(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7043422号
(P7043422)

(45)発行日　令和4年3月29日(2022.3.29)

(24)登録日　令和4年3月18日(2022.3.18)

(51)国際特許分類			FI		
C12N	*15/62*	*(2006.01)*	C12N	15/62	ZZNA
C07K	*19/00*	*(2006.01)*	C07K	19/00	
C07K	*14/52*	*(2006.01)*	C07K	14/52	
C12N	*15/13*	*(2006.01)*	C12N	15/13	
C12N	*15/19*	*(2006.01)*	C12N	15/19	

請求項の数　27　（全232頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2018-559278(P2018-559278)
(86)(22)出願日　平成29年5月8日(2017.5.8)
(65)公表番号　特表2019-521655(P2019-521655A)
(43)公表日　令和1年8月8日(2019.8.8)
(86)国際出願番号　PCT/EP2017/060863
(87)国際公開番号　WO2017/194438
(87)国際公開日　平成29年11月16日(2017.11.16)
審査請求日　令和2年4月30日(2020.4.30)
(31)優先権主張番号　16169237.1
(32)優先日　平成28年5月11日(2016.5.11)
(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)

(73)特許権者　306021192
エフ・ホフマン－ラ・ロシュ・アクチェンゲゼルシャフト
スイス、ツェハー－４０７０バーゼル、グレンツァッハーシュトラーセ１２４番
(74)代理人　110002077
園田・小林特許業務法人
(72)発明者　ブルエンカー，　ペーター
スイス国　８３３５　ヒットナウ，　ブルクヴィーゼンシュトラーセ　３ツェー
(72)発明者　コラー，　クラウディア　フェッラーラ
スイス国　６３００　ツーク，　ヘンイビューエル　１３
(72)発明者　グラウ－リチャーズ，　ザンドラ
スイス国　８９０３　ビルメンスドルフ，
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　Ｃ末端融合ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

４－１ＢＢリガンド（４－１ＢＢＬ）三量体含有抗原結合分子であって、

（ａ）標的細胞抗原に特異的に結合することができる一つのＦａｂドメイン、

（ｂ）安定な会合が可能な第一及び第二サブユニットからなるＦｃドメイン、及び

（ｃ）ペプチドリンカーによって互いに連結された配列番号：５のアミノ酸配列を含む４－１ＢＢＬの二つのエクトドメインを含む第一ポリペプチドと、配列番号：５のアミノ酸配列を含む前記４－１ＢＢＬの一つのエクトドメインを含む第二ポリペプチドと

を含み、

前記第一ポリペプチドが、ホールのアミノ酸置換Ｙ３４９Ｃ、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ及びＹ４０７Ｖ（ＫａｂａｔのＥＵインデックスによる番号付け）を含むＦｃドメインの第一サブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合され、前記第二ポリペプチドが、ノブのアミノ酸置換Ｓ３５４Ｃ及びＴ３６６Ｗ（ＫａｂａｔのＥＵインデックスによる番号付け）を含むＦｃドメインの第二サブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合され、標的細胞抗原に特異的に結合することができるＦａｂドメインのＶＨ及びＣＨ１ドメインが、ノブ変異を含むＦｃドメインの第二サブユニットのＮ末端にＣ末端で融合され、標的細胞抗原への結合に対して一価である、４－１ＢＢＬ三量体含有抗原結合分子。

【請求項２】

４－１ＢＢＬがヒトＴ細胞活性化を共刺激する、請求項１に記載の４－１ＢＢＬ三量体含有抗原結合分子。

【請求項３】
標的細胞抗原が、線維芽細胞活性化タンパク質（ＦＡＰ）、メラノーマ関連コンドロイチン硫酸プロテオグリカン（ＭＣＳＰ）、上皮増殖因子受容体（ＥＧＦＲ）、がん胎児抗原（ＣＥＡ）、ＣＤ１９、ＣＤ２０及びＣＤ３３からなる群から選択される、請求項１又は２に記載の４－１ＢＢＬ三量体含有抗原結合分子。
【請求項４】
標的細胞抗原が線維芽細胞活性化タンパク質（ＦＡＰ）である、請求項１から３の何れか一項に記載の４－１ＢＢＬ三量体含有抗原結合分子。
【請求項５】
ＦＡＰに特異的に結合することができるＦａｂドメインが、
（ａ）（ｉ）配列番号：１３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号：１４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び（ｉｉｉ）配列番号：１５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含むＶＨドメインと、（ｉｖ）配列番号：１６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｖ）配列番号：１７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、及び（ｖｉ）配列番号：１８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含むＶＬドメイン、又は
（ｂ）（ｉ）配列番号：１９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号：２０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号：２１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含むＶＨドメインと、（ｉｖ）配列番号：２２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｖ）配列番号：２３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、及び（ｖｉ）配列番号：２４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含むＶＬドメイン
とを含む、請求項１から４の何れか一項に記載の４－１ＢＢＬ三量体含有抗原結合分子。
【請求項６】
ＦＡＰに特異的に結合することができるＦａｂドメインが、配列番号：２５のアミノ酸配列を含む可変重鎖と、配列番号：２６のアミノ酸配列を含む可変軽鎖とを含むか、又はＦＡＰに特異的に結合することができるＦａｂドメインが、配列番号：２７のアミノ酸配列を含む可変重鎖と、配列番号：２８のアミノ酸配列を含む可変軽鎖とを含む、請求項１から５の何れか一項に記載の４－１ＢＢＬ三量体含有抗原結合分子。
【請求項７】
（ｉ）配列番号：１０６のアミノ酸配列を含む軽鎖、
（ｉｉ）配列番号：１０４のアミノ酸配列を含む融合ポリペプチド、及び
（ｉｉｉ）配列番号：１０５のアミノ酸配列を含む重鎖
を含む、請求項１から６の何れか一項に記載の４－１ＢＢＬ三量体含有抗原結合分子。
【請求項８】
標的細胞抗原がＣＤ１９である、請求項１から３の何れか一項に記載の４－１ＢＢＬ三量体含有抗原結合分子。
【請求項９】
ＣＤ１９に特異的に結合することができるＦａｂドメインが、
（ａ）（ｉ）配列番号：２９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号：３０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号：３１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含むＶＨドメインと、（ｉｖ）配列番号：３２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｖ）配列番号：３３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、及び（ｖｉ）配列番号：３４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含むＶＬドメイン、又は
（ｂ）（ｉ）配列番号：３５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号：３６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号：３７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含むＶＨドメインと、（ｉｖ）配列番号：３８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｖ）配列番号：３９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、及び（ｖｉ）配列番号：４０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含むＶＬドメイン
とを含む、請求項１から３又は８の何れか一項に記載の４－１ＢＢＬ三量体含有抗原結合分子。
【請求項１０】

ＣＤ１９に特異的に結合することができるＦａｂドメインが、配列番号：４１のアミノ酸配列を含む可変重鎖と、配列番号：４２のアミノ酸配列を含む可変軽鎖とを含むか、又はＦＡＰに特異的に結合することができるＦａｂドメインが、配列番号：４３のアミノ酸配列を含む可変重鎖と、配列番号：４４のアミノ酸配列を含む可変軽鎖とを含む、請求項１から３、８又は９の何れか一項に記載の４－１ＢＢＬ三量体含有抗原結合分子。

【請求項１１】

（ｉ）配列番号：１２０のアミノ酸配列を含む軽鎖、
（ｉｉ）配列番号：１０４のアミノ酸配列を含む融合ポリペプチド、及び
（ｉｉｉ）配列番号：１１９のアミノ酸配列を含む重鎖；
又は
（ｉ）配列番号：１２６のアミノ酸配列を含む軽鎖、
（ｉｉ）配列番号：１７４のアミノ酸配列を含む融合ポリペプチド、及び
（ｉｉｉ）配列番号：１２５のアミノ酸配列を含む重鎖
を含む、請求項１から３又は８から１０の何れか一項に記載の４－１ＢＢＬ三量体含有抗原結合分子。

【請求項１２】

標的細胞抗原がＣＥＡである、請求項１から３の何れか一項に記載の４－１ＢＢＬ三量体含有抗原結合分子。

【請求項１３】

ＣＥＡに特異的に結合することができるＦａｂドメインが、（ｉ）配列番号：４５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号：４６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号：４７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含むＶＨドメインと、（ｉｖ）配列番号：４８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｖ）配列番号：４９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、及び（ｖｉ）配列番号：５０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含むＶＬドメインとを含む、請求項１から３又は１２の何れか一項に記載の４－１ＢＢＬ三量体含有抗原結合分子。

【請求項１４】

ＣＥＡに特異的に結合することができるＦａｂドメインが、配列番号：５１のアミノ酸配列を含む可変重鎖と、配列番号：５２のアミノ酸配列を含む可変軽鎖とを含む、請求項１から３、１２又は１３の何れか一項に記載の４－１ＢＢＬ三量体含有抗原結合分子。

【請求項１５】

安定な会合が可能な第一及び第二サブユニットからなるＦｃドメインが、ＩｇＧドメイン、特にＩｇＧ１ドメインである、請求項１から１４の何れか一項に記載の４－１ＢＢＬ三量体含有抗原結合分子。

【請求項１６】

Ｆｃドメインが、Ｆｃ受容体、特にＦｃγ受容体への結合を減少させる一又は複数のアミノ酸置換を含む、請求項１から１５の何れか一項に記載の４－１ＢＢＬ三量体含有抗原結合分子。

【請求項１７】

Ｆｃドメインが、２３４位及び２３５位（ＫａｂａｔのＥＵインデックスによる番号付け）及び／又は３２９位（ＫａｂａｔのＥＵインデックスによる番号付け）にアミノ酸置換を含むＩｇＧ１ Ｆｃドメインである、請求項１から１６の何れか一項に記載の４－１ＢＢＬ三量体含有抗原結合分子。

【請求項１８】

請求項１から１７の何れか一項に記載の４－１ＢＢＬ三量体含有抗原結合分子をコードする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項１９】

請求項１８に記載の単離されたポリヌクレオチドを含むベクター、特に発現ベクター。

【請求項２０】

請求項１８に記載の単離されたポリヌクレオチド又は請求項１９に記載のベクターを含む

宿主細胞。
【請求項２１】
請求項２０に記載の宿主細胞を、抗原結合分子の発現に適した条件下で培養し、抗原結合分子を回収することを含む、請求項１から１７の何れか一項に記載の４－１ＢＢＬ三量体含有抗原結合分子の産生方法。
【請求項２２】
請求項１から１７の何れか一項に記載の４－１ＢＢＬ三量体含有抗原結合分子と少なくとも一種の薬学的に許容可能な賦形剤とを含有する薬学的組成物。
【請求項２３】
医薬として使用するための、請求項１から１７の何れか一項に記載の４－１ＢＢＬ三量体含有抗原結合分子、又は請求項２２に記載の薬学的組成物。
【請求項２４】
がんの治療における使用のための、請求項１から１７の何れか一項に記載の４－１ＢＢＬ三量体含有抗原結合分子、又は請求項２２に記載の薬学的組成物。
【請求項２５】
がんの治療のための医薬の製造のための、請求項１から１７の何れか一項に記載の４－１ＢＢＬ三量体含有抗原結合分子の使用。
【請求項２６】
個体における疾患を治療するための医薬であって、薬学的に許容される形態で請求項１から１７の何れか一項に記載の４－１ＢＢＬ三量体含有抗原結合分子を含有する組成物の治療的有効量を含む、医薬。
【請求項２７】
前記疾患ががんである、請求項２６に記載の医薬。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、（ａ）標的細胞抗原に特異的に結合することができるＦａｂドメイン、（ｂ）安定な会合が可能な第一及び第二サブユニットからなるＦｃドメイン、及び（ｃ）ペプチドリンカーによって互いに連結されたＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドと、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドであって、Ｆｃドメインのサブユニットの一つのＣ末端にそのＮ末端で融合された第一ポリペプチドと、Ｆｃドメインの他のサブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合された第二ポリペプチドを含む、新規なＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子であって、標的細胞抗原への結合に対して一価である、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子に関する。本発明は更にこれら分子を生成する方法と同分子を使用する方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
ＴＮＦ（腫瘍壊死因子）受容体スーパーファミリーの分子と相互作用するリガンドは、免疫系の機構及び機能において中心的役割を有している。免疫応答、造血及び形態形成等の通常の機能を制御する一方、ＴＮＦファミリーリガンド（サイトカインとも呼ばれる）は、腫瘍形成、移植片拒絶反応、敗血症性ショック、ウイルス複製、骨吸収、関節リウマチ及び糖尿病に役割を果たす（Aggarwal, 2003）。ＴＮＦリガンドファミリーは、「ＴＮＦ相同性ドメイン」（ＴＨＤ）と命名された保存Ｃ末端ドメインの存在により特徴付けられた、１９のＩＩ型（つまり、細胞内Ｎ末端及び細胞外Ｃ末端）膜貫通タンパク質をコードする１８の遺伝子を含む。このドメインは、受容体結合を担っており、従ってＴＮＦリガンドファミリーメンバーの生物活性に必須である。ファミリーメンバー間の配列同一性は約２０～３０％である（Bodmer, 2002）。ＴＮＦリガンドファミリーのメンバーは、自己集合性の非共有結合三量体としてその生物的機能を発揮する（Banner等, 1993）。従って、ＴＮＦファミリーリガンドは、ＴＮＦＲスーパーファミリーの対応する受容体に

結合してそれを活性化することができる三量体を形成する。
【０００３】
ＴＮＦ受容体スーパーファミリーのメンバーである４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）は、Ｔ細胞活性化によりその発現が誘導される分子として最初に同定された（Kwon及びWeissman, 1989）。その後の研究により、Ｔリンパ球及びＢリンパ球（Snell等, 2011；Zhang等, 2010）、ＮＫ細胞（Lin等, 2008）、ＮＫＴ細胞（Kim等, 2008）、単球（Kienzle及びvon Kempis, 2000；Schwarz等, 1995）、好中球（Heinisch等, 2000）、マスト細胞（Nishimoto等, 2005）及び樹状細胞、並びに内皮及び平滑筋細胞のような非造血性起源の細胞（Broll等, 2001；Olofsson等, 2008）における４－１ＢＢの発現が実証された。異なる細胞型における４－１ＢＢの発現は、多くの場合誘導性であり、様々な刺激性シグナル、例えばＴ細胞受容体（ＴＣＲ）又はＢ細胞受容体トリガー、並びに共刺激分子又は炎症誘発サイトカインの受容体を通して誘導されるシグナル伝達により駆動される（Diehl等, 2002；von Kempis等, 1997；Zhang等, 2010）。
【０００４】
４－１ＢＢリガンド（４－１ＢＢＬ又はＣＤ１３７Ｌ）の発現は、より限定されており、Ｂ細胞、樹状細胞（ＤＣ）及びマクロファージのようなプロフェッショナル抗原提示細胞（ＡＰＣ）上に観察される。４－１ＢＢＬの誘導性発現は、αβ及びγδ両方のＴ細胞サブセットを含むＴ細胞と内皮細胞に特徴的である（Shao及びSchwarz, 2011に概説）。
【０００５】
ＣＤ１３７シグナル伝達は、ＮＫ細胞のＩＦＮγ分泌及び増殖を刺激し（Buechele等, 2012；Lin等, 2008；Melero等, 1998）、またその生存率の上昇及びサイトカイン分泌能の増大により示されるようにＤＣ活性化を促進し、共刺激分子をアップレギュレートすることが知られている（Choi等, 2009；Futagawa等, 2002；Wilcox等, 2002）。しかし、ＣＤ１３７は、Ｔ細胞のＣＤ４＋及びＣＤ８＋両方のサブセットにおいてＴＣＲ誘導性活性化を調節する共刺激分子として最もよく特徴付けられる。ＴＣＲトリガーとの組み合わせで、アゴニスト４－１ＢＢ特異的抗体は、Ｔ細胞の増殖を増強し、リンホカイン分泌を刺激し、活性化により誘導された細胞死に対するＴリンパ球の感受性を低下させる（Snell等, 2011に概説）。
【０００６】
Ｔ細胞に対するインビトロでの４－１ＢＢ抗体のこれら共刺激効果と一致して、腫瘍を有するマウスへのその投与は、多くの実験的腫瘍モデルにおいて強力な抗腫瘍効果をもたらす（Melero等, 1997；Narazaki等, 2010）。しかし、４－１ＢＢは、通常、他の免疫調節化合物（Curran等, 2011；Guo等, 2013；Morales-Kastresana等, 2013；Teng等, 2009；Wei等, 2013）、化学療法薬剤（Ju等, 2008；Kim等, 2009）、腫瘍特異的ワクチン接種（Cuadros等, 2005；Lee等, 2011）又は放射線療法（Shi及びSiemann, 2006）と組み合わせて投与されたときにのみ抗腫瘍剤としてその有効性を示す。インビボでの枯渇実験により、４－１ＢＢ特異的抗体の抗腫瘍効果においてＣＤ８＋Ｔ細胞が最も重要な役割を果たすことが実証された。しかしながら、腫瘍モデル又は抗４－１ＢＢを含む併用療法によっては、ＤＣ、ＮＫ細胞又はＣＤ４＋Ｔ細胞などの他の細胞型の寄与が報告されている（Melero等, 1997；Murillo等, 2009；Narazaki等, 2010；Stagg等, 2011）。
【０００７】
異なるリンパ球サブセットに対するそれらの直接的な効果に加えて、４－１ＢＢアゴニストは、腫瘍血管内皮上の細胞間接着分子１（ＩＣＡＭ１）及び血管細胞接着分子１（ＶＣＡＭ１）の４－１ＢＢ媒介性アップレギュレーションにより、腫瘍において活性化Ｔ細胞の浸潤及び保持を誘導することもまたできる（Palazon等, 2011）。
【０００８】
４－１ＢＢトリガーはまた腫瘍微小環境における又は慢性感染の間の免疫寛容の破壊を生じる一因となりうる可溶性抗原への曝露により誘導されるＴ細胞アネルギーの状態を反転させうる（Wilcox等, 2004）。

【０００９】
４－１ＢＢアゴニスト抗体のインビボでの免疫調節特性は、抗体分子上に野生型Ｆｃ部分の存在を必要とし、これにより、ＴＮＦＲスーパーファミリーの他のアポトーシス誘導又は免疫調節メンバーに特異的なアゴニスト抗体について記載されているように（Li及びRavetch, 2011；Teng等, 2009）、Ｆｃ受容体結合がこのような試薬の薬理活性に必要とされる重要な事象として関与しているようである。しかし、機能的に活性なＦｃドメインを含む４－１ＢＢ特異的アゴニスト抗体の全身投与はまた肝毒性に関連付けられるＣＤ８＋Ｔ細胞の増殖を誘導し（Dubrot等, 2010）、このような増殖は、マウスにおいて機能的Ｆｃ受容体の非存在下で減少されるか又は有意に改善される。ヒト臨床治験では（ＣｌｉｎｉｃａｌＴｒｉａｌｓ．ｇｏｖ，ＮＣＴ００３０９０２３）、三週に一度１２週間にわたって投与されたＦｃコンピテント４－１ＢＢアゴニスト抗体（ＢＭＳ－６６３５１３）は、メラノーマ、卵巣癌又は腎細胞癌を有する患者において疾患の安定化を誘導した。しかし、別の治験（ＮＣＴ００６１２６６４）において投与された同じ抗体は、グレード４の肝炎を引き起こし、治験の終了に至った（Simeone及びAscierto, 2012）。
【００１０】
まとめると、入手可能な前臨床及び臨床データは、有効な４－１ＢＢアゴニストが臨床的に強く求められていることを明らかに実証している。しかしながら、新世代の薬物候補は、造血細胞及び内皮細胞の表面上で４－１ＢＢに効果的に結合するだけでなく、制御不能な副作用を避けるために、Ｆｃ受容体に対する結合以外の機序によりこれを達成することができなければならない。後者は、腫瘍特異的又は腫瘍関連部分に対する優先的結合及びそこでのオリゴマー形成を通して達成されうる。
【００１１】
４－１ＢＢリガンドの一つの細胞外ドメインと単鎖抗体断片からなる融合タンパク質（Mueller等, 2008；Hornig等, 2012）又は重鎖のＣ末端に融合した単一の４－１ＢＢリガンド（Zhang等, 2007）が作製されている。国際公開第２０１０／０１００５１号には、互いに結合しかつ抗体部分に融合した三つのＴＮＦリガンドエクトドメインからなる融合タンパク質の作製が開示されている。
【００１２】
しかしながら、腫瘍特異的又は腫瘍関連標的に対する優先的結合能を有するＦａｂドメインと共刺激ＴＮＦリガンド三量体形成能を有する部分とを組み合わせ、薬剤的に有用であるために十分な安定性を同時に有する新規の抗原結合分子に対する需要が依然として存在する。本発明の抗原結合分子は両方を兼ね備え、驚くべきことに、三量体、よって生物学的に活性なＴＮＦリガンドを提供するが、三量体形成ＴＮＦリガンドエクトドメインのうちの一つは、分子の他の二つのＴＮＦリガンドエクトドメインとは別のポリペプチド上に位置している。驚くべきことに、標的細胞抗原に特異的に結合することができる一つのＦａｂドメインが、好ましい標的特性を提供するのに十分であることが見出された。この発明の抗原結合分子は特に安定で堅牢である。
【発明の概要】
【００１３】
一態様では、本発明は、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子であって、
（ａ）標的細胞抗原に特異的に結合することができる一つのＦａｂドメイン、
（ｂ）安定な会合が可能な第一及び第二サブユニットからなるＦｃドメイン、及び
（ｃ）ペプチドリンカーによって互いに連結されたＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドと、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドであって、Ｆｃドメインのサブユニットの一つのＣ末端にそのＮ末端で融合された第一ポリペプチドと、Ｆｃドメインの他のサブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合された第二ポリペプチドを含み、標的細胞抗原への結合に対して一価である、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供する。
【００１４】

特定の態様では、ＴＮＦリガンドファミリーメンバーは、ヒトＴ細胞活性化を共刺激するものである。従って、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、（ａ）標的細胞抗原に特異的に結合することができる一つのＦａｂドメイン、（ｂ）安定な会合が可能な第一及び第二サブユニットからなるＦｃドメイン、及び（ｃ）ペプチドリンカーによって互いに連結されたＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドと、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドであって、Ｆｃドメインのサブユニットの一つのＣ末端にそのＮ末端で融合された第一ポリペプチドと、Ｆｃドメインの他のサブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合された第二ポリペプチドを含み、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は標的細胞抗原への結合に対して一価であり、ＴＮＦリガンドファミリーメンバーはヒトＴ細胞活性化を共刺激する。より詳細には、ＴＮＦリガンドファミリーメンバーは、４－１ＢＢＬ及びＯＸ４０Ｌから選択される。

【００１５】

一態様では、ＴＮＦリガンドファミリーメンバーは４－１ＢＢＬである。

【００１６】

更なる態様では、ＴＮＦリガンドファミリーメンバーのエクトドメインは、配列番号：１、配列番号：２、配列番号：３、配列番号：４、配列番号：５、配列番号：６、配列番号：７及び配列番号：８からなる群から選択されるアミノ酸配列、特に配列番号：１又は配列番号：５のアミノ酸配列を含む。

【００１７】

更なる態様では、本発明のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、

（ａ）標的細胞抗原に特異的に結合することができる一つのＦａｂドメイン、

（ｂ）安定な会合が可能な第一及び第二サブユニットからなるＦｃドメイン、及び

（ｃ）ペプチドリンカーによって互いに連結されたＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドと、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドであって、Ｆｃドメインのサブユニットの一つのＣ末端にそのＮ末端で融合された第一ポリペプチドと、Ｆｃドメインの他のサブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合された第二ポリペプチドを含み、ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドが、配列番号：９及び配列番号：１０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドが、配列番号：１及び配列番号：５からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一態様では、ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドが配列番号：９のアミノ酸配列を含み、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドが、配列番号：１のアミノ酸配列を含む。特定の態様では、ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドが配列番号：１０のアミノ酸配列を含み、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドが配列番号：５のアミノ酸配列を含む。

【００１８】

更なる態様では、ＴＮＦリガンドファミリーメンバーがＯＸ４０Ｌである、上述のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。一態様では、ＴＮＦリガンドファミリーメンバーのエクトドメインが、配列番号：１１及び配列番号：１２からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。

【００１９】

一態様では、本発明は、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子であって、

（ａ）標的細胞抗原に特異的に結合することができる一つのＦａｂドメイン、

（ｂ）安定な会合が可能な第一及び第二サブユニットからなるＦｃドメイン、及び

（ｃ）ペプチドリンカーによって互いに連結されたＴＮＦリガンドファミリーメンバーの

二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドと、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドであって、Ｆｃドメインのサブユニットの一つのＣ末端にそのＮ末端で融合された第一ポリペプチドと、Ｆｃドメインの他のサブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合された第二ポリペプチドを含む、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供する。従って、本発明は、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が標的細胞抗原への結合に対して一価である、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子に関する。

【００２０】

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

【００２１】

特定の態様では、標的細胞抗原は線維芽細胞活性化タンパク質（ＦＡＰ）である。

【００２２】

一態様では、本発明は、ＦＡＰに特異的に結合することができるＦａｂドメインが、
（ａ）（ｉ）配列番号：１３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号：１４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び（ｉｉｉ）配列番号：１５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含むＶＨドメインと、（ｉｖ）配列番号：１６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｖ）配列番号：１７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、及び（ｖｉ）配列番号：１８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含むＶＬドメイン、又は
（ｂ）（ｉ）配列番号：１９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号：２０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号：２１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含むＶＨドメインと、（ｉｖ）配列番号：２２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｖ）配列番号：２３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、及び（ｖｉ）配列番号：２４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含むＶＬドメイン
を含む、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供する。

【００２３】

特定の態様では、本発明は、ＦＡＰに特異的に結合することができるＦａｂドメインが、（ｉ）配列番号：１９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号：２０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号：２１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含むＶＨドメインと、（ｉｖ）配列番号：２２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｖ）配列番号：２３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、及び（ｖｉ）配列番号：２４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含むＶＬドメインを含む、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供する。

【００２４】

更なる態様では、ＦＡＰに特異的に結合することができるＦａｂドメインが、配列番号：２５のアミノ酸配列を含む可変重鎖と、配列番号：２６のアミノ酸配列を含む可変軽鎖を含むか、又はＦＡＰに特異的に結合することができるＦａｂドメインが、配列番号：２７のアミノ酸配列を含む可変重鎖と、配列番号：２８のアミノ酸配列を含む可変軽鎖を含む、上述のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。

【００２５】

他の特定の態様では、標的細胞抗原はＣＤ１９である。

【００２６】

一態様では、本発明は、ＣＤ１９に特異的に結合することができるＦａｂドメインが、
（ａ）（ｉ）配列番号：２９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号：３０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号：３１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含むＶＨドメインと、（ｉｖ）配列番号：３２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｖ）配列番号：３３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、及び（ｖｉ）配列番号：３４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含むＶＬドメイン、又は

（ｂ）（ｉ）配列番号：３５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号：３６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号：３７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含むＶＨドメインと、（ｉｖ）配列番号：３８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｖ）配列番号：３９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、及び（ｖｉ）配列番号：４０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含むＶＬドメイン
を含む、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供する。

【００２７】

特定の態様では、本発明は、ＣＤ１９に特異的に結合することができるＦａｂドメインが、（ｉ）配列番号：３５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号：３６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号：３７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含むＶＨドメインと、（ｉｖ）配列番号：３８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｖ）配列番号：３９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、及び（ｖｉ）配列番号：４０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含むＶＬドメインを含む、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供する。

【００２８】

更なる態様では、ＣＤ１９に特異的に結合することができるＦａｂドメインが、配列番号：４１のアミノ酸配列を含む可変重鎖と、配列番号：４２のアミノ酸配列を含む可変軽鎖を含むか、又はＦＡＰに特異的に結合することができるＦａｂドメインが、配列番号：４３のアミノ酸配列を含む可変重鎖と、配列番号：４４のアミノ酸配列を含む可変軽鎖を含む、上述のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。

【００２９】

他の特定の態様では、標的細胞抗原はＣＥＡである。

【００３０】

一態様では、本発明は、ＣＥＡに特異的に結合することができるＦａｂドメインが、（ｉ）配列番号：４５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号：４６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号：４７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含むＶＨドメインと、（ｉｖ）配列番号：４８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｖ）配列番号：４９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、及び（ｖｉ）配列番号：５０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含むＶＬドメインを含む、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供する。

【００３１】

特定の態様では、本発明は、ＣＥＡに特異的に結合することができるＦａｂドメインが、配列番号：５１のアミノ酸配列を含む可変重鎖と、配列番号：５２のアミノ酸配列を含む可変軽鎖を含む、上述のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。

【００３２】

更なる態様では、ＦｃドメインはＩｇＧ、特にＩｇＧ１ ＦｃドメインまたはＩｇＧ４ ＦｃドメインＦｃドメインである。より具体的には、ＦｃドメインはＩｇＧ１ ＦｃドメインＦｃドメインである。

【００３３】

特に、本発明のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、標的細胞抗原に特異的に結合することができるＦａｂドメインを含み、ＦａｂドメインのＶＨ及びＣＨ１ドメインが、ＦｃドメインＦｃドメイン中のＣＨ２ドメインのＮ末端にＣ末端で融合している。

【００３４】

別の態様では、本発明は、
（ｂ）安定な会合が可能な第一及び第二サブユニットからなるＦｃドメインを含み、該ＦｃドメインＦｃドメインが、Ｆｃ受容体、特にＦｃγ受容体への結合を減少させる一又は複数のアミノ酸置換を含む、上述のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子に関する。

【００３５】

特に、ＦｃドメインＦｃドメインは、ＩｇＧ重鎖の２３４位及び２３５位（ＫａｂａｔのＥＵインデックスによる番号付け）及び／又は３２９位（ＫａｂａｔのＥＵインデックスによる番号付け）にアミノ酸置換を含む。より具体的には、アミノ酸置換Ｌ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ及び

Ｐ３２９Ｇ（ＫａｂａｔのＥＵインデックスによる番号付け）を有するＩｇＧ１ Ｆｃドメインを含む、本発明に係る三量体ＴＮＦファミリーリガンド含有抗原結合分子が提供される。

【００３６】

更なる態様では、Ｆｃドメインは、Ｆｃドメインの第一及び第二サブユニットの会合を促進する修飾を含む。特定の態様では、Ｆｃドメインの第一サブユニットがノブのアミノ酸置換Ｓ３５４Ｃ及びＴ３６６Ｗ（ＫａｂａｔのＥＵインデックスによる番号付け）を含み、Ｆｃドメインの第二サブユニットがホールのアミノ酸置換Ｙ３４９Ｃ、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ及びＹ４０７Ｖ（ＫａｂａｔのＥＵインデックスによる番号付け）を含む、上述のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。

【００３７】

更なる態様では、ペプチドリンカーによって互いに連結されたＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドがＦｃドメイン（ホール）の第二サブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合され、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドがＦｃドメイン（ノブ）の第一サブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合されている、上述のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。

【００３８】

他の態様では、ペプチドリンカーによって互いに連結されたＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドがＦｃドメイン（ノブ）の第一サブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合され、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドがＦｃドメイン（ホール）の第二サブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合されている、上述のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。

【００３９】

一態様では、本発明は、標的細胞抗原に特異的に結合することができるＦａｂドメインがＦｃドメイン（ノブ）の第一サブユニットのＮ末端にＣ末端で融合されている、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供する。他の態様では、標的細胞抗原に特異的に結合することができるＦａｂドメインがＦｃドメイン（ホール）の第二サブユニットのＮ末端にＣ末端で融合されている、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。

【００４０】

特定の態様では、標的細胞抗原に特異的に結合することができるＦａｂドメインがＦｃドメイン（ノブ）の第一サブユニットのＮ末端にＣ末端で融合され、ペプチドリンカーによって互いに連結されたＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドが、Ｆｃドメイン（ホール）の第二サブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合され、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドがＦｃドメイン（ノブ）の第一サブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合されている、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。

【００４１】

更なる態様では、

（ａ）標的細胞抗原に特異的に結合することができるＦａｂドメイン、

（ｂ）安定な会合が可能な第一及び第二サブユニットからなるＦｃドメイン、及び

（ｃ）ペプチドリンカーによって互いに連結されたＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドと、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドであって、ノブ変異を含むＦｃドメインの第二サブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合された第一ポリペプチドと、ホール変異を含むＦｃドメインの第一サブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合された第二ポリペプチドを含み、標的細胞抗原に特異的に結合することができる

ＦａｂドメインのＶＨ及びＣＨ１ドメインが、ノブ変異を含むＦｃドメインの第二サブユニットのＮ末端にＣ末端で融合された、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。

【００４２】

別の態様では、

（ａ）標的細胞抗原に特異的に結合することができるＦａｂドメイン、

（ｂ）安定な会合が可能な第一及び第二サブユニットからなるＦｃドメイン、及び

（ｃ）ペプチドリンカーによって互いに連結されたＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドと、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドであって、ノブ変異を含むＦｃドメインの第二サブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合された第一ポリペプチドと、ホール変異を含むＦｃドメインの第一サブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合された第二ポリペプチドを含み、標的細胞抗原に特異的に結合することができるＦａｂドメインのＶＨ及びＣＨ１ドメインが、ホール変異を含むＦｃドメインの第一サブユニットのＮ末端にＣ末端で融合された、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。

【００４３】

更に別の態様では、

（ａ）標的細胞抗原に特異的に結合することができるＦａｂドメイン、

（ｂ）安定な会合が可能な第一及び第二サブユニットからなるＦｃドメイン、及び

（ｃ）ペプチドリンカーによって互いに連結されたＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドと、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドであって、ホール変異を含むＦｃドメインの第一サブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合された第一ポリペプチドと、ノブ変異を含むＦｃドメインの第二サブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合された第二ポリペプチドを含み、標的細胞抗原に特異的に結合することができるＦａｂドメインのＶＨ及びＣＨ１ドメインが、ノブ変異を含むＦｃドメインの第二サブユニットのＮ末端にＣ末端で融合された、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。

【００４４】

加えて、

（ａ）標的細胞抗原に特異的に結合することができるＦａｂドメイン、

（ｂ）安定な会合が可能な第一及び第二サブユニットからなるＦｃドメイン、及び

（ｃ）ペプチドリンカーによって互いに連結されたＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドと、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドであって、ホール変異を含むＦｃドメインの第一サブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合された第一ポリペプチドと、ノブ変異を含むＦｃドメインの第二サブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合された第二ポリペプチドを含み、標的細胞抗原に特異的に結合することができるＦａｂドメインのＶＨ及びＣＨ１ドメインが、ホール変異を含むＦｃドメインの第一サブユニットのＮ末端にＣ末端で融合された、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。

【００４５】

更なる態様では、本発明は、（ｄ）標的細胞抗原に特異的に結合することができないＦａｂドメインを更に含む、上述のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供する。よって、本発明は、

（ａ）標的細胞抗原に特異的に結合することができるＦａｂドメイン、

（ｂ）安定な会合が可能な第一及び第二サブユニットからなるＦｃドメイン、

（ｃ）ペプチドリンカーによって互いに連結されたＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドと、前記ＴＮＦリガンドファ

ミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドであって、Ｆｃドメインのサブユニットの一つのＣ末端にそのＮ末端で融合された第一ポリペプチドと、Ｆｃドメインの他のサブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合された第二ポリペプチド、及び
（ｄ）標的細胞抗原に特異的に結合することができないＦａｂドメイン
を含む、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供する。
【００４６】
本発明の別の態様によれば、上述のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子をコードする単離されたポリヌクレオチドが提供される。本発明は、本発明の単離されたポリヌクレオチドを含むベクター、特に発現ベクターと、本発明の単離されたポリヌクレオチド又はベクターを含む宿主細胞を更に提供する。幾つかの実施態様では、宿主細胞は真核細胞、特に哺乳動物細胞である。
【００４７】
別の態様では、（ｉ）本発明の宿主細胞を、抗原結合分子の発現に適した条件下で培養する工程、及び（ｉｉ）抗原結合分子を回収する工程を含む、本発明のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を産生する方法が提供される。本発明はまた本発明の方法によって産生されたＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を包含する。
【００４８】
本発明は更に本発明のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子と少なくとも一種の薬学的に許容可能な賦形剤とを含有する薬学的組成物を提供する。
【００４９】
また本発明には、医薬として使用するための、本発明のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子、又は本発明の薬学的組成物が包含される。一態様では、それを必要とする個体における疾患の治療に使用するための、本発明のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子、又は本発明の薬学的組成物が提供される。本発明はまた（ｉ）Ｔ細胞応答の刺激、（ｉｉ）活性化Ｔ細胞の生存の支援、（ｉｉｉ）感染症の治療、（ｉｖ）がんの治療、（ｖ）がんの進行の遅延化、又は（ｖｉ）がんに罹患している患者の生存の延長において使用するための、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子、又は本発明の薬学的組成物を提供する。特定の実施態様では、がんの治療に使用するための、本発明のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子、又は本発明の薬学的組成物が提供される。
【００５０】
またそれを必要とする個体における疾患の治療のための医薬の製造における、特にがんの治療のための医薬の製造における本発明のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子の使用、並びに薬学的に許容される形態で本発明のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を含有する組成物の治療的有効量を個体に投与することを含む個体において疾患を治療する方法が提供される。本発明のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子の使用がまた提供される。特定の実施態様では、疾患はがんである。本発明はまた細胞傷害性Ｔ細胞活性をアップレギュレート又は延長するための医薬の製造における、本発明のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子又は本発明の薬学的組成物の使用を提供する。また個体に有効量の本発明のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子、又は本発明の薬学的組成物を投与することを含む、がんを有する個体における細胞傷害性Ｔ細胞活性をアップレギュレート又は延長する方法もまた提供される。上記の実施態様の何れにおいても、個体は、好ましくは哺乳動物、特にヒトである。
【図面の簡単な説明】
【００５１】
【図１】図１は、分断三量体ヒト４－１ＢＢリガンドのアセンブリーの構成要素を示す。図（１Ａ）は、ペプチドリンカー（Ｇ４Ｓ）$_2$によってヒトＣＨ３ドメインのＣ末端にＮ末端で融合された二量体４－１ＢＢリガンドを含むポリペプチドを示し、図（１Ｂ）は、ペプチドリンカー（Ｇ４Ｓ）$_2$によってＦｃドメイン内の他のＣＨ３ドメインのＣ末端に

Ｎ末端で融合された単量体４－１ＢＢリガンドを含むポリペプチドを示す。図（１Ｃ）は、ペプチドリンカー（Ｇ４Ｓ）$_2$によってヒトＣＨ３ドメインのＣ末端にＮ末端で融合された二量体ＯＸ４０リガンドを示し、図（１Ｄ）は、ペプチドリンカー（Ｇ４Ｓ）$_2$によってＦｃドメイン内の他のヒトＣＨ３ドメインのＣ末端にＮ末端で融合された単量体リガンドを示す。

【図２】図２Ａ～２Ｄは、本発明の一価の標的４－１ＢＢＬ三量体含有抗原結合分子の構造の模式図である。図２Ａには、標的細胞抗原に特異的に結合することができるＦａｂドメインがＦｃノブ鎖に結合され、二量体４－１ＢＢＬがＦｃホール鎖のＣ末端に融合され、単量体４－１ＢＢＬがＦｃノブ鎖のＣ末端に融合されたタイプｘ．１１のコンストラクトとしての抗原結合分子が示される。コンストラクト２．１１、１．１１、３．１１、４．１１、５．１１及び対照Ｈが対応する実施例である。タイプｘ．１２のコンストラクトが図２Ｂに示される。標的細胞抗原に特異的に結合することができるＦａｂドメインがＦｃノブ鎖に結合され、二量体４－１ＢＢＬがまたＦｃノブ鎖のＣ末端に融合され、単量体４－１ＢＢＬがＦｃホール鎖のＣ末端に融合されている。コンストラクト２．１２、１．１２、３．１２、４．１２、５．１２及び対照Ｉがこれらの抗原結合分子の実施例である。図２Ｃには、標的細胞抗原に特異的に結合することができるＦａｂドメインがＦｃホール鎖に結合され、二量体４－１ＢＢＬがＦｃホール鎖のＣ末端に融合され、単量体４－１ＢＢＬがＦｃノブ鎖のＣ末端に融合されたタイプｘ．１３のコンストラクトとして抗原結合分子が示されている。コンストラクト２．１３、１．１３、３．１３、４．１３、５．１３及び対照Ｊが対応する実施例である。図２Ｄは、標的細胞抗原に特異的に結合することができるＦａｂドメインがＦｃホール鎖に結合され、二量体４－１ＢＢＬがまたＦｃノブ鎖のＣ末端に融合され、単量体４－１ＢＢＬがＦｃホール鎖のＣ末端に融合されたタイプｘ．１４のコンストラクトに関する。コンストラクト２．１４、１．１４、３．１４、４．１４、５．１４及び対照Ｋがその実施例である。これら全てのコンストラクトの調製は実施例１に記載される。ＶＨ、ＶＬ、ＣＬ及びＣＨ１ドメインはＦａｂドメインを符号で表し、太い黒色の点はノブ・イントゥ・ホール修飾を表す。

【図３】図３Ａ～３Ｄは、ここに記載の更なる分子の概略図である。図３Ａは、二つのＤＰ４７（生殖系列）非標的Ｆａｂドメインを有するｈｕ ＩｇＧ１である対照Ｆを示す。図３Ｂは、二量体４－１ＢＢＬがＦｃノブ重鎖のＣＬドメインのＮ末端に融合され、単量体４－１ＢＢＬが軽鎖のＣＨ１ドメインのＮ末端に融合された、非標的４－１ＢＢＬ三量体含有抗原結合分子である対照Ｄを示す。*は、ＣＨ１及びＣＬドメインにおけるアミノ酸修飾（いわゆる荷電残基）を符号で表している。図３Ｃは、図３Ｂと同じコンストラクトを示すが、ＤＰ４７ ＦａｂドメインがＦＡＰ（４Ｂ９）Ｆａｂドメインによって置換されている。これらのコンストラクトの調製と産生は、実施例１．１１に記載される。太い黒い点はノブ・イントゥ・ホール修飾を表す。図３Ｄは、実施例３．１で調製された単量体４－１ＢＢ Ｆｃ（ｋｉｈ）コンストラクトの図である。

【図４Ａ－Ｂ】図４Ａは、本発明の一価の標的分断三量体Ｃ末端４－１ＢＢリガンド含有抗原結合分子の同時結合のためのＳＰＲ実験のセットアップを示す。ＦＡＰ（４Ｂ９）標的分断４－１ＢＢＬ（７１－２４８）Ｆｃ ｋｉｈ抗原結合分子コンストラクト２．１１のヒト４－１ＢＢ及びヒトＦＡＰへの同時結合が図４Ｂに示される。

【図４Ｃ－Ｄ】ＣＤ１９（８Ｂ８－０１８）標的分断４－１ＢＢＬ（７１－２４８）Ｆｃ ｋｉｈ抗原結合分子（コンストラクト３．１１）のヒト４－１ＢＢ及びヒトＣＤ１９への同時結合が図４Ｃに示される。ＣＤ１９（８Ｂ８－２Ｂ１１）標的分断４－１ＢＢＬ（７１－２４８）Ｆｃ ｋｉｈ抗原結合分子（コンストラクト４．１１）のヒト４－１ＢＢ及びヒトＣＤ１９への同時結合が図４Ｄに示される。

【図５】図５Ａ～５Ｄは、標的細胞抗原に結合することができない更なるＦａｂドメインを含む本発明の一価の標的４－１ＢＢＬ三量体含有抗原結合分子の構造の概略図である。図５Ａには、標的細胞抗原（ＤＰ４７生殖系列）に特異的に結合することができないＦａｂドメインがＦｃノブ鎖に結合され、抗原（ＦＡＰ）に特異的に結合することができるＦａｂドメインがＦｃホール鎖に連結され、二量体４－１ＢＢＬがＦｃホール鎖のＣ末端に

融合され、単量体４－１ＢＢＬがＦｃノブ鎖のＣ末端に融合されたタイプｘ．１５のコンストラクトとして抗原結合分子が示されている。コンストラクト２．１５がその実施例である。タイプｘ．１６のコンストラクトが図５Ｂに示される。標的細胞抗原（ＤＰ４７生殖系列）に特異的に結合することができないＦａｂドメインがＦｃノブ鎖に結合され、抗原（ＦＡＰ）に特異的に結合することができるＦａｂドメインがＦｃホール鎖に連結され、二量体４－１ＢＢＬがまたＦｃノブ鎖のＣ末端に融合され、単量体４－１ＢＢＬがＦｃホール鎖のＣ末端に融合されている。コンストラクト２．１６がその実施例である。図５Ｃには、標的細胞抗原に特異的に結合することができるＦａｂドメインがＦｃノブ鎖に結合され、標的細胞抗原（ＤＰ４７生殖系列）に特異的に結合することができないＦａｂドメインがＦｃホール鎖に連結され、二量体４－１ＢＢＬがＦｃホール鎖のＣ末端に融合され、単量体４－１ＢＢＬがＦｃノブ鎖のＣ末端に融合さたタイプｘ．１７のコンストラクトとして抗原結合分子が示されている。コンストラクト２．１７がその実施例である。図５Ｄは、標的細胞抗原に特異的に結合することができるＦａｂドメインがＦｃノブ鎖に結合され、標的細胞抗原（ＤＰ４７生殖系列）に特異的に結合することができないＦａｂドメインがＦｃホール鎖に結合され、二量体４－１ＢＢＬがまたＦｃノブ鎖のＣ末端に融合され、単量体４－１ＢＢＬがＦｃホール鎖のＣ末端に融合されたタイプｘ．１８のコンストラクトに関する。コンストラクト２．１８がその実施例である。これら全てのコンストラクトの調製は実施例４に記載される。

【図６】図６Ａは、ＤＰ４７／本発明の一価のＦＡＰ標的分断三量体Ｃ末端４－１ＢＢリガンド含有抗原結合分子の同時結合のためのＳＰＲ実験のセットアップを示す。ＤＰ４７／ＦＡＰ（４Ｂ９）標的分断４－１ＢＢＬ（７１－２５４）Ｆｃ ｋｉｈ抗原結合分子コンストラクト２．１５のヒト４－１ＢＢ及びヒトＦＡＰへの同時結合が図６Ｂに示される。

【図７Ａ－Ｄ】図７Ａ～７Ｈには、新鮮に単離されたＰＢＭＣへのＦＡＰ標的分断三量体４－１ＢＢリガンドＦｃ融合抗原結合分子の結合が示されている。示されているのは、試験されたコンストラクトの濃度に対するＰＥコンジュゲート二次検出抗体の蛍光強度の幾何（ジオ）平均である。陰性対照として対照Ｆ及び対照Ｄを、陽性対照としてコンストラクト２．４（実施例１．１１に記載）を使用した。図７Ａ～７Ｄには、コンストラクト２．１１の結合が示され、図７Ｅ～７Ｈには、コンストラクト２．１５の結合が示されている。コンストラクト２．１１の構造は図２Ａに示され、コンストラクト２．１５の構造は図５Ａに示されている。結合は、新鮮なヒトＣＤ４５＋ＣＤ３＋ＣＤ８ｎｅｇＣＤ４＋Ｔ細胞（図７Ａ又は７Ｅ）、新鮮なヒトＣＤ４５＋ＣＤ３＋ＣＤ４ｎｅｇＣＤ８＋Ｔ細胞（図７Ｂ又は７Ｆ）、新鮮なヒトＣＤ４５＋ＣＤ３＋ＣＤ４ｎｅｇＣＤ８ｎｅｇγδＴ細胞（図７Ｃ又は７Ｇ）及びＣＤ４５＋ＣＤ３ｎｅｇＣＤ１９＋Ｂ細胞（図７Ｄ又は７Ｈ）でモニターした。新鮮な単離ＰＢＭＣの大部分が４－１ＢＢ又はＦＡＰを発現しないので、結合は検出できなかった。

【図７Ｅ－Ｈ】上記

【図８Ａ－Ｃ】図８Ａ～８Ｆは、ＦＡＰ標的分断三量体４－１ＢＢリガンドＦｃ融合抗原結合分子の活性化ヒトＰＢＭＣへの結合を示す。試験されたコンストラクトの濃度に対するＰＥコンジュゲート二次検出抗体の蛍光強度の幾何平均が示される。陰性対照として対照Ｆ及び対照Ｄを、陽性対照として実施例１．１１に記載のコンストラクト２．４を使用した。図８Ａ～８Ｃには、コンストラクト２．１１の結合が、図８Ｄ～８Ｆには、コンストラクト２．１５の結合が示される。アゴニスト抗ヒトＣＤ２８及び抗ヒトＣＤ３抗体４－１ＢＢでの活性化後、４－１ＢＢ発現はＣＤ３＋ＣＤ８＋Ｔ細胞の大部分でアップレギュレートされ、大多数のＣＤ３＋ＣＤ４＋及びＣＤ３＋ＣＤ４ｎｅｇＣＤ８ｎｅｇγδＴ細胞ではアップレギュレート度合いは少ない。融合４－１ＢＢ分断三量体リガンドを含む全てのコンストラクト（対照Ｄ、コンストラクト２．４、コンストラクト２．１１及び２．１５）は、それらがＦＡＰ（４Ｂ９）標的（コンストラクト２．４及び２．１１）か又はＤＰ４７非標的（対照Ｄ）かに依存しないで、ヒト４－１ＢＢと非常に類似した親和性で結合するのに対し、融合４－１ＢＢ分断三量体リガンドを伴わない非標的分子（対照Ｆ）は活性化ヒトＴ細胞に結合しない。

【図８Ｄ－Ｆ】上記
【図９Ａ－Ｂ】図９Ａ～９Ｄは、ヒト－ＦＡＰ発現ヒトメラノーマＭＶ－３細胞及びＷＭ－２６６－４細胞への、ＦＡＰ標的又は非標的分断三量体ヒト４－１ＢＢリガンドＦｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子の結合を示す。結合は、Ｒ－フィコエリトリン－蛍光色素コンジュゲート抗ヒトＩｇＧ ＦｃγＦ特異的ヤギＩｇＧ Ｆ（ａｂ’）２断片で検出した。陰性対照として対照Ｆ及びＤを、陽性対照として実施例１．１１に記載のコンストラクト２．４を使用した。試験されたコンストラクト及び対照の濃度に対する蛍光強度の幾何平均が示される。図９Ａ（ＭＶ－３細胞）及び９Ｂ（ＷＭ－２６６－４細胞）には、対照分子と比較したコンストラクト２．１１の結合が示され、図９Ｃ（ＭＶ－３細胞）及び９Ｄ（ＷＭ－２６６－４細胞）には、対照分子と比較したコンストラクト２．１５の結合が示されている。全てのＦＡＰ標的コンストラクトは、ヒトＦＡＰと同様の親和性で結合する。
【図９Ｃ－Ｄ】上記
【図１０】図１０は、レポーター細胞株を使用する実施例６．３に記載のＮＦｋＢ活性アッセイの一般的原理を例証するスキームを示す。示されるのは、ヒト４－１ＢＢ発現ＨｅＬａレポーター細胞株を用いてセットアップされた活性化アッセイである。レポーター細胞上に発現された４－１ＢＢの架橋がＮＦκＢ活性化及びＮＦκＢ媒介ルシフェラーゼ発現を誘導する。細胞の溶解後、ルシフェラーゼが、ルシフェリンのオキシルシフェリンへの酸化を触媒しうる。この化学反応は、ＮＦκＢ媒介ルシフェラーゼ発現の強度と正の相関があり、発光強度（放出光単位）によって測定することができる。
【図１１】図１１には、ＦＡＰ標的４－１ＢＢリガンド三量体含有Ｆｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子によるＮＦκＢシグナル伝達経路の活性化が、ＦＡＰ発現標的細胞へのその結合に厳密に依存することが示されている。ヒト４－１ＢＢ発現ＮＦκＢレポーターＨｅＬａ細胞を、異なるレベルの細胞表面ＦＡＰ発現を示す標記の腫瘍細胞と共培養した。放出光単位（ＵＲＬ）が０．５ｓ／ウェルで測定され、コンストラクト２．１１又はコンストラクト２．１５又は（陽性対照として）コンストラクト２．４又は（陰性対照として）対照Ｄ又はＦの使用濃度に対してプロットされる。ヒト４－１ＢＢ発現ＨｅＬａ－レポーター細胞を、架橋ヒト－ＦＡＰ発現ヒトメラノーマ細胞株ＭＶ－３の不在下（図１１Ａ）又は存在下（図１１Ｂ参照）又は３Ｔ３－ｈｕＦＡＰクローン１９の存在下（図１１Ｃ参照）で６時間インキュベートした後、ルシフェラーゼ活性を、実施例６．３に記載のように評価した。腫瘍細胞に対する４－１ＢＢ発現ＨｅＬａレポーター細胞の細胞比は、各セットアップに示される。
【図１２】図１２は、実施例６．４に記載されているヒトＰＢＭＣ活性化アッセイの概略スキームを示す。ＰＢＭＣの活性化は、ＦＡＰ発現線維芽細胞、アゴニスト抗ヒトＣＤ３抗体及び二重特異性抗ＦＡＰ分断三量体４－１ＢＢＬ融合抗原結合分子コンストラクト２．１１の存在下で達成される。プレート中の１ウェル当たりの内容物は、４５Ｇｙ照射の２×１０^{4}のＮＩＨ／３Ｔ３－ヒトＦＡＰクローン１９、７．５×１０^{6}のＣＦＳＥ標識ヒトＰＢＭＣ、０．５ｎＭのアゴニスト抗ヒトＣＤ３ヒトＩｇＧ ｗｔ（クローンＶ９）及び１０$^{-5}$ｎＭ～１０ｎＭの滴定濃度のコンストラクト２．１１、コンストラクト２．４、対照Ｄ又は対照Ｆであった。インキュベーション時間は４日間であった。
【図１３】図１３Ａ及び１３Ｂには、ＦＡＰ＋線維芽細胞、アゴニストＣＤ３抗体及びＦＡＰ標的分断三量体４－１ＢＢＬ融合分子の存在下でのヒトＰＢＭＣ活性化アッセイの結果が示されている。ＣＤ２５及びＣＤ１３７（４－１ＢＢ）を発現するＣＤ８＋Ｔ細胞のパーセンテージが、コンストラクト２．１１又は陽性対照としてコンストラクト２．４又は陰性対照分子として対照Ｄ及び対照Ｆの使用濃度に対してプロットされている（実施例１．１１参照）。
【図１４】図１４は、ＮＬＶ－ペプチドをパルスしたＦＡＰ発現ＭＶ－３ヒトメラノーマ細胞及び二重特異性抗ＦＡＰ分断三量体４－１ＢＢＬ融合分子コンストラクト２．１１の存在下でのＮＬＶ特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞活性化の概略的セットアップを示す。プレート中の１ウェル当たりの内容物は、パルスなし、１０$^{-9}$又は１０$^{-8}$Ｍ ＮＬＶ－ペプチドをパルスした、５×１０^{4}ヒトメラノーマ細胞ＭＶ－３、６２５０ ＣＦＳＥ標識ＮＬＶ特異

的ＣＤ８ Ｔ細胞及び１０－５ｎＭ～１０ｎＭの滴定濃度のコンストラクト２．１１、コンストラクト２．４、対照Ｄ又は対照Ｆであった。インキュベーション時間は、ブレフェルジンＡ及びモネシンの存在下で２４時間＋４時間であった。

【図１５Ａ－Ｃ】図１５Ａ～１５Ｆには、滴定濃度の異なるＦＡＰ標的又は非標的分断三量体ヒトヒト４－１ＢＢリガンドＦｃ（ｋｉｈ）抗原結合分子の存在下でのＨＬＡ－Ａ２－ＮＬＶ特異的ＣＤ８ Ｔ細胞及びＮＬＶをパルスしたＨＬＡ－Ａ２＋ＦＡＰ＋ヒトメラノーマ細胞株ＭＶ－３を用いた活性化アッセイからの結果が示される。ＣＤ１３７（４－１ＢＢ）及びＩＦＮγ発現ＮＬＶ特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞のパーセンテージが、試験化合物（コンストラクト２．１１又は陽性対照としてのコンストラクト２．４又は陰性対照としての対照Ｄ及び対照Ｆ）の使用濃度に対してプロットされる。全てのＦＡＰ標的分断三量体ヒト４－１ＢＢリガンドＦｃ（ｋｉｈ）抗原結合分子は、ＣＤ１３７（４－１ＢＢ）－アップレギュレーション（正のフィードバックループ）として図１５Ａ～Ｃに、また２４時間の刺激後にＩＦＮγ発現として図１５Ｄ～Ｆに示された、ＨＬＡ－Ａ２－ＮＬＶ－ペプチド特異的ＣＤ８ Ｔ細胞の同様の活性化の改善を示す。曲線の差は、通常の誤差偏差の範囲にあり、有意ではない。

【図１５Ｄ－Ｆ】上記

【図１６】図１６Ａ及び１６Ｂは、それぞれ、ヒトＰＢＭＣ由来の４－１ＢＢ発現活性化ヒトＣＤ４及びＣＤ８ Ｔ細胞への、ＣＤ１９標的分断三量体４－１ＢＢＬ Ｆｃ（ｋｉｈ）抗原結合分子の結合を示す（実施例７．１参照）。細胞をＣＤ４及びＣＤ８でゲーティングし、結合曲線をヒトＦｃに対する二次抗体の平均蛍光強度で表した。

【図１７】図１７は、ＣＤ１９を発現するＢリンパ腫細胞株へのＣＤ１９標的分断三量体４－１ＢＢＬ融合分子の結合を示す（実施例７．２）。ＷＳＵ－ＤＬＣＬ２細胞に対する試験化合物（ＣＤ１９標的分断三量体４－１ＢＢＬ Ｆｃ（ｋｉｈ）抗原結合分子及び非標的対照Ｄ）の結合曲線は、ヒトＦｃに対する二次抗体の平均蛍光強度で表した。

【図１８】図１８は、レポーター細胞株及びＣＤ１９発現腫瘍細胞株を使用する、実施例７．３に記載のＮＦκＢ活性アッセイの一般的原理を例証するスキームを示す。示されるのは、ヒト４－１ＢＢ発現ＨｅＬａレポーター細胞株を用いてセットアップされた活性化アッセイである。レポーター細胞上に発現された４－１ＢＢの架橋が、ＮＦκＢ活性化及びＮＦκＢ媒介ルシフェラーゼ発現を誘導する。細胞の溶解後、ルシフェラーゼが、ルシフェリンのオキシルシフェリンへの酸化を触媒しうる。この化学反応は、ＮＦκＢ媒介ルシフェラーゼ発現の強度と正の相関があり、発光強度（放出光単位）によって測定することができる。

【図１９Ａ－Ｂ】図１９Ａ～１９Ｄは、実施例７．３に記載のアッセイで測定された、ＣＤ１９発現腫瘍細胞株及びＣＤ１９標的分断三量体４－１ＢＢＬ Ｆｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子の存在下での４－１ＢＢ発現レポーター細胞株におけるルシフェラーゼのＮＦκＢ活性化を示す。抗ヒトＣＤ１９－バインダークローン８Ｂ８－０１８（コンストラクト３．３及び３．１１）又は抗ヒトＣＤ１９バインダークローン８Ｂ８－２Ｂ１１（コンストラクト４．１及び４．１１）の何れかを含む異なる試験化合物を、異なる濃度で（ｘ軸にｎＭとして示す）、４－１ＢＢ発現レポーター細胞株と共にＣＤ１９発現細胞なし（図１９Ａ）又はＣＤ１９発現腫瘍細胞株ＯＣＩ－Ｌｙ１８、Ｎａｌｍ６及びＳＵ－ＤＨＬ－８（それぞれ、図１９Ｂ、図１９Ｃ及び図１９Ｄ）と共にＥ：Ｔ比１：５で６時間インキュベートした。一価のＣＤ１９標的分断三量体４－１ＢＢＬ Ｆｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子（コンストラクト３．１１及び４．１１）は、（実施例１．１１に記載のように）陽性のＣＤ１９標的対照分子コンストラクト３．４及び４．１と類似した、０．５ｓ／ウェルで測定された放出光単位（ＵＲＬ）によって測定された良好なルシフェラーゼ活性を誘発することができた。非ＣＤ１９標的対照分子の対照Ｆ及びＤは、ルシフェラーゼ活性を誘導しない。全ての値は、ブランク対照（対照添加又はコンストラクト添加なし）を差し引くことによりベースラインを修正した。

【図１９Ｃ－Ｄ】上記

【図２０】図２０は、ＣＤ１９標的分断三量体４－１ＢＢＬ融合分子と組み合わせてアゴ

ニストＣＤ３抗体を介した活性化ＰＢＭＣ中のＩＦＮγ放出を示す。ＩＦＮ－γ放出は、異なる標的又は非標的ＣＤ１９標的分断三量体４－１ＢＢＬ　Ｆｃ（ｋｉｈ）抗原結合分子の存在下においてヒトＰＢＭＣの培養上清中でＥＬＩＳＡによって測定した。

【発明を実施するための形態】

【００５２】

［定義］

他の定義がなされない限り、ここで使用される技術及び科学用語は、この発明が属する分野において一般的に使用されているものと同じ意味を有する。この明細書を解釈する目的で、次の定義が適用され、適宜、単数形で使用された用語は複数形をまた含み、その逆もしかりである。

【００５３】

ここで使用される場合、「抗原結合分子」という用語は、その最も広い意味では抗原決定基に特異的に結合する分子を意味する。抗原結合分子の例は、抗体、抗体断片及びスキャフォールド抗原結合タンパク質である。

【００５４】

ここで使用される場合、「標的細胞抗原に特異的に結合することができる部分」又は「標的細胞抗原に特異的に結合することができる抗原結合ドメイン」という用語は、抗原決定基に特異的に結合するポリペプチド分子を指す。一態様では、抗原結合部分は、その標的細胞抗原を通してシグナル伝達を活性化することができる。特定の態様では、抗原結合部分は、それが結合するエンティティ（例えばＴＮＦファミリーリガンド三量体）を標的部位へ、例えば特定の型の腫瘍細胞又は抗原決定基を有する腫瘍間質へと方向付けることができる。標的細胞抗原に特異的に結合することができる部分には、ここで更に定義される抗体とその断片が含まれる。加えて、標的細胞抗原に特異的に結合することができる部分には、ここで更に定義されるスキャフォールド抗原結合タンパク質、例えば設計リピートタンパク質又は設計リピートドメインをベースとする結合ドメイン（例えば国際公開第２００２／０２０５６５号参照）が含まれる。

【００５５】

ここで使用される場合、「標的細胞抗原に特異的に結合することができるＦａｂドメイン」という用語は、抗原決定基に特異的に結合するＦａｂドメインを指す。一態様では、抗原結合部分は、その標的細胞抗原を通してシグナル伝達を活性化することができる。特定の態様では、抗原結合部分は、それが結合するエンティティ（例えばＴＮＦファミリーリガンド三量体）を標的部位へ、例えば特定の型の腫瘍細胞又は抗原決定基を有する腫瘍間質へと方向付けることができる。

【００５６】

抗体又はＦａｂドメインに関し、「標的細胞抗原に特異的に結合することができる部分」という用語は、抗原の一部又は全部に結合し、かつそれに相補的な領域を含む分子の部分を指す。抗原に特異的に結合することができる部分は、例えば、一又は複数の抗体可変ドメイン（抗体可変領域とも呼ばれる）により提供されうる。特に、抗原に特異的に結合することができる部分は、抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）と抗体重鎖可変領域（ＶＨ）を含む。

【００５７】

ここでの「抗体」という用語は最も広い意味で使用され、様々な抗体構造を包含し、限定されないが、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、単一特異性及び多重特異性抗体（例えば二重特異性抗体）、及び所望の抗原結合活性を示す限り、抗体断片を含む。

【００５８】

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

基に対するものである。
【００５９】
ここで使用される「単一特異性」抗体という用語は、各々が同じ抗原の同じエピトープに結合する一又は複数の結合部位を有する抗体を意味する。「二重特異性」という用語は、抗原結合分子が少なくとも二つの別個の抗原決定基に特異的に結合することができることを意味する。典型的には、二重特異性抗原結合分子は、各々が異なる抗原決定基に特異的である二つの抗原結合部位を含む。所定の実施態様では、二重特異性抗原結合分子は、二つの抗原決定基、特に二つの別個の細胞上に発現した二つの抗原決定基に同時に結合することができる。
【００６０】
本出願内で使用される「価」という用語は、抗原結合分子内における特定数の結合部位の存在を意味する。而して、「二価」、「四価」、及び「六価」という用語は、抗原結合分子内における、二つの結合部位、四つの結合部位、及び六つの結合部位の存在をそれぞれ意味する。
【００６１】
本出願内で使用される「抗原に対して一価」という用語は、抗原結合分子中の前記抗原に対する一つの結合部位のみの存在を意味する。本出願内で使用される「標的細胞抗原に対して一価」という用語は、抗原結合分子中の前記標的細胞抗原に対する一つの結合部位のみの存在を意味する。
【００６２】
「完全長抗体」、「インタクトな抗体」、及び「全抗体」という用語は、本明細書中で互換的に使用され、天然抗体構造と実質的に類似の構造を有する抗体を指す。「天然抗体」は、様々な構造を有する天然に生じる免疫グロブリン分子を指す。例えば、天然ＩｇＧクラスの抗体は、ジスルフィド結合している二つの軽鎖と二つの重鎖からなる約１５００００ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。Ｎ末端からＣ末端まで、各重鎖は可変重鎖ドメイン又は重鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（ＶＨ）を有し、その後に重鎖定常領域とも呼ばれる三つの定常ドメイン（ＣＨ１、ＣＨ２及びＣＨ３）が続いている。同様に、Ｎ末端からＣ末端まで、各軽鎖は可変軽鎖ドメイン又は軽鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（ＶＬ）を有し、その後に軽鎖定常領域とも呼ばれる軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）が続いている。抗体の重鎖は、五つの種類のうちの一つ、つまり、α（ＩｇＡ）、δ（ＩｇＤ）、ε（ＩｇＥ）、γ（ＩｇＧ）、又はμ（ＩｇＭ）に割当てられ、それらの幾つかは更にサブタイプ、例えばγ１（ＩｇＧ１）、γ２（ＩｇＧ２）、γ３（ＩｇＧ３）、γ４（ＩｇＧ４）、α１（ＩｇＡ１）及びα２（ＩｇＡ２）に分けることができる。抗体の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ（κ）とラムダ（λ）と呼ばれる二つの種類のうちの一つに割り当てることができる。
【００６３】
「抗体断片」は、インタクトな抗体が結合する抗原に結合するインタクトな抗体の一部を含むインタクトな抗体以外の分子を指す。抗体断片の例には、限定されないが、Ｆｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆａｂ’－ＳＨ、Ｆ（ａｂ’）２；ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、クロスＦａｂ断片；直鎖状抗体；単鎖抗体分子（例えばｓｃＦｖ）；及び単一ドメイン抗体が含まれる。所定の抗体断片の概説については、Hudson等 Nat. Med. 9:129-134 (2003)を参照。ｓｃＦｖ断片の概説については、例えば、Pluckthun, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg及びMoore編, (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994)を参照；また、国際公開第９３／１６１８５号；及び米国特許第５５７１８９４号及び同第５５８７４５８号もまた参照。サルベージ受容体結合エピトープ残基を含み、かつインビボ半減期が増加したＦａｂ及びＦ（ａｂ’）２断片の議論については、米国特許第５８６９０４６号を参照のこと。ダイアボディは、二価又は二重特異性でありうる二つの抗原－結合部位を有する抗体断片である。例えば、欧州特許出願公開第４０４０９７号；国際公開第１９９３／０１１６１号；Hudson等, Nat Med 9, 129-134 (2003)；及びHollinger等, Proc Natl Acad Sci USA 90

, 6444-6448 (1993)を参照のこと。トリアボディ及びテトラボディはまたHudson等, Nat. Med. 9:129-134 (2003)に記載されている。単一ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインの全て又は一部、又は軽鎖可変ドメインの全て又は一部を含む抗体断片である。所定の実施態様では、単一ドメイン抗体はヒト単一ドメイン抗体である（Domantis, Inc., Waltham, MA；例えば、米国特許第６２４８５１６Ｂ１号を参照）。抗体断片は、ここに記載されるように、限定されないが、インタクトな抗体のタンパク消化、並びに組換え宿主細胞（例えば、大腸菌又はファージ）による産生を含む、様々な技術によって作製することができる。

【００６４】

ここで使用される「Ｆａｂドメイン」という用語は、以下に定義されるＦａｂ断片又はクロスＦａｂ断片を示す。

【００６５】

インタクトな抗体のパパイン消化により、それぞれ重鎖及び軽鎖可変ドメインと、また軽鎖の定常ドメイン及び重鎖の第一定常ドメイン（ＣＨ１）とを含む「Ｆａｂ」断片と呼ばれる、二つの同一の抗原結合断片が産生される。ここで使用される場合、従って、「Ｆａｂ断片」という用語は、軽鎖（ＣＬ）のＶＬドメインと定常ドメインを含む軽鎖断片と、重鎖のＶＨドメインと第一定常ドメイン（ＣＨ１）を含む抗体断片を指す。Ｆａｂ’断片は、抗体ヒンジ領域由来の一又は複数のシステインを含む重鎖ＣＨ１ドメインのカルボキシ末端に少しの残基が付加される点でＦａｂ断片と異なる。Ｆａｂ’－ＳＨは、定常ドメインのシステイン残基が遊離チオール基を有するＦａｂ’断片である。ペプシン処理により、二つの抗原結合部位（二つのＦａｂ断片）とＦｃ領域の一部を有するＦ（ａｂ’）$_2$断片が得られる。

【００６６】

「クロス－Ｆａｂ断片」又は「ｘＦａｂ断片」又は「クロスオーバーＦａｂ断片」という用語は、重鎖及び軽鎖の可変領域又は定常領域の何れかが交換されているＦａｂ断片を指す。クロスオーバーＦａｂ分子の２通りの異なる鎖組成が可能であり、本発明の二重特異性抗体に含まれる：一方では、Ｆａｂ重鎖及び軽鎖の可変領域が交換される、すなわち、クロスオーバーＦａｂ分子は、軽鎖可変領域（ＶＬ）と重鎖定常領域（ＣＨ１）からなるペプチド鎖と、重鎖可変領域（ＶＨ）と軽鎖定常領域（ＣＬ）からなるペプチド鎖を含む。このクロスオーバーＦａｂ分子は、ＣｒｏｓｓＦａｂ（ＶＬＶＨ）とも称される。他方では、Ｆａｂ重鎖及び軽鎖の定常領域が交換される場合、クロスオーバーＦａｂ分子は、重鎖可変領域（ＶＨ）と軽鎖定常領域（ＣＬ）からなるペプチド鎖と、軽鎖可変領域（ＶＬ）と重鎖定常領域（ＣＨ１）からなるペプチド鎖を含む。このクロスオーバーＦａｂ分子は、ＣｒｏｓｓＦａｂ（ＣＬＣＨ１）とも称される。

【００６７】

「単鎖Ｆａｂ断片」又は「ｓｃＦａｂ」は、抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）、抗体定常ドメイン１（ＣＨ１）、抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）、抗体軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）及びリンカーからなるポリペプチドであり、前記抗体ドメイン及び前記リンカーは、Ｎ末端からＣ末端の方向で、次の順：ａ）ＶＨ－ＣＨ１－リンカー－ＶＬ－ＣＬ、ｂ）ＶＬ－ＣＬ－リンカー－ＶＨ－ＣＨ１、ｃ）ＶＨ－ＣＬ－リンカー－ＶＬ－ＣＨ１又はｄ）ＶＬ－ＣＨ１－リンカー－ＶＨ－ＣＬの一つを有し；ここで、前記リンカーは少なくとも３０のアミノ酸、好ましくは３２～５０のアミノ酸のポリペプチドである。前記単鎖Ｆａｂ断片は、ＣＬドメインとＣＨ１ドメインとの間の天然ジスルフィド結合により安定化されている。加えて、これら単鎖Ｆａｂ分子は、システイン残基の挿入（例えば、Ｋａｂａｔの番号付けによる、可変重鎖の４４位と可変軽鎖の１００位）による鎖間ジスルフィド結合の生成によって更に安定化されるかもしれない。

【００６８】

「クロスオーバー単鎖Ｆａｂ断片」又は「ｘ－ｓｃＦａｂ」は、抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）、抗体定常ドメイン１（ＣＨ１）、抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）、抗体軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）及びリンカーからなるポリペプチドであり、前記抗体ドメイン及び前記

リンカーは、Ｎ末端からＣ末端の方向で、次の順：ａ）ＶＨ－ＣＬ－リンカー－ＶＬ－ＣＨ１及びｂ）ＶＬ－ＣＨ１－リンカー－ＶＨ－ＣＬの一つを有し；ここで、ＶＨ及びＶＬは、抗原に特異的に結合する抗原結合部位を一緒に形成し、前記リンカーは少なくとも３０のアミノ酸のポリペプチドである。加えて、これらｘ－ｓｃＦａｂ分子は、システイン残基の挿入（例えば、Ｋａｂａｔの番号付けによる、可変重鎖の４４位と可変軽鎖の１００位）による鎖間ジスルフィド結合の生成によって更に安定化されるかもしれない。

【００６９】

「単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）」は、１０から約２５のアミノ酸の短いリンカーペプチドにより連結された、抗体の重鎖（ＶＨ）と軽鎖（ＶＬ）の可変領域の融合タンパク質である。リンカーは通常は柔軟性のためにグリシンに、また溶解性のためにセリン又はスレオニンに富み、V_HのＮ末端をV_LのＣ末端に連結するか、又はその逆の連結をなしうる。このタンパク質は、定常領域の除去とリンカーの導入にもかかわらず、元の抗体の特異性を保持する。ｓｃＦｖ抗体は、例えばHouston, J.S., Methods in Enzymol. (1991) 46-96に記載されている。加えて、抗体断片は、ＶＨドメインの特徴、すなわちＶＬドメインと共に集合して機能的抗原結合部位を形成し、又はＶＬドメインの特徴、すなわちＶＨドメインと共に集合して機能的抗原結合部位を形成する特徴を有し、よって全長抗体の抗原結合特性をもたらす単鎖ポリペプチドを含む。

【００７０】

「スキャフォールド抗原結合タンパク質」は、当該技術分野において知られており、例えば、フィブロネクチンとアンキリンリピートタンパク質（ＤＡＲＰｉｎ）が抗原結合ドメインのための代替的スキャフォールドとして使用されており、例えば、Gebauer及びSkerra, Engineered protein scaffolds as next-generation antibody therapeutics. Curr Opin Chem Biol 13:245-255 (2009)及びStumpp等, Darpins: A new generation of protein therapeutics. Drug Discovery Today 13: 695-701 (2008)を参照。本発明の一態様では、スキャフォールド抗原結合タンパク質は、ＣＴＬＡ－４（エビボディ（Evibody））、リポカリン（アンチカリン）、プロテインＡ由来の分子、例えばプロテインＡのＺ－ドメイン（アフィボディ（Affibody））、Ａ－ドメイン（アビマー（Avimer）／マキシボディ（Maxibody））、血清トランスフェリン（トランスボディ）；アンキリンリピートタンパク質（ＤＡＲＰｉｎ）、抗体軽鎖又は重鎖の可変ドメイン（単一ドメイン抗体、ｓｄＡｂ）、抗体重鎖の可変ドメイン（ナノボディ、ａＶＨ）、V_{NAR}断片、フィブロネクチン（アドネクチン）、Ｃ型レクチンドメイン（テトラネクチン）；新規抗原受容体ベーターラクタマーゼの可変ドメイン（V_{NAR}断片）、ヒトガンマ－クリスタリン又はユビキチン（アフィリン（Affilin）分子）；ヒトプロテアーゼ阻害剤のクニッツ型ドメイン、ミクロボディ、例えばノッチンファミリー由来のタンパク質、ペプチドアプタマー及びフィブロネクチン（アドネクチン）からなる群から選択される。

【００７１】

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

【００７２】

「抗原結合ドメイン」という用語は、抗原の一部又は全部に特異的に結合し、それに相補的である領域を含む抗原結合分子の部分を指す。抗原が大きい場合、抗原結合分子は抗原の特定の部分にのみ結合し得、その部分はエピトープと呼ばれる。抗原結合部位は、例えば、一又は複数の可変ドメイン（可変領域とも呼ばれる）によって提供されうる。好ましくは、抗原結合部位は、抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）と抗体重鎖可変領域（ＶＨ）を含む。

【００７３】

ここで使用される場合、「抗原決定基」という用語は、「抗原」及び「エピトープ」と同義であり、抗原結合部分が結合し、抗原結合部分－抗原複合体を形成するポリペプチド巨大分子上の部位（例えば、アミノ酸の近接する伸長又は非近接アミノ酸の異なる領域から形成された立体配座構造）を指す。有用な抗原決定基は、例えば、腫瘍細胞の表面、ウイ

ルス感染細胞の表面、他の疾患細胞の表面、免疫細胞の表面に、血清中に遊離した状態で、及び／又は細胞外マトリックス（ＥＣＭ）に見出すことができる。特に断らない限り、ここで抗原として有用なタンパク質は、霊長類（例えばヒト）及びげっ歯類（例えば、マウス及びラット）などの哺乳動物を含む任意の脊椎動物源由来のタンパク質の任意の天然型でありうる。特定の実施態様では、抗原はヒトタンパク質である。ここで特定のタンパク質に言及される場合、その用語は「全長」の未処理タンパク質並びに細胞内でのプロセシングにより生じる任意の形態のタンパク質を包含する。その用語はまたタンパク質の天然に生じるバリアント、例えば、スプライスバリアント又はアレルバリアントを包含する。

【００７４】

「特異的な結合」とは、結合が、抗原について選択的であり、望ましくない相互作用又は非特異的相互作用とは区別可能であることを意味する。抗原結合分子の特定の抗原への結合能は、酵素結合免疫吸着法（ＥＬＩＳＡ）又は当業者によく知られた他の技術、例えば表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）技術（ＢＩＡｃｏｒｅ機器での解析）（Liljeblad等, Glyco J 17, 323-329 (2000)）、及び伝統的結合アッセイ（Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002)）により測定することができる。一実施態様では、抗原結合分子の無関係なタンパク質への結合の程度は、例えばＳＰＲによって測定した場合、抗原結合分子の抗原への結合の約１０％未満である。所定の実施態様では、抗原に結合する分子は、≦１μＭ、≦１００ｎＭ、≦１０ｎＭ、≦１ｎＭ、≦０．１ｎＭ、≦０．０１ｎＭ、又は≦０．００１ｎＭ（例えば、１０－８Ｍ以下、例えば１０－８Ｍ～１０－１３Ｍ、例えば、１０－９Ｍ～１０－１３Ｍ）の解離定数（Ｋｄ）を有する。

【００７５】

「親和性」又は「結合親和性」は、分子（例えば、抗体）の単一結合部位とその結合パートナー（例えば、抗原）との間の非共有結合相互作用の総和の強度を指す。ここで使用される場合、特に断らない限り、「結合親和性」は、結合対（例えば、抗体と抗原）のメンバー間の１：１の相互作用を反映する固有の結合親和性を指す。分子Ｘのそのパートナー Ｙに対する親和性は、一般に、解離定数（Ｋｄ）によって表すことができ、これは、解離速度定数と会合速度定数（それぞれ、ｋｏｆｆ及びｋｏｎ）の比である。従って、等価な親和性は、速度定数の比が同じままである限り、異なる速度定数を含みうる。親和性は、ここに記載されたものを含む当該技術分野で知られた一般的な方法により測定することができる。親和性を測定するための特定の方法は、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）である。

【００７６】

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

【００７７】

プロリルエンドペプチダーゼＦＡＰ又はセプラーゼ（ＥＣ３．４．２１）としても知られている「線維芽細胞活性化タンパク質（ＦＡＰ）」という用語は、特に断りのない限り、霊長類（例えば、ヒト）、非ヒト霊長類（例えば、カニクイザル）及びげっ歯類（例えば、マウス及びラット）などの哺乳類を含む任意の脊椎動物源由来の任意の天然ＦＡＰを指す。その用語は、「完全長」の未処理のＦＡＰ並びに細胞内でのプロセシングから生じるＦＡＰの任意の形態を包含する。その用語はまた、ＦＡＰの天然に生じるバリアント、例えばスプライスバリアント又はアレルバリアントを包含する。一実施態様では、本発明の抗原結合分子は、ヒト、マウス及び／又はカニクイザルＦＡＰに特異的に結合することができる。ヒトＦＡＰのアミノ酸配列は、ＵｎｉＰｒｏｔ（www.uniprot.org）受託番号Ｑ１２８８４（バージョン１４９、配列番号：５３）、又はＮＣＢＩ（www.ncbi.nlm.nih.gov/）ＲｅｆＳｅｑ ＮＰ＿００４４５１．２に示されている。ヒトＦＡＰの細胞外ドメ

