

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7285076号

(P7285076)

(45)発行日 令和5年6月1日(2023.6.1)

(24)登録日 令和5年5月24日(2023.5.24)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 K 14/525 (2006.01)

C 0 7 K 14/525

Z N A

C 0 7 K 16/30 (2006.01)

C 0 7 K 16/30

C 0 7 K 19/00 (2006.01)

C 0 7 K 19/00

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395

D

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 K 39/395

N

請求項の数 24 (全219頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-559342(P2018-559342)

(86)(22)出願日 平成29年5月8日(2017.5.8)

(65)公表番号 特表2019-523216(P2019-523216

A)

(43)公表日 令和1年8月22日(2019.8.22)

(86)国際出願番号 PCT/EP2017/060870

(87)国際公開番号 WO2017/194442

(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22日(2020.4.22)

(31)優先権主張番号 16169244.7

(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 514099673

エフ・ホフマン・ラ・ロシュ・アクチュ

ンゲゼルシャフト

スイス国 シーエイチー４０７０ バーゼ

ル グレンツァッハーシュトラッセ １２４

(74)代理人 110002077

園田・小林弁理士法人

(72)発明者 アマン， マリア

スイス国 ８９５２ シュリーレン， ヴ

ァーギシュトラッセ １０， シー／オー

ロシュ グリクアート アーゲー

(72)発明者 ブルエンカー， ペーター

スイス国 ８９５２ シュリーレン， ヴ

ァーギシュトラッセ １０， シー／オー

ロシュ グリクアート アーゲー

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 T N Fファミリーリガンドトリマーとテネイン結合部分とを含む抗原結合分子

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

T N Fファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子であって、

(a) テネインC (T n C) と特異的に結合することができる少なくとも１つの抗原結合部分と、

(b) ジスルフィド結合により互いに連結されている第１及び第２のポリペプチドとを含み、

第１のポリペプチドが、ペプチドリンカーにより互いに接続されているT N Fリガンドファミリーメンバーの２つのエクドメインを含むこと、及び第２のポリペプチドが、前記T N Fリガンドファミリーメンバーの１つだけのエクドメインを含むことを特徴とするT N Fファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子。

【請求項２】

請求項１に記載のT N Fファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子であって、

(a) T n C と特異的に結合することができる少なくとも１つの部分と、

(b) ジスルフィド結合により互いに連結されている第１及び第２のポリペプチドとを含み、

(i) 第１のポリペプチドがC H １若しくはC Lドメインを、及び第２のポリペプチドがC L若しくはC H １ドメインをそれぞれ含有し、第２のポリペプチドが、C H １ドメインとC Lドメイン間のジスルフィド結合により第１のポリペプチドと連結されており、第１のポリペプチドが、ペプチドリンカーにより互いに接続され且つペプチドリンカーに

よりCH1若しくはCLドメインに接続されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクドメインを含み、第2のポリペプチドが、ペプチドリンカーによって前記第2のポリペプチドのCL若しくはCH1ドメインに接続されている前記TNFリガンドファミリーメンバーの1つのエクドメインを含むこと、又は

(ii) 第1のポリペプチドがCH3ドメインを、及び第2のポリペプチドがCH3ドメインをそれぞれ含有し、第1のポリペプチドが、ペプチドリンカーにより互いに接続され且つペプチドリンカーによりCH3ドメインのC末端に接続されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクドメインを含み、第2のポリペプチドが、ペプチドリンカーによって前記第2のポリペプチドのCH3ドメインのC末端に接続されている前記TNFリガンドファミリーメンバーの1つだけのエクドメインを含むこと、又は

(iii) 第1のポリペプチドがVH-CL若しくはVL-CH1ドメインを、及び第2のポリペプチドがVL-CH1ドメイン若しくはVH-CLドメインをそれぞれ含有し、第2のポリペプチドが、第1のポリペプチドのVH-CLドメインと第2のポリペプチドのVL-CH1ドメインとの間若しくは第1のポリペプチドのVL-CH1ドメインと第2のポリペプチドのVH-CLドメインとの間のジスルフィド結合により第1のポリペプチドと連結されており、第1のポリペプチドが、ペプチドリンカーにより互いに接続され且つペプチドリンカーにより第1のポリペプチドのVH-CLドメイン若しくはVL-CH1ドメインに接続されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクドメインを含み、第2のポリペプチドが、ペプチドリンカーによって第2のポリペプチドのVL-CH1ドメイン若しくはVH-CLドメインに接続されている前記TNFリガンドファミリーメンバーの1つのエクドメインを含むこと

を特徴とする、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子。

【請求項3】

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、請求項1又は2に記載のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子。

【請求項4】

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、請求項1から3の何れか一項に記載のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子。

【請求項5】

TNFリガンドファミリーメンバーが4-1BBLである、請求項1から4の何れか一項に記載のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子。

【請求項6】

請求項1から5の何れか一項に記載のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子であって、

(a) TnCと特異的に結合することができる少なくとも1つの抗原結合部分、及び

(b) CH1又はCLドメインを含有する第1のポリペプチド及びCL又はCH1ドメインを含有する第2のポリペプチドであって、第2のポリペプチドがCH1ドメインとCLドメイン間のジスルフィド結合により第1のポリペプチドと連結されている、第1のポリペプチド及び第2のポリペプチド

を含み、

第1のポリペプチドが、ペプチドリンカーにより互いに接続され且つペプチドリンカーによりCH1又はCLドメインに接続されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクドメインを含むこと、及び第2のポリペプチドが、ペプチドリンカーによって前記第2のポリペプチドのCL又はCH1ドメインに接続されている前記TNFリガンドファミリーメンバーの1つだけのエクドメインを含むことを特徴とする、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子。

【請求項7】

TnCと特異的に結合することができる部分が、抗体断片、Fab分子、クロスオーバーFab分子、単鎖Fab分子、Fv分子、scFv分子、単ドメイン抗体、aVH及

10

20

30

40

50

び足場抗原結合タンパク質からなる群から選択される、請求項 1 から 6 の何れか一項に記載の T N F ファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子。

【請求項 8】

T n C と特異的に結合することができる 1 つ又は 2 つの部分を含む、請求項 1 から 7 の何れか一項に記載の T N F ファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子。

【請求項 9】

T n C と特異的に結合することができる抗原結合部分が、T n C と特異的に結合することができる F a b 分子である、請求項 1 から 8 の何れか一項に記載の T N F ファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子。

【請求項 10】

T n C と特異的に結合することができる抗原結合部分が、(i) 配列番号 67 のアミノ酸配列を含む C D R - H 1 と、(i i) 配列番号 68 のアミノ酸配列を含む C D R - H 2 と、(i i i) 配列番号 69 のアミノ酸配列を含む C D R - H 3 とを含む V H ドメイン、及び (i v) 配列番号 55 のアミノ酸配列を含む C D R - L 1 と、(v) 配列番号 56 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2 と、(v i) 配列番号 57 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3 とを含む V L ドメインを含む、請求項 1 から 9 の何れか一項に記載の T N F ファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子。

【請求項 11】

T n C と特異的に結合することができる抗原結合部分が、(i) 配列番号 70 のアミノ酸配列を含む C D R - H 1 と、(i i) 配列番号 71 のアミノ酸配列を含む C D R - H 2 と、(i i i) 配列番号 72 のアミノ酸配列を含む C D R - H 3 とを含む V H ドメイン、及び (i v) 配列番号 58 のアミノ酸配列を含む C D R - L 1 と、(v) 配列番号 59 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2 と、(v i) 配列番号 60 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3 とを含む V L ドメインを含む、請求項 1 から 9 の何れか一項に記載の T N F ファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子。

【請求項 12】

F c ドメインが、234 及び 235 位 (E U 番号付け) 、並びに / 又は 329 位 (E U 番号付け) にアミノ酸置換を含む I g G 1 F c ドメインである、請求項 2 から 11 の何れか一項に記載の T N F ファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子。

【請求項 13】

T n C に特異的に結合することができる F a b 分子を含む第 1 の重鎖及び T n C に特異的に結合することができる F a b 分子を含む第 1 の軽鎖；

第 2 の重鎖及び第 2 の軽鎖；並びに

(i) C 末端で第 2 のペプチドリンカーにより第 2 の重鎖に融合されている第 1 のペプチドであって、第 1 のペプチドリンカーによって互いに接続されている T N F リガンドファミリーメンバーの 2 つのエクトドメインを含む第 1 のペプチド及び C 末端で第 3 のペプチドリンカーにより第 2 の軽鎖に融合されている第 2 のペプチドであって、前記 T N F リガンドファミリーメンバーの 1 つのエクトドメインを含む第 2 のペプチド、又は、

(i i) C 末端で第 2 のペプチドリンカーにより第 2 の軽鎖に融合されている第 1 のペプチドであって、第 1 のペプチドリンカーによって互いに接続されている T N F リガンドファミリーメンバーの 2 つのエクトドメインを含む第 1 のペプチド及び C 末端で第 3 のペプチドリンカーにより第 2 の重鎖に融合されている第 2 のペプチドであって、前記 T N F リガンドファミリーメンバーの 1 つのエクトドメインを含む第 2 のペプチドを含む、

請求項 1 から 12 の何れか一項に記載の T N F ファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子。

【請求項 14】

第 1 のペプチドリンカーにより互いに接続されている T N F リガンドファミリーメンバーの 2 つのエクトドメインを含む第 1 のペプチドが、その C 末端で第 2 のペプチドリンカーにより重鎖の一部である C H 1 ドメインに融合されており、前記 T N F リガンドファミ

10

20

30

40

50

リーメンバーの1つのエクストドメインを含む第2のペプチドが、そのC末端で第3のペプチドリンカーにより軽鎖の一部であるCLドメインに融合されている、請求項1から13の何れか一項に記載のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子。

【請求項15】

第1のペプチドリンカーにより互いに接続されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクストドメインを含む第1のペプチドが、そのC末端で第2のペプチドリンカーにより重鎖の一部であるCLドメインに融合されており、前記TNFリガンドファミリーメンバーの1つのエクストドメインを含む第2のペプチドが、そのC末端で第3のペプチドリンカーにより軽鎖の一部であるCH1ドメインに融合されている、請求項1から13の何れか一項に記載のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子。

10

【請求項16】

第1のペプチドリンカーにより互いに接続されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクストドメインを含む第1のペプチドが、そのC末端で第2のペプチドリンカーにより重鎖の一部であるVHドメインに融合されており、前記TNFリガンドファミリーメンバーの1つのエクストドメインを含む第2のペプチドが、そのC末端で第3のペプチドリンカーにより軽鎖の一部であるVLドメインに融合されている、請求項1から13の何れか一項に記載のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子。

【請求項17】

抗原結合部分が、ヒト、マウス及びカニクイザルTnCと結合する、請求項1から16の何れか一項に記載のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子。

20

【請求項18】

抗原結合部分が、ヒト、マウス及びカニクイザルTnCのうちの少なくとも1つと2nM未満のK_D値で結合する、請求項1から17の何れか一項に記載のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子。

【請求項19】

請求項1から18の何れか一項に記載のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子と少なくとも1つの薬学的に許容される添加剤とを含む薬学的組成物。

【請求項20】

医薬としての使用のための、請求項1から18の何れか一項に記載のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子、又は請求項19に記載の薬学的組成物。

30

【請求項21】

がんの治療における使用のための、請求項1から18の何れか一項に記載のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子、又は請求項19に記載の薬学的組成物。

【請求項22】

がんの治療のための医薬の製造のための、請求項1から18の何れか一項に記載のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子の使用。

【請求項23】

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の請求項1から18の何れか一項に記載のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子を含む組成物の治療有効量を含む医薬。

40

【請求項24】

前記疾患ががんである、請求項23に記載の医薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子であって、(a) テネイシンC (TnC) と特異的に結合することができる少なくとも1つの抗原結合部分と、(b) ジスルフィド結合により互いに連結されている第1及び第2のポリペプチドとを含み、第1のポリペプチドが、ペプチドリンカーにより互いに接続されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクストドメイン又はそれらの2つの断片を含むこと、

50

及び第2のポリペプチドが、前記TNFリガンドファミリーメンバーの1つだけのエクストドメイン又はその断片を含むことを特徴とする抗原結合分子に関する。本発明は、さらに、これらの分子の製造方法及びこれらの分子の使用方法に関する。

【背景技術】

【0002】

TNF（腫瘍壊死因子）受容体スーパーファミリーの分子と相互作用するリガンドは、免疫系の機構及び機能に極めて重要な役割を担っている。免疫応答、造血及び形態形成等の正常な機能を調節する上に、TNFファミリーリガンド（サイトカインとも呼ばれる）は、腫瘍発生、移植拒絶反応、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も関与する（Aggarwal、2003）。TNFリガンドファミリーは、「TNF相同ドメイン」（THD）と命名された保存C末端ドメインの存在を特徴とする、19のII型（すなわち、細胞内N末端及び細胞外C末端）膜貫通タンパク質をコードする18の遺伝子を含む。このドメインは、受容体結合に関与し、したがって、TNFリガンドファミリーメンバーの生物活性に肝要である。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、それらの生物学的機能を自己集合性一価トリマーとして発揮する（Banner等、Cell 1993、73、431-445）。したがって、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と結合することができ、該受容体を活性化することができるトリマーを形成する。

【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、その発現がT細胞活性化により誘導される分子として始めて同定された（Kwon及びWeissman、1989）。その後の研究により、T及びBリンパ球における4-1BBの発現（Snell等、2011;Zhang等、2010）、NK細胞における4-1BBの発現（Lin等、2008）、NKT細胞における4-1BBの発現（Kim等、2008）、単球における4-1BBの発現（Kienzle及びvon Kempis、2000;Schwarz等、1995）、好中球における4-1BBの発現（Heinisch等、2000）、マスト細胞における4-1BBの発現（Nishimoto等、2005）及び樹状細胞並びに非造血系由来の細胞、例えば内皮細胞及び平滑筋細胞、における4-1BBの発現（Broll等、2001;Olofsson等、2008）が実証された。異なる細胞型における4-1BBの発現は、主として誘導性であり、T細胞受容体（TCR）又はB細胞受容体誘発等の様々な刺激シグナルによってはもちろん、炎症性サイトカインの共刺激分子又は受容体により誘導されるシグナル伝達によっても駆動される（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、B細胞、樹状細胞（DC）及びマクロファージ等のプロフェッショナル抗原提示細胞（APC）上で観察される。4-1BBLの誘導性発現は、 $\alpha\beta$ T細胞サブセットと $\gamma\delta$ T細胞サブセットの両方を含むT細胞、及び内皮細胞に特有である（Shao及びSchwarz、2011に概説がある）。

【0005】

CD137シグナル伝達が、NK細胞のIFN γ 分泌及び増殖を刺激すること（Buechele等、2012;Lin等、2008;Melero等、1998）、並びに生残期間の延長、サイトカイン分泌能力の増大及び共刺激分子発現増加能力の増大によって示されるようにDC活性化を促進すること（Choi等、2009;Futagawa等、2002;Wilcox等、2002）は公知である。しかし、CD137は、T細胞のCD4+サブセットとCD8+サブセットの両方においてTCR誘導活性化を調節する共刺激分子として最もよく特徴づけられている。TCR誘発と併せて、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、活性化誘導細胞死に対するTリンパ球の感受性を減少させる（Snell等、2011に概説がある）。

【0006】

インビトロでのT細胞に対する4-1BBのこれらの共刺激効果と一致して、担腫瘍マウスへのそれらの投与は、多くの実験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、通常は、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)、化学療法試薬(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)と併用で投与されたときにのみ、抗腫瘍剤としてのその効力を呈示する。インビボ枯渇実験により、CD8+T細胞は、4-1BB特異的抗体の抗腫瘍作用に最も肝要な役割を果たすことが実証された。しかし、抗4-1BBを含む、腫瘍モデル又は併用療法に依存して、DC、NK細胞又はCD4+T細胞等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)。

10

【0007】

異なるリンパ球サブセットに対するそれらの直接的効果に加えて、4-1BBアゴニストは、腫瘍血管内皮上での細胞内接着分子1(ICAM1)及び血管細胞接着分子1(VCAM1)の4-1BB媒介発現増加によって活性化T細胞の腫瘍内への浸潤及び腫瘍内での保持も誘導することができる(Palazon等、2011)。

【0008】

4-1BB誘発は、腫瘍微小環境内又は慢性感染中の免疫学的寛容の破綻の一因となり得る、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も好転させることがある(Wilcox等、2004)。

20

【0009】

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)、インビボでの4-1BBアゴニスト抗体の免疫調節特性には抗体分子上の野生型Fc部分の存在が必要であるため、Fc受容体結合は、そのような試薬の薬理活性に必要な重要な事象として意味づけられると思われる。しかし、機能的に活性なFcドメインを有する4-1BB特異的アゴニスト抗体の全身投与は、肝毒性に関連するCD8+T細胞の増殖も誘導し(Dubrot等、2010)、これは、マウスでは機能性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。ヒト臨床試験(ClinicalTrials.gov、NCT00309023)で12週間にわたって3週間に1回投与されたFcコンピテント4-1BBアゴニスト抗体(BMS-663513)は、メラノーマ、卵巣又は腎細胞がんを有する患者において疾患の安定化を誘導した。しかし、別の試験(NCT00612664)で投与された同じ抗体は、グレード4肝炎を引き起こして試験の中止をもたらした(Simeone及びAscierto、2012)。

30

【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アゴニストの高度な臨床的需要があることを明確に示す。しかし、新世代薬候補は、造血細胞及び内皮細胞の表面で4-1BBと有効に会合しなければならないばかりでなく、制御できない副作用を回避するためにFc受容体との結合以外のメカニズムによってその有効な会合を果たすこともできなければならない。後者は、腫瘍特異的部分又は腫瘍関連部分への優先的結合によってし得る。

40

【0011】

テネインは、脊椎動物に見られる、大きい多量体細胞外マトリックス(ECM)糖タンパク質の高度に保存されるファミリーである。テネインC、テネインR、テネインX及びテネインWと称される4つのテネインパラログが、哺乳動物において同定されている。テネインファミリータンパク質は、N末端7アミノ酸リピート、上皮増殖因子(EGF)様リピート、フィブロネクチンIII型ドメインリピート及びC末端フィブリノーゲン様球状ドメインを含む、共通の一次構造を有する。N末端オリゴマー化ドメインによって、個々のサブユニットは、集合してトリマーになり、又はさらにはTnCの場合のようにヘキサマーになる。実際、TnCのオリゴマー化ドメインは、それぞれのTN

50

F受容体リガンドに融合されたとき、CD27L、CD40L、41BBL、及びグルコシルコリチコイド誘導性TNF受容体リガンドの三量体化を増進すると報告された(Wyzgol等、J Immunol. 183(3)、1851-61(2009)及びBerg等、Cell Death and Differentiation 14(12)、2021-2034(2007)を参照されたい)。これらの研究は、TnCポリペプチド鎖の断片を使用して、TnC-TNF-リガンド融合ポリペプチド中の活性化トリマー形態のTNFリガンドを安定させた。

【0012】

哺乳動物テネイシンC(TnC)モノマーは、典型的に、1.45個のEGF様リピート及び8個のフィブロネクチンIII型ドメインリピートを有し、これらは、全てのテネイシンCアイソフォームにより共有される。しかし、9個以下のさらなるフィブロネクチンIII型ドメイン(ドメインA1からD)を独立して選択的スプライシングにより含めること又は排除することができ、その結果、多数のテネイシンCアイソフォームが生じる(例えば、Hsia及びSchwarzbauer、J Biol Chem 280、26641-26644(2005)を参照されたい)。

【0013】

テネイシンCは、発生中の胚において一過性発現されるが、實際上、成体組織には存在しない。しかし、テネイシンCは、ある特定の病的状態、例えば創傷治癒、炎症及びがんを含む、再形成過程を経る組織において再び現れる(Chiquet-Ehrismann及びChiquet、J Pathol 200、488-499(2003)に概説がある)。

【0014】

重要なこととして、テネイシンCは、脳、乳房、結腸、肺、皮膚及び他の器官の腫瘍を含む、悪性固形腫瘍の大多数において高度に発現され(Orend及びChiquet-Ehrismann、Cancer Letters 244、143-163(2006)に概説がある)、これらの器官における腫瘍微小環境では形質転換上皮細胞によってはもちろん間質細胞によっても発現され得る(Yoshida等、J Pathol 182、421-428(1997)、Hanamura等、Int J Cancer 73、10-15(1997))。特に、選択的スプライシングを受けたドメインA1からDを含有するテネイシンCの「大型アイソフォーム」は、浸潤がんでは発現されるが、健常成体組織ではほぼ検出不能である(Borsi等、Int J Cancer 52、688-692(1992)、Carnemolla等、Eur J Biochem 205、561-567(1992))。

【発明の概要】

【0015】

活性で安全な4-1BBアゴニストが依然として必要とされている。本発明の二重特異性分子は、本発明の分子を広範な悪性腫瘍の腫瘍細胞に標的指向化する少なくとも1つのTnC抗原結合部分と、トリマーの従って生物活性のTNFリガンドとを有するものであり、腫瘍細胞に対処するためのユニークな標的指向化ツールとなる。本発明の抗原結合分子は、薬学的に有用であるために十分な安定性を有し、向上した効率及び安全性で種々のがんの治療に使用することができる。

【0016】

一態様では、本発明は、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子であって、(a)テネイシンC(TnC)と特異的に結合することができる少なくとも1つの部分と、(b)ジスルフィド結合により互いに連結されている第1及び第2のポリペプチドとを含み、

第1のポリペプチドが、ペプチドリンカーにより互いに接続されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクトドメイン又はそれらの2つの断片を含むこと、及び第2のポリペプチドが、前記TNFリガンドファミリーメンバーの1つだけのエクトドメイン又はその断片を含むことを特徴とする抗原結合分子を提供する。

【0017】

特定の態様では、本発明は、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子であって、

(a) TnCと特異的に結合することができる少なくとも1つの部分と、

10

20

30

40

50

(b) ジスルフィド結合により互いに連結されている第1及び第2のポリペプチドとを含み、

第1のポリペプチドが、ペプチドリinkerにより互いに接続されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクドメイン又はそれらの2つの断片を含むこと、及び第2のポリペプチドが、前記TNFリガンドファミリーメンバーの1つだけのエクドメイン又はその断片を含むことを特徴とする抗原結合分子であり、

(c) 安定的に結合することができる第1及び第2のサブユニットから構成されるFcドメイン

を含む、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子を提供する。

【0018】

さらなる態様では、本発明は、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子であって、

(a) TnCと特異的に結合することができる少なくとも1つの部分と、

(b) ジスルフィド結合により互いに連結されている第1及び第2のポリペプチドとを含み、

(i) 第1のポリペプチドがCH1若しくはCLドメインを含有すること、及び第2のポリペプチドがCL若しくはCH1ドメインを含有することをそれぞれ特徴とし、第2のポリペプチドが、CH1ドメインとCLドメイン間のジスルフィド結合により第1のポリペプチドと連結されており、第1のポリペプチドが、ペプチドリinkerにより互いに及びCH1若しくはCLドメインに接続されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクドメイン若しくはそれらの断片を含み、第2のポリペプチドが、ペプチドリinkerによって前記ポリペプチドのCL若しくはCH1ドメインに接続されている前記TNFリガンドファミリーメンバーの1つのエクドメイン若しくはその断片を含む、又は

(ii) 第1のポリペプチドがCH3ドメインを含有すること、及び第2のポリペプチドがCH3ドメインを含有することをそれぞれ特徴とし、第1のポリペプチドが、ペプチドリinkerにより互いに及びCH3ドメインのC末端に接続されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクドメイン若しくはそれらの断片を含み、第2のポリペプチドが、ペプチドリinkerによってポリペプチドのCH3ドメインのC末端に接続されている前記TNFリガンドファミリーメンバーの1つだけのエクドメイン若しくはその断片を含む、又は

(iii) 第1のポリペプチドがVH-CL若しくはVL-CH1ドメインを含有すること、及び第2のポリペプチドがVL-CH1ドメイン若しくはVH-CLドメインを含有することをそれぞれ特徴とし、第2のポリペプチドが、CH1ドメインとCLドメイン間のジスルフィド結合により第1のポリペプチドと連結されており、第1のポリペプチドが、ペプチドリinkerにより互いに及びVH若しくはVLに接続されているTNFリガンドファミリーメンバー2つのエクドメイン若しくはそれらの断片を含み、第2のポリペプチドが、ペプチドリinkerによって前記ポリペプチドのVL若しくはVHに接続されている前記TNFリガンドファミリーメンバーの1つのエクドメイン若しくはその断片を含む、抗原結合分子を提供する。

【0019】

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。したがって、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子は、

(a) TnCと特異的に結合することができる少なくとも1つの部分と、

(b) ジスルフィド結合により互いに連結されている第1及び第2のポリペプチドとを含み、

第1のポリペプチドが、ペプチドリinkerにより互いに接続されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクドメイン又はそれらの2つの断片を含むこと、及び第2のポリペプチドが、前記TNFリガンドファミリーメンバーの1つだけのエクドメイン又はその断片を含むことを特徴とし、この場合、前記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。より特に、TNFリガンドファミリーメンバーは

10

20

30

40

50

、４－１ＢＢＬ及びＯＸ４０Ｌから選択される。

【００２０】

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。

【００２１】

さらなる態様では、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１７２、配列番号１７３、配列番号１７４、配列番号１７５、配列番号１８３、配列番号１９２、配列番号１９３及び配列番号１９４からなる群から選択されるアミノ酸配列、特に、配列番号１７２又は配列番号１８３のアミノ酸配列を含む。

【００２２】

別の態様では、ＴＮＦリガンドファミリーメンバーのエクトドメイン又はその断片は、配列番号１７２、配列番号１７３、配列番号１７４、配列番号１７５及び配列番号１８３からなる群から選択されるアミノ酸配列、特に、配列番号１７２又は配列番号１８３のアミノ酸配列を含む。より特に、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１８３のアミノ酸配列を含む。

【００２３】

さらなる態様では、本発明のＴＮＦファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子は、
(a) Tn Cと特異的に結合することができる少なくとも１つの部分と、
(b) ジスルフィド結合により互いに連結されている第１及び第２のポリペプチドと
を含み、

第１のポリペプチドが、配列番号１７６、配列番号１８４、配列番号１８５及び配列番号１８６からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むこと、及び第２のポリペプチドが、配列番号１７２、配列番号１７４及び配列番号１７５及び配列番号１８３からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むことを特徴とする。

【００２４】

一態様では、本発明のＴＮＦファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子は、
(a) Tn Cと特異的に結合することができる少なくとも１つの部分と、
(b) ジスルフィド結合により互いに連結されている第１及び第２のポリペプチドと
を含み、

第１のポリペプチドが、配列番号１７６のアミノ酸配列を含むこと、及び第２のポリペプチドが、配列番号１７７のアミノ酸配列を含むことを特徴とする。

【００２５】

さらなる態様では、本発明のＴＮＦファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子は、
(a) Tn Cと特異的に結合することができる少なくとも１つの部分と、
(b) ジスルフィド結合により互いに連結されている第１及び第２のポリペプチドと
を含み、

第１のポリペプチドが、配列番号１７６のアミノ酸配列を含むこと、及び第２のポリペプチドが、配列番号１８７のアミノ酸配列を含むことを特徴とする。

【００２６】

なおさらなる態様では、本発明のＴＮＦファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子は、

(a) Tn Cと特異的に結合することができる少なくとも１つの部分と、
(b) ジスルフィド結合により互いに連結されている第１及び第２のポリペプチドと
を含み、

第１のポリペプチドが、配列番号１８４のアミノ酸配列を含むこと、及び第２のポリペプチドが、配列番号１８８又は配列番号１８９のアミノ酸配列を含むことを特徴とする。

【００２７】

別の態様では、本発明のＴＮＦファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子は、

(a) Tn Cと特異的に結合することができる少なくとも１つの部分と、
(b) CH1又はCLドメインを含有する第１のポリペプチド、及びCL又はCH1ドメインを含有する第２のポリペプチドと

10

20

30

40

50

をそれぞれ含み、第2のポリペプチドが、CH1ドメインとCLドメイン間のジスルフィド結合により第1のポリペプチドと連結されており、

第1のポリペプチドが、ペプチドリンカーにより互いに及びCH1又はCLドメインに接続されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクドメイン又はそれらの2つの断片を含むこと、及び第2のポリペプチドが、ペプチドリンカーによって前記ポリペプチドのCL又はCH1ドメインに接続されている前記TNFリガンドファミリーメンバーの1つだけのエクドメイン又はその断片を含むことを特徴とする。

【0028】

一態様では、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子であって、

- (a) TnCと特異的に結合することができる少なくとも1つの部分と、
- (b) CH1ドメインを含有する第1のポリペプチド、及びCLドメインを含有する第2のポリペプチドと

を含み、第2のポリペプチドが、CH1ドメインとCLドメイン間のジスルフィド結合により第1のポリペプチドと連結されており、

第1のポリペプチドが、ペプチドリンカーにより互いに及びCH1ドメインに接続されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクドメイン又はそれらの断片を含むこと、及び第2のポリペプチドが、ペプチドリンカーによって前記ポリペプチドのCLドメインに接続されている前記TNFリガンドファミリーメンバーの1つのエクドメイン又はその断片を含むことを特徴とする抗原結合分子を提供する。

【0029】

別の態様では、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子であって、

- (a) TnCと特異的に結合することができる少なくとも1つの部分と、
- (b) CLドメインを含有する第1のポリペプチド、及びCH1ドメインを含有する第2のポリペプチドと

を含み、第2のポリペプチドが、CH1ドメインとCLドメイン間のジスルフィド結合により第1のポリペプチドと連結されており、

第1のポリペプチドが、ペプチドリンカーにより互いに及びCLドメインに接続されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクドメイン又はそれらの断片を含むこと、及び第2のポリペプチドが、ペプチドリンカーによって前記ポリペプチドのCH1ドメインに接続されている前記TNFリガンドファミリーメンバーの1つのエクドメイン又はその断片を含むことを特徴とする抗原結合分子を提供する。

【0030】

一態様では、本発明は、TnCと特異的に結合することができる部分が抗体断片である、上文で定義された通りのTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子を提供する。

【0031】

特に、TnCと特異的に結合することができる部分は、抗原結合部分である。

【0032】

特に、TnCと特異的に結合することができる部分は、抗体断片、Fab分子、クロスオーバーFab分子、単鎖Fab分子、Fv分子、scFv分子、単ドメイン抗体、並びにaVH及び足場抗原結合タンパク質からなる群から選択される。

【0033】

特に、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子は、TnCと特異的に結合することができる1つ又は2つの部分を含む。

【0034】

特定の態様では、本発明は、TnCと特異的に結合することができる部分がFab分子である、上で定義された通りのTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子に関する。

【0035】

一態様では、本発明は、TnCと特異的に結合することができる部分が足場抗原結合タ

10

20

30

40

50

ンパク質である、上文で定義された通りのTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子を提供する。

【0036】

本発明は、TnCと特異的に結合することができる少なくとも1つの部分を含む、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子を提供する。特定の態様では、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子は、TnCと特異的に結合することができる1つの部分を含む。別の態様では、本発明は、TnCと特異的に結合することができる2つの部分を含む、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子を提供する。

【0037】

一態様では、本発明は、TnCと特異的に結合することができる部分が、(i) 配列番号67又は配列番号70のアミノ酸配列を含むCDR-H1と、(ii) 配列番号68又は配列番号71のアミノ酸配列を含むCDR-H2と、(iii) 配列番号69又は配列番号72のアミノ酸配列を含むCDR-H3とを含むVHドメイン、及び(iv) 配列番号55又は配列番号58のアミノ酸配列を含むCDR-L1と、(v) 配列番号56又は配列番号59のアミノ酸配列を含むCDR-L2と、(vi) 配列番号57又は配列番号60のアミノ酸配列を含むCDR-L3とを含むVLドメインを含む、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子を提供する。

10

【0038】

一態様では、本発明は、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子であって、TnCと特異的に結合することができる部分が、(i) 配列番号67のアミノ酸配列を含むCDR-H1と、(ii) 配列番号68のアミノ酸配列を含むCDR-H2と、(iii) 配列番号69のアミノ酸配列を含むCDR-H3とを含むVHドメイン、及び(iv) 配列番号55のアミノ酸配列を含むCDR-L1と、(v) 配列番号56のアミノ酸配列を含むCDR-L2と、(vi) 配列番号57のアミノ酸配列を含むCDR-L3とを含むVLドメインを含む、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子を提供する。

20

【0039】

別の態様では、本発明は、TnCと特異的に結合することができる部分が、(i) 配列番号70のアミノ酸配列を含むCDR-H1と、(ii) 配列番号71のアミノ酸配列を含むCDR-H2と、(iii) 配列番号72のアミノ酸配列を含むCDR-H3とを含むVHドメイン、及び(iv) 配列番号58のアミノ酸配列を含むCDR-L1と、(v) 配列番号59のアミノ酸配列を含むCDR-L2と、(vi) 配列番号60のアミノ酸配列を含むCDR-L3とを含むVLドメインを含む、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子を提供する。

30

【0040】

一態様では、TnCと特異的に結合することができる部分が、配列番号46のアミノ酸配列を含む可変重鎖と配列番号45のアミノ酸配列を含む可変軽鎖とを含むか、又はTnCと特異的に結合することができる部分が、配列番号48のアミノ酸配列を含む可変重鎖と配列番号47のアミノ酸配列を含む可変軽鎖とを含む、上文で定義された通りのTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子が提供される。

40

【0041】

さらなる態様では、本発明によるTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子であって、第1のペプチドリンカーにより互いに接続されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクトドメイン又はそれらの断片を含むペプチドが、そのC末端で第2のペプチドリンカーにより重鎖のCH1又はCLドメインに融合されており、前記TNFリガンドファミリーメンバーの1つのエクトドメイン又はその断片が、そのC末端で第3のペプチドリンカーにより軽鎖のCL又はCH1ドメインに融合されている、抗原結合分子が提供される。

【0042】

特定の態様では、本発明は、ペプチドリンカーが、(G4S)₂、すなわち、配列番号

50

150のペプチドリンカーである、上で定義された通りのTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子に関する。一態様では、第1のペプチドリンカーは、(G4S)₂であり、第2のペプチドリンカーは、GSPGSSSSGS（配列番号153）であり、第3のペプチドリンカーは、(G4S)₂である。別の態様では、第1、第2及び第3のペプチドリンカーは、(G4S)₂である。

【0043】

本発明は、安定的に結合することができる第1及び第2のサブユニットから構成されるFcドメインを含む、上文で定義された通りのTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子にさらに関する。

【0044】

特に、(c) 安定的に結合することができる第1及び第2のサブユニットから構成されるFcドメインを含む本発明のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子は、(a) 標的細胞抗原と特異的に結合することができるFab分子をさらに含み、Fab重鎖は、そのC末端でFcドメイン内のCH2ドメインのN末端に融合されている。

【0045】

さらなる態様では、Fcドメインは、IgG、特に、IgG1 Fcドメイン又はIgG4 Fcドメインである。より特に、Fcドメインは、IgG1 Fcドメインである。特定の態様では、Fcドメインは、Fcドメインの第1のサブユニットと第2のサブユニットの結合を促進する修飾を含む。

【0046】

別の態様では、本発明は、(c) 安定的に結合することができる第1及び第2のサブユニットから構成されるFcドメインを含み、Fcドメインが、Fc受容体との、特に、Fcγ受容体への結合を低減させる1つ又は複数のアミノ酸置換を含む、上文で定義された通りのTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子に関する。

【0047】

特に、Fcドメインは、IgG重鎖の234及び235位（EU番号付け）並びに／又は329位（EU番号付け）にアミノ酸置換を含む。より特に、アミノ酸置換L234A、L235A及びP329G（EU番号付け）を有するIgG1 Fcドメインを含む、本発明によるトリマーTNFファミリーリガンド含有抗原結合分子が提供される。

【0048】

さらなる態様では、本発明は、第1の重鎖及び第1の軽鎖を含むTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子であって、第1の重鎖及び第1の軽鎖の双方が、TnCと特異的に結合することができるFab分子、C末端で第2のペプチドリンカーにより第2の重鎖又は軽鎖に融合されている第1のペプチドであって、第1のペプチドリンカーによって互いに接続されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクトドメイン又はそれらの断片を含む第1のペプチド及びC末端で第3のペプチドリンカーにより第2の軽鎖又は重鎖に融合されている第2のペプチドであって、前記TNFリガンドファミリーメンバーの1つのエクトドメインを含む第2のペプチドを含む、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子を提供する。

【0049】

別の態様では、第1のペプチドリンカーにより互いに接続されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクトドメイン又はそれらの断片を含む第1のペプチドが、そのC末端で第2のペプチドリンカーにより重鎖の一部であるCH1ドメインに融合されており、前記TNFリガンドファミリーメンバーの1つのエクトドメイン又はその断片を含む第2のペプチドが、そのC末端で第3のペプチドリンカーにより軽鎖の一部であるCLドメインに融合されている、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子が提供される。

【0050】

10

20

30

40

50

さらに別の態様では、第1のペプチドリンカーにより互いに接続されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクストドメイン又はそれらの断片を含む第1のペプチドが、そのC末端で第2のペプチドリンカーにより重鎖の一部であるCLドメインに融合されており、前記TNFリガンドファミリーメンバーの1つのエクストドメイン又はその断片を含む第2のペプチドが、そのC末端で第3のペプチドリンカーにより軽鎖の一部であるCH1ドメインに融合されている、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子が提供される。

【0051】

さらなる態様では、本発明は、第1のペプチドリンカーにより互いに接続されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクストドメイン又はそれらの断片を含む第1のペプチドが、そのC末端で第2のペプチドリンカーにより重鎖の一部であるVHドメインに融合されており、前記TNFリガンドファミリーメンバーの1つのエクストドメイン又はその断片を含む第2のペプチドが、そのC末端で第3のペプチドリンカーにより軽鎖の一部であるVLドメインに融合されている、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子を提供する。

【0052】

さらに、TNFリガンドファミリーメンバーに隣接するCLドメイン内の123位（EU番号付け）のアミノ酸がアルギニン（R）に置換されており、124位（EU番号付け）のアミノ酸がリジン（K）に置換されている、及びTNFリガンドファミリーメンバーに隣接するCH1ドメイン内の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トリマー含有抗原結合分子が提供される。

【0053】

さらなる態様では、

（a）TnCと特異的に結合することができるFab分子を両方が含む、第1の重鎖及び第1の軽鎖、

（b）配列番号176、配列番号184、配列番号185及び配列番号186からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む第2の重鎖、並びに配列番号172、配列番号174、配列番号175及び配列番号183からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む第2の軽鎖

を含む、上文に記載のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子が提供される。

【0054】

一態様では、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子であって、

（i）配列番号46のアミノ酸配列を含むVHドメインを含む第1の重鎖、及び配列番号45のアミノ酸配列を含むVLドメインを含む第1の軽鎖、又は配列番号48のアミノ酸配列を含むVHドメインを含む第1の重鎖、及び配列番号47のアミノ酸配列を含むVLドメインを含む第1の軽鎖と、

（ii）配列番号178のアミノ酸配列を含む第2の重鎖と、

（iii）配列番号179のアミノ酸配列を含む第2の軽鎖と

を含む、抗原結合分子が提供される。

【0055】

別の態様では、本発明は、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子であって、

（i）配列番号46のアミノ酸配列を含むVHドメインを含む第1の重鎖、及び配列番号45のアミノ酸配列を含むVLドメインを含む第1の軽鎖、又は配列番号48のアミノ酸配列を含むVHドメインを含む第1の重鎖、及び配列番号47のアミノ酸配列を含むVLドメインを含む第1の軽鎖と、

（ii）配列番号102、配列番号108、配列番号116及び配列番号120からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む第2の重鎖と、

（iii）配列番号103、配列番号109、配列番号117及び配列番号121からな

10

20

30

40

50

る群から選択されるアミノ酸配列を含む第2の軽鎖とを含む、抗原結合分子を提供する。

【0056】

さらに別の態様では、本発明は、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子であって、

(a) TnCと特異的に結合することができる少なくとも1つの部分と、

(b) ジスルフィド結合により互いに連結されている第1及び第2のポリペプチドとを含む、

第1のポリペプチドがCH3ドメインを含有すること、及び第2のポリペプチドがCH3ドメインを含有することをそれぞれ特徴とし、第1のポリペプチドが、ペプチドリinkerにより互いに及びCH3ドメインのC末端に接続されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクドメイン若しくはそれらの断片を含み、第2のポリペプチドが、ペプチドリinkerによって前記ポリペプチドのCH3ドメインのC末端に接続されている前記TNFリガンドファミリーメンバーの1つのエクドメイン若しくはその断片を含む抗原結合分子を提供する。

【0057】

さらなる態様では、本発明のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子は、

(a) TnCと特異的に結合することができる少なくとも1つのFabドメインと、

(b) 安定的に結合することができる第1及び第2のサブユニットから構成されるFcドメインと、

(c) ペプチドリinkerにより互いに接続されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクドメイン又はそれらの断片を含む第1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1つのエクドメイン又はその断片を含む第2のポリペプチドと

を含み、第1のポリペプチドは、そのN末端でFcドメインのサブユニットの一方のC末端側に融合されており、第2のポリペプチドは、そのN末端でFcドメインのサブユニットの他方のC末端に融合されており、TNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクドメイン又はそれらの断片を含む第1のポリペプチドは、配列番号176及び配列番号184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1つのエクドメイン又はその断片を含む第2のポリペプチドは、配列番号172及び配列番号183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2つのエクドメイン又はそれらの断片を含む第1のポリペプチドは、配列番号176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1つのエクドメイン又はその断片を含む第2のポリペプチドは、配列番号172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2つのエクドメイン又はそれらの断片を含む第1のポリペプチドは、配列番号184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1つのエクドメイン又はその断片を含む第2のポリペプチドは、配列番号183のアミノ酸配列を含む。

【0058】

一態様では、本発明は、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子であって、

(a) TnCと特異的に結合することができる少なくとも1つのFabドメインと、

(b) 安定的に結合することができる第1及び第2のサブユニットから構成されるFcドメインと、

(c) ペプチドリinkerにより互いに接続されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクドメイン又はそれらの断片を含む第1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1つのエクドメイン又はその断片を含む第2のポリペプチドと

を含み、第1のポリペプチドが、そのN末端でFcドメインのサブユニットの一方のC末端側に融合されており、第2のポリペプチドが、そのN末端でFcドメインのサブユニットの他方のC末端に融合されている抗原結合分子を提供する。したがって、本発明は、標

的細胞抗原への結合について一価である、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子に関する。

【0059】

さらなる態様では、本発明は、(d) TnCと特異的に結合することができないFabドメインをさらに含む、前に定義された通りのTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子を提供する。したがって、本発明は、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子であって、

(a) TnCと特異的に結合することができる少なくとも1つのFabドメインと、

(b) 安定的に結合することができる第1及び第2のサブユニットから構成されるFcドメインと、

(c) ペプチドリンカーにより互いに接続されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクドメイン又はそれらの断片を含む第1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1つのエクドメイン又はその断片を含む第2のポリペプチドであって、第1のポリペプチドは、そのN末端でFcドメインのサブユニットの一方のC末端側に融合されており、第2のポリペプチドは、そのN末端でFcドメインの他方のサブユニットのC末端に融合されている、ポリペプチドと、

(d) 標的細胞抗原と特異的に結合することができないFabドメインとを含む、抗原結合分子を提供する。

【0060】

特に、

(i) 配列番号127のアミノ酸配列を含む第1の重鎖、配列番号125のアミノ酸配列を含む第2の重鎖、及び配列番号77のアミノ酸配列を含む1つの軽鎖、又は

(ii) 配列番号130のアミノ酸配列を含む第1の重鎖、配列番号131のアミノ酸配列を含む第2の重鎖、及び配列番号77のアミノ酸配列を含む1つの軽鎖、又は

(iii) 配列番号124のアミノ酸配列を含む第1の重鎖、配列番号133のアミノ酸配列を含む第2の重鎖、及び配列番号77のアミノ酸配列を含む1つの軽鎖、又は

(iv) 配列番号136のアミノ酸配列を含む第1の重鎖と、配列番号137のアミノ酸配列を含む第2の重鎖、及び配列番号77のアミノ酸配列を含む1つの軽鎖

を含む、上文に記載のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子が提供される。

【0061】

特に、そのようなTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子は、TnCと特異的に結合することができる2つの部分を含む。一態様では、本発明は、TnCと特異的に結合することができる2つの部分を含む、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子を提供する。特に、

(i) 配列番号112のアミノ酸配列を含む第1の重鎖、配列番号113のアミノ酸配列を含む第2の重鎖、及び配列番号77のアミノ酸配列を含む2つの軽鎖、又は

(ii) 配列番号124のアミノ酸配列を含む第1の重鎖、配列番号125のアミノ酸配列を含む第2の重鎖、及び配列番号77のアミノ酸配列を含む2つの軽鎖

を含む、上文に記載のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子が提供される。

【0062】

一態様では、TNFリガンドファミリーメンバーはOX40Lである。さらなる態様では、TNFリガンドファミリーメンバーのエクドメインは、配列番号181又は配列番号182からなる群から選択されるアミノ酸配列、特に、配列番号181のアミノ酸配列を含む。

【0063】

さらなる態様では、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子であって、

(a) TnCと特異的に結合することができる少なくとも1つの部分と、

(b) ジスルフィド結合により互いに連結されている第1及び第2のポリペプチドとを含み、

第1のポリペプチドが、配列番号190又は配列番号191のアミノ酸配列を含むこと

10

20

30

40

50

、及び第2のポリペプチドが、配列番号181又は配列番号182のアミノ酸配列を含むことを特徴とする、上文に記載の抗原結合分子が提供される。

【0064】

別の態様では、標的細胞抗原がテネイシンC (Tn C) であり、Tn Cと特異的に結合することができる部分が、(i) 配列番号67又は配列番号70のアミノ酸配列を含むCDR-H1と、(ii) 配列番号68又は配列番号71のアミノ酸配列を含むCDR-H2と、(iii) 配列番号69又は配列番号72のアミノ酸配列を含むCDR-H3とを含むVHドメイン、及び(iv) 配列番号55又は配列番号58のアミノ酸配列を含むCDR-L1と、(v) 配列番号56又は配列番号59のアミノ酸配列を含むCDR-L2と、(vi) 配列番号57又は配列番号60のアミノ酸配列を含むCDR-L3とを含むVLドメインを含む、本明細書に記載のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子が提供される。

10

【0065】

特に、

(i) 配列番号46のアミノ酸配列を含むVHドメインを含む第1の重鎖、及び配列番号45のアミノ酸配列を含むVLドメインを含む第1の軽鎖、又は配列番号48のアミノ酸配列を含むVHドメインを含む第1の重鎖、及び配列番号47のアミノ酸配列を含むVLドメインを含む第1の軽鎖と、

(ii) 配列番号195からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む第2の重鎖と、

(iii) 配列番号196のアミノ酸配列を含む第2の軽鎖と

20

を含む、本明細書に記載のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子が提供される。

【0066】

本発明の別の態様によれば、上文で定義するような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、及び本発明の単離されたポリペプチド又はベクターを含む宿主細胞を、さらに提供する。一部の実施態様では、宿主細胞は、真核細胞、特に、哺乳動物細胞である。

【0067】

別の態様では、本発明の抗原結合分子を産生する方法であって、(i) 本発明の宿主細胞を抗原結合分子の発現に好適な条件下で培養するステップ、及び(ii) 抗原結合分子を回収するステップを含む方法が提供される。本発明は、本発明の方法により産生される抗原結合分子も包含する。

30

【0068】

本発明は、本発明の抗原結合分子と少なくとも1つの薬学的に許容される添加剤とを含む薬学的組成物をさらに提供する。

【0069】

医薬として使用するための、本発明の抗原結合分子又は本発明の薬学的組成物も、本発明に包含される。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、本発明の抗原結合分子又は本発明の薬学的組成物が提供される。特定の実施態様では、がんの治療に使用するための、本発明の抗原結合分子又は本発明の薬学的組成物が提供される。

40

【0070】

それを必要とする個体における疾患の治療用の医薬を製造するための、特に、がんの治療用の医薬を製造するための、本発明の抗原結合分子の使用、並びに個体における疾患を治療する方法であって、薬学的に許容される形態の本発明の抗原結合分子を含む組成物の治療有効量を前記個体に投与することを含む方法も提供される。具体的実施態様では、疾患は、がんである。上記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】

50

【0071】

【図1】図1は、抗TnCクローン18D4（図1b）及び抗TnCクローン11C7（図1c）で染色したときの、倍率100倍でのLS174T異種移植片腫瘍における免疫組織学的染色を示す図である。染色パターンは、特定のTnC間質線維に対応する。クローン18D4とクローン11C7両方についてのTnC染色は、全体的に見て、中等度の強度で発現される。ネガティブアイソタイプコントロールシグナルは、この手法の特異性を確認する（図1a）。

【図2】図2は、ヒト腫瘍アレイにおけるウサギアイソタイプコントロールでの免疫組織学的染色の結果を示す図である。試験した全ての組織において、ネガティブアイソタイプコントロールシグナルは、この手法の特異性を確認する。

【図3】図3は、ヒト腫瘍アレイにおける抗TnCクローン18D4での免疫組織学的染色の結果を示す図である。染色パターンは、特定のTnC間質線維に対応する。TnC染色は、殆どの腫瘍組織においてコントロール正常ペア組織と比較して高レベルで発現される。

【図4】図4は、抗TnCクローン11C7でのヒト腫瘍アレイにおける免疫組織学的染色の結果を示す図である。染色パターンは、特定のTnC間質線維に対応する。TnC染色は、殆どの腫瘍組織においてコントロール正常ペア組織と比較して高レベルで発現される。

【図5a-b】図5は、一価のTnC標的スプリットトリマーヒト4-1BBリガンド（71-254）（コンストラクト6.1）の集合成分を示す図である。A）ヒトIgG1-CLドメインに融合されているダイマーリガンド。B）ヒトIgG1-CH1ドメインに融合されているモノマーリガンド。

【図6】図6は、本発明の4-1BBトリマー含有抗原結合分子コンストラクト6.1（CH-CLクロスと荷電残基を含有する、一価のTnC標的（18D4）スプリットトリマー4-1BBリガンド（71-254）Fc（kih）PGLALA融合体）を示す図である。このコンストラクトの調製及び産生は、実施例1.1で説明する。VH及びVLDドメインは、抗TnC抗体18D4のものであり、大きい黒い点は、ノブイントゥーホール修飾を表す。＊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）を表す記号である。

【図7a-b】図7は、一価のTnC標的スプリットトリマーヒト4-1BBリガンド（71-254）（コンストラクト6.2）の集合成分を示す図である。A）は、ヒトIgG1-CLドメインに融合されているダイマーリガンドを示す。B）は、ヒトIgG1-CH1ドメインに融合されているモノマーリガンドを示す。

【図8】図8は、CH-CLクロスを含有し、荷電残基を有さない、一価のTnC標的（18D4）スプリットトリマー4-1BBリガンド（71-254）Fc（kih）融合体（コンストラクト6.2）を示す図である。このコンストラクトの調製及び産生は、実施例1.2で説明する。VH及びVLDドメインは、抗TnC抗体18D4のものであり、大きい黒い点は、ノブイントゥーホール修飾を表す。

【図9a-b】図9は、二価のTnC標的のスプリットトリマーヒト4-1BBリガンド（71-254）（コンストラクト6.3）の集合成分を示す図である。A）は、ヒトIgG1 Fcホール鎖に融合されているダイマーリガンドを示す。B）は、ヒトIgG1 Fcノブ鎖に融合されているモノマーリガンドを示す。

【図10】図10は、二価のTnC標的（18D4）スプリットトリマー4-1BBリガンドFc（kih）PGLALA融合体（コンストラクト6.3）を示す図である。このコンストラクトの調製及び産生は、実施例1.3で説明する。VH及びVLDドメインは、抗TnC抗体18D4のものであり、大きい黒い点は、ノブイントゥーホール修飾を表す。

【図11a-b】図11は、一価のTnC標的スプリットトリマーヒト4-1BBリガンド（71-248）（コンストラクト6.4）の集合成分を示す図である。A）は、ヒトIgG1-CLドメインに融合されているダイマーリガンドを示す。B）は、ヒトIgG1-CH1ドメインに融合されているモノマーリガンドを示す。

10

20

30

40

50

【図12】図12は、CH-CLクロスと荷電残基を含有する、一価のTnC標的(18D4)スプリットトリマー4-1BBリガンド(71-248)Fc(kih)融合体(コンストラクト6.4)の図である。このコンストラクトの調製及び産生は、実施例1.4で説明する。VH及びVLDメインは、抗TnC抗体18D4のものであり、大きい黒い点は、ノブイントゥーホール修飾を表す。

【図13a-b】図13は、一価のTnC標的スプリットトリマーヒト4-1BBリガンド(71-248)(コンストラクト6.5)の集成分を示す図である。A)は、ヒトIgG1-CLドメインに融合されているダイマーリガンドを示す。B)は、ヒトIgG1-CH1ドメインに融合されているモノマーリガンドを示す。

【図14】図14は、CH-CLクロスを含有し、荷電残基を有さない、一価のTnC標的(18D4)スプリットトリマー4-1BBリガンド(71-248)Fc(kih)融合体(コンストラクト6.5)を示す図である。このコンストラクトの調製及び産生は、実施例1.5で説明する。VH及びVLDメインは、抗TnC抗体18D4のものであり、大きい黒い点は、ノブイントゥーホール修飾を表す。

【図15a-b】図15は、二価のTnC標的スプリットトリマーヒト4-1BBリガンド(71-248)(コンストラクト6.6)の集成分を示す図である。A)は、ヒトIgG1 Fcホール鎖に融合されているダイマーリガンドを示す。B)は、ヒトIgG1 Fcノブ鎖に融合されているモノマーリガンドを示す。

【図16】図16は、二価のTnC標的(18D4)スプリットトリマー4-1BBリガンド(71-248)Fc(kih)融合体(コンストラクト6.6)を示す図である。このコンストラクトの調製及び産生は、実施例1.6で説明する。VH及びVLDメインは、抗TnC抗体18D4のものであり、大きい黒い点は、ノブイントゥーホール修飾を表す。

【図17a-b】図17は、ヒトFcのC末端に融合されている一価の標的指向性スプリットトリマーヒト4-1BBリガンドの集成分を示す図である。A)は、ヒトIgG1 Fcホール又はノブ鎖に融合されているダイマーリガンドを示す。B)は、ヒトIgG1 Fcノブ又はホール鎖に融合されているモノマーリガンドを示す。

【図18a】図18は、一価の標的指向性スプリットトリマーC末端4-1BBリガンドFc(kih)ノブ融合体を示すものであり、図18aは、ダイマー4-1BBLがホールFc鎖に融合されており、モノマー4-1BBLがノブFc鎖に融合されている、コンストラクト6.11を示す図である。このコンストラクトの調製及び産生は、実施例1.7で説明する。VH及びVLDメインは、抗TnC抗体18D4のものであり、大きい黒い点は、ノブイントゥーホール修飾を表す。

【図18b】図18は、一価の標的指向性スプリットトリマーC末端4-1BBリガンドFc(kih)ノブ融合体を示すものであり、図18bは、ダイマー4-1BBLがノブFc鎖に融合されており、モノマー4-1BBLがホールFc鎖に融合されている、コンストラクト6.12を示す図である。このコンストラクトの調製及び産生は、実施例1.7で説明する。VH及びVLDメインは、抗TnC抗体18D4のものであり、大きい黒い点は、ノブイントゥーホール修飾を表す。

【図19a】図19は、一価の標的指向性(ホール鎖)スプリットトリマーC末端4-1BBリガンドFc(kih)融合体を示すものであり、図19aは、ダイマー4-1BBLがホールFc鎖に融合されており、モノマー4-1BBLがノブFc鎖に融合されている、コンストラクト6.13の図である。このコンストラクトの調製及び産生は、実施例1.8で説明する。VH及びVLDメインは、抗TnC抗体18D4のものであり、大きい黒い点は、ノブイントゥーホール修飾を表す。

【図19b】図19は、一価の標的指向性(ホール鎖)スプリットトリマーC末端4-1BBリガンドFc(kih)融合体を示すものであり、図19bは、ダイマー4-1BBLがノブFc鎖に融合されており、モノマー4-1BBLがホールFc鎖に融合されている、コンストラクト6.14の図である。このコンストラクトの調製及び産生は、実施例1.8で説明する。VH及びVLDメインは、抗TnC抗体18D4のものであり、大きい

10

20

30

40

50

い黒い点は、ノブイントゥーホール修飾を表す。

【図20a】図20は、標的指向性スプリットトリマーC-末端4-1BBリガンド(71-248)Fc(kih)融合分子の同時結合に関するものであり、図20aは、SPR実験の仕組みを示す図である。

【図20b】図20は、標的指向性スプリットトリマーC-末端4-1BBリガンド(71-248)Fc(kih)融合分子の同時結合に関するものであり、図20bは、コンストラクト6.5についてのヒト4-1BB及びヒトTnCの同時結合を示す図である。

【図20c】図20は、標的指向性スプリットトリマーC-末端4-1BBリガンド(71-248)Fc(kih)融合分子の同時結合に関するものであり、図20cは、コンストラクト6.6についてのヒト4-1BB及びヒトTnCの同時結合を示す図である。

【図21】図21は、TnC標的4-1BBスプリットトリマーリガンドFc融合抗原結合分子の、単離した後のPMBcへの結合を示す図である。PEがコンジュゲートされた二次検出抗体の蛍光強度の幾何平均(y軸)を、試験したコンストラクトの濃度(x軸)に対して示す。新鮮ヒトCD45+CD3+CD8neg CD4+T細胞(図21a)、新鮮ヒトCD45+CD3+CD4neg CD8+T細胞(図21b)、新鮮ヒトCD45+CD3neg CD19+B細胞(図21c)及びCD45+CD3+CD4neg CD8neg γδT細胞(図21d)に関して、結合をモニターした。

【図22】図22は、TnC標的4-1BBスプリットトリマーリガンドFc融合抗原結合分子の活性化PMBcへの結合を示す図である。PEがコンジュゲートされた二次検出抗体の蛍光強度の幾何平均(y軸)を、試験したコンストラクトの濃度(x軸)に対して示す。活性化ヒトCD45+CD3+CD8neg CD4+T細胞(図22a)、活性化ヒトCD45+CD3+CD4neg CD8+T細胞(図22b)、CD45+CD3neg CD19+B細胞(図22c)及び活性化ヒトCD45+CD3+CD4neg CD8neg γδT細胞(図22d)に関して結合をモニターした。

【図23】図23は、TnC標的又は非標的指向性のスプリットトリマーヒト4-1BBリガンドFc(kih)融合分子の、ヒトTnC発現U87-MG腫瘍細胞株への結合を示す図である。R-フィコエリトリン蛍光色素がコンジュゲートされた抗ヒトIgG Fcγ特異的ヤギIgG F(ab')₂断片を用いて結合を検出し、フローサイトメトリーにより測定した幾何平均をy軸上に示す。x軸上には、TnC標的4-1BBスプリットトリマーリガンドFc融合抗原結合分子及びそれらのコントロールについての使用濃度を示す。

【図24】図24は、ヒト4-1BB発現HeLaレポーター細胞株を用いる活性化アッセイの仕組みの説明を示す図である。レポーター細胞上で発現される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、ルシフェラーゼは、ルシフェリンのオキシルシフェリンへの酸化を触媒することができる。この化学反応は、NFκB媒介ルシフェラーゼ発現と正の相関を示し、この化学反応を蛍光強度(放出光単位)により測定することができる。

【図25】図25は、NFκB活性化誘導ルシフェラーゼ活性を示す図である。放出光単位(URL)を1ウェルにつき0.5秒間測定し、スプリットトリマー4-1BBリガンド含有融合分子及びコントロールの使用濃度に対してプロットしたものである。ヒト4-1BB発現HeLaレポーター細胞を、ヒトTnC発現U87MG細胞による架橋の非存在下(図25a)及び存在下(図25b)で6時間インキュベートした。4-1BB発現HeLaレポーター細胞のTnC発現腫瘍細胞に対する細胞比は、1:5であった。

【図26】図26は、TnC発現U87MG、アゴニストヒトCD3抗体及び二重特異性抗TnCスプリットトリマー4-1BB融合分子コンストラクト6.5の存在下でのヒトPBMC活性化の概略的仕組みの説明を示す図である。

【図27】図27は、TnC+U87MG、アゴニストCD3抗体、及びTnC標的スプリットトリマー4-1BB融合分子の存在下での、ヒトPBMC活性化アッセイを示す図である。全CD8+T細胞に対する頻度としてのCD25及びCD137(4-1BB)の発現レベルを、コンストラクト6.5及び6.6又はコントロール(コントロールF、

10

20

30

40

50

コントロール L 及びコントロール E) の使用濃度に対してプロットしたものである。

【発明を実施するための形態】

【0072】

定義

別途定義がない限り、本明細書で使用される専門及び科学用語は、本発明が属する技術分野において一般に使用されているのと同じ意味を有する。本明細書を解釈するため、以下の定義を適用することとし、適切な場合にはいつでも、単数形で使用される用語は複数形も含むことになり、また逆に複数形で使用される用語は単数形も含むことになる。

【0073】

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

【0074】

本明細書で使用される用語「特異的に結合することができる部分」は、抗原決定基と特異的に結合することができるポリペプチド分子を指す。一態様では、抗原結合部分は、その標的細胞抗原による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、それが結合している実体（例えば、TNFファミリーリガンドトリマー）を標的部位に、例えば、抗原決定基を有する特定の種類の腫瘍細胞又は腫瘍間質に指向させることができる。標的細胞抗原と特異的に結合することができる部分は、本明細書中でさらに定義されるような抗体及びそれらの断片を含む。加えて、標的細胞抗原と特異的に結合することができる部分は、本明細書中でさらに定義されるような足場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に基づく結合ドメインを含む（例えば、国際公開第2002/020565号を参照されたい）。

【0075】

抗体又はその断片に関して、用語「特異的に結合することができる部分」は、抗原の一部又は全てと特異的に結合する領域であって抗原の一部又は全てと相補的である領域を含む、分子の一部を指す。特異的に抗原に結合することができる部分は、例えば、1つ又は複数の抗体可変ドメイン（抗体可変領域とも呼ばれる）によって、提供され得る。特に、特異的に抗原に結合することができる部分は、抗体軽鎖可変領域（VL）及び抗体重鎖可変領域（VH）を含む。

【0076】

本明細書での用語「抗体」は、最も広い意味で使用され、様々な抗体構造を包含し、そのような抗体構造には、これらに限定されないが、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）が含まれ、抗体断片も、それらが所望の抗原結合活性を呈示するのであれば、含まれる。

【0077】

本明細書で使用される用語「モノクローナル抗体」は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を指し、すなわち、集団を構成する個々の抗体は、生じ得る変異抗体、例えば、天然に存在する突然変異を含有する変異抗体又はモノクローナル抗体の産生中に生じる変異抗体であって、一般に少量で存在するそのような変異体を除いて、同一である、及び／又は同一の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概して含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、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。

【0078】

本明細書で使用される用語「単一特異性」抗体は、各々が同じ抗原の同じエピトープと結合する1つ又は複数の結合部位を有する抗体を示す。用語「二重特異性」は、抗原結合分子が少なくとも2つの異なる抗原決定基と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、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2つの抗原結合部位を含む。ある特定の実施態様では、二重特異性抗原結合部位は、2つの抗原決定基、特に、2つの異なる細胞上で発現される2つの抗原決定基に、同時に結合する

10

20

30

40

50

ことができる。

【0079】

本願の中で使用される用語「原子価」は、抗原結合分子中の指定数の結合部位の存在を示す。しかるが故に、用語「二価」、「四価」及び「六価」は、抗原結合分子中の2つの結合部位、4つの結合部位及び6つの結合部位の存在をそれぞれ示す。

【0080】

用語「完全長抗体」、「インタクトな抗体」、及び「全抗体」は、天然抗体構造と実質的に同様の構造を有する抗体を指すために本明細書では同義で使用される。「天然抗体」は、様々な構造を有する、天然に存在する免疫グロブリン分子を指す。例えば、天然IgGクラス抗体は、ジスルフィド結合されている2つの軽鎖と2つの重鎖から構成されている、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末端へ、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)、続いて、重鎖定常領域とも呼ばれる3つの定常ドメイン(CH1、CH2及びCH3)を有する。同様に、N末端からC末端へ、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)、続いて、軽鎖定常領域とも呼ばれる軽鎖定常ドメイン(CL)を有する。抗体の重鎖は、 α (IgA)、 δ (IgD)、 ϵ (IgE)、 γ (IgG)又は μ (IgM)と呼ばれる5つのタイプのうちの1つに割り当てることができ、これらのタイプの一部は、サブタイプ、例えば、 $\gamma 1$ (IgG1)、 $\gamma 2$ (IgG2)、 $\gamma 3$ (IgG3)、 $\gamma 4$ (IgG4)、 $\alpha 1$ (IgA1)及び $\alpha 2$ (IgA2)にさらに分けられる。抗体の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カップパ(κ)及びラムダ(λ)と呼ばれる2つのタイプの一方に割り当てることができる。

【0081】

「抗体断片」は、インタクト抗体が結合する抗原に結合するインタクト抗体の一部分を含む、インタクト抗体以外の分子を指す。抗体断片の例としては、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)；及び単ドメイン抗体が挙げられるが、これらに限定されない。ある特定の抗体断片の概説については、Hudson等、Nat Med 9、129-134(2003)を参照されたい。scFv断片の概説については、Pluckthun、The Pharmacology of Monoclonal Antibodies、113巻、Rosenburg及びMoore編、Springer-Verlag、New York、p269-315(1994)を参照されたい。国際公開第93/16185号、並びに米国特許第5571894号及び同第5587458号も参照されたい。サルベージ受容体結合エピトープ残基を含み、インビボ半減期が増加されている、Fab及びF(ab')₂断片の論考については、米国特許第5869046号を参照されたい。ダイアボディは、二価又は二重特異性であり得る2つの抗原結合部位を有する抗体断片であり、例えば、欧州特許第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)を参照されたい。トリアボディ及びテトラボディも、Hudson等、Nat Med 9、129-134(2003)に記載されている。単ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインの全て若しくは一部分又は軽鎖可変ドメインの全て若しくは一部分を含む、抗体断片である。ある特定の実施態様では、単ドメイン抗体は、ヒト単ドメイン抗体(Domantis, Inc.、Waltherm, MA；例えば、米国特許第6248516号B1を参照されたい)である。抗体断片は、インタクトな抗体のタンパク質消化、及び組換え宿主細胞(例えば、大腸菌(E. coli)又はファージ)による産生を含むがこれらに限定されない、本明細書に記載の様々な手法によって作製することができる。

【0082】

インタクトな抗体のパパイン消化は、「Fab」断片と呼ばれる2つの同一の抗原結合断片であって、各々が、重鎖及び軽鎖可変ドメインを含有し、軽鎖の定常ドメイン及び重

10

20

30

40

50

鎖の第1の定常ドメイン（CH1）も含有する、2つの抗原結合断片を生じさせる。したがって、本明細書で使用される用語「Fab断片」は、軽鎖のVLドメイン及び定常ドメイン（CL）と重鎖のVHドメイン及び第1の定常ドメイン（CH1）とを含む軽鎖断片を含む、抗体断片を指す。Fab'断片は、抗体ヒンジ領域からの1つ又は複数のシステインをはじめとする、少数の残基の重鎖CH1ドメインのカルボキシ末端における付加が、Fab断片とは異なる。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、2つの抗原結合部位（2つのFab断片）とFc領域の一部とを有するF(ab')₂断片が得られる。

【0083】

用語「クロスFab断片」又は「xFab断片」又は「クロスオーバーFab断片」は、重鎖及び軽鎖の可変領域又は定常領域のどちら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つの異なる組成があり得、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、すなわち、クロスオーバーFab分子は、軽鎖可変領域（VL）及び重鎖定常領域（CH1）から構成されるペプチド鎖と、重鎖可変領域（VH）及び軽鎖定常領域（CL）から構成されるペプチド鎖を含む。このクロスオーバーFab分子は、クロスFab（VLVH）とも呼ばれる。他方では、Fab重鎖及び軽鎖の定常領域が交換されている場合、クロスオーバーFab分子は、重鎖可変領域（VH）及び軽鎖定常領域（CL）から構成されるペプチド鎖と、軽鎖可変領域（VL）及び重鎖定常領域（CH1）から構成されるペプチド鎖を含む。このクロスオーバーFab分子は、クロスFab（CLCH1）とも呼ばれる。

【0084】

「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って、前記抗体ドメイン及び前記リンカーが、N末端からC末端方向に、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の順序のうちの1つを有し、前記リンカーが、少なくとも30アミノ酸、好ましくは32アミノ酸と50アミノ酸の間のポリペプチドである、ポリペプチドである。前記単鎖Fab断片は、CLドメインとCH1ドメイン間の天然ジスルフィド結合によって安定化される。加えて、単鎖Fab分子は、システイン残基の挿入（例えば、カバット番号付けに従って可変重鎖内の44位及び可変軽鎖内の100位）による鎖間ジスルフィド結合の生成によってさらに安定化されることもある。

【0085】

「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って、前記抗体ドメイン及び前記リンカーが、N末端からC末端方向に、a) VH-CL-リンカー-VL-CH1及びb) VL-CH1-リンカー-VH-CLの順序のうちの一方を有し、VH及びVLと一緒に、抗原と特異的に結合する抗原結合部位を形成し、前記リンカーが、少なくとも30アミノ酸のポリペプチドである、ポリペプチドである。加えて、これらのx-scFab分子は、システイン残基の挿入（例えば、カバット番号付けに従って可変重鎖内の44位及び可変軽鎖内の100位）による鎖間ジスルフィド結合の生成によってさらに安定化されることもある。

【0086】

「単鎖可変断片（scFv）」は、10から約25アミノ酸の短いリンカーで接続された、抗体の重鎖（VH）可変領域と軽鎖（VL）可変領域の融合タンパク質である。リンカーは、通常、可動性のためにグリシンを多く含んでいることはもちろん、溶解性のためにセリン又はスレオニンも多く含んでおり、VHのN末端をVLのC末端と接続することができ、又は逆にVLのC末端をVHのN末端と接続することができる。このタンパク質は、定常領域の除去及びリンカーの導入にもかかわらず、元の抗体の特異性を保持する。

s c F v抗体は、例えば、Houston, J. S., *Methods in Enzymol.* 203 (1991) 46-96に記載されている。加えて、抗体断片は、VHドメインの特性、すなわち、VLドメインと集合することができる特性、又はVLドメインの特性、すなわち、VHドメインと集合して機能性抗原部位になる特性を有し、その結果、完全長抗体の抗原結合特性を提供する、単鎖ポリペプチドを含む。

【0087】

「足場抗原結合タンパク質」は、当該技術分野で公知であり、例えば、フィブロネクチン及び設計アンキリンリピートタンパク質 (DARPin) は、抗原結合ドメインの代替足場として使用されている。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)を参照されたい。本発明の一態様では、足場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 (Anticalin))、プロテインA由来分子、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/マキシボディ (Avimer/Maxibody))、血清トランスフェリン (トランスボディ (trans-body))；設計アンキリンリピートタンパク質 (DARPin)、抗体軽鎖又は重鎖の可変ドメイン (単ドメイン抗体、sdAb)、抗体重鎖の可変ドメイン (ナノボディ、aVH)、VNAR断片、フィブロネクチン (AdNectin)、C型レクチンドメイン (テトラネクチン (Tetranectin))；新規抗原受容体ベクターラクタマーゼの可変ドメイン (VNAR断片)、ヒトガンマークリスタリン又はユビキチン (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からのタンパク質、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。

【0088】

CTLA-4 (細胞傷害性Tリンパ球関連抗原4) は、主としてCD4+T細胞上で発現される、CD28ファミリー受容体である。その細胞外ドメインは、可変ドメイン様Igフォールドを有する。抗体のCDRに対応するループを異種配列で置換して、異なる結合特性を付与することができる。異なる結合特異性を有するように操作されたCTLA-4は、エビボディとしても公知である (例えば米国特許第7166697号B1)。エビボディは、抗体の単離された領域 (例えば、ドメイン抗体) と同じくらいのサイズである。さらなる詳細については、*Journal of Immunological Methods* 248 (1-2)、31-45 (2001)を参照されたい。

