

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7575100号
(P7575100)

(45)発行日 令和6年10月29日(2024.10.29)

(24)登録日 令和6年10月21日(2024.10.21)

(51)国際特許分類		F I	
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46 Z N A
C 0 7 K	16/30 (2006.01)	C 0 7 K	16/30
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28
A 6 1 K	39/395(2006.01)	A 6 1 K	39/395 T
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395 R
		請求項の数	11 (全79頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2021-525835(P2021-525835)	(73)特許権者	512257473
(86)(22)出願日	令和1年11月12日(2019.11.12)		ジェイエヌ バイオサイエンシーズ エル
(65)公表番号	特表2022-513432(P2022-513432 A)		エルシー
(43)公表日	令和4年2月8日(2022.2.8)		アメリカ合衆国 9 4 0 4 3 カリフォル
(86)国際出願番号	PCT/US2019/060982		ニア州, マウンテン ビュー, ローグ
(87)国際公開番号	WO2020/102233	(74)代理人	110001139
(87)国際公開日	令和2年5月22日(2020.5.22)		S K弁理士法人
審査請求日	令和4年11月8日(2022.11.8)	(74)代理人	100130328
(31)優先権主張番号	62/760,328		弁理士 奥野 彰彦
(32)優先日	平成30年11月13日(2018.11.13)	(74)代理人	100130672
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 伊藤 寛之
(31)優先権主張番号	62/838,579	(72)発明者	鶴下 直也
(32)優先日	平成31年4月25日(2019.4.25)		アメリカ合衆国 カルフォルニア 9 4 0
最終頁に続く			4 3, マウンテン ビュー ローグ アベ
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 免疫細胞活性化のための二重特異性抗体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

PD-L1に特異的に結合する第1結合部位、及びGITRに特異的に結合する第2結合部位を含み、

前記第1結合部位がPD-L1のPD-1への結合をアンタゴナイズし、且つ前記第2結合部位がGITRをアゴナイズし、

第1のペアの重鎖可変領域及び軽鎖可変領域が第1結合部位を形成し、第2のペアの重鎖可変領域及び軽鎖可変領域が第2結合部位を形成し、前記第1のペアの重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のC末端がそれぞれ重鎖定常領域及び軽鎖定常領域のN末端に融合し、第2のペアの重鎖可変領域及び軽鎖可変領域がscFvを形成し、前記scFvの軽鎖可変領域が前記重鎖定常領域のC末端に融合し、

前記重鎖定常領域が、FcRγ結合を減少させる少なくとも1つの変異を有し、

2つの第1結合部位及び2つの第2結合部位を含む、二重特異性抗体。

【請求項2】

前記第1結合部位が、

配列番号62～64のCDR H1、H2及びH3を含む成熟重鎖可変領域、並びに配列番号66～68のCDR L1、L2及びL3を含む成熟軽鎖可変領域を含み；又は

配列番号75～77のCDR H1、H2及びH3を含む成熟重鎖可変領域、並びに配列番号79～81のCDR L1、L2及びL3を含む成熟軽鎖可変領域を含み；又は

配列番号85～87のCDR H1、H2及びH3を含む成熟重鎖可変領域、並びに配列番号89

～91のCDR L1、L2及びL3を含む成熟軽鎖可変領域を含み、

且つ前記第2結合部位が、配列番号33～35のCDR H1、H2及びH3をそれぞれ含む成熟重鎖可変領域、及び配列番号37～39のCDR L1、L2及びL3をそれぞれ含む成熟軽鎖可変領域を含む、請求項1に記載の二重特異性抗体。

【請求項3】

前記第1結合部位が、

配列番号61の残基20～138を含む成熟重鎖可変領域、及び配列番号65の残基23～127を含む成熟軽鎖可変領域を含み；又は

配列番号74の残基20～138を含む成熟重鎖可変領域、及び配列番号78の残基23～128を含む成熟軽鎖可変領域を含み；又は

配列番号84の残基19～137を含む成熟重鎖可変領域、及び配列番号88の残基23～128を含む成熟軽鎖可変領域を含み、

且つ前記第2結合部位が、配列番号32の残基20～137を含む成熟重鎖可変領域、及び配列番号36の残基21～127を含む成熟軽鎖可変領域を含む、請求項2に記載の二重特異性抗体。

【請求項4】

前記第1結合部位が、配列番号61の残基20～138を含む成熟重鎖可変領域、及び配列番号65の残基23～127を含む成熟軽鎖可変領域を含み、且つ前記第2結合部位が、配列番号41又は125を含む一本鎖Fvフラグメントを含む、請求項2に記載の二重特異性抗体。

【請求項5】

前記第1及び第2結合部位がヒト化結合部位、ペニヤ化結合部位又はヒト結合部位であり、前記重鎖定常領域及び軽鎖定常領域がヒト重鎖定常領域及びヒト軽鎖定常領域である、請求項1～4のいずれか1項に記載の二重特異性抗体。

【請求項6】

前記重鎖定常領域のアイソタイプがヒトIgG1であり、前記軽鎖定常領域のアイソタイプがカッパである、請求項1～5のいずれか1項に記載の二重特異性抗体。

【請求項7】

前記重鎖定常領域が、FcRnとの結合を増加させる少なくとも1つの変異を有する、請求項1～6のいずれか1項に記載の二重特異性抗体。

【請求項8】

配列番号70の重鎖及び配列番号71の軽鎖を含む請求項1に記載の二重特異性抗体。

【請求項9】

請求項1～8のいずれか1項に記載の二重特異性抗体及び薬学的に許容される担体を含む、医薬組成物。

【請求項10】

がんを治療するための医薬組成物であって、請求項1～8のいずれか1項に記載の二重特異性抗体を含む、医薬組成物。

【請求項11】

感染症を治療するための医薬組成物であって、請求項1～8のいずれか1項に記載の二重特異性抗体を含む、医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は2018年11月13日に出願された62/760,328及び2019年4月25日に出願された62/838,579の本出願であり、これらの各々は全ての目的のためにその全体が参照により組み込まれる。

【0002】

配列表の参照による組み込み

本願は438kバイトのtxtファイル530874-ST25内の配列を含み、これは参照により組

10

20

30

40

50

み込まれる。

【背景技術】

【0003】

抗原特異的な免疫反応は、複数の正負の制御因子によって制御される複雑な生物学的プロセスである。T細胞はまず、抗原提示細胞（APC）上の主要組織適合性複合体（MHC）分子によって提示された同種ペプチド抗原を認識すると、T細胞受容体（TCR）を介して刺激される。T細胞の最適な活性化には、CD28スーパーファミリーに属するCD28やICOSなどの共刺激分子による第2のシグナルが必要である。さらに、TNF受容体スーパーファミリーに属するCD40、OX40、GITR、CD27、HVEM、及び4-1BBなど、細胞の種類や発生段階に依存して発現する他の共刺激分子によって、免疫反応はポジティブに制御され、PD-1、TIGIT、TIM-3、LAG-3、BTLA、VISTA、CD96、及びCD112Rなどのチェックポイント分子によってネガティブに制御される。チェックポイント分子の機能は、体内の免疫系の望ましくない過剰反応を防ぐことである。しかし、チェックポイント分子は、免疫系ががんや感染症と効果的に闘う能力を制限してしまう。レビューについては、Pardoll, *Nat. Rev. Cancer*, 12:252-264, 2012; Mahoney et al., *Nat. Rev. Drug Discov.* 14:561-584, 2015; Shin et al., *Curr. Opin. Immunol.* 33:23-35, 2015; Marquez-Rodas et al. *Ann. Transl. Med.* 3:267, 2015; Mercier et al., *Front. Immunol.* 6:418, 2015; Topalian et al., *Cancer Cell* 27: 450-461, 2015; Baumeister et al., *Annu. Rev. Immunol.* 34:539-573, 2016; Ward-Kavanagh et al., *Immunity* 44:1005-1019, 2016; Torphy et al., *Int. J. Mol. Sci.* 18:2642, 2017を参照。

【0004】

アンタゴニズするモノクローナル抗体によってチェックポイント分子の機能を遮断することが、免疫力を高めるために有効であることが報告されている（Mercier et al., *supra*; Baumeister et al., *supra*）。例えば、T細胞の表面に発現するPD-1（CD279としても知られる）と、そのリガンドである抗原提示細胞に発現するPD-L1（CD274としても知られる）との相互作用は、生体内の免疫反応を抑制する。がん細胞に発現したチェックポイント分子のリガンドが、免疫細胞に発現したそれぞれの受容体と相互作用し、体内の免疫反応を弱める。その結果、がん細胞の生存と増殖が可能となる。モノクローナル抗体によるPD-1とPD-L1の相互作用の阻害は、がんの治療に有効であることが示されている。現在までに、3種類の抗PD-1モノクローナルIgG抗体（ニボルマブ、ペムブロリズマブ、及びセミプリマブ）と、3種類の抗PD-L1モノクローナルIgG抗体（デュルバルマブ、アテゾリズマブ、及びアベルマブ）が、米国FDAよりがん治療薬として承認されている。さらに、TIGIT、TIM-3、LAG-3、及びVISTAなどの他のチェックポイント分子に対する、それぞれのリガンドとの相互作用を阻害するモノクローナルIgG抗体が、臨床試験で治療効果が検討されている（Marin-Acevedo et al., *J. Hematol. Oncol.* 11:39, 2018）。

【0005】

T細胞上のCTLA-4と抗原提示細胞上のB7-1及びB7-2（それぞれ共刺激分子CD28のリガンドであるCD80及びCD86とも呼ばれる）との相互作用を遮断し、その結果、CD28を介したT細胞の活性化を刺激するCTLA-4に対するモノクローナルIgG抗体（イピリムマブ）が、がん治療薬として用いられている。また、ICOS、CD40、OX40、GITR、CD27、及び4-1BBなどの共刺激分子に対するアゴニストIgG抗体も、免疫細胞を活性化する能力がある（Peggs et al., *Clin. Exp. Immunol.* 157:9-19, 2009; Melero et al., *Clin. Cancer Res.* 19:1044-1053, 2013; Attanasio et al., *Immunity* 44:1053-1068, 2016; Strugill et al., *Am. J. Hematol. Oncol.* 13:4-15, 2017）。ICOSと同様にTNF受容体スーパーファミリーに属する共刺激分子は、免疫応答を高めるために細胞内シグナル伝達を開始するために、免疫細胞の表面上でマルチメリック架橋を必要とする（Watanabe et al., *Int. Immunol.* 17:269-278, 2005; Croft et al., *Nat. Rev. Drug Discov.* 12:147-168, 2013; Wikenheiser et al., *Front. Immunol.* 7: Article 304, 2016）。IgGは抗原結合に対して2価であるため、細胞表面に結合したIgG分子が、別の細胞のFcγ受容体との結合などを介してコンジュゲートされない限り、これらの共刺激分子を

介したシグナル伝達を効率的に引き起こすことができない。FcγRIIB（CD32Bとしても知られる）への結合を強化するためのFc変異を有する抗CD40 IgG2抗体は、マウス異種移植腫瘍モデルにおいて、親IgG2抗体よりも優れた抗腫瘍活性を示した（Dahan et al., Cancer Cell 29:820-831, 2016）。表面分子の多価結合を促進する別のアプローチとして、Tsoらは、ヒトガンマ重鎖のC末端にヒトmu重鎖のCH3及びCH4領域を融合させてIgG抗体を設計した（US Patent 10,053,517）。このように設計された6量体IgG抗体は、細胞表面の共刺激分子を効率的に架橋し、細胞内のシグナル伝達を引き起こすことができる。

【0006】

二重特異性抗体とは、2つの異なる抗原又は同じ抗原上の2つの異なるエピトープに結合できる人工的に作られた抗体である。様々な形態の二重特異性抗体が作製されている（Lameris et al., Crit. Rev. Oncol. Hematol. 92:153-165, 2014; Kontermann et al., Drug Discov. Today 20:838-847, 2015; Spiess et al., Mol. Immunol. 67:95-106, 2015; Brinkmann et al., MAbs 9:182-212, 2017; Sedykh et al., Drug Des. Dev. Ther. 12:195-208, 2018）。CD3とCD19に結合するブリナツモマブなどの二重特異性抗体の中には、T細胞をCD19を持つがん細胞の近くに連れてきて、がん細胞に対するT細胞媒介性の細胞傷害性を引き起こすように設計されたものもある（Viardot et al., Cancer Treat. Rev. 65:87-95, 2018）。

【発明の概要】

【0007】

本発明は、CD33に特異的に結合する第1結合部位、及びGITR、OX40、CD40、ICOS又は4-1BBに特異的に結合する第2結合部位を含む、二重特異性抗体を提供する。任意に、二重特異性抗体は、IgG Fc領域をさらに含む。任意に、第2結合部位は、OX40又はCD40をアゴナイズする。任意に、第1結合部位は、配列番号94～96のCDR H1、H2及びH3をそれぞれ含む成熟重鎖可変領域、及び配列番号97～99のCDR L1、L2及びL3をそれぞれ含む成熟軽鎖可変領域を含み、且つ第2結合部位が、配列番号33～35のCDR H1、H2及びH3をそれぞれ含む成熟重鎖可変領域、及び配列番号37～39のCDR L1、L2及びL3をそれぞれ含む成熟軽鎖可変領域、又は配列番号13～15のCDR H1、H2及びH3をそれぞれ含む成熟重鎖可変領域、及び配列番号17～19のCDR L1、L2及びL3をそれぞれ含む成熟軽鎖可変領域、又は配列番号49～51のCDR H1、H2及びH3をそれぞれ含む成熟重鎖可変領域、及び配列番号53～55のCDR L1、L2及びL3をそれぞれ含む成熟軽鎖可変領域、又は配列番号109～111のCDR H1、H2及びH3をそれぞれ含む成熟重鎖可変領域、及び配列番号113～115のCDR L1、L2及びL3をそれぞれ含む成熟軽鎖可変領域、又は配列番号128～130のCDR H1、H2及びH3をそれぞれ含む成熟重鎖可変領域、及び配列番号132～134のCDR L1、L2及びL3をそれぞれ含む成熟軽鎖可変領域を含む。任意に、第1結合部位は、配列番号2の残基20～135を含む成熟重鎖可変領域、及び配列番号7の残基20～131を含む成熟軽鎖可変領域を含み、且つ第2結合部位が、配列番号32の残基20～137を含む成熟重鎖可変領域、及び配列番号36の残基21～127を含む成熟軽鎖可変領域、又は配列番号12の残基20～138を含む成熟重鎖可変領域、及び配列番号16の残基21～127を含む成熟軽鎖可変領域、又は配列番号48の残基20～138を含む成熟重鎖可変領域、及び配列番号52の残基23～127を含む成熟軽鎖可変領域、又は配列番号108の残基20～136を含む成熟重鎖可変領域、及び配列番号112の残基21～126を含む成熟軽鎖可変領域、又は配列番号127の残基20～138を含む成熟重鎖可変領域、及び配列番号131の残基21～133を含む成熟軽鎖可変領域を含む。任意に、第一結合部位は、配列番号2の残基20～135を含む成熟重鎖可変領域、及び配列番号7の残基20～131を含む成熟軽鎖可変領域を含み、且つ第2結合部位は、配列番号22、41、57、117、122、123、124、125、136、又は139を含む一本鎖Fvフラグメントを含む。

【0008】

本発明はさらに、EGFRに特異的に結合する第1結合部位、GITR、OX40、CD40、ICOS又は4-1BBに特異的に結合する第2結合部位を提供する。任意に、二重特異性抗体は、Fc

10

20

30

40

50

領域をさらに含む。任意に、第1結合部位はEGFRのEGFへの結合をアンタゴナイズし、第2結合部位はGITRをアゴナイズする。任意に、第1結合部位は、配列番号100～102のCDR H1、H2及びH3をそれぞれ含む成熟重鎖可変領域、及び配列番号103～105のCDR L1、L2及びL3をそれぞれ含む成熟軽鎖可変領域を含み、且つ第2結合部位が、配列番号33～35のCDR H1、H2及びH3をそれぞれ含む成熟重鎖可変領域、及び配列番号37～39のCDR L1、L2及びL3をそれぞれ含む成熟軽鎖可変領域、又は配列番号13～15のCDR H1、H2及びH3をそれぞれ含む成熟重鎖可変領域、及び配列番号17～19のCDR L1、L2及びL3をそれぞれ含む成熟軽鎖可変領域、又は配列番号49～51のCDR H1、H2及びH3をそれぞれ含む成熟重鎖可変領域、及び配列番号53～55のCDR L1、L2及びL3をそれぞれ含む成熟軽鎖可変領域、又は配列番号109～111のCDR H1、H2及びH3をそれぞれ含む成熟重鎖可変領域、及び配列番号113～115のCDR L1、L2及びL3をそれぞれ含む成熟軽鎖可変領域、又は配列番号128～130のCDR H1、H2及びH3をそれぞれ含む成熟重鎖可変領域、及び配列番号132～134のCDR L1、L2及びL3をそれぞれ含む成熟軽鎖可変領域を含む。任意に、第1結合部位は、配列番号29の残基20～138を含む成熟重鎖可変領域、及び配列番号30の残基21～127を含む成熟軽鎖可変領域を含み、且つ第2結合部位が、配列番号32の残基20～137を含む成熟重鎖可変領域、及び配列番号36の残基21～127を含む成熟軽鎖可変領域、又は配列番号12の残基20～138を含む成熟重鎖可変領域、及び配列番号16の残基21～127を含む成熟軽鎖可変領域、又は配列番号48の残基20～138を含む成熟重鎖可変領域、及び配列番号52の残基23～127を含む成熟軽鎖可変領域、又は配列番号108の残基20～136を含む成熟重鎖可変領域、及び配列番号112の残基21～126を含む成熟軽鎖可変領域、又は配列番号127の残基20～138を含む成熟重鎖可変領域、及び配列番号131の残基21～133を含む成熟軽鎖可変領域を含む。任意に、第1結合部位は、配列番号29の残基20～138を含む成熟重鎖可変領域、及び配列番号30の残基21～127を含む成熟軽鎖可変領域を含み、第2結合部位は、配列番号22、41、57、117、122、123、124、125、136、又は139を含む一本鎖Fvフラグメントを含む。

【0009】

本発明はさらに、配列番号13～15のCDR H1、H2及びH3をそれぞれ含む成熟重鎖可変領域、及び配列番号17～19のCDR L1、L2及びL3をそれぞれ含む成熟軽鎖可変領域、又は配列番号49～51のCDR H1、H2及びH3をそれぞれ含む成熟重鎖可変領域、及び配列番号53～55のCDR L1、L2及びL3をそれぞれ含む成熟軽鎖可変領域、又は配列番号109～111のCDR H1、H2及びH3をそれぞれ含む成熟重鎖可変領域、及び配列番号113～115のCDR L1、L2及びL3をそれぞれ含む成熟軽鎖可変領域、又は配列番号128～130のCDR H1、H2及びH3をそれぞれ含む成熟重鎖可変領域、及び配列番号132～134のCDR L1、L2及びL3をそれぞれ含む成熟軽鎖可変領域をそれぞれ含む、モノクローナル抗体を提供する。任意に、モノクローナル抗体は、配列番号32の残基20～137を含む成熟重鎖可変領域、及び配列番号36の残基21～127を含む成熟軽鎖可変領域、又は配列番号12の残基20～138を含む成熟重鎖可変領域、及び配列番号16の残基21～127を含む成熟軽鎖可変領域、又は配列番号48の残基20～138を含む成熟重鎖可変領域、及び配列番号52の残基23～127を含む成熟軽鎖可変領域、又は配列番号108の残基20～136を含む成熟重鎖可変領域、及び配列番号112の残基21～126を含む成熟軽鎖可変領域、又は配列番号127の残基20～138を含む成熟重鎖可変領域、及び配列番号131の残基21～133を含む成熟軽鎖可変領域を含む。

【0010】

本発明はさらに、PD-L1に特異的に結合する第1結合部位、及びGITR、OX40、CD40、ICOS又は4-1BBに特異的に結合する第2結合部位を含む二重特異性抗体を提供する。任意に、二重特異性抗体は、Fc領域をさらに含む。任意に、第1結合部位は、PD-L1のPD1への結合をアンタゴナイズし、且つ第2結合部位は、GITR、OX40、CD40、ICOS又は4-1BBをアゴナイズする。任意に、第1結合部位は、配列番号62～64、75～77又は85～87のCDR H1、H2及びH3をそれぞれ含む成熟重鎖可変領域、及び配列番号66～68、79～81又は89～91のCDR L1、L2及びL3をそれぞれ含む成熟軽鎖可変領域を含み、且つ第2

結合部位が、配列番号33～35のCDR H1、H2及びH3をそれぞれ含む成熟重鎖可変領域、及び配列番号37～39のCDR L1、L2及びL3をそれぞれ含む成熟軽鎖可変領域、又は配列番号13～15のCDR H1、H2及びH3をそれぞれ含む成熟重鎖可変領域、及び配列番号17～19のCDR L1、L2及びL3をそれぞれ含む成熟軽鎖可変領域、又は配列番号49～51のCDR H1、H2及びH3をそれぞれ含む成熟重鎖可変領域、及び配列番号53～55のCDR L1、L2及びL3をそれぞれ含む成熟軽鎖可変領域、又は配列番号109～111のCDR H1、H2及びH3をそれぞれ含む成熟重鎖可変領域、及び配列番号113～115のCDR L1、L2及びL3をそれぞれ含む成熟軽鎖可変領域、又は配列番号128～130のCDR H1、H2及びH3をそれぞれ含む成熟重鎖可変領域、及び配列番号132～134のCDR L1、L2及びL3をそれぞれ含む成熟軽鎖可変領域をそれぞれ含む。任意に、第1結合部位は、配列番号61の残基20～138、配列番号74の残基20～138、又は配列番号84の残基19～137を含む成熟重鎖可変領域、及び配列番号65の残基23～127、配列番号78の残基23～128、又は配列番号88の残基23～128を含む成熟軽鎖可変領域をそれぞれ含み、且つ第2結合部位が、配列番号32の残基20～137を含む成熟重鎖可変領域、及び配列番号36の残基21～127を含む成熟軽鎖可変領域、又は配列番号12の残基20～138を含む成熟重鎖可変領域、及び配列番号16の残基21～127を含む成熟軽鎖可変領域、又は配列番号48の残基20～138を含む成熟重鎖可変領域、及び配列番号52の残基23～127を含む成熟軽鎖可変領域、又は配列番号108の残基20～136を含む成熟重鎖可変領域、及び配列番号112の残基21～126を含む成熟軽鎖可変領域、又は配列番号127の残基20～138を含む成熟重鎖可変領域、及び配列番号131の残基21～133を含む成熟軽鎖可変領域を含む。任意に、第1結合部位は、配列番号61の残基20～138、配列番号74の残基20～138、配列番号84の残基19～137を含む成熟重鎖可変領域、及び配列番号65の残基23～128、配列番号78の残基23～128、又は配列番号88の残基23～128を含み、且つ第2結合部位は、配列番号22、41、57、117、122、123、124、125、136、又は139を含む一本鎖Fvフラグメントを含む。

【0011】

上述したいくつかの二重特異性抗体は、第1結合部位を形成する第1のペアの重鎖及び軽鎖可変領域、及び第2結合部位を形成する第2のペアの重鎖及び軽鎖可変領域を含む。ここで、第1のペアの重鎖及び軽鎖可変領域のC末端が重鎖及び軽鎖定常領域のN末端と融合し、第2のペアの重鎖及び軽鎖可変領域は、重鎖定常領域のC末端と融合したscFvを形成しているか、又はその逆である。いくつかの二重特異性抗体では、第1のペアの重鎖及び軽鎖可変領域のC末端が重鎖及び軽鎖定常領域のN末端に融合し、第2のペアの重鎖及び軽鎖可変領域が重鎖定常領域のC末端に融合したscFvを形成している。いくつかの二重特異性抗体では、scFvの軽鎖可変領域が重鎖定常領域のC末端に融合している。いくつかの二重特異性抗体では、第1及び第2結合部位は、ヒト化、ベニヤ化又はヒトであり、重鎖及び軽鎖定常領域はヒトである。いくつかの二重特異性抗体では、重鎖定常領域のアイソタイプはヒトIgG1であり、軽鎖定常領域はカッパである。いくつかの二重特異性抗体は、2つの第1結合部位と2つの第2結合部位を含む。いくつかの二重特異性抗体では、重鎖定常領域が、FcR γ 結合を減少又は増加させる少なくとも1つの変異を有する。いくつかの二重特異性抗体では、重鎖定常領域は、FcR η への結合を増加させる少なくとも1つの変異を有する。

【0012】

本発明はさらに、がん細胞、病原体に感染した細胞、又は免疫細胞上の抗原に特異的に結合する第1結合部位、及び共刺激分子に特異的に結合する第2結合部位を含む、二重特異性抗体を提供する。ここで、第1のペアの重鎖及び軽鎖可変領域が第1結合部位を形成し、第2のペアの重鎖及び軽鎖可変領域が第2結合部位を形成し、ここで、第1のペアの重鎖及び軽鎖可変領域のC末端が重鎖及び軽鎖定常領域のN末端に融合し、第2のペアの重鎖及び軽鎖可変領域が重鎖定常領域のC末端に融合したscFvを形成しているか、又はその逆である。任意に、第1結合部位は重鎖及び軽鎖定常領域のN末端に連結され、第2結合部位は重鎖定常領域のC末端に連結される。

【0013】

本発明はさらに、配列番号62～64、75～77又は85～87のCDR H1、H2及びH3をそ

れぞれ含む成熟重鎖可変領域、及び配列番号66～68、79～81又は89～91のCDR L1、L2及びL3をそれぞれ含む成熟軽鎖可変領域を含む、PD-L1に特異的に結合するモノクローナル抗体を提供する。任意に、モノクローナル抗体は、配列番号61の残基20～138、配列番号74の残基20～138、又は配列番号84の残基19～137を含む成熟重鎖可変領域、及び配列番号65の残基23～127、配列番号78の残基23～128、又は配列番号88の残基23～128を含む成熟軽鎖可変領域をそれぞれ含む。

【0014】

本発明はさらに、二重特異性抗体又はモノクローナル抗体のいずれか、及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を提供する。

【0015】

本発明はさらに、がんを有する又はそのリスクがある対象に、上記で定義された二重特異性又はモノクローナル抗体の有効なレジメを投与する工程を含む、がんの治療又は予防効果を発揮する方法を提供する。

【0016】

本発明はさらに、感染症を有する又はそのリスクがある対象に、上記で定義した二重特異性抗体又はモノクローナル抗体の有効なレジメを投与する工程を含む、感染症の治療方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1A-D】発現ベクターpHuM195-IgG1(A)、pBS824(B)、pFCm331(C)、及びpFCm267(D)の構造の概略。関連する制限酵素部位を示す。図は縮尺に合わせて描かれていない。

【0018】

【図2】本発明の二重特異性IgG抗体の構造の概略。

【0019】

【図3】CD33及びOX40に結合する二重特異性抗体(BS824)を用いた、OX40を発現するJurkat Dual細胞(JD/OX40)におけるルシフェラーゼ活性の分析。トリプリケート分析の平均相対ルミネッセンスユニット(RLU)を標準偏差バーとともに示す。

【0020】

【図4】EGFR及びGITRに結合する二重特異性抗体(BS827)を用いた、GITRを発現するJurkat Dual細胞(JD/GITR)におけるルシフェラーゼ活性の分析。トリプリケート分析の平均相対ルミネッセンスユニット(RLU)を標準偏差バーとともに示す。

【0021】

【図5】CD33及びCD40に結合する二重特異性抗体(BS828)を用いた、ラモス細胞におけるCD95の発現のFACS分析。X軸、Y軸はそれぞれCD20、CD95の発現量を示す。右上及び右下の数字は、各象限におけるCD20陽性細胞の割合を示す。

【0022】

【図6】PD-L1及びGITRに結合する二重特異性抗体(BS809)によるT細胞の活性化。IL-2の平均発現レベルを標準偏差バーとともに示す。

【0023】

【図7】PD-L1及びOX40に結合する二重特異性抗体(BS813)を用いた、OX40を発現するJurkat Dual細胞(JD/OX40)におけるルシフェラーゼ活性の分析。トリプリケート分析の平均相対ルミネッセンスユニット(RLU)をとともに標準偏差バーで示す。

【0024】

【図8】PD-L1及びGITRに結合する二重特異性抗体(BS809)を用いた、GITRを発現するJurkat Dual細胞(JD/GITR)におけるルシフェラーゼ活性の分析。トリプリケート分析の平均相対ルミネッセンスユニット(RLU)を標準偏差バーとともに示す。

【0025】

【図9】PD-L1及びOX40に結合する二重特異性抗体(BS813、BS841及びBS839)によるヒトT細胞の活性化。トリプリケート分析の平均IL-2発現レベルを標準偏差バーとと

10

20

30

40

50

もに示す。

【0026】

【図10】PD-L1及びOX40に結合する二重特異性抗体（BS813、BS841及びBS839）によるSEB処理したヒト末梢血単核細胞の活性化。トリプリケート分析の平均IL-2発現レベルを標準偏差バーとともに示す。

【0027】

【図11】PD-L1及びICOSに結合する二重特異性抗体（BS859）によるヒトT細胞の活性化。平均的なIL-2及びIL-10の発現レベルを標準偏差バーとともに示す。

【0028】

【図12】PD-L1及びGITRに結合する二重特異性抗体（BS840）を用いた、GITRを発現するJurkat Dual細胞（JD/GITR）におけるルシフェラーゼ活性の分析。トリプリケート分析の平均相対ルミネッセンスユニット（RLU）を標準偏差バーとともに示す。

【0029】

【図13】PD-L1及びCD40に結合する二重特異性抗体（BS846）を用いた、Ramos細胞の活性化。

【0030】

定義

本発明の二重特異性抗体は、典型的には単離された形態で提供される。これは、二重特異性抗体が典型的には、その生産又は精製から生じる干涉蛋白質及び他のコンタミネーション物質に対して少なくとも50% w/w純粋であることを意味するが、二重特異性抗体が、過剰な医薬用の許容可能な担体又はその使用を容易にすることを目的とした他のビヒクルと組み合わされる可能性を排除するものではない。二重特異性抗体は、生産又は精製に起因する干涉蛋白質及びコンタミネーション物質に対して少なくとも60、70、80、90、95又は99% w/w純粋な場合がある。多くの場合、二重特異性抗体は、その精製後に残る主要な高分子種である。

【0031】

二重特異性抗体の標的抗原への特異的結合は、少なくとも 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、又は 10^{10} M^{-1} のアフィニティを意味する。アフィニティは異なるターゲットに対して異なることがある。特異的な結合は、検出可能なほど高い大きさであり、少なくとも1つの無関係な標的に対して起こる非特異的な結合と区別できるものである。特異的な結合は、特定の官能基間の結合又は特定の空間的な適合（例えば、ロックとキーの型）の形成の結果である可能性があり、一方、非特異的な結合は典型的には、ファンデルワールス力の結果である。しかしながら、特異的結合は、2つの異なる結合部位を有する二重特異性抗体が、これらの2つの結合部位の標的に対してのみ結合することを必ずしも意味するものではない。

【0032】

基本的な抗体の構造単位は、サブユニットのテトラマーである。各テトラマーは、2つの同一のポリペプチド鎖のペアを含み、各ペアは、1つの「軽」（約25kDa）及び1つの「重」鎖（約50～70kDa）を有する。各鎖のアミノ末端部分には、主に抗原認識に関わる約100～110個以上のアミノ酸を含む可変領域が含まれている。この可変領域は、最初は切断可能なシグナルペプチドと結合して発現する。シグナルペプチドを含まない可変領域は、成熟可変領域と呼ばれることもある。従って、例えば、軽鎖成熟可変領域とは、軽鎖シグナルペプチドを含まない軽鎖可変領域を意味する。しかし、可変領域を参照するとき、必ずしもシグナル配列が存在するわけではなく、実際、シグナル配列は、本発明の二重特異性抗体が発現及び分泌されると切断される。重鎖と軽鎖の可変領域のペアは、抗体の結合領域を定義する。軽鎖と重鎖のそれぞれのカルボキシ末端部分は、軽鎖定常領域と重鎖定常領域を定義する。重鎖定常領域は、主にエフェクター機能を担っている。IgG抗体では、重鎖定常領域は、CH1、ヒンジ、CH2、及びCH3領域に分かれている。IgAでは、重鎖定常領域はCH1、CH2、及びCH3に分けられる。CH1領域は、ジスルフィド結合及び非共有結合によって軽鎖定常領域に結合する。ヒンジ領域は、抗体の結合領域とエフェクタ

