

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7691138号
(P7691138)

(45)発行日 令和7年6月11日(2025.6.11)

(24)登録日 令和7年6月3日(2025.6.3)

(51)国際特許分類		F I	
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63 Z
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19
請求項の数 19 (全147頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2022-508971(P2022-508971)	(73)特許権者	511001758
(86)(22)出願日	令和2年8月12日(2020.8.12)		アプティーボ リサーチ アンド デベロ
(65)公表番号	特表2022-545368(P2022-545368 A)		ップメント エルエルシー
(43)公表日	令和4年10月27日(2022.10.27)		アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 2 1
(86)国際出願番号	PCT/US2020/046005		, シアトル, フォース アベニュー 2
(87)国際公開番号	WO2021/030488	(74)代理人	4 0 1, スイート 1 0 5 0
(87)国際公開日	令和3年2月18日(2021.2.18)		100114775
審査請求日	令和5年8月14日(2023.8.14)	(74)代理人	弁理士 高岡 亮一
(31)優先権主張番号	62/885,751	(74)代理人	100121511
(32)優先日	令和1年8月12日(2019.8.12)		弁理士 小田 直
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100202751
(31)優先権主張番号	62/902,318		弁理士 岩堀 明代
(32)優先日	令和1年9月18日(2019.9.18)	(74)代理人	100208580
最終頁に続く		(74)代理人	弁理士 三好 玲奈
		(74)代理人	100191086
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 4－1 B Bおよび0 X 4 0結合タンパク質ならびに関連する組成物および方法、4－1 B Bに対する抗体、0 X 4 0に対する抗体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

順にアミノ末端からカルボキシル末端に、(i)第1単鎖可変領域フラグメント(s c F v)、(i i)免疫グロブリンヒンジ領域であるリンカー、(i i i)免疫グロブリン定常領域、(i v)リンカー、および(v)第2 s c F vを含むポリペプチドを含む二重特異性抗体であって、(a)第1 s c F vが、ヒト4－1 B B抗原結合ドメインを含み、第2 s c F vが、ヒト0 X 4 0抗原結合ドメインを含むか、(b)第1 s c F vが、ヒト0 X 4 0抗原結合ドメインを含み、第2 s c F vが、ヒト4－1 B B抗原結合ドメインを含み、

ヒト4－1 B B抗原結合ドメインが、配列番号17のV Hおよび配列番号18のV LにおいてI M G Tにより定義される6つのC D Rを含むか、配列番号19のV Hおよび配列番号20のV LにおいてI M G Tにより定義される6つのC D Rを含み、かつ

ヒト0 X 4 0抗原結合ドメインが、配列番号29のV Hおよび配列番号28のV LにおいてI M G Tにより定義される6つのC D Rを含む、
二重特異性抗体。

【請求項2】

(i)ヒト4－1 B B抗原結合ドメインが、V HおよびV Lを含み、V Hが、配列番号17のアミノ酸配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含み、V Lが、配列番号18のアミノ酸配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む、かつ

(i i)ヒト0 X 4 0抗原結合ドメインが、V HおよびV Lを含み、V Hが、配列番号

29 または配列番号31のアミノ酸配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含み、VLが、配列番号28または配列番号30のアミノ酸配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列を含む、
請求項1に記載の抗体。

【請求項3】

(i) ヒト4-1BB結合ドメインが、(a) 配列番号17のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号18のアミノ酸配列を含むVL、(b) 配列番号19のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号20のアミノ酸配列を含むVL、(c) 配列番号21のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号22のアミノ酸配列を含むVL、(d) 配列番号23のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号24のアミノ酸配列を含むVL、(e) 配列番号32
10
のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号18のアミノ酸配列を含むVL、もしくは(f) 配列番号143のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号20のアミノ酸配列を含むVLを含む、ならびに／または

(ii) ヒト4-1BB結合ドメインが、同じポリペプチド鎖にVHおよびVLを含み、
ヒト4-1BB結合ドメインのVHが、ヒト4-1BB結合ドメインのVLに対してN
末端にある、もしくはヒト4-1BB結合ドメインのVHが、ヒト4-1BB結合ドメインのVLに対してC末端にある、もしくは

ヒト4-1BB結合ドメインが、VHおよびVLの間のリンカーを含み、リンカーが、アミノ酸(Gly4Ser)_nを含んでもよく、n=1~5(配列番号117)である、
請求項1に記載の抗体。

【請求項4】

(i) ヒト4-1BB結合ドメインが、カニクイザル4-1BBに結合することができる、もしくはヒト4-1BB結合ドメインが、ヒト4-1BB活性を刺激することができる、ならびに／または

(ii) ヒト4-1BB結合ドメインが、ヒト化VH配列およびVL配列を含む、ならびに／または

(iii) ヒトOX40結合ドメインが、(a) 配列番号25のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号26のアミノ酸配列を含むVL、(b) 配列番号27のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号28のアミノ酸配列を含むVL、(c) 配列番号29のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号26のアミノ酸配列を含むVL、(d) 配列番号29のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号30のアミノ酸配列を含むVL、(e) 配列番号31
30
のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号28のアミノ酸配列を含むVL、(f) 配列番号31のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号30のアミノ酸配列を含むVL、(g) 配列番号33のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号28のアミノ酸配列を含むVL、(h) 配列番号29のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号34のアミノ酸配列を含むVL、(i) 配列番号29のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号35のアミノ酸配列を含むVL、(j) 配列番号29のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号36のアミノ酸配列を含むVL、(k) 配列番号29のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号37のアミノ酸配列を含むVL、(l) 配列番号31のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号34のアミノ酸配列を含むVL、(m) 配列番号31のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号35のアミノ酸配列を含むVL、(n) 配列番号31のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号36のアミノ酸配列を含むVL、(o) 配列番号31のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号37のアミノ酸配列を含むVL、(p) 配列番号31のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号38のアミノ酸配列を含むVL、(q) 配列番号31のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号39のアミノ酸配列を含むVL、(r) 配列番号31のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号40のアミノ酸配列を含むVL、もしくは(s) 配列番号31のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号41のアミノ酸配列を含むVLを含む、
請求項1から3のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項5】

ヒトOX40結合ドメインが、同じポリペプチド鎖にVHおよびVLを含み、ヒトOX

10

20

30

40

50

40結合ドメインのVHが、ヒトOX40結合ドメインのVLに対してN末端にある、もしくはヒトOX40結合ドメインのVHが、ヒトOX40結合ドメインのVLに対してC末端にある、または

ヒトOX40結合ドメインが、VHおよびVLの間のリンカーを含み、リンカーが、アミノ酸配列(Gly₄Ser)_nを含んでもよく、n=1~5(配列番号117)である、請求項1から4のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項6】

4-1BB結合ドメインが、配列番号42、44、58、63、77、および145のいずれか1つのアミノ酸配列を含むscFvを含む、請求項1から5のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項7】

OX40結合ドメインが、配列番号46、47、52、54、56、59~62、64~76、および146のいずれか1つのアミノ酸配列を含むscFvを含む、請求項1から6のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項8】

(i) OX40結合ドメインが、カニクイザルOX40に結合することができる、ならびに／または

(ii) ヒトOX40結合ドメインが、ヒトOX40活性を刺激することができる、ならびに／または

(iii) OX40結合ドメインが、マウスもしくはラットのVH配列およびVL配列を含む、ならびに／または

(iv) ヒト4-1BB結合ドメインが、配列番号17のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号18のアミノ酸配列を含むVLを含み、OX40結合ドメインが、(a) 配列番号29のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号28のアミノ酸配列を含むVL、(b) 配列番号31のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号30のアミノ酸配列を含むVL、または(c) 配列番号29のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号35のアミノ酸配列を含むVLを含む、ならびに／または

(v) ヒト4-1BB結合ドメインが、配列番号58のアミノ酸配列を含むscFvを含み、ヒトOX40結合ドメインが、配列番号59、62、または66のいずれか1つのアミノ酸配列を含むscFvを含む、ならびに／または

(vi) ヒト4-1BB結合ドメインおよびヒトOX40結合ドメインが、同じポリペプチド上にある、または

(vii) ヒト4-1BB結合ドメインが、ヒトOX40結合ドメインに対してN末端にある、もしくはヒト4-1BB結合ドメインが、ヒトOX40結合ドメインに対してC末端にある、

請求項1から7のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項9】

免疫グロブリン定常領域が、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2もしくはIgDの免疫グロブリンCH2ドメインおよびCH3ドメインを含む、請求項1から8のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項10】

請求項1から9のいずれか一項に記載の抗体をコードする、ポリヌクレオチド。

【請求項11】

請求項10に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項12】

(i) 請求項10に記載のポリヌクレオチドもしくは請求項11に記載のベクター、または

(ii) 請求項1から9のいずれか一項に記載の抗体をコードするポリヌクレオチドの組み合わせ、もしくは

ポリヌクレオチドが、1つのベクターにコードされているもしくは複数のベクターに

10

20

30

40

50

コードされている、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の抗体をコードするポリヌクレオチドの組み合わせ、
を含む、
宿主細胞。

【請求項 1 3】

請求項 1 2 に記載の宿主細胞を培養して抗体を産生することを含む、ヒト 4-1BB およびヒト OX40 に特異的に結合する抗体を産生する方法。

【請求項 1 4】

試料中の 4-1BB および OX40 を検出するための方法であって、前記試料を、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の抗体と接触させることを含み、前記試料が、細胞を含む、方法。

10

【請求項 1 5】

請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の抗体および医薬適合性のある賦形剤を含む、医薬組成物。

【請求項 1 6】

(a) NK 細胞、または
(b) T 細胞、もしくは CD4 + T 細胞もしくは CD8 + T 細胞である T 細胞、または
(c) NK 細胞および T 細胞、もしくは NK 細胞および CD4 + T 細胞もしくは CD8 + T 細胞である T 細胞、または
(d) T 細胞、もしくは CD4 + T 細胞もしくは CD8 + T 細胞である T 細胞
を、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の抗体または請求項 1 5 に記載の医薬組成物と接触させることを含む、

20

(a) NK 細胞増殖を高めるための、または
(b) T 細胞増殖を高めるための、または
(c) NK 細胞増殖および T 細胞増殖を高めるための、または
(d) T 細胞同時刺激経路を刺激するための、
インビトロの方法。

【請求項 1 7】

(a) 対象における免疫応答を増強するための、または
(b) 対象における腫瘍浸潤リンパ球の数を増加させるための、または
(c) 対象におけるエフェクタ細胞によりグランザイムの発現を増強させるための、または
(d) 対象における腫瘍細胞の数を低減させるための、または
(e) 対象における癌を処置するための、

30

方法における使用のための請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の抗体または請求項 1 5 に記載の医薬組成物であって、前記方法が、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の抗体または請求項 1 5 に記載の医薬組成物の有効量を対象に投与することを含む、抗体または医薬組成物。

【請求項 1 8】

(i) 癌が、固形腫瘍癌である、ならびに／または
(ii) 癌が、肉腫、癌腫、もしくはリンパ腫である、ならびに／または
(iii) 癌が、メラノーマ、腎癌、膀胱癌、肺癌、胃癌、結腸癌／腸癌、前立腺癌、卵巣癌、乳癌、肝癌、脳癌、もしくは血液癌からなる群より選択される、ならびに／または
(iv) 対象が、ヒトであり、もしくは対象が、ヒトであり腫瘍浸潤リンパ球に対して 4-1BB および OX40 を発現する、
請求項 1 7 (e) に記載の使用のための抗体または医薬組成物。

40

【請求項 1 9】

治療における使用のための、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の抗体または請求項 1 5 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

50

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、米国仮出願第62／885，751号（2019年8月12日出願）、第62／902，318号（2019年9月18日出願）、第62／911，010号（2019年10月4日出願）、および第63／056，115号（2020年7月24日出願）の利益を主張するものであり、それぞれ、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

E F S－W E Bを介して電子的に提出された配列表の参照

電子的に提出された配列表の内容（名称：4897__004PC04__Seq l i s t i n g__S T 2 5 . t x t；サイズ：366，599バイト；および作成日：2020年8月12日）は、37C.F.R. §1.52（e）（5）に準拠して参照により本明細書に組み込まれる。

【0003】

本開示は、4－1BBおよびOX40に結合する二重特異性抗体を含む、特に4－1BBおよび／またはOX40に結合する抗体、ならびにそれを含む組成物に関する。これらの抗体は、免疫応答を増強するため、固形腫瘍癌を含む疾患の処置のために有用である。

【背景技術】

【0004】

4－1BB（CD137）およびOX40は、TNF受容体（TNFR）ファミリーのメンバーである（Bremer，I S R N O n c o l .：371854（2013））。これらの受容体は、ナイーブT細胞またはNK細胞上に恒常的には存在しない：それらの発現は、T細胞受容体（TCR）を通じたT細胞の刺激またはNK細胞における他の刺激により引き起こされる。4－1BBは、CD8T細胞およびNK細胞において主にアップレギュレートされるが、OX40は、CD4T細胞に対して主にアップレギュレートされる。これらの受容体の機能は、T細胞およびNK細胞に同時刺激シグナルを提供することである。これらの受容体の活性化は、4－1BBリガンド（4－1BBL）またはOX40リガンド（OX40L）三量体との相互作用を通じた三量体化により自然に引き起こされ、シグナル伝達および特異的細胞機能の開始をもたらす。4－1BBは、IFN-γ、グランザイム、および抗アポトーシス遺伝子の増加した発現を通じてCD8T細胞およびNK細胞のエフェクタ機能を強化し、より多くのより良好なエフェクタCD8T細胞およびNK細胞の生成をもたらす。OX40は、メモリーCD4T細胞のIL-2およびクローン拡大を生じるそれらの能力を強化することにより、CD4T細胞のエフェクタ機能を強化する。

【0005】

4－1BBおよびOX40は、多くの場合、腫瘍浸潤リンパ球上に発現し、実際、それらの発現は、腫瘍特異的T細胞を同定するために使用されている。ヒト固形腫瘍は、多くの場合、リンパ球、主にCD8+T細胞およびCD4+T細胞により浸潤される。腫瘍浸潤リンパ球の蓄積は、多くの場合、種々の悪性腫瘍により影響された患者の間の改善された生存率と関連している。（Ye et al.，Onc o I m m u n o l o g y 2：e27184（2013）；Montler et al.，C l i n T r a n s l I m m u n o l o g y 5：e70（2016））。

【0006】

4－1BB受容体およびOX40受容体の三量体化は、モノクローナル抗体を介して誘導することができる。いくつかの刊行された例において、モノクローナル抗体は、それらのFc領域を通じてFcガンマ受容体に結合し、受容体のより高次のクラスター化を誘導することによりシグナル伝達を誘導するために開発されている（Mayes et al.，N a t u r e R e v i e w s D r u g D i s c o v e r y 17：509（2018））。

10

20

30

40

50

【0007】

種々の誘導された自然発生の腫瘍モデルにおける前臨床結果は、アゴニスト抗体を用いて4-1BBを標的化することが、腫瘍クリアランスおよび永続的な抗腫瘍免疫をもたらす可能性があることを示唆する。ウレルマブおよびウトミルマブは、アゴニスト抗4-1BBモノクローナル抗体であり、固形腫瘍の処置を含む適応症において臨床試験が進行中である。有効性の初期兆候にも関わらず、ウレルマブの臨床開発は、1mg/kgを超える投与量での炎症性肝毒性により阻止されている。ウトミルマブは、ウレルマブよりも効力が低い、ウレルマブと比較して改善された安全性プロファイルを有する（Chester et al., Blood 131:39-57 (2018)）。ウレルマブまたは他の全身性損傷で観察されるような肝毒性を引き起こさない4-1BBを標的化する有効な治療の必要性が存在する。

10

【0008】

OX40アゴニストは、腫瘍へのT細胞浸潤を増加させることが報告されている。OX40を標的化する別の利点は、OX40シグナル伝達が、抗腫瘍免疫応答のTreg媒介抑制を阻止することができることである。4T-1乳癌、B16メラノーマ、ルイス肺癌およびいくらかの化学的に誘導された肉腫を含むいくらかの前臨床マウス癌モデルにおいて、OX40アゴニストの注射は、結果として、治療反応となっている。（Ohsima et al., J. Immunology 159:3838-3848 (1997); Imura et al., J. Exp. Med. 183:2185-2195 (1996); Maxwell et al., J. Immunology 164:107-112 (2000); Gough et al., J. Immunotherapy 33(8):798-809 (2010)）。

20

【0009】

マウス抗ヒトOX40mAb（クローン9B12）は、進行性固形腫瘍を有する30人の患者の臨床試験において試験された第1OX40アゴニスト試薬であった。この第I相試験において、RECIST基準による客観的な応答を示した患者はいなかったが、血液中の抗原を経験したCD4+T細胞およびCD8+T細胞によるKi67染色のようないくらかの免疫応答は増加し、T細胞の活性化を強化することが示された。加えて、腫瘍浸潤TregによるOX40のアップレギュレーションが検出された。全体として、アゴニスト抗OX40mAb 9B12は、軽度から中等度の副作用で十分に耐受性を示した。（Curti et al., Cancer Res. 73(24):7189-7198 (2013)）。

30

【0010】

いくらかの場合、研究者らは、アゴニズムを誘導するために4-1BBもしくはOX40、または複数のOX40Lおよび4-1BB細胞外ドメインの融合に対して複数の結合ドメイン(>2)を含むタンパク質コンストラクトを生成した。他の例において、4-1BBまたはOX40に対する結合ドメイン（複数を含む）および腫瘍特異的抗原に対する結合ドメイン（複数を含む）を含む二重特異性タンパク質がある。腫瘍抗原結合を介する結合およびクラスター化は、4-1BBおよびOX40のクラスター化およびシグナル伝達を誘導する。しかし、これらのコンストラクトはいずれも、腫瘍浸潤リンパ球、つまり、CD8+T細胞CD4+T細胞、およびNK細胞の機能を刺激し、エフェクタ細胞のオフターゲット活性化（すなわち、FcγR1、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIa、およびFcγRIIbへの結合を通じた活性化）を最小限にするか、全くない状態で行うことは期待されていない。そのため、腫瘍浸潤リンパ球の活性を選択的に増強する（循環リンパ球に対する影響が最小であるか全くない）ために、4-1BBおよびOX40の両方に結合して刺激する二重特異性抗体が必要とされる。

40

【発明の概要】

【0011】

本明細書において示されるように、4-1BBおよびOX40に結合する二重特異性タンパク質（例えば、ADAPTIR（商標）二重特異性抗体）は、一方の受容体に結合し

50

て他方の受容体のシグナル伝達を誘導することにより、およびその逆でも作用する。好都合には、これは、1つの治療タンパク質を使用する両方の受容体のアゴニズムを引き出す。二重特異性タンパク質のFc領域は、Fcガンマ受容体および相補的な関連タンパク質への結合を排除する修飾が含まれている可能性があり、そのため二重特異性タンパク質の活性は、同じ細胞または異なる細胞のいずれかに対する両方の受容体の存在に厳密に依存する。活性は、一方または両方の受容体の不在下では観察されない。重要なことには、本明細書で提供される二重特異性コンストラクトは、結果として、T細胞およびNK細胞の増殖において用量依存的増加となるが、4-1BBおよびOX40を標的化する単一特異性コンストラクトの組み合わせは、そうすることができない。

【0012】

特定の場合、本明細書で提供される二重特異性抗体は、順にアミノ末端からカルボキシル末端に、(i)第1単鎖可変フラグメント(scFv)、(ii)任意で、ヒンジ領域であるリンカー、(iii)免疫グロブリン定常領域、および(iv)第2scFvを含むポリペプチドを含み、(a)第1scFvが、ヒト4-1BB抗原結合ドメインを含み、第2scFvが、ヒトOX40抗原結合ドメインを含むか、(b)第1scFvが、ヒトOX40抗原結合ドメインを含み、第2scFvが、ヒト4-1BB抗原結合ドメインを含む。

【0013】

特定の場合、本明細書で提供される抗体は、ヒト4-1BB抗原結合ドメインを含み、4-1BB抗原結合ドメインは、配列番号17を含む重鎖可変ドメイン(VH)および配列番号18を含む軽鎖可変ドメイン(VL)を含む抗体の、ヒト4-1BBへの結合を競合的に阻害する。

【0014】

特定の場合において、本明細書で提供される抗体は、ヒト4-1BB抗原結合ドメインを含み、4-1BB抗原結合ドメインは、配列番号17のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号18のアミノ酸配列を含むVLを含む抗体と同じヒト4-1BBのエピトープに特異的に結合する。

【0015】

特定の場合において、本明細書で提供される抗体は、ヒト4-1BB抗原結合ドメインを含み、ヒト4-1BB抗原結合ドメインは、配列番号17のVHおよび配列番号18のVLにおいて6つの相補性決定領域(CDR)を含むか、配列番号19のVHおよび配列番号20のVLにおいて6つのCDRを含む。

【0016】

特定の場合において、CDRは、IMGT定義CDR、カバット定義CDR、コチア定義CDR、またはAbM定義CDRである。

【0017】

特定の場合において、本明細書で提供される抗体は、ヒト4-1BB抗原結合ドメインを含み、ヒト4-1BB抗原結合ドメインは、VHおよびVLを含み、VHは、配列番号17のアミノ酸配列を含む。

【0018】

特定の場合において、本明細書で提供される抗体は、ヒト4-1BB抗原結合ドメインを含み、ヒト4-1BB抗原結合ドメインは、VHおよびVLを含み、VLは、配列番号18のアミノ酸配列を含む。

【0019】

特定の場合において、本明細書で提供される抗体は、ヒトOX40抗原結合ドメインを含み、OX40抗原結合ドメインは、配列番号29を含むVHおよび配列番号28を含むVLを含む抗体の、ヒトOX40への結合を競合的に阻害する。

【0020】

特定の場合において、本明細書で提供される抗体は、ヒトOX40抗原結合ドメインを含み、OX40抗原結合ドメインは、配列番号29のアミノ酸配列を含むVHおよび配列

10

20

30

40

50

番号 28 のアミノ酸配列を含む V L を含む抗体と同じヒト O X 40 のエピトープに特異的に結合する。

【0021】

特定の場合において、本明細書で提供される抗体は、ヒト O X 40 抗原結合ドメインを含み、ヒト O X 40 抗原結合ドメインは、配列番号 29 の V H および配列番号 28 の V L において 6 つの C D R を含む。

【0022】

特定の場合において、C D R は、I M G T 定義 C D R、カバット定義 C D R、コチア定義 C D R、または A b M 定義 C D R である。

【0023】

特定の場合において、本明細書で提供される抗体は、ヒト O X 40 抗原結合ドメインを含み、ヒト O X 40 抗原結合ドメインは、V H および V L を含む、V H は、配列番号 29 のアミノ酸配列を含む。

【0024】

特定の場合において、本明細書で提供される抗体は、ヒト O X 40 抗原結合ドメインを含み、ヒト O X 40 抗原結合ドメインは、V H および V L を含む、V L は、配列番号 28 のアミノ酸配列を含む。

【0025】

特定の場合において、抗体は、単一特異性である。

【0026】

特定の場合において、抗体は、I g G 抗体である。特定の場合において、I g G 抗体は、I g G₁ 抗体である。

【0027】

特定の場合において、抗体は、さらに、重鎖定常領域および軽鎖定常領域を含み、任意で、重鎖定常領域は、ヒト I g G₁ 重鎖定常領域であり、任意で、軽鎖定常領域は、ヒト I g G_κ 軽鎖定常領域である。

【0028】

特定の場合において、抗体は、単鎖 F v (s c F v) である。特定の場合において、抗体は、F a b、F a b'、F (a b')₂、s c F v、ジスルフィド結合した F v、または s c F v - F c を含む。

【0029】

特定の場合において、4-1 B B 結合ドメインを含む抗体は、二重特異性である。特定の場合において、二重特異性抗体は、ヒト O X 40 抗原結合ドメインを含む。特定の場合において、ヒト O X 40 抗原結合ドメインは、(a) 配列番号 29 を含む V H および配列番号 28 を含む V L を含む抗体の、ヒト O X 40 への結合を競合的に阻害する、(b) 配列番号 29 のアミノ酸配列を含む V H および配列 28 のアミノ酸配列を含む V L を含む抗体と同じヒト O X 40 のエピトープに特異的に結合する、(c) 配列番号 29 の V H および配列番号 28 の V L において 6 つの C D R を含む、任意で、C D R は、I M G T 定義 C D R、カバット定義 C D R、コチア定義 C D R、または A b M 定義 C D R である、(d) V H および V L を含む、V H は、配列番号 29 のアミノ酸配列を含む、および／または (e) V H および V L を含む、V L は、配列番号 28 のアミノ酸配列を含む。

【0030】

特定の場合において、O X 40 結合ドメインを含む抗体は、二重特異性である。特定の場合において、二重特異性抗体は、ヒト 4-1 B B 抗原結合ドメインを含む。特定の場合において、ヒト 4-1 B B 抗原結合ドメインは、(a) 配列番号 17 を含む V H および配列番号 18 を含む V L を含む抗体の、ヒト 4-1 B B への結合を競合的に阻害する、(b) 配列番号 17 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 18 のアミノ酸配列を含む V L を含む抗体と同じヒト 4-1 B B のエピトープに特異的に結合する、(c) 配列番号 17 の V H および配列番号 18 の V L において 6 つの C D R または配列番号 19 の V H および配列番号 20 の V L において 6 つの C D R を含む、任意で、C D R は、I M G T 定義 C D

10

20

30

40

50

R、カバット定義CDR、コチア定義CDR、またはAbM定義CDRである、(d) VHおよびVLを含み、VHは、配列番号17のアミノ酸配列を含む、および／または(e) VHおよびVLを含み、VLは、配列番号18のアミノ酸配列を含む。

【0031】

特定の場合において、本明細書で提供される二重特異性抗体は、(a) ヒト4-1BB抗原結合ドメインおよび(b) ヒトOX40抗原結合ドメインを含み、4-1BB抗原結合ドメインは、(i) GYTFTSYW (配列番号5) のアミノ酸配列を含むVH-CDR1；(ii) IYPGSSSTT (配列番号6) のアミノ酸配列を含むVH-CDR2；(iii) ASFSDGYAYAMDY (配列番号7) のアミノ酸配列を含むVH-CDR3；(iv) QDISNY (配列番号8) のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン(VL)-CDR1；(v) YTS (配列番号9) のアミノ酸配列を含むVL-CDR2；および(vi) QQGYTLPYT (配列番号10) のアミノ酸配列を含むVL-CDR3を含み、OX40抗原結合ドメインは、(i) GFTLSYYG (配列番号11) のアミノ酸配列を含むVH-CDR1；(ii) ISHDGSDK (配列番号12) のアミノ酸配列を含むVH-CDR2；(iii) SNDQFDP (配列番号13) のアミノ酸配列を含むVH-CDR3；(iv) NIGSKS (配列番号14) のアミノ酸配列を含むVL-CDR1；(v) DDS (配列番号15) のアミノ酸配列を含むVL-CDR2；および(vi) QVWDSSSDHVV (配列番号16) のアミノ酸配列を含むVL-CDR3を含む。

【0032】

本明細書で提供される二重特異性抗体の特定の場合において、ヒト4-1BB抗原結合ドメインは、(a) 配列番号17を含むVHおよび配列番号18を含むVLを含む抗体の、ヒト4-1BBへの結合を競合的に阻害する、(b) 配列番号17のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号18のアミノ酸配列を含むVLを含む抗体と同じヒト4-1BBのエピトープに特異的に結合する、(c) 配列番号17のVHおよび配列番号18のVLにおいて6つのCDRまたは配列番号19のVHおよび配列番号20のVLにおいて6つのCDRを含み、任意で、CDRは、IMGT定義CDR、カバット定義CDR、コチア定義CDR、またはAbM定義CDRである、(d) VHおよびVLを含み、VHは、配列番号17のアミノ酸配列を含む、および／または(e) VHおよびVLを含み、VLは、配列番号18のアミノ酸配列を含む。

【0033】

本明細書で提供される二重特異性抗体の特定の場合において、ヒトOX40抗原結合ドメインは、(a) 配列番号29を含むVHおよび配列番号28を含むVLを含む抗体の、ヒトOX40への結合を競合的に阻害する、(b) 配列番号29のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号28のアミノ酸配列を含むVLを含む抗体と同じヒトOX40のエピトープに特異的に結合する、(c) 配列番号29のVHおよび配列番号28のVLにおいて6つのCDRを含み、任意で、CDRは、IMGT定義CDR、カバット定義CDR、コチア定義CDR、またはAbM定義CDRである、(d) VHおよびVLを含み、VHは、配列番号29のアミノ酸配列を含む、および／または(e) VHおよびVLを含み、VLは、配列番号28のアミノ酸配列を含む。

【0034】

特定の場合において、ヒト4-1BB結合ドメインは、配列番号17、19、21、23、32、および143からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、または99%同一であるアミノ酸配列を含むVHを含む。特定の場合において、ヒト4-1BB結合ドメインは、配列番号17、19、21、23、32、および143のいずれか1つのアミノ酸配列を含むVHを含む。

【0035】

特定の場合において、ヒト4-1BB結合ドメインは、配列番号18、20、22、および24からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、または99%同一であるアミノ酸配列を含むVLを含む。特定の場合に

において、ヒト4-1BB結合ドメインは、配列番号18、20、22、および24のいずれか1つのアミノ酸配列を含むV Lを含む。

【0036】

特定の場合において、ヒト4-1BB結合ドメインは、(a) 配列番号17のアミノ酸配列を含むV Hおよび配列番号18のアミノ酸配列を含むV L、(b) 配列番号19のアミノ酸配列を含むV Hおよび配列番号20のアミノ酸配列を含むV L、(c) 配列番号21のアミノ酸配列を含むV Hおよび配列番号22のアミノ酸配列を含むV L、(d) 配列番号23のアミノ酸配列を含むV Hおよび配列番号24のアミノ酸配列を含むV L、(e) 配列番号32のアミノ酸配列を含むV Hおよび配列番号18のアミノ酸配列を含むV L、または(f) 配列番号143のアミノ酸配列を含むV Hおよび配列番号20のアミノ酸配列を含むV Lを含む。

10

【0037】

特定の場合において、ヒト4-1BB結合ドメインは、配列番号17のアミノ酸配列を含むV Hおよび配列番号18のアミノ酸配列を含むV Lを含む。

【0038】

特定の場合において、ヒト4-1BB結合ドメインは、同じポリペプチド鎖にV HおよびV Lを含む。特定の場合において、ヒト4-1BB結合ドメインのV Hは、ヒト4-1BB結合ドメインのV Lに対してN末端にある。特定の場合において、ヒト4-1BB結合ドメインのV Hは、ヒト4-1BB結合ドメインのV Lに対してC末端にある。特定の場合において、ヒト4-1BB結合ドメインは、V HおよびV Lの間のリンカーを含む。特定の場合において、リンカーは、アミノ酸(GlySer)_nを含み、n=1~5(配列番号117)である。特定の場合において、n=3~5であるか、n=4~5である。特定の場合において、n=4である。

20

【0039】

特定の場合において、ヒト4-1BB結合ドメインは、配列番号42、44、58、63、77、および145のいずれか1つのアミノ酸配列を含むs c F vを含む。

【0040】

特定の場合において、ヒト4-1BB結合ドメインは、配列番号58のアミノ酸配列を含むs c F vを含む。

【0041】

特定の場合において、ヒト4-1BB結合ドメインは、カニクイザル4-1BBと結合することができる。

30

【0042】

特定の場合において、ヒト4-1BB結合ドメインは、ヒト4-1BB活性を刺激することができる。

【0043】

特定の場合において、ヒト4-1BB結合ドメインは、ヒト化V HおよびV L配列を含む。

【0044】

特定の場合において、ヒトOX40結合ドメインは、配列番号25、27、29、31、および33からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、または99%同一であるアミノ酸配列を含むV Hを含む。特定の場合において、ヒトOX40結合ドメインは、配列番号25、27、29、31、および33のいずれか1つのアミノ酸配列を含むV Hを含む。

40

【0045】

特定の場合において、ヒトOX40結合ドメインは、配列番号26、28、30、および34~41からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、または99%同一であるアミノ酸配列を含むV Lを含む。特定の場合において、ヒトOX40結合ドメインは、配列番号26、28、30、および34~41のいずれか1つのアミノ酸配列を含むV Lを含む。

50

【0046】

特定の場合において、ヒトOX40結合ドメインは、(a) 配列番号25のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号26のアミノ酸配列を含むVL、(b) 配列番号27のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号28のアミノ酸配列を含むVL、(c) 配列番号29のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号26のアミノ酸配列を含むVL、(d) 配列番号29のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号30のアミノ酸配列を含むVL、(e) 配列番号31のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号28のアミノ酸配列を含むVL、(f) 配列番号31のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号30のアミノ酸配列を含むVL、(g) 配列番号33のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号28のアミノ酸配列を含むVL、(h) 配列番号29のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号34のアミノ酸配列を含むVL、(i) 配列番号29のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号35のアミノ酸配列を含むVL、(j) 配列番号29のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号36のアミノ酸配列を含むVL、(k) 配列番号29のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号37のアミノ酸配列を含むVL、(l) 配列番号31のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号34のアミノ酸配列を含むVL、(m) 配列番号31のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号35のアミノ酸配列を含むVL、(n) 配列番号31のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号36のアミノ酸配列を含むVL、(o) 配列番号31のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号37のアミノ酸配列を含むVL、(p) 配列番号31のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号38のアミノ酸配列を含むVL、(q) 配列番号31のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号39のアミノ酸配列を含むVL、(r) 配列番号31のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号40のアミノ酸配列を含むVL、または(s) 配列番号31のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号41のアミノ酸配列を含むVLを含む。

10

20

【0047】

特定の場合において、ヒトOX40結合ドメインは、(a) 配列番号29のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号28のアミノ酸配列を含むVL、(b) 配列番号31のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号30のアミノ酸配列を含むVL、または(c) 配列番号29のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号35のアミノ酸配列を含むVLを含む。

【0048】

特定の場合において、ヒトOX40結合ドメインは、同じポリペプチド鎖にVHおよびVLを含む。特定の場合において、ヒトOX40結合ドメインのVHは、ヒトOX40結合ドメインのVLに対してN末端にある。特定の場合において、ヒトOX40結合ドメインのVHは、ヒトOX40結合ドメインのVLに対してC末端にある。特定の場合において、ヒトOX40結合ドメインは、VHおよびVLの間のリンカーを含む。特定の場合において、リンカーは、アミノ酸配列(Gly₄Ser)_nを含み、n=1~5(配列番号117)である。特定の場合において、n=3~5である。特定の場合において、n=4である。

30

【0049】

特定の場合において、ヒトOX40結合ドメインは、配列番号46、47、52、54、56、59~62、64~76、および146のいずれか1つのアミノ酸配列を含むscFvを含む。特定の場合において、ヒトOX40結合ドメインは、配列番号59、62、または66のいずれか1つのアミノ酸配列を含むscFvを含む。

40

【0050】

特定の場合において、ヒトOX40結合ドメインは、カニクイザルOX40と結合することができる。

【0051】

特定の場合において、ヒトOX40結合ドメインは、ヒトOX40活性を刺激することができる。

【0052】

特定の場合において、ヒトOX40結合ドメインは、マウスまたはラットVHおよびV

50

L配列を含む。

【0053】

特定の場合において、ヒト4-1BB結合ドメインは、配列番号17のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号18のアミノ酸配列を含むVLを含み、ヒトOX40結合ドメインは、(a)配列番号29のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号28のアミノ酸配列を含むVL、(b)配列番号31のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号30のアミノ酸配列を含むVL、または(c)配列番号29のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号35のアミノ酸配列を含むVLを含む。

【0054】

特定の場合において、ヒト4-1BB結合ドメインは、配列番号58のアミノ酸配列を含むscFvを含み、ヒトOX40結合ドメインは、配列番号59、62、または66のいずれか1つのアミノ酸配列を含むscFvを含む。

【0055】

特定の場合において、ヒト4-1BB結合ドメインおよびヒトOX40結合ドメインは、同じポリペプチド上にある。特定の場合において、ヒト4-1BB結合ドメインは、ヒトOX40結合ドメインに対してN末端にある。特定の場合において、ヒト4-1BB結合ドメインは、ヒトOX40結合ドメインに対してC末端にある。

【0056】

特定の場合において、抗体は、免疫グロブリン定常領域を含む。特定の場合において、免疫グロブリン定常状態は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2またはIgDの免疫グロブリンCH2およびCH3ドメインを含む。特定の場合において、免疫グロブリン定常領域は、IgG1の免疫グロブリンCH2およびCH3ドメインを含む。特定の場合において、抗体は、CH1ドメインを含まない。

【0057】

特定の場合において、免疫グロブリン定常領域は、FcγR1、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIa、およびFcγRIIbとの結合を防止するために、野生型免疫グロブリン定常領域と比較して1つ、2つ、3つまたはそれ以上のアミノ酸置換を含む。特定の場合において、免疫グロブリン定常領域は、Fc媒介T細胞活性化を防止または低減するために、野生型免疫グロブリン定常領域と比較して1つ、2つ、3つまたはそれ以上のアミノ酸置換を含む。特定の場合において、免疫グロブリン定常領域は、CD3活性化を防止または低減するために、野生型免疫グロブリン定常領域と比較して1つ、2つ、3つまたはそれ以上のアミノ酸置換を含む。特定の場合において、免疫グロブリン定常領域は、ADCC活性を防止または低減するために、野生型免疫グロブリン定常領域と比較して1つ、2つ、3つまたはそれ以上のアミノ酸置換を含む。特定の場合において、免疫グロブリン定常領域は、EUNanバリングシステムにしたがって置換E233P、L234A、L235A、G237A、およびK322AならびにG236の欠失を含むヒトIgG1 CH2ドメインを含む。

【0058】

特定の場合において、抗体は、免疫グロブリン定常領域およびヒト4-1BB結合ドメインの間ならびに／または免疫グロブリン定常領域およびヒトOX40結合ドメインの間のリンカーを含む。特定の場合において、免疫グロブリン定常領域およびヒト4-1BB結合ドメインの間ならびに／または免疫グロブリン定常領域およびヒトOX40結合ドメインの間のリンカーは、10～30個のアミノ酸、15～30個のアミノ酸、または20～30個のアミノ酸を含む。特定の場合において、免疫グロブリン定常領域およびヒト4-1BB結合ドメインの間または免疫グロブリン定常領域およびヒトOX40結合ドメインの間のリンカーは、アミノ酸配列(Gly₄Ser)_nを含み、n=1～5(配列番号117)である。特定の場合において、n=1である。

【0059】

特定の場合において、抗体は、2つのポリペプチドの二量体を含み、各ポリペプチドは、順にアミノ末端からカルボキシル末端に、第1scFv、ヒンジ領域、免疫グロブリン

10

20

30

40

50

定常領域、および第2 s c F vを含み、(a) 第1 s c F vが、ヒト4-1 B B抗原結合ドメインを含み、第2 s c F vが、ヒトOX40抗原結合ドメインを含むか、(b) 第1 s c F vが、ヒトOX40抗原結合ドメインを含み、第2 s c F vが、ヒト4-1 B B抗原結合ドメインを含む。特定の場合において、二量体は、ホモ二量体である。

【0060】

特定の場合において、第1 s c F vは、ヒト4-1 B B結合ドメインを含み、第2 s c F vは、ヒトOX40抗原結合ドメインを含む。

【0061】

特定の場合において、ヒンジは、I g G₁ヒンジである。特定の場合において、ヒンジは、配列番号115のアミノ酸1~15を含む。

【0062】

特定の場合において、ヒンジおよび免疫グロブリン定常領域は、配列番号115のアミノ酸配列を含む。

【0063】

特定の場合において、抗体は、免疫グロブリン定常領域およびヒトOX40結合ドメインの間のリンカーを含み、リンカーは、アミノ酸配列(G l y₄ S e r)_nを含み、n = 1~5 (配列番号117)である。特定の場合において、n = 1である。

【0064】

特定の場合において、ヒト4-1 B B結合ドメインは、配列番号17のアミノ酸配列を含むV Hおよび配列番号18のアミノ酸配列を含むV Lを含み、ヒトOX40結合ドメインは、(a) 配列番号29のアミノ酸配列を含むV Hおよび配列番号28のアミノ酸配列を含むV L、(b) 配列番号31のアミノ酸配列を含むV Hおよび配列番号30のアミノ酸配列を含むV L、または(c) 配列番号29のアミノ酸配列を含むV Hおよび配列番号35のアミノ酸配列を含むV Lを含む。

【0065】

特定の場合において、ヒト4-1 B B結合ドメインは、配列番号58のアミノ酸配列を含み、ヒトOX40結合ドメインは、配列番号59、62、または66のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。

【0066】

特定の場合において、本明細書で提供される二重特異性抗体は、ヒト4-1 B B抗原結合ドメインおよびヒトOX40抗原結合ドメインを含み、抗体は、配列番号78~100および144からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。特定の場合において、抗体は、2つのポリペプチドを含むホモ二量体であり、各ポリペプチドは、配列番号78~100および144からなる群より選択される同じアミノ酸配列を含む。

【0067】

特定の場合において、本明細書で提供される二重特異性抗体は、ヒト4-1 B B抗原結合ドメインおよびヒトOX40抗原結合ドメインを含み、抗体は、配列番号78のアミノ酸配列を含む。特定の場合において、抗体は、2つのポリペプチドを含むホモ二量体であり、各ポリペプチドは、配列番号78のアミノ酸配列を含む。

【0068】

特定の場合において、本明細書で提供される二重特異性抗体は、ヒト4-1 B B抗原結合ドメインおよびヒトOX40抗原結合ドメインを含み、抗体は、配列番号81のアミノ酸配列を含む。特定の場合において、抗体は、2つのポリペプチドを含むホモ二量体であり、各ポリペプチドは、配列番号81のアミノ酸配列を含む。

【0069】

特定の場合において、本明細書で提供される二重特異性抗体は、ヒト4-1 B B抗原結合ドメインおよびヒトOX40抗原結合ドメインを含み、抗体は、配列番号90のアミノ酸配列を含む。特定の場合において、抗体は、2つのポリペプチドを含むホモ二量体であり、各ポリペプチドは、配列番号90のアミノ酸配列を含む。

【0070】

10

20

30

40

50

特定の場合において、ヒト4-1BB結合ドメインおよびヒトOX40結合ドメインは、別個のポリペプチド上にある。特定の場合において、ヒト4-1BB結合ドメインは、別個のポリペプチド上にVHおよびVLを含む。特定の場合において、ヒトOX40結合ドメインは、別個のポリペプチド上にVHおよびVLを含む。

【0071】

特定の場合において、抗体は、ノブ-イン-ホール (knob-in-hole) (KIH) 抗体、CH3ドメインにおいて一致した突然変異を含むIgG1抗体、交換されたVHを有する2つの改変Fvフラグメント、ダイアボディ、scFv×scFv、scFv-Fc-scFv、クアドロマ、CrossMab Fab、CrossMab VH-VL、またはストランド-エクスチェンジ・エンジニアード・ドメイン・ボディ (SEED body) である。

10

【0072】

特定の場合において、抗体は、ヒト4-1BBおよびヒトOX40と同時に結合することができる。

【0073】

特定の場合において、抗体は、CD8⁺T、CD4⁺T、および／またはNK細胞の用量依存的拡大を促進することができる。

【0074】

特定の場合において、抗体は、刺激されたPBMCからのIFN-γ、IL-2、および／またはTNF-αの分泌を増加することができる。

20

【0075】

特定の場合において、抗体は、ヒト4-1BBおよびヒトOX40に対してアゴニスティックである。

【0076】

特定の場合において、抗体は、単離される。

【0077】

特定の場合において、抗体は、モノクローナル抗体である。

【0078】

特定の場合において、抗体は、さらに検出可能な標識を含む。

【0079】

特定の場合において、本明細書で提供されるポリヌクレオチドは、本明細書で提供される抗体をコードする。特定の場合において、本明細書で提供されるベクターは、本明細書で提供されるポリヌクレオチドを含み、任意で、ベクターは、発現ベクターである。

30

【0080】

特定の場合において、本明細書で提供される宿主細胞は、本明細書で提供されるポリヌクレオチドまたは本明細書で提供されるベクターを含む。

【0081】

特定の場合において、本明細書で提供される宿主細胞は、本明細書で提供される抗体をコードする本明細書で提供されるポリヌクレオチドの組み合わせを含む。特定の場合において、ポリヌクレオチドは、1つのベクターにコードされる。特定の場合において、ポリヌクレオチドは、複数のベクターにコードされる。

40

【0082】

特定の場合において、宿主細胞は、CHO、HEK293、またはCOS細胞からなる群より選択される。

【0083】

特定の場合において、本明細書で提供されるヒト4-1BBおよびヒトOX40に特異的に結合する抗体を産生する方法は、本明細書で提供される宿主細胞を培養し、そのため、抗体を産生すること、任意でさらに、抗体を回収することを含む。

【0084】

特定の場合において、本明細書で提供される試料中の4-1BBおよびOX40を検出

50

するための方法は、前記試料を請求項 1 から 106 のいずれか一項に記載の抗体と接触させることを含み、任意で、試料は、細胞を含む。

【0085】

特定の場合において、本明細書で提供される医薬組成物は、本明細書で提供される抗体および医薬適合性のある賦形剤を含む。

【0086】

特定の場合において、本明細書で提供されるNK細胞の増殖を高めるための方法は、NK細胞を、本明細書で提供される抗体または本明細書で提供される医薬組成物と接触させることを含む。

【0087】

特定の場合において、本明細書で提供されるT細胞の増殖を高めるための方法は、T細胞を、本明細書で提供される抗体または本明細書で提供される医薬組成物と接触させることを含む。

【0088】

特定の場合において、本明細書で提供されるNK細胞の増殖およびT細胞の増殖を高めるための方法は、NK細胞およびT細胞を、本明細書で提供される抗体または本明細書で提供される医薬組成物と接触させることを含む。

【0089】

特定の場合において、本明細書で提供されるT細胞同時刺激経路を刺激する方法は、T細胞を、本明細書で提供される抗体または本明細書で提供される医薬組成物と接触させることを含む。

【0090】

特定の場合において、T細胞は、CD4+T細胞である。特定の場合において、T細胞は、CD8+T細胞である。

【0091】

特定の場合において、細胞は、対象内にあり、接触は、抗体または医薬組成物を対象に投与することを含む。

【0092】

特定の場合において、本明細書で提供される対象における免疫応答を増強する方法は、対象に、有効量の本明細書で提供される抗体または本明細書で提供される医薬組成物を投与することを含む。

【0093】

特定の場合において、本明細書で提供される対象における癌を処置する方法は、対象に、有効量の本明細書で提供される抗体または本明細書で提供される医薬組成物を投与することを含む。特定の場合において、癌は、メラノーマ、腎癌、膵癌、肺癌、腸癌、前立腺癌、乳癌、肝癌、脳癌、または血液癌からなる群より選択される。

【0094】

特定の場合において、対象は、ヒトである。

【図面の簡単な説明】

【0095】

【図1A-B】図1Aおよび図1Bは、CHOクローンにおける4-1BB(CD137)の表面発現を示す。2つのパネルは、完全長ヒト(1A)およびカニクイザル(1B)の4-1BBを発現するCHOクローンに対する代表的な細胞染色を示す。トランスフェクトされていない細胞は、淡灰色のヒストグラムで示される；クローンは、暗灰色に実線の境界線が被さっている。1:50希釈で試料を4-1BBに対する抗体(PE抗huCD137#309804、BioLegend)で染色し、その後、GUAVA Easy cytometer HTを用いて分析した。親CHOを陰性対照として使用した。(実施例2を参照されたい。)

【図2A-C】図2A~図2Cは、CHOクローンにおけるOX40の表面発現を示す。3つのパネルは、3つのヒトOX40発現CHOクローンの代表的な染色を示す(2A:

10

20

30

40

50

O X F 0 0 1 a _ 9 G 1 0 ; 2 B : O X F 0 0 1 a _ 6 B 1 ; 2 C : O X F 0 0 4 a _ 1 1 H 7) 。トランスフェクトされていない細胞は、淡灰色のヒストグラムで示される ; クローンは、暗灰色に実線の境界線が被さっている。(2 A) および (2 B) におけるクローンは、ヒト O X 4 0 を発現する一方で、(2 C) におけるクローンは、カニクイザル O X 4 0 を発現する。1 : 3 0 希釈で試料をヒト O X 4 0 に対する抗体 (クローン L 1 0 6 、 B D B i o s c i e n c e s) で染色し、その後、G U A V A E a s y c y t e を用いて分析した。親 C H O を陰性対照として使用した。(実施例 2 を参照されたい。)

【図 3 A - B】図 3 A および図 3 B は、抗 O X 4 0 コンストラクトの、ヒト (3 A) またはカニクイザル (3 B) O X 4 0 発現 C H O K 1 S V 細胞への結合を示す。A D A P T I R (商標) コンストラクトの段階希釈を、ヒトまたはカニクイザル O X 4 0 でトランスフェクトされた C H O K 1 S V 細胞とインキュベートし、続いて、蛍光色素コンジュゲートヤギー α - ヒト F c 二次抗体で標識した。y 軸は、平均蛍光強度単位 (M F I) を示す。(実施例 6 を参照されたい。)

10

【図 4】図 4 は、機能的 O X 4 0 レポーターアッセイにおいて、MDA - M B - 2 3 1 腫瘍株を使用する、抗腫瘍 $\times$ 抗 O X 4 0 コンストラクトの機能性の、2 つの異なるリンカーを有する V H - V L または V L - V H 方向のいずれかでの結合ドメインとの比較を示す。段階希釈したコンストラクトを、N F κ B / O X 4 0 レポーター細胞株および MDA - M B - 2 3 1 標的細胞とともに 5 時間、並べて流し、続いて B i o - G l o を添加した。y 軸は、相対発光量 (R L U) を示す。(実施例 6 を参照されたい。)

【図 5 A - B】図 5 A および図 5 B は、抗 O X 4 0 コンストラクトの、ヒト (5 A) またはカニクイザル (5 B) O X 4 0 発現 C H O K 1 S V 細胞への結合を示す。A D A P T I R (商標) コンストラクトの段階希釈を、ヒトまたはカニクイザル O X 4 0 でトランスフェクトされた C H O K 1 S V 細胞とインキュベートし、続いて、蛍光色素コンジュゲートヤギー α - ヒト F c 二次抗体で標識した。y 軸は、M F I を示す。(実施例 9 を参照されたい。)

20

【図 6】図 6 は、機能的 O X 4 0 レポーターアッセイにおいて、好ましい方向での抗 O X 4 0 コンストラクトの活性の比較を示す。段階希釈したコンストラクトを、N F κ B / O X 4 0 レポーター細胞株および C H O / C D 6 4 標的細胞とともに 5 時間、並べて流し、続いて B i o - G l o を添加した。y 軸は、R L U を示す。(実施例 9 を参照されたい。)

【図 7】図 7 は、ヒト生殖細胞系統配列 I G H V 1 - 4 6 * 0 1 、 I G H J 4 * 0 1 、 I G K V 3 D - 7 * 0 1 、および I G K J 1 * 0 1 の、マウスクローン 6 およびそのヒト化変異体 F O B W 0 0 6 H L H 2 0 、 F O B W 0 0 6 H L H 2 6 および F O B W 0 0 6 H L H 4 0 の V 領域および J 領域への複数の配列アラインメントを示す。フレームワークおよび C D R は、I M G T 定義を使用して指定される。F O B W 0 0 6 H L H 4 0 およびヒト生殖細胞系統の間の差異は、太字で示され、F O B W 0 0 6 H L H 4 0 およびマウスクローン 6 の間の差異は、下線付きである。(実施例 1 1 を参照されたい。)

30

【図 8 A - B】図 8 A および図 8 B は、ヒト (8 A) またはカニクイザル (8 B) 4 - 1 B B 発現 J u r k a t 細胞への結合を示す。F O B 0 1 1 0 4 3 (マウス) および F O B 0 1 1 8 8 (部分ヒト化) 4 - 1 B B コンストラクトを、それぞれ示す。A D A P T I R (商標) コンストラクトの段階希釈を、ヒトまたはカニクイザル 4 - 1 B B でトランスフェクトされた J u r k a t 細胞とインキュベートし、続いて、蛍光色素コンジュゲートヤギー α - ヒト F c 二次抗体で標識した。y 軸は、M F I を示す。(実施例 1 3 を参照されたい。)

40

【図 9】図 9 は、機能的ヒト 4 - 1 B B レポーターアッセイにおいて、マウス (F O B 0 1 1 4 3) および部分ヒト化 (F O B 0 1 1 8 8) 抗 4 - 1 B B コンストラクトの活性の比較を示す。段階希釈したコンストラクトを、N F κ B / 4 - 1 B B レポーター細胞株および C H O / C D 6 4 標的細胞とともに 5 時間、並べて流し、続いて B i o - G l o を添加した。y 軸は、R L U を示す。(実施例 1 3 を参照されたい。)

【図 1 0 A - D】図 1 0 A ~ 図 1 0 D は、O X 4 0 における T m 安定化突然変異および 4 - 1 B B における追加のヒト化を有する抗 4 - 1 B B $\times$ 抗 O X 4 0 コンストラクトの、ヒ

50

ト（１０Ａ）もしくはカニクイザル（１０Ｃ）４－１ＢＢ発現Ｊｕｒｋａｔ細胞またはヒト（１０Ｂ）もしくはカニクイザル（１０Ｄ）ＯＸ４０発現ＣＨＯＫ１ＳＶ細胞への結合を示す。ＡＤＡＰＴＩＲ（商標）コンストラクトの段階希釈を、ヒトまたはカニクイザルＥＣＤでトランスフェクトされた細胞とインキュベートし、続いて、蛍光色素コンジュゲートヤギーα－ヒトＦｃ二次抗体で標識した。ｙ軸は、平均ＭＦＩを示す。（実施例１６を参照されたい。）

【図１１Ａ－Ｂ】図１１Ａおよび図１１Ｂは、ＯＸ４０におけるＴｍ安定化突然変異および４－１ＢＢにおける追加のヒト化を有する抗４－１ＢＢ×抗ＯＸ４０コンストラクトの、ＮＦκＢシグナル伝達を誘導する機能性を示す。（１１Ａ）４－１ＢＢレポータアッセイにおいて、ＯＸ４０発現ＣＨＯＫ１ＳＶは、架橋のために使用された。（１１Ｂ）ＯＸ４０レポータアッセイにおいて、４－１ＢＢ発現Ｊｕｒｋａｔ細胞は、架橋のために添加された。段階希釈したコンストラクトを、標的細胞およびＮＦκＢレポータ細胞株とともに５時間、並べて実行し、続いてＢｉｏ－Ｇｌｏを添加した。ｙ軸は、ＲＬＵを示す。（実施例１６を参照されたい。）

10

【図１２Ａ－Ｄ】図１２Ａ～図１２Ｄは、４－１ＢＢにおける追加のヒト化および結合ドメインの交互の方向を有する抗４－１ＢＢ×抗ＯＸ４０コンストラクトの、ヒト（１２Ａ）もしくはカニクイザル（１２Ｃ）４－１ＢＢ発現Ｊｕｒｋａｔ細胞またはヒト（１２Ｂ）もしくはカニクイザル（１２Ｄ）ＯＸ４０発現ＣＨＯＫ１ＳＶ細胞への結合を示す。ＡＤＡＰＴＩＲ（商標）コンストラクトの段階希釈を、トランスフェクトされた細胞とインキュベートし、続いて、蛍光色素コンジュゲートヤギーα－ヒトＦｃ二次抗体で標識した。ｙ軸は、ＭＦＩを示す。（実施例１９を参照されたい。）

20

【図１３】図１３は、抗４－１ＢＢ×抗ＯＸ４０コンストラクトの、親ＣＨＯＫ１ＳＶ細胞への結合を示す。ＡＤＡＰＴＩＲ（商標）コンストラクトの段階希釈を、親ＣＨＯＫ１ＳＶ細胞とインキュベートし、続いて、蛍光色素コンジュゲートヤギーα－ヒトＦｃ二次抗体で標識した。ｙ軸は、ＭＦＩを示す。（実施例１９を参照されたい。）