【0089】

リポカリンは、ステロイド、ビリル、レチノイド等の小さい疎水性分子を輸送する、細胞外タンパク質の1ファミリーである。リポカリンは、異なる標的抗原と結合するように操作することができる、円錐構造の開口端に多数のループを有する、堅いベータシート二次構造を有する。アンチカリンは、サイズが160-180アミノ酸であり、リポカリンに由来する。さらなる詳細については、*Biochim Biophys Acta* 1482:337-350 (2000)、米国特許第7250297号B1及び米国特許出願公開第2007/0224633を参照されたい。

【0090】

アフィボディは、抗原と結合するように操作することができる、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) のプロテインAに由来する足場である。このドメインは、およそ58アミノ酸の3ヘリックスバンドルからなる。表面残基の無作為化によりライブラリーが作成されている。さらなる詳細については、*Protein Eng. Des. Sel.* 17、455-462 (2004) 及び欧州特許第1641818号A1を参照されたい。

10

20

30

40

50

【0091】

アビマーは、Aドメイン足場ファミリーに由来するマルチドメインタンパク質である。おおよそ35アミノ酸の天然ドメインが定義されたジスルフィド結合構造をとる。Aドメインのこのファミリーにより呈示される自然変異のシャッフリングにより多様性が生じる。さらなる詳細については、Nature Biotechnology 23 (12)、1556-1561 (2005) 及び Expert Opinion on Investigational Drugs 16 (6)、909-917 (2007年6月) を参照されたい。

【0092】

トランスフェリンは、モノマー血清輸送糖タンパク質である。許容表面ループ内へのペプチド配列の挿入により異なる標的抗原に結合するようにトランスフェリンを操作することができる。操作されたトランスフェリン足場の例としては、トランスボディが挙げられる。さらなる詳細については、J. Biol. Chem 274、24066-24073 (1999) を参照されたい。

【0093】

設計アンキリンリピートタンパク質 (DARPin) は、膜内在性タンパク質の細胞骨格への接着を媒介するタンパク質の1ファミリーであるアンキリンから誘導されたものである。単一のアンキリンリピートは、2つのアルファヘリックスと1つのベータターンからなる33残基モチーフである。各リピートの第1のアルファヘリックス及びベータターンにおける残基を無作為化することにより異なる標的抗原に結合するようにDARPinを操作することができる。モジュールの数を増加させること (アフィニティー成熟法) により、DARPinの結合面を増加させることができる。さらなる詳細については、J. Mol. Biol. 332、489-503 (2003)、PNAS 100 (4)、1700-1705 (2003)、及び J. Mol. Biol. 369、1015-1028 (2007)、及び米国特許出願公開第2004/0132028号A1を参照されたい。

【0094】

単ドメイン抗体は、単一モノマー可変抗体ドメインからなる抗体断片である。最初の単ドメイン抗体は、ラクダ科動物からの抗体重鎖の可変ドメイン (ナノボディ又はV_HH断片) から誘導された。さらに、用語単ドメイン抗体は、サメに由来する自律性ヒト重鎖可変ドメイン (aVH) 又はV_{NAR}断片を含む。

【0095】

フィブロネクチンは、抗原と結合するように操作することができる足場である。アドネクチンは、繰り返し単位数15のヒトフィブロネクチンIII型 (FN3) の10番目のドメインの天然アミノ酸配列の骨格からなる。ベータサンドイッチの一端の3つのループを、アドネクチンが目的の治療標的を特異的に認識できるように操作することができる。さらなる詳細については、Protein Eng. Des. Sel. 18、435-444 (2005)、米国特許出願公開第2008/0139791、国際公開第2005/056764号及び米国特許第6818418号B1を参照されたい。

【0096】

ペプチドアブタマーは、活性部位に挿入された拘束された可変ペプチドループを含有する典型的なチオレドキシン (TrxA) である定常足場タンパク質からなる、コンビナトリアル認識分子である。さらなる詳細については、Expert Opin. Biol. Ther. 5、783-797 (2005) を参照されたい。

【0097】

ミクロボディは、3~4個のシステイン架橋を含有する、長さ20-50アミノ酸の天然に存在する微小タンパク質から誘導されたものであり、微小タンパク質の例としては、KalataBI及びコノトキシン及びノッチンが挙げられる。微小タンパク質は、その微小タンパク質の全フォールドに影響を与えずに25個までのアミノ酸を含むように操作することができるループを有する。操作されたノッチンドメインのさらなる詳細について

10

20

30

40

50

は、国際公開第2008/098796号を参照されたい。

【0098】

参照分子と「同じエピトープと結合する抗原結合分子」は、競合アッセイで参照分子のその抗原への結合を50%以上ブロックする抗原結合分子を指し、逆に言うと、参照分子は、競合アッセイで抗原結合分子のその抗原への結合を50%以上ブロックする。

【0099】

用語「抗原結合ドメイン」は、抗原の一部又は全てと特異的に結合する領域であって抗原の一部又は全てと相補的である領域を含む、抗原結合分子の一部を指す。抗原が大きい場合、抗原結合分子は、エピトープと称される抗原の特定の部分のみと結合することができる。抗原結合ドメインは、例えば、1つ又は複数の可変ドメイン（可変領域とも呼ばれる）によってもたらされることがある。好ましくは、抗原結合ドメインは、抗体軽鎖可変領域（VL）及び抗体重鎖可変領域（VH）を含む。

【0100】

本明細書で使用される用語「抗原決定基」は、「抗原」及び「エピトープ」と同義であり、抗原結合部分が結合し、その結果、抗原結合部分－抗原複合体を形成することになる、ポリペプチド上の部位（例えば、アミノ酸の近接ストレッチ、又は近接していないアミノ酸から構成される立体配座構造）を指す。有用な抗原決定基は、例えば、腫瘍細胞の表面で、ウイルス感染細胞の表面で、他の罹病細胞の表面で、免疫細胞の表面で、血清中で遊離した状態で、及び／又は細胞外マトリックス（ECM）中で見いだすことができる。本明細書において抗原として有用なタンパク質は、別途指示がない限り、霊長類（例えば、ヒト）及びげっ歯類（例えば、マウス及びラット）等の哺乳動物を含む、任意の脊椎動物源からの、任意の天然形態のタンパク質であり得る。特定の実施態様では、抗原は、ヒトタンパク質である。本明細書で特定のタンパク質に言及する場合のこの用語は、「完全長」のプロセッシングされていないタンパク質はもちろん、細胞内でのプロセッシングの結果として得られる任意の形態のタンパク質も包含する。この用語は、タンパク質の天然に存在する変異体、例えば、スプライスバリエント又は対立遺伝子変異体も包含する。

【0101】

用語「TnCと特異的に結合することができる」は、テネイシンC（TnC）に十分なアフィニティーで結合することができる抗原結合分子又は抗原結合部分を指し、したがって、抗原結合分子は、TnCを標的とする点で診断及び／又は治療剤として有用である。抗原結合分子には、抗体、Fab分子、クロスオーバーFab分子、単鎖Fab分子、Fv分子、scFv分子、単ドメイン抗体、並びにVH及び足場抗原結合タンパク質が含まれるが、これらに限定されない。一実施態様では、無関係の非TnCタンパク質への抗TnC抗原結合分子の結合度は、例えばラジオイムノアッセイ（RIA）によって測定して、TnCへの抗原結合分子の結合の約10%未満である。ある特定の実施態様では、TnCと結合する抗原結合分子は、 $\leq 1 \mu\text{M}$ 、 $\leq 100 \text{ nM}$ 、 $\leq 10 \text{ nM}$ 、 $\leq 5 \text{ nM}$ 、 $\leq 2 \text{ nM}$ 、 $\leq 1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.01 \text{ nM}$ 、又は $\leq 0.001 \text{ nM}$ （例えば、 10^{-8} M 以下、例えば、 10^{-8} M から 10^{-13} M 、例えば、 10^{-9} M から 10^{-13} M 、例えば、 10 nM から 0.1 nM 、例えば、 5 nM から 0.1 nM 、例えば、 2 nM から 0.1 nM ）の解離定数（ K_D ）を有する。ある特定の実施態様では、抗TnC抗原結合分子は、異なる種からのTnC間で保存されるTnCエピトープと結合する。ある特定の実施態様では、TnCのエピトープと結合する抗原結合分子は、A1、A2、A3、A4、B、AD1、AD2、C及びDからなる群から選択されるドメインのうちの少なくとも1つに特異的である。ある特定の実施態様では、TnC A1及びTnC A4ドメインに特異的な抗原結合分子が提供される。ある特定の実施態様では、TnC Cドメインに特異的な抗原結合分子が提供される。「特異的結合」とは、結合が抗原に対して選択であることを意味し、望ましくない又は非特異的な相互作用とは区別することができる。特定の抗原と結合する抗原結合分子の能力は、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、又は当業者によく知られている他の手法、例えば表面プラズモン共鳴（SPR）手法（Biacore装置で分析される）（Liljeblad等、Glyco J 17、323-329(2000)）及び伝統

10

20

30

40

50

的な結合アッセイ (Heeley, Endocr Res 28, 217-229(2002))、どちらかによって測定することができる。一実施態様では、無関係の非TnCタンパク質への抗原結合分子の結合度は、例えばSPRによって測定して、抗原への抗原結合分子の結合の約10%未満である。ある特定の実施態様では、抗原と結合する分子は、 $\leq 1 \mu\text{M}$ 、 $\leq 100 \text{ nM}$ 、 $\leq 10 \text{ nM}$ 、 $\leq 5 \text{ nM}$ 、 $\leq 2 \text{ nM}$ 、 $\leq 1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.01 \text{ nM}$ 、又は $\leq 0.001 \text{ nM}$ (例えば、 10^{-8} M 以下、例えば、 10^{-8} M から 10^{-13} M 、例えば、 10^{-9} M から 10^{-13} M)の解離定数 (K_D)を有する。

【0102】

「アフィニティー」又は「結合アフィニティー」は、分子 (例えば、抗体) の単一の結合部位とその結合パートナー (例えば、抗原) との非共有結合的相互作用の総計の強度を指す。別途指示がない限り、本明細書で使用される「結合アフィニティー」は、結合対のメンバー (例えば、抗体と抗原) 間の1:1相互作用を表す固有の結合フィニティーを指す。分子XのそのパートナーYに対するアフィニティーは、解離速度定数と結合速度定数 (それぞれ、 k_{off} と k_{on}) の比である、解離定数 (K_d) によって一般に表すことができる。したがって、同等のアフィニティーは、速度定数の比が同じままであるならば、異なる速度定数を含むこともある。アフィニティーは、本明細書に記載のものを含む、当該技術分野で公知の一般的な方法によって測定することができる。アフィニティー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。

【0103】

本明細書で使用される「標的細胞抗原」は、標的細胞、例えば、がん細胞等の腫瘍内の細胞、又は腫瘍間質の細胞の表面に又はその環境で提示される抗原決定基を指す。ある特定の実施態様では、標的細胞抗原は、腫瘍組織内又は周囲の細胞外マトリックスにおいて発現される。特に、標的細胞抗原は、テネイシンC (TnC) である。本明細書で使用される用語「テネイシンC」又は「TnC」は、別途指示がない限り、霊長類 (例えば、ヒト及びカニクイザル) 及びげっ歯類 (例えば、マウス及びラット) 等の哺乳動物を含む任意の脊椎動物源からの任意の天然TnCを指す。この用語は、「完全長」のプロセッシングされていないTnC、並びに細胞内でのプロセッシングの結果として得られる任意の形態のTnCを包含する。この用語は、TnCの天然に存在する変異体、例えば、スプライスバリエント又は対立遺伝子変異体も包含する。例示的ヒトTnC抗原配列 (N末端GST及び6xHisタグ、並びにC末端aviタグ及び6xHisタグを有する) のアミノ酸配列は、配列番号4で示される。例示的マウスTnC抗原配列 (N末端GST及び6xHisタグ、並びにC末端aviタグ及び6xHisタグを有する) のアミノ酸配列は、配列番号5で示される。例示的カニクイザルTnC抗原配列 (N末端GST及び6xHisタグ、並びにC末端aviタグ及び6xHisタグを有する) のアミノ酸配列は、配列番号6で示される。ヒトTnC分子に関して、5番目の定常フィブロネクチンIII型ドメインと6番目の定常フィブロネクチンIII型ドメイン間に挿入され得る、9つ以下の選択的スプライシングを受けたフィブロネクチンIII型ドメインが公知である (TnCのドメイン構造の模式図については、例えば、Orend及びChiquet-Ehrismann, Cancer Letters 244, 143-163(2006)を参照されたい)。同様に、マウスTnC分子に関して、6つの選択的スプライシングを受けたフィブロネクチンIII型ドメインが (例えば、Joestner and Faissner, J Biol Chem 274, 17144-17151(1999)に) 記載されている。

【0104】

用語「可変領域」又は「可変ドメイン」は、抗原結合分子の抗原への結合に関与する、抗体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、各ドメインが4つの保存されたフレームワーク領域 (FR) 及び3つの超可変領域 (HVR) を含む、同様の構造を一般に有する。例えば、Kindt等、Kuby Immunology、第6版、W. H. Freeman and Co., p. 91 (2007)を参照されたい。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得る。

【0105】

本明細書で使用される用語「超可変領域」、又は「HVR」は、配列が超可変性である、及び／又は構造的に明確なループ（「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、超可変ループからの及び／又は「相補性決定領域」（CDR）からのアミノ酸残基を含み、CDRは、配列可変性が最も高い及び／又は抗原認識に関与するものである。例示的超可変ループは、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）に存在する。（Chothia及びLesk、J.Mol.Biol.196:901-917(1987)）。例示的CDR（CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2及びCDR-H3）は、L1のアミノ酸残基24-34、L2のアミノ酸残基50-56、L3のアミノ酸残基89-97、H1のアミノ酸残基31-35B、H2のアミノ酸残基50-65、及びH3のアミノ酸残基95-102に存在する。（Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第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）とも称され、これらの用語は、本明細書では抗原結合領域を形成する可変領域の部分に言及する際に同義で使用される。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）によって及びChothia等、J. Mol. Biol. 196:901-917（1987）によって記載されており、これらの文献における定義は、互いに比較したとき、アミノ酸残基の重複又はサブセットを含む。それでもなお、抗体又はその変異体のCDRに言及するためのどちらかの定義の適用は、本明細書中で定義され、使用されるこの用語の範囲内であると考えている。上記引用参考文献の各々によって定義されるCDRを包含する適切なアミノ酸残基を比較として下の表Aに記載する。特定のCDRを包含する正確な残基番号は、CDRの配列及びサイズによって変わることになる。当業者は、抗体の可変領域アミノ酸配列を考えれば、どの残基が特定のCDRを含むかを常套的に決定することができる。

表 A. CDR 定義¹

CDR	カバット	コチア	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中の全てのCDR定義の番号付けは、カバット等により記載された番号付け規定によるものである（下記参照）。

² 表A中で使用されている小文字「b」を伴う「AbM」は、Oxford Molecularの「AbM」抗体モデル化ソフトウェアによって定義されるようなCDRを指す。

【0106】

カバット等は、任意の抗体に適用することができる可変領域配列の番号付けシステムも定義した。当業者は、配列自体以外の何れの実験データにも頼らずに、「カバット番号付け」のこのシステムを任意の可変領域配列に明確に割り当てることができる。本明細書で使用される「カバット番号付け」は、Kabat等、U. S. Dept. of Health and Human Services、「Sequence of Protei

ns of Immunological Interest」(1983)によって記載された番号付けシステムを指す。別途定めがない限り、抗体可変領域内の特定のアミノ酸残基位置の番号付けへの言及は、カバット番号付けシステムによるものである。

【0107】

VH中のCDR1を除いて、CDRは、一般に、超可変ループを形成するアミノ酸残基を含む。CDRは、抗原と接触する残基である「特異性決定残基」、すなわち「SDR」も含む。SDRは、短縮CDR又はa-CDRと呼ばれる、CDRの領域内に含有される。例示的a-CDR(a-CDR-L1、a-CDR-L2、a-CDR-L3、a-CDR-H1、a-CDR-H2、及びa-CDR-H3)は、L1のアミノ酸残基31-34、L2のアミノ酸残基50-55、L3のアミノ酸残基89-96、H1のアミノ酸残基31-35B、H2のアミノ酸残基50-58、及びH3のアミノ酸残基95-102に存在する。(Almagro及びFransson, Front. Biosci. 13:1619-1633(2008)を参照されたい)。別途指示がない限り、可変ドメイン内のHVR残基及び他の残基(例えば、FR残基)は、本明細書では上掲のKabatt等に従って番号付けされる。

【0108】

抗原結合分子(例えば、抗体)に関連して本明細書で使用される用語「アフィニティー成熟した」は、親抗原結合分子から例えば突然変異によって誘導される抗原結合分子であって、親抗体と、同じ抗原と結合し、好ましくは同じエピトープと結合し、抗原に対して参照抗原結合分子のものより高いアフィニティーを有する抗原結合分子を指す。アフィニティー成熟は、一般に、抗原結合分子の1つ又は複数のCDR内の1つ又は複数のアミノ酸残基の修飾を含む。典型的に、アフィニティー成熟した抗原結合分子は、最初の親抗原結合分子と同じエピトープと結合する。

【0109】

「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、FR1、FR2、FR3及びFR4という4つのFRドメインからなる。したがって、HVR及びFR配列は、一般に、VH(又はVL)内に、FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4という配列で出現する。

【0110】

本明細書での「アクセプターヒトフレームワーク」は、下で定義されるような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、それらの同じアミノ酸配列を含むこともあり、又はある特定のアミノ酸配列変化を有することもある。一部の実施態様では、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。一部の実施態様では、VLアクセプターヒトフレームワークは、配列の点で、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同一である。

【0111】

用語「キメラ」抗体は、重鎖及び／又は軽鎖の一部が特定の源又は種に由来するが、その重鎖及び／又は軽鎖の残部が異なる源又は種に由来する抗体を指す。

【0112】

抗体の「クラス」は、その重鎖が有する定常ドメイン又は定常領域のタイプを指す。IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMという5つの主要抗体クラスがあり、これらのうちの幾つかは、さらに、サブクラス(アイタイプ)、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及びIgA2に分けることができる。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及び μ と呼ばれる。

【0113】

「ヒト化」抗体は、非ヒトHVRからのアミノ酸残基とヒトFRからのアミノ酸残基と

を含むキメラ抗体を指す。ある特定実施態様ではヒト化抗体は、HVR（例えば、CDR）の全て又は実質的に全てが非ヒト抗体のものに対応し、FRの全て又は実質的に全てがヒト抗体のものに対応する、少なくとも1つの、典型的には2つの、可変ドメインの実質的に全てを含むことになる。ヒト化抗体は、ヒト抗体に由来する抗体定常領域の少なくとも一部分を任意選択的に含んでいてもよい。抗体の、例えば非ヒト抗体の、「ヒト化形態」は、ヒト化を受けた抗体を指す。本発明により包含される「ヒト化抗体」の他の形態は、定常領域を、元の抗体の定常領域から、本発明による特性、特に、C1q結合及び／又はFc受容体（FcR）結合に関する特性を生じさせるようにさらに修飾又は変化させたものである。

【0114】

「ヒト」抗体は、ヒト若しくはヒト細胞によって産生される抗体のアミノ酸配列に対応する、又はヒト抗体レパートリーを用いる若しくはヒト抗体をコードする他の配列を用い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、厳密に言えば、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を除外する。

【0115】

本明細書での用語「Fcドメイン」又は「Fc領域」は、定常領域の少なくとも一部分を含有する抗体重鎖の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Fc領域を含む。IgG Fc領域は、IgG CH2及びIgG CH3ドメインを含む。ヒトIgG Fc領域の「CH2ドメイン」は、通常、約231位のアミノ酸残基から約340位のアミノ酸残基にわたる。一実施態様では、糖鎖がCH2ドメインに結合している。本明細書でのCH2ドメインは、天然配列CH2ドメインであってもよく、又は変異CH2ドメインであってもよい。「CH3ドメイン」は、C末端のFc領域内のCH2ドメインへの（すなわち、IgGの約341位のアミノ酸残基から約447位のアミノ酸残基への）残基のストレッチを含む。本明細書でのCH3領域は、天然配列CH3ドメインであってもよく、変異CH3ドメイン（例えば、その一方の鎖内に「突出部」（「ノブ」）が導入されており、その他方の鎖に相応じて「空洞」（「ホール」）が導入されているCH3；本明細書に参照により明確に援用される米国特許第5821333号を参照されたい）であってもよい。そのような変異CH3ドメインを使用して、掘明細書に記載の2つの非同一抗体重鎖のヘテロ二量体化を促進することができる。一実施態様では、ヒトIgG重鎖Fc領域は、Cys226から又はPro230から、重鎖のカルボキシル末端にわたる。しかし、Fc領域のC末端リジン（Lys447）が存在してもよく、又は存在しなくてもよい。本明細書中で別途定めがない限り、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、第5版、Public Health Service、National Institutes of Health、Bethesda、MD、1991に記載されているような、EUインデックスとも呼ばれる、EU番号付けシステムによるものである。

【0116】

「ノブイントゥーホール」（kih）技術は、例えば、米国特許第5731168号、米国特許第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、突出部を空洞内に配置してヘテロ二量体形成を促進すること及びホモ二量体形成を妨げることができるように、第1のポリペプチドの接触面に突出部（「ノブ」）を、及び第2のポリペプチドの接触面に対応する空洞（「ホール」）を導入することを含む。突出部は、第1のポリペプチドの接触面からの小さいアミノ酸側鎖をより大きい側鎖（例えば、チロシン又はトリプトファン）で置換することにより構築される。大きい側鎖をより小さい側鎖（例えば、アラニン又はスレオニン）で置換することにより、突出部と同一又は同様のサイズの代償的「空洞」が第2の抗体の境界面に作出される。突出部及び空洞は、ポリペプチドをコードする核酸を例えば部位

10

20

30

40

50

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することによって、作製することができる。具体的実施態様では、ノブ修飾は、Fcドメインの2つのサブユニット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2つのサブユニットの他方にアミノ酸置換T366S、L368A及びY407Vを含む。さらなる具体的実施態様では、ノブ修飾を含むFcドメインのサブユニットは、アミノ酸置換S354Cをさらに含み、ホール修飾を含むFcドメインのサブユニットは、アミノ酸置換Y349Cをさらに含む。これら2つのシステイン残基の導入により、Fc領域の2つサブユニット間にジスルフィド架橋が形成され、かくてダイマーがさらに安定化される結果となる(Carter、J Immunol Methods 248、7-15(2001))。この番号付けは、Kabatt等、「Sequences of Proteins of Immunological Interest」、第5版、Public Health Service、National Institutes of Health、Bethesda、MD、1991のEUIンデックスによるものである。

【0117】

「免疫グロブリンのFc領域と同等の領域」は、免疫グロブリンのFc領域の天然に存在する対立遺伝子変異体はもちろん、置換、付加又は欠失を生じさせる改変だが免疫グロブリンのエフェクター機能を媒介する能力(例えば、抗体依存性細胞傷害)を実質的に低下させない改変を有する変異体も含むことを意図したものである。例えば、生物学的機能を実質的に失うことなく、1つ又は複数のアミノ酸を免疫グロブリンの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。当該技術分野で公知の一般的規則に従って、活性に対してわずかな影響しか及ぼさないような変異体を選択することができる(例えば、Bowie、J. U.等、Science 247:1306-10(1990)を参照されたい)。

【0118】

用語「エフェクター機能」は、抗体アイソタイプによって異なる、抗体のFc領域に起因する生物活性を指す。抗体エフェクター機能の例としては、C1q結合及び補体依存性細胞傷害(CDC)、Fc受容体結合、抗体依存性細胞介在性細胞傷害(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)の発現低下、及びB細胞活性化が挙げられる。

【0119】

「活性化Fc受容体」は、抗体のFc領域による会合を受けてエフェクター機能を果たすように受容体保有細胞を刺激するシグナル伝達事象を惹起するFc受容体である。活性化Fc受容体としては、FcγRIIIa(CD16a)、FcγRI(CD64)、FcγRIIa(CD32)、及びFcαRI(CD89)が挙げられる。特定の活性化Fc受容体は、ヒトFcγRIIIaである(UniProt寄託番号P08637、バージョン141を参照されたい)。

【0120】

用語「TNFリガンドファミリーメンバー」又は「TNFファミリーリガンド」は、炎症誘発性サイトカインを指す。一般に、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極めて重要な役割を果たす。現在、配列、機能及び構造の類似性に基づいて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19のサイトカインが同定されている。これら全てのリガンドは、C末端細胞外ドメイン(エクトドメイン)とN末端細胞内ドメインと単一の膜貫通ドメインとを有するII型膜貫通タンパク質である。TNF相同ドメイン(THD)として公知の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%アミノ酸同一性を有し、受容体との結合に関与する。TNFエクトドメインは、TNFリガンドによるそれらの特異的受容体により認識されるトリマー複合体の形成にも関与する。

【0121】

TNFリガンドファミリーのメンバーは、リンホトキシンα(別名LTA又はTNFSF1)、TNF(別名TNFSF2)、LTβ(別名TNFSF3)、OX40L(別名

10

20

30

40

50

TNFSF4)、CD40L(別名CD154又はTNFSF5)、FasL(別名CD95L、CD178又はTNFSF6)、CD27L(別名CD70又はTNFSF7)、CD30L(別名CD153又はTNFSF8)、4-1BBL(別名TNFSF9)、TRAIL(別名APO2L、CD253又はTNFSF10)、RANKL(別名CD254又はTNFSF11)、TWEAK(別名TNFSF12)、APRIL(別名CD256又はTNFSF13)、BAFF(別名CD257又はTNFSF13B)、LIGHT(別名CD258又はTNFSF14)、TL1A(別名VEGI又はTNFSF15)、GITRL(別名TNFSF18)、EDA-A1(別名エクトジスプラシンA1)及びEDA-A2(別名エクトジスプラシンA2)からなる群から選択される。この用語は、別途指示がない限り、霊長類(例えば、ヒト)、非霊長類(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)等の哺乳動物を含む任意の脊椎動物源からの任意の天然TNFファミリーリガンドを指す。本発明の具体的実施態様では、TNFリガンドファミリーメンバーは、OX40L、FasL、CD27L、TRAIL、4-1BBL、CD40L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。【0122】

TNFリガンドファミリーメンバーのさらなる情報、特に配列は、UniProt(www.uniprot.org)等の公的にアクセス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寄託番号P01374、配列番号203)、ヒトTNF(UniProt寄託番号P01375、配列番号204)、ヒトリンホトキシン β (UniProt寄託番号Q06643、配列番号205)、ヒトOX40L(UniProt寄託番号P23510、配列番号206)、ヒトCD40L(UniProt寄託番号P29965、配列番号207)、ヒトFasL(UniProt寄託番号P48023、配列番号208)、ヒトCD27L(UniProt寄託番号P32970、配列番号209)、ヒトCD30L(UniProt寄託番号P32971、配列番号210)、4-1BBL(UniProt寄託番号P41273、配列番号211)、TRAIL(UniProt寄託番号P50591、配列番号212)、RANKL(UniProt寄託番号O14788、配列番号213)、TWEAK(UniProt寄託番号O43508、配列番号214)、APRIL(UniProt寄託番号O75888、配列番号215)、BAFF(UniProt寄託番号Q9Y275、配列番号216)、LIGHT(UniProt寄託番号O43557、配列番号217)、TL1A(UniProt寄託番号O95150、配列番号218)、GITRL(UniProt寄託番号Q9UNG2、配列番号219)及びエクトジスプラシンA(UniProt寄託番号Q92838、配列番号220)。

【0123】

「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)にわたる膜タンパク質のドメインである。エクトドメインは、通常は、シグナル伝達をもたらす表面との接触を開始させるタンパク質の一部である。したがって、本明細書中で定義されるTNFリガンドファミリーメンバーのエクトドメインは、細胞外空間にわたるTNFリガンドタンパク質の一部(細胞外ドメイン)を指すが、三量体化及び対応するTNF受容体との結合に関与するそのより短い部分又は断片も含む。したがって、用語「TNFリガンドファミリーメンバーのエクトドメイン又はその断片」は、細胞外ドメインを形成するTNFリガンドファミリーメンバーの細胞外ドメインを指すか、又は受容体となお結合することができるその一部(受容体結合ドメイン)を指す。

【0124】

用語「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」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。TNFファミリーリガンドは、それらの対応するTNF受容体との相互作用によりTCRシグナルを共刺激することができ、それら

の受容体との相互作用は、T細胞を活性化する結果となるシグナル伝達カスケードを開始させるTNFR関連因子の動員をもたらす。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、より特に、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。

【0125】

上文で説明したように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1メンバーである。配列番号212のアミノ酸配列を有する完全又は完全長4-1BBLは、細胞の表面でトリマーを形成すると記載されている。トリマーの形成は、4-1BBLのエクトドメインの特異的輸送性によって可能になる。前記輸送性は、ここでは「三量体化領域」に指定される。ヒト4-1BBL配列（配列番号180）のアミノ酸50-254は、4-1BBLの細胞外ドメインを形成するが、その断片でさえトリマーを形成することができる。本発明の具体的実施態様では、用語「4-1BBLのエクトドメイン又はその断片」は、配列番号175（ヒト4-1BBLのアミノ酸52-254）、配列番号172（ヒト4-1BBLのアミノ酸71-254）、配列番号174（ヒト4-1BBLのアミノ酸80-254）及び配列番号173（ヒト4-1BBLのアミノ酸85-254）から選択されるアミノ酸を有するポリペプチド、又は配列番号183（ヒト4-1BBLのアミノ酸71-248）、配列番号194（ヒト4-1BBLのアミノ酸52-248）、配列番号193（ヒト4-1BBLのアミノ酸80-248）及び配列番号192（ヒト4-1BBLのアミノ酸85-248）から選択されるアミノ酸を有するポリペプチドを指すが、四量体化することができるエクトドメインの他の断片もここに含まれる。

【0126】

上文で説明したように、OX40Lは、もう1つのタイプのII型膜貫通タンパク質であり、TNFリガンドファミリーのさらなるメンバーである。完全又は完全長OX40Lは、配列番号206のアミノ酸配列を有する。ヒトOX40L配列（配列番号181）のアミノ酸51-183は、OX40Lの細胞外ドメインを形成するが、その断片でさえトリマーを形成することができる。本発明の具体的実施態様では、用語「OX40Lのエクトドメイン又はその断片」は、配列番号181（ヒトOX40Lのアミノ酸51-183）又は配列番号182（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、三量体化することができるエクトドメインの他の断片もここに含まれる。

【0127】

用語「ペプチドリンカー」は、1つ又は複数のアミノ酸、典型的には約2から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、当該技術分野で公知であり、又は本明細書で説明される。好適な非免疫原性リンカーペプチドは、例えば、 $(G_4S)_n$ 、 $(SG_4)_n$ 又は $G_4(SG_4)_n$ ペプチドリンカー（ここで、「n」は、一般に1と10の間の数、典型的には1と4の間の数、特に2である）であり、すなわち、GGGG（配列番号162）、GGGGSGGGG（配列番号150）、SGGGGSGGGG（配列番号151）及びGGGGSGGGGSGGGG（配列番号152）からなる群から選択されるペプチドであるが、配列GSPGSSSSGS（配列番号153）、GSGSGSGS（配列番号154）、GSGSGNGS（配列番号155）、GSGSGSGS（配列番号156）、GSGSGS（配列番号157）、GSGS（配列番号158）、GSGSGNGSG（配列番号159）、GGNGSGSG（配列番号160）及びGGNGSG（配列番号149）も含む。特に興味深いペプチドリンカーは、 $(G_4S)_1$ 、すなわち、GGGG（配列番号162）、 $(G_4S)_2$ 、すなわち、GGGGSGGGG（配列番号150）、及びGSPGSSSSGS（配列番号153）であり、より特に、 $(G_4S)_2$ 、すなわち、GGGGSGGGG（配列番号150）、及びGSPGSSSSGS（配列番号153）である。

【0128】

本願の中で使用される用語「アミノ酸」は、アラニン（3文字表記：a l a、1文字表記：A）、アルギニン（a r g、R）、アスパラギン（a s n、N）、アスパラギン酸（a s p、D）、システイン（c y s、C）、グルタミン（g l n、Q）、グルタミン酸（g l u、E）、グリシン（g l y、G）、ヒスチジン（h i s、H）、イソロイシン（i l e、I）、ロイシン（l e u、L）、リジン（l y s、K）、メチオニン（m e t、M）、フェニルアラニン（p h e、F）、プロリン（p r o、P）、セリン（s e r、S）、スレオニン（t h r、T）、トリプトファン（t r p、W）、チロシン（t y r、Y）、及びバリン（v a l、V）を含む、天然に存在するカルボキシ α -アミノ酸の群を示す。

【0129】

本明細書で使用される「単鎖融合タンパク質」は、抗原結合部分の一部又はFc部分に融合されている前記TNFリガンドファミリーの1つ又は2つのエクトドメインから構成されている単鎖ポリペプチドを指す。この融合は、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によって前記TNFリガンドファミリーメンバーのエクトドメインのC又はN末端アミノ酸に直接的に連結させることにより行うことができる。

【0130】

「融合されている」又は「接続されている」とは、成分（例えば、前記TNFリガンドファミリーメンバーのポリペプチド及びエクトドメイン）が、ペプチド結合により、直接的に又は1つ若しくは複数のペプチドリンカーによって連結されていることを意味する。

【0131】

参照ポリペプチド（タンパク質）配列に対する「パーセント（%）アミノ酸配列同一性」は、配列をアラインし、必要に応じて、最大パーセントの配列同一性を達成するようにギャップを導入した後の、いかなる保存的置換も配列同一性の一部とみなさない、参照ポリペプチド配列中のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセンテージと定義する。パーセントアミノ酸配列同一性の決定を目的とするアラインメントは、当該技術分野での技能の範囲内である様々な方法で、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN、SAWI又はMegalign（DNSTAR）ソフトウェア等の、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、果たすことができる。当業者は、比較される配列の完全長にわたって最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、配列のアラインメントに適しているパラメータを決定することができる。しかし、本明細書では、%アミノ酸配列同一性値は、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、Genentech, Inc.の著作物であり、ソースコードは、米国著作権局、Washington D. C.、20559にユーザー文書と共に出願され、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、Genentech, Inc.、South San Francisco、Californiaから公的に入手可能であり、又はALIGN-2プログラムをソースコードからコンパイルしてもよい。ALIGN-2プログラムを、デジタルUNIX V4.0Dを含むUNIX操作システムでの使用用にコンパイルしたほうがよい。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、変わらない。ALIGN-2がアミノ酸配列比較に利用される状況では、所与のアミノ酸配列Bに対しての、それとの、又はそれに対する所与のアミノ酸配列Aの%アミノ酸同一性（或いは、所与のアミノ酸配列Bに対しての、それとの、又はそれに対するある特定の%アミノ酸配列同一性を有する又は含む所与のアミノ酸配列Aと表現することができる）は、次のように算出される：

$$100 \times \text{分数 } X / Y$$

（ここで、Xは、配列アラインメントプログラムALIGN-2により該プログラムのAとBのアラインメントで同一マッチとしてスコアされるアミノ酸残基の数であり、Yは、B中のアミノ酸残基の総数である）。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さと同じでない場合、AのBに対しての%アミノ酸配列同一性が、BのAに対しての%アミノ酸配列同一性と同一にならないことは理解されるであろう。別途特に指定のない限り、本明細書で使用される全ての%アミノ酸同一性は、ALIGN-2コンピュータプログラムを使

10

20

30

40

50

用して直ぐ前の段落で説明したように得たものである。

【 0 1 3 2 】

ある特定の実施態様では、本明細書で提供される T N F リガンドトリマー含有抗原結合分子の「アミノ酸配列変異体」が企図される。例えば、T N F リガンドトリマー含有抗原結合分子の結合フィニティー及び／又は他の生物学的特性を向上させることが望ましいこともある。T N F リガンドトリマー含有抗原結合分子のアミノ酸配列変異体は、当該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。そのような修飾としては、例えば、抗体のアミノ酸配列からの残基の欠失、及び／又はアミノ酸配列への残基の挿入、及び／又はアミノ酸配列内の残基の置換が挙げられる。最終コンストラクトが所望の特性、例えば、抗原結合を有するのであれば、欠失、挿入及び置換をどのように組み合わせて最終コンストラクトに達してもよい。置換突然変異の対象となる部位としては、H V R 及びフレームワーク (F R) が挙げられる。保存的置換は、表 B 中の「好ましい置換」という見出しの下に提供され、アミノ酸側鎖クラス (1) から (6) に関して下でさらに説明される。目的の分子にアミノ酸置換を導入し、それらの産物を所望の活性、例えば、抗原結合の保持／向上、免疫原性の低下、又は A D C C 若しくは C D C の向上についてスクリーニングすることができる。

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

【0133】

アミノ酸を共通側鎖特性に従って分類することができる：

- (1) 疎水性：ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile、
- (2) 中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln、
- (3) 酸性：Asp、Glu、
- (4) 塩基性：His、Lys、Arg、
- (5) 鎖配向に影響を及ぼす残基：Gly、Pro、
- (6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe。

【0134】

非保存的置換は、これらのクラスのうちの1クラスのメンバーを別のクラスと交換することを必然的に伴うことになる。

【0135】

用語「アミノ酸配列変異体」は、親抗原結合分子（例えば、ヒト化又はヒト抗体）の1つ又は複数の超可変領域残基のアミノ酸置換がある実質的変異体を含む。一般に、さらなる研究に選択される、結果として得られる変異体は、親抗原結合分子と比較してある特定の生物学的特性の修飾（例えば、向上）（例えば、フィニティー増大、免疫原性低下）を有することになり、及び／又は親抗原結合分子のある特定の生物学的特性を実質的に保持していることになる。例示的な実質的変異体は、アフィニティー成熟した抗体であり、この抗体は、例えば、ファージディスプレイに基づくアフィニティー成熟手法、例えば本明細書に記載の手法を使用して生成することができる。簡単に言うと、1つ又は複数のHVR残基を突然変異させ、変異抗原結合分子をファージ上に提示させ、特定の生物活性（例えば、結合フィニティー）についてスクリーニングする。ある特定の実施態様では、置換、挿入又は欠失を、そのような改変が、抗原に結合する抗原結合分子の能力を実質的に低下させないのであれば、1つ又は複数のHVR内で行うことができる。例えば、結合アフィニティーを実質的に低下させない保存的改変（例えば、本明細書で提供されるような保存的置換）をHVR内で行うことができる。突然変異誘発の標的となり得る抗体の残基又は領域の有用な同定方法は、Cunningham及びWells（1989）Science、244：1081-1085により記載されているように、「アラニンスキャンニング突然変異誘発」と呼ばれる。この方法では、標的残基（例えば、荷電残基、例えばArg、Asp、His、Lys及びGlu）の残基又は群が同定され、中性又は負荷電アミノ酸（例えば、アラニン又はポリアラニン）に置換され、それによって、抗体と抗原の相互作用が影響を受けるかどうか判定される。最初の置換に対する官能基の感受性を立証するために、さらなる置換がアミノ酸位置に導入してもよい。或いは、又は加えて、抗体と抗原間の接点を同定するために、抗原-抗原結合分子複合体の結晶構造。そのような接触残基及び隣接残基を置換の候補として、標的にしてもよく、又は除去してもよい。変異体をスクリーニングして、それらが所望の特性を含有するかどうかを判定してもよい。

【0136】

アミノ酸配列挿入は、1残基から100以上の残基を含有するポリペプチドまで長さに幅があるアミノ及び／又はカルボキシル末端融合、並びに単一の又は複数のアミノ酸残基の配列内挿入を含む。末端挿入の例としては、N末端メチオニル残基を有するTNFリガンドトリマー含有抗原結合分子が挙げられる。分子の他の挿入変異体は、TNFファミリーリガンドトリマー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又はC末端の融合を含む。

【0137】

ある特定の実施態様では、本明細書で提供されるTNFファミリーリガンドトリマー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、1つ又は複数のグリコシル化部位が作出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り得ることができる。TNFリガンドトリマー含有抗原結合分子がFc領域を含む場合、それに結合している糖を改変してもよい。哺乳動物細胞により産生される天然抗体は、N結合によりFc領域のCH2ドメインのAsn

10

20

30

40

50

297に一般に結合されている分岐した、二分岐オリゴ糖を概して含む。例えば、Wright等、TIBTECH 15:26-32 (1997)を参照されたい。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」の中のGlcNAcに結合しているフコースを含み得る。一部の実施態様では、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子中のオリゴ糖の修飾を行って、ある特定の向上した特性を有する変異体を作成することができる。一態様では、Fc領域に（直接的又は間接的に）結合しているフコースを欠く糖鎖構造を有する、TNFファミリーリガンドトリマー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、向上したADCC機能を有し得る。例えば、米国特許公開番号・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)を参照されたい。本発明のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子のさらなる変異体としては、例えば、Fc領域に結合している二分岐オリゴ糖が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挙げられる。そのような変異体は、フコシル化の低下及び／又はADCC機能の向上を有することができる。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)を参照されたい。Fc領域に結合しているオリゴ糖内に少なくとも1つのガラクトース残基を有する変異体も提供される。そのような抗体変異体は、CDCの機能向上を有することができ、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。

【0138】

ある特定の態様では、本発明のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子のシステイン操作変異体、例えば、当該分子の1つ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」を作成することが望ましいこともある。特定の実施態様では、置換される残基は、分子の到達可能な部位に存在する。それらの残基をシステインで置換することにより、その結果として反応性チオール基は抗体の到達可能な部位に位置し、それを使用して抗体を他の部分、例えば、薬物部分又はリンカー-薬物部分にコンジュゲートさせて、イムノコンジュゲートを作成することができる。ある特定の実施態様では、次の残基の何れか1つ又は複数をシステインで置換することができる：軽鎖のV205 (カバット番号付け)、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生成することができる。

【0139】

ある特定の態様では、本明細書で提供されるTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子は、当該技術分野で公知であり、容易に入手することができるさらなる非タンパク質性部分を含有するように、さらに修飾することができる。抗体の誘導体化に好適な部分には、水溶性ポリマーが含むが、これらに限定されない。水溶性ポリマーの非限定的な例としては、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共重合体、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／無水マレイン酸共重合体、ポリアミノ酸 (ホモポリマー又はランダム共重合体のどちらか)、及びデキストラン又はポリ (n-ビニルピロリドン) ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド／エチレンオキシド共重合体、ポリオキシエチル化ポリオール (例えば、グリセロール)、ポリビニルアルコール、並びにこれらの混合物が挙げられるが、それらに限定されない。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは、水中でのその安定のため、製造において有利であり得る。ポリマーは、何れの分子量のものであってもよく、及び分岐していてもよく、又は分岐していなくてもよい。抗体に結合しているポリマーの数は様々であってよく、1つよ

り多くのポリマーが結合している場合、それらは、同じ分子であってもよく、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／又はタイプは、これらに限定されないが、抗体の向上させるべき特定の特性又は機能、抗体誘導体が定義された条件下で治療に使用されることになるかどうか等を含む、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り選択的に加熱することができる、抗体と非タンパク質性部分のコンジュゲートが提供される。一実施態様では、非タンパク質性部分は、カーボンナノチューブ (Kam, N.W.等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102(2005) 11600-11605) である。放射線は、何れの波長のものであってもよく、抗体-非タンパク質性部分の近位にある細胞が殺滅される温度に非タンパク質性部分を加熱するが通常の細胞を害さない波長を含むが、これに限定されない。

10

【0140】

別の態様では、本明細書で提供されるTNFファミリーリガンドトリマー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」は、細胞傷害性剤を含むがこれに限定されない1つ又は複数の異種分子にコンジュゲートしている抗体である。

【0141】

「異種間反応性」は、ある特定の抗体が抗体のそれぞれの標的抗原と特異的に結合できることを指し、ここで前記標的抗原は、異なる種 (例えば、ヒト、マウス、カニクイザル等) に由来し得る。異種間反応性抗体は、少なくとも2つの異なる種に由来するそのそれぞれの標的抗原と約1 μ M未満、好ましくは約100 nM未満、より好ましくは約10 nM未満、より好ましくは約5 nM未満、最も好ましくは約2 nM未満の K_D 値で結合する。用語「少なくとも2つの異なる種に由来するそのそれぞれの標的抗原と~未満の K_D 値で結合する」は、それぞれの抗体が、指定された種の各々に由来する標的抗原と、指定された K_D 値未満の解離定数 K_D で結合することを意味する。好ましい実施態様では、異種間反応性抗体は、指定された全ての種からの標的抗原と、同様のアフィニティーで、好ましくは、10 nMから0.1 nM、より好ましくは5 nMから0.1 nM、最も好ましくは2 nMから0.1 nMの K_D 範囲内で結合する。一部の実施態様では、数種に由来する抗原に対する同様のアフィニティーは、目的の全ての種に対して狭い K_D 範囲内 (例えば、10 nMから0.1 nMの範囲内又はそれより狭い範囲内) での標的抗原の結合を意味し、例えば、ヒト疾患の診断アッセイ又は動物モデルに有利である。さらに好ましい実施態様では、異種間反応性抗体は、指定された全ての種 (例えば、ヒト、マウス及びカニクイザル) からの標的抗原と、同様のアフィニティーで、特に、100倍の K_D 範囲内、50倍の K_D 範囲内、20倍の K_D 範囲内、10倍の K_D 範囲内、5倍の K_D 範囲内で結合する。好ましい実施態様では、異種間反応性抗体は、ヒト、マウス及びカニクイザルからの標的抗原と、同様のアフィニティーで、特に10倍の K_D 範囲内で結合する。明確にするために言えば、異種間反応性抗体は、指定された他の種と比較して最も高いアフィニティーを有する指定された種の1つと結合する。したがって、異種間反応性抗体は、指定された他の種と比較して最も低いアフィニティーを有する指定された種の1つと結合する。定義された倍数Xの K_D 範囲内とは、最高のアフィニティーを有する指定された種に対するアフィニティーが、最低のアフィニティーを有する指定された種に対するアフィニティーのX倍以下であることを意味する。言い換えると、最低のアフィニティーを有する指定された種の K_D 値は、最高のアフィニティーを有する指定された種の K_D 値のX分の1以下である。指定された全ての種の K_D 測定に同じ条件が適用されるのであれば、何れのアフィニティー又はアビディティー測定方法を使用して、異種間反応性抗体が、指定された全ての種からの標的抗原と本明細書に記載の所与の K_D 倍数範囲内で結合することを検証してもよいことは、明らかである。好ましくは、 K_D 値は、SPRを使用して、特に25°Cで測定される。好ましくは、アフィニティーは、異種間反応性抗体をFab断片として使用して測定される。

20

30

40

【0142】

用語「ポリヌクレオチド」は、単離された核酸分子又はコンストラクト、例えば、メッ

50

センジャーRNA (mRNA)、ウイルス由来RNA、又はプラスミドDNA (pDNA) を指す。ポリヌクレオチドは、通常ホスホジエステル結合を含むこともあり、又は通常のものでない結合（例えば、ペプチド核酸 (PNA) において見られるもの等のアミド結合）を含むこともある。用語「核酸分子」は、ポリヌクレオチド中に存在する任意の1つ又は複数の核酸セグメント、例えば、DNA又はRNA断片を指す。

【0143】

「単離された」核酸分子又はポリヌクレオチドは、その天然の環境から取り出された核酸分子、DNA又はRNAを意図したものである。例えば、ベクターに含有されてい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、本発明では単離されたものとみなされる。単離されたポリヌクレオチドのさらなる例としては、異種宿主細胞内に維持されている組換えポリヌクレオチド、又は溶解状態の（部分的に若しくは実質的に）精製されたポリヌクレオチドが挙げられる。単離された核酸は、そのポリヌクレオチド分子を元々含有する細胞に含有されているポリヌクレオチド分子を含むが、ポリヌクレオチド分子は、染色体外に存在するか、又はその自然な染色体位置とは異なる染色体位置に存在する。単離されたRNA分子は、本発明のインビボ又はインビトロRNA転写物はもちろん、プラス及びマイナス鎖形態、並びに二本鎖形態も含む。本発明による単離されたポリヌクレオチド又は核酸は、合成により産生されたそのような分子をさらに含む。加えて、ポリヌクレオチド又は核酸は、調節エレメント、例えば、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を含むこともあり、又は含まないこともある。

【0144】

本発明の参照ヌクレオチド配列と少なくとも例えば95%「同一の」ヌクレオチド配列を有する核酸又はポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチド配列が参照ヌクレオチド配列のヌクレオチド100個毎に5つ以下の点突然変異を含み得ることを除いて、ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が参照配列と同一であることを意図したものである。言い換えると、参照ヌクレオチド配列と少なくとも95%同一の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、参照配列中のヌクレオチドの5%以下を欠失させてもよく、若しくは別のヌクレオチドで置換してもよく、又は参照配列中の全ヌクレオチドの5%以下の数のヌクレオチドを参照配列に挿入してもよい。参照配列のこれらの改変を、参照ヌクレオチド配列の5'又は3'末端位置で行ってもよく、或いは参照配列内の残基又は参照配列内の1つ若しくは複数の近接する基内の残基間に個々に散在する、これらの末端位置の間のどこで行ってもよい。実際問題として、何れかの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、公知のコンピュータプログラム、例えば、ポリペプチドについて上で論じたもの（例えばALIGN-2）を使用して従来通りに決定することができる。

【0145】

用語「発現カセット」は、標的細胞内での特定の核酸の転写を可能にする一連の指定核酸エレメントを有する、組換えにより又は合成により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をプラスミド、染色体、ミトコンドリアDNA、プラスミドDNA、ウイルス、又は核酸断片に組み込むことができる。典型的に、発現ベクターの組換え発現カセット部分は、数ある配列の中でも特に、転写すべき核酸配列、及びプロモーターを含む。ある特定の実施態様では、本発明の発現カセットは、本発明の二重特異性抗原結合分子をコードするポリヌクレオチド配列又はそれらの断片を含む。

【0146】

用語「ベクター」又は「発現ベクター」は、「発現コンストラクト」と同義であり、作動可能に結合されている特定の遺伝子を標的細胞に導入し、その標的細胞内でのその遺伝子の発現を指示する、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はもちろん、導入された宿主細胞のゲノムに組み込まれたベクターも含む。本発明の発現ベクターは、発現カセットを含む。発現ベクターは、大量の安定したmRNAの転写を可能にする。発現ベクターが標的細胞の内部に入ると、遺伝子によりコードされているリ

ボ核酸分子又はタンパク質が、細胞の転写及び／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れらの断片を含む、発現カセットを含む。

【0147】

用語「宿主細胞」、「宿主細胞株」及び「宿主細胞培養物」は、同義で使用され、外来性核酸が導入された細胞を、そのような細胞の子孫を含めて、含む。宿主細胞は、「形質転換体」及び「形質転換細胞」を含み、これらには、初代形質転換細胞、及び継代数を問わずそれらに由来する子孫が含まれる。子孫は、核酸含有量の点で親細胞と完全に同一でないこともあり、突然変異を含有することもある。最初に形質転換された細胞の中でスクリーニング又は選択されたのと同じ機能又は生物学的活性を有する変異体子孫が、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生成するために使用することができる任意のタイプの細胞システムである。宿主細胞には、培養細胞、例えば、ほんの数例を挙げれば、CHO細胞、BHK細胞、NSO細胞、SP2/O細胞、YO骨髓腫細胞、P3X63マウス骨髓腫細胞、PER細胞、PER.C6細胞又はハイブリドーマ細胞等の、哺乳動物培養細胞、酵母細胞、昆虫細胞及び植物細胞が含まれるが、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若しくは動物組織内に含まれている細胞も含まれる。

10

【0148】

薬剤の「有効量」は、その薬剤が投与される細胞又は組織に生理的变化をもたらすために必要な量を指す。

20

【0149】

薬剤、例えば薬学的組成物の「治療有効量」は、必要な投薬量で、必要な期間にわたって、所望の治療又は予防結果を達成するために、有効な量を指す。薬剤の治療有効量は、例えば、疾患の有害作用を除去する、減少させる、遅延させる、最小にする、又は予防する。

【0150】

「個体」又は「対象」は、哺乳動物である。哺乳動物としては、家畜（例えば、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ及びウマ）、霊長類（例えば、ヒト及び非ヒト霊長類、例えばサル）、ウサギ、及びげっ歯類（例えば、マウス及びラット）が挙げられるが、これらに限定されない。特定の場合、個体又は対象はヒトである。

30

【0151】

用語「薬学的組成物」は、含有する活性成分の生物活性が有効であることを可能にするような形態である調製物であって、その製剤が投与されることになる対象にとって許容できないほど毒性であるさらなる成分を含有しない調製物を指す。

【0152】

「薬学的に許容される添加添加剤」は、薬学的組成物中の活性成分以外の成分であって、対象にとって非毒性である成分を指す。薬学的に許容される添加剤としては、バッファ、安定剤又は防腐剤が挙げられるが、これらに限定されない。

【0153】

用語「添付文書」は、治療用製品の市販のパッケージの中に通例含まれている説明書であって、そのような治療用製品に関する適応症、用法、投薬量、投与、併用療法、禁忌及び／又は警告についての情報を含む説明書を指すために使用される。

40

【0154】

本明細書で使用される「治療」（及び「治療する」又は「治療すること」等の文法上の語尾変化形）は、治療を受ける個体の自然な経過を改変しようとする臨床的介入を指し、予防のために行われることもあり、又は臨床病理検査の過程において行われることもある。治療の望ましい効果としては、疾患の発生又は再発の予防、症候の緩和、疾患の任意の直接的又は間接的病理学的帰結の減少、転移の予防、疾患進行速度の低下、病態の改善又は緩和、及び寛解又は予後の改善が挙げられるが、これらに限定されない。一部の実施態様では、本発明の分子は、疾患の発症を遅延させるために、又は疾患の進行を緩徐化する

50

ために使用される。

【0155】

本明細書で使用される用語「がん」は、増殖性疾患、例えば、リンパ腫、がん、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、細気管支肺胞上皮細胞肺がん、骨がん、膵臓がん、皮膚がん、頭部又は頸部のがん、皮膚又は眼内黒色腫、子宮がん、卵巣がん、直腸がん、肛門部がん、胃がん（stomach cancer、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、卵管がん、子宮内膜がん、子宮頸がん、膣がん、外陰がん、ホジキン病、食道がん、小腸がん、内分泌系のがん、甲状腺がん、副甲状腺がん、副腎がん、軟組織肉腫、尿道がん、陰茎がん、前立腺がん、膀胱がん、腎臓又は尿管のがん、腎細胞がん、腎盂がん、中皮腫、肝細胞がん、胆道がん、中枢神経系（中枢神経系）の腫瘍、脊椎腫瘍、脳幹神経膠腫、多形神経膠芽腫、星状細胞腫、シュワン腫、上衣腫、髄芽腫、髄膜腫、扁平上皮がん、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）、慢性リンパ球性白血病（CLL）、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、ヘアリー細胞白血病、慢性骨髄芽球性白血病を、上記のがんの何れかについての難治性型、又は上記のがんの1つ若しくは複数についての組合せを含めて指す。

10

【0156】

組成物及び方法

テネイシンC（Tn C）の選択的スプライシングを受けた異なるアイソフォームは、ある特定の病的状態で特異的に発現されるが健康成人組織には本質的に存在せず、したがって、Tn C標的抗原結合分子には大きな治療上の可能性がある。本発明は、生産性、安定性、結合アフィニティー、生物活性、標的指向化効率、及び毒性低下等の、特に有利な特性を有する、新規TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子を提供する。本発明は、Tn Cと結合する抗原結合分子、特に、アフィニティー及び異種間反応性が向上した抗原結合分子を、さらに提供する。本発明の抗原結合分子は、例えば、Tn Cの発現を特徴とする疾患、例えばがんの診断又は治療に、有用である。

20

【0157】

一態様では、標的細胞抗原がテネイシンC（Tn C）である、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子が提供される。さらなる態様では、本発明は、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子であって、

30

（a）テネイシンC（Tn C）と特異的に結合することができる少なくとも1つの部分と、
（b）ジスルフィド結合により互いに連結されている第1及び第2のポリペプチドとを含み、

第1のポリペプチドが、ペプチドリンカーにより互いに接続されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクドメイン又はそれらの2つの断片を含むこと、及び第2のポリペプチドが、前記TNFリガンドファミリーメンバーの1つだけのエクドメイン又はその断片を含むことを特徴とする抗原結合分子を提供する。

【0158】

特定の態様では、本発明は、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子であって、

40

（a）Tn Cと特異的に結合することができる少なくとも1つの部分と、
（b）ジスルフィド結合により互いに連結されている第1及び第2のポリペプチドとを含み、

第1のポリペプチドが、ペプチドリンカーにより互いに接続されている、TNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクドメイン又はそれらの2つの断片を含むこと、及び第2のポリペプチドが、前記TNFリガンドファミリーメンバーの1つだけのエクドメイン又はその断片を含むことを特徴とする抗原結合分子であり、

（c）安定的に結合することができる第1及び第2のサブユニットから構成されるFcドメインを含む、抗原結合分子を提供する。

50

【0159】

特定の態様では、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子は、

- (a) TnCと特異的に結合することができる少なくとも1つの部分と、
- (b) ジスルフィド結合により互いに連結されている第1及び第2のポリペプチドとを含み、

第1のポリペプチドが、ペプチドリinkerにより互いに接続されている、TNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクドメイン又はそれらの2つの断片を含むこと、及び第2のポリペプチドが、前記TNFリガンドファミリーメンバーの1つだけのエクドメイン又はその断片を含むことを特徴とし、この場合、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。

10

【0160】

別の特定の態様では、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子は、

- (a) TnCと特異的に結合することができる少なくとも1つの部分と、
- (b) ジスルフィド結合により互いに連結されている第1及び第2のポリペプチドとを含み、

第1のポリペプチドが、ペプチドリinkerにより互いに接続されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクドメイン又はそれらの2つの断片を含むこと、及び第2のポリペプチドが、前記TNFリガンドファミリーメンバーの1つだけのエクドメイン又はその断片を含むことを特徴とし、この場合、TNFリガンドファミリーメンバーのエクドメインは、全ての場合、同一である。

20

【0161】

さらなる態様では、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子であって、

- (a) TnCと特異的に結合することができる少なくとも1つの部分と、
- (b) ジスルフィド結合により互いに連結されている第1及び第2のポリペプチドとを含み、

(i) 第1のポリペプチドがCH1若しくはCLドメインを含有すること、及び第2のポリペプチドがCL若しくはCH1ドメインを含有することをそれぞれ特徴とし、第2のポリペプチドが、CH1ドメインとCLドメイン間のジスルフィド結合により第1のポリペプチドと連結されており、第1のポリペプチドが、ペプチドリinkerにより互いに及びCH1若しくはCLドメインに接続されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクドメイン若しくはそれらの断片を含み、第2のポリペプチドが、ペプチドリinkerによって前記ポリペプチドのCL若しくはCH1ドメインに接続されている前記TNFリガンドファミリーメンバーの1つのエクドメイン若しくはその断片を含む、又は

30

(ii) 第1のポリペプチドがCH3ドメインを含有すること、及び第2のポリペプチドがCH3ドメインを含有することをそれぞれ特徴とし、第1のポリペプチドが、ペプチドリinkerにより互いに及びCH3ドメインのC末端に接続されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクドメイン若しくはそれらの断片を含み、第2のポリペプチドが、ペプチドリinkerによって前記ポリペプチドのCH3ドメインのC末端に接続されている前記TNFリガンドファミリーメンバーの1つだけのエクドメイン若しくはその断片を含む、又は

40

(iii) 第1のポリペプチドがVH-CL若しくはVL-CH1ドメインを含有すること、及び第2のポリペプチドがVL-CH1ドメイン若しくはVH-CLドメインを含有することをそれぞれ特徴とし、第2のポリペプチドが、CH1ドメインとCLドメイン間のジスルフィド結合により第1のポリペプチドと連結されており、第1のポリペプチドが、ペプチドリinkerにより互いに及びVH若しくはVLに接続されているTNFリガンドファミリーメンバー2つのエクドメイン若しくはそれらの断片を含み、第2のポリペプチドが、ペプチドリinkerによって前記ポリペプチドのVL若しくはVHに接続されている前記TNFリガンドファミリーメンバーの1つのエクドメイン若しくはその断片を含む、本明細書に記載の抗原結合分子が提供される。

【0162】

50

さらなる態様では、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子であって、
(a) TnCと特異的に結合することができる少なくとも1つの部分と、
(b) ジスルフィド結合により互いに連結されている第1及び第2のポリペプチドと
を含み、

(i) 第1のポリペプチドがCH1若しくはCLドメインを含有すること、及び第2のポリペプチドがCL若しくはCH1ドメインを含有することをそれぞれ特徴とし、第2のポリペプチドが、CH1ドメインとCLドメイン間のジスルフィド結合により第1のポリペプチドと連結されており、第1のポリペプチドが、ペプチドリンカーにより互いに及びCH1若しくはCLドメインに接続されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクドメイン若しくはそれらの断片を含み、第2のポリペプチドが、ペプチドリンカーによって前記ポリペプチドのCL若しくはCH1ドメインに接続されている前記TNFリガンドファミリーメンバーの1つのエクドメイン若しくはその断片を含む、又は

(ii) 第1のポリペプチドがCH3ドメインを含有すること、及び第2のポリペプチドがCH3ドメインを含有することをそれぞれ特徴とし、第1のポリペプチドが、ペプチドリンカーにより互いに及びCH3ドメインのC末端に接続されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクドメイン若しくはそれらの断片を含み、第2のポリペプチドが、ペプチドリンカーによって前記ポリペプチドのCH3ドメインのC末端に接続されている前記TNFリガンドファミリーメンバーの1つだけのエクドメイン若しくはその断片を含む、請求項1に記載の抗原結合分子が提供される。

【0163】

ある特定の態様では、TNFファミリーリガンドトリマー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。より特に、TNFリガンドファミリーメンバーは、4-1BBLである。

【0164】

別の態様では、TNFリガンドファミリーメンバーのエクドメインは、配列番号172、配列番号173、配列番号174、配列番号175、配列番号183、配列番号192、配列番号193及び配列番号194からなる群から選択されるアミノ酸配列、特に、配列番号172又は配列番号183の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エクドメイン又はその断片は、配列番号172、配列番号173、配列番号174、配列番号175及び配列番号183からなる群から選択されるアミノ酸配列、特に、配列番号172又は配列番号183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エクドメイン又はその断片は、配列番号183のアミノ酸配列を含む。

【0165】

さらなる態様では、本発明のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子は、
(a) TnCと特異的に結合することができる少なくとも1つの部分と、
(b) ジスルフィド結合により互いに連結されている第1及び第2のポリペプチドと
を含み、第1のポリペプチドが、配列番号176、配列番号184、配列番号185及び配列番号186からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むこと、及び第2のポリペプチドが、配列番号172、配列番号174、配列番号175及び配列番号183からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むことを特徴とする。特定の実施態様では、第1のポリペプチドは、配列番号184のアミノ酸配列を含み、第2のポリペプチドは、配列番号183のアミノ酸配列を含む。

【0166】

一態様では、本発明のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子は、
(a) TnCと特異的に結合することができる少なくとも1つの部分と、
(b) ジスルフィド結合により互いに連結されている第1及び第2のポリペプチドと
を含み、第1のポリペプチドが、配列番号176のアミノ酸配列を含むこと、及び第2のポリペプチドが、配列番号177のアミノ酸配列を含むことを特徴とする。

【0167】

さらなる態様では、本発明のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子は、
(a) TnCと特異的に結合することができる少なくとも1つの部分と、
(b) ジスルフィド結合により互いに連結されている第1及び第2のポリペプチドと
を含み、第1のポリペプチドが、配列番号176のアミノ酸配列を含むこと、及び第2の
ポリペプチドが、配列番号187のアミノ酸配列を含むことを特徴とする。

【0168】

なおさらなる態様では、本発明のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子
は、

(a) TnCと特異的に結合することができる少なくとも1つの部分と、
(b) ジスルフィド結合により互いに連結されている第1及び第2のポリペプチドと
を含み、第1のポリペプチドが、配列番号184のアミノ酸配列を含むこと、及び第2の
ポリペプチドが、配列番号188又は配列番号189のアミノ酸配列を含むことを特徴と
する。

【0169】

別の態様では、TNFリガンドファミリーメンバーはOX40Lである。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が、配列番号181又は配列番
号182のアミノ酸配列、特に、配列番号181のアミノ酸配列を含む、TNFファミリ
ーリガンドトリマー含有抗原結合分子が提供される。

【0170】

一態様では、本発明は、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子であって、
(a) TnCと特異的に結合することができる少なくとも1つの部分と、
(b) ジスルフィド結合により互いに連結されている第1及び第2のポリペプチドと
を含み、

第1のポリペプチドが、配列番号190又は配列番号191のアミノ酸配列を含むこと
、及び第2のポリペプチドが、配列番号181又は配列番号182のアミノ酸配列を含む
ことを、それぞれ特徴とする抗原結合分子に関する。

【0171】

一態様では、本発明のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子は、
(a) TnCと特異的に結合することができる少なくとも1つの部分と、
(b) CH1又はCLドメインを含有する第1のポリペプチド、及びCL又はCH1ドメ
インを含有する第2のポリペプチドと
をそれぞれ含み、第2のポリペプチドが、CH1ドメインとCLドメイン間のジスルフィ
ド結合により第1のポリペプチドと連結されており、

抗原結合分子は、第1のポリペプチドが、ペプチドリンカーにより互いに及びCH1又
はCLドメインに接続されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクトドメ
イン又はそれらの断片を含むこと、及び第2のポリペプチドが、ペプチドリンカーによ
って前記ポリペプチドのCL又はCH1ドメインに接続されている前記TNFリガンドファ
ミリーメンバーの1つだけのエクトドメイン又はその断片を含むことを特徴とする。

【0172】

一態様では、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子であって、
(a) TnCと特異的に結合することができる少なくとも1つの部分と、
(b) CH1ドメインを含有する第1のポリペプチド、及びCLドメインを含有する第2
のポリペプチドと
を含み、

第2のポリペプチドが、CH1ドメインとCLドメイン間のジスルフィド結合により第
1のポリペプチドと連結されており、

第1のポリペプチドが、ペプチドリンカーにより互いに及びCH1ドメインに接続され
ているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクトドメイン又はそれらの断片を含
むこと、及び第2のポリペプチドが、ペプチドリンカーによって前記ポリペプチドのCL

10

20

30

40

50

ドメインに接続されている前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの１つのエクドメイン又はその断片を含むことを特徴とする抗原結合分子が提供される。

【０１７３】

別の態様では、ＴＮＦファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子であって、

(a) T n Cと特異的に結合することができる少なくとも１つの部分と、

(b) C Lドメインを含有する第１のポリペプチド、及びC H 1ドメインを含有する第２のポリペプチドと

を含み、

第２のポリペプチドが、C H 1ドメインとC Lドメイン間のジスルフィド結合により第１のポリペプチドと連結されており、

第１のポリペプチドが、ペプチドリンカーにより互いに及びC Lドメインに接続されているＴＮＦリガンドファミリーメンバーの２つのエクドメイン又はそれらの断片を含むこと、及び第２のポリペプチドが、ペプチドリンカーによって前記ポリペプチドのC H 1ドメインに接続されている前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの１つのエクドメイン又はその断片を含むことを特徴とする抗原結合分子が提供される。

【０１７４】

別の態様では、本発明は、ＴＮＦファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子であって、

(a) T n Cと特異的に結合することができる１つの部分と、

(b) ジスルフィド結合により互いに連結されている第１及び第２のポリペプチドと

を含み、

第１のポリペプチドが、ペプチドリンカーにより互いに接続されているＴＮＦリガンドファミリーメンバーの２つのエクドメイン又はそれらの２つの断片を含むこと、及び第２のポリペプチドが、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの１つだけのエクドメイン又はその断片を含むことを特徴とする抗原結合分子を提供する。

【０１７５】

さらに別の態様では、本発明は、ＴＮＦファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子であって、

(a) T n Cと特異的に結合することができる１つより多くの部分と、

(b) ジスルフィド結合により互いに連結されている第１及び第２のポリペプチドと

を含み、

第１のポリペプチドが、ペプチドリンカーにより互いに接続されているＴＮＦリガンドファミリーメンバーの２つのエクドメイン又はそれらの２つの断片を含むこと、及び第２のポリペプチドが、ペプチドリンカーによって前記ポリペプチドに接続されている、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの１つだけのエクドメイン又はその断片を含むことを特徴とする、抗原結合分子を提供する。

【０１７６】

一態様では、本発明は、ＴＮＦファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子であって、

(a) T n Cと特異的に結合することができる２つの部分と、

(b) ジスルフィド結合により互いに連結されている第１及び第２のポリペプチドと

を含み、

第１のポリペプチドが、ペプチドリンカーにより互いに接続されているＴＮＦリガンドファミリーメンバーの２つのエクドメイン又はそれらの２つの断片を含むこと、及び第２のポリペプチドが、前記ＴＮＦリガンドファミリーメンバーの１つだけのエクドメイン又はその断片を含むことを特徴とする抗原結合分子を提供する。

【０１７７】

特定の態様では、ＴＮＦファミリー、リガンドトリマー含有抗原結合分子であって、

(a) T n Cと特異的に結合することができる少なくとも１つの部分と、

(b) ジスルフィド結合により互いに連結されている第１及び第２のポリペプチドと

を含み、

10

20

30

40

50

第1のポリペプチドがCH3ドメインを含有すること、及び第2のポリペプチドがCH3ドメインを含有することをそれぞれ特徴とし、第1のポリペプチドが、ペプチドリンカーにより互いに及びCH3ドメインのC末端に接続されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクドメイン若しくはそれらの断片を含み、第2のポリペプチドが、ペプチドリンカーによって前記ポリペプチドのCH3ドメインのC末端に接続されている前記TNFリガンドファミリーメンバーの1つのエクドメイン若しくはその断片を含む抗原結合分子が提供される。特に、そのようTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子は、TnCと特異的に結合することができる2つの部分を含む。

【0178】

さらなる態様では、本発明は、TnCと特異的に結合することができる部分が、抗体、抗体断片及び足場抗原結合タンパク質からなる群から選択される、上文で定義された通りのTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子を提供する。

【0179】

一態様では、TnCと特異的に結合することができる部分が、抗体断片、Fab分子、クロソオーバーFab分子、単鎖Fab分子、Fv分子、scFv分子、単ドメイン抗体、aVH及び足場抗原結合タンパク質からなる群から選択される、上文に記載のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子が提供される。一態様では、TnCと特異的に結合することができる部分は、aVH又は足場抗原結合タンパク質である。一態様では、標的細胞抗原と特異的に結合することができる部分は、標的細胞抗原と特異的に結合することができる足場抗原結合タンパク質である。

【0180】

特に、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子は、TnCと特異的に結合することができる1つ又は2つの部分を含む。

【0181】

特定の態様では、TnCと特異的に結合することができる部分が、標的細胞抗原と特異的に結合することができるFab分子又はクロソオーバーFab分子である、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子が提供される。特に、TnCと特異的に結合することができる部分は、Fab分子である。

【0182】

さらなる態様では、第1の重鎖及び第1の軽鎖を含む、本発明によるTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子であって、第1の重鎖及び第1の軽鎖の双方が、TnCと特異的に結合することができるFab分子、C末端で第2のペプチドリンカーにより第2の重鎖又は軽鎖に融合されている第1のペプチドであって、第1のペプチドリンカーによって互いに接続されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクドメイン又はそれらの断片を含む第1のペプチド及びC末端で第3のペプチドリンカーにより第2の軽鎖又は重鎖に融合されている第2のペプチドであって、前記TNFリガンドファミリーメンバーの1つのエクドメインを含む第2のペプチドを含む、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子を提供される。