10

20

30

40

50

一領域の間に柔軟性を与えるとともに、4量体サブユニット内の2つの重鎖定常領域の間に分子間ジスルフィド結合のサイトを提供する。CH2及びCH3領域は、エフェクター機能とFcRn結合の主要な部位である。

【0033】

軽鎖は、カッパ又はラムダに分類される。重鎖は、ガンマ、ミュー、アルファ、デルタ、又はイプシロンに分類され、それぞれ抗体のアイソタイプをIgG、IgM、IgA、IgD、及びIgEとして定義する。軽鎖と重鎖では、可変領域と定常領域が約12個以上のアミノ酸を含む「J」セグメントで結合しており、重鎖には約10個以上のアミノ酸を含む「D」セグメントが含まれている（典型的にはFundamental Immunology (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y., 1989), Ch. 7を参照）（全ての目的のためにその全体が参照により組み込まれる）。

【0034】

各軽/重鎖ペアの成熟可変領域は、抗体結合部位を形成する。従って、インタクト抗体は、2つの結合部位を有する、即ち2価である。天然の抗体では、結合部位は同じである。しかし、二重特異性抗体では、これらの結合部位は、フォーマットによって同じであったり、異なっていたりする（例えば、Songsivilai and Lachmann, Clin. Exp. Immunol., 79:315-321 (1990); Kostelny et al., J. Immunol., 148:1547-53 (1992)を参照）。可変領域はすべて、比較的保存されたフレームワーク領域（FR）に、相補性決定領域（CDR）とも呼ばれる3つの超可変領域が結合した、同じ典型的な構造を示す。各ペアの2本の鎖からのCDRは、フレームワーク領域によって整列され、特定のエピトープへの結合を可能にする。N-末端からC-末端にかけて、軽鎖、重鎖ともにドメインFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、及びFR4を含む。各ドメインへのアミノ酸の割り当ては、Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 and 1991)、又はChothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Chothia et al., Nature 342:878-883 (1989)の定義に従う。また、Kabatは、異なる重鎖可変領域間又は異なる軽鎖可変領域間の対応する残基に同じ番号を割り当てる、広く使用されている番号付け規則（Kabatナンバリング）を提供する。Kabatナンバリングは、抗体定常領域に使用できるが、本願の場合のように、EUインデックス（EUNanbリングとも呼ばれる）がより一般的に使用される。

【0035】

用語「エピトープ」は、二重特異性抗体のアームが結合する抗原上の部位を指す。エピトープは、連続したアミノ酸又は1つ以上の蛋白質の三次元フォールディングによって並置された非連続のアミノ酸から形成され得る。連続したアミノ酸から形成されたエピトープ（線状エピトープとも呼ばれる）は、典型的には変性溶媒にさらされても保持されるのに対し、三次元フォールディングによって形成されたエピトープ（コンフォメーションエピトープとも呼ばれる）は、典型的には変性溶媒で処理されると失われる。一部の抗体は末端特異的エピトープに結合する。つまり、抗体は別のポリペプチドに融合した同じポリペプチドと比較して、自由端を持つポリペプチドに選択的に結合し、自由端が失われる。エピトープは、典型的には、少なくとも3個、より一般的には、少なくとも5個又は8～10個のアミノ酸を含み、独特の空間的コンフォメーションを有している。エピトープの空間的コンフォメーションを決定する方法としては、例えば、X線結晶構造解析や2次元核磁気共鳴などを含む。例えば、Epitope Mapping Protocols, in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996)を参照。

【0036】

「抗原」又は「標的抗原」という用語は、二重特異性抗体の1つの結合部位によって結合される標的分子を示す。抗原は、任意の長さの蛋白質（天然、合成、又は組換え発現）、核酸、炭水化物などの分子である可能性がある。抗原には、レセプター、リガンド、カウンターレセプター、コート蛋白質などがある。

【0037】

同じ又は重複するエピトープを認識する抗体は、ある抗体が別の抗体の標的抗原への結

合と競合する能力を示す単純なイムノアッセイで識別できる。また、抗体のエピトープは、抗原と結合した抗体のX線結晶構造解析により、接触残基を特定することでも定義できる。また、一方の抗体の結合を減少又は排除する抗原の全てのアミノ酸変異が他方の結合を減少又は排除する場合、2つの抗体は同じエピトープを持つ。一方の抗体の結合を減少又は排除するいくつかのアミノ酸変異が他方の結合を減少又は排除する場合、2つの抗体は重複するエピトープを有する。

【0038】

抗体間の競合は、試験下の抗体が参照抗体の共通抗原への特異的結合を阻害するアッセイによって決定される（例えば、Junghans et al., Cancer Res. 50:1495, 1990を参照）。過剰な試験抗体（例えば、少なくとも2倍、5倍、10倍、20倍又は100倍）が、競合結合アッセイで測定されるように、参照抗体の結合を少なくとも50%、好ましくは75%、90%又は99%阻害する場合、試験抗体は参照抗体と競合する。競合アッセイによって同定された抗体（競合抗体）には、参照抗体と同じエピトープに結合する抗体、及び立体障害が生じるために参照抗体によって結合されるエピトープに十分に近接した隣接エピトープに結合する抗体を含む。

【0039】

「対象」という用語は、予防的又は治療的な治療を受けるヒト及び他の哺乳類の対象を含む。他の哺乳類の対象には、ヒトの状態の動物モデル（例えば、げっ歯類、非ヒト霊長類）及び獣医学的な対象を含む。

【0040】

アミノ酸の置換を保存的又は非保存的に分類する目的で、アミノ酸は以下のようにグループ化される。グループI（疎水性側鎖）：met, ala, val, leu, ile、グループII（中性親水性側鎖）：cys, ser, thr、グループIII（酸性側鎖）：asp, gluグループIV（塩基性側鎖）：asn, gln, his, lys, argグループV（鎖の配向に影響を与える残基）：gly, pro、及びグループVI（芳香族側鎖）：trp, tyr, phe。保存的置換は、同じクラスのアミノ酸同士を置換することである。非保存的置換は、これらのクラスの1つのメンバーを別のクラスのメンバーと交換することである。

【0041】

パーセンテージ配列同一性は、可変領域の場合はKabatナンバリング規則、定常領域の場合はEUナンバリング規則によって最大限にアライメントされた抗体配列を用いて決定される。アラインメント後、対象抗体領域（例えば、重鎖又は軽鎖の全成熟可変領域）を参照抗体の同じ領域と比較する場合、対象抗体領域と参照抗体領域間の配列同一性百分率は、対象抗体領域と参照抗体領域の両方において同じアミノ酸が占有する位置の数を、ギャップを考慮せずに、これらの2領域のアライメントした位置の総数で割り、100を掛けて百分率に変換したものである。

【0042】

列挙された1つ以上の要素を「含む」組成物又は方法は、具体的に列挙されていない他の要素を含むこともある。例えば、抗体を含む組成物は、抗体のみを含有することもあり、又は抗体を他の成分と組み合わせて含有することもある。

【0043】

「抗体依存性細胞傷害」（ADCC）という用語は、抗体でコートされた標的細胞（即ち、抗体が結合した細胞）と、溶解活性を有する免疫細胞（エフェクター細胞とも呼ばれる）との相互作用に依存する細胞死を誘導するメカニズムである。このようなエフェクター細胞には、ナチュラルキラー細胞、単球/マクロファージ、好中球などがある。ADCCは、細胞に結合した抗体のFc領域と、好中球、マクロファージ、ナチュラルキラー細胞などの免疫エフェクター細胞に存在するFcγ受容体（特にFcγRIとFcγRIII）との相互作用によって生じる。標的細胞は、媒介となるエフェクター細胞の種類に応じて、貪食又は溶解によって排除される。抗体でコートされた標的細胞の死は、エフェクター細胞活性の結果として起こる。

【0044】

「抗体依存性細胞食作用」又はADCPとしても知られるオプソニン化の用語は、抗体でコートされた細胞が、免疫グロブリンFc領域に結合する食免疫細胞（例えば、マクロファージ、好中球、及び樹状細胞）によって、全体的に又は部分的に内在化される処理を指す。
【0045】

用語「補体依存性細胞傷害」又はCDC（CMCとも呼ばれる）は、標的結合抗体のFcエフェクタードメインが一連の酵素反応を活性化し、結果として標的細胞膜に穴を形成する細胞死を誘導するメカニズムを指す。一般に、抗原-抗体複合体（例えば、抗体でコートされた細胞上のもの）は、補体成分C1qに結合して活性化し、これが補体カスケードを活性化して、標的細胞の死をもたらす。また、補体の活性化は、白血球上の補体受容体（例えば、CR3）に結合することによってADCCを促進する標的細胞表面への補体成分の沈着という結果になるかも知れない。

10

【0046】

FcRn受容体への抗体のpH依存性結合とは、抗体がそのような受容体に、pH6.0において、pH7.5よりも強く結合することを意味する。飲作用による内在化後のエンドソームにおける低いpHでのFcRnへの結合は、IgG抗体をリソソームにおける異化作用分解から救済する。救済されたIgG抗体は、次に、中性pHにてFcRnから解放され、血液循環に再利用される。このようなpH依存性FcRn結合が、IgG抗体（及び、本発明の二重特異性抗体）の長い血清半減期の分子メカニズムの基礎となる（Ghetie et al., Annu. Rev. Immunol. 18:739-766, 2000）。例えば、ヒトIgG抗体は、pH6.0にて、ヒト新生児型Fc受容体（FcRn）に結合する一方、pH7.5においては、FcRnに弱く結合するにすぎない。IgG抗体におけるFcRn結合部位は、CH2ドメインとCH3ドメインとの連結部に存在する。ミュー重鎖は、pH6.0又はpH7.5においてFcRnに結合しないので、天然IgMは、FcRn媒介経路を利用して、白血球における分解から抗体を救済することができないため、一般に、天然IgG抗体よりも半減期が短い。

20

【0047】

プロテインAは、もともと黄色ブドウ球菌の細胞壁において発見された、40~60kDaの表面蛋白質である。プロテインAは、マウスIgG2a及びIgG2bのほか、ヒトIgG1、IgG2及びIgG4に高い親和性で特異的に結合する。プロテインAは、ヒトIgG3、IgA又はIgMには結合しない。プロテインAは、抗体のアフィニティ精製に使用される。

【0048】

プロテインGは、65kDa（G148プロテインG）及び58kDa（C40プロテインG）の連鎖球菌（Streptococcal）細胞表面蛋白質である。プロテインGは、血清アルブミン結合ドメインを含むがIgG結合には必要とされず、削除されていることが多い。プロテインGは、ヒトIgGの全てのアイソタイプに特異的に結合するが、IgA及びIgMには結合しない。プロテインGも、抗体精製に使用される。

30

【発明を実施するための形態】

【0049】

I. 全般的な事項

本発明は、CD33、EGFR、PD-L1などのがん関連抗原に結合する1本目のアームと、OX40、CD40、GITR、ICOS、4-1BBなどの共刺激分子に結合する2本目のアームを有する二重特異性抗体を提供する。本発明の実施にメカニズムの理解は必須ではないが、がん関連抗原を発現するがん細胞と、共刺激分子を発現する免疫細胞との間に、本発明の二重特異性抗体がブリッジングすることで、共刺激分子がクラスター化し、がん細胞に近接した場所で免疫細胞が選択的に活性化されると考えられる。そのため、免疫細胞は、健康な組織への毒性を抑えながら、がん細胞に対する免疫治療効果を発揮できる。二重特異性抗体は、受容体とリガンドとの相互作用（例えば、EGFRとEGFとの相互作用、PD-L1とPD1との相互作用、又はCD33とシアル酸との相互作用）にアンタゴナイズする結果、がん関連抗原を発現する細胞に対して追加の活性を有し得る。がん細胞（又は病原体に感染した細胞）と共刺激分子に結合する本発明のいくつかの二重特異性抗体は、それらの2種類の細胞の間にブリッジを作り、細胞間接合部で共刺激分子の多価架橋による免疫応答を引き

40

50

起こし、がんや感染症と戦うことができる。また、本発明のいくつかの二重特異性抗体は、チェックポイント分子（例えば、PD-L1）の機能を阻害し、共刺激分子（例えば、GITR、OX40、CD40、ICOS、4-1BB）の多価架橋によるシグナル伝達経路を誘発することで、免疫応答を高めることができる。

【0050】

II. 標的

本発明の二重特異性抗体は、それぞれが異なる標的抗原に特異的に結合する少なくとも2本のアームを有する。標的となりうる蛋白質のクラスの1つは、がん関連抗原である。このような抗原は、がんによって発現され、典型的にはコントロールとなる正常組織よりも高いレベルで発現されている（過剰発現）。がん関連抗原の例としては、CD33、EGFR、PD-L1などがある。これらのターゲットのヒト型の例示的なSwiss Prot番号は、P20138、P00533、Q9NZQ7である。CD33は、シアル酸と結合し、主に急性骨髄性白血病などの骨髄由来のがんで過剰発現している。EGFRはEGFと結合し、主に胃がん、乳がん、子宮内膜がん、大腸がん、頭頸部がん、卵巣がん、子宮頸がん、膀胱がん、及び食道がんなどで過剰発現する。PD-L1はPD1と結合し、胃がん、肝細胞カルシノーマ、腎細胞カルシノーマ、食道がん、膵臓がん、卵巣がん、膀胱がんなどのがんで過剰に発現する。別のクラスの蛋白質は、病原体に感染した細胞の表面に発現する抗原である。

【0051】

別のクラスの蛋白質は、CD40、OX40、GITR、ICOS、4-1BBなどの共刺激分子である。P25942、P23510、Q9Y5U5、Q9Y6W8、及びQ07011がこれらの標的のヒト型の例示的なSwiss Prot番号である。文脈から明らかでない限り、特定の標的への言及は、ヒト型に言及していると理解すべきである。しかし、実験動物（例えば、マウス、ラット）、非ヒト霊長類、コンパニオンアニマル、又は農場動物などの非ヒト型も使用可能である。

【0052】

III. 各標的に対する例示的な抗体

二重特異性抗体は、コンポーネント抗体の重鎖及び軽鎖可変領域のペアから形成される。コンポーネント抗体は、とりわけ、げっ歯類、キメラ化、ペニヤ化、ヒト化、霊長類化、霊長類、又はヒトであることができる。コンポーネント抗体は、同じ種類のもので、異なる種類のものでよい。例えば、一方はヒト化で、他方はヒトであることができる。

【0053】

抗原に対する他の非ヒトモノクローナル抗体、例えば、マウス、モルモット、霊長類、ウサギ又はラットのモノクローナル抗体の生産は、例えば、抗原もしくはその断片、又は抗原を有する細胞で動物を免疫することによって行うことができる。Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (CSHP NY, 1988)（すべての目的のために参照により組み込まれる）を参照。このような抗原は、天然のソースから、ペプチド合成によって、又は組換え発現によって得ることができる。任意に、抗原は、キャリア蛋白質と融合又は複合体化した状態で投与することもできる。任意に、抗原はアジュバントと一緒に投与できる。アジュバントは、以下のようにいくつかのタイプを使用できる。実験動物の免疫化には、完全フロイントアジュバントに続いて不完全アジュバントを用いることが好ましい。

【0054】

ヒト化抗体は、非ヒト「ドナー」抗体からのCDRがヒト「アクセプター」抗体配列に移植されている、遺伝子操作された抗体である（例えば、Queen, U.S. Pat. Nos. 5,530,101 and 5,585,089; Winter, U.S. Pat. No. 5,225,539, Carter, U.S. Pat. No. 6,407,213, Adair, U.S. Pat. Nos. 5,859,205 and 6,881,557, Foote, U.S. Pat. No. 6,881,557を参照）。アクセプター抗体配列は、例えば、成熟ヒト抗体配列、そのような配列の複合体、ヒト抗体配列のコンセンサス配列、又は、生殖細胞系領域配列であってもよい。従って、ヒト化抗体は、完全に又は実質的にドナー抗体に由来するCDRのいくつか又は全て、並びに、完全に又は実質的にヒト抗体配列に由来する、定常領域（存在する場合）及び可変領域フレームワーク配列を有する抗体である。同様に、ヒト化重鎖は、完全に

又は実質的にドナー抗体重鎖に由来する、少なくとも1つ、2つ、通常は3つ全てのCDR、並びに、実質的にヒト重鎖可変領域フレームワーク配列及び定常領域配列に由来する、重鎖定常領域(存在する場合)及び重鎖可変領域フレームワーク配列を有する。同様に、ヒト化軽鎖は、完全に又は実質的にドナー抗体軽鎖に由来する、少なくとも1つ、2つ、通常は3つ全てのCDR、並びに、実質的にヒト軽鎖可変領域フレームワーク配列及び定常領域配列に由来する、軽鎖定常領域(存在する場合)及び軽鎖可変領域フレームワーク配列を有する。ナノボディ及びdAbsを除き、ヒト化抗体は、ヒト化重鎖及びヒト化軽鎖を含む。ヒト化抗体におけるCDRは、対応するCDR間で、対応残基(Kabatの規定による)の少なくとも85%、90%、95%又は100%が同一であるときは、非ヒト抗体における対応するCDRに実質的に由来する。抗体鎖の可変領域フレームワーク配列又は抗体鎖の定常領域は、カバトの規定による対応残基の少なくとも85%、90%、95%又は100%が同一であるときは、それぞれ、ヒト可変領域フレームワーク配列又はヒト定常領域に実質的に由来する。

【0055】

ヒト化抗体は、しばしば、マウス抗体由来の6つ全てのCDR(好ましくは、Kabatの定義による)を取り込んでいるが、ヒト化抗体は、全てよりも少ないCDR(例えば、マウス抗体由来の少なくとも3つ、4つ又は5つのCDR)にて作製することもできる(例えば、Pascalis et al., J. Immunol. 169:3076, 2002; Vajdos et al., Journal of Molecular Biology, 320: 415-428, 2002; Iwahashi et al., Mol. Immunol. 36:1079-1091, 1999; Tamura et al., Journal of Immunology, 164:1432-1441, 2000)。

【0056】

キメラ抗体は、非ヒト抗体(例えば、マウス)の軽鎖及び重鎖の成熟可変領域が、ヒトの軽鎖定常領域及び重鎖定常領域と組み合わせられた抗体である。このような抗体は、マウス抗体の結合特異性を実質的に又は完全に保持しており、約2/3がヒトの配列である。

【0057】

ベニヤ化抗体は、非ヒト抗体のいくつかの、通常は全てのCDR、及び、非ヒト可変領域フレームワーク残基を保持するが、B細胞エピトープ又はT細胞エピトープに寄与するかも知れない他の可変領域フレームワーク残基、例えば、露出残基(Padlan, Mol. Immunol. 28:489, 1991)が、ヒト抗体配列の対応位置由来の残基で置き換えられた、1種のヒト化抗体である。その結果、CDRが、非ヒト抗体に完全に又は実質的に由来し、非ヒト抗体の可変領域フレームワークが、置換によって、ヒト様とされた抗体となる。

【0058】

ヒト抗体は、ヒトから単離できるが、他に、ヒト免疫グロブリン遺伝子の発現からも生じる(例えば、インビトロでの又はファージ提示による遺伝子組み換えマウス)。ヒト抗体の生産方法には、トリオーマ法(Oestberg et al., Hybridoma 2:361-367 (1983); Oestberg, U.S. Pat. No. 4,634,664; and Engleman et al., U.S. Pat. No. 4,634,666)、ヒト免疫グロブリン遺伝子を含む遺伝子組み換えマウスの使用(例えば、Lonberg et al., WO93/12227 (1993); U.S. Pat. Nos. 5,877,397, 5,874,299, 5,814,318, 5,789,650, 5,770,429, 5,661,016, 5,633,425, 5,625,126, 5,569,825, 5,545,806, Nature 148, 1547-1553 (1994), Nature Biotechnology 14, 826 (1996), Kucherlapati, WO 91/10741 (1991)を参照)、及びファージディスプレイ法(例えば、Dower et al., WO 91/17271 and McCafferty et al., WO 92/01047, U.S. Pat. Nos. 5,877,218, 5,871,907, 5,858,657, 5,837,242, 5,733,743及び5,565,332を参照)を含む。

【0059】

抗体は、抗原との特異的な結合についてスクリーニングされる。抗体は、抗原の特定の領域への結合、参照抗体との競合、抗原を有する細胞のアゴニスト又はアンタゴニストであるかどうかをさらにスクリーニングできる。非ヒト抗体は、上述のようにキメラ化、ベニヤ化、ヒト化のフォームに変換できる。

【0060】

本明細書は、CD33、EGFR、PD-L1、CD40、OX40、GITR及びICOSに特異的に結合

10

20

30

40

50

する例示的な抗体を開示する。これらの抗体は、以下の表1に示すように、配列表で提供される成熟重鎖及び軽鎖可変領域配列及びKabat CDRによって特徴付けられる。

【0061】

【表1】

表1

標的	抗体名	成熟 VH	成熟 VL	CDRH1-3 配列番号	CDRL1-L3 配列番号
CD33	HuM195	配列番号 2 の 20 - 135	配列番号 7 の 21 - 131	94 - 96	97 - 99
EGFR	Ch225	配列番号 29 の 20 - 138	配列番号 30 の 21 - 127	100 - 102	103 - 105
OX40	HuOHX14DS	配列番号 12 の 20 - 138	配列番号 16 の 21 - 127	13 - 15	17 - 19
CD40	HuACS2	配列番号 48 の 20 - 138	配列番号 52 の 23 - 127	49 - 51	53 - 55
GITR	HuGAB11	配列番号 32 の 20 - 137	配列番号 36 の 21 - 127	33 - 35	37 - 39
PD-L1	HuPRO1	配列番号 61 の 20 - 138	配列番号 65 の 23 - 127	62 - 64	66 - 68
PD-L1	HuPRO2	配列番号 74 の 20 - 138	配列番号 78 の 23 - 128	75 - 77	79 - 81
PD-L1	HuPRO5	配列番号 84 の 19 - 137	配列番号 88 の 23 - 128	85 - 87	89 - 91
ICOS	HuTAM14	配列番号 108 の 20 - 136	配列番号 112 の 21 - 126	109 - 111	113 - 115
4-1BB	HuFOB5	配列番号 127 の 20 - 138	配列番号 131 の 21 - 133	128 - 130	132 - 134

10

【0062】

本明細書は、CD40、OX40、GITR、ICOS及び4-1BBに結合する例示的な一本鎖Fv (scFv) 抗体を開示する。このscFv抗体を以下の表2に示す。

20

【0063】

【表2】

表2

標的	抗体名	配列番号
OX40	HuOHX14DS.scFv	22
OX40	HuOHX14DS.scFv.ds	122
CD40	HuACS2.scFv	57
CD40	HuACS2.scFv.ds	123
GITR	HuGAB11.scFv	41
GITR	HuGAB11.scFv.ds	125
ICOS	HuTAM14.scFv	117
ICOS	HuTAM14.scFv.ds	124
4-1BB	HuFOB5.scFv.LH.ds	136
4-1BB	HuFOB5.scFv.HL.ds	139

30

【0064】

Kabat又は代替の定義、例えば、Chothia、ChothiaとKabatの組み合わせ、AbM又はContact (ワールドワイドウェブbioinf.org.uk/absを参照) によって定義された同じCDRを有する他の抗体、又は同じエピトープに結合する、又はこれらの抗体のいずれかとその標的蛋白質への結合を競合する他の抗体も使用できる。また、上記の抗体の代わりに、上記の標的のいずれかに結合する他の手段を用いることもできる。CD40、OX40、GITR、ICOS及び4-1BBに結合する抗体は、その受容体をアゴナイズし、それによってその受容体を発現する免疫細胞を活性化できる。がん関連抗原に結合する抗体は、がん関連抗原とそのリガンド又はカウンターレセプターとの相互作用をアンタゴナイズしてもしなくてもよい。アンタゴナイズ作用は、がん細胞に対する細胞傷害性の付加的なメカニズムを提供

40

50

するが、共刺激受容体に結合する二重特異性抗体の結合アームによる免疫細胞の活性化には必須ではない。

【0065】

CD33に対する他の抗体としては、ゲンツズマブ、リンツズマブ、BI836858を含む (H eider Blood 2011;118(15):4159-4168)。EGFRに対する抗体としては、セツキシマブとして販売されているキメラバージョンのC225、パニツムマブ、マツズマブ、ネシツムマブを含む。PD-L1に対する抗体には、デュルバルマブ、アベルマブ、アテゾリズマブ、MDX-1105/BMS936559を含む。CD40に対するアゴニスト抗体としては、CP-870, 893 (Pfizer及びVLST)、ダセツズマブ (Seattle Genetics)、Chi Lob 7/4 (サウサンプトン大学)、及びルカツマブ (Novartis) を含む (Vonderheide et al., Clin Canc er Res 19, 1035-1043 (2013))。アゴニストOX40抗体としては、MOXR0916 (Inf ante et al., Journal of Clinical Oncology 2016 34:15_suppl 101-101)、PF-04 518600 (Long et al., Journal of Clinical Oncology 2016 34:15_suppl, e14518 -e14518)、MEDI0562 (Glisson et al., Annals of Oncology, Volume 27, Issue suppl_6, 1 October 2016, 1052PD)、MEDI6469 (Bell et al., Clin Cancer Res 2 017;23(23_Suppl):Abstract nr 37) を含む。GITRに対するアゴニスト抗体としては、DTA-1 (Shimizu et al., Nat Immunol. 3, 135-142, 2002)、INCAGN01876 (G onzalez et al. Cancer Res. 2016 Volume 76, Issue 14, Abstract 3220)、及び2 8F3、19D3、18E10、3C3、2G6、8A6、9G7、14E3、19H8、及び6G10 (WO201 7087678) を含む。ICOSに対するアゴニスト抗体としては、MEDI-570 (Medimmune; Nicholson et al. Reprod. Toxicol. 2017 74:116-133)、GSK3359609 (GlaxoSm ithKline; Angevin et al. 2017 Cancer Res. Volume 77, Issue 13 Supplement, A bstract CT039)、BMS-986226 (Bristol-Myers Squib; Wang et al. 2019 BBA R ev. Cancer 1871:199-224)、JTX-2011 (Jounce Therapeutics; Michaelson et al. 2016 Cancer Res. Volume 76, Issue 14 Supplement, Abstract 573) を含む。4-1BBに対するアゴニスト抗体としては、ウレルマブ (Bristol-Myers Squib)、ウトミ ルマブ (Pfizer)、AGEN2373 (Agenus; Galand et al. 2019 J. Clin.Oncol. 37, no . 15 suppl.e14005) を含む。

【0066】

これらの抗体のいずれか、又はKabat又は代替の定義、例えば、Chothia、ChothiaとK abatの組み合わせ、AbM又はContactによって定義された同じCDRを有する他の抗体、同じエピトープに結合する、又はこれらの抗体のいずれかとその標的蛋白質への結合を競合する他の抗体も、本発明の二重特異性抗体に組み込むことができる。また、上記標的のい ずれかに結合する他の手段を、上記抗体の代わりに使用することもできる。

【0067】

本発明はまた、HuPRO1、HuPRO2及びHuPRO5を含むヒトPD-L1に特異的に結合するモノクローナル抗体、及びその抗体の1つと同じ6つのCDR (任意の従来 of 定義による)、又はモノクローナル抗体と同じペアの成熟重鎖及び軽鎖可変領域を共有する他の抗体を提供する。そのような抗体は、PD-L1とPD1との相互作用を阻害できる。本発明はまた、HuOHX14DSを含むヒトOX40に特異的に結合するモノクローナル抗体、及びその抗体と 同じ6つのCDR (任意の従来 of 定義による) 又は同じペアの成熟重鎖及び軽鎖可変領域を共有する他の抗体を提供するものである。本発明はまた、HuACS2を含むヒトCD40に特異的に結合するモノクローナル抗体、及び同じ6つのCDR (任意の従来 of 定義による) 又は同じペアの成熟重鎖及び軽鎖可変領域を共有する他の抗体を提供する。本発明はまた、HuTAM14を含むヒトICOSに特異的に結合するモノクローナル抗体、及び同じ6つのCDR (任意の従来 of 定義による) 又は同じペアの成熟重鎖及び軽鎖可変領域を共有する他の抗体を提供する。本発明はまた、HuFOB5を含むヒト4-1BBに特異的に結合するモノクロー ナル抗体、及び同じ6つのCDR (任意の従来 of 定義による) 又は同じペアの成熟重鎖及び 軽鎖可変領域を共有する他の抗体を提供する。

【0068】

IV. 二重特異性抗体のフォーマット

二重特異性抗体については、100以上のフォーマットが記載されている（例えば、Kontermann et al., *Drug Discovery Today* 20, 838-847 (2015); Sedykh et al., *Drug Des. Devel. Ther.* 2, 195-209 (2018)）。このようなフォーマットは、2つの標的のそれぞれに対して少なくとも1つの結合部位を含む。好ましいフォーマットは、各標的に対して2つ以上の結合部位を含む。

【0069】

いくつかのフォーマットは、各標的に対して1つずつ、2つの結合領域を有する通常の抗体と同様のテトラマー構造を有する。各結合領域は、対になった重鎖及び軽鎖の可変領域から形成され、これらの可変領域は重鎖及び軽鎖の定常領域にそれぞれ連結されている。そのような二重特異性抗体は、2つの結合部位とそれを形成する重鎖と軽鎖のペアが異なる点で、通常の抗体とは異なる。従って、そのような抗体は、2つの異なる重鎖と軽鎖のペアの会合を必要とする。

【0070】

一方の抗体のCH3ドメイン内の大きなアミノ酸を小さなアミノ酸に置換し（「ノブ」）、他方の抗体のその逆（「ホール」）を行うことにより、ホモダイマーの形成や重鎖のミスペアリングを低減するために、「ノブ-イントゥ-ホール」アプローチが採用されている（Ridgway et al., *Protein Eng* 9:617-21, 1996; Atwell et al., *J Mol Biol* 270:26-35, 1997; 及びU.S. Pat. No. 7,695,936）。そのようなフォーマットにおける軽鎖のミスペアリングは、いくつかの戦略によって減らすことができる。一つの戦略は、2つの異なる重鎖可変領域に対して共通の軽鎖可変領域を使用することである。しかし、これは一部の抗体にしか適用できない。また、ノブを含む半分子とホールを含む半分子を別々のバクテリアで発現させるというアプローチもある。また、CrossMabと呼ばれる別のアプローチでは、重鎖の一方のCH1ドメインと対応する軽鎖の定常CLドメインを交換して、設計された重鎖と軽鎖の間に正しいペアリングを誘導する（Schaefer et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 108:11187-92, 2011; WO 2009/080251; WO 2009/080252; WO 2009/080253）。別のアプローチは、VH-VL及びCH1-CLの界面に追加の変異を導入することである（Lewis et al., *Nat. Biotechnol.*, 32 (2014), pp. 191-198）。これらの変異は重鎖が軽鎖と優先的にペアになることを促す。別のアプローチは、プロテインA結合を促進する変異をFc領域の1つに導入し、中間的なプロテインA結合を有するヘテロダイマーペアを、より高い又は低いプロテインA結合を有するホモダイマーからアフィニティークロマトグラフィーによって選択することである（Tusdian et al, *MAbs*. 2016 May-Jun;8(4):828-38）。