【図１４Ａ－Ｄ】図１４Ａ～図１４Ｄは、ＯＸ４０における追加のｐＩ安定化突然変異および交互の方向を有する抗４－１ＢＢ×抗ＯＸ４０コンストラクトの、ＮＦκＢシグナル伝達を誘導する機能性を示す。ヒト（１４Ａ）およびカニクイザル（１４Ｃ）４－１ＢＢレポータアッセイにおいて、ＯＸ４０発現ＣＨＯＫ１ＳＶは、架橋のために使用された。ヒト（１４Ｂ）およびカニクイザル（１４Ｄ）ＯＸ４０レポータアッセイにおいて、４－１ＢＢ発現Ｊｕｒｋａｔ細胞は、架橋のために添加された。段階希釈したコンストラクトを、標的細胞およびＮＦκＢレポータ細胞株とともに５時間インキュベートし、続いてＢｉｏ－Ｇｌｏを添加した。ｙ軸は、ＲＬＵを示す。（実施例１９を参照されたい。）

30

【図１５Ａ－Ｂ】図１５Ａおよび図１５Ｂは、ＯＸ４０における追加のｐＩ安定化突然変異および交互の方向を有する抗４－１ＢＢ×抗ＯＸ４０コンストラクトの、ＮＦκＢシグナル伝達を誘導する非特異的活性を示す。段階希釈したコンストラクトを、親ＣＨＯＫ１ＳＶ細胞標的細胞および４－１ＢＢ／ＮＦκＢレポータ細胞（１５Ａ）またはＯＸ４０／ＮＦκＢレポータ株（１５Ｂ）のいずれかと５時間インキュベートし、続いてＢｉｏ－Ｇｌｏを添加した。ｙ軸は、ＲＬＵを示す。（実施例１９を参照されたい。）

【図１６】図１６は、非ヒト化抗４－１ＢＢ×非最適化抗ＯＸ４０コンストラクトとともにインキュベートし、４－１ＢＢまたはたＯＸ４０のみに結合する単一特異性の対応物と比較した、インビトロ培養物におけるＰＢＭＣ細胞の拡大を示す。富化されたＰＢＭＣは、ＣｅｌｌＴｒａｃｅ Ｖｉｏｌｅｔで標識され、抗ＣＤ３および治療的コンストラクトの希釈物とともに培養した。５日目に、ＦＡＣＳ染色を介して細胞を染色し、ＣｅｌｌＴｒａｃｅ Ｖｉｏｌｅｔ希釈に基づいて細胞増殖について分析した。ｙ軸は、増殖したＣＤ８⁺、ＣＤ４⁺またはＮＫ細胞の存在を示す。（実施例２０を参照されたい。）

40

【図１７】図１７は、ヒト化抗４－１ＢＢ×最適化抗ＯＸ４０コンストラクトとともにインキュベートしたインビトロ培養物におけるＰＢＭＣ細胞の拡大を示す。富化されたＰＢＭＣは、ＣｅｌｌＴｒａｃｅ Ｖｉｏｌｅｔで標識され、αＣＤ３および治療的コンストラクトの希釈物とともに培養した。７２時間で、ＦＡＣＳ染色を介して細胞を染色し、

50

CellTrace Violet希釈に基づいて細胞増殖について分析した。y軸は、増殖したCD8⁺T細胞またはCD4⁺T細胞の存在を示す。(実施例21を参照されたい。)

【図18A-B】図18Aおよび図18Bは、ヒト化抗4-1BB×最適化抗OX40コンストラクトとともにインキュベートしたインビトロ培養物におけるPBMC細胞の拡大を示す。富化されたPBMCは、CellTrace Violetで標識され、αCD3および治療的コンストラクトの希釈物とともに培養した。72時間で、FACS染色を介して細胞を染色し、CellTrace Violet希釈(18A)およびCD25発現(18B)に基づいて細胞増殖についてNK分析した。y軸は、増殖したNK細胞およびCD25に陽性であったNK細胞の割合をそれぞれ示す。(実施例21を参照されたい。)

10

【図19】図19は、ヒト化抗4-1BB×最適化抗OX40コンストラクトとともにインキュベートしたインビトロ培養物におけるPBMC細胞からのサイトカイン分泌を示す。富化されたPBMCを、抗CD3および治療的コンストラクトの希釈物とともに培養した。48時間で、上清を回収し、マルチプレックスアッセイ(Milliplex)を介してサイトカインのレベルについて分析した。y軸は、各処置培養から分泌されたサイトカインの量pg/mlを示す。(実施例21を参照されたい。)

【図20A-D】図20A~図20Dは、追加のpI変化を有する抗4-1BB×抗OX40コンストラクトの、(20A)ヒト4-1BB発現細胞、(20B)ヒトOX40発現細胞、(20C)カニクイザル4-1BB発現細胞または(20D)カニクイザルOX40発現細胞への結合を示す。ADAPTIR(商標)コンストラクトの段階希釈をトランスフェクトした標的細胞とインキュベートし、続いて、蛍光色素コンジュゲートヤギーα-ヒトFc二次抗体で標識した。y軸は、平均蛍光強度単位(MFI)を示す。(実施例25を参照されたい。)

20

【図21】図21は、抗4-1BB×抗OX40コンストラクトの、親CHOK1SV細胞への結合を示す。ADAPTIR(商標)コンストラクトの、段階希釈を親CHOK1SV細胞とインキュベートし、その後、蛍光色素コンジュゲートヤギーα-ヒトFc二次抗体で標識した。y軸は、平均蛍光強度単位(MFI)を示す。(実施例25を参照されたい。)

【図22A-D】図22A~図22Dは、OX40における追加のpI安定化突然変異を有する抗4-1BB×抗OX40コンストラクトの、NFκBシグナル伝達を誘導する機能性を示す。段階希釈したコンストラクトを、CHO/OX40標的細胞および(22A)ヒト4-1BBまたは(22C)カニクイザル4-1BB NFκBレポータ細胞株のいずれかとともにインキュベートした。あるいは、コンストラクトをJurkat/4-1BB標的細胞および(22B)ヒトOX40または(22B)カニクイザルOX40 NFκBレポータ細胞株のいずれかとともにインキュベートした。アッセイを5時間インキュベートし、続いてBio-Gloルシフェラーゼ試薬を添加した。y軸は、相対発光量(RLU)を示す。(実施例25を参照されたい。)

30

【図23A-B】図23A~図23Bは、OX40における追加のpI変化を有する抗4-1BB×抗OX40コンストラクトの、NFκBシグナル伝達を誘導する非特異的活性を示す。段階希釈したコンストラクトを親CHOK1SV細胞標的細胞および(23A)4-1BB NFκBレポータ細胞または(23B)OX40 NFκBレポータ株のいずれかとともに5時間インキュベートし、続いてBio-Gloルシフェラーゼ試薬を添加した。y軸は、相対発光量(RLU)を示す。(実施例25を参照されたい。)

40

【図24】図24は、抗4-1BB×抗OX40コンストラクトとともにインキュベートしたインビトロ培養物におけるPBMC細胞の拡大を示す。富化されたPBMCを、CellTrace Violetで標識し、ヒト血清含有培地中で抗CD3および治療的コンストラクトの希釈物とともに培養した。96時間で、FACS染色を介して細胞を染色し、細胞増殖についてCellTrace Violet希釈に基づいて分析した。y軸は、増殖したCD8⁺T細胞またはCD4⁺T細胞の存在を示す。(実施例26を参照さ

50

りたい。)

【図25】図25は、抗4-1BB×抗OX40コンストラクトとともにインキュベートしたインビトロ培養物におけるPBMC細胞の拡大を示す。富化されたPBMCを、CellTrace Violetで標識し、ヒト血清含有培地中で抗CD3および治療的コンストラクトの希釈物とともに培養した。96時間で、FACS染色を介してNK細胞を染色し、細胞増殖およびCD25発現について分析した。y軸は、増殖したNK細胞の割合および活性化マーカーCD25を発現するNK細胞の割合を示す。(実施例26を参照されたい。)

【図26】図26は、抗4-1BB×抗OX40コンストラクトとともにインキュベートしたインビトロ培養物におけるPBMC細胞からのサイトカイン分泌を示す。富化されたPBMCを、ウシ胎仔血清含有培地中で抗CD3および治療的コンストラクトの希釈物とともに培養した。48時間で、上清を回収し、マルチプレックスアッセイ(Milliplex)を介してサイトカインのレベルについて分析した。y軸は、各処置培養から分泌されたサイトカインの量pg/mlを示す。(実施例26を参照されたい。)

【図27】図27は、ADAPTIR(商標)フォーマットでの代表的な二重特異性抗体を示す。抗体は、それぞれ順にアミノ末端からカルボキシル末端に、4-1BBに結合する第1scFv抗原結合ドメイン、ヒンジ領域、免疫グロブリン定常領域、およびOX40に結合する第2scFv抗原結合ドメインである2つの同一ポリペプチドを含む。

【図28A-B】図28Aおよび28Bは、二重特異性抗体コンストラクトを用いてインビトロで刺激されたCD4(28A)およびCD8(28B)T細胞におけるグランザイムBの発現を示す。2つのドナー(ドナーAおよびドナーB)からの富化されたPBMCを、抗CD3抗体(Ab)およびFXX01102(配列番号81)の段階希釈とともに培養した。72時間で、細胞を回収し、フローサイトメトリにより、グランザイムBおよび表面マーカーの細胞内発現について分析した。y軸は、CD4またはCD8T細胞サブセット内のグランザイムB+細胞の割合を示す。非刺激PBMCを対照として使用した。抗CD3抗体で処置され、二重特異性抗体で処置されていない細胞は、0nMでマークされたポイントとしてグラフ上に表示される。(実施例33を参照されたい。)

【図29】図29は、二重特異性抗体コンストラクトを用いてインビトロで刺激されたCD4T細胞およびCD8T細胞、ならびにNK細胞におけるグランザイムBの発現を示す。富化されたPBMCを、抗CD3抗体(Ab)およびFXX01102(配列番号81)の段階希釈とともに培養した。72時間で、細胞を回収し、フローサイトメトリにより、グランザイムBおよび表面マーカーの細胞内発現について分析した。y軸は、CD4T細胞もしくはCD8T細胞、または(CD335)NK細胞サブセット内のグランザイムB+細胞の割合を示す。非刺激PBMCを対照として使用した。抗CD3抗体で処置され、二重特異性抗体で処置されていない細胞は、0nMでマークされたポイントとしてグラフ上に表示される。(実施例33を参照されたい。)

【図30】図30は、抗4-1BB×抗OX40 ADAPTIR(商標)二重特異性タンパク質FXX01102(配列番号81)の添加で、用量依存的に標的細胞を死滅させるPBMCの能力を示す。富化されたPBMCを、2pMまたは0.5pMのCD3×TAA T細胞誘導抗体、TAA+標的細胞、および抗4-1BB-Fc-抗OX40の段階希釈とともに培養した。72時間で、細胞を回収し、フローサイトメトリにより生存率について腫瘍細胞を分析した。y軸は、7AADに染色されなかった標的細胞(生存細胞)の割合を示す。対照: 標的細胞単独および非刺激PBMCと同時培養した標的細胞(実施例34を参照されたい。)

【図31】図31は、30μg/マウスの用量でFXX01102を用いた処置が、結果としてB-hOX40/h4-1BBマウスにおけるMB49腫瘍増殖の統計的に有意な減少となったことを示す。メスB-hOX40/h41BBマウスの右側腹部に500,000のMB49細胞をSCで注射した(n=4または8/群)。処置は、6日目、9日目、12日目、15日目、18日目、21日目および24日目に腹腔内注射により投与された。各群についての平均腫瘍体積を±SEMでプロットする。1500mm³以上の腫

10

20

30

40

50

瘍エンドポイントに到達したマウスは、未来時点で使用される最後に記録された腫瘍体積を有していた。研究群についての6日目から26日目までの平均腫瘍体積における差異は、チューキーの多重比較検定を用いるJMP反復測定分散分析を使用して決定された。 $p < 0.05$ の値は、有意であるとみなされた。

【図32】図32は、 $30 \mu\text{g}$ /マウスの用量でFXX01102を用いた処置が、結果として、処置された8匹のマウスのうち2匹のマウスにおける完全な腫瘍拒絶および1匹の一過性腫瘍拒絶となったことを示す。メスB-hu41BBマウスの右側腹部に500,000のMB49細胞をSCで注射した($n=4$ または8/群)。処置は、6日目、9日目、12日目、15日目、18日目、21日目および24日目に腹腔内注射により投与された。データは、示されるように腫瘍チャレンジ後の日での腫瘍面積(mm^3)として表され、各線は、個々のマウスを表す。

10

【図33】図33は、 $30 \mu\text{g}$ /マウスの用量でFXX01102を用いた処置が、結果として、溶媒対照群と比較して有意に延長された生存となったことを示す。マウスがエンドポイント(腫瘍体積 $\geq 1500 \text{mm}^3$)に到達し、安楽死させた各時点で、生存イベントを記録した。生存は、研究の34日間を通じて評価された。中央生存率および統計的有意性は、ログランク検定および生存曲線の比較のためのウィルコクソン検定を用いるJMP生存分析を使用して算出された。 $p < 0.05$ の値は、有意であるとみなされた。

【図34】図34は、CD3陽性、CD4陽性、およびCD8陽性T細胞ならびにCD335陽性NK細胞において、 $30 \mu\text{g}$ /マウスの用量でFXX01102を用いる処置の14日後に、Ki67陽性T細胞の増殖の頻度が増加したことを示す。腫瘍チャレンジ後20日目(FXX01102を用いる処置の14日後)に、T細胞マーカーおよび細胞内Ki67の発現のために、 $100 \mu\text{L}$ の末梢血を染色した。

20

【発明を実施するための形態】

【0096】

本開示の理解を容易にするため、いくつかの用語および成句を以下に定義する。

I. 用語

【0097】

本明細書で使用されるように、用語「4-1BB」は、哺乳動物4-1BBポリペプチドを指し、天然4-1BBポリペプチドおよび4-1BBポリペプチドのアイソフォームを含むが、これらに限定されない。「4-1BB」は、完全長の未処理4-1BBポリペプチドならびに細胞内での処理から生じる4-1BBポリペプチドの形状を包含する。本明細書で使用されるように、用語「CD137」は、用語「4-1BB」と置き換え可能であると理解される必要がある。本明細書で使用されるように、用語「ヒト4-1BB」は、配列番号1のアミノ酸配列を含むポリペプチドを指す。本明細書で使用されるように、用語「カニクイザル4-1BB」は、配列番号2のアミノ酸配列を含むポリペプチドを指す。「4-1BBポリヌクレオチド」、「4-1BBヌクレオチド」、または「4-1BB核酸」は、4-1BBをコードするポリヌクレオチドを指す。

30

【0098】

本明細書で使用されるように、用語「OX40」は、哺乳動物OX40ポリペプチドを指し、天然OX40ポリペプチドおよびOX40ポリペプチドのアイソフォームを含むが、これらに限定されない。「OX40」は、完全長の未処理OX40ポリペプチドならびに細胞内での処理から生じるOX40ポリペプチドの形状を包含する。本明細書で使用されるように、用語「ヒトOX40」は、配列番号3のアミノ酸配列を含むポリペプチドを指す。本明細書で使用されるように、用語「カニクイザルOX40」は、配列番号4のアミノ酸配列を含むポリペプチドを指す。「OX40ポリヌクレオチド」、「OX40ヌクレオチド」、または「OX40核酸」は、OX40をコードするポリヌクレオチドを指す。

40

【0099】

本明細書で使用されるように、用語「腫瘍浸潤リンパ球」または「TIL」は、腫瘍細胞に直接対抗する、および/またはそれを囲むリンパ球を指す。腫瘍浸潤リンパ球は、典型的に非循環性リンパ球であり、CD8+T細胞、CD4+T細胞およびNK細胞を含む

50

。腫瘍浸潤リンパ球は、OX40および4-1BBを発現することができる。

【0100】

本明細書で使用されるように、用語「抗体」および「複数の抗体」は、技術用語であり、本明細書において置き換え可能に使用することができ、抗原を特異的に結合する少なくとも1つの抗原結合部位を有する分子または分子の複合体を指す。

【0101】

抗体は、例えば、モノクローナル抗体、組換え産生された抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、再表面形成された抗体、キメラ抗体、免疫グロブリン、合成抗体、2つの重鎖および2つの軽鎖分子を含む四量体抗体、抗体軽鎖単量体、抗体重鎖単量体、抗体軽鎖二量体、抗体重鎖二量体、抗体軽鎖-抗体重鎖対、細胞内抗体、ヘテロ共役抗体、シングルドメイン抗体、一価抗体、一本鎖抗体または単鎖Fv (scFv)、ラクダ化抗体、アフィボディ、Fabフラグメント、F(ab')₂フラグメント、ジスルフィド結合Fv (sdFv)、抗イディオタイプ抗体 (抗-Id) 抗体 (例えば、抗-抗-Id抗体を含む)、二重特異性抗体、および多重特異性抗体を含むことができる。ある実施形態において、本明細書に記載の抗体は、ポリクローナル抗体集団を指す。抗体は、免疫グロブリン分子の任意のタイプ (例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、またはIgY)、任意のクラス (例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、またはIgA₂)、または任意のサブクラス (例えば、IgG_{2a}またはIgG_{2b}) であり得る。ある実施形態において、本明細書に記載の抗体は、IgG抗体、またはそのクラス (例えば、ヒトIgG₁、IgG₂、またはIgG₄) またはサブクラスである。具体的な実施形態において、抗体は、ヒト化モノクローナル抗体である。別の具体的な実施形態において、抗体は、例えば、免疫グロブリンであるヒトモノクローナル抗体である。ある実施形態において、本明細書に記載の抗体は、IgG₁、IgG₂、またはIgG₄抗体である。

【0102】

「二重特異性」抗体は、2つの異なる抗原に結合する2つの異なる抗原結合部位 (Fc領域を除く) を有する抗体である。二重特異性抗体は、例えば、組換え産生された抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、再表面形成された抗体、キメラ抗体、免疫グロブリン、合成抗体、2つの重鎖および2つの軽鎖分子を含む四量体抗体、抗体軽鎖単量体、ヘテロ共役抗体、結合一本鎖抗体または結合単鎖Fv (scFv)、ラクダ化抗体、アフィボディ、結合Fabフラグメント、F(ab')₂フラグメント、化学的に結合したFv、およびジスルフィド結合Fv (sdFv) を含むことができる。二重特異性抗体は、免疫グロブリン分子の任意のタイプ (例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、またはIgY)、任意のクラス (例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、またはIgA₂)、または任意のサブクラス (例えば、IgG_{2a}またはIgG_{2b}) であり得る。ある実施形態において、本明細書に記載の二重特異性抗体は、IgG抗体、またはそのクラス (例えば、ヒトIgG₁、IgG₂、またはIgG₄) またはサブクラスである。ある実施形態において、本明細書に記載の二重特異性抗体は、任意で同一のポリペプチドである2つのポリペプチドを含み、各ポリペプチドは、順にアミノ末端からカルボキシル末端に、第1scFv抗原結合ドメイン、リンカー (任意で、リンカーは、ヒンジ領域である)、免疫グロブリン定常領域、および第2scFv抗原結合ドメインを含む。抗体のこの特定のタイプは、ADAPTIR (商標) 技術により例示され、それは、図27に示されている。二重特異性抗体は、例えば、各標的について一価 (例えば、1つの抗原を標的化する1つのアームおよび第2抗原を標的化する他のアームを有するIgG分子) であり得るか、各標的について二価 (例えば、二重可変ドメイン抗体、IgG-scFv、scFv-Fc-scFv、または二量体を含むADAPTIR (商標) 抗体であって、二量体の各ポリペプチドは、2つの異なる抗原結合ドメインを含む) であり得る。

【0103】

本明細書で使用されるように、用語「抗原結合ドメイン」、「抗原結合領域」、「抗原結合部位」、および類似の用語は、抗体分子上に抗原 (例えば、相補性決定領域 (CDR)) についてのその特異性を与えるアミノ酸残基を含む抗体分子の部分に指す。抗原結合

領域は、げっ歯類（例えば、マウス、ラット、またはハムスター）およびヒトなどの任意の動物種に由来することができる。4-1BBに結合する抗原結合ドメインは、本明細書において、例えば、「4-1BB結合ドメイン」と呼ばれる可能性がある。OX40に結合する抗原結合ドメインは、本明細書において、例えば、「OX40結合ドメイン」と呼ばれる可能性がある。本明細書で使用されるように、「ヒト4-1BB結合ドメイン」または「ヒト4-1BB抗原結合ドメイン」は、ヒト4-1BBに特異的に結合するが、非ヒト4-1BB（例えば、マウス、げっ歯類、または非ヒト霊長目4-1BB）にも結合する可能性がある抗原結合ドメインを指す。同様に、「ヒトOX40結合ドメイン」または「ヒトOX40抗原結合ドメイン」は、ヒトOX40に特異的に結合する抗原結合ドメインを指す。

10

【0104】

本明細書で使用される用語「4-1BB/OX40抗体」、「抗4-1BB/OX40抗体」または「4-1BB×OX40抗体」は、4-1BB（例えば、ヒト4-1BB）に結合する抗原結合ドメインおよびOX40（例えば、ヒトOX40）に結合する抗原結合ドメインを含む二重特異性抗体を指す。

【0105】

「モノクローナル」抗体は、単一抗原決定基、またはエピトープの高度に特異的な認識および結合に関与する均一な抗体集団を指す。これは、異なる抗原決定基に対して向けられる異なる抗体を典型的に含むポリクローナル抗体と対照的である。用語「モノクローナル」抗体は、完全な免疫グロブリン分子および完全長免疫グロブリン分子の両方、同様に Fab、Fab'、F(ab)2、Fv、単鎖(scFv)、抗体部分を含む融合タンパク質、ならびに抗原認識部位を含む任意の他の修飾された免疫グロブリン分子を包含する。さらに、「モノクローナル」抗体は、ハイブリドーマ、ファージ選択、組換え発現、およびトランスジェニック動物を含むが、これらに限定されない任意の数の手段で作成されたそのような抗体を指す。

20

【0106】

用語「キメラ」抗体は、アミノ酸配列が、2つまたはそれ以上の種に由来する抗体を指す。典型的に、軽鎖および重鎖両方の可変領域は、所望の特異性、親和性、および能力を有する哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギなど）の1つの種に由来する抗体の可変領域に対応する一方で、定常領域は、別の（通常はヒト）に由来する抗体における配列と相同であり、その種において免疫応答を誘発することを回避する。

30

【0107】

用語「ヒト化」抗体は、最小限の非ヒト（例えば、マウス）配列を含む、非ヒト（例えば、マウス）抗体の形状を指す。典型的に、ヒト化抗体は、相補性決定領域(CDR)からの残基が、所望の特異性、親和性、および能力を有する非ヒト種（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター）のCDRからの残基により置き換えられる（「CDR移植」）、ヒト免疫グロブリンである(Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science 239:1534-1536 (1988))。いくつかの場合、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域(FR)残基は、所望の特異性、親和性、および能力を有する非ヒト種からの抗体において対応する残基で置き換えられる。そのヒト化抗体は、さらに、Fvフレームワーク領域内および/または置き換えられた非ヒト残基内のいずれかで追加の残基の置換により修飾され、抗体の特異性、親和性、および/または能力を洗練し、最適化することができる。一般に、ヒト化抗体は、非ヒト免疫グロブリンに対応するCDR領域のすべてまたは実質的にすべてを含む可変ドメインの実質的にすべて、少なくとも1つ、典型的には2つまたは3つを含むが、すべてまたは実質的にすべてのFR領域は、ヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである。ヒト化抗体は、また、免疫グロブリン定常領域またはドメイン(Fc)、典型的には、ヒト免疫グロブリンの少なくとも一部を含むことができる。ヒト化抗体を生成するために使用された方法の例は、米国特許第5,225,

40

50

539号; Roguska et al., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 91(3):969-973(1994)、および Roguska et al., Protein Eng. 9(10):895-904(1996)に記載されている。

【0108】

用語「ヒト」抗体は、ヒト免疫グロブリン遺伝子座に由来するアミノ酸配列を有する抗体を意味し、そのような抗体は、当技術分野において既知である任意の技術を使用して作成される。

【0109】

可変領域は、典型的に、抗体の一部、一般に、軽鎖および重鎖の一部、典型的には、抗体間の配列において大きく異なり、特定の抗原についての特定の抗体の結合および特異性において使用される、成熟重鎖におけるアミノ末端約110個から125個のアミノ酸および成熟軽鎖における約90個から115個のアミノ酸を指す。配列における変動性は、相補性決定領域(CDR)と呼ばれる領域に集中し、可変ドメイン内のより高度に保存された領域は、フレームワーク領域(FR)と呼ばれる。特定のメカニズムまたは理論に拘束されることなく、軽鎖および重鎖のCDRが、主に、抗体の抗原との相互作用および特異性の原因となると考えられている。ある実施形態において、可変領域は、ヒト可変領域である。ある実施形態において、可変領域は、げっ歯類またはマウスCDRおよびヒトフレームワーク領域(FR)を含む。特定の実施形態において、可変領域は、霊長類(例えば、非ヒト霊長類)可変領域である。ある実施形態において、可変領域は、げっ歯類またはマウスCDRおよび霊長類(例えば、非ヒト霊長類)フレームワーク領域(FR)を含む。

【0110】

用語「VH」および「VHドメイン」は、抗体の重鎖可変領域を指すために交換可能に使用される。

【0111】

用語「VL」および「VLドメイン」は、抗体の軽鎖可変領域を指すために交換可能に使用される。

【0112】

用語「カバットナンバリング」および同様の用語は、当技術分野において認識されており、抗体の重鎖および軽鎖可変領域、またはその抗原結合部分におけるアミノ酸残基に番号付与するシステムを指す。ある態様において、抗体のCDRは、カバットナンバリングシステムにしたがって決定することができる(例えば、Kabat EA&Wu TT(1971) Ann NY Acad Sci 190:382-391およびKabat EA et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242を参照されたい)。カバットナンバリングシステムを使用して、抗体重鎖分子内のCDRは、典型的に、任意で、35に続く、1個または2個の追加のアミノ酸(カバットナンバリングスキームにおいて35Aおよび35Bと呼ばれる)を含むことができるアミノ酸31位から35位(CDR1)、アミノ酸50位から65位(CDR2)、およびアミノ酸95位から102位(CDR3)に存在する。カバットナンバリングシステムを使用して、抗体軽鎖分子内のCDRは、典型的に、アミノ酸24位から34位(CDR1)、アミノ酸50位から56位(CDR2)、およびアミノ酸89位から97位(CDR3)に存在する。具体的な実施形態において、本明細書に記載の抗体のCDRは、カバットナンバリングスキームにしたがって決定されている。

【0113】

コチアは、代わりに、構造ループの位置を指す(ChothiaおよびLesk, J. Mol. Biol. 196:901-917(1987))。カバットナンバリング規定を使用して番号付与されたコチアCDR-H1ループの端は、ループの長さに応じてH3

2 および H 3 4 の間で異なる（これは、カバットナンバリングスキームが、H 3 5 A および H 3 5 B での挿入を配置するためである；3 5 A も 3 5 B も存在しない場合、ループは、3 2 で終了する；3 5 A のみ存在する場合、ループは、3 3 で終了する；3 5 A および 3 5 B が両方とも存在する場合、ループは、3 4 で終了する）。具体的な実施形態において、本明細書に記載の抗体の C D R は、コチアナンバリングスキームにしたがって決定されている。

【0114】

A b M 超可変領域は、カバット C D R およびコチア構造ループの間の中間物を表し、O x f o r d M o l e c u l a r の A b M 抗体モデリングソフトウェアにより使用される。具体的な実施形態において、本明細書に記載の抗体の C D R は、A b M ナンバリングスキームにしたがって決定されている。

【0115】

【表 1】

ループ	カバット	A b M	コチア
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32..34
		(カバットナンバリング)	
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32
		(コチアナンバリング)	
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102

【0116】

I M G T ナンバリング規定は、B r o c h e t , X , e t a l , N u c l . A c i d s R e s . 3 6 : W 5 0 3 - 5 0 8 (2 0 0 8) に記載されている。具体的な実施形態において、本明細書に記載の抗体の C D R は、I M G T ナンバリング規定にしたがって決定されている。本明細書で使用されるように、別段の定めがない限り、免疫グロブリン分子の可変領域におけるアミノ酸残基の位置は、I M G T ナンバリング規定にしたがって番号付与される。

【0117】

本明細書で使用されるように、用語「定常領域」または「定常ドメイン」は、交換可能であり、当技術分野において共通の意味を有している。定常領域は、抗体部分、例えば、抗原への抗体の結合に直接関与していないが、F c 受容体との相互作用のような、種々のエフェクタ機能を示すことができる軽鎖および／または重鎖のカルボキシル末端部分である。免疫グロブリン分子の定常領域は、免疫グロブリン可変ドメインと比較して、一般に、より多くの保存されたアミノ酸配列を有する。免疫グロブリン「定常領域」または「定常ドメイン」は、C H 1 ドメイン、ヒンジ、C H 2 ドメイン、および C H 3 ドメインまたはこれらのドメインのサブセット、例えば、C H 2 ドメインおよび C H 3 ドメインを含むことができる。本明細書で提供される、ある実施形態において、免疫グロブリン定常領域は、C H 1 ドメインを含まない。本明細書で提供される、ある実施形態において、免疫グロブリン定常領域は、ヒンジを含まない。本明細書で提供される、ある実施形態において、免疫グロブリン定常領域は、C H 2 ドメインおよび C H 3 ドメインを含む。

【0118】

「F c 領域」または「F c ドメイン」は、細胞上の抗体受容体および補体の C 1 q 成分への結合に関与しているソースの抗体の部分に対応するか、それに由来するポリペプチド配列を指す。F c は、「結晶性断片」の略語であり、タンパク質結晶を容易に形成する抗

体の断片を指す。元来、タンパク質消化により説明されてきた別個のタンパク質断片は、免疫グロブリンタンパク質の全体的な一般構造を定義することができる。「Fc領域」または「Fcドメイン」は、CH2ドメイン、CH3ドメイン、および任意でヒンジの全部または一部を含む。「Fc領域」または「Fcドメイン」は、単一ポリペプチドまたは2つのジスルフィド結合ポリペプチドを指すことができる。免疫グロブリン構造および機能のレビューについては、Putnam, The Plasma Proteins, Vol. V (Academic Press, Inc., 1987), pp. 49-140; および Padlan, Mol. Immunol. 31: 169-217, 1994を参照されたい。本明細書で使用されるように、用語Fcは、天然に存在する配列の変形を含む。
【0119】

本明細書で使用されるように、「免疫グロブリン二量体化ドメイン」または「免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメイン」は、第2ポリペプチド鎖の異なる免疫グロブリンドメインと優先的に相互作用するか、会合するポリペプチド鎖の免疫グロブリンドメインを指し、異なる免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインの相互作用は、第1ポリペプチド鎖および第2ポリペプチド鎖のヘテロ二量体化（すなわち、「ヘテロ二量体」とも呼ばれる、2つの異なるポリペプチド鎖の間での二量体の形成）に実質的に寄与するか、効率的に促進する。免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメイン間の相互作用は、第1ポリペプチド鎖の免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインおよび／または第2ポリペプチド鎖の免疫グロブリンヘテロ二量体化ドメインの不在下での第1ポリペプチド鎖および第2ポリペプチド鎖の間の二量体化において統計的に有意な低減がある場合、第1ポリペプチド鎖および第2ポリペプチド鎖のヘテロ二量体化に「実質的に寄与するか効率的に促進する」。ある実施形態において、第1ポリペプチド鎖および第2ポリペプチド鎖が同時発現する場合、第1ポリペプチド鎖および第2ポリペプチド鎖の少なくとも60%、少なくとも約60%から約70%、少なくとも約70%から約80%、少なくとも80%から約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%は、互いとヘテロ二量体を形成する。代表的な免疫グロブリンヘテロ二量体ドメインには、そこで提供されるように、免疫グロブリンCH1ドメイン、免疫グロブリンCLドメイン（例えば、CκまたはCλアイソタイプ）、または、野生型免疫グロブリンCH1およびCLドメインおよび変更された（または突然変異した）免疫グロブリンCH1およびCLドメインを含む、それらの誘導体が含まれる。

【0120】

「野生型免疫グロブリンヒンジ領域」は、CH1およびCH2ドメイン（IgG、IgA、およびIgDについて）の間に挿入され、それらを接続する、または天然に存在する抗体の重鎖において確認されるCH1およびCH3ドメイン（IgEおよびIgMについて）の間に挿入され、それらを接続する、天然に存在する上側ヒンジおよび中央ヒンジアミノ酸配列を指す。ある実施形態において、野生型免疫グロブリンヒンジ領域配列は、ヒトであり、ヒトIgGヒンジ領域を含むことができる。「変更された野生型免疫グロブリンヒンジ領域」または「変更された免疫グロブリンヒンジ領域」は、（a）最大30%のアミノ酸変化（例えば、最大25%、20%、15%、10%、または5%のアミノ酸置換または欠失）を有する野生型免疫グロブリンヒンジ領域、または（b）約5個のアミノ酸（例えば、約5個、6個、7個、8個、9個、10個、11個、12個、13個、14個、15個、16個、17個、18個、19個、または20個のアミノ酸）から最大約120個のアミノ酸の長さを有する（例えば、約10個から約40個のアミノ酸または約15個から約30個のアミノ酸または約15個から約20個のアミノ酸または約20個から約25個のアミノ酸の長さを有する）、最大約30%のアミノ酸変化（例えば、最大約25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、または1%のアミノ酸置換または欠失またはそれらの組み合わせ）を有する、ならびに、米国特許公開第2013/0129723号および米国特許公開第2013/0095097号に開示されるようなIgGコアヒンジ領域を有する野生型免疫グロブリンヒンジ領域の一部を指す。本明細書で提供されるように、「ヒンジ領域」または「ヒンジ」は、抗原結合ドメイン（例えば4-

1 B B または O X 4 0 結合ドメイン) および免疫グロブリン定常領域の間に位置することができる。

【0121】

本明細書で使用されるように、「リンカー」は、部分、例えば、2つの化合物、例えば、ポリペプチドを結合させることができるポリペプチドを指す。リンカーの非限定例には、グリシン-セリン(例えば、(G l y 4 S e r)) リピートを含む可動性リンカー、および(a)膜貫通タンパク質(例えば、I型膜貫通タンパク質)のドメイン間領域;(b)II型のC型レシチンのストーク領域;または(c)免疫グロブリンヒンジに由来するリンカーが含まれる。本明細書で提供されるように、リンカーは、例えば、(1)単鎖F v (s c F v)におけるV H領域およびV L領域の間のポリペプチド領域または(2)免疫グロブリン定常領域および抗原結合ドメインの間のポリペプチド領域を指すことができる。ある実施形態において、リンカーは、5個から約35個のアミノ酸、例えば、約15個から約25個のアミノ酸で構成される。いくつかの実施形態において、リンカーは、少なくとも5個のアミノ酸、少なくとも7個のアミノ酸または少なくとも9個のアミノ酸で構成される。

10

【0122】

本明細書で使用されるように、抗体に関して使用される場合の用語「重鎖」は、定常領域のアミノ酸配列に基づいて、任意の別個のタイプ、例えば、アルファ(α)、デルタ(δ)、イプシロン(ϵ)、ガンマ(γ)、およびミュー(μ)を指すことができ、それらは、I g Gのサブクラス、例えば、I g G₁、I g G₂、I g G₃、およびI g G₄を含む、I g A、I g D、I g E、I g G、およびI g Mクラスの抗体をそれぞれ生じる。

20

【0123】

本明細書で使用されるように、抗体に関して使用される場合の用語「軽鎖」は、定常領域のアミノ酸配列に基づいて、任意の別個のタイプ、例えば、カッパ(κ)またはラムダ(λ)を指すことができる。軽鎖アミノ酸配列は、当技術分野において周知である。具体的な実施形態において、軽鎖は、ヒト軽鎖である。

【0124】

本明細書で使用されるように、用語「E Uナンバリングシステム」は、それぞれ、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、E d e l m a n, G. M. e t a l., P r o c. N a t l. A c a d. U S A, 63, 78-85 (1969) および K a b a t e t a l, S e q u e n c e s o f P r o t e i n s o f I m m u n o l o g i c a l I n t e r e s t, U. S. D e p t. H e a l t h a n d H u m a n S e r v i c e s, 5 t h e d i t i o n, 1991に記載されるように、抗体の定常領域についてのE Uナンバリング規定を指す。本明細書で使用されるように、別段の定めがない限り、免疫グロブリン分子の定常領域におけるアミノ酸残基の位置は、E U命名法(W a r d e t a l., 1995 T h e r a p. I m m u n o l. 2: 77-94)にしたがって番号付与される。

30

【0125】

本明細書で使用されるように、用語「二量体」は、共有結合(例えば、ジスルフィド結合)を含む分子内力および他の相互作用(例えば、静電相互作用、塩橋、水素結合、および疎水的相互作用)の1つまたは複数の形態を介して互に関連している2つのサブユニットからなり、適切な条件下(例えば、生理的条件下、組換えタンパク質を発現、精製、および/または貯蔵するのに適した水溶液中、または非変性および/または非還元電気泳動のための条件下)で安定している生物学的実体を指す。本明細書で使用されるように、「ヘテロ二量体」または「ヘテロ二量体タンパク質」は、2つの異なるポリペプチドから形成される二量体を指す。本明細書で使用されるように、「ホモ二量体」または「ホモ二量体タンパク質」は、2つの同一なポリペプチドから形成される二量体を指す。

40

【0126】

本明細書で使用されるように、「抗体依存性細胞媒介性細胞傷害」および「A D C C」は、F c γ R (例えば、ナチュラルキラー(NK)細胞およびマクロファージなどの単球

50

細胞)を発現する非特異的細胞傷害性細胞が、標的細胞上に結合した抗体(またはFcγRを結合することができる他のタンパク質)を認識し、続いて標的細胞の溶解を引き起こす細胞媒介プロセスを指す。原則として、FcγRを活性化する任意のエフェクタ細胞は、ADCCを媒介するように動作させることができる。ADCCを媒介するための初代細胞は、FcγRIIIのみを発現するNK細胞であり、一方で、単球は、活性化、局在化、または分化の状態に応じて、FcγRI、FcγRII、およびFcγRIIIを発現することができる。造血細胞に対するFcγR発現のレビューについては、例えば、Ravetch et al., Annu. Rev. Immunol., 9: 457-92 (1991)を参照されたい。

【0127】

本明細書でaに関して使用されるように、用語「ADCC活性を有すること」は、ポリペプチド(例えば、免疫グロブリンヒンジ領域ならびにIgG(例えば、IgG1)に由来するようなCH2ドメインおよびCH3ドメインを有する免疫グロブリン定常領域を含むもの)が、Fc受容体が発現する細胞溶解性免疫エフェクタ細胞(例えば、NK細胞)上に細胞溶解性Fc受容体(例えば、FcγRIII)が結合することを通じて、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)を媒介することができることを意味する。

【0128】

本明細書で使用されるように、「補体依存性細胞傷害」および「CDC」は、正常血清中の成分(「補体」)が、抗体または他の標的抗原に結合したC1q補体結合タンパク質と一緒に、標的抗原を発現する標的細胞の溶解を示すプロセスを指す。補体は、それらの効果を発揮するために、協力し、系統立てて作用する血清タンパク質の群からなる。

【0129】

本明細書で使用されるように、用語「古典的補体経路」および「古典的補体系」は同義であり、補体の活性化のための特定の経路を指す。古典的経路は、開始のために抗原抗体複合物を必要とし、規則的な方法でC1からC9と指定された9個の主要なタンパク質成分の活性化を伴う。活性化プロセスにおけるいくつかのステップについて、産物は、後に続くステップを触媒する酵素である。このカスケードは、比較的小さい初期シグナルによる大量の補体の増幅および活性化を提供する。

【0130】

ポリペプチドに関連して本明細書で使用されるように、用語「CDC活性を有すること」は、ポリペプチド(例えば、免疫グロブリンヒンジ領域ならびにIgG(例えば、IgG1)に由来するようなCH2ドメインおよびCH3ドメインを有する免疫グロブリン定常領域を含むもの)が、C1q補体タンパク質の結合および古典的補体系の活性化を通じて補体依存性細胞傷害(CDC)を媒介することができることを意味する。本発明の一実施形態において、組換えポリペプチドは、CDC活性を弱めるように修飾されている。

【0131】

「結合親和性」は、一般に、分子の単一の結合部位(例えば、抗体)およびその結合パートナー(例えば、抗原)の間の非共有相互作用の合計の強度を指す。別段の指示がない限り、本明細書で使用されるように、「結合親和性」は、結合対(例えば、抗体および抗原)のメンバーの間の1:1相互作用を反映する固有の結合親和性を指す。分子Xの、そのパートナーYについての親和性は、一般に、解離定数(K_D)により表すことができる。親和性は、平衡解離定数(K_D)、および平衡会合定数(K_A)を含むがこれらに限定されない、当技術分野において既知である多くの方法により測定および/または表現することができる。 K_D は、 k_{off}/k_{on} の商から算出され、 K_A は、 k_{on}/k_{off} の商から算出される。 k_{on} は、例えば、抗原に対する抗体の会合速度定数を指し、 k_{off} は、例えば、抗原からの抗体の解離を指す。 k_{on} および k_{off} は、BIAcore(登録商標)またはKinExAのような当業者に既知である技術により決定することができる。

【0132】

本明細書で使用されるように、用語「免疫特異的に結合する」、「免疫特異的に認識する」、「特異的に結合する」、および「特異的に認識する」は、抗体の文脈において類似

10

20

30

40

50

の用語である。これらの用語は、抗体がその抗原結合ドメインを介してエピトープに結合すること、ならびに結合が抗原結合ドメインおよびエピトープの間のいくつかの相補性を伴うことを示す。したがって、ヒト4-1BBおよび／またはOX40に「特異的に結合する」抗体も可能であるが、非関連の非4-1BBおよび／またはOX40タンパク質への結合の程度は、例えば、放射免疫測定（RIA）により測定されるように、抗体の、4-1BBおよび／またはOX40への結合の約10%未満である。

【0133】

結合ドメインは、「高親和性」結合ドメインおよび「低親和性」結合ドメインとして分類することができる。「高親和性」結合ドメインは、 10^{-7} M未満、 10^{-8} M未満、 10^{-9} M未満、 10^{-10} M未満の K_D 値を有するそれらの結合ドメインを指す。「低親和性」結合ドメインは、 10^{-7} Mを超える、 10^{-6} Mを超える、または 10^{-5} Mを超える K_D を有するそれらの結合ドメインを指す。「高親和性」および「低親和性」結合ドメインは、それらの標的を結合するが、試験試料中に存在する他の成分を有意に結合しない。

10

【0134】

本明細書で使用されるように、抗体は、標的に近接する場合、当業者が結合に必要であると考えられる条件下で、その標的（すなわち、ヒト4-1BBまたはヒトOX40）を特異的に結合する場合に「結合可能」である。「ヒト4-1BB抗原結合ドメイン」は、ヒト4-1BBに特異的に結合する結合ドメインを意味すると理解されるべきである。「ヒトOX40抗原結合ドメイン」は、OX40に特異的に結合する結合ドメインを意味すると理解されるべきである。

20

【0135】

本明細書で使用されるように、「エピトープ」は、当技術分野における用語であり、抗体が特異的に結合することができる抗原の局在領域を指す。エピトープは、例えば、ポリペプチドの隣接アミノ酸（直線状または隣接エピトープ）であり得る、または、エピトープは、例えば、ポリペプチドまたは複数のポリペプチド（立体配座、非直線状、不連続、または非隣接のエピトープ）の2つまたはそれ以上の非隣接領域から一緒に来る可能性がある。ある実施形態において、抗体が結合するエピトープは、例えば、NMR分光法、X線回折結晶構造解析研究、ELISAアッセイ、質量分析と組み合わせた水素／重水素交換（例えば、液体クロマトグラフィエレクトロスプレー質量分析）、アレイベースのオリゴペプチド走査アッセイ、および／または突然変異誘発性マッピング（例えば、部位特異的突然変異誘発性マッピング）により決定することができる。X線回折結晶構造解析のため、結晶化は、当技術分野において既知である任意の方法を使用して達成することができる（例えば、Giege R et al., (1994) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 50 (Pt 4): 339-350; McPherson A (1990) Eur J Biochem 189: 1-23; Chayen NE (1997) Structure 5: 1269-1274; McPherson A (1976) J Biol Chem 251: 6300-6303）。抗体：抗原結晶は、周知のX線回折技術を使用して研究することができ、X-PLORのようなコンピュータソフトウェアを使用して精緻化することができる（Yale University, 1992, Molecular Simulations, Inc. により配布；例えば、Meth Enzymol (1985) 114&115巻, eds Wyckoff HW et al., ; 米国特許公開第2004/0014194号）、およびBUSTER (Bricogne G (1993) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 49 (Pt 1): 37-60; Bricogne G (1997) Meth Enzymol 276A: 361-423, ed Carter CW; Roversi P et al., (2000) Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 56 (Pt 10): 1316-1323を参照されたい）。突然変異誘発性マッピング研究は、当業者に既知である任意の方法を使用して達成することができる。アラニンスキャニング突然変異誘発技術を含む、突然変異誘発技術の説明については、例えば、Champe M et al., (1995) J

30

40

50

Biol Chem 270:1388-1394およびCunningham BC&Wells JA (1989) Science 244:1081-1085を参照されたい。

【0136】

参照抗体と「同じエピトープに結合する」抗体は、参照抗体と同じ、抗原上のアミノ酸残基に結合する抗体を指す。参照抗体と同じエピトープに結合する抗体の能力は、水素／重水素交換アッセイ (Coales et al. Rapid Commun. Mass Spectrom. 2009; 23:639-647を参照されたい) により決定することができる。

【0137】

参照抗体と「同じ立体構造エピトープに結合する」抗体は、参照抗体として、抗原の立体配座または構造に結合する抗体を指す。参照抗体と同じ立体構造エピトープに結合する抗体の能力は、例えば、水素／重水素交換アッセイ (Coales et al. Rapid Commun. Mass Spectrom. 2009; 23:639-647を参照されたい)、X線結晶構造解析、およびアラニンスキャニングにより決定されるように抗原と複合体化した抗体 (複数の抗体) の構造の比較を含む、当技術分野において既知である方法により決定することができる。参照抗体と同じ直線状エピトープに結合する抗体は、参照抗体と同じ、抗原上の直線状アミノ酸配列に結合する抗体を指す。直線状エピトープについて、pepspot分析のようなペプチドマッピング実験を使用して、同じ直線状エピトープへの結合を決定することができる。

【0138】

抗体は、その抗体が、参照抗体のエピトープへの結合をある程度ブロックする程度までそのエピトープまたは重複しているエピトープに優先的に結合する場合、そのエピトープへの参照抗体の結合を「競合的に阻害する」と言われている。競合的阻害は、当技術分野において既知である任意の方法、例えば、競合ELISAアッセイ、表面プラズモン共鳴 (SPR)、またはバイオレイヤー干渉法 (BLI) により決定することができる。抗体は、参照抗体のその標的への結合を少なくとも50%まで防止または低減する場合、所与のエピトープへの参照抗体の結合を競合的に阻害すると言することができる。ある実施形態において、抗体は、参照抗体の所与のエピトープへの結合を少なくとも90%、少なくとも80%、少なくとも70%、または少なくとも60%まで競合的に阻害する。ある実施形態において、参照抗体は、抗4-1BB抗体、抗OX40抗体、抗4-1BB二重特異性抗体もしくは多重特異性抗体、または抗OX40二重特異性抗体もしくは多重特異性抗体である。例えば、参照抗体は、抗4-1BB×抗OX40二重特異性抗体であり得る。ヒト4-1BB抗原結合ドメインを有する参照抗体は、配列番号17の重鎖可変ドメイン (VH) および配列番号18の軽鎖可変ドメイン (VL) を含む可能性がある。ヒトOX40抗原結合ドメインを有する参照抗体は、配列番号29の重鎖および配列番号28のVLを含む可能性がある。

【0139】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」は、本明細書において交換可能に使用され、任意の長さのアミノ酸のポリマーを指す。ポリマーは、直鎖または分岐であり得、それは、修飾アミノ酸を含む可能性があり、非アミノ酸により中断され得る。その用語は、また、自然に、または介入；例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化、または標識成分との結合などの任意の他の操作もしくは修飾により修飾されているアミノ酸ポリマーも包含する。また、定義には、例えば、アミノ酸の1つまたは複数の類縁体 (例えば、非天然アミノ酸などを含む)、ならびに当技術分野において既知である他の修飾を含むポリペプチドも含まれる。本発明のポリペプチドが、抗体に基づいているため、ある実施形態において、ポリペプチドが、単鎖または関連する鎖として生じることができることが理解される。

【0140】

本明細書で使用されるように、用語「核酸」、「核酸分子」、または「ポリヌクレオチド」は、一本鎖または二本鎖のいずれかの形状のデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌ

10

20

30

40

50

クレオチドおよびそれらのポリマーを指す。特に制限がない限り、その用語は、参照核酸と類似の結合特性を有し、天然に存在するヌクレオチドと類似の様式で代謝される天然のヌクレオチドの類縁体を含む核酸を包含する。別段の定めがない限り、特定の核酸配列は、また、その保存的に修飾された変異体（例えば、縮重コドン置換）および相補的配列ならびに明示的に示された配列を暗黙的に包含する。具体的には、縮重コドン置換は、1つまたは複数の選択された（またはすべての）コドンの3番目の位置が混合塩基および／またはデオキシイノシン残基で置換されている配列を生成することにより達成することができる（Batzler et al. (1991) *Nucleic Acid Res.* 19:5081; Ohtsuka et al. (1985) *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608; Cassol et al. (1992); Rossolini et al. (1994) *Mol. Cell. Probes* 8:91-98)。核酸という用語は、遺伝子、遺伝子によりコードされるcDNAおよびmRNAと交換可能に使用される。本明細書で使用されるように、用語「核酸」、「核酸分子」、または「ポリヌクレオチド」は、DNA分子（例えば、cDNAまたはゲノムDNA）、RNA分子（例えば、mRNA）、ヌクレオチド類縁体を使用して生成されたDNAもしくはRNAの類縁体、ならびにそれらの誘導体、断片およびホモログを含むことが意図されている。

【0141】

本明細書で使用されるように、用語「発現ベクター」は、1つまたは複数の発現単位を含む直鎖もしくは環状の核酸分子を指す。1つまたは複数の発現単位に加えて、発現ベクターは、また、例えば、1つもしくは複数の複製起点または1つもしくは複数の選択可能なマーカーのような追加の核酸セグメントを含むことができる。発現ベクターは、一般に、プラスミドまたはウイルスDNAに由来するか、両方の要素を含むことができる。

【0142】

「パーセント同一性」は、2つの配列（例えば、アミノ酸配列または核酸配列）間の同一性の程度を指す。パーセント同一性は、2つの配列を整列させ、その配列間の同一性を最大にするためにギャップを導入することにより決定することができる。アラインメントは、当技術分野において既知であるプログラムを使用して生成することができる。本明細書における目的のため、ヌクレオチド配列のアラインメントは、デフォルトパラメータに設定されたblastnプログラムを用いて実行することができ、アミノ酸配列のアラインメントは、デフォルトパラメータに設定されたblastpプログラムを用いて実行することができる（ワールドワイドウェブ上のアメリカ国立生物工学情報センター（NCBI）、ncbi.nlm.nih.govを参照されたい）。

【0143】

本明細書で使用されるように、「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置き換えられているものである。側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野において定義されている。これらのファミリーは、塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非電化極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン）、ベーター分岐側鎖（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を有するアミノ酸を含む。ある実施形態において、抗体のCDR（複数を含む）内またはフレームワーク領域（複数を含む）内の1つまたは複数のアミノ酸残基は、類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置き換えることができる。

【0144】

本明細書で使用されるように、指定されたポリペプチドに「由来する」ポリペプチドまたはアミノ酸配列は、ポリペプチドの起源を指す。ある実施形態において、特定の配列（往々にして、「出発」または「親」または「親の」配列と呼ばれる）に由来するポリペプチドまたはアミノ酸配列は、出発配列またはその一部と本質的に同一であるアミノ酸配列

を有し、その部分は、少なくとも10～20個のアミノ酸、少なくとも20～30個のアミノ酸、または少なくとも30～50個のアミノ酸、または少なくとも50～150個のアミノ酸からなるか、そうでなければ、出発配列におけるその起源を有するものとして当業者に識別可能である。例えば、結合ドメインは、抗体、例えば、Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv、単ドメイン抗体(sdAb)などに由来することができる。

【0145】

別のポリペプチドに由来するポリペプチドは、出発ポリペプチドに関連して1つまたは複数の突然変異、例えば、別のアミノ酸残基で置換されているか、1つまたは複数のアミノ酸残基の挿入または欠失を有する1つまたは複数のアミノ酸残基を有することができる。ポリペプチドは、天然に存在しないアミノ酸配列を含むことができる。そのような変化は、必然的に、出発ポリペプチドと100%未満の配列同一性または類似性を有する。一実施形態において、変異体は、出発ポリペプチドのアミノ酸配列と約60%から100%未満のアミノ酸配列同一性または類似性のアミノ酸配列を有するであろう。別の実施形態において、変異体は、出発ポリペプチドのアミノ酸配列と約75%から100%未満、約80%から100%未満、約85%から100%未満、約90%から100%未満、約95%から100%未満のアミノ酸配列同一性または類似性のアミノ酸配列を有するであろう。

【0146】

本明細書で使用されるように、用語「宿主細胞」は、任意のタイプの細胞、例えば、初代細胞、培養中の細胞、または細胞株からの細胞であり得る。具体的な実施形態において、用語「宿主細胞」は、核酸分子でトランスフェクトされた細胞およびそのような細胞の子孫または潜在的な子孫を指す。そのような細胞の子孫は、例えば、後継世代もしくは核酸分子の宿主細胞ゲノムへの統合において生じる可能性がある突然変異または環境的影響により、核酸分子でトランスフェクトされた親細胞とは同一ではない可能性がある。

【0147】

「単離された」ポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、または組成物は、自然界には見られない形状である、ポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、または組成物である。単離されたポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞または組成物は、自然界で見られるような形状ではなくなっている程度まで精製されているものを含む。いくつかの実施形態において、単離された抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、または組成物は、実質的に純粋である。本明細書で使用されるように、「実質的に純粋」は、少なくとも50%純度である（すなわち、汚染物質がない）材料を指す。いくつかの場合において、材料は、少なくとも90%純度、少なくとも95%純度、少なくとも98%純度、または少なくとも99%純度である。

【0148】

用語「医薬製剤」は、有効成分の生物学的活性が効果的であることを可能にするような形状であり、製剤が投与される対象に対して容認できない程度の毒性がある追加の成分を含まない調製物を指す。製剤は、滅菌することができる。

【0149】

本明細書で使用されるように、用語「医薬適合性のある」は、当技術分野において周知である経路を使用して投与される場合、一般に、アレルギー性または他の深刻な有害反応を生じない分子実体および組成物を指す。連邦政府または州政府の規制当局により承認された、または米国薬局方もしくは動物、より具体的にはヒトにおける使用のための他の一般的に認められている薬局方にリストされている分子実体および組成物は、「医薬適合性のある」とみなされる。

【0150】

本明細書で使用されるように、用語「投与する」、「投与すること」、「投与」などは、薬剤、例えば、4-1BB/OX40抗体の、生物学的作用の所望の部位への送達（例えば、静脈内投与）を可能にするために使用することができる方法を指す。本明細書に記載の薬剤および方法を用いて使用することができる投与技術は、例えば、Goodman

および Gilman, The Pharmacological Basis of Therapeutics, current edition, Pergamon; ならびに Remington's, Pharmaceutical Sciences, current edition, Mack Publishing Co., Easton, Pa. において見出すことができる。

【0151】

本明細書で使用されるように、用語「対象」および「患者」は、交換可能に使用される。対象は、動物であり得る。いくつかの実施形態において、対象は、非ヒト動物のような哺乳動物（例えば、ウシ、ブタ、ウマ、ネコ、イヌ、ラット、マウス、サルまたは他の霊長類など）である。いくつかの実施形態において、対象は、ヒトである。本明細書で使

10

【0152】

用語「治療的有効量」は、対象における疾患または障害を処置するのに有効な薬剤、例えば、抗 4-1BB/OX40 抗体の量を指す。癌の場合において、治療的有効量の薬剤は、癌細胞の数を低減することができる；腫瘍のサイズまたは量を低減することができる；抹消臓器への癌細胞浸潤を阻害する（すなわち、ある程度まで遅延させる、ある実施形態において、停止する）ことができる；腫瘍転移を阻害する（すなわち、ある程度まで遅延させる、ある実施形態において、停止する）ことができる；腫瘍増殖をある程度阻害することができる；癌に関連する症状の1つまたは複数がある程度緩和することができる；および／または結果として増加した無増悪生存期間（PFS）、無病生存期間（DFS）、または全生存期間（OS）、完全奏効（CR）、部分奏効（PR）、またはいくつかの場合において、安定性疾患（SD）、進行性疾患（PD）の減少、短縮した無増悪期間（TTP）、またはそれらの任意の組み合わせのような好ましい応答となることができる。