【0183】

さらなる態様では、第1のペプチドリンカーにより互いに接続されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクドメイン又はそれらの断片を含むペプチドが、そのC末端で第2のペプチドリンカーにより重鎖のCH1ドメインに融合されており、前記TNFリガンドファミリーメンバーの1つのエクドメイン又はその断片が、そのC末端で第3のペプチドリンカーにより軽鎖のCLドメインに融合されている、本発明によるTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子が提供される。

【0184】

さらなる態様では、第1のペプチドリンカーにより互いに接続されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクドメイン又はそれらの断片を含む第1のペプチドが、そのC末端で第2のペプチドリンカーにより重鎖の一部であるCH1ドメインに融合されており、前記TNFリガンドファミリーメンバーの1つのエクドメイン又はその断片

10

20

30

40

50

を含む第2のペプチドが、そのC末端で第3のペプチドリinkerにより軽鎖の一部であるCLドメインに融合されている、本発明によるTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子が提供される。

【0185】

別の態様では、第1のペプチドリinkerにより互いに接続されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクドメイン又はそれらの断片を含むペプチドが、そのC末端で第2のペプチドリinkerにより重鎖のCLドメインに融合されており、前記TNFリガンドファミリーメンバーの1つのエクドメイン又はその断片が、そのC末端で第3のペプチドリinkerにより軽鎖のCH1ドメインに融合されている、本発明によるTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子が提供される。

10

【0186】

別の態様では、第1のペプチドリinkerにより互いに接続されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクドメイン又はそれらの断片を含む第1のペプチドが、そのC末端で第2のペプチドリinkerにより重鎖の一部であるCLドメインに融合されており、前記TNFリガンドファミリーメンバーの1つのエクドメイン又はその断片を含む第2のペプチドが、そのC末端で第3のペプチドリinkerにより軽鎖の一部であるCH1ドメインに融合されている、本発明によるTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子が提供される。

【0187】

さらなる態様では、本発明は、第1のペプチドリinkerにより互いに接続されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクドメイン又はそれらの断片を含むペプチドが、そのC末端で第2のペプチドリinkerにより軽鎖のCLドメインに融合されており、前記TNFリガンドファミリーメンバーの1つのエクドメイン又はその断片が、そのC末端で第3のペプチドリinkerにより重鎖のCH1ドメインに融合されている、本発明によるTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子に関する。

20

【0188】

別の態様では、第1のペプチドリinkerにより互いに接続されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクドメイン又はそれらの断片を含む第1のペプチドが、そのC末端で第2のペプチドリinkerにより重鎖の一部であるVHドメインに融合されており、前記TNFリガンドファミリーメンバーの1つのエクドメイン又はその断片を含む第2のペプチドが、そのC末端で第3のペプチドリinkerにより軽鎖の一部であるVLドメインに融合されている、本発明によるTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子が提供される。

30

【0189】

特定の態様では、本発明は、ペプチドリinkerが(G4S)₂である、上で定義された通りのTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子に関する。一態様では、第1のペプチドリinkerは、(G4S)₂ (配列番号150)であり、第2のペプチドリinkerは、GSPGSSSSGS (配列番号153)であり、第3のペプチドリinkerは、(G4S)₂ (配列番号150)である。特に、本発明は、第1のペプチドリinkerが、(G4S)₂ (配列番号150)であり、第2のペプチドリinkerが、(G4S)₂ (配列番号150)であり、第3のペプチドリinkerが、(G4S)₂ (配列番号150)である、上で定義された通りのTNFリガンドトリマー含有抗原結合分子に関する。

40

【0190】

別の態様では、上文で定義された通りのTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子は、安定的に結合することができる第1及び第2のサブユニットから構成されるFcドメインを含む。

【0191】

特に、本発明のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子は、(a) Fab重鎖が、そのC末端でFcドメイン内のCH2ドメインのN末端に融合されている、TnCと特異的に結合することができるFab分子と、(c) 安定的に結合することができる

50

第1及び第2のサブユニットから構成されるFcドメインとを含む。

【0192】

さらなる態様では、Fcドメインは、IgG、特に、IgG1 Fcドメイン又はIgG4 Fcドメインである。より特に、Fcドメインは、IgG1 Fcドメインである。特定の態様では、Fcドメインは、Fcドメインの第1のサブユニットと第2のサブユニットの結合を促進する修飾を含む。

【0193】

Fc受容体結合を低減させる及び／又はエフェクター機能を低下させるFcドメイン修飾
本発明のTNFファミリーリガンドトリマー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、各々のサブユニットがCH2及びCH3 IgG重鎖定常ドメインを含む、ダイマーである。Fcドメインの2つのサブユニットは、互いに安定的に結合することができる。

【0194】

Fcドメインは、標的組織内への良好な蓄積及び有利な組織－血液分布比の一因となる長い半減期を含む、有利な薬物動態特性を、本発明の抗原結合分子に付与する。しかし、同時に、Fcドメインは、好ましい抗原保有細胞へではなくFc受容体を発現する細胞への本発明の二重特異性抗体の望ましくない標的指向化をもたらす。したがって、特定の態様では、本発明のTNFファミリーリガンドトリマー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受容体への結合アフィニティーの低下及び／又はエフェクター機能の低下を呈示する。一態様では、Fcは、Fc受容体と実質的に結合せず、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。具体的態様では、Fc受容体は、活性化ヒトFcγ受容体、より具体的には、ヒトFcγRIIIa、FcγRI又はFcγRIIIa、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下は、これらに限定されないが、次のうちの1つ又は複数を含み得る：補体依存性細胞傷害(CDC)の低下、抗体依存性細胞介在性細胞傷害(ADCC)の低下、抗体依存性細胞貪食(ADCP)の低下、サイトカイン分泌の低下、抗原提示細胞による免疫複合体媒介抗原取り込みの低減、NK細胞への結合の低減、マクロファージへの結合の低減、単球への結合の低減、多形核細胞への結合の低減、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。

【0195】

ある特定の態様では、1つ又は複数のアミノ酸修飾を本明細書で提供される抗原結合分子のFc領域に導入することによってFc領域変異体を生成することができる。Fc領域変異体は、1つ又は複数のアミノ酸位置にアミノ酸修飾(例えば、置換)を含むヒトFc領域配列(例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4 Fc領域)を含み得る。

【0196】

特定の態様では、本発明は、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子であって、

(a) TnCと特異的に結合することができる少なくとも1つの部分と、

(b) ジスルフィド結合により互いに連結されている第1及び第2のポリペプチドとを含み、

第1のポリペプチドが、ペプチドリンカーにより互いに接続されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクトドメイン又はそれらの2つの断片を含むこと、及び第2のポリペプチドが、前記TNFリガンドファミリーメンバーの1つだけのエクトドメイン又はその断片を含むことを特徴とする抗原結合分子であり、

(c) 安定的に結合することができる第1及び第2のサブユニットから構成されるFcドメイン

10

20

30

40

50

を含み、Fcドメインが、Fc受容体との、特に、Fcγ受容体への結合を低減させる1つ又は複数のアミノ酸置換を含む、抗原結合分子を提供する。

【0197】

一態様では、本発明の抗原結合分子のFcドメインは、Fc受容体へのFcドメインの結合アフィニティー及び／又はエフェクター機能を低下させる1つ又は複数のアミノ酸突然変異を含む。典型的に、同じ1つ又は複数のアミノ酸突然変異が、Fcドメインの2つのサブユニットの各々に存在する。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234及び235位（EU番号付け）並びに／又は329位（EU番号付け）にアミノ酸置換を含む。より特に、IgG重鎖にアミノ酸置換L234A、L235A及びP329G（「PGLALA」、EU番号付け）を有するFcドメインを含む、本発明による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突然変異を指す。アミノ酸置換の組合せ「PGLALA」は、ヒトIgG1 FcドメインのFcγ受容体結合をほぼ完全に消失させ、国際特許出願公開第2012/130831号A1に記載されており、この参考特許文献には、そのような変異Fcドメインを調製する方法、及びその特性、例えば、Fc受容体結合又はエフェクター機能を判定する方法も記載されている。「EU番号付け」は、Kabat等、「Sequences of Proteins of Immunological Interest」、第5版、Public Health Service、National Institutes of Health、Bethesda、MD、1991のEUインデックスによる番号付けを指す。

【0198】

Fc受容体結合が低減された及び／又はエフェクター機能が低下したFcドメインは、Fcドメイン残基238、265、269、270、297、327及び329の1つ又は複数についての置換を有するものも含む（米国特許第6737056号）。そのようなFc突然変異体は、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突然変異体を含む、アミノ酸265、269、270、297及び327位のうちの2カ所以上に置換を有するFc突然変異体を含む（米国特許7332581号）。

【0199】

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受容体への結合アフィニティーの低下及びエフェクター機能の低下を呈示する。より具体的な態様では、Fcドメインは、S228位（カバット番号付け）にアミノ酸置換を含む、特に、アミノ酸置換S228Pを含む、IgG4 Fcドメインである。より具体的な態様では、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ドメイン突然変異体及びそれらのFcγ受容体結合特性は、国際公開第2012/130831号にも記載されている。

【0200】

変異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してアミノ酸欠失、置換、挿入又は修飾により調製することができる。遺伝学的方法としては、コード化DNA配列の部位特異的突然変異誘発、PCR、遺伝子合成等を挙げることができる。正しいヌクレオチド変化を例えば配列決定によって検証することができる。

【0201】

Fc受容体への結合は、例えばELISAによって、又はBIAcore装置（GE Healthcare）等の標準的計測手段と組換え発現により得ることができるものなどのFc受容体とを使用して表面プラズモン共鳴（SPR）によって、容易に判定することができる。好適なそのような結合アッセイは、本明細書で説明される。或いは、Fcドメインの、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アフィニティーは、特定のFc受容体を発現することが公知の細胞株、例えば、FcγIIIIa受容体を発現するヒトNK細胞を使用して、評価することができる。

【0202】

Fcドメインのエフェクター機能、又はFcドメインを含む本発明の抗原結合分子のエフェクター機能は、当該技術分野で公知の方法により測定することができる。ADCCの測定に好適なアッセイは、本明細書で説明される。目的の分子のADCC活性を評定するためのインビトロアッセイの他の例は、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。或いは、非放射性アッセイの方法を用いてもよい（例えば、フローサイトメトリー用のACTI（商標）非放射性細胞傷害性アッセイ（Cell Technology, 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）を参照されたい）。そのようなアッセイに有用なエフェクター細胞としては、抹消血単核細胞（PBMC）及びナチュラルキラー（NK）細胞が挙げられる。或いは、又は加えて、目的の分子のADCC活性を、インビボで、例えば、Clynes等、Proc Natl Acad Sci USA 95、652-656 (1998)に開示されているもの等の動物モデルにおいて、評定することができる。

10

【0203】

一部の実施態様では、補体成分への、特にC1qへの、Fcドメインの結合が低減される。したがって、エフェクター機能を低下させるようにFcドメインを操作する一部の実施態様では、前記エフェクター機能の低下は、CDCの低下を含む。本発明の抗原結合分子が、C1qに結合することができるかどうか、及びそれ故にCDC活性を有するかどうかを判定するために、C1q結合アッセイを行ってもよい。例えば、国際公開第2006/029879号及び国際公開第2005/100402号におけるC1q及びC3c結合ELISAを参照されたい。補体活性化を評定するために、CDCアッセイを行ってもよい（例えば、Gazzano-Santoro等、J Immunol Methods 202、163(1996)；Cragg等、Blood 101、1045-1052(2003)；並びにCragg及びGlennie、Blood 103、2738-2743(2004)を参照されたい）。

20

【0204】

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

30

【0205】

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トリマー含有抗原結合分子は、

- (a) TnCと特異的に結合することができる少なくとも1つの部分と、
- (b) ジスルフィド結合により互いに連結されている第1及び第2のポリペプチドとを含む、

第1のポリペプチドが、ペプチドリンカーにより互いに接続されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクトドメイン又はそれらの2つの断片を含むこと、及び第2のポリペプチドが、前記TNFリガンドファミリーメンバーの1つだけのエクトドメイン又はその断片を含むことを特徴とし、

40

(c) 安定的に結合することができる第1及び第2のサブユニットから構成されるFcドメイン

を含み、Fcドメインは、Fc受容体との、特に、Fcγ受容体への結合を低減させる1つ又は複数のアミノ酸置換を含む。したがって、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子は、2つの非同一のポリペプチド鎖（「重鎖」）に通常は含まれているFcドメインの2つのサブユニットの一方又は他方に融合されている、異なる部分を含む。これらのポリペプチドの組換え共発現及びその後の二量体化は、2つのポリペプチドの幾つかの可能な組合せをもたらす。したがって、組換え産生でのTNFファミリーリガンド

50

リマー含有抗原結合分子の収量及び純度を向上させるために、本発明のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子のFcドメインに所望のポリペプチドの結合を促進する修飾を導入することは、有利であるであろう。

【0206】

したがって、本発明のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子のFcドメインは、Fcドメインの第1及び第2のサブユニットの結合を促進する修飾を含む。ヒトIgGFcドメインの2つのサブユニット間の最も広範なタンパク質-タンパク質相互作用部位は、FcドメインのCH3ドメイン内にある。したがって、前記修飾は、特に、FcドメインのCH3ドメインにおけるものである。

【0207】

具体的態様では、前記修飾は、Fcドメインの2つのサブユニットの一方のサブユニットに「ノブ」修飾を含み、Fcドメインの2つのサブユニットの他方のサブユニットに「ホール」修飾を含む、いわゆる「ノブイントゥーホール」修飾である。したがって、特定の態様では、本発明は、IgG分子を含む、上文に記載のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子であって、第1の重鎖のFc部分が第1の二量体化モジュールを含み、第2の重鎖のFc部分が、第2の二量体化モジュールを含むことにより、IgG分子の2つの重鎖のヘテロ二量体化が可能になり、ノブイントゥーホール技術に従って、第1の二量体化モジュールがノブを含み、第2の二量体化モジュールがホールを含む、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子に関する。

【0208】

ノブイントゥーホール技術は例えば、米国特許第5731168号、米国特許第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、突出部を空洞内に配置して、ヘテロ二量体形成を促進すること及びホモ二量体形成を妨げることができるように、第1のポリペプチドの接触面に突出部(「ノブ」)を、及び第2のポリペプチドの接触面に対応する空洞(「ホール」)を導入することを含む。突出部は、第1のポリペプチドの接触面からの小さいアミノ酸側鎖をより大きい側鎖(例えば、チロシン又はトリプトファン)で置換することにより構築される。大きい側鎖をより小さい側鎖(例えば、アラニン又はスレオニン)で置換することにより、突出部と同一又は同様のサイズの代償的「空洞」が第2の抗体の境界面に作出される。

【0209】

したがって、特定の態様では、本発明のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子のFcドメインの第1のサブユニットのCH3ドメイン内のアミノ酸残基がより大き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2のサブユニットのCH3ドメイン内の空洞の中に位置することができる突出部が第1のサブユニットのCH3ドメイン内に生成され、Fcドメインの第2のサブユニットのCH3ドメイン内の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1のサブユニットのCH3ドメイン内の突出部が位置することができる空洞が第2のサブユニットのCH3ドメイン内に生成される。

【0210】

突出部及び空洞は、ポリペプチドをコードするヌクレオチド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することによって、作製することができる。

【0211】

具体的態様では、Fcドメインの第1のサブユニットのCH3ドメイン内の366位のスレオニン残基がトリプトファン残基で置換され(T366W)、Fcドメインの第2のサブユニットのCH3ドメイン内の407位のチロシン残基がバリン残基で置換される(Y407V)。より特に、Fcドメインの第2のサブユニット内で、さらに、366位のスレオニン残基がセリン残基で置換され(T366S)、368位のロイシン残基がアラニン残基で置換される(L368A)。より特に、Fcドメインの第1のサブユニット内

10

20

30

40

50

で、さらに、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2のサブユニット内で、さらに、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2つのシステイン残基の導入の結果、Fcドメインの2つのサブユニット間にジスルフィド架橋が形成されることになる。このジスルフィド架橋がダイマーをさらに安定させる（Carter、J Immunol Methods 248、7-15(2001)）。

【0212】

代替態様では、Fcドメインの第1及び第2のサブユニットの結合を促進する修飾は、例えば、PCT公開・国際公開第2009/089004号に記載されているような、静電的ステアリング効果を媒介する修飾を含む。一般に、この方法は、ホモダイマー形成が静電的に不利になるが、ヘテロ二量体化が静電的に有利になるように、2つのFcドメインサブユニットの接触面の1つ又は複数のアミノ酸残基を荷電アミノ酸残基に置換することを含む。

【0213】

CH1／CLドメインにおける修飾

正しいペアリングをさらに増進するために、TNFファミリーリガンドトリマー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」）を含有することができる。これらの修飾は、クロスした又はクロスしていない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ドメインのうちの1つにおいて123位（EU番号付け）のアミノ酸がアルギニン（R）に置換されており、124位（EU番号付け）のアミノ酸がリジン（K）に置換されている、及びCH1ドメインのうちの1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トリマー含有抗原結合分子に関する。

【0214】

より特に、本発明は、前記TNFリガンドファミリーメンバーに隣接するCLドメイン内の123位（EU番号付け）のアミノ酸がアルギニン（R）に置換されており、124位（EU番号付け）のアミノ酸がリジン（K）に置換されている、及び前記TNFリガンドファミリーメンバーに隣接するCH1ドメイン内の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トリマー含有抗原結合分子に関する。

【0215】

特定のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子

別の態様では、本発明は、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子であって、TnCと特異的に結合することができるFab分子を両方が含む、第1の重鎖及び第1の軽鎖と、第2のペプチドリンカーによりそのC末端で第2の重鎖又は軽鎖に融合されている、第1のペプチドリンカーによって互いに接続されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクトドメイン又はそれらの断片を含む、第1のペプチドと、第3のペプチドリンカーによりそのC末端で第2の軽鎖又は重鎖に融合されている前記TNFリガンドファミリーメンバーの1つのエクトドメインを含む、第2のペプチドとをそれぞれ含む、抗原結合分子を提供する。

【0216】

さらなる態様では、第1のペプチドリンカーにより互いに接続されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクトドメイン又はそれらの断片を含む第1のペプチドが、そのC末端で第2のペプチドリンカーにより重鎖の一部であるCH1ドメインに融合されており、前記TNFリガンドファミリーメンバーの1つのエクトドメイン又はその断片を含む第2のペプチドが、そのC末端で第3のペプチドリンカーにより軽鎖の一部であるCLドメインに融合されている、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子が提供される。

【0217】

さらに別の態様では、第1のペプチドリンカーにより互いに接続されているTNFリガ

10

20

30

40

50

ンドファミリーメンバーの2つのエクトドメイン又はそれらの断片を含む第1のペプチドが、そのC末端で第2のペプチドリンカーにより重鎖の一部であるCLドメインに融合されており、前記TNFリガンドファミリーメンバーの1つのエクトドメイン又はその断片を含む第2のペプチドが、そのC末端で第3のペプチドリンカーにより軽鎖の一部であるCH1ドメインに融合されている、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子が提供される。

【0218】

さらなる態様では、第1のペプチドリンカーにより互いに接続されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクトドメイン又はそれらの断片を含む第1のペプチドが、そのC末端で第2のペプチドリンカーにより重鎖の一部であるVHドメインに融合されており、前記TNFリガンドファミリーメンバーの1つのエクトドメイン又はその断片を含む第2のペプチドが、そのC末端で第3のペプチドリンカーにより軽鎖の一部であるVLドメインに融合されている、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子が提供される。

【0219】

一態様では、本発明は、前記TNFリガンドファミリーメンバーに隣接するCLドメイン内の123位（EU番号付け）のアミノ酸がアルギニン（R）に置換されており、124位（EU番号付け）のアミノ酸がリジン（K）に置換されている、及び前記TNFリガンドファミリーメンバーに隣接するCH1ドメイン内の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、本明細書に記載のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子を提供する。これらの修飾は、例えばミスペアリング等の望ましくない効果を回避する有利な特性を有する、いわゆる荷電残基をもたらす。

【0220】

一態様では、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子であって、
（a）TnCと特異的に結合することができる少なくとも1つのFabドメインと、
（b）安定的に結合することができる第1及び第2のサブユニットから構成されるFcドメインと、
（c）ペプチドリンカーにより互いに接続されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクトドメイン又はそれらの断片を含む第1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1つのエクトドメイン又はその断片を含む第2のポリペプチドとを含み、

第1のポリペプチドが、そのN末端で、ノブ突然変異を含むFcドメインの第2のサブユニットのC末端側に融合されており、第2のポリペプチドが、そのN末端で、ホール突然変異を含むFcドメインの第1のサブユニットのC末端に融合されている、抗原結合分子が提供される。

【0221】

特定の態様では、本発明は、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子であって、

（a）TnCと特異的に結合することができる少なくとも1つのFabドメインと、
（b）安定的に結合することができる第1及び第2のサブユニットから構成されるFcドメインと、
（c）ペプチドリンカーにより互いに接続されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクトドメイン又はそれらの断片を含む第1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1つのエクトドメイン又はその断片を含む第2のポリペプチドとを含み、

第1のポリペプチドが、そのN末端で、ノブ突然変異を含むFcドメインの第2のサブユニットのC末端側に融合されており、第2のポリペプチドが、そのN末端で、ホール突

10

20

30

40

50

然変異を含む F c ドメインの第 1 のサブユニットの C 末端に融合されており、F a b 重鎖が、その C 末端で、ノブ突然変異を含む F c ドメインの第 2 のサブユニットの N 末端側に融合されている、抗原結合分子を提供する。

【0222】

別の態様では、本発明は、T N F ファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子であって、

(a) T n C と特異的に結合することができる少なくとも 1 つの F a b ドメインと、

(b) 安定的に結合することができる第 1 及び第 2 のサブユニットから構成される F c ドメインと、

(c) ペプチドリinkerにより互いに接続されている T N F リガンドファミリーメンバーの 2 つのエクトドメイン又はそれらの断片を含む第 1 のポリペプチド、及び前記 T N F リガンドファミリーメンバーの 1 つのエクトドメイン又はその断片を含む第 2 のポリペプチドと

を含み、

第 1 のポリペプチドが、その N 末端で、ノブ突然変異を含む F c ドメインの第 2 のサブユニットの C 末端側に融合されており、第 2 のポリペプチドが、その N 末端で、ホール突然変異を含む F c ドメインの第 1 のサブユニットの C 末端に融合されており、F a b 重鎖が、その C 末端で、ホール突然変異を含む F c ドメインの第 1 のサブユニットの N 末端に融合されている、抗原結合分子を提供する。

【0223】

さらなる態様では、T N F ファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子であって、

(a) T n C と特異的に結合することができる少なくとも 1 つの F a b ドメインと、

(b) 安定的に結合することができる第 1 及び第 2 のサブユニットから構成される F c ドメインと、

(c) ペプチドリinkerにより互いに接続されている T N F リガンドファミリーメンバーの 2 つのエクトドメイン又はそれらの断片を含む第 1 のポリペプチド、及び前記 T N F リガンドファミリーメンバーの 1 つのエクトドメイン又はその断片を含む第 2 のポリペプチドと

を含み、

第 1 のポリペプチドが、その N 末端で、ホール突然変異を含む F c ドメインの第 1 のサブユニットの C 末端側に融合されており、第 2 のポリペプチドが、その N 末端で、ノブ突然変異を含む F c ドメインの第 2 のサブユニットの C 末端に融合されている、抗原結合分子が提供される。

【0224】

特定の態様では、本発明は、T N F ファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子であって、

(a) T n C と特異的に結合することができる少なくとも 1 つの F a b ドメインと、

(b) 安定的に結合することができる第 1 及び第 2 のサブユニットから構成される F c ドメインと、

(c) ペプチドリinkerにより互いに接続されている T N F リガンドファミリーメンバーの 2 つのエクトドメイン又はそれらの断片を含む第 1 のポリペプチド、及び前記 T N F リガンドファミリーメンバーの 1 つのエクトドメイン又はその断片を含む第 2 のポリペプチドと

を含み、

第 1 のポリペプチドが、その N 末端で、ホール突然変異を含む F c ドメインの第 1 のサブユニットの C 末端側に融合されており、第 2 のポリペプチドが、その N 末端で、ノブ突然変異を含む F c ドメインの第 2 のサブユニットの C 末端側に融合されており、F a b 重鎖が、その C 末端で、ノブ突然変異を含む F c ドメインの第 2 のサブユニットの N 末端に融合されている、抗原結合分子を提供する。

【0225】

別の態様では、本発明は、T N Fファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子であって、

- (a) T n Cと特異的に結合することができる少なくとも1つのF a bドメインと、
- (b) 安定的に結合することができる第1及び第2のサブユニットから構成されるF cドメインと、
- (c) ペプチドリンカーにより互いに接続されているT N Fリガンドファミリーメンバーの2つのエクドメイン又はそれらの断片を含む第1のポリペプチド、及び前記T N Fリガンドファミリーメンバーの1つのエクドメイン又はその断片を含む第2のポリペプチドとを含み、

第1のポリペプチドが、そのN末端で、ホール突然変異を含むF cドメインの第1のサブユニットのC末端側に融合されており、第2のポリペプチドが、そのN末端で、ノブ突然変異を含むF cドメインの第2のサブユニットのC末端側に融合されており、F a b重鎖が、そのC末端で、ホール突然変異を含むF cドメインの第1のサブユニットのN末端に融合されている、抗原結合分子を提供する。

【0226】

特定のT n C結合部分

一態様では、本発明は、T n C結合部分を提供する。別の態様では、本発明のT N C結合部分に、本明細書に記載の二価又は多価結合分子を含めることができる。一実施態様では、T n Cと特異的に結合することができる部分は、抗体断片、F a b分子、クロスオーバーF a b分子、単鎖F a b分子、F v分子、s c F v分子、単ドメイン抗体、並びにa V H及び足場抗原結合タンパク質からなる群から選択される。別の態様では、本発明は、T n Cと特異的に結合することができる1つ又は複数の部分を含む抗原結合分子を提供する。本明細書に記載のT n C結合部分を含む本発明の分子は、1つ又は複数のT n Cドメインに対する高いアフィニティー、及び／又は異種間反応性を有する。

【0227】

一実施態様では、本発明の抗T n C抗原結合分子は、配列番号55、配列番号56、配列番号57、配列番号58、配列番号59、配列番号60、配列番号67、配列番号68、配列番号69、配列番号70、配列番号71及び配列番号72からなる群から選択される少なくとも1つ（例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5若しくは6つ）の重鎖若しくは軽鎖相補性決定領域（C D R）、又は前記C D Rの特異性決定残基（S D R）を少なくとも含有する領域の変異体若しくは切断型を含む。

【0228】

一実施態様では、本発明の抗原結合分子は、(a) 配列番号67及び配列番号70からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むH C D R 1、(b) 配列番号68及び配列番号71からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むH C D R 2、及び(c) 配列番号69及び配列番号72からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むH C D R 3、から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、又は3つ全ての重鎖C D R（H C D R）を含む。さらなる実施態様では、抗原結合分子は、(a) 配列番号67及び配列番号70からなる群から選択される重鎖C D R 1、(b) 配列番号68及び配列番号71からなる群から選択される重鎖C D R 2、及び(c) 配列番号69及び配列番号72からなる群から選択される重鎖C D R 3、を含む重鎖可変領域、又は前記C D RについてのS D Rを少なくとも含有する重鎖可変領域の変異体若しくは切断型を含む。

【0229】

一実施態様では、本発明の抗原結合分子は、(a) 配列番号55及び配列番号58からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むL C D R 1、(b) 配列番号56及び配列番号59からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むL C D R 2、及び(c) 配列番号57及び配列番号60からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むL C D R 3、から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、又は3つ全ての軽鎖C D R（L C D R）を含む。さらなる実施態様では、抗原結合分子は、(a) 配列番号55及び配列番号58からなる

群から選択される軽鎖CDR1、(b)配列番号56及び配列番号59からなる群から選択される軽鎖CDR2、及び(c)配列番号57及び配列番号60からなる群から選択される軽鎖CDR3、を含む、軽鎖可変領域、又は前記CDRについてのSDRを少なくとも含有する軽鎖可変領域の変異体若しくは切断型を含む。

【0230】

一実施態様では、本発明の抗原結合分子は、配列番号67及び配列番号70からなる群から選択される重鎖CDR1と、配列番号68及び配列番号71からなる群から選択される重鎖CDR2と、配列番号69及び配列番号72からなる群から選択される重鎖CDR1とを含む、重鎖可変領域；及び配列番号55及び配列番号58からなる群から選択される軽鎖CDR1と、配列番号56及び配列番号59からなる群から選択される軽鎖CDR2と、配列番号57及び配列番号60からなる群から選択される軽鎖CDR1とを含む、軽鎖可変領域；又は前記CDRについてのSDRを少なくとも含有する可変領域の変異体若しくは切断型を含む。

10

【0231】

さらに別の具体的な実施態様では、本発明の抗原結合分子は、配列番号67の重鎖CDR1と、配列番号68の重鎖CDR2と、配列番号69の重鎖CDR3とを含む重鎖可変領域；及び配列番号55の軽鎖CDR1と、配列番号56の軽鎖CDR2と、配列番号57の軽鎖CDR3とを含む軽鎖可変領域を含む。

【0232】

さらに別の具体的な実施態様では、本発明の抗原結合分子は、配列番号70の重鎖CDR1と、配列番号71の重鎖CDR2と、配列番号72の重鎖CDR3とを含む重鎖可変領域；及び配列番号58の軽鎖CDR1と、配列番号59の軽鎖CDR2と、配列番号60の軽鎖CDR3とを含む軽鎖可変領域を含む。

20

【0233】

一実施態様では、本発明の抗原結合分子は、配列番号46及び配列番号48からなる群から選択される配列に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(VH)を含む。一実施態様では、抗原結合分子は、配列番号46及び配列番号48からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。

【0234】

ある特定の実施態様では、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するVH配列は、参照配列と比べて置換(例えば、保存的置換)、挿入又は欠失を含有するが、その配列を含む抗TnC抗原結合分子は、TnCと結合する能力を保持する。ある特定の実施態様では、配列番号46又は配列番号48における合計1から10個のアミノ酸が置換、挿入及び／又は欠失されている。ある特定の実施態様では、置換、挿入又は欠失は、HVR又はCDR外の領域で(すなわち、FR内で)行われる。任意選択的に、本発明による抗TnC抗原結合分子は、配列番号46又は配列番号48のVH配列を含み、この配列は、この配列の後翻訳修飾を含む。特定の実施態様では、VHは、HCDR1、HCDR2及びHCDR3について配列番号67、配列番号68、配列番号69、配列番号70、配列番号71及び配列番号72に記載の配列から選択される1、2又は3つの重鎖CDRを含む。

30

【0235】

別の実施態様では、本発明の抗原結合分子は、配列番号45及び配列番号47からなる群から選択される配列に対して少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。さらに別の実施態様では、抗原結合分子は、配列番号45及び配列番号47からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0236】

ある特定の実施態様では、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するVL配列は、参照配列と比べて

40

50

置換（例えば、保存的置換）、挿入又は欠失を含有するが、その配列を含む抗 T n C 抗原結合分子は、T n C と結合する能力を保持する。ある特定の実施態様では、配列番号 45 又は配列番号 47 における合計 1 から 10 個のアミノ酸が置換、挿入及び／又は欠失されている。ある特定の実施態様では、置換、挿入又は欠失は、H V R 又は C D R 外の領域で（すなわち、F R 内で）行われる。任意選択的に、本発明の抗 T n C 抗原結合分子は、配列番号 45 又は配列番号 47 の V L 配列を含み、この配列は、この配列の後翻訳修飾を含む。特定の実施態様では、V L は、L C D R 1、L C D R 2 及び L C D R 3 について配列番号 55、配列番号 56、配列番号 57、配列番号 58、配列番号 59 及び配列番号 60 に記載の配列から選択される 1、2 又は 3 つの軽鎖 C D R を含む。

【0237】

別の態様では、上で提供された実施態様の何れかにおけるような V H と、上で提供された実施態様の何れかにおけるような V L とを含む、抗 T n C 抗原結合分子が提供される。一実施態様では、抗原結合分子は、配列番号 46 及び配列番号 48 の群から選択される配列と少なくとも約 90%、91%、92%、93%、94%、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 45 及び配列番号 47 の群から選択される配列と少なくとも約 90%、91%、92%、93%、94%、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。一実施態様では、抗原結合分子は、配列番号 46 又は配列番号 48 及び配列番号 45 又は配列番号 47 の V H 及び V L 配列をそれぞれ含み、これらの配列は、これらの配列の後翻訳修飾を含む。

【0238】

具体的な実施態様では、本発明の抗原結合分子は、配列番号 46 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号 45 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。具体的な実施態様では、本発明の抗原結合分子は、配列番号 48 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号 47 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。特定の実施態様では、上記実施態様の何れかによる抗原結合分子は、さらに、F c 領域を含むか、又は免疫グロブリンの F c 領域と同等の領域を含む。一実施態様では、本発明の抗原結合分子は、F c 領域、特に I g G F c 領域、最も特に I g G 1 F c 領域を含む。特定の実施態様では、本発明の抗原結合分子は、完全長抗体、特に I g G クラス抗体、最も特に I g G 1 アイソタイプ抗体である。別の実施態様では、本発明の抗原結合分子の T n C 結合部分は、s d F v 断片、F v 断片、F a b 断片及び F (a b ') 2 断片の群から選択される、抗体断片である。さらなる実施態様では、本発明の抗原結合分子は、F c 領域を有する抗体断片であるか又は免疫グロブリンの F c 領域と同等の領域を含む融合タンパク質である。一実施態様では、本発明の抗原結合分子は、モノクローナル抗体である。一実施態様では、本発明の抗原結合分子は、キメラのものであり、より具体的にはヒト化されたものである。特定の実施態様において、本発明の抗原結合分子は、ヒトのものである。別の実施態様では、本発明の抗原結合分子は、ヒト定常領域を含む。一実施態様では、本発明の抗原結合分子は、ヒト F c 領域、好ましくはヒト I g G F c 領域、最も特にヒト I g G 1 F c 領域を含む。

【0239】

一実施態様では、本発明の抗原結合分子は、重鎖定常領域を含み、前記重鎖定常領域は、F c 領域を含むヒト I g G 定常領域、特にヒト I g G 1 定常領域である。一実施態様では、本発明の抗原結合分子は、重鎖領域を含み、前記重鎖領域は、F c 領域を含むヒト I g G 重鎖領域、特にヒト I g G 1 重鎖領域である。具体的な実施態様では、抗原結合分子は、配列番号 78、配列番号 80、配列番号 83 及び配列番号 84 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、重鎖領域を含む。別の具体的な実施態様では、本発明の抗原結合分子は、配列番号 77 及び配列番号 79 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、軽鎖領域を含む。さらに別の具体的な実施態様では、本発明の抗原結合分子は、配列番号 78 のアミノ酸配列を含む重鎖領域、及び配列番号 77 のアミノ酸配列を含む軽鎖領域を含む。さらに別の具体的な実施態様では、本発明の抗原結合分子は、配列番号 80 のア

ミノ酸配列を含む重鎖領域、及び配列番号79のアミノ酸配列を含む軽鎖領域を含む。

【0240】

特定の実施態様では、本発明は、TnCと特異的に結合する抗原結合分子であって、a)Fc領域を含む又は免疫グロブリンのFc領域と同等の領域を含む、配列番号78及び配列番号80からなる群から選択される配列と少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖領域、又は配列番号77及び配列番号79からなる群から選択される配列と少なくとも約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖領域、又はこれらの組合せを含む、抗原結合分子を提供する。

10

【0241】

一実施態様では、本発明の抗原結合分子は、テネイシンC(TnC)と、約1 μ M未満から約0.01nMの解離定数(K_D)値、特に約100nM未満、約10nM未満、又は約1nM未満の K_D 値で結合する。具体的な実施態様では、本発明の抗原結合分子は、ヒトテネイシンC(TnC)と、約1nM未満の解離定数(K_D)で結合する。一実施態様では、本発明の抗原結合分子は、ヒト、マウス及びカニクイザルTnCと結合する。一実施態様では、本発明の抗原結合分子は、異種間反応性を有する。別の具体的な実施態様では、本発明の抗原結合分子は、ヒト、マウス及びカニクイザルTnCのCDメインと結合する。一実施態様では、本発明の抗原結合分子は、異種間反応性を有する。一実施態様では、本発明の抗原結合分子は、ヒト、マウス及びカニクイザルTnCのうちの少なくとも1つと約100nM未満、10nM未満、5nM未満又は2nM未満の K_D 値で結合する。具体的な実施態様では、本発明の抗原結合分子は、ヒト、マウス及びカニクイザルTnCのうちの少なくとも1つと約2nM未満の K_D 値で結合する。さらなる実施態様では、本発明の抗原結合分子は、ヒトTnCと第1の K_D 値 K_{D1} で結合し、前記抗原結合分子は、マウスと第2の K_D 値 K_{D2} で結合し、前記抗原結合分子は、カニクイザルと第3の K_D 値 K_{D3} で結合し、 K_{D1} 、 K_{D2} 及び K_{D3} からなる群から選択される K_D 値の全てが、約10nM未満、5nM未満又は2nM未満である。なおさらなる実施態様では、本発明の抗原結合分子は、ヒトTnCと第1の K_D 値 K_{D1} で結合し、前記抗原結合分子は、マウスと第2の K_D 値 K_{D2} で結合し、前記抗原結合分子は、カニクイザルと第3の K_D 値 K_{D3} で結合し、 K_{D1} 、 K_{D2} 及び K_{D3} からなる群から選択される K_D 値の全てが、10nMから0.1nMの範囲、5nMから0.1nMの範囲、又は2nMから0.1nMの範囲である。さらなる実施態様では、本発明の抗体は、ヒトTnCと第1の K_D 値 K_{D1} で結合し、前記抗体は、マウスと第2の K_D 値 K_{D2} で結合し、前記抗体は、カニクイザルと第3の K_D 値 K_{D3} で結合し、 K_{D1} 、 K_{D2} 及び K_{D3} からなる群から選択される K_D 値の全てが、20倍の K_D 範囲内である。さらなる実施態様では、本発明の抗体は、ヒトTnCと第1の K_D 値 K_{D1} で結合し、前記抗体は、マウスと第2の K_D 値 K_{D2} で結合し、前記抗体は、カニクイザルと第3の K_D 値 K_{D3} で結合し、 K_{D1} 、 K_{D2} 及び K_{D3} からなる群から選択される K_D 値の全てが、10倍の K_D 範囲内である。一実施態様では、本発明の抗原結合分子は、A1、A2、A3、A4、B、AD1、AD2、C及びDからなる群から選択されるTnCドメインのうちの少なくとも1つに特異的である。一実施態様では、A1、A4及びCからなる群から選択されるTnCドメインのうちの少なくとも1つと特異的に結合することができる抗原結合分子が提供される。一実施態様では、本発明の抗原結合分子は、TnCドメインA1及びA4に特異的である。一実施態様では、本発明の抗原結合分子は、TnCドメインCに特異的である。具体的な実施態様では、本発明の抗原結合分子は、ヒト、マウス及びカニクイザルTnCの、A1ドメインと及びA4ドメインと結合する。別の具体的な実施態様では、本発明の抗原結合分子は、ヒト、マウス及びカニクイザルTnCのCDメインと結合する。一実施態様では、本発明の抗原結合分子は、異種間反応性を有する。より具体的な実施態様では、本発明の抗原結合分子は、ヒト、マウス及びカニクイザルTnC A1のA1ドメインと、並びにヒト、マウス及びカニクイザルTnC A4のA4ドメインと、約100nM未満、約10nM未満、

20

30

40

50

約 5 nM 未満又は約 2 nM 未満の K_D 値で結合する。 K_D 値は、抗体を Fab 又は IgG として使用して表面プラズモン共鳴により決定される。一実施態様では、本発明の TnC 抗原結合分子は、ヒト組織内の TnC に結合する。

【0242】

一実施態様では、本発明の抗原結合分子は、Fc 領域を含み、前記抗原結合分子は、Fc 領域に少なくとも 1 つのアミノ酸置換を含む。一実施態様では、Fc 領域に少なくとも 1 つのアミノ酸置換を含む本発明の抗原結合分子は、親非置換 Fc 領域を含む抗原結合分子と比較して、エフェクター機能が低下されている、及び／又は Fc 受容体結合アフィニティーが低下されている。具体的な実施態様では、前記親非置換 Fc 領域は、アミノ酸残基 Leu234、Leu235 及び Pro329 を含み、置換 Fc 領域は、親非置換 Fc 領域と比べて、Leu234Ala、Leu235Ala 及び Pro329Gly からなる群から選択されるアミノ酸置換のうちの少なくとも 1 つを含む。特定の実施態様では、本発明は、TnC と特異的に結合する抗原結合分子であって、a) 配列番号 83 及び配列番号 84 からなる群から選択される配列と少なくとも約 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 又は 100% 同一であるアミノ酸配列を含む重鎖領域と、配列番号 77 及び配列番号 79 からなる群から選択される配列と少なくとも約 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 又は 100% 同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖領域とを含む、抗原結合分子を提供する。具体的な実施態様では、本発明の抗体は、配列番号 83 及び配列番号 84 の群から選択されるアミノ酸配列を含む、重鎖領域を含む。さらなる実施態様では、置換 Fc 領域を含む抗原結合分子は、親非置換重鎖領域を含む抗原結合分子と比較して、エフェクター機能が低下されている、及び／又は Fc 受容体結合アフィニティーが低下されている。さらなる具体的な実施態様では、前記置換 Fc 領域を含む本発明の抗原結合分子は、親非置換 Fc 領域と比べてアミノ酸置換 Leu234Ala、Leu235Ala 及び Pro329Gly を含み、FcγR 及び C1q との結合が消失される、及び／又は Fc 媒介エフェクター機能が消失される。特定の実施態様では、エフェクター機能の低下は、ADCC の低下である。別の特定の実施態様では、エフェクター機能の低下は、ADCC の消失である。Fc 受容体結合の減少は、好ましくは、活性化 Fc 受容体、最も好ましくは FcγRIIIa への結合の減少である。一実施態様では、本発明の抗原結合分子は、治療有効量で個体に投与されたとき、臨床的に有意なレベルの毒性の原因とならない。

【0243】

特定の実施態様では、本発明は、TnC と特異的に結合する抗原結合分子であって、a) 配列番号 46 及び配列番号 48 からなる群から選択される配列と少なくとも約 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 若しくは 100% 同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、又は配列番号 45 及び配列番号 47 からなる群から選択される配列と少なくとも約 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 若しくは 100% 同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、又はこれらの組合せと、b) Fc 領域、又は免疫グロブリンの Fc 領域と同等の領域とを含む、抗原結合分子を提供する。一実施態様では、本発明の抗原結合分子は、Fc 領域を含み、Fc 領域は、糖改変 Fc 領域である。さらなる実施態様では、本発明の抗原結合分子は、Fc 領域に修飾オリゴ糖を有するように糖改変される。具体的な実施態様では、抗原結合分子は、非糖改変抗原結合分子と比較して、Fc 領域内の二分されたオリゴ糖の割合が増加されている。より具体的な実施態様では、抗原結合分子の Fc 領域内の N 結合型オリゴ糖の少なくとも約 10%、約 15%、約 20%、約 25%、約 30%、約 35%、約 40%、約 45%、約 50%、約 55%、約 60%、約 65%、約 70%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90%、約 95% 又は約 100%、好ましくは少なくとも約 50%、より好ましくは少なくとも約 70% は、二分されている。二分されたオリゴ糖は、ハイブリッド型であってもよく、複合体型であってもよい。別の具体的な実施態様では、本発明の抗原結合分子は、非糖改変抗原結合分子と比較して、Fc 領域内の非フコシル化オリゴ糖の割合が増加されている。より具体的な実施態様では、抗原結

合分子のFc領域内のN結合型オリゴ糖の少なくとも約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%又は約100%、好ましくは少なくとも約50%、より好ましくは少なくとも約70%は、フコシル化されていない。非フコシル化オリゴ糖は、ハイブリッド型であってもよく、複合体型であってもよい。特定の実施態様では、本発明の抗原結合分子は、非糖改変抗原結合分子と比較して、Fc領域内の二分された非フコシル化オリゴ糖の割合が増加されている。具体的には、抗原結合分子は、N結合型オリゴ糖の少なくとも約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%又は約100%、好ましくは少なくとも約15%、より好ましくは少なくとも約25%、少なくとも約35%又は少なくとも約50%が、二分されており、フコシル化されていない、Fc領域を含む。二分された非フコシル化オリゴ糖は、ハイブリッド型であってもよく、複合体型であってもよい。一実施態様では、本発明の抗原結合分子は、エフェクター機能が増加されている、及び／又はFc受容体結合アフィニティーが増大されている。エフェクター機能の増加及び／又はFc受容体結合の増加は、例えば、抗体の糖改変及び／又はアフィニティー成熟に起因し得る。一実施態様では、エフェクター機能の増加及び／又はFc受容体結合の増加は、抗原結合分子のFc領域の糖改変の結果である。別の実施態様では、エフェクター機能の増加及び／又はFc受容体結合の増加は、アフィニティーの増大と糖改変の組合せの結果である。エフェクター機能の増加は、これらに限定されないが、次のうちの1つ又は複数を含み得る：Fc媒介細胞傷害性の増加（抗体依存性細胞介在性細胞傷害（ADCC）の増加を含む）、抗体依存性細胞貪食（ADCP）の増加、サイトカイン分泌の増加、抗原提示細胞による免疫複合体媒介抗原取り込みの増加、NK細胞への結合の増加、マクロファージへの結合の増加、単球への結合の増加、多形核細胞への結合の増加、アポトーシスを誘導する直接的シグナル伝達の増加、標的結合抗体の架橋の増加、樹状細胞成熟の増加、又はT細胞プライミングの増加。特定の実施態様では、エフェクター機能の増加は、ADCCの増加である。Fc受容体結合の増加は、好ましくは、活性化Fc受容体、最も好ましくはFcγRIIIaへの結合の増加である。一実施態様では、本発明の抗原結合分子は、治療有効量で個体に投与されたとき、臨床的に有意なレベルの毒性の原因とならない。

【0244】

特定の実施態様では、本発明は、TnCのA1及びA4ドメインと特異的に結合する抗原結合分子であって、配列番号46のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号45のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、ヒトIgG Fc領域とを含む抗原結合分子を提供する。

【0245】

特定の実施態様では、本発明は、TnCのCドメインと特異的に結合する抗原結合分子であって、配列番号48のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号47のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、ヒトIgG Fc領域とを含む抗原結合分子を提供する。

【0246】

特定の実施態様では、本発明は、TnCのA1及びA4ドメインと特異的に結合する抗原結合分子であって、配列番号46のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号45のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、ヒトIgG Fc領域とを含み、エフェクター機能の増加及び／又はFc受容体結合アフィニティーの増大を有するように糖改変されている、抗原結合分子を提供する。

【0247】

特定の実施態様では、本発明は、TnCのCドメインと特異的に結合する抗原結合分子であって、配列番号48のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号47のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、ヒトIgG Fc領域とを含み、エフェクター機能の増加及び／又はFc受容体結合アフィニティーの増大を有するように糖改変されている、抗原結合分子を提供する。

【0248】

特定の実施態様では、本発明は、TnCのA1及びA4ドメインと特異的に結合する抗原結合分子であって、配列番号46のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号45のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、ヒトIgG Fc領域とを含み、Fc領域に少なくとも1つのアミノ酸置換を含む、抗原結合分子であり、親非置換Fc領域が、アミノ酸残基Leu234、Leu235及びPro329を含み、置換されているFc領域が、親非置換Fc領域と比べてLeu234Ala、Leu235Ala及びPro329Glyからなる群から選択されるアミノ酸置換のうちの少なくとも1つを含み、置換されているFc領域を含む当該抗原結合分子が、親非置換Fc領域を含む抗原結合分子と比較して、エフェクター機能が低下されており、及び／又はFc受容体結合アフィニティーが低下されている、抗原結合分子を提供する。

10

【0249】

特定の実施態様では、本発明は、TnCのCドメインと特異的に結合する抗原結合分子であって、配列番号48のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号47のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、ヒトIgG Fc領域とを含み、Fc領域に少なくとも1つのアミノ酸置換を含む、抗原結合分子であり、親非置換Fc領域が、アミノ酸残基Leu234、Leu235及びPro329を含み、置換されているFc領域が、親非置換Fc領域と比べてLeu234Ala、Leu235Ala及びPro329Glyからなる群から選択されるアミノ酸置換のうちの少なくとも1つを含み、置換されているFc領域を含む当該抗原結合分子が、親非置換Fc領域を含む抗原結合分子と比較して、エフェクター機能が低下されており、及び／又はFc受容体結合アフィニティーが低下されている、抗原結合分子を提供する。

20

【0250】

特定の実施態様では、本発明は、TnCのA1及びA4ドメインと特異的に結合する抗原結合分子であって、

(a) 配列番号67の重鎖CDR1、

(b) 配列番号68の重鎖CDR2、

(c) 配列番号69の重鎖CDR3

を含む重鎖可変領域と、

(a) 配列番号55の軽鎖CDR1、

(b) 配列番号56の軽鎖CDR2、及び

(c) 配列番号57の軽鎖CDR3

を含む軽鎖可変領域と

を含む抗原結合分子を提供する。

30

【0251】

特定の実施態様では、本発明は、TnCのCドメインと特異的に結合する抗原結合分子であって、

(a) 配列番号70の重鎖CDR1、

(b) 配列番号71の重鎖CDR2、

(c) 配列番号72の重鎖CDR3

を含む重鎖可変領域と、

(a) 配列番号58の軽鎖CDR1、

(b) 配列番号59の軽鎖CDR2、及び

(c) 配列番号60の軽鎖CDR3

を含む軽鎖可変領域と

を含む抗原結合分子を提供する。

40

【0252】

特定の実施態様では、本発明は、TnCのA1及びA4ドメインと特異的に結合する抗原結合分子であって、配列番号78のアミノ酸配列を含む重鎖領域と、配列番号77のアミノ酸配列を含む軽鎖領域とを含む抗原結合分子を提供する。

50

【0253】

特定の実施態様では、本発明は、ヒト、マウス及びカニクイザル T n C の A 1 及び A 4 ドメインと特異的に結合する抗原結合分子であって、配列番号 46 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号 45 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、ヒト I g G F c 領域とを含む抗原結合分子を提供する。

【0254】

特定の実施態様では、本発明は、T n C の C ドメインと特異的に結合する抗原結合分子であって、配列番号 80 のアミノ酸配列を含む重鎖領域と、配列番号 79 の群から選択されるアミノ酸を含む軽鎖領域とを含む、抗原結合分子を提供する。

【0255】

特定の実施態様では、本発明は、ヒト、マウス及びカニクイザル T n C の C ドメインと特異的に結合する抗原結合分子であって、配列番号 48 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号 47 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、ヒト I g G F c 領域とを含む抗原結合分子を提供する。

【0256】

別の特定の実施態様では、本発明は、T n C の A 1 及び A 4 ドメインと特異的に結合する抗原結合分子であって、配列番号 46 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号 45 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、ヒト I g G F c 領域とを含み、F c 領域内の非フコシル化オリゴ糖の割合が増加されている、及び／又は二分されたオリゴ糖の割合が増加されている、抗原結合分子を提供する。別の特定の実施態様では、本発明は、T n C の C ドメインと特異的に結合する抗原結合分子であって、配列番号 48 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号 47 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域と、ヒト I g G F c 領域とを含み、F c 領域内の非フコシル化オリゴ糖の割合が増加されている、及び／又は二分されたオリゴ糖の割合が増加されている、抗原結合分子を提供する。

【0257】

一態様では、本発明は、T n C と特異的に結合する抗原結合分子であって、親抗原結合分子の少なくとも 1 つの重鎖又は軽鎖 C D R に少なくとも 1 つのアミノ酸置換を含む抗原結合分子を提供する。例えば、抗原結合分子は、親抗原結合分子の 1 つ又は複数の超可変領域又は C D R (すなわち、1 つ、2 つ、3 つ、4 つ、5 つ又は 6 つの超可変領域又は C D R) に、少なくとも 1 つの、例えば、約 1 つから約 10 (すなわち、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9 又は 10)、特に、約 2 つから約 5 つの置換を含み得る。

【0258】

加えて、抗原結合分子は、親抗原結合分子と比較して、重鎖又は軽鎖どちらかの 1 つ又は複数のフレームワーク領域に 1 つ又は複数の付加、欠失及び／又は置換も含み得る。一実施態様では、少なくとも 1 つの C D R における前記少なくとも 1 つのアミノ酸置換は、その親抗原結合分子と比較して、抗原結合分子の結合アフィニティーの増加の一因となる。別の実施態様では、前記抗原結合分子は、T n C に対して親抗原結合分子より少なくとも約 2 倍から約 10 倍大きいアフィニティーを(本発明の抗原結合分子と親抗原結合分子を同じ形式、例えば F a b 形式で比較したとき)有する。さらに、親抗原結合分子に由来する抗原結合分子は、本発明の抗体に関して上段で説明した特徴の何れかを、単独で又は組合せて取り入れることができる。

【0259】

T N F ファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子の特定の T n C 結合部分

一態様では、本発明は、T n C と特異的に結合することができる部分が、(i) 配列番号 67 又は配列番号 70 のアミノ酸配列を含む C D R - H 1 と、(i i) 配列番号 68 又は配列番号 71 のアミノ酸配列を含む C D R - H 2 と、(i i i) 配列番号 69 又は配列番号 72 のアミノ酸配列を含む C D R - H 3 とを含む V H ドメイン、及び(i v) 配列番号 55 又は配列番号 58 のアミノ酸配列を含む C D R - L 1 と、(v) 配列番号 56 又は配列番号 59 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2 と、(v i) 配列番号 57 又は配列番号 60 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3 とを含む V L ドメインを含む、T N F ファミリー

リガンドトリマー含有抗原結合分子を提供する。

【0260】

特定の態様では、T n Cと特異的に結合することができる部分が、T n Cと特異的に結合することができるF a b分子であり、(i)配列番号67のアミノ酸配列を含むC D R-H 1と、(i i)配列番号68のアミノ酸配列を含むC D R-H 2と、(i i i)配列番号69のアミノ酸配列を含むC D R-H 3とを含むV Hドメイン、及び(i v)配列番号55のアミノ酸配列を含むC D R-L 1と、(v)配列番号56のアミノ酸配列を含むC D R-L 2と、(v i)配列番号57のアミノ酸配列を含むC D R-L 3とを含むV Lドメインを含む、本発明のT N Fファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子が提供される。

10

【0261】

別の態様では、T n Cと特異的に結合することができる部分が、T n Cと特異的に結合することができるF a b分子であり、(i)配列番号70のアミノ酸配列を含むC D R-H 1と、(i i)配列番号71のアミノ酸配列を含むC D R-H 2と、(i i i)配列番号72のアミノ酸配列を含むC D R-H 3とを含むV Hドメイン、及び(i v)配列番号58のアミノ酸配列を含むC D R-L 1と、(v)配列番号59のアミノ酸配列を含むC D R-L 2と、(v i)配列番号60のアミノ酸配列を含むC D R-L 3とを含むV Lドメインを含む、本発明のT N Fファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子が提供される。

【0262】

一態様では、T n Cと特異的に結合することができる部分は、配列番号46のアミノ酸配列を含む可変重鎖と配列番号45のアミノ酸配列を含む可変軽鎖とを含むか、又は配列番号48のアミノ酸配列を含む可変重鎖と配列番号47のアミノ酸配列を含む可変軽鎖とを含む。

20

【0263】

さらなる態様では、T n Cと特異的に結合することができる部分は、配列番号46のアミノ酸配列と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号45のアミノ酸配列と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

30

【0264】

別の態様では、T n Cと特異的に結合することができる部分は、配列番号48のアミノ酸配列と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号47のアミノ酸配列と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0265】

特定の態様では、T n Cと特異的に結合することができる部分は、配列番号46のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号45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、T n Cと特異的に結合することができる部分は、配列番号48のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号47のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。具体的な態様では、T n Cと特異的に結合することができる部分は、配列番号46のアミノ酸配列をからなるV Hドメイン、及び配列番号45のアミノ酸配列をからなるV Lドメインを含む。

40

【0266】

さらなる態様では、本発明のT N Fファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子は、(a) T n Cと特異的に結合することができるF a b分子を両方が含む、第1の重鎖及び第1の軽鎖、(b) 配列番号176、配列番号184、配列番号185及び配列番号186からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む第2の重鎖、並びに配列番号172、配列番号174

50

、配列番号 175 及び配列番号 183 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む第 2 の軽鎖を含む。

【0267】

さらなる態様では、本発明の TNF ファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子は、
(a) 配列番号 46 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号 45 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む、TnC と特異的に結合することができる少なくとも 1 つの部分と、

(b) ジスルフィド結合により互いに連結されている第 1 及び第 2 のポリペプチドとを含み、

第 1 のポリペプチドが、配列番号 176、配列番号 184、配列番号 185 及び配列番号 186 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むこと、及び第 2 のポリペプチドが、配列番号 172、配列番号 174、配列番号 175 及び配列番号 183 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むことを特徴とする。

【0268】

特定の態様では、本発明の TNF ファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子は、
(a) 配列番号 46 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号 45 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む、TnC と特異的に結合することができる少なくとも 1 つの部分と、

(b) ジスルフィド結合により互いに連結されている第 1 及び第 2 のポリペプチドとを含み、

第 1 のポリペプチドが、配列番号 176 のアミノ酸配列を含むこと、及び第 2 のポリペプチドが、配列番号 172 のアミノ酸配列を含むことを特徴とする。

【0269】

特定の態様では、本発明の TNF ファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子は、
(a) 配列番号 46 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号 45 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む、TnC と特異的に結合することができる少なくとも 1 つの部分と、

(b) ジスルフィド結合により互いに連結されている第 1 及び第 2 のポリペプチドとを含み、

第 1 のポリペプチドが、配列番号 184 のアミノ酸配列を含むこと、及び第 2 のポリペプチドが、配列番号 183 のアミノ酸配列を含むことを特徴とする。

【0270】

別の態様では、本発明の TNF ファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子は、
(a) 配列番号 48 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号 47 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む、TnC と特異的に結合することができる少なくとも 1 つの部分と、

ジスルフィド結合により互いに連結されている第 1 及び第 2 のポリペプチドとを含み、

第 1 のポリペプチドが、配列番号 176、配列番号 184、配列番号 185 及び配列番号 186 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むこと、及び第 2 のポリペプチドが、配列番号 172、配列番号 174、配列番号 175 及び配列番号 183 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むことを特徴とする。

【0271】

特定の態様では、本発明の TNF ファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子は、
(a) 配列番号 48 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号 47 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む、TnC と特異的に結合することができる少なくとも 1 つの部分と、

(b) ジスルフィド結合により互いに連結されている第 1 及び第 2 のポリペプチドとを含み、

10

20

30

40

50

第1のポリペプチドが、配列番号176のアミノ酸配列を含むこと、及び第2のポリペプチドが、配列番号172のアミノ酸配列を含むことを特徴とする。

【0272】

特定の態様では、本発明のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子は、
(a) 配列番号48のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号47のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む、TnCと特異的に結合することができる少なくとも1つの部分と、

(b) ジスルフィド結合により互いに連結されている第1及び第2のポリペプチドとを含み、

第1のポリペプチドが、配列番号184のアミノ酸配列を含むこと、及び第2のポリペプチドが、配列番号183のアミノ酸配列を含むことを特徴とする。

10

【0273】

一態様では、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子であって、

(i) 配列番号46のアミノ酸配列を含むVHドメインを含む第1の重鎖、及び配列番号45のアミノ酸配列を含むVLドメインを含む第1の軽鎖、又は

配列番号48のアミノ酸配列を含むVHドメインを含む第1の重鎖、及び配列番号47のアミノ酸配列を含むVLドメインを含む第1の軽鎖と、

(ii) 配列番号178のアミノ酸配列を含む第2の重鎖と、

(iii) 配列番号179のアミノ酸配列を含む第2の軽鎖とを含む、抗原結合分子が提供される。

20

【0274】

別の態様では、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子であって、TnCと特異的に結合することができるFab分子を両方が含む、第1の重鎖及び第1の軽鎖と、第2のペプチドリンカーによりそのC末端でCH1ドメインに融合されている、第1のペプチドリンカーにより互いに接続されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクトドメイン又はそれらの断片を含む、第2の重鎖と、第3のペプチドリンカーによりそのC末端でCLドメインに融合されているTNFリガンドファミリーメンバーの1つのエクトドメイン又はその断片を含む、第2の軽鎖とを含み、

(i) 配列番号46のアミノ酸配列を含むVHドメインを含む第1の重鎖、及び配列番号45のアミノ酸配列を含むVLドメインを含む第1の軽鎖、又は配列番号48のアミノ酸配列を含むVHドメインを含む第1の重鎖、及び配列番号47のアミノ酸配列を含むVLドメインを含む第1の軽鎖と、

(ii) 配列番号178のアミノ酸配列を含む第2の重鎖と、

(iii) 配列番号179のアミノ酸配列を含む第2の軽鎖とを含む抗原結合分子が提供される。

30

【0275】

さらなる態様では、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子であって、TnCと特異的に結合することができるFab分子を両方が含む、第1の重鎖及び第1の軽鎖と、第1のペプチドリンカーにより互いに接続されており、第2のペプチドリンカーによりそのC末端でCLドメインに融合されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクトドメイン又はそれらの断片を含む、第2の重鎖と、第3のペプチドリンカーによりそのC末端でCH1ドメインに融合されているTNFリガンドファミリーメンバーの1つのエクトドメイン又はその断片を含む、第2の軽鎖とを含み、

(i) 配列番号46のアミノ酸配列を含むVHドメインを含む第1の重鎖、及び配列番号45のアミノ酸配列を含むVLドメインを含む第1の軽鎖、又は配列番号48のアミノ酸配列を含むVHドメインを含む第1の重鎖、及び配列番号47のアミノ酸配列を含むVLドメインを含む第1の軽鎖と、

(ii) 配列番号102、配列番号108、配列番号116及び配列番号120からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む第2の重鎖と、

(iii) 配列番号103、配列番号109、配列番号117及び配列番号121からな

40

50

る群から選択されるアミノ酸配列を含む第2の軽鎖とを含む抗原結合分子が提供される。

【0276】

別の態様では、本発明は、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子であって、

(i) 配列番号46のアミノ酸配列を含むVHドメインを含む第1の重鎖、及び配列番号45のアミノ酸配列を含むVLドメインを含む第1の軽鎖、又は

配列番号48のアミノ酸配列を含むVHドメインを含む第1の重鎖、及び配列番号47のアミノ酸配列を含むVLドメインを含む第1の軽鎖と、

(ii) 配列番号102、配列番号108、配列番号116及び配列番号120からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む第2の重鎖と、

(iii) 配列番号103、配列番号109、配列番号117及び配列番号121からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む第2の軽鎖とを含む、抗原結合分子を提供する。

【0277】

さらに別の態様では、本発明は、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子であって、

(a) TnCと特異的に結合することができる少なくとも1つの部分と、

(b) ジスルフィド結合により互いに連結されている第1及び第2のポリペプチドとを含む、

第1のポリペプチドがCH3ドメインを含有すること、及び第2のポリペプチドがCH3ドメインを含有することをそれぞれ特徴とし、第1のポリペプチドが、ペプチドリンカーにより互いに及びCH3ドメインのC末端に接続されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクドメイン若しくはそれらの断片を含み、第2のポリペプチドが、ペプチドリンカーによって前記ポリペプチドのCH3ドメインのC末端に接続されている前記TNFリガンドファミリーメンバーの1つのエクドメイン若しくはその断片を含む抗原結合分子を提供する。

【0278】

さらなる態様では、本発明のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子は、

(a) TnCと特異的に結合することができる少なくとも1つのFabドメインと、

(b) 安定的に結合することができる第1及び第2のサブユニットから構成されるFcドメインと、

(c) ペプチドリンカーにより互いに接続されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクドメイン又はそれらの断片を含む第1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1つのエクドメイン又はその断片を含む第2のポリペプチドと

を含み、第1のポリペプチドは、そのN末端でFcドメインのサブユニットの一方のC末端側に融合されており、第2のポリペプチドは、そのN末端でFcドメインの他方のサブユニットのC末端に融合されており、TNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクドメイン又はそれらの断片を含む第1のポリペプチドは、配列番号176及び配列番号184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1つのエクドメイン又はその断片を含む第2のポリペプチドは、配列番号172及び配列番号183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2つのエクドメイン又はそれらの断片を含む第1のポリペプチドは、配列番号176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1つのエクドメイン又はその断片を含む第2のポリペプチドは、配列番号172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2つのエクドメイン又はそれらの断片を含む第1のポリペプチドは、配列番号184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1つのエクドメイン又はその断片を含む第2のポリペプチドは、配列番号183のアミノ酸配列を含む。

【0279】

一態様では、本発明は、

- (a) T n Cと特異的に結合することができる少なくとも1つのF a bドメインと、
 - (b) 安定的に結合することができる第1及び第2のサブユニットから構成されるF cドメインと、
 - (c) ペプチドリinkerにより互いに接続されているT N Fリガンドファミリーメンバーの2つのエクドメイン又はそれらの断片を含む第1のポリペプチド、及び前記T N Fリガンドファミリーメンバーの1つのエクドメイン又はその断片を含む第2のポリペプチドと
- を含み、第1のポリペプチドが、そのN末端でF cドメインのサブユニットの一方のC末端側に融合されており、第2のポリペプチドが、そのN末端でF cドメインの他方のサブユニットのC末端に融合されているT N Fファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子を提供する。したがって、本発明は、標的細胞抗原への結合について一価である、T N Fファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子に関する。

10

【0280】

さらなる態様では、本発明は、

- (a) 配列番号46のアミノ酸配列を含むV Hドメイン及び配列番号45のアミノ酸配列を含むV Lドメイン、又は配列番号48のアミノ酸配列を含むV Hドメイン及び配列番号47のアミノ酸配列を含むV Lドメインを含む、T n Cと特異的に結合することができるF a bドメインと、
 - (b) 安定的に結合することができる第1及び第2のサブユニットから構成されるF cドメインと、
 - (c) ペプチドリinkerにより互いに接続されているT N Fリガンドファミリーメンバーの2つのエクドメイン又はそれらの断片を含む第1のポリペプチド、及び前記T N Fリガンドファミリーメンバーの1つのエクドメイン又はその断片を含む第2のポリペプチドと
- を含み、第1のポリペプチドが、そのN末端でF cドメインのサブユニットの一方のC末端側に融合されており、第2のポリペプチドが、そのN末端でF cドメインの他方のサブユニットのC末端に融合されているT N Fファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子を提供する。

20

30

【0281】

別の態様では、本発明は、

- (a) 配列番号46のアミノ酸配列を含むV Hドメイン及び配列番号45のアミノ酸配列を含むV Lドメイン、又は配列番号48のアミノ酸配列を含むV Hドメイン及び配列番号47のアミノ酸配列を含むV Lドメインを含む、T n Cと特異的に結合することができるF a bドメインと、
 - (b) 安定的に結合することができる第1及び第2のサブユニットから構成されるF cドメインと、
 - (c) ペプチドリinkerにより互いに接続されているT N Fリガンドファミリーメンバーの2つのエクドメイン又はそれらの断片を含む第1のポリペプチド、及び前記T N Fリガンドファミリーメンバーの1つのエクドメイン又はその断片を含む第2のポリペプチドと
- を含み、第1のポリペプチドが、そのN末端でF cドメインのサブユニットの一方のC末端側に融合されており、第2のポリペプチドが、そのN末端でF cドメインの他方のサブユニットのC末端に融合されており、T N Fリガンドファミリーメンバーの2つのエクドメイン又はそれらの断片を含む第1のポリペプチドが、配列番号176及び配列番号184からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、前記T N Fリガンドファミリーメンバーの1つのエクドメイン又はその断片を含む第2のポリペプチドが、配列番号172及び配列番号183からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むT N Fファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子を提供する。

40

50

【0282】

特定の態様では、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子であって、

(a) 配列番号46のアミノ酸配列を含むVHドメイン及び配列番号45のアミノ酸配列を含むVLドメインを含む、TnCと特異的に結合することができるFabドメインと、

(b) 安定的に結合することができる第1及び第2のサブユニットから構成されるFcドメインと、

(c) ペプチドリinkerにより互いに接続されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクドメイン又はそれらの断片を含む第1のポリペプチド、及びTNFリガンドファミリーメンバーの1つのエクドメイン又はその断片を含む第2のポリペプチドとを含み、第1のポリペプチドが、そのN末端でFcドメインのサブユニットの一方のC末端側に融合されており、第2のポリペプチドが、そのN末端でFcドメインの他方のサブユニットのC末端に融合されており、TNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクドメインを含む第1のポリペプチドが、配列番号184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1つのエクドメインを含む第2のポリペプチドが、配列番号183のアミノ酸配列を含む、抗原結合分子が提供される。

10

【0283】

別の態様では、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子であって、

(i) TnCと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と、

(ii) Fcドメインの第1のサブユニットと、ペプチドリinkerにより互いに接続されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクドメイン又はそれらの断片を含む第1のポリペプチドとを含む融合ポリペプチドであって、第1のポリペプチドがそのN末端でFcドメインの第1のサブユニットに融合されている、融合ポリペプチドと、

20

(iii) TnCと特異的に結合することができるFabドメインのVHドメインと、Fcドメインの第2のサブユニットと、TNFリガンドファミリーメンバーの1つのエクドメイン又はその断片を含む第2のポリペプチドとを含む重鎖であって、TnCと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、そのC末端でFcドメインの第2のサブユニットのN末端に融合されており、前記TNFリガンドファミリーメンバーの1つのエクドメイン又はその断片を含む第2のポリペプチドが、そのN末端でFcドメインの第2のサブユニットのC末端に融合されている重鎖とを含む、抗原結合分子が提供される。

30

【0284】

さらなる態様では、本発明は、(d) TnCと特異的に結合することができないFabドメインをさらに含む、前に定義された通りのTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子を提供する。したがって、本発明は、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子であって、

(a) TnCと特異的に結合することができるFabドメインと、

(b) 安定的に結合することができる第1及び第2のサブユニットから構成されるFcドメインと、

(c) ペプチドリinkerにより互いに接続されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクドメイン又はそれらの断片を含む第1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1つのエクドメイン又はその断片を含む第2のポリペプチドと

40

を含み、第1のポリペプチドが、そのN末端でFcドメインのサブユニットの一方のC末端側に融合されており、第2のポリペプチドが、そのN末端でFcドメインの他方のサブユニットのC末端に融合されており、

(d) 標的細胞抗原と特異的に結合することができないFabドメインを含む、抗原結合分子を提供する。

【0285】

本発明のさらなる特定の態様では、

50

(a) T n Cと特異的に結合することができるF a b分子を両方が含む、第1の重鎖及び第1の軽鎖（この場合、第1の重鎖は、配列番号46のアミノ酸配列を含み、第1の軽鎖は配列番号45のアミノ酸配列を含む）と、

(b) 第2のペプチドリンカーによりそのC末端でC Lドメインに融合されている第1のペプチドリンカーによって互いに接続されているT N Fリガンドファミリーメンバーの2つのエクドメイン又はそれらの断片を含む第2の重鎖、及び第3のペプチドリンカーによりそのC末端がC H 1ドメインに融合されているT N Fリガンドファミリーメンバーの1つのエクドメイン又はその断片を含む第2の軽鎖（この場合、第2の重鎖は、配列番号116又は配列番号120のアミノ酸配列を含み、第2の軽鎖は配列番号117又は配列番号121のアミノ酸配列を含む）と

を含むT N Fファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子が提供される。特に、第2の重鎖は、配列番号116のアミノ酸配列を含み、第2の軽鎖は、配列番号117のアミノ酸配列を含む。