インＣＤ）は、アミノ酸位置２６から７６０に及ぶ。ＨｉｓタグヒトＦＡＰ ＥＣＤのアミノ酸配列及びヌクレオチド配列はそれぞれ配列番号５４及び５５に示される。マウスＦＡＰのアミノ酸配列はＵｎｉＰｒｏｔ受託番号Ｐ９７３２１（バージョン１２６、配列番号：５６）、又はＮＣＢＩ ＲｅｆＳｅｑ ＮＰ＿０３２０１２．１に示されている。マウスＦＡＰの細胞外ドメイン（ＥＣＤ）は、アミノ酸位置２６から７６１に及ぶ。配列番号５７及び５８は、それぞれ、ＨｉｓタグマウスＦＡＰ ＥＣＤのアミノ酸配列及びヌクレオチド配列を示す。配列番号５９及び６０は、それぞれ、ＨｉｓタグカニクイザルＦＡＰＥＣＤのアミノ酸配列及びヌクレオチド配列を示す。好ましくは、本発明の抗ＦＡＰ結合分子は、ＦＡＰの細胞外ドメインに結合する。例示的な抗ＦＡＰ結合分子は、国際特許出願番号ＷＯ２０１２／０２０００６号（Ａ２）号に記載されている。

【００７８】

がん胎児抗原関連細胞接着分子５（ＣＥＡＣＡＭ５）としても知られている「がん胎児抗原（ＣＥＡ）」という用語は、特に断りのない限り、霊長類（例えば、ヒト）、非ヒト霊長類（例えば、カニクイザル）及びげっ歯類（例えば、マウス及びラット）などの哺乳類を含む任意の脊椎動物源由来の任意の天然ＣＥＡを指す。ヒトＣＥＡのアミノ酸配列はＵｎｉＰｒｏｔ受託番号Ｐ０６７３１（バージョン１５１、配列番号：６１）に示されている。ＣＥＡは、腫瘍関連抗原として長く特定されている（Gold及びFreedman, J Exp Med., 121:439-462, 1965；Berinstein N. L., J Clin Oncol., 20:2197-2207, 2002）。もともと、胎児組織においてのみ発現されるタンパク質として分類されたＣＥＡは、今は幾つかの正常な成体組織において同定されている。これらの組織は主として上皮由来であり、胃腸管、呼吸器管及び泌尿生殖器管の細胞、並びに結腸、子宮頸部、汗腺及び前立腺の細胞を含む（Nap等, Tumour Biol., 9(2-3):145-53, 1988；Nap等, Cancer Res., 52(8):2329-23339, 1992）。上皮由来の腫瘍並びにそれらの転移は、腫瘍関連抗原としてＣＥＡを含む。ＣＥＡ自体の存在はがん性細胞への形質転換を示すものではないが、ＣＥＡの分布は指標となる。正常組織では、ＣＥＡは一般に細胞の頂端膜側表面上に発現され（Hammarstroem S., Semin Cancer Biol. 9(2):67-81 (1999)）、血流中の抗体に到達できなくなる。正常組織とは対照的に、ＣＥＡは、がん細胞の表面全体にわたって発現される傾向にある（Hammarstroem S., Semin Cancer Biol. 9(2):67-81 (1999)）。発現パターンのこの変化は、ＣＥＡをがん細胞における抗体結合に到達可能にする。加えて、ＣＥＡ発現はがん性細胞において増加する。更に、ＣＥＡ発現の増加は、細胞間接着の増加を促進し、これが転移をもたらしうる（Marshall J., Semin Oncol., 30 (a Suppl. 8):30-6, 2003）。様々な腫瘍体におけるＣＥＡ発現の蔓延は一般に非常に高い。公表されたデータと一致して、組織試料において実施された自身の分析では、その高い罹患率が確認され、結腸直腸癌（ＣＲＣ）で約９５％、膵臓がんで約９０％、胃がんで約８０％、非小細胞肺がん（ＨＥＲ３と同時発現しているＮＳＣＬＣ）で約６０％、乳がんで約４０％であり；小細胞肺がん及び神経膠芽腫において低発現が見出された。

【００７９】

ＣＥＡは細胞表面から容易に切断され、腫瘍からの血流中に、直接的に又はリンパ管を介して流出する。この性質のために、血清ＣＥＡのレベルは、がんの診断、及びがん、特に結腸直腸がんの再発のスクリーニングのための臨床マーカーとして使用されている（Goldenberg D M., The International Journal of Biological Markers, 7:183-188, 1992；Chau I.等, J Clin Oncol., 22:1420-1429, 2004；Flamini等, Clin Cancer Res; 12(23):6985-6988, 2006）。

【００８０】

コンドロイチン硫酸プロテオグリカン４（ＣＳＰＧ４）としても知られている「メラノーマ関連コンドロイチン硫酸プロテオグリカン（ＭＣＳＰ）」という用語は、特に断りのない限り、霊長類（例えば、ヒト）、非ヒト霊長類（例えば、カニクイザル）及びげっ歯類（例えば、マウス及びラット）などの哺乳類を含む任意の脊椎動物源由来の任意の天然ＭＣＳＰを指す。ヒトＭＣＳＰのアミノ酸配列はＵｎｉＰｒｏｔ受託番号Ｑ６ＵＶＫ１（バージョン１０３、配列番号：６２）に示されている。プロトオンコジーンｃ－ＥｒｂＢ－

１又は受容体チロシンタンパク質キナーゼｅｒｂＢ－１とも呼ばれる「上皮増殖因子受容体（ＥＧＦＲ）」という用語は、特に断りのない限り、霊長類（例えば、ヒト）、非ヒト霊長類（例えば、カニクイザル）及びげっ歯類（例えば、マウス及びラット）などの哺乳類を含む任意の脊椎動物源由来の任意の天然ＥＧＦＲを指す。ヒトＥＧＦＲのアミノ酸配列はＵｎｉＰｒｏｔ受託番号Ｐ００５３３（バージョン２１１、配列番号：６３）に示されている。

【００８１】

「ＣＤ１９」という用語は、Ｂリンパ球表面抗原Ｂ４又はＴ細胞表面抗原Ｌｅｕ－１２としても知られているＢリンパ球抗原ＣＤ１９を指し、特に断りのない限り、霊長類（例えば、ヒト）、非ヒト霊長類（例えば、カニクイザル）及びげっ歯類（例えば、マウス及びラット）などの哺乳類を含む任意の脊椎動物源由来の任意の天然ＣＤ１９を含む。ヒトＣＤ１９のアミノ酸配列はＵｎｉＰｒｏｔ受託番号Ｐ１５３９１（バージョン１６０、配列番号：６４）に示されている。その用語は、「完全長」未処理ヒトＣＤ１９並びにここに報告される抗体がそれに結合する限り、細胞内でのプロセシングに起因する任意の形態のヒトＣＤ１９を包含する。ＣＤ１９は、限定されないが、プレＢ細胞、発生初期のＢ細胞（すなわち未成熟Ｂ細胞）、形質細胞への最終分化を介した成熟Ｂ細胞、及び悪性Ｂ細胞を含む、ヒトＢ細胞の表面上に発現される構造的に異なる細胞表面受容体である。ＣＤ１９は、殆どのプレＢ急性リンパ性白血病（ＡＬＬ）、非ホジキンリンパ腫、Ｂ細胞慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、前リンパ球性白血病、ヘアリーセル白血病、一般的な急性リンパ球性白血病、一部のＮｕｌｌ急性リンパ芽球性白血病によって発現される。形質細胞上でのＣＤ１９の発現は、それが多発性骨髄腫のような分化したＢ細胞腫瘍上で発現されうることを更に示唆する。従って、ＣＤ１９抗原は、非ホジキンリンパ腫、慢性リンパ球性白血病及び／又は急性リンパ芽球性白血病の治療における免疫療法の標的である。

【００８２】

「ＣＤ２０」は、膜貫通４ドメインサブファミリーＡメンバー１（ＭＳ４Ａ１）、Ｂリンパ球表面抗原Ｂ１又は白血球表面抗原Ｌｅｕ－１６としても知られているＢリンパ球抗原ＣＤ２０を指し、特に断りのない限り、霊長類（例えば、ヒト）、非ヒト霊長類（例えば、カニクイザル）及びげっ歯類（例えば、マウス及びラット）などの哺乳類を含む任意の脊椎動物源由来の任意の天然ＣＤ２０を含む。ヒトＣＤ２０のアミノ酸配列はＵｎｉＰｒｏｔ受託番号Ｐ１１８３６（バージョン１４９、配列番号：６５）に示されている。「ＣＤ３３」は、ＳＩＧＬＥＣ３又はｇｐ６７としても知られている骨髄細胞表面抗原ＣＤ３３を指し、特に断りのない限り、霊長類（例えば、ヒト）、非ヒト霊長類（例えば、カニクイザル）及びげっ歯類（例えば、マウス及びラット）などの哺乳類を含む任意の脊椎動物源由来の任意の天然ＣＤ３３を含む。ヒトＣＤ３３のアミノ酸配列はＵｎｉＰｒｏｔ受託番号Ｐ２０１３８（バージョン１５７、配列番号：６６）に示されている。

【００８３】

「可変領域」又は「可変ドメイン」という用語は、抗原結合分子の抗原への結合に関与する抗体の重鎖又は軽鎖のドメインを指す。天然抗体の重鎖及び軽鎖の可変ドメイン（それぞれＶＨ及びＶＬ）は一般に類似構造を有しており、各ドメインが四つの保存されたフレームワーク領域（ＦＲ）と三つの超可変領域（ＨＶＲ）を含む。例えば、Kindt等, Kuby Immunology, 6版, W.H. Freeman and Co., p91 (2007)を参照のこと。抗原結合特異性を付与するには、単一のＶＨ又はＶＬドメインで十分でありうる。

【００８４】

ここで使用される「超可変領域」又は「ＨＶＲ」という用語は、配列が超可変性であり、及び／又は構造的に定まったループ（「超可変ループ」）を形成する抗体可変ドメインの領域の各々を指す。一般に、天然４鎖抗体は、ＶＨに３つ（Ｈ１、Ｈ２、Ｈ３）、及びＶＬに３つ（Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３）の６つのＨＶＲを含む。ＨＶＲは、一般に超可変ループ由来及び／又は「相補性決定領域」（ＣＤＲ）由来のアミノ酸残基を含み、後者は、最も高い配列可変性を有し、及び／又は抗原認識に関与している。例示的な超可変ループはアミノ酸残基２６－３２（Ｌ１）、５０－５２（Ｌ２）、９１－９６（Ｌ３）、２６－３２（

Ｈ１）、５３－５５（Ｈ２）、及び９６－１０１（Ｈ３）で生じる（Chothia及びLesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)）。例示的なＣＤＲ（ＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２、ＣＤＲ－Ｌ３、ＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、及びＣＤＲ－Ｈ３）は、Ｌ１の２４－３４、Ｌ２の５０－５６、Ｌ３の８９－９７、Ｈ１の３１－３５Ｂ、Ｈ２の５０－６５、及びＨ３の９５－１０２のアミノ酸残基に生じる。（Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)）。超可変領域（ＨＶＲ）は、「相補性決定領域」（ＣＤＲ）とも呼ばれ、これらの用語は、抗原結合領域を形成する可変領域の部分に言及してここでは交換可能に使用される。この特定の領域は、Kabat等, U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983)及びChothia等, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)に記載されており、その定義は、互いに比較された場合のアミノ酸残基の重複又はサブセットを含む。それでも、抗体又はその変異体のＣＤＲに言及して何れかの定義が適用される場合、ここで定義され使用される用語の範囲に含まれることが意図される。上で引用した文献の各々により定義されるＣＤＲを包含する適切なアミノ酸残基は、比較として以下の表Ａに記載される。特定のＣＤＲを包含する正確な残基数は、ＣＤＲの配列及び大きさに応じて変化するであろう。当業者であれば、抗体の可変領域のアミノ酸配列を前提に、何れの残基が特定のＣＤＲを含むかを常套的に決定することができる。

表A CDR の定義[1]

CDR	Kabat	Chothia	AbM[2]
V_H CDR1	31–35	26–32	26–35
V_H CDR2	50–65	52–58	50–58
V_H CDR3	95–102	95–102	95–102
V_L CDR1	24–34	26–32	24–34
V_L CDR2	50–56	50–52	50–56
V_L CDR3	89–97	91–96	89–97

１ 表Ａにおける全てのＣＤＲの定義の番号付けは、Ｋａｂａｔ等（以下参照）によって規定された番号付けの規定に従う。
２ 表Ａで使用される小文字の「ｂ」を含む「ＡｂＭ」は、Ｏｘｆｏｒｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒの「ＡｂＭ」抗体モデル化ソフトウェアによって定義されたＣＤＲを指す。

【００８５】
Ｋａｂａｔ等は、あらゆる抗体に適用可能な可変領域配列の番号付けシステムもまた定めた。当業者であれば、配列自体を超える何らかの実験データに頼らなくとも、この「Ｋａｂａｔの番号付け」システムをあらゆる可変領域配列に明確に割り当てることができる。ここで使用される場合、「Ｋａｂａｔの番号付け」は、Kabat等, U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983)によって規定された番号付けシステムを指す。特に断らない限り、抗体可変領域内における特定のアミノ酸残基の位置の番号付けへの言及は、Ｋａｂａｔの番号付けシステムによる。

【００８６】
ＶＨのＣＤＲ１を例外として、ＣＤＲは超可変ループを形成するアミノ酸残基を一般に含む。ＣＤＲはまた抗原に接触する残基である「特異性決定残基」又は「ＳＤＲ」も含む。ＳＤＲは、短縮型ＣＤＲ、又はａ－ＣＤＲと呼ばれるＣＤＲの領域内に含まれる。例示的なａ－ＣＤＲ（ａ－ＣＤＲ－Ｌ１、ａ－ＣＤＲ－Ｌ２、ａ－ＣＤＲ－Ｌ３、ａ－ＣＤＲ－Ｈ１、ａ－ＣＤＲ－Ｈ２、及びａ－ＣＤＲ－Ｈ３）は、Ｌ１の３１－３４、Ｌ２の５０－

５５、Ｌ３の８９－９６、Ｈ１の３１－３５Ｂ、Ｈ２の５０－５８、及びＨ３の９５－１０２のアミノ酸残基に生じる。（Almagro及びFransson, Front. Biosci.13:1619-1633 (2008)を参照。）特に断らない限り、可変ドメイン内のＨＶＲ残基及び他の残基（例えば、ＦＲ残基）は、ここでは上掲のＫａｂａｔ等に従って番号付けされる。

【００８７】

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

【００８８】

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

【００８９】

ここでの目的に対して「アクセプターヒトフレームワーク」とは、以下に定義されるように、ヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワークから得られる軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）フレームワーク又は重鎖可変ドメイン（ＶＨ）フレームワークのアミノ酸配列を含むフレームワークである。ヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワーク「に由来する」アクセプターヒトフレームワークは、その同一のアミノ酸配列を含んでいてもよく、又はそれはアミノ酸配列変化を含んでいてもよい。幾つかの実施態様では、アミノ酸変化の数は、１０以下、９以下、８以下、７以下、６以下、５以下、４以下、３以下、又は２以下である。幾つかの実施態様では、ＶＬアクセプターヒトフレームワークは、ＶＬヒト免疫グロブリンフレームワーク配列又はヒトコンセンサスフレームワーク配列と配列が同一である。

【００９０】

「キメラ」抗体という用語は、重鎖及び／又は軽鎖の一部が特定の起源又は種に由来し、重鎖及び／又は軽鎖の残りが異なる起源又は種に由来する抗体を指す。

【００９１】

抗体の「クラス」は、その重鎖が保有する定常ドメイン又は定常領域のタイプを指す。抗体には５つの主要なクラス、すなわち、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ、及びＩｇＭがあり、これらの幾つかは、サブクラス（アイソタイプ）、例えばＩｇＧ$_1$、ＩｇＧ$_2$、ＩｇＧ$_3$、ＩｇＧ$_4$、ＩＧＡ$_1$、及びＩｇＡ$_2$に更に分けることができる。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれα、δ、ε、γ、及びμと呼ばれる。

【００９２】

「ヒト化」抗体は、非ヒトＨＶＲ由来のアミノ酸残基とヒトＦＲ由来のアミノ酸残基を含むキメラ抗体を指す。所定の実施態様では、ヒト化抗体は、少なくとも一つ、典型的には二つの可変ドメインの実質的に全てを含み、ＨＶＲ（例えば、ＣＤＲ）の全て又は実質的に全てが、 非ヒト抗体のものに対応し、ＦＲの全て又は実質的に全てが、ヒト抗体のものに対応する。ヒト化抗体は、場合によってはヒト抗体由来の抗体定常領域の少なくとも一部を含んでいてもよい。抗体、例えば、非ヒト抗体の「ヒト化型」は、ヒト化を受けた抗体を指す。本発明が包含する「ヒト化抗体」の他の型は、定常領域が、特にＣ１ｑ結合及び／又はＦｃ受容体（ＦｃＲ）結合に関して、本発明に係る特性を生じるように元の抗体の定常領域から追加的に修飾又は変更されているものである。

【００９３】

「ヒト抗体」は、ヒト又はヒト細胞により産生されるか、又はヒト抗体のレパートリーや

他のヒト抗体コード化配列を利用する非ヒト源に由来する抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を有するものである。ヒト抗体のこの定義は、特に非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を除外する。

【００９４】

ここでの「Ｆｃドメイン」又は「Ｆｃ領域」という用語は、定常領域の少なくとも一部を含む、抗体重鎖のＣ末端領域を定義するために使用される。この用語は、天然配列Ｆｃ領域及び変異型Ｆｃ領域を含む。ＩｇＧ Ｆｃ領域は、ＩｇＧ ＣＨ２及びＩｇＧ ＣＨ３ドメインを含む。ヒトＩｇＧ Ｆｃ領域の「ＣＨ２ドメイン」は、通常、約２３１位のアミノ酸残基から約３４０位のアミノ酸残基まで延びる。一実施態様では、糖鎖がＣＨ２ドメインに結合している。ここでのＣＨ２ドメインは、天然配列ＣＨ２ドメイン又は変異型ＣＨ２ドメインでありうる。「ＣＨ３ドメイン」は、Ｆｃ領域内においてＣＨ２ドメインのＣ末端に残基ストレッチを含む（すなわち、ＩｇＧの約３４１位のアミノ酸残基から約４４７のアミノ酸残基）。ここでのＣＨ３領域は、天然配列ＣＨ３ドメイン又は変異型ＣＨ３ドメイン（例えばその一方の鎖に「隆起」（「ノブ」）が導入され、その他方の鎖に「空洞」（「ホール」）が対応して導入されたＣＨ３ドメイン；米国特許第５８２１３３３号参照（出典明示によりここに明示的に援用する））でありうる。そのような変異型ＣＨ３ドメインは、ここに記載の二つの非同一抗体重鎖のヘテロ二量体化を促進するために使用されうる。一実施態様では、ヒトＩｇＧ重鎖Ｆｃ領域は、Ｃｙｓ２２６又はＰｒｏ２３０から重鎖のカルボキシル末端にまで及ぶ。しかしながら、Ｆｃ領域のＣ末端リジン（Ｌｙｓ４４７）は、存在しても存在しなくてもよい。ここで特段の特定がなされない限り、Ｆｃ領域又は定常領域内のアミノ酸残基の番号付けは、Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991に記載されたＥＵインデックスとも呼ばれるＥＵ番号付けシステムに従う。

【００９５】

「ノブ・イントゥ・ホール」技術は、例えば、米国特許第５７３１１６８号；同第７６９５９３６号；Ridgway等, Prot Eng 9, 617-621 (1996)及びCarter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001)に記載されている。一般に、この方法は、隆起を空洞に位置させ、ヘテロ二量体形成を促進し、ホモ二量体形成を妨害することができるように第一のポリペプチドの界面に隆起（「ノブ」）を、第二のポリペプチドの界面に対応する空洞（「ホール」）を導入することを含む。隆起は、第一のポリペプチドの界面由来の小さなアミノ酸側鎖を大きな側鎖（例えば、チロシン又はトリプトファン）で置き換えることにより構築される。隆起と同じか又は同様のサイズの相補的な空洞は、大きなアミノ酸側鎖を小さいもの（例えばアラニン又はスレオニン）で置き換えることにより、第二のポリペプチドの界面に作り出される。隆起と空洞は、ポリペプチドをコードする核酸を、例えば部位特異的突然変異誘発により、又はペプチド合成により、改変させることにより作り出すことができる。特定の実施態様では、ノブ修飾は、Ｆｃドメインの二つのサブユニットのうちの一方にアミノ酸置換Ｔ３６６Ｗを含み、ホール修飾は、Ｆｃドメインの二つのサブユニットのうちの他方にアミノ酸置換Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ及びＹ４０７Ｖを含む。更なる特定の実施態様では、ノブ修飾を含むＦｃドメインのサブユニットは、加えてアミノ酸置換Ｓ３５４Ｃを含み、ホール修飾を含むＦｃドメインのサブユニットは、加えてアミノ酸置換Ｙ３４９Ｃを含む。これら二つのシステイン残基の導入により、Ｆｃ領域の二つのサブユニット間にジスルフィド架橋が形成され、従って二量体を更に安定させる（Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001)）。番号付けは、Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991のＥＵインデックスに従う。

【００９６】

「免疫グロブリンのＦｃ領域に等価な領域」は、免疫グロブリンのＦｃ領域の天然に生じるアレルバリアント、並びに置換、付加又は欠失を生成するが、免疫グロブリンのエフェクター機能（例えば抗体依存性細胞傷害性）媒介能を実質的に低下させることのない改変

を有する変異体を含めることを意図している。例えば、一又は複数のアミノ酸は、生物学的機能を実質的に失うことなく、免疫グロブリンのＦｃ領域のＮ末端又はＣ末端から欠失させることができる。このような変異体は、活性に対する影響が最小となるように、当該技術分野で知られた一般的規則に従って選択することができる（例えば、Bowie, J. U.等, Science 247:1306-10 (1990)参照）。

【００９７】

「エフェクター機能」という用語は、抗体のアイソタイプにより変わる抗体のＦｃ領域に起因する生物学的活性を指す。抗体エフェクター機能の例には、Ｃ１ｑ結合及び補体依存性細胞傷害性（ＣＤＣ）、Ｆｃ受容体結合、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性（ＡＤＣＣ）、抗体依存性細胞貪食（ＡＤＣＰ）、サイトカイン分泌、抗原提示細胞による免疫複合体媒介抗原取り込み、細胞表面受容体（例えば、Ｂ細胞受容体）のダウンレギュレーション、及びＢ細胞の活性化が含まれる。

【００９８】

「活性化Ｆｃ受容体」は、抗体のＦｃ領域による結合に続いて、エフェクター機能を実行するように受容体保有細胞を刺激するシグナル伝達イベントを誘発するＦｃ受容体である。活性化Ｆｃ受容体には、ＦｃγＲＩＩＩａ（ＣＤ１６ａ）、ＦｃγＲＩ（ＣＤ６４）、ＦｃγＲＩＩａ（ＣＤ３２）、及びＦｃαＲＩ（ＣＤ８９）が含まれる。特定の活性化Ｆｃ受容体は、ヒトＦｃγＲＩＩＩａである（ＵｎｉＰｒｏｔ受託番号Ｐ０８６３７、バージョン１４１参照）。

【００９９】

「ＴＮＦリガンドファミリーメンバー」又は「ＴＮＦファミリーリガンド」という用語は炎症誘発性サイトカインを指す。一般にサイトカイン、特にＴＮＦリガンドファミリーのメンバーは、免疫系の刺激及び協調に重要な役割を果たす。現在、１９のサイトカインが、配列、機能的及び構造的類似性に基づいてＴＮＦ（腫瘍壊死因子）リガンドスーパーファミリーのメンバーとして同定されている。これらのリガンドは全て、Ｃ末端細胞外ドメイン（エクトドメイン）、Ｎ末端細胞内ドメイン及び単一膜貫通ドメインを有するＩＩ型膜貫通タンパク質である。ＴＮＦ相同ドメイン（ＴＨＤ）として知られるＣ末端細胞外ドメインは、スーパーファミリーメンバー間で２０～３０％のアミノ酸同一性を有し、受容体への結合を担う。ＴＮＦエクトドメインはまたＴＮＦリガンドがそれらの特異的受容体によって認識される三量体複合体を形成することに関与している。

【０１００】

ＴＮＦリガンドファミリーのメンバーは、リンパ毒素α（ＬＴＡ又はＴＮＦＳＦ１としても知られている）、ＴＮＦ（ＴＮＦＳＦ２としても知られている）、ＬＴβ（ＴＮＦＳＦ３としても知られている）、ＯＸ４０Ｌ（ＴＮＦＳＦ４としても知られている）、ＣＤ４０Ｌ（ＣＤ１５４又はＴＮＦＳＦ５としても知られている）、ＦａｓＬ（ＣＤ９５Ｌ、ＣＤ１７８又はＴＮＦＳＦ６としても知られている）、ＣＤ２７Ｌ（ＣＤ７０又はＴＮＦＳＦ７としても知られている）、ＣＤ３０Ｌ（ＣＤ１５３又はＴＮＦＳＦ８としても知られている）、４－１ＢＢＬ（ＴＮＦＳＦ９としても知られている）、ＴＲＡＩＬ（ＡＰＯ２Ｌ、ＣＤ２５３又はＴＮＦＳＦ１０としても知られている）、ＲＡＮＫＬ（ＣＤ２５４又はＴＮＦＳＦ１１としても知られている）、ＴＷＥＡＫ（ＴＮＦＳＦ１２としても知られている）、ＡＰＲＩＬ（ＣＤ２５６又はＴＮＦＳＦ１３としても知られている）、ＢＡＦＦ（ＣＤ２５７又はＴＮＦＳＦ１３Ｂとしても知られている）、ＬＩＧＨＴ（ＣＤ２５８又はＴＮＦＳＦ１４としても知られている）、ＴＬ１Ａ（ＶＥＧＩ又はＴＮＦＳＦ１５としても知られている）、ＧＩＴＲＬ（ＴＮＦＳＦ１８としても知られている）、ＥＤＡ－Ａ１（エクトジスプラシンＡ１としても知られている）及びＥＤＡ－Ａ２（エクトジスプラシンＡ２としても知られている）からなる群から選択される。この用語は、特に断らない限り、霊長類（例えばヒト）、非ヒト霊長類（例えばカニクイザル）及びげっ歯類（例えば、マウス及びラット）などの哺乳動物を含む任意の脊椎動物源由来の任意の天然ＴＮＦファミリーリガンドを指す。本発明の特定の実施態様では、ＴＮＦリガンドファミリーメンバーは、ＯＸ４０Ｌ、ＦａｓＬ、ＣＤ２７Ｌ、ＴＲＡＩＬ、４－１ＢＢＬ、ＣＤ４０

Ｌ及びＧＩＴＲＬからなる群から選択される。特定の実施態様では、ＴＮＦリガンドファミリーメンバーは、４－１ＢＢＬ及びＯＸ４０Ｌから選択される。

【０１０１】

ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの更なる情報、特に配列は、Ｕｎｉｐｒｏｔ（ｗｗｗ．ｕｎｉｐｒｏｔ．ｏｒｇ）のような公的に入手可能なデータベースから得ることができる。例えば、ヒトＴＮＦリガンドは、次のアミノ酸配列を有する：ヒトリンホトキシンα（ＵｎｉＰｒｏｔ受託番号Ｐ０１３７４、配列番号：６７）、ヒトＴＮＦ（ＵｎｉＰｒｏｔ受託番号Ｐ０１３７５、配列番号：６８）、ヒトリンホトキシンβ（ＵｎｉＰｒｏｔ受託番号Ｑ０６６４３、配列番号：６９）、ヒトＯＸ４０Ｌ（ＵｎｉＰｒｏｔ受託番号Ｐ２３５１０、配列番号：７０）、ヒトＣＤ４０Ｌ（ＵｎｉＰｒｏｔ受託番号Ｐ２９９６５、配列番号：７１）、ヒトＦａｓＬ（ＵｎｉＰｒｏｔ受託番号Ｐ４８０２３、配列番号：７２）、ヒトＣＤ２７Ｌ（ＵｎｉＰｒｏｔ受託番号Ｐ３２９７０、配列番号：７３）、ヒトＣＤ３０Ｌ（ＵｎｉＰｒｏｔ受託番号Ｐ３２９７１、配列番号：７４）、４－１ＢＢＬ（ＵｎｉＰｒｏｔ受託番号Ｐ４１２７３、配列番号：７５）、ＴＲＡＩＬ（ＵｎｉＰｒｏｔ受託番号Ｐ５０５９１、配列番号：７６）、ＲＡＮＫＬ（ＵｎｉＰｒｏｔ受託番号Ｏ１４７８８、配列番号：７７）、ＴＷＥＡＫ（ＵｎｉＰｒｏｔ受託番号Ｏ４３５０８、配列番号：７８）、ＡＰＲＩＬ（ＵｎｉＰｒｏｔ受託番号Ｏ７５８８８、配列番号：７９）、ＢＡＦＦ（ＵｎｉＰｒｏｔ受託番号Ｑ９Ｙ２７５、配列番号：８０）、ＬＩＧＨＴ（ＵｎｉＰｒｏｔ受託番号Ｏ４３５５７、配列番号：８１）、ＴＬ１Ａ（ＵｎｉＰｒｏｔ受託番号Ｏ９５１５０、配列番号：８２）、ＧＩＴＲＬ（ＵｎｉＰｒｏｔ受託番号Ｑ９ＵＮＧ２、配列番号：８３）及びエクトジスプラシンＡ（ＵｎｉＰｒｏｔ受託番号Ｑ９２８３８、配列番号：８４）。

【０１０２】

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

【０１０３】

「共刺激ＴＮＦリガンドファミリーメンバー」又は「共刺激ＴＮＦファミリーリガンド」という用語は、Ｔ細胞の増殖及びサイトカイン産生を共刺激することができる、ＴＮＦリガンドファミリーメンバーのサブグループを指す。これらのＴＮＦファミリーリガンドは、その対応するＴＮＦ受容体との相互作用時にＴＣＲシグナルを共刺激することができ、その受容体との相互作用は、Ｔ細胞活性化をもたらすシグナル伝達カスケードを開始させるＴＮＦＲ関連因子（ＴＲＡＦ）の動員につながる。共刺激ＴＮＦファミリーリガンドは、４－１ＢＢＬ、ＯＸ４０Ｌ、ＧＩＴＲＬ、ＣＤ７０、ＣＤ３０Ｌ、及びＬＩＧＨＴからなる群から選択され、より具体的には、共刺激ＴＮＦリガンドファミリーメンバーは、４－１ＢＢＬ及びＯＸ４０Ｌから選択される。

【０１０４】

上述のように、４－１ＢＢＬはＩＩ型膜貫通タンパク質であり、ＴＮＦリガンドファミリーの一メンバーである。配列番号：４２のアミノ酸配列を有する完全長又は全長４－１ＢＢＬが、細胞の表面上に三量体を形成することが記載されている。三量体の形成は、４－１ＢＢＬのエクトドメインの特定のモチーフによって可能になる。前記モチーフは、ここでは「三量化領域」と命名される。ヒト４－１ＢＢＬ配列（配列番号：８５）のアミノ酸５０－２５４が、４－１ＢＢＬの細胞外ドメインを形成するが、その断片でさえも三量体を形成することができる。本発明の特定の実施態様では、「４－１ＢＢＬのエクトドメイ

ン又はその断片」という用語は、配列番号：４（ヒト４－１ＢＢＬのアミノ酸５２－２５４）、配列番号：１（ヒト４－１ＢＢＬのアミノ酸７１－２５４）、配列番号：３（ヒト４－１ＢＢＬのアミノ酸８０－２５４）、及び配列番号：２（ヒト４－１ＢＢＬのアミノ酸８５－２５４）から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチド、又は配列番号：５（ヒト４－１ＢＢＬのアミノ酸７１－２４８）、配列番号：８（ヒト４－１ＢＢＬのアミノ酸５２－２４８）、配列番号：７（ヒト４－１ＢＢＬのアミノ酸８０－２４８）及び配列番号：６（ヒト４－１ＢＢＬのアミノ酸８５－２４８）から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを指し、また三量体形成能を有するエクトドメインの他の断片もここに含まれる。

【０１０５】

上述のように、ＯＸ４０Ｌは別のＩＩ型膜貫通タンパク質であり、ＴＮＦリガンドファミリーの更なるメンバーである。完全長又は全長ヒトＯＸ４０Ｌは、配列番号：７０のアミノ酸配列を有する。ヒトＯＸ４０Ｌ配列（配列番号：１１）のアミノ酸５１－１８３は、ＯＸ４０Ｌの細胞外ドメインを形成するが、その断片でさえも三量体を形成することができる。本発明の特定の実施態様では、「ＯＸ４０Ｌのエクトドメイン又はその断片」という用語は、配列番号：１１（ヒトＯＸ４０Ｌのアミノ酸５１－１８３）又は配列番号：１２（ヒトＯＸ４０Ｌのアミノ酸５２－１８３）から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを指すが、三量体形成能を有するエクトドメインの他の断片もここに含まれる。

【０１０６】

「ペプチドリンカー」という用語は、一又は複数のアミノ酸、典型的には約２～２０のアミノ酸を含むペプチドを指す。ペプチドリンカーは当該分野において知られているか、又はここに記載される。適切な非免疫原性リンカーペプチドは、例えば、（Ｇ４Ｓ）ｎ、（ＳＧ４）ｎ又はＧ４（ＳＧ４）ｎペプチドリンカーであり、ここで「ｎ」は一般に１～１０の数、典型的には１～４の数、特に２であり、すなわち、ペプチドはＧＧＧＧＳ（配列番号：８６）、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号：８７）、ＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧ（配列番号：８８）、（Ｇ４Ｓ）３又はＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号：８９）、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧ又はＧ４（ＳＧ４）２（配列番号：９０）、及び（Ｇ４Ｓ）４又はＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号：９１）からなる群から選択されるが、配列ＧＳＰＧＳＳＳＳＧＳ（配列番号：９２）、ＧＳＧＳＧＳＧＳ（配列番号：９３）、ＧＳＧＳＧＮＧＳ（配列番号：９４）、ＧＧＳＧＳＧＳＧ（配列番号：９５）、ＧＧＳＧＳＧ（配列番号：９６）、ＧＧＳＧ（配列番号：９７）、ＧＧＳＧＮＧＳＧ（配列番号：９８）、ＧＧＮＧＳＧＳＧ（配列番号：９９）及びＧＧＮＧＳＧ（配列番号：１００）も含む。特に興味のあるペプチドリンカーは、（Ｇ４Ｓ）１又はＧＧＧＧＳ（配列番号：８６）、（Ｇ４Ｓ）２又はＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号：８７）及びＧＳＰＧＳＳＳＳＧＳ（配列番号：９２）であり、より特定的には（Ｇ４Ｓ）２又はＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号：８７）である。

【０１０７】

この出願内で使用される「アミノ酸」という用語は、アラニン（３文字コード：ａｌａ、１文字コード：Ａ）、アルギニン（ａｒｇ、Ｒ）、アスパラギン（ａｓｎ、Ｎ）、アスパラギン酸（ａｓｐ、Ｄ）、システイン（ｃｙｓ、Ｃ）、グルタミン（ｇｌｎ、Ｑ）、グルタミン酸（ｇｌｕ、Ｅ）、グリシン（ｇｌｙ、Ｇ）、ヒスチジン（ｈｉｓ、Ｈ）、イソロイシン（ｉｌｅ、Ｉ）、ロイシン（ｌｅｕ、Ｌ）、リジン（ｌｙｓ、Ｋ）、メチオニン（ｍｅｔ、Ｍ）、フェニルアラニン（ｐｈｅ、Ｆ）、プロリン（ｐｒｏ、Ｐ）、セリン（ｓｅｒ、Ｓ）、スレオニン（ｔｈｒ、Ｔ）、トリプトファン（ｔｒｐ、Ｗ）、チロシン（ｔｙｒ、Ｙ）、及びバリン（ｖａｌ、Ｖ）を含む天然に生じるカルボキシα－アミノ酸の群を意味する。

【０１０８】

ここで使用される「単鎖融合タンパク質」は、抗原結合部分又はＦｃ部分の一部に融合された前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一又は二のエクトドメインからなる単鎖ポリペプチドを指す。融合は、抗原結合部分のＮ又はＣ末端アミノ酸を、ペプチドリンカー

を介して、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーのエクトドメインのＣ末端又はＮ末端アミノ酸に直接的に連結することによって生じうる。

【０１０９】

「融合された」又は「連結された」とは、構成要素（例えば、ポリペプチド及び前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーのエクトドメイン）が、直接的にあるいは一又は複数のペプチドリンカーを介して、ペプチド結合によって連結されることを意味する。

【０１１０】

参照ポリペプチド（タンパク質）配列に対する「アミノ酸配列同一性パーセント（％）」は、最大の配列同一性パーセントを達成するように配列を整列させ、必要に応じてギャップを導入した後の、如何なる保存的置換も配列同一性の一部とみなさない、参照ポリペプチド配列内のアミノ酸残基と同一である候補配列内のアミノ酸残基のパーセンテージとして定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを決定する目的のためのアラインメントは、当業者の技量内にある様々な方法で、例えばＢＬＡＳＴ、ＢＬＡＳＴ－２、ＡＬＩＧＮ、ＳＡＷＩ又はＭｅｇａｌｉｇｎ（ＤＮＡＳＴＡＲ）ソフトウェアのような公的に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用して達成することができる。当業者であれば、比較される配列の全長にわたって最大のアライメントを達成するのに必要な任意のアルゴリズムを含め、配列を整列させるための適切なパラメータを決定することができる。しかしながら、ここでの目的に対して、アミノ酸配列同一性％の値は、配列比較コンピュータプログラムＡＬＩＧＮ－２を使用して生成される。ＡＬＩＧＮ－２配列比較コンピュータプログラムは、ジェネンテック社によって著作され、ソースコードは米国著作権庁、ワシントンＤ．Ｃ．，２０５５９に使用者用書類と共に提出され、米国著作権登録番号ＴＸＵ５１００８７で登録されている。ＡＬＩＧＮ－２プログラムは、ジェネンテック社（South San Francisco, California）から公的に入手可能であり、又はそのソースコードからコンパイルされうる。ＡＬＩＧＮ－２プログラムは、デジタルＵＮＩＸのＶ４．０Ｄを含むＵＮＩＸオペレーティングシステムでの使用のためにコンパイルされるべきである。全ての配列比較パラメータはＡＬＩＧＮ－２プログラムによって設定され、変動しない。アミノ酸配列比較にＡＬＩＧＮ－２が用いられる状況では、与えられたアミノ酸配列Ａの、与えられたアミノ酸配列Ｂへの、それとの、又はそれに対するアミノ酸配列同一性％（あるいは、与えられたアミノ酸配列Ｂへの、それとの、又はそれに対する所定のアミノ酸配列同一性％を有するか又は含む与えられたアミノ酸配列Ａと言うこともできる）は、次のように計算される：

分率Ｘ／Ｙの１００倍

ここで、Ｘは配列アラインメントプログラムＡＬＩＧＮ－２により、ＡとＢのそのプログラムのアラインメントにおいて完全な一致としてスコアされたアミノ酸残基の数であり、ＹはＢの全アミノ酸残基数である。アミノ酸配列Ａの長さがアミノ酸配列Ｂの長さと等しくない場合、ＡのＢに対するアミノ酸配列同一性％は、ＢのＡに対するアミノ酸配列同一性％とは等しくないことは理解されるであろう。特に断らない限り、ここで使用される全てのアミノ酸配列同一性％値は、ＡＬＩＧＮ－２コンピュータプログラムを使用して、直前の段落に記載されたようにして得られる。

【０１１１】

所定の実施態様では、ここで提供されるＴＮＦリガンド三量体含有抗原結合分子のアミノ酸配列変異体が考慮される。例えば、ＴＮＦリガンド三量体含有抗原結合分子の結合親和性及び／又は他の生物学的特性を改善することが望ましい場合がある。ＴＮＦリガンド三量体含有抗原結合分子のアミノ酸配列変異体は、分子をコードするヌクレオチド配列に適切な修飾を導入することにより、又はペプチド合成により、調製することができる。このような修飾は、例えば、抗体のアミノ酸配列内の残基からの欠失、及び／又は残基への挿入、及び／又は残基の置換を含む。最終コンストラクトが所望の特性、例えば抗原結合を有していることを条件として、最終コンストラクトに到達するために欠失、挿入、及び置換の任意の組み合わせを行うことができる。置換変異誘発のための対象部位には、ＨＶＲ及びフレームワーク（ＦＲ）が含まれる。保存的置換は、表Ｂに「好ましい置換」という

見出しの下に提供され、アミノ酸側鎖クラス（１）～（６）を参照して以下に更に記載される。アミノ酸置換は、対象の分子に導入することができ、その産物は、所望の活性、例えば、抗原結合性の保持／改善、免疫原性の低下、又はＡＤＣＣ又はＣＤＣの改善についてスクリーニングされうる。

【０１１２】

表B

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

【０１１３】

アミノ酸は、共通の側鎖特性に従ってグループ分けされうる：

（１）疎水性：ノルロイシン、Ｍｅｔ、Ａｌａ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ；

（２）中性の親水性：Ｃｙｓ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ；

（３）酸性：Ａｓｐ、Ｇｌｕ；

（４）塩基性：Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ａｒｇ；

（５）鎖配向に影響する残基：Ｇｌｙ、Ｐｒｏ；

（６）芳香族：Ｔｒｐ、Ｔｙｒ、Ｐｈｅ。

【０１１４】

非保存的置換は、これらのクラスのうちの一つのメンバーを別のクラスに交換することを必要とする。

【０１１５】
「アミノ酸配列変異体」という用語は、親抗原結合分子（例えば、ヒト化抗体又はヒト抗体）の一又は複数の超可変領域残基にアミノ酸置換が存在する実質的な変異体を含む。一般に、更なる研究のために選択された得られた変異体は、親抗原結合分子と比較して、特定の生物学的特性の修飾（例えば、改善）（例えば、親和性の増加、免疫原性の低下）を有し、かつ／又は親抗原結合分子の特定の生物学的特性を実質的に保持するであろう。例示的な置換変異体は、親和性成熟抗体であり、例えば、ここに記載のものなどのファージディスプレイに基づく親和性成熟技術を使用して簡便に作製することができる。簡潔には、一又は複数のＨＶＲ残基が変異され、変異体抗原結合分子がファージ上に提示され、特定の生物学的活性（例えば結合親和性）についてスクリーニングされる。所定の実施態様では、抗原結合分子が抗原に結合する能力を実質的に低減させない限り、一又は複数のＨＶＲ内に置換、挿入又は欠失が生じうる。例えば、実質的に結合親和性を低減させない保存的改変（例えばここで提供される保存的置換）をＨＶＲ内で行うことができる。変異誘発の標的となりうる抗体の残基又は領域の同定のための有用な方法は、Cunningham及びWells (1989) Science, 244:1081-1085に記載されているように「アラニンスキャニング変異誘発」と呼ばれる。この方法では、標的残基の残基又は群（例えば、Ａｒｇ、Ａｓｐ、Ｈｉｓ、Ｌｙｓ及びＧｌｕのような荷電残基）が同定され、抗原と抗体との相互作用が影響を受けるかどうかを決定するために、中性又は負に荷電したアミノ酸（例えば、アラニン又はポリアラニン）により置換される。更なる置換が、最初の置換に対する機能的感受性を示すアミノ酸位置に導入されうる。あるいは又は加えて、抗原－抗原結合分子複合体の結晶構造が、抗体と抗原との接触点を同定する。そのような接触残基及び隣接残基は、置換の候補として標的とされてもよいし、又は排除されてもよい。変異体は、所望の特性を含むかどうかを決定するためにスクリーニングされうる。
【０１１６】
アミノ酸配列挿入には、１残基から１００以上の残基を含むポリペプチドまでの長さの範囲のアミノ末端及び／又はカルボキシル末端融合、並びに単一又は複数のアミノ酸残基の配列内挿入が含まれる。末端挿入の例には、Ｎ末端メチオニル残基を有するＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が含まれる。分子の他の挿入変異体には、ＴＮＦリガンド三量体含有抗原結合分子の血清半減期を増加させるポリペプチドへのＮ末端又はＣ末端への融合が含まれる。
【０１１７】
所定の実施態様では、ここで提供されるＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、抗体がグリコシル化される程度を増加又は減少させるように改変される。分子のグリコシル化変異体は、一又は複数のグリコシル化部位が生成又は除去されるようにアミノ酸配列を改変することによって簡便に得ることができる。ＴＮＦリガンド三量体含有抗原結合分子がＦｃ領域を含む場合、それに結合した糖が改変されうる。哺乳動物細胞によって産生される天然抗体は、典型的には、Ｆｃ領域のＣＨ２ドメインのＡｓｎ２９７にＮ結合によって一般に結合されている分枝した二分岐オリゴ糖を含む。例えばWright等 TIBTECH 15:26-32 (1997)を参照。オリゴ糖は、様々な糖、例えば、マンノース、Ｎ－アセチルグルコサミン（ＧｌｃＮＡｃ）、ガラクトース、及びシアル酸、並びに二分岐オリゴ糖構造の「幹」のＧｌｃＮＡｃに結合したフコースを含む。幾つかの実施態様では、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子におけるオリゴ糖の修飾が、所定の改善された特性を有する変異体を作製するために行われうる。一態様では、Ｆｃ領域に（直接的又は間接的に）結合したフコースを欠く糖構造を有するＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子の変異体が提供される。そのようなフコシル化変異体は、改善されたＡＤＣＣ機能を有しうる。例えば、米国特許出願公開第２００３／０１５７１０８号（Presta, L.）又は米国特許出願公開第２００４／００９３６２１号（協和発酵工業株式会社）を参照。本発明のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子の更なる変異体には、例えば、Ｆｃ領域に結合した二分岐オリゴ糖がＧｌｃＮＡｃによって二分されている、二分されたオリゴ糖を有するものが含まれる。そのような変異体は、フコシル化及び／又

は改善されたＡＤＣＣ機能を有する場合がある。例えば、国際公開第２００３／０１１８７８号（Jean-Mairet等）；米国特許第６６０２６８４号（Umana等）；及び米国特許出願公開第２００５／０１２３５４６号（Umana等）を参照。Ｆｃ領域に結合したオリゴ糖中に少なくとも一つのガラクトース残基を有する変異体もまた提供される。そのような抗体変異体は、改善されたＣＤＣ機能を有する場合があり、例えば国際公開第１９９７／３００８７号（Patel等）；国際公開第１９９８／５８９６４号（Raju, S.）；及び国際公開第１９９９／２２７６４号（Raju, S.）に記載されている。

【０１１８】

所定の実施態様では、本発明のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子のシステイン操作変異体、例えば分子の一又は複数の残基がシステイン残基で置換されている「チオＭＡｂ」を作製することが望ましい場合がある。特定の実施態様では、置換された残基は分子の接近可能な部位で生じる。その残基をシステインで置換することにより、反応性チオール基をそれにより抗体の接近可能な部位に位置させ、抗体を、例えば薬物部分又はリンカー－薬物部分のような他の部分にコンジュゲートするために使用して、イムノコンジュゲートを作製することができる。所定の実施態様では、次の残基のうちの何れかの一又は複数がシステインで置換されうる：軽鎖のＶ２０５（Ｋａｂａｔの番号付け）；重鎖のＡ１１８（ＥＵ番号付け）；及び重鎖Ｆｃ領域のＳ４００（ＥＵ番号付け）。システイン操作抗原結合分子は、例えば、米国特許第７５２１５４１号に記載されているようにして作製されうる。

【０１１９】

所定の態様では、ここで提供されるＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、当該技術分野で知られており、容易に入手可能な追加の非タンパク質部分を含むように更に修飾することができる。抗体の誘導体化に適した部分は、限定されるものではないが、水溶性ポリマーを含む。水溶性ポリマーの非限定的な例は、限定されないが、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）、エチレングリコール／プロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ－１，３－ジオキソラン、ポリ－１，３，６－トリオキサン、エチレン／無水マレイン酸コポリマー、ポリアミノ酸（ホモポリマー又はランダムコポリマーの何れか）、及びデキストラン又はポリ（ｎ－ビニルピロリドン）ポリエチレングリコール、プロプロピレングリコールホモポリマー、プロリプロピレンオキシド／エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール（例えばグリセロール）、ポリビニルアルコール、及びそれらの混合物を含む。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは、水中でのその安定性のために製造上の利点を有しうる。ポリマーは、任意の分子量であってよく、分枝状でも非分枝状でもよい。抗体に結合されるポリマーの数は変動しうるが、一を超えるポリマーが結合される場合、それらは同じか又は異なる分子であってもよい。一般に、誘導体化に使用されるポリマーの数及び／又は種類は、限定されるものではないが、改善されるべき抗体の特定の性質又は機能、二重特異性抗体誘導体が定まった条件下で治療に使用されるかどうか等々を含む考慮事項に基づいて決定することができる。別の態様では、放射線への曝露によって選択的に加熱されうる非タンパク質部分と抗体とのコンジュゲートが提供される。一実施態様では、非タンパク質部分は、カーボンナノチューブである（Kam, N.W.等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (2005) 11600-11605）。放射線は任意の波長のものであり得、限定されないが、通常の細胞を害さないが、抗体－非タンパク質部分の近位細胞が死滅する温度まで非タンパク質部分を加熱する波長を含む。

【０１２０】

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

【０１２１】

「ポリヌクレオチド」という用語は、単離された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）、ウイルス由来ＲＮＡ、又はプラスミドＤＮＡ（ｐＤ

ＮＡ）を指す。ポリヌクレオチドは、一般的なホスホジエステル結合又は非一般的結合（例えば、ペプチド核酸（ＰＮＡ）に見られるようなアミド結合）を含みうる。「核酸分子」という用語は、ポリヌクレオチド中に存在する、任意の一又は複数の核酸セグメント、例えばＤＮＡ又はＲＮＡ断片を指す。

【０１２２】

「単離された」核酸分子又はポリヌクレオチドによって、その天然環境から除去されている核酸分子、ＤＮＡ又はＲＮＡが意図される。例えば、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は、本発明の目的に対して単離されたと考えられる。単離されたポリヌクレオチドの更なる例には、異種宿主細胞内に維持された組換えポリヌクレオチド、又は溶液中の（部分的に又は実質的に）精製されたポリヌクレオチドが含まれる。単離されたポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチド分子を通常は含む細胞に含まれるポリヌクレオチド分子を含むが、そのポリヌクレオチド分子は、染色体外又はその自然の染色体上の位置とは異なる染色体位置に存在している。単離されたＲＮＡ分子は、インビボ又はインビトロの本発明のＲＮＡ転写物、並びにポジティブ及びネガティブな鎖型、及び二重鎖型を含む。本発明に係る単離されたポリヌクレオチド又は核酸は、更に合成により製造されたそのような分子を含む。加えて、ポリヌクレオチド又は核酸は、プロモーター、リボソーム結合部位、又は転写ターミネーターのような調節エレメントでありうるか又はこれを含みうる。

【０１２３】

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

【０１２４】

「発現カセット」という用語は、組換えにより又は合成により、標的細胞内の特定の核酸の転写を許容する一連の特定の核酸エレメントを用いて生成されたポリヌクレオチドを指す。組換え発現カセットは、プラスミド、染色体、ミトコンドリアＤＮＡ、プラスチドＤＮＡ、ウイルス、又は核酸断片中に取り込むことができる。典型的には、発現ベクターの組換え発現カセット部分には、他の配列の中でも、転写される核酸配列及びプロモーターが含まれる。所定の実施態様では、本発明の発現カセットは、本発明の二重特異性抗原結合分子をコードするポリヌクレオチド配列又はその断片を含む。

【０１２５】

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

クレオチド配列又はその断片を含む発現カセットを含む。

【０１２６】

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

【０１２７】

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

【０１２８】

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

【０１２９】

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

【０１３０】

「薬学的組成物」という用語は、その中に含まれる活性成分の生物学的活性を有効であるようにする形態であり、製剤が投与される対象にとって許容できない毒性を有する更なる成分を含まない調製物を指す。

【０１３１】

「薬学的に許容可能な賦形剤」は、対象に非毒性である、活性成分以外の薬学的組成物中の成分を指す。薬学的に許容可能な賦形剤は、限定されないが、緩衝液、安定剤、又は保存料を含む。

【０１３２】

「添付文書」という用語は、治療製品の商品包装に通例含まれる説明書を指すのに使用され、適応症、用法、投薬量、投与、併用療法、当該治療製品の使用に関する禁忌及び／又は注意事項についての情報を含む。

【０１３３】

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

【０１３４】

ここで使用される「がん」という用語は、増殖性疾患、例えば、リンパ腫、がん腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、白血病、リンパ性白血病、肺がん、非小細胞肺（ＮＳＣＬ）がん

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

【０１３５】

［本発明のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子］

本発明は、生産性、安定性、堅牢性、結合親和性、生物学的活性、ターゲティング効率、及び毒性低減などの特に有利な性質を有する新規なＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供する。

【０１３６】

第一の態様では、本発明は、

（ａ）標的細胞抗原に特異的に結合することができるＦａｂドメイン、

（ｂ）安定な会合が可能な第一及び第二サブユニットからなるＦｃドメイン、及び

（ｃ）ペプチドリンカーによって互いに連結されたＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドと、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドであって、Ｆｃドメインのサブユニットの一つのＣ末端にそのＮ末端で融合された第一ポリペプチドと、Ｆｃドメインの他のサブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合された第二ポリペプチドを含む、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供する。

【０１３７】

特定の態様では、本発明は、

（ａ）標的細胞抗原に特異的に結合することができるＦａｂドメイン、

（ｂ）安定な会合が可能な第一及び第二サブユニットからなるＦｃドメイン、及び

（ｃ）ペプチドリンカーによって互いに連結された共刺激性ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドと、前記共刺激性ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドであって、Ｆｃドメインのサブユニットの一つのＣ末端にそのＮ末端で融合された第一ポリペプチドと、Ｆｃドメインの他のサブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合された第二ポリペプチドを含む、共刺激性ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供する。よって、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、（ａ）標的細胞抗原に特異的に結合することができるＦａｂドメイン、（ｂ）安定な会合が可能な第一及び第二サブユニットからなるＦｃドメイン、及び（ｃ）ペプチドリンカーによって互いに連結されたＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドと、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドであって、Ｆｃドメインのサブユニットの一つのＣ末端にそのＮ末端で融合された第一ポリペプチドと、Ｆｃドメインの他のサブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合された第二ポリペプチドを含み、ＴＮＦリガンドファミリーメンバーがヒトＴ細胞活性化を共刺激する。

【０１３８】

別の特定の態様では、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、（ａ）標的細胞抗原に特異的に結合することができるＦａｂドメイン、（ｂ）安定な会合が可能な第

一及び第二サブユニットからなるＦｃドメイン、及び（ｃ）ペプチドリンカーによって互いに連結されたＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドと、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドであって、Ｆｃドメインのサブユニットの一つのＣ末端にそのＮ末端で融合された第一ポリペプチドと、Ｆｃドメインの他のサブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合された第二ポリペプチドを含み、ＴＮＦリガンドファミリーメンバーのエクトドメインがどの場合においても同一である。

【０１３９】

特定の態様では、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、４－１ＢＢＬ及びＯＸ４０Ｌから選択される、ヒトＴ細胞活性化を共刺激するＴＮＦリガンドファミリーメンバーを含む。より特定的には、ＴＮＦリガンドファミリーメンバーは４－１ＢＢＬである。

【０１４０】

更なる態様では、ＴＮＦリガンドファミリーメンバーのエクトドメインは、配列番号：１、配列番号：２、配列番号：３、配列番号：４、配列番号：５、配列番号：６、配列番号：７及び配列番号：８からなる群から選択されるアミノ酸配列、特に配列番号：１又は配列番号：５のアミノ酸配列を含む。

【０１４１】

特定の態様では、ＴＮＦリガンドファミリーメンバーのエクトドメインは、配列番号：５、配列番号：６、配列番号：７及び配列番号：８からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。より特定的には、ＴＮＦリガンドファミリーメンバーのエクトドメインは配列番号：５のアミノ酸配列を含む。

【０１４２】

更なる態様では、本発明のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、

（ａ）標的細胞抗原に特異的に結合することができるＦａｂドメイン、

（ｂ）安定な会合が可能な第一及び第二サブユニットからなるＦｃドメイン、及び

（ｃ）ペプチドリンカーによって互いに連結されたＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドと、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドであって、Ｆｃドメインのサブユニットの一つのＣ末端にそのＮ末端で融合された第一ポリペプチドと、Ｆｃドメインの他のサブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合された第二ポリペプチドを含み、ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドは、配列番号：９及び配列番号：１０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドは、配列番号：１及び配列番号：５からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一態様では、ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドは配列番号：９のアミノ酸配列を含み、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドは配列番号：１のアミノ酸配列を含む。特定の態様では、ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドは配列番号：１０のアミノ酸配列を含み、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドは配列番号：５のアミノ酸配列を含む。

【０１４３】

更なる態様では、ＴＮＦリガンドファミリーメンバーがＯＸ４０Ｌである、上述のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。一態様では、ＴＮＦリガンドファミリーメンバーのエクトドメインが、配列番号：１１及び配列番号：１２からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。

【０１４４】

一態様では、本発明は、

（ａ）標的細胞抗原に特異的に結合することができる一つのＦａｂドメイン、
（ｂ）安定な会合が可能な第一及び第二サブユニットからなるＦｃドメイン、及び
（ｃ）ペプチドリンカーによって互いに連結されたＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドと、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドであって、Ｆｃドメインのサブユニットの一つのＣ末端にそのＮ末端で融合された第一ポリペプチドと、Ｆｃドメインの他のサブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合された第二ポリペプチドを含む、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供する。従って、本発明は、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が、標的細胞抗原への結合に対して一価であるＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子に関する。

【０１４５】
別の態様では、標的細胞抗原が、線維芽細胞活性化タンパク質（ＦＡＰ）、ＣＤ１９、がん胎児抗原（ＣＥＡ）、メラノーマ関連コンドロイチン硫酸プロテオグリカン（ＭＣＳＰ）、上皮増殖因子受容体（ＥＧＦＲ）、ＣＤ２０及びＣＤ３３からなる群から選択される、本発明のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。一態様では、標的細胞抗原は、線維芽細胞活性化タンパク質（ＦＡＰ）、ＣＤ１９及びがん胎児抗原（ＣＥＡ）からなる群から選択される。

【０１４６】
特定の態様では、標的細胞抗原に特異的に結合することができるＦａｂドメインが、標的細胞抗原に特異的に結合することができるＦａｂ又はクロスオーバーＦａｂである、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。

【０１４７】
特定の態様では、標的細胞抗原は線維芽細胞活性化タンパク質（ＦＡＰ）である。

【０１４８】
一態様では、本発明は、ＦＡＰに特異的に結合することができるＦａｂドメインが、
（ａ）（ｉ）配列番号：１３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号：１４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び（ｉｉｉ）配列番号：１５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含むＶＨドメインと、（ｉｖ）配列番号：１６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｖ）配列番号：１７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、及び（ｖｉ）配列番号：１８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含むＶＬドメイン又は
（ｂ）（ｉ）配列番号：１９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号：２０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号：２１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含むＶＨドメインと、（ｉｖ）配列番号：２２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｖ）配列番号：２３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、及び（ｖｉ）配列番号：２４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含むＶＬドメイン
を含む、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供する。

【０１４９】
特定の態様では、本発明は、ＦＡＰに特異的に結合することができるＦａｂドメインが、（ｉ）配列番号：１９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号：２０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号：２１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含むＶＨドメインと、（ｉｖ）配列番号：２２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｖ）配列番号：２３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、及び（ｖｉ）配列番号：２４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含むＶＬドメインを含む、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供する。

【０１５０】
更なる態様では、ＦＡＰに特異的に結合することができるＦａｂドメインが、配列番号：２５のアミノ酸配列を含む可変重鎖と、配列番号：２６のアミノ酸配列を含む可変軽鎖を含むか、又はＦＡＰに特異的に結合することができるＦａｂドメインが、配列番号：２７のアミノ酸配列を含む可変重鎖と、配列番号：２８のアミノ酸配列を含む可変軽鎖を含む、上述のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。

【０１５１】
他の特定の態様では、標的細胞抗原はＣＤ１９である。
【０１５２】
一態様では、本発明は、ＣＤ１９に特異的に結合することができるＦａｂドメインが、（ａ）（ｉ）配列番号：２９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号：３０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号：３１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含むＶＨドメインと、（ｉｖ）配列番号：３２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｖ）配列番号：３３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、及び（ｖｉ）配列番号：３４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含むＶＬドメイン、又は
（ｂ）（ｉ）配列番号：３５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号：３６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号：３７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含むＶＨドメインと、（ｉｖ）配列番号：３８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｖ）配列番号：３９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、及び（ｖｉ）配列番号：４０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含むＶＬドメイン
を含む、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供する。
【０１５３】
特定の態様では、本発明は、ＣＤ１９に特異的に結合することができるＦａｂドメインが、（ｉ）配列番号：３５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号：３６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号：３７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含むＶＨドメインと、（ｉｖ）配列番号：３８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｖ）配列番号：３９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、及び（ｖｉ）配列番号：４０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含むＶＬドメインを含む、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供する。
【０１５４】
更なる態様では、ＣＤ１９に特異的に結合することができるＦａｂドメインが、配列番号：４１のアミノ酸配列を含む可変重鎖と、配列番号：４２のアミノ酸配列を含む可変軽鎖を含むか、又はＦＡＰに特異的に結合することができるＦａｂドメインが、配列番号：４３のアミノ酸配列を含む可変重鎖と、配列番号：４４のアミノ酸配列を含む可変軽鎖を含む、上述のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。
【０１５５】
他の特定の態様では、標的細胞抗原はＣＥＡである。
【０１５６】
一態様では、本発明は、ＣＥＡに特異的に結合することができるＦａｂドメインが、（ｉ）配列番号：４５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号：４６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号：４７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含むＶＨドメインと、（ｉｖ）配列番号：４８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｖ）配列番号：４９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、及び（ｖｉ）配列番号：５０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含むＶＬドメインを含む、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供する。
【０１５７】
特定の態様では、本発明は、ＣＥＡに特異的に結合することができるＦａｂドメインが、配列番号：５１のアミノ酸配列を含む可変重鎖と、配列番号：５２のアミノ酸配列を含む可変軽鎖を含む、上述のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。
【０１５８】
更なる態様では、ＦｃドメインはＩｇＧ、特にＩｇＧ１ ＦｃドメインまたはＩｇＧ４ Ｆｃドメインである。より具体的には、ＦｃドメインはＩｇＧ１ Ｆｃドメインである。特定の態様では、ＦｃドメインはＦｃドメインの第一及び第二サブユニットの会合を促進する修飾を含む。
【０１５９】
特に、本発明のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、標的細胞抗原に特

異的に結合することができるＦａｂドメインを含み、Ｆａｂ重鎖は、Ｆｃドメイン中のＣＨ２ドメインのＮ末端にＣ末端で融合している。

【０１６０】

別の態様では、本発明は、

（ｂ）安定な会合が可能な第一及び第二サブユニットからなるＦｃドメインを含み、該Ｆｃドメインが、Ｆｃ受容体、特にＦｃγ受容体への結合を減少させる一又は複数のアミノ酸置換を含む、上述のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子に関する。

【０１６１】

［Ｆｃ受容体結合及び／又はエフェクター機能を低減させるＦｃドメイン修飾］

本発明のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子のＦｃドメインは、免疫グロブリン分子の重鎖ドメインを含む一対のポリペプチド鎖からなる。例えば、免疫グロブリンＧ（ＩｇＧ）分子のＦｃドメインは二量体であり、その各々のサブユニットはＣＨ２及びＣＨ３ ＩｇＧ重鎖定常ドメインを含む。Ｆｃドメインの二つのサブユニットは、互いに安定に会合することができる。

【０１６２】

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

【０１６３】

特定の態様では、ここで提供されるＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子のＦｃ領域に一又は複数のアミノ酸修飾を導入し、それによりＦｃ領域変異体を作製することができる。Ｆｃ領域変異体は、一又は複数のアミノ酸位置にアミノ酸修飾（例えば、置換）を含むヒトＦｃ領域配列（例えば、ヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３又はＩｇＧ４Ｆｃ領域）を含みうる。

【０１６４】

特定の態様では、本発明は、

（ａ）標的細胞抗原に特異的に結合することができるＦａｂドメイン、

（ｂ）安定な会合が可能な第一及び第二サブユニットからなるＦｃドメイン、及び

（ｃ）ペプチドリンカーによって互いに連結されたＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドと、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドであって、Ｆｃドメインのサブユニットの一つのＣ末端にそのＮ末端で融合された第一ポリペプチドと、Ｆｃドメインの他のサブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合された第二ポリペプチドを含み、Ｆｃドメインが、Ｆｃ受容体、特にＦｃγ受容体への結合を低下させる一又は複数のアミノ酸置換を含む、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供す

る。
【０１６５】
一態様では、本発明のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子のＦｃドメインは、ＦｃドメインのＦｃ受容体に対する結合親和性及び／又はエフェクター機能を低減させる一又は複数のアミノ酸変異を含む。典型的には、Ｆｃドメインの二つのサブユニットのそれぞれに同じ一又は複数のアミノ酸変異が存在する。特に、Ｆｃドメインは、Ｅ２３３、Ｌ２３４、Ｌ２３５、Ｎ２９７、Ｐ３３１及びＰ３２９（ＥＵ番号付け）の位置にアミノ酸置換を含む。特に、Ｆｃドメインは、ＩｇＧ重鎖の位置２３４及び２３５（ＥＵ番号付け）及び／又は３２９（ＥＵ番号付け）にアミノ酸置換を含む。より具体的には、ＩｇＧ重鎖中のアミノ酸置換Ｌ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、及びＰ３２９Ｇ（「Ｐ３２９Ｇ　ＬＡＬＡ」、ＥＵ番号付け）を有するＦｃドメインを含む、本発明に係る三量体ＴＮＦファミリーリガンド含有抗原結合分子が提供される。アミノ酸置換Ｌ２３４Ａ及びＬ２３５Ａは、いわゆるＬＡＬＡ変異を指す。アミノ酸置換の「Ｐ３２９Ｇ ＬＡＬＡ」組み合せは、ヒトＩｇＧ１ ＦｃドメインのＦｃγ受容体結合をほぼ完全に破壊し、国際特許出願公開番号ＷＯ２０１２／１３０８３１Ａ１に記載されており、これはそのような変異体Ｆｃドメインを調製する方法と、Ｆｃ受容体結合又はエフェクター機能などのその性質を決定する方法をまた記載している。「ＥＵ番号付け」は、Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991のＥＵインデックスに従う番号付けを指す。
【０１６６】
Ｆｃ受容体結合及び／又はエフェクター機能が低減したＦｃドメインは、Ｆｃドメイン残基２３８、２６５、２６９、２７０、２９７、３２７及び３２９のうちの一又は複数の置換を伴うものを含む（米国特許第６７３７０５６号）。そのようなＦｃ変異体は、残基２６５及び２９７のアラニンへの置換を有するいわゆる「ＤＡＮＡ」Ｆｃ変異体を含む、アミノ酸位置２６５、２６９、２７０、２９７及び３２７のうちの二以上において置換を有するＦｃ変異体を含む（米国特許第７３３２５８１号）。
【０１６７】
別の態様では、ＦｃドメインはＩｇＧ４ Ｆｃドメインである。ＩｇＧ４抗体は、ＩｇＧ１抗体と比較して、Ｆｃ受容体に対する結合親和性の低減及びエフェクター機能の低減を示す。より特定の態様では、Ｆｃドメインは、Ｓ２２８（Ｋａｂａｔ番号付け）の位置にアミノ酸置換を、特にアミノ酸置換Ｓ２２８Ｐを含む、ＩｇＧ４ Ｆｃドメインである。より特定の態様では、Ｆｃドメインは、アミノ酸置換Ｌ２３５Ｅ及びＳ２２８Ｐ及びＰ３２９Ｇ（ＥＵ番号付け）を含む、ＩｇＧ４ Ｆｃドメインである。そのようなＩｇＧ４ Ｆｃドメイン変異体及びそれらのＦｃγ受容体結合特性はまた国際公開第２０１２／１３０８３１号に記載されている。
【０１６８】
変異体Ｆｃドメインは、当該技術分野で周知の遺伝学的又は化学的方法を使用するアミノ酸の欠失、置換、挿入、又は修飾により調製することができる。遺伝学的方法は、コード化ＤＮＡ配列の部位特異的変異誘発、ＰＣＲ、遺伝子合成などを含みうる。正確なヌクレオチド変化は、例えば配列決定により検証することができる。
【０１６９】
Ｆｃ受容体に対する結合は、例えばＥＬＩＳＡにより、又はＢＩＡｃｏｒｅ器具（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）のような標準の器具類を使用する表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）により容易に決定することができ、このようなＦｃ受容体は組換え発現により得ることができる。このような適切な結合アッセイはここに記載される。代替的に、Ｆｃドメイン、又はＦｃドメインを含む細胞活性化二重特異性抗原結合分子のＦｃ受容体に対する結合親和性は、特定のＦｃ受容体を発現することが知られている細胞株、例えばＦｃγＩＩＩａ受容体を発現するヒトＮＫ細胞を使用して評価されうる。
【０１７０】
Ｆｃドメイン、又はＦｃドメインを含む本発明の二重特異性抗体のエフェクター機能は、

当該技術分野で知られた方法により測定することができる。ＡＤＣＣを測定するための適切なアッセイはここに記載される。対象分子のＡＤＣＣ活性を評価するためのインビトロアッセイの他の例が、米国特許第５５００３６２号；Hellstrom等 Proc Natl Acad Sci USA 83, 7059-7063 (1986)及びHellstrom等, Proc Natl Acad Sci USA 82, 1499-1502 (1985)；米国特許第５８２１３３７号；Bruggemann等, J Exp Med 166, 1351-1361 (1987)に記載されている。あるいは、非放射性アッセイ法を用いてもよい（例えばフローサイトメトリーのためのＡＣＴＩ™非放射性細胞傷害性アッセイ（CellTechnology, Inc. Mountain View, CA）；及びＣｙｔｏＴｏｘ ９６（登録商標）非放射性細胞傷害性アッセイ（Promega, Madison, WI）参照）。このようなアッセイに有用なエフェクター細胞には、末梢血単核球（ＰＢＭＣ）及びナチュラルキラー（ＮＫ）細胞が含まれる。あるいは、又は加えて、対象分子のＡＤＣＣ活性は、例えばClynes等, Proc Natl Acad Sci USA 95, 652-656 (1998)に開示されるもののような動物モデルにおいてインビボで評価することができる。

【０１７１】

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

【０１７２】

特定の態様では、Ｆｃドメインは、Ｆｃドメインの第一及び第二サブユニットの会合を促進する修飾を含む。

【０１７３】

［ヘテロ二量体化を促進するＦｃドメイン修飾］

一態様では、本発明のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、（ａ）標的細胞抗原に特異的に結合することができるＦａｂドメイン、（ｂ）安定な会合が可能な第一及び第二サブユニットからなるＦｃドメイン、及び（ｃ）ペプチドリンカーによって互いに連結されたＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドと、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドであって、Ｆｃドメインのサブユニットの一つのＣ末端にそのＮ末端で融合された第一ポリペプチドと、Ｆｃドメインの他のサブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合された第二ポリペプチドを含み、Ｆｃドメインが、Ｆｃ受容体、特にＦｃγ受容体への結合を低下させる一又は複数のアミノ酸置換を含む。よって、それらは、典型的には二つの非同一ポリペプチド鎖（「重鎖」）に含まれるＦｃドメインの二つのサブユニットの一方又は他方に融合された異なる部分を含む。これらのポリペプチドの組換え同時発現とそれに続く二量体化は、二つのポリペプチドの幾つかの可能な組み合わせをもたらす。従って、組換え産生におけるＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子の収率及び純度を改善するためには、本発明のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子のＦｃドメイン内に所望のポリペプチドの会合を促進する修飾を導入することが有利であろう。

【０１７４】

従って、本発明のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子のＦｃドメインは、Ｆｃドメインの第一サブユニットと第二サブユニットの会合を促進する修飾を含む。ヒトＩｇＧのＦｃドメインの二つのサブユニット間の最も広範囲のタンパク質－タンパク質相互作用の部位は、ＦｃドメインのＣＨ３ドメインにある。よって、前記修飾は特にＦｃドメインのＣＨ３ドメインにある。

【０１７５】
特定の態様では、前記修飾は、Ｆｃドメインの二つのサブユニットの一方に「ノブ」修飾を含み、Ｆｃドメインの二つのサブユニットの他方のものに「ホール」修飾を含む、いわゆる「ノブ・イントゥ・ホール」修飾である。よって、特定の態様では、本発明は、第一重鎖のＦｃ部分が第一の二量体化モジュールを含み、第二重鎖のＦｃ部分がＩｇＧ分子の二つの重鎖のヘテロ二量化を可能にする第二の二量体化モジュールを含み、ノブ・イントゥ・ホール技術に従って、第一の二量体化モジュールがノブを含み、第二の二量体化モジュールがホールを含む、ＩｇＧ分子を含む上述のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子に関する。
【０１７６】
「ノブ・イントゥ・ホール」技術は、例えば、米国特許第５７３１１６８号；同第７６９５９３６号；Ridgway等, Prot Eng 9, 617-621 (1996)及びCarter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001)に記載されている。一般に、該方法は、隆起を空洞に位置させ、ヘテロ二量体形成を促進し、ホモ二量体形成を妨害することができるように第一ポリペプチドの界面に隆起（「ノブ」）を、第二ポリペプチドの界面に対応する空洞（「ホール」）を導入することを含む。隆起は、第一ポリペプチドの界面由来の小さなアミノ酸側鎖を大きな側鎖（例えば、チロシン又はトリプトファン）で置き換えることにより構築される。隆起と同じか又は同様のサイズの相補的な空洞は、大きなアミノ酸側鎖を小さいもの（例えばアラニン又はスレオニン）で置き換えることにより、第二ポリペプチドの界面に作り出される。
【０１７７】
従って、特定の態様では、本発明のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子のＦｃドメインの第一サブユニットのＣＨ３ドメインにおいて、アミノ酸残基が、より大きな側鎖体積を有するアミノ酸残基で置換され、それによって第二サブユニットのＣＨ３ドメイン内の空洞内に位置しうる第一サブユニットのＣＨ３ドメイン内に隆起が作製され、Ｆｃドメインの第二サブユニットのＣＨ３ドメインにおいて、アミノ酸残基がより小さい側鎖体積を有するアミノ酸残基で置換され、それによって第一サブユニットのＣＨ３ドメイン内に隆起が位置しうる第二サブユニットのＣＨ３ドメイン内に空洞が作製される。
【０１７８】
隆起と空洞は、ポリペプチドをコードする核酸を、例えば部位特異的変異誘発により、又はペプチド合成により、改変させることにより作り出すことができる。
【０１７９】
特定の態様では、Ｆｃドメインの第一サブユニットのＣＨ３ドメインにおいて、３６６位のトレオニン残基がトリプトファン残基で置換され（Ｔ３６６Ｗ）、Ｆｃドメインの第二サブユニットのＣＨ３ドメインにおいて、４０７位のチロシン残基はバリン残基で置換される（Ｙ４０７Ｖ）。より詳細には、Ｆｃドメインの第二サブユニットにおいて、加えて３６６位のスレオニン残基はセリン残基で置換され（Ｔ３６６Ｓ）、３６８位のロイシン残基はアラニン残基で置換される（Ｌ３６８Ａ）。より詳細には、Ｆｃドメインの第一サブユニットにおいて、加えて３５４位のセリン残基がシステイン残基で置換され（Ｓ３５４Ｃ）、Ｆｃドメインの第二サブユニットにおいて、加えて３４９位のチロシン残基がシステイン残基で置換される（Ｙ３４９Ｃ）。これらの二つのシステイン残基の導入は、Ｆｃドメインの二つのサブユニット間のジスルフィド架橋の形成をもたらす。ジスルフィド架橋は二量体を更に安定化させる（Carter、Ｊ Immunol Methods 248、7-15（2001））。
【０１８０】
よって、特定の態様では、Ｆｃドメインは、Ｆｃドメインの第一及び第二サブユニットの会合を促進する修飾を含む。特定の態様では、Ｆｃドメインの第一サブユニットがノブのアミノ酸置換Ｓ３５４Ｃ及びＴ３６６Ｗ（ＫａｂａｔのＥＵインデックスによる番号付け）を含み、Ｆｃドメインの第二サブユニットが、ホールのアミノ酸置換Ｙ３４９Ｃ、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ及びＹ４０７Ｖ（ＫａｂａｔのＥＵインデックスによる番号付け）を

含む、上述のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。
【０１８１】
別の態様では、Ｆｃドメインの第一及び第二サブユニットの会合を促進する修飾は、例えば、ＰＣＴ公報国際公開第２００９／０８９００４号に記載されるような静電ステアリング効果を媒介する修飾を含む。一般に、この方法は、二つのＦｃドメインサブユニットの界面の一又は複数のアミノ酸残基の荷電アミノ酸残基による置換を含み、その結果、ホモ二量体形成が静電気的に好ましくないものになるが、ヘテロ二量体化は静電気的に好ましくなる。
【０１８２】
更なる態様では、ペプチドリンカーによって互いに連結されたＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドがＦｃドメイン（ホール）の第二サブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合され、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドがＦｃドメイン（ノブ）の第一サブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合された、上述のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。
【０１８３】
別の態様では、ペプチドリンカーによって互いに連結されたＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドがＦｃドメイン（ノブ）の第一サブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合され、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドがＦｃドメイン（ホール）の第二サブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合された、上述のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。
【０１８４】
一態様では、本発明は、細胞表面抗原に特異的に結合することができるＦａｂドメインがＦｃドメイン（ノブ）の第一サブユニットのＮ末端にＣ末端で融合されている、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供する。別の態様では、細胞表面抗原に特異的に結合することができるＦａｂドメインがＦｃドメイン（ホール）の第二サブユニットのＮ末端にＣ末端で融合されている、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。
【０１８５】
特定の態様では、細胞表面抗原に特異的に結合することができるＦａｂドメインがＦｃドメイン（ノブ）の第一サブユニットのＮ末端にＣ末端で融合され、ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドがＦｃドメイン（ホール）の第二サブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合され、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドがＦｃドメイン（ノブ）の第一サブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合された、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。
【０１８６】
更なる態様では、本発明は、（ｄ）標的細胞抗原に特異的に結合することができないＦａｂドメインを更に含む、上述のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供する。よって、本発明は、
（ａ）標的細胞抗原に特異的に結合することができるＦａｂドメイン、
（ｂ）安定な会合が可能な第一及び第二サブユニットからなるＦｃドメイン、
（ｃ）ペプチドリンカーによって互いに連結されたＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドと、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドであって、Ｆｃドメインのサブユニットの一つのＣ末端にそのＮ末端で融合された第一ポリペプチドと、Ｆｃドメインの他のサブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合された第二ポリペプチド、及び
（ｄ）標的細胞抗原に特異的に結合することができないＦａｂドメイン

