

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-549555

(P2023-549555A)

(43)公表日 令和5年11月27日(2023.11.27)

(51)国際特許分類			F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/13	(2006.01)	C 1 2 N	15/13	Z N A	4 B 0 6 4
C 1 2 N	15/63	(2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	4 B 0 6 5
C 0 7 K	16/28	(2006.01)	C 0 7 K	16/28		4 C 0 8 4
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P	21/02	C	4 C 0 8 5
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08		4 H 0 4 5
			審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全305頁) 最終頁に続く
(21)出願番号			特願2023-529918(P2023-529918)		(71)出願人	
(86)(22)出願日			令和3年11月18日(2021.11.18)		520046487	
(85)翻訳文提出日			令和5年7月11日(2023.7.11)		パイオニア イミュノセラピューティクス	
(86)国際出願番号			PCT/US2021/059955		インコーポレイテッド	
(87)国際公開番号			WO2022/109178		アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォル	
(87)国際公開日			令和4年5月27日(2022.5.27)		ニア州 サウス サンフランシスコ タワー	
(31)優先権主張番号			63/115,272		プレイス 2 スイート 8 0 0	
(32)優先日			令和2年11月18日(2020.11.18)		(74)代理人	
(33)優先権主張国・地域又は機関			米国(US)		100102978	
(31)優先権主張番号			63/244,662		弁理士 清水 初志	
(32)優先日			令和3年9月15日(2021.9.15)		(74)代理人	
(33)優先権主張国・地域又は機関			米国(US)		100205707	
(81)指定国・地域			AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA		弁理士 小寺 秀紀	
			最終頁に続く		(74)代理人	
					100160923	
					弁理士 山口 裕孝	
					(74)代理人	
					100119507	
					弁理士 刑部 俊	
					(74)代理人	
					100142929	
					最終頁に続く	

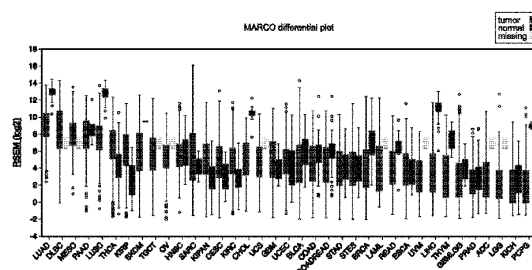
(54)【発明の名称】 抗M A R C O抗体及びその使用

(57)【要約】

本明細書では、抗M A R C O抗体が提供される。抗M A R C O抗体を生成及び使用する方法も提供される。

【選択図】図1

FIG. 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

コラーゲン構造を有するヒトマクロファージ受容体（MARCO）（配列番号：384）のスカベンジャー受容体システインリッチ（SRCR）ドメイン（配列番号384の残基424～519）に結合する、単離抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 2】

前記抗体が、3つの重鎖CDR配列、CDR-H1、CDR-H2、及びCDR-H3を含む重鎖可変（VH）配列、ならびに3つの軽鎖CDR配列、CDR-L1、CDR-L2、及びCDR-L3を含む軽鎖可変（VL）配列を含み、

a. CDR-H1が、配列GFSLTSYHVS（配列番号2）を含み、

b. CDR-H2が、配列AIWTGGSLA（配列番号3）を含み、

c. CDR-H3が、配列DLSDYYSSTSFY（配列番号4）を含み、

d. CDR-L1が、配列ASEGISNDLA（配列番号431）またはXASEGISNDLA（配列番号383）を含み、式中、Xはアルギニン（R）またはロイシン（L）であり、

e. CDR-L2が、配列AASRLQD（配列番号8）を含み、

f. CDR-L3が、配列QQSYKYPLT（配列番号9）を含む、

請求項1に記載の単離抗体。

【請求項 3】

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、MARCO（配列番号384）のQ452、Y472、K473、E450、Q487、T499、H505、D507、S509、またはE511のうちの少なくとも1つの残基に結合する、請求項1または2に記載の単離抗体。

【請求項 4】

前記抗体または抗原結合フラグメントが、キメラ、ヒト、ヒト化、またはラットの抗体または抗原結合フラグメントを含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 5】

3つの重鎖CDR配列、CDR-H1、CDR-H2、及びCDR-H3を含む重鎖可変（VH）配列、ならびに3つの軽鎖CDR配列、CDR-L1、CDR-L2、及びCDR-L3を含む軽鎖可変（VL）配列を含む、ヒトMARCO（配列番号384）に結合する単離抗体またはその抗原結合フラグメントであって、

a. CDR-H1が、配列GFSLTSYHVS（配列番号2）を含み、

b. CDR-H2が、配列AIWTGGSLA（配列番号3）を含み、

c. CDR-H3が、配列DLSDYYSSTSFY（配列番号4）を含み、

d. CDR-L1が、配列ASEGISNDLA（配列番号431）またはXASEGISNDLA（配列番号383）を含み、式中、Xはアルギニン（R）またはロイシン（L）であり、

e. CDR-L2が、配列AASRLQD（配列番号8）を含み、

f. CDR-L3が、配列QQSYKYPLT（配列番号9）を含む、

前記単離抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 6】

CDR-L1が、配列ASEGISNDLA（配列番号431）を含む、請求項5に記載の単離抗体。

【請求項 7】

CDR-L1が、配列RASEGISNDLA（配列番号27）を含む、請求項5に記載の単離抗体。

【請求項 8】

CDR-L1が、配列LASEGISNDLA（配列番号7）を含む、請求項5に記載の単離抗体。

【請求項 9】

前記 V H 配列が、配列番号 6 1 に記載の V H 配列を含む、請求項 5 ～ 7 のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 1 0】

前記 V H 配列が、配列番号 1 1 1 に記載の V H 配列を含む、請求項 5 ～ 7 のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 1 1】

前記 V H 配列が、配列番号 1、1 1、2 1、3 1、4 1、5 1、6 1、7 1、8 1、9 1、1 0 1、1 1 1、1 2 1、1 3 1、4 3 4、4 4 4、及び 4 7 4 に記載の配列から選択される配列を含む、請求項 5 ～ 8 のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 1 2】

前記 V L 配列が、配列番号 6 6 に記載の V L 配列を含む、請求項 5 ～ 1 1 のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 1 3】

前記 V L 配列が、配列番号 1 1 6 に記載の V L 配列を含む、請求項 5 ～ 1 1 のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 1 4】

前記 V L 配列が、配列番号 6、1 6、2 6、3 6、4 6、5 7、6 6、7 6、8 6、9 6、1 0 6、1 1 6、1 2 6、1 3 6、4 3 9、4 4 9、及び 4 7 9 に記載の配列から選択される配列を含む、請求項 5 ～ 1 1 のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 1 5】

前記 V H 配列が、配列番号 6 1 に記載の V H 配列を含み、前記 V L 配列が、配列番号 6 6 に記載の V L 配列を含む、請求項 5 ～ 1 4 のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 1 6】

前記 V H 配列が、配列番号 1 1 1 に記載の V H 配列を含み、前記 V L 配列が、配列番号 1 1 6 に記載の V L 配列を含む、請求項 5 ～ 1 4 のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 1 7】

前記 V H 配列が、配列番号 1、1 1、2 1、3 1、4 1、5 1、6 1、7 1、8 1、9 1、1 0 1、1 1 1、1 2 1、1 3 1、4 3 4、4 4 4、及び 4 7 4 に記載の配列から選択される配列を含み、前記 V L 配列が、配列番号 6、1 6、2 6、3 6、4 6、5 7、6 6、7 6、8 6、9 6、1 0 6、1 1 6、1 2 6、1 3 6、4 3 9、4 4 9、及び 4 7 9 に記載の配列から選択される配列を含む、請求項 5 ～ 1 4 のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 1 8】

前記 V H 配列が、配列番号 1、1 1、2 1、3 1、4 1、5 1、6 1、7 1、8 1、9 1、1 0 1、1 1 1、1 2 1、1 3 1、4 3 4、4 4 4、及び 4 7 4 に記載の配列から選択される配列に対して、少なくとも 9 0 %、9 2 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % の同一性を有する配列を含み、及び／または前記 V L 配列が、配列番号 6、1 6、2 6、3 6、4 6、5 7、6 6、7 6、8 6、9 6、1 0 6、1 1 6、1 2 6、1 3 6、4 3 9、4 4 9、及び 4 7 9 に記載の配列から選択される配列に対して、少なくとも 9 0 %、9 2 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % の同一性を有する配列を含む、請求項 5 ～ 1 4 のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 1 9】

配列番号 6 5 に記載の重鎖配列を含む、請求項 5 ～ 1 8 のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 2 0】

配列番号 1 1 5 に記載の重鎖配列を含む、請求項 5 ～ 1 8 のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 2 1】

配列番号 5、1 5、1 2 5、3 5、4 5、5 5、6 5、7 5、8 5、9 5、1 0 5、1 1 5、1 2 5、1 4 5、4 3 8、4 4 8、及び 4 7 8 に記載の配列から選択される重鎖配

10

20

30

40

50

列を含む、請求項 5 ～ 20 のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 22】

配列番号 70 に記載の軽鎖配列を含む、請求項 5 ～ 21 のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 23】

配列番号 120 に記載の軽鎖配列を含む、請求項 5 ～ 21 のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 24】

配列番号 10、20、30、40、50、6、70、80、90、100、110、120、130、140、443、453、及び 483 に記載の配列から選択される軽鎖配列を含む、請求項 5 ～ 23 のいずれか一項に記載の単離抗体。

10

【請求項 25】

配列番号 65 に記載の重鎖配列、及び配列番号 70 に記載の軽鎖配列を含む、請求項 5 ～ 24 のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 26】

配列番号 115 に記載の重鎖配列、及び配列番号 120 に記載の軽鎖配列を含む、請求項 5 ～ 24 のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 27】

配列番号 5、15、125、35、45、55、65、75、85、95、105、115、125、145、438、448、及び 478 に記載の配列から選択される重鎖配列、及び配列番号 10、20、30、40、50、6、70、80、90、100、110、120、130、140、443、453、及び 483 に記載の配列から選択される軽鎖配列を含む、請求項 5 ～ 24 のいずれか一項に記載の単離抗体。

20

【請求項 28】

配列番号 5、15、125、35、45、55、65、75、85、95、105、115、125、145、438、448、及び 478 に記載の配列から選択される配列に対して少なくとも 90%、92%、95%、97%、98%、または 99% の同一性を有する重鎖配列、及び／または配列番号 10、20、30、40、50、6、70、80、90、100、110、120、130、140、443、453、及び 483 に記載の配列から選択される配列に対して少なくとも 90%、92%、95%、97%、98%、または 99% の同一性を有する軽鎖配列を含む、請求項 5 ～ 24 のいずれか一項に記載の単離抗体。

30

【請求項 29】

3つの重鎖 CDR 配列、CDR-H1、CDR-H2、及び CDR-H3 を含む重鎖可変 (VH) 配列、ならびに 3つの軽鎖 CDR 配列、CDR-L1、CDR-L2、及び CDR-L3 を含む軽鎖可変 (VL) 配列を含む、ヒト MARCO (配列番号 384) に結合する単離抗体またはその抗原結合フラグメントであって、

a. CDR-H1 が、配列 GYTFTDYAVN (配列番号 232) を含み、

b. CDR-H2 が、配列 WINTQTGKPT (配列番号 233) を含み、

c. CDR-H3 が、配列 DSYYS S S SLDY (配列番号 234) を含み、

40

d. CDR-L1 が、配列 ASAGISNDLA (配列番号 432) または XASAGISNDLA (配列番号 381) を含み、式中、X はアルギニン (R) またはロイシン (L) であり、

e. CDR-L2 が、配列 AASRLQD (配列番号 238) を含み、

f. CDR-L3 が、配列 QQS Y K Y PWT (配列番号 239) を含む、

前記単離抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 30】

CDR-L1 が、配列 ASAGISNDLA (配列番号 432) を含む、請求項 29 に記載の単離抗体。

【請求項 31】

50

C D R - L 1 が、配列 R A S A G I S N D L A (配列番号 3 1 7) を含む、請求項 2 9 に記載の単離抗体。

【請求項 3 2】

C D R - L 1 が、配列 L A S A G I S N D L A (配列番号 2 3 7) を含む、請求項 2 9 に記載の単離抗体。

【請求項 3 3】

前記 V H 配列が、配列番号 4 5 4 に記載の V H 配列を含む、請求項 2 9 ～ 3 2 のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 3 4】

前記 V H 配列が、配列番号 2 4 1、3 1 1、3 2 1、3 3 1、3 4 1、3 5 1、4 5 4、及び 4 6 4 に記載の配列から選択される配列を含む、請求項 2 9 ～ 3 2 のいずれか一項に記載の単離抗体。

10

【請求項 3 5】

前記 V L 配列が、配列番号 4 5 9 に記載の V L 配列を含む、請求項 2 9 ～ 3 4 のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 3 6】

前記 V L 配列が、配列番号 2 4 6、3 1 6、3 2 6、3 3 6、3 4 6、3 5 6、4 5 9、及び 4 6 9 に記載の配列から選択される配列を含む、請求項 2 9 ～ 3 4 のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 3 7】

20

前記 V H 配列が、配列番号 4 5 4 に記載の V H 配列を含み、前記 V L 配列が、配列番号 4 5 9 に記載の V L 配列を含む、請求項 2 9 ～ 3 6 のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 3 8】

前記 V H 配列が、配列番号 2 4 1、3 1 1、3 2 1、3 3 1、3 4 1、3 5 1、4 5 4、及び 4 6 4 に記載の配列から選択される配列を含み、前記 V L 配列が、配列番号 2 4 6、3 1 6、3 2 6、3 3 6、3 4 6、3 5 6、4 5 9、及び 4 6 9 に記載の配列から選択される配列を含む、請求項 2 9 ～ 3 6 のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 3 9】

前記 V H 配列が、配列番号 2 4 1、3 1 1、3 2 1、3 3 1、3 4 1、3 5 1、4 5 4、及び 4 6 4 に記載の配列から選択される配列に対して、少なくとも 9 0 %、9 2 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % の同一性を有する配列を含み、及び／または前記 V L 配列が、配列番号 2 4 6、3 1 6、3 2 6、3 3 6、3 4 6、3 5 6、4 5 9、及び 4 6 9 に記載の配列から選択される配列に対して、少なくとも 9 0 %、9 2 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % の同一性を有する配列を含む、請求項 2 9 ～ 3 6 のいずれか一項に記載の単離抗体。

30

【請求項 4 0】

配列番号 4 5 8 に記載の重鎖配列を含む、請求項 2 9 ～ 3 8 のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 4 1】

配列番号 2 4 5、3 1 5、3 2 5、3 3 5、3 4 5、3 5 5、4 5 8、及び 4 6 8 に記載の配列から選択される重鎖配列を含む、請求項 2 9 ～ 3 8 のいずれか一項に記載の単離抗体。

40

【請求項 4 2】

配列番号 4 6 3 に記載の軽鎖配列を含む、請求項 2 9 ～ 4 1 のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 4 3】

配列番号 2 5 0、3 2 0、3 3 0、3 4 0、3 5 0、3 6 0、4 6 3、及び 4 7 3 に記載の配列から選択される軽鎖配列を含む、請求項 2 9 ～ 4 1 のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 4 4】

50

配列番号 458 に記載の重鎖配列、及び配列番号 463 に記載の軽鎖配列を含む、請求項 29～43 のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 45】

配列番号 245、315、325、335、345 355、458、及び 468 に記載の配列から選択される重鎖配列、及び配列番号 250、320、330、340、350、360、463、及び 473 に記載の配列から選択される軽鎖配列を含む、請求項 29～43 のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 46】

配列番号 245、315、325、335、345 355、458、及び 468 に記載の配列から選択される配列に対して少なくとも 90%、92%、95%、97%、98%、または 99% の同一性を有する重鎖配列、及び／または配列番号 250、320、330、340、350、360、463、及び 473 に記載の配列から選択される配列に対して少なくとも 90%、92%、95%、97%、98%、または 99% の同一性を有する軽鎖配列を含む、請求項 29～43 のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 47】

3つの重鎖 CDR 配列、CDR-H1、CDR-H2、及び CDR-H3 を含む重鎖可変 (VH) 配列、ならびに 3つの軽鎖 CDR 配列、CDR-L1、CDR-L2、及び CDR-L3 を含む軽鎖可変 (VL) 配列を含む、ヒト MARCO (配列番号 384) に結合する単離抗体またはその抗原結合フラグメントであって、

- a. CDR-H1 が、配列 KFTFSNYGMN (配列番号 142) を含み、
- b. CDR-H2 が、配列 LIYYNSNNKY (配列番号 143) を含み、
- c. CDR-H3 が、配列 SLTGGS DYFDS (配列番号 144) を含み、
- d. CDR-L1 が、配列 ASKSIGTFLA (配列番号 433) または XASKS IGTFLA (配列番号 382) を含み、式中、X はアルギニン (R) またはリジン (K) であり、
- e. CDR-L2 が、配列 SGSTLQS (配列番号 148) を含み、
- f. CDR-L3 は、配列 QQHDEYPFT (配列番号 149) を含む、

前記単離抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 48】

CDR-L1 が、配列 ASKSIGTFLA (配列番号 433) を含む、請求項 47 に記載の単離抗体。

【請求項 49】

CDR-L1 が、配列 KASKSIGTFLA (配列番号 147) を含む、請求項 47 に記載の単離抗体。

【請求項 50】

CDR-L1 が、配列 RASKSIGTFLA (配列番号 157) を含む、請求項 47 に記載の単離抗体。

【請求項 51】

前記 VH 配列が、配列番号 141、151、161、171、181、191、201、211、及び 221 に記載の配列から選択される配列を含む、請求項 47～50 のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 52】

前記 VL 配列が、配列番号 146、156、166、176、186、196、206、216、及び 226 に記載の配列から選択される配列を含む、請求項 47～51 のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 53】

前記 VH 配列が、配列番号 141、151、161、171、181、191、201、211、及び 221 に記載の配列から選択される配列を含み、前記 VL 配列が、配列番号 146、156、166、176、186、196、206、216、及び 226 に記載の配列から選択される配列を含む。請求項 47～52 のいずれか一項に記載の単離抗体

。

【請求項 5 4】

前記 V H 配列が、配列番号 1 4 1、1 5 1、1 6 1、1 7 1、1 8 1、1 9 1、2 0 1、2 1 1、及び 2 2 1 に記載の配列から選択される配列に対して、少なくとも 9 0 %、9 2 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % の同一性を有する配列を含み、及び／または前記 V L 配列が、配列番号 1 4 6、1 5 6、1 6 6、1 7 6、1 8 6、1 9 6、2 0 6、2 1 6、及び 2 2 6 に記載の配列から選択される配列に対して、少なくとも 9 0 %、9 2 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % の同一性を有する配列を含む、請求項 4 7 ～ 5 2 のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 5 5】

配列番号 1 4 5、1 5 5、1 6 5、1 7 5、1 8 5、1 9 5、2 0 5、2 1 5、及び 2 2 5 に記載の配列から選択される重鎖配列を含む、請求項 4 7 ～ 5 4 のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 5 6】

配列番号 1 5 0、1 6 0、1 7 0、1 8 0、1 9 0、2 0 0、2 1 0、2 2 0、及び 2 3 0 に記載の配列から選択される軽鎖配列を含む、請求項 4 7 ～ 5 5 のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 5 7】

配列番号 1 4 5、1 5 5、1 6 5、1 7 5、1 8 5、1 9 5、2 0 5、2 1 5、及び 2 2 5 に記載の配列から選択される重鎖配列、及び配列番号 1 5 0、1 6 0、1 7 0、1 8 0、1 9 0、2 0 0、2 1 0、2 2 0、及び 2 3 0 に記載の配列から選択される軽鎖配列を含む、請求項 4 7 ～ 5 6 のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 5 8】

配列番号 1 4 5、1 5 5、1 6 5、1 7 5、1 8 5、1 9 5、2 0 5、2 1 5、及び 2 2 5 に記載の配列から選択される配列に対して、少なくとも 9 0 %、9 2 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % の同一性を有する配列を含む重鎖配列、及び／または配列番号 1 5 0、1 6 0、1 7 0、1 8 0、1 9 0、2 0 0、2 1 0、2 2 0、及び 2 3 0 に記載の配列から選択される配列に対して、少なくとも 9 0 %、9 2 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % の同一性を有する配列を含む軽鎖配列を含む、請求項 4 7 ～ 5 4 のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 5 9】

3 つの重鎖 C D R 配列、C D R - H 1、C D R - H 2、及び C D R - H 3 を含む重鎖可変 (V H) 配列、ならびに 3 つの軽鎖 C D R 配列、C D R - L 1、C D R - L 2、及び C D R - L 3 を含む軽鎖可変 (V L) 配列を含む、ヒト M A R C O (配列番号 3 8 4) に結合する単離抗体またはその抗原結合フラグメントであって、

- a. C D R - H 1 が、配列 G Y T F T D Y Y L H (配列番号 2 5 2) を含み、
- b. C D R - H 2 が、配列 Y I N P N N A Y T S (配列番号 2 5 3) を含み、
- c. C D R - H 3 が、配列 D T T D Y Y N L H F A Y (配列番号 2 5 4) を含み、
- d. C D R - L 1 が、配列 L T S E G I S N D L A (配列番号 2 5 7) を含み、
- e. C D R - L 2 が、配列 D A S R L E D (配列番号 2 5 8) を含み、
- f. C D R - L 3 が、配列 Q Q S Y K Y P L T (配列番号 2 5 9) を含む、

前記単離抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 6 0】

前記 V H 配列が、配列番号 2 5 1 または 2 6 1 に記載の配列を含む、請求項 5 9 に記載の単離抗体。

【請求項 6 1】

前記 V L 配列が、配列番号 2 5 6 または 2 6 6 に記載の配列を含む、請求項 5 9 または 6 0 に記載の単離抗体。

【請求項 6 2】

前記 V H 配列が、配列番号 2 5 1 または 2 6 1 に記載の配列を含み、前記 V L 配列が、

配列番号 2 5 6 または 2 6 6 に記載の配列を含む、請求項 5 9 ～ 6 1 のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 6 3】

前記 V H 配列が、配列番号 2 5 1 または 2 6 1 に記載の配列と少なくとも 9 0 %、9 2 %、9 5 %、9 7 %、9 8、または 9 9 % の同一性を有する配列を含み、及び／または前記 V L 配列が、配列番号 2 5 6 または 2 6 6 に記載の配列と少なくとも 9 0 %、9 2 %、9 5 %、9 7 %、9 8、または 9 9 % の同一性を有する配列を含む、請求項 5 9 ～ 6 1 のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 6 4】

配列番号 2 5 5 または 2 6 5 に記載の重鎖配列を含む、請求項 5 9 ～ 6 2 のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 6 5】

配列番号 2 6 0 または 2 7 0 に記載の軽鎖配列を含む、請求項 5 9 ～ 6 4 のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 6 6】

配列番号 2 5 5 または 2 6 5 に記載の重鎖配列、及び配列番号 2 6 0 または 2 7 0 に記載の軽鎖配列を含む、請求項 5 9 ～ 6 5 のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 6 7】

配列番号 2 5 5 または 2 6 5 に記載の配列と少なくとも 9 0 %、9 2 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % の同一性を有する配列を含む重鎖配列、及び配列番号 2 6 0 または 2 7 0 に記載の配列と少なくとも 9 0 %、9 2 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % の同一性を有する配列を含む軽鎖配列を含む、請求項 5 9 ～ 6 5 のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 6 8】

3 つの重鎖 C D R 配列、C D R - H 1、C D R - H 2、及び C D R - H 3 を含む重鎖可変 (V H) 配列、ならびに 3 つの軽鎖 C D R 配列、C D R - L 1、C D R - L 2、及び C D R - L 3 を含む軽鎖可変 (V L) 配列を含む、ヒト M A R C O (配列番号 3 8 4) に結合する単離抗体またはその抗原結合フラグメントであって、

- a. C D R - H 1 が、配列 G F S L T S Y T L S (配列番号 3 6 2) を含み、
- b. C D R - H 2 が、配列 A I W G G D N T D (配列番号 3 6 3) を含み、
- c. C D R - H 3 が、配列 E L G G S F D Y (配列番号 3 6 4) を含み、
- d. C D R - L 1 が、配列 K T S Q N I N K K L D (配列番号 3 6 7) を含み、
- e. C D R - L 2 が、配列 Y T N N L Q T (配列番号 3 6 8) を含み、
- f. C D R - L 3 が、配列 Y Q Y D S G F T (配列番号 3 6 9) を含む、

前記単離抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 6 9】

前記 V H 配列が、配列番号 3 6 1 または 3 7 1 に記載の配列を含む、請求項 6 8 に記載の単離抗体。

【請求項 7 0】

前記 V L 配列が、配列番号 3 6 6 または 3 7 6 に記載の配列を含む、請求項 6 8 または 6 9 に記載の単離抗体。

【請求項 7 1】

前記 V H 配列が、配列番号 3 6 1 または 3 7 1 に記載の配列を含み、前記 V L 配列が、配列番号 3 6 6 または 3 7 6 に記載の配列を含む、請求項 6 8 ～ 7 0 のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 7 2】

前記 V H 配列が、配列番号 3 6 1 または 3 7 1 に記載の配列と少なくとも 9 0 %、9 2 %、9 5 %、9 7 %、9 8、または 9 9 % の同一性を有する配列を含み、及び／または前記 V L 配列が、配列番号 3 6 6 または 3 7 6 に記載の配列と少なくとも 9 0 %、9 2 %、9 5 %、9 7 %、9 8、または 9 9 % の同一性を有する配列を含む、請求項 6 8 ～ 7 0 の

10

20

30

40

50

いずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 7 3】

配列番号 3 6 5 または 3 7 5 に記載の重鎖配列、及び配列番号 3 7 0 または 3 8 0 に記載の軽鎖配列を含む、請求項 6 8 ～ 7 2 のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 7 4】

配列番号 3 6 5 または 3 7 5 に記載の配列と少なくとも 9 0 %、9 2 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % の同一性を有する配列を含む重鎖配列、及び配列番号 3 7 0 または 3 8 0 に記載の配列と少なくとも 9 0 %、9 2 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % の同一性を有する配列を含む軽鎖配列を含む、請求項 6 8 ～ 7 2 のいずれか一項に記載の単離抗体。

10

【請求項 7 5】

モノクローナル抗体、中和抗体、アンタゴニスト抗体、アゴニスト抗体、ポリクローナル抗体、アフコシル化抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、全長抗体、及び s c F v である、上記請求項のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 7 6】

s c F v である、上記請求項のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 7 7】

モノクローナル抗体である、上記請求項のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 7 8】

ヒト化抗体である、上記請求項のいずれか一項に記載の単離抗体。

20

【請求項 7 9】

ヒト抗体である、上記請求項のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 8 0】

F c 領域を含む、上記請求項のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 8 1】

前記 F c 領域が、ヒト F c 領域を含む、上記請求項のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 8 2】

活性ヒト F c 領域を含む、上記請求項のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 8 3】

I g G、I g A、I g D、I g E、及び I g M から選択されるクラスの重鎖ヒト定常領域を含む、上記請求項のいずれか一項に記載の単離抗体。

30

【請求項 8 4】

クラス I g G ならびに、I g G 1、I g G 2、I g G 3、及び I g G 4 から選択されるサブクラスのヒト重鎖定常領域を含む、上記請求項のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 8 5】

前記ヒト F c 領域が、野生型ヒト I g G 1 F c 領域を含む、請求項 8 4 に記載の単離抗体。

【請求項 8 6】

前記ヒト F c 領域が、野生型ヒト I g G 4 F c 領域を含む、請求項 8 4 に記載の単離抗体。

40

【請求項 8 7】

前記 F c 領域が、1 つまたは複数のアミノ酸置換を含み、前記 1 つまたは複数の置換が、前記 1 つまたは複数の置換がない F c 領域と比較して、抗体半減期の増加、A D C C 活性の増加、A D C P 活性の増加、C D C 活性の増加、A D C C 活性の減少、A D C P 活性の減少、または C D C 活性の減少をもたらす、請求項 8 0 ～ 8 6 のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 8 8】

前記 F c 領域が、F c γ R I、F c γ R I I a、F c γ R I I b、F c γ R I I c、F c γ R I I I a、及び F c γ R I I I b からなる群から選択される F c γ 受容体に結合する、請求項 8 0 ～ 8 4 のいずれか一項に記載の単離抗体。

50

【請求項 89】

表面プラズモン共鳴（SPR）アッセイによって測定される、約 0.5、1、2、3、4、5、6、または 7×10^{-9} M 以下の K_D でヒト MARCO に結合する、上記請求項のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 90】

前記抗体のヒト MARCO への結合が、二価カチオン依存性である、上記請求項のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 91】

前記抗体のヒト MARCO への前記結合が、二価カチオン非依存性である、請求項 1 ～ 89 のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 92】

前記二価カチオンが、 Ca^{2+} または Mg^{2+} を含む、請求項 90 または 91 に記載の単離抗体。

【請求項 93】

ヒト MARCO の細胞外ドメインに結合する、上記請求項のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 94】

可溶性 MARCO に結合する、上記請求項のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 95】

ヒト MARCO、カニクイザル MARCO、またはヒト及びカニクイザル MARCO の前記 SRCR ドメインに結合する、上記請求項のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 96】

ヒト MARCO の前記 SRCR ドメイン（配列番号 384 の残基 424 ～ 519）に結合する、請求項 95 に記載の単離抗体。

【請求項 97】

前記抗体またはその抗原結合フラグメントが、MARCO（配列番号 384）の Q452、Y472、K473、E450、Q487、T499、H505、D507、S509、または E511 のうちの少なくとも 1 つに結合する、請求項 96 に記載の単離抗体。

【請求項 98】

受容体リガンド遮断活性を有する、上記請求項のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 99】

任意に核酸アッセイまたはタンパク質アッセイによって測定される、アイソタイプ対照抗体と比較しての、細胞との接触時の少なくとも 1 つのサイトカインまたはケモカインの増強された発現を誘導する、上記請求項のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 100】

前記少なくとも 1 つのサイトカインまたはケモカインが、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL7R、IL-12、IL12-p70、IL-15、IL-18、IL-27、IP-10、IFN- γ 、TNF α 、MIP1- α 、MIP1- β 、MIP-2、CSF2、CSF3、G-CSF、M-CSF、CCL3、CCL4、CCL5、CCL20、CCL24、CXCL1、CXCL3、CXCL8、CXCL9、CXCL10、CXCL12、gro- α 、MCP-1、MCP-3、LIF、またはエオタキシンのうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 99 に記載の単離抗体。

【請求項 101】

細胞接触時に、任意に核酸アッセイまたはタンパク質アッセイによって測定される、アイソタイプ対照抗体と比較しての、増強された NK 細胞活性化、B 細胞制御 T 細胞増殖、T 細胞活性化、または T 細胞分化を誘導する、上記請求項のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 102】

細胞接触時に、アイソタイプ対照抗体と比較して、IL-2-STAT5 シグナル伝達、NF- κ B シグナル伝達、TLR シグナル伝達、接着及び運動性シグナル伝達、細胞骨

10

20

30

40

50

格再構成シグナル伝達、NF-κBを介したTNFαシグナル伝達、IL-6-JAK-STAT3シグナル伝達、SYKシグナル伝達、MAPKシグナル伝達、TPL2シグナル伝達、カルシウムシグナル伝達、IFNγ応答、またはIFNα応答を誘導する、上記請求項のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項103】

細胞接触時に、アイソタイプ対照抗体と比較して、細胞周期経路、細胞生存、細胞接着、Myc標的経路、E2F標的経路、低酸素、mTORシグナル伝達経路、PI3K-AKTシグナル伝達経路、Srcシグナル伝達経路、PKCシグナル伝達経路、上皮間葉移行シグナル伝達経路、酸化的リン酸化、またはMAPKシグナル伝達経路を減少させる、上記請求項のいずれか一項に記載の単離抗体。

10

【請求項104】

細胞接触時に、アイソタイプ対照抗体と比較して、IL-1β及び／またはIL-18分泌及び／または食作用によって決定されるインフラマソーム活性化を誘導する、上記請求項のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項105】

細胞接触時に、アイソタイプ対照抗体と比較して、骨髄性M2様TAMsのM1様腫瘍関連マクロファージ（TAM）への再分極、及び／または炎症誘発性単球へのmMDSCの再分極を誘導する、上記請求項のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項106】

細胞接触時に、アイソタイプ対照抗体と比較して、CD8+ T細胞、CD4+ T細胞、NK細胞、樹状細胞、MHCII+マクロファージ、MHCII^{high}単球、またはMHCII^{mid}単球を増加させる、上記請求項のいずれか一項に記載の単離抗体。

20

【請求項107】

細胞接触時に、アイソタイプ対照抗体と比較して、脾臓中のマクロファージ、辺縁帯マクロファージ、濾胞性B細胞、及び／または赤色髄マクロファージを増加させる、上記請求項のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項108】

細胞接触時に、アイソタイプ対照抗体と比較して、TAM、腫瘍関連好中球（TAN）、形質B細胞、辺縁帯B細胞、CD19+ B細胞、MHCII-単球、及び／またはMHCII-マクロファージを減少させる、上記請求項のいずれか一項に記載の単離抗体。

30

【請求項109】

対象への投与時に、アイソタイプ対照抗体と比較して、増強された抗腫瘍記憶応答を誘導する、上記請求項のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項110】

細胞がMARCO+細胞である、上記請求項のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項111】

前記細胞がヒトMARCO+細胞である、上記請求項のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項112】

前記MARCO+細胞が、単球、単球性骨髄由来サプレッサー細胞（mMDSC）、またはマクロファージである、請求項110または111に記載の単離抗体。

40

【請求項113】

前記マクロファージが、腫瘍関連マクロファージ（TAM）または単球由来マクロファージ（MDM）である、請求項112に記載の単離抗体。

【請求項114】

MARCO+細胞の細胞表面上のMARCOに結合する、上記請求項のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項115】

前記抗体が、

a. ヒト化PI-HX-3011、PI-HX-3031、PI-HX-3043、P

50

- I-HX-3061、PI-HX-3092抗体と、ヒトMARCOへの結合を競合する、
- b. ヒトMARCOに結合する、
 - c. カニクイザルMARCOに結合する、
 - d. ヒト及びカニクイザルMARCOに結合する、
 - e. ヒトMARCOのSRCRDメインに結合する、
 - f. カニクイザルMARCOのSRCRDメインに結合する、
 - g. ヒト及びカニクイザルMARCOのSRCRDメインに結合する、
 - h. ヒトまたはカニクイザルMARCOに二価カチオン依存的に結合する、
 - i. ヒトまたはカニクイザルのMARCOに二価カチオン非依存的に結合する、
 - j. MARCO+細胞への結合時に、MARCOシグナル伝達を刺激する、
 - k. MARCO+細胞への結合時に1つまたは複数の免疫シグナル伝達経路を誘導する、
- l. MARCO+細胞への結合時に、サイトカインまたはケモカインの分泌を誘導し、任意に、前記サイトカインまたはケモカインが、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL7R、IL-12、IL12-p70、IL-15、IL-18、IL-27、IP-10、IFN- γ 、TNF α 、MIP1- α 、MIP1- β 、MIP-2、CSF2、CSF3、G-CSF、M-CSF、CCL3、CCL4、CCL5、CCL20、CCL24、CXCL1、CXCL3、CXCL8、CXCL9、CXCL10、CXCL12、gro- α 、MCP-1、MCP-3、LIF、またはエオタキシンである、
- m. MARCO+細胞への結合時にNK細胞の活性化、B細胞の制御、T細胞の増殖、T細胞の活性化、またはT細胞の分化の増加を誘導する、
 - n. IL-2-STAT5シグナル伝達、NF- κ Bシグナル伝達、TLRシグナル伝達、接着及び運動性シグナル伝達、細胞骨格再構成シグナル伝達、NF- κ Bを介したTNF α シグナル伝達、IL-6-JAK-STAT3シグナル伝達、SYKシグナル伝達、MAPKシグナル伝達、TPL2シグナル伝達、カルシウムシグナル伝達、IFN γ 応答、またはIFN α 応答を誘導する、
 - o. 細胞周期経路、細胞生存、細胞接着、Myc標的経路、E2F標的経路、低酸素、mTORシグナル伝達経路、PI3K-AKTシグナル伝達経路、Srcシグナル伝達経路、PKCシグナル伝達経路、上皮間葉移行シグナル伝達経路、酸化的リン酸化、またはMAPKシグナル伝達経路を減少させる、
 - p. IL-1 β 及び／またはIL-18の分泌及び／または食作用によって決定されるインフラマソームの活性を誘導する、
 - q. 骨髄性M2様TAMのM1様TAMSへの再分極、及び／またはmMDSの炎症誘発性単球への再分極を誘導する、
 - r. MARCO+細胞への結合時に、脾臓のB細胞を調節する、
 - s. 脾臓及び／または腫瘍において、CD8+ T細胞、CD4+ T細胞、NK細胞、樹状細胞、MHCII+マクロファージ、MHCII^{high}単球、及び／またはMHCII^{mid}単球を増加させる、
 - t. 脾臓及び／または腫瘍において、マクロファージ、辺縁帯マクロファージ、濾胞B細胞、及び／または赤色髄マクロファージを増加させる、
 - u. 脾臓及び／または腫瘍において、TAM、腫瘍関連好中球、形質B細胞、辺縁帯B細胞、CD19+ B細胞、MHCII-単球、及び／またはMHCII-マクロファージを減少させる、
 - v. MARCO+細胞への結合時に、細胞接着、細胞骨格、走化性、及び細胞移動の変化を誘発する、
 - w. MARCO+細胞への結合時に、接着、移動、走化性細胞周期、T細胞受容体、食作用、オートファジー、及びwnt経路を含む細胞シグナル伝達経路を誘導する、
 - x. MARCO+骨髄細胞を無能化する、または、

10

20

30

40

50

y . a . ~ x . の任意の組み合わせが可能である、
上記請求項のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 1 1 6】

医薬として使用するための、上記請求項のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 1 1 7】

がんまたは感染症の治療に使用するための、上記請求項のいずれか一項に記載の単離抗体。

【請求項 1 1 8】

がんの治療に使用するための上記請求項のいずれか一項に記載の単離抗体であって、前記がんが、固形腫瘍及び液状腫瘍から選択される、前記単離抗体。

【請求項 1 1 9】

上記の請求項のいずれか一項に記載の抗体、その V H、その V L、その軽鎖、その重鎖、またはその抗原結合部分をコードする、単離されたポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセットであって、任意に、c D N Aである、前記単離されたポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセット。

【請求項 1 2 0】

請求項 1 1 9 に記載のポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセットを含む、ベクターまたはベクターのセット。

【請求項 1 2 1】

請求項 1 1 9 に記載のポリヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドのセット、または請求項 1 2 0 に記載のベクターもしくはベクターのセットを含む、宿主細胞。

【請求項 1 2 2】

抗体を産生する方法であって、請求項 1 2 1 に記載の宿主細胞を用いて前記抗体またはその抗原結合フラグメントを発現させること、及び発現された前記抗体を単離することを含む、前記方法。

【請求項 1 2 3】

請求項 1 ~ 1 1 8 のいずれか一項に記載の単離抗体またはその抗原結合フラグメント、及び薬学的に許容される賦形剤を含む、医薬組成物。

【請求項 1 2 4】

請求項 1 ~ 1 1 8 のいずれか一項に記載の単離抗体もしくはその抗原結合フラグメント、または請求項 1 2 3 に記載の医薬組成物、及び使用説明書を含む、キット。

【請求項 1 2 5】

対象における免疫応答を増強させる方法であって、抗ヒト M A R C O 抗体またはその抗原結合フラグメントを含む組成物を前記対象に投与することを含む、前記方法。

【請求項 1 2 6】

前記組成物が、ヒト M A R C O の前記 S R C R ドメイン（配列番号 3 8 4 の残基 4 2 4 ~ 5 1 9）に結合する抗体を含む、請求項 1 2 5 に記載の方法。

【請求項 1 2 7】

前記組成物が、請求項 1 1 ~ 1 1 8 のいずれか一項に記載の単離抗体、または請求項 1 2 3 に記載の医薬組成物を含む、請求項 1 2 5 または 1 2 6 に記載の方法。

【請求項 1 2 8】

前記抗体が、受容体リガンド遮断活性を有する、請求項 1 2 7 に記載の方法。

【請求項 1 2 9】

前記増強された免疫応答が適応免疫応答である、請求項 1 2 5 ~ 1 2 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3 0】

前記増強された免疫応答が自然免疫応答である、請求項 1 2 5 ~ 1 2 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3 1】

前記増強された免疫応答が、任意に核酸アッセイまたはタンパク質アッセイによって測

10

20

30

40

50

定される、アイソタイプ対照抗体と比較しての、細胞による少なくとも1つのサイトカインまたはケモカインの増強された発現を含む、請求項125～130のいずれか一項に記載の方法。

【請求項132】

前記少なくとも1つのサイトカインまたはケモカインが、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL7R、IL-12、IL12-p70、IL-15、IL-18、IL-27、IP-10、IFN- γ 、TNF α 、MIP1- α 、MIP1- β 、MIP-2、CSF2、CSF3、G-CSF、M-CSF、CCL3、CCL4、CCL5、CCL20、CCL24、CXCL1、CXCL3、CXCL8、CXCL9、CXCL10、CXCL12、gro- α 、MCP-1、MCP-3、LIF、またはエオタキシンのうちの少なくとも1つを含む、請求項131に記載の方法。

10

【請求項133】

前記増強された免疫応答が、任意に核酸アッセイまたはタンパク質アッセイによって決定される、アイソタイプ対照抗体と比較しての、増強されたNK細胞活性化、B細胞制御T細胞増殖、T細胞活性化、またはT細胞分化を含む、請求項125～129のいずれか一項に記載の方法。

【請求項134】

前記抗体が、いくつかの実施形態では、細胞接触時に、アイソタイプ対照抗体と比較して、IL-2-STAT5シグナル伝達、NF- κ Bシグナル伝達、TLRシグナル伝達、接着及び運動性シグナル伝達、細胞骨格再構成シグナル伝達、NF- κ Bを介したTNF α シグナル伝達、IL-6-JAK-STAT3シグナル伝達、SYKシグナル伝達、MAPKシグナル伝達、TPL2シグナル伝達、カルシウムシグナル伝達、IFN γ 応答、またはIFN α 応答を誘導する、請求項125～133のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項135】

前記抗体が、細胞接触時に、アイソタイプ対照抗体と比較して、細胞周期経路、細胞生存、細胞接着、Myc標的経路、E2F標的経路、低酸素、mTORシグナル伝達経路、PI3K-AKTシグナル伝達経路、Srcシグナル伝達経路、PKCシグナル伝達経路、上皮間葉移行シグナル伝達経路、酸化的リン酸化、またはMAPKシグナル伝達経路を減少させる、請求項125～134のいずれか一項に記載の方法。

【請求項136】

前記抗体が、細胞接触時に、アイソタイプ対照抗体と比較して、IL-1 β 及び／またはIL-18分泌及び／または食作用によって決定されるインフラマソーム活性化を誘導する、請求項125～135のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項137】

前記抗体が、細胞接触時に、アイソタイプ対照抗体と比較して、骨髄性M2様TAMのM1様TAMへの再分極、及び／またはmMDSCの炎症誘発性単球への再分極を誘導する、請求項125～136のいずれか一項に記載の方法。

【請求項138】

前記抗体が、細胞接触時に、アイソタイプ対照抗体と比較して、CD8+ T細胞、CD4+ T細胞、NK細胞、樹状細胞、MHCII+マクロファージ、MHCII^{high}単球、またはMHCII^{mid}単球を増加させる、請求項125～137のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項139】

前記抗体が、細胞接触時に、アイソタイプ対照抗体と比較して、脾臓中のマクロファージ、辺縁帯マクロファージ、濾胞性B細胞、及び／または赤色髄マクロファージを増加させる、上請求項125～138のいずれか一項に記載の方法。

【請求項140】

前記抗体が、細胞接触時に、アイソタイプ対照抗体と比較して、TAM、腫瘍関連好中球、形質B細胞、辺縁帯B細胞、CD19+ B細胞、MHCII-単球、及び／またはMHCII-マクロファージを減少させる、請求項125～139のいずれか一項に記載

50

の方法。

【請求項 1 4 1】

前記抗体が、記憶免疫応答の増強を誘導する、請求項 1 2 5 ～ 1 4 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4 2】

前記細胞が、M A R C O + 細胞である、請求項 1 2 5 ～ 1 4 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4 3】

前記細胞が、ヒト M A R C O + 細胞である、請求項 1 2 5 ～ 1 4 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4 4】

前記 M A R C O + 細胞が、単球、単球性骨髄由来サプレッサー細胞 (m M D S C)、またはマクロファージである、請求項 1 4 2 または 1 4 3 に記載の方法。

【請求項 1 4 5】

前記マクロファージが、腫瘍関連マクロファージ (T A M) または単球由来マクロファージ (M D M) である、請求項 1 4 4 に記載の方法。

【請求項 1 4 6】

前記抗体が、M A R C O + 細胞の細胞表面上の M A R C O に結合する、請求項 1 2 5 ～ 1 4 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4 7】

前記対象が、ヒトである、請求項 1 2 5 ～ 1 4 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4 8】

前記対象が、がん罹患している、請求項 1 2 5 ～ 1 4 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4 9】

前記がんが、固形がんである、請求項 1 4 8 に記載の方法。

【請求項 1 5 0】

前記がんが、液性がんである、請求項 1 4 8 または 1 4 9 に記載の方法。

【請求項 1 5 1】

前記がんが、肺癌、肺腺癌、肺扁平上皮癌、肺小細胞癌、腎臓癌、肝臓癌、腎細胞癌、子宮頸癌、卵巣癌、結腸直腸癌、結腸癌、神経芽細胞腫、乳癌、三種陰性乳癌、基底細胞様乳癌、胃癌 (g a s t r i c c a n c e r)、胃癌 (s t o m a c h c a n c e r)、膀胱癌、前立腺癌、皮膚癌、リンパ腫、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (D L B C L)、小リンパ球性リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、中皮腫、膵臓癌、甲状腺癌、子宮内膜癌、頭頸部癌、または頭頸部扁平上皮癌 (H N S C) からなる群から選択される、請求項 1 4 8 ～ 1 5 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 5 2】

前記がんが、結腸癌、乳癌、基底細胞様乳癌、卵巣癌、または胃癌である、請求項 1 5 1 に記載の方法。

【請求項 1 5 3】

M A R C O が、非腫瘍免疫細胞と比較して、腫瘍免疫細胞上でより高いレベルで発現される、請求項 1 4 8 ～ 1 5 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 5 4】

I L - 1 0 が、非腫瘍免疫細胞と比較して、腫瘍免疫細胞上でより高いレベルで発現される、請求項 1 4 8 ～ 1 5 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 5 5】

対象におけるがんを治療する方法であって、抗ヒト M A R C O 抗体またはその抗原結合フラグメントを含む組成物を前記対象に投与することを含む、前記方法。

【請求項 1 5 6】

前記組成物が、ヒト M A R C O の前記 S R C R ドメイン (配列番号 3 8 4 の残基 4 2 4

10

20

30

40

50

～519)に結合する抗体を含む、請求項155に記載の方法。

【請求項157】

前記組成物が、請求項1～118のいずれか一項に記載の抗体、または請求項123に記載の医薬組成物を含む、請求項155または156に記載の方法。

【請求項158】

対象におけるがんを治療する方法であって、請求項1～118のいずれか一項に記載の抗ヒトMARCO抗体もしくはその抗原結合フラグメント、または請求項123に記載の医薬組成物を含む組成物を前記対象に投与することを含む、前記方法。

【請求項159】

前記対象が、免疫療法を以前に受けているか、同時に受けているか、またはその後受けることになる、請求項155～158のいずれか一項に記載の方法。 10

【請求項160】

前記免疫療法が、チェックポイント阻害剤、T細胞のチェックポイント阻害剤、及び抗PD1抗体のうちの少なくとも1つである、請求項159に記載の方法。

【請求項161】

前記免疫療法が、抗PD1抗体を含む、請求項160に記載の方法。

【請求項162】

対象におけるがんを治療する方法であって、抗ヒトMARCO抗体またはその抗原結合フラグメント、及び免疫療法を含む組成物を前記対象に投与することを含む、前記方法。

【請求項163】

前記組成物が、ヒトMARCOの前記SRCRDメイン（配列番号384の残基424～519）に結合する抗体を含む、請求項162に記載の方法。 20

【請求項164】

前記組成物が、請求項1～118のいずれか一項に記載の抗体、または請求項123に記載の医薬組成物を含む、請求項162または163に記載の方法。

【請求項165】

前記免疫療法が、チェックポイント阻害剤、T細胞のチェックポイント阻害剤、及び抗PD1抗体のうちの少なくとも1つである、請求項162～164のいずれか一項に記載の方法。

【請求項166】

前記免疫療法が、抗PD1抗体を含む、請求項165に記載の方法。 30

【請求項167】

前記対象が、ヒトである、請求項155～190のいずれか一項に記載の方法。

【請求項168】

前記がんが、固形がんである、請求項155～167のいずれか一項に記載の方法。

【請求項169】

前記がんが、液性がんである、請求項155～168のいずれか一項に記載の方法。

【請求項170】

前記がんが、肺癌、肺腺癌、肺扁平上皮癌、肺小細胞癌、腎臓癌、肝臓癌、腎細胞癌、子宮頸癌、卵巣癌、結腸直腸癌、結腸癌、神経芽細胞腫、乳癌、三種陰性乳癌、基底細胞様乳癌、胃癌（gastric cancer）、胃癌（stomach cancer）、膀胱癌、前立腺癌、皮膚癌、リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）、小リンパ球性リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、中皮腫、膵臓癌、甲状腺癌、子宮内膜癌、頭頸部癌、または頭頸部扁平上皮癌（HNSC）からなる群から選択される、請求項155～169のいずれか一項に記載の方法。 40

【請求項171】

前記がんが、結腸癌、乳癌、基底細胞様乳癌、卵巣癌、または胃癌である、請求項170に記載の方法。

【請求項172】

MARCOが、非腫瘍免疫細胞と比較して、腫瘍免疫細胞上でより高いレベルで発現さ 50

れる、請求項 155～171 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 173】

IL-10 が、非腫瘍免疫細胞と比較して、腫瘍免疫細胞上でより高いレベルで発現される、請求項 155～172 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 174】

前記抗体が、アイソタイプ対照抗体と比較して、増強された抗腫瘍記憶応答を誘導する、請求項 155～173 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 175】

前記投与が、アイソタイプ対照抗体と比較して、対象における免疫応答を増強させる、請求項 155～174 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 176】

前記増強された免疫応答が適応免疫応答である、請求項 175 に記載の方法。

【請求項 177】

前記増強された免疫応答が自然免疫応答である、請求項 175 に記載の方法。

【請求項 178】

前記増強された免疫応答が、任意に核酸アッセイまたはタンパク質アッセイによって測定される、アイソタイプ対照抗体と比較しての、細胞による少なくとも 1 つのサイトカインまたはケモカインの発現を含む、請求項 175～177 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 179】

前記少なくとも 1 つのサイトカインまたはケモカインが、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL7R、IL-12、IL12-p70、IL-15、IL-18、IL-27、IP-10、IFN- γ 、TNF α 、MIP1- α 、MIP1- β 、MIP-2、CSF2、CSF3、G-CSF、M-CSF、CCL3、CCL4、CCL5、CCL20、CCL24、CXCL1、CXCL3、CXCL8、CXCL9、CXCL10、CXCL12、gro- α 、MCP-1、MCP-3、LIF、またはエオタキシンのうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 178 に記載の方法。

【請求項 180】

前記増強された免疫応答が、任意に核酸アッセイまたはタンパク質アッセイによって測定される、アイソタイプ対照抗体と比較しての、増強された NK 細胞活性化、B 細胞制御 T 細胞増殖、T 細胞活性化、または T 細胞分化を含む、請求項 175～179 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 181】

前記抗体が、いくつかの実施形態では、細胞接触時に、アイソタイプ対照抗体と比較して、IL-2-STAT5 シグナル伝達、NF- κ B シグナル伝達、TLR シグナル伝達、接着及び運動性シグナル伝達、細胞骨格再構成シグナル伝達、NF- κ B を介した TNF α シグナル伝達、IL-6-JAK-STAT3 シグナル伝達、SYK シグナル伝達、MAPK シグナル伝達、TPL2 シグナル伝達、カルシウムシグナル伝達、IFN γ 応答、または IFN α 応答を誘導する、請求項 175～180 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 182】

前記抗体が、細胞接触時に、アイソタイプ対照抗体と比較して、細胞周期経路、細胞生存、細胞接着、My c 標的経路、E2F 標的経路、低酸素、mTOR シグナル伝達経路、PI3K-AKT シグナル伝達経路、Src シグナル伝達経路、PKC シグナル伝達経路、上皮間葉移行シグナル伝達経路、酸化的リン酸化、または MAPK シグナル伝達経路を減少させる、請求項 175～181 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 183】

前記抗体が、細胞接触時に、アイソタイプ対照抗体と比較して、IL-1 β 及び／または IL-18 分泌及び／または食作用によって決定されるインフラマソーム活性化を誘導する、請求項 175～182 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 184】

前記抗体が、細胞接触時に、アイソタイプ対照抗体と比較して、骨髄性 M2 様 TAM の

10

20

30

40

50

M1様TAMへの再分極、及び／またはmMDS Cの炎症誘発性単球への再分極を誘導する、請求項175～183のいずれか一項に記載の方法。

【請求項185】

前記抗体が、細胞接触時に、アイソタイプ対照抗体と比較して、CD8+ T細胞、CD4+ T細胞、NK細胞、樹状細胞、MHCII+マクロファージ、MHCII^{high}単球、またはMHCII^{mid}単球を増加させる、請求項175～184のいずれか一項に記載の方法。

【請求項186】

前記抗体が、細胞接触時に、アイソタイプ対照抗体と比較して、脾臓中のマクロファージ、辺縁帯マクロファージ、濾胞性B細胞、及び／または赤色髄マクロファージを増加させる、請求項175～185のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項187】

前記抗体が、細胞接触時に、アイソタイプ対照抗体と比較して、TAM、腫瘍関連好中球、形質B細胞、辺縁帯B細胞、CD19+ B細胞、MHCII-単球、及び／またはMHCII-マクロファージを減少させる、請求項175～186のいずれか一項に記載の方法。

【請求項188】

前記細胞が、MARCO+細胞である、請求項155～187のいずれか一項に記載の方法。

【請求項189】

20

前記細胞が、ヒトMARCO+細胞である、請求項188に記載の方法。

【請求項190】

前記MARCO+細胞が、単球、単球性骨髓由来サプレッサー細胞(mMDS C)、またはマクロファージである、請求項188または189に記載の方法。

【請求項191】

前記マクロファージが、腫瘍関連マクロファージ(TAM)または単球由来マクロファージ(MDM)である、請求項190に記載の方法。

【請求項192】

前記抗体が、MARCO+細胞の細胞表面上のMARCOに結合する、請求項155～191のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項193】

細胞表面にMARCOを発現する骨髓細胞を無能化する方法であって、前記骨髓細胞を、抗ヒトMARCO抗体またはその抗原結合フラグメントと接触させることを含む、前記方法。

【請求項194】

細胞表面上でMARCOを発現する骨髓細胞を無能化する方法であって、前記骨髓細胞を、請求項1～118のいずれか一項に記載の抗体または請求項123に記載の医薬組成物と接触させることを含む、前記方法。

【請求項195】

前記抗体が、ADCC活性、CDC活性、またはADCP活性のうちの少なくとも1つによって前記骨髓細胞を無能化し、任意で、前記抗体が、ADCC活性によって前記骨髓細胞を無能化し、任意で、前記抗体が、CDC活性によって前記骨髓細胞を無能化し、及び任意で、前記抗体が、ADCP活性によって前記骨髓細胞を無能化する、請求項193または194に記載の方法。

40

【請求項196】

前記骨髓細胞が、MARCO+細胞である、請求項193～195のいずれか一項に記載の方法。

【請求項197】

前記骨髓細胞が、ヒトMARCO+細胞である、請求項196に記載の方法。

【請求項198】

50

前記骨髄細胞が、単球、単球性骨髄由来サプレッサー細胞 (m M D S C)、またはマクロファージである、請求項 193～197 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 199】

前記マクロファージが、腫瘍関連マクロファージ (T A M) または単球由来マクロファージ (M D M) である、請求項 198 に記載の方法。

【請求項 200】

前記骨髄細胞が、腫瘍内または脾臓の骨髄細胞である、請求項 193～199 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 201】

前記接触が、*in vitro* または *in vivo* である、請求項 200 に記載の方法。

10

【請求項 202】

前記接触が、対象において *in vivo* で起こり、任意で、前記対象が、がん罹患している、請求項 201 に記載の方法。

【請求項 203】

前記対象が、ヒトである、請求項 202 に記載の方法。

【請求項 204】

前記がんが、固形がんである、請求項 202 に記載の方法。

【請求項 205】

前記がんが、液性がんである、請求項 202 に記載の方法。

20

【請求項 206】

前記がんが、肺癌、肺腺癌、肺扁平上皮癌、肺小細胞癌、腎臓癌、肝臓癌、腎細胞癌、子宮頸癌、卵巣癌、結腸直腸癌、結腸癌、神経芽細胞腫、乳癌、三種陰性乳癌、基底細胞様乳癌、胃癌 (*g a s t r i c c a n c e r*)、胃癌 (*s t o m a c h c a n c e r*)、膀胱癌、前立腺癌、皮膚癌、リンパ腫、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (*D L B C L*)、小リンパ球性リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、中皮腫、膵臓癌、甲状腺癌、子宮内膜癌、頭頸部癌、または頭頸部扁平上皮癌 (*H N S C*) からなる群から選択される、請求項 202～205 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 207】

前記がんが、結腸癌、乳癌、基底細胞様乳癌、卵巣癌、または胃癌である、請求項 206 に記載の方法。

30

【請求項 208】

前記接触が、アイソタイプ対照抗体と比較して、前記対象における免疫応答を増強させる、請求項 194～207 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 209】

前記増強された免疫応答が適応免疫応答である、請求項 208 に記載の方法。

【請求項 210】

前記増強された免疫応答が自然免疫応答である、請求項 208 に記載の方法。

【請求項 211】

前記増強された免疫応答が、任意に核酸アッセイまたはタンパク質アッセイによって測定される、アイソタイプ対照抗体と比較しての、細胞による少なくとも 1 つのサイトカインまたはケモカインの発現を含む、請求項 208～210 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 212】

前記少なくとも 1 つのサイトカインまたはケモカインが、*I L - 1 α*、*I L - 1 β*、*I L - 2*、*I L - 4*、*I L - 6*、*I L 7 R*、*I L - 1 2*、*I L 1 2 - p 7 0*、*I L - 1 5*、*I L - 1 8*、*I L - 2 7*、*I P - 1 0*、*I F N - γ*、*T N F α*、*M I P 1 - α*、*M I P 1 - β*、*M I P - 2*、*C S F 2*、*C S F 3*、*G - C S F*、*M - C S F*、*C C L 3*、*C C L 4*、*C C L 5*、*C C L 2 0*、*C C L 2 4*、*C X C L 1*、*C X C L 3*、*C X C L 8*、*C X C L 9*、*C X C L 1 0*、*C X C L 1 2*、*g r o - α*、*M C P - 1*、*M C P - 3*、*L I F*、またはエオタキシンのうちの少なくとも 1 つを含む、請求項 211 に記載の方法。

50

【請求項 2 1 3】

前記増強された免疫応答が、任意に核酸アッセイまたはタンパク質アッセイによって測定される、アイソタイプ対照抗体と比較しての、増強されたNK細胞活性化、B細胞制御T細胞増殖、T細胞活性化、またはT細胞分化を含む、請求項 2 0 8～2 1 2のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 1 4】

前記抗体が、細胞接触時に、アイソタイプ対照抗体と比較して、IL-2-STAT5シグナル伝達、NF-κBシグナル伝達、TLRシグナル伝達、接着及び運動性シグナル伝達、細胞骨格再構成シグナル伝達、NF-κBを介したTNFαシグナル伝達、IL-6-JAK-STAT3シグナル伝達、SYKシグナル伝達、MAPKシグナル伝達、TPL2シグナル伝達、カルシウムシグナル伝達、IFNγ応答、またはIFNα応答、請求項 2 0 8～2 1 3のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 2 1 5】

前記抗体が、細胞接触時に、アイソタイプ対照抗体と比較して、細胞周期経路、細胞生存、細胞接着、Myc標的経路、E2F標的経路、低酸素経路、mTORシグナル伝達経路、PI3K-AKTシグナル伝達経路、Srcシグナル伝達経路、PKCシグナル伝達経路、上皮間葉移行シグナル伝達経路、酸化的リン酸化、またはMAPKシグナル伝達経路を減少させる、請求項 2 0 8～2 1 4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 1 6】

前記抗体が、細胞接触時に、IL-1β及び／またはIL-18分泌及び／または食作用によって決定されるインフラマソーム活性化を誘導する、請求項 2 0 8～2 1 5のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 2 1 7】

前記抗体が、細胞接触時に、骨髄性M2様TAMのM1様TAMへの再分極、及び／またはmMDSの炎症誘発性単球への再分極を誘導する、請求項 2 0 8～2 1 6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 1 8】

前記抗体が、細胞接触時に、アイソタイプ対照抗体と比較して、CD8+ T細胞、CD4+ T細胞、NK細胞、樹状細胞、MHCII+マクロファージ、MHCII^{high}単球、またはMHCII^{mid}単球を増加させる、請求項 2 0 8～2 1 7のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 2 1 9】

前記抗体が、細胞接触時に、アイソタイプ対照抗体と比較して、脾臓中のマクロファージ、辺縁帯マクロファージ、濾胞性B細胞、及び／または赤色髄マクロファージを増加させる、請求項 2 0 8～2 1 8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 2 0】

前記抗体が、細胞接触時に、アイソタイプ対照抗体と比較して、TAM、腫瘍関連好中球、形質B細胞、辺縁帯B細胞、CD19+ B細胞、MHCII-単球、及び／またはMHCII-マクロファージを減少させる、請求項 2 0 8～2 1 9のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 2 2 1】

前記対象が、免疫療法を以前に受けているか、同時に受けているか、またはその後受けることになる、請求項 1 9 4～2 2 0のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 2 2】

前記免疫療法が、チェックポイント阻害剤、T細胞のチェックポイント阻害剤、及び抗PD1抗体のうちの少なくとも1つである、請求項 2 2 1に記載の方法。前記免疫療法が、抗PD1抗体を含む、請求項 2 2 1に記載の方法。

【請求項 2 2 3】

対象由来の試料中のMARCOタンパク質の発現レベルを決定する方法であって、前記試料を抗MARCO抗体と接触させること、及び免疫組織化学アッセイまたは可溶性MA

50

R C Oアッセイを実施することを含む、前記方法。

【請求項 2 2 4】

前記アッセイが、免疫組織化学アッセイであり、前記抗体が、R D M 5、R D M 9、P I - 3 0 1 0 . 1 5、P I - 3 0 1 0 . 2 5、またはP I - 3 0 3 0 . 4 1を含む、請求項 2 2 3 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、2 0 2 0 年 1 1 月 1 8 日に出願された米国出願第 6 3 / 1 1 5 , 2 7 2 号、及び 2 0 2 1 年 9 月 1 5 日に出願された米国出願第 6 3 / 2 4 4 , 6 6 2 号に対する優先権及び利益を主張し、これらは、全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0 0 0 2】

配列表

本出願には、E F S - W e b を介して提出された配列表を含み、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。2 0 X X 年、X X 月に作成された該 A S C I I コピーは、X X X X X U S _ s e q u e n c e l i s t i n g . t x t と称され、サイズが X , X X X , X X X バイトである。

【背景技術】

【0 0 0 3】

背景

腫瘍微小環境の骨髄集団は、単球及び好中球（骨髄由来抑制細胞として大まかに分類される場合がある）、マクロファージ、及び樹状細胞を顕著に含む。腫瘍内骨髄集団は、全体として、非刺激性または抑制性であると長らく考えられているが、さらに最近では、すべての腫瘍浸潤性骨髄細胞が同等になるとは限らないことが認められている。

【0 0 0 4】

コラーゲン構造を持つマクロファージ受容体（M A R C O、S C A R A 2 としても知られる。2 0 2 0 年 5 月 8 日、N C B I ウェブサイトから入手可能な H G N C : 6 8 9 5 及び N C B I : N M _ 0 0 6 7 7 0 . 3 を参照。すべての目的で参照により本明細書に組み込まれる）は、クラス A スカベンジャー受容体ファミリーに属し、腹腔マクロファージ、及び脾臓とリンパ節のマクロファージの亜集団で発現する（H i r a n o S , P L o S O N E 2 0 1 5 : 1 0 (1 1) : e 0 1 4 2 0 6 2 （非特許文献 1）を参照）。最近の研究では、M A R C O がヒトのがんにおける T A M の特異的マーカーとして強調されている（L a v i n e t a l . , C e l l ; 2 0 1 7 : 1 6 9 (4) 7 5 0 - 7 6 5 （非特許文献 2））。M A R C O は、オプソニン化されていない粒子及び細菌などの微生物のマクロファージ内在化を媒介する（J i n g J , J I m m u n o l 2 0 1 3 ; 1 9 0 : (1 2) 6 3 6 0 - 6 3 6 7 （非特許文献 3）を参照）。最近、M A R C O は樹状細胞における T L R 誘導性遺伝子発現応答に関与し、炎症性免疫応答で役割を果たしている可能性があることが示されている（K i s s i c k H T , P L o S o N E 2 0 1 4 ; 9 (8) : 2 1 0 4 1 4 8 （非特許文献 4））。

【0 0 0 5】

免疫細胞応答の刺激に効果のない骨髄細胞（例えば、T 細胞や N K 細胞など）を選択的に除去、再プログラミング、または活性化することにより、腫瘍微小環境内の免疫応答を増強することを含む、新しいがん治療アプローチに対する満たされていないニーズが存在する。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0 0 0 6】

【非特許文献 1】H i r a n o S , P L o S O N E 2 0 1 5 : 1 0 (1 1) : e 0 1 4 2 0 6 2

10

20

30

40

50

【非特許文献2】Lavin et al., Cell; 2017: 169 (4) 750-765

【非特許文献3】Jing J, J Immunol 2013; 190: (12) 6360-6367

【非特許文献4】Kissick HT, PLoS ONE 2014; 9 (8): 2104148

【発明の概要】

【0007】

概要

いくつかの態様では、コラーゲン構造を有するヒトマクロファージ受容体 (MARCO) (配列番号384) に結合する、単離抗体またはその抗原結合フラグメントが本明細書に提供される。

【0008】

いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合フラグメントは、ヒトMARCOのスカルペンジャー受容体システインリッチ (SRCR) ドメイン (配列番号384の残基424~519) に結合する。

【0009】

いくつかの態様では、コラーゲン構造を有するヒトマクロファージ受容体 (MARCO) (配列番号: 384) のスカルペンジャー受容体システインリッチ (SRCR) ドメイン (配列番号384の残基424~519) に結合する、単離抗体またはその抗原結合フラグメントが本明細書に提供される。

【0010】

いくつかの実施形態では、抗体は、3つの重鎖CDR配列、CDR-H1、CDR-H2、及びCDR-H3を含む重鎖可変 (VH) 配列と、3つの軽鎖CDR配列、CDR-L1、CDR-L2、及びCDR-L3を含む軽鎖可変 (VL) 配列とを含み、CDR-H1は、配列GFSLTSYHVS (配列番号2) を含み、CDR-H2は、配列AIWTGGSIA (配列番号3) を含み、CDR-H3は、配列DLSDYYSSYTSTFDY (配列番号4) を含み、CDR-L1は配列ASEGISNDLA (配列番号431) またはXASEGISNDLA (配列番号383) (式中、Xはアルギニン (R) またはロイシン (L) である) を含み、CDR-L2は配列AASRLQD (配列番号8) を含み、CDR-L3は配列QQSYKYPLT (配列番号9) を含む。

【0011】

いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合フラグメントは、MARCO (配列番号384) の以下の残基: Q452、Y472、K473、E450、Q487、T499、H505、D507、S509、またはE511のうちの少なくとも1つに結合する。

【0012】

いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、キメラ、ヒト、ヒト化、またはラットの抗体または抗原結合フラグメントを含む。

【0013】

いくつかの実施形態では、CDR-L1は、配列ASEGISNDLA (配列番号431) を含む。

【0014】

いくつかの実施形態では、CDR-L1は、配列RASEGISNDLA (配列番号27) を含む。

【0015】

いくつかの実施形態では、CDR-L1は、配列LASEGISNDLA (配列番号7) を含む。

【0016】

いくつかの実施形態では、VH配列は、配列番号61に記載のVH配列を含む。

10

20

30

40

50

【0017】

いくつかの実施形態では、V H 配列は、配列番号 1 1 1 に記載の V H 配列を含む。

【0018】

いくつかの実施形態では、V H 配列は、配列番号 1、1 1、2 1、3 1、4 1、5 1、6 1、7 1、8 1、9 1、1 0 1、1 1 1、1 2 1、1 3 1、4 3 4、4 4 4、及び 4 7 4 に記載の配列から選択される配列を含む。

【0019】

いくつかの実施形態では、V L 配列は、配列番号 6 6 に記載の V L 配列を含む。

【0020】

いくつかの実施形態では、V L 配列は、配列番号 1 1 6 に記載の V L 配列を含む。

10

【0021】

いくつかの実施形態では、V L 配列は、配列番号 6、1 6、2 6、3 6、4 6、5 7、6 6、7 6、8 6、9 6、1 0 6、1 1 6、1 2 6、1 3 6、4 3 9、4 4 9、及び 4 7 9 に記載の配列から選択される配列を含む。

【0022】

いくつかの実施形態では、V H 配列は、配列番号 6 1 に記載の V H 配列を含み、V L 配列は、配列番号 6 6 に記載の V L 配列を含む。

【0023】

いくつかの実施形態では、V H 配列は、配列番号 1 1 1 に記載の V H 配列を含み、V L 配列は、配列番号 1 1 6 に記載の V L 配列を含む。

20

【0024】

いくつかの実施形態では、V H 配列は、配列番号 1、1 1、2 1、3 1、4 1、5 1、6 1、7 1、8 1、9 1、1 0 1、1 1 1、1 2 1、1 3 1、4 3 4、4 4 4、及び 4 7 4 に記載の配列から選択される配列を含み、V L 配列は、配列番号 6、1 6、2 6、3 6、4 6、5 7、6 6、7 6、8 6、9 6、1 0 6、1 1 6、1 2 6、1 3 6、4 3 9、4 4 9、及び 4 7 9 に記載の配列から選択される配列を含む。

【0025】

いくつかの実施形態では、V H 配列は、配列番号 1、1 1、2 1、3 1、4 1、5 1、6 1、7 1、8 1、9 1、1 0 1、1 1 1、1 2 1、1 3 1、4 3 4、4 4 4、及び 4 7 4 に記載の配列から選択される配列に対して、少なくとも 9 0 %、9 2 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % の同一性を有する配列を含み、及び／または V L 配列は、配列番号 6、1 6、2 6、3 6、4 6、5 7、6 6、7 6、8 6、9 6、1 0 6、1 1 6、1 2 6、1 3 6、4 3 9、4 4 9、及び 4 7 9 に記載の配列から選択される配列に対して、少なくとも 9 0 %、9 2 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % の同一性を有する配列を含む。

30

【0026】

いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号 6 5 に記載の重鎖配列を含む。

【0027】

いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号 1 1 5 に記載の重鎖配列を含む。

【0028】

いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号 5、1 5、1 2 5、3 5、4 5、5 5、6 5、7 5、8 5、9 5、1 0 5、1 1 5、1 2 5、1 4 5、4 3 8、4 4 8、及び 4 7 8 に記載の配列から選択される重鎖配列を含む。

40

【0029】

いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号 7 0 に記載の軽鎖配列を含む。

【0030】

いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号 1 2 0 に記載の軽鎖配列を含む。

【0031】

いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号 1 0、2 0、3 0、4 0、5 0、6、7 0、8 0、9 0、1 0 0、1 1 0、1 2 0、1 3 0、1 4 0、4 4 3、4 5 3、及び 4 8 3

50

に記載の配列から選択される軽鎖配列を含む。

【0032】

いくつかの実施形態では、本抗体は、配列番号65に記載の重鎖配列を含み、配列番号70に記載の軽鎖配列を含む。

【0033】

いくつかの実施形態では、本抗体は、配列番号115に記載の重鎖配列を含み、配列番号120に記載の軽鎖配列を含む。

【0034】

いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号5、15、125、35、45、55、65、75、85、95、105、115、125、145、438、448、及び478に記載の配列から選択される重鎖配列、及び配列番号10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、443、453、及び483に記載の配列から選択される軽鎖配列を含む。

10

【0035】

いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号5、15、125、35、45、55、65、75、85、95、105、115、125、145、438、448、及び478に記載の配列から選択される配列に対して少なくとも90%、92%、95%、97%、98%、または99%の同一性を有する重鎖配列、及び／または配列番号10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、443、453、及び483に記載の配列から選択される配列に対して少なくとも90%、92%、95%、97%、98%、または99%の同一性を有する軽鎖配列を含む。

20

【0036】

いくつかの態様では、3つの重鎖CDR配列、CDR-H1、CDR-H2、及びCDR-H3を含む重鎖可変(VH)配列と、3つの軽鎖CDR配列、CDR-L1、CDR-L2、及びCDR-L3を含む軽鎖可変(VL)配列とを含む、ヒトMARCO(配列番号384)に結合する単離抗体またはその抗原結合フラグメントが本明細書で提供され、ここで、CDR-H1は、配列GYTF TDYAVN(配列番号232)を含み、CDR-H2は、配列WINTQTGKPT(配列番号233)を含み、CDR-H3は、配列DSYYYS S SLDY(配列番号234)を含み、CDR-L1は配列ASAGISNDLA(配列番号432)またはXASAGISNDLA(配列番号381)(式中、Xはアルギニン(R)またはロイシン(L)である)を含み、CDR-L2は配列AASRLQD(配列番号238)を含み、CDR-L3は配列QQSYKYPWT(配列番号239)を含む。

30

【0037】

いくつかの実施形態では、CDR-L1は、配列ASAGISNDLA(配列番号432)を含む。

【0038】

いくつかの実施形態では、CDR-L1は、配列RASAGISNDLA(配列番号317)を含む。

【0039】

いくつかの実施形態では、CDR-L1は、配列LASAGISNDLA(配列番号237)を含む。

40

【0040】

いくつかの実施形態では、VH配列は、配列番号454に記載のVH配列を含む。

【0041】

いくつかの実施形態では、VH配列は、配列番号241、311、321、331、341、351、454、及び464に記載の配列から選択される配列を含む。

【0042】

いくつかの実施形態では、VL配列は、配列番号459に記載のVL配列を含む。

【0043】

50

いくつかの実施形態では、V L 配列は、配列番号 2 4 6、3 1 6、3 2 6、3 3 6、3 4 6、3 5 6、4 5 9、及び 4 6 9 に記載の配列から選択される配列を含む。

【0 0 4 4】

いくつかの実施形態では、V H 配列は、配列番号 4 5 4 に記載の V H 配列を含み、V L 配列は、配列番号 4 5 9 に記載の V L 配列を含む。

【0 0 4 5】

いくつかの実施形態では、V H 配列は、配列番号 2 4 1、3 1 1、3 2 1、3 3 1、3 4 1、3 5 1、4 5 4、及び 4 6 4 に記載の配列から選択される配列を含み、V L 配列は、配列番号 2 4 6、3 1 6、3 2 6、3 3 6、3 4 6、3 5 6、4 5 9、及び 4 6 9 に記載の配列から選択される配列を含む。

10

【0 0 4 6】

いくつかの実施形態では、V H 配列は、配列番号 2 4 1、3 1 1、3 2 1、3 3 1、3 4 1、3 5 1、4 5 4、及び 4 6 4 に記載の配列から選択される配列に対して、少なくとも 9 0 %、9 2 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % の同一性を有する配列を含み、及び／または V L 配列は、配列番号 2 4 6、3 1 6、3 2 6、3 3 6、3 4 6、3 5 6、4 5 9、及び 4 6 9 に記載の配列から選択される配列に対して、少なくとも 9 0 %、9 2 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % の同一性を有する配列を含む。

【0 0 4 7】

いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号 4 5 8 に記載の重鎖配列を含む。

【0 0 4 8】

いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号 2 4 5、3 1 5、3 2 5、3 3 5、3 4 5 3 5 5、4 5 8、及び 4 6 8 に記載の配列から選択される重鎖配列を含む。

20

【0 0 4 9】

いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号 4 6 3 に記載の軽鎖配列を含む。

【0 0 5 0】

いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号 2 5 0、3 2 0、3 3 0、3 4 0、3 5 0、3 6 0、4 6 3、及び 4 7 3 に記載の配列から選択される軽鎖配列を含む。

【0 0 5 1】

いくつかの実施形態では、本抗体は、配列番号 4 5 8 に記載の重鎖配列を含み、配列番号 4 6 3 に記載の軽鎖配列を含む。

30

【0 0 5 2】

いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号 2 4 5、3 1 5、3 2 5、3 3 5、3 4 5 3 5 5、4 5 8、及び 4 6 8 に記載の配列から選択される重鎖配列、及び配列番号 2 5 0、3 2 0、3 3 0、3 4 0、3 5 0、3 6 0、4 6 3、及び 4 7 3 に記載の配列から選択される軽鎖配列を含む。

【0 0 5 3】

いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号 2 4 5、3 1 5、3 2 5、3 3 5、3 4 5 3 5 5、4 5 8、及び 4 6 8 に記載の配列から選択される配列に対して少なくとも 9 0 %、9 2 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % の同一性を有する重鎖配列、及び／または配列番号 2 5 0、3 2 0、3 3 0、3 4 0、3 5 0、3 6 0、4 6 3、及び 4 7 3 に記載の配列から選択される配列に対して少なくとも 9 0 %、9 2 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % の同一性を有する軽鎖配列を含む。

40

【0 0 5 4】

いくつかの態様では、3 つの重鎖 C D R 配列、C D R - H 1、C D R - H 2、及び C D R - H 3 を含む重鎖可変 (V H) 配列と、3 つの軽鎖 C D R 配列、C D R - L 1、C D R - L 2、及び C D R - L 3 を含む軽鎖可変 (V L) 配列とを含む、ヒト M A R C O (配列番号 3 8 4) に結合する単離抗体またはその抗原結合フラグメントが本明細書で提供され、ここで、C D R - H 1 は、配列 K F T F S N Y G M N (配列番号 1 4 2) を含み、C D R - H 2 は、配列 L I Y Y N S N N K Y (配列番号 1 4 3) を含み、C D R - H 3 は、配列 S L T G G S D Y F D S (配列番号 1 4 4) を含み、C D R - L 1 は配列 A S K S I G

50

T F L A (配列番号 4 3 3) または X A S K S I G T F L A (配列番号 3 8 2) (式中、X はアルギニン (R) またはロイシン (L) である) を含み、C D R - L 2 は配列 S G S T L Q S (配列番号 1 4 8) を含み、C D R - L 3 は配列 Q Q H D E Y P F T (配列番号 1 4 9) を含む。

【0055】

いくつかの実施形態では、C D R - L 1 は、配列 A S K S I G T F L A (配列番号 4 3 3) を含む。

【0056】

いくつかの実施形態では、C D R - L 1 は、配列 K A S K S I G T F L A (配列番号 1 4 7) を含む。

【0057】

いくつかの実施形態では、C D R - L 1 は、配列 R A S K S I G T F L A (配列番号 1 5 7) を含む。

【0058】

いくつかの実施形態では、V H 配列は、配列番号 1 4 1、1 5 1、1 6 1、1 7 1、1 8 1、1 9 1、2 0 1、2 1 1、及び 2 2 1 に記載の配列から選択される配列を含む。

【0059】

いくつかの実施形態では、V L 配列は、配列番号 1 4 6、1 5 6、1 6 6、1 7 6、1 8 6、1 9 6、2 0 6、2 1 6、及び 2 2 6 に記載の配列から選択される配列を含む。

【0060】

いくつかの実施形態では、V H 配列は、配列番号 1 4 1、1 5 1、1 6 1、1 7 1、1 8 1、1 9 1、2 0 1、2 1 1、及び 2 2 1 に記載の配列から選択される配列を含み、V L 配列は、配列番号 1 4 6、1 5 6、1 6 6、1 7 6、1 8 6、1 9 6、2 0 6、2 1 6、及び 2 2 6 に記載の配列から選択される配列を含む。

【0061】

いくつかの実施形態では、V H 配列は、配列番号 1 4 1、1 5 1、1 6 1、1 7 1、1 8 1、1 9 1、2 0 1、2 1 1、及び 2 2 1 に記載の配列から選択される配列に対して、少なくとも 90%、92%、95%、97%、98%、または 99% の同一性を有する配列を含み、及び／または V L 配列は、配列番号 1 4 6、1 5 6、1 6 6、1 7 6、1 8 6、1 9 6、2 0 6、2 1 6、及び 2 2 6 に記載の配列から選択される配列に対して、少なくとも 90%、92%、95%、97%、98%、または 99% の同一性を有する配列を含む。

【0062】

いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号 1 4 5、1 5 5、1 6 5、1 7 5、1 8 5、1 9 5、2 0 5、2 1 5、及び 2 2 5 に記載の配列から選択される重鎖配列を含む。

【0063】

いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号 1 5 0、1 6 0、1 7 0、1 8 0、1 9 0、2 0 0、2 1 0、2 2 0、及び 2 3 0 に記載の配列から選択される軽鎖配列を含む。

【0064】

いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号 1 4 5、1 5 5、1 6 5、1 7 5、1 8 5、1 9 5、2 0 5、2 1 5、及び 2 2 5 に記載の配列から選択される重鎖配列と、配列番号 1 5 0、1 6 0、1 7 0、1 8 0、1 9 0、2 0 0、2 1 0、2 2 0、及び 2 3 0 に記載の配列から選択される軽鎖配列を含む。

【0065】

いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号 1 4 5、1 5 5、1 6 5、1 7 5、1 8 5、1 9 5、2 0 5、2 1 5、及び 2 2 5 に記載の配列から選択される配列に対して、少なくとも 90%、92%、95%、97%、98%、または 99% の同一性を有する配列を含む重鎖配列、及び／または配列番号 1 5 0、1 6 0、1 7 0、1 8 0、1 9 0、2 0 0、2 1 0、2 2 0、及び 2 3 0 に記載の配列から選択される配列に対して、少なくとも 90%、92%、95%、97%、98%、または 99% の同一性を有する配列を含む軽鎖

10

20

30

40

50

配列を含む。

【0066】

別の態様では、3つの重鎖CDR配列、CDR-H1、CDR-H2、及びCDR-H3を含む重鎖可変(VH)配列と、3つの軽鎖CDR配列、CDR-L1、CDR-L2、及びCDR-L3を含む軽鎖可変(VL)配列とを含む、ヒトMARCO(配列番号384)に結合する単離抗体またはその抗原結合フラグメントが本明細書で提供され、ここで、CDR-H1は、配列GYTF TDY YLH(配列番号252)を含み、CDR-H2は、配列YINPNNA YTS(配列番号253)を含み、CDR-H3は、配列DTDY YNLHFAY(配列番号254)を含み、CDR-L1は配列LTSEGISNDLA(配列番号257)を含み、CDR-L2は配列DASRLED(配列番号258)を含み、CDR-L3は配列QQSYKYPLT(配列番号259)を含む。

10

【0067】

いくつかの実施形態では、VH配列は、配列番号251または261に記載のVH配列を含む。

【0068】

いくつかの実施形態では、VL配列は、配列番号256または266に記載のVL配列を含む。

【0069】

いくつかの実施形態では、VH配列は、配列番号251または261に記載の配列を含み、VL配列は、配列番号256または266に記載の配列を含む。

20

【0070】

いくつかの実施形態では、VH配列は、配列番号251または261に記載の配列と少なくとも90%、92%、95%、97%、98、または99%の同一性を有する配列を含み、及び／またはVL配列は、配列番号256または266に記載の配列と少なくとも90%、92%、95%、97%、98、または99%の同一性を有する配列を含む。

【0071】

いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号255または265に記載の重鎖配列を含む。

【0072】

いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号260または270に記載の軽鎖配列を含む。

30

【0073】

いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号255または265に記載の重鎖配列を含み、配列番号260または270に記載の軽鎖配列を含む。

【0074】

いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号255または265に記載の配列と少なくとも90%、92%、95%、97%、98%、または99%の同一性を有する配列を含む重鎖配列、及び配列番号260または270に記載の配列と少なくとも90%、92%、95%、97%、98%、または99%の同一性を有する配列を含む軽鎖配列を含む。

【0075】

別の態様では、3つの重鎖CDR配列、CDR-H1、CDR-H2、及びCDR-H3を含む重鎖可変(VH)配列と、3つの軽鎖CDR配列、CDR-L1、CDR-L2、及びCDR-L3を含む軽鎖可変(VL)配列とを含む、ヒトMARCO(配列番号384)に結合する単離抗体またはその抗原結合フラグメントが本明細書で提供され、ここで、CDR-H1は、配列GFSLTSY TLS(配列番号362)を含み、CDR-H2は、配列AIWGGDN TD(配列番号363)を含み、CDR-H3は、配列ELGGSFDY(配列番号364)を含み、CDR-L1は配列KTSQNINKKLD(配列番号367)、CDR-L2は配列YTNNLQT(配列番号368)を含み、CDR-L3は配列YQYDSGFT(配列番号369)を含む。

40

【0076】

50

いくつかの実施形態では、V H 配列は、配列番号 3 6 1 または 3 7 1 に記載の V H 配列を含む。

【0077】

いくつかの実施形態では、V L 配列は、配列番号 3 6 6 または 3 7 6 に記載の V L 配列を含む。

【0078】

いくつかの実施形態では、V H 配列は、配列番号 3 6 1 または 3 7 1 に記載の配列を含み、V L 配列は、配列番号 3 6 6 または 3 7 6 に記載の配列を含む。

【0079】

いくつかの実施形態では、V H 配列は、配列番号 3 6 1 または 3 7 1 に記載の配列と少なくとも 90 %、92 %、95 %、97 %、98、または 99 % の同一性を有する配列を含み、及び／または V L 配列は、配列番号 3 6 6 または 3 7 6 に記載の配列と少なくとも 90 %、92 %、95 %、97 %、98、または 99 % の同一性を有する配列を含む。

10

【0080】

いくつかの実施形態では、本抗体は、配列番号 3 6 5 または 3 7 5 に記載の重鎖配列を含み、配列番号 3 7 0 または 3 8 0 に記載の軽鎖配列を含む。

【0081】

いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号 3 6 5 または 3 7 5 に記載の配列と少なくとも 90 %、92 %、95 %、97 %、98 %、または 99 % の同一性を有する配列を含む重鎖配列、及び配列番号 3 7 0 または 3 8 0 に記載の配列と少なくとも 90 %、92 %、95 %、97 %、98 %、または 99 % の同一性を有する配列を含む軽鎖配列を含む。

20

【0082】

いくつかの実施形態では、抗体は、モノクローナル抗体、中和抗体、アンタゴニスト抗体、アゴニスト抗体、ポリクローナル抗体、アフコシル化抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、全長抗体、及び s c F v である。

【0083】

いくつかの実施形態では、抗体は、s c F v である。

【0084】

いくつかの実施形態では、抗体は、モノクローナル抗体である。

【0085】

いくつかの実施形態では、抗体は、ヒト化抗体である。

30

【0086】

いくつかの実施形態では、抗体は、ヒト抗体である。

【0087】

いくつかの実施形態では、抗体は、F c 領域を含む。

【0088】

いくつかの実施形態では、抗体は、ヒト F c 領域を含む。

【0089】

いくつかの実施形態では、抗体は、活性ヒト F c 領域を含む。

【0090】

いくつかの実施形態では、抗体は、I g G、I g A、I g D、I g E、及び I g M から選択されるクラスの重鎖ヒト定常領域を含む。

40

【0091】

いくつかの実施形態では、抗体は、クラス I g G ならびに、I g G 1、I g G 2、I g G 3、及び I g G 4 から選択されるサブクラスのヒト重鎖定常領域を含む。

【0092】

いくつかの実施形態では、ヒト F c 領域は、野生型ヒト I g G 1 F c 領域を含む。

【0093】

いくつかの実施形態では、ヒト F c 領域は、野生型ヒト I g G 4 F c 領域を含む。

【0094】

50

いくつかの実施形態では、Fc領域は、1つまたは複数のアミノ酸置換を含み、1つまたは複数の置換は、1つまたは複数の置換がないFc領域と比較して、抗体半減期の増加、ADCC活性の増加、ADCP活性の増加、CDC活性の増加、ADCC活性の減少、ADCP活性の減少、またはCDC活性の減少をもたらす。

【0095】

いくつかの実施形態では、Fc領域は、FcγRI、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIc、FcγRIIIa、及びFcγRIIIbからなる群から選択されるFcγ受容体に結合する。

【0096】

いくつかの実施形態では、抗体は、表面プラズモン共鳴（SPR）アッセイによって測定される、約0.5、1、2、3、4、5、6、または 7×10^{-9} M以下のKDでヒトMARCOに結合する。

【0097】

いくつかの実施形態では、ヒトMARCOへの抗体の結合は、二価カチオン依存性である。

【0098】

いくつかの実施形態では、ヒトMARCOへの抗体の結合は、二価カチオン非依存性である。

【0099】

いくつかの実施形態では、二価カチオンは Ca^{2+} または Mg^{2+} を含む。

【0100】

いくつかの実施形態では、抗体は、ヒトMARCOの細胞外ドメインに結合する。

【0101】

いくつかの実施形態では、抗体は、可溶性MARCOに結合する。

【0102】

いくつかの実施形態では、抗体は、ヒトMARCO、カニクイザルMARCO、またはヒト及びカニクイザルMARCOのSRCRDメインに結合する。

【0103】

いくつかの実施形態では、抗体は、ヒトMARCOのSRCRDメイン（配列番号384の残基424～519）に結合する。

【0104】

いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合フラグメントは、MARCO（配列番号384）のQ452、Y472、K473、E450、Q487、T499、H505、D507、S509、またはE511のうちの少なくとも1つに結合する。

【0105】

いくつかの実施形態では、抗体は受容体リガンド遮断活性を有する。

【0106】

いくつかの実施形態では、抗体は、任意に核酸アッセイまたはタンパク質アッセイによって測定される、アイソタイプ対照抗体と比較しての、細胞との接触時の少なくとも1つのサイトカインまたはケモカインの増強された発現を誘導する。

【0107】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのサイトカインまたはケモカインは、IL-1α、IL-1β、IL-2、IL-4、IL-6、IL7R、IL-12、IL12-p70、IL-15、IL-18、IL-27、IP-10、IFN-γ、TNFα、MIP1-α、MIP1-β、MIP-2、CSF2、CSF3、G-CSF、M-CSF、CCL3、CCL4、CCL5、CCL20、CCL24、CXCL1、CXCL3、CXCL8、CXCL9、CXCL10、CXCL12、gro-α、MCP-1、MCP-3、LIF、またはエオタキシンのうちの少なくとも1つを含む。

【0108】

いくつかの実施形態では、細胞接触時に、抗体は、任意に核酸アッセイまたはタンパク

10

20

30

40

50

質アッセイによって測定される、アイソタイプ対照抗体と比較しての、増強されたNK細胞活性化、B細胞制御T細胞増殖、T細胞活性化、またはT細胞分化を誘導する。

【0109】

いくつかの実施形態では、細胞接触時に、抗体は、アイソタイプ対照抗体と比較して、IL-2-STAT5シグナル伝達、NF-κBシグナル伝達、TLRシグナル伝達、接着及び運動性シグナル伝達、細胞骨格再構成シグナル伝達、NF-κBを介したTNFαシグナル伝達、IL-6-JAK-STAT3シグナル伝達、SYKシグナル伝達、MAPKシグナル伝達、TPL2シグナル伝達、カルシウムシグナル伝達、IFNγ応答、またはIFNα応答を誘導する。

【0110】

いくつかの実施形態では、細胞接触時に、抗体は、アイソタイプ対照抗体と比較して、細胞周期経路、細胞生存、細胞接着、Myc標的経路、E2F標的経路、低酸素、mTORシグナル伝達経路、PI3K-AKTシグナル伝達経路、Srcシグナル伝達経路、PKCシグナル伝達経路、上皮間葉移行シグナル伝達経路、酸化的リン酸化、またはMAPKシグナル伝達経路を減少させる。

【0111】

いくつかの実施形態では、細胞接触時に、抗体は、アイソタイプ対照抗体と比較して、IL-1β及び／またはIL-18分泌及び／または食作用によって決定されるインフラマソーム活性化を誘導する。

【0112】

いくつかの実施形態では、細胞接触時に、抗体は、アイソタイプ対照抗体と比較して、骨髓性M2様TAMsのM1様腫瘍関連マクロファージ（TAM）への再分極、及び／または炎症誘発性単球へのmMDSCの再分極を誘導する。

【0113】

いくつかの実施形態では、細胞接触時に、抗体は、アイソタイプ対照抗体と比較して、CD8+ T細胞、CD4+ T細胞、NK細胞、樹状細胞、MHCII+マクロファージ、MHCIIhigh単球、またはMHCIIimid単球を増加させる。

【0114】

いくつかの実施形態では、細胞接触時に、抗体は、アイソタイプ対照抗体と比較して、脾臓中のマクロファージ、辺縁帯マクロファージ、濾胞性B細胞、及び／または赤色髄マクロファージを増加させる。

【0115】

いくつかの実施形態では、細胞接触時に、抗体は、アイソタイプ対照抗体と比較して、TAM、腫瘍関連好中球、形質B細胞、辺縁帯B細胞、CD19+ B細胞、MHCII-単球、及び／またはMHCII-マクロファージを減少させる。

【0116】

いくつかの実施形態では、対象への投与時に、抗体は、アイソタイプ対照抗体と比較して、増強された抗腫瘍記憶応答を誘導する。

【0117】

いくつかの実施形態では、細胞は、MARCO+細胞である。

【0118】

いくつかの実施形態では、細胞は、ヒトMARCO+細胞である。

【0119】

いくつかの実施形態では、MARCO+細胞は、単球、単球性骨髓由来サプレッサー細胞（mMDSC）、またはマクロファージである。

【0120】

いくつかの実施形態では、マクロファージは、腫瘍関連マクロファージ（TAM）または単球由来マクロファージ（MDM）である。

【0121】

いくつかの実施形態では、抗体は、MARCO+細胞の細胞表面上のMARCOに結合

10

20

30

40

50

する。

【0122】

いくつかの実施形態では、抗体は、ヒトMARCOへの結合について、ヒト化PI-HX-3011、PI-HX-3031、PI-HX-3043、PI-HX-3061、PI-HX-3092抗体と競合する；ヒトMARCOに結合する；カニクイザルMARCOに結合する；ヒト及びカニクイザルMARCOに結合する；ヒトMARCOのSRCRドメインに結合する；カニクイザルMARCOのSRCRドメインに結合する；ヒト及びカニクイザルMARCOのSRCRドメインに結合する；ヒトまたはカニクイザルのMARCOに二価カチオン依存的に結合する；ヒトまたはカニクイザルのMARCOに、二価カチオンに依存しない方法で結合する；MARCO+細胞に結合すると、MARCOシグナル伝達を刺激する；MARCO+細胞に結合すると、1つまたは複数の免疫シグナル伝達経路が誘導される；MARCO+細胞への結合時にサイトカインまたはケモカインの分泌を誘導し、任意に、サイトカインまたはケモカインが、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL7R、IL-12、IL12-p70、ILである-15、IL-18、IL-27、IP-10、IFN- γ 、TNF α 、MIP1- α 、MIP1- β 、MIP-2、CSF2、CSF3、G-CSF、M-CSF、CCL3、CCL4、CCL5、CCL20、CCL24、CXCL1、CXCL3、CXCL8、CXCL9、CXCL10、CXCL12、gro- α 、MCP-1、MCP-3、LIF、またはエオタキシンである；MARCO+細胞に結合すると、NK細胞の活性化、B細胞の制御、T細胞の増殖、T細胞の活性化、またはT細胞の分化の増加を誘導する；IL-2-STAT5シグナル伝達、NF- κ Bシグナル伝達、TLRシグナル伝達、接着及び運動性シグナル伝達、細胞骨格再編成シグナル伝達、NF- κ Bを介したTNF α シグナル伝達、IL-6-JAK-STAT3シグナル伝達、SYKシグナル伝達、MAPKシグナル伝達、TPL2シグナル伝達、カルシウムシグナル伝達、IFN γ 応答、またはIFN α 応答を誘導する；細胞周期経路、細胞生存、細胞接着、Myc標的経路、E2F標的経路、低酸素、mTORシグナル伝達経路、PI3K-AKTシグナル伝達経路、Srcシグナル伝達経路、PKCシグナル伝達経路、上皮間葉移行シグナル伝達経路、酸化的リン酸化、またはMAPKシグナル伝達経路を減少させる；IL-1 β 及び／またはIL-18の分泌及び／または食作用によって決定されるインフラマソームの活性化を誘導する；骨髓性M2様TAMからM1様TAMSへの再分極、及び／またはmMDSから炎症性単球への再分極を誘導する；MARCO+細胞に結合すると、脾臓のB細胞を調節する；脾臓及び／または腫瘍において、CD8+ T細胞、CD4+ T細胞、NK細胞、樹状細胞、MHCI+マクロファージ、MHCIhigh単球、及び／またはMHCIimid単球を増加させる；脾臓及び／または腫瘍において、マクロファージ、辺縁帯マクロファージ、濾胞性B細胞、及び／または赤色髄マクロファージを増加させる；脾臓及び／または腫瘍において、TAM、腫瘍関連好中球、形質B細胞、辺縁帯B細胞、CD19+ B細胞、MHCI-単球、及び／またはMHCI-マクロファージを減少させる；MARCO+細胞に結合すると、細胞接着、細胞骨格、走化性、細胞遊走の変化を誘発する；MARCO+細胞に結合すると、接着、移動、走化性細胞周期、T細胞受容体、食作用、オートファジー、及びwnt経路を含む細胞シグナル伝達経路を誘導する；MARCO+骨髓細胞を無能化する；または上記の任意の組み合わせが可能である。

【0123】

いくつかの実施形態では、抗体は、医薬として使用するためのものである。

【0124】

いくつかの実施形態では、抗体は、がんまたは感染症の治療に使用するためのものである。

【0125】

いくつかの実施形態では、抗体はがんの治療に使用するためのものであり、がんは固形腫瘍及び液体腫瘍から選択される。

【0126】

10

20

30

40

50

別の態様では、本明細書に記載の抗体、そのVH、そのVL、その軽鎖、その重鎖、またはその抗原結合部分をコードする単離ポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセットが本明細書に提供され、場合により、単離ポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセットはcDNAである。

【0127】

別の態様では、ポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのセットを含むベクターまたはベクターのセットが本明細書に提供される。

【0128】

別の態様では、ポリヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドのセット、またはベクターもしくはベクターのセットを含む宿主細胞が本明細書に提供される。

【0129】

別の態様では、宿主細胞で抗体またはその抗原結合フラグメントを発現させること、及び発現された抗体を単離することを含む、抗体を産生する方法が本明細書に提供される。

【0130】

別の態様では、単離抗体またはその抗原結合フラグメント、及び薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物が本明細書に提供される。

【0131】

別の態様では、単離抗体もしくはその抗原結合フラグメント、または医薬組成物及び使用説明書を含むキットが本明細書に提供される。

【0132】

別の態様では、抗ヒトMARCO抗体またはその抗原結合フラグメントを含む組成物を対象に投与することを含む、対象における免疫応答を増強させる方法が本明細書に提供される。

【0133】

いくつかの実施形態では、組成物は、ヒトMARCOのSRCRDメイン（配列番号384の残基424～519）に結合する抗体を含む。

【0134】

いくつかの実施形態では、組成物は、単離抗体または医薬組成物を含む。

【0135】

いくつかの実施形態では、抗体は、受容体リガンド遮断活性を有する。

【0136】

いくつかの実施形態では、増強された免疫応答は、適応免疫応答である。

【0137】

いくつかの実施形態では、増強された免疫応答は、自然免疫応答である。

【0138】

いくつかの実施形態では、増強された免疫応答は、任意に核酸アッセイまたはタンパク質アッセイによって測定される、アイソタイプ対照抗体と比較しての、細胞による少なくとも1つのサイトカインまたはケモカインの増強された発現を含む。

【0139】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのサイトカインまたはケモカインは、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL7R、IL-12、IL12-p70、IL-15、IL-18、IL-27、IP-10、IFN- γ 、TNF α 、MIP1- α 、MIP1- β 、MIP-2、CSF2、CSF3、G-CSF、M-CSF、CCL3、CCL4、CCL5、CCL20、CCL24、CXCL1、CXCL3、CXCL8、CXCL9、CXCL10、CXCL12、gro- α 、MCP-1、MCP-3、LIF、またはエオタキシンのうちの少なくとも1つを含む。

【0140】

いくつかの実施形態では、増強された免疫応答は、任意に核酸アッセイまたはタンパク質アッセイによって測定される、アイソタイプ対照抗体と比較しての、増強されたNK細胞活性化、B細胞制御T細胞増殖、T細胞活性化、またはT細胞分化を含む。

10

20

30

40

50

【0141】

いくつかの実施形態では、細胞接触時に、抗体は、アイソタイプ対照抗体と比較して、IL-2-STAT5シグナル伝達、NF-κBシグナル伝達、TLRシグナル伝達、接着及び運動性シグナル伝達、細胞骨格再構成シグナル伝達、NF-κBを介したTNFαシグナル伝達、IL-6-JAK-STAT3シグナル伝達、SYKシグナル伝達、MAPKシグナル伝達、TPL2シグナル伝達、カルシウムシグナル伝達、IFNγ応答、またはIFNα応答を誘導する。

【0142】

いくつかの実施形態では、細胞接触時に、抗体は、アイソタイプ対照抗体と比較して、細胞周期経路、細胞生存、細胞接着、Myc標的経路、E2F標的経路、低酸素、mTORシグナル伝達経路、PI3K-AKTシグナル伝達経路、Srcシグナル伝達経路、PKCシグナル伝達経路、上皮間葉移行シグナル伝達経路、酸化的リン酸化、またはMAPKシグナル伝達経路を減少させる。

10

【0143】

いくつかの実施形態では、細胞接触時に、抗体は、アイソタイプ対照抗体と比較して、IL-1β及び／またはIL-18分泌及び／または食作用によって決定されるインフラマソーム活性化を誘導する。

【0144】

いくつかの実施形態では、細胞接触時に、抗体は、アイソタイプ対照抗体と比較して、骨髄性M2様TAMのM1様TAMへの再分極、及び／またはmMDSCの炎症誘発性単球への再分極を誘導する。

20

【0145】

いくつかの実施形態では、細胞接触時に、抗体は、アイソタイプ対照抗体と比較して、CD8+ T細胞、CD4+ T細胞、NK細胞、樹状細胞、MHCII+マクロファージ、MHCIIhigh単球、またはMHCIIimid単球を増加させる。

【0146】

いくつかの実施形態では、細胞接触時に、抗体は、アイソタイプ対照抗体と比較して、脾臓中のマクロファージ、辺縁帯マクロファージ、濾胞性B細胞、及び／または赤色髄マクロファージを増加させる。

【0147】

いくつかの実施形態では、細胞接触時に、抗体は、アイソタイプ対照抗体と比較して、TAM、腫瘍関連好中球、形質B細胞、辺縁帯B細胞、CD19+ B細胞、MHCII-単球、及び／またはMHCII-マクロファージを減少させる。

30

【0148】

いくつかの実施形態では、抗体は、増強された記憶免疫応答を誘導する。

【0149】

いくつかの実施形態では、細胞は、MARCO+細胞である。

【0150】

いくつかの実施形態では、細胞は、ヒトMARCO+細胞である。

【0151】

いくつかの実施形態では、MARCO+細胞は、単球、単球性骨髄由来サプレッサー細胞(mMDSC)、またはマクロファージである。

40

【0152】

いくつかの実施形態では、マクロファージは、腫瘍関連マクロファージ(TAM)または単球由来マクロファージ(MDM)である。

【0153】

いくつかの実施形態では、抗体は、MARCO+細胞の細胞表面上のMARCOに結合する。

【0154】

いくつかの実施形態では、対象は、ヒトである。

50

【0155】

いくつかの実施形態では、対象は、がんに罹患している。

【0156】

いくつかの実施形態では、がんは、固形がんである。

【0157】

いくつかの実施形態では、がんは、液性がんである。

【0158】

いくつかの実施形態では、がんは、肺癌、肺腺癌、肺扁平上皮癌、肺小細胞癌、腎臓癌、肝臓癌、腎細胞癌、子宮頸癌、卵巣癌、結腸直腸癌、結腸癌、神経芽細胞腫、乳癌、三種陰性乳癌、基底細胞様乳癌、胃癌 (gastric cancer)、胃癌 (stomach cancer)、膀胱癌、前立腺癌、皮膚癌、リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫 (DLBCL)、小リンパ球性リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、中皮腫、膵臓癌、甲状腺癌、子宮内膜癌、頭頸部癌、または頭頸部扁平上皮癌 (HNSC) からなる群から選択される。

10

【0159】

いくつかの実施形態では、がんは、結腸癌、乳癌、基底細胞様乳癌、卵巣癌、または胃癌である。

【0160】

いくつかの実施形態では、MARCOは、非腫瘍免疫細胞と比較して、腫瘍免疫細胞上でより高いレベルで発現される。

20

【0161】

いくつかの実施形態では、IL-10は、非腫瘍免疫細胞と比較して、腫瘍免疫細胞上でより高いレベルで発現される。

【0162】

別の態様では、抗ヒトMARCO抗体またはその抗原結合フラグメントを含む組成物を対象に投与することを含む、対象のがんを治療する方法が本明細書に提供される。

【0163】

いくつかの実施形態では、組成物は、ヒトMARCOのSRCRDメイン (配列番号384の残基424~519) に結合する抗体を含む。

【0164】

いくつかの実施形態では、組成物は、本明細書に開示される抗体またはその医薬組成物を含む。

30

【0165】

別の態様では、抗ヒトMARCO抗体またはその抗原結合フラグメントもしくはその医薬組成物を含む組成物を対象に投与することを含む、対象のがんを治療する方法が本明細書に提供される。

【0166】

いくつかの実施形態では、対象は、免疫療法を以前に受けているか、同時に受けているか、またはその後受けることになる。

【0167】

いくつかの実施形態では、免疫療法は、チェックポイント阻害剤、T細胞のチェックポイント阻害剤、及び抗PD1抗体のうちの少なくとも1つである。

40

【0168】

いくつかの実施形態では、免疫療法は、抗PD1抗体を含む。

【0169】

別の態様では、抗ヒトMARCO抗体またはその抗原結合フラグメント及び免疫療法を含む組成物を対象に投与することを含む、対象のがんを治療する方法が本明細書に提供される。

