(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2023-503230
(P2023-503230A)
(43)公表日　令和5年1月27日(2023.1.27)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ　39/395 (2006.01)		Ａ６１Ｋ	39/395	Ｕ	４Ｃ０８４
Ａ６１Ｐ　35/00 (2006.01)		Ａ６１Ｐ	35/00		４Ｃ０８５
Ａ６１Ｐ　43/00 (2006.01)		Ａ６１Ｐ	43/00	１２１	４Ｃ０８６
Ａ６１Ｋ　45/00 (2006.01)		Ａ６１Ｋ	45/00		４Ｈ０４５
Ａ６１Ｐ　37/04 (2006.01)		Ａ６１Ｐ	37/04		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全81頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2022-524617(P2022-524617)
(86)(22)出願日　令和2年11月19日(2020.11.19)
(85)翻訳文提出日　令和4年4月26日(2022.4.26)
(86)国際出願番号　PCT/CN2020/130103
(87)国際公開番号　WO2021/098777
(87)国際公開日　令和3年5月27日(2021.5.27)
(31)優先権主張番号　PCT/CN2019/120056
(32)優先日　令和1年11月21日(2019.11.21)
(33)優先権主張国・地域又は機関
中国(CN)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　514164650
ベイジーン リミテッド
英国領ケイマン諸島 グランド ケイマン カマナ ベイ ソラリス アベニュー ９４ ムーラント オザネス コーポレイト サービシズ （ケイマン） リミテッド内
(74)代理人　110002871
弁理士法人坂本国際特許商標事務所
(72)発明者　ジアン、ベイベイ
中華人民共和国 ベイジン １０２２０６、チャンピン、チョングアンクン ライフ サイエンス パーク、サイエンス パーク ロード、ナンバー ３０
(72)発明者　リウ、イェ
中華人民共和国 ベイジン １０２２０６
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ＰＩ３キナーゼデルタ阻害剤との組合せで抗ＯＸ４０抗体を用いる癌治療の方法

(57)【要約】
ＰＩ３Ｋ（ホスファチジルイノシトール－４，５－二リン酸３－キナーゼ）デルタ阻害剤との組合せで、ヒトＯＸ４０（ＡＣＴ３５、ＣＤ１３４、又はＴＮＦＲＳＦ４）に結合する非競合アゴニスト抗ＯＸ４０抗体及びその抗原結合性フラグメントにより癌を治療する方法を提供する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
癌治療の方法であって、ＰＩ３Ｋδ阻害剤との組合せで有効量の非競合抗ＯＸ４０抗体又はその抗原結合フラグメントを対象に投与することを含む、方法。
【請求項２】
前記非競合抗ＯＸ４０抗体が、
（ｉ）（ａ）配列番号３のＨＣＤＲ（重鎖相補性決定領域）１と（ｂ）配列番号２４のＨＣＤＲ２と（ｃ）配列番号５のＨＣＤＲ３とを含む重鎖可変領域及び（ｄ）配列番号２５のＬＣＤＲ（軽鎖相補性決定領域）１と（ｅ）配列番号１９のＬＣＤＲ２と（ｆ）配列番号８のＬＣＤＲ３とを含む軽鎖可変領域、
（ｉｉ）（ａ）配列番号３のＨＣＤＲ１と（ｂ）配列番号１８のＨＣＤＲ２と（ｃ）配列番号５のＨＣＤＲ３とを含む重鎖可変領域及び（ｄ）配列番号６のＬＣＤＲ１と（ｅ）配列番号１９のＬＣＤＲ２と（ｆ）配列番号８のＬＣＤＲ３とを含む軽鎖可変領域、
（ｉｉｉ）（ａ）配列番号３のＨＣＤＲ１と（ｂ）配列番号１３のＨＣＤＲ２と（ｃ）配列番号５のＨＣＤＲ３とを含む重鎖可変領域及び（ｄ）配列番号６のＬＣＤＲ１と（ｅ）配列番号７のＬＣＤＲ２と（ｆ）配列番号８のＬＣＤＲ３とを含む軽鎖可変領域、又は
（ｉｖ）（ａ）配列番号３のＨＣＤＲ１と（ｂ）配列番号４のＨＣＤＲ２と（ｃ）配列番号５のＨＣＤＲ３とを含む重鎖可変領域及び（ｄ）配列番号６のＬＣＤＲ１と（ｅ）配列番号７のＬＣＤＲ２と（ｆ）配列番号８のＬＣＤＲ３とを含む軽鎖可変領域、
を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記ＯＸ４０抗体又は抗原結合が、
（ｉ）配列番号２６を含む重鎖可変領域（ＶＨ）及び配列番号２８を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）、
（ｉｉ）配列番号２０を含む重鎖可変領域（ＶＨ）及び配列番号２２を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）、
（ｉｉｉ）配列番号１４を含む重鎖可変領域（ＶＨ）及び配列番号１６を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）、又は
（ｉｖ）配列番号９を含む重鎖可変領域（ＶＨ）及び配列番号１１を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）、
を含む、請求項２に記載の方法。
【請求項４】
ＰＩ３Ｋδ阻害剤が、イデラリシブ、デュベリシブ、ウムブラリシブ、ＡＭＧ－３１９、ＰＩ３０６５、化合物１、化合物２Ａ、又はそれらの薬学的に許容可能な塩からなる群から選択される、請求項１に記載の方法。
【請求項５】
ＰＩ３Ｋδ阻害剤が、（Ｓ）－３－（１－（８－アミノ－１－メチルイミダゾ［１，５－ａ］ピラジン－３－イル）エチル）－５－クロロ－６－フルオロ－２－イソプロポキシ－Ｎ－（２－（４－メチルピペラジン－１－イル）エチル）ベンズアミド又はその薬学的に許容可能な塩である、請求項１又は４に記載の方法。
【請求項６】
ＰＩ３Ｋδ阻害剤が、１－クロロ－３－（１－（５－クロロ－４－フルオロ－２－イソプロポキシ－３－（６－（トリフルオロメチル）ピリジン－３－イル）フェニル）エチル）イミダゾ［１，５－ａ］ピラジン－８－アミン又はその薬学的に許容可能な塩である、請求項１又は４に記載の方法。
【請求項７】
前記癌が血液癌である、請求項１に記載の方法。
【請求項８】
前記血液癌が、白血病、リンパ腫、骨髄腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、ホジキンリンパ腫（ＨＬ）、又はＢ細胞悪性病変である、請求項７に記載の方法。

