(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2023-540444
(P2023-540444A)
(43)公表日　令和5年9月25日(2023.9.25)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C12N	*15/13 (2006.01)*	C12N	15/13		4C076
C07K	*16/28 (2006.01)*	C07K	16/28	ZNA	4C084
C07K	*16/46 (2006.01)*	C07K	16/46		4C085
A61K	*39/395 (2006.01)*	A61K	39/395	D	4H045
A61P	*29/00 (2006.01)*	A61K	39/395	N	

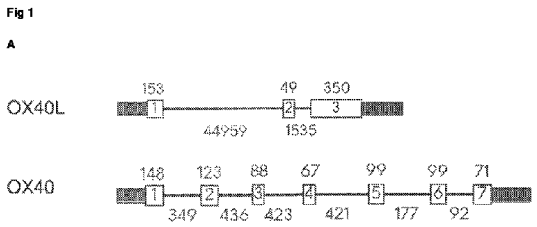
審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全81頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2023-507798(P2023-507798)
(86)(22)出願日　令和3年8月6日(2021.8.6)
(85)翻訳文提出日　令和5年3月27日(2023.3.27)
(86)国際出願番号　PCT/GB2021/052043
(87)国際公開番号　WO2022/029447
(87)国際公開日　令和4年2月10日(2022.2.10)
(31)優先権主張番号　2012331.1
(32)優先日　令和2年8月7日(2020.8.7)
(33)優先権主張国・地域又は機関
英国(GB)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　522414327
ペットメディックス・リミテッド
イギリス・ケンブリッジ・ＣＢ２２・３ＦＨ・バブラハム・バブラハム・リサーチ・キャンパス・ビルディング・９４０・ザ・グレン・ヴェルジェ・ビルディング
(74)代理人　100108453
弁理士　村山 靖彦
(74)代理人　100110364
弁理士　実広 信哉
(74)代理人　100133400
弁理士　阿部 達彦
(72)発明者　アラン・ブラッドリー
イギリス・ケンブリッジ・ＣＢ２２・３
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　治療用抗体

(57)【要約】
本発明は、コンパニオンアニマルにおける炎症性疾患、例えば、アトピー性皮膚炎(AD)及び/又は湿疹を治療するために、OX40シグナル伝達経路を調節する抗体に関する。関連する方法及び使用もまた記載される。



10

20

【特許請求の範囲】
【請求項１】
コンパニオンアニマルＯＸ４０Ｌに特異的に結合する抗体又はその断片。
【請求項２】
前記コンパニオンアニマルがイヌ又はネコである、請求項1に記載の抗体又は断片。
【請求項３】
イヌ科ＯＸ４０Ｌに結合する、請求項1又は2に記載の抗体又は断片。
【請求項４】
a)前記コンパニオンアニマルにおいて又は該コンパニオンアニマルの細胞において、ＯＸ４０活性若しくは活性化を低減、阻害又は中和すること;
b)該コンパニオンアニマルにおいて又は該コンパニオンアニマルの細胞において、サイトカインの分泌を変化させること及び/又は
c)該コンパニオンアニマルにおいて、白血球の増殖を減少させること
が可能である、請求項3に記載の抗体又は断片。
【請求項５】
抗体が、イヌ科又はイヌ科化抗体である、請求項4に記載の抗体又は断片。
【請求項６】
抗体が、以下の抗体のうちの1つから選択される、請求項5に記載の抗体又は断片:
配列番号15を含むＨＣ ＣＤＲ1又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列、配列番号16を含むＨＣ ＣＤＲ2又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列、配列番号17を含むＨＣ ＣＤＲ3又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列、配列番号18を含むＬＣ ＣＤＲ1又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列、配列番号19を含むＬＣ ＣＤＲ2又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列及び配列番号20を含むＬＣ ＣＤＲ3又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列を含む抗体;
配列番号25を含むＨＣ ＣＤＲ1又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列、配列番号26を含むＨＣ ＣＤＲ2又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列、配列番号27を含むＨＣ ＣＤＲ3又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列、配列番号28を含むＬＣ ＣＤＲ1又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列、配列番号29を含むＬＣ ＣＤＲ2又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列及び配列番号30を含むＬＣ ＣＤＲ3又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列を含む抗体;
配列番号35を含むＨＣ ＣＤＲ1又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列、配列番号36を含むＨＣ ＣＤＲ2又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列、配列番号37を含むＨＣ ＣＤＲ3又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列、配列番号38を含むＬＣ ＣＤＲ1又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列、配列番号39を含むＬＣ ＣＤＲ2又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列及び配列番号40を含むＬＣ ＣＤＲ3又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列を含む抗体;
配列番号45を含むＨＣ ＣＤＲ1又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列、配列番号46を含むＨＣ ＣＤＲ2又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列、配列番号47を含むＨＣ ＣＤＲ3又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列、配列番号48を含むＬＣ ＣＤＲ1又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列、配列番号49を含むＬＣ ＣＤＲ2又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列及び配列番号50を含むＬＣ ＣＤＲ3又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列を含む抗体;
配列番号55を含むＨＣ ＣＤＲ1又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列、配列番号56を含むＨＣ ＣＤＲ2又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列、配列番号57を含むＨＣ ＣＤＲ3又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列、配列番号58を含むＬＣ ＣＤＲ1又はそれに対して少なくとも80％の配列

同一性を有する配列、配列番号59を含むLC CDR2又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列及び配列番号60を含むLC CDR3又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む抗体;

配列番号65を含むHC CDR1又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列、配列番号66を含むHC CDR2又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列、配列番号67を含むHC CDR3又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列、配列番号68を含むLC CDR1又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列、配列番号69を含むLC CDR2又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列及び配列番号70を含むLC CDR3又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む抗体;

配列番号75を含むHC CDR1又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列、配列番号76を含むHC CDR2又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列、配列番号77を含むHC CDR3又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列、配列番号78を含むLC CDR1又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列、配列番号79を含むLC CDR2又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列及び配列番号80を含むLC CDR3又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む抗体;

配列番号85を含むHC CDR1又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列、配列番号86を含むHC CDR2又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列、配列番号87を含むHC CDR3又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列、配列番号88を含むLC CDR1又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列、配列番号89を含むLC CDR2又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列及び配列番号90を含むLC CDR3又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む抗体;

配列番号95を含むHC CDR1又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列、配列番号96を含むHC CDR2又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列、配列番号97を含むHC CDR3又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列、配列番号98を含むLC CDR1又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列、配列番号99を含むLC CDR2又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列及び配列番号100を含むLC CDR3又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む抗体;

配列番号105を含むHC CDR1又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列、配列番号106を含むHC CDR2又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列、配列番号107を含むHC CDR3又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列、配列番号108を含むLC CDR1又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列、配列番号109を含むLC CDR2又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列及び配列番号110を含むLC CDR3又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む抗体;

配列番号115を含むHC CDR1又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列、配列番号116を含むHC CDR2又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列、配列番号117を含むHC CDR3又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列、配列番号118を含むLC CDR1又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列、配列番号119を含むLC CDR2又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列及び配列番号120を含むLC CDR3又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む抗体;

配列番号125を含むHC CDR1又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列、配列番号126を含むHC CDR2又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列、配列番号127を含むHC CDR3又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列、配列番号128を含むLC CDR1又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列、配列番号129を含むLC CDR2又はそれに対して少なくとも

８０％の配列同一性を有する配列及び配列番号１３０を含むＬＣ ＣＤＲ３又はそれに対して少なくとも８０％の配列同一性を有する配列を含む抗体;或いは

配列番号１３５を含むＨＣ ＣＤＲ１又はそれに対して少なくとも８０％の配列同一性を有する配列、配列番号１３６を含むＨＣ ＣＤＲ２又はそれに対して少なくとも８０％の配列同一性を有する配列、配列番号１３７を含むＨＣ ＣＤＲ３又はそれに対して少なくとも８０％の配列同一性を有する配列、配列番号１３８を含むＬＣ ＣＤＲ１又はそれに対して少なくとも８０％の配列同一性を有する配列、配列番号１３９を含むＬＣ ＣＤＲ２又はそれに対して少なくとも８０％の配列同一性を有する配列及び配列番号１４０を含むＬＣ ＣＤＲ３又はそれに対して少なくとも８０％の配列同一性を有する配列を含む抗体。

【請求項７】

抗体が、以下の抗体のうちの１つから選択される、請求項５又は６に記載の抗体又は抗体断片:

配列番号１２を含むか若しくはそれからなるＨＣ可変領域又はそれに対して少なくとも８０％の配列同一性を有する配列及び配列番号１４を含むか若しくはそれからなるＬＣ可変領域又はそれに対して少なくとも８０％の配列同一性を有する配列を含む抗体;

配列番号２２を含むか若しくはそれからなるＨＣ可変領域又はそれに対して少なくとも８０％の配列同一性を有する配列及び配列番号２４を含むか若しくはそれからなるＬＣ可変領域又はそれに対して少なくとも８０％の配列同一性を有する配列を含む抗体;

配列番号３２を含むか若しくはそれからなるＨＣ可変領域又はそれに対して少なくとも８０％の配列同一性を有する配列及び配列番号３４を含むか若しくはそれからなるＬＣ可変領域又はそれに対して少なくとも８０％の配列同一性を有する配列を含む抗体;

配列番号４２を含むか若しくはそれからなるＨＣ可変領域又はそれに対して少なくとも８０％の配列同一性を有する配列及び配列番号４４を含むか若しくはそれからなるＬＣ可変領域又はそれに対して少なくとも８０％の配列同一性を有する配列を含む抗体;

配列番号５２を含むか若しくはそれからなるＨＣ可変領域又はそれに対して少なくとも８０％の配列同一性を有する配列及び配列番号５４を含むか若しくはそれからなるＬＣ可変領域又はそれに対して少なくとも８０％の配列同一性を有する配列を含む抗体;

配列番号６２を含むか若しくはそれからなるＨＣ可変領域又はそれに対して少なくとも８０％の配列同一性を有する配列及び配列番号６４を含むか若しくはそれからなるＬＣ可変領域又はそれに対して少なくとも８０％の配列同一性を有する配列を含む抗体;

配列番号７２を含むか若しくはそれからなるＨＣ可変領域又はそれに対して少なくとも８０％の配列同一性を有する配列及び配列番号７４を含むか若しくはそれからなるＬＣ可変領域又はそれに対して少なくとも８０％の配列同一性を有する配列を含む抗体;

配列番号８２を含むか若しくはそれからなるＨＣ可変領域又はそれに対して少なくとも８０％の配列同一性を有する配列及び配列番号８４を含むか若しくはそれからなるＬＣ可変領域又はそれに対して少なくとも８０％の配列同一性を有する配列を含む抗体;

配列番号９２を含むか若しくはそれからなるＨＣ可変領域又はそれに対して少なくとも８０％の配列同一性を有する配列及び配列番号９４を含むか若しくはそれからなるＬＣ可変領域又はそれに対して少なくとも８０％の配列同一性を有する配列を含む抗体;

配列番号１０２を含むか若しくはそれからなるＨＣ可変領域又はそれに対して少なくとも８０％の配列同一性を有する配列及び配列番号１０４を含むか若しくはそれからなるＬＣ可変領域又はそれに対して少なくとも８０％の配列同一性を有する配列を含む抗体;

配列番号１１２を含むか若しくはそれからなるＨＣ可変領域又はそれに対して少なくとも８０％の配列同一性を有する配列及び配列番号１１４を含むか若しくはそれからなるＬＣ可変領域又はそれに対して少なくとも８０％の配列同一性を有する配列を含む抗体;

配列番号１２２を含むか若しくはそれからなるＨＣ可変領域又はそれに対して少なくとも８０％の配列同一性を有する配列及び配列番号１２４を含むか若しくはそれからなるＬＣ可変領域又はそれに対して少なくとも８０％の配列同一性を有する配列を含む抗体;或いは

配列番号１３２を含むか若しくはそれからなるＨＣ可変領域又はそれに対して少なくとも８０％の配列同一性を有する配列及び配列番号１３４を含むか若しくはそれからなるＬＣ可

変領域又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む抗体。
【請求項８】
断片が、F(ab')2、Fab、Fv、scFv、重鎖、軽鎖、可変重鎖(VH)、可変軽鎖(VL)、CDR領域、単一VH又はVLドメイン、マキシボディ、ミニボディ、イントラボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、及びビス-scFv、並びにポリペプチドに対して特異的抗原結合性を付与するために十分な免疫グロブリンの少なくとも一部分を含むポリペプチドから選択される、請求項7に記載の抗体又は断片。
【請求項９】
別の部分にコンジュゲート化される、請求項8に記載の抗体又は断片。
【請求項１０】
治療的部分、半減期延長性部分又は標識を含む、請求項9に記載の抗体又は断片。
【請求項１１】
請求項10に記載の抗体又は断片を含む、結合分子。
【請求項１２】
疾患の治療における使用のための、請求項1から10のいずれか一項に記載の抗体若しくは断片又は請求項11に記載の結合分子。
【請求項１３】
請求項1から10のいずれか一項に記載の抗体若しくはその断片又は請求項11に記載の結合分子を含む、医薬組成物。
【請求項１４】
OX40又はOX40L媒介疾患の治療における使用のための、請求項1から10のいずれか一項に記載の抗体若しくはその断片、請求項11に記載の結合分子又は請求項13に記載の医薬組成物。
【請求項１５】
請求項1から10のいずれか一項に記載の抗体若しくは断片、請求項11に記載の結合分子又は請求項13に記載の医薬組成物を、それを必要とする被験体に投与する工程を含む、OX40若しくはOX40L媒介疾患を治療又は予防する方法。
【請求項１６】
前記疾患が、炎症性疾患又は自己免疫疾患から選択される、請求項14に記載の抗体若しくは断片、結合分子又は医薬組成物或いは請求項15に記載の方法。
【請求項１７】
前記疾患が、アトピー性皮膚炎、アレルギー性皮膚炎、掻痒症、乾癬、強皮症、又は湿疹をはじめとする炎症性皮膚疾患;炎症性腸疾患(クローン病及び潰瘍性大腸炎等)に伴う応答;虚血再灌流;成人呼吸窮迫症候群;喘息;髄膜炎;脳炎;ブドウ膜炎;関節リウマチ、シェーグレン症候群、脈管炎等の自己免疫疾患;リンパ球漏出を含む疾患;中枢神経系(CNS)炎症性障害、敗血症又は外傷に対して二次的な多臓器損傷症候群;細菌性肺炎、抗原抗体複合体媒介疾患;胸膜炎、肺胞炎、脈管炎、肺炎、慢性気管支炎、気管支拡張症、及び嚢胞性線維症をはじめとする肺の炎症から選択される、請求項16に記載の抗体若しくは断片、結合分子、医薬組成物又は方法。
【請求項１８】
前記抗体又は断片が、1つ又は複数の治療剤と共に投与される、請求項14、16若しくは17に記載の抗体若しくは断片、結合分子、医薬組成物又は請求項15から17のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１９】
前記1つ又は複数の治療剤が、ラパマイシン(シロリムス)、タクロリムス、シクロスポリン(例えば、Atopica(登録商標))、コルチコステロイド(例えば、メチルプレドニゾロン)、メトトレキサート、ミコフェノール酸モフェチル、抗CD28抗体、抗IL12/IL-23抗体、抗CD20抗体、抗CD30抗体、CTLA4-Fc分子、CCR5受容体アンタゴニスト、抗CD40L抗体、抗VI_A4抗体、抗LFA1抗体、フルダラビン、抗CD52抗体、抗CD45抗体、シクロホスファミド、抗胸腺細胞グロブリン、抗補体C5抗体、抗a4b7インテグリ

ン抗体、抗IL6抗体、抗IL6-R抗体、抗IL2R抗体、抗CD25抗体、抗TNFa/TNFa-Fc分子、HDAC阻害剤、JAK-1及びJAK-3阻害剤等のJAK阻害剤、抗IL-31抗体、SYK阻害剤、抗IL-4Ra抗体、抗IL-13抗体、抗TSLP抗体、PDE4阻害剤、ロキベトマブ(lokietmab)(Cytopoint(登録商標))、及びオクラシチニブ(Apoquel(登録商標))から選択される、請求項18に記載の抗体若しくは断片、結合分子、医薬組成物又は方法。

【請求項２０】

請求項1から10のいずれか一項に記載の抗体若しくは断片、請求項11に記載の結合分子又は請求項13に記載の医薬組成物を、それを必要とする被験体に投与する工程を含む、サイトカインの分泌を減少させる方法。

【請求項２１】

請求項1から10のいずれか一項に記載の抗体若しくはその断片又は請求項11に記載の結合分子を含む、多重特異的結合剤。

【請求項２２】

請求項1から10のいずれか一項に記載の抗体若しくは断片、請求項11に記載の結合分子又は請求項13に記載の医薬組成物を含む、併用療法。

【請求項２３】

請求項1から10のいずれか一項に記載の抗体若しくは断片又は請求項11に記載の結合分子を含む、免疫コンジュゲート。

【請求項２４】

請求項1から10のいずれか一項に記載の抗体若しくはその断片、請求項11に記載の結合分子又は請求項13に記載の医薬組成物を含む、キット。

【請求項２５】

配列番号4若しくは6又はその変異体を含む、単離されたイヌ科OX40タンパク質。

【請求項２６】

任意により配列番号3若しくは5又はその変異体を含む、請求項25に記載のタンパク質をコードする単離された核酸分子。

【請求項２７】

試験サンプルを請求項1から10のいずれか一項に記載の抗体若しくは断片又は請求項11に記載の結合分子と接触させる工程を含む、コンパニオンアニマルにおいてOX40L又はOX40を検出するための方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

導入

本発明は、コンパニオンアニマルにおいて炎症性疾患を治療するために、OX40シグナル伝達経路を調節する抗体に関する。

【背景技術】

【０００２】

慢性的に乾燥した痒みのある赤色皮膚により特徴付けられる、アトピー性皮膚炎(AD)及び/又は湿疹は、イヌでは顕著な問題であり、愛玩犬のうちの10～15％を侵す。

【０００３】

サイトポイントは、イヌでのアトピー性皮膚炎に対する既存の治療であり、月1回の注入による1mg kg^{-1}の推奨最小用量を有する。サイトポイントは抗IL31 Abであり(例えば、国際公開第2013/011407号A1及び同第2019/177697号に記載される)、具体的にはアトピー性皮膚炎に伴う痒み(掻痒症)を治療することが意図される。しかしながら、イヌ科AD患者のうちの少なくとも3分の1がサイトポイントに満足に応答せず、一部の場合には、有効性は最初の注入後に低下し得る(例えば、「CVMP assessment report for CYTOPOINT EMA/118401/2017 (EMEA/V/C/003939/0000)」、及び世界獣医皮膚科学会(World Association for Veterinary Dermatology)、サイトポイントラウンドテーブル2017年5月、https://wavd.org/wp-content/uploads/cyt

opoint-roundtable-2017-05.pdfを参照されたい)。サイトポイントの最も一般的な副作用(1,000頭中の最大1頭を侵し得る)は、アナフィラキシー、顔面浮腫及びじんましん等のアレルギー反応である。サイトポイントは、3kg未満の体重のイヌには投与してはならない(https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/cytopoint-epar-product-information_en.pdf)。

【０００４】

症状ではなく疾患の根本的な原因を治療する、改善された治療並びに薬物に対する必要性がある。特に、安全で、長い作用期間を有し、且つ広いスペクトルの患者、特に非応答者を網羅する有効性を有する治療に対する必要性がある。

【０００５】

有利なことに、炎症カスケードにおいて上流であるOX40/OX40Lを標的化することは、同時に複数のサイトカインを調節する可能性を提示する。

【０００６】

イヌ科OX40Lは、米国特許第10,196,435号に記載されている。イヌ科OX40のタンパク質配列は、現在までに、科学文献又は特許文献中に報告されていない。

【０００７】

ネコ科CD134(OX40)に結合するモノクローナル抗体(7D6)及びネコ免疫不全ウイルスに対するその作用が、Willett等、Journal of Virology、81(18)、2007、9665～9679頁に記載されている。

【０００８】

コンパニオンアニマル(例えば、イヌ)でのアトピー性皮膚炎等の免疫により調節される疾患の治療におけるOX40L又はOX40に対する抗体の使用は、以前には示されていない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００９】

【特許文献１】国際公開第2013/011407号A1

【特許文献２】国際公開第2019/177697号

【特許文献３】米国特許第10,196,435号

【非特許文献】

【００１０】

【非特許文献１】CVMP assessment report for CYTOPOINT EMA/118401/2017 (EMEA/V/C/003939/0000)

【非特許文献２】世界獣医皮膚科学会(World Association for Veterinary Dermatology)、サイトポイントラウンドテーブル2017年5月、https://wavd.org/wp-content/uploads/cytopoint-roundtable-2017-05.pdf

【非特許文献３】https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/cytopoint-epar-product-information_en.pdf

【非特許文献４】Willett等、Journal of Virology、81(18)、2007、9665～9679頁

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【００１１】

発明の記述

第1の態様では、本発明は、コンパニオンアニマルOX40L又はコンパニオンアニマルOX40に特異的に結合する抗体又はその断片に関する。

【００１２】

コンパニオンアニマルは、イヌ又はネコであり得る。

【００１３】

一実施形態では、抗体又は断片は、イヌ科OX40Lに結合する。

【００１４】
一実施形態では、抗体又は断片は、
a)コンパニオンアニマルにおいて又はコンパニオンアニマルの細胞において、ＯＸ４０活性若しくは活性化を低減、阻害又は中和すること;
b)コンパニオンアニマルにおいて又はコンパニオンアニマルの細胞において、サイトカインの分泌を変化させること、及び/又は
c)コンパニオンアニマルにおいて又はコンパニオンアニマルの細胞において、白血球の増殖を減少させること
が可能である。
【００１５】
一実施形態では、抗体又は断片は、
a)コンパニオンアニマルにおいて又はコンパニオンアニマルの細胞において、ＯＸ４０活性若しくは活性化を低減、阻害又は中和すること;
b)コンパニオンアニマルにおいて又はコンパニオンアニマルの細胞において、炎症性サイトカインの分泌を減少させること、及び/又は
c)コンパニオンアニマルにおいて又はコンパニオンアニマルの細胞において、炎症性ケモカイン又はケモカイン受容体の分泌を減少させること、及び/又は
d)コンパニオンアニマルにおいて又はコンパニオンアニマルの細胞において、抑制性サイトカインの分泌を増加させること、及び/又は
e)コンパニオンアニマルにおいて又はコンパニオンアニマルの細胞において、抑制性ケモカイン又はケモカイン受容体の分泌を増加させること、及び/又は
f)コンパニオンアニマルにおいて、白血球の増殖を減少させること
が可能である。
【００１６】
混合リンパ球反応(ＭＬＲ)アッセイ又はＮＦｋＢ活性の阻害を測定するためのＨＥＫ-ｂｌｕｅアッセイ等、これらの特性を評価する好適なアッセイが、本明細書中に記載され、これは実施例中に示されるアッセイ、例えば、ＰＢＭＣ活性化アッセイ等である。他のアッセイが当業者に公知であり、用いることもできる。
【００１７】
サイトカイン又はサイトカイン受容体は、ＴＮＦα、ＩＬ-１Ｒａ、ＩＬ-２、ＩＬ-３、ＩＬ-４、ＩＬ-５、ＩＬ-６、ＩＬ-８、ＩＬ-９、ＩＬ-１０、ＩＬ-１３、ＩＬ-１７、ＲＡＮＴＥＳ、ＧＭ-ＣＳＦ、ＴＧＦ-β及びインターフェロンγから選択してもよい。
【００１８】
一実施形態では、抗体又は断片は、イヌ科ＯＸ４０に結合する。抗体又は断片は、コンパニオンアニマルにおいて又はコンパニオンアニマルの細胞において、ＯＸ４０活性若しくは活性化を低減、阻害又は中和することが可能であり得る。
【００１９】
ＯＸ４０又はＯＸ４０Ｌに結合する抗体に関する本発明の上記及び様々な態様の一実施形態では、抗体又は断片は、完全イヌ科、キメラ又はイヌ科化抗体である。完全イヌ科又はイヌ科との用語は、本明細書中で相互に交換可能に用いられる。好ましい実施形態に従えば、抗体は、イヌ科(すなわち、完全イヌ科)である。
【００２０】
例えば、前記断片は、Ｆ(ａｂ')２、Ｆａｂ、Ｆｖ、ｓｃＦｖ、重鎖、軽鎖、可変重鎖(ＶＨ)、可変軽鎖(ＶＬ)、ＣＤＲ領域、単一ＶＨ又はＶＬドメイン、マキシボディ、ミニボディ、イントラボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、及びビス-ｓｃＦｖ、並びにポリペプチドに対して特異的抗原結合性を付与するために十分な免疫グロブリンの少なくとも一部分を含むポリペプチドから選択される。
【００２１】
一実施形態では、抗体又は断片は、別の部分にコンジュゲート化される。抗体又は断片は、治療的部分、半減期延長性部分又は標識を含んでもよい。

【００２２】
別の態様では、本発明は、上記に記載される通りの抗体又は断片を含む結合分子に関する。
【００２３】
別の態様では、本発明は、疾患の治療での使用のための、上記に記載される通りの抗体若しくは断片又は結合分子に関する。
【００２４】
別の態様では、本発明は、上記に記載される通りの抗体若しくはその断片又は結合分子を含む医薬組成物に関する。
【００２５】
別の態様では、本発明は、ＯＸ４０又はＯＸ４０Ｌ媒介疾患の治療での使用のための、上記に記載される通りの抗体又はその断片、結合分子薬剤に関する。
【００２６】
別の態様では、本発明は、上記に記載される通りの抗体若しくは断片、結合分子又は医薬組成物を、それを必要とする被験体へと投与する工程を含む、ＯＸ４０又はＯＸ４０Ｌ媒介疾患を治療又は予防する方法に関する。
【００２７】
例えば、疾患は、炎症性疾患又は自己免疫疾患から選択される。
【００２８】
疾患は、アトピー性皮膚炎、アレルギー性皮膚炎、掻痒症、乾癬、強皮症、又は湿疹をはじめとする炎症性皮膚疾患;炎症性腸疾患(クローン病及び潰瘍性大腸炎等)に伴う応答;虚血再灌流;成人呼吸窮迫症候群;喘息;髄膜炎;脳炎;ブドウ膜炎;関節リウマチ、シェーグレン症候群、脈管炎等の自己免疫疾患;リンパ球漏出を含む疾患;中枢神経系(ＣＮＳ)炎症性障害、敗血症又は外傷に対して二次的な多臓器損傷症候群、細菌性肺炎、抗原抗体複合体媒介疾患;胸膜炎、肺胞炎、脈管炎、肺炎、慢性気管支炎、気管支拡張症、及び嚢胞性線維症をはじめとする肺の炎症であり得る。
【００２９】
一実施形態では、抗体又は断片、結合分子、医薬組成物は、１つ又は複数の治療剤と共に投与される。
【００３０】
例えば、前記１つ又は複数の治療剤は、ラパマイシン(シロリムス)、タクロリムス、シクロスポリン(例えば、Ａｔｏｐｉｃａ(登録商標))、コルチコステロイド(例えば、メチルプレドニゾロン)、メトトレキサート、ミコフェノール酸モフェチル、抗ＣＤ２８抗体、抗ＩＬ１２/ＩＬ-２３抗体、抗ＣＤ２０抗体、抗ＣＤ３０抗体、ＣＴＬＡ４-Ｆｃ分子、ＣＣＲ５受容体アンタゴニスト、抗ＣＤ４０Ｌ抗体、抗ＶＩ_Ａ４抗体、抗ＬＦＡ１抗体、フルダラビン、抗ＣＤ５２抗体、抗ＣＤ４５抗体、シクロホスファミド、抗胸腺細胞グロブリン、抗補体Ｃ５抗体、抗ａ４ｂ７インテグリン抗体、抗ＩＬ６抗体、抗ＩＬ６-Ｒ抗体、抗ＩＬ２Ｒ抗体、抗ＣＤ２５抗体、抗ＴＮＦａ(ＴＮＦα)/ＴＮＦａ-Ｆｃ分子、ＨＤＡＣ阻害剤、ＪＡＫ阻害剤(ＪＡＫ-１及びＪＡＫ-３阻害剤等)、抗ＩＬ-３１抗体、ＳＹＫ阻害剤、抗ＩＬ-４Ｒａ抗体、抗ＩＬ-１３抗体、抗ＴＳＬＰ抗体、ＰＤＥ４阻害剤、ロキベトマブ(ｌｏｋｉｅｔｍａｂ)(Ｃｙｔｏｐｏｉｎｔ(登録商標))、及びオクラシチニブ(Ａｐｏｑｕｅｌ(登録商標))から選択される。
【００３１】
別の態様では、本発明は、上記に記載される通りの抗体若しくは断片、結合分子又は医薬組成物を、それを必要とする被験体に投与する工程を含む、サイトカインの分泌を減少させる方法に関する。
【００３２】
別の態様では、本発明は、上記に記載される通りの抗体若しくは断片又は結合分子を含む、多重特異的結合剤に関する。
【００３３】
別の態様では、本発明は、上記に記載される通りの抗体若しくは断片、結合分子又は医

薬組成物を含む、併用療法に関する。
【００３４】
別の態様では、本発明は、上記に記載される通りの抗体若しくは断片又は結合分子を含む、免疫コンジュゲートに関する。
【００３５】
別の態様では、本発明は、上記に記載される通りの抗体若しくはその断片、結合分子又は医薬組成物を含む、キットに関する。
【００３６】
別の態様では、本発明は、配列番号4若しくは6又はその変異体を含む単離されたイヌ科ＯＸ４０タンパク質に関する。
【００３７】
別の態様では、本発明は、任意により配列番号3若しくは5又はその変異体を含む、上記の通りのタンパク質をコードする単離された核酸分子に関する。
【００３８】
別の態様では、本発明は、上記の通りの核酸を含むベクターに関する。
【００３９】
別の態様では、本発明は、上記に記載される通りの核酸又はベクターを含む宿主細胞に関し、ここで、宿主細胞は、任意により哺乳動物、酵母、植物又は細菌細胞から選択される。
【００４０】
別の態様では、本発明は、試験サンプルを上記に記載される通りの抗体若しくは断片又は結合分子と接触させる工程を含む、コンパニオンアニマルにおいてＯＸ４０Ｌ又はＯＸ４０を検出するための方法に関する。
【００４１】
別の態様では、本発明は、三量体可溶性コンパニオンアニマルＯＸ４０Ｌ細胞外ドメインプローブ及びコンパニオンアニマルＯＸ４０Ｌ抗体に関してスクリーニングする方法におけるその使用に関する。
【００４２】
本発明は、以下の非限定的図面及び表中に記載される。
【図面の簡単な説明】
【００４３】
【図１】ＯＸ４０及びＯＸ４０Ｌヌクレオチド配列を示す図である。Ａ.イヌゲノム内のエクソンの予測される個数及び配置。エクソンはボックスにより表される。線の上の数字は、ヌクレオチドでの各エクソンの予測されるサイズを表す。線の下の数字は、ヌクレオチドでのイントロン、5'ＵＴＲ及び3'ＵＴＲ(網掛けボックス)の予測されるサイズを表す。予測は、ＮＣＢＩアセンブリＩＤ:３１７１３８(ＣａｎＦａｍ３.１)を用いて行った。予測されるコード配列のサイズ及び配列は、ＲＴ-ＰＣＲにより確認した。Ｂ.本研究において用いられる構築物のうちの一部の漫画的表示。
【図２Ａ】2種類のＯＸ４０スプライシング変異体のヌクレオチド配列を示す図である。Ａ.エクソン1～7(配列番号１５７)からなる全長スプライシング変異体のヌクレオチド配列を示す図である。両方のパネルにおいて、予測された5'ＵＴＲ及び3'ＵＴＲは、小文字斜体で示される。これらの配列の漫画的表示は、図1に示される。
【図２Ｂ】2種類のＯＸ４０スプライシング変異体のヌクレオチド配列を示す図である。Ｂ.第2のスプライシング変異体はエクソン6(大文字の文字列)を欠損する(配列番号１５８)。両方のパネルにおいて、予測された5'ＵＴＲ及び3'ＵＴＲは、小文字斜体で示される。これらの配列の漫画的表示は、図1に示される。
【図２Ｃ】Ｃ.対応するアミノ酸(配列番号4及び6)のアライメントを示す図である。他の生物種由来のＯＸ４０タンパク質との相同性に基づいて、エクソン6が膜貫通ドメインを含むことが予測される。これらの配列の漫画的表示は、図1に示される。
【図３】偏りのないサブクローンＲＴ-ＰＣＲ産物の診断的ＰＣＲにより決定される通りの、Ｐ