を含む、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供する。
【０１８７】
標的細胞抗原に特異的に結合することができないＦａｂドメインを含むこれらの分子は、完全なＩｇＧ様構造を有するが、同時にそれらは標的細胞抗原のためのただ一つの結合部位の利点（一価結合）を有する。従って、それらは、より良好なＰｋプロファイル及び／又は例えば抗薬物抗体によって引き起こされる副作用がより少ない可能性がある。
【０１８８】
［ＣＨ１／ＣＬドメインにおける修飾］
二つの異なるＦａｂドメインを含む抗原結合分子における正確な対合を更に向上させるために、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、異なる荷電アミノ酸置換（いわゆる「荷電残基」）を含みうる。これら修飾は、交差又は非交差ＣＨ１及びＣＬドメインに導入される。特定の態様では、本発明は、ＣＬドメインの一つにおいて、１２３位（ＥＵ番号付け）のアミノ酸がアルギニン（Ｒ）によって置換され、１２４位（ＥＵ番号付け）のアミノ酸がリジン（Ｋ）で置換されており、ＣＨ１ドメインの一つにおいて、１４７位（ＥＵ番号付け）及び２１３位（ＥＵ番号付け）のアミノ酸がグルタミン酸（Ｅ）に置換されている、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子に関する。
【０１８９】
より特定的には、本発明は、
（ａ）標的細胞抗原に特異的に結合することができるＦａｂドメイン、
（ｂ）安定な会合が可能な第一及び第二サブユニットからなるＦｃドメイン、
（ｃ）ペプチドリンカーによって互いに連結されたＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドと、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドであって、Ｆｃドメインのサブユニットの一つのＣ末端にそのＮ末端で融合された第一ポリペプチドと、Ｆｃドメインの他のサブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合された第二ポリペプチド、及び
（ｄ）クロスオーバーＦａｂである標的細胞抗原に特異的に結合することができないＦａｂドメイン
を含み、ＣＬドメインにおいて、１２３位（ＥＵ番号付け）のアミノ酸がアルギニン（Ｒ）によって置換され、１２４位（ＥＵ番号付け）のアミノ酸がリジン（Ｋ）によって置換されており、ＴＮＦリガンドファミリーメンバーに隣接するＣＨ１ドメインにおいて、１４７位（ＥＵ番号付け）及び２１３位（ＥＵ番号付け）のアミノ酸がグルタミン酸（Ｅ）によって置換されている、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子に関する。
【０１９０】
［特定のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子］
一態様では、
（ａ）標的細胞抗原に特異的に結合することができるＦａｂドメイン、
（ｂ）安定な会合が可能な第一及び第二サブユニットからなるＦｃドメイン、及び
（ｃ）ペプチドリンカーによって互いに連結されたＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドと、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドであって、ノブ変異を含むＦｃドメインの第二サブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合された第一ポリペプチドと、ホール変異を含むＦｃドメインの第一サブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合された第二ポリペプチドを含む、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。
【０１９１】
特定の態様では、本発明は、
（ａ）標的細胞抗原に特異的に結合することができるＦａｂドメイン、
（ｂ）安定な会合が可能な第一及び第二サブユニットからなるＦｃドメイン、及び
（ｃ）ペプチドリンカーによって互いに連結されたＴＮＦリガンドファミリーメンバーの

二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドと、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドであって、ノブ変異を含むＦｃドメインの第二サブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合された第一ポリペプチドと、ホール変異を含むＦｃドメインの第一サブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合された第二ポリペプチドを含み、標的細胞抗原に特異的に結合することができるＦａｂドメインのＶＨ及びＣＨ１ドメインが、ノブ変異を含むＦｃドメインの第二サブユニットのＮ末端にＣ末端で融合される、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供する。

【０１９２】

別の態様では、本発明は、

（ａ）標的細胞抗原に特異的に結合することができるＦａｂドメイン、

（ｂ）安定な会合が可能な第一及び第二サブユニットからなるＦｃドメイン、及び

（ｃ）ペプチドリンカーによって互いに連結されたＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドと、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドであって、ノブ変異を含むＦｃドメインの第二サブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合された第一ポリペプチドと、ホール変異を含むＦｃドメインの第一サブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合された第二ポリペプチドを含み、標的細胞抗原に特異的に結合することができるＦａｂドメインのＶＨ及びＣＨ１ドメインが、ホール変異を含むＦｃドメインの第一サブユニットのＮ末端にＣ末端で融合される、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供する。

【０１９３】

更なる態様では、

（ａ）標的細胞抗原に特異的に結合することができるＦａｂドメイン、

（ｂ）安定な会合が可能な第一及び第二サブユニットからなるＦｃドメイン、及び

（ｃ）ペプチドリンカーによって互いに連結されたＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドと、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドであって、ホール変異を含むＦｃドメインの第一サブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合された第一ポリペプチドと、ノブ変異を含むＦｃドメインの第二サブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合された第二ポリペプチドを含む、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。

【０１９４】

特定の態様では、本発明は、

（ａ）標的細胞抗原に特異的に結合することができるＦａｂドメイン、

（ｂ）安定な会合が可能な第一及び第二サブユニットからなるＦｃドメイン、及び

（ｃ）ペプチドリンカーによって互いに連結されたＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドと、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドであって、ホール変異を含むＦｃドメインの第一サブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合された第一ポリペプチドと、ノブ変異を含むＦｃドメインの第二サブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合された第二ポリペプチドを含み、標的細胞抗原に特異的に結合することができるＦａｂドメインのＶＨ及びＣＨ１ドメインが、ノブ変異を含むＦｃドメインの第二サブユニットのＮ末端にＣ末端で融合される、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供する。

【０１９５】

別の態様では、本発明は、

（ａ）標的細胞抗原に特異的に結合することができるＦａｂドメイン、

（ｂ）安定な会合が可能な第一及び第二サブユニットからなるＦｃドメイン、及び

（ｃ）ペプチドリンカーによって互いに連結されたＴＮＦリガンドファミリーメンバーの

二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドと、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドであって、ホール変異を含むＦｃドメインの第一サブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合された第一ポリペプチドと、ノブ変異を含むＦｃドメインの第二サブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合された第二ポリペプチドを含み、標的細胞抗原に特異的に結合することができるＦａｂドメインのＶＨ及びＣＨ１ドメインが、ホール変異を含むＦｃドメインの第一サブユニットのＮ末端にＣ末端で融合される、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供する。

【０１９６】

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

一態様では、標的細胞抗原が線維芽細胞活性化タンパク質（ＦＡＰ）であるＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。

【０１９７】

特定の態様では、ＦＡＰに特異的に結合することができるＦａｂドメインが、配列番号：２５のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号：２６のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む、上述のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。

【０１９８】

別の特定の態様では、ＦＡＰに特異的に結合することができるＦａｂドメインが、配列番号：２７のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号：２８のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む、上述のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。

【０１９９】

一態様では、ＦＡＰに特異的に結合することができるＦａｂドメインは、配列番号：２５のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と配列番号：２６のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域又は配列番号：２７のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と配列番号：２８のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。特定の態様では、ＦＡＰに特異的に結合することができるＦａｂドメインは、配列番号：２５のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と配列番号：２６のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。別の特定の態様では、ＦＡＰに特異的に結合することができるＦａｂドメインは、配列番号：２７のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と配列番号：２８のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。特定の態様では、ＦＡＰに特異的に結合することができるＦａｂドメインは、配列番号：２７のアミノ酸配列からなるＶＨドメインと配列番号：２８のアミノ酸配列からなるＶＬドメインを含む。

【０２００】

更なる態様では、本発明は、

（ａ）配列番号：２５のアミノ酸配列を含むＶＨドメインと配列番号：２６のアミノ酸配列を含むＶＬドメイン、又は配列番号：２７のアミノ酸配列を含むＶＨドメインと配列番号：２８のアミノ酸配列を含むＶＬドメインを含む、ＦＡＰに特異的に結合することができるＦａｂドメイン、

（ｂ）安定な会合が可能な第一及び第二サブユニットからなるＦｃドメイン、及び

（ｃ）ペプチドリンカーによって互いに連結されたＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドと、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドであって、Ｆｃドメインのサブユニットの一つのＣ末端にそのＮ末端で融合された第一ポリペプチドと、Ｆｃドメインの他のサブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合された第二ポリペプチドを含む、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供する。

【０２０１】
別の態様では、本発明は、
（ａ）配列番号：２５のアミノ酸配列を含むＶＨドメインと配列番号：２６のアミノ酸配列を含むＶＬドメイン、又は配列番号：２７のアミノ酸配列を含むＶＨドメインと配列番号：２８のアミノ酸配列を含むＶＬドメインを含む、ＦＡＰに特異的に結合することができるＦａｂドメイン、
（ｂ）安定な会合が可能な第一及び第二サブユニットからなるＦｃドメイン、及び
（ｃ）ペプチドリンカーによって互いに連結されたＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドと、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドであって、Ｆｃドメインのサブユニットの一つのＣ末端にそのＮ末端で融合された第一ポリペプチドと、Ｆｃドメインの他のサブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合された第二ポリペプチドを含み、ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドが配列番号：９及び配列番号：１０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドが配列番号：１及び配列番号：５からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供する。
【０２０２】
特定の態様では、
（ａ）配列番号：２７のアミノ酸配列を含むＶＨドメインと配列番号：２８のアミノ酸配列を含むＶＬドメインを含む、ＦＡＰに特異的に結合することができるＦａｂドメイン、
（ｂ）安定な会合が可能な第一及び第二サブユニットからなるＦｃドメイン、及び
（ｃ）ペプチドリンカーによって互いに連結されたＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドと、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドであって、Ｆｃドメインのサブユニットの一つのＣ末端にそのＮ末端で融合された第一ポリペプチドと、Ｆｃドメインの他のサブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合された第二ポリペプチドを含み、ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメインを含む第一ポリペプチドが配列番号：１０のアミノ酸配列を含み、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメインを含む第二ポリペプチドが配列番号：５のアミノ酸配列を含む、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。
【０２０３】
別の態様では、
（ｉ）ＦＡＰに特異的に結合することができるＦａｂドメインのＶＬドメインを含む軽鎖、
（ｉｉ）Ｆｃドメインの第一サブユニットと、ペプチドリンカーによって互いに連結されたＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドであって、Ｆｃドメインの第一サブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合された第一ポリペプチドとを含む融合ポリペプチド、及び
（ｉｉｉ）ＦＡＰに特異的に結合することができるＦａｂドメインのＶＨドメイン、Ｆｃドメインの第二サブユニット、及び前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドを含む重鎖を含み、ＦＡＰに特異的に結合することができるＦａｂドメインの可変重鎖が、Ｆｃドメインの第二サブユニットのＮ末端にそのＣ末端で融合され、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドがＦｃドメインの第二サブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合されている、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。
【０２０４】
特定の態様では、抗原結合分子が、
（ｉ）配列番号：１０６のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖、

（ｉｉ）配列番号：１０４のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む融合ポリペプチド、及び
（ｉｉｉ）配列番号：１０５のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖
を含む、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。

【０２０５】

より詳細には、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、
（ｉ）配列番号：１０６のアミノ酸配列を含む軽鎖、
（ｉｉ）配列番号：１０４のアミノ酸配列を含む融合ポリペプチド、及び
（ｉｉｉ）配列番号：１０５のアミノ酸配列を含む重鎖
を含む。

【０２０６】

別の特定の態様では、抗原結合分子が、
（ｉ）配列番号：１１４のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖、
（ｉｉ）配列番号：１０４のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む融合ポリペプチド、及び
（ｉｉｉ）配列番号：１１３のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖
を含む、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。

【０２０７】

より詳細には、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、
（ｉ）配列番号：１１４のアミノ酸配列を含む軽鎖、
（ｉｉ）配列番号：１０４のアミノ酸配列を含む融合ポリペプチド、及び
（ｉｉｉ）配列番号：１１３のアミノ酸配列を含む重鎖
を含む。

【０２０８】

更なる態様では、抗原結合分子が、
（ｉ）配列番号：１０６のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖、
（ｉｉ）配列番号：１７８のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む融合ポリペプチド、及び
（ｉｉｉ）配列番号：１７７のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖
を含む、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。

【０２０９】

より詳細には、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、
（ｉ）配列番号：１０６のアミノ酸配列を含む軽鎖、
（ｉｉ）配列番号：１７８のアミノ酸配列を含む融合ポリペプチド、及び
（ｉｉｉ）配列番号：１７７のアミノ酸配列を含む重鎖
を含む。

【０２１０】

更に別の態様では、抗原結合分子が、
（ｉ）配列番号：１１４のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖、
（ｉｉ）配列番号：１７８のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む融合ポリペプチド、及び
（ｉｉｉ）配列番号：１８２のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖
を含む、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。

【０２１１】
より詳細には、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、
（ｉ）配列番号：１１４のアミノ酸配列を含む軽鎖、
（ｉｉ）配列番号：１７８のアミノ酸配列を含む融合ポリペプチド、及び
（ｉｉｉ）配列番号：１８２のアミノ酸配列を含む重鎖
を含む。
【０２１２】
別の態様では、抗原結合分子が、
（ｉ）ＦＡＰに特異的に結合することができるＦａｂドメインのＶＬドメインを含む軽鎖、
（ｉｉ）Ｆｃドメインの第一サブユニットと、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドであって、Ｆｃドメインの第一サブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合された第二ポリペプチドを含む融合ポリペプチド、及び
（ｉｉｉ）ＦＡＰに特異的に結合することができるＦａｂドメインのＶＨドメイン、Ｆｃドメインの第二サブユニット、及びペプチドリンカーによって互いに連結されたＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドを含む重鎖であって、ＦＡＰに特異的に結合することができるＦａｂドメインの可変重鎖が、Ｆｃドメインの第二サブユニットのＮ末端にそのＣ末端で融合され、ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドがＦｃドメインの第二サブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合されている重鎖を含む、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。
【０２１３】
特定の態様では、抗原結合分子が、
（ｉ）配列番号：１０６のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖、
（ｉｉ）配列番号：１０９のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む融合ポリペプチド、及び
（ｉｉｉ）配列番号：１１０のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖
を含む、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。
【０２１４】
より詳細には、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、
（ｉ）配列番号：１０６のアミノ酸配列を含む軽鎖、
（ｉｉ）配列番号：１０９のアミノ酸配列を含む融合ポリペプチド、及び
（ｉｉｉ）配列番号：１１０のアミノ酸配列を含む重鎖
を含む。
【０２１５】
別の特定の態様では、抗原結合分子が、
（ｉ）配列番号：１１４のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖、
（ｉｉ）配列番号：１０９のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む融合ポリペプチド、及び
（ｉｉｉ）配列番号：１１６のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖
を含む、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。
【０２１６】
より詳細には、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、
（ｉ）配列番号：１１４のアミノ酸配列を含む軽鎖、
（ｉｉ）配列番号：１０９のアミノ酸配列を含む融合ポリペプチド、及び
（ｉｉｉ）配列番号：１１６のアミノ酸配列を含む重鎖

を含む。
【０２１７】
特定の態様では、抗原結合分子が、
（ｉ）配列番号：１０６のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖、
（ｉｉ）配列番号：１７４のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む融合ポリペプチド、及び
（ｉｉｉ）配列番号：１７３のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖
を含む、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。
【０２１８】
より詳細には、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、
（ｉ）配列番号：１０６のアミノ酸配列を含む軽鎖、
（ｉｉ）配列番号：１７４のアミノ酸配列を含む融合ポリペプチド、及び
（ｉｉｉ）配列番号：１７３のアミノ酸配列を含む重鎖
を含む。
【０２１９】
別の特定の態様では、抗原結合分子が、
（ｉ）配列番号：１１４のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖、
（ｉｉ）配列番号：１７４のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む融合ポリペプチド、及び
（ｉｉｉ）配列番号：１８０のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖
を含む、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。
【０２２０】
より詳細には、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、
（ｉ）配列番号：１１４のアミノ酸配列を含む軽鎖、
（ｉｉ）配列番号：１７４のアミノ酸配列を含む融合ポリペプチド、及び
（ｉｉｉ）配列番号：１８０のアミノ酸配列を含む重鎖
を含む。
【０２２１】
更なる態様では、抗原結合分子が、
（ｉ）ＦＡＰに特異的に結合することができるＦａｂドメインのＶＬドメインを含む第一軽鎖、
（ｉｉ）ＦＡＰに特異的に結合することができるＦａｂドメインのＶＨドメイン、Ｆｃドメインの第一サブユニット、及び前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドを含む第一重鎖であって、ＦＡＰに特異的に結合することができるＦａｂドメインの可変重鎖がＦｃドメインの第二サブユニットのＮ末端にそのＣ末端で融合され、第二ポリペプチドがＦｃドメインの第一サブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合されている、第一重鎖、
（ｉｉｉ）標的細胞抗原に特異的に結合することができないＦａｂドメインのＶＨドメイン、Ｆｃドメインの第二サブユニット、及びペプチドリンカーによって互いに連結されたＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドを含む第二重鎖であって、標的細胞抗原に特異的に結合することができないＦａｂドメインの可変重鎖がＦｃドメインの第二サブユニットのＮ末端にそのＣ末端で融合され、ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドがＦｃドメインの第二サブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合されている第二重鎖、及び
（ｉｖ）標的細胞抗原に特異的に結合することができないＦａｂドメインのＶＬドメイン

を含む第二軽鎖
を含む、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。
【０２２２】
特定の態様では、抗原結合分子が、
（ｉ）配列番号：１０６のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む第一軽鎖、
（ｉｉ）配列番号：２１７のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む第一重鎖、
（ｉｉｉ）配列番号：２１８のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む第二重鎖、及び
（ｉｖ）配列番号：２１４のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む第二軽鎖
を含む、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。
【０２２３】
より詳細には、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、
（ｉ）配列番号：１０６のアミノ酸配列を含む第一軽鎖、
（ｉｉ）配列番号：２１７のアミノ酸配列を含む第一重鎖、
（ｉｉｉ）配列番号：２１８のアミノ酸配列を含む第二重鎖、及び
（ｉｖ）配列番号：２１４のアミノ酸配列を含む第二軽鎖、
を含む。
【０２２４】
別の特定の態様では、抗原結合分子が、
（ｉ）配列番号：１０６のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖、
（ｉｉ）配列番号：２２２のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む第一重鎖、
（ｉｉｉ）配列番号：２２１のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む第二重鎖、及び
（ｉｖ）配列番号：２１４のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む第二軽鎖
を含む、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。
【０２２５】
より詳細には、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、
（ｉ）配列番号：１０６のアミノ酸配列を含む第一軽鎖、
（ｉｉ）配列番号：２２２のアミノ酸配列を含む第一重鎖、
（ｉｉｉ）配列番号：２２１のアミノ酸配列を含む第二重鎖、及び
（ｉｖ）配列番号：２１４のアミノ酸配列を含む第二軽鎖、
を含む。
【０２２６】
別の態様では、抗原結合分子が、
（ｉ）ＦＡＰに特異的に結合することができるＦａｂドメインのＶＬドメインを含む第一軽鎖、
（ｉｉ）ＦＡＰに特異的に結合することができるＦａｂドメインのＶＨドメイン、Ｆｃドメインのサブユニット、及びペプチドリンカーによって互いに連結されたＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドを含む第一重鎖であって、ＦＡＰに特異的に結合することができるＦａｂドメインの可変重鎖がＦｃドメインの第二サブユニットのＮ末端にそのＣ末端で融合され、ＴＮＦリガンドファミリーメンバーのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドがＦｃドメインの第一サブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合されている、第一重鎖
（ｉｉｉ）標的細胞抗原に特異的に結合することができないＦａｂドメインのＶＨドメイ

ン、Ｆｃドメインの第二サブユニット、及び前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドを含む第二重鎖であって、標的細胞抗原に特異的に結合することができないＦａｂドメインの可変重鎖がＦｃドメインの第二サブユニットのＮ末端にそのＣ末端で融合され、ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドがＦｃドメインの第二サブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合されている第二重鎖、及び
（ｉｖ）標的細胞抗原に特異的に結合することができないＦａｂドメインのＶＬドメインを含む第二軽鎖
を含む、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。

【０２２７】

特定の態様では、抗原結合分子が、
（ｉ）配列番号：１０６のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む第一軽鎖、
（ｉｉ）配列番号：２１２のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む第一重鎖、
（ｉｉｉ）配列番号：２１３のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む第二重鎖、及び
（ｉｖ）配列番号：２１４のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む第二軽鎖
を含む、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。

【０２２８】

より詳細には、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、
（ｉ）配列番号：１０６のアミノ酸配列を含む第一軽鎖、
（ｉｉ）配列番号：２１２のアミノ酸配列を含む第一重鎖、
（ｉｉｉ）配列番号：２１３のアミノ酸配列を含む第二重鎖、及び
（ｉｖ）配列番号：２１４のアミノ酸配列を含む第二軽鎖、
を含む。

【０２２９】

別の特定の態様では、抗原結合分子が、
（ｉ）配列番号：１０６のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖、
（ｉｉ）配列番号：２２６のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む第一重鎖、
（ｉｉｉ）配列番号：２２５のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む第二重鎖、及び
（ｉｖ）配列番号：２１４のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む第二軽鎖
を含む、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。

【０２３０】

より詳細には、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、
（ｉ）配列番号：１０６のアミノ酸配列を含む第一軽鎖、
（ｉｉ）配列番号：２２６のアミノ酸配列を含む第一重鎖、
（ｉｉｉ）配列番号：２２５のアミノ酸配列を含む第二重鎖、及び
（ｉｖ）配列番号：２１４のアミノ酸配列を含む第二軽鎖、
を含む。

【０２３１】

［標的細胞抗原がＣＤ１９であるＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子］
一態様では、標的細胞抗原がＣＤ１９であるＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。

【０２３２】

特定の態様では、ＣＤ１９に特異的に結合することができるＦａｂドメインが、配列番号：４１のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号：４２のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む、上述のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。

【０２３３】

別の特定の態様では、ＣＤ１９に特異的に結合することができるＦａｂドメインが、配列番号：４３のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号：４４のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む、上述のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。

【０２３４】

一態様では、ＣＤ１９に特異的に結合することができるＦａｂドメインは、配列番号：４１のアミノ酸配列を含む可変重鎖と配列番号：４２のアミノ酸配列を含む可変軽鎖又は配列番号：４３のアミノ酸配列を含む可変重鎖と配列番号：４４のアミノ酸配列を含む可変軽鎖を含む。特定の態様では、ＦＡＰに特異的に結合することができるＦａｂドメインは、配列番号：４１のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と配列番号：４２のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。別の特定の態様では、ＦＡＰに特異的に結合することができるＦａｂドメインは、配列番号：４３のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と配列番号：４４のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。特定の態様では、ＦＡＰに特異的に結合することができるＦａｂドメインは、配列番号：４３のアミノ酸配列からなるＶＨドメインと配列番号：４４のアミノ酸配列からなるＶＬドメインを含む。

【０２３５】

更なる態様では、本発明は、

（ａ）配列番号：４１のアミノ酸配列を含むＶＨドメインと配列番号：４２のアミノ酸配列を含むＶＬドメイン、又は配列番号：４３のアミノ酸配列を含むＶＨドメインと配列番号：４４のアミノ酸配列を含むＶＬドメインを含む、ＣＤ１９に特異的に結合することができるＦａｂドメイン、

（ｂ）安定な会合が可能な第一及び第二サブユニットからなるＦｃドメイン、及び

（ｃ）ペプチドリンカーによって互いに連結されたＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドと、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドであって、Ｆｃドメインのサブユニットの一つのＣ末端にそのＮ末端で融合された第一ポリペプチドと、Ｆｃドメインの他のサブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合された第二ポリペプチドを含む、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供する。

【０２３６】

別の態様では、本発明は、

（ａ）配列番号：４１のアミノ酸配列を含むＶＨドメインと配列番号：４２のアミノ酸配列を含むＶＬドメイン、又は配列番号：４３のアミノ酸配列を含むＶＨドメインと配列番号：４４のアミノ酸配列を含むＶＬドメインを含む、ＣＤ１９に特異的に結合することができるＦａｂドメイン、

（ｂ）安定な会合が可能な第一及び第二サブユニットからなるＦｃドメイン、及び

（ｃ）ペプチドリンカーによって互いに連結されたＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドと、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドであって、Ｆｃドメインのサブユニットの一つのＣ末端にそのＮ末端で融合された第一ポリペプチドと、Ｆｃドメインの他のサブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合された第二ポリペプチドを含み、ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含

む第一ポリペプチドが配列番号：９及び配列番号：１０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドが配列番号：１及び配列番号：５からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供する。

【０２３７】

特定の態様では、

（ａ）配列番号：４３のアミノ酸配列を含むＶＨドメインと配列番号：４４のアミノ酸配列を含むＶＬドメインを含む、ＣＤ１９に特異的に結合することができるＦａｂドメイン、

（ｂ）安定な会合が可能な第一及び第二サブユニットからなるＦｃドメイン、及び

（ｃ）ペプチドリンカーによって互いに連結されたＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドと、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドであって、Ｆｃドメインのサブユニットの一つのＣ末端にそのＮ末端で融合された第一ポリペプチドと、Ｆｃドメインの他のサブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合された第二ポリペプチドを含み、ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメインを含む第一ポリペプチドが配列番号：１０のアミノ酸配列を含み、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメインを含む第二ポリペプチドが配列番号：５のアミノ酸配列を含む、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。

【０２３８】

別の態様では、

（ｉ）ＣＤ１９に特異的に結合することができるＦａｂドメインの可変軽鎖を含む軽鎖、

（ｉｉ）Ｆｃドメインの第一サブユニットと、ペプチドリンカーによって互いに連結されたＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドであって、Ｆｃドメインの第一サブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合された第一ポリペプチドとを含む融合ポリペプチド、及び

（ｉｉｉ）ＣＤ１９に特異的に結合することができるＦａｂドメインの可変重鎖、Ｆｃドメインの第二サブユニット、及び前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドを含む重鎖を含み、ＣＤ１９に特異的に結合することができるＦａｂドメインの可変重鎖が、Ｆｃドメインの第二サブユニットのＮ末端にそのＣ末端で融合され、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドがＦｃドメインの第二サブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合されている、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。

【０２３９】

特定の態様では、抗原結合分子が、

（ｉ）配列番号：１２０のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖、

（ｉｉ）配列番号：１０４のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む融合ポリペプチド、及び

（ｉｉｉ）配列番号：１１９のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖

を含む、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。

【０２４０】

より詳細には、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、

（ｉ）配列番号：１２０のアミノ酸配列を含む軽鎖、

（ｉｉ）配列番号：１０４のアミノ酸配列を含む融合ポリペプチド、及び

（ｉｉｉ）配列番号：１１９のアミノ酸配列を含む重鎖

を含む。

【０２４１】

別の特定の態様では、抗原結合分子が、

（ｉ）配列番号：１２６のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖、
（ｉｉ）配列番号：１０４のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む融合ポリペプチド、及び
（ｉｉｉ）配列番号：１２５のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖
を含む、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。
【０２４２】
より詳細には、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、
（ｉ）配列番号：１２６のアミノ酸配列を含む軽鎖、
（ｉｉ）配列番号：１７４のアミノ酸配列を含む融合ポリペプチド、及び
（ｉｉｉ）配列番号：１２５のアミノ酸配列を含む重鎖
を含む。
【０２４３】
更なる態様では、抗原結合分子が、
（ｉ）配列番号：１２０のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖、
（ｉｉ）配列番号：１７８のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む融合ポリペプチド、及び
（ｉｉｉ）配列番号：１８６のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖
を含む、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。
【０２４４】
より詳細には、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、
（ｉ）配列番号：１２０のアミノ酸配列を含む軽鎖、
（ｉｉ）配列番号：１７８のアミノ酸配列を含む融合ポリペプチド、及び
（ｉｉｉ）配列番号：１８６のアミノ酸配列を含む重鎖
を含む。
【０２４５】
更に別の態様では、抗原結合分子が、
（ｉ）配列番号：１２６のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖、
（ｉｉ）配列番号：１７８のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む融合ポリペプチド、及び
（ｉｉｉ）配列番号：１９０のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖
を含む、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。
【０２４６】
より詳細には、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、
（ｉ）配列番号：１２６のアミノ酸配列を含む軽鎖、
（ｉｉ）配列番号：１７８のアミノ酸配列を含む融合ポリペプチド、及び
（ｉｉｉ）配列番号：１９０のアミノ酸配列を含む重鎖
を含む。
【０２４７】
別の態様では、抗原結合分子が、
（ｉ）ＣＤ１９に特異的に結合することができるＦａｂドメインの可変軽鎖を含む軽鎖、
（ｉｉ）Ｆｃドメインの第一サブユニットと、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドであって、Ｆｃドメインの第一サブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合された第二ポリペプチドを含む融合ポリペプチド、及び

（ｉｉｉ）ＣＤ１９に特異的に結合することができるＦａｂドメインの可変重鎖、Ｆｃドメインの第二サブユニット、及びペプチドリンカーによって互いに連結されたＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドを含む重鎖であって、ＣＤ１９に特異的に結合することができるＦａｂドメインの可変重鎖が、Ｆｃドメインの第二サブユニットのＮ末端にそのＣ末端で融合され、ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドがＦｃドメインの第二サブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合されている重鎖を含む、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。

【０２４８】

特定の態様では、抗原結合分子が、

（ｉ）配列番号：１２０のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖、

（ｉｉ）配列番号：１０９のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む融合ポリペプチド、及び

（ｉｉｉ）配列番号：１２２のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖

を含む、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。

【０２４９】

より詳細には、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、

（ｉ）配列番号：１２０のアミノ酸配列を含む軽鎖、

（ｉｉ）配列番号：１０９のアミノ酸配列を含む融合ポリペプチド、及び

（ｉｉｉ）配列番号：１２２のアミノ酸配列を含む重鎖

を含む。

【０２５０】

別の特定の態様では、抗原結合分子が、

（ｉ）配列番号：１２６のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖、

（ｉｉ）配列番号：１０９のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む融合ポリペプチド、及び

（ｉｉｉ）配列番号：１２８のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖

を含む、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。

【０２５１】

より詳細には、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、

（ｉ）配列番号：１２６のアミノ酸配列を含む軽鎖、

（ｉｉ）配列番号：１０９のアミノ酸配列を含む融合ポリペプチド、及び

（ｉｉｉ）配列番号：１２８のアミノ酸配列を含む重鎖

を含む。

【０２５２】

特定の態様では、抗原結合分子が、

（ｉ）配列番号：１２０のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖、

（ｉｉ）配列番号：１７４のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む融合ポリペプチド、及び

（ｉｉｉ）配列番号：１８４のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖

を含む、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。

【０２５３】

より詳細には、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、

（ｉ）配列番号：１２０のアミノ酸配列を含む軽鎖、

（ｉｉ）配列番号：１７４のアミノ酸配列を含む融合ポリペプチド、及び
（ｉｉｉ）配列番号：１８４のアミノ酸配列を含む重鎖
を含む。
【０２５４】
別の特定の態様では、抗原結合分子が、
（ｉ）配列番号：１２６のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖、
（ｉｉ）配列番号：１７４のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む融合ポリペプチド、及び
（ｉｉｉ）配列番号：１８８のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖
を含む、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。
【０２５５】
より詳細には、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、
（ｉ）配列番号：１２６のアミノ酸配列を含む軽鎖、
（ｉｉ）配列番号：１７４のアミノ酸配列を含む融合ポリペプチド、及び
（ｉｉｉ）配列番号：１８８のアミノ酸配列を含む重鎖
を含む。
【０２５６】
［標的細胞抗原がＣＥＡであるＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子］
一態様では、標的細胞抗原がＣＥＡであるＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。
【０２５７】
特定の態様では、ＣＥＡに特異的に結合することができるＦａｂドメインが、配列番号：５１のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号：５２のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む、上述のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。
【０２５８】
一態様では、ＣＥＡに特異的に結合することができるＦａｂドメインは、配列番号：５１のアミノ酸配列を含む可変重鎖と配列番号：５２のアミノ酸配列を含む可変軽鎖又は配列番号：１６３のアミノ酸配列を含む可変重鎖と配列番号：１６４のアミノ酸配列を含む可変軽鎖を含む。特定の態様では、ＣＥＡに特異的に結合することができるＦａｂドメインは、配列番号：５１のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と配列番号：５２のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。特定の態様では、ＣＥＡに特異的に結合することができるＦａｂドメインは、配列番号：５１のアミノ酸配列からなるＶＨドメインと配列番号：５２のアミノ酸配列からなるＶＬドメインを含む。
【０２５９】
更なる態様では、本発明は、
（ａ）配列番号：５１のアミノ酸配列を含むＶＨドメインと配列番号：５２のアミノ酸配列を含むＶＬドメインを含む、ＣＥＡに特異的に結合することができるＦａｂドメイン、
（ｂ）安定な会合が可能な第一及び第二サブユニットからなるＦｃドメイン、及び
（ｃ）ペプチドリンカーによって互いに連結されたＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドと、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドであって、Ｆｃドメインのサブユニットの一つのＣ末端にそのＮ末端で融合された第一ポリペプチドと、Ｆｃドメインの他のサブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合された第二ポリペプチドを含む、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供する。
【０２６０】

別の態様では、本発明は、
（ａ）配列番号：５１のアミノ酸配列を含むＶＨドメインと配列番号：５２のアミノ酸配列を含むＶＬドメインを含む、ＣＥＡに特異的に結合することができるＦａｂドメイン、
（ｂ）安定な会合が可能な第一及び第二サブユニットからなるＦｃドメイン、及び
（ｃ）ペプチドリンカーによって互いに連結されたＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドと、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドであって、Ｆｃドメインのサブユニットの一つのＣ末端にそのＮ末端で融合された第一ポリペプチドと、Ｆｃドメインの他のサブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合された第二ポリペプチドを含み、ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドが配列番号：９及び配列番号：１０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドが配列番号：１及び配列番号：５からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供する。
【０２６１】
特定の態様では、
（ａ）配列番号：５１のアミノ酸配列を含むＶＨドメインと配列番号：５２のアミノ酸配列を含むＶＬドメインを含む、ＣＥＡに特異的に結合することができるＦａｂドメイン、
（ｂ）安定な会合が可能な第一及び第二サブユニットからなるＦｃドメイン、及び
（ｃ）ペプチドリンカーによって互いに連結されたＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドと、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドであって、Ｆｃドメインのサブユニットの一つのＣ末端にそのＮ末端で融合された第一ポリペプチドと、Ｆｃドメインの他のサブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合された第二ポリペプチドを含み、ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメインを含む第一ポリペプチドが配列番号：１０のアミノ酸配列を含み、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメインを含む第二ポリペプチドが配列番号：５のアミノ酸配列を含む、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。
【０２６２】
別の態様では、
（ｉ）ＣＥＡに特異的に結合することができるＦａｂドメインの可変軽鎖を含む軽鎖、
（ｉｉ）Ｆｃドメインの第一サブユニットと、ペプチドリンカーによって互いに連結されたＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドであって、Ｆｃドメインの第一サブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合された第一ポリペプチドとを含む融合ポリペプチド、及び
（ｉｉｉ）ＣＥＡに特異的に結合することができるＦａｂドメインの可変重鎖、Ｆｃドメインの第二サブユニット、及び前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドを含む重鎖を含み、ＣＥＡに特異的に結合することができるＦａｂドメインの可変重鎖が、Ｆｃドメインの第二サブユニットのＮ末端にそのＣ末端で融合され、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドがＦｃドメインの第二サブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合されている、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。
【０２６３】
特定の態様では、抗原結合分子が、
（ｉ）配列番号：１５６のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖、
（ｉｉ）配列番号：１０４のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む融合ポリペプチド、及び
（ｉｉｉ）配列番号：１５５のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９

８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖
を含む、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。
【０２６４】
より詳細には、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、
（ｉ）配列番号：１５６のアミノ酸配列を含む軽鎖、
（ｉｉ）配列番号：１０４のアミノ酸配列を含む融合ポリペプチド、及び
（ｉｉｉ）配列番号：１５５のアミノ酸配列を含む重鎖
を含む。
【０２６５】
更なる態様では、抗原結合分子が、
（ｉ）配列番号：１５６のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖、
（ｉｉ）配列番号：１７８のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む融合ポリペプチド、及び
（ｉｉｉ）配列番号：１９４のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖
を含む、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。
【０２６６】
より詳細には、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、
（ｉ）配列番号：１５６のアミノ酸配列を含む軽鎖、
（ｉｉ）配列番号：１７８のアミノ酸配列を含む融合ポリペプチド、及び
（ｉｉｉ）配列番号：１９４のアミノ酸配列を含む重鎖
を含む。
【０２６７】
別の態様では、抗原結合分子が、
（ｉ）ＣＥＡに特異的に結合することができるＦａｂドメインの可変軽鎖を含む軽鎖、
（ｉｉ）Ｆｃドメインの第一サブユニットと、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドであって、Ｆｃドメインの第一サブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合された第二ポリペプチドを含む融合ポリペプチド、及び
（ｉｉｉ）ＣＥＡに特異的に結合することができるＦａｂドメインの可変重鎖、Ｆｃドメインの第二サブユニット、及びペプチドリンカーによって互いに連結されたＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドを含む重鎖であって、ＣＥＡに特異的に結合することができるＦａｂドメインの可変重鎖が、Ｆｃドメインの第二サブユニットのＮ末端にそのＣ末端で融合され、ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドがＦｃドメインの第二サブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合されている重鎖を含む、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。
【０２６８】
特定の態様では、抗原結合分子が、
（ｉ）配列番号：１５６のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖、
（ｉｉ）配列番号：１０９のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む融合ポリペプチド、及び
（ｉｉｉ）配列番号：１５８のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖
を含む、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。
【０２６９】
より詳細には、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、
（ｉ）配列番号：１５６のアミノ酸配列を含む軽鎖、

（ｉｉ）配列番号：１０９のアミノ酸配列を含む融合ポリペプチド、及び
（ｉｉｉ）配列番号：１５８のアミノ酸配列を含む重鎖
を含む。
【０２７０】
特定の態様では、抗原結合分子が、
（ｉ）配列番号：１５６のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖、
（ｉｉ）配列番号：１７４のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む融合ポリペプチド、及び
（ｉｉｉ）配列番号：１９２のアミノ酸配列と少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、９９％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む重鎖
を含む、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。
【０２７１】
より詳細には、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、
（ｉ）配列番号：１５６のアミノ酸配列を含む軽鎖、
（ｉｉ）配列番号：１７４のアミノ酸配列を含む融合ポリペプチド、及び
（ｉｉｉ）配列番号：１９２のアミノ酸配列を含む重鎖
を含む。
【０２７２】
［ポリヌクレオチド］
本発明は更にここに記載のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子又はその断片をコードする単離されたポリヌクレオチドを提供する。
【０２７３】
本発明のＴＮＦリガンド三量体含有抗原結合分子をコードする単離されたポリヌクレオチドは、抗原結合分子全体をコードする単一のポリヌクレオチドとして、又は同時発現される複数の（例えば二つ以上の）ポリヌクレオチドとして発現されうる。同時発現されるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドは、例えば、ジスルフィド結合又は他の手段を介して会合して、機能的抗原結合分子を形成しうる。例えば、免疫グロブリンの軽鎖部分は、免疫グロブリンの重鎖部分からの別個のポリヌクレオチドによってコードされうる。同時発現されると、重鎖ポリペプチドは軽鎖ポリペプチドと会合して免疫グロブリンを形成する。
【０２７４】
幾つかの態様では、単離されたポリヌクレオチドは、ここに記載の本発明のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子全体をコードする。特に、単離されたポリヌクレオチドは、ここに記載の本発明に係るＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子に含まれるポリペプチドをコードする。
【０２７５】
一態様では、本発明は、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子をコードする単離されたポリヌクレオチドを対象とし、該ポリヌクレオチドは、（ａ）標的細胞抗原に特異的に結合することができるＦａｂドメインをコードする配列、（ｂ）Ｆｃドメインの第一サブユニットとペプチドリンカーによって互いに連結されたＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドをコードする配列、及び（ｃ）Ｆｃドメインの第二サブユニットと前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドをコードする配列を含む。
【０２７６】
所定の態様では、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子をコードする単離されたポリヌクレオチドが提供され、該ポリヌクレオチドは、（ａ）標的細胞抗原に特異的に結合することができるＦａｂドメインをコードする配列、（ｂ）Ｆｃドメインの第一サブユニットとペプチドリンカーによって互いに連結されたＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含むポリペプチドをコードする配列、（ｃ）

Ｆｃドメインの第二サブユニットと前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドをコードする配列、及び（ｄ）標的細胞抗原に特異的に結合することができないＦａｂドメインをコードする配列を含む。

【０２７７】

別の態様では、４－１ＢＢリガンド三量体含有抗原結合分子をコードする単離されたポリヌクレオチドが提供され、該ポリヌクレオチドは、（ａ）標的細胞抗原に特異的に結合することができるＦａｂドメインをコードする配列、（ｂ）Ｆｃドメインの第一サブユニットとペプチドリンカーによって互いに連結されたＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドをコードする配列、及び（ｃ）ＦｃドメインのＦｃドメインの第二サブユニットと前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドをコードする配列を含む。

【０２７８】

更なる態様では、本発明は、配列番号：１、配列番号：２、配列番号：３、配列番号：４、配列番号：５、配列番号：６、配列番号：７及び配列番号：８に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも約９０％、９５％、９８％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む二つの４－１ＢＢＬ断片を含むポリペプチドをコードする配列を含む単離されたポリヌクレオチドと、配列番号：１、配列番号：２、配列番号：３、配列番号：４、配列番号：５、配列番号：６、配列番号：７及び配列番号：８に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも約９０％、９５％、９８％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む一つの４－１ＢＢＬ断片を含むポリペプチドをコードする配列を含むポリヌクレオチドに関する。

【０２７９】

更に、ＯＸ４０リガンド三量体含有抗原結合分子をコードする単離されたポリヌクレオチドが提供され、該ポリヌクレオチドは、（ａ）標的細胞抗原に特異的に結合することができる部分をコードする配列、（ｂ）ペプチドリンカーによって互いに連結されたＯＸ４０Ｌの二つのエクトドメイン又はその二つの断片を含むポリペプチドをコードする配列　（ｃ）ＯＸ４０Ｌの一つのエクトドメイン又はその断片を含むポリペプチドをコードする配列を含む。

【０２８０】

別の態様では、本発明は、配列番号：９又は配列番号：１０に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも約９０％、９５％、９８％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む二つの４－１ＢＢＬ断片を含むポリペプチドをコードする配列を含む単離されたポリヌクレオチドと、配列番号：１又は配列番号：５に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも約９０％、９５％、９８％又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む一つの４－１ＢＢＬ断片を含むポリペプチドをコードする配列を含むポリヌクレオチドに関する。

【０２８１】

更なる態様では、本発明は、ここに開示される特異的ｃＤＮＡ配列と少なくとも約９０％、９５％、９８％又は１００％同一である配列を含むポリヌクレオチドに関する。特定の態様では、本発明は、ここに開示される特異的ｃＤＮＡ配列の一つと同一の配列を含むポリヌクレオチドに関する。

【０２８２】

所定の態様では、ポリヌクレオチド又は核酸はＤＮＡである。他の実施態様では、本発明のポリヌクレオチドは、例えばメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）の形態の、ＲＮＡである。本発明のＲＮＡは一本鎖でも二本鎖でもよい。

【０２８３】

［組換え法］

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

る。このようなポリヌクレオチドは、一般的な手順を使用して容易に単離され、配列決定されうる。本発明の一態様では、本発明のポリヌクレオチドの一又は複数を含むベクター、好ましくは発現ベクターが提供される。当業者に周知の方法を使用して、適切な転写／翻訳制御シグナルと共にＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子（断片）のコード配列を含む発現ベクターを構築することができる。これらの方法には、インビトロ組換えＤＮＡ技術、合成技術及びインビボ組換え／遺伝子組換えが含まれる。例えば、Maniatis等, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989)；及びAusubel等, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989)に記載された技術を参照のこと。発現ベクターはプラスミド、又はウイルスの一部でありうるか、又は核酸断片でありうる。発現ベクターは、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子又はそのポリペプチド断片をコードするポリヌクレオチド（すなわちコード領域）が、プロモーター及び／又は他の転写もしくは翻訳制御エレメントと作動可能に結合してクローニングされる発現カセットを含む。ここで使用される場合、「コード領域」は、アミノ酸に翻訳されるコドンからなる核酸の一部である。「終止コドン」（ＴＡＧ、ＴＧＡ、又はＴＡＡ）はアミノ酸に翻訳されないが、存在する場合にはコード領域の一部と考えられるが、任意の隣接配列、例えばプロモーター、リボソーム結合部位、転写ターミネーター、イントロン、５’及び３’未翻訳領域などはコード領域の一部ではない。二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中に、例えば単一ベクター上に、又は別々のポリヌクレオチドコンストラクト中に、例えば別個の（異なる）ベクター上に存在しうる。更に、任意のベクターは単一のコード領域を含んでいてもよいし、二つ以上のコード領域を含んでいてもよく、例えば本発明のベクターは、タンパク質分解性切断を介して、最終タンパク質に翻訳後又は翻訳と同時に分離される一又は複数のポリペプチドをコードしてもよい。加えて、本発明のベクター、ポリヌクレオチド、又は核酸は、本発明のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子もしくはそのポリペプチド断片、又はその変異体もしくは誘導体をコードするポリヌクレオチドに融合された又は非融合の異種コード領域をコードしうる。異種コード領域は、限定されないが、特殊化されたエレメント又はモチーフ、例えば分泌シグナルペプチド又は異種機能ドメインを含む。作動可能な結合は、ポリペプチドなどの遺伝子産物のコード領域が、遺伝子産物の発現を制御配列の影響下又は制御下に置くように、一又は複数の制御配列と結合されるときである。（ポリペプチドコード領域及びそれに結合するプロモーターのような）二つのＤＮＡ断片は、プロモーター機能の誘導が所望の遺伝子産物をコードするｍＲＮＡの転写をもたらし、かつ二つのＤＮＡ断片間の連結の性質が、遺伝子産物の発現を導く発現制御配列の能力を妨げないか又は転写されるべきＤＮＡ鋳型の能力を妨げない場合、「作動可能に結合している」。従って、プロモーター領域は、プロモーターがその核酸の転写をもたらすことができる場合にポリペプチドをコードする核酸に作動可能に結合される。プロモーターは所定の細胞においてのみＤＮＡの実質的な転写を導く細胞特異的プロモーターでありうる。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ポリヌクレオチドと作動可能に結合されうる。

【０２８４】

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

モーター誘導性テトラサイクリン）を含む。同様に、様々な翻訳制御エレメントが当業者に知られている。これらには、限定されないが、リボソーム結合部位、翻訳開始及び終結コドン、及びウイルス系由来エレメント（特に、配列内リボソーム進入部位、又はＣＩＴＥ配列とも呼ばれるＩＲＥＳ）が含まれる。発現カセットはまた他の特徴、例えば、複製起点、及び／又は染色体組込みエレメント、例えばレトロウイルス末端反復配列（ＬＴＲ）、又はアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）末端逆位配列（ＩＴＲ）を含みうる。

【０２８５】

本発明のポリヌクレオチド及び核酸コード領域は、本発明のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの分泌を指示する分泌又はシグナルペプチドをコードする更なるコード領域と結合させることができる。例えば、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子又はそのポリペプチド断片の分泌が望まれる場合、シグナル配列をコードするＤＮＡが、本発明のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子又はそのポリペプチド断片をコードする核酸の上流に配置されうる。シグナル仮説によると、哺乳動物細胞によって分泌されるタンパク質は、粗面小胞体上で成長するタンパク質鎖の排出が一度開始されると成熟タンパク質から切断されるシグナルペプチド又は分泌リーダー配列を有する。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一般にポリペプチドのＮ末端に融合されたシグナルペプチドを有しており、これが翻訳されたポリペプチドから切断されてポリペプチドの分泌又は「成熟」型が生成されることを認識している。所定の実施態様では、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が使用され、又は作動可能に結合しているポリペプチドの分泌を指示する能力を保持するその配列の機能的誘導体が使用される。あるいは、異種哺乳動物シグナルペプチド、又はその機能的誘導体が使用されうる。例えば、野生型リーダー配列は、ヒト組織プラスミノーゲン活性化因子（ＴＰＡ）又はマウスβ－グルクロニダーゼのリーダー配列で置換されうる。

【０２８６】

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

【０２８７】

本発明の更なる態様では、本発明の一又は複数のポリヌクレオチドを含む宿主細胞が提供される。所定の実施態様では、本発明の一又は複数のベクターを含む宿主細胞が提供される。ポリヌクレオチド及びベクターには、ポリヌクレオチド及びベクターそれぞれに関連してここに記載される特徴の何れかを単独で又は組み合わせて組み込むことができる。一態様では、宿主細胞は、本発明のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子（の一部）をコードするポリヌクレオチドを含むベクターを含む（例えば該ベクターで形質転換又はトランスフェクトされている）。ここで使用される場合、「宿主細胞」という用語は、本発明の融合タンパク質又はその断片を生成するよう操作されうる任意の種類の細胞系を指す。抗原結合分子の複製及び発現の補助に適した宿主細胞は当該技術分野で周知である。そのような細胞は特定の発現ベクターで適切にトランスフェクト又は形質導入することができ、多量のベクター含有細胞を、臨床利用のための十分な量の抗原結合分子を得るために、大規模発酵槽でのシーディング用に増殖させることができる。適切な宿主細胞は、原核生物微生物、例えば大腸菌、又は様々な真核生物細胞、例えばチャイニーズハムスター卵巣細胞（ＣＨＯ）、昆虫細胞などを含む。例えば、特に、グリコシル化が必要ではない場合には、ポリペプチドは細菌中で生成されうる。発現後、ポリペプチドは可溶性画分において細菌細胞ペーストから単離され得、更に精製することができる。原核生物に加えて、糸状菌又は酵母菌のような真核微生物が、菌類や酵母菌株を含むポリペプチドをコードするベクターのための適切なクローニング又は発現宿主であり、そのグリコシル化経路は「ヒト化」されており、部分的又は完全なヒトグリコシル化パターンを有するポリペプチドの産生をもたらす。Gerngross, Nat Biotech 22, 1409-1414 (2004)、及び

Li等, Nat Biotech 24, 210-215 (2006)を参照。
【０２８８】
（グリコシル化）ポリペプチドの発現に適した宿主細胞はまた多細胞生物（無脊椎動物と脊椎動物）から由来する。無脊椎動物細胞の例には植物及び昆虫細胞が含まれる。昆虫細胞と併せて使用することができる、特にスポドプテラ・フルギペルダ細胞のトランスフェクションのための、多数のバキュロウイルス株が同定されている。植物細胞培養物をまた宿主として利用することができる。例えば、米国特許第５９５９１７７号、第６０４０４９８号、第６４２０５４８号、第７１２５９７８号、及び第６４１７４２９号（トランスジェニック植物における抗体産生のためのＰＬＡＮＴＩＢＯＤＩＥＳ™技術を記載）を参照のこと。脊椎動物細胞もまた宿主として使用されうる。例えば、懸濁液中で増殖するように適合化されている哺乳動物細胞株が有用でありうる。有用な哺乳動物宿主細胞株の他の例は、ＳＶ４０で形質転換されたサル腎臓ＣＶ１株（ＣＯＳ－７）、ヒト胚腎臓株（Graham等, J. Gen Virol. 36:59 (1977)に記載された２９３又は２９３Ｔ細胞）、ベビーハムスター腎臓細胞（ＢＨＫ）、マウスセルトリ細胞（例えば、Mather, Biol Reprod 23:243-251 (1980)に記載されたＴＭ４細胞）、サル腎細胞（ＣＶ１）、アフリカミドリザル腎細胞（ＶＥＲＯ－７６）、ヒト子宮頸癌細胞（ＨＥＬＡ）、イヌ腎臓細胞（ＭＤＣＫ）、バッファローラット肝臓細胞（ＢＲＬ３Ａ）、ヒト肺細胞（Ｗ１３８）、ヒト肝細胞（ＨｅｐＧ２）、マウス乳腺腫瘍細胞（ＭＭＴ０６０５６２）、（例えばMather等, Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)に記載された）ＴＲＩ細胞、ＭＲＣ５細胞、及びＦＳ４細胞である。他の有用な哺乳動物宿主細胞株は、ｄｈｆｒ－ＣＨＯ細胞（Urlaub等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)）を含むチャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞；及びＹＯ、ＮＳ０、Ｐ３Ｘ６３及びＳｐ２／０などの骨髄腫細胞株を含む。タンパク質産生に適した所定の哺乳動物宿主細胞株の概説については、例えば、Yazaki及びWu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo編, Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003)を参照。宿主細胞は、培養細胞、例えば幾つか挙げると、哺乳動物培養細胞、酵母細胞、昆虫細胞、細菌細胞及び植物細胞、並びにトランスジェニック動物、トランスジェニック植物又は培養植物又は動物組織内部に含まれる細胞を含む。一実施態様では、宿主細胞は、真核生物細胞、好ましくは哺乳動物細胞、例えばチャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、ヒト胎児由来腎臓（ＨＥＫ）細胞、又はリンパ系細胞（例えば、ＹＯ、ＮＳ０、Ｓｐ２０細胞）である。これらの系において外来遺伝子を発現する標準的な技術が当該技術分野で知られている。免疫グロブリンの重鎖又は軽鎖の何れかを含むポリペプチドを発現する細胞は、発現された生成物が重鎖と軽鎖の両方を有する免疫グロブリンであるように、免疫グロブリン鎖の他方をまた発現するように改変されうる。
【０２８９】
一態様では、本発明のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子又はそのポリペプチド断片を産生する方法が提供され、その方法は、ここで提供される本発明のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子又はそのポリペプチド断片をコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞を、本発明のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子又はそのポリペプチド断片の発現に適した条件下で培養すること、及び本発明のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子又はそのポリペプチド断片を宿主細胞（又は宿主細胞培養培地）から回収することを含む。
【０２９０】
本発明のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子において、構成要素（標的細胞抗原に特異的に結合することができるＦａｂドメイン、ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む一つのポリペプチド、及び前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含むポリペプチド）は互いに遺伝的に融合されていない。ポリペプチドは、その構成要素（ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片とＣＨ又はＣＬなどの他の構成要素）が互いに直接又はリンカー配列を介して融合されるように設計される。リンカーの組成

及び長さは、当該技術分野で周知の方法に従って決定することができ、有効性について試験することができる。本発明の抗原結合分子の異なる構成要素間のリンカー配列の例は、ここに提供される配列に見出される。所望されるならば、融合タンパク質の個々の成分を分離するために切断部位を組み込むための付加的な配列、例えばエンドペプチダーゼ認識配列をまた含めることができる。

【０２９１】

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

【０２９２】

免疫グロブリンの任意の動物種を本発明において使用することができる。本発明において有用な非限定的な免疫グロブリンは、マウス、霊長類、又はヒト由来のものでありうる。融合タンパク質のヒトでの使用が意図される場合、免疫グロブリンの定常領域がヒトに由来する免疫グロブリンのキメラ形態が使用されうる。ヒト化又は完全ヒト形態の免疫グロブリンもまた当該分野でよく知られている方法に従って調製されうる（例えばＷｉｎｔｅｒの米国特許第５５６５３３２号を参照）。ヒト化は、限定されないが、（ａ）重要なフレームワーク残基（例えば、良好な抗原結合親和性又は抗体機能を保持するために重要であるもの）の保持を伴う又は伴わないヒト（例えば、レシピエント抗体）フレームワーク及び定常領域上への非ヒト（例えば、ドナー抗体）ＣＤＲの移植、（ｂ）ヒトフレームワーク及び定常領域上への非ヒト特異性決定領域（ＳＤＲ又はａ－ＣＤＲ；抗体－抗原相互作用に重要な残基）のみの移植、又は（ｃ）非ヒト可変ドメイン全体の移植であるが、表面残基の置換によるヒト様切片でのそれらの「クローキング」を含む、様々な方法によって達成することができる。ヒト化抗体及びそれらの製造方法は、例えばAlmagro及びFransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)に概説され、更に例えばRiechmann等, Nature 332, 323-329 (1988)；Queen等, Proc Natl Acad Sci USA 86, 10029-10033 (1989)；米国特許第５８２１３３７号、同第７５２７７９１号、同第６９８２３２１号、及び同第７０８７４０９号；Jones等, Nature 321, 522-525 (1986)；Morrison等, Proc Natl Acad Sci 81, 6851-6855 (1984)；Morrison及びOi, Adv Immunol 44, 65-92 (1988)；Verhoeyen等, Science 239, 1534-1536 (1988)；Padlan, Molec Immun 31(3), 169-217 (1994)；Kashmiri等, Methods 36, 25-34 (2005)（ＳＤＲ（ａ－ＣＤＲ）移植を記述）；Padlan, Mol Immunol 28, 489-498 (1991)（「リサーフェシング」を記述）；Dall'Acqua等, Methods 36, 43-60 (2005)（「ＦＲシャッフリング」を記述）；及びOsbourn等, Methods 36, 61-68 (2005)及びKlimka等, Br J Cancer 83, 252-260 (2000)（ＦＲシャッフリングに対する「誘導選択（guided selection）」アプローチを記述）に記載されている。本発明に係る特定の免疫グロブリンはヒト免疫グロブリンである。ヒト抗体及びヒト可変領域は、当該技術分野において知られている様々な技術を使用して産生することができる。ヒト抗体は一般にvan Dijk及びvan de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5: 368-74 (2001) 及びLonberg, Curr. Opin. Immunol. 20:450-459 (2008)に記載されている。ヒト可変領域は、ハイブリドーマ法によって作製されたヒトモノクローナル抗体の一部を形成することができ、かつそのような抗体から誘導することができる（例えば、Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 19

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

【０２９３】

所定の態様では、本発明の抗原結合分子に含まれる標的細胞抗原に特異的に結合することができるＦａｂドメイン（例えば、Ｆａｂ断片）は、例えばＰＣＴ公報国際公開第２０１２／０２０００６号（親和性成熟に関する実施例を参照）又は米国特許出願公開第２００４／０１３２０６６号に開示された方法に従って、結合親和性を増強させるように操作される。特定の抗原決定基に結合する本発明の抗原結合分子の能力は、酵素結合免疫吸着測定法（ＥＬＩＳＡ）又は当業者によく知られている他の技術、例えば表面プラズモン共鳴技術（Liljeblad等, Glyco J 17, 323-329 (2000)）及び伝統的な結合アッセイ（Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002)）の何れかによって測定することができる。競合アッセイを使用して、特定の抗原への結合について参照抗体と競合する抗原結合分子を同定することができる。所定の実施態様では、そのような競合する抗原結合分子は、参照抗原結合分子によって結合される同じエピトープ（例えば線状又は立体構造エピトープ）に結合する。抗原結合分子が結合するエピトープをマッピングするための例示的な方法の詳細が、Morris (1996) “ Epitope Mapping Protocols," in Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ）に提供されている。例示的な競合アッセイでは、抗原に結合する第一の標識抗原結合分子と、抗原への結合について第一の抗原結合分子と競合するその能力について試験される第二の非標識抗原結合分子とを含む溶液中で固定化した抗原をインキュベートする。第二の抗原結合分子はハイブリドーマ上清中に存在しうる。対照として、固定化抗原が、第一の標識抗原結合分子を含むが第二の未標識抗原結合分子は含まない溶液中でインキュベートされる。第一の抗体の抗原への結合を許容する条件下でインキュベートした後、過剰な未結合抗体が除去され、固定化された抗原に結合した標識の量が測定される。固定化抗原に結合した標識の量が、対照試料と比較して試験試料中で実質的に減少している場合、それは、第二の抗原結合分子が、抗原への結合について第一の抗原結合分子と競合していることを示している。Harlow及びLane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)を参照。

【０２９４】

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

れるように発現されたＴＮＦリガンド三量体含有抗原結合分子は、還元及び非還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥによって証明される通りにインタクトで、正しく組み立てられていることが示された。

【０２９５】

［アッセイ］

ここに提供される抗原結合分子は、当該技術分野で既知の様々なアッセイによって、同定され、その物理的／化学的性質及び／又は生物学的活性についてスクリーニングされ、又は特徴付けられる。

【０２９６】

１．アフィニティーアッセイ

対応するＴＮＦ受容体に対するここに提供されるＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子の親和性は、実施例に記載の方法に従い、Ｂｉａｃｏｒｅ（登録商標）機器（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）のような標準的機器類と、組換え発現により得られうるもののような受容体又は標的タンパク質を使用して、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）により決定することができる。ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子のその標的細胞抗原に対する親和性もまた、ＢＩＡｃｏｒｅ機器（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）のような標準的器具類と、組換え発現により得られるような受容体又は標的タンパク質を使用して、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）により決定することができる。結合親和性を測定するための特定の例証的で例示的な実施態様を、実施例３に記載する。一態様によれば、K_Dは、２５℃においてＢＩＡＣＯＲＥ（登録商標）Ｔ１００マシン（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を使用する表面プラズモン共鳴により測定される。

【０２９７】

２．結合アッセイ及びその他のアッセイ

ここで提供されるＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子の対応する受容体発現細胞への結合は、特定の受容体又は標的抗原を発現する細胞株を使用して、例えばフローサイトメトリー（ＦＡＣＳ）により、評価することができる。一態様では、ＴＮＦ受容体を発現する新鮮な末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）が結合アッセイに使用される（実施例６．１及び７．１）。これらの細胞は、単離後に直接（ナイーブＰＭＢＣ）又は刺激後（活性化ＰＭＢＣ）に使用される。別の態様では、活性化マウス脾細胞（ＴＮＦ受容体分子を発現）を使用して、本発明のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子の対応するＴＮＦ受容体発現細胞への結合を実証した。

【０２９８】

更なる態様では、標的細胞抗原、例えばＦＡＰを発現するがん細胞株を使用して、抗原結合分子の標的細胞抗原への結合を実証した（実施例６．２）。別の態様では、ＣＤ１９を発現するがん細胞株を使用して、抗原結合分子のＣＤ１９への結合を実証した（実施例７．２）。

【０２９９】

別の態様では、競合アッセイを使用して、それぞれ標的又はＴＮＦ受容体への結合について特異的抗体又は抗原結合分子と競合する抗原結合分子を同定することができる。所定の実施態様では、そのような競合抗原結合分子は、特異的抗標的抗体又は特異的抗ＴＮＦ受容体抗体が結合する同じエピトープ（例えば線状又は立体構造エピトープ）に結合する。抗体が結合するエピトープをマッピングするための例示的方法の詳細は、Morris (1996) “Epitope Mapping Protocols,” in Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ)に提供されている。

【０３００】

３．活性アッセイ

一態様では、特異的標的細胞抗原及び生物学的活性を有する特異的ＴＮＦ受容体に結合するＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を同定するためのアッセイが提供される。生物学的活性には、例えば、標的細胞抗原を発現する細胞上のＴＮＦ受容体を介したアゴニストシグナル伝達が含まれうる。インビトロでこのような生物学的活性を有する

ものとしてアッセイによって同定されたＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子もまた提供される。

【０３０１】

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

【０３０２】

［薬学的組成物、製剤及び投与経路］

更なる態様では、本発明は、例えば以下の治療法の何れかに使用される、ここで提供されるＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子の何れかを含有する薬学的組成物を提供する。一実施態様では、薬学的組成物は、ここに提供されるＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子の何れかと少なくとも一種の薬学的に許容可能な賦形剤とを含有する。他の実施態様では、薬学的組成物は、ここで提供されるＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子の何れかと、例えば以下に記載されるような少なくとも一種の追加の治療剤とを含有する。

【０３０３】

本発明の薬学的組成物は、薬学的に許容可能な賦形剤に溶解され又は分散された、一又は複数のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子の治療的有効量を含有する。「薬学的に又は薬理学的に許容可能な」という語句は、用いられる投薬量及び濃度でレシピエントに一般に非毒性であり、すなわち、例えばヒトなどの動物に必要に応じて投与されたとき、副作用、アレルギー反応、又は他の望ましくない応答を生じさせない分子的実体及び組成物を指す。少なくとも一種のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子と、場合によっては追加的な活性成分とを含有する薬学的組成物の調製は、出典明示によりここに援用されるRemington’s Pharmaceutical Sciences, 18版 Mack Printing Company, 1990によって例示されるように、本開示に鑑みて当業者には既知であろう。特に、組成物は凍結乾燥製剤又は水溶液である。ここで使用される場合、「薬学的に許容可能な賦形剤」には、当業者には既知であるように、任意の全ての溶媒、緩衝液、分散媒、コーティング、界面活性剤、抗酸化剤、保存料（例えば抗菌剤、抗真菌剤）、等張剤、塩、安定剤及びそれらの組み合わせが含まれる。

【０３０４】

非経口組成物には、注射による投与、例えば皮下、皮内、病巣内、静脈内、動脈内、筋肉内、髄腔内又は腹腔内への注射用にデザインされたものが含まれる。注射の場合、本発明のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、水溶液、好ましくはハンクス液、リンゲル液、又は生理食塩水緩衝液などの生理的に適合性のある緩衝液中で製剤化されうる。溶液は、懸濁化剤、安定剤、及び／又は分散剤などの製剤関連薬剤を含みうる。代替的に、融合タンパク質は、使用前は、適切なビヒクル、例えば滅菌済みの発熱物質を含まない水を用いた構成用の粉末形態でありうる。滅菌注射溶液は、本発明の融合タンパク質を、必要に応じて、以下に列挙する様々な他の成分と共に適切な溶媒中において必要量で取り込むことによって調製される。無菌性は、例えば、滅菌濾過膜を通して濾過することにより、容易に達成されうる。一般に、分散液は、塩基性分散媒及び／又は他の成分を含む滅菌ビヒクル中に、様々な滅菌された活性成分を取り込むことにより調製される。滅菌注射液、懸濁液、又は乳濁液を調製するための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、

その予め滅菌濾過された液体媒体から活性成分と任意の追加の所望の成分の粉末を生じる真空乾燥又は凍結乾燥技術である。液体媒体は、必要であれば適切に緩衝されなければならず、液体希釈剤は注射前に十分な生理食塩水又はグルコースで先ず等張にされなければならない。組成物は、製造及び貯蔵の条件下で安定でなければならず、細菌及び真菌のような微生物の汚染作用から保存されなければならない。エンドトキシンの汚染が安全レベルで最小限に、例えば０．５ｎｇ／ｍｇタンパク質未満に維持されなければならないことが理解される。適切な薬学的に許容可能な賦形剤には、限定されないが、緩衝剤、例えばリン酸塩、クエン酸塩及び他の有機酸；アスコルビン酸及びメチオニンを含む抗酸化剤；保存料（例えば、塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム；塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチル又はベンジルアルコール；アルキルパラベン、例えばメチル又はプロピルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；３－ペンタノール；及びｍ－クレゾール）；低分子量（約１０残基未満）のポリペプチド；タンパク質、例えば、血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えばポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、又はリジン；グルコース、マンノース、又はデキストリンを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物；キレート剤、例えばＥＤＴＡ；糖、例えばスクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトール；塩形成対イオン、例えばナトリウム；金属錯体（例えば、Ｚｎ－タンパク質錯体）；及び／又は非イオン性界面活性剤、例えばポリエチレングリコール（ＰＥＧ）が含まれる。水性注射懸濁液には、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、デキストランなどの懸濁液の粘度を上昇させる化合物が含まれうる。場合によっては、懸濁液は、適切な安定剤、又は化合物の溶解度を上昇させて高濃度溶液の調製を可能にする薬剤もまた含みうる。加えて、活性化合物の懸濁液は、適切な油性注射懸濁液として調製することができる。適切な親油性溶媒又はビヒクルには、ゴマ油のような脂肪油、又はエチルクリート（ethyl cleat）もしくはトリグリセリドのような合成脂肪酸エステル、又はリポソームが含まれる。

【０３０５】

活性成分は、例えばコアセルベーション技術又は界面重合法によって調製されたマイクロカプセル、例えばそれぞれヒドロキシメチルセルロースマイクロカプセル又はゼラチン－マイクロカプセル及びポリ－（メチルメタクリレート）マイクロカプセルに、コロイド薬物送達システム（例えばリポソーム、アルブミンミクロスフィア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル）に、又はマクロエマルジョンに、封入されうる。このような技術は、Remington’s Pharmaceutical Sciences（18版 Mack Printing Company, 1990）に開示されている。徐放性調製物が調製されうる。徐放性調製物の適切な例は、ポリペプチドを含む固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスを含み、そのマトリックスは成形品、例えばフィルム又はマイクロカプセルの形態である。特定の実施態様では、注射可能な組成物の吸収の延長を、例えばモノステアリン酸アルミニウム、ゼラチン、又はそれらの組合せのような吸収を遅延させる薬剤を組成物に使用することによりもたらすことができる。

【０３０６】

ここでの例示的な薬学的に許容可能な賦形剤は、侵入型薬物分散剤、例えば、可溶性中性活性ヒアルロニダーゼ糖タンパク質（ｓＨＡＳＥＧＰ）、例えば、ｒＨｕＰＨ２０（ＨＹＬＥＮＥＸ（登録商標）, Baxter International, Inc.）のようなヒト可溶性ＰＨ－２０ヒアルロニダーゼ糖タンパク質を更に含む。ｒＨｕＰＨ２０を含む所定の例示的なｓＨＡＳＥＧＰと使用法は、米国特許出願公開第２００５／０２６０１８６号及び同第２００６／０１０４９６８号に記載されている。一態様では、ｓＨＡＳＥＧＰは、コンドロイチナーゼなどの一又は複数の更なるグリコサミノグリカナーゼと組み合わせられる。

【０３０７】

例示的な凍結乾燥抗体製剤は、米国特許第６２６７９５８号に記載されている。水性抗体製剤は、米国特許第６１７１５８６号及び国際公開第２００６／０４４９０８号に記載さ

れているものを含み、後者の製剤はヒスチジン－酢酸緩衝液を含む。
【０３０８】
先に記載した組成物に加えて、融合タンパク質はデポー製剤として製剤化することもできる。そのような長時間作用性製剤は、移植（例えば、皮下又は筋肉内）又は筋肉内注射によって投与されうる。従って、例えば、融合タンパク質は、適切な高分子又は疎水性材料（例えば、許容可能な油中のエマルジョンとして）又はイオン交換樹脂、又は難溶性誘導体として、例えば難溶性塩として製剤化されうる。
【０３０９】
本発明の融合タンパク質を含む薬学的組成物は、一般的な混合、溶解、乳化、カプセル化、封入、又は凍結乾燥プロセスにより製造することができる。薬学的組成物は、一又は複数の生理学的に許容可能な担体、希釈剤、賦形剤、又は薬学的に使用可能な調製物へのタンパク質のプロセシングを容易にする補助剤を使用する一般的な方法で製剤化されうる。適当な製剤は、選択される投与経路に依存する。
【０３１０】
ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、遊離酸又は塩基の、中性又は塩の形態の組成物に製剤化することができる。薬学的に許容可能な塩は、遊離酸又は塩基の生物活性を実質的に保持する塩である。これらには、酸付加塩、例えば、タンパク質性組成物の遊離アミノ基で形成されたもの、又は例えば塩酸もしくはリン酸のような無機酸、又は酢酸、シュウ酸、酒石酸もしくはマンデル酸のような有機酸で形成されたものが含まれる。また、遊離カルボキシル基で形成される塩は、例えば水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、又は水酸化第二鉄のような無機塩基；又はイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、又はプロカインのような有機塩基から誘導することができる。薬学的塩は、対応する遊離塩基形態より、水性及び他のプロトン性溶媒に溶け易い傾向がある。
【０３１１】
ここでの組成物は、治療される特定の適応症に必要な一を超える活性成分、好ましくは互いに悪影響を及ぼさない相補的な活性を有するものをまた含みうる。そのような活性成分は、適切には、意図された目的に有効な量で組み合わせて存在する。
【０３１２】
インビボ投与に使用される製剤は一般に無菌である。無菌性は、例えば滅菌濾過膜を通した濾過によって、容易に達成することができる。
【０３１３】
［治療方法及び組成物］
ここに提供されるＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子の何れも、治療方法に使用することができる。
【０３１４】
治療法における使用のために、本発明のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、良好な医療行為と一致する様式で処方され、用量決定され、投与されうる。この文脈において考慮すべき要因は、治療される特定の疾患、治療される特定の哺乳動物、個々の患者の臨床状態、疾患の原因、薬剤送達部位、投与方法、投与スケジュール及び医師に既知の他の要因を含む。
【０３１５】
一態様では、医薬として使用するための本発明のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。更なる態様では、疾患の治療、特にがんの治療における使用のための、本発明のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。所定の態様では、治療方法における使用のための本発明のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が提供される。一態様では、本発明は、必要とする個体における疾患の治療における使用のための、ここに記載のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を提供する。所定の態様では、本発明は、融合タンパク質の治療的有効量を個体に投与することを含む、疾患を有する個体を治療する方法における使用のためのＴＮＦファミリ

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

【０３１６】

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

【０３１７】

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

【０３１８】

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

【０３１９】

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

【０３２０】

更なる態様では、本発明は、個体における疾患を治療するための方法であって、本発明のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子の治療的有効量を前記個体に投与することを含む方法を提供する。一態様では、薬学的に許容される形態の本発明の融合タンパク質を含む組成物が、前記個体に投与される。所定の態様では、治療される疾患は増殖性

疾患である。特定の態様では、疾患はがんである。別の態様では、疾患は感染症又は自己免疫疾患である。所定の態様では、その方法は、少なくとも一種の追加的治療剤、例えば、治療される疾患ががんであれば抗がん剤の治療的有効量を個体に投与することを更に含む。上記実施態様の何れかに係る「個体」は、哺乳動物、好ましくはヒトでありうる。

【０３２１】

疾患の予防又は治療では、本発明のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子の適切な投薬量は（単独で使用されるか、又は一又は複数の他の追加的治療剤との組み合わせで使用される場合）、治療される疾患の種類、投与経路、患者の体重、融合タンパク質の種類、疾患の重症度及び経過、融合タンパク質が予防又は治療何れの目的で投与されるか、以前の又は同時の治療的介入、患者の臨床歴及び融合タンパク質に対する応答、並びに主治医の裁量に依存するであろう。何れにしても、投与の責任を負う医師が、組成物中の活性成分の濃度及び個々の対象のための適切な用量を決定するであろう。限定されないが、様々な時点にわたる、単一又は複数回投与、ボーラス投与、パルス注入を含む様々な投与スケジュールがここで考慮される。

【０３２２】

ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、単回、又は一連の治療にわたって患者に適切に投与される。疾患の種類及び重症度に応じて、例えば一又は複数の別個の投与によるか、又は連続注入によるかに関わらず、約１μｇ／ｋｇ～１５ｍｇ／ｋｇ（例えば０．１ｍｇ／ｋｇ～１０ｍｇ／ｋｇ）のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が患者への投与のための初期候補投薬量となりうる。一つの典型的な一日の投薬量は、上記の要因に応じて、約１μｇ／ｋｇ～１００ｍｇ／ｋｇ以上の範囲かもしれない。数日間以上にわたる反復投与の場合には、状態に応じて、治療は、疾患症状の望まれる抑制が起こるまで一般に持続されるであろう。融合タンパク質の一つの例示的な投薬量は、約０．００５ｍｇ／ｋｇ～約１０ｍｇ／ｋｇの範囲であろう。他の例では、用量は、一回の投与につき、体重１ｋｇ当たり約１μｇ、体重１ｋｇ当たり約５μｇ、体重１ｋｇ当たり約１０μｇ、体重１ｋｇ当たり約５０μｇ、体重１ｋｇ当たり約１００μｇ、体重１ｋｇ当たり約２００μｇ、体重１ｋｇ当たり約３５０μｇ、体重１ｋｇ当たり約５００μｇ、体重１ｋｇ当たり約１ｍｇ、体重１ｋｇ当たり約５ｍｇ、体重１ｋｇ当たり約１０ｍｇ、体重１ｋｇ当たり約５０ｍｇ、体重１ｋｇ当たり約１００ｍｇ、体重１ｋｇ当たり約２００ｍｇ、体重１ｋｇ当たり約３５０ｍｇ、体重１ｋｇ当たり約５００ｍｇ、体重１ｋｇ当たり約１０００ｍｇ以上及びそこから導かれるあらゆる範囲をまた含みうる。ここに列挙した数値から誘導可能な範囲の例では、上記の数値に基づいて、体重１ｋｇ当たり約５ｍｇ～体重１ｋｇ当たり約１００ｍｇ、体重１ｋｇ当たり約５μｇ～体重１ｋｇ当たり約５００ｍｇなどを投与することができる。従って、約０．５ｍｇ／ｋｇ、２．０ｍｇ／ｋｇ、５．０ｍｇ／ｋｇ又は１０ｍｇ／ｋｇの一又は複数の用量（又はこれらの何れかの組み合わせ）が患者に投与されうる。このような用量は、断続的に、例えば毎週又は３週毎に（例えば患者が融合タンパク質の約２から約２０用量、例えば約６用量を受けるように）投与されうる。初期の高負荷用量の後、一又は複数の低用量を投与してもよい。しかしながら、他の投薬レジメンも有用でありうる。この治療法の進行は、一般的な技術及びアッセイによって容易にモニターされる。

【０３２３】

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

【０３２４】

全身投与の場合、治療的有効量は、細胞培養アッセイのようなインビトロアッセイから最初に推定することができる。ついで、用量は、細胞培養物において決定されるＩＣ５０を含む血中濃度範囲を達成するために、動物モデルにおいて公式化することができる。この

ような情報は、ヒトにおいて有用な用量を更に精確に決定するために使用することができる。

【０３２５】

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

【０３２６】

投薬量及び間隔は、治療効果を維持するのに十分なＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子の血漿レベルを提供するために個々に調整されうる。注射による投与のための通常の患者投薬量は、約０．１～５０ｍｇ／ｋｇ／日、典型的には約０．５～１ｍｇ／ｋｇ／日の範囲である。治療的に有効な血漿レベルは、毎日複数の用量を投与することにより達成することができる。血漿中のレベルは、例えばＨＰＬＣにより測定することができる。

【０３２７】

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

【０３２８】

ここに記載されるＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子の治療的に有効な用量は、一般に、実質的な毒性を引き起こすことなく治療上の利益を提供する。融合タンパク質の毒性及び治療効果は、細胞培養又は実験動物における標準の薬学的手順により決定することができる。ＬＤ５０（集団の５０％に致死的な用量）及びＥＤ５０（集団の５０％において治療的に有効な用量）を決定するために、細胞培養アッセイ及び動物試験を使用することができる。毒性効果と治療効果との間の用量比は、比ＬＤ５０／ＥＤ５０として表すことができる治療指数である。大きな治療指数を示すＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が好ましい。一実施態様では、本発明に係るＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は高い治療指数を示す。細胞培養アッセイ及び動物研究から得られたデータは、ヒトにおける使用に適したある範囲の投薬量を公式化するのに使用することができる。投薬量は、好ましくは、毒性を殆ど又は全く伴わないＥＤ５０を含む、ある範囲の血中濃度内にある。投薬量は、様々な要因、例えば、用いられる投薬形態、利用される投与経路、対象の状態などに依存してこの範囲内で変動しうる。正確な処方、投与経路、及び投薬量は、患者の状態を考慮して個々の医師により選択されうる（例えば、その全体が出典明示によりここに援用されるFingl等, 1975, in: The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ch. 1, p. 1参照）。

【０３２９】

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

【０３３０】

［その他の薬剤及び治療］

本発明のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、治療法において一又は複数の他の薬剤と組み合わせて投与されうる。例えば、本発明の融合タンパク質は、少なくとも一種の追加的治療剤と同時投与されうる。「治療剤」という用語は、症状又は疾患を治療するために、そのような治療を必要とする個体に投与することができる任意の薬剤を包含する。このような追加的治療剤は、治療される特定の適応症に適した任意の活性成分、好ましくは互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を有するものを含みうる。所定の実施

態様では、追加的治療剤は別の抗がん剤又は免疫療法である。
【０３３１】
このような他の薬剤は、好適には、意図した目的に有効な量で組み合わされて存在する。このような他の薬剤の有効量は、使用される融合タンパク質の量、疾患又は治療の種類、及び上で検討された他の要因に依存する。ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、一般に、ここに記載されるものと同じ投薬量及び投与経路を用いて、又はここに記載された投薬量の約１％～９９％で、又は妥当であると経験的／臨床的に決定された任意の経路及び任意の投薬量で使用される。
【０３３２】
上記のこのような併用療法は、併用投与（二種以上の治療剤が、同一又は別々の組成物に含まれる）、及び本発明のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子の投与が、追加の治療剤及び／又はアジュバントの投与の前、投与と同時、及び／又は投与の後に起こりうる別個の投与を包含する。
【０３３３】
［製造品］
本発明の別の態様では、上述の疾患の治療、予防及び／又は診断に有用な材料を含む製造品が提供される。製造品は、容器と、容器上のもしくは容器に付随したラベル又は添付文書とを含む。好適な容器は、例えばボトル、バイアル、シリンジ、ＩＶ輸液バッグなどを含む。容器はガラス又はプラスチックなどの様々な材料から形成されうる。容器は、単独で又は別の組成物と併用されて、症状の治療、予防、及び／又は診断に有効な組成物を収容し、無菌のアクセスポートを有しうる（例えば、容器は皮下注射針により穿孔可能なストッパーを有する静脈内溶液バッグ又はバイアルでありうる）。組成物中の少なくとも一種の活性剤は、本発明のＴＮＦリガンド三量体含有抗原結合分子である。
【０３３４】
ラベル又は添付文書は、組成物が選択された症状を治療するために使用されることを示す。更に、製造品は、（ａ）本発明のＴＮＦリガンド三量体含有抗原結合分子を含有する組成物をその中に含む第一の容器；及び（ｂ）更なる細胞傷害性又はその他の治療剤をその中に含む組成物を含む第二の容器を含みうる。本発明のこの実施態様における製造品は、組成物を特定の症状を治療するために使用できることを示す添付文書を更に含みうる。
【０３３５】
代替的に又は追加的に、製造品は、薬学的に許容される緩衝液、例えば注射用静菌水（ＢＷＦＩ）、リン酸緩衝生理食塩水、リンガー液、及びデキストロース液を含む第二（又は第三）の容器を更に含みうる。製造品は、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針、及びシリンジを含む、商業的及び使用者の観点から望まれる他の材料を更に含んでいてもよい。
【０３３６】