【0286】

さらに、本発明は、T N Fファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子であって、

(a) T n Cと特異的に結合することができる少なくとも1つの部分と、

(b) ジスルフィド結合により互いに連結されている第1及び第2のポリペプチドとを含む、

第1のポリペプチドがC H 3ドメインを含有すること、及び第2のポリペプチドがC H 3ドメインを含有することをそれぞれ特徴とし、第1のポリペプチドが、ペプチドリンカーにより互いに及びC H 3ドメインのC末端に接続されているT N Fリガンドファミリーメンバーの2つのエクドメイン若しくはそれらの断片を含み、第2のポリペプチドが、ペプチドリンカーによって前記ポリペプチドのC H 3ドメインのC末端に接続されている前記T N Fリガンドファミリーメンバーの1つのエクドメイン若しくはその断片を含む抗原結合分子を提供する。

【0287】

特に、

(i) 配列番号127のアミノ酸配列を含む第1の重鎖、配列番号125のアミノ酸配列を含む第2の重鎖、及び配列番号77のアミノ酸配列を含む1つの軽鎖、又は

(i i) 配列番号130のアミノ酸配列を含む第1の重鎖、配列番号131のアミノ酸配列を含む第2の重鎖、及び配列番号77のアミノ酸配列を含む1つの軽鎖、又は

(i i) 配列番号124のアミノ酸配列を含む第1の重鎖、配列番号133のアミノ酸配列を含む第2の重鎖、及び配列番号77のアミノ酸配列を含む1つの軽鎖、又は

(i i) 配列番号136のアミノ酸配列を含む第1の重鎖と、配列番号137のアミノ酸配列を含む第2の重鎖と、配列番号77のアミノ酸配列を含む1つの軽鎖

を含む、上文に記載のT N Fファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子が提供される。

【0288】

特定の態様では、そのようなT N Fファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子は、T n Cと特異的に結合することができる2つの部分を含む。

【0289】

一態様では、本発明は、T n Cと特異的に結合することができる2つの部分を含む、T N Fファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子を提供する。特に、

(i) 配列番号112のアミノ酸配列を含む第1の重鎖、配列番号113のアミノ酸配列を含む第2の重鎖、及び配列番号77のアミノ酸配列を含む2つの軽鎖、又は

(i i) 配列番号124のアミノ酸配列を含む第1の重鎖、配列番号125のアミノ酸配列を含む第2の重鎖、及び配列番号77のアミノ酸配列を含む2つの軽鎖

を含む、上文に記載のT N Fファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子が提供される。

【0290】

別の態様では、T N Fファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子であって、

(i) T N Cと特異的に結合することができるF a bドメインのV Lドメインを含む軽鎖

10

20

30

40

50

と、

(i i) F cドメインの第1のサブユニットと、T N Fリガンドファミリーメンバーの1つのエクトドメイン又はその断片を含む第2のポリペプチドとを含む融合ポリペプチドであって、第2のポリペプチドが、そのN末端でF cドメインの第1のサブユニットのC末端に融合されている、融合ポリペプチドと、

(i i i) T n Cと特異的に結合することができるF a bドメインのV Hドメインと、F cドメインの第2のサブユニットと、ペプチドリンカーにより互いに接続されているT N Fリガンドファミリーメンバーの2つのエクトドメイン又はそれらの断片を含む第1のポリペプチドとを含む重鎖であって、T n Cと特異的に結合することができるF a bドメインの可変重鎖が、そのC末端でF cドメインの第2のサブユニットのN末端に融合されており、T N Fリガンドファミリーメンバーの2つのエクトドメイン又はそれらの断片を含む第1のポリペプチドが、そのN末端でF cドメインの第2のサブユニットのC末端に融合されている、重鎖と

を含む、抗原結合分子が提供される。

【0291】

さらなる態様では、T N Fファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子であって、

(i) T n Cと特異的に結合することができるF a bドメインのV Lドメインを含む第1の軽鎖と、

(i i) T n Cと特異的に結合することができるF a bドメインのV Hドメインと、F cドメインの第1のサブユニットと、前記T N Fリガンドファミリーメンバーの1つのエクトドメイン又はその断片を含む第2のポリペプチドとを含む第1の重鎖であって、T n Cと特異的に結合することができるF a bドメインの可変重鎖が、そのC末端でF cドメインの第2のサブユニットのN末端に融合されており、第2のポリペプチドが、そのN末端でF cドメインの第1のサブユニットのC末端に融合されている、第1の重鎖と、

(i i i) 標的細胞抗原と特異的に結合することができないF a bドメインのV Hドメインと、F cドメインの第2のサブユニットと、ペプチドリンカーにより互いに接続されているT N Fリガンドファミリーメンバーの2つのエクトドメイン又はそれらの断片を含む第1のポリペプチドとを含む第2の重鎖であって、標的細胞抗原と特異的に結合することができないF a bドメインの可変重鎖が、そのC末端でF cドメインの第2のサブユニットのN末端に融合されており、T N Fリガンドファミリーメンバーの2つのエクトドメイン又はそれらの断片を含む第1のポリペプチドが、そのN末端でF cドメインの第2のサブユニットのC末端に融合されている第2の重鎖と、

(i v) 標的細胞抗原と特異的に結合することができないF a bドメインのV Lドメインを含む第2の軽鎖と

を含む、抗原結合分子が提供される。

【0292】

別の態様では、T N Fファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子であって、

(i) T n Cと特異的に結合することができるF a bドメインのV Lドメインを含む第1の軽鎖と、

(i i) T n Cと特異的に結合することができるF a bドメインのV Hドメインと、F cドメインの第1のサブユニットと、ペプチドリンカーにより互いに接続されているT N Fリガンドファミリーメンバーの2つのエクトドメイン又はそれらの断片を含む第1のポリペプチドとを含む第1の重鎖であって、T n Cと特異的に結合することができるF a bドメインの可変重鎖が、そのC末端でF cドメインの第2のサブユニットのN末端に融合されており、T N Fリガンドファミリーメンバーのエクトドメイン又はそれらの断片を含む第1のポリペプチドが、そのN末端でF cドメインの第1のサブユニットのC末端に融合されている、第1の重鎖と、

(i i i) 標的細胞抗原と特異的に結合することができないF a bドメインのV Hドメインと、F cドメインの第2のサブユニットと、前記T N Fリガンドファミリーメンバーの1つのエクトドメイン又はその断片を含む第2のポリペプチドとを含む第2の重鎖であって

10

20

30

40

50

て、標的細胞抗原と特異的に結合することができないF a bドメインの可変重鎖が、そのC末端でF cドメインの第2のサブユニットのN末端に融合されており、TNFリガンドファミリーメンバーの1つのエクトドメイン又はその断片を含む第2のポリペプチドが、そのN末端でF cドメインの第2のサブユニットのC末端に融合されている、第2の重鎖と、

(i v) 標的細胞抗原と特異的に結合することができないF a bドメインのV Lドメインを含む第2の軽鎖と

を含む抗原結合分子が提供される。

【0293】

さらなる特定の態様では、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子であって、

a) 配列番号104のアミノ酸配列と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一であるアミノ酸配列を含む第1の重鎖、配列番号77のアミノ酸配列と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一であるアミノ酸配列を含む第1の軽鎖、配列番号102のアミノ酸配列と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一であるアミノ酸配列を含む第2の重鎖、及び配列番号103のアミノ酸配列と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一であるアミノ酸配列を含む第2の軽鎖、又は

b) 配列番号104のアミノ酸配列と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一であるアミノ酸配列を含む第1の重鎖、配列番号77のアミノ酸配列と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一であるアミノ酸配列を含む第1の軽鎖、配列番号108のアミノ酸配列と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一であるアミノ酸配列を含む第2の重鎖、及び配列番号109のアミノ酸配列と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一であるアミノ酸配列を含む第2の軽鎖、又は

(c) 配列番号112のアミノ酸配列と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一であるアミノ酸配列を含む第1の重鎖、配列番号113のアミノ酸配列と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一であるアミノ酸配列を含む第2の重鎖、及び配列番号77のアミノ酸配列と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一であるアミノ酸配列を含む2つの軽鎖、又は

d) 配列番号104のアミノ酸配列と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一であるアミノ酸配列を含む第1の重鎖、配列番号77のアミノ酸配列と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一であるアミノ酸配列を含む第1の軽鎖、配列番号116のアミノ酸配列と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一であるアミノ酸配列を含む第2の重鎖、及び配列番号117のアミノ酸配列と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一であるアミノ酸配列を含む第2の軽鎖、又は

e) 配列番号104のアミノ酸配列と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一であるアミノ酸配列を含む第1の重鎖、配列番号77のアミノ酸配列と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一であるアミノ酸配列を含む第1の軽鎖、配列番号120のアミノ酸配列と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一であるアミノ酸配列を含む第2の重鎖、及び配列番号121のアミノ酸配列と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一であるアミノ酸配列を含む第2の軽鎖、又は

(f) 配列番号124のアミノ酸配列と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一であるアミノ酸配列を含む第1の重鎖、配列番号125のアミノ酸配列と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一であるアミノ酸配列を含む第2の重鎖、及び配列番号77のアミノ酸配列と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一であるアミノ酸配列を

10

20

30

40

50

含む2つの軽鎖、又は

(g) 配列番号127のアミノ酸配列と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一であるアミノ酸配列を含む第1の重鎖、配列番号128のアミノ酸配列と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一であるアミノ酸配列を含む第2の重鎖、及び配列番号77のアミノ酸配列と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一であるアミノ酸配列を含む1つの軽鎖、又は

(h) 配列番号130のアミノ酸配列と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一であるアミノ酸配列を含む第1の重鎖、配列番号131のアミノ酸配列と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一であるアミノ酸配列を含む第2の重鎖、及び配列番号77のアミノ酸配列と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一であるアミノ酸配列を含む1つの軽鎖、又は

(i) 配列番号124のアミノ酸配列と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一であるアミノ酸配列を含む第1の重鎖、配列番号133のアミノ酸配列と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一であるアミノ酸配列を含む第2の重鎖、及び配列番号77のアミノ酸配列と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一であるアミノ酸配列を含む1つの軽鎖、又は

(j) 配列番号136のアミノ酸配列と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一であるアミノ酸配列を含む第1の重鎖、配列番号137のアミノ酸配列と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一であるアミノ酸配列を含む第2の重鎖、及び配列番号77のアミノ酸配列と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%若しくは100%同一であるアミノ酸配列を含む1つの軽鎖

を含むTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子が提供される。

【0294】

さらなる特定の態様では、本発明は、

a) 配列番号104のアミノ酸配列を含む第1の重鎖、配列番号77のアミノ酸配列を含む第1の軽鎖、配列番号102のアミノ酸配列を含む第2の重鎖、及び配列番号103のアミノ酸配列を含む第2の軽鎖を含む分子、

b) 配列番号104のアミノ酸配列を含む第1の重鎖、配列番号77のアミノ酸配列を含む第1の軽鎖、配列番号108のアミノ酸配列を含む第2の重鎖、及び配列番号109のアミノ酸配列を含む第2の軽鎖を含む分子、

(c) 配列番号112のアミノ酸配列を含む第1の重鎖、配列番号113のアミノ酸配列を含む第2の重鎖、及び配列番号77のアミノ酸配列を含む2つの軽鎖を含む分子、

d) 配列番号104のアミノ酸配列を含む第1の重鎖、配列番号77のアミノ酸配列を含む第1の軽鎖、配列番号116のアミノ酸配列を含む第2の重鎖、及び配列番号117のアミノ酸配列を含む第2の軽鎖を含む分子、

e) 配列番号104のアミノ酸配列を含む第1の重鎖、配列番号77のアミノ酸配列を含む第1の軽鎖、配列番号120のアミノ酸配列を含む第2の重鎖、及び配列番号121のアミノ酸配列を含む第2の軽鎖を含む分子、

(f) 配列番号124のアミノ酸配列を含む第1の重鎖、配列番号125のアミノ酸配列を含む第2の重鎖、及び配列番号77のアミノ酸配列を含む2つの軽鎖を含む分子、

(g) 配列番号127のアミノ酸配列を含む第1の重鎖、配列番号128のアミノ酸配列を含む第2の重鎖、及び配列番号77のアミノ酸配列を含む1つの軽鎖を含む分子、

(h) 配列番号130のアミノ酸配列を含む第1の重鎖、配列番号131のアミノ酸配列を含む第2の重鎖、及び配列番号77のアミノ酸配列を含む1つの軽鎖を含む分子、

(i) 配列番号124のアミノ酸配列を含む第1の重鎖、配列番号133のアミノ酸配列を含む第2の重鎖、及び配列番号77のアミノ酸配列を含む1つの軽鎖を含む分子、

(j) 配列番号136のアミノ酸配列を含む第1の重鎖、配列番号137のアミノ酸配列を含む第2の重鎖、及び配列番号77のアミノ酸配列を含む1つの軽鎖を含む分子からなる群から選択されるTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子に関する。
【0295】

別の態様では、TNFリガンドファミリーメンバーがOX40Lであり、標的細胞抗原がテネイシンC (TnC) であり、TnCと特異的に結合することができる部分が、

(i) 配列番号67又は配列番号70のアミノ酸配列を含むCDR-H1と、

(ii) 配列番号68又は配列番号71のアミノ酸配列を含むCDR-H2と、

(iii) 配列番号69又は配列番号72のアミノ酸配列を含むCDR-H3とを含むVHドメイン、及び

(iv) 配列番号55又は配列番号58のアミノ酸配列を含むCDR-L1と、

(v) 配列番号56又は配列番号59のアミノ酸配列を含むCDR-L2と、

(vi) 配列番号57又は配列番号60のアミノ酸配列を含むCDR-L3とを含むVLドメイン

を含むTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子が提供される。

【0296】

特定の態様では、TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子は、

(i) 配列番号46のアミノ酸配列を含むVHドメインを含む第1の重鎖、及び配列番号45のアミノ酸配列を含むVLドメインを含む第1の軽鎖、又は配列番号48のアミノ酸配列を含むVHドメインを含む第1の重鎖、及び配列番号47のアミノ酸配列を含むVLドメインを含む第1の軽鎖と、

(ii) 配列番号195からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む第2の重鎖と、

(iii) 配列番号196のアミノ酸配列を含む第2の軽鎖とを含む。

【0297】

ポリヌクレオチド

本発明は、本明細書に記載の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又はその断片をさらに提供する。

【0298】

本発明の抗原結合分子の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発現されることもあり、又は共発現される複数の（例えば、2つ以上の）ポリヌクレオチドとして発現されることもある。共発現されるポリヌクレオチドによりコードされているポリペプチドは、例えば、ジスルフィド結合又は他の手段によって機能性抗原結合分子を形成するように結合することができる。例えば、免疫グロブリンの軽鎖部分は、該免疫グロブリンの重鎖部分とは別のポリヌクレオチドによりコードされ得る。共発現されたとき、重鎖ポリペプチドは、軽鎖ポリペプチドと結合して、免疫グロブリンを形成することになる。

【0299】

一部の態様では、単離されたポリヌクレオチドは、本明細書に記載の本発明による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、本明細書に記載の本発明によるTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子に含まれているポリペプチドをコードする。

【0300】

一態様では、本発明は、TNFファミリーリガンドトリマー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であって、(a) TnCと特異的に結合することができる部分をコードする配列と、(b) ペプチドリンカーにより互いに接続されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクトドメイン又はそれらの2つの断片を含むポリペプチドをコードする配列と、(c) TNFリガンドファミリーメンバーの1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とを含む、単離されたポリヌクレオチドに関する。

【0301】

別の態様では、本発明は、4-1BBリガンドトリマー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であって、(a) TnCと特異的に結合することができる部分をコードする配列と、(b) ペプチドリンカーにより互いに接続されている4-1BBLの2つのエクドメイン又はそれらの2つの断片を含むポリペプチドをコードする配列と、(c) 4-1BBLの1つのエクドメイン又はその断片を含むポリペプチドをコードする配列とを含む、単離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0302】

一実施態様では、本発明は、配列番号55、配列番号56、配列番号57、配列番号58、配列番号59、配列番号60、配列番号67、配列番号68、配列番号69、配列番号70、配列番号71及び配列番号72に記載の重鎖若しくは軽鎖相補性決定領域(CDR)のうちの1つ又は複数(例えば、2つ、3つ、4つ、5若しくは6つ)をコードする配列、又は前記CDRについての特異性決定残基(SDR)を少なくとも含有する配列の変異体若しくは切断型を含む。

10

【0303】

別の実施態様では、ポリヌクレオチドは、配列番号55、配列番号56、配列番号57、配列番号58、配列番号59、配列番号60、配列番号67、配列番号68、配列番号69、配列番号70、配列番号71及び配列番号72から選択される3つの重鎖CDR(例えば、HCDR1、HCDR2及びHCDR3)若しくは3つの軽鎖CDR(例えば、LCDR1、LCDR2及びLCDR3)をコードする配列、又は前記3つの相補性決定領域の各々についてのSDRを少なくとも含有する配列の変異体若しくは切断型を含む。さらに別の実施態様では、ポリヌクレオチドは、配列番号55、配列番号56、配列番号57、配列番号58、配列番号59、配列番号60、配列番号67、配列番号68、配列番号69、配列番号70、配列番号71及び配列番号72から選択される3つの重鎖CDR(例えば、HCDR1、HCDR2及びHCDR3)及び3つの軽鎖軽鎖CDR(例えば、LCDR1、LCDR2及びLCDR3)をコードする配列を含む。

20

【0304】

特定の実施態様では、1つ又は複数のCDRをコードするポリヌクレオチドは、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52、配列番号53、配列番号54、配列番号61、配列番号62、配列番号63、配列番号64、配列番号65及び配列番号66のCDRヌクレオチド配列のうちの1つ又は複数と少なくとも約90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一である配列を含む。

30

【0305】

さらなる実施態様では、ポリヌクレオチドは、配列番号46及び配列番号48の群から選択される重鎖可変領域をコードする配列、並びに／又は配列番号45及び配列番号47の群から選択される軽鎖可変領域をコードする配列を含む。特定の実施態様では、重鎖及び／又は軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドは、配列番号41、配列番号42、配列番号43及び配列番号44からなる可変領域ヌクレオチド配列の群からなる群から選択される配列、又はそれらの組合せを含む。

【0306】

具体的な実施態様では、ポリヌクレオチドは、配列番号46及び配列番号48の群から選択される重鎖可変領域をコードする配列と、重鎖定常領域、特にヒト重鎖定常領域、をコードする配列とを含む。特定の実施態様では、前記重鎖定常領域は、Fc領域を含むヒトIgG重鎖定常領域、特にヒトIgG1重鎖定常領域である。別の実施態様では、ポリヌクレオチドは、配列番号45及び配列番号47の群から選択される軽鎖可変領域をコードする配列と、軽鎖定常領域、特にヒト軽鎖定常領域、をコードする配列とを含む。

40

【0307】

一実施態様では、本発明は、配列番号77及び配列番号79からなる群から選択される配列と少なくとも約90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同

50

一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする第1の単離されたポリヌクレオチドと、配列番号78及び配列番号80からなる群から選択される配列と少なくとも約90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする第2の単離されたポリヌクレオチドとを含む、組成物に関する。

【0308】

一実施態様では、本発明は、配列番号77及び配列番号79からなる群から選択される配列と少なくとも約90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一である配列を含む第1の単離されたポリヌクレオチドと、配列番号83及び配列番号84からなる群から選択される配列と少なくとも約90%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一である配列を含む第2の単離されたポリヌクレオチドとを含む、組成物に関する。

【0309】

さらなる態様では、本発明は、配列番号172、配列番号173、配列番号174、配列番号175又は配列番号183で示されるアミノ酸配列と少なくとも約90%、95%、98%又は100%同一であるアミノ酸配列を含む2つの4-1BB断片を含むポリペプチドをコードする配列を含む単離されたポリヌクレオチドに関し、及び配列番号172、配列番号173、配列番号174、配列番号175又は配列番号183で示されるアミノ酸配列と少なくとも約90%、95%、98%又は100%同一であるアミノ酸配列を含む1つの4-1BB断片を含むポリペプチドをコードする配列を含むポリヌクレオチドに関する。

【0310】

さらに、OX40リガンドトリマー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であって、(a) TnCと特異的に結合することができる部分をコードする配列と、(b) ペプチドリinkerにより互いに接続されているOX40Lの2つのエクドメイン又はそれらの2つの断片を含むポリペプチドをコードする配列と、(c) OX40Lの1つのエクドメイン又はその断片を含むポリペプチドをコードする配列とを含む、単離されたポリヌクレオチドが提供される。

【0311】

別の態様では、本発明は、配列番号181又は配列番号182で示されるアミノ酸配列と少なくとも約90%、95%、98%又は100%同一であるアミノ酸配列を含む2つの4-1BB断片を含むポリペプチドをコードする配列を含む単離されたポリヌクレオチドに関し、及び配列番号181又は配列番号182で示されるアミノ酸配列と少なくとも約90%、95%、98%又は100%同一であるアミノ酸配列を含む1つの4-1BB断片を含むポリペプチドをコードする配列を含むポリヌクレオチドに関する。

【0312】

さらなる態様では、本発明は、本明細書で開示される特異的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、本明細書で開示される特異的cDNA配列の1つと同一である配列を含むポリヌクレオチドに関する。

【0313】

他の態様では、核酸分子は、配列番号176、177、184、185、186、187、188若しくは189の何れか1つに記載のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含むか、又はそのようなヌクレオチド配列からなる。さらなる態様では、核酸分子は、配列番号102、103、104、108、109、112、113、116、117、120、121、124、125、127、130、131、133、136、137、178及び179の何れか1つに記載のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含むか、又はそのようなヌクレオチド配列からなる。

【0314】

さらに他の態様では、核酸分子は、配列番号41、42、43、44、49、50、5

1、52、53、54、61、62、63、64、65、66、73、74、75、76、81、82、88、89、90、91、96、98、99、100、106、107、110、111、114、115、118、119、122、123、126、128、129、132、134若しくは135からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むか、又はそのようなヌクレオチド配列からなる。

【0315】

ある特定の態様では、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、RNAであり、例えば、メッセンジャーRNA (mRNA) の形態である。本発明のRNAは、一本鎖のものであってもよく、又は二本鎖のものであってもよい。

【0316】

組換え方法

本発明の抗原結合分子は、例えば、固相ペプチド合成（例えば、メリフィールド固相合成）又は組換え産生によって得ることができる。組換え産生の場合、抗原結合分子又はそのポリペプチド断片をコードする1つ又は複数のポリヌクレオチド、例えば上で説明したようなポリヌクレオチドは、宿主細胞におけるさらなるクローニング及び／又は発現のために、単離され、1つ又は複数のベクターに挿入される。そのようなポリヌクレオチドは、従来の手順を使用して容易に単離及び配列決定することができる。本発明の一態様では、本発明のポリヌクレオチドのうちの1つ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。当業者に周知である方法を使用して、抗原結合分子（断片）のコード配列を適切な転写／翻訳制御シグナルと共に含有する発現ベクターを構築することができる。これらの方法には、インビトロ組換えDNA手法、合成手法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)に記載の手法を参照されたい。発現ベクターは、プラスミドの一部、ウイルスであることができ、又は核酸断片であってもよい。発現ベクターは、発現カセットを含む、抗原結合分子又はそのポリペプチド断片（すなわち、コード化領域）をコードするポリヌクレオチドが、プロモーター及び／又は他の転写若しくは翻訳制御エレメントと作動可能に結合した状態で発現カセットにクローニングされる。本明細書で使用する「コード化領域」は、アミノ酸に翻訳されるコドンからなる核酸の一部分である。「終止コドン」(TAG、TGA又はTAA)は、アミノ酸に翻訳されないが、存在する場合にはコード化領域の一部とみなされることがあり、しかし、何れの隣接配列も、例えば、プロモーター、リボソーム結合部位、転写ターミネーター、イントロン、5'及び3'非翻訳領域等は、コード化領域の一部ではない。2つ以上のコード化領域が、単一のポリヌクレオチドコンストラクト内に、例えば単一のベクター上に、存在することができ、又は別々のポリヌクレオチドコンストラクト内に、例えば、別々の（異なる）ベクター上に存在することができる。さらに、何れのベクターも、単一のコード化領域を含有することができ、又は2つ以上のコード化領域を含むことができ、例えば、本発明のベクターは、タンパク質切断による後翻訳又は共翻訳によって最終タンパク質に分離される1つ又は複数のポリペプチドをコードすることができる。加えて、本発明のベクター、ポリヌクレオチド又は核酸は、本発明の抗原結合分子若しくはそのポリペプチド断片又はそれらの変異体若しくは誘導体をコードするポリヌクレオチドに融合されている又は融合されていない、異種コード化領域をコードすることができる。異種コード配列には、限定ではないが、特殊化し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性ドメインが含まれる。作動可能な結合は、遺伝子産物の発現が調節配列の影響下又は制御下で起こるように遺伝子産物、例えばポリペプチド、のコード化領域が1つ又は複数の調節配列と結合している場合である。2つのDNA断片（例えば、ポリペプチドコード化領域

10

20

30

40

50

及びそれと結合しているプロモーター)は、プロモーター機能の誘導が、所望の遺伝子産物をコードするmRNAの転写をもたらす場合、及び2つのDNA断片間の結合の性質が、遺伝子産物の発現を指示する発現調節配列の能力に干渉しない、又は転写されるDNAテンプレートの能力に干渉しない場合、「作動可能に結合している」。したがって、プロモーター領域とポリペプチドをコードする核酸とは、プロモーターがその核酸の転写を果たすことができた場合、作動可能に結合していることになる。プロモーターは、所定の細胞内でのみDNAの実質的転写を指示する細胞特異的プロモーターであってもよい。プロモーターに加えて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を、ポリヌクレオチドと作動可能に結合させて、細胞特異的転写を指示することもできる。

【0317】

好適なプロモーター及び他の転写制御領域は、本明細書で開示される。様々な転写制御領域が当業者に公知である。これらの転写制御領域としては、限定ではないが、脊椎動物細胞において機能する転写制御領域、例えば、これらに限定されないが、サイトメガロウイルスから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と共に、前初期プロモーター)、シミアンウイルス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)が挙げられる。他の転写制御領域としては、アクチン、熱ショックタンパク質、ウシ成長ホルモン及びウサギαグロビン等の、脊椎動物遺伝子に由来するもの、並びに真核細胞における遺伝子発現を制御することができる他の配列が挙げられる。さらなる好適な転写制御領域としては、組織特異的プロモーター及びエンハンサー、並びに誘導性プロモーター(例えば、テトラサイクリンを誘導することができるプロモーター)が挙げられる。同様に、様々な翻訳制御エレメントが当業者に公知である。これらの翻訳制御エレメントとしては、リボソーム結合部位、翻訳開始及び終結コドン、並びにウイルス系に由来するエレメント(特に、配列内リボソーム進入部位、すなわちIRESであって、CITE配列とも呼ばれる)が挙げられるが、これらに限定されない。発現カセットは、他の特徴、例えば、複製開始点、及び／又は染色体組み込みエレメント、例えばレトロウイルス長末端反復(LTR)又はアデノ随伴ウイルス(AV)逆位末端反復(ITR)も含むことができる。

【0318】

本発明のポリヌクレオチド及び核酸コード化領域を、本発明のポリヌクレオチドによってコードされてい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さらなるコード化領域と結合させることができる。例えば、抗原結合分子又はそのポリペプチド断片の分泌が所望される場合、シグナル配列をコードするDNAを、本発明の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することができる。シグナル仮説によれば、哺乳動物細胞により分泌されるタンパク質は、粗面小胞体を横断する成長ポリペプチド鎖の輸送が開始されたら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、脊椎動物細胞により分泌されるポリペプチドにはこのポリペプチドのN末端に融合されたシグナルペプチドがあり、このシグナルペプチドが、翻訳されたポリペプチドから切断されて、そのポリペプチドの分泌形態又は「成熟」形態を生じさせることを承知している。ある特定の実施態様では、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るか、又はそれと作動可能に結合しているポリペプチドの分泌を指示する能力を保持するその配列の機能的誘導体を使用される。或いは、異種哺乳動物シグナルペプチド、又はその機能的誘導体を使用してもよい。例えば、野生型リーダー配列を、ヒト組織プラスミノゲン活性化因子(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してもよい。

【0319】

後の精製を助長するために使用することができる短いタンパク質配列(例えば、ヒスチジンタグ)又は融合タンパク質への標識を支援するために使用することができる短い配列をコードするDNAを、本発明の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内に又はそのようなポリヌクレオチドの末端に含めてもよい。

【0320】

本発明のさらなる態様では、本発明の1つ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。ある特定の実施態様では、本発明の1つ又は複数のベクターを含む宿主細胞が提供される。ポリヌクレオチド又はベクターは、ポリヌクレオチド及びベクターに関して本明細書にそれぞれ記載の特徴のいずれかを、個々に又は組み合わせて取り入れることができる。一態様では、宿主細胞は、本発明の本発明の抗原結合分子（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、そのようなベクターで形質転換されている、又はそのようなベクターがトランスフェクトされている）。本明細書で使用する用語「宿主細胞」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に操作することができる任意の種類の細胞システムを指す。抗原結合分子の複製に及び発現を支持するのに好適な宿主細胞は、当該技術分野で周知である。そのような細胞に特定の発現ベクターを適宜トランスフェクト又は形質導入してもよく、そして大量のベクター含有細胞を大規模発酵槽への播種のために増殖させて、臨床応用のための十分な量の抗原結合分子を得ることができる。好適な宿主細胞としては、原核微生物、例えば大腸菌、又は様々な真核細胞、例えばチャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）、昆虫細胞等が挙げられる。例えば、特にグリコシル化の必要がない場合、ポリペプチドを細菌において産生させてもよい。発現後、ポリペプチドを可溶型画分中の細菌細胞ペーストから単離してもよく、そしてさらに精製することができる。原核生物に加えて、糸状菌又は酵母等の真核微生物は、ポリペプチドをコードするベクターのための好適なクローニング又は発現宿主であり、そのような糸状菌又は酵母等の真核微生物には、グリコシル化経路が「ヒト化」されており、その結果、部分的又は完全ヒトグリコシル化パターンを有するポリペプチドを産生することになる、真菌及び酵母株が含まれる。Gerngross、Nat Biotech 22、1409-1414（2004）、及びLi等、Nat Biotech 24、210-215（2006）を参照されたい。

【0321】

（グリコシル化された）ペプチドの発現に好適な宿主細胞はまた、多細胞生物（無脊椎動物及び脊椎動物）にも由来する。無脊椎動物細胞の例としては、植物及び昆虫細胞が挙げられる。非常に多数のバキュロウイルス株が同定されており、それらは、特にヨトウガ（*Spodoptera frugiperda*）細胞のトランスフェクションのために、昆虫細胞と併用され得る。植物細胞培養物も宿主として用いることができる。例えば、米国特許第5959177号、同第6040498号、同第6420548号、同第7125978号及び同第6417429号を参照されたい（これらの特許文献には、トランスジェニック植物において抗体を産生させるためのPLANTIBODIES（商標）技術が記載されている）。脊椎動物細胞も宿主として使用することができる。例えば、懸濁状態での増殖に適応する哺乳動物細胞株は、有用であり得る。有用な哺乳動物宿主細胞株の他の例は、SV40により形質転換されたサル腎臓CV1系（COS-7）、ヒト胎児腎臓系（例えば、Graham等、J Gen Virol 36、59（1977）に記載の、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）に記載の、TM4細胞）、サル腎臓細胞（CV1）、アフリカミドリザル腎臓細胞（VERO-76）、ヒト子宮頸がん細胞（HELA）、イヌ腎臓細胞（MDCK）、バッファローラット肝臓細胞（BRL 3A）、ヒト肺細胞（W138）、ヒト肝臓細胞（Hep G2）、マウス乳房腫瘍細胞（MMT 060562）、TRI細胞（例えば、Mather等、Annals N.Y. Acad Sci 383、44-68（1982）に記載のもの）、MRC 5細胞、及びFS4細胞である。他の有用な哺乳動物宿主細胞株としては、dhfr-CHO細胞（Urlaub等、Proc Natl Acad Sci USA 77、4216（1980））をはじめとするチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、並びに骨髓腫細胞株、例えば、YO、NS0、P3X63及びSp2/0が挙げられる。タンパク質産生に好適な哺乳動物宿主細胞の概説については、例えば、Yazaki及びWu、Methods in Molecular Biology、248巻（B.K.C. Lo編、Humana Press、Totowa、NJ）、p255-268（2003）を参照されたい。宿主細胞としては

、ほんの数例を挙げれば、培養細胞、例えば哺乳動物培養細胞、酵母細胞、昆虫細胞、細菌細胞及び植物細胞が挙げられるが、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若しくは動物組織内に含まれている細胞も挙げられる。一実施態様では、宿主細胞は、真核細胞、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、Y0、NS0、Sp20細胞）である。これらの系において外来遺伝子を発現させるための標準的技術は、当該技術分野で公知である。免疫グロブリンの重鎖又は軽鎖のどちらかを含むポリペプチドを発現する細胞を、免疫グロブリン鎖の他方も発現するように操作することができ、その結果、発現産物は、重鎖と軽鎖の両方を有する免疫グロブリンになる。

【0322】

一態様では、本発明の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であって、本明細書で提供されるような、本発明の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、本発明の抗原結合分子又はそのポリペプチド断片の発現に好適な条件下で培養するステップ、及び宿主細胞（又は宿主細胞培地）から本発明の抗原結合分子又はそのポリペプチド断片を回収するステップを含む方法が提供される。

【0323】

本発明のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子中の成分（TnCと特異的に結合することができる少なくとも1つの部分と、TNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクドメイン又はそれらの断片を含む1つのポリペプチドと、前記TNFリガンドファミリーメンバーの1つのエクドメイン又はその断片を含むポリペプチド）は、互いに遺伝子融合されていない。ポリペプチドは、その成分（TNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクドメイン又はそれらの断片、及び他の成分、例えばCH又はCL）が直接的に又はリンカー配列によって互いに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、又は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成分間のリンカー配列の例は、本明細書に提供される配列の中で見付けられる。所望される場合には融合タンパク質の個々の成分を分離するために、さらなる配列、例えばエンドペプチダーゼ認識配列、を切断部位に組み込むこともできる。

【0324】

ある特定の実施態様では、抗原結合分子の一部を形成する、TnCと特異的位結合することができる部分（例えば、Fab断片）は、抗原と結合することができる免疫グロブリン可変領域を少なくとも含む。可変領域は、天然に存在する又は天然に存在しない抗体及びそれらの断片の一部を形成することができ、並びにそのような抗体及びそれらの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を参照）。天然に存在しない抗体は、固相ペプチド合成を使用して構築することができ、組換え産生することができ（例えば、米国特許第4186567号に記載の通り）、又は例えば、可変重鎖と可変軽鎖とを含むコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングすることにより、得ることができる（例えば、McCaffertyの米国特許第5969108号を参照されたい）。

【0325】

任意の動物種の免疫グロブリンを本発明で使用するすることができる。本発明において有用な非限定的免疫グロブリンは、マウス、霊長類又はヒト起源のものであり得る。融合タンパク質がヒト用である場合、免疫グロブリンの定常領域がヒトからのものであるキメラ形態の免疫グロブリンを使用してもよい。ヒト化形態又は完全ヒト形態の免疫グロブリンを当該技術分野で周知の方法に従って調製することもできる（例えば、Winterの米国特許第5565332号を参照されたい）。ヒト化は、様々は方法によって果たすことができ、そのような方法としては、（a）肝要なフレームワーク残基（例えば、良好な抗原結合アフィニティー若しくは抗体機能の保持に重要であるもの）を保持して若しくは保持

10

20

30

40

50

せずにヒト（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に非ヒト（例えば、ドナー抗体）CDRをグラフトする方法、（b）ヒトフレームワーク及び定常領域上に非ヒト特異性決定領域（SDR若しくはa-CDR；抗体-抗原相互作用に肝要な残基）のみをグラフトする方法、又は（c）非ヒト可変ドメイン全体を移植するが、それらを表面残基の置換によりヒト様切片で「クローキング」する方法が挙げられるが、これらに限定されない。ヒト化抗体及びそれらの作製方法は、例えば、Almagro及びFransson、Front Biosci 13、1619-1633（2008）に概説があり、さらに、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）（該文献にはSDR（a-CDR）グラフト化が記載されている）；Padlan、Mol Immunol 28、489-498（1991）（該文献には「リサーフェーシング」が記載されている）；Dall'Acqua等、Methods 36、43-60（2005）（該文献には「FRシャッフリング」が記載されている）；並びにOsbourne等、Methods 36、61-68（2005）及びKlimka等、Br J Cancer 83、252-260（2000）（該文献にはFRシャッフリングへの「誘導選択」アプローチが記載されている）に記載されている。本発明による特定の免疫グロブリンは、ヒト免疫グロブリンである。ヒト抗体及びヒト可変領域は、当該技術分野で公知の様々な手法を使用して産生することができる。ヒト抗体は、van Dijk及びvan de Winkel、Curr Opin Pharmacol 5、368-74（2001）並びにLonberg、Curr Opin Immunol 20、450-459（2008）に一般的に記載されている。ヒト可変領域は、ハイブリドーマ法により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、そのようなヒトモノクローナル抗体から誘導することができる（例えば、Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications、p51-63（Marcel Dekker, Inc., New York, 1987）を参照されたい）。ヒト抗体及びヒト可変領域は、抗原曝露に応答してインタクトなヒト抗体又はヒト可変領域を有するインタクトな抗体を産生するように修飾されたトランスジェニック動物に免疫原を投与することによって調製することもできる（例えば、Lonberg、Nat Biotech 23、1117-1125（2005）を参照されたい）。ヒト抗体及びヒト可変領域は、ヒト由来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り生成することもできる（例えば、Hoogenboom等、Methods in Molecular Biology 178、1-37（O'Brien等編、Humana Press, Totowa, NJ, 2001）；及びMcCafferty等、Nature 348、552-554；Clackson等、Nature 352、624-628（1991）を参照されたい）。ファージは、概して、抗体断片を単鎖Fv（scFv）断片として提示するか、又はFab断片として提示する。

【0326】

ある特定の態様では、本発明の抗原結合分子に含まれている標的細胞抗原と特異的に結合することができる部分（例えば、Fab断片）は、例えば、PCT公開・国際公開第2012/020006号又は米国特許出願公開第2004/0132066に従って、結合アフィニティー増強を有するように操作される。特異的抗原決定基と結合する本発明の抗原結合分子の能力は、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、又は当業者によく知られている他の手法、例えば表面プラズモン共鳴法（Liljeblad等、Glyco J17、323-329（2000））及び伝統的な結合アッセイ（Heeley、Endocr Res 28、217-229（2002））、どちら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

10

20

30

40

50

結合について参照抗体と競合する抗原結合分子を同定してもよい。ある特定の実施態様では、そのような競合抗原結合分子は、参照抗原結合分子が結合するのと同じエピトープ（例えば、直鎖状又は立体構造エピトープ）と結合する。抗原結合分子が結合するエピトープの詳細な例示的マッピング方法は、*Methods in Molecular Biology* 66巻（Humana Press、Totowa、NJ）のMorris（1996）「*Epitope Mapping Protocols*」に提供されている。例示的競合アッセイでは、固定化抗原が、その抗原と結合する第1の標識抗原結合分子と、その抗原への結合について第1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ことになる第2の非標識抗原結合分子を含む溶液中で、インキュベートされる。第2の抗原結合分子は、ハイブリドーマ上清中に存在してもよい。コントロールとして、固定化抗原が、第1の標識抗原結合分子を含むが第2の非標識抗原結合分子を含まない溶液中でインキュベートされる。第1の抗体の抗原への結合が可能な条件下でのインキュベーション後、過剰な非結合抗体が除去され、固定化抗原と結合している標識の量が測定される。固定化抗原と結合している標識の量が、試験試料においてコントロール試料と比べて実質的に低減された場合には、それは、第2の抗原結合分子が第1の抗原結合分子と抗原への結合について競合していることを示す。Harlow及びLane（1988）*Antibodies: A Laboratory Manual* 第14章（Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor、NY）を参照されたい。

【0327】

本明細書に記載の通りに調製された本発明の抗原結合分子を、当該技術分野で公知の技法、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等により精製してもよい。特定のタンパク質を精製するために使用される実際の条件は、一部は、正味電荷、疎水性、親水性などのような因子に依存することになり、当業者には明らかであるであろう。アフィニティークロマトグラフィー精製には、抗原結合分子が結合する抗体、リガンド、受容体又は抗原を使用することができる。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に、プロテインA又はプロテインGを有するマトリックスを使用してもよい。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使用して、本質的に実施例に記載するように抗原結合分子を単離することができる。ゲル電気泳動、高圧液体クロマトグラフィー等を含む、様々な周知分析法の何れによって抗原結合分子又はその断片の純度を判定してもよい。例えば、実施例に記載するように発現された抗原結合分子は、還元又は非還元SDS-PAGEにより実証されるように、インタクトであること及び適切に集合することを示した。

【0328】

アッセイ

本明細書で提供される抗原結合分子を、当該技術分野で公知の様々なアッセイにより、同定することができ、それらの物理的／化学的特性及び／又は生物活性についてスクリーニングすること又は特徴を明らかにすることができる。

【0329】

1. アフィニティーアッセイ

本明細書で提供される抗原結合分子のTnCに対する及び／又は対応するTNF受容体に対するアフィニティーを、BIAcore装置（GE Healthcare）等の標準的計測手段と、受容体又は標的タンパク質、例えば組換え発現により得ることができるものを使用して、表面プラズモン共鳴（SPR）により、実施例に記載の方法に従って判定することができる。TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子の標的細胞抗原に対するアフィニティーも、BIAcore装置（GE Healthcare）等の標準的計測手段と、受容体又は標的タンパク質、例えば組換え発現により得ることができるものを使用して、表面プラズモン共鳴（SPR）により判定することができる。結合アフィニティーの測定についての説明に役立つ例示的な具体的実施態様を実施例4に記

載する。一態様によれば、 K_D は、B I A C O R E（登録商標）T 1 0 0マシン（G E H e a l t h c a r e）を使用して25℃で表面プラズモン共鳴により測定される。

【0330】

2. 結合アッセイ及び他のアッセイ

本明細書で提供されるTNFファミリーリガンドトリマー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細胞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抹消血単核細胞（PBMC）が結合アッセイに使用される。これらの細胞は、単離後に直接使用される（ナイーブPBMC）か、又は刺激後に使用される（活性化PBMC）。別の態様では、活性化マウス脾細胞（TNF受容体分子を発現する）を使用して、本発明のTNFファミリーリガンドトリマー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。

【0331】

さらなる態様では、TNF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。

【0332】

別の態様では、競合アッセイを使用して、標的又はTNF受容体との結合について特定の抗体又は抗原結合分子とそれぞれ競合する抗原結合分子を同定することができる。ある特定の実施態様では、そのような競合抗原結合分子は、特定の抗標的抗体又は特定の抗TNF受容体抗体が結合するのと同じエピトープ（例えば、直鎖状又は立体構造エピトープ）と結合する。抗体が結合するエピトープの詳細な例示的マッピング方法は、Methods in Molecular Biology 66巻（Humana Press, Totowa, NJ）のMorris（1996）「Epitope Mapping Protocols」に提供されている。

【0333】

3. 活性アッセイ

一態様では、特定の標的細胞抗原と結合し、生物活性を有する特定のTNF受容体と結合する、TNFファミリーリガンドトリマー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。生物活性としては、例えば、標的細胞抗原を発現する細胞上のTNF受容体によるアゴニストシグナル伝達を挙げることができる。アッセイによりインビトロでそのような生物活性を有すると同定されたTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子も提供される。

【0334】

ある特定の態様では、本発明のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子は、そのような生物活性について試験される。本発明の分子の生物活性を検出するためのアッセイは、実施例12に記載のものである。さらに、細胞溶解を（例えば、LDH放出の測定により）検出するアッセイ、誘導アポトーシス動態を（例えば、カスパーゼ3／7活性の測定により）検出するアッセイ、又はアポトーシスを（例えば、TUNELアッセイを使用して）検出するアッセイは、当該技術分野で周知である。加えて、そのような複合体の生物活性を、NK細胞、NK T細胞若しくは $\gamma\delta$ T細胞等の様々なリンパ球サブセットの生存、増殖及びリンホカイン分泌に対するそれらの効果を評価することによって、又は樹状細胞、単球／マクロファージ若しくはB細胞等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定することによって、評定することができる。

【0335】

薬学的組成物、製剤及び投与経路

さらなる態様では、本発明は、本明細書で提供される抗原結合分子の何れかを含む薬学的組成物であって、例えば、下記治療方法の何れかにおいて使用するための薬学的組成物が提供される。一実施態様では、薬学的組成物は、本明細書で提供される抗原結合分子の何れかと、少なくとも1つの薬学的に許容される添加剤とを含む。別の実施態様では、薬学的組成物は、本明細書で提供される抗原結合分子の何れかと、少なくとも1つのさらな

る治療剤、例えば下記のものを含む。

【0336】

本発明の薬学的組成物は、薬学的に許容される添加剤に溶解又は分散された1つ又は複数の抗原結合分子の治療有効量を含む。句「薬学的又は薬学的に許容される」は、用いられる投薬量及び濃度でレシピエントに対して一般に非毒性である、すなわち、例えばヒト等の動物に必要なに応じて投与されたときに有害反応、アレルギー反応又は他の望ましくない反応を生じさせない、分子実体及び組成物を指す。少なくとも1つの抗原結合分子と任意選択的にさらなる活性成分とを含有する医薬組成物の調製は、本明細書に参照により援用される 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公知であるであろう。特に、組成物は、凍結乾燥製剤又は水溶液である。本明細書で使用される「薬学的に許容される添加剤」は、当業者に公知であるであろうような、任意の及び全ての溶媒、バッファー、分散媒、コーティング剤、界面活性剤、抗酸化剤、防腐剤（例えば、抗菌剤、抗真菌剤）、等張剤、塩、安定剤及びこれらの組合せを含む。

【0337】

非経口組成物としては、注射、例えば、皮下、皮内、病巣内、静脈内、動脈内、筋肉内、髄腔内又は腹腔内注射による投与用に設計されたものが挙げられる。注射のために、本発明の抗原結合分子を、水溶液中で、好ましくは、生理的に適合性の緩衝液、例えばハンクス液、リンゲル液又は生理食塩水バッファー中で製剤化することができる。溶液は、調合剤、例えば、懸濁剤、安定剤及び／又は分散剤を含有してもよい。或いは、融合タンパク質は、使用前に好適なビヒクル、例えば、滅菌した発熱物質不含の水で構成するための粉末形態であってもよい。滅菌注射用溶液は、必要量の本発明の融合タンパク質を、必要に応じて、下に列挙する様々な他の成分と共に、適切な溶媒に添合することにより調製される。無菌状態は、例えば滅菌濾過膜による濾過により、容易に果たすことができる。一般に、分散体は、塩基性分散媒及び／又は他の成分を含有する滅菌ビヒクルに滅菌された様々な活性成分を添合することによって調製される。滅菌注射用溶液、懸濁液又はエマルジョンの調製のための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、任意のさらなる所望成分を加えた活性成分の粉末を、前以て滅菌濾過されたその液体媒体から生じさせる、真空乾燥及び凍結乾燥手法である。液体媒体は、必要に応じて適切に緩衝されるべきであり、注射前に、十分な食塩水又はグルコースを用いて先ず液体希釈剤を等張性にすべきである。組成物は、製造及び保管条件下で安定していなければならない。エンドトキシン汚染を安全レベルで、例えばタンパク質1mg当り0.5ng未満で、最小限に保つべきであることは理解されるであろう。薬学的に許容される好適な添加剤としては、バッファー、例えば、リン酸塩、クエン酸塩及び他の有機酸；抗酸化剤（アスコルビン酸及びメチオニンを含む）；防腐剤（例えば、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；ヘキサメトニウムクロリド；ベンザルコニウムクロリド；ベンゼトニウムクロリド；フェノール、ブチル若しくはベンジルアルコール；アルキルパラベン、例えばメチル若しくはプロピルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾール）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；タンパク質、例えば、血清アルブミン、ゼラチン若しくは免疫グロブリン；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、アルギニン若しくはリジン；単糖類、二糖類及び他の糖（グルコース、マンノース若しくはデキストリンを含む）；キレート剤、例えば、EDTA；糖類、例えば、スクロース、マンニトール、トレハロース若しくはソルビトール；塩形成性対イオン、例えばナトリウム、金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）；並びに／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）が挙げられるが、これらに限定されない。注射用水性懸濁液は、懸濁液の粘度を上昇させる化合物、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、デキストラン等を含有してもよい。任意選択的に、懸濁液は、高濃度溶液の調製

10

20

30

40

50

を可能にするために、好適な安定剤、又は化合物の溶解度を増加させる好適な薬剤も含有してもよい。加えて、活性化合物の懸濁液を適切な注射用油性懸濁液として調製することができる。好適な親油性溶媒又はビヒクルとしては、脂肪油、例えばゴマ油、又は合成脂肪酸、例えば、エチルクレート (ethyl cleat) 若しくはトリグリセリド、又はリポソームが挙げられる。

【0338】

活性成分を、例えば、コアセルベーション手法により若しくは界面重合により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若しくはゼラチン-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、コロイド状薬物送達システム (例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフェア、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してもよい。そのような手法は、Remington's Pharmaceutical Sciences (18版、Mack Printing Company、1990) に開示されている。徐放性調製物を調製してもよい。徐放調製物の好適な例としては、ポリペプチドを含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスが挙げられ、このマトリックスは、造形品、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、例えば、モノステアリン酸アルミニウム、ゼラチン又はこれらの組合せ等の、吸収を遅らせる薬剤の組成物における使用によって、注射用組成物の持続的吸収をもたらすことができる。

【0339】

本明細書での例示的な薬学的に許容される添加剤としては、侵入型の薬物分散剤、例えば、可溶型中性活性ヒアルロニダーゼ糖タンパク質 (sHASEGP)、例えば、ヒト可溶型PH-20ヒアルロニダーゼ糖タンパク質、例えばrHuPH20 (HYLENEX (登録商標)、Baxter International, Inc.) がさらに挙げられる。rHuPH20を含む、ある特定の例示的sHASEGP及び使用方法は、米国特許公開第2005/0260186号及び同第2006/0104968号に記載されている。一態様では、sHASEGPは、コンドロイチナーゼ等の1つ又は複数のグルコサミノグリカナーゼと併用される。

【0340】

例示的凍結乾燥抗体製剤は、米国特許第6267958号に記載されている。水性抗体製剤には、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が含まれ、後者の製剤は、ヒスチジン-酢酸塩バッファーを含む。

【0341】

前述の組成物に加えて、融合タンパク質を持効性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、埋め込み (例えば、皮下に又は筋肉内に) によって投与することができ、又は筋肉内注射によって投与することができる。したがって、例えば、融合タンパク質は、好適な高分子又は疎水性材料を用いて (例えば、許容される油中のエマルジョンとして) 製剤化することができ、又はイオン交換樹脂を用いて製剤化することができ、又はやや難溶性の誘導体として、例えば、やや難溶性の塩として製剤化することができる。

【0342】

本発明の融合タンパク質を含む薬学的組成物は、従来の混合、溶解、乳化、カプセル化、封入又は凍結乾燥プロセスによって製造することができる。薬学的に使用することができる調製物へのタンパク質の加工を助長する1つ又は複数の生理学的に許容される担体、希釈剤、添加剤又は助剤を使用して、従来の様式で薬学的組成物を製剤化することができる。適切な製剤は、選択される投与経路に依存する。

【0343】

抗原結合分子を、遊離酸若しくは塩基、中性又は塩形態の組成物に製剤化することができる。薬学的に許容される塩は、遊離酸又は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とで形成される酸付加塩、或いは例えば塩酸若しくはリン酸等の無機酸とで、又は酢酸、シュウ酸、酒石酸

10

20

30

40

50

若しくはマンデル酸のような有機酸とで形成される酸付加塩が含まれる。遊離カルボキシル基とで形成される塩を、例えばナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム若しくは水酸化第二鉄などの無機塩基から誘導することもでき、又はイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン若しくはプロカインのような有機塩基から誘導することもできる。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への可溶性が高い傾向がある。

【0344】

本明細書における組成物はまた、治療することになる特定の適応症のための活性成分、好ましくは、互いに有害に作用しない相補的活性を有するものも、必要に応じて1つより多く含有することができる。そのような活性成分は、好適には、所期の目的に有効である量での組合せで存在する。

【0345】

インビボでの投与に使用されることになる製剤は、一般に無菌である。無菌状態は、例えば滅菌濾過膜による濾過により、容易に果たすことができる。

【0346】

治療方法及び治療用組成物

本明細書で提供される抗原結合分子の何れを治療方法に使用してもよい。治療方法での使用のために、本発明の抗原結合分子を、医学行動規範と一致した様式で製剤化、投薬及び投与することができる。これに関連して考慮する因子としては、治療されることになる特定の障害、治療されることになる特定の哺乳動物、個々の患者の臨床症状、障害の原因、薬剤の送達部位、投与方法、投与スケジュール、及び医療施術者に公知の他の因子が挙げられる。

【0347】

一態様では、医薬として使用するための本発明の抗原結合分子が提供される。さらなる態様では、疾患の治療に使用するための、特に、がんの治療に使用するための、本発明の抗原結合分子が提供される。ある特定の態様では、治療方法に使用するための本発明の抗原結合分子が提供される。一態様では、本発明は、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、本明細書に記載の抗原結合分子を提供する。ある特定の態様では、本発明は、疾患を有する個体を治療する方法に使用するための抗原結合分子を提供し、方法は、治療有効量の融合タンパク質を個体に投与することを含む。ある特定の態様では、治療されることになる疾患は、がんである。がんの例としては、固形腫瘍、膀胱がん、腎細胞がん、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、子宮頸がん、子宮内膜がん、食道がん、結腸がん、結腸直腸がん、直腸がん、胃がん、前立腺がん、血液がん、皮膚がん、扁平上皮がん、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挙げられる。したがって、がんの治療に使用するための本明細書に記載の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、典型的に哺乳動物であり、より具体的にはヒトである。

【0348】

別の態様では、感染性疾患の治療に使用するための、特に、ウイルス感染症の治療のための、本明細書に記載の抗原結合分子が提供される。さらなる態様では、例えば狼瘡疾患等の自己免疫疾患の治療に使用するための、本明細書に記載の抗原結合分子が提供される。

【0349】

一態様では、標的細胞抗原がTnCである、頭頸部扁平上皮がん(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使用するための、本発明による抗原結合分子が提供される。

【0350】

さらなる態様では、本発明は、それを必要とする個体における疾患を治療ための医薬の製造又は調製における抗原結合分子の使用に関する。一態様では、医薬は、疾患を有する個体に治療有効量の医薬を投与することを含む、疾患を治療する方法に使用するもの

10

20

30

40

50

のである。ある特定の実施態様では、治療されることになる疾患は、増殖性疾患、特にがんである。したがって、一態様では、本発明は、がんを治療ための医薬の製造又は調製における本発明の抗原結合分子の使用に関する。がんの例としては、固形腫瘍、膀胱がん、腎細胞がん、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、子宮頸がん、子宮内膜がん、食道がん、結腸がん、結腸直腸がん、直腸がん、胃がん、前立腺がん、血液がん、皮膚がん、扁平上皮がん、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挙げられる。本発明の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疾患としては、腹部、骨、乳房、消化器系、肝臓、膵臓、腹膜、内分泌腺（副腎皮質、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、軟組織、脾臓、胸部及び泌尿生殖器系に位置する腫瘍が挙げられるが、これらに限定されない。前がん状態又は病変及びがん転移も挙げられる。ある特定の実施態様では、がんは、腎細胞がん、皮膚がん、肺がん、結腸直腸がん、乳がん、脳がん、頭頸部がんからなる群から選択される。当業者は、一部のケースでは、抗原結合分子が治療をもたらさないこともあり、部分的恩恵しかもたらさないこともあることを認識しているだろう。一部の態様では、何らかの恩恵がある生理的变化も治療に有益とみなされる。したがって、一部の態様では、生理的变化をもたらす抗原結合分子の量が「有効量」又は「治療有効量」とみなされる。

10

【0351】

さらなる態様では、本発明は、感染性疾患の治療のための、特に、ウイルス感染症の治療のための又は自己免疫疾患、例えば狼瘡疾患の治療のための、医薬の製造又は調製における本明細書に記載の抗原結合分子の使用に関する。

20

【0352】

さらなる態様では、本発明は、個体における疾患を治療する方法であって、本発明の抗原結合分子の治療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。ある特定の態様では、治療されることになる疾患は、増殖性疾患ある。特定の態様では、疾患は、がんである。別の態様では、疾患は、感染性疾患又は自己免疫疾患である。ある特定の態様では、方法は、少なくとも1つのさらなる治療剤、例えば、治療することになる疾患ががんである場合には抗がん剤の治療有効量を個体に投与することをさらに含む。上記実施態様の何れによる「個体」も、哺乳動物、好ましくはヒトであり得る。

30

【0353】

疾患の予防又は治療のための、本発明の抗原結合分子の（単独で使用される場合、又は1つ若しくは複数の他のさらなる治療剤と併用される場合の）適切な投薬量は、治療されることになる疾患のタイプ、投与経路、患者の体重、融合タンパク質のタイプ、疾患の重症度及び経過、融合タンパク質が予防目的で投与されるのか又は治療目的で投与されるのか、以前の又は現行の治療的介入、患者の病歴及び融合タンパク質への応答、並びに主治医の裁量に依存することになる。いずれにせよ、投与を担当する施術者が、個々の対象のための、組成物中の活性成分の濃度、及び適切な用量を決定することになる。単回投与又は様々な時点にわたっての複数回投与、ボーラス投与、及びパルス注入を含むがこれらに限定されない、様々な投薬スケジュールが、本明細書では企図されている。

40

【0354】

抗原結合分子は、1回で、又は一連の治療にわたって、患者に適切に投与される。疾患のタイプ及び重症度に依存して、抗原結合分子約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ から $15\text{mg}/\text{kg}$ （例えば、 $0.1\text{mg}/\text{kg}$ — $10\text{mg}/\text{kg}$ ）が、例えば、1回の投与若しくは複数回の別々の投与によるか、連続注入によるかを問わず、患者への投与のための最初の候補投薬量であり得る。1つの典型的な1日投薬量は、上述の因子に依存して約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ から $100\text{mg}/\text{kg}$ 以上にわたり得る。状態に応じて数日又はそれより長きにわたる反復投与については、一般に、病徴の所望の抑制が起こるまでその治療が持続されることになる。抗原結合分子の1つの例示的投薬量は、約 $0.005\text{mg}/\text{kg}$ から約 $10\text{mg}/\text{kg}$ の範

50

図となる。他の例では、用量は、1投与につき約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重から、約 $5\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重から、約 $10\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重から、約 $50\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重から、約 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重から、約 $200\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重から、約 $350\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重から、約 $500\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重から、約 $1\text{mg}/\text{kg}$ 体重から、約 $5\text{mg}/\text{kg}$ 体重から、約 $10\text{mg}/\text{kg}$ 体重から、約 $50\text{mg}/\text{kg}$ 体重から、約 $100\text{mg}/\text{kg}$ 体重から、約 $200\text{mg}/\text{kg}$ 体重から、約 $350\text{mg}/\text{kg}$ 体重から、約 $500\text{mg}/\text{kg}$ 体重から、約 $1000\text{mg}/\text{kg}$ 体重以上まで、及びこれらの中から導かれる任意の範囲も含み得る。ここに列挙した数値から導くことができる例では、上記の数値に基づいて約 $5\text{mg}/\text{kg}$ 体重から約 $1000\text{mg}/\text{kg}$ 体重、約 $5\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重から約 $500\text{mg}/\text{kg}$ 体重等の範囲を、投与することができる。したがって、約 $0.5\text{mg}/\text{kg}$ 、 $2.0\text{mg}/\text{kg}$ 、 $5.0\text{mg}/\text{kg}$ 又は $10\text{mg}/\text{kg}$ のうちの1つ又は複数の用量（又はこれらの任意の組合せ）を患者に投与してもよい。そのような用量を、間欠的に、例えば、週に1回又は3週間に1回（例えば、患者が、約2から約20用量、又は例えば約6用量の融合タンパク質を受けるように）投与してもよい。より高い初期負荷用量、その後、より低い1用量又は複数の用量を投与してもよい。しかし、他の投与レジメンが有用であることもある。この治療の進展は、従来の手法及びアッセイによって容易にモニターされる。

【0355】

本発明の抗原結合分子は、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ことになる。病状の治療又は予防に使用するための、本発明の抗原結合分子又はそれらの薬学的組成物は、治療有効量で投与又は適用される。治療有効量の決定は、特に、本明細書で提供される詳細な開示に鑑みて、十分に当業者の能力の範囲内である。

【0356】

全身投与のための治療有効用量は、最初は細胞培養アッセイ等のインビトロアッセイから推定することができる。次いで、用量を動物モデルで公式化して、細胞培養物で決定されるような IC_{50} を含む循環濃度範囲を達成することができる。そのような情報を使用して、ヒトにおいて有用な用量をより正確に決定することができる。

【0357】

当該技術分野で周知である手法を使用して、インビボデータ、例えば動物モデルから、初期投薬量を推定することもできる。当業者は、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だろう。

【0358】

投薬量及び間隔を個々に調整して、治療効果を維持するのに十分である抗原結合分子の血漿レベルをもたらすことができる。注射による投与についての通常の患者投薬量は、約 0.1 から $50\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ 、典型的には約 0.5 から $1\text{mg}/\text{kg}/\text{日}$ にわたる。治療有効血漿レベルは、毎日複数用量を投与することにより達成することができる。血漿中レベルは、例えばHPLCにより、測定することができる。

【0359】

局所投与又は選択的取り込みの場合、抗原結合分子の有効局所濃度は、血漿濃度と関連づけられないこともある。当業者は、過度の実験を伴わずに治療有効局所投薬量を最適化することができるであろう。

【0360】

本明細書に記載の抗原結合分子の治療有効用量は、一般に、実質的な毒性を引き起こすことなく治療的恩恵をもたらすことになる。融合タンパク質の毒性及び治療有効性は、細胞培養物又は実験動物において標準薬学的手順により判定することができる。細胞培養アッセイ及び動物研究を使用して、 LD_{50} （集団の50%に対して致死的な用量）及び ED_{50} （集団の50%において治療に有効な用量）を決定することができる。毒性効果と治療効果の用量比が治療指数であり、例えば比率 $\text{LD}_{50}/\text{ED}_{50}$ として表される。大きい治療指数を呈示する抗原結合分子が好ましい。一実施態様では、本発明による抗原結合分子は、高い治療指数を呈示する。細胞培養アッセイ及び動物研究から得られるデータは、ヒトでの使用に好適な投薬量範囲の公式化に使用することができる。投薬量は、毒性が殆

ど又は全くないED₅₀を含む循環濃度の範囲内にあることが好ましい。投薬量は、様々な因子、例えば、用いられる剤形、用いられる投与経路、対象の状態等に依存して、この範囲内で変動し得る。的確な製剤、投与経路及び投薬量は、個々の医師が患者の状態を考慮して選択することができる（例えば、その全内容が本明細書に参照により援用される、The Pharmacological Basis of Therapeutics、第1章、p1におけるFingl等、1975を参照されたい）。

【0361】

本発明の融合タンパク質での治療を受ける患者の主治医には、毒性、臓器不全等のために投与を終了、中断又は調整する方法及び時が分るであろう。逆に言えば、主治医には、臨床応答が（毒性を除外して）不適切であった場合、治療をより高レベルに調整する方法も分るであろう。目的の障害の管理の際に投与される用量の大きさは、治療されることになる状態の重症度、投与経路等に伴って変わることになる。状態の重症度は、例えば、一部は、標準的な予後評価方法により評価することができる。さらに、用量及び恐らく投薬頻度も、個々の患者の年齢、体重及び応答によって変わることになる。

【0362】

他の薬剤及び治療

本発明の抗原結合分子を治療の際に1つ又は複数の他の薬剤と組み合わせて投与してもよい。例えば、本発明の融合タンパク質を少なくとも1つのさらなる治療剤と共投与してもよい。用語「治療剤」は、そのような治療を必要とする個体において症候又は疾患を治療するために投与することができる任意の薬剤を包含する。そのようなさらなる薬剤は、治療することになる特定の適応症に好適な任意の活性成分、好ましくは、互いに有害に作用しない相補的活性を有するものを含み得る。ある特定の実施態様では、さらなる治療剤は、別の抗がん剤である。

【0363】

そのような他の薬剤は、好適には、意図された目的に有効である量での組合せで存在する。そ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、障害又は治療のタイプ、及び上で論じた他の因子に依存する。本発明の抗原結合分子は、一般に、本明細書に記載のものと同一投薬量で及び同一投薬経路で、又は本明細書に記載の投薬量の約1から99%で、又は適切であると実験的に／臨床的に判定される、任意の投薬量で及び任意の経路により使用される。

【0364】

上述のそのような併用療法は、併用投与（この場合、2つ以上の治療剤が同じ又は別々の組成物に含まれる）、及び別々の投与を包含し、別々の投与の場合、本発明の抗原結合分子の投与を、さらなる治療剤及び／又はアジュバントの投与より前に、投与と同時に、及び／又は投与の後に行うことができる。

【0365】

製造品

本発明の別の態様では、上記の障害の治療、予防及び／又は診断に有用な材料を含有する製造品が提供される。製造品は、容器と、その容器上の又はその容器に付随するラベル又は添付文書を含む。好適な容器としては、例えば、ボトル、バイアル、注射器、IV溶液バッグ等が挙げられる。容器は、ガラス又はプラスチック等の様々な材料から形成されたものであり得る。容器は、単独である組成物を保持するか、又は状態の治療、予防及び／若しくは診断に有効な別の組成物と組み合わせられた組成物を保持し、滅菌アクセスポートを有することができる（例えば、容器は、静脈内溶液バッグであってもよく、又は皮下注射針によって穿刺可能なストッパーを有するバイアルであってもよい）。組成物中の少なくとも1種の活性薬剤は、本発明の抗原結合分子である。

【0366】

ラベル又は添付文書は、組成物が選ばれた状態の治療に使用されることを示す。さらに、製造品は、（a）本発明の抗原結合分子を含む組成物が中に入っている第1の容器、及び（b）さらなる細胞傷害性剤又は別の治療剤を含む組成物が中に入っている第2の容器

を含むことができる。本発明のこの実施態様での製造品は、特定の状態を治療するために組成物を使用することができることを示す添付文書をさらに含むことができる。

【 0 3 6 7 】

或いは、又は加えて、製造品は、静菌性の注射用水（B W F I）、リン酸塩緩衝食塩水、リンゲル液及びデキストロース溶液等の、薬学的に許容されるバッファーを含む、第2の（又は第3の）容器をさらに含むことができる。製造品は、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針及び注射器を含む、商業的及び使用者の観点から望ましい他の材料をさらに含むことができる。

表 C(配列):

配列番号	名称	配列
1	ヌクレオチド配列 huTNC	表 3
2	ヌクレオチド配列 muTNC	表 3
3	ヌクレオチド配列 cynoTNC	表 3
4	huTNC	表 3
5	muTNC	表 3
6	cynoTNC	表 3
7	GST huTNC fn5 A1234 BC fn6 B	表 4
8	GST huTNCfn5 mu A124 BC hu fn6 B	表 4
9	GST TNC hu fn5 B-C fn6 B	表 4
10	GST huTNC fn5 A1234 fn6 B	表 4
11	huTNC A4 B	表 4
12	huTNC A1 B	表 4
13	ヌクレオチド配列 pRJH33 ライブラリー-鋳型 DP88-4 ラ イブラリー	表 6
14	ヌクレオチド配列 Fab 軽鎖 V1_5	表 7
15	ヌクレオチド配列 Fab 重鎖 VH1_69	表 7
16	Fab 軽鎖 Vk1_5	表 8
17	Fab 重鎖 VH1_69 (DP88)	表 8
18	ヌクレオチド配列 LMB3	表 9
19	ヌクレオチド配列 Vk1_5_L3r_S	表 9
20	ヌクレオチド配列 Vk1_5_L3r_SY	表 9
21	ヌクレオチド配列 Vk1_5_L3r_SPY	表 9
22	ヌクレオチド配列 RJH31	表 9
23	ヌクレオチド配列 RJH32	表 9
24	ヌクレオチド配列 DP88-v4- 4	表 9
25	ヌクレオチド配列 DP88-v4- 6	表 9
26	ヌクレオチド配列 DP88-v4- 8	表 9
27	ヌクレオチド配列 fdseqlong	表 9

10

20

30

40

50

28	ヌクレオチド配列 ラムダ DP47 ライブラリー VI3_19/VH3_23 の pRJH53 ライブラリー鑄型	表 10
29	ヌクレオチド配列 Fab 軽鎖 VI3_19	表 11
30	ヌクレオチド配列 Fab 重鎖 VH3_23	表 11
31	Fab 軽鎖 VI3_19	表 12
32	Fab 重鎖 VH3_23(DP47)	表 12
33	ヌクレオチド配列 VI_3_19_L3r_V	表 13
34	ヌクレオチド配列 VI_3_19_L3r_HV	表 13
35	ヌクレオチド配列 VI_3_19_L3r_HLV	表 13
36	ヌクレオチド配列 RJH80	表 13
37	ヌクレオチド配列 DP47CDR3_ba (mod.)	表 13
38	ヌクレオチド配列 DP47-v4- 4	表 13
39	ヌクレオチド配列 DP47-v4- 6	表 13
40	ヌクレオチド配列 DP47-v4- 8	表 13
41	ヌクレオチド配列 18D4 VL	表 14
42	ヌクレオチド配列 18D4 VH	表 14
43	ヌクレオチド配列 11C7 VL	表 14
44	ヌクレオチド配列 11C7 VH	表 14
45	18D4 VL	表 15
46	18D4 VH	表 15
47	11C7 VL	表 15
48	11C7 VH	表 15
49	ヌクレオチド配列 18D4 LCDR1	表 16
50	ヌクレオチド配列 18D4 LCDR2	表 16
51	ヌクレオチド配列 18D4 LCDR3	表 16
52	ヌクレオチド配列 11C7 LCDR1	表 16
53	ヌクレオチド配列 11C7 LCDR2	表 16

10

20

30

40

50

54	ヌクレオチド配列 11C7 LCDR3	表 16
55	18D4 LCDR1	表 17
56	18D4 LCDR2	表 17
57	18D4 LCDR3	表 17
58	11C7 LCDR1	表 17
59	11C7 LCDR2	表 17
60	11C7 LCDR3	表 17
61	ヌクレオチド配列 18D4 HCDR1	表 18
62	ヌクレオチド配列 18D4 HCDR2	表 18
63	ヌクレオチド配列 18D4 HCDR3	表 18
64	ヌクレオチド配列 11C7 HCDR1	表 18
65	ヌクレオチド配列 11C7 HCDR2	表 18
66	ヌクレオチド配列 11C7 HCDR3	表 18
67	18D4 HCDR1	表 19
68	18D4 HCDR2	表 19
69	18D4 HCDR3	表 19
70	11C7 HCDR1	表 19
71	11C7 HCDR2	表 19
72	11C7 HCDR3	表 19
73	ヌクレオチド配列 18D4 軽鎖	表 20
74	ヌクレオチド配列 18D4 重鎖	表 20
75	ヌクレオチド配列 11C7 軽鎖	表 20
76	ヌクレオチド配列 11C7 重鎖	表 20
77	18D4 軽鎖	表 21
78	18D4 重鎖	表 21
79	11C7 軽鎖	表 21
80	11C7 重鎖	表 21
81	ヌクレオチド配列 18D4 重鎖 PGLALA	表 22
82	ヌクレオチド配列 11C7 重鎖 PGLALA	表 22
83	18D4 重鎖 PGLALA	表 23
84	11C7 重鎖 PGLALA	表 23
85	ヒト 4-1BB Fc(kih)	表 27
86	カニクイザル 4-1BB Fc(kih)	表 27