HA活性化イヌPBMCにおける2種類のスプライシング変異体の相対的存在量を示す図である。測定は、活性化の1日後及び4日後に、独立したPBMCサンプルに対して行った。挿入図:短い(S)及び長い(L)スプライシング変異体のPCR鑑別。+ve=陽性対照。0.5、1.0及び3.0bpでの比較的明るいバンドを含む1kb Plus DNAラダー(NEB社)。

【図４】フローサイトメトリーを用いて測定された、免疫化及び非免疫化マウス由来の血清抗体力価を示す図である。A.非免疫化マウスでは、未トランスフェクション細胞(△)又はOX40Lを安定的に発現する細胞(〇)への感知できる抗体結合はなかった。B.免疫化マウス由来の血清を第1追加免疫の10日後に回収したところ、未トランスフェクション細胞(▽)とOX40Lを安定的に発現する細胞(□)との間での明らかな区別を生じた。本実施例では、流体力学的尾静脈注入を初回免疫化のために用い、OX40Lは、その後の細胞に基づく追加免疫のために、マウス胎児線維芽細胞において安定的に発現された。

【図５】OX40-OX40L相互作用を測定するための機能的アッセイを示す図である。A.HEK-Blue-OX40をHEK-OX40L細胞と混合してから6時間、24時間及び48時間後に放出された、分泌型アルカリホスファターゼの酵素活性を示す代表的曲線。全ての曲線は、培養培地単独を用いて取得されるシグナルを減算したベースラインである。

【図６】OX40Lのヌクレオチド配列を示す図である。A.斜体で示される予測されるUTRを含む、イヌからクローニングされた全長配列(配列番号159)。B.IL-2シグナル配列(大文字、下線)、Hisタグ(大文字、網掛け)、AviTag(大文字、太字)、ロイシンジッパー(小文字、網掛け)、GSリンカー(大文字、太字、下線)及び細胞外膜貫通ドメイン接合部で切断されたOX40Lの細胞外ドメインを含む、分泌型OX40L構築物(配列番号160)。これらの配列の漫画的表示は、図1に示される。

【図７】OX40L細胞外ドメイン(ECD)を含む可溶性タンパク質の模式的表示を示す図である。A.単量体ヒトIgG1(mvhfc)、6×ヒスチジン(HIS)タグ及びタバコエッチウイルス(TEV)プロテアーゼ切断性ペプチドを含む単量体OX40Lプローブ。B.ニワトリテネイシンC三量体化ドメイン及びヒトIgG1 Fc又はHISタグのいずれかを含む三量体OX40Lプローブ。三量体との用語は、OX40L細胞外ドメインのコンホメーションを意味する。

【図８】候補OX40L抗体の単回用量細胞結合アッセイを示す図である。ヒストグラムは、候補OX40L抗体及びそれに続く蛍光標識二次抗体を用いて染色された、OX40L発現性HEK293細胞又は親株のフローサイトメトリーにより取得されるシグナルの重ね合わせ強度を示す。図中に示される全ての抗体は、親株と比較して、より高い親和性を有してOX40L発現性HEK細胞に結合する。

【図９】PMX014及びPMX020(又は対照として抗体なし、左側パネル)をロードされ、続いてOX40L単量体(上部パネル)又は三量体(Fc融合)プローブ(下部パネル)を用いて染色されたOneComp eBeadsのフローサイトメトリーを示す密度プロットを示す図である。PMX014は両方のプローブに結合するが、PMX020は三量体プローブのみに結合する。

【図１０】OX40Lを発現するHEK細胞上のOX40Lに結合する抗体についての親和性決定を示す図である。グラフは、Log_{10}[濃度]に対して幾何平均(GeoMean)任意単位(AU)をプロットすることにより作成される。K_d(EC_{50})は、Prismを用いて算出した。K_d(PMX012)=3.0017e-9M;K_d(PMX013)=1.653e-7M;K_d(PMX014)=5.122e-9M;K_d(PMX016)=3.743e-8M;K_d(PMX017)=3.004e-8M;K_d(PMX018)=2.360e-8M;K_d(PMX019)=4.488e-9M;K_d(PMX020)=2.803e-9M。

【図１１】OX40Lを発現するMEF細胞上のOX40Lに結合する抗体についての親和性決定を示す図である。グラフは、Log_{10}[濃度]に対して幾何平均任意単位(AU)をプロットすることにより作成される。K_d(EC_{50})は、Prismを用いて算出した。K_d(PMX013)=2.272e-8M;K_d(PMX014)=1.111e-9M;K_d(PMX016)=1.078e-7M;K_d(PMX017)=1.068e-8M;K_d(PMX019)=3.826e-8M;K_d(PMX020)=7.101e-10M。

【図１２】イヌ科IgGB Def2及びDef7骨格に作り出されたOX40Lに結合する抗体についての親和性決定を示す図である。実験は、OX40Lを発現するHEK細胞を用いて行った。グラフは、Log_{10}[濃度]に対して幾何平均任意単位(AU)値をプロットすることにより

作成される。$K_d(EC_{50})$は、Prismを用いて算出した。K_d(PMX014 Def2)=7.462e-008M;K_d(PMX014 Def7)=7.424e-008 M;K_d(PMX020 Def2)=4.539e-008M;K_d(PMX020 Def7)=5.813e-008M。Def2又はDef7骨格は、可変領域の親和性を変化させない。

【図１３】OX40Lに結合する抗体についての単一濃度ブロッキングアッセイ(HEK-blueアッセイ)を示す図である。データは、抗体の非存在下で取得される応答により規定される最大シグナル(100%)及びHEK-blue-OX40細胞単独の存在下で測定される最小シグナル(0%)を用いて標準化される。統計学的検定、ダネット多重比較検定、adj p〈0.0001(****)、adj p=0.0063(**)。

【図１４】OX40Lに結合する抗体についての濃度依存的ブロッキング(HEK-blueアッセイ)を示す図である。データは、抗体の非存在下で取得される応答により規定される最大シグナル(100%)及びHEK-blue-OX40細胞単独の存在下で測定される最小シグナル(0%)を用いて標準化される。

【図１５】PMX012～PMX023の重鎖可変領域タンパク質配列のアライメントを示す図である。灰色の残基は、全てのアライメントされた配列間で保存されている。

【図１６】PMX012～PMX023の軽鎖可変領域タンパク質配列のアライメントを示す図である。灰色の残基は、全てのアライメントされた配列間で保存されている。

【図１７】相同性により分類される、OX40Lに結合する抗体についての重鎖可変領域タンパク質配列のアライメントを示す図である。灰色の残基は、各群中の全てのアライメントされた配列間で保存されている。

【図１８】相同性により分類される、OX40Lに結合する抗体についての軽鎖可変領域タンパク質配列のアライメントを示す図である。灰色の残基は、各群中の全てのアライメントされた配列間で保存されている。

【図１９】IgG B突然変異体のCDC活性を示す図である:Def突然変異体は、IgG-B CDC活性を抑制する。野生型(WT)イヌ科IgG-Bと比較した場合の、エフェクター機能欠損IgG-B突然変異体Def1、2、3、5、6、7、8及び9による、ヒトCD20(CLBL1 hCD20)を発現するイヌ科T細胞の補体依存的死滅の低減を示す補体依存的細胞傷害性アッセイ。本アッセイで用いられる全ての抗体は、オファツムマブ可変領域を有する。データは死滅のパーセンテージとしてプロットされ、100%は全ての細胞が死滅することを意味し、0%は対照細胞(抗体添加なし)で取得されるものと同一であったシグナルを意味する。

【発明を実施するための形態】

【００４４】

Table 1(表1).アミノ酸残基及び保存的アミノ酸置換の例。

【００４５】

Table 2(表2).核酸及びアミノ酸配列。

【００４６】

Table 3(表3).示される実験において決定される通りのPMX012、PMX014及びPMX023の親和性(K_d)。SPRデータは、平衡でのK_d値のみを示す。

【００４７】

Table 4(表4).図14に記載される通りの濃度依存的HEK-blueアッセイにおけるOX40シグナル伝達活性化の阻害から誘導されるIC50値。

【００４８】

Table 5(表5).PMX012～PM024抗体(全部)の重鎖可変領域又は図17に記載される通りの各群内での保存されたアミノ酸のパーセント。高い相同性が、各群内で観察される。

【００４９】

Table 6(表6).PMX012～PM024抗体(全部)の軽鎖可変領域又は図18に記載される通りの各群内での保存されたアミノ酸のパーセント。高い相同性が、各群内で観察される。

【００５０】

詳細な説明

ＯＸ４０はＴ細胞の表面上で発現され、且つＯＸ４０ＬはＴ細胞並びにＢ細胞及びマクロファージ等の抗原提示細胞の両方の表面上で発現される。ＯＸ４０及びＯＸ４０Ｌのいずれも、構成的に発現されないが、それらのそれぞれの細胞の活性化の２４～７２時間後に増加する。Ｔ細胞上のＯＸ４０受容体にＯＸ４０Ｌが結合すると、Ｔ細胞サイトカイン産生を増加させ、且つその後の細胞死からＴ細胞を保護する。したがって、ＯＸ４０は、免疫応答の確立及び維持において重要な役割を有する。

【００５１】

ヒトでは、ＯＸ４０Ｌの密度及びＯＸ４０陽性細胞の数の両方が、アトピー性皮膚炎において、健康に見える真皮よりも病変真皮で顕著に大きく、ＯＸ４０/ＯＸ４０Ｌシグナル伝達の遮断は、数種類の炎症性応答を調節する。ＯＸ４０Ｌはまた、胸腺間質リンホポエチン(ＴＳＬＰ)に対する樹状細胞の応答も制御し、これにより、ＩＬ-２１及びＣＸＣＬ１３産生を生じる。ＯＸ４０/ＯＸ４０Ｌ軸は、結果として、その共刺激シグナルが炎症性サイトカインを放出する数種類の細胞プロセスの上流に位置するので、複数の炎症性応答を調節する可能性を提示する。

【００５２】

ＯＸ４０シグナル伝達は、アレルギー、喘息等の様々な疾患、並びに多発性硬化症、関節リウマチ、炎症性腸疾患、移植片対宿主病、実験的自己免疫性脳脊髄炎(ＥＡＥ)、実験的リーシュマニア症、コラーゲン誘導関節炎、大腸炎(潰瘍性大腸炎等)、接触過敏反応、糖尿病、クローン病、及びグレーブス病を含む自己免疫及び炎症に伴う疾患に関連付けられてきた。ヒトでの証拠は、ＯＸ４０/ＯＸ４０Ｌ軸の破壊が増殖応答を低減させ、且つアトピー性皮膚炎及び癌をはじめとする多数の疾患の症状を治療又は改善するために用いることができたことを示唆する。ＯＸ４０又はＯＸ４０Ｌのいずれかに対する抗体は、この破壊を達成するために用いることができるであろう。

【００５３】

しかしながら、例えば、イヌにおける、アトピー性皮膚炎等のコンパニオンアニマルでのＯＸ４０/ＯＸ４０Ｌ媒介疾患に対する抗体治療の役割は、以前には調査されてきていない。

【００５４】

つまり、第１の態様では、本発明は、コンパニオンアニマルＯＸ４０Ｌ又はコンパニオンアニマルＯＸ４０に特異的に結合する抗体又はその断片に関する。

【００５５】

本発明のコンパニオンアニマルは、イヌ、ネコ、ウマ、鳥類、ウサギ、ヤギ、爬虫類、魚類及び両生類から好適に選択される。イヌは、本発明の好ましいコンパニオンアニマルである。ネコは、本発明の好ましいコンパニオンアニマルである。ウマは、本発明の好ましいコンパニオンアニマルである。疑義を回避するために、ヒトはコンパニオンアニマルでない。

【００５６】

一態様では、コンパニオンアニマルはイヌである。

【００５７】

一態様では、コンパニオンアニマルはネコである。

【００５８】

一態様では、コンパニオンアニマルはウマである。

【００５９】

一実施形態では、本明細書中に記載される抗体及び断片は、野生型イヌ科ＯＸ４０Ｌに特異的に結合する。野生型イヌ科ＯＸ４０Ｌに関するアミノ酸配列(配列番号１)及びヌクレオチド配列は、Ｔａｂｌｅ ２(表２)に示される(配列番号２)。本明細書中に記載される抗体及び断片は、配列番号１に特異的に結合する。一実施形態では、本明細書中に記載される抗体及び断片は、配列番号１の変異体に特異的に結合する。

【００６０】

一実施形態では、本明細書中に記載される抗体及び断片は、野生型イヌ科ＯＸ４０に特異

的に結合する。野生型イヌ科ＯＸ４０に関するアミノ酸配列(配列番号４及び６)及びヌクレオチド配列は、Ｔａｂｌｅ ２(表２)に示される(配列番号３及び５)。実施例中に説明される通り、２種類の異なるスプライシング変異体が特定された。本明細書中に記載される抗体及び断片は、配列番号３及び/又は５によりコードされるタンパク質に特異的に結合する。一実施形態では、本明細書中に記載される抗体及び断片は、配列番号３及び/又は５の変異体によりコードされるタンパク質(配列番号４及び６)に特異的に結合する。

【００６１】

上記に記載される配列の変異体は、上記に示される配列に対して、少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％又は９５％の配列同一性を有することができる。

【００６２】

本明細書中で用いる場合、用語「相同性」又は「同一性」は、一般的に、配列をアライメントした後、及び一部の実施形態では、必要な場合、最大相同性パーセントを達成するためにギャップを導入した後、及び一部の実施形態では配列同一性の一部分としてのいかなる保存的置換も考慮せずに、比較される参照ポリペプチドの残基と同一である、配列中のアミノ酸残基のパーセンテージを意味する。つまり、２種類のアミノ酸配列間での相同性パーセントは、２種類の配列間での同一性パーセントと等価である。Ｎ末端若しくはＣ末端伸長部、タグ又は挿入のいずれも、同一性又は相同性を低減するものと解釈されない。アライメントのための方法及びコンピュータープログラムは周知である。２種類のアミノ酸配列間での同一性パーセンテージは、周知の数学的アルゴリズムを用いて決定することができる。

【００６３】

別途明記されない限り、本明細書中で用いる場合、用語ＯＸ４０Ｌは、コンパニオンアニマルＯＸ４０Ｌ、例えば、イヌ又はネコＯＸ４０Ｌを意味する。ＯＸ４０Ｌはまた、「ＯＸ４０抗原リガンド」、「ＯＸ４０リガンド」、「ＣＤ２５２」、「ＴＮＦＳＦ４」及び「ＣＤ１３４リガンド」としても知られる。一実施形態では、抗体又はその断片は、イヌＯＸ４０Ｌに結合する。一実施形態では、抗体又はその断片は、ネコＯＸ４０Ｌに結合する。

【００６４】

別途明記されない限り、本明細書中で用いる場合、用語ＯＸ４０は、コンパニオンアニマルＯＸ４０、例えば、イヌ又はネコＯＸ４０を意味する。ＯＸ４０はまた、「ＴＮＦＲスーパーファミリーメンバー４」、「ＴＮＦＲＳＦ４」、「ＯＸ４０抗原」及び「ＣＤ１３４」としても知られる。一実施形態では、抗体又はその断片は、イヌＯＸ４０Ｌに結合する。一実施形態では、抗体又はその断片は、ネコＯＸ４０Ｌに結合しない。一実施形態では、抗体又はその断片は、Ｗｉｌｌｅｔｔ等に開示される通りの７Ｄ６ではない。

【００６５】

用語「ＯＸ４０Ｌ結合分子/タンパク質/ポリペプチド/薬剤/部分」、「ＯＸ４０Ｌ抗原結合分子分子/タンパク質/ポリペプチド/薬剤/部分」、「抗ＯＸ４０Ｌ抗体」、「抗ＯＸ４０Ｌ抗体断片」は全て、コンパニオンアニマルＯＸ４０Ｌ、例えば、イヌ又はネコＯＸ４０Ｌ抗原に特異的に結合することが可能な分子を意味する。結合反応は、例えば、無関係な特異性の抗体を用いる陰性対照試験を参照して、標準的な方法により示すことができる。

【００６６】

用語「ＯＸ４０結合分子/タンパク質/ポリペプチド/薬剤/部分」、「ＯＸ４０抗原結合分子分子/タンパク質/ポリペプチド/薬剤/部分」、「抗ＯＸ４０抗体」、「抗ＯＸ４０抗体断片」は全て、コンパニオンアニマルＯＸ４０、例えば、イヌ又はネコＯＸ４０抗原に特異的に結合することが可能な分子を意味する。結合反応は、例えば、無関係な特異性の抗体を用いる陰性対照試験を参照して、標準的な方法により示すことができる。

【００６７】

一部の実施形態では、本明細書中に提供される抗体又は断片は、ＯＸ４０Ｌポリペプチドの三次元表面特徴であるＯＸ４０Ｌエピトープに結合する。一部の実施形態では、本明細書中に提供される抗体又は断片は、単一サブユニットからのポリペプチドを含むエピトープ、又は多量体形態から生じるコンホメーションエピトープ(例えば、ＯＸ４０Ｌポリペプチ

ドの単量体又は三量体形態におけるエピトープ)に結合する。エピトープに寄与するOX40Lポリペプチドの領域は、ポリペプチドの連続的なアミノ酸であり得るか、又はエピトープは、ポリペプチドの2つ以上の非連続的領域から一緒に生じ得る。OX40Lエピトープは、(a)OX40Lの三量体形態(「三量体OX40Lエピトープ」)、(b)OX40Lの単量体形態(「単量体OX40Lエピトープ」)、(c)OX40Lの三量体及び単量体形態の両方、(d)OX40Lの三量体形態であるが単量体形態でない形態、又は(e)OX40Lの単量体形態であるが三量体形態でない形態で存在し得る。

【００６８】

例えば、一部の実施形態では、エピトープは、三量体形態でのみ存在するか結合に利用可能であるが、単量体形態に存在しないか又は抗OX40L抗体による結合に利用可能でない。他の実施形態では、OX40Lエピトープは、OX40Lポリペプチドの直線状特徴である(例えば、OX40Lポリペプチドの三量体形態又は単量体形態において)。本明細書中に提供される抗体は、(a)OX40Lの単量体形態のエピトープ、(b)OX40Lの三量体形態のエピトープ、(c)OX40Lの単量体形態であるが三量体形態でない形態のエピトープ、(d)OX40Lの三量体形態であるが単量体形態でない形態のエピトープ、又は(e)OX40Lの単量体形態及び三量体形態の両方に特異的に結合することができる。一部の実施形態では、本明細書中に提供される抗体は、OX40Lの三量体形態のエピトープに特異的に結合するが、OX40Lの単量体形態のエピトープに特異的に結合しない。一部の実施形態では、本明細書中に提供される抗体は、OX40Lの単量体形態のエピトープに結合し、且つ三量体形態に結合し得る場合又は結合し得ない場合がある。

【００６９】

対象となる抗原、例えば、それぞれコンパニオンアニマルOX40L又はコンパニオンアニマルOX40に「結合する」か又は「結合することが可能」な抗体又はその断片は、十分な親和性を有して抗原に結合し、それにより抗体又は断片が、本明細書中に記載される通りの、それぞれ抗原OX40又はOX40Lを発現する細胞又は組織の標的化において治療剤として有用となるものである。

【００７０】

本明細書中に記載される通りの抗体及びその断片は、それぞれ標的コンパニオンアニマルOX40L又は標的コンパニオンアニマルOX40に特異的に結合する。例えば、一実施形態では、本明細書中に記載される通りの抗体及びその断片は、イヌ科OX40Lに特異的に結合する。別の実施形態では、本明細書中に記載される通りの抗体及びその断片は、ネコ科OX40Lに特異的に結合する。例えば、一実施形態では、本明細書中に記載される通りの抗体及びその断片は、イヌ科OX40に特異的に結合する。別の実施形態では、本明細書中に記載される通りの抗体及びその断片は、ネコ科OX40に特異的に結合する。抗体結合の文脈における用語「特異的に」とは、特異的抗原、すなわち、ポリペプチド、又はエピトープに対する抗体の高アビディティ及び/又は高親和性を意味する。多数の実施形態では、特異的抗原は、そこから抗体産生細胞が単離された動物宿主を免疫化するために用いられる抗原(又は抗原の断片若しくは副画分)である。

【００７１】

言い換えれば、OX40L又はOX40抗原に対する結合は、他の抗原、すなわち、非特異的相互作用とは測定可能に異なる抗原に対する、同じ抗体の結合よりも強い。つまり、一実施形態では、本発明の抗体又は断片は、マウス若しくはヒトOX40L又はOX40抗原と交差反応しない。

【００７２】

本明細書中で用いる場合、特定のポリペプチド又は特定のポリペプチド標的上のエピトープへの「特異的結合」又はそれに「特異的に結合する」又はそれに「対して特異的」であるとの用語は、少なくとも約10^{-6}M、或いは少なくとも約10^{-7}M、或いは少なくとも約10^{-8}M、或いは少なくとも約10^{-9}M、或いは少なくとも約10^{-10}M、或いは少なくとも約10^{-11}M、或いは少なくとも約10^{-12}M、又はそれ以下の標的に対するKD(K_d)を有する分子により示し得る。一実施形態では、KD(K_d)は、10^{-9}M以下である。一実施形

態では、用語「特異的結合」とは、分子が、いかなる他のポリペプチド又はポリペプチドエピトープへの実質的な結合も伴わずに、特定のポリペプチド又は特定のポリペプチド上のエピトープに結合する場合の結合を意味する。

【００７３】

一実施形態では、本発明の抗体は、コンパニオンアニマルOX40L、例えば、イヌ科OX40Lに特異的に結合するアンタゴニスト抗体である。

【００７４】

本明細書中で用いる場合、OX40L/OX40の「アンタゴニスト」又は「阻害剤」とは、OX40L/OX40を発現する細胞において又はOX40L/OX40リガンドを発現する細胞において等、OX40L/OX40の生物学的活性のうちの1つ又は複数を、阻害するか又はそれ以外の様式で減少させることが可能なリガンド(例えば、抗体又は断片)を意味する。例えば、特定の実施形態では、本発明の抗体は、抗体が細胞と接触した際に、細胞表面発現されたOX40L/OX40を有する細胞からのサイトカインの分泌を阻害するか又はそれ以外の様式で減少させるアンタゴニスト抗体である。一部の実施形態では、OX40Lのアンタゴニスト(例えば、本発明のアンタゴニスト抗体)は、例えば、OX40L/OX40を発現する細胞の活性化及び/又は細胞シグナル伝達経路を阻害するか又はそれ以外の様式で減少させ、それにより、アンタゴニストの非存在下でのOX40L/OX40媒介型生物学的活性と比較して、細胞のOX40L/OX40媒介型生物学的活性を阻害することにより、作用することができる。特定の実施形態では、本明細書中に提供される抗体は、完全イヌ科アンタゴニスト抗OX40L/OX40抗体、好ましくは完全イヌ科モノクローナルアンタゴニスト抗OX40L/OX40抗体である。

【００７５】

本明細書中で用いる場合、用語「抗体」とは、2本の重鎖(H)及び2本の軽鎖(L)の4本のポリペプチド鎖、又はIg分子の必須のエピトープ結合特徴を保持する、いずれかのその機能的断片、突然変異体、変異体、若しくは誘導体から構成される、いずれかの免疫グロブリン(Ig)分子、又はその抗原結合部分を広く意味する。

【００７６】

全長抗体において、各重鎖は、重鎖可変領域又はドメイン(本明細書中でHCVRと短縮される)及び重鎖定常領域から構成される。重鎖定常領域は、3つのドメイン、C_H1、C_H2及びC_H3から構成される。各軽鎖は、軽鎖可変領域又はドメイン(本明細書中でLCVRと短縮される)及び軽鎖定常領域から構成される。軽鎖定常領域は、1つのドメインC_Lから構成される。

【００７７】

重鎖及び軽鎖可変領域は、比較的保存されているフレームワーク領域(FR)と称される領域が散りばめられている、相補性決定領域(CDR)と称される超可変性の領域へと更に細分することができる。各重鎖及び軽鎖可変領域は、アミノ末端からカルボキシ末端へと以下の順序で配置される3個のCDR及び4個のFRから構成される:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

【００７８】

免疫グロブリン分子は、いずれかのタイプ、クラス又はサブクラスのものであり得る(例えば、イヌに関して、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及びIgY;例えば、イヌ科IgGサブタイプ、例えば、IgG-A、IgG-B、IgG-C、及びIgG-D)。イヌ科において、A、B、C、及びDと称される4種類のIgG重鎖がある。これらの重鎖は、IgGA、IgGB、IgGC及びIgGDと称されるイヌIgGの4種類の異なるサブクラスを表す。これらの4種類の重鎖のDNA及びアミノ酸配列は、Tang等(Vet. Immunol. Immunopathol. 80:259～270頁(2001))により最初に特定された。これら重鎖の例示的アミノ酸及びDNA配列は、GenBankデータベースからも入手可能である(IgGA:登録番号AAL35301.1、IgGB:登録番号AAL35302.1、IgGC:登録番号AAL35303.1、IgGD:登録番号AAL35304.1)。イヌ科抗体はまた、2種類のタイプの軽鎖、κ及びλも含む(GenBank登録番号κ軽鎖アミノ酸配列ABY 57289.1、GenBank登録番号ABY 55569.1)。本発明者等により用いられ

る通りの、且つ本発明の態様及び実施形態に従う、IgG-A、IgG-B、IgG-C及びIgG-Dに対するアミノ酸配列は、Table 2(表2)に示される。

【００７９】

用語「CDR」とは、抗体可変配列内の相補性決定領域を意味する。重鎖及び軽鎖の可変領域のそれぞれにおいて3個のCDRがあり、可変領域のそれぞれに関してCDR1、CDR2及びCDR3と指定される。用語「CDRセット」とは、抗原に結合することが可能な単一可変領域中に存在する3個のCDRの群を意味する。これらのCDRの正確な境界は、当技術分野で公知の様々なシステムに従って、異なって定義され得る。

【００８０】

Kabat相補性決定領域(CDR)は、配列多様性に基づき、且つ最も一般的に用いられるものである(Kabat等、(1971) Ann. NY Acad. Sci. 190:382～391頁及びKabat等、(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、U.S. Department of Health and Human Services、NIH Publication No. 91-3242)。Chothiaは、その代わりに、構造的ループの位置を参照する(Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901～917頁(1987))。Kabatナンバリングシステムは、可変ドメイン中の残基(概ね軽鎖の残基1～107及び重鎖の残基1～113)を参照する場合に、広く用いられる。別のシステムは、ImMunoGeneTics(IMGT)ナンバリングスキームである。IMGTナンバリングスキームは、Lefranc等、Dev. Comp. Immunol.、29、185～203頁(2005)に記載される。当技術分野で認識されるこれらの用語は、抗体、又は抗原結合部分の重鎖及び軽鎖可変領域中の他のアミノ酸残基よりもより可変(すなわち、超可変)であるアミノ酸残基をナンバリングするシステムを意味する。

【００８１】

IMGTナンバリングスキームが、別途明記されない限り、本明細書中で用いられる。

【００８２】

本発明に従うOX40L又はOX40に対する抗体は、イヌ科、ヒト化、ネコ科、キメラ抗体、ネコ科化又はイヌ科化抗体であり得る。

【００８３】

「キメラ抗体」は、1つの生物種由来の抗体の相補性決定領域(CDR)を含む可変ドメインを含むが、抗体分子の定常ドメインは別の生物種のもの、例えば、イヌ科抗体に由来する、組み換えタンパク質である。例示的なキメラ抗体は、キメラヒト-イヌ科抗体である。

【００８４】

「ヒト化抗体」は、1つの生物種由来の抗体、例えば、げっ歯類抗体からのCDRが、げっ歯類抗体の重鎖及び軽鎖可変鎖からヒト重鎖及び軽鎖可変ドメイン(例えば、フレームワーク領域配列)へ移されている、組み換えタンパク質である。抗体分子の定常ドメインは、ヒト抗体のものに由来する。特定の実施形態では、親(げっ歯類)抗体由来の限定された数のフレームワーク領域アミノ酸残基を、ヒト抗体フレームワーク領域配列へと置換することができる。

【００８５】

本明細書中で用いる場合、用語「イヌ科化抗体」とは、イヌ科及び非イヌ科(例えば、ネズミ)抗体の両方に由来する配列を含む組み換え抗体の形態を意味する。一般的に、イヌ科化抗体は、超可変ループのうちの全て又は実質的に全てが非イヌ科免疫グロブリンのものに対応し、且つフレームワーク(FR)領域のうちの全て又は実質的に全て(及び典型的には残余のフレームのうちの全て又は実質的に全て)がイヌ科免疫グロブリン配列のものである、少なくとも1つ又は複数、典型的には2つの可変ドメインのうちの実質的に全てを含むであろう。イヌ科化抗体は、ネズミ又はヒト抗体由来の3個の重鎖CDR及び3個の軽鎖CDRの両方を、イヌ科フレーム又は改変型イヌ科フレームと一緒に含むことができる。改変型イヌ科フレームは、イヌ科化抗体の有効性を更に最適化して、例えば、その標的に対するその結合を増加させることができる、1つ又は複数のアミノ酸変化を含む。例えば、超可変ループの、非イヌ科配列は、イヌ科配列と更に比較することができ、可能な

限り多数の残基が真正イヌ科配列と類似するとして変更される。

【００８６】

「生物種化」(speciated)抗体(例えば、ヒト化、イヌ科化、キメラ、ネコ科化)は、標的生物種の抗体と類似させるために遺伝子操作されているものである。一実施形態では、「生物種化」抗体は、標的生物種の抗体に約８０％、８５％及び９０％を超えて類似する。

【００８７】

一実施形態では、抗体又は抗体断片は、イヌ科である。イヌ科とは、完全イヌ科を意味する。用語「完全イヌ科」及び「イヌ科」は、本明細書中で相互に交換可能に用いられる。

【００８８】

生物種化抗体とは対照的に、本発明の完全イヌ科抗体は、イヌ科可変領域を有し、且つ別の生物種由来の完全若しくは部分的CDR又はFRを含まない。有利なことに、本明細書中に記載される通りの完全イヌ科抗体は、イヌ科免疫グロブリン配列を含むトランスジェニックマウスから取得されてきた。これらの免疫化マウスにおいて産生される抗体は、in vivo B細胞シグナル伝達並びにin vivo V(D)J組み換え、in vivo接合部多様化、重鎖と軽鎖とのin vivo対形成及びin vivo超突然変異をはじめとする天然の親和性成熟を可能にする発達を通して形成される。このように産生される完全イヌ科抗体は、大規模での産生に先立って非常に長いリード最適化を最小化する、発達可能性に関して最適な特性を有する抗体を生成する。有利なことに、そのような完全イヌ科抗体は、患畜へと導入された際に最も低い考えられる免疫原性のリスクを提示し、したがって、反復投薬レジメンを促進する。有害なin vivo免疫原性は、例えば、抗薬物抗体(ADA)の産生、又はin vivoでの経時的な有効性の低下を特定するためのアッセイにより、評価することができる。ex vivo mAb遺伝子操作が発達障害、免疫原性、及び低減した親和性(上記で概説される通り)を導入するリスクを冒すことを考慮すれば、本発明の完全イヌ科抗体は、したがって、臨床的文脈において有効な療法である可能性が最も高い。

【００８９】

本明細書中で用いる場合、用語「モノクローナル抗体」とは、単一のB又は形質細胞に由来する抗体を意味する。モノクローナル抗体調製物中の全ての抗体分子が、少量で存在し得る考えられる天然に存在する翻訳後修飾(例えば、異性化、アミド化、炭水化物付加)を除いて、同一である。モノクローナル抗体は、非常に特異的であり、単一の抗原性部位を標的とする。典型的には異なる決定基(エピトープ)を標的とする異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物と対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一決定基を標的とする。