表C (配列):

配列番号:	名称	配列
1	ヒト (hu) 4-1BBL (71-254)	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWY SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELR RVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASS EARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLT QGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE
2	hu 4-1BBL (85-254)	LDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGL SYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLA LHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLL HLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEI PAGLPSPRSE
3	hu 4-1BBL (80-254)	DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGV SLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGS GSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFG FQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGL FRVTPEIPAGLPSPRSE
4	hu 4-1BBL (52-254)	PWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQG MFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDT KELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPL RSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAG QRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLP SPRSE
5	hu 4-1BBL (71-248)	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWY SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELR RVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASS EARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLT QGATVLGLFRVTPEIPAGL
6	hu 4-1BBL (85-248)	LDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGL SYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLA LHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLL HLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEI PAGL
7	hu 4-1BBL (80-248)	DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGV SLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGS GSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFG FQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGL FRVTPEIPAGL
8	hu 4-1BBL (52-248)	PWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQG MFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDT KELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPL RSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAG QRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
9	$(G4S)_2$ リンカーにより連結された二量体 hu 4-1BBL (71-254)	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWY SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELR RVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASS EARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLT QGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGSREGPE LSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGL AGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAG

配列番号:	名称	配列
		EGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNS AFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATV LGLFRVTPEIPAGLPSPRSE
10	$(G4S)_2$リンカーにより連結された二量体 hu 4-1BBL (71-248)	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWY SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELR RVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASS EARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLT QGATVLGLFRVTPEIPAGLGGGGSGGGGSREGPELSPDD PAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSL TGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGS VSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQ GRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFR VTPEIPAGL
11	hu OX40L (51-183)	QVSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFILTSQKEDEIMKVQNNS VIINCDGFYLISLKGYFSQEVNISLHYQKDEEPLFQLKKVRS VNSLMVASLTYKDKVYLNVTTDNTSLDDFHVNGGELILIHQ NPGEFCVL
12	hu OX40L (52-183)	VSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFILTSQKEDEIMKVQNNSV IINCDGFYLISLKGYFSQEVNISLHYQKDEEPLFQLKKVRSV NSLMVASLTYKDKVYLNVTTDNTSLDDFHVNGGELILIHQN PGEFCVL
13	FAP(28H1) CDR-H1	SHAMS
14	FAP(28H1) CDR-H2	AIWASGEQYYADSVKG
15	FAP(28H1) CDR-H3	GWLGNFDY
16	FAP(28H1) CDR-L1	RASQSVSRSYLA
17	FAP(28H1) CDR-L2	GASTRAT
18	FAP(28H1) CDR-L3	QQGQVIPPT
19	FAP(4B9) CDR-H1	SYAMS
20	FAP(4B9) CDR-H2	AIIGSGASTYYADSVKG
21	FAP(4B9) CDR-H3	GWFGGFNY
22	FAP(4B9) CDR-L1	RASQSVTSSYLA
23	FAP(4B9) CDR-L2	VGSRRAT
24	FAP(4B9) CDR-L3	QQGIMLPPT
25	FAP(28H1) VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQ APGKGLEWVSAIWASGEQYYADSVKGRFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGWLGNFDYWGQGTLVTVSS
26	FAP(28H1) VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSRSYLAWYQQK PGQAPRLLIIGASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPE DFAVYYCQQGQVIPPTFGQGTKVEIK
27	FAP(4B9) VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQ APGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSS
28	FAP(4B9) VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAWYQQK PGQAPRLLINVGSRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP EDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIK
29	CD19 (8B8-018) CDR-H1	DYIMH
30	CD19 (8B8-018) CDR-H2	YINPYNDGSKYTEKFQG
31	CD19 (8B8-018) CDR-H3	GTYYYGSALFDY
32	CD19 (8B8-018) CDR-L1	KSSQSLENPNGNTYLN
33	CD19 (8B8-018) CDR-L2	RVSKRFS

配列番号:	名称	配列
34	CD19 (8B8-018) CDR-L3	LQLTHVPYT
35	CD19 (8B8-2B11) CDR-H1	DYIMH
36	CD19 (8B8-2B11) CDR-H2	YINPYNDGSKYTEKFQG
37	CD19 (8B8-2B11) CDR-H3	GTYYYGPQLFDY
38	CD19 (8B8-2B11) CDR-L1	KSSQSLETSTGTTYLN
39	CD19 (8B8-2B11) CDR-L2	RVSKRFS
40	CD19 (8B8-2B11) CDR-H3	LQLLEDPYT
41	CD19 (8B8-018) VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGSALFDYWGQGTTVTVSS
42	CD19 (8B8-018) VL	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLENPNGNTYLNWYLQKPGQSPQLLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQLTHVPYTFGQGTKLEIK
43	CD19 (8B8-2B11) VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGPQLFDYWGQGTTVTVSS
44	CD19 (8B8-2B11) VL	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETSTGTTYLNWYLQKPGQSPQLLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQLLEDPYTFGQGTKLEIK
45	CEA CDR-H1	DTYMH
46	CEA CDR-H2	RIDPANGNSKYVPKFQG
47	CEA CDR-H3	FGYYVSDYAMAY
48	CEA CDR-L1	RAGESVDIFGVGFLH
49	CEA CDR-L2	RASNRAT
50	CEA CDR-L3	QQTNEDPYT
51	ヒト化 CEA バインダーVH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTYMHWVRQAPGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGTLVTVSS
52	ヒト化 CEA バインダーVL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAGESVDIFGVGFLHWYQQKPGQAPRLLIYRASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQTNEDPYTFGQGTKLEIK
53	ヒト (hu) FAP	UniProt 番号 Q12884
54	hu FAP 外部ドメイン+ポリ-lys-タグ+his_6-タグ	RPSRVHNSEENTMRALTLKDILNGTFSYKTFFPNWISGQEYLHQSADNNIVLYNIETGQSYTILSNRTMKSVNASNYGLSPDRQFVYLESDYSKLWRYSYTATYYIYDLSNGEFVRGNELPRPIQYLCWSPVGSKLAYVYQNNIYLKQRPGDPPFQITFNGRENKIFNGIPDWVYEEEMLATKYALWWSPNGKFLAYAEFNDTDIPVIAYSYYGDEQYPRTINIPYPKAGAKNPVVRIFIIDTTYPAYVGPQEVPVPAMIASSDYYFSWLTWVTDERVCLQWLKRVQNVSVLSICDFREDWQTWDCPKTQEHIEESRTGWAGGFFVSTPVFSYDAISYYKIFSDKDGYKHIHYIKDTVENAIQITSGKWEAINIFRVTQDSLFYSSNEFEEYPGRRNIYRISIGSYPPSKKCVTCHLRKERCQYYTASFSDYAKYYALVCYGPGIPISTLHDGRTDQEIKILEENKELENALKNIQLPKEEIKKLEVDEITLWYKMILPPQFDRSKKYPLLIQVYGGPCSQSVRSVFAVNWISYLASKEGMVIALVDGRGTAFQGDKLLYAVYRKLGVYEVEDQITAVRKFIEMGFIDEKRIAIWGWSYGGYVSSLALASGTGLFKCGIA

配列番号:	名称	配列
		VAPVSSWEYYASVYTERFMGLPTKDDNLEHYKNSTVMAR AEYFRNVDYLLIHGTADDNVHFQNSAQIAKALVNAQVDFQ AMWYSDQNHGLSGLSTNHLYTHMTHFLKQCFSLSDGKKK KKKGHHHHHH
55	hu FAP 外部ドメイン+ポリ-lys-タグ+his_6-タグのヌクレオチド配列	CGCCCTTCAAGAGTTCATAACTCTGAAGAAAATACAAT GAGAGCACTCACACTGAAGGATATTTTAAATG GAACATTTTCTTATAAAACATTTTTTCCAAACTGGATTT CAGGACAAGAATATCTTCATCAATCTGCAGATAACAAT ATAGTACTTTATAATATTGAAACAGGACAATCATATACC ATTTTGAGTAATAGAACCATGAAAAGTGTGAATGCTTC AAATTACGGCTTATCACCTGATCGGCAATTTGTATATCT AGAAAGTGATTATTCAAAGCTTTGGAGATACTCTTACA CAGCAACATATTACATCTATGACCTTAGCAATGGAGAA TTTGTAAGAGGAAATGAGCTTCCTCGTCCAATTCAGTA TTTATGCTGGTCGCCTGTTGGGAGTAAATTAGCATATG TCTATCAAAACAATATCTATTTGAAACAAAGACCAGGA GATCCACCTTTTCAAATAACATTTAATGGAAGAGAAAA TAAAATATTTAATGGAATCCCAGACTGGGTTTATGAAG AGGAAATGCTTGCTACAAAATATGCTCTCTGGTGGTCT CCTAATGGAAAATTTTTGGCATATGCGGAATTTAATGAT ACGGATATACCAGTTATTGCCTATTCCTATTATGGCGA TGAACAATATCCTAGAACAATAAATATTCCATACCCAA AGGCTGGAGCTAAGAATCCCGTTGTTCGGATATTTATT ATCGATACCACTTACCCTGCGTATGTAGGTCCCCAGGA AGTGCCTGTTCCAGCAATGATAGCCTCAAGTGATTATT ATTTCAGTTGGCTCACGTGGGTTACTGATGAACGAGTA TGTTTGCAGTGGCTAAAAAGAGTCCAGAATGTTTCGGT CCTGTCTATATGTGACTTCAGGGAAGACTGGCAGACAT GGGATTGTCCAAAGACCCAGGAGCATATAGAAGAAAGC AGAACTGGATGGGCTGGTGGATTCTTTGTTTCAACACC AGTTTTCAGCTATGATGCCATTTCGTACTACAAAATATT TAGTGACAAGGATGGCTACAAACATATTCACTATATCA AAGACACTGTGGAAAATGCTATTCAAATTACAAGTGGC AAGTGGGAGGCCATAAATATATTCAGAGTAACACAGGA TTCACTGTTTTATTCTAGCAATGAATTTGAAGAATACCC TGGAAGAAGAAACATCTACAGAATTAGCATTGGAAGCT ATCCTCCAAGCAAGAAGTGTGTTACTTGCCATCTAAGG AAAGAAAGGTGCCAATATTACACAGCAAGTTTCAGCGA CTACGCCAAGTACTATGCACTTGTCTGCTACGGCCCAG GCATCCCCATTTCCACCCTTCATGATGGACGCACTGAT CAAGAAATTAAAATCCTGGAAGAAAACAAGGAATTGGA AAATGCTTTGAAAAATATCCAGCTGCCTAAAGAGGAAA TTAAGAAACTTGAAGTAGATGAAATTACTTTATGGTACA AGATGATTCTTCCTCCTCAATTTGACAGATCAAAGAAG TATCCCTTGCTAATTCAAGTGTATGGTGGTCCCTGCAG TCAGAGTGTAAGGTCTGTATTTGCTGTTAATTGGATATC TTATCTTGCAAGTAAGGAAGGGATGGTCATTGCCTTGG TGGATGGTCGAGGAACAGCTTTCCAAGGTGACAAACTC CTCTATGCAGTGTATCGAAAGCTGGGTGTTTATGAAGT TGAAGACCAGATTACAGCTGTCAGAAAATTCATAGAAA TGGGTTTCATTGATGAAAAAAGAATAGCCATATGGGGC

配列番号:	名称	配列
		TGGTCCTATGGAGGATACGTTTCATCACTGGCCCTTGC ATCTGGAACTGGTCTTTTCAAATGTGGTATAGCAGTGG CTCCAGTCTCCAGCTGGGAATATTACGCGTCTGTCTAC ACAGAGAGATTCATGGGTCTCCCAACAAAGGATGATAA TCTTGAGCACTATAAGAATTCAACTGTGATGGCAAGAG CAGAATATTTCAGAAATGTAGACTATCTTCTCATCCAC GGAACAGCAGATGATAATGTGCACTTTCAAAACTCAGC ACAGATTGCTAAAGCTCTGGTTAATGCACAAGTGGATT TCCAGGCAATGTGGTACTCTGACCAGAACCACGGCTTA TCCGGCCTGTCCACGAACCACTTATACACCCACATGAC CCACTTCCTAAAGCAGTGTTTCTCTTTGTCAGACGGCA AAAAGAAAAAGAAAAAGGGCCACCACCATCACCATCAC
56	マウス FAP	UniProt 番号 P97321
57	マウス FAP 外部ドメイン+ポリ-lys-タグ+his_6-タグ	RPSRVYKPEGNTKRALTLKDILNGTFSYKTYFPNWISEQEY LHQSEDDNIVFYNIETRESYIILSNSTMKSVNATDYGLSPDR QFVYLESDYSKLWRYSYTATYYIYDLQNGEFVRGYELPRPI QYLCWSPVGSKLAYVYQNNIYLKQRPGDPPFQITYTGREN RIFNGIPDWVYEEEMLATKYALWWSPDGKFLAYVEFNDSDI PIIAYSYYGDGQYPRTINIPYPKAGAKNPVVRVFIVDTTYPH HVGPMEVPVPEMIASSDYYFSWLTWVSSERVCLQWLKRV QNVSVLSICDFREDWHAWECPKNQEHVEESRTGWAGGFF VSTPAFSQDATSYYKIFSDKDGYKHIHYIKDTVENAIQITSG KWEAIYIFRVTQDSLFYSSNEFEGYPGRRNIYRISIGNSPPSK KCVTCHLRKERCQYYTASFSYKAKYYALVCYGPGLPISTL HDGRTDQEIQVLEENKELENSLRNIQLPKVEIKKLKDGGLTF WYKMILPPQFDRSKKYPLLIQVYGGPCSQSVKSVFAVNWIT YLASKEGIVIALVDGRGTAFQGDKFLHAVYRKLGVYEVEDQ LTAVRKFIEMGFIDEERIAIWGWSYGGYVSSLALASGTGLFK CGIAVAPVSSWEYYASIYSERFMGLPTKDDNLEHYKNSTV MARAEYFRNVDYLLIHGTADDNVHFQNSAQIAKALVNAQV DFQAMWYSDQNHGILSGRSQNHLYTHMTHFLKQCFSLSD GKKKKKKGHHHHHH
58	マウス FAP 外部ドメイン+ポリ-lys-タグ+his_6-タグのヌクレオチド配列	CGTCCCTCAAGAGTTTACAAACCTGAAGGAAACACAAA GAGAGCTCTTACCTTGAAGGATATTTTAAATGGAACAT TCTCATATAAAACATATTTTCCCAACTGGATTTCAGAAC AAGAATATCTTCATCAATCTGAGGATGATAACATAGTAT TTTATAATATTGAAACAAGAGAATCATATATCATTTTGA GTAATAGCACCATGAAAAGTGTGAATGCTACAGATTAT GGTTTGTCACCTGATCGGCAATTTGTGTATCTAGAAAG TGATTATTCAAAGCTCTGGCGATATTCATACACAGCGA CATACTACATCTACGACCTTCAGAATGGGGAATTTGTA AGAGGATACGAGCTCCCTCGTCCAATTCAGTATCTATG CTGGTCGCCTGTTGGGAGTAAATTAGCATATGTATATC AAAACAATATTTATTTGAAACAAAGACCAGGAGATCCA CCTTTTCAAATAACTTATACTGGAAGAGAAAATAGAATA TTTAATGGAATACCAGACTGGGTTTATGAAGAGGAAAT GCTTGCCACAAAATATGCTCTTTGGTGGTCTCCAGATG GAAAATTTTTGGCATATGTAGAATTTAATGATTCAGATA TACCAATTATTGCCTATTCTTATTATGGTGATGGACAGT ATCCTAGAACTATAAATATTCCATATCCAAAGGCTGGG GCTAAGAATCCGGTTGTTCGTGTTTTTATTGTTGACAC

配列番号:	名称	配列
		CACCTACCCTCACCACGTGGGCCCAATGGAAGTGCCA GTTCCAGAAATGATAGCCTCAAGTGACTATTATTTCAG CTGGCTCACATGGGTGTCCAGTGAACGAGTATGCTTGC AGTGGCTAAAAAGAGTGCAGAATGTCTCAGTCCTGTCT ATATGTGATTTCAGGGAAGACTGGCATGCATGGGAATG TCCAAAGAACCAGGAGCATGTAGAAGAAAGCAGAACAG GATGGGCTGGTGGATTCTTTGTTTCGACACCAGCTTTT AGCCAGGATGCCACTTCTTACTACAAAATATTTAGCGA CAAGGATGGTTACAAACATATTCACTACATCAAAGACA CTGTGGAAAATGCTATTCAAATTACAAGTGGCAAGTGG GAGGCCATATATATATTCCGCGTAACACAGGATTCACT GTTTTATTCTAGCAATGAATTTGAAGGTTACCCTGGAA GAAGAAACATCTACAGAATTAGCATTGGAAACTCTCCT CCGAGCAAGAAGTGTGTTACTTGCCATCTAAGGAAAGA AAGGTGCCAATATTACACAGCAAGTTTCAGCTACAAAG CCAAGTACTATGCACTCGTCTGCTATGGCCCTGGCCTC CCCATTTCCACCCTCCATGATGGCCGCACAGACCAAGA AATACAAGTATTAGAAGAAAACAAAGAACTGGAAAATT CTCTGAGAAATATCCAGCTGCCTAAAGTGGAGATTAAG AAGCTCAAAGACGGGGGACTGACTTTCTGGTACAAGAT GATTCTGCCTCCTCAGTTTGACAGATCAAAGAAGTACC CTTTGCTAATTCAAGTGTATGGTGGTCCTTGTAGCCAG AGTGTTAAGTCTGTGTTTGCTGTTAATTGGATAACTTAT CTCGCAAGTAAGGAGGGGATAGTCATTGCCCTGGTAGA TGGTCGGGGCACTGCTTTCCAAGGTGACAAATTCCTGC ATGCCGTGTATCGAAAACTGGGTGTATATGAAGTTGAG GACCAGCTCACAGCTGTCAGAAAATTCATAGAAATGGG TTTCATTGATGAAGAAAGAATAGCCATATGGGGCTGGT CCTACGGAGGTTATGTTTCATCCCTGGCCCTTGCATCT GGAACTGGTCTTTTCAAATGTGGCATAGCAGTGGCTCC AGTCTCCAGCTGGGAATATTACGCATCTATCTACTCAG AGAGATTCATGGGCCTCCCAACAAAGGACGACAATCTC GAACACTATAAAAATTCAACTGTGATGGCAAGAGCAGA ATATTTCAGAAATGTAGACTATCTTCTCATCCACGGAA CAGCAGATGATAATGTGCACTTTCAGAACTCAGCACAG ATTGCTAAAGCTTTGGTTAATGCACAAGTGGATTTCCA GGCGATGTGGTACTCTGACCAGAACCATGGTATATTAT CTGGGCGCTCCCAGAATCATTTATATACCCACATGACG CACTTCCTCAAGCAATGCTTTTCTTTATCAGACGGCAA AAAGAAAAAGAAAAAGGGCCACCACCATCACCATCAC
59	カニクイザル FAP 外部ドメイン+ポリ-lys-タグ+his_6-タグ	RPPRVHNSEENTMRALTLKDILNGTFSYKTFFPNWISGQEY LHQSADNNIVLYNIETGQSYTILSNRTMKSVNASNYGLSPD RQFVYLESDYSKLWRYSYTATYYIYDLSNGEFVRGNELPRP IQYLCWSPVGSKLAYVYQNNIYLKQRPGDPPFQITFNGREN KIFNGIPDWVYEEEMLATKYALWWSPNGKFLAYAEFNDTDI PVIAYSYYGDEQYPRTINIPYPKAGAKNPFVRIFIIDTTYPAY VGPQEVPVPAMIASSDYYFSWLTWVTDERVCLQWLKRVQ NVSVLSICDFREDWQTWDCPKTQEHIEESRTGWAGGFFVS TPVFSYDAISYYKIFSDKDGYKHIHYIKDTVENAIQITSGKWE AINIFRVTQDSLFYSSNEFEDYPGRRNIYRISIGSYPPSKKCV TCHLRKERCQYYTASFSDYAKYYALVCYGPGIPISTLHDGR

配列番号:	名称	配列
		TDQEIKILEENKELENALKNIQLPKEEIKKLEVDEITLWYKMIL PPQFDRSKKYPLLIQVYGGPCSQSVRSVFAVNWISYLASK EGMVIALVDGRGTAFQGDKLLYAVYRKLGVYEVEDQITAV RKFIEMGFIDEKRIAIWGWSYGGYVSSLALASGTGLFKCGIA VAPVSSWEYYASVYTERFMGLPTKDDNLEHYKNSTVMAR AEYFRNVDYLLIHGTADDNVHFQNSAQIAKALVNAQVDFQ AMWYSDQNHGLSGLSTNHLYTHMTHFLKQCFSLSDGKKK KKKGHHHHHH
60	カニクイザル FAP 外部ドメイン+ポリ-lys-タグ+his_6-タグのヌクレオチド配列	CGCCCTCCAAGAGTTCATAACTCTGAAGAAAATACAAT GAGAGCACTCACACTGAAGGATATTTTAAATGGGACAT TTTCTTATAAAACATTTTTTCCAAACTGGATTTCAGGAC AAGAATATCTTCATCAATCTGCAGATAACAATATAGTAC TTTATAATATTGAAACAGGACAATCATATACCATTTTGA GTAACAGAACCATGAAAAGTGTGAATGCTTCAAATTAT GGCTTATCACCTGATCGGCAATTTGTATATCTAGAAAG TGATTATTCAAAGCTTTGGAGATACTCTTACACAGCAA CATATTACATCTATGACCTTAGCAATGGAGAATTTGTAA GAGGAAATGAGCTTCCTCGTCCAATTCAGTATTTATGC TGGTCGCCTGTTGGGAGTAAATTAGCATATGTCTATCA AAACAATATCTATTTGAAACAAAGACCAGGAGATCCAC CTTTTCAAATAACATTTAATGGAAGAGAAAATAAAATAT TTAATGGAATCCCAGACTGGGTTTATGAAGAGGAAATG CTTGCTACAAAATATGCTCTCTGGTGGTCTCCTAATGG AAAATTTTTGGCATATGCGGAATTTAATGATACAGATAT ACCAGTTATTGCCTATTCCTATTATGGCGATGAACAAT ATCCCAGAACAATAAATATTCCATACCCAAAGGCCGGA GCTAAGAATCCTTTTGTTCGGATATTTATTATCGATACC ACTTACCCTGCGTATGTAGGTCCCCAGGAAGTGCCTGT TCCAGCAATGATAGCCTCAAGTGATTATTATTTCAGTT GGCTCACGTGGGTTACTGATGAACGAGTATGTTTGCAG TGGCTAAAAAGAGTCCAGAATGTTTCGGTCTTGTCTAT ATGTGATTTCAGGGAAGACTGGCAGACATGGGATTGTC CAAAGACCCAGGAGCATATAGAAGAAAGCAGAACTGGA TGGGCTGGTGGATTCTTTGTTTCAACACCAGTTTTCAG CTATGATGCCATTTCATACTACAAAATATTTAGTGACAA GGATGGCTACAAACATATTCACTATATCAAAGACACTG TGGAAAATGCTATTCAAATTACAAGTGGCAAGTGGGAG GCCATAAATATATTCAGAGTAACACAGGATTCACTGTT TTATTCTAGCAATGAATTTGAAGATTACCCTGGAAGAA GAAACATCTACAGAATTAGCATTGGAAGCTATCCTCCA AGCAAGAAGTGTGTTACTTGCCATCTAAGGAAAGAAAG GTGCCAATATTACACAGCAAGTTTCAGCGACTACGCCA AGTACTATGCACTTGTCTGCTATGGCCCAGGCATCCCC ATTTCCACCCTTCATGACGGACGCACTGATCAAGAAAT TAAAATCCTGGAAGAAAACAAGGAATTGGAAAATGCTT TGAAAAATATCCAGCTGCCTAAAGAGGAAATTAAGAAA CTTGAAGTAGATGAAATTACTTTATGGTACAAGATGATT CTTCCTCCTCAATTTGACAGATCAAAGAAGTATCCCTT GCTAATTCAAGTGTATGGTGGTCCCTGCAGTCAGAGTG TAAGGTCTGTATTTGCTGTTAATTGGATATCTTATCTTG CAAGTAAGGAAGGGATGGTCATTGCCTTGGTGGATGGT

配列番号:	名称	配列
		CGGGGAACAGCTTTCCAAGGTGACAAACTCCTGTATGC AGTGTATCGAAAGCTGGGTGTTTATGAAGTTGAAGACC AGATTACAGCTGTCAGAAAATTCATAGAAATGGGTTTC ATTGATGAAAAAAGAATAGCCATATGGGGCTGGTCCTA TGGAGGATATGTTTCATCACTGGCCCTTGCATCTGGAA CTGGTCTTTTCAAATGTGGGATAGCAGTGGCTCCAGTC TCCAGCTGGGAATATTACGCGTCTGTCTACACAGAGAG ATTCATGGGTCTCCCAACAAAGGATGATAATCTTGAGC ACTATAAGAATTCAACTGTGATGGCAAGAGCAGAATAT TTCAGAAATGTAGACTATCTTCTCATCCACGGAACAGC AGATGATAATGTGCACTTTCAAAACTCAGCACAGATTG CTAAAGCTCTGGTTAATGCACAAGTGGATTTCCAGGCA ATGTGGTACTCTGACCAGAACCACGGCTTATCCGGCCT GTCCACGAACCACTTATACACCCACATGACCCACTTCC TAAAGCAGTGTTTCTCTTTGTCAGACGGCAAAAAGAAA AAGAAAAAGGGCCACCACCATCACCATCAC
61	ヒト CEA	UniProt 番号 P06731
62	ヒト MCSP	UniProt 番号 Q6UVK1
63	ヒト EGFR	UniProt 番号 P00533
64	ヒト CD19	UniProt 番号 P15391
65	ヒト CD20	UniProt 番号 P11836
66	ヒト CD33	UniProt 番号 P20138
67	ヒト リンホトキシン α	UniProt 番号 P01374
68	ヒト TNF	UniProt 番号 P01375
69	ヒト リンホトキシン β	UniProt 番号 Q06643
70	ヒト OX40L	UniProt 番号 P23510
71	ヒト CD40L	UniProt 番号 P29965
72	ヒト FasL	UniProt 番号 P48023
73	ヒト CD27L	UniProt 番号 P32970
74	ヒト CD30L	UniProt 番号 P32971
75	ヒト 4-1BBL	UniProt 番号 P41273
76	ヒト TRAIL	UniProt 番号 P50591
77	ヒト RANKL	UniProt 番号 O14788
78	ヒト TWEAK	UniProt 番号 O43508
79	ヒト APRIL	UniProt 番号 O75888
80	ヒト BAFF	UniProt 番号 Q9Y275
81	ヒト LIGHT	UniProt 番号 O43557
82	ヒト TL1A	UniProt 番号 O95150
83	ヒト GITRL	UniProt 番号 Q9UNG2
84	ヒトエクトジスプラシン A	UniProt 番号 Q92838
85	hu 4-1BBL (50-254)	ACPWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLR QGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKE DTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQ PLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSA GQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL PSPRSE
86	ペプチドリンカー G4S	GGGGS
87	ペプチドリンカー $(G4S)_2$	GGGGSGGGGS
88	ペプチドリンカー $(SG4)_2$	SGGGGSGGGG
89	ペプチドリンカー $(G_4S)_3$	GGGGSGGGGSGGGGS

配列番号:	名称	配列
90	ペプチドリンカー G4(SG4)$_2$	GGGGSGGGGSGGGG
91	ペプチドリンカー (G_4S)$_4$	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
92	ペプチドリンカー	GSPGSSSSGS
93	ペプチドリンカー	GSGSGSGS
94	ペプチドリンカー	GSGSGNGS
95	ペプチドリンカー	GGSGSGSG
96	ペプチドリンカー	GGSGSG
97	ペプチドリンカー	GGSG
98	ペプチドリンカー	GGSGNGSG
99	ペプチドリンカー	GGNGSGSG
100	ペプチドリンカー	GGNGSG
101	Fc ホール二量体 4-1BBL (71-248) 鎖のヌクレオチド配列	表1参照
102	抗 FAP(4B9) Fc ノブ単量体 4-1BBL (71-248) のヌクレオチド配列	表1参照
103	抗 FAP(4B9) 軽鎖のヌクレオチド配列	表1参照
104	Fc ホール二量体 4-1BB (71-248) リガンド鎖	表1参照
105	抗 FAP(4B9) Fc ノブ単量体 41-BBL (71-248)	表1参照
106	抗 FAP(4B9)軽鎖	表1参照
107	Fc ホール単量体 4-1BBL (71-248) 鎖のヌクレオチド配列	表2参照
108	抗 FAP(4B9) Fc ノブ二量体 4-1BBL (71-248) のヌクレオチド配列	表2参照
109	Fc ホール単量体 4-1BB リガンド (71-248) 鎖	表2参照
110	抗 FAP(4B9) Fc ノブ二量体 4-1BBL (71-248)	表2参照
111	抗 FAP(28H1) Fc ノブ単量体 4-1BBL (71-248) のヌクレオチド配列	表3参照
112	抗 FAP(28H1) 軽鎖のヌクレオチド配列	表3参照
113	抗 FAP(28H1) Fc ノブ単量体 4-1BBL (71-248)	表3参照
114	抗 FAP(28H1) 軽鎖	表3参照
115	抗 FAP(28H1) Fc ノブ二量体 4-1BBL (71-248) のヌクレオチド配列	表4参照
116	抗 FAP(28H1) Fc ノブ二量体 4-1BBL (71-248)	表4参照
117	抗 CD19(8B8-018) Fc ノブ単量体 4-1BBL (71-248) のヌクレオチド配列	表5参照

配列番号:	名称	配列
118	抗 CD19(8B8-018) 軽鎖のヌクレオチド配列	表5参照
119	抗 CD19(8B8-018) Fc ノブ単量体 4-1-BBL (71-248)	表5参照
120	抗 CD19(8B8-018) 軽鎖	表5参照
121	抗 CD19(8B8-018) Fc ノブ二量体 4-1BBL (71-248) のヌクレオチド配列	表6参照
122	抗 CD19(8B8-018) Fc ノブ二量体 4-1BB (71-248)	表6参照
123	抗 CD19(8B8-2B11) Fc ノブ単量体 4-1BBL (71-248) のヌクレオチド配列	表7参照
124	抗 CD19(8B8-2B11) 軽鎖のヌクレオチド配列	表7参照
125	抗 CD19(8B8-2B11) Fc ノブ単量体 4-1BBL (71-248)	表7参照
126	抗 CD19(8B8-2B11) 軽鎖	表7参照
127	抗 CD19(8B8-2B11) Fc ノブ二量体 4-1BBL (71-248) のヌクレオチド配列	表8参照
128	抗 CD19(8B8-2B11) Fc ノブ二量体 4-1BB リガンド (71-248)	表8参照
129	抗 CD19 8B8 の HVR-L1	NSNGNT
130	抗 CD19 8B8 の HVR-L2	KFNG
131	HYRF 変異を含む Fc ホール鎖のヌクレオチド配列	表11参照
132	ヒト CD19 抗原 Fc ノブ鎖 avi タグのヌクレオチド配列	表11参照
133	HYRF 変異を含む Fc ホール鎖	表11参照
134	ヒト CD19 抗原 Fc ノブ 鎖 avi タグ	表11参照
135	カニクイザル CD19 抗原 Fc ノブ鎖 avi タグのヌクレオチド配列	表11参照
136	カニクイザル CD19 抗原 Fc ノブ鎖 avi タグ	表11参照
137	ヌクレオチド配列 CD19 (8B8) VH 親クローン	CAAGTTCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAA ACCGGGGCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCTG GTTACACCTTCACTGACTATATCATGCACTGGGTTCGT CAGGCCCCGGGCCAGGGTCTGGAGTGGATGGGCTACA TTAACCCATACAACGACGGTTCCAAATATACCGAGAAA TTCCAGGGCCGCGTCACGATGACCAGCGACACTTCTAT CTCCACCGCGTACATGGAACTGTCTAGACTGCGTTCTG ACGACACCGCTGTTTACTATTGTGCACGCGGTACTTAC TACTACGGTTCCGCCCTCTTTGATTACTGGGGCCAAGG TACCACGGTGACCGTAAGCTCT
138	ヌクレオチド配列 CD19 (8B8) VL 親クローン	GATATTGTTATGACTCAAACTCCACTGTCTCTGTCCGT GACCCCGGGTCAGCCAGCGAGCATTTCTTGCAAATCCA

配列番号:	名称	配列
		GCCAATCTCTGGAAAACTCCAACGGCAACACGTACCTG AACTGGTATCTCCAGAAACCGGGTCAGAGCCCGCAGC TGCTGATCTACCGTGTATCTAAGCGCTTCTCCGGCGTT CCTGATCGTTTCAGCGGTTCTGGATCCGGCACCGACTT TACTCTGAAAATCAGCCGTGTGGAAGCTGAAGACGTTG GCGTCTACTATTGTCTGCAGTTGACCCACGTTCCGTAC ACCTTCGGTCAAGGAACTAAACTGGAAATTAAA
139	CD19 L1 リバースランダム	表13参照
140	CD19 L2 フォワードランダム	表13参照
141	CD19 H1 リバースランダム	表13参照
142	CD19 H2 フォワードランダム	表13参照
143	CD19 H3 リバースコンスタント	表13参照
144	LMB3	表13参照
145	CD19 L1 フォワードコンスタント	表14参照
146	CD19 L3 リバースランダム	表14参照
147	CD19 L3 フォワードコンスタント	表14参照
148	CD19 H3 リバースランダム	表14参照
149	ヌクレオチド配列 SNAP タグ ヒト CD19 ECD- PDGFR	GGCCGCCGCTAGCGGCATCGACTACAAGGACGACGAT GACAAGGCCGGCATCGATGCCATCATGGACAAAGACT GCGAAATGAAGCGCACCACCCTGGATAGCCCTCTGGG CAAGCTGGAACTGTCTGGGTGCGAACAGGGCCTGCAC GAGATCAAGCTGCTGGGCAAAGGAACATCTGCCGCCG ACGCCGTGGAAGTGCCTGCCCCAGCCGCCGTGCTGGG CGGACCAGAGCCACTGATGCAGGCCACCGCCTGGCTC AACGCCTACTTTCACCAGCCTGAGGCCATCGAGGAGTT CCCTGTGCCAGCCCTGCACCACCCAGTGTTCCAGCAG GAGAGCTTTACCCGCCAGGTGCTGTGGAAACTGCTGAA AGTGGTGAAGTTCGGAGAGGTCATCAGCTACCAGCAGC TGGCCGCCCTGGCCGGCAATCCCGCCGCCACCGCCGC CGTGAAAACCGCCCTGAGCGGAAATCCCGTGCCCATT CTGATCCCCTGCCACCGGGTGGTGTCTAGCTCTGGCG CCGTGGGGGGCTACGAGGGCGGGCTCGCCGTGAAAGA GTGGCTGCTGGCCCACGAGGGCCACAGACTGGGCAAG CCTGGGCTGGGTGATATCCCCGAGGAACCCCTGGTCG TGAAGGTGGAAGAGGGCGACAATGCCGTGCTGCAGTG CCTGAAGGGCACCTCCGATGGCCCTACCCAGCAGCTG ACCTGGTCCAGAGAGAGCCCCCTGAAGCCCTTCCTGA AGCTGTCTCTGGGCCTGCCTGGCCTGGGCATCCATATG AGGCCTCTGGCCATCTGGCTGTTCATCTTCAACGTGTC CCAGCAGATGGGCGGCTTCTACCTGTGTCAGCCTGGC CCCCCATCTGAGAAGGCTTGGCAGCCTGGCTGGACCG TGAACGTGGAAGGATCCGGCGAGCTGTTCCGGTGGAA CGTGTCCGATCTGGGCGGCCTGGGATGCGGCCTGAAG AACAGATCTAGCGAGGGCCCCAGCAGCCCCAGCGGCA AACTGATGAGCCCCAAGCTGTACGTGTGGGCCAAGGA CAGACCCGAGATCTGGGAGGGCGAGCCTCCTTGCCTG

配列番号:	名称	配列
		CCCCCTAGAGACAGCCTGAACCAGAGCCTGAGCCAGG ACCTGACAATGGCCCCTGGCAGCACACTGTGGCTGAG CTGTGGCGTGCCACCCGACTCTGTGTCTAGAGGCCCTC TGAGCTGGACCCACGTGCACCCTAAGGGCCCTAAGAG CCTGCTGAGCCTGGAACTGAAGGACGACAGGCCCGCC AGAGATATGTGGGTCATGGAAACCGGCCTGCTGCTGCC TAGAGCCACAGCCCAGGATGCCGGCAAGTACTACTGC CACAGAGGCAACCTGACCATGAGCTTCCACCTGGAAAT CACCGCCAGACCCGTGCTGTGGCACTGGCTGCTGAGA ACAGGCGGCTGGAAGGTCGACGAACAAAAACTCATCTC AGAAGAGGATCTGAATGCTGTGGGCCAGGACACGCAG GAGGTCATCGTGGTGCCACACTCCTTGCCCTTTAAGGT GGTGGTGATCTCAGCCATCCTGGCCCTGGTGGTGCTCA CCATCATCTCCCTTATCATCCTCATCATGCTTTGGCAG AAGAAGCCACGT
150	ヌクレオチド配列 SNAP タグカニクイザル CD19 ECD- PDGFR	CCGGCCGCCGCTAGCGGCATCGACTACAAGGACGACG ATGACAAGGCCGGCATCGATGCCATCATGGACAAAGAC TGCGAAATGAAGCGCACCACCCTGGATAGCCCTCTGG GCAAGCTGGAACTGTCTGGGTGCGAACAGGGCCTGCA CGAGATCAAGCTGCTGGGCAAAGGAACATCTGCCGCC GACGCCGTGGAAGTGCCTGCCCCAGCCGCCGTGCTGG GCGGACCAGAGCCACTGATGCAGGCCACCGCCTGGCT CAACGCCTACTTTCACCAGCCTGAGGCCATCGAGGAGT TCCCTGTGCCAGCCCTGCACCACCCAGTGTTCCAGCA GGAGAGCTTTACCCGCCAGGTGCTGTGGAAACTGCTGA AAGTGGTGAAGTTCGGAGAGGTCATCAGCTACCAGCAG CTGGCCGCCCTGGCCGGCAATCCCGCCGCCACCGCCG CCGTGAAAACCGCCCTGAGCGGAAATCCCGTGCCCAT TCTGATCCCCTGCCACCGGGTGGTGTCTAGCTCTGGCG CCGTGGGGGGCTACGAGGGCGGGCTCGCCGTGAAAGA GTGGCTGCTGGCCCACGAGGGCCACAGACTGGGCAAG CCTGGGCTGGGTGATATCCCCCAGGAACCCCTGGTCG TGAAGGTGGAAGAGGGCGACAATGCCGTGCTCCAGTG TCTCGAGGGCACCTCCGATGGCCCTACACAGCAGCTC GTGTGGTGCAGAGACAGCCCCTTCGAGCCCTTCCTGAA CCTGTCTCTGGGCCTGCCTGGCATGGGCATCAGAATGG GCCCTCTGGGCATCTGGCTGCTGATCTTCAACGTGTCC AACCAGACCGGCGGCTTCTACCTGTGTCAGCCTGGCCT GCCAAGCGAGAAGGCTTGGCAGCCTGGATGGACCGTG TCCGTGGAAGGATCTGGCGAGCTGTTCCGGTGGAACGT GTCCGATCTGGGCGGCCTGGGATGCGGCCTGAAGAAC AGAAGCAGCGAGGGCCCTAGCAGCCCCAGCGGCAAGC TGAATAGCAGCCAGCTGTACGTGTGGGCCAAGGACAG ACCCGAGATGTGGGAGGGCGAGCCTGTGTGTGGCCCC CCTAGAGATAGCCTGAACCAGAGCCTGAGCCAGGACC TGACAATGGCCCCTGGCAGCACACTGTGGCTGAGCTGT GGCGTGCCACCCGACTCTGTGTCCAGAGGCCCTCTGA GCTGGACACACGTGCGGCCTAAGGGCCCTAAGAGCAG CCTGCTGAGCCTGGAACTGAAGGACGACCGGCCCGAC CGGGATATGTGGGTGGTGGATACAGGCCTGCTGCTGA CCAGAGCCACAGCCCAGGATGCCGGCAAGTACTACTG

配列番号:	名称	配列
		CCACAGAGGCAACTGGACCAAGAGCTTTTACCTGGAAA TCACCGCCAGACCCGCCCTGTGGCACTGGCTGCTGAG AATCGGAGGCTGGAAGGTCGACGAGCAGAAGCTGATC TCCGAAGAGGACCTGAACGCCGTGGGCCAGGATACCC AGGAAGTGATCGTGGTGCCCCACAGCCTGCCCTTCAA GGTGGTCGTGATCAGCGCCATTCTGGCCCTGGTGGTG CTGACCATCATCAGCCTGATCATCCTGATTATGCTGTG GCAGAAAAAGCCCCGC
151	ポリペプチド配列 SNAP タグヒト CD19 ECD- PDGFR	PAAASGIDYKDDDDKAGIDAIMDKDCEMKRTTLDSPLGKLE LSGCEQGLHEIKLLGKGTSAADAVEVPAPAAVLGGPEPLM QATAWLNAYFHQPEAIEEFPVPALHHPVFQQESFTRQVLW KLLKVVKFGEVISYQQLAALAGNPAATAAVKTALSGNPVPI LIPCHRVVSSSGAVGGYEGGLAVKEWLLAHEGHRLGKPGL GDIPEEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTSDGPTQQLTWSRES PLKPFLKLSLGLPGLGIHMRPLAIWLFIFNVSQQMGGFYLC QPGPPSEKAWQPGWTVNVEGSGELFRWNVSDLGGLGCG LKNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVWAKDRPEIWEGEPPCLP PRDSLNQSLSQDLTMAPGSTLWLSCGVPPDSVSRGPLSW THVHPKGPKSLLSLELKDDRPARDMWVMETGLLLPRATA QDAGKYYCHRGNLTMSFHLEITARPVLWHWLLRTGGWKV DEQKLISEEDLNAVGQDTQEVIVVPHSLPFKVVVISAILALV VLTIISLIILIMLWQKKPR
152	ポリペプチド配列 SNAP タグカニクイザル CD19 ECD- PDGFR	PAAASGIDYKDDDDKAGIDAIMDKDCEMKRTTLDSPLGKLE LSGCEQGLHEIKLLGKGTSAADAVEVPAPAAVLGGPEPLM QATAWLNAYFHQPEAIEEFPVPALHHPVFQQESFTRQVLW KLLKVVKFGEVISYQQLAALAGNPAATAAVKTALSGNPVPI LIPCHRVVSSSGAVGGYEGGLAVKEWLLAHEGHRLGKPGL GDIPQEPLVVKVEEGDNAVLQCLEGTSDGPTQQLVWCRD SPFEPFLNLSLGLPGMGIRMGPLGIWLLIFNVSNQTGGFYL CQPGLPSEKAWQPGWTVSVEGSGELFRWNVSDLGGLGC GLKNRSSEGPSSPSGKLNSSQLYVWAKDRPEMWEGEPVC GPPRDSLNQSLSQDLTMAPGSTLWLSCGVPPDSVSRGPL SWTHVRPKGPKSSLLSLELKDDRPDRDMWVVDTGLLLTR ATAQDAGKYYCHRGNWTKSFYLEITARPALWHWLLRIGGW KVDEQKLISEEDLNAVGQDTQEVIVVPHSLPFKVVVISAILA LVVLTIISLIILIMLWQKKPR
153	抗 CEA(T84.66-LCHA) Fc ノブ単量体 4-1BBL (71-248)のヌクレオチド配列	表17 参照
154	抗 CEA(T84.66-LCHA)軽鎖のヌクレオチド配列	表17 参照
155	抗 CEA(T84.66-LCHA) Fc ノブ単量体 4-1BBL (71-248)	表17 参照
156	抗 CEA(T84.66-LCHA) 軽鎖	表17 参照
157	抗 CEA(T84.66-LCHA) Fc ノブ二量体 4-1BBL (71-248)のヌクレオチド配列	表18 参照
158	抗 CEA(T84.66-LCHA) Fc ノブ二量体 4-1BBL (71-248)	表18 参照
159	抗 mu CEA T84.66	MKCSWVIFFL MAVVTGVNSE VQLQQSGAEL

配列番号:	名称	配列
	VH	VEPGASVKLS CTASGFNIKD TYMHWVKQRP EQGLEWIGRI DPANGNSKYV PKFQGKATIT ADTSSNTAYL QLTSLTSEDT AVYYCAPFGY YVSDYAMAYW GQGTSVTVSS
160	抗 mu CEA T84.66 VL	METDTLLLWV LLLWVPGSTG DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT MSCRAGESVD IFGVGFLHWY QQKPGQPPKL LIYRASNLES GIPVRFSGTG SRTDFTLIID PVEADDVATY YCQQTNEDPY TFGGGTKLEI K
161	IGHV1-69*08 IMGT 受託番号 Z14309	TAAGGGGCTT CCTAGTCCTA AGGCTGAGGA AGGGATCCTG GTTTAGTTAA AGAGGATTTT ATTCACCCCT GTGTCCTCTC CACAGGTGTC CAGTCCCAGG TCCAGCTGGT GCAATCTGGG GCTGAGGTGA AGAAGCCTGG GTCCTCGGTG AAGGTCTCCT GCAAGGCTTC TGGAGGCACC TTCAGCAGCT ATACTATCAG CTGGGTGCGA CAGGCCCCTG GACAAGGGCT TGAGTGGATG GGAAGGATCA TCCCTATCCT TGGTACAGCA AACTACGCAC AGAAGTTCCA GGGCAGAGTC ACGATTACCG CGGACAAATC CACGAGCACA GCCTACATGG AGCTGAGCAG CCTGAGATCT GAGGACACGG CCGTGTATTA CTGTGCGAGA GA
162	IGKV3-11*01 IMGT 受託番号	CTGCAGCTGG AAGCTCAGCT CCCACCCAGC TGCTTTGCAT GTCCCTCCCA GCTGCCCTAC CTTCCAGAGC CCATATCAAT GCCTGTGTCA GAGCCCTGGG GAGGAACTGC TCAGTTAGGA CCCAGAGGGA ACCATGGAAG CCCCAGCTCA GCTTCTCTTC CTCCTGCTAC TCTGGCTCCC AGGTGAGGGG AACATGAGGT GGTTTTGCAC ATTAGTGAAA ACTCTTGCCA CCTCTGCTCA GCAAGAAATA TAATTAAAAT TCAAAGTATA TCAACAATTT TGGCTCTACT CAAAGACAGT TGGTTTGATC TTGATTACAT GAGTGCATTT CTGTTTTATT TCCAATTTCA GATACCACCG GAGAAATTGT GTTGACACAG TCTCCAGCCA CCCTGTCTTT GTCTCCAGGG GAAAGAGCCA CCCTCTCCTG CAGGGCCAGT CAGAGTGTTA GCAGCTACTT AGCCTGGTAC CAACAGAAAC CTGGCCAGGC TCCCAGGCTC CTCATCTATG ATGCATCCAA CAGGGCCACT GGCATCCCAG CCAGGTTCAG TGGCAGTGGG TCTGGGACAG ACTTCACTCT CACCATCAGC AGCCTAGAGC CTGAAGATTT TGCAGTTTAT TACTGTCAGC AGCGTAGCAA CTGGCCTCCC ACAGTGATTC CACATGAAAC AAAAACCCCA ACAAGACCAT CAGTGTTTAC TAGATTATTA TACCAGCTGC TTCCTTTACA GACAGCTAGT GGGGTGGCCA CTCAGTGTTA GCATCTCAGC TCTATTTGGC CATTTTGGAG TTCAAGT
163	親 CEA バインダーVH	表20参照

配列番号:	名称	配列
164	親 CEA バインダーVL	表20参照
165	DP47 Fc ノブ単量体 4-1BBL (71-248)のヌクレオチド配列	表21参照
166	DP47 軽鎖のヌクレオチド配列	表21参照
167	DP47 Fc ノブ単量体 4-1BBL (71-248)	表21参照
168	DP47 軽鎖	表21参照
169	DP47 Fc ノブ二量体 4-1BBL (71-248)のヌクレオチド配列	表22参照
170	DP47 Fc ノブ二量体 4-1BBL (71-248)	表22参照
171	抗 FAP(4B9) Fc ホール二量体 4-1BB リガンド (71-248) のヌクレオチド配列のヌクレオチド配列	表23参照
172	Fc ノブ単量体 4-1BBL (71-248) のヌクレオチド配列のヌクレオチド配列	表23参照
173	抗 FAP(4B9) Fc ホール二量体 4-1BB リガンド (71-248)	表23参照
174	Fc ノブ単量体 4-1BBL (71-248)	表23参照
175	抗 FAP(4B9) Fc ホール単量体 4-1BBL (71-248) のヌクレオチド配列のヌクレオチド配列	表24参照
176	Fc ノブ二量体 4-1BB リガンド (71-248) のヌクレオチド配列のヌクレオチド配列	表24参照
177	抗 FAP(4B9) Fc ホール単量体 4-1BBL (71-248)	表24参照
178	Fc ノブ二量体 4-1BB リガンド (71-248)	表24参照
179	抗 FAP(28H1) Fc ホール二量体 4-1BB リガンド (71-248) のヌクレオチド配列のヌクレオチド配列	表25参照
180	抗 FAP(28H1) Fc ホール二量体 4-1BB リガンド (71-248)	表25参照
181	抗 FAP(28H1) Fc ホール単量体 4-1BBL (71-248) のヌクレオチド配列のヌクレオチド配列	表26参照
182	抗 FAP(28H1) Fc ホール単量体 4-1BBL (71-248)	表26参照
183	抗 CD19(8B8-018) Fc ホール二量体 4-1BB リガンド (71-248) 鎖のヌクレオチド配列	表27参照
184	抗 CD19(8B8-018) Fc ホール二量体 4-1BB (71-248) リガンド鎖	表27参照
185	抗 CD19(8B8-018) Fc ホール単量体 4-1BBL (71-248) 鎖のヌクレオチド配列	表28参照

配列番号:	名称	配列
186	抗 CD19(8B8-018) Fc ホール単量体 4-1BBL (71-248) 鎖	表28参照
187	抗 CD19(8B8-2B11) Fc ホール二量体 4-1BB リガンド (71-248) 鎖のヌクレオチド配列	表29参照
188	抗 CD19(8B8-2B11) Fc ホール二量体 4-1BB リガンド (71-248) 鎖	表29参照
189	抗 CD19(8B8-2B11) Fc ホール単量体 4-1BB リガンド (71-248) 鎖のヌクレオチド配列	表30参照
190	抗 CD19(8B8-2B11) Fc ホール単量体 4-1BB リガンド (71-248) 鎖	表30参照
191	抗 CEA(T84.66-LCHA) Fc ホール二量体 4-1BB リガンド (71-248) 鎖のヌクレオチド配列	表31参照
192	抗 CEA(T84.66-LCHA) Fc ホール二量体 4-1BB リガンド (71-248) 鎖	表31参照
193	抗 CEA(T84.66-LCHA) Fc ホール単量体 4-1BBL (71-248) 鎖のヌクレオチド配列	表32参照
194	抗 CEA(T84.66-LCHA) Fc ホール単量体 4-1BBL (71-248) 鎖	表32参照
195	DP47 Fc ホール二量体 4-1BB リガンド (71-248) 鎖のヌクレオチド配列	表33参照
196	DP47 Fc ホール二量体 4-1BB リガンド (71-248) 鎖	表33参照
197	DP47 Fc ホール単量体 4-1BBL (71-248) 鎖のヌクレオチド配列	表34参照
198	DP47 Fc ホール単量体 4-1BBL (71-248) 鎖	表34参照
199	二量体 4-1BB リガンド (71-248) - CL* Fc ノブ 鎖のヌクレオチド配列	表35参照
200	単量体 4-1BBL (71-248) -CH1* のヌクレオチド配列	表35参照
201	DP47 Fc ホール鎖のヌクレオチド配列	表35参照
202	二量体 4-1BB リガンド (71-248) - CL* Fc ノブ鎖	表35参照
203	単量体 4-1BBL (71-248) -CH1*	表35参照
204	DP47 Fc ホール鎖	表35参照
205	DP47 重鎖 (huIgG1 PGLALA)のヌクレオチド配列	表38参照
206	DP47 重鎖 (huIgG1 PGLALA)	表38参照

配列番号:	名称	配列
207	ヒト 4-1BB His のヌクレオチド配列	表40参照
208	ヒト 4-1BB His	表40参照
209	FAP(4B9) Fc ホール二量体 4-1BB リガンド (71-254)鎖のヌクレオチド配列	表44参照
210	DP47 Fc ノブ単量体 4-1BB (71-254) リガンドのヌクレオチド配列	表44参照
211	DP47 (VL-CH1) 軽鎖のヌクレオチド配列	表44参照
212	抗 FAP(4B9) Fc ホール二量体 4-1BB リガンド (71-254) 鎖	表44参照
213	DP47 Fc ノブ単量体 4-1BB (71-254) リガンド	表44参照
214	DP47 (VL-CH1) 軽鎖	表44参照
215	抗 FAP(4B9) Fc ホール単量体 4-1BBL (71-254) 鎖のヌクレオチド配列	表45参照
216	DP47 (VH-CL) Fc ノブ二量体 4-1BB リガンド (71-254) 鎖のヌクレオチド配列	表45参照
217	抗 FAP(4B9) Fc ホール単量体 4-1BBL (71-254) 鎖	表45参照
218	DP47 (VH-CL) Fc ノブ二量体 4-1BB リガンド (71-254) 鎖	表45参照
219	DP47(VH-CL) Fc ホール二量体 4-1BB リガンド (71-254)鎖のヌクレオチド配列	表45参照
220	FAP (4B9) Fc ノブ単量体 4-1BB (71-254)リガンドのヌクレオチド配列	表46参照
221	DP47(VH-CL) Fc ホール二量体 4-1BB リガンド (71-254)鎖	表46参照
222	FAP (4B9) Fc ノブ単量体 4-1BB (71-254) リガンド	表46参照
223	DP47 (VH-CL) Fc ホール単量体 4-1BBL (71-254) 鎖のヌクレオチド配列	表47参照
224	FAP (4B9) Fc ノブ二量体 4-1BB リガンド (71-254) 鎖のヌクレオチド配列	表47参照
225	DP47 (VH-CL) Fc ホール単量体 4-1BBL (71-254)鎖	表47参照
226	FAP (4B9) Fc ノブ二量体 4-1BB リガンド (71-254)鎖	表47参照
227	DP47 (VHCL) Fc ノブ単量体 4-1BB (71-248) リガンドのヌクレオチド配列	表48参照
228	DP47 (VH-CL) Fc ノブ単量体 4-	表48参照

配列番号:	名称	配列
	1BB (71-248) リガンド	
229	DP47 (VH-CL) Fc ノブ二量体 4-1BB リガンド (71-248)鎖のヌクレオチド配列	表49参照
230	DP47 (VH-CL) Fc ノブ二量体 4-1BB リガンド (71-248)鎖	表49参照
231	DP47(VH-CL) Fc ホール二量体 4-1BB リガンド (71-248)鎖のヌクレオチド配列	表50参照
232	DP47(VH-CL) Fc ホール二量体 4-1BB リガンド (71-248)鎖	表50参照
233	DP47 (VH-CL) Fc ホール単量体 4-1BBL (71-248)鎖のヌクレオチド配列	表51参照
234	DP47 (VH-CL) Fc ホール単量体 4-1BBL (71-248)鎖	表51参照
235	抗 FAP (4B9) Fc ホール 鎖のヌクレオチド配列	表36参照
236	抗 FAP (4B9) Fc ホール鎖	表36参照
237	抗 CD19(8B8-018) Fc ホール鎖のヌクレオチド配列	表37a参照
238	抗 CD19(8B8-018) Fc ホール鎖	表37a参照
239	二量体 hu 4-1BBL (71-254) - CL* Fc ノブ鎖のヌクレオチド配列	表37b参照
240	単量体 hu 4-1BBL (71-254) - CH1*のヌクレオチド配列	表37b参照
241	抗 CD19(8B8-2B11) Fc ホール鎖のヌクレオチド配列	表37b参照
242	二量体 hu 4-1BBL (71-254) - CL* Fc ノブ 鎖	表37b参照
243	単量体 hu 4-1BBL (71-254) - CH1*	表37b参照
244	CD19(8B8-2B11) Fc ホール鎖	表37b参照
245	avi タグ	GLNDIFEAQKIEWHE

【０３３７】

ヒト免疫グロブリン軽鎖及び重鎖のヌクレオチド配列に関する一般的な情報は、Kabat, E.A.等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)に与えられている。抗体鎖のアミノ酸は、上述のＫａｂａｔ（Kabat, E.A.等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)）に従うＥＵ番号付けシステムに従って番号が付けられ、言及される。

【０３３８】

次の番号が付されたパラグラフ（パラ）は、本発明の態様を記載する：

１．　ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子であって、

（ａ）標的細胞抗原に特異的に結合することができるＦａｂドメイン、

（ｂ）安定な会合が可能な第一及び第二サブユニットからなるＦｃドメイン、及び
（ｃ）ペプチドリンカーによって互いに連結されたＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドと、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドであって、Ｆｃドメインのサブユニットの一つのＣ末端にそのＮ末端で融合された第一ポリペプチドと、Ｆｃドメインの他のサブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合された第二ポリペプチドを含む、ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。
２．　ＴＮＦリガンドファミリーメンバーがヒトＴ細胞活性化を共刺激する、パラ１に記載のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。
３．　ＴＮＦリガンドファミリーメンバーが、４－１ＢＢＬ及びＯＸ４０Ｌから選択される、パラ１又は２に記載のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。
４．　ＴＮＦリガンドファミリーメンバーが４－１ＢＢＬである、パラ１から３の何れか一に記載のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。
５．　ＴＮＦリガンドファミリーメンバーのエクトドメインが、配列番号：１、配列番号：２、配列番号：３、配列番号：４、配列番号：５、配列番号：６、配列番号：７及び配列番号：８からなる群から選択されるアミノ酸配列、特に配列番号：１又は配列番号：５のアミノ酸配列を含む、パラ１から４の何れか一に記載のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。
６．　ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドが配列番号：９及び配列番号：１０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドが配列番号：１及び配列番号：５からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、パラ１から５の何れか一に記載のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。
７．　ＴＮＦリガンドファミリーメンバーがＯＸ４０Ｌである、パラ１から３の何れか一に記載のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。
８．　ＴＮＦリガンドファミリーメンバーのエクトドメインが、配列番号：１１及び配列番号：１２からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、パラ１から３又は７の何れか一に記載のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。
９．　ＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子が標的細胞抗原への結合に対して一価である、パラ１から８の何れか一に記載のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。
１０．　標的細胞抗原が、線維芽細胞活性化タンパク質（ＦＡＰ）、メラノーマ関連コンドロイチン硫酸プロテオグリカン（ＭＣＳＰ）、上皮増殖因子受容体（ＥＧＦＲ）、がん胎児抗原（ＣＥＡ）、ＣＤ１９、ＣＤ２０及びＣＤ３３からなる群から選択される、パラ１から９の何れか一に記載のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。
１１．　標的細胞抗原が線維芽細胞活性化タンパク質（ＦＡＰ）である、パラ１から１０の何れか一に記載のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。
１２．　ＦＡＰに特異的に結合することができるＦａｂドメインが、
（ａ）（ｉ）配列番号：１３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号：１４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２及び（ｉｉｉ）配列番号：１５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含むＶＨドメインと、（ｉｖ）配列番号：１６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｖ）配列番号：１７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、及び（ｖｉ）配列番号：１８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含むＶＬドメイン、又は
（ｂ）（ｉ）配列番号：１９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号：２０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号：２１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含むＶＨドメインと、（ｉｖ）配列番号：２２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｖ）配列番号：２３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、及び（ｖｉ）配列番号：２４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含むＶＬドメイン
を含む、パラ１から１１の何れか一に記載のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結

合分子。
１３．　ＦＡＰに特異的に結合することができるＦａｂドメインが、配列番号：２５のアミノ酸配列を含む可変重鎖と、配列番号：２６のアミノ酸配列を含む可変軽鎖を含むか、又はＦＡＰに特異的に結合することができるＦａｂドメインが、配列番号：２７のアミノ酸配列を含む可変重鎖と、配列番号：２８のアミノ酸配列を含む可変軽鎖を含む、パラ１から１２の何れか一に記載のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。
１４．　標的細胞抗原がＣＤ１９である、パラ１から１０の何れか一に記載のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。
１５．　ＣＤ１９に特異的に結合することができるＦａｂドメインが、
（ａ）（ｉ）配列番号：２９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号：３０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号：３１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含むＶＨドメインと、（ｉｖ）配列番号：３２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｖ）配列番号：３３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、及び（ｖｉ）配列番号：３４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含むＶＬドメイン、又は
（ｂ）（ｉ）配列番号：３５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号：３６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号：３７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含むＶＨドメインと、（ｉｖ）配列番号：３８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｖ）配列番号：３９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、及び（ｖｉ）配列番号：４０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含むＶＬドメイン
を含む、パラ１から１０又は１４の何れか一に記載のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。
１６．　ＣＤ１９に特異的に結合することができるＦａｂドメインが、配列番号：４１のアミノ酸配列を含む可変重鎖と、配列番号：４２のアミノ酸配列を含む可変軽鎖を含むか、又はＦＡＰに特異的に結合することができるＦａｂドメインが、配列番号：４３のアミノ酸配列を含む可変重鎖と、配列番号：４４のアミノ酸配列を含む可変軽鎖を含む、パラ１から１０、１４又は１５の何れか一に記載のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。
１７．　標的細胞抗原がＣＥＡである、パラ１から１０の何れか一に記載のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。
１８．　ＣＥＡに特異的に結合することができるＦａｂドメインが、（ｉ）配列番号：４５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号：４６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号：４７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含むＶＨドメインと、（ｉｖ）配列番号：４８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｖ）配列番号：４９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、及び（ｖｉ）配列番号：５０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含むＶＬドメインを含む、パラ１から１０又は１７の何れか一に記載のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。
１９．　ＣＥＡに特異的に結合することができるＦａｂドメインが、配列番号：５１のアミノ酸配列を含む可変重鎖と、配列番号：５２のアミノ酸配列を含む可変軽鎖を含む、パラ１から１０、１７又は１８の何れか一に記載のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。
２０．　ＦｃドメインがＩｇＧ、特にＩｇＧ１ Ｆｃドメイン又はＩｇＧ４ Ｆｃドメインである、パラ１から１９の何れか一に記載のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。
２１．　Ｆｃドメインが、２３４位及び２３５位（ＥＵ番号付け）及び／又は３２９位（ＥＵ番号付け）にアミノ酸置換を含むＩｇＧ１ Ｆｃドメインである、パラ１から２０の何れか一に記載のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。
２２．　Ｆｃドメインの第一サブユニットがアミノ酸置換Ｓ３５４Ｃ及びＴ３６６Ｗ（ＫａｂａｔのＥＵインデックスによる番号付け）を含み、Ｆｃドメインの第二サブユニットがアミノ酸置換Ｙ３４９Ｃ、Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ及びＹ４０７Ｖ（ＫａｂａｔのＥＵインデックスによる番号付け）を含む、パラ１から２１の何れか一に記載のＴＮＦファミ

リーリガンド三量体含有抗原結合分子。
２３．　ペプチドリンカーによって互いに連結されたＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドがＦｃドメインの第二サブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合され、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドがＦｃドメインの第一サブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合されている、パラ１から２２の何れか一に記載のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。
２４．　ペプチドリンカーによって互いに連結されたＴＮＦリガンドファミリーメンバーの二つのエクトドメイン又はその断片を含む第一ポリペプチドがＦｃドメインの第一サブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合され、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの一つのエクトドメイン又はその断片を含む第二ポリペプチドがＦｃドメインの第二サブユニットのＣ末端にそのＮ末端で融合されている、パラ１から２２の何れか一に記載のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。
２５．　標的細胞抗原に特異的に結合することができるＦａｂドメインが、Ｆｃドメインの第一サブユニットのＮ末端にＣ末端で融合されている、パラ１から２４の何れか一に記載のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。
２６．　（ｄ）標的細胞抗原に特異的に結合することができないＦａｂドメイン
を更に含む、パラ１から２６の何れか一に記載のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子。
２７．　パラ１から１６の何れか一に記載のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子をコードする単離されたポリヌクレオチド。
２８　パラ２７に記載の単離されたポリヌクレオチドを含むベクター、特に発現ベクター。
２９．　パラ２７に記載の単離されたポリヌクレオチド又はパラ２８に記載のベクターを含む宿主細胞。
３０．　パラ１から２６の何れか一に記載のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子の産生方法であって、
（ｉ）パラ２９に記載の宿主細胞を、抗原結合分子の発現に適した条件下で培養する工程、及び
（ｉｉ）抗原結合分子を回収する工程
を含む、方法。
３１．　パラ１から２６の何れか一に記載のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子と少なくとも一種の薬学的に許容可能な賦形剤とを含有する薬学的組成物。
３２．　医薬として使用するための、パラ１から２６の何れか一項に記載のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子、又はパラ３１に記載の薬学的組成物。
３３．　がんの治療における使用のための、パラ１から２６の何れか一に記載のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子、又はパラ３１に記載の薬学的組成物。
３４．　がんの治療のための医薬の製造のための、パラ１から２６の何れか一に記載のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子の使用。
３５．　個体における疾患の治療方法において、薬学的に許容される形態でパラ１から２６の何れか一に記載のＴＮＦファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子を含有する組成物の治療的有効量を前記個体に投与することを含む、方法。
３６．　前記疾患ががんである、パラ３５に記載の方法。
【実施例】
【０３３９】
次は本発明の方法及び組成物の実施例である。上に提供された一般的な説明を考慮すると、様々な他の実施態様が実施されうることが理解される。
【０３４０】
［組換えＤＮＡ技術］
Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989に記載されているように、標準的な方法を使

用して、ＤＮＡを操作した。分子生物学的試薬を、製造業者の指示に従って使用した。ヒト免疫グロブリン軽鎖及び重鎖のヌクレオチド配列に関する一般的な情報は、Kabat, E.A.等, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5版, NIH Publication No 91-3242に与えられている。

【０３４１】

［ＤＮＡ配列決定］

ＤＮＡ配列は、二本鎖配列決定により決定した。

【０３４２】

［遺伝子合成］

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

【０３４３】

［細胞培養技術］

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

【０３４４】

［タンパク質の精製］

標準的プロトコールを参照して、濾過した細胞培養上清からタンパク質を精製した。簡潔には、抗体をプロテインＡセファロースカラム（ＧＥ ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）に適用し、ＰＢＳで洗浄した。抗体の溶出は、ｐＨ２．８で達成し、続いて試料を直ちに中和させた。凝集したタンパク質をＰＢＳ又は２０ｍＭのヒスチジン、１５０ｍＭのＮａＣｌ（ｐＨ６．０）中のサイズ排除クロマトグラフィー（Ｓｕｐｅｒｄｅｘ２００，ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）により単量体抗体から分離した。単量体抗体画分をプールし、例えばＭＩＬＬＩＰＯＲＥ Ａｍｉｃｏｎ Ｕｌｔｒａ（３０ＭＷＣＯ）遠心濃縮器を使用して（必要に応じて）濃縮し、－２０℃又は－８０℃で凍結し保存した。試料の一部を、例えばＳＤＳ－ＰＡＧＥ、サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）又は質量分析法によるその後のタンパク質分析及び分析的特徴付けのために提供した。

【０３４５】

［ＳＤＳ－ＰＡＧＥ］

ＮｕＰＡＧＥ（登録商標）Ｐｒｅ－Ｃａｓｔゲルシステム（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を製造業者の指示に従って使用した。特に、１０％又は４～１２％のＮｕＰＡＧＥ（登録商標）Ｎｏｖｅｘ（登録商標）Ｂｉｓ－ＴＲＩＳ Ｐｒｅ－Ｃａｓｔゲル（ｐＨ６．４）及びＮｕＰＡＧＥ（登録商標）ＭＥＳ（還元ゲル、ＮｕＰＡＧＥ（登録商標）酸化防止剤ランニング緩衝液添加剤を含む）又はＭＯＰＳ（非還元ゲル）ランニング緩衝液を使用した。

【０３４６】

［分析用サイズ排除クロマトグラフィー］

抗体の凝集及びオリゴマー状態の測定のためのサイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）をＨＰＬＣクロマトグラフィーによって実施した。簡潔には、プロテインＡ精製抗体を、Ａｇｉｌｅｎｔ ＨＰＬＣ １１００システム上の３００ｍＭのＮａＣｌ、５０ｍＭのＫＨ$_2$

ＰＯ４／Ｋ２ＨＰＯ４、ｐＨ７．５中のＴｏｓｏｈ ＴＳＫｇｅｌ Ｇ３０００ＳＷカラムに又はＤｉｏｎｅｘ ＨＰＬＣシステム上の２×ＰＢＳ中のＳｕｐｅｒｄｅｘ２００カラム（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）に適用した。溶出したタンパク質を、ＵＶ吸光度及びピーク面積の積分によって定量した。ＢｉｏＲａｄゲル濾過スタンダード１５１－１９０１が標準となった。

【０３４７】

［質量分析］

この節では、その正しいアセンブリーに重点を置いて、ＶＨ／ＶＬ交換（ＶＨ／ＶＬ ＣｒｏｓｓＭａｂｓ）を含む多重特異性抗体の特徴付けについて記載する。予想される一次構造は、脱グリコシル化されたインタクトなＣｒｏｓｓＭａｂ、及び脱グリコシル化／プラスミン消化又は別の脱グリコシル化／限定ＬｙｓＣ消化ＣｒｏｓｓＭａｂのエレクトロスプレーイオン化質量分析（ＥＳＩ－ＭＳ）によって分析した。

【０３４８】

ＶＨ／ＶＬ ＣｒｏｓｓＭａｂを、１ｍｇ／ｍｌのタンパク質濃度で３７℃において最大１７時間、リン酸又はトリス緩衝液中でＮ－グリコシダーゼＦで脱グリコシル化した。プラスミン又は限定ＬｙｓＣ（Ｒｏｃｈｅ）消化は、１００μｇの脱グリコシル化ＶＨ／ＶＬ ＣｒｏｓｓＭａｂを用いてトリス緩衝液ｐＨ８中で、それぞれ、室温において１２０時間、３７℃において４０分間、実施した。質量分析に先立ち、Ｓｅｐｈａｄｅｘ Ｇ２５カラム（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）上でＨＰＬＣにより試料を脱塩した。ＴｒｉＶｅｒｓａ ＮａｎｏＭａｔｅ源（Ａｄｖｉｏｎ）を備えたｍａＸｉｓ ４Ｇ ＵＨＲ－ＱＴＯＦ ＭＳシステム（Ｂｒｕｋｅｒ Ｄａｌｔｏｎｉｋ）でＥＳＩ－ＭＳによって全質量を測定した。

【０３４９】

［表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）（ＢＩＡＣＯＲＥ）を使用する各抗原に対する多重特異性抗体の結合及び結合親和性の測定］

ＢＩＡＣＯＲＥ機器（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ ＡＢ，Ｕｐｐｓａｌａ，Ｓｗｅｄｅｎ）を使用する表面プラズモン共鳴により、作製した抗体のそれぞれの抗原への結合を調べる。簡単に説明すると、親和性測定のために、ヤギ－抗ヒトＩｇＧ、ＪＩＲ１０９－００５－０９８抗体を、それぞれの抗原に対する抗体の提示のために、アミンカップリングによってＣＭ５チップ上に固定する。結合は、ＨＢＳ緩衝液（ＨＢＳ－Ｐ（１０ｍＭのＨＥＰＥＳ、１５０ｍＭのＮａＣｌ、０．００５％のＴｗｅｅｎ２０，ｐＨ７．４）中、２５℃（あるいは３７℃）で測定する。抗原（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ又は社内で精製）を様々な溶液中濃度で加えた。結合を、８０秒から３分の抗原注入によって測定し；解離を、チップ表面をＨＢＳ緩衝液で３～１０分間洗浄して測定し、ＫＤ値を、１：１のラングミュア結合モデルを使用して推定した。陰性対照データ（例えば緩衝液曲線）を、系固有のベースラインドリフトの補正及びノイズシグナル低減のために試料曲線から減算する。それぞれのＢｉａｃｏｒｅ評価ソフトウェアを、センサーグラムの解析及び親和性データの計算に使用する。

【０３５０】

実施例１

一価標的ヒト４－１ＢＢリガンド三量体含有Ｆｃ融合抗原結合分子の調製

１．１ ４－１ＢＢリガンドがＣ末端融合された一価ＦＡＰ標的４－１ＢＢリガンド三量体含有Ｆｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子（コンストラクト１．１１、２．１１、１．１２及び２．１２）の調製（ノブ鎖上のＦＡＰ）

ヒト４－１ＢＢリガンドのエクトドメインの一部をコードするＤＮＡ配列（アミノ酸７１－２４８）をＵｎｉｐｒｏｔデータベースのＰ４１２７３配列（配列番号：７５）に従って合成した。

【０３５１】

図１ａ：ヒトＩｇＧ１ Ｆｃ、（Ｇ４Ｓ）２コネクター、ヒト４－１ＢＢリガンド、（Ｇ４Ｓ）２コネクター、ヒト４－１ＢＢリガンドに示すように、（Ｇ４Ｓ）２リンカーによって分離された４－１ＢＢリガンドの二つのエクトドメインを含むポリペプチドを、ヒトＩ

ｇＧ１ ＦｃホールまたはノブＣ末端にインフレームでサブクローニングした。図１Ｂ：ヒトＩｇＧ１ Ｆｃ、（Ｇ４Ｓ）２コネクター、ヒト４－１ＢＢリガンドに記載されているように、４－１ＢＢリガンドの一つのエクトドメインを含むポリペプチドを、ヒトＩｇＧ１ ＦｃノブまたはホールＣ末端にインフレームでサブクローニングした。

【０３５２】

線維芽細胞活性化タンパク質（ＦＡＰ）、クローン４Ｂ９またはクローン２８Ｈ１に特異的なバインダーをコードする重鎖及び軽鎖ＤＮＡ配列の可変領域を、ノブの定常重鎖またはヒトＩｇＧ１の定常軽鎖の何れかとインフレームでサブクローニングした。ＦＡＰバインダーの生成及び調製は、出典明示によりここに援用される国際公開第２０１２／０２０００６Ａ２号に記載されている。

【０３５３】

国際特許出願公報の国際公開第２０１２／１３０８３１Ａ１号に記載された方法に従ってＦｃガンマ受容体への結合を抑止するためにＰｒｏ３２９Ｇｌｙ、Ｌｅｕ２３４Ａｌａ及びＬｅｕ２３５Ａｌａ変異をノブ及びホール重鎖の定常領域に導入した。

【０３５４】

全てのコンストラクトについて、Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001)に記載されているように、ノブ・イントゥ・ホールヘテロ二量体化技術を使用した。ＣＨ３ドメイン中にＹ３４９Ｃ／Ｔ３６６Ｓ／Ｌ３６８Ａ／Ｙ４０７Ｖ変異を含むｈｕＩｇＧ１ ＦｃホールＣＨ３ドメイン中にＳ３５４Ｃ／Ｔ３６６Ｗ変異を含む抗ＦＡＰ ｈｕＩｇＧ１ノブ及び抗ＦＡＰ軽鎖の組合せが、構築された三量体４－１ＢＢリガンドと一つのＦＡＰ結合Ｆａｂを含む、ヘテロ二量体の作製を可能にする（図２Ａ及び２Ｂ）。

【０３５５】

表１は、一価ＦＡＰ（４Ｂ９）標的４－１ＢＢリガンド（７１－２４８）三量体含有Ｆｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子（コンストラクト２．１１）のｃＤＮＡ及びアミノ酸配列を示す。

【０３５６】

表1：FAP（4B9）標的ヒト4－1BBリガンド三量体含有Fc（kih）融合分子コンストラクト2．11の配列

配列番号:	説明	配列
101	Fc ホール二量体 4-1BB リガンド (71-248)鎖のヌクレオチド配列	GACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTG CAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGA CACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTG GTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGC GGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCT CACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG TGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAA CCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGT GCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGG TCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACAT CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTA CAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA ACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTGGAGG CGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCCCTGAGCT GAGCCCTGATGATCCTGCCGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGG AATGTTTGCCCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGAT GGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGT CACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACT GGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTG GAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGT CTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGATCTGCTGCTGGCGC CGCTGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCAGC GAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGC ACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACAGA GGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTAC AGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCAGGC CTGGGAGGCGGCGGATCTGGCGGCGGAGGATCTAGAGAAGGA CCCGAGCTGTCCCCCGACGATCCCGCTGGGCTGCTGGATCTG AGACAGGGCATGTTCGCTCAGCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGC TGATTGACGGACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCAGGGCTGGC AGGGGTGTCCCTGACTGGGGGACTGTCCTACAAAGAAGATACA AAAGAACTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGTACTATGTGTTTT TTCAGCTGGAACTGAGGCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGCTCAG GATCTGTGTCCCTGGCTCTGCATCTGCAGCCACTGCGCTCTGC AGCAGGGGCTGCAGCACTGGCCCTGACTGTGGACCTGCCCCC AGCTTCTTCCGAGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCCAAGGA CGCCTGCTGCATCTGAGCGCCGGACAGCGCCTGGGAGTGCAT CTGCATACTGAAGCCAGAGCCCGGCATGCTTGGCAGCTGACTC AGGGGGCAACTGTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACACCTGAGAT CCCAGCCGGGCTC
102	抗 FAP(4B9) Fc ノブ単量体 4-1BB (71-248)リガンドのヌクレオチド配列	GAGGTGCAGCTGCTCGAAAGCGGCGGAGGACTGGTGCAGCCT GGCGGCAGCCTGAGACTGTCTTGCGCCGCCAGCGGCTTCACC TTCAGCAGCTACGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCCCCTGGC AAGGGACTGGAATGGGTGTCCGCCATCATCGGCTCTGGCGCCA GCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAG CCGGGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGC

		CTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGGGA TGGTTCGGCGGCTTCAACTACTGGGGACAGGGCACCCTGGTCA CAGTGTCCAGCGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCT GGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCT GGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTG TCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTC CCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCG TGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACAT CTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAG AAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCAC CGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCT CTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACC CCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGC ATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGG CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC TCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCA GCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCCTGCAGAGA TGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTCAAG GGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACG GCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGA CAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACTCCAAACTGACCGTGGAC AAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTG ATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGA GCCTGAGCCCCGGCGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGAT CCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCTGATGATCCTGCCGGAC TGCTGGACCTGCGGCAGGGAATGTTTGCCCAGCTGGTGGCCCA GAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGAT CCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACA AAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGT ACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGG CGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCT CTGAGATCTGCTGCTGGCGCCGCTGCTCTGGCACTGACAGTGG ATCTGCCTCCTGCCAGCAGCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGG GTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTG GGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGG CAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGA CCCCCGAGATTCCTGCCGGGCTC
103	抗 FAP(4B9) 軽鎖 のヌクレオチド配列	GAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCCGGCACCCTGTCTCTGAGCC CTGGCGAGAGAGCCACCCTGTCCTGCAGAGCCTCCCAGTCCG TGACCTCCTCCTACCTCGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCA GGCCCCTCGGCTGCTGATCAACGTGGGCAGTCGGAGAGCCAC CGGCATCCCTGACCGGTTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCGA CTTCACCCTGACCATCTCCCGGCTGGAACCCGAGGACTTCGCC GTGTACTACTGCCAGCAGGGCATCATGCTGCCCCCCACCTTTG GCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCTGCAC CATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT GGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCA GAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATC GGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGA CAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCA GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATC

		AGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAG AGTGT
104	Fc ホールニ量体 4-1BB (71-248) リガンド鎖	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRD ELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG GGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLID GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLEL RRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARN SAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFR VTPEIPAGLGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLV AQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYY VFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPP ASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQG ATVLGLFRVTPEIPAGL
105	抗 FAP(4B9) Fc ノブ単量体 41-BB (71-248) リガンド	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKG LEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVS LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGG GSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDP GLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGS GSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRL LHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
106	抗 FAP(4B9) 軽鎖	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAWYQQKPGQAP RLLINVGSRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQG IMLPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【０３５７】