20

【0153】

「処置すること」または「処置」または「処置するため」または「緩和すること」または「緩和するため」のような用語は、診断された病的状態または障害を治癒する、減速する、症状を軽減する、および／または進行を停止する治療法を指す。したがって、処置を必要とするものには、すでに障害と診断された、または障害を有する疑いがあるものが含まれる。ある実施形態において、患者が、以下：癌細胞の数の減少または完全な欠如；腫瘍サイズの減少；例えば、軟部組織および骨への癌の拡散を含む末梢器官への癌細胞の浸潤の阻害または欠如；腫瘍転移の阻害または欠如；腫瘍増殖の阻害または欠如；特定の癌に関連する1つまたは複数の症状の緩和；低下した疾病率および死亡率；生活の質における改善；腫瘍形成性、腫瘍形成頻度、または腫瘍の腫瘍形成能における低下；腫瘍内の癌幹細胞の数または頻度の減少；腫瘍形成性細胞の非腫瘍形成性状態への分化；増加した無増悪生存期間（PFS）、無病生存期間（DFS）、または全生存期間（OS）、完全奏効（CR）、部分奏効（PR）、安定性疾患（SD）、進行性疾患（PD）の減少、短縮した無増悪期間（TTP）、またはそれらの任意の組み合わせの1つまたは複数を示す場合、対象は、本発明の方法にしたがって癌の「処置」が成功する。

30

40

【0154】

用語「癌」および「癌性」は、細胞の集団が無秩序な細胞増殖により特徴づけられる哺乳動物の生理学的状態を参照または説明する。癌の例には、メラノーマ、腎癌、膀胱癌、肺癌、腸癌、前立腺癌、乳癌、肝癌、脳癌、および血液癌が含まれるが、これらに限定されない。癌は、原発性腫瘍であり得るか、進行癌もしくは転移性癌であり得る。

【0155】

癌は、固形腫瘍癌であり得る。用語「固形腫瘍」は、通常、嚢胞または液体領域を含まない異常な組織の塊を指す。固形腫瘍の例は、肉腫、癌腫、およびリンパ腫である。白血病（血液の癌）は、一般に固形腫瘍を形成しない。固形腫瘍は、OX40 および 4-1B

50

Bを発現する腫瘍浸潤リンパ球を含むことができる。

【0156】

本明細書で使用されるような、用語「a」および「an」が、別段の定めがない限り、「1つまたは複数の」列挙された成分を指す。

【0157】

特に明記されていない限り、または文脈から明らかでない限り、本明細書で使用されるように、用語「または」は、包括的であると理解されている。本明細書において「Aおよび／またはB」などの成句で使用されるような用語「および／または」は、「AおよびB」、「AまたはB」、「A」、および「B」の両方を含むことを意図する。同様に、「A、B、および／またはC」などの成句で使用されるような用語「および／または」は、以下の実施形態：A、B、およびC；A、B、またはC；AまたはC；AまたはB；BまたはC；AおよびC；AおよびB；BおよびC；A（単独）；B（単独）；ならびにC（単独）のそれぞれを包含することを意図する。

【0158】

本明細書において、実施形態が言葉「含んでいる」で説明される場合は常に、「からなる」および／または「本質的にからなる」の用語で説明される他の類似の実施形態も提供され、本出願の開示の一部であることが理解される。本開示において、「含む」、「含んでいる」、「含有している」および「有する」などは、米国特許法および欧州特許法においてそれらに帰する意味を有することができ、「含有する」、「含有している」などを意味することができる；「本質的なになること」または「本質的なになる」は同様に、米国特許法および欧州特許法に基づく意味を有する。米国特許法に関する限り、その用語は制限がなく、列挙されているが従来技術の実施形態を除くものよりも多くの存在により、列挙されているものの基本的または新規特徴が、変更されない限り、列挙されているものよりも多くの存在を可能にすることが認識されるべきである。欧州特許法に関する限り、「本質的なになること」または「実質的に含むこと」の使用は、特定のさらなる成分、すなわち、化合物または組成物の本質的な特徴に実質的に影響しない成分が存在し得ることを意味することが認識されるべきである。

【0159】

本明細書で使用されるように、用語「約」または「おおよそ」は、数値または数値範囲を変更するために使用される場合、値または範囲より最大5%上または5%下の偏差が、列挙された値または範囲の意図された意味の範囲内にあることを示す。

【0160】

本明細書で提供される任意のドメイン、成分、組成物、および／または方法は、本明細書で提供される他のドメイン、成分、組成物、および／または方法のいずれか1つまたは複数と組み合わせることができる。

II. 4-1BBおよびOX40抗体

【0161】

本明細書において、4-1BB抗体、OX40抗体、および4-1BB×OX40二重特異性抗体が提供される。4-1BB抗体および4-1BB×OX40二重特異性抗体は、ヒト4-1BBに特異的に結合する抗原結合ドメイン（すなわち、ヒト4-1BB抗原結合ドメイン）を含む。OX40抗体および4-1BB×OX40二重特異性抗体は、ヒトOX40に結合する抗原結合ドメイン（すなわち、ヒトOX40抗原結合ドメイン）を含む。4-1BB×OX40二重特異性抗体は、ヒト4-1BB結合ドメインおよびヒトOX40結合ドメインを含むことができる。4-1BB×OX40二重特異性抗体は、各標的について一価であり、すなわち、1つのヒト4-1BB結合ドメインおよび1つのヒトOX40結合ドメインを含む。二重特異性抗体は、また、一方または両方の標的タンパク質に対して二価であり得る、すなわち、2つの4-1BB結合ドメインおよび／または2つのOX40結合ドメインを含む。代表的な4-1BB×OX40二重特異性抗体フォーマットを図27に示す。

A. 4-1BB結合ドメイン

【0162】

本明細書において、4-1BB×OX40二重特異性抗体を会合させるために使用することができるヒト4-1BBに結合する抗原結合ドメイン（すなわち、4-1BB結合ドメイン）が提供される。4-1BB結合ドメインは、ヒト4-1BBへの結合に加えて、他の種からの4-1BB、例えば、カニクイザルおよび／またはマウス4-1BBに結合することができる。ある場合において、4-1BB結合ドメインは、ヒト4-1BBおよびカニクイザル4-1BBに結合する。

【0163】

4-1BB結合ドメインは、6つの相補性決定領域（CDR）、すなわち、可変重鎖（VH）CDR1、VH CDR2、VH CDR3、可変軽鎖（VL）CDR1、VL CDR2、およびVL CDR3を含むことができる。4-1BB結合ドメインは、可変重鎖（VH）および可変軽鎖（VL）を含むことができる。VHおよびVLは、別個のポリペプチドであり得るか、（例えば、scFvにおいて）同じポリペプチドの一部であり得る。

【0164】

ある実施形態において、本明細書に記載の4-1BB結合ドメインは、表Aおよび表Bに列記される6つのCDR（例えば、配列番号5～10または配列番号5、119、7、120、121、および122）の組み合わせを含む。

【0165】

【表2】

表A. 4-1BB VH CDRアミノ酸配列¹

VH CDR1 (配列番号)	VH CDR2 (配列番号)	VH CDR3 (配列番号)
GYTFTSYW (配列番号 5)	IYPSGGST (配列番号 6)	ASFSDGYYAYAMDY (配列番号 7)
GYTFTSYW (配列番号 5)	IYPGSSTT (配列番号 119)	ASFSDGYYAYAMDY (配列番号 7)

¹ CDRは、IMGTにしたがって決定される。

【0166】

【表3】

表B. 4-1BB VL CDRアミノ酸配列²

VL CDR1 (配列番号)	VL CDR2 (配列番号)	VL CDR3 (配列番号)
QSVSSY (配列番号 8)	YAS (配列番号 9)	QQGYNLPYT (配列番号 10)
QDISNY (配列番号 120)	YTS (配列番号 121)	QQGYTLPYT (配列番号 122)

² CDRは、IMGTにしたがって決定される。

【0167】

4-1BBについて一価である4-1BB×OX40二重特異性抗体は、上記表Aおよび表Bに列記される6つのCDR（例えば、配列番号5～10または配列番号5、119、7、120、121、および122）と組み合わせて単一の4-1BB結合ドメインを含むことができる。4-1BBについて二価である4-1BB×OX40二重特異性抗体は、それぞれ上記表Aおよび表Bに列記される6つのCDR（例えば、配列番号5～10または配列番号5、119、7、120、121、および122）の組み合わせを含む、

2つの4-1BB結合ドメインを含むことができる。

【0168】

本明細書に記載されるように、4-1BB結合は、表Cに列記される抗体のVHを含むことができる。

【0169】

【表4】

表C：4-1BB可変重鎖（VH）アミノ酸配列

配列番号	VH アミノ酸配列
17	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGL EWMGNIYPSGGSTNYAQKFQGRVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSED AVYYCASFSFGYYAYAMDYWGQGLTVTVSS
19	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWINWVKQRPGQGLE WIGNIYPSGSTTNYNEKFKSKATLTVDTSSTAYMQLSSLTSDDSAVF YCASFSFGYYAYAMDYWVQGTSTVTVSS
21	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTSYWINWVRQAPGQGLE WIGNIYPSGSTTNYNEKFKSRATLTVDTSSTAYMELSSLRSED YCASFSFGYYAYAMDYWGQGLTVTVSS
23	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGL EWMGNIYPSGSTTNYAQKFQGRVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSED AVYYCASFSFGYYAYAMDYWGQGLTVTVSS
32	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGL EWMGNIYPSGGSTNYAQKFQGRVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSED AVYYCASFSFGYYAYAMDYWGQGLTVTV
143	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCEASGYTFTSYWINWVKQRPGQGLE WIGNIYPSGSTTNYNEKFKSKATLTVDTSSTAYMQLSSLTSDDSAVF YCASFSFGYYAYAMDYWVQGTSTVTVSS

【0170】

本明細書に記載されるように、4-1BB結合ドメインは、表Cの配列と少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または100%の配列同一性を有するVHを含むことができ、任意で、VHは、それぞれ配列番号5～7のVH CDR1配列、VH CDR2配列、およびVH CDR3配列、またはそれぞれ配列番号5、119、および7のVH CDR1配列、VH CDR2配列、およびVH CDR3配列を含む。

【0171】

本明細書に記載されるように、4-1BB結合ドメインは、表CのVH配列のCDR、例えば、IMGT定義CDR、カバット定義CDR、コチア定義CDR、またはAbM定義CDRを含むVHを含むことができる。

【0172】

本明細書に記載されるように、4-1BB結合ドメインは、表Dに列記される抗体のVLを含むことができる。

【0173】

10

20

30

40

50

【表 5】

表 D：4－1 B B 可変軽鎖（V L）アミノ酸配列

配列番号	VL アミノ酸配列
18	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLNWYQQKPGQAPRLLI YYASRRHTGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQGYNLPY TFGQGTKVEIK
20	DIQMTQTTSSLSASLGDRVITITCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLI YYTSRLHSGVPSRFSGGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGYTLPY TFGGGTKLEIK
22	EIVMTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQDISNYLNWYQQKPGQAVRLLI YYTSRLHSGIPDRFSGSGSGTDYTLTISRLEPEDFAVYFCQQGYTLPYT FGQGTKVEIK
24	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISNYLNWYQQKPGQAVRLLI YYTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFAVYFCQQGYTLPYT FGQGTKVEIK

10

【0174】

本明細書に記載されるように、4－1 B B 結合ドメインは、表 D の配列と少なくとも約 70 %、少なくとも約 75 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、少なくとも約 99 %、または 100 % の配列同一性を有する V L を含むことができ、任意で、V L は、それぞれ配列 8～10 の V L C D R 1 配列、V L C D R 2 配列、および V L C D R 3 配列、またはそれぞれ配列番号 120～122 の V L C D R 1 配列、V L C D R 2 配列、および V L C D R 3 配列を含む。

20

【0175】

本明細書に記載されるように、4－1 B B 結合ドメインは、表 D の V L 配列の C D R、例えば、I M G T 定義 C D R、カバット定義 C D R、コチア定義 C D R、または A b M 定義 C D R を含む V L を含むことができる。

30

【0176】

本明細書に記載されるように、4－1 B B 結合ドメインは、表 C に列記される V H および表 D に列記される V L を含むことができる。4－1 B B について一価である 4－1 B B × O X 40 二重特異性抗体は、表 C に列記される V H および表 D に列記される V L を含む単一 4－1 B B 結合ドメインを含むことができる。4－1 B B について二価である 4－1 B B × O X 40 二重特異性抗体は、それぞれ表 C に列記される V H および表 D に列記される V L を含む、2 つの 4－1 B B 結合ドメインを含むことができる。表 C に列記される V H および表 D に列記される V L は、異なるポリペプチドであり得るか、同じポリペプチド上にあり得る。V H および V L が同じポリペプチド上にある場合、それらは、いずれかの方向（すなわち、V H－V L または V L－V H）であり得、それらは、リンカー（例えば、グリシン－セリンリンカー）により接続される可能性がある。ある実施形態において、V H および V L は、少なくとも 15 個のアミノ酸長（例えば、15～50 個のアミノ酸、15～40 個のアミノ酸、15～30 個のアミノ酸、15～25 個のアミノ酸または 15～20 個のアミノ酸）であるグリシン－セリンリンカーで接続される。ある実施形態において、V H および V L は、少なくとも 20 個のアミノ酸長（例えば、20～50 個のアミノ酸、20～40 個のアミノ酸、20～30 個のアミノ酸、または 20～25 個のアミノ酸）であるグリシン－セリンリンカーにより接続される。

40

【0177】

本明細書に記載されるように、4－1 B B 結合ドメインは、表 C の V H 配列の C D R、例えば、I M G T 定義 C D R、カバット定義 C D R、コチア定義 C D R、または A b M 定

50

義 C D R を含む V H および表 D の V L 配列の C D R、例えば、I M G T 定義 C D R、カバット定義 C D R、コチア定義 C D R、または A b M 定義 C D R を含む V L を含むことができる。

【0178】

ある実施形態において、4-1 B B 結合ドメインは、(i) 配列番号 17 のアミノ酸配列を含む V H (または配列番号 17 と少なくとも約 70%、少なくとも約 75%、少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99% 同一である配列、任意で、それぞれ配列番号 5~7 の V H C D R 1 配列、V H C D R 2 配列、および V H C D R 3 配列を含む V H)、ならびに (ii) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む V L (または配列番号 18 と少なくとも約 70%、少なくとも約 75%、少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99% 同一である配列、任意で、それぞれ配列番号 8~10 の V L C D R 1 配列、V L C D R 2 配列、および V L C D R 3 配列を含む V L) を含む。

10

【0179】

ある実施形態において、4-1 B B 結合ドメインは、(i) 配列番号 19 のアミノ酸配列を含む V H (または配列番号 19 と少なくとも約 70%、少なくとも約 75%、少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99% 同一である配列、任意で、それぞれ配列番号 5、119、および 7 の V H C D R 1 配列、V H C D R 2 配列、および V H C D R 3 配列を含む V H)、ならびに (ii) 配列番号 20 のアミノ酸配列を含む V L (または配列番号 20 と少なくとも約 70%、少なくとも約 75%、少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99% 同一である配列、任意で、それぞれ配列番号 120~122 の V L C D R 1 配列、V L C D R 2 配列、および V L C D R 3 配列を含む V L) を含む。

20

【0180】

ある実施形態において、4-1 B B 結合ドメインは、(i) 配列番号 21 のアミノ酸配列を含む V H (または配列番号 21 と少なくとも約 70%、少なくとも約 75%、少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99% 同一である配列、任意で、それぞれ配列番号 5、19、および 7 の V H C D R 1 配列、V H C D R 2 配列、および V H C D R 3 配列を含む V H)、ならびに (ii) 配列番号 22 のアミノ酸配列を含む V L (または配列番号 22 と少なくとも約 70%、少なくとも約 75%、少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99% 同一である配列、任意で、それぞれ配列番号 120~122 の V L C D R 1 配列、V L C D R 2 配列、および V L C D R 3 配列を含む V L) を含む。

30

【0181】

ある実施形態において、4-1 B B 結合ドメインは、(i) 配列番号 23 のアミノ酸配列を含む V H (または配列番号 23 と少なくとも約 70%、少なくとも約 75%、少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99% 同一である配列、任意で、それぞれ配列番号 5、119、および 7 の V H C D R 1 配列、V H C D R 2 配列、および V H C D R 3 配列を含む V H)、ならびに (ii) 配列番号 24 のアミノ酸配列を含む V L (または配列番号 24 と少なくとも約 70%、少なくとも約 75%、少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99% 同一である配列、任意で、それぞれ配列番号 120~122 の V L C D R 1 配列、V L

40

50

CDR2配列、およびVL CDR3配列を含むVL)を含む。

【0182】

ある実施形態において、4-1BB結合ドメインは、(i)配列番号32のアミノ酸配列を含むVH(または配列番号32と少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%同一である配列、任意で、それぞれ配列番号5~7のVH CDR1配列、VH CDR2配列、およびVH CDR3配列を含むVH)、ならびに(ii)配列番号18のアミノ酸配列を含むVL(または配列番号18と少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%同一である配列、任意で、それぞれ配列番号8~10のVL CDR1配列、VL CDR2配列、およびVL CDR3配列を含むVL)を含む。

10

【0183】

ある実施形態において、4-1BB結合ドメインは、(i)配列番号143のアミノ酸配列を含むVH(または配列番号143と少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%同一である配列、任意で、それぞれ配列番号5、119、および7のVH CDR1配列、VH CDR2配列、およびVH CDR3配列を含むVH)、ならびに(ii)配列番号20のアミノ酸配列を含むVL(または配列番号20と少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%同一である配列、任意で、それぞれ配列番号120~122のVL CDR1配列、VL CDR2配列、およびVL CDR3配列を含むVL)を含む。

20

【0184】

ある実施形態において、本明細書に記載の4-1BB結合ドメイン(例えば、scFv)は、ヒト4-1BBに結合し、表Eに記載のアミノ酸配列の1つを含む。

【0185】

30

40

50

【表 6】

表 E : 4 - 1 B B 結合配列

4-1BB 結合構築物	配列番号	VH 配列番号	VL 配列番号
FOB01143 scFv	42	21	22
FOB01143 完全構築物	43	21	22
FOB01188 scFv および FX01047 および FX01055 4-1BB scFv	44	23	24
FOB01188 完全構築物	45	23	24
FX01066, FXX01099, FXX01101, FXX01102, FXX01079, および FXX01110- FXX01121 4-1BB scFv	58	17	18
FXX01104, FXX01105, FXX01107, および FXX01108 4-1BB scFv	63	32	18
FOB01173 scFv	77	143	20
FOB01173 完全構築物	101	143	20
FXX01028	145	19	20

10

20

【0186】

本明細書に記載されるように、4 - 1 B B について一価である 4 - 1 B B × O X 4 0 二重特異性抗体は、表 E に列記される配列を含む単一の 4 - 1 B B 結合ドメインを含むことができる。4 - 1 B B について二価である 4 - 1 B B × O X 4 0 二重特異性抗体は、それぞれ表 E に列記される配列を含む、2 つの 4 - 1 B B 結合ドメインを含むことができる。

【0187】

本明細書に記載されるように、4 - 1 B B 結合ドメインは、表 E の配列と少なくとも約 7 0 %、少なくとも約 7 5 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 % 同一であるアミノ酸配列を含むことができ、任意で、その配列は、それぞれ配列番号 5 ~ 7 の V H C D R 1 配列、V H C D R 2 配列、および V H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 8 ~ 1 0 の V L C D R 1 配列、V L C D R 2 配列、および V L C D R 3 配列、またはそれぞれ配列番号 5、1 1 9、および 7 の V H C D R 1 配列、V H C D R 2 配列、および V H C D R 3 配列、ならびにそれぞれ配列番号 1 2 0 ~ 1 2 2 の V L C D R 1 配列、V L C D R 2 配列、および V L C D R 3 配列を含む。

30

【0188】

ある実施形態において、本明細書で提供される 4 - 1 B B 結合ドメインは、表 C の V H 配列（例えば、配列番号 1 7 を含む V H）および表 D の V L 配列（例えば、配列番号 1 8 を含む V L）を含む抗体の、ヒト 4 - 1 B B への結合を競合的に阻害する。

40

【0189】

ある実施形態において、本明細書で提供される 4 - 1 B B 結合ドメインは、ヒト 4 - 1 B B に対して、表 C の V H 配列（例えば、配列番号 1 7 を含む V H）および表 D の V L 配列（例えば、配列番号 1 8 を含む V L）を含む抗体としてヒト 4 - 1 B B の同じエピトープに特異的に結合する。

【0190】

ある実施形態において、本明細書で提供される 4 - 1 B B 結合ドメインは、4 - 1 B B

50

を刺激することができる。ある実施形態において、4-1BB×OX40二重特異性抗体中の本明細書で提供される4-1BB結合ドメインは、4-1BBおよびOX40両方の存在下で4-1BBのみを刺激する。

B. OX40結合ドメイン

【0191】

本明細書において、4-1BB×OX40二重特異性抗体を会合させるために使用することができるヒトOX40に結合する抗原結合ドメイン（すなわち、OX40結合ドメイン）が提供される。OX40結合ドメインは、ヒトOX40への結合に加えて、他の種からのOX40、例えば、カニクイザルおよび／またはマウスOX40に結合することができる。特定の場合において、OX40結合ドメインは、ヒトOX40およびカニクイザルOX40に結合する。

10

【0192】

OX40結合ドメインは、6つの相補性決定領域（CDR）、すなわち、可変重鎖（VH）CDR1、VH CDR2、VH CDR3、可変軽鎖（VL）CDR1、VL CDR2、およびVL CDR3を含むことができる。OX40結合ドメインは、可変重鎖（VH）および可変軽鎖（VL）を含むことができる。VHおよびVLは、別個のポリペプチドであり得るか、（例えば、scFvにおいて）同じポリペプチドの一部であり得る。

【0193】

ある実施形態において、本明細書に記載のOX40結合ドメインは、表Fおよび表Gに列記される6つのCDRを含む。

20

【0194】

【表7】

表F. OX40 VH CDRアミノ酸配列³

VH CDR1 (配列番号)	VH CDR2 (配列番号)	VH CDR3 (配列番号)
GFTLSYYG (配列番号 11)	ISHDGSDK (配列番号 12)	SNDQFDP (配列番号 13)

³ CDRは、IMGTにしたがって決定される。

30

【0195】

【表8】

表G. OX40 VL CDRアミノ酸配列⁴

VL CDR1 (配列番号)	VL CDR2 (配列番号)	VL CDR3 (配列番号)
NIGSKS (配列番号 14)	DDS (配列番号 15)	QVWDSSSDHVV (配列番号 16)

⁴ CDRは、IMGTにしたがって決定される。

40

【0196】

OX40について一価である4-1BB×OX40二重特異性抗体は、上記表Fおよび表Gに列記される6つのCDRを有する単一のOX40結合ドメインを含むことができる。OX40について二価である4-1BB×OX40二重特異性抗体は、それぞれ上記表Fおよび表Gに列記される6つのCDRを含む、2つのOX40結合ドメインを含むことができる。

【0197】

本明細書に記載されるように、OX40結合は、表Hに列記される抗体のVHを含むことができる。

【0198】

50

【表 9】

表 H：O X 4 0 可変重鎖（V H）アミノ酸配列

配列番号	VH アミノ酸配列
25	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSYYGMHWVRQAPGKGLE WVAVISHDGS DKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMDSLRAEDTA L YYCSNDQFDPWGQGTLVTVSS
27	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSYYGMHWVRQAPGKGLE WVAVISHDGS DKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA V YYCSNDQFDPWGQGTLVTVSS
29	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSYYGMHWVRQAPGKGLE WVAAISHDGS DKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA V YYCSNDQFDPWGQGTLVTVSS
31	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSYYGMHWVRQAPGKGLE WVAAISHDGS DKYYADSVKGRFTISRDN SKNRLYLQMNSLRAEDTA V YYCSNDQFDPWGQGTLVTVSS
33	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSYYGMHWVRQAPGKGLE WVAVISHDGS DKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA V YYCSNDQFDPWGQGTLVTV

10

20

【0199】

本明細書に記載されるように、O X 4 0 結合ドメインは、表 H の配列と少なくとも約 7 0 %、少なくとも約 7 5 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %、または 1 0 0 % の配列同一性を有する V H を含むことができ、任意で、V H は、それぞれ配列番号 1 1 ～ 1 3 の V H C D R 1 配列、V H C D R 2 配列、および V H C D R 3 配列を含む。

【0200】

本明細書に記載されるように、O X 4 0 結合ドメインは、表 H の V H 配列の C D R、例えば、I M G T 定義 C D R、カバット定義 C D R、コチア定義 C D R を含む V H を含むことができる。

【0201】

本明細書に記載されるように、O X 4 0 結合ドメインは、表 I に列記される抗体の V L を含むことができる。

【0202】

30

40

50

【表 10】

表 I : 可変軽鎖 (V L) アミノ酸配列

配列番号	VL アミノ酸配列
26	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWFQQKPGQAPALVV YDDSGRPSGIPERFSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSD HVVFEGGGTKLTVL
28	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVNWFQQKPGQAPVLVV YDDSGRPSGIPERFSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSD HVVFEGGGTKLTVL
30	SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVNWFQQKPGQAPVLVV YDDSGRPSGIPERFSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSD HVVFEGGGTKLTVL
34	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVNWFQQKPGQAPVLVV YDDSGRPSGIPARFSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSD HVVFEGGGTKLTVL
35	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVNWFQQKPGQAPVLVV YDDSGRPSGVPNRFSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSS DHVVFEGGGTKLTVL
36	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVNWFQQKPGQAPVLVV YDDSGRPSGVPSRFSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSS DHVVFEGGGTKLTVL
37	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVNWFQQKPGQAPVLVV YDDSGRPSGIPKRFSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSD HVVFEGGGTKLTVL
38	SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVNWFQQKPGQAPVLVV YDDSGRPSGIPARFSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSD HVVFEGGGTKLTVL
39	SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVNWFQQKPGQAPVLVV YDDSGRPSGVPNRFSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSS DHVVFEGGGTKLTVL
40	SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVNWFQQKPGQAPVLVV YDDSGRPSGVPSRFSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSS DHVVFEGGGTKLTVL
41	SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVNWFQQKPGQAPVLVV YDDSGRPSGIPKRFSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSD HVVFEGGGTKLTVL

10

20

30

40

【0203】

本明細書に記載されるように、OX40結合ドメインは、表Iの配列と少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または100%の配列同一性を有するVLを含むことができ、任意で、VLは、それぞれ配列番号14～16のVL CDR1配列、VL CDR2配列、およびVL CDR3配列を含む。

【0204】

本明細書に記載されるように、OX40結合ドメインは、表IのVL配列のCDR、例

50

例えば、IMGT定義CDR、カバット定義CDR、コチア定義CDR、またはAbM定義CDRを含むVLを含むことができる。

【0205】

本明細書に記載されるように、OX40結合ドメインは、表Hに列記されるVHおよび表Iに列記されるVLを含むことができる。4-1BBについて一価である4-1BB×OX40二重特異性抗体は、表Hに列記されるVHおよび表Iに列記されるVLを含む単一4-1BB結合ドメインを含むことができる。4-1BBについて二価である4-1BB×OX40二重特異性抗体は、それぞれ表Hに列記されるVHおよび表Iに列記されるVLを含む、2つの4-1BB結合ドメインを含むことができる。表Hに列記されるVHおよび表Iに列記されるVLは、異なるポリペプチドであり得るか、同じポリペプチド上にあり得る。VHおよびVLが同じポリペプチド上にある場合、それらは、いずれかの方向（すなわち、VH-VLまたはVL-VH）であり得、それらは、リンカー（例えば、グリシン-セリンリンカー）により接続される可能性がある。ある実施形態において、VHおよびVLは、少なくとも15個のアミノ酸長（例えば、15～50個のアミノ酸、15～40個のアミノ酸、15～30個のアミノ酸、15～25個のアミノ酸または15～20個のアミノ酸）であるグリシン-セリンリンカーで接続される。ある実施形態において、VHおよびVLは、少なくとも20個のアミノ酸長（例えば、20～50個のアミノ酸、20～40個のアミノ酸、20～30個のアミノ酸、または20～25個のアミノ酸）であるグリシン-セリンリンカーにより接続される。

【0206】

本明細書に記載されるように、OX40結合ドメインは、表HのVH配列のCDR、例えば、IMGT定義CDR、カバット定義CDR、コチア定義CDR、またはAbM定義CDRを含むVH、および表IのVL配列のCDR、例えば、IMGT定義CDR、カバット定義CDR、コチア定義CDR、またはAbM定義CDRを含むVLを含むことができる。

【0207】

ある実施形態において、OX40結合ドメインは、(i) 配列番号25のアミノ酸配列を含むVH（または配列番号25と少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%同一である配列、任意で、それぞれ配列番号11～13のVH CDR1配列、VH CDR2配列、およびVH CDR3配列を含むVH）、ならびに(ii) 配列番号26のアミノ酸配列を含むVL（または配列番号18と少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%同一である配列、任意で、それぞれ配列番号14～16のVL CDR1配列、VL CDR2配列、およびVL CDR3配列を含むVL）を含む。

【0208】

ある実施形態において、OX40結合ドメインは、(i) 配列番号27のアミノ酸配列を含むVH（または配列番号27と少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%同一である配列、任意で、それぞれ配列番号11～13のVH CDR1配列、VH CDR2配列、およびVH CDR3配列を含むVH）、ならびに(ii) 配列番号28のアミノ酸配列を含むVL（または配列番号28と少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%同一である配列、任意で、それぞれ配列番号14～16のVL CDR1配列、VL CDR2配列、およびVL CDR3配列を含むVL）を含む。

【0209】

ある実施形態において、OX40結合ドメインは、(i) 配列番号29のアミノ酸配列を含むVH（または配列番号29と少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%同一である配列、任意で、それぞれ配列番号11～13のVH CDR1配列、VH CDR2配列、およびVH CDR3配列を含むVH）、ならびに(ii) 配列番号28のアミノ酸配列を含むVL（または配列番号28と少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%同一である配列、任意で、それぞれ配列番号14～16のVL CDR1配列、VL CDR2配列、およびVL CDR3配列を含むVL）を含む。

10

【0210】

ある実施形態において、OX40結合ドメインは、(i) 配列番号29のアミノ酸配列を含むVH（または配列番号29と少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%同一である配列、任意で、それぞれ配列番号11～13のVH CDR1配列、VH CDR2配列、およびVH CDR3配列を含むVH）、ならびに(ii) 配列番号26、30、および34～37のいずれか1つのアミノ酸配列を含むVL（または配列番号28および34～37のいずれか1つと少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%同一である配列、任意で、それぞれ配列番号14～16のVL CDR1配列、VL CDR2配列、およびVL CDR3配列を含むVL）を含む。

20

【0211】

ある実施形態において、OX40結合ドメインは、(i) 配列番号31のアミノ酸配列を含むVH（または配列番号31と少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%同一である配列、任意で、それぞれ配列番号11～13のVH CDR1配列、VH CDR2配列、およびVH CDR3配列を含むVH）、ならびに(ii) 配列番号28、30、および34～41のいずれか1つのアミノ酸配列を含むVL（または配列番号28、30、および34～41のいずれか1つと少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%同一である配列、任意で、それぞれ配列番号14～16のVL CDR1配列、VL CDR2配列、およびVL CDR3配列を含むVL）を含む。

30

【0212】

ある実施形態において、OX40結合ドメインは、(i) 配列番号33のアミノ酸配列を含むVH（または配列番号33と少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%同一である配列、任意で、それぞれ配列番号11～13のVH CDR1配列、VH CDR2配列、およびVH CDR3配列を含むVH）、ならびに(ii) 配列番号28のアミノ酸配列を含むVL（または配列番号28と少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%同一である配列、任意で、それぞれ配列番号14～16のVL CDR1配列、VL CDR2配列、およびVL CDR3配列を含むVL）を含む。

40

【0213】

50

ある実施形態において、本明細書に記載のOX40結合ドメイン（例えば、scFv）は、ヒトOX40に結合し、表Jに記載のアミノ酸配列の1つを含む。

【0214】

【表11】

表J：OX40結合配列

OX40 結合構築物	配列番号	VH 配列番号	VL 配列番号
OXF169 および OXF170 scFv	46	25	26
OXF171 および OXF172 scFv	47	25	26
OXF169 完全構築物	48	25	26
OXF170 完全構築物	49	25	26
OXF171 完全構築物	50	25	26
OXF172 完全構築物	51	25	26
OXF01099 scFv	52	27	28
OXF01099 完全構築物	53	27	28
OXF01115 scFv	54	29	28
OXF01115 完全構築物	55	29	28
OXF01122 scFv	56	25	26
OXF01122 完全構築物	57	25	26
OXF01070 scFv -Fc	102	25	26
FX01066, FX01104, および FX01047 抗 OX40 scFv	59	29	28
FX01099 および FX01105 抗 OX40 scFv	60	29	30
FX01101 および FX01107 抗 OX40 scFv	61	31	28
FX01102 抗 OX40 scFv	62	31	30
FXX01055 および FX01079 抗 OX40 scFv	64	33	28
FXX01110 抗 OX40 scFv	65	29	34
FXX01111 抗 OX40 scFv	66	29	35
FXX01112 抗 OX40 scFv	67	29	36
FXX01113 抗 OX40 scFv	68	29	37
FXX01114 抗 OX40 scFv	69	31	34
FXX01115 抗 OX40 scFv	70	31	35

10

20

30

40

50

FXX01116 抗 OX40 scFv	71	31	36
FXX01117 抗 OX40 scFv	72	31	37
FXX01118 抗 OX40 scFv	73	31	38
FXX01119 抗 OX40 scFv	74	31	39
FXX01120 抗 OX40 scFv	75	31	40
FXX01121 抗 OX40 scFv	76	31	41
FXX01028 抗 OX40 scFv	146	25	26

10

【0215】

本明細書に記載されるように、OX40について一価である4-1BB×OX40二重特異性抗体は、表Jに列記される配列を含む単一OX40結合ドメインを含むことができる。OX40について二価である4-1BB×OX40二重特異性抗体は、それぞれ表Jに列記される配列を含む、2つのOX40結合ドメインを含むことができる。

【0216】

本明細書に記載されるように、OX40結合ドメインは、表Jの配列と少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%同一であるアミノ酸配列を含むことができ、任意で、その配列は、それぞれ配列番号11～13のVH CDR1配列、VH CDR2配列、およびVH CDR3配列、ならびにそれぞれ配列番号14～16のVL CDR1配列、VL CDR2配列、およびVL CDR3配列を含む。

20

【0217】

ある実施形態において、本明細書で提供されるOX40結合ドメインは、表HのVH配列（例えば、配列番号29を含むVH）および表IのVL配列（例えば、配列番号28を含むVL）を含む抗体の、ヒトOX40への結合を競合的に阻害する。

【0218】

ある実施形態において、本明細書で提供されるOX40結合ドメインは、ヒトOX40に対して、表HのVH配列（例えば、配列番号29を含むVH）および表IのVL配列（例えば、配列番号28を含むVL）を含む抗体としてヒトOX40の同じエピトープに特異的に結合する。

30

【0219】

ある実施形態において、本明細書で提供されるOX40結合ドメインは、OX40を刺激することができる。「可能である」とは、OX40結合ドメインが、活性を実行することができるが、当業者が理解することができる適切な条件下でのみそのようにすることができることを意味する。ある実施形態において、4-1BB×OX40二重特異性抗体中の本明細書で提供されるOX40結合ドメインは、4-1BBおよびOX40両方の存在下でOX40のみを刺激する。

C. 4-1BBおよび／またはOX40結合ドメイン

40

【0220】

4-1BBまたはOX40結合ドメインにおいて、VH CDRまたはVHおよびVL CDRまたはVLは、別個のポリペプチドであり得るか、同じポリペプチド上にあり得る。VH CDRまたはVHおよびVL CDRまたはVLは、同じポリペプチド上にあり、それらは、いずれかの方向（すなわち、VH-VLまたはVL-VH）であり得る。

【0221】

VH CDRまたはVHおよびVL CDRまたはVLが、同じポリペプチド上にある場合、それらは、リンカー（例えば、グリシン-セリンリンカー）により接続される可能性がある。VHは、リンカー配列のN末端に配置することができ、VLは、リンカー配列のC末端に配置することができる。代わりに、VLは、リンカー配列に対してN末端に配置

50

することができ、VHは、リンカー配列に対してC末端に配置することができる。

【0222】

VH領域およびVL領域を結合するためのペプチドリンカーの使用は、当技術分野において周知であり、この特定の分野内で多くの出版物が存在する。いくつかの実施形態において、ペプチドリンカーは、Gly-Gly-Gly-Gly-Serアミノ酸配列（(Gly₄Ser)₃）（配列番号116）の3つのリピートからなる15merである。他のリンカーが使用されており、ファージディスプレイ技術、ならびに選択的感染性ファージ技術が、適切なリンカー配列を多様化および選択するために使用されてきている（Tang et al., J. Biol. Chem. 271, 15682-15686, 1996; Hennecke et al., Protein Eng. 11, 405-410, 1998）。ある実施形態において、VH領域およびVL領域は、式（Gly₄Ser）_nを含むアミノ酸配列を有するペプチドリンカーにより結合され、n=1~5（配列番号117）である。ある実施形態において、n=3~10である。ある実施形態において、n=3~5である。ある実施形態において、n=4~10である。ある実施形態において、n=4~5である。ある実施形態において、n=4である。他の適切なリンカーは、ランダム突然変異導入を通じて、単純なリンカー（例えば、（Gly₄Ser）_n）を最適化することにより得ることができ、n=1~5（配列番号117）である。

10

【0223】

4-1BBおよび／またはOX40結合ドメインは、ヒト化結合ドメインであり得る。4-1BBおよび／またはOX40結合ドメインは、ラット結合ドメインであり得る。4-1BBおよび／またはOX40結合ドメインは、マウス結合ドメインであり得る。ある実施形態において、4-1BB×OX40二重特異性抗体は、ヒト化4-1BB結合ドメインおよびラットOX40結合ドメインを含む。ある実施形態において、4-1BB×OX40二重特異性抗体は、ヒト化4-1BB結合ドメインおよびマウスOX40結合ドメインを含む。ある実施形態において、4-1BB×OX40二重特異性抗体は、ヒト化4-1BB結合ドメインおよびヒト化OX40結合ドメインを含む。

20

【0224】

4-1BBおよび／またはOX40結合ドメインは、scFvであり得る。ある実施形態において、4-1BB×OX40二重特異性抗体内のすべての4-1BBおよびOX40結合ドメインは、scFvである。ある実施形態において、4-1BB×OX40二重特異性抗体内の1つの4-1BB結合および1つのOX40結合ドメインは、scFvである。ある実施形態において、4-1BB×OX40二重特異性抗体内の少なくとも1つの4-1BBまたはOX40結合ドメインは、scFvである。ある実施形態において、ポリペプチドは、4-1BB結合ドメイン（例えば、scFv）およびOX40結合ドメイン（例えば、scFv）を含む。

30

【0225】

4-1BBおよび／またはOX40結合ドメインは、別個のポリペプチド鎖にVHおよびVLを含むことができる。ある実施形態において、4-1BB×OX40二重特異性抗体中のすべての4-1BBおよびOX40結合ドメインは、別個のポリペプチド鎖にVHおよびVLを含む。ある実施形態において、4-1BB×OX40二重特異性抗体中の少なくとも1つの4-1BBまたはOX40結合ドメインは、別個のポリペプチド鎖にVHおよびVLを含む。

40

D. 4-1BB×OX40二重特異性抗体

【0226】

本明細書において、ヒト4-1BBおよびヒトOX40に結合する二重特異性抗体（4-1BB×OX40二重特異性抗体）が提供される。そのような二重特異性抗体は、少なくとも1つの4-1BB結合ドメインおよび少なくとも1つのヒトOX40結合ドメインを含む。二重特異性抗体内の4-1BB結合ドメインは、例えば、上で議論された任意の4-1BB結合ドメインを含む、任意のヒト4-1BB結合ドメインであり得る。二重特異性抗体内のOX40結合ドメインは、例えば、上で議論された任意のOX40結合ドメ

50

インを含む、任意のヒト O X 4 0 結合ドメインであり得る。

【0227】

ある実施形態において、本明細書で提供される 4-1 B B × O X 4 0 二重特異性抗体は、同時に 4-1 B B および O X 4 0 に結合することができる。

【0228】

ある実施形態において、本明細書で提供される 4-1 B B × O X 4 0 二重特異性抗体は、T細胞同時刺激経路を刺激することができる。ある実施形態において、本明細書で提供される 4-1 B B × O X 4 0 二重特異性抗体は、O X 4 0 の存在下でのみ 4-1 B B を刺激することができる。ある実施形態において、本明細書で提供される 4-1 B B × O X 4 0 二重特異性抗体は、4-1 B B の存在下でのみ O X 4 0 を刺激することができる。

10

【0229】

ある実施形態において、本明細書で提供される 4-1 B B × O X 4 0 抗体は、ナチュラルキラー (NK) 細胞増殖を高めることができる。ある実施形態において、本明細書で提供される 4-1 B B × O X 4 0 二重特異性抗体は、T細胞増殖を高めることができる。ある実施形態において、本明細書で提供される 4-1 B B × O X 4 0 二重特異性抗体は、C D 8 T細胞増殖を高めることができる。ある実施形態において、本明細書で提供される 4-1 B B × O X 4 0 二重特異性抗体は、C D 4 T細胞増殖を高めることができる。ある実施形態において、本明細書で提供される 4-1 B B × O X 4 0 二重特異性抗体は、C D 8 T細胞増殖および C D 4 T細胞増殖を高めることができる。ある実施形態において、本明細書で提供される 4-1 B B × O X 4 0 二重特異性抗体は、NK細胞増殖およびT細胞増殖を高めることができる。

20

【0230】

ある実施形態において、4-1 B B × O X 4 0 二重特異性抗体は、4-1 B B および O X 4 0 を同時刺激する。ある実施形態において、4-1 B B × O X 4 0 二重特異性抗体は、T細胞の相乗的な同時刺激を提供する。ある実施形態において、4-1 B B × O X 4 0 二重特異性抗体は、相乗的な腫瘍溶解を提供する。ある実施形態において、4-1 B B × O X 4 0 二重特異性抗体は、抗腫瘍免疫応答を増強する相乗効果を提供する。

【0231】

ある実施形態において、4-1 B B × O X 4 0 二重特異性抗体は、T細胞活性化を強化する、および／またはT細胞生存を延長する。

30

【0232】

ある実施形態において、4-1 B B × O X 4 0 二重特異性抗体は、2つの4-1 B B 結合ドメインおよび2つのO X 4 0 結合ドメインを含む。4-1 B B × O X 4 0 二重特異性抗体は、同じ標的（例えば、4-1 B B または O X 4 0）に結合する2つの抗原結合ドメインを含み、それらの2つの抗原結合ドメインは、同じアミノ酸配列（複数を含む）を含むことができるか、異なるアミノ酸配列を含むことができる。ある実施形態において、2つの4-1 B B 結合ドメインは、同じアミノ酸配列（複数を含む）を含む。ある実施形態において、2つのO X 4 0 結合ドメインは、同じアミノ酸配列（複数を含む）を含む。ある実施形態において、2つの4-1 B B 結合ドメインは、同じ酸配列（複数を含む）を含み、2つのO X 4 0 結合ドメインは、同じアミノ酸配列（複数を含む）を含む。

40

【0233】

本明細書で提供されるような4-1 B B × O X 4 0 二重特異性抗体は、2つの異なるモノクローナル抗体を化学的に結合することにより、またはハイブリッド-ハイブリドーマを産生するために2つのハイブリドーマ細胞株を融合することにより、調製することができる。使用することができる他の多価のフォーマットには、例えば、クアドローマ、K λ ボディ、d A b、ダイアボディ、T a n d A b、ナノボディ、小モジュラー免疫医薬品 (S M I P (商標))、D O C K - A N D - L O C K (登録商標) (D N L (登録商標))、C r o s s M a b F a b、C r o s s M a b V H - V L、鎖交換エンジニアード・ドメインボディ (S E E D ボディ)、A f f i b o d y、F y n o m e r、クニツツドメイン、A l b u - d a b、交換されたV Hを有する2つの改変F vフラグメント（例えば、

50

二重親和性再標的化分子 (D. A. R. T))、 $scFv \times scFv$ (例えば、BiTE)、DVD-IG、Covx-body、ペプチボディ、 $scFv-Ig$ 、SVD-Ig、dAb-Ig、ノブ-イン-ホール (Knobs-in-Holes)、CH3ドメイン内に一致した突然変異を含むIgG1抗体 (例えば、Duobody抗体) およびtriomAbが含まれる。代表的な二重特異性フォーマットは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Garber et al., Nature Reviews Drug Discovery 13:799-801 (2014) において議論されている。追加の代表的な二重特異性フォーマットは、それぞれ、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Liu et al. Front. Immunol. 8:38 doi:10.2289/fimmu.2017.00038、ならびにBrinkmannおよびKontermann, MABS 9:2, 182-212 (2017) において議論されている。ある実施形態において、二重特異性抗体は、 $F(ab')_2$ フラグメントであり得る。 $F(ab')_2$ フラグメントは、ヒンジ領域のジスルフィド結合により結合された四量体抗体分子の2つの抗原結合アームを含む。

【0234】

本明細書において開示される4-1BB $\times$ OX40二重特異性抗体は、多重特異性結合タンパク質足場を組み込むことができる。足場を使用する多重特異性結合タンパク質は、例えば、それぞれ、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、PCT出願公開WO2007/146968号、米国特許出願公開第2006/0051844号、PCT出願公開WO2010/040105号、PCT出願公開WO2010/003108号、米国特許第7,166,707号、および米国特許第8,409,577号において開示されている。4-1BB $\times$ OX40二重特異性抗体は、2つの結合ドメイン (そのドメインは、同じまたは異なる標的を特異的に結合するように設計することができる)、ヒンジ領域、リンカー (例えば、カルボキシル末端またはアミノ末端リンカー)、および免疫グロブリン定常領域を含むことができる。4-1BB $\times$ OX40二重特異性抗体は、2つの同一のジスルフィド結合ポリペプチドを含むホモ二量体タンパク質であり得る。

【0235】

一実施形態において、4-1BB $\times$ OX40二重特異性抗体は、各ペプチドが、順にアミノ末端からカルボキシル末端に、第1抗原結合ドメイン、リンカー (例えば、リンカーは、ヒンジ領域である)、免疫グロブリン定常領域、および第2抗原結合ドメインを含む、2つのポリペプチドを含む。図27は、この配置での4-1BB $\times$ OX40二重特異性抗体を示す。この配置は、本明細書において、ADAPTIR (商標) フォーマットとも呼ばれる。

【0236】

いくつかの実施形態において、4-1BB $\times$ OX40二重特異性抗体は、順にアミノ末端からカルボキシル末端に、4-1BB結合ドメイン (例えば、 $scFv$)、リンカー (例えば、リンカーは、ヒンジ領域である)、免疫グロブリン定常領域、リンカー、およびOX40結合ドメイン (例えば、 $scFv$) を含むポリペプチドを含む。ある実施形態において、4-1BB結合ドメイン (例えば、 $scFv$) は、順にアミノ末端からカルボキシル末端に、VH、リンカー (例えば、グリシン-セリンリンカー)、およびVLを含む。ある実施形態において、4-1BB結合ドメインおよび免疫グロブリン定常領域の間のリンカーは、ヒンジであり、ヒンジは、IgG1ヒンジである。ある実施形態において、免疫グロブリン定常領域は、CH2ドメインおよびCH3ドメインを含む。ある実施形態において、OX40結合ドメイン (例えば、 $scFv$) は、順にアミノ末端からカルボキシル末端に、VL、リンカー (例えば、グリシン-セリンリンカー)、およびVHを含む。

【0237】

したがって、いくつかの実施形態において、4-1BB $\times$ OX40二重特異性抗体は、順にアミノ末端からカルボキシル末端に、4-1BB結合ドメインのVH、リンカー (例えば、グリシン-セリンリンカー)、4-1BB結合ドメインのVL、IgG1ヒンジ、CH2ドメインおよびCH3ドメインを含む免疫グロブリン定常領域、リンカー (例えば

、グリシンーセリンリンカー）、OX40結合ドメインのVL、リンカー（例えば、グリシンーセリンリンカー）、およびOX40結合ドメインのVHを含むポリペプチドを含む。いくつかの実施形態において、4-1BB×OX40二重特異性抗体は、そのようなポリペプチドの二量体を含む。

【0238】

いくつかの実施形態において、4-1BB×OX40二重特異性抗体は、例えば、米国特許出願公開第2003/0133939号、第2003/0118592号、および第2005/0136049号において一般に開示されているようなタンパク質足場を含む。4-1BB×OX40二重特異性抗体は、それぞれ、順にアミノ末端からカルボキシル末端に：第1抗原結合ドメイン、リンカー（例えば、リンカーは、ヒンジ領域である）、および免疫グロブリン定常領域を含む、2つのペプチドの二量体（例えば、ホモ二量体）を含む可能性がある。他の実施形態において、4-1BB×OX40二重特異性抗体は、例えば、米国特許出願公開第2009/0148447号において一般に開示されているようなタンパク質足場を含む。4-1BB/OX40抗体は、それぞれ、順にアミノ末端からカルボキシル末端に：免疫グロブリン定常領域、リンカー（例えば、リンカーは、ヒンジ領域である）および第1抗原結合ドメインを含む、2つのポリペプチドの二量体（例えば、ホモ二量体）を含む可能性がある。

【0239】

いくつかの実施形態において、4-1BB×OX40二重特異性抗体は、scFvである2つの抗原結合ドメインならびに別個のポリペプチド上にVHおよびVLを含む2つの抗原結合ドメインを含む。そのような実施形態において、scFvは、VHを含むポリペプチドのN末端またはC末端に融合させることができる。scFvは、また、VLを含むポリペプチドのN末端またはC末端に融合させることもできる。

【0240】

本発明の追加の代表的な二重特異性抗体分子は、(i) それぞれ、2つの異なる抗原結合領域を含み、1つが4-1BBに対する特異性を備え、1つがOX40に対する特異性を備える2つのアームを有する抗体、(ii) 1つの抗原結合領域または4-1BBに対して特異的なアームおよび第2抗原結合領域またはOX40に対して特異的なアームを有する抗体、(iii) 例えば、追加のペプチドリンカーによりタンデムに結合された2つのscFvを介して4-1BBに対する第1特異性およびOX40に対する第2特異性を有する単鎖抗体；(iv) 各軽鎖および重鎖が、短いペプチド結合を通じてタンデム内に2つの可変ドメインを含む、二重可変ドメイン抗体(DVD-Ig) (Wu et al., *Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig (商標) Molecule, In: Antibody Engineering, Springer Berlin Heidelberg (2010))*); (v) 化学的に結合した二重特異性F(ab')₂フラグメント；(vi) 2つの単鎖ダイアボディの融合であり、結果として、標的抗原のそれぞれについて2つの結合部位を有する四価の二重特異性抗体となるTandab；(vii) scFvの、結果として多価分子となるダイアボディとの組み合わせであるフレキシボディ；(viii) Fabに適用する場合、異なるFabフラグメントに結合した2つの同一なFabフラグメントからなる三価の二重特異性タンパク質を生じることができるプロテインキナーゼAにおける「二量体化およびドッキングドメイン」に基づく、いわゆる「ドックアンドロック」分子；(ix) 例えば、ヒトFabアームの両端に融合した2つのscFvを含むいわゆるスコピオン分子；ならびに(x) ダイアボディを含む。

【0241】

二重特異性抗体の異なるクラスの例には、ヘテロ二量体化を強制するための相補的CH3ドメインを有するIgG様分子；分子の2つの部位それぞれが2つの異なる抗体のFabフラグメントまたはFabフラグメントの一部を含む、組換えIgG様二重標的化分子；完全長IgG抗体が追加のFabフラグメントまたはFabフラグメントの一部に融合

10

20

30

40

50

されている、IgG融合分子；単鎖Fv分子または安定化ダイアボディが重鎖定常ドメイン、Fc領域またはその一部に融合しているFc融合分子；異なるFabフラグメントと一緒に融合している、Fab融合分子；異なる単鎖Fv分子または異なるダイアボディまたは異なる重鎖抗体（例えば、ドメイン抗体、ナノボディ）が互いに、または別のタンパク質もしくは担体分子に融合している、ScFv系およびダイアボディ系の重鎖抗体（例えば、ドメイン抗体、ナノボディ）が含まれるが、これらに限定されない。

【0242】

Fab融合二重特異性抗体の例には、F(ab)₂（メダレックス／AMGEN）、二重作用またはビスFab（ジェネンテック）、ドック－アンド－ロック（Dock-and-Lock）（DNL）（イミュノメディクス）、二価二重特異性（Biotecnol）およびFab－Fv（UCB－セルテック）が含まれるが、これらに限定されない。ScFv系、ダイアボディ系のドメイン抗体の例には、二重特異性T細胞誘導抗体（BITE）（マイクロメット、タンデムダイアボディ（Tandab）（Affimed）、二重親和性再標的化技術（D.A.R.T）（マクロジェニクス）、単鎖ダイアボディ（アカデミック）、TCR様抗体（AIT、ReceptorLogics）、ヒト血清アルブミンScFv融合（メリマク）およびCOMBODY（Epigen Biotech）、二重標的化ナノボディ（Ablynx）、および二重標的化重鎖オンリードメイン抗体が含まれるが、これらに限定されない。

【0243】

本明細書で提供されるように、4－1BB×OX40二重特異性抗体は、それぞれ配列番号5～7の4－1BB VH CDR1配列、CDR2配列、およびCDR3配列、それぞれ配列番号8～10の4－1BB VL CDR1配列、CDR2配列、およびCDR3配列、それぞれ配列番号11～13のOX40 VH CDR1配列、CDR2配列、およびCDR3配列、ならびにそれぞれ配列番号14～16のOX40 VL CDR1配列、CDR2配列、およびCDR3配列を含むことができる。

【0244】

本明細書で提供されるように、4－1BB×OX40二重特異性抗体は、それぞれ配列番号5、119、および7の4－1BB VH CDR1配列、CDR2配列、およびCDR3配列、それぞれ配列番号120～122の4－1BB VL CDR1配列、CDR2配列、およびCDR3配列、それぞれ配列番号11～13のOX40 VH CDR1配列、CDR2配列、およびCDR3配列、ならびに配列番号14～16のOX40 VL CDR1配列、CDR2配列、およびCDR3配列を含むことができる。

【0245】

本明細書で提供されるように、4－1BB×OX40二重特異性抗体は、本明細書で提供される4－1BB VHおよびVL配列ならびにOX40 VHおよびVL配列の任意の組み合わせを含むことができる。

【0246】

例えば、4－1BB×OX40二重特異性抗体は、4－1BB結合ドメインおよびOX40結合ドメインを含むことができ、4－1BB結合ドメインは、配列番号17のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号18のアミノ酸配列を含むVLを含み、OX40結合ドメインは、(i)配列番号29のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号28のアミノ酸配列を含むVL、(ii)配列番号29のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号30のアミノ酸配列を含むVL、(iii)配列番号31のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号28のアミノ酸配列を含むVL、(iv)配列番号31のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号30のアミノ酸配列を含むVL、(v)配列番号33のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号28のアミノ酸配列を含むVL、(vi)配列番号29のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号34のアミノ酸配列を含むVL、(vii)配列番号29のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号35のアミノ酸配列を含むVL、(viii)配列番号29のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号36のアミノ酸配列を含むVL、(ix)配列番号29のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号37のアミノ酸配列を含む

10

20

30

40

50

V L、(x) 配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 3 4 のアミノ酸配列を含む V L、(x i) 配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 3 5 のアミノ酸配列を含む V L、(x i i) 配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 3 6 のアミノ酸配列を含む V L、(x i i i) 配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む V L、(x i v) 配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 3 8 のアミノ酸配列を含む V L、(x v) 配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 3 9 のアミノ酸配列を含む V L、(x v i) 配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 4 0 のアミノ酸配列を含む V L、(x v i i) 配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 4 1 のアミノ酸配列を含む V L、または (x v i i i) 配列番号 2 5 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 2 6 のアミノ酸配列を含む V L を含む。いくつかの実施形態において、両方の V H 配列および両方の V L 配列は、単一ポリペプチド鎖（例えば、1 つの 4-1 B B s c F v および 1 つの O X 4 0 s c F v を含む単一ポリペプチド）上にある。いくつかの実施形態において、1 つのポリペプチドは、両方の V H 配列を含み、別のポリペプチドは、両方の V L 配列を含む。
【0 2 4 7】