【0071】

他の二重特異性抗体は、同じ重鎖と軽鎖のペアに複数の結合特異性を組み合わせることによって、ミスペアリングの問題を回避している。これを行うための1つのアプローチは、デュアル可変ドメインと呼ばれ、2つの異なる重鎖可変領域を重鎖定常領域にタンデムに連結し、2つの異なる軽鎖可変領域を軽鎖定常領域にタンデムに連結することである（Correia et al., *MAbs*. 2013 May 1; 5(3): 364-372）。このような抗体は、2つの同一のペアになった重鎖及び軽鎖が会合することにより、テトラマーとして組み立てることができる。組み立てられた抗体は、各標的に対する2つの異なる結合部位を含む。

【0072】

本発明の実施例で踏襲されている別のアプローチは、一本鎖Fv (scFv) を重鎖定常領域のC末端に連結することにより、第2の結合特異性を組み込むことである。このような二重特異性抗体は、標準的な抗体と同様に、重鎖定常領域及び軽鎖定常領域のN末端に結合した重鎖可変領域及び軽鎖可変領域によって形成される第1結合部位を含む。重鎖のC末端は、第2結合部位を提供するscFvに結合している。scFvは典型的には、リンカーを介して結合され、さらにリンカーがscFvの重鎖と軽鎖の可変領域を結合している。scFvは、その軽鎖可変領域又は重鎖可変領域の末端からリンカーを介してFc領域に結合できる。2つの同一のペアになった重鎖と軽鎖の複合体化によって組み立てられた場合、そのような二重特

10

20

30

40

50

異性抗体は、2つの異なる特異性のそれぞれにおける2つの結合部位を含む。そのような二重特異性抗体のがん関連抗原又は感染細胞抗原と共刺激抗原結合アームは、どちらの方向にも取り付けることができる。重鎖と軽鎖の定常領域のN末端に結合するアームは、重鎖と軽鎖の可変領域として別々に提供され、C末端に結合するアームはscFvフラグメントとして提供される。このフォーマットの利点は、2つの異なる結合空間が重鎖定常領域全体によって分離されることであり、これは細胞間の橋渡しを促進し得る。

【0073】

別のフォーマットでは、第1の標的に特異的に結合するscFvを重鎖定常領域に、別の標的に特異的に結合するscFvを軽鎖定常領域に連結する。このような抗体は、各結合部位の2つのコピーを含むテトラマーとして組み立てられる(Bs(scFv)4-IgG) (Zuo et al., Protein Eng 13: 361-367, 2000)。

【0074】

他のフォーマットは、定常領域なしに一本鎖でscFv結合領域を連結する。例えば、BiTeフォーマットは、リンカーを介して2つのscFvフラグメントをリンクしている(例えば、Ross et al., PLoS ONE 12(8): e0183390, 2017を参照)。このようなフォーマットは、エフェクター機能を欠き、半減期が短い傾向にあるが、サイズが小さいことによるアクセス性や生産の容易さという利点があり得る。

【0075】

上記フォーマットの多くは、重鎖及び軽鎖可変領域の間、又は可変領域と定常領域の間にリンカーペプチドを含む。リンカーは、柔軟性を与える短いペプチドであり、多くの場合、主にGly、Ala及び/又はSerによって占められている。いくつかの例示的なリンカーは、Gly-Gly-Ala-Ala、Gly-Gly-Gly-Gly-Ser、Leu-Ala-Ala-Ala-Ala、及びそれらのマルチマーである。

【0076】

V. 定常領域の選択

二重特異性抗体のフォーマットの多くは、ヒト定常領域の少なくとも一部を含む。定常領域の選択は、部分的には、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性、抗体依存性細胞貪食性及び/又は補体依存性細胞傷害性が望まれるかどうかに依存する。例えば、ヒトのアイソタイプIgG1及びIgG3は補体依存性細胞傷害性を持ち、ヒトのアイソタイプIgG2及びIgG4は持たない。軽鎖定常領域は、ラムダ又はカッパであり得る。また、ヒトIgG1及びIgG3は、ヒトIgG2及びIgG4よりも強い細胞媒介性エフェクター機能を誘導する。ここで、ADCC、ADCP及びCDCは、二重特異性抗体の一方のアームによって結合されたがん細胞又は感染細胞に対する追加の作用機序を提供するのに有用であるが、他方のアームによって共刺激分子をアゴナイズして免疫細胞を活性化するには有用ではない。

【0077】

軽鎖及び/又は重鎖のアミノ末端又はカルボキシ末端の1つ又は数個のアミノ酸、例えば、重鎖のC末端リジンは、分子の一部又は全部において欠失又は誘導体化されていてもよい。補体媒介性細胞傷害性又はADCCなどのエフェクター機能を低下又は増加させるために(例えば、Winter et al., US Patent No. 5,624,821; Tso et al., US Patent No. 5,834,597; 及びLazar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:4005, 2006を参照)、又はヒトにおける半減期を延長させるために(例えば、Hinton et al., J. Biol. Chem. 279:6213, 2004を参照)、定常領域でアミノ酸置換を行うことができる。例えば、IgG Fcには、FcRn結合を増加させる多くの既知の変異がある。例示的な置換としては、250位のGln及び/又は428位のLeu、434位のSer又はAsn、252位のTyr、254位のThr、256位のGlu、及び434位のAlaが挙げられる(EUナンバリング)。FcRn結合の増加は、本発明のハイブリッド蛋白質がFcRnへの結合について内因性IgGとより強く競合する上で有利である。また、ADCC、ADCP又はCDCのいずれかを減少させるための多数の変異が知られている。(例えば、Winter et al., US Patent No. 5,624,821; Tso et al., US Patent No. 5,834,597; and Lazar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:4005, 2006を参照)。例えば、234位、235位、236位及び/又は237位のアミノ酸残基のいずれかを

置換すると、Fc γ 受容体、特にFc γ RI受容体に対する親和性が低下する（例えば、US 6,624,821を参照）。任意に、ヒトIgG2の234位、236位及び/又は237位のアミノ酸残基がAlaで置換され、235位がGln又はGluで置換される（例えば、US 5,624,821を参照）。エフェクター機能を低下させる他の置換としては、268位のAla、297位のGly又はAla、309位のLeu、322位のAla、327位のGly、330位のSer、331位のSer、238位のSer、268位のAla、309位のLeuを含む。

【0078】

ヒトの定常領域は、異なる個体間でアロタイプの変化及びアイソアロタイプの変化を示す。即ち、定常領域は、異なる個体において1つ以上の多型位置で異なり得る。アイソアロタイプは、アイソアロタイプを認識する血清が1つ以上の他のアイソタイプの非多型領域に結合する点でアロタイプと異なる。

【0079】

VI. 組換え抗体の発現

二重特異性抗体は、典型的には組換え発現によって生産される。二重特異性のフォーマットに応じて、1つ、2つ又はそれ以上の抗体鎖の発現が必要となる場合がある。複数の鎖を発現させる場合、それらは同じベクター又は異なるベクターから発現させることができる。組換えポリヌクレオチドコンストラクトは、典型的には、プロモーターのような、自然発生又は異種発現制御要素を含む、抗体鎖のコーディング配列に動作可能に連結された発現制御配列を含む。発現制御配列は、真核生物又は原核生物の宿主細胞を形質転換又はトランスフェクションできるベクターのプロモーターシステムであり得る。ベクターが適切な宿主に組み込まれると、宿主は、ヌクレオチド配列の高レベルの発現及び二重特異性抗体の収集及び精製に適した条件で維持される。

【0080】

これらの発現ベクターは、典型的には、エピソームとして、又は宿主の染色体DNAの不可欠な部分として、宿主生物において複製可能である。典型的には、発現ベクターは、所望のDNA配列で形質転換されたそれらの細胞の検出を可能にするために、選択マーカー、例えば、アンピシリン耐性又はハイグロマイシン耐性を含む。

【0081】

大腸菌 (*E.coli*) は、抗体、特に抗体フラグメントの発現に有用な原核宿主の1つである。酵母などの微生物も発現に有用である。サッカロミセスは、所望に応じて発現制御配列、複製起点、終止配列などを有する適切なベクターを持つ酵母宿主の1つである。典型的なプロモーターとしては、3-ホスホグリセリン酸キナーゼをはじめとする糖分解酵素を含む。誘導性の酵母プロモーターとしてはとりわけ、アルコールデヒドロゲナーゼ、イソシトクロームC、並びにマルトース及びガラクトースの利用を担う酵素に由来するプロモーターを含む。

【0082】

免疫グロブリン又はそのフラグメントをコードするヌクレオチドの発現に、哺乳類細胞を用いることができる。Winnacker, *From Genes to Clones* (VCH Publishers, NY, 1987) を参照。インタクトの異種蛋白質を分泌できる適切な宿主細胞系が多数開発されており、CHO細胞系、様々なCOS細胞系、HeLa細胞、HEK293細胞、L細胞並びに、Sp2/0及びNS0を含む非抗体生産ミエローマを含む。細胞は非ヒト細胞であってもよい。これらの細胞に用いる発現ベクターは、複製起点、プロモーター、エンハンサーなどの発現制御配列 (Queen et al., *Immunol. Rev.* 89:49 (1986)) 並びに、リボソーム結合部位、RNAプライス部位、ポリアデニル化部位、及び転写ターミネーター配列などの必要なプロセッシング情報部位を含んでもよい。発現制御配列は、内在遺伝子、サイトメガロウイルス、SV40、アデノウイルス、ウシバピローマウイルスなどに由来するプロモーターを含んでもよい。Co et al., *J. Immunol.* 148:1149 (1992) を参照。

【0083】

あるいは、抗体コード配列をトランスジーンに組み込んで、トランスジェニック動物のゲノム内に導入した後トランスジェニック動物の乳の中に発現させてもよい（例えば、U.

10

20

30

40

50

S. Pat. No. 5,741,957; U.S. Pat. No. 5,304,489; 及びU.S. Pat. No. 5,849,992を参照)。適切なトランスジーンとしては、カゼイン又はベータラクトグロブリンなどの乳腺特異的遺伝子由来のプロモーター及びエンハンサーと作動可能に連結された、軽鎖及び/又は重鎖のコード配列を含む。

【0084】

目的とするDNAセグメントを含むベクターは、細胞宿主の種類に応じた方法により宿主細胞に導入できる。例えば、原核細胞には塩化カルシウムトランスフェクションがよく用いられ、他の細胞宿主にはリン酸カルシウム処理、エレクトロポレーション、リポフェクション、遺伝子銃、又はウイルスベースのトランスフェクションを用いることができる。哺乳類細胞の形質転換に用いられる方法としては、ポリブレンの使用、プロトプラスト融合、リボソーム、エレクトロポレーション、及びマイクロインジェクションを含む。トランスジェニック動物の作製には、トランスジーンをマイクロインジェクションにより受精卵母細胞内に注入するか胚性幹細胞のゲノム内に組み込み、そのような細胞の核を除核卵母細胞内に移入できる。

【0085】

抗体の重鎖及び軽鎖をコードするベクター（1つ又は複数）を細胞培養物に導入した後、細胞プールを無血清培地中で抗体の生産力及び品質についてスクリーニングできる。次に、最も生産量の多い細胞プールをFACSベースのシングルセルクローニングに供して、モノクローナルラインを作製できる。培地1L当たり7.5g超に相当する、1日当たり50pg/細胞又は100pg/細胞超の具体的な生産量を用いることができる。シングルセルクローニングにより生産される抗体を濁度、ろ過特性、PAGE、IEF、UVスキャン、HP-SEC、炭水化物-オリゴ糖マッピング、質量分析並びに、ELISA又はBiacoreなどの結合アッセイについて試験できる。次に、選択したクローンを複数のバイアルに保管しのちの使用のために凍結保存する。

【0086】

発現後、抗体をプロテインA捕捉、HPLC精製、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動などを含む当該技術分野の標準的方法に従って精製できる（典型的にはScopes, Protein Purification (Springer-Verlag, NY, 1982)を参照)。

【0087】

コドン最適化、プロモーターの選択、転写エレメントの選択、ターミネーターの選択、無血清シングルセルクローニング、細胞バンキング、コピー数増幅のための選択マーカーの使用、CHOターミネーター、又は蛋白質力価の向上を含む、抗体の商業的生産の方法論を用いることができる（例えば、US 5,786,464; US 6,114,148; US 6,063,598; US 7,569,339; W02004/050884; W02008/012142; W02008/012142; W02005/019442; W02008/107388; W02009/027471; 及びUS 5,888,809を参照）。

【0088】

VII. 核酸

本発明は、上述の重鎖及び軽鎖のいずれかをコードする核酸をさらに提供する。任意に、そのような核酸は、シグナルペプチドをさらにコードし、核酸の定常領域コーディング配列にシグナルペプチドを連結して発現させることができ、プロモーター、エンハンサー、リボソーム結合部位、転写終了シグナルなどのコーディング配列の発現を確実にするための制御配列と作動可能に連結できる。重鎖及び軽鎖をコードする核酸は、単離された形で生じさせることができ、又は1つ以上のベクターにクローニングできる。核酸は、例えば、固相合成又はオーバーラップするオリゴヌクレオチドのPCRによって合成できる。重鎖及び軽鎖をコードする核酸は、1つの連続した核酸として、例えば、発現ベクター内で結合することができ、又は別々に、例えば、それぞれ独自の発現ベクターにクローン化することができる。

【0089】

VIII. 治療方法及び医薬組成物

本発明の二重特異性抗体は、二重特異性抗体の1つのアームが、上記で開示されたよう

な、がんで発現又は過剰発現された標的に結合するものを含むがんの治療に使用できる。二重特異性抗体は、固形腫瘍、及び血液悪性腫瘍の治療に使用できる。血液悪性腫瘍には、白血病（例えば、T細胞大顆粒リンパ球白血病）、リンパ腫（ホジキン又は非ホジキン）、又は多発性ミエローマを含む。固形腫瘍としては、皮膚（例えば、メラノーマ）、卵巣、子宮内膜、腎臓、肝臓、膵臓、膀胱、乳房、卵巣、前立腺、直腸、結腸、胃、腸、膵臓、肺、胸腺、甲状腺、腎臓、脳を含む。

【0090】

本発明の二重特異性抗体は、二重特異性抗体が、感染細胞で発現されるが一致する非感染細胞では発現されない抗原に特異的に結合する一つのアームを有する場合、病原性感染症を治療するために使用され得る。このような抗原は、病原体によってコードされ得るか、又は病原体による感染に応答して細胞によって発現され得る。感染細胞に発現する抗原の例としては、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）の糖蛋白質gp41及びgp120、ヒトT細胞白血病ウイルス1型（HTLV-1）のEnv蛋白質、単純ヘルペスウイルス（HSV）の糖蛋白質gB及びgH、インフルエンザヘマグルチニン（HA）及びノイラミニダーゼ（NA）、及び呼吸器合胞体ウイルス（RSV）のF蛋白質を含む。二重特異性抗体で治療可能な病原性感染症の例としては、ウイルス、細菌、原虫、真菌感染症を含む。ウイルス感染症の例としては、HIV、肝炎（A、B、又はC）、ヘルペスウイルス（例えば、VZV、HSV-1、HAV-6、HSV-II、CMV、エプスタインバールウイルス）、アデノウイルス、XMRV、インフルエンザウイルス、フラビウイルス、エコーウイルス、ライノウイルス、コクサッキーウイルス、コロナウイルス、呼吸器シンシチアルウイルス、ムンプスウイルス、ロタウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、パルボウイルス、ワクシニアウイルス、HTLVウイルス、デングウイルス、MLV関連ウイルス、パピローマウイルス、モルスカムウイルス、ポリオウイルス、狂犬病ウイルス、JCウイルス、及びアルボウイルス性脳炎ウイルスを含む。細菌感染症のいくつかの例としては、クラミジア、リケッチア菌、マイコバクテリア、ブドウ球菌、連鎖球菌、肺炎球菌、髄膜炎球菌及びコノコクシ（*Conococci*）、クレブシエラ、プロテウス、セラチア、シュードモナス、レジオネラ、ジフテリア、サルモネラ、バチルス、コレラ、テタナス、ボツリヌス、炭疽菌、ペスト、レプトスピラ症、ライムス病菌、連鎖球菌、又はナイセリアを含む。病原性真菌の例としては、カンジダ、アスペルギルス、クリプトコッカス、ヒストプラズマ、ニューモシスチス、スタキボトリスを含む。原生動物の例としては、クリプトスポリジウム、ジアルジアラムリア及びプラスモジウムを含む。

【0091】

二重特異性抗体は、発症を遅らせ、重症度を軽減し、さらなる悪化を抑制し、及び/又は状態の少なくとも1つの徴候又は状態を改善するような投与量、投与経路及び投与頻度を意味する有効なレジメで投与される。対象が既に疾患に罹患している場合、そのレジメは治療上有効なレジメと呼ぶことができる。対象が一般集団と比較して疾患のリスクが高いが、まだ症状を経験していない場合、レジメは予防的に有効なレジメと呼ぶことができる。いくつかの例では、治療的又は予防的な有効性は、個々の対象において、過去のコントロール又は同じ対象における過去の経験と比較して観察できる。他の例では、治療的又は予防的な有効性は、前臨床試験又は臨床試験において、未治療の対象のコントロール集団と比較して、治療を受けた対象の集団で実証できる。

【0092】

好ましくは、二重特異性抗体は、その構成抗体を個別に比較して、がん又は感染細胞に対して少なくとも相加的な活性を示し、より好ましくは相乗的な活性を示す。相乗効果は、Tallarida, *Genes Cancer*. 2011 Nov; 2(11): 1003-1008に述べられているように、定量的に評価することが好ましい。また好ましくは、二重特異性抗体は、それぞれが二重特異性抗体と等モル濃度である、その構成抗体の混合物と比較して増加した活性を示す。このような活性は、例えば、二重特異性抗体の一方のアームに特異的に結合した抗原を発現するがん細胞又は感染細胞に対する、二重特異性抗体の他方のアームに特異的に結合した共刺激分子を発現する免疫細胞の存在下での細胞傷害性又はサイトスタティシティと

して測定できる。

【0093】

二重特異性抗体の例示的な投与量は、0.01～20、又は0.5～5、又は0.01～1、又は0.01～0.5、又は0.05～0.5mg/kg体重（例えば、0.1、0.5、1、2、3、4、又は5mg/kg）、又は固定用量として10～1500mgである。投与量は、患者の状態及び事前の治療に対する反応（もしあれば）、治療が予防的であるか治療的であるか、及び障害が急性であるか慢性であるか、などに依存する。

【0094】

投与は、非経口、静脈内、経口、皮下、動脈内、頭蓋内、髄腔内、腹腔内、局所、鼻腔内、又は筋肉内で行うことができる。体循環への投与は、静脈内投与又は皮下投与が好ましい。静脈内投与は、例えば、30～90分などの時間をかけて注入することにより行うことができる。

【0095】

投与の頻度は、他の要因の中でもとりわけ、循環系における二重特異性抗体の半減期、対象の状態、投与経路に依存する。投与頻度は、毎日、毎週、毎月、四半期ごと、又は患者の状態の変化や治療対象の障害の進行に応じて不定期に行うことができる。静脈内投与の場合は、連続した治療期間中、週1回から四半期に1回の頻度が例示されるが、それより多い又は少ない頻度での投与も可能である。皮下投与の場合、例示的な投与頻度は、毎日から毎月であるが、それより多い又は少ない頻度での投与も可能である。

【0096】

投与回数は、障害が急性であるか慢性であるか、及び治療に対する障害の反応に依存する。急性障害又は慢性障害の急性増悪の場合、1回から10回の投与で十分であることが多い。急性疾患や慢性疾患の急性増悪時には、1回のボラス投与（任意に分割投与）で十分な場合もある。急性疾患や急性増悪の再発に対しては、治療を繰り返すことができる。慢性疾患に対しては、二重特異性抗体を定期的に、例えば、毎週、隔週、毎月、四半期、6ヶ月ごとに、少なくとも1年、5年、10年、又は対象の生涯にわたって投与できる。

【0097】

医薬組成物は、好ましくは、ヒトへの非経口投与に適している（例えば、FDAの基準に従う）。非経口投与のための医薬組成物は、好ましくは無菌かつ実質的に等張であり、GMP条件下で生産される。医薬品組成物は、単位投与形態（即ち、1回の投与のための投与量）で提供できる。医薬組成物は、1つ以上の薬学的に許容される担体、希釈剤、賦形剤又は補助剤を用いて製剤化できる。薬学的に許容されるとは、ヒトへの投与に適していることを意味し、例えば、FDAによって承認されているか、承認可能であることを意味する。処方方は、選択した投与経路によって異なる。注射の場合、抗体は水溶液、好ましくはHank's液、Ringer's液、生理食塩水又は酢酸バッファーなどの生理学的に適合したバッファーで処方できる（注射部位の不快感を軽減するため）。この溶液には、懸濁剤、安定化剤、分散剤などの調整剤を含み得る。あるいは、抗体は、使用前に適切なビヒクル、例えば、滅菌パイロジェンフリー水で構成するために凍結乾燥された形態であってもよい。

【0098】

本発明の二重特異性抗体による治療は、治療される障害に対して有効な他の治療と組み合わせることができる。がんの治療に使用する場合、本発明の二重特異性抗体は、化学療法、放射線、幹細胞治療、手術、又はHER2抗原に対するハーセプチンTM（トラスツズマブ）、VEGFに対するアバスタチンTM（ベバシズマブ）、又はEGF受容体に対する抗体（例えば、（アービタックスTM、セツキシマブ）、及びベクティビックスTM（パニツムマブ））などの他の生物製剤による治療と組み合わせることができる。化学療法剤としては、クロラムブシル、シクロホスファミド又はメルファラン、カルボプラチナム、ダウノルビシン、ドキソルビシン、イダルビシン、及びミトキサントロン、メトトレキサート、フルダラビン、及びシタラビン、エトポシド又はトポテカン、ビンクリスチン、ビンブラステインを含む。感染症に対しては、抗生物質、抗ウイルス剤、抗真菌剤、抗寄生虫剤などを併用して治療できる。

【0099】

IX. 他の方

本発明の二重特異性抗体は、診断法、予後診断法、実験法にも利用できる。それらは、がんによって発現された抗原のレベル、又はがんを有する患者の循環中の抗原のレベルを測定し、そのレベルが測定可能であるか、あるいは上昇しているかどうかを判断し、従って、がんの治療を追跡し、導くために使用できる。なぜなら、抗原の測定可能なレベル又は上昇したレベルに関連するがんは、がんに結合するアームを含む二重特異性抗体による治療に最も感受性が高いからである。二重特異性抗体は、特に、ELISAアッセイ、ラジオイムノアッセイ、又は免疫組織化学に使用できる。二重特異性抗体は、蛍光分子、スピン標識分子、酵素又は放射性同位元素で標識することができ、アッセイを行うために必要な全ての試薬を含むキットの形で提供されてもよい。

10

【0100】

上又は下で引用された全ての特許出願、ウェブサイト、その他の出版物、アクセッション番号などは、全ての目的のために、個々の項目が参照により組み込まれることが具体的かつ個別に示されているのと同じ程度に、その全体が参照により組み込まれる。ある配列の異なるバージョンが異なる時期にアクセッション番号に関連付けられている場合、本出願の有効出願日におけるアクセッション番号に関連付けられたバージョンを意味する。有効出願日とは、該当する場合はアクセッション番号を参照して、実際の出願日と優先権出願の出願日のうち、どちらか早い方を指す。同様に、出版物やウェブサイトなどの異なるバージョンが異なる時期に公開されている場合、他に指示がない限り、本願の有効出願日に最も最近公開されたバージョンを意味する。本発明の任意の特徴、工程、要素、実施形態、又は側面は、特に他に示されていない限り、他のものと組み合わせて使用できる。本発明は、明確さと理解のために、例示及び実施例を用いてある程度詳細に説明してきたが、添付の請求項の範囲内で特定の変更及び修正を実施できることは明らかであろう。

20

【実施例】

【0101】

実施例1：一般的な方法及び材料

【0102】

遺伝子クローニング、変異誘発、プラスミド構築、ELISA及びFACSは、Green及びSambrook (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 4th ed., 2012, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY)、Greenfield (Antibodies, A Laboratory Manual, 2nd ed., 2014, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY)、Kostelnyら (Int. J. Cancer 93:556-565, 2001)、Coleら (J. Immunol. 159:3613-3621, 1997) 及びTsurushitaら (Methods 36:69-83, 2005) に記載の標準的な実験技術や、ベンダーのプロトコールに従って実施した。

30

【0103】

所望の抗原に対するモノクローナル抗体を生産するマウスハイブリドーマは、GenomONE CF EX Cell Fusion Reagent (Cosmo Bio, Carlsbad, CA) を用いた標準的な細胞融合技術に従ってJN Biosciences (Cosmo Bio, Carlsbad, CA) で作製した。マウスへの免疫には、精製された可溶性の組換え抗原、通常はヒトIgG Fc領域への融合物、又は表面に組換え抗原を発現するマウス細胞株を使用した。ハイブリドーマ細胞の培養上清中に分泌されたマウスモノクローナル抗体を一連のスクリーニングに供し、以下の特性を有する抗体を同定した。(1)ヒト抗原への特異的結合、(2)カニクイザル抗原への特異的結合、(3)抗原とそのリガンドとの相互作用のブロック、又は細胞表面の抗原との結合による細胞活性の刺激などの所望の生物学的機能。選択したハイブリドーマ細胞は、ハイブリドーマSFM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) などの無血清培地で増殖させた。マウスモノクローナルIgG抗体をプロテインAアフィニティカラム (MabSelect SuRe, GE Healthcare Life Sciences, Marlborough, MA) を用いて製造業者のプロトコールに従って精製した。精製した抗体のバッファーは、透析によってリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に交換した。抗体濃度は、280nmでの吸光度を測定することにより決定した (OD 1.4

40

50

=1mg/ml)。

【0104】

培養上清中のマウスIgG抗体の発現量をサンドイッチELISAで測定した。典型的な実験では、ELISAプレートをやぎ抗マウスIgG Fc特異的ポリクローナル抗体 (SouthernBiotech, Birmingham, AL) でコートし、Wash Buffer (0.05% Tween 20を含むPBS) で洗浄し、ELISA Buffer (2% スキムミルクと0.05% Tween 20を含むPBS) でブロッキングした。Wash Bufferでの洗浄後、ELISA Bufferで適切に希釈した試験サンプルをELISAプレートに供した。標準品として適切なマウスIgG/ カッパ抗体を用いた。ELISAプレートを室温で60分間インキュベートし、Wash Bufferで洗浄した後、結合したマウス抗体をHRP結合ヤギ抗マウスカッパ鎖ポリクローナル抗体 (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX) を用いて検出した。プレートを室温で30分インキュベートし、Wash Bufferで洗浄した後、ABTS基質 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を加えて発色を開始し、2% シュウ酸で停止させた。吸光度は405 nmで読み取った。

【0105】

培養上清中のキメラ抗体及びヒト化IgG/ カッパ抗体の発現は、ELISAプレートのコーティングにヤギ抗ヒトIgG Fc特異的ポリクローナル抗体 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) を使用し、結合した抗体の検出にHRP結合ヤギ抗ヒトカッパ鎖ポリクローナル抗体 (Bethyl Laboratories) を使用した以外は、上述のようにサンドイッチELISAで測定した。

【0106】

マウスモノクローナル抗体の重鎖及び軽鎖可変領域 (それぞれVH及びVL) の配列決定は、Tsurushitaら (Methods 36: 69-83, 2005) に記載されている手順のような標準的な分子生物学的技術で行った。VH及びVLのヒト化は、Tsurushitaら (前掲) に記載された一般的な手順で以下のように行った。まず、ヒト化するマウス抗体の可変領域の3次元分子モデルを適切なソフトウェアを用いて構築した。次に、その分子モデルを用いて、CDR (相補性決定領域) 構造の形成に重要な、あるいは抗原結合に必要なフレームワークアミノ酸残基を特定する。並行して、マウスのVH及びVLのアミノ酸配列とそれぞれ高い相同性を有すcDNA由来のヒトVH及びVLのアミノ酸配列をそれぞれ選択する。最後に、抗原結合部位の形成に重要であると同定されたフレームワークアミノ酸残基とともにCDR配列を、マウスの可変領域から対応する選択されたヒトのフレームワーク配列にグラフトする。

【0107】

チャイニーズハムスター卵巣細胞株CHO-K1への安定したトランスフェクションは、エレクトロポレーションによって行った。トランスフェクションの前に、適切な制限酵素を用いて発現ベクターを直鎖化した。典型的な実験では、約 10^7 個のCHO-K1細胞を20 μ gの直鎖化したプラスミドでトランスフェクションし、SFM4CHO培地 (GE Healthcare Life Sciences) に懸濁し、細胞を適切に希釈した後、いくつかの96ウェルプレートに100 μ l/ウェルでプレーティングした。48時間後、20 μ g/mlのピューロマイシンを含むSFM4CHO培地を100 μ l/wellで添加し、安定したトランスフェクタントを単離した。選抜開始から約10日後、トランスフェクタントの培養上清を抗体生産のためにアッセイした。高レベルの抗体を生産するCHO-K1安定トランスフェクタントを、上述のようにELISAによって同定した。

【0108】

本発明のヒト化IgG抗体及び二重特異性IgG抗体などの組換え抗体を高度に生産するCHO-K1安定トランスフェクタントを、細胞の生存率が50%未満になるまでSFM4CHOで培養した。遠心分離とろ過の後、培養上清をプロテインAカラム (HiTrap MABSelect Sure, GE Healthcare Life Sciences) にロードした。カラムをPBSで洗浄した後、0.1MのNaClを含む0.1Mのグリシン-HCl (pH3.0) 又は0.1Mの酢酸ナトリウム (pH3.6) で抗体を溶出させた。溶出した抗体のバッファーは、1M Tris-HCl (pH8.0) で中和した後、透析によりPBSに変えた。280nmでの吸光度を測定し、抗体濃度を決定した (1mg/ml=

10

20

30

40

50

1.4 OD)。

【0109】

実施例2：CD33及びOX40に結合する二重特異性抗体（BS824）の構築

【0110】

ヒトCD33 (Siglec-3としても知られている；配列番号1) に結合するヒト化抗CD33 IgG1/カッパ抗体 (Co et al., J. Immunol. 148:1149-1154, 1992) の生産のために設計された哺乳類発現ベクターpHuM195-IgG1 (図1A) は、以下の遺伝子要素を含む。図1AのSallサイトから時計回りに進むと、このベクターは、抗体重鎖遺伝子の転写を開始するために、ヒトサイトメガロウイルス (CMV) 主要最初期プロモーター及びエンハンサー (図ではCMV-P) で始まる重鎖転写ユニットを含む。CMVプロモーターの後には、SpeI

10

SallサイトとHindIIIサイトに挟まれたヒト化M195 VH (配列番号2) をコードするエクソン、ヒトガンマ-1重鎖のCH1 (配列番号3)、ヒンジ (Hinge; 配列番号4)、CH2 (配列番号5)、CH3 (配列番号6) 定常領域をコードするエクソンと介在するイントロンを含むゲノム配列、そしてEagIサイトの後にはヒトガンマ-1重鎖遺伝子のポリアデニル化サイトが続く。重鎖遺伝子配列の後、軽鎖転写ユニットは、CMVプロモーターとエンハンサー (CMV-P) から始まり、NheIサイトとEcoRIサイトに挟まれたヒト化M195 (HuM195) VL (配列番号7) をコードするエクソン、イントロンの一部が先行するヒトカッパ鎖定常領域エクソン (Ck) (配列番号8) をコードするエクソンを含むゲノム配列、Ckエクソンに続くヒトカッパ鎖遺伝子のポリアデニル化サイトが続く。軽鎖遺伝子の後には、SV40

20

初期プロモーター (SV40-P)、ピューロマイシン耐性のためのピューロマイシンN-アセチルトランスフェラーゼ遺伝子 (puro)、及びSV40ポリアデニル化サイトを含むセグメント (SV40-A) が続く。最後に、pHuM195-IgG1は、細菌の複製起点 (pUC ori) とβラクタマーゼ遺伝子 (β lactamase) を含む。図中の矢印は、転写の方向を示している。ヒト化IgG1/カッパモノクローナル抗体 (HuM195-IgG1) は、哺乳類細胞においてpHuM195-IgG1から発現される。