【００９０】

用語「エピトープ」又は「抗原性決定基」とは、(それに対して免疫グロブリン、抗体又は抗体断片が特異的に結合する)抗原の表面上の部位を意味する。一般的に、抗原は、数個又は多数の異なるエピトープを有し、多数の異なる抗体と反応する。この用語は、具体的には直線状エピトープ及びコンホメーションエピトープを含む。タンパク質抗原内のエピトープは、連続的なアミノ酸(通常、直線状エピトープ)又はタンパク質の三次フォールディングにより並置される非連続的アミノ酸(通常、コンホメーションエピトープ)の両方から形成することができる。連続的アミノ酸から形成されるエピトープは、典型的には、常にではないが、変性性溶媒への曝露に際して保持されるが、三次フォールディングにより形成されるエピトープは、変性性溶媒を用いる処理時には通常失われる。エピトープは、典型的に、固有の空間的コンホメーション中に少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14又は15個のアミノ酸を含む。どのエピトープが所与の抗体又は抗体断片により結合されるかを決定するための方法(すなわち、エピトープマッピング)は、当技術分野で周知であり、且つ、例えば、免疫ブロッティング及び免疫沈降アッセイを含み、このとき、重複又は連続的ペプチドが、所与の抗体又は抗体断片との反応性に関して試験される。

【００９１】

2種類の抗体が同一又は立体構造上重複するエピトープを認識する場合、抗体は、参照抗体と「本質的に同じエピトープ」に結合する。2種類のエピトープが同一又は立体構造上重複するエピトープに結合するか否かを決定するための、最も広く用いられ且つ迅速な方法は、競合アッセイであり、これは標識抗原又は標識抗体のいずれかを用いる様々な形式で構成することができる。エピトープは、抗原の三次元的表面特徴であり得るか又はそうでないことができる。特定の実施形態では、OX40Lエピトープは、OX40Lポリペプチドの三次元的表面特徴(例えば、OX40Lポリペプチドの三量体形態における)である。他の実施形態では、OX40Lエピトープは、OX40Lポリペプチドの直線状特徴(例えば、OX40Lポリペプチドの三量体形態又は単量体形態において)である。本明細書中に提供される抗体は、OX40Lの単量体形態のエピトープ、OX40Lの三量体形態のエピトープ、又はOX40Lの単量体形態及び三量体形態の両方に特異的に結合することができる。具体的な実施形態では、本明細書中に提供される抗体は、OX40Lの三量体形態のエピトープに特異的に結合するが、OX40Lの単量体形態に特異的に結合しない。一部の実施形態では、抗体は、例えば、単量体/単一サブユニットに結合し、且つ活性な三量体形態の形成を遮断する。好適には、抗体は、OX40Lの細胞外ドメインに結合する。

【００９２】

用語「抗原結合部位」とは、抗原に特異的に結合する領域を含む抗体又は抗体断片の一部分を意味する。抗原結合部位は、1つ又は複数の抗体可変ドメインにより提供され得る。抗原結合部位は、典型的には、抗体又は抗体断片の会合したV_H及びV_L内に含まれる。

【００９３】

本明細書中で用いる場合、抗体との用語はまた、抗体断片も含む。具体的には、本発明はまた、抗体断片にも及ぶ。抗体断片は、抗体の一部分、例えば、F(ab')2、Fab、Fv、scFv、重鎖、軽鎖、可変重鎖(V_H)、可変軽鎖(V_L)、CDR領域、単一V_H又はV_Lドメイン、マキシボディ、ミニボディ、イントラボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、及びビス-scFv、並びにポリペプチドに対して特異的抗原結合性を付与するために十分な免疫グロブリンの少なくとも一部分を含むポリペプチドである。したがって、抗体断片は、抗原結合部分を含む。

【００９４】

抗体断片は、全長抗体の機能的断片であり、すなわち、完全抗体の標的特異性を保持する。Fab(断片、抗体)、scFv(単鎖可変鎖断片)及び単一ドメイン抗体(dAb)等の組み換え機能的抗体断片は、したがって、mAbに基づく治療薬に対する代替物として、治療薬を開発するために用いられてきた。

【００９５】

「Fv」は、完全な抗原認識及び抗原結合部位を含む、最小抗体断片である。この断片は、緊密な非共有会合での1本の重鎖及び1本の軽鎖可変領域ドメインの二量体からなる。これらの2つのドメインのフォールディングから、抗原結合のためのアミノ酸残基に寄与し、且つ抗体に対して抗原結合特異性を付与する6個の超可変ループ(H及びL鎖由来の各3個のループ)が生じる。しかしながら、単一可変ドメイン(又は抗原に対して特異的な3個のHVRのみを含むFvの半分)でさえも、結合部位全体よりも低親和性ではあるが、抗原を認識し且つこれに結合する能力を有する。「sFv」又は「scFv」とも短縮される「単鎖Fv」は、単一ポリペプチド鎖へと連結されたVH及びVL抗体ドメインを含む抗体断片である。

【００９６】

scFv断片(約25kDa)は、2つの可変ドメインV_H及びV_Lからなる。天然では、V_H及びV_Lドメインは、疎水性相互作用を介して非共有的に会合され、解離する傾向がある。しかしながら、安定な断片を、親水性の柔軟なリンカーを用いてドメイン同士を連結することにより遺伝子操作して、単鎖Fv(scFv)を作製することができる。

【００９７】

最小の抗原結合断片は、単一可変断片、すなわち、可変重鎖(V_H)又は可変軽鎖(V_L)ドメインである。V_H及びV_Lドメインはそれぞれ、抗原に結合することが可能である。それ

ぞれ軽鎖/重鎖パートナーに対する結合又は実際には完全抗体の他の一部分の存在は、標的結合に対して必要とされない。1つの単一ドメイン(V_H及びV_Lドメインに対応する)へとサイズが低減されている抗体の抗原結合実体は、一般的に、「単一ドメイン抗体」又は「免疫グロブリン単一可変ドメイン」と称される。つまり、単一ドメイン抗体(約12～15kDa)は、V_H又はV_Lドメインのいずれかを有する。

【００９８】

つまり、一実施形態では、断片は、F(ab')2、Fab、Fv、scFv、重鎖、軽鎖、可変重鎖(V_H)、可変軽鎖(V_L)、CDR領域、単一V_H又はV_Lドメイン、マキシボディ、ミニボディ、イントラボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、及びビス-scFv、並びにポリペプチドに対して特異的抗原結合性を付与するために十分な免疫グロブリンの少なくとも一部分を含むポリペプチドから選択される。

【００９９】

一実施形態では、本発明は、免疫グロブリンドメイン、例えば、コンパニオンアニマル、例えば、イヌ科OX40L細胞外ドメインポリペプチド断片又はその生物学的等価物に融合されたFcドメインに関しない。

【０１００】

本発明の抗体及び抗体断片は、単離される。本明細書中で用いる場合、用語「単離された」とは、その天然の環境から単離されている部分を意味する。例えば、用語「単離された」とは、他の単一ドメイン抗体、抗体又は抗体断片を実質的に含まない、単一ドメイン抗体を意味する。更に、単離された単一ドメイン抗体は、他の細胞性物質及び/又は化学物質を実質的に含まないことができる。

【０１０１】

一態様では、本発明は、イヌ科等のコンパニオンアニマルOX40Lに特異的に結合する抗体又はその断片に関し、該抗体は、OX40に対するOX40Lの結合を遮断し、且つ/又はOX40に対するOX40Lの結合性に付随する1つ若しくは複数の機能を阻害する。好適には、抗体は、コンパニオンアニマルにおけるOX40活性を低減、阻害又は中和する。一実施形態では、抗体又はその断片は、以下の特性のうちの1つ又は複数を示す:

a)細胞又は動物において、サイトカインの分泌を変化させることが可能である、且つ/又は

b)イヌ等のコンパニオンアニマルにおいて、白血球の増殖を減少させることが可能である。

【０１０２】

「変化させる」とは、対照と比較して、抗体の存在下での化合物の量を増加又は減少させることを意味する。本明細書中で用いる場合、「減少させること」又は「減少させる」とは、低減を意味し、減少は、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%又はそれ以上であり得る。

【０１０３】

例えば、抗体又は断片は、

a)コンパニオンアニマルにおいて又はコンパニオンアニマルの細胞において、炎症性サイトカインの分泌を減少させること、及び/又は

b)コンパニオンアニマルにおいて又はコンパニオンアニマルの細胞において、炎症性ケモカイン又はケモカイン受容体の分泌を減少させること、及び/又は

c)コンパニオンアニマルにおいて又はコンパニオンアニマルの細胞において、抑制性サイトカインの分泌を増加させること、及び/又は

d)コンパニオンアニマルにおいて又はコンパニオンアニマルの細胞において、抑制性ケモカイン又はケモカイン受容体の分泌を増加させること、及び/又は

e)コンパニオンアニマルにおいて、白血球の増殖を減少させること

が可能である。

【０１０４】

サイトカインは、TNFα、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、IL-10、

IL-13、IL-17、RANTES、GM-CSF、TGF-β及びインターフェロンγから選択することができる。

【０１０５】

「炎症性」化合物は、炎症の促進に関与するものである一方、「抑制性」化合物は、炎症の抑制又は調節に関与するものである。炎症性サイトカインとしては、インターロイキン-1(IL-1)、IL-12、及びIL-18、TNFα、インターフェロンγ(IFNγ)並びにGM-CSFが挙げられる。抑制性又は抗炎症性サイトカイン又は受容体としては、IL-4、IL-10、IL-11、IL-13及びTGF-βが挙げられる。サイトカインは、ケモカインであり得る。一実施形態では、ケモカインは、例えば、CXCL13、CXCR5から選択することができる。本発明に従う抗体はまた、サイトカイン又はケモカイン受容体発現を変化させることもできる。

【０１０６】

アッセイは、in vitroで(例えば、1個の細胞、複数の細胞又は組織を用いて)又はin vivoで行うことができる。

【０１０７】

一実施形態では、本発明に従う抗体の存在下でのOX40に対するOX40Lの結合は、例えば、SPR(表面プラズモン共鳴)アッセイにおいて決定することができる。OX40L/OX40相互作用の阻害を決定するための他の方法は、例えば、国際公開第2016/139482号又は同第2013/008171号に記載され、例えば、組み換えOX40L発現細胞に対する抗体結合のフローサイトメトリーモニタリングを含む。

【０１０８】

一実施形態では、OX40に対するOX40Lの結合を遮断するOX40Lに対する抗体の能力は、NFkB活性の阻害を測定することにより、測定することができる。NFkB活性を測定するための好適なアッセイとしては、本明細書中に記載されるHEK-blueアッセイが挙げられる。したがって、一実施形態では、イヌ科等のコンパニオンアニマルOX40Lに特異的に結合する抗体又はその断片は、細胞に基づくアッセイにおいて、OX40R媒介型NFkB活性を低減、阻害又は中和する。

【０１０９】

一実施形態では、アッセイは、本明細書中の実施例7に実質的に記載される通り、コンパニオンアニマル(例えば、イヌ)OX40が、異なる生物種由来の細胞株、例えば、HEK等のヒト細胞株において用いられる、異種アッセイである。

【０１１０】

一実施形態では、OX40に対するOX40Lの結合を遮断するOX40Lに対する抗体の能力は、抗体の非存在下で観察されるものと比較して、細胞における減少したサイトカインの分泌を測定することにより、測定することができる。一実施形態では、OX40に対するOX40Lの結合を遮断するOX40Lに対する抗体の能力は、PBMCからのIL-2又はINF-γ分泌の阻害を測定することにより、測定することができる。したがって、一実施形態では、イヌ科等のコンパニオンアニマルOX40Lに特異的に結合する抗体又はその断片は、PBMCからのOX40R媒介型IL-2又はINF-γ(INFγ)分泌を低減、阻害又は中和する。別の実施形態では、OX40に対するOX40Lの結合を遮断するOX40Lに対する抗体の能力は、PBMCからのIL-13分泌の阻害を測定することにより、測定することができる。OX40に対するOX40Lの結合を遮断するOX40に対する抗体の能力は、同様に測定することができる。

【０１１１】

抗体又は断片は、in vitroアッセイにおいて白血球(例えば、単核細胞)の増殖の減少を生じさせることが可能であり、このとき、抗体又は断片は、OX40L/OX40L受容体相互作用に拮抗する。

【０１１２】

当技術分野で公知である通り、用語「白血球」は、例えば、リンパ球、多形核白血球及び単球のうちの1つ又は複数を含む。これもまた当業者に容易に明らかになる通り、用語

「単球」は、例えば、末梢血単核細胞(ＰＢＭＣ)又は単球由来細胞、例えば、樹状細胞(ＤＣ)を含む。

【０１１３】

白血球増殖は、例えば、本明細書中に記載される通りの、混合リンパ球反応(ＭＬＲ)において測定することができる。増殖を減少させる本発明に従う抗体の能力は、抗体の非存在下での増殖に対する比較により、測定することができる。

【０１１４】

白血球、例えば、粘膜固有層リンパ球(ＬＰＬ)の増殖は、当業者に明らかであろう通り、組織生検、染色及び組織学を用いて、評価することができる。ヘマトキシリン・エオジン染色(Ｈ&Ｅ染色すなわちＨＥ染色)は、例えば、全範囲のヒト組織でのリンパ球の浸潤を探すために組織学で一般的に用いられ、組織学における主要な染色のうちの1つである。これは医学的診断における最も広く用いられる染色であり、且つ多くの場合に金字塔であり、したがって、本発明の通りに白血球の増殖を評価するために用いることができる。例えば、ＯＸ４０Ｌ媒介疾患若しくは状態に罹患しているか又はそのリスクを有するコンパニオンアニマル由来の消化管組織(例えば、胃腸組織)を取得し、染色し、且つＬＰＬの浸潤の程度に関して評価することができる。

【０１１５】

比較は、本発明の抗体を投与されたコンパニオンアニマル由来の組織を、抗体の投与前の同じ動物から、或いは治療を受けておらず且つ疾患若しくは状態のリスクを有するか又は罹患している別のコンパニオンアニマルから取得される組織における浸潤の程度と比較して行うことができる。例えば、比較は、例えば、ＩＢＤに罹患している同じ(か又は異なる)コンパニオンアニマルから取得されるコンパニオンアニマル胃腸組織間でのものでなされる。抗ＯＸ４０Ｌ抗体はＯＸ４０Ｌに結合し、サイトカイン及び細胞受容体発現を調節し、それにより、非疾患状態に特徴的なサイトカインレベルを生じる。抗ＯＸ４０抗体はＯＸ４０に結合し、サイトカイン及び細胞受容体発現を調節し、それにより、非疾患状態に特徴的なサイトカインレベルを生じる。

【０１１６】

サイトカインは、正常な胃腸ホメオスタシスを維持するための粘液関連免疫系の不可欠なシグナルである。炎症開始を支持するそれらのプロフィールの不均衡は、炎症性腸疾患(ＩＢＤ)、例えば、クローン病(ＣＤ)及び潰瘍性大腸炎(ＵＣ)において観察されるもの等の、疾患状態を導き得る。ＩＢＤにおけるＩＬ-1a、ＩＬ-1β、ＩＬ-2、-6、-8、-12、-17、-23、ＩＦＮ-γ、又はＴＮＦα等の炎症性サイトカインの役割は、ＵＣ及びＣＤの発症及び進行に関連付けられる。主要な炎症メディエーターは、インターロイキン(ＩＬ)-12、インターフェロン(ＩＦＮ)-y、及び腫瘍壊死因子(ＴＮＦ)-α等のＴｈ1サイトカインであるので、ＣＤは、多くの場合、Ｔ-ヘルパー(Ｔｈ)1媒介疾患の原型として記載される。サイトカイン又はサイトカイン受容体は、ＴＮＦα、ＩＬ-2、ＩＬ-3、ＩＬ-4、ＩＬ-5、ＩＬ-6、ＩＬ-8、ＩＬ-9、ＩＬ-10、ＩＬ-13、ＩＬ-17、ＲＡＮＴＥＳ、ＧＭ-ＣＳＦ、ＴＧＦ-β及びインターフェロンγから選択することができる。

【０１１７】

抗体の特性を評価するための好適なアッセイに関する更なる情報は、実施例中に提供される。

【０１１８】

一実施形態では、イヌ科ＯＸ４０Ｌに結合する抗体は、以下の抗体のうちの1つから選択することができる:

配列番号15を含むＨＣ ＣＤＲ1又はそれに対して少なくとも８０％の配列同一性を有する配列、配列番号16を含むＨＣ ＣＤＲ2又はそれに対して少なくとも８０％の配列同一性を有する配列、配列番号17を含むＨＣ ＣＤＲ3又はそれに対して少なくとも８０％の配列同一性を有する配列、配列番号18を含むＬＣ ＣＤＲ1又はそれに対して少なくとも８０％の配列同一性を有する配列、配列番号19を含むＬＣ ＣＤＲ2又はそれに対して少なくとも８０％の配列同一性を有する配列及び配列番号20を含むＬＣ ＣＤＲ3又はそれに対して少なくとも８

0％の配列同一性を有する配列を含む抗体;

配列番号25を含むHC CDR1又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列、配列番号26を含むHC CDR2又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列、配列番号27を含むHC CDR3又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列、配列番号28を含むLC CDR1又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列、配列番号29を含むLC CDR2又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列及び配列番号30を含むLC CDR3又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列を含む抗体;

配列番号35を含むHC CDR1又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列、配列番号36を含むHC CDR2又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列、配列番号37を含むHC CDR3又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列、配列番号38を含むLC CDR1又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列、配列番号39を含むLC CDR2又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列及び配列番号40を含むLC CDR3又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列を含む抗体;

配列番号45を含むHC CDR1又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列、配列番号46を含むHC CDR2又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列、配列番号47を含むHC CDR3又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列、配列番号48を含むLC CDR1又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列、配列番号49を含むLC CDR2又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列及び配列番号50を含むLC CDR3又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列を含む抗体;

配列番号55を含むHC CDR1又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列、配列番号56を含むHC CDR2又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列、配列番号57を含むHC CDR3又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列、配列番号58を含むLC CDR1又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列、配列番号59を含むLC CDR2又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列及び配列番号60を含むLC CDR3又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列を含む抗体;

配列番号65を含むHC CDR1又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列、配列番号66を含むHC CDR2又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列、配列番号67を含むHC CDR3又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列、配列番号68を含むLC CDR1又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列、配列番号69を含むLC CDR2又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列及び配列番号70を含むLC CDR3又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列を含む抗体;

配列番号75を含むHC CDR1又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列、配列番号76を含むHC CDR2又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列、配列番号77を含むHC CDR3又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列、配列番号78を含むLC CDR1又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列、配列番号79を含むLC CDR2又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列及び配列番号80を含むLC CDR3又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列を含む抗体;

配列番号85を含むHC CDR1又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列、配列番号86を含むHC CDR2又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列、配列番号87を含むHC CDR3又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列、配列番号88を含むLC CDR1又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列、配列番号89を含むLC CDR2又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列及び配列番号90を含むLC CDR3又はそれに対して少なくとも80％の配列同一性を有する配列を含む抗体;

配列番号95を含むHC CDR1又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列、配列番号96を含むHC CDR2又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列、配列番号97を含むHC CDR3又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列、配列番号98を含むLC CDR1又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列、配列番号99を含むLC CDR2又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列及び配列番号100を含むLC CDR3又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む抗体;

配列番号105を含むHC CDR1又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列、配列番号106を含むHC CDR2又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列、配列番号107を含むHC CDR3又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列、配列番号108を含むLC CDR1又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列、配列番号109を含むLC CDR2又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列及び配列番号110を含むLC CDR3又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む抗体;

配列番号115を含むHC CDR1又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列、配列番号116を含むHC CDR2又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列、配列番号117を含むHC CDR3又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列、配列番号118を含むLC CDR1又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列、配列番号119を含むLC CDR2又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列及び配列番号120を含むLC CDR3又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む抗体;

配列番号125を含むHC CDR1又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列、配列番号126を含むHC CDR2又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列、配列番号127を含むHC CDR3又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列、配列番号128を含むLC CDR1又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列、配列番号129を含むLC CDR2又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列及び配列番号130を含むLC CDR3又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む抗体;或いは

配列番号135を含むHC CDR1又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列、配列番号136を含むHC CDR2又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列、配列番号137を含むHC CDR3又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列、配列番号138を含むLC CDR1又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列、配列番号139を含むLC CDR2又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列及び配列番号140を含むLC CDR3又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む抗体。

【０１１９】

一実施形態では、抗体は、上記に記載されるもののうちの1つから選択されるが、上記の配列番号中に規定される配列と比較して、1、2、3、4又は5箇所のアミノ酸置換を有する1つ若しくは複数のHC及び/若しくはLC CDR1、2及び/又はCDR3配列を含む。

【０１２０】

上記に列記される抗体の断片もまた提供され、且つ本発明の範囲内に入る。

【０１２１】

一実施形態では、抗体は、以下の抗体のうちの1つから選択することができる:

配列番号12を含むか若しくはそれからなるHC可変領域又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列及び配列番号14を含むか若しくはそれからなるLC可変領域又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む抗体;

配列番号22を含むか若しくはそれからなるHC可変領域又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列及び配列番号24を含むか若しくはそれからなるLC可変領域又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む抗体;

配列番号32を含むか若しくはそれからなるHC可変領域又はそれに対して少なくとも

80%の配列同一性を有する配列及び配列番号34を含むか若しくはそれからなるLC可変領域又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む抗体;
配列番号42を含むか若しくはそれからなるHC可変領域又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列及び配列番号44を含むか若しくはそれからなるLC可変領域又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む抗体;
配列番号52を含むか若しくはそれからなるHC可変領域又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列及び配列番号54を含むか若しくはそれからなるLC可変領域又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む抗体;
配列番号62を含むか若しくはそれからなるHC可変領域又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列及び配列番号64を含むか若しくはそれからなるLC可変領域又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む抗体;
配列番号72を含むか若しくはそれからなるHC可変領域又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列及び配列番号74を含むか若しくはそれからなるLC可変領域又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む抗体;
配列番号82を含むか若しくはそれからなるHC可変領域又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列及び配列番号84を含むか若しくはそれからなるLC可変領域又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む抗体;
配列番号92を含むか若しくはそれからなるHC可変領域又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列及び配列番号94を含むか若しくはそれからなるLC可変領域又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む抗体;
配列番号102を含むか若しくはそれからなるHC可変領域又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列及び配列番号104を含むか若しくはそれからなるLC可変領域又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む抗体;
配列番号112を含むか若しくはそれからなるHC可変領域又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列及び配列番号114を含むか若しくはそれからなるLC可変領域又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む抗体;
配列番号122を含むか若しくはそれからなるHC可変領域又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列及び配列番号124を含むか若しくはそれからなるLC可変領域又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む抗体;或いは
配列番号132を含むか若しくはそれからなるHC可変領域又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列及び配列番号134を含むか若しくはそれからなるLC可変領域又はそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列を含む抗体。

【0122】

一実施形態では、抗体は、上記に記載されるもののうちの1つから選択され、且つ上記の配列番号により規定される通りの配列と比較して、1～20、例えば、1～10、例えば、2、3、4又は5箇所のアミノ酸置換を含むHC可変領域及び/若しくはLC可変領域を含む。

【0123】

上記に列記される抗体の断片もまた提供される。

【0124】

抗体のVH及びVL領域のアミノ酸配列は、図15及び図16に示される。したがって、抗体又は断片は、これらの図面中に示される配列を含むか又はそれからなる抗体から選択することができる。一実施形態では、抗体は、PMX012、PMX013、PMX014、PMX015、PMX016、PMX017、PMX018、PMX019、PMX020、PMX021、PMX022、PMX023又はPMX024から選択される。一実施形態では、抗体は、PMX023又はPMX012である。配列はまた、table 2(表2)にも示される。

【0125】

図17及び図18は、抗体のVH及びVL領域を配列比較に基づいて、異なる群、すなわち、ファミリーへと群分けすることができ、且つ各ファミリーは、顕著な配列同一性を共有することを示す。群Aは、PMX016、PMX018、PMX020及びPMX023を含む。群B

は、ＰＭＸ０１７、ＰＭＸ０２１、ＰＭＸ０２２を含む。群Ｃは、ＰＭＸ０１９及びＰＭＸ０２４を含む。本明細書中に記載される他の抗体は、これらのファミリーには入らない。一実施形態では、抗体又は断片は、群Ａ中に示される通りの抗体若しくはそれに対して少なくとも８０％の配列同一性を有する抗体、群Ｂ中に示される通りの抗体若しくはそれに対して少なくとも８０％の配列同一性を有する抗体又は群Ｃ中に示される通りの抗体若しくはそれに対して少なくとも８０％の配列同一性を有する抗体から選択することができる。

【０１２６】

本明細書中の図面中及びtable 2(表2)中に示される通りの、ＰＭＸと指定される抗体及び抗体断片の全配列が、本発明の範囲内に入る。

【０１２７】

上記の様々な実施形態において記載される場合、配列同一性は、少なくとも８０％である。一実施形態では、配列同一性は、少なくとも７９％、８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％又は９９％である。一実施形態では、前記配列同一性は、少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％又は９９％である。

【０１２８】

上記の通り、配列への参照により規定される抗体又は断片は、１つ又は複数のアミノ酸置換を含むことができる。一実施形態では、改変は、保存的配列改変である。本明細書中で用いる場合、用語「保存的配列改変」は、アミノ酸配列を含む抗体の結合特性に顕著に影響しないか又はこれを変化させない、アミノ酸改変を意味することが意図される。そのような保存的改変としては、アミノ酸置換、付加及び欠失が挙げられる。改変は、部位特異的突然変異誘発及びＰＣＲ媒介突然変異誘発等の、当技術分野で公知の標準的技術により、本発明の抗体へと導入することができる。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を用いて置き換えられるものである。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野で規定されている。これらのファミリーとしては、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)、非荷電極性側鎖(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)、β分岐側鎖(例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン)及び芳香族側鎖(例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)を有するアミノ酸が挙げられる。つまり、本発明の抗体又は断片の１つ若しくは複数のＣＤＲ領域及び/又は１つ若しくは複数のフレームワーク領域内の１つ又は複数のアミノ酸残基を、同じ側鎖ファミリーからの他のアミノ酸残基を用いて置き換えることができ、且つ変化した抗体を、保持される機能に関して試験することができる(本明細書中に記載されるか又は当技術分野で公知の機能的アッセイを用いて)。

【０１２９】

つまり、これらのアミノ酸変化は、典型的には、抗原に対するその親和性又はその特異性等の、ポリペプチドの生物学的活性、機能、又は他の所望の特性を変化させることなく、行うことができる。一般的に、ポリペプチドの非必須領域中の単一アミノ酸置換は、生物学的活性を実質的に変化させない。更に、構造又は機能が類似するアミノ酸の置換は、ポリペプチドの生物学的活性を比較的破壊しにくい。本明細書中に記載されるポリペプチド及びペプチドのアミノ酸残基に関する略称、並びにこれらのアミノ酸残基についての保存的置換が、以下のTable 1(表1)に示される。

【０１３０】

【表１】

Table 1.アミノ酸残基及び保存的アミノ酸置換の例

元の残基 三文字コード，一文字コード	保存的置換
アラニン, Ala, A	Gly, Ser
アルギニン, Arg, R	Lys, His
アスパラギン, Asn, N	Gln, His
アスパラギン酸 Asp, D	Glu, Asn
システイン, Cys, C	Ser, Ala
グルタミン, Gln, Q	Asn
グルタミン酸, Glu, E	Asp, Gln
グリシン, Gly, G	Ala
ヒスチジン, His, H	Asn, Gln
イソロイシン, Ile, I	Leu, Val
ロイシン, Leu, L	Ile, Val
リジン, lys, K	Ar, His
メチオニン, Met, M	Leu, Ile, Tyr
フェニルアラニン, Phe, F	Tyr, Met, Leu
プロリン, Pro, P	Ala
セリン, Ser, S	Thr
トレオニン, Thr, T	Ser
トリプトファン, Trp, W	Tyr, Phe
チロシン, Tyr, Y	Try, Phe
バリン, Val, V	Ile, Leu

【０１３１】

本明細書中に記載される抗体は、好適なFc領域を含むことができる。一実施形態では、抗体又はその抗原結合部分は、Fc領域、例えば、イヌ科Fc領域、例えば、イヌ科IgGB Fc領域を含む。一実施形態では、抗体のFc部分は、改変することができる。例えば、改変は、特定の特性を改善するために、例えば、低減された補体及びFcγR媒介型エフェクター機能を提供するために、Fc領域に対して行うことができる。

【０１３２】

イヌ科IgG-B Fc領域に基づく本発明のイヌ科抗体に対する例示的な改変型Fc領域は、Fc領域をはじめとするIgG B定常領域を示す、配列番号１４２～１５０に提供される。これらの配列は、野生型Fc IgG-B領域と比較して改変を含む。改変型Fc領域は、野生型IgG-B Fcドメインを含む同じポリペプチドと比較した場合に、イヌ科IgG-Bエフェクター機能を低減又は消滅させる。このことは、実施例中に示される。アミノ酸置換は、下部ヒンジ、プロリンサンドイッチ領域及びSHED領域中に存在する。つまり、本発明の抗体は、配列番号１４２～１５０に示される通りの改変を有する改変型Fc領域を含むことができる。改変は、配列番号１４１に示される通りのwt配列を参照する。

【０１３３】

つまり、イヌ科IgG-B定常領域中の野生型残基(配列番号１４１)を参照して、抗体は、Fcドメイン中に、以下の位置での以下のアミノ酸置換を有することができる:

E１１９G;

M１２０S若しくはA;

L１２１A;

D１５３G;

P１５４R;

D１５６N;

N２１１H;

K２１２I;

A213G;
P215G及び/又は
P217S。
【０１３４】
一実施形態では、Fc領域は、
a)配列番号141の120位でのSへのアミノ酸置換並びに
b)配列番号141の211位でのHへのアミノ酸置換、配列番号141の212位でのIへのアミノ酸置換及び配列番号141の213位でのGへのアミノ酸置換
を含む。
【０１３５】
一実施形態では、Fc領域は、
a)配列番号141の120位でのSへのアミノ酸置換;
b)配列番号141の153位でのGへのアミノ酸置換及び配列番号141の154位でのRへのアミノ酸置換並びに
c)配列番号141の211位でのHへのアミノ酸置換、配列番号141の212位でのIへのアミノ酸置換及び配列番号141の213位でのGへのアミノ酸置換
を含む。
【０１３６】
一実施形態では、Fc領域は、
a)配列番号141の120位でのSへのアミノ酸置換;
b)配列番号141の153位でのGへのアミノ酸置換及び配列番号141の154位でのRへのアミノ酸置換並びに
c)配列番号141の211位でのHへのアミノ酸置換、配列番号141の212位でのIへのアミノ酸置換、配列番号141の213位でのGへのアミノ酸置換及び配列番号141の217位でのSへのアミノ酸置換
を含む。
【０１３７】
一実施形態では、Fc領域は、
a)配列番号141の120位でのSへのアミノ酸置換;
b)配列番号141の153位でのGへのアミノ酸置換及び配列番号141の154位でのRへのアミノ酸置換並びに
c)配列番号141の211位でのHへのアミノ酸置換、配列番号141の212位でのIへのアミノ酸置換、配列番号141の213位でのGへのアミノ酸置換及び配列番号141の215位でのGへのアミノ酸置換
を含む。
【０１３８】
一実施形態では、Fc領域は、配列番号141の120位でのAへの及び121位でのAへのアミノ酸置換を含む。
【０１３９】
一実施形態では、Fc領域は、
a)配列番号141の120位でのAへの及び121位でのAへのアミノ酸置換並びに
b)配列番号141の217位でのSへのアミノ酸置換
を含む。
【０１４０】
一実施形態では、Fc領域は、
a)配列番号141の120位でのAへの及び121位でのAへのアミノ酸置換並びに
b)配列番号141の215位でのGへのアミノ酸置換
を含む。
【０１４１】
一実施形態では、Fc領域は、

a)配列番号１４１の１１９位でのＧへのアミノ酸置換並びに
b)配列番号１４１の１５６位でのＮへのアミノ酸置換
を含む。
【０１４２】
一実施形態では、Ｆｃ領域は、
a)配列番号１４１の１２０位でのＡへの及び１２１位でのＡへのアミノ酸置換;
b)配列番号１４１の１５６位でのＮへのアミノ酸置換並びに
c)配列番号１４１の２１７位でのＳへのアミノ酸置換
を含む。
【０１４３】
別の態様では、それぞれコンパニオンアニマルＯＸ４０Ｌ又はＯＸ４０(例えば、イヌＯＸ４０又はＯＸ４０Ｌ)上の、本発明のＯＸ４０Ｌ/ＯＸ４０抗体のうちのいずれかと同じエピトープ又は重複するエピトープにおいて又はその近傍において結合する結合分子、例えば、抗体、抗体断片又は抗体ミメティクスが提供される(すなわち、本発明の抗体と、ＯＸ４０Ｌ/ＯＸ４０に対する結合に関して交差競合する能力を有する抗体)。つまり、本発明の抗体は、参照抗体として用いることができる。
【０１４４】
そのような交差競合性抗体は、標準的なＯＸ４０Ｌ/ＯＸ４０結合アッセイにおいて、本明細書中に記載される抗体と交差競合するそれらの能力に基づいて特定することができる。例えば、ＢＩＡcore(登録商標)分析等のＳＰＲ分析、ＦｏｒｔＢｉｏ Ｏｃｔｅｔ(登録商標)等のＢＬＩ分析、ＥＬＩＳＡアッセイ又はフローサイトメトリーを、抗体との交差競合を実証するために用いることができる。
【０１４５】
一実施形態では、それぞれコンパニオンアニマルＯＸ４０Ｌ又はＯＸ４０(例えば、イヌＯＸ４０又はＯＸ４０Ｌ)に結合することが可能な結合剤が提供され、このとき、本発明の抗体は、競合アッセイにおいて結合剤を置き換える。
【０１４６】
抗体誘導体が、本発明の範囲内に含められる。抗体の「誘導体」は、通常はタンパク質の一部分でない追加の化学的部分を含む。タンパク質の共有的修飾が、本発明の範囲内に含められる。そのような修飾は、選択された側鎖又は末端残基と反応することが可能な有機誘導体化剤を用いて、抗体の標的化されたアミノ酸残基を反応させることにより、分子へと導入することができる。例えば、当技術分野で周知の二官能性薬剤を用いる誘導体化は、水不溶性支持体マトリックスへと又は他の高分子担体へと、抗体又は断片を架橋するために有用である。
【０１４７】
本明細書中に記載される通りの抗体又はその断片は、それぞれコンパニオンアニマルＯＸ４０Ｌ又はＯＸ４０(例えば、イヌＯＸ４０又はＯＸ４０Ｌ)発現細胞の二重標的化を提供する、多重特異的、例えば、二重特異的又は三重特異的結合剤におけるビルディングブロックとして用いることができる。つまり、本明細書中に記載される通りの抗体又はその断片は、異なる抗原を標的化するために、別の治療的実体へと連結される。この他の治療的実体は、例えば、抗体又は抗体断片(例えば、Ｆａｂ、Ｆ(ａｂ')２、Ｆｖ、単鎖Ｆｖ断片(ｓｃＦｖ)若しくは単一ドメイン抗体、例えば、ＶＨ又はＶＨＨドメイン)、ＣＤＲ領域又は抗体ミメティクスタンパク質から選択される。好適な非免疫原性リンカーペプチドは、当技術分野で公知であり、例えば、Ｇ及び/若しくはＳ残基を含むリンカー、(Ｇ４Ｓ)ｎ、(ＳＧ４)ｎ又はＧ４(ＳＧ４)ｎペプチドリンカーであり、このとき、「ｎ」は、一般的に、１～１０の数字である。
【０１４８】
別の実施形態では、本発明に従う抗体又はその断片は、分子の半減期を延長するために作用し得る、更なる部分に連結される。更なる部分は、血清アルブミン、例えば、イヌ又はネコ血清アルブミンに結合するタンパク質、例えば、抗体、又はその一部分を含むことができる。半減期を延長する他の修飾もまた公知であり、且つ、例えば、ＰＥＧによるか