表２は、一価ＦＡＰ（４Ｂ９）標的４－１ＢＢリガンド（７１－２４８）三量体含有Ｆｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子（コンストラクト２．１２）のｃＤＮＡ及びアミノ酸配列を示す。

【０３５８】

表2：FAP（4B9）標的ヒト4－1BBリガンド三量体含有Fc（kih）融合分子コンストラクト2．12の配列

配列番号:	説明	配列
107	Fc ホール単量体 4-1BBL (71-248)鎖のヌクレオチド配列	GACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTG CAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGA CACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTG GTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGC GGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCT CACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG TGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAA CCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGT GCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGG TCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACAT CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTA CAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA ACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAGAGA GGGCCCTGAGCTGAGCCCTGATGATCCTGCCGGACTGCTGGA CCTGCGGCAGGGAATGTTTGCCCAGCTGGTGGCCCAGAACGTG CTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGAC TGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGA CACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTG TTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGAT CTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGATC TGCTGCTGGCGCCGCTGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCT CCTGCCAGCAGCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAG GCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGC ATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGA CACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGACCCCCG AGATTCCTGCCGGGCTC
108	抗 FAP(4B9) Fc ノブ二量体 4-1BB リガンド (71-248)のヌクレオチド配列	GAGGTGCAGCTGCTCGAAAGCGGCGGAGGACTGGTGCAGCCT GGCGGCAGCCTGAGACTGTCTTGCGCCGCCAGCGGCTTCACC TTCAGCAGCTACGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCCCCTGGC AAGGGACTGGAATGGGTGTCCGCCATCATCGGCTCTGGCGCCA GCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAG CCGGGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGC CTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGGGA TGGTTCGGCGGCTTCAACTACTGGGGACAGGGCACCCTGGTCA CAGTGTCCAGCGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCT GGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCT GGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTG TCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTC CCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCG TGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACAT CTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAG AAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCAC CGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCT CTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACC CCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGC

		ATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGG CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC TCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCA GCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCCTGCAGAGA TGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTCAAG GGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACG GCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGA CAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACTCCAAACTGACCGTGGAC AAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTG ATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGA GCCTGAGCCCCGGCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCTGATG ATCCTGCCGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGAATGTTTGCCCA GCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCC TGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCG GCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAA GGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGA GTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGC ATCTGCAGCCTCTGAGATCTGCTGCTGGCGCCGCTGCTCTGGC ACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCAGCGAGGCCCGGAAT AGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCG GCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTA GACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCC TGTTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCAGGCCTGGGAGGCG GCGGATCTGGCGGCGGAGGATCTAGAGAAGGACCCGAGCTGT CCCCCGACGATCCCGCTGGGCTGCTGGATCTGAGACAGGGCA TGTTCGCTCAGCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGCTGATTGACGG ACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCAGGGCTGGCAGGGGTGTC CCTGACTGGGGGACTGTCCTACAAAGAAGATACAAAAGAACTG GTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGTACTATGTGTTTTTTCAGCTGG AACTGAGGCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGCTCAGGATCTGTGT CCCTGGCTCTGCATCTGCAGCCACTGCGCTCTGCAGCAGGGG CTGCAGCACTGGCCCTGACTGTGGACCTGCCCCCAGCTTCTTC CGAGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCCAAGGACGCCTGCT GCATCTGAGCGCCGGACAGCGCCTGGGAGTGCATCTGCATACT GAAGCCAGAGCCCGGCATGCTTGGCAGCTGACTCAGGGGGCA ACTGTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACACCTGAGATCCCAGCCG GGCTC
103	抗 FAP(4B9) 軽鎖 のヌクレオチド配列	表1参照
109	Fc ホール単量体 4-1BB リガンド (71-248)鎖	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRD ELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGL AGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGS VSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLH LSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL

110	抗 FAP(4B9) Fc ノブ二量体 4-1BB リガンド (71-248)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKG LEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVS LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGREGPELSP DDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGG LSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQP LRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGV HLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLGGGGSGGGGSR EGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLA GVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSV SLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLS AGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
106	抗 FAP(4B9) 軽鎖	表1参照

【０３５９】

表３は、一価ＦＡＰ（２８Ｈ１）標的４－１ＢＢリガンド三量体含有Ｆｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子（コンストラクト１．１１）のｃＤＮＡ及びアミノ酸配列を示す。

【０３６０】

表3：FAP（28H1）標的ヒト4－1BBリガンド三量体含有Fc（kih）融合分子コンストラクト1．11の配列

配列番号:	説明	配列
101	Fc ホール二量体 4-1BB リガンド (71-248) 鎖のヌクレオチド配列	表1参照
111	抗 FAP(28H1) Fc ノブ単量体 4-1BB リガンド (71-248) のヌクレオチド配列	GAAGTGCAGCTGCTGGAATCCGGCGGAGGCCTGGTGCAGCCT GGCGGATCTCTGAGACTGTCCTGCGCCGCCTCCGGCTTCACCT TCTCCTCCCACGCCATGTCCTGGGTCCGACAGGCTCCTGGCAA AGGCCTGGAATGGGTGTCCGCCATCTGGGCCTCCGGCGAGCA GTACTACGCCGACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGG GACAACTCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGC GGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAAGGGCTGGC TGGGCAACTTCGACTACTGGGGACAGGGCACCCTGGTCACCGT GTCCAGCGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCA CCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGC TGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGT GGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGG CTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGT GACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGC AACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAG TTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTG CCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTC CCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTG AGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGA GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAAT GCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTAC CGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGG CGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCCTGCAGAGATGA GCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTCAAGGGC TTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCC AGCCTGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACAG CGACGGCAGCTTCTTCCTGTACTCCAAACTGACCGTGGACAAG AGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATG CACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGC CTGAGCCCCGGCGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGATCC AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCTGATGATCCTGCCGGACTG CTGGACCTGCGGCAGGGAATGTTTGCCCAGCTGGTGGCCCAGA ACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCC TGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAA GAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTAC TACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCG AAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCT GAGATCTGCTGCTGGCGCCGCTGCTCTGGCACTGACAGTGGAT CTGCCTCCTGCCAGCAGCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGT TTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGG GAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGC

		AGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGAC CCCCGAGATTCCTGCCGGGCTC
112	抗 FAP(28H1)軽鎖 のヌクレオチド配列	GAGATCGTGCTGACCCAGTCCCCCGGCACCCTGTCTCTGAGCC CTGGCGAGAGAGCCACCCTGTCCTGCAGAGCCTCCCAGTCCG TGTCCCGGTCCTACCTCGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCA GGCCCCTCGGCTGCTGATCATCGGCGCCTCTACCAGAGCCAC CGGCATCCCTGACCGGTTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCGA CTTCACCCTGACCATCTCCCGGCTGGAACCCGAGGACTTCGCC GTGTACTACTGCCAGCAGGGCCAGGTCATCCCTCCCACCTTTG GCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGTACGGTGGCTGCAC CATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT GGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCA GAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATC GGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGA CAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCA GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATC AGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAG AGTGT
104	Fc ホール二量体 4-1BB リガンド (71-248) 鎖	表1参照
113	抗 FAP(28H1) Fc ノ ブ単量体 4-1BB リ ガンド (71-248)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQAPGKG LEWVSAIWASGEQYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAKGWLGNFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVS LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGG GSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDP GLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGS GSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRL LHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
114	抗 FAP(28H1) 軽鎖	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSRSYLAWYQQKPGQAP RLLIIGASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQG QVIPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【０３６１】

表４は、一価ＦＡＰ（２８Ｈ１）標的４－１ＢＢリガンド三量体含有Ｆｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子（コンストラクト１．１２）のｃＤＮＡ及びアミノ酸配列を示す。

【０３６２】

表４：FAP（２８H１）標的ヒト４－１BBリガンド三量体含有Fc（kih）融合分子コンストラクト１．１２の配列

配列番号:	説明	配列
107	Fc ホール単量体 4-1BB リガンド (71-248)鎖のヌクレオチド配列	表２参照
115	抗 FAP(28H1) Fc ノブ二量体 4-1BB リガンド (71-248)のヌクレオチド配列	GAAGTGCAGCTGCTGGAATCCGGCGGAGGCCTGGTGCAGCCT GGCGGATCTCTGAGACTGTCCTGCGCCGCCTCCGGCTTCACCT TCTCCTCCCACGCCATGTCCTGGGTCCGACAGGCTCCTGGCAA AGGCCTGGAATGGGTGTCCGCCATCTGGGCCTCCGGCGAGCA GTACTACGCCGACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGG GACAACTCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGC GGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAAGGGCTGGC TGGGCAACTTCGACTACTGGGGACAGGGCACCCTGGTCACCGT GTCCAGCGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCA CCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGC TGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGT GGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGG CTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGT GACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGC AACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAG TTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTG CCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTC CCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTG AGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGA GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAAT GCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTAC CGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGG CGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCCTGCAGAGATGA GCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTCAAGGGC TTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCC AGCCTGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACAG CGACGGCAGCTTCTTCCTGTACTCCAAACTGACCGTGGACAAG AGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATG CACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGC CTGAGCCCCGGCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCTGATGAT CCTGCCGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGAATGTTTGCCCAG CTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCT GGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCG GCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAA GGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGA GTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGC ATCTGCAGCCTCTGAGATCTGCTGCTGGCGCCGCTGCTCTGGC ACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCAGCGAGGCCCGGAAT AGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCG GCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTA

		GACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCC TGTTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCAGGCCTGGGAGGCG GCGGATCTGGCGGCGGAGGATCTAGAGAAGGACCCGAGCTGT CCCCCGACGATCCCGCTGGGCTGCTGGATCTGAGACAGGGCA TGTTCGCTCAGCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGCTGATTGACGG ACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCAGGGCTGGCAGGGGTGTC CCTGACTGGGGGACTGTCCTACAAAGAAGATACAAAAGAACTG GTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGTACTATGTGTTTTTTCAGCTGG AACTGAGGCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGCTCAGGATCTGTGT CCCTGGCTCTGCATCTGCAGCCACTGCGCTCTGCAGCAGGGG CTGCAGCACTGGCCCTGACTGTGGACCTGCCCCCAGCTTCTTC CGAGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCCAAGGACGCCTGCT GCATCTGAGCGCCGGACAGCGCCTGGGAGTGCATCTGCATACT GAAGCCAGAGCCCGGCATGCTTGGCAGCTGACTCAGGGGGCA ACTGTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACACCTGAGATCCCAGCCG GGCTC
112	抗 FAP(28H1) 軽鎖のヌクレオチド配列	表3参照
109	Fc ホール単量体 4-1BB リガンド (71-248) 鎖	表2参照
116	抗 FAP(28H1) Fc ノブ二量体 4-1BB リガンド (71-248)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQAPGKG LEWVSAIWASGEQYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAKGWLGNFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVS LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGREGPELSP DDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGG LSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQP LRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGV HLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLGGGGSGGGGSR EGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLA GVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSV SLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLS AGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
114	抗 FAP(28H1)軽鎖	表3参照

【０３６３】

１．２　４－１ＢＢリガンドがＣ末端に融合した一価ＣＤ１９標的４－１ＢＢリガンド三量体含有Ｆｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子（コンストラクト３．１１、４．１１、３．１２及び４．１２）の調製（ノブ鎖上のＣＤ１９）

該分子は、抗ＦＡＰバインダーを抗ＣＤ１９バインダーで置き換えたことを唯一の相違点として、一価ＦＡＰ標的コンストラクトについて実施例１．１に記載されたようにして調製した。

【０３６４】

ＣＤ１９、クローン８Ｂ８－０１８又はクローン８Ｂ８－２Ｂ１１に特異的なバインダー

をコードする重鎖及び軽鎖ＤＮＡ配列の可変領域を、ノブの定常重鎖又はヒトＩｇＧ１の定常軽鎖の何れかとインフレームでサブクローニングした。ＣＤ１９クローンの生成は実施例１．３に記載されている。

【０３６５】

国際特許出願公報の国際公開第２０１２／１３０８３１Ａ１号に記載された方法に従ってＦｃガンマ受容体への結合を抑止するためにＰｒｏ３２９Ｇｌｙ、Ｌｅｕ２３４Ａｌａ及びＬｅｕ２３５Ａｌａ変異をノブ及びホール重鎖の定常領域に導入した。

【０３６６】

全てのコンストラクトについて、Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001)に記載されているように、ノブ・イントゥ・ホールヘテロ二量体化技術を使用した。ＣＨ３ドメイン中にＹ３４９Ｃ／Ｔ３６６Ｓ／Ｌ３６８Ａ／Ｙ４０７Ｖ変異を含むｈｕＩｇＧ１ Ｆｃホール鎖、ＣＨ３ドメイン中にＳ３５４Ｃ／Ｔ３６６W変異を含む抗ＦＡＰ ｈｕＩｇＧ１ノブ鎖及び抗ＦＡＰ軽鎖の組合せが、構築された三量体４－１ＢＢリガンドと一つのＣＤ１９結合Ｆａｂを含む、ヘテロ二量体の作製を可能にする（図２Ａ及び２Ｂ）。

【０３６７】

表５は、一価ＣＤ１９（８Ｂ８－０１８）標的４－１ＢＢリガンド（７１－２４８）三量体含有Ｆｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子（コンストラクト３．１１）のｃＤＮＡ及びアミノ酸配列を示す。

【０３６８】

表５：CD19（8B8－018）標的ヒト4－1BBリガンド三量体含有Fc（kih）融合分子コンストラクト

３．11の配列

配列番号:	説明	配列
101	Fc ホール二量体 4-1BB リガンド (71-248) 鎖のヌクレオチド配列	表1参照
117	抗 CD19(8B8-018) Fc ノブ単量体 4-1BB (71-248) リガンドのヌクレオチド配列	CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGGTCAAGAAACCC GGGGCTTCTGTGAAGGTTTCATGCAAGGCAAGCGGATACACCT TCACCGACTATATCATGCATTGGGTCAGGCAGGCCCCTGGCCA AGGTCTCGAATGGATGGGCTACATTAACCCATATAATGATGGC TCCAAATACACCGAGAAGTTTCAGGGAAGAGTCACTATGACAT CTGACACCAGTATCAGCACTGCTTACATGGAGCTGTCCCGCCT TCGGTCTGATGACACCGCAGTGTATTACTGTGCCAGGGGCACA TATTACTACGGCTCAGCTCTGTTCGACTATTGGGGGCAGGGAA CCACAGTAACCGTGAGCTCCGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGT CTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACA GCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCG GTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTG CACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCC TCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCC AGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAA GGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCAC ACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCG TCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGA TCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAG CCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG TACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGC ACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC CAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCC CCCTGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGT GTCTGGTCAAGGGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACCCC CCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACTCCAAA CTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC AGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACC CAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCGGAGGCGGCGGAAGC GGAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCTGAT GATCCTGCCGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGAATGTTTGCCC AGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTC CTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGC GGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCA AGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAG AGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTG CATCTGCAGCCTCTGAGATCTGCTGCTGGCGCCGCTGCTCTGG CACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCAGCGAGGCCCGGA

		ATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGC CGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGC TAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGG CCTGTTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCTGCCGGGCTC
118	抗 CD19(8B8-018)軽鎖のヌクレオチド配列	GACATCGTCATGACCCAGACACCCCTGTCCCTCTCTGTGACCC CTGGCCAGCCAGCCTCAATTAGCTGCAAGTCCTCTCAAAGTCT GGAGAACCCCAATGGGAACACTTACCTTAATTGGTATCTGCAG AAACCCGGACAATCCCCTCAACTCCTGATCTACAGGGTCTCTA AGAGATTCTCAGGCGTGCCAGATCGCTTTAGCGGTTCCGGGTC TGGCACAGACTTCACCTTGAAGATTAGTCGGGTTGAAGCTGAG GATGTGGGAGTCTATTACTGTCTGCAGCTCACTCATGTGCCCT ACACCTTTGGTCAGGGCACAAAACTGGAGATCAAGCGGACCGT GGCCGCTCCCTCCGTGTTCATCTTCCCACCCTCCGACGAGCAG CTGAAGTCCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACT TCTACCCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACG CCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAATCCGTGACCGAGCAGG ACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCCTCCACCCTGACCCT GTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAA GTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGTCCTTCA ACCGGGGCGAGTGC
104	Fc ホール二量体 4-1BB (71-248) リガンド鎖	表1参照
119	抗 CD19(8B8-018) Fc ノブ単量体 4-1-BB (71-248) リガンド	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQAPGQG LEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRLRSDD TAVYYCARGTYYYGSALFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDEL TKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGG GGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPL SWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAF GFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTP EIPAGL
120	抗 CD19(8B8-018)軽鎖	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLENPNGNTYLNWYLQKPG QSPQLLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY CLQLTHVPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【０３６９】

表６は、一価ＣＤ１９（８Ｂ８－０１８）標的４－１ＢＢリガンド（７１－２４８）三量体含有Ｆｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子（コンストラクト３．１２）のｃＤＮＡ及びアミノ酸配列を示す。

【０３７０】

表2：CD19（B8－018）標的ヒト4－1BBリガンド三量体含有Fc（kih）融合分子コンストラクト
３．12の配列

配列番号:	説明	配列
107	Fc ホール単量体 4-1BBL (71-248) 鎖のヌクレオチド配列	表2参照
121	抗 CD19(8B8-018) Fc ノブ二量体 4-1BB (71-248) リガンドのヌクレオチド配列	CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGGTCAAGAAACCC GGGGCTTCTGTGAAGGTTTCATGCAAGGCAAGCGGATACACCT TCACCGACTATATCATGCATTGGGTCAGGCAGGCCCCTGGCCA AGGTCTCGAATGGATGGGCTACATTAACCCATATAATGATGGC TCCAAATACACCGAGAAGTTTCAGGGAAGAGTCACTATGACAT CTGACACCAGTATCAGCACTGCTTACATGGAGCTGTCCCGCCT TCGGTCTGATGACACCGCAGTGTATTACTGTGCCAGGGGCACA TATTACTACGGCTCAGCTCTGTTCGACTATTGGGGGCAGGGAA CCACAGTAACCGTGAGCTCCGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGT CTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACA GCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCG GTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTG CACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCC TCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCC AGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAA GGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCAC ACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCG TCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGA TCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAG CCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG TACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGC ACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC CAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCC CCCTGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGT GTCTGGTCAAGGGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACCCC CCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACTCCAAA CTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTC AGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACC CAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAGAGAGGGCCCTGAG CTGAGCCCTGATGATCCTGCCGGACTGCTGGACCTGCGGCAG GGAATGTTTGCCCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCG ATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGT GTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAA CTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGC TGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGT GTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGATCTGCTGCTGGC GCCGCTGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCA GCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCT

		GCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCACAC AGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGC TACAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCA GGCCTGGGAGGCGGCGGATCTGGCGGCGGAGGATCTAGAGAA GGACCCGAGCTGTCCCCCGACGATCCCGCTGGGCTGCTGGAT CTGAGACAGGGCATGTTCGCTCAGCTGGTGGCTCAGAATGTGC TGCTGATTGACGGACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCAGGGCT GGCAGGGGTGTCCCTGACTGGGGGACTGTCCTACAAAGAAGAT ACAAAAGAACTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGTACTATGTGT TTTTTCAGCTGGAACTGAGGCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGCTC AGGATCTGTGTCCCTGGCTCTGCATCTGCAGCCACTGCGCTCT GCAGCAGGGGCTGCAGCACTGGCCCTGACTGTGGACCTGCCC CCAGCTTCTTCCGAGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCCAAG GACGCCTGCTGCATCTGAGCGCCGGACAGCGCCTGGGAGTGC ATCTGCATACTGAAGCCAGAGCCCGGCATGCTTGGCAGCTGAC TCAGGGGGCAACTGTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACACCTGAG ATCCCAGCCGGGCTC
118	抗 CD19 (8B8-018) 軽鎖のヌクレオチド配列	表5参照
109	Fc ホール単量体 4-1BB リガンド (71-248) 鎖	表2参照
122	抗 CD19(8B8-018) Fc ノブ二量体 4-1BB (71-248) リガンド	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQAPGQG LEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRLRSDD TAVYYCARGTYYYGSALFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDEL TKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGRE GPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAG VSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVS LALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLS AGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLGGGG SGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSW YSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVA GEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGF QGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEI PAGL
120	抗 CD19(8B8-018) 軽鎖	表5参照

【０３７１】

表７は、一価ＣＤ１９（８Ｂ８－０１８）標的４－１ＢＢリガンド三量体含有Ｆｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子（コンストラクト４．１１）のｃＤＮＡ及びアミノ酸配列を示す。

【０３７２】

表7：CD19（2B11）標的ヒト4－1BBリガンド三量体含有Fc（kih）融合分子コンストラクト4．11の配列

配列番号:	説明	配列
101	Fc ホール二量体 4-1BB リガンド (71-248) 鎖のヌクレオチド配列	表1参照
123	抗 CD19(8B8-2B11) Fc ノブ単量体 4-1BB (71-248) リガンドのヌクレオチド配列	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAACCGG GCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCTGGTTACACCTT CACTGACTATATCATGCACTGGGTTCGTCAGGCCCCGGGCCAG GGTCTGGAGTGGATGGGCTACATTAACCCATACAACGACGGTT CCAAATATACCGAGAAATTCCAGGGCCGCGTCACGATGACCAG CGACACTTCTATCTCCACCGCGTACATGGAACTGTCTAGACTG CGTTCTGACGACACCGCTGTTTACTATTGTGCACGCGGTACCT ACTACTACGGTCCACAGCTGTTTGATTACTGGGGCCAAGGTAC CACGGTGACCGTAAGCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTC TTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAG CGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGT GACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCA CACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTC AGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAG ACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGG TGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACAC ATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTC AGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATC TCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCG TGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT ACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCA CCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC AACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAG CCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCC CCTGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTG TCTGGTCAAGGGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACCCCC CCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACTCCAAAC TGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCA GCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCC AGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCGGAGGCGGCGGAAGCG GAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCTGATG ATCCTGCCGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGAATGTTTGCCCA GCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCC TGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCG GCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAA GGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGA GTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGC ATCTGCAGCCTCTGAGATCTGCTGCTGGCGCCGCTGCTCTGGC ACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCAGCGAGGCCCGGAAT AGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCG

		GCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTA GACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCC TGTTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCTGCCGGGCTC
124	抗 CD19(8B8-2B11) 軽鎖のヌクレオチド配列	GATATTGTCATGACTCAAACTCCACTGTCTCTGTCCGTGACCC CGGGTCAGCCAGCGAGCATTTCTTGCAAATCCAGCCAATCTCT GGAAACCTCCACCGGCACCACGTACCTGAACTGGTATCTCCAG AAACCGGGTCAGAGCCCGCAGCTGCTGATCTACCGTGTATCTA AGCGCTTCTCCGGCGTTCCTGATCGTTTCAGCGGTTCTGGATC CGGCACCGACTTTACTCTGAAAATCAGCCGTGTGGAAGCTGAA GACGTTGGCGTCTACTATTGTCTGCAGCTGCTGGAAGATCCAT ACACCTTCGGTCAAGGAACTAAACTGGAAATTAAACGTACGGT GGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAG TTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTT CTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCC CTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACA GCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGA GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGT CACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAAC AGGGGAGAGTGTGATATTGTCATGACTCAAACTCCACTGTCTC TGTCCGTGACCCCGGGTCAGCCAGCGAGCATTTCTTGCAAATC CAGCCAATCTCTGGAAACCTCCACCGGCACCACGTACCTGAAC TGGTATCTCCAGAAACCGGGTCAGAGCCCGCAGCTGCTGATCT ACCGTGTATCTAAGCGCTTCTCCGGCGTTCCTGATCGTTTCAG CGGTTCTGGATCCGGCACCGACTTTACTCTGAAAATCAGCCGT GTGGAAGCTGAAGACGTTGGCGTCTACTATTGTCTGCAGCTGC TGGAAGATCCATACACCTTCGGTCAAGGAACGAAACTGGAAAT TAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCA TCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCC TGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAA GGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTC ACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGC ACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCT ACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCA CAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
104	Fc ホール二量体 4-1BB リガンド (71-248) 鎖	表1参照
125	抗 CD19(8B8-2B11) Fc ノブ単量体 4-1BB リガンド (71-248)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQAPGQG LEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRLRSDD TAVYYCARGTYYYGPQLFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDEL TKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGG GGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPL SWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAF

		GFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTP EIPAGL
126	抗 CD19(8B8-2B11) 軽鎖	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETSTGTTYLNWYLQKPG QSPQLLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY CLQLLEDPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST LTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【０３７３】

表８は、一価ＣＤ１９（８Ｂ８－２Ｂ１１）標的４－１ＢＢリガンド三量体含有Ｆｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子（コンストラクト４．１２）のｃＤＮＡ及びアミノ酸配列を示す。

【０３７４】

表8：CD19（8B8－2B11）標的ヒト4－1BBリガンド三量体含有Fc（kih）融合分子コンストラクト

４．12の配列

配列番号:	説明	配列
107	Fc ホール単量体 4-1BB リガンド (71-248) 鎖のヌクレオチド配列	表2参照
127	抗 CD19(8B8-2B11) Fc ノブ二量体 4-1BB (71-248) リガンドのヌクレオチド配列	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAACCGG GCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCTGGTTACACCTT CACTGACTATATCATGCACTGGGTTCGTCAGGCCCCGGGCCAG GGTCTGGAGTGGATGGGCTACATTAACCCATACAACGACGGTT CCAAATATACCGAGAAATTCCAGGGCCGCGTCACGATGACCAG CGACACTTCTATCTCCACCGCGTACATGGAACTGTCTAGACTG CGTTCTGACGACACCGCTGTTTACTATTGTGCACGCGGTACCT ACTACTACGGTCCACAGCTGTTTGATTACTGGGGCCAAGGTAC CACGGTGACCGTAAGCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTC TTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAG CGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGT GACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCA CACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTC AGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAG ACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGG TGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACAC ATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTC AGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATC TCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCG TGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGT ACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCA CCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC AACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAG CCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCC CCTGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTG TCTGGTCAAGGGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACCCCC CCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACTCCAAAC TGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCA GCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCC AGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAGAGAGGGCCCTGAGC TGAGCCCTGATGATCCTGCCGGACTGCTGGACCTGCGGCAGG GAATGTTTGCCCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGA TGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTG TCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAAC TGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCT GGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGT GTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGATCTGCTGCTGGC GCCGCTGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCA GCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCT

		GCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCACAC AGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGC TACAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCA GGCCTGGGAGGCGGCGGATCTGGCGGCGGAGGATCTAGAGAA GGACCCGAGCTGTCCCCCGACGATCCCGCTGGGCTGCTGGAT CTGAGACAGGGCATGTTCGCTCAGCTGGTGGCTCAGAATGTGC TGCTGATTGACGGACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCAGGGCT GGCAGGGGTGTCCCTGACTGGGGGACTGTCCTACAAAGAAGAT ACAAAAGAACTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGTACTATGTGT TTTTTCAGCTGGAACTGAGGCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGCTC AGGATCTGTGTCCCTGGCTCTGCATCTGCAGCCACTGCGCTCT GCAGCAGGGGCTGCAGCACTGGCCCTGACTGTGGACCTGCCC CCAGCTTCTTCCGAGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCCAAG GACGCCTGCTGCATCTGAGCGCCGGACAGCGCCTGGGAGTGC ATCTGCATACTGAAGCCAGAGCCCGGCATGCTTGGCAGCTGAC TCAGGGGGCAACTGTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACACCTGAG ATCCCAGCCGGGCTC
124	抗 CD19(8B8-2B11) 軽鎖のヌクレオチド配列	表7参照
109	Fc ホール単量体 4-1BB リガンド (71-248) 鎖	表2参照
128	抗 CD19(8B8-2B11) Fc ノブ二量体 4-1BB リガンド (71-248)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQAPGQG LEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRLRSDD TAVYYCARGTYYYGPQLFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDEL TKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGRE GPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAG VSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVS LALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLS AGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLGGGG SGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSW YSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVA GEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGF QGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEI PAGL
126	抗 CD19(8B8-2B11) 軽鎖	表7参照

【０３７５】

１．３．抗ＣＤ１９バインダー８Ｂ８－０１８及び８Ｂ８－２Ｂ１１の生成

１．３．１　抗ＣＤ１９クローン８Ｂ８－０１８の生成

ａ）マウス抗ヒトＣＤ１９抗体（ハイブリドーマ）の免疫化及び生成

Ｂａｌｂ／ｃマウスを６回免疫化し、ＣＤ１９－トランスフェクトＨＥＫ２９３細胞（１細胞当たり平均受容体密度３５０００）で追加免疫した。免疫応答は、ヒトＣＤ１９－トランスフェクトＮＩＨ－３Ｔ３細胞においてＣＤ１９－細胞－ＥＬＩＳＡを用いて血清試料を試験することによってモニターした。十分な力価の抗ヒトＣＤ１９抗体を有するマウスからの脾臓細胞を、マウスミエローマ細胞株Ｐ３Ｘ６３　Ａｇ８．６５３との融合による

不死化に使用した。３回の融合を実施し、ハイブリドーマ上清を、ヒトＣＤ１９－トランスフェクトＮＩＨ－３Ｔ３細胞上の細胞－ＥＬＩＳＡ及び抗ヒトＣＤ１９特異的抗体用のＤａｕｄｉ（ＣＤ１９＋）及びＣＤ１９－細胞を使用するＦＡＣＳ結合アッセイによりスクリーニングした（国際公開第２０１１／１４７８３４号の実施例１を参照）。

【０３７６】

ｂ）抗ＣＤ１９抗体のハイブリドーマスクリーニング及び細胞生物学的機能評価

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

－　培養培地：ＤＭＥＭ高グルコース（４．５ｍｇ／ｍｌ）、１０％ＦＣＳ、ピルビン酸Ｎａ、ＮＥＡＡ、グルタミン

－　陽性対照抗体：抗ＣＤ１９モノクローナル抗体（ＩｇＧ１）Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎカタログ番号５５５４０９　ｃ＝１ｍｇ／ｍｌ

－　検出抗体：ヤギ抗マウスＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）ＨＲＰコンジュゲートＢｉｏ－Ｒａｄカタログ番号１７０－０６５１６

－　希釈　１×ＥＬＩＳＡブロッキング試薬で１：２０００

－　他の試薬：フィブロネクチン　Ｒｏｃｈｅカタログ番号８３８０３９　ｃ＝１ｍｇ／ｍｌ

－　グルタルジアルデヒド：２５％原液／／Ｇｒａｄｅ　Ａｇａｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ＃Ｒ１０２　最終濃度：ＰＢＳ中０．０５％

－　ＥＬＩＳＡブロッキング試薬：１０×原液／／Ｒｏｃｈｅカタログ番号１１１２５８９

－　ＴＭＢ基質：Ｒｏｃｈｅカタログ番号１１４３２５５９

－　停止液：１ＭのＨ２ＳＯ４

－　ＢｉｏＲａｄカタログ番号１７０－６５１６　希釈　１×ＥＬＩＳＡブロッキング試薬で１：２０００

【０３７７】

１日目：

－　フィブロネクチンコーティング：ＰＢＳ中５μｇ／ｃｍ^2；９６ウェルプレート＝３２ｃｍ^2；６ｍｌ中１６０μｇ／プレート

－　ＰＢＳ、５０μｌ／ウェル

－　室温で４５分間インキュベートし、コーティング溶液を吸引する

－　９６ウェルプレート中の５０μｌの培養培地中に１．２５×１０４細胞／ウェルで播種する

－　３７℃において４０時間インキュベートする

－　プレートの上半分に加える：ＣＤ１９を発現するＮＩＨ３Ｔ３細胞

－　プレートの下半分に加える：トランスフェクトされていないＮＩＨ３Ｔ３細胞

【０３７８】

３日目：

－　５０μｌの培養培地中に陽性対照抗体又は試料（上清又はマウス血清）の添加

－　４℃において２時間インキュベートする

－　培地を除去し、１００μｌのグルタルジアルデヒド（ＰＢＳ中０．０５％）で細胞を固定する

－　２００μｌのＰＢＳで２回洗浄する

－　検出抗体１：２０００、５０μｌ／ウェルの添加

－　室温で２時間インキュベートする

－　２００μｌのＰＢＳで３回洗浄する

－　５０μｌのＴＭＢを添加し、室温で３０分間インキュベートする

－　２５μｌの１ＭのＨ２ＳＯ４を添加することにより停止する；４５０ｎｍ／６２０ｎ

ｍで吸光度を読み取る
－　結果の計算：ＯＤ　ＮＩＨ３Ｔ３　ＣＤ１９：ＯＤ　ＮＩＨ３Ｔ３（トランスフェクトされていない）の比
【０３７９】
選択された抗体は、トランスフェクトされていないＮＩＨ３Ｔ３細胞と比較して、ＣＤ１９トランスフェクトＮＩＨ３Ｔ３細胞への特異的結合を示した（国際公開第２０１１／１４７８３４号の実施例２を参照）。
【０３８０】
ｃ）抗ＣＤ１９抗体のヒト化
マウス抗体のＣＤ１９結合特異性をヒトアクセプターフレームワークに移し、人体が異物と認識する配列伸長から生じる可能性のある免疫原性の問題を排除した。これは、マウス（ドナー）抗体の相補性決定領域（ＣＤＲ）全体をヒト（アクセプター）抗体フレームワークに移植することによって行われ、ＣＤＲ移植又は抗体ヒト化と呼ばれている。
【０３８１】
マウスのアミノ酸配列を、ヒト生殖系列抗体Ｖ遺伝子のコレクションと整列させ、配列同一性及び相同性に従って分類した。一つの特定のアクセプター配列を選択する前に、ドナー抗体のいわゆるカノニカルループ構造を決定しなければならない（Morea, V.等, Methods, Vol 20, Issue 3 (2000) 267-279）。これらのカノニカルループ構造は、いわゆるカノニカル位置に存在する残基の種類によって決定される。これらの位置は、（部分的に）ＣＤＲ領域の外側にあり、親（ドナー）抗体のＣＤＲコンフォメーションを保持するために最終コンストラクトにおいて機能的に等価に保たれなければならない。ヒト生殖系列配列ＶＢＡＳＥ＿ＶＨ１＿１を重鎖のためのアクセプターとして選択し、配列ＶＢＡＳＥ＿ＶＫ２＿５を軽鎖のために選択した。
【０３８２】
野生型ヒト化抗ヒトＣＤ１９抗体８Ｂ８はＨＶＲ－Ｌ１：ＮＳＮＧＮＴ（配列番号：１２９）に３つの脱アミドホットスポットを有することが見出された。加えて、ＨＶＲ－Ｈ２において、更なる脱アミドホットスポットが存在することが見出された：ＫＦＮＧ（配列番号：１３０）。ＨＶＲ－Ｈ２の脱アミドホットスポットに対処するために、位置６４のＮ（Ａｓｎ）からＱ（Ｇｌｎ）への点変異（Ｋａｂａｔによる番号付け）が導入されている。軽鎖の脱アミドホットスポットに対処し、改善された脱アミド化安定性を有するヒト化抗ヒトＣＤ１９抗体を得るために、Ｓ（セリン）からＰ（プロリン）までの２７ｅ位での単一変異（Ｋａｂａｔによる番号付け）を導入した。従って、以下の表１６に示すＣＤＲを有するクローン８Ｂ８－０１８が生成された。
【０３８３】

表9:ヒト化野生型 CD19 抗体 8B8 との 8B8-018 の比較

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

【０３８４】
加えて、８Ｂ８－０１８は、次の表１０に示すように、カニクイザルＣＤ１９に対する交差反応性を維持する。

EC50 [μg/ml]	wt 8B8	8B8-018
huCD19 ECD	0.087	0.084
cyCD19 ECD	0.313	0.255

【０３８５】
１．３．２　ファージディスプレイキャンペーンのためのＣＤ１９抗原Ｆｃ融合体の調製、精製及び特徴付け
単量体状態のヒト及びカニクイザルＣＤ１９エクトドメイン（ヒトＣＤ１９は配列番号：６４参照）を発現させ精製するために、それぞれのＤＮＡ断片を「ノブ」変異を含むヒトＩｇＧ１　Ｆｃ遺伝子セグメントに融合させ（ヒト：配列番号：１３２；カニクイザル：配列番号：１３５）、「Ｆｃ－ホール」（配列番号：１３１）対応物でトランスフェクトした（Merchant等, 1998）。ＩｇＡ切断部位（ＰＴＰＰＴＰ）を抗原エクトドメインとＦｃノブ鎖との間に導入した。定方向のビオチン化のためのＡｖｉタグを抗原－Ｆｃノブ鎖のＣ末端に導入し、変異Ｈ４３５Ｒ及びＹ４３６Ｆを精製目的のためにＦｃホールに導入した（Jendeberg L.等, J. Immunological methods, 1997）。Ｓ３５４Ｃ／Ｔ３６６Ｗ変異（ヒト：配列番号：１３４；カニクイザル：配列番号：１３６）を含む抗原－Ｆｃノブ鎖と、Ｙ３４９Ｃ／Ｔ３６６Ｓ／Ｌ３６８Ａ／Ｙ４０７Ｖ変異（配列番号：１３３）を含むＦｃホール鎖との組み合わせは、ＣＤ１９エクトドメインの単一コピーを含むヘテロ二量体Ｆｃ融合断片の生成を可能にする（図３Ｃの４－１ＢＢコンストラクトと同様に）。表１３は、抗原Ｆｃ融合コンストラクトのｃＤＮＡ及びアミノ酸配列を列挙する。
【０３８６】

表１１：単量体ヒト及びカニクイザルCD１９抗原Fc（kih）融合分子のcDNA及びアミノ酸配列

配列番号:	抗原	配列
131	HYRF 変異を含む Fc ホール鎖のヌクレオチド配列	GACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCA GGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACC CTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGAC GTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCA GTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCA CCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAA CAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAA AGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCC GGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCA AAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG GGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACT CCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGA GCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG AGGCTCTGCACAACCGCTTCACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC CGGGTAAA
132	ヒト CD19 抗原 Fc ノブ 鎖 avi タグのヌクレオチド配列	CCCGAGGAACCCCTGGTCGTGAAGGTGGAAGAGGGCGACAATGC CGTGCTGCAGTGCCTGAAGGGCACCTCCGATGGCCCTACCCAGCA GCTGACCTGGTCCAGAGAGAGCCCCCTGAAGCCCTTCCTGAAGCT GTCTCTGGGCCTGCCTGGCCTGGGCATCCATATGAGGCCTCTGGC CATCTGGCTGTTCATCTTCAACGTGTCCCAGCAGATGGGCGGCTT CTACCTGTGTCAGCCTGGCCCCCCATCTGAGAAGGCTTGGCAGCC TGGCTGGACCGTGAACGTGGAAGGATCCGGCGAGCTGTTCCGGTG GAACGTGTCCGATCTGGGCGGCCTGGGATGCGGCCTGAAGAACA GATCTAGCGAGGGCCCCAGCAGCCCCAGCGGCAAACTGATGAGC CCCAAGCTGTACGTGTGGGCCAAGGACAGACCCGAGATCTGGGAG GGCGAGCCTCCTTGCCTGCCCCCTAGAGACAGCCTGAACCAGAGC CTGAGCCAGGACCTGACAATGGCCCCTGGCAGCACACTGTGGCTG AGCTGTGGCGTGCCACCCGACTCTGTGTCTAGAGGCCCTCTGAGC TGGACCCACGTGCACCCTAAGGGCCCTAAGAGCCTGCTGAGCCTG GAACTGAAGGACGACAGGCCCGCCAGAGATATGTGGGTCATGGAA ACCGGCCTGCTGCTGCCTAGAGCCACAGCCCAGGATGCCGGCAA GTACTACTGCCACAGAGGCAACCTGACCATGAGCTTCCACCTGGA AATCACCGCCAGACCCGTGCTGTGGCACTGGCTGCTGAGAACAGG CGGCTGGAAGGTCGACGCTAGCGGTGGTAGTCCGACACCTCCGA CACCCGGGGGTGGTTCTGCAGACAAAACTCACACATGCCCACCGT GCCCAGCACCTGAAGCCGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCC CCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGG TCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCA AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGA CAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA GCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGT ACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGAGCCCCCATCGAGA AAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGT ACACCCTGCCCCCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCA GCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCG TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCA CGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCA AGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCT

		CATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGA AGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATCCGGAGGCCTGAACGACA TCTTCGAGGCCCAGAAGATTGAATGGCACGAG
133	HYRF 変異を含む Fc ホール鎖	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQV SLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK
134	ヒト CD19 抗原 Fc ノブ 鎖 avi タグ	PEEPLVVKVEEGDNAVLQCLKGTSDGPTQQLTWSRESPLKPFLKLSLG LPGLGIHMRPLAIWLFIFNVSQQMGGFYLCQPGPPSEKAWQPGWTVNV EGSGELFRWNVSDLGGLGCGLKNRSSEGPSSPSGKLMSPKLYVWAKD RPEIWEGEPPCLPPRDSLNQSLSQDLTMAPGSTLWLSCGVPPDSVSR GPLSWTHVHPKGPKSLLSLELKDDRPARDMWVMETGLLLPRATAQDA GKYYCHRGNLTMSFHLEITARPVLWHWLLRTGGWKVDASGGSPTPPT PGGGSADKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRD ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGL NDIFEAQKIEWHE
135	カニクイザル CD19 抗原 Fc ノブ鎖 avi タグのヌクレオチド配列	CCCCAGGAACCCCTGGTCGTGAAGGTGGAAGAGGGCGACAATGC CGTGCTCCAGTGCCTGGAAGGCACCTCCGATGGCCCTACACAGCA GCTCGTGTGGTGCAGAGACAGCCCCTTCGAGCCCTTCCTGAACCT GTCTCTGGGCCTGCCTGGCATGGGCATCAGAATGGGCCCTCTGGG CATCTGGCTGCTGATCTTCAACGTGTCCAACCAGACCGGCGGCTT CTACCTGTGTCAGCCTGGCCTGCCAAGCGAGAAGGCTTGGCAGCC TGGATGGACCGTGTCCGTGGAAGGATCTGGCGAGCTGTTCCGGTG GAACGTGTCCGATCTGGGCGGCCTGGGATGCGGCCTGAAGAACA GAAGCAGCGAGGGCCCTAGCAGCCCCAGCGGCAAGCTGAATAGC AGCCAGCTGTACGTGTGGGCCAAGGACAGACCCGAGATGTGGGA GGGCGAGCCTGTGTGTGGCCCCCCTAGAGATAGCCTGAACCAGAG CCTGAGCCAGGACCTGACAATGGCCCCTGGCAGCACACTGTGGCT GAGCTGTGGCGTGCCACCCGACTCTGTGTCCAGAGGCCCTCTGAG CTGGACACACGTGCGGCCAAAGGGCCCTAAGAGCAGCCTGCTGA GCCTGGAACTGAAGGACGACCGGCCCGACCGGGATATGTGGGTG GTGGATACAGGCCTGCTGCTGACCAGAGCCACAGCCCAGGATGCC GGCAAGTACTACTGCCACAGAGGCAACTGGACCAAGAGCTTTTAC CTGGAAATCACCGCCAGACCCGCCCTGTGGCACTGGCTGCTGAGA ATCGGAGGCTGGAAGGTCGACGCTAGCGGTGGTAGTCCGACACCT CCGACACCCGGGGGTGGTTCTGCAGACAAAACTCACACATGCCCA CCGTGCCCAGCACCTGAAGCCGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCT CTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCC TGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGA GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGC CAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGT GGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAA GGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGAGCCCCCAT CGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACA GGTGTACACCCTGCCCCCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA GGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACAT CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACA AGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCT ACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC

		GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC ACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATCCGGAGGCCTG AACGACATCTTCGAGGCCCAGAAGATTGAATGGCACGAG
136	カニクイザル CD19 抗原 Fc ノブ鎖 avi タグ	PQEPLVVKVEEGDNAVLQCLEGTSDGPTQQLVWCRDSPFEPFLNLSL GLPGMGIRMGPLGIWLLIFNVSNQTGGFYLCQPGLPSEKAWQPGWTVS VEGSGELFRWNVSDLGGLGCGLKNRSSEGPSSPSGKLNSSQLYVWAK DRPEMWEGEPVCGPPRDSLNQSLSQDLTMAPGSTLWLSCGVPPDSV SRGPLSWTHVRPKGPKSSLLSLELKDDRPDRDMWVVDTGLLLTRATA QDAGKYYCHRGNWTKSFYLEITARPALWHWLLRIGGWKVDASGGSPT PPTPGGGSADKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPC RDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKS GGLNDIFEAQKIEWHE

【０３８７】
単量体抗原／Ｆｃ融合分子の産生のために、指数関数的に増殖する懸濁ＣＨＯ細胞を、標準的な方法を使用して融合タンパク質の二成分（ノブ及びホール鎖）をコードする二つのプラスミドで同時トランスフェクトした。

【０３８８】
分泌されたタンパク質を、プロテインＡを使用するアフィニティークロマトグラフィー、ついでサイズ排除クロマトグラフィーにより細胞培養上清から精製した。アフィニティークロマトグラフィーのために、上清を、リン酸ナトリウム（２０ｍＭ）、クエン酸ナトリウム（２０ｍＭ）、０．５Ｍの塩化ナトリウム緩衝液（ｐＨ７．５）で平衡化したＭａｂＳｅｌｅｃｔ Ｓｕｒｅカラム容量（ＣＶ）＝５～１５ｍＬ、ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ製の樹脂にロードした。未結合タンパク質を、少なくとも６カラム容量の同じ緩衝液で洗浄することによって除去した。線形勾配を使用して結合したタンパク質を溶出した；工程１、０～６０％溶出緩衝液（２０ｍＭのクエン酸ナトリウム、５００ｍＭの塩化ナトリウム緩衝液（ｐＨ２．５））から１０ＣＶ；工程２、６０～１００％溶出緩衝液から２ＣＶ。線形勾配のために、１００％溶出緩衝液を用いた更なる２カラム容積の段階溶出を適用した。

【０３８９】
収集した画分のｐＨを、１／４０（ｖ／ｖ）の２ＭのＴｒｉｓ（ｐＨ８．０）を加えることによって調節した。タンパク質を濃縮し、濾過し、２ｍＭのＭＯＰＳ、１５０ｍＭの塩化ナトリウム、０．０２％（ｗ／ｖ）のアジ化ナトリウム溶液（ｐＨ７．４）で平衡化したＨｉＬｏａｄ Ｓｕｐｅｒｄｅｘ ２００カラム（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）上にロードした。

【０３９０】
表１２は、単量体ヒト及びカニクイザルＣＤ１９抗原Ｆｃ（ｋｉｈ）融合タンパク質の収量及び最終単量体含有量をまとめたものである。

表12－単量体ヒト及びカニクイザルCD19抗原Fc(kih)融合タンパク質の生化学的分析

コンストラクト	単量体 [%] (SEC)	収量 [mg/l]
単量体ヒト CD19 Fc(kih)融合タンパク質	91	0.2
単量体カニクイザル CD19 Fc(kih)融合タンパク質	95	3.56

【０３９１】
精製された抗原の一部を、ＢｉｒＡビオチン－タンパク質リガーゼ標準反応キット（Ａｖｉｄｉｔｙ、カタログ番号ＢｉｒＡ５００）を使用して製造業者の説明書に従ってインビ

トロでビオチン化した。ビオチン化の程度はヒトＣＤ１９含有融合体について９４％、それぞれのカニクイザルＣＤ１９コンストラクトについては１００％であった。ついで、ビオチン化タンパク質を、脱アミドホットスポットＮ２７ｄ及びＮ２８を欠く親和性成熟８Ｂ８由来クローンの選択、スクリーニング及び特徴付けに使用した。ａ）位置２７ｄ及び２８のアスパラギン残基が両方とも除去され、ｂ）改善された親和性を有する８Ｂ８変異体を選択するために重鎖及び軽鎖の更なるＣＤＲが無作為化された、二つのファージディスプレイライブラリーが作製された。

【０３９２】

１．３．３　ＣＤＲ－Ｌ１ホットスポットを欠く８Ｂ８親和性成熟ライブラリーの作製

ＣＤＲ－Ｌ１に位置する脱アミド部位Ｎ２７ｄ及びＮ２８を持たない親和性成熟８Ｂ８由来抗体の作製は、標準的なプロトコール（Silacci等, 2005）を使用してファージディスプレイによって実施した。第一の工程では、ヒト化親クローン８Ｂ８のＶＬ及びＶＨ ＤＮＡ配列（配列番号：１３７及び配列番号：１３８）をファージミドにクローニングし、ついで無作為化のための鋳型として使用した。次の工程では、ファージディスプレイによる好ましいクローンの選択のための２つのライブラリーを作製した。上記のホットスポット位置を除去するために、位置２７ｄ及び２８のアミノ酸Ｓ Ｔ Ｑ Ｅのみを許容したＬＣＤＲ１無作為化プライマー（配列番号：１３９）を両方のライブラリーに使用した。成熟ライブラリー１は、軽鎖及び重鎖の両方のＣＤＲ１及び２において無作為化された一方、成熟ライブラリー２は、軽鎖のＣＤＲ１及び３並びに重鎖のＣＤＲ３において無作為化された。軽鎖及び重鎖の両方のＣＤＲ１及び２において無作為化された成熟ライブラリー１の作製のために、３つの断片を「重複伸長によるスプライシング」（ＳＯＥ）ＰＣＲによって構築し、ファージベクターにクローニングした。次のプライマーの組み合わせを使用して、ライブラリー断片を作製した：断片１（ＬＭＢ３（配列番号：１４４）及びＣＤ１９ Ｌ１リバースランダム（配列番号：１３９）、断片２（ＣＤ１９ Ｌ２フォワードランダム（配列番号：１４０）及びＣＤ１９ Ｈ１リバースランダム（配列番号：１４１）、及び断片３（ＣＤ１９ Ｈ２フォワードランダム（配列番号：１４２）及びＣＤ１９ Ｈ３リバースコンスタント（配列番号：１４３））（表１３）。十分な量の全長無作為化断片のアセンブリー後、それを同様に処理したアクセプターファージミドベクターと一緒にＮｃｏＩ／ＮｈｅＩで消化した。３倍モル過剰のライブラリーインサートを１０μｇのファージミドベクターとライゲートさせた。精製されたライゲーションを２０回の形質転換に使用し、２×１０ｅｘｐ９の形質転換体を得た。８Ｂ８親和性成熟ライブラリーを示すファージミド粒子を救出し、ＰＥＧ／ＮａＣｌ精製によって精製し、選択に使用した。

【０３９３】

軽鎖のＣＤＲ１及び３並びに重鎖のＣＤＲ３において無作為化された第二のライブラリーの作製も同様に行われた。次のプライマーの組み合わせを使用して、ライブラリー断片を作製した：断片１（ＬＭＢ３（配列番号：１４４）及びＣＤ１９ Ｌ１リバースランダム（配列番号：１３９））、断片２（ＣＤ１９ Ｌ１フォワードコンスタント（配列番号：１４５）及びＣＤ１９ Ｌ３リバースランダム（配列番号：１４６）、及び断片３（ＣＤ１９ Ｌ３フォワードコンスタント（配列番号：１４７）及びＣＤ１９ Ｈ３リバースランダム（配列番号：１４８）（表１４）。十分な量の全長無作為化断片のアセンブリー後、それを同様に処理したアクセプターファージミドベクターと一緒にＮｃｏＩ／ＫｐｎＩで消化した。３倍モル過剰のライブラリーインサートを２０ｕｇのファージミドベクターとライゲートさせた。精製されたライゲーションを４０回の形質転換に使用し、２×１０ｅｘｐ９の形質転換体を得た。８Ｂ８親和性成熟ライブラリーを示すファージミド粒子を救済し、ＰＥＧ／ＮａＣｌ精製によって精製し、選択に使用した。

【０３９４】

表13：8B8親和性成熟のためのプライマー及びホットスポット除去ライブラリーL1__L2／H1__H2

配列番号	名称	配列
139	CD19 L1 リバース ランダム	CAG CTG CGG GCT CTG ACC CGG TTT CTG GAG ATA CCA GTT CAG 1 CGT 2 GCC 3 GGA 4 TTC CAG AGA TTG GCT GGA TTT GCA AGA AAT G 1: 40% Y, 6% A/S/T/G/P/D/N/E/Q/V, 2: 40% N, 6% A/S/T/Y/G/P/D/E/Q/V, 3: 25% S/T/Q/E, 4: 25% S/T/Q/E
140	CD19 L2 フォワード ランダム	CTC CAG AAA CCG GGT CAG AGC CCG CAG CTG CTG ATC TAC 5 GTA TCT 6 CGC 7 8 GGC GTT 9 GAT CGT TTC AGC GGT TCT GGA TCC GGC ACC 5: 30% R, 20% E, 5% A/S/T/Y/G/P/D/N/Q/V. 6: 30% K, 20% S, 5% A/N/T/Y/G/P/D/E/Q/V, 7: 40% F, 5% A/S/T/Y/G/P/D/E/Q/V/I/L, 8: 40% S, 6.6% A/T/Y/G/P/D/E/Q/V, 9: 50% P, 50% L
141	CD19 H1 リバース ランダム	CAT CCA CTC CAG ACC CTG GCC CGG GGC CTG ACG AAC CCA 10 CAT 11 12 13 14 GAA 15 GTA ACC AGA TGC TTT GCA GCT CAC TTT AAC GGA AGC 10: 52% H, 4% G/A/S/P/T/N/Y/D/E/Q/V/I,11: 30% I, 15% Y, 5% G/A/S/T/P/N/H/D/E/Q/V,12: 52% Y, 4% G/A/S/P/T/N/H/D/E/Q/V/I,13: 30% D, 15% G, 5% A/S/P/Y/N/H/D/E/Q/V/I, 14: 52% T, 4% G/A/S/P/Y/N/H/D/E/Q/V/I, 15: 52% T, 4% G/A/S/P/Y/N/H/D/E/Q/V/I
142	CD19 H2 フォワード ランダム	CAG GCC CCG GGC CAG GGT CTG GAG TGG ATG GGC 16 ATT 17 CCA 18 19 20 21 TCC 22 TAT ACC 23 AAA TTC CAG GGC CGC GTC ACG ATG ACC 16: 45% Y, 5% A/S/P/T/N/H/D/E/Q/V/I, 17: 52% N, 4% G/A/S/P/Y/T/H/D/E/Q/V/I, 18: 40% Y, 5% G/A/S/P/T/N/H/D/E/Q/V/I, 19: 30% N, 15% S, 5% G/A/T/P/Y/H/D/E/Q/V/I, 20: 30% D, 15% G, 5% A/S/T/P/Y/N/H/E/Q/V/I, 21: 52% G, 4% N/A/S/P/Y/T/H/D/E/Q/V/I, 22: 30% K, 15% N, 4% G/A/S/P/Y/T/H/D/E/Q/V/I, 23: 30% E, 15% Q, 5% G/A/S/T/P/Y/N/H/D/V/I
143	CD19 H3 リバース コンスタント	CGTCACCGGTTCGGGGAAGTAGTCCTTGACCAG
144	LMB3	CAGGAAACAGCTATGACCATGATTAC

表１４：８Ｂ８親和性成熟のためのプライマー及びホットスポット除去ライブラリーＬ１__Ｌ３／Ｈ３

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

【０３９５】

１．３．４　ＣＤＲ－Ｌ１ホットスポットＮ２７ｄ及びＮ２８を欠いている親和性成熟８Ｂ８由来クローンの選択

ＣＤＲ－Ｌ１ホットスポットＮ２７ｄ及びＮ２８を欠く親和性成熟クローンの選択のために、ファージディスプレイによる二つの選択アプローチを実施した：

【０３９６】

第一のアプローチでは、両方のファージディスプレイライブラリーを使用して、ヒトＣＤ１９－Ｆｃ融合タンパク質において選択を実施した。パニングラウンドは、次のパターンに従って溶液中で実施した：１．約１０^{12}個のファージミド粒子を、３０ｎＭのビオチン化ＣＤ１９－Ｆｃタンパク質に１ｍｌの総体積において０．５時間で結合させ、２．ビオチン化ＣＤ１９－Ｆｃタンパク質及び特異的に結合したファージ粒子を、５．４×１０^{7}個のストレプトアビジン被覆磁気ビーズを１０分間加えることにより捕捉し、３．ビーズを、５×１ｍｌのＰＢＳ／Ｔｗｅｅｎ２０及び５×１ｍｌのＰＢＳを使用して洗浄し、４．ファージ粒子を、１ｍｌの１００ｍＭのＴＥＡを加えることにより１０分間溶出し、５００ｕｌの１ＭのＴｒｉｓ／ＨＣｌ（ｐＨ７．４）を加えることにより中和し、５．指

数関数的に増殖する大腸菌ＴＧ１細菌を再感染させ、６．ヘルパーファージＶＣＳＭ１３で感染させ、その後ファージミド粒子をＰＥＧ／ＮａＣｌ沈降させて次の選択ラウンドに使用する。減少する抗原濃度（３０×１０－９Ｍ、１０×１０－９Ｍ、及び３×１０－９Ｍ）を使用して３ラウンドにわたって選択を行った。ラウンド２及び３において、ストレプトアビジンビーズの代わりにニュートラアビジンプレートを使用して抗原：ファージ複合体の捕捉を実施した。ニュートラアビジンプレートを５×ＰＢＳ／Ｔｗｅｅｎ２０及び５×ＰＢＳにより洗浄した。ラウンド３では、ファージがプレートから溶出される前に、「オフ速度（off-rate）」選択のために、ニュートラアビジンプレートを２リットルのＰＢＳ中で一晩インキュベートした。更に、カニクイザルＣＤ１９－Ｆｃタンパク質を、交差反応性バインダーを濃縮するためにラウンド２において使用した。

【０３９７】

第二の選択アプローチでは、細胞表面上にヒト又はカニクイザルＣＤ１９ ＥＣＤの何れかを一過性に発現する細胞でファージパニングを実施した。ＨＥＫ細胞の一過性トランスフェクションのために、次のタンパク質セグメントについてＤＮＡ配列（５’→３’）を保有する発現プラスミドを作製した：Ｆｌａｇタグ、ＳＮＡＰタグ、ヒト又はカニクイザル何れか起源のＣＤ１９ ＥＣＤ、及び血小板由来増殖因子受容体（ＰＤＧＦＲ）の膜貫通領域（配列番号：１４９及び１５０）。細胞表面上のそれぞれのタンパク質（配列番号：１５１及び１５２）の発現は、検出のために抗Ｆｌａｇ抗体を使用するフローサイトメトリーによって確認した。両方のライブラリーを、ヒト又はカニクイザルＣＤ１９ ＥＣＤ含有タンパク質融合体の何れかを発現する細胞に最初の選択ラウンドで曝露した。その後のパニングラウンドでは、ＣＤ１９ ＥＣＤの種がそれに応じて交互にされた。無関係の膜タンパク質で一過性にトランスフェクトされた細胞を、前透明化に使用した。

【０３９８】

パニングラウンドは、次のパターンに従って実施した：

１．上記の標準的な手順に従って、ＣＤ１９ ＥＣＤ又は無関係の膜貫通タンパク質の何れかを発現するコンストラクトによるＨＥＫ細胞のトランスフェクション、

２．５％CO_2雰囲気を有するインキュベーター内で、３７℃において合計４８時間の細胞のインキュベーション、

３．遠心分離（２５０×ｇで３分間）による細胞の単離と、ＰＢＳ／５％ＢＳＡ中の１×１０Ｅ７ ＣＤ１９ ＥＣＤ陽性細胞及び１×１０Ｅ７陰性細胞のそれぞれの再懸濁、

４．穏やかに回転するチューブローテーターを使用してファージライブラリーを４℃において６０分間、１×１０７のＣＤ１９陰性細胞と共にインキュベートすることによる非特異的ファージの前透明化、

５．２５０×ｇで３分間の細胞の遠心分離、新鮮なチューブへの上清の移入、１×１０Ｅ７ ＣＤ１９陽性細胞の添加、及びチューブローテーター上での穏やかな回転による４℃における６０分間のインキュベーション、

６．２５０×ｇで１分間の遠心分離による細胞の洗浄、上清の吸引、及び１ｍｌのＰＢＳ中に再懸濁（８回）、

７．１ｍｌの１００ｍＭのＴＥＡを用いたファージ溶出、室温で５分間のインキュベーション、及び５００ｕｌの１ＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．６での溶出液の中和、

８．指数関数的に増殖する大腸菌ＴＧ１細菌の再感染、及び

９．ヘルパーファージＶＣＳＭ１３による感染とその後の選択ラウンドで使用されるファージミド粒子の続くＰＥＧ／ＮａＣｌ沈殿。選択は３ラウンドにわたって実施された。

【０３９９】

両方の選択アプローチについて、特異的バインダーを次のようにＥＬＩＳＡによって同定した：１ウェル当たり３０ｎＭのビオチン化ＣＤ１９－Ｆｃタンパク質１００ｕｌをニュートラアビジンプレートにコーティングした。Ｆａｂ含有細菌上清を添加し、抗Ｆｌａｇ／ＨＲＰ二次抗体を使用して、結合するＦａｂをそれらのＦｌａｇタグにより検出した。

【０４００】

組換えヒトＣＤ１９についてＥＬＩＳＡ陽性であったクローンを、ヒトＣＤ１９ ＥＣＤ含

有発現プラスミド（配列番号：１４９）で一過性にトランスフェクトした細胞を使用する細胞ベースＥＬＩＳＡで更に試験した。この分析は次のように実施した：トランスフェクションの４８時間後、ＨＥＫ細胞を収集し、２５０×ｇで５分間遠心分離した。ついで、細胞を氷冷ＰＢＳ ＢＳＡ２％に再懸濁し、４×１０^{6}細胞／ｍｌとし、氷上で２０分間インキュベートして、非特異的結合部位をブロックした。１００ｕｌ中４×１０^{5}細胞を９６ウェルプレートの各ウェルに分配し、２５０×ｇ及び４℃において３分間遠心分離した。上清を吸引除去し、可溶性Ｆａｂ断片を含む５０ｕｌの細菌上清を５０ｕｌの氷冷ＰＢＳ／ＢＳＡ２％で希釈し、プレートに添加し、細胞と混合し、４℃において１時間インキュベートした。その後、細胞を氷冷ＰＢＳにより３回洗浄した後、抗Ｆａｂ－ＨＲＰ抗体の１：２０００希釈物を含む、ウェル当たり１００ｕｌのＰＢＳ ＢＳＡ２％を添加した。１時間のインキュベーション時間の後、細胞を氷冷ＰＢＳで３回再び洗浄した。発色のために、１ウェル当たり１００ｕｌの「１－ｓｔｅｐ ｕｌｔｒａ ＴＭＢ－ＥＬＩＳＡ」基質を添加した。１０分間のインキュベーション時間の後、ウェル当たり４０ｕｌのH_2SO_4（１Ｍ）を含む新しい９６ウェルプレートに上清を移し、吸光度を４５０ｎＭで測定した。バックグラウンドを超えて有意なシグナルを示すクローンを、ＰｒｏｔｅＯｎ ＸＰＲ３６を使用するＳＰＲ分析による動態スクリーニング実験に供した。

【０４０１】

１．３．５ ＳＰＲによる親和性成熟８Ｂ８由来変異体の同定

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

【０４０２】

この実験のために、７０００ＲＵのポリクローナル抗ヒトＦａｂ抗体を、アミンカップリングによって、ＧＬＭチップの６つのチャネル全てに固定化した（酢酸ナトリウムｐＨ４．５、２５μｌ／分、２４０ｓ）（垂直配向）。各抗体含有細菌上清を濾過し、ＰＢＳで２倍に希釈し、次に垂直配向で１００～４００応答単位（ＲＵ）の固定化レベルを達成するように２５μｌ／分で３６０秒間注入した。単量体ＣＤ１９－Ｆｃの注入：ワンショットキネティックス（one-shot kinetics）測定のために、注入方向を水平配向に変更し、精製単量体ＣＤ１９－Ｆｃの３倍希釈シリーズ（１５０～６ｎＭで変わる濃度範囲）を、５０μｌ／分で別々のチャネル１－４に沿って１８０秒の結合時間及び３００秒の解離時間で同時に注入した。参照用に「インライン」ブランクを提供するための第６チャネルにおけるＰＢＳ注入と共に、親和性成熟ＣＤ１９変異体への特異的結合のための陰性対照として、チャネル５にヒトＩｇＧ Ｆｃ断片（１５０ｎＭ）を注入した。再生は、１０ｍＭのグリシンｐＨ１．５及び５０ｍＭのＮａＯＨの２つのパルスにより３０秒間９０ｕｌ／分（水平配向）で実施した。解離速度定数（ｋｏｆｆ）は、センサーグラムを同時にフィッティングすることにより、ＰｒｏｔｅＯｎ Ｍａｎａｇｅｒ ｖ３．１ソフトウェアにおいて単純な１対１ラングミュア結合モデルを使用して計算した。最も遅い解離速度定数を有するＦａｂを発現するクローンを同定した。対応するファージミドの可変ドメインを配列決定した。重要なことは、ＣＤＲ－Ｌ１中のアスパラギン残基（位置２７ｄ及び２８）の両方がセリン又はスレオニンにより置換され、両方の脱アミド化部位が除去されたことを示している。

【０４０３】

表15:細菌上清を用いたスクリーニング分析で得られた親8B8及び選択クローン2B11の解離定数

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

【０４０４】

表１６は、クローン８Ｂ８－０１８及び８Ｂ８－２Ｂ１１それぞれのＣＤＲ及び可変領域ＶＨ及びＶＬのアミノ酸配列を示す。

表16:クローン8B8－018及び8B8－2B11のCDRと可変領域VH及びVLの配列

配列番号:	説明	配列
29	CD19 (8B8-018) CDR-H1	DYIMH
30	CD19 (8B8-018) CDR-H2	YINPYNDGSKYTEKFQG
31	CD19 (8B8-018) CDR-H3	GTYYYGSALFDY
32	CD19 (8B8-018) CDR-L1	KSSQSLENPNGNTYLN
33	CD19 (8B8-018) CDR-L2	RVSKRFS
34	CD19 (8B8-018) CDR-L3	LQLTHVPYT
41	CD19 (8B8-018) VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQA PGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYM ELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGSALFDYWGQGTTVTVSS
42	CD19 (8B8-018) VL	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLENPNGNTYLNWY LQKPGQSPQLLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRV EAEDVGVYYCLQLTHVPYTFGQGTKLEIK
35	CD19 (8B8-2B11) CDR-H1	DYIMH
36	CD19 (8B8-2B11) CDR-H2	YINPYNDGSKYTEKFQG
37	CD19 (8B8-2B11) CDR-H3	GTYYYGPQLFDY
38	CD19 (8B8-2B11) CDR-L1	KSSQSLETSTGTTYLN
39	CD19 (8B8-2B11) CDR-L2	RVSKRFS
40	CD19 (8B8-2B11) CDR-L3	LQLLEDPYT
43	CD19 (8B8-2B11) VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQA PGQGLEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYM ELSRLRSDDTAVYYCARGTYYYGPQLFDYWGQGTTVTVSS
44	CD19 (8B8-2B11) VL	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLETSTGTTYLNWYL QKPGQSPQLLIYRVSKRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVE AEDVGVYYCLQLLEDPYTFGQGTKLEIK

【０４０５】

１．４　４－１ＢＢリガンドがＣ末端に融合した一価ＣＥＡ標的４－１ＢＢリガンド三量体含有Ｆｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子（コンストラクト５．１１及び５．１２）の調製（ノブ鎖上のＣＥＡ）

該分子は、抗ＦＡＰバインダーを抗ＣＥＡバインダーで置き換えたことを唯一の相違点として、一価のＦＡＰ標的コンストラクトについて実施例１．１に記載されたようにして調製した。

【０４０６】

がん胎児抗原（ＣＥＡ）、クローンＴ８４．６６－ＬＣＨＡに特異的なバインダーをコードする重鎖及び軽鎖ＤＮＡ配列の可変領域を、ノブの定常重鎖又はヒトＩｇＧ１の定常軽鎖の何れかとインフレームでサブクローニングした。ＣＥＡクローンの生成は実施例１．５に記載されている。

【０４０７】

国際特許出願公報の国際公開第２０１２／１３０８３１Ａ１号に記載された方法に従ってＦｃガンマ受容体への結合を抑止するためにＰｒｏ３２９Ｇｌｙ、Ｌｅｕ２３４Ａｌａ及びＬｅｕ２３５Ａｌａ変異をノブ及びホール重鎖の定常領域に導入した。

【０４０８】

全てのコンストラクトについて、Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001)に記載されているように、ノブ・イントゥ・ホールヘテロ二量体化技術を使用した。ＣＨ３ドメイン中にＹ３４９Ｃ／Ｔ３６６Ｓ／Ｌ３６８Ａ／Ｙ４０７Ｖ変異を含むｈｕＩｇＧ１ Ｆｃホール鎖、ＣＨ３ドメイン中にＳ３５４Ｃ／Ｔ３６６Ｗ変異を含む抗ＦＡＰ ｈｕＩｇＧ

１ノブ鎖及び抗ＦＡＰ軽鎖の組合せが、構築された三量体４－１ＢＢリガンドと一つのＣＥＡ結合Ｆａｂを含む、ヘテロ二量体の作製を可能にする（図２Ａ及び２Ｂ）。

【０４０９】

表１７は、一価ＣＥＡ（Ｔ８４．６６－ＬＣＨＡ）標的４－１ＢＢリガンド（７１－２４８）三量体含有Ｆｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子（コンストラクト５．１１）のｃＤＮＡ及びアミノ酸配列を示す。

表17：CEA（T84．66－LCHA）標的ヒト4－1BBリガンド三量体含有Fc（kih）融合分子コンストラクト5．11の配列

配列番号:	説明	配列
101	Fc ホール二量体 4-1BB リガンド (71-248) 鎖のヌクレオチド配列	表1参照
153	抗 CEA(T84.66-LCHA) Fc ノブ単量体 4-1BB (71-248) リガンドのヌクレオチド配列	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCC GGCAGCAGCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTTCAAC ATCAAGGACACCTACATGCACTGGGTGCGCCAGGCCCCTGGAC AGGGACTGGAATGGATGGGCAGAATCGACCCCGCCAACGGCA ACAGCAAATACGTGCCCAAGTTCCAGGGCAGAGTGACCATCAC CGCCGACACCAGCACCTCCACCGCCTACATGGAACTGAGCAG CCTGCGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCCCCTTC GGCTACTACGTGTCCGACTACGCCATGGCCTATTGGGGCCAGG GCACACTCGTGACCGTGTCCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCATC GGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGC ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAAC CGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCG TGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTC CCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCAC CCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACC AAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTC ACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGAC CGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCAT GATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTG AGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACG GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGC AGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCT GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTC TCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCA AAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC CCCCCTGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTG GTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAG TGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACC CCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACTCCA AACTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGT TCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACAC CCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCGGAGGCGGCGGAAG CGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCTGA TGATCCTGCCGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGAATGTTTGCC CAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGT CCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGG CGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGC CAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCGG AGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCC TGCATCTGCAGCCTCTGAGATCTGCTGCTGGCGCCGCTGCTCT GGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCAGCGAGGCCCG

50

		GAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCT GCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGG GCTAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTG GGCCTGTTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCTGCCGGGCTC
154	抗 CEA(T84.66-LCHA)軽鎖のヌクレオチド配列	GAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCTGCCACCCTGTCACTGTCTC CAGGCGAGAGAGCCACCCTGAGCTGTAGAGCCGGCGAGAGCG TGGACATCTTCGGCGTGGGATTTCTGCACTGGTATCAGCAGAA GCCCGGCCAGGCCCCCAGACTGCTGATCTACAGAGCCAGCAA CCGGGCCACAGGCATCCCCGCCAGATTTTCTGGCTCTGGCAGC GGCACCGACTTCACCCTGACAATCAGCAGCCTGGAACCCGAG GACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGACCAACGAGGACCCCT ACACCTTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGTACGGT GGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAG TTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTT CTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCC CTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACA GCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGA GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGT CACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAAC AGGGGAGAGTGT
104	Fc ホール二量体 4-1BB (71-248) リガンド鎖	表1参照
155	抗 CEA (T84.66-LCHA) Fc ノブ単量体 4-1-BB (71-248) リガンド	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTYMHWVRQAPGQG LEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDEL TKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGG GGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPL SWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAF GFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTP EIPAGL
156	抗 CEA(T84.66-LCHA)軽鎖	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAGESVDIFGVGFLHWYQQKPGQ APRLLIYRASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQ QTNEDPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【０４１０】

表１８は、一価ＣＥＡ（Ｔ８４．６６－ＬＣＨＡ）標的４－１ＢＢリガンド（７１－２４８）三量体含有Ｆｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子（コンストラクト５．１２）のｃＤＮＡ及びアミノ酸配列を示す。

表１８：CEA（T84．６６－LCHA）標的ヒト４－１BBリガンド三量体含有Fc（kih）融合分子コンストラクト
５．１２の配列

配列番号:	説明	配列
107	Fc ホール単量体 4-1BBL (71-248) 鎖のヌクレオチド配列	表２参照
157	抗 CEA(T84.66-LCHA) Fc ノブ二量体 4-1BB (71-248) リガンドのヌクレオチド配列	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCC GGCAGCAGCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTTCAAC ATCAAGGACACCTACATGCACTGGGTGCGCCAGGCCCCTGGAC AGGGACTGGAATGGATGGGCAGAATCGACCCCGCCAACGGCA ACAGCAAATACGTGCCCAAGTTCCAGGGCAGAGTGACCATCAC CGCCGACACCAGCACCTCCACCGCCTACATGGAACTGAGCAG CCTGCGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCCCCTTC GGCTACTACGTGTCCGACTACGCCATGGCCTATTGGGGCCAGG GCACACTCGTGACCGTGTCCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCATC GGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGC ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAAC CGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCG TGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTC CCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCAC CCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACC AAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTC ACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGAC CGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCAT GATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTG AGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACG GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGC AGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCT GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTC TCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCA AAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGC CCCCCTGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTG GTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAG TGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACC CCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACTCCA AACTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGT TCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACAC CCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAGAGAGGGCCCTGA GCTGAGCCCTGATGATCCTGCCGGACTGCTGGACCTGCGGCA GGGAATGTTTGCCCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGATC GATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCG TGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGA ACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAG CTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCT GTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGATCTGCTGCTG GCGCCGCTGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAG CAGCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTG

		CTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCACA CAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCG CTACAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGC AGGCCTGGGAGGCGGCGGATCTGGCGGCGGAGGATCTAGAGA AGGACCCGAGCTGTCCCCCGACGATCCCGCTGGGCTGCTGGA TCTGAGACAGGGCATGTTCGCTCAGCTGGTGGCTCAGAATGTG CTGCTGATTGACGGACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCAGGGC TGGCAGGGGTGTCCCTGACTGGGGGACTGTCCTACAAAGAAGA TACAAAAGAACTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGTACTATGTG TTTTTTCAGCTGGAACTGAGGCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGCT CAGGATCTGTGTCCCTGGCTCTGCATCTGCAGCCACTGCGCTC TGCAGCAGGGGCTGCAGCACTGGCCCTGACTGTGGACCTGCC CCCAGCTTCTTCCGAGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCCAA GGACGCCTGCTGCATCTGAGCGCCGGACAGCGCCTGGGAGTG CATCTGCATACTGAAGCCAGAGCCCGGCATGCTTGGCAGCTGA CTCAGGGGGCAACTGTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACACCTGA GATCCCAGCCGGGCTC
154	抗 CEA(T84.66-LCHA) 軽鎖のヌクレオチド配列	表17参照
109	Fc ホール単量体 4-1BB リガンド (71-248) 鎖	表2参照
158	抗 CEA(T84.66-LCHA) Fc ノブ二量体 4-1BB (71-248) リガンド	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTYMHWVRQAPGQG LEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDEL TKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGRE GPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAG VSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVS LALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLS AGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLGGGG SGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSW YSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVA GEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGF QGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEI PAGL
156	抗 CEA(T84.66-LCHA) 軽鎖	表17参照

【０４１１】

１．５　抗ＣＥＡクローンＴ８４．６６－ＬＣＨＡの作製

１．５．１　抗ＣＥＡクローンＴ８４．６６のヒト化

ヒト生殖系列フレームワークアクセプター配列上へのＣＤＲの移植によって、マウス抗体Ｔ８４．６６（Wagener等, Ｊ Immunol 130, 2308 (1983), Neumaier等, Ｊ Immunol 135, 3604 (1985)）の新規なヒト化変異体を開発した。

【０４１２】

非ヒト由来の抗体のヒト化は、本質的に、非ヒト抗体（ドナー）由来のＣＤＲ残基をヒト（アクセプター）抗体のフレームワーク上に移植することからなる。通常、アクセプター

フレームワークは、ドナーの配列を潜在的なアクセプター配列の集合に整列させ、ドナーと妥当な相同性を有するか又は構造及び活性に重要な幾つかの位置に類似のアミノ酸を示すものを選択することによって選択される。本件の場合、抗体アクセプターフレームワークの探索は、マウスＴ８４．６６タンパク質（ＮＣＢＩ受託番号：重鎖についてＣＡＡ３６９８０（配列番号：１５９）及び軽鎖についてＣＡＡ３６９７９（配列番号：１６０））配列をヒト生殖系列配列の集合に整列させ、高い配列同一性を示したヒト配列を取り上げることにより実施した。ここでは、ＩＭＧＴデータベースからの配列ＩＧＨＶ１－６９＊０８を、重鎖フレームワークアクセプター配列（ＩＭＧＴ受託番号Ｚ１４３０９、配列番号：１６１）として選択し、ＩＧＫＶ３－１１＊０１配列（ＩＭＧＴ受託番号Ｘ０１６６８、配列番号：１６２）を軽鎖のフレームワークアクセプターとして選択した。これらの２つのアクセプターフレームワーク上に、マウス重鎖及び軽鎖可変ドメインの３つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を移植した。フレームワーク４（ＦＲ４）領域は生殖系列Ｖ遺伝子の可変領域の一部ではないので、その位置のアラインメントは個々に行った。ＪＨ４配列を重鎖について選択し、ＪＫ２配列を軽鎖について選択した。

【０４１３】

１１．１．２ 細胞へのＴ８４．６６ ＩｇＧの異なるヒト化変異体の結合

Ｔ８４．６６ ＩｇＧの異なるヒト化変異体の結合を、ＣＥＡ発現ヒト胃腺癌細胞（ＭＫＮ４５、ＤＳＭＺ ＡＣＣ４０９）で試験した。

【０４１４】

細胞を採取し、カウントし、生存率を確認し、ＦＡＣＳ緩衝液（１００μｌのＰＢＳ ０．１％のＢＳＡ）中に２×１０^{6}細胞／ｍｌで再懸濁させた。ＣＥＡ ＩｇＧの濃度を増加させながら（４ｎｇ／ｍｌ～６０μｇ／ｍｌ）、丸底９６ウェルプレート中で１００μｌの細胞懸濁液（０．２×１０^{6}細胞を含む）を４℃において３０分間インキュベートし、冷ＰＢＳ０．１％ＢＳＡで２回洗浄し、ＰＥコンジュゲートＡｆｆｉｎｉＰｕｒｅ Ｆ（ａｂ’）２断片ヤギ抗ヒトＩｇＧ Ｆｃｇ断片特異的二次抗体（Ｊａｃｋｓｏｎ Ｉｍｍｕｎｏ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｌａｂ ＰＥ＃１０９－１１６－１７０）と共に４℃において更に３０分間、再インキュベートし、冷ＰＢＳ０．１％ＢＳＡで２回洗浄し、ＦＡＣＳ ＣａｎｔｏＩＩ（Ｓｏｆｔｗａｒｅ ＦＡＣＳ Ｄｉｖａ）を使用してＦＡＣＳにより直ちに分析した。結合曲線及びＥＣ５０値は、ＧｒａｐｈＰａｄＰｒｉｓｍ５を使用して得て、計算した。

【０４１５】

表１９は、ＭＫＮ４５細胞上に発現された、ヒトＣＥＡに対するＴ８４．６６ ＩｇＧの選択されたヒト化変異体の異なる結合データを示す。計算されたＥＣ５０結合値に基づいて、更なる評価のためにヒト化変異体１を選択した。

表19:T84. 66 IgGの異なったヒト化変異体の細胞への結合

	EC50 (μg/ml)
親キメラ T84.66	0.99
ヒト化変異体 1	1.5
ヒト化変異体 2	8.6
ヒト化変異体 3	1.4
ヒト化変異体 4	3.1