【0111】

ヒト及びカニクイザルのOX40 (TNFRSF4及びCD134としても知られる) に特異的に結合するIgG/カッパモノクローナル抗体OHX14を生産するマウスハイブリドーマを、実施例1に記載したように単離した。免疫原として、ヒトOX40の細胞外領域をFLAGポリペプチド (配列番号9) に融合させ、次いでヒトCD55のグリコシルホスファチジルイノシール (GPI) アンカレッジシグナル (配列番号10) (OX40-FLAG-GPI; 配列番号11) に融合させて構成される組換えヒトOX40を表面に安定的に発現するマウスミエローマ細胞株NS0を用いた。OHX14 VH及びVLの配列決定及びヒト化は、Tsurushitaら (前掲) に記載されているように実施した。

【0112】

ヒト化OHX14 (HuOHX14DS) VHのアミノ酸配列は、MGRLTSSFLLLIVPAYVLSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTSYIMHWVRQAPGQGLEWIGYINPYNSGTYNEKFKGRVTITSDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAHYYGSTFTMDYWGQGTTTVTVSS (配列番号12) である。HuOHX14DS VHのCDR1、2及び3のアミノ酸配列は、Kabatらによる定義 (Sequences of Proteins of Immunological Interests, Fifth edition, NIH Publication No. 91-3242, U.S. Department of Health and Human Services, 1991) によれば、それぞれSYIMH (配列番号13)、YINPYNSGTYNEKFKG (配列番号14) 及びYYGSTFTMDY (配列番号15) である。HuOHX14DS VHをコードする遺伝子は、コード領域の3'末端にスプライスドナーシグナル、フラグメントの5'末端にSpeIサイト、フラグメントの3'末端にHindIIIサイトを含むエクソンとして合成した。

【0113】

ヒト化OHX14 (HuOHX14DS) VLのアミノ酸配列は、MMSSAQFLGLLLLCFQGTRCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRTYLNWYQQKPKGKVPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCQQGNTLPWTFGGGKVEIK (配列番号16) である。HuOHX14DS VLのCDR1、2及び3のアミノ酸配列は、Kabatら (前掲) による定

10

20

30

40

50

義によれば、それぞれRASQDIRTYLN（配列番号17）、YTSRLHS（配列番号18）及びQQGNTLPWT（配列番号19）である。HuOHX14DS VLをコードする遺伝子は、コード領域の3'末端にスプライスドナーシグナル、フラグメントの5'末端にNheIサイト、フラグメントの3'末端にEcoRIサイトを含むエクソンとして合成した。

【0114】

発現ベクターpHuOHX14DS-IgG1.AAは、(i)HuOHX14DS VHエクソンをSpeIとHind IIIサイトの間に配置し、(ii)HuOHX14DS VLエクソンをNheIとEcoRIサイトの間に配置し、且つ(iii)エフェクター機能（Hezareh et al., J. Virol. 75:12161-12168, 2001）を排除するために、CH2の234位と235位（KabatらのEUナンバリング、前掲）の2つのロイシン残基をアラニン残基に置換されている（それぞれL234AとL235A）（配列番号20）ことを除いて、pHuM195-IgG1と同じ構造を有する。新規ベクターpHuOHX14DS-IgG1.AAは、哺乳類細胞においてヒト化抗OX40 IgG1/カップ抗体（HuOHX14DS-IgG1.AA）を発現する。

【0115】

ヒトCD33（配列番号1）及びヒトOX40（配列番号21）の両方に結合する二重特異性抗体の発現のために設計された哺乳類発現ベクターpBS824（図1B）は、pHuM195-IgG1を以下のように改変することによって構築した。pHuOHX14DS-IgG1.AAのヒト化抗ヒトOX40モノクローナル抗体のVL及びVHコーディング領域を、N-末端からC-末端までVL、ポリペプチドリンカー、及びVHの順に一本鎖Fv（scFv）フォームに変換した（HuOHX14DS.scFv；配列番号22）。HuOHX14DS.scFvのN末端をpHuM195-IgG1のCH3の最後から2番目のグリシン残基にポリペプチドリンカーを隔てて融合させた（CH3-HuOHX14D.scFv；配列番号23）。さらに、CH2において234位と235位（EUナンバリング）の2つのロイシン残基をアラニン残基に置換した（それぞれ、L234AとL235A）。結果として得られたベクターpBS824は、ヒトCD33とOX40の両方に結合するBS824と名付けられた二重特異性IgG抗体を発現する。

【0116】

pBS824にコードされている成熟重鎖のアミノ酸配列は、QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFTDYNMHWVRQAPGQGLEWIGYIYPYNGGTGYNQKFKSKATITADESTNTA YMELSSLRSEDTAVYYCARGRPAMDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRTYLNWYQQKPG KVPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCQQGNTLPWTFGGGT KVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFTSYIMHWVRQ APGQGLEWIGYINPYNSGTYNEKFKGRVTITSDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAHY YGSTFTMDYWGQGTITVTVSS（配列番号24）である。

【0117】

pBS824にコードされている成熟軽鎖のアミノ酸配列は、DIQMTQSPSSLSASVGDRVT ITCRAESVDNYGISFMNWFQQKPGGAPKLLIYAASNQSGSVPSRFSGSGSGTDFTLTIS LQPDDFATYYCQQSKEVPWTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTSTSLSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC（配列番号25）である。

【0118】

BS824などの本発明の二重特異性IgG抗体の概略構造を図2に示す。

【0119】

pHuM195-IgG1、pHuOHX14DS-IgG1.AA及びpBS824の3つの発現ベクターのそれぞれを、上述のようにCHO-K1細胞に安定的にトランスフェクトした。HuM195-IgG1、

10

20

30

40

50

HuOHX14DS-IgG1.AA及びBS824を、上述のようにプロテインAアフィニティカラムを用いて、それぞれのCHO-K1安定トランスフェクタントの培養上清から精製した。還元条件下でのSDS-PAGE分析では、これら3つの抗体のそれぞれにおいて、2つの優勢なバンドのみが示された。およそ50kDの重鎖と25kDの軽鎖（HuM195-IgG1及びHuOHX14DS-IgG1.AAの場合）、又はおよそ75kDの重鎖と25kDの軽鎖（BS824の場合）であった。

【0120】

実施例3：CD33及びOX40に結合する二重特異性抗体（BS824）の生物学的活性

【0121】

CD33及びOX40に結合するBS824の生物学的活性を、表面にヒトOX40を発現するJurkat Dual reporter細胞（InvivoGen, San Diego, CA）（JD/OX40）及び表面にヒトCD33を発現するマウスミエローマ細胞株NS0（NS0/CD33）を用いて調べた。細胞表面におけるOX40の結合はNF- κ Bシグナルを引き起こさすことが知られている（Song et al., J. Immunol. 180:7240-7248, 2008）。Jurkat Dual細胞では、細胞内NF- κ Bシグナル伝達経路の活性化により、組換えルチアルシフェラーゼの発現及び分泌が行われる。

【0122】

JD/OX40は、ヒトOX40の発現用ベクターpFCm331をJurkat Dual細胞にエレクトロポレーションによって安定的にトランスフェクトすることによって作製した。発現ベクターpFCm331（図1C）は、(a)SpeI-EagIフラグメントがヒトOX40をコードするDNAフラグメント（配列番号21）で置換され、且つ(b)軽鎖遺伝子が除去されていることを除いて、pHuM195-IgG1と同じ構造を有する。表面にOX40を発現するプロマイシン耐性Jurkat Dual細胞（JD/OX40）を、10%ウシ胎児血清（FBS）を含むRPMI1640培地で、7.5%CO₂インキュベーターで37℃に維持した。JD/OX40細胞では、HuM195-IgG1と二次的なPE標識ヤギ抗ヒトIgG抗体を用いたフローサイトメトリーにより、CD33の発現は検出されなかった。

【0123】

NS0/CD33は、ヒトCD33を発現させるための発現ベクターpFCm267を、エレクトロポレーションによりNS0細胞に安定的にトランスフェクトすることにより作製した。発現ベクターpFCm267（図1D）は、(a)ピューロマイシンN-アセチルトランスフェラーゼ遺伝子（puro）が大腸菌キサンチン-グアニン-ホスホリボシルトランスフェラーゼ（gpt）に置き換えられ、且つ(b)SpeI-EagIフラグメントが、N末端からC末端までが合成シグナルペプチド（配列番号26）、ヒトCD33の細胞外領域（CD33 EC；配列番号27）、FLAGポリペプチド（配列番号9）、及びGPIアンカレッジシグナル（配列番号10）（CD33-FLAG-GPI）で構成された組換えヒトCD33をコードするDNAフラグメントに置き換えられていることを除いて、pFCm331と同じ構造を有している。(i)10%FBS、1 μ g/mlミコフェノール酸、HT培地サプリメント（Sigma-Aldrich, St. Louis, MO）及び0.25mg/mlキサンチンを含むDME培地で生存し、且つ(ii)表面にCD33-FLAG-GPIを発現したNS0安定トランスフェクタントを、10%FBSを含むDME培地で、37℃、7.5%CO₂インキュベーターで維持した。

【0124】

免疫共刺激分子のTNF受容体スーパーファミリーのメンバーであるOX40は、細胞内シグナル伝達のNF- κ B経路を誘発するために、細胞表面での三量体化を必要とする（Watts, Annu. Rev. Immunol. 23:23-68, 2005; Croft et al., Nat. Rev. Drug Discov. 12: 147-168, 2013; Willoughby et al., Mol. Immunol. 83:13-22, 2017）。JD/OX40細胞では、表面上のOX40のマルチメリック架橋が、ルチアルシフェラーゼの発現及び分泌をアップレギュレートする。約20万個のJD/OX40細胞を、10%FBS、0.5 μ g/mlのマウス抗ヒトCD3 IgG抗体OKT3（BioLegend, San Diego, CA）及び5 μ g/mlのヤギ抗マウスIgG抗体（ヒトIgG-吸収）（Jackson ImmunoResearch）を含む200 μ lのRPMI1640培地で、T細胞を活性化するための一次シグナルを提供するために、(i)1 μ g/mlのHuM195-IgG1（抗CD33）、(ii)1 μ g/mlのHuOHX14DS-IgG1.AA（抗OX40）、(iii)1 μ g/mlのBS824、又は(iv)抗体なしで、約20万個のNS0/CD33細胞の存在下又は非存在下で

、96ウェルプレートで7.5%CO₂インキュベーターで37℃で1日インキュベートした。培養上清中のルシフェラーゼ活性は、QUANTI-Luc試薬（InvivoGen）を用いて、ベンダーのプロトコールに従い、3回に分けて測定した。発光は、Synergy HTマイクロプレートリーダー（BioTek, Winooski, VT）を用いて測定した。その結果を図3に示す。

【0125】

JD/OX40細胞における平均相対ルシフェラーゼユニット（RLU）は、抗体なしで6,458、HuM195-IgG1で5,997、HuOHX14DS-IgG1.AAで7,361、BS824で5,009、NS0/CD33で6,918、HuM195-IgG1とNS0/CD33で6,240、HuOHX14DS-IgG1.AAとNS0/CD33で8,698、BS824とNS0/CD33で21,684であった。CD33とOX40に結合する二重特異性抗体（BS824）とCD33発現細胞（NS0/CD33）の両方が存在する場合のみ、JD/OX40細胞のルシフェラーゼ活性が有意に上昇した。この結果は、JD/OX40細胞とNS0/CD33細胞を橋渡しできるBS824のみが（HuM195-IgG1やHuOHX14DS-IgG1.AAではなく）、JD/OX40細胞の表面のOX40をNS0/CD33細胞に近接した場所にクラスター化させ、JD/OX40細胞を活性化させてルシフェラーゼの発現を増加させることを示している。

10

【0126】

実施例4：EGFR及びGITRに結合する二重特異性抗体（BS827）の構築

【0127】

ヒト上皮成長因子受容体（EGFR；配列番号28）に結合するキメラIgG1/カッパ抗体を発現させるための哺乳類発現ベクターpCh225-IgG1を以下のように作製した。マウス225（Ch225）VH（配列番号29）をコードする遺伝子を、コード領域の3'末端にスプライスドナーシグナル、フラグメントの5'末端にSpeIサイト、及びフラグメントの3'末端にHindIIIサイトを含むエクソンとして合成した。また、マウス225（Ch225）VLをコードする遺伝子（配列番号30）は、コーディング領域の3'末端にスプライスドナーシグナル、フラグメントの5'末端にNheIサイト、フラグメントの3'末端にEcoRIサイトを含むエクソンとして合成した。Ch225のVH及びVLEクソンを、抗体発現ベクターの対応する部位にクローニングした。その結果、抗EGFR抗体Ch225-IgG1を発現させるためのプラスミドpCh225-IgG1は、VH及びVLコード領域がそれぞれCh225 VH及びVLで置換されていることを除いて、pHuM195-IgG1（図1A）と同じ構造を有するものとなった。

20

【0128】

ヒト及びカニクイザルのGITR（TNFRSF18及びCD357としても知られている）に特異的に結合するIgG/カッパモノクローナル抗体GAB11を生産するマウスハイブリドーマを実施例1に記載したように単離した。免疫原として、ヒトガンマ-1重鎖のFc領域に融合したヒトGITRの細胞外領域（hGITR-Fc；配列番号31）を用いた。GAB11 VH及びVLの配列決定及びヒト化は、Tsurushitaら（前掲）に記載されているように行った。

30

【0129】

ヒト化GAB11（HuGAB11）VHのアミノ酸配列は、MAVLGLLLCLVTFPSCVLSQVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLTDYGVSWIRQPPGKALEWLGVIWGGGGTTYNSALKSRLTISKDTSKSQVVLMTNMDPVDATYYCAKHPYGHFGMDYWGQGTTVTVSS（配列番号32）である。HuGAB11 VHのCDR1、2及び3のアミノ酸配列は、Kabatら（前掲）による定義によれば、それぞれDYGV（配列番号33）、VIWGGGGTTYNSALKS（配列番号34）及びHPYGHFGMDY（配列番号35）である。HuGAB11 VHをコードする遺伝子は、コード領域の3'末端にスプライスドナーシグナル、フラグメントの5'末端にSpeIサイト、フラグメントの3'末端にHindIIIサイトを含むエクソンとして合成した。

40

【0130】

ヒト化GAB11（HuGAB11）VLのアミノ酸配列は、MRVLAELLGLLLFCFLGVRCIDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINVWLSWYQQKPGKVPKLLIYKASNLHTGVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQQGQSYPLTFGGGTKVEIK（配列番号36）である。HuGAB11 VLのCDR1、2及び3のアミノ酸配列は、Kabatら（前掲）による定義によれば、それぞれHASQNINVWLS（配列番号37）、KASNLHT（配列番号38）及びQQGQSY

50

LT（配列番号39）である。HuGAB11 VLをコードする遺伝子は、コード領域の3'末端にスプライスドナーシグナル、フラグメントの5'末端にNheIサイト、フラグメントの3'末端にEcoRIサイトを含むエクソンとして合成した。

【0131】

発現ベクターpHuGAB11-IgG1.AAは、(i)HuGAB11 VHエクソンがSpeIサイトとHind IIIサイトの間に配置され、(ii)HuGAB11 VLエクソンがNheIサイトとEcoRIサイトの間に配置され、(iii)エフェクター機能（Hezarehら、前掲）を排除するために、CH2における234位及び235位（EUナンバリング）の2つのロイシン残基がアラニン残基に置換されている（それぞれL234A及びL235A）（配列番号20）ことを除いて、pHuM195-IgG1（図1A）と同じ構造を有している。新規ベクターpHuGAB11-IgG1.AAは、哺乳類細胞においてヒト化抗GITR IgG1/カッパ抗体（HuGAB11-IgG1.AA）を発現する。

10

【0132】

ヒトEGFR（配列番号28）とヒトGITR（配列番号40）の両方に結合する二重特異性抗体の発現のために設計された哺乳類発現ベクターpBS827は、pCh225-IgG1を以下のように改変することによって構築した。pHuGAB11-Ig1.AAのヒト化抗ヒトGITRモノクローナル抗体のVL及びVHコーディング領域を、N-末端からC-末端までVL、ポリペプチドリンカー、及びVHの順にscFvフォームに変換した（HuGAB11.scFv；配列番号41）。HuGAB11.scFvのN末端を、ポリペプチドリンカーを使用して、pCh225-IgG1のCH3の最後から2番目のグリシン残基に融合した（CH3-HuGAB11.scFv；配列番号42）。さらに、CH2の234位と235位（EUナンバリング）の2つのロイシン残基をアラニン残基に置換した（それぞれL234AとL235A）。結果として得られたベクターpBS827は、ヒトEGFRとGITRの両方に結合するBS827と名付けられた二重特異性IgG抗体を発現する。

20

【0133】

pBS827にコードされている成熟重鎖のアミノ酸配列は QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPTFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGTLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINWLSWYQQKPGKVPKLLIYKASNLHTGVPSTRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQQGQSYPLTFGGGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGVTLKESGPVLVKPTETLTLTCTVSGFSLTDYGVSWIRQPPGKALEWLGVIWGGGGTYNSALKSRLTISKDTSKSQVVLTMNMDPVDATATYYCAKHPYGFHFGMDYWGQGTITVTVSS（配列番号43）である。

30

【0134】

pBS827にコードされている成熟軽鎖のアミノ酸配列はDILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC（配列番号44）である。

40

【0135】

BS827の概略構造を図2に示す。

【0136】

pCh225-IgG1、pHuGAB11-IgG1.AA及びpBS827の3つの発現ベクターを、上述のようにCHO-K1に安定的にトランスフェクトした。Ch225-IgG1、HuGAB11-IgG1.AA及びBS827は、上記のようにプロテインAアフィニティカラムを用いて、それぞれのCHO-K1安定トランスフェクタントの培養上清から精製した。還元条件下でのSDS-PAGE分析では、これら3つの抗体のそれぞれで2つの優勢なバンドのみが示された。およそ50kDの重鎖

50

と25kDの軽鎖（Ch225-IgG1及びHuGAB11-IgG1.AAの場合）、又はおよそ75kDの重鎖と25kDの軽鎖（BS827の場合）であった。

【0137】

実施例5：EGFR及びGITRに結合する二重特異性抗体（BS827）の生物学的活性

【0138】

EGFR及びGITRに結合するBS827の生物活性を、表面にヒトGITRを発現するJurkat Dual細胞（InvivoGen）（JD/GITR）及び表面にヒトEGFRを発現するマウスミエローマ細胞株NS0（NS0/EGFR）を用いて検討した。

【0139】

JD/GITRは、エレクトロポレーションでヒトGITRの発現用ベクターpFCm343をJurkat Dual細胞に安定的にトランスフェクトすることにより作製した。発現ベクターpFCm343は、SpeI-EagIフラグメントが成熟ヒトGITR（配列番号45）に融合した合成シグナルペプチド（配列番号26）をコードするDNAフラグメントで置換されていることを除いて、pFCm331（図1C）と同じ構造を有している。表面にGITRを発現するプロマイシン耐性Jurkat Dual細胞（JD/GITR）を、10%FBSを含むRPMI1640培地で、7.5%CO₂インキュベーターを用いて37℃で維持した。JD/GITR細胞では、Ch225-IgG1及び二次的PE標識ヤギ抗ヒトIgG抗体を用いたフローサイトメトリーにより、EGFRの発現は検出されなかった。

【0140】

NS0/EGFRは、エレクトロポレーションで発現ベクターpFCm507をNS0細胞に安定的にトランスフェクトすることにより作製した。発現ベクターpFCm507は、SpeI-EagIフラグメントは、N末端からC末端まで、合成シグナルペプチド（配列番号26）、ヒトEGFRの細胞外領域（配列番号46）、FLAGポリペプチド（配列番号9）、及びヒトCD55のGPIアンカレッジシグナル（配列番号10）で構成された組換えヒトEGFRをコードするDNAフラグメントで置換されている（EGFR-FLAG-GPI）ことを除いて、pFCm331（図1C）と同じ構造を有している。EGFR-FLAG-GPIを表面に発現させたプロマイシン耐性NS0安定トランスフェクタントを、10%FBSを含むDME培地を用いて、7.5%CO₂インキュベーターで37℃に維持した。

【0141】

免疫共刺激分子のTNF受容体スーパーファミリーの1つであるGITRは、細胞内シグナル伝達のNF-κB経路を引き起こすために、細胞表面での三量体化を必要とする（Watts, Annu. Rev. Immunol. 23:23-68, 2005; Chattopadhyay et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 104: 19452-19457, 2007; Croft et al., Nat. Rev. Drug Discov. 12:147-168, 2013）。JD/GITR細胞では、表面のGITRをマルチメリック架橋することで、ルシフェラーゼの発現及び分泌がアップレギュレートされる。約20万個のJD/GITR細胞を、10%FBS、0.5 μg/mlのマウス抗ヒトCD3 IgG抗体OKT3（BioLegend）及び5 μg/mlのヤギ抗マウスIgG抗体（ヒトIgG吸収）（Jackson ImmunoResearch）を含む200 μlのRPMI1640培地で、T細胞を活性化するための一次シグナルを提供するために、(i)1 μg/mlのCh225-IgG1（抗EGFR）、(ii)1 μg/mlのHuGAB11-IgG1.AA（抗GITR）、(iii)1 μg/mlのBS827、又は(iv)抗体なしで、約20万個のNS0又はNS0/EGFR細胞とともに、96ウェルプレートで7.5%CO₂インキュベーターで37℃で1日インキュベートした。培養上清中のルシフェラーゼ活性は、QUANTI-Luc試薬（InvivoGen社）を用いて、ベンダーのプロトコールに従い、3回に分けて測定した。発光は、Synergy HTマイクロプレートリーダー（BioTek）を用いて測定した。その結果を図4に示す。

【0142】

JD/GITR細胞における平均相対ルシフェラーゼユニット（RLU）は、NS0細胞単独では18,086、Ch225-IgG1とNS0細胞では17,183、HuGAB11-IgG1.AA及びNS0細胞では18,504、BS827とNS0細胞では17,490、NS0/EGFR細胞単独では18,662、Ch225-IgG1とNS0/EGFR細胞では20,748、HuGAB11-IgG1.AAとNS0/EGFR細胞では18,391、BS827とNS0/EGFR細胞では47,523であった。JD/GITR細胞のルシフェラーゼ活性は、E

10

20

30

40

50

GFRとGITRに結合する二重特異性抗体（BS827）とEGFR発現細胞（NS0/EGFR）の両方の存在下でのみ有意に上昇した。この結果は、JD/GITR細胞とNS0/EGFR細胞を橋渡しできるBS827のみが（Ch225-IgG1やHuGAB11-IgG1.AAではなく）、JD/GITR細胞の表面のGITRをNS0/EGFR細胞に近接した場所にクラスター化させ、JD/GITR細胞を活性化させてルシフェラーゼの発現を増加させることを示している。

【0143】

実施例6：CD33及びCD40に結合する二重特異性抗体（BS828）

【0144】

ヒト及びカニクイザルのCD40（TNFRSF5としても知られている）に結合するIgG/カップモノクローナル抗体ACS2を生産するマウスハイブリドーマを実施例1に記載したように単離した。免疫原として、ヒトガンマ-1重鎖のFc領域に融合したヒトCD40の細胞外領域（hCD40-Fc；配列番号47）を用いた。ACS2 VH及びVLの配列決定及びヒト化は、Tsurushitaら（Methods 36:69-83, 2005）に記載されているように実施した。

【0145】

ヒト化ACS2（HuACS2）VHのアミノ酸配列は、MKLWLNWVFLTLHGIQCQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYWLHWVRQAPGQGLEWIGRIDPNSGDTKYNEKFKSRATITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARYYYGRSYFDYWGGTTVTVSS（配列番号48）である。HuACS2 VHのCDR1、2及び3のアミノ酸配列は、Kabatら（前掲）による定義によれば、それぞれSYWLH（配列番号49）、RIDPNSGDTKYNEKFKS（配列番号50）及びYYYGRSYFDY（配列番号51）である。HuACS2 VHをコードする遺伝子は、コード領域の3'末端にスプライスドナーシグナル、フラグメントの5'末端にSpeIサイト、フラグメントの3'末端にHindIIIサイトを含むエクソンとして合成した。

【0146】

成熟したヒト化ACS2（HuACS2）VLのアミノ酸配列は、MDFQVQIFSLLISAVIISRG EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWWYQQKPGQAPRRWIYDTSKLASGVPAR FSGSGSGTDYTLTISLSEPEDFAVYYCQQWSSNPLTFGGGTKVEIK（配列番号52）である。HuACS2 VLのCDR1、2及び3のアミノ酸配列は、Kabatら（前掲）による定義によれば、それぞれSASSSVSYMH（配列番号53）、DTSKLAS（配列番号54）及びQQWSSNPLT（配列番号55）である。HuACS2 VLをコードする遺伝子は、コード領域の3'末端にスプライスドナーシグナル、フラグメントの5'末端にNheIサイト、フラグメントの3'末端にEcoRIサイトを含むエクソンとして合成した。

【0147】

発現ベクターpHuACS2-IgG1.AAは、(i)HuACS2 VHエクソンをSpeIサイトとHindIIIサイトの間に配置し、(ii)HuACS2 VLエクソンをNheIサイトとEcoRIサイトの間に配置し、(iii)エフェクター機能（Hezarehら、前掲）を排除するために、CH2の234位及び235位（EU番号）の2つのロイシン残基をアラニン残基に置換している（それぞれL234A及びL235A）（配列番号20）ことを除いて、pHuM195-IgG1（図1A）と同じ構造を有している。新規ベクターpHuACS2-IgG1.AAは、哺乳類細胞においてヒト化抗CD40 IgG1/カップ抗体（HuACS2-IgG1.AA）を発現する。

【0148】

ヒトCD33（配列番号1）及びヒトCD40（配列番号56）の両方に結合する二重特異性抗体の発現のために設計された哺乳類発現ベクターpBS828を、pHuM195-IgG1を以下のように改変して構築した。pHuACS2-IgG1.AAのヒト化抗ヒトCD40モノクローナル抗体のVL及びVHコーディング領域を、N-末端からC-末端までVL、ポリペプチドリンカー、及びVHの順に一本鎖Fv（scFv）フォームに変換した（HuACS2.scFv；配列番号57）。HuACS2.scFvのN末端を、ポリペプチドリンカーを使用して、pHuM195-IgG1のCH3の最後から2番目のグリシン残基に融合した（CH3-HuACS2.scFv；配列番号58）。さらに、CH2の234位と235位（Euナンバリング）の2つのロイシン残基をアラニン残基に置換した（それぞれL234AとL235A）。結果として得られたベクターpBS828は、ヒトCD33とCD40の両方に結合するBS828と名付けられた二重特異性IgG抗体を発現する。

10

20

30

40

50

【0149】

pBS828にコードされている成熟重鎖のアミノ酸配列は、QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV
SCKASGYTFTDYNMHWVRQAPGQGLEWIGYIYPYNGGTGYNQKFKSKATITADESTNTA
YMESSLRSEDTAVYYCARGRPAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICN
VNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY
KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWWYQQKPGQA
PRRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISLEPEDFAVYYCQQWSSNPLTFGGGK
VEIKGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTSYWLHWVRQA
PGQGLEWIGRIDPNSGDTKYNEKFKSRATITVDKSTSTAYMESSLRSEDTAVYYCARYY
YGRSYFDYWGQGTITVTVSS（配列番号59）である。

10

【0150】

pBS828にコードされている成熟軽鎖のアミノ酸配列は、pBS824にコードされている
成熟軽鎖配列（配列番号25）と同じである。

【0151】

BS828の概略構造を図2に示す。

【0152】

20

pHuM195-IgG1、pHuACS2-IgG1.AA及びpBS828の3つの発現ベクターのそれぞれを
、上述のようにCHO-K1細胞に安定的にトランスフェクトした。HuM195-IgG1、HuACS
2-IgG1.AA及びBS828は、上述のようにプロテインAアフィニティカラムを用いて、それ
ぞれのCHO-K1安定トランスフェクタントの培養上清から精製した。還元条件下でのSDS-
PAGE分析では、これら3つの抗体のそれぞれで2つの優勢なバンドのみが示された。およ
そ50kDの重鎖と25kDの軽鎖（HuM195-IgG1及びHuACS2-IgG1.AAの場合）、又はお
よそ75kDの重鎖と25kDの軽鎖（BS828の場合）であった。

【0153】

ヒトBurkitt's Bリンパ腫細胞株Ramosは、表面にCD40を発現している。Ramos細胞
の表面上のCD40を、天然のCD40リガンドである可溶性三量体CD154（CD40L及びTNF
SF5とも呼ばれる）で架橋すると、CD95の発現上昇が誘導されることが知られている（H
enriquez et al., J. Immunol. 162:3298-3307, 1999）。Ramos細胞におけるCD95
発現を上昇させるBS828の生物学的活性を、表面にCD33を発現しているヒト前骨髄性白
血病細胞株HL-60の存在下又は非存在下で調べた。

30

【0154】

約10万個のRamos細胞を、10%FBSを含む200 μ lのRPMI1640培地に、(i)0.5 μ g/ml
のHuM195-IgG1（抗CD33）、(ii)0.5 μ g/mlのHuACS2-IgG1.AA（抗CD40）、(iii)
0.5 μ g/mlのBS828、又は(iv)抗体なしで、約5万個のHL-60細胞の存在下又は非存在下
で、96ウェルプレートで、37°C、7.5%CO₂インキュベーター内で3日間インキュベート
した。Ramos細胞におけるCD95の発現は、Ramos細胞を検出するためのFITC標識マウ
ス抗ヒトCD20モノクローナル抗体（クローン2H7、BioLegend社製）とPE標識マウス抗
ヒトCD95抗体（クローンDX2、BioLegend社製）を用いてフローサイトメトリーで解析
した。Ramos細胞はCD20陽性であり、HL-60細胞はCD20陰性である。FACS分析の結果
を図5に示す。

40

【0155】

CD20陽性のRamos細胞に占めるCD95陽性集団の割合は、抗体なしでは1.3%、HuM1
95-IgG1では0.8%、HuACS2-IgG1.AAでは1.4%、BS828では1.6%であった。Ramos
細胞をHL-60細胞の存在下でインキュベートした場合、Ramos細胞に占めるCD95陽性集
団の割合は、抗体なしで1.0%、HuM195-IgG1で1.1%、HuACS2-IgG1.AAで0.7%、B
S828で58.4%であった。Ramos細胞におけるCD95の発現は、CD33とCD40に結合する

50

二重特異性抗体（BS828）とCD33を発現する細胞（HL-60細胞）の両方の存在下でのみ、有意に上昇した。この結果は、Ramos細胞とHL-60細胞の間を橋渡しできるBS828のみが（HuM195-IgG1やHuACS2-IgG1.AAではなく）、HL-60細胞に近接した位置でRamos細胞表面のCD40のマルチメリック架橋を引き起こし、Ramos細胞のCD95のアップレギュレーションを導くことを示している。

【0156】

実施例7：PD-L1とGITRに結合する二重特異性抗体（BS809）

【0157】

PD-L1（B7H1及びCD274としても知られる）は、チェックポイント分子PD-1のリガンドとして機能するI型膜貫通蛋白質である。PD-L1がT細胞上のPD-1に結合すると、免疫反応が抑制される。PD-L1は、がん細胞に多く発現している（Patel et al. 2015 Mol. Cancer Ther. 14:847-856; Brody et al. 2017 Lung Cancer 112:200-215; Sun et al. 2018 Immunity 48:434-452）。ヒト及びカニクイザルのPD-L1に結合し、PD-1とPD-L1の間の相互作用をブロックするIgG/カッパモノクローナル抗体PRO1を生産するマウスハイブリドーマを、実施例1に記載したように単離した。免疫原として、ヒトガンマ-1重鎖のFc領域に融合したヒトPD-L1の細胞外領域（hPD-L1-Fc；配列番号60）を用いた。PRO1 VH及びVLの配列決定及びヒト化は、Tsurushitaら（前掲）に記載されているように実施した。