【0170】

いくつかの実施形態では、組成物は、ヒトMARCOのSRCRDメイン (配列番号3

50

84の残基424～519)に結合する抗体を含む。

【0171】

いくつかの実施形態では、組成物は、本明細書に開示される抗体またはその医薬組成物を含む。

【0172】

いくつかの実施形態では、免疫療法は、チェックポイント阻害剤、T細胞のチェックポイント阻害剤、及び抗PD1抗体のうちの少なくとも1つである。

【0173】

いくつかの実施形態では、免疫療法は、抗PD1抗体を含む。

【0174】

いくつかの実施形態では、対象は、ヒトである。

【0175】

いくつかの実施形態では、がんは、固形がんである。

【0176】

いくつかの実施形態では、がんは、液性がんである。

【0177】

いくつかの実施形態では、がんは、肺癌、肺腺癌、肺扁平上皮癌、肺小細胞癌、腎臓癌、肝臓癌、腎細胞癌、子宮頸癌、卵巣癌、結腸直腸癌、結腸癌、神経芽細胞腫、乳癌、三種陰性乳癌、基底細胞様乳癌、胃癌(gastric cancer)、胃癌(stomach cancer)、膀胱癌、前立腺癌、皮膚癌、リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBCL)、小リンパ球性リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、中皮腫、膵臓癌、甲状腺癌、子宮内膜癌、頭頸部癌、または頭頸部扁平上皮癌(HNSC)からなる群から選択される。

【0178】

いくつかの実施形態では、がんは、結腸癌、乳癌、基底細胞様乳癌、卵巣癌、または胃癌である。

【0179】

いくつかの実施形態では、MARCOは、非腫瘍免疫細胞と比較して、腫瘍免疫細胞上でより高いレベルで発現される。

【0180】

いくつかの実施形態では、IL-10は、非腫瘍免疫細胞と比較して、腫瘍免疫細胞上でより高いレベルで発現される。

【0181】

いくつかの実施形態では、抗体は、アイソタイプ対照抗体と比較して、増強された抗腫瘍記憶応答を誘導する。

【0182】

いくつかの実施形態では、投与は、アイソタイプ対照抗体と比較して、対象における免疫応答を増強させる。

【0183】

いくつかの実施形態では、増強された免疫応答は、適応免疫応答である。

【0184】

いくつかの実施形態では、増強された免疫応答は、自然免疫応答である。

【0185】

いくつかの実施形態では、増強された免疫応答は、任意に核酸アッセイまたはタンパク質アッセイによって測定される、アイソタイプ対照抗体と比較しての、細胞による少なくとも1つのサイトカインまたはケモカインの発現を含む。

【0186】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのサイトカインまたはケモカインは、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL7R、IL-12、IL12-p70、IL-15、IL-18、IL-27、IP-10、IFN- γ 、TNF α 、M

10

20

30

40

50

IP1- α 、MIP1- β 、MIP-2、CSF2、CSF3、G-CSF、M-CSF、CCL3、CCL4、CCL5、CCL20、CCL24、CXCL1、CXCL3、CXCL8、CXCL9、CXCL10、CXCL12、gro- α 、MCP-1、MCP-3、LIF、またはエオタキシンのうちの少なくとも1つを含む。

【0187】

いくつかの実施形態では、増強された免疫応答は、任意に核酸アッセイまたはタンパク質アッセイによって測定される、アイソタイプ対照抗体と比較しての、増強されたNK細胞活性化、B細胞制御T細胞増殖、T細胞活性化、またはT細胞分化を含む。

【0188】

いくつかの実施形態では、細胞接触時に、抗体は、アイソタイプ対照抗体と比較して、IL-2-STAT5シグナル伝達、NF- κ Bシグナル伝達、TLRシグナル伝達、接着及び運動性シグナル伝達、細胞骨格再構成シグナル伝達、NF- κ Bを介したTNF α シグナル伝達、IL-6-JAK-STAT3シグナル伝達、SYKシグナル伝達、MAPKシグナル伝達、TPL2シグナル伝達、カルシウムシグナル伝達、IFN γ 応答、またはIFN α 応答を誘導する。

【0189】

いくつかの実施形態では、細胞接触時に、抗体は、アイソタイプ対照抗体と比較して、細胞周期経路、細胞生存、細胞接着、Myc標的経路、E2F標的経路、低酸素、mTORシグナル伝達経路、PI3K-AKTシグナル伝達経路、Srcシグナル伝達経路、PKCシグナル伝達経路、上皮間葉移行シグナル伝達経路、酸化的リン酸化、またはMAPKシグナル伝達経路を減少させる。

【0190】

いくつかの実施形態では、細胞接触時に、抗体は、アイソタイプ対照抗体と比較して、IL-1 β 及び／またはIL-18分泌及び／または食作用によって決定されるインフラマソーム活性化を誘導する。

【0191】

いくつかの実施形態では、細胞接触時に、抗体は、アイソタイプ対照抗体と比較して、骨髄性M2様TAMのM1様TAMへの再分極、及び／またはmMDSの炎症誘発性単球への再分極を誘導する。

【0192】

いくつかの実施形態では、細胞接触時に、抗体は、アイソタイプ対照抗体と比較して、CD8⁺T細胞、CD4⁺T細胞、NK細胞、樹状細胞、MHCII+マクロファージ、MHCIIhigh単球、またはMHCIImid単球を増加させる。

【0193】

いくつかの実施形態では、細胞接触時に、抗体は、アイソタイプ対照抗体と比較して、脾臓中のマクロファージ、辺縁帯マクロファージ、濾胞性B細胞、及び／または赤色髄マクロファージを増加させる。

【0194】

いくつかの実施形態では、細胞接触時に、抗体は、アイソタイプ対照抗体と比較して、TAM、腫瘍関連好中球(TAN)、形質B細胞、辺縁帯B細胞、CD19⁺B細胞、MHCII⁻単球、及び／またはMHCII⁻マクロファージを減少させる。

【0195】

いくつかの実施形態では、細胞は、MARCO⁺細胞である。

【0196】

いくつかの実施形態では、細胞は、ヒトMARCO⁺細胞である。

【0197】

いくつかの実施形態では、MARCO⁺細胞は、単球、単球性骨髄由来サプレッサー細胞(mMDS)、またはマクロファージである。

【0198】

いくつかの実施形態では、マクロファージは、腫瘍関連マクロファージ(TAM)また

10

20

30

40

50

は単球由来マクロファージ（MDM）である。

【0199】

いくつかの実施形態では、抗体は、MARCO+細胞の細胞表面上のMARCOに結合する。

【0200】

別の態様では、骨髄細胞を抗ヒトMARCO抗体またはその抗原結合フラグメントと接触させることを含む、細胞表面にMARCOを発現する骨髄細胞を無能化する方法が本明細書に提供される。

【0201】

別の態様では、骨髄細胞を本明細書に記載の抗体またはその医薬組成物と接触させることを含む、細胞表面上でMARCOを発現する骨髄細胞を無能化する方法が本明細書に提供される。

【0202】

いくつかの実施形態では、抗体は、ADCC活性、CDC活性、またはADCP活性のうち少なくとも1つによって骨髄細胞を無能化し、任意で、抗体は、ADCC活性によって骨髄細胞を無能化し、任意で、抗体は、CDC活性によって骨髄細胞を無能化し、及び任意で、抗体は、ADCP活性によって骨髄細胞を無能化する。

【0203】

いくつかの実施形態では、骨髄細胞は、MARCO+細胞である。

【0204】

いくつかの実施形態では、骨髄細胞は、ヒトMARCO+細胞である。

【0205】

いくつかの実施形態では、骨髄細胞は、単球、単球性骨髄由来サプレッサー細胞（mMDSC）、またはマクロファージである。

【0206】

いくつかの実施形態では、マクロファージは、腫瘍関連マクロファージ（TAM）または単球由来マクロファージ（MDM）である。

【0207】

いくつかの実施形態では、骨髄細胞は、腫瘍内または脾臓の骨髄細胞である。

【0208】

いくつかの実施形態では、接触は、in vitroまたはin vivoである。

【0209】

いくつかの実施形態では、接触は、対象においてin vivoで起こり、任意で、対象は、がん罹患している。

【0210】

いくつかの実施形態では、対象は、ヒトである。

【0211】

いくつかの実施形態では、がんは、固形がんである。

【0212】

いくつかの実施形態では、がんは、液性がんである。

【0213】

いくつかの実施形態では、がんは、肺癌、肺腺癌、肺扁平上皮癌、肺小細胞癌、腎臓癌、肝臓癌、腎細胞癌、子宮頸癌、卵巣癌、結腸直腸癌、結腸癌、神経芽細胞腫、乳癌、三種陰性乳癌、基底細胞様乳癌、胃癌（gastric cancer）、胃癌（stomach cancer）、膀胱癌、前立腺癌、皮膚癌、リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）、小リンパ球性リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、中皮腫、膵臓癌、甲状腺癌、子宮内膜癌、頭頸部癌、または頭頸部扁平上皮癌（HNSC）からなる群から選択される。

【0214】

いくつかの実施形態では、がんは、結腸癌、乳癌、基底細胞様乳癌、卵巣癌、または胃

10

20

30

40

50

癌である。

【0215】

いくつかの実施形態では、接触は、アイソタイプ対照抗体と比較して、対象における免疫応答を増強させる。

【0216】

いくつかの実施形態では、増強された免疫応答は、適応免疫応答である。

【0217】

いくつかの実施形態では、増強された免疫応答は、自然免疫応答である。

【0218】

いくつかの実施形態では、増強された免疫応答は、任意に核酸アッセイまたはタンパク質アッセイによって測定される、アイソタイプ対照抗体と比較しての、細胞による少なくとも1つのサイトカインまたはケモカインの発現を含む。

10

【0219】

いくつかの実施形態では、少なくとも1つのサイトカインまたはケモカインは、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL7R、IL-12、IL12-p70、IL-15、IL-18、IL-27、IP-10、IFN- γ 、TNF α 、MIP1- α 、MIP1- β 、MIP-2、CSF2、CSF3、G-CSF、M-CSF、CCL3、CCL4、CCL5、CCL20、CCL24、CXCL1、CXCL3、CXCL8、CXCL9、CXCL10、CXCL12、gro- α 、MCP-1、MCP-3、LIF、またはエオタキシンのうちの少なくとも1つを含む。

20

【0220】

いくつかの実施形態では、増強された免疫応答は、任意に核酸アッセイまたはタンパク質アッセイによって測定される、アイソタイプ対照抗体と比較しての、増強されたNK細胞活性化、B細胞制御T細胞増殖、T細胞活性化、またはT細胞分化を含む。

【0221】

いくつかの実施形態では、細胞接触時に、抗体は、アイソタイプ対照抗体と比較して、IL-2-STAT5シグナル伝達、NF- κ Bシグナル伝達、TLRシグナル伝達、接着及び運動性シグナル伝達、細胞骨格再構成シグナル伝達、NF- κ Bを介したTNF α シグナル伝達、IL-6-JAK-STAT3シグナル伝達、SYKシグナル伝達、MAPKシグナル伝達、TPL2シグナル伝達、カルシウムシグナル伝達、IFN γ 応答、またはIFN α 応答する。

30

【0222】

いくつかの実施形態では、細胞接触時に、抗体は、アイソタイプ対照抗体と比較して、細胞周期経路、細胞生存、細胞接着、Myc標的経路、E2F標的経路、低酸素経路、mTORシグナル伝達経路、PI3K-AKTシグナル伝達経路、Srcシグナル伝達経路、PKCシグナル伝達経路、上皮間葉移行シグナル伝達経路、酸化的リン酸化、またはMAPKシグナル伝達経路を減少させる。

【0223】

いくつかの実施形態では、細胞接触時に、抗体は、IL-1 β 及び／またはIL-18分泌及び／または食作用によって決定されるインフラマソーム活性化を誘導する。

40

【0224】

いくつかの実施形態では、細胞接触時に、抗体は、骨髄性M2様TAMのM1様TAMへの再分極、及び／またはmMDSCの炎症誘発性単球への再分極を誘導する。

【0225】

いくつかの実施形態では、細胞接触時に、抗体は、アイソタイプ対照抗体と比較して、CD8+ T細胞、CD4+ T細胞、NK細胞、樹状細胞、MHCII+マクロファージ、MHCIIhigh単球、またはMHCIImid単球を増加させる。

【0226】

いくつかの実施形態では、細胞接触時に、抗体は、アイソタイプ対照抗体と比較して、脾臓中のマクロファージ、辺縁帯マクロファージ、濾胞性B細胞、及び／または赤色髄マ

50

クロファージを増加させる。

【0227】

いくつかの実施形態では、細胞接触時に、抗体は、アイソタイプ対照抗体と比較して、TAM、腫瘍関連好中球、形質B細胞、辺縁帯B細胞、CD19+B細胞、MHCIIE-単球、及び／またはMHCIIE-マクロファージを減少させる。

【0228】

いくつかの実施形態では、対象は、免疫療法を以前に受けているか、同時に受けているか、またはその後受けることになる。

【0229】

いくつかの実施形態では、免疫療法は、チェックポイント阻害剤、T細胞のチェックポイント阻害剤、及び抗PD1抗体のうちの少なくとも1つである。 10

【0230】

いくつかの実施形態では、免疫療法は、抗PD1抗体を含む。

【0231】

いくつかの実施形態では、対象由来の試料中のMARCOタンパク質の発現レベルを決定することは、試料を抗MARCO抗体と接触させること、及び免疫組織化学アッセイまたは可溶性MARCOアッセイを実施することを含む。

【0232】

いくつかの実施形態では、アッセイは免疫組織化学アッセイであり、抗体は、RDM5、RDM9、PI-3010.15、PI-3010.25、またはPI-3030.4 20
1を含む。

【0233】

本発明のこれら及び他の特徴、態様、及び利点は、以下の説明、及び添付の図面に関してよりよく理解されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0234】

【図1】腫瘍組織（左側のバー）対正常組織（右側のバー）における順序付けされたMARCO mRNA発現を示す。

【0235】

【図2】MARCO RNA発現が、ヒト単球由来マクロファージ（MDM）においてIL-10によって誘導されたことを示す。 30

【0236】

【図3】図3Aは、さまざまな腫瘍タイプにおけるMARCOとIL-10発現の相関を示す。図3Bは、TREM2発現、CD45発現、IL-10発現、及びMARCO発現間の相関ヒートマップを示す。

【0237】

【図4】図4Aは、MARCO発現がCRCにおける患者の生存確率と逆相関することを示す。図4Bは、MARCO発現がRCCにおける患者の生存確率と逆相関することを示す。図4Cは、MARCO発現が神経芽細胞腫における患者の生存確率と逆相関することを示す。図4Dは、INSSステージに従って、神経芽細胞腫の疾患重症度の関数としてMARCO発現が増加したことを示している。 40

【0238】

【図5】他の乳癌サブタイプと比較して基底細胞様乳癌においてMARCOが上方制御されることを示す。

【0239】

【図6A】33個の抗ヒトMARCO抗体の、GFP-239T対照細胞（左のバー）、ヒトMARCOを発現する細胞（中央のバー）、またはマウスMARCOを発現する細胞（右のバー）への結合を示す。

【図6B】対照細胞（GFP対照）と比較した、huMARCO、muMARCO、及びCynoMARCOを発現する細胞に結合する1つのMARCO抗体、PI-M014の 50

フローサイトメトリーヒストグラムを示す。

【図 6 C】 h u M A R C O を発現する細胞に結合する P I - M 0 1 4 及びアイソタイプ対照抗体の滴定を示す。

【図 6 D】 ヒト単球由来マクロファージへの P I - M 0 1 4 結合のフローサイトメトリーヒストグラムを示す。

【 0 2 4 0 】

【図 7】 結合競合アッセイの要約を示し、P I - M 0 1 5 及び P I - M 0 1 7 が M A R C O 抗原への結合について互いに競合し、それらが同じ M A R C O エピトープに結合したことを示している。

【 0 2 4 1 】

【図 8 A】 M A R C O がヒト M D M で発現されることを示す。

【図 8 B】 M A R C O が原発性ヒト腫瘍試料（胃癌及び卵巣癌）由来の腫瘍関連マクロファージ（T A M）において発現されることを示す。

【 0 2 4 2 】

【図 9】 R D M - 9 5 1 4 が用量依存的に M A R C O への L D L 結合もブロックしたことを示す。

【 0 2 4 3 】

【図 1 0】 図 1 0 A は、R D M - 9 5 1 4 が、C T 2 6 腫瘍及び P y 8 1 1 9 腫瘍から単離された M H C I I ^{h i g h} T A M 及び M H C I I ^{l o w} T A M 上の表面発現 M A R C O に結合したことを示す。図 1 0 B は、C T 2 6 同系腫瘍モデルにおいて M A R C O が T A M 及び単球で発現されることを示す。

【 0 2 4 4 】

【図 1 1】 図 1 1 A は、抗マウス M A R C O 抗体 P I - H X - 3 0 1 7（左バー、P I - 3 0 0 9 に改名）、P I - H X - 3 0 1 6（中央左バー、P I - 3 0 0 8 に改名）、P I - H X - 3 0 2 1（中央右バー、P I - 3 0 0 7 に改名）及び P I - H X - 3 0 1 2（右のバー）が、それぞれマウス B M D M に結合したことを示す。図 1 1 B は、同じ抗体が、C T 2 6 同系腫瘍モデル（n = 2）の腫瘍から単離された T A M（右バー）及び単球（左バー）上の M A R C O にも結合したことを示す。

【 0 2 4 5 】

【図 1 2】 アイソタイプ抗体、P D - 1 抗体のみ、または P I - 3 0 0 8 と P D - 1 抗体、P I - 3 0 0 7 と P D - 1 抗体、P I - 3 0 0 9 と P D - 1 抗体、及び P I - 3 0 0 7 と P D - 1 抗体で処置したマウス群における腫瘍体積を示す。

【 0 2 4 6 】

【図 1 3 A】 アイソタイプ対照抗体で処置された個々のマウスにおける腫瘍体積を示す。

【図 1 3 B】 抗 P D - 1 抗体で処置された個々のマウスにおける腫瘍体積を示す。

【図 1 3 C】 P I - 3 0 0 8 及び抗 P D - 1 抗体で処置された個々のマウスにおける腫瘍体積を示す。

【図 1 3 D】 P I - 3 0 0 9 及び抗 P D - 1 抗体で処置された個々のマウスにおける腫瘍体積を示す。

【図 1 3 E】 アイソタイプ対照抗体で処置された個々のマウスにおける腫瘍体積を示す。

【図 1 3 F】 フコシル化 P I - 3 0 0 8 で処置された個々のマウスにおける腫瘍体積を示す。

【図 1 3 G】 アフコシル化 P I - 3 0 0 8 で処置した個々のマウスの腫瘍体積を示す。

【図 1 3 H】 示された抗体で処置されたマウスにおける腫瘍体積を示す。

【図 1 3 I】 示された抗体で処置されたマウスにおける腫瘍体積を示す。

【図 1 3 J】 w t F c P I - 3 0 0 8 及び P D - 1 抗体と比較した、アイソタイプ対照抗体（w t F c）で処置したマウスにおける腫瘍増殖阻害のパーセンテージ（T G I %）を示す。

【図 1 3 K】 デッド F c P I - 3 0 2 1 及び P D - 1 抗体と比較した、アイソタイプ対照抗体（エフェクターデッド F c）で処置したマウスにおける腫瘍増殖阻害のパーセンテージ

10

20

30

40

50

ージ (TGI%) を示す。

【0247】

【図14】抗MARCO及び抗PD-1抗体で以前に処置されたマウスにおける再移植されたCT26腫瘍細胞及びEMT6細胞の腫瘍体積を示す。

【0248】

【図15】図15Aは、PD研究のタイムラインを示す。図15Bは、アイソタイプ抗体またはPI-3008で処置されたマウスにおけるCT26腫瘍体積を示す。図15Cは、1回目及び2回目の投与後のマウスにおけるPI-3008抗体の定量化を示す。

【0249】

【図16A】PI-3008で処置されたCT26マウスのTME内での炎症誘発性分子の発現を示す。

10

【図16B】PI-3008での*in vitro*または*in vivo*処置後のBMDM及びCT26腫瘍において上方制御された遺伝子の比較を示す。

【0250】

【図17】図17Aは、PI-HX-3061 VHとヒトVHフレームワーク配列及びPI-HX-3061に基づく3つのヒト化VH配列との配列比較を示す。図17Bは、PI-HX-3061 VLとヒトVLフレームワーク配列及びPI-HX-3061に基づく1つのヒト化VL配列との配列比較を示す。

【0251】

【図18】PI-HX-3031 VLとヒトVLフレームワーク配列及びPI-HX-3031に基づく6つのヒト化VL配列との配列比較を示す。

20

【0252】

【図19】競合アッセイにおいて抗MARCO抗体及びAF488蛍光細菌とともにインキュベートした細胞の幾何平均蛍光強度 (gMFI) を示す。細胞を抗MARCO抗体とブレインキュベーションすると、細菌の結合と蛍光シグナルが用量依存的に減少した。

【0253】

【図20】図20Aは、MARCOを過剰発現する293T細胞に結合するが、PBL (末梢血白血球) に存在する免疫細胞には結合しないキメラ抗体の結合を示す。好酸球結合は、hIgG1アイソタイプ対照を含むすべての試験済み抗体で非特異的であった。PI-3010は左に、PI-3030は左中央に、PI-3031は右中央に、アイソタイプ対照hIgG1を右に示している。図20Bは、子宮内膜癌 (原発性ヒト腫瘍) 由来のTAM及び単球に対するPI-HX-3031の結合を示す。抗体結合は右のピーク、アイソタイプ対照の結合は左のピークである。

30

【0254】

【図21】ヒト及びマウスのMARCOにおける野生型SRCRDメインの配列比較、ならびに示されたマウス及びヒトの組換え変異体タンパク質においてなされた突然変異を示す。

【0255】

【図22】ヒト及びマウスのMARCOにおける野生型SRCRDメインのアミノ酸残基、ならびに示された組換え変異体タンパク質においてなされた突然変異を示す。

40

【0256】

【図23】組換えヒトSRCR MARCO hVar3タンパク質への示された抗体の結合を示す。

【0257】

【図24】マウスSRCR (左、Q452) 及びヒトSRCR (右、D452) における重複SRCRエピトープ残基 (丸で囲んだ) を示す。

【0258】

【図25】Aは、PI-3025のPK標準検量線を示す。Bは、PI-3048のPK標準検量線を示す。

【0259】

50

【図 26】図 26 A は、リガンド結合 PK アッセイにおける PI-3025 及び PI-3048 の濃度-時間プロファイルを示す。図 26 B は、総 PK アッセイにおける PI-3025 及び PI-3048 の濃度-時間プロファイルを示す。

【0260】

【図 27】抗 MARCO 抗体による処置後の 2 つの異なるドナー由来の hMDM 中のサイトカイン及びその他の関連遺伝子発現 (MIP-1 α 、IL-27、LIF、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IP-10、IL-6、IL-10、CD40、IL-12p70、G-CSF、IFN γ 、GM-CSF、TNF α 、MIP-1 β 、MCP-1、MIG、gro- α 、IL-1 α 、IL-15、MCP-3、M-CSF、及び VEGF-A) を提供する。

10

【0261】

【図 28】PI-3010.15、PI-3010.25、PI-3030.41、または hIgG1 対照で処理した後の、示された遺伝子の qPCR mRNA 発現データを提供する。

【0262】

【図 29-1】ヒト及びマウス MARCO mAb が同様の経路調節を駆動することを示す。

【図 29-2】図 29-1 の説明を参照のこと。

【0263】

【図 30】hDTC で抗 MARCO 抗体によって増加する上位の免疫活性化遺伝子及び経路には、IL-2-STAT5 シグナル伝達、NF- κ B を介した TNF α シグナル伝達、IL-6-JAK-STAT3 シグナル伝達、炎症反応、IFN γ 応答、及び IFN α 応答が含まれることを示す。

20

【0264】

【図 31-1】PI-3010.15 がヒト抑制性マクロファージ (M2c) で炎症誘発性サインを誘導したことを示す。

【図 31-2】図 31-1 の説明を参照のこと。

【0265】

【図 32】PI-3010.15 及び PI-3030.41 によって誘導された示されたサイトカイン発現倍率変化の比較を提供する。

30

【0266】

【図 33】図 33 A は、PI-3008 が、C57BL/6 マウスからの非分極マクロファージにおいて、インフラマソームによる統計的に有意な IL-1 β 分泌を誘導したことを示す。図 33 B は、PI-3008 が、C57BL/6 マウスからの IL-10 分極マクロファージにおけるインフラマソームによる統計的に有意な IL-1 β 分泌を誘導したことを示す。図 33 C は、PI-3008 が、Balb/c マウス由来の非分極マクロファージにおいてインフラマソームによる統計的に有意な IL-1 β 分泌を誘導したことを示す。図 33 D は、PI-3008 が、Balb/c マウスからの IL-10 分極マクロファージにおいて、インフラマソームによる統計的に有意な IL-1 β 分泌を誘導したことを示す。

40

【0267】

【図 34】図 34 A は、PI-3025 (IgG1 フォーマット) 及び PI-3048 (IgG4 フォーマット) が、0.1 μ g/ml LPS+ATP 及び 1 μ g/ml LSP+ATP とのインキュベーション後に、IL-10 分極マクロファージにおいて統計的に有意な IL-1 β 分泌を誘導したことを示す。図 34 B は、1 μ g/ml の LPS+ATP で処置した後、PI-3048 が IL-1 β 分泌を誘導したことを示す。PI-3025 のバーは各群の左から 2 番目に表示され、PI-3048 のバーは各群の右側に表示される。

【0268】

【図 35】PI-3010.15、PI-3010.25、及び PI-3030.41 が

50

LPS及びATPで処置した場合に未処理条件と比較してIL-1 β 産生を誘導したことを示す。

【0269】

【図36】PI-3008がEMT6モデルで単剤として抗腫瘍活性を示したことを示す。アイソタイプ対照抗体で処置したマウスの腫瘍体積を右パネルに示し、PI-3008抗体で処置したマウスの腫瘍体積を左パネルに示す。PI-3008処置マウスは、レスポonderとノンレスポonderに分類した。

【0270】

【図37】PI-3008がE0771モデルで単剤として抗腫瘍活性を示したことを示す。アイソタイプ対照抗体で処理したマウスの腫瘍体積を右上と右下のパネルに示し、PD-1抗体で処理したマウスの腫瘍体積を左上のパネルに示し、PI-3008抗体で処理したマウスの腫瘍体積を左下のパネルに示す。

10

【0271】

【図38A】PI-3008を投与されたマウスが、アイソタイプ対照と比較して統計的に有意な腫瘍体積の減少を示したことを示す($p=0.0037$)。

【図38B】アイソタイプ抗体及びPI-3008についての腫瘍増殖阻害(TGI)のパーセンテージを示す。

【図38C】PI-3008及びエフェクターデッドPI-3021の両方が、E0771モデルにおいて抗腫瘍活性を有することを示す。

【0272】

【図39A】E0771 PD/PK/有効性研究タイムラインの概略図を提供する。

20

【図39B】アイソタイプ対照処置マウス及びPI-3008処置マウスにおける研究過程にわたる腫瘍体積を示す。

【図39C】アイソタイプ対照マウスにおける個々の腫瘍体積を提供する。

【図39D】PI-3008マウスの個々の腫瘍体積を提供する。

【図39E】28日目の最終腫瘍体積を提供する。

【図39F】PI-3008の血清レベルを提供する。

【0273】

【図40】図40Aは、PD-1抗体を用いた単独及び組み合わせ実験におけるPI-3008血清濃度を提供する。図40Bは、組み合わせ実験におけるPD-1抗体血清濃度を提供する。

30

【0274】

【図41A】アイソタイプ対照またはPI-3008の投与後にDABで染色されたCD8⁺T細胞及びNCR1⁺(NK細胞)のIHC画像を提供する。

【図41B】フローサイトメトリーによる炎症性単球浸潤(CD8⁺T細胞、NCR1⁺NK細胞)の定量化を提供する。

【図41C】フローサイトメトリーによるMHCII⁺High Ly6C⁺単球、DC浸潤、及びNK1.1⁺NK細胞の定量化を提供する。

【図41D】示された領域におけるCD206⁺細胞、MARCO⁺細胞、NCR1⁺細胞、及びCD8a⁺細胞の定量化を提供する。

40

【0275】

【図42】図42Aは、E0771モデル腫瘍上清中でPI-3008によって誘導された示された炎症誘発性サイトカイン及びケモカインの発現レベルを提供する。図42Bは、腫瘍上清中の投与2後1日目に観察されたT細胞活性化及びNK細胞活性化に関連する示されたサイトカインの発現レベルを提供する。

【0276】

【図43】受容体占有アッセイの結果を提供する。

【0277】

【図44】図44Aは、アイソタイプ対照抗体またはPI-3008で処理した後の脾臓における示された細胞型の定量化を提供する。図44Bは、アイソタイプ対照抗体または

50

P I - 3 0 0 8 で処理した後の脾臓における示された細胞型の定量化を提供する。図 4 4 C は、アイソタイプ対照抗体または P I - 3 0 0 8 で処理した後の脾臓における示された細胞型の定量化を提供する。図 4 4 D は、アイソタイプ対照抗体または P I - 3 0 0 8 で処理した後の脾臓の示された細胞型の定量化を提供する。各図において、アイソタイプ試料は対の左側に表示され、P I - 3 0 0 8 試料は対の右側に表示される。

【0278】

【図 4 5】アイソタイプ対照抗体または P I - 3 0 0 8 で処理した後の脾臓及び血清における示された免疫グロブリン型の定量化を提供する。

【0279】

【図 4 6】2 回目の投与後及びアイソタイプ対照抗体または P I - 3 0 0 8 での処置後の試験終了時の脾臓における M A R C O 陽性細胞の定量化を提供する。

10

【0280】

【図 4 7】図 4 7 A は、アイソタイプ対照抗体または P I - 3 0 0 8 で処理した後の脾臓における示された細胞型の定量化を提供する。図 4 7 B は、アイソタイプ対照抗体または P I - 3 0 0 8 で処理した後の脾臓における示された細胞型の定量化を提供する。図 4 7 C は、アイソタイプ対照抗体または P I - 3 0 0 8 で処理した後の脾臓における示された細胞型の定量化を提供する。図 4 7 D は、アイソタイプ対照抗体または P I - 3 0 0 8 で処理した後の脾臓における示された細胞型の定量化を提供する。

【0281】

【図 4 8】図 4 8 A は、アイソタイプ対照抗体または P I - 3 0 0 8 で処理した後の脾臓における組織区画当たりの陽性細胞のパーセンテージの定量化を提供する。図 4 8 B は、アイソタイプ対照抗体または P I - 3 0 0 8 で処理した後の脾臓における組織区画当たりの陽性細胞のパーセンテージの定量化を提供する。図 4 8 C は、アイソタイプ対照抗体または P I - 3 0 0 8 で処理した後の脾臓における組織区画当たりの陽性細胞のパーセンテージの定量化を提供する。図 4 8 D は、アイソタイプ対照抗体または P I - 3 0 0 8 で処理した後の脾臓における組織区画当たりの陽性細胞のパーセンテージの定量化を提供する。各図において、アイソタイプ試料は対の左側に表示され、P I - 3 0 0 8 試料は対の右側に表示される。

20

【0282】

【図 4 9】アイソタイプ対照処置腫瘍と比較して、I H C によって測定されるように、P I - 3 0 0 8 が C D 8 + T 細胞及び細胞毒性マーカーグランザイム B の増加を誘導したことを示す。

30

【0283】

【図 5 0】脾臓の辺縁帯マクロファージにおける M A R C O レベルの変化を示しており、非 P I - 3 0 0 8 競合抗マウス M A R C O I H C 適合抗体で染色した場合、辺縁帯領域に顕著なギャップがある。

【0284】

【図 5 1 A】上部パネルの高 p H (E R 2) エピトープ検索条件を使用して 2 . 5 μ g / m L R D M 5 で染色された結腸直腸腫瘍組織 (左) 及び肺腫瘍組織 (右) の代表的な画像を示す。下のパネルは、高 p H (E R 2) エピトープ検索条件を使用して 2 . 5 μ g / m L R D M 5 で染色された、肺、脾臓、及び肝臓からの正常組織コアの代表的な画像を提供する。暗いゲイ色は、M A R C O を発現する骨髓細胞の陽性染色を示す。

40

【図 5 1 B】R D M 5 抗体での I H C 染色後の示された癌タイプにおける陽性 M A R C O 癌症例のパーセンテージを示す。

【図 5 1 C】R D M 5 抗体で I H C 染色した後の、示された癌タイプにおける I H C スコアを示す。

【0285】

【図 5 2】いくつかの抗 M A R C O 抗体の M A R C O への結合がカルシウム依存性であったことを示す。

【0286】

50

【図 5 3】示された M A R C O 抗体のヒト及びカニクイザル M A R C O 発現細胞株への結合を示す。

【 0 2 8 7 】

【図 5 4】一過性トランスフェクションによって作製された参照抗体と比較した、安定トランスフェクション法によって産生された抗体の M A R C O 発現細胞への結合を示す。

【 0 2 8 8 】

【図 5 5】図 5 5 A は、R G - 3 0 0 0 A の s M A R C O 較正曲線を示す。図 5 5 B は、正常及び癌血清試料における s M A R C O レベルを示す。

【 0 2 8 9 】

【図 5 6 - 1】M A R C O 抗体、P D - 1 抗体、組み合わせ、またはアイソタイプ抗体で治療した後の B 細胞欠損マウスの腫瘍体積を示す。

10

【図 5 6 - 2】図 5 6 - 1 の説明を参照のこと。

【 0 2 9 0 】

【図 5 7】4 時間または 2 4 時間で示されたアゴニストと組み合わせた P I - 3 0 1 0 . 1 5 またはアイソタイプ抗体によって誘導された N F - k B レポーター活性を示す。

【 0 2 9 1 】

【図 5 8】P I - 3 0 0 8 処置が、初期の時点で E 0 7 7 1 モデルの腫瘍において示されたサイトカイン及びケモカインを誘導したことを示す。

【 0 2 9 2 】

【図 5 9】P I - 3 0 0 8 処置が、初期の時点で E 0 7 7 1 モデルの脾臓において示されたサイトカイン及びケモカインを誘導したことを示す。

20

【 0 2 9 3 】

【図 6 0】アイソタイプ対照抗体または P I - 3 0 0 8 の投与後 2 日目及び 5 日目における示された腫瘍骨髓細胞タイプの定量化を提供する。

【 0 2 9 4 】

【図 6 1】アイソタイプ対照抗体または P I - 3 0 0 8 の投与後 2 日目及び 5 日目における示された腫瘍骨髓細胞タイプの定量化を提供する。

【 0 2 9 5 】

【図 6 2】アイソタイプ対照抗体または P I - 3 0 0 8 の投与後 2 日目及び 5 日目における示された腫瘍骨髓細胞タイプの定量化を提供する。

30

【 0 2 9 6 】

【図 6 3】アイソタイプ対照抗体または P I - 3 0 0 8 の投与後 2 日目及び 5 日目における示された腫瘍リンパ系細胞タイプの定量化を提供する。

【 0 2 9 7 】

【図 6 4】アイソタイプ対照抗体または P I - 3 0 0 8 の投与後 5 日目における示された脾臓リンパ系細胞タイプの定量化を提供する。

【 0 2 9 8 】

【図 6 5】アイソタイプ対照抗体または P I - 3 0 0 8 の投与後 5 日目における示された脾臓リンパ系細胞または骨髓細胞タイプの定量化を提供する。

【 0 2 9 9 】

40

【図 6 6】アイソタイプ対照抗体または P I - 3 0 0 8 の投与後 5 日目における示された脾臓骨髓細胞タイプの定量化を提供する。

【 0 3 0 0 】

【図 6 7】アイソタイプ対照抗体または P I - 3 0 0 8 の投与後 5 日目における示された脾臓骨髓細胞タイプの定量化を提供する。

【 0 3 0 1 】

【図 6 8】アイソタイプ対照抗体または P I - 3 0 0 8 の投与後 5 日目における示された脾臓骨髓細胞タイプの定量化を提供する。

【 0 3 0 2 】

【図 6 9】アイソタイプ対照抗体または P I - 3 0 0 8 の投与後 5 日目における示された

50

血液中の細胞タイプの定量化を提供する。

【0303】

【図70】治療用MARCO抗体の受容体占有が、脾臓及び腫瘍におけるMARCO発現細胞において達成されたことを示す。

【0304】

【図71】PI-3010.15が示された炎症誘発性サイトカインの発現を誘導したことを示す。

【発明を実施するための形態】

【0305】

詳細な説明

10

定義

特許請求の範囲及び明細書で使用される用語は、特に明記しない限り、以下に記載するように定義する。

【0306】

「改善」という用語は、疾患状態、例えば、がんの疾患状態の治療における任意の治療的に有益な結果を意味し、その予防、重症度もしくは進行の軽減、寛解、または治癒を含む。

【0307】

「in situ」という用語は、生きている生物とは別個に成長する生きた細胞、例えば、組織培養で成長する過程で起こるプロセスを指す。

20

【0308】

「in vivo」という用語は、生体内で発生するプロセスを指す。

【0309】

本明細書で使用される「哺乳動物」という用語は、ヒト及び非ヒトの両方を含み、ヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、ネズミ、ウシ、ウマ、及びブタを含むがこれらに限定されない。

【0310】

パーセント「同一性」という用語は、2つ以上の核酸またはポリペプチド配列の文脈において、以下に記載する配列比較アルゴリズム（例えば、BLASTP及びBLASTNまたは当業者が利用できる他のアルゴリズム）の1つを使用して、または目視検査により測定された、最大対応性について比較及びアラインメントされる時に、同一である特定のパーセンテージのヌクレオチドまたはアミノ酸残基を有する、2つ以上の配列または部分配列を指す。用途に応じて、パーセント「同一性」は、比較される配列の領域上にわたり、例えば、機能ドメイン上にわたり、あるいは、比較される2つの配列の全長上にわたり存在することができる。

30

【0311】

配列比較のため、典型的には、1つの配列が基準配列の役割を果たし、これと試験配列が比較される。配列比較アルゴリズムを使用する場合、試験配列及び参照配列をコンピュータに入力し、必要に応じてサブシーケンス座標を指定し、配列アルゴリズムプログラムパラメーターを指定する。その後、配列比較アルゴリズムは、所定のプログラムパラメーターに基づいて、参照配列に対する試験配列（複数可）の配列同一性パーセントを算出する。

40

【0312】

比較のための配列の最適なアラインメントは、例えば、Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981)の局所的相同性アルゴリズムにより、Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970)の相同性アラインメントアルゴリズムにより、Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988)の類似性探索方法により、これらのアルゴリズムのコンピュータ化実装により (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Compu

50

ter Group, 575 Science Dr., Madison, Wis. におけるGAP, BESTFIT, FASTA, 及びTFASTA)、または目視検査(一般的には、Ausubel et al.、以下を参照)により実施され得る。

【0313】

パーセント配列同一性及び配列類似性を決定するのに適したアルゴリズムの1つの例は、BLASTアルゴリズムであり、Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)に記載される。BLAST分析を実行するためのソフトウェアは、アメリカ国立生物工学情報センター(ncbi.nlm.nih.gov/)を介して公的に利用可能である。

【0314】

「十分な量」という用語は、所望の効果を生み出すのに十分な量、例えば、細胞内のタンパク質凝集を調節するのに十分な量を意味する。

【0315】

「治療の有効量」という用語は、疾患の症状を改善するのに有効な量である。予防は治療と見なすことができるため、治療の有効量は「予防的有効量」であることができる。

【0316】

この出願で使用される略語には次のものが挙げられる。

【0317】

本明細書及び添付の特許請求の範囲において使用される場合、単数形「a」、「an」、及び「the」は、文脈が別途明確に指示しない限り、複数の指示対象を含むことに留意しなければならない。

【0318】

抗体
構造

本願は、MARCOタンパク質に結合する抗体を含む抗体及び組成物を提供する。このような抗体には、免疫応答を増強、強化、または誘導するか、または骨髄細胞を殺傷、無能化、または枯渇させる抗体が含まれる。

【0319】

「抗体」という用語は、本明細書ではその最も広義な意味で使用され、抗原またはエピトープに特異的に結合する1つまたは複数の抗原結合ドメインを含む特定のタイプの免疫グロブリン分子を含む。抗体には、完全な抗体(例えば、完全な免疫グロブリン)、抗体フラグメント、及び多重特異性抗体が具体的に含まれる。

【0320】

認識される免疫グロブリン遺伝子は、 κ 定常領域遺伝子、 λ 定常領域遺伝子、 α 定常領域遺伝子、 γ 定常領域遺伝子、 δ 定常領域遺伝子、 ϵ 定常領域遺伝子、及び μ 定常領域遺伝子と、莫大な数の免疫グロブリン可変領域遺伝子を含む。軽鎖は、 κ または λ のいずれかに分類される。抗体または免疫グロブリンの「クラス」は、その重鎖によって保有される定常ドメインまたは定常領域の型を指す。5つの主要な抗体クラスIgA、IgD、IgE、IgG、及びIgMが存在し、これらのうちの数個は、サブクラス(アイソタイプ)、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、及びIgA2にさらに細分化され得る。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインはそれぞれ、 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 、及び μ と呼ばれる。

【0321】

例示的な免疫グロブリン(抗体)構造単位は、2対のポリペプチド鎖から構成され、各対は、1つの「軽」鎖(約25kD)及び1つの「重」鎖(約50~70kD)を有し、例えば、軽鎖と重鎖の対ホモ二量体である。各鎖のN末端は、抗原認識を主に担う約100~110個以上のアミノ酸の可変領域を規定する。用語「軽鎖可変」(VL)及び「重鎖可変」(VH)は、これらの軽鎖及び重鎖ドメインをそれぞれ指す。IgG1重鎖は、N末端~C末端までそれぞれVH、CH1、CH2、及びCH3ドメインで構成される。軽鎖は、N末端~C末端までのVL及びCLドメインで構成される。IgG1重鎖は、C

10

20

30

40

50

H1ドメインとCH2ドメインの間にヒンジを含む。特定の実施形態では、免疫グロブリン構築物は、治療用ポリペプチドに連結されたIgG、IgM、IgA、IgD、またはIgE由来の少なくとも1つの免疫グロブリンドメインを含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体に見られる免疫グロブリンドメインは、ダイアボディまたはナノボディなどの免疫グロブリンベースの構築物に由来するか、またはそれらに誘導される。特定の実施形態では、本明細書に記載の免疫グロブリン構築物は、ラクダ抗体などの重鎖抗体由来の少なくとも1つの免疫グロブリンドメインを含む。特定の実施形態では、本明細書で提供される免疫グロブリン構築物は、ウシ抗体、ヒト抗体、ラクダ抗体、マウス抗体または任意のキメラ抗体などの哺乳動物抗体由来の少なくとも1つの免疫グロブリンドメインを含む。

10

【0322】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、重鎖を含む。一実施形態では、重鎖は、IgAである。一実施形態では、重鎖は、IgDである。一実施形態では、重鎖は、IgEである。一実施形態では、重鎖は、IgGである。一実施形態では、重鎖は、IgMである。一実施形態では、重鎖は、IgG1である。一実施形態では、重鎖は、IgG2である。一実施形態では、重鎖は、IgG3である。一実施形態では、重鎖は、IgG4である。一実施形態では、重鎖は、IgA1である。一実施形態では、重鎖は、IgA2である。

【0323】

本明細書で使用される「超可変領域」または「HVR」という用語は、配列が超可変である、及び／または構造的に定義されたループ（「超可変ループ」）を形成する、抗体可変ドメインの領域の各々を指す。一般に、天然4本鎖抗体は、6つのHVRを含み、3つはVH（H1、H2、H3）中にあり、3つはVL（L1、L2、L3）中にある。HVRは一般に、超可変ループからの及び／または「相補性決定領域」（CDR）からのアミノ酸残基を含み、このうち後者が、配列可変性が最も高く、及び／または抗原認識に関与する。VHにおけるCDR1を除いて、CDRは一般に、超可変ループを形成するアミノ酸残基を含む。超可変領域（HVR）は、「相補性決定領域」（CDR）とも呼ばれ、これらの用語は、抗原結合領域を形成する可変領域の部分に関して、本明細書では同義に使用される。この特定の領域は、Kabat et al., U. S. Dept. of Health and Human Services, Sequences of Proteins of Immunological Interest (1983) 及び Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) により記載されており、定義は、互いに比較した時、アミノ酸残基の重複またはサブセットを含む。それにも関わらず、抗体またはその変異体のCDRを指すいずれかの定義の適用は、本明細書で定義及び使用される用語の範囲内にあることが意図される。特定のCDRを包含する正確な残基番号は、CDRの配列及びサイズにより変動するであろう。当業者らは、抗体の可変領域アミノ酸配列を考慮すると、どの残基が特定のCDRを含むかを規定通りに判定し得る。

20

30

【0324】

CDRのアミノ酸配列境界は、Kabat et al., 上掲（「Kabat」番号付けスキーム）；Al-Lazikani et al., 1997, J. Mol. Biol., 273:927-948（「Chothia」番号付けスキーム）；MacCallum et al., 1996, J. Mol. Biol., 262:732-745（「Contact」番号付けスキーム）；Lefranc et al., Dev. Comp. Immunol., 2003, 27:55-77（「IMGT」番号付けスキーム）；及びHonegge and Pluckthun, J. Mol. Biol., 2001, 309:657-70（「Aho」番号付けスキーム）（これらのそれぞれは、全体が参照により組み込まれる）により記載されるものを含む、多数の既知の番号付けスキームのいずれかを使用して、当業者により決定することができる。

40

【0325】

50

表 A は、K a b a t 及び C h o t h i a スキームによって同定された C D R - L 1、C D R - L 2、C D R - L 3、C D R - H 1、C D R - H 2、及び C D R - H 3 の位置を提供する。C D R - H 1 では、残基の番号付けは、K a b a t 及び C h o t h i a の両方の番号付けスキームを使用して提供される。

【0326】

C D R は、例えば、b i o i n f . o r g . u k / a b s / a b n u m / で入手可能な且つ全体が参照により組み込まれる A b h i n a n d a n a n d M a r t i n , I m m u n o l o g y , 2 0 0 8 , 4 5 : 3 8 3 2 - 3 8 3 9 に記載される、A b n u m などの抗体番号付けソフトウェアを使用して、割り当てられてもよい。

【0327】

【表 A】

10

表 A. K a b a t 及び C h o t h i a 番号付けスキームによる C D R の残基。

CDR	Kabat	Chothia
L1	L24~L34	L24~L34
L2	L50~L56	L50~L56
L3	L89~L97	L89~L97
H1 (Kabat 番号付け)	H31~H35B	H26~H32 または H34*
H1 (Chothia 番号付け)	H31~H35	H26~H32
H2	H50~H65	H52~H56
H3	H95~H102	H95~H102

20

*C D R - H 1 の C 末端は、K a b a t 番号付け規則を使用して番号付けされる場合、C D R の長さに応じて H 3 2 と H 3 4 の間で変化する。

【0328】

「E U 番号付けスキーム」は一般に、抗体重鎖定常領域内の残基に言及する時に使用される（例えば、上掲の K a b a t e t a l . で報告されるように）。別途記載のない限り、E U 番号付けスキームは、本明細書に記載の抗体重鎖定常領域の残基を指すために使用される。

30

【0329】

本明細書で使用される「単鎖」という用語は、ペプチド結合によって直線的に連結されたアミノ酸モノマーを含む分子を指す。特定のそのような実施形態では、F a b 軽鎖の C 末端は、単鎖 F a b 分子の F a b 重鎖の N 末端に連結される。本明細書でより詳細に説明するように、s c F v は、ポリペプチド鎖によってその C 末端から重鎖の可変ドメイン（V H）の N 末端に連結された軽鎖の可変ドメイン（V L）を有する。あるいは、s c F v は、ポリペプチド鎖によって V H の C 末端が V L の N 末端に連結されているポリペプチド鎖で構成される。

40

【0330】

「F a b フラグメント」（フラグメント抗原結合とも呼ばれる）は、軽鎖及び重鎖上のそれぞれ可変ドメイン V L 及び V H を伴う軽鎖の定常ドメイン（C L）及び重鎖の第 1 の定常ドメイン（C H 1）を含有する。可変ドメインは、抗原結合に関与する相補性決定ループ（C D R、超可変領域とも呼ばれる）を含む。F a b ' フラグメントは、抗体ヒンジ領域からの 1 つまたは複数のシステインを含む重鎖 C H 1 ドメインのカルボキシ末端に数個の残基の付加により、F a b フラグメントとは異なる。

【0331】

「F (a b ')₂」フラグメントは、ジスルフィド結合によりヒンジ領域の近くで結合

50

されている2つのFab'フラグメントを含有する。F(ab')₂フラグメントは、例えば、組み換え法またはインタクト抗体のペプシン消化により生成され得る。F(ab')₂フラグメントは、例えば、β-メルカプトエタノールで処理することにより解離させることができる。

【0332】

「Fv」フラグメントは、1つの重鎖可変ドメイン及び1つの軽鎖可変ドメインの非共有結合で連結された二量体を含む。

【0333】

「単鎖Fv」または「scFv」は、抗体のVH及びVLドメインを含み、これらのドメインは、単一のポリペプチド鎖に存在する。一実施形態では、Fvポリペプチドはさらに、scFvが抗原結合のための所望の構造を形成することを可能にするVHドメイン及びVLドメイン間にポリペプチドリッカーを含む。scFvのレビューについては、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)を参照のこと。HER2抗体scFvフラグメントは、WO93/16185；米国特許第5,571,894号；及び米国特許第5,587,458号に記載される。

【0334】

「scFv-Fc」フラグメントは、Fcドメインに結合しているscFvを含む。例えば、Fcドメインは、scFvのC末端に結合され得る。Fcドメインは、scFv内の可変ドメインの配向（すなわち、VH-VLまたはVL-VH）に応じて、VHまたはVLの後に続き得る。当技術分野で知られているか、または本明細書に記載されている任意の適切なFcドメインを使用することができる。いくつかの場合では、Fcドメインは、IgG4 Fcドメインを含む。いくつかの場合では、Fcドメインは、IgG1 Fcドメインを含む。

【0335】

「単ドメイン抗体」または「sdAb」という用語は、抗体の1つの可変ドメインが他の可変ドメインの存在なしに抗原に特異的に結合する分子を指す。単ドメイン抗体及びそのフラグメントは、Arabi Ghahroudi et al., FEBS Letters, 1998, 414:521-526及びMuyldermans et al., Trends in Biochem. Sci., 2001, 26:230-245に記載され、これらのそれぞれは、全体が参照により組み込まれる。単ドメイン抗体は、sdAbまたはナノボディとしても知られる。Sdabはかなり安定しており、抗体のFc鎖との融合パートナーとして簡単に発現しやすい(Harmsen MM, De Haard HJ (2007). "Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments". Appl. Microbiol Biotechnol. 77 (1): 13-22)。

【0336】

天然に存在する抗体構造と実質的に類似する構造を有し且つFc領域を含む重鎖を有する抗体を指す「全長抗体」、「インタクト抗体」、及び「全抗体」という用語が本明細書において同義に使用される。例えば、IgG分子を指すために使用される時、「全長抗体」は、2つの重鎖及び2つの軽鎖を含む抗体である。

【0337】

「エピトープ」という用語は、抗体に特異的に結合する抗原の一部を意味する。エピトープは多くの場合、表面にアクセス可能なアミノ酸残基及び／または糖側鎖からなり、特定の3次元構造特性及び特定の電荷特性を有し得る。立体配座及び非立体配座エピトープは、後者ではなく前者への結合が変性溶媒の存在下で失われ得るという点で区別される。エピトープは、結合に直接関与するアミノ酸残基、及び結合に直接関与しない他のアミノ

10

20

30

40

50

酸残基を含み得る。抗体が結合するエピトープは、例えば、異なる点変異を有するM A R C O変異体またはキメラM A R C O変異体への抗体結合の試験などの、エピトープ決定のための既知の手法を使用して決定することができる。いくつかの実施形態では、M A R C OエピトープはS R C Rドメインにある。いくつかの実施形態では、M A R C Oエピトープはコラーゲン様ドメインにある。いくつかの実施形態では、抗M A R C O抗体またはその抗原結合フラグメントは、S R C Rドメインに結合する。いくつかの実施形態では、抗M A R C O抗体またはその抗原結合フラグメントは、コラーゲン様ドメインに結合する。

【0338】

「多重特異性抗体」は、2つ以上の異なるエピトープに集合的に特異的に結合する2つ以上の異なる抗原結合ドメインを含む抗体である。2つ以上の異なるエピトープは、同じ抗原（例えば、細胞により発現される単一のM A R C O分子）または異なる抗原（例えば、同じ細胞により発現される異なるM A R C O分子、もしくはM A R C O分子及び非M A R C O分子）上のエピトープであってよい。いくつかの態様では、多重特異性抗体は、2つの異なるエピトープに結合する（すなわち、「二重特異性抗体」）。一部の態様では、多重特異性抗体は、3つの異なるエピトープに結合する（すなわち、「三重特異性抗体」）。

10

【0339】

「単一特異性抗体」は、単一のエピトープに特異的に結合する1つまたは複数の結合部位を含む抗体である。単一特異性抗体の例は、二価（すなわち、2つの抗原結合ドメインを有する）であるが、2つの抗原結合ドメインのそれぞれで同じエピトープを認識する、天然に存在するI g G分子である。結合特異性は、任意の好適な原子価で存在し得る。

20

【0340】

「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団由来の抗体を指す。実質的に均一な抗体の集団は、モノクローナル抗体の産生中に通常生じ得る変異体を除いて、実質的に類似し且つ同じエピトープ（複数可）に結合する抗体を含む。そのような変異体は一般に、少量でのみ存在する。モノクローナル抗体は通常、複数の抗体から単一の抗体を選択することを含むプロセスにより得られる。例えば、選択プロセスは、ハイブリドーマクローン、ファージクローン、酵母クローン、細菌クローン、または他の組み換えD N Aクロンのプールなど、複数のクローン由来のユニークなクロンの選択であり得る。選択された抗体はさらに、例えば、標的に対する親和性（「親和性成熟」）を改善するため、抗体をヒト化するため、細胞培養における産生を改善するため、及び／または対象における免疫原性を低減させるために、改変することができる。

30

【0341】

「エフェクター機能」は、抗体のF c領域により媒介される生物活性を指し、この活性は、抗体アイソタイプに応じて変動し得る。抗体エフェクター機能の例としては、補体依存性細胞傷害（C D C）を活性化するC 1 q結合、抗体依存性細胞傷害（A D C C）を活性化するF c受容体結合、及び抗体依存性細胞貪食（A D C P）、受容体リガンド遮断、アゴニズム、またはアンタゴニズムが挙げられる。活性F c領域は、A D C C、C D C、及び／またはA D C PなどのF cベースのエフェクター機能が可能な領域である。

40

【0342】

抗M A R C O抗体は、表に示されるクローンなど、本明細書に記載されるものを含み得る。いくつかの実施形態では、抗体は、代替足場を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、代替足場からなる。いくつかの実施形態では、抗体は、代替足場から本質的になる。いくつかの実施形態では、抗体は、抗体フラグメントを含む。いくつかの実施形態では、抗体は、抗体フラグメントからなる。いくつかの実施形態では、抗体は、抗体フラグメントから本質的になる。「M A R C O抗体」、「抗M A R C O抗体」、または「M A R C O特異的抗体」は、抗原M A R C Oに特異的に結合する、本明細書で提供される抗体である。いくつかの実施形態では、抗体は、M A R C Oの細胞外ドメインに結合する。ある特定の実施形態では、本明細所で提供されるM A R C O抗体は、異なる種由来のM A R C Oタンパク質間で保存されるM A R C Oのエピトープに結合する。

50

【0343】

「キメラ型抗体」または「キメラ抗体」という用語は、重鎖及び／または軽鎖の一部が特定の供給源または種に由来するが、重鎖及び／または軽鎖の残りが異なる供給源または種に由来する抗体を指す。

【0344】

非ヒト抗体の「ヒト化」形態は、非ヒト抗体に由来する最小配列を含むキメラ抗体である。ヒト化抗体は、一般に、1つまたは複数のCDRからの残基が非ヒト抗体（ドナー抗体）の1つまたは複数のCDRからの残基によって置換されているヒト抗体（レシピエント抗体）である。ドナー抗体は、所望の特異性、親和性、または生物学的効果を有するマウス、ラット、ウサギ、ニワトリ、または非ヒト霊長類抗体などの任意の適切な非ヒト抗体であり得る。ヒト対象に投与された場合、ヒト化抗体は、非ヒト種の抗体と比較して、免疫応答を誘導する可能性が低く、及び／または重篤でない免疫応答を誘導する。場合によっては、レシピエント抗体の選択されたフレームワーク領域残基は、ドナー抗体からの対応するフレームワーク領域残基によって置換される。ヒト化抗体は、レシピエント抗体またはドナー抗体のいずれにも見られない残基を含み得る。これらの修飾を行って、抗体の性能をさらに洗練することができる。ヒト化抗体を作製する方法の例は、米国特許第6,054,297号、同第5,886,152号、及び同第5,877,293号に見出すことができ、これらのそれぞれは参照によりその全体が組み込まれる。さらなる詳細については、Jones et al., Nature, 1986, 321:522-525; Riechmann et al., Nature, 1988, 332:323-329; 及びPresta, Curr. Op. Struct. Biol., 1992, 2:593-596（これらのそれぞれは、全体が参照により組み込まれる）を参照のこと。

【0345】

いくつかの実施形態では、抗体は、ラットMARCO抗体を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、キメラMARCO抗体を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、ヒトMARCO抗体を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、ヒトMARCO抗体を含む。

【0346】

いくつかの実施形態では、ヒト化MARCO抗体VH配列は、配列番号141に記載のラットVH配列と比較して、16G、19R、23A、37V、42G、48V、49S、82Q、88A、93V、114T、115L、S16G、K19R、V23A、I37V、K42G、I48V、A49S、E82Q、S88A、M93V、V114T、またはM115Lのうちの少なくとも1つを含む。いくつかの実施形態では、ヒト化MARCO抗体VH配列は、EUインデックスに従って番号付けされたG16、R19、A23、V37、G42、V48、S49、Q82、A88、V93、T114、L115のうちの少なくとも1つを含む。いくつかの実施形態では、ヒト化MARCO抗体VH配列は、EUインデックスに従って番号付けされたI38、I48、A49、S54、Q54、A54、G56、S56、Q56、A56、S57、Q57、またはA57のうちの少なくとも1つを含む。

【0347】

いくつかの実施形態では、ヒト化MARCO抗体VL配列は、配列番号146に記載のラットVL配列と比較して、2I、10S、13S、16V、18D、19R、21T、23T、25R、38Q、41G、43A、44P、50D、51A、53S、55E、58V、76S、77S、79Q、85T、99Q、V2I、Y10S、A13S、P16V、E18D、S19R、S21T、S23T、K25R、E38Q、E41G、T43A、N44P、S50D、G51A、T53S、Q55E、T58V、R76S、N77S、E79Q、V85T、及びS99Qのうちの少なくとも1つを含む。いくつかの実施形態では、ヒト化MARCO抗体VL配列は、EUインデックスに従って番号付けされたI2、S10、S13、V16、D18、R19、T21、T23、R25、Q38、G41、A43、P44、D50、A51、S53、E55、V58、S76、S77、Q79、T85、またはQ99のうちの少なくとも1つを含む。いくつかの実施形態では

、ヒト化M A R C O抗体V L配列は、E Uインデックスに従って番号付けされたV 2、R 2 4、K 2 4、Q 3 8、E 3 8、A 4 3、T 4 3、N 4 4、またはP 4 4のうちの少なくとも1つを含む。

【0348】

いくつかの実施形態では、ヒト化M A R C O抗体V H配列は、配列番号231に示されるラットV H配列と比較して、2 V、9 A、11 V、16 A、20 V、38 R、43 Q、46 E、62 Q、63 K、65 Q、66 G、68 V、69 T、70 M、71 T、72 R、73 D、76 T、78 A、79 Y、80 M、81 E、82 L、83 S、84 S、86 R、87 S、92 V、94 Y、96 A、114 T、115 L、I 2 V、P 9 A、L 11 V、E 16 A、I 20 V、K 38 R、N 43 Q、K 46 E、D 62 Q、D 63 K、K 65 Q、Q 66 G、F 68 V、V 69 T、F 70 M、S 71 T、L 72 R、E 73 D、A 76 T、S 78 A、F 79 Y、L 80 M、Q 81 E、I 82 L、N 83 S、N 84 S、N 86 R、I 87 S、T 92 V、F 94 Y、T 96 A、V 114 T、M 115 Lのうちの少なくとも1つを含む。いくつかの実施形態では、ヒト化M A R C O抗体V H配列は、E Uインデックスに従って番号付けされたV 2、A 9、V 11、A 16、V 20、R 38、Q 43、E 46、Q 62、K 63、Q 65、G 66 G、V 68、T 69、M 70、T 71、R 72、D 73、T 76、A 78、Y 79、M 80、E 81、L 82、S 83、S 84、R 86、S 87、V 92、Y 94、A 96、T 114、L 115のうちの少なくとも1つを含む。

10

【0349】

いくつかの実施形態では、ヒト化M A R C O抗体V L配列は、配列番号236に示されるラットV L配列と比較して、9 S、15 V、17 D、18 R、20 T、22 T、24 R、40 P、43 A、45 K、70 D、72 T、73 T、76 S、77 L、82 F、84 T、86 Y、100 Q、106 I、A 9 S、L 15 V、E 17 D、T 18 R、S 20 T、E 22 T、L 24 R、S 40 P、S 43 A、Q 45 K、R 70 D、S 72 T、K 73 T、D 76 S、M 77 L、E 82 F、D 84 T、F 86 Y、G 100 Q、L 106 Iのうちの少なくとも1つを含む。いくつかの実施形態では、ヒト化M A R C O抗体V L配列は、E Uインデックスに従って番号付けされたS 9、V 15、D 17、R 18、T 20、T 22、R 24、P 40、A 43、K 45、D 70、T 72、T 73、S 76、L 77、F 82、T 84、Y 86、Q 100、またはI 106のうちの少なくとも1つを含む。

20

【0350】

いくつかの実施形態では、ヒト化M A R C O抗体V H配列は、配列番号1に示されるラットV H配列と比較して、1 E、5 Q、13 K、16 E、48 I、61 P、62 S、67 V、68 T、76 N、79 S、82 L、83 S、85 V、86 T、87 A、88 A、92 V、116 T、117 L、Q 1 E、K 5 Q、Q 13 K、Q 16 E、M 48 I、S 61 P、L 62 S、L 67 V、S 68 T、S 76 N、F 79 S、M 82 L、N 83 S、L 85 V、Q 86 T、T 87 A、E 88 A、T 92 V、V 116 T、またはM 117 Lのうちの少なくとも1つを含む。いくつかの実施形態では、ヒト化M A R C O抗体V H配列は、E Uインデックスに従って番号付けされたE 1、Q 5、K 13、E 16、I 48、P 61、S 62、V 67、T 68、N 76、S 79、L 82、S 83、V 85、T 86、A 87、A 88、V 92、T 116、またはL 117のうちの少なくとも1つを含む。

30

【0351】

いくつかの実施形態では、ヒト化M A R C O抗体V L配列は、配列番号6に示されるラットV L配列と比較して、9 S、13 A、15 V、17 D、18 R、20 T、22 T、24 R、40 P、43 A、45 K、56 S、70 D、71 F、72 T、74 T、77 S、78 L、92 F、94 T、96 Y、100 Q、9 S、T 13 A、L 15 V、E 17 D、T 18 R、S 20 T、E 22 T、L 24 R、S 40 P、S 43 A、Q 45 K、D 56 S、R 70 D、Y 71 F、S 72 T、K 74 T、G 77 S、M 78 L、E 92 F、D 94 T、F 96 Y、またはS 100 Qのうちの少なくとも1つを含む。いくつかの実施形態では、ヒト化M A R C O抗体V L配列は、E Uインデックスに従って番号付けされたS 9、T 13、A 13、D 17、R 18、T 20、T 22、L 24、R 24、N 31、S 31、Q 31、

40

50

A 3 1、D 3 1、P 4 0、A 4 3、S 4 3、I 4 3、K 4 5、D 5 6、S 5 6、D 7 0、Y 7 1、F 7 1、T 7 2、T 7 4、S 7 7、L 7 8、M 7 8、F 8 3、E 8 3、T 8 5、Y 8 7、F 8 7、F 9 2、T 9 4、S 1 0 0、または Q 1 0 0 のうちの少なくとも 1 つを含む。

【0352】

一実施形態において、ヒト抗体由来の定常ドメイン（複数可）は、非ヒト種の可変ドメイン（複数可）に融合される。別の実施形態では、非ヒト抗体の 1 つまたは複数の C D R 配列中の 1 つまたは複数のアミノ酸残基は、それがヒト対象に投与された時、非ヒト抗体の免疫原性の可能性を低減させるように変化し、変化したアミノ酸残基はいずれも、抗体の抗原への免疫特異的結合について重要でないか、または、行われたアミノ酸配列への変化が保存的な変化であり、その結果、ヒト化抗体の抗原への結合が、非ヒト抗体の抗原への結合と比べ著しく低くはない。

10

【0353】

「ヒト抗体」は、ヒトまたはヒト細胞により産生されるか、または、ヒト抗体レパートリーまたはヒト抗体コード配列（例えば、ヒト供給源から得られるか、または *de novo* で設計される）を利用する非ヒト供給源に由来する抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を有するものである。ヒト抗体は、特に、ヒト化抗体を除外する。一実施形態では、可変ドメイン及び定常ドメインのすべてが、ヒト免疫グロブリン配列（完全ヒト抗体）に由来する。これらの抗体は、ヒトの重鎖及び／または軽鎖をコードする遺伝子に由来する抗体を発現するように遺伝子改変されたマウスの目的の抗原による免疫化を含むさまざまな方法で調製することができる。

20

【0354】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される抗体は、抗体フラグメントを含む。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される抗体は、抗体フラグメントからなる。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される抗体は、抗体フラグメントから本質的になる。いくつかの実施形態では、抗体フラグメントは、F v フラグメントである。いくつかの実施形態では、抗体フラグメントは、F a b フラグメントである。いくつかの実施形態では、抗体フラグメントは、F (a b ')₂ フラグメントである。いくつかの実施形態では、抗体フラグメントは、F a b ' フラグメントである。いくつかの実施形態では、抗体フラグメントは、s c F v (s F v) フラグメントである。いくつかの実施形態では、抗体フラグメントは、s c F v - F c フラグメントである。いくつかの実施形態では、抗体フラグメントは、単一ドメイン抗体のフラグメントである。

30

【0355】

M A R C O 抗体の配列

表 B は、本明細書に提供される例示的な抗 M A R C O 抗体の名称及び配列番号を提供する。

【0356】

40

50

【表 B】

表 B		配列番号
名称	改訂された名前（該当する場合）	説明
PI-HX-3031		親ラットハイブリドーマ
PI-3010-AB	PI-3010	hIgG1 / キメラ PI-HX-3031
PI-3011-AB	PI-3010.11	ヒト化 PI-HX-3031 / 3031-1 hIgG1
PI-3012-AB	PI-3010.12	ヒト化 PI-HX-3031 / 3031-2 hIgG1
PI-3013-AB	PI-3010.13	ヒト化 PI-HX-3031 / 3031-3 hIgG1
PI-3014-AB	PI-3010.14	ヒト化 PI-HX-3031 / 3031-4 hIgG1
PI-3015-AB	PI-3010.15	ヒト化 PI-HX-3031 / 3031-5 hIgG1
PI-3020-AB	PI-3010.20	キメラ PI-HX-3031-hIgG4
PI-3022-AB	PI-3010.22	ヒト化 PI-HX-3031 / 3031-2 hIgG1
PI-3023-AB	PI-3010.23	ヒト化 PI-HX-3031 / 3031-2 hIgG1
PI-3024-AB	PI-3010.24	ヒト化 PI-HX-3031 / 3031-2 hIgG1
PI-3025-AB	PI-3010.25	ヒト化 PI-HX-3031 / 3031-2 hIgG1
PI-3026-AB	PI-3010.26	ヒト化 PI-HX-3031 / 3031-2 hIgG1
PI-3027-AB	PI-3010.27	ヒト化 PI-HX-3031 / 3031-2 hIgG1
PI-3046-AB	PI-3010.46	ヒト化 PI-HX-3031 / 3031-2 hIgG4
PI-3048-AB	PI-3010.48	ヒト化 PI-HX-3031 / 3031-2 hIgG4
PI-HX-3061		親ラットハイブリドーマ
PI-3016-AB		ヒト化 PI-HX-3061 / 3061-1 hIgG1
PI-3017-AB		ヒト化 PI-HX-3061 / 3061-2 hIgG1
PI-3018-AB		ヒト化 PI-HX-3061 / 3061-3 hIgG1

10

20

30

40

50

PI-3019-AB		PI-HX-3061 mIgG2a キメラ	181~190
PI-3028-AB		PI-HX-3061 hIgG1 キメラ	191~200
PI-3029-AB		PI-HX-3061 hIgG4 キメラ	201~210
PI-3032-AB		ヒト化 PI-HX-3061 / 3061-2 hIgG1	211~220
PI-3033-AB		ヒト化 PI-HX-3061 / 3061-2 hIgG1	221~230
PI-HX-3011		親ラットハイブリドーマ	231~240
PI-3030-AB	PI-3030	HX3011-h1 キメラ hIgG1	241~250
PI-3036-AB	PI-3030.36	ヒト化 PI-HX-3011 / 3011-1 hIgG1	311~320
PI-3037-AB	PI-3030.37	ヒト化 PI-HX-3011 / 3011-2 hIgG1	321~330
PI-3038-AB	PI-3030.38	ヒト化 PI-HX-3011 / 3011-3 hIgG1	331~340
PI-3039-AB	PI-3030.39	ヒト化 PI-HX-3011 / 3011-4 hIgG1	341~350
PI-3040-AB	PI-3030.40	ヒト化 PI-HX-3011 / 3011-5 hIgG1	351~360
PI-3041-AB	PI-3030.41	ヒト化 PI-HX-3011 / 3011-5 hIgG1	454~463
PI-3047-AB	PI-3030.47	ヒト化 PI-HX-3011 / 3011-5 hIgG4	464~473
PI-HX-3043		親ラットハイブリドーマ	251~260
PI-3031-AB		HX3043-h1 キメラ hIgG1	261~270
PI-HX-3092		親ラットハイブリドーマ	361~370
PI-3035		HX3092 (A 変異) - mIgG2a	371~380

10

20

30

40

50

【 0 3 5 7 】

C D R

いくつかの実施形態では、ヒト MARCO（配列番号 384）に結合する単離抗体またはその抗原結合フラグメントは、3つの重鎖 CDR 配列、CDR-H1、CDR-H2、及び CDR-H3 を含む重鎖可変（VH）配列と、3つの軽鎖 CDR 配列、CDR-L1、CDR-L2、及び CDR-L3 を含む軽鎖可変（VL）配列とを含み、CDR-H1 は、配列 G F S L T S Y H V S（配列番号 2）を含み、CDR-H2 は、配列 A I W T G G S I A（配列番号 3）を含み、CDR-H3 は、配列 D L S D Y Y S S Y T S F D Y（配列番号 4）を含み、CDR-L1 は配列 A S E G I S N D L A（配列番号 431）または X A S E G I S N D L A（配列番号 383）（式中、X はアルギニン（R）またはロイシン（L）である）を含み、CDR-L2 は配列 A A S R L Q D（配列番号 8）を含み、CDR-L3 は配列 Q Q S Y K Y P L T（配列番号 9）を含む。

【 0 3 5 8 】

いくつかの実施形態では、CDR-L1 は、配列 L A S E G I S N D L A（配列番号 7）を含む。いくつかの実施形態では、CDR-L1 は、配列 R A S E G I S N D L A（配列番号 27）を含む。いくつかの実施形態では、CDR-L1 は、配列 A S E G I S N D L A（配列番号 431）を含む。

【 0 3 5 9 】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号 4 の CDR-H3、配列番号 3 の CDR-H2、配列番号 2 の CDR-H1、配列番号 9 の CDR-L3 を、

配列番号 8 の C D R - L 2、及び配列番号 7 の C D R - L 1 を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号 4 の C D R - H 3、配列番号 3 の C D R - H 2、配列番号 2 の C D R - H 1、配列番号 9 の C D R - L 3、配列番号 8 の C D R - L 2、及び配列番号 2 7 の C D R - L 1 を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号 4 の C D R - H 3、配列番号 3 の C D R - H 2、配列番号 2 の C D R - H 1、配列番号 9 の C D R - L 3、配列番号 8 の C D R - L 2、及び配列番号 4 3 1 の C D R - L 1 を含む。いくつかの実施形態では、C D R - H 3 は、配列番号 4 の C D R - H 3 と少なくとも約 5 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、または 9 5 % の同一性を有し、C D R - H 2 は、配列番号 3 の C D R - H 2 と少なくとも約 5 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、または 9 5 % の同一性を有し、C D R - H 1 は、配列番号 2 の C D R - H 1 と少なくとも約 5 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、または 9 5 % の同一性を有し、C D R - L 3 は、配列番号 9 の C D R - L 3 と少なくとも約 5 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、または 9 5 % の同一性を有し、C D R - L 2 は、配列番号 8 の C D R - L 2 と少なくとも約 5 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、または 9 5 % の同一性を有し、C D R - L 1 は、配列番号 4 3 1、3 8 3、7、または 2 7 の C D R - L 1 と少なくとも約 5 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、または 9 5 % の同一性を有する。いくつかの実施形態では、C D R - H 3 は、最大 1、2、3、4、5、6、7、または 8 個のアミノ酸置換を有する配列番号 4 の C D R - H 3 であり、C D R - H 2 は、最大 1、2、3、4、5、6、7、または 8 個のアミノ酸置換を有する配列番号 3 の C D R - H 2 であり、C D R - H 1 は、最大 1、2、3、4、または 5 個のアミノ酸置換を有する配列番号 2 の C D R - H 1 であり、C D R - L 3 は、1、2、3、4、または 5 個までのアミノ酸置換を有する配列番号 9 の C D R - L 3 であり、C D R - L 2 は、最大 1、2、3、または 4 個のアミノ酸置換を有する配列番号 8 の C D R - L 2 であり、C D R - L 1 は、最大 1、2、3、4、5、または 6 個のアミノ酸置換を有する配列番号 4 3 1、3 8 3、7、または 2 7 の C D R - L 1 である。

10

20

30

40

50

【0360】

いくつかの実施形態では、3つの重鎖 C D R 配列、C D R - H 1、C D R - H 2、及び C D R - H 3 を含む重鎖可変 (V H) 配列と、3つの軽鎖 C D R 配列、C D R - L 1、C D R - L 2、及び C D R - L 3 を含む軽鎖可変 (V L) 配列とを含む、ヒト M A R C O (配列番号 3 8 4) に結合する単離抗体またはその抗原結合フラグメントが本明細書で提供され、ここで、C D R - H 1 は、配列 G Y T F T D Y A V N (配列番号 2 3 2) を含み、C D R - H 2 は、配列 W I N T Q T G K P T (配列番号 2 3 3) を含み、C D R - H 3 は、配列 D S Y Y Y S S S L D Y (配列番号 2 3 4) を含み、C D R - L 1 は配列 A S A G I S N D L A (配列番号 4 3 2) または X A S A G I S N D L A (配列番号 3 8 1) (式中、X はロイシン (L) またはアルギニン (R) である) を含み、C D R - L 2 は配列 A A S R L Q D (配列番号 2 3 8) を含み、C D R - L 3 は配列 Q Q S Y K Y P W T (配列番号 2 3 9) を含む。いくつかの実施形態では、C D R - L 1 は、配列 L A S A G I S N D L A (配列番号 2 3 7) を含む。いくつかの実施形態では、C D R - L 1 は、配列 R A S A G I S N D L A (配列番号 3 1 7) を含む。いくつかの実施形態では、C D R - L 1 は、配列 A S A G I S N D L A (配列番号 4 3 2) を含む。

【0361】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号 2 3 4 の C D R - H 3、配列番号 2 3 3 の C D R - H 2、配列番号 2 3 2 の C D R - H 1、配列番号 2 3 9 の C D R - L 3、配列番号 2 3 8 の C D R - L 2、及び配列番号 2 3 7 の C D R - L 1 を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号 2 3 4 の C D R - H 3、配列番号 2 3 3 の C D R - H 2、配列番号 2 3 2 の C D R - H 1、配列番号 3 1 9 の C D R - L 3、配列番号 3 1 8 の C D R - L 2、及び配列番号 3 1 7 の C D R - L 1 を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号 2 3 4 の C D R - H 3、配列番号 2 3 3 の C D R - H 2、配列番号 2 3 2 の C D R - H 1、配列番号 2 3 9 の C D R - L 3、配列番号 2 3 8 の C D R - L 2、及び配列番号 4 3 2 の C D R - L 1

を含む。いくつかの実施形態では、CDR-H3は、配列番号234のCDR-H3と少なくとも約50%、75%、80%、85%、90%、または95%の同一性を有し、CDR-H2は、配列番号233のCDR-H2と少なくとも約50%、75%、80%、85%、90%、または95%の同一性を有し、CDR-H1は、配列番号232のCDR-H1と少なくとも約50%、75%、80%、85%、90%、または95%の同一性を有し、CDR-L3は、配列番号239のCDR-L3と少なくとも約50%、75%、80%、85%、90%、または95%の同一性を有し、CDR-L2は、配列番号238のCDR-L2と少なくとも約50%、75%、80%、85%、90%、または95%の同一性を有し、CDR-L1は、配列番号432、237、317、または381のCDR-L1と少なくとも約50%、75%、80%、85%、90%、または95%の同一性を有する。いくつかの実施形態では、CDR-H3は、最大1、2、3、4、5、6、7、または8個のアミノ酸置換を有する配列番号234のCDR-H3であり、CDR-H2は、最大1、2、3、4、5、6、7、または8個のアミノ酸置換を有する配列番号233のCDR-H2であり、CDR-H1は、最大1、2、3、4、または5個のアミノ酸置換を有する配列番号232のCDR-H1であり、CDR-L3は、1、2、3、4、または5個までのアミノ酸置換を有する配列番号239のCDR-L3であり、CDR-L2は、最大1、2、3、または4個のアミノ酸置換を有する配列番号238のCDR-L2であり、CDR-L1は、最大1、2、3、4、5、または6個のアミノ酸置換を有する配列番号432、237、317、または381のCDR-L1である。

10

20

【0362】

いくつかの実施形態では、ヒトMARCO（配列番号363）に結合する単離抗体またはその抗原結合フラグメントは、3つの重鎖CDR配列、CDR-H1、CDR-H2、及びCDR-H3を含む重鎖可変（VH）配列と、3つの軽鎖CDR配列、CDR-L1、CDR-L2、及びCDR-L3を含む軽鎖可変（VL）配列とを含み、ここで、CDR-H1は、配列GYTF TDY YLH（配列番号252）を含み、CDR-H2は、配列YINPNNA YTS（配列番号253）を含み、CDR-H3は、配列DTTDY YNLHFAY（配列番号254）を含み、CDR-L1は配列LTSEGISNDLA（配列番号257）を含み、CDR-L2は配列DASRLED（配列番号258）を含み、CDR-L3は配列QQSYKYPLT（配列番号259）を含む。

30

【0363】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号254のCDR-H3、配列番号253のCDR-H2、配列番号252のCDR-H1、配列番号259のCDR-L3、配列番号258のCDR-L2、及び配列番号257のCDR-L1を含む。いくつかの実施形態では、CDR-H3は、配列番号254のCDR-H3と少なくとも約50%、75%、80%、85%、90%、または95%の同一性を有し、CDR-H2は、配列番号253のCDR-H2と少なくとも約50%、75%、80%、85%、90%、または95%の同一性を有し、CDR-H1は、配列番号252のCDR-H1と少なくとも約50%、75%、80%、85%、90%、または95%の同一性を有し、CDR-L3は、配列番号259のCDR-L3と少なくとも約50%、75%、80%、85%、90%、または95%の同一性を有し、CDR-L2は、配列番号258のCDR-L2と少なくとも約50%、75%、80%、85%、90%、または95%の同一性を有し、CDR-L1は、配列番号257のCDR-L1と少なくとも約50%、75%、80%、85%、90%、または95%の同一性を有する。いくつかの実施形態では、CDR-H3は、最大1、2、3、4、5、6、7、または8個のアミノ酸置換を有する配列番号254のCDR-H3であり、CDR-H2は、最大1、2、3、4、5、6、7、または8個のアミノ酸置換を有する配列番号253のCDR-H2であり、CDR-H1は、最大1、2、3、4、または5個のアミノ酸置換を有する配列番号252のCDR-H1であり、CDR-L3は、1、2、3、4、または5個までのアミノ酸置換を有する配列番号259のCDR-L3であり、CDR-L2は、最大1、2、3

40

50

、または4個のアミノ酸置換を有する配列番号258のCDR-L2であり、CDR-L1は、最大1、2、3、4、5、または6個のアミノ酸置換を有する配列番号257のCDR-L1である。

【0364】

いくつかの実施形態では、ヒトMARCO（配列番号363）に結合する単離抗体またはその抗原結合フラグメントは、3つの重鎖CDR配列、CDR-H1、CDR-H2、及びCDR-H3を含む重鎖可変（VH）配列と、3つの軽鎖CDR配列、CDR-L1、CDR-L2、及びCDR-L3を含む軽鎖可変（VL）配列とを含み、ここで、CDR-H1は、配列KFTFSNYGMN（配列番号142）を含み、CDR-H2は、配列LIYYNSNNKY（配列番号143）を含み、CDR-H3は、配列SLTGGS
DYFDS（配列番号144）を含み、CDR-L1は配列ASKSIGTFLA（配列
番号433）またはXASKSIGTFLA（配列番号382）（式中、Xはリジン（K）
またはアルギニン（R）である）を含み、CDR-L2は配列SGSTLQS（配列番
号148）を含み、CDR-L3は配列QQHDEYPFT（配列番号149）を含む。

10

【0365】

いくつかの実施形態では、CDR-L1は、配列KASKSIGTFLA（配列番号147）を含む。いくつかの実施形態では、CDR-L1は、配列RASKSIGTFLA（配列番号157）を含む。いくつかの実施形態では、CDR-L1は、配列ASKSIGTFLA（配列番号433）を含む。

【0366】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号144のCDR-H3、配列番号143のCDR-H2、配列番号142のCDR-H1、配列番号149のCDR-L3、配列番号148のCDR-L2、及び配列番号147のCDR-L1を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号144のCDR-H3、配列番号143のCDR-H2、配列番号142のCDR-H1、配列番号149のCDR-L3、配列番号148のCDR-L2、及び配列番号157のCDR-L1を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号144のCDR-H3、配列番号143のCDR-H2、配列番号142のCDR-H1、配列番号149のCDR-L3、配列番号148のCDR-L2、及び配列番号433のCDR-L1を含む。いくつかの実施形態では、CDR-H3は、配列番号144のCDR-H3と少なくとも約50%、75%、80%、85%、90%、または95%の同一性を有し、CDR-H2は、配列番号143のCDR-H2と少なくとも約50%、75%、80%、85%、90%、または95%の同一性を有し、CDR-H1は、配列番号142のCDR-H1と少なくとも約50%、75%、80%、85%、90%、または95%の同一性を有し、CDR-L3は、配列番号149のCDR-L3と少なくとも約50%、75%、80%、85%、90%、または95%の同一性を有し、CDR-L2は、配列番号148のCDR-L2と少なくとも約50%、75%、80%、85%、90%、または95%の同一性を有し、CDR-L1は、配列番号433、382、147、または157のCDR-L1と少なくとも約50%、75%、80%、85%、90%、または95%の同一性を有する。いくつかの実施形態では、CDR-H3は、最大1、2、3、4、
5、6、7、または8個のアミノ酸置換を有する配列番号144のCDR-H3であり、
CDR-H2は、最大1、2、3、4、5、6、7、または8個のアミノ酸置換を有する
配列番号143のCDR-H2であり、CDR-H1は、最大1、2、3、4、または5
個のアミノ酸置換を有する配列番号142のCDR-H1であり、CDR-L3は、1、
2、3、4、または5個までのアミノ酸置換を有する配列番号149のCDR-L3であ
り、CDR-L2は、最大1、2、3、または4個のアミノ酸置換を有する配列番号14
8のCDR-L2であり、CDR-L1は、最大1、2、3、4、5、または6個のアミ
ノ酸置換を有する配列番号433、382、147、または157のCDR-L1である

20

30

40

【0367】

50

いくつかの実施形態では、ヒトMARCO（配列番号384）に結合する単離抗体またはその抗原結合フラグメントは、3つの重鎖CDR配列、CDR-H1、CDR-H2、及びCDR-H3を含む重鎖可変（VH）配列と、3つの軽鎖CDR配列、CDR-L1、CDR-L2、及びCDR-L3を含む軽鎖可変（VL）配列とを含み、ここで、CDR-H1は、配列GFSLTSTLS（配列番号362）を含み、CDR-H2は、配列AIWGGDNTD（配列番号363）を含み、CDR-H3は、配列ELGGSFY（配列番号364）を含み、CDR-L1は配列KTSQNIKKLD（配列番号367）、CDR-L2は配列YTNNLQT（配列番号368）を含み、CDR-L3は配列YQYDSGFT（配列番号369）を含む。

【0368】

いくつかの実施形態では、CDR-H3は、配列番号364のCDR-H3と少なくとも約50%、75%、80%、85%、90%、または95%の同一性を有し、CDR-H2は、配列番号363のCDR-H2と少なくとも約50%、75%、80%、85%、90%、または95%の同一性を有し、CDR-H1は、配列番号362のCDR-H1と少なくとも約50%、75%、80%、85%、90%、または95%の同一性を有し、CDR-L3は、配列番号369のCDR-L3と少なくとも約50%、75%、80%、85%、90%、または95%の同一性を有し、CDR-L2は、配列番号368のCDR-L2と少なくとも約50%、75%、80%、85%、90%、または95%の同一性を有し、CDR-L1は、配列番号367のCDR-L1と少なくとも約50%、75%、80%、85%、90%、または95%の同一性を有する。いくつかの実施形態では、CDR-H3は、最大1、2、3、4、5、6、7、または8個のアミノ酸置換を有する配列番号364のCDR-H3であり、CDR-H2は、最大1、2、3、4、5、6、7、または8個のアミノ酸置換を有する配列番号363のCDR-H2であり、CDR-H1は、最大1、2、3、4、または5個のアミノ酸置換を有する配列番号362のCDR-H1であり、CDR-L3は、1、2、3、4、または5個までのアミノ酸置換を有する配列番号369のCDR-L3であり、CDR-L2は、最大1、2、3、または4個のアミノ酸置換を有する配列番号368のCDR-L2であり、CDR-L1は、最大1、2、3、4、5、または6個のアミノ酸置換を有する配列番号367のCDR-L1である。

【0369】

いくつかの態様では、アミノ酸置換は保存的アミノ酸置換である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗体は、本明細書では「変異体」と呼ばれる。いくつかの実施形態では、そのような変異体は、例えば、親和性成熟、部位特異的変異導入、ランダム変異導入、または当該技術分野で既知のもしくは本明細書に記載の他の任意の方法により、本明細書で提供される配列に由来する。いくつかの実施形態では、そのような変異体は、本明細書で提供される配列に由来せず、例えば、抗体を得るための本明細書で提供される方法に従ってde novoで単離され得る。

【0370】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号4、14、24、34、44、54、64、74、84、94、104、114、124、134、144、154、164、174、184、194、204、214、224、234、244、254、264、274、284、294、304、314、324、334、344、354、364、374、437、447、457、467、または477から選択されるCDR-H3を含む。いくつかの態様では、CDR-H3は、配列番号4、14、24、34、44、54、64、74、84、94、104、114、124、134、144、154、164、174、184、194、204、214、224、234、244、254、264、274、284、294、304、314、324、334、344、354、364、374、437、447、457、467、または477のCDR-H3と少なくとも約50%、75%、80%、85%、90%、または95%の同一性を有する。いくつかの実施形態では、CDR-H3は、配列番号4、14、24、34、

44、54、64、74、84、94、104、114、124、134、144、154、164、174、184、194、204、214、224、234、244、254、264、274、284、294、304、314、324、334、344、354、364、374、437、447、457、467、または477から選択されるCDR-H3であり、最大1、2、3、4、5、6、7、または8個のアミノ酸置換を有する。いくつかの態様では、アミノ酸置換は保存的アミノ酸置換である。

【0371】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号3、13、23、33、43、53、63、73、83、93、103、113、123、133、143、513、163、173、183、193、203、213、223、233、243、253、263、273、283、293、303、313、323、333、343、353、363、373、376、436、446、456、466、または476のCDR-H2を含む。いくつかの態様では、CDR-H2は、配列番号3、13、23、33、43、53、63、73、83、93、103、113、123、133、143、513、163、173、183、193、203、213、223、233、243、253、263、273、283、293、303、313、323、333、343、353、363、373、376、436、446、456、466、または476のCDR-H2と少なくとも約50%、75%、80%、85%、90%、または95%の同一性を有する。いくつかの実施形態では、CDR-H2は、配列番号3、13、23、33、43、53、63、73、83、93、103、113、123、133、143、513、163、173、183、193、203、213、223、233、243、253、263、273、283、293、303、313、323、333、343、353、363、373、376、436、446、456、466、または476のCDR-H2であり、最大1、2、3、4、5、6、7、または8個のアミノ酸置換を有する。いくつかの態様では、アミノ酸置換は保存的アミノ酸置換である。

10

20

【0372】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号2、12、22、32、42、52、62、72、82、92、102、112、122、132、142、152、162、172、182、192、202、212、222、232、242、252、262、272、282、292、302、312、322、332、342、352、362、372、435、445、455、465、または475のCDR-H1を含む。いくつかの態様では、CDR-H1は、配列番号2、12、22、32、42、52、62、72、82、92、102、112、122、132、142、152、162、172、182、192、202、212、222、232、242、252、262、272、282、292、302、312、322、332、342、352、362、372、435、445、455、465、または475のCDR-H1と少なくとも約50%、75%、80%、85%、90%、または95%の同一性を有する。いくつかの実施形態では、CDR-H1は、配列番号2、12、22、32、42、52、62、72、82、92、102、112、122、132、142、152、162、172、182、192、202、212、222、232、242、252、262、272、282、292、302、312、322、332、342、352、362、372、435、445、455、465、または475のCDR-H1であり、最大1、2、3、4、5、6、7、または8個のアミノ酸置換を有する。いくつかの態様では、アミノ酸置換は保存的アミノ酸置換である。

30

40

【0373】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される抗体は、配列番号4、14、24、34、44、54、64、74、84、94、104、114、124、134、144、154、164、174、184、194、204、214、224、234、244、254、264、274、284、294、304、314、324、334、344、354、364、374、437、447、457、467、または477のCDR-H

50

3、配列番号3、13、23、33、43、53、63、73、83、93、103、113、123、133、143、513、163、173、183、193、203、213、223、233、243、253、263、273、283、293、303、313、323、333、343、353、363、373、376、436、446、456、466、または476のCDR-H2、及び配列番号2、12、22、32、42、52、62、72、82、92、102、112、122、132、142、152、162、172、182、192、202、212、222、232、242、252、262、272、282、292、302、312、322、332、342、352、362、372 435、445、455、465、または475のCDR-H1を含む。いくつかの実施形態では、CDR-H3は、配列番号4、14、24、34、44、54、64、74、84、94、104、114、124、134、144、154、164、174、184、194、204、214、224、234、244、254、264、274、284、294、304、314、324、334、344、354、364、374、437、447、457、467、または477のCDR-H3と少なくとも約50%、75%、80%、85%、90%、または95%の同一性を有し、CDR-H2は、配列番号3、13、23、33、43、53、63、73、83、93、103、113、123、133、143、513、163、173、183、193、203、213、223、233、243、253、263、273、283、293、303、313、323、333、343、353、363、373、376、436、446、456、466、または476のCDR-H2と少なくとも約50%、75%、80%、85%、90%、または95%の同一性を有し、及びCDR-H1は、配列番号2、12、22、32、42、52、62、72、82、92、102、112、122、132、142、152、162、172、182、192、202、212、222、232、242、252、262、272、282、292、302、312、322、332、342、352、362、372 435、445、455、465、または475のCDR-H1と少なくとも約50%、75%、80%、85%、90%、または95%の同一性を有する。いくつかの実施形態では、CDR-H3は、最大1、2、3、4、5、6、7、または8個のアミノ酸置換を有する、配列番号4、14、24、34、44、54、64、74、84、94、104、114、124、134、144、154、164、174、184、194、204、214、224、234、244、254、264、274、284、294、304、314、324、334、344、354、364、374、437、447、457、467、または477のCDR-H3であり、CDR-H2は、最大1、2、3、4、5、6、7、または8個のアミノ酸置換を有する、配列番号3、13、23、33、43、53、63、73、83、93、103、113、123、133、143、513、163、173、183、193、203、213、223、233、243、253、263、273、283、293、303、313、323、333、343、353、363、373、376、436、446、456、466、または476のCDR-H2であり、及びCDR-H1は、最大1、2、3、4または5個のアミノ酸置換を有する、配列番号2、12、22、32、42、52、62、72、82、92、102、112、122、132、142、152、162、172、182、192、202、212、222、232、242、252、262、272、282、292、302、312、322、332、342、352、362、372 435、445、455、465、または475のCDR-H1である。いくつかの態様において、アミノ酸置換は保存的アミノ酸置換である。

【0374】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号9、19、29、39、49、59、69、79、89、99、109、119、129、139、149、159、169、179、189、199、209、219、229、239、249、259、269、279、289、299、309、319、329、339、349、359、369、379、442、452、462、472、または482のCDR-L

3を含む。いくつかの態様では、CDR-L3は、配列番号9、19、29、39、49、59、69、79、89、99、109、119、129、139、149、159、169、179、189、199、209、219、229、239、249、259、269、279、289、299、309、319、329、339、349、359、369、379、442、452、462、472、または482のCDR-L3と、少なくとも約50%、75%、80%、85%、90%、または95%の同一性を有する。いくつかの態様では、CDR-L3は、最大1、2、3、4、5、6、7、または8個のアミノ酸置換を有する、配列番号9、19、29、39、49、59、69、79、89、99、109、119、129、139、149、159、169、179、189、199、209、219、229、239、249、259、269、279、289、299、309、319、329、339、349、359、369、379、442、452、462、472、または482のCDR-L3である。いくつかの態様において、アミノ酸置換は保存的アミノ酸置換である。

10

【0375】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号8、18、28、38、48、58、68、78、88、98、108、218、228、238、248、258、268、278、288、298、308、318、328、338、348、358、368、378、441、451、461、471、または481のCDR-L2を含む。いくつかの態様では、CDR-L2は、配列番号8、18、28、38、48、58、68、78、88、98、108、218、228、238、248、258、268、278、288、298、308、318、328、338、348、358、368、378、441、451、461、471、または481のCDR-L2と、少なくとも約50%、75%、80%、85%、90%、または95%の同一性を有する。いくつかの実施形態では、CDR-L2は、最大1、2、3、4、5、6、7または8個のアミノ酸置換を有する、配列番号8、18、28、38、48、58、68、78、88、98、108、218、228、238、248、258、268、278、288、298、308、318、328、338、348、358、368、378、441、451、461、471、または481のCDR-L2である。いくつかの態様において、アミノ酸置換は保存的アミノ酸置換である。

20

【0376】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号7、17、27、37、47、57、67、77、87、97、107、117、127、137、147、157、167、177、187、197、207、217、227、237、247、257、267、277、287、297、307、317、327、337、347、357、367、377、381、382、383、440、450、460、470、または480のCDR-L1を含む。いくつかの態様では、CDR-L1は、配列番号7、17、27、37、47、57、67、77、87、97、107、117、127、137、147、157、167、177、187、197、207、217、227、237、247、257、267、277、287、297、307、317、327、337、347、357、367、377、381、382、または383、440、450、460、470、または480のCDR-L1と、少なくとも約50%、75%、80%、85%、90%、または95%の同一性を有する。いくつかの実施形態では、CDR-L1は、最大1、2、3、4、5、6、7、または8個のアミノ酸置換を有する、配列番号7、17、27、37、47、57、67、77、87、97、107、117、127、137、147、157、167、177、187、197、207、217、227、237、247、257、267、277、287、297、307、317、327、337、347、357、367、377、381、382、383、440、450、460、470、または480のCDR-L1である。

30

40

【0377】

いくつかの態様において、アミノ酸置換は保存的アミノ酸置換である。いくつかの実施

50

形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号 9、19、29、39、49、59、69、79、89、99、109、119、129、139、149、159、169、179、189、199、209、219、229、239、249、259、269、279、289、299、309、319、329、339、349、359、369、379、442、452、462、472、または 482 の CDR-L3、及び配列番号 8、18、28、38、48、58、68、78、88、98、108、218、228、238、248、258、268、278、288、298、308、318、328、338、348、358、368、378、441、451、461、471、または 481 の CDR-L2 を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号 9、19、29、39、49、59、69、79、89、99、109、119、129、139、149、159、169、179、189、199、209、219、229、239、249、259、269、279、289、299、309、319、329、339、349、359、369、379、442、452、462、472、または 482 の CDR-L3、配列番号 8、18、28、38、48、58、68、78、88、98、108、218、228、238、248、258、268、278、288、298、308、318、328、338、348、358、368、378、441、451、461、471、または 481 の CDR-L2、及び配列番号 77、17、27、37、47、57、67、77、87、97、107、117、127、137、147、157、167、177、187、197、207、217、227、237、247、257、267、277、287、297、307、317、327、337、347、357、367、377、381、382、または 383、440、450、460、470、または 480 の CDR-L1 を含む。いくつかの実施形態では、CDR-L3 は、配列番号 9、19、29、39、49、59、69、79、89、99、109、119、129、139、149、159、169、179、189、199、209、219、229、239、249、259、269、279、289、299、309、319、329、339、349、359、369、379、442、452、462、472、または 482 の CDR-L3 と少なくとも約 50%、75%、80%、85%、90%、または 95% の同一性を有し、CDR-L2 は、配列番号 8、18、28、38、48、58、68、78、88、98、108、218、228、238、248、258、268、278、288、298、308、318、328、338、348、358、368、378、441、451、461、471、または 481 の CDR-L2 と少なくとも約 50%、75%、80%、85%、90%、または 95% の同一性を有し、及び CDR-L1 は、配列番号 7、17、27、37、47、57、67、77、87、97、107、117、127、137、147、157、167、177、187、197、207、217、227、237、247、257、267、277、287、297、307、317、327、337、347、357、367、377、381、382、または 383、440、450、460、470、または 480 の CDR-L1 と少なくとも約 50%、75%、80%、85%、90%、または 95% の同一性を有する。いくつかの実施形態では、CDR-L3 は、最大 1、2、3、4、または 5 個のアミノ酸置換を有する配列番号 9、19、29、39、49、59、69、79、89、99、109、119、129、139、149、159、169、179、189、199、209、219、229、239、249、259、269、279、289、299、309、319、329、339、349、359、369、379、442、452、462、472、または 482 の CDR-L3 であり、CDR-L2 は、最大 1、2、3、または 4 個のアミノ酸置換を有する配列番号 8、18、28、38、48、58、68、78、88、98、108、218、228、238、248、258、268、278、288、298、308、318、328、338、348、358、368、378、441、451、461、471、または 481 の CDR-L2 であり、CDR-L1 は、最大 1、2、3、4、5、または 6 個のアミノ酸置換を有する配列番号 7、17、27、37、47、57、67、77、87、97、107、117、127、

10

20

30

40

50

137、147、157、167、177、187、197、207、217、227、
237、247、257、267、277、287、297、307、317、327、
337、347、357、367、377、381、382、383、440、450、
460、470、または480のCDR-L1である。いくつかの態様において、アミノ
酸置換は保存的アミノ酸置換である。

【0378】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、1～3個の、配列番号1、1
1、21、31、41、51、61、71、81、91、101、111、121、13
1、141、151、161、171、181、191、201、211、221、23
1、241、251、261、271、281、291、301、311、321、33
1、341、351、361、371、434、444、454、464、または474
から選択されるV_HドメインのCDRを含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供
される抗体は、2～3個の、配列番号1、11、21、31、41、51、61、71、
81、91、101、111、121、131、141、151、161、171、18
1、191、201、211、221、231、241、251、261、271、28
1、291、301、311、321、331、341、351、361、371、43
4、444、454、464、または474から選択されるV_HドメインのCDRを含む
。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、3個の、配列番号1、11、
21、31、41、51、61、71、81、91、101、111、121、131、
141、151、161、171、181、191、201、211、221、231、
241、251、261、271、281、291、301、311、321、331、
341、351、361、371、434、444、454、464、または474から
選択されるV_HドメインのCDRを含む。いくつかの態様では、CDRはKabat C
DRである。いくつかの態様では、CDRはChothia CDRである。いくつかの
態様では、CDRはAbM CDRである。いくつかの態様では、CDRはContact
CDRである。いくつかの態様では、CDRはIMGT CDRである。

【0379】

いくつかの実施形態では、CDR-H1は、最大1、2、3、4、または5個のアミノ
酸置換を有する、配列番号1、11、21、31、41、51、61、71、81、91
、101、111、121、131、141、151、161、171、181、191
、201、211、221、231、241、251、261、271、281、291
、301、311、321、331、341、351、361、371、434、444
、454、464、または474から選択されるV_HドメインのCDR-H1を含む。い
くつかの実施形態では、CDR-H2は、最大1、2、3、4、5、6、7、または8個
のアミノ酸置換を有する、配列番号1、11、21、31、41、51、61、71、8
1、91、101、111、121、131、141、151、161、171、181
、191、201、211、221、231、241、251、261、271、281
、291、301、311、321、331、341、351、361、371、434
、444、454、464、または474から選択されるV_HドメインのCDR-H2を
含む。いくつかの実施形態では、CDR-H3は、最大1、2、3、4、5、6、7、ま
たは8個のアミノ酸置換を有する、配列番号1、11、21、31、41、51、61、
71、81、91、101、111、121、131、141、151、161、171
、181、191、201、211、221、231、241、251、261、271
、281、291、301、311、321、331、341、351、361、371
、434、444、454、464、または474から選択されるV_HドメインのCDR
-H3を含む。いくつかの態様において、アミノ酸置換は保存的アミノ酸置換である。い
くつかの実施形態では、本段落に記載される抗体は、本明細書では「変異体」と呼ばれる
。いくつかの実施形態では、そのような変異体は、例えば、親和性成熟、部位特異的変異
導入、ランダム変異導入、または当該技術分野で既知のもしくは本明細書に記載の他の任
意の方法により、本明細書で提供される配列に由来する。いくつかの実施形態では、その

ような変異体は、本明細書で提供される配列に由来せず、例えば、抗体を得るための本明細書で提供される方法に従って *de novo* で単離され得る。

【0380】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、1～3個の、配列番号6、16、26、36、46、56、66、76、86、96、106、116、126、136、146、156、166、176、186、196、206、216、226、236、246、256、266、276、286、296、306、316、326、336、346、356、366、376、434、444、454、464、または474から選択されるVLDメインのCDRを含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、2～3個の、配列番号6、16、26、36、46、56、66、76、86、96、106、116、126、136、146、156、166、176、186、196、206、216、226、236、246、256、266、276、286、296、306、316、326、336、346、356、366、376、434、444、454、464、または474から選択されるVLDメインのCDRを含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、3個の、配列番号6、16、26、36、46、56、66、76、86、96、106、116、126、136、146、156、166、176、186、196、206、216、226、236、246、256、266、276、286、296、306、316、326、336、346、356、366、376、434、444、454、464、または474から選択されるVLDメインのCDRを含む。いくつかの態様では、CDRはKabata CDRである。いくつかの態様では、CDRはChothia CDRである。いくつかの態様では、CDRはAbM CDRである。いくつかの態様では、CDRはContact CDRである。いくつかの態様では、CDRはIMGT CDRである。

【0381】

いくつかの実施形態では、CDR-L1は、最大1、2、3、4、または5個のアミノ酸置換を有する、配列番号6、16、26、36、46、56、66、76、86、96、106、116、126、136、146、156、166、176、186、196、206、216、226、236、246、256、266、276、286、296、306、316、326、336、346、356、366、376、434、444、454、464、または474から選択されるVLDメインのCDR-L1である。いくつかの実施形態では、CDR-L2は、最大1、2、3、4、5、6、7、または8個のアミノ酸置換を有する、配列番号6、16、26、36、46、56、66、76、86、96、106、116、126、136、146、156、166、176、186、196、206、216、226、236、246、256、266、276、286、296、306、316、326、336、346、356、366、または376から選択されるVLDメインのCDR-L2である。いくつかの実施形態では、CDR-L3は、最大1、2、3、4、5、6、7、または8個のアミノ酸置換を有する、配列番号6、16、26、36、46、56、66、76、86、96、106、116、126、136、146、156、166、176、186、196、206、216、226、236、246、256、266、276、286、296、306、316、326、336、346、356、366、376、434、444、454、464、または474から選択されるVLDメインのCDR-L3である。いくつかの態様において、アミノ酸置換は保存的アミノ酸置換である。いくつかの実施形態では、本段落に記載される抗体は、本明細書では「変異体」と呼ばれる。いくつかの実施形態では、そのような変異体は、例えば、親和性成熟、部位特異的変異導入、ランダム変異導入、または当該技術分野で既知のもしくは本明細書に記載の他の任意の方法により、本明細書で提供される配列に由来する。いくつかの実施形態では、そのような変異体は、本明細書で提供される配列に由来せず、例えば、抗体を得るための本明細書で提供される方法に従って *de novo* で単離され得る。

【0382】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、1～3個の、配列番号1、11、21、31、41、51、61、71、81、91、101、111、121、131、141、151、161、171、181、191、201、211、221、231、241、251、261、271、281、291、301、311、321、331、341、351、361、371、434、444、454、464、または474から選択されるVHドメインのCDRを含み、1～3個の、配列番号6、16、26、36、46、56、66、76、86、96、106、116、126、136、146、156、166、176、186、196、206、216、226、236、246、256、266、276、286、296、306、316、326、336、346、356、366、376、434、444、454、464、または474から選択されるVLドメインのCDRを含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、2～3個の、配列番号1、11、21、31、41、51、61、71、81、91、101、111、121、131、141、151、161、171、181、191、201、211、221、231、241、251、261、271、281、291、301、311、321、331、341、351、361、371、434、444、454、464、または474から選択されるVHドメインのCDRを含み、2～3個の、配列番号6、16、26、36、46、56、66、76、86、96、106、116、126、136、146、156、166、176、186、196、206、216、226、236、246、256、266、276、286、296、306、316、326、336、346、356、366、376、434、444、454、464、または474から選択されるVLドメインのCDRを含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、3個の、配列番号1、11、21、31、41、51、61、71、81、91、101、111、121、131、141、151、161、171、181、191、201、211、221、231、241、251、261、271、281、291、301、311、321、331、341、351、361、371、434、444、454、464、または474から選択されるVHドメインのCDRを含み、3個の、配列番号6、16、26、36、46、56、66、76、86、96、106、116、126、136、146、156、166、176、186、196、206、216、226、236、246、256、266、276、286、296、306、316、326、336、346、356、366、376、434、444、454、464、または474から選択されるVLドメインのCDRを含む。いくつかの態様では、CDRはKabat CDRである。いくつかの態様では、CDRはChothia CDRである。いくつかの態様では、CDRはAbM CDRである。いくつかの態様では、CDRはContact CDRである。いくつかの態様では、CDRはIMGT CDRである。