【０４１６】

ヒト化変異体１は、次ではＴ８４．６６－ＬＣＨＡと称される。そのＣＤＲとＶＨ及びＶＬのアミノ酸配列並びに親キメラＴ８４．６６クローンのＶＨ及びＶＬドメインのアミノ酸配列を表２０に示す。

表20：CEAクローンT84．66－LCHA及びその親抗体T84．66の可変ドメインのアミノ酸配列

説明	配列	配列番号:
CEA CDR-H1	DTYMH	45
CEA CDR-H2	RIDPANGNSKYVPKFQG	46
CEA CDR-H3	FGYYVSDYAMAY	47
CEA CDR-L1	RAGESVDIFGVGFLH	48
CEA CDR-L2	RASNRAT	49
CEA CDR-L3	QQTNEDPYT	50
親 CEA バインダー VH	EVQLQQSGAELVEPGASVKLSCTASGFNIKDTYMHWVKQRPEQGLEWI GRIDPANGNSKYVPKFQGKATITADTSSNTAYLQLTSLTSEDTAVYYCA PFGYYVSDYAMAYWGQGTSVTVSS	163
親 CEA バインダー VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATMSCRAGESVDIFGVGFLHWYQQKPGQPP KLLIYRASNLESGIPVRFSGTGSRTDFTLIIDPVEADDVATYYCQQTNEDP YTFGGGTKLEIK	164
ヒト化 CEA バインダーCEA (T84.66-LCHA) VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTYMHWVRQAPGQGLEW MGRIDPANGNSKYVPKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC APFGYYVSDYAMAYWGQGTLVTVSS	51
ヒト化 CEA バインダー CEA (T84.66-LCHA) VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAGESVDIFGVGFLHWYQQKPGQAPR LLIYRASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQTNEDP YTFGQGTKLEIK	52

【０４１７】

１．６　４－１ＢＢリガンドがＣ末端に融合した一価の非標的４－１ＢＢリガンド三量体含有Ｆｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子（対照Ｈ及びＩ）の調製（ノブ鎖上のＤＰ４７）

該分子は、抗ＦＡＰバインダー（ＶＨ－ＶＬ）を抗原に結合しないＤＰ４７と呼ばれる生殖系列対照で置き換えたことを唯一の相違点として、一価のＦＡＰ標的コンストラクトについて実施例１．１に記載されたようにして調製した。

【０４１８】

表２１は、一価の非標的４－１ＢＢリガンド（７１－２４８）三量体含有Ｆｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子（対照Ｈ）のｃＤＮＡ及びアミノ酸配列を示す。

表21： 一価DP47非標的ヒト4－1BBリガンド三量体含有Fc(kih)融合分子対照Hの配列

配列番号:	説明	配列
101	Fc ホール二量体 4-1BB リガンド (71-248) 鎖のヌクレオチド配列	表1参照
165	DP47 Fc ノブ単量体 4-1BB (71-248) リガンドのヌクレオチド配列	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTG GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTT TAGCAGTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAG GGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCA CATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAG AGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTG AGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGGCAGCG GATTTGACTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAG T GCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCT CCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGG TCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTC AGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCT ACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTG CCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGA ATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCC CAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCA CCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAA AACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAC ATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAG TTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGA CAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGG TCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAA GGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCC CATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAA CCACAGGTGTACACCCTGCCCCCCTGCAGAGATGAGCTGACCA AGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCC CAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGA GAACAACTACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGG CAGCTTCTTCCTGTACTCCAAACTGACCGTGGACAAGAGCCGG TGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAG GCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCC CCGGCGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGG GCCCTGAGCTGAGCCCTGATGATCCTGCCGGACTGCTGGACCT GCGGCAGGGAATGTTTGCCCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCT GCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTG GCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGAC ACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGT TCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATC TGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGATCT GCTGCTGGCGCCGCTGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTC CTGCCAGCAGCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGG CAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCA

		TCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGAC ACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGACCCCCGA GATTCCTGCCGGGCTC
166	DP47 軽鎖のヌクレオチド 配列	GAAATCGTGTTAACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTC CAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCTTGCAGGGCCAGTCAGAGTGT TAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAG GCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGAGCATCCAGCAGGGCCACTG GCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCCGGGACAGACTT CACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTG TATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCGCTGACGTTCGGCC AGGGGACCAAAGTGGAAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATC TGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGA ACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAG AGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGG TAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGC ACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACT ACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGG CCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
104	Fc ホール二量体 4-1BB (71-248) リガンド鎖	表1参照
167	DP47 Fc ノブ単量体 4-1-BB (71-248) リガンド	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKG LEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAKGSGFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVS LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGG GSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDP GLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGS GSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRL LHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
168	DP47 軽鎖	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAP RLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQY GSSPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【０４１９】

表２２は、一価の非標的４－１ＢＢリガンド（７１－２４８）三量体含有Ｆｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子（対照Ｉ）のｃＤＮＡ及びアミノ酸配列を示す。

表22：一価DP47非標的ヒト4－1BBリガンド三量体含有Fc(kih)融合分子対照Iの配列

配列番号:	説明	配列
107	Fc ホール単量体 4-1BBL (71-248) 鎖のヌクレオチド 配列	表2参照
169	DP47 Fc ノブ二量体 4-1BBL (71-248)のヌクレオチド配列	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTG GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTT TAGCAGTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAG GGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCA CATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAG AGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTG AGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGGCAGCG GATTTGACTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAG TGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCC TCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTG GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACT CAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCC TACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGT GCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG AATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGC CCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGC ACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCA AAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCA CATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAA GTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTG GTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCA AGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCC CATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAA CCACAGGTGTACACCCTGCCCCCCTGCAGAGATGAGCTGACCA AGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCC CAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGA GAACAACTACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGG CAGCTTCTTCCTGTACTCCAAACTGACCGTGGACAAGAGCCGG TGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAG GCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCC CCGGCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCTGATGATCCTGCCG GACTGCTGGACCTGCGGCAGGGAATGTTTGCCCAGCTGGTGGC CCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGC GATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCT ACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCG TGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGC CGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAG CCTCTGAGATCTGCTGCTGGCGCCGCTGCTCTGGCACTGACAG TGGATCTGCCTCCTGCCAGCAGCGAGGCCCGGAATAGCGCATT TGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGG CTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCC

		TGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAGAG TGACCCCCGAGATTCCAGCAGGCCTGGGAGGCGGCGGATCTG GCGGCGGAGGATCTAGAGAAGGACCCGAGCTGTCCCCCGACG ATCCCGCTGGGCTGCTGGATCTGAGACAGGGCATGTTCGCTCA GCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGCTGATTGACGGACCTCTGAGC TGGTACTCCGACCCAGGGCTGGCAGGGGTGTCCCTGACTGGG GGACTGTCCTACAAAGAAGATACAAAAGAACTGGTGGTGGCTA AAGCTGGGGTGTACTATGTGTTTTTTCAGCTGGAACTGAGGCG GGTGGTGGCTGGGGAGGGCTCAGGATCTGTGTCCCTGGCTCTG CATCTGCAGCCACTGCGCTCTGCAGCAGGGGCTGCAGCACTG GCCCTGACTGTGGACCTGCCCCCAGCTTCTTCCGAGGCCAGAA ACAGCGCCTTCGGGTTCCAAGGACGCCTGCTGCATCTGAGCGC CGGACAGCGCCTGGGAGTGCATCTGCATACTGAAGCCAGAGC CCGGCATGCTTGGCAGCTGACTCAGGGGGCAACTGTGCTGGG ACTGTTTCGCGTGACACCTGAGATCCCAGCCGGGCTC
166	DP47 軽鎖のヌクレオチド配列	表２１参照
109	Fc ホール単量体 4-1BB リガンド (71-248) 鎖	表２参照
170	DP47 Fc ノブ二量体 4-1BBL (71-248)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKG LEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAKGSGFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVS LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGREGPELSP DDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGG LSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQP LRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGV HLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLGGGGSGGGGSR EGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLA GVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSV SLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLS AGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
168	DP47 軽鎖	表２１参照

【０４２０】

１．７　４－１ＢＢリガンドがＣ末端に融合した一価ＦＡＰ標的４－１ＢＢリガンド三量体含有Ｆｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子（コンストラクト１．１３、２．１３、１．１４及び２．１４）の調製（ホール鎖上のＦＡＰ）

（Ｇ４Ｓ）２リンカーによって分離された４－１ＢＢリガンドの二つのエクトドメインを含むポリペプチドを、図１ａ：ヒトＩｇＧ１　Ｆｃ、（Ｇ４Ｓ）２コネクター、ヒト４－１ＢＢリガンドに示されるように、ヒトＩｇＧ１　Ｆｃホール又はノブ鎖のＣ末端にインフレームでサブクローニングした（Merchant, Zhu 1998）。４－１ＢＢリガンドの一つのエクトドメインを含むポリペプチドを、図１Ｂ：ヒトＩｇＧ１　Ｆｃ、（Ｇ４Ｓ）２コネクタ

ー、ヒト４－１ＢＢリガンドに記載されているように、ヒトＩｇＧ１ Ｆｃノブ又はホール鎖のＣ末端にインフレームでサブクローニングした。

【０４２１】

線維芽細胞活性化タンパク質（ＦＡＰ）、クローン４Ｂ９又はクローン２８Ｈ１に特異的なバインダーをコードする重鎖及び軽鎖ＤＮＡ配列の可変領域を、ホールの定常重鎖又はヒトＩｇＧ１の定常軽鎖の何れかとインフレームでサブクローニングした。ＦＡＰバインダーの生成及び調製は、出典明示によりここに援用される国際公開第２０１２／０２０００６Ａ２号に記載されている。

【０４２２】

国際特許出願公報の国際公開第２０１２／１３０８３１Ａ１号に記載された方法に従ってＦｃガンマ受容体への結合を抑止するためにＰｒｏ３２９Ｇｌｙ、Ｌｅｕ２３４Ａｌａ及びＬｅｕ２３５Ａｌａ変異をノブ及びホール重鎖の定常領域に導入した。

【０４２３】

全てのコンストラクトについて、Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001)に記載されているように、ノブ・イントゥ・ホールヘテロ二量体化技術を使用した。ＣＨ３ドメイン中にＹ３４９Ｃ／Ｔ３６６Ｓ／Ｌ３６８Ａ／Ｙ４０７Ｖ変異を含むｈｕＩｇＧ１ Ｆｃホール鎖、ＣＨ３ドメイン中にＳ３５４Ｃ／Ｔ３６６Ｗ変異を含む抗ＦＡＰ ｈｕＩｇＧ１ノブ鎖及び抗ＦＡＰ軽鎖の組合せが、構築された三量体４－１ＢＢリガンドと一つのＦＡＰ結合Ｆａｂを含む、ヘテロ二量体の作製を可能にする（図２Ｃ及び２Ｄ）。

【０４２４】

表２３は、一価ＦＡＰ（４Ｂ９）標的４－１ＢＢリガンド（７１－２４８）三量体含有Ｆｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子（コンストラクト２．１３）のｃＤＮＡ及びアミノ酸配列を示す。

【０４２５】

表23：FAP（4B9）標的ヒト4－1BBリガンド三量体含有Fc（kih）融合分子コンストラクト2．13の配列

配列番号:	説明	配列
171	抗 FAP(4B9) Fc ホール二量体 4-1BB リガンド (71-248) 鎖のヌクレオチド 配列	GAGGTGCAGCTGCTCGAAAGCGGCGGAGGACTGGTGCAGCCT GGCGGCAGCCTGAGACTGTCTTGCGCCGCCAGCGGCTTCACC TTCAGCAGCTACGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCCCCTGGC AAGGGACTGGAATGGGTGTCCGCCATCATCGGCTCTGGCGCCA GCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAG CCGGGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGC CTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGGGA TGGTTCGGCGGCTTCAACTACTGGGGACAGGGCACCCTGGTCA CAGTGTCCAGCGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCT GGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCTCT GGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTG TCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCC CCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGT GGTCACCGTGCCTTCTAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATC TGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA AGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCACACATGCCCACC GTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTC TTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCC CTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGG CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC TCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCA GCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGA TGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAA GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG GGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGG ACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGA CAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCT CCCTGTCTCCGGGTGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGAT CCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCTGATGATCCTGCCGGAC TGCTGGACCTGCGGCAGGGAATGTTTGCCCAGCTGGTGGCCCA GAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGAT CCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACA AAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGT ACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGG CGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCT CTGAGATCTGCTGCTGGCGCCGCTGCTCTGGCACTGACAGTGG ATCTGCCTCCTGCCAGCAGCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGG GTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTG GGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGG CAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGA CCCCCGAGATTCCAGCAGGCCTGGGAGGCGGCGGATCTGGCG GCGGAGGATCTAGAGAAGGACCCGAGCTGTCCCCCGACGATC CCGCTGGGCTGCTGGATCTGAGACAGGGCATGTTCGCTCAGCT GGTGGCTCAGAATGTGCTGCTGATTGACGGACCTCTGAGCTGG TACTCCGACCCAGGGCTGGCAGGGGTGTCCCTGACTGGGGGA

		CTGTCCTACAAAGAAGATACAAAAGAACTGGTGGTGGCTAAAG CTGGGGTGTACTATGTGTTTTTTCAGCTGGAACTGAGGCGGGT GGTGGCTGGGGAGGGCTCAGGATCTGTGTCCCTGGCTCTGCAT CTGCAGCCACTGCGCTCTGCAGCAGGGGCTGCAGCACTGGCC CTGACTGTGGACCTGCCCCCAGCTTCTTCCGAGGCCAGAAACA GCGCCTTCGGGTTCCAAGGACGCCTGCTGCATCTGAGCGCCG GACAGCGCCTGGGAGTGCATCTGCATACTGAAGCCAGAGCCC GGCATGCTTGGCAGCTGACTCAGGGGGCAACTGTGCTGGGACT GTTTCGCGTGACACCTGAGATCCCAGCCGGGCTC
172	Fc ノブ単量体 4-1BB (71-248) リガンドのヌクレオチド配列	GACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTG CAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGA CACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTG GTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGC GGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCT CACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG TGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAA CCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTA CACCCTGCCCCCCTGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGT GTCCCTGTGGTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCCCAGCGATATC GCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAACTAC AAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCC TGTACTCCAAACTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGG GCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAA CCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCGGAGG CGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCCCTGAGCT GAGCCCTGATGATCCTGCCGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGG AATGTTTGCCCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGAT GGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGT CACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACT GGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTG GAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGT CTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGATCTGCTGCTGGCGC CGCTGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCAGC GAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGC ACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACAGA GGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTAC AGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCTGCCGGG CTC
103	抗 FAP(4B9) 軽鎖	表1参照
173	抗 FAP(4B9) Fc ホール二量体 4-1BB (71-248) リガンド鎖のヌクレオチド 配列	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKG LEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVS LSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGG GSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDP

		GLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGS GSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRL LHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL GGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLID GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLEL RRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARN SAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFR VTPEIPAGL
174	Fc ノブ単量体 41-BBL (71-248)	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRD ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG GGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLID GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLEL RRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARN SAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFR VTPEIPAGL
106	抗 FAP(4B9) 軽鎖	表1参照

【０４２６】

表２４は、一価ＦＡＰ（４Ｂ９）標的４－１ＢＢリガンド（７１－２４８）三量体含有Ｆｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子（コンストラクト２．１４）のｃＤＮＡ及びアミノ酸配列を示す。

【０４２７】

表24：FAP（4B9）標的ヒト4－1BBリガンド三量体含有Fc（kih）融合分子コンストラクト2．14の配列

配列番号:	説明	配列
175	抗 FAP(4B9) Fc ホール単量体 4-1BBL (71-248) 鎖のヌクレオチド 配列	GAGGTGCAGCTGCTCGAAAGCGGCGGAGGACTGGTGCAGCCT GGCGGCAGCCTGAGACTGTCTTGCGCCGCCAGCGGCTTCACC TTCAGCAGCTACGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCCCCTGGC AAGGGACTGGAATGGGTGTCCGCCATCATCGGCTCTGGCGCCA GCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAG CCGGGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGC CTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGGGA TGGTTCGGCGGCTTCAACTACTGGGGACAGGGCACCCTGGTCA CAGTGTCCAGCGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCT GGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCTCT GGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTG TCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCC CCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGT GGTCACCGTGCCTTCTAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATC TGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA AGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCACACATGCCCACC GTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTC TTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCC CTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGG CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC TCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCA GCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGA TGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAA GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG GGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGG ACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGA CAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCT CCCTGTCTCCGGGTGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGAT CCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCTGATGATCCTGCCGGAC TGCTGGACCTGCGGCAGGGAATGTTTGCCCAGCTGGTGGCCCA GAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGAT CCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACA AAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGT ACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGG CGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCT CTGAGATCTGCTGCTGGCGCCGCTGCTCTGGCACTGACAGTGG ATCTGCCTCCTGCCAGCAGCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGG GTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTG GGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGG CAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGA CCCCCGAGATTCCTGCCGGGCTC
176	Fc ノブ二量体 4-1BB リガンド (71-248)のヌクレオチド	GACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTG CAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGA CACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTG GTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT

	配列	ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGC GGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCT CACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAG TGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAA CCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTA CACCCTGCCCCCCCTGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCAGGT GTCCCTGTGGTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCCCAGCGATATC GCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAACTAC AAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCC TGTACTCCAAACTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGG GCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAA CCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCGGAGG CGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCCCTGAGCT GAGCCCTGATGATCCTGCCGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGG AATGTTTGCCCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGAT GGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGT CACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACT GGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTG GAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGT CTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGATCTGCTGCTGGCGC CGCTGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCAGC GAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGC ACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACAGA GGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTAC AGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCAGGC CTGGGAGGCGGCGGATCTGGCGGCGGAGGATCTAGAGAAGGA CCCGAGCTGTCCCCCGACGATCCCGCTGGGCTGCTGGATCTG AGACAGGGCATGTTCGCTCAGCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGC TGATTGACGGACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCAGGGCTGGC AGGGGTGTCCCTGACTGGGGGACTGTCCTACAAAGAAGATACA AAAGAACTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGTACTATGTGTTTT TTCAGCTGGAACTGAGGCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGCTCAG GATCTGTGTCCCTGGCTCTGCATCTGCAGCCACTGCGCTCTGC AGCAGGGGCTGCAGCACTGGCCCTGACTGTGGACCTGCCCCC AGCTTCTTCCGAGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCCAAGGA CGCCTGCTGCATCTGAGCGCCGGACAGCGCCTGGGAGTGCAT CTGCATACTGAAGCCAGAGCCCGGCATGCTTGGCAGCTGACTC AGGGGGCAACTGTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACACCTGAGAT CCCAGCCGGGCTC
103	抗 FAP(4B9) 軽鎖のヌクレオチド配列	表1参照
177	抗 FAP(4B9) Fc ホール単量体 4-1BB リガンド (71-248) 鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKG LEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVS LSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKL

		TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGG GSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDP GLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGS GSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRL LHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
178	Fc ノブ二量体 4-1BB リガンド (71-248)	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRD ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG GGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLID GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLEL RRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARN SAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFR VTPEIPAGLGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLV AQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYY VFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPP ASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQG ATVLGLFRVTPEIPAGL
106	抗 FAP(4B9) 軽鎖	表1参照

【０４２８】

表２５は、一価ＦＡＰ（２８Ｈ１）標的４－１ＢＢリガンド三量体含有Ｆｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子（コンストラクト１．１３）のｃＤＮＡ及びアミノ酸配列を示す。

【０４２９】

表25：FAP（28H1）標的ヒト4－1BBリガンド三量体含有Fc（kih）融合分子コンストラクト1．13の配列

配列番号:	説明	配列
179	抗 FAP(28H1) Fc ホール二量体 4-1BB リガンド (71-248) 鎖のヌクレオチド配列	GAAGTGCAGCTGCTGGAATCCGGCGGAGGCCTGGTGCAGCCT GGCGGATCTCTGAGACTGTCCTGCGCCGCCTCCGGCTTCACCT TCTCCTCCCACGCCATGTCCTGGGTCCGACAGGCTCCTGGCAA AGGCCTGGAATGGGTGTCCGCCATCTGGGCCTCCGGCGAGCA GTACTACGCCGACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGG GACAACTCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGC GGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAAGGGCTGGC TGGGCAACTTCGACTACTGGGGACAGGGCACCCTGGTCACCGT GTCCAGCGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGC CCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCTCTGGG CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCC TGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCC GCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGG TCACCGTGCCTTCTAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTG CAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAA GGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCACACATGCCCACC GTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTC TTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCC CTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGG CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC TCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCA GCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGA TGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAA GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG GGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGG ACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGA CAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCT CCCTGTCTCCGGGTGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGAT CCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCTGATGATCCTGCCGGAC TGCTGGACCTGCGGCAGGGAATGTTTGCCCAGCTGGTGGCCCA GAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGAT CCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACA AAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGT ACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGG CGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCT CTGAGATCTGCTGCTGGCGCCGCTGCTCTGGCACTGACAGTGG ATCTGCCTCCTGCCAGCAGCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGG GTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTG GGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGG CAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGA CCCCCGAGATTCCAGCAGGCCTGGGAGGCGGCGGATCTGGCG GCGGAGGATCTAGAGAAGGACCCGAGCTGTCCCCCGACGATC CCGCTGGGCTGCTGGATCTGAGACAGGGCATGTTCGCTCAGCT GGTGGCTCAGAATGTGCTGCTGATTGACGGACCTCTGAGCTGG TACTCCGACCCAGGGCTGGCAGGGGTGTCCCTGACTGGGGGA

		CTGTCCTACAAAGAAGATACAAAAGAACTGGTGGTGGCTAAAG CTGGGGTGTACTATGTGTTTTTTCAGCTGGAACTGAGGCGGGT GGTGGCTGGGGAGGGCTCAGGATCTGTGTCCCTGGCTCTGCAT CTGCAGCCACTGCGCTCTGCAGCAGGGGCTGCAGCACTGGCC CTGACTGTGGACCTGCCCCCAGCTTCTTCCGAGGCCAGAAACA GCGCCTTCGGGTTCCAAGGACGCCTGCTGCATCTGAGCGCCG GACAGCGCCTGGGAGTGCATCTGCATACTGAAGCCAGAGCCC GGCATGCTTGGCAGCTGACTCAGGGGGCAACTGTGCTGGGACT GTTTCGCGTGACACCTGAGATCCCAGCCGGGCTC
172	Fc ノブ単量体 4-1BB リガンド (71-248) のヌクレオチド配列	表23参照
112	抗 FAP(28H1) 軽鎖のヌクレオチド配列	表3参照
180	抗 FAP(28H1) Fc ホール二量体 4-1BB リガンド (71-248) 鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQAPGKG LEWVSAIWASGEQYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAKGWLGNFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVS LSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGG GSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDP GLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGS GSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRL LHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL GGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLID GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLEL RRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARN SAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFR VTPEIPAGL
174	Fc ノブ単量体 4-1BB リガンド (71-248)	表23参照
114	抗 FAP(28H1) 軽鎖	表3参照

【０４３０】

表２６は、一価ＦＡＰ（２８Ｈ１）標的４－１ＢＢリガンド三量体含有Ｆｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子（コンストラクト１．１４）のｃＤＮＡ及びアミノ酸配列を示す。

【０４３１】

表26：FAP（28H1）標的ヒト4－1BBリガンド三量体含有Fc（kih）融合分子コンストラクト1．14の配列

配列番号:	説明	配列
181	抗 FAP(28H1) Fc ホール単量体 4-1BB リガンド (71-248) 鎖のヌクレオチド配列	GAAGTGCAGCTGCTGGAATCCGGCGGAGGCCTGGTGCAGCCT GGCGGATCTCTGAGACTGTCCTGCGCCGCCTCCGGCTTCACCT TCTCCTCCCACGCCATGTCCTGGGTCCGACAGGCTCCTGGCAA AGGCCTGGAATGGGTGTCCGCCATCTGGGCCTCCGGCGAGCA GTACTACGCCGACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGG GACAACTCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGC GGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCAAGGGCTGGC TGGGCAACTTCGACTACTGGGGACAGGGCACCCTGGTCACCGT GTCCAGCGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGC CCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCTCTGGG CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCC TGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCC GCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGG TCACCGTGCCTTCTAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTG CAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAA GGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCACACATGCCCACC GTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTC TTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCC CTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGG CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC TCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCA GCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGA TGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAA GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG GGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGG ACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGA CAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCT CCCTGTCTCCGGGTGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGAT CCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCTGATGATCCTGCCGGAC TGCTGGACCTGCGGCAGGGAATGTTTGCCCAGCTGGTGGCCCA GAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGAT CCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACA AAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGT ACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGG CGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCT CTGAGATCTGCTGCTGGCGCCGCTGCTCTGGCACTGACAGTGG ATCTGCCTCCTGCCAGCAGCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGG GTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTG GGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGG CAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGA CCCCCGAGATTCCTGCCGGGCTC
176	Fc ノブ二量体 4-1BBL (71-248) のヌ	表24参照

	クレオチド配列	
112	抗 FAP(28H1) 軽鎖のヌクレオチド配列	表3参照
182	抗 FAP(28H1) Fc ホール単量体 4-1BBL (71-248) 鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQAPGKGLEWVSAIWASGEQYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWLGNFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
178	Fc ノブ二量体 4-1BB リガンド (71-248)	表24参照
114	抗 FAP(28H1) 軽鎖	表3参照

【０４３２】

１．８　４－１ＢＢリガンドがＣ末端に融合した一価ＣＤ１９標的４－１ＢＢリガンド三量体含有Ｆｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子（コンストラクト３．１３、４．１３、３．１４及び４．１４）の調製（ホール鎖上のＣＤ１９）

該分子は、抗ＦＡＰバインダーを抗ＣＤ１９バインダーで置き換えたことを唯一の相違点として、一価のＦＡＰ標的４－１ＢＢリガンド三量体含有Ｆｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子について実施例１．７に記載されたようにして調製する。

【０４３３】

ＣＤ１９、クローン８Ｂ８－０１８又はクローン８Ｂ８－２Ｂ１１に特異的なバインダーをコードする重鎖及び軽鎖ＤＮＡ配列の可変領域を、ホールの定常重鎖又はヒトＩｇＧ１の定常軽鎖の何れかとインフレームでサブクローニングする。

【０４３４】

Ｙ３４９Ｃ／Ｔ３６６Ｓ／Ｌ３６８Ａ／Ｙ４０７Ｖ変異を含む抗ＣＤ１９ｈｕＩｇＧ１ Ｆｃホール鎖、Ｓ３５４Ｃ／Ｔ３６６Ｗ変異を含むｈｕＩｇＧ１ノブ鎖及び抗ＣＤ１９軽鎖の組合せが、構築された三量体４－１ＢＢリガンドと一つのＣＤ１９結合Ｆａｂを含む、ヘテロ二量体の作製を可能にする（図２Ｃ又は２Ｄ）。

【０４３５】

表２７は、一価標的ＣＤ１９（８Ｂ８－０１８）分断三量体４－１ＢＢリガンド（７１－２４８）Ｃ末端Ｆｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子（コンストラクト３．１３）のｃＤＮＡ及びアミノ酸配列をそれぞれ示す。

【０４３６】

表27：CD19（8B8－018）標的ヒト4－1BBリガンド三量体含有Fc（kih）融合分子コンストラクト

3．13の配列

配列番号:	説明	配列
183	抗 CD19(8B8-018) Fc ホール二量体 4-1BB リガンド (71-248) 鎖のヌクレオチド配列	CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGGTCAAGAAACCC GGGGCTTCTGTGAAGGTTTCATGCAAGGCAAGCGGATACACCT TCACCGACTATATCATGCATTGGGTCAGGCAGGCCCCTGGCCA AGGTCTCGAATGGATGGGCTACATTAACCCATATAATGATGGC TCCAAATACACCGAGAAGTTTCAGGGAAGAGTCACTATGACAT CTGACACCAGTATCAGCACTGCTTACATGGAGCTGTCCCGCCT TCGGTCTGATGACACCGCAGTGTATTACTGTGCCAGGGGCACA TATTACTACGGCTCAGCTCTGTTCGACTATTGGGGGCAGGGAA CCACAGTAACCGTGAGCTCCGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGT GTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCAC AGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCC GTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTG CACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATAGCC TGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCTAGCAGCCTGGGCACCCA GACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAG GTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCACA CATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGT CAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGAT CTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAG CCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG TACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGC ACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC CAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCC CCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGT GCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCC TCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAG CTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCT CATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTGGAGGCGGCGGAAGCGG AGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCTGATGA TCCTGCCGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGAATGTTTGCCCAG CTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCT GGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCG GCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAA GGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGA GTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGC ATCTGCAGCCTCTGAGATCTGCTGCTGGCGCCGCTGCTCTGGC ACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCAGCGAGGCCCGGAAT AGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCG GCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTA GACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCC TGTTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCAGGCCTGGGAGGCG GCGGATCTGGCGGCGGAGGATCTAGAGAAGGACCCGAGCTGT CCCCCGACGATCCCGCTGGGCTGCTGGATCTGAGACAGGGCA

10 20 30 40 50

		TGTTCGCTCAGCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGCTGATTGACGG ACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCAGGGCTGGCAGGGGTGTC CCTGACTGGGGGACTGTCCTACAAAGAAGATACAAAAGAACTG GTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGTACTATGTGTTTTTTCAGCTGG AACTGAGGCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGCTCAGGATCTGTGT CCCTGGCTCTGCATCTGCAGCCACTGCGCTCTGCAGCAGGGG CTGCAGCACTGGCCCTGACTGTGGACCTGCCCCCAGCTTCTTC CGAGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCCAAGGACGCCTGCT GCATCTGAGCGCCGGACAGCGCCTGGGAGTGCATCTGCATACT GAAGCCAGAGCCCGGCATGCTTGGCAGCTGACTCAGGGGGCA ACTGTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACACCTGAGATCCCAGCCG GGCTC
172	Fc ノブ単量体 4-1BB (71-248) リガンドのヌクレオチド配列	表23参照
118	抗 CD19(8B8-018) 軽鎖のヌクレオチド配列	表5参照
184	抗 CD19(8B8-018) Fc ホール二量体 4-1BB (71-248)リガンド鎖	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQAPGQG LEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRLRSDD TAVYYCARGTYYYGSALFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDEL TKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGG GGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPL SWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAF GFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTP EIPAGLGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQ NVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVF FQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPAS SEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGAT VLGLFRVTPEIPAGL
174	Fc ノブ単量体 41-BBL (71-248)	表23参照
120	抗 FAP(4B9) 軽鎖	表5参照

【０４３７】

表２８は、一価ＣＤ１９（８Ｂ８－０１８）標的４－１ＢＢリガンド（７１－２４８）三量体含有Ｆｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子（コンストラクト３．１４）のｃＤＮＡ及びアミノ酸配列を示す。

【０４３８】

表28：CD19（8B8－018）標的ヒト4－1BBリガンド三量体含有Fc（kih）融合分子コンストラクト
３．14の配列

配列番号:	説明	配列
185	抗 CD19(8B8-018)Fc ホール単量体 4-1BBL (71-248)鎖のヌクレオチド配列	CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGGTCAAGAAACCC GGGGCTTCTGTGAAGGTTTCATGCAAGGCAAGCGGATACACCT TCACCGACTATATCATGCATTGGGTCAGGCAGGCCCCTGGCCA AGGTCTCGAATGGATGGGCTACATTAACCCATATAATGATGGC TCCAAATACACCGAGAAGTTTCAGGGAAGAGTCACTATGACAT CTGACACCAGTATCAGCACTGCTTACATGGAGCTGTCCCGCCT TCGGTCTGATGACACCGCAGTGTATTACTGTGCCAGGGGCACA TATTACTACGGCTCAGCTCTGTTCGACTATTGGGGGCAGGGAA CCACAGTAACCGTGAGCTCCGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGT GTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCAC AGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCC GTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTG CACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATAGCC TGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCTAGCAGCCTGGGCACCCA GACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAG GTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCACA CATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGT CAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGAT CTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAG CCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG TACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGC ACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC CAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCC CCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGT GCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCC TCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAG CTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCT CATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTGGAGGCGGCGGAAGCGG AGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCTGATGA TCCTGCCGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGAATGTTTGCCCAG CTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCT GGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCG GCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAA GGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGA GTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGC ATCTGCAGCCTCTGAGATCTGCTGCTGGCGCCGCTGCTCTGGC ACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCAGCGAGGCCCGGAAT AGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCG GCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTA GACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCC TGTTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCTGCCGGGCTC
176	Fc ノブ二量体 4-	表24参照

	1BB リガンド (71-248) のヌクレオチド配列	
118	抗 CD19(8B8-018) 軽鎖のヌクレオチド配列	表5参照
186	抗 CD19(8B8-018)Fc ホール単量体 4-1BB リガンド (71-248) 鎖	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQAPGQG LEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRLRSDD TAVYYCARGTYYYGSALFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDEL TKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGG GGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPL SWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAF GFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTP EIPAGL
178	Fc ノブ二量体 4-1BB リガンド (71-248)	表24参照
120	抗 CD19(8B8-018) 軽鎖	表5参照

【０４３９】

表２９は、一価ＣＤ１９（８Ｂ８－２Ｂ１１）標的４－１ＢＢリガンド三量体含有Ｆｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子（コンストラクト４．１３）のｃＤＮＡ及びアミノ酸配列を示す。

【０４４０】

表29：CD19（8B8－2B11）標的ヒト4－1BBリガンド三量体含有Fc（kih）融合分子コンストラクト

4．13の配列

配列番号:	説明	配列
187	抗 CD19(8B8-2B11) Fc ホール二量体 4-1BB リガンド (71-248) 鎖のヌクレオチド配列	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAACCGG GCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCTGGTTACACCTT CACTGACTATATCATGCACTGGGTTCGTCAGGCCCCGGGCCAG GGTCTGGAGTGGATGGGCTACATTAACCCATACAACGACGGTT CCAAATATACCGAGAAATTCCAGGGCCGCGTCACGATGACCAG CGACACTTCTATCTCCACCGCGTACATGGAACTGTCTAGACTG CGTTCTGACGACACCGCTGTTTACTATTGTGCACGCGGTACCT ACTACTACGGTCCACAGCTGTTTGATTACTGGGGCCAAGGTAC CACGGTGACCGTAAGCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTG TTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACA GCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCC GTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTG CACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATAGCC TGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCTAGCAGCCTGGGCACCCA GACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAG GTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCACA CATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGT CAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGAT CTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAG CCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG TACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGC ACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC CAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCC CCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGT GCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCC TCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAG CTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCT CATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTGGAGGCGGCGGAAGCGG AGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCTGATGA TCCTGCCGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGAATGTTTGCCCAG CTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCT GGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCG GCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAA GGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGA GTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGC ATCTGCAGCCTCTGAGATCTGCTGCTGGCGCCGCTGCTCTGGC ACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCAGCGAGGCCCGGAAT AGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCG GCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTA GACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCC TGTTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCAGGCCTGGGAGGCG GCGGATCTGGCGGCGGAGGATCTAGAGAAGGACCCGAGCTGT CCCCCGACGATCCCGCTGGGCTGCTGGATCTGAGACAGGGCA

		TGTTCGCTCAGCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGCTGATTGACGG ACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCAGGGCTGGCAGGGGTGTC CCTGACTGGGGGACTGTCCTACAAAGAAGATACAAAAGAACTG GTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGTACTATGTGTTTTTTCAGCTGG AACTGAGGCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGCTCAGGATCTGTGT CCCTGGCTCTGCATCTGCAGCCACTGCGCTCTGCAGCAGGGG CTGCAGCACTGGCCCTGACTGTGGACCTGCCCCCAGCTTCTTC CGAGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCCAAGGACGCCTGCT GCATCTGAGCGCCGGACAGCGCCTGGGAGTGCATCTGCATACT GAAGCCAGAGCCCGGCATGCTTGGCAGCTGACTCAGGGGGCA ACTGTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACACCTGAGATCCCAGCCG GGCTC
172	Fc ノブ単量体 4-1BB リガンド (71-248) のヌクレオチド配列	表23参照
124	抗 CD19(8B8-2B11) 軽鎖のヌクレオチド配列	表7参照
188	抗 CD19(8B8-2B11) Fc ホール二量体 4-1BB リガンド (71-248) 鎖	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQAPGQG LEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRLRSDD TAVYYCARGTYYYGPQLFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDEL TKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGG GGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPL SWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAF GFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTP EIPAGLGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQ NVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVF FQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPAS SEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGAT VLGLFRVTPEIPAGL
174	Fc ノブ単量体 4-1BB リガンド (71-248)	表23参照
126	抗 CD19(8B8-2B11) 軽鎖	表7参照

【０４４１】

表３０は、一価ＣＤ１９（８Ｂ８－２Ｂ１１）標的４－１ＢＢリガンド三量体含有Ｆｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子（コンストラクト４．１４）のｃＤＮＡ及びアミノ酸配列を示す。

【０４４２】

表30：CD19（8B8－2B11）標的ヒト4－1BBリガンド三量体含有Fc（kih）融合分子コンストラクト
4．14の配列

配列番号:	説明	配列
189	抗 CD19(8B8-2B11) Fc ホール単量体 4-1BB リガンド (71-248)鎖のヌクレオチド配列	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAACCGG GCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCTGGTTACACCTT CACTGACTATATCATGCACTGGGTTCGTCAGGCCCCGGGCCAG GGTCTGGAGTGGATGGGCTACATTAACCCATACAACGACGGTT CCAAATATACCGAGAAATTCCAGGGCCGCGTCACGATGACCAG CGACACTTCTATCTCCACCGCGTACATGGAACTGTCTAGACTG CGTTCTGACGACACCGCTGTTTACTATTGTGCACGCGGTACCT ACTACTACGGTCCACAGCTGTTTGATTACTGGGGCCAAGGTAC CACGGTGACCGTAAGCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTG TTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACA GCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCC GTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTG CACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATAGCC TGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCTAGCAGCCTGGGCACCCA GACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAG GTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCACA CATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGT CAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGAT CTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAG CCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG TACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGC ACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC CAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCC CCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGT GCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCC TCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAG CTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCT CATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTGGAGGCGGCGGAAGCGG AGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCTGATGA TCCTGCCGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGAATGTTTGCCCAG CTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCT GGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCG GCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAA GGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGA GTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGC ATCTGCAGCCTCTGAGATCTGCTGCTGGCGCCGCTGCTCTGGC ACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCAGCGAGGCCCGGAAT AGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCG GCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTA GACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCC TGTTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCTGCCGGGCTC
176	Fc ノブ二量体 4-	表24参照

	1BBL (71-248) のヌクレオチド配列	
124	抗 CD19(8B8-2B11)軽鎖のヌクレオチド配列	表7参照
190	抗 CD19(8B8-2B11) Fc ホール単量体 4-1BBL (71-248) 鎖	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQAPGQG LEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRLRSDD TAVYYCARGTYYYGPQLFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDEL TKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGG GGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPL SWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAF GFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTP EIPAGL
178	Fc ノブ二量体 4-1BB リガンド (71-248)	表24参照
126	抗 CD19(8B8-2B11) 軽鎖	表7参照

【０４４３】
１．９　４－１ＢＢリガンドがＣ末端に融合した一価ＣＥＡ標的４－１ＢＢリガンド三量体含有Ｆｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子（コンストラクト５．１３及び５．１４）の調製（ホール鎖上のＣＥＡ）
該分子は、抗ＦＡＰバインダーを抗ＣＥＡバインダーで置き換えたことを唯一の相違点として、一価ＦＡＰ標的コンストラクトについて実施例１．７に記載されたようにして調製する。
【０４４４】
がん胎児抗原（ＣＥＡ）、クローンＴ８４．６６－ＬＣＨＡに特異的なバインダーをコードする重鎖及び軽鎖ＤＮＡ配列の可変領域を、ノブの定常重鎖又はヒトＩｇＧ１の定常軽鎖の何れかとインフレームでサブクローニングする。ＣＥＡクローンの作製は実施例１．５に記載されている。
【０４４５】
ＣＨ３ドメイン中のＹ３４９Ｃ／Ｔ３６６Ｓ／Ｌ３６８Ａ／Ｙ４０７Ｖ変異を含むｈｕＩｇＧ１　Ｆｃホール鎖、ＣＨ３ドメイン中にＳ３５４Ｃ／Ｔ３６６Ｗ変異を含む抗ＣＥＡｈｕＩｇＧ１ノブ鎖及び抗ＣＥＡ軽鎖の組合せが、構築された三量体４－１ＢＢリガンドと一つのＣＥＡ結合Ｆａｂを含む、ヘテロ二量体の作製を可能にする（図２Ｃ及び２Ｄ）。
【０４４６】
表３１は、一価ＣＥＡ（Ｔ８４．６６－ＬＣＨＡ）標的４－１ＢＢリガンド（７１－２４８）三量体含有Ｆｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子（コンストラクト５．１３）のｃＤＮＡ

及びアミノ酸配列を示す。

【０４４７】

表17：CEA（T84．66－LCHA）標的ヒト4－1BBリガンド三量体含有Fc（kih）融合分子コンストラクト5．13の配列

配列番号:	説明	配列
191	抗 CEA(T84.66-LCHA)Fc ホール二量体 4-1BB リガンド(71-248)鎖のヌクレオチド配列	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCC GGCAGCAGCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTTCAAC ATCAAGGACACCTACATGCACTGGGTGCGCCAGGCCCCTGGAC AGGGACTGGAATGGATGGGCAGAATCGACCCCGCCAACGGCA ACAGCAAATACGTGCCCAAGTTCCAGGGCAGAGTGACCATCAC CGCCGACACCAGCACCTCCACCGCCTACATGGAACTGAGCAG CCTGCGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCCCCTTC GGCTACTACGTGTCCGACTACGCCATGGCCTATTGGGGCCAGG GCACACTCGTGACCGTGTCCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCCTC CGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGG CACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAG CCCGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGC GTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATA GCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCTAGCAGCCTGGGCAC CCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACC AAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACTC ACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGAC CGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCAT GATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTG AGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACG GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGC AGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCT GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTC TCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCA AAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGC CCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTC GTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAG TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACG CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCA AGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCT TCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACAC GCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTGGAGGCGGCGGAAG CGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCTGA TGATCCTGCCGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGAATGTTTGCC CAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGT CCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGG CGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGC CAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCGG AGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCC TGCATCTGCAGCCTCTGAGATCTGCTGCTGGCGCCGCTGCTCT GGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCAGCGAGGCCCG GAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCT GCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGG GCTAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTG GGCCTGTTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCAGGCCTGGGA GGCGGCGGATCTGGCGGCGGAGGATCTAGAGAAGGACCCGAG

		CTGTCCCCCGACGATCCCGCTGGGCTGCTGGATCTGAGACAGG GCATGTTCGCTCAGCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGCTGATTGA CGGACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCAGGGCTGGCAGGGGT GTCCCTGACTGGGGGACTGTCCTACAAAGAAGATACAAAAGAA CTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGTACTATGTGTTTTTTCAGC TGGAACTGAGGCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGCTCAGGATCTG TGTCCCTGGCTCTGCATCTGCAGCCACTGCGCTCTGCAGCAGG GGCTGCAGCACTGGCCCTGACTGTGGACCTGCCCCCAGCTTCT TCCGAGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCCAAGGACGCCTG CTGCATCTGAGCGCCGGACAGCGCCTGGGAGTGCATCTGCATA CTGAAGCCAGAGCCCGGCATGCTTGGCAGCTGACTCAGGGGG CAACTGTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACACCTGAGATCCCAGC CGGGCTC
172	Fc ノブ単量体 4-1BBL (71-248)のヌクレオチド配列	表23参照
154	抗 CEA(T84.66-LCHA)軽鎖のヌクレオチド配列	表17参照
192	抗 CEA(T84.66-LCHA)Fc ホール二量体 4-1BB (71-248)リガンド鎖	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTYMHWVRQAPGQG LEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDEL TKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGG GGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPL SWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAF GFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTP EIPAGLGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQ NVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVF FQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPAS SEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGAT VLGLFRVTPEIPAGL
174	Fc ノブ単量体 4-1-BB (71-248)リガンド	表23参照
156	抗 CEA(T84.66-LCHA) 軽鎖	表17参照

【０４４８】

表３２は、一価ＣＥＡ（Ｔ８４．６６－ＬＣＨＡ）標的４－１ＢＢリガンド（７１－２４８）三量体含有Ｆｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子（コンストラクト５．１４）のｃＤＮＡ及びアミノ酸配列を示す。

【０４４９】

表32：CEA（T84．66－LCHA）標的ヒト4－1BBリガンド三量体含有Fc（kih）融合分子コンストラクト5．14の配列

配列番号:	説明	配列
193	抗 CEA(T84.66-LCHA) Fc ホール単量体 4-1BBL (71-248)鎖のヌクレオチド配列	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAAGTGAAGAAACCC GGCAGCAGCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCAGCGGCTTCAAC ATCAAGGACACCTACATGCACTGGGTGCGCCAGGCCCCTGGAC AGGGACTGGAATGGATGGGCAGAATCGACCCCGCCAACGGCA ACAGCAAATACGTGCCCAAGTTCCAGGGCAGAGTGACCATCAC CGCCGACACCAGCACCTCCACCGCCTACATGGAACTGAGCAG CCTGCGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCCCCCTTC GGCTACTACGTGTCCGACTACGCCATGGCCTATTGGGGCCAGG GCACACTCGTGACCGTGTCCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCCTC CGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGG CACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAG CCCGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGC GTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATA GCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCTAGCAGCCTGGGCAC CCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACC AAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACTC ACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGAC CGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCAT GATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTG AGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACG GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGC AGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCT GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTC TCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCA AAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGC CCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTC GTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAG TGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACG CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCA AGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCT TCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACAC GCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTGGAGGCGGCGGAAG CGGAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCTGA TGATCCTGCCGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGAATGTTTGCC CAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGT CCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGG CGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGC CAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCGG AGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCC TGCATCTGCAGCCTCTGAGATCTGCTGCTGGCGCCGCTGCTCT GGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCAGCGAGGCCCG GAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCT GCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGG GCTAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTG GGCCTGTTCAGAGTGACCCCCGAGATTCCTGCCGGGCTC
176	Fc ノブ二量体 4-	表24参照

	1BB (71-248)リガンドのヌクレオチド配列	
154	抗 CEA(T84.66-LCHA)軽鎖のヌクレオチド配列	表17参照
194	抗 CEA(T84.66-LCHA) Fc ホール単量体 4-1BB リガンド (71-248)鎖	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTYMHWVRQAPGQG LEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDEL TKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGG GGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPL SWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAF GFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTP EIPAGL
178	Fc ノブ二量体 4-1BB (71-248) リガンド	表24参照
156	抗 CEA(T84.66-LCHA) 軽鎖	表17参照

【０４５０】

１．１０　４－１ＢＢリガンドがＣ末端に融合した一価の非標的４－１ＢＢリガンド三量体含有Ｆｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子（対照Ｊ及びＫ）の調製（ホール鎖上のＤＰ４７）

該分子は、抗ＦＡＰバインダー（ＶＨ－ＶＬ）を抗原に結合しないＤＰ４７と呼ばれる生殖系列対照で置き換えたことを唯一の相違点として、一価のＦＡＰ標的コンストラクトについて実施例１．７に記載されたようにして調製した。

【０４５１】

表３３は、一価の非標的４－１ＢＢリガンド（７１－２４８）三量体含有Ｆｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子（対照Ｊ）のｃＤＮＡ及びアミノ酸配列を示す。

表33：一価DP47非標的ヒト4－1BBリガンド三量体含有Fc(kih)融合分子対照Jの配列

配列番号:	説明	配列
195	DP47 Fc ホールニ量体 4-1BB リガンド(71-248)鎖のヌクレオチド配列	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTG GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTT TAGCAGTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAG GGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCA CATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAG AGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTG AGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGGCAGCG GATTTGACTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAG TGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAG CAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCTCTGGGCTGCCT GGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAAC AGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTG CTGCAGAGTTCTGGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCG TGCCTTCTAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGT GAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGA GCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCA GCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC CAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGT CAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT GTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATG GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGC CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA GAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTG ACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCT ATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC CGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGA CGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGC AGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG AGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTC TCCGGGTGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGA GGGCCCTGAGCTGAGCCCTGATGATCCTGCCGGACTGCTGGA CCTGCGGCAGGGAATGTTTGCCCAGCTGGTGGCCCAGAACGTG CTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGAC TGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGA CACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTG TTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGAT CTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGATC TGCTGCTGGCGCCGCTGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCT CCTGCCAGCAGCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAG GCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGC ATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGA CACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGACCCCCG AGATTCCAGCAGGCCTGGGAGGCGGCGGATCTGGCGGCGGAG GATCTAGAGAAGGACCCGAGCTGTCCCCCGACGATCCCGCTG GGCTGCTGGATCTGAGACAGGGCATGTTCGCTCAGCTGGTGGC TCAGAATGTGCTGCTGATTGACGGACCTCTGAGCTGGTACTCC GACCCAGGGCTGGCAGGGGTGTCCCTGACTGGGGGACTGTCC

		TACAAAGAAGATACAAAAGAACTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGG TGTACTATGTGTTTTTTCAGCTGGAACTGAGGCGGGTGGTGGC TGGGGAGGGCTCAGGATCTGTGTCCCTGGCTCTGCATCTGCAG CCACTGCGCTCTGCAGCAGGGGCTGCAGCACTGGCCCTGACT GTGGACCTGCCCCCAGCTTCTTCCGAGGCCAGAAACAGCGCCT TCGGGTTCCAAGGACGCCTGCTGCATCTGAGCGCCGGACAGC GCCTGGGAGTGCATCTGCATACTGAAGCCAGAGCCCGGCATGC TTGGCAGCTGACTCAGGGGGCAACTGTGCTGGGACTGTTTCGC GTGACACCTGAGATCCCAGCCGGGCTC
172	Fc ノブ単量体 4-1BBL (71-248) のヌクレオチド配列	表23参照
166	DP47 軽鎖のヌクレオチド配列	表21参照
196	DP47 Fc ホールニ量体 4-1BB リガンド (71-248)鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKG LEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAKGSGFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVS LSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGG GSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDP GLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGS GSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRL LHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL GGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLID GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLEL RRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARN SAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFR VTPEIPAGL
174	Fc ノブ単量体 4-1-BB (71-248) リガンド	表23参照
168	DP47 軽鎖	表21参照

【０４５２】

表３４は、一価の非標的４－１ＢＢリガンド（７１－２４８）三量体含有Ｆｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子（対照Ｋ）のｃＤＮＡ及びアミノ酸配列を示す。

表34：一価DP47非標的ヒト4－1BBリガンド三量体含有Fc(kih)融合分子対照Kの配列

配列番号:	説明	配列
197	DP47 Fc ホール単量体 4-1BBL (71-248)鎖のヌクレオチド配列	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTG GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTT TAGCAGTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAG GGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCA CATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAG AGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTG AGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGGCAGCG GATTTGACTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAG TGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAG CAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCTCTGGGCTGCCT GGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAAC AGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTG CTGCAGAGTTCTGGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCG TGCCTTCTAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGT GAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGA GCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCA GCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC CAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGT CAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCC AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT GTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATG GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGC CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA GAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTG ACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCT ATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC CGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGA CGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGC AGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG AGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTC TCCGGGTGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGAGA GGGCCCTGAGCTGAGCCCTGATGATCCTGCCGGACTGCTGGA CCTGCGGCAGGGAATGTTTGCCCAGCTGGTGGCCCAGAACGTG CTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGAC TGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGA CACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTG TTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGAT CTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGATC TGCTGCTGGCGCCGCTGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCT CCTGCCAGCAGCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAG GCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGC ATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGA CACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGACCCCCG AGATTCCTGCCGGGCTC
176	Fc ノブ二量体 4-1BBL (71-248) のヌ	表24参照

	クレオチド配列	
166	DP47 軽鎖のヌクレオチド配列	表21参照
198	DP47 Fc ホール単量体 4-1BBL (71-248) 鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKG LEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAKGSGFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVS LSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGG GSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDP GLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGS GSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRL LHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
178	Fc ノブ二量体 4-1BBL (71-248)	表24参照
168	DP47 軽鎖	表21参照

【０４５３】

１．１１　更なる対照分子の調製

図３Ｂに示されるＮ末端に融合した４－１ＢＢＬ部分を有する分子である対照Ｄを、抗原に結合しないＤＰ４７と呼ばれる生殖系列対照と組み合わせて調製した。

【０４５４】

該分子は、国際特許出願公報の国際公開第２０１２／１３０８３１Ａ１号に記載された方法に従ってＦｃガンマ受容体への結合を抑止するためにノブ及びホール重鎖の定常領域にＰｒｏ３２９Ｇｌｙ、Ｌｅｕ２３４Ａｌａ及びＬｅｕ２３５Ａｌａ変異を含む。

【０４５５】

ヒトＣＬドメインに融合した二量体４－１ＢＢリガンドをコードするポリペプチドを、ノブ上のヒトＩｇＧ１重鎖ＣＨ２及びＣＨ３ドメインとインフレームでサブクローニングし、単量体４－１ＢＢリガンドをコードするポリペプチドをヒトＣＨ１ドメインに融合させた。正しい対形成を改善するために、次の変異が交差ＣＨ－ＣＬに導入されている。ヒトＣＬに融合した二量体４－１ＢＢリガンドでは、Ｅ１２３Ｒ及びＱ１２４Ｋ。ヒトＣＨ１に融合した単量体４－１ＢＢリガンドでは、Ｋ１４７Ｅ及びＫ２１３Ｅ。

【０４５６】

表３５は、一価の「非標的」４－１ＢＢリガンド（７１－２４８）三量体含有Ｆｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子（対照Ｄ）のｃＤＮＡ及びアミノ酸配列を示す。

表35：CH－CL交差及び荷電残基＊を含む一価DP47非標的ヒト4－1BBリガンド三量体含有Fc（kih）融合分子（対照D）の配列

配列番号:	説明	配列
199	二量体 4-1BB リガンド(71-248) - CL* Fc ノブ 鎖のヌクレオチド配列	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGGACTG CTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGTGGCCCAGA ACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCC TGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAA GAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTAC TACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCG AAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCT GAGATCTGCTGCTGGCGCCGCTGCTCTGGCACTGACAGTGGAT CTGCCTCCTGCCAGCAGCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGT TTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGG GAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGC AGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGAC CCCCGAGATTCCAGCCGGACTGGGAGGCGGCGGATCTGGCGG CGGAGGATCTAGAGAAGGACCCGAGCTGTCCCCTGACGATCCA GCCGGGCTGCTGGATCTGAGACAGGGAATGTTCGCCCAGCTG GTGGCTCAGAATGTGCTGCTGATTGACGGACCTCTGAGCTGGT ACTCCGACCCAGGGCTGGCAGGGGTGTCCCTGACTGGGGGAC TGTCCTACAAAGAAGATACAAAAGAACTGGTGGTGGCTAAAGC TGGGGTGTACTATGTGTTTTTTCAGCTGGAACTGAGGCGGGTG GTGGCTGGGGAGGGCTCAGGATCTGTGTCCCTGGCTCTGCATC TGCAGCCACTGCGCTCTGCAGCAGGGGCTGCAGCACTGGCCC TGACTGTGGACCTGCCCCCAGCTTCTTCCGAGGCCAGAAACAG CGCCTTCGGGTTCCAAGGACGCCTGCTGCATCTGAGCGCCGGA CAGCGCCTGGGAGTGCATCTGCATACTGAAGCCAGAGCCCGG CATGCTTGGCAGCTGACTCAGGGGGCAACTGTGCTGGGACTGT TTCGCGTGACACCTGAGATCCCCGCTGGACTGGGCGGAGGCG GTTCCGGAGGGGGAGGATCTCGTACGGTGGCTGCACCATCTGT CTTTATCTTCCCACCCAGCGACCGGAAGCTGAAGTCTGGCACA GCCAGCGTCGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCCCGCGAGG CCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCA ACAGCCAGGAAAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCA CCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACT ACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGG GCCTGTCTAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGT GCGACAAGACCCACACCTGTCCTCCATGCCCTGCCCCTGAAGC TGCTGGCGGCCCTAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAAGCCCAAG GACACCCTGATGATCAGCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGG TGGTGGATGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTG GTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAATGCCAAGACCAAGCC GCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGT CCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGA AAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGT GTACACCCTGCCCCCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA GGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGAC ATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC TACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCT

		TCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCA GGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC AACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
200	単量体 4-1BBL (71-248) -CH1*の ヌクレオチド配列	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGGACTG CTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGTGGCCCAGA ACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCC TGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAA GAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTAC TACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCG AAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCT GAGATCTGCTGCTGGCGCCGCTGCTCTGGCACTGACAGTGGAT CTGCCTCCTGCCAGCAGCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGT TTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGG GAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGC AGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGAC CCCCGAGATTCCAGCCGGACTGGGAGGCGGAGGTTCCGGAGG CGGAGGATCTGCTAGCACAAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCTCTG GCCCCTAGCAGCAAGAGCACATCTGGCGGAACAGCCGCCCTG GGCTGCCTGGTGGAAGATTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGT CCTGGAATTCTGGCGCCCTGACAAGCGGCGTGCACACCTTTCC AGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTC GTGACAGTGCCCAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCT GCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACGAGA AGGTGGAACCCAAGTCCTGC
201	DP47 Fc ホール鎖 のヌクレオチド配列	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTG GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTT TAGCAGTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAG GGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCA CATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAG AGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTG AGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGGCAGCG GATTTGACTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAG TGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCC TCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTG GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACT CAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCC TACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGT GCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG AATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGC CCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGC ACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCA AAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCA CATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAA GTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTG GTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCA AGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCC CATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAA CCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACC AAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATC CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG AGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGG

		CTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGG TGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGG CTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCC GGGTAAA
166	DP47 軽鎖のヌクレオチド配列	表21参照
202	二量体 4-1BB リガンド (71-248) - CL* Fc ノブ鎖	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGL AGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGS VSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLH LSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLGG GGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPL SWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAF GFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTP EIPAGLGGGGSGGGGSRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECDKTHTCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
203	単量体 4-1BBL (71-248) -CH1*	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGL AGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGS VSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLH LSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLGG GGSGGGGSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDEKVEPKSC
204	DP47 Fc ホール 鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKG LEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAKGSGFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVS LSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
168	DP47 軽鎖	表21参照

【０４５７】

ＤＰ４７の代わりに、クローン４Ｂ９である線維芽細胞活性化タンパク質（ＦＡＰ）に特異的なバインダーをコードする重鎖及び軽鎖ＤＮＡ配列の可変領域を、ホールの定常重鎖又はヒトＩｇＧ１の定常軽鎖の何れかとインフレームでサブクローニングした対照ＤのＦＡＰ標的変異体を調製した。表３６は、一価ＦＡＰ標的４－１ＢＢリガンド（７１－２４８）三量体含有Ｆｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子（コンストラクト２．４）のｃＤＮＡ及びアミノ酸配列を示す。

【０４５８】

表36：一価FAP（4B9）標的ヒト4－1BBリガンド （71－248）含有Fc（kih）融合分子コンストラクト

2．4の配列

配列番号:	説明	配列
199	二量体 hu 4-1BBL (71-248) - CL* Fc ノブ鎖のヌクレオチド配列	表35参照
200	単量体 hu 4-1BBL (71-248) - CH1*のヌクレオチド配列	表35参照
235	抗 FAP (4B9) Fc ホール鎖のヌクレオチド配列	GAGGTGCAGCTGCTCGAAAGCGGCGGAGGACTGGTGCAGCCT GGCGGCAGCCTGAGACTGTCTTGCGCCGCCAGCGGCTTCACC TTCAGCAGCTACGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCCCCTGGC AAGGGACTGGAATGGGTGTCCGCCATCATCGGCTCTGGCGCCA GCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAG CCGGGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGC CTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGGGA TGGTTCGGCGGCTTCAACTACTGGGGACAGGGCACCCTGGTCA CAGTGTCCAGCGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCT GGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCTCT GGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTG TCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCC CCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGT GGTCACCGTGCCTTCTAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATC TGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA AGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCACACATGCCCACC GTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTC TTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCC CTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGG CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC TCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCA GCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGA TGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAA GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG GGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGG ACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGA CAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCT CCCTGTCTCCGGGTAAA
103	抗 FAP(4B9) 軽鎖のヌクレオチド配列	表1参照

202	二量体 hu 4-1BBL (71-248) - CL* Fc ノブ 鎖	表35参照
203	単量体 hu 4-1BBL (71-248) - CH1*	表35参照
236	抗 FAP (4B9) Fc ホール 鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKG LEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVS LSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
106	抗 FAP (4B9) 軽鎖	表1参照

【０４５９】

ＤＰ１９の代わりに、クローン８Ｂ８－０１８及び８Ｂ８－２Ｂ１１である、ＣＤ１９に特異的なバインダーをコードする重鎖及び軽鎖ＤＮＡ配列の可変領域をホールの定常重鎖又はヒトＩｇＧ１の定常軽鎖の何れかとインフレームでサブクローニングしたＣＤ１９標的変異体をまた調製した。ヒト４－１ＢＢリガンドのエクトドメインの一部をコードするＤＮＡ配列（アミノ酸７１－２５４又はアミノ酸７１－２４８）をＵｎｉｐｒｏｔデータベースのＰ４１２７３配列に従って合成した。表３７ａは、交差ＣＨ－ＣＬ及び荷電残基を有する一価ＣＤ１９（８Ｂ８－０１８）標的分断三量体４－１ＢＢリガンド（７１－２４８）Ｆｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子（コンストラクト３．４）のｃＤＮＡ及びアミノ酸配列を示す。表３７ｂは、一価ＣＤ１９標的４－１ＢＢリガンド（７１－２５４）三量体含有Ｆｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子（コンストラクト４．１）のｃＤＮＡ及びアミノ酸配列を示す。

【０４６０】

表37a：荷電残基を持つCHーCL交差を含む一価CD19（8B8－018）標的分断三量体4－1BBリガンド（71－248）Fc（kih）融合体（コンストラクト3．4）のcDNA及びアミノ酸配列　*荷電残基

配列番号:	説明	配列
199	二量体 hu 4-1BBL (71-248) - CL* Fc ノブ 鎖のヌクレオチド配列	表35参照
200	単量体 hu 4-1BBL (71-248) - CH1*のヌクレオチド配列	表35参照
237	抗 CD19(8B8-018) Fc ホール鎖のヌクレオチド配列	CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGGTCAAGAAACCC GGGGCTTCTGTGAAGGTTTCATGCAAGGCAAGCGGATACACCT TCACCGACTATATCATGCATTGGGTCAGGCAGGCCCCTGGCCA AGGTCTCGAATGGATGGGCTACATTAACCCATATAATGATGGC TCCAAATACACCGAGAAGTTTCAGGGAAGAGTCACTATGACAT CTGACACCAGTATCAGCACTGCTTACATGGAGCTGTCCCGCCT TCGGTCTGATGACACCGCAGTGTATTACTGTGCCAGGGGCACA TATTACTACGGCTCAGCTCTGTTCGACTATTGGGGGCAGGGAA CCACAGTAACCGTGAGCTCCGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGT GTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCAC AGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCC GTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTG CACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATAGCC TGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCTAGCAGCCTGGGCACCCA GACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAG GTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCACA CATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGT CAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGAT CTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAG CCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG TACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGC ACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC CAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCC CCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGT GCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCC TCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAG CTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCT CATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
118	抗 CD19(8B8-018) 軽鎖のヌクレオチド配列	表5参照
202	二量体 hu 4-1BBL (71-248) - CL* Fc ノブ 鎖	表35参照

203	単量体 hu 4-1BBL (71-248) - CH1*	表35参照
238	抗 CD19(8B8-018) Fc ホール 鎖	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQAPGQG LEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRLRSDD TAVYYCARGTYYYGSALFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDEL TKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
120	抗 CD19(8B8-018) 軽鎖	表5参照

表37b：一価CD19（8B8－2B11）標的ヒト4－1BBリガンド （71－254）含有Fc（kih）融合分子コンストラクト4．1の配列

配列番号:	説明	配列
239	二量体 hu 4-1BBL (71-254) - CL* Fc ノブ 鎖のヌクレオチド配列	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGGACTG CTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGTGGCCCAGA ACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCC TGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAA GAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTAC TACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCG AAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCT GAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGACAGTGGAT CTGCCTCCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGT TTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGG GAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGC AGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGAC CCCCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAAGG CGGAGGCGGATCTGGCGGCGGAGGATCTAGAGAGGGACCCGA ACTGTCCCCTGACGATCCAGCCGGGCTGCTGGATCTGAGACAG GGAATGTTCGCCCAGCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGCTGATTG ACGGACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCAGGGCTGGCAGGGG TGTCCCTGACTGGGGGACTGTCCTACAAAGAAGATACAAAAGA ACTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGTACTATGTGTTTTTTCAG CTGGAACTGAGGCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGCTCAGGATCT GTGTCCCTGGCTCTGCATCTGCAGCCACTGCGCTCTGCTGCTG GCGCAGCTGCACTGGCTCTGACTGTGGACCTGCCACCAGCCTC TAGCGAGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCCAAGGACGCCT GCTGCATCTGAGCGCCGGACAGCGCCTGGGAGTGCATCTGCAT ACTGAAGCCAGAGCCCGGCATGCTTGGCAGCTGACTCAGGGG GCAACTGTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACACCTGAGATCCCTG CCGGACTGCCAAGCCCTAGATCAGAAGGGGGCGGAGGTTCCG GAGGGGGAGGATCTCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTTAT CTTCCCACCCAGCGACCGGAAGCTGAAGTCTGGCACAGCCAG CGTCGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCCCGCGAGGCCAAG GTGCAGTGGAAGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGC CAGGAAAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTAC AGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAG AAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGT CTAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGCGACA AGACCCACACCTGTCCTCCATGCCCTGCCCCTGAAGCTGCTGG CGGCCCTAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAAGCCCAAGGACACC CTGATGATCAGCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGG ATGTGTCCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGT GGACGGCGTGGAAGTGCACAATGCCAAGACCAAGCCGCGGGA GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACC GTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCAT CTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACAC CCTGCCCCCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAG CCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCC GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAG

		ACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCT ACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGA ACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCA CTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
240	単量体 hu 4-1BBL (71-254) - CH1*のヌクレオチド配列	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGGACTG CTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGTGGCCCAGA ACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCC TGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAA GAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTAC TACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCG AAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCT GAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCTGGCTCTGACAGTGGAT CTGCCTCCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGT TTCAAGGCCGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGACTGG GAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGAGCCAGGCACGCCTGGC AGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGAC CCCCGAGATTCCTGCCGGCCTGCCTAGCCCTAGATCTGAAGGC GGCGGAGGTTCCGGAGGCGGAGGATCTGCTAGCACAAAGGGC CCCAGCGTGTTCCCTCTGGCCCCTAGCAGCAAGAGCACATCTG GCGGAACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGGAAGATTACTTCCC CGAGCCCGTGACCGTGTCCTGGAATTCTGGCGCCCTGACAAGC GGCGTGCACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGT ACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACAGTGCCCAGCAGCTCTCTGGG CACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAAC ACCAAGGTGGACGAGAAGGTGGAACCCAAGTCCTGC
241	抗 CD19(8B8-2B11) Fc ホール鎖のヌクレオチド配列	CAGGTGCAATTGGTTCAATCTGGTGCTGAAGTAAAAAAACCGG GCGCTTCCGTTAAAGTGAGCTGCAAAGCATCTGGTTACACCTT CACTGACTATATCATGCACTGGGTTCGTCAGGCCCCGGGCCAG GGTCTGGAGTGGATGGGCTACATTAACCCATACAACGACGGTT CCAAATATACCGAGAAATTCCAGGGCCGCGTCACGATGACCAG CGACACTTCTATCTCCACCGCGTACATGGAACTGTCTAGACTG CGTTCTGACGACACCGCTGTTTACTATTGTGCACGCGGTACCT ACTACTACGGTCCACAGCTGTTTGATTACTGGGGCCAAGGTAC CACGGTGACCGTAAGCTCTGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTG TTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACA GCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCC GTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTG CACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATAGCC TGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCTAGCAGCCTGGGCACCCA GACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAG GTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCACA CATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGT CAGTCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGAT CTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAG CCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG TACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGC ACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC CAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCC CCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGT

		GCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCC TCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAG CTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCT CATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
124	抗 CD19(8B8-2B11)軽鎖のヌクレオチド配列	表7参照
242	二量体 hu 4-1BBL (71-254) - CL* Fc ノブ 鎖	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGL AGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGS VSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLH LSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPS PRSEGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNV LLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQ LELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSE ARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVL GLFRVTPEIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGSRTVAAPSVFIFPPSDRK LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRD ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
243	単量体 hu 4-1BBL (71-254) - CH1*	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGL AGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGS VSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLH LSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPS PRSEGGGGSGGGGSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVE DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSC
244	CD19(8B8-2B11) Fc ホール 鎖	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYIMHWVRQAPGQG LEWMGYINPYNDGSKYTEKFQGRVTMTSDTSISTAYMELSRLRSDD TAVYYCARGTYYYGPQLFDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDEL TKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
126	抗 CD19(8B8-2B11) 軽鎖	表7参照

【０４６１】
対照Ｆと呼ばれるアッセイで使用された更なる対照は、国際特許出願公報の国際公開第２０１２／１３０８３１Ａ１号に記載された方法に従ってＦｃガンマ受容体への結合を抑止するためにＰｒｏ３２９Ｇｌｙ、Ｌｅｕ２３４Ａｌａ及びＬｅｕ２３５Ａｌａ変異（ＰＧＬＡＬＡと呼ぶ）を含む、非標的ＤＰ４７、生殖系列対照、ヒトＩｇＧ１であった。
【０４６２】
表３８は、「非標的」ＤＰ４７ ｈｕＩｇＧ１ ＰＧＬＡＬＡ抗体（対照Ｆ）のｃＤＮＡ及びアミノ酸配列を示す。
【０４６３】

表38：DP47非標的ヒトIgG1 PGLALA（対照F）の配列

配列番号:	説明	配列
205	DP47 重鎖 (huIgG1 PGLALA) のヌクレオチド配列	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTG GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTT TAGCAGTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAG GGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCA CATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAG AGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTG AGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGGCAGCG GATTTGACTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAG TGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCC TCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTG GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACT CAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCC TACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGT GCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG AATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGC CCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGC ACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCA AAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCA CATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAA GTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTG GTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCA AGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCC CATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAA CCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCA AGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCC CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGA GAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGG CTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGG TGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGG CTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCC GGGTAAA
166	DP47 軽鎖のヌクレオチド配列	表21参照
206	DP47 重鎖 (huIgG1 PGLALA)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKG LEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAKGSGFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
168	DP47 軽鎖	表21参照

【０４６４】

実施例２

一価標的ヒト４－１ＢＢリガンド三量体含有Ｆｃ融合抗原結合分子の産生

標的及び非標的一価三量体４－１ＢＢリガンドＣ末端Ｆｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子をコードする配列を、ＭＰＳＶプロモーターからの挿入断片の発現を駆動し、ＣＤＳの３’末端に位置する合成ポリＡ配列を含むプラスミドベクター中にクローニングした。加えて、ベクターは、プラスミドのエピソーム維持のためのＥＢＶ ＯｒｉＰ配列を含む。

【０４６５】

分断三量体４－１ＢＢリガンドＦｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子を、ポリエチレンイミン

を使用してＨＥＫ２９３－ＥＢＮＡ細胞を哺乳動物発現ベクターで同時トランスフェクトすることによって産生した。細胞は、対応する発現ベクターでトランスフェクトした。変異体ｘ．１１、ｘ．１２、ｘ．１３、ｘ．１４及び対照分子Ｈ、Ｉ、Ｊ及びＫについては、１：１：１の比（「ベクターノブ鎖」：「ベクターホール鎖」：「ベクター軽鎖」）。対照Ｄについては、１：１：１：１（「ベクターノブ鎖」：「ベクターホール鎖」：「ベクター軽鎖」：「ベクター軽鎖２」）の比で、ヒトＩｇＧ１、対照Ｆについては、１：１の比（「ベクター重鎖」：「ベクター軽鎖」）。

【０４６６】

５００ｍＬの振盪フラスコ中での産生のために、トランスフェクションの２４時間前に３億個のＨＥＫ２９３　ＥＢＮＡ細胞を播種した。トランスフェクションのために、細胞を２１０×ｇで１０分間遠心分離し、上清を２０ｍＬの予熱したＣＤ　ＣＨＯ培地と交換した。発現ベクター（２００μｇの全ＤＮＡ）を２０ｍＬのＣＤ　ＣＨＯ培地中で混合した。５４０μＬのＰＥＩの添加後、溶液を１５秒間ボルテックスし、室温で１０分間インキュベートした。その後、細胞をＤＮＡ／ＰＥＩ溶液と混合し、５００ｍＬの振盪フラスコに移し、３７℃において３時間、５％CO_2雰囲気のインキュベーターでインキュベートした。インキュベーション後、６ｍＭのＬ－グルタミン、５ｇ／ＬのＰＥＰＳＯＹ及び１．２ｍＭのバルプロ酸を補填したＥｘｃｅｌｌ培地１６０ｍＬを加え、細胞を２４時間培養した。トランスフェクションの１日後、１２％のフィードを加えた。７日間培養した後、上清を少なくとも４００×ｇで３０～４０分間遠心分離して収集した。溶液を滅菌濾過し（０．２２μｍフィルター）、アジ化ナトリウムを０．０１％（ｗ／ｖ）の最終濃度になるように添加し、４℃に保った。

【０４６７】

分泌タンパク質を、プロテインＡを使用するアフィニティークロマトグラフィーと、続くサイズ排除クロマトグラフィーにより、細胞培養上清から精製した。アフィニティークロマトグラフィーでは、上清を、リン酸ナトリウム（２０ｍＭ）、クエン酸ナトリウム（２０ｍＭ）緩衝液（ｐＨ７．５）で平衡化したＭａｂＳｅｌｅｃｔ　Ｓｕｒｅカラム（ＣＶ＝５～１５ｍＬ、ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ製の樹脂）にロードした。未結合タンパク質は、少なくとも６カラム容量の同じ緩衝液で洗浄することによって除去した。結合タンパク質は、２０ｍＭクエン酸ナトリウム、１００ｍＭ塩化ナトリウム、１００ｍＭグリシン緩衝液（ｐＨ３．０）を用いた段階溶出（８ＣＶ）又は線形勾配（２０ＣＶ）の何れかを使用して溶出させた。線形勾配では、更なる４カラム容量の段階溶出を適用した。

【０４６８】

収集した画分のｐＨを、１／１０（ｖ／ｖ）の０．５Ｍリン酸ナトリウム（ｐＨ８．０）を加えることによって調整した。２０ｍＭのヒスチジン、１４０ｍＭの塩化ナトリウム、ｐＨ６．０の０．０１％（ｖ／ｖ）Ｔｗｅｅｎ２０溶液で平衡にしたＨｉＬｏａｄ　Ｓｕｐｅｒｄｅｘ２００カラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）上にロードする前にタンパク質を濃縮した。

【０４６９】

タンパク質濃度は、アミノ酸配列に基づいて計算したモル吸光係数を使用して、２８０ｎｍでの光学密度（ＯＤ）を測定することによって決定した。標的三量体４－１ＢＢリガンドＦｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子の純度と分子量を、還元剤（５ｍＭの１，４－ジチオトレイトール）の存在下及び非存在下でＣｏｏｍａｓｓｉｅ　ＳｉｍｐｌｅＢｌｕｅ™　ＳａｆｅＳｔａｉｎ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　ＵＳＡ）で染色して、ＳＤＳ－ＰＡＧＥにより、又はＣａｌｉｐｅｒ　ＬａｂＣｈｉｐ　ＧＸＩＩ（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）を使用するＣＥ－ＳＤＳによって分析した。試料の凝集物含有量は、２５ｍＭのK_2HPO_4、１２５ｍＭのＮａＣｌ、２００ｍＭのＬ－アルギニンモノヒドロクロライド、０．０２％（ｗ／ｖ）のNaN_3、ｐＨ６．７のランニング緩衝液で２５℃において平衡にしたＴＳＫｇｅｌ　Ｇ３０００ＳＷ　ＸＬ分析サイズ排除カラム（Ｔｏｓｏｈ）を使用して分析した。

【０４７０】

表３９は、標的分断三量体Ｃ末端４－１ＢＢリガンドＦｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子の

収量及び最終単量体含量をまとめたものである。

表39：例示的な標的分断三量体C末端4－1BBリガンドFc(kih)融合抗原結合分子の生化学的分析

コンストラクト	単量体 [%] (SEC)	収量 [mg/l]
一価標的 FAP(4B9)分断三量体 C 末端 4-1BB リガンド (71-248) Fc (kih)融合抗原結合分子 コンストラクト 2.11	97.8	19
一価標的 CD19(8B8-018)分断三量体 C 末端 4-1BB リガンド (71-248) Fc (kih)融合抗原結合分子 コンストラクト 3.11	100	16
一価標的 CD19(8B8-2B11)分断三量体 C 末端 4-1BB リガンド (71-248) Fc (kih)融合抗原 結合分子 コンストラクト 4.11	100	6
一価 DP47 非標的分断三量体ヒト 4-1BB リガンド (71-254) Fc (kih)融合抗原 (対照 D)	99.5	25.9
生殖系列 DP47 ヒト IgG1 PGLALA 対照 F	100	50

【０４７１】

実施例３

表面プラズモン共鳴による親和性決定

３．１　抗原の調製、精製及び特徴付け又は表面プラズモン共鳴

［ヒトＣＤ１９Ｆｃ融合タンパク質］

ヒトＩｇＧ１　Ｆｃドメインに融合したヒトＣＤ１９エクトドメインの調製、精製及び特徴付けは、実施例１．３．２に記載されている。

【０４７２】

［ヒト４－１ＢＢ］

ヒト４－１ＢＢのエクトドメイン（Ｑ０７０１１、アミノ酸２４－１８６）を、ａｖｉ（ＧＬＮＤＩＦＥＡＱＫＩＥＷＨＥ、配列番号：２４５）及びヘキサヒスチジンタグ（表４０）とインフレームでサブクローニングした。

表40:単量体ヒト4－1BB His分子の配列

配列番号:	抗原	配列
207	ヒト 4-1BB His のヌクレオチド配列	CTGCAGGACCCCTGCAGCAACTGCCCTGCCGGCACCTTCTGCGA CAACAACCGGAACCAGATCTGCAGCCCCTGCCCCCCCAACAGCTT CAGCTCTGCCGGCGGACAGCGGACCTGCGACATCTGCAGACAGT GCAAGGGCGTGTTCAGAACCCGGAAAGAGTGCAGCAGCACCAGC AACGCCGAGTGCGACTGCACCCCCGGCTTCCATTGTCTGGGAGCC GGCTGCAGCATGTGCGAGCAGGACTGCAAGCAGGGCCAGGAACT GACCAAGAAGGGCTGCAAGGACTGCTGCTTCGGCACCTTCAACGA CCAGAAGCGGGGCATCTGCCGGCCCTGGACCAACTGTAGCCTGG ACGGCAAGAGCGTGCTGGTCAACGGCACCAAAGAACGGGACGTC GTGTGCGGCCCCAGCCCTGCTGATCTGTCTCCTGGGGCCAGCAG CGTGACCCCTCCTGCCCCTGCCAGAGAGCCTGGCCACTCTCCTCA GGTCGACGAACAGTTATATTTTCAGGGCGGCTCAGGCCTGAACGA CATCTTCGAGGCCCAGAAGATCGAGTGGCACGAGGCTCGAGCTCA CCACCATCACCATCAC
208	ヒト 4-1BB His	LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKG VFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKG CKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPA DLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQVDEQLYFQGGSGLNDIFEAQKIEWH EARAHHHHHH

【０４７３】

タンパク質産生を、実施例１．３．２のＣＤ１９　Ｆｃ融合タンパク質について上記したように実施した。分泌されたタンパク質は、キレートクロマトグラフィーと、続いてサイズ排除クロマトグラフィーによって細胞培養上清から精製した。

【０４７４】

最初のクロマトグラフィー工程は、２０ｍＭのリン酸ナトリウム、５００ｎＭの塩化ナトリウム、ｐＨ７．４中で平衡にしたＮｉＮＴＡ　Ｓｕｐｅｒｆｌｏｗ　Ｃａｒｔｒｉｄｇｅ（５ｍｌ、Ｑｉａｇｅｎ）で実施した。溶出は、５％から４５％の溶出緩衝液（２０ｍＭのリン酸ナトリウム、５００ｎＭの塩化ナトリウム、５００ｍＭのイミダゾール，ｐＨ７．４）から１２カラム容量以上の勾配を適用することにより実施した。