又はリポソーム中への取り込みによる修飾を含む。

【０１４９】

一実施形態では、本発明の抗体又はその断片は、検出可能又は機能的標識を用いて標識される。標識は、限定するものではないが、蛍光団、蛍光剤、放射性標識、酵素、化学発光剤、核磁気共鳴活性標識又は光増感剤をはじめとする、シグナルを生成するか又は生成するように誘導することができるいずれかの分子であり得る。つまり、結合性は、蛍光若しくは発光、放射能、酵素活性又は光吸光度を検出することにより、検出及び/又は測定することができる。

【０１５０】

また他の実施形態では、本発明に従う抗体又はその断片は、毒素へとカップリングされる。一実施形態では、治療的部分は、毒素、例えば、細胞傷害性放射性核種、化学的毒素又はタンパク質毒素である。

【０１５１】

本明細書中で用いる場合、用語「半減期」とは、例えば、配列若しくは化合物の分解及び/又は天然のメカニズムによる配列若しくは化合物のクリアランス若しくは隔離に起因して、アミノ酸配列、化合物又はポリペプチドの血清濃度がin vivoで50％まで低減するためにかかる時間を意味する。半減期は、本発明の対応する抗体の半減期よりも、少なくとも1.5倍、好ましくは少なくとも2倍、少なくとも5倍等、例えば、少なくとも10倍又は20倍超まで大きく増加させることができる。例えば、増加した半減期は、本発明の対応する抗体と比較して、1時間超、好ましくは2時間超、より好ましくは6時間超、12時間超等、又は24、48若しくは72時間超でさえあり得る。本発明のアミノ酸配列、化合物又はポリペプチドのin vivo半減期は、薬物動態解析等のそれ自体が公知であるいずれかの様式で、決定することができる。好適な技術は、当業者には明らかであろう。半減期は、例えば、t1/2-α　t1/2-β及び曲線下面積(AUC)等のパラメーターを用いて表現することができる。

【０１５２】

本発明の抗体及び断片はまた、細胞療法、例えば、キメラ抗原受容体T細胞(CAR-T)療法において用いることもできる。

【０１５３】

核酸

別の態様では、本発明は、本明細書中に記載される通りの抗体又は抗体断片のアミノ酸配列をコードする核酸配列に関する。

【０１５４】

一実施形態では、核酸は、配列番号11、配列番号21、配列番号31、配列番号41、配列番号51、配列番号61、配列番号71、配列番号81、配列番号91、配列番号101、配列番号111、配列番号121又は配列番号131から選択される配列を含むか又はそれからなる、HC可変領域をコードする。

【０１５５】

一実施形態では、核酸は、配列番号13、配列番号23、配列番号33、配列番号43、配列番号53、配列番号63、配列番号73、配列番号83、配列番号93、配列番号103、配列番号113、配列番号123又は配列番号133から選択される配列を含むか又はそれからなる、LC可変領域をコードする。

【０１５６】

抗体を作製するための例示的方法

本明細書中に記載される抗体又は断片は、標的コンパニオンアニマルのOX40L又はOX40抗原、例えば、イヌ若しくはネコOX40L又はOX40を用いる刺激に際して抗体を発現する、哺乳動物、例えば、げっ歯類、例えば、トランスジェニック動物から取得することができる。コンパニオンアニマル抗体が生成されるように、好適なコンパニオンアニマル抗体遺伝子を導入することができる。げっ歯類、例えば、マウスは、好ましくは、内因性抗体遺伝子を発現する、低減した能力を有する。つまり、一実施形態では、げっ歯類は

、内因性軽鎖及び/又は重鎖抗体遺伝子を発現する、低減した能力を有する。したがって、げっ歯類、例えば、マウスは、例えば、以下で更に説明される通り、機能的マウス軽鎖及び/重鎖が生成されないように、内因性κ及びλ軽鎖及び/又は重鎖抗体遺伝子の発現を破壊するための改変を含むことができる。そのようなトランスジェニックげっ歯類は、当技術分野で記載され、且つこれは、以下の実施例において更に説明される。

【０１５７】

他の方法は、典型的には、標的コンパニオンアニマルのＯＸ４０Ｌ又はＯＸ４０抗原を用いてマウスを免疫化する工程、Ｂ細胞を単離する工程及びそれらを融合パートナー細胞株と融合させる工程、選択によりマウスモノクローナル抗体を単離する工程に従う、マウスモノクローナルの生物種化を含むことができる。続いて、キメラ化及び/又は更なる情報学誘導生物種化により、生物種化が行われる。イヌ科化又はネコ科化のための戦略等の生物種化のための戦略が、例えば、国際公開第２０１３/０１１４０７号に記載され、実施例５を参照されたい。

【０１５８】

他の方法では、アミノ酸配列のセット、集合又はライブラリーを、例えば、スクリーニングを促進するために、ファージ、ファージミド、リボソーム又は好適な微生物(酵母等)上に提示させることができる。アミノ酸配列(のセット、集合又はライブラリー)を提示及びスクリーニングするための好適な方法、技術及び宿主生物は、当業者には明らかであろう(例えば、Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual, Academic Press;第１版(１９９６年１０月２８日)Brian K. Kay、Jill Winter、John McCaffertyを参照されたい)。

【０１５９】

抗原特異的重鎖単独抗体を発現する細胞又は組織を単離する工程、単離された細胞又は組織に由来するｍＲＮＡからV_Hドメインをコードする配列をクローニングする工程及びライブラリーを用いてコードされるタンパク質を提示させる工程により、ライブラリー、例えば、ファージライブラリーを作製することもまた可能である。抗体又は断片は、細菌、酵母又は他の発現系において発現させることができる。

【０１６０】

例示的な治療的応用

一態様では、本発明者等は、疾患の治療における使用のための、本明細書中に記載される通りの抗体又は断片を提供する。

【０１６１】

別の態様では、本明細書中に記載される通りの抗体又は断片及び任意により薬学的に許容される担体を含む医薬組成物が提供される。本明細書中で用いる場合、医薬組成物との用語は、コンパニオンアニマルを治療するために用いられる、すなわち、獣医学的使用のための組成物、すなわち、獣医組成物を意味する。好ましい実施形態では、治療される動物は、イヌ又はネコである。

【０１６２】

本明細書中に記載される通りの抗体若しくはその断片又は本発明の医薬組成物は、限定するものではないが、経口、局所、非経口、舌下、直腸、経膣、眼、鼻内、肺、皮内、硝子体内、筋内、腹腔内、静脈内、皮下、大脳内、経皮、経粘膜、吸入による、又は特に耳、鼻、眼、若しくは皮膚に対する局所又は吸入による経路をはじめとする、いずれかの便利な経路により、投与することができる。

【０１６３】

一実施形態では、投与は皮下的である。抗体又は抗体断片の濃度は、１０～５０ｍｇ/ｍＬ、例えば、１０、２０、３０、４０又は５０ｍｇ/ｍＬであり得る。一実施形態では、濃度は、２５～３５ｍｇ/ｍＬ、例えば、約３０ｍｇ/ｍＬである。一実施形態では、抗体は、１ｍＬの溶液中の用量として提供される。

【０１６４】

非経口投与としては、例えば、静脈内、筋内、動脈内、腹腔内、鼻内、直腸、膀胱内、

皮内、局所又は皮下投与が挙げられる。好ましくは、組成物は、非経口的に投与される。

【０１６５】

薬学的に許容される担体又はビヒクルは、粒子状であり得、それにより、組成物は、例えば、錠剤又は散剤形態にある。用語「担体」とは、それと共に本発明の薬物抗体コンジュゲートが投与される、希釈剤、アジュバント又は賦形剤を意味する。そのような医薬担体は、例えば、ラッカセイ油、ダイズ油、鉱油、ゴマ油等の、石油、動物、植物又は合成起源のものをはじめとする、水又は油等の液体であり得る。担体は、生理食塩液、アカシカゴム、ゼラチン、デンプンペースト、タルク、ケラチン、コロイド状シリカ、尿素等であり得る。加えて、助剤、安定化剤、増粘剤、滑沢剤及び着色料を用いることができる。一実施形態では、動物に投与される場合、本発明の抗体若しくはその断片又は組成物及び薬学的に許容される担体は、無菌である。本発明の薬物抗体コンジュゲートが静脈内投与される場合、水が好ましい担体である。生理食塩溶液及び水性デキストロース及びグリセロール溶液もまた、特に、注入可能溶液に対する、液体担体として利用することができる。好適な医薬担体はまた、例えば、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、コメ、小麦粉、石灰、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノール等の賦形剤も含む。所望の場合、本発明の組成物はまた、微量の湿潤化剤若しくは乳化剤、又はpH緩衝剤もまた含有することができる。

【０１６６】

本発明の医薬組成物は、液体、例えば、溶液、エマルジョン又は懸濁液の形態にあり得る。液体は、注入、点滴(例えば、IV点滴)によるか又は皮下的な送達に対して有用であり得る。

【０１６７】

経口投与に対して意図される場合、組成物は、好ましくは、固体又は液体形態にあり、このとき、半固体、半液体、懸濁物及びゲル形態が、本明細書中で固体又は液体のいずれかとして見なされる形態の範囲内に含められる。

【０１６８】

経口投与のための固体組成物として、組成物は、散剤、顆粒剤、圧縮錠剤、丸剤、カプセル剤、チューインガム剤、ウエハース剤等の形態へと製剤化することができる。そのような固体組成物は、典型的に、1つ又は複数の不活性希釈剤を含有する。加えて、以下のうちの1つ又は複数が存在し得る:結合剤、例えば、カルボキシメチルセルロース、エチルセルロース、微晶質セルロース、又はゼラチン;賦形剤、例えば、デンプン、ラクトース又はデキストリン、崩壊剤、例えば、アルギン酸、アルギン酸ナトリウム、コーンスターチ等;滑沢剤、例えば、ステアリン酸マグネシウム;流動促進剤、例えば、コロイド状二酸化ケイ素;甘味料、例えば、スクロース又はサッカリン;香味料、例えば、ペパーミント、サリチル酸メチル又はオレンジ香料;並びに着色料。組成物がカプセル剤(例えば、ゼラチンカプセル剤)の形態にある場合、上記のタイプの材料に加えて、ポリエチレングリコール、シクロデキストリン又は脂肪油等の液体担体を含有することができる。

【０１６９】

組成物は、液体、例えば、エリキシル剤、シロップ剤、溶液剤、エマルジョン剤又は懸濁液剤の形態にあり得る。液体は、経口投与に対して又は注入による送達に対して有用であり得る。経口投与に対して意図される場合、組成物は、甘味料、保存料、色素/着色料及び香味増強剤のうちの1つ又は複数を含むことができる。注入による投与のための組成物では、界面活性剤、保存料、湿潤化剤、分散化剤、懸濁化剤、緩衝剤、安定化剤及び等張化剤のうちの1つ又は複数もまた、含めることができる。

【０１７０】

組成物は、1つ又は複数の投与量単位の形態を採ることができる。

【０１７１】

具体的な実施形態では、治療が必要な領域に対して局所的に、又は注入、静脈内注入若しくは点滴により、組成物を投与することが望ましい場合がある。

【０１７２】
特定の障害又は状態の治療において有効/活性である治療薬の量は、障害又は状態の性質及び治療対象の動物に依存するであろうし、且つ標準的な臨床的技術により決定することができる。加えて、in vitro又はin vivoアッセイを、任意により、最適な投与量範囲の特定を助けるために利用することができる。組成物中で利用される対象の正確な用量はまた、投与の経路、及び疾患又は障害の重篤度にも依存するであろうし、且つ実施者の判断及び各被験体の環境に従って決定されるべきである。年齢、体重、性別、食餌、投与時間、排泄速度、宿主の状態、薬剤組み合わせ、反応感度及び疾患の重症度等の因子が、考慮されるであろう。

【０１７３】
典型的には、量は、組成物の質量基準で本発明の抗体の少なくとも約0.01％である。経口投与に対して意図される場合、この量は、組成物の質量基準で約0.1％～約80％の範囲で変更し得る。好ましい経口組成物は、組成物の質量基準で約4％～約50％の本発明の抗体を含むことができる。

【０１７４】
本発明の好ましい組成物は、非経口投与量単位が、本発明の抗体の質量基準で約0.01％～約2％を含有するように調製される。

【０１７５】
注入による投与のために、組成物は、概ね典型的には約0.1mg/kg～約250mg/kg被験体体重、好ましくは、約0.1mg/kg～約20mg/kg動物体重、及びより好ましくは約1mg/kg～約10mg/kg動物体重を含むことができる。一実施形態では、組成物は、約1～30mg/kg、例えば、約5～25mg/kg、約10～20mg/kg、約1～5mg/kg、又は約3mg/kgの用量で投与される。投薬スケジュールは、例えば、週1回～2、3、4、5、6、7、8週間又はそれ以上毎に1回で変化し得る。

【０１７６】
一実施形態では、治療後、被験体は、少なくとも7日間、又は少なくとも14日間、又は少なくとも21日間、又は少なくとも28日間、又は少なくとも40日間、又は少なくとも50日間、又は少なくとも60日間の疾患無増悪期間を有する。

【０１７７】
一実施形態では、生存期間の日数、無病日数、又は疾患無増悪日数は、少なくとも2ヵ月間、又は少なくとも3ヵ月間、又は少なくとも4ヵ月間、例えば、少なくとも5ヵ月間、少なくとも6ヵ月間等である。

【０１７８】
一実施形態では、生存期間の日数、無病日数、又は疾患無増悪日数は、少なくとも9ヵ月間、又は少なくとも1年間である。本発明は、それを必要とする動物へと有効量の本発明の抗体又は断片を投与する工程を含む、コンパニオンアニマル、例えば、イヌ、ネコ又はウマにおいて、OX40L/OX40媒介疾患若しくは障害を治療又は予防する方法を提供する。

【０１７９】
本明細書中で用いる場合、「治療する」、「治療すること」又は「治療」とは、疾患若しくは障害を阻害又は軽減することを意味する。例えば、治療は、疾患若しくは障害に伴う症状の発生の延期、及び/又は前記疾患に伴って発生するであろうか若しくは発生することが予期されるそのような症状の重症度の低減を含むことができる。この用語は、既存の症状を改善すること、追加の症状を予防すること、及びそのような症状の根本原因を改善又は予防することを含む。つまり、この用語は、治療される哺乳動物、例えば、コンパニオンアニマル患者のうちの少なくとも一部に対して、有益な結果が与えられることを意味する。多数の医学的処置が、全部ではないが、治療を受ける一部の患者に対して有効である。

【０１８０】
好適には、アトピー性皮膚炎等の状態を治療するために、治療後に、掻痒スコアでの低

減が観察される。掻痒スコアを測定するための好適な方法は、当業者に公知であろう。

【０１８１】

一実施形態では、本発明に従うアンタゴニスト抗体、又はその断片は、国際公開第2013/0008171号に記載される等の、移植片対宿主反応におけるGVHD反応を抑制する。

【０１８２】

用語「被験体」又は「患者」とは、治療、観察、又は実験の対象であるコンパニオンアニマルを意味する。例示のみを目的として、被験体としては、限定するものではないが、イヌ、ネコ又はウマが挙げられる。疑義を回避するために、ヒトの治療は除外される。

【０１８３】

本明細書中で用いる場合、用語「有効量」とは、単独で又は追加の治療剤と組み合わせて細胞、組織、又は被験体に投与される場合に、投与の条件下で所望の治療的又は予防的効果を達成するために有効である、抗OX40L/OX40抗体の量を意味する。

【０１８４】

別の態様では、本発明は、本明細書中に規定される通りの疾患の治療又は予防のための医薬の製造における、本明細書中に記載される通りの抗体若しくは断片、又は本発明の医薬組成物の使用に関する。

【０１８５】

上記で言及される通り、本発明に従う抗体又は断片は、OX40L/OX40媒介疾患の治療又は予防において有用である。

【０１８６】

OX40L/OX40媒介疾患との用語は、OX40L/OX40シグナル伝達経路により媒介され、且つOX40L/OX40抗原を標的化することにより治療/軽減することができる、いずれかの疾患又は障害を意味する。OX40L媒介疾患及びOX40媒介疾患とは、それぞれOX40L若しくはOX40により完全又は部分的に引き起こされるか、或いはその結果である、いずれかの疾患又は状態を意味する。特定の実施形態では、OX40L又はOX40は、細胞の表面上に異常に(例えば、高度に)発現される。一部の実施形態では、OX40L又はOX40は、特定の細胞タイプ上で異常に上方調節される場合がある。他の実施形態では、正常、異常又は過剰な細胞シグナル伝達は、OX40Lに対するOX40の結合により引き起こされる。

【０１８７】

一実施形態では、疾患は炎症性状態であり、これは、炎症又は自己免疫疾患を生じる病理学的状態を意味する。特に、疾患は、以下の非限定的なリストから選択される:アトピー性皮膚炎(アトピー)、アレルギー性皮膚炎、掻痒症、乾癬、強皮症、又は湿疹をはじめとする炎症性皮膚疾患;炎症性腸疾患(クローン病及び潰瘍性大腸炎等)に伴う応答;虚血再灌流;成人呼吸窮迫症候群;喘息;髄膜炎;脳炎;ブドウ膜炎;関節リウマチ、シェーグレン症候群、脈管炎等の自己免疫疾患;リンパ球漏出を含む疾患;中枢神経系(CNS)炎症性障害、敗血症又は外傷に対して二次的な多臓器損傷症候群;細菌性肺炎、抗原抗体複合体媒介疾患;胸膜炎、肺胞炎、脈管炎、肺炎、慢性気管支炎、気管支拡張症、及び嚢胞性線維症をはじめとする肺の炎症;等。他の疾患としては、皮膚掻痒(sweet itch)、夏季再発性皮膚炎又はウマ科昆虫刺咬性過敏症等のウマ科症状が挙げられる。

【０１８８】

他の薬剤との例示的な組み合わせ

本発明の抗体、抗体断片又は医薬組成物は、唯一の有効成分として又は1つ若しくは複数の他の治療剤との組み合わせで、投与することができる。治療剤は、疾患の治療において有用な化合物又は分子である。

【０１８９】

治療剤の例としては、抗体、抗体断片、薬物、毒素、ヌクレアーゼ、ホルモン、抗炎症剤、免疫調節剤、アポトーシス促進剤、抗血管新生剤、ホウ素化合物、光活性剤又は色素及び放射性同位体が挙げられる。抗体分子は、完全抗体又はその断片(例えば、Fab、F(ab')2、Fv、単鎖Fv断片(scFv)若しくは単一ドメイン抗体、例えば、V_Hドメイン、又

は抗体ミメティクスタンパク質)を含む。

【０１９０】

一実施形態では、本明細書中に記載される抗体若しくは抗体断片又は医薬組成物は、既存の療法又は治療剤と組み合わせて用いられる。つまり、別の態様では、本発明はまた、本明細書中に記載される抗体若しくは抗体断片又は医薬組成物及び別の療法の投与を含む、併用療法にも関する。

【０１９１】

一実施形態では、治療剤は、以下の非限定的なリストから選択される:ラパマイシン(シロリムス)、タクロリムス、シクロスポリン、コルチコステロイド(例えば、メチルプレドニゾロン)、メトトレキサート、ミコフェノール酸モフェチル、抗CD28抗体、抗IL12/IL-23抗体、抗CD20抗体、抗CD30抗体、CTLA4-Fc分子、CCR5受容体アンタゴニスト、抗CD40L抗体、抗VI_A4抗体、抗LFA1抗体、フルダラビン、抗CD52抗体、抗CD45抗体、シクロホスファミド、抗胸腺細胞グロブリン、抗補体C5抗体、抗a4b7インテグリン抗体、抗IL6抗体、抗IL6-R抗体、抗IL2R抗体、抗CD25抗体、抗TNFa/TNFa-Fc分子、HDAC阻害剤、JAK阻害剤(JAK-1及びJAK-3阻害剤等)、抗IL-31抗体、SYK阻害剤、抗IL-4Ra抗体、抗IL-13抗体、抗TSLP抗体、及びPDE4阻害剤、ロキベトマブ(lokietmab)(Cytopoint(登録商標))、シクロスポリン(Atopica(登録商標))及びオクラシチニブ(Apoquel(登録商標))。一部の実施形態では、本明細書中に記載される抗体若しくは抗体断片又は医薬組成物は、2種類以上の治療剤と共に投与することができる。

【０１９２】

本明細書中に記載される抗体若しくは抗体断片又は医薬組成物は、他の療法又は治療的化合物又は療法と同時に又は異なる時点で、例えば、同時に、別個に又は連続的に、投与することができる。

【０１９３】

例示的キット

別の態様では、本発明は、本発明の抗体若しくは断片を含む、例えば、本明細書中に列記される通りの疾患の治療若しくは予防のための、及び/又は疾患の診断、予後若しくはモニタリングのためにOX40L/OX40を検出するための、キットを提供する。そのようなキットは、他の構成要素、梱包材、説明書、又はOX40L/OX40タンパク質の検出に役立てるための材料を含むことができる。キットは、OX40L/OX40に結合する標識抗体又はOX40L/OX40に結合する抗体を含む結合分子及び標識を検出するための1つ又は複数の化合物を含むことができる。

【０１９４】

別の態様では、本発明は、凍結乾燥形態で梱包されるか、又は水性媒体中で梱包される、本明細書中に記載される、OX40L/OX40に結合する抗体若しくはその断片、又は医薬組成物を提供する。

【０１９５】

例示的な非治療的応用

別の態様では、本明細書中に記載される通りのOX40L/OX40に結合する抗体又は断片は、診断試験及びアッセイ等の、非治療的目的のために用いられる。試験サンプル中のコンパニオンアニマルOX40L/OX40の存在を検出するための方法は、本明細書中に記載される抗体又はその断片及び少なくとも1種の検出可能な標識と前記サンプルを接触させる工程、及びコンパニオンアニマルOX40L/OX40への前記抗体の結合を検出する工程を含む。

【０１９６】

診断目的のための抗体の修飾は、当技術分野で周知である。例えば、抗体は、ビオチン等のリガンド基、又は蛍光基、放射性同位体、若しくは酵素等の検出可能マーカー基を用いて修飾することができる。本発明の化合物は、診断目的のために用いることができ、且つ、例えば、慣用の技術を用いて標識することができる。好適な検出可能標識としては、限定するものではないが、蛍光団、発色団、放射性原子、電子密度の高い試薬、酵素、及

び特異的結合パートナーを有するリガンドが挙げられる。

【０１９７】

一部の実施形態では、抗体に対する抗原の結合は、固体支持体の使用を伴わずに検出される。例えば、抗体に対する抗原の結合は、液体形式で検出することができる。

【０１９８】

他の実施形態では、抗体又は断片は、例えば、ニトロセルロース、又は細胞、細胞粒子若しくは可溶性タンパク質を固相化することが可能な別の固体支持体へと固定することができる。続いて、支持体を、好適なバッファーを用いて洗浄し、それに続いて検出可能に標識された抗体を用いて処理することができる。続いて、固相支持体を、バッファーを用いて2度目に洗浄して、未結合のペプチド又は抗体を除去することができる。続いて、固体支持体上の結合した標識の量を、公知の方法工程により検出することができる。「固相支持体」又は「担体」とは、ペプチド、抗原、又は抗体に結合することが可能ないずれかの支持体を意味する。周知の支持体又は担体としては、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリフッ化ビニリデン(PVDF)、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然及び修飾セルロース、ポリアクリルアミド、アガロース、及びマグネタイトが挙げられる。担体の性質は、本発明の目的のために、ある程度まで可溶性又は不溶性のいずれかであり得る。支持体材料は、カップリングされる分子がOX40L/OX40又は抗OX40L/OX40抗体に結合することが可能である限り、実質的にいかなる考えられる構造的構成でも有することができる。つまり、支持体構成は、ビーズにおける等の球形、又は試験管の内側表面、若しくはロッドの外表面における等の円筒形であり得る。或いは、表面は、例えば、シート、培養ディッシュ、試験紙等の平坦であり得る。例えば、支持体は、ポリスチレンビーズを含むことができる。当業者は、抗体、ペプチド若しくは抗原に結合させるための多数の他の好適な担体を知っているであろうし、又は慣用の実験によりこれを究明することができる。周知の方法工程が、所与のロットの抗OX40L/OX40抗体の結合活性を決定することができる。当業者は、慣用の実験により、有効且つ最適なアッセイ条件を決定することができる。

【０１９９】

本発明の目的のために、上記アッセイにより検出されるOX40L/OX40は、生物学的試験サンプル中に存在することができる。OX40L/OX40を含有するいずれかのサンプルを用いることができる。例えば、サンプルは、例えば、血液、血清、リンパ液、尿、糞便、炎症性滲出液、脳脊髄液、羊水、組織抽出物又はホモジネート等の生物学的流体である。

【０２００】

OX40タンパク質及び核酸配列

本発明者等は、イヌにおいてOX40のスプライシング変異体を特定及び単離してきた。

【０２０１】

別の態様では、本発明は、単離されたイヌ科OX40アミノ酸配列に関する。本発明はまた、イヌ科OX40タンパク質をコードする単離された核酸配列にも関する。

【０２０２】

一実施形態では、単離されたイヌ科OX40タンパク質は、配列番号4若しくは6又はその変異体を含む。

【０２０３】

一実施形態では、上記の通りのタンパク質をコードする単離された核酸分子は、任意により、配列番号3若しくは5又はその変異体を含む。

【０２０４】

本発明に従う核酸は、DNA又はRNAを含むことができ、且つ完全若しくは部分的に合成で又は組み換えで生成されてもよい。本明細書中で示される通りのヌクレオチド配列に対する参照は、特定された配列を含むDNA分子を包含し、且つ、文脈がそうでないことを要求しない限り、Uを用いてTが置き換えられる特定された配列を含むRNA分子を包含する。

【０２０５】
別の態様では、本発明は、三量体可溶性コンパニオンアニマル(例えば、イヌ科)ＯＸ４０Ｌ細胞外ドメインプローブ及びコンパニオンアニマル(例えば、イヌ科)ＯＸ４０Ｌ抗体に関してスクリーニングする方法におけるその使用に関する。三量体との用語は、ＯＸ４０Ｌ細胞外ドメインのコンホメーションを意味する。コンパニオンアニマル(例えば、イヌ科)ＯＸ４０Ｌ抗体の存在に関してサンプルをスクリーニングするための方法もまた、範囲内に入る。そのような方法は、サンプルをプローブに曝露する工程及びＯＸ４０抗体の存在を評価する工程を含む。サンプルは、動物由来のいずれかのサンプル、例えば、細胞、組織、血液、唾液又は他の好適なサンプルであり得る。
【０２０６】
三量体可溶性ＯＸ４０Ｌ細胞外ドメインプローブは、本明細書中に、例えば、図７の模式図に示される。これは、ニワトリテネイシンＣ三量体化ドメイン及びヒトＩｇＧ１ Ｆｃ又はＨＩＳタグのいずれかを含む。好適な配列もまた提供され、例えば、図６を参照されたい。
【０２０７】
核酸構築物及び宿主細胞
更に、本発明は、本明細書中に規定される通りの少なくとも１種の核酸、すなわち、本発明の抗体をコードする核酸分子又はＯＸ４０タンパク質をコードする核酸分子を含む核酸構築物に関する。構築物は、プラスミド、ベクター、転写又は発現カセットの形態であり得る。
【０２０８】
発現ベクターは、例えば、ｐＢＲ３２２、ｐＵＣ、若しくはＣｏ１Ｅ１等のプラスミド、又は２型アデノウイルスベクター若しくは５型アデノウイルスベクター等のアデノウイルスベクターであり得る。本発明における使用のために好適なベクターとしては、例えば、細菌ベクター、哺乳動物ベクター、ウイルスベクター(レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、シミアンウイルス４０(ＳＶ４０)、及びウシパピローマウイルスベクター等)及び昆虫細胞における使用のためのバキュロウイルス由来ベクターが挙げられる。そのようなベクター中のポリヌクレオチドは、好ましくは、例えば、発現が求められる細胞タイプに基づいて選択されるプロモーターへと機能的に連結される。
【０２０９】
発現ベクターは、慣用の技術により宿主細胞へと移入することができ、続いて、トランスフェクションされた細胞を、慣用の技術により培養して、本発明の抗体を生成させる。本発明は、異種プロモーターに機能的に連結された、本発明の抗体(例えば、全抗体、その重鎖若しくは軽鎖、若しくはその一部分、若しくは本発明の単鎖抗体、又はその断片若しくは変異体)をコードするポリヌクレオチドを含有する宿主細胞を含む。抗体分子全体の発現のために、重鎖及び軽鎖両方をコードするベクターを、免疫グログリン分子全体の発現のために、宿主細胞において共発現させることができる。一実施形態では、発現ベクターは、異種発現、例えば、異なる生物種由来の宿主生物中での発現を可能にするものである。
【０２１０】
本発明はまた、本明細書中に記載される通りの１つ又は複数の核酸構築物、すなわち、本発明の抗体をコードする核酸分子又はＯＸ４０タンパク質をコードする核酸分子を含む、単離された組み換え宿主細胞にも関する。本発明において有用な宿主細胞は、原核細胞、酵母細胞、又は高等真核細胞であり、且つ、限定するものではないが、抗体コード配列を含む組み換えバクテリオファージＤＮＡ、プラスミドＤＮＡ若しくはコスミドＤＮＡ発現ベクターを用いて形質転換された細菌(例えば、大腸菌(Ｅ．ｃｏｌｉ)、枯草菌(Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ))等の微生物;抗体コード配列を含有する組み換え酵母発現ベクターを用いて形質転換された酵母(例えば、サッカロミセス属(Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ)、ピチア属(Ｐｉｃｈｉａ));抗体コード配列を含有する組み換えウイルス発現ベクター(例えば、バキュロウイルス)を用いて感染させた昆虫細胞系;抗体コード配列を含有する、組み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)を用いて感染さ