【0158】

ヒト化PRO1（HuPRO1）VHのアミノ酸配列は、MEWNWVVLFLSLTAGVYAQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTFSSSYISWVRQAPGQGLEWIAWIYAGTGGTSYNQKFTGRATITVDESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARHEGVYWFYFDVWGQGTTVTVSS（配列番号61）である。HuPRO1 VHのCDR1、2及び3のアミノ酸配列は、Kabatら（前掲）による定義によれば、それぞれSSYIS（配列番号62）、WIYAGTGGTSYNQKFTG（配列番号63）及びHEGVYWFYFDV（配列番号64）である。HuPRO1 VHをコードする遺伝子は、コード領域の3'末端にスプライスドナーシグナル、フラグメントの5'末端にSpeIサイト、フラグメントの3'末端にHindIIIサイトを含むエクソンとして合成した。

【0159】

ヒト化PRO1（HuPRO1）VLのアミノ酸配列は、MDFQVQIFSFLLISAVIMSRGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWWYQQKPGQAPRPWIYDTSNLAGSFPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIK（配列番号65）である。HuPRO1 VLのCDR1、2及び3のアミノ酸配列は、Kabatら（前掲）による定義によれば、それぞれSASSSVSYMH（配列番号66）、DTSNLAG（配列番号67）及びHQRSSYPWT（配列番号68）である。HuPRO1 VLをコードする遺伝子は、コード領域の3'末端にスプライスドナーシグナル、フラグメントの5'末端にNheIサイト、フラグメントの3'末端にEcoRIサイトを含むエクソンとして合成した。

【0160】

発現ベクターpHuPRO1-IgG1.AAは、(i)HuPRO1 VHエクソンをSpeIサイトとHindIIIサイトの間に配置し、(ii)HuPRO1 VLエクソンをNheIサイトとEcoRIサイトの間に配置し、(iii)エフェクター機能（Hezarehら、前掲）を排除するために、CH2の234位と235位（EUナンバリング）の2つのロイシン残基をアラニン残基に置換している（それぞれL234AとL235A）（配列番号20）ことを除いて、pHuM195-IgG1（図1A）と同じ構造を有する。新規ベクターpHuPRO1-IgG1.AAは、哺乳類細胞においてヒト化抗PD-L1 IgG1/カッパ抗体（HuPRO1-IgG1.AA）を発現する。

【0161】

ヒトPD-L1（配列番号69）とヒトGITR（配列番号45）の両方に結合する二重特異性抗体の発現のために設計された哺乳類発現ベクターpBS809は、pHuPRO1-IgG1.AAにおいて、CH3コーディング領域をCH3-HuGAB11.scFv（配列番号42）のコーディング領域と置き換えることによって構築した。

【0162】

10

20

30

40

50

pBS809にコードされている成熟重鎖のアミノ酸配列は、QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV
SCKASGFTFSSSYISWVRQAPGQGLEWIAWIYAGTGGTSYNQKFTGRATITVDESTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCARHEGVYWFYFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG
GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
P
EVTCTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHN
HYTQKSLSLSPGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQININWLSWYQ
QKPGKVPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQQGQSYPLTF
GGGKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLTDYGVSWI
RQPPGKALEWLGVIWGGGGTYYNALKSRLTISKDTSKSQVVLTMNMDPVDATYYCA
KHPYGHFGMDYWGQGTTVTVSS (配列番号70) である。

10

【0163】

pBS809にコードされている成熟軽鎖のアミノ酸配列は、EIVLTQSPATLSLSPGERATL
SCSASSSVSYMHYQQKPGQAPRWIYDTSNLSGFPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDF
AVYYCHQRSSYPWTFGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE
AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS
SPVTKSFNRGEC (配列番号71) である。

20

【0164】

BS809の概略構造を図2に示す。

【0165】

pHuPRO1-IgG1.AA、pHuGAB11-IgG1.AA及びpBS809の3つの発現ベクターのそれ
ぞれを、上述のようにCHO-K1に安定的にトランスフェクトした。HuPRO1-IgG1.AA、H
uGAB11-IgG1.AA及びBS809は、上述のようにプロテインAアフィニティカラムを用いて
、それぞれのCHO-K1安定トランスフェクタントの培養上清から精製した。還元条件下で
のSDS-PAGE分析では、これら3つの抗体のそれぞれにおいて、2つの優勢なバンドのみが
示された。およそ50kDの重鎖と25kDの軽鎖 (HuPRO1-IgG1.AA及びHuGAB11-IgG1.
AAの場合)、又はおよそ75kDの重鎖と25kDの軽鎖 (BS809の場合) であった。

【0166】

30

免疫応答を増強するBS809の生物学的活性を、ヒトT細胞におけるIL-2の発現レベルを
測定することによって分析した (Malek, Annu. Rev. Immunol. 26:453-79, 2008; Li
ao et al., Immunity 38:13-25, 2013)。2人のドナー (3124及び4143) からのヒト
末梢血単核細胞 (PBMC) を、iQ Biosciences (Berkeley, CA) から入手した。PBMC
は、10%FBSと5 µg/mlのフィトヘマグルチニン-L (PHA-L) を含むRPMI-1640で、7.
5%CO₂インキュベーターで37°Cで3日間培養し、T細胞を濃縮した (3日齢PBMC)。3日
齢PBMCにおけるPD-1、PD-L1、GITRの発現をフローサイトメトリーで確認した。3日齢
PBMCの約10万個の細胞を、1 µg/mlのマウス抗ヒトCD3モノクローナル抗体OKT3でプ
レコートした96ウェルプレートのウェルで、(i)追加抗体なし (コントロール)、(ii)1 µg
/mlのHuPRO1-IgG1.AA (抗PD-L1)、(iii)1 µg/mlのHuGAB11-IgG1.AA (抗GITR
(iv)1 µg/mlのHuPRO1-IgG1.AAと1 µg/mlのHuGAB11-IgG1.AA、及び(v)1 µg/
mlのBS809の存在下で、7.5%CO₂インキュベーター内、37°Cで1日インキュベートした
。培養上清中のIL-2濃度は、Human IL-2 ELISA MAX Standard Kit (BioLegend, San
Diego, CA)を用いて測定した。その結果を図6に示す。

40

【0167】

ドナー3124のPBMC由来のT細胞における平均IL-2濃度は、(i)抗体なし (コントロール
) で2,776pg/ml、(ii)HuPRO1-IgG1.AAで3,075pg/ml、HuGAB11-IgG1.AAで2,57
7pg/ml、HuPRO1-IgG1.AAとHuGAB11-IgG1.AAの混合物で2,747pg/ml、BS809で
4,826pg/mlであった。IL-2の発現は、PD-L1とGITRの両方に結合する二重特異性抗体
の存在下でのみ、未処理のコントロール細胞のIL-2レベルと比較して有意に増加した。こ

50

れは、BS809によるPD-L1発現細胞とGITR発現T細胞との間の橋渡しにより、PD-L1発現細胞に近接した位置で表面のGITRがマルチメリック架橋され、T細胞が活性化されてIL-2発現がアップレギュレートされるためである。

【0168】

ドナー4143のPBMC由来のT細胞における平均IL-2濃度は、(i)抗体なしで658pg/ml、(ii)HuPRO1-IgG1.AAで1,453pg/ml、(iii)HuGAB11-IgG1.AAで659pg/ml、(iv)HuPRO1-IgG1.AAとHuGAB11-IgG1.AAの混合物で2,136pg/ml、(v)BS809で4,196pg/mlであった。IL-2の発現は、HuPRO1-IgG1.AAの存在下で、未処理のコントロール細胞のIL-2レベルと比較して増加した。これは、免疫応答を抑制するPD-L1とPD-1の相互作用がHuPRO1-IgG1.AAによってブロックされたためと考えられる。IL-2の発現がBS809の存在下でさらに有意に増加したのは、(a)抗PD-L1アンタゴニスト活性と、(b)PD-L1発現細胞とGITR発現T細胞の間を橋渡しして表面上のGITRをマルチメリック架橋する能力があり、その結果、T細胞が強力に活性化されるためである。

【0169】

実施例8：PD-L1及びOX40に結合する二重特異性抗体（BS813）

【0170】

ヒトPD-L1（配列番号69）及びヒトOX40（配列番号21）の両方に結合する二重特異性抗体の発現のために設計された哺乳類発現ベクターpBS813は、pHuPRO1-IgG1.AAのCH3コーディング領域をCH3-HuOHX14DS.scFv（配列番号23）のコーディング領域と置き換えることによって構築した。

【0171】

pBS813にコードされている成熟重鎖のアミノ酸配列は、QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGFTFSSSYISWVRQAPGQGLEWIAWIYAGTGGTSYNQKFTGRATITVDESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARHEGVYWFYFDVWGQGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRTYLNWYQ QKPGKVPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCQQGNTLPWTF GGGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFTSYIMH WVRQAPGQGLEWIGYINPYNSTKYNEKFKGRVTITSDKSTSTAYMELSSLRSED TAVYY CAHYYGSTFTMDYWGQGTTTVTVSS（配列番号72）である。

【0172】

pBS813にコードされている成熟軽鎖のアミノ酸配列は、pBS809にコードされている成熟軽鎖の配列（配列番号71）と同じである。

【0173】

BS813の概略構造を図2に示す。

【0174】

pHuPRO1-IgG1.AA、pHuOHX14DS-IgG1.AA及びpBS813の3つの発現ベクターのそれぞれを、上述のようにCHO-K1細胞に安定的にトランスフェクトした。HuPRO1-IgG1.AA、HuOHX14DS-IgG1.AA及びBS813は、上述のようにプロテインAアフィニティカラムを用いて、それぞれのCHO-K1安定トランスフェクタントの培養上清から精製した。還元条件下でのSDS-PAGE分析では、これら3つの抗体のそれぞれにおいて、2つの優勢なバンドのみが示された。およそ50kDの重鎖と25kDの軽鎖（HuPRO1-IgG1.AA及びHuOHX14DS-IgG1.AAの場合）、およそ75kDの重鎖と約25kDの軽鎖（BS813の場合）であった。NS0細胞に発現ベクターpFCm370をエレクトロポレーションで安定的にトランスフェクトすることにより、組換えヒトPD-L1を表面に発現するNS0/PD-L1細胞を作製した。発現ベクターpFCm370は、SpeI-EagIフラグメントを、N末端からC末端まで、合成シ

グナルペプチド（配列番号26）、ヒトPD-L1の細胞外領域（配列番号73）、FLAGポリペプチド（配列番号9）、及びヒトCD55のGPIアンカレッジングナル（配列番号10）で構成されたリコンビナントヒトPD-L1をコードするDNAフラグメント（PD-L1-FLAG-GPI）で置換していることを除いて、pFCm331と同じ構造を有している。(i)10%FBS、1µg/mlミコフェノール酸、HT培地サプリメント、及び0.25mg/mlキサンチンを含むDME培地で生存し、且つ(ii)表面にPD-L1-FLAG-GPIを発現しているNS0安定トランスフェクタントを、10%FBSを含むDME培地で37℃、7.5%CO₂インキュベーターで維持した。

【0175】

約20万個のJD/OX40細胞を、10%FBS、0.5µg/mlのマウス抗ヒトCD3 IgG抗体OKT3（BioLegend, San Diego, CA）及び5µg/mlのヤギ抗マウスIgG抗体（ヒトIgG-吸収）（Jackson ImmunoResearch）を含む200µlのRPMI1640培地で、抗体なし（a及びf）、1µg/mlのHuPRO1-IgG1.AA（抗PD-L1）（b及びg）、1µg/mlのHuOHX14DS-IgG1.AA（抗OX40）（c及びh）、1µg/mlのHuPRO1-IgG1.AA及び1µg/mlのHuOHX14DS-IgG1.AA（d及びi）、及び1µg/mlのBS813（e及びj）とともに、96ウェルプレートで、37℃、7.5%CO₂インキュベーター内で1日間インキュベートした。20万個のNS0細胞を反応a、b、c、d、eに加えた。20万個のNS0/PD-L1細胞を反応f、g、h、i、jに加えた。培養上清中のルシフェラーゼ活性は、QUANTI-Luc試薬（InvivoGen）を用いて、ベンダーのプロトコールに従い、3回に分けて測定した。発光は、Synergy HTマイクロプレートリーダー（BioTek, Winooski, VT）を用いて測定した。その結果を図7に示す。

【0176】

JD/OX40細胞における平均相対ルシフェラーゼユニット（RLU）は、NS0細胞で4,683、HuPRO1-IgG1.AA及びNS0細胞で6,193(b)、HuOHX14DS-IgG1.AAで7,230(c)、HuPRO1-IgG1.AA、HuOHX14DS-IgG1.AAで7,671(d)であった。AA、HuOHX14DS-IgG1.AA、及びNS0細胞で7,671(d)、BS813、及びNS0細胞で6,146(e)、NS0/PD-L1細胞で3,842(f)、HuPRO1-IgG1.AA、及びNS0/PD-L1細胞で3,866(g)、HuOHX14DS-IgG1.AA及びNS0/PD-L1細胞で5,921(h)、HuPRO1-IgG1.AA、HuOHX14DS-IgG1.AA、及びNS0/PD-L1細胞で2,836(i)、BS813、及びNS0/PD-L1細胞で23,715(j)であった。PD-L1とOX40に結合する二重特異性抗体（BS813）とPD-L1発現細胞（NS0/PD-L1）の両方が存在する場合のみ、JD/OX40細胞のルシフェラーゼ活性が有意に上昇した。この結果は、JD/OX40細胞とNS0/PD-L1細胞の間に橋渡しをできるBS813のみが（HuPRO1-IgG1.AA、HuOHX14DS-IgG1.AA及びこれら2つの一重特異性抗体の組み合わせではなく）、NS0/PD-L1細胞に近接した位置でJD/OX40細胞表面のOX40のマルチメリック架橋を引き起こし、その結果、JD/OX40細胞が活性化されてルシフェラーゼの発現量が増加することを示している。

【0177】

実施例9：PD-L1及びOX40に結合する二重特異性抗体（BS841）の作製

【0178】

(i)ヒト及びカニクイザルのPD-L1に結合し、(ii)PD-1とPD-L1との間の相互作用をブロックするIgG/カッパモノクローナル抗体PRO2を生産するマウスハイブリドーマを、実施例1に記載したように単離した。PRO2のVH及びVLの配列決定及びヒト化は、Tsurushitaら（前掲）に記載されているように行った。

【0179】

ヒト化PRO2（HuPRO2）VHのアミノ酸配列は、MGWNNWIFLFLSGTAGVHCQVQLVQSGAEVKKKPGSSVKVSKASGYTFTSYGINWVRQAPGQGLEWIGYIYPGSGGPPVYNQKFKGRVTLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARENYRYWYFDVWGQGTTVTVSS（配列番号74）である。HuPRO2 VHのCDR1、2、3のアミノ酸配列は、Kabatら（前掲）による定義によれば、それぞれSYGIN（配列番号75）、YIYPGSGGPPVYNQKFKG（配列番号76）、ENYRYWYFDV（配列番号77）である。HuPRO2 VHをコードする遺伝子は、コード領域の3'末端にスプライスドナーシグナル、フラグメントの5'末端にSpeIサイト、フラグメントの3'末端にHindIIIサイトを含むエクソンとして合成した。

【0180】

ヒト化PRO2 (HuPRO2) VLのアミノ酸配列は、MHFQVQIFSLLISASVIMSRGDIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCSASSSVNYMHWFQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQRSSYPLTFGGGTKVEIK (配列番号78) である。HuPRO2 VLのCDR1、2及び3のアミノ酸配列は、Kabatら (前掲) による定義によれば、それぞれSASSSVNYMH (配列番号79)、STSNLAS (配列番号80) 及びQQRSSYPLT (配列番号81) である。HuPRO2 VLをコードする遺伝子は、コード領域の3'末端にスプライスドナーシグナル、フラグメントの5'末端にNheIサイト、フラグメントの3'末端にEcoRIサイトを含むエクソンとして合成した。

【0181】

発現ベクターpHuPRO2-IgG1.AAは、(i)SpeIサイトとHindIIIサイトの間にHuPRO2 VHエクソンを配置し、(ii)NheIサイトとEcoRIサイトの間にHuPRO2 VLエクソンを配置し、(iii)エフェクター機能 (Hezarehら、前掲) の除去のために、CH2の234位と235位 (Euナンバリング) の2つのロイシン残基をアラニン残基に置換している (それぞれL234AとL235A) (配列番号20) ことを除いて、pHuM195-IgG1 (図1A) と同じ構造を有している。新規ベクターpHuPRO2-IgG1.AAは、哺乳類細胞においてヒト化抗PD-L1 IgG1/カップ抗体 (HuPRO2-IgG1.AA) を発現する。

【0182】

ヒトPD-L1 (配列番号69) 及びヒトOX40 (配列番号21) の両方に結合する二重特異性抗体の発現のために設計された哺乳類発現ベクターpBS841は、pHuPRO2-IgG1.AAのCH3コーディング領域をCH3-HuOHX14DS.scFv (配列番号23) のコーディング領域で置き換えることによって構築した。

【0183】

pBS841にコードされている成熟重鎖のアミノ酸配列は、QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYGINWVRQAPGQGLEWIGYIYPGSGGPVYNQKFKGRVTLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARENYRYWYFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRTYLNWYQQKPGKVPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDVATYYCQQGNTLPWTFGGGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYIMHWVRQAPGQGLEWIGYINPYNSGTYNEKFKGRVTITSDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAHYYGSTFTMDYWQGTTVTVSS (配列番号82) である。

【0184】

pBS841にコードされている成熟軽鎖のアミノ酸配列は、DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCSASSSVNYMHWFQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQRSSYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号83) である。

【0185】

実施例10: PD-L1及びOX40に結合する二重特異性抗体 (BS839) の作製

【0186】

(i)ヒト及びカニクイザルのPD-L1に結合し、且つ(ii)PD-1とPD-L1との間の相互作用をブロックするIgG/カップモノクローナル抗体PRO5を生産するマウスハイブリドーマを、実施例1に記載したように単離した。PRO5のVH及びVLの配列決定及びヒト化は、Tsurushitaら (前掲) に記載されているように行った。

【0187】

10

20

30

40

50

ヒト化PRO5 (HuPRO5) VHのアミノ酸配列は、MMVLSLLYLLTALPGILSQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGDSISSGYWNWIRQPPGKGLEYMGYISYTGSTYSNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSQNWERAFAFWGQGTTLTVTVSS (配列番号84) である。HuPRO5 VHのCDR1、2及び3のアミノ酸配列は、Kabatら (前掲) による定義によれば、それぞれSGYWN (配列番号85)、YISYTGSTYSNPSLKS (配列番号86) 及びSQNWERAFAFW (配列番号87) である。HuPRO5 VHをコードする遺伝子は、コード領域の3'末端にスプライスドナーシグナル、フラグメントの5'末端にSpeIサイト、フラグメントの3'末端にHindIIIサイトを含むエクソンとして合成した。

【0188】

ヒト化PRO5 (HuPRO5) VLのアミノ酸配列は、MDFQVQIFSFLLISASVIMSRGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMHWWYQQKPGKAPKLWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCFQSGSGYPFTFGGGTKVEIK (配列番号88) である。HuPRO5 VLのCDR1、2及び3のアミノ酸配列は、Kabatら (前掲) による定義によれば、それぞれSASSSVSYMH (配列番号89)、DTSKLAS (配列番号90) 及びFQGSFGYPFT (配列番号91) である。HuPRO5 VLをコードする遺伝子は、コード領域の3'末端にスプライスドナーシグナル、フラグメントの5'末端にNheIサイト、フラグメントの3'末端にEcoRIサイトを含むエクソンとして合成した。

【0189】

発現ベクターpHuPRO5-IgG1.AAは、(i)SpeIサイトとHindIIIサイトの間にHuPRO5 VHエクソンを配置し、(ii)NheIサイトとEcoRIサイトの間にHuPRO5 VLエクソンを配置し、(iii)エフェクター機能 (Hezarehら、前掲) を排除するために、CH2の234位と235位 (Euナンバリング) の2つのロイシン残基をアラニン残基に置換している (それぞれL234AとL235A) (配列番号20) ことを除いて、pHuM195-IgG1 (図1A) と同じ構造を有している。新規ベクターpHuPRO5-IgG1.AAは、哺乳類細胞においてヒト化抗PD-L1 IgG1/カッパ抗体(HuPRO5-IgG1.AA)を発現する。

【0190】

ヒトPD-L1 (配列番号69) 及びヒトOX40 (配列番号21) の両方に結合する二重特異性抗体の発現のために設計された哺乳類発現ベクターpBS839は、pHuPRO5-IgG1.AAのCH3コーディング領域をCH3-HuOHX14DS.scFv (配列番号23) のコーディング領域で置き換えることによって構築した。

【0191】

pBS839にコードされている成熟重鎖のアミノ酸配列は、VQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGDSISSGYWNWIRQPPGKGLEYMGYISYTGSTYSNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSQNWERAFAFWGQGTTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRTYLNWYQQKPGKVPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCQQGNTLPWTFGGGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTSYIMHWVRQAPGQGLEWIGYINPYNSGTYNEKFKGRVTITSDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAHYYGSTFTMDYWGQGTITVTVSS (列番号92) である。

【0192】

pBS839にコードされている成熟軽鎖のアミノ酸配列は、DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMHWWYQQKPGKAPKLWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCFQGSFGYPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (列番号93) である。

【0193】

実施例11：PD-L1及びOX40に結合する二重特異性抗体BS839及びBS841の発現及び特性評価

【0194】

pHuPRO2-IgG1.AA、pHuPRO5-IgG1.AA、pBS839及びpBS841の4つの発現ベクターは、上記のようにCHO-K1に安定的にトランスフェクトする。HuPRO2-IgG1.AA、HuPRO5-IgG1.AA、BS839及びBS841は、上述のようにプロテインAアフィニティカラムを用いて、それぞれのCHO-K1トランスフェクタントの培養上清から精製する。還元条件でSDS-PAGE分析を行い、これら4つの抗体の重鎖及び軽鎖のサイズを調べる。

【0195】

免疫応答を増強するBS839及びBS841の生物学的活性を、ヒトT細胞におけるIL-2の発現レベルを測定することによって分析する。ヒトPBMCを、10%FBS及び10 µg/mlのPHA-Lを含むRPMI-1640中で、上述のように3日間培養する（3日齢PBMC）。3日齢PBMCの約10万個の細胞を、1 µg/mlのマウス抗ヒトCD3モノクローナル抗体OKT3でプレコートした96ウェルプレートのウェルで、(i)追加の抗体なし、(ii)1 µg/mlのHuPRO2-IgG1.AA、(iii)1 µg/mlのHuPRO5-IgG1.AA、(iv)1 µg/mlのHuOHX14DS-IgG1.AA、(v)1 µg/mlのHuPRO2-IgG1.AAとHuOHX14DS-IgG1.AA、(vi)1 µg/mlのHuPRO5-IgG1.AAとHuOHX14DS-IgG1.AAの、(vii)1 µg/mlのS841、及び(iii)1 µg/mlのS839の存在下で、7.5%CO₂インキュベーターで37℃で1日インキュベートする。培養上清中のIL-2濃度は、Human IL-2 ELISA MAX Standard Kit (BioLegend) を用いて測定する。

【0196】

実施例12：がん細胞と共刺激分子に結合する二重特異性抗体

【0197】

がん細胞に結合するモノクローナル抗体をハイブリドーマ技術又はディスプレイ技術を用いて単離する (Akamatsu et al., J. Immunol. Methods, 327:40-52, 2007; Bradbury et al., Nat. Biotechnol. 29:245-254, 2011; Hammers et al., J. Invest. Dermatol. 134:e17, 2014; Cherf et al., Methods Mol. Biol. 1319:155-175, 2015; Saeed et al., MOJ Immunol. 3:00099, 2016; Mahmuda et al., Trop. J. Pharm. Res. 16:713-722, 2017)。このような単離された抗がん抗体のVH領域及びVL領域、又はそれらのヒト化形態は、上述のようにpHuM195-IgG1 (図1A) などの発現ベクターにクローニングする。また、免疫共刺激分子に結合する別のモノクローナル抗体 (Bakdash et al., Front. Immunol. 4: Article 53, 2013; Mahoney et al., Nat. Rev. Drug Discov. 14:561-584, 2015) をハイブリドーマ技術又はディスプレイ技術を用いて分離する。そのような単離された抗共刺激分子抗体のVH及びVL領域、又はそのヒト化形態を一本鎖Fv (scFv) フォームに変換する (Nelson, mAbs 2:77-83, 2010; Ahmad et al., Clin. Dev. Immunol. Article ID 980250, 2012)。抗共刺激分子抗体のscFvフォームを、抗がん抗体の重鎖のC末端に融合させて、がん細胞及び共刺激分子に結合する二重特異性抗体を発現する新しいベクターを作製する。このように作製された(i)がん細胞と免疫細胞との間に橋渡しをし、且つ(ii)共刺激分子のマルチメリック架橋によってそのような免疫細胞を活性化できる二重特異性抗体の生物学的活性を、適切な疾患モデル、例えば、ヒト由来の免疫細胞を有するヒト化マウスを用いた腫瘍異種移植モデルで試験する (Day et al., Cell 163:39-53, 2015; Morton et al., Cancer Res. 76:6153-6158, 2016)。

【0198】

実施例13：病原体由来分子と共刺激分子に結合する二重特異性抗体

【0199】

感染体が宿主細胞の表面に発現させた病原体に結合するモノクローナル抗体を、上述のようにハイブリドーマ技術又はディスプレイ技術を用いて単離する。このような単離された抗病原体抗体のVH領域及びVL領域、又はそれらのヒト化形態を、上述のようにpHuM195-IgG1 (図1A) などの発現ベクターにクローニングする。免疫共刺激分子に結合する別のモノクローナル抗体をハイブリドーマ技術又はディスプレイ技術を用いて単離する。そ

のような単離された抗共刺激分子抗体のVH及びVL領域、又はそのヒト化形態を上述のようにscFvフォームに変換する。抗共刺激抗体のscFvフォームを、抗病原体IgG抗体の発現ベクターにおいて、上述のように抗病原体抗体の重鎖のC末端に融合する。このようにして得られた新規ベクターは、病原体に感染した細胞と共刺激分子に結合できる二重特異性IgG抗体を発現する。このように作製された(i)病原体に感染した細胞と免疫細胞との間に橋渡しをすることができ、且つ(ii)共刺激分子をマルチメリック架橋することによってそのような免疫細胞を活性化できる二重特異性抗体の生物学的活性を、適切な疾患モデル、例えば、病原体に感染したヒト由来の免疫細胞を有するヒト化マウスで試験する (Shultz et al., Ann. N. Y. Acad. Sci. 1245:50-54, 2011; Leung et al., Eur. J. Immunol. 43: 2246-2254, 2013)。

10

【0200】

実施例14：異なるフォーマットの受容体結合モジュールによるscFvの置き換え

【0201】

IgG分子に第2の抗原結合部位を提供する本発明の二重特異性抗体のscFv領域を、細胞表面受容体（例えば、成長因子、サイトカイン、ケモカイン、受容体の可溶性形態）に結合できるポリペプチド、VH、VL、又はVHHなどの単ドメイン抗体 (Holt et al., Trends Biotechnol. 21:484-490, 2003; Bannas et al, Front. Immunol. 8: Article 1603, 2017)、又は抗体ミメティック (Yu et al., Annu. Rev. Anal. Chem. 10: 293-320, 2017) で置換する。このように作製した二重特異性抗体を、がんや感染症について上述したような適切な疾患モデル動物において、共刺激分子の多価架橋を介して免疫細胞を活性化する生物学的活性を試験する。

20

【0202】

実施例15：軽鎖のC末端におけるscFvの融合

【0203】

抗共刺激分子のscFv領域を、チェックポイント分子、がん細胞又は病原体に対するIgG抗体の軽鎖のC末端に融合させる。このように作製された二重特異性抗体を、がんや感染症について上述したような適切な動物モデルにおいて、共刺激分子の多価架橋を介して免疫細胞を活性化する生物学的活性を試験する。

【0204】

実施例16：BS809によるT細胞の活性化

30

【0205】

約10万個のJD/GITR細胞を、10%FBS、0.5 µg/mlのマウス抗ヒトCD3 IgG抗体OKT3 (BioLegend, San Diego, CA)、5 µg/mlのヤギ抗マウスIgG抗体 (ヒトIgG-吸着) (Jackson ImmunoResearch) を含む200 µl/wellのRPMI1640培地で、抗体なし (a及びf)、1 µg/mlのHuPRO1-IgG1.AA (図8の抗PD-L1) (b及びg)、1 µg/mlのHuGAB11-IgG1. AA (図8の抗GITR) (c及びh)、1 µg/mlのHuPRO1-IgG1.AA及び1 µg/mlのHuGAB11-IgG1.AA (d及びi)、及び1 µg/mlのBS809 (e及びj) とともに、96ウェルプレートで37°Cで7.5%CO₂インキュベーター内でインキュベートした。反応a、b、c、d、eには10万個のNS0細胞が含まれる。f、g、h、i、jの反応には10万個のNS0/PD-L1細胞が含まれる。1日培養後、培養上清中のルシフェラーゼ活性を、QUANTI-Luc試薬 (InvivoGen) を用いて、ベンダーのプロトコルに従って3回に分けて測定した。発光は、Gen5ソフトウェア (BioTek, Winooski, VT) を搭載したSynergy HTマイクロプレートリーダーを用いて測定した。その結果を図8に示す。

40

【0206】

JD/GITR細胞の培養上清における平均相対ルシフェラーゼユニット (RLU) は、(a)NS0細胞で479,187、(b)HuPRO1-IgG1.AA及びNS0細胞で400,158、(c)HuGAB11-IgG1.AA及びNS0細胞で472,050、(d)HuPRO1-IgG1.AA、HuGAB11-IgG1.AA及びNS0細胞で531,275、(e)BS809及びNS0細胞で422,955、(f)NS0/PD-L1細胞で405,780、(g)HuPRO1-IgG1.AA及びNS0/PD-L1細胞で443,588、(h)HuGAB11-IgG1.AA及びNS0/PD-L1細胞で568,268、(i)HuPRO1-IgG1.AA、HuGAB11-Ig1.AA及びNS0/PD-L1細胞

50

胞で569,172、(j)BS809及びNS0/PD-L1細胞で1,035,453であった。PD-L1とGITRに結合する二重特異性抗体（BS809）とPD-L1発現細胞（NS0/PD-L1）の両方が存在する場合のみ、JD/GITR細胞のルシフェラーゼ活性が有意に上昇した。この結果は、JD/GITR細胞とNS0/PD-L1細胞との間に橋渡しをできるBS809のみが（HuPRO1-IgG1.AA、HuGAB11-IgG1.AA、及びこれら2つの一重特異性抗体の組み合わせではなく）、NS0/PD-L1細胞に近接した位置でJD/GITR細胞の表面にあるGITRのマルチメリック架橋を引き起こし、その結果、JD/GITR細胞が活性化されてルシフェラーゼの発現量が増加することを示している。

【0207】

実施例17：BS813、BS841及びBS839によるPHA-L処理PBMCの活性化

10

【0208】

免疫応答を増強するBS813、BS841及びBS839の生物学的活性を、ヒトT細胞におけるIL-2発現を測定することによって分析した。PD-L1及びOX40に結合するそれぞれの二重特異性抗体BS813、BS841及びBS839を、それぞれpBS813、pBS841及びpBS839を安定的にトランスフェクトしたCHO-K1細胞の培養上清から、プロテインAアフィニティカラムを用いて精製した。ヒトPBMCを、10%FBS及び10 µg/mlのPHA-Lを含むRPMI-1640培地で、上述のように3日間培養した（3日齢PBMC）。3日齢PBMCの約10万細胞を、1 µg/mlのマウス抗ヒトCD3モノクローナル抗体OKT3でプレコートした96ウェルプレートに200 µl/ウェルで、(a)追加抗体なし、(b)1 µg/mlのHuPRO1-IgG1.AA（図9の抗PD-L1 #1）及び1 µg/mlのHuOHX14DS-IgG1.AA（図9の抗OX40）、(c)1 µg/mlのHuPRO2-IgG1.AA（図9の抗PD-L1 #2）及び1 µg/mlのHuOHX14DS-IgG1.AA、(d)HuPRO5-IgG1.AA（図9の抗PD-L1 #5）及び1 µg/mlのHuOHX14DS-IgG1.AA、(e)1 µg/mlのBS813、(f)1 µg/mlのBS841、(g)1 µg/mlのBS839の存在下で、7.5%CO₂インキュベーター内で37℃で1日インキュベートした。培養上清中のIL-2濃度は、Human IL-2 ELISA MAX Standard Kit（BioLegend）を用いて、3回に分けて測定した。その結果を図9に示す。