【０４７５】

タンパク質を濃縮し、２ｍＭのＭＯＰＳ、１５０ｍＭの塩化ナトリウム、ｐＨ７．４の０．０２％（ｗ／ｖ）のアジ化ナトリウム溶液で平衡にしたＨｉＬｏａｄ　Ｓｕｐｅｒｄｅｘ７５カラム（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）にロードする前に濃縮し、濾過した。表４１は、単量体ヒトａｖｉＨｉｓタグ４－１ＢＢの収量と最終単量体含量をまとめたものである。

表41:単量体ヒト4－1BB avi Hisの生化学的分析

コンストラクト	単量体 [%] (SEC)	収量 [mg/l]
単量体 ヒト 4-1BB avi His	100	16.4

【０４７６】

３．２　親和性の決定

組換え４－１ＢＢ又はＣＤ１９への標的分断三量体Ｃ末端４－１ＢＢリガンド抗原結合分子の結合を表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）によって評価した。全てのＳＰＲ実験は、ランニング緩衝液（０．０１ＭのＨＥＰＥＳ，ｐＨ７．４、０．１５ＭのＮａＣｌ、３ｍＭのＥＤＴＡ、０．００５％の界面活性剤Ｐ２０、Ｂｉａｃｏｒｅ、Ｆｒｅｉｂｕｒｇ／Ｇｅ

ｒｍａｎｙ）としてＨＢＳ－ＥＰを用いて２５℃においてＢｉａｃｏｒｅ Ｔ２００で実施した。

【０４７７】

［ヒト４－１ＢＢに対する親和性］

抗ヒトＦｃ抗体（Ｂｉａｃｏｒｅ，Ｆｒｅｉｂｕｒｇ／Ｇｅｒｍａｎｙ）を、標準アミンカップリングキット（Ｂｉａｃｏｒｅ，Ｆｒｅｉｂｕｒｇ／Ｇｅｒｍａｎｙ）を使用してｐＨ５．０でＣＭ５チップ上に直接カップリングさせた。固定化レベルはおよそ４０００ＲＵであった。標的分断三量体Ｃ末端４－１ＢＢリガンドを４ｎＭの濃度で９０秒間捕捉した。組換えヒト４－１ＢＢ ａｖｉ ｈｉｓを２．７～２０００ｎＭの濃度範囲で３０μＬ／分の流量で１２０秒にわたってフローセルに通した。解離を１２０秒間モニターした。バルク屈折率の差を、基準フローセルで得られた応答を差し引くことによって補正した。ここで、抗原は、固定された抗ヒトＦｃ抗体を伴うが抗体ではなくＨＢＳ－ＥＰが注入された表面上を通過させた。

【０４７８】

［ヒトＣＤ１９に対する親和性］

抗ヒトＦａｂ抗体（Ｂｉａｃｏｒｅ，Ｆｒｅｉｂｕｒｇ／Ｇｅｒｍａｎｙ）を、標準アミンカップリングキット（Ｂｉａｃｏｒｅ，Ｆｒｅｉｂｕｒｇ／Ｇｅｒｍａｎｙ）を使用してｐＨ５．０でＣＭ５チップ上に直接カップリングさせた。固定化レベルはおよそ７０００ＲＵであった。標的分断三量体Ｃ末端４－１ＢＢリガンドを７５～１００ｎＭの濃度で６０秒間捕捉した。組換えヒトＣＤ１９ Ｆｃ（ｋｉｈ）を７．８～５００ｎＭの濃度範囲で３０μＬ／分の流量で２２０秒にわたってフローセルに通した。解離を６００／２５００秒間モニターした。バルク屈折率の差を、基準フローセルで得られた応答を差し引くことによって補正した。ここで、抗原は、固定された抗ヒトＦｃ抗体を伴うが抗体ではなくＨＢＳ－ＥＰが注入された表面上を通過させた。

【０４７９】

数値積分法による１：１ラングミュア結合の速度方程式に適合させるために、Ｂｉａｃｏｒｅ Ｔ２００評価ソフトウェア（ｖＡＡ，Ｂｉａｃｏｒｅ ＡＢ，Ｕｐｐｓａｌａ／Ｓｗｅｄｅｎ）を使用して速度定数を導出し、結合活性を定性的に推定するために使用した。

【０４８０】

表42:標的分断三量体C末端4－1BBリガンド抗原結合分子の組換えヒト4－1BBへの結合

コンストラクト	組換えヒト 4-1BB			
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	KD (M)
コンストラクト 2.11	7.62E+04	2.63E-02	3.47E-07	2.079E-08
コンストラクト 4.11	7.37E+04	2.72E-02	3.69E-07	1.762E-08

標的分断三量体Ｃ末端４－１ＢＢリガンド抗原結合分子とヒト４－１ＢＢ ａｖｉ ｈｉｓの間の相互作用の親和定数を、１：１ラングミュア結合に適合させることによって決定した。結果は３回の実験の平均である。

【０４８１】

表43:標的分断三量体C末端4－1BBリガンドの組換えヒトCD19への結合

コンストラクト	組換えヒト CD19			
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	KD (M)
コンストラクト 4.11	5.22E+04	4.57E−05	8.85E−10	1.32E−10

標的分断三量体Ｃ末端４－１ＢＢリガンド抗原結合分子とヒトＣＤ１９ Ｆｃ（ｋｉｈ）の間の相互作用の親和定数を、１：１ラングミュア結合に適合させることによって決定した。結果は３回の実験の平均である。

【０４８２】

３．３　表面プラズモン共鳴による標的Ｃ末端４－１ＢＢ分断三量体リガンドＦｃ融合抗原結合分子の同時結合の測定

ヒト４－１ＢＢ Ｆｃ（ｋｉｈ）とヒトＦＡＰ、又はヒトＣＤ１９の同時結合能を表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）によって評価した。全てのＳＰＲ実験は、ランニング緩衝液（０．０１ＭのＨＥＰＥＳ ｐＨ７．４、０．１５ＭのＮａＣｌ、３ｍＭのＥＤＴＡ、０．００５％の界面活性剤Ｐ２０、Ｂｉａｃｏｒｅ，Ｆｒｅｉｂｕｒｇ／Ｇｅｒｍａｎｙ）としてＨＢＳ－ＥＰを用いて２５℃においてＢｉａｃｏｒｅ Ｔ２００で実施した。

【０４８３】

ビオチン化ヒト４－１ＢＢ Ｆｃ（ｋｉｈ）をストレプトアビジン（ＳＡ）センサーチップのフローセルに直接カップリングさせた。最大２００共鳴単位（ＲＵ）の固定化レベルを使用した。標的三量体Ｃ末端４－１ＢＢリガンドＦｃ（ｋｉｈ）融合分子を、２００ｎＭの濃度範囲で３０μＬ／分の流量でフローセルに９０秒間通過させ、解離をゼロ秒に設定した。ヒトＦＡＰ又はヒトＣＤ１９ Ｆｃ（ｋｉｈ）を、３０μＬ／分の流量で第二アナライトとして注入し、５００ｎＭの濃度で９０秒間フローセルを通した（図４Ａ）。解離を１２０秒間モニターした。バルク屈折率の差異は、タンパク質が固定化されていない基準フローセルで得られた応答を差し引くことによって補正した。二重特異性コンストラクトは、それぞれヒト４－１ＢＢとヒトＦＡＰ又はヒトＣＤ１９に同時に結合することができた（図４Ｂ、４Ｃ及び４Ｄ）。

【０４８４】

実施例４

ＦＡＰ標的／ＤＰ４７ヒト４－１ＢＢリガンド三量体含有Ｆｃ融合抗原結合分子の調製及び精製

４．１　４－１ＢＢリガンドがＣ末端に融合した一価ＦＡＰ（４Ｂ９）標的／ＤＰ４７ ４－１ＢＢリガンド三量体含有Ｆｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子（コンストラクト２．１５及び２．１６）の調製（ホール鎖上のＦＡＰ）

ヒト４－１ＢＢリガンドのエクトドメインの一部をコードするＤＮＡ配列（アミノ酸７１－２５４）を、ＵｎｉｐｒｏｔデータベースのＰ４１２７３配列に従って合成した。

【０４８５】

（Ｇ４Ｓ）２リンカーによって分離された４－１ＢＢリガンドの二つのエクトドメインを含むポリペプチドを、図１Ａ：ヒトＩｇＧ１ Ｆｃ、（Ｇ４Ｓ）２コネクター、ヒト４－１ＢＢリガンド、（Ｇ４Ｓ）２コネクター、ヒト４－１ＢＢリガンドに示されるように、ヒトＩｇＧ１ Ｆｃホール又はノブ鎖のＣ末端にインフレームでサブクローニングした。４－１ＢＢリガンドの一つのエクトドメインを含むポリペプチドを、図１Ｂ：ヒトＩｇＧ１ Ｆｃ、（Ｇ４Ｓ）２コネクター、ヒト４－１ＢＢリガンドに記載されているように、ヒトＩｇＧ１ Ｆｃノブ又はホール鎖のＣ末端にインフレームでサブクローニングした。

【０４８６】

クローン４Ｂ９である線維芽細胞活性化タンパク質（ＦＡＰ）に特異的なバインダーをコ

ードする重鎖及び軽鎖ＤＮＡ配列の可変領域を、ホールの定常重鎖又はヒトＩｇＧ１の定常軽鎖の何れかとインフレームでサブクローニングした。クローンＤＰ４７である非結合クローンをコードする重鎖及び軽鎖ＤＮＡ配列の可変領域を、ノブの定常重鎖又はヒトＩｇＧ１の定常軽鎖の何れかとインフレームでサブクローニングした。誤って対にされた軽鎖の形成を減少させるために、ｃｒｏｓｓｍａｂ技術を適用した（国際特許出願の国際公開第２０１０／１４５７９２Ａ１号）。この実施例では、バインダーＤＰ４７の交差Ｆａｂユニット（ＶＨＣＬ）をノブ鎖に融合させた。

【０４８７】

Ｆｃガンマ受容体への結合を抑止するためにＰｒｏ３２９Ｇｌｙ、Ｌｅｕ２３４Ａｌａ及びＬｅｕ２３５Ａｌａ変異をノブ及びホール重鎖の定常領域に導入した（国際特許出願公報の国際公開第２０１２／１３０８３１Ａ１号）。

【０４８８】

Ｙ３４９Ｃ／Ｔ３６６Ｓ／Ｌ３６８Ａ／Ｙ４０７Ｖ変異を含む抗ＦＡＰ ｈｕＩｇＧ１ Ｆｃホール鎖、Ｓ３５４Ｃ／Ｔ３６６Ｗ変異を含むＤＰ４７ ｈｕＩｇＧ１ Ｆｃノブ鎖及び抗ＦＡＰ及びＤＰ４７の二つの軽鎖の組合せが、構築された三量体４－１ＢＢリガンド、一つのＦＡＰ結合Ｆａｂ及び一つの非結合ＤＰ４７Ｆａｂを含む、ヘテロ二量体の作製を可能にする（図５Ａ及び５Ｂ）。

【０４８９】

表４４は、二量体４－１ＢＢＬがホール鎖に融合している一価ＦＡＰ（４Ｂ９）標的４－１ＢＢリガンド（７１－２５４）三量体含有Ｆｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子（コンストラクト２．１５）のｃＤＮＡ及びアミノ酸配列を示す。

表44：FAP(4B9)標的／DP47ヒト4－1BBリガンド三量体含有Fc(kih)融合抗原結合分子コンストラクト2．15の配列

配列番号:	説明	配列
209	抗 FAP(4B9) Fc ホール二量体 4-1BB リガンド (71-254)鎖のヌクレオチド配列	GAGGTGCAGCTGCTCGAAAGCGGCGGAGGACTGGTGCAGCCT GGCGGCAGCCTGAGACTGTCTTGCGCCGCCAGCGGCTTCACC TTCAGCAGCTACGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCCCCTGGC AAGGGACTGGAATGGGTGTCCGCCATCATCGGCTCTGGCGCCA GCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAG CCGGGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGC CTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGGGA TGGTTCGGCGGCTTCAACTACTGGGGACAGGGCACCCTGGTCA CAGTGTCCAGCGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCT GGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCTCT GGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTG TCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCC CCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGT GGTCACCGTGCCTTCTAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATC TGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA AGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCACACATGCCCACC GTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTC TTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCC CTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGG CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC TCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCA GCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGA TGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAA GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG GGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGG ACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGA CAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCT CCCTGTCTCCGGGTGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGAT CCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGGAC TGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGTGGCCCA GAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGAT CCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACA AAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGT ACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGG CGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCT CTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGACAGTGG ATCTGCCTCCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGG GTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTG GGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGG CAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGA CCCCCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAAG GCGGAGGCGGATCTGGCGGCGGAGGATCTAGAGAGGGACCCG AACTGTCCCCTGACGATCCAGCCGGGCTGCTGGATCTGAGACA

		GGGAATGTTCGCCCAGCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGCTGATT GACGGACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCAGGGCTGGCAGGG GTGTCCCTGACTGGGGGACTGTCCTACAAAGAAGATACAAAAG AACTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGTACTATGTGTTTTTTCA GCTGGAACTGAGGCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGCTCAGGATC TGTGTCCCTGGCTCTGCATCTGCAGCCACTGCGCTCTGCTGCT GGCGCAGCTGCACTGGCTCTGACTGTGGACCTGCCACCAGCCT CTAGCGAGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCCAAGGACGCC TGCTGCATCTGAGCGCCGGACAGCGCCTGGGAGTGCATCTGCA TACTGAAGCCAGAGCCCGGCATGCTTGGCAGCTGACTCAGGGG GCAACTGTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACACCTGAGATCCCTG CCGGACTGCCAAGCCCTAGATCAGAA
210	DP47 (VHCL) Fc ノブ単量体 4-1BB (71-254) リガンドのヌクレオチド配列	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTG GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTT TAGCAGTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAG GGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCA CATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAG AGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTG AGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGGCAGCG GATTTGACTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAG CGCTAGTGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTTATCTTTCCCCCATCC GATGAACAGCTGAAAAGCGGCACCGCCTCCGTCGTGTGTCTGC TGAACAATTTTTACCCTAGGGAAGCTAAAGTGCAGTGGAAAGT GGATAACGCACTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAATCTGTGACA GAACAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCCTCCACCC TGACACTGTCTAAGGCTGATTATGAGAAACACAAAGTCTACGC CTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAG AGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGACAAGACCCACACCTGTCCCC CTTGTCCTGCCCCTGAAGCTGCTGGCGGCCCTTCTGTGTTCCT GTTCCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACC CCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGACC CTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCA CAACGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGG CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC TCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCA GCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCCTGCAGAGA TGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTCAAG GGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACG GCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGA CAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACTCCAAACTGACCGTGGAC AAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTG ATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGA GCCTGAGCCCCGGCGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGAT CCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGGAC TGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGTGGCCCA GAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGAT CCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACA AAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGT ACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGG CGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCT CTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGACAGTGG ATCTGCCTCCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGG

		GTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTG GGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGG CAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGA CCCCCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAA
103	抗 FAP(4B9)軽鎖のヌクレオチド配列	表1参照
211	DP47 (VL-CH1)軽鎖のヌクレオチド配列	GAAATCGTGTTAACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTC CAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCTTGCAGGGCCAGTCAGAGTGT TAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAG GCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGAGCATCCAGCAGGGCCACTG GCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCCGGGACAGACTT CACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTG TATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCGCTGACGTTCGGCC AGGGGACCAAAGTGGAAATCAAGAGCTCCGCTAGCACCAAAGG CCCTTCCGTGTTTCCTCTGGCTCCTAGCTCCAAGTCCACCTCT GGAGGCACCGCTGCTCTCGGATGCCTCGTGAAGGATTATTTTC CTGAGCCTGTGACAGTGTCCTGGAATAGCGGAGCACTGACCTC TGGAGTGCATACTTTCCCCGCTGTGCTGCAGTCCTCTGGACTG TACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCCCAGCAGCAGCCTG GGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCA ACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAAGTCTTGT
212	抗 FAP(4B9) Fc ホール二量体 4-1BB リガンド (71-254) 鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKG LEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVS LSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGG GSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDP GLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGS GSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRL LHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL PSPRSEGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQ NVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVF FQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPAS SEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGAT VLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE
213	DP47 (VH-CL) Fc ノブ単量体 4-1BB (71-254)リガンド	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKG LEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAKGSGFDYWGQGTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECDKT HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELT KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGG

		GGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPL SWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAF GFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTP EIPAGLPSPRSE
106	抗 FAP(4B9)軽鎖	表1参照
214	DP47 (VL-CH1) 軽鎖	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAP RLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQY GSSPLTFGQGTKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

【０４９０】

表４５は、二量体４－１ＢＢＬがＦｃノブ鎖に融合している一価ＦＡＰ（４Ｂ９）標的４－１ＢＢリガンド（７１－２５４）三量体含有Ｆｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子（コンストラクト２．１６）のｃＤＮＡ及びアミノ酸配列を示す。

表45：FAP（4B9）標的ヒト4－1BBリガンド三量体含有Fc（kih）融合分子コンストラクト2．16の配列

配列番号:	説明	配列
215	抗 FAP(4B9) Fc ホール単量体 4-1BBL (71-254)鎖のヌクレオチド配列	GAGGTGCAGCTGCTCGAAAGCGGCGGAGGACTGGTGCAGCCT GGCGGCAGCCTGAGACTGTCTTGCGCCGCCAGCGGCTTCACC TTCAGCAGCTACGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCCCCTGGC AAGGGACTGGAATGGGTGTCCGCCATCATCGGCTCTGGCGCCA GCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAG CCGGGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGC CTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGGGA TGGTTCGGCGGCTTCAACTACTGGGGACAGGGCACCCTGGTCA CAGTGTCCAGCGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCT GGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCTCT GGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTG TCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCC CCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGT GGTCACCGTGCCTTCTAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATC TGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA AGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACTCACACATGCCCACC GTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTC TTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCC CTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGG CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC TCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCA GCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGA TGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAA GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG GGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGG ACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGA CAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCT CCCTGTCTCCGGGTGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGAT CCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGGAC TGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGTGGCCCA GAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGAT CCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACA AAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGT ACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGG CGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCT CTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGACAGTGG ATCTGCCTCCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGG GTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTG GGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGG CAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGA CCCCCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAA
216	DP47 (VH-CL) Fc ノブ二量体 4-1BB リガンド (71-254)鎖	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTG GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTT TAGCAGTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAG GGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCA

	のヌクレオチド配列	CATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAG AGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTG AGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGGCAGCG GATTTGACTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAG CGCTAGTGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTTATCTTTCCCCCATCC GATGAACAGCTGAAAAGCGGCACCGCCTCCGTCGTGTGTCTGC TGAACAATTTTTACCCTAGGGAAGCTAAAGTGCAGTGGAAAGT GGATAACGCACTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAATCTGTGACA GAACAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCCTCCACCC TGACACTGTCTAAGGCTGATTATGAGAAACACAAAGTCTACGC CTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAG AGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGACAAGACCCACACCTGTCCCC CTTGTCCTGCCCCTGAAGCTGCTGGCGGCCCTTCTGTGTTCCT GTTCCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACC CCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGACC CTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCA CAACGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGG CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC TCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCA GCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCCTGCAGAGA TGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTCAAG GGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACG GCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGA CAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACTCCAAACTGACCGTGGAC AAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTG ATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGA GCCTGAGCCCCGGCGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGAT CCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGGAC TGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGTGGCCCA GAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGAT CCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACA AAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGT ACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGG CGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCT CTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGACAGTGG ATCTGCCTCCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGG GTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTG GGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGG CAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGA CCCCCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAAG GCGGAGGCGGATCTGGCGGCGGAGGATCTAGAGAGGGACCCG AACTGTCCCCTGACGATCCAGCCGGGCTGCTGGATCTGAGACA GGGAATGTTCGCCCAGCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGCTGATT GACGGACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCAGGGCTGGCAGGG GTGTCCCTGACTGGGGGACTGTCCTACAAAGAAGATACAAAAG AACTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGTACTATGTGTTTTTTCA GCTGGAACTGAGGCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGCTCAGGATC TGTGTCCCTGGCTCTGCATCTGCAGCCACTGCGCTCTGCTGCT GGCGCAGCTGCACTGGCTCTGACTGTGGACCTGCCACCAGCCT CTAGCGAGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCCAAGGACGCC TGCTGCATCTGAGCGCCGGACAGCGCCTGGGAGTGCATCTGCA TACTGAAGCCAGAGCCCGGCATGCTTGGCAGCTGACTCAGGGG

		GCAACTGTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACACCTGAGATCCCTG CCGGACTGCCAAGCCCTAGATCAGAA
103	抗 FAP(4B9)軽鎖のヌクレオチド配列	表１参照
211	DP47 (VL-CH1)軽鎖のヌクレオチド配列	表４２参照
217	抗 FAP(4B9) Fc ホール単量体 4-1BBL (71-254) 鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKG LEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVS LSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGG GSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDP GLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGS GSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRL LHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL PSPRSE
218	DP47 (VH-CL) Fc ノブ二量体 4-1BB リガンド (71-254)鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKG LEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAKGSGFDYWGQGTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECDKT HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELT KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGG GGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPL SWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAF GFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTP EIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFA QLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKA GVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTV DLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQL TQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE
106	抗 FAP(4B9) 軽鎖	表１参照
214	DP47 (VL-CH1) 軽鎖	表４２参照

【０４９１】

４．２　４－１ＢＢリガンドがＣ末端に融合した一価ＦＡＰ（４Ｂ９）標的／ＤＰ４７　４－１ＢＢリガンド三量体含有Ｆｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子（コンストラクト２．１７及び２．１８）の調製（ノブ鎖上のＦＡＰ）

ヒト４－１ＢＢリガンドのエクトドメインの一部をコードするＤＮＡ配列（アミノ酸７１－２５４）を、Ｕｎｉｐｒｏｔデータベースの Ｐ４１２７３配列に従って合成した。

【０４９２】

（Ｇ４Ｓ）２リンカーによって分離された４－１ＢＢリガンドの二つのエクトドメインを含むポリペプチドを、図１Ａ：ヒトＩｇＧ１　Ｆｃ、（Ｇ４Ｓ）２コネクター、ヒト４－１

ＢＢリガンド、（Ｇ４Ｓ）２コネクター、ヒト４－１ＢＢリガンドに示されるように、ヒトＩｇＧ１ Ｆｃホール又はノブ鎖のＣ末端にインフレームでサブクローニングした。４－１ＢＢリガンドの一つのエクトドメインを含むポリペプチドを、図１Ｂ：ヒトＩｇＧ１ Ｆｃ、（Ｇ４Ｓ）２コネクター、ヒト４－１ＢＢリガンドに記載されているように、ヒトＩｇＧ１ Ｆｃノブ又はホール鎖のＣ末端にインフレームでサブクローニングした。

【０４９３】

クローン４Ｂ９である線維芽細胞活性化タンパク質（ＦＡＰ）に特異的なバインダーをコードする重鎖及び軽鎖ＤＮＡ配列の可変領域を、ノブの定常重鎖又はヒトＩｇＧ１の定常軽鎖の何れかとインフレームでサブクローニングした。クローンＤＰ４７である非結合クローンをコードする重鎖及び軽鎖ＤＮＡ配列の可変領域を、ホールの定常重鎖又はヒトＩｇＧ１の定常軽鎖の何れかとインフレームでサブクローニングした。誤って対にされた軽鎖の形成を減少させるために、ｃｒｏｓｓｍａｂ技術を適用した（国際特許出願の国際公開第２０１０／１４５７９２Ａ１号）。この実施例では、バインダーＤＰ４７の交差Ｆａｂユニット（ＶＨＣＬ）をノブ鎖に融合させた。

【０４９４】

Ｆｃガンマ受容体への結合を抑止するためにＰｒｏ３２９Ｇｌｙ、Ｌｅｕ２３４Ａｌａ及びＬｅｕ２３５Ａｌａ変異をノブ及びホール重鎖の定常領域に導入した（国際特許出願公報の国際公開第２０１２／１３０８３１Ａ１号）。

【０４９５】

Ｙ３４９Ｃ／Ｔ３６６Ｓ／Ｌ３６８Ａ／Ｙ４０７Ｖ変異を含むＤＰ４７ ｈｕＩｇＧ１ Ｆｃホール鎖、Ｓ３５４Ｃ／Ｔ３６６Ｗ変異を含む抗ＦＡＰ ｈｕＩｇＧ１ Ｆｃノブ鎖及び抗ＦＡＰ及びＤＰ４７の二つの軽鎖の組合せが、構築された三量体４－１ＢＢリガンド、一つのＦＡＰ結合Ｆａｂ及び一つの非結合ＤＰ４７Ｆａｂを含む、ヘテロ二量体の作製を可能にする（図５Ｃ及び５Ｄ）。

【０４９６】

表４６は、二量体４－１ＢＢＬがＦｃホール鎖に融合している一価ＤＰ４７／ＦＡＰ（４Ｂ９）標的４－１ＢＢリガンド（７１－２５４）三量体含有Ｆｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子（コンストラクト２．１７）のｃＤＮＡ及びアミノ酸配列を示す。

表46：FAP（4B9）標的／DP47ヒト4－1BBリガンド三量体含有Fc（kih）融合抗原結合分子コンストラクト2．17の配列

配列番号:	説明	配列
219	DP47(VH-CL) Fc ホール二量体 4-1BB リガンド (71-254)鎖のヌクレオチド配列	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTG GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTT TAGCAGTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAG GGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCA CATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAG AGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTG AGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGGCAGCG GATTTGACTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAG CGCTAGTGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTTATCTTTCCCCCATCC GATGAACAGCTGAAAAGCGGCACCGCCTCCGTCGTGTGTCTGC TGAACAATTTTTACCCTAGGGAAGCTAAAGTGCAGTGGAAAGT GGATAACGCACTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAATCTGTGACA GAACAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCCTCCACCC TGACACTGTCTAAGGCTGATTATGAGAAACACAAAGTCTACGC CTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAG AGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGACAAAACTCACACATGCCCAC CGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCT CTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACC CCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGC ATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGG CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC TCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCA GCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGA TGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAA GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG GGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGG ACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGA CAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCT CCCTGTCTCCGGGTGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGAT CCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGGAC TGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGTGGCCCA GAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGAT CCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACA AAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGT ACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGG CGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCT CTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGACAGTGG ATCTGCCTCCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGG GTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTG GGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGG CAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGA CCCCCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAAG GCGGAGGCGGATCTGGCGGCGGAGGATCTAGAGAGGGACCCG AACTGTCCCCTGACGATCCAGCCGGGCTGCTGGATCTGAGACA

		GGGAATGTTCGCCCAGCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGCTGATT GACGGACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCAGGGCTGGCAGGG GTGTCCCTGACTGGGGGACTGTCCTACAAAGAAGATACAAAAG AACTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGTACTATGTGTTTTTTCA GCTGGAACTGAGGCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGCTCAGGATC TGTGTCCCTGGCTCTGCATCTGCAGCCACTGCGCTCTGCTGCT GGCGCAGCTGCACTGGCTCTGACTGTGGACCTGCCACCAGCCT CTAGCGAGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCCAAGGACGCC TGCTGCATCTGAGCGCCGGACAGCGCCTGGGAGTGCATCTGCA TACTGAAGCCAGAGCCCGGCATGCTTGGCAGCTGACTCAGGGG GCAACTGTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACACCTGAGATCCCTG CCGGACTGCCAAGCCCTAGATCAGAA
220	FAP (4B9) Fc ノブ単量体 4-1BB (71-254)リガンドのヌクレオチド配列	GAGGTGCAGCTGCTCGAAAGCGGCGGAGGACTGGTGCAGCCT GGCGGCAGCCTGAGACTGTCTTGCGCCGCCAGCGGCTTCACC TTCAGCAGCTACGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCCCCTGGC AAGGGACTGGAATGGGTGTCCGCCATCATCGGCTCTGGCGCCA GCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAG CCGGGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGC CTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGGGA TGGTTCGGCGGCTTCAACTACTGGGGACAGGGCACCCTGGTCA CAGTGTCCAGCGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCT GGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCTCT GGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTG TCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCC CCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGT GGTCACCGTGCCTTCTAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATC TGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA AGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCC CTTGTCCTGCCCCTGAAGCTGCTGGCGGCCCTTCTGTGTTCCT GTTCCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACC CCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGACC CTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCA CAACGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGG CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC TCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCA GCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCCTGCAGAGA TGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTCAAG GGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACG GCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGA CAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACTCCAAACTGACCGTGGAC AAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTG ATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGA GCCTGAGCCCCGGCGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGAT CCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGGAC TGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGTGGCCCA GAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGAT CCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACA AAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGT ACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGG CGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCT CTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGACAGTGG ATCTGCCTCCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGG

		GTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTG GGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGG CAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGA CCCCCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAA
103	抗 FAP(4B9) 軽鎖のヌクレオチド配列	表１参照
211	DP47 (VL-CH1) 軽鎖のヌクレオチド配列	表４２参照
221	DP47(VH-CL) Fc ホール二量体 4-1BB リガンド (71-254) 鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKG LEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAKGSGFDYWGQGTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECDKT HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGG GGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPL SWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAF GFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTP EIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFA QLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKA GVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTV DLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQL TQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE
222	FAP (4B9) Fc ノブ単量体 4-1BB (71-254)リガンド	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKG LEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVS LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGG GSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDP GLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGS GSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRL LHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL PSPRSE
106	抗 FAP(4B9)軽鎖	表１参照
214	DP47 (VL-CH1) 軽鎖	表４２参照

【０４９７】

表４７は、二量体４－１ＢＢＬがノブ鎖に融合している一価ＤＰ４７／ＦＡＰ（４Ｂ９）標的４－１ＢＢリガンド（７１－２５４）三量体含有Ｆｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子（コンストラクト２．１８）のｃＤＮＡ及びアミノ酸配列を示す。

表47：FAP（4B9）標的ヒト4－1BBリガンド三量体含有Fc（kih）融合分子コンストラクト2．18の配列

配列番号:	説明	配列
223	DP47 (VH-CL) Fc ホール単量体 4-1BBL (71-254)鎖のヌクレオチド配列	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTG GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTT TAGCAGTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAG GGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCA CATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAG AGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTG AGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGGCAGCG GATTTGACTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAG CGCTAGTGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTTATCTTTCCCCCATCC GATGAACAGCTGAAAAGCGGCACCGCCTCCGTCGTGTGTCTGC TGAACAATTTTTACCCTAGGGAAGCTAAAGTGCAGTGGAAAGT GGATAACGCACTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAATCTGTGACA GAACAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCCTCCACCC TGACACTGTCTAAGGCTGATTATGAGAAACACAAAGTCTACGC CTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAG AGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGACAAAACTCACACATGCCCAC CGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCT CTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACC CCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGC ATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGG CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC TCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCA GCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGA TGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAA GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG GGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGG ACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGA CAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCT CCCTGTCTCCGGGTGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGAT CCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGGAC TGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGTGGCCCA GAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGAT CCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACA AAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGT ACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGG CGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCT CTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGACAGTGG ATCTGCCTCCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGG GTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTG GGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGG CAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGA CCCCCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAA
224	FAP (4B9) Fc ノブ二量体 4-1BB リガンド (71-254)鎖のヌ	GAGGTGCAGCTGCTCGAAAGCGGCGGAGGACTGGTGCAGCCT GGCGGCAGCCTGAGACTGTCTTGCGCCGCCAGCGGCTTCACC TTCAGCAGCTACGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCCCCTGGC AAGGGACTGGAATGGGTGTCCGCCATCATCGGCTCTGGCGCCA

	クレオチド配列	GCACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAG CCGGGACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGC CTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAAGGGA TGGTTCGGCGGCTTCAACTACTGGGGACAGGGCACCCTGGTCA CAGTGTCCAGCGCTAGCACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCT GGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCTCT GGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTG TCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCC CCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGT GGTCACCGTGCCTTCTAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATC TGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA AGGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCC CTTGTCCTGCCCCTGAAGCTGCTGGCGGCCCTTCTGTGTTCCT GTTCCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACC CCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGACC CTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCA CAACGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGG CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC TCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCA GCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCCTGCAGAGA TGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTCAAG GGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACG GCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGA CAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACTCCAAACTGACCGTGGAC AAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTG ATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGA GCCTGAGCCCCGGCGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGAT CCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGGAC TGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGGTGGCCCA GAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGAT CCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACA AAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGT ACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGG CGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCT CTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGACAGTGG ATCTGCCTCCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGG GTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTG GGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGG CAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGA CCCCCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAAG GCGGAGGCGGATCTGGCGGCGGAGGATCTAGAGAGGGACCCG AACTGTCCCCTGACGATCCAGCCGGGCTGCTGGATCTGAGACA GGGAATGTTCGCCCAGCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGCTGATT GACGGACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCAGGGCTGGCAGGG GTGTCCCTGACTGGGGGACTGTCCTACAAAGAAGATACAAAAG AACTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGTACTATGTGTTTTTTCA GCTGGAACTGAGGCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGCTCAGGATC TGTGTCCCTGGCTCTGCATCTGCAGCCACTGCGCTCTGCTGCT GGCGCAGCTGCACTGGCTCTGACTGTGGACCTGCCACCAGCCT CTAGCGAGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCCAAGGACGCC TGCTGCATCTGAGCGCCGGACAGCGCCTGGGAGTGCATCTGCA TACTGAAGCCAGAGCCCGGCATGCTTGGCAGCTGACTCAGGGG

		GCAACTGTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACACCTGAGATCCCTG CCGGACTGCCAAGCCCTAGATCAGAA
103	抗 FAP(4B9) 軽鎖のヌクレオチド配列	表1参照
211	DP47 (VL-CH1)軽鎖のヌクレオチド配列	表42参照
225	DP47 (VH-CL) Fc ホール単量体 4-1BBL (71-254)鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKG LEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAKGSGFDYWGQGTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECDKT HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGG GGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPL SWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAF GFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTP EIPAGLPSPRSE
226	抗 FAP(4B9) Fc ノブ二量体 4-1BB リガンド (71-254) 鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKG LEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVS LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGG GSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDP GLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGS GSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRL LHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL PSPRSEGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQ NVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVF FQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPAS SEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGAT VLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE
106	抗 FAP(4B9) 軽鎖	表1参照
214	DP47 (VL-CH1) 軽鎖	表42参照

【０４９８】

４．３　４－１ＢＢリガンドがＣ末端に融合した一価ＦＡＰ（４Ｂ９）標的／ＤＰ４７　４－１ＢＢリガンド三量体含有Ｆｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子（コンストラクト２．１９及び２．２０）の調製（ホール鎖上のＦＡＰ）

ヒト４－１ＢＢリガンドのエクトドメインの一部をコードするＤＮＡ配列（アミノ酸７１－２４８）を、Ｕｎｉｐｒｏｔデータベースの Ｐ４１２７３配列に従って合成した。コンストラクト２．１９及び２．２０を、コンストラクト２．１５及び２．１６について実施例４．１に記載されているようにして調製した。

【０４９９】

表４８は、二量体４－１ＢＢＬがホール鎖に融合した、一価ＦＡＰ（４Ｂ９）標的／ＤＰ４７ ４－１ＢＢリガンド（７１－２４８）三量体含有Ｆｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子（コンストラクト２．１９）のｃＤＮＡ及びアミノ酸配列を示す。

表48：FAP（4B9）標的／DP47ヒト4－1BBリガンド三量体含有Fc（kih）融合抗原結合分子
コンストラクト2．19の配列

配列番号:	説明	配列
171	抗 FAP(4B9) Fc ホール二量体 4-1BB リガンド (71-248)鎖のヌクレオチド配列	表23参照
227	DP47 (VHCL) Fc ノブ単量体 4-1BB (71-248) リガンドのヌクレオチド配列	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTG GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTT TAGCAGTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAG GGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCA CATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAG AGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTG AGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGGCAGCG GATTTGACTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAG CGCTAGTGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTTATCTTTCCCCCATCC GATGAACAGCTGAAAAGCGGCACCGCCTCCGTCGTGTGTCTGC TGAACAATTTTTACCCTAGGGAAGCTAAAGTGCAGTGGAAAGT GGATAACGCACTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAATCTGTGACA GAACAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCCTCCACCC TGACACTGTCTAAGGCTGATTATGAGAAACACAAAGTCTACGC CTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAG AGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGACAAGACCCACACCTGTCCCC CTTGTCCTGCCCCTGAAGCTGCTGGCGGCCCTTCTGTGTTCCT GTTCCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACC CCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGACC CTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCA CAACGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGG CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC TCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCA GCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCCTGCAGAGA TGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTCAAG GGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACG GCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGA CAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACTCCAAACTGACCGTGGAC AAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTG ATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGA GCCTGAGCCCCGGCGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGAT CCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCTGATGATCCTGCCGGAC TGCTGGACCTGCGGCAGGGAATGTTTGCCCAGCTGGTGGCCCA GAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGAT CCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACA AAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGT ACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGG CGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCT CTGAGATCTGCTGCTGGCGCCGCTGCTCTGGCACTGACAGTGG ATCTGCCTCCTGCCAGCAGCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGG

		GTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTG GGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGG CAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGA CCCCCGAGATTCCTGCCGGGCTC
103	抗 FAP(4B9)軽鎖のヌクレオチド配列	表１参照
211	DP47 (VL-CH1)軽鎖のヌクレオチド配列	表４２参照
173	抗 FAP(4B9) Fc ホール二量体 4-1BB リガンド (71-248) 鎖	表２３参照
228	DP47 (VH-CL) Fc ノブ単量体 4-1BB (71-248)リガンド	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKG LEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAKGSGFDYWGQGTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECDKT HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELT KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGG GGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPL SWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAF GFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTP EIPAGL
106	抗 FAP(4B9)軽鎖	表１参照
214	DP47 (VL-CH1) 軽鎖	表４２参照

【０５００】

表４９は、二量体４－１ＢＢＬがＦｃノブ鎖に融合した、一価ＦＡＰ（４Ｂ９）標的／ＤＰ４７　４－１ＢＢリガンド（７１－２４８）三量体含有Ｆｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子（コンストラクト２．２０）のｃＤＮＡ及びアミノ酸配列を示す。

表49：FAP（4B9）標的ヒト4－1BBリガンド三量体含有Fc（kih）融合分子コンストラクト2．20の配列

配列番号:	説明	配列
175	抗 FAP(4B9) Fc ホール単量体 4-1BBL (71-248)鎖のヌクレオチド配列	表24参照
229	DP47 (VH-CL) Fc ノブ二量体 4-1BB リガンド (71-248)鎖のヌクレオチド配列	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTG GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTT TAGCAGTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAG GGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCA CATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAG AGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTG AGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGGCAGCG GATTTGACTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAG CGCTAGTGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTTATCTTTCCCCCATCC GATGAACAGCTGAAAAGCGGCACCGCCTCCGTCGTGTGTCTGC TGAACAATTTTTACCCTAGGGAAGCTAAAGTGCAGTGGAAAGT GGATAACGCACTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAATCTGTGACA GAACAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCCTCCACCC TGACACTGTCTAAGGCTGATTATGAGAAACACAAAGTCTACGC CTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAG AGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGACAAGACCCACACCTGTCCCC CTTGTCCTGCCCCTGAAGCTGCTGGCGGCCCTTCTGTGTTCCT GTTCCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGACC CCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCACGAGGACC CTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCA CAACGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGG CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC TCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCA GCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCCTGCAGAGA TGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTCAAG GGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACG GCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGA CAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACTCCAAACTGACCGTGGAC AAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTG ATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGA GCCTGAGCCCCGGCGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGAT CCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCTGATGATCCTGCCGGAC TGCTGGACCTGCGGCAGGGAATGTTTGCCCAGCTGGTGGCCCA GAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGAT CCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACA AAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGT ACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGG CGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCT CTGAGATCTGCTGCTGGCGCCGCTGCTCTGGCACTGACAGTGG

		ATCTGCCTCCTGCCAGCAGCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGG GTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTG GGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGG CAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGA CCCCCGAGATTCCAGCAGGCCTGGGAGGCGGCGGATCTGGCG GCGGAGGATCTAGAGAAGGACCCGAGCTGTCCCCCGACGATC CCGCTGGGCTGCTGGATCTGAGACAGGGCATGTTCGCTCAGCT GGTGGCTCAGAATGTGCTGCTGATTGACGGACCTCTGAGCTGG TACTCCGACCCAGGGCTGGCAGGGGTGTCCCTGACTGGGGGA CTGTCCTACAAAGAAGATACAAAAGAACTGGTGGTGGCTAAAG CTGGGGTGTACTATGTGTTTTTTCAGCTGGAACTGAGGCGGGT GGTGGCTGGGGAGGGCTCAGGATCTGTGTCCCTGGCTCTGCAT CTGCAGCCACTGCGCTCTGCAGCAGGGGCTGCAGCACTGGCC CTGACTGTGGACCTGCCCCCAGCTTCTTCCGAGGCCAGAAACA GCGCCTTCGGGTTCCAAGGACGCCTGCTGCATCTGAGCGCCG GACAGCGCCTGGGAGTGCATCTGCATACTGAAGCCAGAGCCC GGCATGCTTGGCAGCTGACTCAGGGGGCAACTGTGCTGGGACT GTTTCGCGTGACACCTGAGATCCCAGCCGGGCTC
103	抗 FAP(4B9)軽鎖のヌクレオチド配列	表1参照
211	DP47 (VL-CH1)軽鎖のヌクレオチド配列	表42参照
177	抗 FAP(4B9) Fc ホール単量体 4-1BBL (71-248) 鎖	表24参照
230	DP47 (VH-CL) Fc ノブ二量体 4-1BB リガンド (71-248) 鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKG LEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAKGSGFDYWGQGTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECDKT HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELT KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGG GGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPL SWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAF GFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTP EIPAGLGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQ NVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVF FQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPAS SEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGAT VLGLFRVTPEIPAGL
106	抗 FAP(4B9) 軽鎖	表1参照

214	DP47 (VL-CH1) 軽鎖	表42参照

【０５０１】

４．４　４－１ＢＢリガンドがＣ末端に融合した一価ＤＰ４７／ＦＡＰ（４Ｂ９）標的４－１ＢＢリガンド三量体含有Ｆｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子（コンストラクト２．２１及び２．２２）の調製（ノブ鎖上のＦＡＰ）

ヒト４－１ＢＢリガンドのエクトドメインの一部をコードするＤＮＡ配列（アミノ酸７１－２４８）を、ＵｎｉｐｒｏｔデータベースのＰ４１２７３配列に従って合成した。コンストラクト２．２１及び２．２２を、コンストラクト２．１７及び２．１８について実施例４．２に記載されているようにして調製した。

【０５０２】

表５０は、二量体４－１ＢＢＬがＦｃホール鎖に融合した、一価ＤＰ４７／ＦＡＰ（４Ｂ９）標的４－１ＢＢリガンド（７１－２５４）三量体含有Ｆｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子（コンストラクト２．２１）のｃＤＮＡ及びアミノ酸配列を示す。

表50：FAP(4B9)標的／DP47ヒト4－1BBリガンド三量体含有Fc(kih)融合抗原結合分子
コンストラクト2．21の配列

配列番号:	説明	配列
231	DP47(VH-CL) Fc ホール二量体 4-1BB リガンド (71-248) 鎖のヌクレオチド配列	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTG GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTT TAGCAGTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAG GGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCA CATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAG AGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTG AGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGGCAGCG GATTTGACTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAG CGCTAGTGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTTATCTTTCCCCCATCC GATGAACAGCTGAAAAGCGGCACCGCCTCCGTCGTGTGTCTGC TGAACAATTTTTACCCTAGGGAAGCTAAAGTGCAGTGGAAAGT GGATAACGCACTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAATCTGTGACA GAACAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCCTCCACCC TGACACTGTCTAAGGCTGATTATGAGAAACACAAAGTCTACGC CTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAG AGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGACAAAACTCACACATGCCCAC CGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCT CTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACC CCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGC ATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGG CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC TCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCA GCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGA TGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAA GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG GGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGG ACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGA CAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCT CCCTGTCTCCGGGTGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGAT CCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCTGATGATCCTGCCGGAC TGCTGGACCTGCGGCAGGGAATGTTTGCCCAGCTGGTGGCCCA GAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGAT CCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACA AAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGT ACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGG CGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCT CTGAGATCTGCTGCTGGCGCCGCTGCTCTGGCACTGACAGTGG ATCTGCCTCCTGCCAGCAGCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGG GTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTG GGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGG CAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGA CCCCCGAGATTCCTGCCGGGCTC
102	FAP (4B9) Fc ノブ	表1参照

	単量体 4-1BB (71-248)リガンドのヌクレオチド配列	
103	抗 FAP(4B9)軽鎖のヌクレオチド配列	表1参照
211	DP47 (VL-CH1)軽鎖のヌクレオチド配列	表42参照
232	DP47(VH-CL) Fc ホール二量体 4-1BB リガンド (71-248) 鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGSGFDYWGQGTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
105	FAP (4B9) Fc ノブ単量体 4-1BB (71-248) リガンド	表1参照
106	抗 FAP(4B9) 軽鎖	表1参照
214	DP47 (VL-CH1) 軽鎖	表42参照

【０５０３】

表５１は、二量体４－１ＢＢＬがノブ鎖に融合した、一価ＤＰ４７／ＦＡＰ（４Ｂ９）標的４－１ＢＢリガンド（７１－２５４）三量体含有Ｆｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子（コンストラクト２．２２）のｃＤＮＡ及びアミノ酸配列を示す。

表51：FAP（4B9）標的ヒト4－1BBリガンド三量体含有Fc（kih）融合分子コンストラクト2．22の配列

配列番号:	説明	配列
233	DP47 (VH-CL) Fc ホール単量体 4-1BBL (71-248)鎖のヌクレオチド配列	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTG GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTT TAGCAGTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAG GGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCA CATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAG AGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAGATGAACAGCCTG AGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGGCAGCG GATTTGACTACTGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAG CGCTAGTGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTTATCTTTCCCCCATCC GATGAACAGCTGAAAAGCGGCACCGCCTCCGTCGTGTGTCTGC TGAACAATTTTTACCCTAGGGAAGCTAAAGTGCAGTGGAAAGT GGATAACGCACTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAATCTGTGACA GAACAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCCTCCACCC TGACACTGTCTAAGGCTGATTATGAGAAACACAAAGTCTACGC CTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAG AGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGACAAAACTCACACATGCCCAC CGTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCT CTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACC CCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGC ATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGG CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCC TCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCA GCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGA TGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAA GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG GGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGG ACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGA CAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCT CCCTGTCTCCGGGTGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGAT CCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCTGATGATCCTGCCGGAC TGCTGGACCTGCGGCAGGGAATGTTTGCCCAGCTGGTGGCCCA GAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGAT CCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACA AAGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGT ACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAACTGCGGAGAGTGGTGGCCGG CGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCT CTGAGATCTGCTGCTGGCGCCGCTGCTCTGGCACTGACAGTGG ATCTGCCTCCTGCCAGCAGCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGG GTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTG GGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGG CAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGA CCCCCGAGATTCCTGCCGGGCTC

108	FAP (4B9) Fc ノブ二量体 4-1BB リガンド (71-248)鎖のヌクレオチド配列	表2参照
103	抗 FAP(4B9)軽鎖のヌクレオチド配列	表1参照
211	DP47 (VL-CH1)軽鎖のヌクレオチド配列	表42参照
234	DP47 (VH-CL) Fc ホール単量体 4-1BBL (71-248)鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKG LEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAKGSGFDYWGQGTLVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECDKT HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELT KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGG GGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPL SWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRV VAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAF GFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTP EIPAGL
110	抗 FAP(4B9) Fc ノブ二量体 4-1BB リガンド (71-248) 鎖	表2参照
106	抗 FAP(4B9)軽鎖	表1参照
214	DP47 (VL-CH1)軽鎖	表42参照

【０５０４】

実施例５

一価ＦＡＰ標的ヒトＤＰ４７／４－１ＢＢリガンド三量体含有Ｆｃ融合抗原結合分子の産生

一価ＦＡＰ標的三量体４－１ＢＢリガンドＣ末端Ｆｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子を、ＭＰＳＶプロモーターから挿入断片の発現を駆動し、ＣＤＳの３’末端に位置する合成ポリＡ配列を含むプラスミドベクター中にクローニングした。加えて、ベクターは、プラスミドのエピソーム維持のためにＥＢＶ ＯｒｉＰ配列を含む。

【０５０５】

分断三量体４－１ＢＢリガンドＦｃ（ｋｉｈ）融合分子を、ポリエチレンイミンを使用してＨＥＫ２９３－ＥＢＮＡ細胞を哺乳動物発現ベクターと同時トランスフェクトすることによって産生した。細胞は対応する発現ベクターでトランスフェクトした。コンストラクト２．１５から２．２２については、１：１：１：１比（「ベクターＦｃホール鎖」：「

ベクター軽鎖１」：「ベクターＦｃノブ鎖」：「ベクター軽鎖２」）。産生と精製は実施例２に記載したようにして実施した。

【０５０６】

表５２は、例示的なＤＰ４７／ＦＡＰ（４Ｂ９）標的分断三量体Ｃ末端４－１ＢＢリガンドＦｃ（ｋｉｈ）融合抗原結合分子の収量及び最終モノマー含量をまとめたものである。

表52:例示的標的分断三量体C末端4－1BBリガンドFc(kih)融合抗原結合分子の生化学的分析

コンストラクト	単量体 [%] (SEC)	収量 [mg/l]
一価 FAP(4B9)標的分断三量体 4-1BB リガンド C 末端 Fc (kih)融合体(コンストラクト 2.15)	98.9	14.5

【０５０７】

実施例５

表面プラズモン共鳴によるＤＰ４７／ＦＡＰ（４Ｂ９）標的Ｃ末端４－１ＢＢ分断三量体リガンドＦｃ融合抗原結合分子の同時結合の測定

ヒト４－１ＢＢ Ｆｃ（ｋｉｈ）及びヒトＦＡＰに同時に結合する能力を表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）によって評価した。全てのＳＰＲ実験は、ランニング緩衝液（０．０１ＭのＨＥＰＥＳ，ｐＨ７．４、０．１５ＭのＮａＣｌ、３ｍＭのＥＤＴＡ、０．００５％の界面活性剤Ｐ２０、Ｂｉａｃｏｒｅ、Ｆｒｅｉｂｕｒｇ／Ｇｅｒｍａｎｙ）としてＨＢＳ－ＥＰを用いて２５℃においてＢｉａｃｏｒｅ Ｔ２００で実施した。

【０５０８】

ビオチン化ヒト４－１ＢＢ Ｆｃ（ｋｉｈ）をストレプトアビジン（ＳＡ）センサーチップのフローセルに直接カップリングさせた。最大２００共鳴単位（ＲＵ）の固定化レベルを使用した。標的三量体Ｃ末端４－１ＢＢリガンドＦｃ（ｋｉｈ）融合分子を、２００ｎＭの濃度範囲で３０μＬ／分の流量でフローセルに９０秒間通過させ、解離をゼロ秒に設定した。ヒトＦＡＰを、３０μＬ／分の流量で第二アナライトとして注入し、５００ｎＭの濃度で９０秒間フローセルを通した（図６Ａ）。解離を１２０秒間モニターした。バルク屈折率の差異は、タンパク質が固定化されていない基準フローセルで得られた応答を差し引くことによって補正した。全ての二重特異性コンストラクトがヒト４－１ＢＢとヒトＦＡＰに同時に結合することができた（図６Ｂ）。

【０５０９】

実施例６

一価ＦＡＰ標的Ｃ末端４－１ＢＢ分断三量体リガンドＦｃ融合抗原結合分子の機能的特徴付け

６．１　新鮮な活性化ヒトＰＢＭＣへの結合

バフィーコートをチューリッヒ献血センターから得た。新鮮な末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を単離するために、バフィーコートを同じ容量のＤＰＢＳ（Ｌｉｆｅ ＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓによるＧｉｂｃｏ，カタログ番号１４１９０３２６）で希釈した。５０ｍＬのポリプロピレン遠心管（ＴＰＰ、カタログ番号９１０５０）に１５ｍＬのＨｉｓｔｏｐａｑｕｅ１０７７（ＳＩＧＭＡ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ，カタログ番号１０７７１、ポリスクロース及びジアトリゾ酸ナトリウム、濃度１．０７７ｇ／ｍＬに調整）を供給し、希釈したバフィコート内容物をＨｉｓｔｏｐａｑｕｅ１０７７上に層化させた。遠心管を４５０×ｇで３０分間遠心分離した。ついで、ＰＢＭＣを界面から回収し、ＤＰＢＳで３回洗浄し、１０％（ｖ／ｖ）のウシ胎仔血清（ＦＢＳ，米国起源，ＰＡＮ ｂｉｏｔｅｃｈ，Ｐ３０－２００９，ロットＰ１５０３０７ＧＩ，ガンマ線照射マイコプラズマフリー，熱失活５６℃３５分）、１％（ｖ／ｖ）のＧｌｕｔａＭＡＸ Ｉ（Ｌｉｆｅ ＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓによるＧｉｂｃｏ，カタログ番号３５０５００３８）、１ｍＭのピルビン酸ナトリウム（ＳＩＧＭＡ、カタログ番号Ｓ８６３６）、１％（ｖ／ｖ）のＭＥＭ非必須アミノ

酸（ＳＩＧＭＡ、カタログ番号Ｍ７１４５）及び５０μＭのβ－メルカプトエタノール（ＳＩＧＭＡ、Ｍ３１４８）と共に供給されたＰＰＭＩ１６４０培地（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓによる Ｇｉｂｃｏ，カタログ番号４２４０１－０４２）からなるＴ細胞培地に再懸濁した。

【０５１０】

ＰＢＭＣを単離後に直接使用したか（新鮮なヒトＰＢＭＣへの結合）又はそれらを刺激してＴ細胞の細胞表面上に４－１ＢＢ発現を誘導した（活性化ヒトＰＢＭＣへの結合）。ヒトＣＤ８ Ｔ細胞上の４－１ＢＢアップレギュレーションを誘導するために、６ウェルの組織培養プレート（ＴＴＰ、カタログ番号９２００６）を４℃において一晩、ＤＰＢＳ中の１０ｕｇ／ｍＬの抗ヒトＣＤ３（クローンＯＫＴ３、マウスＩｇＧ２ａ、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、カタログ番号３１７３１５）及び２ｕｇ／ｍＬの抗ヒトＣＤ２８（クローンＣＤ２８．２、マウスＩｇＧ１、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、カタログ番号３０２９２３）で被覆した；更に使用する直前に、プレートをＤＰＢＳで２回洗浄し、コーティングされていない抗体を除去した。新たに単離したＰＢＭＣを、Ｔ細胞培地（上記と同じ培地）中で１×１０６細胞／ｍＬに設定し、ａＣＤ３／ａＣＤ２８で被覆した６ウェルプレートに播種し、３７℃及び５％ＣＯ２で３日間培養した。

【０５１１】

結合アッセイのために、丸底懸濁細胞９６ウェルプレート（ｇｒｅｉｎｅｒ ｂｉｏ－ｏｎｅ、ｃｅｌｌｓｔａｒ、カタログ番号６５０１８５）の各ウェルに０．１×１０６個の新鮮又は活性化ＰＢＭＣを加えた。プレートを３５０×ｇ、４℃において５分間遠心分離し、上清を捨てた。その後、細胞を、暗所で４℃において３０分間、１：５０００希釈された固定化生存色素ｅＦ６６０（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ、カタログ番号６５－０８６４－１８）を含む１００μＬ／ウェルのＤＰＢＳ中で染色した。細胞を２００μＬの氷冷冷ＤＰＢＳ緩衝液で１回洗浄した。次に、一価ＦＡＰ標的Ｃ末端４－１ＢＢ分断三量体リガンドＦｃ融合抗原結合分子（特にコンストラクト２．１１又はコンストラクト２．１５）、陽性対照としてコンストラクト２．４、及び陰性対照として対照Ｄ及び対照Ｆ（実施例１．１１に記載のように調製）を含む５０μＬ／ウェルの４℃の冷ＦＡＣＳ緩衝液（２％のＦＢＳ、５ｍＭのＥＤＴＡ，ｐＨ８（Ａｍｒｅｓｃｏ、カタログ番号Ｅ１７７）及び７．５ｍＭのアジ化ナトリウム（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、カタログ番号Ｓ２００２）と共に供給されるＤＰＢＳ）を加え、細胞を４℃において６０分間インキュベートし、２００μＬ／ウェルの４℃のＦＡＣＳ緩衝液で３回洗浄した。細胞を、０．６７μｇ／ｍＬの抗ヒトＣＤ４５－ＡＦ４８８（クローンＨＩ３０、マウスｉｇＧ１ｋ、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、カタログ番号３０４０１９）、０．３３μｇ／ｍＬの抗ヒトＣＤ８ａ－ＢＶ５１０（クローンＳＫ１、マウスＩｇＧ１ｋ、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、カタログ番号３４４７３２）、０．２３μｇ／ｍＬの抗ヒトＣＤ４－ＢＶ４２１（クローンＯＫＴ４、マウスＩｇＧ２ｂκ、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、カタログ番号３１７４３４）、０．６７μｇ／ｍＬの抗ヒトＣＤ３－ＰｅｒＣＰ－Ｃｙ５．５（クローンＵＣＨＴ１、マウスＩｇＧ１ｋ、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、カタログ番号３００４３０）、０．６７μｇ／ｍＬの抗ヒトＣＤ１９－ＰＥ／Ｃｙ７（クローンＨＩＢ１９、マウスＩｇＧ１ｋ、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、カタログ番号３０２２１６）、５μｇ／ｍＬのＰＥコンジュゲートＡｆｆｉｎｉＰｕｒｅ抗ヒトＩｇＧ Ｆ（ａｂ’）２断片特異的ヤギＦ（ａｂ’）断片（Ｊａｃｋｓｏｎ ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ、カタログ番号１０９１１６０９８）を含む５０μＬ／ウェルの４℃の冷ＦＡＣＳ緩衝液に更に再懸濁し、４℃において３０分間インキュベートした。細胞を２００μＬ／ウェルの４℃のＦＡＣＳ緩衝液で２回洗浄し、ついで１％のホルムアルデヒドと共に供給されるＤＰＢＳ（Ｓｉｇｍａ、ＨＴ５０１３２０－９．５Ｌ）で固定した。細胞を１００μＬ／ウェルのＦＡＣＳ緩衝液に再懸濁し、ＭＡＣＳ Ｑｕａｎｔ Ａｎａｌｙｚｅｒ１０（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃｈ）を使用して獲得した。ＦｌｏｗＪｏ Ｖ１０（ＦｌｏｗＪｏ、ＬＬＣ）及びＧｒａｐｈＰａｄ Ｐｒｉｓｍ６．０４（ＧｒａｐｈＰａｄ Ｓｏｆｔｗａｒｅ、Ｉｎｃ）を使用してデータを解析した。

【０５１２】

ゲートを、生存ＣＤ４５＋ＣＤ３＋ＣＤ１９ｎｅｇＣＤ８ｎｅｇＣＤ４＋Ｔ細胞、ＣＤ４５＋ＣＤ３＋ＣＤ１９ｎｅｇＣＤ４ｎｅｇＣＤ８＋Ｔ細胞、ＣＤ４５＋ＣＤ３＋ＣＤ４ｎｅｇＣＤ８ｎｅｇγδＴ細胞及びＣＤ４５＋ＣＤ３ｎｅｇＣＤ１９＋Ｂ細胞にセットし、ＰＥコンジュゲートＡｆｆｉｎｉＰｕｒｅ抗ヒトＩｇＧ ＩｇＧ Ｆｃγ断片特異的ヤギＦ（ａｂ’）２断片の蛍光強度の幾何平均を、ＦＡＰ標的又は非標的Ｃ末端４－１ＢＢ分断三量体リガンドＦｃ融合抗原結合分子の滴定濃度に対してプロットした。図７Ａ～Ｈ及び図８Ａ～Ｆに示されるように、ヒトＰＢＭＣの活性化後のみ４－１ＢＢがヒトＣＤ４＋及びＣＤ８＋Ｔ細胞上でアップレギュレートされた。表５３ａ及び５３ｂに、活性化ヒトＰＢＭＣに対する結合曲線についてＥＣ５０値を要約する。

【０５１３】

表53a：活性化ヒトPBMCに対する結合曲線のEC_{50}値（コンストラクト2．11）（図8A－C参照）

	対照 D	コンストラクト 2.4	コンストラクト 2.11
活性化 $CD4^+$ T 細胞に対する EC_{50} [nM]	0.37	0.41	0.28
活性化 $CD8^+$ T 細胞に対する EC_{50} [nM]	0.63	1.13	0.41
活性化γδ T 細胞に対する EC_{50} [nM]	0.28	0.64	0.36

表53b：活性化ヒトPBMCに対する結合曲線のEC_{50}値（コンストラクト2．15）（図8D－F参照）

	対照 D	コンストラクト 2.4	コンストラクト 2.15
活性化 $CD4^+$ T 細胞に対する EC_{50} [nM]	0.08	0.10	0.11
活性化 $CD8^+$ T 細胞に対する EC_{50} [nM]	0.15	0.23	0.17
活性化γδ T 細胞に対する EC_{50} [nM]	0.09	0.11	0.12

【０５１４】

６．２　ＦＡＰ発現腫瘍細胞の結合

ＦＡＰ発現細胞に対する結合アッセイのために、異なるＦＡＰ発現腫瘍細胞を使用した：ヒトメラノーマ細胞株ＭＶ－３（最初の出版：van Muijen GN, Jansen KF, Cornelissen IM, Smeets DF, Beck JL, Ruiter DJ. Establishment and characterization of a human melanoma cell line (MV3) which is highly metastatic in nude mice. Int J Cancer. 1991 Apr 22;48(1):85-91）及びヒトメラノーマ細胞株ＷＭ－２６６－４（ＡＴＣＣ ＣＲＬ－１６７６）。

【０５１５】

ＤＰＢＳ（Ｌｉｆｅ ＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓによるＧｉｂｃｏ、カタログ番号１４１９０３２６）に再懸濁した０．１×１０^{6}個の腫瘍細胞を、丸底懸濁細胞９６ウェルプレート（ｇｒｅｉｎｅｒ ｂｉｏ－ｏｎｅ、ｃｅｌｌｓｔａｒ、カタログ番号６５０１８５）の各ウェルに加えた。細胞を２００μＬのＤＰＢＳで１回洗浄した。細胞を、１：５０００希釈の固定可能な生存色素ｅＦｌｕｏｒ６６０（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ、カタログ番号６５－０８６４－１８）を含む１００μＬ／ウェルの４℃の冷ＤＰＢＳ緩衝液に再懸濁し、プレートを４℃において３０分間インキュベートした。細胞を２００μＬ／ウェルの４

℃の冷ＤＰＢＳ緩衝液で１回洗浄し、一連の濃度でコンストラクト２．１１又はコンストラクト２．１５、陽性対照としてコンストラクト２．４、及び陰性対照として対照Ｄ及び対照Ｆを含む５０μＬ／ウェルの４℃の冷ＦＡＣＳ緩衝液（２％のＦＢＳ、５ｍＭのＥＤＴＡ，ｐＨ８（Ａｍｒｅｓｃｏ、カタログ番号Ｅ１７７）及び７．５ｍＭのアジ化ナトリウム（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、カタログ番号Ｓ２００２）と共に供給されるＤＰＢＳ）に再懸濁し、４℃において１時間のインキュベーションを続けた。十分に洗浄した後、細胞を、５μｇ／ｍＬのＰＥコンジュゲートＡｆｆｉｎｉＰｕｒｅ抗ヒトＩｇＧ Ｆ（ａｂ’）２断片特異的ヤギＦ（ａｂ’）２断片（Ｊａｃｋｓｏｎ ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ、カタログ番号１０９１１６０９８）を含む５０μＬ／ウェルの４℃の冷ＦＡＣＳ緩衝液で４℃において３０分間、更に染色した。細胞を２００μＬ／ウェルの４℃のＦＡＣＳ緩衝液で２回洗浄し、細胞を１％のホルムアルデヒドを含む５０μＬ／ウェルのＤＰＢＳ（Ｓｉｇｍａ、ＨＴ５０１３２０－９．５Ｌ）において固定した。細胞を１００μＬ／ウェルのＦＡＣＳ緩衝液に再懸濁し、ＭＡＣＳ Ｑｕａｎｔ Ａｎａｌｙｚｅｒ１０（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃｈ）を使用して獲得した。ＦｌｏｗＪｏ Ｖ１０（ＦｌｏｗＪｏ、ＬＬＣ）及びＧｒａｐｈＰａｄ Ｐｒｉｓｍ６．０４（ＧｒａｐｈＰａｄ Ｓｏｆｔｗａｒｅ、Ｉｎｃ）を使用してデータを解析した。

【０５１６】

ゲートを、生存腫瘍細胞にセットし、ＰＥコンジュゲートＡｆｆｉｎｉＰｕｒｅ抗ヒトＩｇＧ ＩｇＧ Ｆｃγ断片特異的ヤギＦ（ａｂ’）２断片の蛍光強度の幾何平均を、ＦＡＰ標的又は非標的Ｃ末端４－１ＢＢ分断三量体リガンドＦｃ融合抗原結合分子の滴定濃度に対してプロットした。図９Ａ及びＢに示されるように、ＦＡＰ標的分断三量体４－１ＢＢリガンド融合分子コンストラクト２．４及びコンストラクト２．１１のみがＦＡＰ発現腫瘍細胞ＭＶ－３及びＷＭ－２６６－４に結合する一方、非標的アイソタイプ対照の対照Ｆ及び非標的分断三量体４－１ＢＢリガンド融合分子の対照Ｄは腫瘍細胞に結合しなかった。図９Ｃ及び９Ｄには、三重特異的ＤＰ４７／ＦＡＰ標的分断三量体４－１ＢＢリガンド融合分子コンストラクト２．１５がまたＦＡＰ発現腫瘍細胞ＭＶ－３及びＷＭ－２６６－４に結合することが示される。表５４ａ及び５４ｂには、ＦＡＰ＋腫瘍結合曲線のＥＣ５０値を列挙する。

【０５１７】

表54a: FAP発現腫瘍細胞に対する結合曲線のEC_{50}値（図9A及びB）

	コンストラクト 2.4	コンストラクト 2.11
MV-3 に対する EC_{50} [nM]	2.16	0.82
WM-266-4 に対する EC_{50} [nM]	3.43	1.16

表54a:FAP発現腫瘍細胞に対する結合曲線のEC_{50}値（図9C及びD）

	コンストラクト 2.4	コンストラクト 2.11
MV-3 に対する EC_{50} [nM]	2.21	3.42
WM-266-4 に対する EC_{50} [nM]	1.18	2.4

【０５１８】

６．３　生物学的活性：ヒト４－１ＢＢ発現ＨｅＬａレポーター細胞株のＮＦ－κＢ活性化

６．３．１　ヒト４－１ＢＢ及びＮＦ－κＢ－ルシフェラーゼを発現するＨｅＬａレポーター細胞の作製

ヒトパピローマウイルス－１８誘導子宮頸癌細胞株ＨｅＬａ（ＡＴＣＣ ＣＣＬ－２）に、ヒト４－１ＢＢの配列（Ｕｎｉｐｒｏｔ受託Ｑ０７０１１）を含む発現ベクターｐＥＴＲ１０８２９に基づくプラスミドをＣＭＶ－プロモーター及びピューロマイシン耐性遺伝子の制御下で形質導入した。細胞を、１０％（ｖ／ｖ）のウシ胎仔血清（ＦＢＳ，ＬｉｆｅＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓによるＧｉｂｃｏ，カタログ番号１６０００－０４４，ロット番号９４１２７３，ガンマ線照射マイコプラズマフリー，熱失活５６℃３５分）、１％のＧｌｕｔａＭＡＸ－Ｉ（Ｌｉｆｅ ＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓによるＧｉｂｃｏ，カタログ番号３５０５０－０３８）、３μｇ／ｍＬのピューロマイシン（ＩｎｖｉｖｏＧｅｎ，カタログ番号ａｎｔ－ｐｒ）と共に供給されたＤＭＥＭ培地（Ｌｉｆｅ ＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓによるＧｉｂｃｏ，カタログ番号４２４３０－０２５）で培養した。４－１ＢＢ形質導入ＨｅＬａ細胞をフローサイトメトリーによって４－１ＢＢ発現について試験した：０．２×１０^{6}個の生存細胞を、０．１μｇのＰｅｒＣＰ／Ｃｙ５．５コンジュゲート抗ヒト４－１ＢＢマウスＩｇＧ１κクローン４Ｂ４－１（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄカタログ番号３０９８１４）又はそのアイソタイプ対照（ＰｅｒＣＰ／Ｃｙ５．５コンジュゲートマウスＩｇＧ１κアイソタイプ対照抗体クローンＭＯＰＣ２１、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄカタログ番号４００１５０）を含む１００μＬのＦＡＣＳ緩衝液（２％のＦＢＳ、５ｍＭのＥＤＴＡ ｐＨ８（Ａｍｒｅｓｃｏ、カタログ番号Ｅ１７７）及び７．５ｍＭのアジ化ナトリウム（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、カタログ番号Ｓ２００２）中に再懸濁させ、４℃において３０分間インキュベートした。細胞をＦＡＣＳ緩衝液で２回洗浄し、０．０６μｇのＤＡＰＩ（Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ Ｂｉｏｔｅｃ、カタログ番号Ｓｃ－３５９８）を含む３００μＬのＦＡＣＳ緩衝液に再懸濁し、５レーザーＬＳＲ－Ｆｏｒｔｅｓｓａ（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ、ＤＩＶＡソフトウェア）を使用して獲得した。限定された希釈を実施して次のような単一クローンを作製した：ヒト４－１ＢＢを形質導入したＨｅＬａ細胞を培地に１０、５及び２．５細胞／ｍＬの濃度で再懸濁し、２００μＬの細胞懸濁液を丸底の組織培養処理９６ウェルプレート（６プレート／細胞濃度、ＴＰＰカタログ番号９２６９７）に移した。単一クローンを収集し、増殖させ、上記のように４－１ＢＢ発現について試験した。４－１ＢＢが最も高発現のクローン（クローン５）を、その後のＮＦκＢ－ルシフェラーゼ発現ベクター５４９５ｐ Ｔｒａｎｌｕｃｅｎｔ ＨｙｇＢによるトランスフェクションのために選択した。ベクターは、トランスフェクトされた細胞にハイグロマイシンＢに対する耐性とＮＦκＢ応答エレメント（Ｐａｎｏｍｉｃｓ、カタログ番号ＬＲ００５１）の制御下でルシフェラーゼを発現する能力との両方を付与する。ヒト４－１ＢＢ ＨｅＬａクローン５細胞を７０％のコンフルエンスになるまで培養した。５０μｇ（４０μＬ）の線状化（制限酵素ＡｓｅＩ及びＳａｌＩ）した５４９５ｐの半透明ＨｙｇＢ発現ベクターを、無菌の０．４ｃｍのＧｅｎｅ Ｐｕｌｓｅｒ／ＭｉｃｒｏＰｕｌｓｅｒキュベット（Ｂｉｏｒａｄ、カタログ番号１６５－２０８１）に添加した。４００μｌのサプリメント無添加のＤＭＥＭ中の２．５×１０^{6}個のヒト４－１ＢＢ ＨｅＬａクローン５細胞を添加し、プラスミド溶液と注意深く混合した。細胞のトランスフェクションは、Ｇｅｎｅ Ｐｕｌｓｅｒ Ｘｃｅｌｌ全システム（Ｂｉｏｒａｄ、カタログ番号１６５２６６０）を使用して、次の設定下で実施した：指数パルス、キャパシタンス５００μＦ、電圧１６０Ｖ、抵抗∞。パルス直後に、トランスフェクトされた細胞を、１０％のＦＢＳ及び１％のＧｌｕｔａＭＡＸ Ｉ（Ｌｉｆｅ ＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓによるＧｉｂｃｏ、カタログ番号３５０５０３８）と共に供給された１５ｍＬの３７℃の温かいＤＭＥＭ培地（Ｌｉｆｅ ＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓによるＧｉｂｃｏ、カタログ番号４２４３０－０２５）を含む組織培養フラスコ７５ｃｍ^{2}（ＴＰＰ、カタログ番号９００７５）に移した。翌日、３μｇ／ｍＬのピューロマイシン（ＩｎｖｉｖｏＧｅｎ、カタログ番号ａｎｔ ｐｒ）と２００μｇ／ｍＬのハイグロマイシンＢ（Ｒｏｃｈｅ、カタログ番号１０８４３５５５００１）を含む培養培地を添加した。生存細胞を増殖させ、上記のように限界希釈を実施して単一クローンを作製した。クローンを上記の４－１ＢＢ発現とＮＦκＢ－ルシフェラーゼ活性について次のように試験した：クローンを選択培地中で収集し、細胞カウンターＶｉ－ｃｅｌｌ ｘｒ ２．０３（Ｂｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ、カタログ番号７３１０５０

）を使用して計数した。細胞を０．３３×１０^{6}細胞／ｍＬの細胞密度に設定し、１５０μＬのこの細胞懸濁液を蓋付きの無菌の白色９６ウェル平底組織培養プレート（ｇｒｅｉｎｅｒ ｂｉｏ ｏｎｅ、カタログ番号６５５０８３）の各ウェルと、対照として通常の９６ウェル平底組織培養プレート（ＴＰＰカタログ番号９２０９６）に移し、翌日に生存及び細胞密度を試験した。細胞を３７℃及び５％CO_2で一晩インキュベートした。翌日、異なる濃度の組換えヒト腫瘍壊死因子アルファ（ｒｈＴＮＦα、ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ、カタログ番号３０００１Ａ）を含む５０μＬの培地を９６ウェルプレートの各ウェルに加え、１００、５０、２５、１２．５、６．２５及び０ｎｇ／ウェルの最終濃度のｒｈＴＮＦαにした。細胞を３７℃及び５％CO_2で６時間インキュベートし、ついで２００μＬ／ウェルのＤＰＢＳで３回洗浄した。レポーター溶解緩衝液（Ｐｒｏｍｅｇａ、カタログ番号：Ｅ３９７１）を各ウェル（３０μｌ）に加え、プレートを－２０℃において一晩保存した。翌日、凍結した細胞プレート及び検出緩衝液（ルシフェラーゼ１０００アッセイシステム、Ｐｒｏｍｅｇａ、カタログ番号Ｅ４５５０）を室温まで解凍した。１００μＬの検出緩衝液を各ウェルに加え、プレートを、ＳｐｅｃｔｒａＭａｘ Ｍ５／Ｍ５ｅマイクロプレートリーダー及びＳｏｆｔＭａｘ Ｐｒｏ Ｓｏｆｔｗａｒｅ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｅｖｉｃｅｓ）を使用して、できるだけ速く測定した。対照（ｒｈＴＮＦαが無添加）より上の測定されたＵＲＬをルシフェラーゼ活性とした。最も高いルシフェラーゼ活性とかなりのレベルの４－１ＢＢ発現を示すＮＦκＢ－ｌｕｃ－４－１ＢＢ－ＨｅＬａクローン２６を更なる使用のために選択した。

【０５１９】

６．３．２　ＦＡＰ発現腫瘍細胞と共培養したヒト４－１ＢＢを発現するＨｅＬａレポーター細胞のＮＦ－κＢ活性化

ＮＦκＢ－ｌｕｃ－４－１ＢＢ－ＨｅＬａクローン２６細胞をＤＰＢＳ（Ｌｉｆｅ ＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓによるＧｉｂｃｏ、カタログ番号１４１９０３２６）で洗浄し、０．０５％のトリプシンＥＤＴＡ（Ｌｉｆｅ ＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓによるＧｉｂｃｏ、カタログ番号２５３０００５４）で５分間３７℃において処理した。細胞を収集し、１０％のウシ胎仔血清（ＦＢＳ，米国起源，ＰＡＮ ｂｉｏｔｅｃｈ，Ｐ３０－２００９，ロットＰ１５０３０７ＧＩ，ガンマ線照射マイコプラズマフリー，熱失活５６℃３５分）及び１％のＧｌｕｔａＭＡＸ－Ｉ（Ｌｉｆｅ ＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓによるＧｉｂｃｏ，カタログ番号３５０５００３８）と共に供給されたＤＭＥＭ培地（Ｌｉｆｅ ＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓによるＧｉｂｃｏ、カタログ番号４２４３００２５）に再懸濁させた。細胞カウンターＶｉ－ｃｅｌｌ ｘｒ２．０３（Ｂｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ、カタログ番号７３１０５０）を使用して細胞を計数し、０．２×１０^{6}細胞／ｍＬの細胞密度に設定した。この細胞懸濁液１００μＬ（２×１０^{4}細胞）を、蓋付きの無菌の白色９６ウェル平底組織培養プレート（ｇｒｅｉｎｅｒ ｂｉｏ ｏｎｅ、カタログ番号６５５０８３）の各ウェルに移し、プレートを３７℃、５％CO_2で一晩インキュベートした。翌日、異なる滴定濃度のコンストラクト２．１１を含む培地５０μＬを加えた。陽性対照としてコンストラクト２．４を、陰性対照として対照Ｄ及び対照Ｆ（実施例１．１１に記載）を加えた。ＦＡＰ結合媒介性架橋のために、ＦＡＰ発現株ＭＶ－３（最初の刊行：van Muijen GN, Jansen KF, Cornelissen IM, Smeets DF, Beck JL, Ruiter DJ. Establishment and characterization of a human melanoma cell line (MV3) which is highly metastatic in nude mice. Int J Cancer. 1991 Apr 22;48(1):85-91）、ヒトメラノーマ細胞株ＷＭ－２６６－４（ＡＴＣＣ ＣＲＬ－１６７６）又はヒトＦＡＰでトランスフェクトされたＦＡＰ発現マウス線維芽細胞株ＮＩＨ／３Ｔ３（ＮＩＨ／３Ｔ３－ｈｕＦＡＰクローン１９）を使用した。

【０５２０】

従って、ＦＡＰを発現する腫瘍細胞株をＤＰＢＳ（Ｌｉｆｅ ＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓによるＧｉｂｃｏ、カタログ番号１４１９０３２６）で洗浄し、無酵素のＰＢＳベースの細胞解離緩衝液（Ｌｉｆｅ ＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓによるＧｉｂｃｏ、カタログ番号１３１５１－０１４）で３７℃において１０分間処理した。その後、細胞を収集し、細胞カウ

ンターＶｉ－ｃｅｌｌ ｘｒ ２．０３を使用して計数した。細胞を、１０％のＦＢＳ及び１％のＬ－ＧｌｕｔａＭＡＸ－１と共に供給されるＤＥＭに再懸濁して２×１０^{6}細胞／ｍＬにし、ウェル当たり５０μＬを添加した。架橋ＦＡＰ発現腫瘍細胞を加えた後、プレートを３７℃及び５％のCO_2で６時間インキュベートした。白色平底９６ウェルプレートを２００μＬ／ウェルのＤＰＢＳで３回洗浄した。４０μｌの新鮮に調製したレポーター溶解緩衝液（Ｐｒｏｍｅｇａ、カタログ番号：Ｅ３９７１）を各ウェルに添加し、プレートを－２０℃において一晩保存した。翌日、凍結プレート及び検出緩衝液（ルシフェラーゼ１０００アッセイシステム、Ｐｒｏｍｅｇａ、カタログ番号Ｅ４５５０）を室温に解凍した。１００μＬの検出緩衝液を各ウェルに添加し、プレートを、次の設定でＳｐｅｃｔｒａＭａｘ Ｍ５／Ｍ５ｅマイクロプレートリーダー及びＳｏｆｔＭａｘ Ｐｒｏ Ｓｏｆｔｗａｒｅ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｅｖｉｃｅｓ）を使用してできるだけ速やかに測定した：ルシフェラーゼ（ＲＬＵ）については５００ｍｓの積分時間、フィルターなし、全ての波長とトップの読み取りを収集。アッセイのセットアップを図１０に示し、コンストラクト２．１１、２．１５及び２．４並びに対照について測定した活性を図１１に示す。表５５には、ＮＦκＢ活性化誘導ルシフェラーゼ活性曲線のＥＣ５０値を列挙する。

【０５２１】

表55：NFκB活性化誘導ルシフェラーゼ活性曲線のEC_{50}値

	コンストラクト 2.4	コンストラクト 2.11	コンストラクト 2.15
MV-3 に対する EC_{50} [nM]	0.15	0.18	0.16
3T3-huFAP に対する EC_{50} [nM]	0.06	0.08	0.10