せたか若しくは組み換えプラスミド発現ベクター(例えば、Tiプラスミド)を用いて形質転換された植物細胞系;又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ー)若しく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ー;ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター)に由来するプロモーターを含有する組み換え発現構築物を保有する哺乳動物細胞系(例えば、COS、CHO、BHK、293、3T3細胞)が挙げられる。

【０２１１】

本発明において宿主細胞として有用な原核生物としては、大腸菌、枯草菌、エンテロバクター属(Enterobacter)、エルウィニア属(Erwinia)、クレブシエラ属(Klebsiella)、プロテウス属(Proteus)、サルモネラ属(Salmonella)、セラチア属(Serratia)、及びシゲラ属(Shigella)、並びにバシラス綱(Bacilli)、シュードモナス属(Pseudomonas)、及びストレプトマイセス属(Streptomyces)等の、グラム陰性又はグラム陽性生物が挙げられる。大腸菌B、大腸菌X1776(ATCC31,537)、及び大腸菌W3110(ATCC27,325)等の他の菌株が好適であるが、1つの好ましい大腸菌クローニング宿主は、大腸菌294(ATCC31,446)である。これらの例は、限定的ではなく例示的である。一実施形態では、本明細書中に記載される通りの抗OX40抗体を作製する方法が提供され、このとき、方法は、抗体をコードするポリヌクレオチドの発現に対して好適な条件下で宿主細胞を培養する工程及び抗体を単離する工程を含む。

【０２１２】

一部の実施形態では、核酸はまた、リーダー配列も含んでもよい。生来型免疫グロブリン生殖系列リーダー配列をはじめとするいずれかの好適なリーダー配列を用いることができるか、又は、Campathリーダー配列(米国特許第8,362,208号B2を参照されたい)等、他のリーダー配列を、タンパク質発現を強化するために選択してもよい。

【０２１３】

アッセイ及び発現系

本発明はまた、コンパニオンアニマル(例えば、イヌ)OX40及び異なる生物種由来の細胞株、例えば、HEK等のヒト細胞株を含む、異種アッセイ又は発現系にも関する。

【０２１４】

アッセイは、コンパニオンアニマル(例えば、イヌ)OX40を、異なる生物種由来の細胞株、例えば、異なる哺乳動物由来の細胞株、例えば、げっ歯類細胞株又はHEK等のヒト細胞株と接触させる工程を含む。例えば、細胞株は、コンパニオンアニマル(例えば、イヌ)OX40を用いてトランスフェクションされ、それにより、安定的又は一時的様式で、コンパニオンアニマル(例えば、イヌ)OX40を発現する。

【０２１５】

細胞株は、レポーター遺伝子を含むことができ、OX40LによるOX40の活性化は、レポーター遺伝子を用いて、例えば、レポーター遺伝子発現の定量化により、評価することができる。好適なレポーター遺伝子は当業者に公知であり、且つ蛍光マーカー又はアルカリホスファターゼ(SEAP)を含んでもよい。

【０２１６】

本明細書中に記載される特定の実施形態は、例示を目的として示され、且つ本発明の限定として示されていないことが理解されるであろう。本発明の主要な特徴は、本発明の範囲から逸脱することなく、様々な実施形態で利用することができる。当業者は、慣用の研究以上のものを用いずに、本明細書中に記載される具体的手順に対する多数の等価物を認識するか、又は究明することができるであろう。そのような等価物は、本発明の範囲内に入ると考えられ、且つ特許請求の範囲により網羅される。本明細書中で言及される全ての刊行物及び特許出願は、本発明が属する分野の当業者の技能のレベルを示すものである。全ての刊行物及び特許出願が、それぞれの個別の刊行物又は特許出願が具体的且つ個別に参照により組み入れられると示されているのと同じ程度まで、参照により本明細書中に組み入れられる。特許請求の範囲及び/又は本明細書中で用語「含むこと」と共に用いられる場合、単語「a」又は「an」は「1」を意味する場合があるが、「1つ又は複数」、「少なくとも1」、及び「1つ又は2以上」の意味にも合致する。本開示は選択肢のみ及び

「及び/又は」を意味する定義を支持するが、特許請求の範囲中の用語「又は」の使用は、選択肢のみを意味することが明示的に示されているか又は選択肢が互いに排他的でない限り、「及び/又は」を意味するために用いられる。本出願全体を通して、用語「約」は、値が、値を決定するために利用されるデバイス、方法に関して内在する誤差の変動、又は研究被験体間に存在する変動を含むことを示すために用いられる。

【０２１７】

本明細書及び特許請求の範囲において用いる場合、単語「含むこと」(comprising)(及び「含むこと」のいずれかの形態、例えば、「含む」(「comprise」及び「comprises」))、「有すること」(及び「有すること」のいずれかの形態、例えば、「有する」(「have」及び「has」))、「はじめとする」(及び「はじめとする」のいずれかの形態、例えば、「挙げられる」(「includes」及び「include」))又は「含有すること」(及び「含有すること」のいずれかの形態、例えば、「含有する」(「contains」及び「contain」))は、包含的又はオープンエンドであり、且つ追加の列挙されない要素又は方法工程を除外しない。

【０２１８】

本明細書中で用いる場合、用語「又はその組み合わせ」とは、用語に先行する列記された項目の全ての並べ替え及び組み合わせを意味する。例えば、「A、B、C、又はその組み合わせ」は、A、B、C、AB、AC、BC、又はABC、及び特定の文脈において順序が重要な場合にはまた、BA、CA、CB、CBA、BCA、ACB、BAC、又はCABのうちの少なくとも1種を含むことが意図される。この例を続けると、BB、AAA、ABAB、BBC、AAABCCCC、CBBAAA、CABABB、その他等の1つ若しくは複数の項目又は用語の繰り返しを含む組み合わせが、明確に含められる。当業者は、文脈からそうでないことが明らかでない限り、典型的には、いずれかの組み合わせにおける項目又は用語の数に対する制限はないことを理解するであろう。

【０２１９】

本開示のいずれかの一部分は、文脈からそうでないことが明らかでない限り、本開示のいずれかの他の一部分と組み合わせて読み取ることができる。

【０２２０】

本明細書中に開示及び特許請求される組成物及び/又は方法のうちの全てが、本開示に照らして、過度の実験を伴わずに、作製及び実施することができる。本発明の組成物及び方法が好ましい実施形態の観点で記載されてきたが、本発明の概念、精神及び範囲から逸脱することなく、組成物及び/又は方法へと、並びに本明細書中に記載される方法の工程又は一連の工程において、変動を適用できることが、当業者に明らかであろう。当業者に明らかな全てのそのような類似の代替物及び改変は、添付の特許請求の範囲により規定される通りの本発明の精神、範囲及び概念の範囲内に入ると見なされる。

【０２２１】

本発明が、以下の非限定的な実施例において、より詳細に記載される。

【実施例】

【０２２２】

(実施例1)

イヌ科OX40L及びOX40のクローニング

OX40L配列予測

イヌ科OX40Lに対するヌクレオチド配列を、ヒトOX40Lヌクレオチド配列との相同性に基づいて、UCSC Genome Browser(University of Santa Cruz)ビーグル参照ゲノムから予測した。5'末端及びそれに続く細胞外ドメインからなる多数の膜貫通タンパク質とは異なり、OX40L構造は反転している(図1Aを参照されたい)。これは、3個の予測されたエクソンを与えた。図1Bは、細胞からの分泌を促進するために、IL-2シグナル配列を用いてN末端細胞内領域を置き換えることにより形成されるOX40Lの可溶性形態(「$OX40L_{EXT}$」)の模式図を示す。対応するヌクレオチド配列を、図6Bに示す。

【０２２３】

OX40配列予測

イヌ科OX40に対するヌクレオチド配列は、ヒトOX40とのイヌ参照ゲノムの相同性から予測した。これは、N末端に細胞外ドメインを含む7個の予測されたエクソンを与えた(図1A)。

【０２２４】

OX40L及びOX40クローニング

OX40L及びOX40の両方に対する配列を、標準的プロトコールを用いてビーグル血液から単離されたPBMCからのクローニングにより確認した。簡潔には、ビーグル全血はEnvigo RMS社(Alconbury、Huntingdon、UK)から供給され、フィコール勾配を用いてPBMCを単離した。簡潔には、10mL全血を、25mLリン酸緩衝生理食塩液(PBS)を用いて希釈し、15mL Ficoll Paque Plus(Sigma Aldrich社)上に重層し、その後、低速加速及びブレーキなしで、室温において10分間、800rcfで遠心分離した。相間ディスクをPBS中へと回収し、PBMCを計数し、続いて、RPMI培地(Sigma Aldrich社)+1 μg mL^{-1} IL-2中に10^6細胞mL^{-1}で希釈した。

【０２２５】

OX40及びOX40L発現を刺激するために、5mg mL^{-1}フィトヘマグルチニン(PHA-L;Fisher Scientific社)を添加し、1日間及び4日間後にPBMCを回収した。QIAGEN RNeasyミニキット(Qiagen社、Hilden、DE)及び標準的手順を用いて、活性化されたPBMCから総RNAを単離し、カラム上DNアーゼ消化後に160μg～440μg RNAを得た。OX40及びOX40Lの特異的cDNA増幅を、予測されたOX40及びOX40Lヌクレオチド配列から生成した3'及び5'末端プライマーと共にSuperScript IV One-Step RT-PCRキット(ThermoFisher社、Massachusetts、US)を用いて行った。プライマー配列は、table 2(表2)に示される。

【０２２６】

OX40及びOX40L PCR産物を、CloneJET PCRクローニングキット(ThermoFisher社)を用いてpJETへとサブクローニングし、続いて、哺乳動物発現のためにpcDNA3.1へと移した。

【０２２７】

細胞発現のためのクローニングされたOX40L/全長膜形態のイヌ科OX40L配列に対するヌクレオチド及びアミノ酸配列は、table 2(表2)に示される(配列番号1及び2)。

【０２２８】

OX40に関して、RT-PCR産物中の潜在的なスプライシング変異体の存在が観察された。個別のスプライシング変異体転写産物を単離するために、RT-PCR産物をサブクローニングし、短い変異体及び長い変異体の2種類の異なる転写産物を、table 2(表2)に示される通りの配列を伴って特定した(ヌクレオチド、アミノ酸翻訳)(配列番号3～6)。

【０２２９】

図2Cは、これらのスプライシング変異体のアライメントを示す。OX40の長いスプライシング変異体は、配列1-2-3-4-5-6-7に配置されたエクソンからなる。短いスプライシング変異体はエクソン6を含まず、且つ配置1-2-3-4-5-7を有する。

【０２３０】

OX40スプライシング変異体の相対的存在量を、pJET-OX40コロニーの単一工程PCRを用いて評価した。簡潔には、単一コロニーを、10μL OneTaq Quick-Load PCRミックス(NEB社)へとLB-ampプレートから採取し、以下のPCRサイクルを用いて増幅した:94℃30sの1サイクル;94℃30s、61℃30s、68℃2分間の30サイクル;68℃5分間の1サイクル。2種類のスプライシング変異体の存在量を、得られたPCR産物の相対的長さを評価することにより決定した(図3)。短いスプライシング変異体は、切断型産物をコードする。この産物は膜貫通領域を全体で欠損しているので、得られる短い変異体は分泌されるであろうというのが最もあり得ることに見える。

【０２３１】

(実施例2)

イヌ科OX40及びOX40Lの発現

ヒト胎児腎臓(HEK)293細胞を、5%CO_2を含む湿潤雰囲気中において37℃で、10%胎児ウシ血清(FBS;Sigma Aldrich社)を添加したDMEM/F12(Life Technologies社、California、US)中の単層として90mm丸型組織培養プレート上で生育させた。HEK293細胞を、ポリエチレンイミン(PEI MAX;40kDa、Polysciences Inc.社、Eppelheim、Germany)を使用して、OX40(配列番号5)又はOX40L(配列番号1)cDNAのいずれかをコードするプラスミドを用いてトランスフェクションした。30μLのPEI MAX(1mg mL^{-1})、5μg cDNA及び1mL DMEM/F12を室温で10分間インキュベートし、70～80%コンフルエントHEK293細胞の90mmプレートへと滴下添加し、2～3日間インキュベートした。安定的にトランスフェクションされた細胞を、好適な抗生物質を用いて、48時間後に選択した。

【0232】

マウス胎児線維芽細胞(MEF)を、湿潤雰囲気及び5%CO_2において37℃で、10%FBS、10%β-メルカプトエタノール及び10%非必須アミノ酸を添加したDMEM-高グルコース(Life Technologies社)中の単層として90mm丸型組織培養プレート上で生育させた。細胞を、製造業者が推奨する説明書に従ってLipofectamine LTX(ThermoFisher Scientific社、Waltham、MA、USA)を使用して、OX40L cDNA(配列番号1)をコードするプラスミドを用いてトランスフェクションした。安定的にトランスフェクションされた細胞を、好適な抗生物質を用いて、48時間後に選択した。

【0233】

(実施例3)

免疫化-DNA及びMEFを用いて

例えば、国際公開第2018/189520号及び同第2020/074874号に実質的に記載される通りの、Ky9(商標)マウスを免疫化した。トランスジェニックマウスは、マウスへのイヌ由来の免疫グロブリン重鎖(IGH)及び軽鎖(IGL)可変(V)領域遺伝子、IGH D領域遺伝子並びにIGH及びIGL J領域遺伝子の挿入により、野生型マウスと比較して改変されており、この挿入により、定常領域と組み合わせた、マウスにおけるイヌ科DNAの発現から生じる可変抗体領域を含む抗体重鎖の生成を可能にする。定常領域は、げっ歯類免疫グロブリン(IG)定常領域であり得、これにより、イヌ科可変領域及びげっ歯類定常領域を有するキメラ重鎖の生成が生じる。そのようなキメラ抗体鎖の可変領域に関する情報、又はこれを含む核酸を、例えば、イヌにおける治療的用途のための、完全イヌ科抗体を生成するために用いることができる。イヌ科DNAを含むげっ歯類はまた、疾患の理解及び医薬の試験のための動物モデルとしても機能し得る。

【0234】

DNA免疫化のために、流体力学的尾静脈注入(HTVI)を用いる初回免疫及び追加免疫レジメンを行い、組織を回収した。

【0235】

細胞に基づく免疫化のために、OX40Lを安定的に発現するMEF細胞を用いる初回免疫及び追加免疫レジメンを行い、組織を回収した。

【0236】

更なる免疫化レジメンを、OX40L発現MEF細胞追加免疫と組み合わせた初回免疫のためのHTVI DNA免疫化を用いて行った。

【0237】

血清力価の決定:免疫化前及びその後の各追加免疫の10日間後に、マウスを採血した。microvette 200 Z-gelチューブ(Starstedt AG & Co. KG社、Germany)を用いて血清及び赤血球を分離させ、OX40L特異的抗体応答の力価を、BD Accuri C6フローサイトメーター(Becton Dickinson社、NJ、USA)又はBeckman Coulter社CytoFLEXSを用いて評価した。免疫化後血清を、FACSバッファー(PBS+3%FBS)中で連続希釈し、10^5個の野生型細胞又は10^5個のOX40Lを安定的に発現する同じ細胞のいずれかへと添加した。マウス抗体を、1/200希釈のアイソタイプIgG1、IgG2a、IgG2bに対するB

B700コンジュゲート化2°モノクローナル抗体を用いて検出し(BD OptiBuild(商標)、Becton Dickinson社)、これらの細胞に対する結合を、免疫化前血清と比較した(図4)。

【０２３８】

(実施例4)

抗体産生細胞の単離

組織単離:

脾臓、リンパ節及び骨髄を、マウスから回収した。脾臓を小片へと切断し、氷上でRPMI-1640(Lonza社、Basel、CH)+10%FBSを用いてリンスしながら、45μmセルストレイナー(Falcon社)を通して押し出すことにより、脾細胞を調製した。類似のプロセスを、リンパ節からのリンパ球に関して用いた。骨髄は、大腿骨及び脛骨から回収し、RPMI-1640を用いて予め湿らせた45μmセルストレイナーを通して、21ゲージ針を用いてRPMI-1640で髄質を流した。全ての細胞タイプを、300gで5分間、ペレット化し、続いて、フローソーティングのために直接的に用いるか、又はFBS+10%ジメチルスルホキシド(DMSO)中に再懸濁し、且つ-150℃で凍結させた。

【０２３９】

細胞選別:

一般的に、抗原特異的脾臓B細胞は、細胞表面上に膜貫通抗体を発現するので、標識抗原VLP又は抗原タンパク質プローブにより捕捉することができる。一方で、抗原特異的形質細胞は、それらの分泌型抗体の優勢な発現に起因して、抗原プローブにより容易に標識されにくい。したがって、脾臓又は骨髄から単離した形質細胞を、これらの集団の抗原特異的サブセットを単離するために、抗原プローブを用いることなく、次の抗体配列回収の工程に進めた。CD138及びCD267(TACI)の細胞表面共発現を、骨髄及び脾臓中の形質芽球及び形質細胞の集団を特定するために用いた。抗原特異的細胞選別に先立って、製造業者の説明書に従って(StemCell Technologies社、UK)、マウス汎B細胞単離キットを用いて、B細胞富化を行った。

【０２４０】

それらの表面上に標的抗原を発現する標識VLPにより、抗原特異的細胞を捕捉することができる。VLPは、OX40Lを用いて安定的にトランスフェクションされ、続いてレトロウイルスgagタンパク質を用いて一時的にトランスフェクションされたHEK細胞から生成され、MA(gagマトリックス断片p15-GFP融合タンパク質)を用いて蛍光標識され;gag発現は細胞からのVLP出芽を可能にし、且つMAは蛍光検出のためにVLPを標識する。VLP上の表面抗原は、精製及び修飾のいかなる工程も伴わずに、組み換え細胞から直接的に発現され、生来型で提示される。チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)又はマウス胎児線維芽細胞(MEF)等の他の哺乳動物細胞株もまた、VLP生成のために用いることができる。

【０２４１】

抗原特異的B細胞はまた、標識抗原タンパク質プローブによっても捕捉することができる。OX40L細胞外ドメイン(ECD)を含む単量体OX40Lタンパク質、又は三量体可溶性OX40L細胞外ドメインプローブ(図7中の模式図に示され、Willett等、Mol Immunol. 2009、46(6);1020～1030頁を参照する)を、発現ベクター中に合成し、CHO細胞において発現させた。Fcタグ付きプローブを、Mab selectプロテインA樹脂(Cytiva社)を用いて、又はMab Select SuReカラム(Cytiva社)を用いるAKTAにより、培養上清から精製した。HISタグ三量体OX40Lタンパク質を、HIS-Pur Ni-NTA樹脂(ThermoFisher社)を用いて精製した。

【０２４２】

Alexa Fluor 647に対するOX40L ECD TNCc HIS(MW=62.143kDa;三量体)のコンジュゲート化を、製造業者のプロトコールに従って、微小スケールタンパク質標識キット(Molecular Probes社-Invitrogen社カタログ番号A30009)を用いて行った。標識化の程度を、NanoDrop分光光度計を用いて決定した。

【０２４３】

同様に、Alexa Fluor 647への単量体dOX40L-mvhfc(MW=40.435kDa)及びOX40L ECD TNCc Fc(MW=280.980kDa;六量体)のコンジュゲート化を、抗体標識化に関する製造業者のプロトコールに従って、Alexa Fluor 647抗体標識キット(Molecular Probes-Invitrogen社カタログ番号A20186)を用いて行った。標識化の程度を、NanoDrop分光光度計を用いて決定した。

【０２４４】

両方のプローブの様々な希釈を、フローサイトメトリーによる抗原特異的B細胞を特定及び選別するために、OX40L過剰発現HEK293由来Gag-GFPウイルス様粒子(VLP)と併せた、OX40L又は無関係の免疫原を用いて免疫化されたマウスの脾細胞に対して試験した。無関係の物質に対する最小限のバックグラウンド染色を示す最適な希釈を、続いて、BD FACSAria Fusionセルソーター(BD Biosciences社)による抗原特異的B細胞特定及び選別のために用いた。

【０２４５】

続いて、CD19、IgM、IgA、IgD及びCD138をはじめとするマーカーは、免疫化に対して応答している細胞において富化されたアイソタイプスイッチしたB細胞を特定するために用いられる。

【０２４６】

選別された細胞は、製造業者の説明書に従って、10XGenomics Chromium単一細胞免疫プロファイリングシステム及びV(D)Jキット(10XGenomics社)を用いる抗体プロファイリングのために調製される。発現される抗体のヌクレオチド配列は、600サイクル(2×300サイクル)を用いるIllumina MiSeq配列決定によるか又は2×150サイクルを用いるIlumina iSeq、Miseq、MiniSeq、Nextseq、Hiseq 4000若しくはNovaseq配列決定により決定される。配列は、各細胞に関する生殖系列配列及び超突然変異を予測するために、pRESTO/Change-O(Yale University)/IgBlast(NCBI, USA)ソフトウェアに基づくカスタムツールを用いて分析される。可変免疫グロブリン領域は、重鎖遺伝子に関して免疫グロブリンヌクレオチド配列のVDJ領域並びにIgκ及びIgλに関して免疫グロブリンヌクレオチド配列のVJ領域を含む。クローン性ファミリー内には、免疫グロブリン遺伝子組み換え及び体細胞超突然変異中に生じるそれらのV(D)Jセグメント内の共有される突然変異を有するサブファミリーがある。固有のV(D)Jセグメント使用頻度を示す異なるクローン性ファミリーは、通常、異なる結合特性を示す。組み換え及び超突然変異中に、その抗体が抗原に対して比較的高い親和性を有する細胞が選択され、同じ系統由来の低親和性クローンが中和機能を有する場合、親和性は、通常、更なる突然変異を増加させ;例えば、クラスター化したファミリーが、国際公開第2015/040401号の図6に示される。

【０２４７】

クローン性ファミリーは、一般的に、2種類以上のクローン性細胞の類縁の免疫グロブリン重鎖及び/又は軽鎖V(D)J配列により規定される。類縁の免疫グロブリン重鎖V(D)J配列は、V(D)J遺伝子セグメントのそれらの共有された使用頻度により特定することができる。選別されたAg特異的単一B細胞の抗体配列の分析の例が、国際公開第2015/040401号の図5に示され、且つ重鎖V遺伝子ファミリー使用頻度により配置される抗体配列を示し、提示される系統樹を生成するためにクラスター化される。これら等の系統樹から、候補クローンが選択される。候補クローンVH及びVL並びにそれらの対応するCDRの核酸及びアミノ酸配列が、以下の配列table 2(表2)に与えられる。

【０２４８】

例えば、抗イヌ科OX40L mAb PMX012、PMX014～018、PMX020～023は、全てが、同じ重鎖V遺伝子(cIGHV3-5)及び軽鎖V遺伝子(cIGLV3-3)によりコードされる。抗イヌ科OX40L mAb PMX013は、重鎖V遺伝子cIGHV4-1及び軽鎖V遺伝子cIGLV3-3によりコードされる。PMX019及びPMX024は、重鎖V遺伝子cIGHV3-2及び軽鎖V遺伝子cIGLV3-3によりコードされる。

【０２４９】

PMX012～PMX024は、以下のTable 2(表2)に示される配列を有する。

【０２５０】

(実施例5)

単一細胞からのモノクローナル抗体の生成

一部の実施形態では、選択された候補クローンの重鎖及び軽鎖V(D)J配列が合成され、且つヒトIgG4、イヌIgG定常領域(例えば、IgGB定常領域)、又はそれぞれイヌIGK若しくはIGL定常領域のゲノム配列を含む発現ベクターへとクローニングされる。一部の実施形態では、IgG B定常領域は、定常領域をエフェクター欠損にする突然変異を含む。これらの突然変異型Fc領域に対する好適な配列は、以下の配列表に与えられる。

【０２５１】

上記に記載される通りに選択されるイヌ科重鎖可変領域をコードするDNAは、ヒトIgG4、又はイヌ科IgGB Def2(配列番号143)若しくはDef7(配列番号148)のいずれかの定常領域(CH1-ヒンジ-CH2-CH3)の上流に、発現ベクターへとクローニングされる。イヌ科軽鎖可変領域をコードするDNAは、ヒトκ軽鎖、又はイヌ科κ若しくはλ軽鎖のいずれかの定常領域の上流に、発現ベクターへとクローニングされる。

【０２５２】

重鎖及び軽鎖をコードする発現ベクターを、安定的発現を得るために、CHO細胞等の好適な哺乳動物細胞株へと共トランスフェクションする。抗体生成のために、6×10^6個の選択されたCHO細胞を、3mL培養培地中に播種し、200rpmで振盪しながら、32℃、5%CO_2でインキュベートする。4%HyClone Cell Boost 7a添加物+0.4%HyClone Cell Boost 7b添加物+1%グルコースを、1、4、7及び10日目に培地に添加する。培養上清を12日目に回収し、IgG濃度を、表面プラズモン共鳴(Biacore 8K、Cytiva Life Sciences社)を用いて、プロテインAチップ上で決定する。

【０２５３】

(実施例6)

OX40L候補抗体の結合アッセイ

結合アッセイ:細胞表面発現されたイヌ科OX40Lタンパク質に対するOX40L候補抗体の結合

候補抗体を含有するCHO細胞上清を、FACSバッファー(3%FBSを含有するPBS)中で1、5又は10μg/mLまで希釈し、細胞表面上に発現されるイヌ科OX40Lタンパク質に結合するそれらの能力に関してスクリーニングする。簡潔には、細胞表面にイヌ科OX40Lを発現するHEK293又はMEF細胞(又はいずれかの他の一般的に用いられる細胞株)を、氷上で30分間、候補抗体を含有する100μLのFACSバッファーと共にインキュベートする。対照として、親細胞株(OX40Lを発現しないHEK293又はMEF細胞)もまた、同じ抗体溶液を用いて染色する。染色後、細胞を、150μL FACSバッファーを用いて染色し、その後、300gで3分間遠心分離する。上清を除去し、細胞ペレットを、暗所において30分間、1:1000希釈の試験抗体のヒト又はイヌ科Fc領域を認識する蛍光標識二次抗体を含有するFACSバッファー中に再懸濁し、続いて、150μL FACSバッファーを用いて洗浄し、300gで3分間、遠心分離する。細胞をFACSバッファー中に再懸濁し、Cytoflex(Beckton Dickinson社)又はAccuri(Beckman Coulter社)サイトメーターのいずれかを用いて、フローサイトメトリーを行い、その後、FlowJoを用いてデータ解析を行う(図8)。

【０２５４】

単量体又は三量体抗原プローブに対する候補抗体の結合

OneComp eBeads(Invitrogen-ThermoFisher社、Cat #:01-1111-41)は、様々な生物種由来の抗体と反応し、且つ免疫グロブリン軽鎖非依存的である球形粒子である。ビーズ溶液は、ビーズの2種類の集団を含有し:いずれかの抗体を捕捉することが可能な集団及び抗体に結合しない対照集団、それにより、二相性分布を生じる。したがって、ビーズの半分のみが試験される抗体に結合できるので、理論的最大結合は50%である。

【０２５５】

OneComp eBeadsを、OX40L抗体と共にインキュベートした。1回の洗浄後、続いて、ビーズを、OX40L三量体AlexaFluor 647コンジュゲート化プローブと共にインキュベートし、再度洗浄し、続いて、Beckman Coulter社CytoFLEX S上で取得した。FlowJoを用いてデータを解析した(図9)。PMX014は両方のプローブに結合するが、PMX020は、細胞表面で発現されるOX40Lの天然コンホメーションを反復する三量体プローブのみに結合する。この実験は、三量体OX40Lプローブが、OX40L候補の特定及びスクリーニングに関するプローブの選別及びスクリーニングの両方として用いるために、より適していることを確認する。

【０２５６】

細胞表面上に発現されるOX40Lに対する結合による抗体親和性の決定

OX40Lを発現する細胞に対する特異的結合は、プロテインA樹脂(MabSelect、Cytiva社)を用いてCHO上清からmAbを精製することにより確認される。簡潔には、MabSelect樹脂をPBS中で洗浄し、希釈して10%スラリーとする。10%スラリーの適切な体積を上清に添加し、RTで5～10分間インキュベートし、続いて、フィルターカラムへとロードする。PBSを用いる3回の洗浄後、抗体を、IgG溶出バッファー(Pierce社)を用いて、中和バッファー(10mM TRIS pH8.0)へと、8:1 IgG溶出バッファー:中和バッファー比率で直接的に溶出する。Nanodrop One(Thermo Fisher社)を用いて280nmで吸光度を測定することにより、抗体溶液を定量化する。6.6μM～66pMの範囲の精製抗体の連続1:3希釈をFACSバッファー中に調製し、イヌ科OX40Lを発現するHEK293又はMEF細胞(又はいずれかの他の一般的に用いられる細胞株)を染色するために用いる。幾何平均値を抗体濃度に対してプロットし、4つのパラメーターロジスティック方程式及び可変勾配を用いて、GraphPad Prismで親和性(K_d)を算出する(図10～図12)。

【０２５７】

表面プラズモン共鳴(SPR)による抗体親和性の決定

OX40L抗体の親和性(K_d)はまた、CHO細胞において発現される組み換えOX40L ECD-TNCc-HISタンパク質を用いて、SPRによっても測定される(図7B)。

【０２５８】

OX40L ECD-TNCc-HISタンパク質を、HIS-Pur Ni NTA樹脂(ThermoFisher社)を用いてCHO上清から精製する。簡潔には、PD10脱塩カラムを用いて、10mMイミダゾールを含有するPBS pH8.0へとCHO上清をバッファー交換する。続いて、バッファー交換された上清を、回転させながら、HIS-Pur Ni NTA樹脂と共に4℃で1時間インキュベートする。樹脂を重力式ろ過カラムへと添加し、10mMイミダゾールを含有するPBS pH8.0を用いて3回洗浄し、続いて、500mMイミダゾールを含有する2.5mLのPBS pH8.0を用いて溶出し、PD10脱塩カラムを用いてPBS pH7.4へとバッファー交換する。

【０２５９】

SPR(Biacore 8K、Cytivia社)により親和性を決定するために、精製されたOX40L ECD-TNCc-HISタンパク質を、製造業者が推奨するプロトコールを用いて、アミンカップリングにより、CM5センサーチップ(Cytivia社)の表面へと低密度で共有結合させる。その後、候補抗体を、一定範囲の濃度でチップ表面に通し、専用ソフトウェア(Biacore Insight評価ソフトウェア)を用いて親和性を決定する。結果を、Table 3(表3)、SPR exp 1及び2にまとめる。

【０２６０】

或いは、OX40Lタンパク質の細胞外ドメイン($OX40L_{EXT}$)をHEK293細胞において発現させ、IL-2プロモーターの制御下で細胞外培地中へと分泌させる(図1B)。これを、HISタグを利用して、Ni^+カラムを用いて精製する。しかしながら、哺乳動物細胞は、多数のHis含有タンパク質を含み、多くの場合に、対象となるHISタグタンパク質と共に共溶出する。サンプルを更に精製するために、$OX40L_{EXT}$含有溶出液を、その後、Biacore 8K中でストレプトアビジンセンサーチップ(SシリーズSAセンサーチップ、GE Healthcare社;Cat #BR100531)に通し、このチップは$OX40L_{EXT}$のビオチン化Aviタグを捕捉し、且つ残余のHIS含有タンパク質を洗い流すことを可能にする。センサーチップロ

ーディングは、約500～1500応答単位が見られるまで継続する。Biacoreのシリーズ SCM5センサーチップ(Cat #BR100530)へのOX40L$_{EXT}$のアミンカップリングもまた用いることができるが、反応は非特異的であるので、これは非標的タンパク質の固相化を生じ、且つ免疫化がエピトープ位置で起こる場合には潜在的なOX40L標的部位を塞ぐ場合があるであろう。

【0261】

分泌された抗体を含有するCHO細胞培地、又は馴化培地(対照)を、その後、センサーに通し、結合をモニタリングする。これらの測定から、標的タンパク質とのAbの結合を評価することができる。

【0262】

精製されたOX40の短いスプライシング変異体(図1)のその後の注入は、OX40及びOX40L$_{EXT}$の嵌合又は阻害を可能にする。そのような測定は、Ab嵌合がリガンド-受容体相互作用を妨げるか否かの示唆として用いることができる。