10

4-1 B B × O X 4 0 二重特異性抗体は、4-1 B B 結合ドメインおよび O X 4 0 結合ドメインを含むことができ、4-1 B B 結合ドメインは、配列番号 3 2 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 1 8 のアミノ酸配列を含む V L を含み、O X 4 0 結合ドメインは、(i) 配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 2 8 のアミノ酸配列を含む V L、(i i) 配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 3 0 のアミノ酸配列を含む V L、(i i i) 配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 2 8 のアミノ酸配列を含む V L、(i v) 配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 3 0 のアミノ酸配列を含む V L、(v) 配列番号 3 3 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 2 8 のアミノ酸配列を含む V L、(v i) 配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 3 4 のアミノ酸配列を含む V L；(v i i) 配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 3 5 のアミノ酸配列を含む V L；(v i i i) 配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 3 6 のアミノ酸配列を含む V L；(i x) 配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む V L；(x) 配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 3 4 のアミノ酸配列を含む V L；(x i) 配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 3 5 のアミノ酸配列を含む V L、(x i i) 配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 3 6 のアミノ酸配列を含む V L、(x i i i) 配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む V L、(x i v) 配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 3 8 のアミノ酸配列を含む V L、(x v) 配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 3 9 のアミノ酸配列を含む V L、(x v i) 配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 4 0 のアミノ酸配列を含む V L、(x v i i) 配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 4 1 のアミノ酸配列を含む V L、または (x v i i i) 配列番号 2 5 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 2 6 のアミノ酸配列を含む V L を含む。いくつかの実施形態において、両方の V H 配列および両方の V L 配列は、単一ポリペプチド鎖（例えば、1 つの 4-1 B B s c F v および 1 つの O X 4 0 s c F v を含む単一ポリペプチド）上にある。いくつかの実施形態において、1 つのポリペプチドは、両方の V H 配列を含み、別のポリペプチドは、両方の V L 配列を含む。

20

30

40

【0 2 4 8】

4-1 B B × O X 4 0 二重特異性抗体は、4-1 B B 結合ドメインおよび O X 4 0 結合ドメインを含むことができ、4-1 B B 結合ドメインは、配列番号 2 3 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 2 4 のアミノ酸配列を含む V L を含み、O X 4 0 結合ドメインは、(i) 配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 2 8 のアミノ酸配列を含む V L、(i i) 配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 3 0 のアミノ酸配列を含む V L、(i i i) 配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 2 8 のアミノ酸配列を含む V L、(i v) 配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含む V H および配列

50

番号 30 のアミノ酸配列を含む V L、(v) 配列番号 33 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 28 のアミノ酸配列を含む V L、(v i) 配列番号 29 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 34 のアミノ酸配列を含む V L；(v i i) 配列番号 29 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 35 のアミノ酸配列を含む V L；(v i i i) 配列番号 29 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 36 のアミノ酸配列を含む V L；(i x) 配列番号 29 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 37 のアミノ酸配列を含む V L；(x) 配列番号 31 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 34 のアミノ酸配列を含む V L、(x i) 配列番号 31 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 35 のアミノ酸配列を含む V L、(x i i) 配列番号 31 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 36 のアミノ酸配列を含む V L、(x i i i) 配列番号 31 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 37 のアミノ酸配列を含む V L、(x i v) 配列番号 31 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 38 のアミノ酸配列を含む V L、(x v) 配列番号 31 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 39 のアミノ酸配列を含む V L、(x v i) 配列番号 31 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 40 のアミノ酸配列を含む V L、(x v i i) 配列番号 31 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 41 のアミノ酸配列を含む V L、または (x v i i i) 配列番号 25 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 26 のアミノ酸配列を含む V L を含む。いくつかの実施形態において、両方の V H 配列および両方の V L 配列は、単一ポリペプチド鎖（例えば、1つの 4-1 B B s c F v および 1つの O X 40 s c F v を含む単一ポリペプチド）上にある。いくつかの実施形態において、1つのポリペプチドは、両方の V H 配列を含み、別のポリペプチドは、両方の V L 配列を含む。

【0249】

4-1 B B × O X 40 二重特異性抗体は、4-1 B B 結合ドメインおよび O X 40 結合ドメインを含むことができ、4-1 B B 結合ドメインは、配列番号 19 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 20 のアミノ酸配列を含む V L を含み、O X 40 結合ドメインは、(i) 配列番号 20 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 28 のアミノ酸配列を含む V L、(i i) 配列番号 29 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 30 のアミノ酸配列を含む V L、(i i i) 配列番号 31 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 28 のアミノ酸配列を含む V L、(i v) 配列番号 31 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 30 のアミノ酸配列を含む V L、(v) 配列番号 33 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 28 のアミノ酸配列を含む V L、(v i) 配列番号 29 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 34 のアミノ酸配列を含む V L；(v i i) 配列番号 29 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 35 のアミノ酸配列を含む V L；(v i i i) 配列番号 29 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 36 のアミノ酸配列を含む V L；(i x) 配列番号 29 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 37 のアミノ酸配列を含む V L；(x) 配列番号 31 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 34 のアミノ酸配列を含む V L、(x i) 配列番号 31 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 35 のアミノ酸配列を含む V L、(x i i) 配列番号 31 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 36 のアミノ酸配列を含む V L、(x i i i) 配列番号 31 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 37 のアミノ酸配列を含む V L、(x i v) 配列番号 31 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 38 のアミノ酸配列を含む V L、(x v) 配列番号 31 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 39 のアミノ酸配列を含む V L、(x v i) 配列番号 31 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 40 のアミノ酸配列を含む V L、(x v i i) 配列番号 31 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 41 のアミノ酸配列を含む V L、または (x v i i i) 配列番号 25 のアミノ酸配列を含む V H および配列番号 26 のアミノ酸配列を含む V L を含む。いくつかの実施形態において、両方の V H 配列および両方の V L 配列は、単一ポリペプチド鎖（例えば、1つの 4-1 B B s c F v および 1つの O X 40 s c F v を含む単一ポリペプチド）上にある。いくつかの実施形態において、1つのポリペプチドは、両方の V H 配列を含み、別のポリペプチドは、両方の V L 配列を含む。

【0250】

4-1 B B × O X 40 二重特異性抗体は、4-1 B B 結合ドメインおよび O X 40 結合

ドメインを含むことができ、4-1BB結合ドメインは、配列番号17のアミノ酸配列を含むVH（または配列番号17と少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%同一である配列、任意で、VHは、それぞれ配列番号5~7のVH CDR1配列、VH CDR2配列、およびVH CDR3配列）および配列番号18のアミノ酸配列を含むVL（または配列番号18と少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%同一である配列、任意で、VLは、それぞれ配列番号8~10のVL CDR1配列、VL CDR2配列、およびVL CDR3配列を含む）を含み、OX40結合ドメインは、配列番号29のアミノ酸配列を含むVH（または配列番号17と少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%同一である配列、任意で、VHは、それぞれ11~13のVH CDR1配列、VH CDR2配列、およびVH CDR3配列を含む）および配列番号28のアミノ酸配列を含むVL（または配列番号28と少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%同一である配列、任意で、VLは、それぞれ配列番号14~16のVL CDR1配列、VL CDR2配列、およびVL CDR3配列を含む）を含む。いくつかの実施形態において、両方のVH配列および両方のVL配列は、単一ポリペプチド鎖（例えば、1つの4-1BB scFvおよび1つのOX40 scFvを含む単一ポリペプチド）上にある。いくつかの実施形態において、1つのポリペプチドは、両方のVH配列を含み、別のポリペプチドは、両方のVL配列を含む。
【0251】

4-1BB×OX40二重特異性抗体は、4-1BB結合ドメインおよびOX40結合ドメインを含むことができ、4-1BB結合ドメインは、配列番号17のアミノ酸配列を含むVH（または配列番号17と少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%同一である配列、任意で、VHは、それぞれ配列番号5~7のVH CDR1配列、VH CDR2配列、およびVH CDR3配列を含む）および配列番号18のアミノ酸配列を含むVL（または配列番号18と少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%同一である配列、任意で、VLは、それぞれ配列番号8~10のVL CDR1配列、VL CDR2配列、およびVL CDR3配列を含む）を含み、OX40結合ドメインは、配列番号31のアミノ酸配列を含むVH（または配列番号31と少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%同一である配列、任意で、VHは、それぞれ配列番号11~13のVH CDR1配列、VH CDR2配列、およびVH CDR3配列を含む）および配列番号30のアミノ酸配列を含むVL（または配列番号30と少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%同一である配列、任意で、VLは、それぞれ配列番号14~16のVL CDR1配列、VL CDR2配列、およびVL CDR3配列を含む）を含む。いくつかの実施形態において、両方のVH配列および両方のVL配列は、単一ポリペプチド鎖（例えば、1つの4-1BB scFvおよび1つのOX40 scFvを含む単一ポリペプチド）上にある。いくつかの実施形態において、1つのポリペプチドは、両方のVH配列を含み、別のポリペプチドは、両方の

10

20

30

40

50

V L 配列を含む。

【0252】

4-1BB×OX40二重特異性抗体は、4-1BB結合ドメインおよびOX40結合ドメインを含むことができ、4-1BB結合ドメインは、配列番号17のアミノ酸配列を含むVH（または配列番号17と少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%同一である配列、任意で、VHは、それぞれ配列番号5～7のVH CDR1配列、VH CDR2配列、およびVH CDR3配列）および配列番号18のアミノ酸配列を含むVL（または配列番号18と少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%同一である配列、任意で、VLは、それぞれ配列番号8～10のVL CDR1配列、VL CDR2配列、およびVL CDR3配列を含む）を含み、OX40結合ドメインは、配列番号29のアミノ酸配列を含むVH（または配列番号29と少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%同一である配列、任意で、VHは、それぞれ配列番号11～13のVH CDR1配列、VH CDR2配列、およびVH CDR3配列を含む）および配列番号35のアミノ酸配列を含むVL（または配列番号35と少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%同一である配列、任意で、VLは、それぞれ配列番号14～16のVL CDR1配列、VL CDR2配列、およびVL CDR3配列を含む）を含む。いくつかの実施形態において、両方のVH配列および両方のVL配列は、単一ポリペプチド鎖（例えば、1つの4-1BB scFvおよび1つのOX40 scFvを含む単一ポリペプチド）上にある。いくつかの実施形態において、1つのポリペプチドは、両方のVH配列を含み、別のポリペプチドは、両方のVL配列を含む。

【0253】

本明細書で提供されるように、4-1BB×OX40二重特異性抗体は、本明細書で提供される4-1BB scFv配列およびOX40 scFv配列の任意の組み合わせを含むことができる。例えば、4-1BB×OX40二重特異性抗体は、配列番号58および59のscFvを含むことができる。4-1BB×OX40二重特異性抗体は、配列番号58および60のscFvを含むことができる。4-1BB×OX40二重特異性抗体は、配列番号58および61のscFvを含むことができる。4-1BB×OX40二重特異性抗体は、配列番号58および62のscFvを含むことができる。4-1BB×OX40二重特異性抗体は、配列番号63および59のscFvを含むことができる。4-1BB×OX40二重特異性抗体は、配列番号63および60のscFvを含むことができる。4-1BB×OX40二重特異性抗体は、配列番号63および61のscFvを含むことができる。4-1BB×OX40二重特異性抗体は、配列番号63および62のscFvを含むことができる。4-1BB×OX40二重特異性抗体は、配列番号44および59のscFvを含むことができる。4-1BB×OX40二重特異性抗体は、配列番号44および64のscFvを含むことができる。4-1BB×OX40二重特異性抗体は、配列番号58および64のscFvを含むことができる。4-1BB×OX40二重特異性抗体は、配列番号58および65のscFvを含むことができる。4-1BB×OX40二重特異性抗体は、配列番号58および66のscFvを含むことができる。4-1BB×OX40二重特異性抗体は、配列番号58および67のscFvを含むことができる。4-1BB×OX40二重特異性抗体は、配列番号58および68のscFvを含むことができる。4-1BB×OX40二重特異性抗体は、配列番号58および69のscFvを含むことができる。4-1BB×OX40二重特異性抗体は、配列番号58および7

0のs c F vを含むことができる。4-1 B B×O X 4 0二重特異性抗体は、配列番号58および71のs c F vを含むことができる。4-1 B B×O X 4 0二重特異性抗体は、配列番号58および72のs c F vを含むことができる。4-1 B B×O X 4 0二重特異性抗体は、配列番号58および73のs c F vを含むことができる。4-1 B B×O X 4 0二重特異性抗体は、配列番号58および74のs c F vを含むことができる。4-1 B B×O X 4 0二重特異性抗体は、配列番号58および75のs c F vを含むことができる。4-1 B B×O X 4 0二重特異性抗体は、配列番号58および76のs c F vを含むことができる。4-1 B B×O X 4 0二重特異性抗体は、配列番号145および146のs c F vを含むことができる。そのようなs c F v対は、同じポリペプチド上または別個のポリペプチド上にある可能性がある。s c F v対が、同じポリペプチド上にある場合、4-1 B B s c F vは、O X 4 0 s c F vに対してN末端にある可能性があるか、4-1 B B s c F vは、O X 4 0 s c F vに対してC末端にある可能性がある。

【0254】

本明細書で提供されるように、本明細書で提供される任意のC D R、V H、V L、および／またはs c F v配列を含む抗体またはポリペプチドは、さらに、ヒンジを含むことができる。ヒンジは、例えば、4-1 B B結合ドメイン（例えば、s c F v）および免疫グロブリン定常領域の間に位置することができる。ヒンジは、また、O X 4 0結合ドメイン（例えば、s c F v）および免疫グロブリン定常領域の間に位置することもできる。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、順にアミノ末端からカルボキシル末端に、抗原結合ドメイン（例えば、s c F v）、ヒンジ領域、および免疫グロブリン定常領域を含む。

【0255】

ヒンジは、免疫グロブリンヒンジ、例えば、ヒトI g Gヒンジである可能性がある。いくつかの実施形態において、ヒンジは、ヒトI g G₁ヒンジである。いくつかの実施形態において、ヒンジは、ヒトI g G₁のアミノ酸216～230（E Uナンバリングによる）またはそれと少なくとも90%同一である配列を含む。例えば、ヒンジは、ヒトI g G₁の、E Uナンバリングによるアミノ酸C220で置換を含むことができる。非ヒト源由来の場合、ヒンジは、ヒト化することができる。いくつかの実施形態において、ヒンジは、配列番号115のアミノ酸1～15を含む。ヒンジの非限定例は、以下の表Kおよび表Lに提供される。

【0256】

ある実施形態において、ヒンジは、野生型ヒトI g G₁ヒンジ、野生型ヒトI g G₂ヒンジ、または野生型ヒトI g G₄ヒンジのような野生型免疫グロブリンヒンジ領域と少なくとも80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である配列を含むか、その配列である。

【0257】

代表的な変更免疫グロブリンヒンジは、1つ、2つまたは3つの異なるアミノ酸残基（例えば、セリンまたはアラニン）により置換された野生型ヒトI g G₁ヒンジ内で認められる1つ、2つまたは3つのシステイン残基を有する免疫グロブリンヒトI g G₁ヒンジ領域を含む。変更免疫グロブリンヒンジは、別のアミノ酸（例えば、セリンまたはアラニン）で置換されたプロリンを追加で有することができる。例えば、上述した変更ヒトI g G₁ヒンジは、別のアミノ酸残基（例えば、セリン、アラニン）により置換された野生型ヒトI g G₁ヒンジ領域の3つのシステインに対してカルボキシル末端に位置するプロリンを追加で有することができる。一実施形態において、コアヒンジ領域のプロリンは、置換されていない。

【0258】

ある実施形態において、ヒンジは、約5個から150個のアミノ酸、5個から10個の

10

20

30

40

50

アミノ酸、10個から20個のアミノ酸、20個から30個のアミノ酸、30個から40個のアミノ酸、40個から50個のアミノ酸、50個から60個のアミノ酸、5個から60個のアミノ酸、5個から40個のアミノ酸、8個から20個のアミノ酸、または10個から15個のアミノ酸を含む。ヒンジは、主に柔軟性があるが、より高い剛性の特徴も与えることができるか、最小のβ-シート構造を有する、主にα-ヘリックス構造を含むことができる。ヒンジの配列の長さは、ヒンジが（別の領域またはドメインを介して）直接的または間接的に接続する結合ドメインの結合親和性ならびにヒンジまたはリンカーが直接的または間接的に接続されているFc領域部分の1つまたは複数の活性に影響する可能性がある。

【0259】

ある実施形態において、ヒンジは、血漿および血清中で安定であり、タンパク質分解的開裂に耐性がある。IgG1上側ヒンジ領域内の第1リジンは、タンパク質分解的開裂を最小にするために突然変異することができる。例えば、リジンは、メチオニン、トレオニン、アラニンまたはグリシンで置換することができるか、欠失させることができる。

【0260】

いくつかの実施形態において、4-1BB×OX40二重特異性抗体は、ヒンジを含まない。例えば、いくつかの実施形態において、4-1BB×OX40二重特異性抗体は、ヒンジの代わりにリンカーを含む。

【0261】

本明細書で提供されるように、本明細書で提供される任意のCDR、VH、VL、scFvおよび／またはヒンジを含む抗体またはポリペプチドは、さらに、免疫グロブリン定常領域を含むことができる。免疫グロブリン定常領域は、例えば、ヒンジおよび4-1BB結合ドメイン（例えば、4-1BB結合scFv）の間に位置することができる。免疫グロブリン定常領域は、また、ヒンジおよびOX40結合ドメイン（例えば、OX40結合scFv）の間に位置することもできる。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、順にアミノ末端からカルボキシル末端に、ヒンジ領域、免疫グロブリン定常領域、および抗原結合ドメイン（例えば、scFv）を含む。

【0262】

いくつかの実施形態において、免疫グロブリン定常領域は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2またはIgDの免疫グロブリンCH2ドメインおよびCH3ドメインを含み、任意で、IgGはヒトである。いくつかの場合、免疫グロブリン定常領域は、IgG1（例えば、ヒトIgG1）の免疫グロブリンCH2ドメインおよびCH3ドメインを含む。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、CH1ドメインを含まない。

【0263】

いくつかの実施形態において、免疫グロブリン定常領域は、1つ、2つ、3つ、4つ、5つまたはそれ以上のアミノ酸置換および／または欠失を含み、FcγR1、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIIa、およびFcγRIIIbへの結合を防止する。

【0264】

ある実施形態において、免疫グロブリン定常領域は、1つ、2つ、3つまたはそれ以上のアミノ酸置換を含み、Fc媒介T細胞活性化を防止または低減する。

【0265】

いくつかの実施形態において、免疫グロブリン定常領域は、1つ、2つ、3つ、4つまたはそれ以上のアミノ酸置換および／または欠失を含み、CDC活性および／またはADCC活性を防止または低減する。いくつかの実施形態において、免疫グロブリン定常領域は、1つ、2つ、3つ、4つ、5つまたはそれ以上のアミノ酸置換および／または欠失を含み、FcγRまたはC1q相互作用を防止または弱める。

【0266】

本発明は、配列番号17のVHのCDRおよび配列番号18のVLのCDRを含むヒト4-1BB抗原結合ドメインならびに配列番号31のVHのCDRおよび配列番号30の

10

20

30

40

50

V LのC D Rを含むヒトO X 4 0抗原結合ドメインを有する抗体（例えば、配列番号8 1の抗体）を含む。この実施形態において、ヒト4－1 B B抗原結合ドメインおよびヒトO X 4 0抗原結合ドメインは、F c γ R 1、F c γ R I I a、F c γ R I I b、F c γ R I I a、およびF c γ R I I I bへの結合を防止する突然変異を含む「ヌル」定常領域により分離することができる。そのような「ヌル」定常領域は、本発明の二重特異性抗体が腫瘍浸潤リンパ球を活性化すると同時に、他のエフェクタ細胞を活性化しないか、活性化を最小にすることを可能にする。定常領域の存在は、定常領域がない類似の二重特異性抗体と比較して二重特異性抗体の半減期を延長する。

【0267】

ある実施形態において、免疫グロブリン定常領域は、E Uナンバリングシステムにしたがって、置換L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、G 2 3 7 A、およびK 3 2 2 Aを含むヒトI g G 1 C H 2ドメインを含む。

10

【0268】

ある実施形態において、免疫グロブリン定常領域は、E Uナンバリングシステムにしたがって、以下の置換：E 2 3 3 P、L 2 3 4 A、L 2 3 4 V、L 2 3 5 A、G 2 3 7 A、E 3 1 8 A、K 3 2 0 A、およびK 3 2 2 Aの1つまたは複数、および／またはG 2 3 6の欠失を含むヒトI g G 1 C H 2ドメインを含む。

【0269】

ある実施形態において、免疫グロブリン定常領域は、E Uナンバリングシステムにしたがって、以下の置換：E 2 3 3 P、L 2 3 4 A、L 2 3 4 V、L 2 3 5 A、G 2 3 7 A、およびK 3 2 2 Aの1つまたは複数、および／またはG 2 3 6の欠失を含むヒトI g G 1 C H 2ドメインを含む。

20

【0270】

ある実施形態において、免疫グロブリン定常領域は、E Uナンバリングシステムにしたがって、置換L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、G 2 3 7 A、E 3 1 8 A、K 3 2 0 A、およびK 3 2 2 Aを含むヒトI g G 1 C H 2ドメインを含む。

【0271】

ある実施形態において、免疫グロブリン定常領域は、E Uナンバリングシステムにしたがって、置換L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、G 2 3 7 A、およびK 3 2 2 Aを含むヒトI g G 1 C H 2ドメインを含む。

30

【0272】

ある実施形態において、免疫グロブリン定常領域は、E Uナンバリングシステムにしたがって、置換E 2 3 3 P、L 2 3 4 V、L 2 3 5 A、G 2 3 7 A、およびK 3 2 2 Aを含むヒトI g G 1 C H 2ドメインを含む。

【0273】

ある実施形態において、免疫グロブリン定常領域は、E Uナンバリングシステムにしたがって、置換E 2 3 3 P、L 2 3 4 V、L 2 3 5 A、G 2 3 7 A、およびK 3 2 2 A、ならびにG 2 3 6の欠失を含むヒトI g G 1 C H 2ドメインを含む。

【0274】

ある実施形態において、免疫グロブリン定常領域は、E Uナンバリングシステムにしたがって、置換E 2 3 3 P、L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、G 2 3 7 A、およびK 3 2 2 Aを含むヒトI g G 1 C H 2ドメインを含む。例えば、本発明は、アミノ末端からカルボキシル末端に、第1 s c F v、免疫グロブリンヒンジ、E Uナンバリングシステムにしたがって、置換E 2 3 3 P、L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、G 2 3 7 A、およびK 3 2 2 Aを含むI g G 1 C H 2ドメイン、I g G 1 C H 3、ならびに第2 s c F vを含む二重特異性抗体を含む。一実施形態において、第1 s c F vは、ヒト4－1 B Bに特異的に結合し、第2 s c F vは、ヒトO X 4 0に特異的に結合する。一実施形態において、第1 s c F vは、ヒトO X 4 0に特異的に結合し、第2 s c F vは、ヒトO X 4 0に特異的に結合する。

40

【0275】

ある実施形態において、免疫グロブリン定常領域は、E Uナンバリングシステムにした

50

がって、置換 E 2 3 3 P、L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、G 2 3 7 A、および K 3 2 2 A ならびに G 2 3 6 の欠失を含むヒト I g G 1 C H 2 ドメインを含む。例えば、本発明は、アミノ末端からカルボキシル末端に、第 1 s c F v、免疫グロブリンヒンジ、E U ナンバリングシステムにしたがって、置換 E 2 3 3 P、L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、G 2 3 7 A、および K 3 2 2 A ならびに G 2 3 6 の欠失を含む I g G 1 C H 2、I g G 1 C H 3、ならびに第 2 s c F v を含む二重特異性抗体を含む。一実施形態において、第 1 s c F v は、ヒト 4-1 B B に特異的に結合し、第 2 s c F v は、ヒト O X 4 0 に特異的に結合する。一実施形態において、第 1 s c F v は、ヒト O X 4 0 に特異的に結合し、第 2 s c F v は、ヒト O X 4 0 に特異的に結合する。

【0276】

ある実施形態において、免疫グロブリン定常領域は、ヒト I g G 1 C H 3 ドメインを含む。

【0277】

ある実施形態において、免疫グロブリン定常領域は、配列番号 1 1 1、1 1 2、もしくは 1 1 4 のアミノ酸 1 6 ~ 2 3 1 または配列番号 1 1 3 または 1 1 5 のアミノ酸 1 6 ~ 2 3 0 を含む。ある実施形態において、免疫グロブリン定常領域は、配列番号 1 1 5 のアミノ酸 1 6 ~ 2 3 0 を含む。

【0278】

本明細書で提供される 4-1 B B × O X 4 0 抗体に存在することができる追加の免疫グロブリン定常領域は、以下でより詳細に論じられる。

【0279】

いくつかの実施形態において、ヒンジおよび免疫グロブリン定常領域は、配列番号 1 1 1 ~ 1 1 5 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、ヒンジおよび免疫グロブリン定常領域は、配列番号 1 1 5 のアミノ酸配列を含む。

【0280】

いくつかの実施形態において、4-1 B B × O X 4 0 二重特異性抗体は、免疫グロブリン定常領域を含まない。いくつかの実施形態において、4-1 B B × O X 4 0 二重特異性抗体は、ヒンジを含まず、免疫グロブリン定常領域を含まない。

【0281】

本明細書で提供されるように、本明細書で提供される任意の C D R、V H、V L、s c F v、ヒンジ、および／または免疫グロブリン定常領域を含む抗体またはポリペプチドは、さらに、リンカーを含むことができる。リンカーは、例えば、免疫グロブリン定常領域および C 末端結合ドメインの間に位置することができる。例えば、リンカーは、免疫グロブリン定常領域および C 末端 4-1 B B 結合ドメインの間に位置することができる。リンカーは、また、免疫グロブリン定常領域および C 末端 O X 4 0 結合ドメインの間に位置することもできる。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、順にアミノ末端からカルボキシル末端に、免疫グロブリン定常領域、リンカー、および抗原結合ドメインを含む。

【0282】

いくつかの実施形態において、（例えば、免疫グロブリン定常領域および抗原結合ドメインの間の）リンカーは、3 個 ~ 3 0 個のアミノ酸、3 個 ~ 1 5 個のアミノ酸、または約 3 個 ~ 1 0 個のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態において、（例えば、免疫グロブリン定常領域および抗原結合ドメインの間の）リンカーは、5 個 ~ 3 0 個のアミノ酸、5 個 ~ 1 5 個のアミノ酸、または約 5 個 ~ 1 0 個のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態において、（例えば、免疫グロブリン定常領域および抗原結合ドメインの間の）リンカーは、アミノ酸配列 (G l y 4 S e r)_n を含み、n = 1 ~ 5（配列番号 1 1 7）であり、任意で n = 1 である。いくつかの実施形態において、（例えば、免疫グロブリン定常領域および抗原結合ドメインの間の）リンカーは、アミノ酸配列 G G G S P S（配列番号 1 1 8）を含む。いくつかの実施形態において、（例えば、免疫グロブリン定常領域および抗原結合ドメインの間の）リンカーは、配列番号 1 0 9 または 1 1 0 のアミノ酸配列を含む。

【0283】

10

20

30

40

50

リンカーの非限定例は、以下の表 K および表 L に与えられる。

【 0 2 8 4 】

【表 1 2】

表 K : 代表的なヒンジおよびリンカー

名称	アミノ酸配列	配列番号
sss(s)-hIgG1 ヒンジ	EPKSSDKTHTSPSS	150
csc(s)-hIgG1 ヒンジ	EPKSCDKTHTSPPCS	151
ssc(s)-hIgG1 ヒンジ	EPKSSDKTHTSPPCS	152
scc(s)-hIgG1 ヒンジ	EPKSSDKTHTCPPCS	153
css(s)-hIgG1 ヒンジ	EPKSCDKTHTSPSS	154
scs(s)-hIgG1 ヒンジ	EPKSSDKTHTCPPSS	155
ccc(s)-hIgG1 ヒンジ	EPKSCDKTHTSPPCS	156
ccc(p)-hIgG1 ヒンジ	EPKSCDKTHTSPPCP	157
sss(p)-hIgG1 ヒンジ	EPKSSDKTHTSPSP	158
csc(p)-hIgG1 ヒンジ	EPKSCDKTHTSPPCP	159
ssc(p)-hIgG1 ヒンジ	EPKSSDKTHTSPPCP	160
scc(p)-hIgG1 ヒンジ	EPKSSDKTHTCPPCP	161
css(p)-hIgG1 ヒンジ	EPKSCDKTHTSPSP	162
scs(p)-hIgG1 ヒンジ	EPKSSDKTHTCPPSP	163
Scppcp	SCPPCP	164
STD1	NYGGGSGGGSGGGSGNS	165
STD2	NYGGGSGGGSGGGSGNYGGGSGGGSGGGSGNS	166
H1	NS	167
H2	GGGSGNS	168
H3	NYGGGSGNS	169
H4	GGGSGGGSGNS	170
H5	NYGGGSGGGSGNS	171
H6	GGGSGGGSGGGSGNS	172
H7	GCPPCPNS	173

10

20

30

40

50

(G ₄ S) ₃	GGGGSGGGGSGGGGS	174
H105	SGGGGSGGGGSGGGGS	175
(G ₄ S) ₄	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	176
H75 (NKG2A 四重突然変異体)	QRHNNSSLNTGTQMAGHSPNS	177
H83 (NKG2A 由来)	SSLNTGTQMAGHSPNS	178
H106 (NKG2A 由来)	QRHNNSSLNTGTQMAGHS	179
H81 (NKG2D 由来)	EVQIPLTESYSPNS	180
H91 (NKG2D 由来)	NSLANQEVQIPLTESYSPNS	181
H94	SGGGGSGGGGSGGGGSPNS	182
H111	SGGGGSGGGGSGGGGSPGS	183
H114	GGGGSGGGGSGGGGSPS	184

10

20

【0285】

いくつかの実施形態において、4-1BB×OX40抗体は、順にアミノ末端からカルボキシル末端に、(i) 配列番号17のアミノ酸配列を含むVH、(ii) リンカー（例えば、グリシン-セリンリンカー）、(iii) 配列番号18のアミノ酸配列を含むVL、(iv) EUNANBリングにしたがって、C220S置換を含むIgG₁ヒンジ、(v) EUNANBリングシステムにしたがって、以下の置換：E233P、L234A、L234V、L235A、G237A、およびK322A、ならびにG236の欠失を含むCH2ドメインならびに野生型CH3ドメインを含む免疫グロブリン定常領域、(vi) 配列番号28のアミノ酸配列を含むVL、(vii) リンカー（例えば、グリシン-セリンリンカー）、ならびに(viii) 配列番号29のアミノ酸配列を含むVHを含むポリペプチドを含む。いくつかの実施形態において、4-1BB×OX40抗体は、そのようなポリペプチドの二量体を含む。

30

【0286】

いくつかの実施形態において、4-1BB×OX40抗体は、順にアミノ末端からカルボキシル末端に、(i) 配列番号17のアミノ酸配列を含むVH、(ii) リンカー（例えば、グリシン-セリンリンカー）、(iii) 配列番号18のアミノ酸配列を含むVL、(iv) EUNANBリングにしたがって、C220S置換を含むIgG₁ヒンジ、(v) EUNANBリングシステムにしたがって、以下の置換：E233P、L234A、L234V、L235A、G237A、およびK322A、ならびにG236の欠失を含むCH2ドメインならびに野生型CH3ドメインを含む免疫グロブリン定常領域、(vi) 配列番号30のアミノ酸配列を含むVL、(vii) リンカー（例えば、グリシン-セリンリンカー）、ならびに(viii) 配列番号31のアミノ酸配列を含むVHを含むポリペプチドを含む。いくつかの実施形態において、4-1BB×OX40抗体は、そのようなポリペプチドの二量体を含む。

40

【0287】

いくつかの実施形態において、4-1BB×OX40抗体は、順にアミノ末端からカルボキシル末端に、(i) 配列番号17のアミノ酸配列を含むVH、(ii) リンカー（例えば、グリシン-セリンリンカー）、(iii) 配列番号18のアミノ酸配列を含むVL、(iv) EUNANBリングにしたがって、C220S置換を含むIgG₁ヒンジ、(v)

50

） E U ナンバリングにしたがって、以下の置換： E 2 3 3 P、L 2 3 4 A、L 2 3 4 V、L 2 3 5 A、G 2 3 7 A、および K 3 2 2 A、ならびに G 2 3 6 の欠失を含む C H 2 ドメインならびに野生型 C H 3 ドメインを含む免疫グロブリン定常領域、（ v i ）配列番号 3 5 のアミノ酸配列を含む V L、（ v i i ）リンカー（例えば、グリシン－セリンリンカー）、ならびに（ v i i i ）配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含む V H を含むポリペプチドを含む。いくつかの実施形態において、4－1 B B × O X 4 0 抗体は、そのようなポリペプチドの二量体を含む。

【 0 2 8 8 】

いくつかの実施形態において、4－1 B B × O X 4 0 二重特異性抗体は、配列番号 7 8 ～ 1 0 0 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む。

【 0 2 8 9 】

【表 1 3】

表 L：F X X 抗体配列番号

抗体	完全 構築物	4-1BB VH	4-1BB VL	4-1BB scFv	OX40 VH	OX40 VL	OX40 scFv
FXX01066	78	17	18	58	29	28	59
FXX01099	79	17	18	58	29	30	60
FXX01101	80	17	18	58	31	28	61
FXX01102	81	17	18	58	31	30	62
FXX01104	82	32	18	63	29	28	59
FXX01105	83	32	18	63	29	30	60
FXX01107	84	32	18	63	31	28	61
FXX01108	85	32	18	63	31	30	62
FXX01047	86	23	24	44	29	28	59
FXX01055	87	23	24	44	33	28	64
FXX01079	88	17	18	58	33	28	64
FXX01110	89	17	18	58	29	34	65
FXX01111	90	17	18	58	29	35	66
FXX01112	91	17	18	58	29	36	67
FXX01113	92	17	18	58	29	37	68
FXX01114	93	17	18	58	31	34	69
FXX01115	94	17	18	58	31	35	70
FXX01116	95	17	18	58	31	36	71
FXX01117	96	17	18	58	31	37	72
FXX01118	97	17	18	58	31	38	73
FXX01119	98	17	18	58	31	39	74
FXX01120	99	17	18	58	31	40	75
FXX01121	100	17	18	58	31	41	76
FXX01028	144	19	20	145	25	26	146

【 0 2 9 0 】

いくつかの実施形態において、4－1 B B × O X 4 0 二重特異性抗体は、配列番号 7 8 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、4－1 B B × O X 4 0 二重特異性抗体は、8 1 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、4－1 B B × O X 4 0 二重特異性抗体は、配列番号 9 0 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、4－1 B B × O X 4 0 二重特異性抗体は、本質的に、配列番号 7 8 のアミノ酸配列から

なる。いくつかの実施形態において、4-1BB×OX40二重特異性抗体は、本質的に、81のアミノ酸配列からなる。いくつかの実施形態において、4-1BB×OX40二重特異性抗体は、本質的に、配列番号90のアミノ酸配列からなる。いくつかの実施形態において、4-1BB×OX40二重特異性抗体は、配列番号78のアミノ酸配列からなる。いくつかの実施形態において、4-1BB×OX40二重特異性抗体は、81のアミノ酸配列からなる。いくつかの実施形態において、4-1BB×OX40二重特異性抗体は、配列番号90のアミノ酸配列からなる。

【0291】

いくつかの実施形態において、4-1BB×OX40二重特異性抗体は、ヒト4-1BBおよびヒトOX40に結合することができるホモ二量体であり、2つのポリペプチドを含み、各ポリペプチドは、配列番号78～100からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。

10

【0292】

いくつかの実施形態において、4-1BB×OX40二重特異性抗体は、ヒト4-1BBおよびヒトOX40に結合することができるホモ二量体であり、2つの同一のポリペプチドを含み、各ポリペプチドは、配列番号78のアミノ酸配列と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%またはそれ以上であるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、4-1BB×OX40二重特異性抗体は、2つのポリペプチドを含むホモ二量体であり、各ポリペプチドは、配列番号78のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、ヒト4-1BBおよびヒトOX40に結合する二重特異性抗体は、2つのポリペプチドからなるか、本質的に2つのポリペプチドからなる二量体であり、各ポリペプチドは、配列番号78のアミノ酸配列を含む。

20

【0293】

いくつかの実施形態において、4-1BB×OX40二重特異性抗体は、ヒト4-1BBおよびヒトOX40に結合することができるホモ二量体であり、2つの同一のポリペプチドを含み、各ポリペプチドは、配列番号81のアミノ酸配列と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%またはそれ以上であるアミノ酸配列を含む。

【0294】

いくつかの実施形態において、4-1BB×OX40二重特異性抗体は、ヒト4-1BBおよびヒトOX40に結合することができるホモ二量体であり、2つのポリペプチドを含み、各ポリペプチドは、配列番号81のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、ヒト4-1BBおよびヒトOX40に結合する二重特異性抗体は、2つのポリペプチドからなるか、本質的に2つのポリペプチドからなる二量体であり、各ポリペプチドは、配列番号81のアミノ酸配列を含む。

30

【0295】

いくつかの実施形態において、4-1BB×OX40二重特異性抗体は、ヒト4-1BBおよびヒトOX40に結合することができるホモ二量体であり、2つの同一のポリペプチドを含み、各ポリペプチドは、配列番号90のアミノ酸配列と少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%またはそれ以上であるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、4-1BB×OX40二重特異性抗体は、ヒト4-1BBおよびヒトOX40に結合することができるホモ二量体であり、2つのポリペプチドを含み、各ポリペプチドは、配列番号90のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、ヒト4-1BBおよびヒトOX40に結合する二重特異性抗体は、2つのポリペプチドからなるか、本質的に2つのポリペプチドからなる二量体であり、各ポリペプチドは、配列番号90のアミノ酸配列を含む。

40

【0296】

本発明の二重特異性抗体は、腫瘍細胞を溶解することができる。「可能である」とは、二重特異性抗体が、適切な実験室条件下で活性を実行することができることを意味する。腫瘍溶解は、当技術分野において既知である方法を使用して、インビトロおよびインビボ

50

で決定することができる。例えば、腫瘍溶解は、P M B C（または精製T細胞）および腫瘍細胞を、抗C D 3×抗腫瘍関連抗原（T A A）二重特異性分子（C D 3×T A A誘導抗体）と同時培養することにより評価することができる。C D 3×T A A誘導抗体は、T細胞のポリクローナル刺激剤であり、T細胞にシグナルを与え、結果として、4-1 B BおよびO X 4 0のアップレギュレーションとなる。このタイプの実験において、C D 3×T A A誘導抗体を最適以下の濃度で培養物に加え、その間、抗4-1 B Bおよび抗O X 4 0二重特異性抗体（例えば、配列番号81を含む抗体）の培養物への添加は、C D 3×T A A誘導抗体により誘導される標的細胞溶解を、用量依存的にさらに高める。類似の方法で、標的細胞の溶解も、クロミウム51放出アッセイを使用して評価することができる。

【0297】

腫瘍溶解は、また、ヒト4-1 B BおよびヒトO X 4 0を発現する宿主マウスを使用する同系腫瘍モデル（例えば、対応する内因性マウスプロモータ遺伝子の制御下でヒト4-1 B BおよびヒトO X 4 0を発現するマウス、例えば、B i o c y t o g e n、中国からのメスB-h O X 4 0/h 4-1 B Bマウス（C 5 7 B L/6-T n f r s f 4 t m 1（T N F R S F 4）C D 1 3 7 t m 1（C D 1 3 7）/B c g e n））を使用して評価することもできる。例えば、マウスに、M B 4 9腫瘍細胞またはM C 3 8腫瘍細胞のような同系腫瘍株を接種することができる。腫瘍増殖が目に見えるようになると、例えば、約6日目に、抗4-1 B Bおよび抗O X 4 0二重特異性抗体または対照の抗体を（例えば、腹腔内に）投与することができる。対照の抗体で処置されたマウスと比較して抗4-1 B Bおよび抗O X 4 0二重特異性抗体で処置されたマウスにおいて腫瘍サイズが減少し、二重特異性抗体が腫瘍細胞を溶解することができることを示唆する。腫瘍溶解は、また、T細胞をプライムするためにC D 3二重特異性誘導抗体と組み合わせて投与されたヒトT細胞で移植された免疫不全マウスの異種移植モデルでも評価することができる。

【0298】

一実施形態において、本発明の抗体は、熱安定性である。本発明の抗体は、多くの従来技術の抗体（例えば、米国特許公開第2018/0118841号および米国特許公開第2015/0307620号に開示されているそれらの抗体）を超えて改善された安定性を示す。T mは、熱安定性の測定値であり、当技術分野において既知である方法により（例えば、実施例に記載の任意の方法にしたがって）決定することができる。一実施形態において、本発明の二重特異性抗体は、T mが約63、64、65、66、67、68または69である。例えば、本発明は、ヒト4-1 B B結合ドメインが、配列番号17のアミノ酸配列と少なくとも85%、90%、95%、または99%同一であるアミノ酸配列を含むV Hおよび配列番号18のアミノ酸配列と少なくとも85%、90%、95%、または99%同一であるアミノ酸配列を含むV Lを含み、ヒトO X 4 0結合ドメインが、配列番号31のアミノ酸配列と少なくとも85%、90%、95%、または99%同一であるアミノ酸配列を含むV Hおよび配列番号30のアミノ酸配列と少なくとも85%、90%、95%、または99%同一であるアミノ酸配列を含むV Lを含む、二重特異性抗体を含む、二重特異性抗体は、T mが64~68である。

【0299】

別の実施例において、本発明の抗体は、理論的p Iが7.5未満、7.6未満、7.7未満、7.8未満、7.9未満、または8未満である。理論的p Iは、当技術分野において既知である方法により（例えば、実施例に記載の任意の方法にしたがって）決定することができる。一実施形態において、本発明は、ヒト4-1 B B結合ドメインが、配列番号17のアミノ酸配列と少なくとも85%、90%、95%、または99%同一であるアミノ酸配列を含むV Hおよび配列番号18のアミノ酸配列と少なくとも85%、90%、95%、または99%同一であるアミノ酸配列を含むV Lを含み、ヒトO X 4 0結合ドメインが、配列番号31のアミノ酸配列と少なくとも85%、90%、95%、または99%同一であるアミノ酸配列を含むV Hおよび配列番号30のアミノ酸配列と少なくとも85%、90%、95%、または99%同一であるアミノ酸配列を含むV Lを含む、二重特異性抗体を含む、二重特異性抗体は、p Iが7.8未満である。

E. 4-1BBおよびOX40単一特異性抗体

【0300】

本明細書において、ヒト4-1BBまたはヒトOX40のいずれかに結合する単一特異性抗体が提供される。本明細書で提供される抗4-1BB抗体は、本明細書に記載の1つまたは複数の任意の4-1BB結合ドメインを含むことができる。本明細書で提供される抗OX40抗体は、本明細書に記載の1つまたは複数の任意の抗OX40結合ドメインを含むことができる。

【0301】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供される抗4-1BB抗体または抗OX40抗体は、IgG抗体である。いくつかの実施形態において、本明細書で提供される抗4-1BB抗体または抗OX40抗体は、IgG₁抗体である。

【0302】

いくつかの実施形態において、抗4-1BB抗体は、配列番号5～10の6つのCDR、配列番号5、119、7、120、121、および122の6つのCDR、または本明細書で提供される4-1BB結合VH配列およびVL配列の組み合わせならびに重鎖定常領域を含む。いくつかの実施形態において、抗4-1BB抗体は、配列番号5～10の6つのCDR、配列番号5、119、7、120、121、および122の6つのCDR、または本明細書で提供される4-1BB結合VH配列およびVL配列の組み合わせならびに軽鎖定常領域を含む。いくつかの実施形態において、抗4-1BB抗体は、配列番号5～10の6つのCDR、配列番号5、119、7、120、121、および122の6つのCDR、または本明細書で提供される4-1BB結合VH配列およびVL配列の組み合わせならびに、重鎖定常領域、および軽鎖定常領域を含む。

【0303】

いくつかの実施形態において、抗OX40抗体は、配列番号11～16の6つのCDR、または本明細書で提供されるOX40結合VH配列およびVL配列の組み合わせならびに重鎖定常領域を含む。いくつかの実施形態において、抗OX40抗体は、配列番号11～16の6つのCDR、または本明細書で提供されるOX40結合VH配列およびVL配列の組み合わせならびに軽鎖定常領域を含む。いくつかの実施形態において、抗OX40抗体は、配列番号11～16の6つのCDR、または本明細書で提供されるOX40結合VH配列およびVL配列の組み合わせならびに、重鎖定常領域、および軽鎖定常領域を含む。

【0304】

抗4-1BB抗体またはOX40抗体の定常領域は、本明細書で論じられる任意の定常領域であり得る。これらの抗体に存在する定常領域は、以下でより詳細に論じられる。

【0305】

いくつかの実施形態において、抗4-1BB抗体または抗OX40抗体は、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、ジスルフィド結合Fv、またはscFv-Fcである。いくつかの実施形態において、抗4-1BB抗体または抗OX40抗体は、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、ジスルフィド結合Fv、またはscFv-Fcを含む。例えば、本発明は、米国特許第9,005,612号に開示されるように、SMIPフォーマット（すなわち、scFv-Fc）での抗4-1BB抗体または抗OX40抗体を含む。SMIP抗体は、アミノ末端からカルボキシル末端に、scFvならびに免疫グロブリンヒンジおよびCH2/CH3領域を含む修飾された定常ドメインを含むことができる。本発明は、また、刊行された米国特許出願第2009/0148447号に開示されるように、PIMSフォーマットで抗4-1BB抗体または抗OX40抗体を含む。PIMS抗体は、アミノ末端からカルボキシル末端に、免疫グロブリンヒンジおよびCH2/CH3領域、ならびにscFvを含む修飾された定常ドメインを含むことができる。

【0306】

抗4-1BB抗体は、4-1BBについて一価（すなわち、1つの4-1BB結合ドメインを含む）、4-1BBについて二価（すなわち、2つの4-1BB結合ドメインを含

10

20

30

40

50

む) であり得るか、3つまたはそれ以上の4-1BB結合ドメインを有することができる。

【0307】

抗OX40抗体は、OX40について一価（すなわち、1つのOX40結合ドメインを含む）、OX40について二価（すなわち、2つのOX40結合ドメインを含む）であり得るか、3つまたはそれ以上のOX40結合ドメインを有することができる。

F. 定常領域

【0308】

上記で議論したように、4-1BBまたはOX40に結合する単一特異性抗体および4-1BB×OX40二重特異性抗体を含む、本明細書で提供される抗体は、免疫グロブリン定常領域を含むことができる。ある実施形態において、免疫グロブリン定常領域は、Fcガンマ受容体と相互作用しない。

【0309】

具体的な実施形態において、4-1BBおよび／またはOX40に免疫特異的に結合する、本明細書に記載の抗体は、本明細書に記載の任意のアミノ酸配列を含むVHドメインをおよびVLドメインを含み、定常領域は、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、またはIgY免疫グロブリン分子、またはヒトIgG、IgE、IgM、IgD、IgA、またはIgY免疫グロブリン分子の定常領域のアミノ酸配列を含む。別の具体的な実施形態において、4-1BBおよび／またはOX40に免疫特異的に結合する、本明細書に記載の抗体は、本明細書に記載の任意のアミノ酸配列を含むVHドメインおよびVLドメインを含み、定常領域は、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、またはIgY免疫グロブリン分子、免疫グロブリン分子の任意のクラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、およびIgA2）、または任意のサブクラス（例えば、IgG2aおよびIgG2b）の定常領域のアミノ酸配列を含む。特定の実施形態において、定常領域は、ヒトIgG、IgE、IgM、IgD、IgA、またはIgY免疫グロブリン分子、免疫グロブリン分子の任意のクラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、およびIgA2）、または任意のサブクラス（例えば、IgG2aおよびIgG2b）の定常領域のアミノ酸配列を含む。

【0310】

一実施形態において、重鎖定常領域は、ヒトIgG₁重鎖定常領域であり、軽鎖定常領域は、ヒトIgG_κ軽鎖定常領域である。

【0311】

いくつかの実施形態において、定常領域は、1つ、2つ、3つまたはそれ以上のアミノ酸置換を含み、FcγR1、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIa、およびFcγRIIbへの結合を防止する。

【0312】

ある実施形態において、定常領域は、1つ、2つ、3つまたはそれ以上のアミノ酸置換を含み、Fc媒介T細胞活性化を防止または低減する。

【0313】

いくつかの実施形態において、定常領域は、1つ、2つ、3つまたはそれ以上のアミノ酸置換を含み、CDC活性および／またはADCC活性を防止または低減する。

【0314】

いくつかの実施形態において、1つ、2つ、またはそれ以上の突然変異（例えば、アミノ酸置換）は、本明細書に記載の抗体またはその抗原結合フラグメント（例えば、カバットナンバリングシステム（例えば、カバットでのEUインデックス）にしたがう番号付で、CH2ドメイン（ヒトIgG₁の残基231～340）および／またはCH3ドメイン（ヒトIgG₁の残基341～447）および／またはヒンジ領域のFc領域に導入され、血清半減期、補体結合反応、Fc受容体結合、および／または抗原依存性細胞傷害活性のような抗体またはその抗原結合フラグメントの1つまたは複数の機能的特性を変更する。

【0315】

ある実施形態において、1つ、2つ、またはそれ以上の突然変異（例えば、アミノ酸置換）は、Fc領域のヒンジ領域（CH1ドメイン）に導入され、そのため、ヒンジ領域にあるシステイン残基の数は、例えば、米国特許第5,677,425号に記載されるように変更される（例えば、増加または減少させる）。CH1ドメインのヒンジ領域にあるシステイン残基の数は、例えば、軽鎖および重鎖の会合を容易にする、または抗体もしくはその抗原結合フラグメントの安定性を変更する（例えば、増加または減少させる）ように変更することができる。

【0316】

いくつかの実施形態において、1つ、2つ、またはそれ以上の突然変異（例えば、アミノ酸置換）は、本明細書に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントのFc領域（例えば、カバットナンバリングシステム（例えば、カバットでのEUインデックス）にしたがう番号付与で、CH2ドメイン（ヒトIgG1の残基231～340）および／またはCH3ドメイン（ヒトIgG1の残基341～447））および／またはヒンジ領域に導入され、エフェクタ細胞の表面上のFc受容体（例えば、活性化Fc受容体）についての抗体またはその抗原結合フラグメントの親和性を増加または減少させる。Fc受容体についての親和性を増加または減少するFc領域における突然変異、およびそのような突然変異をFc受容体またはそのフラグメントに導入するための技術は、当業者に既知である。Fc受容体についての抗体またはその抗原結合フラグメントの親和性を変更することができるFc受容体における突然変異の例は、例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Smith P et al., (2012) PNAS 109:6181-6186、米国特許第6,737,056号、および国際公開WO02/060919号；WO98/23289号；およびWO97/34631号に記載されている。

【0317】

具体的な実施形態において、1つ、2つ、またはそれ以上のアミノ酸突然変異（すなわち、置換、挿入または欠失）は、IgG定常ドメイン、またはそのFcRn結合フラグメント（好ましくは、FcまたはヒンジFcドメインフラグメント）に導入され、インビボで抗体またはその抗原結合フラグメントの半減期を変更する（例えば、減少または増加させる）。インビボで抗体またはその抗原結合フラグメントの半減期を変更する（例えば、減少または増加させる）突然変異の例について、例えば、国際公開WO02/060919号；WO98/23289号；およびWO97/34631号；ならびに米国特許第5,869,046号、第6,121,022号、第6,277,375号および第6,165,745号を参照されたい。いくつかの実施形態において、1つ、2つまたはそれ以上のアミノ酸突然変異（すなわち、置換、挿入、または欠失）は、IgG定常ドメイン、またはそのFcRn結合フラグメント（好ましくは、FcまたはヒンジFcドメインフラグメント）に導入され、インビボで抗体またはその抗原結合フラグメントの半減期を短縮する。他の実施形態において、1つ、2つまたはそれ以上のアミノ酸突然変異（すなわち、置換、挿入または欠失）は、IgG定常ドメイン、またはそのFcRn結合フラグメント（好ましくは、FcまたはヒンジFcドメインフラグメント）に導入され、インビボで抗体またはその抗原結合フラグメントの半減期を延長する。具体的な実施形態において、抗体またはその抗原結合フラグメントは、カバットでのEUインデックス（Kabatt E et al., (1991)、上記）による番号付与で、第2定常（CH2）ドメイン（ヒトIgG1の残基231～340）および／または第3定常（CH3）ドメイン（ヒトIgG1の残基341～447）に、1つまたは複数のアミノ酸突然変異（例えば、置換）を有する可能性がある。具体的な実施形態において、IgG1の定常領域は、カバットでのEUインデックスによる番号付与で、252位にメチオニン（M）からチロシン（Y）への置換、254位にセリン（S）からトレオニン（T）への置換、および256位にトレオニン（T）からグルタミン酸（E）への置換を含む。参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第7,658,921号を参照されたい。「YTE突然変異」とも呼ばれるこのタイプの突然変異IgGは、同じ抗体の野生型バージョンと比較して4倍延長した半減期を提示することが示されている（Dall'Aquila WF et al., (2

10

20

30

40

50

006) J Biol Chem 281:23514-24を参照されたい)。ある実施形態において、抗体またはその抗原結合フラグメントは、カバットでのE Uインデックスによる番号付与で、251位～257位、285位～290位、308位～314位、385位～389位、および428位～436位に、アミノ酸残基の1つ、2つ、3つまたはそれ以上のアミノ酸置換を含むIgG定常ドメインを含む。

【0318】

さらなる実施形態において、1つ、2つ、またはそれ以上のアミノ酸置換は、IgG定常ドメインFc領域に導入され、抗体またはその抗原結合フラグメントのエフェクタ機能（複数を含む）を変更する。例えば、カバットでのE Uインデックスによる番号付与で、アミノ酸残基234、235、236、237、297、318、320および322から選択される1つまたは複数のアミノ酸は、異なるアミノ酸残基で置き換えることができ、そのため、抗体またはその抗原結合フラグメントは、エフェクタリガンドについての変更された親和性を有するが、親抗体の抗原結合能力は保持する。親和性の変更されるエフェクタリガンドは、例えば、Fc受容体または補体のC1成分であり得る。この取り組みは、米国特許第5,624,821号および第5,648,260号にさらに詳細に説明されている。いくつかの実施形態において、（点突然変異または他の手段を通じての）定常領域ドメインの欠失または不活性化は、循環抗体またはその抗原結合フラグメントのFc受容体の結合を低減する可能性があり、それによって、腫瘍局在化を高める。例えば、定常ドメインを欠失または不活性化し、それによって腫瘍局在化を高める突然変異の説明については、米国特許第5,585,097号および第8,591,886号を参照されたい。ある実施形態において、Fc領域上の潜在的なグリコシル化部位を除去するために、1つまたは複数のアミノ酸置換をFc領域に導入することができ、Fc受容体結合を低減する可能性がある（例えば、Shields RL et al., (2001) J Biol Chem 276:6591-604を参照されたい）。

【0319】

ある実施形態において、カバットでのE Uインデックスによる番号付与で、定常領域にあるアミノ酸残基329、331、および322から選択される1つまたは複数のアミノ酸は、抗体またはその抗原結合フラグメントが変更されたC1q結合および／または低減したか消失された補体依存性細胞傷害（CDC）を有するように、異なるアミノ酸残基で置き換えることができる。この取り組みは、米国特許第6,194,551号（Idusogie et al）においてさらに詳細に説明される。いくつかの実施形態において、CH2ドメインのN末端領域にあるアミノ酸231位から238位内の1つまたは複数のアミノ酸残基は変更され、それによって補体を固定する抗体の能力を変更する。この取り組みは、国際公開WO94/29351号においてさらに説明される。ある実施形態において、Fc領域は、抗体依存性細胞傷害（ADCC）を媒介するため、および／または、カバットでのE Uインデックスによる番号付与で、以下の位置：238位、239位、248位、249位、252位、254位、255位、256位、258位、265位、267位、268位、269位、270位、272位、276位、278位、280位、283位、285位、286位、289位、290位、292位、293位、294位、295位、296位、298位、301位、303位、305位、307位、309位、312位、315位、320位、322位、324位、326位、327位、328位、329位、330位、331位、333位、334位、335位、337位、338位、340位、360位、373位、376位、378位、382位、388位、389位、398位、414位、416位、419位、430位、434位、435位、437位、438位、もしくは439位で1つまたは複数のアミノ酸を突然変異する（例えば、アミノ酸置換を導入する）ことにより、Fcγ受容体についての抗体もしくはその抗原結合フラグメントの親和性を高めるために、抗体またはその抗原結合フラグメントの能力を高めるように修飾される。この取り組みは、国際公報WO00/42072号にさらに説明される。

