結合するエピトープからなるか又はそれを含むペプチドである単離ペプチドが提供される。ある特定の態様では、ペプチドは、100アミノ酸以下、75アミノ酸以下、

50

50アミノ酸以下、40アミノ酸以下、35アミノ酸以下、30アミノ酸以下、25アミノ酸以下、20アミノ酸以下、又は15アミノ酸以下からなり、OX40のCRD3の隣接又は非隣接アミノ酸を少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも15、少なくとも20、少なくとも25、又は約10～約30含み、例えば、配列番号91のアミノ酸108～146に対して少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は少なくとも100%同一であるOX40領域を含む。ある特定の態様では、ペプチドは、配列番号91のアミノ酸116に対応する位置にロイシン及び配列番号91のアミノ酸126に対応する位置にアラニンを保持する。

【0179】

かかる単離ペプチドは、例えば、OX40に特異的に結合する結合分子に関してライブラリーをスクリーニングするために、又は被験体動物において抗OX40抗体を産生する免疫原として、使用可能である。

【0180】

本開示では、とくに指定がない限り、当該技術の範囲内にある細胞生物学、細胞培養、分子生物学、トランスジェニック生物学、微生物学、組換えDNA、及び免疫学の従来技術を利用する。かかる技術は、文献に十分に説明されている。例えば、Sambrook et al., ed. (1989) *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press); Sambrook et al., ed. (1992) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (Cold Springs Harbor Laboratory, NY); D. N. Glover ed., (1985) *DNA Cloning*, Volumes I and II; Gait, ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*; Mullis et al. 米国特許第4,683,195号明細書; Hames and Higgins, eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*; Hames and Higgins, eds. (1984) *Transcription And Translation*; Freshney (1987) *Culture Of Animal Cells* (Alan R. Liss, Inc.); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press) (1986); Perbal (1984) *A Practical Guide To Molecular Cloning*; 専門書、Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Miller and Calos eds. (1987) *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells*, (Cold Spring Harbor Laboratory); Wu et al., eds., *Methods In Enzymology*, Vols. 154 and 155; Mayer and Walker, eds. (1987) *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Academic Press, London); Weir and Blackwell, eds., (1986) *Handbook Of Experimental Immunology*, Volumes I - IV; Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986); 及び Ausubel et al. (1989) *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, Baltimore, Md.) を参照のこと。

【0181】

抗体工学の一般的原理は、Borrebaeck, ed. (1995) *Antibody Engineering* (2nd ed.; Oxford Univ. Press)

10

20

30

40

50

に記載されている。タンパク質工学の一般的原理は、Rickwood et al., eds. (1995) Protein Engineering, A Practical Approach (IRL Press at Oxford Univ. Press, Oxford, Eng.)に記載されている。抗体及び抗体-ハプテン結合の一般的原理は、Nisonoff (1984) Molecular Immunology (2nd ed.; Sinauer Associates, Sunderland, Mass.); 及び Steward (1984) Antibodies, Their Structure and Function (Chapman and Hall, New York, N.Y.)に記載されている。そのほかに、とくに記載されていない当該技術分野で公知の免疫学の標準的方法は、一般に、Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York; Stites et al., eds. (1994) Basic and Clinical Immunology (8th ed.; Appleton & Lange, Norwalk, Conn.) 及び Mishell and Shiigi (eds) (1980) Selected Methods in Cellular Immunology (W.H. Freeman and Co., NY)に従う。

10

【0182】

免疫学の一般的原理が記載されている標準的参考文献としては、Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York; Klein (1982) J., Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination (John Wiley & Sons, NY); Kennett et al., eds. (1980) Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyses (Plenum Press, NY); Campbell (1984) "Monoclonal Antibody Technology" in Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, ed. Burden et al., (Elsevier, Amsterdam); Goldsby et al., eds. (2000) Kuby Immunology (4th ed.; H. Freeman & Co.); Roitt et al. (2001) Immunology (6th ed.; London: Mosby); Abbas et al. (2005) Cellular and Molecular Immunology (5th ed.; Elsevier Health Sciences Division); Kontermann and Dubel (2001) Antibody Engineering (Springer Verlag); Sambrook and Russell (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press); Lewin (2003) Genes VIII (Prentice Hall 2003); Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press); Dieffenbach and Dveksler (2003) PCR Primer (Cold Spring Harbor Press)が挙げられる。

20

30

40

【0183】

以上で引用した参考文献はすべて、さらには本明細書で引用した参考文献はすべて、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0184】

例示を目的として以下の実施例を提供するが、これらに限定されるものではない。

【実施例】

【0185】

略号及び用語の定義を表2に列挙する。

50

【 0 1 8 6 】

【 表 2 】

表 2. 略号のリストおよび用語の定義

略号または用語	定義
1A7	アイソタイプ対照マウス IgG1 κ 抗体
9B12	マウス抗ヒト OX40 IgG1 κ モノクローナル抗体
A375	ヒト黒色腫細胞系
Aa	アミノ酸
ADCC	抗体依存性細胞傷害
ADPE	抗体開発およびタンパク質工学
ANOVA	分散分析
Asp	アスパラギン酸
BSA	ウシ血清アルブミン
BLASTP	タンパク質配列相同性基本局所アライメント検索ツール
C	対照群の最終腫瘍体積
CD	分化クラスター
CDC	補体依存性細胞傷害
CD4 ⁺ , OX40 ⁺	CD4 陽性, OX40 陽性
CDR	相補性決定領域
CFA	完全フロイントアジュバント
CFSE	カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル
CI	信頼区間
Clq	補体成分 Clq
CR	完全奏功
CRD	システインリッチドメイン
Cyno	カニクイザル

10

20

略号または用語	定義
DM-L	密度媒体-リンパ球
E:T	エフェクター対標的 (比)
EC	有効濃度
EC _f	最大効果の f %を生じる有効濃度
EC ₂₀	最大効果の 20%を生じる有効濃度
EC ₅₀	半値有効濃度
EC ₉₀	最大効果の 90%を生じる有効濃度
F	最大に対する比率
FACS	蛍光活性化細胞選別
FBS	ウシ胎仔血清
Fc	結晶性フラグメント
Fcγ1g-/-	遺伝子工学操作マウス株; 活性化 Fcγ レセプター (Fcγ I, III, および IV) 発現欠如
Fcγ2b-/-	遺伝子工学操作マウス株; 阻害性 Fcγ IIb レセプター 発現欠如
FCS	フローサイトメトリー標準
Fcγ	結晶性 γ フラグメント
FMO	蛍光マイナスワン
FP	融合タンパク質
G	重力
H	時間
H ⁺ L	重鎖+軽鎖
HEK293	ヒト胎児腎細胞系
Hr	時間
HSC	造血幹細胞
Hu	ヒト
ICOS	誘導性 T 細胞コスティミュレーター
IgG	免疫グロブリン
IgG1	免疫グロブリン G1
IL-2	インターロイキン 2
IP	腹腔内
IU	国際単位
K _d	平衡結合解離定数
KI	ノックイン
KLH	キーホールリンペットヘモシニアン
KO	ノックアウト
K _p	平衡解離定数
Leu	ロイシン
M	マウス
mAb	モノクローナル抗体
mL	ミリリットル
OX40mAb24	ヒト化抗ヒト OX40 IgG1κモノクローナル抗体

10

20

30

40

略号または用語	定義
MFI	平均蛍光強度
mOX40L FP	マウス OX40 リガンドマウス IgG1 融合タンパク質
mOX40L FP (Y182A)	OX40 への結合が低減されるように工学操作されたマウス OX40 リガンドマウス IgG1 融合タンパク質
NFκB	活性化 B 細胞の核因子 κ 軽鎖エンハンサー
NIP228	4-ヒドロキシ-3-ヨード-5-ニトロフェニル酢酸に対するマウス IgG1κ モノクローナル抗体
NK	ナチュラルキラー
NOD/SCID	非肥満糖尿病性/重症複合免疫不全性
NSG	遺伝的背景 Nod.Cg-Prkd ^{escid} /129 ^{tm/Wy/SzJ} を有するマウス
OX40L	OX40 リガンド
OX40L FP IgG4P Y180A	OX40 への結合が低減されるように工学操作されたヒト OX40 リガンド IgG4P 融合タンパク質
OX40mAb24	ヒト化抗ヒト OX40 IgG1 κモノクローナル抗体
OX86	ラット抗マウス OX40 IgG1κモノクローナル抗体
PBMC	末梢血単核細胞
PBS	リン酸緩衝生理食塩水
PHA-L	フィトヘマグルチニン-ロイコアグルチニン
PI	ヨウ化プロピジウム
PK/PD	薬動学//薬力学
RBC	赤血球
RBCL	赤血球溶解
RBD	レセプター結合ドメイン
Rh	組換えヒト
RLU	相対光単位
RPMI	Roswell Park Memorial Institute 1640 培地
ROA	投与経路
SC	皮下
SD	標準偏差
SEM	平均値の標準誤差
Ser	セリン
T	試験群の最終腫瘍体積
Tcm	中枢記憶 T 細胞
TCR	T 細胞レセプター
Teff	エフェクター T 細胞
Tem	エフェクター記憶 T 細胞
TGI	腫瘍成長阻害
TIL	腫瘍浸潤性白血球
TM	膜貫通ドメイン
TNFR	腫瘍壊死因子レセプター
TNFRSF	腫瘍壊死因子レセプタースーパーファミリー
TRAF2	腫瘍壊死因子レセプター関連因子 2

略号または用語	定義
Treg	調節性 T 細胞
μL	マイクロリットル
μg	マイクログラム
V	体積

【 0 1 8 7 】

実施例 1：抗ヒト OX40 ネズミ mAb9B12 のヒト化

ネズミ mAb9B12 の CDR を選択されたヒト生殖系列フレームワーク上にグラフトすることによりヒト化した。ネズミ mAb9B12 の重鎖可変領域 (VH) 及び軽鎖可変

10

20

30

40

50

領域 (V L) の配列を公共 N C B I データベースで入手可能なヒト抗体生殖系列配列と比較した。最も高い配列相同性に基づいてヒトアクセプターフレームワーク (F R) を特定した。最適アクセプターフレームワークを選択する際、結合に影響を及ぼす可能性があるマッチ残基 (バーニアゾーン残基、カノニカルクラス残基、及び V H / V L インターフェース残基) や免疫原性の可能性 (低い生殖系列頻度) などのいくつかの基準を考慮した。それぞれ個別のフレームワーク領域に対して最も相同なヒト免疫グロブリン生殖系列セグメントを選択することにより、V H 及び V L の最適ハイブリッドヒトアクセプター F R 配列を独立して設計した。3つの異なる生殖系列アクセプター配列を組み合わせることでヒト化 V H フレームワークバックボーンを形成し、一方、V L については2つの異なる生殖系列アクセプター配列を選択した。V H 鎖 (9 B 1 2 V H - h u) に対して選択された完全ヒト生殖系列アクセプターテンプレートは、I G V H 4 - 3 4 * 0 9 (F R 1) と V H 4 - 3 9 (F R 2) と V H 6 - 1 (F R 3) と J H 4 (F R 4) との組合せであった。V L (9 B 1 2 V L - h u 1) は、O 1 8 (F R 1) と O 1 8 (F R 2) と L 2 3 (F R 3) と J K 1 (F R 4) との組合せであった。ネズミ配列とヒトテンプレートアクセプター配列との間のフレームワーク相同性は、V H では 7 7 % 及び V L では約 7 2 % であった。

10

20

30

40

50

【0188】

親 C D R の機能的コンフォメーションに影響を及ぼし得るか又はそれを維持し得るとともにヒト生殖系列配列にマッチしないネズミフレームワーク残基を特定してヒトアクセプター F R 中に選択的に再導することにより、9 B 1 2 の結合親和性及び機能を最もよく保存するようにした。この場合、V H 鎖のマウス F R 残基 2 7 D、3 9 K、4 7 Y、4 8 M、7 1 R、7 8 Y、及び 4 4 V 並びに V L 鎖の 9 1 F 及び 6 8 R をヒトテンプレートで復帰突然変異させた。ヒト化抗体を生成するために、K a b a t により定義された C D R 残基を V H 及び V L の両方の設計されたアクセプターフレームワーク中に融合した。2つのヒト化 V H 遺伝子 (9 B 1 2 V H - h u 及び 9 B 1 2 V H - h u 3 9 K 7 1 R) 並びに2つの V L 遺伝子 (9 B 1 2 V L - h u 1 及び 9 B 1 2 V L - h u 2) を G e n e A R T (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c, W a l t h a m, M A) により合成し、次いで、インハウス p O E I g G 1 発現ベクター中にクローニングした。

【0189】

一群のヒト化変異体を作製して T 細胞ベースの結合及び増殖アッセイで特徴付けた。重鎖可変領域にマウス F R 残基に復帰されたいくつかのフレームワークアミノ酸を含有するヒト化変異体は、9 B 1 2 と同程度の親和性及び類似の効力 (T 細胞増殖) で活性化 C D 4 + T 細胞上の O X 4 0 に結合した。すべてのヒト化 V H 変異体とペアをなす可変軽鎖は、完全ヒト化フレームワークをコードする。免疫原性のリスクを低減するために、影響しないマウス残基を対応するヒト残基で置き換えることにより、V H ヒト F R 中のマウス残基の数をさらに低減した。配列ライアビリティの可能性を除去するために、V H - C D R 2 の N G 脱アミド化部位並びに V H - C D R 3 の R Y D インテグリン結合部位及び D G 異性化部位を独立して又は組み合わせることで積極的に除去した。ヒト I g G 1 の F c エフェクター機能により媒介される A D C C を回避するために、ヒト化リード m A b に対して I g G 4 P 及び I g G 1 T M の F c 変異体を作製した。得られた I g G 4 P 及び I g G 1 T M の変異体は、O X 4 0 に対して I g G 1 変異体と同一の結合活性を呈したが、ネズミ m A b 9 B 1 2 に最も類似した A D C C 活性を有意に低減した。要約すると、ヒト化変異体は、親マウス m A b 9 B 1 2 と同程度の細胞結合親和性及び i n v i t r o 効力を呈した。すべてヒト化 V L とペアをなすヒト化 V H 変異体間のアミノ酸差を図 1 にまとめる。

【0190】

アカゲザルで i n v i v o 特徴付けを行うためにリバースキメラを工学操作した。簡潔に述べると、ヒト化 m A b 2 4 の V H 及び V L をネズミ 9 B 1 2 の定常重鎖及び定常軽鎖にグラフトした。i n v i t r o 特徴付けを行ったところ、リバースキメラの F a b 部分は m A b 2 4 と同程度にヒト O X 4 0 に結合することが実証された。

【0191】

実施例 2 : 活性化されたヒト、非ヒト霊長動物、ラット、及びマウスの T 細胞の表面上に

発現される天然 O X 4 0 への O X 4 0 m A b 2 4 の結合親和性及びレセプター占有率

2 . 1 材料

この実施例で使用した材料を表 2 - 1 に列挙する。

【 0 1 9 2 】

【表 2 - 1】

表 2-1 材料

アイテム	供給元
AlexaFluor® A488 ヤギ抗ヒト IgG (H+L)	Life Technologies, Carlsbad, CA
AlexaFluor® A488 ヤギ抗マウス IgG (H+L)	Life Technologies, Carlsbad, CA
AlexaFluor® A488 ヤギ抗ラット IgG (H+L)	Life Technologies, Carlsbad, CA
抗生物質/抗真菌溶液, 100X	Life Technologies, Carlsbad, CA
抗ラット CD134 (OX40 クローン)抗体	Biolegend, San Jose, CA
抗ラット CD3 抗体	BD Biosciences, San Jose, CA
抗マウス CD134 (OX86 クローン)抗体	MedImmune, Gaithersburg, MD
抗ラット IgG1, κアイソタイプ対照 mAb クローン RTK2071	Biolegend, San Jose, CA
Balb/C マウス	Harlan, Indianapolis, IN
β-メルカプトエタノール(BME)	Life Technologies, Carlsbad, CA
コンカナバリン A	Sigma, St. Louis, MO
エチレンジアミン四酢酸(EDTA)	Life Technologies, Carlsbad, CA
熱不活性化新生仔ウシ血清(FBS)	Life Technologies, Carlsbad, CA
ハムスター 抗マウス CD3 抗体	BD Biosciences, San Jose, CA
ハムスター 抗マウス CD28 抗体	BD Biosciences, San Jose, CA
組換えヒト IL-2	Preprotech, Rocky Hill, NJ
リンパ球分離培地(LSM)	MP Biomedicals, Santa Ana, CA
Magcselect ラット CD4 T 細胞単離キット	R&D Systems, Minneapolis, MN
Miltenyi MACS 緩衝液	Miltenyi San, Diego, CA
マウス CD4 T 細胞単離キット	Miltenyi San, Diego, CA
マウス IgG1, κ イソタイプ対照 mAb クローン MOPC-21	Biolegend, San Jose, CA
非ヒト 霊長動物 CD4 T 細胞単離キット	Miltenyi San, Diego, CA
非 TC 処理 丸底 96 ウェルプレート	VWR, Radnor, PA
Percoll	Sigma, St. Louis, MO
フィトヘマグルチニン-ロイコアグルチニン (PHA-L)	Roche Applied Science, Indianapolis, IN
リン酸緩衝生理食塩水, pH 7.2 (PBS)	Life Technologies, Carlsbad, CA
RosetteSep CD4 T 細胞富化キット	Stem Cell Technologies, Vancouver, BC
RPMI-1640	Life Technologies, Carlsbad, CA
Sprague Dawley ラット	Harlan, Indianapolis, IN
ヘパリンナトリウム抗凝固処理全血	MedImmune Blood Donor Program, Gaithersburg, MD

10

20

30

40

【 0 1 9 3 】

この実施例では、ヒト、非ヒト霊長動物、ラット、及びマウスの T 細胞の細胞表面上に発現される O X 4 0 に結合する O X 4 0 m A b 2 4 の見掛けの親和性を測定するために、細胞ベースの平衡結合アッセイを実施した。そのほかに、平衡結合アッセイを利用して、活性化ヒト C D 4 + T 細胞上で 2 0 %、5 0 %、又は 9 0 % のヒト O X 4 0 レセプター占有率を達成する O X 4 0 m A b 2 4 の濃度を決定した。

【 0 1 9 4 】

O X 4 0 m A b 2 4 及び 9 B 1 2 の結合を比較するために、C D 4 + T 細胞の表面上に発現されるヒト及び非ヒト霊長動物の O X 4 0 への O X 4 0 m A b 2 4 の由来源のネズミ抗ヒト O X 4 0 モノクローナル抗体 9 B 1 2 の結合について、2 0 %、5 0 %、又は 9 0

50

%レセプター占有率を達成するのに必要なOX40mAb24濃度も決定した。

【0195】

2.2 アッセイ

2.2.1 一次ヒトCD4⁺T細胞及びOX40発現ジャーカットT細胞へのOX40mAb24の結合

ヒトOX40に結合するOX40mAb24の見掛けの平衡結合定数(K_d)及び平衡時に細胞表面ヒトOX40レセプターの20%、50%、又は90%に結合するのに必要な濃度を、OX40発現活性化一次ヒトCD4⁺T細胞又はヒトOX40過剰発現ジャーカットT細胞へのOX40mAb24の結合曲線から計算した。OX40mAb24値との比較のために、類似の実験を同時に行ってこれらの細胞への9B12の結合を評価した。

10

【0196】

最初に、RosetteSep CD4⁺T細胞富化キット(Stem Cell Technologies, Vancouver, BC)及び改良された製造業者のプロトコルを用いて、MedImmune Blood Donor Programにより、健常ドナーから得られたヘパリンナトリウム抗凝固処理全血から一次ヒトCD4⁺T細胞を単離した。

【0197】

T細胞を活性化してOX40をアップレギュレートするために、2 μ g/mLのPHA-L及び20IU/mLのrhIL-2と共に、一次ヒトCD4⁺T細胞を48時間培養した。続いて、OX40mAb24結合実験で>95%生存可能な活性化T細胞を使用した。ドナーはすべて、ユニークな個体である。すなわち、同一のドナーに由来するCD4⁺T細胞を用いた繰返し結合実験は行わなかった。

20

【0198】

活性化を必要とすることなくヒトOX40過剰発現ジャーカットNF κ B-ルシフェラーゼクロン64細胞を結合実験前に完全RPMI+10%FBS中で培養した。

【0199】

OX40mAb24(10 μ g/mL)又は9B12(10 μ g/mL)を17ポイント2倍希釈系列で希釈した。OX40mAb24を100,000細胞(活性化一次CD4⁺T細胞又はヒトOX40過剰発現ジャーカットNF κ B-ルシフェラーゼクロン64細胞)/ウェルで添加して4で1時間インキュベートした。バックグラウンド結合を減算するために、二次抗体のみの存在下で細胞をインキュベートした。OX40mAb24又は9B12のOX40結合の特異性を示すために、OX40過剰発現ジャーカットT細胞と共に、それぞれ、対照R347ヒトIgG1モノクローナル抗体及びマウスIgG1アイソタイプクロンMOPC-21を実験に使用した。インキュベーション後、細胞を200 μ Lの冷(4)FACS緩衝液で3回洗浄し、10 μ g/mLのAlexaFluor(登録商標)647標識ヤギ抗ヒトIgG二次抗体(OX40mAb24への結合のために)又は10 μ g/mLのAlexaFluor(登録商標)488標識ヤギ抗マウスIgG二次抗体(9B12への結合のために)と5 μ g/mLのヨウ化プロピジウム(PI)とを含有する100 μ LのFACS緩衝液(PBS+2%の熱不活性化新生仔ウシ血清)と共にインキュベートした。二次抗体インキュベーション後、細胞を洗浄し、以下に記載されるようにBD LSRIIフローサイトメーターを用いてフローサイトメトリー分析を行うために100 μ LのFACS緩衝液中に懸濁させた。

30

40

【0200】

2.2.2 マウスCD4⁺T細胞へのOX40mAb24の結合

活性化一次CD4⁺T細胞上に発現されるマウスOX40への結合に関してOX40mAb24を調べた。OX40mAb24と比較するために、類似の実験を同時に行ってこれらの細胞への9B12の結合を評価した。以下のプロトコルに従って、採取された正常Balb/Cマウス脾臓からマウスCD4⁺T細胞を単離した。

【0201】

50

脾臓を70 µMナイロンフィルターに押し付けて潰して脾細胞を放出させ、1 mLの完全培地(RPMI-1640 + 10% FBS、1%抗生物質/抗真菌溶液、及び55 µM βメルカプトエタノール[BME])でフィルターを濯いだ。脾細胞をペレット化し、上清を廃棄した。ペレットを5 mLのIX赤血球(RBC)溶解緩衝液で処理してインキュベートすることによりRBCを溶解させた。インキュベーション時間の終了時に完全培地の添加によりオスモル濃度を回復した。

【0202】

細胞をペレット化し、Miltenyi MACS緩衝液(PBS pH7.2 + 0.5%ウシ血清アルブミン(BSA) + 2 mMエチレンジアミン四酢酸[EDTA])で洗浄し、そして上清を廃棄した。ペレットを冷MACS緩衝液中に懸濁させ、そしてVice 11カウンターでカウントして細胞数及び生存能を決定した。

10

【0203】

製造業者の取扱い説明書に従ってMiltenyi プロセスキット(San Diego, CA)を用いてマウスCD4⁺T細胞の単離を行い、単離細胞を完全培地中に懸濁させた。

【0204】

2 µg/mLの各ハムスター抗マウスCD3及びハムスター抗マウスCD28抗体で被覆された96ウェルプレート中でマウスCD4⁺T細胞(150,000/ウェル、100 µL完全培地中)を一晩培養し、そしてT細胞を活性化してOX40発現を誘導した。インキュベーションプレートから活性化CD4⁺T細胞を取り出して、結合アッセイのために100,000細胞を非組織培養物処理96ウェル丸底プレートの各ウェルに導入し、そしてFACS緩衝液を用いて1回洗浄した。10点データ曲線が得られるようにFACS緩衝液でそれぞれ3倍段階希釈された10 µg/mLのOX40 mAb 24、9B12、及びラット抗マウスOX40 クローンOX86(陽性対照)抗体を用いて、結合を行った。陰性対照では、3点データ曲線が得られるように10 µg/mLのR347ヒトIgG1、MOPC-21マウスIgG1、又はRTK2071ラットIgG1を6倍希釈した。OX40 mAb 24又は抗体を含有するFACS緩衝液(50 µL)をデュープリケートでCD4⁺T細胞に添加してインキュベートした。一次インキュベーション後、細胞を200 µLの4のFACS緩衝液で洗浄し、10 µg/mLのAlexaFluor(登録商標)488標識ヤギ抗ヒト二次抗体、10 µg/mLのAlexaFluor(登録商標)488標識ヤギ抗マウス二次抗体、又はAlexaFluor(登録商標)488標識ヤギ抗ラット二次抗体と、5 µg/mLのPIと、を含有する50 µLのFACS緩衝液と共にインキュベートした。二次抗体インキュベーション後、細胞を4のFACS緩衝液(200 µL/洗浄)で洗浄し、そして第2.3節に記載されるようにBD LSRIIFローサイトメーターを用いてフローサイトメトリー分析を行うために100 µLのFACS緩衝液中に懸濁させた。

20

30

【0205】

2.2.3 ラットCD4⁺T細胞へのOX40 mAb 24の結合

活性化一次CD4⁺T細胞上に発現されるラットOX40への結合に関してOX40 mAb 24を調べた。OX40 mAb 24との比較が行えるように、9B12を用いて類似の実験を同時に行った。製造業者の取扱い説明書に従ってR&D Systems Magellectキット(Minneapolis, MN)を用いてラットCD4⁺T細胞の単離を行ったこと以外は、マウス脾細胞の単離に関連して以上に説明したプロトコルに従って、新たに採取した正常スプラーグドーリーラット脾臓からラットCD4⁺細胞を単離した。

40

【0206】

T細胞を活性化してOX40発現を誘導するために、1 µg/mLのコンカナバリンA(ConA)及び500 IU/mLのIL-2の入ったT75細胞培養フラスコ中でラットCD4⁺T細胞(1 × 10⁶/mL完全培地)を一晩培養し、そして一晩インキュベートした。フラスコから活性化CD4⁺T細胞を取り出して、結合アッセイのために100

50

、000細胞を非組織培養物処理96ウェル丸底プレートの各ウェルに導入し、そしてFACS緩衝液で洗浄した。10点データ曲線が得られるようにFACS緩衝液で3倍段階希釈された10 μ g/mLのOX40mAb24、9B12、又はマウス抗ラットCD134クローンOX40（陽性対照）抗体を用いて、結合を行った。陰性対照では、3点データ曲線が得られるように10 μ g/mLのR347ヒトIgG1又はマウスIgG1クローンMOPC-21を6倍段階希釈した。100 μ LのOX40mAb24対照タンパク質、9B12、又はクローンOX40抗体をデュプリケートでCD4⁺T細胞に添加してインキュベートした。一次インキュベーション後、細胞を200 μ L/洗浄の4のFACS緩衝液で洗浄し、10 μ g/mLのAlexaFluor（登録商標）488標識ヤギ及びヒト抗マウス二次抗体又はAlexaFluor（登録商標）488標識ヤギ抗マウス二次抗体と、5 μ g/mLのPIと、を含有する100 μ LのFACS緩衝液と共にインキュベートした。二次抗体インキュベーション後、第2.3節に記載されるように細胞を処理してフローサイトメトリーに供した。

10

20

30

40

50

【0207】

2.2.4 カニクイザルCD4⁺T細胞へのOX40mAb24の結合

活性化一次CD4⁺T細胞上に発現されるカニクイザル(cyno)OX40への結合に関してOX40mAb24を調べた。OX40mAb24値との比較が行えるように、9B12を用いて類似の実験を同時に行った。以下のプロトコルに従ってWorld Wide Primates (Miami, FL)製の健常カニクイザルドナー(N=2)から得られたヘパリンナトリウム抗凝固処理全血からカニクイザルCD4⁺T細胞を単離した。

【0208】

50mLのコニカル遠心チューブ中の30mLの60%Percoll上に全血を層状化した。血液を遠心分離し、末梢血単核細胞(PBMC)をインターフェースで捕集し、1200RPMで冷(4)Miltentyi MACS緩衝液により10分間洗浄した。上清を廃棄し、ペレットを5mLの1 $\times$ RBC溶解緩衝液で処理し、そしてインキュベートした。インキュベーション時間の終了時に完全培地(10%のFBS及び1%の抗生物質/抗真菌剤を含むRPMI)をペレットに添加して溶解プロセスを停止した。

【0209】

細胞をペレット化し、20mLの冷(4)Miltentyi MACS緩衝液で洗浄した。上清を廃棄し、細胞ペレットを冷(4)MACS緩衝液中に懸濁させ、そしてViCellカウンターでカウントして細胞数及び生存能を決定した。

【0210】

製造業者の取扱い説明書に従ってMiltentyi非ヒト霊長動物キットを用いてカニクイザルCD4⁺T細胞の単離を行い、次いで、CD4⁺T細胞をViCellカウンターでカウントし、そして以上に記載の完全培地中に1 $\times$ 10⁶/mLで懸濁させた。

【0211】

2 μ g/mLのPHA-L及び20IU/mLのIL-2を含むT75細胞培養フラスコ中でカニクイザルCD4⁺T細胞(完全培地中1 $\times$ 10⁶/mL)を48時間インキュベートすることにより、T細胞を活性化してOX40発現を誘導した。フラスコから活性化CD4⁺T細胞を取り出して、結合アッセイのために100,000細胞を非組織培養物処理96ウェル丸底プレートの各ウェルに導入し、そして200 μ LのFACS緩衝液で洗浄した。11点データ曲線が得られるようにFACS緩衝液で4倍段階希釈した10 μ g/mLのOX40mAb24若しくは9B12、又は3点データ曲線が得られるように6倍段階希釈したR347ヒトIgG1若しくはマウスIgG1クローンMOPC-21(陰性対照)の両方を用いて結合を行った。OX40mAb24、9B12、又は対照タンパク質をCD4⁺T細胞に添加してインキュベートした。一次インキュベーション後、細胞を200 μ L/洗浄の冷(4)FACS緩衝液で洗浄し、10 μ g/mLのAlexaFluor（登録商標）488標識ヤギ抗ヒト二次抗体又は10 μ g/mLのAlexaFluor（登録商標）488標識ヤギ抗マウス二次抗体と、5 μ g/mLのPI

と、を含有する100 μ LのFACS緩衝液と共にインキュベートした。二次抗体インキュベーション後、第2.3節に記載されるように細胞を処理してフローサイトメトリーに供した。

【0212】

2.2.5 アカゲザルCD4⁺T細胞へのOX40mAb24の結合

活性化一次CD4⁺T細胞上に発現されるアカゲザルOX40への結合に関してOX40mAb24を調べた。OX40mAb24値との比較が行えるように、9B12を用いて類似の実験を同時に行った。以下のプロトコルに従ってWorld Wide Primates (Miami, FL)製の健常アカゲザルドナー(N=2)から得られたヘパリンナトリウム抗凝固処理全血からアカゲザルCD4⁺T細胞を単離した。

10

【0213】

ヘパリン処理アカゲザル血液(20 mL)をPBSで1:1希釈し、50 mLのコニカル遠心チューブ中の15 mLの95%LSM上に層状化した。血液を遠心分離し、PBM Cをインターフェースで捕集し、そして30分間にわたり400 $\times$ gで冷Miltenyi MACS緩衝液を用いて2回洗浄した。上清を廃棄し、ペレットを5 mLのIX RBC溶解緩衝液で処理し、そしてインキュベートした。インキュベーション時間の終了時に完全培地(10%のFBS及び1%の抗生物質/抗真菌剤を含むRPMI)をペレットに添加して溶解プロセスを停止した。細胞をペレット化し、20 mLの冷Miltenyi MACS緩衝液で洗浄した。上清を廃棄し、ペレットを冷MACS緩衝液中に懸濁させ、そしてVice11カウンターでカウントして細胞数及び生存能を決定した。製造業者の取扱い説明書に従ってMiltenyi非ヒト霊長動物キット(San Diego, CA)を用いてアカゲザルCD4⁺T細胞の単離を行った。

20

【0214】

5 μ g/mLのCon-A及び1000 IU/mLのIL-2を含むT75細胞培養フラスコ中でアカゲザルCD4⁺T細胞(完全培地中 1×10^6 / mL)を48時間培養することにより、T細胞を活性化してOX40発現を誘導した。10点(実験1)又は12点データ曲線(実験2)が得られるようにFACS緩衝液で3倍段階希釈した10 μ g/mLのOX40mAb24及び9B12を用いて、並びに2データ点(実験1)又は4データ点(実験2)が得られるように6倍希釈した10 μ g/mLのヒト及びマウスアイソタイプ対照を用いて、100,000活性化アカゲザルCD4⁺T細胞への結合を行った。AlexaFluor(登録商標)488標識ヤギ抗ヒト二次抗体及びAlexaFluor(登録商標)488標識ヤギ抗マウス二次結合は、カニクイザルCD4⁺T細胞に対して以上に記載した通りであり、フローサイトメトリーは、第2.3節に記載される通りである。

30

【0215】

2.3 フローサイトメトリー

第2.1節に記載のアッセイのフローサイトメトリーは、LSRIIFローサイトメーター(Becton-Dickinson, San Jose, CA)を用いて行った。Flow Joサイトメトリー解析ソフトウェア(TreeStar, Ashland, OR)を用いて細胞へのOX40mAb24、9B12、及び対照タンパク質の結合を決定した。OX40発現細胞(非染色でPIも二次抗体も無し)、AlexaFluor(登録商標)488標識二次抗体試薬若しくはAlexaFluor(登録商標)647標識二次抗体試薬のみに結合される細胞、又は0.1%のサボニンで透過化されて10 μ g/mLのPIで処理された細胞を含有するウェルを単一染色補償対照として準備した。蛍光補償後、生存(PI陰性)細胞をゲート処理して二次抗体の平均蛍光強度(MFI)を決定した。

40

【0216】

2.4 計算

2.4.1 見掛けの平衡解離定数(K_d)の決定

Windows用GraphPad Prismバージョン5.01(GraphPa

50

d Software, San Diego California USA, www.graphpad.com) を用いてタンパク質濃度 (M) に対して OX40 mAb 24 結合の MFI をプロットすることにより結合曲線を作成し、この曲線から見掛けの K_d が決定した。ヒト、マウス、ラット、カニクイザル、又はアカゲザルの OX40 への OX40 mAb 24 及び 9B12 の結合に対する見掛けの K_d を決定するために、一部位 (特異的) 結合に対する非線形回帰 (曲線当てはめ) 式を利用した。

【0217】

2.4.2 20%、50%、及び90%レセプター占有率値の決定

レセプターに結合されるモノクローナル抗体 (mAb) の量は、以下の結合関係式：

式1： レセプター (A) + mAb (B) $\leftrightarrow$ レセプター - mAb 複合体 (AB)

から推定可能である。

【0218】

それぞれの抗体の結合解離定数 (K_d) は、式2：

【数1】

$$Kd = \frac{[A][B]}{[AB]}$$

により表される。式中、[A] 及び [B] は、それぞれ、遊離のレセプター及び抗体の濃度を表す。最後に、抗体に結合されるすべてのレセプター分子の占有率、分率 (F) は、式3：

【数2】

$$F = \frac{[AB]}{[A] + [AB]}$$

により計算可能である。式2を作成して式3に代入すると、式4：

【数3】

$$F = \frac{[A][B]/Kd}{[A] + ([A][B]/Kd)}$$

が得られる。式4を単純化すると、式5：

【数4】

$$F = \frac{[B]}{[B] + Kd}$$

が得られる。従って、すべてのレセプター分子のうち平衡条件で抗体に結合されるものの分率は、遊離 mAb の濃度及びそれぞれの抗体の解離定数 K_d が既知であれば、計算可能である。F として表されるレセプター占有率に必要とされる抗体の濃度を計算する式を導くと、以下の式：

式6：

$$[B] = F * Kd / (1 - F)$$

が得られる。式中、[B] は、mAb この場合は OX40 mAb 24 の濃度に等しい。この式 (式6) を用いて 20、50、及び90%レセプター占有率 ($F = 0.20$ 、 0.50 、又は 0.90) に必要とされる OX40 mAb 24 の濃度を細胞結合実験から計算し、この濃度から以上に記載の一部位 (特異的) 結合に対する非線形回帰 (曲線当てはめ) 式を用いて K_d 値を計算した。

【0219】

2.5 統計的方法

Graphpad Prismソフトウェアで95%の信頼水準の対応のないスチュー

10

20

30

40

50

デントの両側 t 検定及び異なる標準偏差を含むデータセットを補正するウェルチ補正を利用し、OX40 発現ジャーカット T 細胞と対比して活性化一次ヒト CD4 T 細胞上の OX40 への OX40 mAb24 結合で決定された見掛けの K_d 値間又は見掛けのレセプター占有率値間の統計学的有意差を決定した。記述統計量（すなわち、平均値及び平均値の標準誤差）は、まとめた図及び表に示される。

【0220】

2.6 結果

2.6.1 一次ヒト CD4⁺ T 細胞への OX40 mAb24 の結合

6つの独立した T 細胞ドナーを用いた $n = 6$ の結合アッセイにおいて、OX40 mAb24 は活性化ヒト CD4⁺ T 細胞に結合し、見掛けの K_d の平均は 312 pM であり、20%、50%、及び 90% レセプター占有率値は、それぞれ、78.1、312、及び 2810 pM であった（図 2A 及び 2B 並びに表 2-2）。

10

【0221】

それと比較して、9B12 は活性化ヒト CD4⁺ T 細胞に結合し、平均 K_d は 669 pM であり、20%、50%、及び 90% レセプター占有率値は、それぞれ、167、669、及び 6020 pM であった（図 2C 及び 2D 並びに表 2-2）。従って、9B12 の見掛けの K_d 値と OX40 mAb24 の見掛けの K_d 値との比は 2.1 ~ 1 であり、ネズミモノクローナル抗体及びヒト化モノクローナル抗体でヒト OX40 への類似した結合親和性を反映している。

20

【0222】

【表 2-2】

表 2-2 OX40 発現活性化一次ヒト CD4⁺ T 細胞への OX40mAb24 または 9B12 の結合に対する見掛けの親和性 (K_d) およびレセプター占有値

結合タンパク質	ドナー数	K_d (StdErr), pM	EC_{20} (StdErr), pM	EC_{50} (StdErr), pM	EC_{90} (StdErr), pM
OX40mAb24	6	312 (57.9)	78.1 (14.5)	312 (57.9)	2810 (521)
9B12	6	669 (137)	167 (34.3)	669 (137)	6020 (1230)

EC_{20} = 最大効果の 20% を生じる有効濃度; EC_{50} = 半値有効濃度; EC_{90} = 最大効果の 90% を生じる有効濃度; K_d = 平衡結合解離定数; StdErr = 平均値の標準誤差。

30

【0223】

2.6.2 ヒト OX40 を過剰発現するように工学操作されたジャーカット T 細胞株への OX40 mAb24 の結合

OX40 mAb24 は OX40 発現ジャーカット T 細胞に結合し、平均 K_d は 424 pM であり、20%、50%、及び 90% レセプター占有率値は、それぞれ、106、424、及び 3820 pM であった。図 3A ~ C 及び表 2-3。活性化一次ヒト CD4⁺ T 細胞及び OX40 過剰発現ジャーカット T 細胞により発現される OX40 への OX40 mAb24 の見掛けの結合親和性又はレセプター占有率には統計学的有意差はなかった ($p = 0.59$)。

【0224】

それと比較して、9B12 はこれらの細胞に結合し、平均 K_d は 726 pM であり、20%、50%、及び 90% レセプター占有率値は、それぞれ、182、726、及び 6540 pM であった（図 3D ~ F 及び表 2-3）。従って、9B12 の見掛けの K_d 値と OX40 mAb24 の見掛けの K_d 値との比は 1.7 ~ 1 であり、OX40 オン活性化ヒト CD4⁺ T 細胞への結合で計算された比に類似していた。

40

【0225】

【表 2 - 3】

表 2-3 ヒト OX40 過剰発現 Jurkat NFκB-ルシフェラーゼクローン 64 細胞への
OX40mAb24 または 9B12 の結合に対する見掛けの親和性 (K_d) およびレセプター占有値

結合 タンパク質	実験数	K_d (StdErr), pM	EC_{20} (StdErr), pM	EC_{50} (StdErr), pM	EC_{90} (StdErr), pM
OX40mAb24	3	424 (173)	106 (43.3)	424 (173)	3820 (1560)
9B12	3	726 (308)	182 (76.9)	726 (308)	6540 (2770)

EC_{20} = 最大効果の 20%を生じる有効濃度; EC_{50} = 半値有効濃度; EC_{90} = 最大効果の 90%を生じる有効濃度; K_d = 平衡結合解離定数; StdErr = 平均値の標準誤差.