10

20

30

40

50

【0383】

VHドメイン

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号1、11、21、31、41、51、61、71、81、91、101、111、121、131、141、151、161、171、181、191、201、211、221、231、241、251、261、271、281、291、301、311、321、331、341、351、361、371、434、444、454、464、または474から選択されるVH配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号1のVH配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号21のVH配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号121のVH配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号181のVH配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号191のVH配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号221のVH配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号241のVH配列を含む。いくつかの

10

20

30

40

50

も約50%、60%、70%、80%、90%、95%、または99%の同一性を有するV_H配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号21に対して少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、95%、または99%の同一性を有するV_H配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号121に対して少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、95%、または99%の同一性を有するV_H配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号181に対して少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、95%、または99%の同一性を有するV_H配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号191に対して少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、95%、または99%の同一性を有するV_H配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号221に対して少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、95%、または99%の同一性を有するV_H配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号241に対して少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、95%、または99%の同一性を有するV_H配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号261に対して少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、95%、または99%の同一性を有するV_H配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号351に対して少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、95%、または99%の同一性を有するV_H配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号371に対して少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、95%、または99%の同一性を有するV_H配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号434に対して少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、95%、または99%の同一性を有するV_H配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号444に対して少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、95%、または99%の同一性を有するV_H配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号454に対して少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、95%、または99%の同一性を有するV_H配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号464に対して少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、95%、または99%の同一性を有するV_H配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号474に対して少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、95%、または99%の同一性を有するV_H配列を含む。

10

20

30

40

50

【0386】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号1、11、21、31、41、51、61、71、81、91、101、111、121、131、141、151、161、171、181、191、201、211、221、231、241、251、261、271、281、291、301、311、321、331、341、351、361、371、434、444、454、464、または474に提供される例示V_H配列に対して少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、95%、または99%の同一性を有するV_H配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、最大1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25個のアミノ酸置換を有する、配列番号1、11、21、31、41、51、61、71、81、91、101、111、121、131、141、151、161、171、181、191、201、211、221、231、241、251、261、271、281、291、301、311、321、331、341、351、361、371、434、444、454、464、または474に提供されるV_H配列を含む。いくつかの態様において、アミノ酸置換は保存的アミノ酸置換である。いくつかの実施形態では、本段落に記載される抗体は、本明細書では「変異体」と呼ばれる。いくつかの実施形態では、その

ような変異体は、例えば、親和性成熟、部位特異的変異導入、ランダム変異導入、または当該技術分野で既知のもしくは本明細書に記載の他の任意の方法により、本明細書で提供される配列に由来する。いくつかの実施形態では、そのような変異体は、本明細書で提供される配列に由来せず、例えば、抗体を得るための本明細書で提供される方法に従って *de novo* で単離され得る。

【0387】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号385、386、387、388、389、390、391、392、393、394、395、395、396、397、398、399、400、401、402、403、404、405、406、407、408、409、410、411、412、413、414、415、416、417、418、419、420、421、422、423、424、425、または426のいずれか1つに示されるポリヌクレオチド配列によってコードされる。

10

【0388】

V_Lドメイン

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号6、16、26、36、46、56、66、76、86、96、106、116、126、136、146、156、166、176、186、196、206、216、226、236、246、256、266、276、286、296、306、316、326、336、346、356、366、376、439、449、459、469、または479から選択されるV_L配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号6のV_L配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号26のV_L配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号126のV_L配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号186のV_L配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号196のV_L配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号226のV_L配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号246のV_L配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号266のV_L配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号356のV_L配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号376のV_L配列を含む。

20

30

【0389】

いくつかの実施形態では、V_L配列は、配列番号6と少なくとも70%、80%、または90%の同一性を有し、配列番号6からの任意の変異体は、CDR-L1、CDR-L2、またはCDR-L3内で生じない。いくつかの実施形態では、V_L配列は、配列番号26と少なくとも70%、80%、または90%の同一性を有し、配列番号26からの任意の変異体は、CDR-L1、CDR-L2、またはCDR-L3内で生じない。いくつかの実施形態では、V_L配列は、配列番号126と少なくとも70%、80%、または90%の同一性を有し、配列番号126からの任意の変異体は、CDR-L1、CDR-L2、またはCDR-L3内で生じない。いくつかの実施形態では、V_L配列は、配列番号186と少なくとも70%、80%、または90%の同一性を有し、配列番号186からの任意の変異体は、CDR-L1、CDR-L2、またはCDR-L3内で生じない。いくつかの実施形態では、V_L配列は、配列番号196と少なくとも70%、80%、または90%の同一性を有し、配列番号196からの任意の変異体は、CDR-L1、CDR-L2、またはCDR-L3内で生じない。いくつかの実施形態では、V_L配列は、配列番号226と少なくとも70%、80%、または90%の同一性を有し、配列番号226からの任意の変異体は、CDR-L1、CDR-L2、またはCDR-L3内で生じない。いくつかの実施形態では、V_L配列は、配列番号246と少なくとも70%、80%、または90%の同一性を有し、配列番号246からの任意の変異体は、CDR-L1、CD

40

50

20

30

50

、 80 %、 90 %、 95 %、 または 99 %の同一性を有する V_L 配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号 469 に対して少なくとも約 50 %、 60 %、 70 %、 80 %、 90 %、 95 %、 または 99 %の同一性を有する V_L 配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号 479 に対して少なくとも約 50 %、 60 %、 70 %、 80 %、 90 %、 95 %、 または 99 %の同一性を有する V_L 配列を含む。

【0391】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号 6、 16、 26、 36、 46、 56、 66、 76、 86、 96、 106、 116、 126、 136、 146、 156、 166、 176、 186、 196、 206、 216、 226、 236、 246、 256、 266、 276、 286、 296、 306、 316、 326、 336、 346、 356、 366、 376、 439、 449、 459、 469、 または 479 に提供される、例示 V_L 配列に対して少なくとも約 50 %、 60 %、 70 %、 80 %、 90 %、 95 %、 または 99 %の同一性を有する V_L 配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、1、 2、 3、 4、 5、 6、 7、 8、 9、 10、 11、 12、 13、 14、 15、 16、 17、 18、 19、 20、 21、 22、 23、 24、 または 25 個のアミノ酸置換を有する、配列番号 6、 16、 26、 36、 46、 56、 66、 76、 86、 96、 106、 116、 126、 136、 146、 156、 166、 176、 186、 196、 206、 216、 226、 236、 246、 256、 266、 276、 286、 296、 306、 316、 326、 336、 346、 356、 366、 376、 439、 449、 459、 469、 または 479 に提供される V_L 配列を含む。いくつかの態様において、アミノ酸置換は保存的アミノ酸置換である。いくつかの実施形態では、本段落に記載される抗体は、本明細書では「変異体」と呼ばれる。いくつかの実施形態では、そのような変異体は、例えば、親和性成熟、部位特異的変異導入、ランダム変異導入、または当該技術分野で既知のもしくは本明細書に記載の他の任意の方法により、本明細書で提供される配列に由来する。いくつかの実施形態では、そのような変異体は、本明細書で提供される配列に由来せず、例えば、抗体を得るための本明細書で提供される方法に従って *de novo* で単離され得る。

【0392】

V_H - V_L 組み合わせ

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号 1、 11、 21、 31、 41、 51、 61、 71、 81、 91、 101、 111、 121、 131、 141、 151、 161、 171、 181、 191、 201、 211、 221、 231、 241、 251、 261、 271、 281、 291、 301、 311、 321、 331、 341、 351、 361、 371、 434、 444、 454、 464、 または 474 から選択される V_H 配列、及び配列番号 6、 16、 26、 36、 46、 56、 66、 76、 86、 96、 106、 116、 126、 136、 146、 156、 166、 176、 186、 196、 206、 216、 226、 236、 246、 256、 266、 276、 286、 296、 306、 316、 326、 336、 346、 356、 366、 376、 439、 449、 459、 469、 または 479 から選択される V_L 配列を含む。

【0393】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号 1 の V_H 配列、及び配列番号 6 の V_L 配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号 21 の V_H 配列、及び配列番号 26 の V_L 配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号 121 の V_H 配列、及び配列番号 126 の V_L 配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号 181 の V_H 配列、及び配列番号 186 の V_L 配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号 191 の V_H 配列、及び配列番号 196 の V_L 配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号 221 の V_H 配列、及

び配列番号 2 2 6 の V_L 配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号 2 4 1 の V_H 配列、及び配列番号 2 4 6 の V_L 配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号 2 6 1 の V_H 配列、及び配列番号 2 6 6 の V_L 配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号 3 5 1 の V_H 配列、及び配列番号 3 5 6 の V_L 配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号 3 7 1 の V_H 配列、及び配列番号 3 7 6 の V_L 配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号 4 3 4 の V_H 配列、及び配列番号 4 3 9 の V_L 配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号 4 4 4 の V_H 配列、及び配列番号 4 4 9 の V_L 配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号 4 5 4 の V_H 配列、及び配列番号 4 5 9 の V_L 配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号 4 6 4 の V_H 配列、及び配列番号 4 6 9 の V_L 配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号 4 7 4 の V_H 配列、及び配列番号 4 7 9 の V_L 配列を含む。

10

20

30

40

50

【0394】

いくつかの実施形態では、V_H 配列は、配列番号 1 に対して少なくとも 70 %、80 %、または 90 % の同一性を有し、軽鎖の可変領域は、配列番号 6 に対して少なくとも 70 %、80 %、または 90 % の同一性を有し、配列番号 1 由来の変異体は CDR-H1、CDR-H2、または CDR-H3 内では発生せず、配列番号 6 由来の変異体は CDR-L1、CDR-L2、または CDR-L3 内では発生しない。いくつかの実施形態では、V_H 配列は、配列番号 2 1 に対して少なくとも 70 %、80 %、または 90 % の同一性を有し、軽鎖の可変領域は、配列番号 2 6 に対して少なくとも 70 %、80 %、または 90 % の同一性を有し、配列番号 2 1 由来の変異体は CDR-H1、CDR-H2、または CDR-H3 内では発生せず、配列番号 2 6 由来の変異体は CDR-L1、CDR-L2、または CDR-L3 内では発生しない。いくつかの実施形態では、V_H 配列は、配列番号 1 2 1 に対して少なくとも 70 %、80 %、または 90 % の同一性を有し、軽鎖の可変領域は、配列番号 1 2 6 に対して少なくとも 70 %、80 %、または 90 % の同一性を有し、配列番号 1 2 1 由来の変異体は CDR-H1、CDR-H2、または CDR-H3 内では発生せず、配列番号 1 2 6 由来の変異体は CDR-L1、CDR-L2、または CDR-L3 内では発生しない。いくつかの実施形態では、V_H 配列は、配列番号 1 8 1 に対して少なくとも 70 %、80 %、または 90 % の同一性を有し、軽鎖の可変領域は、配列番号 1 8 6 に対して少なくとも 70 %、80 %、または 90 % の同一性を有し、配列番号 1 8 1 由来の変異体は CDR-H1、CDR-H2、または CDR-H3 内では発生せず、配列番号 1 8 6 由来の変異体は CDR-L1、CDR-L2、または CDR-L3 内では発生しない。いくつかの実施形態では、V_H 配列は、配列番号 1 9 1 に対して少なくとも 70 %、80 %、または 90 % の同一性を有し、軽鎖の可変領域は、配列番号 1 9 6 に対して少なくとも 70 %、80 %、または 90 % の同一性を有し、配列番号 1 9 1 由来の変異体は CDR-H1、CDR-H2、または CDR-H3 内では発生せず、配列番号 1 9 6 由来の変異体は CDR-L1、CDR-L2、または CDR-L3 内では発生しない。いくつかの実施形態では、V_H 配列は、配列番号 2 2 1 に対して少なくとも 70 %、80 %、または 90 % の同一性を有し、軽鎖の可変領域は、配列番号 2 2 6 に対して少なくとも 70 %、80 %、または 90 % の同一性を有し、配列番号 2 2 1 由来の変異体は CDR-H1、CDR-H2、または CDR-H3 内では発生せず、配列番号 2 2 6 由来の変異体は CDR-L1、CDR-L2、または CDR-L3 内では発生しない。いくつかの実施形態では、V_H 配列は、配列番号 2 4 1 に対して少なくとも 70 %、80 %、または 90 % の同一性を有し、軽鎖の可変領域は、配列番号 2 4 6 に対して少なくとも 70 %、80 %、または 90 % の同一性を有し、配列番号 2 4 1 由来の変異体は CDR-H1、CDR-H2、または CDR-H3 内では発生せず、配列番号 2 4 6 由来の変異体は CDR-L1、CDR-L2、または CDR-L3 内では発生しない。いくつかの実施形態では、V_H 配列は、配列番号 2 6 1 に対して少なくとも 70 %、80 %、または 90 % の同一性を

有し、軽鎖の可変領域は、配列番号 266 に対して少なくとも 70%、80%、または 90%の同一性を有し、配列番号 261 由来の変異体は CDR-H1、CDR-H2、または CDR-H3 内では発生せず、配列番号 266 由来の変異体は CDR-L1、CDR-L2、または CDR-L3 内では発生しない。いくつかの実施形態では、V_H配列は、配列番号 351 に対して少なくとも 70%、80%、または 90%の同一性を有し、軽鎖の可変領域は、配列番号 356 に対して少なくとも 70%、80%、または 90%の同一性を有し、配列番号 351 由来の変異体は CDR-H1、CDR-H2、または CDR-H3 内では発生せず、配列番号 356 由来の変異体は CDR-L1、CDR-L2、または CDR-L3 内では発生しない。いくつかの実施形態では、V_H配列は、配列番号 371 に対して少なくとも 70%、80%、または 90%の同一性を有し、軽鎖の可変領域は、配列番号 376 に対して少なくとも 70%、80%、または 90%の同一性を有し、配列番号 371 由来の変異体は CDR-H1、CDR-H2、または CDR-H3 内では発生せず、配列番号 376 由来の変異体は CDR-L1、CDR-L2、または CDR-L3 内では発生しない。いくつかの実施形態では、V_H配列は、配列番号 434 に対して少なくとも 70%、80%、または 90%の同一性を有し、軽鎖の可変領域は、配列番号 439 に対して少なくとも 70%、80%、または 90%の同一性を有し、配列番号 434 由来の変異体は CDR-H1、CDR-H2、または CDR-H3 内では発生せず、配列番号 439 由来の変異体は CDR-L1、CDR-L2、または CDR-L3 内では発生しない。いくつかの実施形態では、V_H配列は、配列番号 444 に対して少なくとも 70%、80%、または 90%の同一性を有し、軽鎖の可変領域は、配列番号 449 に対して少なくとも 70%、80%、または 90%の同一性を有し、配列番号 444 由来の変異体は CDR-H1、CDR-H2、または CDR-H3 内では発生せず、配列番号 449 由来の変異体は CDR-L1、CDR-L2、または CDR-L3 内では発生しない。いくつかの実施形態では、V_H配列は、配列番号 454 に対して少なくとも 70%、80%、または 90%の同一性を有し、軽鎖の可変領域は、配列番号 459 に対して少なくとも 70%、80%、または 90%の同一性を有し、配列番号 454 由来の変異体は CDR-H1、CDR-H2、または CDR-H3 内では発生せず、配列番号 459 由来の変異体は CDR-L1、CDR-L2、または CDR-L3 内では発生しない。いくつかの実施形態では、V_H配列は、配列番号 464 に対して少なくとも 70%、80%、または 90%の同一性を有し、軽鎖の可変領域は、配列番号 469 に対して少なくとも 70%、80%、または 90%の同一性を有し、配列番号 464 由来の変異体は CDR-H1、CDR-H2、または CDR-H3 内では発生せず、配列番号 469 由来の変異体は CDR-L1、CDR-L2、または CDR-L3 内では発生しない。いくつかの実施形態では、V_H配列は、配列番号 474 に対して少なくとも 70%、80%、または 90%の同一性を有し、軽鎖の可変領域は、配列番号 479 に対して少なくとも 70%、80%、または 90%の同一性を有し、配列番号 474 由来の変異体は CDR-H1、CDR-H2、または CDR-H3 内では発生せず、配列番号 479 由来の変異体は CDR-L1、CDR-L2、または CDR-L3 内では発生しない。

【0395】

特定の態様では、配列番号 1、11、21、31、41、51、61、71、81、91、101、111、121、131、141、151、161、171、181、191、201、211、221、231、241、251、261、271、281、291、301、311、321、331、341、351、361、371、434、444、454、464、または 474 のいずれかは、配列番号 6、16、26、36、46、56、66、76、86、96、106、116、126、136、146、156、166、176、186、196、206、216、226、236、246、256、266、276、286、296、306、316、326、336、346、356、366、376、439、449、459、469、または 479 のいずれかと組み合わせることができる。例えば、配列番号 11 は、配列番号 6、16、26、36、46、56、66、76、86、96、106、116、126、136、146、156、16

6、176、186、196、206、216、226、236、246、256、266、276、286、296、306、316、326、336、346、356、366、376、439、449、459、469、または479のいずれかと組み合わせることができる。別の例として、配列番号16は、配列番号1、11、21、31、41、51、61、71、81、91、101、111、121、131、141、151、161、171、181、191、201、211、221、231、241、251、261、271、281、291、301、311、321、331、341、351、361、371、434、444、454、464、または474のいずれかと組み合わせることができる。

【0396】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号1、11、21、31、41、51、61、71、81、91、101、111、121、131、141、151、161、171、181、191、201、211、221、231、241、251、261、271、281、291、301、311、321、331、341、351、361、または371に提供される、例示V_H配列に対して少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、95%、または99%の同一性を有するV_H配列、及び配列番号6、16、26、36、46、56、66、76、86、96、106、116、126、136、146、156、166、176、186、196、206、216、226、236、246、256、266、276、286、296、306、316、326、336、346、356、366、376、439、449、459、469、または479に提供される、例示V_L配列に対して少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%、95%、または99%の同一性を有するV_L配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、最大1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25個のアミノ酸置換を有する、配列番号1、11、21、31、41、51、61、71、81、91、101、111、121、131、141、151、161、171、181、191、201、211、221、231、241、251、261、271、281、291、301、311、321、331、341、351、361、371、434、444、454、464、または474に提供されるV_H配列、及び最大1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25個のアミノ酸置換を有する、配列番号6、16、26、36、46、56、66、76、86、96、106、116、126、136、146、156、166、176、186、196、206、216、226、236、246、256、266、276、286、296、306、316、326、336、346、356、366、376、439、449、459、469、または479に提供されるV_L配列を含む。いくつかの態様において、アミノ酸置換は保守的アミノ酸置換である。いくつかの実施形態では、本段落に記載される抗体は、本明細書では「変異体」と呼ばれる。いくつかの実施形態では、そのような変異体は、例えば、親和性成熟、部位特異的変異導入、ランダム変異導入、または当該技術分野で既知のもしくは本明細書に記載の他の任意の方法により、本明細書で提供される配列に由来する。いくつかの実施形態では、そのような変異体は、本明細書で提供される配列に由来せず、例えば、抗体を得るための本明細書で提供される方法に従ってdenovoで単離され得る。

【0397】

いくつかの実施形態では、重鎖可変または軽鎖可変の相同性パーセントは、CDRの外で計算される。例えば、相同性パーセントはフレームワーク領域で計算することができる。

【0398】

いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号5、15、25、35、45、55、65、75、85、95、105、115、125、135

10

20

30

40

50

、 1 4 5、1 5 5、1 6 5、1 7 5、1 8 5、1 9 5、2 0 5、2 1 5、2 2 5、2 3 5
 、 2 4 5、2 5 5、2 6 5、2 7 5、2 8 5、2 9 5、3 0 5、3 1 5、3 2 5、3 3 5
 、 3 4 5、3 5 5、3 6 5、3 7 5、4 3 8、4 4 8、4 5 8、4 6 8、または 4 7 8 に
 提供される重鎖を含む。

【0 3 9 9】

いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号 1 0、2
 0、3 0、4 0、5 0、6 0、7 0、8 0、9 0、1 0 0、1 1 0、1 2 0、1 3 0、1
 4 0、1 5 0、1 6 0、1 7 0、1 8 0、1 9 0、2 1 0、2 2 0、2 3 0、2 4 0、2
 5 0、2 6 0、2 7 0、2 8 0、2 9 0、3 1 0、3 2 0、3 3 0、3 4 0、3 5 0、3
 6 0、3 7 0、3 8 0、4 4 3、4 5 3、4 6 3、4 7 3、または 4 8 3 に提供される軽
 鎖を含む。

10

【0 4 0 0】

特定の態様では、配列番号 5、1 5、2 5、3 5、4 5、5 5、6 5、7 5、8 5、9
 5、1 0 5、1 1 5、1 2 5、1 3 5、1 4 5、1 5 5、1 6 5、1 7 5、1 8 5、1 9
 5、2 0 5、2 1 5、2 2 5、2 3 5、2 4 5、2 5 5、2 6 5、2 7 5、2 8 5、2 9
 5、3 0 5、3 1 5、3 2 5、3 3 5、3 4 5、3 5 5、3 6 5、3 7 5、4 3 8、4 4
 8、4 5 8、4 6 8 または 4 7 8 のいずれかは、配列番号：1 0、2 0、3 0、4 0、5
 0、6 0、7 0、8 0、9 0、1 0 0、1 1 0、1 2 0、1 3 0、1 4 0、1 5 0、1 6
 0、1 7 0、1 8 0、1 9 0、2 1 0、2 2 0、2 3 0、2 4 0、2 5 0、2 6 0、2 7
 0、2 8 0、2 9 0、3 1 0、3 2 0、3 3 0、3 4 0、3 5 0、3 6 0、3 7 0、3 8
 0、4 4 3、4 5 3、4 6 3、4 7 3、または 4 8 3 のいずれかと組み合わせることがで
 きる。

20

【0 4 0 1】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号 5、1 5、2 5、3
 5、4 5、5 5、6 5、7 5、8 5、9 5、1 0 5、1 1 5、1 2 5、1 3 5、1 4 5、
 1 5 5、1 6 5、1 7 5、1 8 5、1 9 5、2 0 5、2 1 5、2 2 5、2 3 5、2 4 5、
 2 5 5、2 6 5、2 7 5、2 8 5、2 9 5、3 0 5、3 1 5、3 2 5、3 3 5、3 4 5、
 3 5 5、3 6 5、3 7 5、4 3 8、4 4 8、4 5 8、4 6 8 または 4 7 8 に提供される例
 示 V_H 配列に対して少なくとも約 5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 %、ま
 たは 9 9 % の同一性を有する重鎖配列、及び配列番号 1 0、2 0、3 0、4 0、5 0、6
 0、7 0、8 0、9 0、1 0 0、1 1 0、1 2 0、1 3 0、1 4 0、1 5 0、1 6 0、1
 7 0、1 8 0、1 9 0、2 1 0、2 2 0、2 3 0、2 4 0、2 5 0、2 6 0、2 7 0、2
 8 0、2 9 0、3 1 0、3 2 0、3 3 0、3 4 0、3 5 0、3 6 0、3 7 0、3 8 0、4
 4 3、4 5 3、4 6 3、4 7 3、または 4 8 3 に提供される例示 V_L 配列に対して少なく
 とも約 5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 %、または 9 9 % の同一性を有す
 る軽鎖配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、最大 1、2
 、3、4、5、6、7、8、9、1 0、1 1、1 2、1 3、1 4、1 5、1 6、1 7、1
 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、または 2 5 個のアミノ酸置換を有する、配列
 番号 5、1 5、2 5、3 5、4 5、5 5、6 5、7 5、8 5、9 5、1 0 5、1 1 5、1
 2 5、1 3 5、1 4 5、1 5 5、1 6 5、1 7 5、1 8 5、1 9 5、2 0 5、2 1 5、2
 2 5、2 3 5、2 4 5、2 5 5、2 6 5、2 7 5、2 8 5、2 9 5、3 0 5、3 1 5、3
 2 5、3 3 5、3 4 5、3 5 5、3 6 5、3 7 5、4 3 8、4 4 8、4 5 8、4 6 8、ま
 たは 4 7 8 に提供される重鎖配列、及び最大 1、2、3、4、5、6、7、8、9、1 0
 、1 1、1 2、1 3、1 4、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、
 2 4、または 2 5 個のアミノ酸置換を有する、配列番号 1 0、2 0、3 0、4 0、5 0、
 6 0、7 0、8 0、9 0、1 0 0、1 1 0、1 2 0、1 3 0、1 4 0、1 5 0、1 6 0、
 1 7 0、1 8 0、1 9 0、2 1 0、2 2 0、2 3 0、2 4 0、2 5 0、2 6 0、2 7 0、
 2 8 0、2 9 0、3 1 0、3 2 0、3 3 0、3 4 0、3 5 0、3 6 0、3 7 0、3 8 0、
 4 4 3、4 5 3、4 6 3、4 7 3 または 4 8 3 に提供される軽鎖配列を含む。

30

40

【0 4 0 2】

50

いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントのポリヌクレオチド配列は、配列番号 427 または 430 に示されるシグナル配列を含む。いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントのポリヌクレオチド配列は、配列番号 428 または 429 に示されるシグナル配列を含む。

【0403】

Fc 領域

本明細書の「Fcドメイン」または「Fc領域」という用語は、定常領域の少なくとも一部を含有する免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために使用される。用語は、天然配列Fc領域及び多様性Fc領域を含む。本明細書で別途指定のない限り、Fc領域または定常領域中のアミノ酸残基の番号付けは、Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991 に記載されるように、EUインデックスとも呼ばれるEU番号付けシステムによるものである。本明細書で使用される二量体Fcの「Fcポリペプチド」は、二量体Fcドメインを形成する2つのポリペプチドのうちの1つ、すなわち、安定した自己会合が可能な免疫グロブリン重鎖のC末端定常領域を含むポリペプチドを指す。例えば、二量体IgGFcのFcポリペプチドは、IgG CH2 及び IgG CH3 定常ドメイン配列を含む。Fcは、クラスIgA、IgD、IgE、IgG、及びIgMのものであり得、これらのいくつかはさらに、サブクラス（アイソタイプ）、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、及びIgA2に分けられ得る。

【0404】

「Fc受容体」及び「FcR」という用語は、抗体のFc領域に結合する受容体を説明するために使用される。例えば、FcRは天然配列のヒトFcRであり得る。一般に、FcRは、IgG抗体に結合するもの（ガンマ受容体）であり、FcγRI、FcγRII、及びFcγRIIIサブクラスを含み、これには、これらの受容体の対立遺伝子変異型及び選択的スプライシング形態を含む。FcγRII受容体は、主に細胞質ドメインが異なる類似のアミノ酸配列を有するFcγRIIA（「活性化受容体」）及びFcγRIIB（「阻害受容体」）を含む。他のアイソタイプの免疫グロブリンは、特定のFcRに結合することもできる（例えば、Janeway et al., *Immunobiology: the immune system in health and disease*, (Elsevier Science Ltd., NY) (4th ed., 1999) を参照のこと）。活性化受容体FcγRIIAは、その細胞質ドメインに免疫受容体チロシン活性化モチーフ（ITAM）を含有する。阻害受容体FcγRIIBは、細胞質ドメインに免疫受容体チロシン系阻害モチーフ（ITIM）を含有する（Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15: 203~234 (1997) で概説される）。FcRは、Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991); Capel et al., *Immunomet* hods 4: 25-34 (1994)、及びde Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126: 330-41 (1995) で概説される。将来的に同定されるべきものを含む他のFcRは、本明細書では「FcR」という用語に包含される。用語は、母系IgGの胎児への移入に関与する、新生児受容体FcRnも含む（Guyer et al., *J. Immunol.* 117: 587 (1976); 及びKim et al., *J. Immunol.* 24: 249 (1994)）。

【0405】

いくつかの実施形態では、抗体は、IgG1抗体である。

【0406】

いくつかの実施形態では、抗体は、IgG3抗体である。

【0407】

いくつかの実施形態では、抗体は、IgG2抗体である。

【0408】

いくつかの実施形態では、抗体は、IgG4抗体である。

【0409】

CH2ドメインの修飾は、FcRのFcへの結合に影響を与え得る。Fc領域における多数のアミノ酸改変は、異なるFcガンマ（Fcγ）受容体に対するFcの親和性を選択的に変更するために当該技術分野で既知である。一実施形態では、Fcは、Fcガンマ受容体の選択的結合を促進する1つまたは複数の改変を含む。

【0410】

一部の実施形態では、本明細書に記載の抗体は、エフェクター機能を媒介する能力を改善する改変を含む。そのような修飾は当該技術分野で公知であり、アフコシル化、または活性化受容体、主にADCCの場合はFCGR3a、CDCの場合はC1qに対するFcの親和性の操作が含まれる。

10

【0411】

特定の実施形態では、本明細書で提供される抗体は、ADCCを改善する1つまたは複数のアミノ酸置換を有するFc領域を含む。

【0412】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、C1q結合及び／またはCDCを改善または減少させる1つまたは複数の改変を含む。米国特許第6,194,551号、WO99/51642、及びIdusogie et al., J. Immunol., 2000, 164:4178-4184（これらのそれぞれは、全体が参照により組み込まれる）を参照のこと。

20

【0413】

したがって、一実施形態では、本明細書に記載の抗体は、改善されたエフェクター機能を付与する1つまたは複数のアミノ酸修飾を含む二量体Fcを含むことができる。別の実施形態では、抗体をアフコシル化してエフェクター機能を改善することができる。

【0414】

FcγR及び／または補体結合及び／またはエフェクター機能を低減させるFc改変は、当該技術分野で既知である。近年の刊行物は、エフェクター活性が低減またはサイレンシングされた抗体を操作するために使用されている方策について説明する（Strohl, WR (2009), Curr Opin Biotech 20:685-691及びStrohl, WR and Strohl LM, "Antibody Fc engineering for optimal antibody performance" In Therapeutic Antibody Engineering, Cambridge: Woodhead Publishing (2012), pp 225-249を参照のこと）。これらの方策は、グリコシル化の修飾によるエフェクター機能の低減、IgG2/IgG4足場の使用、またはヒンジもしくはFcのCH2領域への変異の導入を含む。例えば、米国特許公開第2011/0212087号（Strohl）、国際特許公開第WO2006/105338号（Xencor）、米国特許公開第2012/0225058号（Xencor）、米国特許公開第2012/0251531号（Genentech）、及びStrop et al. ((2012) J. Mol. Biol. 420:204-219)は、Fcに結合するFcγRまたは補体を低減させる特定の修飾について説明する。

30

【0415】

アミノ酸配列を変更することなく、Fcグリコシル化部位（Asn 297 EUナンバリング）上にフコースをほとんどまたは全く含まない抗体を産生する方法は、当該技術分野で周知である。Glymax X（登録商標）技術（ProBioGen AG）は、抗体産生に使用される細胞へのフコース生合成の細胞経路をそらす酵素の遺伝子の導入に基づく。これは、抗体産生細胞によるN結合型抗体炭水化物部分への糖「フコース」の付加を防止する（von Horsten et al. (2010) Glycobiology. 2010 Dec; 20(12):1607-18）。脱フコシル化抗体を産生す

40

50

ることが可能な細胞株の例としては、タンパク質フコシル化が欠損している、細菌性酸化還元酵素であるGDP-6-デオキシ-D-リキソ-4-ヘキシロースレダクターゼ(RMD)の安定した過剰発現を有するCHO-DG44(Henning von Horsten et al., Glycobiol 2010, 20:1607-1618を参照のこと)またはLec13 CHO細胞(Ripka et al., Arch. Biochem. Biophys., 1986, 249:533-545; 米国特許公開第2003/0157108号; WO2004/056312 (これらのそれぞれは、全体が参照により組み込まれる)を参照のこと)、ならびにアルファ-1, 6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子などのノックアウト細胞株またはFUT8ノックアウトCHO細胞(Yamane-Ohnuki et al., Biotech. Bioeng., 2004, 87:614-622; Kanda et al., Biotechnol. Bioeng., 2006, 94:680-688; 及びWO 2003/085107 (これらのそれぞれは、全体が参照により組み込まれる)を参照のこと)が挙げられる。フコシル化のレベルが低下した抗体を得るための別のアプローチは、米国特許第8, 409, 572号に見出すことができ、これは、抗体のフコシル化のレベルの低下を生じる能力について抗体産生のための細胞株を選択することを教示する。

10

【0416】

脱フコシル化抗体を産生することが可能な細胞株の例としては、タンパク質フコシル化が欠損している、細菌性酸化還元酵素であるGDP-6-デオキシ-D-リキソ-4-ヘキシロースレダクターゼ(RMD)の安定した過剰発現を有するCHO-DG44(Henning von Horsten et al., Glycobiol 2010, 20:1607-1618を参照のこと)またはLec13 CHO細胞(Ripka et al., Arch. Biochem. Biophys., 1986, 249:533-545; 米国特許公開第2003/0157108号; WO2004/056312 (これらのそれぞれは、全体が参照により組み込まれる)を参照のこと)、ならびにアルファ-1, 6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子などのノックアウト細胞株またはFUT8ノックアウトCHO細胞(Yamane-Ohnuki et al., Biotech. Bioeng., 2004, 87:614-622; Kanda et al., Biotechnol. Bioeng., 2006, 94:680-688; 及びWO 2003/085107 (これらのそれぞれは、全体が参照により組み込まれる)を参照のこと)が挙げられる。

20

30

【0417】

抗体は、完全にアフコシル化することができ(それらが、検出可能なフコースを含有しないことを意味する)、またはそれらは、部分的にアフコシル化することができ、このことは、単離抗体が、哺乳動物発現系により産生された類似の抗体について通常検出されるフコースの量の95%未満、85%未満、75%未満、65%未満、55%未満、45%未満、35%未満、25%未満、15%未満、または5%未満を含有することを意味する。

【0418】

一部の態様では、本明細書で提供される抗体は、天然に存在するIgG1ドメインと比較して、Asn297位でフコース含有量が低減したIgG1ドメインを含む。そのようなFcドメインは、改善されたADCCを有することが既知である。全体が参照により組み込まれるShields et al., J. Biol. Chem., 2002, 277:26733-26740を参照のこと。いくつかの態様では、そのような抗体は、Asn297位に任意のフコースを含まない。フコースの量は、例えば、全体が参照により組み込まれるWO2008/077546に記載されるような任意の好適な方法を使用して決定されてもよい。

40

【0419】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、GlcNAcによって二分された抗体のFc領域に結合している二分岐オリゴ糖など、二分されたオリゴ糖を含む。か

50

かる抗体変異形は、低減されたフコシル化及び／または改善されたADCC機能を有し得る。そのような抗体変異体の例は、例えば、WO2003/011878、米国特許第6,602,684号、及び同第2005/0123546号に記載されており、これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる。

【0420】

本明細書に提供される抗体に組み込まれ得る他の例示的なグリコシル化変異体は、例えば、米国特許公開第2003/0157108号、同第2004/0093621号、同第2003/0157108号、同第2003/0115614号、同第2002/0164328号、同第2004/0093621号、同第2004/0132140号、同第2004/0110704号、同第2004/0110282号、同第2004/0109865号；国際特許公開第2000/61739号、同第2001/29246号、同第2003/085119号、同第2003/084570号、同第2005/035586号、同第2005/035778号、同第2005/053742号、同第2002/031140号、Okazaki et al., J. Mol. Biol., 2004, 336:1239-1249、及びYamane-Ohnuki et al., Biotech. Bioeng., 2004, 87:614-622に記載され、これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる。

10

【0421】

一部の実施形態では、本明細書で提供される抗体は、Fc領域に結合しているオリゴ糖中に少なくとも1つのガラクトース残基を有するFc領域を含む。かかる抗体変異形は、改善されたCDC機能を有し得る。そのような抗体変異体の例は、例えば、WO1997/30087；WO1998/58964；及びWO1999/22764に記載され、これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる。

20

【0422】

脱フコシル化抗体を産生することが可能な細胞株の例としては、タンパク質フコシル化が欠損している、細菌性酸化還元酵素であるGDP-6-デオキシ-D-リキソー4-ヘキシロースレダクターゼ(RMD)の安定した過剰発現を有するCHO-DG44(Henning von Horsten et al., Glycobiol 2010, 20:1607-1618を参照のこと)またはLec13 CHO細胞(Ripka et al., Arch. Biochem. Biophys., 1986, 249:533-545；米国特許公開第2003/0157108号；WO2004/056312(これらのそれぞれは、全体が参照により組み込まれる)を参照のこと)、ならびにアルファ-1,6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子などのノックアウト細胞株またはFUT8ノックアウトCHO細胞(Yamane-Ohnuki et al., Biotech. Bioeng., 2004, 87:614-622；Kanda et al., Biotechnol. Bioeng., 2006, 94:680-688；及びWO2003/085107(これらのそれぞれは、全体が参照により組み込まれる)を参照のこと)が挙げられる。

30

【0423】

いくつかの実施形態では、抗体は、抗体依存性細胞食作用(ADCP)活性を有する。ADCPは、病原性または腫瘍形成性の標的細胞の表面の抗原に抗体が結合する時生じ得る。単球及びマクロファージを含む、細胞表面にFc受容体を保有する食細胞は、標的細胞に結合している抗体のFc領域を認識して結合する。Fc受容体が抗体結合標的細胞に結合すると、標的細胞の貪食を開始することができる。ADCPは、ADCCの一形態と考えることができる。

40

【0424】

いくつかの実施形態では、抗体は、免疫複合体を形成することが可能である。例えば、免疫複合体は、抗体で覆われた腫瘍細胞であり得る。

【0425】

いくつかの態様では、抗MARCO抗体は、がん組織の外側に存在する骨髓細胞と実質

50

的に結合しない。いくつかの態様では、抗M A R C O抗体は、がん組織に存在する刺激性骨髄細胞と実質的に結合しない。

【0426】

いくつかの実施形態では、抗体は、モノクローナル抗体である。

【0427】

いくつかの実施形態では、抗体は、ポリクローナル抗体である。

【0428】

いくつかの実施形態では、抗体はハイブリドーマによって産生される。他の実施形態では、抗体は、所望の可変ドメイン及び定常ドメインを発現するように操作された組換え細胞により産生される。

【0429】

いくつかの実施形態では、抗体は、抗原特異性及びより低いヒンジ領域またはその変異体を保持する一本鎖抗体または他の抗体誘導体であり得る。

【0430】

いくつかの実施形態では、抗体は、多機能抗体、組み換え抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、フラグメント、またはその変異体であり得る。特定の実施形態では、抗体フラグメントまたはその誘導体は、F a bフラグメント、F a b' 2フラグメント、C D R及びS c F vから選択される。

【0431】

いくつかの実施形態では、抗体は、M A R C Oタンパク質などの表面抗原に特異的である。いくつかの実施形態では、治療用抗体は、腫瘍抗原（例えば、腫瘍細胞によって特異的に発現される分子）に特異的である。特定の実施形態では、治療用抗体は、ヒトまたは非ヒト霊長類I g G 1またはI g G 3 F c部分を有し得る。

【0432】

結合

標的分子への抗体の結合に関して、特定の抗原（例えば、ポリペプチド標的）または特定の抗原上のエピトープ「と結合する」、「と特異的結合すること」、「に特異的に結合する」、「に特異的である」、「と選択的に結合する」、及び「に選択的である」という用語は、（例えば、非標的分子との）非特異的または非選択的相互作用とは測定可能に異なる結合を意味する。特異的結合は、例えば、標的分子への結合を測定し、それを非標的分子への結合と比較することにより測定することができる。特異的結合は、標的分子上で認識されるエピトープを模倣する対照分子との競合により決定することもできる。その場合、標的分子への抗体の結合が対照分子により競合的に阻害される場合、特異的結合が示される。抗原標的の架橋は結合の一種である。いくつかの実施形態では、抗M A R C O抗体は、M A R C OをM A R C O + 細胞上のM A R C Oに架橋する。

【0433】

「親和性」は、分子（例えば、抗体）の単一の結合部位とその結合パートナー（例えば、抗原またはエピトープ）との間の、総計の非共有性相互作用の強度を指す。別途指定されない限り、本明細書で使用される時、「親和性」は、結合対のメンバー（例えば、抗体及び抗原またはエピトープ）間の1 : 1の相互作用を反映する、本来の結合親和性を指すことができる。分子Xの、そのパートナーYに対する親和性は、解離平衡定数（ K_D ）によって表すことができる。解離平衡定数に寄与する速度論的要素は、以下でより詳細に説明される。親和性は、表面プラズモン共鳴（S P R）技術（例えば、B I A C O R E（登録商標））または生物層干渉法（例えば、F O R T E B I O（登録商標））などの本明細書に記載のものを含む、当技術分野で公知の一般的な方法によって測定することができる。

【0434】

本明細書で使用される「 k_d 」（ $s e c^{-1}$ ）という用語は、特定の抗体－抗原相互作用の解離速度定数を指す。この値は、 $k_{o f f}$ 値とも呼ばれる。

【0435】

本明細書で使用される「 k_a 」（ $M^{-1} \times s e c^{-1}$ ）という用語は、特定の抗体－抗

10

20

30

40

50

原相互作用の会合速度定数を指す。この値は、 k_{on} 値とも呼ばれる。

【0436】

本明細書で使用される「 k_D 」(M)という用語は、特定の抗体－抗原相互作用の解離平衡定数を指す。 $K_D = k_d / k_a$ 。いくつかの実施形態では、抗体の親和性は、そのような抗体とその抗原との間の相互作用の K_D に関して記載される。明確にするために、当技術分野で知られているように、 K_D 値が小さいほど親和性相互作用が高いことを示し、 K_D 値が大きいほど親和性相互作用が低いことを示す。

【0437】

本明細書で使用される「 K_A 」(M^{-1})という用語は、特定の抗体－抗原相互作用の会合平衡定数を指す。 $K_A = k_a / k_d$ 。

【0438】

本明細書で2つ以上の抗体との関連で使用される場合、「と競合する」または「と交差競合する」という用語は、2つ以上の抗体が抗原（例えば、MARCO）への結合について競合することを示す。1つの例示的なアッセイでは、MARCOは、表面上にコーティングされ、第1のMARCO抗体と接触させ、その後、第2のMARCO抗体が加えられる。別の例示的なアッセイでは、第1のMARCO抗体が表面にコーティングされ、MARCOと接触させ、次に、第2のMARCO抗体が加えられる。いずれのアッセイでも、第1のMARCO抗体の存在が第2のMARCO抗体の結合を低減させる場合、抗体は、互いに競合する。「と競合する」という用語は、1つの抗体が別の抗体の結合を低減させるが、抗体が逆の順序で加える時、競合が観察されない抗体の組み合わせも含む。しかし、一部の実施形態では、第1及び第2の抗体は、それらが加えられる順序に関係なく、互いの結合を阻害する。いくつかの実施形態では、1つの抗体は、抗原への別の抗体の結合を、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも99%低減させる。当業者は、MARCOに対する抗体の親和性及び抗体の価数に基づいて、競合アッセイで使用する抗体の濃度を選択することができる。この定義に記載されるアッセイは、例示であり、当業者は、抗体が互いに競合するかどうかを決定するために任意の好適なアッセイを利用することができる。好適なアッセイは、例えば、Cox et al., "Immunoassay Methods," in Assay Guidance Manual [Internet], Updated December 24, 2014 (ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92434/; accessed September 29, 2015); Silman et al., Cytometry, 2001, 44:30-37; 及び Finco et al., J. Pharm. Biomed. Anal., 2011, 54:351-358に記載され、これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる。

【0439】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される抗体は、ヒトMARCOに結合する。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される抗体は、マウスMARCOに結合する。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される抗体は、マカクMARCOに結合する。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される抗体は、カニクイザルMARCOに結合する。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、ヒト、アカゲザル、及び／またはカニクイザルのMARCOに結合する。

【0440】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、約0.001、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、7、8、9、または 10×10^{-9} M以下の K_D (Biacoreアッセイで測定)でヒトMARCOに結合する。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体の K_D は、約0.001~0.01、0.01~0.1、0.01~0.05、0.05~0.1、0.1~0.5、0.5~1、

0.25~0.75、0.25~0.5、0.5~0.75、0.75~1、0.75~2、1.1~1.2、1.2~1.3、1.3~1.4、1.4~1.5、1.5~1.6、1.6~1.7、1.7~1.8、1.8~1.9、1.9~2、1~2、1~5、2~7、3~8、3~5、4~6、5~7、6~8、7~9、7~10、または $5 \sim 10 \times 10^{-9} \text{ M}$ (Biacoreアッセイで測定)である。

【0441】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、約2、1.98、1.95、1.9、1.85、1.8、1.75、1.7、1.65、1.6、1.55、1.50、1.45、または $1.4 \times 10^{-9} \text{ M}$ 以下、またはそれ以下の K_D (Biacoreアッセイで測定)でヒトMARCOに結合する。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、1.9~1.8、1.8~1.7、1.7~1.6、1.6~1.5、または $1.9 \sim 1.5 \times 10^{-9} \text{ M}$ の間の K_D (Biacoreアッセイで測定)でヒトMARCOに結合する。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、約10、9.56、9.5、9.0、8.88、8.84、8.5、8、7.5、7.32、7、6.5、6、5.5、5、4.5、4、3.5、3、2.5、2、1.5、または $1 \times 10^{-4} (1/s)$ 以下の K_D (Biacoreアッセイで測定)でヒトMARCOに結合する。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、7~10、7~8、8~9、9~10、7~7.5、7.5~8、8~8.5、8.5~9、9~9.5、または $9.5 \sim 10 \times 10^{-4} (1/s)$ の K_D (Biacoreアッセイで測定)でヒトMARCOに結合する。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、約4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、45、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、7、8、9、もしくは $10 \times 10^5 (1/Ms)$ 以上の K_a (Biacoreアッセイで測定)でヒトMARCOに結合する。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、4~7、4~4.5、4.5~5、5~5.5、5.5~6、6~6.5、もしくは6.5~7、7~8、8~9、または $9 \sim 10 \times 10^5 (1/Ms)$ の K_a (Biacoreアッセイで測定)でヒトMARCOと結合する。

【0442】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、2、1.9、1.8、1.7、1.6、1.5、1.4、1.3、1.2、1.1、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、または0.1 nM以下のEC50 (フローサイトメトリーで測定)でヒトMARCOに結合する。いくつかの実施形態では、抗体は、0.6~1.4 nMの間のEC50 (フローサイトメトリーで測定)でヒトMARCOに結合する。いくつかの実施形態では、抗体は、約0.5、0.6、0.9、1.1、1.2、1.3、1.4、または1.5 nMのEC50 (フローサイトメトリーで測定)でヒトMARCOに結合する。

【0443】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、2、1.9、1.8、1.7、1.6、1.5、1.4、1.3、1.2、1.1、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、または0.1 nM以下のEC50 (フローサイトメトリーで測定)でマウスMARCOに結合する。いくつかの実施形態では、抗体は、0.6~1.4 nMの間のEC50 (フローサイトメトリーで測定)でマウスMARCOに結合する。いくつかの実施形態では、抗体は、約0.5、0.6、0.9、1.1、1.2、1.3、1.4、または1.5 nMのEC50 (フローサイトメトリーで測定)でマウスMARCOに結合する。

【0444】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、20 nM以上のEC50 (フローサイトメトリーで測定)でヒトMARCOに結合しない。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、3 nM以上のEC50 (フローサイトメトリーで測定)でマウスMARCOに結合しない。

10

20

30

40

50

【0445】

目的の抗体（例えば、MARCO）が結合している標的抗原上のエピトープに結合する抗体をスクリーニングするために、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)に記載されるような所定の交差遮断アッセイを実施することができる。代替的または追加的に、エピトープマッピングは、当該分野で既知の方法により実施することができる。

【0446】

抗体間の競合は、試験中の抗体が参照抗体の共通の抗原への特異的結合を阻害または遮断するアッセイによって決定することができる（例えば、Jung et al., Cancer Res. 50:1495, 1990; Fendly et al., Cancer Research 50:1550-1558; US 6,949,245を参照）。過剰な試験抗体（例えば、少なくとも2×、5×、10×、20×、または100×）が参照抗体の結合を、例えば、少なくとも50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%阻害または遮断する（競合結合アッセイで測定）場合、試験抗体は、参照抗体と競合する。競合アッセイにより同定される抗体（競合抗体）は、参照抗体と同じエピトープに結合する抗体、及び立体障害が発生するために参照抗体が結合しているエピトープに十分に近い隣接エピトープに結合する抗体を含む。例えば、MARCOへの結合について本明細書に記載の第1の抗体と競合する第2の競合抗体は、同定することができる。特定の場合では、第2の抗体は、第1の抗体の結合を、例えば、少なくとも50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%遮断または阻害し得る（競合結合アッセイで測定）。特定の場合では、第2の抗体は、第1の抗体を50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、または99%超、置換することができる。

【0447】

いくつかの実施形態では、抗体は、MARCOのスカベンジャー受容体システインリッチ（SRCR）ドメインに結合する。

【0448】

いくつかの実施形態では、抗体は、野生型ヒトMARCO（配列番号363）の残基Q452、Y472、またはK473のうちの少なくとも1つを含むSRCR上のエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、抗体は、野生型ヒトMARCO（配列番号363）の残基H505、D507、S509またはE511のうちの少なくとも1つを含むSRCR上のエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、抗体は、野生型ヒトMARCO（配列番号363）の残基E450、Q452、Q487またはT499のうちの少なくとも1つを含むSRCR上のエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、抗体は、野生型ヒトMARCO（配列番号363）の残基E450、Q452、Q487、T499、H505、D507、S509、またはE511のうちの少なくとも1つを含むSRCR上のエピトープに結合する。

【0449】

いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号363に記載のMARCOの以下の残基：Q452、Y472、K473、E450、Q487、T499、H505、D507、S509、またはE511のうちの少なくとも1つに結合する。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号363の以下の残基：Q452、Y472、K473、E450、Q487、T499、H505、D507、S509、またはE511の少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、または10個に結合する。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合フラグメントは、MARCO（配列番号384）の以下の残基：Q452、Y472、K473、E450、Q487、T499、H505、D507、S509、またはE511のうちの少なくとも2つに結合する。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合フラグメントは、MARCO（配列番号384）の以下の残基：Q452、Y472、K4

73、E450、Q487、T499、H505、D507、S509、またはE511のうちの少なくとも3つに結合する。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合フラグメントは、MARCO（配列番号384）の以下の残基：Q452、Y472、K473、E450、Q487、T499、H505、D507、S509、またはE511のうちの少なくとも4つに結合する。

【0450】

いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合フラグメントは、少なくともQ452に結合する。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合フラグメントは、少なくともY472に結合する。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合フラグメントは、少なくともK473に結合する。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合フラグメントは、少なくともE450に結合する。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合フラグメントは、少なくともQ487に結合する。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合フラグメントは、少なくともT499に結合する。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合フラグメントは、少なくともH505に結合する。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合フラグメントは、少なくともD507に結合する。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合フラグメントは、少なくともS509に結合する。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合フラグメントは、少なくともS509に結合する。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合フラグメントは、少なくともE511に結合する。

【0451】

機能

いくつかの実施形態では、抗体は、抗体依存性細胞傷害（ADCC）活性を有する。ADCCは、抗体が病原性または腫瘍形成性の標的細胞の表面の抗原に結合する時に生じ得る。細胞傷害性T細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、マクロファージ、好中球、好酸球、樹状細胞、または単球を含む、細胞表面上にFcγRまたはFcGR）を有するエフェクター細胞は、標的細胞に結合している抗体のFc領域を認識して結合する。そのような結合は、細胞死につながる細胞内シグナル伝達経路の活性化を引き起こし得る。特定の実施形態では、抗体の免疫グロブリンFc領域サブタイプ（アイソタイプ）は、ヒトIgG1及びIgG3を含む。本明細書で使用される場合、ADCCは、Fc受容体（FcR）を発現する非特異的細胞傷害性細胞（例えば、ナチュラルキラー（NK）細胞、好中球、及びマクロファージ）が標的細胞の結合している抗体を認識し、続いて、標的細胞の溶解を引き起こす細胞媒介性反応を指す。ADCCを媒介する初代細胞であるNK細胞は、FcγRIIのみを発現するが、単球は、FcγRI、FcγRII、及びFcγRIIIを発現する。造血細胞上のFcR発現は、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991)の464頁の表3にまとめられる。目的の分子のADCC活性を評価するために、米国特許第5,500,362号または同第5,821,337号に記載されるような*in vitro* ADCCアッセイが実施されてもよい。そのようなアッセイに有用なエフェクター細胞は、末梢血単核細胞（PBMC）及びナチュラルキラー（NK）細胞を含む。代替的または追加的に、目的の分子のADCC活性は、例えば、Clynes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 95:652-656 (1998)に開示されるような動物モデルにおいて、*in vivo*で評価され得る。

【0452】

いくつかの実施形態では、抗体は、補体依存性細胞傷害（CDC）活性を有する。抗体誘導性CDCは、典型的な補体カスケードのタンパク質により媒介され、抗体への補体タンパク質C1qの結合により引き起こされる。C1qに結合する抗体Fc領域は、補体カスケードの活性化を誘導し得る。特定の実施形態では、抗体の免疫グロブリンFc領域サブタイプ（アイソタイプ）は、ヒトIgG1及びIgG3を含む。本明細書で使用される場合、CDCは、補体の存在下で、分子が標的を溶解させる能力を指す。補体活性化経路は、同種抗原と複合化された分子（例えば、ポリペプチド（例えば、抗体））への補体系

(C1q)の最初の成分の結合により開始される。補体活性化を評価するために、例えば、Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996)に記載されるような、CDCアッセイが実施され得る。

【0453】

いくつかの実施形態では、抗体は、アゴニスト抗体である。アゴニスト抗体は、抗体が細胞上に発現されたMARCOタンパク質に結合した後、MARCO発現細胞の1つまたは複数の活性または機能を誘導する（例えば、増加させる）ことができる。アゴニスト抗体は、MARCO発現細胞に結合して活性化し、細胞の増殖に変化を引き起こすか、または抗原提示能を修飾し得る。アゴニスト抗体は、MARCO発現細胞に結合して活性化し、細胞成長またはアポトーシスの修飾につながる細胞内シグナル伝達経路を誘発し得る。

10

【0454】

いくつかの実施形態では、抗体は、アンタゴニスト抗体である。アンタゴニスト抗体は、抗体が細胞上で発現されたMARCOタンパク質に結合した後、MARCO発現細胞の1つまたは複数の活性または機能を遮断する（例えば、減少させる）ことができる。例えば、アンタゴニスト抗体は、1つまたは複数のMARCOタンパク質に結合するリガンドに結合して遮断し、細胞の分化及び増殖を防止するか、または抗原提示能を修飾し得る。アンタゴニスト抗体は、リガンドによるMARCOタンパク質に結合して活性化を防止し、細胞成長及び生存に寄与する細胞内シグナル伝達経路を修飾し得る。

【0455】

いくつかの実施形態では、抗体は、枯渇抗体である。枯渇抗体は、分子の他の免疫細胞との抗体の相互作用を介した接触時に、MARCO発現細胞を殺傷するものである。例えば、抗体は、MARCOタンパク質を有する細胞に結合する時、補体タンパク質を捉え、補体依存性細胞溶解を誘導し得る。抗体は、MARCOタンパク質を有する細胞に結合する時、抗体依存性細胞傷害(ADCC)によりそれらを殺傷するために、Fc受容体を持つ近隣の細胞も誘発し得る。

20

【0456】

いくつかの実施形態では、抗体は中和抗体であり、抗体は、MARCO発現細胞の1つまたは複数の生物学的活性を中和する。いくつかの実施形態では、MARCOタンパク質はMARCO発現細胞の表面で発現され、抗体はMARCOタンパク質の細胞外ドメインを認識する。

30

【0457】

いくつかの実施形態では、抗体は、MARCO発現細胞に対して選択的である（優先的にMARCOに結合する）。特定の実施形態では、MARCO発現細胞に選択的に結合する抗体は、 $0.0001\text{ nM} \sim 1\text{ }\mu\text{M}$ の範囲の解離定数(Kd)を有する。ある特定の実施形態では、抗体は、異なる種由来のタンパク質間で保存されるMARCOタンパク質上のエピトープに特異的に結合する。別の実施形態において、選択的結合は、排他的結合を含むが、それを必要とするわけではない。

【0458】

一実施形態では、標的に結合した抗MARCO抗体は、それが結合しているMARCO発現細胞のin vivo枯渇の原因となる。いくつかの実施形態では、クラスター化された抗体によって誘導されるエフェクタータンパク質は、炎症性サイトカインの放出、抗原産生の調節、エンドサイトーシス、または細胞殺傷を含む、さまざまな応答を引き起こすことができる。一実施形態では、抗体は、in vivoで補体を動員及び活性化するか、または抗体依存性細胞傷害(ADCC)を媒介するか、またはin vivoでFc受容体に結合することによって食作用を媒介することができる。抗体はまた、結合時にMARCO発現細胞のアポトーシスまたはネクローシスを誘導することによって、MARCO発現細胞を枯渇させ得る。

40

【0459】

いくつかの実施形態では、MARCO発現細胞の無能化はin vitroであり、a) 非刺激性骨髄細胞を殺傷すること、b) 非刺激性骨髄細胞の磁気ビーズ枯渇；またはc

50

）非刺激性骨髓細胞の蛍光活性化細胞選別（FACS）選別により達成される。

【0460】

いくつかの実施形態では、抗体はエフェクター分子に結合またはコンジュゲートしている。特定の実施形態では、抗体は、放射性核種、細胞毒素、化学療法薬、薬物、プロドラッグ、毒素、酵素、免疫調節薬、抗血管新生薬、プロアポトーシス薬、サイトカイン、ホルモン、オリゴヌクレオチド、アンチセンス分子、s i R N A、第2の抗体、及び第2の抗体フラグメントからなる群から選択される、少なくとも1つの薬剤にコンジュゲートすることができる。

【0461】

特定の実施形態において、抗体は、薬物、例えば、毒素、化学療法剤、免疫モジュレーター、または放射性同位元素にコンジュゲートされる。ADC（抗体薬物コンジュゲート）の調製のいくつかの方法は、当該技術分野で既知であり、例えば、米国特許第8,624,003号（pot法）、同第8,163,888号（1段階）、及び5,208,020（2段階法）に記載される。抗体またはその抗原結合フラグメントは、抗原結合性である放射性核種、細胞毒素、化学療法薬、薬物、プロドラッグ、毒素、酵素、免疫調節薬、抗血管新生薬、プロアポトーシス薬、サイトカイン、ホルモン、オリゴヌクレオチド、アンチセンス分子、s i R N A、第2の抗体、及び第2の抗体フラグメントを含む少なくとも1つの薬剤にコンジュゲートすることができる。

【0462】

いくつかの実施形態では、抗体は、免疫応答を調節する。いくつかの実施形態では、抗体は、免疫応答を増強する。いくつかの実施形態では、抗体は、免疫応答を増強または開始する。

【0463】

がんの治療方法

別の態様では、本発明は、抗M A R C O抗体を含む有効量の組成物を個体に投与することを含む、個体の免疫関連状態（例えば、がん）を治療する方法を提供する。別の態様では、本発明は、抗M A R C O抗体を含む有効量の組成物を個体に投与することを含む、個体の免疫応答を増強する方法を提供する。

【0464】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法は、個体における免疫関連状態の治療に有用である。一実施形態では、個体はヒトである。

【0465】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法（免疫応答を増強する方法など）は、がんの治療に有用であり、したがって、抗M A R C O抗体を投与された個体はがん罹患している。いくつかの実施形態では、がんは、固形がんである。いくつかの実施形態では、がんは、液性がんである。いくつかの実施形態では、がんは、免疫回避性である。いくつかの実施形態では、がんは、免疫応答性である。いくつかの実施形態では、がんは、I L - 1 0を発現する。いくつかの実施形態では、がんは、低酸素癌である。特定の実施形態では、がんは、肺癌、肺腺癌、肺扁平上皮癌、肺小細胞癌、腎臓癌、肝臓癌、腎細胞癌、子宮頸癌、卵巣癌、結腸直腸癌、結腸癌、神経芽細胞腫、乳癌、三種陰性乳癌、基底細胞様乳癌、胃癌（g a s t r i c c a n c e r）、胃癌（s t o m a c h c a n c e r）、膀胱癌、前立腺癌、皮膚癌、リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（D L B C L）、小リンパ球性リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、中皮腫、膵臓癌、甲状腺癌、子宮内膜癌、頭頸部癌、または頭頸部扁平上皮癌（H N S C）からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、がんは、結腸癌、乳癌、基底細胞様乳癌、卵巣癌、または胃癌である。

【0466】

いくつかの実施形態では、治療により、がんの体積またはサイズが減少する。いくつかの実施形態では、治療は、抗体の投与前のがんの体積と比較して、がんの体積を減少させるのに有効である。いくつかの実施形態では、治療は、癌増殖速度の低下をもたらす。い

10

20

30

40

50

くつかの実施形態では、治療は、抗体の投与前のがん成長率と比較してがん成長率を低下させるのに有効である。いくつかの実施形態では、治療は、がんを排除するのに有効である。

【0467】

いくつかの実施形態では、MARCOは、非がん化細胞と比較して、がん細胞においてより高いレベルで発現される。いくつかの実施形態では、IL-10は、非がん化細胞と比較して、がん細胞においてより高いレベルで発現される。MARCO及び／またはIL-10のレベルは、FACS、ウエスタンブロット、ELISA、免疫沈降、免疫組織化学、モノプレックス免疫組織化学、マルチプレックス免疫組織化学、フローサイトメトリー、免疫蛍光、ラジオイムノアッセイ、ドットブロッティング、免疫検出法、表面プラズモン共鳴、光学分光法、質量分析、HPLC、qPCR、RT-qPCR、マルチプレックスqPCRまたはRT-qPCR、RNA-seq、マイクロアレイ解析、SAGE、MassARRAY法、Luminex、MSD、及びFISH、ならびにそれらの組み合わせなどのタンパク質アッセイまたは核アッセイを含むがこれらに限定されない、当分野で知られている任意の技術によって評価することができる。

10

【0468】

併用療法

がんの治療では、抗MARCO抗体を免疫チェックポイントタンパク質を阻害する1つまたは複数の抗体と組み合わせることができる。腫瘍細胞の表面に表示される免疫チェックポイントタンパク質が特に興味深い。臨床がん免疫療法、細胞傷害性Tリンパ球関連抗原4（CTLA4、CD152としても知られる）、及びプログラム細胞死タンパク質1（PD1、CD279としても知られる）との関連で最も活発に研究されている免疫チェックポイント受容体は双方ともに阻害受容体である。これらの受容体のいずれかを遮断する抗体の臨床活性は、抗腫瘍免疫を複数のレベルで増強させ得ること、ならびに機械論的考察及び前臨床モデルにより導かれる組み合わせの方策を理性的に設計することができることを意味する。

20

【0469】

PD-1の2つのリガンドは、PD-1リガンド1（PD-L1、B7-H1及びCD274としても知られる）ならびにPD-L2（B7-DC及びCD273としても知られる）である。PD-L1は、がん細胞上に発現され、T細胞上の受容体PD-1への結合を介して、それがT細胞の活性化／機能を阻害する。がん細胞上のその同種リガンドであるPD-L1及びPD-L2と、PD-1の相互作用を遮断する阻害薬は、T細胞の活性化及び機能の両方の増加をもたらし、がん細胞が免疫系を回避することを防止する。

30

【0470】

いくつかの実施形態では、免疫療法は、PD-1及びPD-L1またはPD-L2の結合を妨害する薬剤である。いくつかの実施形態では、免疫療法は、抗PD1抗体である。いくつかの実施形態では、免疫療法は、抗PD-L1抗体である。いくつかの実施形態では、免疫療法は、抗PD-L2抗体である。

【0471】

種々のPD-1、PD-L1、及びPD-L2抗体は、当該技術分野で既知である。いくつかの実施形態では、追加の治療薬は、アテゾリズマブ（PD-L1）、アベルマブ（PD-L1）、デュルバルマブ（PD-L1）、ニボルマブ（PD-1）、ペンブロリズマブ（PD-1）、セミプリマブ（PD-1）、イピリムマブ（CTLA-4）、トレメリムマブ（CTLA-4）、またはそれらの任意の組み合わせのうちの少なくとも1つである。

40

【0472】

追加の治療剤は、任意の適切な手段によって投与することができる。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体及び追加の治療薬は、同じ医薬組成物に含まれる。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体及び追加の治療薬は、異なる医薬組成物に含まれる。

50

【0473】

本明細書で提供される抗体及び追加の治療薬が異なる医薬組成物中に含まれる実施形態では、抗体の投与は、追加の治療薬の投与の前に、同時に、及び／または後に行うことができる。

【0474】

免疫調節の方法

MARCO+腫瘍関連マクロファージ (TAM) 及び MARCO+ mMDSC などの免疫抑制性 M2 様 MARCO 発現細胞は、IL-10 が豊富な低酸素腫瘍微小環境 (TME) で上方制御される。これらの細胞は、免疫細胞傷害活性を抑制する。免疫抑制は、血管新生と転移の増加にもつながる。

【0475】

抗 MARCO 抗体は、少なくとも MARCO+ 骨髄性 M2 様 TAM から M1 様 TAM への再分極、及び mMDSC から炎症誘発性単球への再分極を媒介することにより、腫瘍内免疫を活性化することができる。この再分極は、サイトカイン、ケモカイン、及び活性化受容体の産生につながり、T 細胞、B 細胞、及び NK 細胞の活性化につながる。骨髄 M2 様 TAM 及び mMDSC の再分極は、T 細胞、B 細胞、及び NK 細胞を活性化することができる。活性化されると、これらの NK 細胞、CD8+ T 細胞、M1 様 TAM、及び炎症性単球は、腫瘍の破壊を誘導することができる。さらに、抗腫瘍免疫は、M2 様 TAM 及び免疫抑制性 mMDSC を減少させることによって調節することができる。抗腫瘍免疫は、脾臓及びリンパ節における抗原提示の増加及び細胞の活性化によっても媒介され得る。抗 MARCO 抗体が髄索マクロファージ (MCM) に結合することは、リンパ節の接着性及び運動性の変化を誘発し、抗 MARCO 抗体が脾臓の辺縁帯マクロファージ (MZM) に結合することは、接着性及び運動性を変化させ、潜在的な B 細胞の活性化につながり得る。

【0476】

いくつかの実施形態では、MARCO+細胞の再分極は、分子会合、酵素活性、転写、翻訳、及び炎症誘発性シグナル伝達 (Src、SYK、NF-κB、PI3K/AKT、TLR、STAT6、IL2RA、CAMK、PKC、Raf1、TPL2、MAPK、細胞周期、生存、細胞接着及び遊走、細胞骨格再編成) に関与するリン酸シグナル伝達カスケードの高速調節；食作用、接着、運動性、走化性の変化；単剤として、及び TLR アゴニストと併用した NF-κB レポーター活性の活性化；IL-1α、IL-1β、IL-2、IL-4、IL-6、IL7R、IL-12、IL12-p70、IL-15、IL-18、IL-27、IP-10、IFN-γ、TNFα、MIP1-α、MIP1-β、MIP-2、CSF2、CSF3、G-CSF、M-CSF、CCL3、CCL4、CCL5、CCL20、CCL24、CXCL1、CXCL3、CXCL8、CXCL9、CXCL10、CXCL12、gro-α、MCP-1、MCP-3、LIF、エオタキシンを含むがこれらに限定されない炎症誘発性サイトカイン及びケモカインの分泌の誘導；及びインフラマソームの活性化と食作用の強化によって観察される。

【0477】

本明細書に記載の MARCO 抗体の投与方法は、免疫応答の調節をもたらすことができる。調節は、免疫応答の増加または減少であり得る。いくつかの実施形態では、調節は、免疫応答の増加である。

【0478】

一態様では、本明細書に記載の MARCO 抗体の投与は、サイトカイン、ケモカインなどの炎症誘発性分子の誘導、または骨髄細胞による骨髄活性化受容体の発現をもたらす得る。一般に、誘導された炎症誘発性分子は、アイソタイプ対照で達成されるレベルよりも高いレベルで存在する。いくつかの実施形態では、骨髄細胞は、MARCO 発現 (MARCO+) 細胞である。いくつかの実施形態では、MARCO+ 骨髄細胞は単球またはマクロファージである。いくつかの実施形態では、MARCO+ マクロファージは、腫瘍関連マクロファージ (TAM) または単球由来マクロファージ (MDM) である。このような

10

20

30

40

50

炎症誘発性分子は、T細胞活性化、T細胞増殖、T細胞分化、M1様マクロファージ活性化、B細胞調節、及びNK細胞活性化を含むがこれらに限定されない抗腫瘍免疫の活性化をもたらす。したがって、抗MARCO抗体の投与は、腫瘍の破壊につながる複数の抗腫瘍免疫メカニズムを誘導することができる。

【0479】

別の態様では、抗MARCO抗体またはその抗原結合フラグメントを含む有効量の組成物を個体に投与することを含む、個体における免疫応答を増強させる方法が本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、対象における免疫応答を増強させる方法は、ヒトMARCO（配列番号363）のSRCRDメインに結合する抗体を対象に投与することを含む。いくつかの実施形態では、対象における免疫応答を増強させる方法は、ヒトMARCO（配列番号363）への結合について参照抗体と競合する抗体を対象に投与することを含む。いくつかの実施形態では、対象における免疫応答を増強させる方法は、ヒトMARCO（配列番号363）への結合について競合する抗体を対象に投与することを含み、抗体は、少なくともヒトMARCO（配列番号363）の残基Q452、Y472、及びK473のうちの1つに結合する。いくつかの実施形態では、対象における免疫応答を増強させる方法は、ヒトMARCO（配列番号363）への結合について競合する抗体を対象に投与することを含み、抗体は、少なくともヒトMARCO（配列番号363）の残基E450、Q452、Q487及びT499のうちの1つに結合する。いくつかの実施形態では、対象における免疫応答を増強させる方法は、ヒトMARCO（配列番号363）への結合について競合する抗体を対象に投与することを含み、抗体は、少なくともヒトMARCO（配列番号363）の残基H505、D507、S509またはE511のうちの1つに結合する。

【0480】

いくつかの実施形態では、抗体は、薬学的に許容される賦形剤をさらに含む医薬組成物中に存在する。

【0481】

本明細書に記載の免疫応答を増強する任意の態様及びすべての態様では、特徴（複数可）または機能（複数可）の態様の任意の増強もしくは減少または変化は、抗MARCO抗体と接触していない細胞と比較される。

【0482】

免疫応答を増強することは、免疫応答の強化または免疫応答の誘導の両方であり得る。例えば、免疫応答を増強することは、免疫応答の始動もしくは開始、または進行中の免疫応答もしくは既存の免疫応答の増加もしくは増幅の両方を包含する。いくつかの実施形態では、治療は、免疫応答を誘導する。いくつかの実施形態では、誘導免疫応答は、適応免疫応答である。いくつかの実施形態では、誘導免疫応答は、自然免疫応答である。いくつかの実施形態では、治療は、免疫応答を強化する。いくつかの実施形態では、増強免疫応答は、適応免疫応答である。いくつかの実施形態では、増強免疫応答は、自然免疫応答である。いくつかの実施形態では、治療は、免疫応答を増強する。いくつかの実施形態では、増強された免疫応答は、適応免疫応答である。いくつかの実施形態では、増強された免疫応答は、自然免疫応答である。いくつかの実施形態では、免疫応答は、抗MARCO抗体の投与によって開始または開始される。いくつかの実施形態では、免疫応答は、抗MARCO抗体の投与によって強化される。

【0483】

別の態様では、本出願は、細胞を抗MARCO抗体と接触させ、細胞の免疫機能を調節する方法を提供する。調節は、免疫応答を増強すること、またはMARCO発現細胞をリプログラミングすることであり得る。いくつかの実施形態では、調節は、免疫機能の増加である。いくつかの実施形態では、機能の調節は、MARCO発現骨髄細胞の活性化をもたらす。いくつかの実施形態では、機能の調節は、MARCO発現骨髄細胞のリプログラミングをもたらす。

【0484】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、細胞は、骨髄細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、M A R C O 発現細胞 (M A R C O + 細胞) である。いくつかの実施形態では、M A R C O + 細胞は、単球、マクロファージ、腫瘍関連マクロファージ (T A M)、及び単球由来マクロファージ (M D M) のうちの1つまたは複数である。いくつかの態様では、M A R C O + 細胞は、単球である。いくつかの態様では、M A R C O + 細胞は、マクロファージである。いくつかの実施形態では、M A R C O + 細胞は、腫瘍関連マクロファージ (T A M) である。いくつかの実施形態では、M A R C O + 細胞は、単球由来マクロファージ (M D M) である。いくつかの実施形態では、M A R C O 発現細胞を M A R C O 抗体と接触させることは、細胞の活性化を誘導する。

【0485】

いくつかの実施形態では、M A R C O + 細胞の機能の調節は、例えば、M H C I 分子のナীব C D 8 + T 細胞への腫瘍抗原を交差提示する M A R C O 発現細胞の能力を増加させること、または M A R C O 発現細胞によるサイトカインまたはケモカイン分泌の増加させることによって、天然及び活性化 C D 8 + T 細胞の両方を刺激する細胞の能力の増加をもたらす。いくつかの実施形態では、M A R C O + 細胞の機能の調節は、例えば、M H C I I 分子のナীব C D 4 + T 細胞への腫瘍抗原を交差提示する M A R C O 発現細胞の能力を増加させることによって、天然及び活性化 C D 4 + T 細胞の両方を刺激する細胞の能力の増加をもたらす。いくつかの実施形態では、機能の調節は、サイトカイン、ケモカイン、または共刺激受容体もしくは活性化受容体を産生する細胞の能力を増強または増加させる。いくつかの実施形態では、調節は、例えば、T 細胞受容体 (T C R) シグナル伝達、T 細胞増殖、または T 細胞サイトカイン産生を誘発する細胞の能力を含む、M A R C O + 細胞の T 細胞刺激機能を増加させる。

【0486】

いくつかの実施形態では、増強された免疫応答は、サイトカイン及びケモカインの分泌である。いくつかの実施形態では、M A R C O 抗体はアゴニスト活性を有する。いくつかの実施形態では、M A R C O 抗体は、アイソタイプ対照抗体と比較しての、細胞内の少なくとも1つのサイトカインまたはケモカインの増強された発現を誘導する。いくつかの実施形態では、M A R C O 抗体は、アイソタイプ対照抗体と比較しての、細胞内の少なくとも1つの炎症誘発性サイトカインまたはケモカインの増強された発現を誘導する。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのサイトカインまたはケモカインは、I L - 1 α 、I L - 1 β 、I L - 2、I L - 4、I L - 6、I L 7 R、I L - 1 2、I L 1 2 - p 7 0、I L - 1 5、I L - 1 8、I L - 2 7、I P - 1 0、I F N - γ 、T N F α 、M I P 1 - α 、M I P 1 - β 、M I P - 2、C S F 2、C S F 3、G - C S F、M - C S F、C C L 3、C C L 4、C C L 5、C C L 2 0、C C L 2 4、C X C L 1、C X C L 3、C X C L 8、C X C L 9、C X C L 1 0、C X C L 1 2、g r o - α 、M C P - 1、M C P - 3、L I F、またはエオタキシンからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、サイトカインまたはケモカインは I L - 2 である。いくつかの実施形態では、サイトカインまたはケモカインは I L - 1 2 である。いくつかの実施形態では、サイトカインまたはケモカインの分泌は、未処理細胞またはアイソタイプ対照抗体で処理した細胞と比較して約 1 ~ 1 0 0 倍、1、5、1 0、2 0、3 0、4 0、5 0、6 0、7 0、8 0、9 0、1 0 0、1 ~ 1 0、1 0 ~ 2 0、2 0 ~ 3 0、3 0 ~ 4 0、4 0 ~ 5 0、5 0 ~ 6 0、6 0 ~ 7 0、7 0 ~ 8 0、8 0 ~ 9 0、または 9 0 ~ 1 0 0 倍で増加する。いくつかの実施形態では、ケモカインは I L - 2 であり、分泌は、未処理細胞またはアイソタイプ対照抗体で処理した細胞と比較して、約 1 ~ 1 0 0 倍、1 倍、5 倍、1 0 倍、2 0 倍、3 0 倍、4 0 倍、5 0 倍、6 0 倍、7 0 倍、8 0 倍、9 0 倍、1 0 0 倍、1 ~ 1 0 倍、1 0 ~ 2 0 倍、2 0 ~ 3 0 倍、3 0 ~ 4 0 倍、4 0 ~ 5 0 倍、5 0 ~ 6 0 倍、6 0 ~ 7 0 倍、7 0 ~ 8 0 倍、8 0 ~ 9 0 倍、または 9 0 ~ 1 0 0 倍増加する。いくつかの実施形態では、サイトカインは I L - 1 2 であり、分泌は、未処理細胞またはアイソタイプ対照抗体で処理した細胞と比較して、約 1 ~ 1 0 0 倍、1 倍、5 倍、1 0 倍、2 0 倍、3 0 倍、4 0 倍、5 0 倍、6 0 倍、7 0 倍、8 0 倍、9 0 倍、1 0 0 倍、1 ~ 1 0 倍、1 0 ~ 2 0 倍、2 0 ~ 3 0 倍

、30～40倍、40～50倍、50～60倍、60～70倍、70～80倍、80～90倍、または90～100倍増加する。

【0487】

いくつかの実施形態では、MARCO抗体は、アイソタイプ対照抗体と比較して、細胞内の少なくとも1つの遺伝子の発現の減少を誘導する。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの遺伝子は、ALK、MPB、TMEM37、NHS L2、またはSLC46A2である。いくつかの実施形態では、遺伝子は、未処理細胞またはアイソタイプ対照抗体で処理した細胞と比較して約1～100倍、1、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、1～10、10～20、20～30、30～40、40～50、50～60、60～70、70～80、80～90、または90～100倍減少する。

10

【0488】

いくつかの実施形態では、MARCO抗体は、アイソタイプ対照抗体と比較して、インフラマソームの活性化を誘導する。インフラマソームの活性化は、IL-1 β 及び／またはIL-18の分泌を測定することによって決定することができる。

【0489】

いくつかの実施形態では、MARCO抗体は、アイソタイプ対照抗体と比較して、骨髄性M2様TAMのM1様TAMへの再分極、及び／またはmMDSCの炎症誘発性単球への再分極を誘導する。

【0490】

20

いくつかの実施形態では、MARCO抗体は、アイソタイプ対照抗体と比較して、CD8+ T細胞、CD4+ T細胞、NK細胞、樹状細胞、MHCII^{high}単球、MHCII^{mid}単球、辺縁帯マクロファージ、濾胞B細胞、及び／または赤色髄マクロファージを増加させる。

【0491】

いくつかの実施形態では、細胞接触時に、抗体は、アイソタイプ対照抗体と比較して、TAM、好中球、辺縁帯B細胞、CD19+ B細胞、及び／またはMHCII⁺単球を減少させる。

【0492】

いくつかの実施形態では、MARCO抗体は、腫瘍における細胞骨格、アクチン及び筋肉、ならびに細胞接着関連経路を変化させることによって、運動性及び／または食作用の変化を調節する。いくつかの実施形態では、MARCO抗体は、M2からM1へのマクロファージのリプログラミング、食作用及び／またはインフラマソームの増加、NK細胞の活性化、及び／またはT細胞の活性化を含むTME内の炎症誘発性活性化をもたらす。

30

【0493】

いくつかの実施形態では、MARCO抗体は、リンパ節における細胞シグナル伝達、細胞接着、細胞骨格、及び運動性の変化を調節する。いくつかの実施形態では、MARCO抗体は、リンパ節の髄索マクロファージに結合し、細胞接着及び運動性を調節する。

【0494】

いくつかの実施形態では、MARCO抗体は、脾臓における細胞接着、細胞骨格、移動、運動性、細胞シグナル伝達、及びB細胞活性化を調節する。いくつかの実施形態では、MARCO抗体は、脾臓の辺縁帯マクロファージに結合し、細胞接着、運動性、及びB細胞活性化を調節する。

40

【0495】

いくつかの実施形態では、調節は、アイソタイプ対照抗体と比較して、細胞接着、細胞骨格、及び細胞遊走を増加させる。いくつかの実施形態では、調節は、アイソタイプ対照抗体と比較して、脾臓におけるB細胞の成熟を誘導する。いくつかの実施形態では、調節は、アイソタイプ対照抗体と比較して、細胞周期、T細胞受容体、食作用、オートファジー、及びwnt経路を含む細胞シグナル伝達経路を誘導する。

【0496】

50

いくつかの実施形態では、増強された免疫応答は、抗腫瘍免疫細胞の動員及び活性化である。

【0497】

いくつかの実施形態では、抗体は、アイソタイプ対照抗体と比較して、記憶免疫応答を誘導する。一般に、記憶免疫応答は、免疫系が以前に遭遇した病原体または抗原へのその後の曝露に対する防御免疫応答である。例示的な記憶免疫応答には、感染または抗原によるワクチン接種後の免疫応答が含まれる。一般に、記憶免疫応答は、T細胞やB細胞などのリンパ球によって媒介される。いくつかの実施形態では、記憶免疫応答は、がん細胞の増殖、増殖、または転移を含む、がんに対する防御免疫応答である。いくつかの実施形態では、記憶免疫応答は、がん細胞の成長、増殖、または転移を阻害、防止、または低減する。

10

【0498】

いくつかの実施形態では、MARCO抗体は、アイソタイプ抗体と比較して、以下の経路または以下に関連する遺伝子のうちの少なくとも1つを誘導または増加させる：脾臓におけるB細胞成熟、アクチン媒介性細胞収縮経路、キナーゼ活性化及び活性経路、Toll様受容体シグナル伝達経路、TLR 4及び9経路、GTPase結合及び活性、及び／またはRAS-Rhoシグナル伝達経路。いくつかの実施形態では、MARCO抗体は、アイソタイプ抗体と比較して、以下の経路または以下に関連する遺伝子のうちの少なくとも1つを誘導または増加させる：体液性免疫応答、NK媒介性免疫、NK活性化、IL-2及びIL-12産生、細胞殺傷、エフェクターの調節プロセス、T細胞増殖、活性化、分化、走化性及び遊走、細胞間接着、食作用、及び／または骨髄分化。

20

【0499】

いくつかの実施形態では、MARCO抗体は、アイソタイプ抗体と比較して、以下の経路または以下に関連する遺伝子の少なくとも1つを誘導または増加させる：ナチュラルキラー細胞媒介性細胞傷害、T細胞受容体シグナル伝達経路、JAK/STATシグナル伝達経路、サイトカイン-サイトカイン受容体相互作用、IgA産生のための腸免疫ネットワーク、白血球経内皮移動、ケモカインシグナル伝達経路、造血細胞系統、II型糖尿病、及びFc-εRIシグナル伝達経路。いくつかの実施形態では、MARCO抗体は、アイソタイプ抗体と比較して、以下の経路または以下に関連する遺伝子の少なくとも1つを減少または抑制させる：相同組換え、アルツハイマー病、RNAポリメラーゼ、アルギニン及びプロリン代謝、クエン酸回路（TCA回路）、ポルフィリン及びクロロフィル代謝、バリン、ロイシン、及びイソロイシンの分解、不飽和脂肪酸の生合成、N-グリカンの生合成、及びアミノアシルtRNAの生合成。

30

【0500】

いくつかの実施形態では、MARCO抗体は、アイソタイプ抗体と比較して、以下の経路または以下に関連する遺伝子の少なくとも1つを誘導または増加させる：サイトカイン-サイトカイン受容体相互作用、ナチュラルキラー細胞媒介性細胞傷害、原発性免疫不全症、ケモカインシグナル伝達経路、造血細胞系統、JAK/STATシグナル伝達経路、T細胞受容体シグナル伝達経路、IgA産生のための腸免疫ネットワーク、神経活性リガンド受容体相互作用、及びFc-εRIシグナル伝達経路。いくつかの実施形態では、MARCO抗体は、アイソタイプ抗体と比較して、以下に関連する経路または遺伝子の少なくとも1つを減少または抑制する：解糖糖新生、プロパン酸代謝、プロテアソーム、クエン酸サイクル、TCAサイクル、心筋収縮、アルツハイマー病、ハンチントン病、酸化的リン酸化、リボソームに、及びパーキンソン病。

40

【0501】

いくつかの実施形態では、MARCO抗体は、アイソタイプ抗体と比較して、以下の経路または以下に関連する遺伝子の少なくとも1つを誘導または増加させる：ホスファチジルイノシトールシグナル伝達系、接着斑、イノシトールリン酸代謝、軸索誘導、接着結合、がんにおける経路、アクチン細胞骨格の調節、プロゲステロン仲介された卵母細胞成熟、ERBBシグナル伝達経路、及びWntシグナル伝達経路。いくつかの実施形態では、

50

MARCO抗体は、アイソタイプ抗体と比較して、以下の経路または以下に関連する遺伝子の少なくとも1つを誘導または増加させる：アミノアシルtRNA生合成、リソソーム、ヒスチジン代謝、薬物代謝シトクロムp450、プロテアソーム、アルツハイマー病、ハンチントン病、パーキンソン病、酸化的リン酸化、及びリボソーム。

【0502】

いくつかの実施形態では、MARCO抗体は、アイソタイプ抗体と比較して、以下の経路または以下に関連する遺伝子の少なくとも1つを誘導または増加させる：接着斑、ホスファチジルイノシトールシグナル伝達系、ニューロトロフィンシグナル伝達経路、インシュリンシグナル伝達経路、イノシトールリン酸代謝、MAPKシグナル伝達経路、がんの経路、アクチン細胞骨格の調節、ERBBシグナル伝達経路、及び接着結合。いくつかの実施形態では、MARCO抗体は、アイソタイプ抗体と比較して、以下に関連する経路または遺伝子の少なくとも1つを減少または抑制する：シトクロムp450による生体異物の代謝、造血細胞系統、リソソーム、アルツハイマー病、プロテアソーム、サイトカイン-サイトカイン受容体相互作用、ハンチントン病、アイソタイプ抗体と比較した、パーキンソン病、酸化的リン酸化、及びリボソーム。

10

【0503】

いくつかの実施形態では、MARCO抗体は、以下の経路の少なくとも1つまたは以下に関連する遺伝子を誘導または増加させる：ECM受容体相互作用、接着斑、密着結合、接着結合、プロテアソーム、補体及び凝固カスケード、細胞接着分子及びCAM、がんにおける経路、不整脈性右心室心筋症ARVC、Wntシグナル伝達経路、アクチン骨格の調節、軸索誘導、ハンチントン病、病原性大腸菌感染症、アルツハイマー病、白血球経内皮遊走、サイトカイン-サイトカイン受容体相互作用、基底細胞癌、メラニン形成、ヘッジホッグシグナル伝達経路。いくつかの実施形態では、MARCO抗体は、アイソタイプ抗体と比較して、以下に関連する経路または遺伝子の少なくとも1つを減少または抑制する：細胞周期、アミノアシルtRNA生合成、ミスマッチ修復、グリコシルホスファチジルイノシトールGPIアンカー生合成、グリセロリン脂質代謝、及び相同組換え。

20

【0504】

いくつかの実施形態では、MARCO抗体は、アイソタイプ抗体と比較して、以下の経路または以下に関連する遺伝子の少なくとも1つを誘導または増加させる：細胞周期、プロテアソーム、T細胞受容体シグナル伝達経路、DNA複製、ユビキチン媒介タンパク質分解、アクチン細胞骨格の調節、接着結合、病原性大腸菌感染、基底転写因子、ペントースリン酸経路、FcガンマR媒介食作用、ニューロトロフィンシグナル伝達経路、オートファジー調節、解糖糖新生、卵母細胞減数分裂、慢性骨髄性白血病、クエン酸回路TCAサイクル、Wntシグナル伝達経路、P53シグナル伝達経路、及びナチュラルキラー細胞媒介性細胞毒性。いくつかの実施形態では、MARCO抗体は、アイソタイプ抗体と比較して、以下に関連する経路または遺伝子の少なくとも1つを減少または抑制する：ABCトランスポーター、グリコシルホスファチジルイノシトールGPIアンカー生合成、RNAポリメラーゼ、リボソーム、アラキドン酸代謝、グリセロリン脂質代謝。

30

【0505】

いくつかの実施形態では、MARCO抗体は、アイソタイプ対照抗体と比較して、IL-2-STAT5シグナル伝達、NF-κBシグナル伝達、TLRシグナル伝達、接着及び運動性シグナル伝達、細胞骨格再構成シグナル伝達、NF-κBを介したTNFαシグナル伝達、IL-6-JAK-STAT3シグナル伝達、SYKシグナル伝達、MAPKシグナル伝達、TPL2シグナル伝達、カルシウムシグナル伝達、IFNγ応答、またはIFNα応答、補体、炎症反応経路、または同種移植片拒絶経路を誘導する。

40

【0506】

いくつかの実施形態では、MARCO抗体は、アイソタイプ対照抗体と比較して、酸化的リン酸化、mTORシグナル伝達、小胞体ストレス応答、コレステロール恒常性、脂肪酸代謝、myc標的、解糖経路、細胞周期経路、細胞生存、細胞接着、E2F標的経路、低酸素、PI3K-AKTシグナル伝達経路、Srcシグナル伝達経路、PKCシグナル

50

伝達経路、上皮間葉移行シグナル伝達経路、酸化的リン酸化、またはMAPKシグナル伝達経路を減少させる。

【0507】

いくつかの実施形態では、MARCO抗体は、アイソタイプ対照抗体と比較しての、腫瘍中の細胞における少なくとも1つの炎症促進性または活性化遺伝子の発現増加を誘導する。いくつかの実施形態では、MARCO抗体は、以下の遺伝子の少なくとも1つの発現を誘導または増加させる：Klrk1、Nrcl、Prf1、Cd40、Cd8α、Nod2、Tlr4、Tnf、Nlrp3、Cd274、Clec9α、Cd200r3、Il-27、Cxccl9、Cxccl10、またはCxccl12。

【0508】

いくつかの実施形態では、MARCO抗体は、脾臓及び／または腫瘍において、CD8+ T細胞、CD4+ T細胞、NK細胞、樹状細胞、MHCII+マクロファージ、MHCIIhigh単球、及び／またはMHCIIimid単球を増加させる。

【0509】

いくつかの実施形態では、MARCO抗体は、脾臓及び／または腫瘍において、マクロファージ、辺縁帯マクロファージ、濾胞B細胞、及び／または赤色髄マクロファージを増加させる。

【0510】

いくつかの実施形態では、MARCO抗体は、脾臓及び／または腫瘍において、TAM、腫瘍関連好中球、形質B細胞、辺縁帯B細胞、CD19+ B細胞、MHCII-単球、及び／またはMHCII-マクロファージを減少させる。

【0511】

いくつかの実施形態では、ケモカイン、サイトカイン、遺伝子、または経路の発現レベルは、核酸またはタンパク質アッセイによって検出される。例示的な核酸またはタンパク質アッセイは、FACS、ウエスタンブロット、ELISA、免疫沈降、免疫組織化学、免疫蛍光、モノプレックス免疫組織化学、マルチプレックス免疫組織化学、免疫蛍光、ラジオイムノアッセイ、ドットブロット法、免疫検出方法、HPLC、表面プラズモン共鳴、光学分光、質量分光、qPCR、RT-qPCR、多重qPCRまたはRT-qPCR、RNA-seq、マイクロアレイ分析、SAGE、MassARRAY技法、Luminex、MSD、及びFISH、ならびにそれらの組み合わせを含むが、これらに限定されない。

【0512】

いくつかの実施形態では、MARCO抗体は、MARCO+細胞に結合すると、細胞接着、細胞骨格、走化性、及び細胞遊走の変化を誘発する。

【0513】

いくつかの実施形態では、抗体は、MARCOをMARCO+細胞の細胞表面上のMARCOに架橋する。いくつかの実施形態では、接触は、in vitroである。いくつかの実施形態では、接触は、in vivoである。いくつかの特定の実施形態では、接触は、ヒトにおいてin vivoである。いくつかの実施形態では、接触は、抗MARCO抗体を投与することによって行われる。いくつかの実施形態では、抗体を受ける個体（ヒトなど）はがんに罹患している。

【0514】

MARCO発現細胞を無能化、殺傷、または枯渇させる方法

一態様では、本出願は、MARCO発現細胞の無能化をもたらす、ヒト抗体またはヒト化抗体などの抗MARCO抗体と細胞を接触させる方法を提供する。MARCO発現細胞を無能化することには、MARCO発現細胞を殺傷及び／または枯渇させることも含まれる。

【0515】

別の態様では、本出願は、MARCO発現細胞を抗MARCO抗体と接触させる方法を提供し、これによりMARCO発現細胞の無能化がもたらされる。

10

20

30

40

50

【0516】

いくつかの実施形態では、MARCO発現（MARCO+）するものは、骨髓細胞である。いくつかの実施形態では、MARCO発現するものは、単球またはマクロファージの1つまたは複数である。いくつかの実施形態では、MARCO発現細胞は、TAM細胞及び単球由来マクロファージ（MDM）のうちの1つまたは複数である。いくつかの実施形態では、MARCO発現細胞は、単球性骨髓由来サプレッサー細胞（mMDS C）である。

【0517】

いくつかの実施形態では、本願は、MARCO発現細胞をMARCO抗体と接触させ、それによってMARCO発現細胞を殺傷させることを含む、MARCO発現細胞を無能化させる方法を提供する。無能化は、細胞を、部分的または完全に機能しないようにすることを指す。いくつかの実施形態では、細胞の無能化は、細胞において成長停止を誘導することをもたらす。いくつかの実施形態では、細胞の無能化は、細胞におけるアポトーシスをもたらす。いくつかの実施形態では、細胞の無能化は、例えば、補体依存性細胞傷害（CDC）または抗体依存性細胞傷害（ADCC）により、細胞の溶解をもたらす。いくつかの実施形態では、MARCO発現細胞の無能化は、細胞の壊死をもたらす。いくつかの実施形態では、MARCO発現細胞の無能化は、細胞において成長停止を誘導することをもたらす。いくつかの実施形態では、MARCO発現細胞の無能化は、細胞の不活化をもたらす。いくつかの実施形態では、MARCO発現細胞の無能化は、細胞内のMARCOタンパク質の活性の中和をもたらす。いくつかの実施形態では、MARCO発現細胞の無能化は、細胞の増殖の低減をもたらす。いくつかの実施形態では、MARCO発現細胞の無能化は、細胞の分化をもたらす。いくつかの実施形態では、MARCO発現の無能化は、阻害性抗原提示細胞として作用する細胞の能力の減少をもたらすか、または活性化抗原提示細胞として作用する細胞の能力の増加をもたらす。いくつかの実施形態では、MARCO発現細胞の無能化は、腫瘍組織または腫瘍微小環境（TME）内の細胞の局在異常をもたらす。いくつかの実施形態では、MARCO発現細胞の無能化は、腫瘍組織または腫瘍微小環境内の細胞の空間構成の改変をもたらす。いくつかの実施形態では、MARCO発現細胞の無能化は、腫瘍組織またはTME内の細胞の時間的発現の改変をもたらす。いくつかの実施形態では、方法は、さらに、MARCO発現細胞を除去することを含む。

【0518】

本明細書に記載のMARCO発現細胞を無能化する任意の及びすべての態様では、特性（複数可）または機能（複数可）の態様の任意の増加または減少または変化は、抗MARCO抗体と接触していない細胞と比較されるとおりである。

【0519】

別の態様では、本出願は、MARCO発現細胞を抗MARCO抗体と接触させる方法を提供し、これによりMARCO発現細胞の機能の調節をもたらす。調節は、以下のうちのいずれか1つまたは複数であり得る。いくつかの実施形態では、MARCO発現細胞は、単球、マクロファージ、TAM及びMDMのうちの1つまたは複数である。いくつかの実施形態では、細胞の機能の調節は、例えば、MHC I分子のナイーブCD8+ T細胞への腫瘍抗原を交差提示するMARCO発現細胞の能力を増加させることによって、天然及び活性化CD4+ T細胞の両方を刺激する細胞の能力の増加をもたらす。いくつかの実施形態では、MARCO発現細胞の機能の調節は、例えば、MHC II分子のナイーブCD4+ T細胞への腫瘍抗原を交差提示するMARCO発現細胞の能力を増加させることによって、天然及び活性化CD4+ T細胞の両方を刺激する細胞の能力の増加をもたらす。いくつかの実施形態では、調節は、例えば、T細胞受容体（TCR）シグナル伝達、T細胞増殖、またはT細胞サイトカイン産生を誘発する細胞の能力を含む、骨髓細胞のT細胞刺激機能を増加させる。いくつかの実施形態では、機能の調節は、サイトカイン、ケモカイン、または共刺激受容体もしくは活性化受容体を産生する細胞の能力を増強または増加させる。

【0520】

本明細書に記載のM A R C O 発現細胞の機能を減少させる任意の及びすべての態様では、特性（複数可）または機能（複数可）の態様の任意の増加または減少または変化は、抗M A R C O 抗体と接触していない細胞と比較されるとおりである。

【0521】

いくつかの実施形態では、本出願は、M A R C O 発現細胞をM A R C O 抗体と接触させ、それにより、M A R C O 抗体を殺傷することを含む、M A R C O 抗体を殺傷する（細胞死の誘導とも呼ばれる）方法を提供する。いくつかの実施形態では、殺傷は、抗M A R C O 抗体と接触されていないM A R C O 発現細胞と比較して増加する。いくつかの実施形態では、接触は、M A R C O 発現細胞においてアポトーシスを誘導する。いくつかの実施形態では、M A R C O 発現細胞は、M A R C O 発現細胞及び非M A R C O 発現細胞を含む免疫細胞の集団にある。いくつかの実施形態では、方法は、M A R C O 発現細胞を除去することをさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞の10%～100%が殺傷される。いくつかの実施形態では、細胞の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%または100%が殺傷される。

【0522】

いくつかの実施形態では、M A R C O 発現細胞の数が減少する。いくつかの実施形態では、M A R C O 発現細胞は、例えばネクローシスまたはアポトーシスによって殺傷される。いくつかの実施形態では、M A R C O 発現細胞は、増殖停止を受けるように誘導される。いくつかの実施形態では、M A R C O 発現細胞はもはや増殖しない。いくつかの実施形態では、M A R C O 発現細胞の空間的局在化が変更され、T M E の特定の領域で比が増加する。いくつかの実施形態では、M A R C O 発現細胞の時間的発現が変化し、比率が腫瘍の発生中の特定の時間中に増加する。

【0523】

追加の方法

M A R C O の発現の決定

本明細書では、以下を含む、個体におけるがんを治療する方法または免疫応答を調節する方法も提供される。これには、対象におけるM A R C O の発現を決定すること、またはすでに決定していること、及び対象に、M A R C O に結合する単離抗体または抗原結合フラグメントを投与する、またはすでに投与していることを含む。

【0524】

いくつかの実施形態では、方法は、個体由来の生体試料中のM A R C O の発現レベルを決定することまたはすでに決定していることを含む。いくつかの実施形態では、生体試料には、体液、組織試料、器官試料、尿、糞便、血液、唾液、C S F、及びそれらの任意の組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、生体試料は腫瘍組織に由来する。いくつかの実施形態では、発現レベルは、T R E M 1 タンパク質をコードするmRNAのmRNA発現レベルを含む。いくつかの実施形態では、M A R C O の発現レベルは、M A R C O のタンパク質発現レベルを含む。いくつかの実施形態では、M A R C O の発現レベルは、F A C S、ウエスタンブロット、E L I S A、免疫沈降、免疫組織化学、モノプレックス免疫組織化学、マルチプレックス免疫組織化学、免疫蛍光、ラジオイムノアッセイ、ドットブロッキング、免疫検出法、H P L C、表面プラズモン共鳴、光学分光法、質量分析、q P C R、R T-q P C R、多重q P C RまたはR T-q P C R、R N A-s e q、マイクロアレイ解析、S A G E、M a s s A R R A Y手法、L u m i n e x、M S D、及びF I S H、ならびにそれらの組み合わせからなる群より選択される方法を使用して、試料において検出される。

【0525】

いくつかの態様では、対象由来の試料中のM A R C O タンパク質の発現レベルを決定する方法が本明細書に提供され、方法は、試料を抗M A R C O 抗体と接触させること、及び免疫組織化学アッセイを実施することを含む。いくつかの実施形態では、抗体は、R D M 5、R D M 9、P I-3010.15、P I-3010.25、またはP I-3030.41を含む。

【0526】

検出及び／または定量化のための本明細書に記載される実施形態では、抗MARCO抗体はMARCOタンパク質に結合するが、必ずしもADCCなどの生物学的応答に影響を与える必要はないが、それは、生物学的応答に影響を与える可能性がある。いくつかの実施形態では、抗体は、可溶性MARCOに結合する。

【0527】

別の態様では、本発明は、個体由来の生体試料におけるMARCOの発現レベルを検出すること、及びMARCOの発現レベルに基づいて、個体が免疫療法に应答し得るかどうかを判定することを含む、免疫関連状態（例えば、がん）の処置のための免疫療法（例えば、抗MARCO抗体を用いる）に应答し得る個体を同定するための方法を提供し、健康な個体のものと比較して上昇した個体のMARCOのレベルは、個体が免疫療法に应答し得ることを示す。いくつかの実施形態では、個体におけるMARCO発現はすでに決定されている。いくつかの実施形態では、これらの方法はまた、個体における免疫関連状態（例えば、がん）を診断するために使用されてもよく、MARCOの発現レベルに基づき、健康な個体のものと比較して上昇した個体のMARCOのレベルは、個体のがんに罹患していることを示す。いくつかの実施形態では、MARCOの発現レベルは、MARCOのmRNA発現レベルを含む。他の実施形態では、MARCOの発現レベルは、MARCOのタンパク質発現レベルを含む。いくつかの実施形態では、MARCOの発現レベルは、核酸またはタンパク質アッセイを使用して試料中で検出される。例示的な核酸またはタンパク質アッセイは、FACS、ウエスタンブロット、ELISA、免疫沈降、免疫組織化学、モノプレックス免疫組織化学、マルチプレックス免疫組織化学、免疫蛍光、ラジオイムノアッセイ、ドットブロット法、免疫検出方法、HPLC、表面プラズモン共鳴、光学分光、質量分光、qPCR、RT-qPCR、多重qPCRまたはRT-qPCR、RNA-seq、マイクロアレイ分析、SAGE、MassARRAY技法、Luminex、MSD、及びFISH、ならびにそれらの組み合わせを含むが、これらに限定されない。これらの実施形態では、抗MARCO抗体はMARCOタンパク質に結合するが、必ずしもADCCなどの生物学的応答に影響を与える必要はない。いくつかの実施形態では、生体試料は腫瘍組織に由来する。いくつかの実施形態では、生体試料は、体液、組織試料、器官試料、尿、糞便、血液、唾液、CSF、及びそれらの任意の組み合わせを含むが、これらに限定されない。

【0528】

いくつかの実施形態では、アッセイは免疫組織化学アッセイであり、抗体は、RDM5、RDM9、PI-3010.15、PI-3010.25、またはPI-3030.41を含む。

【0529】

投与方法

いくつかの実施形態では、抗MARCO抗体は、静脈内、筋肉内、皮下、局所、経口、経皮、腹腔内、眼窩内、移植により、吸入により、髄腔内、脳室内、または鼻腔内投与される。有効量の抗MARCO抗体が、がんの治療のために投与され得る。抗MARCO抗体の適切な投与量は、治療されるがんの種類、抗MARCO抗体の種類、がんの重症度及び経過、個体の臨床的条件、個体の臨床歴及び治療への応答、ならびに担当医の裁量に基づいて判定され得る。

【0530】

調製方法

本明細書に記載の抗体は、例えば、米国特許第4,816,567号に記載されるような、組み換え方法及び組成物を使用して産生され得る。

【0531】

一実施形態において、本明細書に記載される抗体をコードする単離核酸が提供される。そのような核酸は、抗体のVLを含むアミノ酸配列及び／またはVHを含むアミノ酸配列（例えば、抗体の軽鎖及び／または重鎖）または単一ドメイン抗体のVHHを含むアミノ

酸配列をコードしてもよい。さらなる一実施形態において、そのような核酸を含む1つ以上のベクター（例えば、発現ベクター）が提供される。一実施形態では、核酸は、マルチシストロニックベクターで提供される。さらなる実施形態において、そのような核酸を含む宿主細胞が提供される。そのような一実施形態では、宿主細胞は、（1）抗体のV_Lを含むアミノ酸配列及び抗原結合ポリペプチド構築物のV_Hを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含むベクター、または（2）抗原結合ポリペプチド構築物のV_Lを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第1のベクター及び抗原結合ポリペプチド構築物のV_Hを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第2のベクター、を含む（例えば、形質転換されている）。一実施形態では、宿主細胞は、真核細胞、例えば、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、またはヒト胚性腎臓（HEK）細胞、またはリンパ系細胞（例えば、Y0、NS0、Sp20細胞）である。一実施形態では、抗体を作製する方法が提供され、方法は、抗体の発現に適する条件下で、上で提供されるように、抗体をコードする核酸を含む宿主細胞を培養する、及び任意に、宿主細胞（または宿主細胞培地）から抗体を回収することを含む。

10

【0532】

抗体の組み換え産生に関しては、例えば、上述の抗体をコードする核酸は単離され、宿主細胞内でのさらなるクローニング及び／または発現のために、1つまたは複数のベクター中に挿入される。そのような核酸は、慣例の手順を使用して（例えば、抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合可能である、オリゴヌクレオチドプローブを使用することによって）、容易に単離され、配列決定され得る。

20

【0533】

「実質的に精製された」という用語は、天然に存在する環境に見られるようなタンパク質に通常付随するか、またはそれと相互作用する構成成分が実質的または本質的に不含であり得る本明細書に記載の構築物、またはその変異体を指し、すなわち、天然の細胞または特定の実施形態では、細胞外物質に実質的に含まない組み換え産生されたヘテロマルチマーの場合の宿主細胞は、混入タンパク質の約30%未満、約25%未満、約20%未満、約15%未満、約10%未満、約5%未満、約4%未満、約3%未満、約2%未満、または約1%未満（乾燥重量で）を有するタンパク質の調製物を含む。ヘテロマルチマーまたはその変異体が宿主細胞により組み換え産生される時、特定の実施形態におけるタンパク質は、細胞の乾燥重量の約30%、約25%、約20%、約15%、約10%、約5%、約4%、約3%、約2%、または約1%以下で存在する。ヘテロマルチマーまたはその変異体が宿主細胞により組み換え産生される時、タンパク質は、特定の実施形態では、細胞の乾燥重量の約5g/L、約4g/L、約3g/L、約2g/L、約1g/L、約750mg/L、約500mg/L、約250mg/L、約100mg/L、約50mg/L、約10mg/L、または約1mg/L以下で、培地中に存在する。特定の実施形態では、本明細書に記載の方法により生成される「実質的に精製された」ヘテロマルチマーは、SDS/PAGE解析、RP-HPLC、SEC、及びキャピラリー電気泳動などの適切な方法により決定された、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%の精製レベル、具体的には、少なくとも約75%、80%、85%の精製レベル、より具体的には、少なくとも約90%の精製レベル、少なくとも約95%の精製レベル、少なくとも約99%の精製レベル、またはそれ以上を有する。