10

20

30

40

50

87	マウス 4-1BB Fc(kih)	表 27
88	ヌクレオチド配列 Fc ホール鎖	表 28
89	ヌクレオチド配列 ヒト 4-1BB Fc(kih)	表 28
90	ヌクレオチド配列 カニクイザル 4-1BB Fc(kih)	表 28
91	ヌクレオチド配列 マウス 4-1BB Fc(kih)	表 28
92	Fc ホール鎖	表 28
93	ヒト 4-1BB 抗原 Fc ノブ鎖	表 28
94	カニクイザル 4-1BB Fc(kih)	表 28
95	マウス 4-1BB Fc(kih)	表 28
96	ヌクレオチド配列 ヒト 4-1BB His	表 29
97	ヒト 4-1BB His	表 29
98	ヌクレオチド配列 ダイマー リガンド(71-254)-CL* Fc ノ ブ鎖	表 30
99	ヌクレオチド配列 モノマーリ ガンド(71-254)-CH1*	表 30
100	ヌクレオチド配列 抗 TnC(18D4) Fc ホール鎖	表 30
101	無作為化配列 1	NNNNNNNNNN
102	ダイマーリガンド(71-254)- CL* Fc ノブ鎖	表 31
103	モノマーリガンド(71-254)- CH1*	表 31
104	抗 TnC(18D4) Fc ホール鎖	表 31
105	無作為化配列 2	NNNNNNNNNN
106	ヌクレオチド配列 ダイマー リガンド(71-254)-CL Fc ノブ 鎖	表 32
107	ヌクレオチド配列 モノマーリ ガンド(71-254)-CH1	表 32
108	ダイマーリガンド(71-254)- CL Fc ノブ鎖	表 33
109	モノマーリガンド(71-254)- CH1	表 33
110	ヌクレオチド配列 抗	表 34

10

20

30

40

50

	TnC(18D4)Fc ホールダイマーリガンド(71-254)鎖	
111	ヌクレオチド配列 抗 TnC(18D4)Fc ノブモノマーリガンド(71-254)鎖	表 34
112	抗 TnC(18D4)Fc ホールダイマーリガンド(71-254)鎖	表 35
113	抗 TnC(18D4)Fc ノブモノマーリガンド(71-254)鎖	表 35
114	ヌクレオチド配列 ダイマーリガンド(71-248)-CL* Fc ノブ鎖	表 36
115	ヌクレオチド配列 モノマーリガンド(71-248)-CH1*	表 36
116	ダイマーリガンド(71-248)-CL* Fc ノブ鎖	表 37
117	モノマーリガンド(71-248)-CH1*	表 37
118	ヌクレオチド配列 ダイマーリガンド(71-248)-CL Fc ノブ鎖	表 38
119	ヌクレオチド配列 モノマーリガンド(71-248)-CH1	表 38
120	ダイマーリガンド(71-248)-CL Fc ノブ鎖	表 39
121	モノマーリガンド(71-248)-CH1	表 39
122	ヌクレオチド配列 抗 TnC(18D4)Fc ホールダイマーリガンド(71-248)鎖	表 40
123	ヌクレオチド配列 抗 TnC(18D4)Fc ノブモノマー(71-248)リガンド	表 40
124	抗 TnC(18D4)Fc ホールダイマーリガンド(71-248)鎖	表 41
125	抗 TnC(18D4)Fc ノブモノマー(71-248)リガンド	表 41
126	ヌクレオチド配列 Fc ホールダイマーリガンド(71-248)鎖	表 42
127	Fc ホールダイマーリガンド(71-248)鎖	表 43
128	ヌクレオチド配列 Fc ホールモノマーリガンド(71-248)鎖	表 44
129	ヌクレオチド配列 抗 TnC(18D4)Fc ノブダイマーリガンド(71-248)鎖	表 44
130	Fc ホールモノマーリガンド	表 45

10

20

30

40

50

	(71-248)鎖	
131	抗 TnC(18D4)Fc ノブダイマ ーリガンド(71-248)鎖	表 45
132	ヌクレオチド配列 Fc ノブモ ノマーリガンド(71-248)鎖	表 46
133	Fc ノブモノマーリガンド(71- 248)鎖	表 47
134	ヌクレオチド配列 抗 TnC(18D4)Fc ホールモノマ ーリガンド(71-248)鎖	表 48
135	ヌクレオチド配列 Fc ノブダ イマーリガンド(71-248)鎖	表 48
136	抗 TnC(18D4)Fc ホールモノ マーリガンド(71-248)鎖	表 49
137	Fc ノブダイマーリガンド(71- 248)鎖	表 49
138	ヌクレオチド配列 DP47 Fc ホール鎖	表 50
139	ヌクレオチド配列 DP47 軽 鎖	表 50
140	DP47 Fc ホール鎖	表 50
141	DP47 軽鎖	表 50
142	ヌクレオチド配列 ダイマー hu 4-1BBL(71-254)に融合 されている PD47 Fc ホール 鎖	表 51
143	ヌクレオチド配列 モノマー hu 4-1BBL(71-254)に融合 されている PD47 Fc ノブ鎖	表 51
144	ダイマー-hu 4-1BBL(71-254) に融合されている PD47 Fc ホール鎖	表 51
145	モノマー-hu 4-1BBL(71-254) に融合されている PD47 Fc ノブ鎖	表 51
146	ヌクレオチド配列 DP47 重 鎖(hu IgG1 PGLALA)	表 54
147	DP47 重鎖(hu IgG1 PGLALA)	表 54
148	ヌクレオチド配列 抗 TnC(18D4)重鎖(huIgG1 PGLALA)	表 55
149	抗 TnC(18D4)重鎖(huIgG1 PGLALA)	表 55
150	ペプチドリinker-(G4S) ₂	GGGGSGGGGS

10

20

30

40

50

151	ペプチドリinker(SG4) ₂	SGGGGSGGGG
152	ペプチドリinker-G4(SG4) ₂	GGGGSGGGGSGGGG
153	ペプチドリinker-1	GSPGSSSSGS
154	ペプチドリinker-(G4S) ₄	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
155	ペプチドリinker-2	SGSGNGS
156	ペプチドリinker-3	GGSGSGSG
157	ペプチドリinker-4	GGSGSG
158	ペプチドリinker-5	GGSG
159	ペプチドリinker-6	GGSGNGSG
160	ペプチドリinker-7	GGNGSGSG
161	ペプチドリinker-8	GGNGSG
162	ペプチドリinker-9	GGGGS
163	リーダー配列 1	MDWTWRILFLVAAATGAHS
164	リーダー配列 1(DNA1)	ATGGACTGGACCTGGAGAATCCTCTTCTTG TGGCAGCAGCCACAGGAGCCCACTCC
165	リーダー配列 1(DNA2)	ATGGACTGGACCTGGAGGATCCTCTTCTTG TGGCAGCAGCCACAGGAGCCCACTCC
166	リーダー配列 2	MDMRVPAQLLGLLLWFGA
167	リーダー配列 2(DNA)	ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTG GGCCTCCTGCTGCTCTGGTTCCCAGGTGCC AGGTGT
168	リーダー配列 3	MGWSCIILFLVATATGVHS
169	リーダー配列 3(DNA 1)	ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTG TAGCAACAGCTACCGGTGTGCATTCC
170	リーダー配列 3(DNA 2)	ATGGGCTGGTCCTGCATCATCCTGTTTCTGG TGGCTACCGCCACTGGAGTGCATTCC
171	リーダー配列 3(DNA 3)	ATGGGCTGGTCCTGCATCATCCTGTTTCTGG TCGCCACAGCCACCGGCGTGCCTCT
172	ヒト(hu)4-1BBL(71-254)	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLL IDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVV AKAGVYYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHL QPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGF QGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQ GATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE
173	hu 4-1BBL (85-254)	LDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLA GVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYYYVFFQLE LRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALA LTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRL GVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEI PAGLPSRSE
174	hu 4-1BBL (80-254)	DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYS DPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYYYV FFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAG AAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLS AGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLF RVTPEIPAGLPSRSE
175	hu 4-1BBL (52-254)	PWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPA

10

20

30

40

50

		GLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPG LAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYVFFQ LELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAA LALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQ RLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTP EIPAGLPSRSE
176	(G4S) ₂ リンカーにより接続さ れているダイマー _{hu} 4- 1BBL(71-254)	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLL IDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVV AKAGVYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHL QPLRSAAGAAAALALTVDLPPASSEARNSAFGF QGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQ GATVLGLFRVTP EIPAGLPSRSEGGGGSGGG GSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQN VLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKE LVVAKAGVYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLA LHLQPLRSAAGAAAALALTVDLPPASSEARNSA FGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQL TQGATVLGLFRVTP EIPAGLPSRSE
177	モノマー _{hu} -1BBL(71-254) プラス(G4S) ₂ リンカー	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLL IDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVV AKAGVYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHL QPLRSAAGAAAALALTVDLPPASSEARNSAFGF QGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQ GATVLGLFRVTP EIPAGLPSRSEGGGGSGGG GS
178	ダイマー _{hu} 4-1BBL(71- 254) _{Fc} ノブ鎖	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLL IDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVV AKAGVYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHL QPLRSAAGAAAALALTVDLPPASSEARNSAFGF QGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQ GATVLGLFRVTP EIPAGLPSRSEGGGGSGGG GSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQN VLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKE LVVAKAGVYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLA LHLQPLRSAAGAAAALALTVDLPPASSEARNSA FGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQL TQGATVLGLFRVTP EIPAGLPSRSEGGGGSG GGGSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK

10

20

30

40

179	モノマー _{hu} 4-1BBL(71-254)-CL	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLL IDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVV AKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHL QPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGF QGRLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQ GATVLGLFRVTPEIPAGLSPRSEGGGSGGG GSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
180	hu 4-1BBL (50-254)	ACPWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDD PAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSD PGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYV FQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGA AALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLHLSA GQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFR VTPEIPAGLSPRSE
181	hu OX40L (51-183)	QVSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFIILTSQKEDE IMKVQNNSVIINCDFYLLISLKGYSQEVNLSLHY QKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVASLTYKDKVYL NVTDDNTSLDDFHVNGGELILIHQNPGEFCVL
182	hu OX40L (52-183)	VSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFIILTSQKEDEI MKVQNNSVIINCDFYLLISLKGYSQEVNLSLHY QKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVASLTYKDKVYL NVTDDNTSLDDFHVNGGELILIHQNPGEFCVL
183	ヒト(hu) 4-1BBL (71-248)	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLL IDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVV AKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHL QPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGF QGRLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQ GATVLGLFRVTPEIPAGL
184	(G4S) ₂ リンカーにより接続されているダイマー _{hu} 4-1BBL(71-248)	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLL IDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVV AKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHL QPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGF QGRLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQ GATVLGLFRVTPEIPAGLGGGGSGGGGSREGP ELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGP LSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKA GVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPL RSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGR LLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGAT VLGLFRVTPEIPAGL
185	(G4S) ₂ リンカーにより接続されているダイマー _{hu} 4-1BBL(80-254)	DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYS DPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYV FFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAG AAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLHLS AGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLF

10

20

30

40

50

		RVTPEIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGSDPAGLL DLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAG VSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELR RVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALT VDLPPASSEARNSAFGFQGRLHLSAGQRLGV HLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPA GLPSPRSE
186	(G4S) ₂ リンカーにより接続さ れているダイマー _{hu} 4- 1BBL(52-254)	PWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPA GLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPG LAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQ LELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAA LALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLHLSAGQ RLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTP EIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGSPWAVSGARA SPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMF AQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGL SYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGE GSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPA SSEARNSAFGFQGRLHLSAGQRLGVHLHTEA RARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPR SE
187	モノマー _{hu} -1BBL(71-254) プラス(G4S) ₁ リンカー	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLL IDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVV AKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHL QPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGF QGRLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQ GATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSEGGGGS
188	モノマー _{hu} -1BBL(71-248) プラス(G4S) ₂ リンカー	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLL IDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVV AKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHL QPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGF QGRLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQ GATVLGLFRVTPEIPAGLGGGGSGGGGS
189	モノマー _{hu} -1BBL(71-248) プラス(G4S) ₁ リンカー	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLL IDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVV AKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHL QPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGF QGRLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQ GATVLGLFRVTPEIPAGLGGGGS
190	(G4S) ₂ リンカーにより接続さ れているダイマー _{hu} OX40L(51-183)	QVSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFI LTSQKEDE IMKVQNNSVIINCDFYLISLKG YFSQEVNISLHY QKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVASLTYKDKVYL NVT TDNTSLDDFHVNGGELILIHQNPGEFCVLG GGSGGGGGSQVSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEK GFILTSQKEDEIMKVQNNSVIINCDFYLISLKG Y FSQEVNISLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVA SLTYKDKVYLNVT TDNTSLDDFHVNGGELILIH QNPGEFCVL

10

20

30

40

50

191	(G4S) ₂ リンカーにより接続されているダイマー-hu OX40L(52-183)	VSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFI LTSQKEDEI MKVQNN SVIINC DGFY LISLKG YFSQEVN ISLHY QKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVASLTYKDKVYL NVT TDNTSLDD FHVNGGELILIHQNPGEFCVLG GGSGGGGGSVSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKG FI LTSQKEDEIMKVQNN SVIINC DGFY LISLKG YF SQEVN ISLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVAS LTYKDKVYLNVT TDNTSLDD FHVNGGELILIHQ NPGEFCVL
192	hu 4-1BBL (85-248)	LDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLA GVSLTGGLSYKEDTKELVVA KAGVYYVFFQLE LRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALA LTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRL GVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEI PAGL
193	hu 4-1BBL (80-248)	DPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYS DPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVA KAGVYYV FFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAG AAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLS AGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLF RVTPEIPAGL
194	hu 4-1BBL (52-248)	PWAVSGARASPGSAASPR LREGPELSPDDPA GLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPG LAGVSLTGGLSYKEDTKELVVA KAGVYYVFFQ LELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAA LALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQ RLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTP EIPAGL
195	ダイマー-hu OX40L(51-183)- CL* Fc ノブ鎖	QVSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFI LTSQKEDE IMKVQDN SVIINC DGFY LISLKG YFSQEV DISLHY QKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVASLTYKDKVYL NVT TDNTSLDD FHVNGGELILIHQNPGEFCVLG GGSGGGGGSQVSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEK GFI LTSQKEDEIMKVQDN SVIINC DGFY LISLKG Y FSQEV DISLHYQKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVA SLTYKDKVYLNVT TDNTSLDD FHVNGGELILIH QNPGEFCVLGGSGGGGGSRTVAAPSVFIFPP SDRKLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECDK THTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP GK

10

20

30

40

196	モノマー-hu OX40L(51-183)-CH1*	QVSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFILTSQKEDE IMKVQDNSVIINCDGFYLISLKGYSQEVDISLHY QKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVASLTYKDKVYL NVTDDNTSLDDFHVNGGELILIHQNPGEFCVLG GGGSGGGGSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDEKVEPKSC
197	ヒト TnC	UniProt 番号 P24821
198	ヒト MCSP	UniProt 番号 Q6UVK1
199	ヒト EGFR	UniProt 番号 P00533
200	ヒト CD19	UniProt 番号 P15391
201	ヒト CD20	UniProt 番号 P11836
202	ヒト CD33	UniProt 番号 P20138
203	ヒトリンホトキシン α	UniProt 番号 P01374
204	ヒト TNF	UniProt 番号 P01375
205	ヒトリンホトキシン β	UniProt 番号 Q06643
206	ヒト OX40L	UniProt 番号 P23510
207	ヒト CD40L	UniProt 番号 P29965
208	ヒト FasL	UniProt 番号 P48023
209	ヒト CD27L	UniProt 番号 P32970
210	ヒト CD30L	UniProt 番号 P32971
211	ヒト 4-1BBL	UniProt 番号 P41273
212	ヒト TRAIL	UniProt 番号 P50591
213	ヒト RANKL	UniProt 番号 O14788
214	ヒト TWEAK	UniProt 番号 O43508
215	ヒト APRIL	UniProt 番号 O75888
216	ヒト BAFF	UniProt 番号 Q9Y275
217	ヒト LIGHT	UniProt 番号 O43557
218	ヒト TL1A	UniProt 番号 O95150
219	ヒト GITRL	UniProt 番号 Q9UNG2
220	ヒトエクトジスプラシン A	UniProt 番号 Q92838

【0368】

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情報は、Kabat, E. A. 等、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第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、上で定義されたように、カバットによるEU番号付けシステム (Kabat, E.A.等、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、Public Health Service、National Institutes of Health、Bethesda、MD(1991)) に従って番号付けされ、言及される。

【0369】

特定の実施態様

1. TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子であって、
(a) テネイシンC (TnC) と特異的に結合することができる少なくとも1つの部分と、
(b) ジスルフィド結合により互いに連結されている第1及び第2のポリペプチドとを含み、

第1のポリペプチドが、ペプチドリンカーにより互いに接続されているTNFリガンド

ファミリーメンバーの2つのエクストドメイン又はそれらの断片を含むこと、及び第2のポリペプチドが、前記TNFリガンドファミリーメンバーの1つだけのエクストドメイン又はその断片を含むことを特徴とする抗原結合分子。

【0370】

2. TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子であって、

(a) テネイシンC (Tn C) と特異的に結合することができる少なくとも1つの抗原結合部分と、

(b) ジスルフィド結合により互いに連結されている第1及び第2のポリペプチドとを含み、

第1のポリペプチドが、ペプチドリンカーにより互いに接続されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクストドメイン又はそれらの断片を含むこと、及び第2のポリペプチドが、前記TNFリガンドファミリーメンバーの1つだけのエクストドメイン又はその断片を含むことを特徴とする抗原結合分子。

【0371】

3. (c) 安定的に結合することができる第1及び第2のサブユニットから構成されるFcドメイン

をさらに含む、実施態様1又は2のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子。

【0372】

4. TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子であって、

(a) Tn Cと特異的に結合することができる少なくとも1つの部分と、

(b) ジスルフィド結合により互いに連結されている第1及び第2のポリペプチドとを含み、

(i) 第1のポリペプチドがCH1若しくはCLドメインを含有すること、及び第2のポリペプチドがCL若しくはCH1ドメインを含有することをそれぞれ特徴とし、第2のポリペプチドが、CH1ドメインとCLドメイン間のジスルフィド結合により第1のポリペプチドと連結されており、第1のポリペプチドが、ペプチドリンカーにより互いに及びCH1若しくはCLドメインに接続されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクストドメイン若しくはそれらの断片を含み、第2のポリペプチドが、ペプチドリンカーによって前記ポリペプチドのCL若しくはCH1ドメインに接続されている、前記TNFリガンドファミリーメンバーの1つのエクストドメイン若しくはその断片を含む、又は

(ii) 第1のポリペプチドがCH3ドメインを含有すること、及び第2のポリペプチドがCH3ドメインを含有することをそれぞれ特徴とし、第1のポリペプチドが、ペプチドリンカーにより互いに及びCH3ドメインのC末端に接続されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクストドメイン若しくはそれらの断片を含み、第2のポリペプチドが、ペプチドリンカーによって前記ポリペプチドのCH3ドメインのC末端に接続されている前記TNFリガンドファミリーメンバーの1つだけのエクストドメイン若しくはその断片を含む、又は

(iii) 第1のポリペプチドがVH-CL若しくはVL-CH1ドメインを含有すること、及び第2のポリペプチドがVL-CH1ドメイン若しくはVH-CLドメインを含有することをそれぞれ特徴とし、第2のポリペプチドが、CH1ドメインとCLドメイン間のジスルフィド結合により第1のポリペプチドと連結されており、第1のポリペプチドが、ペプチドリンカーにより互いに及びVH若しくはVLに接続されているTNFリガンドファミリーメンバー2つのエクストドメイン若しくはそれらの断片を含み、第2のポリペプチドが、ペプチドリンカーによって前記ポリペプチドのVL若しくはVHに接続されている前記TNFリガンドファミリーメンバーの1つのエクストドメイン若しくはその断片を含む、

実施態様1から3の何れか一実施態様の抗原結合分子。

【0373】

5. 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、実施態様1から4の何れか一実施態様のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子。

【0374】

6. 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、実施態様1から5の何れか一実施態様のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子。

【0375】

7. TNFリガンドファミリーメンバーが、4-1BBLである、実施態様1から6の何れか一実施態様のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子。

【0376】

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172、配列番号173、配列番号174、配列番号175、配列番号183、配列番号192、配列番号193及び配列番号194からなる群から選択されるアミノ酸配列、特に、配列番号172又は配列番号183のアミノ酸配列を含む、実施態様1から7の何れか一実施態様のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子。

10

【0377】

9. 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183のアミノ酸配列を含む、実施態様1から8の何れか一実施態様のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子。

【0378】

10. TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子であって、
(a) TnCと特異的に結合することができる少なくとも1つの部分と、
(b) ジスルフィド結合により互いに連結されている第1及び第2のポリペプチドとを含む、

20

第1のポリペプチドが、配列番号176、配列番号184、配列番号185及び配列番号186からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むこと、及び第2のポリペプチドが、配列番号172、配列番号174、配列番号175及び配列番号183からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むことを特徴とする、実施態様1から9の何れか一実施態様の抗原結合分子。

【0379】

11. TNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子であって、
(a) TnCと特異的に結合することができる少なくとも1つの部分と、
(b) CH1又はCLドメインを含有する第1のポリペプチド、及びCL又はCH1ドメインを含有する第2のポリペプチドとをそれぞれ含み、第2のポリペプチドが、CH1ドメインとCLドメイン間のジスルフィド結合により第1のポリペプチドと連結されており、

30

第1のポリペプチドが、ペプチドリンカーにより互いに及びCH1又はCLドメインに接続されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクトドメイン又はそれらの断片を含むこと、及び第2のポリペプチドが、ペプチドリンカーによって前記ポリペプチドのCL又はCH1ドメインに接続されている前記TNFリガンドファミリーメンバーの1つだけのエクトドメイン又はその断片を含むことを特徴とする、実施態様1から10の何れか一実施態様の抗原結合分子。

40

【0380】

12. TnCと特異的に結合することができる部分が、抗体断片、Fab分子、クロスオーバーFab分子、単鎖Fab分子、Fv分子、scFv分子、単ドメイン抗体、aVH及び足場抗原結合タンパク質からなる群から選択される、実施態様1から11の何れか一実施態様のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子。

【0381】

13. TnCと特異的に結合することができる1つ又は2つの部分を含む、実施態様1から12の何れか一実施態様のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子。

【0382】

14. TnCと特異的に結合することができる部分が、TnCと特異的に結合するこ

50

とができる F a b 分子である、実施態様 1 から 13 の何れか一実施態様の T N F ファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子。

【0383】

15. T n C と特異的に結合することができる部分が、(i) 配列番号 67 又は配列番号 70 のアミノ酸配列を含む C D R - H 1 と、(i i) 配列番号 68 又は配列番号 71 のアミノ酸配列を含む C D R - H 2 と、(i i i) 配列番号 69 又は配列番号 72 のアミノ酸配列を含む C D R - H 3 とを含む V H ドメイン、及び(i v) 配列番号 55 又は配列番号 58 のアミノ酸配列を含む C D R - L 1 と、(v) 配列番号 56 又は配列番号 59 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2 と、(v i) 配列番号 57 又は配列番号 60 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3 とを含む V L ドメインを含む、実施態様 1 から 14 の何れか一実施態様の T N F ファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子。

10

【0384】

16. T n C と特異的に結合することができる部分が、配列番号 46 のアミノ酸配列を含む可変重鎖と配列番号 45 のアミノ酸配列を含む可変軽鎖とを含むか、又は T N C と特異的に結合することができる部分が、配列番号 48 のアミノ酸配列を含む可変重鎖と配列番号 47 のアミノ酸配列を含む可変軽鎖とを含む、実施態様 1 から 15 の何れか一実施態様の T N F ファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子。

【0385】

17. F c ドメインが、I g G、特に、I g G 1 F c ドメイン又は I g G 4 F c ドメインである、実施態様 3 から 16 の何れか一実施態様の T N F ファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子。

20

【0386】

18. F c ドメインが、234 及び 235 位 (E U 番号付け) 並びに / 又は 329 位 (E U 番号付け) にアミノ酸置換を含む I g G 1 F c ドメインである、実施態様 3 から 17 の何れか一実施態様の T N F ファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子。

【0387】

19. T N F ファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子であって、T n C と特異的に結合することができる F a b 分子を両方が含む、第 1 の重鎖及び第 1 の軽鎖と、第 2 のペプチドリンカーによりその C 末端で第 2 の重鎖又は軽鎖に融合されている、第 1 のペプチドリンカーによって互いに接続されている T N F リガンドファミリーメンバーの 2 つのエクトドメイン又はそれらの断片を含む、第 1 のペプチドと、第 3 のペプチドリンカーによりその C 末端で第 2 の軽鎖又は重鎖に融合されている前記 T N F リガンドファミリーメンバーの 1 つのエクトドメインを含む、第 2 のペプチドとをそれぞれ含む、実施態様 1 から 18 の何れか一実施態様の抗原結合分子。

30

【0388】

20. 第 1 のペプチドリンカーにより互いに接続されている T N F リガンドファミリーメンバーの 2 つのエクトドメイン又はそれらの断片を含む第 1 のペプチドが、その C 末端で第 2 のペプチドリンカーにより重鎖の一部である C H 1 ドメインに融合されており、前記 T N F リガンドファミリーメンバーの 1 つのエクトドメイン又はその断片を含む第 2 のペプチドが、その C 末端で第 3 のペプチドリンカーにより軽鎖の一部である C L ドメインに融合されている、実施態様 1 から 19 の何れか一実施態様の T N F ファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子。

40

【0389】

21. 第 1 のペプチドリンカーにより互いに接続されている T N F リガンドファミリーメンバーの 2 つのエクトドメイン又はそれらの断片を含む第 1 のペプチドが、その C 末端で第 2 のペプチドリンカーにより重鎖の一部である C L ドメインに融合されており、前記 T N F リガンドファミリーメンバーの 1 つのエクトドメイン又はその断片を含む第 2 のペプチドが、その C 末端で第 3 のペプチドリンカーにより軽鎖の一部である C H 1 ドメインに融合されている、実施態様 1 から 20 の何れか一実施態様の T N F ファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子。

50

【0390】

22. 第1のペプチドリinkerにより互いに接続されているTNFリガンドファミリーメンバーの2つのエクドメイン又はそれらの断片を含む第1のペプチドが、そのC末端で第2のペプチドリinkerにより重鎖の一部であるVHドメインに融合されており、前記TNFリガンドファミリーメンバーの1つのエクドメイン又はその断片を含む第2のペプチドが、そのC末端で第3のペプチドリinkerにより軽鎖の一部であるVLドメインに融合されている、実施態様1から21の何れか一実施態様のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子。

【0391】

23. TNFリガンドファミリーメンバーに隣接するCLドメイン内の123位（EU番号付け）のアミノ酸がアルギニン（R）に置換されており、124位（EU番号付け）のアミノ酸がリジン（K）に置換されている、及び前記TNFリガンドファミリーメンバーに隣接するCH1ドメイン内の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、実施態様20又は21のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子。

【0392】

24. (a) TnCと特異的に結合することができるFab分子を両方が含む、第1の重鎖及び第1の軽鎖、
(b) 配列番号176、配列番号184、配列番号185及び配列番号186からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む第2の重鎖、並びに配列番号172、配列番号174、配列番号175及び配列番号183からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む第2の軽鎖
を含む、実施態様1から23の何れか一実施態様のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子。

【0393】

25. (i) 配列番号46のアミノ酸配列を含むVHドメインを含む第1の重鎖、及び配列番号45のアミノ酸配列を含むVLドメインを含む第1の軽鎖、又は
配列番号48のアミノ酸配列を含むVHドメインを含む第1の重鎖、及び配列番号47のアミノ酸配列を含むVLドメインを含む第1の軽鎖と、
(ii) 配列番号178のアミノ酸配列を含む第2の重鎖と、
(iii) 配列番号179のアミノ酸配列を含む第2の軽鎖と
を含む、実施態様1から20の何れか一実施態様のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子。

【0394】

26. (i) 配列番号46のアミノ酸配列を含むVHドメインを含む第1の重鎖、及び配列番号45のアミノ酸配列を含むVLドメインを含む第1の軽鎖、又は
配列番号48のアミノ酸配列を含むVHドメインを含む第1の重鎖、及び配列番号47のアミノ酸配列を含むVLドメインを含む第1の軽鎖と、
(ii) 配列番号102、配列番号108、配列番号116及び配列番号120からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む第2の重鎖と、
(iii) 配列番号103、配列番号109、配列番号117及び配列番号121からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む第2の軽鎖と
を含む、実施態様1から19及び21の何れか一実施態様のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子。

【0395】

27. (a) TnCと特異的に結合することができる少なくとも1つの部分と、
(b) ジスルフィド結合により互いに連結されている第1及び第2のポリペプチドと
を含み、
第1のポリペプチドがCH3ドメインを含有すること、及び第2のポリペプチドがCH3ドメインを含有することをそれぞれ特徴とし、第1のポリペプチドが、ペプチドリinker

10

20

30

40

50

ーにより互いに及びC H 3ドメインのC末端に接続されているT N Fリガンドファミリーメンバーの2つのエクトドメイン若しくはそれらの断片を含み、第2のポリペプチドが、ペプチドリンカーによって前記ポリペプチドのC H 3ドメインのC末端に接続されている前記T N Fリガンドファミリーメンバーの1つのエクトドメイン若しくはその断片を含む、実施態様1から18の何れか一実施態様のT N Fファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子。

【0396】

28. (i) 配列番号127のアミノ酸配列を含む第1の重鎖、配列番号125のアミノ酸配列を含む第2の重鎖、及び配列番号77のアミノ酸配列を含む1つの軽鎖、又は (ii) 配列番号130のアミノ酸配列を含む第1の重鎖、配列番号131のアミノ酸配列を含む第2の重鎖、及び配列番号77のアミノ酸配列を含む1つの軽鎖、又は (iii) 配列番号124のアミノ酸配列を含む第1の重鎖、配列番号133のアミノ酸配列を含む第2の重鎖、及び配列番号77のアミノ酸配列を含む1つの軽鎖、又は (iv) 配列番号136のアミノ酸配列を含む第1の重鎖と、配列番号137のアミノ酸配列を含む第2の重鎖、及び配列番号77のアミノ酸配列を含む1つの軽鎖を含む、実施態様27のT N Fファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子。

【0397】

29. 標的細胞抗原と特異的に結合することができる2つの部分を含む、実施態様27のT N Fファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子。

【0398】

30. (i) 配列番号112のアミノ酸配列を含む第1の重鎖、配列番号113のアミノ酸配列を含む第2の重鎖、及び配列番号77のアミノ酸配列を含む2つの軽鎖、又は (ii) 配列番号124のアミノ酸配列を含む第1の重鎖、配列番号125のアミノ酸配列を含む第2の重鎖、及び配列番号77のアミノ酸配列を含む2つの軽鎖を含む、実施態様27又は29の何れか一実施態様のT N Fファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子。

【0399】

31. T N FリガンドファミリーメンバーがO X 4 0 Lである、実施態様1から6、11から23、27から29の何れか一実施態様のT N Fファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子。

【0400】

32. T N Fリガンドファミリーメンバーのエクトドメインが、配列番号181又は配列番号182のアミノ酸配列、特に、配列番号181のアミノ酸配列を含む、実施態様1から6、11から23、27から29の何れか一実施態様のT N Fファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子。

【0401】

33. (a) 標的細胞抗原と特異的に結合することができる少なくとも1つの部分と、(b) ジスルフィド結合により互いに連結されている第1及び第2のポリペプチドとを含む、

第1のポリペプチドが、配列番号190又は配列番号191のアミノ酸配列を含むこと、及び第2のポリペプチドが、配列番号181又は配列番号182のアミノ酸配列を含むことを特徴とする、実施態様1から6、11から23、27から29、31及び32の何れか一実施態様のT N Fファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子。

【0402】

34. 標的細胞抗原がテネイシンC (T n C) であり、T n Cと特異的に結合することができる部分が、(i) 配列番号67又は配列番号70のアミノ酸配列を含むC D R-H1と、(ii) 配列番号68又は配列番号71のアミノ酸配列を含むC D R-H2と、(iii) 配列番号69又は配列番号72のアミノ酸配列を含むC D R-H3とを含むV Hドメイン、及び(iv) 配列番号55又は配列番号58のアミノ酸配列を含むC D R-L1と、(v) 配列番号56又は配列番号59のアミノ酸配列を含むC D R-L2と、(

10

20

30

40

50

v i) 配列番号 57 又は配列番号 60 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3 とを含む V L ドメインを含む、実施態様 1 から 6、11 から 23、27 から 29 及び 31 から 33 の何れか一実施態様の T N F ファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子。

【0403】

35. T n C と特異的に結合することができる抗原結合部分が、(i) 配列番号 67 のアミノ酸配列を含む C D R - H 1 と、(i i) 配列番号 68 のアミノ酸配列を含む C D R - H 2 と、(i i i) 配列番号 69 のアミノ酸配列を含む C D R - H 3 とを含む V H ドメイン、及び (i v) 配列番号 55 のアミノ酸配列を含む C D R - L 1 と、(v) 配列番号 56 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2 と、(v i) 配列番号 57 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3 とを含む V L ドメインを含む、実施態様 1 から 6、11 から 23、27 から 29 及び 31 から 33 の何れか一実施態様の T N F ファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子。

10

【0404】

36. T n C と特異的に結合することができる抗原結合部分が、(i) 配列番号 70 のアミノ酸配列を含む C D R - H 1 と、(i i) 配列番号 71 のアミノ酸配列を含む C D R - H 2 と、(i i i) 配列番号 72 のアミノ酸配列を含む C D R - H 3 とを含む V H ドメイン、及び (i v) 配列番号 58 のアミノ酸配列を含む C D R - L 1 と、(v) 配列番号 59 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2 と、(v i) 配列番号 60 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3 とを含む V L ドメインを含む、実施態様 1 から 6、11 から 23、27 から 29 及び 31 から 33 の何れか一実施態様の T N F ファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子。

20

【0405】

37. (i) 配列番号 46 のアミノ酸配列を含む V H ドメインを含む第 1 の重鎖、及び配列番号 45 のアミノ酸配列を含む V L ドメインを含む第 1 の軽鎖、又は

配列番号 48 のアミノ酸配列を含む V H ドメインを含む第 1 の重鎖、及び配列番号 47 のアミノ酸配列を含む V L ドメインを含む第 1 の軽鎖と、

(i i) 配列番号 195 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む第 2 の重鎖と、

(i i i) 配列番号 196 のアミノ酸配列を含む第 2 の軽鎖と

を含む、実施態様 1 から 6、11 から 23、27 から 29 及び 31 から 36 の何れか一実施態様の T N F ファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子。

30

【0406】

38. 抗原結合部分が、アフィニティーの向上を有する、実施態様 1 から 37 の何れか一実施態様の T N F ファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子。

【0407】

39. 抗原結合部分がヒト T n C と約 1 n M 未満の K_D 値で結合する、実施態様 1 から 38 の何れか一実施態様の T N F ファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子。

【0408】

40. 抗原結合部分が、異種間反応性を有する、実施態様 1 から 39 の何れか一実施態様の T N F ファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子。

【0409】

40

41. 抗原結合部分が、ヒト、マウス及びカニクイザル T n C のうちの少なくとも 1 つと約 2 n M 未満の K_D 値で結合する、実施態様 1 から 40 の何れか一実施態様の T N F ファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子。

【0410】

42. 抗原結合部分が、ヒト、マウス及びカニクイザル T n C と結合する、実施態様 1 から 41 の何れか一実施態様の T N F ファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子。

【0411】

43. 抗原結合部分が、指定された全ての種からの標的抗原と同様のアフィニティーで結合する、実施態様 40 から 42 の何れか一実施態様の T N F ファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子。

50

【0412】

44. 抗原結合部分が、指定された全ての種からの標的抗原と同様のアフィニティー、特に、100倍の K_D 範囲内、50倍の K_D 範囲内、20倍の K_D 範囲内、10倍の K_D 範囲内、5倍の K_D 範囲内で結合する、実施態様40から43の何れか一実施態様のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子。

【0413】

45. 抗原結合部分が、指定された全ての種からの標的抗原と同様の10倍の K_D 範囲内のアフィニティーで結合する、実施態様40から44の何れか一実施態様のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子。

【0414】

46. 実施態様1から45の何れか一実施態様のTNFファミリーリガンドトリマー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。

【0415】

47. 実施態様46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。

【0416】

48. 実施態様46の分離されたポリヌクレオチド又は実施態様47のベクターを含む宿主細胞。

【0417】

49. 実施態様1から45の何れか一実施態様のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子を産生する方法であって、

(i) 実施態様48の宿主細胞を抗原結合分子の発現に好適な条件下で培養するステップ、及び

(ii) 抗原結合分子を回収するステップを含む方法

【0418】

50. 実施態様1から45の何れか一実施態様のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子と少なくとも1つの薬学的に許容される添加剤とを含む薬学的組成物。

【0419】

51. 医薬として使用するための、実施態様1から45の何れか一実施態様のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子、又は実施態様50の薬学的組成物。

【0420】

52. がんの治療に使用するための、実施態様1から45の何れか一実施態様のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子、又は実施態様50の薬学的組成物。

【0421】

53. がんの治療用の医薬を製造するための、実施態様1から45の何れか一実施態様のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子の使用。

【0422】

54. 個体における疾患を治療する方法であって、薬学的に許容される形態の実施態様1から45の何れか一実施態様のTNFファミリーリガンドトリマー含有抗原結合分子を含む組成物の治療有効量を前記個体に投与することを含む方法。

【0423】

55. 前記疾患が、がんである、実施態様54の方法。

【実施例】

【0424】

以下は、本発明の方法及び組成物の実施例である。当然のことながら、上で提供した一般的な説明を考慮して様々な他の実施態様を実施することができる。

【0425】

組換えDNA手法

Sambrook, J. 等、Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

10

20

30

40

50

ory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989に記載されているような標準的方法を使用してDNAを操作した。分子生物学試薬は、製造業者の説明書に従って使用した。DNA配列は、二本鎖配列決定により決定した。一部のケースでは、Geneart AG (Regensburg, Germany) が自動遺伝子合成により合成オリゴヌクレオチド及びPCR産物から所望の遺伝子セグメントを調製した。単一の制限エンドヌクレアーゼ切断部位が隣接している遺伝子セグメントを、記述のプラスミドにクローニングした。形質転換され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配列決定により確認した。好適な制限部位を用いて、それぞれの発現ベクターへのサブクローニングを可能にするように遺伝子セグメントを設計した。

10

【0426】

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遺伝子情報は、Kabatt, E. A. 等、(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、NIH出版番号91-3242に与えられている。発現のために、全てのコンストラクトは、真核細胞においてタンパク質を分泌に導くリーダーペプチドをコードする5'末端DNA配列を含有した。それらをコードする例示的リーダーペプチド及びポリヌクレオチド配列を配列163から配列番号171に与える。

【0427】

細胞培養手法

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な、標準的な細胞培養手法を使用した。

20

【0428】

タンパク質精製

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。簡単に言うと、抗体をプロテインAセファロースカラム (GE healthcare) に供し、PBSで洗浄した。抗体の溶出をpH2.8で行い、その直後に試料を中和した。凝集したタンパク質を、モノマー抗体から、PBS中又は20mM ヒスチジン、150mM NaCl pH6.0中で、サイズ排除クロマトグラフィー (Superdex 200, GE Healthcare) により分離した。モノマー抗体画分をプールし、例えばMILLIPORE Amicon Ultra (30 MWCO) 遠心濃縮器を (必要に応じて) 使用して濃縮し、凍結し、-20℃又は-80℃で保管した。試料の一部は、例えばSDS-PAGE、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 又は質量分析による、後のタンパク質分析及び分析的特徴づけに供した。

30

【0429】

SDS-PAGE

NuPAGE (登録商標) Pre-Castゲルシステム (Invitrogen) を製造業者の説明書に従って使用した。具体的には、10%又は4-12% 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) 抗酸化剤ランニングバッファー添加剤を伴う) 又はMOPS (非還元ゲル) ランニングバッファーを使用した。

40

【0430】

分析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を判定する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り行った。簡単に言うと、300mM NaC

50

l、50mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、pH7.5中のプロテインA精製抗体をAgilent HPLC 1100システム上のTosoh TSKgel G3000SWカラムに、又は2xPBS中のプロテインA精製抗体をDionex HPLCシステム上のSuperdex 200カラム(GE Healthcare)に供した。UV吸光度、及びピーク面積の積分により、溶出タンパク質を定量した。BioRadゲル濾過スタンダード151-1901が、標準として用いられた。

【0431】

質量分析

このセクションは、VH/VL交換された多重特異性抗体(VH/VL CrossMabs)の特徴づけを、それらの正しい構築に重点を置いて説明する。予想一次構造を、脱グリコシル化されたインタクトなCrossMabについての及び脱グリコシル化/プラスミン消化された又は代替的に脱グリコシル化/限定LysC消化されたCrossMabについてのエレクトロスプレーイオン化質量分析(ESI-MS)により分析した。

【0432】

N-グリコシダーゼFを用いて、リン酸バッファー又はTrisバッファー中37℃で17時間まで、1mg/mlのタンパク質濃度で、VH/VL CrossMabを脱グリコシル化した。100µgの脱グリコシル化VH/VL CrossMabを用いてTrisバッファーpH8中で、それぞれ、室温で120時間、及び37℃で40分間、プラスミン消化又は限定LysC(Roche)消化を行った。質量分析の前に、セファデックスG25カラム(GE Healthcare)を用いてHPLCにより試料を脱塩した。TriVersa NanoMateソース(Advion)を装備したmaxis 4G UHR-QTOF MSシステム(Bruker Daltonik)を用いてESI-MSにより総質量を決定した。

【0433】

表面プラズモン共鳴(SPR)を用いた、多重特異性抗体のそれぞれの抗原への結合及び結合アフィニティーの判定(BIACORE)

生成された抗体のそれぞれの抗原への結合は、BIACORE装置(GE Healthcare Biosciences AB、Uppsala、Sweden)を使用して、表面プラズモン共鳴により調査する。簡単に言うと、アフィニティー測定のために、ヤギ抗ヒトIgG、JIR 109-005-098抗体を、それぞれの抗原に対する抗体の提示のためにCM5チップ上にアミンカップリングによって固定化する。結合を、HBSバッファー(HBS-P(10mM HEPES、150mM NaCl、0.005% Tween 20、pH7.4)中、25℃で(又は代替的に37℃で)測定する。抗原(R&D Systems又は社内で精製したもの)を溶液中の様々な濃度で添加する。80秒から3分の抗原注入により結合を測定し、チップ表面をHBSバッファーで3-10分間洗浄することにより解離を測定し、1:1ラングミュア結合モデルを使用してKD値を推定した。系固有のベースラインドリフトの補正のために、及びノイズシグナル低減のために、試料曲線からネガティブコントロールデータ(例えば、緩衝曲線)を減算する。センサーグラムの分析に、及びアフィニティーデータの計算に、それぞれのBiacore Evaluation Softwareを使用する。

【0434】

実施例1

TnC抗原配列及び抗原の産生

表3及び表4の全てのコンストラクトをGSTのC末端に融合させ、大腸菌BL21(DE3)において発現させる。部位特異的ビオチン化のために、テネイシン配列のC末端にAviタグを付加させ、BirAビオチンリガーゼを別のプラスミド(Avidity、Colorado、USA)上で共発現させた。増殖培地は、100µg/mlのアンプシリン及び20µg/mlのクロラムフェニコールを含有する2YTであった。ビオチンを添加して50µMの最終濃度にした。1mM IPTGを用いて22℃で一晩、タンパク質発現を誘導した。細胞を遠心分離により回収し、B-PER試薬(pierce

78260) 及び1mg/mlのリゾチーム (Sigma L6876) の存在下での超音波処理により細胞溶解を行った。溶解物を遠心分離し、清澄化された溶解物をグルタチオンセファロースカラム (GE Healthcare; 製品番号17-0756-01) に負荷した。洗浄後、TnC分子をトロンビン (Sigma Aldrich、製品番号10602400001) によって一晚、4℃でGSTから切断した。溶出は、50mM Trisバッファー pH8.0、200mM NaCl、5mM MgCl₂、1mM DTT及び10%グリセロール中で行った。最終精製ステップは、ゲル濾過カラム (Superdex 75 16/60、GE Healthcare) を用いて行った。試料は、処理するまで液体窒素で急速冷凍しておいた。

表 3:異種間アフィニティー判定に使用した TnC 抗原の配列(参照箇所表 26)

抗原	配列	配列番号
huTnC	ATGTCCCCTATACTAGGTTATTGGAAAATTAAGGGCCTTG TGCAACCCCACTCGACTTCTTTTGGGAATATCTTGAAGAAAA ATATGAAGAGCATTGTATGAGCGCGATGAAGGTGATAA ATGGCGAAACAAAAAGTTTGAATTGGGTTTGGAGTTTCC CAATCTTCCTTATTATATTGATGGTGATGTTAAATTAACA CAGTCTATGGCCATCATACGTTATATAGCTGACAAGCAC AACATGTTGGGTGGTTGTCCAAAAGAGCGTGACAGAGATT TCAATGCTTGAAGGAGCGGTTTTGGATATTAGATACGGT GTTTCGAGAATTGCATATAGTAAAGACTTTGAAACTCTCA AAGTTGATTTTCTTAGCAAGCTACCTGAAATGCTGAAAAT GTTGAAGATCGTTTATGTCATAAAACATATTTAAATGGT GATCATGTAACCCATCCTGACTTCATGTTGTATGACGCTC TTGATGTTGTTTTATACATGGACCCAATGTGCCTGGATGC GTTCCCAAAATTAGTTTGTTTAAAAAACGTATTGAAGCT ATCCACAAATTGATAAGTACTTGAAATCCAGCAAGTATA TAGCATGGCCTTTGCAGGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG GTGGCGACCATCCTCCAAAATCGGATGGTTCAACTAGTG GTTCTGGTCATCACCATCACCATCACTCCGCGGGTCTGG TGCCACGCGGTAGTACTGCAATTGGTATGAAAGAAACCG CTGCTGCTAAATTGAAACGCCAGCACATGGACAGCCAG ATCTGGGTACCGGTGGTGGCTCCGGTATTGAGGACGCG GGTCCATGGGATATCGGGGATCCGAGCTGGACACCCCCA AGGACCTGCAGGTGTCCGAGACAGCCGAGACAAGCCTGA CCCTGCTGTGAAAACCCCCCTGGCCAAGTTCGACCGGT ACAGACTGAACTACAGCCTGCCCACTGGACAGTGGGTGCG GCGTGCAGCTGCCCCGGAACACCACTCCTACGTGCTGC GGGGCTGGAACCCGGCCAGGAATACAACGTCCTGCTGA CGGCCGAGAAGGGCCGCGCACAAAGAGCAAGCCCGCCAGA GTGAAGGCCAGCACCGAGCAGGCCCGGAGCTGAAAA CCTGACCGTGACCGAAGTGGGCTGGGACGGCCTGCGGC TGAACCTGGACCGCGCTGACCAAGCCTATGAGCACTTTA TCATTAGGTGCAGGAGGCCAACAAAGGTGGAGGCAGCTC GGAACCTCACCGTGCTGGCAGCCTTCGGGCTGTGGACA TACCGGGCCTCAAGGCTGCTACGCCTTATACAGTCTCCA TCTATGGGGTGATCCAGGGCTATAGAACACCAAGTCTCT CTGCTGAGGCCTCCACAGGCGAAACACCGAACCTGGGC GAAGTGGTGGTGGCGGAAGTGGGTTGGGATGCGCTGAAA CTGAACTGGACCGCGCCGGAAGGCGCGTATGAATATTTT TTCATCCAGGTGCAGGAAGCGGATACCGTTGAAGCGGCG CAGAACCTGACCGTTCCGGGCGGTCTGCGTAGCACCGAT CTGCCGGGCTGAAAGCGGCGACCCATTATACATTACC ATCCGTGGGGTGACCCAGGACTTCTCTACCAACCCCTCTG AGCGTGAGGTGCTGACCGAGGAGGTACCCGACATGGG CAACCTGACCGTGACCGAGGTGTCCTGGGACGCCCTGCG GCTGAACTGGACACCCCCGACGGCACCTACGACCAAGTT CACAATCCAGGTGCAGGAAGCCGACCAAGGTGGAAGAAGC ACATAATCTGACCGTTCCGGGTAGCCTGCGTAGCATGGA	配列番号 1

10

20

30

40

50

40

	CTGCTGCTAAATTCGAACGCCAGCACATGGACAGCCCAG ATCTGGGTACCGGTGGTGGCTCCGGTATTGAGGGACGCG GGTCCATGGGATATCGGGGATCCGAGCTGGACACCCCCA AGGACCTGCAGGTGTCCGAGACAGCCGAGACAAGCCTGA CCCTGCTGTGAAAAACCCCCCTGGCCAAGTTCGACCGGT ACAGACTGAACTACAGCCTGCCCACTGGACAGTGGGTGCG GCGTGCAGCTGCCCCGGAACACCACCTOCTACGTGCTGC GGGGCCTGGAACCCGGCCAGGAATACAACGTCTCTGTGA CGGCCGAGAAGGGCCGCGCACAAGAGCAAGCCCCGCCAGA GTGAAGGCCAGCACCGAGGAAGTGCCAGCCTGAAAA CCTGACCGTGACCGAGGCCGGCTGGGACGGCCTGCGGC TGAAGTGGACCGCCGACGACCTGGCCTACGAGTACTTCG TGATCCAGGTGCAGGAAGCCAACAACGTCGAGACAGCCC ACAACTTCACCGTGCCCGGCAACCTGAGAGCCGCCGACA TCCCCGGCCTGAAGGTGGCCACATCCTACCGGGTGTCCA TCTACGGCGTGCCAGGGGCTACCGGACCCCCGTGCTGT CCGCCGAGACAAGCACCGGCACCACGCCGAACCTGGGC GAAGTGACCGTGGCGGAAGTGGGTTGGGATGCGCTGACC CTGAATTGGACCGCACCGGAAGGCGCGTATAAAAACTTT TTCATCCAGGTGCTGGAAGCGGATACCACCCAGACCGTG CAGAACCTGACCGTGCCGGGTGGTCTGCGTAGCGTAGAT CTGCCTGGTCTGAAAGCAGCAACCCGCTATTACATTACC CTGCGTGGTGTACCCAGGATTTTGGCACCGCACCGCTG AGCGTTGAAGTTCTGACCGAGGATCTGCCGACGCTGGGT GGTCTGAGCGTTACCGAAGTTAGTTGGGATGGTCTGACC CTGAATTGGACACCGATGATCTGGCATATAAACATTTTG TGGTGCAGGTTCAAGAGGCCAATAATGTTGAAGCAGCAC AGAATCTGACCGTTCGGGTAGCCTGCGTGCAAGTTGATA TTCCGGGACTGAAAGCCGATACCCCGTATCGTGTTAGCA TTTATGGTGTATTTCAGGGTTATCGTACCCCGATGCTGAG CACCGATGTTAGCACAGCACGTGAACCGGAAATTGGTAA TCTGAATGTTAGTGATGTGACCCCGAAATCATTAACTCTG AGCTGGACCGCAACCGATGGTATTTTTGATATGTTTACCA TTGAAATTATTGATAGCAATCGCCTGCTGCAGACCGCAG AACATAACATTAGCGGTGCAGAACGTACCGCACATATTA GCGGTCTGCCTCCGAGCACCGATTTTATTGTTTATCTGA GCGGTATTGCACCGAGCATTCTGTACCAAAACCATAGCA CCACCGCAACCGAAGCACTGACCGCAATGGGTAGCC CGAAAGAAGTGATTTTTAGCGATATTACCGAAAATAGCG CCACCGTTTCATGGCGTGACCGACCGCACAGGTTGAAA GCTTTCGTATTACCTATGTTCCGATTACCGGTGGCACCC CGAGCATGTTACCGTTGATGGCACCAAAACCCAGACCC GTCTGGTTAAACTGATTCCGGGTGTTGAATATCTGGTTAG CATTATTGCCATGAAAGGCTTTGAAGAAAGCGAACCGGT TAGCGGTAGCTTTACCACAGCTAGCGGCCTGAACGACAT CTTCGAGGCTCAGAAAATCGAATGGCACGAAGGTACCCA TCACCATCACCACTAA	10
		20
		30
cynoTNC	ATGTCCCCTATACTAGGTTATTGAAAAATTAAGGGCCTTG TGCAACCCACTCGACTTCTTTTGAATATCTTGAAGAAAA ATATGAAGAGCATTTGTATGAGCGCGATGAAGGTGATAA ATGGCGAAACAAAAAGTTTGAATTGGGTTTGGAGTTTCC CAATCTTCCTTATTATATTGATGGTGATGTAAATTAACA	配列番号 3
		40

	CAGTCTATGGCCATCATACGTTATATAGCTGACAAGCAC AACATGTTGGGTGGTTGTCCAAAAGAGCGTGACAGAGATT TCAATGCTTGAAGGAGCGGTTTTGGATATTAGATACGGT GTTTCGAGAATTGCATATAGTAAAGACTTTGAAACTCTCA AAGTTGATTTTCTTAGCAAGCTACCTGAAATGCTGAAAAT GTTCGAAGATCGTTTATGTCATAAACATATTTAAATGGT GATCATGTAACCCATCCTGACTTCATGTTGTATGACGCTC TTGATGTTGTTTTATACATGGACCCAATGTGCCTGGATGC GTTCCCAAAATTAGTTTGTTTAAAAAACGTATTGAAGCT ATCCCACAAATTGATAAGTACTTGAAATCCAGCAAGTATA TAGCATGGCCTTTGCAGGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG GTGGCGACCATCCTCCAAAATCGGATGGTTCAACTAGTG GTTCTGGTCATCACCATCACCATCACTCCGCGGGTCTGG TGCCACGCGGTAGTACTGCAATTGGTATGAAAGAAACCG CTGCTGCTAAATTCGAACGCCAGCACATGGACAGCCCAG ATCTGGGTACCGGTGGTGGCTCCGGTATTGAGGGACGCG GGTCCATGGGATATCGGGGATCCGAACCTGGATACCCCGA AAGATCTGCGTGTTAGCGAAACCGCAGAAACCGCCTGA CCCTGTTTTGAAAACACCGCTGGCAAAATTTGATCGTTA TCGTCTGAATTATAGCCTGCCGACCGGTCAGTGGGTTGG TGTTCACTGCTGCTCGTAATACCACCAGTTATGTTCTGCGT GGTCTGGAACCGGGTCAAGAATATAACGTTCTGCTGACC GCAGAAAAAGGTGCTCATAAAAGCAAACCGGCACGTGTT AAAGCAAGCACCGAACAGGCACCGGAACCTGAAAATCTG ACCGTTACCGAAGTTGGCTGGGATGGCCTGCGCCTGAAC TGGACGGCTGCGGACCAGGCCTACGAACACTTCGTTATC CAGGTGCAAGAAGCCAACAAAGTAGAAGCCGCTCAGAAT CTGACGGTTCGGGAAATCTGCGTGACGTTGATATTCCG GGTCTGAAAGCAGCAACCCCGTATACCGTTAGCATTTAT GGTGTATTTCAGGGTTATCGTACACCGGTTCTGAGTGCC GAAGCCAGCACCGGTGAAACCCCGAATCTGGGTGAAGTT ATGGTTAGCGAAGTGGGCTGGGATGCACTGAAACTGAAT TGGACAGTTCGGGAAGGTGCCTATGAATACTTTTTCATTC AGGTTCAAGAAGCGGATACCGTTGAAGCCGCTCAGAATC ATACCGTTCGGGTGGTCTGCGTAGCACCGATCTGCCTG GCCTGAAAGCCGCTACCCATTACACCATACCATTCGTG GTGTTACCCAGGATTTTAGCACACACCGCTGAGCGTTG AAGTTCTGACAGAAGAACTGCCGCAGCTGGGTGATCTGG CAGTTAGCGAAGTTGGTTGGGATGGTCTGCGTCTGAATT GGACCGCAGCAGATCAGGCATATGAACATTTTGTATCC AGGTGCAAGAAGTGAACAAAGTTGAAGCAGCACAGAATC TGACCGTTCGGGTAGCCTGCGTGACGTTGATATTCCGG GTCTGAAAGCAGCAACCCCGTATACCGTTAGCATTTATG GTGTTATTGCGGTTATCGTACACCGGTTCTGAGCGCAG AAGCAAGCACCGCAAAAGAACCGGAAATTGGTAATCTGA ACGTGAGCGATATTACACCGGAAAGTTTTAGCCTGAGCT GGACCGCAACCGATGGTATTTTGAACCTTTACCATCG AGATCATCGATAGCAATCGTCTGCTGGAATCGTGGAAT ATAACATTAGCGGTGCAGAACGTACCGCACATATTAGCG GTCTGCCTCCGAGCACCGATTTTATTGTTTATCTGAGCG GTCTGGCACCGAGCTTTCGTACCAAAACCATTAGCGCAA CCGCAACCACCGAAGCACTGACCGCAATGGGTAGCCCG	10 20 30 40
--	---	---

	AAAGAAGTGATTTTTAGCGATATTACCGAAAATAGCGCCA CCGTTTCATGGCGTGCACCGACCGCACAGGTTGAAAGCT TTCGTATTACCTATGTTCCGATTACCGGTGGCACCCCGA GCATGGTTACCGTGGATGGCACCAAAACCCAGACCCGTC TGGTTAAACTGGTTCGGGTGTTGAATATCTGGTGAATAT CATTGCCATGAAAGGCTTTGAAGAAAGCGAACCGGTTAG CGGTAGCTTTACACCGCTAGCGGCCTGAACGACATCTT CGAGGCTCAGAAAATCGAATGGCACGAAGGTACCCATCA CCATCACCACCACTAA	
huTNC	MSPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWR NKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQSMIIIRYIADKHNMLGGC PKERAISMLEGAVLDIRYGVSRJAYS KDFETLKVDFLSKLPE MLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPM CLDAFPKLVCFKKRIEAIQIDKYLKSSKYIAWPLQGQWQATFG GGDHPPKSDGSTSGSGHHHHHSAGLVPRGSTAIGMKETA AAKFERQHMDSPDLGTGGSGIEGRGSMGYRGSELDTPKDL QVSETAETSLTLLWKTPAKFDYRLNYSLPTGQWVGVLPL RNTTSYVLRGLEPGQEYNVLLTAEKGRHKS KPARVKASTEQ APELENLTVTEVGWDGLRLNWTAAADQAYEHFIQVQEANKVE AARNLTVPGSLRAVDIPGLKAATPYTVSIYGVIGYRTPVLS AEASTGETPNLGEVVVAEVGWDALKLNWTAPEGAYEYFFIQ VQEADTVAAQNLTVPGLRSTDLPLGLKAATHYTITIRGVTQ DFSTTPLSVEVLTEEVPMGNLTVTEVSWDALRLNWTTDPG TYDQFTIQVQEADQVEEAHNLTVPGSLRSMEIPGLRAGTPYT VTLHGEVRGHSTRPLAVEVVTEDLPQLGDLAVSEVGWDGLR LNWTAADNAYEHFVIQVQEVNKVEAAQNLTLPGLRAVDIPG LEAATPYRVSIYGVIRGYRTPVLSAEASTAKEPEIGNLNVS DIT PESFNL SWMATDGIFETFTIEIISNRLLTVEYNISGAERTAH SGLPPSTDFIVYLSGLAPSIRTKTISATATTEALPLENL TISDI NPYGFTVSWMASENAFDSFLVTVD SGKLLDPQEFTLSGTQ RKLELRGLITGIGYEVMSVSGFTQGHQTKPLRAEIVTEAMGSP KEVIFSDITENSATVSWRAPTAQVESFRITYVPITGGTPSMVT VDGKTQTRLVKLIPGVEYLVSIAMKGFEESEPVS GSFTTAS GLNDIFEAKIEWHEGTHHHHHH	配列番号 4
muTNC	MSPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWR NKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQSMIIIRYIADKHNMLGGC PKERAISMLEGAVLDIRYGVSRJAYS KDFETLKVDFLSKLPE MLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPM CLDAFPKLVCFKKRIEAIQIDKYLKSSKYIAWPLQGQWQATFG GGDHPPKSDGSTSGSGHHHHHSAGLVPRGSTAIGMKETA AAKFERQHMDSPDLGTGGSGIEGRGSMGYRGSELDTPKDL QVSETAETSLTLLWKTPAKFDYRLNYSLPTGQWVGVLPL RNTTSYVLRGLEPGQEYNVLLTAEKGRHKS KPARVKASTEE VPSLENLTVTEAGWDGLRLNWTADDLAYEYFVIQVQEANNV ETAHNFTVPGNLRAADIPGLKVATSYRVSIYGVARGYRTPVL SAETSTGTPNLGEVTVAEVGDALTLNWTAPEGAYKNFFI QVLEADTTQTVQNLTVPGGLRSVDLPGLKAATRYITLRGV TQDFGTAPLSVEVLTEDLPQLGGLSVTEVSWDGLTLNWTTD DLAYKHFFVVQVQEANNVEAAQNLTVPGLRAVDIPGLKADT PYRVSIYGVIGYRTPMLSTDVSTAREPEIGNLNVS DVT PK FNLSWTATDGIFDMFTIEIISNRLLQTA EHNISGAERTAHISG	配列番号 5

10

20

30

40

50

	LPPSTDFIVYLSGIAPSIRTKTISTTATTEALTAMGSPKEVIFS DITENSATVSWRAPTAQVESFRITYVPITGGTPSMVTVDGKT TQTRLVKLIPGVEYLVSIAMKGFEESEPVS GSFTTASGLNDIF EAQKIEWHEGTHHHHHH	
cynoTNC	MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWR NKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQSMAIIRYIADKHNMLGGC PKERAEISMLEGAVLDIRYGVSR IAYSKDFETLKVDFLSKLPE MLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPM CLDAFPKLVCFKKRIE AIPQIDKYLKSSKYIAWPLQG WQATFG GGDHPPKSDGSTSGSGHHHHHHSAGLVPRGSTAIGMKETA AAKFERQHMDSPDLGTGGGSGIEGRGSMGYRGSELDTPKDL RVSETAETSLTLFWKTPLAKFDYRLNYSLPTGQWVG VQLP RNTTSYVLRGLEPGQEYNVLLTAEKGRHKSKPARVKASTEQ APELENLTVTEVGWDGLRLN WTAADQAYEHFVIQVQEANKV EAAQNLTVPGNLRAVDIPGLKAATPYTVSIYGV IQGYRTPVL SAEASTGETPNLGEVMVSEVGWDALKLNWTVPEGAYEYFFI QVQEADTVEAAQNHTVPGGLRSTDLPGLKAATHYTITIRGVT QDFSTTPLSVEVLTEELPQLGDLAVSEVGWDGLRLN WTAAD QAYEHFVIQVQEVNKVEAAQNLTVPGLSLRAVDIPGLKAATPY TVSIYGVIRGYRTPVLSAEASTAKEPEIGNLNVS DITPESFSL WTATDGIFETFTIEIIDS NRLL EIVEYNISGAERTAHISGLPPST DFIVYLSGLAPSFRTKTISATATTEALTAMGSPKEVIFSDITEN SATVSWRAPTAQVESFRITYVPITGGTPSMVTVDGKTQTQTRL VKLVPGVEYLVNIAMKGFEESEPVS GSFTTASGLNDIFEAK IEWHEGTHHHHHH	配列番号 6

10

20

30

40

50

表 4:アフィニティー判定に使用した TnC 抗原の配列(参照表 5)

抗原 pETR 番号 バッチ ID	タンパク質配列	配列番号
GST huTNC fn5 A1234 BC fn6 B	MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRN KKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQSMIIRYIADKHNMLGGCPK ERAEISMLEGAVLDIRYGVSR IAYSKDFETLKVDFLSKLPEMLK MFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDA FPKLVCFKKRIEAI PQIDKYLKSSKYIAWPLQGQWQATFGGGDH PPKSDGSTSGSGHHHHHSAGLVPRGSTAIGMKETAAAKFE RQHMDSPDLGTGGGSGIEGRGSMGYRGSELDTPKDLQVSET AETSLTLLWKTPAKFDYRLNYSLPTGQWVGVLPRNTTSY VLRGLEPGQEYNVLLTAEKGRHKSKPARVKASTEQAPELENL TVTEVGWDGLRLNWT AADQAYEHFIQVQEANKVEAARNLTV PGSLRAVDIPGLKAATPYTVSIYGVIGYRTPVLSAEASTGET PNLGEVVVAEVGWDALKLNWTAPEGAYEYFFIQVQEADTVEA AQNLTVPGGLRSTDLPGLKAATHYTITIRGVTQDFSTTPLSVE VLTEEVPDMGNLTVTEVSWDALRLNWTPDGTQDFTIQVQ EADQVEEAHNLTVPGSLRSMEIPGLRAGTPYTVTLHGEVRGH STRPLAVEVVTEDLPQLGDLAVSEVGWDGLRLNWT AADNAY EHFVIQVQEVNKVEAAQNLTLPGSLRAVDIPGLEAATPYRVS YGVIRGYRTPVLSAEASTAKEPEIGNLNVSDITPESFNLSWMA TDGIFETFTIEIDSNRLLTVEYNISGAERTAHISGLPPSTDFIV YLSGLAPSIRTKTISATATTEALPLENL TISDINPYGFTVSWM ASENAFDSFLVTVVDSGKLLDPQEFTLSGTQRKLELRGLITGI GYEVMVSGFTQGHQTKPLRAEIVTEAMGSPKEVIFSDITENSA TVSWRAPTAQVESFRITYVPITGGTPSMVTVDGTKTQTRLVK LIPGVEYLVSIAMKGFEESEPVS GSFTTASGLNDIFEAKIEW HEGTHHHHHH	配列番号 7
GST huTNCfn5 mu A124 BC hu fn6 B	MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRN KKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQSMIIRYIADKHNMLGGCPK ERAEISMLEGAVLDIRYGVSR IAYSKDFETLKVDFLSKLPEMLK MFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDA FPKLVCFKKRIEAI PQIDKYLKSSKYIAWPLQGQWQATFGGGDH PPKSDGSTSGSGHHHHHSAGLVPRGSTAIGMKETAAAKFE RQHMDSPDLGTGGGSGIEGRGSMGYRGSELDTPKDLQVSET AETSLTLLWKTPAKFDYRLNYSLPTGQWVGVLPRNTTSY VLRGLEPGQEYNVLLTAEKGRHKSKPARVKASTEVP SLENL TVTEAGWDGLRLNWTADDLAYEYFVIQVQEANNVETAHNFT VPGNLRAADIPGLKVATSYRVSIGVARGYRTPVLSAETSTG TTPNLGEVTVAEVGWDALTLNWT APEGAYKNFFIQVLEADTT QTVQNLTVPGGLRSVDLPGLKAATRYITLRGVTQDFGTAPL SVEVLTEDLPQLGGLSVTEVSWDGLTLNWT TDDLAYKHVV QVQEANNVEAAQNLTVPGSLRAVDIPGLKADTPYRVSIGVI QGYRTPMLSTDVSTAREPEIGNLNVSDVTPKSFNLSWTATDG	配列番号 8

10

20

30

40

	IFDMFTIEIISNRLLQTAHEHNISGAERTAHISGLPPSTDFIVYLS GIAPSIRTKTISTTATTEALTAMGSPKEVIFSDITENSATVSWR APTAQVESFRITYVPITGGTPSMVTVDGTKTQTRLVKLIPGVE YLVSIAMKGFEESEPVSGSFTTASGLNDIFEAQKIEWHEGTHH HHHH	
GST TNC hu fn5 B-C fn6 B	MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRN KKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQSMIIRYIADKHNLGGCPK ERAEISMLEGAVLDIRYGVSRAYSDFETLKVDFLSKLPEMLK MFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDA FPKLVCFKKRIEAIQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDH PPKSDGSTSGSGHHHHHSAGLVPRGSTAIGMKETAAAKFE RQHMDSPDLGTGGSGIEGRGSMGYRGSELDTPKDLQVSET AETSLTLLWKTPLAKFDYRLNYSLPTGQWVGVLPRNTTSY VLRGLEPGQEYNVLLTAEKGRHKSPPARVKASTAKEPEIGNL NVSDITPESFNLSSMATDGIETFTIEIISNRLLTVEYNISGA ERTAHISGLPPSTDFIVYLSGLAPSIRTKTISATTEALPLEN LTISDINPYGFTVSWMASENAFDSFLVTVVDSGKLLDPQEFTL SGTQRKLELRGLITGIGYEVMSVSGFTQGHQTKPLRAEIVTAM GSPKEVIFSDITENSATVSWRAPTAQVESFRITYVPITGGTPS MVTVDGKTQTRLVKLIPGVEYLVSIAMKGFEESEPVSGSFT TASGLNDIFEAQKIEWHEGTHHHHHH	配列番号 9
GST huTNC fn5 A1234 fn6 B	MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRN KKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQSMIIRYIADKHNLGGCPK ERAEISMLEGAVLDIRYGVSRAYSDFETLKVDFLSKLPEMLK MFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDA FPKLVCFKKRIEAIQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDH PPKSDGSTSGSGHHHHHSAGLVPRGSTAIGMKETAAAKFE RQHMDSPDLGTGGSGIEGRGSMGYRGSELDTPKDLQVSET AETSLTLLWKTPLAKFDYRLNYSLPTGQWVGVLPRNTTSY VLRGLEPGQEYNVLLTAEKGRHKSPPARVKASTEQAPELENL TVTEVGWDGLRLNWTAAADQAYEHFIQVQEAANKVEAARNLTV PGSLRAVDIPGLKAATPYTVSIYGIQGYRTPVLSAEASTGET PNLGEVVVAEVGWDALKLNWTAPEGAYEYFFIQVQEADTVEA AQNLTVPGGRLSTDLPLGLKAATHYTITIRGVTQDFSTTPLSVE VLTEEVPMGNLTVTEVSWDALRLNWTPDGTQDFTIQVQ EADQVEEAHNLTVPGSLRSMEIPGLRAGTPYTVTLHGEVRGH STRPLAVEVVTEDLPQLGDLAVSEVGWDGLRLNWTAAADNAY EHFVIQVQEVNKEAAQNLTLPGLRAVDIPGLEAATPYRVSI YGVIRGYRTPVLSAEASTAKEAMGSPKEVIFSDITENSATVSW RAPTAQVESFRITYVPITGGTPSMVTVDGTKTQTRLVKLIPGV EYLVSIAMKGFEESEPVSGSFTTASGLNDIFEAQKIEWHEGTH HHHHH	配列番号 10
huTNC A4 B	MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRN KKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQSMIIRYIADKHNLGGCPK ERAEISMLEGAVLDIRYGVSRAYSDFETLKVDFLSKLPEMLK MFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDA FPKLVCFKKRIEAIQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDH PPKSDGSTSGSGHHHHHSAGLVPRGSTAIGMKETAAAKFE RQHMDSPDLGTGGSGIEGRGSMGYRGSELDLPQLGDLAVSE VGWDGLRLNWTAAADNAYEHFVIQVQEVNKEAAQNLTLPGLS	配列番号 11

10

20

30

40

50

	LRAVDIPGLEAATPYRVSIYGVIRGYRTPVLSAEASTASGLNDI FEAQKIEWHEGTHHHHHH	
huTNC A1 B	MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRN KKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQSMARIYIADKHNMLGGCPK ERAEISMLEGAVLDIRYGVSR IAYSKDFETLKVDFLSKLPEMLK MFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDA FPKLVCFKKRIEAI PQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDH PPKSDGSTSGSGHHHHHSAGLVPRGSTAIGMKETAAAKFE RQHMDSPDLGTGGGSGIEGRGSMGYRGSEQAPELENLTVTE VGWDGLRLNWT AADQAYEHFIQVQEANKVEAARNLTVPGSL RAVDIPGLKAATPYTVSIYGVIIQGYRTPVLSAEASTASGLNDIF EAQKIEWHEGTHHHHHH	配列番号 12

10

【0435】

実施例 2

一般的 Fab ライブラリーからの抗 T n C 抗体の選択

抗 T n C 抗体を、D P 8 8 - 4 (クローン 1 8 D 4) 及びラムダ D P 4 7 (クローン 1 1 C 7) という 2 つの異なる一般的ファージディスプレイライブラリーから選択した。