10

【0 2 2 6】

2 . 6 . 3 マウス又はラット CD4⁺ T 細胞への OX40mAb24 の結合

OX40mAb24 及び 9B12 はいずれも、活性化マウス CD4⁺ T 細胞にも活性化ラット CD4⁺ T 細胞にも結合しなかった (データは示されていない)。市販の抗マウス OX40 抗体及び抗ラット OX40 抗体、それぞれ、クローン OX86 及び OX40 では、活性化マウス CD4⁺ T 細胞及び活性化ラット CD4⁺ T 細胞の陽性染色が観察された。9B12 は活性化マウス CD4⁺ T 細胞にも活性化ラット CD4⁺ T 細胞にも結合しなかった (データは示されていない)。

【0 2 2 7】

2 . 6 . 4 カニクイザル及びアカゲザル CD4⁺ T 細胞への OX40mAb24 の結合

OX40mAb24 は、581 pM の平均 K_d で活性化カニクイザル細胞に結合した。カニクイザル K_d は、ヒト K_d の 1 . 9 倍であった (表 2 - 4)。

20

【0 2 2 8】

9B12 は、1088 pM の平均 K_d で活性化カニクイザル CD4⁺ T 細胞に結合した (表 2 - 4)。この結果、9B12 の見掛けの K_d 値と OX40mAb24 の見掛けの K_d 値との比は 1 . 9 ~ 1 になった。

【0 2 2 9】

OX40mAb24 は、369 pM の平均 K_d で活性化アカゲザル CD4⁺ T 細胞に結合した (表 2 - 4)。アカゲザル K_d は、ヒト K_d の 1 . 2 倍であった。

【0 2 3 0】

9B12 は、713 pM の平均 K_d で活性化アカゲザル CD4⁺ T 細胞に結合した (表 2 - 4)。この結果、9B12 の見掛けの K_d 値と OX40mAb24 の見掛けの K_d 値との比は示されていないが 2 . 8 ~ 1 になる。

30

【0 2 3 1】

【表 2 - 4】

表 2-4 カニクイザルおよびアカゲザル OX40 発現活性化一次 CD4⁺ T 細胞への
OX40mAb24 または 9B12 の結合に対する見掛けの親和性 (K_d)

結合タンパク質	カニクイザル		アカゲザル	
	実験数	K_d (StdErr), pM	実験数	K_d (StdErr), pM
OX40mAb24	2	581 (238)	2	369 (236)
9B12	2	1088 (37)	2	713 (559)

40

K_d = 平衡結合解離定数; StdErr = 平均値の標準誤差.

【0 2 3 2】

実施例 3 : ヒト OX40 への OX40mAb24 の結合特異性

この実施例では、NGFR (TNFRSF16)、LTβR (TNFRSF3)、TNFR2 (TNFRSF1β)、GITR (TNFRSF18)、CD137 (TNFRSF9)、及び HVEM (TNFRSF14) を含む関連アミノ酸配列を有する他のヒト TNFRSF メンバーと対比してヒト OX40 への OX40mAb24 の特異性を決定する

50

ために、フローサイトメトリーベースの細胞結合アッセイを行った。そのほかに、組換えヒトTNFRSFメンバーへのOX40mAb24の結合特異性をELISA方式で試験した。このメンバーには、以上に挙げたもののほか、DR6(TNFRSF21)、オステオプロテゲリン(OPG、TNFRSF11B)、RANK(TNFRSF11A)、FAS(TNFRSF6)、及びCD40(TNFRSF5)が含まれる。

【0233】

3.1 材料

この試験で使用した材料を表3-1に列挙する。

【0234】

【表3-1】

10

表3-1 材料

アイテム	供給元
AlexaFluor® 647 ヤギ抗ヒト IgG (H+L)	Life Technologies, Carlsbad, CA
BioTek® プレートウォッシャー	BioTek®, Wincoski, VT
CD137 (TNFRSF9) pCMV6-XL5 発現ベクター	Origene Technologies, Inc., Rockville, MD
GITR (TNFRSF18) pCMV6-XL5 発現ベクター	Origene Technologies, Inc., Rockville, MD
ヤギ抗ヒト IgGκ 軽鎖 HRP コンジュゲート	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
ヤギ抗マウス IgG (Fab 特異的) HRP コンジュゲート	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO
HVEN (TNFRSF14) pCMV6-XL4 発現ベクター	Origene Technologies, Inc., Rockville, MD
リポフェクタミン 2000	Life Technologies, Carlsbad, CA
AF488 抗マウス IgG1 アイソタイプ	Biolegend, San Diego, CA
AF488 抗ヒト GITR	Ebioscience, San Diego, CA
AF647 抗ヒト NGFR	BD, San Jose, CA
APC 抗ヒト CD137	BD, San Jose, CA
APC 抗マウス IgG1 アイソタイプ	Biolegend, San Diego, CA
Clone Manager v9 ソフトウェア	Sci-Ed Software, Cary, NC
熱不活性化ウシ胎仔血清(FBS)	Life Technologies, Carlsbad, CA
LTBR (TNFRSF3) pCMV6-XL4 発現ベクター	Origene Technologies, Inc., Rockville, MD
MaxiSorp 96 ウェル平底プレート	VWR, Radnor, PA
熱不活性化新生仔ウシ血清	Life Technologies, Carlsbad, CA
NGFR (TNFRSF16) pCMV6-XL5 発現ベクター	Origene Technologies, Inc., Rockville, MD
PE 抗ヒト HVEM	Ebioscience, San Diego, CA
PE 抗ヒト LtβR	R&D systems, Minneapolis, MN
PE 抗ヒト TNFRSF 1B	BD, San Jose, CA
PE 抗マウス IgG1 アイソタイプ	Biolegend, San Diego, CA
PE 抗ラットアイソタイプ	Ebioscience, San Diego, CA
カルシウムおよびマグネシウムを含まない PBS, pH 7.2	Life Technologies, Carlsbad, CA
組換えヒト TNFRSF1β (TNFR1)	R&D systems, Minneapolis, MN
組換えヒト TNFRSF3 (LTBR)	R&D systems, Minneapolis, MN
組換えヒト TNFRSF4 (OX40)	R&D systems, Minneapolis, MN
組換えヒト TNFRSF5 (CD40)	R&D systems, Minneapolis, MN
組換えヒト TNFRSF6 (FAS)	R&D systems, Minneapolis, MN
組換えヒト TNFRSF9 (CD137)	In house protein; lot# AMPur19
組換えヒト TNFRSF11A (RANK)	R&D systems, Minneapolis, MN
組換えヒト TNFRSF11B (OPG)	R&D systems, Minneapolis, MN
組換えヒト TNFRSF14 (HVEM)	R&D systems, Minneapolis, MN
組換えヒト TNFRSF16 (NGFR)	R&D systems, Minneapolis, MN
組換えヒト TNFRSF18 (GITR)	In house protein; lot# LBPur0025
組換えヒト TNFRSF21 (DR6)	R&D systems, Minneapolis, MN
TNFRSF1β pCMV6-XL5 発現ベクター	Origene Technologies, Inc., Rockville, MD
Tween-20	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO

20

30

40

【0235】

3.2 方法

50

3.2.1 ヒトOX40に近い配列相同性を有するタンパク質の検索

ヒトOX40とのアミノ酸配列同一性を有するヒトタンパク質を同定するために、OX40のタンパク質配列(CCD S 11 / UniProt P 43489)を用いて、タンパク質配列相同性のBasic Local Alignment Search Tool (BLASTP) 検索を行った。19種のTNFRSFファミリーメンバー/アイソフォームを同定した。CCDS及びUniProtデータベース(www.uniprot.org)の両方を用いて、これらのタンパク質の全長配列を検証した。Clone Manager バージョン9ソフトウェアでblosum62スコア行列を用いてヒトOX40参照に対する集合アライメントを行うことにより、ヒトOX40とBLASTP検索で同定されたタンパク質との間のアミノ酸同一性のパーセントを決定した(表3-2)

10

【0236】

3.2.2 HEK293細胞で発現される他のTNFRSFメンバーと対比したOX40へのOX40mAb24の結合特異性

哺乳動物細胞にトランスフェクトしたときに個別のTNFRSFメンバーの発現を誘導可能なcDNA構築物をOrigene Technologies, Rockville, MDから入手した。一過性トランスフェクションに使用するために、Protein Sciences group, MedImmune, Gaithersburg, MDによりこれらのcDNA構築物の増幅及び精製を行った。TNFRSFメンバーをそれぞれ個別に発現させるために、Lipofectamine 2000に対する製造業者の推奨プロトコルに従って、TNFRSFメンバーの1つをコードする発現ベクターの0.5 µgのDNAと組み合わせてLipofectamine 2000 (Life Technologies, Carlsbad, CA)を用いて、HEK293細胞をトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後、トリプシン処理により組織培養プレートから細胞を取り出した。血清含有完全培地RPMI-1640+10%FBSの添加、それに続く細胞のペレット化、及び完全培地による洗浄を行って、トリプシンを中和した。次いで、細胞を冷FACS緩衝液(PBS+2%FBS)中に懸濁させ、96ウェル非組織培養物処理プレートにプレーティングし、TNFRSFメンバー特異的mAb(表3-3)及びOX40mAb24を用いた結合試験に供した。

20

【0237】

抗体又はOX40mAb24を結合させるために、HEK細胞をペレット化し、FACS緩衝液を除去し、そして2 µg/mLのヨウ化プロピジウム(PI)と、製造業者により推奨された濃度のトランスフェクトTNFRSFメンバーに特異的な蛍光色素標識mAb又は1 µg/mLの濃度のOX40mAb24と、を含有するFACS緩衝液中に細胞を懸濁させた。結合対照では、蛍光色素標識アイソタイプ対照抗体と共に細胞を個別にインキュベートした。4の暗所で抗体と共に細胞を1時間インキュベートした。その後、蛍光色素標識モノクローナル抗体と共にインキュベートされた細胞を冷FACS緩衝液で洗浄し、次いで、結合イベントを集め、そして第3.2.3節に記載されるように、LSRIIFローサイトメーター(BD Biosciences, San Jose, CA)及びFlowJoソフトウェアを用いてフローサイトメトリーにより解析した。OX40mAb24と共にインキュベートされた細胞を氷冷FACS緩衝液で洗浄し、次いで、25 µg/mLのAlexa Fluor(登録商標)647ヤギ抗ヒトIgG(H+L)二次抗体を懸濁させ、そして4の暗所でさらに30分間インキュベートした。二次抗体結合対照では、OX40mAb24の不在下で、ただし、蛍光色素標識二次抗体のみの存在下で、細胞をインキュベートした。その後、細胞を洗浄し、冷FACS緩衝液中に懸濁させ、LSRIIFローサイトメーターによる解析に供した。

30

40

【0238】

3.2.3 フローサイトメトリー解析

FlowJoソフトウェア(Ashland, OR)を用いてフローサイトメトリー標準(FCS)データを検査した。mAb結合を解析するために、最初に、細胞を生存(P

50

I 陰性)細胞に関してゲート処理し、次いで、イベントの全数に対してイベントの平均蛍光強度(MFI)をプロットして結合ヒストグラムを作成した。バックグラウンド(アイソタイプ対照又は二次抗体単独)に対するMFI倍率を決定できるように、各サンプルについてすべての生存細胞の幾何MFIを決定した。

【0239】

3.2.4 OX40 mAb 24 結合特異性 ELISA

ストックタンパク質をPBSで5 µg/mLに希釈した後、8点で各組換えヒトTNFRSFタンパク質の二倍希釈系列を調製した。続いて、50 µLの各抗原希釈液をデュープリケートでNunc 96ウェルMaxiSorp平底プレートのウェルに導入し、4
10
で一晩インキュベートしてタンパク質をプレートに吸着させた。その後、BioTek(登録商標)プレートウォッシャーによりプレートをPBSで3回洗浄して未結合タンパク質を除去した。抗OX40 mAb 29、9B12、及び対照抗体をPBSで10 µg/mLの最終濃度に希釈して50 µLのmAbを各ウェルに添加し、そして室温で1時間インキュベートしてmAbをプレート結合タンパク質に結合させた。その後、BioTek(登録商標)プレートウォッシャーを用いてウェルをPBS/0.1% Tween-20(体積/体積)で洗浄した。HRPコンジュゲートのヤギ抗ヒト二次抗体又はヤギ抗マウス二次抗体を10 µg/mLで各ウェルに添加し、室温で1時間インキュベートした。PBS/0.1% Tween-20で3回洗浄した後、各ウェルに50 µLのTMB基質を添加し、そして室温で5分間インキュベートして比色生成物を形成した。50 µLの0.5
20
モルH₂SO₄をウェルに添加することにより反応を停止させ、その直後、比色生成物を検出するためにEnvision Cプレートリーダーを用いて450 nmでプレートを読み取った。Windows用ソフトウェアGraphPad Prismバージョン5.01で結果をグラフで示し、単一部位結合に対する非線形回帰分析を用いて結合曲線を作成した。

【0240】

3.3 結果

ヒトOX40に関するタンパク質配列相同性BLASTP検索により、全長OX40配列に対して15~27%のアミノ酸配列同一性を共有する19種のヒトTNFRSFタンパク質又はアイソフォームを同定した。タンパク質及びその配列同一性パーセントを表3-2に列挙する。

【0241】

10

20

30

【表 3 - 2】

表 3-2 ヒト OX40 に対して最高度の相同性を有する 12 種の TNFRSF
メンバーのアミノ酸 配列同一性。

TNFRSF メンバー	代替名	OX40 との 同一性%	UniProt タンパク質 配列 ID
TNFRSF11A	RANK, CD265	27	Q9Y6Q6 アイソ 2 (delta 7,8,9)
TNFRSF6B	DcR3	25	O95407
TNFRSF18	GITR, AITR	25	Q9Y5U5 アイソ 2
TNFRSSF10C	DCR1, TRAIL-R3	24	O14798
TNFRSF5	CD40	23	P25942 アイソ 2
TNFRSF18	GITR, AITR	23	Q9Y5U5 アイソ 3
TNFRSF18	GITR, AITR	23	Q9Y5U5
TNFRSF9	CD137, 4-1BB	22	Q07011
TNFRSF5	CD40	21	P25942
TNFRSF14	TR2, HVEM-A	21	Q92956
TNFRSF16	NGF receptor	21	P08138
TNFRSF3	LTBR, TNFRIII	20	P36941
TNFRSF6	Fas	20	P25445 アイソ 6 Tmdcl (A)
TNFRSF6	Fas	20	P25445
TNFRSF3	LTBR, TNFRIII	19	P36941 アイソ 2
TNFRSF6	Fas	19	P25445 アイソ 7 FasExo8Del
TNFRSF11B	オステオプロテゲリン	18	O0030
TNFRSF1B	TNFR1b, TNFR2, CD120b	18	P20333
TNFRSF11A	RANK, CD265	16	Q9Y6Q6

CCDS = コンセンサスコード配列; ID = 識別子; NA = 該当なし; TNFRSF = 腫瘍壊死因子レセプター
スーパーファミリー; UniProt - Universal Protein Resource

【 0 2 4 2 】

以上の第 3 . 1 . 3 節に記載のフローサイトメトリーにより、ヒト NGFR、LTβR、TNFR2、GITR、CD137、又は HVEM を発現する一過性トランスフェクト HEK293 細胞への OX40 mAb 24 の結合を評価した。各ヒト TNFRSF タンパク質に特異的な市販の抗体を用いて、ヒト NGFR、LTβR、TNFR2、GITR、CD137、及び HVEM の細胞表面発現を確認し、各 TNFRSF タンパク質に対するアイソタイプ対照抗体と比較して MFI の増加倍率を表 3 - 3 に示す。ヒト NGFR、LTβR、TNFR2、GITR、CD137、又は HVEM を発現する HEK293 細胞への OX40 mAb 24 の結合は、上述の細胞への二次抗体単独の結合で見られたものを実質的に超えない（表 3 - 3、図 4 A）。これとは対照的に、OX40 を構成的に過剰発現するジャーカット細胞系への OX40 mAb 24 の結合は、平均 MFI で蛍光色素標識二次抗体単独の結合の 4.8 倍であった（表 3 - 3 及び図 4 B）。

【 0 2 4 3 】

【表 3 - 3】

表 3-3: TNFRSF 過剰発現 HEK293 細胞への蛍光色素標識 TNFRSF 特異的モノクローナル抗体
および OX40mAb24 の結合倍率または OX40 過剰発現 Jurkat 細胞への
OX40mAb24 の結合倍率

発現される TNFRSF メンバー	TNFRSF メンバーが 導入された 細胞系	レセプター特異的市販 mAb 結合(アイソタイプ対照 MFI に対する比)	OX40mAb24 結合(二次 抗体単独 MFI に 対する比)
OX40	Jurkat	ND	48
TNFRSF16 (NGFR)	HEK293	17	2.2
TNFRSF3 (LTβR)	HEK293	146	1.0
TNFRSF1β	HEK293	5.0	1.0
TNFRSF18 (GITR)	HEK293	37	1.1
TNFRSF9 (CD137)	HEK293	24	1.2
TNFRSF14 (HVEM)	HEK293	69	1.1

mAb = モノクローナル抗体; MFI = 平均蛍光強度; ND = 未決定; TNFRSF = 腫瘍壊死因子レセプタースーパーファミリー

10

【 0 2 4 4 】

E L I S A 方式では、O X 4 0 m A b 2 4 の F a b アームを含有する I g G 1 F c ドメインが 3 つのアミノ酸修飾を含有する抗体 (m A b 2 9) の結合は、O X 4 0 に特異的であり (図 5 A)、組換えヒト N G F R (T N F R S F 1 6)、L T β R (T N F R S F 3)、T N F R 2 (T N F R S F 1 β)、G I T R (T N F R S F 1 8)、C D 1 3 7 (T N F R S F 9)、H V E M (T N F R S F 1 4)、D R 6 (T N F R S F 2 1)、オステオプロテゲリン (O P G、T N F R S F 1 1 B)、R A N K (T N F R S F 1 1 A)、F A S (T N F R S F 6)、及び C D 4 0 (T N F R S F 5) へのバックグラウンドを超える特異的結合を示さなかった。O X 4 0 m A b 2 4 を形成するために「ヒト化」されたマウス抗ヒト O X 4 0 I g G 1 モノクローナル抗体 9 B 1 2 は、これらの T N F R S F タンパク質への結合の類似の欠如を示した (図 5 B)。

20

【 0 2 4 5 】

3 . 4 : 結 論

ヒト O X 4 0 への O X 4 0 m A b 2 4 及び 9 B 1 2 の結合は特異的であり、関連性の高い T N F R S F タンパク質と交差反応しない。

30

【 0 2 4 6 】

実施例 4 : i n v i t r o で O X 4 0 を介して一次ヒト C D 4 + T 細胞を共刺激する O X 4 0 m A b 2 4 の能力

この実施例では、プレートベースのヒト C D 4 + T 細胞増殖及びサイトカイン放出アッセイを用いて、C D 3 / T 細胞レセプター (T C R) 複合体を介する活性化と組み合わせて T 細胞の活性化を増強する O X 4 0 m A b 2 4 の能力を評価した。C D 3 / T C R シグナル伝達の不在下で可溶性 O X 4 0 m A b 2 4 及びプレート結合 O X 4 0 m A b 2 4 の活性を調べたのと同様に、可溶性 O X 4 0 m A b 2 4 の活性も調べた。

40

【 0 2 4 7 】

4 . 1 材 料

この試験で使用した材料を表 4 - 1 に列挙する。

【 0 2 4 8 】

【表 4 - 1】

表 4-1 材料

アイテム	供給元
AlexaFluor® 647 ヤギ抗ヒト IgG (H+L)	Life Technologies, Carlsbad, CA
抗ヒト CD4 EFluor450®	eBioscience, San Diego, CA
ウシ血清アルブミン (BSA)	Sigma, Saint Louis, MO
CFSE 細胞標識キット	Life Technologies, Carlsbad, CA
完全 RPMI 培地: RPMI-1640 + 10% FBS	Life Technologies, Carlsbad, CA 製の材料
ディープウェルプレート, ポリプロピレン, 2 mL	VWR, Radnor, PA
EasySep CD4 ⁺ T 細胞富化キット	Stem Cell Technologies, Vancouver, BC Canada
FlowJo ソフトウェア	TreeStar, Ashland, OR
Fcγ特異的ヤギ抗ヒト IgG	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA
Fcγ特異的ヤギ抗マウス IgG	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA
熱不活性化新生仔ウシ血清	Life Technologies, Carlsbad, CA
組換えヒト IL-2	Preprotech, Rocky Hill, NJ
Leuko Pak	AllCells, Alameda, CA
LSM	MP Biomedicals, Santa Ana, CA
LSR II フローサイトメーター	BD Biosciences, San Jose, CA
マウス抗ヒト CD3 抗体クローン OKT3	Biolegend, San Diego, CA
新生仔ウシ血清, 熱不活性化(FBS)	Life Technologies, Carlsbad, CA
非組織培養処理丸底 96 ウェルプレート	VWR, Radnor, PA
PHA-L	Roche Applied Science, Indianapolis, IN
カルシウムおよびマグネシウムを含まないリン酸緩衝生理食塩水(PBS) pH7.2	Life Technologies, Carlsbad, CA
Prism ソフトウェア, v 5.01	Graphpad Software, San Diego, CA
ヨウ化プロピジウム (1 mg/mL 溶液)	Sigma, Saint Louis, MO
RosetteSep CD4 ⁺ T 細胞富化キット	StemCell Technologies, Vancouver, BC Canada
RPMI-1640	Life Technologies, Carlsbad, CA
Th1/Th2 マルチサイトカイン検出アレイ	Mesoscale Discovery (MSD), Rockville, MD
Vi 細胞カウンター	Beckman Coulter, Indianapolis, IN
ヘパリンナトリウム抗凝固処理全血	MedImmune Blood Donor Program, Gaithersburg, MD

10

20

30

【 0 2 4 9 】

4 . 2 アッセイ

4 . 2 . 1 O X 4 0 m A b 2 4 のプレート固定化バイオ活性

プレートベースの薬剤捕捉アッセイでヒト CD 4 ⁺ T 細胞増殖及びサイトカイン産生を測定することにより O X 4 0 m A b 2 4 のバイオ活性を決定した (図 6) 。

【 0 2 5 0 】

製造業者のプロトコルに従って R o s e t t e S e p C D 4 ⁺ T 細胞富化キットを用いて健常ドナー全血から富化ヒト CD 4 ⁺ T 細胞を単離した。4 つの独立したドナーから細胞を用いてアッセイを行った。

40

【 0 2 5 1 】

C D 4 ⁺ T 細胞を完全 R P M I 培養培地中に懸濁させ、細胞濃度を 1 . 0 × 1 0 ⁶ / m L に調整した。最終濃度で 2 μ g / m L のフィトヘマグルチニン - ロイコアグルチニン (P H A - L) 及び 2 0 I U / m L の組換えヒト I L - 2 を添加し、そして 3 7 及び 5 % C O 2 の加湿組織培養インキュベーターで細胞を 2 日間培養することにより、T 細胞を活性化して O X 4 0 をアップレギュレートした。

【 0 2 5 2 】

2 μ g / m L のヤギ抗マウス F c γ 特異的 I g G 及び 2 μ g / m L のヤギ抗ヒト F c γ

50

特異的 I g G を含む 100 μ L の P B S 液で非組織培養処理丸底 96 ウェルアッセイプレートに被覆した。可溶性 O X 40 m A b 24 活性のアッセイを意図したウェルにはヤギ抗ヒト I g G 捕捉抗体を添加しなかった。プレートを 4 で一晩インキュベートし、200 μ L の P B S で洗浄し、P B S 中 1 % B S A (1 % B S A / P B S) を用いて 37 で 90 分間ブロックした。プレートを P B S で洗浄し、1 % B S A / P B S 中に再構成された 2 n g / m L のマウス抗ヒト C D 3 クローン O K T 3 を 37 で 90 分間にわたりプレートに添加した。プレートを P B S で洗浄して未結合 O K T 3 を除去し、O X 40 m A b 24、R 3 4 7 ヒト I g G 1 対照 m A b、9 B 1 2、及びマウス I g G 1 対照 m A b クローン M O P C - 21 を 0.918 μ g / m L (3.0 n M) から開始して 1 % B S A / P B S 中にそれぞれ再構成し、そして 3 倍希釈系列で段階希釈し、次いでアッセイプレートに添加し、37 で 90 分間インキュベートした。

10

【0253】

活性化一次ヒト C D 4⁺ T 細胞を捕集し、完全 R P M I 培地で洗浄し、そして濃度を 1.0 $\times$ 10⁶ 生存細胞 / m L に調整した。推奨された 5 μ M ではなく 1.25 μ M の C F S E を使用して 37 で 10 分間のインキュベートした以外は製造業者の説明書に従って、カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル (C F S E) を用いて細胞を標識した。標識後、細胞を完全 R P M I 培地中に懸濁させ、濃度を 0.5 $\times$ 10⁶ / m L に調整した。プレートを P B S で洗浄し、そして 200 μ L の C D 4⁺ T 細胞 (100,000 / ウェル) を各ウェルに添加した。可溶性 O X 40 m A b 24 を含有するウェルでは、O X 40 m A b 24 をプレート結合 O X 40 m A b 24 に使用される最高最終濃度に完全 R P M I 培地で希釈した。380 $\times$ g で遠心分離することによりプレート中の細胞をペレットにし、37 で 3 日間インキュベートした。72 時間のインキュベーション時間の後、40 μ L の細胞培養上清を取り出してサイトカイン放出測定に供した。C D 4⁺ T 細胞をペレット化し、2 % F B S を含有する P B S (F A C S 緩衝液) で 1 回洗浄した。C D 4⁺ T 細胞を同定するための抗ヒト C D 4 e F l u o r 450 (登録商標) 標識抗体及び生存 / 非生存細胞を識別するためのヨウ化プロビジウム (P I) を含有する結合ミックス中に細胞を懸濁させ、30 分間インキュベートした。インキュベーション後、細胞を F A C S 緩衝液で洗浄し、F A C S 緩衝液中に再懸濁させ、そして L S R I I フローサイトメーター及びフローサイトメトリ標準 (F C S) 形式データを解析するために F l o w J o ソフトウェアを用いてフローサイトメトリにより解析した。

20

30

【0254】

T 細胞増殖を解析するために、F l o w J o ソフトウェアを用いて生存 (P I 陰性) イベントをゲート処理し、C F S E の希釈を示す C D 4 ゲート処理細胞のパーセントを、増殖を起こしている細胞のパーセントの尺度として決定した。

【0255】

サイトカイン放出を解析するために、M e s o S c a l e D i s c o v e r y (G a i t h e r s b u r g , M D) 製の 10 プレックスヒト T h 1 / T h 2 サイトカイン解析キットを用いて製造業者のプロトコルに従って、培養の 72 時間後に得られた細胞培養上清をサイトカイン含有率に関して測定した。このキットは、次のヒトサイトカイン、すなわち、I F N γ 、I L - 2、I L 4、I L - 5、I L - 8、I L - 10、I L - 12 p 70、I L - 13、及び I L - 1 β を定量的に測定する電気化学的検出方法を利用する。

40

【0256】

W i n d o w s 用 G r a p h P a d P r i s m バージョン 5.01 (G r a p h P a d S o f t w a r e , S a n D i e g o C a l i f o r n i a U S A , w w w . g r a p h p a d . c o m) を用いて増殖値又はサイトカイン放出値のいずれかに対して m A b 濃度の対数をプロットした。O X 40 m A b 24 バイオ活性で 20 %、50 %、及び 90 % 最大効果 (E C₂₀、E C₅₀、及び E C₉₀) 値を生じる有効濃度を、E C A n y t h i n g 機能を用いて用量 - 反応シグモイドバイオ活性曲線から計算した。

【0257】

4.3 結果

50

4つのドナーのそれぞれからの増殖データ及び1つのドナーからのサイトカイン放出データを図7A～C及び図8A～Eに示し、ヒト一次CD4⁺T細胞増殖のEC₂₀、EC₅₀、及びEC₉₀の効力値を表4-2に示し、ヒト一次CD4⁺T細胞サイトカイン放出アッセイの効力値を表4-3～表4-7に示し、OX40mAb24及び9B12の平均増殖値及びサイトカイン放出値を表4-8及び表4-9に示す。

【0258】

OX40mAb24は、濃度依存的に一次ヒトCD4⁺T細胞(n=4)の増殖を共刺激し、EC₂₀、EC₅₀、及びEC₉₀値は、それぞれ、21、28、及び72pMであった。9B12は、CD4⁺T細胞の増殖を共刺激し、EC₂₀、EC₅₀、及びEC₉₀値は、106、218、及び622pMであった。従って、最大増殖反応の50%を誘導するのに必要な9B12濃度とOX40mAb24濃度との比は8～1であった(表4-2)。

10

【0259】

OX40mAb24及び9B12は、一次ヒトCD4⁺T細胞を共刺激してサイトカインを放出する(n=4)。平均のEC₂₀、EC₅₀、及びEC₉₀値は、増殖値よりも効力が低かった。これらは、表4-8及び表4-9にまとめられている。IL-2、IL-4、IL-8、IL-12p70、及びIL-1βアッセイ結果では、用量-反応シグモイド曲線が不十分に作成されたか又は存在しなかったので、両方のmAbで非線形回帰分析を行なうことができなかった。

20

【0260】

【表4-2】

表4-2 一次ヒトCD4⁺T細胞増殖アッセイにおけるOX40mAb24および9B12の平均EC₂₀、EC₅₀およびEC₉₀値

ドナー番号	モノクローナル抗体	EC ₂₀ (95% CI), pM	EC ₅₀ (95% CI), pM	EC ₉₀ (95% CI), pM	可溶分活性	TCR刺激の不在下での活性
367	OX40mAb24	32 (22, 46)	38 (20, 72)	71 (17, 29)	未試験	無し
661	OX40mAb24	33 (28, 39)	51 (33, 77)	128 (96, 172)	未試験	無し
645	OX40mAb24	7.5 (2.7, 21)	8.3 (2.8, 25)	35 (7.1, 173)	無し	未試験
651	OX40mAb24	9.6 (6.3, 15)	16 (9.1, 26)	54 (30, 99)	無し	未試験
平均値(平均値の標準誤差), pM	OX40mAb24	21 (6.9)	28 (9.8)	72 (20)		
367	9B12	99.8 (80.0, 125)	156 (90.2, 269)	337 (214, 530)	未試験	未試験
661	9B12	128 (113, 144)	237 (164, 342)	535 (464, 617)	未試験	未試験
645	9B12	77.5 (30.2, 199)	169 (67.0, 425)	686 (152, 3080)	未試験	未試験
651	9B12	118 (80.8, 173)	309 (201, 475)	929 (511, 1690)	未試験	未試験
平均値(平均値の標準誤差), pM	9B12	106 (11.1)	218 (35.2)	622 (125)		

30

40

CI = 信頼区間; EC₂₀ = 最大効果の20%を生じる有効濃度; EC₅₀ = 半値有効濃度; EC₉₀ = 最大効果の90%を生じる有効濃度; TCR = T細胞レセプター。

【0261】

【表 4 - 3】

表 4-3: 一次ヒト CD4⁺ T 細胞バイオ活性アッセイにおける OX40mAb24 または 9B12 により誘導される IFN γ に対する平均 EC₂₀, EC₅₀ および EC₉₀ 値

ドナー番号	モノクローナル抗体	EC ₂₀ (95% CI), pM	EC ₅₀ (95% CI), pM	EC ₉₀ (95% CI), pM	可溶分活性	TCR 刺激の不在下での活性
367	OX40mAb24	38.6 (21.3, 70.0)	57.2 (31.2, 105)	106 (34.6, 328)	未試験	無し
661	OX40mAb24	ND	ND	ND	未試験	無し
645	OX40mAb24	32.1 (20.8, 49.7)	58.2 (42.0, 80.8)	150 (77.6, 289)	無し	未試験
651	OX40mAb24	47.5 (24.5, 91.8)	77.4 (51.4, 116)	168 (86.7, 324)	無し	未試験
平均値(平均値の標準誤差), pM	OX40mAb24	39.4 (4.46)	64.3 (6.57)	141 (18.4)		
367	9B12	ND	ND	ND	未試験	未試験
661	9B12	ND	ND	ND	未試験	未試験
645	9B12	706 (518, 963)	2380 (1420, 3970)	16300 (5480, 48300)	未試験	未試験
651	9B12	344 (274, 430)	758 (639, 900)	2660 (780, 3990)	未試験	未試験
平均値(平均値の標準誤差), pM	9B12	525 (148)	1570 (662)	9480 (5569)		

CI = 信頼区間; EC₂₀ = 最大効果の 20%を生じる有効濃度; EC₅₀ = 半値有効濃度; EC₉₀ = 最大効果の 90%を生じる有効濃度; TCR = T 細胞レセプター.

【 0 2 6 2 】

【表 4 - 4】

表 4-4: 一次ヒト CD4⁺ T 細胞バイオ活性アッセイにおける OX40mAb24 または 9B12 により誘導される TNF α に対する平均 EC₂₀, EC₅₀ および EC₉₀ 値

ドナー番号	モノクローナル抗体	EC ₂₀ (95% CI), pM	EC ₅₀ (95% CI), pM	EC ₉₀ (95% CI), pM	可溶分活性	TCR 刺激の不在下での活性
367	OX40mAb24	ND	ND	ND	未試験	無し
661	OX40mAb24	ND	ND	ND	未試験	無し
645	OX40mAb24	37.6 (22.5, 62.7)	54.1 (29.1, 101)	96.2 (26.7, 347)	無し	未試験
651	OX40mAb24	ND	ND	ND	無し	未試験
平均値(平均値の標準誤差), pM	OX40mAb24	ND	ND	ND		
367	9B12	ND	ND	ND	未試験	未試験
661	9B12	ND	ND	ND	未試験	未試験
645	9B12	306 (258, 503)	670 (527, 853)	1800 (1100, 2920)	未試験	未試験
651	9B12	388 (300, 502)	764 (640, 919)	2260 (1500, 3410)	未試験	未試験
平均値(平均値の標準誤差), pM	9B12	347 (33.5)	717 (38.4)	2030 (188)		

CI = 信頼区間; EC₂₀ = 最大効果の 20%を生じる有効濃度; EC₅₀ = 半値有効濃度; EC₉₀ = 最大効果の 90%を生じる有効濃度; ND = 曲線の当てはめが悪い (EC₂₀, EC₅₀, EC₉₀) または平均値および平均値の標準誤差を決定するうえで値が不十分であるため未決定; TCR = T 細胞レセプター.

【 0 2 6 3 】

10

20

30

【表 4 - 5】

表 4-5: 一次ヒト CD4⁺ T 細胞バイオ活性アッセイにおける OX40mAb24 または 9B12 により誘導される IL10 に対する平均 EC₂₀, EC₅₀ および EC₉₀ 値

ドナー番号	モノクローナル抗体	EC ₂₀ (95% CI), pM	EC ₅₀ (95% CI), pM	EC ₉₀ (95% CI), pM	可溶分活性	TCR 刺激の不在下での活性
367	OX40mAb24	41.6 (17.8, 97.0)	59.5 (25.4, 139)	105 (25.0, 440)	未試験	無し
661	OX40mAb24	63.5 (29.6, 136)	89.5 (64.2, 125)	154 (93.3, 255)	未試験	無し
645	OX40mAb24	ND	ND	ND	無し	未試験
651	OX40mAb24	53.0 (31.0, 90.6)	86.4 (65.0, 115)	188 (110, 321)	無し	未試験
平均値(平均値の標準誤差), pM	OX40mAb24	52.7 (6.32)	78.5 (9.53)	149 (24.1)		
367	9B12	130 (83.3, 204)	198 (139, 284)	385 (224, 662)	未試験	未試験
661	9B12	ND	ND	ND	未試験	未試験
645	9B12	528 (363, 767)	1220 (858, 1740)	4630 (2050, 10400)	未試験	未試験
651	9B12	405 (300, 547)	796 (649, 976)	2320 (1440, 3730)	未試験	未試験
平均値(平均値の標準誤差), pM	9B12	354 (118)	738 (296)	2445 (1227)		

CI = 信頼区間; EC₂₀ = 最大効果の 20%を生じる有効濃度; EC₅₀ = 半値有効濃度; EC₉₀ = 最大効果の 90%を生じる有効濃度; ND = 曲線の当てはめが悪い(ため) (EC₂₀, EC₅₀, EC₉₀) または平均値および平均値の標準誤差を決定するうえで値が不十分であるため未決定; TCR = T 細胞レセプター.

【 0 2 6 4 】

10

20

30

【表 4 - 6】

表 4-6:一次ヒト CD4⁺ T 細胞バイオ活性アッセイにおける OX40mAb24 または 9B12 により誘導される IL13 に対する平均 EC₂₀, EC₅₀ および EC₉₀ 値

ドナー番号	モノクローナル抗体	EC ₂₀ (95% CI), pM	EC ₅₀ (95% CI), pM	EC ₉₀ (95% CI), pM	可溶分活性	TCR 刺激の不在下での活性
367	OX40mAb24	ND	ND	ND	未試験	無し
661	OX40mAb24	ND	ND	ND	未試験	無し
645	OX40mAb24	44.7 (26.5, 75.5)	73.8 (52.2, 104)	163 (93.3, 286)	無し	未試験
651	OX40mAb24	36.2 (24.9, 52.7)	65.0 (49.6, 85.3)	164 (99.2, 273)	無し	未試験
平均値(平均値の標準誤差), pM	OX40mAb24	40.5 (4.25)	69.4 (4.40)	164 (0.50)		
367	9B12	ND	ND	ND	未試験	未試験
661	9B12	154 (841, 283)	238 (166, 341)	472 (278, 800)	未試験	未試験
645	9B12	1100 (413, 2910)	5450 (1060, 2800)	6930 (4310, 1110000)	未試験	未試験
651	9B12	495 (324, 756)	1770 (896, 3510)	13400 (2980, 60400)	未試験	未試験
平均値(平均値の標準誤差), pM	9B12	583 (277)	2486 (1550)	6930 (3730)		

CI = 信頼区間; EC₂₀ = 最大効果の 20%を生じる有効濃度; EC₅₀ = 半値有効濃度; EC₉₀ = 最大効果の 90%を生じる有効濃度; ND = 曲線の当てはめが悪い (EC₂₀, EC₅₀, EC₉₀) または平均値および平均値の標準誤差を決定するうえで値が不十分であるため未決定; TCR = T 細胞レセプター.

【 0 2 6 5 】

【表 4 - 7】

表 4-7: 一次ヒト CD4⁺ T 細胞バイオ活性アッセイにおける OX40mAb24 または 9B12 により誘導される IL5 に対する平均 EC₂₀, EC₅₀ および EC₉₀ 値

ドナー番号	モノクローナル抗体	EC ₂₀ (95% CI), pM	EC ₅₀ (95% CI), pM	EC ₉₀ (95% CI), pM	可溶分活性	TCR 刺激の不在下での活性
367	OX40mAb24	33.2 (21.2, 52.1)	46.7 (24.7, 88.0)	79.8 (12.3, 519)	未試験	無し
661	OX40mAb24	43.4 (27.6, 68.4)	69.0 (49.7, 95.7)	144 (86.8, 238)	未試験	無し
645	OX40mAb24	ND	ND	ND	無し	未試験
651	OX40mAb24	56.2 (35.5, 88.9)	95.9 (76.1, 121)	224 (128, 391)	無し	未試験
平均値(平均値の標準誤差), pM	OX40mAb24	44.3 (6.65)	70.5 (14.2)	149 (41.7)		
367	9B12	ND	ND	ND	未試験	未試験
661	9B12	ND	ND	ND	未試験	未試験
645	9B12	ND	ND	ND	未試験	未試験
651	9B12	423 (285, 627)	1090 (742, 1600)	4870 (1900, 12500)	未試験	未試験
平均値(平均値の標準誤差), pM	9B12	ND	ND	ND		

CI = 信頼区間; EC₂₀ = 最大効果の 20%を生じる有効濃度; EC₅₀ = 半値有効濃度; EC₉₀ = 最大効果の 90%を生じる有効濃度; ND = 曲線の当てはめが悪い (EC₂₀, EC₅₀, EC₉₀) または平均値および平均値の標準誤差を決定するうえで値が不十分であるため未決定; TCR = T 細胞レセプター.

【 0 2 6 6 】

【表 4 - 8】

表 4-8: OX40mAb24 における増殖およびサイトカイン放出に対する平均 EC₂₀, EC₅₀ および EC₉₀ 値のまとめ

バイオ活性リードアウト	EC ₂₀ (StdErr), pM	EC ₅₀ (StdErr), pM	EC ₉₀ (StdErr), pM
CD4 T 細胞増殖	21 (6.9)	28 (98)	72 (20)
IFN γ 放出	39.4 (4.46)	64.3 (6.57)	141 (18.4)
TNF α 放出	ND	ND	ND
IL10	52.7 (6.32)	78.5 (9.53)	149 (24.1)
IL13	40.5 (4.25)	69.4 (4.40)	164 (0.50)
IL5	44.3 (6.65)	70.5 (14.2)	149 (41.7)

EC₂₀ = 最大効果の 20%を生じる有効濃度; EC₅₀ = 半値有効濃度; EC₉₀ = 最大効果の 90%を生じる有効濃度; ND = 平均値および平均値の標準誤差を計算するうえで n 値が不十分であるため未決定; StdErr = 平均値の標準誤差.

【 0 2 6 7 】

10

20

30

40

【表 4 - 9】

表 4-9: 9B12 における増殖およびサイトカイン放出に対する平均 EC₂₀, EC₅₀ および EC₉₀ 値のまとめ

バイオ活性リードアウト	EC ₂₀ (StdErr), pM	EC ₅₀ (StdErr), pM	EC ₉₀ (StdErr), pM
CD4 T 細胞増殖	106 (11.1)	218 (35.2)	622 (125)
IFN γ 放出	525 (148)	1570 (662)	9480 (5569)
TNF α 放出	347 (33.5)	717 (38.4)	2030 (188)
IL10	354 (118)	738 (296)	2445 (1227)
IL13	583 (277)	2486 (1547)	6934 (3732)
IL5	ND	ND	ND

EC₂₀ = 最大効果の 20%を生じる有効濃度; EC₅₀ = 半値有効濃度; EC₉₀ = 最大効果の 90%を生じる有効濃度; ND = 平均値および平均値の標準誤差を計算するうえで n 値が不十分であるため未決定; StdErr = 平均値の標準誤差.