【0320】

ある実施形態において、本明細書に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントは、カバットでのEUインデックスによる番号付与で267位、328位、またはそれらの組み合わせに突然変異（例えば、置換）を有するIgG1の定常ドメインを含む。ある実施形態において、本明細書に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントは、S267E、L328F、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される突然変異（例えば、置換）を有するIgG1の定常ドメインを含む。ある実施形態において、本明細書に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントは、S267E/L328F突然変異（例えば、置換）を有するIgG1の定常ドメインを含む。ある実施形態において、本明細書に記載の、S267E/L328F突然変異（例えば、置換）を有するIgG1の定常ドメインを含む抗体またはその抗原結合フラグメントは、FcγRIIA、FcγRIIB、またはFcγRIIAおよびFcγRIIBについて、向上した結合親和性を有する。

10

【0321】

ある実施形態において、本明細書に記載の任意の定常領域突然変異または修飾は、2つの重鎖定常領域を有する本明細書に記載の抗体またはその抗原結合フラグメントの1つまたは両方の重鎖定常領域に導入することができる。

III. 抗体産生

【0322】

ヒト4-1BBおよび／またはヒトOX40に免疫特異的に結合する抗体は、抗体の合成のための当技術分野において既知である任意の方法により、例えば、化学的合成により、または組換え発現技術により産生することができる。本明細書に記載の方法は、別段の定めがない限り、分子生物学、微生物学、遺伝子解析、組換えDNA、有機化学、生物化学、PCR、オリゴヌクレオチド合成および修飾、核酸ハイブリダイゼーション、および当業者が備えている技術の範囲内で関連する分野における従来の技術を使用する。これらの技術は、例えば、本明細書に引用された参考文献に記載されており、その文献で完全に説明されている。例えば、Maniatis T et al., (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J et al., (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J et al., (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel FM et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1987および毎年更新されたもの); *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons (1987および毎年更新されたもの) Gait (ed.) (1984) *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press; Eckstein (ed.) (1991) *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, IRL Press; Birren B et al., (eds.) (1999) *Genome Analysis: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Pressを参照されたい。

20

30

40

【0323】

本明細書で提供されるような二重特異性抗体は、宿主細胞内でポリヌクレオチドを発現することにより調製することができ、ポリヌクレオチドは、順にアミノ末端からカルボキシル末端に、第1scFv、ヒンジ領域、免疫グロブリン定常領域、および第2scFvを含むポリペプチドをコードし、(a) 第1scFvが、ヒト4-1BB抗原結合ドメインを含み、第2scFvが、ヒトOX40抗原結合ドメインを含むか、(b) 第1scFvが、ヒトOX40抗原結合ドメインを含み、第2scFvが、ヒト4-1BB抗原結合

50

ドメインを含む。ポリペプチドは、二量体として宿主細胞内に発現させることができる。

【0324】

本明細書で提供されるような二重特異性抗体は、2つの異なるモノクローナル抗体を化学的に結合することにより、またはハイブリッド-ハイブリドーマを産生するために2つのハイブリドーマ細胞株を融合することにより、調製することができる。二重特異性二価抗体、およびそれらを製造する方法は、例えば、米国特許第5,731,168号、第5,807,706号、第5,821,333号、および米国特許出願公開第2003/020734号および第2002/0155537号に記載されている；それぞれ、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。二重特異性四価抗体、およびそれらを製造する方法は、例えば、国際出願公開WO02/096948号およびWO00/44788号に記載されており、両方の開示は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。一般に、国際出願公開WO93/17715号、WO92/08802号、WO91/00360号、およびWO92/05793号；Tutt et al., J. Immunol. 147:60-69 (1991)；米国特許第4,474,893号；第4,714,681号；第4,925,648号；第5,573,920号；および第5,601,819号；ならびにKostelny et al., J. Immunol. 148:1547-1553 (1992)を参照されたい；それぞれ、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【0325】

本明細書に記載されるような二重特異性抗体は、例えば、国際公開WO2011/131746号、WO2011/147986号、WO2008/119353号、およびWO2013/060867号において、ならびにLabrijn AF et al., (2013) PNAS 110(13):5145-5150において説明されたように、DuoBodyテクノロジープラットフォーム (Genmab A/S) にしたがって生成することができる。2つの重鎖および2つの軽鎖を含む第1単一特異性抗体の半分ならびに2つの重鎖および2つの軽鎖を含む第2単一特異性抗体の半分の組み合わせるために、DuoBodyテクノロジーを使用することができる。得られるヘテロ二量体は、第2抗体からの1つの重鎖および1つの軽鎖と対になった第1抗体からの1つの重鎖および1つの軽鎖を含む。両方の単一特異性抗体が、異なる抗原に対して異なるエピトープを認識する場合、得られるヘテロ二量体は、二重特異性抗体である。

【0326】

DuoBodyテクノロジーは、各単一特異性抗体が、CH3ドメイン内に単一の点突然変異を有する重鎖定常領域を含むことを必要とする。点突然変異は、いずれかの単一特異性抗体におけるCH3ドメイン間よりも、得られる二重特異性抗体におけるCH3ドメイン間のより強力な相互作用を可能にする。各単一特異性抗体における単一の点突然変異は、例えば、国際公開WO2011/131746号において記載されるように、重鎖定常領域のCH3ドメインにおいて、EUナンバリングシステムにしたがう番号付与で、残基366、368、370、399、405、407、または409である。さらに、単一の点突然変異は、他の単一特異性抗体と比較して1つの単一特異性抗体において異なる残基に位置する。例えば、1つの単一特異性抗体は、EUナンバリングシステムにしたがう番号付与で、突然変異F405L（すなわち、残基405でのフェニルアラニンからロイシンへの突然変異）を含むことができるが、他の単一特異性抗体は、突然変異K409R（すなわち、残基409でのリジンからアルギニンへの突然変異）を含むことができる。単一特異性抗体の重鎖定常領域は、IgG₁、IgG₂、IgG₃、またはIgG₄アイソタイプ（例えば、ヒトIgG₁アイソタイプ）であり得、DuoBodyテクノロジーにより産生された二重特異性抗体は、Fc媒介エフェクタ機能を保持することができる。

【0327】

二重特異性抗体を生成するための別の方法は、「ノブ-イントゥーホール (knobs-into-holes)」戦略と呼ばれている（例えば、国際公開WO2006/028936号を参照されたい）。この技術において、IgGにおけるCH3ドメインの界面

を形成する選択されたアミノ酸を突然変異させることにより、Ig重鎖の誤対合が減少する。2つの重鎖が直接相互作用するCH3ドメイン内の位置で、小さい側鎖（ホール）を有するアミノ酸は、1つの重鎖の配列に導入され、大きい側鎖（ノブ）を有するアミノ酸は、他の重鎖に位置する対の相互作用する残基に導入される。いくつかの実施形態において、本発明の組成物は、二重特異性抗体を優先的に形成するように2つのポリペプチド間の界面で相互作用する選択されたアミノ酸を突然変異させることによりCH3ドメインが修飾されている免疫グロブリン鎖を有する。二重特異性抗体は、同じサブクラス（例えば、IgG1またはIgG3）または異なるサブクラス（例えば、IgG1およびIgG3、またはIgG3およびIgG4）の免疫グロブリン鎖で構成することができる。

【0328】

一実施形態において、4-1BBおよびOX40に結合する二重特異性抗体は、（EUNANバリングシステムにしたがう番号付与で）「ノブ鎖」にT366W突然変異、および「ホール鎖」にT366S、L368A、Y407V突然変異、ならびに任意で、例えば、「ノブ鎖」にY349C突然変異および「ホール鎖」にE356C突然変異またはS354C突然変異；「ノブ鎖」にR409D、K370E突然変異および「ホール鎖」にD399K、E357K突然変異；「ノブ鎖」にR409D、K370E突然変異および「ホール鎖」にD399K、E357K突然変異；「ノブ鎖」にT366W突然変異および「ホール鎖」にT366S、L368A、Y407V突然変異；「ノブ鎖」にR409D、K370E突然変異および「ホール鎖」にD399K、E357K突然変異；鎖の1つにY349C、T366W突然変異および対の鎖にE356C、T366S、L368A、Y407V突然変異；鎖の1つにY349C、T366W突然変異および対の鎖にS354C、T366S、L368A、Y407V突然変異；鎖の1つにY349C、T366W突然変異および対の鎖にS354C、T366S、L368A、Y407V突然変異を導入することによる、CH3ドメイン間の追加の鎖間ジスルフィド架橋を含む。

【0329】

4-1BBおよびOX40に結合する二重特異性抗体は、いくつかの場合、IgG4とIgG1、IgG4とIgG2、IgG4とIgG3、またはIgG1とIgG3の鎖のヘテロ二量体を含むことができる。そのようなヘテロ二量体重鎖抗体は、例えば、ヘテロ二量体重鎖形成を促進するように、ヒトIgG4およびIgG1またはIgG3におけるCH3ドメインの界面を形成する選択されたアミノ酸を修飾することにより、常に操作することができる。

【0330】

本明細書に記載の二重特異性抗体は、当業者に既知である任意の技術により生成することができる。例えば、本明細書に記載のF(ab')₂フラグメントは、ペプシンのような酵素を使用して、免疫グロブリン分子のタンパク質分解的開裂により産生することができる。

【0331】

ある態様において、本明細書に記載の細胞または細胞群を培養することを含む、ヒト4-1BBおよび／またはヒトOX40に免疫特異的に結合する抗体を製造する方法が、本明細書において提供される。ある態様において、本明細書に記載の細胞または宿主細胞（例えば、本明細書に記載の抗体をコードするポリヌクレオチドを含む細胞または宿主細胞）を使用して抗体を発現する（例えば、組換え的に発現する）ことを含む、ヒト4-1BBおよび／またはヒトOX40に免疫特異的に結合する抗体を製造する方法が、本明細書において提供される。特定の実施形態において、細胞は、単離された細胞である。特定の実施形態において、外因性ポリヌクレオチドは、細胞に導入されている。特定の実施形態において、その方法は、細胞または宿主細胞からの抗体を精製するステップをさらに含む。

【0332】

モノクローナル抗体は、当技術分野において既知であり、例えば、Harlow E &

10

20

30

40

50

Lane D, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling GJ et al., : Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563 681 (Elsevier, N. Y., 1981) において教示されるものを含むハイブリドーマ技術を使用して産生することができる。本明細書で使用されるような用語「モノクローナル抗体」は、ハイブリドーマ技術を通じて産生される抗体に限定されない。例えば、モノクローナル抗体は、本明細書に記載の抗体を外因的に発現する宿主細胞から組換え的に産生することができる。本明細書に記載のモノクローナル抗体は、例えば、Kohler G & Milstein C (1975) Nature 256: 495 に記載されるようなハイブリドーマ法により作成することができるか、例えば、本明細書に記載されるような技術を使用してファージライブラリから、例えば、単離することができる。クローン細胞株およびそれにより発現されるモノクローナル抗体の調製のための他の方法は、当技術分野において周知である（例えば、Short Protocols in Molecular Biology, (2002) 5th Ed., Ausubel FM et al., のチャプター11、上記を参照されたい）。

【0333】

さらに、本明細書に記載の抗体は、また、当技術分野において既知である種々のファージディスプレイ法を使用して生成することができる。ファージディスプレイ法において、タンパク質は、それらをコードするポリヌクレオチド配列を運ぶファージ粒子の表面に提示される。特に、VHドメインおよびVLドメインをコードするDNA配列は、動物cDNAライブラリ（例えば、患部組織のヒトまたはマウスcDNAライブラリ）から増幅される。VHドメインおよびVLドメインをコードするDNAは、PCRによりscFvリンカーと一緒に組換えられ、ファージミドベクターにクローンされる。ベクターを、大腸菌（E. coli）にエレクトロポレーションし、大腸菌（E. coli）にヘルパーファージを感染させる。これらの方法で使用されるファージは、典型的に、fdおよびM13を含む繊維状ファージであり、VHドメインおよびVLドメインは、通常、ファージ遺伝子IIIまたは遺伝子VIIのいずれかに組換え的に融合される。特定の抗原に結合する抗体を発現するファージは、抗原、例えば、標識された抗原または固体表面またはビーズに結合もしくは捕捉された抗原を使用して選択または同定することができる。本明細書に記載の抗体を作成するのに使用することができるファージディスプレイ法の例には、Brinkman U et al., (1995) J Immunol Methods 182: 41-50; Ames RS et al., (1995) J Immunol Methods 184: 177-186; Kettleborough CA et al., (1994) Eur J Immunol 24: 952-958; Persic L et al., (1997) Gene 187: 9-18; Burton DR & Barbas CF (1994) Advan Immunol 57: 191-280; PCT出願PCT/GB91/001134号；国際公開WO90/02809号、WO91/10737号、WO92/01047号、WO92/18619号、WO93/11236号、WO95/15982号、WO95/20401号、およびWO97/13844号；ならびに米国特許第5,698,426号、第5,223,409号、第5,403,484号、第5,580,717号、第5,427,908号、第5,750,753号、第5,821,047号、第5,571,698号、第5,427,908号、第5,516,637号、第5,780,225号、第5,658,727号、第5,733,743号、および第5,969,108号に開示されるものが含まれる。

【0334】

上記参考文献に記載されるように、ファージ選択の後、ファージからの抗体コード領域を単離することができ、ヒト抗体を含む抗体を生成するのに使用することができ、例えば、以下に説明するように、哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母、および細菌を含む任意の所望の宿主に発現させることができる。Fab、Fab' および F(ab)₂ フラグ

メントのような抗体を組換え産生する技術は、また、PCT公開WO92/22324号；Mullinax RL et al., (1992) BioTechniques 12(6):864-9；Sawai H et al., (1995) Am J Reprod Immunol 34:26-34；およびBetter M et al., (1988) Science 240:1041-1043に開示されるものなど、当技術分野において既知である方法を使用して採用することができる。

【0335】

一態様において、抗体を生成するために、VHヌクレオチド配列またはVLヌクレオチド配列、制限部位、および制限部位を保護するためのフランキング配列を含むPCRプライマを使用して、鋳型、例えば、scFvクローンからVH配列またはVL配列を増幅させることができる。当業者に既知であるクローン技術を使用して、PCR増幅VHドメインを、VH定常領域を発現するベクターにクローン化することができ、PCR増幅VLドメインを、VL定常領域、例えば、ヒトカッパまたはラムダ定常領域を発現するベクターにクローン化することができる。VHドメインおよびVLドメインは、また、必要な定常領域を発現する1つのベクターにクローン化することもできる。その後、重鎖変換ベクターおよび軽鎖変換ベクターは、細胞株に同時トランスフェクトされ、当業者に既知である技術を使用して、抗体、例えば、IgGを発現する安定細胞株または一過性細胞株を生成する。

【0336】

ヒト化抗体は、所定の抗原に結合することができ、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を実質的に有するフレームワーク領域および非ヒト免疫グロブリン（例えば、マウス免疫グロブリン）のアミノ酸配列を実質的に有するCDRを含む。特定の実施形態において、ヒト化抗体は、また、免疫グロブリン定常領域（Fc）、典型的には、ヒト免疫グロブリンの少なくとも一部を含む。抗体は、また、重鎖のCH1領域、ヒンジ領域、CH2領域、CH3領域、およびCH4領域を含むことができる。ヒト化抗体は、IgM、IgG、IgD、IgAおよびIgEを含む免疫グロブリンの任意のクラス、ならびにIgG₁、IgG₂、IgG₃およびIgG₄を含む任意のアイソタイプから選択することができる。ヒト化抗体は、CDRグラフティング（欧州特許EP239400号；国際公開WO91/09967号；および米国特許第5,225,539号、第5,530,101号、および第5,585,089号）、ベニヤリングまたはリサーフェイシング（欧州特許EP592106号およびEP519596号；Padlan EA (1991) Mol Immunol 28(4/5):489-498；Studnicka GM et al., (1994) Prot Engineering 7(6):805-814；およびRoguska MA et al., (1994) PNAS 91:969-973）、チェーンシャッフリング（米国特許第5,565,332号）、および、例えば、米国特許第6,407,213号、米国特許第5,766,886号、国際公開WO93/17105号；Tan P et al., (2002) J Immunol 169:1119-25；Caldas C et al., (2000) Protein Eng. 13(5):353-60；Morea V et al., (2000) Methods 20(3):267-79；Baca M et al., (1997) J Biol Chem 272(16):10678-84；Roguska MA et al., (1996) Protein Eng 9(10):895-904；Couto JR et al., (1995) Cancer Res. 55(23 Supp):5973s-5977s；Couto JR et al., (1995) Cancer Res 55(8):1717-22；Sandhu JS (1994) Gene 150(2):409-10およびPedersen JT et al., (1994) J Mol Biol 235(3):959-73に開示されている技術を含むが、これらに限定されない、当技術分野において既知である種々の技術を使用して産生することができる。また、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる、米国出願公開US2005/0042664A1号（2005年2月24日）も参照されたい。

10

20

30

40

50

I V . 抗体をコードするポリヌクレオチド

【0337】

ある実施形態において、本開示は、4-1BBおよび／またはOX40、またはそのような抗体のポリペプチド、例えば、VH、VL、VLを有するVH（例えば、scFv中）、重鎖、軽鎖、scFvを有する重鎖、scFvを有する軽鎖、scFvを含む融合タンパク質、リンカー（例えば、リンカーはヒンジである）、免疫グロブリン定常領域、およびscFv、定常領域、またはscFvを有する定常領域に結合する抗体をコードする核酸を含むポリヌクレオチドを包含する。

【0338】

したがって、本明細書において、配列番号5～10の6つのCDRをコードするポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの組み合わせが提供される。ポリヌクレオチドは、それぞれ配列番号147のヌクレオチド76～99、151～174、289～330、502～519、571～579、および688～714として挙げられるヌクレオチド配列を含むことができる。

10

【0339】

本明細書において、配列番号5、119、7、120、121、および122の6つのCDRをコードするポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの組み合わせも提供される。

【0340】

本明細書において、配列番号11～16の6つのCDRをコードするポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの組み合わせも提供される。ポリヌクレオチドは、それぞれ配列番号147のヌクレオチド1912～1935、1987～2010、2125～2145、1528～1545、1597～1605、および1714～1746として挙げられるヌクレオチド配列を含むことができる。

20

【0341】

本明細書において、配列番号5～11の6つのCDRおよび配列番号11～16の6つのCDRをコードするポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの組み合わせも提供される。

【0342】

本明細書において、配列番号5、119、7、120、121、および122の6つのCDRおよび配列番号11～16の6つのCDRをコードするポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの組み合わせも提供される。

30

【0343】

また、本明細書において、本明細書で提供されるVH、例えば、配列番号17、19、21、23、25、27、29、31～33、または143のアミノ酸配列を含むVHをコードするポリヌクレオチドも提供される。ポリヌクレオチドは、配列番号147のヌクレオチド1～363；配列番号147の1837～2178；配列番号148のヌクレオチド1～363；配列番号148の1837～2178；配列番号149のヌクレオチド1～363；または配列番号149の1837～2178として挙げられるヌクレオチド配列を含むことができる。

【0344】

また、本明細書において、本明細書で提供されるVL、例えば、配列番号18、20、22、24、26、28、30または34～41のアミノ酸配列を含むVLをコードするポリヌクレオチドも提供される。ポリヌクレオチドは、配列番号147のヌクレオチド424～744；配列番号147の1453～1776；配列番号148の424～744；配列番号148の1453～1776；配列番号149の424～744；または配列番号149の1453～1776として挙げられるヌクレオチド配列を含むことができる。

40

【0345】

また、本明細書において、本明細書で提供される4-1BB結合配列（例えば、scFv）、例えば、配列番号42～45、58、63、77、または101のアミノ酸配列を含む4-1BB結合配列をコードするポリヌクレオチドも提供される。ポリヌクレオチド

50

は、配列番号 147 のヌクレオチド 1～744；配列番号 148 の 1～744；または配列番号 149 の 1～744 として挙げられるヌクレオチド配列を含むことができる。

【0346】

また、本明細書において、本明細書で提供される OX40 結合配列（例えば、scFv）、例えば、配列番号 46～57、59～76、または 102 のアミノ酸を含む OX40 結合配列をコードするポリヌクレオチドも提供される。ポリヌクレオチドは、配列番号 147 のヌクレオチド 1453～2181；配列番号 148 の 1453～2181；または配列番号 149 の 1453～2181 として挙げられるヌクレオチド配列を含むことができる。

【0347】

また、本明細書において、本明細書で提供される 4-1BB×OX40 二重特異性抗体、例えば、配列番号 78～100 のアミノ酸配列を含む抗体をコードするポリヌクレオチドも提供される。ポリヌクレオチドは、配列番号 147～149 のいずれか 1 つで示されるヌクレオチド配列を含むことができる。

【0348】

ある実施形態において、ポリヌクレオチドは、順にアミノ末端からカルボキシル末端に、第 1 scFv、リンカー（例えば、リンカーはヒンジ領域である）、免疫グロブリン定常領域、および第 2 scFv を含むポリペプチドをコードし、（a）第 1 scFv が、ヒト 4-1BB 抗原結合ドメインを含み、第 2 scFv が、ヒト OX40 抗原結合ドメインを含むか、（b）第 1 scFv が、ヒト OX40 抗原結合ドメインを含み、第 2 scFv が、ヒト 4-1BB 抗原結合ドメインを含む。

【0349】

以下でより詳細に議論されるように、本明細書で開示されるポリヌクレオチドを含むベクターも、提供される。

【0350】

本発明のポリヌクレオチドは、RNA の形状または DNA の形状であり得る。DNA は、cDNA、ゲノム DNA、および合成 DNA を含み、二本鎖または一本鎖であり得、一本鎖は、コード鎖または非コード（アンチセンス）鎖であり得る場合がある。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、もう 1 つの内因性イントロンを欠く cDNA または DNA である。

【0351】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、天然に存在しないポリヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、組換え産生される。

【0352】

ある実施形態において、ポリヌクレオチドは、単離される。ある実施形態において、ポリヌクレオチドは、実質的に純粋である。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、天然成分から精製される。

【0353】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるポリヌクレオチドは、特定の宿主における発現のために最適されたコドンである（ヒト mRNA におけるコドンを、大腸菌（E. coli）のような細菌宿主により好まれるものに変更する）。

V. 細胞およびベクター

【0354】

本明細書に記載のポリヌクレオチドを含むベクターおよび細胞も、本明細書において提供される。

【0355】

ある態様において、4-1BB および／または OX40 に特異的に結合し、関連するポリヌクレオチドおよび発現ベクターを含む、本明細書に記載の抗体を（例えば、組換え的に）発現する細胞（例えば、宿主細胞）が、本明細書において提供される。宿主細胞、例えば、哺乳動物宿主細胞における組換え発現のための、4-1BB および／または OX4

10

20

30

40

50

0 に特異的に結合する抗体をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを含むベクター（例えば、発現ベクター）が、本明細書において提供される。また、本明細書に記載の 4-1BB および／または OX40 に特異的に結合する抗体の組換え的な発現のための、そのようなベクターを含む宿主細胞も、本明細書において提供される。特定の態様において、宿主細胞においてそのような抗体を発現させることを含む、本明細書に記載の 4-1BB および／または OX40 に特異的に結合する抗体を産生するための方法が、本明細書において提供される。

【0356】

本明細書に記載の 4-1BB および／または OX40 に特異的に結合する抗体の組換え発現は、抗体またはそのポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、scFv、リンカー（例えば、リンカーはヒンジである）、免疫グロブリン定常領域；重鎖または軽鎖；1つまたは複数の可変ドメインを含むポリペプチド；任意でリンカー（例えば、リンカーはヒンジである）、免疫グロブリン定常領域および／またはリンカーなどに融合した、1つまたは複数の抗原結合ドメイン（例えば、scFv）を含むポリペプチドを含む融合タンパク質）を含む発現ベクターの構築を含む。本明細書に記載の抗体またはそのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが得られると、抗体またはそのポリペプチドの産生のためのベクターは、当技術分野において周知である技術を使用する組換え DNA 技術により産生することができる。したがって、ポリヌクレオチドを発現させることによりタンパク質を調製するための方法は、抗体またはそのフラグメントをコードするヌクレオチド配列が本明細書に記載されている。当業者に周知の方法を使用して、抗体またはそのポリペプチドのためのコード配列ならびに適切な転写および翻訳制御シグナルを含む発現ベクターを構築することができる。これらの方法には、例えば、インビトロ組換え DNA 技術、合成技術、およびインビボ遺伝子組換えが含まれる。また、プロモータに動作可能に連結された抗体またはそのフラグメントをコードするヌクレオチド配列を含む複製可能なベクターも提供される。そのようなベクターは、例えば、抗体分子の定常領域をコードするヌクレオチド配列を含むことができ（例えば、国際公開 WO 86/05807 号および WO 89/01036 号；ならびに米国特許第 5,122,464 号を参照されたい）、抗体の可変ドメインは、重鎖全体、軽鎖全体、または重鎖全体および軽鎖全体の両方の発現のため、そのようなベクターにクローン化することができる。追加の可変ドメイン、4-1BB 結合ドメイン（例えば、scFv）、および／または OX40 結合ドメインは、また、追加の可変ドメイン、4-1BB 結合ドメイン（例えば、scFv）、および／または OX40 結合ドメインに融合した重鎖または軽鎖を含む融合タンパク質の発現のためのそのようなベクターにクローン化することができる。

【0357】

組換えタンパク質を宿主細胞の分泌経路に向けるため、分泌シグナル配列（リーダー配列としても既知である）は、発現ベクターで提供することができる。分泌シグナル配列は、組換えタンパク質の天然型のものであり得るか、別の分泌された、またはデノボ合成されたタンパク質に由来することができる。分泌シグナル配列は、ポリペプチドをコードする DNA 配列に動作可能に連結することができる。分泌シグナル配列は、一般に、目的のポリペプチドをコードする DNA 配列に対して 5' に位置するが、あるシグナル配列は、目的の DNA 配列の他の場所に位置することができる（例えば、Welch et al., 米国特許第 5,037,743 号；Holland et al., 米国特許第 5,143,830 号を参照されたい）。

【0358】

発現ベクターは、従来の技術により細胞（例えば、宿主細胞）に移すことができ、得られる細胞は、その後、従来の技術により培養して、本明細書に記載の抗体またはそのポリペプチド（例えば、scFv、リンカー（例えば、リンカーはヒンジである）、免疫グロブリン定常領域；重鎖または軽鎖；1つまたは複数の可変ドメインを含むポリペプチド；任意でヒンジ、免疫グロブリン定常領域および／またはリンカーなどに融合した、1つまたは複数の抗原結合ドメイン（例えば、scFv）を含むポリペプチドを含む融合タンパ

ク質)を產生することができる。したがって、宿主細胞内でのそのような配列の発現のために、プロモータに動作可能に連結した、本明細書に記載の抗体またはそのポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞が、本明細書において提供される。

【0359】

ある実施形態において、多重ポリペプチド抗体の発現のため、すべてのポリペプチドをコードするベクターは、個々に、抗体全体の発現のために宿主細胞内で同時発現することができる。

【0360】

ある実施形態において、宿主細胞は、本明細書に記載の抗体の全ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むベクターを含む。具体的な実施形態において、宿主細胞は、本明細書に記載の抗体の全ポリペプチドをコードする複数の異なるベクターを含む。

10

【0361】

ベクターまたはベクターの組み合わせは、相互作用して本明細書に記載の抗体を形成する、2つまたはそれ以上のポリペプチド、例えば、重鎖をコードする第1ポリヌクレオチドおよび軽鎖をコードする第2ポリヌクレオチド；軽鎖をコードする第2ポリヌクレオチドを有する、重鎖およびs c F vを含む融合タンパク質をコードする第1ポリヌクレオチド；重鎖をコードする第2ポリヌクレオチドを有する、軽鎖およびs c F vを含む融合タンパク質をコードする第1ポリヌクレオチド；軽鎖およびV Lを含む融合タンパク質をコードする第2ポリヌクレオチドを有する、重鎖およびV Hを含む融合タンパク質をコードする第1ポリヌクレオチドなどをコードするポリヌクレオチドを含むことができる。2つのポリペプチドが2つの別個のベクターにおいてポリヌクレオチドによりコードされる場合、ベクターは、同じ宿主細胞にトランスフェクトすることができる。

20

【0362】

種々の宿主発現ベクターシステムを利用して、本明細書に記載の抗体またはそのポリペプチド(例えば、s c F v、リンカー(例えば、リンカーはヒンジである)、免疫グロブリン定常領域；重鎖または軽鎖；1つまたは複数の可変ドメインを含むポリペプチド；任意でヒンジ、免疫グロブリン定常領域および／またはリンカーなどに融合した、1つまたは複数の抗原結合ドメイン(例えば、s c F v)を含むポリペプチドを含む融合タンパク質)を発現することができる。そのような宿主発現系は、目的のコード配列を產生することができる、続いて精製することができる媒質を表すが、また、適切なヌクレオチドコード配列を用いて形質転換またはトランスフェクトされる場合、本明細書に記載の抗体またはそのポリペプチドをその場で発現することができる細胞も表す。これらには、抗体コード配列を含む組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNAまたはコスミドDNA発現ベクターで形質転換された細菌(例えば、大腸菌(E. coli)および枯草菌(B. subtilis))のような微生物；抗体コード配列を含む組換え酵母発現ベクターで形質転換された酵母(例えば、サッカロマイセス・ピキア)；抗体コード配列を含む組換えウイルス発現ベクター(例えば、バキュロウイルス)に感染させた昆虫細胞系；抗体コード配列を含む組換えウイルス発現ベクター(例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV；タバコモザイクウイルス、TMV)に感染させたか、組換えプラスミド発現ベクター(例えばTiプラスミド)で形質転換された植物細胞系(例えば、コナミドリムシ(Chlamydomonas reinhardtii)のような緑藻)；または哺乳動物細胞のゲノム(例えば、メタロチオネインプロモータ)または哺乳動物ウイルス(例えば、アデノウイルス後期プロモータ；ワクシニアウイルス7.5Kプロモータ)に由来するプロモータを含む組換え発現コンストラクトを保持する哺乳動物細胞系(例えば、COS(例えば、COS1またはCOS)、CHO、BHK、MDCK、HEK293、NS0、PER.C6、VERO、CRL7030、HsS78Bst、HeLa、およびNIH3T3、HEK-293T、HepG2、SP210、R1.1、B-W、L-M、BSC1、BSC40、YB/20およびBMT10細胞)を含むが、これらに限定されない。

30

40

【0363】

50

本明細書に記載の抗体またはそのポリペプチド（例えば、s c F v、リンカー（例えば、リンカーはヒンジである）、免疫グロブリン定常領域；重鎖または軽鎖；1つまたは複数の可変ドメインを含むポリペプチド；任意でヒンジ、免疫グロブリン定常領域および／またはリンカーなどに融合した、1つまたは複数の抗原結合ドメイン（例えば、s c F v）を含むポリペプチドを含む融合タンパク質）が、組換え発現により產生されると、抗体の精製のための当技術分野において既知である任意の方法、例えば、クロマトグラフィ（例えば、イオン交換、親和性、特にプロテインA、およびサイジングカラムクロマトグラフィの後の特定の抗原に対する親和性による）、遠心分離、溶解度差により、またはタンパク質の精製のための任意の他の標準技術により精製することができる。さらに、本明細書に記載の抗体は、精製を容易にするために、本明細書に記載の異種ポリペプチド配列（例えば、F L A G タグ、h i s タグ、またはアビジン）または当技術分野において既知である他のものに融合することができる。

10

V I . 組成物およびキット

【0364】

生理学的に許容される担体、賦形剤または安定剤中の本明細書に記載の、所望の純度を有する抗体を含む組成物が、本明細書において提供される（Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA）。許容される担体、賦形剤、または安定剤は、使用される投与量および濃度で、レシピエントに対して非毒性である。

【0365】

20

医薬組成物は、対象への特定の投与経路のために処方することができる。例えば、医薬組成物は、非経口、例えば、静脈内投与用に処方することができる。インビボ投与のために使用される組成物は、滅菌することができる。これは、例えば、滅菌濾過膜に通す濾過により容易に達成される。

【0366】

本明細書に記載の医薬組成物は、一実施形態において、薬剤としての使用のためのものである。本明細書に記載の医薬組成物は、免疫応答を増強するのに有用であり得る。本明細書に記載の医薬組成物は、対象におけるナチュラルキラー（NK）細胞および／またはT細胞（例えば、C D 4 T細胞および／またはC D 8 T細胞）増殖を高めるのに有用であり得る。本明細書に記載の医薬組成物は、対象におけるT細胞同時刺激経路を刺激するのに有用であり得る。

30

【0367】

本明細書に記載の医薬組成物は、癌のような健康状態を処置するのに有用であり得る。本明細書に記載されるように処置することができる癌の例には、メラノーマ、腎癌、膀胱癌、肺癌、腸癌、前立腺癌、乳癌、肝癌、脳癌、およびリンパ腫のような血液癌が含まれるが、これらに限定されない。ある場合において、癌は、固形腫瘍である。

V I I . 方法および使用

【0368】

4-1 B B および／またはO X 4 0 に結合する本開示の抗体は、癌の処置のような、治療的処置法を含むが、これらに限定されない種々の用途において有用である。ある実施形態において、薬剤は、腫瘍増殖を阻害する、および／または腫瘍容積を減少させるのに有用である。使用の方法は、インビトロまたはインビボの方法であり得る。本発明は、治療における使用のための任意の開示された抗体（および開示された抗体を含む医薬組成物）の使用を含む。

40

【0369】

本開示は、4-1 B B および／またはO X 4 0 に結合する抗体の治療的有効量を対象に投与することを含む、対象における癌を処置する方法を提供する。本発明は、癌の処置のための任意の開示された抗体の使用を含む。

【0370】

ある実施形態において、癌には、メラノーマ、腎癌、膀胱癌、肺癌、結腸癌／腸癌、胃癌

50

、前立腺癌、卵巣癌、乳癌、肝癌、脳癌、および血液癌を含まれるが、これらに限定されない癌である。癌は、原発性腫瘍である可能性があるか、進行性癌または転移性癌である可能性がある。ある場合において、癌は、固形腫瘍である。例えば、本開示は、肉腫、癌腫、およびリンパ腫の処置のための二重特異性抗体の使用を含む。本発明は、例えば、治療的に有効量の本発明の医薬組成物（例えば、ヒト4-1BBおよびヒトOX40に特異的に結合し、配列番号78～100および144の群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも85%、90%、95%、または99%同一であるアミノ酸配列を含む二重特異性抗体を含む医薬組成物）を対象に投与することによる、肉腫、癌腫、またはリンパ腫を有するヒト対象を処置することを含む。

【0371】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球を含む腫瘍または癌性組織を有するヒト対象を処置する方法を含む。本発明は、4-1BBおよびOX40を発現するリンパ球を含む腫瘍を有するヒト対象を処置することを含む。一実施形態において、本発明は、固形腫瘍を有するヒト対象に、抗4-1BB×抗OX40二重特異性抗体を含む医薬組成物の治療の有効量を投与することを含み、ヒト4-1BB結合ドメインは、配列番号17のアミノ酸配列と少なくとも85%、90%、95%、または99%同一であるアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号18のアミノ酸配列と少なくとも85%、90%、95%、または99%同一であるアミノ酸配列を含むVLを含み、ヒトOX40結合ドメインは、配列番号31のアミノ酸配列と少なくとも85%、90%、95%、または99%同一であるアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号30のアミノ酸配列と少なくとも85%、90%、95%、または99%同一であるアミノ酸配列を含むVLを含む。例えば、本発明は、腫瘍を有するヒト対象に、抗4-1BB×抗OX40二重特異性抗体を含む医薬組成物の有効量を投与することを含み、ヒト4-1BB結合ドメインは、配列番号58のアミノ酸配列と少なくとも85%、90%、95%、または99%同一であるアミノ酸配列を含み、ヒトOX40結合ドメインは、配列番号62のアミノ酸配列と少なくとも85%、90%、95%、または99%同一であるアミノ酸配列を含む。一実施形態において、本発明は、腫瘍を有するヒト対象に、配列番号81のアミノ酸配列と少なくとも85%、90%、95%、または99%同一であるアミノ酸配列を含む抗4-1BB×抗OX40二重特異性抗体を含む医薬組成物の治療の有効量を投与することを含む。

【0372】

本開示は、4-1BBおよび／またはOX40に結合する抗体の治療の有効量を対象に投与することを含む、対象における免疫応答を増強する方法を提供する。

【0373】

本開示は、4-1BBおよび／またはOX40に結合する抗体の治療の有効量を対象に投与することを含む、対象におけるT細胞同時刺激経路を刺激する方法を提供する。

【0374】

本開示は、4-1BBおよび／またはOX40に結合する抗体の治療の有効量を対象に投与することを含む、対象におけるNK細胞および／またはT細胞（例えば、CD4+T細胞および／またはCD8+T細胞）の増殖を高める方法を提供する。本開示は、4-1BBおよびOX40に結合する抗体の治療の有効量を対象に投与することを含む、対象におけるNK細胞、CD4+T細胞、およびCD8+T細胞の増殖を高める方法を提供する。例えば、本発明は、ヒト4-1BBおよびヒトOX40に特異的に結合し、配列番号78～100および144の群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも85%、90%、95%、または99%同一であるアミノ酸配列を含む二重特異性抗体を含む医薬組成物の治療の有効量を投与することを含む、対象におけるNK細胞、CD4+T細胞およびCD8+T細胞の増殖を高める方法を含む。

【0375】

本発明は、治療の有効量の本発明の医薬組成物を対象に投与することにより、対象における腫瘍浸潤リンパ球の数を増加させる方法を含む。例えば、本発明は、ヒト4-1BBおよびヒトOX40に特異的に結合し、配列番号78～100および144の群より選択

10

20

30

40

50

されるアミノ酸配列と少なくとも８５％、９０％、９５％、または９９％同一であるアミノ酸配列を含む二重特異性抗体を含む医薬組成物を投与することにより、対象における腫瘍浸潤リンパ球の数を増加させる方法を含む。

【０３７６】

本発明は、また、本発明の抗体または医薬組成物の治療的有効量を対象に投与することにより、対象における腫瘍浸潤リンパ球によるグランザイムの発現を向上させる方法も含む。例えば、本発明は、本明細書で提供される任意の抗体または医薬組成物の治療的有効量を対象に投与することにより、対象における腫瘍浸潤リンパ球によるグランザイムの発現を向上させる方法を含む。

【０３７７】

ある実施形態において、対象は、ヒトである。

【０３７８】

４－１ＢＢおよび／またはＯＸ４０に結合する抗体の投与は、静脈内投与を含む非経口投与であり得る。

【０３７９】

いくつかの実施形態において、薬剤としての使用のための、４－１ＢＢおよび／またはＯＸ４０に結合する抗体、またはそれを含む医薬組成物が、本明細書において提供される。いくつかの態様において、癌の処置のための方法における使用のための、４－１ＢＢおよび／またはＯＸ４０に結合する抗体、またはそれを含む医薬組成物が、本明細書において提供される。例えば、本発明は、ヒト４－１ＢＢ結合ドメインを含む二重特異性抗体を含む医薬組成物を含み、配列番号１７のアミノ酸配列と少なくとも８５％、９０％、９５％、または９９％同一であるアミノ酸配列を含むＶＨおよび配列番号１８のアミノ酸配列と少なくとも８５％、９０％、９５％、または９９％同一であるアミノ酸配列を含むＶＬを含み、ヒトＯＸ４０結合ドメインは、配列番号３１のアミノ酸配列と少なくとも８５％、９０％、９５％、または９９％同一であるアミノ酸配列を含むＶＨおよび配列番号３０のアミノ酸配列と少なくとも８５％、９０％、９５％、または９９％同一であるアミノ酸配列を含むＶＬを含む。

【０３８０】

一態様において、本明細書で提供される、４－１ＢＢおよび／またはＯＸ４０に結合する抗体は、例えば、生体試料中で、４－１ＢＢおよび／またはＯＸ４０の存在を検出するのに有用である。本明細書で使用されるような用語「検出すること」は、定量的検出または定性的検出を包含する。ある実施形態において、生体試料は、細胞または組織を含む。ある実施形態において、生体試料中の４－１ＢＢおよび／またはＯＸ４０の存在を検出する方法は、抗体の結合を許容する条件下で、生体試料を、本明細書で提供される４－１ＢＢおよび／またはＯＸ４０に結合する抗体と接触させること、ならびに抗体と４－１ＢＢおよび／またはＯＸ４０との間で複合体が形成されるかを検出することを含む。

【０３８１】

ある実施形態において、本明細書で提供される、４－１ＢＢおよび／またはＯＸ４０に結合する抗体は、標識される。標識には、直接検出される標識または部分（蛍光標識、発色団標識、高電子密度標識、化学発光標識、および放射性標識など）、ならびに、例えば、酵素反応または分子相互作用を通じて間接的に検出される酵素またはリガンドのような部分を含むが、これらに限定されない。

【０３８２】

本開示の実施形態は、本開示の特定の抗体の調製および本開示の抗体を使用するための方法において詳細に説明される、以下の非限定的な例を参照することにより、さらに定義することができる。本開示の範囲から逸脱することなく、材料および方法の両方に対する多くの修飾を実行することができることは、当業者に明らかであろう。

実施例

【０３８３】

本明細書に記載の実施例および実施形態が、例示の目的のみであり、それに照らして種

10

20

30

40

50

々の修飾または変更が、当業者に提案され、本出願の精神内および範囲内に含まれることが理解される。

実施例 1．OX40 および 4-1BB 発現 CHO 細胞ならびに組換え OX40 および 4-1BB 細胞外ドメインタンパク質の生成

【0384】

ヒトおよびカニクイザル OX40 および 4-1BB 完全長および細胞外ドメイン（ECD）を定義するヌクレオチド配列を、Genbank データベースから得、表 1 に列記する。

【0385】

【表 1 4】

表 1．細胞株および組換えタンパク質の産生のためのコンストラクトの配列識別子

コンストラクト名	コンストラクトの説明	配列識別子
		タンパク質
FOB005	完全長 ヒト 4-1BB	1
FOB006	完全長 Cyno 4-1BB	2
OXF001	完全長 ヒト OX40	3
OXF004	完全長 Cyno OX40	4
FOB003	ヒト 4-1BB ECD-AFH	103
FOB001	ヒト 4-1BB ECD-mFc	104
FOB004	Cyno 4-1BB ECD-AFH	105
FOB002	Cyno 4-1BB ECD-mFc	106
OXF003	ヒト OX40 ECD-AFH	107
OXF005	Cyno OX40-AFH	108

【0386】

ヒトおよびカニクイザル ECD には、精製、検出およびビオチンベースの標識の目的のための C 末端タグが含まれていた。表 1 のヌクレオチド配列を含む DNA を合成し、哺乳動物細胞の発現および分泌に適している発現ベクターに挿入された。非ヒト霊長類 OX40 および 4-1BB ECD タンパク質を使用して、潜在的な毒物学評価において使用される種に対する結合ドメインの交差反応性および親和性を評価した。また、これらのタンパク質を、免疫化およびスクリーニングのために利用して、両方の標的に対する結合ドメインを単離した。ECD をコードする DNA 発現ベクターを使用して、懸濁培養内で増殖した HEK-293 細胞を一時的にトランスフェクトした。数日間の培養後、遠心分離および滅菌濾過を介して、馴化培地を清澄化した。タンパク質精製を実行し、適切な親和性精製ステップ（典型的に、固定化金属アフィニティクロマトグラフィ、プロテイン A、またはプロテイン G クロマトグラフィ）、続いてサイズ排除クロマトグラフィ（SEC）の組み合わせを利用して、凝集し、クリップした生成物および他の宿主細胞汚染物質を除去した。また、SEC を使用して、タンパク質をリン酸緩衝生理食塩水（PBS）に緩衝交換した。試料の最終純度を、分析的 SEC により決定し、典型的には、90% を超える最終純度であった。タンパク質バッチを滅菌濾過し、必要になるまで 4℃ で貯蔵した。

実施例 2．スクリーニングのための完全長 OX40 および 4-1BB を発現する CHO 細胞株の生成

【0387】

2 つの標的（OX40：OX4F001（hu）および OXF004（cyno）；4-1BB：FOB005（hu）および FOB006（cyno））をコードするプラスミド DNA を PvuI で消化し、エタノール沈殿させ、OX40 コンストラクトを超純水、その後、Maxcyte エレクトロポレーション緩衝液に溶解した。エレクトロポレー

シヨンのためのMaxCyte器具を使用して、線状化DNAをCHO-K1SV細胞（CDACF-CHO-K1SV細胞（IDコード269-W3）、Lonza Biologics）にトランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞を、エレクトロポレーションキュベットからT150培養フラスコに移して休ませ、その後、T150フラスコ内で、6mM L-グルタミンを添加したCD CHO培地40mLに穏やかに懸濁した。フラスコを37℃、5%CO₂インキュベータに入れ、選択条件に入れる前に、24時間回復させた。トランスフェクションの翌日、細胞を1000RPMで5分間遠心分離し、1×GSサブプリメントおよび50μM MSXを含むCD CHO培地に再懸濁した。バルク集団を初期選択から回収した後、市販の試薬を用いて、表面発現について細胞を評価し、代表的なバイアルを凍結した。種々の発現レベルのクローンを得るため、細胞をフローサイトメトリにより選別し、限界希釈により播種し、2週間増殖させた。FOB005およびFOB006選別プールからのクローンを、播種後3時間、24時間、48時間、7日間、および14日間で、CLD Cell Metric（Solentim）を用いるイメージングにより同定した。高品質画像および播種後3時間で同定された単一細胞を有するウェルのみを、フローサイトメトリによる表面発現のさらなる拡大および特徴づけのために選択した（図1Aおよび図1B）。OXF001およびOXF004選別プールからのクローンを、播種後14日間で画像化した。播種後14日目の高品質画像を有するウェルのみを、フローサイトメトリによる表面発現のためのさらなる拡大および特徴づけのために選択した（図2A～図2C）。全クローンは、クローンあたり最大30のバイアルで、バンクで凍結された。

実施例3．4-1BBおよびOX40結合分子ならびに抗体の一般的な発現および精製【0388】

本明細書で開示される単一特異性および二重特異性4-1BBおよびOX40結合分子を、ヒトHEK293またはチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞のいずれかの一過性トランスフェクションにより産生した。遠心分離および／または濾過により、培養物から細胞、細胞屑、および不溶性物質を清澄化した。プロテインAアフィニティクロマトグラフィを使用して、組換えタンパク質を清澄化された馴化培地から精製した。分取サイズ排除クロマトグラフィ（Prep SEC）は、典型的に、タンパク質をさらに精製して均一にし、PBSに緩衝液交換をするために実行された。タンパク質純度は、プロテインAおよびPrep SEC精製ステップのそれぞれの後で、Agilent HPLCでの分析的サイズ排除クロマトグラフィ（分析的SEC）により検証された。エンドトキシンの存在によりインビトロ活性アッセイの結果が混乱しないことを保証するために、エンドトキシン量を、メーカーの指示にしたがってEndosafe PTS機器を使用することにより決定した。得られるタンパク質をSEC精製プロセスの一部としてPBSに緩衝液交換し、1mg/mLまで濃縮し、滅菌濾過して、必要になるか、または指定されるまで、4℃で貯蔵した。タンパク質濃度を280nmでの吸光度から、そしてアミノ酸配列から算出された理論的吸光係数を使用して決定した。

実施例4．ハイブリドーマによるOX40抗体の生成【0389】

抗OX40特異性抗体を、ヒトOX40タンパク質をコードするDNA（Aldevron Freiburg、ドイツ）を用いてOmniRatおよびOmniMouse（Ligand社、サンディエゴ、CA）を免疫化した後に生成されたハイブリドーマライブラリから単離した。個々のクローンの二重特異性を、OX40のヒトおよびカニクイザル変異体でトランスフェクトしたCHO細胞に対するフローサイトメトリを使用して結合を試験することにより確認し、さらに、トランスフェクトしていないCHO細胞への結合がないことにより確認した。選択されたハイブリドーマクローンについての可変重鎖（VH）ドメイン配列および可変軽鎖（VL）ドメイン配列を、全RNAを単離した後のRT-PCRにより得た。簡潔に言うと、QiagenのRNeasy Plusキット（Qiagen、フェンロー、オランダ）を使用して、ハイブリドーマクローンセルバンクから全RNAを単離した。その後、メーカーのプロトコルにしたがって、Superscr

i p t I V (サーモフィッシャーサイエンティフィック、ウォルサム、MA) を使用する F i r s t S t a n d c D N A 合成反応で全 R N A 2 0 0 n g を使用した。鋳型として 2 μ l の c D N A および V H 領域または V L 領域のいずれかの増幅のためのリガンド / O M T により定義された特異的プライマミクスを使用して、P C R を実行した。各クローンについての P C R 産物を、定常ドメインのリバースプライマおよび標準サンガーシーケンシング法を使用して、直接配列決定した。その後、重複配列を含む特異的プライマを使用して可変ドメインを増幅させることにより配列を s c F v に変換し、N E B u i l d e r H i F i D N A アセンブリクローニングキット (ニューイングランドバイオラボ、ビバリー、MA) を使用して、哺乳動物発現ベクターに会合させた。

実施例 5 . 組換えヒト、マウスおよびカニクイザルの細胞外ドメインに対する O X 4 0 および 4 - 1 B B 結合ドメインの結合親和性を決定するための表面プラズモン共鳴 (S P R) 法

【 0 3 9 0 】

組換え単量体ヒトおよびカニクイザル O X 4 0 および 4 - 1 B B の細胞外ドメイン (E C D) に結合する単一特異性および二重特異性タンパク質の S P R 結合親和性研究を、0 . 2 % B S A 緩衝液を含む H B S - E P + 中、2 5 ° C で、B i a c o r e T 2 0 0 または B i a c o r e 8 K システムのいずれかに対して実行した。標準アミンカップリング化学により C M 5 研究グレードセンサチップ (G E) の各フローセルに約 1 0 , 0 0 0 応答単位 (R U) の密度で、1 0 m M 酢酸ナトリウム p H 5 . 0 中、2 5 μ g / m l のマウス抗ヒト I g G (G E , B R - 1 0 0 8 - 3 9) を固定化した。0 . 2 % B S A 緩衝液を含む H B S - E P + 中、約 1 0 0 n M の各結合タンパク質を、1 0 μ L / 分の流速で 2 0 秒間固定化した抗ヒト I g G を有するフローセルに捕捉し、1 つのフローセル表面を参照として変更せずに残した。シングルサイクルカイネティクスモードを使用して、5 つの異なる濃度の E C D を、各フローセルに 3 0 μ L / 分で 3 0 0 秒間連続して注入し、6 0 0 秒間の分離期間が続いた。再生は、3 0 μ L / 分の流速で 3 0 秒間の 3 M M g C l 2 の注入、それに続く、0 . 2 % B S A 緩衝液を含む H B S - E P + による 1 分間の安定化により達成された。

【 0 3 9 1 】

カイネティック S P R 測定から得られたセンサーグラムを、二重減算法により分析した。参照フローセルからのシグナルを、固定化リガンドまたは捕捉されたリガンドを有するフローセルから得られた検体結合応答から減じた。その後、緩衝液参照応答を、複数回の注入から平均化した。その後、平均緩衝液参照応答を、検体結合応答から減じ、最終二重参照データを、B i a c o r e T 2 0 0 評価ソフトウェア (2 . 0 , G E) を用いて分析し、データをグローバルフィッティングしてカイネティックパラメータを導き出した。単純 1 対 1 結合モデルを使用して、全センサーグラムをフィッティングした。

実施例 6 . 細胞結合および活性についての N 末端に対する対照 s c F v および C 末端に対する O X 4 0 s c F v を用いる A D A P T I R (商標) フォーマットにおける O X 4 0 結合ドメインのスクリーニング

【 0 3 9 2 】

ハイブリドーマ上清をスクリーニングすることにより得られた細胞結合データに基づき、選択した抗 O X 4 0 抗体を s c F v に変換し、A D A P T I R (商標) 二重特異性フォーマット (N 末端 s c F v - I g G 1 F c - C 末端 s c F v) に C 末端位置で組み込み、O X 4 0 レポータアッセイにおいて細胞結合および活性についてスクリーニングした。N 末端位置において、対照抗腫瘍抗原 s c F v を使用し、セット全体にわたって一定に維持した。抗 O X 4 0 s c F v 可変ドメインの両方の方向 (V H - V L および V L - V H) 、同様に、F c 領域を C 末端 s c F v に接続するのに使用される 2 つの異なるリンカー (単一 G l y 4 S e r リンカー、または一連の 3 つの G l y 4 S e r リピートのいずれか) の長さを評価した。

【 0 3 9 3 】

フローサイトメトリを使用して、O X 4 0 特異性 s c F v の、トランスフェクトされた

10

20

30

40

50

細胞の表面に発現するヒトおよびカニクイザル OX40 への結合を定量化し、確認した。結合研究を、所内で開発され、その後クローン化された、完全長ヒトまたはカニクイザル OX40 タンパク質を安定して発現する CHO-K1 細胞に対して実行した。典型的には、100,000 個の細胞を、0.2% BSA および 2mM EDTA を含む PBS 緩衝液 50 μ l 中、二重特異性コンストラクトの希釈物と 40 分間、4℃でインキュベートし、続いて洗浄した。後に続くインキュベーションは、PE 標識された、最小異種間反応性二次抗体、ヤギ抗ヒト IgG Fc γ 、F(ab')₂ (Jackson ImmunoResearch) を用いて 4℃で 30 分間行った。LSR-II または FACS Symphony A3 フローサイトメータ (BD Biosciences) を使用して、結合した分子からのシグナルを検出し、FlowJo フローサイトメトリ解析用ソフトウェアにより分析した。細胞上での結合した分子の平均蛍光強度 (MFI) は、ダブレットの除外後に決定された。EC₅₀ 値を決定するための非線形回帰分析を、GraphPad Prism 7 (登録商標) グラフ作成統計ソフトウェアで実行した。

【0394】

図 3A および図 3B は、4 つの異なる二重特異性抗 ROR243 $\times$ 抗 OX40 コンストラクト (OXF169、OXF170、OXF171、および OXF172) の、ヒト OX40 またはカニクイザル OX40 タンパク質のいずれかを安定して発現する CHO 細胞への結合を示す。観察された EC₅₀ を、表 2 で報告する。

【0395】

【表 15】

表 2. scFv の方向およびリンカーの長さの影響を調べる細胞結合および活性データ

コンストラクトの詳細	OX40 レポーター アッセイ		ヒト OX40/CHO へ の結合		cyno OX40/CHO へ の結合	
名称	EC ₅₀ pM	最大 誘導	EC ₅₀ nM	最大 MFI	EC ₅₀ nM	最大 MFI
<u>OXF169</u> 抗腫瘍 scFv-Fc-3X(G4S)- OX40 VHVL	12	481003	1.9	25068	3.2	30168
<u>OXF170</u> 抗腫瘍 scFv-Fc-1X(G4S)- OX40 VHVL	10	557623	2.3	22733	4.2	28248
<u>OXF171</u> 抗腫瘍 scFv-Fc-3X(G4S)- OX40 VLVH	4	582852	1.6	28371	1.9	31803
<u>OXF172</u> 抗腫瘍 scFv-Fc-1X(G4S)- OX40 VLVH	7	540132	1.5	27698	2.0	32481

【0396】

OX40 の標的依存的活性化を誘導するために異なる OX40 結合二重特異性コンストラクトの活性を比較するため、ルシフェラーゼレポーターアッセイを使用した。NF κ B プロモータ (所内で生成された) の制御下でルシフェラーゼレポーター遺伝子を保持する、ヒト OX40 を発現するようにトランスフェクトされた 30000 個の Jurkat 細胞を