【0263】

或いは、分泌された抗体の濃縮及び精製を、シリーズSプロテインGセンサーチップ(Cat #29179315)の表面にCHO細胞培地を通すことにより、行うことができる。そのようなアプローチは、Abを変更しない条件を用いる実験間でセンサーチップを再生することを可能にするが、Abとの嵌合がOX40Lの非生来型配向を誘導し、且つセンサーチップとの立体障害を介して結合を低減させ得るので、OX40L-OX40Rの嵌合をその後に評価することを可能にし得ない。

【0264】

(実施例7)

候補抗体のOX40及びOX40L活性に関する機能的アッセイ

HEK-Blue - NF$_K$B機能的アッセイ:

OX40はNF$_K$Bシグナル伝達経路を介してシグナル伝達し、このことは、ヒトHEK-Blue(商標)Null1-v細胞の使用を可能にする。HEK-Blue(商標)Null1-v細胞は、5箇所のNF-κB及びAP-1結合部位に融合したIFN-β最小プロモーターの制御下に、分泌型胎児アルカリホスファターゼ(SEAP)レポーター遺伝子を発現する。NF-κB及び/又はAP-1アクチベーターを用いるHEK-Blue(商標)Null1-v細胞の刺激は、SEAPの産生を誘導する。

【0265】

HEK-Blue NF-kBレポーター細胞株は、イヌ科OX40を用いるNull-1-v細胞(hkb-null1v、InVivoGen社)の安定的トランスフェクションにより作製される。安定的HEK293細胞株は、OX40$_{long}$を用いるトランスフェクションにより作製される(HEK-OX40L)。1×10^{5}個のHEK-Blue-OX40細胞を、2mL DMEM+10%熱不活性化FBS中に同様に再懸濁し、100μLを96ウェルプレートの各ウェルへと移した。アゴニスト応答に関して、10^{5}個のHEK-OX40L細胞を、2mL DMEM+10%不活性化FBS中に同様に再懸濁し、100μLを同じ96ウェルプレートの各ウェル中のHEK-Blue-OX40細胞へと添加する。OX40LによるOX40の活性化を、QuantiBlue検出キット(Invivogen社、San Diego、USA)を用いて、誘導された分泌型アルカリホスファターゼ(SEAP)レポーター遺伝子発現の定量化により評価する(図5)。

【0266】

OX40-OX40Lシグナル伝達の単一点阻害を、HEK-OX40Lへと特異的抗OX40L抗体又は馴化CHO細胞培地を添加し、10分間後にHEK-Blue-OX40へとそれらを添加することにより決定する。37℃で一晩のインキュベーション後、最大ピーク応答を、OX40L単独に対する応答に対して標準化する。濃度依存性を、阻害剤の非存在下での最大応答に対して応答を標準化し、以下の方程式に対して一連の応答に関する平均±SEMを反復してフィッティングすることにより、精製Abに関して決定する:

【0267】

【数1】

$$I_A = I_{min} + \frac{I_{max} - I_{min}}{1 + 10^{n_H(\log A_{50} - \log A)}}$$

(式1)

【０２６８】

式中、A_{min}はベースライン応答であり、A_{max}はアゴニストにより引き起こされるピーク応答であり、A_{50}は$(A_{max}+A_{min})/2$に等しい応答を生じるAの濃度であり、xはAb濃度であり、且つn_HはHill勾配である。

【０２６９】

ＯＸ４０Ｌの選択された候補がＯＸ４０シグナル伝達を低減させる能力を決定するために、５０００個のＨＥＫ-ｂｌｕｅ-ＯＸ４０細胞及び５０００個のＨＥＫ-ＯＸ４０Ｌ細胞を、６.６μＭの固定濃度(図１３)又は一定範囲の濃度(２.２μＭ～２２０ｐＭ、図１４)のプロテインＡ精製済み候補の存在下で、９６ウェルプレート中に播種する。３７℃で２４時間のインキュベーション後、２０μＬの上清を回収し、１８０μＬのＱｕａｎｔｉＢｌｕｅ試薬の添加及び３７℃での更なる４時間のインキュベーション、及びそれに続くＣｌａｒｉｏＳｔａｒプレートリーダー(ＢＭＧ Ｌａｂｔｅｃｈ社)を用いる６３０ｎｍでの吸光度の測定により、ＳＥＡＰの存在を評価する。専用のＭＡＲＳソフトウェアバージョン３.４０ Ｒ２(ＢＭＧ Ｌａｂｔｅｃｈ社)及びＧｒａｐｈＰａｄ Ｐｒｉｓｍバージョン９.１.を用いて、データを解析する(図１３及び図１４)。抗体の存在下での０％までの相対的シグナルの低減は、低減されたＯＸ４０シグナル伝達を示す。対応するＩＣ５０値を、以下のＴａｂｌｅ ４(表４)に示す。

【０２７０】

ＰＢＭＣ一方向混合リンパ球反応(ＭＬＲ):

ＰＢＭＣを、抗体の存在下又は非存在下で、２名のドナーから単離する。刺激因子細胞を、ＤＮＡ合成を阻害するためにマイトマイシンＣ(４０μｇ/ｍＬ、２５分間)を用いて処理する。５０,０００個の刺激因子細胞を、２００μＬの最終体積で、抗体希釈物、又は培地のみと共に、９６ウェルプレート中の応答者細胞と１:１で混合する。プレートを、３７℃で５～７日間インキュベートする。

【０２７１】

多くの場合、応答は、^{3}[Ｈ]チミジン取り込み及びそれに続く０.５μＣｉパルスにより測定される。１８時間後に細胞を回収し、ベータ線をカウントする。或いは、非放射性試験を用いることができる。細胞計数キット-８(ＣＣＫ-８;Ｄｏｊｉｎｄｏ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社;Ｃａｔ #ＣＫ０４-１１)は、細胞増殖における細胞生存性の決定及び細胞傷害性アッセイのための高感度比色アッセイを可能にする。Ｄｏｊｉｎｄｏ社の水溶性テトラゾリウム塩(ＷＳＴ-８)を、細胞中のデヒドロゲナーゼ活性により還元し、それにより黄色のホルマザン色素が生じ、これは組織培養培地中で可溶性である。細胞中のデヒドロゲナーゼの活性により生成されるホルマザン色素の量は、生存細胞数に直接的に比例する。

【０２７２】

ＣＣＫ-８溶液をＭＬＲの各ウェルに添加し、４時間インキュベートし、その後、マイクロプレートリーダーにおいて４５０ｎｍでのＯＤ値を測定する。刺激指数は以下の通りに算出される:

刺激因子細胞が添加されたウェル中の応答者細胞のＯＤ/応答者細胞のみを含有するウェル中の同じ応答者のＯＤ。

【０２７３】

更なる実験プロトコールは、以下に示される:

ＰＢＭＣを、Ｆｉｃｏｌｌ-Ｐａｑｕｅ ｐｌｕｓ(ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ社)密度勾配遠心分離を用いて、白血球除去システムチャンバー(ＮＨＳＢＴ)から単離する。ＰＢＭＣを、３７℃で１時間、ＰＢＳ中の１０Ｍｇ/ｍＬでのマイトマイシンＣ(Ｓｉｇｍａ社)と共に事前インキュベートする。続いて、

細胞をPBS中で3回洗浄し、各洗浄後に、300×gで3分間遠心分離し、上清を吸引除去する。同種PBMC(マイトマイシンCを用いて処理されていない)を、50pL/ウェルで、2×10^6/mLの濃度において、10%v/v FBSを添加したRPMI中に、96ウェルプレートへと添加する。抗OX40L抗体を培養培地中に希釈し、50pL/ウェルで、PBMC(マイトマイシンC処理されていない)を含有する96ウェルプレートへと添加する。続いて、マイトマイシンC処理されたPBMCを、細胞数/ウェルに基づいて1:1～4:1のマイトマイシンC処理:非マイトマイシンCの範囲の最終細胞比率で、96ウェルプレート中の同種PBMC(マイトマイシンCを用いて処理されていない)に添加する。細胞を、37℃/5%CO_2で5日間インキュベートする。5日間後、TNF-o、IFN-γ、及びIL-2を、製造業者の推奨に従って、duoset ELISA(R&D Systems社)により測定する。増殖を、製造業者の推奨に従って、CFSE希釈により測定する。

【0274】

in vitro PBMC活性化

PBMCを、Ficoll-Paque plus(Cytiva社、GE17-1440-02)密度勾配遠心分離を用いて、ヘパリンナトリウム抗凝固剤を用いて新鮮に採血された全血から単離する。簡潔には、イヌ科血液を、リン酸緩衝生理食塩液(PBS)を用いて1:1希釈し、Ficoll-paque plusの上部に慎重に重層し、低速加速及び終了時のブレーキなしで、800rcfにおいて20分間遠心分離する。上層及び相間ディスクを、PBSを用いて希釈し、1300rpmで10分間遠心分離して、ペレット中にPBMCを収集し、これをPBS中で2度目に洗浄し、全ての残余のフィコールを除去した。2回目の遠心分離後、PBMCを、50ng/mL組み換えイヌ科IL-2(R&D systems社)を添加した培地(PBMC培地=RPMI+10%熱不活性化胎児ウシ血清+1%ペニシリン-ストレプトマイシン+1%非必須アミノ酸+1%L-グルタミン+1%ピルビン酸ナトリウム+1%HEPES)中に再懸濁し、37℃、5%CO_2で24時間インキュベートし、その後、使用又は凍結する。

【0275】

次の日、PBMCを、PHA(Sigma Aldrich社)又はConA(ThermoFisher社)を添加した200μL/ウェルのPBMC培地中で96ウェルプレートに播種し、37℃、5%CO_2で、異なる濃度の追加のOX40L三量体タンパク質及び/又はOX40L抗体を伴うか又は伴わずに培養する。続いて、20μLの上清を、サイトカイン定量化のために3～5日目に回収する。IFN-γを、製造業者の推奨に従ってELISA(MABtech社)により測定する。

【0276】

或いは、PBMCを上記に記載される通りに単離し、使用前に37℃、5%CO_2で24時間インキュベートし、次の日、抗イヌ科CD3(Biorad社)及びCD28(eBioscience社)抗体の組み合わせを用いて予めコーティングされた96ウェルプレート中に播種し、37℃、5%CO_2で、異なる濃度の追加のOX40L三量体タンパク質及び/又はOX40L抗体を伴うか又は伴わずに培養する。続いて、20μLの上清を、サイトカイン定量化のために3～5日目に回収する。IFN-γを、製造業者の推奨に従ってELISA(MABtech社)により測定する。

【0277】

(実施例8)

Fc変異体

Fc変異体構築

抗体生成のために、抗ヒトCD20抗体、リツキシマブ(米国特許第5,736,137号を参照されたい)又はオファツムマブ(Drugbank https://go.drugbank.com/drugs/DB06650で入手可能な配列)の可変領域に融合させた、選択されたイヌ科IgG定常領域を含むキメラ抗体をコードするDNA構築物を作製した。

【0278】

イヌ科IgG-B突然変異体変異体(Def 1～9、配列番号142～150)を、部位特異的突然変異誘発により作製した。具体的には、ヒトオファツムマブ又はリツキシマブ可変領域及びイヌ科IgG-B突然変異体変異体を、Q5高フィデリティーDNAポリメラーゼを用いてP

CR増幅し、NEBuilder HIFI DNAアセンブリ(New England Biolabs社)を用いて哺乳動物発現ベクターPetML5へとアセンブルさせる。Ofa-VH-cIgGB WTオファツムマブ配列は、配列番号151に示される。発現ベクターにおいて、重鎖及び抗生物質耐性遺伝子発現ユニットには、piggyBacトランスポザーゼの存在下での宿主細胞への安定的インテグレーションを媒介するために、DNAトランスポゾンpiggyBac末端逆位反復が隣接している。重鎖及び軽鎖をコードする発現ベクターを、PiggyBacトランスポザーゼと共に、CHO細胞等の好適な哺乳動物細胞株へと共トランスフェクションして、安定的発現を得る。抗体生成のために、3×10^6個の選択されたCHO細胞を3mL培養培地中に播種し、200rpmで振盪しながら、32℃、5%CO_2でインキュベートする。4%HyClone Cell Boost 7a添加物+0.4%HyClone Cell Boost 7b添加物+1%グルコースを、1、4、7及び10日目に培地に添加する。培養上清を12日目に回収し、IgG濃度を、プロテインAチップを用いる表面プラズモン共鳴(Biacore 8K、Cytiva Life Sciences社)を用いて決定する。

【0279】

補体依存的細胞傷害性(CDC)活性

CLBL1(University of Veterinary Medicine Vienna)又はCLC(Umeki S.等、J. Vet. Med. Sci.、75:467～474頁(2013) PubMed=23196801;DOI=10.1292/jvms.12-0448)等のイヌ科リンパ性腫瘍細胞株を、標的細胞として用いることができる。これらの細胞を、ヒトCD20タンパク質(配列番号152)をコードする発現構築物を用いて安定的トランスフェクション又はヌクレオフェクションして、hCD20発現細胞を作製する。発現構築物は、抗体発現に関して上記で記載されるのと同じ方法を用いて作製した。

【0280】

トランスフェクションされた細胞を、ピューロマイシン耐性に関して選択し、$hCD20^{high}$(上位5%)細胞を、抗ヒトCD20抗体(クローン:2H7、BioLegend社)を用いて、hCD20発現に関して染色することにより、FACS選別した。

【0281】

CDC活性を評価するために、未トランスフェクション(野生型)標的リンパ系細胞又は同等のhCD20発現細胞を細胞死滅アッセイで用い、このとき、96ウェルプレートのウェル当たり5000個の標的細胞を、1:12の最終希釈の上記に記載される通りの抗ヒトCD20イヌ科Fcキメラ抗体及びイヌ科補体保存血清(BioIVT)と共に、37℃、5%CO_2で2時間インキュベートした。アッセイは、イヌ科補体保存血清が補体の唯一の供給源となるように、熱不活性化血清を用いて作製された培地(CLBL-1細胞に関して、RPMI+1%L-グルタミン+20%胎児ウシ血清)を用いて設定した。

【0282】

続いて、生存細胞を、アッセイプロトコールに従って、CellTitre-Glo(登録商標)発光細胞生存性アッセイ(Promega社)を用いて定量化した。このアッセイは、細胞生存性の指標として、生存細胞のATP含有量を用いる。発光は、CLARIOstar(BMG Labtech社)において測定した。MARSソフトウェア(BMG Labtech社)を用いてデータを解析し、残余の生存細胞数を、Microsoft Excelを用いて、抗体の存在下での死滅パーセンテージを算出するために用いた。1%Tritonを用いて処理された細胞のサンプル(生存細胞が残っていなかった)からバックグラウンドシグナルを取得し、各試験サンプルから取得したシグナルから減算した。シグナル(0%死滅)を、同一に処理されたが抗体が省略された細胞のサンプルから取得した。グラフを、Microsoft Excel又はGraphPad Prismにおいてプロットした。図19は、hCD20発現CLBL1細胞及びWT CLBL1細胞並びにWT又は突然変異Def1、2、3、5、6、7、8、9を含むイヌ科IgGBを用いて行った例示的CDCアッセイの結果を示す。抗体は、10μg/mL～0.01 10μg/mLの範囲の連続的1:3希釈で用いた。試験した全てのDef突然変異体(Def1、2、3、5、6、7、8、9)は、補体依存的細胞傷害性によりhCD20 CLBL1細胞を死滅させるイヌ科IgGB WTの能力を完全に撤回した(図19)。

【０２８３】
【表２Ａ】

Table 2　配列 PMX と指定され且つ以下に示される抗体及び抗体断片についての全配列は、本発明の範囲内である。

配列番号	説明	配列
1	野生型イヌ科 OX40L アミノ酸	MEGVQPLDQNVGNTPGRRFQKNKVLLVAAIIQGLGLLLCFTYI CLHFYASQVPPQYPPIQSIRVQFTRCENEKGCIITSPSKDETM KVQDNSIIINCDGFYLISLKGYFSEELSLSLYYRKGRGPLFSLS KVTSVDSIGVAYLAFKDKVYFNVTTHSTSYKDIQVNGGELILIH QNPGGFCAY
2	野生型イヌ科 OX40L 核酸	ATGGAAGGGGTCCAACCCCTGGACCAGAATGTGGGAAACA CACCAGGGCGAAGATTCCAGAAGAACAAGGTATTGCTGGT GGCAGCCATAATTCAGGGGCTGGGTCTGCTCCTGTGTTTC ACCTACATCTGCCTGCACTTCTATGCTTCTCAGGTGCCGCC TCAGTATCCTCCAATTCAAAGTATCAGAGTACAATTTACCA GGTGTGAGAATGAGAAAGGTTGCATCATCACATCCCCAAG CAAGGATGAAACTATGAAGGTGCAAGACAACTCAATCATCA TTAACTGTGATGGGTTTTATCTCATCTCCCTGAAGGGTTAC TTCTCTGAGGAGCTCAGCCTCAGCCTTTATTACCGAAAGG GTCGGGGACCCCTCTTCTCTCTGAGCAAGGTCACATCTGT TGACTCCATTGGAGTGGCCTATCTGGCTTTCAAGGACAAA GTCTACTTTAATGTGACCACTCACAGTACCTCCTACAAAGA CATCCAGGTGAATGGTGGGGAATTGATTCTCATTCATCAAA ATCCTGGTGGCTTCTGTGCCTACTGA
3	イヌ科 OX40 短いスプライシング変異体核酸	ATGAGGATGTTCGTGGAGTCCCTGCGGCTCAGCGGTCCTC ACTCAGCCCTCCTGCTCCTGGGGCTTGTGCTGGGTGCCGT AGCTGAGCACAACTGTTTCGGGAACACCTACCCCAAAGAC GGCAAGTGCTGCAATGACTGCCCACCAGGTTATGGAATGG AGAGCCGCTGCAGTAGGAGCCATGACACCAAATGTCATCA GTGTCCATCTGGCTTCTACAATGAGGCTACAAATTACGAAC CCTGCAAGCCCTGCACTCAGTGCAATCAGAGAAGTGGGAG TGAACCCAAGAGGAGATGCACACCCACGCAGGACACCATC TGCAGCTGTAAGCCAGGCACAGAGCCCCGGGACGGCTAC AAGCGTGGAGTCGACTGTGCCCCATGCCCACCCGGACACT TCTCCCCAGGGGATGACCAGGCCTGCAAGCCCTGGACCA ACTGTACCtTGATGggAAGGCGTACAATGCAGCCGGCCAGC AAGAGCTCAGACGCTGTCTGTGAGGACAGGAGCCTCCCC GCCACACTGCCATGGGAGACCCAGAGCCCCCTGACCCGG CCCCCTACCCCTCAGCCCACTATGGCCTGGCCCAGGACCT CGCAGGGGCCCTTCACACCCCCTACGGAGCCCCCCAGGG GTGGAAATAGCTTCCGGACCCCCATCCAAGAGGAGCATGC TGACGCCAACTCCACCCTGGCCAAGATCTGA

【０２８４】

【表２Ｂ】

4	イヌ科 OX40 短いスプライシング変異体アミノ酸	MRMFVESLRLSGPHSALLLLGLVLGAVAEHNCFGNTYPKDGK CCNDCPPGYGMESRCSRSHDTKCHQCPSGFYNEATNYEPC KPCTQCNQRSGSEPKRRCTPTQDTICSCKPGTEPRDGYKRG VDCAPCPPGHFSPGDDQACKPWTNCTLMGRRTMQPASKSS DAVCEDRSLPATLPWETQSPLTRPPTPQPTMAWPRTSQGPF TPPTEPPRGGNSFRTPIQEEHADANSTLAKI
5	イヌ科 OX40 長いスプライシング変異体核酸	ATGAGGATGTTCGTGGAGTCCCTGCGGCTCAGCGGTCCTC ACTCAGCCCTCCTGCTCCTGGGGCTTGTGCTGGGTGCCGT AGCTGAGCACAACTGTTTCGGGAACACCTACCCCAAAGAC GGCAAGTGCTGCAATGACTGCCCACCAGGTTATGGAATGG AGAGCCGCTGCAGTAGGAGCCATGACACCAAATGTCATCA GTGTCCATCTGGCTTCTACAATGAGGCTACAAATTACGAAC CCTGCAAGCCCTGCACTCAGTGCAATCAGAGAAGTGGGAG TGAACCCAAGAGGAGATGCACACCCACGCAGGACACCATC TGCAGCTGTAAGCCAGGCACAGAGCCCCGGGACGGCTAC AAGCGTGGAGTCGACTGTGCCCCATGCCCACCCGGACACT TCTCCCCAGGGGATGACCAGGCCTGCAAGCCCTGGACCA ACTGTACCtTGATGggAAGGCGTACAATGCAGCCGGCCAGC AAGAGCTCAGACGCTGTCTGTGAGGACAGGAGCCTCCCC GCCACACTGCCATGGGAGACCCAGAGCCCCCTGACCCGG CCCCCTACCCCTCAGCCCACTATGGCCTGGCCCAGGACCT CGCAGGGGCCCTTCACACCCCCTACGGAGCCCCCCAGGG GCCCCCAGCTGGCTGCTGTCCTGGGCTTGGGCCTAGGCT TGCTGGCCCCCGTGGCAGCCGCACTGGCCTTGCTCCTGC ACCACAGAGCCTGGCGGCTGCCCCCCGGTGGAAATAGCT TCCGGACCCCCATCCAAGAGGAGCATGCTGACGCCAACTC CACCCTGGCCAAGATCTGA
6	イヌ科 OX40 スプライシング変異体アミノ酸	MRMFVESLRLSGPHSALLLLGLVLGAVAEHNCFGNTYPKDGK CCNDCPPGYGMESRCSRSHDTKCHQCPSGFYNEATNYEPC KPCTQCNQRSGSEPKRRCTPTQDTICSCKPGTEPRDGYKRG VDCAPCPPGHFSPGDDQACKPWTNCTLMGRRTMQPASKSS DAVCEDRSLPATLPWETQSPLTRPPTPQPTMAWPRTSQGPF TPPTEPPRGPQLAAVLGLGLGLLAPVAAALALLLHHRAWRLP PGGNSFRTPIQEEHADANSTLAKI
7	OX40 フォワードプライマー	GGCAGAGATGAGGATGTTCG
8	OX40 リバースプライマー	CACTGGCTGCTCAGATCTTGG
9	OX40L フォワード	GCCACAGTTTTCATCTCCCT
10	OX40L リバース	GCTTGGCTTAGGTGCAGC

【０２８５】

【表２Ｃ】

11	PMX012 重鎖可変領域核酸配列	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGACCTGGTGAAG CCTGGGGGGTCCCTGAGACTTGCCTGTGTGACCTCTGGAT TCACCTTCAGTAGCTATCACATGAACTGGGTCCGCCAGGC TCCAGGGAAGGGGCTTCAGTGGGTCGCTTACATTAACACT GGTGGAACTGTCACAACCTATGCAGACGCTATGAATGCAG ACGCTGTGAGGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGT CAAGAACACGCTGTATCTTCAGATGAATAGACTGAGAGCC GAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGCGCGGGTATGGG GTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT CCCCGG
12	PMX012 重鎖可変領域アミノ酸配列	EVQLVESGGDLVKPGGSLRLACVTSGFTFSSYHMNWVRQAP GKGLQWVAYINTGGTVTTYADAMNADAVRGRFTISRDNVKNT LYLQMNRLRAEDTAVYYCARGYGVFDYWGQGTLVTVSP
13	PMX012 軽鎖可変領域ヌクレオチド配列	TCCTATGTGCTGACACAGCTGCCATCCAAAAATGTGACCCT GAAGCAGCCGGCCCACATCACCTGTGGGGGAGACAACATT GGAAGTAAAAGTGTTCACTGGTACCAGCAGAAGCTGGGCC AGGCCCCTGTACTGATTATCTATTATGATAGCCGTAGGCCG ACAGGGATCCCTGAGCGATTCTCCGGCGCCAACTCGGGG AACACGGCCACCCTGACCATCAGCGGGGCCCTGGCCGAG GACGAGGCTGACTATTACTGCCAGGTGTGGGACAACAGTG ATAGGGCTAGTTGGGTATTCGGTGAAGGGACCCAGCTGAC CGTCCTCG
14	PMX012 軽鎖可変領域アミノ酸配列	SYVLTQLPSKNVTLKQPAHITCGGDNIGSKSVHWYQQKLGQA PVLIIYYDSRRPTGIPERFSGANSGNTATLTISGALAEDEADYY CQVWDNSDRASWVFGEGTQLTVL
15	PMX012 重鎖 CDR1	GFTFSSY
16	PMX012 重鎖 CDR2	NTGGTV
17	PMX012 重鎖 CDR3	CARGYGVFDYW
18	PMX012 軽鎖 CDR1	GGDNIGSKSVH
19	PMX012 軽鎖 CDR2	YDSRRPT
20	PMX012 軽鎖 CDR3	CQVWDNSDRASWVF

【０２８６】

【表２Ｄ】

21	PMX013 重鎖可変領域核酸配列	GAACTCACACTGCAGGAGTCAGGGCCAGGACTGGTGAAG CCCTCACAGACCCTCTCTCTCACCTGTGTTGTGTCCGGAG GCTCCGTCACCAGCAGTCACTACTGGAACTGGATCCGCCA GCGCCCTGGGAGGGGACTGGAATGGATGGGGTCCTGGAC AGGCGGAACAAACTACAACCCGGCATTCCAGGGACGCATC TCTGTCACTTCTGACACGGCCAAGAACCAATTCTCCCTGCA ACTGAGTTCCTTGACCACCGAGGACACGGCCGTGTATTAT TGTGCACGAGGAGGCGGATATAGTGGCACCTGGAAGGATT ACTATGTTATGGACTACTGGGGCCATGGCACCTCAGTCAT CGTGTCCTCAG
22	PMX013 重鎖可変領域アミノ酸配列	ELTLQESGPGLVKPSQTLSLTCVVSGGSVTSSHYWNWIRQR PGRGLEWMGSWTGGTNYNPAFQGRISVTSDTAKNQFSLQLS SLTTEDTAVYYCARGGGYSGTWKDYYVMDYWGHGTSVIVSS
23	PMX013 軽鎖可変領域ヌクレオチド配列	TCCTATGTGCTGACACAGCTGCCATCCAAAAATGTGACCCT GAACCAGCCGGCCCACATCACCTGTGGGGGAGACAACCTT GGAAGTAAAAGTGTTCACTGGTACCAGCAGAAGCTGGGCC AGGCCCCTGTACTGATTATCTATTTTGATACCAGCAGGCCG ACAGGGATCCCTGAGCGATTCTCCGGCGCCAACTCGGGG AACACGGCCACCCTGACCATCAGCGGGGCCCTGGCCGAG GACGAGGCTGACTATTACTGCCAGGTGTGGGACAGCAGTG CTAAGGCTAGTGTGTTCGGCGGAGGCACCCATCTGACCGT CCTCG
24	PMX013 軽鎖可変領域アミノ酸配列	SYVLTQLPSKNVTLNQPAHITCGGDNLGSKSVHWYQQKLGQ APVLIIYFDTSRPTGIPERFSGANSGNTATLTISGALAEDEADY YCQVWDSSAKASVFGGGTHLTVL
25	PMX013 重鎖 CDR1	GGSVTSSH
26	PMX013 重鎖 CDR2	TGG
27	PMX013 重鎖 CDR3	CARGGGYSGTWKDYYVMDYW
28	PMX013 軽鎖 CDR1	GGDNLGSKSVH
29	PMX013 軽鎖 CDR2	FDTSRPT
30	PMX013 軽鎖 CDR3	CQVWDSSAKASVF

【０２８７】

【表２Ｅ】

31	PMX014 重鎖可変領域核酸配列	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGACCTGGTGAAG CCTGGGGGGTCCCTGAGACTTTCCTGTGTGGCCTCTGGAT TCACATTCAGTAACTTCCACATGAGTTGGGTCCGCCAGGCT CCAGGGAAGGGGCTTCAGTGGGTCGCATACATTAACAGTG GTGGATTTAACATAAATTATGAAGACGCTGTGAGGGGCCG CTTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGTTGTATC TTCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAAGACACGGCCATTTA TTACTGTGCGCGTGATTGGGATACACATTTGGATACGAACT GGTTCTACTACTGGGGCCAAGGGACCCTGGTCACTGTGTC CTCAG
32	PMX014 重鎖可変領域アミノ酸配列	EVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSNFHMSWVRQAP GKGLQWVAYINSGGFNINYEDAVRGRFTISRDNAKNTLYLQM NSLRAEDTAIYYCARDWDTHLDTNWFYYWGQGTLVTVSS
33	PMX014 軽鎖可変領域ヌクレオチド配列	TCCTATGTGCTGACACAGCTGCCATCCAAAAATGTGACCCT GAAGCAGTCGGCCCACATCACCTGTCGGGGAGACAACATT GGAAGTAAAAGTGTTCACTGGTACCAGCAGAAGCTGGGCC AGGCCCCTGTACTGATTATCTATTATGATAGCAGCAGGCCG ACAGGGATCCCTGAGCGATTCTCCGGCGCCAACTCGGGG AACACGGCCACCCTGACCATCAGCGGGGCCCTGGCCGAG GACGAGGCTGACTATTACTGCCAGGTGTGGGACATCAGTG CTAAGGCTAGTGTGTTCGGCGGAGGCACCCATCTGACCGT CCTCG
34	PMX014 軽鎖可変領域アミノ酸配列	SYVLTQLPSKNVTLKQSAHITCRGDNIGSKSVHWYQQKLGQA PVLIIYYDSSRPTGIPERFSGANSGNTATLTISGALAEDEADYY CQVWDISAKASVFGGGTHLTVL
35	PMX014 重鎖 CDR1	GFTFSNF
36	PMX014 重鎖 CDR2	NSGGFN
37	PMX014 重鎖 CDR3	CARDWDTHLDTNWFYYW
38	PMX014 軽鎖 CDR1	RGDNIGSKSVH
39	PMX014 軽鎖 CDR2	YDSSRPT
40	PMX014 軽鎖 CDR3	CQVWDISAKASVF

【０２８８】

【表２Ｆ】

41	PMX015 重鎖可変領域核酸配列	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGACCTGGTGAAG CCTGGGGGGTCCCTGAGAATTTCCTGTGTGGCCTCTGGAT TCACCTTCAGTTACTACCACATGAGCTGGGTCCGCCAGGC TCCAGGGAAGGGGCTTCAGTGGGTCGCATATATCAACAGT GGTGGATTTAGTACAAACTATGCAGACGCTGTGAAGGGCC GATGCTCCATCTCCAGAGACAATGGCAAGAACACGCTGTA TCTTCAGATGAACAGCCTGAGACCCGAGGACACGGGCGTT TATTATTGTGCGAGTGAAAGTCGTTGGGGGGATTCTTACAG TGGTATGACCTACTGGGGCCATGGCACTTCACTCTTCGTG TCCTCAG
42	PMX015 重鎖可変領域アミノ酸配列	EVQLVESGGDLVKPGGSLRISCVASGFTFSYYHMSWVRQAP GKGLQWVAYINSGGFSTNYADAVKGRCSISRDNGKNTLYLQ MNSLRPEDTGVYYCASESRWGDSYSGMTYWGHGTSLFVSS
43	PMX015 軽鎖可変領域ヌクレオチド配列	TCCTATGTGCTGACACAGCTGCCATCCAAAAATGTGACCCT GAAGCAGCCGGCCCACATCACCTGTGGGGGAGACAACATT GGAAGTAAAAGTGTTCACTGGTACCAGCAGAAGCTGGGCC AGGCCCCTGTTCTGATTATCTATTATGATAACAGCAGGCCG ACAGGGATCCCTGAGCGATTCTCCGGCGCCAAGTCGGGG AACACGGCCACCCTGACCATCAGCGGGGCCCTGGCCGAG GACGAGGCTGACTATTACTGCCAGGTGTGGGACAGCAGTG CTAAGGCTAGTGTGTTCGGCGGAGGCACCCATCTGACCGT CCTCG
44	PMX015 軽鎖可変領域アミノ酸配列	SYVLTQLPSKNVTLKQPAHITCGGDNIGSKSVHWYQQKLGQA PVLIIYYDNSRPTGIPERFSGAKSGNTATLTISGALAEDEADYY CQVWDSSAKASVFGGGTHLTVL
45	PMX015 重鎖 CDR1	GFTFSYY
46	PMX015 重鎖 CDR2	NSGGFS
47	PMX015 重鎖 CDR3	CASESRWGDSYSGMTYW
48	PMX015 軽鎖 CDR1	GGDNIGSKSVH
49	PMX015 軽鎖 CDR2	YDNSRPT
50	PMX015 軽鎖 CDR3	CQVWDSSAKASVF