【0268】

非プレート結合可溶性 O X 4 0 m A b 2 4 の活性を決定した。可溶性 O X 4 0 m A b 2 4 は、一次ヒト C D 4 + T 細胞増殖 (図 7 A ~ C) 又はサイトカイン放出 (図 8 A ~ E) のいずれについても、抗 C D 3 抗体単独で又は R 3 4 7 ヒト I g G 1 対照 m A b の存在下で観測されるレベルを超えて誘導することはなかった。プレート結合抗 C D 3 抗体単独では、最小レベル ~ 中レベルの増殖及びサイトカイン放出を生じた。ここで可溶性 O X 4 0 m A b 2 4 により示された活性の欠如は、O X 4 0 媒介 N F κ B シグナル伝達を測定した 2 細胞バイオ活性アッセイで細胞ベースの架橋を伴わない可溶性 O X 4 0 m A b 2 4 で観測された活性の不在と一致する (以下の実施例 5 を参照のこと)。

【0269】

同様に、O X 4 0 m A b 2 4 は、プレート表面上に固定されたものでも可溶性未結合タンパク質として添加されたものでも、サブマイトジェニック抗 C D 3 抗体シグナルの不在下で、C D 4 + T 細胞増殖 (図 7 A ~ C) もサイトカイン放出 (図 8 A ~ E) もほとんど又はまったく誘導しなかった。これらの結果から、この試験では、O X 4 0 m A b 2 4 は同時 C D 3 / T C R ライゲーションの不在下で一次ヒト C D 4 + T 細胞で活性を有していないことが示された。

【0270】

4.4 結論

O X 4 0 m A b 2 4 は、ヒト化に用いられた抗体 9 B 1 2 と同じように濃度依存的に一次ヒト C D 4 + T 細胞の増殖及びサイトカイン放出を誘導した (図 8 A ~ E 及び図 9 A ~ E)。O X 4 0 m A b 2 4 は、プレート結合タンパク質として活性を示したが、可溶性タンパク質として活性を示さなかった。さらに、O X 4 0 m A b 2 4 活性は、C D 3 / T C R シグナル伝達と同時に生じた。

【0271】

実施例 5 : ジャーカット N F κ B ルシフェラーゼレポーター T 細胞を用いた 2 細胞ベースのバイオ活性アッセイでの O X 4 0 m A b 2 4 の *in vitro* 活性の決定

この実施例では、ヒト O X 4 0 を介してシグナル伝達する O X 4 0 m A b 2 4 及び 9 B 1 2 の能力を一セットの 2 細胞レポーターバイオ活性アッセイにより評価した。O X 4 0 共刺激を介する T 細胞活性化の測定は、N F κ B シグナル伝達経路の刺激に反応してルシフェラーゼを生成する O X 4 0 過剰発現ジャーカット N F κ B ルシフェラーゼ T 細胞レポーター系を用いて達成された (図 10)。N F κ B シグナル伝達は、O X 4 0 エンゲージメントの下流に行われることが報告されており、増殖やサイトカイン放出などの T 細胞活性化の他の尺度と相関し得る (C r o f t M , e t a l . , I m m u n o l R e v . 2 2 9 : 1 7 3 - 9 1 (2 0 0 9))。細胞溶解物にルシフェラーゼ基質を添加して反応生成物により発せられる光をルミノメーターにより測定することにより、ルシフェラーゼの量つまり T 細胞活性化を測定した。様々な F c γ レセプター補体を発現するように工学操作された細胞を用いて架橋された O X 4 0 m A b 2 4、さらには可溶性非 F c γ R 架橋 O X 4 0 m A b 2 4 のバイオ活性を測定した。

【 0 2 7 2 】

5 . 1 材 料

この試験で使用した材料を表 5 - 1 に列挙する。

【 0 2 7 3 】

【 表 5 - 1 】

表 5-1: 材料

アイテム	供給元
CD45 ⁺ マイクロビーズ	Miltenyi, San Diego, CA
コラゲナーゼ III	Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ
ウシ臍臓由来 DNase I	Sigma, Saint Louis, MO
EDTA, 0.5M pH 8.0	Life Technologies, Carlsbad, CA
Envision ルミネセンスリーダー	Perkin Elmer, Waltham, MA
熱不活性化新生仔ウシ血清(FBS)	Life Technologies, Carlsbad, CA
LS カラム	Miltenyi, San Diego, CA
MACS 緩衝液: PBS + 0.5% BSA + 2 mM EDTA	Life Technologies, Carlsbad, CA 製の材料
非 TC 処理丸底 96 ウェルプレート	VWR, Radnor, PA
Prism v5.01 ソフトウェア	GraphPad, San Diego, CA
Steady-Glo ルシフェラーゼアッセイ溶液	Promega, Madison, WI
ViCell カウンター	Beckman Coulter, Indianapolis, IN

10

20

【 0 2 7 4 】

5 . 2 2 細胞 バイオ活性 アッセイ

5 . 2 . 1 一次 ヒト CD 4 5 ⁺ 細胞 の 単 離

一次ヒトCD45⁺細胞をヒト腫瘍から単離した。腫瘍サンプルを輸送媒体から取り出し、無菌ペトリ皿に配置した。ハンク緩衝塩溶液を添加し、目視可能な壊死組織又はなんらかの正常組織を腫瘍サンプルから切除した。組織を小片（約1mm）にミンスし、50mLコニカルチューブに配置し、コラゲナーゼIII酵素ミックス（250IU/mLコラゲナーゼIII、3mM CaCl₂、315μg/mL DNAアーゼI）を添加し、混合し、そしてインキュベートした。消化サンプルを70ミクロンフィルターに通して濾過し、MACS緩衝液で洗浄した。解離細胞をペレット化し、ViCellカウンターを用いて細胞数及び生存能は決定した。細胞をCD45マイクロビーズと共にMACS緩衝液中に懸濁させ、そして氷上でインキュベートした。細胞を洗浄し、MACS緩衝液中に再懸濁させ、LSカラムを用いたCD45⁺細胞のポジティブ選択に供した。マグネットからカラムを取り出してMACS緩衝液をカラムに添加することにより、ビーズ結合CD45⁺細胞を溶出させた。細胞をペレット化し、完全RPMI培地中に再懸濁させ、そして以上に記載のバイオ活性アッセイで使用した。

30

【 0 2 7 5 】

5 . 2 . 2 アッセイプロトコル

2細胞バイオ活性アッセイを用いてOX40mAb24及び9B12のバイオ活性を試験した。ヒトOX40過剰発現ジャーカットNFκBルシフェラーゼレポータークロン64（OX40ジャーカットレポーター）を用いてOX40アゴニズム（NFκB活性）を測定した。第2のFcγR発現細胞系を用いてOX40mAb24架橋を媒介した。この架橋は、OX40ジャーカットレポーター細胞上のOX40をクラスター化及び活性化する（図10）。架橋に使用したFcγR発現細胞系は、RajiヒトB細胞リンパ腫系、CD32A発現HEK293、CD32B発現HEK293、又は一次ヒト腫瘍から単離されたCD45⁺免疫細胞を含んでいた。

40

【 0 2 7 6 】

OX40mAb24の可溶分活性を決定するために、親HEK293細胞（これはFcγRヌルであるのでOX40mAb24を架橋できない）を用いて、又は共存する架橋細胞の不在下で、バイオ活性アッセイを行った。

50

【0277】

使用前、OX40ジャーカッター細胞を $0.5 \sim 1.5 \times 10^6 / \text{mL}$ の密度で組織培養インキュベーター内の完全RPMI培地中で培養した。バイオアッセイの前日、 10^6 細胞/mLの最終密度で細胞を継代した。

【0278】

OX40ジャーカッター細胞、FcγR発現細胞系、又はHEK親細胞を捕集してペレット化した。一次ヒト腫瘍からCD45⁺細胞及び正常近接組織を単離するために、組織を解離させ、CD45⁺細胞を単離し、以下に記載されるようにバイオ活性アッセイの使用に供した。

【0279】

OX40mAb24、9B12、及び種々の対照抗体を完全RPMI培地で3倍段階希釈した。

【0280】

OX40ジャーカッター細胞 + FcγR発現細胞又はHEK親細胞を100,000細胞/ウェルで96ウェルプレートに添加した。OX40mAb24、9B12、又は対照抗体を10μg/mLの開始濃度で希釈系列で細胞に添加し、組織培養インキュベーター内で37℃でインキュベートした。

【0281】

16～24時間のインキュベーション時間後、100μLの再構成Steady-Gloルシフェラーゼアッセイ溶液(Promega, Madison, WI)を各ウェルに添加し、混合して細胞を溶解させ、次いでインキュベートしてルシフェラーゼシグナルを平衡化させた。Steady-Glo/sampleライセート(150μL)を各ウェルから96ウェル白色壁アッセイプレートに導入し、Perkin Elmer Envisionルミネセンスリーダーを用いてルミネセンスを読み取った。

【0282】

Windows用GraphPad Prismバージョン5.01(GraphPad Software, San Diego, CA)を用いて、ルミネセンスRLU(y軸)に対してOX40mAb24、9B12、R347ヒトIgG1、マウスIgG1クローンMOPC-21の濃度(x軸はタンパク質濃度のlog10である)をプロットした。用量-反応シグモイド(変動傾き)バイオ活性曲線から $f = 20$ 、 $f = 50$ 、及び $f = 90$ でECAny thing(ECf)を用いて、バイオ活性のEC₂₀、EC₅₀、及びEC₉₀値を決定した。

【0283】

5.3 2細胞バイオ活性アッセイの結果

OX40mAb24及び対照抗体のバイオ活性の結果を図11A～D、図12A～D、及び表5-2に示す。

【0284】

FcγR発現細胞系(例えば、一次ヒト腫瘍から単離されたCD32A発現HEK293、CD32B発現HEK293、RajiB細胞、又はCD45⁺細胞)の存在下で、OX40mAb24は、NFκB経路活性化により測定されるようにOX40過剰発現ジャーカッターNFκBレポーター細胞の強力な刺激を示した。第2の細胞型の不在下で又は外因的発現FcγRsの欠如したHEK293細胞の存在下で、OX40mAb24は最小のレポーター活性を呈した(図11A～D)。

【0285】

2細胞バイオアッセイでの効力値(EC₂₀、EC₅₀、及びEC₉₀)を表5-2にまとめる。すべてのアッセイにわたる平均のEC₂₀、EC₅₀、及びEC₉₀値は、それぞれ、228、751、及び5630pMであった。

【0286】

9B12及び対照抗体のバイオ活性の結果を図12A～Dに示し、効力値を表5-3にまとめる。すべてのアッセイの平均のEC₂₀、EC₅₀、及びEC₉₀値は、それぞれ

10

20

30

40

50

、519、2530、及び41100 pMであった。従って、9B12の2細胞バイオ活性 (EC_{50}) とOX40mAb24の2細胞バイオ活性 (EC_{50}) との比は3.4 ~ 1 であると計算された。

【0287】

【表5-2】

表 5-2: OX40mAb24 の2細胞バイオ活性

実験 番号	FcγR 発現細胞*	EC ₂₀ (95% CI) pM	EC ₅₀ (95% CI) pM	EC ₉₀ (95% CI) pM
1	Raji	298 (236, 378)	1140 (982, 1340)	9850 (6500, 14300)
2	CD32A 発現 HEK	104 (78.8, 138)	437 (370, 517)	4250 (2900, 6240)
3	CD32A 発現 HEK	100 (79.5, 126)	322 (281, 370)	2060 (1530, 2780)
4	Raji	350 (259, 467)	1040 (855, 1270)	5930 (3740, 9400)
5	CD32B 発現 HEK	90.6 (75.4, 109)	270 (242, 301)	1520 (1200, 1920)
6	Raji	180 (109, 296)	796 (577, 1100)	8410 (3820, 18500)
7	CD32B 発現 HEK	280 (198, 394)	899 (710, 1140)	5730 (3290, 9970)
8	CD32B 発現 HEK	237 (196, 286)	671 (592, 762)	3510 (2630, 4670)
9	Raji	676 (443, 1030)	1320 (970, 1800)	3820 (2000, 7320)
10	Raji	297 (127, 694)	1260 (666, 2390)	12500 (2570, 60500)
11	CD32B 発現 HEK	144 (113, 184)	700 (598, 818)	8540 (5770, 12600)
12	CD45 ⁺ 細胞, NSCLC	33.6 (24.7, 45.8)	81.6 (68.5, 97.3)	334 (236, 471)
13	CD45 ⁺ 細胞, RCC	92.2 (75.4, 113)	337 (296, 383)	2630 (1940, 3550)
14	CD45 ⁺ 細胞, NSCLC	247 (207, 295)	772 (688, 867)	4700 (3600, 6140)
15	CD45 ⁺ 細胞, RCC	351 (155, 798)	1410 (782, 2530)	12700 (2960, 54500)
16	CD32A 発現 HEK	166 (145, 191)	553 (507, 603)	3720 (3060, 4530)
	平均値(平均値の 標準誤差)	228 (38.9)	751 (101)	5630 (937)

NSCLC = 非小細胞肺癌; RCC = 腎細胞癌

* 示されるように、アッセイでは Raji, CD32A 発現 HEK293, CD32B 発現 HEK293 細胞, または一次ヒト腫瘍サンプルから単離された CD45⁺細胞を OX40 発現 Jurkat NFκB-ルシフェラーゼクローン 64 レポーター細胞と共に使用した。

【0288】

10

20

30

【表 5 - 3】

表 5-3: 9B12 の 2 細胞バイオ活性

実験 番号	FcγR 発現細胞*	EC ₂₀ pM	EC ₅₀ pM	EC ₉₀ pM
1	Raji	1110 (791, 1570)	9280 (4460, 19300)	267000 (57900, 1230000)
2	CD32A 発現 HEK	74.1 (53.0, 104)	338 (279, 410)	3760 (2440, 5790)
3	CD32A 発現 HEK	66.7 (43.3, 103)	225 (175, 289)	1550 (914, 2630)
4	Raji	1040 (834, 1300)	5040 (3880, 6550)	61200 (32200, 116000)
5	CD32B 発現 HEK	249 (206, 303)	726 (641, 823)	3950 (2980, 5240)
6	Raji	548 (408, 736)	2700 (2070, 3620)	33700 (17000, 66700)
7	CD32B 発現 HEK	585 (520, 658)	1770 (1620, 1930)	10200 (8280, 12500)
8	CD32B 発現 HEK	518 (449, 598)	1340 (1210, 1480)	6050 (4800, 7630)
9	Raji	872 (504, 1510)	3070 (1910, 4950)	22600 (7000, 73100)
10	Raji	571 (212, 1540)	3330 (1080, 10200)	54400 (3400, 872000)
11	CD32B 発現 HEK	650 (458, 923)	2360 (1790, 3100)	18200 (9200, 36000)
12	CD45 ⁺ 細胞, NSCLC	104 (76.3, 143)	223 (185, 269)	741 (501, 1100)
13	CD45 ⁺ 細胞, RCC	ND	ND	ND
14	CD45 ⁺ 細胞, NSCLC	ND	ND	ND
15	CD45 ⁺ 細胞, RCC	356 (132, 964)	2420 (938, 6250)	50500 (4140, 616000)
	平均値(平均値の 標準誤差)	519 (96.2)	2530 (687)	41100 (19700)

ND = 未決定; NSCLC = 非小細胞肺癌; RCC = 腎細胞癌

* 示されるように、アッセイでは Raji, CD32A 発現 HEK293, CD32B 発現 HEK293 細胞, または一次ヒト腫瘍サンプルから単離された CD45⁺細胞を OX40 発現 Jurkat NFκB-ルシフェラーゼクロン 64 レポーター細胞と共に使用した。

【 0 2 8 9 】

5 - 4 : 結論

OX40 mAb 24 及び 9B12 は、OX40 過剰発現 ジャーカット NFκB ルシフェラーゼレポーター細胞系で FcγR 経路の刺激により測定したときにヒト T 細胞の活性化を媒介する。OX40 mAb 24 の Fc ドメインを介して架橋可能な FcγRs を発現する細胞の不在下では、最小のレポーター細胞系活性が測定された。しかしながら、mAb を架橋可能な FcγR を発現する細胞と、T 細胞活性化のリードアウトのための ジャーカット過剰発現 NFκB ルシフェラーゼレポーター系と、を含む 2 細胞システムでは、OX40 mAb 24 及び 9B12 は、それぞれ、751 pM 及び 2530 pM の平均 EC₅₀ 値で強力な OX40 活性化を媒介した。従って、2 細胞アッセイシステムでの OX40 mAb 24 のバイオ活性は、9B12 に類似していた。

【 0 2 9 0 】

実施例 6 : 惹起エフェクター機能に対する OX40 mAb 24 の能力

この実施例では、Fc エフェクター機能を惹起する OX40 mAb 24 の能力、すなわち、高レベルの OX40 を発現する一次ヒト CD4⁺ T 細胞に対してヒトナチュラルキラー (NK) 細胞媒介抗体依存性細胞傷害性 (ADCC) を惹起する OX40 mAb 24 の能力、又は補体古典経路による補体依存性細胞傷害性 (CDC) の前提条件として C1q に結合する OX40 mAb 24 の能力に関して、評価した。ヒト IgG4P Fc ドメインを含有する OX40 mAb 24 の形態 (mAb 28) 又は IgG1 Fc ドメインに FcγRIIIa 結合を低減する三重突然変異を含有する OX40 mAb 24 の形態 (mAb 29) を利用して、ADCC 活性を媒介する OX40 mAb 24 IgG1 Fc ドメインの寄与を評価した。また、OX40 mAb 24 のエフェクター機能と、OX40 mAb 24 を形成するためにヒト化されたマウス抗ヒト OX40 IgG1 モノクローナル抗体 9B12 と、を比較した。抗 CD20 抗体 リツキシマブは、CD20 を発現する B 細胞に結合するので、陽性対照として ADCC 実験に使用した。一次活性化ヒト CD4⁺ T 細胞

胞はCD20を発現しないので、ADCCアッセイシステムで使用されるNK細胞の活性を検証するために、CD20を発現するTolledo B細胞系を用いた独立したアッセイを行った。

【0291】

6.1 材料

この試験で使用した材料を表7-1に列挙する。

【0292】

【表6-1】

表 6-1: 材料

アイテム	供給元
補体タンパク質C1q	Quidel, San Diego, CA
完全RPMI培地: RPMI-1640+ 10% FBS	Life Technologies, Carlsbad, CA製の材料
DM-L培地	Stem Cell Technologies, Vancouver, BC Canada
GLCバイオセンサーチップ	Bio-Rad, Hercules, CA
FlowJoソフトウェア	FlowJo, Ashland, OR
組換えヒトIL-2	Preprotech, Rocky Hill, NJ
LSR IIフローサイトメーター	BD Biosciences, San Jose, CA
Prismソフトウェア, v 5.01	Graphpad Software, San Diego, CA
ヨウ化プロピジウム (1 mg/mL溶液)	Sigma, Saint Louis, MO
ProteOn Manager 2.1ソフトウェア	Bio-Rad, Hercules, CA
ProteOn XPR36装置	Bio-Rad, Hercules, CA
RosetteSep CD4 T細胞富化キット	Stem Cell Technologies, Vancouver, BC Canada
RosetteSepヒトNK細胞富化	Stem Cell Technologies, Vancouver, BC Canada
ViCellカウンター	Beckman Coulter, Indianapolis, IN
Vybrant DiO細胞 標識溶液	Life Technologies, Carlsbad, CA
ヘパリンナトリウム抗凝固処理全血	MedImmune Blood Donor Program, MedImmune, Gaithersburg, MD

10

20

【0293】

6.2 アッセイ

6.2.1 抗体依存性細胞傷害性

エフェクターとして富化一次ヒトNK細胞及び標的としてOX40発現一次ヒトCD4⁺T細胞を用いて、9B12と対比して及びIgG4P Fcドメイン又は三重突然変異体(TM)ヒトIgG1 Fcドメインのいずれかと共にOX40mAb24のFabアームを含有するモノクローナル抗体と対比して、OX40mAb24のADCC活性を試験した。陽性対照として、Tolledo B細胞系のリツキシマブ指向性死滅を用いて各NK細胞調製物の活性を試験した。

30

【0294】

一次ヒトCD4⁺T細胞を単離するために、MedImmune Blood Donor Programを介して健常ドナーから得られたヘパリン抗凝固処理全血を次のプロトコルに従って処理した。20mLの全血に対してStem Cell Technologies RosetteSep CD4 T細胞単離キット抗体ミックス(1mL、Stem Cell Technologies, Vancouver, BC Canada)を添加し、混合し、室温(RT)で20分間(mm)インキュベートした。血液を無菌室温FACS緩衝液(PBS、pH7.2 + 2%熱不活性化新生仔ウシ血清)で1:1希釈し、DM-L培地上に層状化し、続いて20分間遠心分離した。遠心分離後、ヒトCD4⁺T細胞を含有するパフィーコートを取り出し、細胞をRT FACS緩衝液で1回洗浄し、さらにRT完全RPMI培地で1回洗浄した。ViCellカウンターにより細胞をカウントして細胞数及び生存能を決定し、CD4⁺T細胞を 1.0×10^6 / mLの濃度で完全RPMI培地中に懸濁させた。

40

【0295】

50

37 及び5%CO₂の加湿組織培養インキュベーター内で2 µg/mLのPHA-L及び20 IU/mLのrhIL-2と共に一次ヒトCD4+T細胞(完全RPMI培地中 1.0×10^6 /mL)を48時間培養することによりT細胞を活性化してOX40をアップレギュレートし、続いて、OX40mAb24 ADCCアッセイに使用した。以下で参照される図中のドナーはすべて、ユニークな個体を表す。すなわち、CD4⁺T細胞は、繰返しADCC実験のために同一のドナーから単離されたものではない。

【0296】

細胞傷害性アッセイで標的T細胞又は培養Toledo B細胞と精製ヒトNK細胞とを識別するために、Vybrant DiO細胞標識溶液を用いて蛍光色素DiOを標的細胞の細胞膜に組み込んだ(サスペンション細胞標識のための製造業者のプロトコルに従って)。1 mLのRosetteSep CD4+T細胞単離キット抗体ミックスの代わりに1 mLのRosetteSep NK細胞単離キット抗体ミックスを使用した以外は、ヒトCD4+T細胞のための以上と同一のプロトコルを用いて、一次ヒトCD4+T細胞及びToledo B細胞の活性化及びDiO標識化の後、MedImmune Blood Donor Programからのヘパリンナトリウム抗凝固処理血液からエフェクターNK細胞を単離した。単離された一次ヒトNK細胞を暖かいRPMI培地(10%FBS+RPMI-1640)で2回洗浄し、次いで、 2.67×10^6 /mLの濃度で完全RPMI中に懸濁させた。同様に、活性化一次ヒトCD4+T細胞を暖かい完全RPMIで2回洗浄し、 2.67×10^5 /mLの濃度で懸濁させた。その後、75 µLの一次ヒトNK細胞(200,000)及び75 µLの活性化一次ヒトCD4+T細胞(20,000)を無菌非組織培養処理丸底96ウェルプレートのウェルにエフェクターと標的との比を10:1として添加した。いくつかの実験では、10 µg/mLの最終濃度を与えるように、OX40mAb24又は対照mAbを含有する完全RPMI培地(50 µL)を添加した。他の実験では、67 nMの最終濃度が得られるようにOX40mAb24若しくは対照mAbの3倍希釈系列を含有する完全RPMI(50 µL)、又は67 nMから出発して9B12若しくはR347ヒトIgG1の27倍希釈系列を含有する完全RPMI(50 µL)を、プレーティングされた細胞に添加した。活性化CD4+T細胞はCD20を発現しないので、OX40発現活性化一次ヒトCD4+T細胞の代わりにDiO標識CD20発現Toledo B細胞を含有するウェルで、リツキシマブ(10 µg/mL、対照抗体)を陽性対照として使用した。RTで遠心分離することによりADCCアッセイの細胞を穏やかにペレット化し、続いて24時間にわたり培養した。

【0297】

インキュベーション時間の終了時、遠心分離により細胞をペレット化し、10 µg/mLのヨウ化プロピジウム(PT)を含有するFACS緩衝液中に懸濁させてBD LSR IIフローサイトメーターによるフローサイトメトリ解析に供した。蛍光補償後、FlowJoソフトウェアを用いてDiO陽性標的CD4⁺T細胞のうち非生存(PT陽性)細胞又はToledo B細胞を識別した。

【0298】

平均値及び平均値の標準誤差の決定を含めてNK細胞ADCCアッセイのデータのグラフ図は、Windows用GraphPad Prismバージョン5.01を用いて作成した。

【0299】

6.2.2 C1qに結合するOX40mAb24

ProteOn XPR36装置を用いて表面プラズモン共鳴により、OX40mAb24又は9B12に対してプールヒト血清から精製されたヒト補体タンパク質C1qへのOX40mAb24又は9B12の結合を決定した。標準的なアミンカップリングを用いてGLCバイオセンサーチップの表面にOX40mAb24又は9B12を固定した。ヒトC1qを26 nM~1.6 nMの範囲内の5つの濃度でPBS/0.005%Tween 20、pH 7.4中に懸濁させた。サンプルを30 µL/minで200秒間注入し、続いて600秒間の解離段階を設けた。1:1フィッティングを用いてProteOn

Manager 2.1ソフトウェア(Bio-Rad)によりセンサーグラムデータを処理した。

【0300】

6.3 結果

NK細胞及びOX40発現標的細胞の同種異系及び自己由来の両方の混合物を用いて、OX40結合の飽和レベル($10\mu\text{g}/\text{mL}$ [67nM]) (実施例2参照)で、ADCCを媒介するOX40mAb24、9B12、並びにOX40mAb24のヒトIgG4P型(mAb28)及びIgG1-TM型(mAb29)の能力を試験した(図13A及び図14A)。OX40mAb24は、活性化ヒトCD4⁺T細胞に対する測定可能なADCC活性を示した。これとは対照的に、9B12、mAb28、及びmAb29は、陰性対照のADCC活性を超える活性を示さなかった。ヒトCD20に対する陽性対照抗体(リツキシマブ)は、同一のNK細胞を用いてADCC活性を示したことから、NK細胞はすべて、ロバストなADCC活性が可能であることが示される(図13B及び図14B)。

【0301】

用量-反応実験では、OX40mAb24は、活性化ヒトCD4⁺T細胞に対する濃度依存性ADCC活性を示した(図15A~D、図16A~D、図17A~B及び表6-2)。これとは対照的に、9B12は、なんら検出可能なADCC活性を示さなかった。そのほかに、R347ヒトIgG1対照mAbは、なんら検出可能なADCC活性を示さなかったことから、OX40mAb24により媒介されるADCC活性は、標的細胞上のOX40とのエンゲージメントに依存することが確認される。ヒトCD20に対する陽性対照抗体もまた、CD20発現B細胞リンパ腫細胞系に対するADCCを示した(図13Bと図14B)、これはアッセイの妥当性を支持する。まとめると、これらの実験の結果から、OX40mAb24は、細胞表面OX40の発現を刺激することがすでに示されている条件下で培養された標的細胞に対するADCCが可能であることが確認された。

【0302】

【表6-2】

表6-2 OX40mAb24 媒介 NK細胞 ADCC 能のまとめ

実験 番号	ドナー番号	EC20 (pM)	EC50 (pM)	EC90 (pM)
3	363	134	2380	225000
3	504	309	1370	14600
4	464	37.0	3050	3330000
4	532	111	1310	66100
5	601	54.4	501	16900
5	602	61.4	527	16000
平均値(平均値の標準誤差), pM		118 (41.1)	1520 (415)	611000 (545000)

【0303】

ヒト補体成分C1qに結合するOX40mAb24の可能性を表面プラズモン共鳴アッセイを用いて評価した。このアッセイでは、C1qへの結合を補体依存性細胞傷害性アッセイの活性のサロゲートとして使用した(Dall'Aquila et al., J. Immunol 177: 1129-1138 (2006))。9B12は陰性対照抗体として使用した。OX40mAb24は、精製ヒトC1qタンパク質への濃度依存性結合能を示した(図18A)。これとは対照的に、9B12は、C1qタンパク質への検出可能な結合をなんら示さなかった(図18B)。

【0304】

6.4 結論

OX40mAb24は、C1qに結合し、活性化CD4⁺T細胞に対するNK媒介ADCCを惹起する。

【0305】

実施例7：OX40mAb24並びにカニクイザル細胞及びアカゲザルT細胞を用いた*in vitro*比較試験

この実施例では、カニクイザル(cyno)/アカゲザルOX40を発現するジャーカットNFκBルシフェラーゼT細胞レポーター系を含む2細胞レポーターバイオ活性アッセイを用いて、T細胞の活性化を増強するOX40mAb24の能力を調べた。Fcγレセプター媒介薬剤架橋は、アカゲザルB細胞系又は赤血球溶解後全血サンプル中のアカゲザルFcγレセプター発現細胞により媒介された。OX40活性化は、一次ヒトT細胞活性化の下流のNFκBシグナル伝達経路の刺激に反応して増加するルシフェラーゼ活性として測定した。NFκBシグナル伝達は、十分に研究されているOX40シグナル伝達の下流イベントであり、増殖やサイトカイン放出などのT細胞活性化の他の尺度と相関がある(Croft M, et al., Immunol Rev. 229: 173-91 (2009))。そのほかに、CD4⁺T細胞増殖が評価されるプレートベースのバイオ活性アッセイを用いて、アカゲザルT細胞のT細胞レセプター媒介活性化(共刺激)を増強するOX40mAb24の能力を試験した。アイソタイプ対照(NIP228 IgG1)を用いて特異的OX40エンゲージメントを示した。

【0306】

併行して、非ヒト霊長動物OX40に対するOX40mAb24及び9B12の活性の比較を行うために、OX40mAb24の由来源のネズミ抗OX40モノクローナル抗体9B12のバイオ活性を測定した。

【0307】

7.1 材料

この試験で使用した材料を表7.1に列挙する。

【0308】

【表7-1】

表 7-1 材料

アイテム	供給元
塩化アンモニウム	StemCell Technologies, Vancouver, BC
抗ヒトCD3 抗体, クローン SP34-2	BD Biosciences, San Jose, CA
抗ヒトCD4-V450 抗体, クローン L200	BD Biosciences, San Jose, CA
抗ヒトCD28 抗体, クローン CD28.2	BD Biosciences, San Jose, CA
CFSE 細胞標識キット	Life Technologies, Carlsbad, CA
コンカナバリン A	Sigma, Saint Louis, MO
Envision マルチ標識プレートリーダー	Perkin Elmer, Waltham, MA
ヤギ抗ヒトFcγ 抗体	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA
ヤギ抗マウスFcγ 抗体	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA
熱不活性化ウシ胎仔血清	Life Technologies, Carlsbad, CA
組換えヒトインターロイキン-2	Preprotech, Rocky Hill, NJ
LSR II フローサイトメーター	BD Biosciences, San Jose, CA
リンパ球分離培地 (LSM)	MP Biomedicals, Santa Ana, CA
MACS 緩衝液	Miltenyi, San Diego, CA
非ヒト霊長動物 CD4 T 細胞単離キット	Miltenyi, San Diego, CA
ヨウ化プロピジウム (1 mg/mL 溶液)	Sigma, Saint Louis, MO
アカゲザル (インド起源) ヘパリンナトリウム 抗凝固処理全血	Worldwide Primates, Miami, FL
RPMI-1640 培地	Life Technologies, Carlsbad, CA
SteadyGlo ルシフェラーゼアッセイ溶液	Promega, Madison, WI
ViCell カウンター	Beckman Coulter, Indianapolis, IN

【0309】

7.2 アッセイ

7.2.1 カニクイザル/アカゲザル2細胞バイオ活性アッセイ

2細胞レポーターアッセイを用いてOX40mAb24をバイオ活性に関して試験した。カニクイザル及びアカゲザルは同一のOX40アミノ酸配列を共有するので、OX40アゴニズム(NFκB活性)のリードアウト用としてカニクイザル/アカゲザルOX40発現ジャーカットNFκBルシフェラーゼレポーター細胞系(クローンB2)を使用した。ジャーカットレポーター細胞上のOX40mAb24架橋つまりOX40クラスタリングを媒介するために、FcγR発現細胞を含有する正常アカゲザルの全血に由来するFcγレセプター発現アカゲザルB細胞系、LCL8664、又は白血球を使用した。OX40mAb24を添加しない場合さらにはFcγR発現細胞の不在下の場合の両方でバックグラウンドバイオ活性を評価した。レポーター細胞上のOX40エンゲージメントの役割を示すために、OX40mAb24の代わりにアイソタイプ対照を使用した。

10

【0310】

次のプロトコルに従ってLCL8664を用いたOX40mAb24 2細胞バイオ活性アッセイを行った。

【0311】

使用前日、カニクイザル/アカゲザルOX40発現ジャーカットNFκBルシフェラーゼレポータークローンB2及びLCL8664を完全RPMI培地(10%ウシ胎仔血清[FBs]及び1%抗生物質/抗真菌剤を有するRPMI)中で培養し、それぞれ、約5×10⁶細胞/mL及び4×10⁵細胞/mLの細胞密度を達成した。翌日、OX40ジャーカットレポーター細胞及びLCL8664をペレット化し、完全培地中に懸濁させ、Vice11カウンターを用いてカウントし、その後、両方の細胞系の細胞濃度を完全培地で2.5×10⁶に調整した。

20

【0312】

クローンB2及びLCL8664細胞を100,000細胞/ウェルで96ウェル丸底非組織培養処理プレートに添加した。30μg/mLから開始して最終濃度まで3倍増分希釈で、OX40mAb24を完全RPMI培地中の細胞に添加した。同様に、R347IgG1(アイソタイプ対照)を10μg/mLの最終濃度で6倍増分希釈で使用した。同様にして、9B12及びMOPC-21(アイソタイプ対照)を希釈した。プレートを加湿5%CO₂雰囲気の中、インキュベーターに導入した。

30

【0313】

16時間のインキュベート時間の後、100μLの再構成Steady-Gloルシフェラーゼアッセイ溶液を各ウェルに添加し、混合して細胞を溶解させ、次いでインキュベートしてルシフェラーゼシグナルを平衡化させた。Steady-Glo/sampleライゼート(150μL)を各ウェルから96ウェル白色壁アッセイプレートに導入し、Perkin Elmer Envisionルミネセンスリーダーを用いてルミネセンスを読み取った。

【0314】

次のプロトコルを用いて、健常インド起源アカゲザルから得られたヘパリンナトリウム抗凝固処理全血からRBC溶解アカゲザル細胞を取得した。

40

【0315】

新鮮全血(5mL)を50mLコニカルチューブに添加し、45mLの塩化アンモニウム溶液を添加した。細胞混合物を氷上で10分間インキュベートし、次いで、ペレット化し、完全RPMI培地で洗浄し、その後、細胞は2細胞バイオ活性アッセイに使用できる状態であった。

【0316】

LCL8664アカゲザルB細胞系で記載したように、アカゲザルRBC溶解全血細胞を用いた2細胞バイオ活性アッセイを行ったが、陰性対照抗体として10μg/mLのNIP228IgG1を使用した。

50

【0317】

7.2.2 アカゲザルCD4⁺T細胞増殖アッセイ

次のプロトコルに従って、活性化一次アカゲザルCD4⁺T細胞及びプレート捕捉薬剤を用いて、CD4⁺T細胞増殖アッセイでOX40mAb24のバイオ活性を決定した。世界的霊長動物の健常アカゲザル(n=2)から得られたヘパリンナトリウム抗凝固処理全血から単離されたアカゲザルCD4⁺T細胞を反応細胞源として使用した。

【0318】

新鮮ヘパリン処理アカゲザル血液を室温(RT)でPBSで希釈1:1した。次いで、20mLの希釈全血を50mLコニカル遠心チューブ中の15mLの95%リンパ球分離培地(LSM)上に重畳した。無制動、室温、400×gで血液を30分間遠心分離した。末梢血単核細胞をインターフェースで捕集し、Miltenyi MACS緩衝液で2回洗浄し、そしてペレット化した。細胞ペレットを赤血球溶解緩衝液で5分間処理し、完全RPMI培地を添加して溶解緩衝液を不活性化した。細胞を洗浄し、MACS緩衝液中に懸濁させ、そしてViCellカウンターでカウントして細胞数及び生存能を決定した。

10

【0319】

製造業者の取扱い説明書に従ってMiltenyi非ヒト霊長動物キットを用いてアカゲザルCD4⁺T細胞を単離した。次いで、CD4⁺T細胞をViCellカウンターでカウントし、51µg/mLのコンカナバリンA及び1000IU/mLのIL-2を含む完全RPMI培地中に1×10⁶細胞/mLで懸濁させ、37℃及び5%CO₂の加湿インキュベーター中で2日間培養することにより、T細胞を活性化してOX40発現を誘導した。2µg/mLのヤギ抗マウスFcγ特異的IgG及び2µg/mLのヤギ抗ヒトFcγ特異的IgGを含む100µLのPBS液で非組織培養処理丸底96ウェルアッセイプレートを被覆した。可溶性OX40mAb24活性のアッセイを意図したウェルにはヤギ抗ヒトIgG捕捉抗体を添加しなかった。プレートを4℃で一晩インキュベートし、200µLのPBSで洗浄し、PBS中1%BSA(1%BSA/PBS)を用いて37℃で90分間ブロックした。プレートをPBSで洗浄し、1%BSA/PBS中に再構成した2ng/mLの抗CD3(クローンSP34-2)を37℃で90分間にわたりプレートに添加した。プレートをPBSで洗浄して未結合分を除去し、OX40mAb24、R347ヒトIgG1対照mAb、9B12、及びマウスIgG1対照mAb(クローンMOPC-21)をそれぞれ1.01µg/mL(6.67nM、実験1)又は1.5µg/mL(10.0nM、実験2)から開始して3倍希釈系列で段階希釈して1%BSA/PBS中に再構成し、次いで、アッセイプレートに添加された、そして37℃で90分間インキュベートした。

20

30

【0320】

活性化一次アカゲザルCD4⁺T細胞を捕集し、完全RPMI培地で洗浄し、そして濃度を1.0×10⁶生存細胞/mLに調整した。推奨の5µMの代わりに1.25µMのCFSEを用いて37℃で10分間のインキュベーションを行った以外は製造業者の説明書に従ってカルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル(CFSE)で細胞を標識した。標識後、細胞を完全RPMI中に懸濁させ、濃度を1.0×10⁶/mLに調整した。プレートをPBSで洗浄し、200µLのCD4⁺T細胞(200,000/ウェル)を各ウェルに添加した。次いで、プレートを37℃で3日間インキュベートした。

40

【0321】

72時間のインキュベーション時間の後、CD4⁺T細胞をペレット化し、2%FBSを含有するPBS(FACS緩衝液)で1回洗浄した。CD4⁺T細胞を同定するための抗CD4-V450R標識抗体と生存/非生存細胞の識別のためのヨウ化プロビジウム(PI)とを含有する結合ミックス中に細胞を懸濁させ、30分間インキュベートした。インキュベーション後、細胞をFACS緩衝液で洗浄し、FACS緩衝液中に再懸濁させ、そしてLSRIIFローサイトメーター及びフローサイトメトリー標準(FCS)形式データを解析するためにFlowJoソフトウェアを用いてフローサイトメトリーにより解

50

析した。

【0322】

一次アカゲザルCD4⁺T細胞を用いて2つの独立した実験でアッセイを繰り返した。

【0323】

細胞増殖を評価するために、FlowJoソフトウェアを用いて生存イベント（ヨウ化プロピジウム陰性）をゲート処理し、CFSEの希釈を示すCD4⁺ゲート処理細胞のパーセントを決定した。抗CD3抗体+OX40mAb24に反応してCFSEの希釈を示すCD4⁺ゲート処理細胞のパーセントから抗CD3単独に反応してCFSEの希釈を示すCD4⁺ゲート処理細胞のパーセントを減算することにより、OX40mAb24の比活性を計算した。

10

【0324】

GraphPad Prism、バージョン5.01 (San Diego, CA) で非線形回帰分析 (log 用量 - 反応、4パラメーターフィッティング曲線) を用いて、ジャーカットNFκBレポーターアッセイ及び一次アカゲザルCD4⁺T細胞アッセイで半値 (EC₅₀) 反応を達成したOX40mAb24の濃度を決定した。

【0325】

7.3 結果

7.3.1 カニクイザル/アカゲザル2細胞バイオ活性アッセイ

カニクイザル/アカゲザル2細胞バイオ活性アッセイの結果を表7-2、図19A~B、図20A~B及び図21A~Bに示す。OX40mAb24は、1450pMの平均EC₅₀ (n=2実験) を有して、アカゲザルB細胞系LCL8664の存在下でカニクイザル/アカゲザルOX40発現ジャーカットT細胞でNFκBシグナル伝達により測定されるようにOX40シグナル伝達経路を活性化した。表7-2に示されるように、カニクイザル/アカゲザル2細胞アッセイでのOX40mAb24活性のEC₅₀値は、Raji B細胞系を用いたヒト2細胞アッセイでの値の1.3倍であり、一方、9B12は、カニクイザル/アカゲザル2細胞アッセイで限られた活性を有し、EC₅₀値を決定できなかった。

20

【0326】

そのほかに、表7-2に示されるように、OX40mAb24は、550pMのEC₅₀ (n=1実験) を有して、Fcγレセプター発現細胞を含有すると予想されるアカゲザルRBC溶解全血の存在下でジャーカットT細胞でOX40シグナル伝達経路を活性化した。同様に表7-2に示されるように、同一のアッセイで9B12のEC₅₀値は6052pMであり、Raji B細胞系を用いたヒト2細胞アッセイで4680pMであった。

30

【0327】

【表 7 - 2】

表 7-2 2 細胞バイオ活性アッセイにおける OX40mAb24 および 9B12 の平均半値有効濃度

試験品または 対照品	2 細胞アッセイ方式		
	アカゲザル LCL8664 B 細胞 + カニクイザル/アカゲザル OX40 発現 Jurkat NFκB- ルシフェラーゼクローン B2 バイオ活性 [平均 EC ₅₀ (Std Err); n]	アカゲザル RBC 溶解全 血 + カニクイザル / アカゲザル OX40 発現 Jurkat NFκB - ルシフェラーゼクローン B2 バイオ活性 [平均 EC ₅₀ (Std Err); n]	ヒト Raji B 細胞 + ヒト OX40 Jurkat NFκB-ルシフェラーゼクローン 64 バイオ活性 ^a [平均 EC ₅₀ (Std Err); n]
OX40mAb24	1450 (204); n=2	550; n=1	1110 (92.5); n=5
R347 ヒト IgG1	活性無し; n=2	NT	活性無し
NIP228 ヒト IgG1	NT	活性無し; n=1	NT
9B12	ND	6052; n=1	4680 (1220); n = 5

Std Err = 平均値の標準誤差. n=実験数. NT=未試験. ND=未決定.