、120,000個のROR発現MDA-MB-231癌(標的)細胞とともに、96ウェルプレートで培養した。二重特異性コンストラクトの5倍希釈物を加えた。細胞を、5%ウシ胎児血清、ピルビン酸ナトリウム、抗生物質、および非必須アミノ酸を添加したRPMI1640培地の全量100μLで培養した。プレートを、加湿インキュベータ内で5時間、37℃、5%CO₂でインキュベートした。100μLのBio-Glow緩衝液(プロメガ)を各ウェルに加え、混合し、10分間インキュベートした。発光を、MicroBeta²2450マイクロプレートカウンター(パーキンエルマー)で測定した。EC₅₀値を決定するための非線形回帰分析を、GraphPad Prism6(登録商標)グラフ作成統計ソフトウェアで実行した。結果を図4に示し、y軸は、相対発光量(RLU)で値を示す。

10

【0397】

図3Aおよび図3Bおよび表2は、OX40発現NFκB Jurkatレポータ株を使用するROR243×OX40コンストラクト(OXF169、OXF170、OXF171およびOXF172)の活性を示す。MDA-MB-231標的細胞を、架橋のために使用した。活性について観察されたEC₅₀値は、4.4pMから12.2pMの間の範囲であった。

【0398】

要約すると、一連のADAPTIR(商標)コンストラクトは、同じ抗OX40ハイブリドマクロン(配列番号25のVHおよび配列番号26のVLを含む)から生成された。レポータアッセイに基づき、リンカーの長さは、活性(OXF171対OXF172、またはOXF169対OXF170)に影響するように見えなかった。しかし、抗OX40scFvが、VL-VHの方向にある場合、活性は、より高いように見えた(表2、図3および図4)。

20

実施例7. OXF171抗OX40scFvの熱安定性の最適化

【0399】

OXF171において使用される抗OX40結合ドメイン(VL-VHの方向でのBZG-12C3scFv)の熱安定性を高めるために、最適化キャンペーンを実行した。エラーが発生しやすいPCRを使用して、ランダム突然変異誘発ファージライブラリを、OXF171scFvについて生成し、穏やかな変性条件下でのファージディスプレイライブラリからのパニングを使用して、安定性を高めたクローンを濃縮した。十分に確立された分子生物学およびファージディスプレイプロトコルの組み合わせを使用した。簡潔に言うと、OXF171において使用される抗OX40scFv結合ドメインをコードする遺伝子を、メーカーのプロトコルにしたがって市販の突然変異誘発キット(GeneMorph IIランダム突然変異誘発キット、アジレントテクノロジー、USA)を使用するエラーが発生しやすいPCR反応の鋳型として使用した。PCR産物を制限酵素により消化し、ファージミドベクターにライゲーションして、pIIIファージコートタンパク質N末端融合ライブラリを作成した。このライブラリを大腸菌(E. coli)SS320/M13KO7コンピテントセルに形質転換し、ファージライブラリを生成した。ベイトとしてビオチン化OX40 ECD(配列番号107)を使用して、ライブラリに対して5ラウンドのパニングを実行した。抗原濃度を下げ、洗浄時間を長くすることにより、連続する各ラウンドについてパニングの高まった厳密性を使用した。より安定したバインダを選択するための方法として、標準PBS-T洗浄をグアニジン塩酸塩または塩化マグネシウム洗浄に置き換えるか、高温でプレインキュベートしたファージを使用する追加のラウンドのパニングを実行した。パニングの最終ラウンドに続いて、ファージアウトプットを播種し、哺乳動物の発現およびスクリーニングのために調製した発現ベクターに、scFvプールのバルククローニングのために調製した。約600の個々のコロニーを選び取り、配列決定した。約200の独特な配列についてプラスミドDNAが単離され、高スループットの293-過性トランスフェクションに使用した(培養体積約0.6mL)。3日間培養した後、細胞上清を精製し、示差走査蛍光定量法(DSF)を使用して、熱安定性を測定した。親OXF171配列と比較して熱安定性が改善された2つのアミノ酸変

30

40

50

更：可変軽鎖におけるH40Nおよび可変重鎖におけるV55Aが同定された。次に、H40NおよびV55A突然変異を別個に、または可変軽鎖におけるフレームワーク生殖細胞突然変異A51V（IGLV3-21*02に戻すため）、ならびに可変重鎖におけるD92NおよびL101V（IGHV3-30*03に戻すため）と組み合わせた。生殖細胞突然変異のH40Nとの組み合わせは、分子OXF01099、FXX01055およびFXX01079に存在する。生殖細胞突然変異のH40NおよびV55Aの組み合わせは、分子OXF01115、FXX01047およびFXX01066に存在する。
実施例8．OXF171抗OX40scFv変異体の生物物理学的特徴の産生および評価【0400】

ファージパニングに続いて、単離されたscFvを配列決定し、抗OX40scFvを野生型IgG1Fc領域（wtFc抗OX40scFv）のC末端に結合させることにより、単一特異性コンストラクトに組み込んだ。チャイニーズハムスター卵巣細胞からの一過性発現および精製に続いて、これらのコンストラクトを、発現、示差走査熱量計（DSC）による熱安定性、SPRによるヒトOX40 ECDへの結合親和性、細胞結合、およびOX40レポーターアッセイにおける活性について特徴づけた。

【0401】

MicroCal VP-キャピラリーDSCシステム（Malvern Instrument）を使用して、抗OX40scFvの温度誘導アンフォールディングの midpoint（ T_m ）を決定するDSCを実行した。緩衝液、PBS pH7.4の完全一致を参照として使用した。参照とともに各タンパク質試料の0.5mg/mL溶液500μLを機器にロードし、25℃から100℃まで毎分1℃の割合で加熱した。溶融曲線について、Origin 7プラットフォームソフトウェアMicroCal VP-Capillary DSC自動分析ソフトウェアを使用して分析し、 T_m 値を導き出した。表面プラズモン共鳴を使用して、実施例5に記載されるようにOX40結合ドメインの結合親和性を決定した。

【0402】

表3に示すように、発現における有意な増加は、非修飾の親コンストラクト（OXF01022）と比較して、2つの変異体（OXF01099およびOXF01115）で得られた。熱安定性は、55.7℃から60℃超で改善されるが、親結合ドメインへの類似の結合親和性を保持していた。改善された発現および T_m 値は、変異体が改善された安定性および溶解性を有しており、治療用タンパク質薬剤の有益な特性とみなされることを示唆する。

【0403】

【表16】

表3．親配列と比較した、好ましい抗OX40変異体の発現、熱安定性および親和性の要約

コンストラクトの詳細	発現力価	DSC	SPRによるヒトOX40 ECDに対する親和性		
			Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(nM)
名称	μg/mL	T_m (°C)			
OXF01122 (親)	163	55.7	3.4E+05	2.1E-04	0.6
OXF01099	285	61.4	5.3E+05	1.4E-04	0.3
OXF01115	326	66.6	3.9E+05	2.6E-04	0.7

【0404】

実施例9．OXF171抗OX40scFv変異体の細胞結合およびインビトロ活性の評価【0405】

結合研究を使用して、好ましい抗OX40変異体のヒトおよびカニクイザルOX40への結合を確認した。図5Aおよび図5Bに示すように、種々の抗OX40コンストラクト

(OXF01122、OXF01099およびOXF01115)のCHO細胞への結合は、ヒトOX40またはカニクイザルOX40タンパク質のいずれかを安定して発現する。親および抗OX40scFv変異体の間の結合に検出可能な差異はなかった。

【0406】

OX40の標的依存的活性化を誘導する異なるOX40結合コンストラクトの能力を比較するため、ルシフェラーゼレポーターアッセイを使用した。実験準備は、変更を加えて、実施例6において説明された。CD64を発現するCHO-K1(FcγRI)を使用して、これらのコンストラクトの野生型Fcを架橋させた。図6は、抗OX40コンストラクトの活性が類似していることを示している。結合およびレポーターアッセイの要約を、表4に示す。

【0407】

【表17】

表4. 親配列と比較した、好ましい抗OX40変異体の細胞結合およびレポーターアッセイデータの要約

コンストラクトの詳細	OX40 レポーター アッセイ		ヒト OX40/CHO へ の結合		cyno OX40CHO へ の 結合	
	EC50 pM	最大 誘導	EC50 nM	最大 MFI	EC50 nM	最大 MFI
OXF01122 (親)	89	1519155	2.2	13783	1.8	15269
OXF01099	182	1427969	4.0	14647	4.0	13336
OXF01115	88	1313128	2.1	14806	1.8	17019

【0408】

実施例10. 野生型マウスの免疫化による4-1BB抗体の生成

【0409】

4-1BB特異性抗体を、組換えヒト4-1BBタンパク質抗原(ImmunoPrecise Antibodies Victoria, B.C. CAN)を用いてBALB/cマウスおよびNZB/Wマウスを免疫化した後に生成されたハイブリドーマライブラリから単離した。ハイブリドーマクローンからの上清を、ELISAによりアッセイし、ヒトおよびカニクイザル4-1BBでトランスフェクトされたCHO細胞に対するフローサイトメトリを使用して、特異性結合について同定されたウェルを確認した。拡大のために陽性クローンを選択し、RNA抽出および可変ドメイン分析のために生存細胞を凍結した。追加の分析のために上清を保存した。

【0410】

全RNAを単離した後に、選択されたハイブリドーマクローンのための可変重鎖(VH)および軽鎖(VL)ドメイン配列をRT-PCRにより得た。簡潔に言うと、QiagenのRNeasy Plusキット(Qiagen、フェンロー、オランダ)を使用して、ハイブリドーマクローン細胞バンクから全RNAを単離し、メーカーのプロトコルにしたがって、oligo dTおよびSuperscript IV(サーモフィッシャーサイエンティフィック、ウォルサム、MA)を使用するFirst Stand cDNA合成反応で全RNA400ngを使用した。cDNA合成の後、1μLのcDNAおよびマウスIgG VH、Vκ、およびVλのための一連のプライマミクス(NovagenマウスIg-プライマセット、EMD Millipore Temecula, CA)を使用して、可変領域cDNAを増幅した。リバー(定常ドメイン)PCRプライマおよび標準サンガーシーケンシング法を使用して、各クローンについてのPCR産物を直接配列決定した。その後、重複配列を含む特異的プライマを使用して可変ドメインを増幅させ

ることにより、配列を s c F v に変換し、NEB u i l d e r H i F i DNA アセンブリクロニングキット（ニューイングランドバイオラボ、ビバリー、MA）を使用して、哺乳動物発現ベクターに会合させた。

実施例 11. s c F v フォーマットにおけるクローン 6、41BB 抗体のヒト化

【0411】

ハイブリドーマ由来抗体の評価後、ヒト化およびさらなる最適化のためにクローン 6 を選択した。主要な目的は、潜在的な免疫原性を最小限にし、結合ドメインの結合および安定性を最適化するために、マウス由来の配列を可能な限り排除することであった。クローン 6 抗体 41BB マウスモノクローナル抗体（VH 配列番号 19；VL 配列番号 20；図 7 も参照されたい）を 3 段階でヒト化した。ステージ 1 では、BioLuminate ソフトウェアパッケージリリース 2018-2（Schrodinger, LLC、ニューヨーク、USA）を使用した。マウスクローン 6 のホモロジーモデルは、PDB ID 1J V 5 に基づいて作成され、ソフトウェアのデフォルト設定および変更された設定を使用して、CDR グラフト化に最も幾何学的に適切で相同である、ヒトフレームワークを同定した。19 の CDR グラフト分子を産生し、完全長ヒト 41BB または c y n o - 41BB を発現する細胞への結合について試験した（データは、示していない）。分子 F O B 0 1 1 4 3（F O B W 0 0 6 H L H 2 0）配列番号 43、PDB ID 5 I 1 7 に基づくグラフトは、親 m A b クローン 6 と類似の結合特性を有することが示された（データは、示していない）。ステージ 2 では、フレームワーク残基をセットおよびセットの組み合わせで突然変異させ、F O B 0 1 1 4 3 のマウス残基を、重鎖の場合はヒト生殖細胞系列配列 I G H V 1 - 4 6 * 0 1 および I G H J 4 * 0 1 に、軽鎖の場合は I G K V 3 D - 7 * 0 1 および I G K J 1 * 0 1 に変換した。分子 F O B 0 1 1 8 8（F O B W 0 0 6 H L H 2 6）、配列番号 45 は、結合、機能、および発展性の特性の最良の組み合わせを保持することが確認された（データは、示していない）。ステージ 3 では、ヒト V 遺伝子生殖細胞系列とは異なる個々の残基を、それぞれ生殖細胞系列に突然変異させ、突然変異体分子のセットは、B i a c o r e 8 K（GEヘルスケアライフサイエンス、USA）を使用して、ヒト 41BB および c y n o - 41BB 組換えタンパク質（それぞれ配列番号 1 および 2）への結合について最初に特徴づけられ、次に、U n c l e 計器（アンチエインドラプズ、USA）を使用して、T_m および T_a g g を測定することにより安定性について特徴づけられた（データは、示していない）。すべて良性的なマウスからヒトへの生殖細胞系アミノ酸の変化を F O B 0 1 1 8 8 分子に組み込むことにより、最終分子 F O B W 0 0 6 H L H 4 0 を作成した。この分子の配列は、I G H V 1 - 4 6 * 0 1 と 92% 同一であり、I G K V 3 D - 7 * 0 1 と 94% 同一である。すべての非生殖細胞系残基は、いずれかの安定性の結合にとって必須である。アミノ酸アラインメントにおけるマウスからヒト化配列への進行（マウスクローン 6 からヒト化 F O B W 0 0 6 H L H 4 0）を図 7 に示す。

実施例 12. 抗 41BB クローン 6 の部分的ヒト化バージョンの産生および生物物理学的評価

【0412】

VH-VL の方向で s c F v 配列を野生型 I g G 1 F c の C 末端に結合させることにより、単一特異性 DNA コンストラクトとして、クローン 6 s c F v の異なるヒト化バージョンを産生した。一過性発現および精製に続いて、示差走査蛍光定量法（DSF）による熱安定性およびヒトおよび c y n o 41BB E D C への結合親和性について、これらのコンストラクトを特徴づけた。試料に対して DSF を実行し、5×の最終濃度まで添加した S Y P R O O r a n g e（ライフテクノロジーズ）を用いて、d P B S 中、0.125 mg/mL で、7500 F a s t リアルタイム PCR システム（サーモフィッシャーサイエンティフィック）に対して 3 連で検査した。試料を、0.9℃/分の走査速度で 25℃ から 95℃ まで加熱した。平均遷移中点値（T_m）を、P r o t e o S t a t（登録商標）P r o P r o t e i n T h e r m a l S h i f t（商標）ソフトウェア v 1.0（サーモフィッシャーサイエンティフィック）を使用して決定した。結合親和性を上述したように実行した。

10

20

30

40

50

【0413】

このデータは、結合および熱安定性が、マウス配列の削除により悪影響を受けなかったことを検証した。ヒト化コンストラクト（FOB01188）をヒトIgG1FcおよびマウスscFv配列（FOB01143）からなるキメラ分子と比較した。マウスおよびヒト化scFvの両方のTm値は、両方とも69℃であり、分子の安定性が変化しなかったことを示唆した（表5）。SPRにより決定された結合親和性は、ヒト化プロセスの結果としてヒトおよびcyno4-1BBECD（表5）の両方に対して、より緊密な結合が達成されたことを示した。

【0414】

【表18】

表5. クローン6抗41BBscFvの部分ヒト化変異体の熱安定性および結合親和性の要約

コンストラクトID	DSF	ヒト4-1BBに対する親和性			Cyno4-1BBに対する親和性		
	Tm1 (°C)	KD (nM)	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (nM)	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)
FOB01143 (マウス)	69.4	38	6.8E+04	2.6E-03	89	4.4E+04	3.9E-03
FOB01188(部分ヒト化)	69.0	25	8.2E+04	2.1E-03	61	5.3E+04	3.2E-03

【0415】

実施例13. 抗41BBクローン6scFvの部分ヒト化バージョンの細胞結合およびインビトロ活性

【0416】

実施例6において説明された一般的な方法を使用し、完全長ヒトまたはカニクイザル4-1BBタンパク質を安定して発現するJurkat細胞を使用して、結果としてコンストラクトFOB01188となる、FOB01143になされたヒト修飾が、ヒト4-1BBまたはカニクイザル4-1BBタンパク質のいずれかに対する結合親和性を負に阻害しなかったことが検証された（表6、図8Aおよび図8B）。

【0417】

4-1BBの標的依存的活性を誘導するための異なる4-1BB結合コンストラクトの活性を比較するため、ルシフェラーゼレポーターアッセイを使用した。実験準備は、実施例6に説明されたようなものであるが、これらのコンストラクトの野生型Fcへの結合を介して4-1BBを架橋するために、標的細胞としてCD64（FcγRI）を発現するCHO-K1を使用した。ヒト4-1BB発現NFκBレポーター株を所内で生成し、活性を決定するためにここで利用した。両方のコンストラクトの活性について観察されたEC50値は、28pMであった。これらのデータ（表6、図9）は、活性が、マウス配列を削除することにより影響を受けなかったことを示した。

【0418】

10

20

30

40

50

【表 19】

表 6. クローン 6 抗 4 1 B B s c F v のヒト化変異体の細胞結合およびレポータアッセイデータの要約

コンストラクトの詳細	レポータアッセイ CD64/CHO		レポータアッセイ CD64/CHO		ヒト 41BB/CHO への結合		cyno 41BB/CHO への 結合	
	EC50 pM	最大 誘導	EC50 pM	最大 誘導	EC50 nM	最大 MFI	EC50 nM	最大 MFI
FOB01143 (マウス)	28	1307559	54	1098725	1.2	1338	2.4	561
FOB01188 (部分ヒト 化)	28	1336019	59	1081756	1.4	1268	2.2	533

10

【0419】

実施例 14：4 1 B B × O X 4 0 二重特異性タンパク質のアセンブリ

【0420】

4 1 B B および O X 4 0 結合ドメインのサブセットを二重特異性タンパク質 F X X 0 1 0 4 7、F X X 0 1 0 5 5、F X X 0 1 0 6 6、および F X X 0 1 0 7 9 に結合させた（表 7；配列番号 8 6、8 7、7 8、8 8 を参照されたい）。個々の結合ドメインを、P C R により増幅させ、標準の分子生物学技術を使用して、F c をコードする DNA フラグメントおよび線形化された発現ベクターと会合させた。

20

実施例 15：追加のヒト化突然変異ならびに O X 4 0 および 4 - 1 B B 結合ドメインの変更した位置を有する、4 - 1 B B および O X 4 0 二重特異性タンパク質の産生および生物物理学的特徴づけ

【0421】

C H O 細胞における一過性発現および精製の後、追加のヒト配列の抗 4 - 1 B B s c F v（F O B 0 1 1 8 8）への組み込みの影響について、4 - 1 B B × O X 4 0 二重特異性タンパク質を調べ、同様に、好ましい方向を決定した。これらの比較を、表 7 に記載のコンストラクトのセットで実行した。

30

【0422】

【表 20】

表 7. 抗 O X 4 0 および抗 4 - 1 B B s c F v の好ましい位置について評価した二重特異性コンストラクトの説明

コンストラクト の名称	N 末端 scFv	C 末端 scFv	41BB 結合ドメイン における追加のヒ ト化突然変異？	OX40 結合ドメイン における追加の Tm 安定化突然変異？
FXX01047	抗 4-1BB	抗 OX40	いいえ	はい
FXX01055	抗 OX40	抗 4-1BB	いいえ	いいえ
FXX01066	抗 4-1BB	抗 OX40	はい	はい
FXX01079	抗 OX40	抗 4-1BB	はい	いいえ

40

【0423】

コンストラクトの比較により、抗 O X 4 0 結合ドメインが、タンパク質の N 末端に位置する場合、一過性 C H O 発現レベルが改善されることが示される（表 8、F X X 0 1 0 5 5 対 F X X 0 1 0 4 7 および F X X 0 1 0 7 9 対 F X X 0 1 0 6 6）。F X X 0 1 0 6 6 および F X X 0 1 0 7 9 における追加のヒト残基の存在は、これらの変更なしでタンパク

50

質対を比較する場合、結果として、標的結合ドメインの両方の方向の良好な発現となる。FXX01066およびFXX01079は、また、分析的SECでの生成物ピーク面積を統合することにより決定された、4℃および40℃での1週間の貯蔵の後の純度における%変化に基づいて、凝集に対してより良好な抵抗性を有していた。同じ方向を有するが、ヒト化突然変異の包含の点で異なるコンストラクトの比較は、より多くのヒトコンストラクトを有するより少量の凝集が形成されることを示し（FXX01066対FXX01047、FXX01079対FXX01055）、それらがより安定であることを支持する。標的結合ドメインの位置は、初期ProA精製ステップが実行された後に測定された分解生成物の量に影響した。ProA溶出物試料も、この方法の分解能が高いために分析的サイズ排除超高速液体クロマトグラフィ（分析的SEC-UPLC）で分析した。Waters ACQUITY UPLC機器で、タンデムに接続した2つのBEH SECカラム（200 Å、1.7 μm、4.6 mm×300 mm）を利用し、リン酸カリウム／塩化カリウム泳動用緩衝液を使用して、分析を実行した。一般に、10 μgを注入し、0.15 mL／分の流速で75分の方法を行なった。ピーク面積を得るための一体化に続いて、データは、N末端位置で抗4-1BB s c F vを有するコンストラクトが、クリップされた生成物の形成に対して、より抵抗性があったことを示した。これは、FXX01047およびFXX01066と比較して、FXX01055およびFXX01079に存在する低分子量汚染物質の割合が大きいことに基づいている。

【0424】

【表21】

表8．選択された4-1BB×OX40二重特異性タンパク質の発現、同質性および安定性の比較

コンストラクト	発現 (μg/mL)	4℃で7日目の %MPにおける 変化	40℃で7日目の %MPにおける変 化	%低分子量 汚染物質
FXX01047	109	-0.3	-1.8	0.0
FXX01055	155	-2.3	0.0	12.0
FXX01066	179	-0.2	-2.0	0.0
FXX01079	242	0.6	-0.1	19.9

【0425】

これらの4つの変異体の、OX40および4-1BBのヒト細胞外ドメインに対する結合親和性を決定した（表9）。OX40への結合親和性は、FXX01066およびFXX01079に含まれる抗標的s c F vまたは追加のヒト化突然変異の相対位置のいずれかにより、有意な影響がなかった。抗4-1BB s c F vが、二重特異性コンストラクトのN末端に位置していた場合、4-1BBに対する親和性がより強くなると決定された。

【0426】

10

20

30

40

50

【表 2 2】

表 9. 選択された 4-1BB×OX40 二重特異性タンパク質の結合親和性

コンストラクトの名称	SPR (T200) によると 41BB ECD への親和性			SPR (T200) によると OX40 ECD への親和性		
	KD (nM)	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (nM)	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)
FXX01047	7	2.8E+05	2.0E-03	0.4	4.0E+05	1.6E-04
FXX01055	21	8.4E+04	1.8E-03	0.3	4.4E+05	1.3E-04
FXX01066	14	3.0E+05	4.4E-03	0.4	3.8E+05	1.4E-04
FXX01079	37	1.0E+05	3.8E-03	0.3	4.5E+05	1.2E-04

10

【0427】

実施例 16：追加のヒト化突然変異ならびに OX40 結合ドメインおよび 4-1BB 結合ドメインの変更された位置を有する 4-1BB および OX40 二重特異性タンパク質の細胞結合およびインビトロ活性

【0428】

フローサイトメトリを使用して、ヒトまたはカニクイザル OX40 およびヒトまたはカニクイザル 4-1BB のいずれかを発現する細胞株を使用する 4-1BB×OX40 二重特異性タンパク質の結合を定量化し、確認した。図 10A～図 10D および表 10 に示すように、変異体は、結合ドメインの追加のヒト化または位置のいずれかのために、結合における差異を提示しない。FXX01047 および FXX01066 は、FXX01055 および FXX01079 よりも僅かに低い EC50 を有しているため、抗 4-1BB scFv が N 末端に存在することが優先される。加えて、カニクイザル OX40 結合は、FXX01079 において低減される。

20

【0429】

4-1BB×OX40 二重特異性タンパク質の活性を比較するため、別のアッセイで、2つのルシフェラーゼレポータ株を利用した。OX40 発現細胞または 4-1BB 発現細胞を使用して結合し、二重特異性抗体の他の端にある抗受容体結合ドメインを介して架橋を誘導した。4-1BB 活性を定量化するため、ヒト 4-1BB NFκB ルシフェラーゼレポータ株を、OX40 発現 CHO-K1 標的細胞とインキュベートした。逆に、OX40 活性を調べるため、ヒト OX40 NFκB ルシフェラーゼレポータ株を標的 4-1BB 発現 Jurkat 細胞とともに加えた。両方のアッセイにおいて、30,000 のレポータおよび標的細胞を、希釈した 4-1BB×OX40 タンパク質に加え、5% FBS を含むレポータ培地中で 5 時間インキュベートした。図 11A に示すように、FXX01047、FXX01055、FXX01066、および FXX01079 の 4-1BB 活性は、識別することができず、抗 4-1BB 結合ドメインにおける scFv 位置または配列修飾により影響を受けない。OX40 レポータアッセイは、抗 OX40 scFv が C 末端に配置されることが優先される（図 11B）が、配列に対する変更が、活性に影響しなかったことを示す。ヒト結合およびレポータアッセイの要約を、表 10 に示す。

30

40

【0430】

50

【表 2 3】

表 1 0 . クローン 6 抗 4 1 B B s c F v のヒト化変異体の細胞結合およびレポーターアッセイデータの要約

コンストラクトの詳細	4-1BB レポーターアッセイ		OX40 レポーターアッセイ		ヒト 41BB/Jurkat への結合		ヒト OX40/CHO への結合	
	EC50 pM	最大誘導	EC50 pM	最大誘導	EC50 nM	最大 MFI	EC50 nM	最大 MFI
FXX01047	14	6581841	10	1968922	0.32	4945	0.35	10487
FXX01055	13	6818255	13	2029136	0.27	4747	0.40	10407
FXX01166	19	6104367	12	533567	0.27	4542	1.5	8621
FXX01179	25	6264343	23	470294	0.53	4115	1.4	9822

10

【0 4 3 1】

実施例 1 7 : 等電点 (p I) を変更するための 4 - 1 B B s c F v の方向および抗 O X 4 0 s c F v のフレームワーク配列修飾の評価

【0 4 3 2】

二重特異性分子をさらに最適化するために、ドメインの順序を、抗 4 1 B B s c F v において評価し、生殖細胞系列由来突然変異を誘導して、抗 O X 4 0 s c F v の等電点を上げた。s c F v フォーマットにおける抗 4 1 B B クローン 6 m A b は、V H - V L フォーマットにおいて全てのステージでヒト化された。変異体のセットを産生して、V L - V H および V H - V L の方向での抗 4 1 B B の挙動を評価した。コンストラクトのこのセットの一部として、抗 O X 4 0 s c F v の p I を変更するための修飾も含めた。これらは、I G H V 3 - 3 0 * 0 3 および I G L V 3 - 2 1 * 0 2 の相同性の高い生殖細胞系列ヒトフレームワークを最初に分析し、C D R から離れた電荷の変化および表面曝露位置を同定することにより構築された。T 8 6 R は、I G H V 3 - 3 0 * 1 3 に存在し、I G L V 3 - 2 1 * 0 1 に Q 1 7 K が存在し、タンパク質の全体的な p I を高めるために含まれた。側方特異的突然変異誘発は、T 8 6 R および Q 1 7 K 変化を個々に、そして組み合わせて生じさせるように実行された。

20

実施例 1 8 : 等電点 (p I) を変更するための、4 - 1 B B s c F v の方向および抗 O X 4 0 s c F v のフレームワーク配列修飾の評価のための抗 4 - 1 B B × 抗 O X 4 0 二重特異性抗体の産生および特徴づけ

30

【0 4 3 3】

一過性発現により、タンパク質を産生し、P r o A クロマトグラフィおよび分取 S E C により精製した。精製に続いて、各試料のタンパク質濃度を、P B S 中で 1 m g / m L に調節し、安定性および結合親和性のいくつかの評価を介して試験した。抗 4 - 1 B B s c F v の方向は、二重特異性コンストラクトの N 末端位置にある場合、S P R により測定されるように、ヒト 4 - 1 B B E C D に対する結合親和性に有意に影響しなかった (表 1 1) 。同様に、抗 O X 4 0 結合ドメインのフレームワーク領域でなされた変化は、ヒト O X 4 0 E C D に対する強固な結合を変更しなかった。タンパク質安定性の評価は、これらの変更の結果として有意差を示さなかった (データは、示していない) 。

40

【0 4 3 4】

50

【表 2 4】

表 1 1. 抗 4-1 B B の両方の方向を有する 4-1 B B × O X 4 0 二重特異性タンパク質の結合親和性

コンストラクトの名称	コンストラクト組成物			ヒト 41BB ECD への親和性			ヒト OX40 ECD への親和性		
	OXF pI 変化 Q->K	OXF pI 変化 T->R	抗 41BB scFv 方向	KD (nM)	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (nM)	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)
FXX01066	いいえ	いいえ	HL	15	2.9E+05	4.5E-03	0.5	6.8E+05	3.1E-04
FXX01099	はい	いいえ	HL	14	3.3E+05	4.6E-03	0.4	7.7E+05	2.8E-04
FXX01101	いいえ	はい	HL	16	2.9E+05	4.6E-03	0.6	6.3E+05	4.1E-04
FXX01102	はい	はい	HL	15	2.9E+05	4.3E-03	0.4	7.1E+05	3.0E-04
FXX01104	いいえ	いいえ	LH	17	3.2E+05	5.5E-03	0.5	7.1E+05	3.2E-04
FXX01105	はい	いいえ	LH	19	2.9E+05	5.5E-03	0.4	7.1E+05	2.7E-04
FXX01107	いいえ	はい	LH	18	3.1E+05	5.6E-03	0.5	6.3E+05	2.9E-04
FXX01108	はい	はい	LH	18	3.1E+05	5.5E-03	0.8	4.8E+05	3.9E-04

10

【0 4 3 5】

実施例 19：等電点（p I）を変更するための、4-1 B B s c F v の方向および抗 O X 4 0 s c F v のフレームワーク配列修飾を評価するための 4-1 B B および O X 4 0 二重特異性タンパク質の細胞結合およびインビトロ活性

20

【0 4 3 6】

A D A P T I R（商標）s c F v 結合ドメインが、ヒトもしくはカニクイザル 4-1 B B または O X 4 0 を発現する細胞に十分に結合したことを示すために、細胞結合研究を完了した。上述したフローサイトメトリに基づく染色手順を使用して、結合研究を実行した。これらのデータは、タンパク質 F X X 0 1 0 6 6、F X X 0 1 0 9 9、F X X 0 1 1 0 1、F X X 0 1 1 0 2、F X X 0 1 1 0 4、F X X 0 1 1 0 5、F X X 0 1 1 0 7 および F X X 0 1 1 0 8 について結合するヒト（図 1 2 A および図 1 2 B）またはカニクイザル（図 1 2 C および図 1 2 D）のいずれかにおいて僅かな変動があることを示す。加えて、これらのタンパク質は、親 C H O - K 1 S V に対するあらゆる非特異的結合を示さなかった（図 1 3）。したがって、抗 O X 4 0 s c F v への p I 変化の追加を有する、または抗 4-1 B B s c F v の代替の方向を有する結合への障害はなかった。

30

【0 4 3 7】

活性アッセイを利用して、それぞれ 4-1 B B または O X 4 0 レポーターアッセイにおいて、O X 4 0 または 4-1 B B のいずれかを架橋する場合、N F κ B シグナル伝達を誘導する能力を示した。この実験のセットにおいて、4-1 B B または O X 4 0 の N F κ B レポーター株を発現するヒトおよびカニクイザルを両方とも、このスクリーンで評価した。カニクイザルレポーター株を生成し、所内でクローン化した。図 1 4 A におけるデータは、親 F X X 0 1 0 6 6 により生成されたものを超えて、タンパク質でのヒト 4-1 B B 活性における最大活性において僅かな増加があることを示す。対照的に、カニクイザル 4-1 B B レポーターにおける活性（図 1 4 C）は、最大 R L U における変動を示し、そのため、T 8 6 R p I 突然変異を有する V L V H 方向において抗 4-1 B B s c F v を有するコンストラクトが V H V L 方向におけるあらゆるコンストラクトよりも僅かに低く、T 8 6 R p I 突然変異がないコンストラクトよりも有意に低かった。図 1 4 B および図 1 4 D は、ヒトまたはカニクイザル O X 4 0 レポーターアッセイにおいて、E C 5 0 または最大 R L U における差異を示さない。ヒト結合およびレポーターアッセイの要約を、表 1 2 に示した。

40

【0 4 3 8】

これらの種々のコンストラクトにより誘導された非特異的活性を決定するため、4-1 B B および O X 4 0 レポーターアッセイを実行した。架橋のために O X 4 0 発現細胞株また

50

は4-1BB発現細胞株（それぞれ）を使用する代わりに、親CHO-K1SV細胞を使用した。架橋なしで、これらのコンストラクトは、NFκBシグナル伝達を誘導しないはずである。架橋なしで、VLVH方向での4-1BBは、有意にNFκBシグナル伝達を誘導する（図15A）。非特異的活性は、4-1BBがVHVL方向である場合に有意に低かった。これらのタンパク質は、親CHO-K1SVを用いて架橋した場合、ヒトOX40レポーターアッセイにおいて非特異的活性を誘導しなかった（図15B）。

【0439】

【表25】

表12. クローン6抗41BBscFvのヒト化変異体の細胞結合およびレポーターアッセイデータの要約

コンストラクトの詳細	4-1BB レポーターアッセイ		OX40 レポーターアッセイ		ヒト41BB/Jurkatへの結合		ヒト OX40/CHOへの結合	
	EC50 pM	最大誘導	EC50 pM	最大誘導	EC50 nM	最大MFI	EC50 nM	最大MFI
FXX01066	18	5498052	12	1988345	0.23	4712	0.29	10356
FXX01099	17	6650047	10	1934075	0.25	4903	0.36	10407
FXX01101	19	6957507	11	2028891	0.25	4850	0.31	10452
FXX01102	14	6936322	10	2052673	0.18	4847	0.34	10549
FXX01104	11	6106857	13	1991890	0.31	4855	0.32	10418
FXX01105	14	6581841	10	1968922	0.33	4945	0.35	10487
FXX01107	16	6847288	13	2137685	0.26	4703	0.29	10254
FXX01108	13	6613976	13	2069456	0.29	4766	0.32	10337

【0440】

実施例20：抗4-1BB×抗体OX40 ADAPTIR（商標）二重特異性処置は、インビトロでの抗4-1BBプラス抗OX40単一特異性タンパク質を用いる処置と比較して相乗的である

【0441】

クローン増殖中のOX40の同時刺激は、活性化T細胞の生存率の向上を促進することが示されている（Rogers, P. R., et al., Immunity, 15(3): 445-55 (2001) および Weatherill, A. R., et al., Cell Immunol, 209(1): 63-75 (2001)）。そのため、インビトロでT細胞およびNK細胞の数を増加させるための抗4-1BB×抗OX40 ADAPTIR（商標）コンストラクトの能力を調べた。末梢血単核細胞（PBMC）を正常なドナーから単離し、4-1BBおよびOX40発現（シグナル2）をアップレギュレートするα-CD3（シグナル1）の存在下で段階希釈した濃度のADAPTIR（商標）とともにインキュベートした。この特定の試験において、PBMC増殖を誘導するそれらの能力について、野生型IgG1のFc領域のN末端にscFvを有する抗OX40単一特異性コンストラクト（OXF01070）および野生型IgG1のFc領域のC末端にscFvを有する抗4-1BB単一特異性コンストラクト（FOB01173）を比較した。単一特異性治療は、OX40および4-1BB相乗効果を用いる二重特異性治療と比較した。標準密度勾配分離法を使用してPBMCをヒト血液から単離し、製造元の推奨のとおり、5μM CellTrace（商標）Violet（Molecular Probes）で染色した。120,000個のPBMCを10倍濃度の試験分子（10μMから1pMの範囲）とインキュベートし、細胞混合物に、96ウェルプレートで、ウェル当たり、10%FBSおよび5ng/mlのα-CD3を添加した完全RPMI1640培地中、200μl/ウェルの最終体積まで加えた。プレートを、加湿インキュベータ内

で24から6日間、37℃、5%CO₂でインキュベートした。

【0442】

NK細胞増殖およびT細胞増殖を、フローサイトメトリにより評価した。7AAD（シグマ）、PE/Cy7-αhCD25、APC/Cy7-αhCD5、BV605-αhCD56、BV650αhCD8およびBV510-αhCD4（Biolegend）を用いて細胞を蛍光標識し、4℃で30分間インキュベートした。細胞を2回洗浄し、再懸濁して、BD FACSymphony（商標）フローサイトメータで獲得した。FlowJoソフトウェアを使用して全試料を分析し、CellTrace（商標）Violet（CTV）の希釈を介して増殖させたNK細胞、CD8⁺T細胞、およびCD4⁺T細胞の割合を算出した。GraphPad Prism7.0を使用してグラフをプロットした。

10

【0443】

図16に示すように、4-1BB×OX40二重特異性タンパク質FXX01047およびFXX01055は、CD8⁺T細胞、CD4⁺T細胞、およびNK細胞（灰色記号）の用量依存的拡大を促進する。EC₅₀値は、3つの細胞サブセットについて13nMから41nMの範囲であった。この実験は、単一特異性コンストラクトOXF01070またはFOB01173が単独で、増殖を促進することができない（色なし記号）ことを明らかに示している。重要なことに、2つの単一特異性コンストラクトの組み合わせは、T細胞増殖またはNK細胞増殖を誘導するのに充分ではなかった（黒色ひし形）。野生型Fcを含む4-1BBおよびOX40単一特異性治療が、劇的に機能低下しているので、これらの結果は、臨床に関連している。4-1BB×OX40抗体の相乗的二重特異性形状においてのみ、強力な増殖を促進する。

20

実施例21：インビトロでの抗4-1BB×抗OX40 ADAPTIR（商標）二重特異性タンパク質処置に応答するヒトT細胞増殖

【0444】

機能のために初代PBMCアッセイにおいて、追加の二重特異性コンストラクトを分析した。方法は、変更を加えて、実施例20において使用したものと類似である。PE/Cy7-αhCD25（Biolegend）について細胞を追加で染色した。全試料を分析して、増殖させたNK細胞、CD8⁺T細胞、およびCD4⁺T細胞の割合および親CD25⁺を介した活性化状態を算出した。

30

【0445】

追加で、Magpixで分析する前に、アッセイ緩衝液で1：3に希釈した72時間の上清から、マルチプレックスアッセイ（Milliplex）を使用して、IFN-γ、IL-2、およびTNF-αについてサイトカイン分泌を評価した。GraphPad Prism7を使用して非線形回帰によりEC₅₀を決定した。2つの個々の健康なドナーのPBMCを使用して、コンストラクトを試験した。

【0446】

これらのデータは、4-1BB×OX40コンストラクトで処置した抗CD3刺激PBMCが、96時間の培養にわたって、用量依存的に増殖するCD8⁺T細胞およびCD4⁺T細胞の割合を確実に増加させることができることを示している（図17）。追加で、刺激されたT細胞からのサイトカインは、NK細胞の増殖（図18A）および活性化（図18B）を誘導する。さらに、72時間で培養物から取り出した上清は、コンストラクトが外因的に追加された場合、IFN-γ、IL-2、およびTNF-αの顕著な用量依存的分泌を明らかにする（図19）。試験した4-1BB×OX40二重特異性タンパク質のインビトロ機能において差異はなかった。まとめると、これらの結果は、4-1BB×OX40コンストラクトが刺激されたPBMCに加えられる場合、用量依存的インビトロNK細胞増殖およびT細胞増殖ならびにサイトカイン産生を示している。トップコンストラクトにより誘導された最大増殖のレベルは、増殖細胞の最大割合およびADAPTIR（商標）が誘導したピーク増殖での濃度の両方において類似であった。

40

実施例22．抗OX40 scFvを最適化するための追加のフレームワーク配列修飾の評価

50

【0447】

実験データの分析の後および結合ドメインの表面特性のモデリングとの組み合わせにおいて、いくつかの変異体が構築され、試験された。ヒト生殖細胞系列フレームワークの配列および構造を模倣するように、突然変異を設計した。簡単に、親IGLV3-21*01アミノ酸配列IPE (IMGTナンバリング71~74) は、IPA、VPN、VPSおよびIPKに突然変異した。二重特異性分子FXX01110から01121 (配列番号89~100) は、OX40ドメインの追加の変異体を表す。

実施例23. 抗OX40 scFvへの追加の修飾を有する二重特異性抗4-1BB×抗OX40 ADAPTIR (商標) コンストラクトの特徴づけ

【0448】

一過性トランスフェクションおよび上述した方法を使用する精製に続いて、算出した等電点 (pI) を変更した変化を含む追加のコンストラクトは、発現レベル、純度、および安定性の特徴への影響について評価された。pIにおける変化は、抗OX40 scFvに対するアミノ酸変化を介して生成された。Genedata Biologics Platform (登録商標) のアルゴリズムを使用して、等電点を算出した。理論的pI値は、方法によって異なる可能性がある。これらの値は、pI、タンパク質の正味電荷の測定値が、異なる条件下でタンパク質の溶解性および安定性に影響することができるので、一般的な傾向を探するために使用された。生成された上清の体積からのプロテインA精製から回収された質量に基づいて発現レベルを算出した (タンパク質の100%がプロテインAによって捕捉されたと仮定する)。以下の表13に示すように、発現およびpIを変更したアミノ酸配列になされた変化で観察された特定の傾向はなかった。タンパク質のこのセットの中で、FXX01111は、最も高い発現レベルを示した。プロテインA親和性捕捉ステップに続いて、分取SECを実行して、高分子量集合体 (HMW) および存在する場合にはいくつかの低分子量物質 (LMW) を除去し、同時に試料をPBSに緩衝液交換した。各コンストラクトの試料を分析的SE-HPLCおよびSE-UPLCにより分析して生成物の均一性を評価した。表13に示す全コンストラクトは、SE-HPLCまたはSE-UPLCのいずれかで検出されたHMW生成物が最小で、高純度レベルを有していた。より高い分解能のSE-UPLC法を使用して、これらのタンパク質について測定された有意なクリップ/低分子量種のピーク面積はなかった。

【0449】

10

20

30

40

50

【表 2 6】

表 1 3. 種々の算出された等電点を有する二重特異性抗 4-1 B B × 抗 O X 4 0 A D A P T I R (商標) コンストラクトの発現レベルおよび純度

名称	理論的 pI	力価、 μg/mL	SE-HPLC	SE-UPLC	SE-UPLC	SE-UPLC
			% MP	% HMW	% MP	% LMW
FXX01066	7.42	69	98.3	1.89	98.1	検出されず
FXX01101	7.61	80	97.8	2.6	97.4	検出されず
FXX01102	7.79	93	97.8	2.29	97.7	検出されず
FXX01110	7.61	127	97.8	2.1	97.9	検出されず
FXX01111	7.61	153	99.0	1.0	99.0	検出されず
FXX01112	7.61	99	98.8	0.9	99.1	検出されず
FXX01113	7.79	71	97.4	3.3	96.7	検出されず
FXX01114	7.79	62	97.7	2.7	97.3	検出されず
FXX01115	7.79	97	95.6	4.2	95.8	検出されず
FXX01116	7.79	93	97.5	2.0	98.0	検出されず
FXX01117	7.93	87	96.0	4.8	95.2	検出されず
FXX01118	7.93	89	96.4	3.9	96.1	検出されず
FXX01119	7.93	108	95.6	3.9	96.1	検出されず
FXX01120	7.93	136	97.5	2.2	97.8	検出されず
FXX01121	8.06	86	94.3	5.3	94.7	検出されず

【0 4 5 0】

精製および純度測定に続いて、各タンパク質の試料を、複数の条件下で貯蔵し、異なる貯蔵条件下であらゆる追加の賦形剤なしで、1 mg/mL で P B S のみで配合された場合に凝集するそれらの特性を評価した。これには、4 °C および 4 0 °C での貯蔵が含まれていた。加えて、凍結、次いで - 2 0 °C の冷凍庫からのタンパク質の解凍の後の凝集体の形成について各変異体を試験した。生成物のピーク面積の変化率を算出し、精製直後および以下の表 1 4 に列記された処置後の試料中に存在する凝集したタンパク質の増加を反映した。全コンストラクトは、4 °C で 1 週間後の最小変化を示し、より大きい変化が、4 0 °C の加速された安定性条件下で貯蔵された試料において検出された。試料は、1 回の凍結 / - 2 0 °C での貯蔵からの解凍のサイクルの後に僅かな変化を示した。これらの値および理論的 p I との相関関係は見られなかった。

【0 4 5 1】

10

20

30

40

50

【表 2 7】

表 1 4. 異なる算出された等電点を有する二重特異性抗 4-1 BB×抗 OX 4 0 ADA P T I R (商標) コンストラクトの 4℃および 4 0℃、ならびに -2 0℃の凍結／解凍での貯蔵安定性の評価

名称	理論的 pI	4℃で 7 日目の %MP における変化	40℃で 7 日目の %MP における変化	-20℃の凍結／解凍での %MP における変化
FXX01066	7.42	-0.5	-2.3	-1.5
FXX01101	7.61	-0.4	-2.2	-1.4
FXX01102	7.79	-0.7	-7.1	-1.8
FXX01110	7.61	-0.3	-4.1	-0.9
FXX01111	7.61	-0.2	-2.6	-1.1
FXX01112	7.61	-0.2	-2.1	-1.1
FXX01113	7.79	-1	-8.5	-1.5
FXX01114	7.79	-0.7	-4.5	-1.3
FXX01115	7.79	-0.1	-1.0	-1.1
FXX01116	7.79	-0.3	-1.6	-1.1
FXX01117	7.93	-1	-8.3	-1.5
FXX01118	7.93	-0.6	-9.9	-1.9
FXX01119	7.93	-0.2	-3.8	-1.5
FXX01120	7.93	-0.2	-2.7	-1.0
FXX01121	8.06	-2.1	-8.9	-1.9

【0 4 5 2】

T_{m1} (第 1 溶融転移の中間点) および T_{agg}、動的光散乱に基づく凝集の開始温度を、アンチエインドラブズからの U n c l e 機器を使用してこれらのコンストラクトについて測定した。表 1 5 に示す全コンストラクトは、6 0℃を超える T_{m1} および T_{agg} 値を有しており、高温安定性を有することを示唆した。タンパク質の産出された p I と相関する熱安定性値において、特定の傾向は見られなかった。

【0 4 5 3】

10

20

30

40

50

【表 28】

表 15. 異なる算出された等電点を有する二重特異性抗 4-1BB×抗 OX40 ADAPTIR (商標) コンストラクトについての T_m1 および T_{agg} 値

名称	pI	T _m 1(°C)	T _{agg} (°C)
FXX01066	7.42	66.8	64.1
FXX01101	7.61	64.3	62.1
FXX01102	7.79	64.6	61.6
FXX01110	7.61	66.5	62.1
FXX01111	7.61	67.5	63.7
FXX01112	7.61	67.5	64.0
FXX01113	7.79	67.0	63.5
FXX01114	7.79	65.5	62.1
FXX01115	7.79	66.1	63.6
FXX01116	7.79	66.8	64.1
FXX01117	7.93	67.1	63.1
FXX01118	7.93	65.5	61.5
FXX01119	7.93	65.6	62.5
FXX01120	7.93	65.7	63.4
FXX01121	8.06	65.7	62.7

【0454】

BIACORE 8K SPRシステムを使用して、ヒトおよび cyno 4-1BB、ならびにヒトおよび cyno OX40 ECDについてのこれらのコンストラクトの親和性を、上述した方法を使用して決定した。チップ上で ADAPTIR (商標) 二重特異性コンストラクトを補足し、複数の濃度で標的の一個 ECD を注入することにより、単一特異性結合親和性を決定した。OX40 scFv の親和性は、値のすべてが nM 以下の範囲にとどまっているので、pI を変更するためになされた変化による測定可能な影響はなかった (表 16)。抗 4-1BB scFv が、コンストラクトのこのセット全体で変化しなかったもので、ヒトおよび cyno 4-1BB への結合は、影響しなかった。

【0455】

10

20

30

40

50

【表 29】

表 16. 異なる算出された等電点を有する ADAPTIR (商標) 二重特異性抗 4-1BB × 抗 OX40 ADAPTIR (商標) コンストラクトの表面プラズモン共鳴により決定された親和性の値

TPP 名称	ヒト 4-1BB ECD への親和性			ヒト OX40 ECD への親和性			cyno 411BB ECD への親和性			cyno OX40 ECD への親和性		
	KD (nM)	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (nM)	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (nM)	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (nM)	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)
FXX 01066	16	2.7E+05	4.3E-03	<1	1.1E+06	2.7E-04	92	1.0E+05	9.2E-03	<1	1.5E+06	1.9E-04
FXX 01101	17	2.7E+05	4.6E-03	<1	9.8E+05	2.9E-04	76	1.0E+05	7.7E-03	<1	1.1E+06	2.7E-04
FXX 01102	16	2.9E+05	4.7E-03	<1	1.0E+06	2.5E-04	75	9.8E+04	7.4E-03	<1	1.1E+06	2.3E-04
FXX 01110	18	2.6E+05	4.8E-03	<1	9.1E+05	3.6E-04	70	1.1E+05	7.7E-03	<1	1.1E+06	2.9E-04
FXX 01111	17	2.7E+05	4.5E-03	<1	9.3E+05	3.8E-04	81	9.9E+04	8.0E-03	<1	1.1E+06	2.9E-04
FXX 01112	17	2.6E+05	4.5E-03	<1	7.9E+05	5.7E-04	77	1.0E+05	8.0E-03	<1	8.7E+05	3.1E-04
FXX 01113	15	3.0E+05	4.6E-03	<1	8.9E+05	3.1E-04	82	9.5E+04	7.8E-03	<1	9.8E+05	2.8E-04
FXX 01114	17	2.7E+05	4.5E-03	<1	1.1E+06	2.6E-04	116	7.9E+04	9.1E-03	<1	1.1E+06	2.8E-04
FXX 01115	16	2.6E+05	4.1E-03	<1	9.8E+05	3.0E-04	72	1.0E+05	7.4E-03	<1	1.1E+06	2.1E-04
FXX 01116	17	2.7E+05	4.6E-03	<1	8.8E+05	4.4E-04	81	9.8E+04	7.9E-03	<1	1.0E+06	2.7E-04
FXX 01117	17	2.5E+05	4.2E-03	<1	9.7E+05	3.0E-04	76	9.6E+04	7.2E-03	<1	1.0E+06	2.0E-04
FXX 01118	17	2.7E+05	4.6E-03	<1	8.4E+05	3.1E-04	80	9.6E+04	7.7E-03	<1	1.1E+06	2.4E-04
FXX 01119	18	2.6E+05	4.6E-03	0.3	9.2E+05	3.1E-04	79	9.5E+04	7.5E-03	0.2	1.0E+06	2.3E-04
FXX 01120	18	2.6E+05	4.6E-03	0.4	1.0E+06	3.9E-04	77	9.7E+04	7.5E-03	0.2	9.5E+05	2.3E-04
FXX 01121	9	3.9E+05	3.6E-03	0.1	1.2E+06	1.3E-04	30	4.2E+05	1.3E-02	0.2	1.0E+06	1.8E-04

【0456】

実施例 24: 異なる算出された等電点を有する二重特異性抗 4-1BB × 抗 OX40 ADAPTIR (商標) コンストラクトへの Fc 受容体結合の特徴づけ

【0457】

二重特異性タンパク質への Fcγ 受容体結合を、室温で、Biacore 8K 機器で表面プラズモン共鳴により測定した。Fcγ 受容体への結合を低減するための修飾 Fc 領域を有する二重特異性タンパク質を、CM5 センサチップの表面に 4000 RU の表面密度まで直接固定した。野生型 Fc を有する二重特異性 ADAPTIR (商標) タンパク質は、陽性対照として同様に表面に固定され、Fc 領域アミノ酸配列に組み込まれた変化に

起因する結合の低下を評価するためのコンパレータとして使用した。30 μ L / 分で60秒間、調製したセンサチップの表面に注入する前、Fc γ 受容体（R&D Systemsから購入）を100 nM（Fc γ RI）または2 μ M（Fc γ 受容体を除くすべて）のいずれかまでHBS-E P + 緩衝液中で希釈した。各注入の会合段階中の最大RU値を使用して、修飾Fcの野生型への結合の値の程度を比較し、以下の表17で報告する。Fc γ RIIAおよびRIIB / C受容体へのいくつかの明らかな残留結合がある状態で、試験された全受容体への結合の有意な低下がある。想定通り、異なるFXX二重特異性抗体は、すべて同じFc配列を共有するので、類似のレベルの結合を示す。

【0458】

【表30】

表17. 修飾Fc配列を有するADAPTIR（商標）二重特異性コンストラクトの異なるFc受容体への結合

試料	Fc タイプ	固定化 レベル (RU)	会合中の最大 RU 値						
			RI	RIIA R167	RIIA H167	RIIB/C	RIIA	RIIA V176F	RIIB
FXX 01028	野生型	4756	1085	430	378	231	532	203	91
FXX 01066	PAA (欠失)	4063	0	92	14	21	5	3	3
FXX 01101	PAA (欠失)	4318	0	94	14	21	3	2	2
FXX 01102	PAA (欠失)	4135	1	88	13	19	2	2	1
FXX 01111	PAA (欠失)	3923	0	86	13	20	3	3	2
FXX 01115	PAA (欠失)	4179	1	89	12	19	0	1	0
FXX 01119	PAA (欠失)	4854	1	103	14	22	0	1	1

【0459】

実施例25：変更された等電点（pI）を有する抗4-1BB $\times$ 抗OX40 ADAPTIR（商標）コンストラクトの細胞結合および機能活性の評価

【0460】

ヒトおよびカニクイザル結合研究を完了し、我々の最適化したADAPTIR（商標）scFv結合ドメインが、我々の標準フローサイトメトリベースの染色手順を使用して細胞に特異的に結合したことを示した。これらのデータは、コンストラクトについて、クローン化細胞株により発現された4-1BBまたはOX40のいずれかへのヒト（図20Aおよび図20B）またはカニクイザル（図20Cおよび図20D）結合のいずれかにおける最小の変化があることを示す。加えて、非特異性について試験した場合、これらのコンストラクトは、親CHO-K1 SVに結合しなかった（図21）。そのため、抗OX40 scFvに対するこれらのpI変化の追加を有する好ましくない結合の変更はない。

【0461】

スクリーニングしたコンストラクトすべてを、ヒトおよびカニクイザル発現4-1BBまたはOX40レポータ株の両方を使用するレポータアッセイにかけ、機能性を示した。図22に示すように、これらのレポータアッセイにおいて、EC50または最大RLUに僅かな差異がある。加えて、これらのタンパク質は、親CHO-K1 SVと架橋した場合、ヒト4-1BB（図23A）またはOX40（図23B）レポータアッセイにおいて

、非特異的活性を誘導しなかった。したがって、これらの最適化したADAPTIR（商標）コンストラクトの機能性は、pI突然変異の導入で変更されなかった。表18は、ヒト結合およびレポーターアッセイにおけるEC50および最大結合／誘導を要約する。

【0462】

【表31】

表18.異なる算出された等電点を有する抗4-1BB×抗OX40 ADAPTIR（商標）コンストラクトを用いるヒト細胞結合およびレポーターアッセイデータの要約

コンストラクトの詳細	4-1BB レポーターアッセイ		OX40 レポーターアッセイ		ヒト 41BB/Jurkat への結合		ヒト OX40/CHO への結合	
	EC50 pM	最大 誘導	EC50 pM	最大 誘導	EC50 nM	最大 MFI	EC50 nM	最大 MFI
FXX01066	17	1365666	21	5863939	0.57	11601	0.57	11601
FXX01101	18	1435671	17	5889413	0.60	11898	0.60	11898
FXX01102	21	1397056	16	5784185	0.54	12115	0.54	12115
FXX01110	21	1379619	17	5904888	0.50	11774	0.50	11774
FXX01111	19	1429221	17	6092237	0.69	12442	0.69	12442
FXX01112	14	1449547	19	6167694	0.53	12390	0.53	12390
FXX01113	19	1367842	16	6099691	0.56	12177	0.56	12177
FXX01114	18	1433016	18	6077716	0.58	12314	0.58	12314
FXX01115	18	1357853	19	6288476	0.62	12119	0.62	12119
FXX01116	19	1394988	17	5951223	0.65	11894	0.65	11894
FXX01117	20	1405760	18	6222166	0.65	12667	0.65	12667
FXX01118	18	1384094	16	6283088	0.58	12382	0.58	12382
FXX01119	11	1374727	12	6067294	0.61	12207	0.61	12207
FXX01120	15	1380059	12	6115030	0.53	12235	0.53	12235
FXX01121	16	1428053	16	6191687	0.42	11105	0.42	11105