30

40

【0534】

抗体をコードするベクターのクローニングまたは発現に適する宿主細胞は、本明細書に記載の原核細胞または真核細胞を含む。

【0535】

「組み換え宿主細胞」または「宿主細胞」は、挿入、例えば、直接的な取り込み、形質導入、f⁻交配、または組み換え宿主細胞を作製するための当該技術分野で既知の他の方法、に使用される方法に関係なく、外因性ポリヌクレオチドを含む細胞を指す。外因性ポ

50

リヌクレオチドは、非統合ベクター、例えば、プラスミドとして維持されても、あるいは、宿主ゲノムに組み込まれてもよい。宿主細胞は、CHO、CHOの誘導体、NSO、Sp2O、CV-1、VERO-76、HeLa、HepG2、Per.C6、またはBHKを含み得る。

【0536】

本明細書で使用される場合、「真核生物 (eukaryote)」という用語は、系統発生ドメイン真核生物 (Eucarya)、例えば、動物 (限定されないが、哺乳動物、昆虫、爬虫類、鳥などを含む)、繊毛虫、植物 (限定されないが、単子葉植物、双子葉植物、藻類などを含む)、菌類、酵母、鞭毛虫、微孢子虫、原生生物などに属する生物を指す。

10

【0537】

本明細書で使用される「原核生物」という用語は、原核生物を指す。本明細書で使用される場合、「原核生物 (prokaryote)」という用語は、原核生物 (prokaryotic organisms) を指す。例えば、非真核生物は、ユーバクテリア (Eubacteria) (限定されないが、大腸菌 (Escherichia coli)、サーマス・サーモフィラス (Thermus thermophilus)、バチルス・ステアロテルモフィルス (Bacillus stearothermophilus)、シュードモナス・フルオレッセンス (Pseudomonas fluorescens)、シュードモナス・エルジノーサ (Pseudomonas aeruginosa)、シュードモナス・プチダ (Pseudomonas putida) などを含む) 系統発生ドメイン、または古細菌 (限定されないが、メタノコッカス・ヤナシイ (Methanococcus jannaschii)、メタノバクテリウム・テルモアウトロピクム (Methanobacterium thermoautotrophicum)、ハロバクテリウム属 (Halobacterium)、例えば、ハロフェラックス・ボルカニ (Haloferax volcanii) 及びハロバクテリウム属の種 NRC-1、アーケオグロブス・フルギダス (Archaeoglobus fulgidus)、パイロコッカス・フリオサス (Pyrococcus furiosus)、パイロコッカス・ホリコシイ (Pyrococcus horikoshii)、アエロパイルム・ペルニクス (Aeuiropyrum pernix) などを含む) 系統発生ドメインに属し得る。

20

30

【0538】

例えば、抗体は、特に、グリコシル化及びFcエフェクター機能が必要とされない場合に、細菌で産生されてもよい。細菌における抗体フラグメント及びポリペプチドの発現では、例えば、米国特許第5,648,237号、同第5,789,199号、及び同第5,840,523号、E. coli. における抗体フラグメントの発現について記載する Charlton, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N. J., 2003), pp. 245-254も参照のこと) を参照のこと。発現後、抗体は、可溶性画分中の細菌細胞ペーストから単離されてもよく、さらに精製することができる。

40

【0539】

原核生物に加えて、糸状菌または酵母菌などの真核微生物は、真菌及び酵母菌系統を含む抗体をコードするベクターのための好適なクローニングまたは発現宿主であり、このグリコシル化経路は、「ヒト化」されており、ヒトグリコシル化パターンを部分的または完全に含む抗体の産生をもたらす。Gerngross, Nat. Biotech. 22: 1409-1414 (2004)、及び Li et al., Nat. Biotech. 24: 210-215 (2006) を参照のこと。

【0540】

グリコシル化抗体の発現に好適な宿主細胞はまた、多細胞生物 (無脊椎動物及び脊椎動物) に由来する。無脊椎動物細胞の例としては、植物及び昆虫細胞が挙げられる。昆虫細胞

50

胞、特に、トランスフェクションの場合、スポドプテラ・フルギペルダ (*Spodoptera frugiperda*) 細胞、とともに使用され得る多数のバキュロウイルス系統が同定されている。

【0541】

植物細胞培養物もまた、宿主として利用することができる。例えば、(トランスジェニック植物において抗体を産生するための PLANTIBODIES (商標) 技術について説明する) 米国特許第 5,959,177 号、同第 6,040,498 号、同第 6,420,548 号、同第 7,125,978 号、及び同第 6,417,429 号を参照のこと。

【0542】

脊椎動物細胞もまた、宿主として使用され得る。例えば、懸濁液中で成長するように適合される哺乳類細胞株が、有用であり得る。有用な哺乳動物宿主細胞株の他の例は、SV40 (COS-7) により形質転換されたサル腎臓 CV1 株；ヒト胎児腎臓株 (例えば、Graham et al., J. Gen. Virol. 36:59 (1977) に記載の 293 または 293 細胞)；乳児ハムスター腎臓細胞 (BHK)；マウスセルトリ細胞 (例えば、Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980) に記載の TM4 細胞)；サル腎臓細胞 (CV1)；アフリカミドリザル腎臓細胞 (VERO-76)；ヒト子宮頸癌細胞 (HELA)；イヌ腎臓細胞 (MDCK)；バッファローラット肝細胞 (BRL 3A)；ヒト肺細胞 (W138)；ヒト肝細胞 (Hep G2)；マウス乳腺腫瘍 (MMT 060562)；例えば、Mather et al., Annals N. Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982) に記載の TRI 細胞；MRC5 細胞；及び FS4 細胞である。他の有用な哺乳動物宿主細胞株としては、DHFR-CHO 細胞を含むチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞 (Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980))；ならびに Y0、NS0、及び SP2/0 などの骨髄腫細胞株が挙げられる。抗体産生に適する特定の哺乳動物宿主細胞株の概説については、例えば、Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N. J.), pp. 255-268 (2003) を参照のこと。

【0543】

一実施形態では、本明細書に記載の抗体は、所定の比で、抗体をコードする核酸で少なくとも 1 つの安定した哺乳動物細胞をトランスフェクトすること及び少なくとも 1 つの哺乳動物細胞において核酸を発現させることを含む方法により、安定した哺乳動物細胞で産生される。いくつかの実施形態では、核酸の所定の比は、発現産物中の抗体の最高のパーセンテージをもたらす投入核酸の相対的な比を決定するために、一過性トランスフェクション実験で決定される。

【0544】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるような安定した哺乳動物細胞で抗体を産生する方法があり、少なくとも 1 つの安定した哺乳動物細胞の発現産物は、単量体の重鎖もしくは軽鎖ポリペプチドまたは他の抗体と比較して、より大きな割合の所望のグリコシル化抗体を含む。

【0545】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の安定な哺乳動物細胞においてグリコシル化抗体を産生する方法があり、該方法は、所望のグリコシル化抗体を同定及び精製することを含む。いくつかの実施形態では、該同定は、液体クロマトグラフィー及び質量分析の一方または両方によるものである。

【0546】

必要に応じて、抗体は、発現後に精製または単離することができる。タンパク質は、当業者らに既知のさまざまな方法で単離または精製されてもよい。標準的な精製方法は、FPLC 及び HPLC などのシステムを使用して、大気圧または高圧で実施される、イオン

10

20

30

40

50

交換、疎水性相互作用、親和性、サイズまたはゲル濾過、ならびに逆相を含むクロマトグラフィー手法を含む。精製方法はまた、電気泳動手法、免疫学手法、沈殿手法、透析手法、及びクロマトフォーカシング手法を含む。タンパク質濃縮と組み合わせた限外濾過及びダイアフィルトレーション手法も有用である。当該技術分野で周知の通り、さまざまな天然タンパク質がFc及び抗体に結合し、これらのタンパク質は、抗体の精製のために本発明において使用を見出し得る。例えば、細菌のタンパク質A及びGは、Fc領域に結合する。同様に、細菌のプロテインLは、一部の抗体のFab領域に結合する。精製は多くの場合、特定の融合パートナーにより使用可能にすることができる。例えば、抗体は、GST融合が用いられる場合、グルタチオン樹脂、Hisタグが用いられるかまたは固定化される場合、Ni²⁺アフィニティークロマトグラフィー、フラグタグが使用される場合、抗フラグ抗体を使用して精製されてもよい。好適な精製手法における一般的なガイダンスについては、例えば、全体が参照により組み込まれるProtein Purification: Principles and Practice, 3rd Ed., Scopes, Springer-Verlag, NY, 1994を参照のこと。必要な精製度は、抗体の使用に応じて変動するであろう。一部の場合では、精製は必要ない。

10

20

30

40

50

【0547】

特定の実施形態において、抗体は、限定されないが、Qセファロース、DEAEセファロース、ポロスHQ、ポロスDEAF、トヨパールQ、トヨパールQAE、トヨパールDEAE、リソース／ソースQ及びDEAE、フラクトゲルQ及びDEAEカラムでのクロマトグラフィーを含む陰イオン交換クロマトグラフィーを使用して精製される。

【0548】

特定の実施形態では、本明細書に記載のタンパク質は、限定されないが、SPセファロース、CMセファロース、ポロスHS、ポロスCM、トヨパールSP、トヨパールCM、リソース／ソースS及びCM、フラクトゲルS及びCMカラム、ならびにその等価物及び同等物を含むカチオン交換クロマトグラフィーを使用して精製される。

【0549】

加えて、本明細書に記載の抗体は、当該技術分野で既知の手法を使用して化学的に合成することができる（例えば、Creighton, 1983, Proteins: Structures and Molecular Principles, W. H. Freeman & Co., N. Y.及びHunkapiller et al., Nature, 310: 105-111 (1984)を参照のこと）。例えば、ポリペプチドのフラグメントに対応するポリペプチドは、ペプチド合成機の使用により合成することができる。さらに、必要に応じて、非古典的アミノ酸または化学的アミノ酸アナログを、ポリペプチド配列への置換または付加として導入することができる。非古典的アミノ酸は一般に、一般的なアミノ酸のD異性体である2, 4ジアミノ酪酸、 α -アミノイソ酪酸、4アミノ酪酸、Abu、2-アミノ酪酸、 γ -Abu、 ϵ -Ahx、6アミノヘキサン酸、Aib、2-アミノイソ酪酸、3-アミノプロピオン酸、オルニチン、ノルロイシン、ノルバリン、ヒドロキシプロリン、サルコシン、シトルリン、ホモシトルリン、システイン酸、 ϵ -ブチルグリシン、 ϵ -ブチルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、アラニン、フルオロアミノ酸、メチルアミノ酸などのデザイナーアミノ酸、C-メチルアミノ酸、N-メチルアミノ酸、及びアミノ酸アナログを含むが、これらに限定されない。さらに、アミノ酸は、D（右旋性）またはL（左旋性）であり得る。

【0550】

医薬組成物

免疫関連疾患（例えば、がん）の治療方法も本発明に包含される。本発明の前記方法は、治療有効量の抗MARCO抗体または抗原結合フラグメントを投与することを含む。MARCO抗体または抗原結合フラグメントは、医薬組成物に処方することができる。これらの組成物は、本明細書に開示の抗MARCO抗体または抗原結合フラグメントのうちの1つまたは複数に加えて、薬学的に許容される賦形剤、担体、緩衝剤、安定剤、または当業者らに周知の他の物質を含み得る。そのような物質は、無毒であるべきであり、有効成

分の有効性を妨げてはならない。担体または他の物質の正確な性質は、投与経路、例えば、経口、静脈内、皮膚または皮下、鼻腔、筋肉内、腹腔内経路に依存し得る。

【0551】

経口投与のための医薬組成物は、錠剤、カプセル剤、散剤、または液体形態であり得る。錠剤は、ゼラチンまたはアジュバントなどの固体担体を含み得る。液体医薬組成物は一般に、水、石油、動物もしくは植物油、鉱油、または合成油などの液体担体を含む。生食塩水、デキストロースもしくは他の糖類溶液、またはグリコール、例えば、エチレングリコール、プロピレングリコール、もしくはポリエチレングリコールを含むことができる。

【0552】

静脈内、皮膚もしくは皮下注射、または罹患部位での注射のために、活性成分は、発熱性物質不含であり、好適なpH、等張性、及び安定性を有する非経口的に許容される水溶液の形態であろう。当業者らは、例えば、塩化ナトリウム注射液、リンガー注射液、乳酸加リンガー注射液などの等張性ビヒクルを使用して、好適な溶液を十分に調製することができる。必要に応じて、保存剤、安定剤、緩衝剤、抗酸化剤、及び／または他の添加剤を含むことができる。

【0553】

それが、個体に与えられるべき本発明によるポリペプチド、抗体（例えば、抗TREM1抗体）、核酸、小分子、または他の薬学的に有用な化合物であるかどうかに関わらず、投与は、「治療的有效量」または「予防的有效量」（場合によっては、治療であり得るが、予防は、治療と考えることができる）であることが好ましく、これは、個体に有益性を示すのに十分である。投与される実際の量、ならびに投与の速度及び経過は、処置されるタンパク質凝集疾患の性質及び重症度に依存するであろう。処置の製剤化、例えば、投薬量の決定などは、一般開業医及び他の医師の責任の範囲内であり、通常、処置されるべき障害、個々の患者の状態、送達部位、投与方法、及び開業医に既知の他の要因を考慮に入れる。上述の手法及びプロトコルの例としては、Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. (ed), 1980に見出され得る。

【0554】

組成物は、処置されるべき状態に応じて、単独でまたは他の処置と組み合わせて、同時にまたは連続的に投与することができる。

【0555】

キット及び製造物品

本出願は、本明細書に記載の抗体組成物のうちのいずれか1つまたは複数を含むキットを提供する。いくつかの実施形態では、キットはさらに、二次抗体、免疫組織化学分析用試薬、薬学的に許容される賦形剤、及び取扱説明書、ならびにそれらの任意の組み合わせのいずれかから選択される構成成分を含有する。特定の一実施形態では、キットは、1つまたは複数の薬学的に許容される賦形剤とともに、本明細書に記載の抗体組成物のうちのいずれか1つまたは複数を含む医薬組成物を含む。

【0556】

本出願はまた、本明細書に記載の抗体組成物またはキットのうちのいずれか1つを含む製造物品を提供する。製造物品の例としては、バイアル（密封バイアルを含む）を含む。

【0557】

追加の実施形態

一態様では、コラーゲン構造を有するヒトマクロファージ受容体（MARCO）（配列番号384）に結合し、参照抗体との結合について競合する、単離抗体またはその抗原結合フラグメントが本明細書に提供され、参照抗体は、3つの重鎖CDR配列、CDR-H1、CDR-H2、及びCDR-H3を含む重鎖可変（VH）配列、ならびに3つの軽鎖CDR配列、CDR-L1、CDR-L2、及びCDR-L3を含む軽鎖可変（VL）配列を含み、

10

20

30

40

50

CDR-H1は、配列GFSLTSYHVS（配列番号2）を含み、
CDR-H2は、配列AIWTGGSLA（配列番号3）を含み、
CDR-H3は、配列DLSDYYSSYTSTFDY（配列番号4）を含み、
CDR-L1は、配列ASEGISNDLA（配列番号431）またはXASEGISNDLA（配列番号383）を含み、式中、Xはアルギニン（R）またはロイシン（L）であり、
CDR-L2は、配列AASRLQD（配列番号8）を含み、
CDR-L3は、配列QQSYKYPLT（配列番号9）を含む。

【0558】

いくつかの実施形態では、CDR-L1は、配列ASEGISNDLA（配列番号431）を含む。

10

【0559】

いくつかの実施形態では、CDR-L1は、配列RASEGISNDLA（配列番号27）を含む。

【0560】

いくつかの実施形態では、VH配列は、配列番号61に記載のVH配列を含み、VL配列は、配列番号66に記載のVL配列を含む。

【0561】

いくつかの実施形態では、VH配列は、配列番号111に記載のVH配列を含み、及びVL配列は、配列番号116に記載のVL配列を含む。

20

【0562】

いくつかの実施形態では、VH配列は、配列番号1、11、21、31、41、51、61、71、81、91、101、111、121、131、434、444、または474に記載のVH配列を含む。

【0563】

いくつかの実施形態では、VL配列は、配列番号6、16、26、36、46、57、66、76、86、96、106、116、126、136、439、449、または479に記載のVL配列を含む。

【0564】

いくつかの実施形態では、VH配列は、配列番号1、11、21、31、41、51、61、71、81、91、101、111、121、131、434、444、または474に記載のVH配列を含み、VL配列は、配列番号6、16、26、36、46、57、66、76、86、96、106、116、126、136、439、449、及び479に記載のVL配列を含む。

30

【0565】

いくつかの実施形態では、本抗体は、配列番号65に記載の重鎖配列を含み、配列番号70に記載の軽鎖配列を含む。

【0566】

いくつかの実施形態では、本抗体は、配列番号115に記載の重鎖配列を含み、配列番号120に記載の軽鎖配列を含む。

40

【0567】

いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号5、15、125、35、45、55、65、75、85、95、105、115、125、145、438、448、及び478に記載の配列から選択される重鎖配列、及び配列番号10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、443、453、及び483に記載の配列から選択される軽鎖配列を含む。

【0568】

いくつかの実施形態では、VH配列は、配列番号61に記載のVH配列からなり、VL配列は、配列番号66に記載のVL配列からなる。

【0569】

50

いくつかの実施形態では、V H 配列は、配列番号 1 1 1 に記載の V H 配列からなり、V L 配列は、配列番号 1 6 6 に記載の V L 配列からなる。

【0570】

いくつかの実施形態では、V H 配列は、配列番号 1、1 1、2 1、3 1、4 1、5 1、6 1、7 1、8 1、9 1、1 0 1、1 1 1、1 2 1、1 3 1、4 3 4、4 4 4、または 4 7 4 に記載の配列から選択される V H 配列からなり、V L 配列は、配列番号 6、1 6、2 6、3 6、4 6、5 7、6 6、7 6、8 6、9 6、1 0 6、1 1 6、1 2 6、1 3 6、4 3 9、4 4 9、または 4 7 9 に記載の配列から選択される V L 配列からなる。

【0571】

いくつかの実施形態では、抗体は重鎖及び軽鎖を含み、重鎖の配列は配列番号 6 5 に記載の重鎖配列からなり、軽鎖の配列は配列番号 7 0 に記載の軽鎖配列からなる。 10

【0572】

いくつかの実施形態では、抗体は重鎖及び軽鎖を含み、重鎖の配列は配列番号 1 1 5 に記載の重鎖配列からなり、軽鎖の配列は配列番号 1 2 0 に記載の軽鎖配列からなる。

【0573】

いくつかの実施形態では、抗体は、ヒト F c 領域を含む。

【0574】

いくつかの実施形態では、ヒト F c 領域は、野生型ヒト I g G 1 F c である。

【0575】

いくつかの実施形態では、抗体は、野生型ヒト I g G 1 F c を含み、V H 配列は、配列番号 6 1 に記載の V H 配列を含み、V L 配列は、配列番号 6 6 に記載の V L 配列を含む。 20

【0576】

いくつかの実施形態では、抗体は、野生型ヒト I g G 1 F c を含み、V H 配列は、配列番号 1 1 1 に記載の V H 配列を含み、V L 配列は、配列番号 1 1 6 に記載の V L 配列を含む。

【0577】

いくつかの実施形態では、抗体は、表面プラズモン共鳴 (S P R) アッセイによって測定される、約 0.5、1、2、3、4、5、6、または 7 × 10⁻⁹ M 以下の K D でヒト M A R C O に結合する。 30

【0578】

いくつかの実施形態では、抗体は、ヒト化される。

【0579】

一態様では、宿主細胞から本明細書に開示される抗体を発現させること、及び発現された抗体を単離することを含む、抗体を産生する方法が本明細書において提供される。

【0580】

一態様では、本発明は、本明細書に開示される抗体、及び薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物を提供する。

【0581】

一態様では、本明細書に開示される抗体及び使用説明書を含むキットが本明細書に提供される。 40

【0582】

一態様では、ヒト M A R C O (配列番号 3 8 4) に結合し、参照抗体との結合について競合する、単離抗体またはその抗原結合フラグメントが本明細書に提供され、参照抗体は、3つの重鎖 C D R 配列、C D R - H 1、C D R - H 2、及び C D R - H 3 を含む重鎖可変 (V H) 配列、ならびに3つの軽鎖 C D R 配列、C D R - L 1、C D R - L 2、及び C D R - L 3 を含む軽鎖可変 (V L) 配列を含み、

C D R - H 1 は、配列 G Y T F T D Y A V N (配列番号 2 3 2) を含み、

C D R - H 2 は、配列 W I N T Q T G K P T (配列番号 2 3 3) を含み、

C D R - H 3 は、配列 D S Y Y Y S S S L D Y (配列番号 2 3 4) を含み、 50

CDR-L1は、配列ASAGISNDLA（配列番号432）またはXASAGISNDLA（配列番号381）を含み、式中、Xはアルギニン（R）またはロイシン（L）であり、

CDR-L2は、配列AASRLQD（配列番号238）を含み、

CDR-L3は、配列QQSYKYPT（配列番号239）を含む。

【0583】

一態様では、ヒトMARCO（配列番号384）への結合について、参照抗体と競合する抗体を対象に投与することを含む、対象におけるがんを治療する方法が本明細書に提供され、参照抗体は、3つの重鎖CDR配列、CDR-H1、CDR-H2、及びCDR-H3を含む重鎖可変（VH）配列を含む重鎖、及び3つの軽鎖CDR配列、CDR-L1、CDR-L2、及びCDR-L3を含む軽鎖可変（VL）配列を含む軽鎖を含み、

CDR-H1は、配列GFSLTSYHVS（配列番号2）を含み、

CDR-H2は、配列AIWTGGSLA（配列番号3）を含み、

CDR-H3は、配列DLSDYYSSTSFY（配列番号4）を含み、

CDR-L1は、配列ASEGISNDLA（配列番号431）またはXASEGISNDLA（配列番号383）を含み、式中、Xはアルギニン（R）またはロイシン（L）であり、

CDR-L2は、配列AASRLQD（配列番号8）を含み、

CDR-L3は、配列QQSYKYPLT（配列番号9）を含む。

【0584】

いくつかの実施形態では、対象は、免疫療法を以前に受けたことがあるか、同時に受けているか、または後に受けることになり、免疫療法は、チェックポイント阻害薬；T細胞のチェックポイント阻害薬；抗PD1抗体；抗PDL1抗体；抗CTLA4抗体；養子T細胞療法；CAR-T細胞療法；樹状細胞ワクチン；単球ワクチン；T細胞及び抗原提示細胞の両方に結合する抗原結合タンパク質；BiTE二重抗原結合タンパク質；Toll様受容体リガンド；サイトカイン；細胞傷害療法；化学療法；放射線療法；小分子阻害薬；小分子アゴニスト；免疫調節薬；ならびにエピジェネティック調節薬のうちの少なくとも1つである。

【0585】

いくつかの実施形態では、免疫療法は、抗PD1抗体、抗PDL1抗体、または抗CTLA4抗体である。

【0586】

一態様では、ヒトMARCO（配列番号384）への結合について、参照抗体と競合する抗体を対象に投与することを含む、対象における免疫応答を増強する方法が本明細書に提供され、参照抗体は、3つの重鎖CDR配列、CDR-H1、CDR-H2、及びCDR-H3を含む重鎖可変（VH）配列を含む重鎖、及び3つの軽鎖CDR配列、CDR-L1、CDR-L2、及びCDR-L3を含む軽鎖可変（VL）配列を含む軽鎖を含み、

CDR-H1は、配列GFSLTSYHVS（配列番号2）を含み、

CDR-H2は、配列AIWTGGSLA（配列番号3）を含み、

CDR-H3は、配列DLSDYYSSTSFY（配列番号4）を含み、

CDR-L1は、配列ASEGISNDLA（配列番号431）またはXASEGISNDLA（配列番号383）を含み、式中、Xはアルギニン（R）またはロイシン（L）であり、

CDR-L2は、配列AASRLQD（配列番号8）を含み、

CDR-L3は、配列QQSYKYPLT（配列番号9）を含む。

【実施例】

【0587】

以下は、本発明を実施するための特定の実施形態の例である。これらの実施例は、例示を目的として提供されているにすぎず、決して本発明の範囲を限定することを意図するものではない。使用される数値（例えば、量、温度など）に対する正確さを確保する努力が

10

20

30

40

50

なされているが、当然いくつかの実験によるエラー及び偏差が許容されるはずである。

【0588】

本発明の実施は、別途指示のない限り、当業者の範囲内で、タンパク質化学、生化学、組み換えDNA手法、及び薬理学の従来の方法を用いるであろう。そのような手法は、文献で完全に説明される。例えば、T. E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W. H. Freeman and Company, 1993); A. L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., current addition); Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition, 1989); *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Carey and Sundberg *Advanced Organic Chemistry* 3rd Ed. (Plenum Press) Vols A and B (1992)を参照のこと。

10

【0589】

実施例1: MARCOは複数の腫瘍タイプに発現する
複数のがん種におけるMARCOバルクRNA発現

20

The Cancer Genome Atlas (TCGA) のすべての適応症における腫瘍及び正常組織におけるMARCO mRNA発現を、firebrowse.orgのBROAD Institute遺伝子発現ビューアーによって生成した。

【0590】

腫瘍組織（左のバー）対正常組織（右のバー）における順序付けられたMARCO mRNA発現を図1に示す。x軸には、次の腫瘍の種類がリストされている: ACC、副腎皮質癌; BLCA、膀胱尿路上皮がん; BRCA、乳房浸潤癌; CESC、子宮頸部扁平上皮癌及び子宮頸部腺癌; CHOL、胆管癌; COAD、結腸腺癌; COADREAD、結腸腺癌及び直腸腺癌; DLBC、びまん性大細胞型b細胞リンパ腫; ESCA、食道癌; GBM、多形性膠芽腫; GBMLGG、多形性膠芽腫及び低悪性度神経膠腫; HNSC、頭頸部扁平上皮癌; KICH、嫌色素性腎癌; KIRC、腎腎明細胞癌; KIRP、腎腎乳頭細胞癌; KIPAN、汎腎臓コホート (KICH+KIRC+KIRP); LAML、急性骨髄性白血病; LGG、脳の低悪性度神経膠腫; LIHC、肝臓肝細胞癌; LUAD、肺腺癌; LUSC、肺扁平上皮癌; MESO、中皮腫; OV、卵巣漿液性嚢胞腺癌; PAAD、膵臓腺癌; PCPG、褐色細胞腫及び傍神経節腫; PRAD、前立腺腺癌; READ、直腸腺癌; SARC、肉腫; SKCM、皮膚皮膚黒色腫; STAD、胃腺癌; STES、胃癌及び食道癌; TGCT、精巣胚細胞腫瘍; THYM、胸腺腫; THCA、甲状腺癌; UCS、子宮癌肉腫; UCEC、子宮体部子宮内膜癌; UVM、ブドウ膜黒色腫。y軸は、期待値最大化 (RSEM) によってRNAseqを使用して定量化された、RNA-seqデータからの転写物存在量のlog₂変換値を表す。

30

40

【0591】

scRNA-seqによる原発腫瘍におけるMARCO発現
単一細胞RNA配列決定 (scRNA-Seq)

さまざまな腫瘍からの凍結解離腫瘍細胞1mLをDiscovery Life Sciencesから購入した。凍結ペレットを37℃の水浴で解凍し、10% FBS及び10mM HEPESを含有する25mLの温かいRPMIで徐々に希釈し、550rcfで5分間遠心分離した。細胞ペレットを抗CD45-PE (クローンHI30、Biolegend) で染色した。DAPI⁻、CD45⁺細胞をBD FACSAria Fusionで選別した。選別後、細胞を3mLの0.04% BSA/PBSで3回洗浄し、5×10⁵細胞/mLで再懸濁した。細胞は、10,000細胞の標的細胞カプセル化の

50

ためにChromium Chip Bにロードされ、Chromium Controller (10X Genomics, Single Cell 3' v3 Reagent Kit) に配置した。GEM-RTクリーンアップ後、cDNA増幅及びライブラリー構築を、10X GenomicsのSingle Cell 3' v3ユーザーマニュアルに従って実行した。ライブラリーは、MedGenome Inc. によるNovaSeqで配列決定した。

【0592】

単一細胞データ処理

配列決定データは、10X Genomics Cell Ranger v3.0.2パイプラインを使用して処理した。MedGenome Inc. は、Cell Rangerサブルーチンmkfastqを使用して生のIllumina bclファイル fastqファイルに変換することにより、各試料のfastqファイルを提供した。その後、STAR (Dobin et al., 2013) を利用してGRCh38ヒト参照ゲノムに対して読み取りをアラインさせるCell Rangerカウントを実行した。冗長な一意の分子識別子 (UMI) で読み取りをフィルタリングした後、生成された遺伝子細胞バーコードファイル (barcodes.tsv、features.tsv、及びmatrix.mtxで構成されるfiltered_feature_bc_matrixフォルダ) をカウントする。mkfastq及びcountの両方をデフォルトのパラメーターで実行した。

【0593】

細胞の識別、クラスタリング、及び可視化

各試料について、filtered_feature_bc_matrixファイルがR (v. 3.6.0) ソフトウェアパッケージSeurat (Satija et al., 2015) (<https://satijalab.org/seurat>) (v2.3.4) に渡され、すべてのダウストリーム分析が行われた。features.tsvファイルは、Read10X関数と互換性があるように、genes.tsvに名前を変更した。データを、最低200個の遺伝子を発現する細胞についてフィルター処理し、すべての遺伝子は少なくとも3個の細胞で発現され、8500以下のUMIを有していた。ミトコンドリア遺伝子に関連する20%を超える読み取りと、リボソーム遺伝子に関連する45%を超える読み取りの細胞を取り除いた。次にカウントデータを対数変換し、残りの各細胞のUMIカウントとミトコンドリア及びリボソーム遺伝子の割合を迷惑因子として使用してスケールリングし (SeuratのScaleData関数で実装)、下流のクラスタリング及び発現差解析で残っている不要な影響を補正した。各試料について、SeuratのFindVariableGenes関数によって定義された高度に可変な遺伝子のセットに対して主成分 (PC) 分析を実行した。得られた上位PC (スクリープロットの目視検査によって選択された) に関連した遺伝子は、グラフベースのクラスター識別と、それに続くt分布確率的近隣埋め込み (tSNE) を使用した次元削減に使用した。クラスターベースのマーカー識別と差次的発現は、すべてのクラスター間比較にSeuratのFindAllMarkersを使用して実行した。グラフは、Seuratの組み込み可視化関数 (TSNEPlot、FeaturePlot) を使用してプロットした。

【0594】

MARCOは、scRNA-seq分析によって決定されるように、主にヒト腫瘍単球及びマクロファージで発現した (データには示さず)。肺癌、腎臓 (RCC) 癌、卵巣癌、結腸直腸癌、及び頭頸部癌の腫瘍細胞はすべて、単球及びマクロファージでMARCOの発現を示した。

【0595】

MARCO RNA発現はIL-10によって誘導される

分化ヒトマクロファージを、次のサイトカインを培地に37℃で24時間添加することによって分極した：50 ng/mlリポ多糖 (LPS) (InvivoGen)、25 n

10

20

30

40

50

g / m l 組み換えヒト I F N - γ (P e p r o T e c h) 、 L P S + I F N - γ 、 I L - 4 、 I L - 1 0 、 T G F - β 、 T G F - β + 、または I L - 1 0 。次に培地を除去し、マクロファージを 3 0 0 μ l の R L T 緩衝液 + B M E で溶解し、Q i a g e n キットを使用して R N A を抽出した。ライブラリーの調製と R N A s e q のために試料を M e d g e n o m e に送る前に、N a n o d r o p と A g i l e n t B i o a n a l y z e r によって m R N A の量と質を評価した。次に、各分極条件での M A R C O m R N A 発現を R N A s e q 分析から抽出し、l o g 2 C P M 単位でプロットした。

【 0 5 9 6 】

図 2 に示されるように、M A R C O R N A 発現が、ヒト単球由来マクロファージ (M D M) において I L - 1 0 によって誘導された。

【 0 5 9 7 】

I L 1 0 及び M A R C O の発現は適応症全体で相関する

T C G A からのすべての単一指標、レベル 2 、 R N A s e q データを、f i r e h o s e _ g e t を使用して B r o a d I n s t i t u t e からダウンロードした。腫瘍試料からの M A R C O 、 I L - 1 0 、 P T P R C (C D 4 5) 、及び T R E M 2 発現の R S E M 値を、1 0 0 万当たりの l o g 2 カウントに変換した。適応症ごとに、M A R C O 及び I L 1 0 発現の中央値を R にプロットした。ドットサイズは、I L 1 0 - M A R C O S p e a r m a n 順位相関の程度によってスケールした。上記の遺伝子の適応症ごとの発現値の中央値のマトリックスは、S p e a r m a n 相関のマトリックスに変換され、R の p h e a t m a p パッケージを使用してヒートマップとしてプロットした。

【 0 5 9 8 】

図 3 A は、さまざまな腫瘍タイプにおける M A R C O と I L - 1 0 発現の相関を示し、図 3 B は、T R E M 2 発現、C D 4 5 発現、I L - 1 0 発現、及び M A R C O 発現間の相関ヒートマップを示す。図 3 A 及び 3 B に示されるように、I L 1 0 及び M A R C O の発現は、がんの適応症全体にわたってよく相関している。

【 0 5 9 9 】

さまざまな適応症における M A R C O の発現と患者の生存率との相関

結腸直腸癌 (C R C) において

5 5 の結腸直腸腫瘍にわたる事前に正規化された M A R C O 発現プロファイル及び関連する臨床データを、N C B I の G E O ウェブサイト (アクセション G S E 1 7 5 3 7) からダウンロードした。発現プロファイルを、M A R C O のレベルの中央値に基づいて 2 つのコホートに分けた。カプラン・マイヤー生存曲線を各コホートについてプロットし、関連するログランク検定を R の s u r v i v a l 及び s u r v m i n e r パッケージを使用して実施した。図 4 A に示されるように、M A R C O 発現は、C R C における患者の生存確率と逆相関し、M A R C O 発現が高いほど患者の生存確率が低くなり、M A R C O 発現が低いほど患者の生存確率が高くなった。

【 0 6 0 0 】

腎細胞癌 (R C C) において

<http://gepia2.cancer-pku.cn/#index> の G e n e E x p r e s s i o n P r o f i l i n g I n t e r a c t i v e A n a l y s i s (G E P I A 2) ビューアーによって生成された M A R C O m R N A 発現の中央分割に基づく T C G A からの腎臓癌 (腎細胞癌) の 2 つのコホートの生存関連。

【 0 6 0 1 】

図 4 B に示されるように、M A R C O 発現は、R C C における患者の生存確率と逆相関し、R C C において、M A R C O 発現が高いほど患者の生存確率が低くなり、M A R C O 発現が低いほど患者の生存確率が高くなった。

【 0 6 0 2 】

神経芽細胞腫において

4 9 8 の神経芽腫腫瘍にわたる事前に正規化された M A R C O 発現プロファイル及び関連する臨床データを、N C B I の G E O ウェブサイト (アクセション G S E 6 2 5 6 4

10

20

30

40

50

）からダウンロードした。発現プロファイルを、MARCOのレベルの中央値に基づいて2つのコホートに分けた。 Kaplan-Meier生存曲線を各コホートについてプロットし、関連するログランク検定をRのsurvival及びsurvminerパッケージを使用して実施した。

【0603】

図4Cに示されるように、MARCO発現は、神経芽細胞腫における患者の生存確率と逆相関し、神経芽細胞腫において、MARCO発現が高いほど患者の生存確率が低くなり、MARCO発現が低いほど患者の生存確率が高くなった。

【0604】

394の神経芽腫腫瘍にわたる事前に正規化されたMARCO発現プロファイル及び関連する臨床データを、NCBIのGEOウェブサイト（アクセッションGSE120572）からダウンロードした。識別されたINSSステージを持つすべての試料についてMARCO発現プロファイルをプロットした。一対比較の統計を、RのWilcoxon順位和検定を使用して生成した。図4Dに示されるように、MARCO発現は、INSSステージに応じて、神経芽細胞腫の疾患重症度の関数として増加した。

【0605】

基底細胞様乳癌において

gepia2.cancer-pku.cn/#indexのGene Expression Profiling Interactive Analysis (GEPIA2) ビューアーによって生成された、ヒト乳癌のPAM50サブタイピングにわたるTCGAからのMARCO発現。METABRIC発現プロファイリング及び関連する臨床データを、cbioportal.orgのcBioPortalからダウンロードした。正規化されたMARCO発現プロファイルを、PAM50サブタイピングに基づいてコホート全体でRにプロットした。一対比較の統計を、RのWilcoxon順位和検定を使用して生成した。

【0606】

図5に示されるように、他の乳癌サブタイプと比較して基底細胞様乳癌においてMARCOが上方制御されることを示す。左のパネルはTCGAからのMARCO発現を示し、右のパネルはMETABRICからのMARCO発現を示している。

【0607】

MARCOは、腫瘍内中間単球の集団で高度に発現している。免疫砂漠と除外の遺伝子シグネチャーは、MARCO+クラスターで上方制御された。膀胱、乳房、結腸直腸、子宮内膜、胃、頭頸部、腎臓、肺、及び卵巣の腫瘍からのヒト免疫細胞の単一細胞配列決定に由来する凝集TAM及び単球は、移行単球（クラスター2）におけるMARCO発現が大幅に上昇した単一のクラスターを生成した。Hallmark経路（MARCOに富むクラスター2対他のすべてのマクロファージ及び単球）のGene Set Enrichment Analysis (GSEA) は、MARCO発現が免疫抑制性、マトリックス関連遺伝子セット（例えば、血管新生、EMT）と関連し、炎症性、インターフェロンの経路のために下方制御されることを示した。MARCO+細胞で上方制御されていることが確認された有意な（FDR<0.05）経路は、解糖、酸化的リン酸化、上皮間葉転換、低酸素、生体異物代謝、血管新生、コレステロール恒常性、脂肪生成、脂肪酸代謝、活性酸素種経路、及びmTORC1シグナル伝達であった。MARCO+細胞で下方制御されていることが確認された有意な（FDR<0.05）経路は、同種移植片拒絶、TGF- β シグナル伝達、KRASシグナル伝達ダウン、NF- κ Bを介したTNF α シグナル伝達、IFN γ 応答、及びIFN α 応答であった。

【0608】

実施例2：抗ヒトMARCO抗体の作製と特徴付け

ハイブリドーマの第1の生成

抗体キャンペーンは、Antibody Solutions (Sunnyvale, CA) で、それぞれ3匹のBalb/cマウスでRapidキャンペーンを2回、4匹の

10

20

30

40

50

B a l b / c マウスで標準キャンペーンを1回実施し、ヒト M A R C O H i s タグ付き細胞外ドメイン (H i s - E C D 1 4 7 - 5 2 0、コラーゲン様ドメイン (C L D) の残基 1 4 7 ~ 4 1 9 及びスカベンジャー受容体システインリッチ (S R C R) ドメインの残基 4 2 4 ~ 5 2 0、P i - 1 1 4) を免疫原として使用した。r a p i d 予防接種プログラムは、経路として足蹠を利用して、週に2回、10回の注射で構成された。標準的な予防接種プログラムは、経路としてサブQを利用して、12週間にわたって5回の注射で構成された。R a p i d 1 キャンペーンにはアジュバントとして T L R + 抗 C T L A 4 が含まれ、R a p i d 2 キャンペーンには T L R + 抗 G I T R が含まれた。マウス血清を異なる時点で抗原力価について E L I S A によって試験した。より高い力価の R a p i d 1 キャンペーンのマウスの脾臓とリンパ節を融合させ、ハイブリドーマライブラリーを作成して、抗原に应答する刺激されたB細胞集団を表す抗体産生細胞の不死集団を提供した。F A C S ソーティングによる単一細胞クローニングを実施して、モノクローナル抗体培養のための単一クローンハイブリドーマを生成した。次に、マウス及びヒト 2 9 3 T 過剰発現 M A R C O 細胞株への結合についてデュアルフローサイトメトリーによって2, 8 8 0 クローンをスクリーニングし、G F P 発現細胞株 (G F P - 2 9 3 T) を結合なしの陰性対照として使用した。33個のクローンが一次スクリーニングから同定され、ヒト及びマウス M A R C O の両方に対して交差反応性があり、バックグラウンド結合はゼロから低であり、M A R C O ヒト抗原 P i - 1 1 4 で E L I S A によってさらにスクリーニングした。33個のクローンからのハイブリドーマ上清の細胞結合をフローサイトメトリーでチェックした。

10

20

【0609】

安定的に過剰発現する細胞株の生成

マウス及びヒトの M A R C O D N A 配列を、A b m g o o d (V a n c o u v e r , C a n a d a) で p L e n t i - G I I I - C M V - G F P - 2 A - P u r o レンチウイルスベクターにクローニングされ、E . c o l i D H 5 - α 株を使用した標準的な細菌形質転換プロトコルを使用して増幅され、高収量のレンチウイルスパッケージング用プラスミドを産生した。空の G F P 対照ベクター、ヒト M A R C O、及びマウス M A R C O クローンレンチウイルスベクターからウイルス粒子を生成し、293T細胞にパッケージングして、高力価のために濃縮した。293T細胞を、A b m g o o d によって提供されたウイルスをそのプロトコルとガイドラインに従って使用した感染の標的細胞として使用した。ピューロマイシンを使用して感染プールを選択し、均質で高レベルのマウス M A R C O (293T__M u M A R C O)、ヒト M A R C O (293T__H u M A R C O)、及び G F P (293T__G F P) を発現する単一クローンを拡大した。

30

【0610】

続いて、p D 2 1 0 9 - C M V - ピューロマイシンレンチウイルス骨格を生成して、I R E S - G F P なしまたはありで、追加の M A R C O プラスミドをクローニングした：ヒト M A R C O 全長 G F P あり (プラスミド 3 0 1 2) 及び G F P なし (プラスミド 3 0 1 0)、マウス M A R C O 全長 G F P あり (プラスミド 3 0 1 3) 及び G F P なし (プラスミド 3 0 1 1)、カニクイザル M A R C O (c y n o M A R C O) 全長 G F P あり (プラスミド 3 0 2 1) 及び G F P なし (プラスミド 3 0 1 4)、ヒト M A R C O C L D のみ (1 - 4 1 9、プラスミド 3 0 2 2)、及びキメラマウス M A R C O C L D - ヒト M A R C O S R C R I R E S - G F P あり (プラスミド 3 0 2 0)。S i g m a の 2 9 3 F T 細胞に、F u g e n e を使用して上記の構築物をトランスフェクトし、レンチウイルス粒子を生成し、続いて293T細胞を形質導入した。ピューロマイシンを使用して陽性クローンを選択し、これを拡大して、i n v i t r o で使用するための次の安定した細胞プールを生成した：3010 (H u __ M A R C O)、3012 (H u __ M A R C O __ G F P)、3011 (M u __ M A R C O)、3013 (M u __ M A R C O __ G F P)、3014 (C y __ M A R C O)、3021 (C y __ M A R C O __ G F P)、3020 (M u C L D __ H u S R C R __ G F P)、及び3022 (H u __ M A R C O __ C L D)。

40

【0611】

50

抗MARCOハイブリドーマ及び抗MARCO抗体の細胞表面発現MARCOへの結合の特徴付け

ヒトMARCO (293T__HuMARCO)、マウスMARCO (293T__MuMARCO)、cyno MARCO (CyMARCO)、及びGFP発現対照細胞株 (293T__GFP) を発現するHEK293T細胞を、37℃で10% FBSを含むDMEM (Gibco) で維持した。細胞を計数し、次いで400×gで5分間遠心分離することにより回収した。上清を除去し、細胞ペレットをCa²⁺及びMg²⁺ + ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (D-PBS) に1×10⁶細胞/mlで再懸濁した。100,000細胞/ウェルを染色用にU底96ウェルプレートに播種し、すべての遠心分離ステップを1500rpm、4℃で5分間行い、試料はプロトコール全体を通して光から保護した。細胞をペレット化し、D-PBSでZombie NIRジメチルスルホキシド (DMSO) ストックを1000倍に希釈して調製したZombie NIR生存色素 (BioLegend) 100µlに再懸濁した。暗所で室温 (RT) で10分間インキュベートすることにより細胞を染色し、続いて100µlの染色培地 (2% FBS及び2mMエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を含むD-PBS) を添加して染色反応をクエンチした。細胞をペレット化し、PI-M014やmIgG2bアイソタイプなどの新たに調製した染色培地中の100µlのスクリーニングに必要なさまざまな抗体とハイブリドーマの上清及び対応するアイソタイプ対照に再懸濁した。すべてのmAbは100nM (15µg/ml) の最終最高濃度で試験し、続いて0mg/ml対照を含む8ポイントの3倍連続希釈で行った。染色は氷上で1時間 (時) 実施し、続いて染色培地で2回洗浄した。次に、細胞をペレット化し、染色培地で抗体ストックを500倍希釈して調製した、アロフィコシアニン (APC) コンジュゲートヤギ抗マウスIgG (Fc特異的) 二次抗体100µlに再懸濁し、氷上で30分間インキュベートした。次に、プレートを染色培地で2回洗浄し、続いてフローサイトメーター (Attune NxT、Life Technologies) で取得するために150µlの同じ緩衝液に再懸濁した。FlowJoソフトウェア (バージョン10.6.1) を使用してフローサイトメトリデータを分析し、Microsoft Excel及びGraphPad Prismソフトウェア (バージョン8) でデータを処理してさらに分析した。最大有効濃度の半分 (EC₅₀) を、幾何平均蛍光強度 (gMFI) に基づいて計算した。サイトメーターでプレートを分析できなかった場合は、洗浄後に細胞をペレット化し、DPBSで室温で15分間、16% (w/v) ストック (Thermo Fisher) を希釈して調製した2%パラホルムアルデヒド (PFA) 100µlで固定した。次に細胞をペレット化し、固定液を除去した後、150µlの染色培地に再懸濁し、フローサイトメーターで取得するまで4℃で保存した。

【0612】

図6Aは、33個の抗体の、GFP-239T対照細胞 (左のバー)、またはヒトMARCOを発現する細胞 (中央のバー)、またはマウスMARCOを発現する細胞 (右のバー) への結合を示す。図6Bは、対照細胞 (GFP対照) と比較した、huMARCO、muMARCO、及びCyno MARCOを発現する細胞に結合する1つのMARCO抗体、PI-M014のフローサイトメトリヒストグラムを示す。図6Cは、huMARCOを発現する細胞に結合するPI-M014及びアイソタイプ対照抗体の滴定を示す。1.37nMのEC₅₀でhuMARCOに結合したPI-M014。

【0613】

ELISAによる組換えMARCOへの抗MARCOハイブリドーマ及び抗MARCO抗体の結合の特徴付け

抗体溶液または抗MARCO抗体からのハイブリドーマを、組換えヒトMARCOタンパク質 (Pi-114 Hisタグ) に対する酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) によってスクリーニングした。簡単に言えば、96ウェルプレート (BioLegend) を、D-PBS中で一晚、組換えMARCOタンパク質1µg/ウェルでコーティングした。プレートをPBS/0.1% TWEEN-20/2mM EDTA (ELISA洗

浄緩衝液)で3回洗浄し、室温で2時間、1%BSAでブロックした。抗体を $5\mu\text{g}/\text{ml}$ の最終最高濃度で室温で1時間インキュベートした後、 $0\text{mg}/\text{ml}$ 対照を含むPBSで8点3倍連続希釈した。プレートを上記のように洗浄し、ヤギ抗マウスIgG F(ab')₂フラグメント-HRPコンジュゲート二次抗体(Jackson Immuno)とともに1:5000希釈で室温で1時間インキュベートした。プレートを上記のELISA洗浄緩衝液で4回洗浄し、TMB基質で10分間展開し(Thermo)、TMB Stop Solution(1M H₃PO₄ Phosphoric Acid)で停止し、A450をプレートリーダー(SpectraMaxi 3x)で決定した。

【0614】

SPRによるMARCO抗体動態の特性評価

10

表面プラズモン共鳴(SPR)をBIAcore(商標)T200(GE Healthcare)装置で実行し、すべてのデータをマルチサイクル速度を使用して25°Cで収集した。抗マウスFc mAb(GE Healthcare)を、mAbの固定化のターゲットとして4500RUのアミン結合化学を使用して、CM4バイオセンサーチップ(GE Healthcare)に固定した。10mM HEPES pH7.4、150mM NaCl、3mM EDTA、及び0.05%(v/v)界面活性剤P20を含む可動緩衝液で段階希釈を行った。抗マウスFc mAbを使用して、ヒトMARCO抗原(リガンド)に対する選択されたモノクローナル抗体を捕捉した。試験した抗MARCO抗体は、PI-M014、PI-M015、PI-M017、及びPI-M018であった。使用した相互作用分析物は、PI-RG-3000と呼ばれるN末端ポリヒスチジンタグ付きヒトMARCO ECD(147-520)であった。次の範囲の抗体濃度をフローセルに注入した:0.625nM、1.25nM、2.5nM、5nM及び10nM。流速30 $\mu\text{L}/\text{分}$ 、結合時間と解離時間はそれぞれ90秒と600秒。各サイクル(抗原の捕捉、抗体の結合、及び解離の段階で構成される)の後、10mMグリシンHCl緩衝液pH1.7を50 $\mu\text{L}/\text{分}$ の流速で100秒間注入することにより、細胞表面を再生した。BIAevaluation 3.1ソフトウェアを使用して速度論的評価を行い、単一サイクル及び複数サイクルの速度を決定した。

20

【0615】

PI-M014単量体は、1回のSPRサイクルで3.91nMのK_Dを示し、複数サイクルのアッセイで1.32nMのK_Dを示した。PI-M015単量体は、複数サイクルアッセイで0.39nMのK_Dを有していた。PI-M017単量体は、複数サイクルアッセイで0.96nMのK_Dを有していた。PI-M018単量体は、複数サイクルアッセイで1.65nMのK_Dを有していた。

30

【0616】

ヒト単球由来マクロファージでのMARCO細胞表面発現

ネガティブ免疫磁気選択(StemCell Technologies)を使用して末梢血単核細胞から分離された凍結ヒト末梢血CD14⁺単球を解凍し、10%(v/v)熱不活化FBS(Hyclone)、1mMピルビン酸ナトリウム、非必須アミノ酸、2mM L-グルタミン、55 μM 2-メルカプトエタノール及び抗真菌抗生物質(すべてGibcoから)を添加したRPMI 1640培地で培養した。単球は、15cmディッシュで $12\sim 15\times 10^6$ 細胞の密度で50ng/mlのヒトマクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)(PeproTech)の存在下で完全RPMI 1640培地で培養することによりマクロファージに分化した。分化の3日目に、新鮮なM-CSFを添加して培地を補充した。分化の7日後、無菌セルスクレーパー(Nunc)を使用してFACS緩衝液(2mM EDTA及び0.5%(w/v)ウシ血清アルブミン(BSA)(Sigma))を含むD-PBSにマクロファージを非酵素的に穏やかに回収し、その後、400 $\times g$ で5分間、約20°Cで遠心分離した。

40

【0617】

細胞を計数し、1ウェル当たり250,000細胞で96ウェルプレートに播種した。ストックをD-PBSで1000倍に希釈することによって調製した100 μL のZom

50

b i e N I R 生存色素 (B i o L e g e n d) を各ウェルに加え、暗所で室温で10分間インキュベートした。150 μ l の F A C S 緩衝液を添加して反応をクエンチし、続いて400 $\times$ g で5分間、4 $^{\circ}$ C で遠心分離した。次いで細胞を、2.5%のマウス及び2.5%のラット血清及びFc受容体ブロッカー (I n n o v e x B i o s c i e n c e s) で50倍希釈したヒト T r u S t a i n F c X (B i o L e g e n d) を含有する100 μ l のブロッキング溶液中で20分間、暗所でインキュベートした。次に、細胞を洗浄し、F A C S 緩衝液 (P I - M 0 1 4、P I - M 0 1 5、P I - M 0 1 7、P I - M 0 1 8、マウス I g G 2 a 及びマウス I g G 2 b、すべて T h e r m o F i s h e r コンジュゲーションキットでAPCをコンジュゲートした) で新しく調製した、100 μ l のスクリーニングに必要なさまざまな抗体及び対応するアイソタイプ対照に再懸濁した。m A b を一点濃度 (P I - M 0 1 4 については3.33 μ g / ml または他のm A b については5 μ g / ml) で試験し、一次インキュベーションを氷上で20~30分間行い、続いてF A C S 緩衝液で2回洗浄した。フローサイトメーター (A t t u n e N x T、L i f e T e c h n o l o g i e s) で取得するために、細胞を150 μ l の同じ緩衝液に再懸濁した。F l o w J o ソフトウェアを使用してフローサイトメトリデータを分析し、M i c r o s o f t E x c e l 及びG r a p h P a d P r i s m ソフトウェアでデータを処理してさらに分析した。

10

【0618】

図6Dに示すように、P I - M 0 1 4 はヒト単球由来マクロファージに結合した。

20

【0619】

マウス抗体依存性細胞貪食 (A D C P) アッセイ

骨髓由来マクロファージを、分化のために25 ng / ml のマウス C S F - 1 (P e p r o t e c h) を使用して、以前に実証したように生成した。培養6日目に、25 ng / ml のマウス I F N - γ (ペプロテック) を18時間BMDM培養に添加した。翌日、A D C P アッセイで使用する前に、細胞を200 ng / ml L P S (i n v i v o g e n) で2時間刺激した。I F N - γ / L P S 誘導BMDMはエフェクター細胞として機能し、ヒト M A R C O (293 T H u _ M A R C O) または対照 (293 T _ G F P) で形質導入されたGFP+HEK293T細胞が標的であった。採取後、エフェクターBMDMをCell-Trace Violet色素 (i n v i t r o g e n) で37 $^{\circ}$ C で20分間染色した。50,000個の標的細胞を96ウェルU底プレートに播種し、抗M A R C O m A b または対応するアイソタイプ (P I - M 0 1 4 ~ P I - M 0 1 8) と共培養した。抗体を段階的に希釈し、37 $^{\circ}$ C で30分間、培地で調製した。次いで、エフェクター細胞を抗体-標的プレートに3:1の比率 (150,000のエフェクター対50,000の標的) で添加し、37 $^{\circ}$ C で2時間インキュベートした。インキュベーション後、Z o m b i e N I R (B i o L e g e n d) を使用して細胞を生存染色し、2%パラホルムアルデヒド (I n v i t r o g e n) を使用して室温で20分間固定した後、A t t u n e N X T フローサイトメーター (T h e r m o F i s h e r) で実行した。A D C P 活性は、C e l l T r a c e V i o l e t 及びG F P レベルの二重陽性に基づいて評価し、生細胞の下流にゲートされた。

30

【0620】

40

標的細胞とP I - M 0 1 5 及びP I - M 0 1 7 のインキュベーションは、ともに、エフェクター細胞によるA D C P 活性を誘導した。結果を表1に要約する。

【0621】

H u M A R C O 抗体エピトープビニング

F o r t e B i o B l i t z ラベルフリーシステムを使用して、抗M A R C O 抗体のエピトープを分析した。

【0622】

タンデムフォーマットでは、N末端h i s タグ付きM A R C O タンパク質をF o r t e B i o 抗h i s プローブにロードし、続いてベースラインをロードしてから、第1の抗体と結合させた。第1の抗体の結合に続いて、第2の抗体を添加し、第2の抗体セットの会

50

合を測定した。増加したシグナルとして測定される、第2の抗体について観察された追加の結合は、第2の抗体が第1の抗体とは異なるエピトープに結合したことを示す。

【0623】

PI-M015とPI-M017は、MARCO抗原への結合について互いに競合し、それらが同じMARCOエピトープに結合することを示した(図7)。他のすべての抗体は異なるエピトープに結合し、MARCOへの結合について他の抗体と競合なかった。しかし、抗体はヒトMARCOのCLDドメインにのみ結合し、ヒトMARCOのSRCRドメインには結合しなかった。

【0624】

原発性ヒトDTC腫瘍及び末梢血白血球(PBL)でのMARCO発現

MARCO発現は、新しく開発されたヒトMARCO抗体を使用して、フローサイトメトリー、卵巣がん、胃癌の3つの適応症からヒト腫瘍の微小環境で評価した。腫瘍組織は、以前に「解離腫瘍細胞」(DTC)として解離し、スナップ凍結した(Folio Conversant)。メーカーのガイドラインに従ってDTCを解凍し、計数して全生存細胞数を評価した。PBLをバフィーコート(スタンフォード血液センターからの2つのドナー)から分離した。DTC及びPBL由来の単一細胞懸濁液をPBS(Gibco)で希釈し、1回洗浄し、Zombie NIR(Biolegend)で染色して、細胞生存率を決定した。ヒト血清(Jackson Immunoresearch)、ヒトFcX(Biolegend)、及びペプチドベースのFcRブロック溶液(Innovex Biosciences)の組み合わせでFc受容体もブロックした。FcRブロック試薬とともにインキュベーションした後、DTCの表面受容体を、主要な腫瘍内免疫サブセットのマーカーとアイソタイプ対照(5 µg/mlのmIgG2aまたはmIgG2bまたはRat IgG2a)及び直接コンジュゲートした抗ヒトMARCO抗体(5 µg/ml PI-M017またはPI-M018またはPI-HX-3031)を含むフローサイトメトリーカクテルで染色した。細胞内CD68発現を測定するために、細胞も固定し、透過処理した(True-Nuclear Transcription Buffer Set, Biolegend)。PBLは、主要な血液免疫サブセットのマーカー、ならびにアイソタイプ対照(PE Zenon標識とコンジュゲートした10 µg/ml hIgG1)及び抗ヒトMARCO抗体(PE Zenon標識とコンジュゲートした10 µg/ml PI-3010、PI-3030、及びPI-3031)を含むフローサイトメトリーカクテルで染色した。DTC及びPBLからのデータを、Attune NxTアナライザー(ThermoFisher)を使用して取得し、FlowJo(BD Biosciences)を使用して分析した。

【0625】

図8A及び8Bは、MARCOがヒトMDM(図8A)及び一次ヒト腫瘍試料(胃癌及び卵巣癌、図8B)からの腫瘍関連マクロファージ(TAM)において発現することを示す。図8A及び8Bにおいて、右側のピークはMARCO抗体PI-M018またはPI-M017の結合及び染色を示し、左側のピークはアイソタイプmIgG2aの結合を示す。

【0626】

第1の抗体キャンペーンから選択された抗体の結合及び機能特性の概要を表1に示す。

【0627】

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1								
抗 huMAR CO mAb	アイソ タイプ	エピト ープビ ン及び マップ	K_D (nM)	内因性 細胞 結合	ヒト EC_{50} 293T (HuMAR CO) (nM)	カニクイ ザル EC_{50} 293T (CyMAR CO) (nM)	マウス EC_{50} 293T (MuMAR CO) (nM)	in vitro BMDM アッセ イにお ける ADCP/ ADCC
PI- M014	mIgG2b	4(CLD)	1.32	+	7.861	11.07	41.57	いいえ
PI- M015 (RDM1)	mIgG2a	1(CLD)	0.39	+	1.606	1.206	NB	はい
PI- M017 (RDM7)	mIgG2a	1(CLD)	0.96	+	1.59	1.522	NB	はい
PI- M018 (RDM9)	mIgG2b	3(CLD)	1.65	+	1.851	45.4	NB	いいえ

*NB：結合なし

【0628】

実施例 3：抗マウス MARCO 抗体の作製と特徴付け

材料及び方法

抗マウス MARCO 抗体を生成するための免疫

ラット抗マウス MARCO ハイブリドーマは、Sigma Adjuvant System (SAS) を単独で使用するか、同じく SAS で HEK293 細胞を発現するマウス MARCO と交互に使用して、Pionyr で生成された組換え N 末端 his タグ付きマウス MARCO タンパク質で Sprague Dawley ラットを免疫することによって生成した。使用したリコンビナント N 末端 his タグ付きマウス MARCO タンパク質の配列を以下に示す。組換えマウス MARCO タンパク質を SDS-PAGE で分析し、サイズ排除クロマトグラフィーを使用して、タンパク質の分子量が正しいことを確認した。

【0629】

ラットは、Antibody Solutions (Santa Clara, CA) で後肢関節部を週 2 回免疫し、21 日目に血清力価を ELISA によって試験した。ハイブリドーマを生成するための電気融合のために、マウス MARCO に対する十分な血清抗体価を有するラットを選択した。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で採取する前に、-3 日目と -2 日目に 2 回の最終追加免疫を行った。

【0630】

マウス MARCO mAb RDM-9514 は、R&D biosystems (CUST017 MABP、クローン 57914) からカスタム精製ハイブリドーマクローンとして購入し、NS0 由来の組換えマウス MARCO Gln70-Ser518 に対してラットで育てた。

【0631】

ハイブリドーマの生成

免疫ラットからリンパ節細胞を採取し、単細胞懸濁液を作製した。BTX EC2000+電気融合装置 (Harvard Bioscience) を用いた電気融合を用いて、リンパ球を骨髓腫細胞株、SP2/0-Ag 14 (ATCC) と融合させた。融合細胞を96ウェル平底プレート (Corning) に播種し、HTを含むClona-Cell Medium E (Stem Cell Technologies) で一晚回収した。翌日、アミノプテリン (Sigma) を培養物に1×最終濃度まで添加した。融合物は6日目と8日目に与えられ、11日目にスクリーニングした。

【0632】

ハイブリドーマのスクリーニング

ハイブリドーマは、免疫化に応じて組換えマウスMARCOタンパク質または組換えヒトMARCOタンパク質のいずれかで、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) によってスクリーニングした。簡単に説明すると、96ウェルMaxisorpプレート (Nunc) を0.1ug/ウェルの組換えMARCOタンパク質で、Ca²⁺及びMg²⁺を含むDPBS (Gibcoカタログ番号14040117) で一晚コーティングした。プレートをPBS/0.05%TWEEN-20で3回洗浄し、2%ウシ胎児血清を含むPBS/Ca²⁺でブロックした。ハイブリドーマの上清を、PBS/Ca²⁺/2%FBS緩衝液を含むウェルに1:1で添加し、室温で1時間インキュベートした。プレートを上記のように洗浄し、ヤギ抗ラットIgG-HRPコンジュゲート二次抗体 (Jackson Immuno) またはマウス抗ラットIgG (1、2a、2b) HRPコンジュゲート抗体 (Southern Biotech) とともに室温で1時間インキュベートした。プレートを洗浄し、TMB基質 (Thermo) で展開させ、TMB Stop Solution (Suromodics) で停止させ、プレートリーダー (Tecan) を使用してA450を決定した。抗MARCO抗体を産生するハイブリドーマを24ウェルプレートに移し、陽性クローンからの上清をMARCO反応性について再試験し、追加の結合アッセイでさらに試験した。ハイブリドーマは、組換えヒトMARCO、組換えマウスMARCO、及び対照の組換えhisタグ付きタンパク質でスクリーニングして、非特異的またはhisタグ特異的クローンを排除し、またマウスMSR1 (R&D Systems) またはヒトMSR1 (R&D Systems) でも試験して関連するスカベンジャー受容体タンパク質に対する交差反応性を確認した。ハイブリドーマは、2つのキメラタンパク質、N末端組換えヒトMARCO SRCR/マウスCLDタンパク質及びN末端組換えマウスMARCO SRCR/ヒトCLDタンパク質への結合についても試験し、抗体が特異的であったMARCOタンパク質上のドメインを決定した。これらの研究で使用された組換えタンパク質の配列は以下のとおりである。

【0633】

N末端hisタグ付きマウスMARCOタンパク質：

HHHHHHHHHGERGSPGPKGAPGAPGIPGLPGPAAEKGEKGAAGRDGTPGVQGPQGP PGSKGEAGLQGLTGAPGKQGATGAPGPRGEKGSKGDI GLTGPKGEHGT KGDKGDLGLPGNKGDMGMKGD TGPMGSPGAQGGKG DAGK PGLPGLAGSPGVKGDQGKPGVQGVPGPQGA PGLSGAKGEPGR TGLPGPAGPPGIAGNPGIAGVKGSKGDTGIQGGQKGT KGESGVPGLVGRKGD TGSPGLAGPKGEPGRVGGQKGD PGMKGS SGQQGQKGEKGGQKGESFQ RVRIMGGTNRGRAEVYNNNEWGTICDDDDWDNNDATVFCRMLGYSRGRALSSYGGGSGNIWLDNVNCRGTENSLWDCSKNSWGNHNCVHNEDAGVECS

【0634】

N末端hisタグ付きキメラMARCOタンパク質 (ヒトSRCR/マウスCLDドメイン)：

HHHHHHHHHKKGERGSPGPKGAPGAPGIPGLPGPAAEKGEKGAAGRDGTPGVQGPQGP PGSKGEAGLQGLTGAPGKQGATG

A P G P R G E K G S K G D I G L T G P K G E H G T K G D K G D L G L P G N K G D
M G M K G D T G P M G S P G A Q G G K G D A G K P G L P G L A G S P G V K G D Q
G K P G V Q G V P G P Q G A P G L S G A K G E P G R T G L P G P A G P P G I A G
N P G I A G V K G S K G D T G I Q G Q K G T K G E S G V P G L V G R K G D T G S
P G L A G P K G E P G R V G Q K G D P G M K G S S G Q Q G Q K G E K G Q K G E N
S V S V R I V G S S N R G R A E V Y Y S G T W G T I C D D E W Q N S D A I V F C
R M L G Y S K G R A L Y K V G A G T G Q I W L D N V Q C R G T E S T L W S C T K
N S W G H H D C S H E E D A G V E C S V

【0635】

N末端h i sタグ付きキメラMARCOタンパク質（マウスSRCR／ヒトCLDドメイン）：

H H H H H H K G E Q G A P G L Q G H K G A M G M P G A P G P P G P P A E K G A
K G A M G R D G A T G P S G P Q G P P G V K G E A G L Q G P Q G A P G K Q G A T
G T P G P Q G E K G S K G D G G L I G P K G E T G T K G E K G D L G L P G S K G
D R G M K G D A G V M G P P G A Q G S K G D F G R P G P P G L A G F P G A K G D
Q G Q P G L Q G V P G P P G A V G H P G A K G E P G S A G S P G R A G L P G S P
G S P G A T G L K G S K G D T G L Q G Q Q G R K G E S G V P G P A G V K G E Q G
S P G L A G P K G A P G Q A G Q K G D Q G V K G S S G E Q G V K G E K G E R G E
S F Q R V R I M G G T N R G R A E V Y Y N N E W G T I C D D D W D N N D A T V F
C R M L G Y S R G R A L S S Y G G G S G N I W L D N V N C R G T E N S L W D C S
K N S W G N H N C V H N E D A G V E C S

【0636】

細胞結合

E L I S AによるMARCOへの結合が陽性のクローンを、ヒトMARCO-293細胞、マウスMARCO-293細胞、または対照293細胞を染色し、IntelliCyt iQueフローサイトメーターを使用したフローサイトメトリーで試験することにより、細胞表面MARCOへの結合を試験した。E L I S AによりMARCOへの結合が陽性であったハイブリドーマ及びフローサイトメトリーにより細胞表面MARCOへの結合が陽性であったハイブリドーマを、サブクロニング及び精製のために選択した。

【0637】

ハイブリドーマのサブクロニングと精製

親ハイブリドーマのサブクロニングを、FACS Ariaでの単一細胞ソーティングによって実行した。単一細胞を、平底96ウェル組織培養プレートのClona-Cell Medium Eに分類した。単一細胞を7～9日間培養し、その後、上記のようにE L I S Aによって抗MARCO特異的クローンについてアッセイした。

【0638】

次いで、モノクローナルハイブリドーマを無血清増殖培地（AOF、Stem Cell Technologies）中での増殖による精製のために培養し、プロテインAまたはプロテインGのいずれかを使用して精製した。

【0639】

ハイブリドーマ抗体可変領域配列の生成

RNeasy精製キット（Qiagenカタログ番号74134）を使用して（104～106）モノクローナルハイブリドーマ細胞から全RNAを抽出し、逆転写（RT）を実行してMaxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit（ThermoFisherカタログ番号K1651）及び逆転遺伝子特異的プライマー（GSP1）を使用してcDNAを合成した。QIAquick PCR Purification Kit（Qiagenカタログ番号28104）を使用して、cDNAを精製し、RT反応におけるGSP及び酵素を除去した。Terminal Deoxynucleotidyl Transferaseを使用して、一連のオリゴdAをcDNAの3'末端に付加し（Thermo Scientificカタ

10

20

30

40

50

ログ番号10533065)、生成物を増幅前に再度精製した(QIAquick PCR Purification Kitカタログ番号28104)。次いで、第2の遺伝子特異的プライマー(GSP2)及びcDNAの3'末端に前もって付加されたオリゴdT Aテイルに結合するオリゴdT フォワードプライマーを用いてPCRを実施した。PCR産物を配列決定した。PCR産物から不十分な品質の配列が生成された場合、PCR産物はTOPOクローン化され、E. coliに形質転換され、単一コロニーを配列決定のために処理した。

【0640】

使用したプライマーは以下のとおりである。

GSP1-mk: TTGTCGTTCACTGCCATCAATC
GSP2-mk: ACATTGATGTCCTTTGGGGTAGAAG
GSP1-mHC: AGCTGGGAAGGTGTGCACAC
GSP2-mHC: GGGATCCAGAGTTCCAGGTC
GSP1-rk: GT GAG GAT GAT GTC TTA TGA ACA
GSP2-rk: GCCATCAATCTTCCACTTGACAC
GSP1-rHC: GAG ATG STT TTC TCG ATG GG
GSP2-rHC: GS GGG AAG ATG AAG ACA GAT G

10

【0641】

カルシウム依存ELISAアッセイ

このアッセイの目的は、抗MARCO抗体によるMARCOへの結合のカルシウム依存性を決定することであった。このアッセイは、ハイブリドーマ上清と精製抗体の両方に適用することができる。

20

【0642】

ヒトまたはマウスのMARCO組換えタンパク質0.05 µg/mlを、次の条件を使用して4枚のNunc-Immuno(商標)MicroWellプレートにコーティングした: Ca²⁺ (Gibcoカタログ番号14040117)を含むDPBS中、2 mM EDTA (Invitrogenカタログ番号15575020)を含むCa²⁺ (Gibcoカタログ番号14190136)を含まないDPBS中—プレートB、10 mM EDTAを含むCa²⁺を含まないDPBS中、及び50 mM EDTAを含むCa²⁺を含まないDPBS中。

30

【0643】

プレートを室温で1時間または4℃で一晩インキュベートした後、プレートをELISA洗浄緩衝液(PBS/0.05% TWEEN-20)で3回洗浄し、次にハイブリドーマ上清(1:5希釈)または精製抗体(1 µg)を、DPBS/Ca²⁺/2% FBS、Ca²⁺を含まないDPBS/2 mM EDTA/2% FBS、Ca²⁺を含まないDPBS/10 mM EDTA/2% FBS、及びCa²⁺を含まないDPBS/50 mM EDTA/2% FBSで希釈した。プレートを再び室温で1時間インキュベートした。

【0644】

プレートを上記のように洗浄し、上記のように4つの異なる緩衝液中でヤギ抗マウスIgG-HRP(Jackson)またはマウス抗ラットIgG-HRP(1+2a+2b)1:1:1の混合物(Southern Biotechカタログ番号3060-05、3065-05、3070-05)とともに、1:5000希釈、室温で1時間インキュベートした。次に、プレートを洗浄し、TMB基質(Thermo Fisher)で展開し、TMB停止液(Surmodics)で停止し、Tecanプレートリーダーを使用してA450で読み取った。

40

【0645】

ProbeLife Gator装置を使用した反応速度とエピトープビニング

ProbeLife Gator(商標)ラベルフリーシステムを使用して、抗MARCO抗体の結合速度とエピトープを分析した。

【0646】

50

反応速度アッセイでは、抗マウスFcまたは抗ヒトFcプローブのいずれかを使用して抗MARCO抗体をプローブに捕捉し、次に5段階の動態プロトコルを使用して、抗原に対する抗体の親和性を測定し、プロトコルは以下の手順を含む：ベースライン、ローディング、ベースライン、会合、及び解離。ProbeLifeが提供するキネティクス緩衝液（K緩衝液）を使用してベースラインを60秒間確立した後、抗mFcまたは抗hFcプローブに200nMの抗体をキャプチャーが飽和に達するまで120秒間ロードし、K緩衝液でのベースラインの測定をさらに60秒間実行し、続いて200nM抗原（ヒトMARCO、マウスMARCOまたはcyno MARCO）を使用した会合ステップを実行し、K緩衝液で5～10分間解離ステップを実行した。アッセイは、抗体と抗原の解離を最大化するために37℃で行った。

10

【0647】

抗体のエピトープビニングには、タンデムフォーマット及びサンドイッチフォーマットの両方を使用した。

【0648】

タンデムフォーマットの場合、200nMのN末端hisタグ付きMARCOタンパク質をProbeLife抗hisプローブに120秒間、または結合が飽和に達するまでロードし、続いて60秒間ベースラインし、200nMでロードした飽和抗体の第1のセットと会合した。第1の抗体の結合に続いて、100～2000nMで第2の抗体を添加し、第2の抗体セットの会合を測定した。増加したシグナルとして測定される、第2の抗体について観察された追加の結合は、第2の抗体が第1の抗体とは異なるエピトープに結合したことを示す。

20

【0649】

サンドイッチアッセイフォーマットでは、200nMの第1の抗体を抗mFcまたは抗hFcプローブに120秒間ロードした後、ベースラインステップを行い、MARCO抗原（200nM）と120秒間会合させた。次に、200nMでの第2の抗体の会合を120秒間測定して、追加の結合があるかどうかを判断した。このフォーマットでは、第1の抗体が低濃度であった場合、プローブ上の遊離結合部位を飽和させるために、第1の会合後に追加のアイソタイプ対照抗体を加えた。すべてのプローブと緩衝液は、ProbeLifeに直接注文した。

【0650】

抗マウスMARCOハイブリドーマによるBMDMのMARCO染色

3匹の雌C57BL/6マウス（Jackson Laboratories）の大腿骨と脛骨を、乳鉢と乳棒を使用して、染色培地（D-PBS中0.5%（w/v）BSA（Sigma）及び2mM EDTA）で洗浄及び粉碎した。次いで、試料を40µmフィルターに通し、D-PBSで洗浄し、室温で5分間、400×gでペレット化した。細胞ペレットを5mlのBD Pharm Lyse緩衝液（BD Biosciences）に再懸濁し、赤血球溶解を室温で5分間行い、続いて10体積の染色培地でクエンチした。細胞を室温で5分間、400×gでペレット化し、15cmプレートで15×10⁶細胞/mlの密度で、10%（v/v）ウシ胎児血清（FBS）（HyClone）及び抗生物質抗真菌溶液（Gibco）を補充したイスコフ改変ダルベッコ培地からなるマクロファージ培地に再懸濁した。これらの骨髄単核細胞を25ng/mlのマウスマクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）（PeproTech）で7日間刺激してM0マクロファージを生成し、100ng/mlのLPSを6日目に培地に補充することによってM1様に、20ng/mlのIL-10を加えてM2様マクロファージに分化させた。分極サイトカインとともに37℃で18時間インキュベーションした後、M0、M1、及びM2様マクロファージをDPBSですすぎ、6mlの2mM EDTA中で10分間インキュベートして、細胞の剥離を促進した。細胞を追加の6mlの上述される染色培地に優しく削り取り、計数し、1ウェル当たり250,000細胞で96ウェルプレートに播種した。ストックをD-PBSで1000倍に希釈することによって調製した100µlのZombie NIR生存色素（BioLegend）を各ウェルに加え、暗所で

30

40

50

室温で10分間インキュベートした。150 μ lの染色培地を添加して反応をクエンチし、続いて400 $\times$ gで5分間、4℃で遠心分離した。次いで細胞を、2.5%のマウス及び2.5%のラット血清及びFc受容体ブロッカー (Innovex Biosciences) で50倍希釈したマウスTruStain FcX PLUS (BioLegend) を含有する100 μ lのブロッキング溶液中で20分間、暗所でインキュベートした。次に、細胞を洗浄し、Ca²⁺ (RDM-9514、HX-3012、HX-3014、HX-3016、HX-3017、Rat IgG2a及びRat IgG1はすべてPE LightningキットでPEコンジュゲートされている) とのDPBS中に2% FBSを含有する新しく調製したFACS緩衝液中の、100 μ lのスクリーニングに必要なさまざまな抗体とハイブリドーマ及び対応するアイソタイプ対照に再懸濁した。RDM-9514は、10 μ g/mlの最高用量のPBSでの8点3倍連続希釈に続いて、10 μ g/mlの最終最高濃度で試験した。内部ハイブリドーマを、5 μ g/mlの単一点濃度で試験した。染色は氷上で20～30分間行い、続いてFACS緩衝液で2回洗浄した。フローサイトメーター (Attune NxT、Life Technologies) で取得するために、細胞を150 μ lの同じ緩衝液に再懸濁した。FlowJoソフトウェア (バージョン10.6.1) を使用してフローサイトメトリデータを分析し、Microsoft Excel及びGraphPad Prismソフトウェア (バージョン8) でデータを処理してさらに分析した。データは、抗体と対応するアイソタイプの間の Δ gMFIとしてプロットした。サイトメーターでプレート进行分析できなかった場合は、洗浄後に細胞をペレット化し、DPBSで室温で15分間、16% (w/v) ストック (Thermo Fisher) を希釈して調製した2%パラホルムアルデヒド (PFA) 100 μ lで固定した。次に細胞をペレット化し、固定液を除去した後、150 μ lの染色培地に再懸濁し、フローサイトメーターで取得するまで4℃で保存した。

【0651】

抗マウスMARCO PEコンジュゲートmAbによる腫瘍のMARCO染色

Py8119及びCT26腫瘍を、マウスからそれらの体積が約400 mm³に達した時に採取した。解剖により脂肪及び繊維状物質を腫瘍から除去した。次に、腫瘍を秤量し、機械的及び酵素的解離の組み合わせによって単一細胞懸濁液用に処理した。組織を細かく切り刻んだ後、腫瘍をgentleMACS Octo Dissociator (Miltenyi Biotec、130-095-937) 中でgentleMACS Cチューブ (Miltenyi Biotec、130-093-235) を用い最適化された酵素カクテル (Miltenyi Biotec、Tumor Dissociation Kit, mouse 130-096-830) を使用して酵素消化させた。解離後、試料をフィルターにかけ、残りの大きな粒子を除去した。フローサイトメトリ用の抗体パネルを使用して、腫瘍組織の単一細胞懸濁液を表面染色した。骨髄サブセットを評価するための抗体パネルには、CD45、XCR1、F4/80、CD64、CD11c、Ly6C、CD11b、Ly6G、CD24、MHCクラスIIに特異的な抗体、及びダンプチャネル (CD45R、CD90.2、CD3e、NKp46、CD19、Siglec F) の系統マーカーを含む。リンパ系サブセットを評価するための抗体パネルには、CD45、CD4、CD25、B220、NKp46、CD44、CD90.2、CD8a、CD11b、及びCD49bに特異的な抗体が含まれる。マウス腫瘍の染色に使用した抗MARCO抗体は、5 μ g/mlのRDM-9514、PI-HX-3012、PI-HX-3021、PI-HX-3016、PI-HX-3017、ラットIgG1及びラットIgG2aアイソタイプであった。すべてのデータはAttuneフローサイトメーター (Thermo Fisher) で収集し、FlowJoソフトウェアを使用して分析した。

【0652】

マウス及びヒト組換えMARCOのLDL競合アッセイ

高結合性の96ウェルMSDプレートを、4 μ g/mlのマウスMARCOまたは4 μ g/mlのヒトMARCO (R&D biosystems) でコーティングした。プレ

ートをP B S T及び5 % B S Aで1時間ブロックした後、滴定した抗マウスまたは抗ヒトM A R C O抗体をプレートに加え、30分間インキュベートした。ビオチン化h L D L (860 p Mまたは2 μ g / m l)を抗体に添加し、抗体 / L D L混合物を1時間インキュベートして混合物を結合平衡に到達させた。プレートを洗浄し、結合したビオチン化L D Lを、r e a d b u f f e rを加えてM S Dプレートの電極に電気を印加すると電気化学発光シグナルを生成するスルホタグ付きストレプトアビジンで検出した。G r a p h P a d P r i s mソフトウェアの4パラメーター曲線適合を使用して、I C 5 0を計算した。

【0653】

結果

マウスM A R C OのS R C Rドメインに結合する複数の抗体が生成され、特徴付けられた。909個の候補抗体が、精製されたマウスM A R C O、ヒトM A R C O、マウスC L D - ヒトS R C R、ヒト - C L D - マウス - S R C R、及びマウスM S R 1を使用した一次E L I S Aスクリーニングで同定された。マウスM A R C OまたはG F P対照を発現する293T細胞への結合の二次スクリーニングにより、275個の候補が得られた。内因性マウスB M D Mへの結合のスクリーニングにより、40個の候補が得られた。S R C Rバインダーのみの最終スクリーニングでは、20個の候補が得られた。候補を、追加の生物物理学的特性についてスクリーニングした。生成された上位の抗マウスM A R C O抗体の生物物理学的特性を表2に示す。これらの抗体は、293T H u M A R C O細胞または293T C y M A R C O細胞への結合を示さなかった。選択したマウスM A R C O抗体の配列を配列表に示す。C D Rは、A b M定義を使用して定義した。

10

20

30

40

50

抗 muMA RCO mAb	アイソ タイプ	SRC R Bin (CDR 3 配 列)	Epito pe Bin	Biacore K _{on} (1/Ms)	Biacore K _{off} (1/s)	マウス EC ₅₀ 293T (MuMAR (nM)	EC ₅₀ LDL 競合 アッ セイ (nM)	MSR 1 結 合	BMD M へ の結 合
RDM- 9514	ラット IgG1	11	2	1.36E+05	6.95E-07	0.83~0.86	0.38	-	+
PI-HX- 3001 (PI- 3006)	ラット IgG2a	1	2	1.88E+05	7.89E-07	0.48~1.09	0.4	-	該当 なし
PI-HX- 3003	ラット IgG2a	8	2	2.16E+05	5.40E-07	1.00	0.23	+/-	+
PI-HX- 3004	ラット IgG2a	10	2	3.45E+05	3.58E-08	0.92	0.17	+/-	該当 なし
PI-HX- 3012	ラット IgG2a	1	2	1.54E+05	2.48E-07	0.80	0.17	-	+
PI-HX- 3013	ラット IgG2a	2	2	2.40E+05	4.50E-07	0.34	0.36	+/-	+
PI-HX- 3021 (PI- 3007)	ラット IgG2a	3	2	1.91E+05	2.11E-05	0.47~0.75	0.25	-	+
PI-HX- 3016 (PI- 3008)	ラット IgG1	1	2	1.84E+05	1.27E-06	0.36~0.59	0.34	-	+
PI-HX- 3017 (PI- 3009)	ラット IgG1	6	2	1.55E+05	2.35E-07	0.66~1.30	0.14	-	+

10

20

30

40

50

【0654】

RDM-9514はMARCOのSRCRドメインに結合した。RDM-9514はまた、用量依存的にMARCOへのLDL結合をブロックし（図9）、CT26腫瘍及びPy8119腫瘍から単離されたMHCI^{high}TAM及びMHCI^{low}TAM上で表面発現MARCOに結合した（図10A）。マウス抗体RDM-9514による染色も、MARCOがCT26同系腫瘍モデルのTAM及び単球で発現されることを示した（図10B）。

【0655】

マクロファージ及びIL-10分極後のマウスBDMDでのMARCO発現も、新しく

生成されたマウスMARCO抗体で評価した。PI-HX-3017（左のバー、名前をPI-3009に変更）、PI-HX-3016（中央の左のバー、名前をPI-3008に変更）、PI-HX-3021（中央の右のバー、名前をPI-3007に変更）、及びPI-HX-3012（右のバー）はそれぞれマウスBMDMに結合した（図11A）。同じ抗体はまた、CT26同系腫瘍モデルにおける腫瘍から単離されたTAM（右のバー）及び単球（左のバー）上のMARCOに結合した（図11B、 $n=2$ ）。

【0656】

実施例4：単剤療法及び併用療法における抗マウスMARCO抗体の*in vivo*有効性材料及び方法

CT26同系モデルにおけるPD-1抗体による*in vivo*併用療法

10

*in vivo*で使用するための抗体はすべてエンドトキシンについて試験され、 0.2 EU/mg を下回るタンパク質で使用した。マウスIgG1 D265Aフォーマットの抗PD-1 [クローンRMP1-14]を得た。マウスIgG1 [クローンMOPC-21]及びマウスIgG2a [クローンC1.18.4]アイソタイプ対照を得た。PI-3006、PI-3007、PI-3008、及びPI-3009がHEK293細胞で生成され、SEC及びCE-SDSによって単分散性と純度が評価され、エンドトキシンについても試験した。抗体は、フローサイトメトリーによって、マウスMARCO過剰発現293T細胞への結合、及び親293T細胞への結合の欠如についても試験した。

【0657】

約8週齢の雌のBALB/cマウスを、Taconic Biosciences (Rensselaer, NY) から入手した。マウス腫瘍細胞株CT26.WT (CRL-2638) を、American Type Culture Collection (ATCC) から入手し、ガイドラインに従って培養した。低継代細胞を無血清 $1 \times \text{DPBS}$ (Gibco) に 1×10^7 細胞/mlで再懸濁した。イソフルラン麻酔下で、腫瘍細胞懸濁液をBALB/cマウスの剃毛した右下腹側腹部に皮下注射した。腫瘍体積の成長は、腫瘍の直径を垂直に測定することで週に2回監視し、式 $(\text{mm}^3) = 0.5 \times (\text{長さ}) \times (\text{幅})^2$ を使用して計算した。腫瘍が平均 97 mm^3 に達した時、それぞれ10匹の動物を含む6つの処置群を無作為に割り当てた。薬物処置のために、抗マウスアイソタイプ対照IgG2a (クローンC1.18.4) を 15 mg/kg 、抗マウスアイソタイプ対照IgG1 (クローンMOPC-21) を 5 mg/kg で、抗マウスPD-1 (マウスIgG1 D265Aフォーマットとして組み換え生産され、PI-0004-ABと呼ばれるクローンRMP1-14) を 5 mg/kg 単独で、または抗マウスMARCO抗体 (PI-3006、PI-3007、PI-3008、及びPI-3009) と組み合わせて 10 mg/kg で5日に1回、合計4回 (Q5Dx4) マウスに腹腔内投与した。すべての研究は、プロトコールEB17-010の下でExplora Biolabs施設内動物管理使用委員会に従って実施した。マウスは、米国農務省の実験動物福祉法に準拠した実験動物の管理と使用に関するNIHガイドに概説されている条件下で飼育した。動物は、Lab Dietの齧歯動物用飼料及び水を自由に摂取できるようにした。安楽死を必要とし得る臨床的異常について、治験責任医師または獣医スタッフが、マウスを少なくとも週に2回監視した。ベースライン体重測定と比較して20%を超える正味の体重減少を示すマウスを安楽死させた。

20

30

40

【0658】

抗腫瘍免疫記憶アッセイ

上記のように、抗MARCO抗体+抗PD-1抗体処置によるCT26腫瘍モデル試験から無腫瘍であったBALB/cマウスを、左腹側腹部に 1×10^6 個のCT26腫瘍細胞で再負荷した。研究期間中の腫瘍増殖を追跡するための対照細胞株として、EMT6細胞を反対側の右腹側腹部に皮下注射した。研究期間中、マウスに追加の治療は提供しなかった。再負荷移植後35日間、腫瘍体積を測定した。

【0659】

CT26モデルにおける薬力学 (PD) 及び*in vivo*抗MARCO抗体単剤の有効性

50

約8週齢の雌のBALB/cマウスを、Taconic Biosciences (Rensselaer, NY) から入手した。マウス腫瘍細胞株CT26.WT (CRL-2638) を、American Type Culture Collection (ATCC) から入手し、ガイドラインに従って培養した。低継代細胞を無血清1×DPBS (Gibco) に1×10⁷細胞/mlで再懸濁した。イソフルラン麻酔下で、腫瘍細胞懸濁液をBALB/cマウスの剃毛した右下腹側腹部に皮下注射した。腫瘍体積の成長は、腫瘍の直径を垂直に測定することで週に2回監視し、式(mm^3) = $0.5 \times (\text{長さ}) \times (\text{幅})^2$ を使用して計算した。腫瘍が平均109 mm³に達した時、それぞれ10匹の動物を含む2つの処置群を無作為に割り当てた。薬物処置のために、抗マウスアイソタイプ対照IgG2a (クローンC1.18.4) 及び抗マウスMARCO抗体 (PI-3008) を10 mg/kgでマウスに7日に1回 (Q7D) 静脈内投与した。すべての研究は、プロトコルEB17-010の下でExplora Biolabs施設内動物管理使用委員会に従って実施した。マウスは、米国農務省の実験動物福祉法に準拠した実験動物の管理と使用に関するNIHガイドに概説されている条件下で飼育した。動物は、Lab Dietの齧歯動物用飼料及び水を自由に摂取できるようにした。安楽死を必要とし得る臨床的異常について、治験責任医師または獣医スタッフが、マウスを少なくとも週に2回監視した。ベースライン体重測定と比較して20%を超える正味の体重減少を示すマウスを安楽死させた。研究タイムラインの概略図を図15Aに示す。

10

【0660】

薬物動態 (PK) アッセイ

20

マウスMARCO PKアッセイを、マウス血清中の薬物抗体レベルの定量化に使用した。高結合96ウェルMSDプレートを2 µg/ml mMARCO (PI-RG-3016) でコーティングした。ブロッキング緩衝液 (PBST、5% BSA (PBS、0.01% Tween-20、BSA)) で1時間ブロッキングした後、標準曲線と希釈血清試料をプレートに加え、プレートシェーカーで2時間インキュベートした。試料と標準曲線の両方を、5%マウス血清の最終濃度に正規化した。プレートをDPBS++ (Gibco)、0.05% Tween-20、1% BSAで洗浄し、結合したMARCO抗体を、スルホタグ付き抗マウスIgG2a (Jackson Immuno) を使用して検出した。Read Bufferを添加し、MSDプレートの電極に電気を印加すると、スルホタグ付き抗体は電気化学発光シグナルを生成する。血清試料中の抗体レベルは、MSDソフトウェアに適合する4パラメーター曲線を使用して標準曲線から補間することによって定量化した。

30

【0661】

CT26 PD研究からの腫瘍、LN、及び脾臓のRNAseq及び経路分析

PDテイクダウンの第1の時点は、抗体のiv投与後4時間であった。各マウスから血液 (血清)、脾臓、腫瘍、及び腫瘍排出リンパ節を採取し、組織を液体窒素で瞬間凍結した。第2の時点は、抗体の第2の静脈内投与の4時間後であり、これは最初の静脈内投与の6日後に起こった。各マウスから血液 (血清)、脾臓、腫瘍、及び腫瘍排出リンパ節を採取し、組織を液体窒素で瞬間凍結した。スナップ凍結試料は、Biospec Beadbeaterを使用した緩衝液RLT+BM中の組織ホモジナイゼーションと、Qiagen All Prepキット及びBiospec Beadbeaterを使用したRNA抽出のためにMedgenome Inc. に発送した。mRNAの量と質を、NanodropとAgilent Bioanalyzerによって評価した後、ライブラリーの調製とRNAseq分析に進み、初期及び後期のPDタイムポイントでMARCOによって誘発された遺伝子発現の変化を特定した。FDR (<0.05) 及びcpm>2カットオフで差次的に発現する遺伝子 (上方制御及び下方制御) を生成し、GSEA経路解析を実行し、Cytoscape、KEGG、及びHallmarks解析を使用してプロットした。4時間でのPI-3008で処理された脾臓からの差次的に発現された遺伝子リストで観察されたIgV遺伝子は、ヒートマップを使用してプロットした。

40

【0662】

50

アフコシル化抗体アッセイ

mIgG2aマウスFcでアフコシル化したPI-3008を生成し、*in vivo*で試験した。フコシル化PI-3008抗体及びmIgG2aアイソタイプ抗体を対照として使用した。

【0663】

CT26腫瘍細胞（マウス当たり 1×10^6 細胞）を0日目に移植した。アフコシル化PI-3008抗体IV（10mg/kg；Q7dx3）の投与を、腫瘍の体積が平均約100mm³に達した時に開始した。

【0664】

エフェクターデッド抗体アッセイ

PI-3008のマウスIgG2a FcにN297A変異を操作して、エフェクターデッドmAb、PI-3021を生成した。PI-3008及びエフェクターデッドPI-3021は、CT26マウスモデルで単独で、及び抗PD-1抗体と組み合わせて試験した。Balb/c雌マウスを、0日目に同系CT26腫瘍細胞（マウス当たり 1×10^6 細胞）を皮下接種し、PI-3008（WT Fc；10mg/kg）、PI-3021（エフェクターデッド；10mg/kg）、抗PD-1（5mg/kg）、及び適切なアイソタイプ対照（10mg/kg）を単剤または併用して投与した。抗PD-1（N=10/群）による治療は、腫瘍体積が平均～100mm³に達した時に開始した。動物は、5日ごとに合計4回腹腔内投与された。腫瘍体積を経時的に監視し、群ごとの平均、研究終了時の個々の腫瘍体積、またはTGI%として提示した。

【0665】

結果

マウス抗MARCO抗体は、抗PD-1抗体と併用したCT26モデルで有意な抗腫瘍効果を示した。図12は、アイソタイプ抗体、PD-1抗体のみ、またはPI-3008とPD-1抗体、PI-3007とPD-1抗体、PI-3009とPD-1抗体、及びPI-3007とPD-1抗体で処置したマウス群における腫瘍体積を示す。PI-3006及びPD-1抗体は10%のがん寛解（CR）をもたらした。一方PD-1抗体と併用したPI-3007及びPI-3009は20%のCRをもたらした。PI-3008が最高のレスポンスとTGI全体を示した。図13A～Dは、アイソタイプ対照、抗PD-1、PI-3008+PD-1抗体、またはPI-3009+PD-1抗体で処置した後の個々のマウスにおける応答を示す。PI-3008（図13C）及びPI-3009（図13D）は、抗PD-1抗体と組み合わせて最良の抗腫瘍効力を示した。

【0666】

アフコシル化抗体アッセイ

PI-3008は、Fc強化変異体（PI-3008-Afu c）よりも優れた単剤（単剤療法）抗腫瘍活性を示した。アフコシル化PI-3008は、フコシル化PI-3008と比較して、はっきりした単剤療法を示さなかった（図13E、13F、及び13G）。理論に拘束されることを望むものではないが、このデータは、強化されたFc媒介関与が単剤療法には必要ないことを示唆している。

【0667】

エフェクターデッド抗体アッセイ

エフェクターデッドPI-3008（PI-3021）も、抗腫瘍効果の増加をもたらさなかった。抗PD-1と併用したPI-3008の抗腫瘍効力は、強力であり、PI-3021/抗PD-1の組み合わせよりも顕著であった（図13H）。CT26モデルでは、抗PD-1と併用したPI-3021は、PI-3008で観察されたのと同じレベルの抗腫瘍活性をもたらさなかった（図13H）。試験終了時、22日目に、PI-3008は抗PD-1単独と比較して腫瘍体積が有意に減少したが、PI-3021は統計的有意性に達しなかった（図13I）。さらに、併用療法で処置した個々のマウスでは、PI-3021と比較して、PI-3008の腫瘍増殖阻害率（TGI%）が高かった（図13J及び13K）。最後に、PI-3021で*in vitro*で処理されたマウスBM

DMは、4時間の処理後にPI-3008で見られるような炎症誘発性経路の活性化を示さなかった（データは示さず）。理論に拘束されることを望むものではないが、このデータは、フコシル化Fcを有するPI-3008が、抗PD-1耐性CT26マウスモデルにおける*in vivo*での所望の抗腫瘍活性のための最適なFcフォーマットであることを示唆している。しかし、PI-3021は、E0771抗PD1感受性モデルにおいてPI-3008と同等の抗腫瘍活性を示し（実施例11及び図38）、抗MARCO抗体活性は、Fcを介したシグナル伝達に加え、さらにMARCOに対する標的活性にも起因する可能性があることを示唆している。

【0668】

抗MARCO及びPD-1の併用治療もまた、CT26腫瘍攻撃後の長期の抗腫瘍免疫記憶をもたらした（図14）。抗MARCO抗体の第1の治療後に腫瘍がなくなったマウスに、CT26腫瘍細胞またはEMT6腫瘍細胞を再移植した。図14に示されるように、抗MARCO及び抗PD-1抗体で以前に処置されたマウスでは、再移植されたCT26腫瘍細胞の増殖は観察されなかった。

【0669】

1つの抗MARCO抗体であるPI-3008の薬力学（PD）及び抗腫瘍効果も、単剤単剤療法としてCT26結腸直腸腫瘍モデルで評価した（図15A～15C）。PI-3008抗MARCO抗体は、CT26モデルで有意な単剤療法を示した。図15Aは、PD研究のタイムラインを示す。図15Bは、アイソタイプ対照抗体と比較して、PI-3008での処置が1回目投与から6日後にマウス腫瘍サイズを減少させたことを示す。図15Cは、1回目及び2回目の投与後のマウスにおけるPI-3008抗体の定量化を示す。

【0670】

CT26腫瘍の分子プロファイリング分析も、PI-3008及びアイソタイプ抗体の1回目及び2回目の投与の4時間後に採取した試料で実施した。抗MARCO抗体は、複数の免疫経路を活性化した。投与1の後、アクチンを介した細胞収縮経路の遺伝子が上方制御され、経路FDR<0.1であった。2回目の投与の4時間後、キナーゼ活性化及び活性経路、Toll様受容体シグナル伝達経路、TLR4及び9経路、GTPase結合及び活性、及びRAS-Rhoシグナル伝達経路の遺伝子が上方制御された。1回目と2回目の両方の投与後、次の経路が上方制御された：体液性免疫応答、NK媒介性免疫、NK活性化、IL-2及びIL-12産生、細胞殺傷、エフェクタープロセスの調節、T細胞増殖、活性化、分化、走化性と遊走、細胞間接着、食作用、骨髄分化。

【0671】

*in vivo*でCT26腫瘍において抗MARCO抗体によって誘導されるKEGG経路を決定した。投与1の後、最も特異に上方制御された上位10の経路は次のとおりである：ナチュラルキラー細胞媒介性細胞傷害、T細胞受容体シグナル伝達経路、JAK/STATシグナル伝達経路、サイトカイン-サイトカイン受容体相互作用、IgA産生のための腸免疫ネットワーク、白血球経内皮移動、ケモカインシグナル伝達経路、造血細胞系統、II型糖尿病、及びFc-εRシグナル伝達経路。投与1の後、最も特異に下方制御された上位10の経路は次のとおりである：相同組換え、アルツハイマー病、RNAポリメラーゼ、アルギニン及びプロリン代謝、クエン酸回路（TCA回路）、ポルフィリン及びクロロフィル代謝、バリン、ロイシン、及びイソロイシンの分解、不飽和脂肪酸の生合成、N-グリカンの生合成、及びアミノアシルtRNAの生合成。

【0672】

投与2の後、CT26腫瘍で最も特異に上方制御された上位10の経路は次のとおりである：サイトカイン-サイトカイン受容体相互作用、ナチュラルキラー細胞媒介性細胞傷害、原発性免疫不全症、ケモカインシグナル伝達経路、造血細胞系譜、JAK/STATシグナル伝達経路、T細胞受容体シグナル伝達経路、IgA産生のための腸免疫ネットワーク、神経活性リガンド受容体相互作用、及びFc-εRシグナル伝達経路。投与2の後、最も特異に下方制御された上位10の経路は次のとおりである：、解糖糖新生、プ

ロパン酸代謝、プロテアソーム、クエン酸サイクルTCAサイクル、心筋収縮、アルツハイマー病、ハンチントン病、酸化的リン酸化、リボソーム、及びパーキンソン病。

【0673】

*in vivo*で腫瘍排出リンパ節において抗MARCO抗体によって誘導されるKEGG経路もまた決定した。投与1の後、最も特異に上方制御された上位10の経路は次のとおりである：ホスファチジルイノシトールシグナル伝達系、接着斑、イノシトールリン酸代謝、軸索ガイダンス、接着結合、がんにおける経路、アクチン細胞骨格の調節、プロゲステロン媒介卵母細胞成熟、ERBBシグナル伝達経路、及びWntシグナル伝達経路。投与1の後、最も特異に下方制御された上位10の経路は次のとおりである：アミノアシルトRNA生合成、リソソーム、ヒスチジン代謝、薬物代謝シトクロムp450、プロ

10

【0674】

投与2の後、腫瘍排出リンパ節で最も特異に上方制御された上位10の経路は次のとおりである：接着斑、ホスファチジルイノシトールシグナル伝達系、ニューロトロフィンシグナル伝達経路、インスリンシグナル伝達経路、イノシトールリン酸代謝、MAPKシグナル伝達経路、がんの経路、アクチン細胞骨格の調節、ERBBシグナル伝達経路、及び接着結合。投与2の後、最も特異に下方制御された上位10の経路は次のとおりである：シトクロムp450による生体異物の代謝、造血細胞系統、リソソーム、アルツハイマー病、プロテアソーム、サイトカイン-サイトカイン受容体相互作用、ハンチントン病、パーキンソン病、酸化的リン酸化、及びリボソーム。

20

【0675】

*in vivo*で脾臓において抗MARCO抗体によって誘導されるKEGG経路もまた決定した。投与1の後、上方制御された経路には：ECM受容体相互作用、接着斑、密着結合、接着結合、プロテアソーム、補体及び凝固カスケード、細胞接着分子及びCAM、がんにおける経路、不整脈性右心室心筋症ARVC、Wntシグナル伝達経路、アクチン骨格の調節、軸索誘導、ハンチントン病、病原性大腸菌感染症、アルツハイマー病、白血球経内皮遊走、サイトカイン-サイトカイン受容体相互作用、基底細胞癌、メラニン形成、ヘッジホッグシグナル伝達経路が含まれる。下方制御された経路には、細胞周期、アミノアシルトRNA生合成、ミスマッチ修復、グリコシルホスファチジルイノシトールGPIアンカー生合成、グリセロリン脂質代謝、及び相同組換えが含まれる。

30

【0676】

投与2の後、脾臓で上方制御された経路には：細胞周期、プロテアソーム、T細胞受容体シグナル伝達経路、DNA複製、ユビキチン媒介タンパク質分解、アクチン細胞骨格の調節、接着結合、病原性大腸菌感染、基底転写因子、ペントースリン酸経路、FcガンマR媒介食作用、ニューロトロフィンシグナル伝達経路、オートファジー調節、解糖糖新生、卵母細胞減数分裂、慢性骨髄性白血病、クエン酸回路TCAサイクル、Wntシグナル伝達経路、P53シグナル伝達経路、及びナチュラルキラー細胞媒介性細胞毒性が含まれる。下方制御された経路には、ABCトランスポーター、グリコシルホスファチジルイノシトールGPIアンカー生合成、RNAポリメラーゼ、リボソーム、アラキドン酸代謝、グリセロリン脂質代謝が含まれる。

40

【0677】

投与1及び投与2の後に、PI-3008で治療したCT26腫瘍で差次的に発現する遺伝子のより詳細な分析も実施した。Klrk1、Nrcl、Prf1などのNK細胞に関連する遺伝子；Cd40、Cd8α、Nod2、Tlr4、Tnf、Nlrp3、Cd274、Clec9α、Cd200r3などの炎症誘発性及び免疫活性化に関連する遺伝子；及びIl-27、Cxc19、Cxc110、Cxc112などの炎症誘発性サイトカインが上方制御された。図16Aは、PI-3008またはアイソタイプ対照抗体で処理した後のCT26腫瘍微小環境におけるKlrk1、Nrcl、Tlr4、Il-27、Cd8α、Cxc19、Cxc110、及びTnfの発現レベルを示す。いずれの場合

50

も、P I - 3 0 0 8 による治療により、遺伝子の発現が増加した。図 1 6 B は、P I - 3 0 0 8 での処置後の B M D M 及び C T 2 6 腫瘍において上方制御された遺伝子の比較を示す。

【 0 6 7 8 】

さらに、抗 M A R C O 抗体 3 0 0 8 は、1 回目の投与後に C T 2 6 脾臓の I G - V 遺伝子を上方制御した。C P M > 1 の 1 5 4 の注釈付き I G - V 遺伝子が知られている。1 5 4 の注釈付き I G - V 遺伝子はすべて P I - 3 0 0 8 処理で上方制御され、1 3 8 / 1 5 4 は F D R < 0 . 0 5 で差次的に発現した。したがって、N K 活性化などの自己抗原または腫瘍抗原を活性化するための抗 M A R C O 抗体治療により、脾臓の辺縁帯における形質細胞または活性化 B 細胞のポリクローナル増殖が発生している可能性がある。

10

【 0 6 7 9 】

実施例 5 : 追加的抗ヒト M A R C O 抗体の作製と特徴付け

材料及び方法

ヒト M A R C O の S R C R ドメインに結合する抗体を開発するためのさらなる抗体キャンペーンを実施した。

【 0 6 8 0 】

抗ヒト M A R C O 抗体を生成するための免疫

ラット抗ヒト M A R C O ハイブリドーマは、S i g m a A d j u v a n t S y s t e m (S A S) 中の組換え N 末端 h i s タグ付きヒト M A R C O タンパク質を単独で使用するか、H E K 2 9 3 細胞を発現するヒト M A R C O と交互に使用して、S p r a g u e D a w l e y ラットを免疫することによって生成した。組換え N 末端 h i s タグ付きヒト M A R C O タンパク質は、ヒト M A R C O の残基 1 4 7 ~ 5 2 0 を含んでいた。組換えヒト M A R C O タンパク質は、適切な折り畳みと三量体形成の品質管理であった。対照的に、実施例 2 に記載の失敗した抗ヒト M A R C O キャンペーンのために以前に使用されたヒト M A R C O タンパク質 (P i 1 1 4) は、C L D ドメインの残基 1 4 7 ~ 4 1 9 及び S R C R ドメインの残基 4 2 4 ~ 5 2 0 を含む改変 M A R C O E C D ドメインからなっていた。

20

【 0 6 8 1 】

ラットは、A n t i b o d y S o l u t i o n s (S a n t a C l a r a , C A) で後肢関節部を週 2 回免疫し、2 1 日目に血清力価を試験した。ハイブリドーマを生成するための電気融合のために、ヒト M A R C O に対する十分な血清抗体価を有するラットを選択した。リン酸緩衝生理食塩水 (P B S) で免疫物を採取する前に、- 3 日目と - 2 日目に 2 回の最終追加免疫を行った。