【0436】

20

ライブラリー構築

D p 8 8 - 4 ライブラリーは、軽鎖 (L 3、3 つの異なる長さ) の C D R 3 及び重鎖 (H 3、3 つの異なる長さ) の C D R 3 内に無作為化配列スペースを含む V k 1 _ 5 (カップ軽鎖) 及び V H 1 _ 6 9 (重鎖) の V ドメインペアリングを使用して、ヒト生殖細胞系遺伝子に基づいて構築した。ライブラリー生成は、オーバーラップ伸長スプライシング (S O E) P C R による 3 つの p P C R 増幅断片のアセンブリによって行った。断片 1 は、無作為化 L 3 を含む抗体遺伝子の 5' 末端を含み、断片 2 は、L 3 から H 3 に及ぶ中心コンストラクト断片であるのに対して、断片 3 は、無作為化 H 3、及び抗体遺伝子の 3' 部分を含む。次のプライマーの組合せをそれぞれ使用して、D P 8 8 - 4 ライブラリー用のこれらのライブラリー断片を生成した：断片 1 (リバースプライマー V k 1 _ 5 _ L 3 r _ S 又は V k 1 _ 5 _ L 3 r _ S Y 又は V k 1 _ 5 _ L 3 r _ S P Y と組み合わせたフォワードプライマー L M B 3)、断片 2 (リバースプライマー R J H 3 2 と組み合わせたフォワードプライマー R J H 3 1) 及び断片 3 (リバースプライマー f d s e q l o n g と組み合わせたフォワードプライマー D P 8 8 - v 4 - 4 又は D P 8 8 - v 4 - 6 又は D P 8 8 - v 4 - 8)。ライブラリー断片の生成のための P C R パラメータは、94℃での 5 分の初期変性、1 分 94℃、1 分 58℃、1 分 72℃の 25 サイクル、そして 10 分間 72℃での末端伸長であった。等モル比のゲル精製された単一断片を鋳型として使用するアセンブリ P C R のためのパラメータは、94℃で 3 分の初期変性、そして 30 秒 94℃、1 分 58℃、2 分 72℃の 5 サイクルであった。この段階で、外部プライマー (L M B 3 及び f d s e q l o n g) を添加し、さらなる 20 サイクルを行った後、10 分間 72℃で末端伸長を行った。十分な量の完全長無作為化 F a b コンストラクトのアセンブリ後、それらを N c o I / N h e I 消化し、同様に処理したアクセプターファージミドベクターにライゲーションした。精製されたライゲーション体を、エレクトロコンピテント大腸菌 T G 1 への ~ 60 回の形質転換に使用した。F a b ライブラリーを呈示するファージミド粒子をレスキューし、選択に使用できるように P E G / N a C l 精製により精製した。これらのライブラリー構築ステップを 3 回繰り返して、 4.4×10^9 の最終ライブラリーサイズを得た。機能性クローンのパーセンテージは、ドットプロットでの C 末端タグ検出により判定して、それぞれ、軽鎖については 92.6%、重鎖については 93.7% であった。

30

40

【0437】

50

ラムダDP47ライブラリーは、次のVドメインペアリングを使用してヒト生殖細胞系遺伝子に基づいて構築した：VL3__19ラムダ軽鎖とVH3__23重鎖。ライブラリーを軽鎖（L3）のCDR3及び重鎖（H3）のCDR3に関して無作為化し、「オーバーラップ伸長によるスプライシング」（SOE）PCRにより3つの断片からのアセンブリを行った。断片1は、無作為化L3を含む抗体遺伝子の5'末端を含み、断片2は、L3の終点からH3の始点に及ぶ中心コンストラクト断片であるのに対して、断片3は、無作為化H3、及びFab断片の3'部分を含む。次のプライマーの組合せを使用して、ライブラリー用のライブラリー断片を生成した：断片1（LMB3-VL__3__19__L3r__V/VL__3__19__L3r__HV/VL__3__19__L3r__HLV）、断片2（RJH80-DP47CDR3__ba(mod)）及び断片3（DP47-v4-4/DP47-v4-6/DP47-v4-8-fdseq long）。ライブラリー断片の産生のためのPCRパラメータは、94℃での5分の初期変性、60秒94℃、60秒55℃、60秒72℃の25サイクル、そして10分間72℃での末端伸長であった。等モル比の3つの断片を鋳型として使用するアセンブリPCRのためのパラメータは、94℃で3分の初期変性、そして60秒94℃、60秒55℃、120秒72℃の5サイクルであった。この段階で、外部プライマーを添加し、さらなる20サイクルを行った後、10分間72℃で末端伸長を行った。十分な量の完全長無作為化Fabコンストラクトのアセンブリ後、それらをNcoI/NheI消化し、並行してアクセプターファージミドベクターを同様に処理した。15μgのFabライブラリーインサートを13.3μgのファージミドベクターとライゲーションした。精製されたライゲーション体を60回の形質転換に使用し、その結果、 1.5×10^9 の形質転換体を得た。Fabライブラリーを提示するファージミド粒子をレスキューし、選択に使用できるようにPEG/NaCl精製により精製した。

【0438】

ファージディスプレイ選択及びELISAスクリーニング

ファージディスプレイ選択のための抗原としてのヒトGST融合TnC fn5 A1234 BC fn6を大腸菌において発現させ、融合タンパク質のC末端に位置するaviタグ認識配列でのBirAビオチンリガーゼの共発現によりインビボで部位特異的にビオチン化した（抗原の産生は実施例1に従い、配列は表4から導かれる）。この抗原は、2つのフィブロネクチンIII型ドメイン5と6の間に位置するヒトTnC追加スプライドドメインA1、A2、A3、A4、B及びCを含む。ファージディスプレイ選択は、これらの追加スプライドドメインの何れかへの結合物質の選択を目的とするものであった。後続のステップでより少数の追加スプライドドメインを含むさらなる抗原コンストラクトを使用して表面プラズモン共鳴によりドメイン特異性を判定する。

【0439】

選択ラウンド（バイオパニング）は、次のパターンに従って溶液中で行った：1. 3つの異なるタグを認識する抗体のライブラリーを枯渇させるための、無関係のGST融合タンパク質を有し、TnC標的細胞抗原と同様のaviタグ及びHis6タグも有する、 $\sim 10^{12}$ 個のファージミド粒子の予備清浄化；2. 総体積1mL中のタグ結合物質のさらなる枯渇のための、上清中の予備清浄化したファージミド粒子と、100nM ビオチン化ヒトGST融合TnC fn5 A1234 BC fn6との、無関係の非ビオチン化GST融合タンパク質の存在下で0.5時間のインキュベーション；3. ニュートラアビジン予備被覆マイクロタイタープレートの4ウェルへの10分間の移入による、ビオチン化ヒトGST融合TnC fn5 A1234 BC fn6及び付着した特異的に結合しているファージの捕捉（ラウンド1及び3）；4. 5xPBS/Tween20及び5xPBSを使用するそれぞれのウェルの洗浄；5. 10分間の1ウェル当たり250μLの100mM TEA（トリエチルアミン）の添加によるファージ粒子の溶出及び4ウェルからプールした溶出物への500μLの1M Tris/HCl pH7.4の添加による中和；6. 溶出したファージ粒子の上清による対数期大腸菌TG1細胞の再感染、ヘルパーファージVCSM13による感染、30℃で一晩の振盪機でのインキュベーション、そし

て次の選択ラウンドで使用されることになるファージミド粒子のその後のPEG/NaCl沈殿。100 nMの一定抗原濃度を使用して3ラウンドにわたって選択を行った。ラウンド2では、ニュートラアビジンへの結合物質の濃縮を回避するために、 5.4×10^7 個のストレプトアビジン被覆磁性ビーズの添加により抗原：ファージ複合体の捕捉を行った。ラウンド2及び3の後に次のようにELISAにより特異的結合物質を同定した：100 μ lの100 mM ビオチン化ヒトGST融合TnC fn5 A1234 BC fn6でニュートラアビジンプレートを被覆した。Fab含有細菌上清を添加し、抗Flag/HPR二次抗体を使用して結合FabをそれらのFlagタグによって検出した。ヒトGST融合TnC fn5 A1234 BC fn6に関するシグナルを提示するクローンであって、標的と同じタグを有する無関係のGST融合タンパク質に関してネガティブであるクローンを、さらなる分析の最終選考に残した。それらを培養体積0.5リットルで細菌により発現させ、アフィニティー精製し、マウスTnCとの交差反応性を試験するために、及び抗体が認識する追加スプライドメインを決定するために、BioRadのProteOn XPR36バイオセンサーを使用するSPR分析によりさらに特徴を明らかにした。

【0440】

BioRadのProteOn XPR36バイオセンサーを使用するSPR分析

ニュートラアビジン捕捉によりNLCチップ上に固定化したビオチン化ヒト及びマウスTnC抗原に関して25℃でProteOn XPR36装置(Biorad)を使用して表面プラズモン共鳴(SPR)により選択クローンのアフィニティー(K_D)を測定した。抗原(リガンド)の固定化：組換え抗原をPBST(10 mM リン酸塩、150 mM 塩化ナトリウム pH 7.4、0.005% Tween 20)で10 μ g/mlに希釈し、次いで30 μ l/分で垂直の向きに注入した。被分析物の注入：「ワンショット動態(one-shot kinetics)」測定のために、注入方向を水平の向きに変え、精製Fabの2倍希釈系列を別々のチャンネル1-5に沿って同時に注入し、200秒の結合時間及び240秒の解離時間をそれぞれ用いた。参照用の「インライン」ブランクを得るために、バッファー(PBST)を第6のチャンネルに沿って注入した。ProteOn Manager v3.1ソフトウェアの単純1対1ラングミュア結合モデルを使用して、結合センソグラムと解離センソグラムの同時フィッティングにより、結合速度定数(k_{on})及び解離速度定数(k_{off})を算出した。平衡解離定数(K_D)を k_{off}/k_{on} 比として算出した。表5は、種及び追加スプライドメインの組成が異なる幾つかのTnC抗原についての2つの選択クローン18D4及び11C7の平衡解離定数(K_D)を収載するものである。

表 5:クローン 18D4 及び 11C7 の平衡解離定数(K_D)

抗原	クローン 18D4 K_D [nM]	クローン 11C7 K_D [nM]
GST huTNC fn5 A1234 BC fn6 B	4.0	2.3
GST huTNCfn5 mu A124 BC hu fn6 B	11.2	1.9
GST TNC hu fn5 B-C fn6 B	該当なし	1.0
GST huTNC fn5 A1234 fn6 B	5.0	該当なし
huTNC A4 B	2.0	該当なし
huTNC A1 B	5.6	該当なし

表 6:PCR に使用した一般的なファージディスプレイ法による DP88-4 ライブラリー (Vk1_5/VH1_69) 鑄型の DNA 配列

コンストラクト	塩基対配列	配列番号
pRJH33 ライブラリー-鋳型 DP88-4 ライブラリー; 軽鎖についての PelB リーダー配列+Vk1_5 カップ Vドメイン+CL 定常ドメインと重鎖についての PelB+VH1_69V ドメイン+CH1 定常ドメインとを含む完全 Fab コー ド化領域	ATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTA CTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGACATCCAGATGAACCA GTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTC CCATCACTTGCCGTGCCAGTCAGAGTATTAGTAGCTGGTTG GCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCCTAAGCTCCT GATCTATGATGCCTCCAGTTTGAAAGTGGGGTCCCATCAC GTTTCAGCGGCAGTGGATCCGGGACAGAATTCACTCTCACC ATCAGCAGCTTGCCAGCCTGATGATTTTGAACCTTATTACTGC CAACAGTATAATAGTTATTCTACGTTTGCCAGGGCACCAAA GTCGAGATCAAGCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCAT CTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCT CTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCA AAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAAC TCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCAC CTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACT ACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAG GGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA GTGTGGAGCCGCAGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATC TGAATGGAGCCGCAGACTACAAGGACGACGACACAAGGGT GCCGCATAATAAGGCGCGCCAATTCTATTTCAAGGAGACAG TCATATGAAATACCTGCTGCCGACCGCTGCTGCTGGTCTGC TGCTCCTCGCTGCCAGCCGGCGATGGCCAGGTGCAATTG GTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCGGT GAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCCGGAGGCACATTCAGCAGCT ACGCTATAAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGGTC GAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAA CTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATTACTGCAG ACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTG AGATCTGAGGACACCGCCGTGTATTACTGTGCGAGACTATC CCCAGGCGGTTACTATGTTATGGATGCCTGGGGCCAAGGGA CCACCGTGACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAAGGCCCATCG GTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGG CACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCG AACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGC GGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACT CTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCT TGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAAGCCC AGCAACACCAAAGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTG TGACGCGGCCGCAAGCACTAGTGCCCATCACCATCACCATC ACGCCGCGGCA	配列番号 13

表 7:DP88-4 ライブラリー(Vk1_5/VH1_69)生殖系列鋳型の塩基対配列

コンストラクト	塩基対配列	配列番号
Fab 軽鎖 V1_5	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCT GTAGGAGACCGTGTCAACCATCACTTGCCGTGCCAGTCAGAG TATTAGTAGCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGA AAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAA GTGGGGTCCCATCACGTTTTCAGCGGCAGTGGATCCGGGACA GAATTCACCTCTCACCATCAGCAGCTTGCAGCCTGATGATTTT GCAACTTATTACTGCCAACAGTATAATAGTTATTCTACGTTT GGCCAGGGCACCAAAGTCGAGATCAAGCGTACGGTGGCTGC ACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAA ATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTA TCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCC TCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGAC AGCAAAGCAGACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCT GAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCG AAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGC TTCAACAGGGGAGAGTGTGGAGCCGCGAGAACAAAAAATCAT CTCAGAAGAGGATCTGAATGGAGCCGCGAGACTACAAGGACG ACGACGACAAGGGTGCCGCA	配列番号 14
Fab 重鎖 VH1_69	CAGGTGCAATTGGTGAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCC TGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCCGGAGGCA CATTACAGCAGCTACGCTATAAGCTGGGTGCGACAGGCCCT GGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTT TGGTACAGCAAACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCA CCATTACTGCAGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAG CTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACCGCCGTGTATTACTG TGCGAGACTATCCCCAGGCGGTTACTATGTTATGGATGCCT GGGGCCAAGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCAGCTAGCACC AAAGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAG CACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGG ACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAGTCAAGG GCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACA GTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGC CCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG AATCACAAGCCCAGCAACACCAAAGTGGACAAGAAAGTTGA GCCCAAATCTTGTGACGCGGCCGCAAGCACTAGTGCCCATC ACCATCACCATCACGCCGCGGCA	配列番号 15

10

20

30

40

50

表 8:DP88-4 ライブラリー(Vk1_5/VH1_69)生殖系列鑄型のアミノ酸配列

コンストラクト	塩基対配列	配列番号
Fab 軽鎖 Vk1_5	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAP KLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQ QYNSYSTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSS TLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGAAEQK LISEEDLNGAADYKDDDDKGAA	配列番号 16
Fab 重鎖 VH1_69(DP88)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAIWVRQAPGQ GLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARLSPGGYYVMDAWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDAAASTSAHHHHHAAA	配列番号 17

10

表 9:DP88-4 ライブラリー(Vk1_5/VH1_69)の生成に使用したプライマー配列

20

プライマー名	プライマー配列 5' -3'	配列番号
LMB3	CAGGAAACAGCTATGACCATGATTAC	配列番号 18
Vk1_5_L3r_S	CTCGACTTTGGTGCCCTGGCCAAACGT <u>SBA</u> <u>ATA</u> <u>CGA</u> <u>ATT</u> <u>ATA</u> CTGTTGGCAGTAATAAGTTGCAAAATCAT	配列番号 19
Vk1_5_L3r_SY	CTCGACTTTGGTGCCCTGGCCAAACGT <u>MHR</u> <u>SGR</u> <u>ATA</u> <u>CGA</u> <u>ATT</u> <u>ATA</u> CTGTTGGCAGTAATAAGTTGCAAAATCAT	配列番号 20
Vk1_5_L3r_SPY	CTCGACTTTGGTGCCCTGGCCAAACGT <u>MHH</u> <u>MSS</u> <u>SGR</u> <u>ATA</u> <u>CG</u> <u>A</u> <u>ATT</u> <u>ATA</u> CTGTTGGCAGTAATAAGTTGCAAAATCAT	配列番号 21
RJH31	ACGTTTGGCCAGGGCACCAAAGTCGAG	配列番号 22
RJH32	TCTCGCACAGTAATACACGGCGGTGTCC	配列番号 23
DP88-v4-4	GGACACCGCCGTGTATTACTGTGCGAGA-1-2-2-3-4-GAC- TAC-TGGGGCCAAGGGACCACCGTGACCGTCTCC	配列番号 24
DP88-v4-6	GGACACCGCCGTGTATTACTGTGCGAGA-1-2-2-2-2-3-4- GAC-TAC-TGGGGCCAAGGGACCACCGTGACCGTCTCC	配列番号 25
DP88-v4-8	GGACACCGCCGTGTATTACTGTGCGAGA-1-2-2-2-2-2-3- 4-GAC-TAC-TGGGGCCAAGGGACCACCGTGACCGTCTCC	配列番号 26
fdseqlong	GACGTTAGTAAATGAATTTTCTGTATGAGG	配列番号 27

30

40

下線付きの塩基:60%所与の配列及び40%N;イタリック体の塩基:60%所与の配列及び40%
M。

1: G/D = 20%, E/V/S = 10%, A/P/R/L/T/Y=5%; 2: G/Y/S=15%, A/D/T/R/P/L/V/

50

N/W/F/I/E = 4,6%; 3: G/A/Y = 20%, P/W/S/D/T = 8%; 4: F = 46%, L/M = 15%,
G/I/Y = 8%.

表 10:PCR に使用した一般的なファージディスプレイ法によるラムダ DP47 ライブラリー
(VI3_19/VH3_23)鋳型の DNA 配列

コンストラクト	塩基対配列	配列番号
ラムダ DP47 ライブラリー VI3_19/VH3_23 の pRJH53 ライ ブラリー鋳型;タ グを含む、軽鎖 についての PelB リーダー配 列+VI3_19 ラム ダ Vドメイン+CL 定常ドメインと重 鎖についての PelB+VH3_23V ドメイン+CH1 定 常ドメインとを含 む、完全 Fab コ ード化領域	ATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTA CTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCCTCGTCTGAGCTGACTCA GGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTGGGACAGACAGTCAGGA TCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGAAGTTATTATGCAAGC TGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGGCCCTGTACTTGTCTAT CTATGGTAAAAACAACCGGCCCTCAGGGATCCCAGACCGAT TCTCTGGCTCCAGCTCAGGAAACACAGCTTCCTTGACCATC ACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGACTATTACTGTAA CTCCCGTGATAGTAGCGGTAATCATGTGGTATTCGGCGGAG GGACCAAGCTGACCGTCCTAGGACAACCCAAGGCTGCCCCC AGCGTGACCCCTGTTCCCCCCCCAGCAGCGAGGAATTGCAGGC CAACAAGGCCACCCTGGTCTGCCTGATCAGCGACTTCTACC CAGGCGCCGTGACCGTGGCCTGGAAGGCCGACAGCAGCCC CGTGAAGGCCGGCGTGGAGACCACACCCCCAGCAAGCAG AGCAACAACAAGTACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGAC CCCCGAGCAGTGGAAGAGCCACAGGTCCTACAGCTGCCAGG TGACCCACGAGGGCAGCACCGTGGAGAAAACCGTGGCCCCC ACCGAGTGACGCGGAGCCGCAGAACAAAACTCATCTCAGA AGAGGATCTGAATGGAGCCGCAGACTACAAGGACGACGACG ACAAGGGTGCCGCATAATAAGGCGCGCCAATTCTATTTCAA GGAGACAGTCATATGAAATACCTGCTGCCGACCGCTGCTGC TGGTCTGCTGCTCCTCGCTGCCAGCCGGCGATGGCCGAGG TGCAATTGCTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGG GGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTT TAGCAGTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA AGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGT AGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGTTACCAT CTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAGATGA ACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCG AAACCGTTTCCGTATTTTGAATACTGGGGCCAAGGAACCCCTG GTCACCGTCTCGAGTGCTAGCACCAAGGCCATCGGTCTT CCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAG CGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCG GTGACGGTGTCTGTGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGT GCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACT CCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGC ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAA CACCAAAGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACG CGGCCGCAAGCACTAGTGCCCATCACCATCACCATCAGGCC GCGGCA	配列番号 28

10

20

30

40

表 11:ラムダ DP47 ライブラリー(VI3_19/VH3_23)生殖系列鋳型の塩基対配列

コンストラクト	塩基対配列	配列番号
Fab 軽鎖 VI3_19	TCGTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTT GGGACAGACAGTCAGGATCACATGCCAAGGAGACAGCCTCA GAAGTTATTATGCAAGCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAG GCCCCCTGTACTTGTCTATCTATGGTAAAAACAACCGGCCCTCA GGGATCCCAGACCGATTCTCTGGCTCCAGCTCAGGAAACAC AGCTTCCTTGACCATCACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGG CTGACTATTACTGTAACCTCCCGTGATAGTAGCGGTAATCATG TGGTATTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGACAA CCCAAGGCTGCCCCCAGCGTGACCCTGTTCCCCCCCAGCAG CGAGGAATTGCAGGCCAACAAGGCCACCCTGGTCTGCCTGA TCAGCGACTTCTACCCAGGCGCCGTGACCGTGGCCTGGAAG GCCGACAGCAGCCCCGTGAAGGCCGGCGTGAGAGCCACCA CCCCCAGCAAGCAGAGCAACAACAAGTACGCCGCCAGCAGC TACCTGAGCCTGACCCCCGAGCAGTGGAAGAGCCACAGGTC CTACAGCTGCCAGGTGACCCACGAGGGCAGCACCGTGGAGA AAACCGTGGCCCCCACCAGGTGCAGCGGAGCCGCAGAACAA AAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATGGAGCCGCAGACTA CAAGGACGACGACGACAAGGGTGCCGCA	配列番号 29
Fab 重鎖 VH3_23	GAGGTGCAATTGCTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCC TGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCA CCTTTAGCAGTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCA GGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGG TGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCA CCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAG ATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTG TGCGAAACCGTTTCCGTATTTTGA TACTG GGGCCAAGGAA CCCTGGTCACCGTCTCGAGTGCTAGCACCAAAGGCCCATCG GTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGG CACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCG AACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGC GGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACT CTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCT TGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCC AGCAACACCAAAGTGACAAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTG TGACGCGGCCGCAAGCACTAGTGCCCATCACCATCACCATC ACGCCGCGGCA	配列番号 30

10

20

30

40

50

表 12:ラムダ DP47 ライブラリー(VI3_19/VH3_23)生殖系列鋳型のアミノ酸配列

コンストラクト	塩基対配列	配列番号
Fab 軽鎖 VI3_19	SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAP VLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCN SRDSSGNHVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANK ATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYA ASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECSGAAE QKLISEEDLNGAADYKDDDDKGAA	配列番号 31
Fab 重鎖 VH3_23(DP47)	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK GLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKPFYFDYWGGT LTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDAAASTSAHHHHHHHAAA	配列番号 32

10

20

30

40

50

表 13:ラムダ DP47 ライブラリー(VI3_19/VH3_23)の生成に使用したプライマー配列

プライマー名	プライマー配列 5' -3'	配列番号
LMB3	表 9 参照	配列番号 18
VI_3_19_L3r_V	GGACGGTCAGCTTGGTCCCTCCGCCGAATAC <u>VHVATT</u> <u>ACC GCT ACT ATC ACG</u> GGAGTTACAGTAATAGTCAGCCTCATCTTCCGC 下線付き:M の場合、60%原塩基及び 40%無作為化 太字且つイタリック体:N の場合、60%原塩基及び 40%無作為化	配列番号 33
VI_3_19_L3r_HV	GGACGGTCAGCTTGGTCCCTCCGCCGAATAC <u>CMMATG</u> <u>ATTACC GCT ACT ATC ACG</u> GGAGTTACAGTAATAGTCAGCCTCATCTTCCGC 下線付き:M の場合、60%原塩基及び 40%無作為化 太字且つイタリック体:N の場合、60%原塩基及び 40%無作為化	配列番号 34
VI_3_19_L3r_HLV	GGACGGTCAGCTTGGTCCCTCCGCCGAATAC <u>RHMVWG</u> <u>ATG ATTACC GCT ACT ATC ACG</u> GGAGTTACAGTAATAGTCAGCCTCATCTTCCGC 下線付き:M の場合、60%原塩基及び 40%無作為化 太字且つイタリック体:N の場合、60%原塩基及び 40%無作為化	配列番号 35
RJH80	TTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCC	配列番号 36
DP47CDR3_ba (mod.)	CGCACAGTAATATACGGCCGTGTCC	配列番号 37
DP47-v4-4	CGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCG-5-1-2-2-3-4- GAC-TAC-TGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCG	配列番号 38
DP47-v4-6	CGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCG-5-1-2-2-2-2-3-4- GAC-TAC- TGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCG	配列番号 39
DP47-v4-8	CGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCG-5-1-2-2-2-2-2-2- 3-4-GAC-TAC- TGGGGCCAAGGAACCCTGGTCACCGTCTCG	配列番号 40
fdseqlong	表 9 参照	配列番号 27

無作為化プライマー中のトリヌクレオチド混合物:1 (G/D=20%, E/V/S=10%, A/P/R/L/T/Y=5%); 2 (G/Y/S=15%, A/D/T/R/P/L/V/N/W/F/I/E=4,6%); 3 (G/A/Y=20, P/W/S/D/T=8%); 4 (F=46%, L/M=15%, G/I/Y=8%); 5 (K=70%, R=30%)

【0 4 4 1】

実施例 3

可変抗体ドメインの発現ベクターへのクローニング

選択抗 T n C 結合物質 (表 1 4 から表 1 9) の重鎖及び軽鎖 DNA 配列の可変領域をヒト Ig G 1 の定常重鎖又は定常軽鎖のどちらかと共にインフレームでサブクローニングした。抗体を、野生型ヒト Ig G 1 骨格として調製したか、又は特許出願公開番号・国際公

開第2012／130831号A1に記載の方法に従ってFcガンマ受容体への結合を妨げるために導入されるPro329Gly、Leu234Ala及びLeu235Ala突然変異を含有する変異体として調製した。

【0442】

抗TnC結合物質のCDR配列を表16から表19に示す。抗TnC IgGの塩基対及びアミノ酸配列を表20及び表21に示す。抗TnC P319GLALA IgGの塩基対及びアミノ酸配列を表22及び表23に示す。キメラMP5Vプロモーターでインサートの転写を駆動する発現ベクターであって、CDSの3'末端に位置する合成ポリAシグナル配列を含有する発現ベクターに、抗体をコードする配列全てをクローニングした。加えて、このベクターは、プラスミドのエピソーム維持のためのEBV OriP配列を含有する。

10

【0443】

ファージディスプレイにより選択される11C7クローンのLCDR3(NSINST RNEV)は、潜在的Nグリコシル化部位、すなわちNSTを含有し、これは、均一な産物の産生を助長するためにアミノ酸置換により除去され得る可能性がある。それでもやはり、標的への結合を保持しなければならない。N(1位)をQ、S又はTによって優先的に置換することができるだろう。或いは、S(2位)をPに置換することができるだろう。或いは、T(3位)を、G若しくはNに、又はS若しくはCを除く任意の他のタンパク質構成アミノ酸に、優先的に置換することができるだろう。何れにせよ最良であろう置換を当業者は実験によって決定することができる。

20

30

40

50

表 14:ファージ由来抗 TnC 抗体についての可変領域塩基対配列

クローン	鎖	塩基対配列	配列番号
18D4	VL	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCACCCTGTCTGCATC TG TAGGAGACCGTGT CACCATCACTTGCCGTGCCAGTCAGA GTATTAGTAGCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGG AAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGA AAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGCGGCAGTGGATCCGGGA CAGAATCACTCTCACCATCAGCAGCTTG CAGCCTGATGAT TTTGCAACTTATTACTGCCAACAGAATAAGAAGTTTCCTTCG GGGACGTTTGGCCAGGGCACCAAAGTCGAGATCAAG	配列番号 41
	VH	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCC TGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCCGGAGGCA CATT CAGCAGCTACGCTATAAGCTGGGTGCGACAGGCCCT GGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTT TGGTACAGCAAAC TACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCA CCATTACTGCAGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAG CTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACCGCCGTGTATTACTG TGCGAAAGGTAAC TTCTACGGTGGTCTGGACTACTGGGGCC AAGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCA	配列番号 42
11C7	VL	TCGTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTT GGGACAGACAGTCAGGGTCACATGCCAAGGAGACAGCCTCA GAAGTTATTATGCAAGCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAG GCCCCGTGACTTGT CATCTATGGTAAAAACAACCGGCCCTC AGGGATCCCAGACCGATTCTCTGGCTCCAGCTCAGGAAACA CAGCTTCCTTGACCATCACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAG GCTGACTATTACTGTAAC TCCATTAATAGTACTCGTAATGAG GTATTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA	配列番号 43
	VH	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCC TGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCA CCTTTAGCAGTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCA GGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGCGGTAGTGG TGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCA CCATCTCCAAAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAG ATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTG TGCGAAAAC TTCTCCGCGTGTTCGCTGGACTACTGGGGCC AAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGT	配列番号 44

10

20

30

40

50

表 15:ファージ由来抗 TnC 抗体についての可変領域ポリペプチド配列

クロー ン	鎖	ポリペプチド配列	
18D4	VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYC QQNKKFPSGTFGGQTKVEIK	配列番号 45
	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPG QGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLR SEDTAVYYCAKGNFYGGLDYWGQGTTVTVSS	配列番号 46
11C7	VL	SSELTQDPAVSVALGQTVRVTCQGDSLRSYYASWYQQKPGQA PVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDADYY CNSINSTRNEVFGGGTKLTVL	配列番号 47
	VH	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISKDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCAKTSRVPPLDYWGQGTLTVSS	配列番号 48

10

20

表 16:抗 TnC 抗体軽鎖の CDR 塩基対配列

クロー ン	配列番 号	LCDR1	配列番 号	LCDR2	配列番 号	LCDR3
18D4	配列番 号 49	CGTGCCAGTCA GAGTATTAGTA GCTGGTTGGCC	配列番 号 50	GATGCCTCCA GTTTGGAAG T	配列番 号 51	CAACAGAATA AGAAGTTTCC TTCGGGGACG
11C7	配列番 号 52	CAAGGAGACAG CCTCAGAAAGTT ATTATGCAAGC	配列番 号 53	GGTAAAAACA ACCGGCCCTC A	配列番 号 54	AACTCCATTA ATAGTACTCG TAATGAGGTA

30

表 17:抗 TnC 抗体軽鎖の CDR ポリペプチド配列

クロー ン	配列番 号	LCDR1	配列番 号	LCDR2	配列番 号	LCDR3
18D4	配列番 号 55	RASQSISSWLA	配列番 号 56	DASSLES	配列番 号 57	QQNKKFPSGT
11C7	配列番 号 58	QGDSLRSYYAS	配列番 号 59	GKNNRPS	配列番 号 60	NSINSTRNEV

40

50

表 18:抗 TnC 抗体重鎖の CDR 塩基対配列

クローン	配列番号	HCDR1	配列番号	HCDR2	配列番号	HCDR3
18D4	配列番号 61	AGCTACGCTAT AAGC	配列番号 62	GGGATCATCC CTATCTTTGGT ACAGCAAAC ACGCACAGAA GTTCCAGGGC	配列番号 63	GGTAACTTCT ACGGTGGTCT GGACTAC
11C7	配列番号 64	GGATTCACCTT TAGCAGTTATG CCATGAGC	配列番号 65	GCTATTAGCG GTAGTGGTGG TAGCACATAC TACGCAGACT CCGTGAAGGG C	配列番号 66	ACTTCTCCGC GTGTTCCGCT GGACTAC

10

20

表 19:抗 TnC 抗体重鎖の CDR ポリペプチド配列

クローン	配列番号	HCDR1	配列番号	HCDR2	配列番号	HCDR3
18D4	配列番号 67	SYAIS	配列番号 68	GIPIFGTANYA QKFQG	配列番号 69	GNFYGGLDY
11C7	配列番号 70	GFTFSSYAMS	配列番号 71	AISGSGGSTYY ADSVKG	配列番号 72	TSPRVPLDY

30

40

50

表 20:野生型ヒト IgG1 形式での抗 TnC クローンの塩基対配列

クロー ン	鎖	塩基対配列	配列番号
18D4	軽鎖	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCACCCTGTCTGCATCT GTAGGAGACCGTGTCAACCATCACTTGCCGTGCCAGTCAGAGT ATTAGTAGCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAA GCCCCAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGAAAGTG GGGTCCCATCACGTTTCAGCGGCAGTGGATCCGGGACAGAAT TCACTCTCAACATCAGCAGCTTGACGCTGATGATTTTGCAAC TTATTACTGCCAACAGAATAAGAAGTTTCCTTCGGGGACGTTT GGCCAGGGCACCAAGTCGAGATCAAGCGTACGGTGGCTGCA CCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAAT CTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCC CAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCA ATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAA GGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAA AGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCCAAGTCAC CCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAG GGGAGAGTGT	配列番号 73
	重鎖	CAGGTGCAATTGGTGAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCT GGGTCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCCGGAGGCACA TTCAGCAGCTACGCTATAAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGA CAAGGGCTCGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGT ACAGCAAATACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCAT ACTGCAGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGC AGCCTGAGATCTGAGGACACCGCCGTGTATTACTGTGCGAAA GGTAAGTCTACGGTGGTCTGGACTACTGGGGCCAAGGGACC ACCGTGACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGGCCATCGGTC TTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACA GCGGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCG GTGACGGTGTGCTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGGCGTG CACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCC CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACC CAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACC AAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAAT CACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAGTCTGGGGGGA CCGTGAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAAGGACACCCCTC ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGAC GTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTG GACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAG GAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACC GTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACC ATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTAC ACCCTGCCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTG AGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC GCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAAACAATAC AAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC	配列番号 74

10

20

30

40

		CTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAG GGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC AACCCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	
11C7	軽鎖	TCGTCTGAGCTGACTCAGGACCCTGCTGTGTCTGTGGCCTTG GGACAGACAGTCAGGGTCACATGCCAAGGAGACAGCCTCAGA AGTTATTATGCAAGCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGACAGGCC CCTGTACTTGTCTATGGTAAAAACAACCGGCCCTCAGGG ATCCCAGACCGATTCTCTGGCTCCAGCTCAGGAAACACAGCT TCCTTGACCATCACTGGGGCTCAGGCGGAAGATGAGGCTGAC TATTACTGTAACCTCCATTAATAGTACTCGTAATGAGGTATTG GCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGTCAACCCAAAGGCTG CCCCAGCGTGACCCTGTTCCCCCCCAGCAGCGAGGAACTGC AGGCCAACAAAGGCCACCCTGGTCTGCCTGATCAGCGACTTCT ACCCAGGCGCCGTGACCGTGGCCTGGAAGGCCGACAGCAGC CCCGTGAAGGCCGCGGTGGAGACCACCACCCCCAGCAAGCA GAGCAACAACAAGTACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGAC CCCCGAGCAGTGGAAGAGCCACAGGTCCTACAGCTGCCAGGT GACCCACGAGGGCAGCACCGTGGAGAAAACCGTGGCCCCCA CCGAGTGACAGC	配列番号 75
	重鎖	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCT GGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGATTACCC TTTAGCAGTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGG AAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGCGGTAGTGGTGGT AGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATC TCCAAAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAGATGAACA GCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAA CTTCTCCGCGTGTTCGCTGGACTACTGGGGCCAAGGAACCC TGGTACCCGTCTCGAGTGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCT TCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAG CGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGG TGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGC ACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCC TCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCC AGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCA AGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTC ACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGAC CGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAAGGACACCCTCA TGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGACG TGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGG ACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGG AGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCG TCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCA TCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACA CCCTGCCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCA GCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCG CCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACA AGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC TCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGG GGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA ACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	配列番号 76

10

20

30

40

50

表 21:野生型ヒト IgG1 形式での抗 TnC クローンのポリペプチド配列

クローン	鎖	ポリペプチド配列	配列番号
18D4	軽鎖	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITICRASQSISSWLAWYQQKPGKAP KLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQ QNKKFPSGTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLS STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	配列番号 77
	重鎖	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQ GLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLR EDTAVYYCAKGNFYGGLDYWGGGTTVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK	配列番号 78
11C7	軽鎖	SSELTQDPAVSVALGQTVRVTCQGDSLRSYYASWYQQKPGQA PVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYC NSINSTRNEVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKA TLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAA SSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	配列番号 79
	重鎖	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK GLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISKDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKTSRVPPLDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK	配列番号 80

10

20

30

40

50

表 22:P329GLALA ヒト IgG1 形式での抗 TnC クローンの塩基対配列

クロー ン	鎖	塩基対配列	
18D4	軽鎖	表 20 参照	配列番号 73
	重鎖 PGLAL A	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCC TGGGTCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCCGGAGGCA CATTACAGCAGCTACGCTATAAGCTGGGTGCGACAGGCCCCCT GGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTT TGGTACAGCAAACCTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCA CCATTACTGCAGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAG CTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACCGCCGTGTATTACTG TGCGAAAGGTAACCTTCTACGGTGGTCTGGACTACTGGGGCC AAGGGACACCGTGACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAGGGC CCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTC TGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTAC TTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAATCAGGCGCCCT GACCAGCGCGTGCACACCTTCCGGGTGTCTACAGTCCT CAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCC AGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCA CAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCA AATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCAGCA CCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGG TCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAG GTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAA TGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACG TACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGACTG GCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAG CCCTCGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAA GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCAT CCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGC CTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACG CCTCCCGTGTCTGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAG CAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCA CTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	配列番号 81
11C7	軽鎖	表 20 参照	配列番号 75
	重鎖 PGLAL A	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCC TGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCA CCTTTAGCAGTTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCA GGGAAGGGGCTGGAGTGGTCTCAGCTATTAGCGGTAGTGG TGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCA CCATCTCCAAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAG	配列番号 82

10

20

30

40

	ATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTA TGCGAAAACCTTCTCCGCGTGTTCCGCTGGACTACTGGGGCC AAGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGTGCTAGCACCAAGGGC CCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTC TGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTAC TTCCCGGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCT GACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCT CAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCC AGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCA CAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCA AATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCA CCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGG TCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAG GTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAA TGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACG TACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTG GCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAG CCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAA GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCAT CCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGC CTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACG CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAG CAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCA CTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	
--	---	--

10

20

30

40

50

表 23:P329GLALA ヒト IgG1 形式での抗 TnC クローンのポリペプチド配列

クロー ン	鎖	ポリペプチド配列	
18D4	軽鎖	表 21 参照	配列番号 77
	重鎖	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPG QGLEWMGGIIPFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLR SEDTAVYYCAKGNFYGGLDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK	配列番号 83
11C7	軽鎖	表 21 参照	配列番号 79
	重鎖	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KGLEWVSAISGGSTYYADSVKGRFTISKDNSKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCAKTSRVPDLYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK	配列番号 84

【0444】

実施例 4

抗 TnC IgG の精製

CMV プロモーターエンハンサー断片と組み合わせた MP5V コアプロモーターからなるキメラ MP5V プロモーターの制御下で全ての遺伝子を一過性に発現させた。発現ベクターは、EBNA（エプスタイン・バーウイルス核抗原）含有宿主細胞におけるエピソーム複製のための oriP 領域も含有する。

【0445】

抗 TnC IgG は、ポリエチレンイミンを使用して哺乳動物発現ベクターを HEK293-EBNA 細胞にコトランスフェクトすることにより產生させた。対応する発現ベクターを 1:1 比（「ベクター HC」：「ベクター HLC」）で細胞にトランスフェクトした。

【0446】

500 mL 震盪フラスコ内での 200 mL の產生のために、サプリメントを含有する Ex cell 培地に 2 億 5 千万個の HEK293 EBNA 細胞をトランスフェクションの 24 時間前に播種した。トランスフェクションのために、細胞を 5 分間、210 x g で遠

心分離し、上清を予温CD-CHO培地に置換した。DNAの最終量が200μgになるように発現ベクターを20mL CD-CHO培地に混入した。540μL PEI (1mg/mL)の添加後、溶液を15秒間ボルテックスし、10分間、室温でインキュベートした。その後、細胞をDNA/PEI溶液と混合し、500mL 震盪フラスコに移し、5%CO₂雰囲気有する、165rpmで震盪するインキュベーターの中で、3時間、37℃でインキュベートした。インキュベーション後、サプリメントを含有する160mLのExcelL培地を添加し、細胞を24時間培養した。この時点で、バルプロ酸濃度は1mMである(培地は、g/LのPepSoy及び6mMのL-グルタミンをさらに含む)。トランスフェクションの24時間後、細胞にアミノ酸及びグルコースフィードを12%最終体積(24mL)で補充し、3g/Lのグルコース(500g/Lのストックからの1.2mL)を補充する。7日間の培養後、細胞上清を45分間の2000-3000xgでの遠心分離により収集した。溶液を滅菌濾過し(0.22μmフィルター)、0.01%(w/v)の最終濃度になるようにアジ化ナトリウムを補充し、4℃で保持した。

【0447】

MabSelectSureを使用してアフィニティークロマトグラフィーにより細胞培養上清からの抗TnC IgGの精製を行った。タンパク質を濃縮し、濾過し、その後、20mM ヒスチジン、140mM NaCl、pH6.0の0.01%Tween-20溶液で平衡させたHiLoad Superdex 200カラム(GE Healthcare)に負荷した。

【0448】

アフィニティークロマトグラフィーのために、36mLの20mM クエン酸ナトリウム、20mM リン酸ナトリウム、pH7.5で平衡させたProtA MabSelect Sureカラム(CV=6mL、GE Healthcare)に上清を負荷した。20mM クエン酸ナトリウム、20mM リン酸ナトリウム、pH7.5を含有する、6-10カラム容積のバッファーで洗浄することにより、非結合タンパク質を除去した。20mM クエン酸ナトリウム、100mM 塩化ナトリウム、100mM グリシン、0.01%(v/v) Tween-20、pH3.0の、15CVの塩化ナトリウム(20から100%)の線形pH勾配を使用して、非結合タンパク質を溶出した。次いで、20mM クエン酸ナトリウム、100mM 塩化ナトリウム、100mM グリシン、0.01%(v/v) Tween-20、pH3.0を含有する、4カラム容積の溶液でカラムを洗浄し、その後、再平衡ステップを行った。

【0449】

収集した画分のpHを、1/10(v/v)の0.5M Na₂HPO₄、pH8.0の添加により調整した。タンパク質を濃縮し、濾過し、その後、20mM ヒスチジン、140mM NaCl、pH6.0、0.01%Tween20で平衡させたHiLoad Superdex 200カラム(GE Healthcare)に負荷した。

【0450】

アミノ酸配列に基づいて算出したモル吸光係数を使用して、280nmでODを測定することにより精製IgGのタンパク質濃度を決定した。LabChipGXII(Caliper)を使用して、還元剤(Invitrogen、USA)の存在及び非存在下でのCE-SDSにより、IgGの純度及び分子量を分析した。精製タンパク質の凝集物含有量は、25℃で25mM K₂HPO₄、125mM NaCl、200mM L-アルギニン・一塩酸塩、0.02%(w/v) NaN₃、pH6.7のランニングバッファー中で平衡させたTSKgel G3000 SW XL分析用サイズ排除カラム(東ソー株式会社)を使用して分析した(表24)。

10

20

30

40

50

表 24:抗 TnC IgG1 の生化学分析

クローン	収量 [mg/l]	モノマー [%]
a-TnC(18D4) huIgG1	6.8	98.3
a-TnC(18D4) P329GLALA huIgG1	26.7	100

10

【0451】

実施例 5

表面プラズモン共鳴 (TnC 結合)

ヒト、マウス及びカニクイザル TnC (表 4 による抗原) への、抗 TnC IgG 18D4 の結合、抗 TnC IgG 11C7 の結合、及び抗 TnC 18D4 の Fab 断片の結合を、表面プラズモン共鳴 (SPR) により評定した。全ての SPR 実験は、ランニングバッファーとして HBS-EP (0.01M HEPES pH7.4、0.15M NaCl、3mM EDTA、0.005% Surfactant P20、Biacore、Freiburg/Germany) を用いて、25℃で、Biacore T200

20

【0452】

固定化ウィザード機能を使用して 100RU までの固定化を目指して、ビオチン化ヒト、マウス又はカニクイザル TnC の 20 µg/ml の保存液を SA チップに注入した。最終固定化レベルは、79-400RU の間であった。

【0453】

次いで直ちに、抗 TnC IgG 18D4 (PGLALA 及び wtFc)、抗 TnC IgG 11C7 (rb IgG)、及び 18D4 Fab 断片に、0.02-12.5nM の範囲の濃度 (IgG) 及び 0.02-50nM の範囲の濃度 (Fab 断片) で、180 秒間、30 µl/分の流量でチップ表面を通過させ、その後、180 秒の解離ステップを行った。最高濃度の IgG については、1800 秒のさらなる解離ステップを行った。各ステップ後、60 秒間の 10mM グリセリン pH2.1 の 2 回の逐次的注入の結果として表面を再生した。TnC のない参照フローセルで得た応答を減算することにより、バルク屈折率差を補正した。ラングミュア 1:1 動態モデルを使用して、アフィニティー及び親和力を計算した。しかし、二価相互作用の 1:1 フィッティングについての K_D は、見掛けの値に過ぎないので、比較にしか使用すべきでない。

30

表 26:KD 値及び種間交差反応性

コンストラクト	hu TNC KD (nM)	cyno TNC KD (nM)	mu TNC KD (nM)
18D4 IgG wt Fc	0.093	0.036	0.061
18D4 IgG PG/LALA	0.032	0.011	0.030
11C7 rb IgG	0.029	不検出	不検出
18D4 Fab 断片	1.44	6.69	6.5

40

50

【0454】

抗TnC結合物質18D4は、pM範囲の同様の親和力でマウス及びカニクイザルTnCと交差反応する。18D4 Fab断片のTnCへの一価結合は、低nM範囲の K_D をもたらす。抗TnC結合物質11C7もまたpM範囲でヒトTnCに結合する。このBiacore実験で使用したマウス及びカニクイザルTnCコンストラクトにはCドメインが存在しなかったため、結合物質11C7については種間交差反応性を評定することができなかった（表26）。

【0455】

熱安定性

静的光散乱（SLS）により、及び加えた温度ストレスに対する固有タンパク質蛍光を測定することにより、熱安定性をモニターした。1mg/mlのタンパク質濃度を有する30µgの濾過したタンパク質試料をOptima 2装置（Avacta Analytical Ltd）に2回ずつ適用した。半径及び全散乱強度を収集しながら、温度を0.1℃/分で25℃から85℃に上昇させた。固有タンパク質蛍光の決定のために、試料を266nmで励起させ、放出を275nmと460nmの間で収集した。両方のIgGは、62℃の凝集温度を有する（表26）。

表 26:熱安定性

コンストラクト	Tagg (°C)
18D4 IgG PGLALA	62
18D4 IgG wtFc	62

【0456】

実施例 6

LS174T異種移植片由来腫瘍組織及びヒト組織アレイにおけるTnC染色の結果
免疫組織化学手法でのTnCの検出のために、LS174T異種移植片由来腫瘍組織及びヒト組織アレイにおいてウサギIgG抗体としての抗TnCクローン18D4及び11C7を試験した。

【0457】

LS174T結腸直腸がん凍結腫瘍試料をクリオスタットで12µm厚の切片にし、スーパーフrost（superfrost）スライド（Thermo Scientific、Germany）にマウントした。ペアの正常試料と腫瘍試料を含むヒト組織アレイの凍結試料をBiochain（San Francisco、USA）から購入した。組織切片を30分間放置して解凍した。スライドをPBSで洗浄し、冷アセトンで10分間固定し、水中の0.03%水素ペルオキシダーゼのインキュベーションステップを行って、内因性ペルオキシダーゼをブロックした。次いで、切片をPBS中の5%ヤギ血清と共に1時間インキュベートし、その後、0.5µg/mlの抗TnCクローン18D4若しくは11C7又はアイソタイプコントロール抗体（Serotec、Germany）と共に4℃で一晩インキュベートした。その後、切片をPBSで3回、各々5分間洗浄し、ペルオキシダーゼRabbit Vectastatin ABCキット（PK-6101、Vector laboratories、California、USA）を製造業者の説明書に従って使用して現像した。次いで、漸増濃度のエタノールでスライドを脱水し、2分間、キシレン中でインキュベートした。1滴のPermOUNT封入剤（Fischer Chemical、Germany）を切片及びカバースリップに添加した。OlympusスキャナーVS120（Olympus、Germany）で画像を得て分析した。

【0458】

L S 1 7 4 T 異種移植片腫瘍における組織学的染色のパターンは、特定の T n C 間質線維に対応した（図 1）。クローン 1 8 D 4 とクローン 1 1 C 7 両方についての T n C 染色は、全体的に見て中等度の強度で発現される。ネガティブアイソタイプコントロールシグナルは、この手法の特異性を確証する。ウサギアイソタイプコントロールでの対応する組織学的染色におけるネガティブアイソタイプコントロールシグナルによって、染色の特異性を確証する（図 2）。抗 T n C クローン 1 8 D 4 でのヒト腫瘍アレイにおける組織学的染色は、特定の T n C 間質線維に対応する。T n C 染色は、殆どの腫瘍組織においてコントロール正常ペア組織と比較して高レベルで発現される（図 3）。抗 T n C クローン 1 1 C 7 でのヒト腫瘍アレイにおける組織学的染色は、特定の T n C 間質線維に対応する。T n C 染色は、殆どの腫瘍組織においてコントロール正常ペア組織と比較して高レベルで発現される（図 4）。

【 0 4 5 9 】

実施例 7

4-1BB の調製、精製及び特徴づけ

ヒト、マウス又はカニクイザル 4-1BB のエクストドメインをコードする DNA 配列（表 2 7）をヒト I g G 1 重鎖 C H 2 及び C H 3 ドメインと共にインフレイムでノブ上にサブクロニングした（Merchant 等、1998）。A c T E V プロテアーゼ切断部位を抗原エクストドメインとヒト I g G 1 の F c との間に導入した。ビオチン化の指向のために A v i タグを抗原-F c ノブの C 末端に導入した。S 3 5 4 C / T 3 6 6 W 突然変異を含有する抗原-F c ノブ鎖と、Y 3 4 9 C / T 3 6 6 S / L 3 6 8 A / Y 4 0 7 V 突然変異を含有する F c ホール鎖の組合せにより、4-1BB エクストドメイン含有鎖の単一コピーを含むヘテロ二量体の生成が可能になり、かくてモノマー形態の F c 結合抗原を作出する。表 2 8 は、抗原 F c 融合コンストラクトの c DNA 及びアミノ酸配列を示す。

表 27: 抗原エクストドメイン(ECD)のアミノ酸番号付け及びそれらの起源

配列番号	コンストラクト	起源	ECD
配列番号 85	ヒト 4-1BB ECD	Q07011 に従って合成した	aa 24-186
配列番号 86	カニクイザル 4-1BB ECD	カニクイザル血液から単離した	aa 24-186
配列番号 87	マウス 4-1BB ECD	P20334 に従って合成した	aa 24-187

10

20

30

40

50

表 28:モノマー抗原 Fc(kih)融合分子の cDNA 及びアミノ酸配列

配列番号	抗原	配列
配列番号 88	ヌクレオチド配列 Fc ホール鎖	GACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCT GAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCC CCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACC CCTGAGGTACACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCAC GAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGG GAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGC GTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTC CCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAA GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCCTGCC CCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAG CCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGA CATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG AGAACAACCTACAAGACCAACGCTCCCGTGCTGGACT CCGACGGCTCCTTCTTCTCGTGAGCAAGCTCACCG TGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCT CATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACT ACACGCAGAAGAGCCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
配列番号 89	ヌクレオチド配列 ヒト 4-1BB 抗原 Fc ノブ鎖	CTGCAGGACCCCTGCAGCAACTGCCCTGCCGGCACC TTCTGCGACAACAACCGGAACCAGATCTGCAGCCCC TGCCCCCCCCAACAGCTTCAGCTCTGCCGGCGGACAG CGGACCTGCGACATCTGCAGACAGTGCAAGGGCGTG TTCAGAACCCGGAAGAGTGAGCAGCAGCAGCAAC GCCGAGTGCGACTGCACCCCGGCTTCCATTGTCTG GGAGCCGGCTGCAGCATGTGCGAGCAGGACTGCAA GCAGGGCCAGGAAGTACCAAGAAGGGCTGCAAGG ACTGCTGCTTCGGCACCTTCAACGACCAGAAGCGGG GCATCTGCCGGCCCTGGACCAACTGTAGCCTGGACG GCAAGAGCGTGCTGGTCAACGGCACCAGAAAGACGGG ACGTCTGTGCGGCCCCAGCCCTGCTGATCTGTCTC CTGGGGCCAGCAGCGTGACCCCTCCTGCCCTGCCA GAGAGCCTGGCCACTCTCCTCAGGTCGACGAACAGT TATATTTTCAGGGGGGCTCACCCAAATCTGCAGACA AAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAC TCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAA AACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTG AGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAG ACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCG TGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGG AGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCC TCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGG AGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAG CCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGC AGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCAT GCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGT

10

20

30

40

50

		GGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCG CCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAAC AACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGAC GGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGAC AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACG CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATCCGGA GGCCTGAACGACATCTTCGAGGCCCGAGAAGATTGAA TGGCACGAG
配列番号 90	ヌクレオチド配列 カニクイザル 4- 1BB 抗原 Fc ノブ 鎖	TTGCAGGATCTGTGTAGTAACTGCCAGCTGGTACA TTCTGTGATAATAACAGGAGTCAGATTTGCAGTCCCT GTCCTCCAAATAGTTTCTCCAGCGCAGGTGGACAAA GGACCTGTGACATATGCAGGCAGTGTAAAGGTGTTT TCAAGACCAGGAAGGAGTGTTCCCTCCACCAGCAATG CAGAGTGTGACTGCATTTCCAGGGTATCACTGCCTGG GGGCAGAGTGCAGCATGTGTGAACAGGATTGTAAAC AAGGTCAAGAATTGACAAAAAAGGTTGTAAAGACT GTTGCTTTGGGACATTTAATGACCAGAAACGTGGCA TCTGTGCCCCCTGGACAACTGTTCTTTGGATGGAA AGTCTGTGCTTGTGAATGGGACGAAGGAGAGGGACG TGGTCTGCGGACCATCTCCAGCCGACCTCTCTCCAG GAGCATCCTCTGCGACCCCGCCTGCCCTGCGAGAG AGCCAGGACACTCTCCGCAGGTCGACGAACAGTTAT ATTTTCAGGGCGGCTCACCCAAATCTGCAGACAAAA CTCACACATGCCACCGTGCCGACGACCTGAACTCC TGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAAC CCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGG TCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG AGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGC AGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCA CCGTCTGCAACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGT ACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCC CCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGC CCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATGCC GGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGTGGT GCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCG TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC ACAAGACCACGCCTCCCGTGTGACTCCGACGGCT CCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGA GCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCG TGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGA AGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATCCGGAGGCC TGAAACGACATCTTCGAGGCCCGAGAAGATTGAATGGC ACGAG
配列番号 91	ヌクレオチド配列 マウス 4-1BB 抗 原 Fc ノブ鎖	GTGCGAAGCAGCTGCGACAACCTGCCAGCCCGGCACC TTCTGCCGGAAGTACAACCCCGTGTGCAAGAGCTGC CCCCCAGCACCTTCAGCAGCATCGGCGGCCAGCC CAACTGCAACATCTGCAGAGTGTGCGCCGGCTACTT CCGGTTCAAGAAGTTCTGCAGCAGCACCCACAACGC CGAGTGCGAGTGCATCGAGGGCTTCCACTGCCTGGG

10

20

30

40

50

		CCCCCAGTGCACCAGATGCGAGAAGGACTGCAGACC CGGCCAGGAAGTACCAGCAGGGCTGTAAGACCTG CAGCCTGGGCACCTTCAACGACCAGAACGGGACCGG CGTGTGCCGGCCTTGACCAATTGCAGCCTGGACGG GAGAAGCGTGCTGAAAACCGGCACCACCGAGAAGGA CGTCGTGTGCGGCCCTCCCGTGGTGTCTTCAGCCC TAGCACCAACCATCAGCGTGACCCCTGAAGGCGGCCC TGGCGGACACTCTCTGCAGGTCTGGTCGACGAACA GTTATATTTTCAGGGCGGCTCACCCAAATCTGCAGA CAAAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGA ACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGACCCC TGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGA AGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG CGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGA GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGT CCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAA GGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCC AGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGG GCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCGTGCCTCC ATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCT GTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACAT CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGA ACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCG ACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGG ACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACA CGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAATCCG GAGGCCTGAACGACATCTTCGAGGCCCAAGATTG AATGGCACGAG	10
配列番号 92	Fc ホール鎖	DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLT VDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	20
配列番号 93	ヒト 4-1BB 抗原 Fc ノブ鎖	LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQR TCDICRQCKGVFRTRKECSSTNAECDCTPGFHCLGAG CSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRP WTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSV TPPAPAREPGHSPQVDEQLYFQGGSPKSADKTHTCPP CPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGLNDIFEAQ KIEWHE	30
配列番号 94	カニクイザル 4-	LQDLCSNCPAGTFCDNNRSQICSPCPPNSFSSAGGQRT CDICRQCKGVFKTRKECSSTNAECDISGYHCLGAEC	40

	1BB 抗原 Fc ノブ鎖	SMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPW TNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSATP PAPAREPGHSPQVDEQLYFQGGSPKSADKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGLNDIFEAKI EWHE
配列番号 95	マウス 4-1BB 抗原 Fc ノブ鎖	VQNSCDNCQPGTFCRKYNPVCKSCPPSTFSSIGGQPN CNICRVCAGYFRFKKFCSTHNAECECIEGFHCLGPQCT RCEKDCRPGQELTKQGCKTCSLGTENDQNGTGVC RPW TNCSLDGRSVLKTGTTEKDVVCGPPVVSFSPSTTISVT PEGGPGGHS LQVLVDEQLYFQGGSPKSADKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKSGGLNDIFEAK KIEWHE

10

20

【0460】

MPSVプロモーターからインサートの転写を駆動するプラスミドベクターであって、CDSの3'末端に位置する合成ポリAシグナル配列を含有するプラスミドベクターに、4-1BB-Fc融合分子をコードする配列全てをクローニングした。加えて、このベクターは、プラスミドのエピソーム維持のためのEBV OriP配列を含有する。

【0461】

ビオチン化モノマー抗原／Fc融合分子の調製のために、指数増殖期の懸濁HEK293 EBNA細胞に、融合タンパク質の2つの成分（ノブ鎖及びホール鎖）及びBirA（ビオチン化反応に必要な酵素）をコードする3つのベクターをコトランスフェクトした。対応するベクターを2：1：0.05比（「抗原ECD-ACTEV-Fcノブ」：「Fcホール」：「BirA」）で使用した。

30

【0462】

500mL震盪フラスコ内でのタンパク質産生のために、4億個のHEK293 EBNA細胞をトランスフェクションの24時間前に播種した。トランスフェクションのために、細胞を5分間、210gで遠心分離し、上清を予温CD CHO培地に置換した。200μgのベクターDNAを含有する20mLのCD CHO培地に発現ベクターを再懸濁させた。540μLのポリエチレンイミン（PEI）の添加後、溶液を15秒間ボルテックスし、10分間、室温でインキュベートした。その後、細胞をDNA／PEI溶液と混合し、500mL震盪フラスコに移し、5%CO₂雰囲気有するインキュベーターの中で、3時間、37℃でインキュベートした。インキュベーション後、160mLのF17培地を添加し、細胞を24時間培養した。産生培地に5mMキフネンシンを補充した。トランスフェクションの翌日、1mMバルプロ酸とサプリメントを含有する7%フィード1とを培養物に添加した。7日の培養後、15分、210gでの細胞回転沈降により細胞上清を収集した。その溶液を滅菌濾過し（0.22μmフィルター）、0.01%（w/v）の最終濃度になるようにアジ化ナトリウムを補充し、4℃で保持した。

40

【0463】

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、続いてサイズ排除クロマ

50

トグラフィーにより、分泌タンパク質を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、40 mL の 20 mM リン酸ナトリウム、20 mM クエン酸ナトリウム、pH 7.5 で平衡させた HiTrap Protein A HP カラム (CV = 5 mL、GE Healthcare) に上清を負荷した。10 カラム容積の 20 mM リン酸ナトリウム、20 mM クエン酸ナトリウム、0.5 M 塩化ナトリウム含有バッファー (pH 7.5) で洗浄することにより、非結合タンパク質を除去した。20 mM クエン酸ナトリウム、0.01% (v/v) Tween-20、pH 3.0 の 20 カラム容積にわたって生じさせた塩化ナトリウム (0 から 500 mM) の線形 pH 勾配を使用して、結合タンパク質を溶出した。次いで、10 カラム容積の 20 mM クエン酸ナトリウム、50 mM 塩化ナトリウム、0.01% (v/v) Tween-20、pH 3.0 で、カラムを洗浄した。

10

【0464】

収集した画分の pH を 1/40 (v/v) の 2 M Tris、pH 8.0 の添加により調整した。タンパク質を濃縮し、濾過し、その後、2 mM MOPS、150 mM 塩化ナトリウム、pH 7.4 の 0.02% (w/v) アジ化ナトリウム溶液で平衡させた HiLoad Superdex 200 カラム (GE Healthcare) に負荷した。

【0465】

ヒト受容体に対するアフィニティー判定のために、ヒト 4-1BB のエクドメインをまた avi (GLNDIFEAQKIEWHE) 及びヘキサヒスチジンタグと共にインフレーションでサブクロニングした。

20

【0466】

タンパク質産生は、Fc 融合タンパク質について上で説明した通りに行った。分泌タンパク質を、細胞培養上清から、キレーティングクロマトグラフィー、続いてサイズ排除クロマトグラフィーにより精製した。第 1 のクロマトグラフィーステップは、20 mM リン酸ナトリウム、500 nM 塩化ナトリウム、pH 7.4 中で平衡させた、NiNTA Superflow Cartridge (5 mL、Qiagen) を用いて行った。溶出バッファー (20 mM リン酸ナトリウム、500 nM 塩化ナトリウム、500 mM イミダゾール、pH 7.4) の 12 カラム容積にわたっての 5% から 45% への勾配を利用することにより溶出を行った。タンパク質を濃縮し、濾過し、その後、2 mM MOPS、150 mM 塩化ナトリウム、pH 7.4 の 0.02% (w/v) アジ化ナトリウム溶液で平衡させた HiLoad Superdex 75 カラム (GE Healthcare) に負荷した (表 29)。

30

40

50

表 29:モノマーヒト 4-1BB His 分子の配列

配列番号	抗原	配列
配列番号 96	ヌクレオチド配列 ヒト 4-1BB His	CTGCAGGACCCCTGCAGCAACTGCCCTGCCGGGCAC CTTCTGCGACAACAACCGGAACCAGATCTGCAGCC CCTGCCCCCCCCAACAGCTTCAGCTCTGCCGGCGGA CAGCGGACCTGCGACATCTGCAGACAGTGCAAGGG CGTGTTTCAGAACCCCGAAAGAGTGCGAGCAGCACCA GCAACGCCGAGTGCGACTGCACCCCGGCTTCCAT TGTCTGGGAGCCGGCTGCAGCATGTGCGAGCAGGA CTGCAAGCAGGGCCAGGAACTGACCAAGAAGGGCT GCAAGGACTGCTGCTTCGGCACCTTCAACGACCAG AAGCGGGGCATCTGCCGGCCCTGGACCAACTGTAG CCTGGACGGCAAGAGCGTGCTGGTCAACGGCACCA AAGAACGGGACGTCGTGTGCGGGCCCCAGCCCTGCT GATCTGTCTCCTGGGGCCAGCAGCGTGACCCCTCC TGCCCCTGCCAGAGAGCCTGGCCACTCTCCTCAGG TCGACGAACAGTTATATTTTCAGGGCGGCTCAGGC CTGAACGACATCTTCGAGGCCCAGAAGATCGAGTG GCAACGAGGCTCGAGCTCACCACCATCACCATCAC
配列番号 97	ヒト 4-1BB His	LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQ RTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLG AGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGI CRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPG ASSVTPPAPAREPGHSPQVDEQLYFQGGSGLNDIFEA QKIEWHEARAHHHHHH

【0467】

実施例 8

Tn C 標的スプリットトリマー 4-1BB リガンド Fc 融合分子の調製

ヒト 4-1BB リガンドのエクトドメインの一部（アミノ酸 71-254 及び 71-248）をコードする DNA 配列を Uniprot データベースの P41273 配列に従って合成した。トリマー 4-1BB リガンドを標的指向化するために使用した Tn C 結合物質は、クローン 18D4 であった。

【0468】

コンストラクト 6.1: CH-CL クロス及び荷電残基を有する、一価の Tn C 標的（18D4）スプリットトリマー 4-1BB リガンド（71-254）Fc (kih) 融合体（G4S）2 リンカーにより隔てられた 4-1BB リガンド（71-254）の 2 つのエクトドメインを含有し、ヒト IgG1-CL ドメインに融合されているポリペプチドを、図 5a [ヒト 4-1BB リガンド、（G4S）2 コネクター、ヒト 4-1BB リガンド、（G4S）2 コネクター、ヒト CL] に示されているようにクローニングした。4-1BB リガンド（71-254）の 1 つのエクトドメインを含有し、ヒト IgG1-CH ドメインに融合されているポリペプチドを、図 5b [ヒト 4-1BB リガンド、（G4S）2 コネクター、ヒト CH] に示されているようにクローニングした。

【0469】

正しいペアリングを増進するために、クロスした CH-CL 内に次の突然変異を導入した。ヒト CL に融合されているダイマー 4-1BB リガンドには、E123R 及び Q124K。ヒト CH1 に融合されているモノマー 4-1BB リガンドには、K147E 及び K

2 1 3 E。

【0 4 7 0】

テネインシ (T n C) に特異的な結合物質であるクローン 1 8 D 4 をコードする重鎖及び軽鎖 DNA 配列の可変領域を、ヒト I g G 1 のホールの定常重鎖又は定常軽鎖のどちらかと共にインフレームでサブクローニングした。

【0 4 7 1】

F c ガンマ受容体との結合を妨げるために、P r o 3 2 9 G l y、L e u 2 3 4 A l a 及び L e u 2 3 5 A l a 突然変異を (国際特許出願公開国際公開第 2 0 1 2 / 1 3 0 8 3 1 号に記載されているように) ノブ及びホール重鎖の定常領域に導入した。

【0 4 7 2】

S 3 5 4 C / T 3 6 6 W 突然変異を含有するダイマーリガンド F c ノブ鎖と、モノマー C H 1 融合体と、Y 3 4 9 C / T 3 6 6 S / L 3 6 8 A / Y 4 0 7 V 突然変異を含有する標的指向性抗 T n C - F c ホール鎖と、抗 T n C 軽鎖との組合せ (米国特許第 5 7 3 1 1 6 8 号、同第 7 6 9 5 9 3 6 号に記載されているようなもの) により、集合トリマー 4 - 1 B B リガンドと T n C 結合 F a b とを含むヘテロ二量体の生成が可能になる (図 2)。

【0 4 7 3】

表 3 0 及び表 3 1 は、C H - C L クロス及び荷電残基を有する、一価の T n C 標的 (1 8 D 4) スプリットトリマー 4 - 1 B B リガンド (7 1 - 2 5 4) F c (k i h) 融合体 (コンストラクト 6 . 1) の c D N A 及びアミノ酸配列をそれぞれ示す。

10

20

30

40

50

表 30:CH-CL クロスと荷電残基を含有する、一価の TnC 標的(18D4)スプリットリマー4-1BB リガンド(71-254)Fc(kih)融合体(コンストラクト 6.1)の塩基対配列。*は、荷電残基を表す。

配列番号	コンストラクト	配列
配列番号 98	ダイマーリガンド(71-254)-CL* Fc ノブ鎖	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCT GGA CTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAG CTGGTGGCCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCC CTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTG TCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACC AAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGCGTGTACTAC GTGTTCTTTCAGCTGGAAC TGCGGAGAGTGGTGGCC GGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCAT CTGCAGCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCT CTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCTCC GAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGG CTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTG CATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGG CAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGTGGGCCTGTTT AGAGTGACCCCCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCT CCAAGAAGCGAAGGCGGAGGCGGATCTGGCGGCGG AGGATCTAGAGAGGGACCCGAACTGTCCCCTGACGA TCCAGCCGGGCTGCTGGATCTGAGACAGGGAATGTT CGCCAGCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGCTGATTGA CGGACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCAGGGCTGGC AGGGGTGTCCCTGACTGGGGGACTGTCCTACAAAGA AGATACAAAGAAGCTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGT GTACTATGTGTTTTTTCAGCTGGAAC TGAGGCGGGT GGTGGCTGGGGAGGGCTCAGGATCTGTGTCCCTGGC TCTGCATCTGCAGCCACTGCGCTCTGCTGCTGGCGC AGCTGCACTGGCTCTGACTGTGGACCTGCCACCAGC CTCTAGCGAGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCCA AGGACGCCTGCTGCATCTGAGCGCCGGACAGCGCCT GGGAGTGCATCTGCATACTGAAGCCAGAGCCCGGCA TGCTTGGCAGCTGACTCAGGGGGCAACTGTGCTGGG ACTGTTTCGCGTGACACCTGAGATCCCTGCCGGACT GCCAAGCCCTAGATCAGAAGGGGGCGGAGGTTCCG GAGGGGGAGGATCTCGTACGGTGGCTGCACCATCTG TCTTTATCTTCCCACCCAGCGACCGGAAGCTGAAGT CTGGCACAGCCAGCGTCTGTGTGCCTGCTGAATAACT TCTACCCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGG ACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAAAGCG TGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCC TGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACG AGAAGCACAAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACC AGGGCCTGTCTAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACC GGGGCGAGTGCGACAAGACCCACACCTGTCCTCCAT GCCCTGCCCTGAAGCTGCTGGCGGCCCTAGCGTGT TCCTGTTCCCCCAGGACCCAAAGGACACCCCTGATGA TCAGCCGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTG

10

20

30

40

		ATGTGTCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATT GGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAATGCCAAGA CCAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACC GTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACT GGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCA ACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCT CCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGT ACACCCTGCCCCCATGCCGGGATGAGCTGACCAAGA ACCAGGTGAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAGGCTTCT ATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATG GGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCCTCCCG TGCTGGAATCCGACGGCTCCTTCTCCTCTACAGCA AGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT CCGGGTAAA
配列番号 99	モノマーリガン ド(71-254)- CH1*	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCT GGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAG CTGGTGGCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCC CTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTG TCACTGACAGGCGCCTGAGCTACAAAGAGGACACC AAAGAAGTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTAC GTGTTCTTTCAGCTGGAAGTGCAGAGAGTGGTGGCC GGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCAT CTGCAGCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCT CTGGCTCTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGTCC GAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCCGG CTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGACTGGGAGTG CATCTGCACACAGAGGCCAGAGCCAGGCACGCCTGG CAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGTGGGCTGTTC AGAGTGACCCCCGAGATTCTGCCGGCCTGCCTAGC CCTAGATCTGAAGGCGGGCGGAGGTTCCGGAGGCGGA GGATCTGCTAGCACAAAGGGCCCCAGCGTGTTCCT CTGGCCCCCTAGCAGCAAGAGCACATCTGGCGGAACA GCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGGAAGATTACTTCCCC GAGCCCCGTGACCGTGTCTGGAATTCTGGCGCCCTG ACAAGCGGCGTGACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAG AGCAGCGGCTGTACTCTCTGAGCAGCGTCGTGACA GTGCCCAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATC TGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTG GACGAGAAGGTGGAACCCAAGTCCTGC
配列番号 100	抗 TnC(18D4)Fc ホール鎖	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAG AAGCCTGGGTCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCC TCCGGAGGCACATTCAGCAGCTACGCTATAAGCTGG GTGCGACAGGCCCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGGATG GGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACCTAC GCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATTAAGTGA GACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGC AGCCTGAGATCTGAGGACACCGCCGTGTATTACTGT GCGAAAGGTAACCTCTACGGTGGTCTGGACTACTGG GGCCAAGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCAGCTAGC

10

20

30

40

50

		ACCAAGGGCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGC AGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCTCTGGG CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGAC CGTGTCTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGT GCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCT GTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCTTCTAG CAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAA CCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGT GGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACCTCACACATGCCC ACCGTGCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTC AGTCTTCTCTTCCCCCAAAAACCAAGGACACCCT CATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGT GGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTT CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGC CAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAC GTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCA GGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGT CTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAAC CATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACA GGTGTGCACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGAC CAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGG CTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAG CAATGGGCAGCCGAGAACTACAAGACCACGCC TCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCGT GAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCA GGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGC TCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT GTCTCCGGGTAAA
配列番号 73	抗 TnC(18D4) 軽鎖	表 20 参照

10

20

30

40

50

表 31:CH-CL クロスと荷電残基を含有する、一価の TnC 標的(18D4)スプリットトリマー4-1BB リガンド(71-254)Fc(kih)融合体(コンストラクト 6.1)のアミノ酸配列。*は、荷電残基を表す。

配列番号	コンストラクト	配列
配列番号 102	ダイマーリガンド(71-254)-CL* Fc ノブ鎖	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLS WYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYVFFQ LELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVD LPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARA RHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSEGGGGSG GGGSRREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLID GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYV VFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALA LTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHT EARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSEGG GGSGGGGSRSTAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYTS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG ECDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
配列番号 103	モノマーリガンド(71-254)- CH1*	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLS WYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYVFFQ LELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVD LPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARA RHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSEGGGGSG GGGSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSC
配列番号 104	抗 TnC(18D4)Fc ホール鎖	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVR QAPGGGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTS TAYMELSSLRSEDTAVYYCAKGNFYGGLDYWGQGT TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQ PREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ QGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
配列番号 77	抗 TnC(18D4) 軽鎖	表 21 参照

【0474】

コンストラクト 6.2: CH-CL クロスを含有し、荷電残基を有さない、一価の TnC 標的 (18D4) スプリットトリマー 4-1BB リガンド (71-254) Fc (kih) 融合体

(G4S) 2 リンカーにより隔てられた 4-1BB リガンド (71-254) の 2 つのエクトドメインを含有し、ヒト IgG1-CL ドメインに融合されているポリペプチドを、図 7a [ヒト 4-1BB リガンド、(G4S) 2 コネクター、ヒト 4-1BB リガンド、(G4S) 2 コネクター、ヒト CL] に示されているようにクローニングした。

【0475】

4-1BBリガンド(71-254)の1つのエクストドメインを含有し、ヒトIgG1-CHドメインに融合されているポリペプチドを、図7b[ヒト4-1BBリガンド、(G4S)2コネクター、ヒトCH]に示されているようにクローニングした。

【0476】

TnCに特異的な結合物質であるクローン18D4をコードする重鎖及び軽鎖DNA配列の可変領域を、ヒトIgG1のホールの定常重鎖又は定常軽鎖のどちらかと共にインフレームでサブクローニングした。

【0477】

Fcガンマ受容体との結合を妨げるために、Pro329Gly、Leu234Ala及びLeu235Ala突然変異をノブ及びホール重鎖の定常領域に導入した(特許寄託番号)。

10

【0478】

S354C/T366W突然変異を含有するダイマーリガンドFcノブ鎖と、モノマーCH1融合体と、Y349C/T366S/L368A/Y407V突然変異を含有する標的指向性抗TnC-Fcホール鎖と、抗TnC軽鎖との組合せにより、集合トリマー4-1BBリガンドとTnC結合Fabとを含むヘテロ二量体の生成が可能になる(図8)。

【0479】

表32及び表33は、CH-CLクロスを含有し、荷電残基を有さない、一価のTnC標的(18D4)スプリットトリマー4-1BBリガンド(71-254)Fc(kih)融合体(コンストラクト6.2)のcDNA及びアミノ酸配列をそれぞれ示す。

20

30

40

50

表 32:CH-CL クロスを含有し、荷電残基を有さない、一価の TnC 標的(18D4)スプリットリマー4-1BB リガンド(71-254)Fc(kih)融合体(コンストラクト 6.2)の塩基対配列。

配列番号	コンストラクト	配列
配列番号 106	ダイマーリガ ンド(71-254)- CL Fc ノブ鎖	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGG ACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGG TGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCC TGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGAC AGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGG TGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAG CTGGAAGCTGCGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGG CTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGAA GCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCTGGCACTGACAGTGGAT CTGCCTCCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCGCATT TGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCC AGAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCT AGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGTCT GGGCCTGTTTCAAGTGAACCCCGAGATTCCAGCCGGCC TGCCTTCTCCAAGAAGCGAAGGCGGAGGCGGATCTGGC GGCGGAGGATCTAGAGAGGGACCCGAAGTGTCCCTGA CGATCCAGCCGGGCTGCTGGATCTGAGACAGGGAATGT TCGCCCAGCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGCTGATTGAC GGACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCAGGGCTGGCAGG GGTGTCCCTGACTGGGGGACTGTCCTACAAAGAAGATA CAAAAGAACTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGTACTAT GTGTTTTTTCAGCTGGAAGTGAAGCGGGTGGTGGCTGG GGAGGGCTCAGGATCTGTGTCCCTGGCTCTGCATCTGC AGCCACTGCGCTCTGCTGCTGGCGCAGCTGCACTGGCT CTGACTGTGGACCTGCCACAGCCTCTAGCGAGGCGAG AAACAGCGCCTTCGGGTTCCAAGGACGCCTGCTGCATC TGAGCGCCGGACAGCGCCTGGGAGTGCATCTGCATACT GAAGCCAGAGCCCCGGCATGCTTGGCAGCTGACTCAGGG GGCAACTGTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACACCTGAGA TCCCTGCCGGACTGCCAAGCCCTAGATCAGAAGGGGGC GGAGGTTCCGGAGGGGGAGGATCTCGTACGGTGGCCG CTCCCTCCGTGTTTATCTTTCCTCCCATCCGATGAACAG CTGAAAAGCGGCACCGCCTCCGTGCTGTGTCTGCTGAA CAATTTTTACCCTAGGGAAGCTAAAGTGCAGTGGAAAG TGGATAACGCACTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAATCT GTGACAGAACAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCT GTCCTCCACCTGACACTGTCTAAGGCTGATTATGAGA AACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCATCAGGGC CTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA GTGTGACAAGACCCACACCTGTCCCCCTTGTCTGCC CTGAAGCTGCTGGCGGCCCTTCTGTGTTCTGTTCCTCC CCAAAGCCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGAGCCCC CGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCACGAGG ACCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTG GAAGTGACACAATGCCAAGACCAAGCCGCGGAGGAGC AGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACC

10

20

30

40

		GTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAA GTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCG AGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAA CCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATGCCGGGATGAGCT GACCAAGAACCAGGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTCAAAG GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC AATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCC CGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCA AGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAA CGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA ACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT AAA	10
配列番号 107	モノマーリガン ド(71-254)- CH1	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGG ACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGG TGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCC TGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGAC AGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGG TGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTTCAG CTGGAAGTGCAGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGG CTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGAA GCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCTGGCTCTGACAGTGGAT CTGCCTCCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCGCATT TGGGTTTCAAGGCCGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCC AGAGACTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGAGCC AGGCACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCT GGGCCTGTTTCAAGTGAACCCCGAGATTCTGCCGGCC TGCCTAGCCCTAGATCTGAAGGCGGCGGAGGTTCCGGA GGCGGAGGATCTGCTAGCACCAAAGGCCCTTCCGTGTT TCCTCTGGCTCCTAGCTCCAAGTCCACCTCTGGAGGCA CCGCTGCTCTCGGATGCCTCGTGAAGGATTATTTTCCT GAGCCTGTGACAGTGTCTGGAATAGCGGAGCACTGAC CTCTGGAGTGCATACTTTCCCGCTGTGCTGCAGTCCT CTGGACTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGCAGTGCCC AGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGT GAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGG TGAACCCAAGTCTTGT	20 30
配列番号 98	抗 TnC(18D4)Fc ホール鎖	表 30 参照	
配列番号 99	抗 TnC(18D4) 軽鎖	表 30 参照	

10

20

30

40

50

表 33:CH-CL クロスを含有し、荷電残基を有さない、一価の TnC 標的(18D4)スプリット
リマー4-1BB リガンド(71-254)Fc(kih)融合体(コンストラクト 6.2)のアミノ酸配列。

配列番号	コンストラクト	配列
配列番号 108	ダイマーリガン ド(71-254)-CL Fc ノブ鎖	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWY SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELR RVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASS EARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLT QGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSEGGGGSGGGGSREGPE LSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGL AGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVG EGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARN AFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATV LGLFRVTPEIPAGLPSRSEGGGGSGGGGSRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGECDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVS LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLS PGK
配列番号 109	モノマーリガン ド(71-254)- CH1	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWY SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELR RVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASS EARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLT QGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSEGGGGSGGGGSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKEPKSC
配列番号 104	抗 TnC(18D4)Fc ホール鎖	表 31 参照
配列番号 77	抗 TnC(18D4) 軽鎖	表 21 参照

【 0 4 8 0 】

コンストラクト 6 . 3 : 二価の T n C 標的 (1 8 D 4) スプリットトリマー 4 - 1 B B
リガンド (7 1 - 2 5 4) F c (k i h) 融合体

(G 4 S) 2 リンカーにより隔てられた 4 - 1 B B リガンド (7 1 - 2 5 4) の 2 つの
エクトドメインを含有するポリペプチドを、ヒト I g G 1 F c ホール鎖の C 末端に、図
9 a [ヒト I g G 1 F c ホール、(G 4 S) 2 コネクター、ヒト 4 - 1 B B リガンド、
(G 4 S) 2 コネクター、ヒト 4 - 1 B B リガンド] に示されているように、融合させた。

【 0 4 8 1 】

図 9 b [ヒトヒト I g G 1 F c ノブ、(G 4 S) 2 コネクター、ヒト 4 - 1 B B リガン
ド] に記載の、4 - 1 B B リガンド (7 1 - 2 5 4) の 1 つのエクトドメインを含有し、
ヒト I g G 1 F c ノブ鎖の C 末端に融合されている、ポリペプチド。

【0482】

TnCに特異的な結合物質であるクローン18D4をコードする重鎖及び軽鎖DNA配列の可変領域を、ヒトIgG1のホール、ノブの定常重鎖、又は定常軽鎖のどちらかと共にインフレームでサブクローニングした。

【0483】

Fcガンマ受容体との結合を妨げるために、Pro329Gly、Leu234Ala及びLeu235Ala突然変異をFcガンマ受容体に導入した（国際特許出願公開国際公開第2012/130831号に記載されている）。

【0484】

Y349C/T366S/L368A/Y407V突然変異を含有する抗TnC huIgG1ホールダイマーリガンド鎖と、S354C/T366W突然変異を含有する抗TnC huIgG1ノブモノマーリガンド鎖と、抗TnC軽鎖との組合せにより、集合トリマー4-1BBリガンドと2つのTnC結合Fabとを含むヘテロ二量体の生成が可能になる（図10）。

【0485】

表34及び表35は、二価のTnC標的（18D4）スプリットトリマー4-1BBリガンド（71-254）Fc(kih)融合体（コンストラクト6.3）のcDNA及びアミノ酸配列をそれぞれ示す。

10

20

30

40

50

表 34:二価の TnC 標的(18D4)スプリットリマー4-1BB リガンド Fc(kih)PGLALA 融合体
(コンストラクト 6.3)の塩基対配列

配列番号	コンストラクト	配列
配列番号 110	抗 TnC(18D4)Fc ホールダイマー リガンド(71- 254)鎖	CAGGTGCAATTGGTGCAAGTCTGGGGCTGAGGTGAAG AAGCCTGGGTCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCC TCCGGAGGCACATTTCAGCAGCTACGCTATAAGCTGG GTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGGAT GGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACATA CGCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATTAAGTGC AGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAG CAGCCTGAGATCTGAGGACACCGCCGTGTATTACTG TGCGAAAGGTAACCTTCTACGGTGGTCTGGACTACTG GGGCCAAGGGACCACCGTGACCGTCTCCTCAGCTAG CACCAAGGGCCCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCCCCA GCAGCAAGAGCACACGCGCGGCACAGCCGCTCTG GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTG ACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGG CGTGACACACCTTCCCCGCGGTGCTGCAGAGTTCTGG CCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTC TAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGT GAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAA GGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAAACCTCACACATG CCCACCGTGCCCAAGCAACCTGAAGCTGCAGGGGGAC CGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACA CCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCG TGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCA AGTTCAACTGGTACGTGGACGCGGTGGAGGTGCATA ATGCCAAGACAAAGCGCGGGAGGAGCAGTACAACA GCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGC ACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGA AAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC CACAGGTGTGCAACCTGCCCCCATCCCGGGATGAG CTGACCAAGAACCAGGTACGCCTCTCGTGCGCAGTC AAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACC ACGCTTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTC TCCCTGTCTCCGGGTGGAGGCGGCGGAAGCGGAGG AGGAGGATCCAGAGAGGGGCCCTGAGCTGAGCCCGG ATGATCCTGCTGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCA TGTTTGCTCAGCTGGTGGCCCAAGCGTGCTGCTGA TCGATGGCCCCCTGTCTGGTACAGCGATCCTGGAC TGGCTGGCGTGTACTGACAGGCGGCCTGAGCTACA AAGAGGACACCAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCC GGCGTGTACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAAGTGGCG AGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCT

10

20

30

40

		CTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGCTGCT GGCGCTGCAGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCT CCTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCGCATTGCG TTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAG AGGCTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGC TAGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGT GCTGGGCCTGTTCAAGTGACCCCCGAGATTCCAGC CGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAAGGCGGAGGGC GATCTGGCGGCGGAGGATCTAGAGAGGGACCCGAA CTGTCCCCTGACGATCCAGCCGGGCTGCTGGATCTG AGACAGGGAATGTTGCCCCAGCTGGTGGCTCAGAAT GTGCTGCTGATTGACGGACCTCTGAGCTGGTACTCC GACCCAGGGCTGGCAGGGGTGTCCCTGACTGGGGG ACTGTCTACAAAGAAGATACAAAGAAGTGGTGGT GGCTAAAGCTGGGGTGACTATGTGTTTTTTCAGCT GGAAGTGAAGCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGCTCAG GATCTGTGTCCCTGGCTCTGCATCTGCAGCCACTGC GCTCTGCTGCTGGCGCAGCTGCACTGGCTCTGACTG TGGACCTGCCACCAGCCTCTAGCGAGGCCAGAAACA GCGCCTTCGGGTTCCAAGGACGCCTGCTGCATCTGA GCGCCGGACAGCGCCTGGGAGTGCATCTGCATACTG AAGCCAGAGCCCGGCATGCTTGGCAGCTGACTCAGG GGGCAACTGTGCTGGGACTGTTTCGCGTGACACCTG AGATCCCTGCCGGAAGTCCAAGCCCTAGATCAGAA
配列番号 111	抗 TnC(18D4)Fc ノ ブモノマーリガ ンド(71-254)鎖	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAG AAGCCTGGGTCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCC TCCGGAGGCACATTCAGCAGCTACGCTATAAGCTGG GTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGGAT GGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTA CGCACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCAACATTACTGC AGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAG CAGCCTGAGATCTGAGGACACCGCCGTGTATTACTG TGCGAAAGGTAACCTCTACGGTGGTCTGGACTACTG GGGCCAAGGGACCAACGTGACCGTCTCCTCAGTAG CACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTC CTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGG GCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGA CGGTGTGCTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGGC GTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGA CTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCC AGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG AATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAA GTTGAGCCCAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGC CCACCGTGCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACC GTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACAC CCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGT GGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAA GTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAA TGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACA GCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCCTCCTGC ACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGA

10

20

30

40

50

		AAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC CACAGGTGTACACCCTGCCCCCTGCAGAGATGAGC TGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTCA AGGGCTTCTACCCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGGG AGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAACACAAGACCA CCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCC TGTA CTCCAAACTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGC AGCAGGGCAACGTGTT CAGCTGCAGCGTGATGCACG AGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGA GCCTGAGCCCCGGCGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGA GGAGGATCCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGA TGATCCTGCTGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCAT GTTTGCTCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGAT CGATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACT GGCTGGCGTG TCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAA AGAGGACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCG GCGTG TACTACGTGTTCTTT CAGCTGGA ACTGCGGA GAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTC TGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGAAGCGCTGCTG GCGCTGCAGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTC CTGCCAGCTCCGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGT TTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGA GGCTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCT AGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGT GCTGGGCCTGTT CAGAGTGACCCCCGAGATTCCAGC CGGCCTGCCTTCTCCAAGAAGCGAA
配列番号 77	抗 TnC(18D4) 軽鎖	表 21 参照

10

20

30

40

50

表 35:二価の TnC 標的(18D4)スプリットトリマー4-1BB リガンド Fc(kih)PGLALA 融合体
(コンストラクト 6.3)のアミノ酸配列

配列番号	コンストラクト	配列
配列番号 112	抗 TnC(18D4)Fc ホールダイマー リガンド(71- 254)鎖	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWV RQAPGGGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKS TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAKGNFYGGLDYWGGG TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAP IEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAV KGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL VSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMF AQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKED TKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALH LQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLL LHLASAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVGLGLFR VTPEIPAGLPSRSEGGGGSGGGGSREGPELSPDDPA GLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVS LTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGE GSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEAR NSAFGFQGRLLHLASAGQRLGVHLHTEARARHAWQLT QGATVGLGLFRVTPEIPAGLPSRSE
配列番号 113	抗 TnC(18D4)Fc ノ ブモノマーリガ ンド(71-254)鎖	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWV RQAPGGGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKS TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAKGNFYGGLDYWGGG TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLV KGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMF AQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKED TKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALH LQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLL LHLASAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVGLGLFR VTPEIPAGLPSRSE
配列番号 77	抗 TnC(18D4) 軽鎖	表 21 参照

【 0 4 8 6 】

コンストラクト 6. 4 : C H - C L クロスと荷電残基を含有する、一価の T n C 標的 (1 8 D 4) スプリットトリマー 4 - 1 B B リガンド (7 1 - 2 4 8) F c (k i h) 融合体 (G 4 S) 2 リンカーにより隔てられた 4 - 1 B B リガンド (7 1 - 2 4 8) の 2 つのエクトドメインを含有し、ヒト I g G 1 - C L ドメインに融合されているポリペプチドを、図 1 1 a [ヒト 4 - 1 B B リガンド、(G 4 S) 2 コネクター、ヒト 4 - 1 B B リガンド、(G 4 S) 2 コネクター、ヒト C L] に示されているようにクローニングした。4 - 1 B B リガンド (7 1 - 2 4 8) の 1 つのエクトドメインを含有し、ヒト I g G 1 - C H ドメインに融合されているポリペプチドを、図 1 1 b [ヒト 4 - 1 B B リガンド、(G 4

S) 2コネクター、ヒトCH] に示されているようにクローニングした。

【0487】

正しいペアリングを増進するために、クロスしたCH-CL内に次の突然変異を導入した。ヒトCLに融合されているダイマー4-1BBリガンドには、E123R及びQ124K。ヒトCH1に融合されているモノマー4-1BBリガンドには、K147E及びK213E。

【0488】

TnCに特異的な結合物質であるクローン18D4をコードする重鎖及び軽鎖DNA配列の可変領域を、ヒトIgG1のホール、ノブの定常重鎖、又は定常軽鎖のどちらかと共にインフレイムでサブクローニングした。

【0489】

Fcガンマ受容体との結合を妨げるために、Pro329Gly、Leu234Ala及びLeu235Ala突然変異をノブ及びホール重鎖の定常領域に導入した（特許寄託番号）。

【0490】

S354C/T366W突然変異を含有するダイマーリガンドFcノブ鎖と、モノマーCH1融合体と、Y349C/T366S/L368A/Y407V突然変異を含有する標的指向性抗TnC-Fcホール鎖と、抗TnC軽鎖との組合せにより、集合トリマー4-1BBリガンドとTnC結合Fabとを含むヘテロ二量体の生成が可能になる（図12）。

【0491】

表36及び表37は、CH-CLクロスと荷電残基を含有する、一価のTnC標的スプリットトリマー4-1BBリガンド（71-248）Fc(kih)融合体（コンストラクト6.4）のcDNA及びアミノ酸配列をそれぞれ示す。

10

20

30

40

50

表 36:CH-CL クロスと荷電残基を含有する、一価の TnC 標的(18D4)スプリットリマー4-1BB リガンド(71-248)Fc(kih)融合体(コンストラクト 6.4)の塩基対配列。*荷電残基

配列番号	コンストラクト	配列
配列番号 114	ダイマーリガ ンド(71-248)- CL* Fc ノブ鎖	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGG ACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGG TGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCC TGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGCTCACTGAC AGGCGGCCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGG TGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTTCAG CTGGAAGTGCAGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGG CTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGAT CTGCTGCTGGCGCCGCTGCTCTGGCACTGACAGTGGAT CTGCCTCCTGCCAGCAGCGAGGCCCGGAATAGCGCATT TGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCC AGAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCT AGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCT GGGCCTGTTTCAGAGTGACCCCCGAGATTCAGCCGGAC TGGGAGGCGCGGATCTGGCGCGCGAGGATCTAGAGA AGGACCCGAGCTGTCCCCTGACGATCCAGCCGGGCTG CTGGATCTGAGACAGGGAATGTTCCGCCAGCTGGTGGC TCAGAAATGTGCTGCTGATTGACGGACCTCTGAGCTGGT ACTCCGACCCAGGGCTGGCAGGGGTGTCCCTGACTGG GGGACTGTCTACAAAGAAGATACAAAGAAGTGGTGG TGGCTAAAGCTGGGGTGTACTATGTGTTTTTTCAGCTGG AACTGAGGCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGCTCAGGATCT GTGTCCCTGGCTCTGCATCTGCAGCCACTGCGCTCTGC AGCAGGGGCTGCAGCACTGGCCCTGACTGTGGACCTGC CCCCAGCTTCTTCCGAGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGG TTCCAAGGACGCCTGCTGCATCTGAGCGCCGGACAGCG CCTGGGAGTGCATCTGCATACTGAAGCCAGAGCCCGG ATGCTTGGCAGCTGACTCAGGGGGCAACTGTGCTGGGA CTGTTTCGCGTGACACCTGAGATCCCCGCTGGACTGGG CGGAGGCGGTTCCGGAGGGGGAGGATCTCGTACGGTG GCTGCACCATCTGTCTTTATCTTCCACCCAGCGACCG GAAGCTGAAGTCTGGCACAGCCAGCGTCTGTGCTGCTGC TGAATAAATTCTACCCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGG AAGGTGGACAATGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGA AAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACA GCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTAC GAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCA GGGCCTGTCTAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGG GCGAGTGCGACAAGACCCACACCTGTCTCCATGCCCT GCCCCCTGAAGCTGCTGGCGGCCCTAGCGTGTTCTGT CCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGGA CCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCAC GAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGG CGTGGAAGTGACAATGCCAAGACCAAGCCGCGGGAG GAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCT CACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGT

10

20

30

40

		ACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCC ATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCG AGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATGCCGGGATG AGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGTGGTGCCTGGTC AAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACATAAGACCACGC CTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTAC AGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGG GGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCC GGGTAAA	10
配列番号 115	モノマーリガン ド(71-248)- CH1*	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGG ACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTGG TGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTGTCC TGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCACTGAC AGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGAACTGG TGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTCTTTTCA CTGGAAGTGGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAGGATCTGG CTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCCTCTGAGAT CTGCTGCTGGCGCCGCTGCTCTGGCACTGACAGTGGAT CTGCCTCCTGCCAGCAGCGAGGCCCGGAATAGCGCATT TGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCC AGAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCT AGACACGCCTGGCAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGCT GGGCCTGTTTCAAGTGAACCCCGAGATTCCAGCCGGAC TGGGAGGCGGAGGTTCCGGAGGCGGAGGATCTGCTAG CACAAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCTCTGGCCCCCTAGCA GCAAGAGCACATCTGGCGGAACAGCCGCCCTGGGCTG CCTGGTGGAAGATTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGT CCTGGAATTCTGGCGCCCTGACAAGCGGCGTGACACCC TTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACTCTCT GAGCAGCGTCGTGACAGTGCCCAGCAGCTCTCTGGGCA CCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGC AACACCAAGGTGGACGAGAAGGTGGAACCCAAGTCCTG C	20 30
配列番号 100	抗 TnC(18D4)Fc ホール鎖	表 30 参照	
配列番号 73	抗 TnC(18D4) 軽鎖	表 20 参照	

10

20

30

40

50

表 37:CH-CL クロスと荷電残基を含有する、一価の TnC 標的(18D4)スプリットトリマー4-1BB リガンド(71-248)Fc(kih)融合体(コンストラクト 6.4)のアミノ酸配列。*荷電残基

配列番号	コンストラクト	配列
配列番号 116	ダイマーリガ ンド(71-248)- CL* Fc ノブ鎖	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWY SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYVFFQLELR RVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASS EARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLT QGATVLGLFRVTPEIPAGLGGGGSGGGGSREGPELSPDDP AGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLT GGLSYKEDTKELVVAAGVYVFFQLELRRVVAGEGSGSV SLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQG RLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVT PEIPAGLGGGGSGGGGSRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEODKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRT EVTCTVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
配列番号 117	モノマーリガ ンド(71-248)- CH1*	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWY SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYVFFQLELR RVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASS EARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLT QGATVLGLFRVTPEIPAGLGGGGSGGGGSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDEKVEPKSC
配列番号 104	抗 TnC(18D4)Fc ホール鎖	表 31 参照
配列番号 77	抗 TnC(18D4) 軽鎖	表 21 参照

【0492】

コンストラクト 6.5: CH-CL クロスを含有し、荷電残基を有さない、一価の TnC 標的 (18D4) スプリットトリマー 4-1BB リガンド (71-248) Fc (kih) 融合体

(G4S) 2 リンカーにより隔てられた 4-1BB リガンド (71-248) の 2 つのエクトドメインを含有し、ヒト IgG1-CL ドメインに融合されているポリペプチドを、図 13a [ヒト 4-1BB リガンド、(G4S) 2 コネクター、ヒト 4-1BB リガンド、(G4S) 2 コネクター、ヒト CL] に示されているようにクローニングした。

【0493】

4-1BB リガンド (71-248) の 1 つのエクトドメインを含有し、ヒト IgG1-CH ドメインに融合されているポリペプチドを、図 13b [ヒト 4-1BB リガンド、(G4S) 2 コネクター、ヒト CH] に示されているようにクローニングした。

【0494】

Tn Cに特異的な結合物質であるクローン18D4をコードする重鎖及び軽鎖DNA配列の可変領域を、ヒトIgG1のホール、ノブの定常重鎖、又は定常軽鎖のどちらかと共にインフレームでサブクローニングした。

【0495】

Fcガンマ受容体との結合を妨げるために、Pro329Gly、Leu234Ala及びLeu235Ala突然変異を、ノブ及びホール重鎖の定常領域に導入した（特許寄託番号）。

【0496】

S354C／T366W突然変異を含有するダイマーリガンドFcノブ鎖と、モノマーCH1融合体と、Y349C／T366S／L368A／Y407V突然変異を含有する標的指向性抗Tn C－Fcホール鎖と、抗Tn C軽鎖との組合せにより、集合トリマー4－1BBリガンドとTn C結合Fabとを含むヘテロ二量体の生成が可能になる（図14）。

【0497】

表38及び表39は、CH－CLクロスFc（kih）融合体（コンストラクト6.5）における、荷電残基を有する、一価のTn C標的（18D4）スプリットトリマー4－1BBリガンド（71－248）の、cDNA及びアミノ酸配列をそれぞれ示す。

10

20

30

40

50

表 38:CH-CL クロスを含有し、荷電残基を有さない、一価の TnC 標的(18D4)スプリット
リマー4-1BB リガンド(72-248)Fc(kih)融合体(コンストラクト 6.5)の塩基対配列。

配列番号	コンストラクト	配列
配列番号 118	ダイマーリガン ド(71-248)-CL Fc ノブ鎖	AGAGAGGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTG GACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCT GGTGGCCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTG TCCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCAC TGACAGGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGA ACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTT TTTCAGCTGGAAGTGCAGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAG GATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCC TCTGAGATCTGCTGCTGGCGCCGCTGCTCTGGCACTG ACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCAGCGAGGCCCGGA ATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCT GTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACA GAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGACACAG GGCGCTACAGTGCTGGGCCGTTCAGAGTGACCCCCG AGATTCCAGCCGACTGGGAGGCGGCGGATCTGGCG GCGGAGGATCTAGAGAAGGACCCGAGCTGTCCCTGA CGATCCAGCCGGGCTGCTGGATCTGAGACAGGGAATG TTCGCCCAGCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGCTGATTG ACGGACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCAGGGCTGGC AGGGGTGTCCCTGACTGGGGGACTGTCTACAAAGAA GATACAAAAGAACTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGT ACTATGTGTTTTTTCAGCTGGAAGTGAAGCGGGTGGT GGCTGGGGAGGGCTCAGGATCTGTGTCCCTGGCTCTG CATCTGCAGCCACTGCGCTCTGCAGCAGGGGCTGCAG CACTGGCCCTGACTGTGGACCTGCCCCCAGCTTCTTC CGAGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCCAAGGACGC CTGCTGCATCTGAGCGCCGGACAGCGCCTGGGAGTGC ATCTGCATACTGAAGCCAGAGCCCGGCATGCTTGGA GCTGACTCAGGGGGCAACTGTGCTGGGACTGTTTCGC GTGACACCTGAGATCCCCGCTGGACTGGGCGGAGGC GGTTCCGGAGGGGGAGGATCTCGTACGGTGGCCGCTC CCTCCGTGTTTATCTTTCCCCCATCCGATGAACAGCT GAAAAGCGGCACCGCCTCCGTGCTGTCTGCTGAAC AATTTTTACCCTAGGGAAGCTAAAGTGCAAGTGGAAG TGGATAACGCACTGCAGTCCGGCAACTCCAGGAATC TGTGACAGAACAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCC CTGTCTCCACCCTGACACTGTCTAAGGCTGATTATG AGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCA GGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGG GGAGAGTGTGACAAGACCCACACCTGTCCCCCTTGTC CTGCCCCCTGAAGCTGCTGGCGGCCCTTCTGTGTTCT GTTCCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGC CGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGT CCCACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGT GGACGGCGTGGAAGTGACAATGCCAAGACCAAGCCG CGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA

10

20

30

40

		GCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGG CAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTC GGCGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAG GGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCC CATGCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCT GTGGTGCCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATC GCCGTGGAGTGCGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAAC AACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACG GCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGAACA GAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCC GTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGA AGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA	10
配列番号 119	モノマーリガン ド(71-248)- CH1	AGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTG GACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCT GGTGGCCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTG TCCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTAC TGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAAGA ACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTGTTT TTTCAGCTGGAAGTGGGAGAGTGGTGGCCGGCGAAG GATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTGCAGCC TCTGAGATCTGCTGCTGGCGCCGCTGCTCTGGCACTG ACAGTGATCTGCCTCCTGCCAGCAGCGAGGCCCGGA ATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTGCACCT GTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTGCACACA GAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGACACAG GGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTTCAAGTGACCCCCG AGATTCCAGCCGGAAGTGGGAGGCGGAGGTTCCGGAG GCGGAGGATCTGCTAGCACCAAGGCCCTTCCGTGTT TCCTCTGGCTCCTAGCTCCAAGTCCACCTCTGGAGGC ACCGCTGCTCTCGGATGCCTCGTGAAGGATTATTTTC CTGAGCCTGTGACAGTGTCTGGAATAGCGGAGCACT GACCTCTGGAGTGCATACTTTCCCCGCTGTGCTGCAG TCCTCTGGACTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACAG TGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTG CAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGAC AAGAAGGTGGAACCCAAGTCTTGT	20 30
配列番号 100	抗 TnC(18D4)Fc ホール鎖	表 30 参照	
配列番号 73	抗 TnC(18D4) 軽鎖	表 20 参照	40

10

20

30

40

50

表 39:CH-CL クロスを含有し、荷電残基を有さない、一価の TnC 標的(18D4)スプリットリマー4-1BB リガンド(72-248)Fc(kih)融合体(コンストラクト 6.5)のアミノ酸配列。

配列番号	コンストラクト	配列
配列番号 120	ダイマーリガンド(71-248)-CL Fc ノブ鎖	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSW YSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLE LRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPP ASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAW QLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLGGGGSGGGGSREGPELS PDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLA GVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAG EGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARN SAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGA TVLGLFRVTPEIPAGLGGGGSGGGGSRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNFPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGECDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK
配列番号 121	モノマーリガンド(71-248)- CH1	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSW YSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLE LRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPP ASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAW QLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLGGGGSGGGGSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSC
配列番号 104	抗 TnC(18D4)Fc ホール鎖	表 31 参照
配列番号 77	抗 TnC(18D4) 軽鎖	表 21 参照

【0498】

コンストラクト 6.6：二価の TnC 標的 (18D4) スプリットリマー4-1BB リガンド (71-248) Fc (kih) 融合体

(G4S) 2リンカーにより隔てられた 4-1BB リガンド (71-248) の 2つのエクトドメインを含有するポリペプチドを、図 15a [ヒト IgG1 Fc ホール、(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] に示されているように、ヒト IgG1 Fc ホール鎖の C 末端に融合させた。

【0499】

図 15b [ヒト IgG1 Fc ノブ、(G4S) 2コネクター、ヒト 4-1BB リガンド] に記載の、4-1BB リガンド (71-248) の 1つのエクトドメインを含有し、ヒト IgG1 Fc ノブ鎖の C 末端に融合されている、ポリペプチド。

【0500】

TnCに特異的な結合物質であるクローン18D4をコードする重鎖及び軽鎖DNA配列の可変領域を、ヒトIgG1のホール、ノブの定常重鎖、又は定常軽鎖のどちらかと共にインフレームでサブクローニングした。

【0501】

Fcガンマ受容体との結合を妨げるために、Pro329Gly、Leu234Ala及びLeu235Ala突然変異を、ノブ及びホール重鎖の定常領域に導入した（特許寄託番号）。

【0502】

Y349C／T366S／L368A／Y407V突然変異を含有する抗TnC huIgG1ホールダイマーリガンド鎖と、S354C／T366W突然変異を含有する抗TnC huIgG1ノブモノマーリガンド鎖と、抗TnC軽鎖との組合せにより、集合トリマー4-1BBリガンドと2つのTnC結合Fabとを含むヘテロ二量体の生成が可能になる（図16）。

【0503】

表40及び表41は、二価のTnC標的（18D4）スプリットトリマー4-1BBリガンド（71-248）Fc(kih)融合体（コンストラクト6.6）のcDNA及びアミノ酸配列をそれぞれ示す。

10

20

30

40

50

表 40:二価の TnC 標的(18D4)スプリットリマー4-1BB リガンド(71-248)Fc(kih)融合体(コンストラクト 6.6)の塩基対配列

配列番号	コンストラクト	配列
配列番号 122	抗 TnC(18D4)Fc ホールダイマー リガンド(71- 248)鎖	CAGGTGCAATTGGTGCACTCTGGGGCTGAGGTGAAGAA GCCTGGGTCCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTCCG GAGGCACATTACAGCAGCTACGCTATAAGCTGGGTGCGA CAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGAGGGA TCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACTACGCACAGAAG TTCCAGGGCAGGGTCACCATTAAGTGCAGACAAATCCAC GAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTG AGGACACCGCCGTGTATTACTGTGCGAAAGGTAACCTC TACGGTGGTCTGGACTACTGGGGCCAAGGGACCACCGT GACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCTCCGTGT TCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCGCGCGG CACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCC CCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGAGCCCT GACCTCCGCGGTGCACACCTTCCCCGCGGTGCTGCAG AGTTCTGGCCTGTATAGCCTGAGCAGCGTGGTCACCGT GCCTTCTAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCA ACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAA GAAGGTGGAGCCCCAAGAGCTGCGACAAAACCTCACACAT GCCCACCCTGCCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACC GTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCC TCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTG GTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAA CTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGA CAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCG TGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACAGGACTGGC TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAA GCCCTCGGCGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAG CCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCACCT GCCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACAGGTG AGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGA CATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG AACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGA CGGCTCCTTCTTCTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACA AGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCC GTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAA GAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTGGAGGCGGCGGAAGC GGAGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCC CTGATGATCCTGCCGACTGCTGGACCTGCGGCAGGG AATGTTTGCCCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGA TCGATGGCCCCCTGTCTGGTACAGCGATCCTGGACTG GCTGGCGTGTCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGA GGACACCAAAGAACTGGTGGTGCCAAAGCCGGCGTG TACTACGTGTTCTTTTCACTGGAAGTGGGAGAGTGGT GGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTGTGGCCCTGC ATCTGCAGCCTCTGAGATCTGCTGCTGGCGCCGCTGCT CTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCAGCGA

10

20

30

40

40

		CAGCTTCTTCCTGTACTCCAAACTGACCGTGGACAAGA GCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCTGCAGCGT GATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGT CCCTGAGCCTGAGCCCCGGCGGAGGCGGCGGAAGCGG AGGAGGAGGATCCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCT GATGATCCTGCCGGA CTGCTGGACCTGCGGCAGGGAAT GTTTGCCCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCG ATGGCCCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCT GGCGTGTCAGTACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGG ACACCAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTA CTACGTGTTCTTTCAGCTGGAAGTGCAGAGAGTGGTGG CCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCAT CTGCAGCCTCTGAGATCTGCTGCTGGCGCCGCTGCTCT GGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCAGCGAG GCCCCGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCT GCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTG CACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGA CACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTTCAGAGTGACC CCCGAGATTCTGCCGGGCTC
配列番号 73	抗 TnC(18D4) 軽鎖	表 20 参照

10

20

30

40

50

表 41:二価の TnC 標的(18D4)スプリットトリマー4-1BB リガンド(71-248)Fc(kih)融合体(コンストラクト 6.6)のアミノ酸配列

配列番号	コンストラクト	配列
配列番号 124	抗 TnC(18D4)Fc ホールダイマー リガンド(71- 248)鎖	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWVRQA PGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCAKGNFYGGLDYWGQGTITVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKLGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQ VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGGGGGSGGGGSGREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQL VAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVV AKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAG AAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVH LHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLGGGGSGG GGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPL SWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQL ELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPP ASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAW QLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
配列番号 125	抗 TnC(18D4)Fc ノ ブモノマー(71- 248)リガンド	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWVRQA PGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCAKGNFYGGLDYWGQGTITVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKLGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQ VSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGGGGGSGGGGSGREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQL VAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVV AKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAG AAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVH LHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
配列番号 77	抗 TnC(18D4) 軽鎖	表 21 参照

【 0 5 0 4 】

コンストラクト 6 . 1 1 及び 6 . 1 2 : 一価の T n C 標的 (ノブ) のトリマー C 末端 4 - 1 B B リガンド F c (k i h) 融合体

(G 4 S) 2 リンカーにより隔てられた 4 - 1 B B リガンドの 2 つのエクトドメインを含有するポリペプチドを、図 1 7 a [ヒト I g G 1 F c 、 (G 4 S) 2 コネクター、ヒト 4 - 1 B B リガンド、(G 4 S) 2 コネクター、ヒト 4 - 1 B B リガンド] に示されているように、ヒト I g G 1 F c ホール又はノブ鎖の C 末端にインフレームでサブクロニングした (Merchant, Zhu 等、1998) 。 4 - 1 B B リガンドの 1 つのエクトドメインを含有するポリペプチドを、図 1 7 b [ヒト I g G 1 F c 、 (G 4 S) 2 コネクター、

ヒト4-1BBリガンド]に示されているように、ヒトIgG1Fcノブ又はホール鎖のC末端にインフレームでサブクロニングした。

【0505】

TnCに特異的な結合物質であるクローン18D4をコードする重鎖及び軽鎖DNA配列の可変領域を、ヒトIgG1のノブの定常重鎖又は定常軽鎖のどちらかと共にインフレームでサブクロニングした。

【0506】

Fcガンマ受容体との結合を妨げるために、Pro329Gly、Leu234Ala及びLeu235Ala突然変異をノブ及びホール重鎖の定常領域に導入した（国際特許出願公開国際公開第2012/130831号に記載されている）。

10

【0507】

Y349C/T366S/L368A/Y407V突然変異を含有するhuIgG1Fcホール鎖と、S354C/T366W突然変異を含有する抗TnC huIgG1ノブ鎖と、抗TnC軽鎖との組合せにより、集合トリマー4-1BBリガンドと1つのTnC結合Fabを含むヘテロ二量体の生成が可能になる（図18）。

【0508】

表42及び表43は、一価のTnC標的（18D4）スプリットトリマーC末端4-1BBリガンド（71-248）Fc(kih)融合体（コンストラクト6.11）のcDNA及びアミノ酸配列をそれぞれ示す。

20

30

40

50

表 42:二価 TnC(18D4)スプリットリマーC 末端 4-1BB リガンド(71-248)Fc(kih)融合体(コンストラクト 6.11)の塩基対配列

配列番号	コンストラクト	配列
配列番号 126	Fc ホールダイマーリガンド(71-248)鎖	GACAAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTG AAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCGGACCCCT GAGGTCACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAAG ACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAG CAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCA CCGTCTGCACACGAGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTA CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCC ATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCC GAGAACCACAGGTGTGCACCCCTGCCCCATCCCGGA TGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCA GTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGT GGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACATAAGAC CACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGC AGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGA GGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCC CTGTCTCCGGGTGGAGGCGCGGAAGCGGAGGAGGA GGATCCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCTGATGATC CTGCCGGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGAATGTTTGC CCAGCTGGTGGCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGC CCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCG TGCTACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGACAC CAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTAC GTGTTCTTTCAGCTGGAAGTGCAGAGAGTGGTGGCCG GCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCT GCAGCCTCTGAGATCTGCTGCTGGCGCCGCTGCTCTG GCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCAGCGAGG CCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCT GCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTG CACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGA CACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTACAGAGTGAC CCCCGAGATTCCAGCAGGCCTGGGAGGCGGCGGATC TGCGCGCGGAGGATCTAGAGAAGGACCCGAGCTGTCC CCCGACGATCCCGCTGGGCTGCTGGATCTGAGACAGG GCATGTTTCGCTCAGCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGCT GATTGACGGACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCAGGG CTGGCAGGGGTGTCCCTGACTGGGGGACTGTCTACA AAGAAGATACAAAAGAACTGGTGGTGGCTAAAGCTGG GGTGTACTATGTGTTTTTTCAGCTGGAAGTGAAGCGG GTGGTGGCTGGGGAGGGCTCAGGATCTGTGTCCCTGG CTCTGCATCTGCAGCCACTGCGCTCTGCAGCAGGGGC TGCAGCACTGGCCCTGACTGTGGACCTGCCCCAGCT TCTTCCGAGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCCAAG GACGCCTGCTGCATCTGAGCGCCGACAGCGCCTGG GAGTGCATCTGCATACTGAAGCCAGAGCCCGCATGC

10

20

30

40

		TTGGCAGCTGACTCAGGGGGCAACTGTGCTGGGACTG TTTCGCGTGACACCTGAGATCCCAGCCGGGCTC
配列番号 123	抗 TnC(18D4)Fc ノ ブモノマーリガ ンド(71-248)鎖	表 40 参照
配列番号 73	抗 TnC(18D4) 軽鎖	表 20 参照

10

表 43:二価 TnC(18D4)スプリットトリマーC 末端 4-1BB リガンド(71-248)Fc(kih)融合体(コ
ンストラクト 6.11)のアミノ酸配列

配列番号	コンストラクト	配列
配列番号 127	Fc ホールダイ マーリガンド (71-248)鎖	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIS KAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGGSFFLVSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGG GGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGP LSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYVFF QLELRRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVD LPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARAR HAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLGGGGSGGGGSREG PELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSD PGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYVFFQLELRR VVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASS EARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLT QGATVLGLFRVTPEIPAGL
配列番号 125	抗 TnC(18D4)Fc ノ ブモノマーリガ ンド(71-248)鎖	表 41 参照
配列番号 77	抗 TnC(18D4) 軽鎖	表 21 参照

20

30

40

【 0 5 0 9 】

表 4 4 及び表 4 5 は、一価の T n C 標的 (1 8 D 4) スプリットトリマーC 末端 4 - 1
B B リガンド (7 1 - 2 4 8) F c (k i h) 融合体 (コンストラクト 6 . 1 2) の c D
N A 及びアミノ酸配列をそれぞれ示す。

50

表 44:一価の TnC 標的(18D4)スプリットリマーC 末端 4-1BB リガンド(71-248)Fc(kih)融合体(コンストラクト 6.12)の塩基対配列

配列番号	コンストラクト	配列
配列番号 128	Fc ホールモノマーリガンド(71-248)鎖	GACAAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTG AAGTGCAGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCGGACCCCT GAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAG ACCGTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAG CAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCA CCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTA CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCC ATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCC GAGAACCACAGGTGTGACCCCTGCCCCCATCCCGGGA TGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTCTCGTGCGCA GTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGT GGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACTACAAGAC CACGCCCTCCCGTGGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTCGTGAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGC AGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGA GGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCC CTGTCTCCGGGTAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCTG ATGATCCTGCCGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGAAT GTTTGCCAGCTGGTGGCCAGAACGTGCTGCTGATC GATGGCCCCCTGTCTGGTACAGCGATCCTGGACTGG CTGGCGTGCTACTGACAGGCGCCTGAGCTACAAAGA GGACACCAAGAAGTGGTGGTGGCCAAGCCGGCGT GTACTACGTGTTCTTTTCTGAGTGGAACTGCGGAGAGTG GTGGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCC TGATCTGCAGCCTCTGAGATCTGCTGCTGGCGCCGC TGCTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGC AGCAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCA GGCTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGT GCATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGG CAGCTGACACAGGGCGCTACAGTGTGGGCCTGTTCA GAGTGACCCCCGAGATTCTGCCGGGCTC
配列番号 129	抗 TnC(18D4)Fc ノブダイマーリガンド(71-248)鎖	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGA AGCCTGGGTCTCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTC CGGAGGCACATTACAGCAGCTACGCTATAAGCTGGGTG CGACAGGCCCTTGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGA GGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACCTACGCAC AGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATTACTGCAGACAA ATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTG AGATCTGAGGACACCGCCGTGTATTACTGTGCGAAAG GTAACCTTCTACGGTGGTCTGGACTACTGGGGCCAAGG GACCACCGTGACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGC CCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCA CCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAA GGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAC

10

20

30

40

		TCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGG CTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAG CGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAG ACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACA CCAAGGTGGACAAGAAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGA CAAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAA GCTGCAGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAA AACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGA GGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG AGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCA GTACAACAGCAGCTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACC GTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACA AGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCAT CGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCTGCAGAGATG AGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTGGT CAAGGGCTTCTACCCAGCGATATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAACCTACAAGACCA CCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCT GTACTCCAAACTGACCGTGGAACAAGAGCCGGTGGCAG CAGGGCAACGTGTTGAGCTGCAGCGTGATGCACGAGG CCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCT GAGCCCCGGCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCTGA TGATCCTGCCGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGAATG TTTGCCAGCTGGTGGCCAGAACGTGCTGCTGATCG ATGGCCCCCTGTCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGC TGGCGTGTCACTGACAGGCGCCTGAGCTACAAGAG GACACCAAGAAGTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGT ACTACGTGTTCTTTCAGCTGGAAGTGGCGAGAGTGGT GGCCGGCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTG CATCTGCAGCCTCTGAGATCTGCTGCTGGCGCCCTG CTCTGGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCAG CGAGGCCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGG CTGCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGC ATCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCA GCTGACACAGGGCGCTACAGTGTGGGCTGTTGAGA GTGACCCCCGAGATTCCAGCAGGCCTGGGAGGCGGC GGATCTGGCGGCGGAGGATCTAGAGAAGGACCCGAG CTGTCCCCCGACGATCCCGCTGGGCTGCTGGATCTGA GACAGGGCATGTTGCTCAGCTGGTGGCTCAGAATGT GCTGCTGATTGACGACCTCTGAGCTGGTACTCCGAC CCAGGGCTGGCAGGGGTGTCCCTGACTGGGGGACTGT CCTACAAAGAAGATACAAAAGAACTGGTGGTGGCTAA AGCTGGGGTGTACTATGTGTTTTTCAGCTGGAAGTGA GGCGGGTGGTGGCTGGGGAGGGCTCAGGATCTGTGT CCTGGCTCTGCATCTGCAGCCACTGCGCTCTGCAGCA GGGGCTGCAGCACTGGCCCTGACTGTGGACCTGCCCC CAGCTTCTTCCGAGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTT CCAAGGACGCCTGCTGCATCTGAGCGCCGGACAGCG CCTGGGAGTGCATCTGCATACTGAAGCCAGAGCCCGG CATGCTTGGCAGCTGACTCAGGGGGCAACTGTGCTGG
--	--	---

10

20

30

40

		GACTGTTTCGCGTGACACCTGAGATCCCAGCCGGGCT C
配列番号 73	抗 TnC(18D4) 軽鎖	表 20 参照

表 45:一価の TnC 標的(18D4)スプリットトリマーC 末端 4-1BB リガンド(71-248)Fc(kih)融合体(コンストラクト 6.12)のアミノ酸配列

配列番号	コンストラクト	配列
配列番号 130	Fc ホールモノマーリガンド(71-248)鎖	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
配列番号 131	抗 TnC(18D4)Fc ノブダイマーリガンド(71-248)鎖	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAKGNFYGGLDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
配列番号 77	抗 TnC(18D4)軽鎖	表 21 参照

【 0 5 1 0 】

コンストラクト 6. 1 3 及び 6. 1 4 : 一価の T n C 標的 (ホール) のトリマー C 末端 4-1 B B リガンド F c (k i h) 融合体

(G 4 S) 2 リンカーにより隔てられた 4-1 B B リガンドの 2 つのエクトドメインを含有するポリペプチドを、図 1 7 a [ヒト I g G 1 F c 、 (G 4 S) 2 コネクター、ヒト 4-1 B B リガンド、 (G 4 S) 2 コネクター、ヒト 4-1 B B リガンド] に示されているように、ヒト I g G 1 F c ホール又はノブ鎖の C 末端にインフレームでサブクロニングした (Merchant, Zhu 等、1998) 。 4-1 B B リガンドの 1 つのエクトドメインを含有するポリペプチドを、図 1 7 b [ヒト I g G 1 F c 、 (G 4 S) 2 コネクター、ヒト 4-1 B B リガンド] に示されているように、ヒト I g G 1 F c ノブ又はホール鎖

10

20

30

40

50

のC末端にインフレームでサブクロニングした。

【0511】

TnCに特異的な結合物質であるクローン18D4をコードする重鎖及び軽鎖DNA配列の可変領域を、ヒトIgG1のホールの定常重鎖又は定常軽鎖のどちらかと共にインフレームでサブクロニングした。

【0512】

Fcガンマ受容体との結合を妨げるために、Pro329Gly、Leu234Ala及びLeu235Ala突然変異をノブ及びホール重鎖の定常領域に導入した（国際特許出願公開国際公開第2012/130831号に記載されている）。

【0513】

Y349C/T366S/L368A/Y407V突然変異を含有する抗TnC huIgG1 Fcホール鎖と、S354C/T366W突然変異を含有するhuIgG1ノブ鎖と、抗TnC軽鎖との組合せにより、集合トリマー4-1BBリガンドと1つのTnC結合Fabとを含むヘテロ二量体の生成が可能になる（図19）。

【0514】

表46及び表47は、一価のTnC標的（18D4）スプリットトリマーC末端4-1BBリガンド（71-248）Fc(kih)融合体（コンストラクト6.13）のcDNA及びアミノ酸配列をそれぞれ示す。

10

20

30

40

50

表 46:一価の TnC 標的(18D4)スプリットリマーC 末端 4-1BB リガンド(71-248)Fc(kih)融合体(コンストラクト 6.13)の塩基対配列。

配列番号	コンストラクト	配列
配列番号 122	抗 TnC(18D4)Fc ホールダイマー リガンド(71- 248)鎖	表 40 参照
配列番号 132	Fc ノブモノマー リガンド(71- 248)鎖	GACAAACTCACACATGCCACCGTGCCCAGCACCTG AAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCT GAGGTCACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAAG ACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAG CAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCCTCA CCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTA CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCC ATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCC GAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCTGCAGAGA TGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTG GTCAAGGGCTTCTACCCAGCGATATCGCCGTGGAGT GGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAACCTACAAGAC CACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTC CTGTACTCCAACTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGC AGCAGGGCAACGTGTTCACTGCAGCGTGATGCACGA GGCCCTGCACAACCACTACACCAGAAGTCCCTGAGC CTGAGCCCCGGCGGAGGCGGCGGAAGCGAGGAGGA GGATCCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCTGATGATC CTGCCGACTGCTGGACCTGCGGCAGGGAATGTTTGC CCAGCTGGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGC CCCCTGTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCG TGCTACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGACAC CAAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTAC GTGTTCTTTCAGCTGGAAGTGGGAGAGTGGTGGCCG GCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCT GCAGCCTCTGAGATCTGCTGCTGGCGCCGCTGCTCTG GCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCAGCGAGG CCCGGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCT GCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTG CACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGA CACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAAGAGTGAC CCCCGAGATTCCTGCCGGGCTC
配列番号 73	抗 TnC(18D4) 軽鎖	表 20 参照

10

20

30

40

50

表 47:一価の TnC 標的(18D4)スプリットトリマーC 末端 4-1BB リガンド(71-248)Fc(kih)融合体(コンストラクト 6.13)のアミノ酸配列。

配列番号	コンストラクト	配列
配列番号 124	抗 TnC(18D4)Fc ホールダイマー リガンド(71- 248)鎖	表 41 参照
配列番号 133	Fc ノブモノマー リガンド(71- 248)鎖	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGG GGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGP LSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYYVFF QLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVD LPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARAR HAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGL
配列番号 77	抗 TnC(18D4) 軽鎖	表 21 参照

【 0 5 1 5 】

表 4 8 及び表 4 9 は、一価の T n C 標 的 (1 8 D 4) ス プ リ ッ ト ト リ マ ー C 末 端 4 - 1 B B リ ガ ン ド (7 1 - 2 4 8) F c (k i h) 融 合 体 (コ ン ス ト ラ ク ト 6 . 1 4) の c D N A 及 び ア ミ ノ 酸 配 列 を そ れ そ れ 示 す。

10

20

30

40

50

表 48:一価の TnC 標的(18D4)スプリットリマーC 末端 4-1BB リガンド(71-248)Fc(kih)融合体(コンストラクト 6.14)の塩基対配列。

配列番号	コンストラクト	配列
配列番号 134	抗 TnC(18D4)Fc ホールモノマー リガンド(71- 248)鎖	CAGGTGCAATTGGTGCAAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGA AGCCTGGGTGCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCCTC CGGAGGCACATTCAGCAGCTACGCTATAAGCTGGGTG CGACAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGA GGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACCTACGCAC AGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATTAAGTGCAGACAA ATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTG AGATCTGAGGACACCGCCGTGATTACTGTGCGAAAG GTAACCTCTACGGTGGTCTGGACTACTGGGGCCAAGG GACCACCGTGACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGC CCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCA CCAGCGGCGGCACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCA AGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAA CAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGACACCTTCCCC GCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATAGCCTGAGCA GCGTGGTCAACCGTGCTTCTAGCAGCCTGGGGACCCA GACCTACATCTGCAACGTGAACCAAGCCCAAGCAAC ACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGCG ACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGA AGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTCCCCCA AAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGACCCCTG AGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGA CCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTG GAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGC AGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCGTCTCAC CGTCTGCACACGAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC AAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCA TCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCG AGAACCACAGGTGTGCACCCCTGCCCCCATCCCGGAT GAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCTCTCGTGCGCAG TCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACC ACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC TCGTGAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAG GCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCC TGCTCCGGGTGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAG GATCCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCTGATGATCC TGCCGGAAGTGTGGACCTGCGGCAGGGAATGTTTGCC CAGCTGGTGGCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCC CCCTGTCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGT GTCACTGACAGGCGGCTGAGCTACAAAGAGGACACC AAAGAACTGGTGGTGGCCAAGGCGGCGTGTACTACG TGTTCTTTGAGCTGGAAGTGGGAGAGTGGTGGCCGG CGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTGCCCCGTCATCTG CAGCCTCTGAGATCTGCTGCTGGCGCCGCTGCTCTGG

10

20

30

40

		CACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCAGCGAGGC CCGGAATAGCGCATTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCTG CACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTGC ACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGAC ACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTCAGAGTGACC CCCGAGATTCTGCCGGGCTC
配列番号 135	Fc ノブダイマー リガンド(71- 248)鎖	GACAAAACACACATGCCCACCGTGCCACGACCTG AAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGACCCCT GAGGTCACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAAG ACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAG CAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCA CCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTA CAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCGGCGCCCC ATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCC GAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCTGCAGAGA TGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGTGGTGTCTG GTCAAGGGCTTCTACCCAGCGATATCGCCGTGGAGT GGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAACATAAGAC CACCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTC CTGTACTCCAACTGACCGTGGACAAGAGCCGGTGGC AGCAGGGCAACGTGTTAGCTGCAGCGTGATGCACGA GGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGC CTGAGCCCCGCGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGA GGATCCAGAGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCTGATGATC CTGCCGGAAGTGTGGACCTGCGGCAGGGAATGTTTGC CCAGCTGGTGGCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGC CCCCTGTCTGTTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCG TGCACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGACAC CAAAGAAGTGGTGGTGGCCAAAGGCCGGCGTGTACTAC GTGTTCTTTAGCTGGAAGTGGGAGAGTGGTGGCCG GCGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTTGGCCCTGCATCT GCAGCCTCTGAGATCTGCTGCTGGCGCCGCTGCTCTG GCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCAGCGAGG CCCGGAATAGCGCATTGGGTTTCAAGGCAGGCTGCT GCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCATCTG CACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAGCTGA CACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTTCAGAGTGAC CCCCGAGATTCCAGCAGGCCTGGGAGGCGGCGGATC TGGCGGCGGAGGATCTAGAGAAGGACCCGAGCTGTCC CCCGACGATCCCGCTGGGCTGCTGGATCTGAGACAGG GCATGTTTCGCTCAGCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGCT GATTGACGACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCAGGG CTGGCAGGGGTGTCCCTGACTGGGGGACTGTCCTACA AAGAAGATACAAAAGAACTGGTGGTGGCTAAAGCTGG GGTGTACTATGTGTTTTTCAGCTGGAAGTGAAGCGG GTGGTGGCTGGGAGGGGCTCAGGATCTGTGTCCCTGG CTCTGCATCTGCAGCCACTGCGCTCTGCAGCAGGGGC TGCAGCACTGGCCCTGACTGTGGACCTGCCCCAGCT TCTTCCGAGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCCAAG GACGCCTGCTGCATCTGAGCGCCGACAGCGCCTGG

10

20

30

40

		GAGTGCATCTGCATACTGAAGCCAGAGCCCGGCATGC TTGGCAGCTGACTCAGGGGGCAACTGTGCTGGGACTG TTTCGCGTGACACCTGAGATCCCAGCCGGGCTC
配列番号 73	抗 TnC(18D4) 軽鎖	表 20 参照

表 49:一価の TnC 標的(18D4)スプリットトリマーC 末端 4-1BB リガンド(71-248)Fc(kih)融合体(コンストラクト 6.14)のアミノ酸配列。

配列番号	コンストラクト	配列
配列番号 136	抗 TnC(18D4)Fc ホールモノマー リガンド(71- 248)鎖	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWVRQ APGQGLEWMGGIIPFGTANYAQKFQGRVTITADKSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCAKGNFYGGLDYWGQGTTVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTL PPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGDSFLLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSREGPELSPDD PAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVS LTGGLSYKEDTKELVVAAGVYYYVFFQLELRRVVAGEGS GSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAF GFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVL GLFRVTPEIPAGL
配列番号 137	Fc ノブダイマー リガンド(71- 248)鎖	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFLLVSKLTVDKSR WQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGG GGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGP LSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYYYVFF QLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVD LPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARAR HAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLGGGGSGGGGSREG PELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSD PGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYYYVFFQLELRR VVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASS EARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLT QGATVLGLFRVTPEIPAGL
配列番号 77	抗 TnC(18D4) 軽鎖	表 21 参照

【 0 5 1 6 】

コントロール分子としての非標的指向性スプリットトリマー 4-1BB リガンド Fc 融合体及びヒト IgG の調製

抗 TnC 結合物質 (VH-VL) が、DP47 と称される抗原と結合しない生殖系列コントロールに置き換えたことのみが異なる、TnC 標的コンストラクト 6.1 のコントロール分子 (コントロール B と名付けた)、6.3 のコントロール分子 (コントロール C と名付けた) 及び 6.5 のコントロール分子 (コントロール E と名付けた) を、上述の通り調製した。

【 0 5 1 7 】

表 5 0 は、クロスした C H - C L と荷電残基を含有する、一価 D P 4 7 - 非標的指向性スプリットトリマー 4 - 1 B B リガンド (7 1 - 2 5 4) F c (k i h) 融合体、コントロール B の c D N A 及びアミノ酸配列をそれぞれ示す。

【 0 5 1 8 】

表 5 1 は、二価 D P 4 7 - 非標的指向性スプリットトリマー 4 - 1 B B リガンド (7 1 - 2 5 4) F c (k i h) 融合体、コントロール C の c D N A 及びアミノ酸配列をそれぞれ示す。

【 0 5 1 9 】

表 5 2 は、C H - C L クロスと荷電残基を含有する、一価 D P 4 7 - 非標的指向性スプリットトリマー 4 - 1 B B リガンド (7 1 - 2 4 8) F c (k i h) 融合体、コントロール D の c D N A 及びアミノ酸配列をそれぞれ示す。

【 0 5 2 0 】

表 5 3 は、C H - C L クロス内に荷電残基を有さない一価 D P 4 7 - 非標的指向性スプリットトリマー 4 - 1 B B リガンド (7 1 - 2 4 8) F c (k i h) 融合体、コントロール E の c D N A 及びアミノ酸配列をそれぞれ示す。

10

20

30

40

50

表 50:CH-CL クロスを有し、荷電残基を有する、一価 DP47 非標的指向性スプリットリマーヒト 4-1BB リガンド(71-254)Fc(kih)融合体(コントロール B)の cDNA 及びアミノ酸配列。*荷電残基

配列番号	説明	配列
配列番号 98	ヌクレオチド配列 ダイマー-hu 4-1BBL(71-254)-CL* Fc ノブ鎖	上記参照
配列番号 99	ヌクレオチド配列 モノマー-hu 4-1BBL(71-254)-CH1*	上記参照
配列番号 138	ヌクレオチド配列 DP47 Fc ホール鎖	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTA CAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC TCCGGATTCACCTTTAGCAGTTATGCCATGAGCTGG GTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGT CTCAGCTATTAAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTA CGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCAG AGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAGATGAA CAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTG TGCGAAAGGCAGCGGATTTGACTACTGGGGCCAAGG AACCTGGTCACCGTCTCGAGTGCTAGCACCAAGGG CCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAG CACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGT CAAGGACTACTTCCCGAACCCTGACGGTGTCTGTG GAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTT CCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCT CAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGG CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAA ATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCCGTGCC AGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCT CTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTC CCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGT GAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTA CGTGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAA GCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGT GGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCT GAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA AGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTGCAC CCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCA GGTCAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATCC CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA GCCGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGCT GGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCGTGAGCAAGCT

10

20

30

40

		CACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACG TCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA ACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGG GTAAA
配列番号 139	ヌクレオチド配 列 DP47 軽鎖	GAAATCGTGTTAACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCT TTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCTTGACAGG GCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGG TACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTC ATCTATGGAGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCA GACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCCGGGACAGACTTC ACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTT GCAGTGATTACTGTACAGCAGTATGGTAGCTACCG CTGACGTTCCGGCCAGGGGACCAAAGTGGAAATCAAA CGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCG CCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCT GTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAG GCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAA TCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGAC AGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTG ACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTC TACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCG CCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT
配列番号 102	ダイマー-hu 4- 1BBL(71-254)- CL* Fc ノブ鎖	表 31 参照
配列番号 103	モノマー-hu 4- 1BBL(71-254)- CH1*	表 31 参照
配列番号 140	DP47 Fc ホー ル鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWV RQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGSFGDYWGQGLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQP REPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
配列番号 141	DP47 軽鎖	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGQGTKEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHK VYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

10

20

30

40

50

表 51:二価 DP47 非標的指向性スプリットリマーヒト 4-1BB リガンド(71-254)Fc(kih)融合体(コントロール C)の cDNA 及びアミノ酸配列。

配列番号	説明	配列
配列番号 142	ヌクレオチド配列 ダイマー ^{hu} 4-1BB(71-254)に融合されている DP47 Fc ホール鎖	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTA CAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC TCCGGATTACCTTTAGCAGTTATGCCATGAGCTGG GTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGT CTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTA CGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAG AGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAGATGAA CAGCCTGAGAGCCGAGGACACGCCCGTATATTA CTG TGCGAAAGGCAGCGGATTTGACTACTGGGGCCAAGG AACCCTGGTCACCGTCTCGAGTGCTAGCACCAAGGG CCCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCCCAGCAGCAAGAG CACCAGCGCGGCACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGG TCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCT GGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGACACCT TCCCCGCCGTGCTGCAGAGTTCTGGCCTGTATAGCC TGAGCAGCGTGGTCACCGTGCCTTCTAGCAGCCTGG GCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGC CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCA AGAGCTGCGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCC CAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCC TCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCT CCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACG TGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGT ACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA AGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTG TGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGC TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACA AAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCA AAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTGCA CCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACC AGGTGAGCCTCTCGTGCGCAGTCAAAGGCTTCTATC CCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG CAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCCTCCCGTG CTGGA CTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTGAGCAAG CTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC AACCCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCG GGTGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCAG AGAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGG ACTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCT GGTGGCCCAGAACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCT GTCCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTC ACTGACAGGCGGCCTGAGCTACAAAGAGGACACCAA AGA ACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGT GTTCTTTCAGCTGGA ACTGCGGAGAGTGGTGGCCGG CGAAGGATCTGGCTCTGTGTCTTGGCCCTGCATCT GCAGCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCT

10

20

30

40

		GGCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCTCCGA GGCCCCGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCT GCTGCACCTGTCTGCCGGCCAGAGGCTGGGAGTGCA TCTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCA GCTGACACAGGGCGCTACAGTGCTGGGCCTGTTGAG AGTGACCCCCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCC AAGAAGCGAAGGCGGAGGCGGATCTGGCGGCGGAG GATCTAGAGAGGGACCCGAAGTGTCCCTGACGATC CAGCCGGGCTGCTGGATCTGAGACAGGGAATGTTG CCCAGCTGGTGGCTCAGAATGTGCTGCTGATTGACG GACCTCTGAGCTGGTACTCCGACCCAGGGCTGGCAG GGGTGTCCCTGACTGGGGGACTGTCTACAAAGAAG ATACAAAAGAAGTGGTGGTGGCTAAAGCTGGGGTGT ACTATGTGTTTTTTCAGCTGGAAGTGAAGCGGGTGG TGGCTGGGGAGGGCTCAGGATCTGTGTCCCTGGCTC TGCATCTGCAGCCACTGCGCTCTGCTGCTGGCGCAG CTGCACTGGCTCTGACTGTGGACCTGCCACCAAGCCT CTAGCGAGGCCAGAAACAGCGCCTTCGGGTTCCAAG GACGCCTGCTGCATCTGAGCGCCGACAGCGCCTGG GAGTGCATCTGCATACTGAAGCCAGAGCCCGGCATG CTTGGCAGCTGACTCAGGGGGCAACTGTGCTGGGAC TGTTTCGCGTGACACCTGAGATCCCTGCCGGAAGTGC CAAGCCCTAGATCAGAA
配列番号 143	ヌクレオチド配 列 モノマーhu 4-1BB(71-254) に融合されてい る DP47 Fc ノブ 鎖	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGTA CAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC TCCGGATTACCTTTAGCAGTTATGCCATGAGCTGG GTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGT CTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTA CGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCAG AGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAGATGAA CAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTG TGCGAAAGGCAGCGGATTTGACTACTGGGGCCAAGG AACCCTGGTCACCGTCTCGAGTGCTAGCACCAAGGG CCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAG CACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGT CAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTG GAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGACACACCTT CCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCT CAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGG CACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCC CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAA ATCTTGTGACAAAACCTACACATGCCACCGTGCCC AGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCCT CTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTC CCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGT GAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTA CGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAA GCCGCGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGT GGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAAGGACTGGCT GAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA AGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAA

10

20

30

40

		AGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACAC CCTGCCCCCCTGCAGAGATGAGCTGACCAAGAACCA GGTGTCCCTGTGGTGTCTGGTCAAGGGCTTCTACCC CAGCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCA GCCTGAGAACAACCTACAAGACCACCCCCCTGTGCT GGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACTCCAACT GACCGTGGACAAGAGCCGGTGGCAGCAGGGCAACG TGTTCACTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACA ACCACTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCG GCGGAGGCGGCGGAAGCGGAGGAGGAGGATCCAGA GAGGGCCCTGAGCTGAGCCCCGATGATCCTGCTGGA CTGCTGGACCTGCGGCAGGGCATGTTTGCTCAGCTG GTGGCCCAAGACGTGCTGCTGATCGATGGCCCCCTG TCCTGGTACAGCGATCCTGGACTGGCTGGCGTGTCA CTGACAGGCGGCTGAGCTACAAAGAGGACACCAAA GAACTGGTGGTGGCCAAGGCCGGCGTGTACTACGTG TTCTTTCAGCTGGAAGTGCAGAGAGTGGTGGCCGGC GAAGGATCTGGCTCTGTGTCTCTGGCCCTGCATCTG CAGCCTCTGAGAAGCGCTGCTGGCGCTGCAGCTCTG GCACTGACAGTGGATCTGCCTCCTGCCAGCTCCGAG GCCCCGAATAGCGCATTTGGGTTTCAAGGCAGGCTG CTGCACCTGTCTGCCGCCAGAGGCTGGGAGTGCAT CTGCACACAGAGGCCAGGGCTAGACACGCCTGGCAG CTGACACAGGGCGCTACAGTGTGGGCTGTTTCTCAGA GTGACCCCCGAGATTCCAGCCGGCCTGCCTTCTCCA AGAAGCGAA
配列番号 139	ヌクレオチド配列 DP47 軽鎖	表 50 参照
配列番号 144	ダイマー-hu 4-1BB(71-254)に融合されている DP47 Fc ホール鎖	EVQLLESGGGLVQPGLSLRLSCAASGFTFSSYAMSWV RQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRADTAVYYCAKSGFDYWQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQP REPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGS REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLS WYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYVFFQ LELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTV LPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARA RHAWQLTQGATVGLGLFRVTPEIPAGLPSPRSEGGGGSG GGGREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLID GPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAAGVYV VFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALA LTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHT

10

20

30

40

		EARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE
配列番号 145	モノマーhu 4-1BB(71-254)に融合されているDP47 Fc ノブ鎖	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWV RQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGT TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGSGGGG SREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPL SWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFF QLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALT DLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEAR ARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSRSE
配列番号 141	DP47 軽鎖	表 50 参照