【０２８９】

【表２Ｇ】

51	PMX016 重鎖可変領域核酸配列	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGACCTGGTGAAG CCGGGGGGGTCCCTGAGACTTTCCTGTGTGGCCTCTGGAT TCACCTTCAGTAATTACCACATGAACTGGGTCCGCCAGGCT CCAGGGAAGGGGCTTCAGTGGGTCGCATACATTACCAGTG ATGGAATTGTTTCAAGCTACGCAGACGTTGTGAAGGGCCG ATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGCTTTTTC TTCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTA TTATTGTGCGAGTGGGTTGTTTTTAGTAGTTGGGGGGGGG ACCTTCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAG
52	PMX016 重鎖可変領域アミノ酸配列	EVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSNYHMNWVRQAP GKGLQWVAYITSDGIVSSYADVVKGRFTISRDNAKNTLFLQM NSLRAEDTAVYYCASGLFLVVGGGTFWGQGTLVTVSS
53	PMX016 軽鎖可変領域ヌクレオチド配列	TCCTATGTGCTGACACAGCTGCCATCCAAAAATGTGACCCT GAAGCAGCCGGCCCACATCACCTGTGGGGGAGACAACATT GGAAGTAAAAGTGTTCACTGGTACCAGCAGAAGCTGGGCC AGGCCCCTGTACTGATTATCTATTCTGATAGTAGCAGGCCG ACAGGGATCCCTGAGCGATTCTCCGGCGCCAACTCGGGG AACACGGCCACCCTGACCATCAGCGGGGCCCTGGCCGAG GACGAGGCTGACTATTACTGCCAGGTGTGGGACAGCAGTG CTAAGGCTAGTGTGTTCGGCGGAGGCACCCATCTGACCGT CCTCG
54	PMX016 軽鎖可変領域アミノ酸配列	SYVLTQLPSKNVTLKQPAHITCGGDNIGSKSVHWYQQKLGQA PVLIIYSDSSRPTGIPERFSGANSGNTATLTISGALAEDEADYY CQVWDSSAKASVFGGGTHLTVL
55	PMX016 重鎖 CDR1	GFTFSNY
56	PMX016 重鎖 CDR2	TSDGIV
57	PMX016 重鎖 CDR3	CASGLFLVVGGGTFW
58	PMX016 軽鎖 CDR1	GGDNIGSKSVH
59	PMX016 軽鎖 CDR2	SDSSRPT
60	PMX016 軽鎖 CDR3	CQVWDSSAKASVF

【０２９０】

【表２Ｈ】

61	PMX017 重鎖可変領域核酸配列	GAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGACCTTGTGAAG CCTGGGGGGTCCCTGAGACTTTCCTGTGTGGCCTCTGGAT TCACCTTCAGTAGTTACCACATGAGCTGGGTCCGCCAGGC TCCAGGGAAGGGGCTTCAGTGGGTCGCATACATTGCCAGT GGTGGTACTGTCACAACCTATGCAGACGCTGTGAGGGGCC GATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAATATGTTGTAT CTTCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACTCGGCCGTAT ATTACTGTACGAGGTGGAAGGGTGGGACTTTTGGCTATGG TATGGACTACTGGGGCCATGGCACCTCACTCTTCGTGTCC TCAG
62	PMX017 重鎖可変領域アミノ酸配列	EVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSSYHMSWVRQAP GKGLQWVAYIASGGTVTTYADAVRGRFTISRDNAKNMLYLQM NSLRAEDSAVYYCTRWKGGTFGYGMDYWGHGTSLFVSS
63	PMX017 軽鎖可変領域ヌクレオチド配列	TCCTATGTGCTGACACAGCTGCCATCCAAAAATGTGACCCT GAAGCAGCCGGCCCACATCACCTGTGGGGGAGACAACATT GGAAGTAAAAGTGTTCACTGGTACCAGCAGAAGCTGGGCC AGGCCCCTGTACTGATTATCTATTATGATAACAACAGGCCG GCAGGGATCCCTGAGCGATTCTCCGGCGCCAACTCGGGG AACACGGCCACCCTGACCATCAGCGGGGCCCTGGCCGAG GACGAGGCTGACTATTACTGCCAGGTGTGGGACAGCAGTG CTAAGGCTAGTGTGTTCGGCGGAGGCACCCATCTGACCGT CCTCG
64	PMX017 軽鎖可変領域アミノ酸配列	SYVLTQLPSKNVTLKQPAHITCGGDNIGSKSVHWYQQKLGQA PVLIIYYDNNRPAGIPERFSGANSGNTATLTISGALAEDEADYY CQVWDSSAKASVFGGGTHLTVL
65	PMX017 重鎖 CDR1	GFTFSSY
66	PMX017 重鎖 CDR2	ASGGTV
67	PMX017 重鎖 CDR3	CTRWKGGTFGYGMDYW
68	PMX017 軽鎖 CDR1	GGDNIGSKSVH
69	PMX017 軽鎖 CDR2	YDNNRPA
70	PMX017 軽鎖 CDR3	CQVWDSSAKASVF

【０２９１】

【表２Ｉ】

71	PMX018 重鎖可変領域核酸配列	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGACCTGGTGAAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTTTCCTGTGTGGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAACTACCACATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTTCAGTGGGTCGCATACATTACCAATGATGGAATTGTTTCAAGCTACGCAGACGCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGCTTTATCTTCAGATGAACAGCCTGAGAGTCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGTGGATTGTTTCTAGTAGTTGGGGGGGGGGACCTTCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAG
72	PMX018 重鎖可変領域アミノ酸配列	EVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSNYHMNWVRQAPGKGLQWVAYITNDGIVSSYADAVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRVEDTAVYYCASGLFLVVGGGTFWGQGTLVTVSS
73	PMX018 軽鎖可変領域ヌクレオチド配列	TCCTATGTGCTGACACAGCTGCCATCCAAAAATGTGACCCTGAAGCAGCCGGCCCACATCACCTGTGGGGGAGACAACATTGGAAGTAAAAGTGTTCACTGGTACCAGCATAAGCTGGGCCAGGCCCCTGTACTGATTATCTATTATGATAGCAGCAGGCCGACAGGGATCCCTGAGCGATTCTCCGGCGCCAACTCGGGGAACACGGCCACCCTGACCATCAGCGGGGCCCTGGCCGAGGACGAGGCTGACTATTACTGCCAGGTGTGGGACAGCAGTGCTAAGGCTAGTGTGTTCGGCGGAGGCACCCATCTGACCGTCCTCG
74	PMX018 軽鎖可変領域アミノ酸配列	SYVLTQLPSKNVTLKQPAHITCGGDNIGSKSVHWYQHKLGQAPVLIIYYDSSRPTGIPERFSGANSGNTATLTISGALAEDEADYYCQVWDSSAKASVFGGGTHLTVL
75	PMX018 重鎖 CDR1	GFTFSNY
76	PMX018 重鎖 CDR2	TNDGIV
77	PMX018 重鎖 CDR3	CASGLFLVVGGGTFW
78	PMX018 軽鎖 CDR1	GGDNIGSKSVH
79	PMX018 軽鎖 CDR2	YDSSRPT
80	PMX018 軽鎖 CDR3	CQVWDSSAKASVF

【０２９２】

【表２Ｊ】

81	PMX019 重鎖可変領域核酸配列	GAGGTACAACTGGTGGAGTCGGGGGGAGACCTGGTGAAG CCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGTGGCCTCTGGAT TCACCTTCAGTAGCAACTACATGAGCTGGATCCGCCAGGC TCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGGTCTCACAAATTAGCGGT GATGGAATTTACACAAACTACGCAGACGCTATGAAGGGCC GATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACGCTGTAT CTGCAGATGAACAGCCTGAGAGATGAGGACACGGCACTAT ATTACTGTGCAACTGGGATATACCCCAATGCTTTTGGTTAC TGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACTGTCTCCTCAG
82	PMX019 重鎖可変領域アミノ酸配列	EVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSSNYMSWIRQAP GKGLQWVSQISGDGIYTNYADAMKGRFTISRDNAKNTLYLQM NSLRDEDTALYYCATGIYPNAFGYWGQGTLVTVSS
83	PMX19 軽鎖可変領域ヌクレオチド配列	TCCTATGTGCTGACACAGTTGTCATCCAAAAATGTGACCCT GAAGCAGCCGGCCCACATCACCTGTGGGGGAGACAACATT GGAAGTAAAAGTGTTCACTGGTACCAGCAGAAGCTGGGCC AGGCCCCTGTACTGATTATCTATTATGATAGCAGCAGGCCG ACAGGGATCCCTGAGCGATTCTCCGGCGCCAACTCGGGG AACACGGCCACCCTGACCATCAGCGGGGCCCTGGCCGAG GACGAGGCTGACTATTACTGCCAGGTGTGGGACAGCAGC GCTAATGTGTTCGGCGGAGGCACCCATCTGACCGTCCTCG
84	PMX019 軽鎖可変領域アミノ酸配列	SYVLTQLSSKNVTLKQPAHITCGGDNIGSKSVHWYQQKLGQA PVLIIYYDSSRPTGIPERFSGANSGNTATLTISGALAEDEADYY CQVWDSSANVFGGGTHLTVL
85	PMX019 重鎖 CDR1	GFTFSSN
86	PMX019 重鎖 CDR2	SGDGIY
87	PMX019 重鎖 CDR3	CATGIYPNAFGYW
88	PMX019 軽鎖 CDR1	GGDNIGSKSVH
89	PMX019 軽鎖 CDR2	YDSSRPT
90	PMX019 軽鎖 CDR3	CQVWDSSANVF

【０２９３】

【表２Ｋ】

91	PMX020 重鎖可変領域核酸配列	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGACCTGGTGAAG CCTGGGGGGTCCCTGAGAATTTCCTGTGTGGCTTCTGGAT TCACCTTCAGTAGCTACCACATGAACTGGGTCCGCCAGGC TCCAGGGAAGGGGCTTCAGTGGGTCGCACACATTAGCAGT GGTGGAACTTTCACAAGTTATGCAGACGCTGTGAAGGGCC GATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGCTCTAT CTTCAGATGATCAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGT ATTACTGTGCGAGTGGGTTGTTTCTAGTAGTTGGGGGGGG GAACTACTGGGGCCGGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA G
92	PMX020 重鎖可変領域アミノ酸配列	EVQLVESGGDLVKPGGSLRISCVASGFTFSSYHMNWVRQAP GKGLQWVAHISSGGTFTSYADAVKGRFTISRDNAKNTLYLQM ISLRAEDTAVYYCASGLFLVVGGGNYWGRGTLVTVSS
93	PMX020 軽鎖可変領域ヌクレオチド配列	TCCTATGTGCTGACACAGCTGCCATCCAAAAATGTGACCCT GAAGCAGCCGGCCCACATCACCTGTGGGGGAGACAACATT GGAAGTAAAAGTGTTCACTGGTACCAGCAGAAGCTGGGCC AGGCCCCTGTACTGATTATCTATTCTGATAGCAGCAGGCC GACAGGGATCCCTGAGCGATTCTCCGGCGCCAACTCGGG GAACACGGCCACCCTGACCATCAGCGGGGCCCTGGCCGA GGACGAGGCTGACTATTACTGCCAGGTGTGGGACAGCAGT GCTAGTGTGTTCGGCGGAGGCACCCATCTGACCGTCCTCG
94	PMX020 軽鎖可変領域アミノ酸配列	SYVLTQLPSKNVTLKQPAHITCGGDNIGSKSVHWYQQKLGQA PVLIIYSDSSRPTGIPERFSGANSGNTATLTISGALAEDEADYY CQVWDSSASVFGGGTHLTVL
95	PMX020 重鎖 CDR1	GFTFSSY
96	PMX020 重鎖 CDR2	SSGGTF
97	PMX020 重鎖 CDR3	CASGLFLVVGGGNYW
98	PMX020 軽鎖 CDR1	GGDNIGSKSVH
99	PMX020 軽鎖 CDR2	SDSSRPT
100	PMX020 軽鎖 CDR3	CQVWDSSASVF

【０２９４】

【表２Ｌ】

101	PMX021 重鎖可変領域核酸配列	GAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGACCTGGTGAAG CCTGGGGGGTCCCTGAGACTTTCCTGTGTGGCCTCTGGAT TCACCTTCAGTAACTACCACATGAGCTGGGTCCGCCAGGC TCCAGGGAAGGGGCTTCAGTGGGTCGCATACATTAACAGT GATGGGAGAGTCACCACCTATTCAGACGCTGTGAAGGGCC GATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGCTGTG TCTTCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTG TATTACTGTGCGAGGTGGAGGGGTGGGACTTTTGGCTATG GTATGGACTACTGGGGCCATGGCACCTCACTCTTCGTGTC TTCAG
102	PMX021 重鎖可変領域アミノ酸配列	EVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSNYHMSWVRQAP GKGLQWVAYINSDGRVTTYSDAVKGRFTISRDNAKNTLCLQM NSLRAEDTAVYYCARWRGGTFGYGMDYWGHGTSLFVSS
103	PMX021 軽鎖可変領域ヌクレオチド配列	TCCTATGTGCTGACACAGCTGCCATCCAAAAATGTGACCCT GAAGCAGCCGGCCCACATCACCTGTGGGGGAGACAATATT GGAAGTAAAAGTGTTCACTGGTACCAGCAGAAGCTGGGCC AGGCCCCTGTACTGATTATCTATTATGATAGCAGCAGGCCG ACAGGGATCCCTGAGCGATTCTCCGGCGCCAACTCGGGG AACACGGCCACCCTGACCATCAGCGGGGCCCTGGCCGAG GACGAGGCTGACTATTACTGCCAGGTGTGGGACAGCAGTG CTAAGGCTAGTGTGTTCGGCGGAGGCACCCATCTGACCGT CCTCG
104	PMX021 軽鎖可変領域アミノ酸配列	SYVLTQLPSKNVTLKQPAHITCGGDNIGSKSVHWYQQKLGQA PVLIIYYDSSRPTGIPERFSGANSGNTATLTISGALAEDEADYY CQVWDSSAKASVFGGGTHLTVL
105	PMX021 重鎖 CDR1	GFTFSNY
106	PMX021 重鎖 CDR2	NSDGRV
107	PMX021 重鎖 CDR3	CARWRGGTFGYGMDYW
108	PMX021 軽鎖 CDR1	GGDNIGSKSVH
109	PMX021 軽鎖 CDR2	YDSSRPT
110	PMX021 軽鎖 CDR3	CQVWDSSAKASVF

【０２９５】

【表２Ｍ】

111	PMX022 重鎖可変領域核酸配列	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGACCTGGTGAAG CCTGGGGGGTCCCTGAGACTTTCCTGTGTGGCCTCTGGAT TCACCTTCAGTAACTACCACATGAGCTGGGTCCGCCAGGC TCCAGGGAAGGGGCTTCAGTGGGTCGCATACATTAATAGT GATGGAAGAATTACAACCTATGCAGACGCTGTGAAGGGCC GATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGCTGTA TCTTCAGATGAACAGCCTGAGAGTCGAGGACACGGCCGTG TATTACTGTGCGAGGTGGAGGGGTGGGACTTTTGGCTATG GTATGGACTACTGGGGCCATGGCACCTCACTCTTCGTGTC CTCAG
112	PMX022 重鎖可変領域アミノ酸配列	EVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSNYHMSWVRQAP GKGLQWVAYINSDGRITTYADAVKGRFTISRDNAKNTLYLQM NSLRVEDTAVYYCARWRGGTFGYGMDYWGHGTSLFVSS
113	PMX022 軽鎖可変領域ヌクレオチド配列	TCCTATGTGCTGACACAGCTGCCATCCAAAAATGTGACCCT GAAGCAGCCGGCCCACATCACCTGTGGGGGAGACAACATT GGAAGTAAAAGTGTTCACTGGTACCAGCAGAAGCTGGGCC AGGCCCCTGTACTGATTATCTATTATGATAGCAGCAGGCCG ACAGGGATCCCTGAGCGATTCTCCGGCGCCAACTCGGGG AACACGGCCACCCTGACCATCAGCGGGGCCCTGGCCGAG GACGAGGCTGACTATTACTGCCAGGTGTGGGACAGCAGTG CTAAGGCTAGTGTGTTCGGCGGAGGCACCCATCTGACCGT CCTCG
114	PMX022 軽鎖可変領域アミノ酸配列	SYVLTQLPSKNVTLKQPAHITCGGDNIGSKSVHWYQQKLGQA PVLIIYYDSSRPTGIPERFSGANSGNTATLTISGALAEDEADYY CQVWDSSAKASVFGGGTHLTVL
115	PMX022 重鎖 CDR1	GFTFSNY
116	PMX022 重鎖 CDR2	NSDGRI
117	PMX022 重鎖 CDR3	CARWRGGTFGYGMDYW
118	PMX022 軽鎖 CDR1	GGDNIGSKSVH
119	PMX022 軽鎖 CDR2	YDSSRPT
120	PMX022 軽鎖 CDR3	CQVWDSSAKASVF

【０２９６】

【表２Ｎ】

121	PMX023 重鎖可変領域核酸配列	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGACCTGATGAAG CCTGGGGGGTCCCTGAGACTTTCCTGTGTGGCCTCTGGAT TCACCTTCCATAACTATCACATGAACTGGGTCCGCCAGGCT CCAGGGAAGGGACTTCAGTGGGTCGCACACATTAGCAGTG ATGGGAGATTCATAAGCTATGCAGACACTGTGAAGGGCCG ATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGCTGTATC TTCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTA TTACTGTGCGAATGGATTGTTTCTGGTACTTGGGGGGGAG AACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAG
122	PMX023 重鎖可変領域アミノ酸配列	EVQLVESGGDLMKPGGSLRLSCVASGFTFHNYHMNWVRQA PGKGLQWVAHISSDGRFISYADTVKGRFTISRDNAKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCANGLFLVLGGENYWGQGTLVTVSS
123	PMX023 軽鎖可変領域ヌクレオチド配列	TCCTATGTGCTGACACAGCTGCCATCCAAAAATGTGACCCT GAAGCAGCCGGCCCACATCACCTGTGGGGGAGACAACATT GGAAGTAAAAGTGTTCACTGGTACCAGCAGAAGCTGGGCC AGGCCCCTATATTGATTATCTATTATGATAGCAGCAGGCCG ACAGGGATCCCTGAGCGATTCTCCGGCGCCAACTCGGGG AACACGGCCACCCTGACCATCAGCGGGGCCCTGGCCGAG GACGAGGCTGACTATTACTGCCAGGTGTGGGACAGCAGTG CTAGTGTGTTCGGCGGAGGCACCCATCTGACCGTCCTCG
124	PMX023 軽鎖可変領域アミノ酸配列	SYVLTQLPSKNVTLKQPAHITCGGDNIGSKSVHWYQQKLGQA PILIIYYDSSRPTGIPERFSGANSGNTATLTISGALAEDEADYYC QVWDSSASVFGGGTHLTVL
125	PMX023 重鎖 CDR1	GFTFHNY
126	PMX023 重鎖 CDR2	SSDGRF
127	PMX023 重鎖 CDR3	CANGLFLVLGGENYW
128	PMX023 軽鎖 CDR1	GGDNIGSKSVH
129	PMX023 軽鎖 CDR2	YDSSRPT
130	PMX023 軽鎖 CDR3	CQVWDSSASVF

【０２９７】

【表２０】

131	PMX024 重鎖可変領域核酸配列	GAGGTGCTACTGATGGAGTCTGGGGGAGACCTGGTGAAG CCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGTGGCCTCTGGAT TCACCTTCAGTAGCAACTACATGTACTGGATCCGCCAGGCT CCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGGTCTCACAAATTAGCGGT GATGGAAGTTTCACAAACTACGCAGACGCTGTGAAGGGCC GATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACACTGTAT CTCCAGATGAACAGCCTGAGAGATGAGGACACGGCAGTTT TTTACTGTGCAAGTGGGATATACCCCAATGCTTTTGGTTAC TGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACTGTCTCCTCAG
132	PMX024 重鎖可変領域アミノ酸配列	EVLLMESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSSNYMYWIRQAP GKGLQWVSQISGDGSFTNYADAVKGRFTISRDNAKNTLYLQM NSLRDEDTAVFYCASGIYPNAFGYWGQGTLVTVSS
133	PMX024 軽鎖可変領域ヌクレオチド配列	TCCTATGTGCTGACACAGCCGCCATCCAAAAATGTGACCCT GAAGCAGCCGGCCCACATCACCTGTGGCGGAGACAATATT GGAAGTAAAAGTGTTCACTGGTATCAGCAGAAGCTGGGCC AGGCCCCTGTACTGATTATCTATTATGATAGCAGCAGGCCG ACAGGGATCCCTGAGCGATTCTCCGGCGCCAACTCGGGG AACACGGCCACCCTGACCATCAGCGGGGCCCTGGCCGAG GACGAGGCTGACTATTACTGCCAGGTGAGGGACAGCAGTG CTAATGTGTTCGGCGGAGGCACCCATCTGACCGTCCTCG
134	PMX024 軽鎖可変領域アミノ酸配列	SYVLTQPPSKNVTLKQPAHITCGGDNIGSKSVHWYQQKLGQA PVLIIYYDSSRPTGIPERFSGANSGNTATLTISGALAEDEADYY CQVRDSSANVFGGGTHLTVL
135	PMX024 重鎖 CDR1	GFTFSSN
136	PMX024 重鎖 CDR2	SGDGSF
137	PMX024 重鎖 CDR3	CASGIYPNAFGYW
138	PMX024 軽鎖 CDR1	GGDNIGSKSVH
139	PMX024 軽鎖 CDR2	YDSSRPT
140	PMX024 軽鎖 CDR3	CQVRDSSANVF
141	WT IgGB 定常領域	ASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVSGYFPEPVTVSWN SGSLTSGVHTFPSVLQSSGLYSLSSMVTVPSSRWPSETFTCN VAHPASKTKVDKPVPKRENGRVPRPPDCPKCPAPEMLGGPS VFIFPPKPKDTLLIARTPEVTCVVVDLDPEDPEVQISWFVDGK QMQTAKTQPREEQFNGTYRVVSVLPIGHQDWLKGKQFTCKV NNKALPSPIERTISKARGQAHQPSVYVLPPSREELSKNTVSLT CLIKDFFPPDIDVEWQSNGQQEPESKYRTTPPQLDEDGSYFL YSKLSVDKSRWQRGDTFICAVMHEALHNHYTQKSLSHSPGK

【０２９８】

【表２Ｐ】

142	Def 1 IgGB 定常領域	ASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVSGYFPEPVTVSWN SGSLTSGVHTFPSVLQSSGLYSLSSMVTVPSSRWPSETFTCN VAHPASKTKVDKPVPKRENGRVPRPPDCPKCPAPESLGGPS VFIFPPKPKDTLLIARTPEVTCVVVDLDPEDPEVQISWFVDGK QMQTAKTQPREEQFNGTYRVVSVLPIGHQDWLKGKQFTCKV NHIGLPSPIERTISKARGQAHQPSVYVLPPSREELSKNTVSLT CLIKDFFPPDIDVEWQSNGQQEPESKYRTTPPQLDEDGSYFL YSKLSVDKSRWQRGDTFICAVMHEALHNHYTQKSLSHSPGK
143	Def 2 IgGB 定常領域	ASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVSGYFPEPVTVSWN SGSLTSGVHTFPSVLQSSGLYSLSSMVTVPSSRWPSETFTCN VAHPASKTKVDKPVPKRENGRVPRPPDCPKCPAPESLGGPS VFIFPPKPKDTLLIARTPEVTCVVVDLGREDPEVQISWFVDGK QMQTAKTQPREEQFNGTYRVVSVLPIGHQDWLKGKQFTCKV NHIGLPSPIERTISKARGQAHQPSVYVLPPSREELSKNTVSLT CLIKDFFPPDIDVEWQSNGQQEPESKYRTTPPQLDEDGSYFL YSKLSVDKSRWQRGDTFICAVMHEALHNHYTQKSLSHSPGK
144	Def 3 IgGB 定常領域	ASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVSGYFPEPVTVSWN SGSLTSGVHTFPSVLQSSGLYSLSSMVTVPSSRWPSETFTCN VAHPASKTKVDKPVPKRENGRVPRPPDCPKCPAPESLGGPS VFIFPPKPKDTLLIARTPEVTCVVVDLGREDPEVQISWFVDGK QMQTAKTQPREEQFNGTYRVVSVLPIGHQDWLKGKQFTCKV NHIGLPSSIERTISKARGQAHQPSVYVLPPSREELSKNTVSLT CLIKDFFPPDIDVEWQSNGQQEPESKYRTTPPQLDEDGSYFL YSKLSVDKSRWQRGDTFICAVMHEALHNHYTQKSLSHSPGK
145	Def 4 IgGB 定常領域	ASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVSGYFPEPVTVSWN SGSLTSGVHTFPSVLQSSGLYSLSSMVTVPSSRWPSETFTCN VAHPASKTKVDKPVPKRENGRVPRPPDCPKCPAPESLGGPS VFIFPPKPKDTLLIARTPEVTCVVVDLGREDPEVQISWFVDGK QMQTAKTQPREEQFNGTYRVVSVLPIGHQDWLKGKQFTCKV NHIGLGSPIERTISKARGQAHQPSVYVLPPSREELSKNTVSLT CLIKDFFPPDIDVEWQSNGQQEPESKYRTTPPQLDEDGSYFL YSKLSVDKSRWQRGDTFICAVMHEALHNHYTQKSLSHSPGK

【０２９９】

【表２Ｑ】

146	Def 5 IgGB 定常領域	ASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVSGYFPEPVTVSWN SGSLTSGVHTFPSVLQSSGLYSLSSMVTVPSSRWPSETFTCN VAHPASKTKVDKPVPKRENGRVPRPPDCPKCPAPEAAGGPS VFIFPPKPKDTLLIARTPEVTCVVVDLDPEDPEVQISWFVDGK QMQTAKTQPREEQFNGTYRVVSVLPIGHQDWLKGKQFTCKV NNKALPSPIERTISKARGQAHQPSVYVLPPSREELSKNTVSLT CLIKDFFPPDIDVEWQSNGQQEPESKYRTTPPQLDEDGSYFL YSKLSVDKSRWQRGDTFICAVMHEALHNHYTQKSLSHSPGK
147	Def 6 IgGB 定常領域	ASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVSGYFPEPVTVSWN SGSLTSGVHTFPSVLQSSGLYSLSSMVTVPSSRWPSETFTCN VAHPASKTKVDKPVPKRENGRVPRPPDCPKCPAPEAAGGPS VFIFPPKPKDTLLIARTPEVTCVVVDLDPEDPEVQISWFVDGK QMQTAKTQPREEQFNGTYRVVSVLPIGHQDWLKGKQFTCKV NNKALPSSIERTISKARGQAHQPSVYVLPPSREELSKNTVSLT CLIKDFFPPDIDVEWQSNGQQEPESKYRTTPPQLDEDGSYFL YSKLSVDKSRWQRGDTFICAVMHEALHNHYTQKSLSHSPGK
148	Def 7 IgGB 定常領域	ASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVSGYFPEPVTVSWN SGSLTSGVHTFPSVLQSSGLYSLSSMVTVPSSRWPSETFTCN VAHPASKTKVDKPVPKRENGRVPRPPDCPKCPAPEAAGGPS VFIFPPKPKDTLLIARTPEVTCVVVDLDPEDPEVQISWFVDGK QMQTAKTQPREEQFNGTYRVVSVLPIGHQDWLKGKQFTCKV NNKALGSPIERTISKARGQAHQPSVYVLPPSREELSKNTVSLT CLIKDFFPPDIDVEWQSNGQQEPESKYRTTPPQLDEDGSYFL YSKLSVDKSRWQRGDTFICAVMHEALHNHYTQKSLSHSPGK
149	Def 8 IgGB 定常領域	ASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVSGYFPEPVTVSWN SGSLTSGVHTFPSVLQSSGLYSLSSMVTVPSSRWPSETFTCN VAHPASKTKVDKPVPKRENGRVPRPPDCPKCPAPGMLGGPS VFIFPPKPKDTLLIARTPEVTCVVVDLDPENPEVQISWFVDGK QMQTAKTQPREEQFNGTYRVVSVLPIGHQDWLKGKQFTCKV NNKALPSPIERTISKARGQAHQPSVYVLPPSREELSKNTVSLT CLIKDFFPPDIDVEWQSNGQQEPESKYRTTPPQLDEDGSYFL YSKLSVDKSRWQRGDTFICAVMHEALHNHYTQKSLSHSPGK
150	Def 9 IgGB 定常領域	ASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVSGYFPEPVTVSWN SGSLTSGVHTFPSVLQSSGLYSLSSMVTVPSSRWPSETFTCN VAHPASKTKVDKPVPKRENGRVPRPPDCPKCPAPEAAGGPS VFIFPPKPKDTLLIARTPEVTCVVVDLDPENPEVQISWFVDGK QMQTAKTQPREEQFNGTYRVVSVLPIGHQDWLKGKQFTCKV NNKALPSSIERTISKARGQAHQPSVYVLPPSREELSKNTVSLT CLIKDFFPPDIDVEWQSNGQQEPESKYRTTPPQLDEDGSYFL YSKLSVDKSRWQRGDTFICAVMHEALHNHYTQKSLSHSPGK

【０３００】

【表２Ｒ】

151	Ofa-VH-cIgGB WT	MELGLSWIFLLAILKGVQCEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCA ASGFTFNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSIGYADSV KGRFTISRDNAKKSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYY YGMDVWGQGTTVTVSSASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVAL ACLVSGYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSVLQSSGLYSLSS MVTVPSSRWPSETFTCNVAHPASKTKVDKPVPKRENGRVPR PPDCPKCPAPEMLGGPSVFIFPPKPKDTLLIARTPEVTCVVVD LDPEDPEVQISWFVDGKQMQTAKTQPREEQFNGTYRVVSVL PIGHQDWLKGKQFTCKVNNKALPSPIERTISKARGQAHQPSV YVLPPSREELSKNTVSLTCLIKDFFPPDIDVEWQSNGQQEPES KYRTTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDTFICAVMHEA LHNHYTQKSLSHSPGK
152	標的細胞の作製のために用いられる hCD20 DNA 配列:	5'ATGACAACACCCAGAAATTCAGTAAATGGGACTTTCCCGG CAGAGCCAATGAAAGGCCCTATTGCTATGCAATCTGGTCC AAAACCACTCTTCAGGAGGATGTCTTCACTGGTGGGCCCC ACGCAAAGCTTCTTCATGAGGGAATCTAAGACTTTGGGGG CTGTCCAGATTATGAATGGGCTCTTCCACATTGCCCTGGG GGGTCTTCTGATGATCCCAGCAGGGATCTATGCACCCATC TGTGTGACTGTGTGGTACCCTCTCTGGGGAGGCATTATGT ATATTATTTCCGGATCACTCCTGGCAGCAACGGAGAAAAAC TCCAGGAAGTGTTTGGTCAAAGGAAAAATGATAATGAATTC ATTGAGCCTCTTTGCTGCCATTTCTGGAATGATTCTTTCAAT CATGGACATACTTAATATTAAAATTTCCCATTTTTTAAAAATG GAGAGTCTGAATTTTATTAGAGCTCACACACCATATATTAAC ATATACAACTGTGAACCAGCTAATCCCTCTGAGAAAAACTC CCCATCTACCCAATACTGTTACAGCATACAATCTCTGTTCTT GGGCATTTTGTCAGTGATGCTGATCTTTGCCTTCTTCCAGG AACTTGTAATAGCTGGCATCGTTGAGAATGAATGGAAAAGA ACGTGCTCCAGACCCAAATCTAACATAGTTCTCCTGTCAGC AGAAGAAAAAAAAGAACAGACTATTGAAATAAAAGAAGAAG TGGTTGGGCTAACTGAAACATCTTCCCAACCAAAGAATGAA GAAGACATTGAAATTATTCCAATCCAAGAAGAGGAAGAAGA AGAAACAGAGACGAACTTTCCAGAACCTCCCCAAGATCAG GAATCCTCACCAATAGAAAATGACAGCTCTCCTTAA3'