30

【 0 6 8 2 】

ハイブリドーマの生成とスクリーニング

ヒト M A R C O 抗体についてのハイブリドーマ生成及びスクリーニングアッセイを、実施例 3 に記載のように実施した。

【 0 6 8 3 】

細胞結合

ヒト M A R C O 抗体の細胞結合アッセイを、実施例 3 に記載のように実施した。

40

【 0 6 8 4 】

実施例 3

ハイブリドーマのサブクローニングと精製

ヒト M A R C O 抗体のハイブリドーマサブクローニング及び精製を、実施例 3 に記載のように実施した。

【 0 6 8 5 】

ハイブリドーマ抗体可変領域配列の生成

ヒト M A R C O 抗体のハイブリドーマ抗体可変領域配列を、実施例 3 に記載のように生成した。

【 0 6 8 6 】

50

キメラ及びヒト化抗体生成

キメラ抗体は、ラットIgG1またはIgG2a FcドメインをヒトIgG1またはIgG4ドメインで置換することによって作製した。

【0687】

ヒト化抗体もラット親ハイブリドーマから合成された。

【0688】

ラットハイブリドーマのVH及びVL配列を、NCBIウェブサイト(ncbi.nlm.nih.gov/igblast/; Ye, J. et al. Nucleic Acids Research 41:W34-W40 (2013))の既知のヒト生殖系列配列のライブラリーと比較した。使用されたデータベースは、NCBI IgBLASTプログラムで使用されるIMGTヒトVH遺伝子(F+ORF、273生殖系列配列)及びIMGTヒトVLカッパ遺伝子(F+ORF、74生殖系列配列)であった。アクセプターヒト生殖系列は、配列が親抗体に最も近いものから選択された。

【0689】

ヒト生殖細胞系IGHV1-46(対立遺伝子1)を、アクセプター配列として選択し、ヒト重鎖IGHJ4(対立遺伝子1)結合領域(J遺伝子)を、IMGT(登録商標)the international ImmunoGenetics information system(登録商標)www.imgt.org(創設者及びディレクター:Marie-Paule Lefranc、仏国モンペリエ)で編集されたヒト結合領域配列から選択した。

【0690】

ヒト生殖細胞系IGKV1-39(対立遺伝子1)を、アクセプター配列として選択し、ヒト軽鎖IGKJ2(対立遺伝子1)結合領域(J遺伝子)を、IMGT(登録商標)the international ImmunoGenetics information system(登録商標)www.imgt.org(創設者及びディレクター:Marie-Paule Lefranc、仏国モンペリエ)で編集されたヒト結合領域配列から選択した。HX-3061ラット親及びヒト化VH及びVL配列の配列アラインメントをそれぞれ、図17A及び17Bに示す。HX-3031ラット親及びヒト化VL配列の配列アラインメントを図18に示す。

【0691】

HX-3061ハイブリドーマに由来するヒト化抗体VH及びHX-3031ハイブリドーマに由来するVLにおいて追加の逆突然変異を行った。HX-3061 VHで行われた逆突然変異は、ヒトフレームワークVH配列に基づいて、V37I、V48I、及びS49Aであった。HX-3031 VLで行われた逆突然変異は、ヒトフレームワークVL配列に基づいて、A13T、A43P、S56D、F71Y、L78M、F83E、及びY87Fであった。

【0692】

CDRをAbM定義に従って定義した(CDR定義を比較する表については、www.bioinf.org.uk/abs/を参照のこと)。

【0693】

カルシウム依存ELISAアッセイ

カルシウム依存性ELISAアッセイは、実施例3に記載のように実施した。

【0694】

ProbeLife Gator装置を使用した反応速度とエピトープビニング

新たに生成された抗ヒトMARCO抗体の反応速度及びエピトープビニング分析を、実施例3に記載されるように実施した。

【0695】

マウス及びヒト組換えMARCOのLDL競合アッセイ

マウス及びヒト組み換えMARCOに対するLDL競合アッセイを、実施例3に記載されるように実施した。

10

20

30

40

50

【0696】

MARCO細菌競合アッセイ

ヒトまたはマウスのMARCOを発現する293T細胞を、親293T細胞とともに採取した。ストックをD-PBSで1000倍に希釈することにより、Zombie NIR生存率色素(BioLegend)を調製し、細胞に添加した。細胞を暗所で室温で10分間色素とともにインキュベートした。1mlの4× Staining buffer (Ca^{2+} を含むDBPS中の2% FBS)を加えて反応をクエンチし、続いて400×gで5分間、4℃で遠心分離した。次いで、細胞をV字型96ウェルプレートに100,000細胞の密度で播種した。A488蛍光標識細菌(InvitrogenのE. coli)を目的の抗ヒト抗体または抗マウス抗体とともに10μg/mlで添加し、37℃で30分間インキュベートした。次いで、プレートを2回洗浄し、フローサイトメーター(Attune NxT、Life Technologies)で取得するため100ulの染色緩衝液で再懸濁した。FlowJoソフトウェア(バージョン10.6.1)を使用してフローサイトメトリデータを分析し、Microsoft Excel及びGraphPad Prismソフトウェア(バージョン8)でデータを処理してさらに分析した。

10

【0697】

結果

ヒトMARCOへの結合に関するELISAスクリーニングによる抗ヒトMARCO抗体の一次スクリーニングの結果、304の候補が得られた。二次スクリーニング

20

【0698】

304の候補抗体が、精製されたヒトMARCOを使用した一次ELISAスクリーニングで同定された。ヒト、カニクイザル、及びマウスMARCOまたはGFP対照細胞を発現する293T細胞への結合の二次スクリーニングにより、138個の候補が得られた。SRCR対CLD結合の追加の二次スクリーニングもまたELISAを介して実行した。90個のSRCR結合抗体と47個のCLD結合抗体が同定された。次いで、候補抗体を、内因性細胞への結合、結合動力学、LDL競合、及びヒトMSR1への結合についてスクリーニングした。42個の候補抗体が同定され、37個のSRCR結合抗体及び5個のCLD結合抗体が同定された。これらのうち、11個の候補抗ヒトMARCO抗体が良好な結合特性で同定された。選択したヒトMARCO抗体の配列を配列表に示す。CDRは、AbM定義を使用して定義した。

30

【0699】

生成されたラットハイブリドーマ抗ヒトMARCO抗体の特性を表3に示す。

【0700】

40

50

【表 3】

表 3									
抗 huMAR CO mAb	アイソ タイプ	Bin	結合に Ca ²⁺ / Mg ²⁺ が必要	K _{on} (1/Ms)	K _{off} (1/s)	ヒト EC ₅₀ 293T (HuMARC O) (nM)	カニクイ ザル EC ₅₀ 293T (CyMAR CO) (nM)	EC ₅₀ LDL 競 合アッ セイ (nM)	MSR 1 結 合
PI-HX- 3011	ラット IgG2a	3	+	4.01E+ 05	9.14E -04	0.096	0.094	該当な し	-
PI-HX- 3023	ラット IgG2a	2	+/-	2.27E+ 05	4.75E -04	0.451	0.071	1.5	-
PI-HX- 3026	ラット IgG2a	2	+	2.42E+ 05	6.01E -04	0.23	0.162	1.3	-
PI-HX- 3028	ラット IgG2a	2	+/-	2.42E+ 05	4.79E -04	0.332	0.144	1.5	-
PI-HX- 3031	ラット IgG2a	3	+	4.43E+ 05	7.98E -04	0.141	0.046	該当な し	-
PI-HX- 3033	ラット IgG2a	2	+	2.70E+ 05	8.07E -04	0.272	0.067	該当な し	-
PI-HX- 3040	ラット IgG2a	3	+	2.41E+ 05	6.72E -04	0.229	0.107	2.9	-
PI-HX- 3041	ラット IgG2a	3	+	3.08E+ 05	7.96E -04	0.215	0.110	該当な し	-
PI-HX- 3043	ラット IgG2a	3	+	2.33E+ 05	8.49E -04	0.438	0.067	3.4	-
PI-HX- 3047	ラット IgG2a	1	-	4.84E+ 05	6.55E -04	0.326	0.100	該当な し	-
PI-HX- 3061	ラット IgG2a	4	-			0.49	0.45	8.2	-

【0701】

11 個の候補抗 MARCO 抗体のうちの 5 つを、CDR 配列分析に基づいてさらに開発するために選択した：PI-HX-3011、PI-HX-3031、PI-HX-3043、PI-HX-3061、及び PI-HX-3092。ヒトキメラ抗体は、ラット IgG2a Fc 領域をヒト IgG1 (PI-HX-3011 及び PI-HX-3043 の場合) または IgG1 及び IgG4 の両方 (PI-3031 及び PI-HX-3061 の場合) と交換することによって作成した。追加のキメラ抗体も、ラット IgG2a Fc 領域をマウス IgG2a (PI-HX-3036 及び PI-HX-3092 の場合) と交換することによって作成した。VH 及び VL フレームワークのさらなるヒト化は、PI-HX-3011、PI-HX-3031、及び PI-HX-3061 ラット親抗体に由来する抗体で実行した。

【0702】

表 4 は、選択されたラット親抗体、キメラ抗体、及び生成されたヒト化抗体の概要を提

供する。

【 0 7 0 3 】

【 表 4 】

表 4			配列番号
名称	改訂された 名前(該当す る場合)	説明	
PI-HX-3031		親ラットハイブリドーマ	1~10
PI-3010-AB	PI-3010	hIgG1 / キメラ PI-HX-3031	11~20
PI-3011-AB	PI-3010.11	ヒト化 PI-HX-3031 / 3031-1 hIgG1	21~30
PI-3012-AB	PI-3010.12	ヒト化 PI-HX-3031 / 3031-2 hIgG1	31~40
PI-3013-AB	PI-3010.13	ヒト化 PI-HX-3031 / 3031-3 hIgG1	41~50
PI-3014-AB	PI-3010.14	ヒト化 PI-HX-3031 / 3031-4 hIgG1	51~60
PI-3015-AB	PI-3010.15	ヒト化 PI-HX-3031 / 3031-5 hIgG1	61~70
PI-3020-AB	PI-3010.20	キメラ PI-HX-3031 - hIgG4	71~80
PI-3022-AB	PI-3010.22	ヒト化 PI-HX-3031 / 3031-2 hIgG1	81~90
PI-3023-AB	PI-3010.23	ヒト化 PI-HX-3031 / 3031-2 hIgG1	91~100
PI-3024-AB	PI-3010.24	ヒト化 PI-HX-3031 / 3031-2 hIgG1	101~110
PI-3025-AB	PI-3010.25	ヒト化 PI-HX-3031 / 3031-2 hIgG1	434~443
PI-3026-AB	PI-3010.26	ヒト化 PI-HX-3031 / 3031-2 hIgG1	121~130
PI-3027-AB	PI-3010.27	ヒト化 PI-HX-3031 / 3031-2 hIgG1	131~140
PI-3046-AB	PI-3010.46	ヒト化 PI-HX-3031 / 3031-2 hIgG4	474~483
PI-3048-AB	PI-3010.48	ヒト化 PI-HX-3031 / 3031-2 hIgG4	444~453
PI-HX-3061		親ラットハイブリドーマ	141~150
PI-3016-AB		ヒト化 PI-HX-3061 / 3061-1 hIgG1	151~160
PI-3017-AB		ヒト化 PI-HX-3061 / 3061-2 hIgG1	161~170
PI-3018-AB		ヒト化 PI-HX-3061 / 3061-3 hIgG1	171~180
PI-3019-AB		PI-HX-3061 mIgG2a キメラ	181~190
PI-3028-AB		PI-HX-3061 hIgG1 キメラ	191~200
PI-3029-AB		PI-HX-3061 hIgG4 キメラ	201~210
PI-3032-AB		ヒト化 PI-HX-3061 / 3061-2 hIgG1	211~220
PI-3033-AB		ヒト化 PI-HX-3061 / 3061-2 hIgG1	221~230

10

20

30

40

50

PI-HX-3011		親ラットハイブリドーマ	231~240
PI-3030-AB	PI-3030	HX3011-h1 キメラ hIgG1	241~250
PI-3036-AB	PI-3030.36	ヒト化 PI-HX-3011 / 3011-1 hIgG1	311~320
PI-3037-AB	PI-3030.37	ヒト化 PI-HX-3011 / 3011-2 hIgG1	321~330
PI-3038-AB	PI-3030.38	ヒト化 PI-HX-3011 / 3011-3 hIgG1	331~340
PI-3039-AB	PI-3030.39	ヒト化 PI-HX-3011 / 3011-4 hIgG1	341~350
PI-3040-AB	PI-3030.40	ヒト化 PI-HX-3011 / 3011-5 hIgG1	351~360
PI-3041-AB	PI-3030.41	ヒト化 PI-HX-3011 / 3011-5 hIgG1	454~463
PI-3047-AB	PI-3030.47	ヒト化 PI-HX-3011 / 3011-5 hIgG4	464~473
PI-HX-3043		親ラットハイブリドーマ	251~260
PI-3031-AB		HX3043-h1 キメラ hIgG1	261~270
PI-HX-3092		親ラットハイブリドーマ	361~370
PI-3035		HX3092 (A 変異) - mIgG2a	371~380

10

20

【 0 7 0 4 】

新しく生成されたラットハイブリドーマ抗ヒトMARCO抗体を、前述のように特徴付けした。ラット親抗体HX-3031及びHX-3061の特性を表5に示す。どちらの抗体もMSR1に結合しなかった。結合速度は、前述のように、huMARCO抗原を使用したマルチサイクル速度分析によって決定した。

【 0 7 0 5 】

【 表 5 】

30

表 5										
抗 huM ARCO mAb	Bin	結合に Ca ²⁺ / Mg ²⁺ が必要	EC ₅₀ (raIgG2a) ELISA (hu/SRCR /cyn)	K _D (M) Hu	K _D (M) Cyno	ヒト EC ₅₀ 293T (HuM ARCO) (nM)	カニク イザル EC ₅₀ 293T (CyMA RCO) (nM)	マウス EC ₅₀ 293T (MuM ARCO) (nM)	EC ₅₀ Bac 競合 アッセイ (nM)	EC ₅₀ LDL 競合 アッセイ (nM)
PI- HX- 3031	3	+	0.13/0.15/ 0.14	9.13E -11	1.09E -10	0.56	0.51	nb	0.18	6.2
PI- HX- 3061	4	-	0.24/0.24/ 0.23	2.56E -10	1.19E -10	0.49	0.45	1.52	0.52	8.2

40

【 0 7 0 6 】

50

1つの抗h u M A R C O抗体（P I - H X - 3 0 6 1）が、ヒト及びマウスM A R C Oと交差反応することが確認された。

【0707】

3つの抗体、2つの抗マウスM A R C O抗体、P I - 3 0 0 8及びP I - 3 0 0 9、及び交差反応性抗ヒトM A R C O抗体P I - H X - 3 0 6 1を、細菌結合アッセイでさらに特徴付けした。図19に示されるように、m u M A R C O 293T細胞をP I - 3 0 0 8、P I - 3 0 0 9、またはP I - H X - 3 0 6 1とそれぞれの濃度を増加させてインキュベーションすると、用量依存的に細菌結合が減少したが、アイソタイプ対照ラットI g G 1またはマウスI g G 2 aとのインキュベーションは細菌の細胞への結合に影響を及ぼさなかった。

10

【0708】

P I - 3 0 0 8、P I - 3 0 0 9、及びP I - H X - 3 0 6 1の物理的特性の比較を表6に示す。

【0709】

【表6】

表6								
抗 muMAR CO mAb	マ ウ ス Bin	結合に Ca ²⁺ /Mg ²⁺ +が必要	Biacore K _D (nM)	マウス EC ₅₀ 293T (muMAR CO) (nM)	EC ₅₀ Bac 競合 アッ セイ (nM)	MSR1 結合	BMDM への結 合	in vivo での TAM への結 合
PI-3008	2	あり	<0.02	1.097	1.81	-	+	+
PI-3009	4	あり	<0.02	未確定	3.84	-	+	+
PI-HX- 3061(交 差反応 性)	5	いいえ	<0.02	2.526	0.85	-	+	未確定

20

30

【0710】

組換えヒトM A R C Oに対する4 E D T A濃度の選択されたラットハイブリドーマ親抗体のE L I S Aスクリーニングは、さまざまな抗M A R C O抗体及び異なるエピトープを有するM A R C Oに結合するための二価カチオンへの異なる依存性を示した。結果を表7に示す。

40

【0711】

50

【表 7】

表 7					
	クローン ID	EDTA [濃度]			
		0	2mM	10mM	50mM
SRCR	PI-HX-3010	0.9525	0.8158	0.101	0.1055
	PI-HX-3011	1.1743	0.0636	0.0811	0.082
	PI-HX-3047	0.9688	1.2065	0.9205	0.9986
	PI-HX-3031	1.3709	0.0678	0.0589	0.0754
	PI-HX-3043	1.1971	0.0595	0.06	0.1002
CLD	PI-HX-3049	1.1909	1.1447	1.0708	1.1915
	PI-HX-3048	1.1987	1.2159	1.0695	1.2002

10

【0712】

選択されたヒトキメラ及びさらにヒト化された抗体を、種結合特異性、二価カチオン結合要件、SRCR及びCLDドメイン結合速度、及び細胞結合についても特徴付けした。

20

【0713】

図52に示されるように、いくつかの抗MARCO抗体のMARCOへの結合はカルシウム依存性であった。2mM EDTAの添加は、PI-3010.15、PI-3010.25、及びPI-3030.41のMARCOへの結合を無効にしたが、カルシウム非依存性mAbであるPI-3032の結合は影響を受けなかった。代理抗マウスMARCO mAb、PI-3008-ABもカルシウム依存的にマウスMARCOに結合した。2mM EDTAの添加は、結合を無効にしたが、カルシウム非依存性抗マウスMARCO mAb、PI-3000は影響を受けなかった。

【0714】

PI-3010(hIgG1)、PI-3030(hIgG1)、及びPI-3031(hIgG1)の特徴付け結果の要約を表8に示す。

30

【0715】

40

50

【表 8】

表 8									
抗 huMARC O mAb	特異 性	Ca ²⁺ 依 存 性 結 合	K _D (nM) ヒト	K _D (nM) カニク イザル	K _{off} (1/s) ProbeLife	EC ₅₀ (nM) OVX ヒ ト	EC ₅₀ (nM) OVXHuSRCR- マウス CLD	EC ₅₀ (nM) OVX カ ニクイ ザル	PBL へ の 結 合
PI-3010- AB(hIgG1)	hu/cy	あ り	0.43~0.64	0.26	2.34E-03	0.68	0.25	0.34	い い え
PI-3010- AB(hIgG1)	hu/cy	あ り	0.44	n.d.	3.51E-03	0.55	0.17	0.38	い い え
PI-3031- AB(hIgG1)	hu/cy	あ り	0.60	n.d.	2.81E-03	1.6	1.071	1.092	い い え

10

20

【0716】

PI-3031 (hIgG1) キメラ及びPI-3031 キメラに基づく2つのさらなるヒト化抗体の結果を表9に示す。

【0717】

30

40

50

【表 9】

表 9									
mAb	SRCR エピ ト プ	Ca ²⁺ 依 存 性	EC ₅₀ (ralgG2a) ELISA (hu/SRCR/cyn)	K _D (M; sc) ヒト	K _D (M; sc) カニク イザル	EC ₅₀ (nM) OVX ヒト	EC ₅₀ (nM) OVX カニク イザル	EC ₅₀ Bac (nM) 細胞 ベー ス	MSR1 結合
PI- 3031- chi (PI- 3010)	Bin3	あり	0.04/0.12/0.07	4.30E- 10	2.59E- 10	0.68	1.48	0.44	-
PI- 3031- h2 (PI- 3012)	Bin3	あり	0.08/0.27/0.07	1.1E-09	7.35E- 10	0.57	1.40	0.12	-
PI- 3031- h5 (PI- 3015)	Bin3	あり	0.08/0.25/0.09	9.11E- 10	6.11E- 10	0.86	1.73	0.50	-

【0718】

キメラ抗体PI-3010、PI-3030、及びPI-3031もPBL結合について評価した。図20Aに示されるように、キメラ抗体は、MARCOを過剰発現する293T細胞に結合したが、PBLに存在する免疫細胞には結合しなかった。好酸球結合は、hIgG1アイソタイプ対照を含む試験したすべての抗体で非特異的であった。PI-3010は左に、PI-3030は左中央に、PI-3031は右中央に、アイソタイプ対照hIgG1は右に示されている。子宮内膜癌（原発性ヒト腫瘍）由来の免疫細胞におけるPI-HX-3031の結合も評価した。図20Bに示されるように、抗体は、腫瘍試料由来のTAM及び単球に結合した。抗体結合は右のピーク、アイソタイプ対照の結合は左のピークである。

【0719】

実施例6：表面残基交換によるエピトープマッピング

材料及び方法

マウスMARCO SRCR結晶構造(PDB Entry 2OY3)を使用して、構築物を設計した。マウス及びヒトのMARCO SRCR配列を整列させ、タンパク質表面の異なる残基をクラスター内で互いに交換した。N末端hisタグ及びCLDドメインをSRCR配列に付加して組換えタンパク質を作製した。これらの研究で使用された組換えタンパク質の配列を以下に列挙する。太字で下線の付いた残基は、交換されたエピトープ残基である。

10

20

30

40

50

hMARCO(His-CLD-SRCR) (RG3033)

HHHHHHKGEQGAPGLQGHKGAMGMPGAPGPPGPPAEKGAKGAMGRDGAT
GPSGPQGPVGKGEAGLQGPQGAPGKQGATGTPGPQGEKGSKGDGGLIGPKGETGT
KGEKGDGLPGSKGDRGMKGDAGVMGPPGAQGSKGDFGRPGPPGLAGFPGAAGD
QQQPGLQGVPGPPGAVGHPGAKGEPGSAGSPGRAGLPSPGSPGATGLKGSKGDGTG
LQQQQGRKGESGVPGPAGVKGEQGSPLAGPKGAPGQAGQKGDQGVKGSSGEQGV
KGEKGERGENSVSVRIVGSSNRGRAEVYYSGTWGTICDDEWQNSDAIVFCRMLGYS
KGRALYKVGAGTGQIWLDNVQCRGTESTLWSCTKNSWGHHDCSHEEDAGVECSV*

10

hVar1 (RG3034)

HHHHHHKGEQGAPGLQGHKGAMGMPGAPGPPGPPAEKGAKGAMGRDGAT
GPSGPQGPVGKGEAGLQGPQGAPGKQGATGTPGPQGEKGSKGDGGLIGPKGETGT
KGEKGDGLPGSKGDRGMKGDAGVMGPPGAQGSKGDFGRPGPPGLAGFPGAAGD
QQQPGLQGVPGPPGAVGHPGAKGEPGSAGSPGRAGLPSPGSPGATGLKGSKGDGTG
LQQQQGRKGESGVPGPAGVKGEQGSPLAGPKGAPGQAGQKGDQGVKGSSGEQGV
KGEKGERGENSVSVRIVGSSNRGRAEVYYNNEWTICDDEWQNSDAIVFCRMLGYS
KGRALYKVGAGTGQIWLDNVQCRGTESTLWSCTKNSWGHHDCSHEEDAGVECSV*

20

hVar2 (RG3035)

HHHHHHKGEQGAPGLQGHKGAMGMPGAPGPPGPPAEKGAKGAMGRDGAT
GPSGPQGPVGKGEAGLQGPQGAPGKQGATGTPGPQGEKGSKGDGGLIGPKGETGT
KGEKGDGLPGSKGDRGMKGDAGVMGPPGAQGSKGDFGRPGPPGLAGFPGAAGD
QQQPGLQGVPGPPGAVGHPGAKGEPGSAGSPGRAGLPSPGSPGATGLKGSKGDGTG
LQQQQGRKGESGVPGPAGVKGEQGSPLAGPKGAPGQAGQKGDQGVKGSSGEQGV
KGEKGERGENSVSVRIVGSSNRGRAEVYYSGTWGTICDDDWDNNDDAIVFCRMLGYS
RGRALYKVGAGTGQIWLDNVQCRGTESTLWSCTKNSWGHHDCSHEEDAGVECSV*

30

hVar3 (RG3036)

HHHHHHKGEQGAPGLQGHKGAMGMPGAPGPPGPPAEKGAKGAMGRDGAT
GPSGPQGPVGKGEAGLQGPQGAPGKQGATGTPGPQGEKGSKGDGGLIGPKGETGT
KGEKGDGLPGSKGDRGMKGDAGVMGPPGAQGSKGDFGRPGPPGLAGFPGAAGD

40

50

QQQPGLQGVPPGAVGHPGAKGEPGSAGSPGRAGLPGSPGSPGATGLKGSKGGDTG
LQQQQGRKGESGVPPAGVKGEQGSPLAGPKGAPQAGQKGDQGVKGSSGEQGV
KGEKGERGENSVSVRIVGSSNRGRAEVYYS GTWGTICDDEWDNSDAIVFCRMLGYS
KGRALSSVGAGTGQIWL DNVQCRGTESTLWSCTKNSWGHHDCSHEEDAGVECSV*

hVar4 (RG3037)

HHHHHHKGEQGAPGLQGHKGAMGMPGAPPPGPPAEKGAKGAMGRDGAT
GPSGPQGGPVKGEAGLQGPQAGPKQGATGTPGPQGEKGSKGDGGLIGPKGETGT
KGEKGD LGLPGSKGDRGMKGDAGVMGPPGAQGSKGDFGRPGPPGLAGFP GAKGD
QQQPGLQGVPPGAVGHPGAKGEPGSAGSPGRAGLPGSPGSPGATGLKGSKGGDTG
LQQQQGRKGESGVPPAGVKGEQGSPLAGPKGAPQAGQKGDQGVKGSSGEQGV
KGEKGERGENSVSVRIVGSSNRGRAEVYYS GTWGTICDDEWQNSDAIVFCRMLGYS
KGRALYKVGAGTGQIWL DNVQCRGTENSLWDCSKN SWGHHDCSHEEDAGVECSV*

10

hVar5 (RG3038)

HHHHHHKGEQGAPGLQGHKGAMGMPGAPPPGPPAEKGAKGAMGRDGAT
GPSGPQGGPVKGEAGLQGPQAGPKQGATGTPGPQGEKGSKGDGGLIGPKGETGT
KGEKGD LGLPGSKGDRGMKGDAGVMGPPGAQGSKGDFGRPGPPGLAGFP GAKGD
QQQPGLQGVPPGAVGHPGAKGEPGSAGSPGRAGLPGSPGSPGATGLKGSKGGDTG
LQQQQGRKGESGVPPAGVKGEQGSPLAGPKGAPQAGQKGDQGVKGSSGEQGV
KGEKGERGENSVSVRIVGSSNRGRAEVYYS GTWGTICDDEWQNSDAIVFCRMLGYS
KGRALYKVGAGTGQIWL DNVQCRGTESTLWSCTKNSWGNHNCVHNEDAGVECSV
*

20

hVar6 (RG3039)

HHHHHHKGEQGAPGLQGHKGAMGMPGAPPPGPPAEKGAKGAMGRDGAT
GPSGPQGGPVKGEAGLQGPQAGPKQGATGTPGPQGEKGSKGDGGLIGPKGETGT
KGEKGD LGLPGSKGDRGMKGDAGVMGPPGAQGSKGDFGRPGPPGLAGFP GAKGD
QQQPGLQGVPPGAVGHPGAKGEPGSAGSPGRAGLPGSPGSPGATGLKGSKGGDTG
LQQQQGRKGESGVPPAGVKGEQGSPLAGPKGAPQAGQKGDQGVKGSSGEQGV
KGEKGERGENSVSVRIVGSSNRGRAEVYYS GTWGTICDDDWDNSDAIVFCRMLGYS
KGRALYKVGAGTGQIWL DNVNCRGTESTLWSCSKNSWGHHDCSHEEDAGVECSV*

30

hVar7 (RG3040)

HHHHHHKGEQGAPGLQGHKGAMGMPGAPPPGPPAEKGAKGAMGRDGAT
GPSGPQGGPVKGEAGLQGPQAGPKQGATGTPGPQGEKGSKGDGGLIGPKGETGT
KGEKGD LGLPGSKGDRGMKGDAGVMGPPGAQGSKGDFGRPGPPGLAGFP GAKGD
QQQPGLQGVPPGAVGHPGAKGEPGSAGSPGRAGLPGSPGSPGATGLKGSKGGDTG

40

LQQQQGRKGESGVPGPAGVKGEQSPGLAGPKGAPGQAGQKGDQGVKGSSGEQGV
KGEKGERGESFORVRIVGGTNRGRAEVYYSGTWGTICDDEWQNSDAIVFCRMLGY
SKGRALYKVGAGTGQIWLNDNVQCRGTESTLWSCSKNSWGHHCDSHEEDAGVECSV

*

mMARCO (RG3016)

HHHHHHHHGERGSPGPKGAPGAPGIPGLPGPAAEKGEKGAAGRDGTPGVQG
PQGPPGSKGEAGLQGLTGAPGKQGATGAPGRGEKGSKDIGLTGPKGEHGTKGDK
GDLGLPGNKGDMGMKGDTGPMGSPGAQGGKGDAGKPGLPGLAGSPGVKGDQGKP
GVQGVPGPQGAPGLSGAKGEPGRTGLPGPAGPPGIAGNPGIAGVKGSKGDTGIQGQK
GTKGESGVPGLVGRKGDTGSPGLAGPKGEPGRVGQKGDPMKGSSGQQGQKGEKG
QKGESFQVRIMGGTNRGRAEVYYNNEWGTICDDDWDNNDATVFCRMLGYSRGR
ALSSYGGGSGNIWLNDNVNCRGTENSLWDCSKNSWGNHNCVHNEDAGVECS

10

mVar1 (RG3026)

HHHHHHHHGERGSPGPKGAPGAPGIPGLPGPAAEKGEKGAAGRDGTPGVQG
PQGPPGSKGEAGLQGLTGAPGKQGATGAPGRGEKGSKDIGLTGPKGEHGTKGDK
GDLGLPGNKGDMGMKGDTGPMGSPGAQGGKGDAGKPGLPGLAGSPGVKGDQGKP
GVQGVPGPQGAPGLSGAKGEPGRTGLPGPAGPPGIAGNPGIAGVKGSKGDTGIQGQK
GTKGESGVPGLVGRKGDTGSPGLAGPKGEPGRVGQKGDPMKGSSGQQGQKGEKG
QKGESFQVRIMGGTNRGRAEVYYSGTWTICDDDWDNNDATVFCRMLGYSRGR
ALSSYGGGSGNIWLNDNVNCRGTENSLWDCSKNSWGNHNCVHNEDAGVECS*

20

mVar2 (RG3027)

HHHHHHHHGERGSPGPKGAPGAPGIPGLPGPAAEKGEKGAAGRDGTPGVQG
PQGPPGSKGEAGLQGLTGAPGKQGATGAPGRGEKGSKDIGLTGPKGEHGTKGDK
GDLGLPGNKGDMGMKGDTGPMGSPGAQGGKGDAGKPGLPGLAGSPGVKGDQGKP
GVQGVPGPQGAPGLSGAKGEPGRTGLPGPAGPPGIAGNPGIAGVKGSKGDTGIQGQK
GTKGESGVPGLVGRKGDTGSPGLAGPKGEPGRVGQKGDPMKGSSGQQGQKGEKG
QKGESFQVRIMGGTNRGRAEVYYNNEWGTICDDEWQNSDATVFCRMLGYSKGR
ALSSYGGGSGNIWLNDNVNCRGTENSLWDCSKNSWGNHNCVHNEDAGVECS*

30

mVar3 (RG3028)

HHHHHHHHGERGSPGPKGAPGAPGIPGLPGPAAEKGEKGAAGRDGTPGVQG
PQGPPGSKGEAGLQGLTGAPGKQGATGAPGRGEKGSKDIGLTGPKGEHGTKGDK
GDLGLPGNKGDMGMKGDTGPMGSPGAQGGKGDAGKPGLPGLAGSPGVKGDQGKP
GVQGVPGPQGAPGLSGAKGEPGRTGLPGPAGPPGIAGNPGIAGVKGSKGDTGIQGQK
GTKGESGVPGLVGRKGDTGSPGLAGPKGEPGRVGQKGDPMKGSSGQQGQKGEKG

40

50

QKGESFQVRIMGGTNRGRAEVYYNNEWGTICDDDWQNNDATVFCRMLGYSRGR
ALYKYGGGSGNIWLDNVNCRGTENSLWDCSKNSWGNHNCVHNEDAGVECS*

mVar4 (RG3029)

HHHHHHHHGERGSPGPKGAPGAPGIPGLPGPAAEKGEKGAAGRDGTPGVQG
PQGPPGSKGEAGLQGLTGAPGKQGATGAPGRGEKGSKGDIGLTGPKGEHGTKGDK
GDLGLPGNKGDMGMKGDTGPMGSPGAQGGKGDAGKPGLPGLAGSPGVKGDQGKP
GVQGVPGPQGAPGLSGAKGEPGRTGLPGPAGPPGIAGNPGIAGVKGSKGDTGIQGQK
GTKGESGVPGLVGRKGDGTGSPGLAGPKGEPGRVGQKGDPMKGSSGQQGQKGEKG
QKGESFQVRIMGGTNRGRAEVYYNNEWGTICDDDWNNDATVFCRMLGYSRGR
ALSSYGGGSGNIWLDNVNCRGTESTLWSCTKNWSGNHNCVHNEDAGVECS*

10

mVar5 (RG3030)

HHHHHHHHGERGSPGPKGAPGAPGIPGLPGPAAEKGEKGAAGRDGTPGVQG
PQGPPGSKGEAGLQGLTGAPGKQGATGAPGRGEKGSKGDIGLTGPKGEHGTKGDK
GDLGLPGNKGDMGMKGDTGPMGSPGAQGGKGDAGKPGLPGLAGSPGVKGDQGKP
GVQGVPGPQGAPGLSGAKGEPGRTGLPGPAGPPGIAGNPGIAGVKGSKGDTGIQGQK
GTKGESGVPGLVGRKGDGTGSPGLAGPKGEPGRVGQKGDPMKGSSGQQGQKGEKG
QKGESFQVRIMGGTNRGRAEVYYNNEWGTICDDDWNNDATVFCRMLGYSRGR
ALSSYGGGSGNIWLDNVNCRGTENSLWDCSKNSWGHHDCSHEEDAGVECS*

20

mVar6 (RG3031)

HHHHHHHHGERGSPGPKGAPGAPGIPGLPGPAAEKGEKGAAGRDGTPGVQG
PQGPPGSKGEAGLQGLTGAPGKQGATGAPGRGEKGSKGDIGLTGPKGEHGTKGDK
GDLGLPGNKGDMGMKGDTGPMGSPGAQGGKGDAGKPGLPGLAGSPGVKGDQGKP
GVQGVPGPQGAPGLSGAKGEPGRTGLPGPAGPPGIAGNPGIAGVKGSKGDTGIQGQK
GTKGESGVPGLVGRKGDGTGSPGLAGPKGEPGRVGQKGDPMKGSSGQQGQKGEKG
QKGESFQVRIMGGTNRGRAEVYYNNEWGTICDDEWQNNDATVFCRMLGYSRGR
ALSSYGGGSGNIWLDNVQCRGTENSLWDCTKNWSGNHNCVHNEDAGVECS*

30

mVar7 (RG3032)

HHHHHHHHGERGSPGPKGAPGAPGIPGLPGPAAEKGEKGAAGRDGTPGVQG
PQGPPGSKGEAGLQGLTGAPGKQGATGAPGRGEKGSKGDIGLTGPKGEHGTKGDK
GDLGLPGNKGDMGMKGDTGPMGSPGAQGGKGDAGKPGLPGLAGSPGVKGDQGKP
GVQGVPGPQGAPGLSGAKGEPGRTGLPGPAGPPGIAGNPGIAGVKGSKGDTGIQGQK
GTKGESGVPGLVGRKGDGTGSPGLAGPKGEPGRVGQKGDPMKGSSGQQGQKGEKG
QKGENSVSVVRIMGSSNRGRAEVYYNNEWGTICDDDWNNDATVFCRMLGYSRGRA
LSSYGGGSGNIWLDNVNCRGTENSLWDCSKNSWGNHNCVHNEDAGVECS*

40

【 0 7 2 0 】

野生型ヒト及びマウスSRCRドメインの配列比較、ならびに作製されたマウス及びヒト変異体配列を図21に示す。

【 0 7 2 1 】

ProbeLife Gator装置を使用した結合速度

ProbeLife Gator（商標）ラベルフリーシステムを使用して、マウス／ヒトSRCR抗原変異体に対するトッパの抗ヒト及び抗マウス抗体の結合を分析した。

【 0 7 2 2 】

反応速度アッセイでは、抗マウスFcまたは抗ヒトFcプローブのいずれかを使用して

50

抗M A R C O抗体をプローブに捕捉し、次に5段階の動態プロトコールを使用して、上記の異なる変異体抗原に対する抗体の親和性を測定し、プロトコールは以下の手順を含む：ベースライン、ローディング、ベースライン、会合、及び解離。P r o b e L i f eが提供するキネティクス緩衝液（K緩衝液）を使用してベースラインを60秒間確立した後、抗m F cまたは抗h F cプローブに200 nMの抗体をキャプチャーが飽和に達するまで120秒間ロードし、K緩衝液でのベースラインの測定をさらに60秒間実行し、続いて200 nM抗原（ヒトS R C R M A R C O変異体及びマウスS R C R M A R C O変異体）を使用した会合ステップを実行し、K緩衝液で5～10分間解離ステップを実行した。アッセイは、抗体と抗原の解離を最大化するために37℃で行った。

【0723】

ローディングに使用した抗体は、P I - 3 0 1 0、P I - 3 0 0 8、P I - 3 0 1 9、P I - 3 0 3 0、P I - 3 0 3 1、及びP I - 3 0 3 5であった。P I - 3 0 0 8、P I - 3 0 1 0、及びP I - 3 0 3 0はC a ²⁺依存性バインダーであり、P I - 3 0 1 9、及びP I - 3 0 3 5はC a ²⁺非依存性バインダーである。P I - 3 0 1 9及びP I - 3 0 3 5は、ヒト及びマウスのM A R C Oの両方に交差反応性を有する。

【0724】

結果

m M A R C OへのP I - 3 0 0 8の結合は、m V a r 2、m V a r 3、m V a r 4、m V a r 5、及びm V a r 6の変異によって最も影響を受けた（データは示さず）。ただし、m M A R C O S R C RへのP I - 3 0 0 8の結合はm V a r 6の変異の影響を最も受けたため、m V a r 6の変異された残基はm M A R C Oエピトープ（マウスM A R C OのD 4 5 0、D 4 5 2、N 4 8 7、S 4 9 9）の一部である可能性がある。m V a r 1とm V a r 7の変異は、P I - 3 0 0 8のm M A R C Oへの結合に最小限の悪影響を及ぼした。野生型（w t）m M A R C O S R C Rドメインとm V a r 6配列の配列比較を図22に示す。

【0725】

C a ²⁺非依存性結合を有する交差反応性抗体、P I - 3 0 1 9及びP I - 3 0 3 5を、マウス及びヒトM A R C O変異体の両方で試験した。P I - 3 0 1 9はh V a r 3（ヒトM A R C OのQ 4 5 2 D、Y 4 7 2 S、及びK 4 7 3 S）の変異によって最も悪影響を受け、P I - 3 0 3 5はh V a r 5及びh V a r 6によって悪影響を受けた（データは示さず）。P I - 3 0 1 9のm V a r 3とP I - 3 0 3 5のm V a r 3及びm V a r 5で、同様の結合の減少が見られた。野生型（w t）h M A R C O S R C Rドメインとh V a r 3、h V a r 5、及びh V a r 6配列の配列比較を図22に示す。太字で下線を引いたアミノ酸は、野生型のヒトまたはマウスのM A R C Oと比較して変異していた。

【0726】

ヒトのみ及びC a ²⁺依存性抗体P I - 3 0 1 0、P I - 3 0 3 0、及びP I - 3 0 3 1はすべて、h V a r 3との結合に有意な減少を示した（データは示さず）したがって、h V a r 3はP I - 3 0 1 0、P I - 3 0 3 0、P I - 3 0 3 1、及びP I - 3 0 1 9の結合に影響を与え、h V a r 5及びh V a r 6はP I - 3 0 3 5の結合に影響を与えた。

【0727】

抗体結合及びカチオン依存性の概要を表10に示す。

【0728】

10

20

30

40

50

【表 10】

表 10			
抗体	変異体減少結合	種の結合	Ca+依存性？
PI-3010 (HX-3031)	hVar3	ヒト／カニクイザル	+
PI-3030 (HX-3011)	hVar3	ヒト／カニクイザル	+
PI-3033 (HX-3043)	hVar3	ヒト／カニクイザル	+
PI-3019 (HX-3061)	hVar3	ヒト／カニクイザル ／マウス	- (非依存性)
PI-3035 (HX-3092)	hVar5、hVar6	ヒト／カニクイザル ／マウス	- (非依存性)
PI-3008	mVar6	マウス	+

10

【0729】

ELISAによって測定されたhVar3への種々のヒト抗体の結合を図23に示す。hIgG1及びmIgG2aを抗体対照として使用した。PI-3008とPI-300を、陰性対照として使用した。ヒトMARCOに対して単一の反応性を持つ抗体（PI-3010、PI-3020、PI-3030、PI-3031）はhVar3に結合せず、交差反応性のHX-3061ハイブリドーマ由来の抗体（PI-3028、PI-3029、PI-319）またはHX-3092（PI-3035）がhVar3に結合した。

20

【0730】

単一の反応性hMARCO抗体の結合エピトープとして、hVar3で同定された残基（Q452、Y472、及びK473）の重要性を確認するために、PI-3010を、変異体tQ452D、Y472S、及びK473S残基を有するhVar3、及び野生型MARCO、Q452、Y472、及びK473と同じ残基を持つmVar3の両方に結合させた。PI-3010の結合はhVar3では失われたが、mVar3では回復した（データには示さず）。これにより、残基Q452、Y472、及びK473の少なくとも1つ、いくつか、またはすべてが、HX-3011、HX-3043、HX-3031、及びHX-3061（例えば、PI-3010、PI-3020、PI-3030、PI-3031、PI-3019、及びPI-3033を含むがこれらに限定されない）に由来するヒトMARCOに対して生成された抗体のMARCOエピトープの一部である可能性が高いことが確認された。これらの残基は、MARCOのD447 D448 E511酸性クラスターの近くにもある。

30

【0731】

PI-3035の結合に影響を与えるhVar5で変異した残基は、H505、D507、S509、及びE511であった。PI-3035の結合に影響を与えるhVar6で変異した残基は、E450、Q452、Q487、及びT499であった。したがって、残基E450、Q452、Q487、T499、H505、D507、S509、及びE511の少なくとも1つ、いくつか、またはすべては、HX-3092由来の抗体に対する別の結合エピトープを表す可能性が高い（例えば、PI-3035を含むがこれに限定されない）。

40

【0732】

マウス及びヒト抗体は、SRCRドメインに重複するエピトープを有し、1つの重複する残基、ヒトSRCRについてはQ452、マウスSRCRについてはD452が図24に示されている。重複する残基は、左側のマウスSRCRドメインと右側のヒトSRCRドメインの両方で丸で囲まれている。

50

【0733】

実施例7：非ヒト霊長類の薬物動態研究

ヒト化薬物候補の薬物曝露と安全性を評価するために、探索的単回投与非ヒト霊長類（NHP）PK及び忍容性研究における、PI-3025-AB2（IgG1フォーマット）及びPI-3048-AB（IgG4フォーマット）抗体濃度を定量化するために、総及び遊離（リガンド結合）の2つの薬物動態（PK）アッセイを開発した。単回投与試験は、PI-3025-AB2（IgG1）及びPI-3048-AB（IgG4）を10 mg/kgで投与した4匹の動物（1群当たり雄1匹及び雌1匹）から構成された。表11に研究デザインを示す。

【0734】

【表11】

表 11						
群	試験材料	用量レベル (mg/kg)	用量体積 (ml/kg)	用量濃度 (mg/ml)	動物数	
					雄：	雌：
1	対照物品	0	2	0	1	1
2	PI-3025-AB2	10	2	5	1	1
3	PI-3048-AB	10	2	5	1	1

【0735】

リガンド結合アッセイ

標準のMSDプレート（Meso Scale Discovery、カタログ番号L15XA-3）を組換えヒトMARCOタンパク質1 µg/mLでコーティングした。プレートを室温にて60分間インキュベートした後、洗浄した。次いで、プレートを5%ウシ血清アルブミン（BSA）で室温で60分間ブロックした。

【0736】

PI-3025-AB2及びPI-3048-ABタンパク質標準と品質管理試料、及び動物試料を緩衝液（PBS/0.5%BSA/0.05%Tween+Ca²⁺/Mg²⁺）で希釈し、塩緩衝液でコーティングしたプレートに加えた。プレートを室温で60分間インキュベートし、洗浄した。0.5 µg/mLの検出抗体、抗ヒトIgG CH2（Thermo Fisher、カタログ番号MA5-16929）を添加し、プレートを室温で60分間インキュベートした。プレートを洗浄し、1× Read Buffer（Meso Scale Discovery、カタログ番号R92TC-1）をMSDプレートに加えた。プレートをMSD Sector Imagerで読み取った。

【0737】

トータルPKアッセイフォーマット

ストレプトアビジンMSDプレート（Meso Scale Discovery、カタログ番号L15SA-1）をビオチン化抗ヒトκ抗体（Invitrogen、カタログ番号SA1-19155）1 µg/mLでコーティングした。プレートを室温にて60分間インキュベートした後、洗浄した。PI-3025-AB2及びPI-3048-ABタンパク質標準と品質管理試料、及び動物試料を緩衝液（PBS/0.5%BSA/0.05%Tween+Ca²⁺/Mg²⁺）で希釈し、塩緩衝液でコーティングしたプレートに加えた。プレートを室温で60分間インキュベートし、洗浄した。0.5 µg/mLの検出抗体、抗ヒトIgG CH2（Thermo Fisher、カタログ番号MA5-16929）を添加し、プレートを室温で60分間インキュベートした。プレートを洗浄し、1× Read Buffer（Meso Scale Discovery、カタログ番号R92TC-1）をMSDプレートに加えた。プレートをMSD Sector Imagerで読み取った。

【 0 7 3 8 】

結果

単回投与試験では、P I - 3 0 2 5 及び P I - 3 0 4 8 抗体が許容可能な P K を持ち、忍容性が良好であることが実証された。総アッセイと遊離アッセイの両方のフォーマットで、各抗体について同様の薬物濃度を測定した。

【 0 7 3 9 】

P I - 3 0 2 5 - A B 2 の P K 検量線を図 2 5 A 及び表 1 2 に示す。

【 0 7 4 0 】

【表 1 2 】

10

表 12						
	LBA アッセイフォーマット			トータルアッセイフォーマット		
公称濃度 ng/ml	検出された 平均濃度 (ng/ml)	計算平均 濃度 CV	回収 平均%	検出された 平均濃度 (ng/ml)	計算平均 濃度 CV	回収 平均%
240	233	5	94	280	10	116
100	109	5	106	120	3	120
50	46	5	96	56	0	111
10	9	5	89	10	5	100
5	4	3	77	5	6	91

20

【 0 7 4 1 】

P I - 3 0 4 8 - A B の P K 検量線を図 2 5 B 及び表 1 3 に示す。

【 0 7 4 2 】

【表 1 3 】

30

表 13						
	LBA アッセイフォーマット			トータルアッセイフォーマット		
公称濃度 ng/ml	検出された 平均濃度 (ng/ml)	計算平均 濃度 CV	回収 平均%	検出された 平均濃度 (ng/ml)	計算平均 濃度 CV	回収 平均%
240	217	4.1	88	295	0	123
100	98	0.8	97	88	21	88
50	47	2.2	94	58	9	116
10	10	1.8	99	10	16	104
5	4	2.4	85	6	3	129

40

【 0 7 4 3 】

P K アッセイを、探索的 N H P 研究で薬物濃度を測定するために首尾よく開発した。P K アッセイの範囲は 1 . 8 5 n g / m L ~ 3 0 0 n g / m L (アッセイ中) で、最小必要希釈 (M R D) は 2 0 であった。L L O Q は 1 . 8 5 n g / m L 、U L O Q は 2 4 0 n g / m L であった。品質管理 (Q C) は、5 n g / m L ~ 2 4 0 n g / m L の範囲であった。

【 0 7 4 4 】

50

*in vivo*リガンド結合PKアッセイの結果を図26Aに示す。PI-3025-AB2は、リガンド結合アッセイにおいて、21日目（504時間）以降、検出可能な薬物レベルを示さなかった（図26A）。PI-3048-ABは、リガンド結合アッセイにおいて28日目（672時間）まで検出された（図26A）。*in vivo*総PKアッセイの結果を図26Bに示す。PI-3025-AB2は、21日目（504時間）及び28日目（672時間）まで検出された（図26B）。PI-3048-ABは28日目（672時間）まで検出された（図26B）。PI-3048-ABを投与した動物は、PI-3025-AB2を投与した動物よりもわずかに良好な曝露を示した。

【0745】

PI-3025-AB2とPI-3048-ABのPKの結果は、総アッセイと遊離アッセイの両方を使用して同等であった。PI-3025-AB2及びPI-3048-AB抗体は、単回投与試験後、許容可能な忍容性及び良好な曝露を示した。

【0746】

実施例8：抗ヒトMARCO抗体の追加の特徴付け

材料及び方法

抗MARCO抗体細胞結合、SPR結合動力学（ K_D ）、及びマクロファージ結合を、実施例2及び5で前述したように実施した。

【0747】

リガンド結合ブロックアッセイ

ヒトMARCOを発現する293T細胞を、親293T細胞とともに採取した。ストックをD-PBSで1000倍に希釈して調製したZombie NIR生存色素（BioLegend）を細胞に添加し、暗所で室温で10分間インキュベートした。1mの4×Staining buffer（ Ca^{2+} を含むDBPS中の2%FBS）を加えて反応をクエンチし、その後、4℃、400×gで5分間遠心分離した。次いで、細胞をV字型96ウェルプレートに100,000細胞の密度で播種した。A488蛍光標識細菌（InvitrogenのE. coli）を目的の抗ヒトMARCO抗体とともに10µg/mlで添加し、37℃で30分間インキュベートした。次いで、プレートを2回洗浄し、フローサイトメーター（Attune NxT、Life Technologies）で取得するため100µlの染色緩衝液で再懸濁した。FlowJoソフトウェア（バージョン10.6.1）を使用してフローサイトメトリデータを分析し、Microsoft Excel及びGraphPad Prismソフトウェア（バージョン8）でデータを処理してさらに分析した。

【0748】

T細胞結合アッセイ

ATCCから入手したJurkat T細胞を使用した標準的なフロー結合アッセイを実施した。100,000細胞/ウェルのJurkat T細胞を染色のためにU底96ウェルプレートに播種し、すべての遠心分離ステップを1500rpm、4℃で5分間行い、プロトコル全体を通して試料を光から保護した。細胞をペレット化し、D-PBSでZombie NIRジメチルスルホキシド（DMSO）ストックを1000倍に希釈して調製したZombie NIR生存色素（BioLegend）100µlに再懸濁した。暗所で室温（RT）で10分間インキュベートすることにより細胞を染色し、続いて10%FBSを含む通常の培地を添加して染色反応をクエンチした。細胞をペレット化し、100µlのさまざまな抗ヒトMARCO抗体と対応するhIgG1及びhIgG4アイソタイプ対照を新たに調製した染色培地（ Ca^{2+} を含むDBPS中2%FBS）に再懸濁した。すべてのmAbは100nM（15µg/ml）の最終最高濃度で試験し、続いて0mg/ml対照を含む8ポイントの3倍連続希釈で行った。染色は氷上で1時間（時）実施し、続いて染色培地で2回洗浄した。次に、細胞をペレット化し、アロフィコシアニン（APC）コンジュゲートヤギ抗マウスIgG（Fc特異的）二次抗体100µlに再懸濁し、染色培地で抗体ストックを500倍希釈して調製し、氷上で30分間インキュベートした。次に、プレートを染色培地で2回洗浄し、続いてフローサイトメーター

10

20

30

40

50

(Attune NxT、Life Technologies)で取得するために150 μ Lの同じ緩衝液に再懸濁した。FlowJoソフトウェア(バージョン10.6.1)を使用してフローサイトメトリーデータを分析し、Microsoft Excel及びGraphPad Prismソフトウェア(バージョン8)でデータを処理してさらに分析した。最大有効濃度の半分(EC50)を、幾何平均蛍光強度(gMFI)に基づいて計算した。

【0749】

動的光散乱(DLS)を使用したmAbの熱安定性評価

動的光散乱は、溶液または懸濁液中の粒子のブラウン運動を利用して、粒子のサイズを測定する。変動率は、散乱粒子の拡散率に直接対応する。粒子が大きいほど拡散が遅くなり、光学的ゆらぎが遅くなり、粒子が小さいほど拡散が速くなり、光学的ゆらぎが速くなる。粒子の拡散係数は、生の光信号の自己相関分析と結果の自己相関関数のフィッティングから決定することができる。次に、ストークス・アインシュタインの式を使用して、拡散係数から粒子サイズを決定する。

10

【0750】

DLS測定は、DynaproプレートリーダーIII(Wyatt Technology)を使用して行った。評価する抗体を1×PBS(Gibcoカタログ番号14190-144)で希釈し、0.02 μ mフィルターで濾過して粒子状物質と大きな凝集物を除去し、最終濃度を1~2 mg/mLにした。25マイクロリットルの抗体溶液を384ウェルプレート(Auroraカタログ番号ABA210100A)のウェルに添加し、続いて5 μ Lのシリコンオイル(Alfa Aesarカタログ番号A12728)を添加した。プレートを覆い、1000×gで1分間遠心分離して、気泡を確実に除去した。次に、プレートをDLS機器にロードし、デフォルトの機器設定とともに次のセトアップを使用してデータを収集した。

20

【0751】

初期温度を25℃に設定し、その後、レーザー強度の自動減衰を有効にして、温度を1℃/分で85℃まで着実に上昇させた。拡散係数及び流体力学的半径を決定するために、各ウェルについて連続測定を行った。凝集の開始温度(Tag g)値を、統合されたDynamics 7.1ソフトウェアを使用して取得した。このソフトウェアは、温度の変化に対応する半径の変化を分析し、流体力学的半径の増加に対応する温度をTag gとして識別する。

30

【0752】

示差走査蛍光測定法(DSF)を使用したmAbの熱安定性評価

DSFは、QuantStudio 5リアルタイムPCR機器(Life Technologies)を使用し、製造元のプロトコルに従って、タンパク質の熱シフトProtein Thermal Shift(商標)Dye Kit(Life Technologiesカタログ番号4461146)を使用して実行した。MicroAmp 384ウェルプレート(Thermo Fisherカタログ番号AB1384/W)をウェル当たり20 μ Lの試料で使用した。モノクローナル抗体をそれぞれの製剤緩衝液で1 mg/mLの濃度に希釈し、試料を次のように調製した：5 μ LのProtein Thermal Shift(商標)緩衝液、12.5 μ Lの抗体(1 mg/mL)または緩衝液(陰性対照)、及び2.5 μ LのDiluted Protein Thermal Shift(商標)Dye(8×)を一緒に加えて、各反応の総量を20.0 μ Lにした。SYPRO Orangeは、反応混合物に添加する前に、提供されたサーマルシフト緩衝液で1000倍濃縮ストック溶液から作業用色素溶液まで125倍に希釈した。漂白を防ぐために、実験の直前にSYPRO Orangeの作業溶液を反応混合物に加えた。各試料を4連で測定した。熱変性は、温度を25℃~95℃まで毎秒0.017℃の速度で上昇させることによって実行した。蛍光強度(490 nmでの励起及び600~630 nmでのROXフィルターを使用した発光)を0.07℃間隔で収集し、Protein Thermal Shift Software(Life Technolo

40

50

gies) で分析し、一次微分法を使用して T_m を計算した。この方法では、 T_m は D S F 融解曲線の一次導関数の最大値に対応する温度である。

【0753】

ヒト解離腫瘍細胞 (D T C) における免疫経路の活性化

4 人の N S C L C 患者からの解離腫瘍細胞 (D T C) を D L S から購入し、メーカーの推奨に従って解凍した。細胞を計数し、抗 a n o t を含むが血清は含まない、E x v i v o 培地中の 3 つのウェルに、24 ウェル当たり約 2 百万細胞でプレーティングした。5 μ g / m l の R & D、R D M 5 及び R D M 9、P I - 3 0 3 0、ならびに h I g G 1 (超 L E A F) を、1 m l の培地を含む各ウェルに添加した。37 °C で 4 時間後、細胞を 15 m l 標準チューブに集め、400 × g で 5 分間、4 °C で遠心分離した。各ペレットを、B -メルカプトエタノールを含む R L T 緩衝液 600 μ l に再懸濁した (1 : 100 希釈)。

10

【0754】

Q i a g e n R N e a s y M i n i キット及び対照処理ヒトを使用して、上記の D T C 試料から全 RNA を単離し、ハイスループット RNA 配列決定に供した。ライブラリーは、I l l u m i n a の T r u S e q S t r a n d e d m R N A キットを使用して調製し、I l l u m i n a N o v a s e q 6000 で配列決定した。その後のデータをヒトゲノム (G R C h 38 . p 12) にアラインし、S T A R アライナーを使用して遺伝子ごとの発現値を表にした。得られた発現マトリックスを、D E S e q 2 を使用した発現差解析の入力として使用した。すべてのタンパク質コード遺伝子の P I - 3 0 1 0 対対照比較から得られた倍数変化は、B r o a d I n s t i t u t e (<https://www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp>) から入手可能な p r e R a n k e d 試験を使用して、G e n e S e t E n r i c h m e n t A n a l y s i s (G S E A) ソフトウェアに提出した。M S i g D B の H a l l m a r k 経路を評価し、結果の正規化された濃縮スコアが R の g g p l o t 2 を使用してプロットした。F D R 値は、標準パラメーターを使用して G S E A 内に埋め込まれた順列試験によって決定した。

20

【0755】

ヒト抑制性マクロファージ (M 2 c) における炎症誘発性シグネチャー

ネガティブ免疫磁気選択 (S t e m C e l l T e c h n o l o g i e s) を使用して末梢血単核細胞から分離した 4 つの凍結ヒト末梢血 C D 14 + 単球を解凍し、10 % (v / v) 熱不活化 F B S (H y C l o n e)、1 m M ピルビン酸ナトリウム、非必須アミノ酸、2 m M L - グルタミン、55 μ M β -メルカプトエタノール及び抗真菌抗生物質 (すべて G i b c o から) を添加した R P M I 1640 培地で培養した。単球は、24 個のウェルプレート中、ウェル当たり 500,000 細胞の密度で 50 n g / m l のヒトマクロファージコロニー刺激因子 (M - C S F) (P e p r o T e c h) の存在下で完全 R P M I 1640 培地で培養することによりマクロファージに分化した。分化の 3 日目に、新鮮な M - C S F を添加して培地を補充した。分化したヒトマクロファージを、次のサイトカインを培地に 37 °C で 24 時間添加することによって分極した：M 0 (サイトカイン添加なし) 及び 25 n g / m l の組換えヒト I L - 10 (M 2 c o n d i t i o n) を 24 時間、37 °C にて。7 日目に培地を吸引し、細胞を穏やかに洗浄した。5 μ g / m l の P I - 3 0 1 0 . 15、P I - 3 0 3 0 . 41、及び h I g G 1 (B i o l e g e n d の U l t r a - L E A F) を含む新鮮な完全 R P M I 1640 培地マクロファージ培地を、上記の 2 つの条件の各ウェルに加えた。4 時間後、培地を吸引し、細胞を β -メルカプトエタノールを含む R L T 緩衝液に溶解した (1 : 100 希釈)。

30

40

【0756】

Q i a g e n R N e a s y M i n i キットを使用して、I L - 10 分極 h M D M から全 RNA を単離し、ハイスループット RNA 配列決定に供した。ライブラリーは、I l l u m i n a の T r u S e q S t r a n d e d m R N A キットを使用して調製し、I l l u m i n a N o v a s e q 6000 で配列決定した。その後のデータをヒトゲノ

50

ム (G R C h 3 8 . p 1 2) にアラインし、S T A R アライナーを使用してすべての M D M について遺伝子ごとの発現値を表にした。得られた発現マトリックスを、D E S e q 2 を使用した発現差解析の入力として使用した。すべてのタンパク質コード遺伝子の P I - 3 0 1 0 . 1 5 対対照比較から得られた倍数変化は、B r o a d I n s t i t u t e (www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp) から入手可能な p r e R a n k e d 試験を使用して、G e n e S e t E n r i c h m e n t A n a l y s i s (G S E A) ソフトウェアに提出した。M S i g D B の H a l l m a r k 経路を評価し、結果の正規化された濃縮スコアが R の g g p l o t 2 を使用してプロットした。F D R 値は、標準パラメーターを使用して G S E A 内に埋め込まれた順列試験によって決定した。

10

【0757】

特徴的な経路：P I - 3 0 0 8 処理 B M D M 対 P I - 3 0 0 8 処理 C T 2 6 腫瘍

4 匹の雌 B A L B / c マウスの個々の大腿骨と脛骨を洗浄し、10% (v/v) ウシ胎児血清 (F B S) (H y C l o n e) と抗生物質抗真菌溶液 (G i b c o) を添加した I s c o v e 改変ダルベッコ培地で構成されるマクロファージ培地で、乳鉢と乳棒を使用して粉碎した。次いで、試料を 40 μ m フィルターに通し、培養液で洗浄し、室温で 5 分間、400 $\times$ g でペレット化した。細胞ペレットを 5 ml の B D P h a r m L y s e 緩衝液 (B D B i o s c i e n c e s) に再懸濁し、赤血球溶解を室温で 5 分間行い、続いて 10 体積のマクロファージでクエンチした。細胞を室温で 5 分間、400 $\times$ g でペレット化し、24 ウェルプレートのウェル当たり 500,000 細胞の密度でマクロファージ培地に再懸濁した。これらの骨髓単核細胞を 25 ng/ml のマウスマクロファージコロニー刺激因子 (M - C S F) (P e p r o T e c h) で 6 日間刺激して M 0 - マクロファージを生成し、培地を L P S (1 ng/ml) 及びマウス I L - 1 0 をそれぞれ 20 ng/ml、37 $^{\circ}$ C で 24 時間補充することによって M 1 様及び M 2 様マクロファージに分極した。

20

【0758】

7 日目に培地を吸引し、細胞をマクロファージ培地で穏やかに洗浄した。5 μ g/ml の P I - 3 0 0 8 またはその m I g G 2 a アイソタイプ対照を含む新鮮な培地を、M 0、M 1、及び M 2 の 3 つの条件から各ウェルに加えた。4 時間後、培地を吸引し、細胞を B - m e l c a p t o e t a n o l を含む R L T 緩衝液に溶解した (1:100 希釈)。

30

【0759】

Q i a g e n R N e a s y M i n i k i t 及び C T 2 6 腫瘍 (図 1 2 C ~ 1 2 H について前述) を使用してこれらの B M D M から全 R N A を単離し、ハイスループット R N A 配列決定に供した。ライブラリーは、I l l u m i n a の T r u S e q S t r a n d e d m R N A キットを使用して調製し、I l l u m i n a N o v a s e q 6 0 0 0 で配列決定した。その後のデータをマウスゲノム (G R C m 3 8 . p 6) にアラインメントし、S T A R アライナーを使用して、すべての B M D M 試料と C T 2 6 試料の遺伝子ごとの発現値をそれぞれ表にした。得られた発現マトリックスを、D E S e q 2 を使用した発現差解析の入力として使用した。すべてのタンパク質コード遺伝子の P I 3 0 0 8 対対照比較 (B M D M 及び C T 2 6 サブセットの両方から) から得られた倍数変化は、B r o a d I n s t i t u t e (www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp) から入手可能な p r e R a n k e d 試験を使用して、G e n e S e t E n r i c h m e n t A n a l y s i s (G S E A) ソフトウェアに提出した。M S i g D B の H a l l m a r k 経路は、B M D M と C T 2 6 の両方の比較について評価し、結果の正規化された濃縮スコアは、R の g g p l o t 2 を使用してプロットした。

40

【0760】

サイトカイン q P C R アッセイ

ネガティブ免疫磁気選択 (S t e m C e l l T e c h n o l o g i e s) を使用して末梢血単核細胞から分離された凍結ヒト末梢血 C D 1 4 + 単球を解凍し、10% (v/v) 熱不活化 F B S (H y C l o n e)、1 mM ピルビン酸ナトリウム、非必須アミノ酸、

50

2 mM L-グルタミン、55 μ M β -メルカプトエタノール及び抗真菌抗生物質（すべて Gibco から）を補充した RPMI 1640 培地で培養した。単球は、24 個のウェルプレート中、ウェル当たり 500,000 細胞の密度で 50 ng/ml のヒトマクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）（PeproTech）の存在下で完全 RPMI 1640 培地で培養することによりマクロファージに分化した。分化の3日目に、新鮮な M-CSF を添加して培地を補充した。分化したヒトマクロファージは、25 ng/ml の組換えヒト IL-10（M2 条件）を 37 °C で 24 時間添加することにより、6 日目に分極された。7 日目に、培地を吸引し、細胞を穏やかに洗浄した。5 μ g/ml の PI-3010.15（PI-3015）、PI-3010.25（PI-3025）、PI-3030.41（PI-3041）、または hIgG1 アイソタイプ対照（Biolegend の Ultra-LEAF）を含む新鮮な完全 RPMI 1640 マクロファージ培地及び 5 μ g/ml の PI-3010.46（PI-3046）、PI-3030.47（PI-3047）、PI-3010.48（PI-3048）、または hIgG4 アイソタイプ対照（Biolegend の Ultra-LEAF）を対応するウェルに加えた。4 時間後、Luminex サイトカイン分泌のために培地を 96 ウェルプレートに回収し、細胞を β -メルカプトエタノールを含む RLT 緩衝液で溶解した（1:100 希釈）。Qiagen RNeasy Mini キットを使用して IL-10 分極 hMDM から全 RNA を単離し、高容量 cDNA 逆転写キット（Applied Biosystems）を使用して 250 ng の RNA を一本鎖 DNA にした。qPCR は、5 μ l の SYBR グリーンミックスと、IL-6、IL-1b、IL10、TNFa、CXCL10、IL18、CCL20、CCL24、IL1A に特異的なプライマーを使用して実行した。試験された内因性ハウスキーピングプライマーは、GAPDH 及び RPL37A であった。プレートは、Thermo Fisher の QuantStudio 5 qPCR マシンで実行された。

10

20

30

40

50

【0761】

このサイトカイン発現 qPCR アッセイは、複数の hMDM ドナーで繰り返され、hIgG1 リード抗体の濃度を hIgG1 アイソタイプ（PI-0003）と比較して 1 μ g/ml になるようにダウン滴定してさまざまに行った。さらに、このアッセイを、炎症誘発性遺伝子シグネチャーの活性化を確認するために使用した。IL-6、TNFa、IL-1b、IL10、IL18、CCL20、CCL24、CXCL8、IL1A の発現を、炎症誘発性活性化について評価し、すべてのアッセイで試験した。

【0762】

さらに、このアッセイを使用して、ヒト全長 MARCO を過剰発現する THP-1 単球細胞における PI-3010.15-AB の下流の炎症誘発性遺伝子シグネチャーの活性化を確認した。

【0763】

qPCR 分析を、 $2^{-\Delta\Delta CT}$ （ $\Delta\Delta CT$ ）を使用して、対応するアイソタイプ対照に対する処理試料の倍率変化を計算することによって行った。各遺伝子 CT 値は、使用した内因性対照（GAPDH または RPL37A など）の CT 値に対して正規化した。

【0764】

MSD によるヒトサイトカイン及びケモカインの分泌

ヒト抗 MARCO PI-3010.15、PI-3010.25、及び PI-3030.41 で処理した hMDM 細胞及びアイソタイプから収集した 200 μ l の上清を、Mesoscale Discovery（MSD、カタログ番号 K15047D）の、10 個のサイトカインを測定する V-PLEX ヒト炎症誘発性パネル 1 ヒトキット（MSD、カタログ番号 K15049D）及び 10 個のケモカインを測定する V-PLEX ヒトケモカインパネル 1 ヒトキット（MSD、カタログ番号 K15049D）、またはカスタマイズされた Thermo Fisher のヒト Precarta Plex 26-plex キット（カタログ番号 PPX-26-MX-3222A）を使用して、サイトカインレベルを評価した。MSD マルチプレックスアッセイプレートは、捕捉抗体でプレコート

されている。元の試料をアッセイ希釈液で前希釈した後、分析用試料またはキット標準をウェル当たり50 μ lの量で加えた。プレートを、室温で2時間攪拌しながらインキュベートした後、洗浄した。

【0765】

V-PLEXアッセイでは、スルホタグ付き検出抗体を添加し、攪拌しながら室温でさらに2時間インキュベートした。インキュベーション後、プレートをもう一度洗浄した。2 $\times$ 読み取り基質を追加し、MSDリーダーでプレートを読み取った。すべてのデータを、MSD Discovery Workbench（登録商標）ソフトウェア4.0によって分析した。

【0766】

カスタマイズされたヒト26プレックスキットの場合、ビオチン化標識検出抗体を添加し、攪拌しながら室温で1時間インキュベートした。プレートを洗浄した。PE（フィコエリトリン）標識ストレプトアビジンを添加し、攪拌しながら室温で30分間インキュベートした。プレートを洗浄した後、Luminex読み取り緩衝液を添加し、Luminex 200アナライザーでプレートを読み取った。すべてのデータをXPONENTソフトウェアによって分析した。

【0767】

結果

抗体PI-3010.15、PI-3010.25、及びPI-3030.41の重鎖及び軽鎖のDNA配列は、コドンが最適化され、Atum（Newark, CA）で独自のベクターに組み込んだ。重鎖及び軽鎖をコードするベクターをCHO細胞に2Lスケールでトランスフェクトした後、MabSelect Sure Protein A樹脂を使用して精製した。両方の候補は、高い力価を示し、プロテインA精製後の凝集体が5%未満であった。データを表14にまとめている。

【0768】

【表14】

表 14					
抗体	生殖系列	アイソタイプ	発現 CHO- 一過性(mg/L)	理論上 pl	モノマー% (プロテイン A 後)
PI-3010.15-H1	IGHV1-46 IGKV1-39	hIgG1	585	8.45	>95
PI-3010.25-H1	IGHV1-46 IGKV1-39	hIgG1	818	8.11	>95
PI-3030.41-H1	IGHV1-59 IGKV1-39	hIgG1	868	8.44	>95

【0769】

PI-3010.15、PI-3010.25、及びPI-3030.41の結合は、組換えヒト及びカニクイザルMARCOタンパク質に対するBiacoreによって評価され、ヒト及びcynoMARCOの両方に対する高い親和性結合を示し、cynoMARCOへの結合の親和性は、ヒトMARCO親和性の2～3倍以内であった。

【0770】

フローサイトメトリーを使用して、HEK 293T細胞のMARCOトランスフェクタント及び内因性MARCOを発現するヒト単球由来マクロファージ（MDM）を含む、ヒト及びカニクイザルMARCO発現細胞株への抗体の結合を評価した。抗体は、同等のEC50でヒト及びcynoMARCOに結合し、高い親和性でヒトMDM上の内因性M

A R C Oに結合した。M A R C Oを発現しなかった親 H E K 2 9 3 T細胞または J u r k a t T細胞へのオフターゲット結合はフローサイトメトリーにより観察されなかった（表 1 5 及び図 5 3）。

【 0 7 7 1 】

【表 1 5】

表 15							
ヒト化 mAb	EC50 OVX 細胞結合 (nM)(hu/cyn)	K _D (nM) ヒト	K _D (nM) カニク イザル	K _{off} (1/s) ヒト	ヒトマクロ ファージへ の結合	リガン ド結合 をブロ ック	T細胞 への結 合
PI- 3010.15 PI-3015 (hIgG1)	0.798/1.16	0.51	1.65	2.94E-04	+	+	-
PI- 3010.46 PI-3046 (hIgG4)	0.821/1.07	0.78	1.10	3.71E-04	+		-
PI- 3010.25 PI-3025 (hIgG1)	0.790/1.01	1.09	1.79	4.30E-04	+	+	-
PI- 3010.48 PI-3048 (hIgG4)	0.721/2.39	1.05	1.81	3.86E-04	+		-
PI- 3030.41 PI-3041 (hIgG1)	0.704/1.028	0.82	1.12	3.34E-04	+	+	-
PI- 3030.47 PI-3047 (hIgG4)	0.796/1.39	0.72	0.79	3.37E-04	+		-

10

20

30

【 0 7 7 2 】

示差走査蛍光測定法（D S F）及び動的光散乱法（D L S）をそれぞれ使用した、融解（T m 1）及び凝集（T a g g）の温度を決定するための熱安定性評価では、3つの抗体すべてが許容範囲内で類似した特性を持っていることが示された。さらに、3つの抗体はすべて、p H 5 . 0 ~ 6 . 5 の範囲のクエン酸及びヒスチジン緩衝液中のサイズ排除クロマトグラフィー（S E C）及びD L Sによって決定されるように、3 0 m g / m l まで可溶性で安定していた。データの要約を以下の表 1 6 に示す。

40

【 0 7 7 3 】

50

【表 16】

表 16							
	分析方法	PI-3010.25 (PI-3025) (hIg1)	PI-3010.48 (PI-3048) (hIg4)	PI-3010.15 (PI-3015) (hIg1)	PI-3010.46 (PI-3046) (hIg4)	PI-3030.41 (PI-3041) (hIg1)	PI-3030.47 (PI-3047) (hIg4)
ヒト MARCO への結合親和性(KD)	Biacore (SPR、nM)	1.09	1.05	0.51	0.78	0.82	0.72
熱安定性(PBS)	Tm1 (DSF、℃)	68	65	68	64	68	64
熱安定性(PBS)	Tagg (DLS、℃)	83	73	78	72	78	71
溶解度 (30 mg/mL)	SEC、DLS	クエン酸及び酢酸緩衝液、pH5.0～6.0 に最大 30 mg/mL で可溶且つ安定					

10

20

【0774】

hMDMにおけるヒト抗MARCO抗体によって誘導されるサイトカイン発現も評価した。表17に示すように、PI-3010.15、PI-3010.46、PI-3010.25、PI-3010.48、PI-3030.41、及びPI-3030.47のすべてが、ドナー1において示されたサイトカイン遺伝子の発現を誘導した。2人の異なるドナー（ドナー1及びドナー2）由来のhMDMにおけるサイトカイン及び他の関連する遺伝子発現（MIP-1 α 、IL-27、LIF、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IP-10、IL-6、IL-10、CD40、IL-12p70、G-CSF、IFN γ 、GM-CSF、TNF α 、MIP-1 β 、MCP-1、MIG、gro- α 、IL-1 α 、IL-15、MCP-3、M-CSF、及びVEGF-A）もまた図27に示される。

30

【0775】

【表 17】

表 17. 対応するアイソタイプに対する遺伝子誘導倍率						
ドナー1	IL-6	TNF α	CXCL10	IL18	CCL20	IL1A
PI-3010.15 IgG1	1.3	2.2	1.5	1.8	1.4	2.4
PI-3010.46 IgG4	1.8	1.9	1	1.8	1.7	3.6
PI-3010.25 IgG1	1.2	2.5	1.5	3.9	1.5	4.1
PI-3010.48 IgG4	1	2.1	0.9	1.5	1.3	3.6
PI-3030.41 IgG1	1.3	3.2	1.9	4.3	1.6	7.8
PI-3030.47 IgG4	2	3.2	1.8	1.3	1.8	6.6

40

【0776】

図28は、PI-3010.15、PI-3010.25、及びPI-3030.41

50

、ならびに h I g G 1 対照の q P C R m R N A データ (T N F α、I L - 1 β、I L - 1 8、及び C X C L 8) 及び M S D サイトカインデータ (T N F α、I L - 1 β、I L - 6、M I P 1 - α) を提供する。炎症誘発性遺伝子の q P C R m R N A 分析は、1 人の代表的なドナーの h I g G 1 対照アイソタイプに対する誘導倍率としてプロットした (上の行)。データは、技術的な複製の平均値 ± 標準偏差 (S D) として表示される。サイトカイン分泌もまた M S D で測定し、データは代表的な炎症性サイトカイン及びケモカインレベルのレベル (p g / m l) についてプロットした (下の行)。データは、同じ代表的なドナーの技術的な複製の平均値 ± 標準偏差 (S D) として表示している。

【 0 7 7 7 】

P I - 3 0 1 0 . 1 5 h I g G 1 対照処置ヒト解離腫瘍細胞及び P I 3 0 0 8 / 対照処置 C T 2 6 腫瘍を、上記のように処理した (図 1 6 B)。両方の実験から得られた G S E A 由来の正規化濃縮スコアを、R で g g p l o t 2 を使用してプロットした。図 2 9 に示されるように、ヒト及びマウスの M A R C O m A b は、同様の経路制御を駆動する。

【 0 7 7 8 】

P I - 3 0 1 0 . 1 5 は、ヒト解離腫瘍細胞 (D T C) において抗腫瘍免疫経路を活性化した (図 3 0)。h D T C で抗 M A R C O 抗体によって増加する上位の免疫活性化遺伝子及び経路には、I L - 2 - S T A T 5 シグナル伝達、N F - k B を介した T N F α シグナル伝達、I L - 6 - J A K - S T A T 3 シグナル伝達、炎症反応、I F N γ 応答、及び I F N α 応答が含まれる (図 3 0)。これらの経路はまた、実施例 4 に示されるように、マウス腫瘍細胞及び B M D M において P I - 3 0 0 8 によって上方制御された。h D T C で抗 M A R C O 抗体によって減少した経路には、低酸素、アピカルジャンクション、M y c ターゲット、P I 3 K - A K T - m T O R、E 2 F ターゲット、及び酸化的リン酸化が含まれる。これらの経路はまた、実施例 4 に示されるように、マウス腫瘍細胞及び B M D M において P I - 3 0 0 8 によって下方制御された。H a l l m a r k 経路セットを使用して経路を定義した。

【 0 7 7 9 】

P I - 3 0 1 0 . 1 5 はまた、ヒト抑制性マクロファージ (M 2 c) において炎症促進性シグネチャーを誘導した (図 3 1)。上方制御されたサイトカイン及び遺伝子は、C X C L 3、C X C L 8、T N F α、C C L 3、I L 7 R、C C L 4、C C L 5、C C L 2 4、C C L 2 0、I L - 1 α、I L - 6、I D O、C D 2 7 4、S F 2、L A M P 3、C C R 7、C X C L 1 1、及び C X C L 9 であった。下方制御されたサイトカイン及び遺伝子は、A L K、M P B、T M E M 3 7、N H S L 2、S L C 4 6 A 2 であった。上方制御された経路は、N F - k B を介した T N F α シグナル伝達、炎症反応、I N F γ 反応、M y c 標的、低酸素、I L 6 / J A K / S T A T 3 シグナル伝達、I F N α 反応、小胞体ストレス応答、I L 2 / S T A T 5 シグナル伝達、U V 応答、同種移植片拒絶、上皮間葉系拒絶反応、アポトーシス、m T O R C 1 シグナル伝達、エストロゲン応答初期、K R A S シグナル伝達、コレステロール恒常性、ノッチシグナル伝達、アピカルジャンクション、w n t β カテニンシグナル伝達、酸化的リン酸化、補体、P I 3 k A k t m T O R シグナル伝達、活性酸素種経路、ヘッジホッグシグナル伝達、血管新生、解糖、K R A S シグナル伝達ダウン、D N A 修復、p 5 3 経路、筋形成、凝固、頂端膜側、アンドロゲン応答、T G F β シグナル伝達、脂肪酸代謝、及び生体異物代謝であった。

【 0 7 8 0 】

下方制御された経路は、胆汁酸代謝、エストロゲン応答後期、脂肪生成、ペルオキシソーム、ヘム代謝、U V 応答ダウン、紡錘体、タンパク質分泌、精子形成、G 2 M チェックポイント、及び E 2 F ターゲットであった。M 2 c h M D M で P I - 3 0 1 0 . 1 5 によって誘導される主要な炎症誘発性遺伝子及び経路には、I L - 2 - S T A T 5 シグナル伝達、N F - k B を介した T N F α シグナル伝達、I L - 6 - J A K - S T A T 3 シグナル伝達、炎症反応、I F N γ 反応、及び I F N α 応答が含まれる。H a l l m a r k 経路セットを使用して経路を定義した。同様の経路が、P I - 3 0 0 8 で処理された B M D M で誘導された。

10

20

30

40

50

【 0 7 8 1 】

PI-3010.15 及び PI3030.41 によって誘導されたサイトカイン発現の倍率変化の比較を図 32 に示す。PI-3010.15 は、PI-3030.41 と比較して、より高いレベルの IL-1 β 、CSF3、CSF2、IL-1 α 、IL-6、TNF α 、CCL4、CXCL1、CCL3、及び CXCL10 を誘導した。

【 0 7 8 2 】

表 18 及び 19 は、抗 MARCO 抗体及び特徴の選択の比較要約を提供する。（－）は抗体間に差がないことを示し、（＋）は利点を示す。

【 0 7 8 3 】

【表 18】

10

表 18			
基準／試験	PI-3010.15	P-3010.25	P-3030.41
K _D ヒト(avid)	-	-	-
K _D カニクイザル(avid)	-	-	-
ELISA 結合	-	-	-
計算された（インシリコ）配列責任	酸化（低） 脱アミド（低） +	脱アミド（低） 異性化（高）	脱アミド（低） 異性化（高）
観察された傾向（強制分解）	酸化（低） +	異性化（低）	脱アミド（高） 異性化（高）
凝集（一過性発現からの SEC、DLS、HIC）	+	+	
凝集（Lonza の安定したプールされたトランスフェクトされた材料からの SEC）	+	+	
熱応力（DLS、DSF）	-	-	-
経時安定性（DLS、SEC、SPR）	+		
脱アミド及び異性化のリスク	+		
機能的 in vitro アッセイ	+		

20

30

【 0 7 8 4 】

40

50

【表 19】

表 19			
In vitro アッセイ	PI-3010.15	PI-3010.25	PI-3030.41
過剰発現細胞への結合及び陰性細胞への結合の欠如	-	-	-
SRCR ドメインへのリガンドの結合を競合する	-	-	-
IL-10 で分極された hMDM 及び THP1 細胞における細胞表面発現	+		
DTC の RNAseq	+	+	
hMDM の RNAseq	+	未試験	
hMDM における遺伝子発現のための qPCR	-	-	-
MSD 及び／または Luminex によるサイトカイン分泌アッセイ	-	-	-
hMDM でインフラマソームを増加	+		
THP1-Blue (商標) NF-κB 細胞での NF-κB レポーターアッセイ	+	+	
食作用の軽度の増加	+	+	

10

20

30

【0785】

選択した3つの抗体の配列に潜在的な傾向が存在するかどうかを判断するために、候補のインシリコ配列分析に Sentinel APART アルゴリズム (Lonza) を使用した。インシリコ分析によって指摘された懸念事項は、疎水性の増加、凝集傾向、アスパラギン酸の異性化、及び酸化傾向であった。以前のインシリコ評価では、懸念された同様の傾向が示されたが、さまざまなストレス条件下で試験し、強制分解アッセイを行った時に、軽微な傾向であることが証明された。以下の表 20 は、理論データと比較した実験データの要約を示している。

40

【0786】

50

【表 2 0】

表 20								
抗体	凝集		脱アミド		異性化／分解		酸化	
	計算 (イン シリ コ)	観測 (HIC)	計算 (イン シリ コ)	観測 (HIC)	計算 (イン シリ コ)	観測 (HIC)	計算 (イン シリ コ)	観測 (HIC)
PI- 3010.15	高	低	0 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (2)	0 (2)
PI- 3010.25	高	低	0 (1)	0 (0)	1 (0)	0 (1)	0 (1)	0 (0)
PI- 3030.41	高	低	0 (2)	1 (1)	2 (0)	1 (1)	0 (3)	0 (0)

10

【 0 7 8 7 】

リード候補の総疎水性を、疎水性相互作用クロマトグラフィー（HIC）を使用して評価した。保持時間が長いほど、疎水性が高いことを示す。このアッセイでは、抗 TREM 1 抗体を陽性対照として使用した。PI-3010.15、PI-3010.25、及び PI-3030.41 抗体はすべて、抗体に予想される範囲の疎水性を示した（表 21）。メインピーク%のレベルが高いほど修飾が少ないことを示し、保持時間が短いことは疎水性が低いことを示す。

20

【 0 7 8 8 】

【表 2 1】

表 21		
試料数	主ピーク(%)	保持時間(分)
PI-3010.15	88.7	15.7
PI-3010.25	95.8	15.6
PI-3030.41	70.7	11.5

30

【 0 7 8 9 】

選択した抗体の傾向を理解するために、強制分解試験を実施した。PI-3010.15-H1、PI-3010.25-H1、及び PI-3030.41-H1 試料をストレス条件下（酸化、低 pH、及び高 pH）でインキュベートし、ペプチドマッピング（LC-MS/MS）によって分析して、mAb 中のタンパク質修飾を同定した。焦点は、異性化及び酸化傾向の分析であった。さらに、他のパラメーターを使用して、さまざまなストレス条件下での各抗体の安定性を評価した（表 22）。

40

【 0 7 9 0 】

50

【表 2 2】

表 22						
試料	供給源	アイソタイプ	濃度 (mg/mL)	条件	時間	読み取り
PI-3010.25	CHO-ATUM	hIgG1	8.4	4°C(PBS 対照) 40°C(PBS) 40°C(pH5.5)	2 週間	ナノドロップ (A280) SEC (凝集) DLS (Tagg、サイズ) DSF (ドメイン安定性) LC-MS (修飾を検出するためのペプチドマッピング) チャージ変異体分析 Biacore (結合)
PI-3010.41	CHO-ATUM	hIgG1	9.5	40°C(pH8.5) 40°C(PBS) + AAPH (6 時間) 25°C(pH3.5)		
PI-3010.15	CHO-ATUM	hIgG1	10.5			

【0791】

異性化

PI-3010.15を次の条件でインキュベートした：PBS中40°Cで2週間、PBS中の対照-80°C、40°C(PBS)+1mM AAPHで6時間、pH5.5酢酸ナトリウム中40°Cで2週間。処理後、試料をLC-MS/MSで分析し、トリプシン消化後の抗体由来の単離ペプチドの修飾%を特定した。

【0792】

潜在的なホットスポットを同定するために、低pHで長時間インキュベーションした後、PI-3010.15でLC/MSペプチドマッピングを行った。PI-3010.15は、イソアスパラギン酸(IsoAsp)、脱アミド化、またはスクシンイミドの形成を示さなかった。PI-3010.25は、軽鎖の残基D56(>2%、pH5.5、40°Cでのみ)及び重鎖のD72(pH3.5で3.7%)でIsoAsp形成を示し、一方、PI-3030.41は、軽鎖のD56(>2.7%、pH5.5、40°Cで)及び重鎖の残基N52でのスクシンイミド(対照を含むすべての条件下で6~9%)でIsoAspを示した。

【0793】

酸化：

PI-3010.15を次の条件でインキュベートした：対照はPBSで-80°C、40°C(PBS)+1mM AAPHで6時間、PBSで0.5及び1.5% H₂O₂で24時間、これを40°C(PBS)+1mM AAPHで6時間の以前の実験と比較した。処理後、試料をLC-MS/MSで分析し、トリプシン消化後の抗体由来の単離ペプチドの修飾%を特定した。

【0794】

PI-3010.15は、AAPH及びH₂O₂処理によるMet-48及びTrp-52の酸化を示した。Trp-52は、インシリコ評価で潜在的な傾向としてフラグが立てられた。Met-48残基は構造内に埋もれており、溶媒にアクセスできないと予想さ

れる。どちらの残基も LC-MS/MS 分析中に同じペプチドの一部として検出されるため、どちらの残基にも酸化傾向を明確に割り当てることはできなかった。

【0795】

ストレスを受けた試料の組換えヒト MARCO への結合を、Biacore によって評価した。ストレスを受けた試料の結合は、対照条件と比較して同様の K_D 及び R_{max} レベルを有し、PI-3010.15 からのさまざまな酸化ストレス試料（表 24）を含め、結合能が有意に影響を受けなかったことを示唆している（表 23）。

【0796】

【表 23】

表 23										
MARCO への結合										
抗体	対照		40℃ 2 週間		脱アミド化 (40℃ 2 週間)		異性化/分解		酸化(1mM AAPH、6 時間)	
	K_D (nM)	R_{max}	K_D (nM)	R_{max}	K_D (nM)	R_{max}	K_D (nM)	R_{max}	K_D (nM)	R_{max}
PI-3010.15	1.2	131.7	1.2	103.8	1.24	111.3	1.24	108.6	1.29	104.5
PI-3010.25	0.54	63.2	0.58	62.2	0.66	62.4	0.66	62.4		
PI-3030.41	0.24	62	0.36	54.3	0.39	54.8	0.34	48.9		

10

20

【0797】

【表 24】

表 24								
酸化								
抗体	対照		0.5% H ₂ O ₂ (24 時間、RT)		0.5% H ₂ O ₂ (24 時間、RT)		1mM AAPH、6 時間 40℃)	
	K_D (nM)	R_{max}	K_D (nM)	R_{max}	K_D (nM)	R_{max}	K_D (nM)	R_{max}
PI-3010.15	0.97	111.7	1.05	97.1	1.07	109.5	1.10	97.6

30

40

【0798】

3つの抗体（PI-3010.15、PI-3010.25、及びPI-3030.41）は、他の賦形剤なしで、pH 範囲 5.0～6.0 の次の緩衝液で 30 mg/mL までうまく濃縮された。対照として PBS を使用した。抗体を 4℃で一晩インキュベートした後に、以下での分析をした：SEC-HPLC による凝集%；DLS を使用したサイズ（半径）と多分散性；熱安定性 [Tagg (DLS)、Tm (DSF)]；SLS によるコロイド安定性 (kd)。

【0799】

PI-3010.25 を、以下の緩衝液（表 25）で濃縮した。

【0800】

50

【表 2 5】

表 25		
緩衝液	pH	PI-3010.25 の mAb 濃度(mg/mL)
10mM ヒスチジン HCl	6.0	27.1
10mM ヒスチジン HCl	5.5	36.4
10mM クエン酸ナトリウム	6.0	33.2
10mM クエン酸ナトリウム	5.5	35.8
10mM クエン酸ナトリウム	5.0	29.7
10mM 酢酸ナトリウム	5.5	33.4
10mM 酢酸ナトリウム	5.0	36.1
PBS (対照)	7.4	30.4

10

【0801】

PI-3010.25 は、HMW凝集体を増加させることなく30mg/mLまで濃縮できるであろう。

20

【0802】

実施例9：抗MARCO抗体はインフラマソーム活性化を誘導する

材料及び方法

mBMDMにおけるインフラマソームアッセイ

3匹の雌C57BL/6マウス及び3匹の雌BALB/c (Jackson Laboratories) の大腿骨と脛骨を、乳鉢と乳棒を使用して、染色培地 (D-PBS 中 0.5% (w/v) BSA (Sigma) 及び 2mM EDTA) で洗浄及び粉碎した。次いで、試料を40µmフィルターに通し、D-PBSで洗浄し、室温で5分間、400×gでペレット化した。細胞ペレットを5mlのBD Pharm Lyse緩衝液 (BD Biosciences) に再懸濁し、赤血球溶解を室温で5分間行い、続いて10体積の染色培地でクエンチした。細胞を室温で5分間、400×gでペレット化し、15cmプレートで15×10⁶細胞/mLの密度で、10% (v/v) ウシ胎児血清 (FBS) (HyClone) 及び抗生物質抗真菌溶液 (Gibco) を補充したイスコフ改変ダルベッコ培地からなるマクロファージ培地に再懸濁した。これらの骨髓単核細胞を25ng/mLのマウスマクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) (PeproTech) で7日間刺激してM0-マクロファージを生成し、20ng/mLのマウスIL-1βを6日目に培地に37℃で24時間補充することによってM2様に分化させた。7日目に、マクロファージをDPBSですすぎ、6mlの2mM EDTA中で10分間インキュベートして、細胞の剥離を促進した。細胞を上記の染色培地の追加の6mlに静かにこすり落とし、計数し、ウェル当たり100,000細胞で96ウェルプレートに播種した。

30

40

【0803】

細胞を付着させるために37℃で30分～1時間後、BMDMを5µg/mLの抗マウスMARCO抗体PI-3008及びその対応するアイソタイプ対照mIgG2aで処理した。抗体との3時間のインキュベーション後、LPS (0.5及び50ng/mLで試験) を添加して、インフラマソーム経路をさらに2.5時間刺激した。次に、ATP (5mM) を30分間添加してインフラマソームを活性化し、MSDで測定したIL-1βのサイトカイン分泌を誘導した。Sidakの多重比較検定を使用して、未処理のアイソタイプ (LPS及びATPなし) に対する分泌型IL-1β倍率変化の統計的有意性を計算した。Sidakの多重比較検定**P<0.01。

50

【0804】

hMDMにおけるインフラマソームアッセイ

ネガティブ免疫磁気選択 (StemCell Technologies) を使用して末梢血単核細胞から分離された凍結ヒト末梢血CD14+単球を解凍し、10% (v/v) 熱不活化FBS (HyClone)、1mMピルビン酸ナトリウム、非必須アミノ酸、2mM L-グルタミン、55 μ M 2-メルカプトエタノール及び抗真菌抗生物質 (すべてGibcoから) を補充したRPMI 1640培地で培養した。単球は、15cmディッシュで $1.2 \sim 1.5 \times 10^6$ 細胞の密度で50 ng/mlのヒトマクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) (PeproTech) の存在下で完全RPMI 1640培地で培養することによりマクロファージに分化した。分化の3日目に、新鮮なM-CSFを添加して培地を補充した。分化したヒトマクロファージは、以下のサイトカインを培地に添加して37℃で24時間分極した: 100 ng/mlのIFN γ (M1条件) 及び25 ng/mlの組換えヒトIL-10 (M2条件) を37℃で24時間。7日目に、無菌セルスクレーパー (Nunc) を使用してFACS緩衝液 (2mM EDTA及び0.5% (w/v) ウシ血清アルブミン (BSA) (Sigma) を含むD-PBS) に、約20℃で5分間、400 $\times$ gで遠心分離することにより分極マクロファージを非酵素的に穏やかに回収した。

10

【0805】

細胞を計数し、1ウェル当たり100,000細胞で96ウェルプレートに播種した。37℃で30分~1時間後細胞を結合させ、hMDMを5 μ g/mlの抗ヒトMARCO抗体PI-3010.15、PI-3010.25 (PI-3025)、PI-3030.41 (PI-3041、及びPI-3010.48 (PI-3048)、ならびにそれらの対応するアイソタイプ対照hIgG1及びhIgG4 (BiolegendのUltra-leaf) で処理した。抗体との3時間のインキュベーション後、LPS (0.1及び1 μ g/mlで試験) を添加して、インフラマソーム経路をさらに2.5時間刺激した。次に、ATP (5mM) を30分間添加してインフラマソームを活性化し、MSDで測定したIL-1 β のサイトカイン分泌を誘導した。Tukeyの多重比較検定を使用して、未処理の (LPS及びATPなし) hIgG1に対する分泌型IL-1 β 倍率変化の統計的有意性を計算した。Tukeyの多重比較検定 (*P<0.05; ***P<0.0006, ****P<0.0001)。

20

30

【0806】

E. coli 食作用アッセイ

ヒト単球由来マクロファージ (MDM) を、10%ウシ胎児血清 (Gibco)、1% β -メルカプトエタノール (ThermoFisher)、1 $\times$ 非必須アミノ酸 (Gibco)、1 $\times$ ピルビン酸ナトリウム (Gibco)、1 $\times$ GlutaMax (Gibco)、1 $\times$ 抗抗 (Gibco)、15cmプレートに50 ng/mlのM-CSF (PeproTech) を補充したRPMI 1640培地でCD14+ヒト単球を培養することにより生成した。培地は3日後に新しくした。培養6日目に、100 ng/mlのヒトIFN- γ (PeproTech) + 50 ng/mlのLPS (Invivogen) または25 ng/mlのIL-10 (PeproTech) を培養物に添加した。翌日、細胞を採取し、96ウェル平底プレートのウェル当たり200,000個の細胞を播種し、PI-3101.15、PI-3010.25またはPI-3030.41及びアイソタイプ対照抗体の用量滴定とともに37℃で2時間、5%CO₂でインキュベートし、細胞を接着させた。

40

【0807】

食作用を測定するために、Vybrant Phagocytosis Assay Kit (Molecular Probes) を使用した。2時間の抗体インキュベーション後、培地を除去し、細胞をE. coli 蛍光BioParticles溶液とともに37℃、5%CO₂で2時間インキュベートした。粒子溶液を除去し、トリパンブルー溶液に置き換えた。室温で1分間のインキュベーション後、溶液を除去し、Tecanマイ

50

クロプレートプレートリーダーで励起波長 480 nm、発光波長 520 nm を使用して蛍光を測定した。

【0808】

結果

PI-3008 は、非分極マクロファージ（図 33A 及び 33C）及び IL-10 分極マクロファージ（図 33B 及び 33D）の両方において、インフラマソームによる統計的に有意な IL-1 β 分泌を誘導した。この効果は、C57BL/6 マウス（図 33A 及び 33B）及び Balb/c マウス（図 33C 及び 33D）の 2 つの別個のマウス系統で観察された。したがって、PI-3008 は、マウス BMDM のインフラマソーム活性化を強化及び増加させる。

10

【0809】

同様の結果がヒト MDM で観察された（図 34A、34B、及び 35）。PI-3010.25（IgG1 フォーマット）及び PI-3010.48（IgG4 フォーマット）の両方が、0.1 μ g/ml LPS+ATP 及び 1 μ g/ml LSP+ATP とのインキュベーション後に、IL-10 分極マクロファージにおいて統計的に有意な IL-1 β 分泌を誘導した（図 34A）。IFN- γ 分極 hMDM では、PI-3025 は 0.1 μ g/ml LPS+ATP とのインキュベーション後に IL-1 β 分泌を誘導し、一方 PI-3010.48 は 1 μ g/ml LPS+ATP による処理後に IL-1 β 分泌を誘導した（図 34B）。PI-3010.25 のバーは各群の左から 2 番目に表示され、PI-3010.48 のバーは各群の右側に表示される。

20

【0810】

別のアッセイでは、PI-3010.15、PI-3010.25、及び PI-3030.41 のすべてが、未処理条件と比較して、LPS 及び ATP で処理した場合に IL-1 β 産生を誘導し（図 35）、抗ヒト MARCO 抗体がインフラマソーム活性を誘導することを示している。

【0811】

IL-10 hMDM ドナー細胞における PI-3010.15、PI-3101.25、及び PI-3030.41 による食作用の誘導率を表 26 に示す。

【0812】

【表 26】

30

表 26		
抗体	アイソタイプ	食作用
PI-3010.25	IgG1	90%
PI-3010.15	IgG1	88%
PI-3030.41	IgG1	50%

【0813】

PI-3010.25 及び PI-3010.15 は、hMDM を IL-10 で分極した場合、複数のドナー間でより一貫した食作用の誘導を示した。

40

【0814】

実施例 10：EMT6 モデルにおける抗マウス MARCO 抗体の *in vivo* 単剤療法効果

方法

EMT6 乳癌腫瘍細胞（マウス当たり 1×10^6 細胞）を 0 日目に移植し、腫瘍が平均体積約 90 mm³ に達した時点で投与（10 mg/kg；Q5d x 4；ip）を開始した。動物は、5 日ごとに合計 4 回腹腔内投与された。腫瘍体積を経時的に監視し、群ごとの平均、研究終了時の個々の腫瘍体積、または TGI % として提示した。

50

【0815】

結果

PI-3008がEMT6モデルで単剤として抗腫瘍活性を示したことを示す（図36）。一部の群では、最大20%の完全奏効（CR）を達成した（レスポnder）。

【0816】

実施例11：E0771モデルにおける抗マウスMARCO抗体のin vivo単剤療法効果

方法

E0771同系マウスモデル

マウスの研究を、カリフォルニア州サウスサンフランシスコのExplora Biosciencesの施設内動物管理使用委員会の指導と承認の下で実施した。

【0817】

8～10週齢の雌C57/BL6マウス（Taconic）に、対数増殖期で増殖したサブコンフルエントなE0771細胞（ATCC）を移植した。マトリゲルを含む無血清培地に再懸濁した100万個の腫瘍細胞を、イソフルラン麻酔下でマウスの乳房脂肪体に同所移植した。腫瘍の大部分が110～120立方ミリメートル（mm³）の場合、治療開始前にマウスを治療群（PI-3008-AB及びPI-0002mIgG2aアイソタイプ）に無作為化した。

【0818】

PD研究

2つの群に無作為化したマウスに、各群の群平均体重に基づいて10mg/kgのPI-3008-ABまたはPI-0002-AB（アイソタイプ）を腹腔内投与した。デジタルノギスを使用して2つの直交する直径を測定した後、式〔長さ×（幅）²〕／2を使用して腫瘍体積を計算した。3つの異なる時点（1回投与の2日後、1回投与の5日後、2回目の投与Q5d×2の24時間後）で、1群当たり15匹のマウスを殺し、腫瘍、脾臓、及び血液を採取した。9匹の動物を腫瘍及び脾臓のフローサイトメトリー処理に使用し、6匹のマウスを腫瘍及び脾臓のIHC評価に使用した。腫瘍体積を経時的に監視し、群ごとの平均、研究終了時の個々の腫瘍体積、またはTGI%として提示した。

【0819】

エフェクターデッド抗体の効能

エフェクターデッド抗MARCO抗体、PI-3021（N297A変異を伴うPI-3008）もE0771モデルで評価した。マウスを、実施例4に記載したように投与した。簡単に言えば、1群当たり10匹のマウスで、腫瘍が約100mm³になった時にIP投与を開始した。投与量は10mg/kg；Q5d×4であった。PI-3008及びエフェクターデッドPI-3021の両方のmIgG2aアイソタイプを使用した。抗PD-1抗体も使用した。

【0820】

E0771同系マウスモデルにおけるPK/PD効果

PK-PD有効性関係を決定するために、PI-3008がこのモデルで単剤療法を誘発したため、E0771同所性乳癌モデルを使用した。研究デザインには、2回目の投与の24時間後に腫瘍と脾臓を採取するPD群、及びPI-3008血清レベルを測定するための「PK」群が含まれる。研究タイムラインの概略図を図39Aに示す。

【0821】

C57BL/6雌マウスに、0日目に同系E0771腫瘍細胞（マウス当たり5×10⁵細胞）を乳房脂肪体に注射し、PI-3008またはアイソタイプ対照（10mg/kg、N=10/群）の投与を、腫瘍体積が平均約100mm³に達した時点で開始した。動物は、5日ごとに合計4回腹腔内投与された。動物のサブセットは、腫瘍と脾臓のPDの変化を評価するために2回目の投与の24時間後にサンプリングした。追加のPDテイクダウンを、初回投与の2日後及び5日後に行った。サンプリングした組織は、Lumina及びフローサイトメトリーによる腫瘍、脾臓、及び血液であった。

10

20

30

40

50

【0822】

残りの動物は、抗腫瘍効果についてモニターされ、薬物曝露分析のために研究の最後にサンプリングした。エンドポイントPDアッセイには、腫瘍及び脾臓のフローサイトメトリープロファイリングによる骨髄及びリンパ系組成の変化、腫瘍及び脾臓のサイトカイン／ケモカインの測定、CD8⁺ T細胞、NK細胞、MARCO細胞、及びCD19⁺ B細胞頻度、及びIHC（モノプレックス及びマルチプレックス）による組織分布の評価が含まれる。

【0823】

フローサイトメトリーアッセイ

マウス腫瘍組織を採取し、氷冷RPMI-1640（Invitrogen）培地に入れた。メーカーの推奨に従って、マウス腫瘍解離キット（Miltenyi）を使用して、腫瘍を酵素的に解離した。解離後、単細胞懸濁液をペレット化し、腫瘍上清を回収し、高速で回転させて不溶性物質を除去し、Halt（商標）Protease Inhibitor Cocktail（Thermo Scientific）を使用して酵素的に不活性化し、下流の分析が行われるまで-80℃で速やかに凍結した。細胞ペレットを染色培地（DPBS／1%BSA／2mMEDTA）に再懸濁し、100µMフィルターに通して解離していない物質を除去した。単細胞懸濁液をViCell XR（Beckman Coulter）で計数し、フローサイトメトリー染色のために96ウェルV底プレートに播種した。

【0824】

細胞をZombie NIR（BioLegend）とともにインキュベートした後、TruStain FcX PLUS（BioLegend）、マウス血清、ラット血清、ハムスター血清（Jackson Immuno Research）の組み合わせカクテルを使用してFcγRブロックを行い、すべてFc Receptor Blocker（Innovex）で調製した。細胞表面タンパク質を氷上で30分間染色した後、二次染色ステップまたは1%PFAで4℃で一晩固定した。細胞内タンパク質を染色するために、細胞を固定し、FoxP3／Transcription Factor Staining Buffer Set（Thermo Fisher Scientific）で透過処理した。細胞内抗体は、2%ラット血清を含む透過処理緩衝液で調製し、細胞を室温で少なくとも30分間インキュベートした。細胞はAttune NXT（ThermoFisher）で実行した。FlowJo（Beckton Dickinson）を使用してフローサイトメトリー分析を実施した。

【0825】

各パネルに使用されるフロー抗体は、以下の表27に記載されており、Ca²⁺／Mg²⁺ PBS及び2%FBSを含むFACS緩衝液に適切な抗体を加えることによって調製した。

【0826】

10

20

30

40

50

【表 27】

表 27	
免疫集団	細胞表面マーカー
好中球	Ly6G+
単球	Ly6G-/Ly6C+及び MHCII ⁻ 、MHCII ^{int} 、MHCII ^{high} のサブゲーティング
TAM	CD11b+/F4/80+及び MHCII ⁻ 、MHCII ^{int} 、MHCII ^{high} のサブゲーティング
DC	F4/80-/CD11c+/MHC-II+
CD4+ T 細胞	CD90.2+/CD8-/CD4
CD8+ T 細胞	CD90.2+/CD4-/CD8+
NK 細胞	CD90.2+/CD4-/CD8-/NK1.1+
記憶 B 細胞	CD90.2-/CD45R+/CD19+
形質 B 細胞	CD90.2-/CD45R+/CD19 ^{Low} /Blimp1+
辺縁帯 B 細胞	CD90.2-/CD45R+/CD21+/CD35 ^{mid} /CD23+
濾胞性 B 細胞	CD90.2-/CD45R+/CD21+/CD35 ^{high}
脾臓マクロファージ	CD11b+/F4/80+ならびに MHCII ⁻ 及び MHCII ⁺ のサブゲーティング
赤色髄マクロファージ	CD11b+/F4/80+/CD206+
辺縁帯マクロファージ	CD11b ^{int} /F480+ 及び/または CD11CD11b ^{int} /F480+/TIM4+
非辺縁帯マクロファージ	CD11b ^{int} /F480+辺縁帯を除くすべての CD11b/F480+集団

10

20

【0827】

30

受容体占有率（RO）アッセイ

腫瘍／脾臓骨髓及び血流サイトメトリー抗体パネルについては、BioLegendのPEとコンジュゲートしたPI-3008抗体またはBioLegendのmIgG2a-PEを染色カクテルに10 µg/mlで添加して、腫瘍、脾臓、及び血液中のさまざまな骨髓細胞内の受容体占有率（RO）を評価した。

【0828】

in vivo 血清濃度

抗マウスMARCO mAbの血清レベルは、コーティングされた組換え細胞外ドメイン（ECD）マウスMARCO Hisタグ付き融合構築タンパク質を用いた標準的なリガンド結合ELISA（LBA）フォーマットを使用して決定した。CT26担癌マウスの血清中のPI-3008 mAbレベルは、複数の研究とさまざまな時点で評価した。PD研究では、PI-3008を、最初のIV投与の4時間後と2回目のIV投与の4時間後に、7日間隔で測定した。

40

【0829】

抗MARCO抗体及び抗PD-1抗体を用いたCT26併用研究におけるin vivo抗体血清レベルも、比較のために評価した。PI-3008及びPD-1は、CT26有効性試験（実施例4）においてQ5d X4に10 mg/kgまたは5 mg/kgでIP投与された。PI-3008及びPD-1濃度測定用の血清試料を、3回目の投与前（投与前）及び最終投与の24時間後（投与後）に収集した。

【0830】

50

Luminexによるマウスのサイトカインとケモカインの分泌

Thermo Fisher ScientificのProcartaPlex Multiplex Immunoassay（カタログ番号PPX-25-MX47WJ7）を使用して、マウス血漿、脾臓上清、または腫瘍上清のサイトカインレベルを評価した。このキットは、Luminex xMAPテクノロジーを介して複数のサイトカインを測定するために、色分けされたビーズを使用する。ビーズは、異なるスペクトル領域に対応するさまざまな比率の赤色及び赤外蛍光体で内部染色されている。実験では、50 μ lの磁気捕捉ビーズを最初にプレートに加えた。分析用試料またはキット標準をウェル容量当たり25 μ lで添加し、等量のユニバーサルアッセイ緩衝液を添加してマトリックスを調整した。室温で2時間インキュベーションした後、ビーズを磁気プレート上に捕捉し、洗浄した後、25 μ l/ウェルの検出抗体を添加した。室温で1時間インキュベーションした後、ビーズを再度洗浄し、ストレプトアビジンフィコエリトリン（SAPE）を50 μ l/ウェルで添加した。最後の1時間のインキュベーションの後、ビーズを洗浄し、120 μ l/ウェルのread bufferを加えた。プレートはLuminex 200 Instrumentで実行した。Luminex Xponentソフトウェアv4.3を使用してデータを分析し、分析物レベル（pg）を腫瘍または脾臓の重量に対して正規化した。サイトカイン/ケモカインのデータは、各分析物のアイソタイプ処理上清の平均に対するPI-3008処理上清の倍率変化として表される。

【0831】

マウス組織及び血清中のIgG/IgMの検出

25 μ L/ウェルのDiluent 100（MSD、カタログR50AA-4）を、捕捉抗体（MSD、カタログ番号K15183B-1及びK15203D-1）でコーティング済みのプレートに加えた。プレートを室温で30分間激しく振盪しながらインキュベートした。標準（マウスアイソタイプパネル1、MSDカタログ番号K15183B-1）及び試料を、Diluent 100（MSD、カタログ番号R50AA-4）で希釈し、コーティングしたプレートに加えた。プレートを室温で激しく振盪しながら120分間インキュベートし、洗浄した。25 μ Lの1×検出抗体溶液を各ウェルに加え、プレートを室温で激しく振盪しながら120分間インキュベートした。プレートを洗浄し、2× Read Buffer（MSD、カタログ番号R92TC-3）をMSDプレートに加えた。プレートはMSD Sector Imagerで読み取りした。マウスアイソタイプパネルのIgG/IgMアッセイ範囲は、24 pg/mL～100,000 pg/mLであった。LLOQは97.7 pg/mLであり、ULOQは100,000 pg/mLであった。マウス組織試料のIgGレベルは、0.8 μ g/mL～1 μ g/mLの範囲であった。マウス組織試料のIgMレベルは、0.2 μ g/mL～1 μ g/mLの範囲であった。マウス血清試料のIgGレベルは、41 μ g/mL～56 μ g/mLの範囲であった。マウス血清試料のIgMレベルは、15 μ g/mL～24 μ g/mLの範囲であった。

【0832】

モノブレックスDAB IHCアッセイにおけるマウス組織の組織学と抗体染色

動物は、CO₂による窒息とそれに続く頸椎脱臼について、制度的に承認された標準作業手順（SOP）に従って安楽死させた。無菌性を確保し、空気中のアレルゲンを減らすために、動物に70%エタノールを噴霧した。次いで、腫瘍及び脾臓を10%中性緩衝ホルマリン（VWR、16004）に収集した。24時間後にホルマリンを除去し、腫瘍と脾臓を70%エタノールに移した。

【0833】

すべての腫瘍と脾臓をCureline（Brisbane, CA）に発送した。Curelineにて組織のSOPと完全に自動化されたワークフローに基づいて組織学が実施された。大きな腫瘍は半分に切断し、小さな腫瘍は無傷のままにしてから処理し、パラフィンに包埋し、5 μ mの薄切片に切断した。脾臓を横断面で切断し、処理してパラフィンに包埋し、3 μ mの薄切片に切断した。

【0834】

CD8a (Cell Signaling、98941S) 免疫組織化学 (IHC) は、pH9.0で20分間、Bond Rx自動染色装置 (Leica Biosystems) を使用してHeat-Induced Epitope Retrieval (HIER) で実行した。CD8a一次抗体 (98941S、Cell Signaling Technologies、使用のために3.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で希釈) 及びBond Polymer Refine Detection (Leica Biosystems) を製造元のプロトコールに従って使用した。脾臓及び腫瘍組織の両方を染色した。

【0835】

Marco (Abcam、ab239369) IHCは、Bond Rx自動染色装置 (Leica Biosystems) を使用して、pH6.0で20分間使用してHIERで実行した。Marco一次抗体 (ab239369、Abcam、1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で使用するために希釈) 及びBond Polymer Refine Detection (Leica Biosystems) を製造元のプロトコールに従って使用した。脾臓及び腫瘍組織の両方を染色した。

10

【0836】

NCR1 IHCは、HIER、pH9.0で20分間、Bond Rx自動染色装置 (Leica Biosystems) を使用して実施した。NCR1一次抗体 (ab233558、Abcam、1.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で使用するために希釈) 及びBond Polymer Refine Detection (Leica Biosystems) を製造元のプロトコールに従って使用した。脾臓及び腫瘍組織の両方を染色した。

20

【0837】

CD19 (Abcam、ab245235) IHCは、pH9.0で20分間、Bond Rx自動染色装置 (Leica Biosystems) を使用してHIERで実施した。CD19一次抗体 (ab245235、Abcam、0.91 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で使用するために希釈) 及びBond Polymer Refine Detection (Leica Biosystems) を製造元のプロトコールに従って使用した。脾臓及び腫瘍組織の両方を染色した。

【0838】

CD206 (MRC1; Invitrogen、PA5-114370) IHCは、pH9.0で20分間、Bond Rx自動染色装置 (Leica Biosystems) を使用してHIERで実施した。CD206一次抗体 (PA5-114370、Thermo Fisher Scientific、脾臓について0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 及び腫瘍について1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で使用するために希釈) 及びBond Polymer Refine Detection (Leica Biosystems) を製造元のプロトコールに従って使用した。脾臓及び腫瘍組織の両方を染色した。

30

【0839】

染色後、切片をdH₂Oで洗浄し、キシレン及びCytoseal XYL (ThermoFisher Scientific) 封入剤で封入した。スライド全体のスキャン (40 $\times$) をAperio AT2 (Leica Biosystems) で実行し、すべてのスキャンをPionyr Pathcoreウェブページに電子的に登録した。

40

【0840】

CD8a、MARCO、NCR1、CD19、及びCD206の定量化

組織切片は、画像解析ソフトウェアHALO v3.3.2541.202 (Indica Labs) を使用して解析した。画像をHALOデータベースにインポートし、ブラシアノテーションツールを使用して分析対象の領域を特定した (レイヤー1と表示)。はさみ注釈ツールを使用して、アーティファクト染色、ひだ、壊死領域、ガラス、または皮膚領域を除外して、脾臓及び腫瘍組織領域全体を含めた。IHC分析を、Indica Labs-Area Quantification v2.1.11アルゴリズムを使用して、すべてのマーカー (CD8a、MARCO、NCR1、CD19、及びCD20

50

6) の各注釈レイヤーで個別に実行した。アルゴリズムは、ヘマトキシリン染色から青色のピクセルを検出し、DAB IHC 染色から茶色のピクセルを検出するように設定した。データを Excel ファイルとしてエクスポートし、注釈付き領域全体に対する陽性 DAB 染色の % が個々のマーカーごとに収集され、データをプリズムにプロットするために使用した。

【0841】

マルチプレックス免疫蛍光 (IF) 染色と画像解析

マウスの脾臓及び腫瘍からの FFPE 切片を、5 プレックス IF パネルを使用して染色した。6 匹の PI-3008 処置マウス及び 6 匹のアイソタイプ処置マウスからの脾臓、ならびに 4 匹の PI-3008 処置マウス及び 4 匹のアイソタイプ処置マウスからの腫瘍を染色し、分析した。マルチプレックスマウス脾臓パネル及びマウス腫瘍 (E0771) パネルに含まれるすべての IHC 抗体は、最初に FFPE マウス脾臓及び腫瘍切片 (E0771 腫瘍) で DAB IHC によって最適化された。次に、マルチプレックスパネルを開発する際に、最適な抗体濃度と染色条件を考慮した。使用した抗体は、Cell Signaling の CD8a、98941S; Abcam の MARCO、ab239369; Abcam の CD19、ab245235、Invitrogen の CD206 (MRC1); PA5-114370; Abcam の NCRI ab233558; 及び Akoya からの核、SKUPF 1490。

【0842】

切片を、それぞれ一次抗体、続いて二次 HRP コンジュゲートポリマー、TSA-Opal フルオロフォアを使用してシグナル増幅する 4 回の連続染色に供した。一次-二次 HRP 複合体を除去するために、染色の各ラウンドの後に熱誘導エピトープ回復ステップを実行した。次に、スライドをスペクトル DAPI で対比染色し、退色防止封入剤を使用して封入した。

【0843】

染色されたスライドは、Vectra 3 イメージングシステム (Akoya Biosciences) を使用してイメージングされた。低倍率スキャンの後、関心領域 (ROI) を Phenochart ビューアー (Akoya Bioscience) を使用してスタンプし、これらのスタンプを次に高解像度 (20x) でスキャンした。代表的な白色髄、赤色髄、及び辺縁帯領域が含まれる領域を選択することにより、脾臓切片ごとに 4 つのスタンプを選択した。腫瘍切片では、腫瘍領域の大部分をカバーするようにスタンプが選択され、エッジ領域と中央領域を意図的に選択して、これらの腫瘍領域の比較分析を容易にした。取得した ROI 画像ファイルを Inform (Akoya Biosciences) で開き、スペクトル的に混合を解除した後、自動蛍光染色を除去した。画像解析は、最初に脾臓組織を赤色髄、白色髄、及び辺縁帯に手動でセグメント化することにより、Inform で実行した。ガラス領域は分析から除外した。腫瘍組織は、腫瘍のみを含み、皮膚、ガラス、及び壊死領域を除外するように手動で分割した。DAPI 対比染色を使用して核を識別及び分割し、その後、目的の細胞タイプを識別するための細胞表現型アルゴリズムのトレーニングを行った。次に、Inform によって生成されたデータを R studio にロードし、phenoptR Reports パッケージ (Akoya Biosciences) を使用して、そこから細胞数、細胞パーセンテージ、細胞密度、及びさまざまな組織区画の最近傍分析を含むデータを生成した。

【0844】

結果

PI-3008-AB はまた、アイソタイプ対照抗体と比較して、同所性 E0771 モデルにおいて単剤として抗腫瘍活性を示した (図 37)。33 日目の試験終了時に、PI-3008 を投与したマウスは、アイソタイプ対照と比較して統計的に有意な腫瘍体積の減少を示した ($p = 0.0037$) (図 38A)。アイソタイプ抗体及び PI-3008 についての腫瘍増殖阻害率 (TGI) を図 38B に示す。

【0845】

10

20

30

40

50

さらに、P I - 3 0 0 8 及びエフェクターデッド P I の両方が、同所性 E 0 7 7 1 モデルにおいて同様の単一薬剤活性を誘発した（図 3 8 C）。個々のパネルは、示された抗体またはアイソタイプ対照で処理した後の個々のマウスの腫瘍体積を示している。右上のパネルは、28日目の各マウスの腫瘍バリウムを示している。右下のパネルは、P I - 3 0 0 8 及び P I - 3 0 2 1 の血清中の抗体濃度を示している。

【0846】

P K - P D 有効性アッセイ

E 0 7 7 1 の *in vivo* P K - P D 試験では、P I - 3 0 0 8 が4回の投与後にアイソタイプ抗体と比較して単剤活性を誘発したことが示された。2回目の投与から、腫瘍サイズの有意差が観察されはじめた（図 3 9 B）。アイソタイプ対照マウスにおける個々の腫瘍体積を図 3 9 C に提供する。P I - 3 0 0 8 マウスにおける個々の腫瘍体積を図 3 9 D に提供する。28日目の最終腫瘍体積を図 3 9 E に提供する。さらに、P I - 3 0 0 8 の血清レベルは、研究の終わりまで強い曝露を維持した（図 3 9 F）。

10

【0847】

P I - 3 0 0 8 と組み合わせた場合の抗 P D - 1 の血清濃度も、単剤として投与した場合の以前の研究で見られたように、予想される曝露範囲内であった（図 4 0 A 及び 4 0 B）。図 4 0 A は P D - 1 抗体を用いた単独及び組み合わせ実験における P I - 3 0 0 8 濃度を提供し、図 4 0 B は、組み合わせ実験における P D - 1 濃度を提供する。

【0848】

P I - 3 0 0 8 は、抗体投与後の T M E における C D 8 + T 細胞及び N K 細胞の増加によって見られるように、E 0 7 7 1 モデルの腫瘍内免疫も活性化した。図 4 1 A は、アイソタイプ対照または P I - 3 0 0 8 の投与後に D A B で染色された C D 8 T 細胞及び N C R 1（N K 細胞）の I H C 画像を提供する。図 4 1 B は、I H C 染色の H A L O 画像分析による、腫瘍領域における細胞障害性 C D 8 + T 細胞及び N K 細胞の定量化を提供する。P I - 3 0 0 8 は、抗腫瘍反応の改善を示す T M E の変化を促進した。抗 M A R C O 抗体は、フローサイトメトリーにより、T M E 中の M H C I I ^{H i g h} L y 6 C + 単球、D C 浸潤、及び N K 1.1 N K 細胞を増加させた（図 4 1 C）。理論に拘束されることは望まないが、これらの細胞の増加は、腫瘍内免疫活性化を増加させ、T M E における抗原提示を改善する可能性がある。

20

【0849】

T M E における C D 8 + T 細胞と N K 細胞の増加も、マルチプレックス I F によって観察された。図 4 1 D は、腫瘍縁における C D 2 0 6 +、細胞、M A R C O + 細胞、N C R 1 + 細胞、及び C D 8 a + 細胞の定量化、腫瘍縁における示された細胞の細胞密度、C D 2 0 6 からの最近接細胞までの距離中央値及び示された細胞型、ならびにアイソタイプ抗体または P I - 3 0 0 8 で処理した後のマウスの M A R C O からの最近接細胞までの距離中央値及び示された細胞型を提供する。アイソタイプ抗体のデータは各データペアの左側に円形のアイコンで表示され、P I - 3 0 0 8 のデータは各データペアの右側に菱形のアイコンで表示される。このマルチプレックス分析は、N K 細胞及び C D 8 T 細胞が抗 M A R C O 治療後に腫瘍で増加することを示した。空間マッピングは、アイソタイプと比較して、P I - 3 0 0 8 処置腫瘍の T M E 内の M A R C O + 細胞との C D 8 + T 細胞及び N K 細胞の距離がより近いことを示した。

30

40

【0850】

E 0 7 7 1 モデルの腫瘍上清において P I - 3 0 0 8 によって誘導される炎症誘発性サイトカイン及びケモカインも評価した（図 4 2 A）。P I - 3 0 0 8 治療は、E 0 7 7 1 モデルの腫瘍上清にサイトカインとケモカインを誘導した。C T 2 6 研究で R N A s e q を介して特定されたのと同じサイトカインが E 0 7 7 1 モデルで誘導された。T 細胞の活性化及び N K 細胞の活性化に関連するサイトカインもまた、投与 2 後 1 日目に腫瘍上清中で観察された（図 4 2 B）。

【0851】

M A R C O は、脾臓において、主に辺縁帯マクロファージ、単球及び樹状細胞において

50

高度に発現される（図43）。アイソタイプ抗体で処理されたマウス由来の試料は、各試料ペアの左側に提供され、PI-3008抗体で処理されたマウス由来の試料は、各試料ペアの右側に提供される。図43のデータは、フローサイトメトリー分析で使用されたPI-3008-PEとmIgG2a-PEアイソタイプ抗体との間の Δ gMFIに基づいてプロットされている。このアッセイでは、MARCOフロー抗体は、試料中のMARCO+細胞への結合について、以前に投与された治療用PI-3008と競合している。したがって、受容体の占有と競合が予想され、フローアッセイでの低い抗MARCO結合を示す低い Δ gMFIレベルによって証明されるように、試料ペアの右側に提供されるPI-3008処理マウス由来の試料で観察された（図43）。フローアッセイにおけるMARCO染色の受容体の占有及び競合は、フローアッセイでの高い抗MARCO結合を示す高い Δ gMFIレベルによって証明されるように、試料ペアの左側に提供されるアイソタイプ処理マウス試料で観察されなかった（図43）。各骨髓性標的集団のアイソタイプ処理試料と比較して、PI-3008処理試料のROが高く、gMFIが低いことから、特定の各集団でのMARCOの発現が確認された。したがって、アイソタイプ治療群は、治療用抗体が存在しない場合に、骨髓標的集団でのMARCOレベルを検出するために（PI-3008フロー抗体を使用して）MARCO発現を示す。MARCO発現は、樹状細胞、CD11b int F480+マクロファージ、TM4+周辺マクロファージ、Ly6C+MHCI I^{High}単球、及びLy6C+MHCI I^{mid}単球で観察された。MARCO発現は、CD11b int F480+及びTIM4+辺縁帯マクロファージによって識別される辺縁帯マクロファージで最も高かった。MARCOはMHCI I+単球にも発現した。受容体占有は、これらの骨髓集団中のPI-3008抗体処置群（2回目の投与の24時間後）で達成された。

10

20

【0852】

要するに、図43は、アイソタイプ群の Δ gMFIが脾臓でMARCO受容体の発現を示したことを示し、PI-3008処置群の Δ gMFIは、PI-3008がMARCO陽性骨髓細胞に結合し、したがって、PI-3008フロー抗体で検出できなかったことが確認された。アイソタイプ抗体で処理されたマウス由来の試料は、各試料ペアの左側に提供され、PI-3008抗体で処理されたマウス由来の試料は、各試料ペアの右側に提供される。

30

【0853】

PI-3008は、脾臓の骨髓集団には影響を与えなかったが、2回目の投与の24時間後にB細胞に影響を与える可能性がある。図44A、44B、及び44Cに示されるように、PI-3008処置は、脾臓中のMARCO+骨髓またはリンパ系細胞集団を変化させなかった。しかし、PI-3008処置は、脾臓におけるCD19+B細胞及び形質B細胞の減少をもたらした（図44D）。アイソタイプ抗体で処理されたマウス由来の試料は、各試料ペアの左側に提供され、PI-3008抗体で処理されたマウス由来の試料は、各試料ペアの右側に提供される。

【0854】

PI-3008処置は、投与2で脾臓及び血清においてIgM産生を減少させ、IgG産生を増加させた（図45）。

40

【0855】

辺縁帯マクロファージでのMARCO発現は、IHCによって測定した場合、脾臓におけるPI-3008処置により減少した（図46）。脾臓のMARCO+細胞を、2回目の投与時と試験終了時に評価した。PI-3008マウスは、アイソタイプ抗体で処理したマウスと比較して、MARCO+辺縁帯マクロファージ数の減少を示した。PI-3008処置後の脾臓の変化を決定するために、モノプレックスIHCも使用した（図47A~D）。PI-3008処置後、全領域でCD8+T細胞及びNK細胞の増加が観察された（図47A及び47B）。CD19+細胞集団は可変であり、IHCによる測定は困難であった（図47C）。PI-3008処理後、CD206（赤色髄マクロファージ）の有意な増加が観察された（図47D）。アイソタイプ抗体で処理されたマウスからの試

50

料は、各試料ペアの左側に提供され、P I - 3 0 0 8 抗体で処理されたマウスからの試料は、各試料ペアの右側に提供される。

【 0 8 5 6 】

アイソタイプ抗体及びP I - 3 0 0 8 で処理した後の組織区画当たりの陽性細胞のパーセンテージを、マルチプレックスI F の画像分析によって決定した（図 4 8 A ~ D）。P I - 3 0 0 8 治療後の赤色髄におけるM A R C O の減少及び全領域におけるM A R C O の減少が観察された（図 4 8 A）。P I - 3 0 0 8 処理後、すべての組織区画にわたるC D 1 9 のわずかな減少が全領域で観察された（図 4 8 B）。P I - 3 0 0 8 処理後、すべての組織区画にわたるC D 8 a の増加が観察された（図 4 8 C）。P I - 3 0 0 8 処理後、赤色髄におけるC D 2 0 6 のわずかな増加が観察された（図 4 8 D）。アイソタイプ抗体で処理されたマウス由来の試料は、各試料ペアの左側に提供され、P I - 3 0 0 8 抗体で処理されたマウス由来の試料は、各試料ペアの右側に提供される。

10

【 0 8 5 7 】

2 日目と5 日目のP D 試料分析

抗体処置後2 日目及び5 日目に採取した腫瘍、脾臓及び血液由来の消化上清及び血漿をルミネックスを介して分析した。抗M A R C O 処置は、初期の時点でE 0 7 7 1 モデルの腫瘍上清にサイトカイン及びケモカインを誘導した（図 5 8 及び図 5 9）。2 日目の試料は右側に表示され、5 日目の試料は左側に表示される。サイトカイン及びケモカインの変化が両方の時点で観察され、G - C S F、I L 2 7、I L 1 0、及びT N F α は2 日目に増加し、I L 1 2 p 7 0、I L 1 0、I L 6、及びI L 4 は5 日目に増加した。ケモカインは遊走に参与し、走化性が最初の抗体投与後2 日目の脾臓で増強した。

20

【 0 8 5 8 】

抗M A R C O 処置は、マウス腫瘍におけるI g G 1 産生も調節した（表 2 8）。

【 0 8 5 9 】

【 表 2 8 】

表 28						
2 日目						
	IgA	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgM	総 IgG
アイソタイプ (µg/ml)	1.22	14.67	2.39	9.58	4.83	26.65
PI-3008 (µg/ml)	1.12	19.42	2.48	8.48	4.57	30.38
5 日目						
アイソタイプ (µg/ml)	1.10	20.61	1.69	13.56	6.54	35.86
PI-3008 (µg/ml)	1.20	15.52	2.25	12.34	6.59	30.12

30

40

【 0 8 6 0 】

抗M A R C O 処理は、脾臓において2 日目にI g M 産生を減少させ、I g G 1 は5 日目にわずかに減少した（表 2 9）。

【 0 8 6 1 】

50

【表 2 9】

表 29						
2 日目						
	IgA	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgM	総 IgG
アイソタイプ ($\mu\text{g/ml}$)	4.36	15.50	5.08	12.73	43.58	33.31
PI-3008 ($\mu\text{g/ml}$)	3.65	14.02	3.18	10.69	28.13	27.88
5 日目						
アイソタイプ ($\mu\text{g/ml}$)	1.90	14.58	1.46	7.74	18.37	23.77
PI-3008 ($\mu\text{g/ml}$)	2.43	10.99	2.01	9.63	17.22	22.62

10

【0 8 6 2】

抗 MARCO 処置は、PI-3008 処理後に血漿中の IgG1 及び IgG2b を減少させた（表 30）。

20

【0 8 6 3】

【表 3 0】

表 30						
5 日目						
	IgA	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgM	総 IgG
アイソタイプ ($\mu\text{g/ml}$)	21	16	13	45	6	74
PI-3008 ($\mu\text{g/ml}$)	18	6	13	37	6	56

30

【0 8 6 4】

最初に、MARCO 抗体処置を 1 回行った後、2 日目と 5 日目に腫瘍骨髄細胞を評価した。抗 MARCO は、2 日目及び 5 日目において、腫瘍中の TAM（減少、図 6 0）及び単球（増加、図 6 1）の総数に影響を与えた。抗 MARCO はまた、2 日目に TAM を免疫抑制性 MHCII- から炎症誘発性 MHCII+ にリプログラムし（図 6 0）、単球を 2 日目に免疫抑制性 MHCII- から炎症誘発性 MHCII+ にリプログラムした（図 6 1）。

40

【0 8 6 5】

抗 MARCO は、2 日目及び 5 日目で CD11c+MHCII+ DC を増加させ、2 日目及び 5 日目で Ly6G+ 好中球をわずかに減少させた（図 6 2）。要約すると、腫瘍骨髄細胞では、抗 MARCO 抗体は炎症誘発性単球及び DC を増加させ、腫瘍関連好中球（TAN）及び TAM を減少させた。さらに、初回投与の 2 日後、抗 MARCO は MHCII- TAM を MHCII+ TAM に、MHCII- 単球を MHCII+ 単球にリプログラムした。

【0 8 6 6】

50

次に、腫瘍リンパ系細胞を、MARCO抗体処置の1回投与後2日目及び5日目に評価した。抗MARCOは、腫瘍において2日目及び5日目にCD8+ T細胞及びCD4+ Tを増加させた（図63）。抗MARCOはまた、腫瘍において5日目にNK1.1 NK細胞も増加させた（図63）。

【0867】

次に、脾臓リンパ系細胞を、MARCO抗体処置の1回投与後2日目及び5日目に評価した。抗MARCOは、両方の日でCD19+ B細胞を減少させ、形質B細胞を変化させなかった（図64及びデータは示さず）。抗MARCOは、脾臓において5日目に濾胞B細胞を増加させ、辺縁帯B細胞を減少させた（図64）。抗MARCOは、5日目にCD19+ B細胞を減少させ、辺縁帯B細胞を減少させ、濾胞B細胞を増加させることにより、脾臓のB細胞集団に影響を与えた（図64）。抗MARCOは、脾臓のCD8+及びCD4+ T細胞を両方の日で増加させた（図65及びデータは示さず）。抗MARCOは、2日目にNK1.1 NK細胞を変化させなかったが、5日目にそれらを増加させた（図65及びデータは示さず）。抗MARCOはまた、脾臓DCを増加させ、脾臓における好中球レベルを変化させなかった（図65）。

10

【0868】

脾臓骨髓細胞は、MARCO抗体処置の1回投与後5日目にも評価した。抗MARCOは、Ly6C+単球をさまざまなMHCI Iレベルの細胞にサブタイプすることにより、5日目にMHCI I-単球を減少させ、MHCI I+単球を増加させた（高及び中間）（図66）。抗MARCOは、2日目及び5日目で脾臓中の赤色髄マクロファージを含む全マクロファージの数を増加させた（図67及びデータは示さず）。抗MARCOはまた、5日目で辺縁帯マクロファージ（MZM）、MHCI I+ DCの数を増加させ、5日目で非辺縁帯マクロファージを増加させた（図67及び68）。

20

【0869】

5日目にフローサイトメトリーによって血液のプロファイリングを行った。5日目にLy6C^{high}単球及びDCのわずかな減少とT細胞の増加が観察された。B細胞の変化は観察されなかった。（図69）。

【0870】

5日目のマウス脾臓、E0771腫瘍、及び血液（図70）におけるMARCO発現及び受容体占有率も評価した。図70に示されるように、MARCOは、脾臓、特にCD11b^{int} F480+及びTIM4+ Macによってゲートされる辺縁帯（MZ）マクロファージにおいて高レベルで発現された。MARCOは、mIgG2aアイソタイプ試料のMARCOフローサイトメトリー染色によって証明されるように、非境界帯マクロファージ（非MZ）では発現せず、フローサイトメトリーMARCO抗体は、細胞への結合について以前のMARCO抗体と競合しなかった。MARCOは、MHCI I^{high}単球（MHCI I^{high}及びMHCI I^{inter}）及びDCで発現した。MARCOは、辺縁帯外のCD206+赤色髄マクロファージ及びMHCI I+ Macでも発現した。治療用MARCO抗体の受容体占有は、MARCO試料のMARCOフローサイトメトリー染色の欠如によって証明されるように、上に列挙される図70の陽性MARCO発現細胞において達成され、フローサイトメトリーMARCO抗体は、以前の治療用MARCO抗体による細胞への結合について競合し、敗れた。

30

40

【0871】

E0771腫瘍では、MARCOは腫瘍内で低レベルで発現していた。受容体占有率は2日目には正確に測定できなかったが、5日目にMHCI I^{high}及び中単球；MHCI I+ DC；及びMHCI I+ TAM及びMHCI I- TAMの両方で達成された（図70）。血中免疫細胞ではMARCO発現は観察されなかった（図70）。

【0872】

要するに、PI-3008は、細胞骨格、アクチン及び筋肉、遊走、細胞接着及び遊走関連経路における遺伝子発現の変化によって証明されるように、腫瘍の運動性及び／または食作用の変化を誘発した。PI-3008は、NK細胞の活性化、T細胞の活性化、及

50

び骨髄細胞の分化によって証明されるように、免疫活性化も誘導した。リンパ節では、P I - 3 0 0 8 は、細胞シグナル伝達、細胞接着、細胞骨格、及び運動性遺伝子に関連する経路の遺伝子発現を変化させた。脾臓では、P I - 3 0 0 8 は、細胞シグナル伝達、細胞接着、細胞骨格、走化性、運動性遺伝子、及びB細胞活性化に関連する経路の遺伝子発現を変化させた。理論に束縛されることを望むものではないが、総合すると、このデータは、抗M A R C O抗体が、少なくともM A R C O + 骨髄性M 2 様T A MからM 1 様T A Mへの再分極、及びmM D S Cから炎症誘発性単球への再分極を媒介することにより、腫瘍内免疫を活性化することができることを示している。この再分極は、サイトカイン、ケモカイン、及び活性化受容体の産生につながり、T細胞及びN K細胞の活性化につながる。骨髄性M 2 様T A M及びmM D S Cの再分極とT細胞及びN K細胞の活性化は、N K細胞、C D 8細胞、及びM 1 様マクロファージによって媒介される腫瘍の破壊につながる。さらに、理論に束縛されることを望むものではないが、抗M A R C O抗体が髄索マクロファージ（M C M）に結合し得ることは、リンパ節の接着性及び運動性の変化を誘発し、抗M A R C O抗体が脾臓の辺縁帯マクロファージ（M Z M）に結合し得ることは、接着性及び運動性を変化させ、潜在的なB細胞の活性化につながり得る。

10

【0873】

実施例12：C T 2 6 i n v i v oモデルにおける薬力学アッセイ
方法

P D研究は、C T 2 6 担癌マウスで実施した。8～10週齢の雌B A L B / cマウス（T a c o n i c）に、対数増殖期で増殖したサブコンフルエントなC T 2 6 . W T細胞（A T C C、P i o n y rで保存）を移植した。無血清培地に再懸濁した100万個の腫瘍細胞を、イソフルラン麻酔下でマウスの右腹部脇腹に皮下移植した。パイロットC T 2 6 P D研究では、腫瘍体積が150～200mm³のマウスに10mg / kgのP I - 3 0 0 8 - A BまたはP I - 0 0 0 2 - A B（アイソタイプ）を1回静脈内投与し、処置の4日後に腫瘍と脾臓を抗マウスM A R C O、抗C D 8、抗グランザイムBによるI H C染色用の10%ホルマリンに採取した。H A L O画像解析ソフトウェア（I n d i c a L a b s）を使用して、腫瘍領域全体にわたるC D 8 + T細胞及びグランザイムB +細胞のパーセンテージを定量化した。脾臓を、非P I - 3 0 0 8競合抗マウスM A R C O I H C適合抗体で染色した。

20

【0874】

結果

抗M A R C O抗体P I - 3 0 0 8は、アイソタイプ対照処置腫瘍と比較しての、腫瘍におけるC D 8 + T細胞及び細胞毒性マーカーグランザイムBの増加を誘導した（図49）。データは、平均の±標準誤差（S E M）の各治療群内の3匹のマウスからの平均パーセンテージ値として表示される。

30

【0875】

脾臓では、辺縁帯マクロファージ上のM A R C Oレベルの変化が観察され、辺縁帯領域に顕著なギャップが見られた（図50）。対照の脾臓は、辺縁帯に数層のM A R C O + 染色細胞を示した。層は、ほとんどの動脈周囲リンパ鞘（P A L S）及びB細胞濾胞のキャップの周りに続いていた。P I - 3 0 0 8で処理したマウスの脾臓は、細胞と層が少なく、M A R C O + 染色がはるかに少ないことを示した。P A L SとB細胞キャップのカバレージにもギャップがあった。したがって、P I - 3 0 0 8で処理した動物の脾臓辺縁帯でM A R C O陽性細胞が減少した。理論に拘束されることを望むものではないが、これらのデータは、抗M A R C OがT M E内で炎症誘発性作動を誘発し、脾臓で見られる接着及び運動性の変化をもたらすことを示唆している。

40

【0876】

実施例13：免疫組織化学M A R C Oアッセイ

ヒトF F P E組織におけるM A R C O発現のプロファイリングに適した抗ヒトM A R C O I H C抗体を特定するために、15個の市販抗体と内部抗体をスクリーニングした。一次スクリーニングには、F F P E埋め込みM A R C O過剰発現（C L 3 0 1 0）、内因

50

性（L1236）、及び陰性対照（MARCOを発現しないHEK-293T細胞及びJurkat細胞）細胞ペレットを染色することが含まれた。一次スクリーニングに合格した抗体は二次スクリーニングに含まれ、*in situ*ハイブリダイゼーション（ISH）によって高RNA発現を有すると同定された肺癌及び結腸癌のFFPE切片を、異なるIHC染色条件（異なる抗体濃度、インキュベーション回数、及び抗原回復）を使用して染色した。R&D、RDM5（クローン番号858428.11、カタログCUSTOL7MABP）及びRDM9（クローン番号858423.11、カタログCUSTOL7MABP）からの2つの潜在的なヒトMARCO特異的既製IHC抗体を特定した。RDM5はRDM9よりわずかに優れていたため、追加の対照組織でのIHCアッセイ条件をさらに最適化するために選択された。RDM5は、自動化されたライブラットフォーム上で高pH抗原回復（ER2）とともに $2.5\mu\text{g}/\text{mL}$ で使用された場合、MARCO陽性細胞の特異的、強力、及び高感度の標識を示した（図51A）。染色は正常及び腫瘍組織マイクロアレイ（TMA）で検証され、MARCO特異性は有資格の病理学者によって確認された。さらに、正常組織でのMARCO発現は、肺、肝臓、及び脾臓の組織常駐マクロファージに限定されており、以前のRNAデータを確証した。

10

20

30

40

50

【0877】

次に、MARCO発現のさらなるプロファイリングを、17個の異なる腫瘍適応症からの、異なる診断（病理学、グレード、及びTNMステージ）を持つ対象ごとに重複したコアを含む20個の組織マイクロアレイ（TMA）で調査した。Reveal BiosciencesのTMAを、10%中性緩衝ホルマリンで24時間固定され、同一のSOPを使用して処理された組織を取得することによって作成した。切片はSuperfrost PlusまたはStartfrost Adhesiveスライド上に採取され、すべてのTMAは注文時に4 μm の連続切片に新鮮に切断され、IHC染色の前に4℃で保存された。

【0878】

Aperio AT2スキャナーを使用して40倍で各TMAのスライド全体をスキャンした後、次のスコアリングシステムを使用して、有資格の病理学者が腫瘍介在性間質のMARCO+細胞の定量化を評価した：0=<1%陽性細胞、0.5=1~10%陽性細胞、1=10~25%陽性細胞、1.5=25~50%陽性細胞、2=約50%陽性細胞、2.5=50~75%陽性細胞、3=約75%陽性細胞、及び3.5=>75%陽性細胞（間質に対して）。面積の半分以上が歪んでいる失われたコアまたは折り畳まれたコアは、分析から除外され、スコアリングされない。MARCO+細胞が間質に対して1%または1%超で発現された場合、各患者の染色は陽性に見なされた。各ドットは1つのケースを表し、各適応症の中央値は線で表される。

【0879】

1%MARCO+細胞をカットオフとする間質での陽性症例のパーセンテージは、結腸癌（92%）で最も高く、続いて肺癌（87%）、子宮内膜癌（78%）、中皮腫（64%）、卵巣癌（61%）、リンパ腫（60%）、甲状腺癌（60%）、TNBC（53%）、乳癌（51%）、頭頸部癌（45%）、胃癌（44%）、膵臓癌（43%）、肝臓癌（39%）、及び腎臓癌（33%）であった（図51B）。MARCO IHCスコアの中央値は、結腸、肺、甲状腺、及び中皮腫でスコア1で最も高く、次は、すべての腫瘍グレードのリンパ腫及び子宮内膜がんがスコアの中央値0.75である（データは示さず）。進行したグレードIIIの腫瘍のみに注目すると、MARCO IHCスコアの中央値は乳癌で0.5から1に、腎臓癌で0から0.5に増加し、MARCO発現の増加がこれらの腫瘍適応症におけるより高い腫瘍グレードと相関していることを示している（図51C）。さらに、正常組織のMARCO IHCスコアは、正常な肝臓、肺、脾臓、結腸、卵巣、及び神経組織で最も高く、前述のMARCO RNA発現データを裏付けている。したがって、RDM5抗体を使用したMARCO IHCスコアに基づくと、結腸癌、肺癌、中皮腫、リンパ腫、甲状腺癌、子宮内膜癌、及び卵巣癌で、IHCスコア及びMARCO陽性症例の数が最も高くなっている。

【 0 8 8 0 】

実施例 1 4 : M A R C O 抗体産生のための細胞株開発

二重遺伝子ベクターごとに2つの独立したトランスフェクションを実行し、トランスフェクションごとに3つの静的な96浅底ウェルプレートを使用した。96深底ウェルプレートでの懸濁培養への移行が行われ、4つのトランスフェクションプールを上部の培養物から生成する。すべての培養物は、6日間の培養を通じて $\geq 97\%$ の生存率を維持した。

【 0 8 8 1 】

トランスフェクションプール産物の品質評価は、部分精製（すなわち、M a b S e l e c t（商標）S u R e（商標）アフィニティークロマトグラフィー及びpH7への試料中和）の後に実施した。L o n z aが、ゲル浸透高速液体クロマトグラフィー（G P - H P L C）、ドデシル硫酸ナトリウム（S D S）電気泳動（還元及び非還元）、及びイメージングキャピラリー等電点電気泳動（i C I E F）によって製品の品質評価を行った。P I - 3 0 3 0 . 4 1 の凝集データは、他の候補と比較して大幅に上昇した。トランスフェクションプール分析の結果を以下の表31～36に示す。

【 0 8 8 2 】

【表 3 1】

表 3 1 : トランスフェクションプール濃度データ

トランスフェクションプール	部分精製濃度(mg/mL)	部分的に精製された体積(μ L)	総量(mg)
3010.15 (1)	0.818	650	0.53
3010.15 (2)	0.959	645	0.62
3010.15 (3)	1.372	650	0.89
3010.15 (4)	1.150	750	0.86
3010.25 (1)	1.248	740	0.92
3010.25 (2)	0.936	655	0.61
3010.25 (3)	1.243	590	0.73
3010.25 (4)	1.271	605	0.77
3030.41 (1)	0.972	650	0.63
3030.41 (2)	1.073	655	0.70
3030.41 (3)	1.025	655	0.67
3030.41 (4)	0.871	650	0.57

【 0 8 8 3 】

【表 3 2】

表 3 2 : G P - H P L C データによるトランスフェクションプール凝集

トランス フェクション プール	フラグメント (%)	モノマー (%)	凝集 (%)	
3010.15 (1)	<0.10	89.98	10.02	7.9~10.0
3010.15 (2)	0.10	91.52	8.48	
3010.15 (3)	<0.10	92.06	7.94	
3010.15 (4)	<0.10	91.63	8.37	
3010.25 (1)	<0.10	95.15	4.85	4.9~9.8
3010.25 (2)	<0.10	90.20	9.80	
3010.25 (3)	<0.10	94.47	5.53	
3010.25 (4)	<0.10	92.49	7.51	
3030.41 (1)	<0.10	80.83	19.17	17.5~19.7
3030.41 (2)	<0.10	81.69	18.31	
3030.41 (3)	<0.10	82.46	17.54	
3030.41 (4)	<0.10	80.33	19.67	

10

20

【 0 8 8 4 】

【表 3 3】

表 3 3 : トランスフェクションプール S D S 電気泳動 (還元) データ

トランス フェクション プール	LC サイズ (kDa)		LC 純度 (%)		HC サイズ (kDa)		HC 純度 (%)		LC+HC 純度 (%)	
3010.15 (1)	27.36	27.3 ~ 27.6	42.11	41.8 ~ 43.3	62.47	62.2 ~ 62.8	57.66	56.4 ~ 58.0	99.77	99.8
3010.15 (2)	27.27		43.33		62.24		56.42		99.75	
3010.15 (3)	27.61		41.77		62.82		58.02		99.80	
3010.15 (4)*	27.52		36.73		62.61		57.55		94.27	
3010.25 (1)*	27.02	26.5 ~ 27.0	26.93	39.8 ~ 41.5	63.01	61.5 ~ 63.0	32.45	58.1 ~ 59.9	59.38	99.6 ~99. 7
3010.25 (2)	26.70		41.47		62.09		58.13		99.60	
3010.25 (3)	26.48		40.72		61.48		58.95		99.67	
3010.25 (4)	26.59		39.77		61.55		59.89		99.65	
3030.41 (1)	26.51	26.5 ~ 26.8	43.32	42.5 ~ 43.5	61.65	61.7 ~ 62.2	56.47	56.0 ~ 57.3	99.79	98.7 ~99. 8
3030.41 (2)	26.48		43.53		61.78		56.27		99.80	
3030.41 (3)	26.72		42.71		62.24		56.01		98.72	
3030.41 (4)	26.75		42.49		62.21		57.30		99.79	

30

40

* 値の違いは、完全に還元されていない試料による可能性がある（還元されたエレクトロフェログラムと試料の非還元データによってサポートされる）。3010.15(4)では少量の高分子量種、3010.25(1)ではかなりの量の高分子量種。これらの値は、候補ごとの純度範囲から除外した。

【 0 8 8 5 】

50

【表 3 4】

表 3 4：トランスフェクションプール S D S 電気泳動（非還元）データ

トランス フェクション プール	IgG サイズ (kDa)		IgG 純度 (%)	
3010.15 (1)	170.16	167.8~170.2	96.04	95.8~97.0
3010.15 (2)	169.62		95.83	
3010.15 (3)	167.81		96.67	
3010.15 (4)	168.09		96.99	
3010.25 (1)	168.83	167.7~169.2	96.72	95.7~96.7
3010.25 (2)	168.47		96.53	
3010.25 (3)	169.19		96.43	
3010.25 (4)	167.72		95.70	
3030.41 (1)	165.78	165.0~167.5	96.04	95.2~96.0
3030.41 (2)	164.99		95.59	
3030.41 (3)	167.45		95.90	
3030.41 (4)	166.61		95.24	

10

20

【 0 8 8 6 】

【表 3 5】

表 3 5：トランスフェクションプール i C I E F アイソフォームデータ

トランス フェクション プール	ピーク領域 (%) *									
	酸性変異体ピーク				主ピーク		塩基性変異体ピーク			
	アイソフォー ム 5		アイソフ ォーム 4		アイソフ ォーム 3		アイソフォー ム 2		アイソフォー ム 1	
3010.15 (1)	5.7	<LOQ -6	18.4	17 ~ 20	67.7	67 ~ 71	6.8	6~7	<LOQ	<LOQ
3010.15 (2)	5.3		17.3		69.2		6.9		<LOQ	
3010.15 (3)	5.1		20.1		67.4		6.4		<LOQ	
3010.15 (4)	<LOQ		19.2		70.6		5.8		<LOQ	
3010.25 (1)	<LOQ	<LOQ	15.9	15 ~ 16	72.8	72 ~ 73	6.6	7	<LOQ	<LOQ
3010.25 (2)	<LOQ		15.9		72.3		6.8		<LOQ	
3010.25 (3)	<LOQ		15.4		72.9		6.7		<LOQ	
3010.25 (4)	<LOQ		16.2		71.9		6.7		<LOQ	
3030.41 (1)	5.4	5~7	19.4	19 ~ 21	69.5	68 ~ 70	<LOQ	<LOQ -5	<LOQ	<LOQ
3030.41 (2)	7.0		20.0		67.8		<LOQ		<LOQ	
3030.41 (3)	5.8		20.5		68.9		<LOQ		<LOQ	
3030.41 (4)	6.5		20.2		67.6		5.0		<LOQ	

30

40

* L O Q は 4 . 9 %。

【 0 8 8 7 】

3 0 1 0 . 1 5 : 計算された p I : 9 . 1 ; アイソフォーム 5 : p I 8 . 8 7 ~ 8 . 8

50

9 ; アイソフォーム 4 : p I 8 . 9 6 ; アイソフォーム 3 : p I 9 . 0 4 ~ 9 . 0 5 ; アイソフォーム 2 : p I 9 . 1 5 ~ 9 . 1 6 ; アイソフォーム 1 : p I 9 . 2 4 ~ 9 . 2 5
。

【 0 8 8 8 】

3 0 1 0 . 2 5 : 計算された p I : 8 . 8 ; アイソフォーム 5 : p I 8 . 3 0 ~ 8 . 3 1 ; アイソフォーム 4 : p I 8 . 4 6 ~ 8 . 4 7 ; アイソフォーム 3 : p I 8 . 6 1 ~ 8 . 6 2 ; アイソフォーム 2 : p I 8 . 7 5 ; アイソフォーム 1 : p I 8 . 9 0 。

【 0 8 8 9 】

3 0 3 0 . 4 1 : 計算された p I : 9 . 1 ; アイソフォーム 5 : p I 8 . 8 0 ~ 8 . 8 2 ; アイソフォーム 4 : p I 8 . 8 9 ; アイソフォーム 3 : p I 8 . 9 9 ~ 9 . 0 0 ; アイソフォーム 2 : p I 9 . 1 0 ~ 9 . 1 1 ; アイソフォーム 1 : p I 9 . 2 0 。

【 0 8 9 0 】

【 表 3 6 】

表 3 6 : トランスフェクションプール i C I E F 要約データ

トランス フェクション プール	ピーク領域 (%)					
	酸性変異体ピーク		主ピーク		塩基性変異体ピーク	
3010.15 (1)	24.1	23~25	67.7	67~71	8.2	7~8
3010.15 (2)	22.6		69.2		8.2	
3010.15 (3)	25.2		67.4		7.5	
3010.15 (4)	22.6		70.6		6.8	
3010.25 (1)	19.8	20~21	72.8	72~73	7.4	7~8
3010.25 (2)	20.0		72.3		7.7	
3010.25 (3)	19.6		72.9		7.4	
3010.25 (4)	20.6		71.9		7.5	
3030.41 (1)	24.8	25~27	69.5	68~70	5.7	5~6
3030.41 (2)	27.0		67.8		5.2	
3030.41 (3)	26.3		68.9		4.8	
3030.41 (4)	26.7		67.6		5.7	

【 0 8 9 1 】

E L I S A 及びフローサイトメトリーによって、M A R C O トランスフェクタント細胞に対する結合について3つの抗体のトランスフェクションプールを試験した。プール材料の結合を、C H O - S 細胞への一過性トランスフェクションによって産生された参照抗体と比較した。安定トランスフェクション法によって産生された抗体は、一過性トランスフェクションによって作製された参照抗体に匹敵する結合を示した (図 5 3) 。

【 0 8 9 2 】

実施例 1 5 : 可溶性 M A R C O アッセイ

材料及び方法

ストレプトアビジン M S D プレート (M S D 、 カタログ番号 L 1 5 S A - 1) を 2 μ g / m L のビオチン化抗 M A R C O 抗体 (P I - 3 0 4 1 - A B 、 P i o n y r) でコーティングした。プレートを室温にて 6 0 分間インキュベートしてから洗浄した。

【 0 8 9 3 】

タンパク質標準 (R G - 3 0 0 0 A 、 A t u m) 及び血清試料 (B i o V T) を緩衝液 (P B S / 0 . 5 % B S A / 0 . 0 5 % T w e e n + C a 2 + / M g 2 +) で希釈し、 2 m M C a 2 + を含む D 4 3 希釈液 (M S D 、 カタログ番号 R 5 0 A G - 2) 中のコーティ

ングしたプレートに加えた。プレートを室温で90分間インキュベートし、洗浄した。1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の検出抗体、抗MARCO (PI-3071-AB、Pionyr) を添加し、プレートを室温で60分間インキュベートした。プレートを洗浄し、1× Read Buffer (MSD、カタログ番号R92TC-1) をMSDプレートに加えた。プレートをMSD Sector Imagerで読み取った。

【0894】

結果

sMARCOアッセイ範囲は0.1 ng/mL ~ 100 ng/mL であった。LLOQは0.1 ng/mL 、ULOQは100 ng/mL であった。RG-3000AのsMARCO検量線を図55A及び表37に示す。

【0895】

【表37】

表 37		
公称濃度 ng/ml	検出された平均濃度 (ng/ml)	回収平均%
100	102.2	102.2
25.0	23.5	94.0
6.25	7.09	113.4
1.56	1.76	113.0
0.39	0.32	83.1
0.10	0.10	100.0

【0896】

正常なヒト血清試料のsMARCOレベルは、9 ng/mL ~ 13 ng/mL の範囲であった。がん血清試料中のsMARCOレベルは、6 ng/mL ~ 22 ng/mL の範囲であった。sMARCOレベルを図55Bに示す。

【0897】

血清試料（ヒト、カニクイザル、及びマウス）からsMARCOを検出するイムノアッセイの開発に成功した。sMARCOアッセイは、その特異性、感度、希釈の直線性、及び選択性について認定されており、商用ソースから取得した患者の血清試料中のsMARCOレベルを正確に決定した。sMARCOレベルは、乳房、結腸直腸、中皮腫、子宮頸部、小リンパ球性リンパ腫、及び非ホジキンリンパ腫と診断された患者でより高いことが観察された（図55B）。

【0898】

実施例16：in vivo B細胞欠損マウス研究

方法

J B細胞変異を有するBalb/cマウスをTaconicから入手した。マウス実験は、実施例4に記載のように設定した。簡単に言えば、CT26腫瘍が中央値約100 mm^3 に達した時にIP投薬を開始した。Q5dx4でマウスに10 mg/kg のPI-3008または5 mg/kg のPD-1抗体を投与した。対照としてWTマウスを使用した。

【0899】

結果

B細胞が存在しないことにより、CT26腫瘍におけるPI-3008と抗PD1の併用効果が弱まった（図56）。PD-1抗体と組み合わせたPI-3008抗体は、B細胞ノックアウトマウス（中段）での組み合わせ治療と比較して、WTマウス（上段）でよ

り大きな腫瘍縮小をもたらした。下のグラフは、各条件での個々のマウスの腫瘍体積を示している。

【0900】

実施例17：PI-3010.15はNF-κBシグナル伝達経路を誘導する

材料及び方法

THP1-Blue (商標) NF-κB細胞はInvivogenから入手し、10% Fetal Bovine Serum (Gibco)、25mM HEPES (Gibco)、1× GlutaMax (Gibco)、100ug/ml Normacin (Gibco)、10ug/ml Blasticidin (ThermoFisher) を添加したRPMI 1640培地 (Gibco) で培養した。24ウェルプレートのウェル当たり8ug/mlのポリブレンを含む500ulの培地中、全長MARCO構築物 (CL#3010) を含むレンチウイルスをMOI 10で約50,000個の細胞に形質導入した。37℃、5%CO₂で一晩インキュベーションした後、細胞をPBSで洗浄し、完全増殖培地中の6ウェルプレートに播種した。2〜3日後、安定した細胞選択のために培地を0.3ug/mlのピューロマイシン (Invitrogen) を含む増殖培地に交換し、プールした細胞を培養して増殖させた。

【0901】

レポーターアッセイでは、96ウェルU底プレートのウェル当たり300,000個の細胞を播種し、PI-3010.15またはアイソタイプ抗体対照の用量滴定及び10e6/mlのHKLM (Invivogen) または10ng/mlのFALSTupと (Invivogen) アゴニストで共培養し、37℃、5%CO₂で4時間または一晩インキュベートした。インキュベーション後、20ulの上清を新しい96ウェルプレートに移し、180ul/ウェルのQuantiblu Solution (Invivogen) とともに37℃、5%CO₂で、30〜60分インキュベーションした。Tecanマイクロプレートリーダーを使用して650nmで光学密度 (OD) を測定することにより、アルカリホスファターゼ活性を計算した。

【0902】

THP-1 MARCO過剰発現細胞を、PI-3010.15治療後に活性化された炎症誘発性遺伝子のバイオマーカーシグネチャーを検証するためにも使用した。培地1ml中の1×10⁶細胞を24ウェルプレートのウェル当たりに播種した。PI-3010.15及びPI-0003 (対応するhIgG1アイソタイプ) を1μg/ml、5μg/ml、及び10μg/mlで4時間及び24時間、細胞に添加した。細胞をRLT緩衝液で溶解し、ヒトプライマーを使用してqPCR試験用にRNAを抽出し、TNFα、IL-6、IL-1β、IL-10、CCL24、CXCL8、IL-1α、IL-18、及びCCL20の発現を測定した。

【0903】

結果

PI-3010.15は、24時間後にHKLM、FSL-1、及びFLA-STアップを添加すると、4時間後にNF-κBシグナル伝達経路を誘導した。PI-3010.15はまた、24時間後に非処理細胞においてNF-κB経路を誘導した (図57)。

【0904】

THP-1 OVX細胞を、MARCO抗体PI-3010.15による炎症誘発性サイトカインの活性化を試験するための初代hMDM細胞の代理としても使用した。細胞を1μg/ml、5μg/ml、または10μg/ml (TNFαのみ) のPI-3010.15またはアイソタイプ抗体とともに4時間または24時間インキュベートした。細胞を収集し、qRT-PCRを介してTNFα、IL-6、IL-1β、CXCL8、CCL20、CCL24、及びIL-18遺伝子発現について評価した。PI-3010.15は、試験したすべての抗体濃度で4時間及び24時間後にTNFα遺伝子発現を誘導した (図71)。PI-3010.15はまた、4時間及び24時間目で炎症誘発性サイトカインIL-6、IL1β、及びCXCL8の発現を誘導した (図71)。5μg/ml

用量の P I - 3 0 1 0 . 1 5 もまた、2 4 時間目で C C L 2 0、C C L 2 4、及び I L 1 8 などの炎症促進性サイトカインを誘導した（図 7 1）。

【0905】

実施例 18：hMDMにおけるホスホアレイアッセイ

方法

I L 1 0 で分極された初代ヒト単球由来マクロファージ（hMDM）（ドナー 2 人）に対して、Full Moon Biosystems Phospho Explorer Antibody Array を使用して、ホスホアレイアッセイを実施した。

【0906】

ネガティブ免疫磁気選択（StemCell Technologies）を使用して末梢血単核細胞から分離された 2 つの凍結ヒト末梢血 C D 1 4 + 単球を解凍し、1 0 %（v / v）熱不活化 F B S（HyClone）、1 m M ピルビン酸ナトリウム、非必須アミノ酸、2 m M L - グルタミン、5 5 u M 2 - メルカプトエタノール及び抗真菌抗生物質（すべて Gibco から）を補充した R P M I 1 6 4 0 培地で培養した。単球は、2 4 個のウェルプレート中、ウェル当たり 5 0 0, 0 0 0 細胞の密度で 5 0 n g / m l のヒトマクロファージコロニー刺激因子（M - C S F）（PeproTech）の存在下で完全 R P M I 1 6 4 0 培地で培養することによりマクロファージに分化した。分化の 3 日目に、新鮮な M - C S F を添加して培地を補充した。分化したヒトマクロファージを、2 5 n g / m l の組換えヒト I L - 1 0（M2 条件）を 3 7 ° C で 2 4 時間添加することにより、6 日目に分極した。7 日目に培地を吸引し、細胞を穏やかに洗浄した。5 μ g / m l の P I - 3 0 1 0 . 1 5 または h I g G 1 アイソタイプ対照（P I - 0 0 0 3）を含むウェルに、5 0 0 μ l のインキュベーション培地（0 . 5 % B S A を含む 1 × R P M I）を添加した。氷冷 P B S で洗浄し、3 0 0 μ l の m P e r 及び 1 : 1 0 0 の H A L T プロテアーゼ及びホスファターゼ阻害剤で細胞を溶解することにより、5 分及び 1 5 分後に処理を終了した。約 3 0 0 μ g のタンパク質ライセートを Full Moon Biosystems に送り、Phospho Explorer Antibody Array を実行した。Full Moon Biosystems は、自社の標準プロトコールを使用して、各対の部位特異的抗体及びリン酸化部位特異的抗体について、レプリケートスポットの平均信号強度を標識、結合、検出し、対になった抗体の信号比を決定する。対照と対照試料との間の倍数変化は、次の式を使用して計算した：処理試料 / 対照試料（h I g G 1 処理または非処理）。

【0907】

P I - 3 0 1 0 . 1 5 / アイソタイプ及び P I - 3 0 1 0 . 1 5 / 未処理比分析の両方について、倍率変化が 0 . 6 未満または 1 . 8 を超える場合、リン酸ヒットは有意であると見なされた。さらに、アイソタイプ自体が hMDM の F c を介したシグナル伝達の変化により、未処理に対して実質的な影響を与えた場合（未処理と比較して 0 . 7 5 倍未満の減少または 1 . 5 倍を超える増加）、ほんの少しヒットが含まれた。これらのヒットについて、P I - 3 0 1 0 . 1 5 / アイソタイプの比率が有意な範囲（< 0 . 6 及び 1 . 8 倍超）に収まる場合、P I - 3 0 1 0 . 1 5 / 未処理の比率は、0 . 7 5 倍未満の減少及び 1 . 5 倍以上の増加の場合に有意であると見なされた。

【0908】

結果

表 3 8 は、5 分での、P I - 3 0 1 0 . 1 5 対アイソタイプ処理細胞及び P I - 3 0 1 0 . 1 5 対未処理（U T）細胞における有意なリン酸化を示す。

【0909】

10

20

30

40

50

【表 3 8】

表 38		
アップ (>1.8FC)		
遺伝子	3015 対アイソタイプ (5 分)	3015 対 UT (5 分)
Cyclin B1 (Phospho-Ser147)	5.084445769	2.561147785
IRS-1 (Phospho-Ser794)	4.447939568	2.871815775
PDGFR alpha (Phospho-Tyr849)	3.247023728	2.0112109
Elk1 (Phospho-Ser389)	2.650795969	1.93843226
HSP27 (Phospho-Ser78)	2.618765237	2.781365032
CDK1/CDC2 (Phospho-Tyr15)	2.495918288	2.915628441
CDK5 (Phospho-Tyr15)	2.495088042	3.772464066
IL-2RA/CD25 (Phospho-Ser268)	2.385317047	2.26149298
Raf1 (Phospho-Ser259)	2.345569464	2.986531327
GluR1 (Phospho-Ser863)	2.218294441	2.416141632
LYN (Phospho-Tyr507)-Src 経路	2.16499766	1.97114872
Ezrin (Phospho-Thr566)	2.148744088	2.992168753
Lamin A/C (Phospho-Ser392)	2.141294348	2.948772441
BAD (Phospho-Ser91/128)	2.011033931	2.461349555
Tau (Phospho-Ser396)	1.955441551	1.918036855
MAP3K8/COT (Phospho-Thr290)	1.943373784	1.967650786
HDAC5 (Phospho-Ser259)	1.922487843	2.088809947
PAK3 (Phospho-Ser154)	1.910328132	2.017578127
mTOR (Phospho-Thr2446)	1.8	2.42
ダウン(<0.6FC)		
14-3-3 beta/zeta (Phospho-Ser186/184)	0.528463565	0.574004751
Synapsin (Phospho-Ser9)	0.468698508	0.444984245
PKC delta (Phospho-Ser645)	0.452312753	0.359573251
14-3-3 zeta (Phospho-Ser58)	0.446714092	0.3453927
Abl1 (Phospho-Thr754/735)	0.399803417	0.334055031
AKT1 (Phospho-Ser246)	0.38984194	0.479793736
Smad1 (Phospho-Ser187)	0.380264132	0.442638779

10

20

30

40

【0 9 1 0】

表 3 9 は、最初のフィルタリングバケットから外れた 5 分間の試料の追加ヒットを示す。

【0 9 1 1】

50

【表 3 9】

表 39			
遺伝子	3015 対 アイソタイプ	3015 対 未処置	アイソ対 未処置
ATF2 (Phospho-Ser62/44)	2.13	1.59	0.75
Claudin 3 (Phospho-Tyr219)	0.22	0.68	3.04
Connexin 43 (Phospho-Ser367)	0.29	0.67	2.32
LCK (Phospho-Tyr192)	0.30	0.63	2.06
Src (Phospho-Tyr529)	0.32	0.78	2.45
IKK-beta (Phospho-Tyr188)	0.42	0.77	1.84
PLD1 (Phospho-Ser561)	0.42	0.78	1.86

10

【0 9 1 2】

表 4 0 は、アイソタイプがシグナルを減少させ（未処理の 0.6 倍未満）、P I - 3 0 1 0.1 5 が生物学的意義のある効果をレスキューした、5 分間の試料の追加ヒットを示す。P I - 3 0 1 0.1 5 / 未処理の増加倍数は > 0.9 であり得る。

20

【0 9 1 3】

【表 4 0】

表 4 0			
遺伝子	3015 対 アイソタイプ	3015 対 未処置	アイソ対 未処置
CaMK1-alpha (Phospho-Thr177)	4.58	1.13	0.25
p27Kip1 (Phospho-Thr187)	3.35	0.95	0.28
Cortactin (Phospho-Tyr421)	3.00	1.29	0.43
Keratin 18 (Phospho-Ser52)	2.36	0.96	0.41
FAK (Phospho-Tyr397)	2.19	0.88	0.40
IkB-beta (Phospho-Thr19)	2.13	1.10	0.52
PLC beta3 (Phospho-Ser1105)	2.11	1.10	0.52

30

【0 9 1 4】

表 4 1 は、1 5 分での、P I - 3 0 1 0.1 5 対アイソタイプ処理細胞及び P I - 3 0 1 0.1 5 対未処理（U T）細胞における有意なリン酸化を示す。

40

【0 9 1 5】

50

【表 4 1】

表 41		
アップ (>1.8FC)		
遺伝子	遺伝子	遺伝子
SYK (Phospho-Tyr525)	3.763491432	2.629401334
Dok-1 (Phospho-Tyr398)	3.086467586	2.609649844
IKK-alpha/beta(Phospho-Ser180/181)	2.959202923	1.934873037
HSP90B (Phospho-Ser226)	2.870020923	3.546965968
GluR1 (Phospho-Ser863)	2.609270653	2.21995696
Synaptotagmin (Phospho-Ser309)	2.600941915	2.136658796
SHP-2 (Phospho-Tyr580)	2.597416517	2.242046774
Filamin A (Phospho-Ser2152)	2.335627516	1.996061335
CaMK4 (Phospho-Thr196/200)	2.279954736	1.893568987
Synuclein alpha (Phospho-Tyr133)	2.131004882	1.874499543
HDAC5 (Phospho-Ser498)	2.110924432	2.744099757
P70S6K (Phospho-Ser424)	2.076974184	1.870856295
4E-BP1 (Phospho-Ser65)	2.06037659	2.827767866
Calmodulin (Phospho-Thr79/Ser81)	2.046380319	2.662693319
MKK4/SEK1 (Phospho-Thr261)	2.035499973	3.040392853
IL-2RA/CD25 (Phospho-Ser268)	1.973584034	2.080305927
Synaptotagmin (Phospho-Thr202)	1.930362488	1.991073071
Rb (Phospho-Ser780)	1.874035219	1.974833058
Tyrosine Hydroxylase (Phospho-Ser40)	1.852127179	1.934979677
ダウン(>0.6FC)		
PLCG2 (Phospho-Tyr1217)	0.591517857	0.563418522
Kv1.3/KCNA3 (Phospho-Tyr135)	0.57141834	0.586825891
DARPP-32 (Phospho-Thr34)	0.55741993	0.41127774
Claudin 7 (Phospho-Tyr210)	0.556173961	0.597139861
Rel (Phospho-Ser503)	0.554992754	0.509612791
Ezrin (Phospho-Tyr478)	0.535586574	0.508394478
LKB1 (Phospho-Ser428)	0.531130409	0.520111023
AurA (Phospho-Ser342)	0.527800917	0.49832997
p130Cas (Phospho-Tyr165)	0.519493014	0.521059511
Cortactin (Phospho-Tyr421)	0.474466269	0.464638242
Dok-1 (Phospho-Tyr362)	0.456406193	0.482008648
Keratin 18 (Phospho-Ser33)	0.417597114	0.288197731
CaMK2-beta/gamma/delta (Phospho-Thr287)	0.410587574	0.537483464
ETK (Phospho-Tyr40)	0.409259434	0.437316317
NFkB-p65 (Phospho-Thr435)	0.400460795	0.344387917
p27Kip1 (Phospho-Ser10)	0.383076583	0.540101088
NFkB-p100/p52 (Phospho-Ser869)	0.37145326	0.532229421

10

20

30

40

50

VEGFR2 (Phospho-Tyr1175)	0.368651283	0.39699714
PKC delta (Phospho-Ser645)	0.3449432	0.538228023
Estrogen Receptor-alpha (Phospho-Ser118)	0.322713977	0.305382748
HSL (Phospho-Ser554)	0.31391716	0.411180773
CD3Z (Phospho-Tyr142)	0.309319341	0.377863121
PAK3 (Phospho-Ser154)	0.288315803	0.472978229
Raf1 (Phospho-Ser296)	0.241201384	0.310819568
CDK1/CDC2 (Phospho-Thr14)	0.232456135	0.311120574

10

【 0 9 1 6 】

表 4 2 は、1 5 分間の試料の最初のフィルタリングバケットから外れた追加ヒットを示す。

【 0 9 1 7 】

【表 4 2】

20

表 42			
遺伝子	3015 対 アイソタイプ	3015 対 未処置	アイソ対 未処置
PKC epsilon (Phospho-Ser729)	0.34	0.75	2.19
EGFR (Phospho-Tyr1110)	0.41	0.71	1.71
ASK1 (Phospho-Ser966)	0.42	0.67	1.58
c-Jun (Phospho-Ser63)	0.43	0.76	1.78
TOP2A/DNA トポイソメラーゼ II (Phospho-Ser1106)	0.45	0.77	1.72
STAT6 (Phospho-Thr645)	0.48	0.74	1.53

30

【 0 9 1 8 】

ホスホアレイスクリーニングに基づいて、5 分後に下方制御された経路は次のとおりである：細胞接着：クローディン 3、コネキシン 43、シアプシン；1 4-3-3 ベータ及びゼータ：複数の炎症経路を調節するアダプター；PI 3 K マスターレギュレーター経路：AKT 1；PKC デルタ（Src の上流）；TGFβ シグナル伝達：Smad 1；c-Abl シグナル伝達（STAT シグナル伝達を調節する）；及び Src 経路：LCK、Src（細胞骨格再構成、食作用及び生存）。

40

【 0 9 1 9 】

5 分後に上方制御された経路は次のとおりである：細胞周期：サイクリン B 1、CDK 1 / CDC 2、CDK 5、PAK 3；IRS-1：インスリンと IL-4 によって活性化されるインスリン受容体、AKT の上流；PDGFR：Ras / ERK を活性化して、血管新生、増殖、遊走遺伝子を調節する血小板由来因子受容体；ELK 1：インフラマソーム中の ERK / PDGFR 及び Rac / JNK の下流の転写因子；Raf 1：LPS または mCSF によって活性化され、ERK 1 / 2 活性化の上流での増殖と活性化；LYN：CD 36 及び BCR 上の LDL によって活性化され、とりわけ AKT 及び SYK をリン酸

50

化する（代謝の再プログラミング）；IL-2RA/CD25：JAK/STAT、PI3K、及びRasシグナル伝達を活性化する；LaminA/C、Ezrin、PAK3（Ras関連Rho GTPase Cdc42及びRacの群1 PAK下流エフェクター、及びAKT）、細胞骨格再編成；MAPK38（TPL2）：（MAP3K）は、TNF α R、IL1R、TLR、CD40、IL17Rの下流で活性化される。TPL2は、MEK1/2及びERK1/2経路を調節して、炎症反応のカスケード；BAD：サバイバル、AKTの下流；及びクロマチン修飾：HDACを調節する。

【0920】

15分後に上方制御された経路は次のとおりである：制御：カルモジュリン、GLUR1、HSP90；酵素活性の誘導：SYK、GLUR1、SHP-2、MKK4、CAMK4；分子会合：DOK1、GLUR1、SHP-2、HSP90；細胞の運動性と細胞骨格の再編成：Filamin A、IKK α /b、SHP-2；転写の活性化：IKK α /b、CAMK4、MKK4；IL2受容体の活性化；mTOR及び翻訳の変更：P70S6K、4E-BP1；及びカルシウムシグナル伝達、エンドサイトーシス、エキソサイトーシス、シナプス、微小管：Synaptogamin、CAMK4、Synuclein α 。

【0921】

15分後に下方制御された経路は次のとおりである：制御（サバイバル）：Raf1、VEGFR2、PKC δ 、EGFR、STAT6；分子会合：DOK1、GLUR1、SHP-2、HSP90；細胞の運動性と細胞骨格の再編成：Claudin 7、Cortactin、PKC δ 、p130Cas、Ezrin、PAK3；Nf κ B経路調節：Nf κ B p100、Rel、Nf κ B-p65；細胞周期の進行：CDK1、p27Kip1、AurA、PKC、CAMK2；カルシウムシグナル伝達：PKC、CaMK2；TCRシグナル伝達：CD3 ζ はLCKシグナル伝達の下流であり、ZAP70の上流である。

【0922】

本発明は、好ましい実施形態及びさまざまな代替実施形態を参照して特に示され、説明されてきたが、本発明の趣旨及び範囲から逸脱することなく、形態及び詳細におけるさまざまな変更が本明細書になされ得ることは、関連する技術分野の当業者には理解されよう。

【0923】

本明細書の本文中で引用したすべての参考文献、発行済特許、及び特許出願は、その全体があらゆる目的のために参照により本明細書に組み込まれる。

【0924】

10

20

30

40

50

配列表

配列 番号	名称	配列
1	HX-3031 重鎖可変	QVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLTSYHVSWVRQPPG KGLEWMGAIWTGGSIAYNLLKSRLSISRDTSKSQVFLKMNS LQTEDTATYYCARDLSDYYSSYTSFDYWGQGVMVTVST
2	HX-3031 CDR-H1	GFSLTSYHVS
3	HX-3031 CDR-H2	AIWTGGSIA
4	HX-3031 CDR-H3	DLSDYYSSYTSFDY
5	HX-3031 重鎖	QVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLTSYHVSWVRQPPG KGLEWMGAIWTGGSIAYNLLKSRLSISRDTSKSQVFLKMNS LQTEDTATYYCARDLSDYYSSYTSFDYWGQGVMVTVSTAET TAPSVYPLAPGTALKSNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTVNSGA LSSGVHTFPAVLQSGLYTLTSSVTVPSSTWSSQAVTCNVAHPA SSTKVDKKIVPRECNPCGCTGSEVSSVFIFPPKTKDVLITITPK VTCVVVDISQNDPEVRFSEWFIIDVEVHTAQTHAPEKQSNSTL RSVSELPIVHRDWLNGKTFKCKVNSGAFFPAPIEKSISKPEGTPR GPQVYTMAPPKEEMTQSQVSITCMVKGFYPPIYTEWKMNQ QPQENYKNTPTMDTDGSYFLYSLNVKKETWQQGNTFTCS VLHEGLHNHHTEKSLSHSP*
6	HX-3031 軽鎖可変	DIQMTQSPASLSTSLGETVSIECLASEGISNDLAWYQQKSGKSP QLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTRYSLKISGMQPEDEADYF CQQSYKYPLTFGSGTKLEIK
7	HX-3031 CDR-L1	LASEGISNDLA
8	HX-3031 CDR-L2	AASRLQD
9	HX-3031 CDR-L3	CQQSYKYPLT
10	HX-3031 軽鎖	DIQMTQSPASLSTSLGETVSIECLASEGISNDLAWYQQKSGKSP QLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTRYSLKISGMQPEDEADYF CQQSYKYPLTFGSGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSTEQLATGGAS VVCLMNNFYPRDISVKWKIDGTERRDGVLDSVTDQDSKST YSMSSTLSLTKADYESHNLYTCEVVHKTSSSPVVKSFNRNEC*
11	PI-3010-AB 重鎖 可変	QVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLTSYHVSWVRQPPG KGLEWMGAIWTGGSIAYNLLKSRLSISRDTSKSQVFLKMNS LQTEDTATYYCARDLSDYYSSYTSFDYWGQGVMVTVST
12	PI-3010-AB CDR- H1	GFSLTSYHVS
13	PI-3010-AB CDR- H2	AIWTGGSIA
14	PI-3010-AB CDR- H3	DLSDYYSSYTSFDY

10

20

30

40

50

15	PI-3010-AB 重鎖	QVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLTSYHVSWSVRQPPG KGLEWMGAIWTGGSIAYNSSLKSRLSISRDTSSQVFLKMNS LQTEDTATYYCARDLSYYSSYTSFDYWGQGMVTVSTAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
16	PI-3010-AB 輕鎖 可變	DIQMTQSPASLSTSLGETVSIECLASEGISNDLAWYQQKSGKSP QLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTRYSLKISGMQPEDEADYF CQQSYKYPLTFGSGTKLEIK
17	PI-3010-AB CDR- L1	LASEGISNDLA
18	PI-3010-AB CDR- L2	AASRLQD
19	PI-3010-AB CDR- L3	CQQSYKYPLT
20	PI-3010-AB 輕鎖	DIQMTQSPASLSTSLGETVSIECLASEGISNDLAWYQQKSGKSP QLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTRYSLKISGMQPEDEADYF CQQSYKYPLTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
21	PI-3011-AB 重鎖 可變	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTSYHVSWSVRQPPGK GLEWIGAIWTGGSIAYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCARDLSYYSSYTSFDYWGQGLTVTVSS
22	PI-3011-AB CDR- H1	GFSLTSYHVS
23	PI-3011-AB CDR- H2	AIWTGGSIA
24	PI-3011-AB CDR- H3	DLSDYYSSYTSFDY

10

20

30

40

50

25	PI-3011-AB 重鎖	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTSYHVSWIRQPPGK GLEWIGAIWTGGSIAYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYYCARDLSDYYSSYTSFDYWGQGTLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
26	PI-3011-AB 輕鎖 可變	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEGISNDLAWYQQKPGKA PKLLIYAASRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQSYKYPLTFGQGGTKLEIK
27	PI-3011-AB CDR- L1	RASEGISNDLA
28	PI-3011-AB CDR- L2	AASRLQD
29	PI-3011-AB CDR- L3	QQSYKYPLT
30	PI-3011-AB 輕鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEGISNDLAWYQQKPGKA PKLLIYAASRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQSYKYPLTFGQGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
31	PI-3012-AB 重鎖 可變	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTSYHVSWVRQPPGK GLEWIGAIWTGGSIAYNPSLKSRTISRDTSKNQVSLKLSSVT AADTAVYYCARDLSDYYSSYTSFDYWGQGTLVTVSS
32	PI-3012-AB CDR- H1	GFSLTSYHVS
33	PI-3012-AB CDR- H2	AIWTGGSIA
34	PI-3012-AB CDR- H3	DLSDYYSSYTSFDY

10

20

30

40

50

35	PI-3012-AB 重鎖	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTSYHVSWVRQPPGK GLEWIGAIWTGGSIAYNPSLKSRTISRDTSKNQVSLKLSSVT AADTAVYYCARDLSDYYSSYTSFDYWGQGTLLTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
36	PI-3012-AB 輕鎖 可變	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEGISNDLAWYQQKPGKA PKLLIYAASRLQSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYY CQQSYKYPLTFGQGGTKLEIK
37	PI-3012-AB CDR- L1	RASEGISNDLA
38	PI-3012-AB CDR- L2	AASRLQD
39	PI-3012-AB CDR- L3	QQSYKYPLT
40	PI-3012-AB 輕鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEGISNDLAWYQQKPGKA PKLLIYAASRLQSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYY CQQSYKYPLTFGQGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
41	PI-3013-AB 重鎖 可變	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTSYHVSWVRQPPGK GLEWIGAIWTGGSIAYNPSLKSRTISRDTSKNQVSLKLSSVT AADTAVYYCARDLSDYYSSYTSFDYWGQGTLLTVSS
42	PI-3013-AB CDR- H1	GFSLSYHVS
43	PI-3013-AB CDR- H2	AIWTGGSIA
44	PI-3013-AB CDR- H3	DLSDYYSSYTSFDY

10

20

30

40

50

45	PI-3013-AB 重鎖	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTSYHVSWVRQPPGK GLEWIGAIWTGGSIAYNPSLKSRTISRDTSKNQVSLKLSSVT AADTAVYYCARDLSDYYSSYTSFDYWGQGTLLTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
46	PI-3013-AB 輕鎖 可變	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEGISNDLAWYQQKPGKA PKLLIYAASRLQSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYY CQQSYKYPLTFGQGGTKLEIK
47	PI-3013-AB CDR- L1	RASEGISNDLA
48	PI-3013-AB CDR- L2	AASRLQD
49	PI-3013-AB CDR- L3	CQQSYKYPLT
50	PI-3013-AB 輕鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEGISNDLAWYQQKPGKA PKLLIYAASRLQSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYY CQQSYKYPLTFGQGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
51	PI-3014-AB 重鎖 可變	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTSYHVSWVRQPPGK GLEWMGAIWTGGSIAYNPSLKSRLTISRDTSKNQVSLKMSSLT AADTAVYYCARDLSDYYSSYTSFDYWGQGTLLTVSS
52	PI-3014-AB CDR- H1	GFSLTSYHVS
53	PI-3014-AB CDR- H2	AIWTGGSIA
54	PI-3014-AB CDR- H3	DLSDYYSSYTSFDY

10

20

30

40

50

55	PI-3014-AB 重鎖	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTSYHVSWVRQPPGK GLEWMGAIWTGGSIAYNPSLKSRLTISRDTSKNQVSLKMSSLT AADTAVYYCARDLSDYYSSYTSFDYWGQGTTLTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
56	PI-3014-AB 輕鎖 可變	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASEGISNDLAWYQQKPGKA PKLLIYAASRLQSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYY CQQSYKYPLTFGQGGTKLEIK
57	PI-3014-AB CDR- L1	RASEGISNDLA
58	PI-3014-AB CDR- L2	AASRLQD
59	PI-3014-AB CDR- L3	CQQSYKYPLT
60	PI-3014-AB 輕鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASEGISNDLAWYQQKPGKA PKLLIYAASRLQSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYY CQQSYKYPLTFGQGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
61	PI-3015-AB 重鎖 可變	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTSYHVSWVRQPPGK GLEWMGAIWTGGSIAYNPSLKSRLTISRDTSKNQVSLKMSSLT AADTAVYYCARDLSDYYSSYTSFDYWGQGTTLTVSS
62	PI-3015-AB CDR- H1	GFSLTSYHVS
63	PI-3015-AB CDR- H2	AIWTGGSIA
64	PI-3015-AB CDR- H3	DLSDYYSSYTSFDY

10

20

30

40

50

65	PI-3015-AB 重鎖	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTSYHVSWVRQPPGK GLEWMGAIWTGGSIAYNPSLKSRLTISRDTSKNQVSLKMSSLT AADTAVYYCARDLSDYYSSYTSFDYWGQGTLLTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
66	PI-3015-AB 輕鎖 可變	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEGISNDLAWYQQKPGKA PKLLIYAASRLQSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYY CQQSYKYPLTFGQGGTKLEIK
67	PI-3015-AB CDR- L1	RASEGISNDLA
68	PI-3015-AB CDR- L2	AASRLQD
69	PI-3015-AB CDR- L3	CQQSYKYPLT
70	PI-3015-AB 輕鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEGISNDLAWYQQKPGKA PKLLIYAASRLQSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYY CQQSYKYPLTFGQGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
71	PI-3020-AB 重鎖 可變	QVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLTSYHVSWVRQPPG KGLEWMGAIWTGGSIAYNSLLKSRLSISRDTSKSQVFLKMNS LQTEDTATYYCARDLSDYYSSYTSFDYWGQGVMVTVST
72	PI-3020-AB CDR- H1	GFSLTSYHVS
73	PI-3020-AB CDR- H2	AIWTGGSIA
74	PI-3020-AB CDR- H3	DLSDYYSSYTSFDY

10

20

30

40

50

75	PI-3020-AB 重鎖	QVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLTSYHVSWSVRQPPG KGLEWMGAIWTGGSIAYNSSLKSRLSISRDTSKSQVFLKMNS LQTEDTATYYCARDLSDYSSSYTSFDYWGQGMVTVSTAST KGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTCTYTCNVDPK SNTKVDKRVESKYGPSPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK*
76	PI-3020-AB 輕鎖 可變	DIQMTQSPASLSTSLGETVSIECLASEGISNDLAWYQQKSGKSP QLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTRYSLKISGMQPEDEADYF CQQSYKYPLTFGSGTKLEIK
77	PI-3020-AB CDR- L1	LASEGISNDLA
78	PI-3020-AB CDR- L2	AASRLQD
79	PI-3020-AB CDR- L3	QQSYKYPLT
80	PI-3020-AB 輕鎖	DIQMTQSPASLSTSLGETVSIECLASEGISNDLAWYQQKSGKSP QLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTRYSLKISGMQPEDEADYF CQQSYKYPLTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
81	PI-3022-AB 重鎖 可變	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTSYHVSWSVRQPPGK GLEWIGAIWTGGSIAYNPSLKSRTISRDTSKNQVSLKLSSVT AADTAVYYCARDLSDYSSSYTSFDYWGQGLTVTVSS
82	PI-3022-AB CDR- H1	GFSLTSYHVS
83	PI-3022-AB CDR- H2	AIWTGGSIA
84	PI-3022-AB CDR- H3	DLSDYSSSYTSFDY

10

20

30

40

50

85	PI-3022-AB 重鎖	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTSYHVSWVRQPPGK GLEWIGAIWTGGSIAYNPSLKSRTISRDTSKNQVSLKLSSVT AADTAVYYCARDLSDYYSSYTSFDYWGQGTLLTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
86	PI-3022-AB 輕鎖 可變	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEGISNDLAWYQQKPGKA PKLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYY CQQSYKYPLTFGQGGTKLEIK
87	PI-3022-AB CDR- L1	RASEGISNDLA
88	PI-3022-AB CDR- L2	AASRLQD
89	PI-3022-AB CDR- L3	CQQSYKYPLT
90	PI-3022-AB 輕鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEGISNDLAWYQQKPGKA PKLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYY CQQSYKYPLTFGQGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
91	PI-3023-AB 重鎖 可變	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTSYHVSWVRQPPGK GLEWIGAIWTGGSIAYNPSLKSRTISRDTSKNQVSLKLSSVT AADTAVYYCARDLSDYYSSYTSFDYWGQGTLLTVSS
92	PI-3023-AB CDR- H1	GFSLTSYHVS
93	PI-3023-AB CDR- H2	AIWTGGSIA
94	PI-3023-AB CDR- H3	DLSDYYSSYTSFDY

10

20

30

40

50

95	PI-3023-AB 重鎖	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTSYHVSWVRQPPGK GLEWIGAIWTGGSIAYNPSLKSRTISRDTSKNQVSLKLSSVT AADTAVYYCARDLSDYYSSYTSFDYWGQGTLLTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
96	PI-3023-AB 輕鎖 可變	DIQMTQSPSSSLSTSVGDRVTITCRASEGISNDLAWYQQKPGKS PKLLIYAASRLQSGVPSRFGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYF CQQSYKYPLTFGQGGTKLEIK
97	PI-3023-AB CDR- L1	RASEGISNDLA
98	PI-3023-AB CDR- L2	AASRLQD
99	PI-3023-AB CDR- L3	CQQSYKYPLT
100	PI-3023-AB 輕鎖	DIQMTQSPSSSLSTSVGDRVTITCRASEGISNDLAWYQQKPGKS PKLLIYAASRLQSGVPSRFGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYF CQQSYKYPLTFGQGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
101	PI-3024-AB 重鎖 可變	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTSYHVSWVRQPPGK GLEWIGAIWTGGSIAYNPSLKSRTISRDTSKNQVSLKLSSVT AADTAVYYCARDLSDYYSSYTSFDYWGQGTLLTVSS
102	PI-3024-AB CDR- H1	GFSLTSYHVS
103	PI-3024-AB CDR- H2	AIWTGGSIA
104	PI-3024-AB CDR- H3	DLSDYYSSYTSFDY

10

20

30

40

50

105	PI-3024-AB 重鎖	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTSYHVSWVRQPPGK GLEWIGAIWTGGSIAYNPSLKSRTISRDTSKNQVSLKLSSVT AADTAVYYCARDLSDYYSSYTSFDYWGQGTLLTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
106	PI-3024-AB 輕鎖 可變	DIQMTQSPSSLSTSVGDRVTITCRASEGISNDLAWYQQKPGKS PKLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDEATYF CQQSYKYPLTFGQGGTKLEIK
107	PI-3024-AB CDR- L1	RASEGISNDLA
108	PI-3024-AB CDR- L2	AASRLQD
109	PI-3024-AB CDR- L3	QQSYKYPLT
110	PI-3024-AB 輕鎖	DIQMTQSPSSLSTSVGDRVTITCRASEGISNDLAWYQQKPGKS PKLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDEATYF CQQSYKYPLTFGQGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
111	PI-3025-AB 重鎖 可變	EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTSYHVSWVRQPPGK GLEWIGAIWTGGSIAYNPSLKSRTISRDTSKNQVSLKLSSVT AADTAVYYCARDLSDYYSSYTSFDYWGQGTLLTVSS
112	PI-3025-AB CDR- H1	GFSLTSYHVS
113	PI-3025-AB CDR- H2	AIWTGGSIA
114	PI-3025-AB CDR- H3	DLSDYYSSYTSFDY

10

20

30

40

50

115	PI-3025-AB 重鎖	EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTSYHVSWVRQPPGK GLEWIGAIWTGGSIAYNPSLKSRTISRDTSKNQVSLKLSSVT AADTAVYYCARDLSDYYSSYTSFDYWGQGTLLTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
116	PI-3025-AB 輕鎖 可變	DIQMTQSPSSLSTSVGDRVITICRASEGISNDLAWYQQKPGKS PKLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDEATYF CQQSYKYPLTFGQGGTKLEIK
117	PI-3025-AB CDR- L1	RASEGISNDLA
118	PI-3025-AB CDR- L2	AASRLQD
119	PI-3025-AB CDR- L3	CQQSYKYPLT
120	PI-3025-AB 輕鎖	DIQMTQSPSSLSTSVGDRVITICRASEGISNDLAWYQQKPGKS PKLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDEATYF CQQSYKYPLTFGQGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
121	PI-3026-AB 重鎖 可變	VQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTSYHVSWVRQPPGKG LEWIGAIWTGGSIAYNPSLKSRTISRDTSKNQVSLKLSSVTA ADTAVYYCARDLSDYYSSYTSFDYWGQGTLLTVSS
122	PI-3026-AB CDR- H1	GFSLSYHVS
123	PI-3026-AB CDR- H2	AIWTGGSIA
124	PI-3026-AB CDR- H3	DLSDYYSSYTSFDY

10

20

30

40

50

125	PI-3026-AB 重鎖	EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTSYHVSWVRQPPGK GLEWIGAIWTGGSIAYNPSLKSRTISRDTSKNQVSLKLSSVT AADTAVYYCARDLSDYYSSYTSFDYWGQGTLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
126	PI-3026-AB 輕鎖 可變	DIQMTQSPSSSLSTSVGDRVTITCRASEGISNDLAWYQQKPGKS PKLLIYAASRLQSGVPSRFGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYF CQQSYKYPLTFGQGGTKLEIK
127	PI-3026-AB CDR- L1	RASEGISNDLA
128	PI-3026-AB CDR- L2	AASRLQD
129	PI-3026-AB CDR- L3	QQSYKYPLT
130	PI-3026-AB 輕鎖	DIQMTQSPSSSLSTSVGDRVTITCRASEGISNDLAWYQQKPGKS PKLLIYAASRLQSGVPSRFGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYF CQQSYKYPLTFGQGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
131	PI-3027-AB 重鎖 可變	EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTSYHVSWVRQPPGK GLEWIGAIWTGGSIAYNPSLKSRTISRDTSKNQVSLKLSSVT AADTAVYYCARDLSDYYSSYTSFDYWGQGTLVTVSS
132	PI-3027-AB CDR- H1	GFSLSYHVS
133	PI-3027-AB CDR- H2	AIWTGGSIA
134	PI-3027-AB CDR- H3	DLSDYYSSYTSFDY

10

20

30

40

50

135	PI-3027-AB 重鎖	EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTSYHVSWVRQPPGK GLEWIGAIWTGGSIAYNP SLKSRVTISRDT SKNQVSLKLSSVT AADTAVYYCARDLSDYSSYTSFDYWGQGT LVT VSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
136	PI-3027-AB 輕鎖 可変	DIQMTQSPSSLSTSVGDRVTITCRASEGISNDLAWYQQKPGKS PKLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDEATYF CQQSYKYPLTFGQGTKLEIK
137	PI-3027-AB CDR- L1	RASEGISNDLA
138	PI-3027-AB CDR- L2	AASRLQD
139	PI-3027-AB CDR- L3	CQQSYKYPLT
140	PI-3027-AB 輕鎖	DIQMTQSPSSLSTSVGDRVTITCRASEGISNDLAWYQQKPGKS PKLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDEATYF CQQSYKYPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
141	HX-3061 重鎖可変	EVQLVESGGGLVQPGSSSLKSCVASKFTFSNYGMNWIRQAPK KLEWIALIYYNSNNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLEMN SLRSED TAMYYCAKSLTGGSDYFDSWGQGVMTVSS
142	HX-3061 CDR-H1	KFTFSNYGMN
143	HX-3061 CDR-H2	LIYYNSNNKY
144	HX-3061 CDR-H3	SLTGGSDYFDS
145	HX-3061 重鎖	EVQLVESGGGLVQPGSSSLKSCVASKFTFSNYGMNWIRQAPK KLEWIALIYYNSNNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLEMN SLRSED TAMYYCAKSLTGGSDYFDSWGQGVMTVSSAETTA PSVYPLAPGTALKSNSMVT LGCLVKGYFPEPVTVTWNSGALS SGVHTFPAVLQSGLYTLTSSVTPSSTWPSQT VTCNVAHPASS TKVDKKIVPRNCGGDCPCICTGSEVSSVFIFPPKPKDVLITL TPKVT CVVVDISQDDPEVHFSWFVDDVEVHTA QTRPPEEQFN STFRSVSELPILHQDWLNGRTRFCKVTSAAFPSPIEKTISKPEGR TQVPHVY TMSPTKEEMTQNEVSITCMVKGFYPPDIYVEWQM NGQPQENYKNTPTMDTDGSYFLYSKLVKKEKWQQGNTFT CSVLHEGLHNHHTKSLSHSP*

10

20

30

40

50

146	HX-3061 軽鎖可変	DVQMTQSPSYLAASPGESVSISCKASKSIGTFLAWYQEKPEKT NKLLIYSGSTLQSGTPSRFSGSGSGTDFTLTIRNLEPEDFAVYY CQQHDEYPFTFGSGTKLEIK
147	HX-3061 CDR-L1	KASKSIGTFLA
148	HX-3061 CDR-L2	SGSTLQS
149	HX-3061 CDR-L3	QQHDEYPFT
150	HX-3061 軽鎖	DVQMTQSPSYLAASPGESVSISCKASKSIGTFLAWYQEKPEKT NKLLIYSGSTLQSGTPSRFSGSGSGTDFTLTIRNLEPEDFAVYY CQQHDEYPFTFGSGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSTEQLATGGAS VVCLMNNFYPRDISVKWKIDGTERRDGVLDSDVDQDSKDST YSMSSTLSLTKADYESHNLTYTCEVVHKTSSSPVVKSFNRNEC*
151	PI-3016-AB 重鎖 可変	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASKFTFSNYGMNWVRQAP GKGLEWVSLIYYNSNNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKSLTGGSDYFDSWGQGT LVTVSS
152	PI-3016-AB CDR- H1	KFTFSNYGMN
153	PI-3016-AB CDR- H2	LIYYNSNNKY
154	PI-3016-AB CDR- H3	SLTGGSDYFDS
155	PI-3016-AB 重鎖	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASKFTFSNYGMNWVRQAP GKGLEWVSLIYYNSNNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKSLTGGSDYFDSWGQGT LVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
156	PI-3016-AB 軽鎖 可変	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSIGTFLAWYQQKPGKA PKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQHDEYPFTFGQGTKLEIK
157	PI-3016-AB CDR- L1	RASKSIGTFLA
158	PI-3016-AB CDR- L2	SGSTLQS
159	PI-3016-AB CDR- L3	QQHDEYPFT

10

20

30

40

50

160	PI-3016-AB 輕鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASKSIGTFLAWYQQKPGKA PKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQHDEYPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
161	PI-3017-AB 重鎖 可変	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASKFTFSNYGMNWIRQAPG KGLEWIALIYYNSNNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKSLTGGSDYFDSWGQGT LTVSS
162	PI-3017-AB CDR- H1	KFTFSNYGMN
163	PI-3017-AB CDR- H2	LIYYNSNNKY
164	PI-3017-AB CDR- H3	SLTGGSDYFDS
165	PI-3017-AB 重鎖	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASKFTFSNYGMNWIRQAPG KGLEWIALIYYNSNNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKSLTGGSDYFDSWGQGT LTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSPGK*
166	PI-3017-AB 輕鎖 可変	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASKSIGTFLAWYQQKPGKA PKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQHDEYPFTFGQGTKLEIK
167	PI-3017-AB CDR- L1	RASKSIGTFLA
168	PI-3017-AB CDR- L2	SGSTLQS
169	PI-3017-AB CDR- L3	QQHDEYPFT
170	PI-3017-AB 輕鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASKSIGTFLAWYQQKPGKA PKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQHDEYPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
171	PI-3018-AB 重鎖 可変	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMNWIRQAPG KGLEWIALIYYNSNNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKSLTGGSDYFDSWGQGT LTVSS
172	PI-3018-AB CDR- H1	KFTFSNYGMN

10

20

30

40

50

173	PI-3018-AB CDR-H2	LIYYNSNNKY
174	PI-3018-AB CDR-H3	SLTGGSDYFDS
175	PI-3018-AB 重鎖	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMNWIRQAPG KGLEWIALIYYNSNNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKSLTGGSDYFDSWGQGT LVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPETCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK*
176	PI-3018-AB 輕鎖 可変	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSIGTFLAWYQQKPGKA PKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC QQHDEYPFTFGQGTKLEIK
177	PI-3018-AB CDR-L1	RASKSIGTFLA
178	PI-3018-AB CDR-L2	SGSTLQS
179	PI-3018-AB CDR-L3	QQHDEYPFT
180	PI-3018-AB 輕鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSIGTFLAWYQQKPGKA PKLLIYSGSTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYC QQHDEYPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC*
181	PI-3019-AB 重鎖 可変	EVQLVESGGGLVQPGSSKLSCVASKFTFSNYGMNWIRQAPK KGLEWIALIYYNSNNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLEMN SLRSEDAMYYCAKSLTGGSDYFDSWGQGVMTVSS
182	PI-3019-AB CDR-H1	KFTFSNYGMN
183	PI-3019-AB CDR-H2	LIYYNSNNKY
184	PI-3019-AB CDR-H3	SLTGGSDYFDS

10

20

30

40

50

185	PI-3019-AB 重鎖	EVQLVESGGGLVQPGSSSLKSCVASKFTFSNYGMNWIRQAPK KGLEWIALIYYNSNNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLEMN SLRSED TAMYYCAKSLTGGSDYFDSWGQGVMVTVSSAKTTA PSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSS GVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASST KVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMI SLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISW FVNNVEVHTAQTQTHRED YNSTLRVVSALPIQH QDWMSGKEFKCKVNNKDL PAPIERTISK PKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVE WTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVER NSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK*
186	PI-3019-AB 輕鎖 可變	DVQMTQSPSYLAASPGESVSISCKASKSIGTFLAWYQE KPEKT NKLLIYSGSTLQSGTPSRFSGSGSGTDFTLTIRNLEPEDFAVYY CQQHDEYPFTFGSGTKLEIK
187	PI-3019-AB CDR- L1	KASKSIGTFLA
188	PI-3019-AB CDR- L2	SGSTLQS
189	PI-3019-AB CDR- L3	QQHDEYPFT
190	PI-3019-AB 輕鎖	DVQMTQSPSYLAASPGESVSISCKASKSIGTFLAWYQE KPEKT NKLLIYSGSTLQSGTPSRFSGSGSGTDFTLTIRNLEPEDFAVYY CQQHDEYPFTFGSGTKLEIKRADAAPT VSI FPPSSEQLTSGGAS VVCFLNNFY PKDINV KWKIDG SERQNGVLNSWTDQDSKDST YSMSSTLT LTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC*
191	PI-3028-AB 重鎖 可變	EVQLVESGGGLVQPGSSSLKSCVASKFTFSNYGMNWIRQAPK KGLEWIALIYYNSNNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLEMN SLRSED TAMYYCAKSLTGGSDYFDSWGQGVMVTVSS
192	PI-3028-AB CDR- H1	KFTFSNYGMN
193	PI-3028-AB CDR- H2	LIYYNSNNKY
194	PI-3028-AB CDR- H3	SLTGGSDYFDS

10

20

30

40

50

195	PI-3028-AB 重鎖	EVQLVESGGGLVQPGSSSLKSCVASKFTFSNYGMNWIRQAPK KGLEWIALIYYNSNNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLEMN SLRSED TAMYYCAKSLTGGSDYFDSWGQGVMVTVSSAKTTA PSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSS GVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASST KVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMI SLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNVEVHTAQTQTHRED YNSTLRVVSALPIQH QDWMSGKEFKCKVNNKDL PAPIERTISK PKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVE WTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVER NSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK*
196	PI-3028-AB 輕鎖 可變	DVQMTQSPSYLAASPGESVSISCKASKSIGTFLAWYQE KPEKT NKLLIYSGSTLQSGTPSRFSGSGSGTDFTLTIRNLEPEDFAVYY CQQHDEYPFTFGSGTKLEIK
197	PI-3028-AB CDR- L1	KASKSIGTFLA
198	PI-3028-AB CDR- L2	SGSTLQS
199	PI-3028-AB CDR- L3	QQHDEYPFT
200	PI-3028-AB 輕鎖	DVQMTQSPSYLAASPGESVSISCKASKSIGTFLAWYQE KPEKT NKLLIYSGSTLQSGTPSRFSGSGSGTDFTLTIRNLEPEDFAVYY CQQHDEYPFTFGSGTKLEIKRADAAPT VSI FPPSSEQLTSGGAS VVCFLNNFY PKDINV KWKIDG SERQNGVLNSWTDQDSKDST YSMSSTLT LTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC*
201	PI-3029-AB 重鎖 可變	EVQLVESGGGLVQPGSSSLKSCVASKFTFSNYGMNWIRQAPK KGLEWIALIYYNSNNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLEMN SLRSED TAMYYCAKSLTGGSDYFDSWGQGVMVTVSS
202	PI-3029-AB CDR- H1	KFTFSNYGMN
203	PI-3029-AB CDR- H2	LIYYNSNNKY
204	PI-3029-AB CDR- H3	SLTGGSDYFDS

10

20

30

40

50

205	PI-3029-AB 重鎖	EVQLVESGGGLVQPGSSSLKSCVASKFTFSNYGMNWIRQAPK KGLEWIALIYYNSNNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLEMN SLRSED TAMYYCAKSLTGGSDYFDSWGQGVMVTVSSAKTTA PSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSS GVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASST KVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMI SLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISW FVNNVEVHTAQTQTHRED YNSTLRVVSALPIQH QDWMSGKEFKCKVNNKDL PAPIERTISK PKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVE WTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVER NSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK*
206	PI-3029-AB 輕鎖 可變	DVQMTQSPSYLAASPGESVSISCKASKSIGTFLAWYQE KPEKT NKLLIYSGSTLQSGTPSRFSGSGSGTDFTLTIRNLEPEDFAVYY CQQHDEYPFTFGSGTKLEIK
207	PI-3029-AB CDR- L1	KASKSIGTFLA
208	PI-3029-AB CDR- L2	SGSTLQS
209	PI-3029-AB CDR- L3	QQHDEYPFT
210	PI-3029-AB 輕鎖	DVQMTQSPSYLAASPGESVSISCKASKSIGTFLAWYQE KPEKT NKLLIYSGSTLQSGTPSRFSGSGSGTDFTLTIRNLEPEDFAVYY CQQHDEYPFTFGSGTKLEIKRADAAPT VSI FPPSSEQLTSGGAS VVCFLNNFY PKDINV KWKIDG SERQNGVLNSWTDQDSKDST YSMSSTLT LTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFN RNEC*
211	PI-3032-AB 重鎖 可變	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASKFTFSNYGMNWIRQAPG KGLEWIALIYYNSNNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKSLTGGSDYFDSWGQGT LVTVSS
212	PI-3032-AB CDR- H1	KFTFSNYGMN
213	PI-3032-AB CDR- H2	LIYYNSNNKY
214	PI-3032-AB CDR- H3	SLTGGSDYFDS

10

20

30

40

50

215	PI-3032-AB 重鎖	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASKFTFSNYGMNWIRQAPG KGLEWIALIYYNSNNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKSLTGGSDYFDSWGQGTLVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPETVCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK*
216	PI-3032-AB 輕鎖 可變	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSIGTFLAWYQQKPGKA PKLLIYSGSTLESQVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQHDEYPFTFGQGTKLEIK
217	PI-3032-AB CDR- L1	KASKSIGTFLA
218	PI-3032-AB CDR- L2	SGSTLQS
219	PI-3032-AB CDR- L3	QQHDEYPFT
220	PI-3032-AB 輕鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSIGTFLAWYQQKPGKA PKLLIYSGSTLESQVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQHDEYPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSITLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
221	PI-3033-AB 重鎖 可變	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASKFTFSNYGMNWIRQAPG KGLEWIALIYYNSNNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKSLTGGSDYFDSWGQGTLVTVSS
222	PI-3033-AB CDR- H1	KFTFSNYGMN
223	PI-3033-AB CDR- H2	LIYYNSNNKY
224	PI-3033-AB CDR- H3	SLTGGSDYFDS

10

20

30

40

50

225	PI-3033-AB 重鎖	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASKFTFSNYGMNWIRQAPG KGLEWIALIYYNSNNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKSLTGGSDYFDSWGQGT LVT VSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK*
226	PI-3033-AB 輕鎖 可変	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSIGTFLAWYQQKPGKA PKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQHDEYPFTFGQGTKLEIK
227	PI-3033-AB CDR- L1	KASKSIGTFLA
228	PI-3033-AB CDR- L2	SGSTLQS
229	PI-3033-AB CDR- L3	QQHDEYPFT
230	PI-3033-AB 輕鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASKSIGTFLAWYQQKPGKA PKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQHDEYPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTY SLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
231	HX-3011 重鎖可変	QIQLVQSGPELKKPGESVKISCKASGYTFTDYAVNWVKQAPG NGLKWMGWINTQTGKPTYADDFKQRFVFSLETSASTSFLQIN NLNIEDTATYFCTRDSYYYSSSLDYWGQGVMTVSS
232	HX-3011 CDR-H1	GYTFTDYAVN
233	HX-3011 CDR-H2	WINTQTGKPT
234	HX-3011 CDR-H3	DSYYYSSSLDY
235	HX-3011 重鎖	QIQLVQSGPELKKPGESVKISCKASGYTFTDYAVNWVKQAPG NGLKWMGWINTQTGKPTYADDFKQRFVFSLETSASTSFLQIN NLNIEDTATYFCTRDSYYYSSSLDYWGQGVMTVSSAETTAP SVYPLAPGTALKSNSMVTGLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGALSS GVHTFPAVLQSGLYTLTSSVTVPSSTWSSQAVTCNVAHPASST KVDKKIVPRECNPCGCTGSEVSSVFIFPPKTKDVLITITLTPKVT CVVVDISQNDPEVRFSWFIDDEVHTAQTHAPEKQSNSTLRS VSELPVHRDWLNGKTFKCKVNSGAFFAPIEKSISKPEGTPRGP QVYTMAPPKEEMTQSQVSITCMVKGFYPPDIYTEWKMNQGP QENYKNTPTMDTDGSYFLYSKLVNKKETWQQGNTFTCSVL HEGLHNHHTKSLSHSP*

10

20

30

40

50

236	HX-3011 輕鎖可変	DIQMTQSPASLSASLGETVSIECLASAGISNDLAWYQQKSGKS PQLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTRFSLKISDMQPEEADY FCQQSYKYPWTFGGGTKLELK
237	HX-3011 CDR-L1	LASAGISNDLA
238	HX-3011 CDR-L2	AASRLQD
239	HX-3011 CDR-L3	QQSYKYPWT
240	HX-3011 輕鎖	DIQMTQSPASLSASLGETVSIECLASAGISNDLAWYQQKSGKS PQLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTRFSLKISDMQPEEADY FCQQSYKYPWTFGGGTKLELK KRADAAPTVSIFPPSTEQLATGG ASVVCLMNNFYPRDISVKWKIDGTERRDGVLDSDVTDQDSKDS TYSMSSTLSLTKADYESHNLYTCEVVHKTSSSPVVKSFNRNEC *
241	PI-3030-AB 重鎖 可変	QIQLVQSGPELKKPGESVKISCKASGYTFTDYAVNWVKQAPG NGLKWMGWINTQTGKPTYADDFKQRFVFSLETSASTSFLQIN NLNIEDTATYFCTRDSYYYSSSLDYWGQGVMTVSS
242	PI-3030-AB CDR-H1	GYTFTDYAVN
243	PI-3030-AB CDR-H2	WINTQTGKPT
244	PI-3030-AB CDR-H3	DSYYYSSSLDY
245	PI-3030-AB 重鎖	QIQLVQSGPELKKPGESVKISCKASGYTFTDYAVNWVKQAPG NGLKWMGWINTQTGKPTYADDFKQRFVFSLETSASTSFLQIN NLNIEDTATYFCTRDSYYYSSSLDYWGQGVMTVSS ASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK*
246	PI-3030-AB 輕鎖 可変	DIQMTQSPASLSASLGETVSIECLASAGISNDLAWYQQKSGKS PQLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTRFSLKISDMQPEEADY FCQQSYKYPWTFGGGTKLELK
247	PI-3030-AB CDR-L1	LASAGISNDLA
248	PI-3030-AB CDR-L2	AASRLQD
249	PI-3030-AB CDR-L3	QQSYKYPWT

10

20

30

40

50

250	PI-3030-AB 軽鎖	DIQMTQSPASLSASLGETVSIIECLASAGISNDLAWYQQKSGKS PQLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTRFSLKISDMQPEDEADY FCQQSYKYPWTFGGGKLELKRVAAPSVEFPPSDEQLKSGT ASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C*
251	HX-3043 重鎖可変	QVNLLQSRALVKPGASVKLSCKASGYTFTDYYLHWVKQSH AKSLEWIGYINPNNAITSYNEKFKSKATLTVDKSTNTAYMEL SRLTSADSATYYCARDTDDYYNLHFAYWGQGTLLTVSS
252	HX-3043 CDR-H1	GYTFTDYYLH
253	HX-3043 CDR-H2	YINPNNAITSY
254	HX-3043 CDR-H3	DTDDYYNLHFAY
255	HX-3043 重鎖	QVNLLQSRALVKPGASVKLSCKASGYTFTDYYLHWVKQSH AKSLEWIGYINPNNAITSYNEKFKSKATLTVDKSTNTAYMEL SRLTSADSATYYCARDTDDYYNLHFAYWGQGTLLTVSSAET TAPSVYPLAPGTALKSNMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGA LSSGVHTFPAVLQSGLYTLTSSVTVPSSTWSSQAVTCNVAHPA SSTKVDKKIVPRECNPCGCTGSEVSSVFIFPPKTKDVLITITPK VTCVVVDISQNDPEVRFSWFIDDEVDHTAQTTHAPEKQSNSTL RSVSELPVHRDWLNGKTFKCKVNSGAFPAIEKSISKPEGTPR GPQVYTMAPPKEEMTQSQVSITCMVKGFYPDIYTEWKMNQ QPQENYKNTPTMDTDGSYFLYSLKLVKKETWQQGNTFTCS VLHEGLHNHTEKSLSHSP*
256	HX-3043 軽鎖可変	DIQMTQSPASLSASLGETVSIIECLTSEGISNDLAWYQQKSGKSP QLLIYDASRLLEDGVPSRFSGSGSGTRYSLKISGMQTEDEADYF CQQSYKYPLTFGSGTKLEIK
257	HX-3043 CDR-L1	LTSEGISNDLA
258	HX-3043 CDR-L2	DASRLLED
259	HX-3043 CDR-L3	QQSYKYPLT
260	HX-3043 軽鎖	DIQMTQSPASLSASLGETVSIIECLTSEGISNDLAWYQQKSGKSP QLLIYDASRLLEDGVPSRFSGSGSGTRYSLKISGMQTEDEADYF CQQSYKYPLTFGSGTKLEIKRADAAPTVEFPPSTEQLATGGAS VVCLMNNFYPRDISVKWKIDGTERRDGVLDSDVTDQDSKST YSMSSTLSLTKADYESHNLTYCEVVKHTSSSPVVKSFNRNEC*
261	PI-3031-AB 重鎖 可変	QVNLLQSRALVKPGASVKLSCKASGYTFTDYYLHWVKQSH AKSLEWIGYINPNNAITSYNEKFKSKATLTVDKSTNTAYMEL SRLTSADSATYYCARDTDDYYNLHFAYWGQGTLLTVSS
262	PI-3031-AB CDR- H1	GYTFTDYYLH
263	PI-3031-AB CDR- H2	YINPNNAITSY
264	PI-3031-AB CDR- H3	DTDDYYNLHFAY

10

20

30

40

50

265	PI-3031-AB 重鎖	QVNLLQSRAALVKPGASVKLSCKASGYTFTDYHLHWVKQSH AKSLEWIGYINPNNAITYSYNEKFKSKATLTVDKSTNTAYMEL SRLTSADSATYYCARDTTDYNNLHFAYWGQGTLLTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
266	PI-3031-AB 輕鎖 可變	DIQMTQSPASLSASLGETVSIECLTSEGISNDLA WYQQKSGKSP QLLIYDASRLEDGVPSTRFSGSGSGTRYSLKISGMQTEDEADYF CQQSYKYPLTFGSGTKLEIK
267	PI-3031-AB CDR- L1	LTSEGISNDLA
268	PI-3031-AB CDR- L2	DASRLED
269	PI-3031-AB CDR- L3	CQQSYKYPLT
270	PI-3031-AB 輕鎖	DIQMTQSPASLSASLGETVSIECLTSEGISNDLA WYQQKSGKSP QLLIYDASRLEDGVPSTRFSGSGSGTRYSLKISGMQTEDEADYF CQQSYKYPLTFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*
271	PI-3006-AB 重鎖 可變	EVQLVESGGGLVKPGASLKLSCVASGFTFSDYWMNWVRQTP GKTMIEWIGDIKDDGSYTNYTPSLKNRFTISRDNASTLYLQM NNVRSEDGTYYCTSGGVFDYWGQGVMVTVSS
272	PI-3006-AB CDR- H1	GFTFSDYW
273	PI-3006-AB CDR- H2	IKDDGSYT
274	PI-3006-AB CDR- H3	TSGGVFDY

10

20

30

40

50

275	PI-3006-AB 重鎖	EVQLVESGGGLVKPGASLKLSCVASGFTFSDYWMNWVRQTP GKTM EWIGDIKDDGSYTNYP SLKNRFTISRDN AKSTLYLQM NNVRSED TGTY YCTSGGVFDYWGQGVMVTVSSAKTTAPSVY PLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHT FPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKV DK KIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVL MISLSPI VTCVVVDVSEDDPDVQISW FVNNVEVHTAQTQTHREDYNST LRVVSALPIQH QDWMSGKEFKCKVNNKDL PAPIERTISKPKGS VRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTD FMPEDIYVEWTN NGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERN SYS CSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK*
276	PI-3006-AB 輕鎖 可變	EIVLTQSPTTMAASPGEMVTITCRASSSVNYMHWFQQKSGTS PKPWIYDTSKLASGV PDRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAASY YCLQRSTFPPTFGAGTKLELK
277	PI-3006-AB CDR- L1	SSVNY
278	PI-3006-AB CDR- L2	DTS
279	PI-3006-AB CDR- L3	LQRSTFPPT
280	PI-3006-AB 輕鎖	EIVLTQSPTTMAASPGEMVTITCRASSSVNYMHWFQQKSGTS PKPWIYDTSKLASGV PDRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAASY YCLQRSTFPPTFGAGTKLELK RADAAPT VSI FPPSSEQLTSGGA SVVCFLN NFYPKDINVKWKIDG SERQNGVLNSWTDQDSKDST YSMSSTLT LTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC*
281	PI-3007-AB 重鎖 可變	QVRLVQSGTALVRPGASVRMSCTASGYSFTDYWVSWVKQSH GQSLEWIGE IYPNSGTTNFNEKFEGKATLTVDKSTSTAYMELS RLTSEDSAIYYCTGEGTFDYWGQGVMVTVSS
282	PI-3007-AB CDR- H1	GYSFTDYW
283	PI-3007-AB CDR- H2	IYPNSGTT
284	PI-3007-AB CDR- H3	TGEGTFDY

10

20

30

40

50

285	PI-3007-AB 重鎖	QVRLVQSGTALVRPGASVRMSCTASGYSFTDYWVSWVKQSH GQSLEWIGEIYPNSGTTNFNEKFEGKATLTVDKSTSTAYMELS RLTSEDSAIYYCTGEGTFDYWGQGVMTVSSAKTTAPSVYPL APVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFP AVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDDKI EPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVT CVVVDVSEDDPDVQISWVFNVEVHTAQTQTHREDYNSTLR VVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSV RAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNN GKTELNYKNTEPVLDSGYSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSC SVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK*
286	PI-3007-AB 輕鎖 可變	EIVLTQSPTTMAASPGEKVTITCRPSSSLNMHWFQQKSGTSP KPWIYDTSKLAGVPDRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYY CLQRSSYPPTFGAGTKLELK
287	PI-3007-AB CDR- L1	SSLSN
288	PI-3007-AB CDR- L2	DTS
289	PI-3007-AB CDR- L3	LQRSSYPPT
290	PI-3007-AB 輕鎖	EIVLTQSPTTMAASPGEKVTITCRPSSSLNMHWFQQKSGTSP KPWIYDTSKLAGVPDRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYY CLQRSSYPPTFGAGTKLELKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGAS VVCFLNNFYDPKDINVKKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDST YSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC*
291	PI-3008-AB 重鎖 可變	EVQLVESGGGLVKPGASLKLSCVASGFTFSDDWMNWVRQTP GKAMEWIGDIKYDGSYTNYPVPSLKNRLTISRDNKNTLYLQ MTNVRSEDATATYYCTSGGVFDYWGQGVMTVSS
292	PI-3008-AB CDR- H1	GFTFSDDW
293	PI-3008-AB CDR- H2	IKYDGSYT
294	PI-3008-AB CDR- H3	TSGGVFDY

10

20

30

40

50

295	PI-3008-AB 重鎖	EVQLVESGGGLVKPGASLKLSCVASGFTFSDDWMNWVRQTP GKAMEWIGDIKYDGSYTNYPVSLKNRLTISRDNKNTLYLQ MTNVRSEDATATYYCTSGGVFDYWGQGVMVTVSSAKTTAPSV YPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGV HTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKV DKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSL SPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNVEVHTAQTQTHREDYN STLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPK GSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEW TNNGKTELNYKNTEPVLDSGSGYFMYSKLRVEKKNWVERNS YSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK*
296	PI-3008-AB 輕鎖 可變	EIVLSQSPTTMAASPGEKVTITCRASSSVSYMHWFQQKSGTSP KPWIYDTSKLAGVDPDRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYY CLQRSGYPPTFGAGTKLEVK
297	PI-3008-AB CDR- L1	SSVSY
298	PI-3008-AB CDR- L2	DTS
299	PI-3008-AB CDR- L3	LQRSGYPPT
300	PI-3008-AB 輕鎖	EIVLSQSPTTMAASPGEKVTITCRASSSVSYMHWFQQKSGTSP KPWIYDTSKLAGVDPDRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYY CLQRSGYPPTFGAGTKLEVKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGA SVVCFLNLFYPKDINVKKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDS YSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC*
301	PI-3009-AB 重鎖 可變	EVQLVESGGGLVQPGRSLKFSCSASGFTFSAYSMWVRQAPK TGLEWVATHIYDGSSTYYRDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMD SLRSEDATATYYCARLGYSGHYFDYWGQGVMVTVSS
302	PI-3009-AB CDR- H1	GFTFSAYS
303	PI-3009-AB CDR- H2	IYDGSST
304	PI-3009-AB CDR- H3	ARLGYSGHYFDY

10

20

30

40

50

305	PI-3009-AB 重鎖	EVQLVESGGGLVQPGRSLKFSCSASGFTFSAYSMWVRQAPK TGLEWVATHIYDGSSTYYRDSVKGRFTISRDNANTLYLQMD SLRSEDATYYCARLGYSGHYFDYWGGVMVTVSSAKTTAP SVYPLAPVCGDGTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSG VHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTK VDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMI LSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNVEVHTAQTQTHREDY NSTLRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISK KGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVE WTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVER NSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK*
306	PI-3009-AB 輕鎖 可變	DTVLTQSPALAVSLGQRVTISCQASESVSSSLHSHYQKQP GQQPKLLIYRASNLSEGVPARFSGSGSGTDFTLNIDPVEADDIA TYFCQQSWNDPRTFGGGTKLELK
307	PI-3009-AB CDR- L1	ESVSSSLHSY
308	PI-3009-AB CDR- L2	RAS
309	PI-3009-AB CDR- L3	QQSWNDPRT
310	PI-3009-AB 輕鎖	DTVLTQSPALAVSLGQRVTISCQASESVSSSLHSHYQKQP GQQPKLLIYRASNLSEGVPARFSGSGSGTDFTLNIDPVEADDIA TYFCQQSWNDPRTFGGGTKLELKRADAAPTVSIFPPSSEQLTS GGASVVCFLNNFYPKDINVKKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDS KDSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNR NEC*
311	PI-3036-AB 重鎖 可變	VQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFDIAVNWVRQAP GQGLEWMGWINTQTGKPTYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYM ELSSLRSEDATVYYCARDSEYSSSLDYWGQGTLLTVSS
312	PI-3036-AB CDR- H1	GYTFDIAVN
313	PI-3036-AB CDR- H2	WINTQTGKPT
314	PI-3036-AB CDR- H3	DSYYYSSSLDY

10

20

30

40

50

315	PI-3036-AB 重鎖	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAVNWVRQA PGQGLEWMGWINTQTGKPTYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVY MELSSLRSEDТАVYYCARDSTYYSSSLDYWGQGTЛTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
316	PI-3036-AB 輕鎖 可變	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASAGISNDLAWYQQKPGK APKLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQSYKYPWTFGQGTKLEIK
317	PI-3036-AB CDR- L1	RASAGISNDLA
318	PI-3036-AB CDR- L2	AASRLQD
319	PI-3036-AB CDR- L3	QQSYKYPWT
320	PI-3036-AB 輕鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASAGISNDLAWYQQKPGK APKLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQSYKYPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C*
321	PI-3037-AB 重鎖 可變	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAVNWVRQA PGQGLEWMGWINTQTGKPTYAQKFQGRVTMTLDTSTSTAY MELSSLRSEDТАVYYCTRDSYSSSLDYWGQGTЛTVSS
322	PI-3037-AB CDR- H1	GYTFTDYAVN
323	PI-3037-AB CDR- H2	WINTQTGKPT
324	PI-3037-AB CDR- H3	DSYYYSSSLDY

10

20

30

40

50

325	PI-3037-AB 重鎖	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAVNWVRQA PGQGLEWMGWINTQTGKPTYAQKFQGRVTMTLDTSTSTAY MELSSLRSEDТАVYYCTRDSYYYSSSLDYWGQGTЛTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
326	PI-3037-AB 輕鎖 可變	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASAGISNDLAWYQQKPGK APKLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSMQPEDFATY YCQQSYKYPWTFGQGTKLEIK
327	PI-3037-AB CDR- L1	RASAGISNDLA
328	PI-3037-AB CDR- L2	AASRLQD
329	PI-3037-AB CDR- L3	QQSYKYPWT
330	PI-3037-AB 輕鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASAGISNDLAWYQQKPGK APKLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSMQPEDFATY YCQQSYKYPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C*
331	PI-3038-AB 重鎖 可變	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDYAVNWVRQAP GQGLEWMGWINTQTGKPTYAQKFQGRFTFTLDTSTSTAYLEI SSLRSEDТАVYYCTRDSYYYSSSLDYWGQGTЛTVSS
332	PI-3038-AB CDR- H1	GYTFTDYAVN
333	PI-3038-AB CDR- H2	WINTQTGKPT
334	PI-3038-AB CDR- H3	DSYYYSSSLDY

10

20

30

40

50

335	PI-3038-AB 重鎖	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDYAVNWVRQAP GQGLEWMGWINTQTGKPTYAQKFQGRFTFTLDTSTSTAYLEI SSLRSED TAVYYCTRDSYYYSSSLDYWGQGT LVT VSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
336	PI-3038-AB 輕鎖 可變	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASAGISNDLAWYQQKPGK APKLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSMQPEDFATY YCQQSYKYPWTFGQGGTKLEIK
337	PI-3038-AB CDR- L1	RASAGISNDLA
338	PI-3038-AB CDR- L2	AASRLQD
339	PI-3038-AB CDR- L3	QQSYKYPWT
340	PI-3038-AB 輕鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASAGISNDLAWYQQKPGK APKLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSMQPEDFATY YCQQSYKYPWTFGQGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C*
341	PI-3039-AB 重鎖 可變	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDYAVNWVRQA PGQGLEWMGWINTQTGKPTYAQKFQGRVTMTLDTSTSTSYM ELSSLRSED TAVYYCTRDSYYYSSSLDYWGQGT LVT VSS
342	PI-3039-AB CDR- H1	GYTFTDYAVN
343	PI-3039-AB CDR- H2	WINTQTGKPT
344	PI-3039-AB CDR- H3	DSYYYSSSLDY

10

20

30

40

50

345	PI-3039-AB 重鎖	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYAVNWVRQA PGQGLEWMGWINTQTGKPTYAQKFQGRVTMTLDTSTSTSYM ELSSLRSEDTAVYYCTRDSYYYSSSLDYWGQGTSLTVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
346	PI-3039-AB 輕鎖 可變	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASAGISNDLAWYQQKPGK APKLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSMQPEDFATY YCQQSYKYPWTFGQGTKLEIK
347	PI-3039-AB CDR- L1	RASAGISNDLA
348	PI-3039-AB CDR- L2	AASRLQD
349	PI-3039-AB CDR- L3	QQSYKYPWT
350	PI-3039-AB 輕鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASAGISNDLAWYQQKPGK APKLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSMQPEDFATY YCQQSYKYPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGE C*
351	PI-3040-AB 重鎖 可變	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDYAVNWVRQAP GQGLEWMGWINTQTGKPTYAQKFQGRFTFTLDTSTSTSYLEI SSLRSEDTAVYYCTRDSYYYSSSLDYWGQGTSLTVTVSS
352	PI-3040-AB CDR- H1	GYTFTDYAVN
353	PI-3040-AB CDR- H2	WINTQTGKPT
354	PI-3040-AB CDR- H3	DSYYYSSSLDY

10

20

30

40

50

355	PI-3040-AB 重鎖	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDYAVNWVRQAP GQGLEWMGWINTQTGKPTYAQKFQGRFTFTLDTSTSTSYLEI SSLRSED TAVYYCTRDSYYYSSSLDYWGQGT LVT VSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYK TTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*
356	PI-3040-AB 輕鎖 可變	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASAGISNDLAWYQQKPGK APKLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSMQPEDFATY YCQQSYKYPWTFGQG TKLEIK
357	PI-3040-AB CDR- L1	RASAGISNDLA
358	PI-3040-AB CDR- L2	AASRLQD
359	PI-3040-AB CDR- L3	QQSYKYPWT
360	PI-3040-AB 輕鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASAGISNDLAWYQQKPGK APKLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSMQPEDFATY YCQQSYKYPWTFGQG TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGE C*
361	PI-HX-3092 重鎖 変数	QVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLTSYTL SWVRQPPGK GLEWIGAIWGGDNTDYN SALKSRLSITWDTSKSQVLLKMNSL QTEDTAIFYCTRELGG SFDYWGQGVMVTVSS
362	PI-HX-3092 CDR- H1	GFSLT SYTLS
363	PI-HX-3092 CDR- H2	AIWGGDNTD
364	PI-HX-3092 CDR- H3	ELGGSFDY

10

20

30

40

50

365	PI-HX-3092 重鎖	QVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLTSYTLWVRQPPGK GLEWIGAIWGGDNTDYN SALKSRLSITWDTSKSQVLLKMNSL QTEDTAIFYCTRELGGSF DYWGQGVMTVSSAETTAPSVYPL APGTALKSNSMVT LGCLVKGYFPEPVTVTWNSGALSSGVHTF PAVLQSGLYTLTSSVTVPSTWSSQAVTCNV AHPASSTKV DK KIVPRECNPCGCTGSEVSSVFIFPPKTKDVL TITLTPKVTCVVV DISQNDPEVRFSWFID DVEVHTAQTHAPEKQSNSTLR SVSELP VHRDWLNGKTFKCKVNSGAFFAPIEKSISKPEGTPRGPQVYT MAPPK EEMTQSQVSITCMVKGFYPPDIYTEWKMN GQPQENY KNTPTMDTDG SYFLYSKLNVKKETWQQGNTFTCSVLHEGL HNHHTEKSLSHSP*
366	PI-HX-3092 輕鎖 変数	DIQMTQSPPVLSASVGDRVTL SCKTSQNINKKLDWYQQKHGE APKLLIYYTNNLQTGIPSRFSGSGSGTDFTLTISTLQPEDVATY YCYQYDSGFTFGAGTKLELK
367	PI-HX-3092 CDR- L1	KTSQNINKKLD
368	PI-HX-3092 CDR- L2	YTNNLQT
369	PI-HX-3092 CDR- L3	YQYDSGFT
370	PI-HX-3092 輕鎖	DIQMTQSPPVLSASVGDRVTL SCKTSQNINKKLDWYQQKHGE APKLLIYYTNNLQTGIPSRFSGSGSGTDFTLTISTLQPEDVATY YCYQYDSGFTFGAGTKLELK RADAAPT VSIFFPSTEQLATGGA SVVCLMNNFYPRDISVKWKIDGTERRDGVLD SVTDQDSKDST YSMSSTLSLTKADYESHNL YTCEVVHKTSSSPVVKSFNRNEC
371	PI-3035-AB 重鎖 可変	QVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLTSYTLWVRQPPGK GLEWIGAIWGGDNTDYN SALKSRLSISRDTSKSQVLLKMNSL QTEDTAIFYCTRELGGSF DYWGQGVMTVSS
372	PI-3035-AB CDR- H1	GFSLTSYTLS
373	PI-3035-AB CDR- H2	AIWGGDNTD
374	PI-3035-AB CDR- H3	ELGGSF DY

10

20

30

40

50

375	PI-3035-AB 重鎖	QVQLKESGPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLTSYTLSWVRQPPGK GLEWIGAIWGGDNTDYN SALKSRLSISRDTSKSQVLLKMNSL QTEDTAIFYCTRELGGSFYWGQGMVTVSSAKTTAPSVYPL APVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFP AVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDDKI EPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVT CVVVDVSEDDPDVQISWVFNVEVHTAQQTTHREDYNSTLR VVSALPIQH QDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSV RAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNN GKTELNYKNTEPVLDSG SYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSC SVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK*
376	PI-3035-AB 軽鎖 可変	DIQMTQSPPVLSASVGDRVTLSCKTSQNINKKLDWYQQKHGE APKLLIYYTNNLQTGIPSRFSGSGSGTDFTLTISTLQPEDVATY YCYQYDSGFTFGAGTKLELK
377	PI-3035-AB CDR- L1	KTSQNINKKLD
378	PI-3035-AB CDR- L2	YTNNLQT
379	PI-3035-AB CDR- L3	YQYDSGFT
380	PI-3035-AB 軽鎖	DIQMTQSPPVLSASVGDRVTLSCKTSQNINKKLDWYQQKHGE APKLLIYYTNNLQTGIPSRFSGSGSGTDFTLTISTLQPEDVATY YCYQYDSGFTFGAGTKLELK RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGA SVVCFLLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDDT YSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
381	HX-3011 CDR-L1 コンセンサス配列	XASAGISNDLA
382	HX-3061 CDR-L1 コンセンサス配列	XASKSIGTFLA
383	HX-3031 CDR-L1 コンセンサス配列	XASEGISNDLA

10

20

30

40

50

384	ヒト MARCO タ ンハ° ク質 UNIPROTQ9UEW 3	MRNKKILKEDELLSETQQAAFHQIAMEPFEINVPKPKRRNGV NFSLAVVVIYLILLTAGA GLLVVQVLNLQARLRVLEMYFLNDTLAAEDSPSFSLLQSAHP GEHLAQGASRLQVLQAQL TWVRVSHEHLLQRVDNFTQNPGMFRIKGEQGAPGLQGHKGA MGMPGAPGPPGPPAEKGAK GAMGRDGATGPSGPQGPPGVKGEAGLQGPQGAPGKQGATGT PGPQGEKGSKGDGGLIGPK GETGTKGEKGDGLPGSKGDRGMKGDAGVMGPPGAQGSKG DFGRPGPPGLAGFPGAAGDQ GQPGLQGVPPGAVGHPGAKGEPGSAGSPGRAGLPGSPGSP GATGLKGSKGDTGLQGQQ GRKGESGVPGPAGVKGEQSPGLAGPKGAPGQAGQKGDQG VKGSSGEQGVKGEKGERGEN SVSVRIVGSSNRGRAEVYYS GTWGTICDDEWQNSDAIVFCRM LGYSKGRALYKVGAGTGQ IWLDNVQCRGTESTLWSCTKNSWGHDCSHEEDAGVECSV

10

20

30

40

50

385	PI-3010-AB HC cDNA	ATGGATTGGACTTGGCGCTTCTTGTTTGTGGTGGCGGCGGC TACTGGAGTGCAGTCACAAGTGCAACTTAAGGAATCCGGA CCGGGACTCGTGCAGCCGTCACAAACTCTTTCGCTTACCTG TACCGTGTCCGGATTTTCCCTGACTTCCTACCATGTGTCCTG GGTCAGACAGCCTCCTGGAAAGGGACTGGAATGGATGGGT GCCATTTGGACTGGGGGATCCATTGCGTATAACTCGCTGCT GAAGTCGCGCTTGTCCATTTTCGAGAGATACTCCAAGTCCC AAGTGTTTCTGAAGATGAACTCCCTGCAAACTGAAGATACT GCCACTTACTACTGTGCCCCGCGATCTGTCCGACTATTACTC GAGTTACACCTCGTTCGATTACTGGGGACAGGGTGTAATGG TCACTGTGTCGACTGCCAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTC CCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGGCACAGC GGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGG TGACGGTGTCTGTGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGT GCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACT CCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGC ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCA ACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGA CAAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCC TGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC AAAACCCAAG GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGT GGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTC AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGA CAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGT GGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATG GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCAGCAACAAAGCCCTCCC AGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAG CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGG ATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGT CAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAACAAGACCACGCCTC CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAG CTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCT TCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC ACGCAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAG

10

20

30

40

50

386	PI-3010-AB LC cDNA	ATGGATATGCGGGTGCCGGCCCCAGCTTCTGGGCCTGTTGCT GCTCTGGCTCTCCGGAGCGCGCTGTGACATCCAAATGACTC AGTCCCCCGCCTCGCTTTCAACCTCCCTGGGAGAAACCGTG TCCATCGAATGCCTGGCTTCCGAAGGGATTTCCAACGATCT GGCCTGGTACCAGCAGAAGTCCGGAAAGTCACCTCAGCTC CTGATCTACGCGGCCAGCCGGCTGCAGGACGGCGTGCCTTC CCGCTTTTCCGGTTCGGGATCAGGGACTCGGTACTCGCTGA AGATTTCCGGGATGCAGCCTGAGGACGAAGCGGACTACTT CTGCCAACAATCCTACAAGTACCCGCTGACCTTCGGCTCCG GCACCAAGCTCGAAATCAAGCGAACTGTGGCTGCACCATC TGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTG GAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCC AGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCC AATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAG CAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTG AGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCG AAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCCGTCACAAAGAG CTTCAACAGGGGAGAGTGTTAA

10

20

30

40

50

387	PI-3011-AB HC cDNA	ATGGATTGGACTTGGCGCTTCTTGTGTTGTGGTGGCGGCGGC TACTGGAGTGCAGTCACAAGTGCAACTTCAAGAATCCGGA CCGGGACTCGTGAAGCCGTCAGAAACTCTTTCGCTTACCTG TACCGTGTCCGGATTTTCCCTGACTTCCTACCATGTGTCTG GATCAGACAGCCTCCTGGAAAGGGACTGGAATGGATCGGT GCCATTTGGACTGGGGGATCCATTGCGTATAACCCGTCCCT GAAGTCGCGCGTGACTATTTTCGGTGGATACCTCCAAGAACC AATTCAGCCTGAAGTTGTCCTCCGTGACTGCCGCCGATACT GCCGTATACTACTGTGCCCGCGATCTGTCCGACTATTACTC GAGTTACACCTCGTTCGATTACTGGGGACAGGGTACTCTGG TCACTGTGTCGTCCGCCAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTC CCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGC GGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGG TGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGT GCACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCCTCAGGACTCTACT CCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGC ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCA ACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTA CAAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAATCC TGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAG GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGT GGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTC AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGA CAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGT GGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATG GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAAGCCCTCCC AGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAG CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGG ATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGT CAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTC CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAG CTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCT TCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC ACGCAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAG

10

20

30

40

50

388	PI-3011-AB LC cDNA	ATGGATATGCGGGTGCCGGCCCAGCTTCTGGGCCTGTTGCT GCTCTGGCTCTCCGGAGCGCGCTGTGACATCCAAATGACTC AGTCCCCCTCATCGCTTTCAGCCTCCGTGGGAGACAGAGTG ACCATCACTTGCCGGGCTTCCGAAGGGATTTCCAACGATCT GGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGAAAGGCCCTAAGCTC CTGATCTACGCGGCCAGCCGGCTGCAGTCCGGCGTGCCTTC CCGCTTTTCCGGTTCGGGATCAGGGACTGACTTCACCCTGA CCATTTCCAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCGACCTACTAC TGCCAACAATCCTACAAGTACCCGCTGACCTTCGGCCAAGG CACCAAGCTCGAAATCAAGCGAACTGTGGCTGCACCATCT GTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGG AACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCA GAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCA ATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGC AAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGA GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGA AGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGC TTCAACAGGGGAGAGTGTTAA

10

20

30

40

50

389	PI-3012-AB HC cDNA	ATGGATTGGACTTGGCGCTTCTTGTGTTGTGGTGGCGGCGGC TACTGGAGTGCAGTCACAAGTGCAACTTCAAGAATCCGGA CCGGGACTCGTGAAGCCGTCAGAAACTCTTTCGCTTACCTG TACCGTGTCCGGATTTTCCCTGACTTCCTACCATGTGTCTG GGTCAGACAGCCTCCTGGAAGGGACTGGAATGGATCGGT GCCATTTGGACTGGGGGATCCATTGCGTATAACCCGTCCCT GAAGTCGCGCGTAACTATTTGAGAGATACCTCCAAGAAC CAAGTGTCCCTGAAGCTGTTCGTCCGTGACTGCCGCCGATAC TGCCGTGTACTACTGTGCCCCGCGATCTGTCCGACTATTACT CGAGTTACACCTCGTTTCGATTACTGGGGACAGGGTACTCTG GTCACTGTGTCGTGCGCCAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTT CCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAG CGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCG GTGACGGTGTTCGTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCG TGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTAC TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGG CACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGC AACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTG ACAAAACCTACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACT CCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCA AGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGC GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGT TCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCG GGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGCCCT CCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCC GGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCT GGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACG CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAG CAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCA CTACACGCAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAG

10

20

30

40

50

390	PI-3012-AB LC cDNA	ATGGATATGCGGGTGCCGGCCCCAGCTTCTGGGCCTGTTGCT GCTCTGGCTCTCCGGAGCGCGCTGTGACATCCAAATGACTC AGTCCCCCTCATCGCTTTCAGCCTCCGTGGGAGACAGAGTG ACCATCACTTGCCGGGCTTCCGAAGGGATTTCCAACGATCT GGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGAAAGGCCCTAAGCTC CTGATCTACGCGGCCAGCCGGCTGCAGTCCGGCGTGCCTTC CCGCTTTTCCGGTTCGGGATCAGGGACTGACTACACCCTGA CCATTTCCAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCGACCTACTAC TGCCAACAATCCTACAAGTACCCGCTGACCTTCGGCCAAGG CACCAAGCTCGAAATCAAGCGAACTGTGGCTGCACCATCT GTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGG AACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCA GAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCA ATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGC AAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGA GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGA AGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGC TTCAACAGGGGAGAGTGTTAA

10

20

30

40

50

391	PI-3013-AB HC cDNA	ATGGATTGGACTTGGCGCTTCTTGTGTTGTGGTGGCGGCGGC TACTGGAGTGCAGTCACAAGTGCAACTTCAAGAATCCGGA CCGGGACTCGTGAAGCCGTCAGAACTCTTTCGCTTACCTG TACCGTGTCCGGATTTTCCCTGACTTCCTACCATGTGTCTG GGTCAGACAGCCTCCTGGAAGGGACTGGAATGGATCGGT GCCATTTGGACTGGGGGATCCATTGCGTATAACCCGTCCCT GAAGTCGCGCGTAACTATTTGAGAGATACCTCCAAGAAC CAAGTGTCCCTGAAGCTGTTCGTCCGTGACTGCCGCCGATAC TGCCGTGTACTACTGTGCCCCGCGATCTGTCCGACTATTACT CGAGTTACACCTCGTTTCGATTACTGGGGACAGGGTACTCTG GTCACTGTGTCGTGCGCCAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTT CCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAG CGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCG GTGACGGTGTTCGTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCG TGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTAC TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGG CACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGC AACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTG ACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACT CCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCA AGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGC GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGT TCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCG GGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGCCCT CCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCC GGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCT GGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACG CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAG CAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCA CTACACGCAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAG

10

20

30

40

50

392	PI-3013-AB LC cDNA	ATGGATATGCGGGTGCCGGCCCAGCTTCTGGGCCTGTTGCT GCTCTGGCTCTCCGGAGCGCGCTGTGACATCCAAATGACTC AGTCCCCCTCATCGCTTTCAGCCTCCGTGGGAGACAGAGTG ACCATCACTTGCCGGGCTTCCGAAGGGATTTCCAACGATCT GGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGAAAGGCCCTAAGCTC CTGATCTACGCGGCCAGCCGGCTGCAGTCCGGCGTGCCTTC CCGCTTTTCCGGTTCGGGATCAGGGACTGACTACACCCTGA CCATTTCCAGCATGCAGCCTGAGGACTTCGCGACCTACTAC TGCCAACAATCCTACAAGTACCCGCTGACCTTCGGCCAAGG CACCAAGCTCGAAATCAAGCGAACTGTGGCTGCACCATCT GTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGG AACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCA GAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCA ATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGC AAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTTGACGCTGA GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGA AGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGC TTCAACAGGGGAGAGTGTTAA

10

20

30

40

50

393	PI-3014-AB HC cDNA	ATGGATTGGACTTGGCGCTTCTTGTGTTGTGGTGGCGGCGGC TACTGGAGTGCAGTCACAAGTGCAACTTCAAGAATCCGGA CCGGGACTCGTGAAGCCGTCAGAAACTCTTTCGCTTACCTG TACCGTGTCCGGATTTTCCCTGACTTCCTACCATGTGTCTG GGTCAGACAGCCTCCTGGAAAGGGACTGGAATGGATGGGT GCCATTTGGACTGGGGGATCCATTGCGTATAACCCGTCCCT GAAGTCGCGCTTGACTATTTTCGAGAGATACCTCCAAGAACC AAGTGTGCGCTGAAGATGTCTCCCTGACTGCCGCCGATACT GCCGTATACTACTGTGCCCGCGATCTGTCCGACTATTACTC GAGTTACACCTCGTTCGATTACTGGGGACAGGGTACTCTGG TCACTGTGTCGTCGGCCAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTC CCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGC GGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGG TGACGGTGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGT GCACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCCTCAGGACTCTACT CCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGC ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCA ACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTA CAAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCC TGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAG GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGT GGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTC AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGA CAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGT GGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATG GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAAGCCCTCCC AGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAG CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGG ATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGT CAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTC CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAG CTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCT TCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC ACGCAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAG

10

20

30

40

50

394	PI-3014-AB LC cDNA	ATGGATATGCGGGTGCCGGCCCCAGCTTCTGGGCCTGTTGCT GCTCTGGCTCTCCGGAGCGCGCTGTGACATCCAAATGACTC AGTCCCCCTCATCGCTTTCAGCCTCCGTGGGAGACAGAGTG ACCATCACTTGCCGGGCTTCCGAAGGGATTTCCAACGATCT GGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGAAAGGCCCTAAGCTC CTGATCTACGCGGCCAGCCGGCTGCAGTCCGGCGTGCCTTC CCGCTTTTCCGGTTCGGGATCAGGGACTGACTACACCCTGA CCATTTCCAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCGACCTACTAC TGCCAACAATCCTACAAGTACCCGCTGACCTTCGGCCAAGG CACCAAGCTCGAAATCAAGCGAACTGTGGCTGCACCATCT GTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGG AACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCA GAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCA ATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGC AAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGA GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGA AGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGC TTCAACAGGGGAGAGTGTTAA

10

20

30

40

50

395	PI-3015-AB HC cDNA	ATGGATTGGACTTGGCGCTTCTTGTGTTGTGGTGGCGGCGGC TACTGGAGTGCAGTCACAAGTGCAACTTCAAGAATCCGGA CCGGGACTCGTGAAGCCGTCAGAAACTCTTTCGCTTACCTG TACCGTGTCCGGATTTTCCCTGACTTCCTACCATGTGTCTG GGTCAGACAGCCTCCTGGAAAGGGACTGGAATGGATGGGT GCCATTTGGACTGGGGGATCCATTGCGTATAACCCGTCCCT GAAGTCGCGCTTGACTATTTTCGAGAGATACCTCCAAGAACC AAGTGTGCGCTGAAGATGTCTCCCTGACTGCCGCCGATACT GCCGTATACTACTGTGCCCGCGATCTGTCCGACTATTACTC GAGTTACACCTCGTTCGATTACTGGGGACAGGGTACTCTGG TCACTGTGTCGTCGGCCAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTC CCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGC GGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGG TGACGGTGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGT GCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACT CCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGC ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCA ACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTA CAAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCC TGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAG GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGT GGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTC AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGA CAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGT GGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATG GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAAGCCCTCCC AGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAG CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGG ATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGT CAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTC CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAG CTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCT TCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC ACGCAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAG

10

20

30

40

50

396	PI-3015-AB LC cDNA	ATGGATATGCGGGTGCCGGCCCAGCTTCTGGGCCTGTTGCT GCTCTGGCTCTCCGGAGCGCGCTGTGACATCCAAATGACTC AGTCCCCCTCATCGCTTTCAGCCTCCGTGGGAGACAGAGTG ACCATCACTTGCCGGGCTTCCGAAGGGATTTCCAACGATCT GGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGAAAGGCCCTAAGCTC CTGATCTACGCGGCCAGCCGGCTGCAGTCCGGCGTGCCTTC CCGCTTTTCCGGTTCGGGATCAGGGACTGACTACACCCTGA CCATTTCCAGCATGCAGCCTGAGGACTTCGCGACCTACTAC TGCCAACAATCCTACAAGTACCCGCTGACCTTCGGCCAAGG CACCAAGCTCGAAATCAAGCGAACTGTGGCTGCACCATCT GTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGG AACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCA GAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCA ATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGC AAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGA GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGA AGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGC TTCAACAGGGGAGAGTGTTAA

10

20

30

40

50

397	PI-3022-AB HC cDNA	ATGGATTGGACTTGGCGCTTCTTGTTTGTGGTGGCGGCGGC TACTGGAGTGCAGTCACAAGTGCAACTTCAAGAATCCGGA CCGGGACTCGTGAAGCCGTCAGAAACTCTTTCGCTTACCTG TACCGTGTCCGGATTTTCCCTGACTTCCTACCATGTGTCTG GGTCAGACAGCCTCCTGGAAGGGACTGGAATGGATCGGT GCCATTTGGACTGGGGGATCCATTGCGTATAACCCGTCCCT GAAGTCGCGCGTAACTATTTGAGAGATACCTCCAAGAAC CAAGTGTCCCTGAAGCTGTTCGTCCGTGACTGCCGCCGATAC TGCCGTGTACTACTGTGCCCCGCGATCTGTCCGACTATTACT CGAGTTACACCTCGTTTCGATTACTGGGGACAGGGTACTCTG GTCACTGTGTCGTGCGCCAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTT CCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAG CGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCG GTGACGGTGTTCGTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCG TGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTAC TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGG CACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGC AACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTG ACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACT CCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCA AGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGC GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGT TCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCG GGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGCCCT CCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCC GGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCT GGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACG CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAG CAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCA CTACACGCAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAG

10

20

30

40

50

398	PI-3022-AB LC cDNA	ATGGATATGCGGGTGCCGGCCCAGCTTCTGGGCCTGTTGCT GCTCTGGCTCTCCGGAGCGCGCTGTGACATCCAAATGACTC AGTCCCCCTCATCGCTTTCAGCCTCCGTGGGAGACAGAGTG ACCATCACTTGCCGGGCTTCCGAAGGGATTTCCAACGATCT GGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGAAAGGCCCTAAGCTC CTGATCTACGCGGCCAGCCGGCTGCAGGACGGCGTGCCTTC CCGCTTTTCCGGTTCGGGATCAGGGACTGACTACACCCTGA CCATTTCCAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCGACCTACTAC TGCCAACAATCCTACAAGTACCCGCTGACCTTCGGCCAAGG CACCAAGCTCGAAATCAAGCGAACTGTGGCTGCACCATCT GTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGG AACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCA GAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCA ATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGC AAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGA GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGA AGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGC TTCAACAGGGGAGAGTGTTAA

10

20

30

40

50

399	PI-3023-AB HC cDNA	ATGGATTGGACTTGGCGCTTCTTGTGTTGTGGTGGCGGCGGC TACTGGAGTGCAGTCACAAGTGCAACTTCAAGAATCCGGA CCGGGACTCGTGAAGCCGTCAGAAACTCTTTCGCTTACCTG TACCGTGTCCGGATTTTCCCTGACTTCCTACCATGTGTCTG GGTCAGACAGCCTCCTGGAAGGGACTGGAATGGATCGGT GCCATTTGGACTGGGGGATCCATTGCGTATAACCCGTCCCT GAAGTCGCGCGTAACTATTTGAGAGATACCTCCAAGAAC CAAGTGTCCCTGAAGCTGTTCGTCCGTGACTGCCGCCGATAC TGCCGTGTACTACTGTGCCCCGCGATCTGTCCGACTATTACT CGAGTTACACCTCGTTTCGATTACTGGGGACAGGGTACTCTG GTCACTGTGTCGTGCGCCAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTT CCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAG CGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCG GTGACGGTGTTCGTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCG TGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTAC TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGG CACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGC AACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTG ACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACT CCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCA AGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGC GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGT TCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCG GGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGCCCT CCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCC GGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCT GGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACG CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAG CAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCA CTACACGCAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAG

10

20

30

40

50

400	PI-3023-AB LC cDNA	ATGGATATGCGGGTGCCGGCCCAGCTTCTGGGCCTGTTGCT GCTCTGGCTCTCCGGAGCGCGCTGTGACATCCAAATGACTC AGTCCCCCTCATCGCTTTCAACCTCCGTGGGAGACAGAGTG ACCATCACTTGCCGGGCTTCCGAAGGGATTTCCAACGATCT GGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGAAAGTCGCCTAAGCTC CTGATCTACGCGGCCAGCCGGCTGCAGTCCGGCGTGCCTTC CCGCTTTTCCGGTTCGGGATCAGGGACTGACTACACCCTGA CCATTTCCAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCGACCTACTTC TGCCAACAATCCTACAAGTACCCGCTGACCTTCGGCCAAGG CACCAAGCTCGAAATCAAGCGAACTGTGGCTGCACCATCT GTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGG AACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCA GAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCA ATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGC AAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGA GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGA AGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGC TTCAACAGGGGAGAGTGTTAA

10

20

30

40

50

401	PI-3024-AB HC cDNA	ATGGATTGGACTTGGCGCTTCTTGTGTTGTGGTGGCGGCGGC TACTGGAGTGCAGTCACAAGTGCAACTTCAAGAATCCGGA CCGGGACTCGTGAAGCCGTCAGAACTCTTTCGCTTACCTG TACCGTGTCCGGATTTTCCCTGACTTCCTACCATGTGTCTG GGTCAGACAGCCTCCTGGAAGGGACTGGAATGGATCGGT GCCATTTGGACTGGGGGATCCATTGCGTATAACCCGTCCCT GAAGTCGCGCGTAACTATTTGAGAGATACCTCCAAGAAC CAAGTGTCCCTGAAGCTGTGCTCCGTGACTGCCGCCGATAC TGCCGTGTACTACTGTGCCCCGCGATCTGTCCGACTATTACT CGAGTTACACCTCGTTTCGATTACTGGGGACAGGGTACTCTG GTCACTGTGTCGTGCGCCAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTT CCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAG CGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCG GTGACGGTGTGCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCG TGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTAC TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGG CACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGC AACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTG ACAAAACCTACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACT CCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCA AGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGC GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGT TCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCG GGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGCCCT CCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCC GGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCT GGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACG CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAG CAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCA CTACACGCAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAG

10

20

30

40

50

402	PI-3024-AB LC cDNA	ATGGATATGCGGGTGCCGGCCCCAGCTTCTGGGCCTGTTGCT GCTCTGGCTCTCCGGAGCGCGCTGTGACATCCAAATGACTC AGTCCCCCTCATCGCTTTCAACCTCCGTGGGAGACAGAGTG ACCATCACTTGCCGGGCTTCCGAAGGGATTTCCAACGATCT GGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGAAAGTCCCCTAAGCTC CTGATCTACGCGGCCAGCCGGCTGCAGGACGGCGTGCCTTC CCGCTTTTCCGGTTCGGGATCAGGGACTGACTACACCCTGA CCATTTCCAGCCTGCAGCCTGAGGACGAAGCGACCTACTTC TGCCAACAATCCTACAAGTACCCGCTGACCTTCGGCCAAGG CACCAAGCTCGAAATCAAGCGAACTGTGGCTGCACCATCT GTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGG AACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCA GAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCA ATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGC AAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGA GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGA AGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGC TTCAACAGGGGAGAGTGTTAA

10

20

30

40

50

403	PI-3025-AB HC cDNA	ATGGATTGGACTTGGCGCTTCTTGTGTTGTGGTGGCGGCGGC TACTGGAGTGCAGTCAGAAAGTGCAACTTCAAGAATCCGGA CCGGGACTCGTGAAGCCGTCAGAAACTCTTTCGCTTACCTG TACCGTGTCCGGATTTCCCTGACTTCCTACCATGTGTCTG GGTCAGACAGCCTCCTGGAAGGGACTGGAATGGATCGGT GCCATTTGGACTGGGGGATCCATTGCGTATAACCCGTCCCT GAAGTCGCGCGTAACTATTTGAGAGATACCTCCAAGAAC CAAGTGTCCCTGAAGCTGTTCGTCCGTGACTGCCGCCGATAC TGCCGTGTACTACTGTGCCCCGCGATCTGTCCGACTATTACT CGAGTTACACCTCGTTTCGATTACTGGGGACAGGGTACTCTG GTCACTGTGTCGTGCGCCAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTT CCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAG CGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCG GTGACGGTGTTCGTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCG TGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTAC TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGG CACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGC AACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTG ACAAAACCTACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACT CCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCA AGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGC GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGT TCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCG GGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGCCCT CCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCC GGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCT GGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACG CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAG CAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCA CTACACGCAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAG

10

20

30

40

50

404	PI-3025-AB LC cDNA	ATGGATATGCGGGTGCCGGCCCAGCTTCTGGGCCTGTTGCT GCTCTGGCTCTCCGGAGCGCGCTGTGACATCCAAATGACTC AGTCCCCCTCATCGCTTTCAGCCTCCGTGGGAGACAGAGTG ACCATCACTTGCCGGGCTTCCGAAGGGATTTCCAACGATCT GGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGAAAGGCCCTAAGCTC CTGATCTACGCGGCCAGCCGGCTGCAGGACGGCGTGCCTTC CCGCTTTTCCGGTTCGGGATCAGGGACTGACTACACCCTGA CCATTTCCAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCGACCTACTAC TGCCAACAATCCTACAAGTACCCGCTGACCTTCGGCCAAGG CACCAAGCTCGAAATCAAGCGAACTGTGGCTGCACCATCT GTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGG AACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCA GAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCA ATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGC AAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGA GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGA AGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGC TTCAACAGGGGAGAGTGTTAA

10

20

30

40

50

405	PI-3026-AB HC cDNA	ATGGATTGGACTTGGCGCTTCTTGTGTTGTGGTGGCGGCGGC TACTGGAGTGCAGTCAGAAAGTGCAACTTCAAGAATCCGGA CCGGGACTCGTGAAGCCGTCAGAAACTCTTTCGCTTACCTG TACCGTGTCCGGATTTTCCCTGACTTCCTACCATGTGTCTG GGTCAGACAGCCTCCTGGAAGGGACTGGAATGGATCGGT GCCATTTGGACTGGGGGATCCATTGCGTATAACCCGTCCCT GAAGTCGCGCGTAACTATTTTCGAGAGATACCTCCAAGAAC CAAGTGTCCCTGAAGCTGTTCGTCCGTGACTGCCGCCGATAC TGCCGTGTACTACTGTGCCCCGCGATCTGTCCGACTATTACT CGAGTTACACCTCGTTTCGATTACTGGGGACAGGGTACTCTG GTCACTGTGTCGTGCGCCAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTT CCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAG CGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCG GTGACGGTGTTCGTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCG TGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTAC TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGG CACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGC AACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTG ACAAAACCTACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACT CCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCA AGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGC GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGT TCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCG GGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGCCCT CCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCC GGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCT GGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACG CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAG CAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCA CTACACGCAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAG

10

20

30

40

50

406	PI-3026-AB LC cDNA	ATGGATATGCGGGTGCCGGCCCAGCTTCTGGGCCTGTTGCT GCTCTGGCTCTCCGGAGCGCGCTGTGACATCCAAATGACTC AGTCCCCCTCATCGCTTTCAACCTCCGTGGGAGACAGAGTG ACCATCACTTGCCGGGCTTCCGAAGGGATTTCCAACGATCT GGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGAAAGTCGCCTAAGCTC CTGATCTACGCGGCCAGCCGGCTGCAGTCCGGCGTGCCTTC CCGCTTTTCCGGTTCGGGATCAGGGACTGACTACACCCTGA CCATTTCCAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCGACCTACTTC TGCCAACAATCCTACAAGTACCCGCTGACCTTCGGCCAAGG CACCAAGCTCGAAATCAAGCGAACTGTGGCTGCACCATCT GTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGG AACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCA GAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCA ATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGC AAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGA GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGA AGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGC TTCAACAGGGGAGAGTGTTAA

10

20

30

40

50

407	PI-3027-AB HC cDNA	ATGGATTGGACTTGGCGCTTCTTGTGTTGTGGTGGCGGCGGC TACTGGAGTGCAGTCAGAAAGTGCAACTTCAAGAATCCGGA CCGGGACTCGTGAAGCCGTCAGAAACTCTTTCGCTTACCTG TACCGTGTCCGGATTTTCCCTGACTTCCTACCATGTGTCTG GGTCAGACAGCCTCCTGGAAGGGACTGGAATGGATCGGT GCCATTTGGACTGGGGGATCCATTGCGTATAACCCGTCCCT GAAGTCGCGCGTAACTATTTTCGAGAGATACCTCCAAGAAC CAAGTGTCCCTGAAGCTGTTCGTCCGTGACTGCCGCCGATAC TGCCGTGTACTACTGTGCCCCGCGATCTGTCCGACTATTACT CGAGTTACACCTCGTTTCGATTACTGGGGACAGGGTACTCTG GTCACTGTGTCGTGCGCCAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTT CCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAG CGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCG GTGACGGTGTTCGTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCG TGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTAC TCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGG CACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGC AACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTG ACAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACT CCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCA AGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGC GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGT TCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCG GGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA ATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGCCCT CCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCC GGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCT GGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACG CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAG CAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCA CTACACGCAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAG

10

20

30

40

50

408	PI-3027-AB LC cDNA	ATGGATATGCGGGTGCCGGCCCAGCTTCTGGGCCTGTTGCT GCTCTGGCTCTCCGGAGCGCGCTGTGACATCCAAATGACTC AGTCCCCCTCATCGCTTTCAACCTCCGTGGGAGACAGAGTG ACCATCACTTGCCGGGCTTCCGAAGGGATTTCCAACGATCT GGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGAAAGTCCCCTAAGCTC CTGATCTACGCGGCCAGCCGGCTGCAGGACGGCGTGCCTTC CCGCTTTTCCGGTTCGGGATCAGGGACTGACTACACCCTGA CCATTTCCAGCCTGCAGCCTGAGGACGAAGCGACCTACTTC TGCCAACAATCCTACAAGTACCCGCTGACCTTCGGCCAAGG CACCAAGCTCGAAATCAAGCGAACTGTGGCTGCACCATCT GTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGG AACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCA GAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCA ATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGC AAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGA GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGA AGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGC TTCAACAGGGGAGAGTGTTAA

10

20

30

40

50

409	PI-3030-AB HC cDNA	ATGGATTGGACTTGGCGCTTCTTGTTTGTGGTGGCGGCGGC TACTGGAGTGCAGTCACAAATCCAGCTCGTGCAGTCCGGG CCAGAGCTGAAAAAGCCCGGAGAATCCGTCAAGATTAGCT GCAAGGCCTCCGGCTACACCTTCACCGACTACGCAGTGAA CTGGGTCAAGCAGGCCCCGGGAAATGGTCTGAAGTGGATG GGCTGGATTAACACGCAGACCGGGAAGCCTACCTACGCCG ACGACTTCAAGCAACGGTTCGTGTTCTCGCTTGAACTAGC GCCTCGACCTCGTTCCTGCAAATCAACAACCTGAACATCGA GGACACCGCCACCTACTTCTGCACAAGAGACTCCTACTATT ACTCATCCTCCCTCGATTACTGGGGACAGGGCGTGATGGTC ACTGTGTCCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCC CCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCG GCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGT GACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTG CACACCTTCCCGGTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTC CCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCA CCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAA CACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGAC AAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCT GGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGG ACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTG GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCA ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGAC AAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTG GTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGG CAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCAGCAACAAAGCCCTCCCA GCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGC CCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGA TGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTC AAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA GCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCC CGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGC TCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTT CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACA CGCAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAG

10

20

30

40

50

410	PI-3030-AB LC cDNA	ATGGATATGCGGGTGCCGGCCCAGCTTCTGGGCCTGTTGCT GCTCTGGCTCTCCGGAGCGCGCTGTGACATCCAAATGACTC AGTCCCCTGCATCCCTGAGCGCGAGCCTGGGGGAGACTGT GTCCATTGAATGCCTCGCCTCCGCCGGAATTTCTAACGACC TGGCCTGGTACCAGCAGAAGTCCGGAAGTCGCCCCAGCT GCTGATCTACGCCGCTTCGAGGCTTCAGGATGGTGTCCCGT CACGGTTTAGCGGATCAGGATCCGGCACCAGATTCTCCCTG AAAATCAGCGACATGCAGCCAGAGGACGAAGCCGACTACT TCTGCCAACAATCGTACAAGTATCCCTGGACCTTCGGCGGG GGCACCAAGCTCGAACTGAAGCGAACTGTGGCTGCACCAT CTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT GGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCC CAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTC CAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACA GCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCT GAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGC GAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGA GCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAA

10

20

30

40

50

411	PI-3036-AB HC cDNA	ATGGACTGGACCTGGAGATTTTATTTCGTCGTCGCTGCCGC CACCGGAGTGCAATCACAAGTACAACCTGGTGCAGAGCGGG GCCGAAGTCAAGAAGCCCGGCGCCTCCGTGAAAGTGTCGT GCAAAGCCTCGGGTTACACATTCAGTACTACGCAGTGAA CTGGGTTCAGACAGGCACCGGGCCAGGGACTCGAGTGGATG GGCTGGATCAACACTCAGACTGGGAAGCCCACCTATGCTC AGAAGTTCCAGGGAAGGGTCACCATGACCCGCGACACCAG CACCTCCACCGTGTACATGGAATTGAGCAGCCTGCGGTCCG AAGATACAGCCGTGTACTATTGTGCGAGGGACTCCTACTAC TACTCATCCTCGCTCGACTACTGGGGCCAGGGTACCCTCGT GACCGTTAGCTCGGCCTCTACTAAGGGTCCGTCCGTGTTCC CGTTGGCCCCGAGCTCGAAGTCCACCTCCGGGGGAACCGC TGCGCTTGATGCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCC TGACGGTGTCTGGAACCTCCGGGGCCCTGACCTCGGGAGT GCACACTTTCCTGCGGTGCTGCAGAGCTCAGGACTGTACA GCCTCAGCTCCGTGCTGACCGTGCCTTCGTCTCGCTGGGC ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCGAGCA ACACCAAGGTCGACAAGAAAGTCGAGCCGAAGTCATGCGA CAAGACTCACACTTGCCCGCCGTGCCCCGCGCCTGAGCTTC TTGGCGGGCCCTCCGTGTTCTGTTCCGCCAAAGCCCAAG GATACTCTGATGATTTTCGCGGACTCCTGAAGTGACCTGTGT GGTCGTGATGTGTCCCATGAGGACCCCGAGGTCAAGTTCA ATTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTCCACAATGCCAAGAC GAAGCCGCGGGAAGAACAGTACAACCTCCACTTATCGCGTG GTGTCCGTGCTCACCGTGCTGCATCAGGACTGGCTGAACGG AAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCACAAGGCCCTGCCT GCCCCAATTGAAAAGACCATCTCAAAAGCGAAGGGCCAGC CGCGCGAACCACAAGTGTACACCCTGCCTCCTTCCCGGGAT GAACTGACCAAGAACCAAGTGTCCCTGACTTGCCTCGTGA AGGGTTTCTACCCGTCCGACATCGCCGTGGAATGGGAGAG CAACGGACAGCCCGAGAACAATTACAAGACTACCCACCC GTGCTCGATTTCGGACGGCAGCTTCTTCTGTACTCCAAGCT GACCGTGGATAAGTCCCGCTGGCAACAGGGAAACGTGTTC AGTTGTTCCGTGATGCACGAAGCCCTGCACAACCACTACAC CCAGAAGTCACTGTCCCTGTCTCCGGGAAAATAA

10

20

30

40

50

412	PI-3036-AB LC cDNA	ATGGATATGAGAGTGCCTGCACAACTTCTTGGATTACTGCT GCTTTGGTTGTCGGGAGCCAGATGCGATATCCAGATGACCC AGTCCCCGTCGAGCCTGTCAGCTTCCGTGGGCGACCGGGTC ACCATTACTTGTCGCGCCTCGGCCGGTATTAGCAATGACTT GGCCTGGTACCAGCAGAAGCCTGGGAAGGCCCCAAGCTC CTCATCTACGCGGCTTCCCCGCCTGCAAGACGGCGTGCCGTC AAGGTTTCAGCGGTTTCGGGCTCCGGAAGTGAATTCACCCTCA CTATCTCGTCCCTGCAACCCGAAGATTTTCGCAACCTACTAC TGCCAGCAGTCCTATAAGTACCCCTGGACTTTCGGACAAGG CACCAAGCTCGAGATCAAGCGGACCGTGGCCGCCCCGAGC GTGTTTATCTTCCCGCCATCTGACGAACAGCTGAAGTCCGG GACAGCGTCCGTGGTCTGCCTGCTCAACAACCTTCTACCCCC GCGAGGCCAAAGTGCAGTGGAAAGTCGATAACGCGCTGCA GTCCGGAAACAGCCAGGAAAGCGTGACTGAGCAAGACTCC AAGGACTCCACCTACTCCCTGTCATCCACCCTGACGCTGTC CAAGGCCGACTACGAAAAGCACAAGGTCTACGCCTGCGAA GTGACCCATCAGGGCCTGTCAAGCCCTGTGACCAAGTCGTT CAACCGGGGAGAGTGTTAA

10

20

30

40

50

413	PI-3038-AB HC cDNA	ATGGACTGGACCTGGAGATTTTATTTCGTCGTCGCTGCCGC CACCGGAGTGCAATCACAAGTACAACCTGGTGCAGAGCGGG GCCGAAGTCAAGAAGCCCGGCGCCTCCGTGAAAGTGTCGT GCAAAGCCTCGGGTTACACATTCAGTACTACGCAGTGAA CTGGGTTCAGACAGGCACCGGGCCAGGGACTCGAGTGGATG GGCTGGATCAACACTCAGACTGGGAAGCCCACCTATGCTC AGAAGTTCCAGGGAAGGGTCACCATGACCCTGGACACCAG CACCTCCACCGCATACATGGAATTGAGCAGCCTGCGGTCCG AAGATACAGCCGTGTACTATTGTACTAGGGACTCCTACTAC TACTCATCCTCGCTCGACTACTGGGGCCAGGGTACCCTCGT GACCGTTAGCTCGGCCTCTACTAAGGGTCCGTCCGTGTTCC CGTTGGCCCCGAGCTCGAAGTCCACCTCCGGGGGAACCGC TGCGCTTGATGCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCC TGACGGTGTCTGGAACCTCCGGGGCCCTGACCTCGGGAGT GCACACTTTCCCTGCGGTGCTGCAGAGCTCAGGACTGTACA GCCTCAGCTCCGTGCTGACCGTGCCTTCGTCTCGCTGGGC ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCGAGCA ACACCAAGGTCGACAAGAAAGTCGAGCCGAAGTCATGCGA CAAGACTCACACTTGCCCGCCGTGCCCCGCGCCTGAGCTTC TTGGCGGGCCCTCCGTGTTCTGTTCCGCCAAAGCCCAAG GATACTCTGATGATTTTCGCGGACTCCTGAAGTGACCTGTGT GGTCGTGATGTGTCCCATGAGGACCCCGAGGTCAAGTTCA ATTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTCCACAATGCCAAGAC GAAGCCGCGGGAAGAACAGTACAACCTCCACTTATCGCGTG GTGTCCGTGCTCACCGTGCTGCATCAGGACTGGCTGAACGG AAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCCAACAAGGCCCTGCCT GCCCCAATTGAAAAGACCATCTCAAAAGCGAAGGGCCAGC CGCGCGAACCACAAGTGTACACCCTGCCTCCTTCCCGGGAT GAACTGACCAAGAACCAAGTGTCCCTGACTTGCCTCGTGA AGGGTTTCTACCCGTCCGACATCGCCGTGGAATGGGAGAG CAACGGACAGCCCGAGAACAATTACAAGACTACCCACCC GTGCTCGATTTCGGACGGCAGCTTCTTCTGTACTCCAAGCT GACCGTGGATAAGTCCCGCTGGCAACAGGGAAACGTGTTC AGTTGTTCCGTGATGCACGAAGCCCTGCACAACCACTACAC CCAGAAGTCACTGTCCCTGTCTCCGGGAAAATAA

10

20

30

40

50

414	PI-3038-AB LC cDNA	ATGGATATGAGAGTGCCTGCACAACTTCTTGGATTACTGCT GCTTTGGTTGTCGGGAGCCAGATGCGATATCCAGATGACCC AGTCCCCGTCGAGCCTGTCAGCTTCCGTGGGCGACCGGGTC ACCATTACTTGTCGCGCCTCGGCCGGTATTAGCAATGACTT GGCCTGGTACCAGCAGAAGCCTGGGAAGGCCCCAAGCTC CTCATCTACGCGGCTTCCCCGCCTGCAAGACGGCGTGCCGTC AAGGTTTCAGCGGTTTCGGGCTCCGGAAGTGAATCACCCCTCA CTATCTCGTCCCTGCAACCCGAAGATTTTCGCAACCTACTAC TGCCAGCAGTCCTATAAGTACCCCTGGACTTTCGGACAAGG CACCAAGCTCGAGATCAAGCGGACCGTGGCCGCCCCGAGC GTGTTTATCTTCCCGCCATCTGACGAACAGCTGAAGTCCGG GACAGCGTCCGTGGTCTGCCTGCTCAACAACCTTCTACCCCC GCGAGGCCAAAGTGCAGTGGAAAGTCGATAACGCGCTGCA GTCCGGAAACAGCCAGGAAAGCGTGACTGAGCAAGACTCC AAGGACTCCACCTACTCCCTGTCATCCACCCTGACGCTGTC CAAGGCCGACTACGAAAAGCACAAGGTCTACGCCTGCGAA GTGACCCATCAGGGCCTGTCAAGCCCTGTGACCAAGTCGTT CAACCGGGGAGAGTGTTAA

10

20

30

40

50

415	PI-3039-AB HC cDNA	ATGGACTGGACCTGGAGATTTTATTTCGTCGTCGCTGCCGC CACCGGAGTGCAATCACAAGTACAACCTGGTGCAGAGCGGG GCCGAAGTCAAGAAGCCCCGGCGCCTCCGTGAAAATCTCGT GCAAAGCCTCGGGTTACACATTCACTGACTACGCAGTGAA CTGGGTCAGACAGGCACCGGGGCCAGGGACTCGAGTGGATG GGCTGGATCAACACTCAGACTGGGAAGCCCACCTATGCTC AGAAGTTCCAGGGAAGGTTACCTTTACCTTGGACACCAGC ACCTCCACCGCGTACTTGGAAATTAGCAGCCTGCGGTCCGA AGATACAGCCGTGTACTATTGTACTAGGGACTCCTACTACT ACTCATCCTCGCTCGACTACTGGGGGCCAGGGTACCCTCGTG ACCGTTAGCTCGGCCTCTACTAAGGGTCCGTCCGTGTTCCC GTTGGCCCCGAGCTCGAAGTCCACCTCCGGGGGAACCGCT GCGCTTGATGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGT GACGGTGTCTGGAACCTCCGGGGGCCCTGACCTCGGGAGTG CACACTTTCCCTGCGGTGCTGCAGAGCTCAGGACTGTACAG CCTCAGCTCCGTCTGTGACCGTGCCTTCGTCCTCGCTGGGCA CCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCGAGCAA CACCAAGGTCGACAAGAAAGTCGAGCCGAAGTCATGCGAC AAGACTCACACTTGCCCCGCCGTGCCCCGCGCCTGAGCTTCT TGGCGGGCCCTCCGTGTTCTTCCGCCAAAGCCCAAGG ATACTCTGATGATTTTCGCGGACTCCTGAAGTGACCTGTGTG GTCGTCGATGTGTCCCATGAGGACCCCGAGGTCAAGTTCAA TTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTCCACAATGCCAAGACG AAGCCGCGGGAAGAACAGTACAACCTCCACTTATCGCGTGG TGTCCGTGCTCACCGTGCTGCATCAGGACTGGCTGAACGGA AAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTG CCCCAATTGAAAAGACCATCTCAAAAGCGAAGGGGCCAGCC GCGCGAACCACAAGTGTACACCCTGCCTCCTTCCCGGGATG AACTGACCAAGAACCAAGTGTCCCTGACTTGCCTCGTGAA GGGTTTCTACCCGTCCGACATCGCCGTGGAATGGGAGAGC AACGGACAGCCCGAGAACAATTACAAGACTACCCACCCG TGCTCGATTTCGGACGGCAGCTTCTTCCTGTACTCCAAGCTG ACCGTGGATAAGTCCCGCTGGCAACAGGGAAACGTGTTCA GTTGTTCCGTGATGCACGAAGCCCTGCACAACCACTACACC CAGAAGTCACTGTCCCTGTCTCCGGGAAAATAA

10

20

30

40

50

416	PI-3039-AB LC cDNA	ATGGATATGAGAGTGCCTGCACAACTTCTTGGATTACTGCT GCTTTGGTTGTCGGGAGCCAGATGCGATATCCAGATGACCC AGTCCCCGTCGAGCCTGTCAGCTTCCGTGGGCGACCGGGTC ACCATTACTTGTCGCGCCTCGGCCGGTATTAGCAATGACTT GGCCTGGTACCAGCAGAAGCCTGGGAAGGCCCCAAGCTC CTCATCTACGCGGCTTCCCCGCCTGCAAGACGGCGTGCCGTC AAGGTTTCAGCGGTTTCGGGCTCCGGAAGTGAATTCACCCTCA CTATCTCGTCCCTGCAACCCGAAGATTTTCGCAACCTACTAC TGCCAGCAGTCCTATAAGTACCCCTGGACTTTCGGACAAGG CACCAAGCTCGAGATCAAGCGGACCGTGGCCGCCCCGAGC GTGTTTATCTTCCCGCCATCTGACGAACAGCTGAAGTCCGG GACAGCGTCCGTGGTCTGCCTGCTCAACAACCTTCTACCCCC GCGAGGCCAAAGTGCAGTGGAAAGTCGATAACGCGCTGCA GTCCGGAAACAGCCAGGAAAGCGTGACTGAGCAAGACTCC AAGGACTCCACCTACTCCCTGTCATCCACCCTGACGCTGTC CAAGGCCGACTACGAAAAGCACAAGGTCTACGCCTGCGAA GTGACCCATCAGGGCCTGTCAAGCCCTGTGACCAAGTCGTT CAACCGGGGAGAGTGTTAA

10

20

30

40

50

417	PI-3040-AB HC cDNA	ATGGACTGGACCTGGAGATTTTATTTCGTCGTCGCTGCCGC CACCGGAGTGCAATCACAAGTACAACCTGGTGCAGAGCGGG GCCGAAGTCAAGAAGCCCGGCGCCTCCGTGAAAGTGTCGT GCAAAGCCTCGGGTTACACATTCAGTACTACGCAGTGAA CTGGGTTCAGACAGGCACCGGGGCCAGGGACTCGAGTGGATG GGCTGGATCAACACTCAGACTGGGAAGCCCACCTATGCTC AGAAGTTCCAGGGAAGGGTCACCATGACCTTGGACACCAG CACCTCCACCTCCTACATGGAATTGAGCAGCCTGCGGTCCG AAGATACAGCCGTGTACTATTGTACTAGGGACTCCTACTAC TACTCATCCTCGCTCGACTACTGGGGCCAGGGTACCCTCGT GACCGTTAGCTCGGCCTCTACTAAGGGTCCGTCCGTGTTCC CGTTGGCCCCGAGCTCGAAGTCCACCTCCGGGGGAACCGC TGCGCTTGATGCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCC TGACGGTGTCTTGGAACTCCGGGGCCCTGACCTCGGGAGT GCACACTTTCCTGCGGTGCTGCAGAGCTCAGGACTGTACA GCCTCAGCTCCGTGCTGACCGTGCCTTCGTCTCGCTGGGC ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCGAGCA ACACCAAGGTCGACAAGAAAGTCGAGCCGAAGTCATGCGA CAAGACTCACACTTGCCCGCCGTGCCCCGCGCCTGAGCTTC TTGGCGGGCCCTCCGTGTTCTGTTCCGCCAAAGCCCAAG GATACTCTGATGATTTTCGCGGACTCCTGAAGTGACCTGTGT GGTCGTGATGTGTCCCATGAGGACCCCGAGGTCAAGTTCA ATTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTCCACAATGCCAAGAC GAAGCCGCGGGAAGAACAGTACAACCTCCACTTATCGCGTG GTGTCCGTGCTCACCGTGCTGCATCAGGACTGGCTGAACGG AAAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCACAACAAGGCCCTGCCT GCCCCAATTGAAAAGACCATCTCAAAAGCGAAGGGCCAGC CGCGCGAACCACAAGTGTACACCCTGCCTCCTTCCCGGGAT GAACTGACCAAGAACCAAGTGTCCCTGACTTGCCTCGTGA AGGGTTTCTACCCGTCCGACATCGCCGTGGAATGGGAGAG CAACGGACAGCCCGAGAACAATTACAAGACTACCCACCC GTGCTCGATTTCGGACGGCAGCTTCTTCTGTACTCCAAGCT GACCGTGGATAAGTCCCGCTGGCAACAGGGAAACGTGTTC AGTTGTTCCGTGATGCACGAAGCCCTGCACAACCACTACAC CCAGAAGTCACTGTCCCTGTCTCCGGGAAAATAA

10

20

30

40

50

418	PI-3040-AB LC cDNA	ATGGATATGAGAGTGCCTGCACAACTTCTTGGATTACTGCT GCTTTGGTTGTCGGGAGCCAGATGCGATATCCAGATGACCC AGTCCCCGTCGAGCCTGTCAGCTTCCGTGGGCGACCGGGTC ACCATTACTTGTCGCGCCTCGGCCGGTATTAGCAATGACTT GGCCTGGTACCAGCAGAAGCCTGGGAAGGCCCCAAGCTC CTCATCTACGCGGCTTCCCCGCCTGCAAGACGGCGTGCCGTC AAGGTTTCAGCGGTTTCGGGCTCCGGAAGTGAATTCACCCTCA CTATCTCGTCCCTGCAACCCGAAGATTTTCGCAACCTACTAC TGCCAGCAGTCCTATAAGTACCCCTGGACTTTCGGACAAGG CACCAAGCTCGAGATCAAGCGGACCGTGGCCGCCCCGAGC GTGTTTATCTTCCCGCCATCTGACGAACAGCTGAAGTCCGG GACAGCGTCCGTGGTCTGCCTGCTCAACAACCTTCTACCCCC GCGAGGCCAAAGTGCAGTGGAAAGTCGATAACGCGCTGCA GTCCGGAAACAGCCAGGAAAGCGTGACTGAGCAAGACTCC AAGGACTCCACCTACTCCCTGTCATCCACCCTGACGCTGTC CAAGGCCGACTACGAAAAGCACAAGGTCTACGCCTGCGAA GTGACCCATCAGGGCCTGTCAAGCCCTGTGACCAAGTCGTT CAACCGGGGAGAGTGTTAA

10

20

30

40

50

419	PI-3041-AB HC cDNA	ATGGACTGGACCTGGAGATTTTATTTCGTCGTCGCTGCCGC CACC GGAGTGCAATCACAAGTACAAC TGGTGCAGAGCGGG GCCGAAGTCAAGAAGCCCGGCGCCTCCGTGAAAATCTCGT GCAAAGCCTCGGGTTACACATTC ACTGACTACGCAGTGAA CTGGGT CAGACAGGCACCGGGCCAGGGACTCGAGTGGATG GGCTGGATCAACACTCAGACTGGGAAGCCCACCTATGCTC AGAAGTTCCAGGGAAGGTTTACCTTCACCCTCGACACCAGC ACCTCCACCTCCTACTTGGAAATTAGCAGCCTGCGGTCCGA AGATACAGCCGTGTACTATTGTACTAGGGACTCCTACTACT ACTCATCCTCGCTCGACTACTGGGGCCAGGGTACCCTCGTG ACCGTTAGCTCGGCCTCTACTAAGGGTCCGTCCGTGTTCCC GTTGGCCCCGAGCTCGAAGTCCACCTCCGGGGGAACCGCT GCGCTTG GATGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGT GACGGTGTCTGGA ACTCCGGGGGCCCTGACCTCGGGAGTG CACACTTTCCCTGCGGTGCTGCAGAGCTCAGGACTGTACAG CCTCAGCTCCGTGCTGACCGTGCC TTCGTCCTCGCTGGGCA CCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCGAGCAA CACCAAGGTCGACAAGAAAGTCGAGCCGAAGTCATGCGAC AAGACTCACACTTGCCCGCCGTGCCCGCGCCTGAGCTTCT TGGCGGGCCCTCCGTGTTCTGTTTCCGCCAAAGCCCAAGG ATACTCTGATGATTTCGCGGACTCCTGAAGTGACCTGTGTG GTCGTGCGATGTGTCCCATGAGGACCCCGAGGTCAAGTTCAA TTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTCCACAATGCCAAGACG AAGCCGCGGGAAGAACAGTACAAC TCCACTTATCGCGTGG TGTCCGTGCTCACCGTGCTGCATCAGGACTGGCTGAACGGA AAGGAGTACAAGTGCAAAGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTG CCCCAATTGAAAAGACCATCTCAA AAGCGAAGGGCCAGCC GCGCGAACCACAAGTGTACACCCTGCCTCCTTCCCGGGATG AACTGACCAAGAACCAAGTGTCCCTGACTTGCCTCGTGAA GGGTTTCTACCCGTCCGACATCGCCGTGGAATGGGAGAGC AACGGACAGCCCGAGAACAATTACAAGACTACCCACCCG TGCTCGATTTCGGACGGCAGCTTCTTCCTGTACTCCAAGCTG ACCGTGGATAAGTCCCGCTGGCAACAGGGAAACGTGTTCA GTTGTTCCGTGATGCACGAAGCCCTGCACAACCACTACACC CAGAAGTCACTGTCCCTGTCTCCGGGAAAATAA

10

20

30

40

50

420	PI-3041-AB LC cDNA	ATGGATATGAGAGTGCCTGCACAACTTCTTGGATTACTGCT GCTTTGGTTGTCGGGAGCCAGATGCGATATCCAGATGACCC AGTCCCCGTCGAGCCTGTCAGCTTCCGTGGGCGACCGGGTC ACCATTACTTGTCGCGCCTCGGCCGGTATTAGCAATGACTT GGCCTGGTACCAGCAGAAGCCTGGGAAGGCCCCAAGCTC CTCATCTACGCGGCTTCCCCGCCTGCAAGACGGCGTGCCGTC AAGGTTTCAGCGGTTTCGGGCTCCGGAAGTGAATCACCCCTCA CTATCTCGTCCCTGCAACCCGAAGATTTTCGCAACCTACTAC TGCCAGCAGTCCTATAAGTACCCCTGGACTTTCGGACAAGG CACCAAGCTCGAGATCAAGCGGACCGTGGCCGCCCCGAGC GTGTTTATCTTCCCGCCATCTGACGAACAGCTGAAGTCCGG GACAGCGTCCGTGGTCTGCCTGCTCAACAACCTTCTACCCCC GCGAGGCCAAAGTGCAGTGGAAAGTCGATAACGCGCTGCA GTCCGGAAACAGCCAGGAAAGCGTGACTGAGCAAGACTCC AAGGACTCCACCTACTCCCTGTCATCCACCCTGACGCTGTC CAAGGCCGACTACGAAAAGCACAAGGTCTACGCCTGCGAA GTGACCCATCAGGGCCTGTCAAGCCCTGTGACCAAGTCGTT CAACCGGGGAGAGTGTTAA

10

20

30

40

50

421	PI-3028-AB HC cDNA	ATGGATTGGACTTGGAGATTTTGTGTTGTGGTGGCGGCGGC CACTGGAGTGCAATCCGAAGTGCAATTGGTGGGAATCGGGT GGTGGACTTGTGCAGCCTGGATCGTCACTTAAGCTGTCCTG TGTGGCCTCGAAGTTTACCTTCTCCAACATATGGGATGAACT GGATTAGACAAGCCCCGAAGAAGGGACTGGAATGGATTGC GCTGATCTATTACAACCTCGAACAACAAGTACTACGCTGATT CCGTGAAGGGTCGCTTCACTATTTCCCGCGACAACCTCGAAG AACACTCTGTACCTTGAGATGAACTCCCTGCGCTCGGAAGA TACTGCCATGTACTACTGTGCCAAGTCGCTGACTGGCGGAT CCGATTACTTCGATTCCCTGGGGACAAGGAGTGATGGTCACT GTATCCAGTGCCAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCT GGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCC CTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGAC GGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCAC ACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCT CAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACC CAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACA CCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAA AACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGG GGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGAC ACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGT GGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAAC TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA AGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGT CAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCA AGGAGTACAAGTGCAAGGTCAGCAACAAAGCCCTCCCAGC CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCC CGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATG AGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAA AGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC AATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCG TGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTC ACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCT CATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACG CAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAG

10

20

30

40

50

422	PI-3028-AB LC cDNA	ATGGACATGCGCGTGCCTGCGCAATTGCTGGGGCTGCTTCT CCTGTGGCTTTTCGGGAGCCCGCTGCGACGTGCAGATGACCC AGTCCCCTTCCTACCTGGCTGCGTCACCGGGAGAATCAGTG TCCATCAGCTGCAAGGCCTCCAAGTCCATTGGTACCTTCCT GGCCTGGTACCAAGAGAAGCCTGAAAAGACCAACAAGCTC CTGATCTACTCGGGATCAACCCTGCAATCCGGCACTCCGTC GCGGTTCTCCGGATCCGGGTCCGGCACCGACTTTACTCTGA CCATTTCGGAACCTGGAACCCGAAGATTTCGCCGTGTACTAC TGTCAGCAGCACGACGAATACCCGTTTACTTTTCGGCTCCGG CACCAAGCTCGAAATCAAGCGAACTGTGGCTGCACCATCT GTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGG AACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCA GAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCA ATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGC AAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGA GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGA AGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGC TTCAACAGGGGAGAGTGTTAA

10

20

30

40

50

423	PI-3029-AB HC cDNA	ATGGATTGGACTTGGAGATTTTGTGTTGTGGTGGCGGCGGC CACTGGAGTGCAATCCGAAGTGCAATTGGTGGGAATCGGGT GGTGGACTTGTGCAGCCTGGATCGTCACTTAAGCTGTCCTG TGTGGCCTCGAAGTTTACCTTCTCCAACATATGGGATGAACT GGATTAGACAAGCCCCGAAGAAGGGACTGGAATGGATTGC GCTGATCTATTACAACCTCGAACAACAAGTACTACGCTGATT CCGTGAAGGGTCGCTTCACTATTTCCCGCGACAACCTCGAAG AACACTCTGTACCTTGAGATGAACTCCCTGCGCTCGGAAGA TACTGCCATGTACTACTGTGCCAAGTCGCTGACTGGCGGAT CCGATTACTTCGATTCCCTGGGGACAAGGAGTGATGGTCACT GTATCCAGTGCCAGCACAAAGGGGCCATCCGTCTTCCCCCT GGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCC CTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGAC GGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCAC ACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCT CAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACG AAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACA CCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCC ATGCCCATCCTGCCCAGCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCAT CAGTCTTCCTGTTCCCCCAAAACCCAAGGACACTCTCATG ATCTCCCGGACCCCTGAGGTACAGTGCGTGGTGGTGGACGT GAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTG GATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGG AGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCT CACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTAC AAGTGCAAGGTCAGCAACAAAGGCCTCCCGTCTCCATCG AGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCC ACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCAGGAGGAGATGACC AAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCT ACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA GCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGAC TCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGA CAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCC GTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGT CCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAATAG

10

20

30

40

50

424	PI-3029-AB LC cDNA	ATGGACATGCGCGTGCCTGCGCAATTGCTGGGGCTGCTTCT CCTGTGGCTTTTCGGGAGCCCGCTGCGACGTGCAGATGACCC AGTCCCCTTCCTACCTGGCTGCGTCACCGGGAGAATCAGTG TCCATCAGCTGCAAGGCCTCCAAGTCCATTGGTACCTTCCT GGCCTGGTACCAAGAGAAGCCTGAAAAGACCAACAAGCTC CTGATCTACTCGGGATCAACCCTGCAATCCGGCACTCCGTC GCGGTTCTCCGGATCCGGGTCCGGCACCGACTTTACTCTGA CCATTTCGGAACCTGGAACCCGAAGATTTCGCCGTGTACTAC TGTCAGCAGCACGACGAATACCCGTTTACTTTTCGGCTCCGG CACCAAGCTCGAAATCAAGCGAACTGTGGCTGCACCATCT GTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGG AACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCA GAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCA ATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGC AAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGA GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGA AGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGC TTCAACAGGGGAGAGTGTTAA

10

20

30

40

50

425	PI-3031-AB HC cDNA	ATGGATTGGACTTGGCGCTTCTTGTTTGTGGTGGCGGCGGC TACTGGAGTGCAGTCACAAGTCAACCTTCTGCAATCCCGGG CAGCACTCGTGAAGCCCGGTGCTTCAGTGAAGCTGAGCTG CAAGGCCTCCGGGTACACCTTCACCGACTACTATCTGCATT GGGTCAAGCAGTCCCACGCCAAGAGCCTGGAGTGGATTGG CTACATCAACCCGAACAACGCCTACACCTCGTACAATGAG AAGTTCAAGTCCAAAGCGACCCTGACCGTGGATAAGTCCA CTAACACCGCCTACATGGAAGTGTCCAGACTCACGTCCGCC GACTCGGCCACCTATTACTGTGCCCCGGGACACCACAGACTA CTACAACCTCCACTTCGCCTACTGGGGCCAGGGAAGTCTGG TCACCGTGTGCGAGCGCCAGCACCAAGGGGCCATCGGTCTTC CCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGC GGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGG TGACGGTGTGCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGT GCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACT CCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGC ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCA ACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTA CAAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAGTCC TGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAG GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGT GGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTC AACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGA CAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGT GGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATG GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAAGCCCTCCC AGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAG CCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGG ATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGT CAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTC CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAG CTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCT TCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC ACGCAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAG

10

20

30

40

50

426	PI-3031-AB LC cDNA	ATGGATATGCGGGTGCCGGCCCAGCTTCTGGGCCTGTTGCT GCTCTGGCTCTCCGGAGCGCGCTGTGACATTCAAATGACCC AGTCCCCTGCATCACTGAGCGCCTCACTGGGGGAAACTGTC AGCATTGAGTGCCTGACCTCCGAGGGAATCTCGAACGACC TGGCCTGGTATCAGCAGAAGTCCGGAAAGTCGCCGCAGCT GCTTATCTACGACGCCAGCAGACTCGAGGACGGCGTGCCC TCCCGCTTTTCCGGCTCTGGTTCCGGCACTCGGTACAGCCT GAAGATCTCCGGAATGCAGACCGAAGATGAAGCTGACTAC TTCTGCCAACAATCGTACAAATACCCACTGACCTTCGGTTC CGGGACCAAGCTCGAAATCAAGCGAACTGTGGCTGCACCA TCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT GGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCC CAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTC CAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACA GCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCT GAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGC GAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGA GCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAA
427	HC シグナルペプ チド配列	ATGGATTGGACTTGCGCCTTCTTGTGTTGTGGTGGCGGCGGC TACTGGAGTGCAGTCA
428	HC シグナルペプ チド配列	MDWTWRFLFVVAATGVQS
429	LC シグナルペプ チド配列	MDMRVPAQLLGLLLWLSGARC
430	LC シグナルペプ チド配列	ATGGATATGCGGGTGCCGGCCCAGCTTCTGGGCCTGTTGCT GCTCTGGCTCTCCGGAGCGCGCTGT
431	CDR L1	ASEGISNDLA
432	CDR L1	ASAGISNDLA
433	CDR L1	ASKSIGTFLA
434	PI-3025-AB2 重鎖 可変	EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTSYHVSWVRQPPGK GLEWIGAIWTGGSIAYNPSLKSRTISRDTSKNQVSLKLSSVT AADTAVYYCARDLSDYYSSYTSFDYWGQGTLVTVSS
435	PI-3025-AB2 CDR-H1	GFSLSYHVS
436	PI-3025-AB2 CDR-H2	AIWTGGSIA
437	PI-3025-AB2 CDR-H3	DLSDYYSSYTSFDY

10

20

30

40

50

438	PI-3025-AB2 重鎖	EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTSYHVSWVRQPPGK GLEWIGAIWTGGSIAYNPSLKSRTISRDTSKNQVSLKLSSVT AADTAVYYCARDLSDYSSYTSFDYWGQGTLLTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
439	PI-3025-AB2 輕鎖 可變	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASEGISNDLAWYQQKPGKA PKLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYY CQQSYKYPLTFGQGGTKLEIK
440	PI-3025-AB2 CDR-L1	RASEGISNDLA
441	PI-3025-AB2 CDR-L2	AASRLQD
442	PI-3025-AB2 CDR-L3	QCSYKYPLT
443	PI-3025-AB 輕鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASEGISNDLAWYQQKPGKA PKLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYY CQQSYKYPLTFGQGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
444	PI-3048-AB 重鎖 可變	EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTSYHVSWVRQPPGK GLEWIGAIWTGGSIAYNPSLKSRTISRDTSKNQVSLKLSSVT AADTAVYYCARDLSDYSSYTSFDYWGQGTLLTVSS
445	PI-3048-AB CDR- H1	GFSLTSYHVS
446	PI-3048-AB CDR- H2	AIWTGGSIA
447	PI-3048-AB CDR- H3	DLSDYSSYTSFDY

10

20

30

40

50

448	PI-3048-AB 重鎖	EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTSYHVSWVRQPPGK GLEWIGAIWTGGSIAYNPSLKSRTISRDTSKNQVSLKLSSVT AADTAVYYCARDLSDYYSSYTSFDYWGQGTLLTVSSASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTCTYTCNVDPKPSN TKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK
449	PI-3048-AB 輕鎖 可變	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEGISNDLAWYQQKPGKA PKLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYY CQQSYKYPLTFGQGGTKLEIK
450	PI-3048-AB CDR- L1	RASEGISNDLA
451	PI-3048-AB CDR- L2	AASRLQD
452	PI-3048-AB CDR- L3	CQQSYKYPLT
453	PI-3048-AB 輕鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEGISNDLAWYQQKPGKA PKLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYY CQQSYKYPLTFGQGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC
454	PI-3041-AB 重鎖 可變	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDYAVNWVRQAP GQGLEWMGWINTQTGKPTYAQKFQGRFTFTLDTSTSTSYLEI SSLRSEDTAVYYCTRDSYYYSSSLDYWGQGTLLTVSS
455	PI-3041-AB CDR- H1	GYTFTDYAVN
456	PI-3041-AB CDR- H2	WINTQTGKPT
457	PI-3041-AB CDR- H3	DSYYYSSSLDY

10

20

30

40

50

458	PI-3041-AB 重鎖	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDYAVNWVRQAP GQGLEWMGWINTQTGKPTYAQKFQGRFTFTLDTSTSTSYLEI SSLRSEDТАVYYCTRDSYYYSSSLDYWGQGTЛTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN TKVDDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
459	PI-3041-AB 輕鎖 可變	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASAGISNDLAWYQQKPGK APKLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSMQPEDFATY YCQQSYKYPWTFGQGТKLEIK
460	PI-3041-AB CDR- L1	RASAGISNDLA
461	PI-3041-AB CDR- L2	AASRLQD
462	PI-3041-AB CDR- L3	QCSYKYPWT
463	PI-3041-AB 輕鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASAGISNDLAWYQQKPGK APKLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSMQPEDFATY YCQQSYKYPWTFGQGТKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTLTЛSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C
464	PI-3047-AB 重鎖 可變	EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDYAVNWVRQAP GQGLEWMGWINTQTGKPTYAQKFQGRFTFTLDTSTSTSYLEI SSLRSEDТАVYYCTRDSYYYSSSLDYWGQGTЛTVSS
465	PI-3047-AB CDR- H1	GYTFTDYAVN
466	PI-3047-AB CDR- H2	WINTQTGKPT
467	PI-3047-AB CDR- H3	DSYYYSSSLDY

10

20

30

40

50

468	PI-3047-AB 重鎖	EVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTFTDYAVNWVRQAP GQGLEWMGWINTQTGKPTYAQKFQGRFTFTLDTSTSTSYLEI SSLRSED TAVYYCTRDSYYYSSSLDYWGQGT LVT VSSASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLG TKTYTCNV DHKPSN TKVDKR VESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLGK
469	PI-3047-AB 輕鎖 可變	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASAGISNDLAWYQQKPGK APKLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSMQPEDFATY YCQQSYKYPWTFGQGTKLEIK
470	PI-3047-AB CDR- L1	RASAGISNDLA
471	PI-3047-AB CDR- L2	AASRLQD
472	PI-3047-AB CDR- L3	QQSYKYPWT
473	PI-3047-AB 輕鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASAGISNDLAWYQQKPGK APKLLIYAASRLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSMQPEDFATY YCQQSYKYPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C
474	PI-3046-AB 重鎖 可變	EVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGFSLTSYHVS WVRQPPGK GLEWMGAIWTGGSIAYNPSLKSRLTISRDT SKNQVSLKMSSLT AADTAVYYCARDLSDYSSYTSFDYWGQGT LVT VSS
475	PI-3046-AB CDR- H1	GFSLT SYHVS
476	PI-3046-AB CDR- H2	AIWTGGSIA
477	PI-3046-AB CDR- H3	DLSDYSSYTSFDY

10

20

30

40

50

478	PI-3046-AB 重鎖	EVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGFSLTSYHVSWVRQPPGK GLEWMGAIWTGGSIAYNPSLKSRLTISRDTSKNQVSLKMSSLT AADTAVYYCARDLSDYYSSYTSFDYWGQGTLLTVSSASTKG PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTCTYTCNVDPHKPSN TKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK
479	PI-3046-AB 輕鎖 可變	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEGISNDLAWYQQKPGKA PKLLIYAASRLQSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYY CQQSYKYPLTFGQGTKLEIK
480	PI-3046-AB CDR- L1	RASEGISNDLA
481	PI-3046-AB CDR- L2	AASRLQD
482	PI-3046-AB CDR- L3	QCSYKYPLT
483	PI-3046-AB 輕鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEGISNDLAWYQQKPGKA PKLLIYAASRLQSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSMQPEDFATYY CQQSYKYPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

10

20

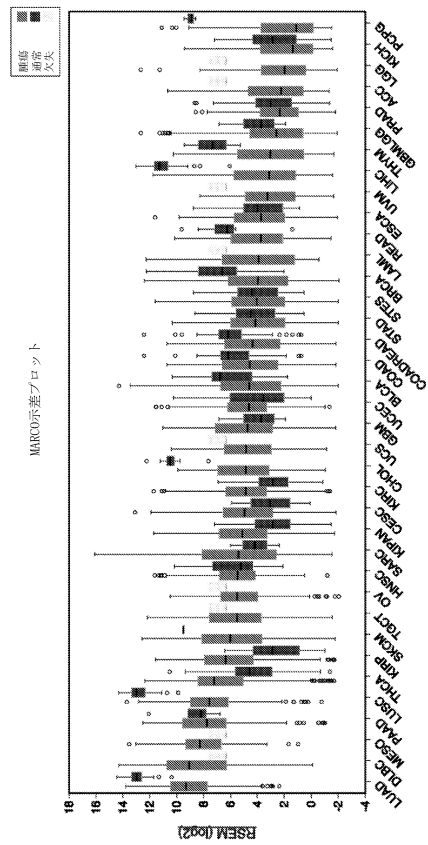
30

40

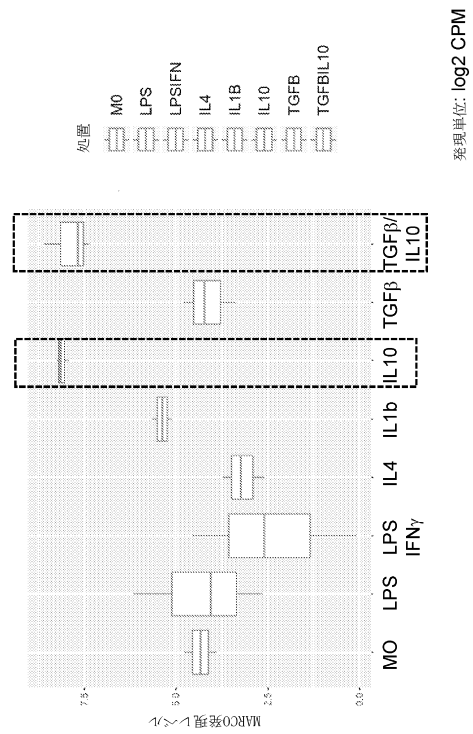
50

【凶面】

【図 1】



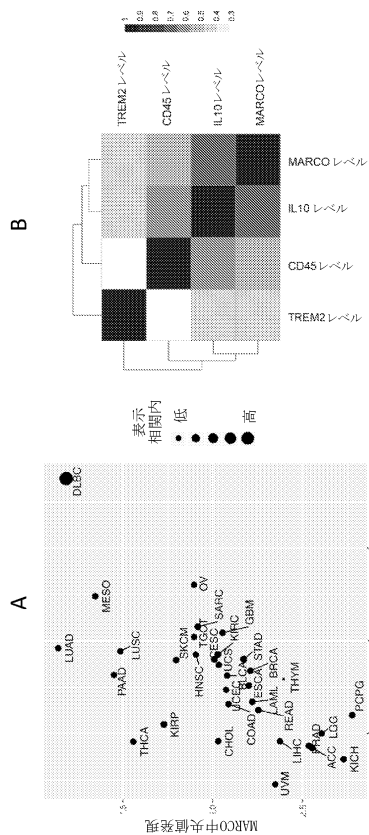
【図 2】



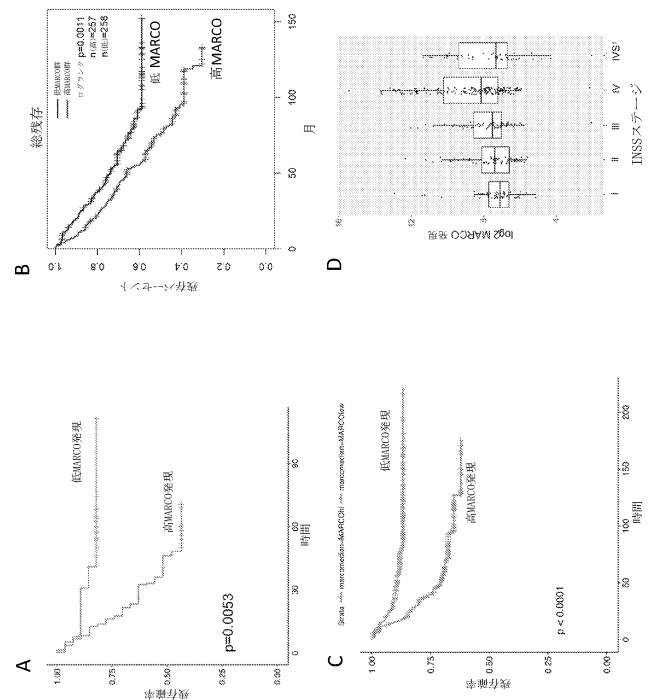
10

20

【圖 3】



【圖 4】

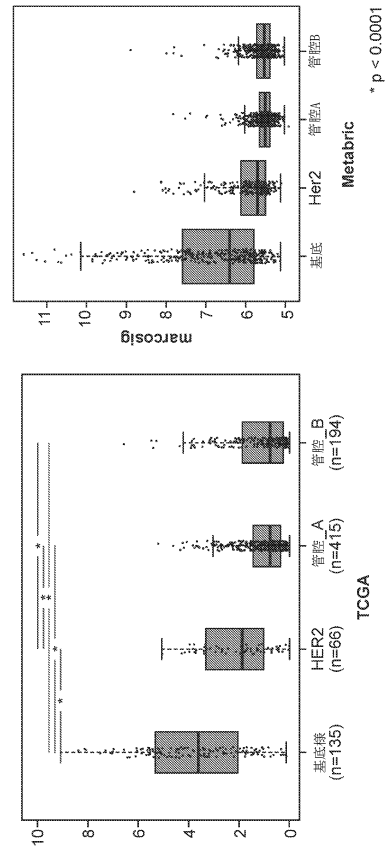


30

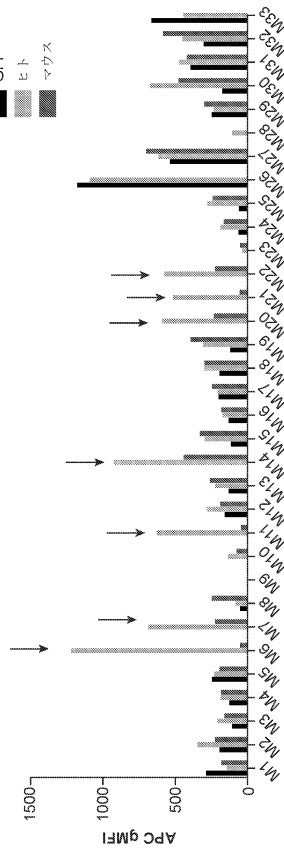
40

50

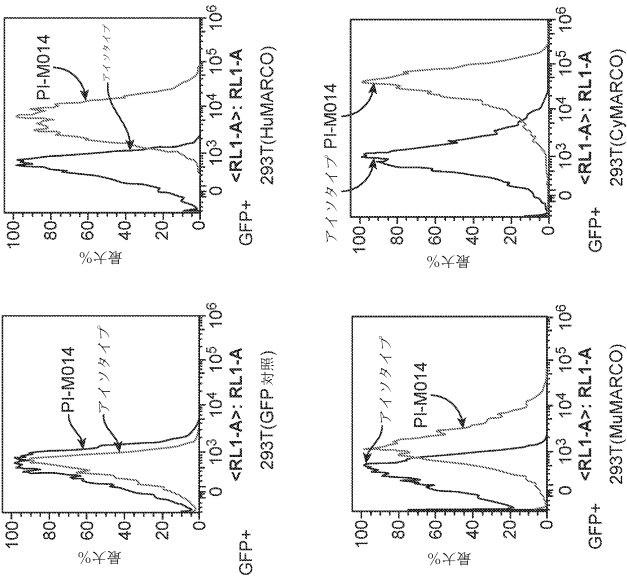
【図 5】



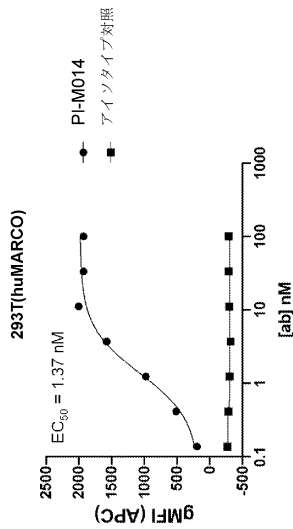
【図 6 A】



【図 6 B】



【図 6 C】



10

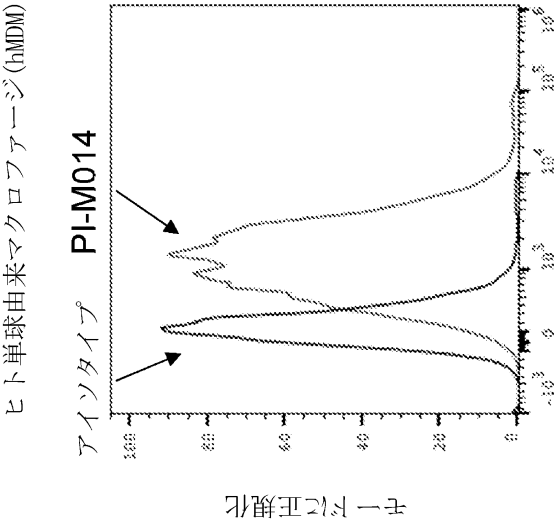
20

30

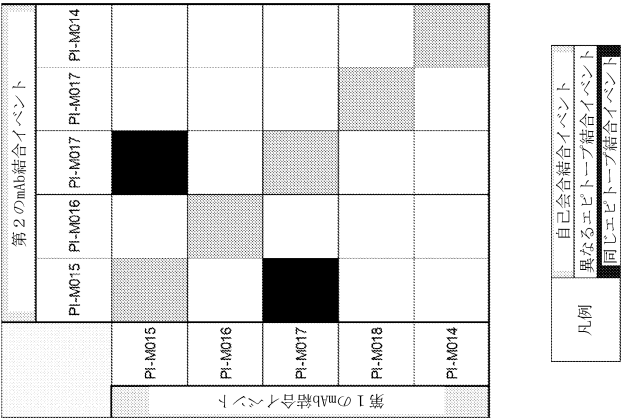
40

50

【図 6 D】

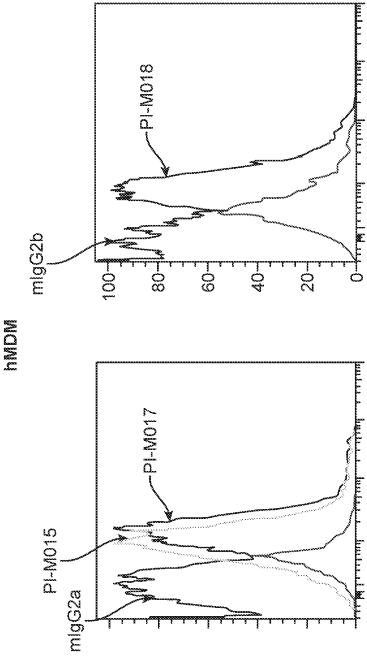


【図 7】

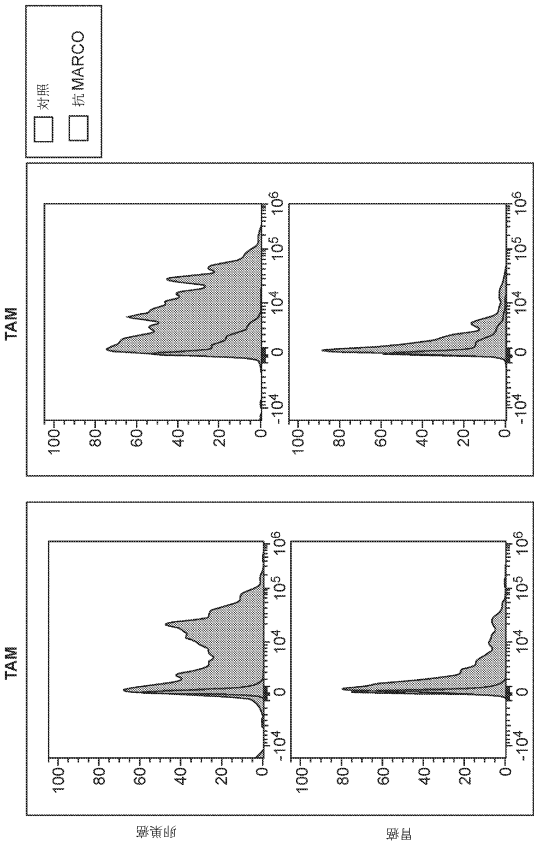


10

【図 8 A】



【図 8 B】



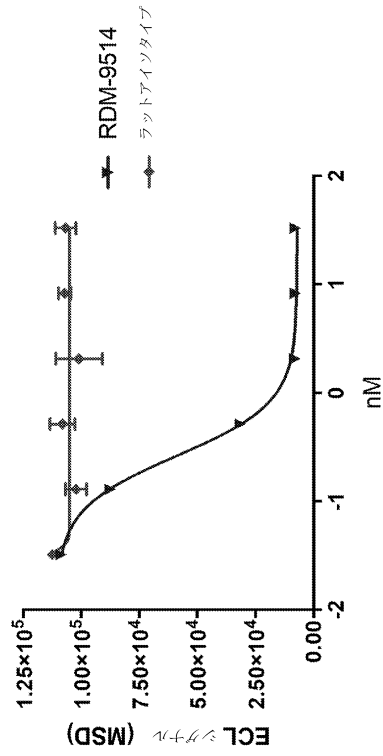
20

30

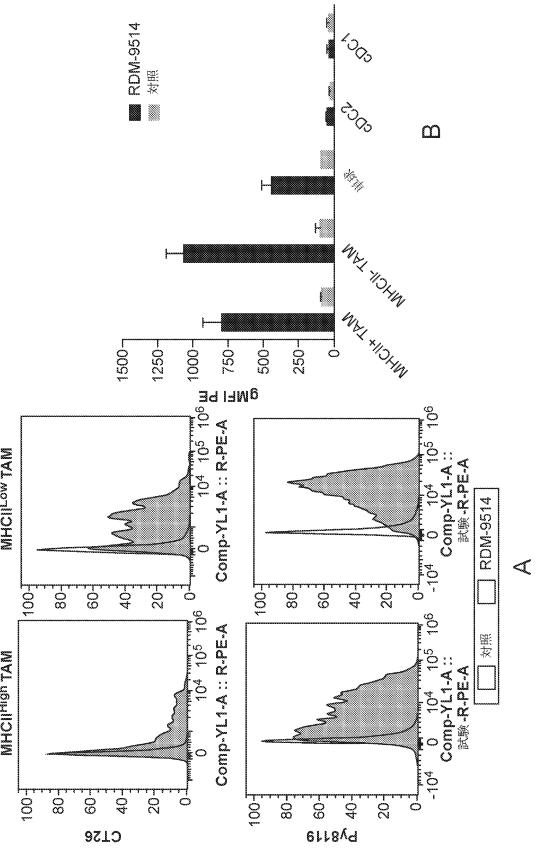
40

50

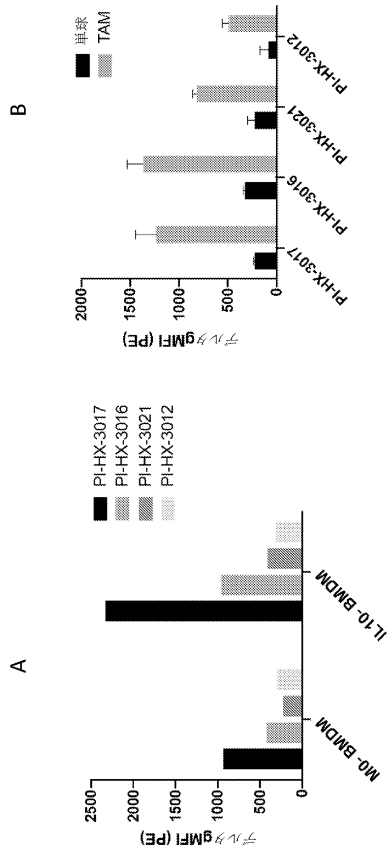
【図 9】



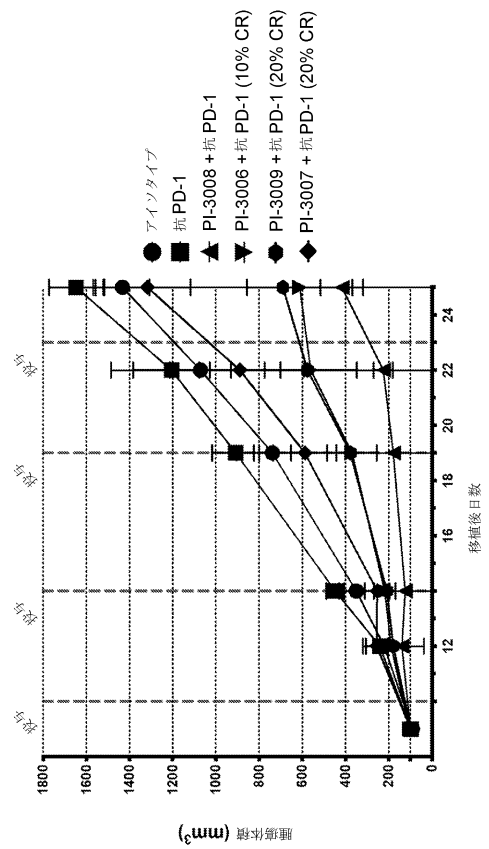
【図 10】



【図 11】



【図 12】



10

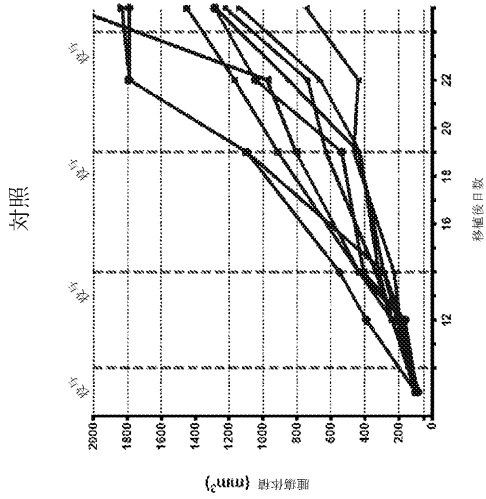
20

30

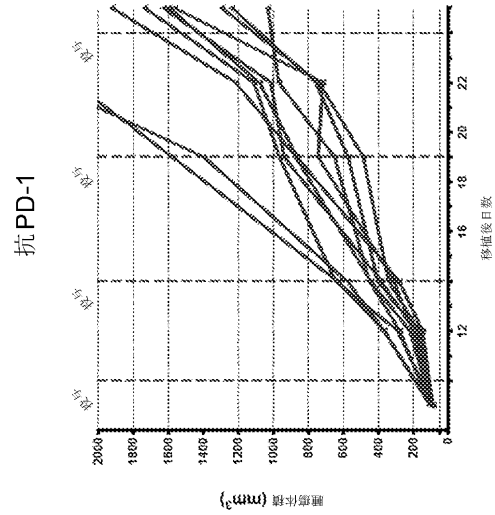
40

50

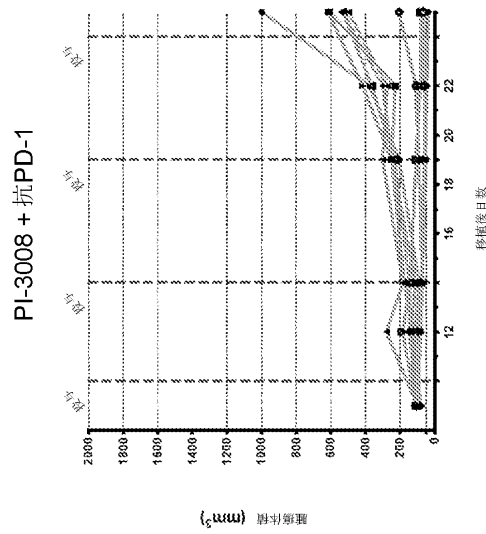
【図 1 3 A】



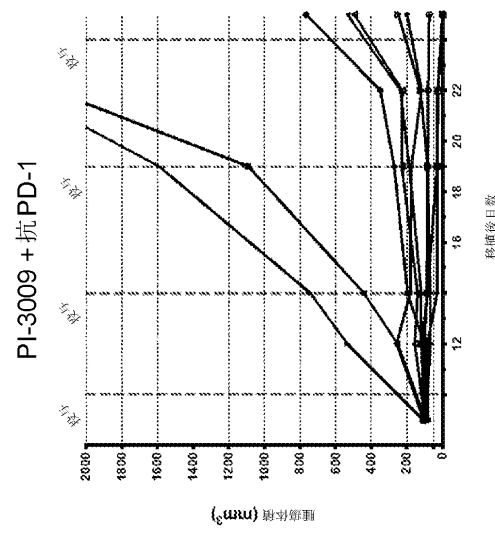
【図 1 3 B】



【図 1 3 C】



【図 1 3 D】



10

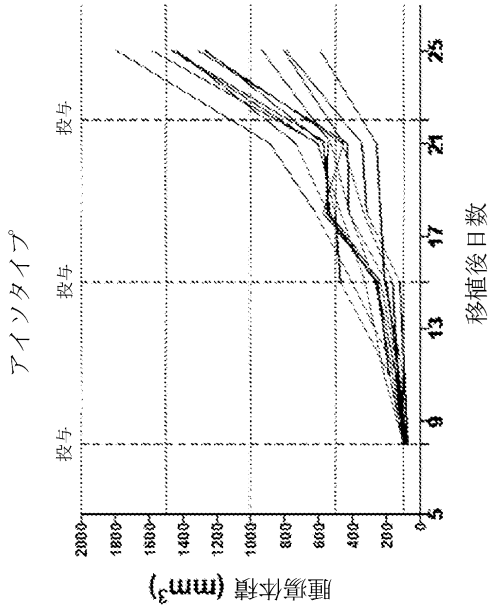
20

30

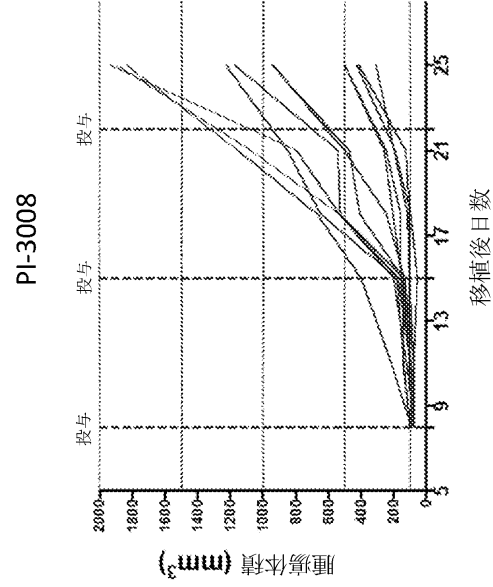
40

50

【図 1 3 E】



【図 1 3 F】



10

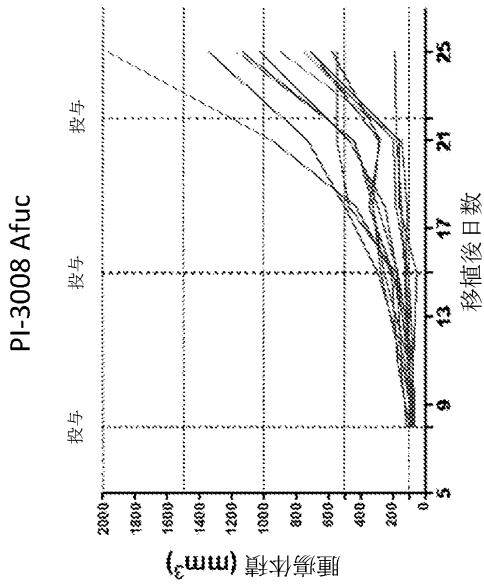
20

30

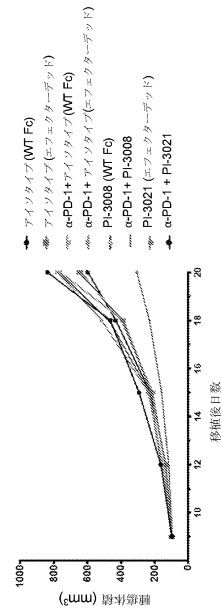
40

50

【図 1 3 G】

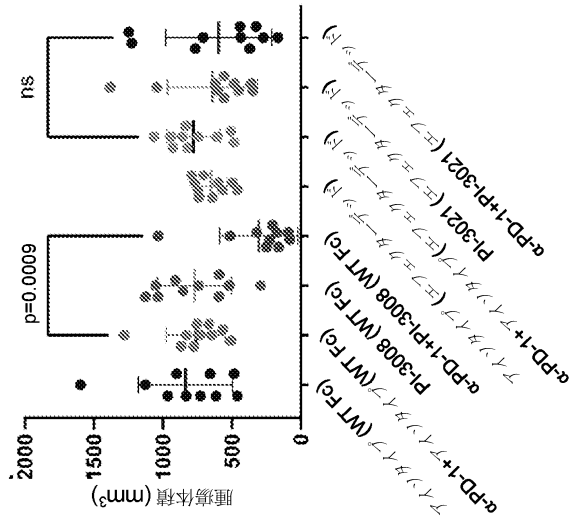


【図 1 3 H】

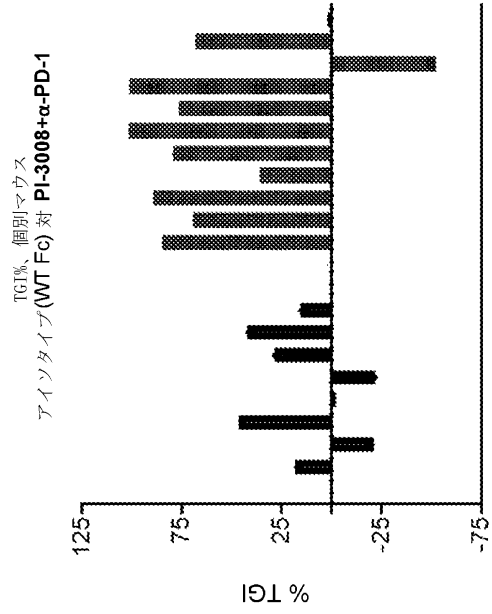


研究終了 - 22日目

【図 13 I】



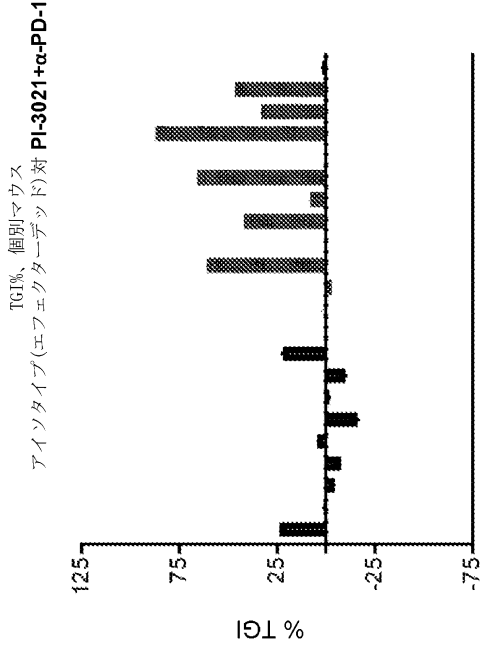
【図 13 J】



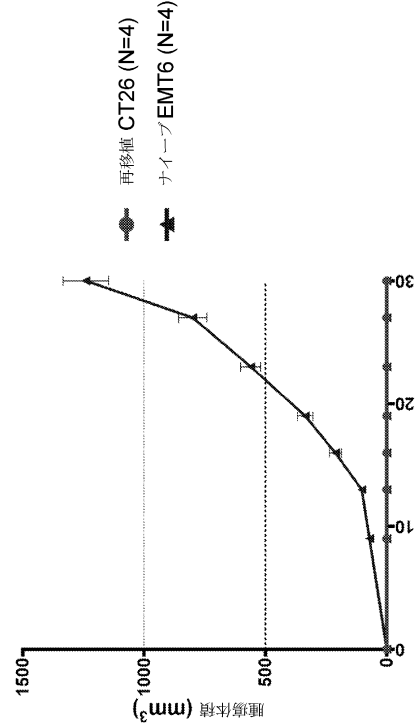
10

20

【図 13 K】



【図 14】

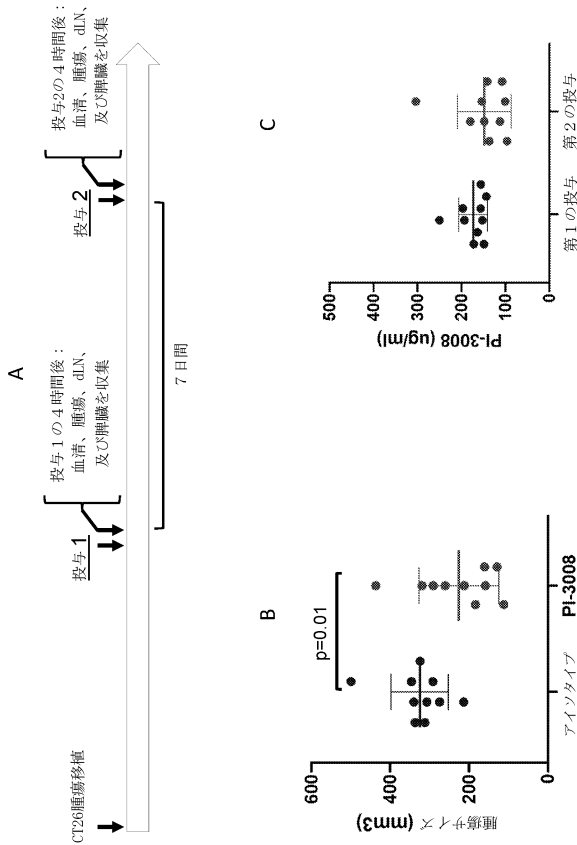


30

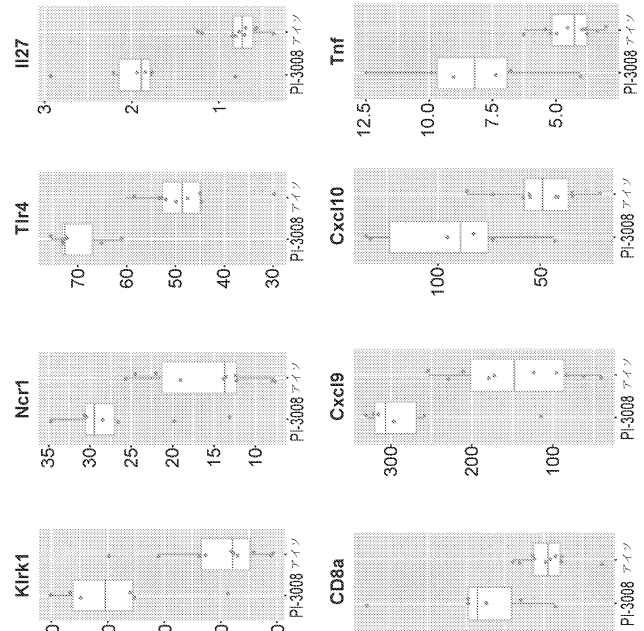
40

50

【図 15】



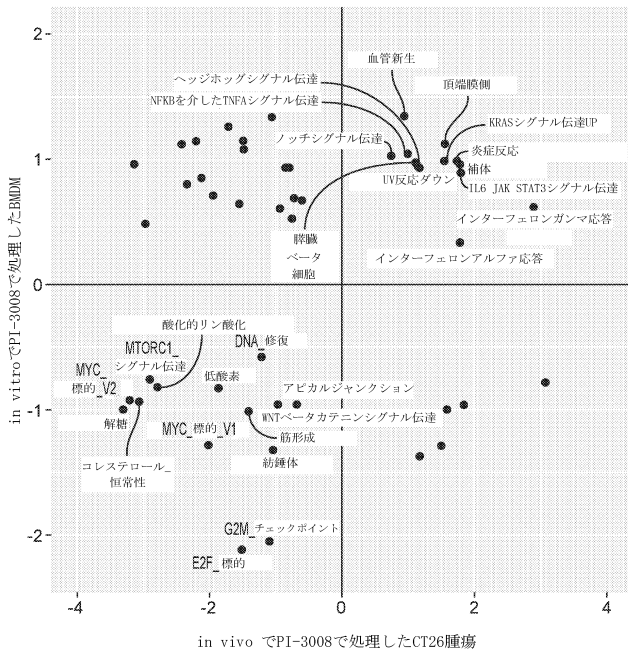
【図 16 A】



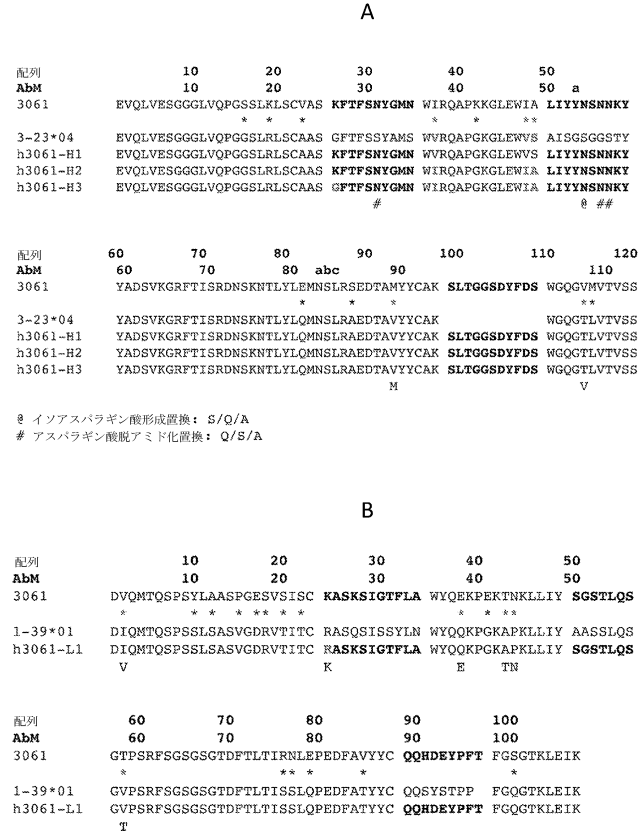
10

20

【図 16 B】



【図 17】

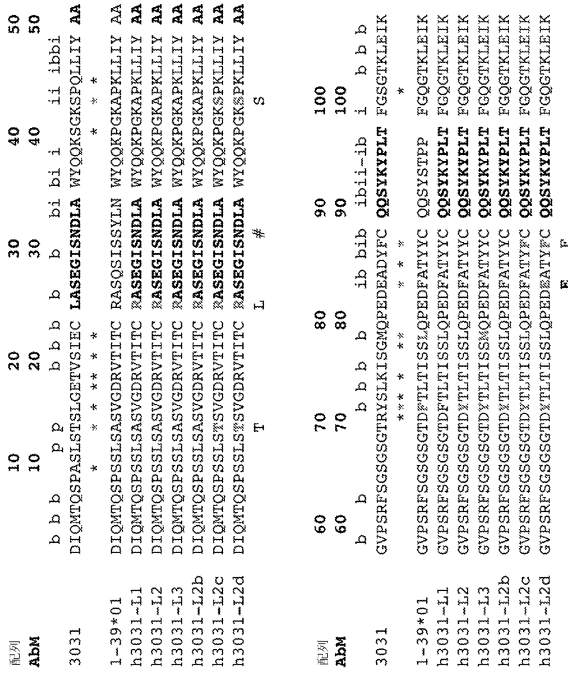


30

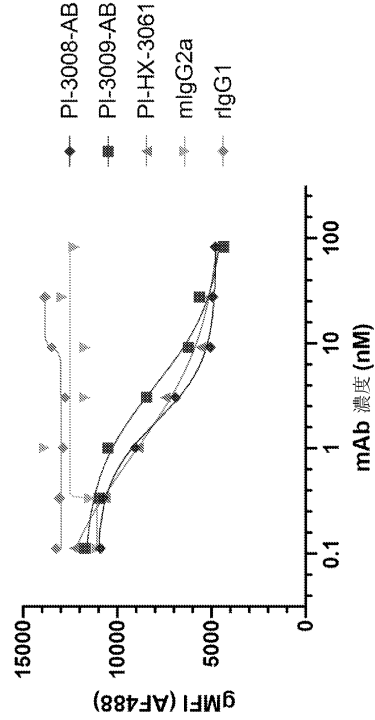
40

50

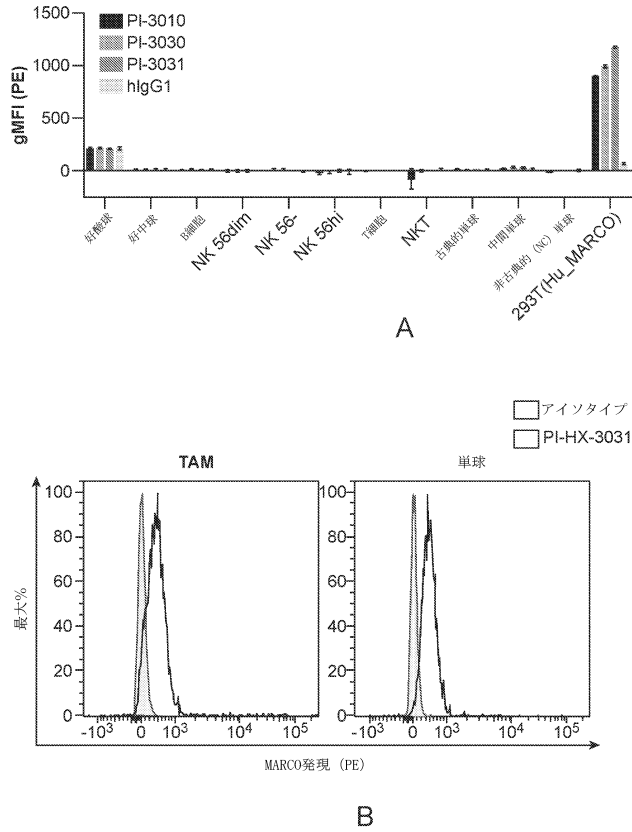
【図 18】



【図 19】



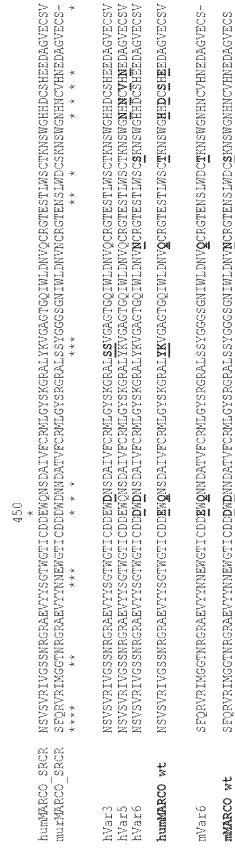
【図 20】



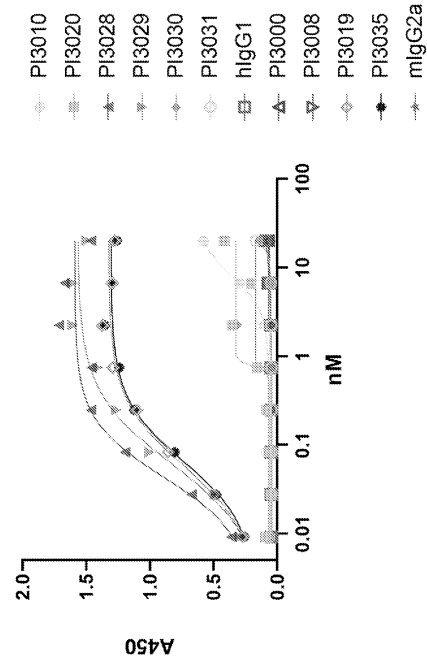
【図 21】



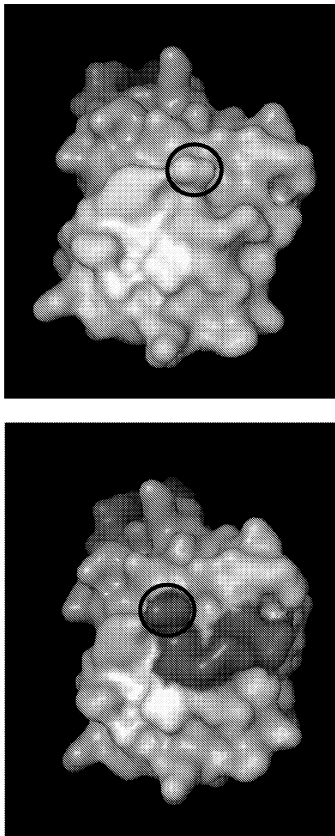
【図 2 2】



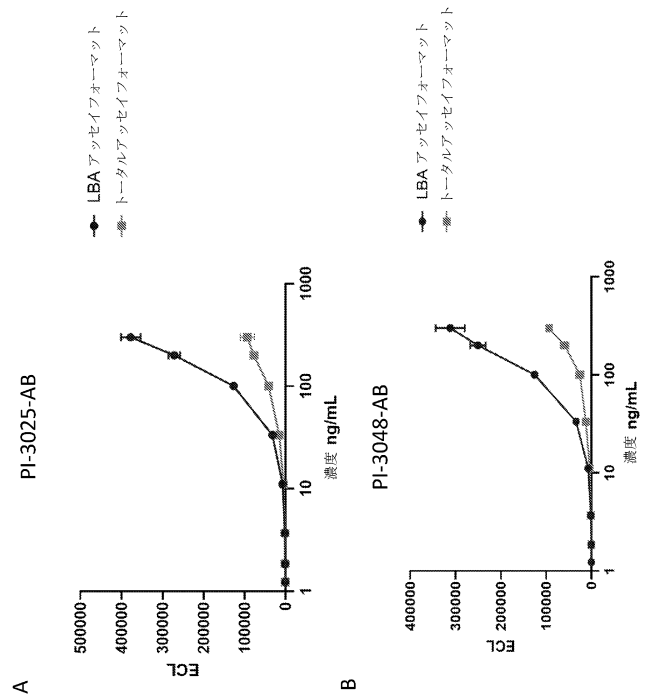
【図 2 3】



【図 2 4】



【図 2 5】



10

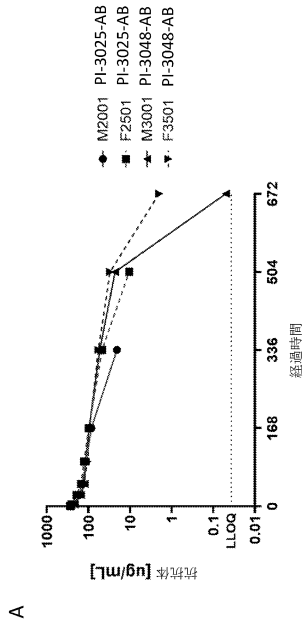
20

30

40

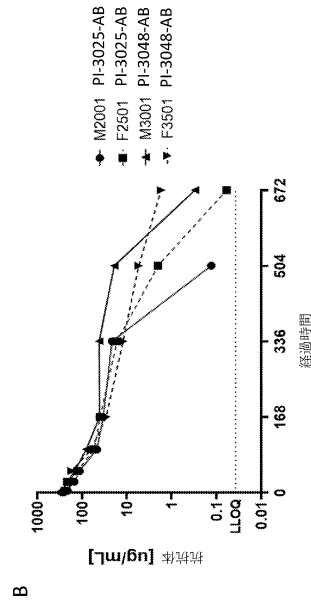
50

【図 2 6】

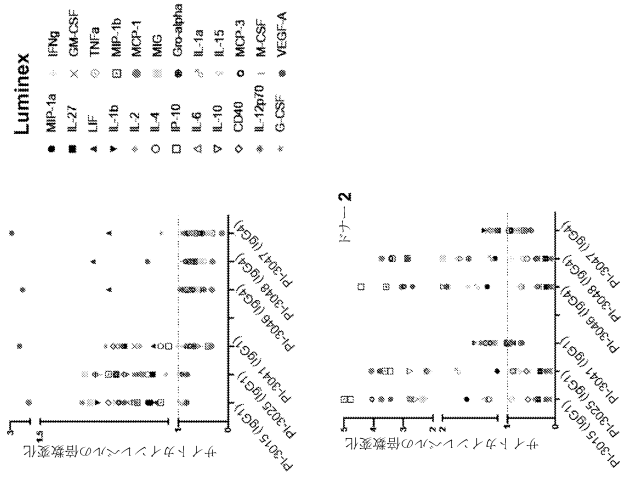


A

【図 27】



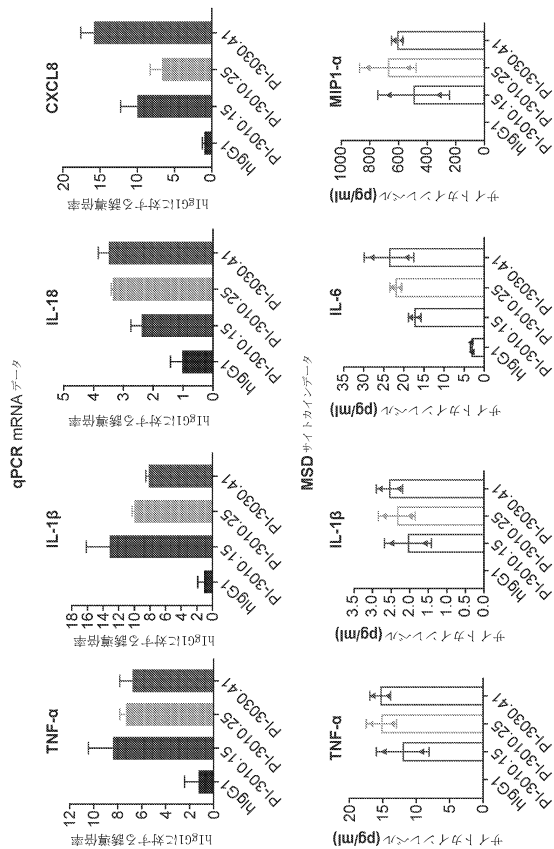
【圖 27】



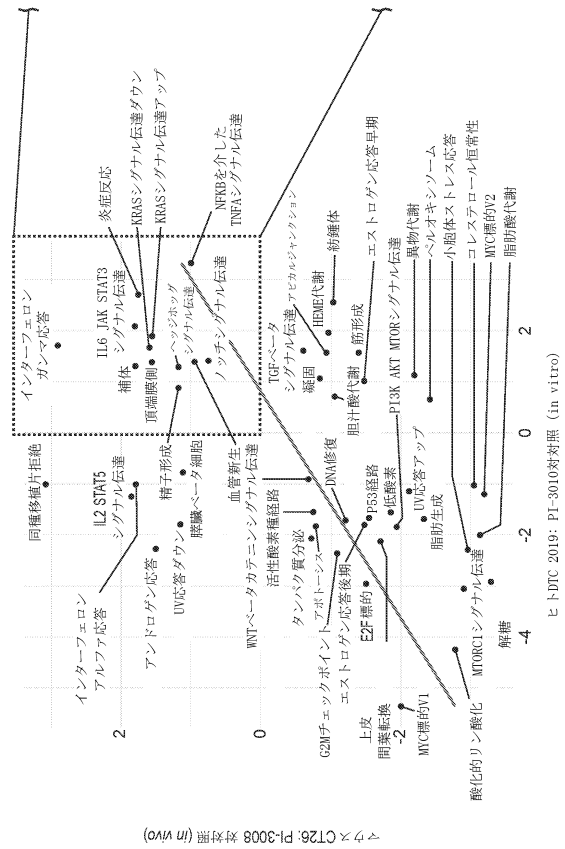
1

ドナ-2

【図 28】

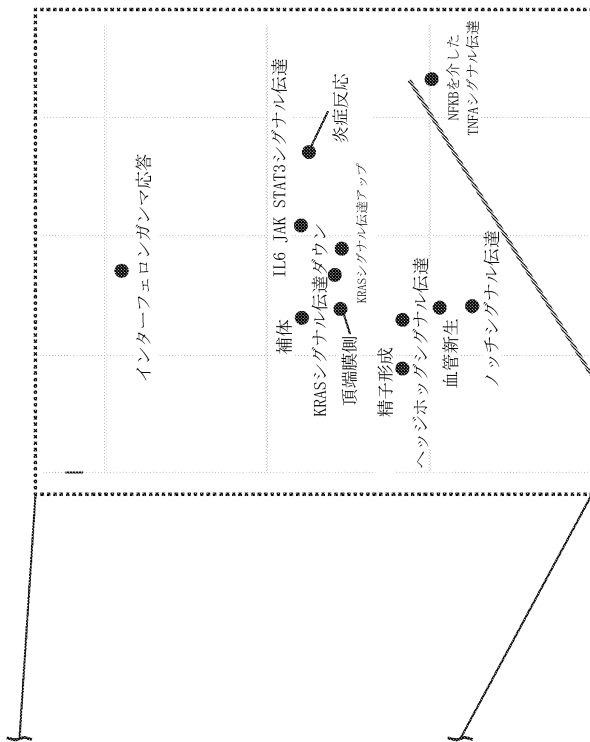


【圖 29-1】



【図 29-2】

ヒトDTC 2019: PI-3008対照 (in vivo)



【図 30】

ヒトDTC 2019: PI-3010対照 (in vitro)

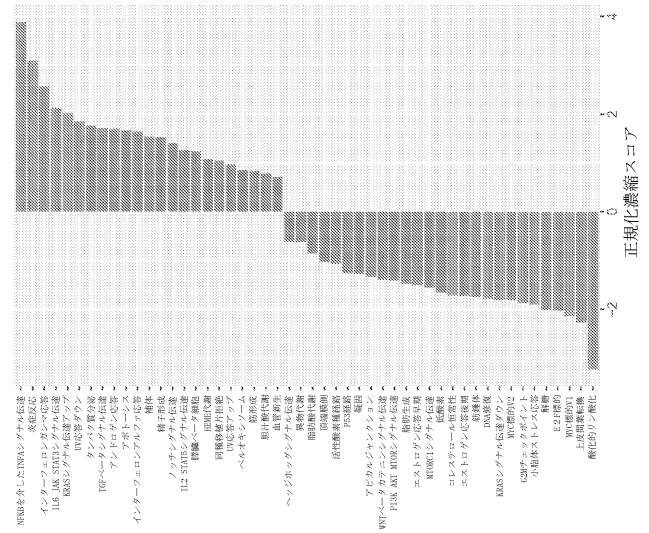
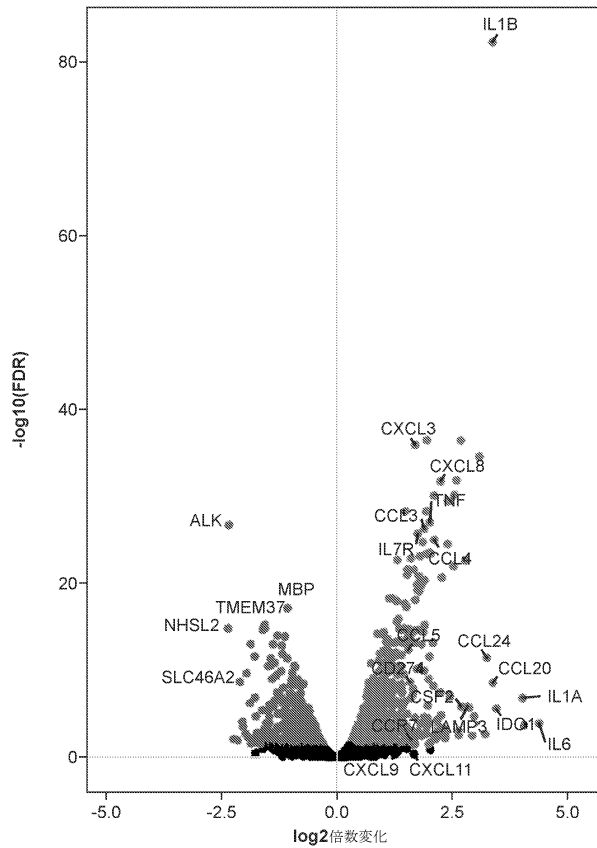
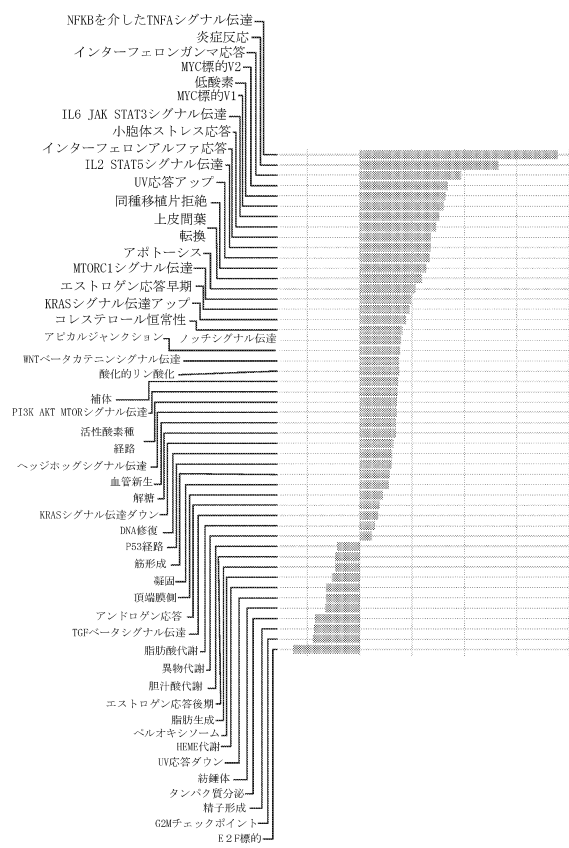


図29

【図 31-1】



【図 31-2】



10

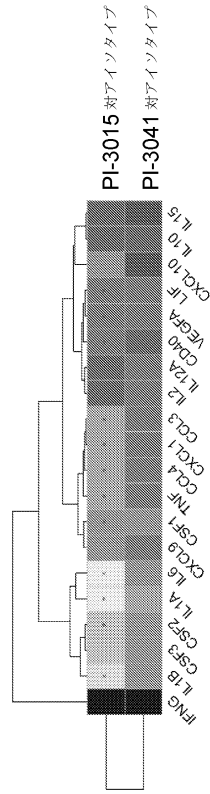
20

30

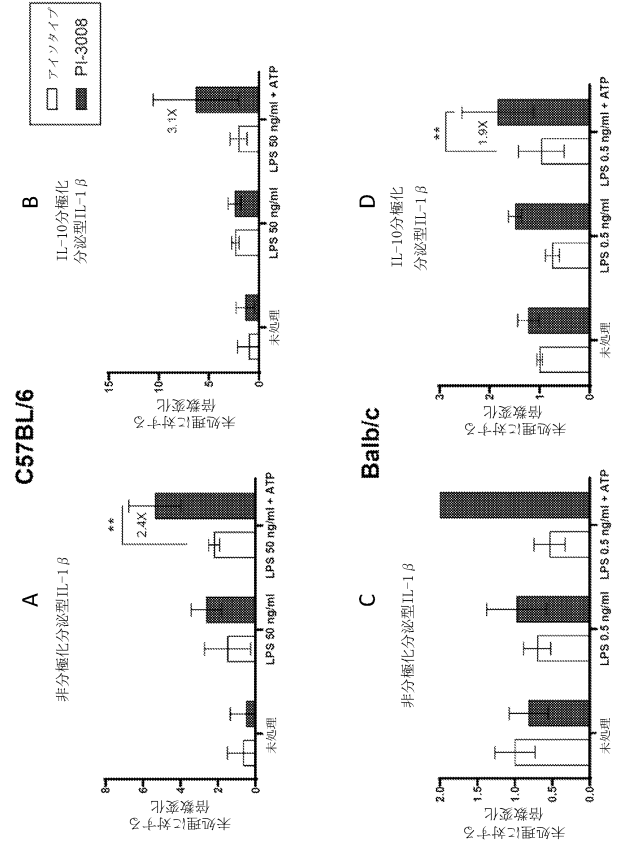
40

50

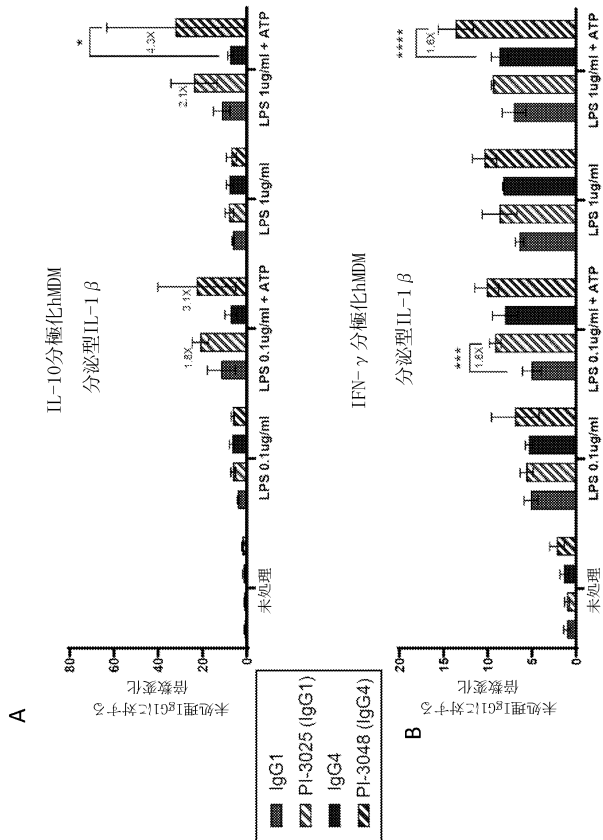
【図 3 2】



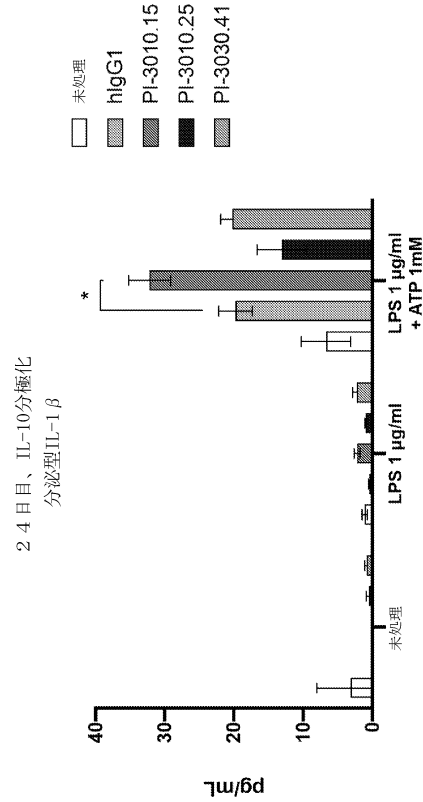
【図 3 3】



【図 3 4】



【図 3 5】



10

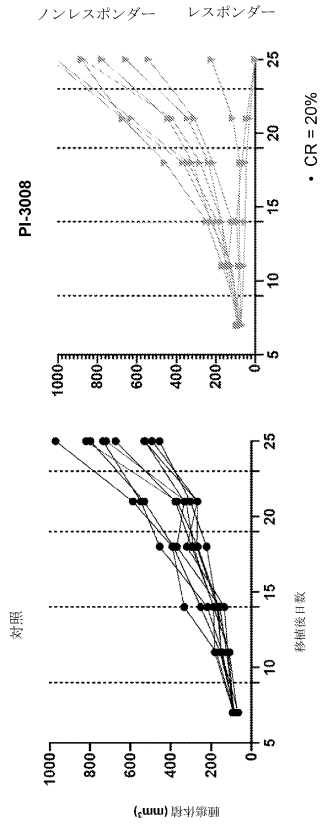
20

30

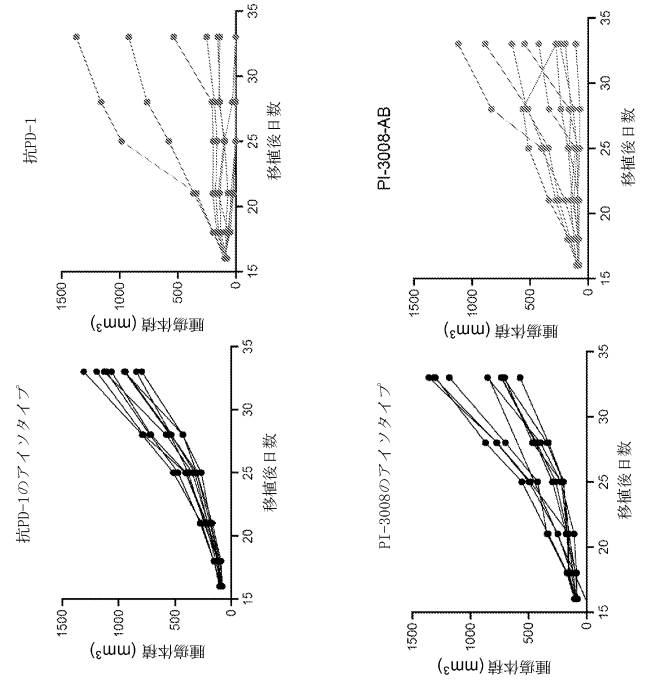
40

50

【図 3 6】



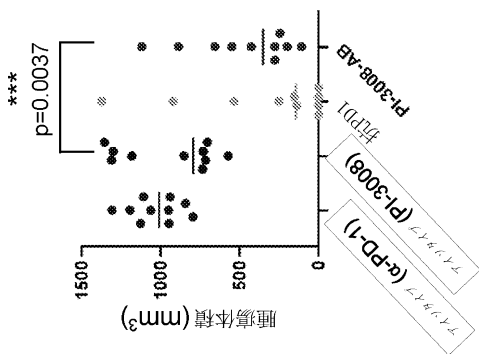
【図 3 7】



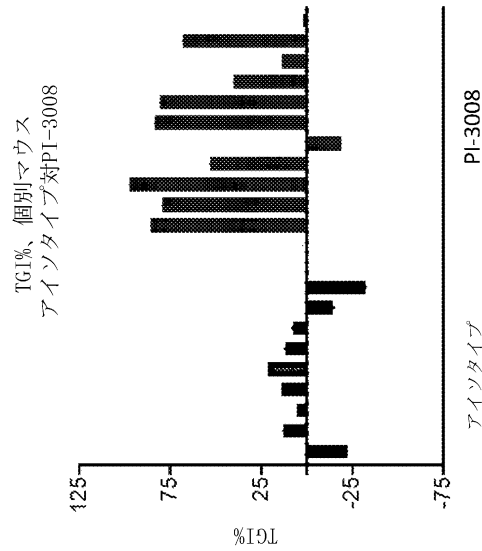
10

20

【図 3 8 A】



【図 3 8 B】



30

40

50

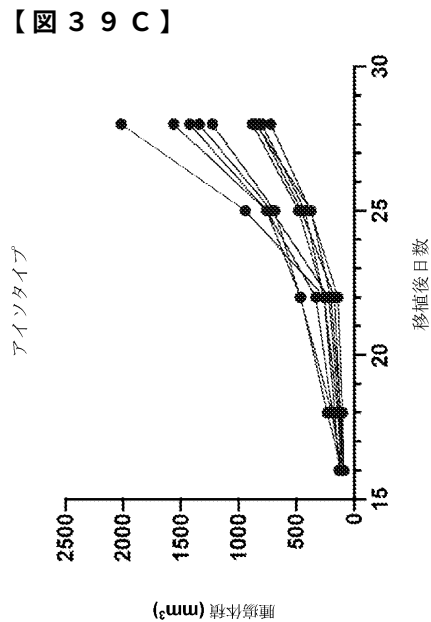
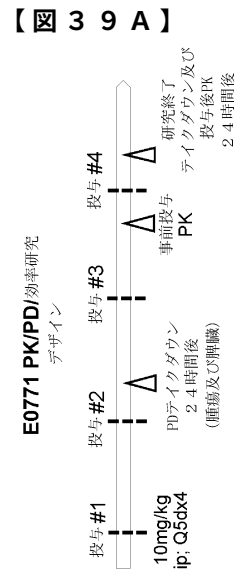
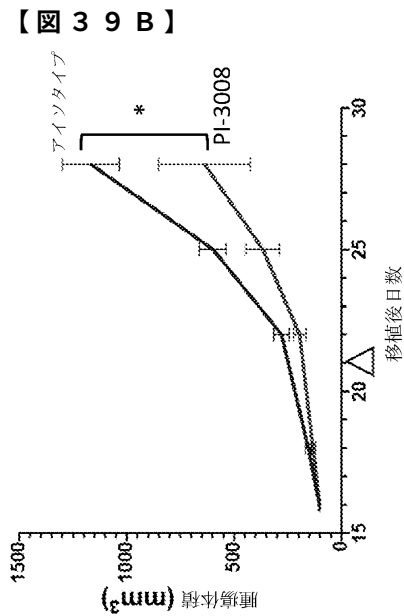
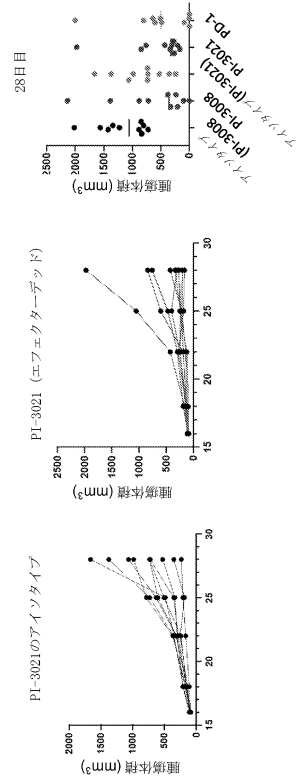
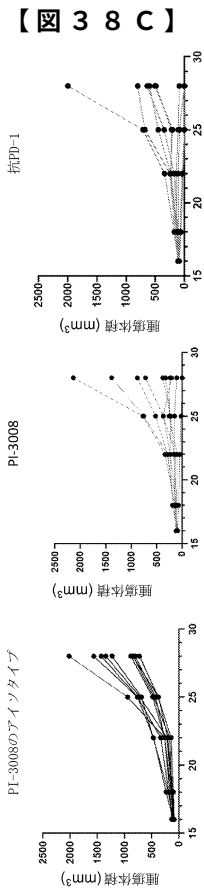
10

20

30

40

50



45

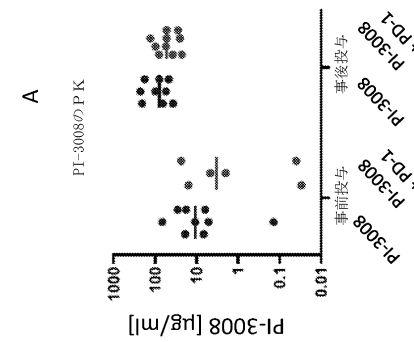
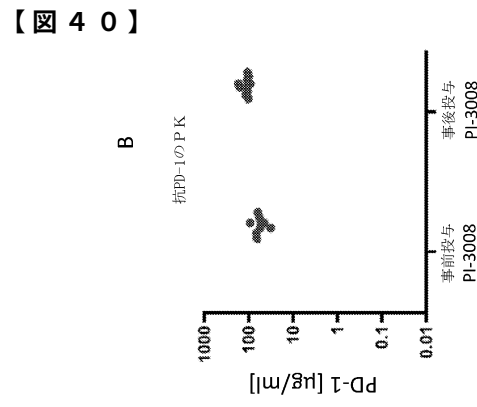
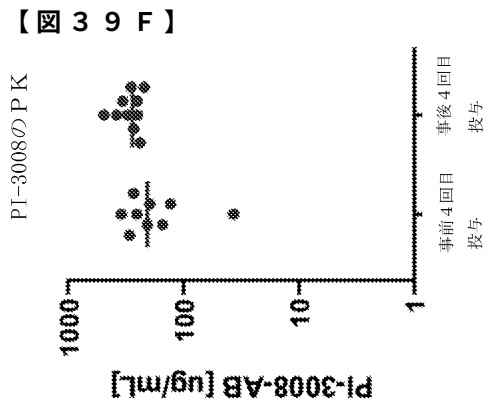
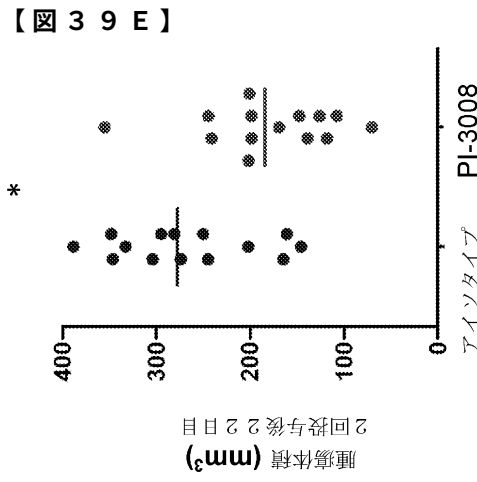
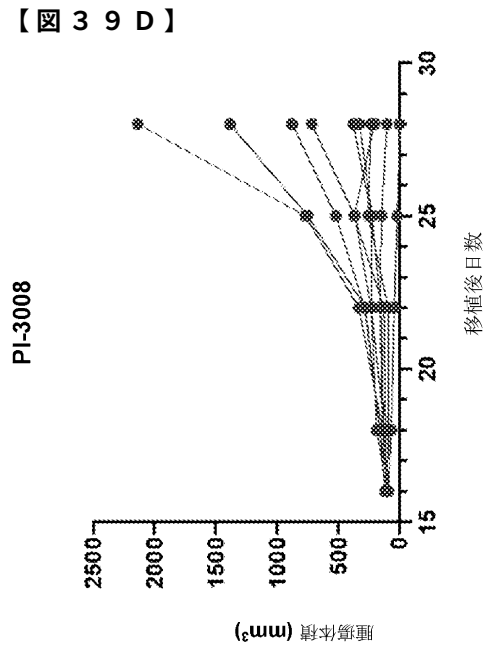
10

20

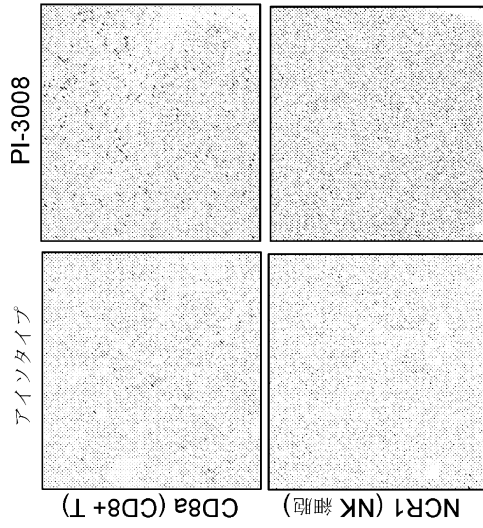
30

40

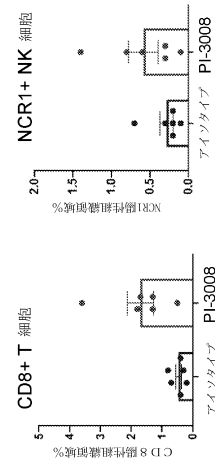
50



【図 4 1 A】

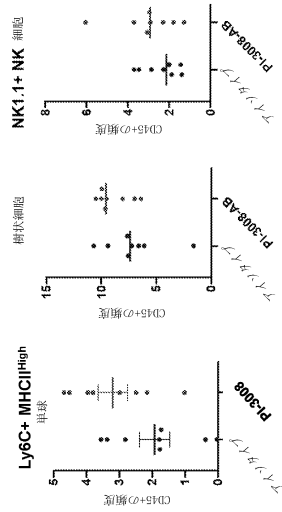


【図 4 1 B】

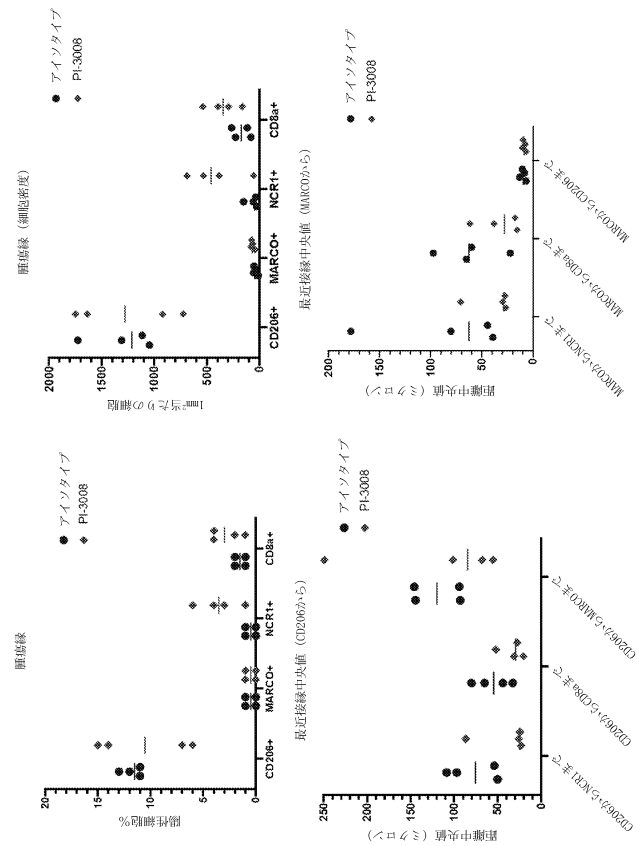


10

【図 4 1 C】



【図 4 1 D】



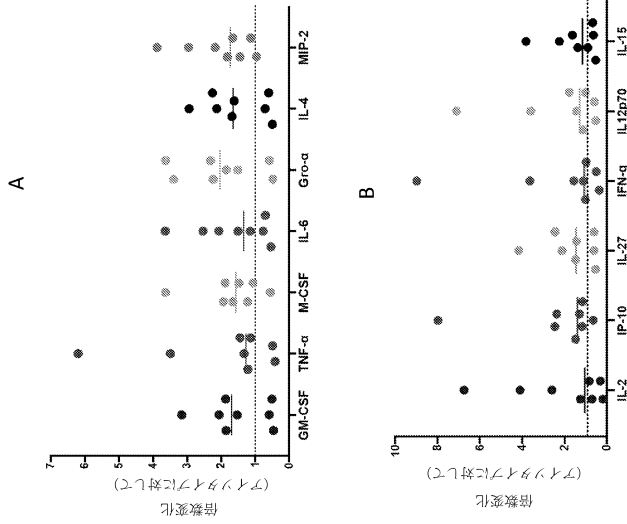
20

30

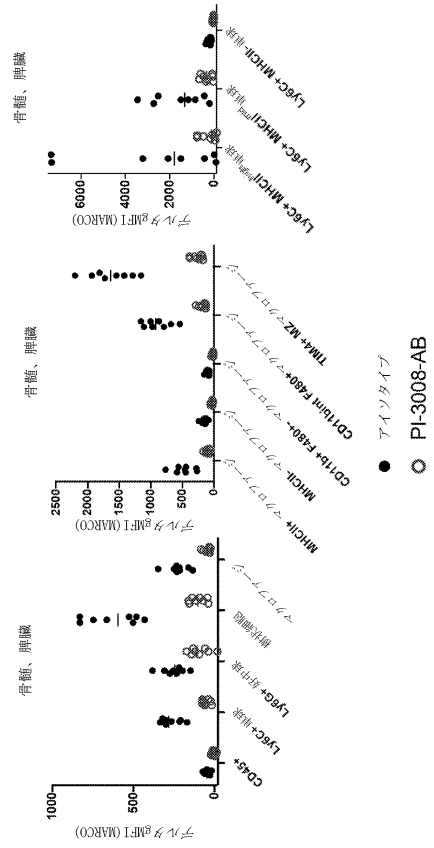
40

50

【図 4 2】



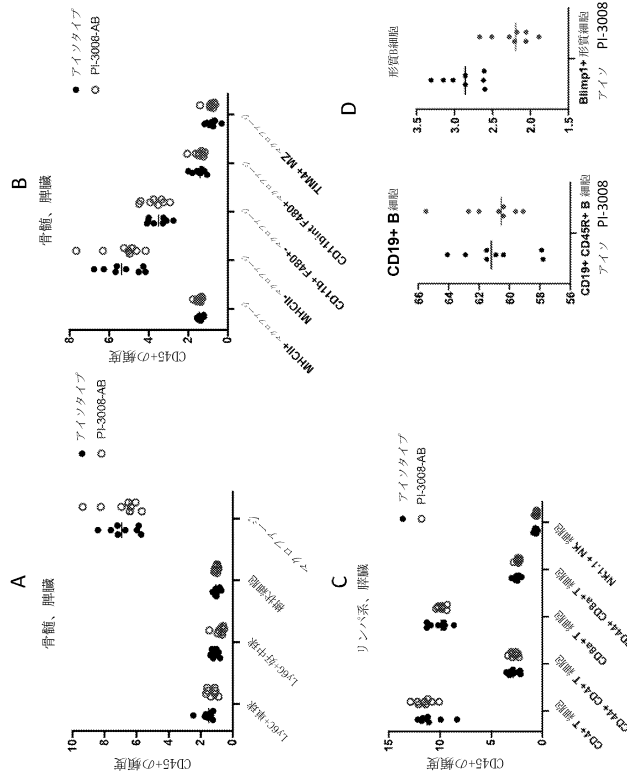
【図 4 3】



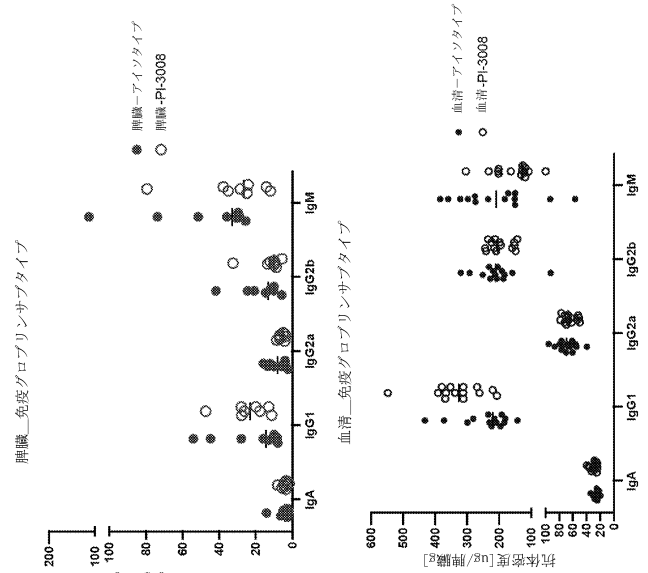
10

20

【図 4 4】



【図 4 5】

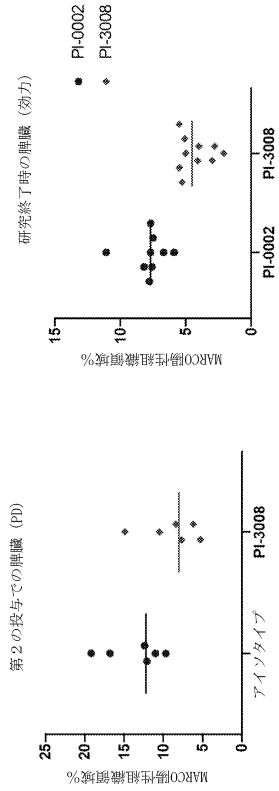


30

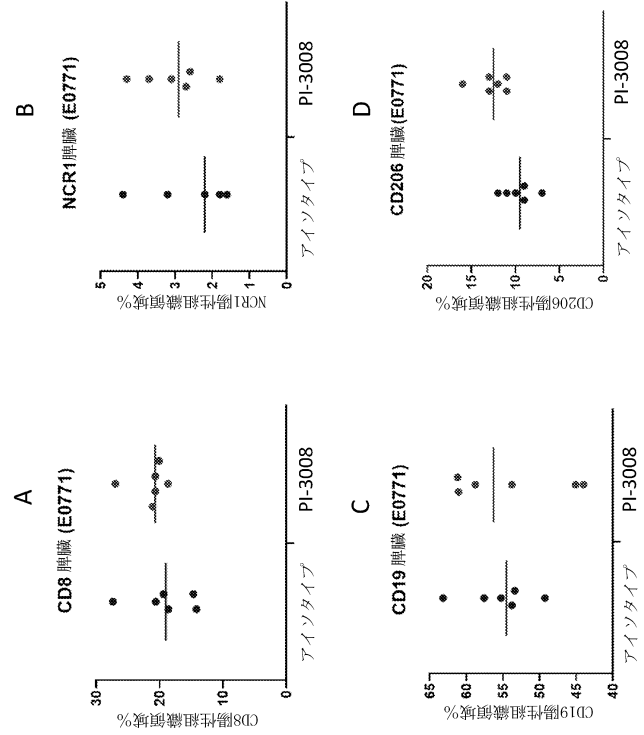
40

50

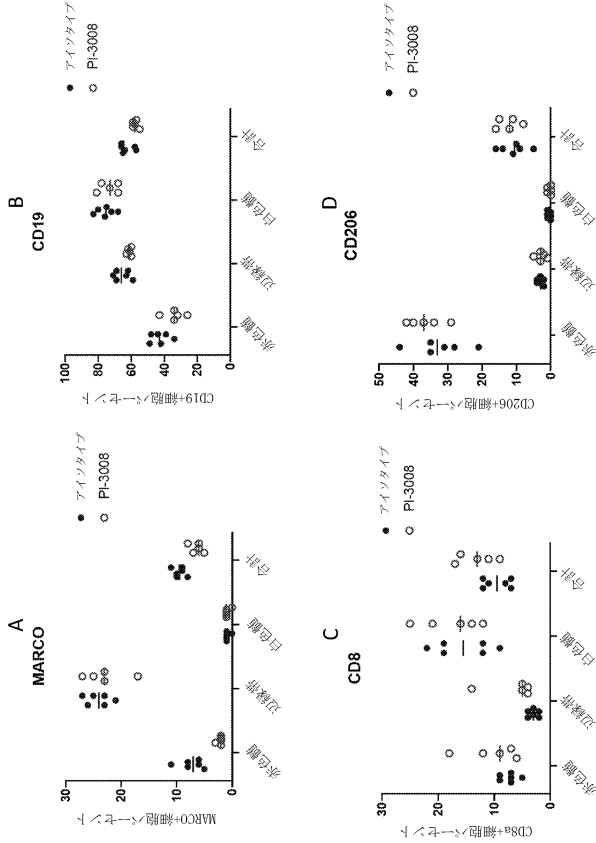
【図 4 6】



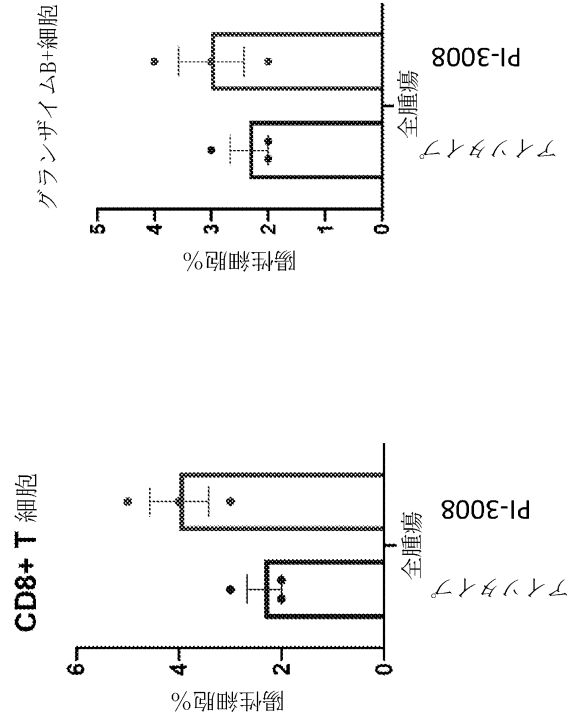
【図 4 7】



【図 4 8】



【図 4 9】



10

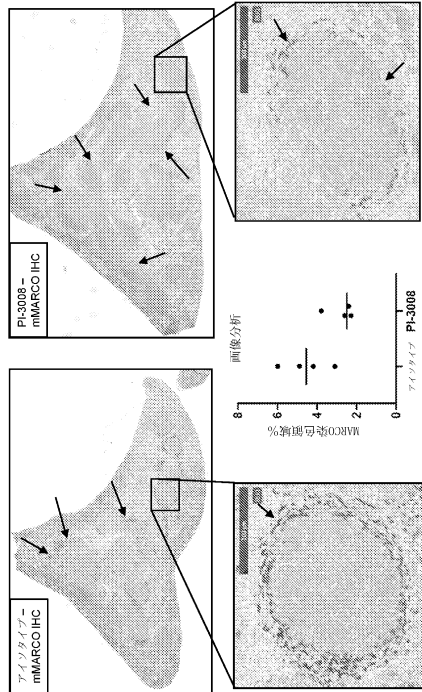
20

30

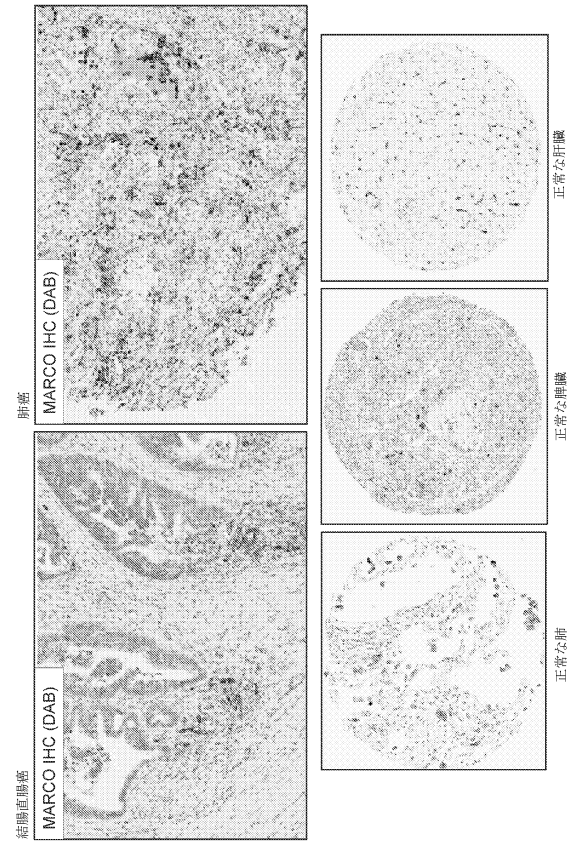
40

50

【図 5 0】



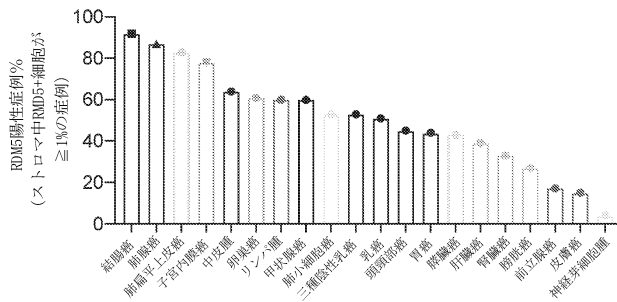
【図 5 1 A】



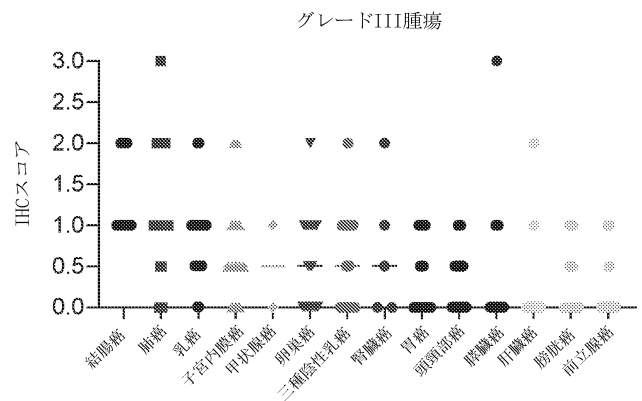
10

20

【図 5 1 B】



【図 5 1 C】

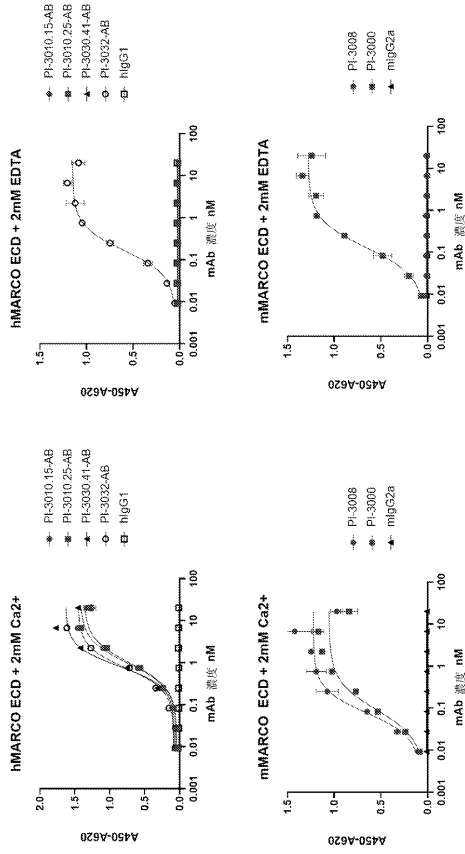


30

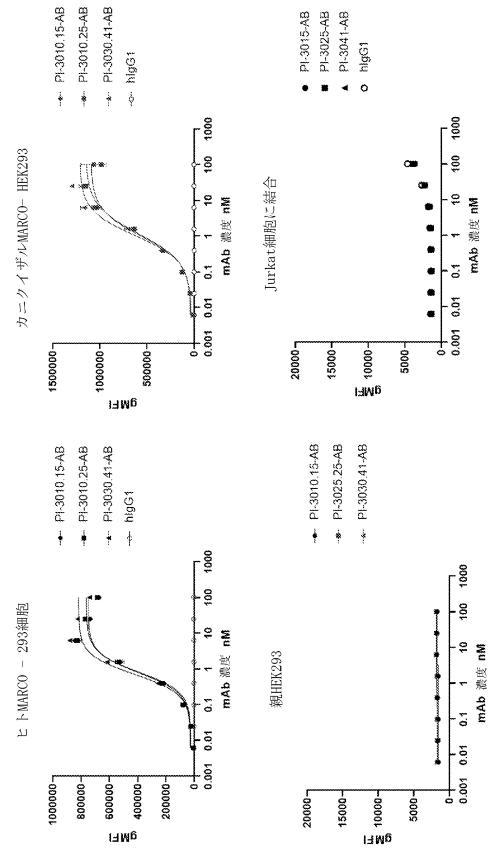
40

50

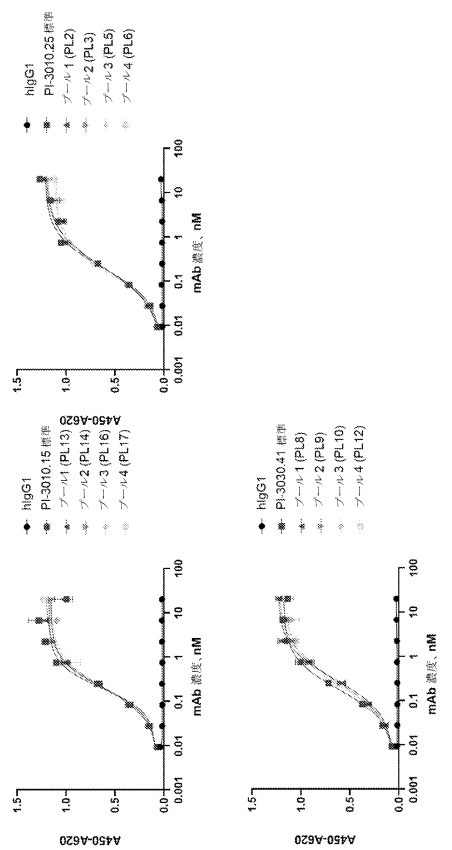
【圖 5 2】



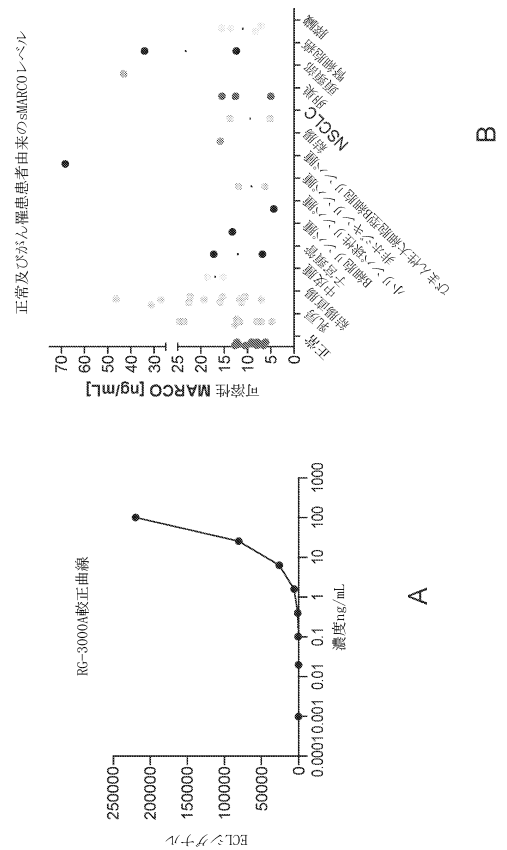
【圖 5 3】



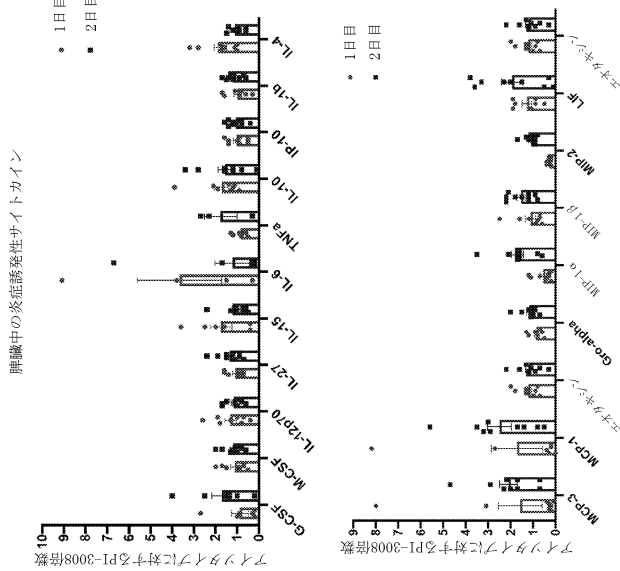
【図 5 4】



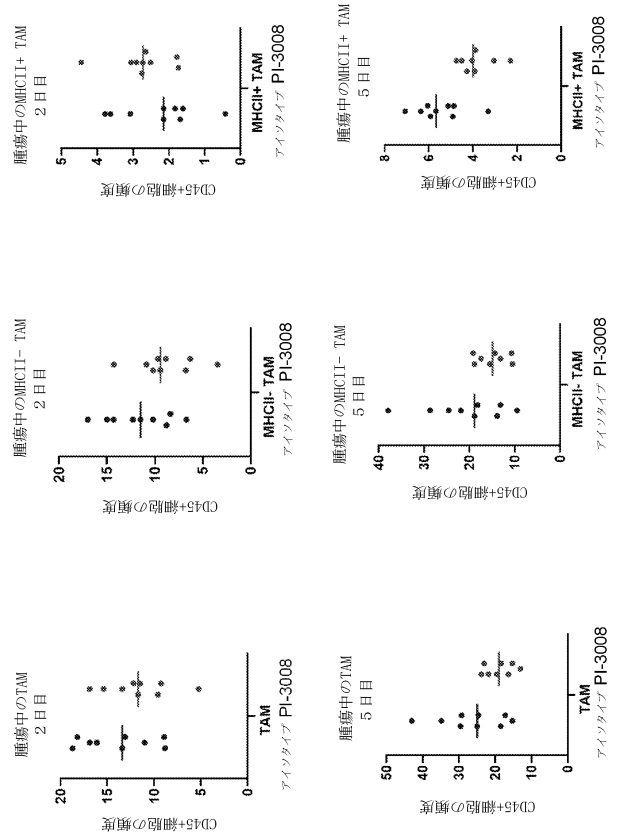
【図 5 5】



【図 59】



【図 60】



10

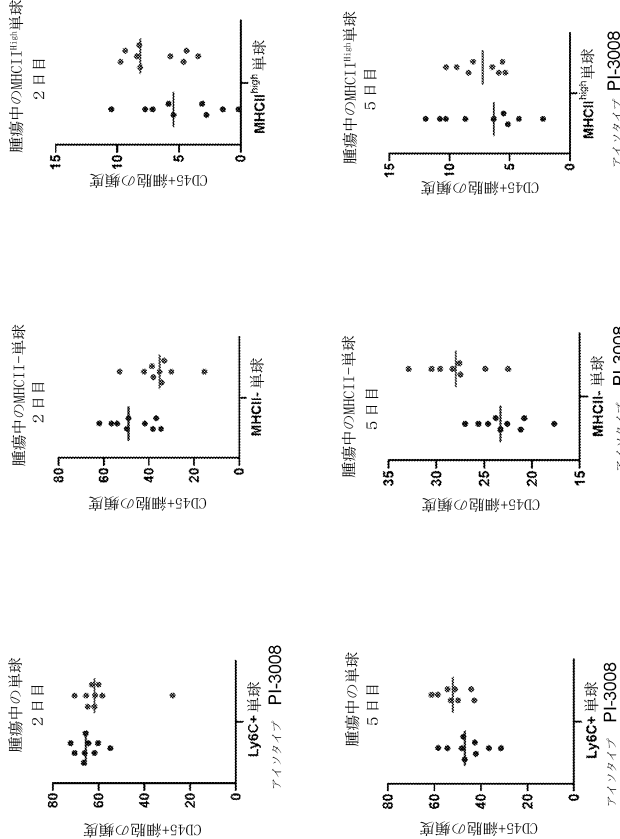
20

30

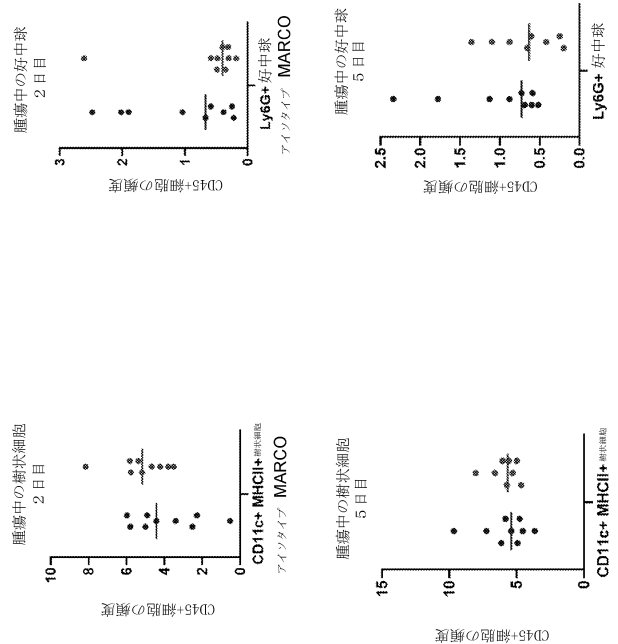
40

50

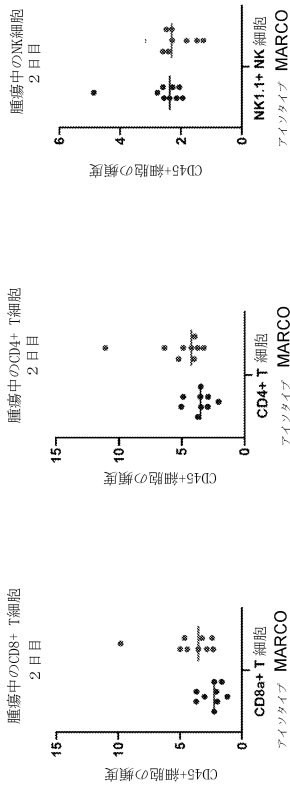
【図 61】



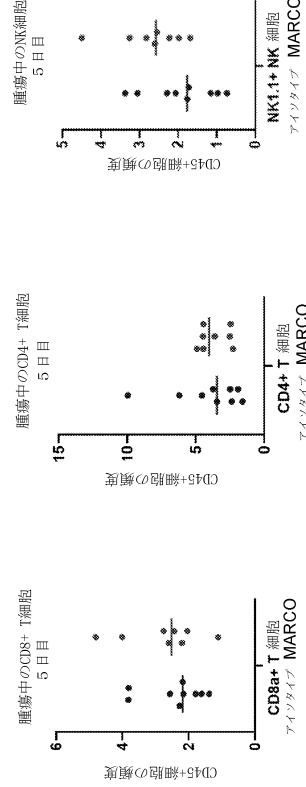
【図 62】



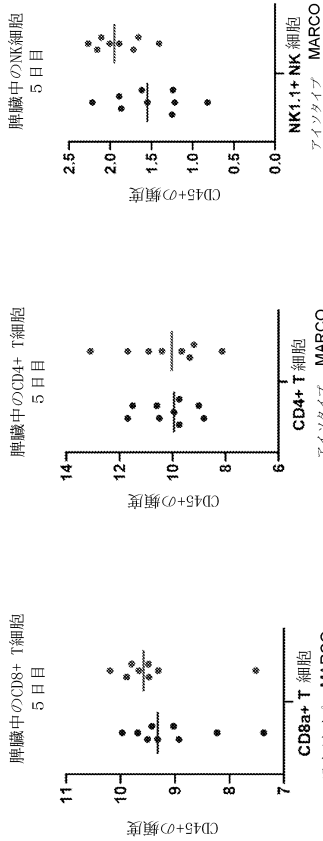
【図 6 3】



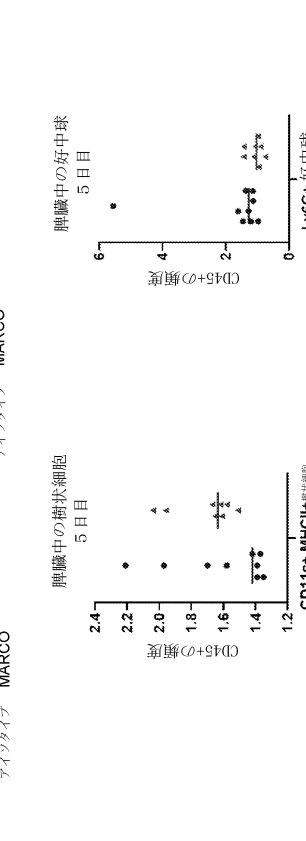
【図 6 4】



【図 6 5】



【図 6 6】



10

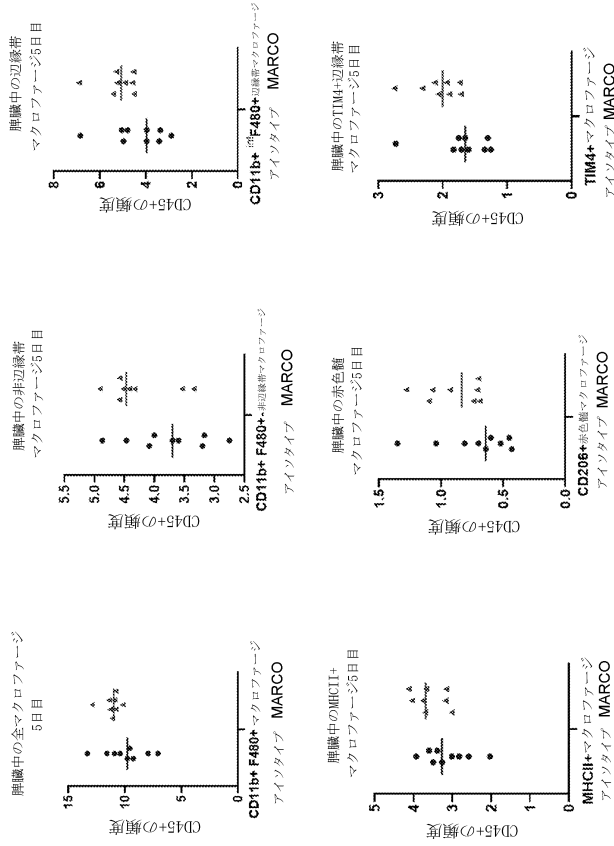
20

30

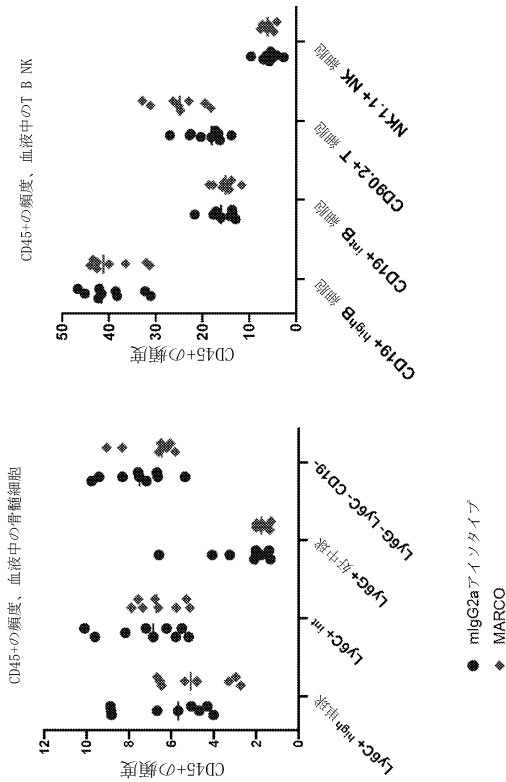
40

50

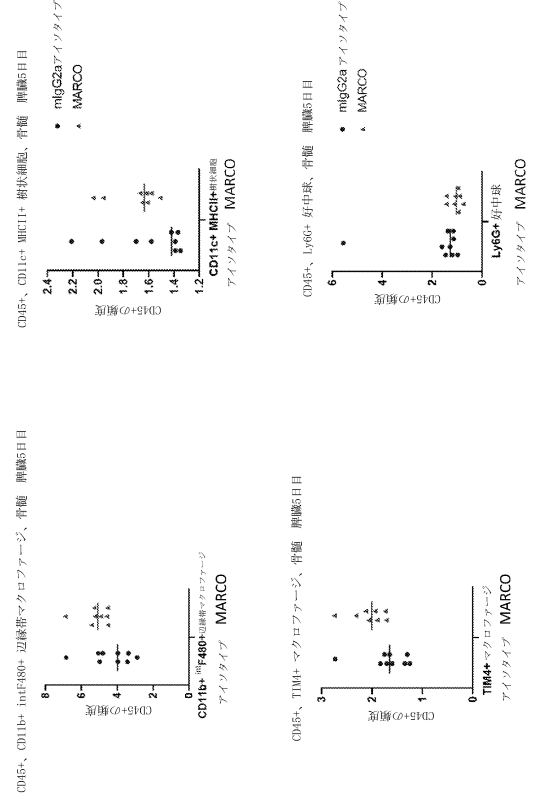
【図 6 7】



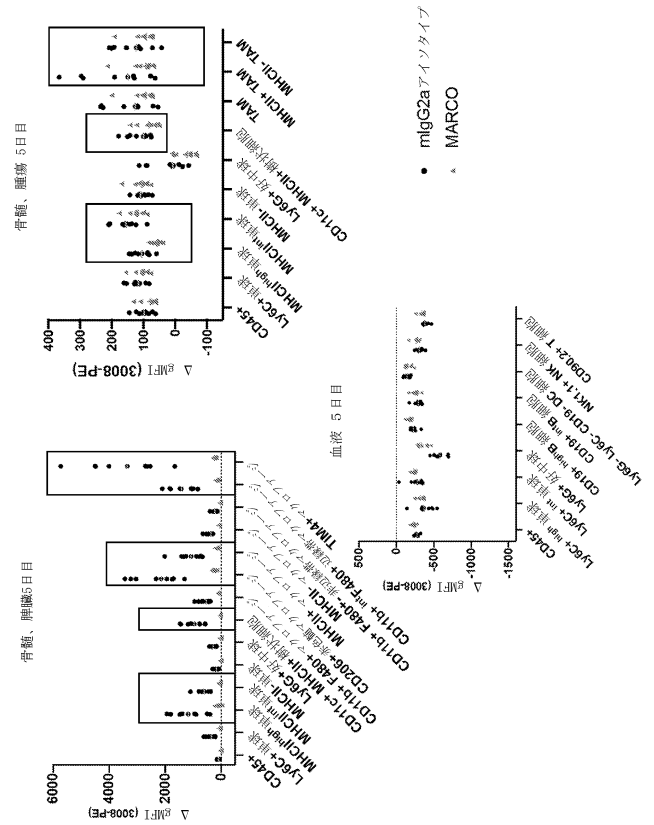
【図 6 9】



【図 6 8】



【図 7 0】



10

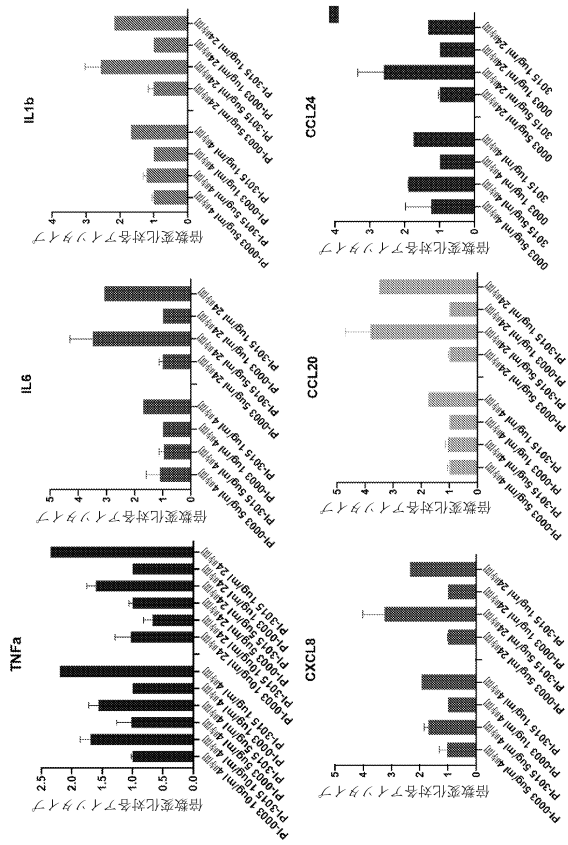
20

30

40

50

【図 7 1】



10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2021/059955

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - A61K 39/00; A61K 39/395; A61K 45/06 (2022.01)

CPC - A61K 2039/507; A61K 2039/585; C07K 16/28; C07K 16/2803; C07K 16/2818; C07K 16/2827 (2022.02)

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)

see Search History document

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

see Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

see Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 8,597,946 B2 (MULE et al) 03 December 2013 (03.12.2013) entire document	1, 2, 5, 6, 11, 125, 155, 157, 162, 164, 193, 223
A	WO 2020/113274 A1 (THE COUNCIL OF THE QUEENSLAND INSTITUTE OF MEDICAL RESEARCH) 11 June 2020 (11.06.2020) entire document	1, 2, 5, 6, 11, 125, 155, 157, 162, 164, 193, 223
A	US 2018/0171021 A1 (THE ROCKEFELLER UNIVERSITY) 21 June 2018 (21.06.2018) entire document	1, 2, 5, 6, 11, 125, 155, 157, 162, 164, 193, 223
A	US 2010/0227415 A1 (WINQVIST et al) 09 September 2010 (09.09.2010) entire document	1, 2, 5, 6, 11, 125, 155, 157, 162, 164, 193, 223
A	US 2012/0231023 A1 (ZURAWSKI et al) 13 September 2012 (13.09.2012) entire document	1, 2, 5, 6, 11, 125, 155, 157, 162, 164, 193, 223

☐ 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

"D" document cited by the applicant in the international application

"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

23 March 2022

Date of mailing of the international search report

APR 12 2022

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents

P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Harry Kim

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2021/059955

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. ☐ forming part of the international application as filed:

☐ 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:

SEQ ID NOs: 1, 6, 81, 66, 141, 146, 361, 366, 384, 454, and 459 were searched.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2021/059955

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.: 4, 12-28, 35-46, 52-58, 62-67, 71-124, 127-154, 158-161, 165-192, 194-222
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 extra sheet(s).

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 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; 2, 5, 6, 11, 125, 155, 157, 162, 164, 193, 223

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 SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2021/059955

Continued from Box No. III Observations where unity of invention is lacking

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees need to be paid.

Group I+: claims 1-3, 5-11, 29-34, 47-51, 59-61, 68-70, 125, 126, 155-157, 162-164, 193, 223, and 224 are drawn to anti-MARCO antibodies, and methods comprising the same.

The first invention of Group I+ is restricted to an isolated antibody comprising a heavy chains variable region and a light chain variable region, where the VH is selected to be SEQ ID NO:1, which further contains CDR-H1 (SEQ ID NO:2), CDR-H2 (SEQ ID NO:3), CDR-H3 (SEQ ID NO:4), and the VL is selected to be SEQ ID NO:6, which further comprises CDR-L1 (SEQ ID NO:431), CDR-L2 (SEQ ID NO:8), CDR-L3 (SEQ ID NO:9), and methods comprising the same. It is believed that claims 1, 2, 5, 6, 11, 125, 155, 157, 162, 164, 193, and 223 read on this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they read on SEQ ID NOs: 1 and 6.

Applicant is invited to elect additional antibody VH, VL, MARCO amino acid epitopes, and their respective, corresponding, SEQ ID NOs to be searched in a specific combination by paying additional fee for each set of election. An exemplary election would be an isolated antibody comprising a heavy chains variable region and a light chain variable region, where the VH is selected to be SEQ ID NO:11, which further contains CDR-H1 (SEQ ID NO:12), CDR-H2 (SEQ ID NO:13), CDR-H3 (SEQ ID NO:14), and the VL is selected to be SEQ ID NO:16, which further comprises CDR-L1 (SEQ ID NO:17), CDR-L2 (SEQ ID NO:18), CDR-L3 (SEQ ID NO:19), and methods comprising the same. Additional antibody VH, VL, MARCO amino acid epitopes, and their respective, corresponding, SEQ ID NOs will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that read on any additional elected inventions. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which read on the first named invention if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined.

The inventions listed in Groups I+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1, because under PCT Rule 13.2 they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The Groups I+ formulas do not share a significant structural element responsible for treating myeloid cancers, requiring the selection of alternative antibody VH and VL where "wherein the VH sequence comprises a sequence selected from the sequences set forth in SEQ ID NO: 1, 11, 21, 31, 41, 51, 61, 71, 81, 91, 101, 111, 121, 131, 434, 444, and 474," and "wherein the VL sequence comprises a sequence selected from the sequences set forth in SEQ ID NO: 6, 16, 26, 36, 46, 56, 66, 76, 86, 96, 106, 116, 126, 136, 439, 449, and 479."

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features of an isolated antibody or antigen binding fragment thereof that binds to a Scavenger Receptor Cysteine-Rich (SRCR) domain of human Macrophage Receptor with Collagenous Structure (MARCO); comprising a variable heavy chain (VH) sequence comprising three heavy chain CDR sequences, CDR-H1, CDR-H2, and CDR-H3, and a variable light chain (VL) sequence comprising three light chain CDR sequences, CDR-L1, CDR-L2, and CDR-L3; a method of increasing an immune response in a subject comprising administering to the subject a composition comprising an anti-human MARCO antibody or antigen binding fragment thereof; a method of treating cancer in a subject; and an immunotherapy; A method of disabling myeloid cells that express MARCO on the cell surface, comprising contacting the myeloid cells with an anti-human MARCO antibody or antigen binding fragment thereof; A method of determining an expression level of MARCO protein in a sample from a subject comprising contacting the sample with an anti-MARCO antibody and performing an immunohistochemistry assay or a soluble MARCO assay. However, these shared technical features do not represent a contribution over the prior art.

Specifically, US 2018/0171021 A1 to The Rockefeller University discloses an isolated antibody or antigen binding fragment thereof that binds to a Scavenger Receptor Cysteine-Rich (SRCR) domain of human Macrophage Receptor with Collagenous Structure (MARCO) ([The present invention provides isolated antibodies, in particular monoclonal antibodies such as human monoclonal antibodies, that bind to MARCO, Para. [0026]); comprising a variable heavy chain (VH) sequence comprising three heavy chain CDR sequences, CDR-H1, CDR-H2, and CDR-H3, and a variable light chain (VL) sequence comprising three light chain CDR sequences, CDR-L1, CDR-L2, and CDR-L3 (further comprising (i) a variable light chain or (ii) a variable heavy chain of the antibody, Para. [0007]; a variable light chain comprising CDRs1-3 of the light chain or (ii) a variable heavy chain comprising CDRs1-3 of the heavy chain of the antibody, Para. [0008]);

a method of increasing an immune response in a subject (anti-MARCO mAb treatment inhibits tumor growth and metastasis by increasing the immunogenicity of the tumor microenvironment, Para. [0017]; to achieve the desired therapeutic response for a particular patient, Para. [0084]) comprising administering to the subject a composition comprising an anti-human MARCO antibody or antigen binding fragment thereof (method comprises administering to the mammal a pharmaceutically effective amount of the above-described antibody, Para. [0012]; [The present invention provides isolated antibodies, in particular monoclonal antibodies such as human monoclonal antibodies, that bind to MARCO, Para. [0026]); a method of treating cancer in a subject ([The method comprises ...to inhibit the tumor growth and metastatic spread. In this method, the mammal can be a human being suffering from cancer, such as breast cancer or a melanoma, Para. [0012]); and an immunotherapy (anti-MARCO immunotherapy, Para. [0160]); a method of disabling myeloid cells that express MARCO on the cell surface ([Tumor associated macrophages (TAMs) are a heterogeneous population of myeloid cells, Para. [0023]; administering to the mammal a pharmaceutically effective amount of the above-described antibody or antigen-binding fragment thereof, which specifically interacts with the macrophage receptor with collagenous structure (MARCO) epitope so as to inhibit the tumor growth and metastatic spread, Para. [0012]; comprising contacting the myeloid cells with an anti-human MARCO antibody or antigen binding fragment thereof (administering to the mammal a pharmaceutically effective amount of the above-described antibody or antigen-binding fragment thereof, which specifically interacts with the macrophage receptor with collagenous structure (MARCO) epitope so as to inhibit the tumor growth and metastatic spread, Para. [0012]); a method of determining an expression level of MARCO protein in a sample from a subject (a set of photographs and diagrams showing characterization of MARCO expression on different macrophage populations, Para. [0020]; the invention provides methods for detecting the presence of human MARCO antigen in a sample, Para. [0103]) comprising contacting the sample with an anti-MARCO antibody and performing an immunohistochemistry assay or a soluble MARCO assay (comprising contacting the sample, and a control sample, with an anti-MARCO antibody, or an antigen-binding portion thereof, which specifically binds to human MARCO, Para. [0103]; [The detection methods can be used to detect MARCO-expressing TAM in a biological sample in vitro as well as in vivo. In vitro techniques for detection include ELISA

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2021/059955

immuocytochemistry, immunohistochemistry, Para. [0105]].

The inventions listed in Groups I+ therefore lack unity under Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical features.

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P	37/04	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	E
A 6 1 P	31/04 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	T
A 6 1 P	31/12 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	V
		A 6 1 P	31/04	
		A 6 1 P	31/12	

,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,D
K,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),O
A(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,B
B,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,Z
W

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ジャーチャン ナディン

アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ タワー プレイス 2
スイート 8 0 0 パイオニア イミュノセラピューティクス インコーポレイテッド内

(72)発明者 ストレウリ ミシェル

アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ タワー プレイス 2
スイート 8 0 0 パイオニア イミュノセラピューティクス インコーポレイテッド内

(72)発明者 ヤン シー

アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ タワー プレイス 2
スイート 8 0 0 パイオニア イミュノセラピューティクス インコーポレイテッド内

(72)発明者 リャン リンダ

アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ タワー プレイス 2
スイート 8 0 0 パイオニア イミュノセラピューティクス インコーポレイテッド内

(72)発明者 スリラム ベンカタラマン

アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ タワー プレイス 2
スイート 8 0 0 パイオニア イミュノセラピューティクス インコーポレイテッド内

-
- (72)発明者 ボラック ジョシュア
アメリカ合衆国 94080 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ タワー プレイス 2
スイート 800 パイオニア イミュノセラピューティクス インコーポレイテッド内
- (72)発明者 ユリッチ ブラディ斯拉バ
アメリカ合衆国 94080 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ タワー プレイス 2
スイート 800 パイオニア イミュノセラピューティクス インコーポレイテッド内
- (72)発明者 ヘッグブロム リネア
アメリカ合衆国 94080 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ タワー プレイス 2
スイート 800 パイオニア イミュノセラピューティクス インコーポレイテッド内
- (72)発明者 モヒカ カラ
アメリカ合衆国 94080 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ タワー プレイス 2
スイート 800 パイオニア イミュノセラピューティクス インコーポレイテッド内
- (72)発明者 プレスタ レナード ジー.
アメリカ合衆国 94080 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ タワー プレイス 2
スイート 800 パイオニア イミュノセラピューティクス インコーポレイテッド内
- (72)発明者 ミトラ サヤンタン
アメリカ合衆国 94080 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ タワー プレイス 2
スイート 800 パイオニア イミュノセラピューティクス インコーポレイテッド内
- F ターム (参考) 4B064 AG27 CA19 CC24 DA01 DA05
 4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X AB01 BA02 CA25 CA44
 4C084 AA19 NA14 ZB26 ZB33 ZB35
 4C085 AA13 AA14 BB11 BB33 BB34 BB35 BB36 BB37 EE01 EE03
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 DA76 EA20 FA72 FA74