【０５２２】

６．４　ＦＡＰ発現細胞の存在下におけるヒトＰＢＭＣの活性化アッセイ

ＦＡＰ結合媒介架橋のために、ヒトＦＡＰでトランスフェクトしたＦＡＰ発現マウス線維芽細胞株ＮＩＨ／３Ｔ３（ＮＩＨ／３Ｔ３－ｈｕＦＡＰクローン１９）を使用した。ＣＭＶプロモーター下でヒトＦＡＰをコードする発現ｐＥＴＲ４９２１プラスミドを用いたマウス胚線維芽細胞ＮＩＨ／３Ｔ３細胞（ＡＴＣＣ ＣＲＬ－１６５８）のトランスフェクションにより細胞を生成させた。細胞を、１．５μｇ／ｍＬのピューロマイシン（ＩｎｖｉｖｏＧｅｎ、カタログ番号：ａｎｔ－ｐｒ－５）の存在下、１０％の仔ウシ血清（ＣＳ、人工栄養仔ウシから鉄分補充、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｃ８０５６－５００ｍＬ）と共に供給されたＤＭＥＭ（Ｌｉｆｅ ＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓによるＧｉｂｃｏ、カタログ番号４２４３０－０２５）に維持した。

【０５２３】

ＮＩＨ／３Ｔ３－ｈｕＦＡＰクローン１９細胞を、１０％のウシ胎仔血清（ＦＢＳ，米国起源，ＰＡＮ ｂｉｏｔｅｃｈ，Ｐ３０－２００９，ロットＰ１５０３０７ＧＩ，ガンマ線照射マイコプラズマフリー，熱失活５６℃３５分）、１％のＧｌｕｔａＭＡＸ－Ｉ（Ｌｉｆｅ ＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓによるＧｉｂｃｏ，カタログ番号３５０５００３８）、１ｍＭのピルビン酸ナトリウム（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、カタログ番号Ｓ８６３６）、１％のＭＥＭ－非必須アミノ酸溶液（ＳＩＧＭＡ－Ａｌｄｒｉｃｈ、カタログ番号Ｍ７１４５）、５０ｕｍのβ－メルカプトエタノール（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、カタログ番号Ｍ３１４８）と共に供給され、５０Ｇｙ（Ｘ線照射装置ＲＳ２０００、Ｒａｄ源）が照射されたＲＰＭＩ１６４０（Ｌｉｆｅ ＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓによるＧｉｂｃｏ、カタログ番号４２４０１－０４２）からなるＴ細胞培地に再懸濁させた。５０μＬのＴ細胞培地中２×１０^{4}個のＮＩＨ／３Ｔ３－ｈｕＦＡＰクローン１９細胞を、丸底組織培養９６ウェルプレート（ＴＴＰ、カタログ番号９２６９７）の各ウェルに播種した。異なる滴定濃度のコンストラクト２．１１を含む５０μＬのＴ細胞培地を添加した。陽性対照と

してコンストラクト２．４を、陰性対照として、実施例１．１１に記載の対照Ｄ及び対照Ｆを加えた。ヒトＰＢＭＣを、４０ｎＭのＣＦＤＡ－ＳＥ（ＳＩＧＭＡ－Ａｌｄｒｉｃｈ、カタログ番号２１８８－２５ＭＧ－Ｆ）を含む３７℃の加温ＤＰＢＳ中、３７℃において１５分間標識した。ＦＢＳを加えてＣＦＳＥ標識化を停止させ、ＰＢＭＣを２回洗浄し、Ｔ細胞培地に再懸濁して最終濃度１．５×１０^{6}細胞／ｍＬとした。５０μＬのこのＰＢＭＣ細胞溶液を各ウェルに播種して７．５×１０^{4}個のＣＦＳＥ標識ＰＢＭＣウェルを加えた。最後に、２ｍＭのアゴニスト抗ヒトＣＤ３抗体（Rodrigues等, Int J Cancer Suppl 7, 45-50 (1992)及び米国特許第６０５４２９７号に記載のヒトＩｇＧ１のクローンＶ９）を含むＴ細胞培地の原液を調製し、５０μＬ／ウェルを各ウェルに加えて、０．５ｍＭの抗ヒトＣＤ３ヒトＩｇＧ１クローンＶ９の最終濃度にした。

【０５２４】

プレートを３７℃において４日間インキュベートした。細胞をＤＰＢＳで洗浄し、４℃において３０分間、１：１０００希釈のＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ（登録商標）Ｆｉｘａｂｌｅ Ａｑｕａ Ｄｅａｄ Ｃｅｌｌ染色キット（Ｌｉｆｅ ＴｅｃｈｎｏｌｏｇｙによるＭｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅｓ、カタログ番号Ｌ３４９５７）を含む１００μＬ／ウェルのＤＰＢＳで染色した。細胞を２００Ｌ／ウェルのＤＰＢＳで１回洗浄し、０．１μｇ／ｍＬのＰｅｒＣＰ－Ｃｙ５．５コンジュゲート抗ヒトＣＤ１３７マウスＩｇＧ１κ（クローン４Ｂ４－１、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、カタログ番号３０９８１４）、０．１μｇ／ｍＬのＰＥ／Ｃｙ７コンジュゲートヒトＰＤ－１マウスＩｇＧ１κ（クローンＥＨ１２．２Ｈ７、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、カタログ番号３２９９１８）、０．０３μｇ／ｍＬのＡＰＣコンジュゲート抗ヒトＣＤ２５マウスＩｇＧ１κ（クローンＢＣ９６、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、カタログ番号３０２６１０）、０．０６μｇ／ｍＬのＡＰＣ／Ｃｙ７コンジュゲート抗ヒトＣＤ８マウスＩｇＧ１κ（クローンＲＰＡ－Ｔ８、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、カタログ番号３３０１０１６）、ＢＶ４２１コンジュゲート抗ヒトＣＤ４マウスＩｇＧ１κ（クローンＲＰＡ－Ｔ４、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、カタログ番号３００５３２）を含む５０μＬのＦＡＣＳ緩衝液（２％のＦＢＳ、５ｍＭのＥＤＴＡ，ｐＨ８（Ａｍｒｅｓｃｏ、カタログ番号Ｅ１７７）及び７．５ｍＭのアジ化ナトリウム（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ Ｓ２００２）と共に供給されたＤＰＢＳ）で４℃において３０分、染色した。細胞を２００μＬ／ウェルのＤＰＢＳで２回洗浄し、５０μＬ／ウェルの新鮮に調製されたＦｏｘＰ３ Ｐｅｒｍ／Ｆｉｘ緩衝液（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ カタログ番号００－５１２３）と共に４℃において３０分間インキュベートした。細胞を２００μＬ／ウェルのＤＰＢＳで２回洗浄し、ＰＥコンジュゲート１：２５０希釈抗ヒトグランザイムＢマウスＩｇＧ１κ（クローンＧＢ１１、ロット４２６９８０３、ＢＤ Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ、カタログ番号５６１１４２）と共に供給される５０μＬ／ウェルの新鮮に調製されるＰｅｒｍ緩衝液（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ、カタログ番号００－８３３３）中に再懸濁させ、４℃において１時間インキュベートした。プレートを２００μＬ／ウェルのＤＰＢＳで２回洗浄し、細胞を、１％のホルムアルデヒド（Ｓｉｇｍａ、ＨＴ５０１３２０－９．５Ｌ）を含むＤＰＢＳで１５分間固定した。細胞を１００μＬ／ウェルのＦＡＣＳ緩衝液に再懸濁し、ＭＡＣＳ Ｑｕａｎｔ Ａｎａｌｙｚｅｒ １０（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃｈ）を使用して獲得した。データはＦｌｏｗＪｏ Ｖ１０（ＦｌｏｗＪｏ，ＬＬＣ）及びＧｒａｐｈＰａｄ Ｐｒｉｓｍ ６．０４（ＧｒａｐｈＰａｄ Ｓｏｆｔｗａｒｅ，Ｉｎｃ）を使用して解析した。

【０５２５】

図１３に示されるように、ＦＡＰ（４Ｂ９）標的分断三量体４－１ＢＢＬ融合分子コンストラクト２．１１と陽性対照コンストラクト２．４のみが、ＣＤ８＋Ｔ細胞上の表面発現ＣＤ２５及び４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）の濃度依存的増加を誘導した。陰性対照分子の対照Ｆ及びＤは、活性化マーカーのこのアップレギュレーションを誘導しなかった。ＣＤ８＋Ｔ細胞におけるＣＤ２５及び４－１ＢＢアップレギュレーションのＥＣ５０値を表５６に示す。

表56：CD8$^+$T細胞に対する活性化マーカー4－1BB（CD137）及びCD25の誘導されたアップレギュレーションのEC_{50}値

	コンストラクト 2.4	コンストラクト 2.11
CD8+ T 細胞に対する CD25 アップレギュレーションの EC_{50} [nM]	0.03	0.07
CD8+ T 細胞に対する CD137 (4-1BB) アップレギュレーションの EC_{50} [nM]	0.08	0.11

【０５２６】

６．５　ＦＡＰ発現細胞の存在下でのＣＭＶ－ＮＬＶ特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞の活性化アッセイ

６．５．１　ＮＬＶ－抗原特異的ＣＤ８　Ｔ細胞の単離及び培養

新鮮な血液をＨＬＡ－Ａ２＋ＣＭＶ感染ボランティアから得た。ＰＢＭＣをフィコール（Ｆｉｃｏｌｌ）密度遠心分離によって単離し、製造者の推奨に従い陰性選択ヒトＣＤ８　Ｔ細胞単離キット（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ、カタログ番号１３０－０９４－１５６）を使用してＰＢＭＣからＣＤ８＋Ｔ細胞を精製した。１０００万個の単離されたＣＤ８Ｔ細胞を、ＣＭＶ由来のＮＬＶＰＭＶＡＴＶペプチドを含むＰＥ標識ＨＬＡ－Ａ２－五量体（ＰｒｏＩｍｍｕｎｅ、カタログ番号Ｆ００８－２Ｂ）５０μＬと共に、１％（ｖ／ｖ）のＦＢＳが補填された１ｍＬの無菌ＤＰＢＳに再懸濁させ、室温において１０分間インキュベートした。細胞を、１％（ｖ／ｖ）のＦＢＳと共に供給された３ｍＬの無菌ＤＰＢＳで２回洗浄した。細胞を、１μｇ／ｍＬの抗ヒトＣＤ８－ＦＩＴＣ（クローンＬＴ８、Ａｂｃａｍ、カタログ番号Ａｂ２８０１０）を含む１％（ｖ／ｖ）のＦＢＳと共に供給された１ｍＬの細胞ＤＰＢＳに再懸濁させ、４℃において３０分間インキュベートした。細胞を２回洗浄し、１％（ｖ／ｖ）のＦＢＳと共に供給されたＤＰＢＳ中で５×１０^{6}細胞／ｍＬの濃度まで再懸濁し、３０μｍの前分離ナイロンネット細胞ストレーナー（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ、カタログ番号１３０－０４１－４０７）を通して濾過した。ＮＬＶ－ペプチド特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞を、次の設定でＡＲＩＡセルソーター（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ，ＤＩＶＡソフトウェア）を使用するＦＡＣＳソーティングによって単離した：１００μｍノズル及び純度ソートマスク。選別された細胞を、１０％（ｖ／ｖ）のＦＢＳ、１％（ｖ／ｖ）のＧｌｕｔａＭＡＸ－１及び４００Ｕ／ｍＬのプロロイキンと共に供給された５ｍｌのＲＰＭＩ１６４０培地を含む１５ｍｌのポリプロピレン遠心管（ＴＰＰ、カタログ番号９１０１５）に収集した。選別した細胞を室温において３５０×ｇで７分間遠心分離し、０．５３×１０^{6}細胞／ｍＬの濃度になるように同培地中に再懸濁させた。１００μＬ／ウェルのこの細胞懸濁液を、予め調製したフィーダープレートの各ウェルに添加した。ＰＨＡ－Ｌ活性化照射同種異系フィーダー細胞を、以前に記載されているように（Levitsky等, 1998）ＰＢＭＣから調製し、１ウェル当たり２×１０^{5}フィーダー細胞で９６ウェル培養プレートに分配した。培養の１日後、選別したＣＤ８＋Ｔ細胞を含むウェルから１００μＬの培地／ウェルを除去し、１０％（ｖ／ｖ）のＦＢＳ及び１％（ｖ／ｖ）のＧｌｕｔａＭＡＸ－１及び４００Ｕ／ｍＬのプロロイキンが補填された新しいＲＰＭＩ１６４０培地と置き換え、これを培養中に定期的に（２～４日ごとに）繰り返した。細胞が増殖し始めると直ぐに、それらを２４ウェル平底組織培養プレート（ＴＰＰ、９２０２４）に移した。細胞を増殖／分裂させ、定期的に新しいフィーダー細胞調製物で再活性化した。

【０５２７】

６．５．２　ＮＬＶ抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞の活性化アッセイ

ＭＶ－３細胞（実施例６．２に既に記載）を収集し、１０％（ｖ／ｖ）のＦＢＳ、１％（ｖ／ｖ）のＧｌｕｔａＭＡＸ Ｉ、１ｍＭのピルビン酸ナトリウム、１％（ｖ／ｖ）のＭＥＭ非必須アミノ酸及び５０μＭのβ－メルカプトエタノールが補充されたＲＰＭＩ１６４０培地からなるＴ細胞培地中に１×１０^{6}細胞／ｍＬになるまで再懸濁させ、３本のチュ

ーブに分離した。合成ＮＬＶＰＭＶＡＴＶペプチド（thinkpeptidesから得た）を最終濃度１×１０－９Ｍ又は１×１０－８Ｍになるように加え、細胞を９０分間インキュベートした。ＮＬＶペプチドをパルスしたＭＶ－３細胞をＴ細胞培地で１回洗浄し、０．５×１０６細胞／ｍＬの密度に再懸濁させ、９６ウェル丸底細胞懸濁プレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ ｂｉｏ－ｏｎｅ、ｃｅｌｌｓｔａｒ、カタログ番号６５０１８５）に分配して（１００μＬ／ウェル）、３７℃において５％CO_2下で一晩インキュベートした。翌日、ＦＡＰ標的４－１ＢＢリガンド三量体含有Ｆｃ融合抗原結合分子（コンストラクト２．１１及び対照としてコンストラクト２．４及び対照Ｆ及びＤ）を、（１０～０．０００４ｎＭの）最終濃度の範囲で５０μＬのＴ細胞培地に添加した。ＮＬＶ特異的ＣＤ８ Ｔ細胞を収集し、洗浄し、５０μＬの培地で各ウェルに加えた（最終腫瘍：ＣＤ８Ｔ細胞比０．１２５）。アッセイの原理は図１４に示す。

【０５２８】

細胞を２４時間インキュベートし、５０μＬ／ウェルを、２．６４μＬ／ｍＬのＧｏｌｇｉストップ（モネシン(Monesin)を含むタンパク質輸送阻害剤、ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ、カタログ番号５５４７２４、最終濃度０．６６μｌ／ｍＬ）を含むＴ細胞培地と置き換え、４μＬ／ｍＬのＧｏｌｇｉプラグ（ブレフェルジンＡを含むタンパク質輸送阻害剤、ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ、カタログ番号５５５０２９、最終濃度１μｇ／ｍＬ）を各ウェルに添加した。

【０５２９】

細胞を４時間インキュベートし、ついでプレートを２００μＬ／ウェルのＤＰＢＳで洗浄し、４℃において３０分間、１：１０００希釈のＬＩＶＥ／ＤＥＡＴＨ Ｆｉｘａｂｌｅ Ａｑｕａ Ｄｅａｄ Ｃｅｌｌ染色（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅｓ、カタログ番号Ｌ３４９５７）を含む１００μＬの４℃のＤＰＢＳで染色した。細胞を２００μＬ／ウェルのＤＰＢＳで洗浄し、１μｇ／ｍＬの抗ヒトＣＤ１３７－ＰｅｒＣＰ－Ｃｙ５．５（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、クローン４Ｂ４－１、カタログ番号３０９８１４）、０．６７μｇ／ｍＬの抗ヒトＣＤ８－ＡＰＣ－Ｃｙ７（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、クローンＲＰＡ－Ｔ８、カタログ番号３０１０１６）及び０．６７μｇ／ｍＬの抗ヒトＰＤ－１－ＰＥ－Ｃｙ７（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、クローンＥＨ１２．２Ｈ７、カタログ番号３２９９１８）を含む５０μＬ／ウェルのＦＡＣＳ緩衝液（２％のＦＢＳ、５ｍＭのＥＤＴＡ、７．５ｍＭのアジ化ナトリウムを含むＤＰＢＳ）で４℃において３０分、染色した。細胞を２００μＬ／ウェルのＤＢＰＳで２回洗浄し、５０ｕＬの新たに調製したＰｅｒｍ／Ｆｉｘ－緩衝液（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅカタログ番号００－５１２３－４３及びカタログ番号００－５２２３－５６）に再懸濁し、４℃において３０分間インキュベートした。細胞を２００ｕＬのＤＰＢＳで２回洗浄し、６ｎｇ／ｍＬの抗ヒトＥｏｍｅｓ－ｅＦ６６０（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ、クローンＷＤ１９２８、カタログ番号５０－４８７７－４２）、抗ヒトＩＦＮγ－ＢＶ４２１（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ、クローン４Ｓ．Ｂ３、カタログ番号５０２５３２）及び４μＬ／ｍＬの抗ヒトグランザイムＢ－ＰＥ（ＢＤ、クローンＧＢ１１、カタログ番号５６１１４２）を含む５０ｕＬの新たに調製したＰｅｒｍ緩衝液（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅカタログ番号００－８３３３－５６）に再懸濁させた。細胞を４℃において１時間インキュベートし、２００ｕＬ／ウェルのＤＰＢＳで２回洗浄した。固定のために、１％のホルムアルデヒドを含む５０μＬ／ウェルのＤＰＢＳを添加し、１５分間インキュベートした。細胞を１００μＬ／ウェルのＦＡＣＳ緩衝液に再懸濁し、ＭＡＣＳ Ｑｕａｎｔ Ａｎａｌｙｚｅｒ １０（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃｈ）を使用して獲得した。ＦｌｏｗＪｏｖ１０．０．７及びＧｒａｐｈ Ｐａｄ Ｐｒｉｓｍ６．０４を用いてデータを解析した。

【０５３０】

図１５に示されるように、ＦＡＰ（４Ｂ９）標的分断三量体４－１ＢＢＬ融合分子コンストラクト２．１１及び陽性対照コンストラクト２．４のみが、ＮＬＶ特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞上での発現した４－１ＢＢ（ＣＤ１３７）（図１５Ａ）及びＩＦＮγ（図１５Ｂ）の濃度依存的増加を誘導した。陰性対照分子の対照Ｆ及びＤは、活性化マーカーのこのアップレギュレーションを誘導しなかった。ＮＬＶ特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞上での４－１ＢＢ及び

ＩＦＮγアップレギュレーションのＥＣ５０値を表５７に示す。

表57：NLV活性化CD8＋T細胞に対する活性化マーカー4－1BB（CD137）及びIFNγの誘導されたアップレギュレーションのEC50値

TCR 刺激	パラメーター	コンストラクト 2.4	コンストラクト 2.11
10−9 M ペプチド	$CD137^+$ CD8 に対する EC_{50} [nM]	0.023	0.006
10−8 M ペプチド	$CD137^+$ CD8 に対する EC_{50} [nM]	0.017	0.006
10−8 M ペプチド	$IFN\gamma^+$ CD8 に対する EC_{50} [nM]	0.021	0.011

【０５３１】

実施例７

一価ＣＤ１９標的Ｃ末端４－１ＢＢ分断三量体リガンドＦｃ融合抗原結合分子の機能的特徴付け

７．１　活性化されたヒトＰＢＭＣへの結合

４－１ＢＢ発現Ｔ細胞への４－１ＢＢＬの結合を調べるために、４８時間、Ｔ細胞上の４－１ＢＢのアップレギュレーションのために、ＴＣＲ刺激によってヒトＰＢＭＣを予め活性化させた。ＰＢＭＣをＦｉｃｏｌｌ（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、カタログ番号１７－１４４０－０３）勾配遠心分離によりバフィコートから精製し、ＲＰＭＩ培地（Ｇｉｂｃｏ、カタログ番号７２４００－０５４）＋１０％のＦＢＳ（Ｇｉｂｃｏ、カタログ番号２００１２－０６８）及び１％のペニシリン－ストレプトマイシン（Ｇｉｂｃｏ、カタログ番号１５０７０－０６３）及び５０ｕＭの２－メルカプトエタノール（Ｇｉｂｃｏ、カタログ番号３１３５０－０１０）に再懸濁して２．８×１０^6／ｍｌの濃度に希釈した。９０ｕｌの細胞を丸底９６ウェルプレート（ｇｒｅｉｎｅｒ ｂｉｏ－ｏｎｅ、ｃｅｌｌｓｔａｒ、カタログ番号６５０１８５）の各ウェルに加えた。ついで、８×１０^{5}ビーズ／ｍｌの更なる５０ｕｌ抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８マイクロビーズ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号１１１３１Ｄ）をウェルに添加した。２日後、細胞を冷ＰＢＳ（Ｇｉｂｃｏ、２００１２－０６８）で１回洗浄し、９０ｕｌの冷ＰＢＳで再懸濁し、コンストラクト４．１１、コンストラクト３．１１、陽性対照コンストラクト４．１及び陰性対照の対照Ｄを含む１０ｕｌの溶液と共に４℃において１時間インキュベートした。十分に洗浄した後、細胞を、５μｇ／ｍＬのＰＥコンジュゲートＡｆｆｉｎｉＰｕｒｅ抗ヒトＩｇＧ Ｆ（ａｂ’）２断片特異的ヤギＦ（ａｂ’）２断片（Ｊａｃｋｓｏｎ ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ、カタログ番号１０９１１６０９８）を含む５０μＬ／ウェルの冷ＦＡＣＳ緩衝液、及び加えて抗ヒトＣＤ３（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、カタログ番号３００３１２）、ＣＤ４（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、カタログ番号３１７４３４）及びＣＤ８（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ、カタログ番号３４４７１０）Ａｂで４℃において３０分間、更に染色した。細胞を２００μＬ／ウェルの４℃のＦＡＣＳ緩衝液で２回洗浄し、細胞を１％のホルムアルデヒド（Ｓｉｇｍａ、ＨＴ５０１３２０－９．５Ｌ）を含む５０μＬ／ウェルのＤＰＢＳに固定した。細胞を１００μＬ／ウェルのＦＡＣＳ緩衝液に再懸濁し、ＦＡＣＳ ＬＳＲ ＩＩ（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用して獲得した。ＦｌｏｗＪｏ Ｖ１０（ＦｌｏｗＪｏ、ＬＬＣ）及びＧｒａｐｈＰａｄ Ｐｒｉｓｍ６．０４を使用してデータを解析した。

【０５３２】

特異的結合を、ＣＤ４及びＣＤ８細胞の純粋な集団にゲーティングした。全てのコンストラクトは、４－１ＢＢ発現ＣＤ４又はＣＤ８ Ｔ細胞への用量依存的な同様の結合特性を示した（図１６）。表５８に、結合曲線のＥＣ５０値を列挙する。

表58：4－1BB^{+}ヒトT細胞に対する結合曲線のEC_{50}値

	コンストラクト 4.11	コンストラクト 3.11	コンストラクト 4.1	対照 D
CD4 に対する EC_{50} [nM]	0.13	0.13	0.11	0.17
CD4 に対する EC_{50} [μg/ml]	0.02	0.02	0.02	0.03
CD8 に対する EC_{50} [nM]	0.32	0.38	0.28	0.23
CD8 に対する EC_{50} [μg/ml]	0.05	0.06	0.05	0.04

【０５３３】

７．２　ＣＤ１９発現腫瘍細胞の結合

腫瘍抗原ＣＤ１９への結合を調べるために、ＣＤ１９＋ＷＳＵ－ＤＬＣＬ２細胞（ＤＳＭＺ番号ＡＣＣ５７５）を使用した。ＤＰＢＳ（Ｌｉｆｅ ＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓによるＧｉｂｃｏ、カタログ番号１４１９０３２６）に再懸濁した０．１×１０６個の腫瘍細胞を丸底懸濁細胞９６ウェルプレート（ｇｒｅｉｎｅｒ ｂｉｏ－ｏｎｅ、ｃｅｌｌｓｔａｒ、カタログ番号６５０１８５）の各ウェルに添加した。細胞をＤＰＢＳ２００μＬで１回洗浄した。細胞を、１：５０００希釈のＦｉｘａｂｌｅ Ｖｉａｂｉｌｉｔｙ Ｄｙｅ ｅＦｌｕｏｒ６６０（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ，カタログ番号６５－０８６４－１８）を含む１００μＬ／ウェルの４℃の冷ＤＰＢＳ緩衝液に再懸濁し、プレートを４℃において３０分間インキュベートした。細胞を２００μＬ／ウェルの４℃の冷ＤＰＢＳ緩衝液で１回洗浄し、コンストラクト４．１１、コンストラクト３．１１、陽性対照としてコンストラクト４．１、そして陰性対照として対照Ｄを一連の濃度で含む５０μＬ／ウェルの４℃の冷ＦＡＣＳ緩衝液（２％のＦＢＳ、５ｍＭのＥＤＴＡ ｐＨ８（Ａｍｒｅｓｃｏ、カタログ番号Ｅ１７７）及び７．５ｍＭのアジ化ナトリウム（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ Ｓ２００２）と共に供給されたＤＰＢＳ）に再懸濁し、続いて４℃において１時間インキュベートした。十分に洗浄した後、細胞を、５μｇ／ｍＬのＰＥコンジュゲートＡｆｆｉｎｉＰｕｒｅ抗ヒトＩｇＧ Ｆ（ａｂ’）２断片特異的ヤギＦ（ａｂ’）２（Ｊａｃｋｓｏｎ ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ、カタログ番号１０９１１６０９８）を含む５０μＬ／ウェルの４℃冷ＦＡＣＳ緩衝液で４℃において３０分間、更に染色した。細胞を２００μＬ／ウェルの４℃のＦＡＣＳ緩衝液で２回洗浄し、細胞を、１％のホルムアルデヒド（Ｓｉｇｍａ、ＨＴ５０１３２０－９．５Ｌ）を含む５０μＬ／ウェルのＤＰＢＳに固定した。細胞を１００μＬ／ウェルのＦＡＣＳ緩衝液に再懸濁し、ＦＡＣＳ ＬＳＲ ＩＩ（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用して獲得した。ＦｌｏｗＪｏ Ｖ１０（ＦｌｏｗＪｏ、ＬＬＣ）及びＧｒａｐｈＰａｄ Ｐｒｉｓｍ６．０４（ＧｒａｐｈＰａｄ Ｓｏｆｔｗａｒｅ，Ｉｎｃ）を使用してデータを解析した。

【０５３４】

ゲートを、生存腫瘍細胞にセットし、ＰＥコンジュゲートＡｆｆｉｎｉＰｕｒｅ抗ヒトＩｇＧ ＩｇＧ Ｆｃγ断片特異的ヤギＦ（ａｂ’）２断片の蛍光強度の幾何平均を、ＣＤ１９標的又は非標的Ｃ末端４－１ＢＢ分断三量体リガンドＦｃ融合抗原結合分子の滴定濃度に対してプロットした。図１７に示されるように、ＣＤ１９標的分断三量体４－１ＢＢリガンド融合分子コンストラクト４．１１及びコンストラクト３．１１のみがＣＤ１９発現腫瘍細胞ＷＳＵ－ＤＬＣＬ２に結合する一方、非標的分断三量体４－１ＢＢリガンド融合分子対照Ｄは腫瘍細胞に結合しなかった。表５９には、ＣＤ１９＋腫瘍結合曲線のＥＣ５０値を列挙する。

表59：CD19^{+}腫瘍細胞に対する結合曲線のEC_{50}値

	コンストラクト 4.11	コンストラクト 3.11	コンストラクト 4.1
EC_{50} [nM]	0.26	0.38	0.17
EC_{50} [μg/ml]	0.04	0.06	0.03

【０５３５】

７．３　生物学的活性：ＣＤ１９発現Ｂ細胞リンパ腫細胞と共培養したヒト４－１ＢＢを発現するＨｅＬａレポーター細胞のＮＦ－κＢ活性化

７．３．１　ヒト４－１ＢＢ及びＮＦ－κＢ－ルシフェラーゼを発現するＨｅＬａレポーター細胞の作製

ＨｅＬａ－ヒト－４－１ＢＢ－ＮＦκＮ－ｌｕｃレポーター細胞株を、実施例６．３．１に記載されているようにして作製した。

【０５３６】

７．３．２　ＦＡＰ発現腫瘍細胞と共培養したヒト４－１ＢＢを発現するＨｅＬａレポーター細胞のＮＦ－κＢ活性化

ＮＦκＢ－ｌｕｃ－４－１ＢＢ－ＨｅＬａクローン２６細胞をＤＰＢＳ（Ｌｉｆｅ ＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓによるＧｉｂｃｏ、カタログ番号１４１９０３２６）で洗浄し、３７℃において５分、０．０５％のトリプシンＥＤＴＡ（Ｌｉｆｅ ＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓによるＧｉｂｃｏ、カタログ番号２５３０００５４）で処理した。細胞を収集し、１０％のウシ胎仔血清（ＦＢＳ，米国起源，ＰＡＮ ｂｉｏｔｅｃｈ，Ｐ３０－２００９，ロットＰ１５０３０７ＧＩ，ガンマ線照射マイコプラズマフリー，熱失活５６℃３５分）及び１％のＧｌｕｔａＭＡＸ－Ｉ（Ｌｉｆｅ ＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓによるＧｉｂｃｏ，カタログ番号３５０５００３８）と共に供給されたＤＭＥＭ培地（Ｌｉｆｅ ＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓによるＧｉｂｃｏ、カタログ番号４２４３００２５）に再懸濁させた。細胞カウンターＶｉ－ｃｅｌｌ ｘｒ２．０３（Ｂｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ、カタログ番号７３１０５０）を使用して細胞を計数し、０．２×１０^{6}細胞／ｍＬの細胞密度に設定した。この細胞懸濁液１００μＬ（２×１０^{4}細胞）を、蓋付きの無菌の白色９６ウェル平底組織培養プレート（ｇｒｅｉｎｅｒ ｂｉｏ ｏｎｅ、カタログ番号６５５０８３）の各ウェルに移し、プレートを３７℃、５％CO_2で一晩インキュベートした。翌日、異なる滴定濃度のコンストラクト３．１１及びコンストラクト４．１１を含む培地５０μＬを加えた。陽性対照としてコンストラクト３．４及び４．１を、陰性対照として対照Ｄ及び対照Ｆ（実施例１．１１に記載した）を加えた。ＣＤ１９結合媒介性架橋のために、次のＣＤ１９発現細胞株を使用した：びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫細胞株ＯＣＩ－Ｌｙ１８（ＤＭＳＺ ＡＣＣ６９９）、急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）細胞株Ｎａｌｍ６（ＤＳＭＺ ＡＣＣ－１２８）及び非ホジキンＢ細胞リンパ腫（Ｂ－ＮＨＬ）細胞株ＳＵ－ＤＨＬ－８（ＤＳＭＺ ＡＣＣ－５７３）。従って、ＣＤ１９を発現する懸濁細胞株ＯＣＩ－Ｌｙ１８、Ｎａｌｍ６及びＳＵ－ＤＨＬ－８を収集し、細胞カウンターＶｉ－ｃｅｌｌｘｒ２．０３を使用して計数し、１０％のＦＢＳ及び１％のＬ－ＧｌｕｔａＭＡＸ－１と共に供給されたＤＥＭに再懸濁させて２×１０^{6}細胞／ｍＬとし、ウェル当たり５０μＬを添加した。架橋ＣＤ１９発現腫瘍細胞系を加えた後、プレートを３７℃及び５％CO_2で６時間インキュベートした。白色平底９６ウェルプレートを２００μＬ／ウェルのＤＰＢＳで３回洗浄した。４０μｌの新しく調製したレポーター溶解緩衝液（Ｐｒｏｍｅｇａ、カタログ番号：Ｅ３９７１）を各ウェルに添加し、プレートを－２０℃で一晩保存した。翌日、凍結プレート及び検出緩衝液（ルシフェラーゼ１０００アッセイシステム、Ｐｒｏｍｅｇａ、カタログ番号Ｅ４５５０）を室温に解凍した。１００μＬの検出緩衝液を各ウェルに添加し、プレートを、次の設定でＳｐｅｃｔｒａＭａｘ Ｍ５／Ｍ５ｅマイクロプレートリーダー及びＳｏｆｔＭａｘ Ｐｒｏ Ｓｏｆｔｗａｒｅ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｅｖｉｃｅ

ｓ）を使用してできるだけ速やかに測定した：ルシフェラーゼ（ＲＬＵ）については５００ｍｓの積分時間、フィルターなし、全ての波長とトップの読み取りを収集。アッセイのセットアップを図１８に示し、コンストラクト３．４、４．１、３．１１及び４．１１並びに対照Ｄ及びＦについて測定した活性を図１９に示す。表６０に、ＣＤ１９発現腫瘍細胞株に対する結合曲線のＥＣ５０値を列挙する。

表60：CD19発現腫瘍細胞株に対する結合曲線のEC_{50}値

	コンストラクト 3.4	コンストラクト 3.11	コンストラクト 4.1
OCI-Ly18 EC_{50} [nM]	0.03	0.03	0.03
Nalm6 EC_{50} [nM]	0.03	0.03	0.02
SU-DHL-8 EC_{50} [nM]	0.03	0.03	0.03

【０５３７】

７．４　生物学的活性：ヒトＰＢＭＣ活性化アッセイ

生理学的関連設定における生物学的活性を決定するために、我々は、活性化ヒトＰＢＭＣにおけるエフェクター機能分子ＩＦＮγの放出を、４－１ＢＢＬを介してＴ細胞及びＮＫ細胞を共刺激することによって測定した。ＰＢＭＣを、Ｆｉｃｏｌｌ（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ、カタログ番号１７－１４４０－０３）勾配遠心分離によりバフィコートから精製し、ついで２．２×１０^{6}／ｍｌの濃度に希釈し、ＲＰＭＩ培地（Ｇｉｂｃｏ、カタログ番号７２４００－０５４）＋１０％のＦＢＳ（Ｇｉｂｃｏ、カタログ番号２００１２－０６８）及び１％のペニシリン－ストレプトマイシン（Ｇｉｂｃｏ、カタログ番号１５０７０－０６３）及び５０ｕＭの２－メルカプトエタノール（Ｇｉｂｃｏ、カタログ番号３１３５０－０１０）に再懸濁した。９０μｌの細胞を丸底９６ウェルプレート（ｇｒｅｉｎｅｒ ｂｉｏ ｏｎｅ、ｃｅｌｌｓｔａｒ、カタログ番号６５０１８５）の各ウェルに添加した。ついで、コンストラクト４．１１、コンストラクト３．１１、陽性対照のコンストラクト４．１及び陰性対照の対照Ｄを含む溶液１０μｌを一連の濃度でウェルに添加し、更に５０μｌの抗ＣＤ３及び抗ＣＤ２８マイクロビーズ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、カタログ番号１１１３１Ｄ）を８×１０^{5}ビーズ／ｍｌで与えた。４８時間のインキュベーション後、ＥＬＩＳＡ（ＤｕｏＳｅｔ Ｈｕｍａｎ ＩＦＮｇ ＥＬＩＳＡキット、Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ、カタログ番号ＤＹ２８５）によるＩＦＮ－γの測定のために上清を収集した。

【０５３８】

図２０は、コンストラクト４．１１、コンストラクト３．１１及び陽性対照コンストラクト４．１が、同様の量のＩＦＮγを産生するようにＰＢＭＣを刺激したが、陰性対照Ｄは、架橋の欠如のためＴ細胞又はＮＫ細胞を活性化しなかったことを示す。表６１に、活性化ヒトＰＢＭＣでのＩＦＮγ曲線のＥＣ５０値を列挙する。

表61：活性化ヒトPBMCに対するIFNγ曲線のEC_{50}値

	コンストラクト 4.11	コンストラクト 3.11	コンストラクト 4.1
EC_{50} [nM]	0.19	0.13	0.06
EC_{50} [μg/ml]	0.03	0.02	0.01

【０５３９】

［引用文献］

Ascierto, P. A., E. Simeone, M. Sznol, Y. X. Fu, and I. Melero (2010), Clinical experiences with anti-CD137 and anti-PD1 therapeutic antibodies. Semin Oncol 37:508-516。

Aggarwal B.B. (2003), Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. Nat. Rev. Immunol. 3(9),745-56。

Banner D.等(1993), Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. Cell 73, 431-445。

Bodmer J., Schneider P.及びTschopp, J. (2002), The molecular architecture of the TNF superfamily. Trends in Biochemical Sciences 27(1), 19-26。

Broll, K., Richter, G., Pauly, S., Hofstaedter, F.,及びSchwarz, H. (2001). CD137 expression in tumor vessel walls. High correlation with malignant tumors. Am J Clin Pathol 115, 543-549。

Buechele, C., Baessler, T., Schmiedel, B.J., Schumacher, C.E., Grosse-Hovest, L., Rittig, K.,及びSalih, H.R. (2012). 4-1BB ligand modulates direct and Rituximab-induced NK-cell reactivity in chronic lymphocytic leukemia. Eur J Immunol 42, 737-748。

Choi, B.K., Kim, Y.H., Kwon, P.M., Lee, S.C., Kang, S.W., Kim, M.S., Lee, M.J.,及びKwon, B.S. (2009). 4-1BB functions as a survival factor in dendritic cells. J Immunol 182, 4107-4115。

Cuadros, C., Dominguez, A.L., Lollini, P.L., Croft, M., Mittler, R.S., Borgstrom, P.,及びLustgarten, J. (2005). Vaccination with dendritic cells pulsed with apoptotic tumors in combination with anti-OX40 and anti-4-1BB monoclonal antibodies induces T cell-mediated protective immunity in Her-2/neu transgenic mice. Int J Cancer 116, 934-943。

Curran, M.A., Kim, M., Montalvo, W., Al-Shamkhani, A.,及びAllison, J.P. (2011). Combination CTLA-4 blockade and 4-1BB activation enhances tumor rejection by increasing T-cell infiltration, proliferation, and cytokine production. PLoS One 6, e19499。

Diehl, L., van Mierlo, G.J., den Boer, A.T., van der Voort, E., Fransen, M., van Bostelen, L., Krimpenfort, P., Melief, C.J., Mittler, R., Toes, R.E.,及びOffringa, R. (2002). In vivo triggering through 4-1BB enables Th-independent priming of CTL in the presence of an intact CD28 costimulatory pathway. J Immunol 168, 3755-3762。

Dubrot, J., Milheiro, F., Alfaro, C., Palazon, A., Martinez-Forero, I., Perez-Gracia, J.L., Morales-Kastresana, A., Romero-Trevejo, J.L., Ochoa, M.C., Hervas-Stubbs, S.等 (2010). Treatment with anti-CD137 mAbs causes intense accumulations of liver T cells without selective antitumor immunotherapeutic effects in this organ. Cancer Immunol Immunother 59, 1223-1233。

Futagawa, T., Akiba, H., Kodama, T., Takeda, K., Hosoda, Y., Yagita, H.,及びOkumura, K. (2002). Expression and function of 4-1BB and 4-1BB ligand on murine dendritic cells. Int Immunol 14, 275-286。

Guo, Z., Cheng, D., Xia, Z., Luan, M., Wu, L., Wang, G.,及びZhang, S. (2013). Combined TIM-3 blockade and CD137 activation affords the long-term protection in a murine model of ovarian cancer. J Transl Med 11, 215。

Heinisch, I.V., Daigle, I., Knopfli, B.,及びSimon, H.U. (2000). CD137 activation abrogates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-mediated anti-apoptosis in neutrophils. Eur J Immunol 30, 3441-3446。

Hornig, N., Kermer, V., Frey, K., Diebolder, P., Kontermann, R.E., Mueller, D. (

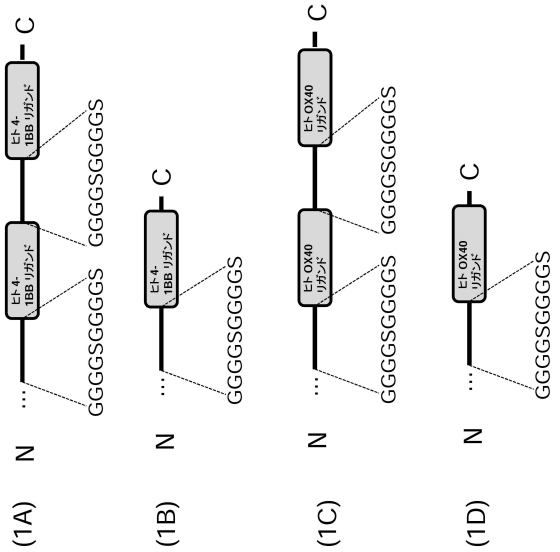
2012), Combination of a bispecific antibody and costimulatory antibody-ligand fusion proteins for targeted cancer immunotherapy. J. Immunother. 35, 418-429。
Ju, S.A., Cheon, S.H., Park, S.M., Tam, N.Q., Kim, Y.M., An, W.G.,及びKim, B.S. (2008). Eradication of established renal cell carcinoma by a combination of 5-fluorouracil and anti-4-1BB monoclonal antibody in mice. Int J Cancer 122, 2784-2790。
Kienzle, G.,及びvon Kempis, J. (2000). CD137 (ILA/4-1BB), expressed by primary human monocytes, induces monocyte activation and apoptosis of B lymphocytes. Int Immunol 12, 73-82。
Kim, D.H., Chang, W.S., Lee, Y.S., Lee, K.A., Kim, Y.K., Kwon, B.S.,及びKang, C.Y. (2008). 4-1BB engagement costimulates NKT cell activation and exacerbates NKT cell ligand-induced airway hyperresponsiveness and inflammation. J Immunol 180, 2062-2068。
Kim, Y.H., Choi, B.K., Oh, H.S., Kang, W.J., Mittler, R.S.,及びKwon, B.S. (2009). Mechanisms involved in synergistic anticancer effects of anti-4-1BB and cyclophosphamide therapy. Mol Cancer Ther 8, 469-478。
Kwon, B.S.及びWeissman, S.M. (1989). cDNA sequences of two inducible T-cell genes. Proc Natl Acad Sci U S A 86, 1963-1967。
Lee, H., Park, H.J., Sohn, H.J., Kim, J.M.,及びKim, S.J. (2011). Combinatorial therapy for liver metastatic colon cancer: dendritic cell vaccine and low-dose agonistic anti-4-1BB antibody co-stimulatory signal. J Surg Res 169, e43-50。
Levitsky, V., de Campos-Lima, P.O., Frisan, T.,及びMasucci, M.G. (1998). The clonal composition of a peptide-specific oligoclonal CTL repertoire selected in response to persistent EBV infection is stable over time. J Immunol 161, 594-601。
Li, F.及びRavetch, J.V. (2011). Inhibitory Fcgamma receptor engagement drives adjuvant and anti-tumor activities of agonistic CD40 antibodies. Science 333, 1030-1034。
Lin, W., Voskens, C.J., Zhang, X., Schindler, D.G., Wood, A., Burch, E., Wei, Y., Chen, L., Tian, G., Tamada, K.等 (2008). Fc-dependent expression of CD137 on human NK cells: insights into "agonistic" effects of anti-CD137 monoclonal antibodies. Blood 112, 699-707。
Melero, I., Johnston, J.V., Shufford, W.W., Mittler, R.S.,及びChen, L. (1998). NK1.1 cells express 4-1BB (CDw137) costimulatory molecule and are required for tumor immunity elicited by anti-4-1BB monoclonal antibodies. Cell Immunol 190, 167-172。
Melero, I., Shuford, W.W., Newby, S.A., Aruffo, A., Ledbetter, J.A., Hellstrom, K.E., Mittler, R.S.,及びChen, L. (1997). Monoclonal antibodies against the 4-1BB T-cell activation molecule eradicate established tumors. Nat Med 3, 682-685。
Merchant, A.M., Zhu, Z., Yuan, J.Q., Goddard, A., Adams, C.W., Presta, L.G.,及びCarter, P. (1998). An efficient route to human bispecific IgG. Nat Biotechnol 16, 677-681。
Morales-Kastresana, A., Sanmamed, M.F., Rodriguez, I., Palazon, A., Martinez-Forero, I., Labiano, S., Hervas-Stubbs, S., Sangro, B., Ochoa, C., Rouzaut, A.等 (2013). Combined immunostimulatory monoclonal antibodies extend survival in an aggressive transgenic hepatocellular carcinoma mouse model. Clin Cancer Res 19, 6151-6162。
Mueller, D., Frey, K., Kontermann, R.E. (2008), A novel antibody-4-1BBl fusion protein for targeted costimulation in cancer immunotherapy, J. Immunother

. 31, 714-722。
Murillo, O., Dubrot, J., Palazon, A., Arina, A., Azpilikueta, A., Alfaro, C., Solano, S., Ochoa, M.C., Berasain, C., Gabari, I.等 (2009). In vivo depletion of DC impairs the anti-tumor effect of agonistic anti-CD137 mAb. Eur J Immunol 39, 2424-2436。
Narazaki, H., Zhu, Y., Luo, L., Zhu, G.,及びChen, L. (2010). CD137 agonist antibody prevents cancer recurrence: contribution of CD137 on both hematopoietic and nonhematopoietic cells. Blood 115, 1941-1948。
Nishimoto, H., Lee, S.W., Hong, H., Potter, K.G., Maeda-Yamamoto, M., Kinoshita, T., Kawakami, Y., Mittler, R.S., Kwon, B.S., Ware, C.F.等(2005). Costimulation of mast cells by 4-1BB, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, with the high-affinity IgE receptor. Blood 106, 4241-4248。
Olofsson, P.S., Soderstrom, L.A., Wagsater, D., Sheikine, Y., Ocaya, P., Lang, F., Rabu, C., Chen, L., Rudling, M., Aukrust, P.等(2008). CD137 is expressed in human atherosclerosis and promotes development of plaque inflammation in hypercholesterolemic mice. Circulation 117, 1292-1301。
Palazon, A., Teijeira, A., Martinez-Forero, I., Hervas-Stubbs, S., Roncal, C., Penuelas, I., Dubrot, J., Morales-Kastresana, A., Perez-Gracia, J.L., Ochoa, M.C.等(2011). Agonist anti-CD137 mAb act on tumor endothelial cells to enhance recruitment of activated T lymphocytes. Cancer Res 71, 801-811。
Schwarz, H., Valbracht, J., Tuckwell, J., von Kempis, J.,及びLotz, M. (1995). ILA, the human 4-1BB homologue, is inducible in lymphoid and other cell lineages. Blood 85, 1043-1052。
Shao, Z.,及びSchwarz, H. (2011). CD137 ligand, a member of the tumor necrosis factor family, regulates immune responses via reverse signal transduction. J Leukoc Biol 89, 21-29。
Shi, W.,及びSiemann, D.W. (2006). Augmented antitumor effects of radiation therapy by 4-1BB antibody (BMS-469492) treatment. Anticancer Res 26, 3445-3453。
Simeone, E.,及びAscierto, P.A. (2012). Immunomodulating antibodies in the treatment of metastatic melanoma: the experience with anti-CTLA-4, anti-CD137, and anti-PD1. J Immunotoxicol 9, 241-247。
Snell, L.M., Lin, G.H., McPherson, A.J., Moraes, T.J.,及びWatts, T.H. (2011). T-cell intrinsic effects of GITR and 4-1BB during viral infection and cancer immunotherapy. Immunol Rev 244, 197-217。
Stagg, J., Loi, S., Divisekera, U., Ngiow, S.F., Duret, H., Yagita, H., Teng, M.W.,及びSmyth, M.J. (2011). Anti-ErbB-2 mAb therapy requires type I and II interferons and synergizes with anti-PD-1 or anti-CD137 mAb therapy. Proc Natl Acad Sci U S A 108, 7142-7147。
Teng, M.W., Sharkey, J., McLaughlin, N.M., Exley, M.A.,及びSmyth, M.J. (2009). CD1d-based combination therapy eradicates established tumors in mice. J Immunol 183, 1911-1920。
von Kempis, J., Schwarz, H.,及びLotz, M. (1997). Differentiation-dependent and stimulus-specific expression of ILA, the human 4-1BB-homologue, in cells of mesenchymal origin. Osteoarthritis Cartilage 5, 394-406。
Wei, H., Zhao, L., Li, W., Fan, K., Qian, W., Hou, S., Wang, H., Dai, M., Hellstrom, I., Hellstrom, K.E.,及びGuo, Y. (2013). Combinatorial PD-1 blockade and CD137 activation has therapeutic efficacy in murine cancer models and synergizes with cisplatin. PLoS One 8, e84927。
Wilcox, R.A., Chapoval, A.I., Gorski, K.S., Otsuji, M., Shin, T., Flies, D.B., Tama

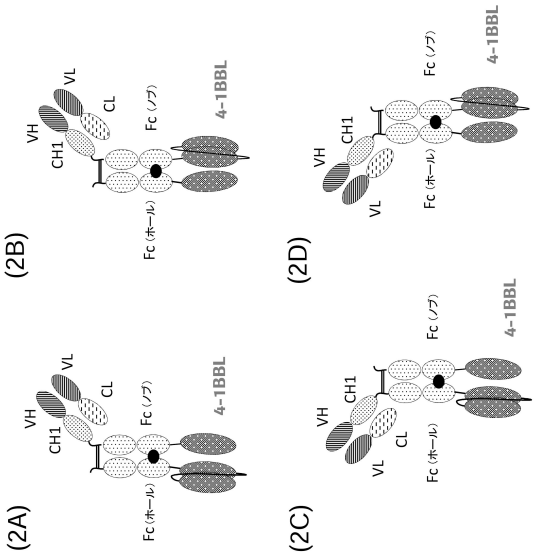
da, K., Mittler, R.S., Tsuchiya, H., Pardoll, D.M.,及びChen, L. (2002). Cutting edge: Expression of functional CD137 receptor by dendritic cells. J Immunol 168, 4262-4267。
Wilcox, R.A., Tamada, K., Flies, D.B., Zhu, G., Chapoval, A.I., Blazar, B.R., Kast, W.M.,及びChen, L. (2004). Ligation of CD137 receptor prevents and reverses established anergy of CD8+ cytolytic T lymphocytes in vivo. Blood 103, 177-184。
Zhang, N., Sadun, R.E., Arias, R.S., Flanagan, M.L., Sachsman, S.M., Nien, Y, Khawli, L.A., Hu, P., Epstein, A.L. (2007). Targeted and untargeted CD137L fusion proteins for the immunotherapy of experimental solid tumors. Clin. Cancer Res. 13, 2758-2767。
Zhang, X., Voskens, C.J., Sallin, M., Maniar, A., Montes, C.L., Zhang, Y., Lin, W., Li, G., Burch, E., Tan, M.等 (2010). CD137 promotes proliferation and survival of human B cells. J Immunol 184, 787-795。

【図面】

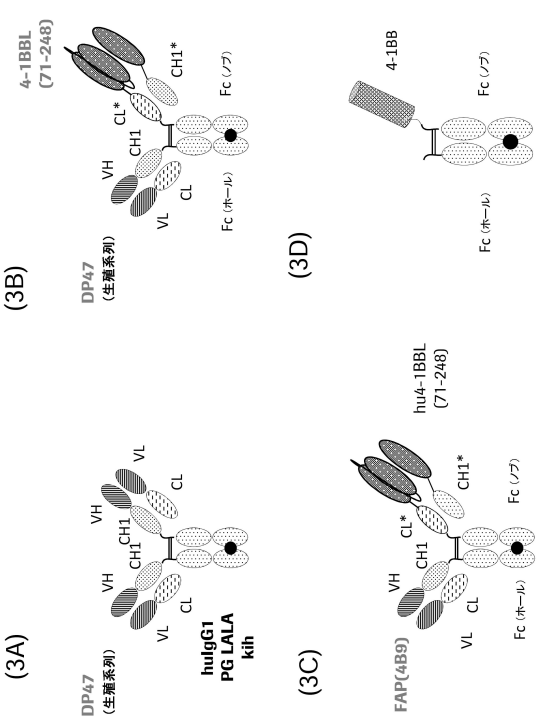
【図１】



【図２】

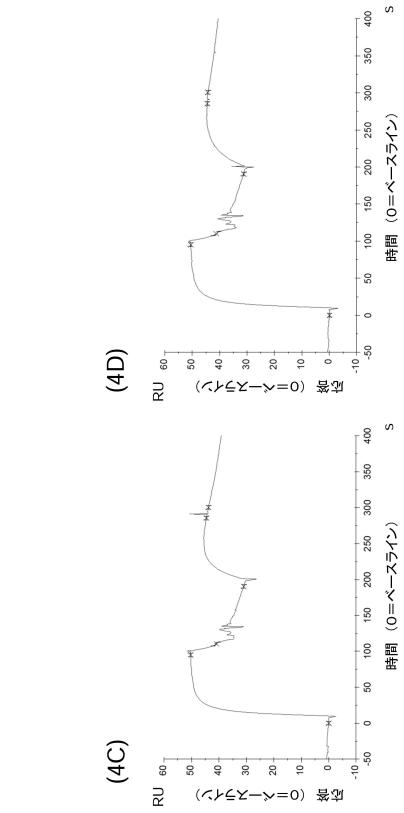


【図３】

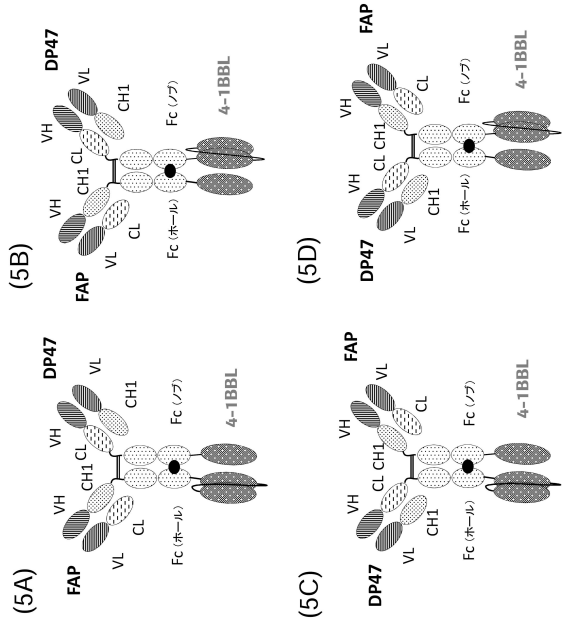


【図４Ａ－Ｂ】

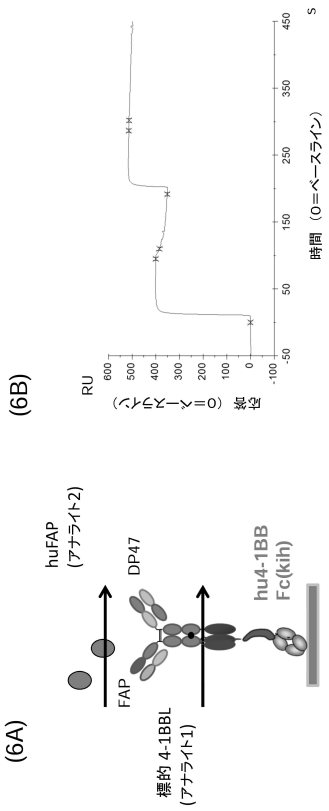
【図４Ｃ－Ｄ】



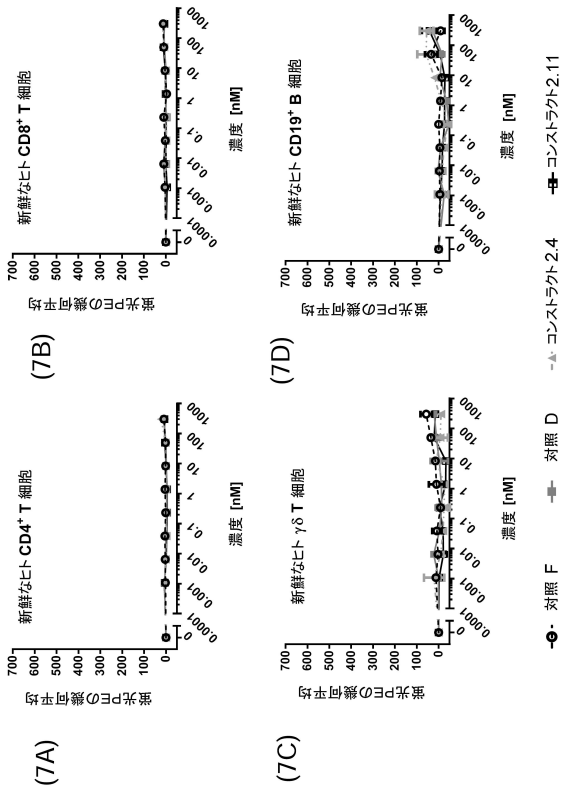
【図５】



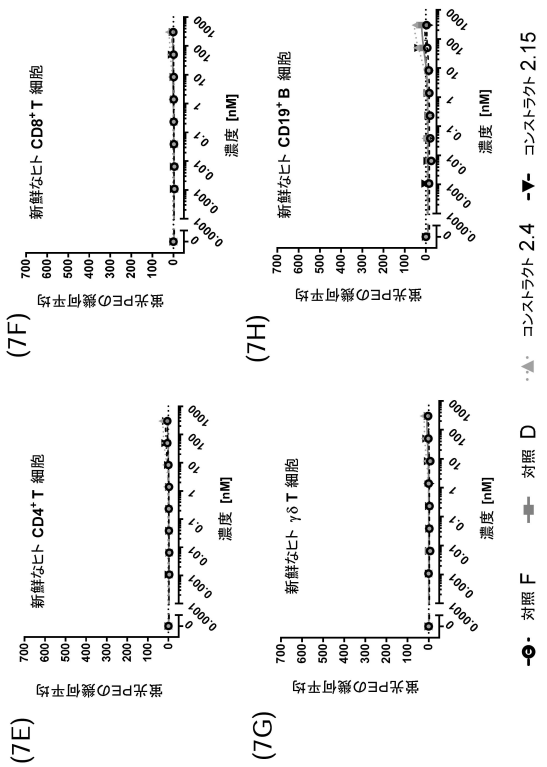
【図６】



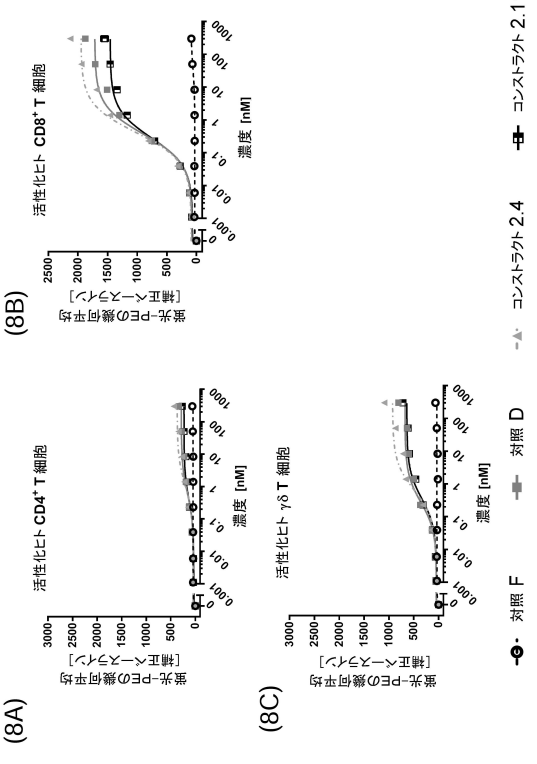
【図７Ａ－Ｄ】



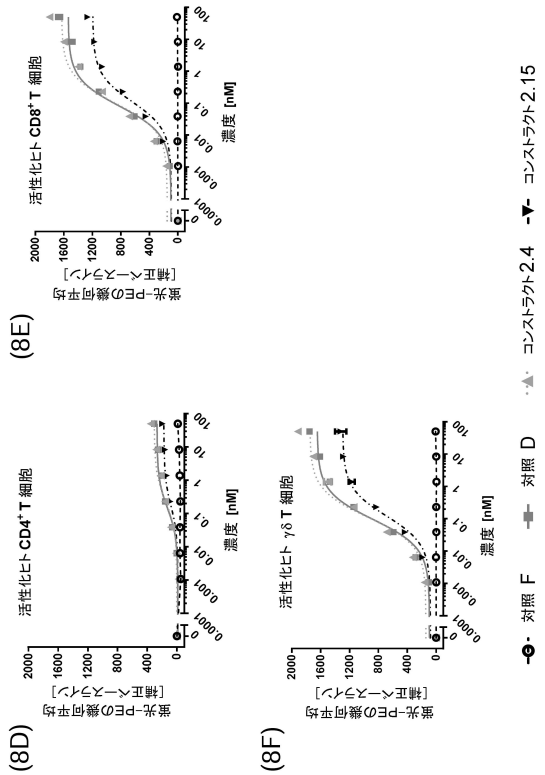
【図７Ｅ－Ｈ】



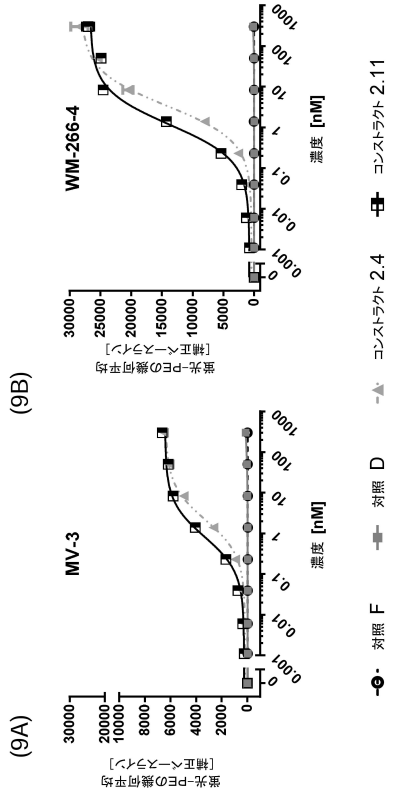
【図８Ａ－Ｃ】



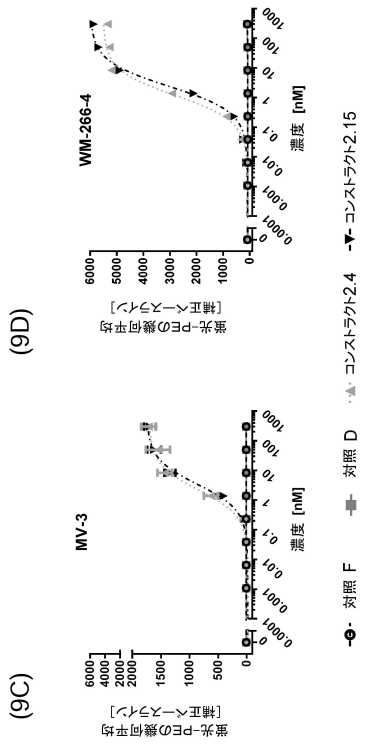
【図８Ｄ－Ｆ】



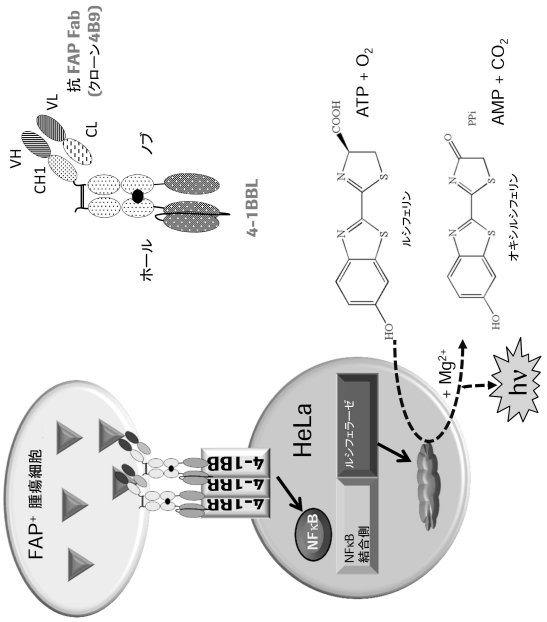
【図９Ａ－Ｂ】



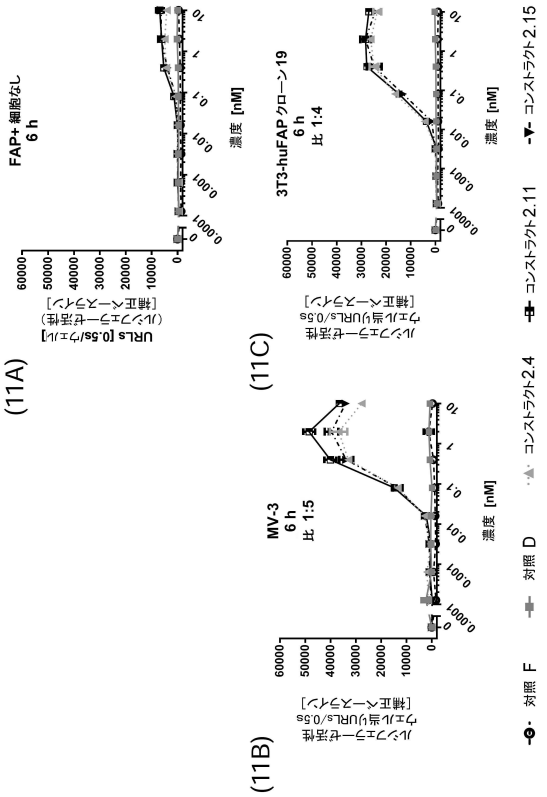
【図９Ｃ－Ｄ】



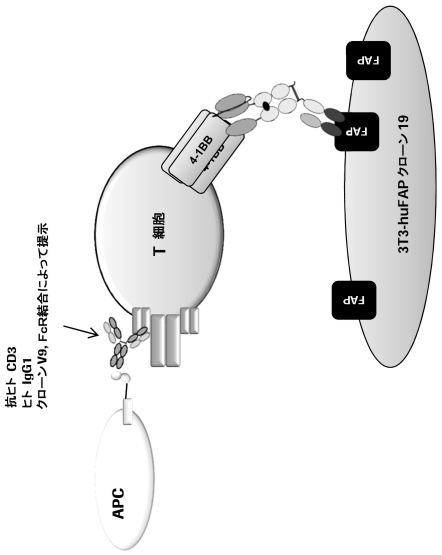
【図１０】



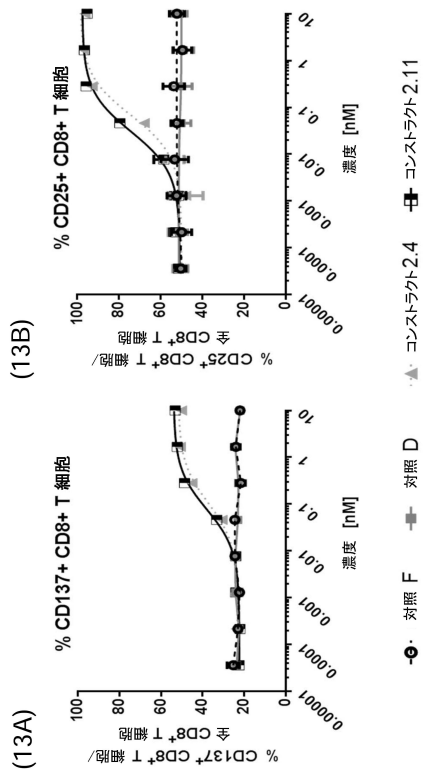
【図１１】



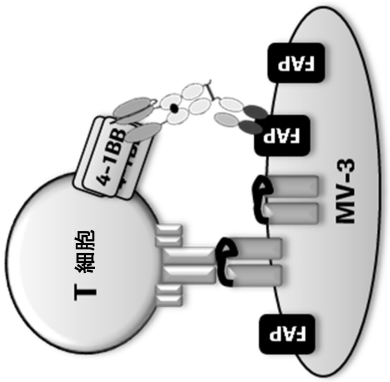
【図１２】



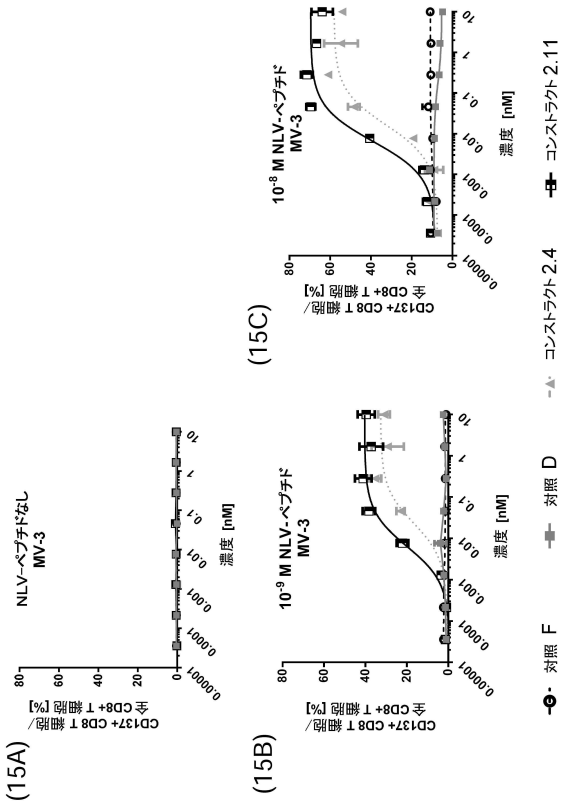
【図１３】



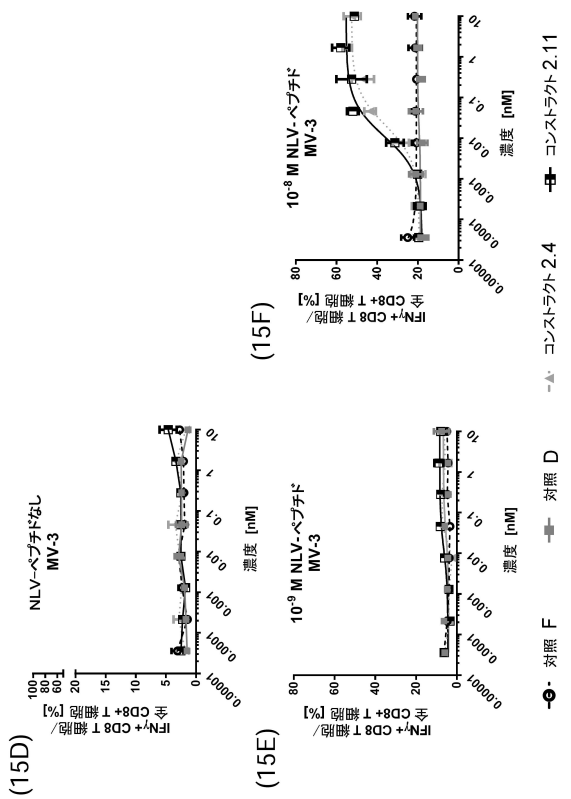
【図１４】



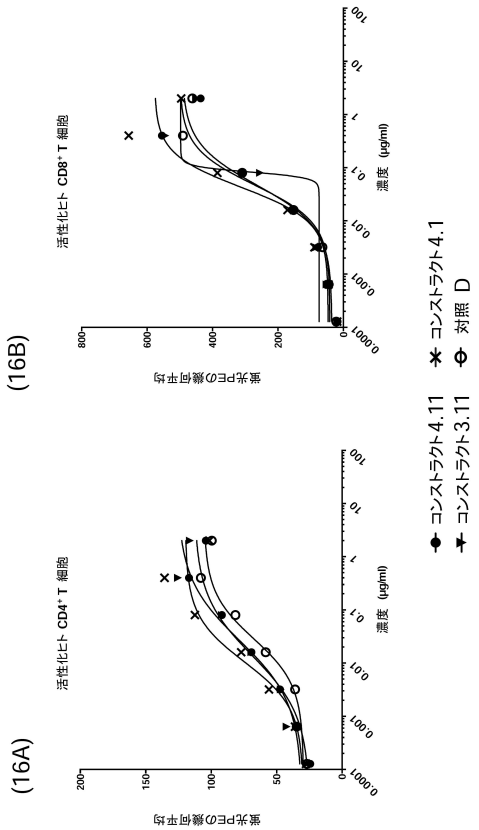
【図１５Ａ－Ｃ】



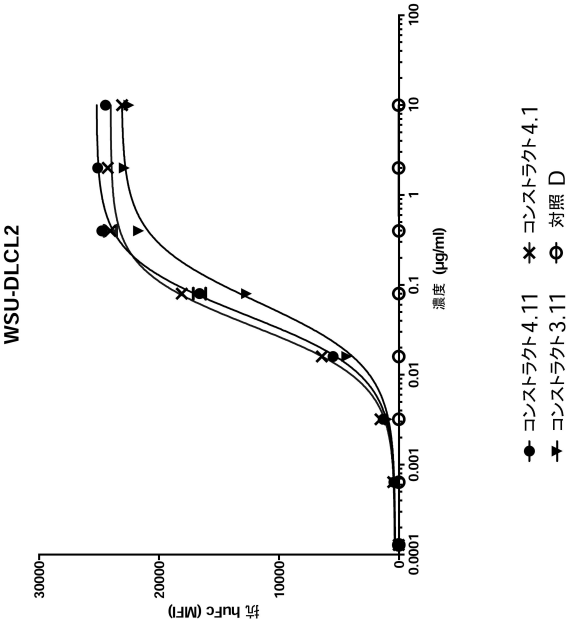
【図１５Ｄ－Ｆ】



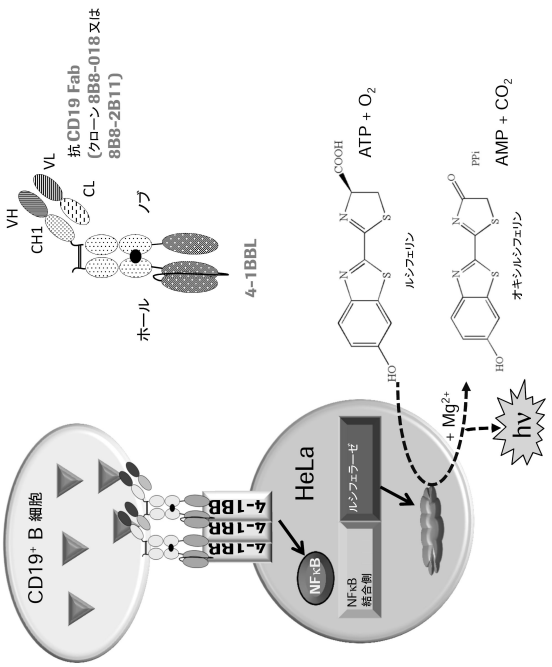
【図１６】



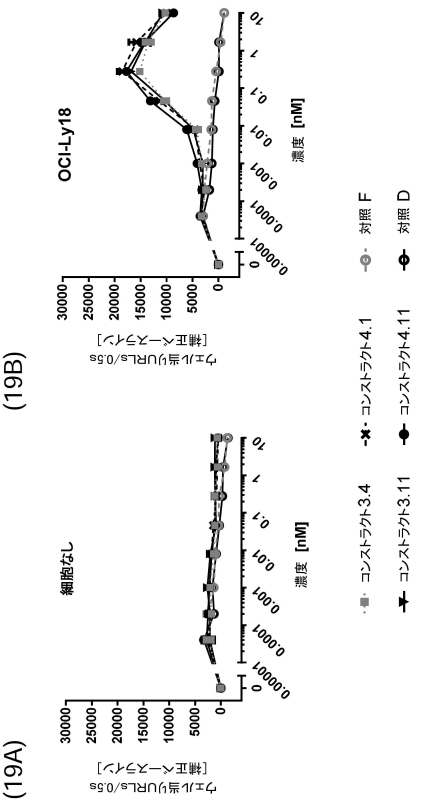
【図１７】



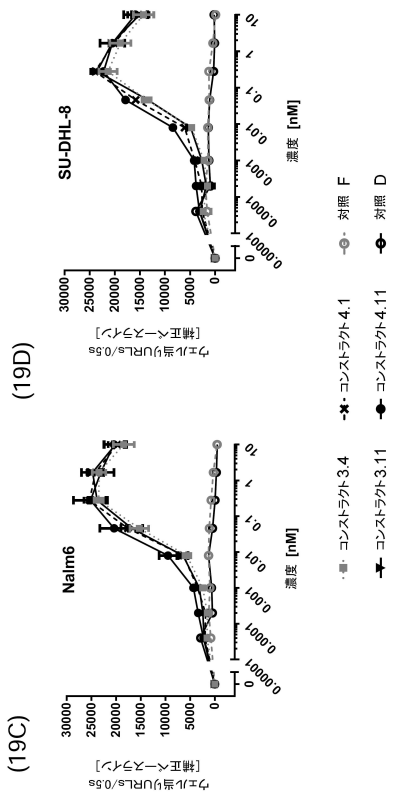
【図１８】



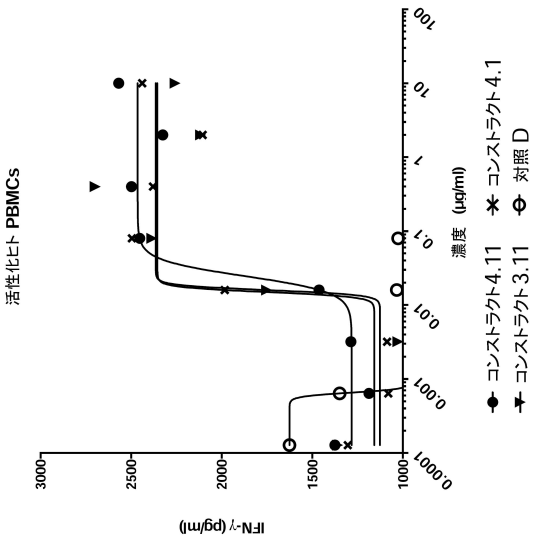
【図１９Ａ－Ｂ】



【図１９Ｃ－Ｄ】



【図２０】



【配列表】
0007043422000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		
C07K 16/46 (2006.01)		C07K	16/46	
C12N 15/63 (2006.01)		C12N	15/63	Z
C12N 1/15 (2006.01)		C12N	1/15	
C12N 1/19 (2006.01)		C12N	1/19	
C12N 1/21 (2006.01)		C12N	1/21	
C12N 5/10 (2006.01)		C12N	5/10	
C12P 21/02 (2006.01)		C12P	21/02	C
A61K 39/395 (2006.01)		A61K	39/395	T
A61P 35/00 (2006.01)		A61P	35/00	

ブライテシュトラーセ １６
(72)発明者 クライン， クリスティアン
スイス国 ８９０６ ボンシュテッテン， カップフシュトラーセ ２６ベー
(72)発明者 メスナー， エッケハルト
スイス国 ８２８０ クロイツリンゲン， フェルゼンブルクヴェーク ５
(72)発明者 ウマーニャ， パブロ
スイス国 ８８３２ ヴォルラウ， フェルゼンラインシュトラーセ ２８
(72)発明者 アマン， マリア
スイス国 ８６００ デューベンドルフ， ノイグートシュトラーセ ５５
(72)発明者 クラウス， クリスティーナ
スイス国 ５４０８ エネットバーデン， リンマータウヴェーク ３
(72)発明者 シュイ， ウェイ
スイス国 ８９５２ シュリーレン， ヴァーギシュトラーセ １８

審査官 伊達 利奈

(56)参考文献
特表２０１５－５１６８１５（ＪＰ，Ａ）
特表２０１４－５１１６７９（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２０１４／１６１８４５（WO，Ａ１）
国際公開第２０１４／１８０７５４（WO，Ａ１）
特表２０１３－５４２７１４（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２０１５／１８３９０２（WO，Ａ１）
国際公開第２０１５／１８４２０３（WO，Ａ１）
特表２０１１－５２８５６２（ＪＰ，Ａ）
特表２００６－５２０３１８（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２００６／１２１８１０（WO，Ａ２）
ISRN Oncology, 2013, No.371854, pp.1-25
The Journal of Immunology, 2004, Vol.172, pp.3930-3939
Molecular Cancer Therapeutics, 2014, Vol.13, No.1, pp.112-121
FEBS Journal, 2008, Vol.275, pp.2296-2304
JOURNAL OF IMMUNOTHERAPY，米国，2008年10月01日，VOL:31, NR:8，PAGE(S):714 - 722，https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18779748
JOURNAL OF IMMUNOTHERAPY，米国，2012年06月01日，VOL:35, NR:5，PAGE(S):418 - 429，http://dx.doi.org/10.1097/CJI.0b013e3182594387

(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ １５／００
ＰｕｂＭｅｄ