20

【0209】

ヒトPBMC由来のT細胞における平均IL-2濃度は、(a)試験抗体なし（コントロール）で439 pg/ml、(b)HuPRO1-IgG1.AA及びHuOHX14DS-IgG1.Aの組み合わせで324 pg/ml、(c)HuPRO2-IgG1.AA及びHuOHX14DS-IgG1.AAの組み合わせで281 pg/ml、(d)HuPRO5-IgG1.AA及びHuOHX14DS-IgG1.AAの組み合わせで53 pg/ml、(e)BS813で2,202 pg/ml、(f)BS841で1,698 pg/ml、(g)BS839で1,259 pg/mlであった。PD-L1とOX40の両方に結合する二重特異性抗体（BS813、BS841及びBS839）のいずれか1つの存在下でのみ、コントロール又はBS813、BS841及びBS839のそれぞれの2つの親抗体の組み合わせにおけるIL-2レベルと比較して、IL-2発現が有意に増加した。これは、BS813、BS841及びBS839の各々によるPD-L1発現細胞とOX40発現T細胞との橋渡しにより、PD-L1発現細胞に近接した位置で細胞表面上のOX40のマルチメリック架橋が生じ、OX40発現T細胞の活性化をもたらしてIL-2発現をアップレギュレートすることによる。

30

【0210】

実施例18：BS813、BS841及びBS839によるSEB処理したPBMCの活性化

40

【0211】

SEB（*Staphylococcus enterotoxin B*）のようなスーパー抗原は、抗原提示細胞上のMHCクラスII分子をT細胞受容体の $\nu\beta$ エレメントに連結することによりT細胞を活性化し、インターロイキン-2（IL-2）、インターロイキン-6（IL-6）、腫瘍壊死因子 α （TNF α ）、及びインターフェロンガンマ（IFN γ ）を含むサイトカインの生産をもたらす（例えば、Krakauer et al., *Toxins* (Basel). 2010 Aug; 2(8): 1963-1983を参照）。SEBは、各特定の血液ドナーに見られる $\nu\beta 3$ 、 $\nu\beta 12$ 、 $\nu\beta 14$ 、及び $\nu\beta 17$ を有するT細胞の割合に応じて、ヒト血液中のT細胞の最大10~20%を活性化できる。従って、SEBは、免疫共刺激分子の活性化をモニターするためのT細胞ベースのサイトカイン分泌アッセイに使用できる。

50

【0212】

約40万個のヒトPBMCを、10%FBS及び1 μ g/mlのSEBを含む200 μ l/ウェルのRPMI-1640培地で、96ウェルプレートで、(a)抗体なし（コントロール）、(b)1 μ g/mlのHuPRO1-IgG1.AA（図10の抗PD-L1 #1）及びHuOHX14DS-IgG1.AA（図10の抗OX40）、(c)1 μ g/mlのHuPRO2-IgG1.AA（図10の抗PD-L1 #2）及び1 μ g/mlのHuOHX14DS-IgG1.AA、(d)HuPRO5-IgG1.AA（図10の抗PD-L1 #5）及び1 μ g/mlのHuOHX14DS-IgG1.AA、(e)1 μ g/mlのBS813、(f)1 μ g/mlのBS841、(g)1 μ g/mlのBS839とともに96ウェルプレートでインキュベートした。7.5% CO₂インキュベーター内で37℃で1日培養した後、Human IL-2 ELISA MAX Standard Kit (BioLegend) を用いて、培養上清中のIL-2濃度を3回に分けて測定した。その結果を図10に示す。

10

【0213】

平均IL-2濃度は、(a)試験抗体なしで11.3ng/ml、(b)HuPRO1-IgG1.AA及びHuOHX14DS-IgG1.AAの組み合わせで10.5ng/ml、(c)HuPRO2-IgG1.AA及びHuOHX14DS-IgG1.AAの組み合わせで10.0ng/ml、(d)HuPRO5-IgG1.AA及びHuOHX14DS-IgG1.AAの組み合わせで10.0ng/ml、(e)BS813で17.7ng/ml、(f)BS841で16.5ng/ml、(g)BS839で15.8ng/mlであった。SEB処理したPBMCに抗体を添加しなかったコントロールのIL-2レベルと比較して、PD-L1とOX40の両方に結合する二重特異性抗体（BS813、BS841、BS839）のいずれか1つの存在下でのみ、IL-2発現が有意に増加した。また、BS813、BS841、BS839のそれぞれの親抗体の2つの組み合わせは、IL-2の発現量はコントロールレベルよりも増加しなかった。この結果は、BS813、BS841及びBS839の各々が、PD-L1発現細胞とOX40発現T細胞との間の橋渡しを行うことができ、これにより、PD-L1発現細胞に近接した位置で細胞表面上のOX40のマルチメリック架橋が生じ、OX40発現T細胞の活性化をもたらし、IL-2発現をアップレギュレートすることを示している。

20

【0214】

実施例19：ジスルフィド結合一本鎖Fvを有する二重特異性抗体

【0215】

Brinkmanらは以前、VLの100位のアミノ酸残基をシステイン残基に変換し、VHの44位の別のアミノ酸残基をシステイン残基に変換することにより、ジスルフィド結合を導入することで、Fvフォーマット(dsFv)におけるVHとVLの結合が安定化することを報告している(Euナンバリング)(Proc. Natl. Acad. Sci. 90:7538-7542, 1993)。また、Fv構造を安定化させるために一对のシステイン残基を導入するために、VHとVLの異なる位置を使用することも報告されている(Brinkman et al. supra; Young et al. FEBS Lett. 377:135-139, 1995; Schmiedl et al. Protein Eng. 13:724-730, 2000)。

30

【0216】

本発明の二重特異性抗PD-L1/GITR抗体(BS809)は、pBS809における部位特異的変異導入により、抗GITR可変領域(1つはVHの44位で他方はVLの100位)に2つのシステイン残基(下線)を導入することで、一本鎖Fv構造を安定化するように改変した。得られた発現ベクターpBS853はpBS809と同じ構造であるが、但し、抗GITR一本鎖Fv領域のアミノ酸配列がpBS853とpBS809で異なっている。ベクターpBS809及びpBS853は、同じ軽鎖配列(配列番号71)を有する。pBS853にコードされている成熟重鎖のアミノ酸配列は、QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGFTFSSSYISWVRQAPGQGLEWIAWIYAGTGGTSYNQKFTGRATITVDESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARHEGVYWFYFDVWVGQGTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINVWLSWYQQKPGKVPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQQGQSYPLTFGC¹GTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVTLKESGPVLVK

40

50

PTETLTCTVSGFSLTDYGVSWIRQPPGKCLEWLGVWGGGGTYNSALKSRLTISKDT
SKSQVVLMTNMDPVDATYYCAKHPYGHFGMDYWGGQTTVTVSS（配列番号106）

である。システイン置換には下線を付している。

【0217】

pBS853にコードされた改変型二重特異性抗体（BS853）を、Durocherら（Nucl. Acids Res. 30:e9, 2002）の手順に従ってHEK293細胞で一過性に発現させた。BS853は、BS809と同程度のPD-L1及びGITRへの結合をELISAで示した。

【0218】

実施例20：PD-L1及びICOSに結合する二重特異性抗体（BS859）

【0219】

ICOS（inducible T-cell costimulatory）は、CD278としても知られており、CD28ファミリーに属する免疫共刺激分子である。免疫細胞の細胞表面上のICOSのマルチメリック架橋は、免疫応答を高めるための細胞内シグナル伝達を開始するために必要である（Wikenheiser et al., Front. Immunol. 7: Article 304, 2016）。

【0220】

ヒト及びカニクイザルのICOSに特異的に結合するIgG/カッパモノクローナル抗体TAM14を生産するラットハイブリドーマを、Sprague Dawleyラットを免疫に使用したことを除いて、実施例1に記載したように単離した。免疫原として、ヒトガンマ-1重鎖のFc領域に融合したヒトICOSの細胞外領域（hICOS-Fc；配列番号107）を用いた。TAM14 VH及びVLの配列決定及びヒト化は、Tsurushitaら（前掲）に記載されているように行った。

【0221】

ヒト化TAM14（HuTAM14）VHのアミノ酸配列は、MAVLVLLCLVTFPSCALSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSISSNSVSWVRQPPGKGLEWMGAIWSSGGSTDYNSALKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCTRWEQPYFFDYWGQGTMTVTSS（配列番号108）である。HuTAM14 VHのCDR1、2及び3のアミノ酸配列は、Kabatら（前掲）による定義によれば、それぞれSNSVS（配列番号109）、AIWSSGGSTDYNSALKS（配列番号110）及びWEQPYFFDY（配列番号111）である。HuTAM14 VHをコードする遺伝子は、コード領域の3'末端にスプライスドナーシグナル、フラグメントの5'末端にSpeIサイト、フラグメントの3'末端にHindIIIサイトを含むエクソンとして合成した。

【0222】

ヒト化TAM14（HuTAM14）VLのアミノ酸配列は、MRTSIQLLGLLLFWLHDAQCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQNIYKYIAWYQQKPGKAPKLLIRYTSTLESGLTPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCLQYVNLTYTGGGKVEIK（配列番号112）である。HuTAM14 VLのCDR1、2及び3のアミノ酸配列は、Kabatら（前掲）による定義によれば、それぞれQASQNIYKYIA（配列番号113）、YTSTLES（配列番号114）及びLQYVNLTY（配列番号115）である。HuTAM14 VLをコードする遺伝子は、コード領域の3'末端にスプライスドナーシグナル、フラグメントの5'末端にNheIサイト、フラグメントの3'末端にEcoRIサイトを含むエクソンとして合成した。

【0223】

発現ベクターpHuTAM14-IgG1.AAは、(i)SpeI部位とHindIII部位の間にHuTAM14 VHエクソンが配置され、(ii)NheI部位とEcoRI部位の間にHuTAM14 VLEクソンが配置され、(iii)エフェクター機能（Hezareh et al., J. Virol. 75:12161-12168, 2001）を排除するために、CH2の234位及び235位の2つのロイシン残基（KabatらのEUナンバリング、前掲）をアラニン残基に置換した（それぞれL234A及びL235A）（配列番号20）ことを除いて、pHuM195-IgG1（図1A）と同じ構造を有する。新規ベクターpHuTAM14-IgG1.AAは、哺乳類細胞においてヒト化抗ICOS IgG1/カッパ抗体（HuTAM14-IgG1.AA）を発現する。

【0224】

ヒトPD-L1（配列番号69）及びヒトICOS（配列番号116）の両方に結合する二重特異性抗体の発現のために設計された哺乳類発現ベクターを、pHuPRO1-IgG1.AAを以下のよ

10

20

30

40

50

うに改変することによって構築した。pHuTAM14-IgG1.AAのヒト化抗ヒトICOSモノクローナル抗体のVL及びVHコード領域を、N-末端からC-末端までVL、ポリペプチドリンカー、及びVHの順に一本鎖Fv (scFv) フォームに変換した (HuTAM14.scFv; 配列番号117)。HuTAM14.scFvのN末端をpHuPRO1-IgG1.AAのCH3の最後から2番目のグリシン残基にポリペプチドリンカーを隔てて融合させた (CH3-HuTAM14.scFv; 配列番号118)。結果として得られたベクターpBS859は、ヒトPD-L1及びICOSの両方に結合するBS859と名付けられた二重特異性IgG抗体を発現する。

【0225】

pBS859にコードされている成熟重鎖のアミノ酸配列は、QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTFSSSYISWVRQAPGQGLEWIAWIYAGTGGTSYNQKFTGRATITVDESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARHEGVYWFYFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQNIYKYIAWYQQKPGKAPKLLIRYTSTLESPTPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCLQYVNLYTFGGGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSISSNSVSWVRQPPGKGLEWMGAIWSSGSTDYNSALKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCTRW

10

20

【0226】

pBS859にコードされている成熟軽鎖のアミノ酸配列は、pBS809にコードされている成熟軽鎖配列 (配列番号71) と同じである。

【0227】

BS859のような本発明の二重特異性IgG抗体の概略構造を図2に示す。

【0228】

pHuPRO1-IgG1.AA、pHuTAM14-IgG1.AA、及びpBS859の3つの発現ベクターのそれぞれを、上述のようにCHO-K1細胞に安定的にトランスフェクトした。HuPRO1-IgG1.AA、HuTAM14-IgG1.AA、及びBS859を、上述のようにプロテインAアフィニティカラムを用いて、それぞれのCHO-K1安定トランスフェクタントの培養上清から精製した。還元条件下でのSDS-PAGE分析では、これら3つの抗体のそれぞれにおいて、2つの優勢なバンドのみが示された。およそ50kDの重鎖と25kDの軽鎖 (HuPRO1-IgG1.AA及びHuTAM14-IgG1.AAの場合)、又はおよそ75kDの重鎖と25kDの軽鎖 (BS859の場合) であった。

30

【0229】

BS859の免疫応答を増強する生物学的活性を、ヒトT細胞におけるIL-2及びIL-10の発現レベルを測定することによって分析した。2人のドナー (3486及び4239) のヒト末梢血単核細胞 (PBMC) をiQ Biosciences (Berkeley, CA) から入手した。ヒトPBMCは、10% FBS及び10 µg/mlのフィトヘマグルチニン-L (PHA-L) を含むRPMI-1640で、7.5% CO₂ インキュベーター内、37°Cで3日間培養し、T細胞を濃縮した (3日齢PBMC)。

40

【0230】

3日齢PBMCの約20万個の細胞を1 µg/mlのマウス抗ヒトCD3モノクローナル抗体OKT3及び1 µg/mlのヒトPD-L1-Fc融合蛋白質 (Recombinant Human B7-H1-Fc Chimera, BioLegend, San Diego, CA) でプレコートした96ウェルプレートのウェルで、(i) 追加抗体なし (コントロール)、(ii) 1 µg/mlのHuPRO1-IgG1.AA (抗PD-L1)、(iii) 1 µg/mlのHuTAM14-IgG1.AA (抗ICOS)、(iv) 1 µg/mlのHuPRO1-IgG1.AA及び1 µg/mlのHuTAM14-IgG1.AA、(v) 1 µg/mlのBS859の存在下で、7.5% CO₂ インキュベーターで37°Cで1日インキュベートした。培養上清中のIL-2及びIL-10の濃度は、それぞれELISA MAX Standard Set Human IL-2及びELISA MAX Standard Set Human IL-10 ((B

50

ioLegend, San Diego, CA) を用いて測定した。その結果を図11に示す。

【0231】

ドナー3486のPBMC由来T細胞における平均IL-2濃度は、(i)抗体なし（コントロール）で3.3ng/ml、(ii)HuPRO1-IgG1.AAで13.3ng/ml、(iii)HuTAM14-IgG1.AAで3.6ng、(iv)HuPRO1-IgG1.AA及びHuTAM14-IgG1.AAの混合物で9.9ng/ml、及び(v)BS859で46.2ng/mlであった。

【0232】

ドナー3486のPBMC由来のT細胞における平均IL-10濃度は、(i)抗体なし（コントロール）で604pg/ml、(ii)HuPRO1-IgG1.AAで676pg/ml、(iii)HuTAM14-IgG1.AAで527pg/ml、(iv)HuPRO1-IgG1.AA及びHuTAM14-IgG1.AAの混合物で699pg/ml、(v)BS859で1,201pg/mlであった。

10

【0233】

ドナー4239のPBMC由来のT細胞における平均IL-2濃度は、(i)抗体なし（コントロール）で0.01ng/ml、(ii)HuPRO1-IgG1.AAで0.15ng/ml、(iii)HuTAM14-IgG1.AAで0.01ng/ml、(iv)HuPRO1-IgG1.AA及びHuTAM14-IgG1.AAの混合物で0.06ng/ml、及び(v)BS859で13.6ng/mlであった。

【0234】

ドナー4239のPBMC由来のT細胞における平均IL-10濃度は、(i)抗体なし（コントロール）で238pg/ml、(ii)HuPRO1-IgG1.AAで252pg/ml、(iii)HuTAM14-IgG1.AAで217pg/ml、(iv)HuPRO1-IgG1.AA及びHuTAM14-IgG1.AAの混合物で220pg/ml、及び(v)BS859で537pg/mlであった。

20

【0235】

HuPRO1-IgG1.AA単独では、2人の異なるドナーからのPHA-L処理PBMCのIL-2発現を、抗体処理をしていないそれぞれのコントロール群と比較して増加させることができた。BS859は、これらの2人のドナーでIL-2発現をさらに有意に増加させた。

【0236】

2人の異なるドナーからのPHA-L処理PBMCにおけるIL-10の発現は、PD-L1及びICOSの両方に結合する本発明の二重特異性抗体（BS859）の存在下でのみ有意に増加した。

【0237】

実施例21：PD-L1及びGITRに結合する二重特異性抗体（BS840）

30

【0238】

ヒトPD-L1（配列番号69）及びヒトGITR（配列番号40）の両方に結合する二重特異性抗体の発現のために設計された哺乳類発現ベクターpBS840は、CH3-HuOHX14DS.scFv（配列番号23）がCH3-HuGAB11.scFv（配列番号42）で置換されていることを除いて、pBS841と同じ構造を有する。ベクターpBS840は、ヒトPD-L1及びGITRの両方に結合するBS840と名付けられた二重特異性IgG抗体を発現する。

【0239】

pBS840にコードされている成熟重鎖のアミノ酸配列は、QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYGINWVRQAPGQGLEWIGYIYPGSGGPVYNQKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARENYRYWYFDVWVGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQININWLSWYQQKPGKVPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQQGQSYPLTFGGGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLTDYGVSWIRQPPGKALEWLGLVIWGGGGTYYNLSALKSRLTISKDTSKSQVVLTMTNMDPVDATATYYCAKHPYGHFGMDYWGQGTITVTVSS（配列番号120）である。

40

50

【0240】

pBS840にコードされる成熟軽鎖のアミノ酸配列は、pBS841にコードされている軽鎖配列のアミノ酸配列と同じである（配列番号83）。

【0241】

発現ベクターpBS840を上述のようにCHO-K1細胞に安定的にトランスフェクトした。得られたCHO-K1安定トランスフェクタントの培養上清からBS840を上記のようにプロテインAアフィニティカラムを用いて精製した。プロテインAで精製したBS840は、Superose 6サイズ排除10/300カラム（GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA）を用いたゲルろ過により、期待されるサイズ（約200kDa）の単一のドミナントピークを示した。還元条件下でのSDS-PAGE分析では、およそ75kDの重鎖と25kDの軽鎖の2つの優勢なバンドのみが示された。

10

【0242】

上述のようにヒトGITRを安定的に発現するJurkat Dual細胞（JD/GITR）を用いて、免疫応答を増強するBS840の生物学的活性を調べた。そのデータを図12に示す。JD/GITR細胞の培養上清における平均相対ルシフェラーゼユニット（RLU）は、(a)NS0細胞で354,057、(b)HuPRO2-IgG1.AA（図12の抗PD-L1 #2；BS840の親モノスペシフィックIgG抗体）、HuGAB11-IgG1.AA（図12の抗GITR）及びNS0細胞で341,277、(c)BS840及びNS0細胞で326,577、(d)NS0/PD-L1細胞で282,554、(e)HuPRO2-IgG1.AA、HuGAB11-Ig1.AA及びNS0/PD-L1細胞で386,137、(f)BS840及びNS0/PD-L1細胞で989,407であった。PD-L1とGITRに結合する二重特異性抗体（BS840）とPD-L1発現細胞（NS0/PD-L1）の両方が存在する場合にのみ、JD/GITR細胞のルシフェラーゼ活性が有意に増加した。

20

【0243】

実施例22：PD-L1とCD40に結合する二重特異性抗体（BS846）

【0244】

ヒトPD-L1（配列番号69）及びヒトCD40（配列番号56）の両方に結合する二重特異性抗体の発現のために設計された哺乳類発現ベクターpBS846は、CH3-HuGAB11.scFv（配列番号42）がCH3-HuACS2.scFv（配列番号58）で置換されていることを除いて、pBS809と同じ構造を有する。ベクターpBS846は、ヒトPD-L1及びCD40の両方に結合するBS846と名付けられた二重特異性IgG抗体を発現する。

30

【0245】

pBS846にコードされている成熟重鎖のアミノ酸配列は、QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV
SCKASGFTFSSSYISWVRQAPGQGLEWIAWIYAGTGGTSYNQKFTGRATITVDESTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCARHEGVYWFYFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG
GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP
EVTCTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHN
HYTQKSLSLSPGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQ
KPGQAPRRWIYDTSKLSAGVPARFSGSGSGTDYTLTISSELEPEDFAVYYCQQWSSNPLTF
GGGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTSYWLH
WVRQAPGQGLEWIGRIDPNSGDTKYNEKFKSRATITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYY
CARYYYGRSYFDYWQGTTVTVSS（配列番号121）である。

40

【0246】

pBS846にコードされている成熟軽鎖のアミノ酸配列は、pBS809にコードされている軽鎖配列のアミノ酸配列と同じである（配列番号71）。

【0247】

発現ベクターpBS846を、上述のようにCHO-K1細胞に安定的にトランスフェクトした。得られたCHO-K1安定トランスフェクタントの培養上清から、BS846を上述のようにプ

50

ロテインAアフィニティカラムを用いて精製した。プロテインAで精製したBS846は、Superose 6サイズ排除10/300カラム (GE Healthcare Life Sciences, Pittsburgh, PA) を用いたゲルろ過により、期待されるサイズ (約200kDa) の単一のドミナントピークを示した。還元条件でのSDS-PAGE分析では、およそ75kDの重鎖と25kDの軽鎖の2つの優勢なバンドのみが示された。

【0248】

CD40媒介免疫応答を増強するBS846の生物学的活性を、上述のようにRamos細胞を用いて調べた。Ramos細胞を、10%FBSを含むDME培地中で、(a)抗体なし及びNS0細胞、(b)1 µg/mlのHuPRO1-IgG1.AA (抗PD-L1) 及びNS0細胞、(c)1 µg/mlのHuACS2-IgG1.AA (抗CD40) 及びNS0細胞、(d)1 µg/mlのHuPRO1-IgG1.AA、1 µg/mlのHuACS2-IgG1.AA及びNS0細胞、(e)1 µg/mlのBS846及びNS0細胞、(f)抗体なし及びNS0/PD-L1細胞、(g)1 µg/mlのHuPRO1-IgG1.AA及びNS0/PD-L1細胞、(h)1 µg/mlのHuACS2-IgG1.AA及びNS0/PD-L1細胞、(i)1 µg/mlのHuPRO1-IgG1.AA、1 µg/mlのHuACS2-IgG1.AA及びNS0/PD-L1細胞、(j)1 µg/mlのBS846及びNS0/PD-L1細胞の存在下で、3日間インキュベートした。ラモス細胞におけるCD95の発現は、ラモス細胞を検出するためのFITC標識マウス抗ヒトCD20モノクローナル抗体 (Clone 2H7, BioLegend) 、及びCD95の発現をモニターするためのPE標識マウス抗ヒトCD95抗体 (Clone DX2, BioLegend) を用いて、フローサイトメトリーで解析した。

【0249】

CD20陽性ラモス細胞に占めるCD95陽性集団の割合は、抗体なし及びNS0細胞で0.3%(a)、1 µg/mlのHuPRO1-IgG1.AA及びNS0細胞で0.3%(b)、1 µg/mlのHuACS2-IgG1.AA及びNS0細胞で0.3%(c)、1 µg/mlのHuPRO1-IgG1.AA、1 µg/mlのHuACS2-IgG1.AA及びNS0細胞で0.3%(d)、1 µg/mlのBS846及びNS0細胞で2.5%(e)、抗体なし及びNS0/PD-L1細胞で0.2%(f)、1 µg/mlのHuPRO1-IgG1.AA及びNS0/PD-L1細胞で0.3%(g)、1 µg/mlのHuACS2-IgG1.AA及びNS0/PD-L1細胞で0.3%(h)、1 µg/mlのHuPRO1-IgG1.AA、1 µg/mlのHuACS2-IgG1.AA及びNS0/PD-L1細胞で0.2%(i)、及び、1 µg/mlのBS846及びNS0/PD-L1細胞で59.5%(j)であった (図13)。

Ramos細胞とNS0/PD-L1細胞の間の橋渡しができるBS846のみがRamos細胞のCD95発現を有意に増加させることができた。これは、BS846がNS0/PD-L1細胞との細胞間接合部でRamos細胞表面のCD40をマルチメリック架橋させ、CD40を介した細胞内シグナル伝達を引き起こしてRamos細胞のCD95発現をアップレギュレートさせることができるためである。

【0250】

実施例24：ジスルフィド結合一本鎖Fv

【0251】

OX40 (HuOHX14DS.scFv; 配列番号22)、CD40 (HuACS2.scFv; 配列番号57)、及びICOS (HuTAM14.scFv) に対する一本鎖Fv (scFv) 抗体の各々は、それぞれ部位特異的変異導入により、VHの44位のアミノ酸残基をシステイン残基に、VLの100位のアミノ酸残基をシステイン残基に置換することで、構造を安定化させた (Euナンバリング) (Brinkman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 90:7538-7542, 1993)。

【0252】

2つのシステイン置換を有する成熟HuOHX14DS.scFvのアミノ酸配列 (HuOHX14DS.scFv.ds) は、DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRTYLNWYQQKPGKVPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCQQGNTLPWTFGCGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKKASGYTFTSYIMHWVRQAPGQCLEWIGYINPYNSGTYNEKFKGRVTITSDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAHYYGSTFTMDYWGQGTITVTVSS (配列番号122) である。

【0253】

2つのシステイン置換を有する成熟HuACS2.scFvのアミノ酸配列 (HuACS2.scFv.ds) は、EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWWYQQKPGQAPRRWIYDTSKLASGV

PARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSSNPLTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGG
GGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTSYWLHWVRQAPGQCLEWIGRIDPNSG
DTKYNEKFKSRATITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARYYYGRSYFDYWGQGTTVT
VSS（配列番号123）である。

【0254】

2つのシステイン置換を有する成熟HuTAM14.scFvのアミノ酸配列（HuTAM14.scFv.ds）は、DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQNIKYIAWYQQKPKGKAPKLLIRYTSTLE
SGTPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCLQYVNLYTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGS
GGGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSISSNSVSWVRQPPGKCLEWMGAIWSSG
STDYNSALKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCTRWEQPYFYFDYWGQGTMTVT
VSS（配列番号124）である。

10

【0255】

2つのシステイン置換を有する成熟HuGAB11.scFvのアミノ酸配列（HuGAB11.scFv.ds）（作製は実施例19に記載されている）は、DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNI
NVWLSWYQQKPKGKVPKLLIYKASNLHTGVPSPRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQ
QQQSYPLTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFS
LTDYGVSWIRQPPGKCLEWLGVIWGGGGTYNSALKSRLTISKDTSKSQVVLTMNMDP
VDTATYYCAKHPYGHFGMDYWGQGTMTVTVSS（配列番号125）である。

【0256】

実施例24に示すアミノ酸配列において、システイン置換に下線を付している。

20

【0257】

実施例25：PD-L1及び4-1BBに結合する二重特異性抗体（BS883及びBS884）の構築

【0258】

4-1BBは、CD137やTNFRSF9としても知られており、TNF受容体スーパーファミリーに属する免疫共刺激分子である。免疫細胞の細胞表面上の4-1BBの架橋は、免疫応答を高めるための細胞内シグナル伝達を開始するために必要である（Chester et al. 2016 Cancer Immunol. Immunother. 65:1243-1248）。

【0259】

ヒト及びカニクイザルの4-1BBに特異的に結合するIgG/カップモノクローナル抗体FOB5を生産するマウスハイブリドーマを、実施例1に記載したように単離した。免疫原として、ヒトガンマ-1重鎖のFc領域に融合したヒト4-1BBの細胞外領域（h4-1BB-Fc；配列番号126）を用いた。FOB5 VH及びVLの配列決定及びヒト化は、Tsurushitaら（前掲）に記載されているように実施した。

30

【0260】

ヒト化FOB5（HuFOB5）VHのアミノ酸配列は、MERHWIFLFLFSVTAGVHSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYIFINYWMHWVRAPGQGLEWIGYINPSTGYTESNQKFKD
RVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSYVGYYYAVDYWGQGTTVTVSS（配列番号127）である。HuFOB5 VHのCDR1、2及び3のアミノ酸配列は、Kabatら（前掲）による定義によれば、それぞれNYWMH（配列番号128）、YINPSTGYTESNQKFKD（配列番号129）及びSYVGYYYAVDY（配列番号130）である。HuFOB5 VHをコードする遺伝子は、コード領域の3'末端にスプライスドナーシグナル、フラグメントの5'末端にSpeIサイト、フラグメントの3'末端にHindIIIサイトを含むエクソンとして合成した。

40

【0261】

ヒト化FOB5（HuFOB5）VLのアミノ酸配列は、MDSQAQVLMLLLLWVSGTCGDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSNNEKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTIFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSPYTFGGGKVEIK（配列番号131）である。HuFOB5 VLのCDR1、2及び3のアミノ酸配列は、Kabatら（前掲）による定義によれば、それぞれKSSQSLLYSNNEKNYLA（配列番号132）、WASTRES（配列番号133）及びQQYYSPYT（配列番号134）である。HuFOB5 VLをコードする遺伝子は、コード領域の3'末端にスプライスドナーシグナル、フラグメントの5'末端にNheIサイト、フ

50

ラグメントの3'末端にEcoRIサイトを含むエクソンとして合成した。

【0262】

発現ベクターpHuFOB5-IgG1.AAは、(i)SpeIサイトとHindIIIサイトの間にHuFOB5 VHエクソンを配置し、(ii)NheIサイトとEcoRIサイトの間にHuFOB5 VLエクソンを配置し、(iii)エフェクター機能 (Hezareh et al., J. Virol. 75:12161-12168, 2001) を排除するために、CH2の234位と235位の2つのロイシン残基 (KabatらのEUナンバリング、前掲) をアラニン残基に置換した (それぞれL234A及びL235A) (配列番号20) ことを除いて、pHuM195-IgG1 (図1A) と同じ構造を有する。新規ベクターpHuFOB5-IgG1.AAは、哺乳類細胞においてヒト化抗4-1BB IgG1/カップパ抗体 (HuFOB5-IgG1.AA) を発現する。

10

【0263】

ヒトPD-L1 (配列番号69) 及びヒト4-1BB (配列番号135) の両方に結合する二重特異性抗体の発現のために設計された哺乳類発現ベクターは、pHuPRO1-IgG1.AA を以下のように改変することによって構築した。pHuFOB5-IgG1.AAのヒト化抗ヒト4-1BBモノクローナル抗体のVL及びVHコーディング領域を、N末端からC末端までVL、ポリペプチドリンカー、VHの順に一本鎖Fv (scFv) フォームに変換した。さらに、HuFOB5 VHの44位のグリシン残基をシステイン残基に変更し、HuFOB5 VLの100位のグリシン残基をシステイン残基に変更して、ジスルフィド結合HuFOB5 scFv (HuFOB5.scFv.LH.ds; 配列番号136) を構築した。HuFOB5.scFvのN末端をpHuPRO1-IgG1.AAのCH3の最後から2番目のグリシン残基にポリペプチドリンカーを隔てて融合させた (CH3-HuFOB5.scFv.LH.ds; 配列番号137)。pHuPRO1-IgG1.AAのCH3コーディング領域をCH3-FOB5.scFv.LH.dsのコーディング領域で置き換えた。結果として得られたベクターpBS883は、ヒトPD-L1と4-1BBの両方に結合するBS883と名付けられた二重特異性IgG抗体を発現する。

20

【0264】

pBS883にコードされている成熟重鎖のアミノ酸配列は、QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGFTFSSSYISWVRQAPGQGLEWIAWIYAGTGGTSYNQKFTGRATITVDESTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCARHEGVYWFYFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSNNEKNY LAWYQKPKGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTIFTLTISLQAEDVAVYYCQQYY SYPYTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYIFIN YWMHWRAPGQCLEWIGYINPSTGYTESNQKFKDRVITADKSTSTAYMELSSLRSEDT AVYYCARSYVGYYAVDYWGQGTTVTVSS (配列番号138) である。システイン置換には下線を付している。

30

【0265】

pBS883にコードされている成熟軽鎖のアミノ酸配列は、pBS809にコードされている成熟軽鎖の配列 (配列番号71) と同じである。

40

【0266】

ヒトPD-L1 (配列番号69) 及びヒト4-1BB (配列番号135) の両方に結合する二重特異性抗体の発現のために設計された別の哺乳類発現ベクターを、pHuPRO1-IgG1.AAを以下のように改変して構築した。pHuFOB5-IgG1.AAのヒト化抗ヒト4-1BBモノクローナル抗体のVH及びVLコード領域を、N-末端からC-末端までVH、ポリペプチドリンカー、VLの順にscFvフォームに変換した。さらに、HuFOB5 VHの44位のグリシン残基をシステイン残基に変更し、HuFOB5 VLの100位のグリシン残基をシステイン残基に変更して、ジスルフィド結合HuFOB5 scFv (HuFOB5.scFv.HL.ds; 配列番号139) を構築した。HuFOB5.scFvのN末端をpHuPRO1-IgG1.AAのCH3の最後から2番目のグリシン残基にポリペ

50

プチドリンカーを隔てて融合させた (CH3-FOB5.scFv.HL.ds ; 配列番号140)。pHuPRO1-IgG1.AAのCH3コーディング領域をCH3-HuFOB5.scFv.HL.dsのコーディング領域で置き換えた。結果として得られたベクターpBS884は、ヒトPD-L1と4-1BBの両方に結合するBS884と名付けられた二重特異性IgG抗体を発現する。

【0267】

pBS884にコードされている成熟重鎖のアミノ酸配列は、QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV
SCKASGFTFSSSYISWVRQAPGQGLEWIAWIYAGTGGTSYNQKFTGRATITVDESTSTAY
MELSSLRSEDTAVYYCARHEGVYWFYFDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG
GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHN
HYTQKSLSLSPGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYIFINYYWMHW
VRAPGQCLEWIGYINPSTGYTESNQKFKDRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA
RSYVGYYAVDYWGQGTITVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATI
NCKSSQSLLYSNNEKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTIFTLTIS
SLQAEDVAVYYCQYYSYPTFGCGTKVEIK (配列番号141) である。システインの置
換には下線を付している。

【0268】

pBS884にコードされている成熟軽鎖のアミノ酸配列は、pBS809にコードされている成熟軽鎖の配列 (配列番号71) と同じである。

【0269】

BS883及びBS884などの本発明の二重特異性IgG抗体の概略構造を図2に示す。

【0270】

実施例26：PD-L1とPD-1との間の相互作用のブロック

【0271】

ヒトPD-1 (配列番号142) とヒトPD-L1との相互作用をブロックするHuPRO1-IgG1.AA、HuPRO2-IgG1.AA及びHuPRO5-IgG1.AAの活性を、NS0/PD-L1細胞及びPD-1-Fc融合蛋白質を用いてフローサイトメトリーにより分析した。PD-L1に結合するリガンドとして使用するために、ヒトPD-1の細胞外領域をヒトガンマ-1重鎖のFc領域に融合させ (hPD-1-Fc ; 配列番号143)、NS0細胞で発現させ、プロテインAアフィニティークロマトグラフィーで精製した。NS0/PD-L1細胞への結合をモニターするために、hPD-1-Fcを標準的なコンジュゲーション法を用いてフルオレセインイソチオシアネート (FITC) で標識した。NS0/PD-L1細胞を、FACS Buffer (0.5%BSA及び0.05%アジ化ナトリウムを含むPBS) 中の亜飽和濃度のFITC標識hPD-1-Fc及び様々な濃度の試験抗体 (HuPRO1-IgG1.AA、HuPRO2-IgG1.AA又はHuPRO5-IgG1.AA) とともに4℃で60分間インキュベートした。FACS Bufferで洗浄して懸濁した後、細胞をフローサイトメトリー解析に供した。hPD-1-FcのNS0/PD-L1細胞への結合をブロックする半数阻害濃度 (IC50) は、HuPRO1-IgG1.AAで106ng/ml、HuPRO2-IgG1.AAで55ng/ml、HuPRO5-IgG1.AAで87ng/mlであった。

配列表

【0272】

配列番号1

【0273】

ヒトCD33のアミノ酸配列

【0274】

MPLLLLLPLLLWAGALAMDPNFWLQVQESVTVQEGLCVLVPCTFFHPIPIYYDKNSPVHGYW
FREGAIIISRDSPVATNKLDQEVQEETQGRFRLLGDPSRNNCSLSIVDARRRDNGSYFFRM
ERGSTKYSYKSPQLSVHVTDLTHRPKILIPGTLEPGHKNLTCSVSWACEQGTPIIFS

WLSAAPTSLGPRTHSSVLIITPRPQDHGTNLTCQVKFAGAGVTTERTIQLNVTYVPQNP
TTGIFPGDGSQKQETRAGVVHGAIGGAGVTALLALCLCLIFFIVKTHRRKAARTAVGRNDT
HPTTGSASPKHQKSKLHGPTETSSCSGAAPTVMDEELHYASLNFHGMNPSKDTSTEY
SEVRTQ

【0275】

配列番号2

【0276】

HuM195 VHのアミノ酸配列

【0277】

MGWSWIFFFLLSGTASVLSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDYNMHWVRQ
APGQGLEWIGYIYPYNGGTGYNQKFKSKATITADESTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARG
RPAMDYWGQGTLVTVSS

10

【0278】

配列番号3

【0279】

pHuM195-IgG1にコードされるヒトガンマ-1重鎖のCH1領域のアミノ酸配列

【0280】

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV

【0281】

20

配列番号4

【0282】

pHuM195-IgG1にコードされるヒトガンマ-1重鎖のヒンジ領域(Hinge)のアミノ酸配列

【0283】

EPKSCDKTHTCPPCP

【0284】

配列番号5

【0285】

pHuM195-IgG1にコードされるヒトガンマ-1重鎖のCH2領域のアミノ酸配列

【0286】

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

30

【0287】

配列番号6

【0288】

pHuM195-IgG1にコードされるヒトガンマ-1重鎖のCH3領域のアミノ酸配列

【0289】

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHREALHNHTYQKSLSLSPGK

【0290】

40

配列番号7

【0291】

HuM195 VLのアミノ酸配列

【0292】

MEKDTLLLWVLLLWVPGSTGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASESDNYGISFMNW
FQQKPGGAPKLLIYAASNQGSQVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPDDEFATYYCQQSKEVP
WTFGGGTKVEIK

【0293】

配列番号8

【0294】

50

pHuM195-IgG1にコードされるヒトカップ定常領域のアミノ酸配列

【0295】

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【0296】

配列番号9

【0297】

FLAGペプチドのアミノ酸配列

【0298】

DYKDDDDK

【0299】

配列番号10

【0300】

GPIアンカレッジシグナルのアミノ酸配列

【0301】

PNKGS GTTSGTTRLLSGHTCFTLTGLLGTLVTMGLLT

【0302】

配列番号11

【0303】

成熟OX40-FLAG-GPIのアミノ酸配列

【0304】

LHCVGDTYPSNDRCCHECRPGNGMVSRCSRSQNTVCRPCGPGFYNDVVSSKPCKPCTW
CNLRSGSERKQLCTATQDTVCRCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWT
NCTLAGKHTLQPASNSSDAICEDRDPPATQPQETQGPPARPITVQPTEAWPRTSQGPSTR
PVEVPGGRATGGGDYKDDDDKGGGPNKGS GTTSGTTRLLSGHTCFTLTGLLGTLVTMGL
LT

【0305】

配列番号12

【0306】

HuOHX14DS VHのアミノ酸配列

【0307】

MGRLTSSFLLLIVPAYVLSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTSYIMHWVRQAP
GQGLEWIGYINPYNSGTYNEKFKGRVTITSDKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAHYYG
STFTMDYWGQGTTVTVSS

【0308】

配列番号13

【0309】

HuOHX14DS VHのCDR1のアミノ酸配列

【0310】

SYIMH

【0311】

配列番号14

【0312】

HuOHX14DS VHのCDR2のアミノ酸配列

【0313】

YINPYNSGTYNEKFKG

【0314】

配列番号15

【0315】

HuOHX14DS VHのCDR3のアミノ酸配列

10

20

30

40

50

【0316】
YYGSTFTMDY

【0317】
配列番号16

【0318】
HuOHX14DS VLのアミノ酸配列

【0319】
MMSSAQFLGLLLLCFQGTRCDIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDIRTYLNWYQQKP
GKVPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCQQGNTLPWTFGGG
TKVEIK

10

【0320】
配列番号17

【0321】
HuOHX14DS VLのCDR1のアミノ酸配列

【0322】
RASQDIRTYLN

【0323】
配列番号18

【0324】
HuOHX14DS VLのCDR2のアミノ酸配列

20

【0325】
YTSRLHS

【0326】
配列番号19

【0327】
HuOHX14DS VLのCDR3のアミノ酸配列

【0328】
QQGNTLPWT

【0329】
配列番号20

30

【0330】
L234A及びL235変異を有するCH2領域のアミノ酸配列

【0331】
APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

【0332】
配列番号21

【0333】
ヒトOX40のアミノ酸配列

【0334】
MCVGARRLGPGCAALLLLGLGLSTVTGLHCVGDTYPSNDRCCHECRPGNGMVSRCRS
QNTVCRPCGPGFYNDVVSSKPKPCTWCNLRSGSERKQLCTATQDTVCRCRAGTQPLDS
YKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGKHTLQPASNSSDAICEDRDPPATQPQ
ETQGPPARPITVQPTAEAWPRTSQGPSTRPVEVPGGRAVAAILGLGLVLGLLGPLAILLALY
LLRRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI

40

【0335】
配列番号22

【0336】
HuOHX14DS.scFvのアミノ酸配列

【0337】

50

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDIRTYLNWYQQKPGKVPKLLIYYTSRLHSGVPS
RFGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCQQGNTLPWTFGGGTKVEIKGGGGSGGGGSGGG
GSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYIMHWVRQAPGQGLEWIGYINPYNSG
TKYNEKFKGRVTITSDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAHYYGSTFTMDYWGQGTTVT
VSS

【0338】

配列番号23

【0339】

pBS824にコードされるCH3とHuOHX14DS.scFv (CH3-HuOHX14DS.scFv)の融合物の
アミノ酸配列

【0340】

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGGSGGGGSDI
QMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQDIRTYLNWYQQKPGKVPKLLIYYTSRLHSGVPSRF
SGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCQQGNTLPWTFGGGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSG
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYIMHWVRQAPGQGLEWIGYINPYNSGTK
YNEKFKGRVTITSDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAHYYGSTFTMDYWGQGTTVTVSS

【0341】

配列番号24

【0342】

pBS824にコードされる成熟重鎖のアミノ酸配列

【0343】

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTDYNMHWRQAPGQGLEWIGYIYPYNGGT
GYNQKFKSKATITADESTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGRPAMDYWGQGLTVTVSSA
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGGSGGGGSDI
QMTQSPSSLSASVGDRV
TITCRASQDIRTYLNWYQQKPGKVPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQ
PEDVATYYCQQGNTLPWTFGGGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGSS
VKVSCKASGYTFTSYIMHWVRQAPGQGLEWIGYINPYNSGTKYNEKFKGRVTITSDKSTS
TAYMELSSLRSEDTAVYYCAHYYGSTFTMDYWGQGTTVTVSS

【0344】

配列番号25

【0345】

pBS824にコードされる成熟軽鎖のアミノ酸配列

【0346】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASESDNYGISFMNWFQQKPGGAPKLLIYAASNQGS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPDFFATYYCQQSKEVPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSS
TLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【0347】

配列番号26

【0348】

合成シグナルペプチドのアミノ酸配列

【0349】

MGWSWIFFFLLSGTASVLS

【0350】

10

20

30

40

50

配列番号27

【0351】

pFCm267にコードされるヒトCD33の細胞外領域のアミノ酸配列

【0352】

MDPNFWLQVQESVTVQEGLCVLVPCTFFHPIPYVDKNSPVHGYWFREGAIISRDSPVAT
NKLDQEVQEETQGRFRLLGDP SRNNCSLSIVDARRRDNGSYFFRMERGSTKYSYKSPQLS
VHVTDLTHRPKILIPGTLEPGH SKNLTC SVSWACEQGT PPIFSWLSAAPTSLGPRTTHSS
VLIITPRPQDHGTNLTCQVKFAGAGVTTERTIQLNVTYVPQNPTTGIFPGD GSGKQETRA
GVVH

【0353】

配列番号28

【0354】

ヒト上皮細胞成長因子受容体(EGFR)のアミノ酸配列

【0355】

MRPSGTAGAALLALLAALCPASRALEEKVKVCQGT SNKLTQLGTFEDHFLSLQRMFNCE
VVLGNLEITYVQRNYDLSFLKTIQEVAGYVLIALNTVERIPL ENLQIIRGNMYE NSYALA
VLSNYDANKTGLKELPMRNLQEILHGAVRFSNNPALCNVESIQWRDIVSSDFLSNMSMD
FQNH LGSCQKCDPSCPNGSCWGAGEENCQKLTKIICAQQCSGR CRGKSPSDCCHNQCAA
GCTGPRES DCLVCRKFRDEATCKDTCPLMLYNPTTYQMDVNPEGKYSFGATCVKKCPR
NYVVTDHGSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKKCEGPCRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIK
HFKNCT SISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLH
AFENLEIIRGR TKQH GQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKL
FGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEG CWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCN
LLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQAHYIDGPHCVKTCPAGVM
GENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEG CPTNGPKIPSIATGMV GALLLLLV
VALGIGLFMR RRHIVRKRTLRRLLQERELVEPLTPSGEAPNQALLRILKETEFKKIKVLGS
GAFGTVYKGLWIPEGEKV KIPVAIKELREATSPKANKEILDEAYVMASVDNPHVCRL LGIC
LTSTVQLITQLMPFGCLLDYVREHKDNIGSQYLLNWC VQIAKGMNYLED RRLVHRDLAA
RNVLVKTPQHVKITDFGLAKLLGAEEKEYHAEGGKVPIKWMAL ESILHRIYTHQSDVWS
YGVTVWELMTFGSKPYDGIPASEISSILEKGERLPQPP ICTIDVYMIMVKCW MIDADSRP
KFRELII EFSKMARDPQRYLVIQGDERMHLPSPTDSNFYRALMDEEDMDDVVD ADEYLIP
QQGFFSSPSTSRTPLLSSL SATSNNSTVACIDRNLQSCPIKEDSFLQRYSSDPTGALTEDS
IDDTFLPVPEYINQSVPKRPAGSVQNPVYHNQPLNPAPSRDPHYQDPHSTAVGNPEYLN
TVQPTCVNSTFD SPAHWAQKGSHQISLDNPDYQQDFFPKEAKPNGIFKGSTAENAEYLR
VAPQSSEFIGA

【0356】

配列番号29

【0357】

マウス225 (Ch225) VHのアミノ酸配列

【0358】

MAVLALLFCLVTFPSCVLSQVQLKQSGPGLVQPSQSL SITCTVSGFSLTNYGVH WVRQSP
GKGLEWLGVIWSGGNTDYNT PFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSN DTAIYYCARALTY
YDYEFAYWGQGLTVT VSA

【0359】

配列番号30

【0360】

マウス225 (Ch225) VLのアミノ酸配列

【0361】

MRAPAQFLGFLFWIPASRSDILLTQSPVILSVSPGERVSF SCRASQSIGTNIHWYQQRTN
GSPRL LIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTK

10

20

30

40

50

LELK

【0362】

配列番号31

【0363】

hG1TR-Fcのアミノ酸配列

【0364】

QRPTGGPGCGPGRLLLGTGTDARCCRVHTTRCCRDYPGEECCSEWDCMCVQPEFHCGD
PCCTTCRHHPCPPGQGVQSQGKFSFGFQCIDCASGTFSGGHEGHCKPWTDCTQFGFLT
V
FPGNKTHNAVCPVPGSPPAEPLGTGGGEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHGDWLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC
SV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

【0365】

配列番号32

【0366】

HuGAB11 VHのアミノ酸配列

【0367】

MAVLGLLLCLVTFPSCVLSQVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLTDYGVSWIRQPP
GKALEWLGVIWGGGGTYYN
SALKSRLTISKDTSKSQVLTMTNMDPVD
TATYYCAKHPY
GHFGMDYWGQGT
TVTVSS

20

【0368】

配列番号33

【0369】

HuGAB11 VHのCDR1のアミノ酸配列

【0370】

DYGV

【0371】

配列番号34

【0372】

HuGAB11 VHのCDR2のアミノ酸配列

【0373】

VIWGGGGTYYN
SALKS

【0374】

配列番号35

【0375】

HuGAB11 VHのCDR3のアミノ酸配列

【0376】

HPYGHFGMDY

【0377】

配列番号36

【0378】

HuGAB11 VLのアミノ酸配列

【0379】

MRVLAELLGLLLCFLGVRCDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINVWLSWYQQK
PGKVPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQQGQSYPLTFGG
GTKVEIK

【0380】

配列番号37

【0381】

30

40

50

HuGAB11 VLのCDR1のアミノ酸配列

【0382】

HASQNIN VWLS

【0383】

配列番号38

【0384】

HuGAB11 VLのCDR2のアミノ酸配列

【0385】

KASNLHT

【0386】

配列番号39

【0387】

HuGAB11 VLのCDR3のアミノ酸配列

【0388】

QQGQSYPLT

【0389】

配列番号40

【0390】

ヒトGITRのアミノ酸配列

【0391】

MAQHGA MGA FRALCGLALLCALSLGQRPTGGPGCGPGRLLLGTGTDARCCRVHTTRCCR
DYPGEECCSEWDCMCVQPEFHCGDPCCTTCRHHPCPPGQGVQSQGKFSFGFQCIDCASG
TFSGGHEGHCKPWT DCTQFGFLT VFPGNKTHNAV CVPGSPPAEPLGWLT VVLLAV AAC
VLLLTSAQLGLHIWQLRSQCMWPRETQLLLEVPPSTEDARSCQFP EEER GERSAEEKGRL
GDLWV

【0392】

配列番号41

【0393】

HuGAB11.scFvのアミノ酸配列

【0394】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIN VWLSWYQQKPGKVPKLLIYKASNLHTGVPS
RFGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQQGQSYPLTFGGG TKVEIKGGGGSGGGGSGGGG
SQVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLTDYGVSWIRQPPGKALEWLGVIWGGGGTTY
NSALKSRLTISKDTSKSQVVLTM TNMDPVD TATYYCAKHPYGHFGMDYWGQGTTVTVSS

【0395】

配列番号42

【0396】

pBS827にコードされるCH3とHuGAB11.scFv (CH3-HuGAB11.scFv)の融合物のアミノ酸配列

【0397】

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGGSGGGGSDI
QMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIN VWLSWYQQKPGKVPKLLIYKASNLHTGVPSR
FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQQGQSYPLTFGGG TKVEIKGGGGSGGGGSGGGG
QVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLTDYGVSWIRQPPGKALEWLGVIWGGGGTTY
NSALKSRLTISKDTSKSQVVLTM TNMDPVD TATYYCAKHPYGHFGMDYWGQGTTVTVSS

【0398】

配列番号43

【0399】

pBS827にコードされる成熟重鎖のアミノ酸配列

10

20

30

40

50

【0400】

QVQLKQSGPGLVQPSSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDY
NTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVSA
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGD
VTITCHASQNINVWLSWYQQKPGKVPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL
QPEDVATYYCQQGQSYPLTFGGGTKEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVTLKESGPVLVKPTE
TLTLTCTVSGFSLTDYGVSWIRQPPGKALEWLGVIWGGGGTYYNALKSRLTISKDTSKS
QVVLMTNMDPVDATATYYCAKHPYGHFGMDYWGQGTITVTVSS

10

【0401】

配列番号44

【0402】

pBS827にコードされる成熟軽鎖のアミノ酸配列

【0403】

DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFS
GSGSGTDFTLINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKA
DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

20

【0404】

配列番号45

【0405】

成熟ヒトGITRのアミノ酸配列

【0406】

QRPTGGPGCGPGRLLLGTGTDARCCRVHTTRCCRDYPGEECCSEWDCMCVQPEFHCGD
PCCTTCRHHPCPPGQGVQSQGKFSFGFQCIDCASGTFSGGHEGHCKPWTDCTQFGFLT
VFPNGKTHNAVCPVPGSPPAEPLGWLTVLLAVAACVLLLTSAQLGLHIWQLRSQCMWPR
ETQLLLEVPSTEDARSCQFPPEERGERSAEEKGRLGDLWV

30

【0407】

配列番号46

【0408】

pFcM507にコードされるヒトEGFRの細胞外領域のアミノ酸配列

【0409】

LEEKKVCQGTSNKLTQLGTFEDHFLSLQRMFNCEVVLGNLEITYVQRNYDLSFLKTIQE
VAGYVLIALNTVERIPLNLQIIRGNMYEENSALAVLSNYDANKTGLKELPMRNLQEIL
HGAVRFSNNPALCNVESIQWRDIVSSDFLSNMSMDFQNLHGLSCQKCDPSPNGSCWGAG
EENCQKLTKIICAQQCSGRRCRGKSPSDCCHNQCAAGCTGPRESCLVCRKFRDEATCKDT
CPPLMLYNPTTYQMDVNPEGKYSFGATCVKKCPRNYVVTDHGSCVRACGADSYEMEED
GVRKCKKCEGPCRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSSISGDLHILPVAFRGDSFTH
TPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRKQHGQFSLAVVSLN
ITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVC
HALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQA
MNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCT
TYGCTGPGLEGCPNTPGPKIPS

40

【0410】

配列番号47

【0411】

50

hCD40-Fcのアミノ酸配列

【0412】

EPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVSDCTEFTETECPCGESEFLDTWNRETHCHQH
KYCDPNLGLRVQQKGTSETDTICTCEEGWHCTSEACESCVLHRSCSPGFGVKQIATGVSD
TICEPCPVGFFSNVSSAFEKCHPWTSCETKDLVVQQAGTNKTDVVCQPQDRLRTGGGEP
KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【0413】

配列番号48

【0414】

HuACS2 VHのアミノ酸配列

【0415】

MKLWLNWVFLLTLLHGIQCQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYWLHWVRQ
APGQGLEWIGRIDPNSGDTKYNEKFKSRATITVDKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARY
YYGRSYFDYWGGTTVTVSS

【0416】

配列番号49

【0417】

HuACS2 VHのCDR1のアミノ酸配列

【0418】

SYWLH

【0419】

配列番号50

【0420】

HuACS2 VHのCDR2のアミノ酸配列

【0421】

RIDPNSGDTKYNEKFKS

【0422】

配列番号51

【0423】

HuACS2 VHのCDR3のアミノ酸配列

【0424】

YYYGRSYFDY

【0425】

配列番号52

【0426】

HuACS2 VLのアミノ酸配列

【0427】

MDFQVQIFSLLISAVIISRGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPG
QAPRRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSSNPLTFGGG
TKVEIK

【0428】

配列番号53

【0429】

HuACS2 VLのCDR1のアミノ酸配列

【0430】

SASSSVSYMH

【0431】

10

20

30

40

50

配列番号54

【0432】

HuACS2 VLのCDR2のアミノ酸配列

【0433】

DTSKLAS

【0434】

配列番号55

【0435】

HuACS2 VLのCDR3のアミノ酸配列

【0436】

QQWSSNPLT

【0437】

配列番号56

【0438】

ヒトCD40のアミノ酸配列

【0439】

MVRLPLQCVLWGCLLTAVHPEPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVS DCTEFTETEC L
PCGESEFLDTWNRETHCHQH KYCDPNLGLRVQQKGTSETDTICTCEEGWHCTSEACESC
VLHRSCSPGFGVKQIATGVSDTICEPCPVGFFSNVSSAFEKCHPWTSCETKDLVVQQAGT
NKTDVVCGPQDRLRALVVIPIIFGILFAILLVLVFIKKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFPDD
LPGSNTAAPVQETLHGCQPVTQEDGKESRISVQERQ

【0440】

配列番号57

【0441】

HuACS2.scFvのアミノ酸配列

【0442】

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPGQAPRRWIYDTSKLASGVPAR
FSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSSNPLTFGGG TKVEIKGGGGSGGGGSGGGGS
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFTSYWLHWVRQAPGQGLEWIGRIDPN S GDTK
YNEKFKSRATITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARYYYGRSYFDYW GQGTTTVTVSS

【0443】

配列番号58

【0444】

pBS828にコードされるCH3とHuACS2.scFv (CH3-HuACS2.scFv)の融合物のアミノ酸配列

【0445】

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD S
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGGSGGGGSGEIV
LTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPGQAPRRWIYDTSKLASGVPARFSG
SGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSSNPLTFGGG TKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSQV
QLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFTSYWLHWVRQAPGQGLEWIGRIDPN S GDTKYN
EKFKSRATITVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARYYYGRSYFDYW GQGTTTVTVSS

【0446】

配列番号59

【0447】

pBS828にコードされる成熟重鎖のアミノ酸配列

【0448】

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYTFTDYNMHWVRQAPGQGLEWIGYIYPYNGGT
GYNQKFKSKATITADESTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGRPAMDYWGQGT LVTVSSA
STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG

10

20

30

40

50

LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERAT
LSCSASSSVSYMHWWYQQKPGQAPRRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISSELEPE
DFAVYYCQQWSSNPLTFGGGTKEIKGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSV
KVSCKASGYTFTSYWLHWVRQAPGQGLEWIGRIDPNSGDTKYNEKFKSRATITVDKSTST
AYMELSSLRSED TAVYYCARYYYGRSYFDYWGQGTTVTVSS

【0449】

10

配列番号60

【0450】

hPD-L1-Fcのアミノ酸配列

【0451】

FTVTVPKDLVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFVHGEEDLKVQ
HSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKI
NQRILVVDPTSEHELTCAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTL
RINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHPNERTHTGGGEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ
VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【0452】

20

配列番号61

【0453】

HuPRO1 VHのアミノ酸配列

【0454】

MEWNWVVLFLSLTAGVYAQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTFSSSYISWVRQA
PGQGLEWIAWIYAGTGGTSYNQKFTGRATITVDESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARHE
GVYWYFDVWGQGTTVTVSS

【0455】

30

配列番号62

【0456】

HuPRO1 VHのCDR1のアミノ酸配列

【0457】

SSYIS

【0458】

配列番号63

【0459】

HuPRO1 VHのCDR2のアミノ酸配列

【0460】

WIYAGTGGTSYNQKFTG

【0461】

配列番号64

【0462】

HuPRO1 VHのCDR3のアミノ酸配列

【0463】

HEGVYWYFDV

【0464】

40

配列番号65

50

【0465】

HuPRO1 VLのアミノ酸配列

【0466】

MDFQVQIFSFLLISAVIMSRGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPG
QAPRPWIYDTSNLAGFPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCHQRSSYPWTFGGGT
KVEIK

【0467】

配列番号66

【0468】

HuPRO1 VLのCDR1のアミノ酸配列

【0469】

SASSSVSYMH

【0470】

配列番号67

【0471】

HuPRO1 VLのCDR2のアミノ酸配列

【0472】

DTSNLAG

【0473】

配列番号68

【0474】

HuPRO1 VLのCDR3のアミノ酸配列

【0475】

HQRSSYPWT

【0476】

配列番号69

【0477】

ヒトPD-L1のアミノ酸配列

【0478】

MRIFAVFIFMTYWHLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEM
EDKNIIQFVHGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYG
GADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDPTSEHELTCAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKT
TTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHPNERTH
LVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET

【0479】

配列番号70

【0480】

pBS809にコードされる成熟重鎖のアミノ酸配列

【0481】

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGFTFSSSYISWVRQAPGQGLEWIAWIYAGTGGTSY
NQKFTGRATITVDESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARHEGVYWFYFDVWGQGTTVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDR
VTITCHASQNINVWLSWYQQKPGKVPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISL
QPEDVATYYCQQGQSYPLTFGGGT KVEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVTLKESGPVLVKPTE
TLTLTCTVSGFSLTDYGVSWIRQPPGKALEWLGVIWGGGGTYYN SALKSRLTISKDTSKS

10

20

30

40

50

QVVLMTNMDPVDATATYYCAKHPYGHFGMDYWGQGTTVTVSS

【0482】

配列番号71

【0483】

pBS809及びpBS813にコードされる成熟軽鎖のアミノ酸配列

【0484】

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPGQAPRPWIYDTSNLAGFPAR
FSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【0485】

配列番号72

【0486】

pBS813にコードされる成熟重鎖のアミノ酸配列

【0487】

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGFTFSSSYISWVRQAPGGGLEWIAWIYAGTGGTSY
NQKFTGRATITVDESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARHEGVYWFYFDVWGQGTTVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAAGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGS
SVKVSCKASGYTFTSYIMHWVRQAPGGGLEWIGYINPYNSGTTYNEKFKGRVTITSDKST
STAYMELSSLRSEDTAVYYCAHYGGSTFTMDYWGQGTTVTVSS

【0488】

配列番号73

【0489】

ヒトPD-L1の細胞外領域のアミノ酸配列

【0490】

FTVTVPKDLVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFVHGEECLKVQ
HSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKI
NQRILVVDPTSEHELTCAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTL
RINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHPNERTH

【0491】

配列番号74

【0492】

HuPRO2 VHのアミノ酸配列

【0493】

MGWNWIFLFLSGTAGVHCQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTSYGINWVRQAP
GGGLEWIGYIYPGSGGPVYNQKFKGRVTLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARENY
RYWYFDVWGQGTTVTVSS

【0494】

配列番号75

【0495】

HuPRO2 VHのCDR1のアミノ酸配列

【0496】

SYGIN

10

20

30

40

50

【 0 4 9 7 】

配列番号76

【 0 4 9 8 】

HuPRO2 VHのCDR2のアミノ酸配列

【 0 4 9 9 】

YIYPGSGGPVYNQKFKG

【 0 5 0 0 】

配列番号77

【 0 5 0 1 】

HuPRO2 VHのCDR3のアミノ酸配列

【 0 5 0 2 】

ENYRYWYFDV

【 0 5 0 3 】

配列番号78

【 0 5 0 4 】

HuPRO2 VLのアミノ酸配列

【 0 5 0 5 】

MHFQVQIFSLLISASVIMSRGDIQLTQSPSFLSASVGDRVITITCSASSSVNYMHWFQQKP

GKAPKLWIYSTSNLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQRSSYPLTFGGG

TKVEIK

【 0 5 0 6 】

配列番号79

【 0 5 0 7 】

HuPRO2 VLのCDR1のアミノ酸配列

【 0 5 0 8 】

SASSSVNYMH

【 0 5 0 9 】

配列番号80

【 0 5 1 0 】

HuPRO2 VLのCDR2のアミノ酸配列

【 0 5 1 1 】

STSNLAS

【 0 5 1 2 】

配列番号81

【 0 5 1 3 】

HuPRO2 VLのCDR3のアミノ酸配列

【 0 5 1 4 】

QQRSSYPLT

【 0 5 1 5 】

配列番号82

【 0 5 1 6 】

pBS841にコードされる成熟重鎖のアミノ酸配列

【 0 5 1 7 】

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTSYGINWVRQAPGGGLEWIGYIYPGSGGPVY

NQKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARENYRYWYFDVWGQTTVTVSS

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS

GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG

PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY

NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD

ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR

10

20

30

40

50

WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDR
VTITCRASQDIRTYLNWYQQKPGKVPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGGTDTLTISLQ
PEDVATYYCQQGNTLPWTFGGGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGS
SVKVSCKASGYTFTSYIMHWVRQAPGQGLEWIGYINPYNSGTKYNEKFKGRVTITSDKST
STAYMELSSLRSEDTAVYYCAHYYGSTFTMDYWGGQTTVTVSS

【0518】

配列番号83

【0519】

pBS841にコードされる成熟軽鎖のアミノ酸配列

【0520】

DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCSASSSVNYMHWFFQQKPGKAPKLWIYSTSNLASGVPSR
FSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQRSSYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【0521】

配列番号84

【0522】

HuPRO5 VHのアミノ酸配列

MMVLSLLYLLTALPGILSQVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGDSISSGYWNWIRQPPG
KGLEVMGYISYTGSTYSNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSQNWE
RAWFAYWGQGTLLTVSS

【0523】

配列番号85

【0524】

HuPRO5 VHのCDR1のアミノ酸配列

【0525】

SGYWN

【0526】

配列番号86

【0527】

HuPRO5 VHのCDR2のアミノ酸配列

【0528】

YISYTGSTYSNPSLKS

【0529】

配列番号87

【0530】

HuPRO5 VHのCDR3のアミノ酸配列

【0531】

SQNWERAUFAY

【0532】

配列番号88

【0533】

HuPRO5 VLのアミノ酸配列

【0534】

MDFQVQIFSFLLISASVIMSRGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMHWYQQKP
GKAPKLWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCFQGSQYPFTFGG
TKVEIK

【0535】

配列番号89

【0536】

10

20

30

40

50

HuPRO5 VLのCDR1のアミノ酸配列

【0537】

SASSSVSYM H

【0538】

配列番号90

【0539】

HuPRO5 VLのCDR2のアミノ酸配列

【0540】

DTSKLAS

【0541】

配列番号91

【0542】

HuPRO5 VLのCDR3のアミノ酸配列

【0543】

FQGS GYPFT

【0544】

配列番号92

【0545】

pBS839にコードされる成熟重鎖のアミノ酸配列

【0546】

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGDSISSGYWNWIRQPPGKGLEYMGYISYTGSTYSN
PSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARSQNWERAWFAYWGQGLTVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAAGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDR
VTITCRASQDIRTYLNWYQQKPGKVPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQ
PEDVATYYCQQGNTLPWTFGGGTKEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGS
SVKVSCKASGYTFTSYIMHWVRQAPGQGLEWIGYINPYNSTKYNEKFKGRVTITSDKST
STAYMELSSLRSEDTAVYYCAHYYGSTFTMDYWGQGTITVTVSS

【0547】

配列番号93

【0548】

pBS839にコードされる成熟軽鎖のアミノ酸配列

【0549】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSSVSYMHWYQQKPGKAPKLWIYDTSKLASGVPSR
FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCFQGSGYPFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【0550】

配列番号94

【0551】

HuM195 VHのCDR1のアミノ酸配列

【0552】

DYNMH

【0553】

配列番号95

【0554】

10

20

30

40

50

HuM195 VHのCDR2のアミノ酸配列

【0555】

YIYPYNGGTGYNQKFKS

【0556】

配列番号96

【0557】

HuM195 VHのCDR3のアミノ酸配列

【0558】

GRPAMDY

【0559】

配列番号97

【0560】

HuM195 VLのCDR1のアミノ酸配列

【0561】

RASESVDNYGISFMN

【0562】

配列番号98

【0563】

HuM195 VLのCDR2のアミノ酸配列

【0564】

AASNQGS

【0565】

配列番号99

【0566】

HuM195 VLのCDR3のアミノ酸配列

【0567】

QQSKEVPWT

【0568】

配列番号100

【0569】

Ch225 VHのCDR1のアミノ酸配列

【0570】

NYGVH

【0571】

配列番号101

【0572】

Ch225 VHのCDR2のアミノ酸配列

【0573】

VIWSGGNTDYNTPFTS

【0574】

配列番号102

【0575】

Ch225 VHのCDR3のアミノ酸配列

【0576】

ALTYDYEFAY

【0577】

配列番号103

【0578】

Ch225 VLのCDR1のアミノ酸配列

【0579】

10

20

30

40

50

RASQSIGTNIH

【0580】

配列番号104

【0581】

Ch225 VLのCDR2のアミノ酸配列

【0582】

YASESIS

【0583】

配列番号105

【0584】

Ch225 VLのCDR3のアミノ酸配列

【0585】

QQNNNWPTT

【0586】

配列番号106

【0587】

pBS853にコードされる成熟重鎖のアミノ酸配列

【0588】

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTFSSSYISWVRQAPGQGLEWIAWIYAGTGGTSY
NQKFTGRATITVDESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARHEGVYWFYFDVWGQGTTVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGD
RVTITCHASQNINWLSWYQQKPGKVPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISL
QPEDVATYYCQQGQSYPLTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVTLKESGPVLVKPTE
TLTLTCTVSGFSLTDYGVSWIRQPPGKCLEWLGVIWGGGGTYYN SALKSRLTISKDTSKS
QVVLTM T NMDPVD TATYYCAKHPYGHFGMDYWGQGTTVTVSS

【0589】

配列番号107

【0590】

hICOS-Fcのアミノ酸配列

【0591】

GEINGSANYEMFIFHNGGVQILCKYPDIVQQFKMQLLKGGQILCDLTCTKSGSNTVSIKSL
KFCHSQLSNNSVSFFLYNLDSHANYYFCNLSIFDPPPFKVTLTGGYLHIYESQLCCQLKT
GGGEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

【0592】

配列番号108

【0593】

HuTAM14 VHのアミノ酸配列

【0594】

MAVLVLLLCLVTFPSCALSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSISSNSVSWVRQPPG
KGLEWMGAIWSSGSTDYNSALKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCTRWEQP
YFYFDYWGQGTMTVTVSS

【0595】

10

20

30

40

50

配列番号109

【0596】

HuTAM14 VHのCDR1のアミノ酸配列

【0597】

SNSVS

【0598】

配列番号110

【0599】

HuTAM14 VHのCDR2のアミノ酸配列

【0600】

AIWSGGSTDYNSALKS

【0601】

配列番号111

【0602】

HuTAM14 VHのCDR3のアミノ酸配列

【0603】

WEQPYYFDY

【0604】

配列番号112

【0605】

HuTAM14 VLのアミノ酸配列

【0606】

MRTSIQLLGLLLFWLHDAQCDIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASQNIYKYIAWYQQKP
GKAPKLLIRYTSTLES GTPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCLQYVNLYTFGGGK
VEIK

【0607】

配列番号113

【0608】

HuTAM14 VLのCDR1のアミノ酸配列

【0609】

QASQNIYKYIA

【0610】

配列番号114

【0611】

HuTAM14 VLのCDR2のアミノ酸配列

【0612】

YTSTLES

【0613】

配列番号115

【0614】

HuTAM14 VLのCDR3のアミノ酸配列

【0615】

LQYVNLYT

【0616】

配列番号116

【0617】

ヒトICOSのアミノ酸配列

【0618】

MKSGLWYFFLFCLRIKVL TGEINGSANYEMFIFHNGGVQILCKYPDIVQQFKMQLLKGGQ
ILCDLT KTKGSGNTVSIKSLKFCHS QLSNNSVSFFLYNLDHSHANY YFCNLSIFDPPP FKV

10

20

30

40

50

TLTGGYLHIYESQLCCQLKFWLPIGCAAFVVVCILGCILICWLTKKKYSSSVHDPNGEYMF
MRAVNTAKKSRLTDVTL

【0619】

配列番号117

【0620】

HuTAM14.scFvのアミノ酸配列

【0621】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQNIYKYIAWYQQKPGKAPKLLIRYTSTLESGLTPSR
FSGSGGTDTYTLTISSLQPEDFATYYCLQYVNLYTFGGGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSQ
VQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSISSNSVSWVRQPPGKGLEWMGAIWSGGSTDYNS
ALKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCTRWEQPYFDYWGGGTMTVSS

10

【0622】

配列番号118

【0623】

pBS859にコードされるCH3とHuTAM14.scFv (CH3-HuTAM14.scFv)の融合物のアミノ酸配列

【0624】

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGGSGGGGSDI
QMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQNIYKYIAWYQQKPGKAPKLLIRYTSTLESGLTPSRFS
GSGSGGTDTYTLTISSLQPEDFATYYCLQYVNLYTFGGGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSQV
QLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSISSNSVSWVRQPPGKGLEWMGAIWSGGSTDYNSA
LKSRTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCTRWEQPYFDYWGGGTMTVSS

20

【0625】

配列番号119

【0626】

pBS859にコードされる成熟重鎖のアミノ酸配列

【0627】

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGFTFSSSYISWVRQAPGQGLEWIAWIYAGTGGTSY
NQKFTGRATITVDESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARHEGVYWFYFDVWGQGTTVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGGSGGGGSDI QMTQSPSSLSASVGD
RVTITCQASQNIYKYIAWYQQKPGKAPKLLIRYTSTLESGLTPSRFSGSGSGGTDTYTLTISSLQ
PEDFATYYCLQYVNLYTFGGGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSQVQLQESGPGLVKPSETLS
LTCTVSGFSISSNSVSWVRQPPGKGLEWMGAIWSGGSTDYNSALKSRVTISRDTSKNQVS
LKLSSVTAADTAVYYCTRWEQPYFDYWGGGTMTVSS

30

【0628】

配列番号120

【0629】

pBS840にコードされる成熟重鎖のアミノ酸配列

【0630】

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTSYGINWVRQAPGQGLEWIGYIYPGSGGPVY
NQKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARENYRYWFYFDVWGQGTTVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY

50

NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDR
VTITCHASQNINVWLSWYQQKPGKVPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL
QPEDVATYYCQQGQSYPLTFGGGTKEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVTLKESGPVLVVKPTE
TLTLTCTVSGFSLTDYGVSWIRQPPGKALEWLGVIWGGGGTYYNALKSRLTISKDTSKS
QVVLTMNMDPVDATYYCAKHPYGHFGMDYWGQGTTVTVSS

【0631】

配列番号121

【0632】

pBS846にコードされる成熟重鎖のアミノ酸配列

【0633】

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFTFSSSYISWVRQAPGQGLEWIAWIYAGTGGTSY
NQKFTGRATITVDESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARHEGVYWFYFDVWGQGT TVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERA
TLSCSASSSVSYMHWYQQKPGQAPRRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTDYTLTISSLEP
EDFAVYYCQQWSSNPLTFGGGTKEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGSS
VKVSCKASGYTFTSYWLHWVRQAPGQGLEWIGRIDPNSGDTKYNEKFKSRATITVDKST
STAYMELSSLRSED TAVYYCARYYYGRSYFDYWGQGT TVTVSS

【0634】

配列番号122

【0635】

HuOHX14DS.scFv.dsのアミノ酸配列

【0636】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRTYLNWYQQKPGKVPKLLIYYTSRLHSGVPS
RFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDVATYYCQQGNTLPWTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGGG
GSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYIMHWVRQAPGQCLEWIGYINPYNSG
TKYNEKFKGRVTITSDKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAHYYGSTFTMDYWGQGT TVT
VSS

【0637】

配列番号123

【0638】

HuACS2.scFv.dsのアミノ酸配列

【0639】

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPGQAPRRWIYDTSKLASGVPAR
FSGSGSGTDYTLTISSLEPEDFAVYYCQQWSSNPLTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGS
QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYWLHWVRQAPGQCLEWIGRIDPNSGDTK
YNEKFKSRATITVDKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARYYYGRSYFDYWGQGT TVTVSS

【0640】

配列番号124

【0641】

HuTAM14.scFv.dsのアミノ酸配列

【0642】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQNIYKYIAWYQQKPGKAPKLLIRYTSTLESGLTPSR
FSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCLQYVNLYTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSQ

10

20

30

40

50

VQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSISSNSVSWVRQPPGKCLEWMGAIWSGGSTDYNS
ALKSRVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCTRWEQPYFDYWGGQGTMTVSS

【0643】

配列番号125

【0644】

HuGAB11.scFv.dsのアミノ酸配列

【0645】

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNINVWLSWYQQKPGKVPKLLIYKASNLHTGVPS
RFGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQQGQSYPLTFGCGTKVEIKGGGSGGGGSGGGG
SQVTLKESGPVLVKPTETLTCTVSGFSLTDYGVSWIRQPPGKCLEWLGVIWGGGGTTY
NSALKSRLTISKDTSKSQVVLMTNMDPVDATYYCAKHPYGHFGMDYWGGQTTTVSS

10

【0646】

配列番号126

【0647】

h4-1BB-Fcのアミノ酸配列

【0648】

FERTRSLQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKE
CSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPW
TNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQTGGGEPKSCD
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

20

【0649】

配列番号127

【0650】

HuFOB5 VHのアミノ酸配列

【0651】

MERHWIFLFLFSVTAGVHSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYIFINYYWMHWVRAP
GQGLEWIGYINPSTGYTESNQKFKDRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSYV
GYYYAVDYWGQGTMTVSS

30

【0652】

配列番号128

【0653】

HuFOB5 VHのCDR1のアミノ酸配列

【0654】

NYWMH

【0655】

配列番号129

【0656】

40

HuFOB5 VHのCDR2のアミノ酸配列

【0657】

YINPSTGYTESNQKFKD

【0658】

配列番号130

【0659】

HuFOB5 VHのCDR3のアミノ酸配列

【0660】

SYVGYYYAVDY

【0661】

50

配列番号131

【0662】

HuFOB5 VLのアミノ酸配列

【0663】

MDSQAQVLMLLLLWVSGTCGDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSNNEKNYL
AWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTIFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYS
YPYTFGGGKVEIK

【0664】

配列番号132

【0665】

HuFOB5 VLのCDR1のアミノ酸配列

【0666】

KSSQSLLYSNNEKNYLA

【0667】

配列番号133

【0668】

HuFOB5 VLのCDR2のアミノ酸配列

【0669】

WASTRES

【0670】

配列番号134

【0671】

HuFOB5 VLのCDR3のアミノ酸配列

【0672】

QQYYSYPYT

【0673】

配列番号135

【0674】

ヒト4-1BBのアミノ酸配列

【0675】

MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRLQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQR
TCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDC
CFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPARE
PGHSPQIISFFLALTSTALLFLFFLTFRFSVVKRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCS
CRFPEEEEGGCEL

【0676】

配列番号136

【0677】

HuFOB5.scFv.LH.dsのアミノ酸配列

【0678】

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSNNEKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTR
ESGVPDRFSGSGSGTIFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSYPYTFGCGTKVEIKGGGGSGGG
SGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYIFINYWMMHWVRAPGQCLEWIGYINP
STGYTESNQKFKDRVITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSYVGYYYAVDYGWQ
GTTVTVSS

【0679】

配列番号137

【0680】

pBS883にコードされるCH3とHuFOB5.scFv.LH.ds (CH3- HuFOB5.scFv.LH.ds)の融
合物のアミノ酸配列

10

20

30

40

50

【0681】

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGGSGGGGSDI
VMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSNNEKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRES
GVPDRFSGSGSGTIFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSPYPTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGS
GGGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYIFINYMHWVRAPGQCLEWIGYINPST
GYTESNQKFKDRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSYVGYYYAVDYWGQGT
TVTSS

【0682】

配列番号138

10

【0683】

pBS883にコードされる成熟重鎖のアミノ酸配列

【0684】

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGFTFSSSYISWVRQAPGGGLEWIAWIYAGTGGTSY
NQKFTGRATITVDESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARHEGVYWFYFDVWGQGTITVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGSGFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGER
ATINCKSSQSLLYSNNEKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTIFT
LTISSLQAEDVAVYYCQQYYSPYPTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAE
VKKPGSSVKVSCASGYIFINYMHWVRAPGQCLEWIGYINPSTGYTESNQKFKDRVTIT
ADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSYVGYYYAVDYWGQGTITVTVSS

20

【0685】

配列番号139

【0686】

HuFOB5.scFv.HL.dsのアミノ酸配列

【0687】

30

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYIFINYMHWVRAPGQCLEWIGYINPSTGYTES
NQKFKDRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSYVGYYYAVDYWGQGTITVTVS
SGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSNNEKNYLAWYQQ
KPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTIFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSPYPTFG
CGTKVEIK

【0688】

配列番号140

【0689】

pBS884にコードされるCH3とHuFOB5.scFv.HL.ds (CH3- HuFOB5.scFv.HL.ds)の融
合物のアミノ酸配列

40

【0690】

GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGGSGGGGSGV
QLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYIFINYMHWVRAPGQCLEWIGYINPSTGYTESNQ
KFKDRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSYVGYYYAVDYWGQGTITVTVSSG
GGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSNNEKNYLAWYQQKPG
QPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTIFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSPYPTFGCGT
KVEIK

【0691】

配列番号141

50

【0692】

pBS884にコードされる成熟重鎖のアミノ酸配列

【0693】

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGFTFSSSYISWVRQAPGGGLEWIAWIYAGTGGTSY
NQKFTGRATITVDESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARHEGVYWFYFDVWGQGTTVTVSS
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGSSV
KVSKASGYIFINYYWMHWVRAPGQCLEWIGYINPSTGYTESNQKFKDRVTITADKSTSTA
YMELSSLRSED TAVYYCARSYVGYYYAVDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIV
MTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSNNEKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESG
VPDRFSGSGSGTIFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSYPYTFGCGTKVEIK

10

【0694】

配列番号142

【0695】

ヒトPD-1のアミノ酸配列

【0696】

MQIPQAPWPVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSN
TSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRN
DSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLVVGVVGG
LGSLVLLVWVLAVICSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSDYGELDFQWREKTPEP
PVPCVPEQTEYATIVFPSGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL

20

【0697】

配列番号143

【0698】

hPD-1-Fcのアミノ酸配列

【0699】

LDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAP
EDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGTYLCGAISLAPKAQIKESLRAELR
VTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTGGGEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

30

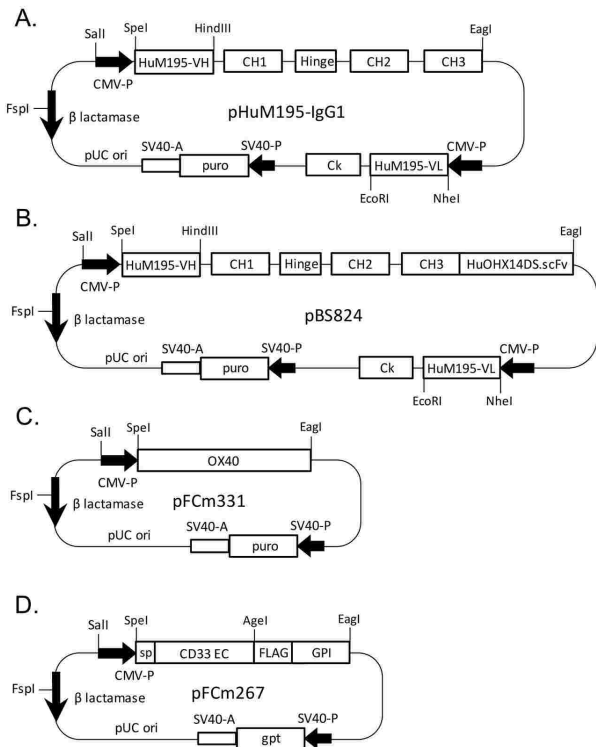
40

50

【図面】

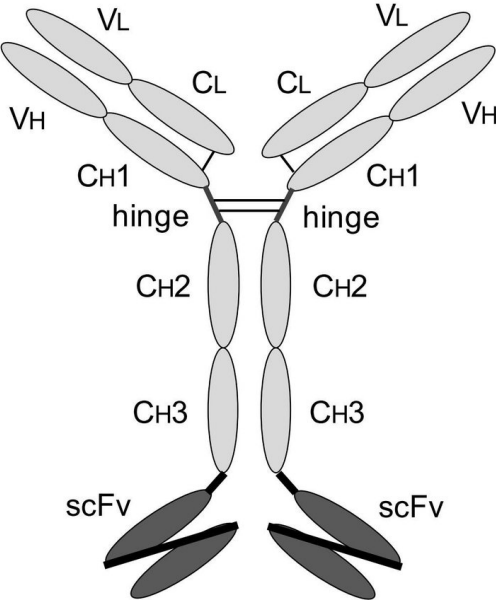
【図 1 A - D】

図1A-D



【図 2】

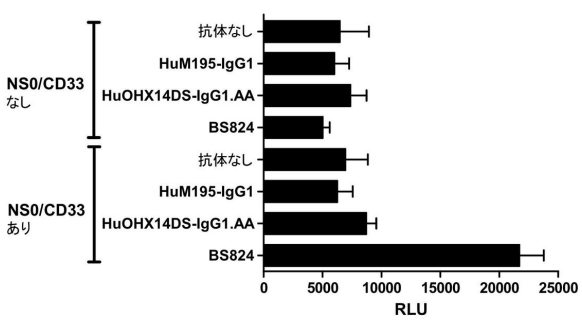
図2



【図 3】

図3

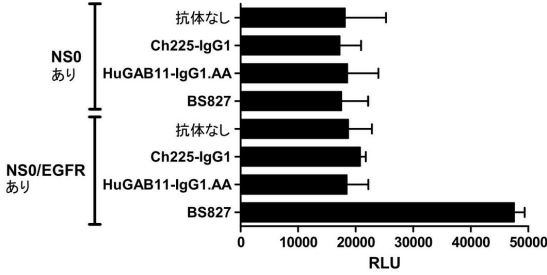
JD/OX40細胞におけるルシフェラーゼ活性



【図 4】

図4

JD/GITR細胞におけるルシフェラーゼ活性



10

20

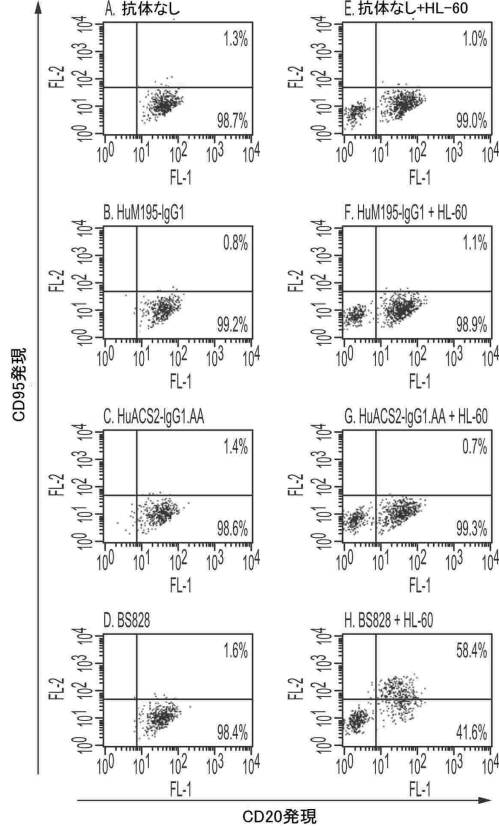
30

40

50

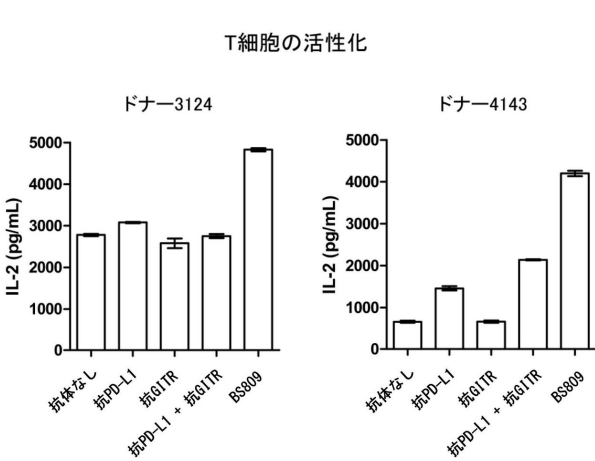
【図 5】

図5



【図 6】

図6

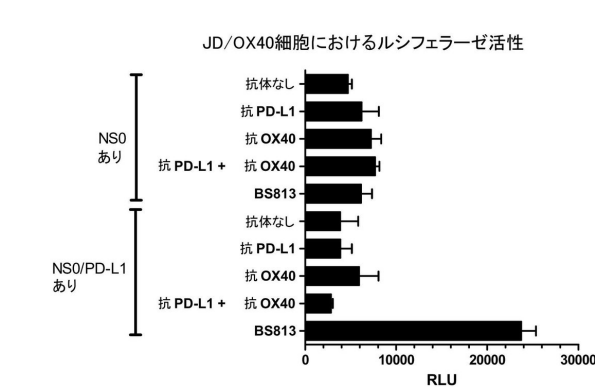


10

20

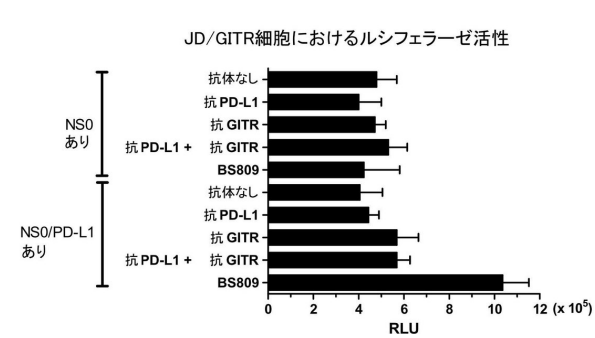
【図 7】

図7



【図 8】

図8



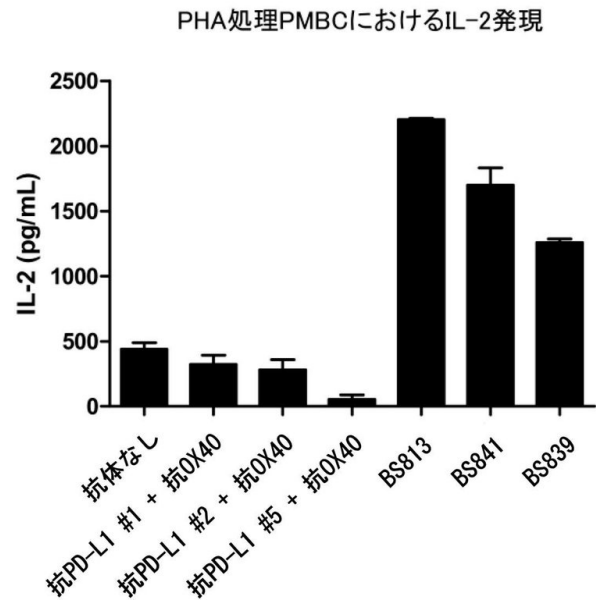
30

40

50

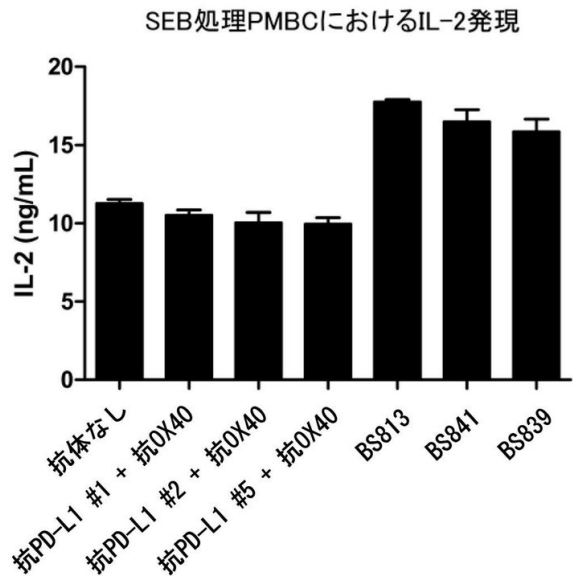
【図 9】

図9



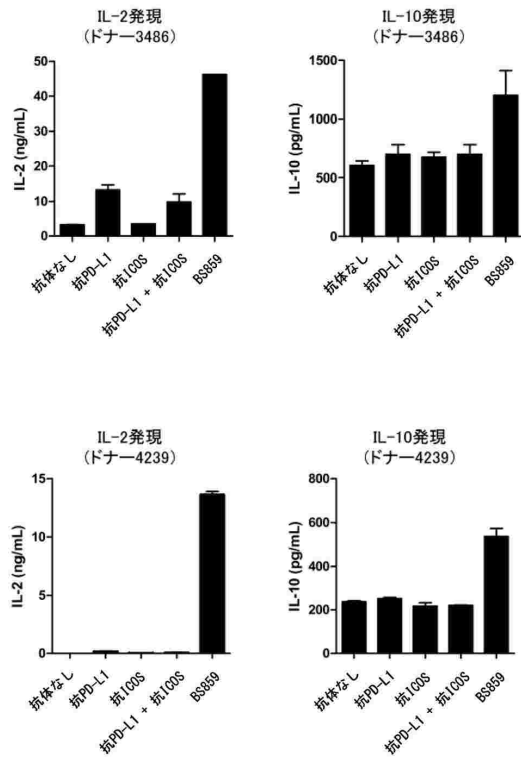
【図 10】

図10



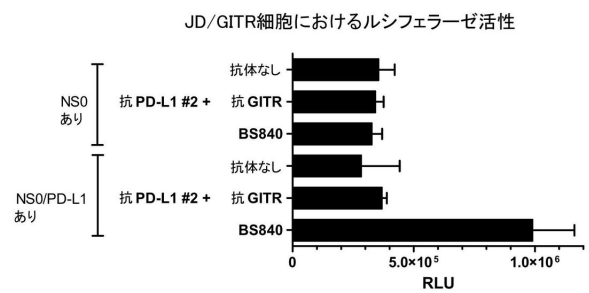
【図 11】

図11



【図 12】

図12



10

20

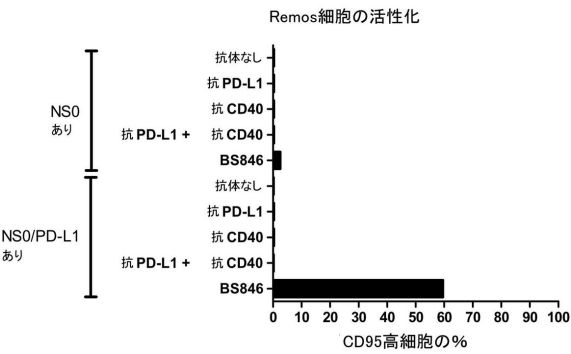
30

40

50

【図 13】

図13



10

【配列表】

0007575100000001.app

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 P 31/18 (2006.01)
A 6 1 P 31/16 (2006.01)
A 6 1 P 31/14 (2006.01)
A 6 1 P 31/22 (2006.01)
A 6 1 P 31/20 (2006.01)
A 6 1 P 31/04 (2006.01)
A 6 1 P 31/10 (2006.01)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)
C 1 2 N 15/10 (2006.01)

F I

A 6 1 K 39/395 S
A 6 1 K 39/395 E
A 6 1 K 39/395 D
A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 31/18
A 6 1 P 31/16
A 6 1 P 31/14
A 6 1 P 31/22
A 6 1 P 31/20
A 6 1 P 31/04
A 6 1 P 31/10
C 1 2 N 15/13
C 1 2 N 15/10 2 0 0 Z

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)
ニュー 3 2 0

(72)発明者 ツォ, ジェイ. ユン

アメリカ合衆国 カルフォルニア 9 4 0 4 3, マウンテン ビュー ローグ アベニュー 3 2 0

審査官 田中 晴絵

(56)参考文献

特表 2 0 1 6 - 5 2 8 2 8 7 (J P, A)
国際公開第 2 0 1 8 / 2 0 2 6 4 9 (W O, A 1)
特表 2 0 1 8 - 5 0 9 1 7 5 (J P, A)
特表 2 0 1 5 - 5 0 2 3 7 3 (J P, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 1 6 / 0 0 - 1 6 / 4 6
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
P u b M e d