【0463】

実施例26：インビボでの抗4-1BB×抗OX40 ADAPTIR（商標）二重特異性タンパク質処置に応答するヒトT細胞増殖およびサイトカイン産生

【0464】

機能的差異について、ADAPTIR（商標）二重特異性コンストラクトを初代PBM Cアッセイで分析した。上述した方法と同様に、単離されたPBM Cを、滴定された試験コンストラクトとともに10ug/mLのαCD3で96時間処置した。96時間後、フローサイトメトリを介して全試料を分析し、増殖させたNK細胞、CD8⁺T細胞、およびCD4⁺T細胞の割合を算出した。図24に示すように、各抗4-1BB×抗OX40 ADAPTIR（商標）コンストラクトは、用量依存的に培養中の増殖したCD8⁺T細胞およびCD4⁺T細胞の数を強力に増強することができた。これらの抗体の機能における僅かな変更があるが、それらは、算出されたpIにおける差異と相関していない。興味深いことに、それぞれCTV希釈およびCD25発現により測定されたように、NK細胞増殖および活性化の強化がある（図25）。さらに、図26に示すように、抗4-1BB×抗OX40二重特異性タンパク質で処置した72時間の培養から収穫した上清は、すべて、IFN-γ、IL-2およびTNF-αの用量依存的分泌を促進する。コンストラクトの算出されたpIにおける変化は、サイトカイン分泌に誘導するそれらの能力を変更しない。まとめると、これらの結果は、刺激されたPBM Cに抗4-1BB×抗OX40コンストラクトを添加する場合、用量依存的インビトロNK細胞増殖およびT細胞増殖ならびにサイトカイン産生を示している。

実施例27：Fc受容体および補体への結合を排除するためのFc突然変異

【0465】

ADAPTIR（商標）二重特異性分子において、Fc領域への突然変異を生じさせ、相互作用するための能力およびFc受容体および補体との相互作用を通じたシグナルを排除することが利点であり得る。以下の表19は、野生型Fcの配列（WT）と比較して、**ADAPTIR**（商標）二重特異性コンストラクト（**Null2**、**K322A Fc**、**TSC1004**、**TSC1005**、**TSC1006**および**TSC1007**）に含まれるFc領域になされる可能性がある、異なる突然変異を示す。

【0466】

【表32】

表19. **ADAPTIR**（商標）二重特異性コンストラクトについてのFc突然変異

EU/Kabat/IMGT による Fc AA 位置	233/246/3	234/247/4	235/248/5	236/249/6	237/250/7	318/337/88	320/339/90	322/341/92
WT IgG1	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Glu	Lys	Lys
Null2 Fc	Glu	<i>Ala</i>	<i>Ala</i>	Gly	<i>Ala</i>	<i>Ala</i>	<i>Ala</i>	<i>Ala</i>
EU-1		L234A	L235A		G237A	E318A	K320A	K322A
EU-3		Leu234Ala	Leu235Ala		Gly237Ala	Glu318Ala	Lys320Ala	Lys322Ala
Kabat-1		L247A	L248A		G250A	E337A	K339A	K341A
Kabat-3		Leu247Ala	Leu248Ala		Gly250Ala	Glu337Ala	Lys339Ala	Lys341Ala
IMGT-1		4	5		7	88	90	92
IMGT-3		4	5		7	88	90	92
K322A Fc	Glu	<i>Ala</i>	<i>Ala</i>	Gly	<i>Ala</i>	Glu	Lys	<i>Ala</i>
EU-1		L234A	L235A		G237A			K322A
EU-3		Leu234Ala	Leu235Ala		Gly237Ala			Lys322Ala
Kabat-1		L247A	L248A		G250A			K341A
Kabat-3		Leu247Ala	Leu248Ala		Gly250Ala			Lys341Ala
IMGT-1		4	5		7			92
IMGT-3		4	5		7			92
TSC 1004	<i>Pro</i>	<i>Val</i>	<i>Ala</i>	Gly	<i>Ala</i>	Glu	Lys	<i>Ala</i>
EU-1	E233P	L234V	L235A		G237A			K322A
EU-3	Glu233Pro	Leu234Val	Leu235Ala		Gly237Ala			Lys322Ala
Kabat-1	E246E	L247V	L248A		G250A			K341A
Kabat-3	Glu246Pro	Leu247Val	Leu248Ala		Gly250Ala			Lys341Ala
IMGT-1	3	4	5		7			92
IMGT-3	3	4	5		7			92
TSC 1005	<i>Pro</i>	<i>Val</i>	<i>Ala</i>	欠失	<i>Ala</i>	Glu	Lys	<i>Ala</i>
EU-1	E233P	L234V	L235A		G237A			K322A
EU-3	Glu233Pro	Leu234Val	Leu235Ala	Gly	Gly237Ala			Lys322Ala
Kabat-1	E246E	L247V	L248A		G250A			K341A
Kabat-3	Glu246Pro	Leu247Val	Leu248Ala	Gly	Gly250Ala			Lys341Ala
IMGT-1	3	4	5	6	7			92
IMGT-3	3	4	5	6	7			92
TSC 1006	<i>Pro</i>	<i>Ala</i>	<i>Ala</i>	Gly	<i>Ala</i>	Glu	Lys	<i>Ala</i>
EU-1	E233P	L234A	L235A		G237A			K322A
EU-3	Glu233Pro	Leu234Ala	Leu235Ala		Gly237Ala			Lys322Ala
Kabat-1	E246E	L247A	L248A		G250A			K341A
Kabat-3	Glu246Pro	Leu247Ala	Leu248Ala		Gly250Ala			Lys341Ala
IMGT-1	3	4	5	6	7	88	90	92
IMGT-3	3	4	5	6	7	88	90	92

10

20

30

40

50

EU/Kabat/IMGT による Fc AA 位置	233/246/3	234/247/4	235/248/5	236/249/6	237/250/7	318/337/88	320/339/90	322/341/92
TSC 1007	<i>Pro</i>	<i>Ala</i>	<i>Ala</i>	欠失	<i>Ala</i>	<i>Glu</i>	<i>Lys</i>	<i>Ala</i>
EU-1	E233P	L234A	L235A		G237A			K322A
EU-3	Glu233Pro	Leu234Ala	Leu235Ala	Gly	Gly237Ala			Lys322Ala
Kabat-1	E246E	L247A	L248A		G250A			K341A
Kabat-3	Glu246Pro	Leu247Ala	Leu248Ala	Gly	Gly250Ala			Lys341Ala
IMGT-1	3	4	5	6	7			92
IMGT-3	3	4	5	6	7			92

10

【0467】

実施例28：Fc受容体および補体への結合に対するFc突然変異のSPR分析の影響

【0468】

ADAPTIR（商標）二重特異性コンストラクトに潜在的に統合されるFc突然変異は、共通のFc受容体（ヒトおよびcyno）および補体活性化システムの成分であるC1Qへの結合について分析された。Biacore T200システムに対して、HBS-EP+緩衝液中、25℃でSPR実験を実行した。

20

【0469】

これらの実験について、CM5センサチップの4つのフローセル全てを、ヤギF(ab)₂抗ヒトFc（Jackson ImmunoResearch）を用いて、応答レベルが約4000RUになるように固定化した。Fc変異体および野生型FcをHBS-EP+中で100nMまで希釈し、10μL/分の流速で120秒間、チップの表面に捕捉した。Fcγ受容体（ヒトおよびcyno、すべてR&D Systemsから購入）および補体（C1Q、Quidel CorporationおよびComplement Technology社から購入）をHBS-EP+で希釈し、その後、分析物として、30μL/分で120秒間流し、続いて、120秒間解離させた。再生は、10mMグリシンpH1.7を30μL/分で30秒間流し、続いて60秒間安定化させることにより達成された。フローセル1は、バックグラウンドのシグナル減算の目的で、常にブランク（捕捉されたタンパク質なし）として放置した。捕捉された各Fc変異体のブランク減算センサーグラムを、Fcγ受容体タンパク質または補体のいずれかへの結合の存在について調べた。ヒトFc受容体IIAおよびRIIIAに多型があるので、両方の配列を結合について試験した。以下に示すように、すべての突然変異のセットは、結果として、C1Q、RIIA H167変異体、RIIB/CおよびRIIIB結合の切断となった。いくつかの突然変異の変異体は、RI、RIIA R167またはRIIIA V176への残留結合を示した。

30

【0470】

40

50

【表 3 3】

表 2 0 . ヒト F c γ 受容体および C 1 Q 結合の結果の要約

試料	結合の強度（野生型ヒト F c に対して）							
	RI	RIIA R167	RIIA H167	RIIB/C	RIIA V176	RIIA F176	RIIB	C1Q
野 生 型 IgG1 Fc	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
TSC 421	BLOD	+	BLOD	BLOD	BLOD	BLOD	BLOD	BLOD
TSC 1004	BLOD	+	BLOD	BLOD	BLOD	BLOD	BLOD	BLOD
TSC 1005	+	BLOD	BLOD	BLOD	+	BLOD	BLOD	BLOD
TSC 1006	BLOD	+	BLOD	BLOD	+	BLOD	BLOD	BLOD
TSC 1007	BLOD	+	BLOD	BLOD	BLOD	BLOD	BLOD	BLOD

10

【 0 4 7 1】

これらの F c 変異体は、また、カニクイザルからの組換え F c 受容体細胞外ドメインへの結合について評価され、これらの突然変異が、また、A D A P T I R（商標）タンパク質治療の毒性を評価するのに使用することができる種での結合も切断することを検証した。以下の表における結果が示すように、突然変異セットは、c y n o R I I B および c y n o R I I I への結合を切断する。2 つの変異体、T S C 1 0 0 4 および T S C 1 0 0 7 は、c y n o R I 受容体へのいくつかの残留結合を示した。

20

【 0 4 7 2】

【表 3 4】

表 2 1 . C y n o F c γ 受容体結合の結果の要約

試料	結合の強度 （野生型ヒト IgG1 Fc に対して）		
	Cyno RI	Cyno RIIB	Cyno RIIB
野生型 Fc	+++	+++	+++
TSC 421	BLOD	BLOD	BLOD
TSC 1004	+	BLOD	BLOD
TSC 1005	BLOD	BLOD	BLOD
TSC 1006	+	BLOD	BLOD
TSC 1007	BLOD	BLOD	BLOD

30

【 0 4 7 3】

実施例 2 9：熱安定性に対する F c 突然変異の影響を評価するための示差走査熱量測定（D S C）

【 0 4 7 4】

A D A P T I R（商標）二重特異性抗体を構築するのに使用することができる異なる F c 領域の熱安定性を、示差走査熱量測定（D S C）を使用して評価した。D S C は、一定の速度で加熱された場合、分子の熱変性に関連する熱容量変化を測定する。ヒンジ、C H 2、および C H 3 ドメインのみを含む F c タンパク質は、一過性トランスフェクションを介して発現され、その後、プロテイン A 精製および S E C を介して精製された。個々のドメインの溶融温度が明らかに同定することができるように、タンパク質の N 末端または C 末端のいずれかに結合した追加のドメインはなかった。目的は、異なる F c 受容体および

40

50

補体への結合を切断するが、野生型 I g G 1 F c 領域の熱安定性を保持する F c 領域において突然変異を同定することであった。

【0475】

M i c r o C a l V P-キャピラリ D S C システム (マルバーンインスツルメント) を使用して、D S C を実行した。緩衝液、P B S p H 7.4 の正確な一致を参照として使用した。参照とともに各タンパク質試料の 0.5 m g / m L 溶液 500 μ L を機器にロードし、25℃から100℃まで、毎分1℃の速度で加熱した。O r i g i n 7 プラットフォームソフトウェア M i c r o C a l V P-キャピラリ D S C 自動化分析ソフトウェアを使用して溶融曲線を分析した。

【0476】

表22は、野生型 I g G 1 配列と比較して、F c 受容体および補体結合を切断することが望ましい二重特異性コンストラクトにおいて使用することができる F c ドメインの熱安定性を示す。試験されたすべての変異体は、W T F c 領域と等価である T m 値を有していた。

【0477】

【表35】

表22. 野生型 I g G 1 F c と比較した異なる F c 領域の熱安定性

ID	CH2 Tm (°C)	CH3 Tm (°C)
野生型 IgG1 Fc	70	82
TSC 421	68	82
TSC 1004	71	83
TSC 1005	72	83
TSC 1006	71	83
TSC 1007	71	83

【0478】

実施例30: F c γ 受容体を発現する細胞株を使用して F c 突然変異を評価するための細胞結合データ

【0479】

F c γ 結合の不在を確認するため、F c γ R トランスフェクタントのセットに対する結合アッセイで、F c 突然変異コンストラクトを試験した。一連の F c γ R 受容体を用いて安定してトランスフェクトされた C H O - K 1 S V 細胞を、表23に列記される各トランスフェクタントとインキュベートした。典型的な実験では、96ウェルプレートにおいて、1ウェルあたり約100,000個の細胞を、0.2% B S A および 2 m M E D T A を含む P B S 緩衝液 100 μ l 中、1 n M から 1000 n M の結合分子の濃度範囲で、氷上で30分間標識し、続いて、洗浄および氷上での P E 標識最小異種間反応性二次抗体、ヤギ抗ヒト I g G F c γ、F (a b ') 2 (ジャクソン・ラボラトリー) との30分間から1時間のインキュベーションを行った。結合した分子からのシグナルを、L S R - I I (商標) フローサイトメータ (B D B i o s c i e n c e s) を使用して検出し、F l o w J o フローサイトメトリ分析ソフトウェアにより分析した。細胞上の結合した分子の平均蛍光強度 (M F I) を、ダブレットの除外後に決定した。

【0480】

表23に列記するように、F c γ R トランスフェクタントに結合した野生型 F c コンストラクト: 予想通り、F c γ R 1 細胞上で最も緊密な結合が観察された。残りの F c γ 受容体への結合は、飽和を示さなかったが、測定可能であった。F c γ R I I B への結合は、ほとんど検出できなかった。対照的に、1003、1004、1005、1006、または1007の F c 突然変異体を使用する場合、結合は、検出されなかった。

【0481】

【表 3 6】

表 2 3 : ヒト F c γ 受容体発現細胞株への結合の要約

試料	結合先						
	RI	RIIA R131	RIIA H131	RIIB/C	RIIA F158	RIIA V158	RIIB
野生型 Fc	+++	+	+	+	+	+	-
TSC1004	-	-	-	-	-	-	-
TSC1005	-	-	-	-	-	-	-
TSC1006	-	-	-	-	-	-	-
TSC1007	-	-	-	-	-	-	-

10

【0 4 8 2】

実施例 3 1 : 新生児 F c 受容体 (F c R n) への結合の S P R 実験

【0 4 8 3】

新生児 F c 受容体、F c R n は、細胞のリソソーム区画において分解を低減することにより、免疫グロブリンおよび F c 含有タンパク質の血清半減期を延長する原因となる。F c R n が免疫グロブリンに適切に結合するために、別のタンパク質、ベータ-2-マクログロブリンと複合体化する必要がある。単純化のため、この複合体は、文書の残りの部分では、単に F c R n と呼ばれるであろう。I g G および他の血清タンパク質は、飲細胞作用を通じて細胞により連続的に内在化される。それらは、分解のためにエンドソームからリソソームへ輸送される。しかし、血清アルブミンおよび I g G は、小胞に存在する酸性条件下で F c R n に結合し、リソソームを回避する。細胞表面に戻ると、I g G は、中性 pH 下で F c R n に結合することができず、循環に戻される。このリサイクルは、I g G が血清半減期 > 7 日間を有するようにするが、血清クリアランスの他のメカニズム（標的媒介配置、分解、凝集など）により影響される可能性がある。

20

【0 4 8 4】

F c 領域を含む抗体様タンパク質治療のため、それらが酸性条件下で F c R n に結合する能力を有することが重要である。異なる突然変異を有する F c 領域 (s c F v が結合していない) のみで構成されているタンパク質コンストラクトを、F c R n へのそれらの結合について評価し、pH 6.0 で S P R を使用して、突然変異が、酸性条件下で F c R n 結合に影響しなかったことを検証した。

30

【0 4 8 5】

F c R n およびベータ-2-マクログロブリンの両方についての遺伝子を含むバイシストロン性ベクターを用いる H E K - 2 9 3 細胞の一過性トランスフェクションを介して、組換え F c R n / b 2 M タンパク質を生成した。I M A C クロマトグラフィを使用して複合体を精製し、続いて、分析的 S E C により I M A C 溶出物の純度を検証した後、緩衝液を I M A C 溶出緩衝液に交換した。10 mM 酢酸ナトリウム (pH 4.5) 中、10 μ g / ml での h F c R n / b 2 M を、直接アミンカップリング化学により、約 600 R U のレベルまで、C M 5 チップ上に固定化した。参照フローセルは、ブランクのままにした。

40

【0 4 8 6】

ブランクとしてのランニング緩衝液を含む、異なる濃度の F c 変異体タンパク質 (pH 6.0 ランニング緩衝液中での 2 倍希釈により 5 nM ~ 80 nM) を、無作為化順序で、30 μ L / 分で 180 秒間注入し、続いて、120 秒間の解離期間があった。

【0 4 8 7】

最適再生は、0.05% T w e e n - 2 0 を含み、pH 7.5 に調節したダルベッコの P B S を 30 μ L / 分の流速で 30 秒間、2 回注入し、続いて 1 分間、ランニング緩衝液

50

安定化を行うことにより達成された。

【0488】

動的SPR測定から得られたセンサーグラムを、二重減算法により分析した。参照フローセルからのシグナルを、固定化リガンドを用いてフローセルから得られた検体結合応答から差し引いた。緩衝液参照を、検体結合応答から差し引き、最終二重参照データを、動的パラメータを導出するためにデータをグローバルフィッティングするBiacore T200評価ソフトウェア（2.0、GE）で分析した。Weirong Wang et al, Drug Metab Dispos. : 39 (9) : 1469-77 (2011) に記載されるように、2状態反応モデルを使用して、全センサーグラムをフィットした。

【0489】

以下の表24に示すように、異なるFc突然変異セットを含むADAPTIR（商標）二重特異性抗体についてのKD値は、すべて、野生型IgG1 Fcを含むモノクローナル抗体について文献で報告されている範囲と一致する範囲内にある。

【0490】

【表37】

表24：異なるFc突然変異を含むADAPTIR（商標）二重特異性抗体についての解離定数（KD）

Fc 変異体	KD(nM)
Null2	33
K322A	22
TSC1004	20
TSC1005	20
TSC1006	19
TSC1007	19

【0491】

実施例32．他のタンパク質フォーマットへの結合ドメインの取り込み、生物物理学的、安定性、結合、および活性の特徴づけ

【0492】

ADAPTIR（商標）／scFv-Fc-scFvフォーマットにおいて抗OX40および抗41BB結合ドメインを利用することに加えて、それらはまた、OX40および4-1BBに個々にまたは同時に結合することができ、両方の受容体を介してシグナル伝達を引き起こすことができる他のタンパク質構造に組み込まれる可能性がある。これらの他のフォーマットには、Spiess et al, Mol. Immun. 67: 95-106 (2015) に記載されるものが含まれるが、これらに限定されない。また、これには、RUBY（商標）、Azymetric（商標）およびTriTAC（商標）二重特異性プラットフォームなどのフォーマットが含まれる。本明細書において開示される抗OX40および抗4-1BB結合ドメインの代替の組成物を生成することは、分子生物学的技術を使用することにより実行され、可変重鎖および／または可変軽鎖ドメインまたは抗4-1BB結合ドメインおよび抗OX40結合ドメインのCDR領域をコードする遺伝子配列を増幅させることができる。その後、これらの遺伝子フラグメントは、タンパク質発現に適切なDNAプラスミドにおいて、意図する二重特異性フォーマットの適切なフレームワークにスプライシングすることができる。発現に続いて、精製技術を使用して、二重特異性タンパク質を単離することができる。これらの技術には、プロテインA、プロテインL、プロテインG、アニオン交換、カチオン交換、または疎水性相互作用クロマトグラフィなどの親和性精製ステップが含まれる。タンパク質精製の後、分子は、示差走査蛍光測定または示差走査熱量測定を含む前述のようなものなどの生物物理学的技術により調べ

ることができる。これらの代替のタンパク質構造は、また、異なる種からの血清、異なる塩濃度中でのインキュベーションによる凝集に対する溶解性および抵抗性、機械的力などについて、評価することができる。代替のタンパク質フォーマットは、1つまたは両方の標的を発現する細胞への結合について評価することができる。加えて、代替のタンパク質フォーマットは、OX40および／または4-1BBのいずれかを発現する細胞の刺激を測定することにより、生物学的活性を評価することができる。これらの細胞集団の刺激、または活性化は、他のアウトプットの中でも、インターフェロングammaまたは他のサイトカインの濃度の増加を決定すること、CD25またはCD69などの活性化を示す他の細胞表面マーカーの発現を測定することにより、測定することができる。インビトロ分析に続いて、これらのフォーマットは、また、癌などのヒトの疾患の処置のための治療として開発することができる。

10

実施例33：インビトロでの抗4-1BB×抗OX40 ADAPTIR（商標）二重特異性タンパク質処置に応答したT細胞におけるグランザイムBの発現

【0493】

T細胞およびNK細胞は、リンパ球：標的細胞間期でのグランザイムおよびパーフォリンの分泌を通じて腫瘍細胞を直接溶解する。パーフォリンおよびグランザイムは、標的細胞の細胞死を誘導することにより、CD8T細胞およびNK細胞の細胞毒性応答を仲介する（Martinze-Lostao et al., Clin Cancer Re; 21(22) November 15, 2015）。グランザイムBの発現は、通常、CD8T細胞およびNK細胞が、エフェクタ細胞毒性細胞に分化するので、それらの刺激に続いて獲得される。そのため、グランザイムBの発現は、CD8T細胞およびNK細胞の細胞毒性の可能性の尺度である。4-1BB受容体を通じたT細胞およびNK細胞の刺激は、IFN-γの分泌に加えて、グランザイムBの発現を強化することを示している。そのため、グランザイムBの発現を強化する抗4-1BB×抗OX40 ADAPTIR（商標）二重特異性（scFv-Fc-scFv）タンパク質FXX01102の能力は、個々の健康なドナーからの血液細胞を使用して決定された。

20

【0494】

標準密度勾配分離法を使用して、末梢血単核球（PBMC）を正常なドナーから単離した。PBMCを抗CD3で活性化して、4-1BBおよびOX40の発現を誘導した。これは、単離したPBMCを段階希釈した濃度の二重特異性ポリペプチドとα-CD3抗体の存在下でインキュベートすることによりなされた。96ウェルプレートで1ウェルあたり10% FBSおよび5 ng/mlのα-CD3を含む完全RPMI 1640培地中、最終体積200 ml/ウェルで、120,000個のPBMCを試験分子の10倍段階希釈とインキュベートした。プレートを加湿インキュベータ内で72時間、37℃、5% CO₂でインキュベートした。細胞を回収し、APC/Cy7-αhCD5、BV605-αhCD56、BV650αhCD8およびBV510-α-hCD4（Biolegend）で蛍光標識し、4℃で30分間インキュベートした。細胞を2回洗浄し、固定して細胞内染色（インビトロジェン）のために透過処理した。透過処理の後、細胞をAPC-α-グランザイムB抗体で標識し、洗浄した。試料を再懸濁し、BD FACSymphony（商標）フローサイトメータで獲得した。FlowJoソフトウェアを使用して、全試料を分析し、NK細胞、CD8+T細胞、およびCD4+T細胞発現グランザイムBの割合を算出した。GraphPad Prism7.0を使用して、グラフをプロットした。

30

40

【0495】

図28Aおよび図28Bに示すように、抗CD3刺激のみ（0 nMで示す）は、CD8T細胞の画分、および通常はCD4T細胞のより少ない画分で、グランザイムB発現を誘導することができる。4-1BB×OX40二重特異性タンパク質FXX01102（配列番号81）の添加は、CD8+T細胞におけるグランザイムBの発現を促進する。さらに、FXX01102（配列番号81）は、また、CD4+T細胞におけるグランザイムBの発現も促進する。結果は、2つの個々のドナー試料で一致していた。NK細胞の分析

50

を含む実験を、第3のドナーに対して実行した：4-1BB×OX40二重特異性タンパク質FXX01102（配列番号81）は、CD4T細胞およびCD8T細胞に加えて、NK細胞集団に対してグランザイムB発現を促進する（図29）。

【0496】

これらの結果は、CD8T細胞およびNK細胞の細胞毒性機能に関与する分子の発現を刺激する場合に4-1BBの説明された機能と一致する。加えて、これらの結果は、二重特異性分子を通じて4-1BBおよびOX40を同時標的化することが、CD4T細胞の細胞毒性の可能性を高めることができることを示す。

実施例34：抗4-1BB×抗OX40 ADAPTIR（商標）二重特異性タンパク質処置に応答したインビトロ腫瘍細胞溶解の強化

【0497】

抗4-1BB×抗OX40 ADAPTIR（商標）二重特異性タンパク質が、グランザイムB発現およびINF-γの分泌を強化するので、T細胞の細胞毒性機能を強化すると期待されている。抗腫瘍応答を開始する1つの方法は、末梢血単核球（PBMC）および腫瘍細胞を抗CD3×抗腫瘍関連抗原（TAA）二重特異性分子（CD3×TAA誘導抗体）とともに同時インキュベートすることである。CD3×TAA誘導抗体は、T細胞のポリクローナル刺激剤であり、T細胞にシグナル1を与え、結果として、4-1BBおよびOX40のアップレギュレーションとなる（シグナル2）。

【0498】

PBMCをヒト血液から標準密度勾配分離法を使用して単離し、蛍光Cell Traceで標識した。120,000個のPBMCを、30,000個のTAA+標的細胞とCD3×TAA誘導抗体（0.5pMまたは2pM）の存在下で同時培養した。抗4-1BB×抗OX40 ADAPTIR（商標）二重特異性タンパク質FXX01102（配列番号81）（5μMから1.2pMの範囲）の8倍濃度を、96ウェルプレートで、10%FBSを含む完全RPMI1640培地中、最終体積200μ/ウェルで細胞培養物に加えた。プレートを加湿インキュベーター内で72時間、37℃、5%CO₂でインキュベートした。細胞を回収し、CD5、CD4、CD8、NK細胞、腫瘍細胞のための抗体、および生/死識別染料（7AAD）を用いて、4℃で30分間蛍光標識した。細胞を洗浄し、BD FACSymphony（商標）フローサイトメータで獲得するために再懸濁した。免疫細胞および腫瘍細胞をCell Traceおよび腫瘍細胞マーカーに基づいてそれぞれ識別した。FlowJoソフトウェアを使用して、全試料を分析し、生細胞または死細胞の割合を算出した。GraphPad Prism7.0を使用して、グラフをプロットした。

【0499】

図30に示すように、PBMCは、CD3×TAA誘導抗体を使用して活性化した場合、用量依存的にTAA+標的細胞を死滅させることができる。この大量のデータは、二重特異性分子を通じて4-1BBおよびOX40を同時標的化することが、PBMCからのリンパ球の細胞毒性能力を強化することができることを示す（Qui HZ et al., J. Immunol. 187:3555-64（2011））。

実施例35：抗4-1BB×抗OX40 ADAPTIR（商標）二重特異性タンパク質処置に応答したインビトロ腫瘍細胞溶解の強化

【0500】

Bio-cytogen、中国からのメスB-hOX40/h4-1BBマウス（C57BL/6-Tnfrsf4tm1（TNFRSF4）CD137tm1（CD137）/Bcgen）を、研究開始前に2週間順応させた。一般的な健康状態について、動物を毎日チェックした。研究動物の処置は、実験動物の管理および使用に関するガイドに指定された条件にしたがっており、研究プロトコルは、施設内動物管理および使用委員会（IACUC）により承認された。

【0501】

マウス膀胱癌細胞株MB49（ミリポア）を解凍し、培養で拡大した。B-hOX40

10

20

30

40

50

／h 4－1 B Bマウスは、0日目に、100 μ L中、 5×10^5 個のMB 4 9マウス膀胱癌細胞を右脇腹に皮下注射することによりチャレンジした。

【0502】

腫瘍チャレンジの後6日目に開始して、処置群は、ランク付けされたランダムな割り当てにより、腫瘍量について正規化され、媒質（PBS）または0.3 μ g／マウスから30 μ g／マウスの投与量でのF X X 0 1 1 0 2（配列番号81）（n=8／群）または20 μ g／マウスでのウレルマブ類縁体（n=4）のいずれかを用いる処置を受けた。処置は、24日目まで3日ごとに腹腔内投与された。腫瘍増殖を、3回／週、キャリパで観察し、測定した。腫瘍体積を、式：体積＝1／2〔長さ×（幅）²〕を使用して算出する。実験のエンドポイントは、腫瘍体積 $\geq 1500 \text{ cm}^3$ 、創傷、またはマウスの健康への影響のいずれかであった。

10

【0503】

循環末梢T細胞数に対する処置の効果を評価するため、処置の14日後に、マウスから出血させた。血液試料を、Sarstedt microvette K3 Eチューブ（#20－1278－100）に回収した。1×BD Pharm Lyse（商標）溶解溶液500 μ Lを加え、内容物を、15 mL遠心分離管に移した。10分後、PBS 9.5 mLを加えて遠心分離した。得られる細胞ペレットを、PBS（DPBS+0.5% BSA+2 mM EDTA）200 μ Lに再懸濁し、96ウェルプレートに移した。細胞を、遠心分離によりペレット化し、デカンテーションした。細胞ペレットを、1×BD Pharm Lyse（商標）溶解溶液200 μ Lに再懸濁し、室温で5分間インキュベートした。細胞を1回洗浄し、LIVE／DEAD（商標）Fixable Aqua Dead Cell Stain（インビトロジェン）を用いて染色した。細胞を1回洗浄し、100 μ g／mLの抗CD16／CD32クローン2.4G2（所内）とともに細胞をインキュベートすることにより、細胞への非特異的結合を遮断した。細胞を、PE@CD62L（eBioscience）、PE-cy7@CD25（Biolegend）、BV421@CD3（Biolegend）、BV605@CD8a（Biolegend）、APC@CD335（Biolegend）、AF700@CD44（Biolegend）およびAPC-eF780@CD4（eBioscience）で表面染色した。細胞を2回洗浄し、固定して細胞内染色Foxp3／転写因子染色緩衝液（eBioscience）のために透過処理した。透過処理の後、細胞をAF488@Ki-67で標識し、洗浄した。試料を再懸濁し、BD FAC LSR IIフローサイトメータで獲得した。FlowJoソフトウェアを使用して全試料を分析し、Ki67を発現するNK細胞、CD8+T細胞、およびCD4+T細胞の割合を算出した。GraphPad Prism 7.0を使用してグラフをプロットした。

20

30

【0504】

SAS／JMPソフトウェア（SAS Institute）を使用して、統計解析を実行した。フィットモデル標準最小二乗法を使用して、反復測定ANOVAモデルをフィッティングし、インビボ研究について、腫瘍体積に対する処置、日にち、処置－日にち相互作用の全体的な影響を評価する。s.c.異種移植モデルの処置群間の腫瘍サイズにおける有意差は、LSMeansプラットフォームを使用してテューキー多重比較検定により評価され、さらに、必要に応じて、各処置－日にちの組み合わせについてLSMeansテューキー多重比較検定を使用して時間および処置の組み合わせを評価する。処置マウス群間の腫瘍進行までの時間（腫瘍体積 $\geq 1500 \text{ cm}^3$ までの時間の中央値で定義される）における有意差を、腫瘍進行曲線の比較のためのログランク（マンテル－コックス）検定を用いるカプラン－マイヤー生存分析を使用して決定する。

40

【0505】

30 μ g／マウスの投与量でのF X X 0 1 1 0 2を用いる処置は、結果として、B－h O X 4 0／h 4－1 B BマウスのMB 4 9腫瘍増殖の統計的に有意な減少となった（図31、表25を参照されたい）。腫瘍減少のレベルは、ウレルマブ類縁体で見られたものと類似であった。

50

【0506】

【表38】

表25：26日目までの平均腫瘍体積の統計的比較

チューキー・クレイマーHSD法を用いるJMP一元配置分散分析	
処置	p-値
PBS 対照 vs. FXX01102 30μg	0.0232
PBS 対照 vs. FXX01102 3μg	0.9965
PBS 対照 vs. FXX01102 0.3μg	0.9662
PBS 対照 vs. ウレルマブ類縁体 20μg	0.2450
FXX01102 30μg vs. FXX01102 3μg	0.0096
FXX01102 30μg vs. FXX01102 0.3μg	0.0045
FXX01102 3μg vs. FXX01102 0.3μg g	0.9983
FXX01102 30μg vs. ウレルマブ類縁体 20μg	0.9837
FXX01102 3μg vs. ウレルマブ類縁体 20μg	0.1452
FXX01102 0.3μg vs. ウレルマブ類縁体 20μg	0.0895

10

【0507】

30μg/マウスのFXX01102を用いる処置は、結果として、処置されたマウス8匹中2匹で完全腫瘍拒絶、1匹で一過性腫瘍拒絶となった（図32）。腫瘍増殖に対する影響に加えて、30μg/マウスの投与量でのFXX01102を用いる処置は、結果として、溶媒対照群と比較して、有意に延長された生存となった（図33、表26）。

20

【0508】

【表39】

表26：34日目までの生存統計的比較

群	平均生存時間 (日数)	PBS 対照と比較した P 値	
		ロギーランク	ウィルコクソン
PBS	24.5		
FXX01102 30μg	不定	<0.0001	0.0003
FXX01102 3μg	23	0.2851	0.4812
FXX01102 0.3μg	20	0.9120	0.598

30

【0509】

核タンパク質Ki-67は、増殖細胞において強く発現し、増殖細胞のフローサイトメトリのマーカーとして使用することができる。Ki67陽性T細胞が増殖する頻度は、CD3陽性、CD4陽性、およびCD8陽性T細胞、ならびにCD335陽性NK細胞において30μg/マウスのFXX01102の処置の14日後に増加した（図34）。

【0510】

本発明は、本明細書に記載の特定の実施形態による範囲に限定されない。確かに、説明されたものに加えて本発明の種々の修飾が、前述の説明および添付の図面から、当業者に明らかになるであろう。そのような修飾は、添付の特許請求の範囲の範囲内に入ることを意図している。

40

【0511】

個々の参考文献（例えば、刊行物または特許または特許出願）が、それぞれ、すべての目的のために、参照によりその全体が本明細書に組み込まれることが、具体的で個別に示される場合と同じ程度に、本明細書において引用されているすべての参考文献（例えば、刊行物または特許または特許出願）は、すべての目的のために、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

50

【0512】

他の実施形態は、以下の特許請求の範囲内である。

【0513】

配列

配列番号 1

LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFTRKECSSTSN
AECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLD
GKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPAPAREPGHSPQIISFFLALTSTALLFLF
FLTLRFSSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

【0514】

配列番号 2

LQDLCSNCPAGTFCDNNRSQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFKTRKECSSTSN
ECDCISGYHCLGAECSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDG
KSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSATPPAPAREPGHSPQIIFLALTSTVVLFLFLFL
VLRFSVVKRSRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

【0515】

配列番号 3

LHCVGDTYPSNDRCCHECRPGNGMVSRCRSQNTVCRPCGPGFYNDVVSSKPCKPCTW
CNLRSGSERKQLCTATQDTVCRCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPWT
NCTLAGKHTLQPASNSSDAICEDRDPPATQPQETQGPPARPITVQPTEAWPRTSQQGPSTR
PVEVPGGRAVAAILGLGLVLGLLGPLAILLALYLLRRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEE
QADAHSTLAKI

【0516】

配列番号 4

KLHCVGDTYPSNDRCCQECRPGNGMVSRCNRSQNTVCRPCGPGFYNDVVSAPCKACT
WCNLRSGSERKQPCTATQDTVCRCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKP
WTNCTLAGKHTLQPASNSSDAICEDRDPPPTQPQETQGPPARPTTVQPTEAWPRTSQR
STRPVEVPRGPAAVAILGLGLALGLLGPLAMLLALLLLRRDQRLPPDAPKAPGGGSFRTP
QEEQADAHSAIAKI

【0517】

配列番号 4 2

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTSYWINWVRQAPGQGLEWIGNIYPGSSTTN
YNEKFKSRATLTVDSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCASFSFGYYAYAMDYWGQGT
LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPGTLSPGERATLSCRASQDISNYLN
WYQQKPGQAVRLLIYYTSRLHSGIPDRFSGSGSGTDYTLTISRLEPEDFAVYFCQQGY
TLPYTFGQGTKVEIKR

【0518】

配列番号 4 3

SSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGG
SGGGGSGGGGSPSEVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTSYWINWVRQAPGQGLE
WIGNIYPGSSTTNVNEKFKSRATLTVDSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCASFSFGYYAY
AMDYWGQGT
LVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPGTLSPGERATLSCRAS
QDISNYLNWYQQKPGQAVRLLIYYTSRLHSGIPDRFSGSGSGTDYTLTISRLEPEDFAVY
FCQQGYTLPYTFGQGTKVEIKR

【0519】

配列番号 4 4

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGNIYPGSSTT

10

20

30

40

50

NYAQKFQGRVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCASFS DGYAYAMDYWGQGL
VTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLS CRASQDISNYLNW
YQQKPGQAVRLLIYYTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGYTLPY
TFGQGTKVEIKR

【0520】

配列番号 4 5

SSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGG
SGGGGSGGGGSPSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGL
EWMGNIYPGSSTTNYAQKFQGRVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCASFS DGY
AYAMDYWGQGLVTVSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLS
CRASQDISNYLNWYQQKPGQAVRLLIYYTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDF
AVYFCQQGYTLPTYTFGQGTKVEIKR

【0521】

配列番号 4 6

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSYYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISHDGS DK
YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMDSLRAEDTALYYCSNDQFDPWGQGLTVTVSSGGG
GSGGGGSGGGGSGGGGSSYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWFQQKPGQAP
ALVVYDDSGRPSGIPERFSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGT
KLTVLR

【0522】

配列番号 4 7

SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWFQQKPGQAPALVVYDDSGRPSGIPER
FSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGG
GGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSYYGMHWVRQAPGKGLEWVAVI
SHDGS DKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMDSLRAEDTALYYCSNDQFDPWGQGLTV
TVSSR

【0523】

配列番号 4 8

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTINCQASQSIDSNLAWFQQKPGQPPKLLIYRASNLASGVPD
RFSGSGSGTDFTLTISSEAEADVATYYCLGGVGAVSYRTSFGGGTKVEIKGGGGSGGGGSG
GGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGSDINDYPITWVRQAPGQGLEWIGFI
NSGGSTWYASWVKGRFTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCARGYSTYYRDFNIWG
QGLTVTVSSSEPKSSDKTHTCPPCPAEEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGAGGGGSGGGGSGGGGSPSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSYYGMHWVR
QAPGKGLEWVAVISHDGS DKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMDSLRAEDTALYYCS
NDQFDPWGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSYVLTQPPSVSVAPGQTARITC
GGNNIGSKSVHWFQQKPGQAPALVVYDDSGRPSGIPERFSGSTSGNTATLTISRVEAGDE
ADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVLR

【0524】

配列番号 4 9

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTINCQASQSIDSNLAWFQQKPGQPPKLLIYRASNLASGVPD
RFSGSGSGTDFTLTISSEAEADVATYYCLGGVGAVSYRTSFGGGTKVEIKGGGGSGGGGSG
GGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGSDINDYPITWVRQAPGQGLEWIGFI
NSGGSTWYASWVKGRFTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCARGYSTYYRDFNIWG

QGT LVT VSSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGAGGGGSPSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSYYGMHWVRQAPGKGLEW
VAVISHDGS DKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMDSLRAEDTALYYCSNDQFDPWGQ
GTLVT VSSGGGGSGGGGSGGGGSSYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSV
HWFQQKPGQAPALV VYDDSGRPSGIPERFSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWD
SSSDHVVF GGGTKLTVLR

【0525】

10

配列番号 5 0

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTINCQASQSIDSNLAWFQQKPGQPPKLLIYRASNLASGVDP
RFGSGSGTDFTLTISSLEAEDVATYYCLGGVGAVSYRTSFGGGTKVEIKGGGGSGGGGSG
GGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGSDINDYPITWVRQAPGQGLEWIGFI
NSGGSTWYASWVKGRFTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCARGYSTYYRDFNIWG
QGT LVT VSSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGAGGGGSGGGGSGGGGSPSSYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWFQQKPG
QAPALV VYDDSGRPSGIPERFSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVF
GGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSY
YGMHWVRQAPGKGLEWVAVISHDGS DKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMDSLRAE
DTALYYCSNDQFDPWGQGT LVT VSSR

20

【0526】

配列番号 5 1

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTINCQASQSIDSNLAWFQQKPGQPPKLLIYRASNLASGVDP
RFGSGSGTDFTLTISSLEAEDVATYYCLGGVGAVSYRTSFGGGTKVEIKGGGGSGGGGSG
GGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGSDINDYPITWVRQAPGQGLEWIGFI
NSGGSTWYASWVKGRFTISRDDSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCARGYSTYYRDFNIWG
QGT LVT VSSSEPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGAGGGGSPSSYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWFQQKPGQAPALV VY
DDSGRPSGIPERFSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVF GGGTKLTVL
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSYYGMHWVRQ
APGKGLEWVAVISHDGS DKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMDSLRAEDTALYYCSN
DQFDPWGQGT LVT VSSR

30

【0527】

配列番号 5 2

SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVNWFQQKPGQAPVLV VYDDSGRPSGIPER
FSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVF GGGTKLTVLGGGGSGGGGSGG
GGSGGGGSSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSYYGMHWVRQAPGKGLEWVAVI
SHDGS DKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCSNDQFDPWGQGT LVT
TVSSR

40

【0528】

配列番号 5 3

SSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI

50

EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSP
SSYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVNWFQQKPGQAPVLVYDDSGRPSGIPE
RFSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTCLTVLGGGGSGGGGSG
GGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSYYGMHWVRQAPGKGLEWVA
VISHDGSCKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCSNDQFDPWGQGT
LTVSSR

【0529】

配列番号 5 4

SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVNWFQQKPGQAPVLVYDDSGRPSGIPER
FSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTCLTVLGGGGSGGGGSGG
GGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSYYGMHWVRQAPGKGLEWVA
SHDGSCKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCSNDQFDPWGQGT
LTVSSR

10

【0530】

配列番号 5 5

SSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSP
SSYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVNWFQQKPGQAPVLVYDDSGRPSGIPE
RFSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTCLTVLGGGGSGGGGSG
GGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSYYGMHWVRQAPGKGLEWVA
AISHDGSCKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCSNDQFDPWGQGT
LTVSSR

20

【0531】

配列番号 5 6

SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWFQQKPGQAPALVYDDSGRPSGIPER
FSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTCLTVLGGGGSGGGGSGG
GGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSYYGMHWVRQAPGKGLEWVA
SHDGSCKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTALYYCSNDQFDPWGQGT
LTVSSR

30

【0532】

配列番号 5 7

SSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSP
SSYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWFQQKPGQAPALVYDDSGRPSGIPE
RFSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTCLTVLGGGGSGGGGSG
GGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSYYGMHWVRQAPGKGLEWVA
VISHDGSCKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTALYYCSNDQFDPWGQGT
LTVSSR

40

【0533】

配列番号 5 8

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGGGLEWMGNIYPSGGST
NYAQKFQGRVTMTVDTSTSTVYMEISSLRSED TAVYYCASFS DGYAYAMDYWGQGT
LTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYL
NWYQQKPGQAPRLLIYYASRRHTGIPARFSGSGGTDFLTISLQPEDFAVYYCQQGYNLPY
TFGQGTKVEIK

50

【0 5 3 4】

配列番号 5 9

SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVNWFQQKPGQAPVLVVYDDSGRPSGIPER
FSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFVGGGTCLTVLGGGGSGGGGSGG
GGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSYYGMHWVRQAPGKGLEWVAAI
SHDGSDKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCSNDQFDPWGQGT
LVTVSSR

【0 5 3 5】

配列番号 6 0

SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVNWFQQKPGQAPVLVVYDDSGRPSGIPER
FSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFVGGGTCLTVLGGGGSGGGGSGG
GGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSYYGMHWVRQAPGKGLEWVAAI
SHDGSDKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCSNDQFDPWGQGT
LVTVSSR

10

【0 5 3 6】

配列番号 6 1

SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVNWFQQKPGQAPVLVVYDDSGRPSGIPER
FSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFVGGGTCLTVLGGGGSGGGGSGG
GGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSYYGMHWVRQAPGKGLEWVAAI
SHDGSDKYYADSVKGRFTISRDN SKNRLYLQMNSLRAEDTAVYYCSNDQFDPWGQGT
LVTVSSR

20

【0 5 3 7】

配列番号 6 2

SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVNWFQQKPGQAPVLVVYDDSGRPSGIPER
FSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFVGGGTCLTVLGGGGSGGGGSGG
GGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSYYGMHWVRQAPGKGLEWVAAI
SHDGSDKYYADSVKGRFTISRDN SKNRLYLQMNSLRAEDTAVYYCSNDQFDPWGQGT
LVTVSSR

【0 5 3 8】

配列番号 6 3

EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLNWYQQKPGQAPRLLIYYASRRHTGIPAR
FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQGYNLPYTFGGGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGS
GGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGNIYP
SGGSTNYAQKFQGRVTMTVDTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCASFS DGYAYAMDYWG
QGTLVTV

30

【0 5 3 9】

配列番号 6 4

SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVNWFQQKPGQAPVLVVYDDSGRPSGIPER
FSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFVGGGTCLTVLGGGGSGGGGSGG
GGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSYYGMHWVRQAPGKGLEWVAVI
SHDGSDKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCSNDQFDPWGQGT
LVTV

40

【0 5 4 0】

配列番号 6 5

SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVNWFQQKPGQAPVLVVYDDSGRPSGIPAR
FSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFVGGGTCLTVLGGGGSGGGGSGG
GGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSYYGMHWVRQAPGKGLEWVAAI
SHDGSDKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCSNDQFDPWGQGT
LVTVSSR

【0 5 4 1】

50

配列番号 6 6

SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVNWFQQKPGQAPVLVVYDDSGRPSGVPN
RFSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSG
GGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSYYGMHWVRQAPGKGLEWVA
AISHDGS DKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCSNDQFDPWGQGT
LVTVSSR

【0 5 4 2】

配列番号 6 7

SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVNWFQQKPGQAPVLVVYDDSGRPSGVPS
RFSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSG
GGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSYYGMHWVRQAPGKGLEWVA
AISHDGS DKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCSNDQFDPWGQGT
LVTVSSR

【0 5 4 3】

配列番号 6 8

SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVNWFQQKPGQAPVLVVYDDSGRPSGIPKR
FSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGG
GGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSYYGMHWVRQAPGKGLEWVA AI
SHDGS DKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCSNDQFDPWGQGT LV
TVSSR

【0 5 4 4】

配列番号 6 9

SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVNWFQQKPGQAPVLVVYDDSGRPSGIPAR
FSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGG
GGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSYYGMHWVRQAPGKGLEWVA AI
SHDGS DKYYADSVKGRFTISRDN SKNRLYLQMNSLRAEDTAVYYCSNDQFDPWGQGT LV
TVSSR

【0 5 4 5】

配列番号 7 0

SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVNWFQQKPGQAPVLVVYDDSGRPSGVPN
RFSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSG
GGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSYYGMHWVRQAPGKGLEWVA
AISHDGS DKYYADSVKGRFTISRDN SKNRLYLQMNSLRAEDTAVYYCSNDQFDPWGQGT
LVTVSSR

【0 5 4 6】

配列番号 7 1

SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVNWFQQKPGQAPVLVVYDDSGRPSGVPS
RFSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSG
GGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSYYGMHWVRQAPGKGLEWVA
AISHDGS DKYYADSVKGRFTISRDN SKNRLYLQMNSLRAEDTAVYYCSNDQFDPWGQGT
LVTVSSR

【0 5 4 7】

配列番号 7 2

SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVNWFQQKPGQAPVLVVYDDSGRPSGIPKR
FSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGG
GGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSYYGMHWVRQAPGKGLEWVA AI
SHDGS DKYYADSVKGRFTISRDN SKNRLYLQMNSLRAEDTAVYYCSNDQFDPWGQGT LV
TVSSR

【0 5 4 8】

配列番号 7 3

10

20

30

40

50

配列番号 7 4

10

【 0 5 5 0 】

配列番号 7 5

20

【 0 5 5 1 】

配列番号 7 6

SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVNWFQKPGQAPVLVVYDDSGRPSGIPKR
FSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVLGGGGSGGGSGG
GGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSYYGMHWVRQAPGKGLEWVAAI
SHDGSCKYYADSVKGRFTISRDN SKNRLYLQMNSLRAEDTAVYYCSNDQFDPWGQGTLV
TVSSR

【 0 5 5 2 】

配列番号 7 7

30

【 0 5 5 3 】

配列番号 7 8

40

【 0 5 5 4 】

配列番号 7 9

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGGGLEWMGNIYPSGGST
NYAQKFQGRVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCASFS DGYAYAMDYWGQGT L
VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLNW
YQQKPGQAPRLLIYYASRRHTGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQGYNL PY
TFGQGTKVEIKEPKSSDKTHTCPPCPAPPAAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGGGGSPSSYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVNW FQQKPGQAPVLVVYD DS
GRPSGIPERFSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVLGGG
GSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSYYGMHWVRQAPG
KGLEWVAAISHDGS DKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCSNDQF
DPWGQGT LVT VSSR

【0555】

配列番号 8 0

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGGGLEWMGNIYPSGGST
NYAQKFQGRVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCASFS DGYAYAMDYWGQGT L
VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLNW
YQQKPGQAPRLLIYYASRRHTGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQGYNL PY
TFGQGTKVEIKEPKSSDKTHTCPPCPAPPAAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGGGGSPSSYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVNW FQQKPGQAPVLVVYD DS
GRPSGIPERFSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVLGGG
GSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSYYGMHWVRQAPG
KGLEWVAAISHDGS DKYYADSVKGRFTISRDN SKNRLYLQMNSLRAEDTAVYYCSNDQF
DPWGQGT LVT VSSR

【0556】

配列番号 8 1

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGGGLEWMGNIYPSGGST
NYAQKFQGRVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCASFS DGYAYAMDYWGQGT L
VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLNW
YQQKPGQAPRLLIYYASRRHTGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQGYNL PY
TFGQGTKVEIKEPKSSDKTHTCPPCPAPPAAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGGGGSPSSYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVNW FQQKPGQAPVLVVYD DS
GRPSGIPERFSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVLGGG
GSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSYYGMHWVRQAPG
KGLEWVAAISHDGS DKYYADSVKGRFTISRDN SKNRLYLQMNSLRAEDTAVYYCSNDQF
DPWGQGT LVT VSSR

【0557】

配列番号 8 2

EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLNWYQQKPGQAPRLLIYYASRRHTGIPAR
FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQGYNL PYTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGS
GGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGGGLEWMGNIY P
SGGSTNYAQKFQGRVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCASFS DGYAYAMDYWG
QGT LVT VEPKSSDKTHTCPPCPAPPAAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE

10

20

30

40

50

DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGG
GGSPSSYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVNWFQQKPGQAPVLVVYDDSGRPS
GIPERFSGTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVLGGGGSGG
GGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSYYGMHWVRQAPGKGLE
WVAAISHDGS DKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCSNDQFDPWG
QGTLVTVSSR

【0558】

配列番号 8 3

EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLNWYQQKPGQAPRLIYYASRRHTGIPAR
FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQGYNLPYTFGGGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGS
GGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYWMNWVRQAPGGGLEWMGNIYP
SGGSTNYAQKFQGRVTMTVDTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCASFS DGYAYAMDYWG
QGTLVTVPEPKSSDKTHTCPPCPAAPPAAAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGG
GGSPSSYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVNWFQQKPGQAPVLVVYDDSGRPS
GIPERFSGTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVLGGGGSGG
GGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSYYGMHWVRQAPGKGLE
WVAAISHDGS DKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCSNDQFDPWG
QGTLVTVSSR

【0559】

配列番号 8 4

EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLNWYQQKPGQAPRLIYYASRRHTGIPAR
FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQGYNLPYTFGGGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGS
GGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYWMNWVRQAPGGGLEWMGNIYP
SGGSTNYAQKFQGRVTMTVDTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCASFS DGYAYAMDYWG
QGTLVTVPEPKSSDKTHTCPPCPAAPPAAAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGG
GGSPSSYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVNWFQQKPGQAPVLVVYDDSGRPS
GIPERFSGTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVLGGGGSGG
GGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSYYGMHWVRQAPGKGLE
WVAAISHDGS DKYYADSVKGRFTISRDN SKNRLYLQMNSLRAEDTAVYYCSNDQFDPWG
QGTLVTVSSR

【0560】

配列番号 8 5

EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLNWYQQKPGQAPRLIYYASRRHTGIPAR
FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQGYNLPYTFGGGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGS
GGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYWMNWVRQAPGGGLEWMGNIYP
SGGSTNYAQKFQGRVTMTVDTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCASFS DGYAYAMDYWG
QGTLVTVPEPKSSDKTHTCPPCPAAPPAAAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGG
GGSPSSYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVNWFQQKPGQAPVLVVYDDSGRPS
GIPERFSGTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVLGGGGSGG

GGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSYYGMHWVRQAPGKGLE
WVAAISHDGS DKYYADSVKGRFTISRDN SKNRLYLQMNSLRAEDTAVYYCSNDQFDPWG
QGT LVT VSSR

【0561】

配列番号 8 6

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGNIYPGSSTT
NYAQKFQGRVTMTVDTSTSTVYME LSSLRSED TAVYYCASFS DGYAYAMDYWGQGT L
VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQDISNYLNW
YQQKPGQAVRLLIYYTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGYTLPY
TFGQGTKVEIKEPKSSDKTHTCPPCPAPPAAPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGGGGSPSSYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVNWFQQKPGQAPVLVYDDSG
GRPSGIPERFSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFSGGTKLTVLGGG
GSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
KGLEWVAAISHDGS DKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCSNDQF
DPWGQGT LVT VSSR

【0562】

配列番号 8 7

SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVNWFQQKPGQAPVLVYDDSGRPSGIPER
FSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFSGGTKLTVLGGGGSGGGGSGG
GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG
SHDGS DKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCSNDQFDPWGQGT LVT
TVEPKSSDKTHTCPPCPAPPAAPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSP
SEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGNIYPGSST
TNYAQKFQGRVTMTVDTSTSTVYME LSSLRSED TAVYYCASFS DGYAYAMDYWGQGT
LVT VSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
WYQQKPGQAVRLLIYYTSRLHSGIPARFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAVYFCQQGYTLP
YTFGQGTKVEIKR

【0563】

配列番号 8 8

SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVNWFQQKPGQAPVLVYDDSGRPSGIPER
FSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFSGGTKLTVLGGGGSGGGGSGG
GGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGG
SHDGS DKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCSNDQFDPWGQGT LVT
TVEPKSSDKTHTCPPCPAPPAAPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSP
SEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGNIYPSGGS
TNYAQKFQGRVTMTVDTSTSTVYME LSSLRSED TAVYYCASFS DGYAYAMDYWGQGT
LVT VSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG
WYQQKPGQAPRLLIYYASRRHTGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQGYNL
PYTFGQGTKVEIKR

【0564】

配列番号 8 9

10

20

30

40

50

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGGGLEWMGNIYPSGGST
NYAQKFQGRVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCASFS DGYAYAMDYWGQGT L
VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLNW
YQQKPGQAPRLLIYYASRRHTGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQGYNLPY
TFGQGTKVEIKEPKSSDKTHTCPPCPAPPAAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGGGGSPSSYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVNW FQQKPGQAPVLVYDD S
GRPSGIPARFSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVLGGG
GSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSYYGMHWVRQAPG
KGLEWVAAISHDGS DKKYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCSNDQF
DPWGQGT LVTVSSR