^a実施例 5 のデータ.

【 0 3 2 8 】

7 . 3 . 2 アカゲザル一次 C 細胞増殖アッセイ

アカゲザル一次 T 細胞増殖アッセイの結果を表 7 - 3、表 7 - 4、及び図 2 2 A ~ D に示す。OX 4 0 m A b 2 4 は、4 3 6 p M の平均 EC₅₀ を有して一次アカゲザル CD 4 + T 細胞の増殖を誘導した（表 7 - 3、n = 2 実験）。表 7 - 5 に示されるように、9 B 1 2 の EC₅₀ 値は 1 1 0 p M であった（表 7 - 4、n = 2 実験）。OX 4 0 m A b 2 4 は、類似のアッセイ方式で 2 8 p M の平均 EC₅₀ を有して活性化一次ヒト CD 4 + T 細胞の増殖を誘導した（表 7 - 5、実施例 4 のデータ）。

【 0 3 2 9 】

【表 7 - 3】

表 7-3 一次アカゲザル CD4 T 細胞増殖アッセイにおける OX40mAb24 の平均半値有効濃度

試験抗体または対照抗体	実験数	平均EC ₅₀ (Std Err)
OX40mAb24	2	436 (309)
NIP228 IgG1	2	活性無し

Std Err = 平均値の標準誤差.

【 0 3 3 0 】

【表 7 - 4】

表 7-4 一次アカゲザル CD4 T 細胞増殖アッセイにおける 9B12 の平均半値有効濃度

試験抗体または対照抗体	実験数	平均EC ₅₀ (Std Err)
9B12	2	110 (13)
MOPC-21マウスIgG1	2	活性無し

Std Err = 平均値の標準誤差.

【 0 3 3 1 】

【表 7 - 5】

表 7-5 アカゲザルおよびヒト CD4 T 細胞増殖アッセイにおける OX40mAb24 および 9B12 の
平均半値有効濃度

試験抗体または対照抗体	アカゲザル平均値 (Std Err)	ヒト平均値 (Std Err)
OX40mAb24	436 (309)	28 (98)
9B12	110 (13)	218 (35)

Std Err = 平均値の標準誤差.

10

【 0 3 3 2 】

7 . 4 結 論

OX40mAb24 は、アカゲザル B 細胞又は RBC 溶解アカゲザル全血内に含有される Fcγ レセプター発現細胞の存在下でカニクイザル / アカゲザル OX40 発現ジャーカット T 細胞 NFκB レポーター細胞系で OX40 シグナル伝達経路を活性化した。そのほかに、OX40mAb24 は一次アカゲザル CD4⁺ T 細胞の増殖を誘導した。

【 0 3 3 3 】

実施例 8 : ヒト癌のマウスモデルにおける OX40mAb24 の活性

この実施例は、OX40mAb24 が癌を治療するための単一作用剤療法として有効であるかを決定するために設計された。この試験は、免疫無防備非肥満糖尿病 / 重症複合免疫不全 (NOD / SCID) マウスにおいてアロ反応性ヒト T 細胞と混合されたヒト癌の異種移植モデルで行われた。

20

【 0 3 3 4 】

8 . 1 材 料

この試験で使用した材料及びそれらの供給元を表 8 - 1 に列挙する。

【 0 3 3 5 】

【表 8 - 1】

表 8-1 材料

アイテム	供給元
DMEM 培地	Invitrogen, Carlsbad, CA
FBS	Invitrogen, Carlsbad, CA
リンパ球分離培地	VWR, West Chester, PA
PBS	Invitrogen, Carlsbad, CA
RPMI 1640	Invitrogen, Carlsbad, CA
RosetteSep CD4 ⁺ T 細胞富化キット	Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada
RosetteSep CD8 ⁺ T 細胞富化キット	Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada
RosetteSep DML 培地	Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada
マイトマイシン C	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO

30

【 0 3 3 6 】

40

8 . 2 実験プロトコル

8 . 2 . 1 試験動物

5 ~ 9 週齢の雌 NOD / SCID マウスを Harlan Laboratories, Inc. から入手した。動物は、MedImmune の Laboratory Animal Resources の施設、Association for Animal Accreditation of Laboratory Animal Care 及び米国農務省 (United States Department of Agriculture) の許可を得た施設で、Iristithtional Animal Care and Use Committee により認可されたプロトコルに従って、人道的に処置及び飼育された。動物は、無菌の寝具及び食品並びに不断給餌の酸性化飲料水を

50

備えた無菌マイクロアイソレーターユニットに維持された。環境条件は標準化した（室温：20 ± 1、相対湿度：50 % ± 10 %、12時間の明暗周期）。動物は、有害な臨床徴候に関して毎日及び体重に関して毎週モニターした。

【0337】

8.2.2 異種移植の確立

ヒト黒色腫細胞系に由来するヒト癌性A375細胞はATCCから入手した。細胞は、5 % CO₂下37 °Cの加湿インキュベーター内で10 % FCSを有するDMEM中に成長させた。次いで、それを採取し、PBSで1回洗浄し、次いで、PBS中に再懸濁させた。

【0338】

ヒト癌性A375細胞は細胞培養物から採取した。それをPBS中に再懸濁させた。続いて、動物への移植前に、A375細胞をA375腫瘍細胞系に対してアロ反応性のCD4⁺及びCD8⁺T細胞系と混合した。

【0339】

CD4⁺及びCD8⁺T細胞系を生成するために、全血20 mL当たり1 mLのRosetteSep[®] T細胞富化製品を添加することにより、健常ドナー由来のヒト末梢血単核細胞(PBMC)をCD4⁺又はCD8⁺T細胞に関して富化した。この後、20分間インキュベートし、続いて、RosetteSep[®] DM-L密度媒体を用いて密度勾配遠心分離を行うことにより単離した。遠心分離後、細胞を2 % ウシ胎仔血清(FBS)が追加されたPBSで3回洗浄し、10 % FBSが追加されたRPMI 1640培地中に再懸濁させた。富化CD4⁺及びCD8⁺T細胞は、組換えヒトインターロイキン2(rhIL-2)が追加された培地中で7 ~ 10日間個別に培養し、そしてそれぞれマイトマイシンC処理A375細胞と組み合わせた。T細胞は、採取してから、rhIL-2が追加された培地中で7 ~ 10日間個別に培養し、そしてマイトマイシンC処理A375細胞と組み合わせた。CD4⁺及びCD8⁺T細胞は採取してから2 : 1の比で組み合わせた。

【0340】

CD4⁺及びCD8⁺T細胞に関して富化されたA375細胞及びPBMCは、移植直前にA375細胞6対T細胞1の比で混合した。

【0341】

異種移植は、動物の右側腹部で3.5 × 10⁶細胞（ヒトT細胞は1 : 6のエフェクター対標的(E : T)の比でA375細胞と混合し、200 µLのPBS中に懸濁させた）の皮下(SC)注射により確立した。

【0342】

8.2.3 ランダム化、群指定、及び用量レベル

細胞のSC注射前に6匹の動物を各実験群にランダムに帰属した。動物の入替えはなかった。各実験に対する群指定及び用量レベルを表8-2、表8-3及び表8-4に列挙する。試験抗体及び対照抗体はPBSで適切な濃度に希釈し、200 µLの全体積で腹腔内(IP)投与した。試験抗体及び対照抗体の初回用量は、癌/エフェクターT細胞の移植後3日目又は4日目に投与した。動物は、図に示される通り及び対応する図の説明に示される通りさらに3回まで試験抗体及び対照抗体の投与を受けた。各動物で腫瘍の形成が週1回又は2回観察された。この試験の主要エンドポイントは、2000 mm³の腫瘍体積又は全体的腫瘍壊死のいずれかであった。

【0343】

8.2.4 腫瘍の測定

各実験に対する図及び表に示される間隔でカリパスにより腫瘍を測定し、次式：

$$V(\text{mm}^3) = (\text{長さ}[\text{mm}] \times \text{幅}[\text{mm}] \times [\text{幅mm}]) / 2$$

により腫瘍体積(V)を計算した。

各群に対して結果を算術平均で報告する。抗腫瘍効果は、腫瘍成長阻害パーセント(% TGI)で表した。これは次のように計算した。

$$\% \text{TGI} = (1 - [\text{治療群の平均腫瘍V}] \div [\text{対照群の平均腫瘍V}]) \times 100$$

【 0 3 4 4 】

8 . 3 統計的方法

O X 4 0 m A b 2 4 治療動物又は 9 B 1 2 治療動物とアイソタイプ対照治療動物との間で比較を行って、マン・ホイットニー順位和検定による統計的有意性で群間差を解析した。

【 0 3 4 5 】

マン・ホイットニー順位和検定から得られた有意な p 値は、算術平均値及び平均値の標準偏差に近接してまとめの表及び図に示される。

【 0 3 4 6 】

8 . 4 結果

10

この試験ではヒト癌のマウスモデルにおける腫瘍の成長に対する O X 4 0 m A b 2 4 の活性を調べた。ヒト癌細胞系をアロ反応性ヒト C D 4 ⁺ 及び C D 8 ⁺ T 細胞系と混合して免疫不全 N O D / S C I D 雌動物に移植した。C D 4 ⁺ 及び C D 8 ⁺ T 細胞は、健常ヒトドナーから単離された P B M C に由来するものであった。異種移植の 3 日後又は 4 日後に動物に試験抗体及び対照抗体の最初の投与を行い、適応があれば試験抗体及び対照抗体の追加投与を行った。

【 0 3 4 7 】

3 つの個別の実験で、O X 4 0 m A b 2 4 + アロ反応性ヒト T 細胞は、アイソタイプ対照群と比較して A 3 7 5 細胞の成長を有意に最大 8 5 % 阻害した（表 8 - 2、表 8 - 3、及び表 8 - 4；図 2 3 A、図 2 4 A、及び図 2 5）。対照 9 B 1 2 + アロ反応性ヒト T 細胞もまた、アイソタイプ対照群と比較して A 3 7 5 細胞の成長を有意に最大 7 7 % 阻害した（表 8 - 2 ~ 8 - 4、図 2 3 B 及び図 2 4 B）。

20

【 0 3 4 8 】

【 表 8 - 2 】

表 8-2 A375 異種移植モデルにおける治療群および 18 日目の TGI パーセント
(実験 2)

群 ^a	試験抗体	用量 ^b (mg/kg)	% TGI ^c
1	無し; T 細胞無し	NA	NA
2	無し	NA	NA
3	アイソタイプ対照	5	NA
4	OX40mAb24	5	79
5	OX40mAb24	2.5	75
6	OX40mAb24	1.0	85
7	9B12	5	53

30

IP = 腹腔内; NA = 該当なし; TGI = 腫瘍成長阻害; V = 体積

^a 1 群当たりの動物数: 6.

^b 動物はすべて 4, 7, 9, および 12 日目に 200µl の試験抗体 IP を摂取した

^c % TGI = [1 - (治療群の平均腫瘍 V) ÷ (アイソタイプ対照群の平均腫瘍 V)] x 100

【 0 3 4 9 】

40

【表 8 - 3】

表 8-3 A375 異種移植モデルにおける治療群および 25 日目の TGI パーセント
(実験 1)

群 ^a	試験抗体	用量 ^b (mg/kg)	% TGI ^c
1	無し; T 細胞無し	NA	NA
2	無し	NA	NA
3	アイソタイプ対照	5	NA
4	OX40mAb24	5	68
5	OX40mAb24	2.5	83
6	OX40mAb24	1.0	84
7	9B12	5	80

IP = 腹腔内; NA = 該当なし; TGI = 腫瘍成長阻害; V = 体積

^a 1 群当たりの動物数: 6.^b 動物はすべて 4, 7, 9, および 12 日目に 200μl の試験抗体 IP を摂取した^c % TGI = [1 - (治療群の平均腫瘍 V) ÷ (アイソタイプ対照群の平均腫瘍 V)] x 100

【 0 3 5 0 】

【表 8 - 4】

表 8-4 A375 異種移植モデルにおける治療群および 28 日目の TGI パーセント
(実験 3)

群 ^a	試験抗体	用量 ^b (mg/kg)	% TGI ^c
1	無し; T 細胞無し	NA	NA
2	無し	NA	NA
3	アイソタイプ対照	3.0	NA
4	OX40mAb24	3.0	75
5	OX40mAb24	1.0	73
6	OX40mAb24	0.3	68
7	OX40mAb24	0.1	84
8	OX40mAb24	0.03	73

IP = 腹腔内; NA = 該当なし; TGI = 腫瘍成長阻害; V = 体積

^a n = 6.^b 動物はすべて 3, 6, 8, および 10 日目に 200μl の試験抗体 IP を摂取した^c % TGI = [1 - (治療群の平均腫瘍 V) ÷ (アイソタイプ対照群の平均腫瘍 V)] x 100

【 0 3 5 1 】

8 . 5 結論

OX40mAb24 は、アロ反応性ヒト T 細胞と混合されたヒト癌のマウスモデルにおいて強力な抗腫瘍活性を示した。OX40mAb24 の抗腫瘍活性は、9B12 の抗腫瘍活性に類似していた。これらの結果は、OX40mAb24 が T 細胞浸潤物を有する癌の患者の治療に単一作用剤療法として有効であり得ることを示す証拠となる。

【 0 3 5 2 】

実施例 9 : ラット / マウス抗マウス OX40 IgG2a キメラ抗体クローン OX86 は、同種同系モデルにおいてマウス癌細胞系の成長を阻害する

OX40mAb24 は、マウス (m) OX40 に交差反応しない (実施例 2 参照)。従って、免疫能のあるマウスモデルにおいてその活性を試験することはできない。OX86 は、mOX40 に特異的に結合してそのシグナル伝達を惹起するラット抗 mOX40 IgG1 抗体であり (al-Shamkhani et al., Eur. J. Immunol. 26: 1695 - 1699 (1996))、癌の免疫能のあるマウスモデルにおいて抗腫瘍活性を有する (Weinberg AD, et al., J. Immunol. 164: 2160 - 2169 (2000))。OX40mAb24 に類似した機能上の性質

10

20

30

40

50

を有するマウスサロゲート抗体を用いてOX40アゴニズムの効果をより完全に調べるために、ラット/マウス抗mOX40IgG2aキメラ抗体（OX86mIgG2a、ラット抗OX40軽鎖及び重鎖の可変領域とマウスIgG2a定常領域とを有する）をOX86から作製した。この実施例では、癌の3つのマウスモデルにおいてOX86mIgG2aの単一作用剤抗腫瘍活性を評価する。

【0353】

9.1 材料

この試験で使用した材料及びそれらの供給元を表9-1に列挙する。

【0354】

【表9-1】

10

表9-1 材料

アイテム	供給元
リン酸緩衝生理食塩水, pH 7.2	Life Technologies, Carlsbad, CA
熱不活性化ウシ胎仔血清	Life Technologies, Carlsbad, CA
Roswell Park Memorial Institute 1640 培地	Life Technologies, Carlsbad, CA
0.25%トリプシン-EDTA (1x)	Life Technologies, Carlsbad, CA

EDTA = エチレンジアミン四酢酸.

【0355】

9.2 実験プロトコル

20

9.2.1 試験動物

6～8週齢のBALB/c及びC57BL/6マウスをMedImmune from Harlan Laboratories, Inc. (Indianapolis, IN)で入手し、試験開始前の3日間にわたり気候順化を行った。その後、マウスの腫瘍移植部位を剃毛し、同定のためにマイクロチップトランスポンダーと共に移植した。

【0356】

動物は、MedImmuneのLaboratory Animal Resourcesの施設、Association for Animal Accreditation of Laboratory Animal Care及び米国農務省(United States Department of Agriculture)の許可を得た施設で、Institutional Animal Care and Use Committeeにより認可されたプロトコルに従って、飼育した。動物は、無菌の寝具及び食品並びに不断給餌の酸性化飲料水を備えた無菌マイクロアイソレーターユニットに維持された。環境条件は標準化した(室温: 20 ± 1 、相対湿度: $50\% \pm 10\%$ 、12時間の明暗周期)。動物は、有害な臨床徴候に関して毎日及び体重に関して隔週でモニターした。後肢麻痺、呼吸窮迫、20%体重損失、又は 2000 mm^3 超の腫瘍体積が認められた場合、動物は CO_2 で窒息させて人道的にただちに屠殺した。

30

【0357】

9.2.2 同系腫瘍の確立及び移植

CT26及び4T1は、Manassas, VAのATCCから入手した。MCA205細胞は、Providence Cancer Center, Portland, ORから入手した。細胞はすべて、10%FBSが追加されたRPMI1640細胞培養地で培養し、37、5% CO_2 の加湿組織培養チャンバー内で成長させ、次いで採取し、FBSで1回洗浄し、次いでPBS中に再懸濁させた。

40

【0358】

アロ移植は、0.1mLのPBS中に懸濁された 5.0×10^5 CT26細胞又は 1.0×10^5 4T1細胞の皮下(SC)注射を7～9週齢のBALB/cマウスの右側腹部内に行って確立し、一方、0.1mLのリン酸緩衝生理食塩水中に懸濁された 2.5×10^5 MCA205細胞は、7～9週齢のC57BL/6マウスの右側腹部に注射した。

50

【 0 3 5 9 】

9 . 2 . 3 ランダム化、群指定、及び用量レベル

この試験ではBALB/c（合計216匹）及びC57BL/6（合計70匹）雌マウスを使用した。CT26腫瘍細胞が移植されたBALB/cマウスは、腫瘍が平均体積120mm³/コホートに成長した後（移植の9日後）又は200mm³/コホートに成長した後（移植の13日後）はランダムに帰属した。4T1腫瘍細胞が移植されたBALB/cマウスは、腫瘍が平均体積120mm³に成長した後（移植の13日後）にランダムに帰属した。C57BL/6マウスは、腫瘍が平均体積95mm³/コホートに成長した後（移植の11日後）にランダムに帰属した。群指定、動物数、用量レベル、及び投与スケジュールを表9-2、表9-3、表9-4及び表9-5に示す。試験抗体及び対照抗体はすべて、腹腔内（IP）注射により投与した。動物の入替えはしなかった。

10

【 0 3 6 0 】

腫瘍体積が約2000mm³に達成した場合又は腫瘍が潰瘍化若しくは壊死した場合、各群の動物を屠殺した。

【 0 3 6 1 】

【表9-2】

表 9-2 試験設計: CT26 同種同系モデル

群	動物数 (M/F)	治療	投与スケジュール (試験日)	用量レベル (mg/kg) ^a	ROA
1	10 (F)	無し	NA	NA	IP
2	10 (F)	陰性対照 (OX86 mIgG1 D265A)	9, 12	2.5	IP
3	10 (F)	OX86 mIgG2a	9, 12	2.5	IP
4	10 (F)	OX86 mIgG2a	9, 12	1.0	IP
5	10 (F)	OX86 mIgG2a	9, 12	0.25	IP
6	10 (F)	OX86 mIgG2a	9, 12	0.1	IP

20

F = 雌; IgG1 = 免疫グロブリン G1; IP = 腹腔内; mAb = モノクローナル抗体; OX86 mIgG2a = マウス IgG2a 定常領域を有するクローン OX86 のラット抗 OX40 軽鎖および重鎖の可変領域; OX86 mIgG1 D265A = Fcドメインに Fcγ レセプターへの結合能を低減する点突然変異を有するマウス抗マウス OX40 mIgG1; NA = 動物を治療しなかったため該当なし; ROA = 投与経路. ^a 投与体積: 0.2 mL.

30

【 0 3 6 2 】

【表9-3】

表 9-3 試験設計: CT26 同種同系モデル

群	動物数 (M/F)	治療	投与スケジュール (試験日)	用量レベル (mg/kg) ^a	ROA
1	12 (F)	無し	NA	NA	IP
2	12 (F)	OX86 mIgG2a	13, 16	10	IP
3	12 (F)	OX86 mIgG2a	13, 16	3	IP
4	12 (F)	OX86 mIgG2a	13, 16	1	IP
5	12 (F)	OX86 mIgG2a	13, 16	0.3	IP
6	12 (F)	OX86 mIgG2a	13, 16	0.1	IP

40

F = 雌; IP = 腹腔内; OX86 mIgG2a = マウス IgG2a 定常領域を有するクローン OX86 のラット抗 OX40 軽鎖および重鎖の可変領域; NA = 動物を治療しなかったため該当なし; ROA = 投与経路. ^a 投与体積: 0.2 mL.

【 0 3 6 3 】

【表 9 - 4】

表 9-4 試験設計: MCA205 同種同系モデル

群	動物数 (M/F)	治療	投与スケジュール (試験日)	用量レベル (mg/kg) ^a	ROA
1	14 (F)	無し	NA	NA	IP
2	14 (F)	アイソタイプ対照 (混合物) ^b	11, 14	20	IP
3	14 (F)	OX86 mIgG2a	11, 14	10	IP
4	14 (F)	OX86 mIgG2a	11, 14	10	IP
5	14 (F)	OX86 mIgG2a	11, 14	5	IP

F = 雌; IP = 腹腔内; OX86 mIgG2a = マウス IgG2a 定常領域を有するクローン OX86 のラット抗 OX40 軽鎖および重鎖の可変領域; NA = 動物を治療しなかったため該当なし; ROA = 投与経路. ^a 投与体積: 0.2 mL. ^b 混合物は mIgG2a (10 mg/kg) および mIgG2b (10 mg/kg) の Fc ドメインを有するアイソタイプ対照抗体を含有する.

10

【 0 3 6 4 】

【表 9 - 5】

表 9-5 試験設計: 4T1 同種同系モデル

群	動物数 (M/F)	治療	投与スケジュール (試験日)	用量レベル (mg/kg) ^a	ROA
1	12 (F)	無し	NA	NA	IP
2	12 (F)	アイソタイプ対照 (混合物) ^b	13, 16, 20, 23	70	IP
3	12 (F)	OX86 mIgG2a	13, 16, 20, 23	10	IP
4	12 (F)	OX86 mIgG2a	13, 16, 20, 23	5	IP
5	12 (F)	OX86 mIgG2a	13, 16, 20, 23	2.5	IP
6	12 (F)	OX86 mIgG2a	13, 16, 20, 23	1.0	IP
7	12 (F)	OX86 mIgG2a	13, 16, 20, 23	0.25	IP

F = 雌; IP = 腹腔内; OX86 mIgG2a = マウス IgG2a 定常領域を有するクローン OX86 のラット抗 OX40 軽鎖および重鎖の可変領域; NA = 動物を治療しなかったため該当なし; ROA = 投与経路. ^a 投与体積: 0.2 mL. ^b 混合物は mIgG2a (10 mg/kg), mIgG2b (20 mg/kg), ラット IgG2a (20 mg/kg) およびラット IgG2b (20 mg/kg) の Fc ドメインを有するアイソタイプ対照抗体を含有する.

20

【 0 3 6 5 】

30

9 . 2 . 4 腫瘍の測定

腫瘍はカリパスにより週 2 回測定し、次式：

$$\text{腫瘍体積 (V)} = [\text{長さ (mm)} \times \text{幅 (mm)}^2] / 2$$

を用いて腫瘍体積を計算した。式中、長さはより長い辺であり、幅は長さに垂直なより短い辺として定義した。

【 0 3 6 6 】

各群の抗腫瘍効果は腫瘍成長阻害 (TGI) として表現され、次のように計算した。

$$\% \text{TGI} = (1 - [\text{治療群の平均 V}] \div [\text{対照群の平均 V}]) \times 100$$

測定可能な腫瘍がなかった場合、腫瘍成長反応は完全反応 (CR) として分類した。

【 0 3 6 7 】

40

9 . 3 統計的方法

一元配置 ANOVA を用いて平均腫瘍体積差を決定した。有意な F 検定では、ダネット又はシダックの多重比較検定を利用した (適切な場合)。適用可能な場合、異分散性を考慮して腫瘍体積に $\log_{10}$ 変換を施した。p 値 < 0.05 は有意であるとみなした。

【 0 3 6 8 】

9 . 4 結果

OX86 mIgG2a によるマウスの治療は、未治療又は陰性又はアイソタイプの対照抗体で治療されたマウス対照と比較して CT26 及び MCA205 の腫瘍細胞の成長の有意な低減をもたらす (表 9 - 6、表 9 - 7、及び表 9 - 8; 図 26A、図 27A 及び図 28A)。OX86 mIgG2a によるマウスの治療は、未治療又はアイソタイプの対照抗

50

体と比較して4 T 1腫瘍細胞の成長の遅延又は低減をもたらす(表9 - 9及び図2 9 A)。

【0369】

同種同系モデルでは、多くの場合、混合反応が現れるが、OX86 mIgG2aによる治療の劇的な反応は、個別の動物の腫瘍成長グラフからより明らかである(図2 6 B、図2 7 B、図2 8 B及び図2 9 B)。OX86 mIgG2aにより治療されたマウスでは、TGIに基づいて(表9 - 6、表9 - 7、表9 - 8、及び表9 - 9; 図2 6 A、図2 7 A、図2 8 A及び図2 9 A)、又は完全反応を呈する動物数の増加に基づいて(表9 - 6、表9 - 7、表9 - 8及び表9 - 9)、用量反応は観察されなかった。

【0370】

【表9 - 6】

表9-6 CT26 同種同系モデルにおける治療群, 22 日目の腫瘍成長阻害パーセント, および完全レスポナー数

群 ^a	試験/対照抗体	用量 ^b (mg/kg)	% TGI ^c	12 匹のマウスのうちの完全レスポナー数 ^d
1	無し	NA	NA	0
2	OX86 mIgG2a	10	67	8
3	OX86 mIgG2a	3	67	6
4	OX86 mIgG2a	10	75	8
5	OX86 mIgG2a	0.3	65	8
6	OX86 mIgG2a	0.1	70	8

IP = 腹腔内; NA = 該当なし; TGI = 腫瘍成長阻害; V 体積.

^a n = 12.

^b 動物はすべて13 および16 日目に200µl の試験抗体 IP を摂取した.

^c % TGI = [1 - (治療群の平均腫瘍 V) ÷ (対照群の平均腫瘍 V)] x 100.

^d 試験終了時に腫瘍体積測定値がゼロと記録された群中の動物数.

【0371】

【表9 - 7】

表9-7 CT26 同種同系モデルにおける治療群, 26 日目の腫瘍成長阻害パーセント, および完全レスポナー数

群 ^a	試験/対照抗体	用量 ^b (mg/kg)	% TGI ^c	10 匹のマウスのうちの完全レスポナー数 ^d
1	無し	NA	NA	1
2	陰性対照 (OX86 mIgG1 D265A)	2.5	NA	1
3	OX86 mIgG2a	2.5	94	7
4	OX86 mIgG2a	1.0	97	8
5	OX86 mIgG2a	0.25	95	6
6	OX86 mIgG2a	0.1	92	7

IP = 腹腔内; NA = 該当なし; TGI = 腫瘍成長阻害; V 体積.

^a n = 10.

^b 動物はすべて9 および12 日目に200µl の試験抗体 IP を摂取した.

^c % TGI = [1 - (治療群の平均腫瘍 V) ÷ (対照群の平均腫瘍 V)] x 100.

^d 試験終了時に腫瘍体積測定値がゼロと記録された群中の動物数.

【0372】

【表 9 - 8】

表 9-8 MCA205 同種同系モデルにおける治療群, 22 日目の腫瘍成長阻害パーセント, および
完全レスポnder数

群 ^a	試験/対照 抗体	用量 ^b (mg/kg)	% TGI ^c	14 匹の マウスのうちの 完全 レスポnder数
1	無し	NA	NA	0
2	アイソタイプ対照 (混合物)	20	NA	0
3	OX86 mIgG2a	20	65	0
4	OX86 mIgG2a	10	76	4
5	OX86 mIgG2a	5	70	2

10

【 0 3 7 3 】

【表 9 - 9】

表 9-9 4T1 同種同系モデルにおける治療群, 25 日目の腫瘍成長阻害パーセント, および
完全レスポnder数

群 ^a	試験/対照 抗体	用量 ^b (mg/kg)	% TGI ^c	12 匹の マウスのうちの 完全 レスポnder数 ^d
1	無し	NA	NA	0
2	アイソタイプ対照 (混合物)	70	NA	0
3	OX86 mIgG2a	10	5	0
4	OX86 mIgG2a	5	34	2
5	OX86 mIgG2a	2.5	37	0
6	OX86 mIgG2a	1.0	22	0
7	OX86 mIgG2a	0.25	ND	0

20

IP = 腹腔内; NA = 該当なし; TGI = 腫瘍成長阻害; V 体積; ND = 未決定.

^a n = 12.

^b 動物はすべて 13, 16, 20 および 23 日目に 200μl の試験抗体 IP を摂取した.

^c % TGI = $[1 - (\text{治療群の平均腫瘍 V}) \div (\text{対照群の平均腫瘍 V})] \times 100$.

^d 試験終了時に腫瘍体積測定値がゼロと記録された群中の動物数.

30

【 0 3 7 4 】

9 - 5 結論

腫瘍を有するマウスに O X 8 6 m I g G 2 a により単一作用剤治療を施すと、未治療、陰性、及び / 又はアイソタイプの対照治療群と比較して、多発性腫瘍の成長を有意に低減する抗腫瘍活性がもたらされる。

【 0 3 7 5 】

実施例 10 : O X 4 0 m A b 2 4 のエピトープの特徴付け

この実施例では、一連のヒト / マウス O X 4 0 キメラ変異体を用いて O X 4 0 m A b 2 4 のエピトープを調べる。

【 0 3 7 6 】

10 . 1 この試験で使用した材料及びそれらの供給元を表 10 - 1 に列挙する。

【 0 3 7 7 】

40

【表 10 - 1】

表 10-1 材料

アイテム	供給元
抗ヒト IgG-Alexa480	Invitrogen (Carlsbad, CA)
抗ヒツジ IgG-Alexa-480	Invitrogen (Carlsbad, CA)
抗ヤギ IgG-Alexa480	Invitrogen (Carlsbad, CA)
FreeStyle 293F 細胞 (HEK293F 細胞)	Invitrogen (Carlsbad, CA)
ヤギ抗マウス OX40 ポリクローナル抗体	R&D Systems (Minneapolis, MN)
LSRII フローサイトメーター	BD Biosciences (San Jose, CA)
リン酸緩衝生理食塩水	Invitrogen (Carlsbad, CA)
ヒツジ抗ヒト OX40 ポリクローナル抗体	R&D Systems (Minneapolis, MN)
293fectin トランスフェクション試薬	Invitrogen (Carlsbad, CA)

10

【 0 3 7 8 】

10.2 ヒト/マウスキメラ変異体の作製

OX40 mAb 24 は、ヒト OX40 (配列番号 91) に特異的に結合し、アミノ酸 (aa) 配列が 60% の同一性を共有するにもかかわらずマウス OX40 (配列番号 92) を認識しない (図 30)。ヒト OX40 とマウス OX40 との間で細胞外ドメインの一部を交換するように工学操作してヒト/マウスキメラ OX40 変異体を作製した。オーバーラップ伸長 PCR でヒト及びマウス OX40 の cDNA 構築物を鋳型として用いて、組換えタンパク質の細胞表面発現のために膜貫通ドメインを有するキメラ変異体を構築した。OX40 は、3 つの完全システインリッチドメイン (CRD) 及び 1 つのトランケートシステインリッチドメインを有する約 45 kDa のタンパク質である。構造は TNFR スーパーファミリーに特有である。

20

【 0 3 7 9 】

ヒト OX40 の細胞外ドメインの以下の残基を対応するマウス OX40 の aa 又はアラニンと置き換えることにより 13 種のキメラノックアウト (KO / 機能喪失) 変異体を構築した (図 31) :

- ・ C R D 1 (ヒト O X 4 0 aa 29 ~ 65 をマウスのカウンターパートで置き換えた)、
- ・ C R D 2 (ヒト O X 4 0 aa 66 ~ 107 をマウスのカウンターパートで置き換えた)、
- ・ C R D 3 (ヒト O X 4 0 aa 108 ~ 146 をマウスのカウンターパートで置き換えた)、
- ・ C R D 4 の + リンカー (ヒト O X 4 0 aa 147 ~ 214 をマウスのカウンターパートで置き換えた)、
- ・ C R D 3 + 4 (ヒト O X 4 0 aa 108 ~ 167 をマウスのカウンターパートで置き換えた)、
- ・ A¹¹¹ (ヒト O X 4 0 aa アラニン 111 をマウスのカウンターパートのプロリンで置き換えた)、
- ・ L¹¹⁶ (ヒト O X 4 0 aa ロイシン 116 をマウスのカウンターパートのグルタミンで置き換えた)、
- ・ P¹²¹ (ヒト O X 4 0 aa プロリン 121 をマウスのカウンターパートのロイシンで置き換えた)、
- ・ A¹²⁶ (ヒト O X 4 0 aa アラニン 126 をマウスのカウンターパートのバリンで置き換えた)、
- ・ D¹³⁷ (ヒト O X 4 0 aa アスパラギン酸 137 をマウスのカウンターパートのアスパラギンで置き換えた)、
- ・ A¹¹¹ P¹²¹ D¹³⁷ (ヒト O X 4 0 aa Ala111、Pro121

30

40

50

、及び A s p 1 3 7 をマウスのカウンターパートで置き換えた）、

・ L^{1 1 6} A^{1 2 6}（ヒト O X 4 0 a a L e u 1 1 6 及び A l a 1 2 6 をマウスのカウンターパートで置き換えた）、

並びに

・ D^{1 1 7} S^{1 1 8}（ヒト O X 4 0 の a a A s p 1 1 7 及び S e r 1 1 8 を A l a 突然変異で置き換えた）。

【0380】

そのほかに、K O 構築物（図 3 1）に対して以上に記載したのと同じの方法を用いてヒト O X 4 0 の以下の残基をマウス O X 4 0 内にグラフトすることにより 5 種のノックイン（K I / 機能獲得）変異体を構築した：

・ C R D 3（ヒト O X 4 0 a a 1 0 8 ~ 1 4 6 を対応するマウス領域にグラフトした）、

・ A^{1 1 1}（ヒト O X 4 0 a a アラニン 1 1 1 を対応するマウス位置にグラフトした）、

・ L^{1 1 6}（ヒト O X 4 0 a a ロイシン 1 1 6 を対応するマウス位置にグラフトした）、

・ A^{1 2 6}（ヒト O X 4 0 a a アラニン 1 2 6 を対応するマウス位置にグラフトした）、

・ L^{1 1 6} A^{1 2 6}（ヒト O X 4 0 a a ロイシン 1 1 6 及びアラニン 1 2 6 を対応するマウス位置にグラフトした）。

【0381】

得られたキメラ D N A は、一過性哺乳動物発現用の哺乳動物発現ベクター p E B N A 中に導入した。2 9 3 F 細胞は、 0.7×10^6 細胞 / m L の密度でトランスフェクションの前日に接種した。製造業者の説明書に従って 5 μ L の 2 9 3 f e c t i n トランスフェクション試薬を用い 3 . 5 μ g の発現ベクターを 5 m L の H E K 2 9 3 F 細胞にトランスフェクトした。

【0382】

1 0 . 3 キメラ O X 4 0 変異体への O X 4 0 m A b 2 4 の結合の特徴付け

トランスフェクションの 4 8 時間後、1 μ g / m L の O X 4 0 m A b 2 4 を含む P B S 中、氷上で H E K 2 9 3 F 細胞を 1 時間インキュベートした。結合された O X 4 0 m A b 2 4 をフローサイトメトリーにより検出するために、細胞を冷 P B S で 3 回洗浄し、1 μ g / m L の A l e x a 4 8 0 コンジュゲート抗ヒト I g G 抗体と共に氷上で 1 時間インキュベートし、次いで L S R I I フローサイトメーターを用いて解析した。

【0383】

すべてのキメラ O X 4 0 変異体の発現レベルもフローサイトメトリーによりモニターした。P B S 中でヒツジ抗ヒト O X 4 0 とヤギ抗マウス O X 4 0 ポリクローナル抗体との混合物と共に 1 μ g / m L で細胞を氷上で 1 時間インキュベートした。細胞を冷 P B S で 3 回洗浄し、次いで A l e x a 4 8 0 コンジュゲート抗ヤギ及び抗ヒツジ I g G ポリクローナル抗体の混合物と共にインキュベートした。冷 P B S で 3 回洗浄した後、細胞を L S R I I フローサイトメーターで解析した。

【0384】

1 0 . 4 結果

キメラヒト / マウス変異体を用いて O X 4 0 m A b 2 4 のエピトープの特徴付けを行った。ヒト O X 4 0 及びマウス O X 4 0 は、a a 配列が 6 0 % の同一性を共有する（図 3 0）。とはいえ、O X 4 0 m A b 2 4 は、ヒト O X 4 0 に特異的に結合するがマウス O X 4 0 を認識しない。この特異性を利用して O X 4 0 m A b 2 4 のエピトープを同定した。マウス O X 4 0 の細胞外ドメインの様々なドメインをヒト O X 4 0 中に（K O / 機能喪失変異体）又はヒト O X 4 0 の様々なドメインをマウス O X 4 0 中に（K I / 機能獲得変異体）スワップイン又はスワップアウトすることにより 1 8 種のキメラ変異体を構築した（図 3 1）。変異体はすべて、キメラタンパク質の細胞表面発現用の膜貫通ドメインをコード

10

20

30

40

50

していた。これらの変異体への O X 4 0 m A b 2 4 の結合特性をフローサイトメトリーにより解析した。

【0385】

ヒト O X 4 0 とマウス O X 4 0 との間で個別のドメインをスワッピングすることにより O X 4 0 m A b 2 4 のエピトープをヒト O X 4 0 の C R D 3 ドメインにマッピングした。ヒト C R D 3 ドメインをマウスのカウンターパートに置き換えた場合 (K O _ C R D 3 及び K O _ C R D 3 - 4)、ヒト O X 4 0 への O X 4 0 m A b 2 4 の結合が消失した (図 3 2 A ~ C)。他のヒト C R D ドメインをマウス領域で置換えても、O X 4 0 m A b 2 4 の結合に影響しなかった (K O _ C R D 1、K O _ C R D 2、及び K O _ C R D 4 + リンカー)。さらに、ヒト C R D 3 ドメインをマウス O X 4 0 中にグラフトしたところ、O X 4 0 m A b 2 4 の結合をもたらした (K I _ C R D 3)。抗ヒト及び抗マウス O X 4 0 ポリクローナル抗体によりモニターしたところ、すべての変異体が発現された (図 3 2 A ~ C)。O X 4 0 m A b 2 4 の親 m A b (9 B 1 2) も結合試験で特徴付けを行った。9 B 1 2 は、これらの変異体に対して O X 4 0 m A b 2 4 と同一の結合プロファイルを示したことから、両方の I g G が C R D 3 ドメインの同一のエピトープを認識することが示唆される。

10

【0386】

さらに、ヒト及びマウスの O X 4 0 間で異なるアミノ酸を突然変異することにより、きわめて重要なエピトープ残基 L e u ^{1 1 6} 及び A l a ^{1 2 6} を C R D 3 ドメインで同定した。ヒト C R D 3 ドメインの A l a ^{1 1 1}、L e u ^{1 1 6}、P r o ^{1 2 1}、A l a ^{1 2 6}、及び A s p ^{1 3 7} を含む 5 つのアミノ酸 (図 3 0) を個別のアミノ酸又は様々な組合せとして対応するマウス残基又は A l a に突然変異させた (図 3 1)。ヒト残基 L e u ^{1 1 6} 及び A l a ^{1 2 6} をマウスのカウンターパートに置き換えた場合 (K O _ L ^{1 1 6} + A ^{1 2 6})、O X 4 0 m A b 2 4 の結合が消失した。さらに、K I / 機能獲得変異体からこれらの 2 つのきわめて重要な残基の重要性が確認された。マウス O X 4 0 中への L e u ^{1 1 6}、A l a ^{1 2 6}、又は組合せのグラフトは、O X 4 0 m A b 2 4 の結合をもたらした。

20

【0387】

10.5 結論

きわめて重要な残基 L e u ^{1 1 6} 及び A l a ^{1 2 6} を含めてヒト / マウスキメラ変異体を用いてエピトープ O X 4 0 m A b 2 4 をヒト O X 4 0 の C R D 3 ドメインにマッピングした。O X 4 0 m A b 2 4 及びその親 9 B 1 2 との間ですべての変異体への結合プロファイルが同一であることから、それらはヒト O X 4 0 上の同一のエピトープを認識することが示唆される。

30

【0388】

実施例 11 : ナイーブマウス及び同系腫瘍を有するマウスにおけるラット / マウス抗マウス O X 4 0 I g G 2 a キメラ抗体クローン O X 8 6 の薬力学的活性

O X 8 6 は、M O X 4 0 に特異的に結合して M O X 4 0 のシグナル伝達を惹起するラット抗 m O X 4 0 I g G 1 抗体であり (a l - S h a m k h a n i e t a l , 1 9 9 6)、癌の免疫能のあるマウスモデルにおいて抗腫瘍活性を有する (W e i n b e r g e t a l , 2 0 0 0)。O X 4 0 m A b 2 4 に類似した機能上の性質を有するマウスサロゲート抗体を用いて O X 4 0 アゴニズムの効果をより完全に調べるために、この実施例では実施例 9 に記載のラット / マウス抗 m O X 4 0 I g G 2 a キメラ抗体 O X 8 6 を利用する。しかしながら、種間でいくつかの類似点を導くことは可能である。例えば、m I g G 2 a 及びヒト I g G 1 は、多くの場合、機能的に等価であるとみなされる。なぜなら、両方のアイソタイプが複数の F c γ レセプターに結合可能であり、高親和性 F c γ レセプター結合が可能であり、A D C C を惹起することが可能であり、しかも補体古典経路による補体依存性細胞傷害性 (C D C) の前提条件であるヒト C 1 q への結合を行うからである (S t e w a r t e t a l , 2 0 1 4、D a l l ' A c q u a e t a l , 2 0 0 6)。O X 8 6 m I G g 2 a はマウス O X 4 0 に結合するので (実施例 9 参照)、サロ

40

50

ゲートマウス O X 4 0 アゴニスト抗体として O X 4 0 m A b 2 4 に使用した。

【0389】

この実施例では、ナイーブマウス及び腫瘍を有するマウスで T 細胞を誘導する O X 8 6 m I g G 2 a の能力、細胞周期に入る能力、及び増殖する能力。さらに、O X 4 0 アゴニスト活性の可能性のあるバイオマーカーとして K 1 6 7 と I C O S を評価し、調べた。T 細胞増殖活性及び抗腫瘍活性を癌の 2 つの同種同系マウスモデルで決定した。さらに最後に、O X 8 6 m I g G 2 a の i n v i v o 活性で活性化 (F c γ レセプター I 、 I I I 、及び I V) 及び / 又は阻害 (C f γ レセプター I I b) F c γ レセプターの果たす役割を決定した。

【0390】

11.1 材料及び方法

11.1.1 動物の受領及び同定

6 ~ 8 週齢の野生型 F c g r 2 b ^{-/-} 又は F c e r 1 g ^{-/-} B A L B / c 、及び F c g r 2 b ^{-/-} 又は F c e r 1 g ^{-/-} C 5 7 B L / 6 マウスは、MedImmune from Harlan Laboratories, Inc. (Indianapolis, IN 又は Charles River Laboratories (UK)) で受領し、試験開始前に 15 日間以下で気候順化させた。その後、個別のマウスを同定するためにマウスにマイクロチップトランスポンダーを移植した。

【0391】

11.1.2 飼育

動物は、Laboratory Animal Resources facility (USA) and Biological Sciences Unit (UK) at MedImmune, an Association for Animal Accreditation of Laboratory Animal Care 及び米国農務省 (United States Department of Agriculture) の許可を得た施設で、Institutional Animal Care and Use Committee (USA) and Home Office (UK) により認可されたプロトコルに従って、人道的に処置及び飼育された。動物は、無菌の寝具及び食品並びに不断給餌の酸性化飲料水 (USA) 又は上水 (UK) を備えた無菌マイクロアイソレーターユニットに維持された。環境条件は標準化した (室温 : 20 ± 1 (USA) 又は 21 ± 1 (UK) 、相対湿度 : 50 % ± 10 % (USA) 又は 55 ± 10 % (UK) 、12 時間の明暗周期) 。動物は、有害な臨床徴候に関して毎日及び体重に関して隔週でモニターした。後肢麻痺、呼吸窮迫、20 % 体重損失、又は 2000 mm³ 超の腫瘍体積が認められた場合、動物は頸椎脱臼又は CO₂ 窒息により人道的にただちに屠殺した。

【0392】

11.1.3 同系腫瘍の確立

CT26 細胞系 (マウス結腸癌) は ATCC, Manassas, VA から入手し、細胞系 MCA205 (化学誘導マウス軟組織肉腫) は Providence Cancer Center, Portland, OR から入手した。両方の細胞系を 37 °C、5 % CO₂ で RPMI 1640 培地 + 10 % FBS 中に維持した。

【0393】

105 CT26 細胞の皮下 (SC) 注射を 7 ~ 9 週齢の野生型 F c g r 2 b ^{-/-} 又は F c e r 1 g ^{-/-} B A L B / c マウスの右側腹部に行って確立した。アロ移植はまた、0.1 mL の PBS 中に再懸濁された 2.5 × 10⁵ MCA205 細胞の SC 注射を 7 ~ 9 週齢の野生型 F c g r 2 b ^{-/-} 又は F c e r 1 g ^{-/-} C 5 7 B L / 6 マウスの右側腹部中に行って確立した。

【0394】

11.1.4 ランダム化、群指定、及び用量レベル

この試験では野生型 (n = 70) 、 F c g r 2 b ^{-/-} (n = 36) 、又は F c e r 1

10

20

30

40

50

g^{-/-} (n = 36) BALB/c、及びFcgr2b^{-/-} (n = 36)又はFcεr1g^{-/-} C57BL/6雌マウス (n = 36)を使用した。マウスはすべて、治療群にランダムに帰属した。群指定、動物数、用量レベル、及び投与スケジュールを表11-1、表11-2及び表11-3に示す。試験品及び対照品はすべて、腹腔内に投与した (IP)。動物の入替えはしなかった。

【0395】

腫瘍体積が約2000mm³に達した場合又は腫瘍が潰瘍化又は壊死した場合、各群の動物を屠殺した。

【0396】

【表11-1】

10

表 11-1 ナイーブ Balb/c Mice の群指定 および用量レベル

群	動物数 (M/F)	治療	投与スケジュール (試験日)	用量レベル (mg/kg) ^a	ROA
1, 9	7 (F), 7 (F)	生理食塩水	1	NA	IP
3, 11	7 (F), 7 (F)	アイソタイプ対照 (NIP228 IgG2a)	1	20	IP
4, 12	7 (F)	OX86 mIgG2a	1	20	IP
5, 13	7 (F), 7 (F)	OX86 mIgG2a	1	2	IP
6, 14	7 (F), 7 (F)	OX86 mIgG2a	1	0.2	IP

F = 雌; M = 雄; NA = 該当なし; IP = 腹腔内; ROA = 投与経路; OX86 mIgG2a = OX86 のマウス抗マウス OX40 IgG2a モノクローナル抗体変異体

^a 投与体積: 生理食塩水は 0.2 mL または体重に合わせて調節された体積; 他の群はすべて 10 mL/kg.

20

【0397】

【表11-2】

表 11-2 CT26 同種同系モデルにおける群指定および用量レベル

群	動物数 (M/F)	マウス 株	治療	投与スケジュール (試験日)	用量レベル (mg/kg) ^a	ROA
1	8 (F)	Balb/c Fcgr2b ^{-/-}	無し	NA	NA	IP
2	8 (F)		対照 (OX86 mIgG1 D265A)	4, 7	2.5	IP
3	8 (F)		OX86 mIgG2a	4, 7	2.5	IP
4	8 (F)	Balb/c Fcεr1g ^{-/-}	無し	NA	NA	IP
5	8 (F)		対照 (OX86 mIgG1 D265A)	4, 7	2.5	IP
6	8 (F)		OX86 mIgG2a	4, 7	2.5	IP

F = 雌; M = 雄; NA = 動物を治療しなかったのが該当なし; IP = 腹腔内; ROA = 投与経路; OX86 mIgG2a = マウス IgG2a 定常領域を有するクローン OX86 のラット抗 OX40 軽鎖および重鎖の可変領域.

^a 投与体積: 0.2 mL.

30

【0398】

【表 1 1 - 3】

表 11-3 MCA205 同種同系モデルにおける群指定および用量レベル

群	動物数 (M/F)	マウス 株	治療	投与スケジュール (試験日)	用量レベル (mg/kg) ^a	ROA
1	8 (F)	C57BL/6 Fcgr2b ^{-/-}	無し	NA	NA	IP
2	8 (F)		対照 (OX86 mIgG1 D265A)	4, 7	7.5	IP
3	8 (F)		OX86 mIgG2a	4, 7	7.5	IP
4	8 (F)	C57BL/6 Fcer1g ^{-/-}	無し	NA	NA	IP
5	8 (F)		対照 (OX86 mIgG1 D265A)	4, 7	7.5	IP
6	8 (F)		OX86 mIgG2a	4, 7	7.5	IP

F = 雌; M = 雄; NA = 動物を治療しなかったため該当なし; IP = 腹腔内; ROA = 投与経路; OX86 mIgG2a = マウス IgG2a 定常領域を有するクローン OX86 のラット抗 OX40 軽鎖および重鎖の可変領域.

^a 投与体積: 0.2 mL.

10

【 0 3 9 9 】

1 1 . 1 . 5 腫瘍の測定

腫瘍はカリパスにより週 2 回測定し、次式：

$$\text{腫瘍体積 (V)} = [\text{長さ (mm)} \times \text{幅 (mm)}^2] / 2$$

を用いて腫瘍体積を計算した。式中、長さはより長い辺であり、幅は長さに垂直なより短い辺として定義した。

20

【 0 4 0 0 】

各群の抗腫瘍効果は腫瘍成長阻害 (TGI) として表現され、次のように計算した。

$$\% \text{TGI} = (1 - [\text{治療群の平均腫瘍 V}] \div [\text{対照群の平均腫瘍 V}]) \times 100$$

【 0 4 0 1 】

1 1 . 1 . 6 組織採取および単細胞の単離

1 1 . 1 . 6 . 1 フローサイトメトリー解析のためのマウス血液細胞の調製

赤血球溶解 (RBC L) 緩衝液 (2 mL) を血液 (50 μ L) に添加し、5 分間インキュベートした。インライフ採血から得られた体積は、20 μ L ~ 50 μ L の範囲内であった。最終採血は 50 μ L であった。RPMI + 10 % ウシ胎仔血清 (FBS) (8 mL) を各サンプルに添加した。各サンプルの細胞をペレット化し (300 $\times$ g、5 min) 次いで 0.3 mL のフロー緩衝液中で再懸濁させた。細胞懸濁液 (200 μ L) を 96 ウェル丸底プレートの各ウェルに添加して蛍光抗体による染色に供した。非染色対照、単一抗体染色対照、アイソタイプ染色対照、及び蛍光マイナスオン (FMO) 抗体染色対照に対して、プール群サンプルを使用した。

30

【 0 4 0 2 】

1 1 . 1 . 6 . 2 マウス流入領域リンパ節及び脾臓の単離並びにフローサイトメトリー解析用の単細胞浮遊液の作製

脾臓を 10 mL の RPMI + 1 Pen / Strept 溶液中に配置し、40 μ m 細胞ストレーナーに通した。サンプルをペレット化し (300 $\times$ g、5 min)、次いで 1 mL の RBC L 緩衝液中に 3 分間再懸濁させた。RPMI + FBS 10 % (9 mL) を各サンプルに添加した。細胞懸濁液をペレット化し、1 mL のフロー緩衝液中に再懸濁させた (300 $\times$ g、5 min)。細胞懸濁液 (100 μ L) を 96 ウェル丸底プレートの各ウェルに添加し、蛍光抗体による染色に供した。プール基サンプルは使用された、非染色対照、単一抗体染色対照、アイソタイプ対照、及び FMO 抗体染色対照に対して、プール群サンプルを使用した。

40

【 0 4 0 3 】

1 1 . 1 . 6 . 3 フローサイトメトリー解析用のマウス腫瘍の単細胞浮遊液の調製

結合組織又は皮膚を採取しないように注意して安楽死マウスから無菌状態で腫瘍を摘出し、6 ウェルディッシュ中のハックス平衡塩溶液で希釈されたコラゲナーゼ中に配置した

50

。酵素消化プロセスの効率を向上させるために、各腫瘍は、スカルペル又は小さな鋭いハサミを用いてより小さな小片にミンスした。ミンスされた腫瘍を15 mL コニカルチューブ中に導入し、振盪プラットフォーム上に配置して37℃で20～30分間インキュベートした。コラゲナーゼを脱活性化させて免疫細胞の生存能を維持するために5 mLのRPMI + 10% FBSを各サンプルに添加した。サンプルを70 µM細胞ストレーナーに通して、50 mL コニカルチューブ中に配置した。各サンプルのアリコートのカウントのために取り出した。残りのサンプルを330 × gの遠心分離機でペレット化し、 1×10^7 細胞/mLの濃度でFACS緩衝液(PBS + 2% FBS)中に再懸濁させた。

【0404】

11.1.7 フローサイトメトリー解析

10

11.1.7.1 腫瘍のないマウス由来の組織の解析

血液又は脾臓細胞の単細胞浮遊液をペレット化し(300 × g、5 min)、50 µLのFcブロック溶液(1:50)中に再懸濁させ、eBiosciences Flow Bufferで希釈し、氷上で10分間インキュベートした。50マイクロリットルの蛍光標識抗体(2 × ストック溶液)を各サンプルに添加した(最終体積100 µL)。単一抗体染色溶液(細胞外)を1 µL/ウェルで添加し、細胞/抗体混合物を氷上で30分間インキュベートした。細胞をペレット化し(300 × g、5 min)、2回洗浄し(200 µL フロー緩衝液/ウェル、300 × g、5 min)、50 µLのFix/Penn緩衝液(3部の希釈液に対して1部の濃縮物)、次いで、4℃の暗所で一晚インキュベートした。

20

【0405】

処理細胞を1 × 透過化緩衝液(水希釈)で2回洗浄した。細胞内標識抗体を透過化緩衝液(100 µL/ウェル)中に希釈して細胞に添加し、次いで、暗所で室温で30分間インキュベートした。単一マーカー染色用の抗体(細胞内)を1 µL/ウェルで細胞に添加して100 µLの透過化緩衝液中に導入し、暗所で氷上で30分間インキュベートした。細胞を透過化緩衝液で1回洗浄し、3.7%のホルムアルデヒド溶液(100 µL)中に再懸濁させ、その後、Canto IIフローサイトメーター(BD Biosciences, San Jose, CA)による解析に供した。

【0406】

11.1.7.2 腫瘍を有するマウス由来の組織の解析

30

11.1.7.2.1 細胞表面染色

ペレット化細胞の各サンプルをFACS緩衝液中に再懸濁させた。FACS緩衝液中の蛍光抗体混合物を適切なウェルに添加し、4℃の暗所で20～30分間インキュベートした。細胞をFACS緩衝液で2回洗浄し、FACS緩衝液中に再懸濁させ、LSRIIFローサイトメーター(BD Biosciences, San Jose, CA)で解析した。

【0407】

11.1.7.2.2 細胞内染色(固定及び透過化された細胞)

ペレット化細胞の各サンプルを、生存/非生存細胞の識別のための蛍光固定青色染料の50 µLの1:500希釈液中に再懸濁させ、4℃の暗所で15分間インキュベートした。細胞をFACS緩衝液で1回洗浄し、Fcブロックを含有する30 µLのPBS + 4%正常マウス血清中に再懸濁させ、室温で15分間インキュベートした。FACS緩衝液中の蛍光抗体混合物を適切なウェルに添加し、4℃の暗所で20～30分間インキュベートした。細胞をFACS緩衝液で2回洗浄し、新たに調製された150 µLのFoxP3 Fix/Penn作用液中に再懸濁させ、暗所で室温で30分間インキュベートした。細胞を1 × 透過化緩衝液で2回洗浄し、抗体を含有する100 µLの1 × 透過化緩衝液中に再懸濁させて細胞内抗原を染色し、暗所で室温で30分間インキュベートした。細胞を1 × 透過化緩衝液で1回洗浄し、FACS緩衝液中に再懸濁させ、LSRIIFローサイトメーターで解析した。

40

【0408】

50

11.1.8 統計的方法

一元配置 ANOVA を用いて $Ki67$ + 又は $ICOS$ + 細胞の平均腫瘍体積差及び平均パーセントを決定した。有意な F 検定では、ダネット又はシダックの多重比較検定を利用した（適切な場合）。適用可能な場合、異分散性を考慮して $\log_{10}$ 変換を施した。 p 値 < 0.05 は有意であるとみなした。線形回帰分析に $GraphPad Prism 6.0$ を利用することにより、 X から Y の最良予測が行われた最良当てはめ線、線の統計的有意水準、及び決定された最良当てはめ線の適合度 (r^2) を得た。

【0409】

11.1.9 材料

この試験で使用した材料及びそれらの供給元を表 11 - 4 及び表 11 - 5 に列挙する。

10

【0410】

【表 11 - 4】

表 11-4 材料

アイテム	供給元
0.25%トリプシン-EDTA (1X)	Life Technologies, Carlsbad, CA
10 x 透過化緩衝液	eBioscience, UK
3.7%ホルムアルデヒド溶液	Sigma-Aldrich, UK
40 および 70 μm 細胞ストレーナー	Corning Life Sciences, Tewksbury, MA
3 型コラゲナーゼ	Worthington Biochem Corp., Lakewood, NJ
Fc ブロック	eBioscience, UK
熱不活性化ウシ胎仔血清	Life Technologies, Carlsbad, CA
固定化/透明化濃厚液	eBioscience, UK
固定化/透明化希釈液	eBioscience, UK
フロー緩衝液	eBioscience, UK
FoxP3 固定化/透明化キット	eBioscience, UK
Hanks 緩衝塩溶液	Life Technologies USA
RBCL 緩衝液中中和用熱不活性化 γ 照射 FBS	SASC Biosciences, KS, USA
LSRII および Canto II フローサイトメーター	BD Biosciences, San Jose, CA
正常マウス血清	Jackson Labs, Bar harbor, MA
Pen/Strep 溶液	Life Technologies UK
透明化緩衝液	eBiosciences, USA
リン酸緩衝生理食塩水, pH 7.2	Life Technologies, Carlsbad, CA
赤血球溶解緩衝液	Sigma, UK
Roswell Park Memorial Institute 1640 培地	Life Technologies, Carlsbad, CA

20

30

【0411】

【表 11 - 5】

表 11-5 フローサイトメトリー試験用蛍光抗体

アイテム	供給元
APC コンジュゲートラット IgG2a 抗 CD4	eBiosciences, UK
FITC コンジュゲート mIgG2a 抗 MHC2	eBiosciences USA
APC-H7 コンジュゲートラット IgG2a 抗 CD8	BD Biosciences, UK
EFluor 480 コンジュゲートラット IgG2a 抗 Ki67	eBioscience, UK
APC コンジュゲートアイソタイプ対照 ラット IgG2a	eBioscience, UK
APC-H7 コンジュゲートアイソタイプ対照 ラット IgGa	BD Biosciences, UK
eFluor コンジュゲートアイソタイプ対照ラット IgG2a	eBioscience, UK
PE コンジュゲートアイソタイプ対照ラット IgG2b	eBioscience, UK
PECy7 コンジュゲート rlgG2a Ki67	eBioscience, USA
BV605 コンジュゲート rlgG2a 抗 CD4	Biolegend USA
BV711 コンジュゲート rlgG2a 抗 CD8	Biolegend USA
Fixable Blue	Life Technologies, USA
PeCy7 コンジュゲートアイソタイプ対照 rlgG2a	Biolegend USA

10

【 0 4 1 2 】

1 1 . 2 結果

20

抗 O X 4 0 抗体 O X 8 6 マウス I g G 2 a (O X 8 6 m I g G 2 a) でナイーブマウスの腹腔内治療を行ったところ、対照品で治療されたマウスと比較して、血中の K i 6 7 + C D 4 + 及び I C O S + C D 4 + T 細胞のパーセントの有意な用量依存性且つ一過性の増加が経時的に得られた (図 3 3 A 及び C) 。 K i 6 7 + C D 4 + 及び I C O S + C D 4 + T 細胞の最大パーセントは 1 0 日目に検出された。 K i 6 7 + C D 4 + 及び I C O S + C D 4 + T 細胞のパーセントの有意な増加は、対照品で治療されたマウスと比較して、O X 8 6 m I g G 2 a の投与後の 1 0 日目のマウスの脾臓中で測定した (図 3 3 B 及び D) 。 K i 6 7 + C D 4 + T 細胞のパーセントと I C O S + C D 4 + T 細胞のパーセントとの間の統計的に有意な強い相関は、1 0 日目の血液及び脾臓は同定された (図 3 4 A 及び 3 4 B) 。

30

【 0 4 1 3 】

O X 8 6 m I g G 2 a によるナイーブマウスの治療でも、対照品で治療されたマウスと比較して、血中の K i 6 7 + C D 8 + T 細胞のパーセントの有意且つ一過性の増加が経時的に得られた (図 3 5 A) 。血中の I C O S + C D 8 + T 細胞のパーセントの経時的増加 (図 3 5 C) 及び 0 日目の脾臓中の K i 6 7 + C D 8 + T 細胞のパーセント (図 3 5 B) は、O X 8 6 m I g G 2 a による治療後に検出されたが、対照品による治療と比較して統計的に有意でなかった。O X 8 6 m I g G 2 a によるナイーブマウスの治療は、対照品で治療されたマウスと比較して、1 0 日目の脾臓中の I C O S + C D 8 + T 細胞のパーセントの有意且つ用量依存性の増加を誘導した (図 3 5 D) 。血中及び脾臓中の K i 6 7 + C D 8 + T 細胞のパーセントと I C O S + C D 8 + T 細胞のパーセントとの間には中程度であるが有意な相関が見られた (図 3 6 A 及び 3 6 B) 。

40

【 0 4 1 4 】

O X 8 6 m I g G 2 a による腫瘍を有する野生型マウスの単一作用剤治療は、未治療群及びアイソタイプ対照治療群と比較して 2 つの組織学的に異なる腫瘍の成長を低減する抗腫瘍活性をもたらした (実施例 9 参照) 。 O X 8 6 m I G g 2 a による治療は、阻害 F c γ レセプター I I B (F c γ r 2 b - / - マウス) の発現が欠如するように遺伝子工学操作された C 5 7 B L / 6 マウスにおける対照品による治療と比較して、2 0 日目に M C A 2 0 5 腫瘍の成長の有意な低減をもたらした (図 3 8 A 、表 1 1 - 7) 。 C T 2 6 腫瘍を有するマウスの同等な治療は、F c γ r 2 b - / B A L B / c マウスにおける対照品による治療と比較して腫瘍の成長の低減をもたらしたが 1 8 日目に統計的有意性に達しなかつ

50

た（図 3 7 A、表 1 1 - 6）。活性化 F c y レセプターの発現が欠如するように遺伝子工学操作された腫瘍を有する B a l b / c 及び C 5 7 B L / 6 マウスでは、いずれの作用剤による成長阻害も観察されなかった（F c e r 1 g^{-/-} マウス、図 3 7 C、図 3 8 C）。混合反応は、多くの場合、同種同系モデルで観察される。しかしながら、F c y レセプターノックアウトマウスの 2 つの異なる株の O X 8 6 m I g G 2 a による治療後の抗腫瘍反応が、個別の動物腫瘍成長グラフから識別可能であり（図 3 7 B 及び D、図 3 8 B 及び D）、O X 8 6 m I g G 2 a による治療は、C T 2 6 及び M C A 2 0 5 腫瘍成長の阻害をもたらし、いくつかの場合には F c g r 2 b^{-/-} マウスで完全反応を誘導した（図 3 7 B、図 3 8 B）。

【 0 4 1 5 】

10

【表 1 1 - 6】

表 11-6 CT26 同種同系マウスモデルにおける治療群および TGI パーセントおよび完全レスポンドー数

群 ^a	試験品/ 対照品	用量 ^b (mg/kg)	マウス 株	% TGI ^c	8 匹のマウスのうちの 完全レスポンドー 数 ^d
1	無し	NA	Balb/c Fcgr2b ^{-/-}	NA	0
2	アイソタイプ対照	2.5 mg/kg		NA	0
3	OX86 mIgG2a	2.5 mg/kg		15	0
4	無し	NA	Balb/c Fcer1g ^{-/-}	NA	0
5	アイソタイプ対照	2.5 mg/kg		NA	0
6	OX86 mIgG2a	2.5 mg/kg		< 0	0

20

TGI = 腫瘍成長阻害; NA = 該当なし; IP = 腹腔内; V = 体積

^a 1 群当たりの動物数: 8.

^b 動物はすべて 4 および 7 日目に 200 µL の試験品 IP を摂取した.

^c % TGI = [1 - (治療群の平均腫瘍 V) ÷ (対照群の平均腫瘍 V)] × 100; Fcgr2b^{-/-} マウスでは 18 日目、Fcer1g^{-/-} マウスでは 16 日目で計算した

^d 試験終了時に腫瘍体積測定値がゼロと記録された群中の動物数.

30

【 0 4 1 6 】

【表 11 - 7】

表 11-7 MCA205 同種同系マウスモデルにおける治療群および TGI パーセントおよび
完全レスポンド率

群 ^a	試験品/ 対照品	用量 ^b (mg/kg)	マウス 株	% TGI ^c	8 匹のマウスのうちの 完全レスポンド率 ^d
1	無し	NA	C57BL/6 Fcgr2b ^{-/-}	NA	0
2	アイソタイプ対照	7.5 mg/kg		NA	0
3	OX86 mIgG2a	7.5 mg/kg		95	8
4	無し	NA	C57BL/6 Fcer1g ^{-/-}	NA	0
5	アイソタイプ対照	7.5 mg/kg		NA	0
6	OX86 mIgG2a	7.5 mg/kg		35	1

TGI = 腫瘍成長阻害; NA = 該当なし; IP = 腹腔内; V = 体積

^a 1 群当たりの動物数: 8.

^b 動物はすべて 4 および 7 日目に 200 μL の試験品 IP を摂取した.

^c % TGI = $[1 - (\text{治療群の平均腫瘍 V}) \div (\text{対照群の平均腫瘍 V})] \times 100$

^d 試験終了時に腫瘍体積測定値がゼロと記録された群中の動物数.

10

20

【0417】

並行薬力学試験では、対照品と比較される OX86 mIgG2a による治療は、脾臓の Ki67 + CD4 + T 細胞 (図 39A) 並びに末梢血及び脾臓の Ki67 + CD8 + T 細胞のパーセントの有意な増加を引き起こしたが、CT26 腫瘍を有する Fcgr2b^{-/-} Balb/c マウスの腫瘍ではそうではなかった (図 40A)。対照品と比較して、OX86 mIgG2a による治療後、CT26 腫瘍を有する Fcer1g^{-/-} Balb/c マウスの血液、脾臓、又は腫瘍で、Ki67 + CD4 + 又は CD8 + T 細胞の増加は検出されなかった (図 39B、図 40B)。

30

【0418】

そのほかに、並行研究では、対照品と比較される OX86 mIgG2a による治療は、MCA205 腫瘍を有する Fcgr2b^{-/-} C57BL/6 マウスの流入領域リンパ節、脾臓、及び腫瘍の Ki67 + CD4 + T 細胞 (図 41A) 並びに流入領域リンパ節及び脾臓の Ki67 + CD8 + T 細胞 (図 42A) のパーセントの有意な増加を引き起こした。MCA205 腫瘍を有する Fcgr2b^{-/-} C57BL/6 マウスの腫瘍の Ki67 + CD8 + T 細胞のパーセントの増加は、統計的に有意でなかった (図 42A)。対照品と比較される OX86 mIgG2a による治療はまた、MCA205 腫瘍を有する Fcer1g^{-/-} C57BL/6 マウスの流入領域リンパ節及び脾臓の Ki67 + CD4 + T 細胞のパーセントの有意な増加を誘導した (図 41B)。これらのマウスの脾臓の Ki67 + CD8 + T 細胞のパーセントの有意な増加も観察された (図 42B)。MCA205 腫瘍を有する Fcgr2b^{-/-} C57BL/6 マウスの腫瘍の Ki67 + CD4 + T 細胞のパーセントの有意な増加検出されが (図 42B)、流入領域リンパ節又は腫瘍の Ki67 + CD8 + T 細胞は検出されなかった (図 42B)。

40

【0419】

11.3 結論

ナイーブマウスにおける単回用量の OX86 mIgG2a は、ICOS 及び Ki67 の発現の増加により測定したとき、それぞれ T 細胞活性化及び増殖の一過性の増加を誘導した。CD4 + 及び CD8 + T 細胞上の ICOS 及び Ki67 のパーセントの有意な直線相関が見いだされた。CT26 及び MCA205 の腫瘍の成長の阻害として測定される OX86 mIgG2a の抗腫瘍活性は、阻害 Fcγ レセプター IIB ではなく活性化 Fcγ レ

50

セプター I、III、及び IV の発現に依存した。活性化 Fcγ レセプターを発現する腫瘍を有するマウスにおける並行薬力学的実験では、末梢血、流入領域リンパ節、及び / 又は脾臓の T 細胞増殖の増加 (Ki67) が観測され、阻害 Fcγ レセプターのみを発現するマウスにおいて、いくつかの T 細胞増殖が観察された。理論により拘束されることを望むものではないが、ナイーブマウスからの薬力学的結果と合わせると、OX86mIgG2a 抗腫瘍活性の可能性のある機構は、末梢及び腫瘍内の T 細胞増殖 (Ki67) である。さらに、OX86mIgG2a の *in vivo* 抗腫瘍活性は Fcγ レセプターの活性化の発現時に生じる。

【0420】

実施例 12：ヒト造血幹細胞が移植された免疫無防備マウスにおける OX40mAb24 療法に反応する T 細胞薬力学的変化

この実施例では、再構成ヒト免疫系を有する免疫無防備マウスにおいて OX40mAb24 がヒト CD4 + 及び CD8 + 記憶 T 細胞を活性化し増大し得るか又はヒト Treg を低減し得るかを調べる。薬剤がヒト T 細胞に対して免疫調節作用を有するか決定するために、ヒト免疫細胞で再構成された *in vivo* マウスモデルシステムにおいて OX40mAb24 を試験した。

【0421】

12.1 材料及び方法

12.1.1 試験動物

Nod.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wj}/SzJ (NSG) マウス (n = 14、23 ~ 26 週齢) を Jackson Laboratory から入手した。動物は、MedImmune の Laboratory Animal Resources の施設、Association for Animal Accreditation of Laboratory Animal Care 及び United States Department of Agriculture の許可を得た施設で、Institutional Animal Care and Use Committee により認可されたプロトコルに従って、人道的に処置及び飼育された。動物は、無菌の寝具及び食品並びに不断給餌の酸性化飲料水を備えた無菌マイクロアイソレーターユニットに維持された。環境条件は標準化した (室温: 20 ± 1、相対湿度: 50 % ± 10 %、12 時間の明暗周期)。動物は、試験期間中、有害な臨床徴候に関して毎日モニターした。

【0422】

12.1.2 HSC 移植 (ヒト化) マウスにおける OX40mAb24 の薬力学

12.1.2.1 ヒト HSC 移植マウスの確立

ヒト CD34 + HSC 移植マウスを Jackson Laboratory から入手した。次のようにマウスを作製した。複数の臍帯血ドナー由来のブールヒト CD34 + 細胞を単離し、Nod.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wj}/SzJ (NSG) マウスのテール静脈に静脈内注射した。移植の 12 週間後、マウス末梢血をサンプリングし、Pharm Lyse 赤血球溶解緩衝液で溶解し、次いで、ヒト CD45、CD19、及び CD3 陽性細胞に関してフローサイトメトリーにより解析し、マウスにおけるヒト免疫細胞移植の程度を決定した。続いて、全生存可能血液細胞のうち 25 % 以上の CD45 + ヒト免疫細胞がうまく移植されたマウスを MedImmune に輸送した。

【0423】

12.1.2.2 ヒト HSC 移植マウスの抗原チャレンジ及び OX40mAb24 治療

ヒト CD34 細胞の注射の 22 週間後にフローサイトメトリーにより NSG マウスへのヒト免疫細胞の持続的移植を確認し、23 週間後に未治療状態又は治療された状態の 3 群のマウスに分けた (表 12-1)。実験開始の 22 週前に最終的治療群間のヒト CD45 + 細胞移植の平均パーセントに統計学的有意差はなかった。群 1 は 4 匹のマウスからなり、皮下 (SC) キーホールリンパットヘモシニアン (KLH) 免疫化も抗体投与も受けなかった。群 2 は 5 匹のマウスからなり、2 つの独立した注射 SC 部位で 300 µg / 50

10

20

30

40

50

μ L の K L H 及び 5 0 μ L の完全フロイントアジュバント (C F A) の投与を受けた。この群のマウスはまた、K L H 免疫化の 1 日後、腹腔内 (I P) に 2 m g / k g の h I g G 1 アイソタイプ対照抗体の投与を受けた。群 3 は 5 匹のマウスからなり、以上に記載の K L H / C F A S C 免疫化を受けた。そのほかに、マウスはまた、1 日後に単回 I P 用量の 2 m g / k g の O X 4 0 m A b 2 4 の投与を受けた。K L H / C F A S C 免疫化の当日、免疫化前 (治療前) 、及び 7 日後 (治療後) 、眼窩後方採血により全血を取得し、細胞の免疫表現型を調べ、フローサイトメトリーによりカウントした。

【 0 4 2 4 】

【表 1 2 - 1】

表 12-1 実験群, ヒト CD45+細胞移植, および治療

群	マウス番号	全生存ヒト+マウス CD45 細胞に対する パーセントとして ヒト CD45+細胞 ^a - HSC 移植後 22 週目	治療 ^b - HSC 移植後 23 週目
1	1-1 4575	39.5	無し
1	1-2 4576	68.3	無し
1	1-3 4577	20.9	無し
1	1-4 4578	23.8	無し
2	2-1 4579	29.6	KLH 免疫化 + NIP228 huIgG1
2	2-2 4580	21.7	KLH 免疫化 + NIP228 huIgG1
2	2-3 4581	27.8	KLH 免疫化 + NIP228 huIgG1
2	2-4 4582	50.3	KLH 免疫化 + NIP228 huIgG1
2	2-5 4583	32.5	KLH 免疫化 + NIP228 huIgG1
3	3-1 4584	15.4	KLH 免疫化 + OX40mAb24
3	3-2 4585	44.3	KLH 免疫化 + OX40mAb24
3	3-3 4586	20.3	KLH 免疫化 + OX40mAb24
3	3-4 4587	16.3	KLH 免疫化 + OX40mAb24
3	3-5 4588	25.6	KLH 免疫化 + OX40mAb24

Hu = ヒト; KLH = キーホールリンペットヘモシニアン; HSC = 造血幹細胞.

^aフローサイトメトリーにより決定されたヒト CD45+ 細胞; ^b KLH 免疫化, キーホールリンペットヘモシニアン+完全フロイントアジュバント.

【 0 4 2 5 】

1 2 . 1 . 2 . 3 フローサイトメトリーによる免疫細胞解析

全血抗体結合プロトコルを用いてフローサイトメトリーにより細胞の免疫表現型を調べた。簡潔に述べると、一定体積の E D T A 抗凝固処理全血をディープウェルプレートのウェルに添加し、T 細胞染色マスターミックスを細胞に添加して細胞表面抗原に結合させた。F A C S 緩衝液 (P B S 、 p H 7 . 2 + 2 % 熱不活性化新生仔ウシ血清) で洗浄した後、1 × R B C 溶解緩衝液を用いて赤血球 (R B C) を溶解し、E B i o s c i e n c e s F i x 及び P e r m k i t を用いて製造業者のプロトコルに従って細胞の固定及び透

過化を行った。続いて、抗F o x P 3 m A b及び抗K i 6 7 m A bを細胞に結合させた。1 × 固定及び透過化緩衝液を用いて細胞を洗浄し、F A C S緩衝液中に再懸濁させ、L S R I Iフローサイトメーターを用いてイベントを解析した。生のフローサイトメトリー標準(F C S)データはF l o w J oソフトウェアを用いて解析され、且つ細胞集団が、生存/死亡細胞の識別、及び二重線と細胞デブリの除去後に同定された。C D 4 + 及びC D 8 + T細胞集団をゲート処理した後、C D 4 5 R A及びC C R 7発現プロファイルにより記憶T細胞を決定した。ナイーブT細胞はC D 4 5 R A + / C C R 7 + として、エフェクターT細胞(T e f f)はC D 4 5 R A + / C C R 7 - として、エフェクター記憶T細胞(T e m)はC D 4 S R A - / C C R 7 - として、及び中枢記憶T細胞(T c m)はC D 4 5 R A - / C C R 7 + として定義した。T r e gはC D 4 + / F o x P 3 + 細胞として定義した。

10

【0426】

12.1.2.4 統計的方法

データのグラフ化及び統計解析のためにW i n d o w s用G r a p h P a d P r i s mソフトウェア(バージョン6.03)を使用した。

【0427】

チューキーの検定後解析を用いた一元配置A N O V A多重比較を用いて実験群平均間の差を比較した。有意F検定では、シダックの多重比較を利用した。0.05未満のp値は有意であるとみなした。

【0428】

20

12.1.3 材料

この試験で使用了材料及びそれらの供給元を表12-2に列挙する。

【0429】

【表 12 - 2】

表 12-2 材料

アイテム	供給元
抗ヒト CCR7 APC クローン 150503	R&D Systems, Minneapolis, MN
抗ヒト CD14 APC クローン M5E2	Biolegend, San Diego, CA
抗ヒト CD16 PE クローン 1243	Biolegend, San Diego, CA
抗ヒト CD25 FITC クローン M-A251	Biolegend, San Diego, CA
抗ヒト CD3 FITC クローン UCHT1	Biolegend, San Diego, CA
抗ヒト CD4 BV605 クローン RPA-T4	Becton Dickinson, San Jose, CA
抗ヒト CD56 FITC クローン HCD56	Biolegend, San Diego, CA
抗ヒト CD8 PE-CF594 クローン RPA-T8	Becton Dickinson, San Jose, CA
抗ヒト CD19 APC クローン HIB19	Biolegend, San Diego, CA
抗ヒト CD19 PE-CF594 クローン HIB19	Becton Dickinson, San Jose, CA
抗ヒト CD45 PE クローン HI30	Biolegend, San Diego, CA
抗ヒト CD45 PE クローン HI30	Biolegend, San Diego, CA
抗ヒト FoxP3 PE クローン PHC101	eBioscience, San Diego, CA
抗ヒト HLA-DR BV421 クローン 3G8	Biolegend, San Diego, CA
抗ヒト Ki67 FITC クローン B56	Becton Dickinson, San Jose, CA
抗マウス CD16/32 PE-Cy7	Biolegend, San Diego, CA
抗マウス CD45 PE-Cy7 クローン 30F11	Biolegend, San Diego, CA
完全フロイントアジュバント(CFA) Difco™	Becton Dickinson, San Jose, CA
EBiosciences 固定化および透明化キット	EBioscience, San Diego, CA
FlowJo ソフトウェア	FlowJo, Ashland, OR
FoxP3/転写因子固定化/透明化濃厚液 および希釈液	eBioscience, San Diego, CA
Graphpad Prism ソフトウェア, v 6.03	Graphpad Software, San Diego, CA
熱不活性化新生仔ウシ血清	Life Technologies, Frederick, MD
キーホールリンペットヘモシニアン	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
Live/Dead® Fixable Blue Dye	Life Technologies, Frederick, MD
LSR II フローサイトメーター	BD Biosciences, San Jose, CA
マウス IgG2a APC アイソタイプ対照	eBioscience, San Diego, CA
マウス IgG2b BV421 アイソタイプ対照	Biolegend, San Diego, CA
マウス IgG1 FITC アイソタイプ対照	Biolegend, San Diego, CA
リン酸緩衝生理食塩水(PBS), pH 7.2	Life Technologies, Frederick, MD
ラット IgG1 PE-CF594 アイソタイプ対照	Becton Dickinson, San Jose, CA
ラット IgG2a PE アイソタイプ対照	eBioscience, San Diego, CA
ラット IgG2a PE-Cy7 アイソタイプ対照	Biolegend, San Diego, CA

10

20

30

【0430】

12.2 結果

40

K L H による免疫化の1日後に O X 4 0 m A b 2 4 又は h u I g G 1 対照抗体を投与した。O X 4 0 m A b 2 4 は、h u I g G 1 アイソタイプ対照抗体が投与された群と比較して6日間後の末梢血中の T r e g のパーセントの統計的に有意な低減にもたらした (p = 0 . 0 1 9 、一元配置 A N O V A 、図 4 3 A 及び 4 3 B) 。治療群間の T r e g のパーセントの差は免疫化及び抗体投与の前に観察されなかった。

【0431】

末梢血 T r e g のパーセントの有意な減少のほかに、h u I g G 1 アイソタイプマッチ対照と比較して O X 4 0 m A b 2 4 による治療後に C D 4 + T e m : T r e g 比に統計的に有意な増加が見られ (p = 0 . 0 4 2) 、且つ全 C D 4 + : T r e g 比 (p = 0 . 0 5 1) 、 C D 4 + T e f f : T r e g 比 (p = 0 . 1 0) 、及び C D 4 + T e m : T r e g

50

比 ($p = 0.069$) が有意な増加傾向を示した (図 4 4 A ~ D) 。同様に、h u I g G 1 アイソタイプ対照で治療されたマウスと比較して、有意性への傾向は O X 4 0 m A b 2 4 で治療されたマウスの末梢血で C D 8 + T e f f : T r e g 比の有意な増加傾向 ($p = 0.064$) が観察された (図 4 5 A ~ B) 。

【 0 4 3 2 】

活性化後に C D 2 5 (I L - 2 レセプター) が T 細胞上でアップレギュレートされたことから、活性化されたばかりの T 細胞のマーカーであると考えられる。h u I g G 1 治療群と比較して O X 4 0 m A b 2 4 治療群で C D 2 5 陽性 C D 8 + T 細胞のパーセントの増加が、全 C D 8 + T 細胞 ($p = 0.038$) 、エフェクター C D 8 + T 細胞 ($p = 0.076$) 、及びエフェクターメモリー C D 8 + T 細胞 ($p = 0.040$) として観察され (図 4 6 A ~ C) 。従って、O X 4 0 m A b 2 4 による O X 4 0 のアゴニズムにより対照抗体と比較して活性化 C D 8 + T 細胞が活性化された。

【 0 4 3 3 】

1 2 . 3 結 論

ヒト免疫細胞が移植されたマウスでは、抗原免疫化後の O X 4 0 m A b 2 4 による治療は、ヒト I g G 1 対照抗体の投与を受けたマウスと比較して末梢 T r e g 細胞の減少をもたらした。同様に、T r e g 細胞に対する全エフェクター・記憶 C D 4 + T 細胞の比及びエフェクター C D 8 + T 細胞の比もまた、h u I g G 1 対照抗体の投与を受けたものと比較して、O X 4 0 m A b 2 4 の投与を受けたマウスの末梢血で増加した。最後に、細胞表面上に C D 2 5 を発現する C D 8 + T 細胞のパーセントが O X 4 0 m A b 2 4 治療後に増加したことから、末梢 C D 8 + T 細胞活性化の O X 4 0 誘発が示唆される。

【 0 4 3 4 】

配列表

配列番号	内容	配列
1	9B12 VL	DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSKLHSGVPSRFGSGSR
2	LCDR1	TDYSLTITDLQEDIATYFCQQGSALPWTFGQGTKVEIK
3	LCDR2	RASQDISNYLN
4	LCDR3	YTSKLHS
5	9B12 VH	QQGSALPWT
6	HFW1	EVQLQESGPSLVKPSQTLSTCSVTGDSFTSGYWNWIRKFPGNRLEYMGYISYNGITYHNPSLKSRI
7	HFW1 変異体	ITRDTSKNHYYLQLNSVTEDATYFCARYRYDYDGGHAMDYWGQGLTVTVSS
8	HFW2	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCAVYGGSF
9	HFW2-XXX	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCAVYGDSFS
10	HFW2 変異体	SGYWN
11	HFW2 変異体	WIRX ₃₉ HPGKGLX ₄₇ X ₄₈ G; ただし X ₃₉ は Q または K であり, X ₄₇ は W または Y であり, かつ X ₄₈ は I または M である
12	HFW2 変異体	WIRQHPGKGLEWIG
13	HFW2 変異体	WIRKHPGKGLEYMG
14	HFW2 変異体	WIRKHPGKGLEWIG
15	HFW2 変異体	WIRKHPGKGLEYIG
16	HCDR1	YISYNGITYHNPSLKS
17	HCDR2 変異体	YISYNAITYHNPSLKS
18	HCDR2 変異体	YISYSGITYHNPSLKS
19	HFW3-XXX	RITINX ₇₁ DTSKNQX ₇₈ SLQLNSVTPEDTAVYX ₉₁ CAR; ;, ただし X ₇₁ は P または R であり, X ₇₈ は F または Y であり, かつ X ₉₁ は Y または F である
20	HFW3 変異体	RITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAR
21	HFW3 変異体	RITINRDTSKNQYSLQLNSVTPEDTAVYFCAR
22	HFW3 変異体	RITINRDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAR
23	HFW3 変異体	RITINRDTSKNQYSLQLNSVTPEDTAVYFCAR
24	HFW3 変異体	RITINRDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAR
25	HFW3 変異体	RITINPDTSKNQYSLQLNSVTPEDTAVYFCAR
26	HFW3 変異体	RITINPDTSKNQYSLQLNSVTPEDTAVYYCAR
27	HCDR3	YRYDYDGGHAMDY
28	HCDR3 変異体	YKYDYDAGHAMDY
29	HCDR3 変異体	YKYDYDGGHAMDY
30	HFW4	WGQGLTVTVSS
31	OX40mAb VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSKLHSGVPSRFGSGSGS
32		GTDTLTITSSLPEDFATYYCQQGSALPWTFGQGTKVEIK

【 0 4 3 5 】

配列 番号	内容	配列
30	OX40mAb 軽鎖	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDISNYLNWYQKPKGKAPKLLIYYTSKLHSGVPSRFSGSGS GTDYTLTISSLPEDFATYYCQQGSALPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
31	OX40mAb 軽鎖 DNA	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCAT CACCTGTCGGGCCAGCCAGGACATCAGCAACTACCTGAAGTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAA GGCCCCAAGCTGCTGATCTACTACACGCAAGCTGCACAGCGGCTGCCCCAGAGATTACAG CGGCAGCGGCTCCGGCACCAGCTACACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCCAGGAGTTCCG CACCTACTACTGCCAGCAGGGCTCCGCCCTGCCCTGGACCTTTGGCCAGGGCACCAGGTGGA AATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTATCTTCCCGCATCTGATGAGCAGTTGAA TCTGGAAGTGCCTCTGTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGT GGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGC AAGGACAGCAGCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACA CAAAGTCTACGCTGCGAAGTCACCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAA CAGGGGAGAGTGT
32	OX40mAb VL-hu2	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDISNYLNWYQKPKGKAVKLLIYYTSKLHSGVPSRFSGSGS RTDYTLTISSLPEDFATYYCQQGSALPWTFGQGTKVEIK
33	OX40mAb5 VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCAVYGGSFSSGYWNWIRQHPGKLEWIGYISYNGITYHNPSLKSR TINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARYRYDYDGGHAMDYWGQGLTLTVSS
34	OX40mAb5 VH DNA	CAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCCTGGTCAAGCCCAGCCAGACCCTGAGCCTGAC CTGTGCCGTGTACGGCGGCAGCTTCAGCAGCGGCTACTGGAAGTGGATCCGGCAGCACCCCGG CAAGGGCCTGGAATGGATCGGCTACATCAGCTACAACGGCATCACCTACCACAACCCAGCCT GAAGTCCCGGATCACCATCAACCCGACACCAGCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAGCTGAACAG CGTGACCCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGGTACAGATACGACTACGACGGCGG CCACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTCAACCTGTCTCT
35	OX40mAb8 VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCAVYGGSFSSGYWNWIRKHPGKLEWIGYISYNGITYHNPSLKSR TINRDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARYRYDYDGGHAMDYWGQGLTLTVSS
36	OX40mAb8VH DNA	CAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCCTGGTCAAGCCCAGCCAGACCCTGAGCCTGAC CTGTGCCGTGTACGGCGGCAGCTTCAGCAGCGGCTACTGGAAGTGGATCCGGAAGCACCCCGG CAAGGGCCTGGAATGGATCGGCTACATCAGCTACAACGGCATCACCTACCACAACCCAGCCT GAAGTCCCGGATCACCATCAACCGGGACACCAGCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAGCTGAACAG CGTGACCCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGGTACAGATACGACTACGACGGCGG CCACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTCAACCTGTCTCT
37	OX40mAb13 VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCAVYGDSFSSGYWNWIRKHPGKLEWIMGYISYNGITYHNPSLKSR ITINRDTSKNQYSLQLNSVTPEDTAVYFCARYRYDYDGGHAMDYWGQGLTLTVSS
38	OX40mAb13 VH DNA	CAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCCTGGTCAAGCCCAGCCAGACCCTGAGCCTGAC CTGTGCCGTGTACGGCGACAGCTTCAGCAGCGGCTACTGGAAGTGGATCCGGAAGCACCCCGG CAAGGGCCTGGAATACATGGGTACATCAGCTACAACGGCATCACCTACCACAACCCAGCCT GAAGTCCCGGATCACCATCAACCGGGACACCAGCAAGAACCAGTACTCCCTGCAGCTGAACAG CGTGACCCCGAGGACACCGCCGTGTACTTCTGCGCCCGGTACAGATACGACTACGACGGCGG CCACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTCAACCTGTCTCT
39	OX40mAb14 VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCAVYGDSFSSGYWNWIRKHPGKLEWIGYISYNGITYHNPSLKSR TINRDTSKNQYSLQLNSVTPEDTAVYFCARYRYDYDGGHAMDYWGQGLTLTVSS
40	OX40mAb14 VH DNA	CAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCCTGGTCAAGCCCAGCCAGACCCTGAGCCTGAC CTGTGCCGTGTACGGCGACAGCTTCAGCAGCGGCTACTGGAAGTGGATCCGGAAGCACCCCGG CAAGGGCCTGGAATACATGGGTACATCAGCTACAACGGCATCACCTACCACAACCCAGCCT GAAGTCCCGGATCACCATCAACCGGGACACCAGCAAGAACCAGTACTCCCTGCAGCTGAACAG CGTGACCCCGAGGACACCGCCGTGTACTTCTGCGCCCGGTACAGATACGACTACGACGGCGG CCACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTCAACCTGTCTCT

10

20

30

配列 番号	内容	配列
41	OX40mAb15 VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCAVYGDSFSSGYWNWIRKHPGKGLYIGYISYNGITYHNPSLKSRI TINRDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYFCARYRYDYDGGHAMDYWGQGLTVTVSS
42	OX40mAb15 VH DNA	CAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCTGGTCAAGCCCAGCCAGACCTGAGCCTGAC CTGTGCCGTGTACGGCGACAGCTTCAGCAGCGGCTACTGGAACGGATCCGGAAGCACCCCGG CAAGGGCCTGGAATACATCGGTACATCAGCTACAACGGCATCACCTACCACAACCCAGCCT GAAGTCCCGGATCACCATCAACCGGGACACCAGCAAGAACCAGTTCTCCCTGCAGCTGAACAG CGTGACCCCCGAGGACACCGCCGTGTACTTCTGCGCCCGGTACAGATACGACTACGACGGCGG CCACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCTCT
43	OX40mAb16 VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCAVYGDSFSSGYWNWIRKHPGKGLYIGYISYNGITYHNPSLKSRI TINRDTSKNQYSLQLNSVTPEDTAVYYCARYRYDYDGGHAMDYWGQGLTVTVSS
44	OX40mAb16 VH DNA	CAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCTGGTCAAGCCCAGCCAGACCTGAGCCTGAC CTGTGCCGTGTACGGCGACAGCTTCAGCAGCGGCTACTGGAACGGATCCGGAAGCACCCCGG CAAGGGCCTGGAATACATCGGTACATCAGCTACAACGGCATCACCTACCACAACCCAGCCT GAAGTCCCGGATCACCATCAACCGGGACACCAGCAAGAACCAGTACTCCCTGCAGCTGAACAG CGTGACCCCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGGTACAGATACGACTACGACGGCGG CCACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCTCT
45	OX40mAb17 VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCAVYGDSFSSGYWNWIRKHPGKGLYIGYISYNGITYHNPSLKSRI TINRDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARYRYDYDGGHAMDYWGQGLTVTVSS
46	OX40mAb VH17 DNA	CAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCTGGTCAAGCCCAGCCAGACCTGAGCCTGAC CTGTGCCGTGTACGGCGACAGCTTCAGCAGCGGCTACTGGAACGGATCCGGAAGCACCCCGG CAAGGGCCTGGAATACATCGGTACATCAGCTACAACGGCATCACCTACCACAACCCAGCCT GAAGTCCCGGATCACCATCAACCGGGACACCAGCAAGAACCAGTACTCCCTGCAGCTGAACAG CGTGACCCCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGGTACAGATACGACTACGACGGCGG CCACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCTCT
47	OX40mAb18 VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCAVYGGFSFSSGYWNWIRKHPGKGLYIGYISYNGITYHNPSLKSRI TINPDTSKNQYSLQLNSVTPEDTAVYFCARYRYDYDGGHAMDYWGQGLTVTVSS
48	OX40mAb18 VH DNA	CAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCTGGTCAAGCCCAGCCAGACCTGAGCCTGAC CTGTGCCGTGTACGGCGGACAGCTTCAGCAGCGGCTACTGGAACGGATCCGGAAGCACCCCGG CAAGGGCCTGGAATACATCGGTACATCAGCTACAACGGCATCACCTACCACAACCCAGCCT GAAGTCCCGGATCACCATCAACCCCGACACCAGCAAGAACCAGTACTCCCTGCAGCTGAACAG CGTGACCCCCGAGGACACCGCCGTGTACTTCTGCGCCCGGTACAGATACGACTACGACGGCGG CCACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCTCT
49	OX40mAb19 VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCAVYGGFSFSSGYWNWIRKHPGKGLYIGYISYNGITYHNPSLKSRI TINRDTSKNQYSLQLNSVTPEDTAVYFCARYRYDYDGGHAMDYWGQGLTVTVSS
50	OX40mAb19 VH DNA	CAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCTGGTCAAGCCCAGCCAGACCTGAGCCTGAC CTGTGCCGTGTACGGCGGACAGCTTCAGCAGCGGCTACTGGAACGGATCCGGAAGCACCCCGG CAAGGGCCTGGAATACATCGGTACATCAGCTACAACGGCATCACCTACCACAACCCAGCCT GAAGTCCCGGATCACCATCAACCGGGACACCAGCAAGAACCAGTACTCCCTGCAGCTGAACAG CGTGACCCCCGAGGACACCGCCGTGTACTTCTGCGCCCGGTACAGATACGACTACGACGGCGG CCACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCTCT
51	OX40mAb20 VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCAVYGGFSFSSGYWNWIRKHPGKGLYIGYISYNGITYHNPSLKSRI TINRDTSKNQYSLQLNSVTPEDTAVYYCARYRYDYDGGHAMDYWGQGLTVTVSS
52	OX40mAb20 VH DNA	CAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCTGGTCAAGCCCAGCCAGACCTGAGCCTGAC CTGTGCCGTGTACGGCGGACAGCTTCAGCAGCGGCTACTGGAACGGATCCGGAAGCACCCCGG CAAGGGCCTGGAATACATCGGTACATCAGCTACAACGGCATCACCTACCACAACCCAGCCT GAAGTCCCGGATCACCATCAACCGGGACACCAGCAAGAACCAGTACTCCCTGCAGCTGAACAG CGTGACCCCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGGTACAGATACGACTACGACGGCGG CCACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCTCT

10

20

30

配列 番号	内容	配列
53	OX40mAb21 VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTLCVAVYGGSFSSGYWNWIRKHPGKGLYIGYISYNGITYHNPSLKSRI TINPDTSKNQYSLQLNSVTPEDTAVYYCARYRYDYDGGHAMDYWGQGLTLTVSS
54	OX40mAb21 VH DNA	CAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCTGGTCAAGCCCAGCCAGACCCTGAGCCTGAC CTGTGCCGTGTACGGCGGCAGCTTCAGCAGCGGCTACTGGAAGTGGATCCGGAAGCACCCCGG CAAGGGCCTGGAATACATCGGTACATCAGCTACAACGGCATCACCTACCACAACCCAGCCT GAAGTCCCGGATCACCATCAACCCCGACACCAGCAAGAACCAGTACTCCCTGCAGCTGAACAG CGTGACCCCCGAGGACACCGCGGTGTACTACTGCGCCCGGTACAGATACGACTACGACGGCGG CCACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCTCT
55	OX40mAb22 VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTLCVAVYGGSFSSGYWNWIRKHPGKGLYIGYISYNAITYHNPSLKSRI TINRDTSKNQYSLQLNSVTPEDTAVYYCARYKYDYDAGHAMDYWGQGLTLTVSS
56	OX40mAb22 VH DNA	CAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCTGGTCAAGCCCAGCCAGACCCTGAGCCTGAC CTGTGCCGTGTACGGCGGCAGCTTCAGCAGCGGCTACTGGAAGTGGATCCGGAAGCACCCCGG CAAGGGCCTGGAATACATCGGTACATCAGCTACAACGCCATCACCTACCACAACCCAGCCT GAAGTCCCGGATCACCATCAACCGGGACACCAGCAAGAACCAGTACTCCCTGCAGCTGAACAG CGTGACCCCCGAGGACACCGCGGTGTACTACTGCGCCCGGTACAAATACGACTACGACGGCGG CCACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCTCT
57	OX40mAb23 VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTLCVAVYGGSFSSGYWNWIRKHPGKGLYIGYISYNAITYHNPSLKSRI TINRDTSKNQYSLQLNSVTPEDTAVYYCARYRYDYDGGHAMDYWGQGLTLTVSS
58	OX40mAb23 VH DNA	CAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCTGGTCAAGCCCAGCCAGACCCTGAGCCTGAC CTGTGCCGTGTACGGCGGCAGCTTCAGCAGCGGCTACTGGAAGTGGATCCGGAAGCACCCCGG CAAGGGCCTGGAATACATCGGTACATCAGCTACAACGCCATCACCTACCACAACCCAGCCT GAAGTCCCGGATCACCATCAACCGGGACACCAGCAAGAACCAGTACTCCCTGCAGCTGAACAG CGTGACCCCCGAGGACACCGCGGTGTACTACTGCGCCCGGTACAGATACGACTACGACGGCGG CCACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCTCT
59	OX40mAb24 VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTLCVAVYGGSFSSGYWNWIRKHPGKGLYIGYISYNGITYHNPSLKSRI TINRDTSKNQYSLQLNSVTPEDTAVYYCARYKYDYDGGHAMDYWGQGLTLTVSS
60	OX40mAb24 VH DNA	CAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCTGGTCAAGCCCAGCCAGACCCTGAGCCTGAC CTGTGCCGTGTACGGCGGCAGCTTCAGCAGCGGCTACTGGAAGTGGATCCGGAAGCACCCCGG CAAGGGCCTGGAATACATCGGTACATCAGCTACAACGGCATCACCTACCACAACCCAGCCT GAAGTCCCGGATCACCATCAACCGGGACACCAGCAAGAACCAGTACTCCCTGCAGCTGAACAG CGTGACCCCCGAGGACACCGCGGTGTACTACTGCGCCCGGTACAAATACGACTACGACGGCGG CCACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCTCT
61	OX40mAb25 VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTLCVAVYGGSFSSGYWNWIRKHPGKGLYIGYISYSGITYHNPSLKSRI INRDTSKNQYSLQLNSVTPEDTAVYYCARYRYDYDGGHAMDYWGQGLTLTVSS
62	OX40mAb25 VH DNA	CAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCTGGTCAAGCCCAGCCAGACCCTGAGCCTGAC CTGTGCCGTGTACGGCGGCAGCTTCAGCAGCGGCTACTGGAAGTGGATCCGGAAGCACCCCGG CAAGGGCCTGGAATACATCGGTACATCAGCTACAGCGGCATCACCTACCACAACCCAGCCT GAAGTCCCGGATCACCATCAACCGGGACACCAGCAAGAACCAGTACTCCCTGCAGCTGAACAG CGTGACCCCCGAGGACACCGCGGTGTACTACTGCGCCCGGTACAGATACGACTACGACGGCGG CCACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCTCT
63	OX40mAb25a VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTLCVAVYGGSFSSGYWNWIRKHPGKGLYIGYISYSGITYHNPSLKSRI INRDTSKNQYSLQLNSVTPEDTAVYYCARYKYDYDGGHAMDYWGQGLTLTVSS
64	OX40mAb25a VH DNA	CAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCTGGTCAAGCCCAGCCAGACCCTGAGCCTGAC CTGTGCCGTGTACGGCGGCAGCTTCAGCAGCGGCTACTGGAAGTGGATCCGGAAGCACCCCGG CAAGGGCCTGGAATACATCGGTACATCAGCTACAGCGGCATCACCTACCACAACCCAGCCT GAAGTCCCGGATCACCATCAACCGGGACACCAGCAAGAACCAGTACTCCCTGCAGCTGAACAG CGTGACCCCCGAGGACACCGCGGTGTACTACTGCGCCCGGTACAAATACGACTACGACGGCGG CCACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCTCT

10

20

30

配列番号	内容	配列
65	OX40mAb26 VH	EVQLQESGPSLVKPSQTLSTCAVYGGSFSSGYWNWIRKHPGNRLEYMGYISYNAITYHNPSLKSRISITRDTSKNHYLLQLNSVTTEDTATYFCARYRYDYDGGHAMDYWGQGLTVTVSS
66	OX40mAb26 VH DNA	GAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCTAAGCCAGCCAGACCTGAGCCTGACCTGTCAGCGTGACCGGCGACAGCTTACAGCGGGTACTGGAACCTGGATCCGGAAGTTCCCGGCAACCGGCTCGAGTACATGGGTACATCAGCTACAACGCCATCACCTACCACAACCCAGCCTGAAGTCCCGGATCAGCATACCCGGGACACCAGCAAGAACCCTACTACTGTCAGCTGAACAGCGTGACCACCGAGGACACCGCCACCTACTTTTGGCGCCGGTACAGATACGACTACGACGGCGGCCACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCTCT
67	OX40mAb27 VH	QVQLQESGPGVLVKPSQTLSTCAVYGGSFSSGYWNWIRKHPGKLEYIGYISYNAITYHNPSLKSRITINRDTSKNQYSLQLNSVTPEDTAVYYCARYKYDYDGGHAMDYWGQGLTVTVSS
68	OX40mAb27 VH DNA	CAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCTGGTCAAGCCAGCCAGACCTGAGCCTGACCTGTGCGGTGTACGGCGGCAGCTTACAGCAGCGGCTACTGGAACCTGGATCCGGAAGCACCCCGGCAAGGGCTGGAATACATCGGCTACATCAGCTACAACGCCATCACCTACCACAACCCAGCCTGAAGTCCCGGATCACCATCAACCGGGACACCAGCAAGAACCAGTACTCCTGTCAGCTGAACAGCGTGACCCCGAGGACACCGCGTGTACTACTGCGCCCGGTACAAATACGACTACGACGGCGGCCACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACCGTGTCTCT
69	ヒト IgG1 CH 鎖	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
70	ヒト IgG1 CH 鎖 DNA	GCgTCgACCAAGGGCCATCgTCTTCCCCCTGGCACCTCTCTCAAGAGCACCTCTGGGGGCAAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCAGGTGACGGTGTCTGGAAGCTCAGGCGCTGACAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGATACACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAAATCTTGTGACAAAATCACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAAGTCTCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCAAAACCCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGAGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTGCAATAATGCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTACAGCGTCTCACCGTCTCTGACCAGGACTGGTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTCTACACCTGCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACTACAAAGACACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCttaagCCTGTCTCCGGGTAAA
71	OX40mAb24 重鎖	QVQLQESGPGVLVKPSQTLSTCAVYGGSFSSGYWNWIRKHPGKLEYIGYISYNGITYHNPSLKSRITINRDTSKNQYSLQLNSVTPEDTAVYYCARYKYDYDGGHAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

20

配列番号	内容	配列
72	OX40mAb24 重鎖 DNA	CAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCTGGTCAAGCCCAGCCAGACCTGAGCCTGAC CTGTGCCGTGTACGGCGGCAGCTTCAGCAGCGGCTACTGGAAGTGGATCCGGAAGCACCCCGG CAAGGGCCTGGAATACATCGGCTACATCAGCTACAACGGCATCACCTACCACAACCCAGCCT GAAGTCCCGGATCACCATCAACCGGGACACCAGCAAGAACCAGTACTCCCTGCAGCTGAACAG CGTGACCCCGGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGGTACAAATACGACTACGACGGCGG CCACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTACCGTGTCTCTGCGTCgACCAAGGGC CCATCgGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCTCCAAGAGCACCTTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCT GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGCGCCTGACCAG CGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTG ACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGC AACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAATCACAATGCCACCCG TGCCAGCACCTGAAGTCTTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACA CCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGAGCTGAGCCACGAAGACC CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCG GGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCGTCTCACCCTGCTGCACAGGACT GGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGA AAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTCTACACCTGCCCCATCCC GGGAGGAGATGACCAGAACCAGGTACGCTGACCTGCTGGTCAAAAGGCTTCTATCCAGCG ACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCC GTGCTGGACTCCGACGGCTCTCTTCTCTATAGCAAGTCAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGC AGCAGGGGAACGTCTTCTATGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGA AGAGCtaagCCTGTCTCCGGGTAAA
73	OX40mAb28 重鎖	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTLCAVYGGSFSSGYWNWIRKHPGKGLYIGYISYNGITYHNPSLKSRI TINRDTSKNQYSLQLNSVTPEDTAVYYCARYKYDYDGGHAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPL APCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGT KTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYPPCPPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHLEALHNHYTQKSLSLSLGK
74	OX40mAb28 重鎖 DNA	CAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCTGGTCAAGCCCAGCCAGACCTGAGCCTGACC TGTGCCGTGTACGGCGGCAGCTTCAGCAGCGGCTACTGGAAGTGGATCCGGAAGCACCCCGG AAGGGCCTGGAATACATCGGCTACATCAGCTACAACGGCATCACCTACCACAACCCAGCCTG AAGTCCCGGATCACCATCAACCGGGACACCAGCAAGAACCAGTACTCCCTGCAGCTGAACAGC GTGACCCCGGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGGTACAAATACGACTACGACGGCGGC CACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTACCGTGTCTCTGCGTCGACCAAGGGC CCCAGCGTGTCCCCCTGGCCCCCTTGAGCAGAGAAGCACAGCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGC TGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTTGAACAGCGCGCTCTGACCA GCGGCGTGATACCTTCCCCGCGGTGCTCCAGAGCAGCGGACTGTACTCCCTGAGCAGCGTGGT GACCGTGCTTCCAGCAGCCTGGGCACCAAGACCTACACCTGCAACGTGGACCAAGCCAG CAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCTTGCCCTGC CCCCAGTTCTTGGGCGGACCTAGCGTGTCTCTGTTCCCCCAAGCCCAAGGACACCCCTGATG ATCAGCAGAACCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCAGGAGGACCCCGAGGTG CAGTTTAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCATAACGCCAAGACCAAGCCAGAGAGGAG CAGTTCAACAGCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGACCAAGGACTGGCTGAAC GGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGGCCTGCCTAGCAGCATCGAGAAGACCATC AGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCAAGGTCTACACCTGCCACCTAGCCAAAGAGGA GATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAAGGCTTCTATCCAGCGATATCGCC GTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGAC AGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACTCCAGACTGACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAGGAGGGC AACGTCTTCAGCTGCTCCGTGATGCACAGGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGA GCCTGAGCCTGGGCAAG

10

20

30

配列 番号	内容	配列
75	OX40mAb29 重鎖	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCAVYGGSFSSGYWNWIRKHPGKGLEYIGYISYNGITYHNPSLKSRI TINRDTSKNQYSLQLNSVTPEDTAVYYCARYKYDYDGGHAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNATKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPASIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
76	OX40mAb29 重鎖 DNA	CAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCCTGGTCAAGCCCAGCCAGACCTGAGCCTGACC TGTGCCGTGTACGGCGGCAGCTTCAGCAGCGGCTACTGGAAGTGGATCCGGAAGCACCCCGGC AAGGGCCTGGAATACATCGGCTACATCAGCTACAACGGCATCACCTACCACAACCCAGCCTG AAGTCCCGGATCACCATCAACCGGGACACCAGCAAGAACCAGTACTCCCTGCAGCTGAACAGC GTGACCCCGGAGGACACCGCGGTGTACTACTGCGCCCGGTACAAATACGACTACGACGGCGGC CACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTCAACCGTGTCTCTGCGTCGACCAAGGGC CCATCCGTCTTCCCCCTGGCACCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCT GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTAGGCCGCTGACCCAG CGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTG ACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAAGCCAGC AACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAATCTTGTGACAAAACCTACACATgcCCacCCT GCCCAGCACCTGAATTGAGGGGGGAcCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCaaGgACACC CTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCT GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGG GAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCTCTCACCCTGTCACCAAGGACTGG CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCTCCATCGAGAAA ACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTcTACACCCTGCCCCCATCCCGG GAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGAC ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACAAAGACCACGCCTCCCGT GCTGGACTCCGACGGCTCTTCTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG CAGGGGAACGTCTTCTATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGAGAAG AGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAG
77	OX40mAb31 重鎖	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCAVYGGSFSSGYWNWIRKHPGKGLEYIGYISYNAITYHNPSLKSRI TINRDTSKNQYSLQLNSVTPEDTAVYYCARYKYDYDGGHAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPL APCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGT KTYTCNVNHHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCV VDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNATKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

10

20

【 0 4 4 1 】

配列番号	内容	配列
78	OX40mAb31 重鎖 DNA	CAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCTGGTCAAGCCCAGCCAGACCTGAGCCTGACC TGTGCCGTGTACGGCGGCAGCTTACAGCAGCGGCTACTGGAAGTGGATCCGGAAGACCCCCGGC AAGGGCCTGGAATACATCGGCTACATCAGCTACAACGCCATCACCTACCACAACCCAGCCTG AAGTCCCGGATCACCATCAACCGGGACACCAGCAAGAACCAGTACTCCCTGCAGCTGAACAGC GTGACCCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGGTACAATACGACTACGACGGCGGC CACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTACCGTGTCTCTGCGTCGACCAAGGGC CCCAGCGTGTCCCCCTGGCCCTTGCAGCAGAAGCACACGCGAGAGCACAGCCCGCTGGGC TGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTTGAACAGCGGCGCTCTGACCA GCGGCGTGCATACCTTCCCCGCGGTGTCTCAGAGCAGCGGACTGTACTCCCTGAGCAGCGTGGT GACCGTGCCTTCCAGCAGCTGGGCACCAAGACCTACACCTGCAACGTGGACCAAGGCCAG CAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCTTGCCTTGC CCCCGAGTTCCTGGGCGGACCTAGCGTGTCTCTGTCTCCCCCAAGCCCAAGGACACCTGATG ATCAGCAGAACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCAGGAGGACCCCGAGGTG CAGTTAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAAGTGCATAACGCCCAAGACCAAGCCAGAGAGGAG CAGTTCAACAGCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACCAGGACTGGTGAAC GGCAAGGAATACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGGCTGCCTAGCAGCATCGAGAAGACCATC AGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTCTACACCTGCCACCTAGCCAAGAGGA GATGACCAAGAACCAGGTGTCTCTGACCTGTCTGGTGAAAGGCTTCTATCCAGCGATATCGCC GTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCTGTGCTGGAC AGCGACGCGAGCTTCTCTCTGTACTCCAGACTGACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAGGAGGGC AACGTCTTACGTGTCTCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCAGAAGTCCCTGA GCCTGAGCCTGGGCAAG
79	OX40mAb32 重鎖	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCAVYGGSFSSGYWNWIRKHPGKGLYIGYISYNAITYHNPSLKSRI TINRDTSKNQYSLQLNSVTPEDTAVYYCARYKYDYDGGHAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPTVTSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPASIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK
80	OX40mAb32 重鎖 DNA	CAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGGCCCTGGCTGGTCAAGCCCAGCCAGACCTGAGCCTGACC TGTGCCGTGTACGGCGGCAGCTTACAGCAGCGGCTACTGGAAGTGGATCCGGAAGACCCCCGGC AAGGGCCTGGAATACATCGGCTACATCAGCTACAACGCCATCACCTACCACAACCCAGCCTG AAGTCCCGGATCACCATCAACCGGGACACCAGCAAGAACCAGTACTCCCTGCAGCTGAACAGC GTGACCCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCCGGTACAATACGACTACGACGGCGGC CACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTACCGTGTCTCTGCTGCGTACCAAGGGC CCATCCGTCTTCCCCCTGGCACCTCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGCT GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGCGGCTGACAG CGGCGTGCACACCTTCCCCGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTG ACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAAGCCAGC AACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAACTCTGTGACAAAACCTCACACATgCacCGT GCCCAGCACCTGAATTCGAGGGGGGAcCGTACGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCaaGgACACC CTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCT GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGG GAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTACGCTCTCACCCTCTGCACCAGGACTGG CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCTCCATCGAGAAA ACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTtACACCCTGCCCCCATCCCGG GAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGAC ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCCGT GCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAG CAGGGGAACGTCTTCTATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAAGAG AGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
81	OX40mAb37 重鎖	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCAVYGGSFSSGYWNWIRKHPGKGLYIGYISYNGITYHNPSLKSRI TINRDTSKNQYSLQLNSVTPEDTAVYYCARYKYDYDGGHAMDYWGQGLTVTVSSAKTTPPSVYPL APGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPTVTVWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSE TVTCNVAPASSTKVVDKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVTCTVVVDISKD DPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTI SKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPMIDTDG SYFVYSKLVNPKSNWEAGNFTTCSVLHEGLHNHTEKSLSHSPGK

10

20

30

配列番号	内容	配列
82	OX40mAb37 重鎖 DNA	CAGGTGCAGCTGCAGGAAAGCGCCCTGGCTGAGTCAAGGCCAGCCAGACCTGAGCCTGACC TGTGCCGTGTACGGCGGAGCTTACAGAGCGGCTACTGGAAGTGGATCCGGAAGCACCCCGGC AAGGGCCTGGAATACATCGGCTACATCAGCTACACGGCATCACCTACCAACCCAGCCTG AAGTCCCGGATCACCATCAACCGGGACACCAGCAAGAACCAGTACTCCCTGCAGTGAACAGC GTGACCCCGAGGACACCGCGTGTACTACTGCGCCCGGTACAAATACGACTACGACGGCGGC CACGCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTCAACCGTGTCTCTGCG ^{Gaa} GACGACACCCC CATCTGTCTATCCACTGGCCCCCTGGATCTGCTGCCAAACTAACTCCATGGTGACCCCTGGGATG CCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTGGATCCCTGTCCAGC GGTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTGCAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTACTG TCCCCTCAGCACCTGGCCAGCGAGACCGTCACTGCAACGTTGCCACCCGGCCAGCAGCA CCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCAGGGATTGTGGTTGTAAAGCCTGTCATATGTAC ₂ GTCCC AGAAGTATCATCTGTCTTCATCTTCCCCCAAAGCCCAAGGATGTGCTACCACTTACTCTGACT CCTAAGGTCACGTGTGTGTGGTAGACATCAGCAAGGATGATCCCAGGTCCAGTTCAGTGGT TTGTAGATGATGTGGAGGTGCACACAGCTCAGACGCAACCCCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCA CTTCCGCTCAGTCAGTGAACCTCCCATCATGCACAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGTTCAA ATGCAGGGTCAACAGTGCAGCTTTCCCTGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGG CAGACCGAAGGCTCCACAGGTGT ₁ ACCATTCCACCTCCCAAGGAGCAGATGGCCAAGGATAA AGTCAGTCTGACCTGCATGATAACAGACTTCTTCCCTGAAGACATTACTGTGGAGTGGCAGTGG AATGGGCAGCCAGCGGAGAACTACAAGAACACTCAGCCCATCATGGACACAGATGGCTCTTAC TTCGTCTACAGCAAGCTCAATGTGCAAGAGCAACTGGGAGGCAGGAAATACTTTCACCTGC TCTGTGTTACATGAGGGCTGCACAACCACCTACTGAGAAGAGCCTCTCCCACTCTCTGGTA AA
83	OX40mAb37 軽鎖	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDISNYLNWYQKPKGKAPKLLIYYTSKLHSGVPSRFSGSGS GTDYLTITSSLPEDFATYYCQQGSALPWTFGQGTKVEIKRADAAPTYSIFPPSSEQLTSGGASVVC LNNFYPKDINVWKIDGSEKQNGVLNSWTDQSDKSTYSMSSTLTLT ₁ KDEYERHNSYTCEATHKT STSPIVKSFNNEC
84	OX40mAb37 軽鎖 DNA	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATC ACCTGTCGGGCGCAGCCAGGACATCAGCAACTACCTGAAGTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAG GCCCCAAGCTGCTGATCTACTACACAGCAAGCTGCACAGCGCGGTGCCAGCAGATTACAGC GGCAGCGGCTCCGGCACCGACTACACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCGCC ACCTACTACTGCCAGCAGGGCTCCGCCCTGCCCTGGACCTTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAA ATCAAGCGGGCTGATGCGGCGCCAAGTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAAACAT CTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACCTTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTG GAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCTTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAA AGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCTCACGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAA CAGCTATACCTGTGAGGCCACTACAAGACATCAACTTACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGG AATGAGTGT
85	OX86 VH	QVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLTGYNLHWVRQPPGKGLEWMGRMRYDGDYYNSVLK SRLSISRDTSKNQVFLKMNSLQTD ₁ TAIYYCTRDGRGDSFDYWGQGMVTVSS
86	OX86 重鎖	QVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLTGYNLHWVRQPPGKGLEWMGRMRYDGDYYNSVLK SRLSISRDTSKNQVFLKMNSLQTD ₁ TAIYYCTRDGRGDSFDYWGQGMVTVSSASTPPSVYPLAP GSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSET VTCNV ₁ AHPASSTKVDKIVPRDCGKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITITLTPKVTCTVVDISKDD PEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAFAFP ₁ IEKTIS KTKGRPKAPQVY ₁ TIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQ ₁ PIMDTDGS YFVYSKLN ₁ VQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHT ₁ TEKSLSHSPGK

10

20

30

配列 番号	内容	配列
87	OX86 重鎖 DNA	CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGTCTGGTGCAGCCCTCAGAGACCTGTCCCTACCT GCACTGTCTCTGGGTTCTCTACTAACCGGTTACAATTTACTGTTGCGCCAGCCTCCAGGAAA GGGTCTGGAGTGGATGGGAAGAATGAGGTATGATGGAGACACATATTATAATTACAGTTCTCAA ATCCCGACTGAGCATCAGCAGGGACACCTCCAAGAACCAAGTTTCTTGAAAATGAACAGTCT GCAAACGGATGACACAGCCATTACTATTGTACCAGAGACGGGCGTGGTGACTCCTTTGATTAC TGGGGCCAAGGAGTCATGGTCACAGTCTCCTCCGCTCGACGACACCCCATCTGTCTATCCAC TGGCCCTGGATCTGCTGCCAACTAATCCATGGTGACCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTA TTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTC CCAGCTGTCTGCAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTACTGTCCCTCCAGCACCT GGCCAGCGAGACCGTCACTGCAACGTTGCCACCCGGCCAGCAGCACCAGGTGGACAAGA AAATTGTGCCAGGATTGTGGTTGTAAGCCTTGCATATGTACCGTCCCAAGATATCATCTGT CTTCATCTTCCCCCAAGGCCAAGGATGTGCTACCATTAATCTGACTCCTAAGGTACAGTGT GTTGTGGTAGACATCAGCAAGGATGATCCCGAGGTCCAGTTCAGCTGGTTTGTAGATGATGTGG AGGTGCACACAGCTCAGACGCAACCCCGGAGGAGCAGTTCAACAGCACTTTCCGCTCAGTCA GTGAACCTCCCATCATGCAACAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGTTCAATGCAGGGTCAACA GTGCAGCTTTCCTGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAGGCAGACCGAAGGCTC CACAGGTGTATACCATTCACCTCCCAAGGAGCAGATGGCCAAAGGATAAAGTCAGTCTGACCT GCATGATAACAGACTTCTTCCCTGAAGACATTACTGTGGAGTGGCAGTGGAAATGGGCAGCCAG CGGAGAACTACAAGAACTCAGCCCATCATGGACACAGATGGCTCTTACTTCGTCTACAGCA AGCTCAATGTGCAAGAGCAACTGGGAGGCAGGAAATCTTTACCTGTCTGTGTACATG AGGGCCTGCACAACCACCATACTGAGAAGAGCCTCTCCACTCTCTGGTAA
88	OX86 VL	DIVMTQGALPNVPVSGESASITCRSSQSLVYKDGQTYLWFLQRPQSPQLLTYWMSTRASGVSDR FSGSGSGTYFTLKISRVR AEDAGVYYCQOVREYPFTFGSGTKLEIK
89	OX86 軽鎖	DIVMTQGALPNVPVSGESASITCRSSQSLVYKDGQTYLWFLQRPQSPQLLTYWMSTRASGVSDR FSGSGSGTYFTLKISRVR AEDAGVYYCQOVREYPFTFGSGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSEQLTSGG ASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDSITYSMSSTLTLDKDEYERHNSYTC EATHKTSTSPIVKSFNRNEC
90	OX86 軽鎖 DNA	GATATTGTGATGACCCAGGGTGCACCTCCCAATCCTGTCCCTTCTGGAGAGTCAGCTTCCATCA CCTGCAGGTCTAGTCAGAGTCTGGTATACAAAGACGGCCAGACATACTTGAATTGGTTTCTGCA GAGGCCAGGACAGTCTCCTCAGCTTCTGACCTATTGGATGTCTACCCGTGCATCAGGAGTCTCA GACAGGTTCACTGGCAGTGGGTGAGGAACATATTTCACACTGAAAATCAGTAGAGTGAAGGCT GAGGATGCGGGTGTGTATTACTGTGAGCAAGTTCGAGAGTATCCTTCACTTTCGGCTCAGGGA CGAAGTTGGAATAAAACGGGCTGATGCGGCGCCAACGTATCCATCTTCCACCATCCAGTG AGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTCTTCTGAACAACTTCTACCCAAAGACAT CAATGTCAAGTGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCTGAAACAGTTGGACTGA TCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCAGTTGACCAAGGACGAGTA TGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTACAAGACATCAACTTCAACCATTTGTCAC GAGCTTCAACAGGAATGAGTGT
91	ヒト OX40	MCVGARRLGRGPCAALLLLGLGLSTVTGLHCVGDTYPSNDRCCHECRPGNGMVSRCRSRQNTVCR PCGPGFYNDVVSCKPCKPCTWCNLRSGSERKQLCTATQDVTVCRCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPP GHFSPGDNQACKPWTNCTLAGKHTLQPASNSSDAICEDRDPPATQPPQETQPPARPITVQPTAEWP RTSQGPSTRPVEVPGRVAAILGLGLVLGLLGPLAILLALYLLRRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQ EEQADAHSTLAKI
92	マウス OX40	MYVWVQOPTALLLLGLTLGVTARRLNCVKHTYPSGHKCCRECPGHGMVSRCDHTRDTLCHPCE TGFYNEAVNYDTCKQCTQCNRHSGSELKQNCPTPTQDVTVCRCRPGTQPRQDSGYKLGVDVCP HFSPGNQACKPWTNCTLSGKQTRHPASDSLDAVCEDRSLATLLWETQRPTRPTTVQSTTVWPR TSELPSPTLVTEPGPAFAVLGLGLLAPLTVLLALYLLRKAWRPLPNTPKPCWGNSFRTPIQEHT DAHFTLAKI

10

20

30

【 図 1 】

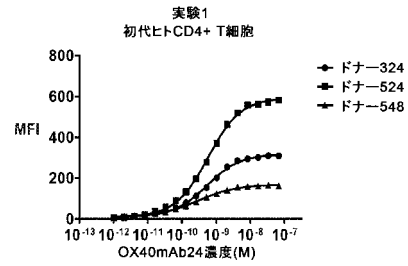
図1

ヒト化VLと対の9B12VH突然変異体										
クローンID	VH突然変異体(ニックネーム)	VH突然変異位置							配列易損性の除去	
		27D	39K	47Y	48M	71R	78Y	91F	NG (CDR2H)	RYDYDG (CDR3H)
OX40mAb1	9B12キメラ	D	K	Y	M	R	Y	F		
OX40mAb2	9B12マウスVH	D	K	Y	M	R	Y	F		
OX40mAb5	hu	G	Q	W	I	P	F	Y	NG	RYDYDG
OX40mAb8	huKR	G	K	W	I	R	F	Y		
OX40mAb10	m1	D	Q	W	I	P	F	Y		
OX40mAb11	m2	G	K	Y	M	P	F	Y		
OX40mAb12	m3	G	Q	W	I	R	Y	F		
OX40mAb13	KR-DYMYF	D	K	Y	M	R	Y	F		
OX40mAb14	KR-DYIYF	D	K	Y	I	R	Y	F		
OX40mAb15	KR-DYIFF	D	K	Y	I	R	F	F		
OX40mAb16	KR-DYIYY	D	K	Y	I	R	Y	Y		
OX40mAb17	KR-DYIFY	D	K	Y	I	R	F	Y		
OX40mAb18	KYYF	G	K	Y	I	R	Y	F		
OX40mAb19	KYRYF	G	K	Y	I	R	Y	F		
OX40mAb20	KYRY	G	K	Y	I	R	Y	Y	NG	RYDYDG
OX40mAb21	KYY	G	K	Y	I	R	Y	Y		
OX40mAb22	55A,96K-A	G	K	Y	I	R	Y	Y	NA	KYDYDG
OX40mAb23	55A	G	K	Y	I	R	Y	Y	NA	RYDYDG
OX40mAb24	96K	G	K	Y	I	R	Y	Y	NG	KYDYDG
OX40mAb25	54S	G	K	Y	I	R	Y	Y	SG	RYDYDG
OX40mAb25a	54S,96K	G	K	Y	I	R	Y	Y	SG	KYDYDG
OX40mAb26	マウスVH-55A	D	K	Y	M	R	Y	F	NA	RYDYDG
OX40mAb27	55A,96K	G	K	Y	I	R	Y	Y	NA	KYDYDG
OX40mAb28	huIgG4P	G	K	Y	I	R	Y	Y	NG	KYDYDG
OX40mAb29	huIgG1TM	G	K	Y	I	R	Y	Y	NG	KYDYDG
OX40mAb30	mlgG1	G	K	Y	I	R	Y	Y	NG	KYDYDG
OX40mAb31	huIgG4P	G	K	Y	I	R	Y	Y	NA	KYDYDG
OX40mAb32	huIgG1TM	G	K	Y	I	R	Y	Y	NA	KYDYDG
OX40mAb37	mlgG1	G	K	Y	I	R	Y	Y	NA	KYDYDG

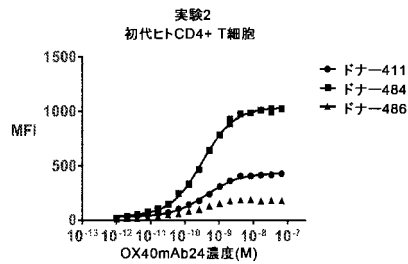
【 図 2 A - B 】

図 2A-D

A



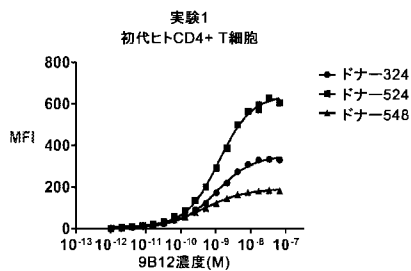
B



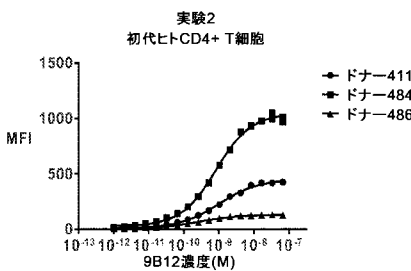
【 図 2 C - D 】

(図2A-D, 続き)

C



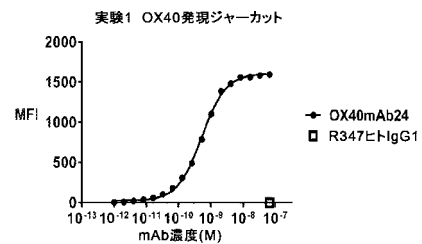
D



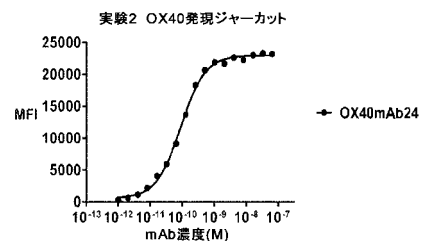
【 図 3 A - C 】

図 3A-F

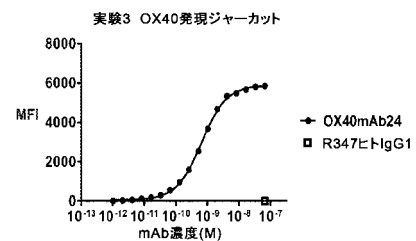
A



B

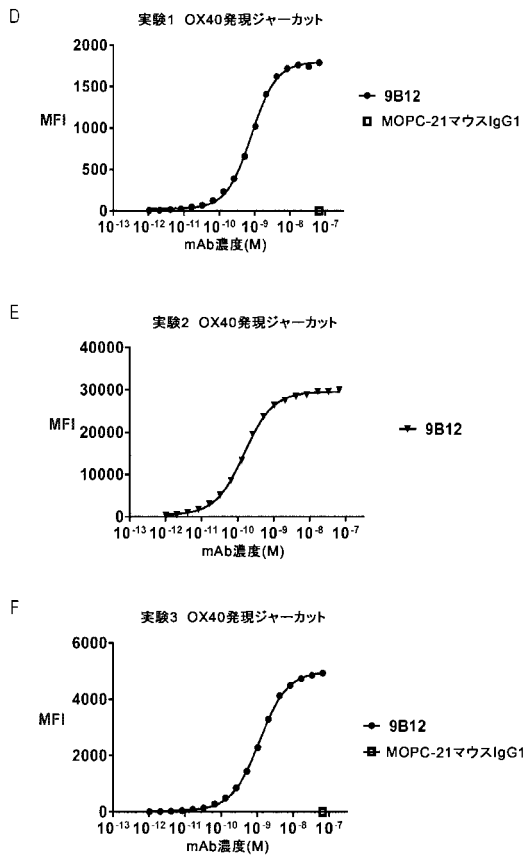


C



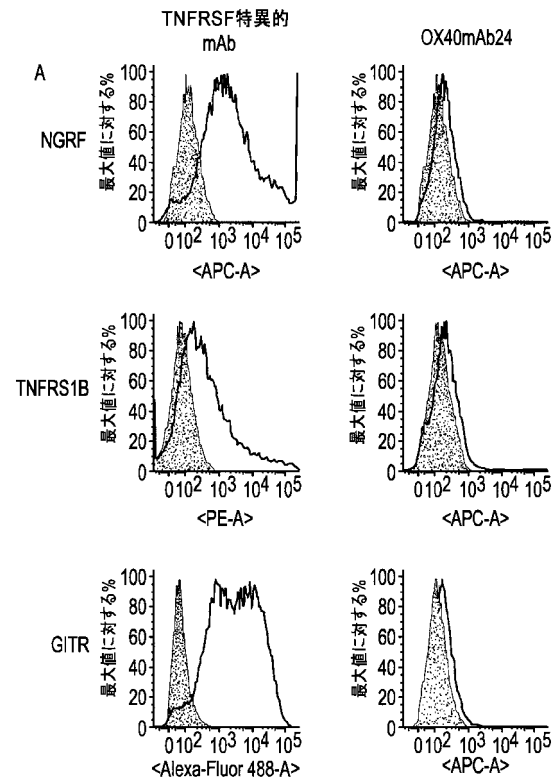
【図3D-F】

(図3A-F, 続き)



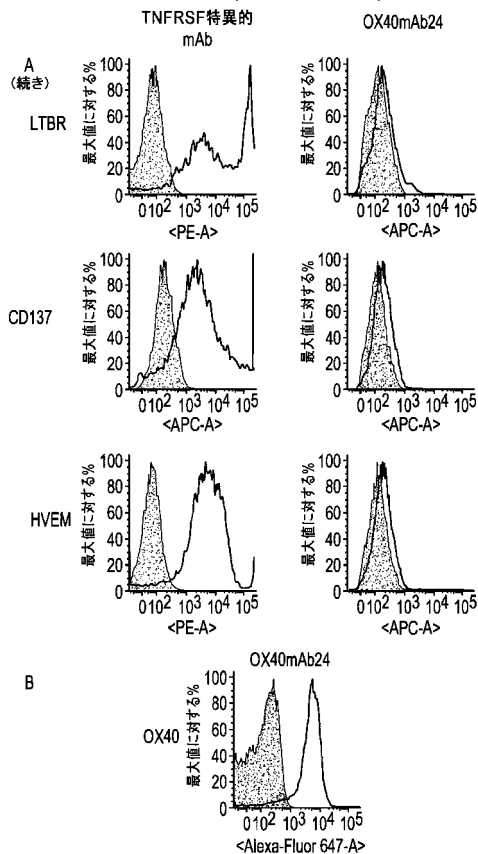
【図4A-B-1】

図4A-B



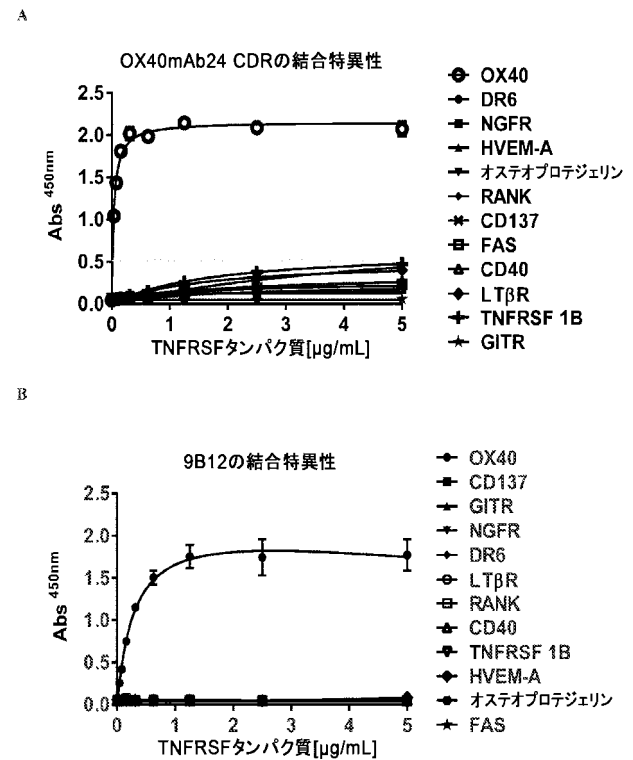
【図4A-B-2】

(図4A-B, 続き)

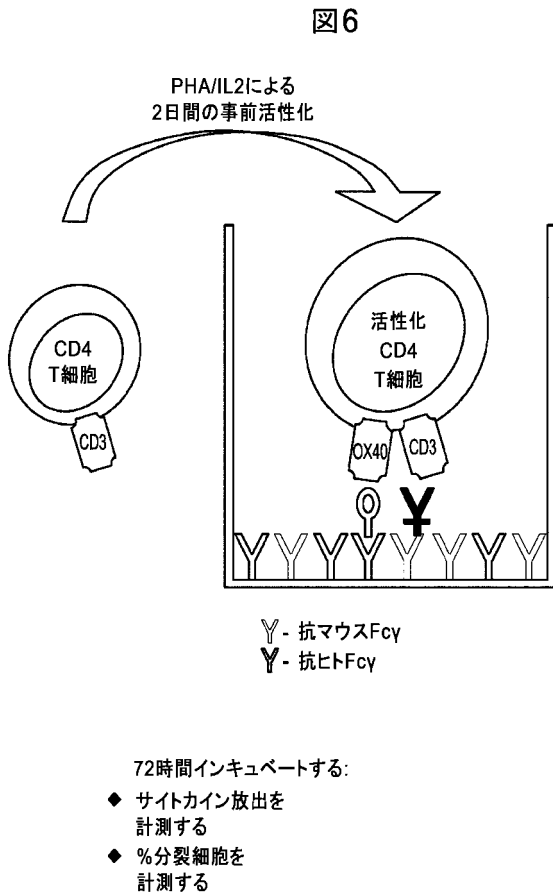


【図5A-B】

図5A-B

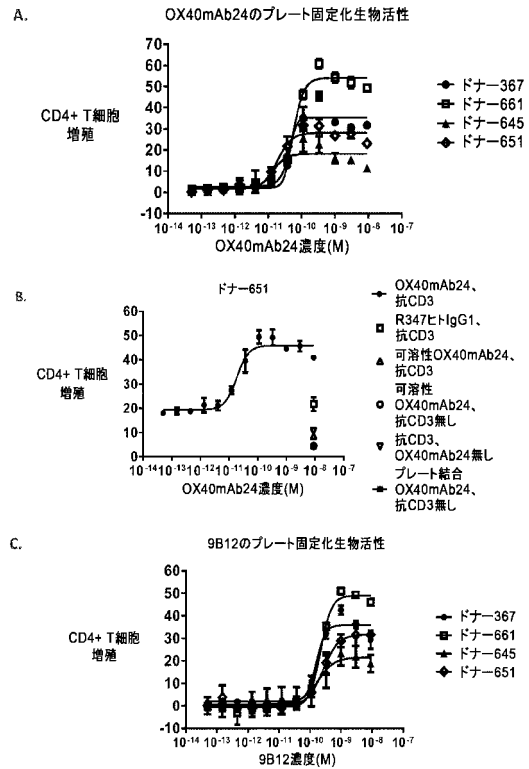


【図6】



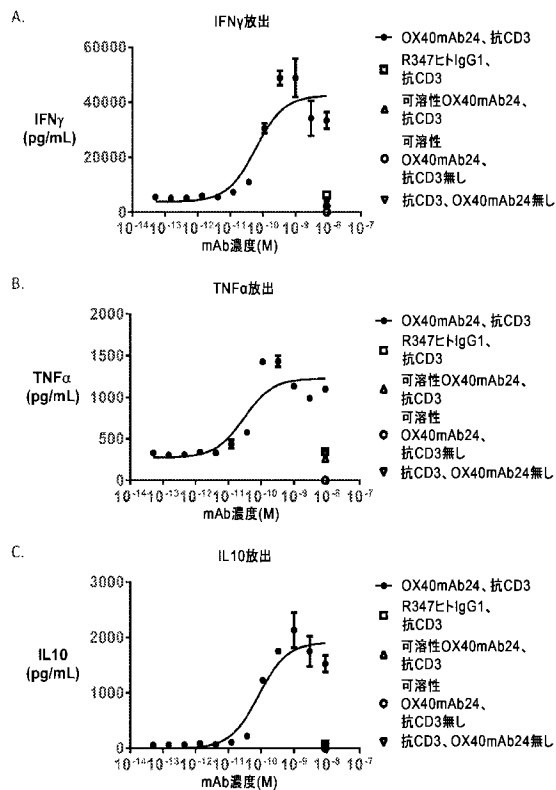
【図7A-C】

図7A-C



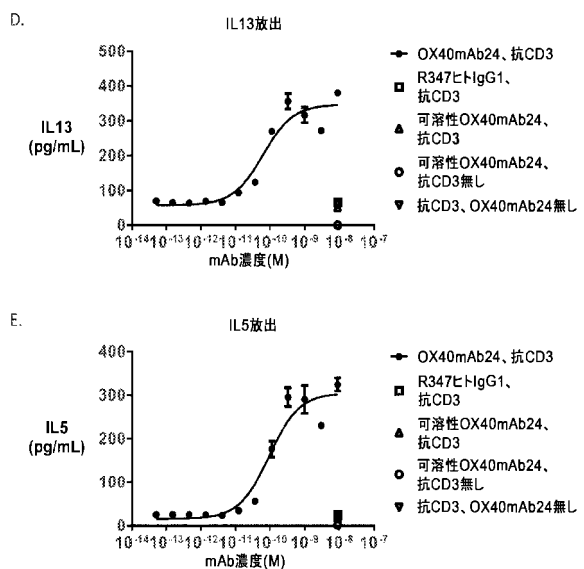
【図8A-C】

図8A-E



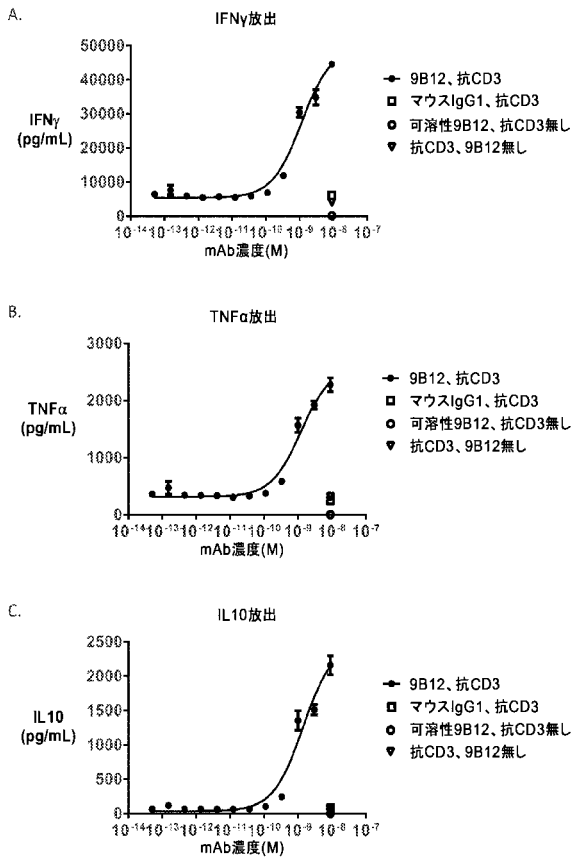
【図8D-E】

(図8A-E, 続き)



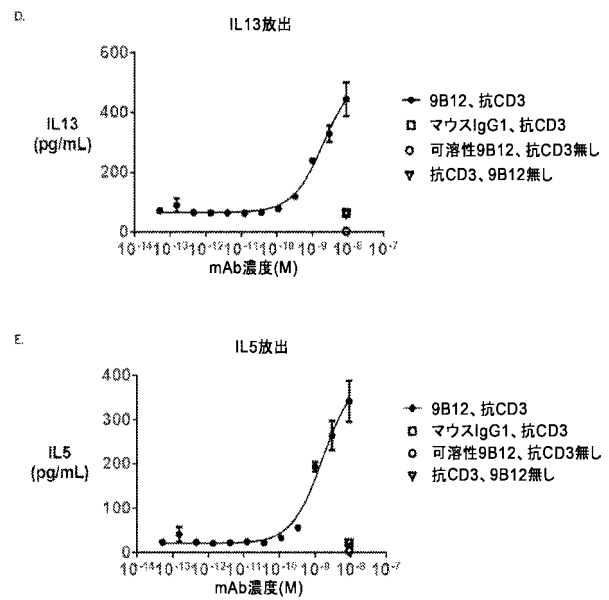
【図 9 A - C】

図9A-E



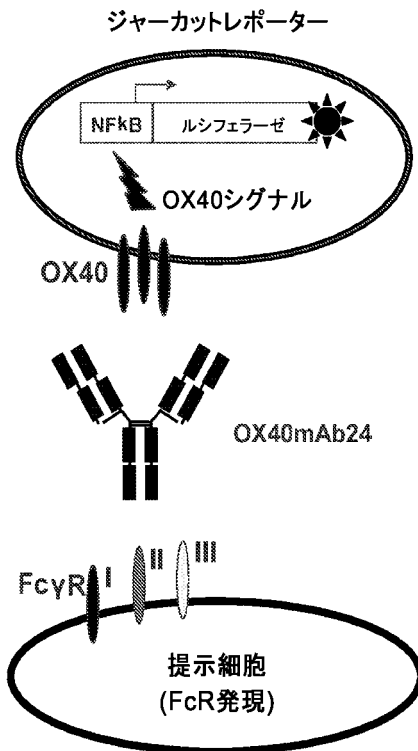
【図 9 D - E】

(図9A-E, 続き)



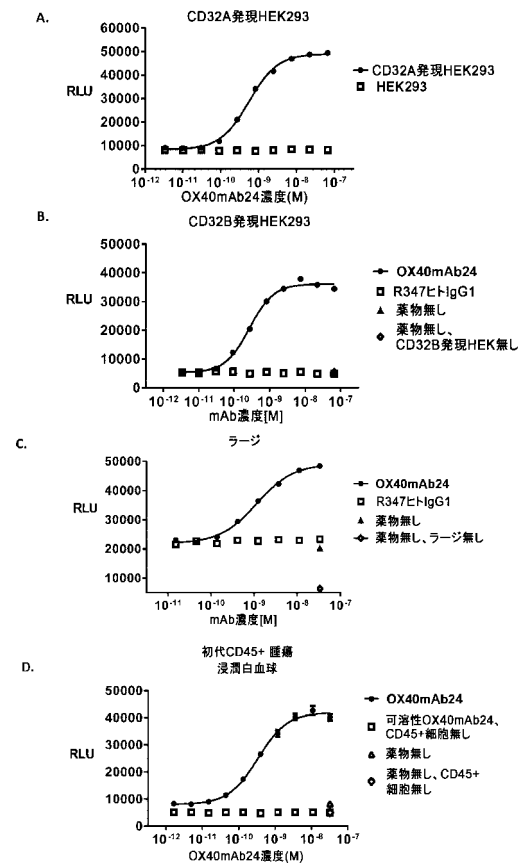
【図 1 0】

図10



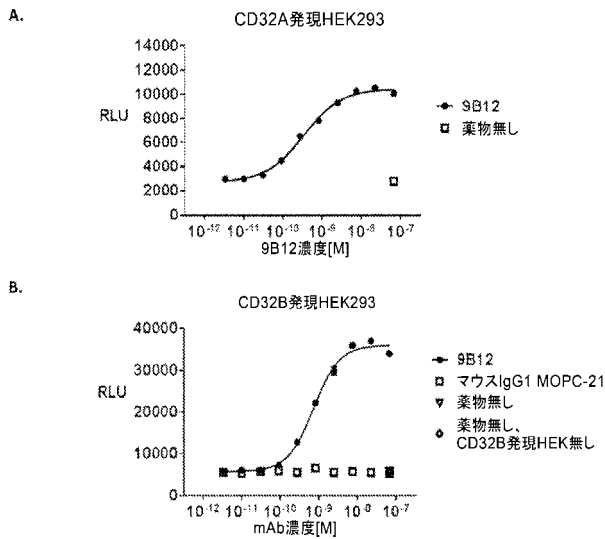
【図 1 1 A - D】

図11A-D



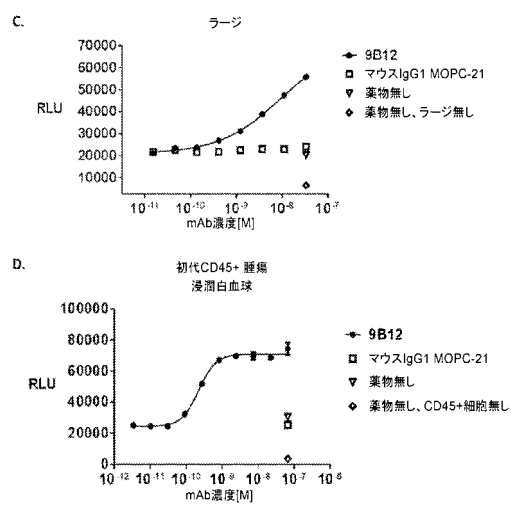
【図12A - B】

図12A-B



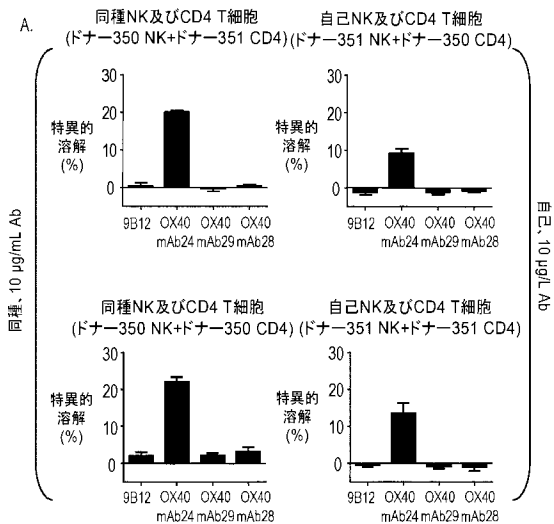
【図12C - D】

図12C-D



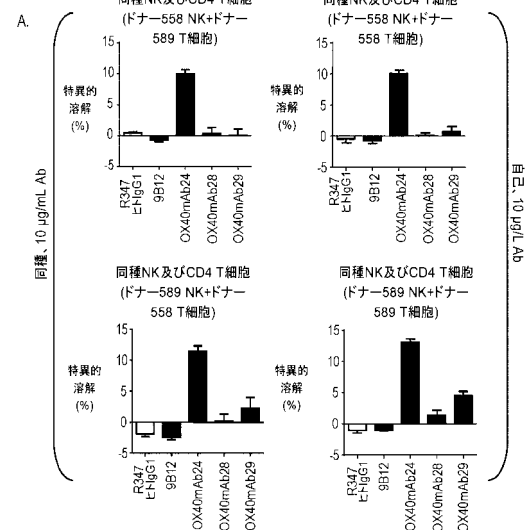
【図13A - B】

図13A-B



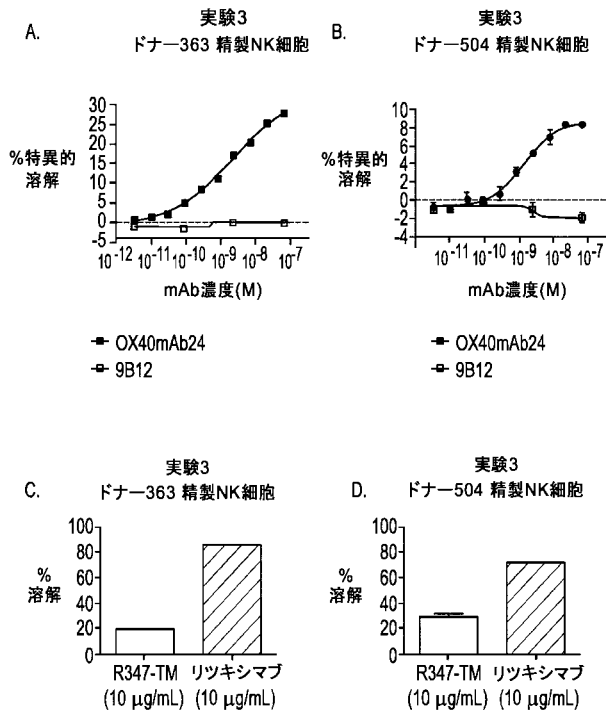
【図14A - B】

図14A-B



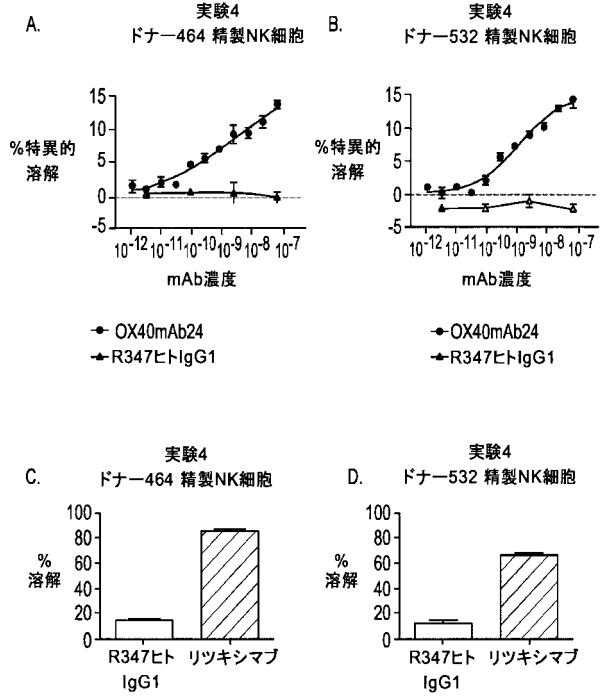
【図15A-D】

図15A-D



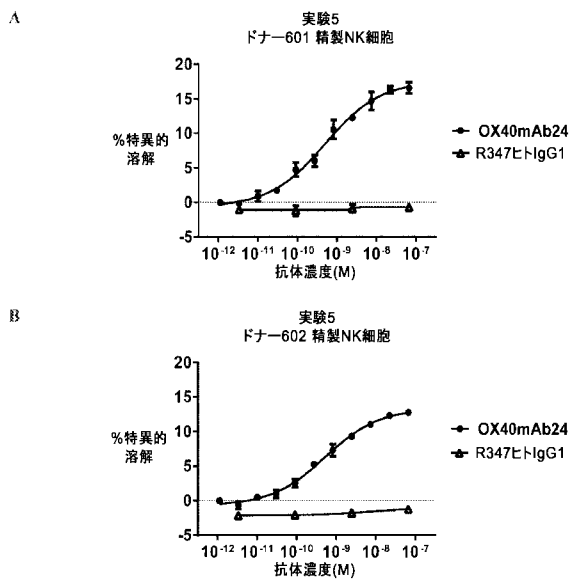
【図16A-D】

図16A-D



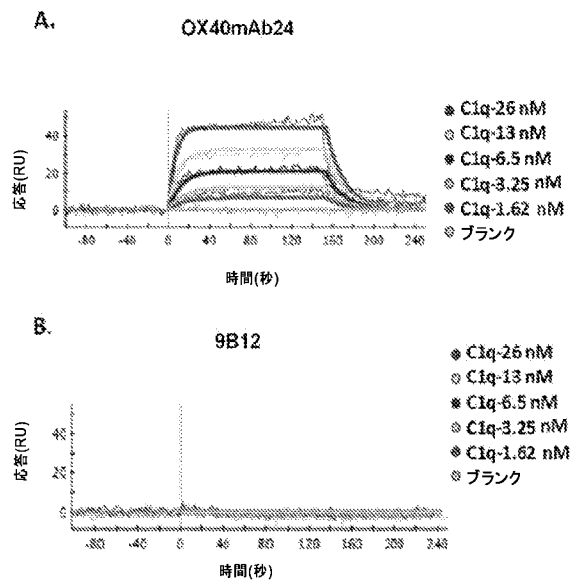
【図17A-B】

図17A-B



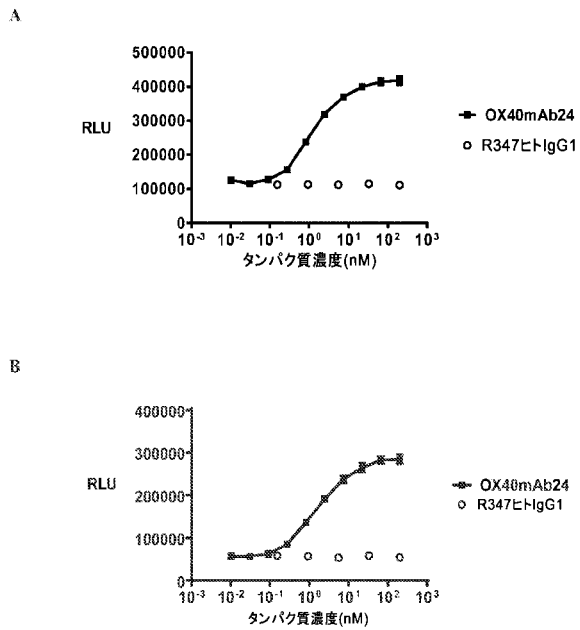
【図18A-B】

図18A-B



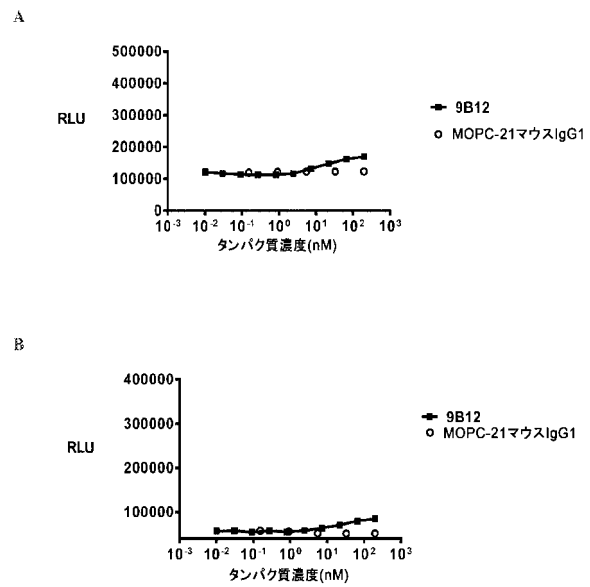
【図19A-B】

図19A-B



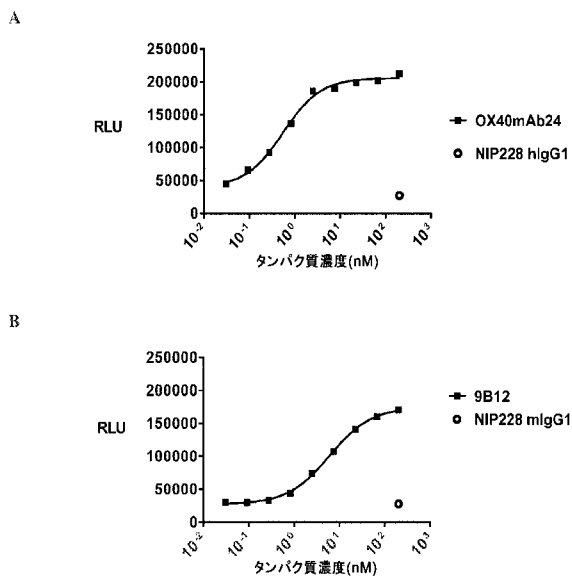
【図20A-B】

図20A-B



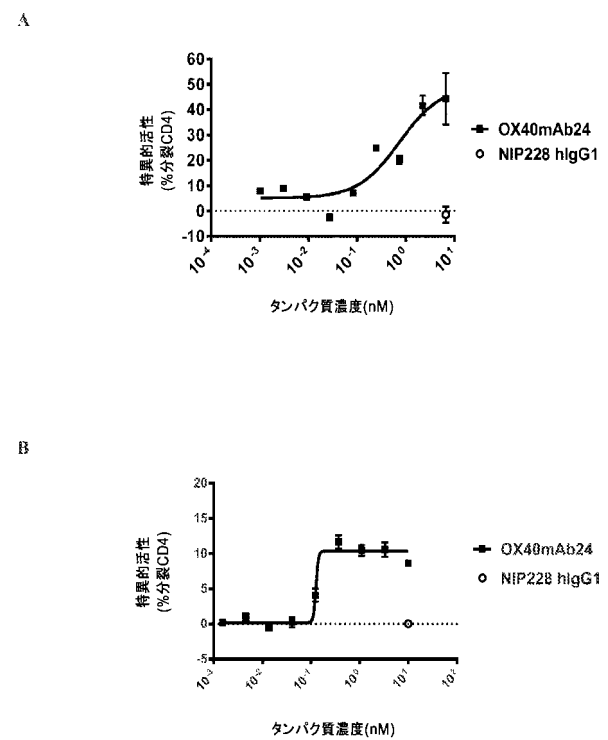
【図21A-B】

図21A-B



【図22A-B】

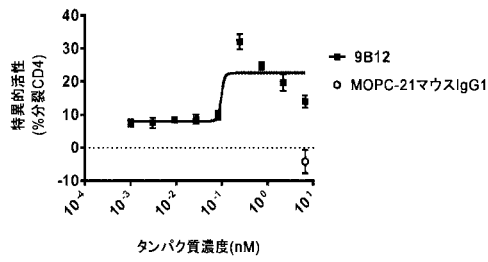
図22A-D



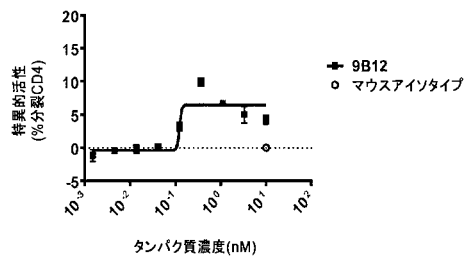
【図22C-D】

(図22A-D, 続き)

C



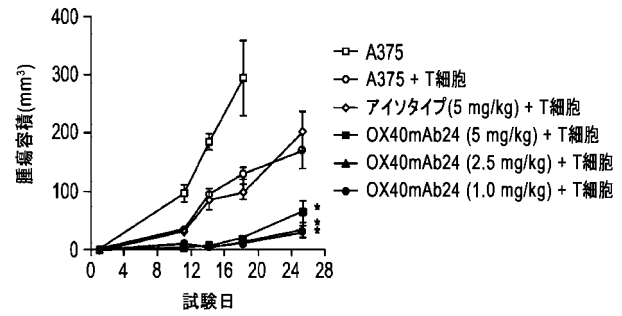
D



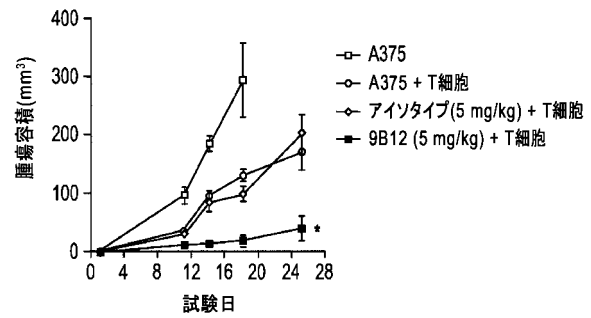
【図23A-B】

図23A-B

A



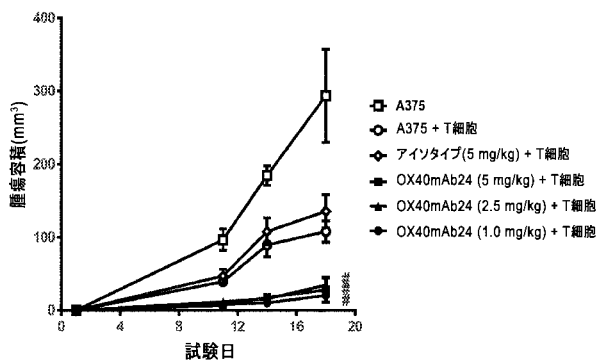
B



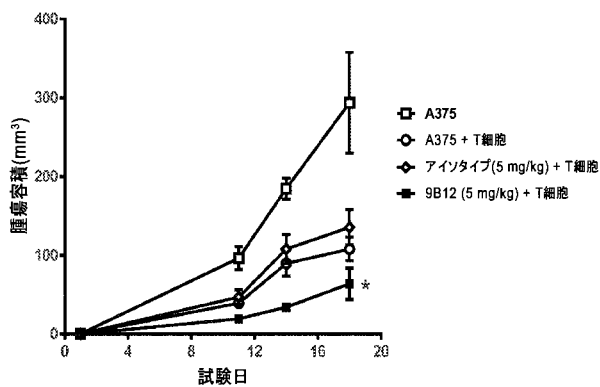
【図24A-B】

図24A-B

A

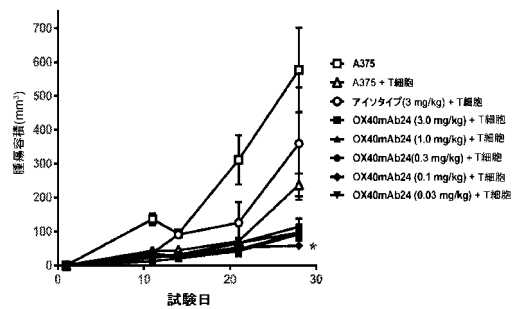


B



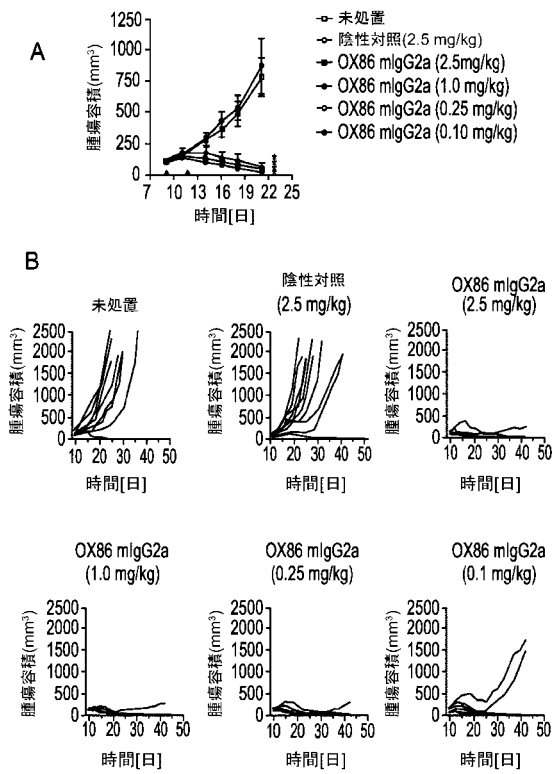
【図25】

図25



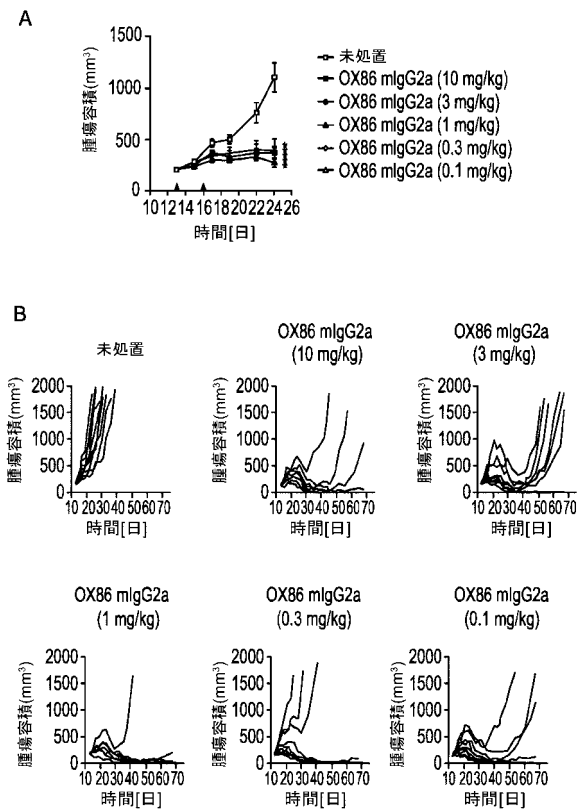
【図 26 A - B】

図 26A-B



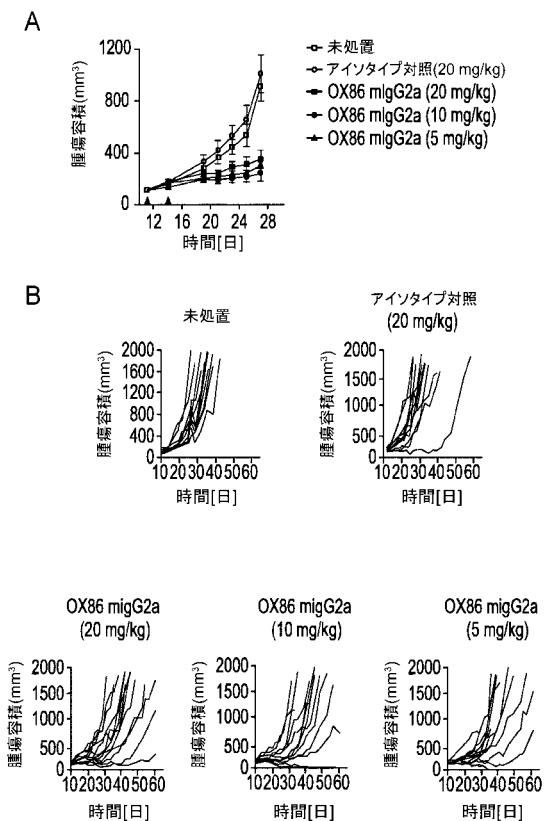
【図 27 A - B】

図 27A-B



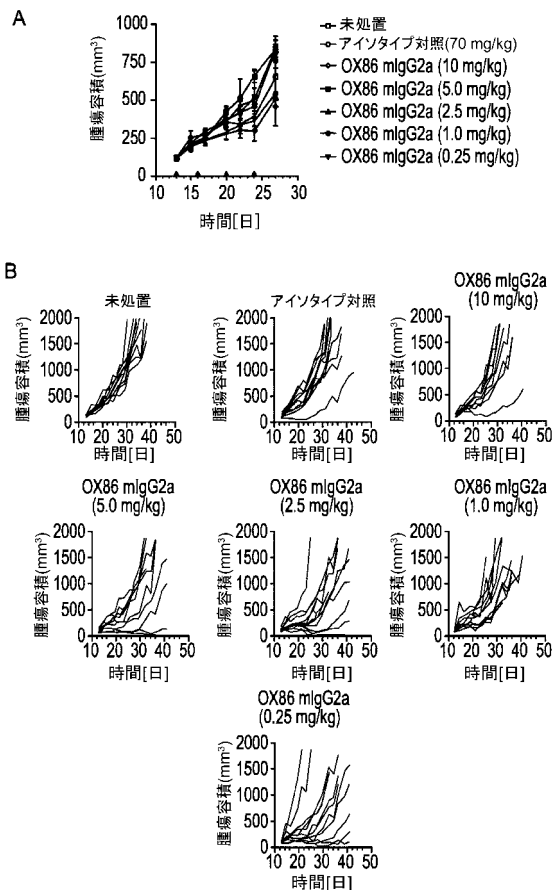
【図 28 A - B】

図 28A-B

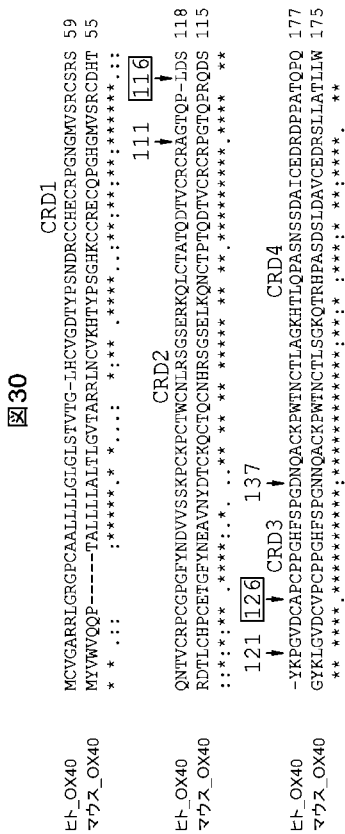


【図 29 A - B】

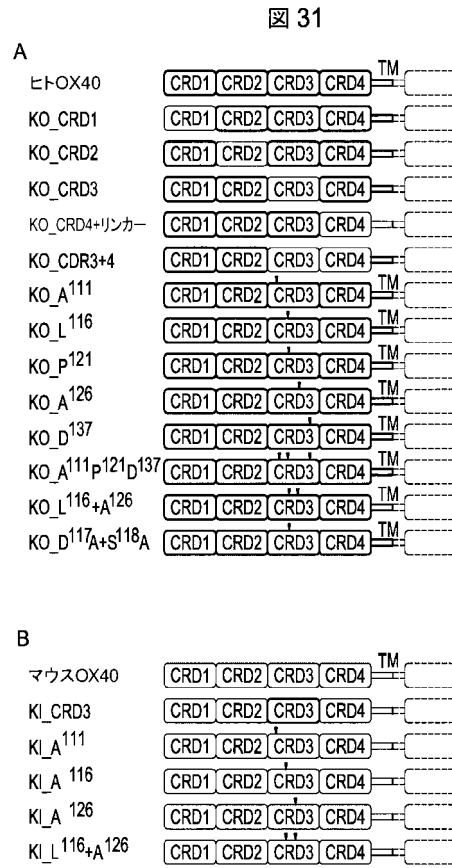
図 29A-B



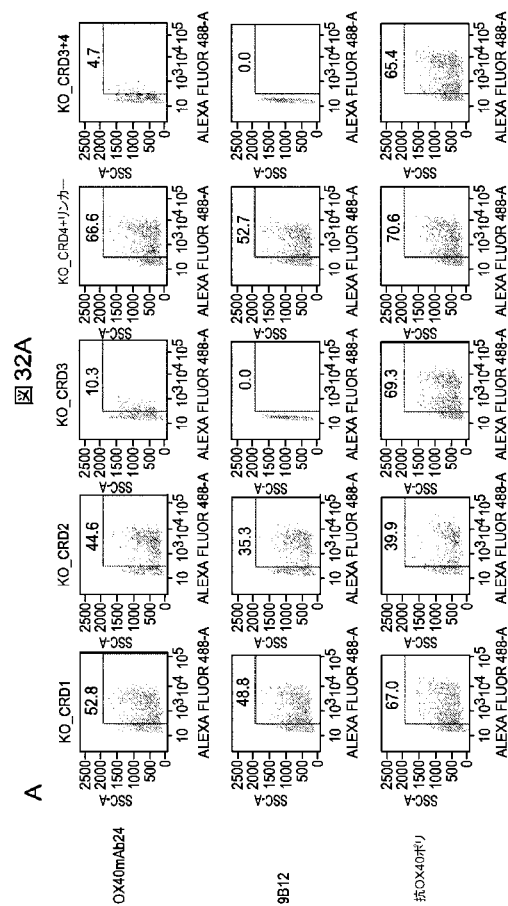
【図 30】



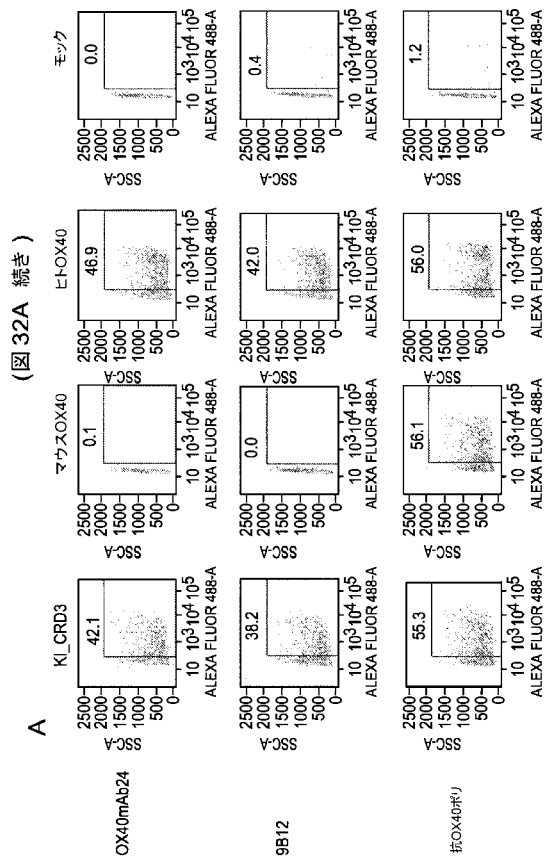
【図 31】



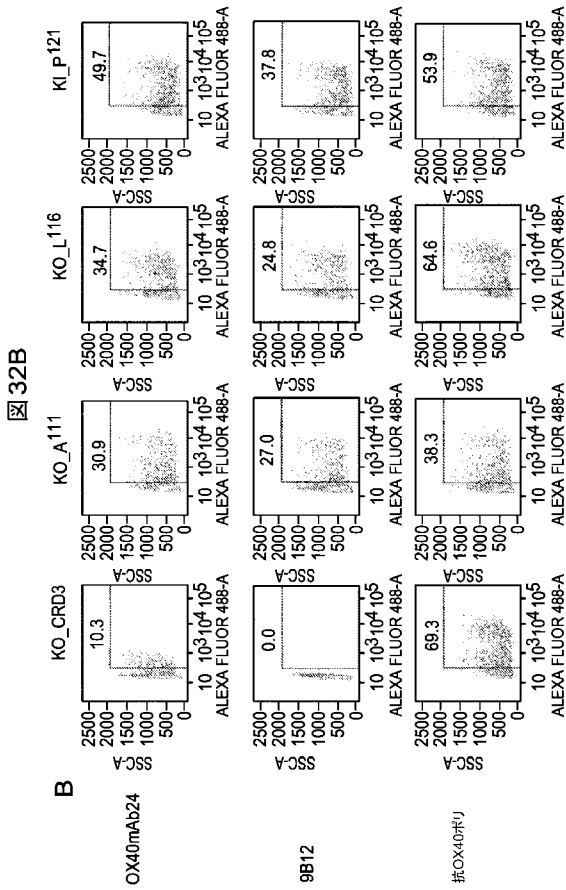
【図 32 A - 1】



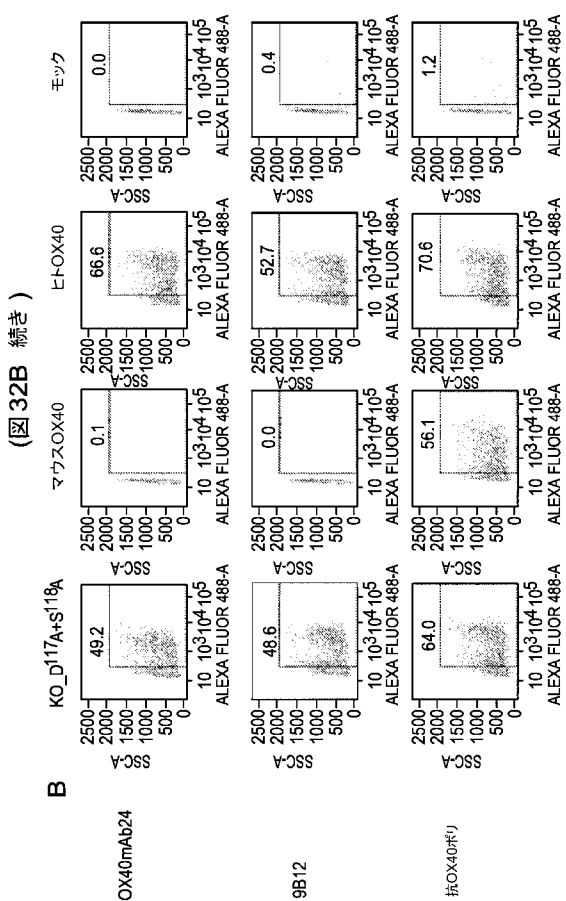
【図 32 A - 2】



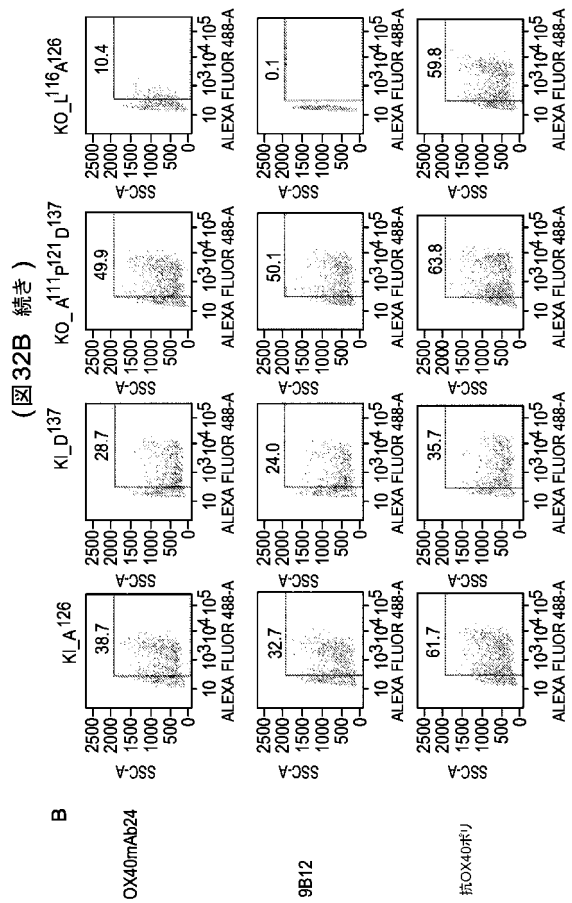
【図 32B - 1】



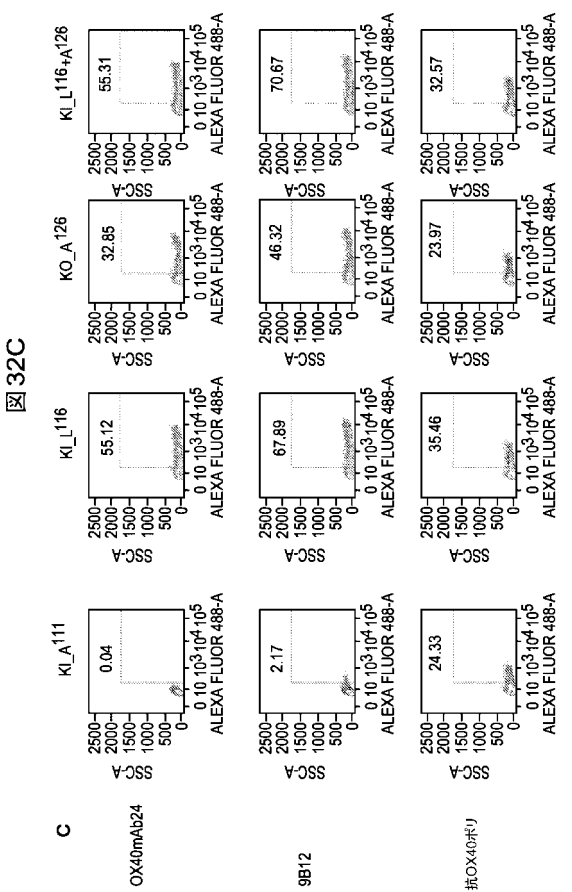
【図 32B - 3】



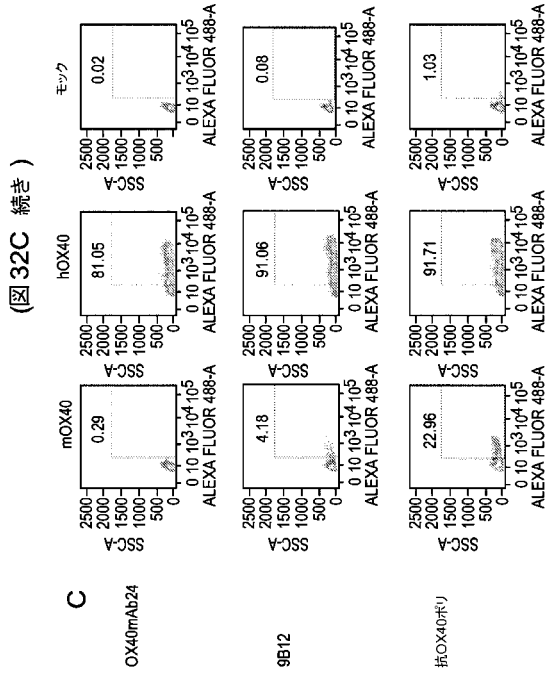
【図 32B - 2】



【図 32C - 1】

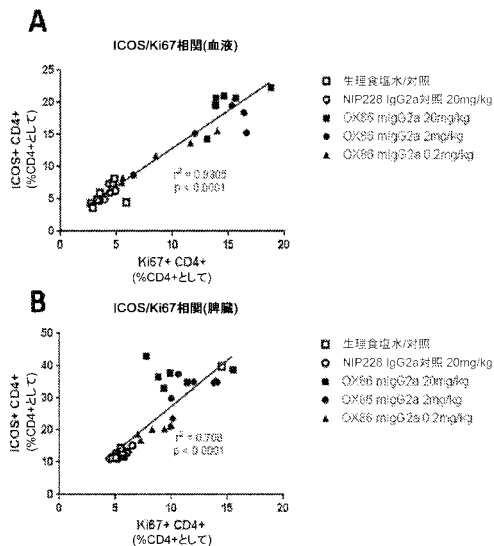


【図 3 2 C - 2】

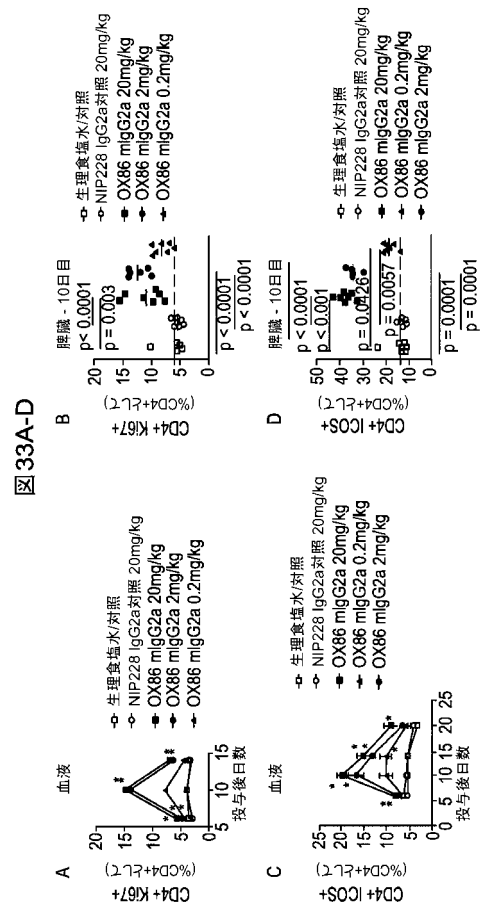


【図 3 4 A - B】

図 34A-B

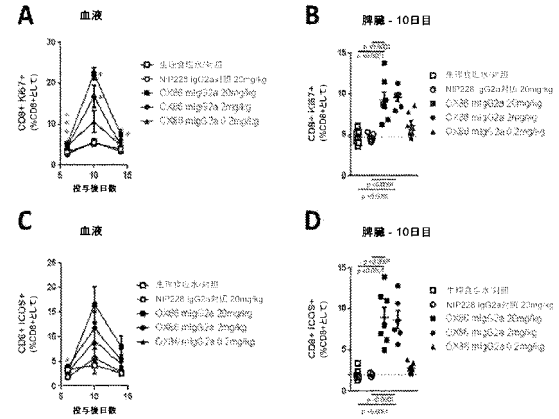


【図 3 3 A - D】



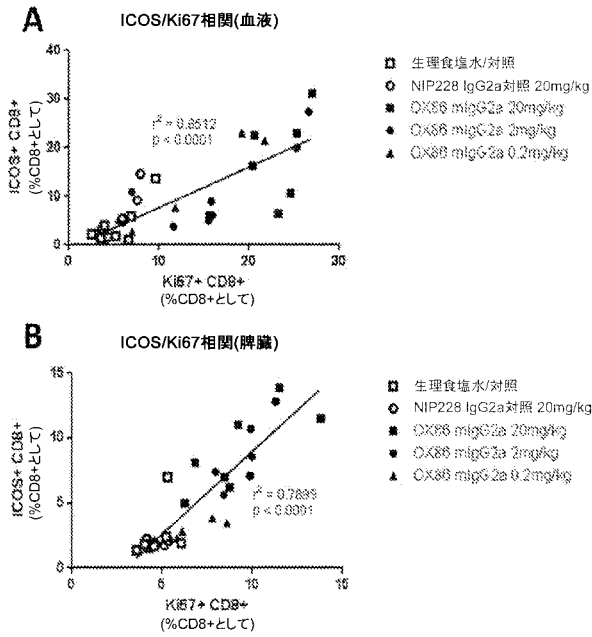
【図 3 5 A - D】

図 35A-D

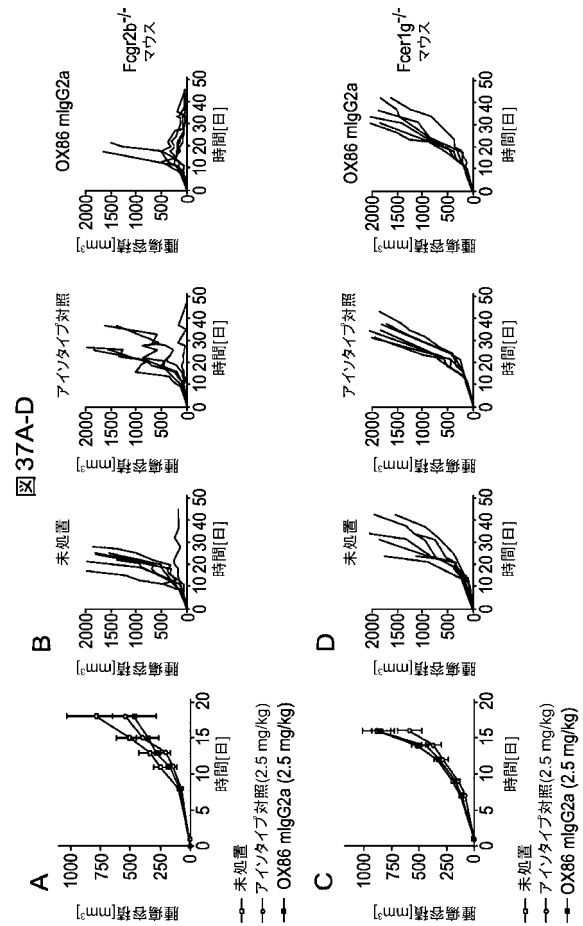


【図 36 A - B】

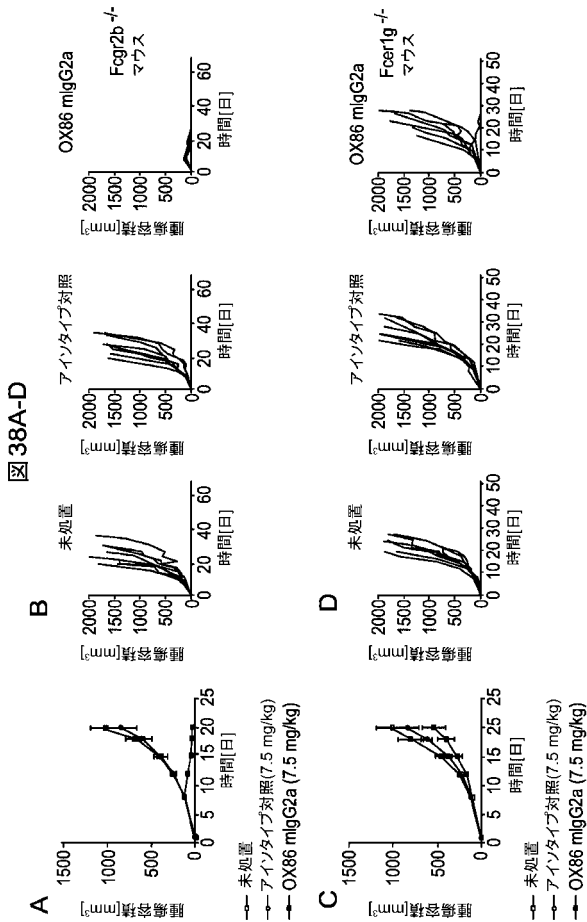
図 36A-B



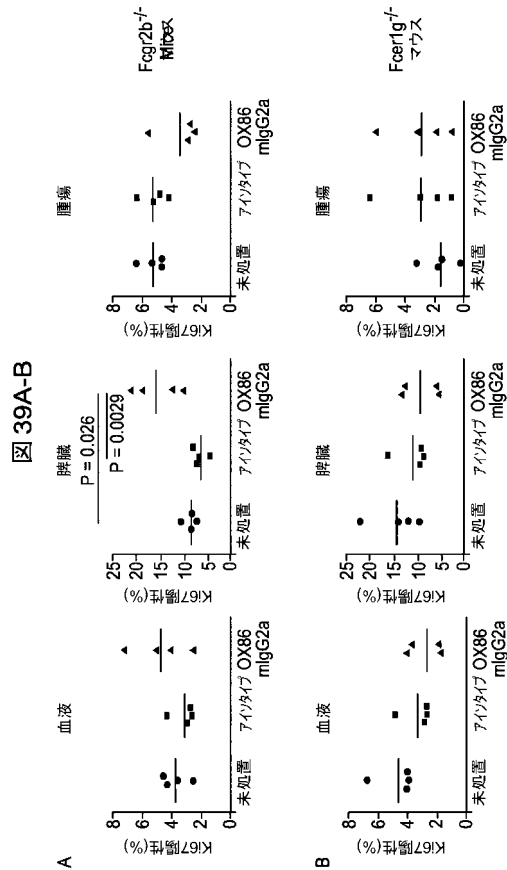
【図 37 A - D】



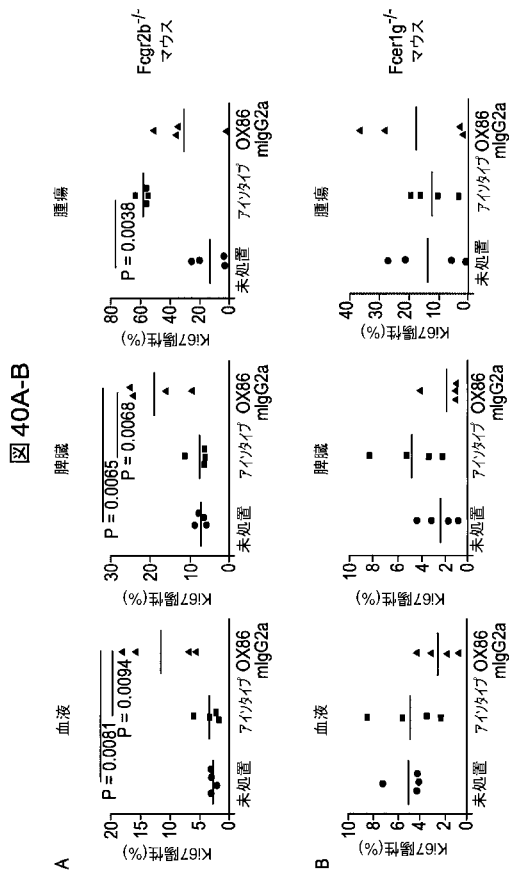
【図 38 A - D】



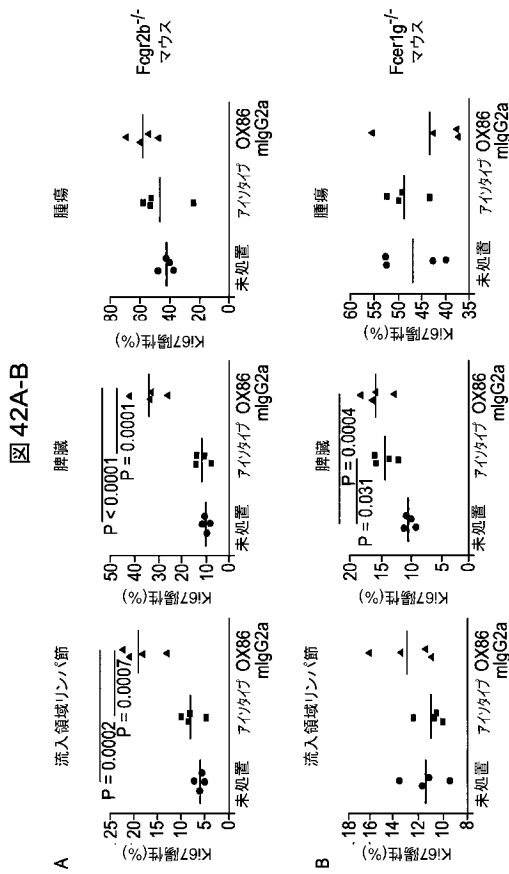
【図 39 A - B】



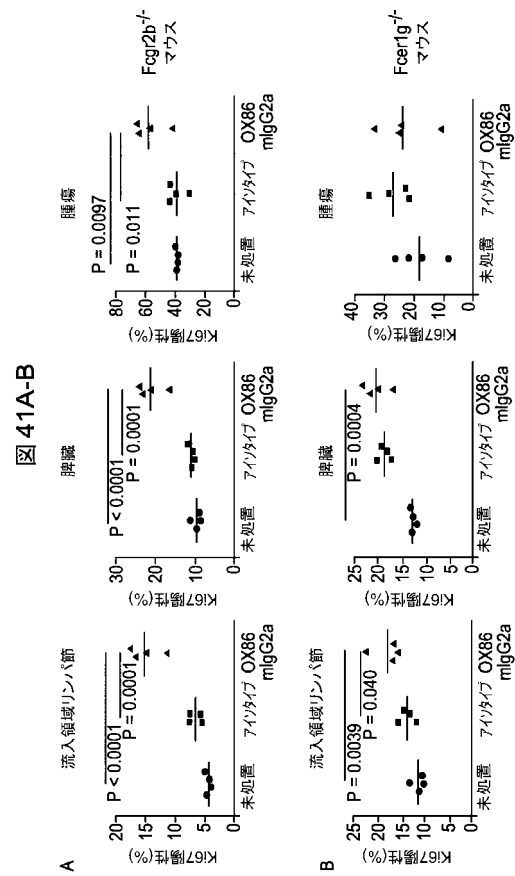
【図 40 A - B】



【図 42 A - B】

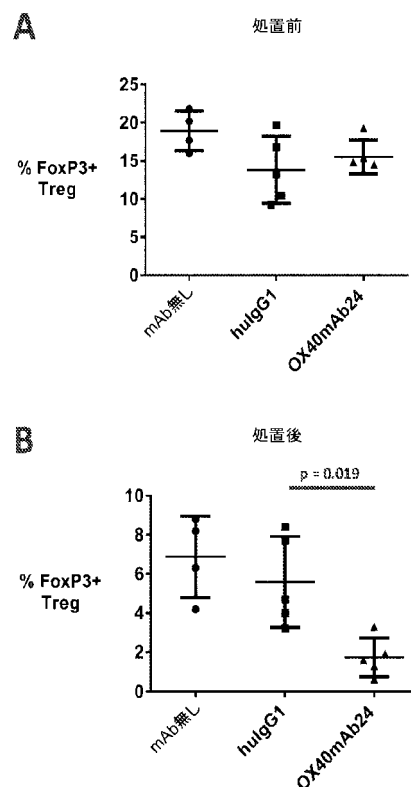


【図 41 A - B】



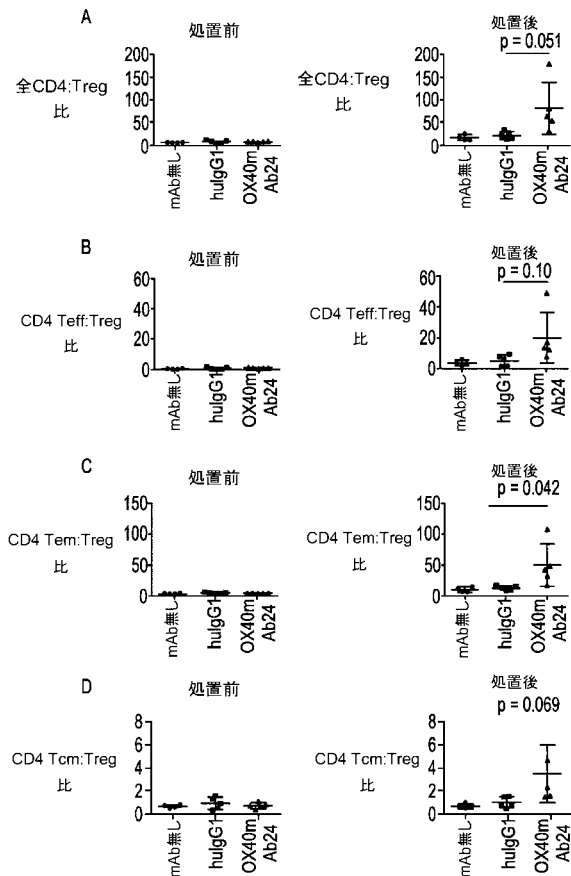
【図 43 A - B】

図 43A-B



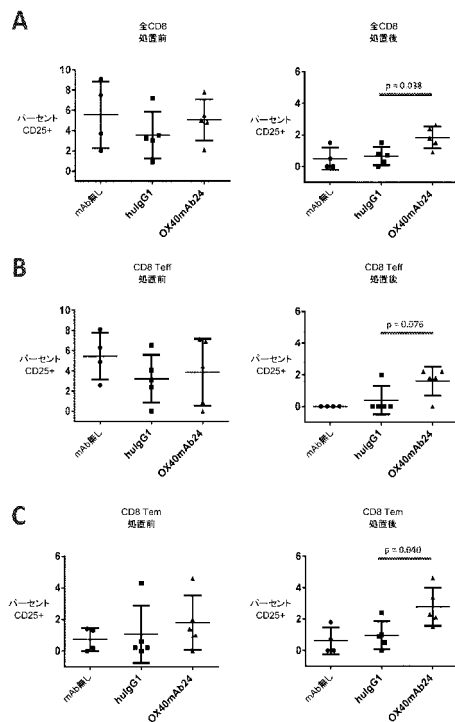
【図 4 4 A - D】

図 44A-D



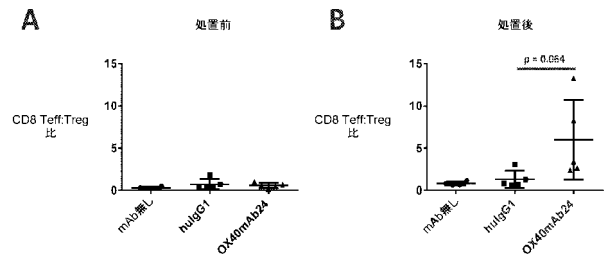
【図 4 6 A - C】

図 46A-C



【図 4 5 A - B】

図 45A-B



【手続補正書】

【提出日】平成29年6月13日(2017.6.13)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2017532037000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US15/54480																		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C07K16/28, A61K39/395 (2015.01) CPC - C07K16/28, A61K39/395 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) IPC(8): C07K 16/28; A61K 39/395; C12N 1/15, 1/19, 1/21, 15/09, 15/13, 5/10 (2015.01) CPC: C07K 16/28, 16/2878, 2317/73, 2317/75, 2317/56; A61K 39/3975 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) PatSeer (US, EP, WO, JP, DE, GB, CN, FR, KR, ES, AU, IN, CA, INPADOC Data), NCBI/PubMed, Lens.org, Google/ Google Scholar; 'OX40,' 'CD134,' 'TNFRSF4,' 'tumor necrosis factor receptor superfamily 4,' 'humanized antibody,' 'HFW,' 'HAMMOND,' 'Scott,' 'OBERST,' Michael, DU, Qun, DAMSCHRODER, Melissa, 'SGYWN,' 'WIRXHPGKGLXGX,' 'YISYNGITYHNPSLKS, SEQ ID Nos 29, 32																				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>WO 2014/148895 A1 (BIOCEROX PRODUCTS B.V. et al.) September 25, 2014; Abstract, page 7, lines 14-30, SEQ ID NO: 99</td> <td>1-3</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2008/106116 A2 (GENENTECH, INC.) September 4, 2008; abstract, paragraphs [0001], [0013]-[0015], [0084]</td> <td>1-3</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2013/028231 A1 (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) February 28, 2013; abstract, paragraphs [0013]-[0021]</td> <td>1-3</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2012/097313 A2 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) July 19, 2012; SEQ ID NO: 97</td> <td>1-3</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2002/0068319 A1 (NI, J et al.) June 6, 2002; paragraph [0482], SEQ ID NO: 145</td> <td>1-3</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	A	WO 2014/148895 A1 (BIOCEROX PRODUCTS B.V. et al.) September 25, 2014; Abstract, page 7, lines 14-30, SEQ ID NO: 99	1-3	A	WO 2008/106116 A2 (GENENTECH, INC.) September 4, 2008; abstract, paragraphs [0001], [0013]-[0015], [0084]	1-3	A	WO 2013/028231 A1 (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) February 28, 2013; abstract, paragraphs [0013]-[0021]	1-3	A	WO 2012/097313 A2 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) July 19, 2012; SEQ ID NO: 97	1-3	A	US 2002/0068319 A1 (NI, J et al.) June 6, 2002; paragraph [0482], SEQ ID NO: 145	1-3
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																		
A	WO 2014/148895 A1 (BIOCEROX PRODUCTS B.V. et al.) September 25, 2014; Abstract, page 7, lines 14-30, SEQ ID NO: 99	1-3																		
A	WO 2008/106116 A2 (GENENTECH, INC.) September 4, 2008; abstract, paragraphs [0001], [0013]-[0015], [0084]	1-3																		
A	WO 2013/028231 A1 (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) February 28, 2013; abstract, paragraphs [0013]-[0021]	1-3																		
A	WO 2012/097313 A2 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) July 19, 2012; SEQ ID NO: 97	1-3																		
A	US 2002/0068319 A1 (NI, J et al.) June 6, 2002; paragraph [0482], SEQ ID NO: 145	1-3																		
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.																				
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family																				
Date of the actual completion of the international search 18 December 2015 (18.12.2015)		Date of mailing of the international search report 19 JAN 2016																		
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT CSP: 571-272-7774																		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US15/54490

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 4-70
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01) 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 オバースト, マイケル
 アメリカ合衆国 2 0 8 7 8 メリーランド州, ゲイサースバーグ, ワン メディミューン ウェイ, メディミューン, エルエルシー

(72)発明者 デュ, クン
 アメリカ合衆国 2 0 8 7 8 メリーランド州, ゲイサースバーグ, ワン メディミューン ウェイ, メディミューン, エルエルシー

(72)発明者 ダムスクローダー, メリッサ
 アメリカ合衆国 2 0 8 7 8 メリーランド州, ゲイサースバーグ, ワン メディミューン ウェイ, メディミューン, エルエルシー

F ターム(参考) 4B064 AG27 CA19 CC24 DA05
 4B065 AA92X AA94X AC20 BA30 BD39 CA44
 4C085 AA14 BB01 BB11 EE01
 4H045 AA11 AA20 AA30 DA76 EA20 FA74