【０３０１】

【表２Ｓ】

153	IgG-B	MEFVLGWVFLVAILQGVQGEVQLVESGGDLVKPAGSLRLSCV ASGFTFSNNAMNWVRQAPGKGLQWVAGINSGGSTASADAV KGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLTAEDTAVYYCAKVIGNWIATS DLDYWGQGTLVIVSSASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALAC LVSGYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSVLQSSGLYSLSSMV TVPSSRWPSETFTCNVAHPASKTKVDKPVPKRENGRVPRPP DCPKCPAPEMLGGPSVFIFPPKPKDTLLIARTPEVTCVVVDLD PEDPEVQISWFVDGKQMQTAKTQPREEQFNGTYRVVSVLPI GHQDWLKGKQFTCKVNNKALPSPIERTISKARGQAHQPSVYV LPPSREELSKNTVSLTCLIKDFFPPDIDVEWQSNGQQEPESKY RTTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDTFICAVMHEALH NHYTQKSLSHSPGK
154	IgG-A	MEFVLGWVFLVAILQGVQGEVQLVESGGDLVKPAGSLRLSCV ASGFTFSNNAMNWVRQAPGKGLQWVAGINSGGSTASADAV KGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLTAEDTAVYYCAKVIGNWIATS DLDYWGQGTLVIVSSASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALAC LVSGYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSVLQSSGLYSLSSMV TVPSSRWPSETFTCNVVHPASNTKVDKPVFNECRCTDTPPC PVPEPLGGPSVLIFPPKPKDILRITRTPEVTCVVLDLGREDPEV QISWFVDGKEVHTAKTQSREQQFNGTYRVVSVLPIEHQDWLT GKEFKCRVNHIDLPSPIERTISKARGRAHKPSVYVLPPSPKEL SSSDTVSITCLIKDFYPPDIDVEWQSNGQQEPERKHRMTPPQ LDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQQGDPFTCAVMHETLQNHYTD LSLSHSPGK
155	IgG-C	MEFVLGWVFLVAILQGVQGEVQLVESGGDLVKPAGSLRLSCV ASGFTFSNNAMNWVRQAPGKGLQWVAGINSGGSTASADAV KGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLTAEDTAVYYCAKVIGNWIATS DLDYWGQGTLVIVSSASTTAPSVFPLAPSCGSQSGSTVALAC LVSGYIPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSILQSSGLYSLSSMVT VPSSRWPSETFTCNVAHPATNTKVDKPVVKECECKCNCNNC PCPGCGLLGGPSVFIFPPKPKDILVTARTPTVTCVVVDLDPEN PEVQISWFVDSKQVQTANTQPREEQSNGTYRVVSVLPIGHQ DWLSGKQFKCKVNNKALPSPIEEIISKTPGQAHQPNVYVLPPS RDEMSKNTVTLTCLVKDFFPPEIDVEWQSNGQQEPESKYRM TPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDTFICAVMHEALHN HYTQKSLSHSPGK

【０３０２】

【表２Ｔ】

156	IgG-D	MEFVLGWVFLVAILQGVQGEVQLVESGGDLVKPAGSLRLSCV ASGFTFSNNAMNWVRQAPGKGLQWVAGINSGGSTASADAV KGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLTAEDTAVYYCAKVIGNWIATS DLDYWGQGTLVIVSSASSTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALAC LVSGYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSVLKSSGLYSLSSMV TVPSSRLPSETFTCNVVHPATNTKVDKPVPKESTCKCISPCPV PESLGGPSVFIFPPKPKDILRITRTPEVTCVVLDLGREDPEVQI SWFVDGKEVHTAKTQPREQQFNSTYRVVSVLPIEHQDWLTG KEFKCRVNHIGLPSPIERTISKARGQAHQPGVYVLPPSPKELS SSDTVTLTCLIKDFFPPEIDVEWQSNGQPEPESKYHTTAPQLD EDGSYFLYSKLSVDKSRWQQGDPFTCAVMHEALQNHYTDLS LSHSPGK

【０３０３】

【表３】

Table 3:

候補	細胞結合 K_D (M)	SPR K_D exp 1 (M)	SPR K_D exp 2 (M)
PMX 012	3.70e-8	1.48e-8	1.48e-8
PMX 014	7.46e-8	1.97e-8	6.61e-9
PMX 023	3.99e-8	2.84e-8	7.53e-8

【０３０４】

【表４】

Table 4:

候補	IC50
PMX012	7.41e-8
PMX014	2.26e-8
PMX020	2.01e-8
PMX023	2.82e-9

【０３０５】

【表５】

Table 5:

候補	全体同一性(%)	平均対同一性(%)
全部	29.20	76.60
群 1	82.5	89.72
群 2	89.26	92.84
群 3	92.37	92.37

【０３０６】

【表６】

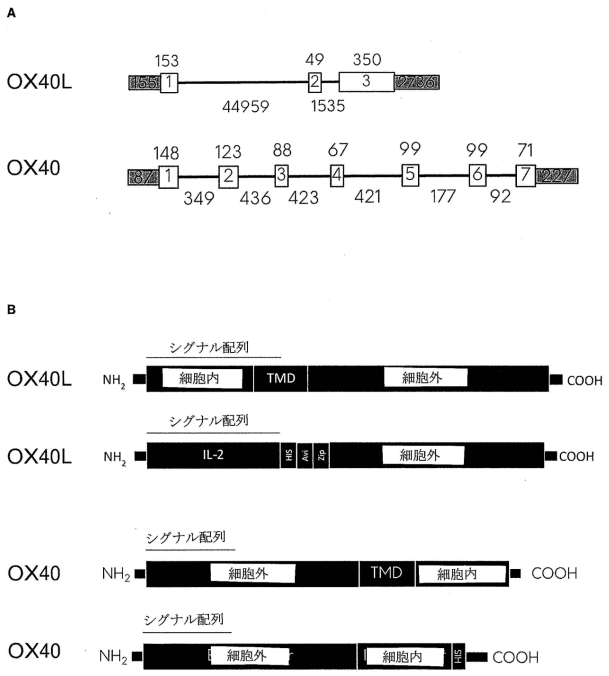
Table 6:

候補	全体同一性(%)	平均対同一性(%)
全部	81.65	96.38
群 1	95.37	98.43
群 2	97.22	98.15
群 3	97.17	97.17

【図面】

【図１】

Fig 1



【図２Ａ】

A

*ctgctggcagag*ATGAGGATGTTCGTGGAGTCCCTGCGGCTCAGCGGTCCTCACTCAGCCCTCCTGCTCCTGGGG
CTTGTGCTGGGTGCCGTAGCTGAGCACAACTGTTTCGGGAACACCTACCCCAAAGACGGCAAGTGCTGCAATGAC
TGCCCACCAGGTTATGGAATGGAGAGCCGCTGCAGTAGGAGCCATGACACCAAATGTCATCAGTGTCCATCTGGC
TTCTACAATGAGGCTACAAATTACGAACCCTGCAAGCCCTGCACTCAGTGCAATCAGAGAAGTGGGAGTGAACCC
AAGAGGAGATGCACACCCACGCAGGACACCATCTGCAGCTGTAAGCCAGGCACAGAGCCCCGGGACGGCTACAAG
CGTGGAGTCGACTGTGCCCCATGCCCACCCGGACACTTCTCCCCAGGGGATGACCAGGCCTGCAAGCCCTGGACC
AACTGTACCTTGATGggAAGGCGTACAATGCAGCCGGCCAGCAAGAGCTCAGACGCTGTCTGTGAGGACAGGAGC
CTCCCCGCCACACTGCCATGGGAGACCCAGAGCCCCCTGACCCGGCCCCCTACCCCTCAGCCCACTATGGCCTGG
CCCAGGACCTCGGCAGGGGCCCTTCACACCCCCTACGGAGCCCCCCAGGGGCCCCCAGCTGGCTGCTGTCCTGGGC
TTGGGGCCTAGGCTTGCTGGCCCCCCGTGGCAGCCGCACTGGCCTTGCTCCTGCACCACAGAGCCCTGGCGGCTGCCC
CCCGGTGGAAATAGCTTCCGGACCCCCATCCAAGAGGAGCATGCTGACGCCAACTCCACCCTGGCCAAGATCTGA
gcagccagtgctcccac

【図２Ｂ】

B

*ctgctggcagag*ATGAGGATGTTCGTGGAGTCCCTGCGGCTCAGCGGTCCTCACTCAGCCCTCCTGCTCCTGGGG
CTTGTGCTGGGTGCCGTAGCTGAGCACAACTGTTTCGGGAACACCTACCCCAAAGACGGCAAGTGCTGCAATGAC
TGCCCACCAGGTTATGGAATGGAGAGCCGCTGCAGTAGGAGCCATGACACCAAATGTCATCAGTGTCCATCTGGC
TTCTACAATGAGGCTACAAATTACGAACCCTGCAAGCCCTGCACTCAGTGCAATCAGAGAAGTGGGAGTGAACCC
AAGAGGAGATGCACACCCACGCAGGACACCATCTGCAGCTGTAAGCCAGGCACAGAGCCCCGGGACGGCTACAAG
CGTGGAGTCGACTGTGCCCCATGCCCACCCGGACACTTCTCCCCAGGGGATGACCAGGCCTGCAAGCCCTGGACC
AACTGTACCtTGATGggAAGGCGTACAATGCAGCCGGCCAGCAAGAGCTCAGACGCTGTCTGTGAGGACAGGAGC
CTCCCCGCCACACTGCCATGGGAGACCCAGAGCCCCCTGACCCGGCCCCCTACCCCTCAGCCCACTATGGCCTGG
CCCAGGACCTCGCAGGGGCCCTTCACACCCCCTACGGAGCCCCCCAGGGGCCCCCAGCTGGCTGCTGTCCTGGGC
TTGGGGCCTAGGCTTGCTGGCCCCCCGTGGCAGCCGCACTGGCCTTGCTCCTGCACCACAGAGCCCTGGCGGCTGCCC
CCCGGTGGAAATAGCTTCCGGACCCCCATCCAAGAGGAGCATGCTGACGCCAACTCCACCCTGGCCAAGATCTGA
gcagccagtgctcccac

【図２Ｃ】

C

短い MRMFVESLRLSGPHSALLLLGLVLGAVAEHNCFGNTYPKDGKCCNDCPPGYGMESRCSRS
長い MRMFVESLRLSGPHSALLLLGLVLGAVAEHNCFGNTYPKDGKCCNDCPPGYGMESRCSRS
****

短い HDTKCHQCPSGFYNEATNYEPCKPCTQCNQRSGSEPKRRCTPTQDTICSCKPGTEPRDGY
長い HDTKCHQCPSGFYNEATNYEPCKPCTQCNQRSGSEPKRRCTPTQDTICSCKPGTEPRDGY
****

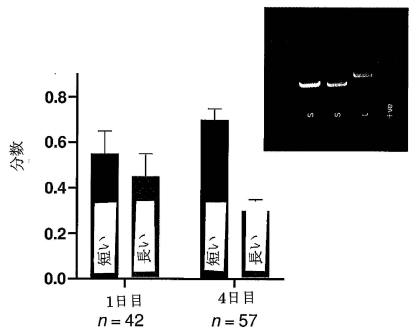
短い KRGVDCAPCPPGHFSPGDDQACKPWTNCTLMGRRTMQPASKSSDAVCEDRSLPATLPWET
長い KRGVDCAPCPPGHFSPGDDQACKPWTNCTLMGRRTMQPASKSSDAVCEDRSLPATLPWET
****

短い QSPLTRPPTPQPTMAWPRTSQGPFTPPTEPPRG----------
長い QSPLTRPPTPQPTMAWPRTSQGPFTPPTEPPRGPQLAAVLGLGLGLLAPVAAALALLLHH
****

短い --------GNSFRTPIQEEHADANSTLAKI
長い RAWRLPPGGNSFRTPIQEEHADANSTLAKI
****

【図３】

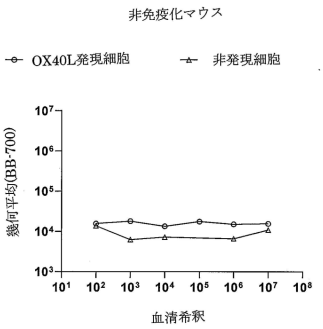
Fig 3.



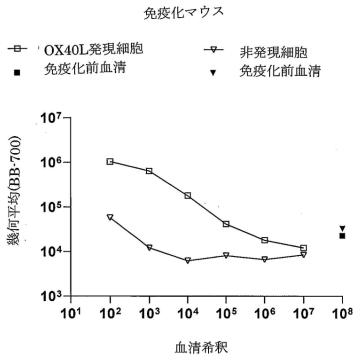
【図４】

Fig 4.

A



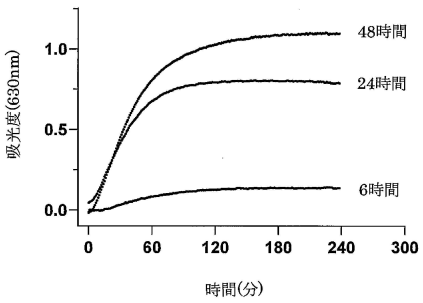
B



【図５】

Fig 5.

A



【図６Ａ】

A

*tgccacagttttcatctcccttacatctaaactgtgaag*ATGGAAGGGGTCCAACCCCTGGACCAGAATGTGGGA
AACACACCAGGGCGAAGATTCCAGAAGAACAAGGTATTGCTGGTGGCAGCCATAATTCAGGGGCTGGGTCTGCTC
CTGTGTTTCACCTACATCTGCCTGCACTTCTATGCTTCTCAGGIGCCGCCTCAGTATCCTCCAATTCAAAGIATC
AGAGTACAATTTACCAGGTGTGAGAATGAGAAAGGTTGCATCATCACATCCCCAAGCAAGGATGAAACTATGAAG
GTGCAAGACAACTCAATCATCATTAACTGTGATGGGTTTTATCTCATCTCCCTGAAGGGTTACTTCTCTGAGGAG
CTCAGCCTCAGCCTTTATTACCGAAAGGGTCGGGGACCCCTCTTCTCTCTGAGCAAGGTCACATCTGTTGACTCC
ATTGGAGTGGCCTATCTGGCTTTCAAGGACAAAGTCTACTTTAATGTGACCACTCACAGTACCTCCTACAAAGAC
ATCCAGGTGAATGGTGGGGAATTGATTCTCATTCATCAAAATCCTGGIGGCTTCTGTGCCTACTG*Aggacctgag*
ggctgcacctaagccaagca

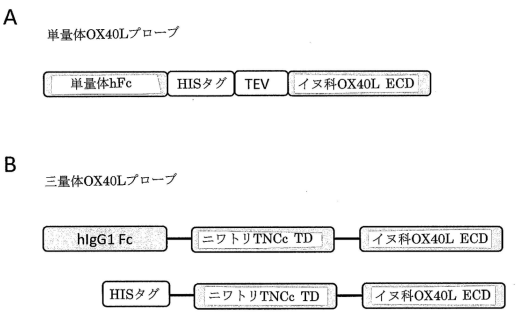
【図６Ｂ】

B

ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCATTGCACTAAGTCTTGCACTTGTCACAAACAGTGCACCACCACCACCAC
CAGGGGTTGAATGATATTTTCGAAGCACAGAAAATTGAATGGCATGAGcgtacgaaacagatcgaggataaaatt
gaagagatctgagcaaaatcatcatacgaaacgaaatcgcgcgtatcaaaagctgatggcgaagcgtGGC
GGTGGCAGCGGTGGCGGTAGCGGCGGTGGCAGCGCTTCTCAGGIGCCGCCTCAGTATCCTCCAATTCAAAGTATC
AGAGTACAATTTACCAGGTGTGAGAATGAGAAAGGTTCCATCATCACATCCCCAAGCAAGGATGAAACTATGAAG
GTGCAAGACAACTCAATCATCATTAACTGTGATGGGTTTTATCTCATCTCCCTGAAGGGTTACTTCTCTGAGGAG
CTCAGCCTCAGCCTTTATTACCGAAAGGGTCGGGGACCCCTCTTCTCTCTGAGCAAGGTCACATCTGTTGACTCC
ATTGGAGTGGCCTATCTGGCTTTCAAGGACAAAGTCTACTTTAATGTGACCACTCACAGTACCTCCTACAAAGAC
ATCCAGGTGAATGGTGGGGAATTGATTCTCATTCATCAAAATCCTGGTGGCTTCTGTGCCTACTGA

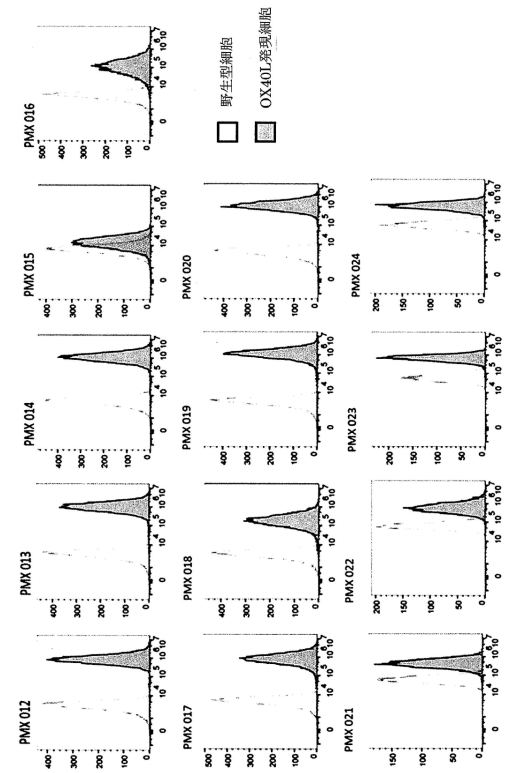
【図７】

Fig. 7



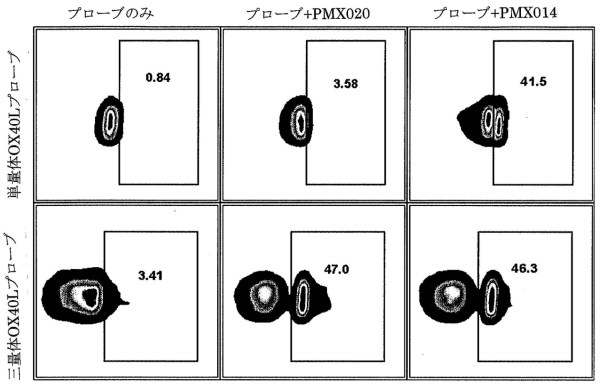
【図８】

Fig. 8



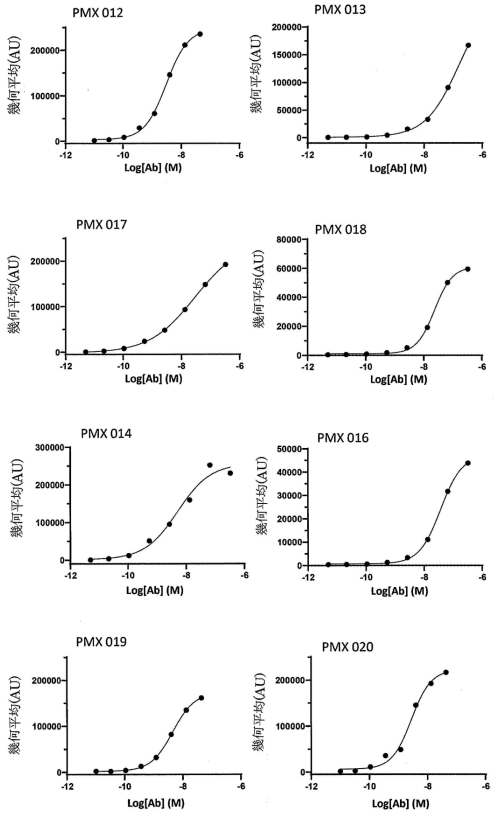
【図９】

Fig. 9



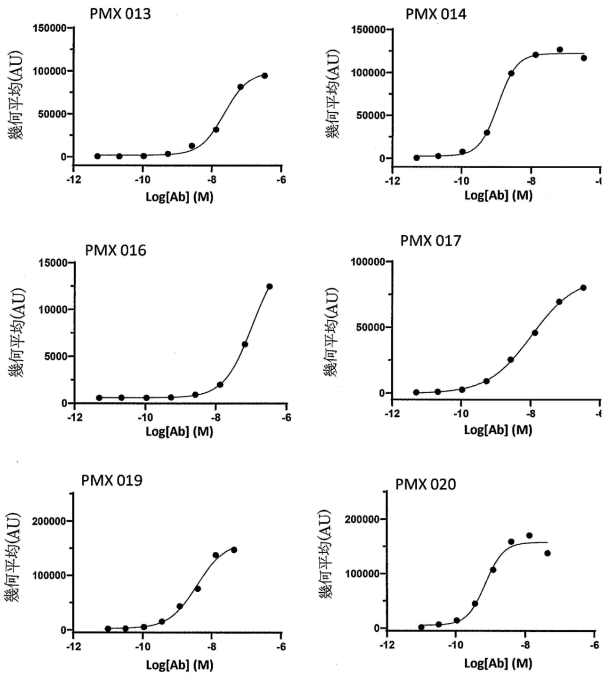
【図１０】

Fig. 10



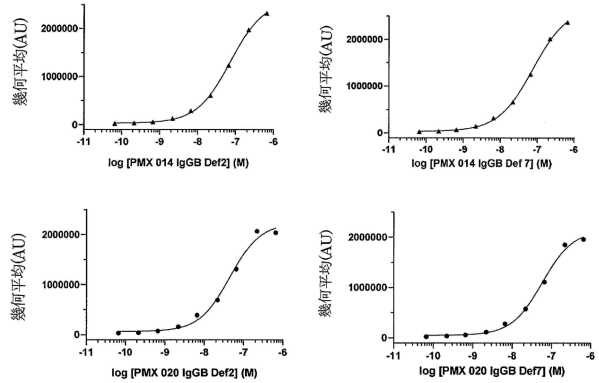
【図１１】

Fig. 11



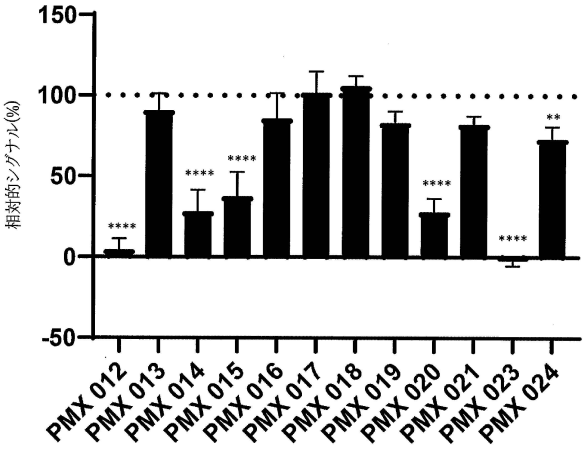
【図１２】

Fig. 12



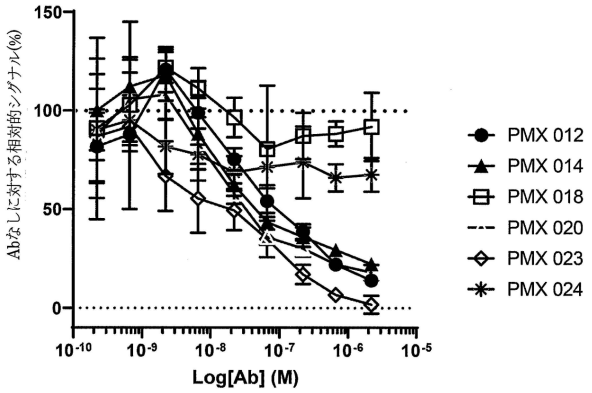
【図１３】

Fig. 13



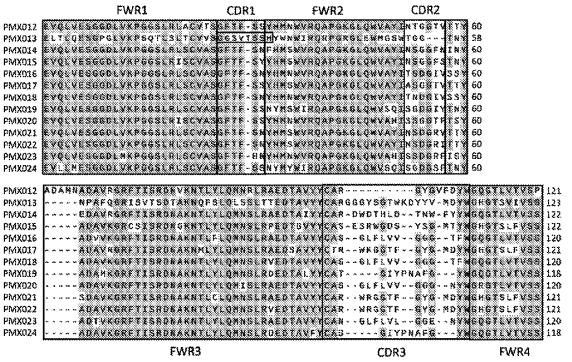
【図１４】

Fig. 14



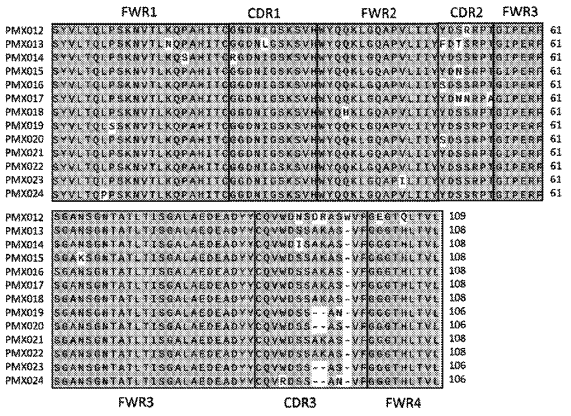
【図１５】

Fig. 15



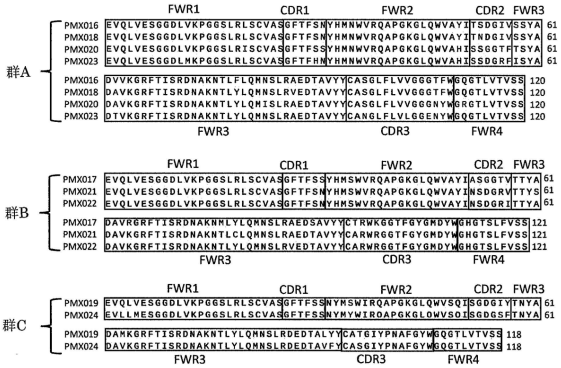
【図１６】

Fig. 16



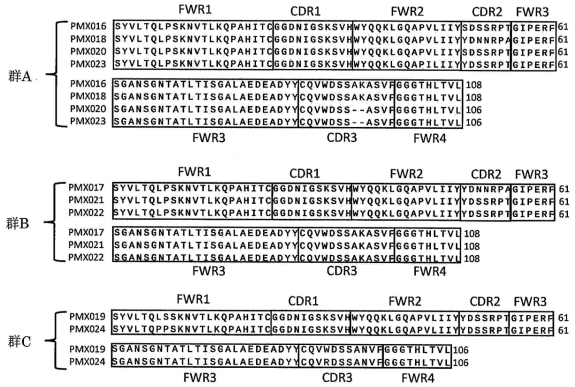
【図１７】

Fig. 17



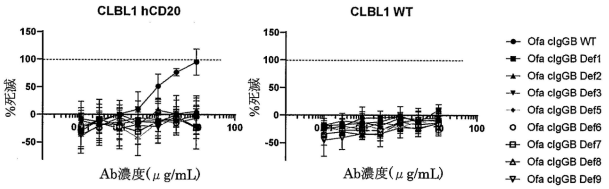
【図１８】

Fig. 18



【図１９】

Fig. 19



【配列表】

2023540444000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2021/052043

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/28 C07K14/705 A61P17/00 A61P29/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2017/137843 A1 (MEBATSION TESHOME [US] ET AL) 18 May 2017 (2017-05-18) paragraph [0074] - paragraph [0077]; sequence 12 example 2	1-7
X	WO 2005/094879 A2 (AMGEN INC [US]; ABGENIX INC [US] ET AL.) 13 October 2005 (2005-10-13) paragraphs [0002], [0230] paragraph [0151]	1-5, 8-24,27
X	WO 2007/133290 A2 (GENENTECH INC [US]; MARTIN FLAVIUS [US]) 22 November 2007 (2007-11-22) page 1, line 10 - line 11 page 2, line 13 - line 20 page 6, line 31 - page 7, line 8	1-5, 8-24,27

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
29 October 2021	13/01/2022

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Sitch, David

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

International application No.
PCT/GB2021/052043

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. [X] forming part of the international application as filed:

      [X] in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      [ ] on paper or in the form of an image file.

   b. [ ] furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      [ ] in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

      [ ] on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. [ ] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2021/052043

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

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

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

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

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

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

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

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims;; it is covered by claims Nos.:
1-24, 27

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/GB2021/052043

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-24, 27

An antibody or fragment thereof that specifically binds to companion animal OX40L; matter related thereto

---

2. claims: 25, 26

An isolated canine OX40 protein comprising SEQ ID NO. 4 or 6 or a variant thereof; mattter related thereto

---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/GB2021/052043

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2017137843 A1	18-05-2017	AU 2013221502 A1	28-08-2014
		BR 112014020019 A2	04-07-2017
		CA 2864119 A1	22-08-2013
		CN 104203271 A	10-12-2014
		EA 201400912 A1	30-01-2015
		EP 2814506 A1	24-12-2014
		EP 3466443 A1	10-04-2019
		ES 2723273 T3	23-08-2019
		ES 2866108 T3	19-10-2021
		HK 1200327 A1	07-08-2015
		JP 6260972 B2	17-01-2018
		JP 2015511948 A	23-04-2015
		MX 360415 B	31-10-2018
		NZ 628270 A	30-09-2016
		NZ 722700 A	22-12-2017
		US 2013209511 A1	15-08-2013
		US 2017137843 A1	18-05-2017
		WO 2013123242 A1	22-08-2013
WO 2005094879 A2	13-10-2005	AU 2005229009 A1	13-10-2005
		CA 2560889 A1	13-10-2005
		EP 1740208 A2	10-01-2007
		JP 2007530045 A	01-11-2007
		US 2006002929 A1	05-01-2006
		WO 2005094879 A2	13-10-2005
WO 2007133290 A2	22-11-2007	AR 057253 A1	21-11-2007
		AU 2006343459 A1	22-11-2007
		BR PI0621065 A2	29-11-2011
		CA 2633602 A1	22-11-2007
		CN 101374865 A	25-02-2009
		CR 10069 A	10-10-2008
		EC SP088543 A	30-07-2008
		EP 1973949 A2	01-10-2008
		JP 2009519718 A	21-05-2009
		KR 20080080639 A	04-09-2008
		MA 30153 B1	02-01-2009
		TW 200732349 A	01-09-2007
		US 2009053230 A1	26-02-2009
		US 2010272738 A1	28-10-2010
		WO 2007133290 A2	22-11-2007
		ZA 200804868 B	28-10-2009

フロントページの続き

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）
A61P	*37/06*	*(2006.01)*	A61P	29/00		
A61P	*43/00*	*(2006.01)*	A61P	37/06		
A61K	*45/00*	*(2006.01)*	A61P	43/00	121	
A61K	*47/68*	*(2017.01)*	A61K	45/00		
G01N	*33/53*	*(2006.01)*	A61K	47/68		
			G01N	33/53	D	

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

（特許庁注：以下のものは登録商標）

１．ＴＲＩＴＯＮ

ＦＨ・バブラハム・バブラハム・リサーチ・キャンパス・ビルディング・９４０・ペットメディックス・リミテッド内

(72)発明者　アンドリュー・ジェームズ・トンプソン
イギリス・ケンブリッジ・ＣＢ２２・３ＦＨ・バブラハム・バブラハム・リサーチ・キャンパス・ビルディング・９４０・ペットメディックス・リミテッド内

(72)発明者　ダニエル・ジョン・ボーランド
イギリス・ケンブリッジ・ＣＢ２２・３ＦＨ・バブラハム・バブラハム・リサーチ・キャンパス・ビルディング・９４０・ペットメディックス・リミテッド内

(72)発明者　ジュエシュアン・ワン
イギリス・ケンブリッジ・ＣＢ２２・３ＦＨ・バブラハム・バブラハム・リサーチ・キャンパス・ビルディング・９４０・ペットメディックス・リミテッド内

(72)発明者　ロベルト・バンディエラ
イギリス・ケンブリッジ・ＣＢ２２・３ＦＨ・バブラハム・バブラハム・リサーチ・キャンパス・ビルディング・９４０・ペットメディックス・リミテッド内

(72)発明者　スティーヴ・ホームズ
イギリス・ケンブリッジ・ＣＢ２２・３ＦＨ・バブラハム・バブラハム・リサーチ・キャンパス・ビルディング・９４０・ペットメディックス・リミテッド内

Ｆターム（参考）　4C076　AA95 CC05 CC07 EE41 EE59 FF68
4C084　AA19 NA05 ZB081 ZB111 ZC611 ZC751
4C085　AA13 AA16 AA25 BB11 BB31 BB41 BB43 CC05 CC21 CC22 EE01 EE03 GG01
4H045　AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA75 DA76 EA20 FA74 GA26