【0565】

配列番号 9 0

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGGGLEWMGNIYPSGGST
NYAQKFQGRVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCASFS DGYAYAMDYWGQGT L
VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLNW
YQQKPGQAPRLLIYYASRRHTGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQGYNLPY
TFGQGTKVEIKEPKSSDKTHTCPPCPAPPAAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGGGGSPSSYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVNW FQQKPGQAPVLVYDD S
GRPSGVPNRFSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVLGGG
GSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSYYGMHWVRQAPG
KGLEWVAAISHDGS DKKYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCSNDQF
DPWGQGT LVTVSSR

【0566】

配列番号 9 1

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGGGLEWMGNIYPSGGST
NYAQKFQGRVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCASFS DGYAYAMDYWGQGT L
VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLNW
YQQKPGQAPRLLIYYASRRHTGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQGYNLPY
TFGQGTKVEIKEPKSSDKTHTCPPCPAPPAAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGGGGSPSSYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVNW FQQKPGQAPVLVYDD S
GRPSGVPNRFSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVLGGG
GSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSYYGMHWVRQAPG
KGLEWVAAISHDGS DKKYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCSNDQF
DPWGQGT LVTVSSR

【0567】

配列番号 9 2

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGGGLEWMGNIYPSGGST
NYAQKFQGRVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCASFS DGYAYAMDYWGQGT L
VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLNW
YQQKPGQAPRLLIYYASRRHTGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQGYNLPY
TFGQGTKVEIKEPKSSDKTHTCPPCPAPPAAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD

VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGGGGSPSSYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVNWFQQKPGQAPVLVYDDSD
GRPSGIPKRFSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVLGGG
GSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSYYGMHWVRQAPG
KGLEWVAAISHDGSCKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCSNDQF
DPWGQGTLVTVSSR

【0568】

配列番号 9 3

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGNIYPSGGST
NYAQKFQGRVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSEDYAVYYCASFSFGYYAYAMDYWGQGT
LTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYL
NWYQQKPGQAPRLLIYYASRRHTGIPARFSGSGGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQGYNLP
YTFGQGTKEIKEPKSSDKTHTCPPCPAPPAAPSFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGGGGSPSSYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVNWFQQKPGQAPVLVYDDSD
GRPSGIPARFSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVLGGG
GSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSYYGMHWVRQAPG
KGLEWVAAISHDGSCKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCSNDQF
DPWGQGTLVTVSSR

【0569】

配列番号 9 4

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGNIYPSGGST
NYAQKFQGRVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSEDYAVYYCASFSFGYYAYAMDYWGQGT
LTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYL
NWYQQKPGQAPRLLIYYASRRHTGIPARFSGSGGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQGYNLP
YTFGQGTKEIKEPKSSDKTHTCPPCPAPPAAPSFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGGGGSPSSYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVNWFQQKPGQAPVLVYDDSD
GRPSGIPARFSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVLGGG
GSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSYYGMHWVRQAPG
KGLEWVAAISHDGSCKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCSNDQF
DPWGQGTLVTVSSR

【0570】

配列番号 9 5

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGNIYPSGGST
NYAQKFQGRVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSEDYAVYYCASFSFGYYAYAMDYWGQGT
LTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYL
NWYQQKPGQAPRLLIYYASRRHTGIPARFSGSGGTDFTLTISSLQPEDFAVYYCQQGYNLP
YTFGQGTKEIKEPKSSDKTHTCPPCPAPPAAPSFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGGGGSPSSYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVNWFQQKPGQAPVLVYDDSD
GRPSGIPARFSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVLGGG

GSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSYYGMHWVRQAPG
KGLEWVAAISHDGS DKYYADSVKGRFTISRDN SKNRLYLQMNSLRAEDTAVYYCSNDQF
DPWGQGTLVTVSSR

【0571】

配列番号 9 6

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGNIYPSGGST
NYAQKFQGRVTMTVDTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCASFS DGYAYAMDYWGQGT L
VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLNW
YQQKPGQAPRLLIYYASRRHTGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQGYNLPY
TFGQGTKVEIKEPKSSDKTHTCPPCPAPPAAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGGGGSPSSYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVNWFQQKPGQAPVLVYDSS
GRPSGIPKRFSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVLGGG
GSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSYYGMHWVRQAPG
KGLEWVAAISHDGS DKYYADSVKGRFTISRDN SKNRLYLQMNSLRAEDTAVYYCSNDQF
DPWGQGTLVTVSSR

【0572】

配列番号 9 7

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGNIYPSGGST
NYAQKFQGRVTMTVDTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCASFS DGYAYAMDYWGQGT L
VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLNW
YQQKPGQAPRLLIYYASRRHTGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQGYNLPY
TFGQGTKVEIKEPKSSDKTHTCPPCPAPPAAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGGGGSPSSYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVNWFQQKPGQAPVLVYDSS
GRPSGIPARFSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVLGGG
GSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSYYGMHWVRQAPG
KGLEWVAAISHDGS DKYYADSVKGRFTISRDN SKNRLYLQMNSLRAEDTAVYYCSNDQF
DPWGQGTLVTVSSR

【0573】

配列番号 9 8

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGNIYPSGGST
NYAQKFQGRVTMTVDTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCASFS DGYAYAMDYWGQGT L
VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLNW
YQQKPGQAPRLLIYYASRRHTGIPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYCQQGYNLPY
TFGQGTKVEIKEPKSSDKTHTCPPCPAPPAAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGGGGSPSSYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVNWFQQKPGQAPVLVYDSS
GRPSGVPNRFSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVLGGG
GSGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSYYGMHWVRQAPG
KGLEWVAAISHDGS DKYYADSVKGRFTISRDN SKNRLYLQMNSLRAEDTAVYYCSNDQF
DPWGQGTLVTVSSR

【0574】

配列番号 9 9

10

20

30

40

50

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYWMNWVRQAPGGGLEWMGNIYPSGGST
NYAQKFQGRVTMTVDTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCASFS DGYAYAMDYWGQGT L
VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLNW
YQQKPGQAPRLLIYYASRRHTGIPARFSGSGGTDFTLTISSSLQPEDFAVYYCQQGYNL PY
TFGQGTKEIKEPKSSDKTHTCPPCPAPPAAPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGGGGSPSSYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVNW FQQKPGQAPVLVVDSDS
GRPSGVPSPRFSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVLGGG
GSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSYYGMHWVRQAPG
KGLEWVAAISHDGS DKYYADSVKGRFTISRDN SKNRLYLQMNSLRAEDTAVYYCSNDQF
DPWGQGT LVTVSSR

10

【0575】

配列番号 100

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYWMNWVRQAPGGGLEWMGNIYPSGGST
NYAQKFQGRVTMTVDTSTSTVYMESSLRSED TAVYYCASFS DGYAYAMDYWGQGT L
VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLNW
YQQKPGQAPRLLIYYASRRHTGIPARFSGSGGTDFTLTISSSLQPEDFAVYYCQQGYNL PY
TFGQGTKEIKEPKSSDKTHTCPPCPAPPAAPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGGGGSPSSYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVNW FQQKPGQAPVLVVDSDS
GRPSGIPKRFSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVLGGG
GSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSYYGMHWVRQAPG
KGLEWVAAISHDGS DKYYADSVKGRFTISRDN SKNRLYLQMNSLRAEDTAVYYCSNDQF
DPWGQGT LVTVSSR

20

【0576】

配列番号 101

SSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK
FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSP
SQVQLQQPGAELVKPGASVKLSCEASGYTFTSYWINWVKQRPQG GLEWIGNIYPGSSTT
NYNEKFKSKATLTVDTSSTAYMQLSSLTSDDSAVFYCASFS DGYAYAMDYWVQGTSV
TVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQT TSSLSASLGDRVTITCRASQDISNYLNWY
QQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGGGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGYTL PYT
FGGGTKLEIKR

30

【0577】

配列番号 102

SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWFQQKPGQAPALVVYDDSGRPSGIPER
FSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGG
GGSGGGGSGVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSYYGMHWVRQAPGKGLEWVAVI
SHDGS DKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMDSLRAEDTALYYCSNDQFDPWGQGT L
TVSSSEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

40

【0578】

50

配列番号 103 (ヒト CD137 ECD-AVI-FLAG-HIS)

LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSN
AECDCPTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLD
GKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQSSSLNDIFEAQKIEWH
EDYKDDDDKDYKDDDDKDYKDDDDKHHHHHHHHHH

【0579】

配列番号 104 (ヒト CD137 ECD-mFc)

LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSN
AECDCPTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLD
GKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQSSSEPRGPTIKPCPPCK
CPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVNNVEVHTAQ
TQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQ
VYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGGSYF
MYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

【0580】

配列番号 105 (Cyno CD137 ECD-avi-flag-his)

LQDLCSNCPAGTFCDNNRSQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFKTRKECSSTSNA
ECDCISGYHCLGAECMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDG
KSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSATPPAPAREPGHSPQSSSLNDIFEAQKIEWHE
DYKDDDDKDYKDDDDKDYKDDDDKHHHHHHHHHH

【0581】

配列番号 106 (Cyno CD137 ECD-mFc)

LQDLCSNCPAGTFCDNNRSQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFKTRKECSSTSNA
ECDCISGYHCLGAECMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDG
KSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSATPPAPAREPGHSPQSSSEPRGPTIKPCPPCK
PAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVNNVEVHTAQ
TQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQ
YVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGGSYFM
YSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

【0582】

配列番号 107 (ヒト OX40 ECD-avi-flag-his)

LHCVGDTYPSNDRCCHECRPGNGMVSRCSRSQNTVCRPCGPGFYNDVVSSKPCKPCTW
CNLRSGSERKQLCTATQDTVCRCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPGPHFSPGDNQACKPWT
NCTLAGKHTLQPASNSSDAICEDRDPPATQPQETQGPPARPITVQPTEAWPRTSQGPSTR
PVEVPGGRATGLNDIFEAQKIEWHEDYKDDDDKDYKDDDDKDYKDDDDKHHHHHH

【0583】

配列番号 108 (Cyno OX40 ECD-avi-flag-his)

KLHCVGDTYPSNDRCCQECRPGNGMVSRCSRSQNTVCRPCGPGFYNDVVSAKPCKACT
WCNLRSGSERKQPCTATQDTVCRCRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPGPHFSPGDNQACKP
WTNCTLAGKHTLQPASNSSDAICEDRDPPPTQPQETQGPPARPTTVQPTEAWPRTSQRP
STRPVEVPRGPATGLNDIFEAQKIEWHEDYKDDDDKDYKDDDDKDYKDDDDKHHHHHH

【0584】

配列番号 109 (リンカー)

AGGGGSGGGGSGGGGSPS

【0585】

配列番号 110 (リンカー)

AGGGGSPS

【0586】

配列番号 111 (K332A)

EPKSSDKTHTCPPCPAPEAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF

10

20

30

40

50

NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

【0587】

配列番号112 (PVAG TSC01004)

EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

【0588】

配列番号113 (PVAdeL TSC01005)

EPKSSDKTHTCPPCPAPPVAAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

【0589】

配列番号114 (PAAAG TSC01006)

EPKSSDKTHTCPPCPAPPAAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

【0590】

配列番号115 (PAAdeL TSC01007)

EPKSSDKTHTCPPCPAPPAAAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

【0591】

配列番号143

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCEASGYTFTSYWINWVKQRPQGQLEWIGNIYPGSSTTN
YNEKFKSKATLTVDTSSTAYMQLSSLTSDDSAVFYCASFSGGYYAYAMDYWVQGTSVT
VSS

【0592】

配列番号144

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWINWVKQRPQGQLEWIGNIYPGSSTTN
YNEKFKSKATLTVDTSSTAYMQLSSLTSDDSAVFYCASFSGGYYAYAMDYWVQGTSVT
VSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQTSSLSASLGDRVTITCRASQDISNYLNWYQ
QKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGGGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGYTLPTF
GGGKLEIKSSSEPKSSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGSGGGGSGGGGSGGGGSPSSYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWFQQK
PGQAPALVYDDSGRPSGIPERFSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVV
FGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLS
YYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISHDGSCKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMDSLRA
EDTALYYCSNDQFDPWGQGTLVTVSSR

【0593】

配列番号145

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWINWVKQRPQGQLEWIGNIYPGSSTTN

10

20

30

40

50

YNEKFKSKATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSDDSAVFYCASFSDDGYAYAMDYWVQGTSVT
VSSGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQTSSLSASLGDRVTITCRASQDISNYLNWYQ
QKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGGGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGYTLPTYF
GGGKLEIKSSS

【0594】

配列番号146

SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWFQQKPGQAPALVVYDDSGRPSGIPER
FSGSTSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVLGGGSGGGGSGG
GGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTLSYYGMHWVRQAPGKGLEWVAVI
SHDGSCKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMDSLRAEDTALYYCSNDQFDPWGQGTLV
TVSSR

【0595】

配列番号147 (FXX01066抗4-1BB SCFV×抗OX40 SCFV AD
APTIRヌクレオチド配列)

GAGGTGCAACTGGTGCAATCAGGAGCTGAGGTGAAAAAACCGGGTGCCAGTGTTAAAGT
TAGCTGTAAGGCATCCGGGTACACGTTTACATCTTACTGGATGAATTGGGTCCGACAGG
CCCCAGGCCAAGGGTTGGAATGGATGGGAAATATTTATCCGTCCGGAGGTAGCACCAAT
TACGCTCAAAAATTTACAGGGAAGGGTGACAATGACGGTGGACACTAGCACCAAGTACTGT
GTACATGGAGTTGTCAAGTCTTCGCTCCGAAGATACTGCCGTGTATTACTGTGCTTCAT
TTAGTGATGGGTATTATGCGTACGCTATGGATTATTGGGGTCAGGGGACCTTGGTGACG
GTGTCCAGTGGTGGTGGAGGTAGTGGTGGAGGCGGATCTGGCGGCGGCGGTTCCAGGAGG
TGGTGGATCCGAGATAGTGATGACTCAATCTCCGGCTACTTTGTCTCTCAGTCCAGGGG
AGCGAGCCACTCTGAGCTGCAGGGCAAGTCAGTCCGTCTCCAGCTATCTTAATTGGTAC
CAACAGAAGCCGGGACAGGCTCCACGATTGTTGATCTACTACGCTAGTCGCAGGCACAC
AGGCATACCTGCTCGCTTTTCTGGAAGCGGGTCAGGAACAGACTTCACTTTGACAATCT
CATCACTTCAGCCGGAGGACTTTGCTGTGTATTACTGCCAACAAGGCTACAACCTCCCC
TATACGTTTGGGCAGGGCACAAAAGTAGAGATTAAGGAGCCCAAATCTTCTGACAAAAC
TCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTCCAGCCGCTGCACCGTCAGTCTTCCTCTTCC
CCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTG
GTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGG
TCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAATACAAGTGCGCG
GTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCA
GCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACC
AGGTACAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAAGCGACATCGCCGTGGAGTGG
GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGA
CGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGA
ACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGC
CTCTCCCTGTCTCCGGGCGGCGGGGGATCCCCGTCATCCTATGTGCTGACTCAGCCACC
CTCGGTGTGGTGGCCCCAGGACAGACGGCCAGGATTACCTGTGGGGGAAACAACATTG
GAAGTAAAAGTGTGAACTGGTTCCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCTGTACTGGTCGTC
TATGATGATAGCGGCCGCCCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCACCTCTGG
GAACACGGCCACCCTGACCATCAGCAGGGTGAAGCCGGGGATGAGGCCGACTATTACT
GTCAGGTGTGGGATAGTAGTAGTGATCATGTGGTATTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACC
GTCCTAGGTGGAGGCGGTTCCAGGCGGAGGTGGATCCGGCGGTGGCGGCTCCGGTGGCGG
CGGATCTCAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCC
TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCCCTCAGTTACTATGGCATGCACTGGGTC
CGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGCTATATCACATGATGGAAGTGA
TAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGA
ACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAAGACACGGCCGTGTATTACTGT

10

20

30

40

50

TCGAATGACCAGTTTGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCGCGC
【0596】

配列番号148 (FXX01102抗4-1BB SCFV×抗OX40 SCFV AD
APTIRヌクレオチド配列)

GAGGTGCAACTGGTGCAATCAGGAGCTGAGGTGAAAAAACCGGGTGCCAGTGTTAAAGT
TAGCTGTAAGGCATCCGGGTACACGTTTACATCTTACTGGATGAATTGGGTCCGACAGG
CCCCAGGCCAAGGGTTGGAATGGATGGGAAATATTTATCCGTCCGGAGGTAGCACCAAT
TACGCTCAAAAATTTACAGGGAAGGGTGACAATGACGGTGGACACTAGCACCAAGTACTGT
GTACATGGAGTTGTCAAGTCTTCGCTCCGAAGATACTGCCGTGTATTACTGTGCTTCAT
TTAGTGATGGGTATTATGCGTACGCTATGGATTATTGGGGTCAGGGGACCTTGGTGACG
GTGTCCAGTGGTGGTGGAGGTAGTGGTGGAGGCGGATCTGGCGGCGGCGGTTTCAAGGAGG
TGGTGGATCCGAGATAGTGATGACTCAATCTCCGGCTACTTTGTCTCTCAGTCCAGGGG
AGCGAGCCACTCTGAGCTGCAGGGCAAGTCAGTCCGTCTCCAGCTATCTTAATTGGTAC
CAACAGAAGCCGGGACAGGCTCCACGATTGTTGATCTACTACGCTAGTCGCAGGCACAC
AGGCATACCTGCTCGCTTTTCTGGAAGCGGGTCAGGAACAGACTTCACCTTTGACAATCT
CATCACTTCAGCCGGAGGACTTTGCTGTGTATTACTGCCAACAAGGCTACAACCTCCCC
TATACGTTTGGGCAGGGCACAAAAGTAGAGATTAAGGAGCCCAAATCTTCTGACAAAAC
TCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTCCAGCCGCTGCACCGTCAGTCTTCCTCTTCC
CCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTG
GTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGG
TCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAATACAAGTGCGCG
GTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCA
GCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACC
AGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAAGCGACATCGCCGTGGAGTGG
GAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGA
CGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGA
ACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGC
CTCTCCCTGTCTCCGGGCGGCGGGGGATCCCCGTCATCCTATGTGCTGACTCAGCCACC
CTCGGTGTGCGTGGCCCCAGGAAAAACGGCCAGGATTACCTGTGGGGGAAACAACATTG
GAAGTAAAAGTGTGAACTGGTTCCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCTGTACTGGTCGTC
TATGATGATAGCGGCCGGCCCTCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCTGGCTCCACCTCTGG
GAACACGGCCACCCTGACCATCAGCAGGGTCGAAGCCGGGGATGAGGCCGACTATTACT
GTCAGGTGTGGGATAGTAGTAGTGATCATGTGGTATTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACC
GTCCTAGGTGGAGGCGGTTTCAAGGCGGAGGTGGATCCGGCGGTGGCGGCTCCGGTGGCGG
CGGATCTCAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCC
TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCCCTCAGTTACTATGGCATGCACTGGGTC
CGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGCTATATCACATGATGGAAGTGA
TAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGA
ACAGACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAAGACACGGCCGTGTATTACTGT
TCGAATGACCAGTTTGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCGCGC

【0597】

配列番号149 (FXX01111抗4-1BB scFV×抗OX40 scFV AD
APTIRヌクレオチド配列)

GAGGTGCAACTGGTGCAATCAGGAGCTGAGGTGAAAAAACCGGGTGCCAGTGTTAAAGT
TAGCTGTAAGGCATCCGGGTACACGTTTACATCTTACTGGATGAATTGGGTCCGACAGG
CCCCAGGCCAAGGGTTGGAATGGATGGGAAATATTTATCCGTCCGGAGGTAGCACCAAT
TACGCTCAAAAATTTACAGGGAAGGGTGACAATGACGGTGGACACTAGCACCAAGTACTGT
GTACATGGAGTTGTCAAGTCTTCGCTCCGAAGATACTGCCGTGTATTACTGTGCTTCAT
TTAGTGATGGGTATTATGCGTACGCTATGGATTATTGGGGTCAGGGGACCTTGGTGACG

10

20

30

40

50

GTGTCCAGTGGTGGTGGAGGTAGTGGTGGAGGCGGATCTGGCGGGCGGCGGTTTCAGGAGG
TGGTGGATCCGAGATAGTGATGACTCAATCTCCGGCTACTTTGTCTCTCAGTCCAGGGG
AGCGAGCCACTCTGAGCTGCAGGGCAAGTCAGTCCGTCTCCAGCTATCTTAATTGGTAC
CAACAGAAGCCGGGACAGGCTCCACGATTGTTGATCTACTACGCTAGTCGCAGGCACAC
AGGCATACCTGCTCGCTTTTCTGGAAGCGGGTCAGGAACAGACTTCACTTTGACAATCT
CATCACTTCAGCCGGAGGACTTTGCTGTGTATTACTGCCAACAAGGCTACAACCTCCCC
TATACGTTTGGGCAGGGCACAAAAGTAGAGATTAAGGAGCCCAAATCTTCTGACAAAAC
TCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTCCAGCCGCTGCACCGTCAGTCTTCCTCTTCC
CCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTG
GTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGG
TCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAATACAAGTGCGCG
GTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCA
GCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACC
AGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAAGCGACATCGCCGTGGAGTGG
GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGA
CGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGA
ACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGC
CTCTCCCTGTCTCCGGGCGGGCGGGGGATCCCCGTCATCCTATGTGCTGACTCAGCCACC
CTCGGTGTGCGGTGGCCCCAGGACAGACGGCCAGGATTACCTGTGGGGGAAACAACATTG
GAAGTAAAAGTGTGAACTGGTTCCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCTGTACTGGTCGTC
TATGATGATAGCGGCCGGCCCTCAGGGGTTCTTAACCGATTCTCTGGCTCCACCTCTGG
GAACACGGCCACCCTGACCATCAGCAGGGTCGAAGCCGGGGATGAGGCCGACTATTACT
GTCAGGTGTGGGATAGTAGTAGTGATCATGTGGTATTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACC
GTCCTAGGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGATCCGGCGGTGGCGGCTCCGGTGGCGG
CGGATCTCAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCC
TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCCCTCAGTTACTATGGCATGCACTGGGTC
CGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGCTATATCACATGATGGAAGTGA
TAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGA
ACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAAGACACGGCCGTGTATTACTGT
TCGAATGACCAGTTTGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCGCGC

10

20

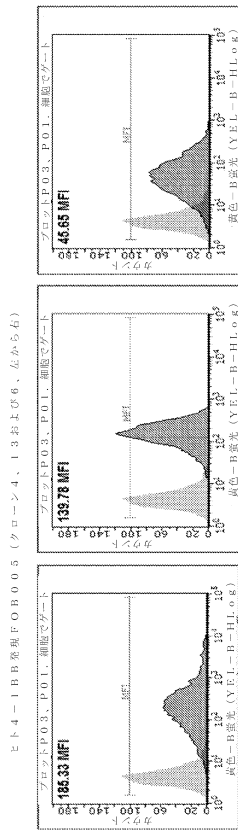
30

40

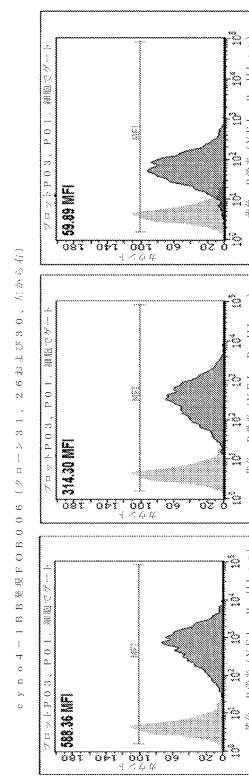
50

【図面】

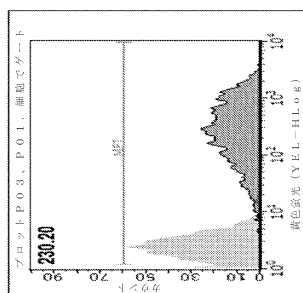
【図 1 A】



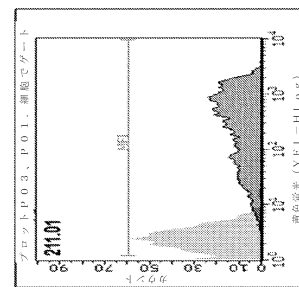
【図 1 B】



【図 2 A】



【図 2 B】



10

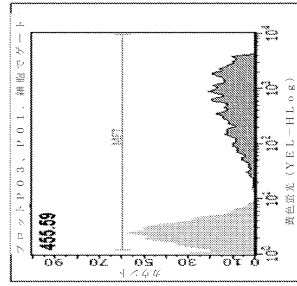
20

30

40

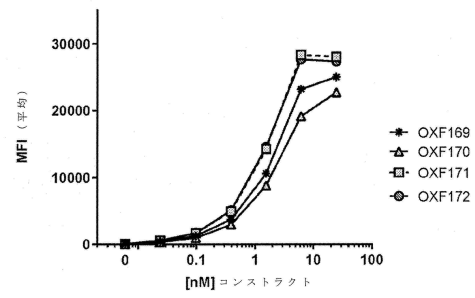
50

【図 2 C】



【図 3 A】

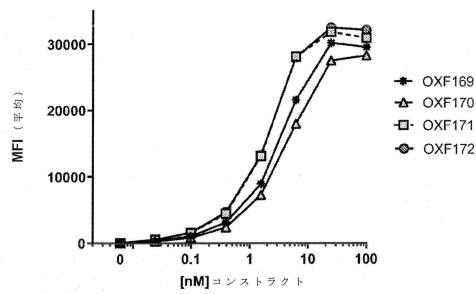
ヒト OX40 CHO K1 SV へのコンストラクト変異体の結合



10

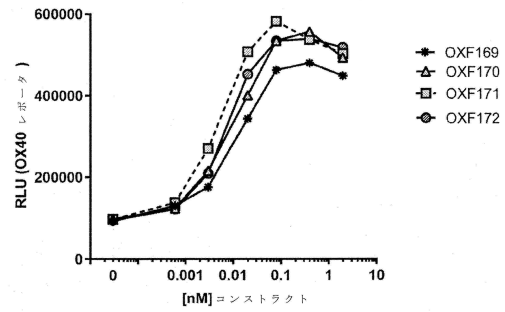
【図 3 B】

カニクイザル OX40 CHO K1 SV へのコンストラクト変異体の結合



【図 4】

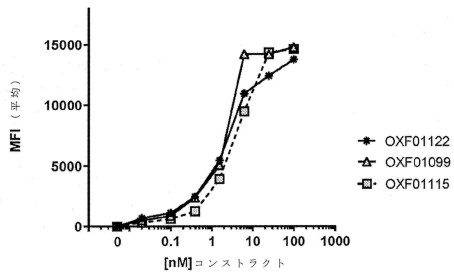
ヒト OX40 レポーターアッセイにおけるコンストラクト変異体の活性



20

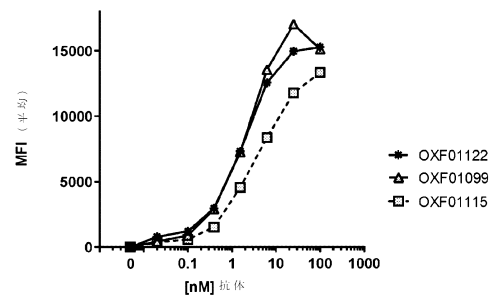
【図 5 A】

ヒト OX40 CHO K1 SV へのコンストラクト変異体の結合



【図 5 B】

カニクイザル OX40 CHO K1 SV へのコンストラクト変異体の結合

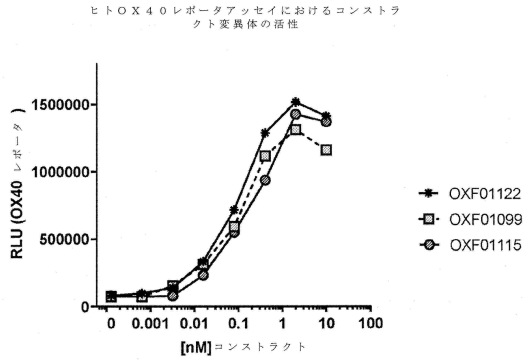


30

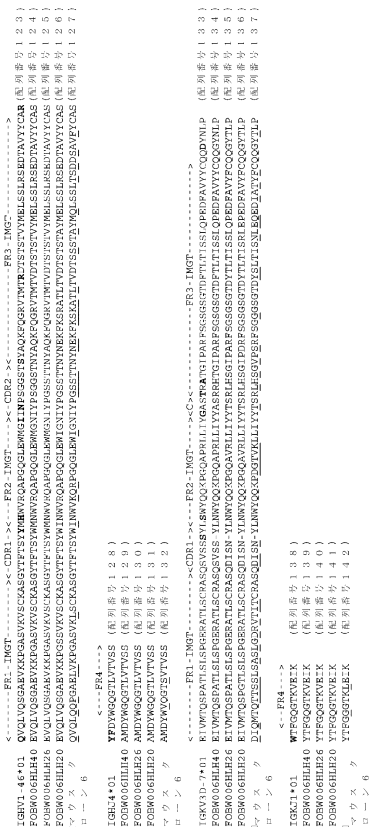
40

50

【図 6】



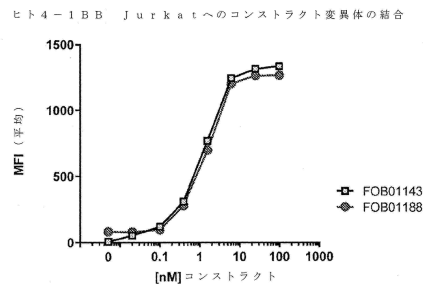
【図 7】



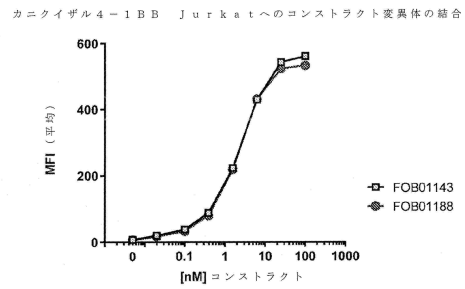
10

20

【図 8 A】



【図 8 B】

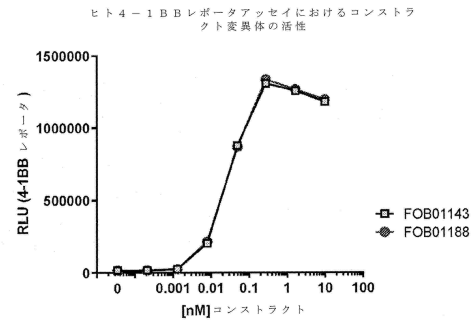


30

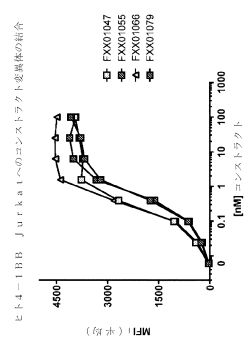
40

50

【図 9】

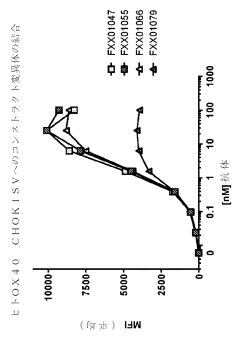


【図 10 A】



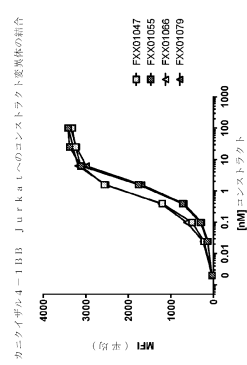
10

【図 10 B】

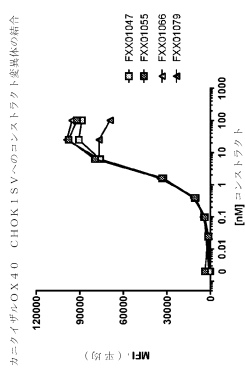


20

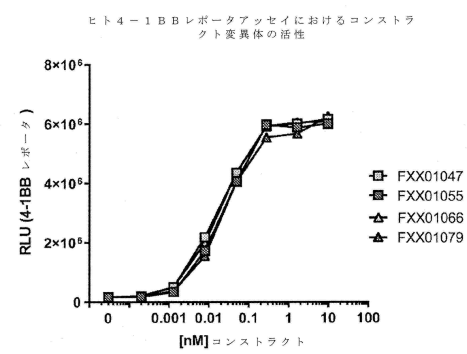
【図 10 C】



【図 10 D】



【図 11 A】

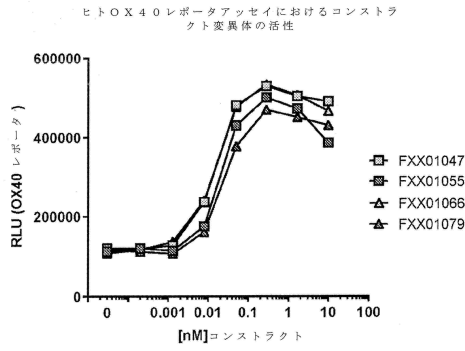


30

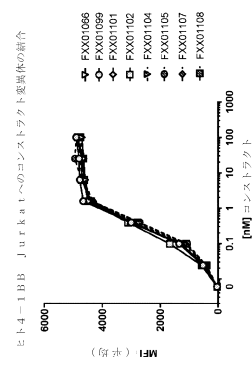
40

50

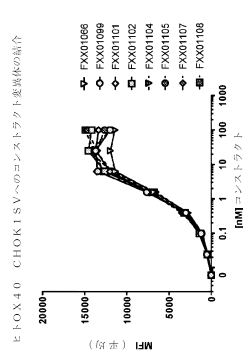
【図 1 1 B】



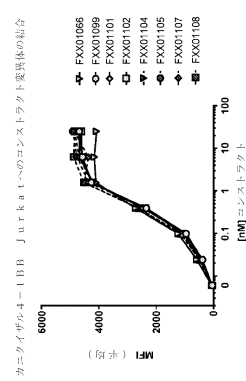
【図 1 2 A】



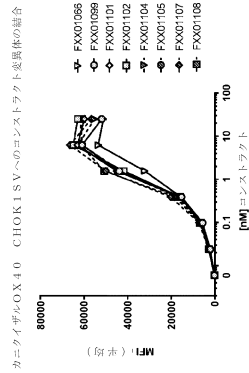
【図 1 2 B】



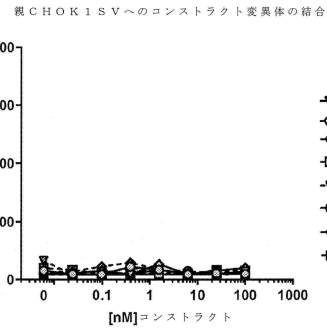
【図 1 2 C】



【図 1 2 D】



【図 1 3】



10

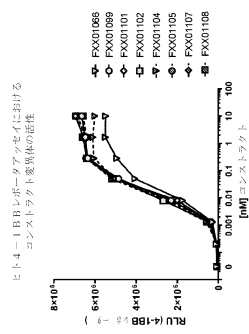
20

30

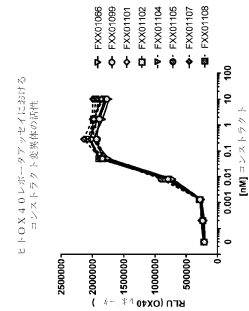
40

50

【図 1 4 A】

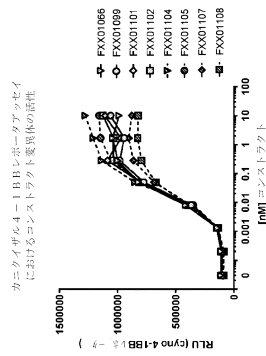


【図 1 4 B】

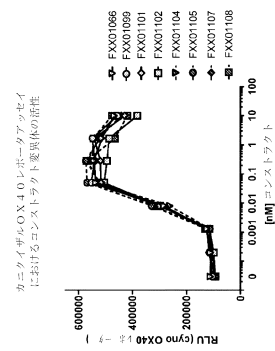


10

【図 1 4 C】

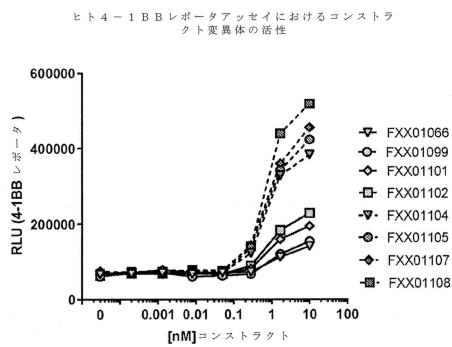


【図 1 4 D】

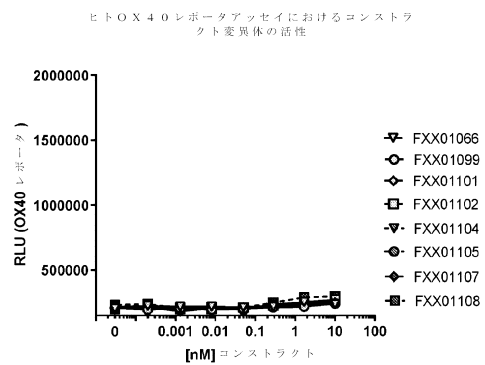


20

【図 1 5 A】



【図 1 5 B】

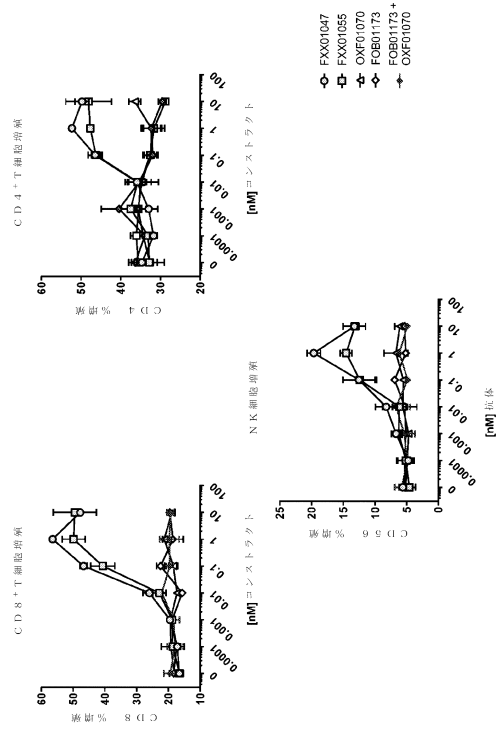


30

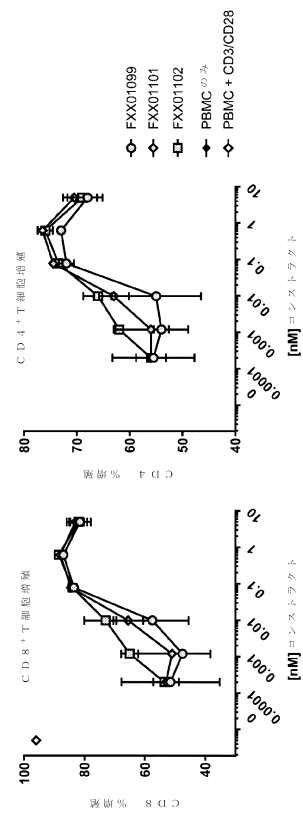
40

50

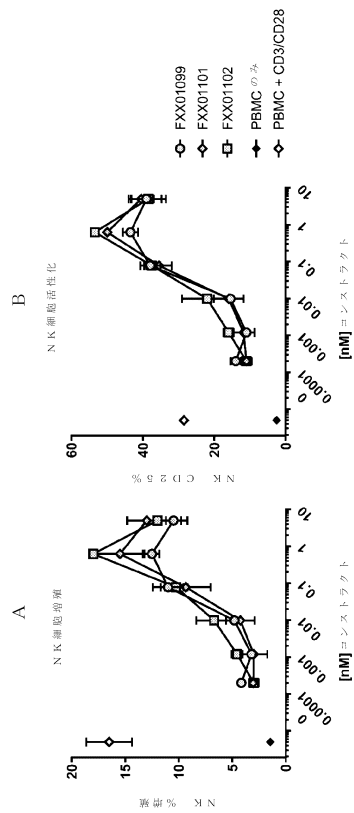
【図 16】



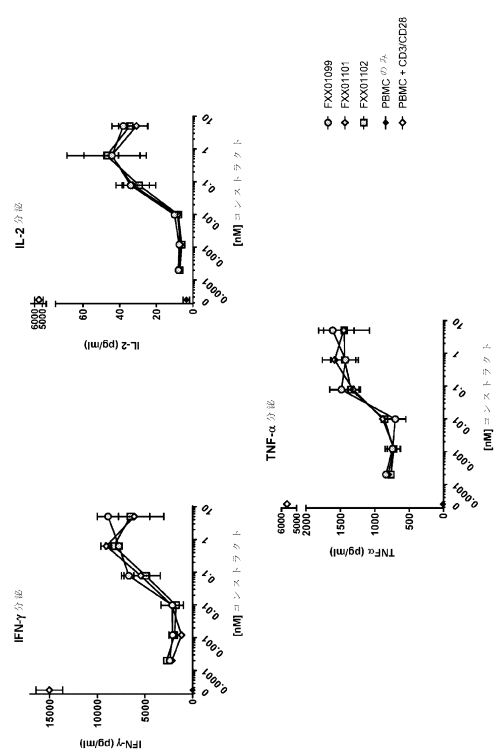
【図 17】



【図 18 A - B】



【図 19】



10

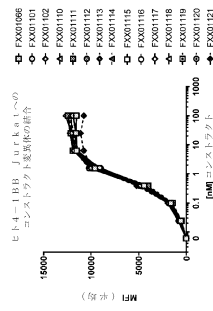
20

30

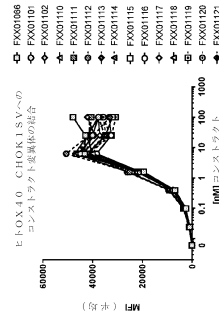
40

50

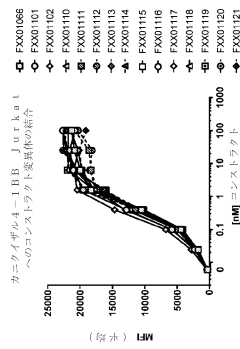
【図 20 A】



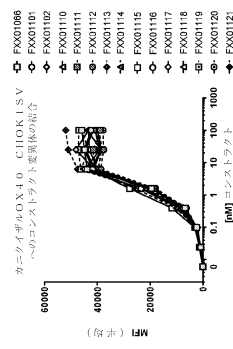
【図 20 B】



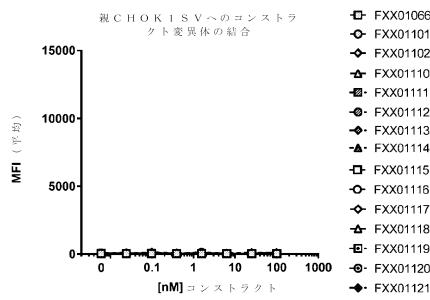
【図 20 C】



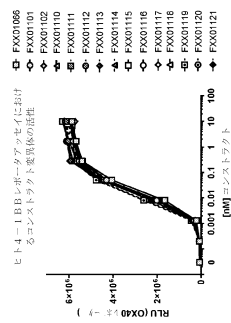
【図 20 D】



【図 21】



【図 22 A】



10

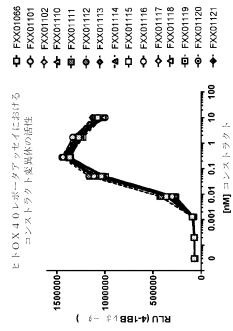
20

30

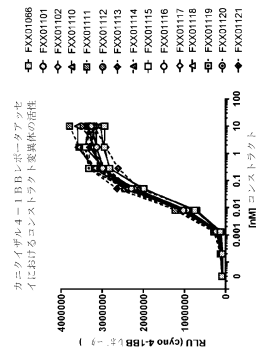
40

50

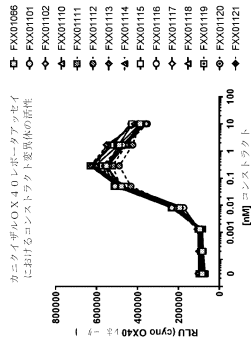
【図 2 2 B】



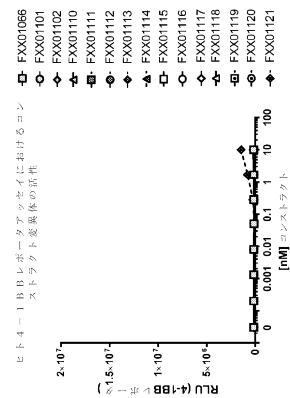
【図 2 2 C】



【図 2 2 D】



【図 2 3 A】



10

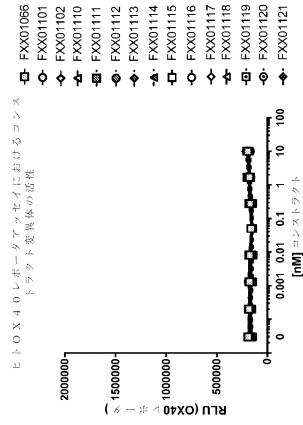
20

30

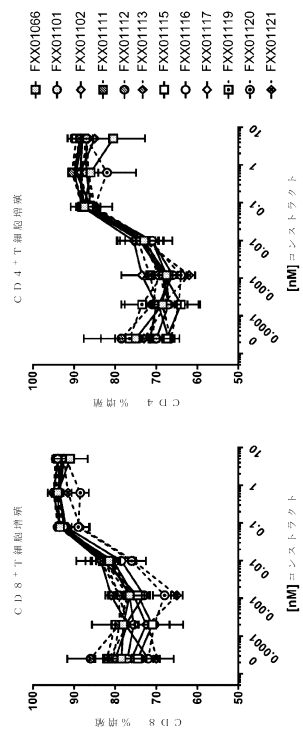
40

50

【図 2 3 B】



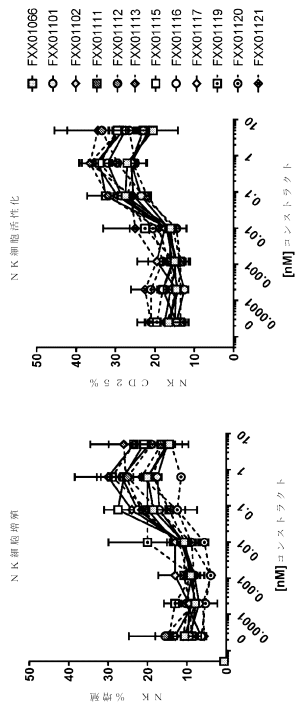
【図 2 4】



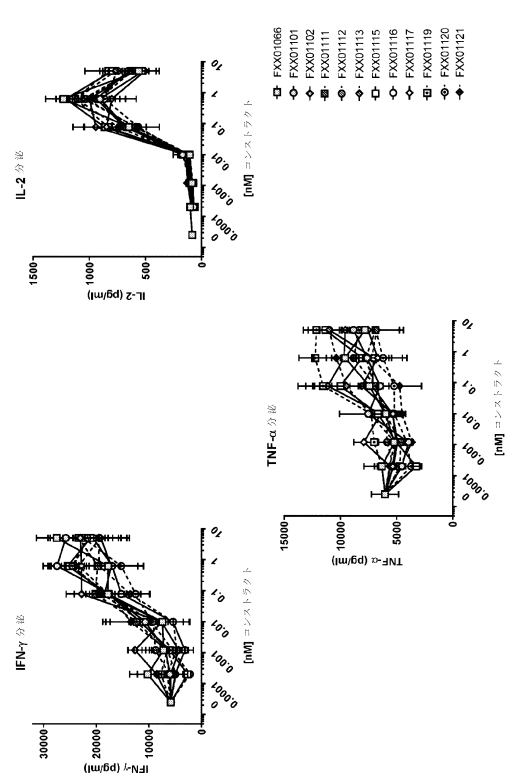
10

20

【図 2 5】



【図 2 6】

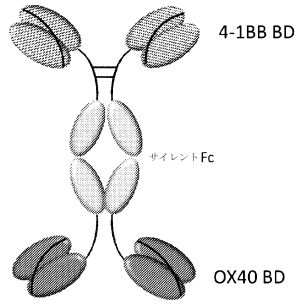


30

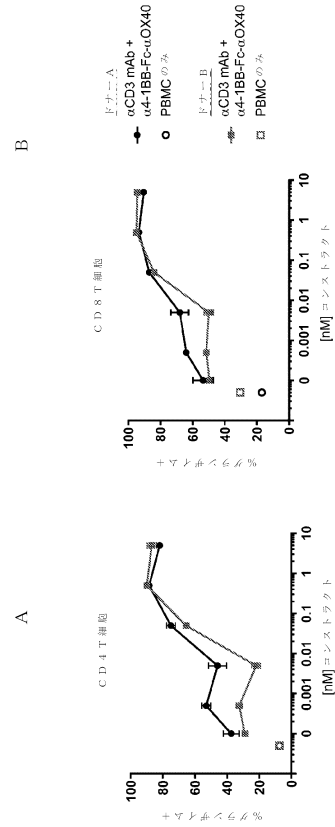
40

50

【図 27】



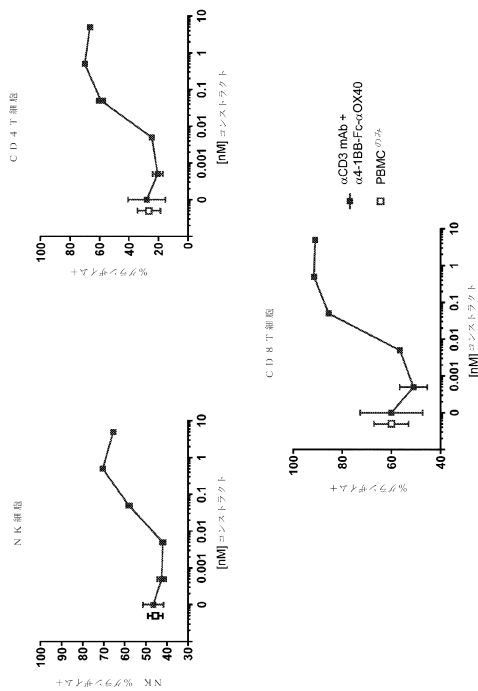
【図 28 A - B】



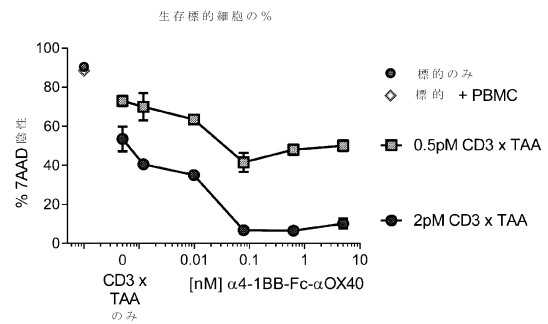
10

20

【図 29】



【図 30】

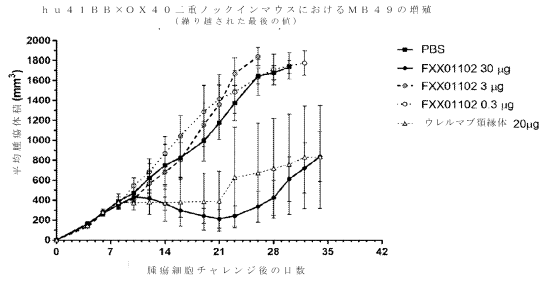


30

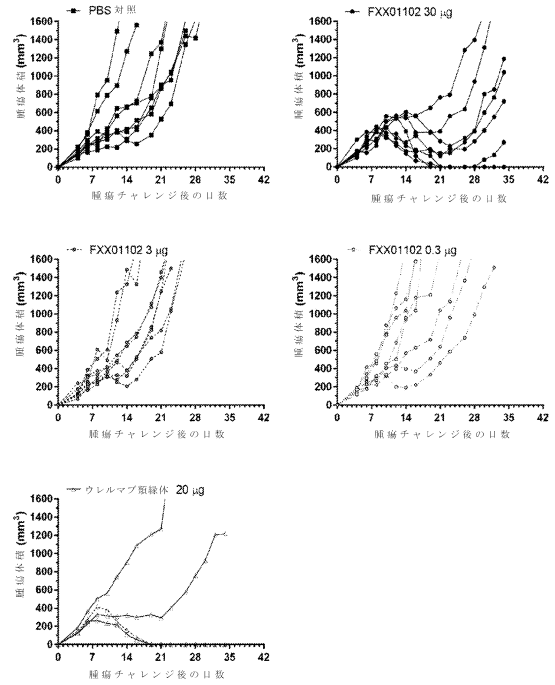
40

50

【図 3 1】



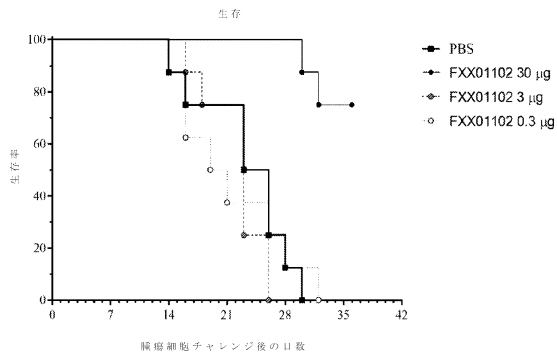
【図 3 2】



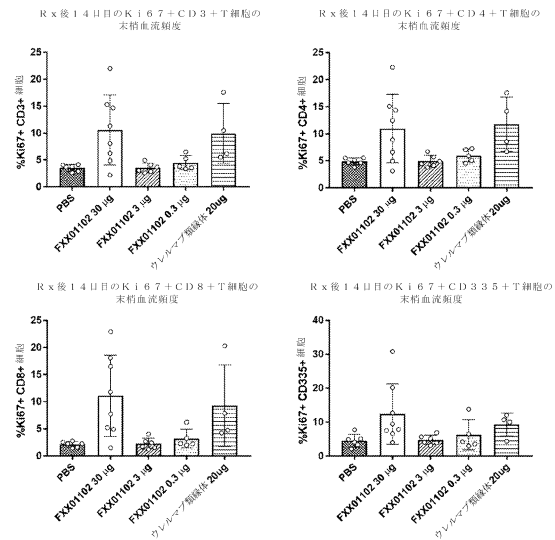
10

20

【図 3 3】



【図 3 4】



30

40

50

【配列表】
0007691138000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08	
C 1 2 N	5/0783(2010.01)	C 1 2 N	5/0783	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P	37/04	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 K	39/395(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
G 0 1 N	33/574(2006.01)	G 0 1 N	33/574	A
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13	Z N A

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/911,010

(32)優先日 令和1年10月4日(2019.10.4)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 63/056,115

(32)優先日 令和2年7月24日(2020.7.24)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

弁理士 高橋 香元

(72)発明者 ビアンヴニユ, デイビッド レナード

アメリカ合衆国, ワシントン州 9 8 1 2 1, シアトル, スイート 1 0 5 0, 2 4 0 1 フォース
アベニュー, アプティーボ セラピューティクス内

(72)発明者 ヘルナンデスーホヨス, ガブリエラ

アメリカ合衆国, ワシントン州 9 8 1 2 1, シアトル, スイート 1 0 5 0, 2 4 0 1 フォース
アベニュー, アプティーボ セラピューティクス内

(72)発明者 ミッシャー, リンダ

アメリカ合衆国, ワシントン州 9 8 1 2 1, シアトル, スイート 1 0 5 0, 2 4 0 1 フォース
アベニュー, アプティーボ セラピューティクス内

(72)発明者 ヴァン シターズ, ダニエル

アメリカ合衆国, ワシントン州 9 8 1 2 1, シアトル, スイート 1 0 5 0, 2 4 0 1 フォース
アベニュー, アプティーボ セラピューティクス内

(72)発明者 ネルソン, ミシェル ハーゼ

アメリカ合衆国, ワシントン州 9 8 1 2 1, シアトル, スイート 1 0 5 0, 2 4 0 1 フォース
アベニュー, アプティーボ セラピューティクス内

(72)発明者 パヴリク, ピーター

アメリカ合衆国, ワシントン州 9 8 1 2 1, シアトル, スイート 1 0 5 0, 2 4 0 1 フォース
アベニュー, アプティーボ セラピューティクス内

審査官 上條 のぶよ

(56)参考文献

特表2018-520650 (JP, A)

国際公開第2018/115003 (WO, A2)

特表2018-535662 (JP, A)

特表2018-535665 (JP, A)

米国特許出願公開第2015/0307620 (US, A1)

国際公開第2019/016402 (WO, A1)

国際公開第2018/057802 (WO, A1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 1 6 / 0 0 - 4 6

C12N 15/00-90

C12N 5/00-28

C12N 1/00-38

C12P 21/00-08

A61K 39/395

G01N 33/00-98

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (ST
N)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq