

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B1)

(11) 特許番号

特許第6609724号
(P6609724)

(45) 発行日 令和1年11月20日(2019.11.20)

(24) 登録日 令和1年11月1日(2019.11.1)

(51) Int.Cl.	F 1	
C 12 N 15/13	(2006.01)	C 12 N 15/13
C 12 P 21/08	(2006.01)	C 12 P 21/08
C 07 K 16/18	(2006.01)	C 07 K 16/18
A 61 P 35/00	(2006.01)	A 61 P 35/00
A 61 P 37/04	(2006.01)	A 61 P 37/04

請求項の数 15 (全 68 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2019-517981 (P2019-517981)
(86) (22) 出願日	平成30年1月5日(2018.1.5)
(86) 国際出願番号	PCT/IB2018/000043
(87) 国際公開番号	W02018/127787
(87) 国際公開日	平成30年7月12日(2018.7.12)
審査請求日	令和1年5月29日(2019.5.29)
(31) 優先権主張番号	62/443,281
(32) 優先日	平成29年1月6日(2017.1.6)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)

早期審査対象出願

(73) 特許権者	519001408 ユーティレックス カンパニー リミテッド 大韓民国 O 8594 ソウル クムチョ ン-ク ガサン デジタル 1-ロ-25 ダエユン テクノタウン 17 チャ スイート # 1401
(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(74) 代理人	100102118 弁理士 春名 雅夫
(74) 代理人	100160923 弁理士 山口 裕孝
(74) 代理人	100119507 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】抗ヒト4-1BB抗体およびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) SEQ ID NO:5の配列を含む重鎖CDR1、SEQ ID NO:6の配列を含む重鎖CDR2、およびSEQ ID NO:7または8の配列を含む重鎖CDR3、ならびに

(b) SEQ ID NO:1の配列を含む軽鎖CDR1、SEQ ID NO:2の配列を含む軽鎖CDR2、およびSEQ ID NO:4の配列を含む軽鎖CDR3

を含む、抗4-1BB抗体またはその抗原結合性フラグメント。

【請求項2】

(a) SEQ ID NO:16もしくは17の配列を含む重鎖フレームワーク1(FR1)領域、および/または

(b) SEQ ID NO:18~20のいずれか一つの配列を含む重鎖フレームワーク3(FR3)領域を含む、請求項1記載の抗4-1BB抗体または抗原結合性フラグメント。

【請求項3】

(a) SEQ ID NO:11~14から選択される配列と少なくとも98%同一な配列を含む重鎖可変ドメイン、

(b) SEQ ID NO:10の配列と少なくとも98%同一な配列を含む軽鎖可変ドメイン、または

(c) SEQ ID NO:11~14から選択される配列と少なくとも98%同一な配列を含む重鎖可変ドメイン、およびSEQ ID NO:10の配列と少なくとも98%同一な配列を含む軽鎖可変ドメイン

10

20

のいずれか一つを含む、請求項1記載の抗4-1BB抗体または抗原結合性フラグメント。

【請求項4】

- (a) SEQ ID NO:11～14から選択される配列を含む重鎖可変ドメイン、
- (b) SEQ ID NO:10の配列を含む軽鎖可変ドメイン、または
- (c) SEQ ID NO:11～14から選択される配列を含む重鎖可変ドメイン、およびSEQ ID NO:10の配列を含む軽鎖可変ドメイン

のいずれか一つを含む、請求項1記載の抗4-1BB抗体または抗原結合性フラグメント。

【請求項5】

ヒト4-1BB分子に対して $1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-12}$ Mの結合アフィニティー(K_D)を有する、請求項1記載の抗4-1BB抗体または抗原結合性フラグメント。

10

【請求項6】

ヒト4-1BBポリペプチドの細胞外ドメイン内のエピトープに結合する、請求項1記載の抗4-1BB抗体または抗原結合性フラグメント。

【請求項7】

ヒト4-1BBの細胞外ドメイン内のエピトープへの結合が、SEQ ID NO:44の位置N30、D38、N39およびR41における1つまたは複数の変異によって抑制される、請求項6記載の抗4-1BB抗体または抗原結合性フラグメント。

【請求項8】

イヌ4-1BBポリペプチドに結合しないかまたは弱く結合する、請求項1記載の抗4-1BB抗体または抗原結合性フラグメント。

20

【請求項9】

ヒト化抗体であるかまたはヒト化抗体を含む、請求項1記載の抗4-1BB抗体または抗原結合性フラグメント。

【請求項10】

抗体が、IgG1、IgG2、IgG4、IgA、IgE、IgM、およびIgDから選択される免疫グロブリン定常ドメインを含む、請求項1記載の抗4-1BB抗体または抗原結合性フラグメント。

【請求項11】

抗体がヒトIgG1であるかまたはヒトIgG1を含む、請求項1記載の抗4-1BB抗体または抗原結合性フラグメント。

【請求項12】

IgG1がSEQ ID NO:22もしくは23と少なくとも95%同一な配列であるか、またはSEQ ID NO:22もしくは23と少なくとも95%同一な配列を含む、請求項11記載の抗4-1BB抗体または抗原結合性フラグメント。

30

【請求項13】

モノクローナル抗体である、請求項1記載の抗4-1BB抗体または抗原結合性フラグメント。

【請求項14】

抗体フラグメントが、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')2フラグメント、またはscFvフラグメントである、請求項1記載の抗4-1BB抗体または抗原結合性フラグメント。

40

【請求項15】

- (a) 請求項1記載の抗4-1BB抗体もしくは抗原結合性フラグメントと、
 - (b) 薬学的に許容される担体と
- を含む、薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2017年1月6日に出願された米国特許出願第62/443,281号に基づく優先権およびその恩典を主張し、前記特許出願の開示は参照によりその全体が本明細書に組み入れられ

50

る。

【背景技術】

【0002】

背景

がんは今なお世界の主要死因のうちの1つである。最近の統計では、世界人口の13%ががんで死亡すると報告されている。国際がん研究機関（International Agency for Research on Cancer）（IARC）の推計によると、2012年には、世界中で1410万例の新規がん症例および820万例のがん死症例があった。世界負荷は、2030年までに、人口増加および加齢や、喫煙、不健康的な食事および運動不足などのリスク因子への曝露により、新規がん症例2170万例およびがん死症例1300万例に拡大すると予想されている。さらに、痛みとがん処置の医療費とは、がん患者にとっても、その家族にとっても、生活の質が低減する原因になる。なによりも、がんが、改良された処置方法を至急見いだす必要のある疾患であることは、明らかである。

【発明の概要】

【0003】

概要

本開示は特に、ヒト4-1BBポリペプチドに結合する抗体およびそれらのフラグメントを提供する。いくつかの局面において、本願抗ヒト4-1BB抗体およびそれらのフラグメントは、基準抗ヒト4-1BB抗体には見いだされない1つまたは複数の特定の構造的特徴を含む点で、基準抗ヒト4-1BB抗体の変種である。本開示は、本願変種抗ヒト4-1BB抗体が、本明細書に記載する1つまたは複数の構造的特徴を欠く基準抗ヒト4-1BB抗体と比較して改良された特性を有するという認識を包含する。いくつかの態様において、本願抗ヒト4-1BB抗体およびそれらのフラグメントは、例えば改良された結合アフィニティー、改良されたT細胞増殖（例えば、CD8⁺ T細胞の増殖）の誘導、T細胞（例えば、CD8⁺ T細胞の増殖）によるIFN 生産を誘導する能力の増加、改良された（例えばより低用量において）インビボでがん増殖を低減および/または排除する能力など、1つまたは複数の改良された特性を有する。

【0004】

いくつかの態様において、抗4-1BB抗体または抗原結合性抗体フラグメントは、SEQ ID NO:5～8の配列であるかそれらの配列を含む、1つ、2つまたは3つの重鎖CDR配列を含む。いくつかの態様において、抗4-1BB抗体または抗原結合性抗体フラグメントは、以下のうちの1つまたは複数を含む：SEQ ID NO:5の配列であるかその配列を含む重鎖CDR1、SEQ ID NO:6の配列であるかその配列を含む重鎖CDR2、およびSEQ ID NO:7または8の配列であるかその配列を含む重鎖CDR3。いくつかの態様において、抗4-1BB抗体または抗原結合性抗体フラグメントは、SEQ ID NO:5の配列であるかその配列を含む重鎖CDR1、SEQ ID NO:6の配列であるかその配列を含む重鎖CDR2、およびSEQ ID NO:7または8の配列であるかその配列を含む重鎖CDR3のそれぞれを含む。

【0005】

いくつかの態様において、抗4-1BB抗体または抗原結合性抗体フラグメントは、SEQ ID NO:1～4の配列であるかそれらの配列を含む、1つ、2つまたは3つの軽鎖CDR配列を含む。いくつかの態様において、抗4-1BB抗体または抗原結合性抗体フラグメントは、以下のうちの1つまたは複数を含む：SEQ ID NO:1の配列であるかその配列を含む軽鎖CDR1、SEQ ID NO:2の配列であるかその配列を含む軽鎖CDR2、およびSEQ ID NO:3または4の配列であるかその配列を含む軽鎖CDR3。いくつかの態様において、抗4-1BB抗体または抗原結合性抗体フラグメントは、SEQ ID NO:1の配列であるかその配列を含む軽鎖CDR1、SEQ ID NO:2の配列であるかその配列を含む軽鎖CDR2、およびSEQ ID NO:3または4の配列であるかその配列を含む軽鎖CDR3のそれぞれを含む。

【0006】

いくつかの態様において、抗4-1BB抗体または抗原結合性抗体フラグメントは、SEQ ID NO:5の配列であるかその配列を含む重鎖CDR1、SEQ ID NO:6の配列であるかその配列を含

10

20

30

40

50

む重鎖CDR2、およびSEQ ID NO:7または8の配列であるかその配列を含む重鎖CDR3を含む重鎖可変ドメイン、ならびに/またはSEQ ID NO:1の配列であるかその配列を含む軽鎖CDR1、SEQ ID NO:2の配列であるかその配列を含む軽鎖CDR2、およびSEQ ID NO:4の配列であるかその配列を含む軽鎖CDR3を含む軽鎖可変ドメインを含む。

【 0 0 0 7 】

いくつかの態様において、抗4-1BB抗体または抗原結合性抗体フラグメントは、SEQ ID NO:16または17の配列を含む重鎖フレームワーク1(FR1)領域を含む重鎖可変ドメインを含む。いくつかの態様において、抗4-1BB抗体または抗原結合性抗体フラグメントは、SEQ ID NO:18～20のいずれか一つの配列を含む重鎖フレームワーク3(FR3)領域を含む重鎖可変ドメインを含む。いくつかの態様において、抗4-1BB抗体または抗原結合性抗体フラグメントは、SEQ ID NO:16または17の配列を含む重鎖フレームワーク1(FR1)領域、およびSEQ ID NO:18～20のいずれか一つの配列を含む重鎖フレームワーク3(FR3)領域を含む、重鎖可変ドメインを含む。

10

【 0 0 0 8 】

いくつかの態様において、抗4-1BB抗体または抗原結合性抗体フラグメントは、SEQ ID NO:11～14から選択される配列であるかその配列を含む重鎖可変ドメインを含む抗体または抗体フラグメントに対する実質的相同性を含む。いくつかの態様において、抗4-1BB抗体または抗原結合性抗体フラグメントは、SEQ ID NO:11～14から選択される配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%または99.5%同一な配列であるかその配列を含む重鎖可変ドメインを含む。いくつかの態様において、抗4-1BB抗体または抗原結合性抗体フラグメントは、SEQ ID NO:11～14から選択される配列であるかその配列を含む重鎖可変ドメインを含む。

20

【 0 0 0 9 】

いくつかの態様において、抗4-1BB抗体または抗原結合性抗体フラグメントは、SEQ ID NO:9または10の配列であるかその配列を含む軽鎖可変ドメインを含む抗体または抗体フラグメントに対する実質的相同性を含む。いくつかの態様において、抗4-1BB抗体または抗原結合性抗体フラグメントは、SEQ ID NO:9または10の配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%または99.5%同一な配列であるかその配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。いくつかの態様において、抗4-1BB抗体または抗原結合性抗体フラグメントは、SEQ ID NO:9または10の配列であるかその配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。

30

【 0 0 1 0 】

いくつかの態様において、抗4-1BB抗体または抗原結合性抗体フラグメントは、SEQ ID NO:11～14から選択される配列であるかその配列を含む重鎖可変ドメインとSEQ ID NO:10の配列であるかその配列を含む軽鎖可変ドメインとを含む抗体または抗体フラグメントに対する実質的相同性を含む。いくつかの態様において、抗4-1BB抗体または抗原結合性抗体フラグメントは、SEQ ID NO:11～14から選択される配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%または99.5%同一な配列であるかその配列を含む重鎖可変ドメインと、SEQ ID NO:10の配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%または99.5%同一な配列であるかその配列を含む軽鎖可変ドメインとを含む。いくつかの態様において、抗4-1BB抗体または抗原結合性抗体フラグメントは、SEQ ID NO:11～14から選択される配列であるかその配列を含む重鎖可変ドメインと、SEQ ID NO:10の配列であるかその配列を含む軽鎖可変ドメインとを含む。

40

【 0 0 1 1 】

いくつかの態様において、本願抗ヒト4-1BB抗体またはそのフラグメントはアゴニスト抗体である。いくつかの態様において、本願抗ヒト4-1BB抗体またはそのフラグメントは、ヒト化抗ヒト4-1BB抗体94G1(すなわち、それぞれSEQ ID NO:9および11の軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインを含む抗体)よりも優れたアゴニスト活性を有すると特徴づけられる。いくつかの態様において、本願抗ヒト4-1BB抗体またはそのフラグメントは、

50

ヒト化抗ヒト4-1BB抗体94G1（すなわち、それぞれSEQ ID NO:9および11の軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインを含む抗体）より改良された結合アフィニティーを有すると特徴づけられる。

【 0 0 1 2 】

いくつかの態様において、本願抗ヒト4-1BB抗体またはそのフラグメントは、ヒト化抗体であるかまたはヒト化抗体を含む。いくつかの態様において、本願抗ヒト4-1BB抗体またはフラグメントは、IgG1またはその変種、IgG2またはその変種、IgG4またはその変種、IgAまたはその変種、IgEまたはその変種、IgMまたはその変種、およびIgDまたはその変種から選択されるヒト免疫グロブリン定常ドメインを含む。いくつかの態様において、本願抗ヒト4-1BB抗体またはそのフラグメントは、ヒトIgG1であるかまたはヒトIgG1を含む。
いくつかの態様において、IgG1は、SEQ ID NO:22もしくは23と少なくとも95%同一な配列であるか、またはSEQ ID NO:22もしくは23と少なくとも95%同一な配列を含む。
10

【 0 0 1 3 】

いくつかの態様において、本願抗ヒト4-1BB抗体またはそのフラグメントはモノクローナル抗体である。

【 0 0 1 4 】

いくつかの態様において、本願抗ヒト4-1BB抗体またはそのフラグメントは完全長抗体である。いくつかの態様において、本願抗ヒト4-1BB抗体またはそのフラグメントは、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')2フラグメント、Fvフラグメント、ジスルフイド結合したFvフラグメント、scFvフラグメント、單一ドメイン抗体、ヒューマボディ（humobody）、ナノボディ、またはダイアボディである。
20

【 0 0 1 5 】

いくつかの態様において、本願抗ヒト4-1BB抗体またはそのフラグメントは、ヒト4-1BB分子に対して $1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-12}$ Mの結合アフィニティー（K_D）を有する。いくつかの態様において、本願抗ヒト4-1BB抗体またはそのフラグメントは、ヒト4-1BB分子に対して $1 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-12}$ Mの結合アフィニティー（K_D）を有する。いくつかの態様において、本願抗ヒト4-1BB抗体またはそのフラグメントは、ヒト4-1BB分子に対して $1 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-12}$ Mの結合アフィニティー（K_D）を有する。いくつかの態様において、本願抗ヒト4-1BB抗体またはそのフラグメントは、ヒト4-1BB分子に対して $1 \times 10^{-10} \sim 1 \times 10^{-12}$ Mの結合アフィニティー（K_D）を有する。
30

【 0 0 1 6 】

いくつかの態様において、本願抗ヒト4-1BB抗体またはそのフラグメントは、ヒト4-1BBポリペプチドの細胞外ドメイン内のエピトープに結合する。いくつかの態様において、本願抗ヒト4-1BB抗体またはそのフラグメントは、ヒト4-1BBの細胞外ドメイン内のエピトープに結合する。いくつかの態様において、本願抗ヒト4-1BB抗体またはそのフラグメントの結合は、SEQ ID NO:44の位置N30、D38、N39、およびR41における1つまたは複数の変異によって抑制される。

【 0 0 1 7 】

いくつかの態様において、本願抗ヒト4-1BB抗体またはそのフラグメントは、非靈長類4-1BBポリペプチドに結合しないかまたは弱く結合する。いくつかの態様において、本願抗ヒト4-1BB抗体またはそのフラグメントは、イヌ4-1BBポリペプチドに結合しないかまたは弱く結合する。
40

【 0 0 1 8 】

いくつかの態様において、本開示は、抗4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントをコードする核酸分子を提供する。いくつかの態様において、本開示は、抗4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントをコードする核酸分子を含むベクターを提供する。いくつかの態様において、本開示は、抗4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントをコードするベクターおよび/または核酸分子を含む宿主細胞を提供する。いくつかの態様において、宿主細胞は、細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞、または哺乳動物細胞から選択される。いくつかの態様において、大腸菌（E. coli）、P. pastoris（P. pastoris）、Sf9、COS、HEK293、
50

CHO、および哺乳動物リンパ球からなる群より選択される。

【0019】

いくつかの態様において、本開示は、抗4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントと薬学的に許容される担体とを含む薬学的組成物を提供する。いくつかの態様において、本開示は、抗4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントをコードする核酸および/またはベクターと薬学的に許容される担体とを含む薬学的組成物を提供する。

【0020】

いくつかの態様において、本開示は、処置を必要とする対象を処置する方法であって、抗4-1BB抗体もしくは抗原結合性フラグメントを含むかまたはそれを送達する組成物を、対象に投与する工程を含む方法を提供する。いくつかの態様において、本開示は、処置を必要とする対象を処置する方法であって、抗4-1BB抗体もしくは抗原結合性フラグメントをコードする核酸および/もしくはベクターを含むかまたはそれを送達する組成物を、対象に投与する工程を含む方法を提供する。いくつかの態様において、対象はがんを有するか、またはがんを発症するリスクがある。

10

【0021】

いくつかの態様において、本開示は、免疫応答の誘導を必要とする対象において免疫応答を誘導する方法であって、抗4-1BB抗体もしくは抗原結合性フラグメントを含むかまたはそれを送達する組成物を、対象に投与する工程を含む方法を提供する。いくつかの態様において、本開示は、免疫応答の誘導を必要とする対象において免疫応答を誘導する方法であって、抗4-1BB抗体もしくは抗原結合性フラグメントをコードする核酸および/もしくはベクターを含むかまたはそれを送達する組成物を、対象に投与する工程を含む方法を提供する。いくつかの態様において、対象はがんを有するか、またはがんを発症するリスクがある。

20

【0022】

いくつかの態様において、本開示は、免疫応答の強化を必要とする対象において免疫応答を強化する方法であって、抗4-1BB抗体もしくは抗原結合性フラグメントを含むかまたはそれを送達する組成物を、対象に投与する工程を含む方法を提供する。いくつかの態様において、本開示は、免疫応答の強化を必要とする対象において免疫応答を強化する方法であって、抗4-1BB抗体もしくは抗原結合性フラグメントをコードする核酸および/もしくはベクターを含むかまたはそれを送達する組成物を、対象に投与する工程を含む方法を提供する。いくつかの態様において、対象はがんを有するか、またはがんを発症するリスクがある。

30

【0023】

いくつかの態様において、対象中の、本開示の方法によって処置されるがんは、膀胱がん、乳がん、子宮頸がん、大腸がん、子宮内膜がん、食道がん、ファロピウス管がん、胆嚢がん、胃腸がん、頭頸部がん、血液がん、咽頭がん、肝がん、肺がん、リンパ腫、黒色腫、中皮腫、卵巣がん、原発性腹膜がん、唾液腺がん、肉腫、胃がん、甲状腺がん、膵がん、および前立腺がんから選択される。

【0024】

いくつかの態様において、組成物は、0.01mg/kg～100mg/kgの用量で、本開示の抗ヒト4-1BB抗体もしくはその抗原結合性フラグメントを含むか、または送達する。いくつかの態様において、組成物は、約0.01mg/kg、0.025mg/kg、0.05mg/kg、0.075mg/kg、0.1mg/kg、0.25mg/kg、0.5mg/kg、0.75mg/kg、1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、8mg/kg、10mg/kg、20mg/kg、25mg/kg、30mg/kg、40mg/kg、50mg/kg、50mg/kg、70mg/kg、80mg/kg、90mg/kg、または100mg/kgの用量で、抗ヒト4-1BB抗体もしくはその抗原結合性フラグメントを含むか、または送達する。

40

【0025】

いくつかの態様において、抗ヒト4-1BB抗体および/またはそのフラグメントならびに/またはそれらを含む組成物は、対象におけるT細胞増殖（例えばCD8⁺ T細胞増殖）の増加および/またはT細胞（例えば、CD8⁺ T細胞）によるIFN 分泌の増加を誘導することを特

50

徵とする。

【0026】

いくつかの態様において、本開示は、抗4-1BB抗体もしくは抗原結合性フラグメントを含むかまたはそれを送達する組成物を、1種または複数種の追加抗がん治療を施された対象または施される予定の対象に投与する工程を含む方法を提供する。いくつかの態様において、本開示は、抗4-1BB抗体もしくは抗原結合性フラグメントを含むかまたはそれを送達する組成物を、電離放射線、化学療法剤、抗体剤および細胞ベースの治療のうちの1つまたは複数が施された対象または施される予定の対象に、対象が両方による処置を受けるように投与する工程を含む方法を提供する。

【0027】

10

いくつかの態様において、本開示は、抗4-1BB抗体もしくは抗原結合性フラグメントを含むかまたはそれを送達する組成物を、免疫チェックポイント阻害剤、IL-12、GM-CSF、抗CD4剤、フルオロウラシル、ドキソルビシン、イリノテカン、パクリタキセル、シスプラチニン、またはシクロホスファミドのうちの1つまたは複数を投与された対象または投与される予定の対象に投与する工程を含む方法を提供する。

【0028】

いくつかの態様において、本開示は、抗4-1BB抗体もしくは抗原結合性フラグメントを含むかまたはそれを送達する組成物を、免疫チェックポイント阻害剤を含む組成物を投与された対象または投与される予定の対象に、対象が両方による処置を受けるように投与する工程を含む方法を提供する。いくつかの態様において、免疫チェックポイント阻害剤は、PD-1シグナル伝達を阻害する剤である。いくつかの態様において、PD-1シグナル伝達を阻害する剤は抗PD-1抗体である。いくつかの態様において、抗PD-1抗体は、ニボルマブ、ペンプロリズマブ、アテゾリズマブ、デュルバルマブまたはアベルマブである。

20

【0029】

いくつかの態様において、本開示は、治療的処置を必要とする対象の治療的処置のための抗4-1BB抗体またはその抗原結合性フラグメントの用量を決定する方法を提供する。いくつかの態様において、そのような方法は、(i) 対象由来の生物学的試料における分泌IFN-ガンマの測定値を用意または取得する工程であって、該対象が、ある量の本願抗4-1BB抗体もしくは抗原結合性フラグメントを含むかまたはそれを送達する組成物を投与されている、工程と、(ii) 前記分泌IFN-ガンマの測定値を基準値と比較する工程とを含み、前記分泌IFN-ガンマの測定値が基準値より高いかまたは低い場合には、投与される抗4-1BB抗体またはその抗原結合性フラグメントの量を調節することによって、対象の治療的処置のための用量を決定する工程を含む。いくつかの態様において、基準値は、1人もしくは複数の健常対象に由来する値、1人もしくは複数のがんと診断された対象に由来する値、またはがんリスク予測アルゴリズムに由来する値を含む指標値を含む。いくつかの態様において、生物学的試料は、全血、血漿、または血清の試料である。いくつかの態様において、対象はがんを有するか、またはがんを発症するリスクがある。いくつかの態様において、がんは、膀胱がん、乳がん、子宮頸がん、大腸がん、子宮内膜がん、食道がん、ファロピウス管がん、胆嚢がん、胃腸がん、頭頸部がん、血液がん、咽頭がん、肝がん、肺がん、リンパ腫、黒色腫、中皮腫、卵巣がん、原発性腹膜がん、唾液腺がん、肉腫、胃がん、甲状腺がん、肺がん、および前立腺がんから選択される。

30

【0030】

40

いくつかの態様において、本開示は、インビボまたはインビトロで細胞によるIFN- の分泌を増加させるための方法であって、細胞を本明細書に記載の抗4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントと接触させる工程を含む方法を提供する。

【0031】

いくつかの態様において、本開示は、活性化T細胞をエクスピボで増殖させるかまたは単離する方法であって、T細胞の集団を本明細書に記載の抗4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントと接触させることによって、活性化T細胞の増殖を増加させる工程を含む方法を提供する。

50

【0032】

いくつかの態様において、本開示は、抗原特異的活性化T細胞を単離するための方法であって、(a) 培地中の末梢血単核球(PBMC)を関心対象のエピトープのペプチドおよびL-2と共に培養する工程、(b) 関心対象のエピトープのペプチドを加えることによって、培養細胞における4-1BB発現を誘導する工程、(c) 培養細胞を本明細書に記載の抗4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントで被覆された表面と接触させる工程であって、4-1BBを発現する培養細胞が前記被覆表面に付着する、工程、ならびに(d) 接着していない細胞を除去することによって、抗原特異的活性化T細胞を単離する工程のうちの1つまたは複数の工程を含む方法を提供する。いくつかの態様において、活性化T細胞はCD8⁺ T細胞である。

10

【0033】

いくつかの態様において、本開示は、がんの処置または予防を必要とする対象におけるがんを処置または予防するための方法であって、本明細書に記載の方法のいずれかによって生成させた活性化T細胞の治療有効量を含む組成物を対象に投与する工程を含む方法を提供する。いくつかの態様において、がんは、膀胱がん、乳がん、子宮頸がん、大腸がん、子宮内膜がん、食道がん、ファロピウス管がん、胆嚢がん、胃腸がん、頭頸部がん、血液がん、咽頭がん、肝がん、肺がん、リンパ腫、黒色腫、中皮腫、卵巣がん、原発性腹膜がん、唾液腺がん、肉腫、胃がん、甲状腺がん、脾がん、および前立腺がんから選択される。いくつかの態様において、組成物は、少なくとも10⁹、少なくとも10¹⁰細胞、または10¹⁰超の活性化T細胞を含む。いくつかの態様において、活性化T細胞はCD8⁺ T細胞である。

20

【0034】

特に、本明細書に記載の抗ヒト4-1BB抗体および/もしくはそれらのフラグメントならびに/またはそれらを含む組成物を特徴づけるための技術も提供される。いくつかの態様では、AML細胞(例えばHL60)に結合する抗ヒト4-1BB抗体および/もしくはそれらのフラグメントならびに/またはそれらを含む組成物を特徴づけるための方法が提供される。いくつかの態様では、ELISA、免疫組織化学、Biacore結合アッセイ、質量分析、等電点電気泳動(IEF)クロマトグラフィーおよび/またはウェスタンプロットによって、抗ヒト4-1BB抗体および/もしくはそれらのフラグメントならびに/またはそれらを含む組成物を特徴づけるための方法が提供される。

30

【0035】

本開示は、本明細書に記載の抗ヒト4-1BB抗体および/またはそれらのフラグメントならびに/または該抗体もしくはそれらのフラグメントを含有する組成物の製作または作製に関係するさまざまな技術を提供する。

【0036】

本願において「約」および「およそ」という用語は同義語として使用される。本明細書における刊行物、特許または特許出願への言及はいずれも、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。本願において使用される数字はいずれも、約/およそが付加されていても付加されていなくても、関連技術分野の当業者が認識する通常の変動をいずれも包含するものとする。

40

【0037】

[本発明1001]

(a) SEQ ID NO:5の配列を含む重鎖CDR1、SEQ ID NO:6の配列を含む重鎖CDR2、およびSEQ ID NO:7または8の配列を含む重鎖CDR3、ならびに

(b) SEQ ID NO:1の配列を含む軽鎖CDR1、SEQ ID NO:2の配列を含む軽鎖CDR2、およびSEQ ID NO:4の配列を含む軽鎖CDR3

を含む、抗4-1BB抗体またはその抗原結合性フラグメント。

[本発明1002]

(a) SEQ ID NO:16もしくは17の配列を含む重鎖フレームワーク1(FR1)領域、および/または

50

(b) SEQ ID NO:18～20のいずれか一つの配列を含む重鎖フレームワーク3(FR3)領域を含む、本発明1001の抗4-1BB抗体または抗原結合性フラグメント。

[本発明1003]

(a) SEQ ID NO:11～14から選択される配列と少なくとも98%同一な配列を含む重鎖可変ドメイン、

(b) SEQ ID NO:10の配列と少なくとも98%同一な配列を含む軽鎖可変ドメイン、または

(c) SEQ ID NO:11～14から選択される配列と少なくとも98%同一な配列を含む重鎖可変ドメイン、およびSEQ ID NO:10の配列と少なくとも98%同一な配列を含む軽鎖可変ドメイン

のいずれか一つを含む、本発明1001または1002の抗4-1BB抗体または抗原結合性フラグメント。

[本発明1004]

(a) SEQ ID NO:11～14から選択される配列を含む重鎖可変ドメイン、

(b) SEQ ID NO:10の配列を含む軽鎖可変ドメイン、または

(c) SEQ ID NO:11～14から選択される配列を含む重鎖可変ドメイン、およびSEQ ID NO:10の配列を含む軽鎖可変ドメイン

のいずれか一つを含む、本発明1001～1003のいずれかの抗4-1BB抗体または抗原結合性フラグメント。

[本発明1005]

ヒト4-1BB分子に対して $1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-12}$ Mの結合アフィニティー(K_D)を有する、本発明1001～1004のいずれかの抗4-1BB抗体または抗原結合性フラグメント。

[本発明1006]

ヒト4-1BBポリペプチドの細胞外ドメイン内のエピトープに結合する、本発明1001～1005のいずれかの抗4-1BB抗体または抗原結合性フラグメント。

[本発明1007]

ヒト4-1BBの細胞外ドメイン内のエピトープへの結合が、SEQ ID NO:44の位置N30、D38、N39およびR41における1つまたは複数の変異によって抑制される、本発明1006の抗4-1BB抗体または抗原結合性フラグメント。

[本発明1008]

イヌ4-1BBポリペプチドに結合しないかまたは弱く結合する、本発明1001～1007のいずれかの抗4-1BB抗体または抗原結合性フラグメント。

[本発明1009]

ヒト化抗体であるかまたはヒト化抗体を含む、本発明1001～1008のいずれかの抗4-1BB抗体または抗原結合性フラグメント。

[本発明1010]

抗体が、IgG1またはその変種、IgG2またはその変種、IgG4またはその変種、IgAまたはその変種、IgEまたはその変種、IgMまたはその変種、およびIgDまたはその変種から選択される免疫グロブリン定常ドメインを含む、本発明1001～1009のいずれかの抗4-1BB抗体または抗原結合性フラグメント。

[本発明1011]

抗体がヒトIgG1であるかまたはヒトIgG1を含む、本発明1001～1010のいずれかの抗4-1BB抗体または抗原結合性フラグメント。

[本発明1012]

IgG1がSEQ ID NO:22もしくは23と少なくとも95%同一な配列であるか、またはSEQ ID NO:22もしくは23と少なくとも95%同一な配列を含む、本発明1011の抗4-1BB抗体または抗原結合性フラグメント。

[本発明1013]

モノクローナル抗体である、本発明1001～1012のいずれかの抗4-1BB抗体または抗原結合性フラグメント。

10

20

30

40

50

[本発明1014]

抗体フラグメントが、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')2フラグメント、Fvフラグメント、ジスルフィド結合したFvフラグメント、scFvフラグメント、単一ドメイン抗体、ヒューマボディ（humabody）、ナノボディまたはダイアボディである、本発明1001～1010のいずれかの抗4-1BB抗体または抗原結合性フラグメント。

[本発明1015]

本発明1001～1014のいずれかの抗4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントをコードする、核酸分子。

[本発明1016]

本発明1015の核酸分子を含む、組換えベクター。

10

[本発明1017]

本発明1016の組換えベクターおよび/または本発明1015の核酸分子を含む、宿主細胞。

[本発明1018]

細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞、または哺乳動物細胞から選択される、本発明1017の宿主細胞。

[本発明1019]

大腸菌（*E. coli*）、*P. pastoris*）、Sf9、COS、HEK293、CHO、および哺乳動物リンパ球からなる群より選択される、本発明1018の宿主細胞。

[本発明1020]

(a) 本発明1001～1014のいずれかの抗4-1BB抗体もしくは抗原結合性フラグメント、本発明1016の核酸分子、本発明1017の組換えベクター、または本発明1017の宿主細胞と、

20

(b) 薬学的に許容される担体と

を含む、薬学的組成物。

[本発明1021]

本発明1001～1014のいずれかの抗4-1BB抗体もしくは抗原結合性フラグメント、本発明1015の核酸、または本発明1016の組換えベクターを含むかまたはそれを送達する組成物を、対象に投与する工程

を含む、処置を必要とする対象を処置する方法。

[本発明1022]

本発明1001～1014のいずれかの抗4-1BB抗体もしくは抗原結合性フラグメント、本発明1015の核酸、または本発明1016の組換えベクターを含むかまたはそれを送達する組成物を、対象に投与する工程

30

を含む、免疫応答の誘導を必要とする対象において免疫応答を誘導する方法。

[本発明1023]

本発明1001～1014のいずれかの抗4-1BB抗体もしくは抗原結合性フラグメント、本発明1015の核酸、または本発明1016の組換えベクターを含むまたはそれを送達する組成物を、対象に投与する工程

を含む、免疫応答の強化または免疫細胞の活性の増加を必要とする対象において免疫応答を強化するかまたは免疫細胞の活性を増加させる方法。

[本発明1024]

40

対象ががんを有するか、またはがんを発症するリスクがある、本発明1021～1023のいずれかの方法。

[本発明1025]

がんが、膀胱がん、乳がん、子宮頸がん、大腸がん、子宮内膜がん、食道がん、ファロピウス管がん、胆嚢がん、胃腸がん、頭頸部がん、血液がん、咽頭がん、肝がん、肺がん、リンパ腫、黒色腫、中皮腫、卵巣がん、原発性腹膜がん、唾液腺がん、肉腫、胃がん、甲状腺がん、膵がん、および前立腺がんから選択される、本発明1024の方法。

[本発明1026]

対象が、両方による処置を受けるように、電離放射線、化学療法剤、抗体剤、および細胞ベースの治療から選択される1種または複数種の追加抗がん治療を施されたかまたは施

50

される予定である、本発明1021～1025のいずれかの方法。

[本発明1027]

1種または複数種の追加抗がん治療が、免疫チェックポイント阻害剤、IL-12、GM-CSF、抗CD4剤、シスプラチニン、フルオロウラシル、ドキソルビシン、イリノテカン、パクリタキセル、またはシクロホスファミドを含む、本発明1026の方法。

[本発明1028]

対象が、両方による処置を受けるように、免疫チェックポイント阻害剤を投与されたかまたは投与される予定である、本発明1021～1025のいずれかの方法。

[本発明1029]

免疫チェックポイント阻害剤がPD-1シグナル伝達を阻害する剤である、本発明1027または1028の方法。

10

[本発明1030]

PD-1シグナル伝達を阻害する剤がPD-1抗体である、本発明1029の方法。

[本発明1031]

治療的処置を必要とする対象の治療的処置のための抗4-1BB抗体またはその抗原結合性フラグメントの用量を決定する方法であって、

(a) 対象由来の生物学的試料における分泌IFN-ガンマの測定値を用意または取得する工程であって、該対象が、ある量の本発明1001～1014のいずれかの抗4-1BB抗体もしくはその抗原結合性フラグメントを含むかまたはそれを送達する組成物を投与されている、工程と、

20

(b) 前記分泌IFN-ガンマの測定値を基準値と比較する工程とを含み、

前記分泌IFN-ガンマの測定値が基準値より高いかまたは低い場合には、投与される抗4-1BB抗体またはその抗原結合性フラグメントの量を調節することによって、対象の治療的処置のための用量を決定する、前記方法。

[本発明1032]

基準値が、1人もしくは複数の健常対象に由来する値、1人もしくは複数のがんと診断された対象に由来する値、またはがんリスク予測アルゴリズムに由来する値を含む指標値を含む、本発明1031の方法。

[本発明1033]

30

生物学的試料が、全血、血漿、または血清の試料である、本発明1031または1032の方法。

[本発明1034]

対象ががんを有するか、またはがんを発症するリスクがある、本発明1031～1033のいずれかの方法。

[本発明1035]

がんが、膀胱がん、乳がん、子宮頸がん、大腸がん、子宮内膜がん、食道がん、ファロピウス管がん、胆嚢がん、胃腸がん、頭頸部がん、血液がん、咽頭がん、肝がん、肺がん、リンパ腫、黒色腫、中皮腫、卵巣がん、原発性腹膜がん、唾液腺がん、肉腫、胃がん、甲状腺がん、膵がん、および前立腺がんから選択される、本発明1034の方法。

40

[本発明1036]

細胞を本発明1001～1014のいずれかの抗4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントと接触させる工程を含む、インビオまたはインビトロで細胞によるIFN- の分泌を増加させるための方法。

[本発明1037]

T細胞の集団を本発明1001～1014のいずれかの抗4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントと接触させることによって、活性化T細胞の増殖を増加させる工程を含む、活性化T細胞をエクスピオで増殖させるかまたは単離する方法。

[本発明1038]

(a) 培地中の末梢血単核球(PBMC)を関心対象のエピトープのペプチドおよびIL-2と

50

共に培養する工程、

(b) 関心対象のエピトープのペプチドを加えることによって、培養細胞における4-1BB発現を誘導する工程、

(c) 培養細胞を本発明1001～1014のいずれかの抗4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントで被覆された表面と接触させる工程であって、4-1BBを発現する培養細胞が前記被覆表面に付着する、工程、ならびに

(d) 接着していない細胞を除去することによって、抗原特異的活性化T細胞を単離する工程

を含む、抗原特異的活性化T細胞を単離するための方法。

[本発明1039]

10

活性化T細胞がCD8⁺ T細胞である、本発明1037または1038の方法。

[本発明1040]

本発明1037～1039のいずれかの方法によって生成させた活性化T細胞の治療有効量を対象に投与する工程を含む、がんの処置または予防を必要とする対象においてがんを処置または予防するための方法。

本発明の他の特徴、目的および利点は、以下の詳細な説明から明白である。ただし、以下の詳細な説明は、本発明の態様を示してはいるものの、単なる例示であって、限定ではないと理解すべきである。本発明の範囲内のさまざまな改変および修飾は、以下の詳細な説明から、当業者には明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

20

【0038】

本願に含まれる図面は以下の図から構成されるが、その目的は例示であって、限定ではない。本開示の上記のおよび他の目的、局面、特徴および利点は、以下の説明を添付の図面と合わせて参照することによって、より明白になり、よりよく理解されるであろう。

【0039】

【図1】図1Aは、ヒト4-1BB細胞外ドメイン(ECD)コンストラクトを図示している。一番上は完全長4-1BB ECD(167アミノ酸)の略図であり、その下に、4-1BB ECDのさまざまなフラグメント: R1(1～55aa)、R2(56～110aa)、R3(110～167aa)、R1.1(1～45aa)、R1.2(1～35aa)、R1.3(11～55aa)、R1.4(21～55aa)、R1.5(1～25aa)およびR1.6(1～30aa)が示されている。これらの4-1BB ECDコンストラクトのそれぞれをGSTと融合した。図1Bは、図1Aに記載する4-1BB ECD融合コンストラクトへの例示的ヒト化抗4-1BB抗体の結合を示すウェスタンプロットである。図のとおり、例示的ヒト化抗4-1BB抗体は、完全長4-1BB ECD融合ポリペプチドおよびR1融合ポリペプチドには結合するが、R2融合ポリペプチドやR3融合ポリペプチドには結合しない。分子サイズマーカーは左側にkDaの単位で示されている。

30

【図2】図2Aは、4-1BB ECD融合コンストラクトを発現する細胞からの全細胞抽出物のSDS-PAGEゲルである。図2Aにおける上記融合コンストラクトは、1mM IPTGで誘導した大腸菌BL21細胞内で発現させ、全細胞抽出物を12%SDS-PAGEで分離した。図のとおり、融合コンストラクト(ECD、R1、R1.1、R1.2、R1.3、R1.4、R1.5およびR1.6)はすべてロバストに発現する。図2Bは、例示的ヒト化抗4-1BB抗体が、完全長4-1BB ECD融合ポリペプチドならびにR1.1、R1.2、R1.3およびR1.6融合ポリペプチドには結合するが、R1.4融合ポリペプチドやR1.5融合ポリペプチドには結合しないことを示すウェスタンプロットである。免疫プロットは例示的抗ヒト4-1BB抗体を使って行った。分子サイズマーカーは左側にkDaの単位で示されている。

40

【図3】図3は、ELISAで測定される組換えヒト4-1BB抗原に対する抗4-1BBモノクローナル抗体の結合アフィニティーを図示している。OD_{450nm}値をy軸上に表し、増加する抗4-1BB抗体の濃度(単位μg/ml)をx軸に沿って表す。BBK-4(円)はマウス抗ヒト4-1BB抗体であり、94G1(四角形)、94K(上向きの三角形)、94KV(菱形)、94KVT(星印)およびEU101(下向きの三角形)は例示的ヒト化変種抗4-1BB抗体である。

【図4】図4は、4-1BB発現Jurkat T細胞(Jurkat 8-1)への抗4-1BBモノクローナル抗体

50

の結合を図示している。平均蛍光強度 (MFI) 値をy軸上に表し、抗体のLog10濃度 (単位 $\mu\text{g}/\text{ml}$) をx軸に沿って表す。BBK-4 (円) はマウス抗ヒト4-1BB抗体であり、94G1 (四角形)、94K (上向きの三角形)、94KV (菱形)、94KVT (星印) およびEU101 (下向きの三角形) は例示的ヒト化変種抗4-1BB抗体である。

【図5】図5は、4-1BBに対する変種抗4-1BB抗体のインピトロ結合アフィニティーを列挙する表である。結合アフィニティーは、表面プラズモン共鳴 (SPR、Biacore 3000) を使って測定した。94G1およびEU101は例示的ヒト化変種抗4-1BB抗体である。

【図6】図6は、4-1BB発現CD8⁺ T細胞への抗4-1BBモノクローナル抗体の結合を図示している。CD8⁺ T細胞をヒトPBMCから単離し、抗CD3抗体によって2日間活性化した。4-1BB-PEは例示的な市販抗4-1BB抗体であり、BBK-4はマウス抗ヒト4-1BB抗体であり、94G1、94K、94KV、94KVTおよびEU101は例示的ヒト化変種抗4-1BB抗体である。下のグラフは、上のFACSデータで各抗体について示した値を反映している。
10

【図7】図7は、抗4-1BB抗体で処理されたCD8⁺ T細胞のインピトロ増殖を定量化しているグラフである。増殖性CD8⁺ T細胞を、抗体なし、ヒトIgG単独、BBK-4、または例示的ヒト化変種抗4-1BB抗体: 94G1、94K、94KV、94KVTおよびEU101による処理に付し、増殖(すなわち代謝活性)細胞を染色するためにWST-1(水溶性テトラゾリウム塩)で処理した。
。

【図8】図8は、抗4-1BB抗体で処理されたCD8⁺ T細胞によるインピトロIFN- γ 分泌を定量化しているグラフである。CD8⁺ T細胞をヒトPBMCから単離し、抗体なし、ヒトIgG単独、または1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗4-1BB抗体: BBK-4、94G1、94K、94KV、94KVTおよびEU101による処理に付した。1日目、3日目および5日目にIFN- γ 分泌を評価した。
20

【図9】図9は、(A) CD4⁺および(B) CD8⁺におけるIFN- γ 分泌を図示するグラフである。健常ドナーのPBMCから単離した後、PBMC中に存在する活性化T細胞を、RPMI-1640+2%FBS培地で24時間休止させ、その休止PBMCを鉄ビーズに取り付けた抗CD4抗体または抗CD8抗体で処理し、MACS磁気分離装置を使ってCD4⁺細胞またはCD8⁺細胞を単離した。単離されたCD4⁺ T細胞またはCD8⁺ T細胞を、4-1BB発現を誘導するためにT細胞活性化因子である抗CD3で処理し、さまざまな濃度のEU101(0.5、1.0、2.5および5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)または対照ヒトIgG(5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)で3日間処理した。3日後に、細胞を除いた培養培地を得て、培養培地中のヒトIFN- γ の蛍光をELISA(ebioscience)で評価した。結果を、IFN- γ ELISAキットに用意されている標準曲線と比較した。
30

【図10A】図10Aは、例示的抗ヒト4-1BB抗体BBK4、94G1、94KVTおよびEU101の抗体依存性細胞傷害(ADCC)を図示するグラフである。

【図10B】図10Bは、例示的抗ヒト4-1BB抗体BBK4、94G1およびEU101の補体依存性細胞傷害(CDC)を図示するグラフである。

【図11】図11は、大腸がん腫瘍細胞(HT29)をヒト化マウスに皮下注射し、腫瘍サイズが100~200mm³に達したら、例示的抗ヒト4-1BB抗体(EU101)を、体重1kgあたり1.0mg、5.0mgおよび10.0mgの用量で5日ごとに3回、マウスに静脈内投与した後の腫瘍サイズとして測定される、例示的抗ヒト4-1BB抗体(EU101)のインピボ抗がん効果を、濃度ごとに示している(代表的データ)。

【図12】図12は、例示的抗ヒト4-1BB抗体(EU101)および例示的抗PD-1抗体(キイトルーダ(Keytruda)、「KD」)の抗がん効果を、濃度ごとに示している。抗がん効果は、ヒト化マウスへの大腸がん腫瘍細胞(HT29)の皮下注射および抗体処置後の腫瘍サイズとして測定した。腫瘍サイズが100~150mm³に達したら、マウスを、体重1kgあたり5.0mgおよび10.0mgの用量で5日ごとに3回の腹腔内注射により、例示的抗ヒト4-1BB抗体(EU101)または例示的抗PD-1抗体(キイトルーダ)で処置した。
40

【図13】図13は、例示的抗ヒト4-1BB抗体(EU101)および例示的抗PD-1抗体(キイトルーダ)の個別処置および併用治療の同等な抗がん効果を示している。抗がん効果は、大腸がん腫瘍細胞(HT29)をヒト化マウスに皮下注射し、抗体処置を行った後の腫瘍サイズとして測定した。腫瘍サイズが300~450mm³に達したら、例示的抗ヒト4-1BB抗体(EU101)を個別処置用に2.5mpkで投与し、例示的抗PD-1抗体(キイトルーダ)を個別処置用に2.5m
50

pkで投与し、併用治療の場合はEU101、2.5mpk + キイトルーダ、2.5mpkを投与した。投与は、3日ごとに合計3回の、マウスの腹腔内注射によった。

【図14】図14Aは、図13に記載の腫瘍移植ヒト化マウスで、例示的抗ヒト4-1BB抗体（EU101）および例示的抗PD-1抗体（キイトルーダ）による個別処置または併用処置の34日後に、マウス血中または腫瘍組織1g中の循環ヒトCD4⁺ T細胞およびCD8⁺ T細胞の数を示している。腫瘍中のT細胞浸潤リンパ球（T cell infiltrating lymphocyte）（TIL）は、フローサイトメーターを使ってCD4⁺ T細胞およびCD8⁺ T細胞の比（%）を測定して総細胞数の比率（proportional ratios of the total cell numbers）を計算することによって、測定した。細胞をFITC標識CD4抗体、蛍光BV510標識CD8抗体および蛍光APC-cy7標識CD45抗体で染色した後、CD4⁺ T細胞およびCD8⁺ T細胞の比（%）を測定するためにフローサイトメトリーを行い、フローサイトメトリープログラム（ゲーティング）によってヒト血球マーカーCD45陽性細胞を分離した。図14Bは、細胞を蛍光APC-cy7標識CD45、蛍光BV510標識CD8抗体、蛍光FITC標識CD4抗体、蛍光PE標識INF⁻、および蛍光APC標識Foxp3抗体で染色した後に、フローサイトメーターを使ってCD8⁺ INF⁻ T細胞の比とTreg（CD4⁺ Foxp3^{high} T細胞）の比との比率を計算することによって測定される、CD8⁺ INF⁻ T細胞の比あたりのTreg（CD4⁺ Foxp3^{high} T細胞）の比を示している。

【図15】図15Aおよび図15Bは、例示的抗ヒト4-1BB抗体（EU101）および例示的抗PD-1抗体（キイトルーダ）の個別処置および併用処置後の、血清および腫瘍内容液におけるIFN- 分析結果を示している。図15Aおよび図15Bに示す処置群のすべてで行った解剖の後、10 μ lの血清および100 μ lの腫瘍内容液を、ヒトIFN- ELISAキットおよびヒトTGF- ELIS Aキットで分析した。

【図16】図16Aは、例示的抗ヒト4-1BB抗体（EU101）によるパニング前に測定された抗原特異的CD8⁺ T細胞比である（4-1BB⁺ CD8⁺ T細胞の比：43.2%、CD8⁺ T細胞の比：58.6%）。図16Bは、例示的抗ヒト4-1BB抗体（EU101）によるパニング後に測定された抗原特異的CD8⁺ T細胞比である（pCMV⁺ CD8⁺ T細胞の比：60.0%、CD8⁺ T細胞の比：79.3%）。

【発明を実施するための形態】

【0040】

特定の定義

以下の説明では、組換えDNAおよび免疫学において使用されるいくつかの用語が、広く利用される。明細書および特許請求の範囲は、そのような用語に与えられる範囲を含め、より明確にかつ一貫して理解されるように、以下の定義が与えられる。

【0041】

約: 値に関して本明細書において使用する場合、「約」という用語は、言及された値との関連において類似する値を指す。一般に、ある文脈において「約」が包含する妥当な変動の程度は、その文脈に精通している当業者には理解されるであろう。例えばいくつかの態様において、「約」という用語は、言及された値の25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%以内またはそれ未満以内の値の範囲を包含しうる。

【0042】

投与: 本明細書において使用する場合、「投与」という用語は、典型的には、組成物である剤または組成物に含まれる剤の送達を達成するための、対象または系への組成物の投与を指す。当業者は、適当な状況において、対象（例えばヒト）への投与に利用することができるさまざまな経路を知っているであろう。例えばいくつかの態様において、投与は点眼、経口、非経口、外用などができる。いくつかの特定態様において、投与は、気管支（例: 気管支点滴によるもの）、バッカル、皮膚（例えば皮膚への外用、皮内、皮下（interdermal）、経皮などのうちの1つまたは複数であるか、またはそれらを含みうる）、経腸、動脈内、皮内、胃内、髄内、筋肉内、鼻腔内、腹腔内、髄腔内、静脈内、室内（intraventricular）、具体的な器官内（例えば肝臓内）、粘膜、経鼻、経口、直腸、皮下、舌下、外用、気管（例: 気管内点滴によるもの）、腔、硝子体などでありうる。い

10

20

30

40

50

くつかの態様において、投与は単回投与だけを伴いうる。いくつかの態様において、投与は固定された投与回数の適用を伴いうる。いくつかの態様において、投与は、間欠的（例：時間を空けて複数回）および/または周期的（同じ時間を隔てた個々の投与）投与である投与を伴いうる。いくつかの態様において、投与は、少なくとも選択されたある期間にわたる連續的投与（例：灌流）を伴いうる。

【0043】

アフィニティー：当技術分野では公知であるとおり、「アフィニティー」は、ある特定リガンドがそのパートナーに結合する堅固さの尺度である。アフィニティーはさまざまな方法で測定することができる。いくつかの態様において、アフィニティーは定量的アッセイによって測定される。いくつかのそのような態様では、結合パートナー濃度を、生理的条件を模倣するために、リガンド濃度過剰に固定することができる。上記に代えて、または上記に加えて、いくつかの態様では、結合パートナー濃度および/またはリガンド濃度を変化させることができる。いくつかのそのような態様では、アフィニティーを、同等な条件下（例：濃度）で、基準と比較することができる。

10

【0044】

アゴニスト：その存在、レベル、程度、タイプまたは形態が、別の剤（すなわちアゴナイズされる剤）のレベルまたは活性の増加と相關する剤条件または事象を指すために、「アゴニスト」という用語を使用しうることは、当業者には理解されるであろう。一般にアゴニストは、例えば小分子、ポリペプチド、核酸、糖質、脂質、金属、および/または関連する活性化活性を示す他の任意の実体など、任意の化合物クラスの剤であるか、それを含みうる。いくつかの態様において、アゴニストは直接でありうる（この場合、アゴニストはその影響をそのターゲットに直接発揮する）。いくつかの態様において、アゴニストは間接的でありうる（この場合、アゴニストは、ターゲットのレベルまたは活性が変化するように、そのターゲットへの結合以外の方法によって、例えばターゲットの制御因子と相互作用することによって、その影響を発揮する）。

20

【0045】

動物：本明細書において使用する場合、動物界の任意のメンバーを指す。いくつかの態様において、「動物」とはヒトを指し、その性別および発生段階は問わない。いくつかの態様において、「動物」とは非ヒト動物を指し、その発生段階は問わない。特定の態様において、非ヒト動物は哺乳動物（例：齧歯類、マウス、ラット、ウサギ、サル、イヌ、ネコ、ヒツジ、ウシ、靈長類および/またはブタ）である。いくつかの態様において、動物には、哺乳動物、鳥類、爬虫類、両生類、魚類、昆虫および/または虫（worm）が含まれるが、それらに限定されるわけではない。いくつかの態様において、動物は、トランスジェニック動物、遺伝子改変動物および/またはクローンでありうる。

30

【0046】

アンタゴニスト：本明細書において使用する「アンタゴニスト」という用語が、その存在、レベル、程度、タイプまたは形態が別の剤（すなわち阻害される剤またはターゲット）のレベルまたは活性の減少と相關する剤条件または事象を指すために使用されることは、当業者には理解されるであろう。一般にアンタゴニストは、例えば小分子、ポリペプチド、核酸、糖質、脂質、金属、および/または関連する阻害活性を示す他の任意の実体など、任意の化合物クラスの剤であるか、それを含みうる。いくつかの態様において、アンタゴニストは直接でありうる（この場合、アンタゴニストはその影響をそのターゲットに直接発揮する）。いくつかの態様において、アンタゴニストは間接的でありうる（この場合、アンタゴニストは、ターゲットのレベルまたは活性が変化するように、そのターゲットへの結合以外の方法によって、例えばターゲットの制御因子と相互作用することによって、その影響を発揮する）。

40

【0047】

抗体：本明細書において使用する場合、「抗体」という用語は、特定ターゲット抗原への特異的結合を付与するのに十分な標準的（canonical）免疫グロブリン配列要素を含むポリペプチドを指す。当技術分野において公知であるとおり、自然界で生産されるインタ

50

クトな抗体は、2本の同一重鎖ポリペプチド（それぞれ約50kD）および2本の同一軽鎖ポリペプチド（それぞれ約25kD）から構成され、それらが互いに会合して一般に「Y字」構造と呼ばれるものになる、およそ150kDの四量体の物質である。各重鎖は、少なくとも4つのドメイン（それぞれ約110アミノ酸長）、すなわちアミノ末端の可変（VH）ドメイン（Y構造の先端部に位置する）とそれに続く3つの定常ドメイン：CH1、CH2およびカルボキシ末端のCH3（Yの軸部分の基部に位置する）とから構成される。「スイッチ」と呼ばれる短い領域が、重鎖の可変領域と定常領域とを接続している。「ヒンジ」は、CH2ドメインおよびCH3ドメインを抗体の残りの部分に接続している。インタクトな抗体では、このヒンジ領域中の2つのジスルフィド結合が2本の重鎖ポリペプチドを互いに接続している。各軽鎖は、2つのドメイン、すなわち、もう1つの「スイッチ」によって互いに分離されたアミノ末端の可変（VL）ドメインと、それに続くカルボキシ末端の定常（CL）ドメインとから構成される。インタクトな抗体四量体は、重鎖と軽鎖が単一のジスルフィド結合によって互いに連結されている2つの重鎖-軽鎖二量体から構成され、他の2つのジスルフィド結合は、これらの二量体が互いに接続されて四量体を形成するように、重鎖ヒンジ領域を互いに接続している。また、天然に生産される抗体は、典型的にはCH2ドメイン上が、グリコシル化されている。天然抗体中の各ドメインは、圧縮された逆平行ベータバレルへと互いに相対してパッケージングされた2つのベータシート（例：3、4または5ストランドのシート）から形成される「免疫グロブリンフォールド」を特徴とする構造を有する。各可変ドメインは、「相補性決定領域」と呼ばれる3つの超可変ループ（CDR1、CDR2およびCDR3）と、いくらか不变である4つの「フレームワーク」領域（FR1、FR2、FR3およびFR4）とを含有する。天然抗体がフォールディングすると、FR領域は、ドメインの構造的フレームワークとなるベータシートを形成し、重鎖と軽鎖の両方からのCDRループ領域は三次元空間で寄せ集められることで、Y構造の先端に位置する単一の超可変抗原結合部位を作り出す。
天然抗体のFc領域は補体系の要素に結合すると共に、例えば細胞傷害性を媒介するエフェクター細胞含むエフェクター細胞上の受容体にも結合する。当技術分野では知られているとおり、Fc受容体に対するFc領域のアフィニティーおよび/または他の結合属性は、グリコシル化または他の修飾によって調整することができる。いくつかの態様において、本発明に従って生産および/または利用される抗体は、グリコシル化されたFcドメイン、例えば修飾されたまたは改変されたそのようなグリコシル化を伴うFcドメインを含む。本発明に関して、特定の態様では、天然抗体に見いだされるように十分な免疫グロブリンドメイン配列を含む任意のポリペプチドまたはポリペプチドの複合体を、そのポリペプチドが天然に生産されたか（例えば抗原に反応する生物によって作成されたか）、組換え工学、化学合成または他の人工系もしくは方法論によって生産されたかを問わず、「抗体」と呼ぶことができ、かつ/または「抗体」として使用することができる。いくつかの態様において、抗体はポリクローナルであり、いくつかの態様において、抗体はモノクローナルである。いくつかの態様において、抗体は、マウス抗体、ウサギ抗体、靈長類抗体またはヒト抗体に特有の定常領域配列を有する。いくつかの態様において、抗体配列要素は、当技術分野において公知であるとおり、ヒト化型、靈長類化型、キメラなどである。さらにまた、本明細書において使用する「抗体」という用語は、適當な態様において（別段の声明がある場合、または文脈上そうでないことが明らかである場合を除き）、抗体の構造的および機能的特徴を代替的表現で利用するための、当技術分野において公知のまたは開発されたコンストラクトまたはフォーマットのいずれをも指すことができる。例えばいくつかの態様において、本発明に従って利用される抗体は、以下から選択されるフォーマット（ただしそれらに限定されるわけではない）をとる：インタクトなIgA、IgG、IgEまたはIgM抗体；二重特異性または多重特異性抗体（例：Zybodies（登録商標）など）；抗体フラグメント、例えばFabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')2フラグメント、Fd'フラグメント、Fdフラグメントおよび単離されたCDRまたはそれらのセット；単鎖Fv；ポリペプチド-Fc融合物；單一ドメイン抗体（例：IgNARまたはそのフラグメントなどのサメ單一ドメイン抗体）；ラクダ科抗体；マスク（masked）抗体（例：Probodies（登録商標））；Small Modular ImmunoPharmaceuticals（「SMIPs（商標）」）；单鎖またはタンデムダイアボディ（Tandem 10 20 30 40 50

dAb (登録商標)) ; ヒューマボディ、VHH; Anticalins (登録商標) ; Nanobodies (登録商標) ミニボディ; BiTE (登録商標) ; アンキリンリピートタンパク質またはDARPINs (登録商標) ; Avimers (登録商標) ; DARTs; TCR様抗体、Adnectins (登録商標) ; Affilins (登録商標) ; Trans-bodies (登録商標) ; Affibodies (登録商標) ; TrimerX (登録商標) ; マイクロプロテイン (MicroProtein) ; Fynomers (登録商標) 、Centyrins (登録商標) ; およびKALBITOR (登録商標) 。いくつかの態様において、抗体は、天然に生産された場合に有するであろう共有結合による修飾 (例: グリカンの付加) を欠いてもよい。いくつかの態様において、抗体は、修飾 (例: グリカン、ペイロード [例: 検出可能部分、治療部分、触媒部分など] または他のペンドント基 [例: ポリエチレングリコールなど] の付加) を含有しうる。

10

【0048】

抗体フラグメント: 本明細書にいう「抗体フラグメント」とは、本明細書に記載する抗体または抗体剤の一部を指し、典型的には、抗原結合部分またはその可変領域を含む部分を指す。抗体フラグメントは任意の手段によって生産されうる。例えばいくつかの態様において、抗体フラグメントは、インタクトな抗体または抗体剤の断片化により、酵素的または化学的に生産することができる。あるいは、いくつかの態様において、抗体フラグメントは組換え的に (すなわち改变された核酸配列の発現によって) 生産することもできる。いくつかの態様において、抗体フラグメントは、全部または一部を合成的に生産することができる。いくつかの態様において、抗体フラグメント (特に抗原結合性抗体フラグメント) は、少なくとも約50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190アミノ酸またはそれ以上、いくつかの態様では少なくとも約200アミノ酸の長さを有しうる。

20

【0049】

結合: 本明細書において使用する「結合」という用語が、典型的には、2つ以上の実体間での非共有結合的会合を指すことは理解されるであろう。「直接的」結合は実体間または部分間の物理的接触を伴い、間接的結合は1つまたは複数の中間実体との物理的接触を介した物理的相互作用を伴う。2つ以上の実体間の結合は、典型的には、例えば相互作用する実体または部分を分離して研究する場合や、より複雑な系を背景として (例えば共有結合または他の形で担体実体と関連付けられた状態で、かつ/または生物学的な系もしくは細胞中で) 研究する場合を含めて、さまざまな背景のいずれにおいても評価することができる。

30

【0050】

がん: 「がん」、「悪性腫瘍」、「新生物」、「腫瘍」および「がん腫」という用語は、本明細書では、相対的に異常な、制御されないおよび/または自律的な成長を示し、その結果、細胞増殖の制御が著しく失われていることを特徴とする異常成長表現型を示す細胞を指すために使用される。いくつかの態様において、腫瘍は、前がん性 (例えば良性) 、悪性、前転移性、転移性および/または非転移性の細胞であるか、それを含みうる。本開示では、その教示内容が特に関連しうる特定のがんを、具体的に特定する。いくつかの態様において、関連がんは固形腫瘍を特徴としうる。いくつかの態様において、関連がんは血液腫瘍を特徴としうる。一般に、当技術分野において公知のさまざまなタイプのがんの例には、例えば白血病、リンパ腫 (ホジキンおよび非ホジキン) 、骨髄腫および骨髄増殖性障害を含む造血器がん; 肉腫、黒色腫、腺腫、固形組織のがん、口、のど、喉頭および肺の扁平上皮がん、肝がん、尿生殖器がん、例えば前立腺がん、子宮頸がん、膀胱がん、子宮がんおよび子宮内膜がん、ならびに腎細胞がん、骨がん、肺がん、皮膚がん、皮膚黒色腫または眼内黒色腫、内分泌系のがん、甲状腺のがん、副甲状腺のがん、頭頸部がん、乳がん、胃腸がんおよび神経系がん、パピローマなどの良性病変などがある。

40

【0051】

CDR: 本明細書において使用する場合、抗体可変領域内の相補性決定領域を指す。重鎖および軽鎖の可変領域のそれぞれには3つのCDRがあり、それらは、可変領域のそれぞれについて、CDR1、CDR2およびCDR3と称されている。「CDRのセット」または「CDRセット」とは

50

、抗原結合能を有する单一可変領域に見いだされる、または抗原結合能を有するコグネイト重鎖および軽鎖可変領域のCDRに見いだされる、3つまたは6つのCDRの集まりを指す。当技術分野ではCDRの境界を画定するためにいくつかのシステムが確立されており（例：Kabat、Chothiaなど）、当業者はこれらのシステム間の相違を認識して、本願に係る発明を理解し実施するためには、CDRの境界を理解することができる。

【0052】

化学療法剤：本明細書において使用する「化学療法剤」という用語は、アポトーシス促進性、細胞分裂阻害性および/または細胞傷害性の剤に関して当技術分野で理解されてい 10
るその意味を有し、例えば特に、望ましくない細胞増殖に関連する1つまたは複数の疾患、障害または状態の処置に利用されかつ/またはそのような処置における使用が推奨されている剤を含む。多くの態様において、化学療法剤はがんの処置に有用である。いくつかの態様において、化学療法剤は、1種または複数種のアルキル化剤、1種または複数種のアントラサイクリン類、1種または複数種の細胞骨格破壊剤（例えばタキサン、メイタンシンおよびそれらの類似体などの微小管標的剤）、1種または複数種のエポチロン、1種または複数種のヒストンデアセチラーゼ阻害剤（HDAC）、1種または複数種のトポイソメラーゼ阻害剤（例：トポイソメラーゼIおよび/またはトポイソメラーゼIIの阻害剤）、1種または複数種のキナーゼ阻害剤、1種または複数種のヌクレオチド類似体またはヌクレオチド前駆体類似体、1種または複数種のペプチド系抗生物質、1種または複数種の白金ベースの剤、1種または複数種のレチノイド、1種または複数種のピンカアルカロイド、および/または以下に挙げるもの（すなわち抗増殖活性を共通して有するもの）のうちの1つまたは複数の1種または複数種の類似体であるか、それを含みうる。いくつかの特定態様において、化学療法剤は、アクチノマイシン、全トランス型レチノイン酸、アウリストチン（Au 20
iristatin）、アザシチジン、アザチオプリン、ブレオマイシン、ボルテゾミブ、カルボプラチニン、カペシタビン、シスプラチニン、クロラムブシル、シクロホスファミド、クルクミン、シタラビン、ダウノルビシン、ドセタキセル、ドキシフルリジン、ドキソルビシン、エピルビシン、エポチロン、エトポシド、フルオロウラシル、ゲムシタビン、ヒドロキシ尿素、イダルビシン、イマチニブ、イリノテカン、メイタンシンおよび/またはその類似体（例えばDM1）、メクロレタミン、メルカプトプリン、メトトレキサート、ミトキサントロン、メイタンシノイド、オキサリプラチニン、パクリタキセル、ペメトレキセド、テニポシド、チオグアニン、トポテカン、バルルビシン、ビンプラスチニン、ビンクリスチニン、ビンデシン、ビノレルビン、およびそれらの組み合わせの1つまたは複数であるか、それを含みうる。いくつかの態様では、化学療法剤を抗体-薬物コンジュゲートとの関連において利用しうる。いくつかの態様において、化学療法剤は、hLL1-ドキソルビシン、hRS 30
7-SN-38、hMN-14-SN-38、hLL2-SN-38、hA20-SN-38、hPAM4-SN-38、hLL1-SN-38、hRS7-Pro-2-P-Dox、hMN-14-Pro-2-P-Dox、hLL2-Pro-2-P-Dox、hA20-Pro-2-P-Dox、hPAM4-Pro-2-P-Dox、hLL1-Pro-2-P-Dox、P4/D10-ドキソルビシン、ゲムツズマブオゾガマイシン、ブレンツキシマブベドチン、トラスツズマブエムタンシン、イノツズマブオゾガマイシン、グレンバツモマブ（glembatumomab）ベドチン、SAR3419、SAR566658、B11B015、BT062、SGN-75、SGN-CD19A、AMG-172、AMG-595、BAY-94-9343、ASG-5ME、ASG-22ME、ASG-16M8F、MDX-1 40
203、MLN-0264、抗PSMA ADC、RG-7450、RG-7458、RG-7593、RG-7596、RG-7598、RG-7599、RG-7600、RG-7636、ABT-414、IMGN-853、IMGN-529、ボルセツズマブマホドチン、およびロルボツズマブメルタンシンからなる群より選択される抗体-薬物コンジュゲートに見いだされるものである。

【0053】

併用治療：本明細書において使用する場合、「併用治療」という用語は、対象が2種以上の治療レジメン（例えば2種以上の治療剤）に同時に曝される状況を指す。いくつかの態様において、前記2種以上の治療レジメンを同時に施しうる。いくつかの態様において、前記2種以上の治療レジメンを逐次的に施しうる（例えば、第2レジメンを何らかの用量で施す前に第1レジメンを施す）。いくつかの態様において、前記2種以上の治療レジメンを、オーバーラップした投与レジメンで施す。いくつかの態様において、併用治療の施行は 50

、1種または複数種の治療剤または治療モダリティを、他の剤またはモダリティを受ける対象に施することを伴いうる。

【0054】

に対応する:本明細書において、「に対応する」という用語は、化合物または組成物中の構造要素の位置/実体を、適当な基準化合物または基準組成物との比較によって指定するために使用されうる。例えはいくつかの態様において、ポリマー中の単量体残基(例:ポリペプチド中のアミノ酸残基またはポリヌクレオチド中の核酸残基)は、適当な基準ポリマー中の残基「に対応する」と同定しうる。例えは、説明を簡単にするために、ポリペプチドの中の残基は、しばしば、基準関連ポリペプチドに基づく標準的ナンバリングシステムを使って指定されるので、例えは190番目の残基「に対応する」アミノ酸が、実際に特定アミノ酸鎖中の第190アミノ酸である必要はなく、むしろ基準ポリペプチド中の190番目に見いだされる残基に対応することは、当業者には理解されるであろう。また、「対応する」アミノ酸を同定する方法は当業者には容易に理解される。例えは当業者は、本開示に従ってポリペプチドおよび/または核酸中の「対応する」残基を同定するために利用することができる、例えはBLAST、CS-BLAST、CUSAW++、DIAMOND、FASTA、GGSEARCH/GLSEARCH、Genoogle、HMMER、HHpred/HHsearch、IDF、Infernal、KLAST、USEARCH、parasail、PSI-BLAST、PSI-Search、ScalaBLAST、Sequillab、SAM、SSEARCH、SWAPHI、SWAPHI-LS、SWIMMまたはSWIPEなどのソフトウェアプログラムを含めて、さまざまな配列アラインメント戦略を知っているだろう。

【0055】

改変された(engineered):一般に「改変された」という用語は、人間の手によって操作されたという局面を指す。例えはポリペプチドは、ポリペプチド配列が人間の手によって操作されると、「改変された」とみなされる。例えは本発明のいくつかの態様において、改変されたポリペプチドは、人間の手によって基準ポリペプチド配列中に導入された1つまたは複数のアミノ酸変異、欠失および/または挿入を含む配列を含む。同様に、細胞または生物は、その遺伝情報が変化するように操作されている(例えは以前は存在しなかつた新しい遺伝物質が、例えは形質転換、交配、体細胞交雑、トランスフェクション、形質導入または他の機序によって導入されているか、以前に存在した遺伝物質が、例えは置換もしくは欠失変異によって、または交配プロトコールによって、改変されまたは除去されている)のであれば、「改変された」とみなされる。当技術分野における慣行どおり、そして当業者には理解されるとおり、改変されたポリペプチドまたは細胞の誘導体および/または子孫も、たとえ実際の操作は先の実体に対して行われたのであっても、依然として「改変された」と呼ばれる。

【0056】

エピトープ:本明細書において使用する場合、免疫グロブリン(例:抗体または受容体)結合構成要素によって特異的に認識される任意の部分を包含する。いくつかの態様において、エピトープは、抗原上の複数の原子または化学基から構成される。いくつかの態様において、そのような原子または化学基は、抗原が適切な三次元コンフォメーションをとったときに、表面に露出する。いくつかの態様において、そのような原子または化学基は、抗原がそのようなコンフォメーションをとったときに、空間において互いに物理的に近い。いくつかの態様において、少なくともいくつかのそのような原子または化学基は、抗原が代替的コンフォメーションをとったとき(例えは線状になったとき)に、物理的に互いに離れている。

【0057】

エクスピボ:本明細書において使用する場合、多細胞生物を背景とせずに起こる生物学的事象を指す。例えは細胞ベースの系との関連では、この用語は、人工的環境において細胞集団内で起こる事象(例:細胞増殖、サイトカイン分泌など)を指すために使用されうる。

【0058】

フレームワークまたはフレームワーク領域:本明細書において使用する場合、可変領域

10

20

30

40

50

のうちのCDRを除いた配列を指す。CDR配列は異なるシステムによって決定することができる、同様にフレームワーク配列も、相応に異なる解釈の対象となる。6つのCDRが、重鎖および軽鎖上のフレームワーク領域を、各鎖上の4つのサブ領域（FR1、FR2、FR3およびFR4）に分割する。ここで、CDR1はFR1とFR2の間に位置し、CDR2はFR2とFR3の間に位置し、CDR3はFR3とFR4の間に位置する。特定サブ領域をFR1、FR2、FR3またはFR4と指定しない場合、フレームワーク領域とは、他でもいわれるとおり、1本の天然免疫グロブリン鎖の可変領域内のFRを合わせたものを表す。本明細書においてFR（a FR）とは、4つのサブ領域のうちの1つを表し、例えばFR1は、可変領域のアミノ末端に最も近くCDR1に対して5'側にある第1フレームワーク領域を表す。また、複数のFR（FRs）とは、フレームワークを構成するサブ領域のうちの2つ以上を表す。

10

【0059】

ヒト化:当技術分野において公知であるとおり、「ヒト化」という用語は、抗体（または抗体構成要素）であって、そのアミノ酸配列は非ヒト種（例:マウス）において產生させた基準抗体からのV_H領域配列およびV_L領域配列を含むが、それらの配列は、基準抗体と比較して、それらをより「ヒト様」にすること、すなわちヒト生殖細胞系可変配列により類似させることを意図した修飾も含んでいるものを指すために、よく使用される。いくつかの態様において、「ヒト化」抗体（または抗体構成要素）は、関心対象の抗原に免疫特異的に結合し、かつ実質的にヒト抗体の配列のようなアミノ酸配列を有するフレームワーク（FR）領域と実質的に非ヒト抗体の配列のようなアミノ酸配列を有する相補性決定領域（CDR）とを有するものである。ヒト化抗体は、CDR領域のすべてまたは実質上すべてが非ヒト免疫グロブリン（すなわちドナー免疫グロブリン）に対応し、フレームワーク領域のすべてまたは実質上すべてがヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のそれである、少なくとも1つの、典型的には2つの、可変ドメイン（Fab、Fab'、F(ab')₂、FabC、Fv）の実質上すべてを含む。いくつかの態様において、ヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域の少なくとも一部分（Fc）、典型的にはヒト免疫グロブリン定常領域のものも含む。いくつかの態様において、ヒト化抗体は、軽鎖と、重鎖の少なくとも可変ドメインとを、どちらも含有する。抗体は、重鎖定常領域のC_H1、ヒンジ、C_H2、C_H3、そして任意でC_H4領域も含みうる。

20

【0060】

インビトロ:本明細書において使用する「インビトロ」という用語は、多細胞生物内ではなく、例えば試験管内または反応槽内、細胞培養中などの、人工的環境において起こる事象を指す。

30

【0061】

インビオ:本明細書において使用する場合、ヒトおよび非ヒト動物などの多細胞生物内で起こる事象を指す。細胞ベースの系との関連では、この用語は（例えばインビトロ系との対比で）生細胞内で起こる事象を指すために使用されうる。

【0062】

単離された:本明細書において使用する場合、（1）それが最初に生産された時（自然界でのことであるか、かつ/または実験的状況でのことであるかは問わない）に、それに付随していた構成要素の少なくとも一部から分離されており、かつ/または（2）人間の手によって設計され、生産され、調製され、かつ/または製造された、物質および/または実体を指す。単離された物質および/または実体は、それらに最初に付隨していた他の構成要素の約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%または約99%超から分離されていることができる。いくつかの態様において、単離された物質は、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%または約99%超純粹である。本明細書において、物質は、それが他の構成要素を実質的に含まなければ、「純粹」である。いくつかの態様において、当業者には理解されるであろうとおり、物質は、特定の他の構成要素、例えば1種または複数種の担体または賦形剤（例:緩衝液、溶媒、水など）などと組み合わされた後でもなお、「単離された」

40

50

とみなすことができ、さらには「純粹」とさえみなしうる。そのような態様において、物質の単離率または純度は、そのような担体または賦形剤を含めずに算出される。一例を挙げると、いくつかの態様において、自然に存在するポリペプチドまたはポリヌクレオチドなどの生物学的ポリマーは、a) それが、その起源または派生源ゆえに、自然界でそのネイティブ状態にあるそれに伴う構成成分の一部または全部が付随していない場合、b) それが、自然界でそれを産生する種からの同じ種の他のポリペプチドまたは核酸を実質上含まない場合、c) それが、自然界でそれを産生する種のものではない細胞または他の発現系によって発現されるか、他の形でそのような細胞または他の発現系からの構成要素が付随している場合には、「単離された」とみなされる。したがって例えばいくつかの態様において、化学合成されたポリペプチドまたは自然界でそれを産生するものとは異なる細胞系において合成されたポリペプチドは、「単離された」ポリペプチドであるとみなされる。上記に代えて、または上記に加えて、いくつかの態様において、1種または複数種の精製技法に供されたポリペプチドは、a) 自然界でそれに付随している他の構成要素および/またはb) 最初に生産された時にそれに付随していた他の構成要素から分離されている限り、「単離された」ポリペプチドであるとみなしうる。

【0063】

K_D :本明細書において使用する場合は、結合剤（例：抗体またはその結合構成要素）の、そのパートナー（例：その抗体または結合構成要素が結合するエピトープ）との複合体からの解離定数を指す。

【0064】

機能的に連結された：本明細書において使用する場合、記載した複数の構成要素が意図したように機能することを可能にする関係にある並置を指す。機能要素に「機能的に連結された」制御要素は、制御要素と適合する条件下で機能要素の発現および/または活性が達成されるような関係にある。いくつかの態様では、「機能的に連結された」制御要素は、関心対象のコーディング要素と連続しており（例えば共有結合で連結され）、いくつかの態様では、制御要素は関心対象の機能要素に対してトランスに作用するか、または他の形で関心対象の機能要素から離れた位置において作用する。

【0065】

薬学的組成物：本明細書において使用する場合、「薬学的組成物」という用語は、活性剤が1種または複数種の薬学的に許容される担体と共に処方されている組成物を指す。いくつかの態様において、組成物はヒト対象または動物対象への投与に適している。いくつかの態様において、活性剤は、適切な集団に投与されたときに予め決定された治療効果を達成する統計的に有意な確率を示す治療レジメンでの投与に適した単位投与量で存在する。

【0066】

ポリペプチド：本明細書において使用する「ポリペプチド」という用語は、一般に、少なくとも3アミノ酸のポリマーという、当技術分野において認識されているその意味を有する。「ポリペプチド」という用語が、本明細書に詳述する完全配列を有するポリペプチドを包含するだけでなく、そのような完全ポリペプチドの機能的フラグメント（すなわち少なくとも1つの活性を保っているフラグメント）に相当するポリペプチドも包含するほど十分に広義であることが意図されていることは、当業者には理解されるであろう。さらによくまた、タンパク質配列が一般に活性を破壊することなく多少の置換に耐えうることも、当業者には理解される。したがって、活性を保っており、同じクラスの他のポリペプチドとの間に、少なくとも約30～40%の総配列同一性、多くの場合、約50%、60%、70%または80%を上回る総配列同一性を有し、さらに通常は、通常少なくとも3～4アミノ酸、多くの場合、最大20アミノ酸またはそれ以上を包含する1つまたは複数の高度に保存された領域に、はるかに高い同一性、多くの場合、90%、さらには95%、96%、97%、98%または99%を上回る同一性を持つ領域を少なくとも1つは含む、任意のポリペプチドが、本発明において使用される関連用語「ポリペプチド」に包含される。ポリペプチドはL-アミノ酸、D-アミノ酸またはその両方を含有してよく、当技術分野において公知のさまざまアミ

10

20

30

40

50

ノ酸修飾またはアミノ酸類似体をどれでも含有してよい。有用な修飾として、例えば末端アセチル化、アミド化、メチル化などが挙げられる。いくつかの態様において、タンパク質は、天然アミノ酸、非天然アミノ酸、合成アミノ酸およびそれらの組み合わせを含みうる。「ペプチド」という用語は、一般に、約100アミノ酸未満、約50アミノ酸未満、20アミノ酸未満、または10アミノ酸未満の長さを有するポリペプチドを指すために使用される。いくつかの態様において、タンパク質は、抗体、抗体フラグメント、生物学的に活性なそれらの部分および/またはそれらの特徴的部分である。

【 0 0 6 7 】

予防するまたは予防:疾患、障害および/または状態の発生に関連して使用される場合、本明細書では、疾患、障害および/または状態を発症するリスクを低減することおよび/または疾患、障害もしくは状態の1つまたは複数の特徴または症状の開始を遅延させかつ/またはその重症度を低減することを指す。いくつかの態様において、予防は集団ベースで評価されるので、ある剤は、ある疾患、障害または状態に陥りやすい集団において、その疾患、障害または状態の1つまたは複数の症状の発生、頻度および/または強さに統計的に有意な減少が観察されるのであれば、その特定の疾患、障害または状態を「予防する」とみなされる。

10

【 0 0 6 8 】

組換え:本明細書において使用する場合は、組換え手段によって設計され、改変され、調製され、発現され、作出され、製造されかつ/または単離されるポリペプチド、例えば宿主細胞にトランスフェクトされた組換え発現ベクターを使って発現されるポリペプチド;組換えコンビナトリアルヒトポリペプチドライブラーから単離されるポリペプチド;当該ポリペプチドまたはその1種もしくは複数種の構成要素、部分、要素もしくはドメインをコードしかつ/またはその発現を指示する1つまたは複数の遺伝子または遺伝子構成要素についてトランスジェニックであるか、または他の形でそれらを発現するように操作されている動物(例:マウス、ウサギ、ヒツジ、魚など)から単離されるポリペプチド;および/または選択された核酸配列要素を互いにスプライスしましたはライゲートすること、選択された配列要素を化学合成することおよび/または他の形で当該ポリペプチドまたはその1種もしくは複数種の構成要素、部分、要素またはドメインをコードしかつ/またはその発現を指示する核酸を生成させることを伴う他の任意の手段によって調製され、発現され、作出されまたは単離されるポリペプチドを指すものとする。いくつかの態様において、そのような選択された配列要素のうちの1種または複数種は、自然界に見いだされる。いくつかの態様において、そのような選択された配列要素のうちの1種または複数種は、インシリコで設計される。いくつかの態様において、1種または複数種のそのような選択された配列要素は、例えば天然源または合成源からの、例えば関心対象の由来生物の(例えばヒト、マウスなどの)生殖細胞系における、公知配列要素の(例えばインビオまたはインビトロでの)変異導入に由来する。

20

【 0 0 6 9 】

特異的結合:本明細書において使用する場合、「特異的結合」という用語は、結合が起こるべき環境において、考えうる結合パートナー同士を区別する能力を指す。他の潜在的ターゲットも存在する時に、ある特定ターゲットと相互作用する結合剤は、それが相互作用するターゲットに「特異的に結合する」といわれる。いくつかの態様において、特異的結合は、結合剤とそのパートナーとの間の会合を検出しましたはその程度を決定することによって評価され、いくつかの態様において、特異的結合は、結合剤-パートナー複合体の解離を検出しましたはその程度を決定することによって評価され、いくつかの態様において、特異的結合は、結合剤の、そのパートナーともう1つの実体との間での二者択一的相互作用において競争する能力を検出しましたは決定することによって評価される。いくつかの態様において、特異的結合は、そのような検出または決定を、ある範囲の濃度にわたって行うことによって評価される。

30

【 0 0 7 0 】

対象:本明細書において使用する場合、「対象」という用語は、生物、典型的には哺乳

40

50

動物（例：ヒト、いくつかの態様では出生前のヒト形態を含む）を指す。いくつかの態様において、対象は、関連する疾患、障害または状態を患っている。いくつかの態様において、対象は、ある疾患、障害または状態に陥りやすい。いくつかの態様において、対象は、ある疾患、障害または状態の1つまたは複数の症状または特徴を示す。いくつかの態様において、対象は、ある疾患、障害または状態の症状または特徴を何も示さない。いくつかの態様において、対象は、疾患、障害または状態への陥りやすさまたはそのリスクに特有の1つまたは複数の特徴を持つ者である。いくつかの態様において、対象は患者である。いくつかの態様において、対象は、診断および/または治療を受けかつ/または受けたことがある個体である。

【0071】

10

治療剤：本明細書において使用する場合、「治療剤」という表現は、概して、生物に投与されたときに所望の薬理学的效果を誘発する任意の剤を指す。いくつかの態様において、剤は、それが適当な集団全体に統計的に有意な効果を示すのであれば、治療剤であるとみなされる。いくつかの態様において、前記適当な集団は、モデル生物の集団でありうる。いくつかの態様において、適当な集団は、一定の年齢群、性別、遺伝的背景、既存の臨床状態などといった、さまざまな基準によって定義されうる。いくつかの態様において、治療剤は、ある疾患、障害および/または状態の1つまたは複数の症状または特徴を軽減し、改善し、緩和し、阻害し、予防し、その開始を遅延させ、その重症度を低減し、かつ/またはその発生率を低減するために使用することができる物質である。いくつかの態様において、「治療剤」は、政府機関による承認を得ることでヒトへの投与用に販売することができるようになった剤または政府機関による承認を得なければヒトへの投与用に販売することができない剤である。いくつかの態様において、「治療剤」は、ヒトに投与するには処方箋が必要とされる剤である。

【0072】

20

治療有効量：本明細書において使用する場合、「治療有効量」という用語は、ある疾患、障害および/または状態を患っている集団またはある疾患、障害および/または状態に陥りやすい集団に、治療的投与レジメンに従って投与したときに、その疾患、障害および/または状態を処置するのに十分な量を意味する。いくつかの態様において、治療有効量は、疾患、障害および/または状態の1つまたは複数の症状の発生率および/または重症度を低減し、それらの症状の1つまたは複数の特徴を安定化し、かつ/またはそれらの症状の開始を遅延させる量である。「治療有効量」という用語が、ある特定個体において処置の成功が達成されることを、実際に必要としないことは、当業者には理解されるであろう。むしろ、治療有効量は、そのような処置を必要とする患者に投与されたときに、有意な数の対象において、所望する特定の薬理学的応答を与える量でありうる。例えばいくつかの態様において、「治療有効量」という用語は、本発明の治療との関連においてそれを必要とする個体に投与した場合に、該個体において起きているがん支持過程を遮断し、安定化し、減弱し、または逆転させるであろう量、または該個体におけるがん抑制過程を強化または増加させるであろう量を指す。がん処置との関連において、「治療有効量」は、がんと診断された個体に投与した場合に、その個体におけるがんのさらなる発達を予防し、安定化し、阻害し、または低減するであろう量である。本明細書に記載する組成物の特に好ましい「治療有効量」は、肺がんなどの悪性腫瘍の発達を（治療的処置において）逆転させるか、または悪性腫瘍の寛解を達成しもしくは長引かせるのに役立つ。個体におけるがんを処置するために当該個体に投与される治療有効量は、寛解を促進しまたは転移を阻害するために投与される治療有効量と、同じである場合も異なる場合もある。大半のがん治療がそうであるように、本明細書に記載する治療方法は、がんの「治癒（cure）」と解釈されたり、がんの「治癒」に制約されたり、または他の形でがんの「治癒」に限定されたりするべきではなく、むしろ本処置方法は、がんを「処置」するための、すなわちがんを有する個体の健康に望ましい変化または有益な変化をもたらすための、記載の組成物の使用に関する。そのような利益は腫瘍学分野の熟練した医療提供者には認識されており、これには、患者状態の安定化、腫瘍サイズの減少（腫瘍退縮）、生体機能の改善（例：がん性

30

40

50

組織またはがん性機関の機能改善)、さらなる転移の減少または阻害、日和見感染の減少、生存性の増加、痛みの減少、運動機能の改善、認知機能の改善、エネルギー感 (feeling of energy) の改善 (活力、倦怠感の減少)、幸福感の改善、正常な食欲の回復、健康な体重増加の回復およびそれらの組み合わせなどが含まれるが、それらに限定されるわけではない。加えて、(例えば処置の過程において) 脾臓腺がんなどの腫瘍の部位からがん細胞の試料を採取し、悪性度の低い表現型へのがん細胞の退縮を分子レベルで検証するために、そのがん細胞を、代謝マーカーおよびシグナル伝達マーカーのレベルについて試験してがん細胞の状態を監視することによって、個体における特定腫瘍の(例えば本明細書に記載する処置の結果としての) 退縮を評価してもよい。例えば、本発明の方法を使用することによって誘導される腫瘍退縮は、上述の血管新生促進マーカーのいずれかの減少、本明細書に記載する抗血管新生マーカーの増加、がんと診断された個体において異常な活性を示す代謝経路、細胞間シグナリゲ経路または細胞内シグナル伝達経路の正常化(すなわちがんを患っていない正常個体に見いだされる状態への変化)を見いだすことによって示されるだろう。いくつかの態様において、治療有効量を製剤化し、かつ/または単回投与で投与しうることは、当業者には理解されるであろう。いくつかの態様では、治療有効量を製剤化し、かつ/または複数回投与で、例えば投与レジメンの一部として、投与しうる。

【0073】

変種:核酸、タンパク質または小分子などの分子に関する本明細書において使用する場合、「変種」という用語は、基準分子とは有意な構造的同一性を示すが、例えば基準実体と比較して1つまたは複数の化学部分の有無またはレベルに関して基準分子と構造的に異なる分子を指す。いくつかの態様において、変種は、その基準分子とは機能的にも異なる。一般に、ある特定分子が、基準分子の「変種」であると適正にみなされるかどうかは、その特定分子の、基準分子との構造同一性の程度に基づく。当業者には理解されるであろうとおり、任意の生物学的または化学的基準分子は、一定の特徴的構造要素を有する。変種は、定義上、1つまたは複数のそのような特徴的構造要素を共通して持つが、少なくとも1つの局面において基準分子とは異なる、別個の分子である。いくつか例を挙げると、ポリペプチドは、線形空間または三次元空間中で互いにに対して指定された位置を有しあつ/または特定の構造モチーフにおよび/もしくは生物学的機能に寄与する複数のアミノ酸から構成される特徴的配列要素を有しうる。核酸は、線形空間または三次元空間中で互いにに対して指定された位置を有する複数のヌクレオチド残基から構成される特徴的配列要素を有しうる。いくつかの態様において、変種ポリペプチドまたは変種核酸は、基準ポリペプチドまたは基準核酸とは、アミノ酸配列またはヌクレオチド配列中の1つまたは複数の相違の結果として、異なりうる。いくつかの態様において、変種ポリペプチドまたは変種核酸は、少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%または99%である基準ポリペプチドまたは基準核酸との総配列同一性を示す。いくつかの態様において、変種ポリペプチドまたは変種核酸は、基準ポリペプチドまたは基準核酸と、少なくとも1つの特徴的配列要素を共有しない。いくつかの態様において、基準ポリペプチドまたは基準核酸は、1つまたは複数の生物学的活性を有する。いくつかの態様において、変種ポリペプチドまたは変種核酸は、基準ポリペプチドまたは基準核酸の生物学的活性のうちの1つまたは複数を共有する。

【0074】

ベクター:本明細書において使用する場合、それに連結されたもう1つの核酸を輸送する能力を有する核酸分子を指す。ベクターの一タイプは「プラスミド」であり、これは、その中に追加DNAセグメントをライゲートすることができる環状二本鎖DNAループを指す。もう1つのタイプのベクターはウイルスベクターであり、ここでは追加DNAセグメントをウイルスゲノム中にライゲートすることができる。特定のベクターは、それらが導入される宿主細胞において自律的に複製する能力を有する(例:細菌複製起点を有する細菌ベクターおよびエピソーム哺乳動物ベクター)。他のベクター(例:非エピソーム哺乳動物ベクター)は、宿主細胞への導入後に宿主のゲノム中に組み込まれることができ、その結果、宿

10

20

30

40

50

主ゲノムと一緒に複製される。さらにまた、特定のベクターは、ベクターが機能的に連結された遺伝子の発現を指示する能力を有する。そのようなベクターを、本明細書では「発現ベクター」という。組換えDNA、オリゴヌクレオチド合成ならびに組織培養および形質転換には、標準的技法（例：エレクトロポレーション、リポフェクション）を使用しうる。酵素反応および精製技法は、製造者の仕様書に従って、または当技術分野においてよく行われているとおりに、または本明細書に記載するとおりに行いうる。前記の技法および手順は、一般に、当技術分野において周知の従来法に従って、本明細書の全体を通して引用し議論するさまざまな一般文献およびより具体的な文献に記載されているように行いうる。例えば、参照によりあらゆる目的で本明細書に組み入れられるSambrook et al., Molecular Cloning:A Laboratory Manual (2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989))を参照されたい。

10

【0075】

例示的態様の詳細な説明

本開示は特に、誘導性共刺激分子である4-1BB、およびそれに結合する治療用抗体であつて、基準抗4-1BB抗体との比較で改良された特徴を有するように改変されているものに関する。例えば、ここに提供する改変された抗体は、ヒト4-1BBの細胞外ドメイン内のエピトープを特異的に認識する基準アゴニスト抗体の抗原アフィニティーと比較して、抗原アフィニティーが強化されるように修飾されている（韓国特許第10-0500286号、アクセシション番号：KCTC 0952BP）。具体的には、本明細書に記載するとおり、本発明者らは、基準ヒト化抗ヒト4-1BB抗体94G1（米国特許第7,932,045号）を改変した。本明細書の実施例で述べるとおり、基準抗体94G1の軽鎖CDR配列および重鎖CDR配列を、各鎖のアフィニティーが改変されるように、別々に、改変した。さらにまた、本明細書に記載するとおり、例示的な改変された抗4-1BB抗体は、活性化T細胞の増殖を効果的に誘導することができる。注目すべきことに、例示的な改変された抗4-1BB抗体は、4-1BB分子に結合して活性化誘導細胞死（AICD）を阻害する4-1BBヒト化抗体が引き起こす刺激ゆえに、驚くほど改変されたCD8⁺ T細胞の活性を誘導する能力を有する。したがって本発明は、基準抗体との比較で改変された特性を持つ改変された抗ヒト4-1BB抗体を提供し、そのうえ、これらの抗体がインビトロおよびインビボで驚くほど有益な活性を有することを実証する。

20

【0076】

4-1BB

30

4-1BB（CD137、TNFRSF9などとも呼ばれる）は、腫瘍壊死因子受容体（TNFR）スーパー・ファミリーに属する受容体である。4-1BBは、活性化Tリンパ球に広く発現して免疫および自己免疫疾患に関する共刺激分子である（Kwon et al. PNAS 84:2896, 1987、Kwon et al. PNAS (1989) 86:1963、Son et al. Journal of Immunological Methods (2004) 286 (1-2) :187-201。これらの文献のそれぞれは参照によりその全体が本明細書に組み入れられる）。ヒト4-1BBは、255アミノ酸タンパク質である（アクセシション番号NM_001561; NP_001552）。完全なヒト4-1BBアミノ酸配列をSEQ ID NO:44に示す。4-1BBは、単量体（30kDa）型および二量体（55kDa）型で細胞表面に発現し、シグナル伝達のために4-1BBリガンドとおそらく三量体化する。

40

【0077】

4-1BBに関する最新の理解は、これが、Foxp3⁺ Tregおよび樹状細胞（DC）を含むいくつかの細胞上に、低レベルではあるが、構成的に発現することを示唆している。（Vinay and Kwon (2014) BMB Rep. 47 (3) :122-129参照。この文献は参照により本明細書に組み入れられる。）サイトカイン（例えば、IL-2、IL-4）、ポリクローナル活性化因子（例えば、Con AおよびPHA）、細胞表面分子（例えば、抗CD3および抗CD28）ならびにCa²⁺ 誘導およびPKC活性の促進因子（例えば、イオノマイシンおよびホルボールミリストアセテート）など、いくつかのアゴニストによる活性化は、4-1BBの発現をさらに強化する（同文献）。

【0078】

マウスT細胞およびヒトT細胞に関する数多くの研究が、4-1BBは、強化された細胞の増

50

殖、生残およびサイトカイン生産を促進することを示している (Croft, 2009, *Nat. Rev. Immunol.* 9:271-285)。一部の4-1BBアゴニストモノクローナル抗体は、さまざまなモデルにおいて、共刺激分子発現を増加させ、細胞溶解性Tリンパ球応答を著しく強化することで、抗腫瘍効力をもたらすことが、研究によって示されている。4-1BBアゴニストモノクローナル抗体は、予防的にも治療的にも効力を有することが実証されている。さらに、4-1BB単独治療および併用治療腫瘍モデルにより、永続的な抗腫瘍保護T細胞メモリー応答が樹立されている (Lynch (2008) *Immunol. Rev.* 22:277-286)。4-1BBアゴニストは、当技術分野において知られるさまざまな自己免疫モデルにおいて、自己免疫反応を阻害することも知られている (Vinay (2006) *J. Mol. Med.* 84:726-736)。4-1BBのこの二重活性は、免疫治療アプローチに伴う自己免疫副作用を抑えつつ、抗腫瘍活性を提供する可能性をもたらす。

10

【 0 0 7 9 】

4-1BB抗体およびそれらのフラグメント

本開示は、少なくとも一部において、インビトロおよび/またはインビボで顕著かつ予想外の優れた特徴を示す、改変された抗ヒト4-1BB抗体およびそれらのフラグメントを提供する。例えば特定の本願抗体は、基準ヒト化抗ヒト4-1BB抗体と比較して増加したアフイニティーを有する。

【 0 0 8 0 】

いくつかの態様において、抗4-1BB抗体または抗原結合性抗体フラグメントは、SEQ ID NO:5~8の配列であるかそれらの配列を含む、1つ、2つまたは3つの重鎖CDR配列を含む。いくつかの態様において、抗4-1BB抗体または抗原結合性抗体フラグメントは、以下のうちの1つまたは複数を含む：SEQ ID NO:5の配列であるかその配列を含む重鎖CDR1、SEQ ID NO:6の配列であるかその配列を含む重鎖CDR2、およびSEQ ID NO:7または8の配列であるかその配列を含む重鎖CDR3。いくつかの態様において、抗4-1BB抗体または抗原結合性抗体フラグメントは、SEQ ID NO:5の配列であるかその配列を含む重鎖CDR1、SEQ ID NO:6の配列であるかその配列を含む重鎖CDR2、およびSEQ ID NO:7または8の配列であるかその配列を含む重鎖CDR3のそれぞれを含む。

20

【 0 0 8 1 】

いくつかの態様において、抗4-1BB抗体または抗原結合性抗体フラグメントは、SEQ ID NO:1~4の配列であるかそれらの配列を含む、1つ、2つまたは3つの軽鎖CDR配列を含む。いくつかの態様において、抗4-1BB抗体または抗原結合性抗体フラグメントは、以下のうちの1つまたは複数を含む：SEQ ID NO:1の配列であるかその配列を含む軽鎖CDR1、SEQ ID NO:2の配列であるかその配列を含む軽鎖CDR2、およびSEQ ID NO:3または4の配列であるかその配列を含む軽鎖CDR3。いくつかの態様において、抗4-1BB抗体または抗原結合性抗体フラグメントは、SEQ ID NO:1の配列であるかその配列を含む軽鎖CDR1、SEQ ID NO:2の配列であるかその配列を含む軽鎖CDR2、およびSEQ ID NO:3または4の配列であるかその配列を含む軽鎖CDR3のそれぞれを含む。

30

【 0 0 8 2 】

いくつかの態様において、抗4-1BB抗体または抗原結合性抗体フラグメントは、SEQ ID NO:5の配列であるかその配列を含む重鎖CDR1、SEQ ID NO:6の配列であるかその配列を含む重鎖CDR2、およびSEQ ID NO:7または8の配列であるかその配列を含む重鎖CDR3を含む重鎖可変ドメイン、ならびに/またはSEQ ID NO:1の配列であるかその配列を含む軽鎖CDR1、SEQ ID NO:2の配列であるかその配列を含む軽鎖CDR2、およびSEQ ID NO:4の配列であるかその配列を含む軽鎖CDR3を含む軽鎖可変ドメインを含む。

40

【 0 0 8 3 】

いくつかの態様において、抗4-1BB抗体または抗原結合性抗体フラグメントは、5番目のアミノ酸アスパラギン(N)がグルタミン(Q)、グルタミン酸(E)またはセリン(S)で置換された、SEQ ID NO:6の配列であるかその配列を含む重鎖CDR2を含む重鎖可変ドメインを含む。いくつかの態様において、抗4-1BB抗体または抗原結合性抗体フラグメントは、5番目のアミノ酸アスパラギン(N)がバリン(V)、グリシン(G)またはプロリン(P)

50

)で置換された、SEQ ID NO:6の配列であるかその配列を含む重鎖CDR2を含む重鎖可変ドメインを含む。

【0084】

いくつかの態様において、抗4-1BB抗体または抗原結合性抗体フラグメントは、LCDR3の6番目のアミノ酸が変異している、SEQ ID NO:3または4の配列であるかその配列を含む軽鎖CDR3を含む軽鎖可変ドメインを含む。

【0085】

いくつかの態様において、抗4-1BB抗体または抗原結合性抗体フラグメントは、SEQ ID NO:16または17の配列を含む重鎖フレームワーク1(FR1)領域を含む重鎖可変ドメインを含む。いくつかの態様において、抗4-1BB抗体または抗原結合性抗体フラグメントは、SEQ

10
ID NO:18～20のいずれか一つの配列を含む重鎖フレームワーク3(FR3)領域を含む重鎖可変ドメインを含む。いくつかの態様において、抗4-1BB抗体または抗原結合性抗体フラグメントは、SEQ ID NO:16または17の配列を含む重鎖フレームワーク1(FR1)領域、およびSEQ ID NO:18～20のいずれか一つの配列を含む重鎖フレームワーク3(FR3)領域を含む、重鎖可変ドメインを含む。

【0086】

いくつかの態様において、抗4-1BB抗体または抗原結合性抗体フラグメントは、SEQ ID NO:11～14から選択される配列であるかその配列を含む重鎖可変ドメインを含む抗体または抗体フラグメントに対する実質的相同性を含む。いくつかの態様において、抗4-1BB抗体または抗原結合性抗体フラグメントは、SEQ ID NO:11～14から選択される配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%または99.5%同一な配列であるかその配列を含む重鎖可変ドメインを含む。いくつかの態様において、抗4-1BB抗体または抗原結合性抗体フラグメントは、SEQ ID NO:11～14から選択される配列であるかその配列を含む重鎖可変ドメインを含む。

【0087】

いくつかの態様において、抗4-1BB抗体または抗原結合性抗体フラグメントは、SEQ ID NO:9または10の配列を有するかその配列を含む軽鎖可変ドメインを含む抗体または抗体フラグメントに対する実質的相同性を含む。いくつかの態様において、抗4-1BB抗体または抗原結合性抗体フラグメントは、SEQ ID NO:9または10の配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%または99.5%同一な配列であるかその配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。いくつかの態様において、抗4-1BB抗体または抗原結合性抗体フラグメントは、SEQ ID NO:9または10の配列であるかその配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。

【0088】

いくつかの態様において、抗4-1BB抗体または抗原結合性抗体フラグメントは、SEQ ID NO:11～14から選択される配列であるかその配列を含む重鎖可変ドメインとSEQ ID NO:10の配列であるかその配列を含む軽鎖可変ドメインとを含む抗体または抗体フラグメントに対する実質的相同性を含む。いくつかの態様において、抗4-1BB抗体または抗原結合性抗体フラグメントは、SEQ ID NO:11～14から選択される配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%または99.5%同一な配列であるかその配列を含む重鎖可変ドメインと、SEQ ID NO:10の配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%または99.5%同一な配列であるかその配列を含む軽鎖可変ドメインとを含む。いくつかの態様において、抗4-1BB抗体または抗原結合性抗体フラグメントは、SEQ ID NO:11～14から選択される配列であるかその配列を含む重鎖可変ドメインと、SEQ ID NO:10の配列であるかその配列を含む軽鎖可変ドメインとを含む。

【0089】

本開示の抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントのアミノ酸配列は、保存的置換によって置換されうる。本明細書において使用する「保存的置換」という用語は、対応するポリペプチドの生物学的または生化学的機能の喪失を引き起こさないように、1つま

10

20

30

40

50

たは複数のアミノ酸が、類似する生化学的特性を有するアミノ酸で置換される、ポリペプチドの修飾を指す。本明細書において使用する「保存的配列変種」または「保存的アミノ酸置換」という用語は、類似する側鎖を有するアミノ酸残基によるアミノ酸残基の置換である。類似する側鎖を有するアミノ酸残基は、当技術分野において定義づけられている。これらの残基には、塩基性側鎖を持つアミノ酸（例：リジン、アルギニンおよびヒスチジン）、酸性側鎖を持つアミノ酸（例：アスパラギン酸およびグルタミン酸）、非荷電極性側鎖を持つアミノ酸（例：グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシンおよびシスティン）、非極性側鎖を持つアミノ酸（例：アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニンおよびトリプトファン）、ベータ分岐側鎖を持つアミノ酸（例：スレオニン、バリンおよびイソロイシン）ならびに芳香族側鎖を持つアミノ酸（例：チロシン、フェニルアラニン、トリプトファンおよびヒスチジン）が含まれる。それゆえに、本発明の抗体は保存的アミノ酸置換を有することができ、それでもなお活性を確保することができると予想される。

【0090】

いくつかの態様において、本開示の抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは、IgG1定常ドメイン、IgG2定常ドメイン、IgG1/IgG2ハイブリッド定常ドメイン、ヒトIgG4定常ドメイン、IgA定常ドメイン、IgE定常ドメイン、IgM定常ドメインおよびIgD定常ドメインから選択される定常領域を含みうる。

【0091】

いくつかの態様において、本開示の抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは、IgA、IgD、IgE、IgM、IgGまたはその変種であるか、それを含む。

【0092】

いくつかの態様において、本開示の抗ヒト4-1BB抗体は、234、235、236、237、238、239、253、254、265、266、267、268、269、270、288、297、298、299、307、311、322、327、328、329、330、331、332、434および435のうちの1つまたは複数の位置にアミノ酸変異および/またはアミノ酸置換を有する変種Fc領域を含む。

【0093】

いくつかの態様において、本開示の抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントはヒトIgG1アイソタイプである。いくつかの態様において、本開示の抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは変種IgG1を含む。いくつかの態様において、抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは、233、234、235、236、265、297、329、331および322のうちの1つまたは複数の位置にアミノ酸変異を有するIgG1ポリペプチドを含む。

【0094】

いくつかの態様において、抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは、L234、L235、D270、N297、E318、K320、K322、P331およびP329に1つまたは複数の変異を含有するIgG1ポリペプチドを含む。いくつかの態様において、抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは、L234、L235、D270、N297、E318、K320、K322、P331およびP329に2つ、3つ、4つまたはそれ以上の変異を含有するIgG1ポリペプチドを含む。いくつかの態様において、抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは、L234AおよびL235Aに変異を持つIgG1ポリペプチドを含む。

【0095】

いくつかの態様において、抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは、軽鎖定常領域を含む。いくつかの態様において、抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは、カッパ(κ)軽鎖および/もしくはラムダ(λ)軽鎖ならびに/またはそれらの変種を含む。

【0096】

いくつかの態様において、抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントはモノクローナル抗体である。いくつかの態様において、抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')2フラグメント、Fvフラグメント、ジスルフィド結合したFvフラグメント、scFvフラグメント、単ードメイン抗体、ヒュ

10

20

30

40

50

ーマボディ、ナノボディ、および/またはダイアボディである。いくつかの態様において、抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは一価抗体である。いくつかの態様において、抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは多価抗体である。いくつかの態様において、抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは多重特異性抗体（例：二重特異性抗体）である。

【0097】

いくつかの態様において、本開示は、グリコシル化部位を付加したまたは欠失させることによって、本開示の抗体の糖質含量を変更する方法を包含する。抗体の糖質含量を変更するための方法は当技術分野において周知であり、本開示に包含される。例えば米国特許第6,218,149号、EP 0 359 096 B1、米国特許出願公開番号US 2002/0028486、WO 03/035835 10、米国特許出願公開第2003/0115614号、米国特許第6,218,149号、米国特許第6,472,511号を参照されたい（これらの文献はすべて参照によりその全体が本明細書に組み入れられる）。別の態様において、本開示は、抗体の1つまたは複数の内在糖質部分を欠失させることによって、本開示の抗体の糖質含量を変更する方法を包含する。具体的な態様において、本開示は、297番目をアスパラギンからアラニンに変更することによって、抗体のFc領域のグリコシル化部位を欠失させることを包含する。いくつかの態様において、抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは、CH2ドメインにN297A変異を含む。いくつかの態様において、N297A変異は、非グリコシル化（aglycosylation）をもたらし、それがFcR結合またはC1q結合を低減する。いくつかの態様において、抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは、N297A変異およびK322A変異を含むFc領域を含む重鎖を含む。いくつかの態様において、抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは、N297A変異およびD265A変異を含むFc領域を含む重鎖を含む。いくつかの態様において、抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは、L234A変異および/またはL235A変異を持つFc領域を含む。いくつかの態様において、抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは、L234A-、L235A、N297A、D265AおよびK322Aから選択される1つまたは複数の変異を持つFc領域を含む。いくつかの態様において、抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは、L234A-、L235A、N297A、D265AおよびK322Aから選択される2つ以上の変異を持つFc領域を含む。いくつかの態様において、抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは、L234A-、L235A、N297A、D265AおよびK322Aから選択される3つ、4つまたは5つの変異を持つFc領域を含む。 20

【0098】

変更されたグリコフォームは、限定するわけではないがエフェクター機能の強化または低減を含むさまざまな目的に役立つ。変更されたグリコフォームは、当業者に公知の任意の方法によって、例えば変更された発現株または変種発現株を使用することによって、1種または複数種の酵素、例えばDI N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII（GnTⅢ）との共発現によって、さまざまな生物またはさまざまな生物に由来する細胞株においてFc領域を含む分子を発現させることによって、またはFc領域を含む分子が発現された後に糖質を修飾することによって、生成させることができる。変更されたグリコフォームを生成させるための方法は当技術分野において公知であり、例えばUmana et al, 1999, Nat. Biotechnol 17:176-180、Davies et al., 2001 Biotechnol Bioeng 74:288-294、Shields et al, 2002, J Biol Chem 277:26733-26740、Shinkawa et al, 2003, J Biol Chem 278:3466-3473、米国特許第6,602,684号、米国特許出願第10/277,370号、米国特許出願第10/113,929号、PCT WO 00/61739A1、PCT WO 01/292246A1、PCT WO 02/311140A1、PCT WO 02/30954A1、POTILLEGENT（商標）技術（Biowa, Inc.、ニュージャージー州プリンストン）、GLYCOMAB（商標）糖鎖工学技術（GLYCART biotechnology AG、スイス国チューリッヒ）に記載されている方法（これらの文献のそれぞれは参照によりその全体が本明細書に組み入れられる）が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。例えばWO 00061739、EA01229125、US 20030115614、Okazaki et al, 2004, JMB, 336:1239-49を参照されたい（これらの文献のそれぞれは参照によりその全体が本明細書に組み入れられる）。 30

【0099】

いくつかの態様において、本開示の抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは、ヒト4-1BBのアゴニストである。

【0100】

いくつかの態様において、本開示の抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは、ヒト4-1BB分子に結合する。いくつかの態様において、本開示の抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは、ヒト4-1BB分子に特異的に結合する。

【0101】

いくつかの態様において、抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは、SEQ ID NO:15の配列であるかその配列を含む配列に結合する。いくつかの態様において、抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは、SEQ ID NO:15の配列であるかその配列を含む4-1BB細胞外ドメインのエピトープに結合する。 10

【0102】

いくつかの態様において、本開示の抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントとヒト4-1BB細胞外ドメインとの結合は、N30、D38、N39、R41、A56、G57、R60またはT61から選択されるSEQ ID NO:44の1つまたは複数の変異によって抑制される。

【0103】

いくつかの態様において、本開示の抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは、ヒト4-1BB分子に、 $1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-12}$ Mの結合アフィニティー(K_D)で結合する。いくつかの態様において、本開示の抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは、ヒト4-1BB分子に、 $1 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-12}$ Mの結合アフィニティー(K_D)で結合する。結合アフィニティー(K_D)は、例えば表面プラズモン共鳴により、例えばBIACOREシステムを使って測定しうる。 20

【0104】

いくつかの態様において、本開示の抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは、ヒト4-1BB分子またはそのフラグメントに、 1.0×10^{-8} M未満の結合アフィニティー(K_D)で結合する。いくつかの態様において、本開示の抗ヒト化4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは、ヒト4-1BB分子またはそのフラグメントに、 1.0×10^{-9} M未満の結合アフィニティー(K_D)で結合する。いくつかの態様において、本開示の抗ヒト化4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは、ヒト4-1BB分子またはそのフラグメントに、 1.0×10^{-10} M未満の結合アフィニティー(K_D)で結合する。 30

【0105】

いくつかの態様において、本開示の抗4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは、非靈長類4-1BBポリペプチド(例えば、イヌ、マウスおよびラット4-1BBポリペプチド)に結合しないかまたは弱く結合する。いくつかの態様において、本開示の抗4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは、ヒトまたはサルの4-1BBに効率よく結合する。この結合アフィニティーは、靈長類4-1BB抗体の構造および/または配列が、イヌ、マウスおよびラットとは著しく異なりうることを示唆している。

【0106】

いくつかの態様において、本開示の抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントはアゴニスト抗体である。いくつかの態様において、本開示の抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントはT細胞活性化を媒介する。いくつかの態様において、本開示の抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは、ヒト4-1BBを発現するCD8⁺および/またはCD4⁺ T細胞に結合する。 40

【0107】

いくつかの態様において、本開示の抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは、ADCC活性を有しないかまたは低いADCC活性を有する。いくつかの態様において、本開示の抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは、CDC活性を有しないかまたは低いCD C活性を有する。いくつかの態様において、本開示の抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは、ADCC活性およびCDC活性を有しないか、または低いADCC活性および低いCDC 50

活性を有する。いくつかの態様において、本開示の抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは、約20%未満、約10%未満、約8%未満または約5%未満のADCC殺細胞活性を有する。いくつかの態様において、本開示の抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは、約10%未満のADCC殺細胞活性を有する。いくつかの態様において、本開示の抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは、約30%未満、約20%未満、約10%未満、約8%未満または約5%未満のCDC殺細胞活性を有する。いくつかの態様において、本開示の抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは、約20%未満のCDC殺細胞活性を有する。

【0108】

いくつかの態様において、本開示の抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは、低い毒性を特徴とする（例えば投与後細胞死の程度が低い）。いくつかの態様において、本開示の抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは低い肝毒性（hepatotoxicity）を特徴とする。いくつかの態様において、治療量の本開示の抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントが投与された対象は、ALT、ASTおよび総ビリルビンのうちの1つまたは複数のレベルが正常範囲内にある。いくつかの態様において、本開示の抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは、症状の測定可能な軽減を伴いかつ/または許容されうる毒性で、長期間にわたって患者を処置できることを特徴とする。低いまたは許容されうる免疫原性および/または高いアフィニティーは、他の適切な特性と共に、達成される治療結果に貢献することができる。「低い免疫原性」とは、本明細書では、処置された患者の約75%未満、または好ましくは約50%未満において有意なHAHA応答、HACA応答またはHAMA応答を生じることおよび/または処置された患者において低い力値を生じることと定義される（Elliott et al., Lancet 344:1125-1127 (1994)、この文献は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる）。

10

20

【0109】

核酸

本開示は、本開示の抗ヒト4-1BB抗体およびそれらのフラグメントをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを提供する。本明細書に記載する抗ヒト4-1BB抗体およびそれらのフラグメントは、核酸分子から、当技術分野に公知の分子生物学的方法を使って生産しうる。本開示の核酸として、例えばDNAおよび/またはRNAが挙げられる。

【0110】

30

いくつかの態様において、核酸コンストラクトは、抗ヒト4-1BB抗体またはそのフラグメント（例:94K、94KV、94KVT、EU101）をコードする領域を含む。いくつかの態様において、そのような抗体またはそれらのフラグメントは、V_H領域および/またはV_L領域を含むであろう。所望の結合特性および/または機能特性に基づいて抗ヒト4-1BB抗体またはそのフラグメントを同定および/または選択し、該抗体の可変領域を単離し、増幅し、クローニングしかつ/または配列決定することができる。V_Hヌクレオチド配列およびV_Lヌクレオチド配列には、アミノ酸をコードするヌクレオチド配列および/または制限部位を保持するヌクレオチド配列の付加、および/またはアミノ酸をコードするヌクレオチド配列の置換などの修飾を加えうる。いくつかの態様において、核酸配列は、イントロン配列を含んでもよく、含まなくてもよい。

40

【0111】

適当な場合には、抗ヒト4-1BB抗体およびそれらのフラグメント（例:94K、94KV、94KVT、EU101）をコードする核酸配列を、特定の細胞タイプまたは生物における発現に最適化されたコドンを含むように修飾しうる（例えば米国特許第5,670,356号および米国特許第5,874,304号参照）。コドン最適化配列は合成配列であり、好ましくは、非コドン最適化親ポリヌクレオチドによってコードされるものと同一のポリペプチド（または完全長ポリペプチドと実質的に同じ活性を有する完全長ポリペプチドの生物学的に活性なフラグメント）をコードする。いくつかの態様において、抗体構成要素をコードする遺伝物質のコード領域は、全体的にまたは部分的に、特定細胞タイプ（例:真核細胞または原核細胞）用にコドン使用頻度を最適化するために、改变された配列を含みうる。例えば本明細書に記載

50

するヒト化重鎖（または軽鎖）可変領域のコード配列は、細菌細胞における発現のために最適化されうる。あるいは、コード配列は哺乳動物細胞（例：CHO細胞）における発現のためにも最適化されうる。そのような配列はコドン最適化配列ということができる。

【0112】

本開示の核酸コンストラクトは、当技術分野に公知の方法によって発現ベクターまたはウイルスベクターに挿入することができ、核酸分子は発現制御配列に機能的に連結することができる。上記の核酸分子またはそれらのフラグメントのいずれかを含むベクターも、本開示によって提供される。上記核酸分子またはそれらのフラグメントはいずれも、任意の適切なベクターにクローニングすることができ、任意の適切な宿主を形質転換またはトランسفェクトするために使用することができる。ベクターおよびそれらを構築するための方法の選択は、当業者には一般に公知であり、一般技術文献に記載されている（一般に「Recombinant DNA Part D」Methods in Enzymology, Vol.153, Wu and Grossman, eds., Academic Press (1987) を参照されたい）。 10

【0113】

いくつかの態様において、外来核酸（DNAまたはRNA）を原核宿主細胞または真核宿主細胞に導入するには、従来使用されている技法、例えば電気泳動、リン酸カルシウム沈殿、DEAE-デキストラントransフェクション、リポフェクションなどを使用しうる。望ましくは、ベクターは、必要に応じて、またそのベクターがDNAであるかRNAであるかを考慮して、そのベクターを導入する宿主（例：細菌、真菌、植物または動物）のタイプに特異的な制御配列、例えば転写および翻訳開始ならびに終止コドンを含みうる。いくつかの態様において、ベクターは、宿主の属に特異的な制御配列を含む。好ましくは、ベクターは、宿主の種に特異的な制御配列を含む。 20

【0114】

核酸コンストラクトは、複製系および挿入された核酸に加えて、形質転換された宿主またはトランسفェクトされた宿主の選択を可能にする1つまたは複数のマーカー遺伝子も含むことができる。マーカー遺伝子としては、殺生物剤耐性、例えば抗生物質耐性、重金属などに対する耐性、栄養要求宿主の補完による原栄養性の付与などが挙げられる。

【0115】

適切なベクターとして、増殖および拡大のためもしくは発現のためまたはその両のために設計されたものが挙げられる。例えばクローニングベクターは、pUC系列、pBluescript系列（Stratagene、カリフォルニア州ラホーヤ）、pET系列（Novagen、ウィスコンシン州マディソン）、pGEX系列（Pharmacia Biotech、スウェーデン国ウプサラ）およびpEX系列（Clontech、カリフォルニア州パロアルト）からなる群より選択される。GT10、GT11、ZapI I（Stratagene）、EMBL4およびN 1149などのバクテリオファージベクターも使用することができる。植物発現ベクターの例には、pBI110、pBI101.2、pBI101.3、pBI121およびpBIN19（Clontech）がある。動物発現ベクターの例には、pEUK-C1、pMAMおよびpMAMneo（Clontech）がある。TOP0クローニングシステム（Invitrogen、カリフォルニア州カールズバッド）も、製造者の推奨に従って使用することができる。 30

【0116】

発現ベクターは、上述の単離または精製された核酸分子に機能的に連結されたネイティブまたは非ネイティブプロモーターを含むことができる。例えば強い、弱い、誘導性、組織特異的および発達段階特異的などといったプロモーターの選択は、当技術分野における技量内である。同様に、上述の核酸分子またはそのフラグメントをプロモーターと組み合わせることも、当技術分野における技量内である。 40

【0117】

適切なウイルスベクターとしては、例えばレトロウイルスベクター、パルボウイルス系ベクター、例えばアデノ随伴ウイルス（AAV）系ベクター、AAV-アデノウイルスキメラベクターおよびアデノウイルス系ベクター、ならびにレンチウイルスベクター、例えば単純ヘルペス（HSV）系ベクターが挙げられる。これらのウイルスベクターは、例えばSambrook et al., Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 2d edition, Cold Spring Harbor 50

Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) およびAusubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, New York, N.Y. (1994) に記載されている標準的な組換えDNA技法を使って調製することができる。

【0118】

レトロウイルスベクターはレトロウイルスに由来する。レトロウイルスは、多種多様な宿主細胞に感染する能力を有するRNAウイルスである。感染すると、レトロウイルスゲノムはその宿主細胞のゲノムに統合し、宿主細胞DNAと一緒に複製されることにより、ウイルスRNAおよびレトロウイルスゲノム中に組み込まれた任意の核酸配列を、絶えず生産する。したがって、レトロウイルスを使用すれば、治療因子の長期発現を達成することができる。遺伝子治療における使用が想定されるレトロウイルスは、比較的非病原性であるが、病原性レトロウイルスも存在する。病原性レトロウイルス、例えばヒト免疫不全ウイルス(HIV)またはヒトT細胞リンパ向性ウイルス(HTLV)を使用する場合は、宿主に対する毒性を排除するためのウイルスゲノムの改変に配慮しなければならない。レトロウイルスベクターはさらに、ウイルスを複製欠損性にするように操作することができる。したがってレトロウイルスベクターは、インビオでの安定な遺伝子導入には特に有用であるとみなされている。HIV系ベクターなどのレンチウイルスベクターは遺伝子送達に使用されるレトロウイルスベクターの好例である。他のレトロウイルスとは異なり、HIV系ベクターは、そのパッセンジャー遺伝子を非分裂細胞に組み込むことが知られており、それゆえに、持続型の疾患の処置に役立つ。

10

20

【0119】

そのようなクローニングおよび/または発現配列には、クローニングおよび/または発現におけるそれらの機能を最適化するために、ポリヌクレオチドの単離に役立つように、または細胞へのポリヌクレオチドの導入を改良するために、追加の配列を付加することができる。クローニングベクター、発現ベクター、アダプターおよびリンカーの使用は当技術分野において周知である。(例えばAusubel(前掲)またはSambrook(前掲)を参照されたい)。

【0120】

いくつかの態様において、本開示の核酸およびベクターは、単離および/または精製されうる。本開示は、上述の単離または精製された核酸分子(ベクターの形態にあってもよい)を含む組成物も提供する。単離された核酸およびベクターは、例えばアルカリ/SDS処理、CsCl結合、カラムクロマトグラフィー、アガロースゲル電気泳動および当技術分野において周知の他の技法を含む当技術分野において公知の標準的な技法を使って、調製することができる。本組成物は本明細書にさらに記載する他の構成要素を含むことができる。

30

【0121】

いくつかの態様において、核酸分子は、適当な宿主細胞に導入されたときに抗ヒト4-1B抗体またはそのフラグメントを発現することができるベクターに挿入される。適当な宿主細胞として、細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞および哺乳動物細胞が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。例示的な宿主細胞として、原核生物(例:大腸菌)および真核生物(例:COS細胞またはCHO細胞)が挙げられる。使用できる哺乳動物宿主細胞として、ヒトHeLa293、H9およびJurkat細胞、マウスNIH3T3およびC127細胞、Cos1、Cos7およびCV1、ウズラQC1-3細胞、マウスL細胞およびチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞(例:DG44細胞)が挙げられる。いくつかの態様において、抗体の発現に適した哺乳動物宿主細胞は、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞(例えばDHFR選択可能マーカーと共に使用されるDHFR-CHO細胞を含む)、NSO骨髄腫細胞、COS細胞またはSP2細胞でありうる。

40

【0122】

転写/翻訳制御シグナルの制御下にある本開示の抗ヒト4-1BB抗体またはそのフラグメントをコードする発現ベクターを構築するには、DNAフラグメントをベクターに挿入するための当業者に公知の任意の方法を使用しうる。これらの方法には、インビトロ組換えDNA

50

および合成技法ならびにインビオ組換えを含めることができる（例えばAusubel（前掲）またはSambrook（前掲）を参照されたい）。

【0123】

抗体の生産

本発明の抗体および抗原結合性フラグメントは、以後の安定な抗体または抗体フラグメントの形成を可能にする当技術分野において公知の任意の技法によって、調製および/または精製されうる。

【0124】

本開示の抗ヒト4-1BB抗体および/または抗原結合性フラグメントをコードする核酸は、従来の手順によって、容易に単離し配列決定することができる。例えば、ハイブリドーマまたはファージテンプレートDNAから対応する重鎖および軽鎖コード領域を特異的に増幅するように設計されたオリゴヌクレオチドプライマーを使用しうる。単離された核酸を発現ベクターに挿入した後、その発現ベクターを宿主細胞に導入することによって形質転換された適切な宿主細胞（すなわち形質転換体）から、所望のモノクローナル抗体が生産されうる。いくつかの態様において、本開示の抗ヒト4-1BB抗体および/または抗原結合性フラグメントを調製するための方法は、抗体をコードする核酸を含む発現ベクターを増幅する工程を含みうるが、それに限定されるわけではない。

10

【0125】

いくつかの態様において、宿主細胞は、例えば酵母、高等植物、昆虫および哺乳動物細胞を含む真核宿主細胞である。組換え生産手順に使用される宿主に依存して、本開示の抗体および抗体フラグメントはグリコシル化体である場合もあるし、非グリコシル化体である場合もある。いくつかの態様において、本開示の抗ヒト4-1BB抗体および/または抗原結合性フラグメントをコードする組換え発現ベクターは、哺乳動物宿主細胞中に導入され、抗体を発現させるのに十分な時間にわたって宿主細胞を培養することによって、抗体が調製されうる。いくつかの態様において、哺乳動物宿主細胞は、培養培地中に本開示の抗体または抗体フラグメントを分泌するのに十分な時間にわたって、培養される。

20

【0126】

いくつかの態様において、発現された本開示の抗体は、宿主細胞から単離された後に、均一に精製されうる。本開示の抗体の単離および/または精製は、タンパク質を単離し精製するための従来の方法によって行いうる。例えば、理論に束縛されることは望まないが、本開示の抗ヒト4-1BB抗体および/または抗原結合性フラグメントは、限定するわけではないがプロテインA精製、プロテインG精製、硫酸アンモニウム沈殿またはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティーコロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含む周知の方法によって組換え細胞培養から回収し、精製することができる。高速液体クロマトグラフィー（「HPLC」）も精製に使用することができる。例えばColligan, Current Protocols in ImmunologyまたはCurrent Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, N.Y., (1997-2001) の例えばチャプター1、4、6、8、9および10を参照されたい（これらの文献はそれぞれその全体が参照により本明細書に組み入れられる）。いくつかの態様において、本開示の抗体は、濾過、超濾過、塩析、透析などをさらに組み合わせることによって、単離および/または精製されうる。

30

【0127】

精製された本開示の抗ヒト4-1BB抗体および/または抗原結合性フラグメントは、例えばELISA、ELISPOT、フローサイトメトリー、免疫細胞学、BIACORE（商標）分析、SAPIDYNE KINEXA（商標）結合平衡除外法（kinetic exclusion assay）、SDS-PAGEおよびウェスタンプロットによって、またはHPLC分析によって、ならびに本明細書において開示する他のいくつかの機能アッセイによって、特徴づけることができる。

40

【0128】

治療的応用

50

本開示は、改変された抗ヒト4-1BB抗体および抗原結合性フラグメントが、例えばがんなどの特定の疾患の診断、予防および/または処置に役立つという認識を包含する。ここに提供される抗4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントはいずれも、治療方法において使用されうる。例えば本開示の抗4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは、例えば悪性疾患（例：がん）の処置において、免疫治療剤として使用することができる。

【0129】

本開示は、悪性疾患を処置および/または予防する方法であって、本開示の抗4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントを対象に投与する工程を含む方法を提供する。細胞、組織、器官、動物または患者における少なくとも1つの悪性疾患を調整または処置するための方法は、がん、および/または炎症性疾患の治療を含むが、それに限定されるわけではない。

10

【0130】

本開示との関連におけるがん処置は、細胞傷害性T細胞および抗がん性サイトカインを増加させることによって媒介されうる。一般に抗原特異的細胞媒介性免疫は細胞傷害性T細胞によって引き起こされ、2つのシグナル伝達事象を含む。第1シグナル伝達事象は、抗原提示細胞からの抗原をT細胞が受容体を介して認識したときに誘導され、第2シグナル伝達は共刺激分子によって誘導される。この第1刺激および第2刺激ゆえに、T細胞活性および関連因子類が増加し、それによって、がん処置において特異的に機能するT細胞が形成され、形成されたT細胞は、共刺激分子による刺激ゆえに、その細胞傷害性、細胞分裂、細胞生存性および抗がん性サイトカイン分泌を増す。

20

【0131】

具体的には、4-1BBによる刺激は、CD8⁺ T細胞の活性を強化し、インターフェロンガンマ（IFN）などの抗がん性サイトカインの分泌を増加させ、Bcl-2、BclXLおよびBfl-1などの抗アポトーシス分子の発現を増加させ、かつ/または活性化誘導細胞死（AICD）を阻害できることが実証されている。いくつかの態様において、本開示の抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは、CD8⁺ T細胞活性、インターフェロンガンマ（IFN）などの抗がん性サイトカインの分泌、Bcl-2、BclXLおよびBfl-1などの抗アポトーシス分子の発現、および活性化誘導細胞死（AICD）の阻害のうちの1つまたは複数を強化するかまたは増加させることができる。いくつかの態様において、本開示の抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントによる治療的処置は、がん細胞の成長を低減および/または阻害することができる。

30

【0132】

いくつかの態様において、本開示は、本開示の抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントを投与することによるインビボまたはインビトロでのサイトカイン分泌の制御を含む、腫瘍成長を遅延させまたは阻害するための方法を提供する。いくつかの態様において、本開示は、本開示の抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントを投与することによるインビボまたはインビトロでのサイトカイン分泌の制御を含む、腫瘍量を低減するための方法を提供する。

【0133】

いくつかの態様において、本開示は、処置されるべきがんまたは腫瘍の生物学的対象をモニタリングすることによって、がんまたは腫瘍を処置するための方法であって、(i) 本開示の抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントを対象に投与する工程、(ii) 対象から生物学的試料を分離し、次に単離する工程、(iii) 前記試料からINF- α またはTGF- β の分泌量を測定し、比率を推定する工程、および(iv) 抗ヒト4-1BB抗体またはその抗原結合性フラグメントが投与されたまたは投与されていない対照試料を比較することによって、前記抗体またはその抗原結合性フラグメントの治療有効量を決定する工程を含む方法を提供する。

40

【0134】

いくつかの態様において、本開示は、処置を必要とする対象を処置する方法であって、本開示の抗4-1BB抗体もしくは抗原結合性フラグメントおよび/またはそれをコードする核

50

酸を含むかまたはそれを送達する組成物を、対象に投与する工程を含む方法を提供する。いくつかの態様において、対象は、がんを発症するリスクを有するか、またはがんを発症するリスクがある。いくつかの態様において、本開示は、患者のがんまたは腫瘍を予防または処置するための方法であって、治療有効量の抗ヒト化4-1BB抗体またはその抗原結合性フラグメントをがんまたは腫瘍を持つ患者に投与する工程を含む方法を提供する。

【0135】

いくつかの態様において、本開示は、免疫応答の誘導を必要とする対象において免疫応答を誘導する方法であって、本開示の抗4-1BB抗体もしくは抗原結合性フラグメントおよび/またはそれをコードする核酸を含むかまたはそれを送達する組成物を、対象に投与する工程を含む方法を提供する。いくつかの態様において、対象は、がんを発症するリスクを有するか、またはがんを発症するリスクがある。

10

【0136】

いくつかの態様において、本開示は、免疫応答の強化または免疫細胞の活性の増加を必要とする対象において免疫応答を強化するかまたは免疫細胞の活性を増加させる方法であって、本開示の抗4-1BB抗体もしくは抗原結合性フラグメントおよび/またはそれをコードする核酸を含むかまたはそれを送達する組成物を、対象に投与する工程を含む方法を提供する。いくつかの態様において、対象は、がんを発症するリスクを有するか、またはがんを発症するリスクがある。

【0137】

本開示の方法による処置に適したがんとして、膀胱がん、乳がん、子宮頸がん、大腸がん、子宮内膜がん、食道がん、ファロピウス管がん、胆嚢がん、胃腸がん、頭頸部がん、血液がん、咽頭がん、肝がん、肺がん、リンパ腫、黒色腫、中皮腫、卵巣がん、原発性腹膜がん、唾液腺がん、肉腫、胃がん、甲状腺がん、脾がん、および前立腺がんを挙げることができるが、それらに限定されるわけではない。いくつかの態様において、本開示の抗4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントによる処置のためのがんとして、がん、リンパ腫（例：ホジキンリンパ腫および非ホジキンリンパ腫）、芽細胞腫、肉腫および白血病を挙げうるが、それらに限定されるわけではない。いくつかの態様において、がんは、扁平上皮がん、小細胞肺がん、非小細胞肺がん、肺腺がん、肺の扁平上皮がん、腹膜がん、肝細胞がん、胃がん、脾がん、神経膠腫、子宮頸がん、卵巣がん、肝がん、膀胱がん、肝細胞がん、乳がん、大腸がん、結腸直腸がん、子宮内膜がんまたは子宮がん、唾液腺がん、腎がん、前立腺がん、外陰がん、甲状腺がん、肝臓がん、白血病および他のリンパ増殖性障害、ならびにさまざまなタイプの頭頸部がんを含みうる。

20

【0138】

本開示の抗4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントを含む組成物は、がん細胞またはその転移を処置するために、またはがんの成長を阻害するために、薬学的有効量で投与されうる。治療方法において使用するために、本開示の抗4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは、医療実施基準（good medical practice）に合致する方法で、製剤化され、用量決定され、投与されるであろう。この関連において考慮すべき因子としては、処置されるその障害、処置されるその哺乳動物、個々の患者の慢性的状態、患者の年齢、患者の体重、障害の原因、剤の送達部位、投与の方法、投与のスケジューリングおよび医療従事者に公知の他の因子が挙げられる。

30

【0139】

本開示は、基準抗体と比較して優れた特性を有しうる高アフィニティー抗ヒト4-1BB抗体を提供する。本開示は、これらの抗体では、T細胞活性化および/またはIFN- γ などのサイトカインの分泌を誘導する能力が改良されているという認識を包含する。したがって本開示は、本開示の抗ヒト4-1BB抗体および抗原結合性フラグメントは基準抗体より低い用量で投与しうるという認識を包含する。

40

【0140】

いくつかの態様において、本開示の抗4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントを含む組成物は、ポーラスとして、または必要な場合には持続注射によって、患者に投与しうる

50

。いくつかの態様において、ボーラス投与は本開示の抗4-1BB Fabのボーラス投与であって、0.0025～100mg/kg、0.025～0.25mg/kg、0.010～0.10mg/kgまたは0.10～0.50mg/kgの用量で投与されうる。持続注射の場合、Fabフラグメントとして提供される本発明の抗体は、1～24時間、1～12時間、2～12時間、6～12時間、2～8時間または1～2時間にわたって、0.001～100mg/kg/分、0.0125～1.25mg/kg/分、0.010～0.75mg/kg/分、0.010～1.0mg/kg/分または0.10～0.50mg/kg/分の用量で投与されうる。いくつかの態様において、本開示の抗体は、完全長抗体（完全な定常ドメインを有するもの）である。いくつかの態様において、完全長抗体は、およそ0.01～10mg/kg、1～8mg/kgまたは2～6mg/kgの用量で投与される。いくつかの態様において、完全長抗体は30～35分間の注射によって投与される。投与頻度は状態の重症度に依存してさまざまでありうる。例えば頻度は2日～7日ごとに1回、1週間に1回または1、2、3もしくは4週間ごとに1回でありうる。

【0141】

いくつかの態様において、組成物は、皮下注射によって患者に投与されうる。具体的に述べると、抗体は、2～7日ごとに1回、毎週、2週間ごとに1回、または毎月、皮下注射により、0.1～100mgの用量で、患者に投与される。

【0142】

併用治療

本開示は、1種または複数種の他の治療と組み合わされた本開示の抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントの投与を含む治療方法を提供する。

【0143】

いくつかの態様において、抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは、がんの処置に関して承認されている1種または複数種の治療と組み合わせて投与される。例えば、抗4-1BB抗体と従来の化学療法剤シスプラチニンによる併用処置は、殺腫瘍と器官特異的毒性の防止とに相乗的活性を有することが示されている（Kim et al., Cancer Research (2008) 68 (18) :7264-9）。

【0144】

いくつかの態様において、本開示の抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは、免疫チェックポイント阻害剤、インターロイキン12（IL-12）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、抗CD4剤および化学療法剤から選択される第2の治療と組み合わせて、対象が両方による処置を受けるように投与される。

【0145】

いくつかの態様において、本開示の抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは、化学療法剤を含む組成物を投与された対象または投与される予定の対象に、対象が両方による処置を受けるように投与される。本開示の治療方法は、当技術分野において公知の任意の化学療法剤の投与を含みうる。いくつかの態様において、化学療法剤は、抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントを含む組成物を投与された対象または投与される予定の対象に投与される。

【0146】

いくつかの態様において、抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは、フルオロウラシルを含む組成物を投与された対象または投与される予定の対象に投与される。いくつかの態様において、フルオロウラシルは、抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントを含む組成物を投与された対象または投与される予定の対象に投与される。いくつかの態様において、抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは、ドキソルビシンを含む組成物を投与された対象または投与される予定の対象に投与される。いくつかの態様において、ドキソルビシンは、抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントを含む組成物を投与された対象または投与される予定の対象に投与される。いくつかの態様において、抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは、イリノテカンを含む組成物を投与された対象または投与される予定の対象に投与される。いくつかの態様において、イリノテカンは、抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントを含む組成物を投与された対象または投与される予定の対象に投与される。いくつかの態様において、抗ヒト4-1B

10

20

30

40

50

B抗体または抗原結合性フラグメントは、パクリタキセルを含む組成物を投与された対象または投与される予定の対象に投与される。いくつかの態様において、パクリタキセルは、抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントを含む組成物を投与された対象または投与される予定の対象に投与される。

【 0 1 4 7 】

いくつかの態様において、抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは、シスプラチニンを含む組成物を投与された対象または投与される予定の対象に投与される。いくつかの態様において、シスプラチニンは、抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントを含む組成物を投与された対象または投与される予定の対象に投与される。いくつかの態様において、抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは、シクロホスファミドを含む組成物を投与された対象または投与される予定の対象に投与される。いくつかの態様において、シクロホスファミドは、抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントを含む組成物を投与された対象または投与される予定の対象に投与される。

10

【 0 1 4 8 】

いくつかの態様において、本開示の抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは、GM-CSFを含む組成物を投与された対象または投与される予定の対象に、対象が両方による処置を受けるように投与される。いくつかの態様において、GM-CSFは、抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントを含む組成物を投与された対象または投与される予定の対象に投与される。

【 0 1 4 9 】

20

いくつかの態様において、本開示の抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは、IL-12を含む組成物を投与された対象または投与される予定の対象に、対象が両方による処置を受けるように投与される。いくつかの態様において、IL-12は、抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントを含む組成物を投与された対象または投与される予定の対象に投与される。

【 0 1 5 0 】

いくつかの態様において、本開示の抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは、抗CD4剤を含む組成物を投与された対象または投与される予定の対象に、対象が両方による処置を受けるように投与される。いくつかの態様において、抗CD4剤は、抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントを含む組成物を投与された対象または投与される予定の対象に投与される。

30

【 0 1 5 1 】

いくつかの態様において、本開示の抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは、チェックポイント阻害剤（例えば、免疫チェックポイント阻害剤）を含む組成物を投与された対象または投与される予定の対象に、対象が両方による処置を受けるように投与される。いくつかの態様において、免疫チェックポイント阻害剤は、抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントを含む組成物を投与された対象または投与される予定の対象に投与される。

【 0 1 5 2 】

本開示の抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントと組み合わせて使用されるチェックポイント阻害剤は、例えば任意の免疫チェックポイント阻害剤ができることがある。阻害性チェックポイント分子の例としては、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、CD277、IDO、KIR、PD-1、LAG-3、TIM-3、TIGITおよびVISTAが挙げられる。免疫チェックポイント阻害剤とは、免疫阻害性チェックポイントタンパク質の機能を阻害する任意の化合物を指しうる。阻害には、機能の低減および完全な阻止が含まれる。いくつかの態様において、免疫チェックポイント阻害剤は、免疫チェックポイントタンパク質を特異的に認識する抗体である。いくつかの免疫チェックポイント阻害剤が公知であり、これら公知の免疫チェックポイントタンパク質阻害剤と同様に、（近い）将来、代替免疫チェックポイント阻害剤も開発されうる。免疫チェックポイント阻害剤として、ペプチド、抗体、核酸分子および小分子が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。

40

50

【 0 1 5 3 】

いくつかの態様において、免疫チェックポイント阻害剤はCTLA-4の阻害剤である。いくつかの態様において、チェックポイント阻害剤はCTLA-4を標的とする抗体、例えばイピリムマブなどである。いくつかの態様において、チェックポイント阻害剤は、T細胞免疫グロブリンおよびムチンドメイン含有タンパク質3(TIM-3)としても公知の膜貫通タンパク質であるCD366を標的とする。いくつかの態様において、免疫チェックポイント阻害剤は、PD-1シグナル伝達を阻害する剤である。

【 0 1 5 4 】

PD-1(すなわちプログラム細胞死タンパク質1)は、T細胞またはB細胞などの免疫細胞の表面に分布するタンパク質であり、CD279としても公知である。ヒトでは、PD-1は、第2染色体の2p37.3位にあるPDCD1遺伝子によって発現される。PD-1は、2つのリガンドPD-L1およびPD-L2に結合することが公知である。10

【 0 1 5 5 】

いくつかの態様では、抗PD-1剤が、本開示の抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントによる処置を受けていたり、または受けた、または受けた予定の患者に投与される。いくつかの特定の態様において、本開示の抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは、抗PD-1剤による処置を受けていたり、または受けた、または受けた予定の患者に投与される。

【 0 1 5 6 】

いくつかの態様では、抗PD-L1剤が、本開示の抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントによる処置を受けていたり、または受けた、または受けた予定の患者に投与される。いくつかの特定の態様において、本開示の抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは、抗PD-L1剤による処置を受けていたり、または受けた、または受けた予定の患者に投与される。いくつかの態様において、PD-L1を阻害する剤として、例えばAMP-244、MEDI-4736、MPDL3280A、MIH1が挙げられる。20

【 0 1 5 7 】

いくつかの態様において、抗PD-1剤はPD-1を阻害する剤である。いくつかの態様において、抗PD-1剤は、PD-L1および/またはPD-L2を阻害する剤である。いくつかの態様において、PD-1シグナル伝達を阻害する抗体剤は、モノクローナル抗体またはそのフラグメントである。いくつかの態様において、PD-1シグナル伝達を阻害する抗体剤は抗PD-1抗体またはそのフラグメントである。30

【 0 1 5 8 】

いくつかの態様において、抗PD-1抗体は、本開示の抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントによる処置を受けていたり、または受けた、または受けた予定の患者に投与される。いくつかの特定の態様において、本開示の抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは、抗PD-1抗体による処置を受けていたり、または受けた、または受けた予定の患者に投与される。抗PD-1抗体としては、例えばニボルマブ、ベンプロリズマブ、アテゾリズマブ、デュルバルマブおよびアベルマブが挙げられる。ベンプロリズマブ(キイトルーダ、Merck)は、PD-1活性を阻害する抗体治療薬である。

【 0 1 5 9 】

本願の実施例において述べるように、抗PD-1抗体と組み合わせた本開示の抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントの投与は、どちらの単独処置と比較しても、効力を強化しうると共に、従来公知の副作用を低減しうる。40

【 0 1 6 0 】

いくつかの特定の態様において、ベンプロリズマブは、本開示の抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントによる処置を受けていたり、または受けた、または受けた予定の患者に投与される。いくつかの特定の態様において、本開示の抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントは、ベンプロリズマブによる処置を受けていたり、または受けた、または受けた予定の患者に投与される。

【 0 1 6 1 】

50

いくつかの態様において、免疫チェックポイント阻害剤（例えば抗PD-1剤）は、約0.01mg/kg～約100mg/kgの量で、患者に投与される。いくつかの態様において、免疫チェックポイント阻害剤（例えば抗PD-1剤）は、下限とその下限より大きい上限とに挟まれた範囲内の量で、患者に投与される。いくつかの態様において、下限は、約0.01mg/kg、0.025mg/kg、0.05mg/kg、0.075mg/kg、0.1mg/kg、0.25mg/kg、0.5mg/kg、0.75mg/kg、1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、8mg/kg、10mg/kg、20mg/kg、25mg/kg、30mg/kg、40mg/kg、50mg/kg、50mg/kg、70mg/kg、80mg/kgまたは90mg/kgでありうる。いくつかの態様において、上限は、約0.025mg/kg、0.05mg/kg、0.075mg/kg、0.1mg/kg、0.25mg/kg、0.5mg/kg、0.75mg/kg、1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、8mg/kg、10mg/kg、20mg/kg、25mg/kg、30mg/kg、40mg/kg、50mg/kg、50mg/kg、70mg/kg、80mg/kg、90mg/kgまたは100mg/kgでありうる。いくつかの態様において、免疫チェックポイント阻害剤（例えば抗PD-1剤）は、約1mg/kg～約20mg/kg、約1mg/kg～約10mg/kg、約1mg/kg～約5mg/kg、約2mg/kg～約5mg/kg、約2mg/kg～約4mg/kg、約3mg/kg～約5mg/kg、または約3mg/kg～約4mg/kgの量で、患者に投与されうる。いくつかの態様において、免疫チェックポイント阻害剤（例えば抗PD-1剤）は、約1mg/kg、約2mg/kg、約3mg/kg、約4mg/kgまたは約5mg/kgの量で、患者に投与されうる。

【0162】

いくつかの態様において、免疫チェックポイント阻害剤と本開示の抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントとの組み合わせによる処置は、対象におけるCD8⁺T細胞の増殖、遊走、持続性および/または細胞傷害活性を強化しうる。

【0163】

細胞ベースの応用

本発明のさらにもう一つの目的は、4-1BBヒト化抗体またはその抗原結合性フラグメントを投与することによる、活性化T細胞をエクスピボで増殖させるための方法を提供することである。

【0164】

いくつかの態様において、活性化T細胞をエクスピボで増殖させかつ/または単離するための方法は、T細胞の集団を本開示の抗4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントと接触させることによって、活性化T細胞の増殖を増加させる工程を含む。

【0165】

いくつかの態様において、活性化T細胞をエクスピボで増殖させるための方法は、本開示の抗4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントを投与する工程を含む。いくつかの態様において、活性化T細胞は、末梢血単核球（PBMC）の試料から増殖および/または単離される。PBMCは、当技術分野において公知の方法を使って取得および/または単離することができる。

【0166】

いくつかの態様において、活性化T細胞をエクスピボで増殖および/または単離するための方法は、培養培地への抗CD3モノクローナル抗体の（例えば少なくとも約0.5ng/mlの濃度での）投与を含む。いくつかの態様において、活性化T細胞をエクスピボで増殖および/または単離するための方法は、培養培地へのIL-2および/またはIL-15の（例えば少なくとも約10単位/mlである濃度での）投与を含む。

【0167】

いくつかの態様において、抗原特異的活性化T細胞を単離するための方法は、（a）培地中の末梢血単核球（PBMC）を関心対象のエピトープのペプチドおよびIL-2と共に培養する工程、（b）関心対象のエピトープのペプチドを加えることによって、培養細胞における4-1BB発現を誘導する工程、（c）培養細胞を抗4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントで被覆された表面と接触させる工程であって、4-1BBを発現する培養細胞が前記被覆表面に付着する、工程、ならびに（d）接着していない細胞を除去することによって、抗原特異的活性化T細胞を単離する工程を含む。

【0168】

10

20

30

40

50

いくつかの態様において、活性化T細胞はCD8⁺T細胞である。

【0169】

いくつかの態様において、リンパ球（例えばT細胞）は、少なくとも約25[°]、好ましくは少なくとも約30[°]、より好ましくは約37[°]の温度で培養される。

【0170】

本開示は、本明細書に記載の方法によって生じる活性化T細胞（例えばCD8⁺T細胞）が、治療的に（例えばがんの処置に）役立つという認識を包含する。

【0171】

細胞ベースの治療

本開示は、自家がん抗原（自己腫瘍抗原）、例えば正常細胞における存在比は低いが、がん細胞では過剰に発現した自家がん抗原を認識するCD8⁺T細胞を、選択的に単離し、大量培養するための方法を提供する。本開示は、これらの方法によって単離される細胞（例えばCD8⁺T）が、がんの処置に役立つことを開示する。

10

【0172】

いくつかの態様において、がんの処置および/または予防を必要とする対象におけるがんを処置および/または予防するための方法は、本明細書に記載するようなエクスピボ法によって生成させた活性化T細胞の治療有効量を対象に投与する工程を含む。

【0173】

適当に再活性化すると、腫瘍抗原特異的T細胞は自家腫瘍細胞を認識し、排除することができる。例えば腫瘍抗原特異的T細胞は、本明細書に記載の方法を使ってエクスピボで生じさせることができる。養子移入すると、特異的に再活性化されたがん患者由来のT細胞が、インビボで自家ヒト腫瘍を効率よく拒絶する。

20

【0174】

本開示は、本開示の抗4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントを投与することによってエクスピボで調製された活性化T細胞の治療有効量を投与する工程を含む、患者のがんおよび/または腫瘍を予防および/または処置するための方法を提供する。

【0175】

いくつかの態様では、治療方法において使用するためのT細胞が、レシピエント対象と同種異系である（種は同じであるが異なるドナーに由来する）。いくつかの態様では、治療方法において使用するためのT細胞が自家（ドナーとレシピエントは同じ）である。いくつかの態様では、治療方法において使用するためのT細胞が同系である（ドナーとレシピエントは異なるが、同一の双生児である）。

30

【0176】

いくつかの態様において、細胞は、まずそれらをその培養培地から収穫し、次に細胞を投与に適した媒質および容器系（「薬学的に許容される」担体）において洗浄および濃縮することにより、処置有効量で製剤化される。適切な注入媒質として、任意の等張性媒質製剤、典型的には生理食塩水、Normosol R (Abbott) またはPlasma-Lyte A (Baxter) を挙げることができるが、5%デキストロース水溶液または乳酸加リングルも利用することができる。注入媒質にはヒト血清アルブミンを補足することができる。

【0177】

組成物中の細胞の処置有効量は、少なくとも10⁸個、典型的には10⁸個超、少なくとも10⁹細胞、一般的には10¹⁰個超である。細胞の数は、その組成物の最終的用途およびそこに含まれる細胞のタイプに依存するであろう。例えばある特定抗原に特異的な細胞が望ましい場合、その集団は、70%超、一般的には80%超、85%および90~95%のそのような細胞を含有するであろう。ここで提供する使用の場合、細胞は、一般に1リットル以下の体積中にある。いくつかの態様において、投与用の細胞は、500ml未満、250ml未満、または100ml以下の体積中にある。いくつかの態様において、望ましい細胞の密度は、典型的には10⁶細胞/ml超であり、一般的には10⁷細胞/ml超、一般的には10⁸細胞/ml以上である。臨床的に妥当な数の免疫細胞は、累積的に10⁸細胞以上、10⁹細胞以上、10¹⁰細胞以上、10¹¹細胞以上、または10¹²細胞以上である複数回の注入に分割することができる。

40

50

【0178】

組成物

ヒト4-1BBポリペプチドのエピトープに特異的に結合する抗体および抗原結合性フラグメントを含む組成物が、ここに提供される。本開示の組成物（例えば、抗ヒト4-1BB抗体または抗体フラグメントを送達する組成物）は、前述の調整、処置または治療を必要とする細胞、組織、器官、動物または患者への本願抗ヒト4-1BB抗体または抗体フラグメントの送達に使用するための任意の適切な有効量の組成物を含みうる。本開示の方法（例えば、細胞を抗ヒト4-1BB抗体または抗体フラグメントと接触させる工程を含む方法）によって生成させた活性化細胞集団（例えば、活性化T細胞集団）を含む組成物も、ここに提供される。

10

【0179】

本開示の組成物は、本明細書に開示する抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントおよび/または本明細書に開示する方法によって得られる細胞集団を含む薬学的組成物を含む。いくつかの態様において、薬学的組成物は、緩衝剤、希釈剤、賦形剤またはそれらの任意の組み合わせを含むことができる。いくつかの態様において、組成物は、所望であれば、1種または複数種の追加治療活性物質も含有することができる。

【0180】

いくつかの態様において、本開示の抗4-1BB抗体、抗原結合性フラグメントおよび/または細胞集団は、哺乳動物（例：ヒト）への投与に適している。ここに提供される薬学的組成物の説明は、主としてヒトへの要処方投与（ethical administration）に適した薬学的組成物に関するが、そのような組成物があらゆる種類の動物への投与に一般に適することは当業者には理解されるであろう。ヒトへの投与に適した薬学的組成物をさまざまな動物への投与に適した組成物にするための変更はよく理解されており、通常の技量を有する獣医薬理学者は、そのような変更を、仮に実験が必要だとしても単なる日常的実験だけで、計画しつつ/または実行することができる。

20

【0181】

いくつかの態様において、組成物は、非経口投与用に製剤化される。例えばここに提供される薬学的組成物は、無菌の注射可能な形態（例：皮下注射または静脈内注入に適した形態）で提供されうる。例えばいくつかの態様において、薬学的組成物は、注射に適した液状剤形で提供される。いくつかの態様において、薬学的組成物は、注射に先だって水性希釈剤（例：水、緩衝液、塩溶液など）で再構成することができる粉末（例：凍結乾燥および/または滅菌されたもの）として、任意で減圧下に提供される。いくつかの態様において、薬学的組成物は、水、塩化ナトリウム溶液、酢酸ナトリウム溶液、ベンジルアルコール溶液、リン酸緩衝食塩水などに希釈および/または再構成される。いくつかの態様において、粉末は、水性希釈剤と穏やかに（例えば振とうせずに）混合すべきである。

30

【0182】

いくつかの態様において、本開示の抗4-1BB抗体、抗原結合性フラグメントおよび/または細胞集団は、薬学的に許容される非経口媒体と共に製剤化される。そのような媒体の例は水、食塩水、リングル液、デキストロース溶液および1~10%ヒト血清アルブミンである。リポソームおよび固定油などの非水性媒体も使用することができる。媒体または凍結乾燥粉末は、等張性を維持する添加剤（例：塩化ナトリウム、マンニトール）および化学的安定性を維持する添加剤（例：緩衝剤および保存剤）を含有することができる。いくつかの態様において、製剤は、公知の技法または適切な技法によって滅菌される。

40

【0183】

本明細書に記載の薬学的組成物の製剤は、薬学分野において公知のまたは今後開発される任意の方法によって調製されうる。一般に、そのような調製方法は、活性成分を希釈剤もしくは他の賦形剤および/または1種もしくは複数種の他の補助成分と混合し、次に必要であればおよび/または所望であれば、製品を所望の単回投与ユニット（single-dose unit）または複数回投与ユニット（multi-dose unit）に成形および/またはパッケージングする工程を含む。

50

【0184】

いくつかの態様において、本開示の抗4-1BB抗体、抗原結合性フラグメントおよび/または細胞集団を含む薬学的組成物は、貯蔵用または投与用の容器、例えばバイアル、シリング（例：IVシリング）またはバッグ（例：IVバッグ）に含めることができる。本開示による薬学的組成物は、ばらで、単一投薬単位としておよび/または複数の単一投薬単位として、調製され、パッケージングされ、かつ/または販売されうる。本明細書において使用する場合、「投薬単位（unit dose）」とは、予め決定された量の活性成分を含む孤立した量の薬学的組成物である。活性成分の量は、一般に、対象に投与されることになる活性成分の投薬量に等しく、かつ/またはそのような投薬量の好都合な部分量、例えばそのような投薬量の半量または3分の1量に等しい。

10

【0185】

本開示による薬学的組成物における活性成分、薬学的に許容される賦形剤および/または任意の追加成分の相対量は、処置される対象の実体、サイズおよび/または状態に依存して、そしてまた組成物の投与経路にも依存して、さまざまであるだろう。下記の実施例では、一部で、齧歯類への例示的抗ヒト4-1BB抗体の投与を説明する。動物系において投薬をスケーリングする標準的方法は当技術分野において公知である。例えば、参照によりその全体が本明細書に組み入れられるJ Basic Clin Pharm. March 2016-May 2016; 7 (2) :27-31を参照されたい。例えば組成物は0.1% ~ 100% (w/w) の活性成分を含みうる。

【0186】

いくつかの態様において、組成物は、0.01mg/kg ~ 100mg/kgの用量で、本開示の抗ヒト4-1BB抗体もしくは抗原結合性フラグメントを含むか、または送達する。いくつかの態様において、組成物は、下限とその下限より大きい上限とに挟まれた範囲内の量の用量で、抗ヒト4-1BB抗体もしくは抗原結合性フラグメントを含むか、または送達する。いくつかの態様において、下限は、約0.01mg/kg、0.025mg/kg、0.05mg/kg、0.075mg/kg、0.1mg/kg、0.25mg/kg、0.5mg/kg、0.75mg/kg、1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、8mg/kg、10mg/kg、20mg/kg、25mg/kg、30mg/kg、40mg/kg、50mg/kg、50mg/kg、70mg/kg、80mg/kgまたは90mg/kgでありうる。いくつかの態様において、上限は、約0.025mg/kg、0.05mg/kg、0.075mg/kg、0.1mg/kg、0.25mg/kg、0.5mg/kg、0.75mg/kg、1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、8mg/kg、10mg/kg、20mg/kg、25mg/kg、30mg/kg、40mg/kg、50mg/kg、50mg/kg、70mg/kg、80mg/kg、90mg/kgまたは100mg/kgでありうる。

20

【0187】

薬学的組成物は薬学的に許容される賦形剤をさらに含んでよく、本明細書にいう薬学的に許容される賦形剤には、所望するその剤形に適したありとあらゆる溶媒、分散媒、希釈剤または他の液状媒体、分散助剤または懸濁助剤、表面活性剤、等張剤、増粘剤または乳化剤、保存剤、固形結合剤、潤滑剤などが含まれる。Remington's The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, A.R.Gennaro (Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006) は、薬学的組成物を製剤化する際に使用されるさまざまな賦形剤およびそれらを調製するための公知の技法を開示している。従来の賦形剤媒質は、それが、例えば何らかの望ましくない生物学的効果を生むか、そうでなければ薬学的組成物の他の何らかの構成要素と有害な形で相互作用することなどによって、ある物質またはその誘導体と不適合でない限り、いずれも、その使用は本開示の範囲内であると考えられる。

30

【0188】

いくつかの態様において、薬学的に許容される賦形剤は、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%純粋である。いくつかの態様において、賦形剤はヒトでの使用および獣医学的使用について承認されている。いくつかの態様において、賦形剤は米国食品医薬品局によって承認されている。いくつかの態様において、賦形剤は医薬品用である。いくつかの態様において、賦形剤は、米国薬局方（USP）、歐州薬局方（EP）、英國薬局方および/または国際薬局方の規格を満たす。

40

【0189】

50

薬学的組成物の製造において使用される薬学的に許容される賦形剤として、不活性希釈剤、分散および/または造粒剤、表面活性剤および/または乳化剤、崩壊剤、結合剤、保存剤、緩衝剤、潤滑剤および/または油が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。そのような賦形剤は任意で薬学的製剤に含めうる。製剤者の判断次第で、カカオ脂および坐剤ワックス、着色剤、コーティング剤、甘味料、フレーバーおよび/または芳香剤などの賦形剤が、組成物に存在しうる。

【0190】

いくつかの態様において、本願の薬学的組成物は、1種または複数種の薬学的に許容される賦形剤（例：保存剤、不活性希釈剤、分散剤、表面活性剤および/または乳化剤、緩衝剤など）を含む。いくつかの態様において、薬学的組成物は、1種または複数種の保存剤を含む。いくつかの態様において、薬学的組成物は保存剤を含まない。

10

【0191】

いくつかの態様において、本開示の抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントを含む組成物は、安定に製剤化される。いくつかの態様において、本開示の抗ヒト4-1BB抗体または抗原結合性フラグメントの安定な製剤は、食塩水または選ばれた塩を含むリン酸緩衝液、ならびに保存処理された溶液および保存剤を含有する製剤、ならびに薬学的使用または獣医学的使用に適した多用途の保存処理された製剤を含有しうる。保存処理された製剤は、少なくとも1つの公知の保存剤、または任意で、水性希釈剤中の少なくとも1つのフェノール、m-クレゾール、p-クレゾール、o-クレゾール、クロロクレゾール、ベンジルアルコール、亜硝酸フェニル水銀（phenylmercuric nitrite）、フェノキシエタノール、ホルムアルデヒド、クロロブタノール、塩化マグネシウム（例：ヘキサ水和物）、アルキルパラベン（メチル、エチル、プロピル、ブチルなど）、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、デヒドロ酢酸ナトリウムおよびチメロサール、またはそれらの混合物からなる群より選択される保存剤を含有する。当技術分野において公知のとおり、例えば0.001～5%またはその中の任意の範囲もしくは値、例えば限定するわけではないが0.001、0.03、0.005、0.009、0.01、0.02、0.03、0.05、0.09、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、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、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.3、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、またはその中の任意の範囲もしくは値など、任意の適切な濃度または混合物を使用することができる。限定でない例として、保存剤なし、0.1～2%m-クレゾール（例：0.2、0.3、0.4、0.5、0.9、1.0%）、0.1～3%ベンジルアルコール（例：0.5、0.9、1.1、1.5、1.9、2.0、2.5%）、0.001～0.5%チメロサール（例：0.005、0.01）、0.001～2.0%フェノール（例：0.05、0.25、0.28、0.5、0.9、1.0%）、0.0005～1.0%アルキルパラベン（例：0.00075、0.0009、0.001、0.002、0.005、0.0075、0.009、0.01、0.02、0.05、0.075、0.09、0.1、0.2、0.3、0.5、0.75、0.9、1.0%）などが挙げられる。

20

【0192】

いくつかの態様において、薬学的組成物は、冷蔵および/または冷凍することができる形態で提供される。いくつかの態様において、薬学的組成物は、冷蔵および/または冷凍することができない形態で提供される。いくつかの態様において、再構成された溶液および/または液状剤形は、再構成後、一定の期間（例：2時間、12時間、24時間、2日、5日、7日、10日、2週間、1ヶ月、2ヶ月またはそれ以上）にわたって貯蔵することができる。いくつかの態様において、指定された時間より長い抗体組成物の貯蔵は、抗体の分解をもたらす。

30

【0193】

液状剤形および/または再構成された溶液は、投与前に粒状物を含みかつ/または変色を伴う場合がある。いくつかの態様において、変色しているか濁っている場合かつ/または濾過後も粒状物が残っている場合、その溶液は使用すべきでない。

40

【0194】

製剤および/または医薬品の製造に関する一般論は、例えばRemington: The Science and

50

Practice of Pharmacy 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005に見いだしうる。

【0195】

キット

本開示は、少なくとも1種の本明細書に記載の抗ヒト4-1BB抗体または抗体フラグメントで満たされた1つまたは複数の溶液を含む、薬学的パックまたはキットを、さらに提供する。キットは、例えば治療方法、診断方法、細胞増殖および/または細胞単離方法などを含む応用可能な任意の方法において、使用しうる。そのような容器には、任意で、医薬品または生物学的製剤の製造、使用または販売を規制する政府機関によって指定された形式で、(a)ヒト投与のための製造、使用または販売の、当該器官による承認、(b)使用説明、またはその両方を反映した告知を添付することができる。

10

【0196】

いくつかの態様において、キットは、検出(例えば、抗ヒト4-1BB抗体または抗体フラグメントの検出)のための1種または複数種の試薬を含みうる。いくつかの態様において、キットは、検出可能な形態の(例えば検出可能部分または検出可能実体と共有結合で関連付けられた)抗ヒト4-1BB抗体または抗体フラグメントを含みうる。

【0197】

いくつかの態様において、ここに提供する抗ヒト4-1BB抗体または抗体フラグメントは、対象を処置するために使用されるキットに含めることができる。いくつかの態様において、ここに提供する抗ヒト4-1BB抗体または抗体フラグメントは、T細胞(例えば、CD8⁺T細胞)の増殖および/または単離に使用されるキットに含めることができる。

20

【0198】

本願全体を通して言及される引用文献(刊行物(literature reference)、発行済み特許、公表された特許出願、および同時係属中の特許出願を含む)は特に、参照により本明細書に組み入れられる。

【0199】

本発明の他の特徴は、以下の例示的態様の以下の説明において明らかになるであろう。ただし、以下の実施例は本発明を例証するために提供されるに過ぎず、本発明の範囲は以下の実施例には限定されない。

【実施例】

30

【0200】

本開示は、少なくとも一部において、基準ヒト化抗ヒト4-1BB抗体94G1には見いだされない1つまたは複数の構造的特徴を含有する改良された特性を持つヒト化抗ヒト4-1BB抗体およびそれらのフラグメントを提供する。マウス抗ヒト4-1BB抗体BBK-4抗体のヒト化によって94G1を作成した。抗原認識部位(CDR領域)は、CDRループ帰属(CDR loop assignment)(IMGT:Lefranc, 1997)および3Dモデル(Swiss-Pdb Viewer(www.expasy.org))を使って決定した。軽鎖のアミノ酸配列上の4部位と重鎖の6部位とを含む合計10部位に多様性を持つファージディスプレイラーブラリーを構築した。パニング後に、1,000個のクローニングのなかからおよそ14個のヒト化抗体クローニングを(合計6つのヒト化scFvのために)選択し、選択したクローニングのなかに94G1を得た(Son et al. J. Immunol. Methods (2004) 286:187-201)。94G1を含むこれらのヒト化抗体は、ヒト4-1BB抗原に対するアフィニティーが、BBK-4の10分の1未満であったが、インビトロで活性だった。本開示は、94G1の構造変種が改良された特性を有しうるという認識を包含する。変種ヒト化抗ヒト4-1BB抗体およびそれらのフラグメントの作成および特徴づけについて、以下の実施例でさらに詳述する。

40

【0201】

実施例1-ヒト化抗ヒト4-1BB抗体の調製

この実施例では、基準94G1抗体との比較で改良されたアフィニティーを持つ例示的抗ヒト4-1BB抗体の生成について述べる。94G1は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられるSon et al. J. Immunol. Methods (2004) 286:187-201に記載されているように

50

、マウス抗ヒト4-1BB抗体（BBK4）をヒト化することによって作成した。ここでは、活性化T細胞（例えば活性化T細胞株）から特異的に単離され、未刺激のT細胞からは同定されたことがない、H4-1BB抗原（アクセッショ番号KCTC0952BP）も使用する。例えばH4-1BB抗原は、ホルボールミリストートアセテート（PMA）、イオノマイシン、コンカナバリンAまたは抗CD3iによって成熟させたT細胞から単離することができる。このH4-1BB抗原は1.4 kbのサイズを有し、マウス4-1BBとの相同性は60%である（Garni-Wagner et al., *Cellular Immunology* (1996) 169:91-98。この文献は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる）。この実施例では、94G1を軽鎖ベクターと重鎖ベクターとに分割し、改良されたヒト化抗体が生じるように、それぞれを最適化した。

【0202】

10

本開示は、改良されたヒト化抗ヒト4-1BB抗体またはそれらのフラグメントを生じさせるための適切な方法が、段階的な单一アミノ酸置換および/またはそれらの組み合わせによる方法であるという認識を包含する。本開示は、94G1抗体には見いだされない1つまたは複数の構造的特徴（例えばアミノ酸置換）を持つヒト化抗ヒト4-1BB抗体およびそれらのフラグメントのさまざまな構造変種を提供する。本開示は、1つまたは複数の抗体特性（例えば増加した抗原アフィニティー）の段階的改良のために、構造的特徴を組み合わせることができるという認識を、さらに包含する。

【0203】

まず、重鎖ではなく軽鎖のCDR領域を変化させることによって、94G1基準抗体と比較して増加したアフィニティーを持つヒト化抗ヒト4-1BB抗体を得た。この軽鎖構造変種を固定し、それを、例えば94G1のCDR領域に変異を持つヒト化抗ヒト4-1BB抗体重鎖構造変種と組み合わせた。さらなる構造的特徴を統合することで、高いアフィニティーおよび/または他の改良された特徴を持つヒト化抗ヒト4-1BB抗体を生じさせた。

20

【0204】

1.1 ベクターの構築

大腸菌においてヒト化抗体の重鎖および軽鎖を改良するために、94G1軽鎖および94G1重鎖を持つベクターを、それぞれpComb3H-HAに変更を加えることによって構築して、Fab型で発現させた（J. Immunol Methods (2008) 329 (1-2):176-83、Virology (2004) 318:598）。具体的には、AP2タグ

(SEQ ID NO: 42 - NANNPDWDFNP)

30

をflagタグ

(SEQ ID NO: 43 - DYKDDDDK)

に変えることによって設計されたベクターに、94G1軽鎖を挿入した。flagタグはその下流に配置されるように設計されている。NCBI GenBankの公知データから得られたヒト重鎖配列（アクセッショ番号AB019438）を、重鎖位置に定常ドメインとして配置した。さらに、94G1軽鎖配列をベクターにクローニングした後、それを形質転換によって大腸菌（例えばTG1）(F' [traD36 proAB + lacIqlacZ M15] supE thi-1 (lac-proAB) (mcrB-h sdSM) 5, (rK-mK-) に導入し、次に、pCOM-Fab-94G1-Lと名付けた形質転換ベクターを選択し、それを軽鎖の親和性成熟を誘導するためのバックボーンとして使用した（表1）。上述の方法を94G1重鎖についても同様に実行し、選択したベクターをpCOM-Fab-94G1-Hと名付けた。改良された軽鎖94/wをpCOM-Fab-94G1の軽鎖として設計し、それを、改良されたアフィニティーを持つ重鎖変種を生成させるためのバックボーンとした。

40

【0205】

（表1）94G1および94/wのLCDRアミノ酸配列

SEQ ID NO.	アミノ酸配列	CDR
SEQ ID NO: 1	QTISDY	LCDR 1
SEQ ID NO: 2	YAS	LCDR 2
SEQ ID NO: 3	QDGHSFPPT	LCDR 3
SEQ ID NO: 4	QDGHSWPPT	LCDR 3.6 変種 94/w

【0206】

10

1.2 ヒト化抗ヒト4-1BB抗体軽鎖の親和性成熟

ここでは、改良された結合アフィニティーを有する軽鎖変種を持つヒト化抗ヒト4-1BB抗体の開発について述べる。上述のpCOM-Fab-94G1-ベクターにおいて94G1軽鎖のLCDR3 (SEQ ID NO:3) を下記のように改変することによって、高いアフィニティーを持つ抗体を得た。94G1軽鎖のLCDR3部分を構成する9アミノ酸SEQ ID NO:3の各アミノ酸位置に19種の異なるアミノ酸を挿入するように設計されたプライマー [NNS (N: A, T, C, G; S: C, G) を使用] を使ったPCRにより、軽鎖をコードするさまざまなDNA配列を増幅した。増幅産物をベクターの軽鎖部分にライゲートしてから、大腸菌TG1に形質転換した。LCDR3の軽鎖構造変種を持つクローニングはすべて異なる形で置換されており、それらを集めて9つの位置混合物 (position mix) を調製した。各アミノ酸位置が異なるアミノ酸で置換されているかどうかを評価するために、それぞれの位置において改変された2つのクローニングをランダムに選び、ABI-3730xlシーケンサーを使って配列決定することによって分析したところ、さまざまな位置において、それぞれの位置のアミノ酸残基が置換されていることがわかった。

20

【0207】

さまざまなLCDR3位置に変異を持つ94G1 Fab変種の抗体アフィニティーが増加しているかどうかを知るために、大腸菌TG1に (最終濃度が1mMになるように) IPTGを加えることによって、各位置混合物を発現させた後、上清中に存在するFab抗体をELISAに付した。具体的には、各位置混合物を、37 のインキュベーターにおいて、2YT培地中で、振とうしながら、培養物の吸光度が600nmで0.8以上になるまで培養した後、IPTG (例えば最終濃度1mM) と共に30 で一晩培養した。翌日、4 、12,000rpmで10分間の遠心分離によって得た上清で、ELISAを行った。4-1BB Fabに関する各クローニングの結合活性を、それぞれの変異体クローニングについての発現レベルで割ることによって、さまざまな94G1 LCDR3変種Fabについて、結合アフィニティーを決定した。LCDR3の6番目 (LCDR3.6) に変異を持つ94G1 LCDR3変種が最も高い結合アフィニティーを示した。

30

【0208】

30

次に、LCDR3.6位置における94G1のさまざまな変異が抗体アフィニティーにどのような影響を及ぼすかを決定するために、pCOM-Fab94G1-LCDR3.6位置混合物から25のモノクローナル抗体を単離し、大腸菌 (例えばTG1) にIPTG (例えば最終濃度1mM) を加えることによって発現させ、培養し、上清中に存在するFab抗体に対してELISAを行った。各クローニングの4-1BB Fab結合活性をそれぞれの発現レベルで割ることによって、さまざまな94G1 LCDR3.6クローニングについて、結合アフィニティーを決定した。

40

【0209】

LCDR3.6位置のフェニルアラニンがトリプトファンで置換されている94G1 LCDR3.6変種が、最も高い結合アフィニティーを示した。改良された94G1軽鎖でpCOM-Fab94G1-Lの定常重鎖をバックボーン94G1の重鎖で置換することによって調製されたFab抗体を、94/wと名付けた。したがって94/w変種は、LCDR3の6番目のアミノ酸がトリプトファン (W) で置換されている (QDGHSWPPT-SEQ ID NO:4) 改良された94G1軽鎖と、94G1重鎖とを含む。94/w Fabの大腸菌におけるIPTG誘導発現とELISAとを使って、上述のように結合アフィニティーを決定した。この方法を使って、94/w Fab抗体は94G1 (Fab抗体) より3.5倍高い結合活性

50

を有することが決定された（データ省略）。

【0210】

1.3 ヒト化抗ヒト4-1BB抗体重鎖CDRの親和性成熟

ここでは、改良された結合アフィニティーを有する重鎖構造変種を持つヒト化抗ヒト4-1BB抗体の開発について述べる。さらに改良された抗ヒト4-1BB抗体を達成するために、上述の94/w重鎖を使用して、94G1重鎖をアフィニティー成熟させた。下記表2に基準94G1抗体重鎖についてHCDRアミノ酸配列を示す。

【0211】

（表2）94G1および94KのHCDRアミノ酸配列

SEQ ID NO.	アミノ酸配列	CDR
SEQ ID NO: 5	GYTFSSYW	HCDR 1
SEQ ID NO: 6	INPGNGHT	HCDR 2
SEQ ID NO: 7	ARSFTTARAFAY	HCDR 3
SEQ ID NO: 8	ARSFKTARAFAY	HCDR 3.5 変種 94K

10

【0212】

20

94/wを出発配列として使用する重鎖の改良は、上記94G1重鎖について述べた方法と同様の方法によって行った。特に、94G1重鎖を改良するために、HCDR2および/またはHCDR3のそれぞれのアミノ酸位置において、アミノ酸残基をさまざまなアミノ酸で置換した。重鎖の第3CDR (HCDR3、SEQ ID NO:7) の場合は、94/w HCDR3のアミノ酸残基の、異なるアミノ酸によるランダム置換でクローニングを生成させ、それらを集めて、12個の位置混合物を調製した。HCDR3の長さが増加する変異体クローニングも調製した。HCDR3の5番目のアミノ酸残基を異なるアミノ酸で置換したときに、アフィニティーの増加が観察された。次に、HCDR3.5位置におけるさまざまな変異が94/w抗体のアフィニティーにどのような影響を及ぼすかを決定するために、94/w抗体のHCDR3.5位置がランダムに置換された位置混合物から、19のモノクローナル抗体を単離した。IPTGを（例えば1mMの濃度になるように）加えることによって大腸菌においてHCDR3.5変種Fabを発現させ、上清中に存在するFab抗体を使ってELISAを行った。配列決定により、HCDR3.5（5番目の位置）位置においてスレオニンをリジンで置換した場合に

（SEQ ID NO: 8 – ARSFKTARAFAY）

30

、最も高いアフィニティーを示すことが確認され、その結果得られた生成物を94K/wと名付けた。

【0213】

40

重鎖の第2CDR (HCDR2) の場合は、ELISA用に、94G1 HCDR2 (SEQ ID NO:6) の9アミノ酸のそれぞれのランダム置換によって、位置混合物を調製した。ELISAの結果は、2番目、5番目および6番目の位置にあるアミノ酸残基を変更した場合に、アフィニティーが増加することを示した。94/w HCDR2.2、HCDR2.5およびHCDR2.6位置混合物のそれから、それぞれ22、19および36のモノクローナル抗体を単離し、4-1BBに関して各クローニングの結合活性をFab発現レベルに応じて分析した。HCDR2.5の場合、ELISA値は、アスパラギンをバリン（V）、グリシン（G）またはプロリン（P）で置換した場合にそれより比較的高かった。加えて、抗体重鎖の配列決定データによれば、HCDR2 (SEQ ID NO:6) の5番目のアミノ酸アスパラギン（N）における脱アミノ化のリスクがあったので、この残基にグルタミン（Q）、グルタミン酸（E）およびセリン（S）による置換を持つ変種HCDR2配列も調製した。

【0214】

上述した重鎖の改良に使用した方法により、上述のように調製された重鎖のHCDR3およ

50

び/またはHDR2に変異を持つ94G1構造変種のDNAを、3塩基配列NNSを使ったPCRによって増幅し、94/w軽鎖の定常ドメインを有するベクターの重鎖位置にライゲートしてから、大腸菌TG1に形質転換した。

【 0 2 1 5 】

1.4 ヒト化抗ヒト4-1BB抗体重鎖フレームワーク領域の最適化

最適化されたフレームワーク配列を持つ重鎖変種も生成させた。例えば、5番目のアミノ酸グルタミン(Q)がバリン(V)で置換されるように重鎖FR1(SEQ ID NO:16)が修飾された重鎖フレームワーク1(FR1)領域を生成させた。例示的なFR1領域を下記表3に示す。

【 0 2 1 6 】

(表3) 94G1重鎖FR1およびそのバリエーション

SEQ ID NO.	アミノ酸配列	
SEQ ID NO: 16	QVQLQQSGAEVKPGASVKLSCKAS	94G1 FR1
SEQ ID NO: 17	QVQLVQSGAEVKPGASVKLSCKAS	FR1 Gln 5 Val

【 0 2 1 7 】

また、重鎖FR3(SEQ ID NO:18)が同様に修飾されたフレームワーク3(FR3)領域も生成させた。すなわち、マウス配列である10番目のアミノ酸アラニン(A)および33番目のアミノ酸セリン(S)をそれぞれバリン(V)およびスレオニン(T)で置換した。例示的なFR3領域を下記表4に示す。

【 0 2 1 8 】

(表4) 94G1重鎖FR3およびそのバリエーション

SEQ ID NO.	アミノ酸配列	
SEQ ID NO: 18	NYNEKFKSRATMTRDTSTSTAYMELSSLRSED SAVYYC	94G1 FR3
SEQ ID NO: 19	NYNEKFKSRVTMTRDTSTSTAYMELSSLRSED SAVYYC	FR3 Ala 10 Val
SEQ ID NO: 20	NYNEKFKSRVTMTRDTSTSTAYMELSSLRSED TAVYYC	FR3 Ala 10 Val; FR3 Ser 33 Thr

【 0 2 1 9 】

1.5 ヒト化抗ヒト4-1BB可変領域および完全長抗体の調製

上述の重鎖CDRおよび軽鎖CDRならびにフレームワーク領域のさまざまな組合せを含む抗ヒト4-1BB抗体可変領域を生成させた。例えばFab型94KVT/w抗体は、重鎖のCDR3において5番目のアミノ酸スレオニンをリジン(K)で置換し、重鎖FR3の10番目のアミノ酸アラニンおよび重鎖FR3の33番目のアミノ酸セリンをそれぞれバリン(V)およびスレオニン(T)で置換して、それぞれSEQ ID NO:30およびSEQ ID NO:34であるかそれらの配列を含む重鎖可変領域配列および軽鎖可変領域配列を生成させることで、生成させた。加えて、HCDR2(SEQ ID NO:6)の5番目のアミノ酸アスパラギン(N)がグルタミン(Q)、グルタミン酸(E)またはセリン(S)で置換された94KVT重鎖変種も生成させた。例示的な重鎖および軽鎖可変ドメイン配列を下記表5に示す(CDR配列に下線を付す)。

【 0 2 2 0 】

(表5) 例示的なヒト化抗ヒト4-1BB抗体可変ドメイン

10

20

30

40

50

抗体	軽鎖可変ドメイン	重鎖可変ドメイン
94G1	DIVMTQSPAFLSVTPGEKVTIT <u>CRASQTISDYLHWYQQKPDQ</u> APKLLIKYASQSISGIPSRFSGS GSGTDFTFTISSLAEAEDAATYY <u>CQDGHSFPPTFGQGTKLEIK</u> (SEQ ID NO: 9)	QVQLQQSGAEVKPGASVKLS CKAS <u>GYTFSSYWMHWVRQAP</u> GQGLEWIGE <u>INPGNGHTNYNEK</u> FKSRATMTRDTSTSTAYMELSS LRSEDSAVYYC <u>ARSFTTARAFA</u> <u>YWGQGTLTVSS</u> (SEQ ID NO: 11)

94w	DIVMTQSPAFLSVTPGEKVTIT <u>CRASQTISDYLHWYQQKPDQ</u> APKLLIKY <u>ASQSISGIPSRFSGS</u> GSGTDFTFTISSL <u>EAEDAATYY</u> <u>CQDGHSWPPTFGQGTKLEIK</u> (SEQ ID NO: 10)	QVQLQQSGAEVKPGASVKLS CKAS <u>GYTFSSYWMHWVRQAP</u> GQGLEWIGE <u>INPGNGHTNYNEK</u> FKSRATMTRDTSTSTAYMELSS LRSEDSAVYYC <u>CARSFTTARAFA</u> <u>YWGQGTLTVSS</u> (SEQ ID NO: 11)	10
94K/w	DIVMTQSPAFLSVTPGEKVTIT <u>CRASQTISDYLHWYQQKPDQ</u> APKLLIKY <u>ASQSISGIPSRFSGS</u> GSGTDFTFTISSL <u>EAEDAATYY</u> <u>CQDGHSWPPTFGQGTKLEIK</u> (SEQ ID NO: 10)	QVQLQQSGAEVKPGASVKLS CKAS <u>GYTFSSYWMHWVRQAP</u> GQGLEWIGE <u>INPGNGHTNYNEK</u> FKSRATMTRDTSTSTAYMELSS LRSEDSAVYYC <u>CARSFKTARAFA</u> <u>YWGQGTLTVSS</u> (SEQ ID NO: 12)	20
94KV/w	DIVMTQSPAFLSVTPGEKVTIT <u>CRASQTISDYLHWYQQKPDQ</u> APKLLIKY <u>ASQSISGIPSRFSGS</u> GSGTDFTFTISSL <u>EAEDAATYY</u> <u>CQDGHSWPPTFGQGTKLEIK</u> (SEQ ID NO: 10)	QVQLVQSGAEVKPGASVKLS CKAS <u>GYTFSSYWMHWVRQAP</u> GQGLEWIGE <u>INPGNGHTNYNEK</u> FKSRVTMTRDTSTSTAYMELSS LRSEDSAVYYC <u>CARSFKTARAFA</u> <u>YWGQGTLTVSS</u> (SEQ ID NO: 13)	30
94KVT/w, EU101	DIVMTQSPAFLSVTPGEKVTIT <u>CRASQTISDYLHWYQQKPDQ</u> APKLLIKY <u>ASQSISGIPSRFSGS</u> GSGTDFTFTISSL <u>EAEDAATYY</u> <u>CQDGHSWPPTFGQGTKLEIK</u> (SEQ ID NO: 10)	QVQLVQSGAEVKPGASVKLS CKAS <u>GYTFSSYWMHWVRQAP</u> GQGLEWIGE <u>INPGNGHTNYNEK</u> FKSRVTMTRDTSTSTAYMELSS LRSEDTAVYYC <u>CARSFKTARAFA</u> <u>YWGQGTLTVSS</u> (SEQ ID NO: 14)	40

【 0 2 2 1 】

完全長抗ヒト4-1BB抗体（全Ig型）への変換のために、それぞれのFabにFcドメインをつけないだ。例えば、HCDR3.5においてスレオニンがリジンで置換されている重鎖およびLCDR3の6番目のアミノ酸がトリプトファン（W）で置換されている94/w変種を持つ軽鎖とで構成される94K/w Fab、ならびにCH2ドメインおよびCH3ドメインから伸びるそれぞれの領域およびヒトIgG1の配列を、オーバーラップするようにPCRによって増幅し、スプライスPCR（splice PCR）に付することで、完全長IgG DNAを生成させ、次に、その結果得られたDNAを哺乳類発現ベクターにクローニングした。本明細書に記載する他のヒト化抗ヒト4-1BB抗体

についても、同様の方法で完全長抗体を生産した。例示的な免疫グロブリン定常領域配列を下記表6に示す。

【0222】

(表6) 例示的免疫グロブリン定常ドメイン

SEQ ID NO.	アミノ酸配列	説明
SEQ ID NO: 21	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	κ定常ドメイン 10
SEQ ID NO: 22	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDY FPEPVTWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTS KAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	IgG1 20
SEQ ID NO: 23	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDY FPEPVTWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTS KAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	IgG1変種 (L234; L235; K322) 30 40

【0223】

本明細書にいう完全長94KVT/w抗体は、IgG1配列、例えばSEQ ID NO:22のものを含む。加えて、上述の94KVT/w可変ドメイン（軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインに関して、それぞれSEQ ID NO:10および14）を、3つの変異:L234、L235およびK322を含む変種IgG1定常ドメイン（SEQ ID NO:23）と共に含む、本明細書においてEU101と呼ぶ完全長抗体も生産した。このように、本実施例は、抗原結合アフィニティーが潜在的に強化されるよ
50

うに改変された、いくつかの例示的ヒト化抗ヒト4-1BB抗体および抗体フラグメントを提供する。以下の実施例ではこれらの例示的抗体およびフラグメントを特徴づける。

【0224】

実施例2-ヒト化抗ヒト4-1BB抗体の結合の特徴づけ

2.1 抗ヒト4-1BB抗体の結合エピトープの決定

本開示は、ここに提供するヒト化抗ヒト4-1BB抗体が、4-1BB共刺激に役立つという認識を包含する。本開示の抗体の治療的応用には、抗がん免疫および/または抗ウイルス免疫の促進が含まれる。しかし臨床応用には、ヒト4-1BBのどの部分が抗ヒト化4-1BB抗体によって認識されかつ/または抗ヒト化4-1BB抗体と反応するのか(すなわち結合エピトープ)を同定することが重要である。4-1BB分子の異なるエピトープを認識する4-1BB抗体が同定されており、これらの抗体は異なる臨床効果を有することが示されている場合がある。(例えば、参考によりその全体が本明細書に組み入れられるKwon et al. Eur. J. Immunogenetics (2002) 29:449-452参照)。エピトープマッピングは、抗体-抗原認識の分子決定子を同定するための方法を包含する。この実施例では、上記実施例1において改変した例示的抗ヒト4-1BB抗体のエピトープマッピングについて述べる。具体的には、この実施例では、94KVT/w可変ドメインを持つヒト化抗ヒト4-1BB抗体EU101の結合エピトープを評価する。

【0225】

ヒト化4-1BB抗体のエピトープを調べるためのヒト4-1BB抗原は、本願の発明者らの少なくとも一部が作成した、ヒト末梢血リンパ球から作製されたcDNAライブラリーに由来する(例えばKwon et al. Cellular Immunology (1996) 169:91-98、Immunol. Lett. (1995) 45:67-73、および韓国特許第10-0500286号参照。これらの文献はそれぞれ参考により本明細書に組み入れられる)。得られた4-1BB cDNAのヒトホモログ(本明細書では以下、H4-1BBという)の細胞外ドメイン(ECD)をコードするcDNAを選択し、GSTと融合させた後、発現させるためにベクター(pGEX-6T)に挿入した。本明細書において使用するGST-4-1BB融合ポリペプチドを生産する細胞株は韓国特許第10-0500286号に関する開示の一部として寄託された。受託番号KCTC 0952BP。ヒト4-1BBの完全長配列を以下にSEQ ID NO:44として示す。ヒト4-1BBの細胞外ドメインは、完全長H4-1BB配列のアミノ酸1~167に対応する。

【0226】

SEQ ID NO:44-完全長ヒト4-1BB配列
MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSQDPCSNCPAGTFCDDNNRNQICSPCPPN
SFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCPTGFHCLGAGCSM
CEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSDGKSVLVN
GTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQIISFFLALTSTALLF
LLFFLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEDGCSCRFPEEEAGGCEL

【0227】

本開示のヒト化抗ヒト4-1BB抗体によって認識される4-1BBのエピトープを決定するために、さまざまなサイズの4-1BB細胞外ドメインのフラグメント(例: R1、R2、R3)でコンストラクトを作成し、GSTに融合し、複製した。本実施例において使用するGST-4-1BBポリペプチドの略図を図1Aに示す。また、異なる4-1BB細胞外ドメインコンストラクトを作成するためにここで使用した例示的プライマー配列を、下記表7に示す。個々の組換えGST-H-4-1BBコンストラクトを、大腸菌BL21DX5 中で、1mM IPTGと共に培養して生成させ、グルタチオン-アガロースカラムを使って融合ポリペプチドを精製した。

【0228】

(表7)エピトープマッピングに役立つヒト4-1BB細胞外ドメインを生成させるために使用した例示的プライマー

	フォワード	リバース
R1	5'- GGATCCACAAGATCATTGCA G-3' (SEQ ID NO. 24)	5'- TTGAGCTCGAGCCTGGTCCTGAAA ACA-3' (SEQ ID NO. 25)
R2	5'- CGCGTGGATCCAAGGAGTGTTCCTC CA-3' (SEQ ID NO. 26)	5'- TTGAGCTCGAGACGTTCTGATCG TTA-3' (SEQ ID NO. 27)
R3	5'- CGCGTGGATCCGGCATCTGTCGACC CT-3' (SEQ ID NO. 28)	5'- TTGAGCTCGAGGATCTGCGGAGAG TGT-3' (SEQ ID NO. 29)
R1.1	5'- GGATCCACAAGATCATTGCA G-3' (SEQ ID NO. 30)	5'- CTCGAGGCATATGTCACAG GT-3' (SEQ ID NO. 31)
R1.2	5'- GGATCCACAAGATCATTGCA G-3' (SEQ ID NO. 32)	5'- CTCGAGGCTGGAGAACT AT-3' (SEQ ID NO. 33)
R1.3	5'- GGATCCTGCCAGCTGGTA C-3' (SEQ ID NO. 34)	5'- TTGAGCTCGAGCCTGGTCCTGAAA ACA-3' (SEQ ID NO. 35)
R1.4	5'- GGATCCAGGAATCAGATTG C-3' (SEQ ID NO. 36)	5'- TTGAGCTCGAGCCTGGTCCTGAAA ACA-3' (SEQ ID NO. 37)
R1.5	5'- GGATCCACAAGATCATTGCA G-3' (SEQ ID NO. 38)	5'- CTCGAGGCAAATCTGATT CT-3' (SEQ ID NO. 39)
R1.6	5'- GGATCCACAAGATCATTGCA G-3' (SEQ ID NO. 40)	5'- CTCGAGTGGAGGACAGGG CT-3' (SEQ ID NO. 41)

【 0 2 2 9 】

形質転換細菌細胞から、溶解緩衝液（例えば、10mM Tris-HCl-pH7.4、50mM NaCl、5mM EDTA、30mM NaF、0.1mM Na3VO4、1%Triton X-100、0.5%Nonidet P-40、1mM PMSFおよびプロテアーゼ阻害剤混合物）によって、精製タンパク質試料を得た。およそ20 µgの各融合ポリペプチド試料を4×SDS試料緩衝液に希釈し、SDS-PAGEでの電気泳動に付した後、ニトロセルロースメンブレン（Millipore、マサチューセッツ州ベッドフォード）に転写した。そのセルロースメンブレン上で、抗ヒト4-1BB mAbを抗マウスIgGセイヨウワサビペルオキシド（HRP）と反応させた。結合抗体は、増感化学発光（ECL）（Amersham Pharmacia Biotech、英国リトル・チャルフォント）によって認識した。

【 0 2 3 0 】

上述したように、また図1Bに示すように、オーバーラップしていない3つのH4-1BB ECDフラグメント-GST融合ポリペプチドR1、R2およびR3のそれぞれを、それぞれGST結合で処理したところ。本開示に包含される例示的ヒト化抗4-1BB抗体（EU101）は、およそ32kDaのN末端フラグメントコンストラクト（R1）融合コンストラクト（4-1BBのアミノ酸1～55）に結合することが、ウェスタンプロットティングによって決定された。さらにまた、R2融合コンストラクトまたはR3融合コンストラクトのどちらでも結合は観察されなかったので、この結合は特異的であった。図1B参照。

【 0 2 3 1 】

さらに、ヒト化抗4-1BB抗体の最小結合部位を決定するために、図1Aに図示するよう

10

20

30

40

50

、R1細胞外ドメインフラグメントを、さらに小さな6つのフラグメント: R1.1 (4-1BBのアミノ酸1~45)、R1.2 (4-1BBのアミノ酸1~35)、R1.3 (4-1BBのアミノ酸11~55)、R1.4 (4-1BBのアミノ酸21~55)、R1.5 (4-1BBのアミノ酸1~25) およびR1.6 (4-1BBのアミノ酸1~30) ポリペプチドフラグメントにさらに分割し、GST (グルタチオンS-トランスフェラーゼ、27kDa) に融合した。これらのコンストラクトの作成に使用した例示的プライマー対を上記表7に示す。融合ポリペプチドコンストラクトを、IPTG誘導 (例えば1mM IPTG) を使って大腸菌BL21細胞中で生産し、細菌全細胞抽出物を12% SDS-PAGEで分離した。図2Aに示すように、SDS-PAGEにより、個々の4-1BB融合ポリペプチドは十分に発現していることが確認された。

【0232】

10

SDS-PAGEをニトロセルロースメンブレンに転写し、例示的抗ヒト4-1BB抗体EU101を使ってイムノプロッティングを行った。図2Bに示すように、例示的ヒト化抗4-1BB抗体に結合するには、H4-1BBの細胞外ドメインのアミノ酸10~30の配列が重要であることが確認された。この分析は、本開示の例示的抗ヒト4-1BB抗体 (EU101) が、
CPAGTFCDNNRNQICSPCPP (SEQ ID NO: 15)

であるかそれを含む配列を持つヒト4-1BBのエピトープに結合することを示している。4-1BB細胞外ドメインのアミノ酸35~50を含む配列が本明細書に記載の例示的ヒト化抗体への結合にとって重要なことも確認された (図2B)。

【0233】

2.2 4-1BB抗原に対する例示的ヒト化抗ヒト4-1BB抗体の結合アフィニティーの評価

20

例示的抗ヒト4-1BB抗体の結合能

ヒト4-1BB抗原 (H4-1BB) への、実施例1に記載の例示的ヒト化抗ヒト4-1BB抗体の結合能を調べるために、ELISAを行った。抗原には大腸菌で発現させた組換えヒト4-1BBを使用した。

【0234】

マウスBBK-4抗体、基準94G1ヒト化抗体および実施例1に記載の改変された例示的抗体94K、94KV、94KVTおよびEU101を、ヒスチジンタグ付き4-1BB細胞外ドメイン組換えタンパク質 (H4-1BB) でコーティングした96ウェルプレート上で、それぞれ処理した。例示的ELISAアフィニティー分析では1.0 μg/mlの濃度で100 μlの総体積を使用し、反応を室温で1時間進行させた。適宜、抗体を認識するセイヨウワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗ヒトIgGおよび抗mIgG-HRPを、そこに添加し、室温で40分間反応させた。洗浄し、発色反応の基質であるABTS溶液 (Sigma-Aldrich) で処理し、室温で30分間反応を進行させた後、発色反応の450nmにおける吸光度をELISAリーダーで検出することで、抗体の結合活性を分析した。結果を図3に示す。図3に示すように、抗体濃度が増加するにつれて、各抗体と4-1BB抗原 (H4-1BB) との間の結合が、改善される。このデータにより、本開示が包含する抗体は4-1BBに特異的に結合することが確認される。

30

【0235】

細胞が発現した抗原への例示的抗4-1BB抗体の結合

細胞上のヒト4-1BB抗原 (H4-1BB) に結合する、例示的ヒト化抗ヒト4-1BB抗体の能力を評価した。4-1BBを過剰発現するようにJurkat 8-1細胞を遺伝子改変した。実施例1に記載の例示的な改変された抗体94K、94KV、94KVTおよびEU101を、マウスBBK-4抗体および基準94G1ヒト化抗体と共に、適宜、抗mIgG-HRP二次抗体または抗hIgG-HRP二次抗体を使って、それぞれJurkat 8-1細胞への結合について評価し、FACSによって分析した。図4に示すように、抗体のそれぞれは、Jurkat 8-1細胞によって発現された4-1BBに効果的に結合することができ、94KVTおよびEU101のアフィニティーはBBK-4および94G1より高かった。

40

【0236】

抗原への例示的抗ヒト4-1BB抗体のインピトロ結合アフィニティー

実施例1に記載の例示的な改変された抗体EU101のインピトロ結合アフィニティーを、基準94G1ヒト化抗体のインピトロ結合アフィニティーと共に、Biacore分析によってそれぞれ決定した。抗ヒトIgGをCM5チップ上に固定化し、上で調製したFab抗体をチップ上に流

50

すことによってカップリングし、最後にヒト4-1BB抗原(H4-1BB)と反応させることで、抗体と抗原の間の結合活性を測定した(Biacore3000、センサーチップCM5)。アフィニティー測定結果を図5に示す。Ka(1/Ms)値とKd(1/s)値は、それぞれ抗体の抗原との会合および抗体の抗原からの解離がどのくらい速いかを表している。解離定数(K_D)は、KdをKaで割ることによって得られる(Kd/Ka = K_D)。

【0237】

解離定数が減少するにつれて、解離はより低い濃度で起こり、アフィニティーは増加していると解釈することができる。図5に示すように、例示的な改変された抗ヒト4-1BB抗体は、基準94G1と比較して改良された結合アフィニティーを持っていた。

【0238】

例示的抗ヒト4-1BB抗体は活性化CD8⁺ T細胞によって発現された4-1BBを認識する

CD8⁺ T細胞をヒトPBMCから単離し、1 μg/mlの抗CD3抗体で2日間活性化した。実施例1に記載の例示的ヒト化抗ヒト4-1BB抗体(94K、94KV、94KVTおよびEU101)の、活性化CD8⁺ T細胞表面の4-1BBを検出する能力を、例示的市販抗4-1BB抗体(4-1BB-PE)と比較して評価した。BBK-4マウス抗ヒト4-1BB抗体および94G1基準ヒト化抗体による検出も示す。4-1BB抗体による処理は25ng/mlの濃度で行った。

【0239】

例示的抗体を、適宜、抗mIgG-DyLight488または抗hIgG-DyLight488で検出し、FACSで分析した。結果を図6に示す。基準94G1抗体がCD8⁺ T細胞の17.93%に4-1BBを検出したのに対し、94KVT抗体およびEU101抗体のそれぞれは、それぞれ25.3%および28.33%のロバストな検出を示した。これは、例示的抗体94KVTおよびEU101がどちらも、BBK-4および94G1との比較で、改変された結合特性を有したことを実証している。このように、本開示のヒト化変種抗体は、インピトロで、活性化T細胞への結合に優れている。

【0240】

実施例3-ヒト化抗ヒト4-1BB抗体のインピトロ効力の分析

抗4-1BB抗体が、活性化CD8⁺ T細胞において発現される共刺激分子4-1BBにシグナル刺激を与えて、CD8⁺ T細胞を活性化し、増殖を誘導し、T_H1型サイトカイン発現を増加させることは、以前に実証されている。この実施例では、実施例1に記載の例示的ヒト化抗ヒト4-1BB抗体の、CD8⁺ T細胞の増殖およびT_H1型サイトカイン発現を誘導する能力を調べた。

【0241】

3.1 例示的抗ヒト4-1BB抗体はCD8⁺ T細胞の細胞増殖を誘導する

CD8⁺ T細胞の増殖を評価するために、細胞増殖試薬であるWST-1(水溶性テトラゾリウム塩)で細胞を染色した。WST-1標識CD8⁺ T細胞を調製し、0.5 μg/mlの抗CD3抗体で活性化した。活性化CD8⁺ T細胞を1.0 μg/mlのアイソタイプ対照抗体、マウスBBK-4抗体、基準94G1抗体および実施例1に記載の例示的ヒト化抗ヒト4-1BB抗体(94K、94KV、94KVTおよびEU101)で処理した。MACSシステムを使って細胞を分析した。結果を図7に示す。図7を参照して述べると、本開示の例示的ヒト化抗ヒト4-1BB抗体はCD8⁺ T細胞の細胞増殖を誘導することが確認された。さらにまた、CD8⁺ T細胞活性化の程度は、94G1 < 94K/94KV < 94KVT/EU101の順に増加する。

【0242】

3.2 例示的抗ヒト4-1BB抗体はサイトカイン分泌を刺激する

IFN- γ は、主としてTリンパ球またはナチュラルキラー細胞(NK細胞)から分泌され、増殖活性および抗ウイルス活性を示す代表的サイトカインである。加えて、IFN- γ は、マクロファージの主要活性化因子であり、特にT_H1細胞を他のタイプの細胞と区別する目安となる主要サイトカインである。IFN- γ 分泌は、細胞傷害性T細胞、食細胞およびB細胞の活性化に大きな役割を果たす。したがって抗がん剤の有効性は、T_H1誘導IFN- γ (T_H1 inducing IFN- γ)量の増加で評価することができる。そのため、特異的刺激によるIFN- γ の分泌の測定は、T細胞の機能的变化の定量的判断基準として使用できる最適な標準になりうる。

10

20

30

40

50

【0243】

CD8⁺ T細胞をヒトPBMCから単離し、0.5 μg/mlの抗CD3 mAb抗体で処理してから、抗体なしまたは1.0 μg/mlの抗4-1BB抗体: BBK-4、94G1、94K、94KV、94KVTおよびEU101による処理に付した。1日目、3日目および5日目にIFN 分泌を評価した。結果を図8に示す。図8からわかるように、IFN 分泌はすべての抗4-1BB抗体処理試料において増加し、その増加は抗体処理の継続時間と相関した。94KVT抗体およびEU101抗体による処理は、5日目に対照群より13倍高い分泌レベルに達した。したがって例示的ヒト化抗体94KVTおよびEU101はどちらも、94G1基準抗体よりも効率よく、IFN 分泌を誘導することができる。

【0244】

3.3 例示的抗ヒト4-1BB抗体による活性化CD4⁺ T細胞またはCD8⁺ T細胞の処理に応じたIFN- レベルの増加 10

3人の健常ドナーから血液を収集し、そこから得られるPBMCをFicoll-plaque勾配遠心分離によって単離し、PBMC中に存在する活性T細胞を、RPMI-1640 + 2% FBS培地の中で24時間休止させた。鉄ビーズに取り付けた抗CD4抗体または抗CD8抗体で休止PBMCを処理し、MACS磁気分離装置を使ってCD4⁺ 細胞またはCD8⁺ 細胞を単離した。単離されたCD4⁺ T細胞またはCD8⁺ T細胞をT細胞活性化因子抗CD3で処理することで4-1BB発現を誘導し、異なる濃度のEU101 (0.5、1.0、2.5および5.0 μg/ml) で3日間処理した。3日後に、細胞を除く培養培地を得て、培養培地中のヒトIFN- の蛍光をELISA (ebioscience) によって評価し、結果を、IFN- ELISAキットに用意されている標準曲線と比較した (図9)。

【0245】

20

図9に示すように、CD4⁺ T細胞およびCD8⁺ T細胞におけるIFN- の発現レベルは用量依存的に増加した。特に、5.0 μg/mlのEU101を処理した場合、CD4⁺ T細胞における278%の増加と比較して、CD8⁺ T細胞では、IFN- の発現レベルが612%増加した。T_H1へのT細胞の転換に伴うIFN- のT細胞特異的発現パターンによれば、本開示の例示的抗ヒト4-1BB抗体EU101は、それががんの予防および/または処置に有効でありうることを示唆するのに十分なインピトロ活性を有する。

【0246】

3.4 例示的抗ヒト4-1BB抗体のADCC活性およびCDC活性の測定

免疫系は、ウイルス感染細胞またはがん細胞を認識してそれらを攻撃する。また、抗体は、細胞傷害によるアポトーシスを誘導するために使用されうる。そのような免疫系には、抗体依存性細胞性細胞傷害 (ADCC) および補体依存性細胞傷害 (CDC) などの2タイプの機序が使用されうる。どちらの場合も、アポトーシスは細胞表面上のターゲットに結合する抗体によって媒介されうる。すなわち、抗体がADCC活性を有する場合は、抗体によって認識された細胞がナチュラルキラー (NK) 細胞によって媒介されるアポトーシスを起こし、抗体がCDC活性を有する場合は、死滅が補体タンパク質によって媒介される。したがって、アンタゴニスト抗体治療薬を開発する場合、抗体によって認識される細胞を死滅させる程度は、ADCC活性およびCDC活性の分析によって確認することができる。しかし、本開示において開示するヒト化4-1BB抗体のターゲットはがん細胞ではなくT細胞である。すなわち、アゴニスト抗体としての4-1BB抗体に結合することによってT細胞の活性化を誘導するための機序を考えると、治療用途には、ADCC活性およびCDC活性を有しない抗体が好ましいだろう。

30

【0247】

40

本開示では、ADCCアッセイのために、同じ密度差を使ってFicoll遠心分離によってヒトPBMCを単離した。10% FBSおよびIL-2 (100U/ml) を含むRPMI (Thermo Fisher Scientific) 中でPBMCをインキュベートすることで、一晩培養した。ターゲット細胞 (4-1BB発現細胞株) を収穫し、1mlの培養培地に再懸濁し、5μM CFSEを使って37 °Cで5分間標識した。本開示のエフェクター/ターゲット細胞を10:1の比で洗浄し、計数してから、分配した。分析のために、本開示の抗体を最終濃度が10nM (1.5 μg/ml) になるように調製し、プレート上、37 °Cで4時間培養した。5 μlの7-AADを各ウェルに加え、FACSチューブに移した後、BD FACScan製のFACSで試料を分析した。非生存ターゲット細胞 (CFSE⁺ 7-AAD⁺) および生

50

存ターゲット細胞 (CFSE⁺ 7-AAD⁻) の頻度を測定した。ADCCを全細胞の生存細胞の頻度で評価した(図10A)。

【0248】

補体依存性細胞傷害(CDC)アッセイは、FACSを読み出し値として使って、上述のADCCアッセイと同様に行った。上記のターゲット細胞を氷上で30分間、抗4-1BB抗体と共にインキュベートしてから、最終濃度20%のヒト補足血清(human supplemented serum)を37度30分間加えた。その後、得られた試料をそれぞれFACSチューブに移し、BD FACScan製のFACSで評価した(図10B)。図10Aおよび図10Bの結果により、例示的ヒト化4-1BB抗体EU101にADCC効果およびCDC効果はほとんどないことが確認される。したがって、本開示の例示的EU101抗体は、アゴニスト抗体として有益なADCC特性およびCDC特性を有し、インビボでの抗がん処置の良い候補であるということができる。10

【0249】

実施例4-例示的ヒト化抗ヒト4-1BB抗体のインビボ有効性の確認

本開示の抗ヒト4-1BB抗体EU101は、インビトロ実施例において用量依存的効果を示し、従来の抗体よりかなり優れた効果を示した。この実施例では、インビボでがんまたは腫瘍を診断し、予防または処置するために、また腫瘍の成長を効果的に阻害するために、抗ヒト4-1BB抗体EU101を単独または異なる組成物との組み合わせで使用できるかどうかをチェックする。

【0250】

4.1 ヒト末梢血単核球のNOD-scid IL2Rgamma^{null}マウス生着および抗ヒト4-1BB抗体の抗腫瘍活性20

HLA-A24型健常ドナーから収集した末梢静脈血をヘパリンで処理し、Ficoll-paque(GE Healthcare、ニュージャージー州ピスカタウェイ)での濃度密度勾配遠心分離に付することで、PBMCを収穫した。PBMCをRPMI-1640培地で洗浄し、 3×10^6 個の細胞を免疫不全マウス、すなわちNSGマウス(NOD.Cg-Prkdc^{scid} IL2rg^{tm1Wjl}/SzJ; NOD-scid IL2r^{null}、Jackson Laboratory)に腹腔内注射した。

【0251】

ヒトPBMC移植の5週間後にマウス眼窩採血によって収集したマウス血中にヒトT細胞が存在するかどうかをチェックするために、フローサイトメトリーでヒト化マウスの分析を行った。7週齢NSGマウス(Jackson Laboratory、メイン州バーハーバー)を特定病原体フリー-(SPF)環境下で飼育した。30

【0252】

APC-cy7蛍光標識CD45抗体ならびにFITC蛍光標識CD4抗体およびBV510蛍光標識CD8抗体などのヒト血球マーカーで細胞を染色してから、CD4とCD8の比をチェックするために、フローサイトメトリーを行った。各マウスからの眼窩採血後に、マウス血試料からのヒトT細胞を観察することで、ヒト免疫系がマウスに生着しているかどうかをチェックした。HLA型ヒト化マウスモデルにおいてヒト腫瘍細胞を調製し、 1×10^7 細胞を各マウスの背中に皮下注射した。腫瘍サイズが $100 \sim 200\text{mm}^3$ に達したら、例示的抗ヒト4-1BB抗体(EU101)の調製物を、体重1kgあたり1.0mg、5.0mgまたは10.0mgで、5日ごとに合計3回、静脈内投与した。対照として、ヒトIgGを使用した。各マウスの腫瘍体積(mm^3)を3日ごとに測定した(図11)。図11に示す結果により、例示的抗ヒト4-1BB抗体(EU101)で処置されたマウスにおける腫瘍サイズは、ヒトIgGで処置されたマウスと比較して低減したこと、さらにまた、この低減は抗体濃度に比例したことが確認される。特に、5mg/kg抗体投与群での腫瘍退縮は迅速に起こった。5mg/kg用量の投与後1週間以内にヒト化マウスにおける腫瘍サイズは安定し、腫瘍成長は根絶された。それゆえに、本開示の例示的抗体EU101はインビボで抗がん効果を示す。40

【0253】

したがって上記の結果は、例示的抗ヒト4-1BB抗体(EU101)はH4-1BBのエピトープ(SEQ ID NO:15)を特異的に認識するが、この例示的抗体の例えは改良されたアフィニティなどの改良された特徴ゆえに、この抗体はインビボマウスモデルにおいて、優れた効果を50

示すことを示している。したがって、本開示によって包含される抗体は、抗がん剤として、基準抗体より低い投薬量で使用できることを、本実施例は示唆している。

【0254】

4.2 例示的抗ヒト4-1BB抗体および抗PD-1剤による腫瘍成長阻害の効果

ヒト化マウスへの腫瘍注射後の例示的抗ヒト4-1BB抗体（EU101）および例示的抗PD-1剤の個別処置が引き起こす効果の比較

ヒト化マウスを上記実施例4.1で述べた方法と同じ方法で調製した。例示的抗ヒト4-1BB抗体（EU101）および例示的抗PD-1剤（キイトルーダ）（ドイツMSDから購入）の用量に応じた抗がん効果の増加を確認する実験を行うために、 1×10^7 細胞のHLA-A型一致ヒト結腸直腸腺がん細胞株HT29を、先に調製したヒト化マウスに皮下注射した。注射した腫瘍の体積が $100 \sim 150\text{mm}^3$ に達したら、マウスを3匹ずつ合計5つの群に分割し、腫瘍阻害に関するEU101の効果を比較するために、各マウス群を、3つの投与条件（対照:IgG、処置群1: 5mg/kgおよび処置群2: 10mg/kg）のそれぞれで、5日間隔で3回、処置し、抗PD-1についても、同じ手順を実行した（図12）。実験の結果として、EU101とキイトルーダ（抗PD1）のどちらの場合も、腫瘍体積は用量依存的に低減した。しかし図12において、5mg/kgのEU101は腫瘍成長に対する影響を有しなかったが、5mg/kgおよび10mg/kgのEU101による処置では、抗腫瘍活性が用量依存的に示された。加えて、EU101は低用量ではキイトルーダ（抗PD-1）より高い有効性を示し、特に5mg/kgのEU101による処置、腫瘍成長を完全に阻止した。

【0255】

腫瘍注射後のEU101と抗PD-1剤との併用によるヒト化マウスの処置

共阻害受容体（PD-1およびCTLA-4）シグナルと共に刺激（CD137）T細胞シグナルは、腫瘍成長を阻害するという同じ目的にとって差異があるので、これら2種の受容体の刺激は相乗効果を予期することができる（Chen et al., Cancer Immunol. Res. (2015) 3:149-160、Bartkowiak et al., Front. Oncol. (2015) 5:117。これらの文献はどちらも参照により本明細書に組み入れられる）。加えて、PD1免疫治療は、がん患者集団の一部については抗がん処置効果の可能性を示したが、異なる抗がん剤との併用治療における低用量の投与は、依然として、より広範な患者集団において必要とされうる。例示的抗ヒト4-1BB抗体（EU101）と例示的抗PD-1剤（キイトルーダ）との併用治療がもたらす抗腫瘍効果を調べるために、腫瘍担持ヒト化マウスをEU101とキイトルーダとの併用治療で処置した。

ヒト化マウスの調製は、実施例4.1で述べた方法と同じ方法で行った。

【0256】

眼採血を行ってヒト化マウスを同定した。ヒト化マウスのなかで、正常な状態を維持しているHLA-A24マウスに、HT29大腸がんを 1×10^7 細胞/マウスで皮下注射した。腫瘍サイズが $300 \sim 450\text{mm}^3$ であるときに、実験を以下のように行った。

【0257】

この実施例からわかるように、最小濃度以下（EU101: 2.5mg/kg、キイトルーダ（ドイツMSD製）: 2.5mg/kg）の個別注射では腫瘍成長は遅延しなかったが、EU101とキイトルーダの併用治療では腫瘍が著しく退縮した。これは、ここに提供する例示的抗ヒト4-1BB抗体（例えばEU101）が、1種または複数種の免疫チェックポイント阻害剤との併用を含む、異なる抗がん剤との併用治療の良い候補であることを示す結果である（図13）。

【0258】

例示的抗ヒト4-1BB抗体および例示的抗PD-1剤の個別処置および併用処置後の正常組織およびヒト結腸直腸腺がん組織中のT細胞浸潤リンパ球（TIL）の分析

HT29移植ヒト化マウスへの例示的抗ヒト4-1BB抗体（EU101）および例示的抗PD-1剤（キイトルーダ）（ドイツMSDから購入）の個別投与後およびEU101とキイトルーダの併用投与後、効果分析が終了した日に、すべての群を解剖して、腫瘍および血液を分離した。分離した腫瘍をコラゲナーゼIVにより37℃で30分間処理した後、腫瘍組織中の細胞を機械的方法で解離し、次に $1 \times \text{PBS}$ で洗浄した。分離した血液からFicoll勾配遠心分離によってPBMCを分離し、分離された腫瘍細胞とPBMCとを、以下の実験に付した。洗浄した細胞から、赤血球（RBC）溶解緩衝液を使ってRBCを除去し、次に $1 \times \text{PBS}$ で洗浄した。洗浄した細胞から

10

20

30

40

50

、40 μ mナイロンセルストレーナーを使って、絡まった細胞デブリを除去することで、単一細胞状態を作りだし、その単一細胞を1×PBSで洗浄した後、各群から分離されたT細胞を、血球計数器を使って計数した。

【0259】

個々のT細胞を、CD45抗体（蛍光APC-cy7標識）、蛍光FITC標識ヒトCD4抗体および蛍光BV510標識ヒトCD8抗体などのヒト血球マーカーで染色した後、FACSアッセイに付した。FACSアッセイは、CD45群からゲーティングされたCD4細胞およびCD8細胞群の比（%）に基づいて行った（図14A）。

【0260】

特に、分離されたT細胞のなかのTreg群を同定するために、細胞の表面を、CD45抗体（蛍光APC-cy7標識）、ヒト蛍光FITC標識CD4抗体およびヒト蛍光PE-cy5-標識CD25抗体などのヒト血球マーカーで染色し、Foxp3/転写因子染色緩衝液セットキット（ebioscience）を使って、細胞転写因子Foxp3（ヒト蛍光APC標識Foxp3抗体）による細胞内および核内染色を行った。FACSアッセイでは、CD45群をゲーティングR1に分離し、CD4⁺CD25^{high}群をゲーティングR2に分離し、Foxp3^{high}群の比（%）をR1群およびR2群において測定した。分離された細胞中のIFN-⁻CD8⁺T細胞を同定するために、細胞表面を、蛍光APC-cy7標識ヒトCD45抗体および蛍光BV510標識ヒトCD8抗体などの血球マーカーで染色し、2%PFAで固定し、0.5%サポニン溶液および蛍光PE-cy7標識ヒトIFN-⁻抗体と反応させた。その後、CD8 T細胞群中のサイトカインIFN-⁻細胞をFACSアッセイで測定した。上記の同じ方法により、細胞を比で同定し、CD8⁺IFN-⁻比とTreg比の比率を算出して、図14Bに示す。

【0261】

この態様の結果によれば、個別投与ではなく、EU101とキイトルーダの併用投与が、腫瘍組織とリンパ球の組み合わせの浸潤を著しく増加させた。さらに具体的な併用処置の結果は以下のとおりである。対照として健常ヒト化マウス中のPBMCに対して併用処置を行ったところ、リンパ球の数はおよそ3倍に増加し、腫瘍組織では腫瘍1gあたりの浸潤リンパ球が76倍に増加した。これは、腫瘍特異的リンパ球の大半が活性化され、ターゲット細胞を殺すために腫瘍組織に動員されたことを意味している。特に併用治療群におけるPBMCを測定すると、図14Aに示すように、CD4⁺T細胞はあまり増加しないが、細胞傷害性CD8⁺T細胞はおよそ5倍に増加した。さらにまた、併用治療群は、腫瘍組織1gあたりのCD8⁺T細胞数に100倍の増加を示した。そのうえ、結果として、IFN-⁻を分泌するCD8⁺T細胞と制御性T細胞の比も、著しく増加した（図14B）。すなわち、EU101と抗PD-1剤の併用処置はエフェクターT細胞の急激な増加をもたらし、したがって腫瘍阻害が効果的に行われるということができる。

【0262】

例示的抗ヒト4-1BB抗体（EU101）および例示的抗PD-1剤（キイトルーダ）による個別処置および併用処置後の血清またはヒト結腸直腸腺がん組織から得られた腫瘍内容液中のIFN-⁻の分析

HT29移植ヒト化マウスへの例示的抗ヒト4-1BB抗体（EU101）および例示的抗PD-1剤（キイトルーダ）の個別投与後および併用投与後。効果分析が終了した日に、すべての群を解剖して、腫瘍および血液を分離した。分離された腫瘍中に存在する腫瘍内容液を分離するための腫瘍解剖では、1ccシリングを使って300 μ lの1×PBSを腫瘍膜の上部に注射し、流れる溶液を腫瘍膜の下部からインスリンシリングを使って採取する。さらに、腫瘍組織の解離では、採取した溶液を加えて腫瘍組織を解離させてから、貯蔵した。さらに、血清として、Ficoll勾配遠心分離によって血液からPBMCを分離したときに、血清を貯蔵しておいた。貯蔵した血清および腫瘍内容液を溶解し、0.22 μ mフィルターユニット（製造者：coring）を使って濾過した。各群につき10 μ lの血清を使用し、100 μ lの腫瘍内容液を使用して、ヒトIFN-⁻およびヒトTGF-⁻を、ヒトIFN-⁻ELISA Ready-SET-Goキット（eBioscience）およびヒトTGFベータ1 ELISA Ready-SET-Goキット（eBioscience）を使って測定した。結果は、各ELISAキットに用意されている標準曲線と比較することによって分析した。

10

20

30

40

50

【0263】

結果として、腫瘍群の血清におけるインターフェロンの濃度は、EU101およびキイトルーダの個別投与と比較して、併用投与において最も高かった。EU101の機序はIFN- α と抗腫瘍効果の相関関係で説明することができるので、併用治療が適用された健常ドナーの血清および腫瘍群の血清におけるIFN- α およびTGF- β の発現レベルを評価した。健常ドナーの血清での実施例の材料によれば、図15Aに示す併用治療群において、IFN- α は約16倍に増加したが、Treg細胞から分泌されるサイトカインTGF- β は、約65%減少した。さらに、図15Bでは、腫瘍内容液中の、併用投与を原因とするIFN- α 濃度は、対照よりもかなり高かった（およそ213倍）。実施例の結果として、EU101により、特に対照群と比較して、併用群はIFN- α 分泌の急激な増加を示した。したがって、本開示の改良された抗ヒト化4-1B10抗体がもたらす抗がん効果は、がん細胞のアポトーシスに直接関係するエフェクターティ細胞の効果的な腫瘍浸潤と、腫瘍組織におけるかなり特異的な効果とを与えることを、確認することができる。言い換えると、EU101は、抗がん剤として、がん細胞のアポトーシスに最適な条件を有することができる、本開示において確認された。従来、がん患者では、抗がん性サイトカインおよび抗がん細胞性免疫がかなり低減していたが、本開示では、EU101が抗がん性サイトカインおよび抗がん細胞性免疫を誘導し、かなりの治療効果をもたらすと予期することができる。

【0264】

このように例示的抗ヒト4-1BB抗体EU101は、IFN- α の高発現によって媒介される抗腫瘍効果を示し、そのような効果は用量依存的に現れるので、がん患者の血清中のIFN- α 濃度は、腫瘍を診断し推定するためのバイオマーカーとして使用することができる。したがって、EU101および抗PD-1の併用処置によるがんまたは腫瘍の効果的処置、IFN- α 濃度の測定による予後によれば、各患者に関してより効果的な処置が行われると予期される。20

【0265】

実施例5-例示的ヒト化抗ヒト4-1BB抗体を使ったエクスピボでの4-1BB $^{+}$ CD8 $^{+}$ T細胞の分離および大量増殖

本発明者らは、抗4-1BB抗体を使った、さまざまな抗原に特異的な4-1BB $^{+}$ CD8 $^{+}$ T細胞の単離および精製において、抗原特異的に活性化されたCD8 $^{+}$ T細胞における4-1BB発現を使用した（韓国特許第10-1503341号）。次の実験は、ここで開発したEU101抗体も抗原特異的CD8 $^{+}$ T細胞の単離および大量増殖に使用されるかどうかを調べるために行った。30

【0266】

がん患者の末梢血からのPBMCの構築は実施例4.1で述べたように行った。しかしこの実施例では、本発明者らが出願した韓国特許出願第10-2016-0165224号に記載の方法によって、がん抗原特異的未分化T細胞を得てもよい。この実施例では、4-1BB $^{+}$ CD8 $^{+}$ T細胞の効果的な分離および高純度の4-1BB $^{+}$ CD8 $^{+}$ T細胞の大量生産のために、抗ヒト4-1BB抗体（EU101）を使ったパニング法を使用した。PBSに希釈した10 μ g/mlの抗ヒト4-1BB抗体（EU101）抗体を10mlフラスコに加え、次に4 $^{\circ}$ Cで20~24時間貯蔵した。貯蔵後に、抗体を含有する上清を除去し、洗浄することなく、PBSに2.5%で溶解したBSA溶液を10mlフラスコ中の細胞ペレットに加え、次に4 $^{\circ}$ Cで20~24時間貯蔵した。その後、BSA溶液を除去し、各フラスコを15mLのPBSで2回洗浄した。先に調製した細胞をX-VIVO 10培地に懸濁し、EU101抗体被覆フラスコに加え、次にCO₂インキュベーター中、37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。インキュベーション後に、上清を除去し、非特異的に結合した細胞を除去するために、細胞ペレットを10mlのRPMI1640培地で2回洗浄した。1%の自己血清および1000IU/ml IL-2含有X-VIVO 10培地をフラスコに加えた後、14日間培養した。本実施例では、一部の細胞を収穫し、次に単離された細胞の純度および表現型を測定するために染色した。図16Aおよび図16Bに示すように、94kvt抗体によるパニング前は、抗原特異的4-1BB $^{+}$ CD8 $^{+}$ T細胞の比が43.2%増加し（CD8 $^{+}$ T細胞比：58.6%）、EU101抗体によるパニング後は、抗原特異的pCMV $^{+}$ CD8 $^{+}$ T細胞の比が60.0%増加した（CD8 $^{+}$ T細胞比：79.3%）。これは、EU101を使って抗原特異的4-1BB $^{+}$ CD8 $^{+}$ T細胞を高純度で単離できることを意味している。上述のように単離された抗原特異的4-1BB $^{+}$ CD8 $^{+}$ T細胞は、本発明者らが出願した韓国特許出願40

第10-2016-0165224号に記載の方法によって、容易に大量生産することができる。

【0267】

上記の説明から、本発明の技術的思想または不可欠な特徴を変えることなく、本発明をさまざまな具体的な形態で実現できることは、当業者には理解されるであろう。しかし、本発明を具体的な例示的態様に限定するつもりはなく、以下の特許請求の範囲およびその等価物から演繹されるすべての変形または修飾形は、詳細な説明ではなく、本発明の範囲に包含されると、理解すべきである。

【0268】

本開示が包含する抗ヒト4-1BB抗体は、例えば基準抗体よりも優れたアフィニティーなど、いくつかの有益な特性を示し、かつ/またはがんもしくは腫瘍を診断し、予防し、もしくは処置するために、単独でまたは別の抗がん剤と組み合わせて使用することができ、またはがんの成長を阻害するために使用することができる。

10

【0269】

以上、実施例を参照して本発明を説明したが、添付の特許請求の範囲に記載される本発明の要旨および範囲から逸脱することなく、本発明をさまざまな形態で改変および変更しうることは、当業者であれば理解することができる。

【0270】

等価物

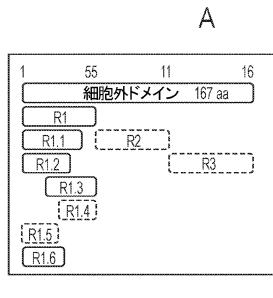
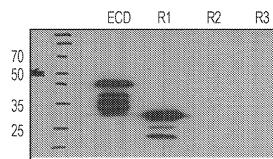
当業者は、本明細書に記載した本発明の具体的な態様の数多くの等価物を認識し、または日常的な実験を使って確認することができるであろう。本発明の範囲を上記の説明に限定する意図はなく、むしろ本発明の範囲は添付の特許請求の範囲に示すとおりである。

20

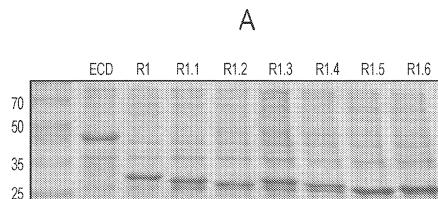
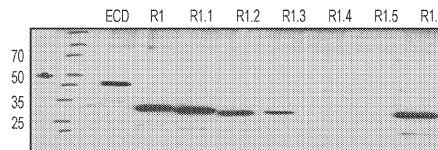
【要約】

基準抗ヒト4-1BB抗体には見いだされない1つまたは複数の構造的特徴であって該抗体の特定の特徴を基準抗体と比較して改良しうる該構造的特徴を有する、抗ヒト4-1BB抗体およびそのフラグメントが提供される。本明細書に記載する抗ヒト4-1BB抗体に関係するさまざまなインビトロ法およびインビオ法ならびに試薬類もまた、提供される。本方法には、抗ヒト4-1BB抗体またはそのフラグメントを用いたT細胞増殖の誘導、IFN のT細胞分泌の誘導、ならびにがんの検出、予防および/または治療的処置が含まれる。

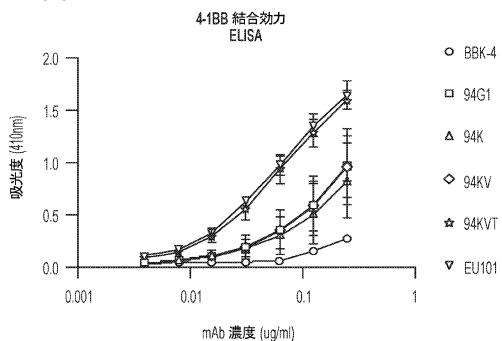
【図1】

**B**

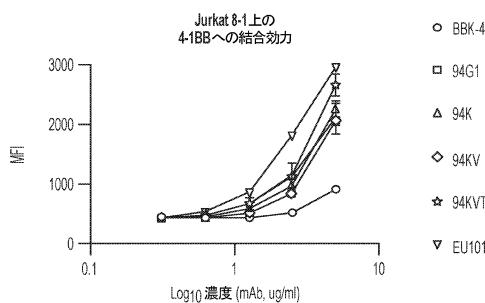
【図2】

**B**

【図3】



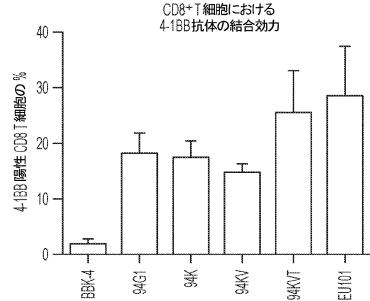
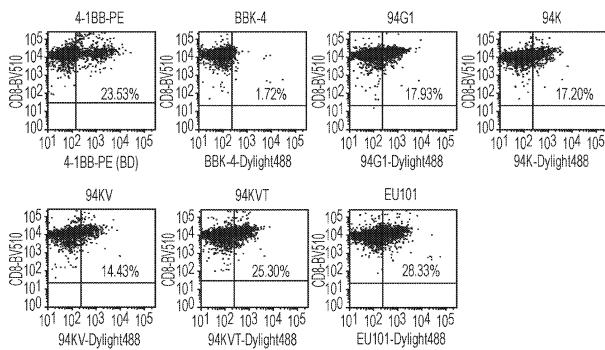
【図4】



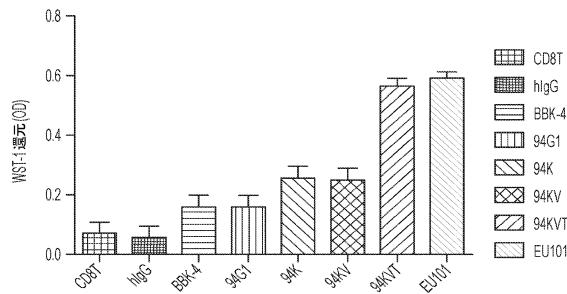
【図5】

抗体	$K_a(1/Ms)$	$K_d(1/s)$	$K_D(M)$
EU101	1.57e10	1.8e-5	6.36e-11
94G1	1.66e9	1.18e-4	6.02e-10

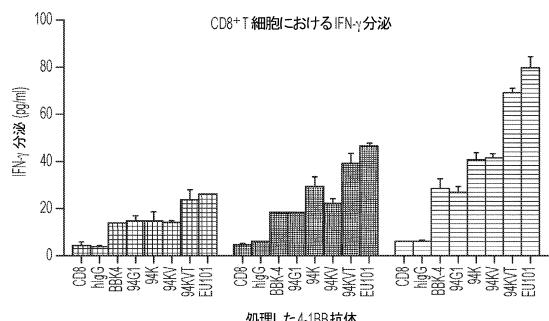
【図6】



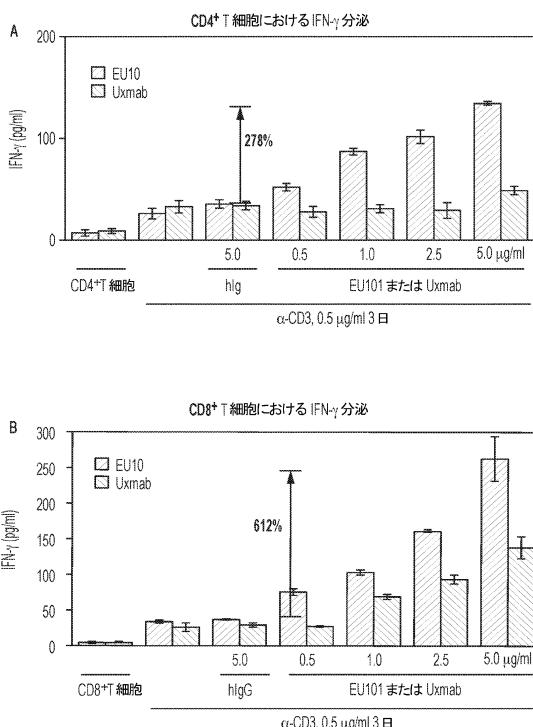
【図7】



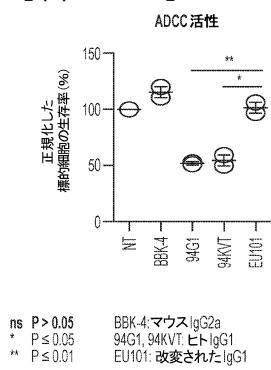
【図8】



【図9】

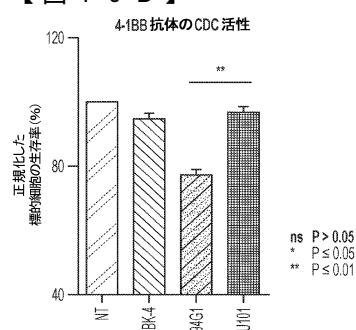


【図10 A】



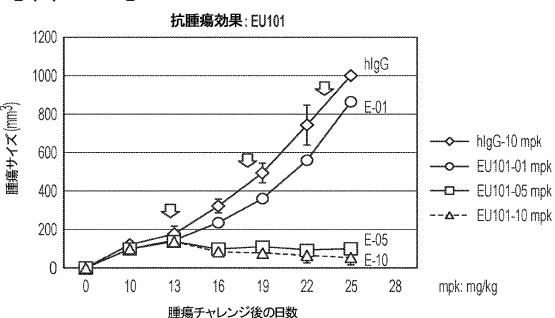
ns P > 0.05
 * P ≤ 0.05
 ** P ≤ 0.01
 BBK-4:マウス IgG2a
 94G1, 94KVT:ヒト IgG1
 EU101: 改変された IgG1

【図10 B】

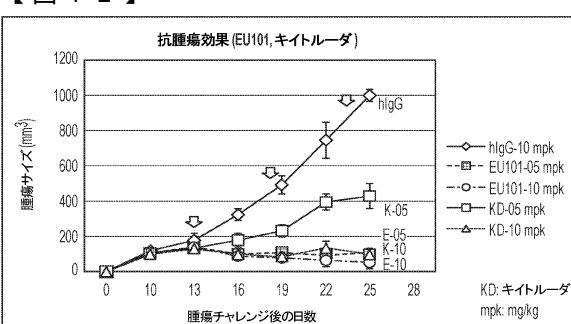


ns P > 0.05
 * P ≤ 0.05
 ** P ≤ 0.01

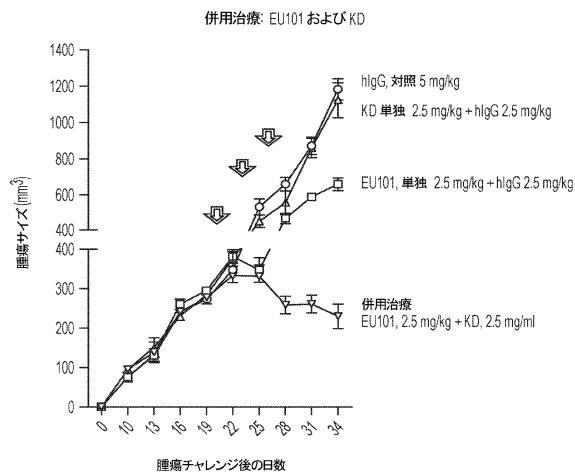
【図11】



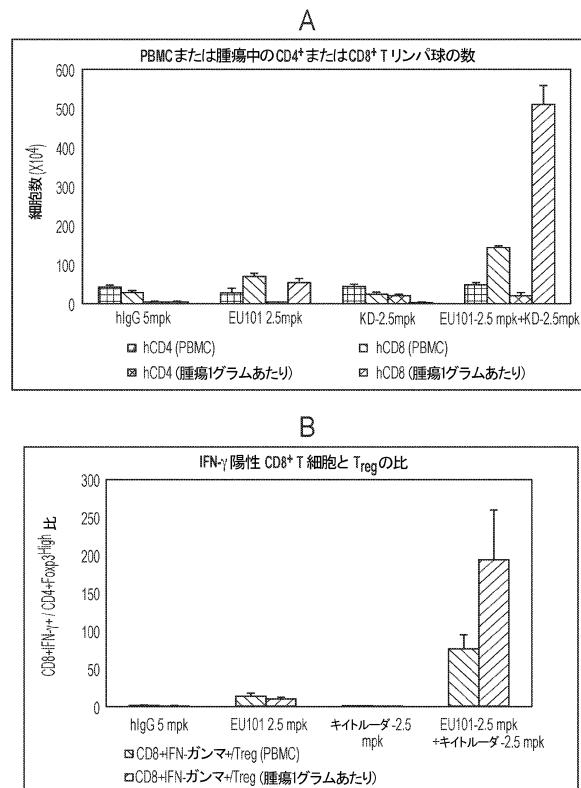
【図12】



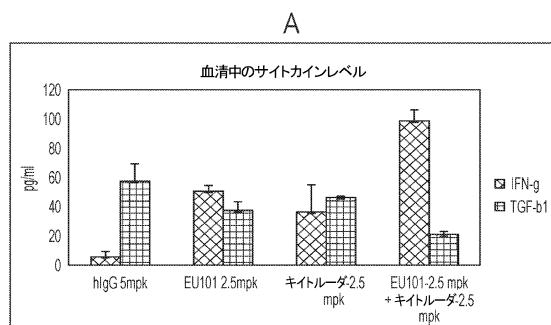
【図13】



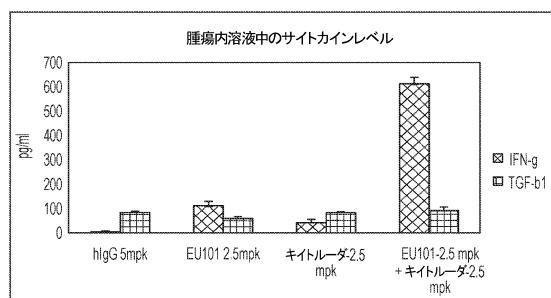
【図14】



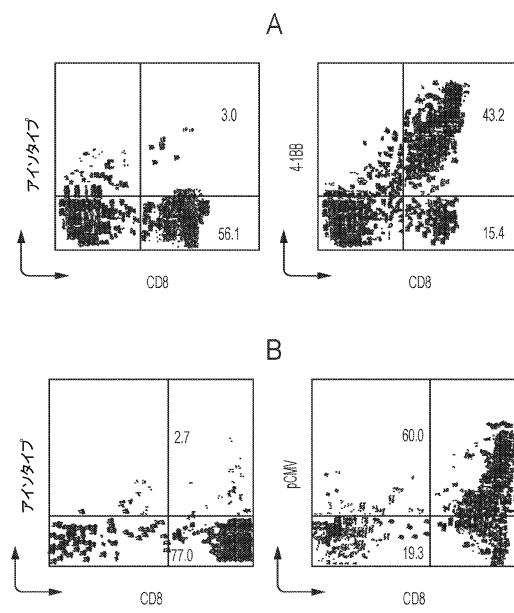
【図15】



B



【図16】



【配列表】

0006609724000001.app

フロントページの続き

(51)Int.CI. F I
 A 6 1 K 39/395 (2006.01) A 6 1 K 39/395 U

(74)代理人 100142929
 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 100205707
 弁理士 小寺 秀紀
 (74)代理人 100114340
 弁理士 大関 雅人
 (74)代理人 100114889
 弁理士 五十嵐 義弘
 (74)代理人 100121072
 弁理士 川本 和弥
 (72)発明者 クォン ビョン エス.
 大韓民国 08594 ソウル クムチョン-ク ガサン デジタル 1-口 25 ダエウン
 テクノタウン 17 チャ スイート #1401 ケア オブ ユーティレックス カンパニー^{リミテッド}
 (72)発明者 イ ソン - ジュ
 大韓民国 08594 ソウル クムチョン-ク ガサン デジタル 1-口 25 ダエウン
 テクノタウン 17 チャ スイート #1401 ケア オブ ユーティレックス カンパニー^{リミテッド}
 (72)発明者 キム ヨン ホ
 大韓民国 08594 ソウル クムチョン-ク ガサン デジタル 1-口 25 ダエウン
 テクノタウン 17 チャ スイート #1401 ケア オブ ユーティレックス カンパニー^{リミテッド}
 (72)発明者 オ ホ - シク
 大韓民国 08594 ソウル クムチョン-ク ガサン デジタル 1-口 25 ダエウン
 テクノタウン 17 チャ スイート #1401 ケア オブ ユーティレックス カンパニー^{リミテッド}
 (72)発明者 イ ジュン ウォン
 大韓民国 08594 ソウル クムチョン-ク ガサン デジタル 1-口 25 ダエウン
 テクノタウン 17 チャ スイート #1401 ケア オブ ユーティレックス カンパニー^{リミテッド}

審査官 松本 淳

(56)参考文献 米国特許第7932045 (U.S., B2)
 特表2002-531383 (JP, A)
 韓国公開特許第10-2004-0083918 (KR, A)
 特表2007-532095 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.CI., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

A 6 1 P

A 6 1 K

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

U n i P r o t / G e n e S e q