10

20

30

40

50

表 52:CH-CL クロスを有し、荷電残基を有する、一価 DP47 非標的指向性スプリットリ
マーヒト 4-1BB リガンド(71-248)Fc(kih)融合体(コントロール D)の cDNA 及びアミノ酸配
列。*荷電残基

配列番号	説明	配列
配列番号 114	ヌクレオチド配 列 ダイマー-hu 4-1BBL(71- 248)-CL* Fc ノ ブ鎖	表 36 参照
配列番号 115	ヌクレオチド配 列 モノマー-hu 4-1BBL(71- 248)-CH1*	表 36 参照
配列番号 138	ヌクレオチド配 列 DP47 Fc ホ ール鎖	表 50 参照
配列番号 139	ヌクレオチド配 列 DP47 軽鎖	表 50 参照
配列番号 116	ダイマー-hu 4- 1BBL(71-248)- CL* Fc ノブ鎖	表 37 参照
配列番号 117	モノマー-hu 4- 1BBL(71-248)- CH1*	表 37 参照
配列番号 140	DP47 Fc ホー ル鎖	表 50 参照
配列番号 141	DP47 軽鎖	表 50 参照

10

20

30

40

50

表 53:CH-CL クロスを有し、荷電残基を有さない、一価 DP47 非標的指向性スプリットリマーヒト 4-1BB リガンド(71-248)Fc(kih)融合体(コントロール E)の cDNA 及びアミノ酸配列。

配列番号	説明	配列
配列番号 118	ヌクレオチド配列 ダイマー-hu 4-1BBL(71-248)-CL Fc ノブ鎖	表 38 参照
配列番号 119	ヌクレオチド配列 モノマー-hu 4-1BBL(71-248)-CH1	表 38 参照
配列番号 138	ヌクレオチド配列 DP47 Fc ホール鎖	表 50 参照
配列番号 139	ヌクレオチド配列 DP47 軽鎖	表 50 参照
配列番号 120	ダイマー-hu 4-1BBL(71-248)-CL Fc ノブ鎖	表 39 参照
配列番号 121	モノマー-hu 4-1BBL(71-248)-CH1	表 39 参照
配列番号 140	DP47 Fc ホール鎖	表 50 参照
配列番号 141	DP47 軽鎖	表 50 参照

【 0 5 2 1 】

PGLALA を含有する 2 つのコントロールヒト IgG1 分子を調製した。表 5 4 は、生殖系列コントロール DP47 huIgG1 PGLALA (コントロール F) の cDNA 及びアミノ酸を示す。表 5 5 は、抗 TnC (18D4) 重鎖 (huIgG1 PGLALA、すなわちコントロール L) の cDNA 及びアミノ酸を示す。

10

20

30

40

表 54 は、生殖系列コントロール DP47 huIgG1 PGLALA(コントロール F)の cDNA 及びアミノ酸配列

配列番号	説明	配列
配列番号 146	ヌクレオチド配列 DP47 重鎖 (huIgG1 PGLALA)	GAGGTGCAATTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGTA CAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC TCCGGATTACACCTTTAGCAGTTATGCCATGAGCTGGG TCCGCCAGGCTCCAGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCT CAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGC AGACTCCGTGAAGGGCCGTTTACCATCTCCAGAGA CAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAGATGAACAG CCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGC GAAAGGCAGCGGATTTGACTACTGGGGCCAAGGAAC CCTGGTCACCGTCTCGAGTGCTAGCACCAAGGGCCC ATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCAC CTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAA GGACTACTTCCCGAACCAGGTGACGGTGTCTGTGAA CTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACACCTTCCC GGCTGTCCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAG CAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCAC CCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAG CAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATC TTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGC ACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAGTCTTCTCCTT CCCCCAAACCCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCG GACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAG CCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCC GCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGT CAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAA TGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGC CCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGC CAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCT GCCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGT CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAG CGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCC GGAGAACAATAACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGA CTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCAC CGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTT CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCA CTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA A
配列番号 139	DP47 軽鎖	表 50 参照
配列番号 147	DP47 重鎖 (huIgG1 PGLALA)	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR QAPGKGLEWVSAISGSGSTYYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGSQFDYWGQGLTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA

10

20

30

40

		PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
配列番号 141	DP47 軽鎖	表 50 参照

10

20

30

40

50

表 55:抗 TnC(18D4)重鎖(huIgG1 PGLALA)(コントロール L)の cDNA 及びアミノ酸配列

配列番号	説明	配列
配列番号 148	ヌクレオチド配列 抗 TnC(18D4)重鎖 (huIgG1 PGLALA)	CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAG AAGCCTGGGTCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCC TCCGGAGGCACATTTCAGCAGCTACGCTATAAGCTGG GTGCGACAGGCCCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGGATG GGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACCTACG CACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTCACCATTAAGTGCAG ACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCA GCCTGAGATCTGAGGACACCGCCGTGTATTACTGTG CGAAAGGTAACCTTCTACGGTGGTCTGGACTACTGGG GCCAAGGGACCAACCGTGACCGTCTCCTCAGCTAGCA CCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCT CCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCT GCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGG TGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGC ACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCT ACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCA GCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATC ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTG AGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCAC CGTGCCAGCACCTGAAGCTGCAGGGGGACCGTCAG TCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCAT GATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGT GGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAA CTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTA CCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGA CTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC CAACAAAGCCCTCGGCGCCCCCATCGAGAAAACCAT CTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGT GTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAA GAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTT CTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAA TGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCC CGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAG CAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGG GAACGTCTTCTCATGTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT CCGGGTAAA
配列番号 73	ヌクレオチド配列 18D4 軽鎖	表 20 参照
配列番号 149	抗 TnC(18D4)重鎖(huIgG1 PGLALA)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVR QAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADKSTS TAYMELSSLRSEDTAVYYCAKGNFYGGLDYWGQTTVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE

10

20

30

40

		PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
配列番号 77	18D4 軽鎖	表 21 参照

10

【0522】

実施例 9

Tn C 標的スプリットトリマー C 末端 4-1 BB リガンド Fc 融合体及びそれらのコントロールの産生

MPSV プロモーターからインサートの発現を駆動するプラスミドベクターであって、CDS の 3' 末端に位置する合成ポリ A 配列を含有するプラスミドベクターに、標的指向性及び非標的指向性トリマー 4-1 BB リガンド C 末端 Fc (kih) 融合体配列をクローニングした。加えて、このベクターは、プラスミドのエピソーム維持のための EBVO r i P 配列を含有する。スプリットトリマー 4-1 BB リガンド Fc (kih) 融合分子は、ポリエチレンイミンを使用して哺乳動物発現ベクターを HEK293-EBNA 細胞にコトランスフェクトすることにより産生させた。対応する発現ベクターを細胞にトランスフェクトした。コンストラクト 6.1、6.2、6.4、6.6 並びにそのコントロール B、D 及び E については、1:1:1:1 比 (「ベクター Fc ホール鎖」:「ベクター PD1 軽鎖」:「ベクター Fc ノブ鎖」:「ベクター 4-1 BBL 軽鎖」) で。コンストラクト 6.3、6.6、6.11、6.12、6.13、6.14 及びそのコントロール C については、1:1:1 比 (「ベクター Fc ホール鎖」:「ベクター Fc ノブ鎖」:「ベクター抗 PD1 軽鎖」) で。アッセイにおいてコントロールとして使用したヒト IgG は、二重特異性コンストラクトの場合と同様に産生させた (トランスフェクションには、軽鎖用のベクター及び重鎖用のベクターのみを 1:1 比で使用した)。

20

30

【0523】

500 mL 震盪フラスコ内での産生のために、3 億個の HEK293 EBNA 細胞をトランスフェクションの 24 時間前に播種した。トランスフェクションのために、細胞を 10 分間、210 x g で遠心分離し、上清を 20 mL の予温 CD-CHO 培地に置換した。発現ベクター (200 µg の全 DNA) を 20 mL CD-CHO 培地と混合した。540 µL PEI の添加後、溶液を 15 秒間ボルテックスし、10 分間、室温でインキュベートした。その後、細胞を DNA/PEI 溶液と混合し、500 mL 震盪フラスコに移し、5% CO₂ 雰囲気有するインキュベーターの中で、3 時間、37°C でインキュベートした。インキュベーション後、6 mM L-グルタミン、5 g/L の PEPSOY、及び 1.2 mM バルプロ酸を補充した 160 mL の Excell 培地を添加し、細胞を 24 時間培養した。トランスフェクションの翌日、12% フィードを添加した。7 日間の培養後、上清を 30-40 分間の少なくとも 400 x g で遠心分離により収集した。溶液を滅菌濾過し (0.22 µm フィルター)、0.01% (w/v) の最終濃度になるようにアジ化ナトリウムを補充し、4°C で保持した。

40

【0524】

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、続いてサイズ排除クロマトグラフィーにより、分泌タンパク質を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、リン酸ナトリウム (20 mM)、クエン酸ナトリウム (20 mM) バッファー (pH 7.5) で平衡させた Mab Select Sure カラム (CV

50

= 5 – 15 mL、GE Healthcareからの樹脂) に上清を負荷した。同バッファの少なくとも6カラム容積で洗浄することにより、非結合タンパク質を除去した。20 mM クエン酸ナトリウム、100 mM 塩化ナトリウム、100 mM グリシンバッファ (pH 2.5) での、線形勾配 (20 CV) 又は段階的溶出 (8 CV) のどちらかを使用して、結合タンパク質を溶出した。線形勾配には、さらなる4カラム容積の段階的溶出を適用した。

【0525】

収集した画分のpHを1/10 (v/v) の0.5 M リン酸ナトリウム、pH 8.0の添加により調整した。タンパク質を濃縮し、その後、20 mM ヒスチジン、140 mM 塩化ナトリウム、pH 6.0の0.01% (v/v) Tween 20溶液で平衡させたHiLoad Superdex 200カラム (GE Healthcare) に負荷した。

【0526】

アミノ酸配列に基づいて算出したモル吸光係数を使用して、280 nmで光学濃度 (OD) を測定することにより、タンパク質濃度を決定した。標的指向性トリマー4-1BBリガンドFc(kih)融合体の純度及び分子量は、還元剤 (5 mM 1,4-ジチオトレイトール) の存在及び非存在下でCoomassie Simple Blue (商標) Safe Stain (Invitrogen USA) で染色するSDS-PAGE分析、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、25 mM K₂HPO₄、125 mM NaCl、200 mM L-アルギニン・一塩酸塩、0.02% (w/v) NaN₃、pH 6.7のランニングバッファ中、25℃で平衡させたTSK gel G3000 SW XL分析用サイズ排除カラム (東ソー株式会社) を使用して分析した。

【0527】

表56は、TnC標的スプリットトリマー4-1BBリガンドFc(kih)融合体の収量及び最終モノマー含有量をまとめたものである。

表 56:TnC 標的スプリットトリマー4-1BB リガンド Fc(kih)融合体の生化学分析

コンストラクト	モノマー [%] (SEC)	収量 [mg/l]
CH-CL クロスを含有し、荷電残基を有さない、一価の TnC 標的(18D4)スプリットトリマー4-1BB リガンド(71-248)Fc(kih)融合体 (コンストラクト 6.5)	91.5	3.7
二価の TnC 標的(18D4)スプリットトリマー4-1BB リガンド (71-248)Fc(kih)融合体 (コンストラクト 6.6)	97	9.9

【0528】

実施例 10

TnC 標的 4-1BB スプリットトリマーリガンド Fc 融合抗原結合分子の表面プラズモン共鳴による同時結合

ヒト 4-1BB Fc(kih) 及びヒト TnC に同時に結合する能力を表面プラズモン共鳴 (SPR) により評定した。全ての SPR 実験は、ランニングバッファとして HBSE (0.01 M HEPES pH 7.4、0.15 M NaCl、3 mM EDTA、0.005% Surfactant P20、Biacore、Freiburg/

Germany) を用いて、25℃で、Biacore T200で行った。

【0529】

ビオチン化TnC-抗原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した。500レゾナンスユニット(RU)以下の固定化レベルを使用した。TnC標的4-1BBリガンドFc(kih)融合分子を100nMの濃度範囲で、30μL/分の流量で90秒にわたってフローセルに通し、解離をゼロ秒に設定した。ヒト4-1BB avi Hisを第2の被分析物として1000nMの濃度で、30μL/分の流量で90秒にわたってフローセルに注入した(図20)。解離を120秒間モニターした。タンパク質を固定化しなかった参照フローセルにおいて得た応答を減算することにより、バルク屈折率差を補正した。全ての二重特異性コンストラクトは、ヒト4-1BB及びヒトTnCに同時に結合することができた(図20)。

10

【0530】

実施例11

一価のTnC標的4-1BBスプリットトリマーリガンドFc融合抗原結合分子の表面プラズモン共鳴によるアフィニティー判定

TnC標的4-1BBリガンドトリマー含有Fc(kih)融合抗原結合分子の組換えTnCへの結合を表面プラズモン共鳴(SPR)によって評定した。全てのSPR実験は、ランニングバッファーとしてHBS-EP(0.01M HEPES pH7.4、0.15M NaCl、3mM EDTA、0.005 % Surfactant P20、Biacore、Freiburg/Germany)を用いて、25℃で、Biacore T100で行った。

20

【0531】

アフィニティー測定のために、標準的アミンカップリングキット(GE Healthcare)を使用して、pH5.0で、約500レゾナンスユニット(RU)の組換えヒト、カニクイザル及びマウスTnCのCM5チップ上への直接カップリングを行った。TnC標的4-1BBリガンドトリマー含有Fc(kih)融合抗原結合分子の希釈系列(0.05-50nM)に両方のフローセル上を30μL/分で120秒間通過させて、結合相を記録した。解離相を180秒間モニターし、試料溶液からHBS-EPに切り替えることにより誘発した。60秒の10mM グリシン-HCl pH2.1の二重注入を使用して、毎サイクル後にチップ表面を再生させた。参照フローセル1で得た応答を減算することにより、バルク屈折率差を補正した。TnC標的4-1BBリガンドトリマー含有Fc(kih)融合抗原結合分子と組換えTnCとの間の相互作用のついでのアフィニティー定数は、Biaevalソフトウェア(GE Healthcare)を使用する1:1ラングミュア結合曲線へのフィッティングにより速度定数から導いた(表57)。

30

40

50

表 57:1:1 ラングミュア結合へのフィッティング及びアフィニティー定数

リガンド	被分析物	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
CH-CL 交差を含有し、荷電残基を有さない、一価の TnC 標的(18D4) スプリットトリマー4-1BB リガンド (71-248)Fc(kih)融合体 (コンストラクト 6.5)	ヒト TnC	2.9E+06	2.0E-03	6.8E-10
	カニクイザル TnC	1.5E+06	6.9E-03	4.7E-09
	マウス TnC	5.9E+05	2.9E-03	5.0E-09
二価の TnC 標的(18D4)スプリットトリマー4-1BB リガンド(71-248)Fc(kih)融合体 (コンストラクト 6.6)	ヒト TnC	5.3E+06	1.1E-04	2.1E-11
	カニクイザル TnC	4.1E+06	1.1E-04	2.7E-11
	マウス TnC	1.2E+06	3.0E-04	2.5E-10

【0532】

実施例 12

TnC 標的 4-1BB スプリットトリマーリガンドFc 融合抗原結合分子の機能的特徴づけ

A) TnC 標的スプリットトリマー4-1BB リガンドの新鮮及び活性化ヒトPBMC に対する結合

バフィーコートをチューリッヒ献血センター (Zurich blood donation center) から入手した。新鮮抹消血単核細胞 (PBMC) を単離するために、バフィーコートを同体積のDPBS (Gibco by Life Technologies、カタログ番号14190326) で希釈した。50mL ポリプロピレン製遠心分離管 (TPP、カタログ番号91050) に、15mL Histopaque 1077 (SIGMA Life Science、カタログ番号10771、密度1.077g/mLに調整された、ポリスクロース及びジアトリゾ酸ナトリウム) を供給し、希釈バフィーコート含有量をHistopaque 1077の上に積層した。管を30分間、450xgで遠心分離した。次いで、PBMCを接触面から収集し、DPBSで3回洗浄し、10% (v/v) ウシ胎児血清 (FBS、原産地米国、PAN biotech、P30-2009、ロットP150307GI、ガンマ線照射によりマイコプラズマ不含、35分間56℃で熱不活化済み) と、1% (v/v) GlutaMAX I (GIBCO by Life Technologies、カタログ番号35050038) と、1mM ピルビン酸ナトリウム (SIGMA、カタログ番号S8636) と、1% (v/v) MEM非必須アミノ酸 (SIGMA、カタログ番号M7145) と、50μM β-メルカプトエタノール (SIGMA、M3148) とを補充した、RPMI 1640培地 (Gibco by Life Technology、カタログ番号42401-042) からなるT細胞培地に再懸濁させた。

【0533】

PBMCを単離後直ちに使用した (新鮮ヒトPBMCに対する結合)、又はPBMCを刺激してT細胞の細胞表面での4-1BB発現を誘導した (活性化ヒトPBMCに対する結合)。ヒトT細胞上での4-1BB発現増加を誘導するために、10% PBSと、1mM ピルビン酸ナトリウム (SIGMA、カタログ番号S8636) と、1% GlutaMAX-Iと、1% MEM-非必須アミノ酸溶液 (SIGMA、カタログ番号M7145) と、50μM ベーターメルカプトエタノール (SIGMA、M3148) と、200 U/mLのプロロイキン (Novartis Pharma Schweiz AG) と、

2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の PHA-L (SIGMA、カタログ番号 L2769) とを補充した RPMI 1640 中で 3 日間培養して、細胞 1×10^6 個/ mL の最終濃度にした。予備活性化後、細胞を回収し、10% PBS と、1 mM ピルビン酸ナトリウム (SIGMA、カタログ番号 S8636) と、1% GlutaMAX-I と、1% MEM-非必須アミノ酸溶液 (SIGMA、カタログ番号 M7145) と、50 μM ベータ-メルカプトエタノール (SIGMA、M3148) とを補充した PRMI 1640 培地に再懸濁させ、一晚、4°C で、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の抗ヒト CD3 (クローン OKT3、マウス IgG2a、BioLegend、カタログ番号 317315) 及び 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 6 ウェル組織培養プレート (TTP、カタログ番号 92006) に播種した。細胞を 3 日間、37°C 及び 5% CO₂ でさらにインキュベートした。

【0534】

結合アッセイのために、 0.1×10^6 個の新鮮又は活性化 PBMC を、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。プレートを 5 分、350 x g で、4°C で遠心分離し、上清を廃棄した。その後、1:5000 希釈した固定可能な生存細胞識別色素 eF660 (eBioscience、カタログ番号 65-0864-18) を含有する 100 μL /ウェルの DPBS 中で 30 分間、4°C で、暗所で細胞を染色した。細胞を 200 μL の冷 DPBS バッファーで 1 回洗浄した。次に、滴定濃度のコンストラクト 6.5 及びコンストラクト 6.6 並びにコントロールとしてコントロール E、コントロール F 及びコントロール L を含有する、50 μL /ウェルの 4°C 冷 FACS バッファー (2% FBS、5 mM EDTA pH8 (Amresco、カタログ番後 E177) 及び 7.5 mM アジ化ナトリウム (Sigma-Aldrich、カタログ番号 S2002) を補充した DPBS) を添加し、細胞を 60 分間、4°C でインキュベートし、200 μL /ウェルの 4°C FACS バッファーで 3 回洗浄した。0.67 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の抗ヒト CD45-AF488 (クローン HI30、マウス IgG1k、BioLegend、カタログ番号 304019) と、0.33 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の抗ヒト CD8a-BV510 (クローン SK1、マウス IgG1k、BioLegend、カタログ番号 344732) と、0.23 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の抗ヒト CD4-BV421 (クローン OKT4、マウス IgG2b κ 、BioLegend、カタログ番号 317434) と、0.67 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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) と、0.67 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の抗ヒト CD19-PE/Cy7 (クローン HIB19、マウス IgG1k、BioLegend、カタログ番号 302216) と、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の、PE がコンジュゲートされた 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 109 116 098) とを含有する 50 μL /ウェルの 4°C 冷 FACS バッファーに細胞をさらに再懸濁させ、30 分間、4°C でインキュベートした。細胞を 200 μL /ウェルの 4°C FACS バッファーで 2 回洗浄し、次いで、1%ホルムアルデヒド (Sigma、HT501320-9.5 L) を補充した DPBS で固定した。細胞を 100 μL /ウェルの FACS バッファーに再懸濁させ、MACS Quant Analyzer 10 (Miltenyi Biotech) を使用して捕捉した。FlowJo V10 (FlowJo, LLC) 及び GraphPad Prism 6.04 (GraphPad Software, Inc) を使用してデータを解析した。

【0535】

生存 CD45+CD3+CD4+T 細胞、CD45+CD3+CD8+T 細胞、CD45+CD3+CD4neg Cd8neg $\gamma\delta$ T 細胞及び CD45+CD3neg CD19+B 細胞にゲートを設定し、PE がコンジュゲートされた AffiniPure 抗ヒト IgG IgG Fcy 断片特異的ヤギ F(ab')₂ 断片の蛍光強度の幾何平均を、滴定濃度の、TnC 標的 4-1BB スプリットリマーリガンドFc 融合抗原結合分子又は DP47 非標的指向性 4-1BB スプリットリマーリガンドFc 融合抗原結合分子及

10

20

30

40

50

びそれらのコントロールに対してプロットした。図 2 1 に示されているように、試験した、T n C 標的 4-1 B B スプリットトリマーリガンド F c 融合抗原結合分子の何れも、又はそれらの対照の何れも、単離したての P B M C の細胞と結合しない。

【 0 5 3 6 】

図 2 2 に示されているように、活性化後、生存 C D 4 5 + C D 3 + C D 4 + T 細胞、C D 4 5 + C D 3 + C D 8 + T 細胞、及び C D 4 5 + C D 3 + C D 4 n e g C d 8 n e g $\gamma \delta$ T 細胞は、ヒト 4-1 B B を発現する。抗 T n C h u I g G 1 P 3 2 9 G L A L A コントロール L 及び D P 4 7 h u I g G 1 P 3 2 9 G L A L A コントロール F は、活性化ヒト P B M C と結合しなかった。コンストラクト 6. 5、コンストラクト 6. 6 及びコントロール E のような、4-1 B B スプリットトリマーリガンドを含有する全ての分子は、活性化 C D 8 + T 細胞、C D 4 + T 細胞及び $\gamma \delta$ T 細胞と結合する。表 5 8 に、活性化ヒト P B M C への結合曲線の E C 5 0 値をまとめる。

表 58: 活性化ヒト P B M C への結合曲線の E C 5 0 値

	コントロール E	コンストラクト 6.5	コンストラクト 6.6
活性化 C D 4 T 細胞に対する E C 5 0 [nM]	0.23	1.11	8.56
活性化 C D 8 T 細胞に対する E C 5 0 [nM]	0.26	1.28	1.29
活性化 $\gamma \delta$ T 細胞に対する E C 5 0 [nM]	0.23	1.79	0.80

【 0 5 3 7 】

B) ヒト T n C 発現腫瘍細胞の結合

T n C 発現腫瘍細胞に関する結合アッセイには、ヒト膠芽細胞腫細胞株 U 8 7 - M G (A T C C H T B - 1 4) を使用した。

【 0 5 3 8 】

冷 D P B S (G i b c o b y L i f e T e c h n o l o g i e s 、カタログ番号 1 4 1 9 0 3 2 6) に再懸濁させた 0.2×10^6 個の腫瘍細胞を丸底浮遊細胞 9 6 ウェルプレート (G r e i n e r B i o - O n e 、 c e l l s t a r 、カタログ番号 6 5 0 1 8 5) の各ウェルに添加した。細胞を $200 \mu\text{L}$ の D P B S で 1 回洗浄した。1 : 5 0 0 希釈した固定可能な生存細胞識別色素 e F l u o r 6 6 0 (e B i o s c i e n c e 、カタログ番号 6 5 - 0 8 6 4 - 1 8) を含有する $100 \mu\text{L}$ / ウェルの 4°C 冷 D P B S バッファーに細胞を再懸濁させ、プレートを 3 0 分間、 4°C でインキュベートした。細胞を $200 \mu\text{L}$ / ウェルの 4°C 冷 D P B S バッファーで 1 回洗浄し、一連の濃度の、T n C 標的 4-1 B B スプリットトリマーリガンド F c 融合抗原結合分子又はそれらのコントロールを含有する、 $50 \mu\text{L}$ / ウェルの 4°C 冷 F A C S バッファー (2 % F B S と、5 m M E D T A p H 8 (A m r e s c o 、カタログ番号 E 1 7 7) と 7 . 5 m M アジ化ナトリウム (S i g m a - A l d r i c h S 2 0 0 2) とを補充した D P B S) に再懸濁させ、その後、1 時間、 4°C でインキュベートした。入念な洗浄後、 $5 \mu\text{g} / \text{mL}$ の、P E がコンジュゲートされた A f f i n i P u r e 抗ヒト I g G F (a b ') 2 断片特異的ヤギ F (a b ') 2 断片 (J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h 、カタログ番号 1 0 9 1 1 6 0 9 8) を含有する、 $50 \mu\text{L}$ / ウェルの 4°C 冷 F A C S バッファーで、3 0 分間、 4°C でさらに細胞を染色した。細胞を $200 \mu\text{L}$ / ウェルの 4°C F A C S バッファーで 2 回洗浄し、1 % ホルムアルデヒド (S i g m a 、 H T 5 0 1 3 2 0 - 9 . 5 L) を含有する $50 \mu\text{L}$ / ウェルの D P B S で細胞を固定した。細胞を $100 \mu\text{L}$ / ウェルの F A C S バッファーに再懸濁させ、M A C S Q u a n t A n a l y z e r 1 0 (M i l t e n y i B i o t e c h) を使用して捕捉した。F l o w J o V 1 0 (F l o w J o , L L C) 及び G r a p h P a d P r i s m 6 . 0 4 (G r a p h P a d S o f

ware, Inc) を使用してデータを解析した。

【0539】

生存腫瘍細胞にゲートを設定し、PEがコンジュゲートされた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、滴定濃度の、TnC標的4-1BBスプリットリマーリガンドFc融合抗原結合分子又はそれらのコントロールに対してプロットした。図23に示されているように、TnCを標的としないコントロールE及びコントロールFは腫瘍細胞と結合しなかった一方で、TnC標的分子であるコンストラクト6.5、コンストラクト6.6及びコントロールLだけがTnC発現U87-MGと結合した。表59に曲線のEC50値を収載する。

表 59: TnC 発現腫瘍細胞への結合曲線の EC50 値

	コンストラクト 6.5	コンストラクト 6.6	コントロール L
U87MG に対する EC50[nM]	73.99	12.75	4.24

【0540】

C) 生物活性: ヒト4-1BB発現HeLaレポーター細胞株のNF-κB活性化
ヒト4-1BB及びNF-κB-ルシフェラーゼを発現するHeLa細胞の生成
CMV-プロモーターの制御下にあるヒト4-1BBの配列(Uniprot寄託Q07011)とピューロマイシン耐性遺伝子とを含有する発現ベクターpETR10829に基づくプラスミドを用いて、ヒトパピローマウイルス18誘発子宮頸がん細胞株HeLa(ATCC CCL-2)に形質導入した。10%ウシ胎児血清(FBS、GIBCO by Life Technologies、カタログ番号16000-044、ロット番号941273、ガンマ線照射によりマイコプラズマ不含、35分間56℃で熱不活化済み)と、1%GlutaMAX-I(GIBCO by Life Technologies、カタログ番号35050-038)と、3μg/mLのピューロマイシン(InvivoGen、カタログ番号ant-pr)とを補充した、DMEM培地(Gibco by Life Technology、カタログ番号42430-025)で、細胞を培養した。4-1BB形質導入HeLa細胞をフローサイトメトリーにより4-1BB発現について試験した: 0.1μg PerCP/Cy5.5がコンジュゲートされた抗ヒト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コントロール(PerCP/Cy5.5がコンジュゲートされたマウスIgG1κアイソタイプコントロール抗体クローンMOPC 21、BioLegendカタログ番号400150)を含有する、100μL FACSバッファ(2%FBSと、5mM EDTA pH8(Amrresco、カタログ番号E177)と7.5mM アジ化ナトリウム(Sigma-Aldrich、カタログ番号S2002)とを補充したDPBA)に、0.2×10⁶個の生存細胞を再懸濁させ、30分間4℃でインキュベートした。細胞をFACSバッファで2回洗浄し、0.06μgのDAPI(Santa Cruz Biotec、カタログ番号Sc-3598)を含有する300μLのFACSバッファに再懸濁させ、5レーザー搭載LSR-Fortessa(BD Bioscience、DIVA software)を使用して捕捉した。次のように、限界希釈を行って単一クローンを生成した: ヒト4-1BB形質導入HeLa細胞を培地に再懸濁させて細胞10、5及び2.5個/mLの濃度にし、200μLの細胞懸濁液を丸底組織培養処理96ウェルプレート(6プレート/細胞濃度、TPPカタログ番号92697)に移した。単一クローンを回収し、増殖させ、4-1BB発現について上で説明したように試験した。4-1BBの最高発現を有したクローン(クローン5)を、NFκB-ルシフェラーゼ発現ベクター5495p Translucent HygBを用いるその後のトランスフェクションに選択した。このベクターは、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細胞を培養して70%コンフルエンスにした。50μg (40μL) の直線化 (制限酵素AseI及びSalI) 5495p Tranlucent HygB発現ベクターを、滅菌0.4 cm Gene Pulser/MicroPulser Cuvette (Biorad、カタログ番号165-2081) に添加した。400μLのサプリメント不含DMEM中の 2.5×10^6 個のヒト4-1BB HeLaクローン5を添加し、注意深くプラスミド溶液と混合した。Gene Pulser Xcell total system (Biorad、カタログ番号165 2660) を、次の設定のもとで使用して細胞のトランスフェクションを行った：指数パルス、キャパシタンス500μF、電圧160V、抵抗∞。パルス後直ちに、トランスフェクト細胞を、10%FBSと1%Glutaamax I (Gibco by Life Technologies、カタログ番号35050 038) とを補充した15mL 37℃温DMEM培地 (Gibco by Life Technologies カatalog番号42430-025) が入っている組織培養フラスコ75cm² (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) 及び200μg/mLのハイグロマイシンB (Roche、カタログ番号10843555001) を含有する培地を添加した。生存細胞を増殖させ、上で説明したように限界希釈を行って、単一クローンを生成した。クローンを4-1BB発現については上で説明したように、NFκB-ルシフェラーゼ活性については次のように試験した。クローンを選択培地に採取し、Cell Counter 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、細胞 0.33×10^6 個/mLの細胞密度に設定し、翌日、この細胞懸濁液の150μLを、蓋付きの滅菌白色96ウェル平底組織培養プレート (Greiner Bio-One、カタログ番号655083) に移して、及びコントロールとして通常の96ウェル平底組織培養プレート (TPPカタログ番号92096) に移して、生存及び細胞密度について試験した。細胞を37℃及び5%CO₂で一晩インキュベートした。翌日、異なる濃度の組換えヒト腫瘍壊死因子アルファ (rhTNFα、PeproTech、カタログ番号300 01A) を含有する培地50μLを、結果として100、50、25、12.5、6.25及び0ng rhTNFα/ウェルの最終濃度になるように、96ウェルプレートの各ウェルに添加した。細胞を6時間、37℃及び5%CO₂でインキュベートし、その後、200μL/ウェルのDPBSで3回洗浄した。レポーター溶解バッファー (Promega、カタログ番号E3971) を各ウェルの添加し (30μL)、プレートを-20℃で一晩保管した。翌日、凍結細胞プレート及び検出バッファー (Luciferase 1000 Assay System、Promega、カタログ番号E4550) を解凍して室温にした。100μLの検出バッファーを各ウェルに添加し、SpectraMax M5/M5eマイクロプレートリーダー及びSoftMax Pro Software (Molecular Devices) を使用してできる限り迅速にプレートを測定した。コントロール (rhTNFαの添加なし) より上の測定URLをルシフェラーゼ活性とみなした。最高ルシフェラーゼ活性及びかなりのレベルの4-1BB発現を呈示するNFκB-luc-4-1BB-HeLaクローン26を、さらなる使用に選択した。

【0541】

TnCを発現するU87MG及びSkK-mel5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

接着ヒト膠芽細胞腫細胞株U87MG (ATCC HTB-14) をDPBS (Gibco by Life Technologies、カタログ番号14190 326) で洗浄し、酵素不含、PBSベースの細胞解離バッファー (Gibco by Life Technologies、カタログ番号13151-014) で10分間、37℃で処理した。その後、細胞を回収し、細胞計数器Vi-cell xr 2.03を使用して計数

10

20

30

40

50

した。10%ウシ胎児血清（FBS、原産地米国、PAN biotech、P30-2009、ロットP150307GI、ガンマ線照射によりマイコプラズマ不含、35分間56℃で熱不活化済み）と1%GlutaMAX-I（GIBCO by Life Technologies、カタログ番号35050-038）とを補充したDMEM培地（Gibco by Life Technologies カタログ番号42430-025）に細胞を再懸濁させて細胞 1×10^6 個/ウェルにし、100 μ Lを蓋付き滅菌白色96ウェル平底組織培養プレート（Greiner Bio-One、カタログ番号655083）のウェルに添加した。ネガティブコントロールについては、100 μ Lの培地を添加した。プレートを37℃及び5%CO₂で一晩インキュベートした。

【0542】

翌日、異なる滴定のスプリットトリマー4-1BBリガンド含有融合タンパク質分子及びそれらのコントロールを添加した。その後、NF κ B-luc-4-1BB-HeLaクローン26細胞をDPBSで洗浄し、0.05%トリプシンEDTA（Gibco by Life Technologies カタログ番号25300-054）で5分間、37℃で処理した。細胞を回収し、10%ウシ胎児血清と1%GlutaMAX-Iとを補充したDMEM培地に再懸濁させた。細胞計数器Vi-cell xr 2.03（Beckman Coulter、カタログ番号731050）を使用して細胞を計数し、細胞 0.4×10^6 個/mLの細胞密度に設定した。この細胞懸濁液の50 μ L（細胞 2×10^4 個）を各ウェルに移した。プレートを6時間、37℃及び5%CO₂でインキュベートした。白色平底96ウェルプレートを200 μ L/ウェルのDPBSで3回洗浄した。40 μ Lの調製したレポーター溶解バッファー（Promega、カタログ番号E3971）を各ウェルに添加し、プレートを-20℃で一晩保管した。翌日、凍結プレート及び検出バッファー（Luciferase 1000 Assay System、Promega、カタログ番号E4550）を解凍して室温にした。100 μ Lの検出バッファーを各ウェルに添加し、SpectraMax M5/M5eマイクロプレートリーダー及びSoftMax Pro Software（Molecular Devices）を次の設定で使用して、できる限り迅速にプレートを測定した：ルシフェラーゼ（RLU）について、積分時間500ms、フィルターなし、全波長収集、トップリディング。

表 60:NF κ B 活性化誘導ルシフェラーゼ活性曲線のEC50 値

	コンストラクト 6.5	コンストラクト 6.6
U87MG EC50 [nM]	0.33	0.70

【0543】

D) TnC発現腫瘍細胞の存在下でのヒトPBMCの活性化アッセイ

TnC結合媒介架橋のために、TnC発現接着ヒト膠芽細胞腫細胞株U87-MG（ATCC HTB-14）を使用した。U87MG細胞をDPBS（Gibco by Life Technologies、カタログ番号14190-326）で洗浄し、酵素不含、PBSベースの細胞解離バッファー（Gibco by Life Technologies、カタログ番号13151-014）で10分間、37℃で処理した。細胞を回収し、10%ウシ胎児血清（FBS、原産地米国、PAN biotech、P30-2009、ロットP150307GI、ガンマ線照射によりマイコプラズマ不含、35分間56℃で熱不活化済み）と、1%L-GlutaMAX-I（GIBCO by Life Technologies、カタログ番号35050-038）と、1mM ピルビン酸ナトリウム（SIGMA-Aldrich、カタログ番号S8636）と、1%MEM-非必須アミノ酸溶液（SIGMA-Aldrich、カタログ番号M7145）と、50 μ M β -メルカプトエタノール（Sigma-Aldrich、Cyt.-No. M3

148) とを補充した RPMI 1640 (GIBCO by Life Technologies、カタログ番号 42401-042) からなる T 細胞培地に再懸濁させ、50 Gy を照射した (X-Ray Irradiator RS 2000、Rad source)。50 μ L T 細胞培地中の 2×10^4 個の U87MG 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) に播種した。異なる滴定濃度のコンストラクト 6.5 及び 6.6 又は適合するコントロール (コントロール F、コントロール L 及びコントロール E) を含有する、50 μ L の T 細胞培地を添加した。40 nM CFDA-SE (SIGMA-Aldrich、カタログ番号 21888-25MG-F) を含有する 37°C 温 DPBS 中でヒト PBMC を 15 分間、37°C で標識した。CFSE への標識づけを FBS の添加により停止させ、PBMC を 2 回洗浄し、T 細胞培地に再懸濁させて、細胞 1.5×10^6 個/mL の最終濃度にした。この PBMC 細胞溶液の 50 μ L を各ウェルに播種した、例えば、 7.5×10^4 個の CFSE 標識 PBMC を各ウェルに添加した。最後に、8 nM アゴニスト抗ヒト CD3 ヒト IgG1 クローン V9 を含有する T 細胞培地の保存液を調製し、50 μ L/ウェルを各ウェルに添加して、2 nM 抗ヒト CD3 ヒト IgG1 クローン V9 の最終濃度を得た。

【0544】

プレートを 4 日間、37°C でインキュベートした。細胞を DPBS で洗浄し、100 μ L/ウェルの DPBS 含有 1:1000 希釈 LIVE/DEAD Fixable Aqua 死細胞染色キット (Molecular Probes by Life Technology、カタログ番号 L34957) で 30 分間、4°C で染色した。細胞を 200 μ L/ウェルの DPBS で 1 回洗浄し、0.1 μ g/mL の、PerCP-Cy5.5 がコンジュゲートされた抗ヒト CD137 マウス IgG1 κ (クローン 4B4-1、BioLegend、カタログ番号 309814)、0.1 μ g/mL の、PE/Cy7 がコンジュゲートされた抗ヒト PD-1 マウス IgG1 κ (クローン EH12.2H7、BioLegend、カタログ番号 329918)、0.03 μ g/mL の、APC がコンジュゲートされた抗ヒト CD25 マウス IgG1 κ (クローン BC96、BioLegend、カタログ番号 302610)、0.06 μ g/mL の、APC/Cy7 がコンジュゲートされた抗ヒト CD8 マウス IgG1 κ (クローン RPA-T8、BioLegend、カタログ番号 3301016)、BV421 がコンジュゲートされた抗ヒト CD4 マウス IgG1 κ (クローン RPA-T4、BioLegend、カタログ番号 300532) を含有する、50 μ L FACS バッファー (2% FBS と、5 mM EDTA pH 8 (Amresco、カタログ番号 E177) と 7.5 mM アジ化ナトリウム (Sigma-Aldrich S2002)) で、30 分間、4°C で染色した。細胞を 200 μ L/ウェルの DPBS で 2 回洗浄し、50 μ L/ウェルの調製した FACS Permeability/Fix バッファー (eBioscience カタログ番号 00-5123) と共に 30 分間、4°C でインキュベートした。細胞を 200 μ L/ウェルの DPBS で 2 回洗浄し、PE がコンジュゲートされた 1:250 希釈抗ヒト グランザイム B マウス IgG1 κ (クローン GB11、ロット 4269803、BD Pharmingen、カタログ番号 561142) を補充した 50 μ L/ウェルの調製した FACS Permeability/Fix バッファー (eBioscience カタログ番号 00-8333) に再懸濁させ、1 時間、4°C でインキュベートした。プレートを 200 μ L/ウェルの DPBS で 2 回洗浄し、1% ホルムアルデヒド (Sigma、HT501320-9.5L) を含有する DPBS で 15 分間、細胞を固定した。細胞を 100 μ L/ウェルの FACS バッファーに再懸濁させ、MACS Quant Analyzer 10 (Miltenyi Biotec) を使用して捕捉した。FlowJo V10 (FlowJo, LLC) 及び GraphPad Prism 6.04 (GraphPad Software, Inc) を使用してデータを解析した。

【0545】

図 27 に示されているように、TnC 標的スプリットトリマー 4-1 BB 融合分子コンストラクト 6.6 及びより少ない程度にコンストラクト 6.5 のみが、CD8⁺ T 細胞上

10

20

30

40

50

でのCD25及び4-1BBの濃度依存性表面発現増加を誘導した。ネガティブコントロール分子（コントロールF、コントロールL及びコントロールE）は、活性化マーカーのこの発現増加を誘導しなかった。相関するEC50値を表61に収載する。

表 61:活性化 CD8+T 細胞上での CD25 及び 4-1BB(CD137)の発現増加の EC50 値

	コンストラクト 6.5	コンストラクト 6.6
% CD25+ CD8 EC50 [nM]	0.13	0.29
% CD137 (4-1BB)+ CD8 EC50 [nM]	0.36	0.13

10

【 0 5 4 6 】

引用

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.

20

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

Berg et al. (2007), Enforced covalent trimerization increases the activity of the TNF ligand family members TRAIL and CD95L. *Cell Death and Differentiation* 14(12), 2021-2034.

Bodmer J., Schneider P. and 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., and Schwarz, H. (2001). CD137 expression in tumor vessel walls. High correlation with malignant tumors. *Am J Clin Pathol* 115, 543-549.

30

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

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

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

40

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

Diehl, L., van Mierlo, G.J., den Boer, A.T., van der Voort, E., Fransen, M., van Bostelen, L., Krimpenfort, P., Melief, C.J., Mittler, R., Toes, R.E., and Offringa, R. (2002). In vivo triggering through 4-1BB enables Th-independent priming

50

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-Garcia, J.L., Morales-Kastresana, A., Romero-Trevejo, J.L., Ochoa, M.C., Hervás-Stubbs, S., et al. (2010). Treatment with anti-CD137 mAbs causes intense accumulations of liver T cells without selective antitumor immunotherapeutic effects in this organ. *Cancer Immunol Immunother* 59, 1223-1233.

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

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

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

Hornig, N., Kermer, V., Frey, K., Diebolder, P., Kontermann, R.E., Mueller, D. (2012). Combination of a bispecific antibody and costimulatory antibody-ligand fusion proteins for targeted cancer immunotherapy. *J. Immunother.* 35, 418-429.

Ju, S.A., Cheon, S.H., Park, S.M., Tam, N.Q., Kim, Y.M., An, W.G., and Kim, B.S. (2008). Eradication of established renal cell carcinoma by a combination of 5-fluorouracil and anti-4-1BB monoclonal antibody in mice. *Int J Cancer* 122, 2784-2790.

Kienzle, G., and von Kempis, J. (2000). CD137 (ILA/4-1BB), expressed by primary human monocytes, induces monocyte activation and apoptosis of B lymphocytes. *Int Immunol* 12, 73-82.

Kim, D.H., Chang, W.S., Lee, Y.S., Lee, K.A., Kim, Y.K., Kwon, B.S., and Kang, C.Y. (2008). 4-1BB engagement costimulates NKT cell activation and exacerbates NKT cell ligand-induced airway hyperresponsiveness and inflammation. *J Immunol* 180, 2062-2068.

Kim, Y.H., Choi, B.K., Oh, H.S., Kang, W.J., Mittler, R.S., and Kwon, B.S. (2009). Mechanisms involved in synergistic anticancer effects of anti-4-1BB and cyclophosphamide therapy. *Mol Cancer Ther* 8, 469-478.

Kwon, B.S., and Weissman, S.M. (1989). cDNA sequences of two inducible T-cell genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 1963-1967.

Lee, H., Park, H.J., Sohn, H.J., Kim, J.M., and Kim, S.J. (2011). Combinatorial therapy for liver metastatic colon cancer: dendritic cell vaccine and low-dose agonistic anti-4-1BB antibody co-stimulatory signal. *J Surg Res* 169, e43-50.

Levitsky, V., de Campos-Lima, P.O., Frisan, T., and Masucci, M.G. (1998). The clonal composition of a peptide-specific oligoclonal CTL repertoire selected in response to persistent EBV infection is stable over time. *J Immunol* 161, 594-601.

Li, F., and Ravetch, J.V. (2011). Inhibitory Fcγ receptor engagement drives adjuvant and anti-tumor activities of agonistic CD40 antibodies. *Science* 333, 1030-1034.

Lin, W., Voskens, C.J., Zhang, X., Schindler, D.G., Wood, A., Burch, E., Wei, Y., Chen, L., Tian, G., Tamada, K., et al. (2008). Fc-dependent expression of CD137 on human NK cells: insights into "agonistic" effects of anti-CD137 monoclonal antibodies. *Blood* 112, 699-707.

Melero, I., Johnston, J.V., Shufford, W.W., Mittler, R.S., and Chen, L. (1998). NK1.1 cells express 4-1BB (CDw137) costimulatory molecule and are required for tumor immunity elicited by anti-4-1BB monoclonal antibodies. *Cell Immunol* 190, 167-172.

Melero, I., Shufford, W.W., Newby, S.A., Aruffo, A., Ledbetter, J.A., Hellstrom, K.E., Mittler, R.S., and Chen, L. (1997). Monoclonal antibodies against the 4-1BB T-cell activation molecule eradicate established tumors. *Nat Med* 3, 682-685.

Merchant, A.M., Zhu, Z., Yuan, J.Q., Goddard, A., Adams, C.W., Presta, L.G., and Carter, P. (1998). An efficient route to human bispecific IgG. *Nat Biotechnol* 16, 677-681.

Morales-Kastresana, A., Sanmamed, M.F., Rodriguez, I., Palazon, A., Martinez-Forero, I., Labiano, S., Hervas-Stubbs, S., Sangro, B., Ochoa, C., Rouzaut, A., et al. (2013). Combined immunostimulatory monoclonal antibodies extend survival in an aggressive transgenic hepatocellular carcinoma mouse model. *Clin Cancer Res* 19, 6151-6162.

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., et al. (2009). In vivo depletion of DC impairs the anti-tumor effect of agonistic anti-CD137 mAb. *Eur J Immunol* 39, 2424-2436.

Narazaki, H., Zhu, Y., Luo, L., Zhu, G., and Chen, L. (2010). CD137 agonist antibody prevents cancer recurrence: contribution of CD137 on both hematopoietic and nonhematopoietic cells. *Blood* 115, 1941-1948.

Nishimoto, H., Lee, S.W., Hong, H., Potter, K.G., Maeda-Yamamoto, M., Kinoshita, T., Kawakami, Y., Mittler, R.S., Kwon, B.S., Ware, C.F., et al. (2005). Costimulation of mast cells by 4-1BB, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, with the high-affinity IgE receptor. *Blood* 106, 4241-4248.

Olofsson, P.S., Soderstrom, L.A., Wagsater, D., Sheikine, Y., Ocaya, P., Lang, F., Rabu, C., Chen, L., Rudling, M., Aukrust, P., et al. (2008). CD137 is expressed in human atherosclerosis and promotes development of plaque inflammation in hypercholesterolemic mice. *Circulation* 117, 1292-1301.

Palazon, A., Teijeira, A., Martinez-Forero, I., Hervas-Stubbs, S., Roncal, C., Penuelas, I., Dubrot, J., Morales-Kastresana, A., Perez-Gracia, J.L., Ochoa, M.C., et al. (2011). Agonist anti-CD137 mAb act on tumor endothelial cells to enhance recruitment of activated T lymphocytes. *Cancer Res* 71, 801-811.

Schwarz, H., Valbracht, J., Tuckwell, J., von Kempis, J., and Lotz, M. (1995). ILA, the human 4-1BB homologue, is inducible in lymphoid and other cell lineages. *Blood* 85, 1043-1052.

Shao, Z., and Schwarz, H. (2011). CD137 ligand, a member of the tumor necrosis factor family, regulates immune responses via reverse signal transduction. *J Leukoc Biol* 89, 21-29.

Shi, W., and Siemann, D.W. (2006). Augmented antitumor effects of radiation therapy by 4-1BB antibody (BMS-469492) treatment. *Anticancer Res* 26, 3445-3453.

Simeone, E., and Ascierto, P.A. (2012). Immunomodulating antibodies in the treatment of metastatic melanoma: the experience with anti-CTLA-4, anti-CD137, and anti-PD1. *J Immunotoxicol* 9, 241-247.

Snell, L.M., Lin, G.H., McPherson, A.J., Moraes, T.J., and Watts, T.H. (2011). T

10

20

30

40

50

-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., and Smyth, M.J. (2011). Anti-ErbB-2 mAb therapy requires type I and II interferons and synergizes with anti-PD-1 or anti-CD137 mAb therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 7142-7147.

Teng, M.W., Sharkey, J., McLaughlin, N.M., Exley, M.A., and Smyth, M.J. (2009). CD137-based combination therapy eradicates established tumors in mice. *J Immunol* 183, 1911-1920.

von Kempis, J., Schwarz, H., and Lotz, M. (1997). Differentiation-dependent and stimulus-specific expression of ILA, the human 4-1BB-homologue, in cells of mesenchymal origin. *Osteoarthritis Cartilage* 5, 394-406.

Wei, H., Zhao, L., Li, W., Fan, K., Qian, W., Hou, S., Wang, H., Dai, M., Hellstrom, I., Hellstrom, K.E., and Guo, Y. (2013). Combinatorial PD-1 blockade and CD137 activation has therapeutic efficacy in murine cancer models and synergizes with cisplatin. *PLoS One* 8, e84927.

Wilcox, R.A., Chapoval, A.I., Gorski, K.S., Otsuji, M., Shin, T., Flies, D.B., Tamada, K., Mittler, R.S., Tsuchiya, H., Pardoll, D.M., and Chen, L. (2002). Cutting edge: Expression of functional CD137 receptor by dendritic cells. *J Immunol* 168, 4262-4267.

Wilcox, R.A., Tamada, K., Flies, D.B., Zhu, G., Chapoval, A.I., Blazar, B.R., Kast, W.M., and Chen, L. (2004). Ligation of CD137 receptor prevents and reverses established anergy of CD8+ cytolytic T lymphocytes in vivo. *Blood* 103, 177-184.

Wyzgol, A., Muller, N., Fick, A., Munkel, S., Grigoleit, G.U., Pfizenmaier, K., and Wajant, H. (2009). Trimer Stabilization, Oligomerization, and Antibody-Mediated Cell Surface Immobilization Improve the Activity of Soluble Trimers of CD27L, CD40L, 41BBL, and Glucocorticoid-Induced TNF Receptor Ligand. *J Immunol* 183, 1851-1861

Zhang, N., Sadun, R.E., Arias, R.S., Flanagan, M.L., Sachsman, S.M., Nien, Y., Krawli, L.A., Hu, P., Epstein, A.L. (2007). Targeted and untargeted CD137L fusion proteins for the immunotherapy of experimental solid tumors. *Clin. Cancer Res.* 13, 2758-2767.

Zhang, X., Voskens, C.J., Sallin, M., Maniar, A., Montes, C.L., Zhang, Y., Lin, W., Li, G., Burch, E., Tan, M., et al. (2010). CD137 promotes proliferation and survival of human B cells. *J Immunol* 184, 787-795.

10

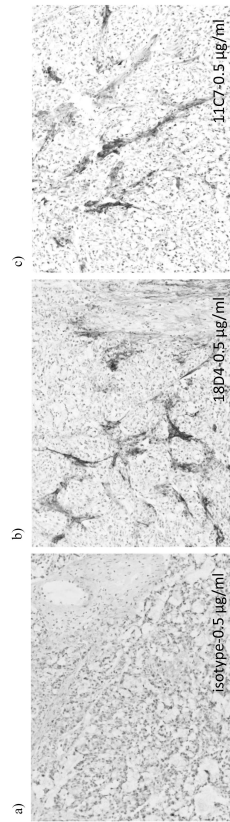
20

30

40

50

【図面】
【図 1】



【図 2】

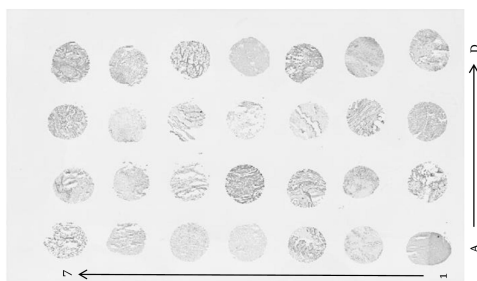
位置	組織型	病理診断	アイソタイプコントロール (0.5 μg/ml)シグナル
A1	脳	正常	-
B1	脳腫瘍	脳腫瘍関連	-
A2	乳房	正常	-
B2	乳癌腫瘍	浸潤性乳管がん	-
A3	結腸	正常	-
B3	結腸腫瘍	腸がん	-
A4	骨格筋	正常	-
B4	骨格筋腫瘍	横紋筋肉腫	-
A5	腎臓	正常	-
B5	腎臓腫瘍	腎細胞がん	-
A6	肝臓	正常	-
B6	肝臓腫瘍	肝細胞がん	-
A7	肺	正常	-
B7	肺腫瘍	扁平上皮がん	-
C1	脾臓	正常	-
D1	脾臓腫瘍	腸がん	-
C2	脾臓腫瘍	正常	-
D2	脾臓腫瘍	腸がん	-
C3	皮膚	正常	-
D3	皮膚腫瘍	悪性メランーマ	-
C4	小腸	正常	-
D4	小腸腫瘍	悪性肉腫腫	-
C5	胃	正常	-
D5	胃腫瘍	腸がん・胃癌	-
C6	脾臓	正常	-
D6	脾臓腫瘍	脾臓性血管肉腫がん	-
C7	子宮	正常	-
D7	子宮腫瘍	腸がん	-

10

20

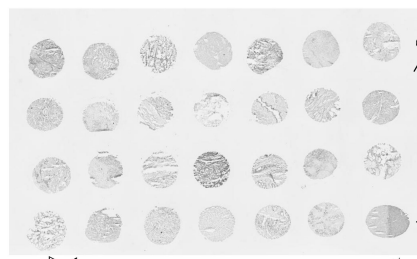
【図 3】

位置	組織型	病理診断	チキシンクロン-18D4 (0.5 μg/ml)シグナル
A1	脳	正常	-
B1	脳腫瘍	脳腫瘍関連	++
A2	乳房	正常	-
B2	乳癌腫瘍	浸潤性乳管がん	++
A3	結腸	正常	+
B3	結腸腫瘍	腸がん	++
A4	骨格筋	正常	-
B4	骨格筋腫瘍	横紋筋肉腫	+++ (1/2+血管周囲)
A5	腎臓	正常	-
B5	腎臓腫瘍	腎細胞がん	++
A6	肝臓	正常	-
B6	肝臓腫瘍	肝細胞がん	++
A7	肺	正常	-
B7	肺腫瘍	扁平上皮がん	+++ (1/2+血管周囲)
C1	脾臓	正常	-
D1	脾臓腫瘍	腸がん	++
C2	脾臓腫瘍	腸がん	++
D2	脾臓腫瘍	腸がん	++
C3	皮膚	正常	-
D3	皮膚腫瘍	悪性メランーマ	+++ (1/2+血管周囲)
C4	小腸	正常	-
D4	小腸腫瘍	悪性肉腫腫	+++ (1/2+血管周囲)
C5	胃	正常	-
D5	胃腫瘍	腸がん・胃癌	++
C6	脾臓	正常	-
D6	脾臓腫瘍	脾臓性血管肉腫がん	++
C7	子宮	正常	-
D7	子宮腫瘍	腸がん	+++



【図 4】

位置	組織型	病理診断	チキシンクロン-11C7 (0.5 μg/ml)シグナル
A1	脳	正常	-
B1	脳腫瘍	脳腫瘍関連	-
A2	乳房	正常	-
B2	乳癌腫瘍	浸潤性乳管がん	++
A3	結腸	正常	+
B3	結腸腫瘍	腸がん	++
A4	骨格筋	正常	-
B4	骨格筋腫瘍	横紋筋肉腫	+++
A5	腎臓	正常	-
B5	腎臓腫瘍	腎細胞がん	++
A6	肝臓	正常	-
B6	肝臓腫瘍	肝細胞がん	++
A7	肺	正常	-
B7	肺腫瘍	扁平上皮がん	+
C1	脾臓	正常	-
D1	脾臓腫瘍	腸がん	++
C2	脾臓腫瘍	腸がん	++
D2	脾臓腫瘍	腸がん	++
C3	皮膚	正常	-
D3	皮膚腫瘍	悪性メランーマ	+++
C4	小腸	正常	-
D4	小腸腫瘍	悪性肉腫腫	+++
C5	胃	正常	-
D5	胃腫瘍	腸がん・胃癌	++
C6	脾臓	正常	-
D6	脾臓腫瘍	脾臓性血管肉腫がん	++
C7	子宮	正常	-
D7	子宮腫瘍	腸がん	+++

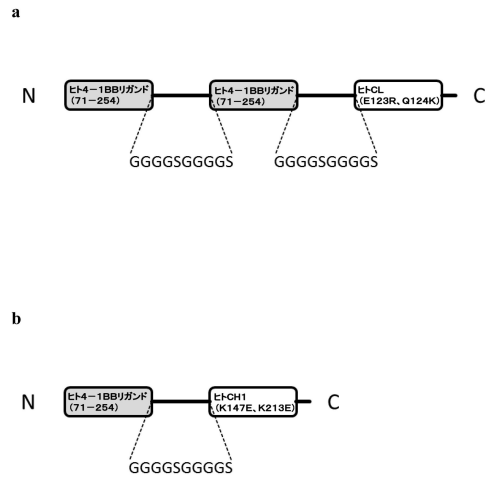


30

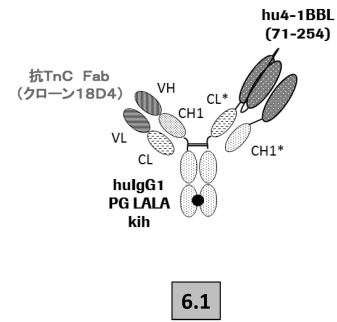
40

50

【図 5】

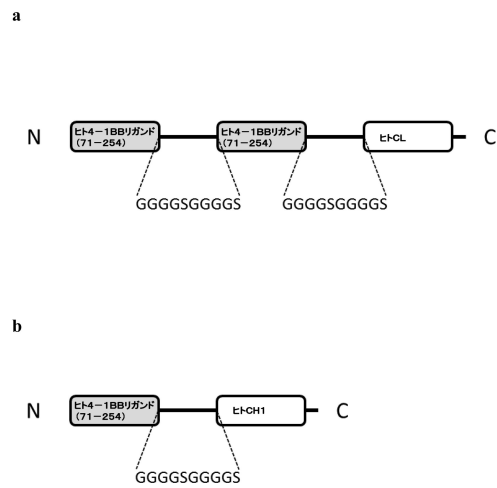


【図 6】

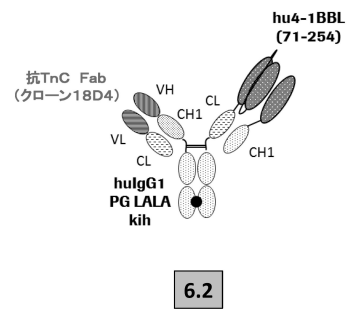


10

【図 7】



【図 8】



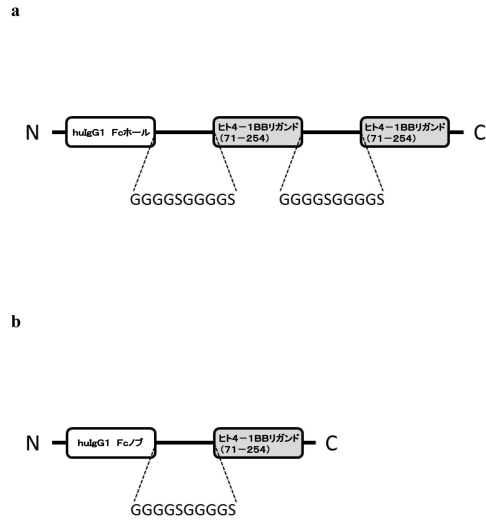
20

30

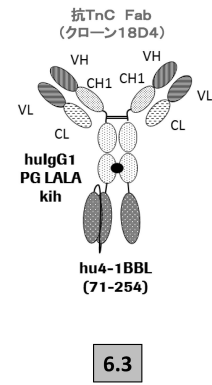
40

50

【図 9】

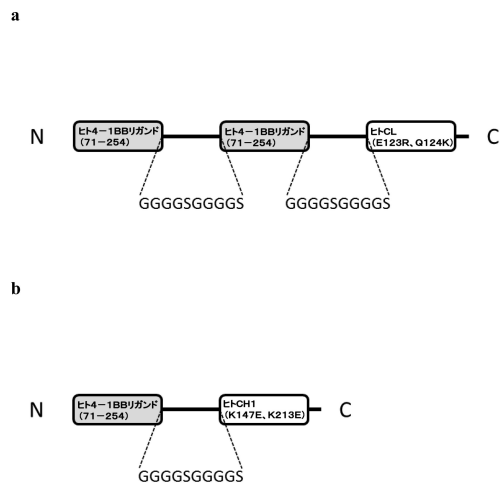


【図 10】

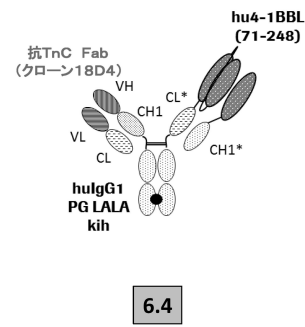


10

【図 11】



【図 12】



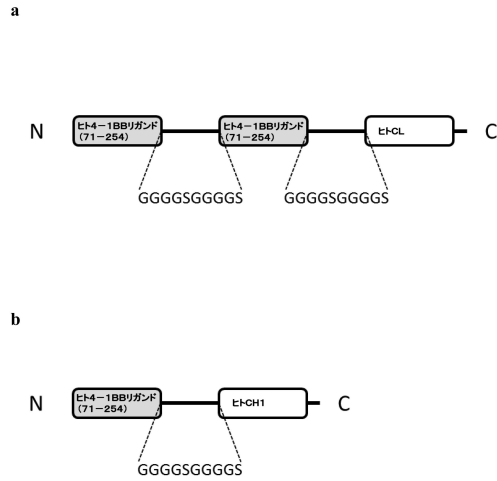
20

30

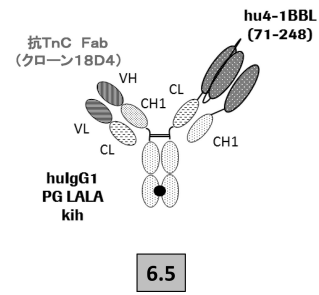
40

50

【図 13】

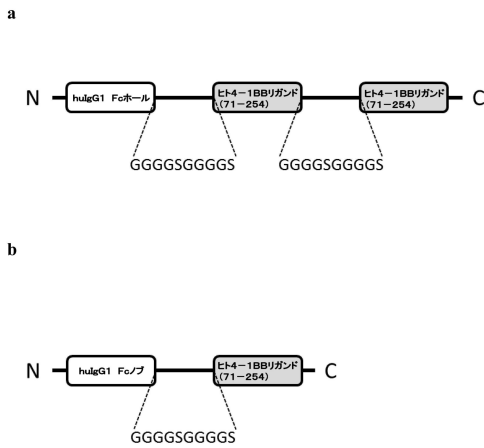


【図 14】

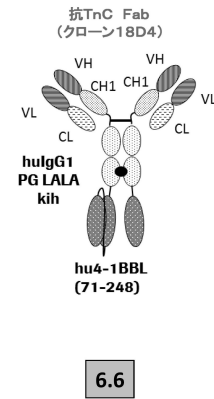


10

【図 15】



【図 16】



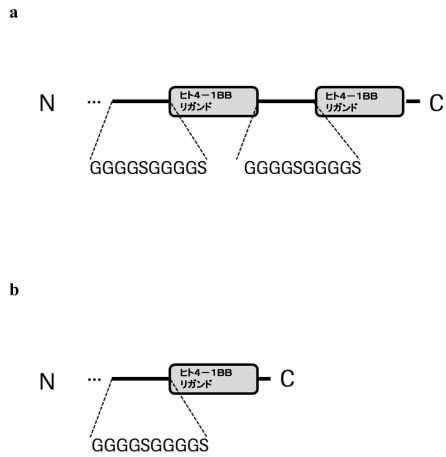
20

30

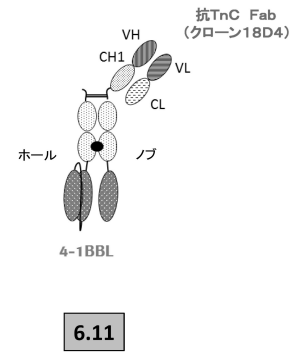
40

50

【図 1 7】

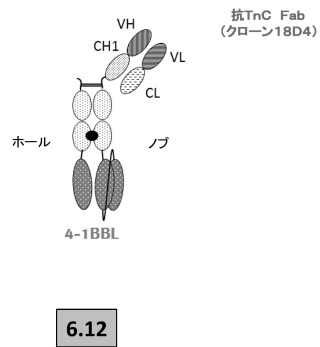


【図 1 8 a】

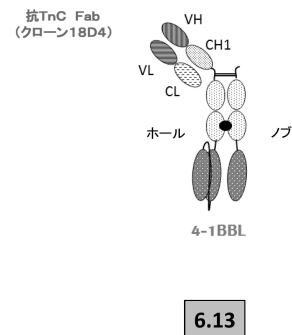


10

【図 1 8 b】



【図 1 9 a】



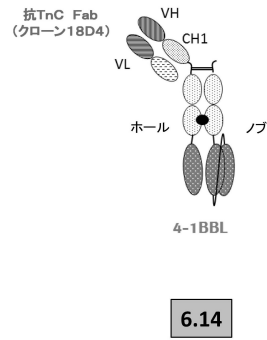
20

30

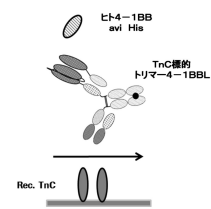
40

50

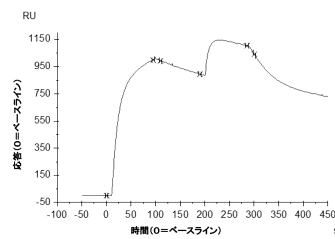
【図 19 b】



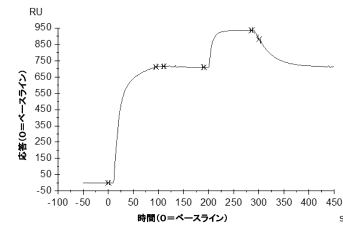
【図 20 a】



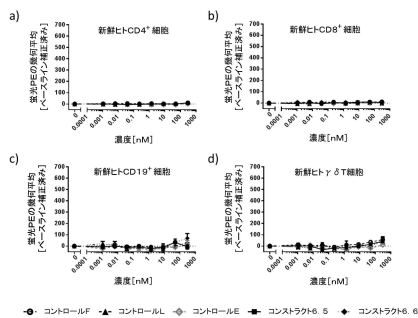
【図 20 b】



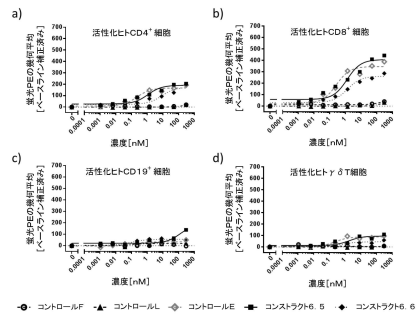
【図 20 c】



【図 21】



【図 22】



10

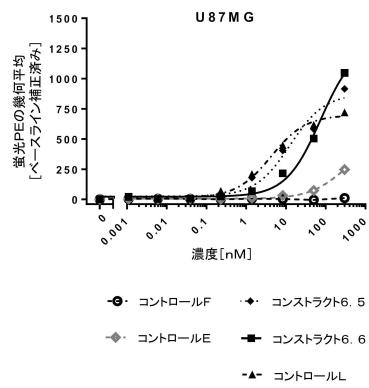
20

30

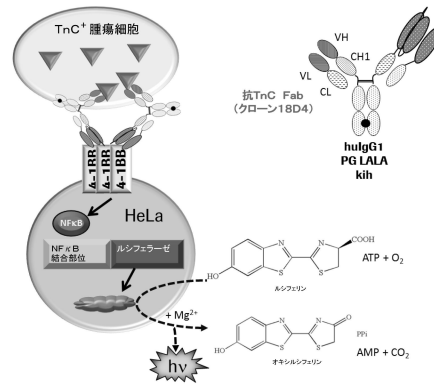
40

50

【図 2 3】

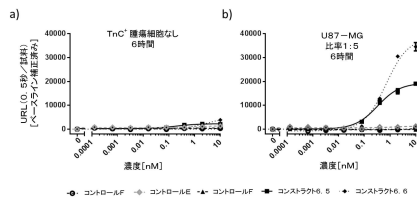


【図 2 4】

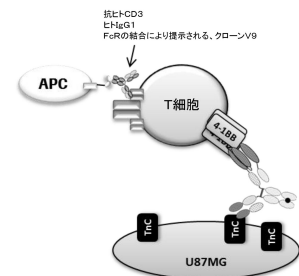


10

【図 2 5】



【図 2 6】

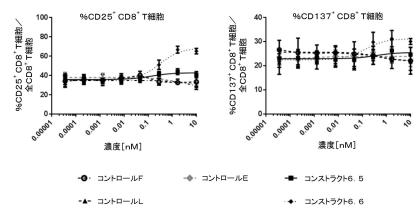


内容物/ウェル:

- ・ 45 Gy照射した2x10⁵ 個のU87MB
- ・ 7.5x10⁵ 個のCFSE標識ヒトPBMC
- ・ 0.5 nMのアゴニスト抗ヒトCD3ヒトIgG wt (クローンV9)
- ・ 滴定濃度10⁻⁵ nMから10 nMのコントラクト6. 5

20

【図 2 7】



30

【配列表】

0007285076000001.app

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	15/28	(2006.01)	A 6 1 P	35/00
C 1 2 N	15/13	(2006.01)	C 1 2 N	15/28
			C 1 2 N	15/13

- (72)発明者 クラウス, クリスティーナ
スイス国 8 9 5 2 シュリーレン, ヴァーギシュトラーセ 1 0, シー／オー ロシュ グリクア
ート アーゲー
- (72)発明者 フェッラーラ コラー, クラウディア
スイス国 8 9 5 2 シュリーレン, ヴァーギシュトラーセ 1 0, シー／オー ロシュ グリクア
ート アーゲー
- (72)発明者 グラウーリチャーズ, ザンドラ
スイス国 8 9 5 2 シュリーレン, ヴァーギシュトラーセ 1 0, シー／オー ロシュ グリクア
ート アーゲー
- (72)発明者 クライン, クリスティアン
スイス国 8 9 5 2 シュリーレン, ヴァーギシュトラーセ 1 0, シー／オー ロシュ グリクア
ート アーゲー
- (72)発明者 レヴィツキー, ヴィクトル
スイス国 8 9 5 2 シュリーレン, ヴァーギシュトラーセ 1 0, シー／オー ロシュ グリクア
ート アーゲー
- (72)発明者 メスナー, エッケハルト
スイス国 8 9 5 2 シュリーレン, ヴァーギシュトラーセ 1 0, シー／オー ロシュ グリクア
ート アーゲー
- (72)発明者 ウマーニャ, パブロ
スイス国 8 9 5 2 シュリーレン, ヴァーギシュトラーセ 1 0, シー／オー ロシュ グリクア
ート アーゲー

審査官 北田 祐介

- (56)参考文献 国際公開第 2 0 0 9 / 0 0 0 5 3 8 (WO, A 1)
特表 2 0 1 3 - 5 4 3 3 7 3 (JP, A)
国際公開第 2 0 1 2 / 1 3 0 8 3 1 (WO, A 1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
C 0 7 K 1 4 / 5 2 5
C 0 7 K 1 6 / 3 0
C 0 7 K 1 9 / 0 0
A 6 1 K 3 9 / 3 9 5
A 6 1 P 3 5 / 0 0
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)