【請求項９】
前記Ｂ細胞悪性病変が、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫（ＳＬＬ）、濾胞性リンパ腫（ＦＬ）、マントル細胞リンパ腫（ＭＣＬ）、辺縁帯リンパ腫（ＭＺＬ）、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症（ＷＭ）、ヘアリー細胞白血病（ＨＣＬ）、バーキット様白血病（ＢＬ）、Ｂ細胞前リンパ球性白血病（Ｂ－ＰＬＬ）、瀰漫性大Ｂ細胞リンパ腫（ＤＬＢＣＬ）、胚中心Ｂ細胞瀰漫性大Ｂ細胞リンパ腫（ＧＬＢ－ＤＬＢＣＬ）、非胚中心Ｂ細胞瀰漫性大Ｂ細胞リンパ腫（非ＧＣＢ　ＤＬＢＣＬ）、サブタイプ未確定のＤＬＢＣＬ、乳房起源又は精巣起源の原発中枢神経系リンパ腫（ＰＣＮＳＬ）、又は二次性中枢神経系リンパ腫（ＳＣＮＳＬ）である、請求項８に記載の方法。
【請求項１０】
前記瀰漫性大Ｂ細胞リンパ腫（ＤＬＢＣＬ）が、活性化Ｂ細胞瀰漫性大Ｂ細胞リンパ腫（ＡＢＣ－ＤＬＢＣＬ）、ＧＬＢ－ＤＬＢＣＬ、又は非ＧＣＢ　ＤＬＢＣＬである、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
前記Ｂ細胞悪性病変が抵抗性Ｂ細胞悪性病変である、請求項８に記載の方法。
【請求項１２】
前記抵抗性Ｂ細胞悪性病変が、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫（ＳＬＬ）、濾胞性リンパ腫（ＦＬ）、マントル細胞リンパ腫（ＭＣＬ）、辺縁帯リンパ腫（ＭＺＬ）、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症（ＷＭ）、ヘアリー細胞白血病（ＨＣＬ）、バーキット様白血病（ＢＬ）、Ｂ細胞前リンパ球性白血病（Ｂ－ＰＬＬ）、瀰漫性大Ｂ細胞リンパ腫（ＤＬＢＣＬ）、胚中心Ｂ細胞瀰漫性大Ｂ細胞リンパ腫（ＧＬＢ－ＤＬＢＣＬ）、非胚中心Ｂ細胞瀰漫性大Ｂ細胞リンパ腫（非ＧＣＢ　ＤＬＢＣＬ）、サブタイプ未確定のＤＬＢＣＬ、乳房起源又は精巣起源の原発中枢神経系リンパ腫（ＰＣＮＳＬ）、又は二次性中枢神経系リンパ腫（ＳＣＮＳＬ）である、請求項１１に記載の方法。
【請求項１３】
前記抵抗性Ｂ細胞悪性病変が瀰漫性大Ｂ細胞リンパ腫（ＤＬＢＣＬ）である、請求項１２に記載の方法。
【請求項１４】
前記抵抗性ＤＬＢＣＬが、活性化Ｂ細胞瀰漫性大Ｂ細胞リンパ腫（ＡＢＣ－ＤＬＢＣＬ）、ＧＬＢ－ＤＬＢＣＬ、又は非ＧＣＢ　ＤＬＢＣＬである、請求項１３に記載の方法。
【請求項１５】
前記癌が固形腫瘍である、請求項１に記載の方法。
【請求項１６】
前記癌が、乳癌、結腸癌、頭頸部癌、胃癌、腎癌、肝癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、皮膚癌、中皮腫、及び肉腫からなる群から選択される、請求項１５に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本明細書には、ヒトＯＸ４０に結合する抗体又はその抗原結合性フラグメントとＰＩ３Ｋ（ホスファチジルイノシトール－４，５－二リン酸３－キナーゼ）デルタ阻害剤とにより癌を治療する方法が開示されている。
【背景技術】
【０００２】
ＯＸ４０（ＡＣＴ３５、ＣＤ１３４、又はＴＮＦＲＳＦ４としても知られる）は、おおよそ５０ＫＤのＩ型膜貫通糖タンパク質であり且つ腫瘍壊死因子レセプタースーパーファミリー（ＴＮＦＲＳＦ）のメンバーである（Ｃｒｏｆｔ，２０１０、Ｇｏｕｇｈ　ａｎｄ　Ｗｅｉｎｂｅｒｇ，２００９）。成熟ヒトＯＸ４０は、３７ＡＡ細胞質内テール及び１８５ＡＡ細胞外領域を含む２４９アミノ酸（ＡＡ）残基で構成される。ＯＸ４０の細胞外ド

メインは、３つの完全な及び１つの不完全なシステインリッチドメイン（ＣＲＤ）を含有する。ＯＸ４０の細胞内ドメインは、ＴＲＡＦ２、ＴＲＡＦ３、及びＴＲＡＦ５を含むいくつかのＴＮＦＲ関連因子（ＴＲＡＦ）への結合を媒介して細胞内キナーゼへのＯＸ４０の連結を可能する１つの保存シグナリング関連ＱＥＥモチーフを含有する（Ａｒｃｈ ａｎｄ Ｔｈｏｍｐｓｏｎ，１９９８、Ｗｉｌｌｏｕｇｈｂｙ ｅｔ ａｌ．，２０１７）。

【０００３】

ＯＸ４０は、活性化ラットＣＤ４＋Ｔ細胞上で最初に発見され、続いて、Ｔ細胞からネズミ及びヒトホモログがクローニングされた（ａｌ－Ｓｈａｍｋｈａｎｉ ｅｔ ａｌ．，１９９６、Ｃａｌｄｅｒｈｅａｄ ｅｔ ａｌ．，１９９３）。Ｔヘルパー（Ｔｈ）１細胞、Ｔｈ２細胞、Ｔｈ１７細胞、さらにはレギュラトリーＴ（Ｔｒｅｇ）細胞を含めて、活性化ＣＤ４＋Ｔ細胞上での発現のほか、ＯＸ４０発現は、活性化ＣＤ８＋Ｔ細胞、ナチュラルキラー（ＮＫ）Ｔ細胞、好中球、及びＮＫ細胞の表面上でも見いだされている（Ｃｒｏｆｔ，２０１０）。これとは対照的に、低ＯＸ４０発現は、ナイーブＣＤ４＋及びＣＤ８＋Ｔ細胞上、さらにはほとんどの休止メモリーＴ細胞上に見いだされる（Ｃｒｏｆｔ，２０１０、Ｓｏｒｏｏｓｈ ｅｔ ａｌ．，２００７）。ナイーブＴ細胞上でのＯＸ４０の表面発現は一過性である。ＴＣＲ活性化後、Ｔ細胞上でのＯＸ４０発現は、２４時間以内に大幅に増加し、２～３日でピークを生じ、５～６日間持続する（Ｇｒａｍａｇｌｉａ ｅｔ ａｌ．，１９９８）。

【０００４】

ＯＸ４０に対するリガンド（ＯＸ４０Ｌ、ｇｐ３４、ＣＤ２５２、又はＴＮＦＳＦ４としても知られる）は、ＯＸ４０に対する唯一のリガンドである。他のＴＮＦＳＦ（腫瘍壊死因子スーパーファミリー）メンバーに類似して、ＯＸ４０Ｌは、２３ＡＡ細胞内ドメイン及び１３３ＡＡ細胞外ドメインを含む１８３ＡＡを含有するＩＩ型糖タンパク質である（Ｃｒｏｆｔ，２０１０、Ｇｏｕｇｈ ａｎｄ Ｗｅｉｎｂｅｒｇ，２００９）。ＯＸ４０Ｌは、天然では、細胞表面上にホモメリックトリマー複合体を形成する。リガンドトリマーは、ＣＲＤ４の関与なしに主にレセプターのＣＲＤ１、ＣＲＤ２、及び部分的ＣＲＤ３領域を介してリガンドモノマー－モノマー界面でＯＸ４０の３つのコピーと相互作用する（Ｃｏｍｐａａｎ ａｎｄ Ｈｙｍｏｗｉｔｚ，２００６）。ＯＸ４０Ｌは、活性化Ｂ細胞（Ｓｔｕｂｅｒ ｅｔ ａｌ．，１９９５）、成熟従来型樹状細胞（ＤＣ）（Ｏｈｓｈｉｍａ ｅｔ ａｌ．，１９９７）、形質細胞様ＤＣ（ｐＤＣ）（Ｉｔｏ ｅｔ ａｌ．，２００４）、マクロファージ（Ｗｅｉｎｂｅｒｇ ｅｔ ａｌ．，１９９９）、及びランゲルハンス細胞（Ｓａｔｏ ｅｔ ａｌ．，２００２）を含めて、活性化抗原提示細胞（ＡＰＣ）上に主に発現される。そのほか、ＯＸ４０Ｌは、ＮＫ細胞、マスト細胞、活性化Ｔ細胞のサブセット、さらには血管内皮細胞、平滑筋細胞などの他の細胞型上に発現されることが分かっている（Ｃｒｏｆｔ，２０１０、Ｃｒｏｆｔ ｅｔ ａｌ．，２００９）。

【０００５】

トリメリックＯＸ４０Ｌによるライゲーションを介するＯＸ４０トリマー化又はアゴニスティック抗体によるダイマー化は、その細胞内ＱＥＥモチーフへのアダプター分子ＴＲＡＦ２、ＴＲＡＦ３、及び／又はＴＲＡＦ５のリクルートメント及びドッキングに寄与する（Ａｒｃｈ ａｎｄ Ｔｈｏｍｐｓｏｎ，１９９８、Ｗｉｌｌｏｕｇｈｂｙ ｅｔ ａｌ．，２０１７）。ＴＲＡＦ２及びＴＲＡＦ３のリクルートメント及びドッキングはさらに、カノニカルＮＦ－κＢ１経路及び非カノニカルＮＦ－κＢ２経路の両方の活性化をもたらすことが可能であり、これによりＴ細胞の生存、分化、拡大、サイトカイン産生、及びエフェクター機能のレギュレーションに重要な役割を果たす（Ｃｒｏｆｔ，２０１０、Ｇｒａｍａｇｌｉａ ｅｔ ａｌ．，１９９８、Ｈｕｄｄｌｅｓｔｏｎ ｅｔ ａｌ．，２００６、Ｒｏｇｅｒｓ ｅｔ ａｌ．，２００１、Ｒｕｂｙ ａｎｄ Ｗｅｉｎｂｅｒｇ，２００９、Ｓｏｎｇ ｅｔ ａｌ．，２００５ａ、Ｓｏｎｇ ｅｔ ａｌ．，２００５ｂ、Ｓｏｎｇ ｅｔ ａｌ．，２００８）。

【０００６】

正常組織では、ＯＸ４０発現は低く、主にリンフォイド器官のリンパ球上で生じる（Ｄｕｒｋｏｐ ｅｔ ａｌ．，１９９５）。しかしながら、自己免疫性疾患（Ｃａｒｂｏｎｉ ｅｔ ａｌ．，２００３、Ｊａｃｑｕｅｍｉｎ ｅｔ ａｌ．，２０１５、Ｓｚｙｐｏｗｓｋａ ｅｔ ａｌ．，２０１４）や癌（Ｋｊａｅｒｇａａｒｄ ｅｔ ａｌ．，２０００、Ｖｅｔｔｏ ｅｔ ａｌ．，１９９７、Ｗｅｉｎｂｅｒｇ ｅｔ ａｌ．，２０００）などの病理学的病態を有する動物モデル及びヒト患者の両方で、ＯＸ４０発現のアップレギュレーションが頻繁に免疫細胞上で観測されている（Ｒｅｄｍｏｎｄ ａｎｄ Ｗｅｉｎｂｅｒｇ，２００７）。とりわけ、ＯＸ４０の発現増加は、結腸直腸癌及び皮膚メラノーマを有する患者のより長い生存に関連し、且つ遠隔転移及びより進行した腫瘍の特徴の発生に逆相関する（Ｌａｄａｎｙｉ ｅｔ ａｌ．，２００４、Ｐｅｔｔｙ ｅｔ ａｌ．，２００２、Ｓａｒｆｆ ｅｔ ａｌ．，２００８）。また、抗ＯＸ４０抗体治療は、各種マウスモデルにおいて抗腫瘍効能を誘発可能であることが示されたことから（Ａｓｐｅｓｌａｇｈ ｅｔ ａｌ．，２０１６）、免疫療法標的としてＯＸ４０の潜在能力が示唆される。Ｃｕｒｔｉらにより行われた癌患者における最初の臨床試験では、腫瘍特異的Ｔ細胞の抗腫瘍効能及び活性化の証拠がアゴニスティック抗ＯＸ４０モノクローナル抗体で観測されたことから、ＯＸ４０抗体は、抗腫瘍Ｔ細胞反応をブーストするのに有用であることが示唆される（Ｃｕｒｔｉ ｅｔ ａｌ．，２０１３）。

【０００７】

抗腫瘍効能を媒介するアゴニスティック抗ＯＸ４０抗体の作用機序は、主にマウス腫瘍モデルで試験されてきた（Ｗｅｉｎｂｅｒｇ ｅｔ ａｌ．，２０００）。最近まで、腫瘍でのアゴニスティック抗ＯＸ４０抗体の作用機序は、エフェクターＴ細胞の共刺激シグナリング経路さらにはＴｒｅｇ細胞の分化及び機能に対する阻害効果をトリガーするその能力に帰属された（Ａｓｐｅｓｌａｇｈ ｅｔ ａｌ．，２０１６、Ｉｔｏ ｅｔ ａｌ．，２００６、Ｓｔ Ｒｏｓｅ ｅｔ ａｌ．，２０１３、Ｖｏｏ ｅｔ ａｌ．，２０１３）。最近の研究では、動物腫瘍モデル及び癌患者の両方で、腫瘍浸潤Ｔｒｅｇは、エフェクターＴ細胞（ＣＤ４$^{+}$及びＣＤ８$^{+}$の両方）並びに末梢Ｔｒｅｇよりも高レベルのＯＸ４０を発現することが示された（Ｌａｉ ｅｔ ａｌ．，２０１６、Ｍａｒａｂｅｌｌｅ ｅｔ ａｌ．，２０１３ｂ、Ｍｏｎｔｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，２０１６、Ｓｏｒｏｏｓｈ ｅｔ ａｌ．，２００７、Ｔｉｍｐｅｒｉ ｅｔ ａｌ．，２０１６）。したがって、抗ＯＸ４０抗体が抗腫瘍反応をトリガーする二次的作用は、抗体依存細胞傷害性（ＡＤＣＣ）及び／又は抗体依存細胞食作用（ＡＤＣＰ）を介して腫瘍内ＯＸ４０$^{+}$Ｔｒｅｇ細胞を枯渇させるそのＦｃ媒介エフェクター機能に依拠する（Ａｓｐｅｓｌａｇｈ ｅｔ ａｌ．，２０１６、Ｂｕｌｌｉａｒｄ ｅｔ ａｌ．，２０１４、Ｍａｒａｂｅｌｌｅ ｅｔ ａｌ．，２０１３ａ、Ｍａｒａｂｅｌｌｅ ｅｔ ａｌ．，２０１３ｂ、Ｓｍｙｔｈ ｅｔ ａｌ．，２０１４）。この研究では、Ｆｃ媒介エフェクター機能を有するアゴニスティック抗ＯＸ４０抗体は、腫瘍内Ｔｒｅｇを優先的には枯渇させてＣＤ８$^{+}$エフェクターＴ細胞と腫瘍マイクロ環境（ＴＭＥ）内のＴｒｅｇとの比を改善することが可能であり、その結果、抗腫瘍免疫反応の改善、腫瘍退縮の増加、及び生存の改善がもたらされることが実証される（Ｂｕｌｌｉａｒｄ ｅｔ ａｌ．，２０１４、Ｃａｒｂｏｎｉ ｅｔ ａｌ．，２００３、Ｊａｃｑｕｅｍｉｎ ｅｔ ａｌ．，２０１５、Ｍａｒａｂｅｌｌｅ ｅｔ ａｌ．，２０１３ｂ）。これらの知見に基づけば、アゴニスティック活性及びＦｃ媒介エフェクター機能の両方を有するアゴニスティック抗ＯＸ４０抗体を開発する医療上の必要性は満たされていない。

【０００８】

これまでのところ、診療でのアゴニスティック抗ＯＸ４０抗体は、主に、ＯＸ４０－ＯＸ４０Ｌ相互作用をブロックするリガンド競合抗体である（たとえば、国際公開第２０１６１９６２２８Ａ１号パンフレット）。ＯＸ４０－ＯＸ４０Ｌ相互作用は、有効な抗腫瘍免疫を増強するのに必須であるので、ＯＸ４０－ＯＸ４０Ｌのブロッケードは、こうしたリガンド競合抗体の効能を制限する。したがって、ＯＸ４０に特異的に結合すると同時にＯＸ４０とＯＸ４０Ｌとの相互作用に干渉しないＯＸ４０アゴニスト抗体は、単独療法及

び組合せ療法の両方を介する癌及び自己免疫性障害の治療に有用である。
【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【０００９】
本開示の発明者らは、以上の活性医薬剤単独の各々の単独療法と比較して、抗ＯＸ４０抗体とＰＩ３Ｋδ阻害剤（たとえば、（Ｓ）－３－（１－（８－アミノ－１－メチルイミダゾ［１，５－ａ］ピラジン－３－イル）エチル）－５－クロロ－６－フルオロ－２－イソプロポキシ－Ｎ－（２－（４－メチルピペラジン－１－イル）エチル）ベンズアミド又はその薬学的に許容可能な塩）との組合せが、癌で腫瘍成長の有意な阻害を生じることを見いだした。
【００１０】
本開示は、免疫細胞でＯＸ４０を活性化してシグナリングを誘発することによりＰＩ３Ｋ（ホスファチジルイノシトール－４，５－二リン酸３－キナーゼ）デルタ阻害剤との組合せで抗腫瘍免疫を促進するアゴニスティック抗ＯＸ４０抗体及びその抗原結合性フラグメントに関する。
【００１１】
一実施形態では、本開示は、ヒトＯＸ４０に結合するアゴニスティックモノクローナル抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供する。一態様では、本開示のアゴニスティック抗体は、ＯＸ４０Ｌと競合することもＯＸ４０のそのリガンドＯＸ４０Ｌへの結合に干渉することもない。
【００１２】
本開示は下記実施形態を包含する。
【００１３】
癌治療の方法であって、ＰＩ３Ｋδ阻害剤との組合せで有効量の抗ＯＸ４０抗体又はその抗原結合性フラグメントを対象に投与することを含む、方法。
【００１４】
癌治療の方法であって、ＰＩ３Ｋδ阻害剤との組合せで有効量の非競合抗ＯＸ４０抗体又はその抗原結合フラグメントを対象に投与することを含む、方法。
【００１５】
ＯＸ４０抗体が、
（ｉ）（ａ）配列番号３のＨＣＤＲ（重鎖相補性決定領域）１と（ｂ）配列番号２４のＨＣＤＲ２と（ｃ）配列番号５のＨＣＤＲ３とを含む重鎖可変領域及び（ｄ）配列番号２５のＬＣＤＲ（軽鎖相補性決定領域）１と（ｅ）配列番号１９のＬＣＤＲ２と（ｆ）配列番号８のＬＣＤＲ３とを含む軽鎖可変領域、
（ｉｉ）（ａ）配列番号３のＨＣＤＲ１と（ｂ）配列番号１８のＨＣＤＲ２と（ｃ）配列番号５のＨＣＤＲ３とを含む重鎖可変領域及び（ｄ）配列番号６のＬＣＤＲ１と（ｅ）配列番号１９のＬＣＤＲ２と（ｆ）配列番号８のＬＣＤＲ３とを含む軽鎖可変領域、
（ｉｉｉ）（ａ）配列番号３のＨＣＤＲ１と（ｂ）配列番号１３のＨＣＤＲ２と（ｃ）配列番号５のＨＣＤＲ３とを含む重鎖可変領域及び（ｄ）配列番号６のＬＣＤＲ１と（ｅ）配列番号７のＬＣＤＲ２と（ｆ）配列番号８のＬＣＤＲ３とを含む軽鎖可変領域、又は
（ｉｖ）（ａ）配列番号３のＨＣＤＲ１と（ｂ）配列番号４のＨＣＤＲ２と（ｃ）配列番号５のＨＣＤＲ３とを含む重鎖可変領域及び（ｄ）配列番号６のＬＣＤＲ１と（ｅ）配列番号７のＬＣＤＲ２と（ｆ）配列番号８のＬＣＤＲ３とを含む軽鎖可変領域
をＰＩ３Ｋδ阻害剤との組合せで含む、方法。
【００１６】
ＯＸ４０抗体又は抗原結合が、
（ｉ）配列番号２６を含む重鎖可変領域（ＶＨ）及び配列番号２８を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）、
（ｉｉ）配列番号２０を含む重鎖可変領域（ＶＨ）及び配列番号２２を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）、

（ｉｉｉ）配列番号１４を含む重鎖可変領域（ＶＨ）及び配列番号１６を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）、又は
（ｉｖ）配列番号９を含む重鎖可変領域（ＶＨ）及び配列番号１１を含む軽鎖可変領域（ＶＬ）
を含む、方法。

【００１７】

ＰＩ３Ｋδ阻害剤が、イデラリシブ、デュベリシブ、ウムブラリシブ、ＡＭＧ－３１９、ＰＩ３０６５、化合物１、化合物２Ａ、又はそれらの薬学的に許容可能な塩からなる群から選択される、方法。

【００１８】

化合物１が、（Ｓ）－３－（１－（８－アミノ－１－メチルイミダゾ［１，５－ａ］ピラジン－３－イル）エチル）－５－クロロ－６－フルオロ－２－イソプロポキシ－Ｎ－（２－（４－メチルピペラジン－１－イル）エチル）ベンズアミドである、前記方法。

【００１９】

化合物２Ａが、１－クロロ－３－（１－（５－クロロ－４－フルオロ－２－イソプロポキシ－３－（６－（トリフルオロメチル）ピリジン－３－イル）フェニル）エチル）イミダゾ［１，５－ａ］ピラジン－８－アミンである、前記方法。

【００２０】

癌が血液癌である、前記方法。

【００２１】

血液癌が、白血病、リンパ腫、骨髄腫、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）、ホジキンリンパ腫（ＨＬ）、又はＢ細胞悪性病変である、前記方法。

【００２２】

Ｂ細胞悪性病変が、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫（ＳＬＬ）、濾胞性リンパ腫（ＦＬ）、マントル細胞リンパ腫（ＭＣＬ）、辺縁帯リンパ腫（ＭＺＬ）、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症（ＷＭ）、ヘアリー細胞白血病（ＨＣＬ）、バーキット様白血病（ＢＬ）、Ｂ細胞前リンパ球性白血病（Ｂ－ＰＬＬ）、瀰漫性大Ｂ細胞リンパ腫（ＤＬＢＣＬ）、胚中心Ｂ細胞瀰漫性大Ｂ細胞リンパ腫（ＧＣＢ－ＤＬＢＣＬ）、非胚中心Ｂ細胞瀰漫性大Ｂ細胞リンパ腫（非ＧＣＢ　ＤＬＢＣＬ）、サブタイプ未確定のＤＬＢＣＬ、乳房起源又は精巣起源の原発中枢神経系リンパ腫（ＰＣＮＳＬ）、又は二次性中枢神経系リンパ腫（ＳＣＮＳＬ）である、前記方法。

【００２３】

瀰漫性大Ｂ細胞リンパ腫（ＤＬＢＣＬ）が、活性化Ｂ細胞瀰漫性大Ｂ細胞リンパ腫（ＡＢＣ－ＤＬＢＣＬ）、ＧＣＢ－ＤＬＢＣＬ、又は非ＧＣＢ　ＤＬＢＣＬである、前記方法。

【００２４】

Ｂ細胞悪性病変が抵抗性Ｂ細胞悪性病変である、前記方法。

【００２５】

抵抗性Ｂ細胞悪性病変が、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、小リンパ球性リンパ腫（ＳＬＬ）、濾胞性リンパ腫（ＦＬ）、マントル細胞リンパ腫（ＭＣＬ）、辺縁帯リンパ腫（ＭＺＬ）、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症（ＷＭ）、ヘアリー細胞白血病（ＨＣＬ）、バーキット様白血病（ＢＬ）、Ｂ細胞前リンパ球性白血病（Ｂ－ＰＬＬ）、瀰漫性大Ｂ細胞リンパ腫（ＤＬＢＣＬ）、胚中心Ｂ細胞瀰漫性大Ｂ細胞リンパ腫（ＧＣＢ－ＤＬＢＣＬ）、非胚中心Ｂ細胞瀰漫性大Ｂ細胞リンパ腫（非ＧＣＢ　ＤＬＢＣＬ）、サブタイプ未確定のＤＬＢＣＬ、乳房起源又は精巣起源の原発中枢神経系リンパ腫（ＰＣＮＳＬ）、又は二次性中枢神経系リンパ腫（ＳＣＮＳＬ）である、前記方法。

【００２６】

抵抗性Ｂ細胞悪性病変が瀰漫性大Ｂ細胞リンパ腫（ＤＬＢＣＬ）である、前記方法。

【００２７】

抵抗性ＤＬＢＣＬが、活性化Ｂ細胞瀰漫性大Ｂ細胞リンパ腫（ＡＢＣ－ＤＬＢＣＬ）、ＧＣＢ－ＤＬＢＣＬ、又は非ＧＣＢ　ＤＬＢＣＬである、前記方法。

【００２８】
癌が、乳癌、結腸癌、頭頸部癌、胃癌、腎癌、肝癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、皮膚癌、中皮腫、及び肉腫である、前記方法。
【００２９】
一実施形態では、抗体又はその抗原結合性フラグメントは、配列番号３、配列番号４、配列番号５、配列番号６、配列番号７、配列番号８、配列番号１３、配列番号１８、配列番号１９、配列番号２４、及び配列番号２５からなる群から選択されたアミノ酸配列を有する１つ以上の相補性決定領域（ＣＤＲ）を含む。
【００３０】
他の一実施形態では、抗体又はその抗原結合性フラグメントは、（ａ）配列番号３、配列番号４、配列番号１３、配列番号１８、配列番号２４、及び配列番号５からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する１つ以上の相補性決定領域（ＨＣＤＲ）を含む重鎖可変領域、及び／又は（ｂ）配列番号６、配列番号２５、配列番号７、配列番号１９、及び配列番号８からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する１つ以上の相補性決定領域（ＬＣＤＲ）を含む軽鎖可変領域を含む。
【００３１】
他の一実施形態では、抗体又はその抗原結合性フラグメントは、（ａ）配列番号３のアミノ酸配列を有するＨＣＤＲ１と、配列番号４、配列番号１３、配列番号１８、又は配列番号２４のアミノ酸配列を有するＨＣＤＲ２と、配列番号５のアミノ酸配列を有するＨＣＤＲ３と、の３つの相補性決定領域（ＨＣＤＲ）を含む重鎖可変領域、及び／又は（ｂ）配列番号６又は配列番号２５のアミノ酸配列を有するＬＣＤＲ１と、配列番号７又は配列番号１９のアミノ酸配列を有するＬＣＤＲ２と、配列番号８のアミノ酸配列を有するＬＣＤＲ３と、の３つの相補性決定領域（ＬＣＤＲ）を含む軽鎖可変領域を含む。
【００３２】
他の一実施形態では、抗体又はその抗原結合性フラグメントは、（ａ）配列番号３のアミノ酸配列を有するＨＣＤＲ１と、配列番号４のアミノ酸配列を有するＨＣＤＲ２と、配列番号５のアミノ酸配列を有するＨＣＤＲ３と、若しくは配列番号３のアミノ酸配列を有するＨＣＤＲ１と、配列番号１３のアミノ酸配列を有するＨＣＤＲ２と、配列番号５のアミノ酸配列を有するＨＣＤＲ３と、若しくは配列番号３のアミノ酸配列を有するＨＣＤＲ１と、配列番号１８のアミノ酸配列を有するＨＣＤＲ２と、配列番号５のアミノ酸配列を有するＨＣＤＲ３と、若しくは配列番号３のアミノ酸配列を有するＨＣＤＲ１と、配列番号２４のアミノ酸配列を有するＨＣＤＲ２と、配列番号５のアミノ酸配列を有するＨＣＤＲ３と、の３つの相補性決定領域（ＨＣＤＲ）を含む重鎖可変領域、及び／又は（ｂ）配列番号６のアミノ酸配列を有するＬＣＤＲ１と、配列番号７のアミノ酸配列を有するＬＣＤＲ２と、配列番号８のアミノ酸配列を有するＬＣＤＲ３と、若しくは配列番号６のアミノ酸配列を有するＬＣＤＲ１と、配列番号１９のアミノ酸配列を有するＬＣＤＲ２と、配列番号８のアミノ酸配列を有するＬＣＤＲ３と、若しくは配列番号２５のアミノ酸配列を有するＬＣＤＲ１と、配列番号１９のアミノ酸配列を有するＬＣＤＲ２と、配列番号８のアミノ酸配列を有するＬＣＤＲ３と、の３つの相補性決定領域（ＬＣＤＲ）を含む軽鎖可変領域を含む。
【００３３】
他の一実施形態では、本開示の抗体又は抗原結合性フラグメントは、配列番号３のアミノ酸配列を有するＨＣＤＲ１と、配列番号４のアミノ酸配列を有するＨＣＤＲ２と、配列番号５のアミノ酸配列を有するＨＣＤＲ３と、を含む重鎖可変領域、及び配列番号６のアミノ酸配列を有するＬＣＤＲ１と、配列番号７のアミノ酸配列を有するＬＣＤＲ２と、配列番号８のアミノ酸配列を有するＬＣＤＲ３と、を含む軽鎖可変領域を含む。
【００３４】
一実施形態では、本開示の抗体又は抗原結合性フラグメントは、配列番号３のアミノ酸配列を有するＨＣＤＲ１と、配列番号１３のアミノ酸配列を有するＨＣＤＲ２と、配列番号５のアミノ酸配列を有するＨＣＤＲ３と、を含む重鎖可変領域、及び配列番号６のアミ

ノ酸配列を有するＬＣＤＲ１と、配列番号７のアミノ酸配列を有するＬＣＤＲ２と、配列番号８のアミノ酸配列を有するＬＣＤＲ３と、を含む軽鎖可変領域を含む。

【００３５】

他の一実施形態では、本開示の抗体又は抗原結合性フラグメントは、配列番号３のアミノ酸配列を有するＨＣＤＲ１と、配列番号１８のアミノ酸配列を有するＨＣＤＲ２と、配列番号５のアミノ酸配列を有するＨＣＤＲ３と、を含む重鎖可変領域、及び配列番号６のアミノ酸配列を有するＬＣＤＲ１と、配列番号１９のアミノ酸配列を有するＬＣＤＲ２と、配列番号８のアミノ酸配列を有するＬＣＤＲ３と、を含む軽鎖可変領域を含む。

【００３６】

他の一実施形態では、本開示の抗体又は抗原結合性フラグメントは、配列番号３のアミノ酸配列を有するＨＣＤＲ１と、配列番号２４のアミノ酸配列を有するＨＣＤＲ２と、配列番号５のアミノ酸配列を有するＨＣＤＲ３と、を含む重鎖可変領域、及び配列番号２５のアミノ酸配列を有するＬＣＤＲ１と、配列番号１９のアミノ酸配列を有するＬＣＤＲ２と、配列番号８のアミノ酸配列を有するＬＣＤＲ３と、を含む軽鎖可変領域を含む。

【００３７】

一実施形態では、本開示の抗体又はその抗原結合性フラグメントは、（ａ）配列番号９、配列番号１４、配列番号２０、若しくは配列番号２６のアミノ酸配列、又は配列番号９、配列番号１４、配列番号２０、若しくは配列番号２６のいずれか１つに対して少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％同一のアミノ酸配列、を有する重鎖可変領域、及び／或いは（ｂ）配列番号１１、配列番号１６、配列番号２２、若しくは配列番号２８のアミノ酸配列、又は配列番号１１、配列番号１６、配列番号２２、若しくは配列番号２８のいずれか１つに対して少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％同一のアミノ酸配列、を有する軽鎖可変領域を含む。

【００３８】

他の一実施形態では、本開示の抗体又はその抗原結合性フラグメントは、（ａ）配列番号９、配列番号１４、配列番号２０、若しくは配列番号２６のアミノ酸配列、又は配列番号９、配列番号１４、配列番号２０、若しくは配列番号２６のアミノ酸配列中に１、２、若しくは３つのアミノ酸置換を有するアミノ酸配列、を有する重鎖可変領域、及び／又は（ｂ）配列番号１１、配列番号１６、配列番号２２、若しくは配列番号２８のアミノ酸配列、又は配列番号１１、配列番号１６、配列番号２２、若しくは配列番号２８のアミノ酸中に１、２、３、４、若しくは５つのアミノ酸置換を有するアミノ酸配列、を有する軽鎖可変領域を含む。他の一実施形態では、アミノ酸置換は保存的アミノ酸置換である。

【００３９】

一実施形態では、本開示の抗体又はその抗原結合性フラグメントは、

（ａ）配列番号９のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域及び配列番号１１のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、又は

（ｂ）配列番号１４のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域及び配列番号１６のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、又は

（ｃ）配列番号２０のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域及び配列番号２２のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、又は

（ｄ）配列番号２６のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域及び配列番号２８のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域

を含む。

【００４０】

一実施形態では、本開示の抗体は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、又はＩｇＧ４アイソタイプである。より具体的な実施形態では、本開示の抗体は、野生型ヒトＩｇＧ１（ヒトＩｇＧ１ｗｔ又はｈｕＩｇＧ１としても参照される）又はＩｇＧ２のＦｃドメインを含む。他の一実施形態では、本開示の抗体は、Ｓ２２８Ｐ及び／又はＲ４０９Ｋ置換（ＥＵ番号付けシステムによる）を有するヒトＩｇＧ４のＦｃドメインを含む。

【００４１】

一実施形態では、本開示の抗体は、１×１０$^{-6}$Ｍ～１×１０$^{-10}$Ｍの結合親和性（K_D）でＯＸ４０に結合する。他の一実施形態では、本開示の抗体は、約１×１０$^{-6}$Ｍ、約１×１０$^{-7}$Ｍ、約１×１０$^{-8}$Ｍ、約１×１０$^{-9}$Ｍ、又は約１×１０$^{-10}$Ｍの結合親和性（K_D）でＯＸ４０に結合する。

【００４２】

他の一実施形態では、本発明の抗ヒトＯＸ４０抗体は、カニクイザルＯＸ４０に対する種交差結合活性を示す。

【００４３】

一実施形態では、本開示の抗ＯＸ４０抗体は、ＯＸ４０－ＯＸ４０Ｌ相互作用界面の外側のヒトＯＸ４０のエピトープに結合する。他の一実施形態では、本開示の抗ＯＸ４０抗体は、ＯＸ４０へのＯＸ４０リガンド結合と競合しない。さらに他の一実施形態では、本開示の抗ＯＸ４０抗体は、ＯＸ４０とそのリガンドＯＸ４０Ｌとの相互作用をブロックしない。

【００４４】

本開示の抗体は、アゴニスティックであり、免疫反応を有意に増強する。本発明は、抗ＯＸ４０抗体のアゴニスティック能を試験する方法を提供する。ある実施形態では、本開示の抗体は、混合リンパ球反応（ＭＬＲ）アッセイで初代Ｔ細胞を有意に刺激してＩＬ－２を産生可能である。

【００４５】

一実施形態では、本開示の抗体は、強いＦｃ媒介エフェクター機能を有する。抗体は、ＮＫ細胞によるレギュラトリーＴ細胞（Ｔｒｅｇ細胞）などのＯＸ４０^{Hi}標的細胞に対する抗体依存細胞性細胞傷害性（ＡＤＣＣ）を媒介する。一態様では、本開示は、異なるＯＸ４０発現レベルに基づいて特異的Ｔ細胞サブセットの抗ＯＸ４０抗体媒介ｉｎ　ｖｉｔｒｏ枯渇を評価する方法を提供する。

【００４６】

本開示の抗体又は抗原結合性フラグメントは、ＯＸ４０－ＯＸ４０Ｌ相互作用をブロックしない。そのほか、ＯＸ４０抗体は、動物モデルで示されるように、ｉｎ　ｖｉｖｏで用量依存抗腫瘍活性を呈する。用量依存活性は、ＯＸ４０－ＯＸ４０Ｌ相互作用をブロックする抗ＯＸ４０抗体の活性プロファイルから区別される。

【００４７】

本開示は、抗体又は抗原結合性フラグメントのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸に関する。一実施形態では、単離された核酸は、配列番号１０、配列番号１５、配列番号２１、若しくは配列番号２７のＶＨヌクレオチド配列、又は配列番号１０、配列番号１５、配列番号２１、若しくは配列番号２７に対して少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の同一性を有するヌクレオチド配列を含み、且つ本開示の抗体又は抗原結合性フラグメントのＶＨ領域をコードする。代替的又は追加的に、単離された核酸は、配列番号１２、配列番号１７、配列番号２３、若しくは配列番号２９のＶＬヌクレオチド配列、又は配列番号１２、配列番号１７、配列番号２３、若しくは配列番号２９に対して少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、若しくは９９％の同一性を有するヌクレオチド配列を含み、且つ本開示の抗体又は抗原結合性フラグメントのＶＬ領域をコードする。

【００４８】

他の一態様では、本開示は、ＯＸ４０抗体又はその抗原結合性フラグメントと、任意選択的に薬学的に許容可能な賦形剤と、を含む医薬組成物に関する。

【００４９】

さらに他の一態様では、本開示は、必要とする対象にＯＸ４０抗体又はその抗原結合性フラグメント又はＯＸ４０抗体医薬組成物を治療有効量で投与することを含む、対象において疾患を治療する方法に関する。他の一実施形態では、抗体又は抗原結合性フラグメントにより治療される疾患は、癌又は自己免疫性疾患である。

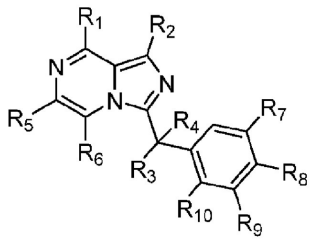
【００５０】

本開示は、癌や自己免疫性疾患などの疾患を治療するための、抗体又はその抗原結合性フラグメント又はＯＸ４０抗体医薬組成物の使用に関する。

【００５１】

国際公開第２０１９／０４７９１５号パンフレットには、下記一般式（Ｉ）を有する一連のイミダゾ［１，５－ａ］ピラジン誘導体化合物若しくはその立体異性体又はそれらの薬学的に許容可能な塩がＰＩ３Ｋδ阻害剤として開示されおり、これは、ホスファチジルイノシトール－４，５－二リン酸３－キナーゼ（ＰＩ３Ｋ）に対して効力のある阻害活性を有することが実証された。

【化１】

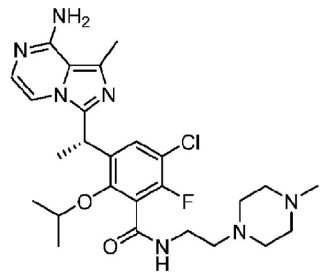


式(I)

【００５２】

国際公開第２０１９／０４７９１５号パンフレットには、有用なＰＩ３Ｋδ阻害剤、たとえば、癌を治療するための（Ｓ）－３－（１－（８－アミノ－１－メチルイミダゾ［１，５－ａ］ピラジン－３－イル）エチル）－５－クロロ－６－フルオロ－２－イソプロポキシ－Ｎ－（２－（４－メチルピペラジン－１－イル）エチル）ベンズアミド（これ以降では化合物１）が開示されている。

【化２】

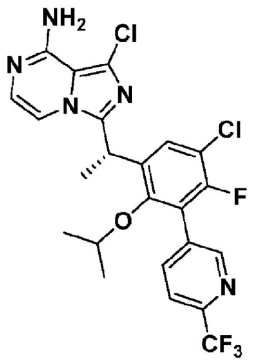


化合物1

【００５３】

また、国際公開第２０１８／１０３６８８号パンフレットには、癌の治療に有用なＰＩ３Ｋδ阻害剤、たとえば、１－クロロ－３－（１－（５－クロロ－４－フルオロ－２－イソプロポキシ－３－（６－（トリフルオロメチル）ピリジン－３－イル）フェニル）エチル）イミダゾ［１，５－ａ］ピラジン－８－アミン（化合物２、化合物２Ａ、及び化合物２Ｂ）が開示されている。

【化３】



化合物2A

【図面の簡単な説明】

【００５４】

【図１】ＯＸ４０－ｍＩｇＧ２ａ、ＯＸ４０－ｈｕＩｇＧ１、及びＯＸ４０－Ｈｉｓ構築物の模式図である。ＯＸ４０　ＥＣＤ：ＯＸ４０細胞外ドメイン。Ｎ：Ｎ末端。Ｃ：Ｃ末端。

【図２】表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）による精製されたキメラ（ｃｈ４４５）並びにヒト化（４４５－１、４４５－２、４４５－３、及び４４５－３ＩｇＧ４）抗ＯＸ４０抗体の親和性決定を示す。

【図３】フローサイトメトリーによるＯＸ４０結合の決定を実証する。ＯＸ４０陽性ＨｕＴ７８／ＯＸ４０細胞は、各種抗ＯＸ４０抗体（抗体ｃｈ４４５、４４５－１、４４５－２、４４５－３、及び４４５－３ＩｇＧ４）とともにインキュベートされ、ＦＡＣＳ解析に付された。結果は、平均蛍光強度（ＭＦＩ、Ｙ軸）により示される。

【図４】フローサイトメトリーによるＯＸ４０抗体の結合を示す。ＨｕＴ７８／ＯＸ４０及びＨｕＴ７８／ｃｙｎｏＯＸ４０細胞は、抗体４４５－３で染色され、平均蛍光強度（ＭＦＩ、Ｙ軸において示された）は、フローサイトメトリーにより決定された。

【図５】表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）によるＯＸ４０野生型及び点突然変異体に対する４４５－３Ｆａｂの親和性決定を示す。

【図６】抗体４４５－３とＯＸ４０上のそのエピトープとの間の詳細な相互作用を示す。抗体４４５－３及びＯＸ４０は、それぞれ、淡灰色及び黒色で描かれる。水素結合又は塩ブリッジ、パイ－パイスタッキング、及びファンデルワールス（ＶＤＷ）相互作用は、それぞれ、破線、二重破線、及び実線で表される。

【図７】抗体４４５－３がＯＸ４０Ｌ結合に干渉しないことを実証する。ＨＥＫ２９３／ＯＸ４０Ｌ細胞を染色する前に、ＯＸ４０－マウスＩｇＧ２ａ（ＯＸ４０－ｍＩｇＧ２ａ）融合タンパク質は、ヒトＩｇＧ（＋ＨｕＩｇＧ）、抗体４４５－３（＋４４５－３）、又は抗体１Ａ７．ｇｒ１（＋１Ａ７．ｇｒ１、米国特許出願公開第２０１５／０３０７６１７号明細書参照）とともに１：１のモル比でプレインキュベートされた。ＯＸ４０－ｍＩｇＧ２ａ／抗ＯＸ４０抗体複合体へのＯＸ４０Ｌの結合は、ＨＥＫ２９３／ＯＸ４０Ｌ細胞及びＯＸ４０－ｍＩｇＧ２ａ／抗ＯＸ４０抗体複合体の共インキュベーション、続く抗マウスＩｇＧ二次Ａｂとの反応及びフローサイトメトリーにより決定された。結果は、デュプリケートの平均±ＳＤで示された。統計的有意性：＊：Ｐ＜０．０５、＊＊：Ｐ＜０．０１。

【図８】報告されたＯＸ４０／ＯＸ４０Ｌ複合体（ＰＤＢコード：２ＨＥＶ）とともにＯＸ４０／４４５－３Ｆａｂの構造アライメントを示す。ＯＸ４０Ｌは白色で示され、４４５－３Ｆａｂは灰色で示され、且つＯＸ４０は黒色で示される。

【図９】抗ＯＸ４０抗体４４５－３がＴＣＲ刺激との関連でＩＬ－２産生を誘発することを示す。ＯＸ４０陽性ＨｕＴ７８／ＯＸ４０細胞（図９Ａ）は、抗ＯＸ４０抗体の存在下

で人工抗原提示細胞（ＡＰＣ）系（ＨＥＫ２９３／ＯＳ８^{Ｌｏｗ}－ＦｃγＲＩ）とともに一晩共培養され、ＩＬ－２産生は、Ｔ細胞刺激に対するリードアウトとして使用された（図９Ｂ）。培養上清中のＩＬ－２は、ＥＬＩＳＡにより検出された。結果は、トリプリケートの平均±ＳＤで示される。

【図１０】抗ＯＸ４０抗体がＭＬＲ反応を増強することを示唆する。ｉｎ　ｖｉｔｒｏ分化樹状細胞（ＤＣ）は、抗ＯＸ４０抗体（０．１～１０μｇ／ｍｌ）の存在下で同種異系ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞とともに２日間共培養された。上清中のＩＬ－２は、ＥＬＩＳＡにより検出された。試験はすべて、クアドルプリケートで行われ、結果は、平均±ＳＤとして示された。統計的有意性：＊：Ｐ＜０．０５、＊＊：Ｐ＜０．０１。

【図１１】抗ＯＸ４０抗体４４５－３がＡＤＣＣを誘発することを実証する。ＡＤＣＣアッセイは、抗ＯＸ４０抗体（０．００４～３μｇ／ｍｌ）又はコントロールの存在下でエフェクター細胞としてＮＫ９２ＭＩ／ＣＤ１６Ｖ細胞及び標的細胞としてＨｕＴ７８／ＯＸ４０細胞を用いて実施された。等しい数のエフェクター細胞及び標的細胞は、乳酸デヒドロゲナーゼ（ＬＤＨ）放出を検出する前に５時間にわたり共培養された。細胞傷害性のパーセンテージ（Ｙ軸）は、実施例１２に記載のように製造業者のプロトコルに基づいて計算された。結果は、トリプリケートの平均±ＳＤで示される。

【図１２】ＮＫ細胞との組合せの抗ＯＸ４０抗体４４５－３がｉｎ　ｖｉｔｒｏの活性化ＰＢＭＣでＣＤ８$^{+}$エフェクターＴ細胞とＴｒｅｇとの比を増加させることを示す。ヒトＰＢＭＣは、ＰＨＡ－Ｌ（１μｇ／ｍｌ）によりあらかじめ活性化され、次いで、抗ＯＸ４０抗体又はコントロールの存在下でＮＫ９２ＭＩ／ＣＤ１６Ｖ細胞とともに共培養された。異なるＴ細胞サブセットのパーセンテージは、フローサイトメトリーにより決定された。ＣＤ８$^{+}$エフェクターＴ細胞とＴｒｅｇとの比がさらに計算された。図１２Ａは、ＣＤ８＋／合計Ｔ細胞比を示す。図１２Ｂは、Ｔｒｅｇ／合計Ｔ細胞比である。図１２Ｃは、ＣＤ８＋／Ｔｒｅｇ比を示す。データは、デュプリケートの平均±ＳＤとして示される。指示濃度での４４５－３と１Ａ７．ｇｒ１との統計的有意性が示される。＊：Ｐ＜０．０５、＊＊：Ｐ＜０．０１。

【図１３Ａ】１Ａ７．ｇｒ１ではなく抗ＯＸ４０抗体４４５－３がＯＸ４０ヒト化マウスにおけるＭＣ３８結腸直腸癌同種同系モデルで用量依存抗腫瘍活性を明らかにすることを示す。ＭＣ３８ネズミ結腸癌細胞（２×１０^{7}）は、雌ヒトＯＸ４０トランスジェニックマウスにおいて皮下に植え込まれた。腫瘍体積によるランダム化後、動物は、抗ＯＸ４０抗体又はアイソタイプコントロールのどちらかが指示通り週１回で３回腹腔内注射された。図１３Ａは、漸増用量の４４５－３抗体と漸増用量の１Ａ７．ｇｒ１抗体とを比較するとともに、腫瘍成長の低減を比較する。

【図１３Ｂ】１Ａ７．ｇｒ１ではなく抗ＯＸ４０抗体４４５－３がＯＸ４０ヒト化マウスにおけるＭＣ３８結腸直腸癌同種同系モデルで用量依存抗腫瘍活性を明らかにすることを示す。ＭＣ３８ネズミ結腸癌細胞（２×１０^{7}）は、雌ヒトＯＸ４０トランスジェニックマウスにおいて皮下に植え込まれた。腫瘍体積によるランダム化後、動物は、抗ＯＸ４０抗体又はアイソタイプコントロールのどちらかが指示通り週１回で３回腹腔内注射された。図１３Ｂは、その具体的用量で治療されたすべてのマウスのデータを提示する。データは、６匹のマウス／群で平均腫瘍体積±平均の標準誤差（ＳＥＭ）として提示される。統計的有意性：＊：Ｐ＜０．０５ｖｓアイソタイプコントロール。

【図１４Ａ】ＯＸ４０抗体で行われたアミノ酸改変の表である。

【図１４Ｂ】ＯＸ４０抗体で行われたアミノ酸改変の表である。

【図１５】マウス乳癌（ＥＭＴ６）腫瘍モデルでの化合物１との組合せの抗ＯＸ４０抗体の効能を示す。

【図１６】マウスＢリンパ腫（Ａ２０）腫瘍モデルでの化合物１との組合せの抗ＯＸ４０抗体の効能を示す。

【図１７】マウス結腸（ＣＴ２６ＷＴ）腫瘍モデルでの化合物２Ａとの組合せの抗ＯＸ４０抗体の効能を示す。

【図１８】ＥＬＩＳＡにより特徴付けられたマウスＯＸ４０への抗体１Ａ７．ｇｒ１の結

合を例示する。
【発明を実施するための形態】
【００５５】
定義
本文書中の他の箇所に具体的な定義がない限り、本明細書で用いられる他の科学技術用語はすべて、当業者により通常理解される意味を有する。
【００５６】
添付の特許請求の範囲を含めて、本明細書で用いられる場合、「ａ」、「ａｎ」、「ｔｈｅ」などの語の単数形は、とくに文脈上明確に規定されない限り、それらの対応する複数形の参照語を含む。
【００５７】
「ｏｒ（又は）」という用語は、とくに文脈上明確に規定されない限り、「ａｎｄ／ｏｒ（及び／又は）」という用語を意味するように用いられ、それと互換的に用いられる。
【００５８】
本明細書で用いられる「抗癌剤」という用語は、限定されるものではないが、細胞傷害剤、化学療法剤、放射線療法及び放射線療法剤、標的化抗癌剤、及び免疫療法剤を含めて、癌などの細胞増殖障害の治療に使用可能ないずれかの作用剤を意味する。
【００５９】
「ＯＸ４０」という用語は、腫瘍壊死因子レセプタースーパーファミリーのメンバーであるおおよそ５０ＫＤのＩ型膜貫通糖タンパク質を意味する。ＯＸ４０は、ＡＣＴ３５、ＣＤ１３４、又はＴＮＦＲＳＦ４としても知られる。ヒトＯＸ４０のアミノ酸配列（配列番号１）は、アクセッション番号ＮＰ＿００３３１８にも見いだされうるとともに、ＯＸ４０タンパク質をコードするヌクレオチド配列は、アクセッション番号：Ｘ７５９６２．１である。「ＯＸ４０リガンド」又は「ＯＸ４０Ｌ」という用語は、ＯＸ４０の唯一のリガンドを意味し、ｇｐ３４、ＣＤ２５２、又はＴＮＦＳＦ４との互換性がある。
【００６０】
本明細書中の「ａｄｍｉｎｉｓｔｒａｔｉｏｎ（投与）」、「ａｄｍｉｎｉｓｔｅｒｉｎｇ（～を投与すること）」、「ｔｒｅａｔｉｎｇ（～を治療すること）」、及び「ｔｒｅａｔｍｅｎｔ（治療）」という用語は、動物、ヒト、実験対象、細胞、組織、器官、又は生物学的流体に適用されるとき、外因性の医薬剤、治療剤、診断剤、又は組成物と、動物、ヒト、対象、細胞、組織、器官、又は生物学的流体と、の接触を意味する。細胞の治療は、細胞への試薬の接触、さらには流体が細胞に接触している場合には流体への試薬の接触を包含する。「ａｄｍｉｎｉｓｔｒａｔｉｏｎ（投与）」及び「ｔｒｅａｔｍｅｎｔ（治療）」という用語は、試薬、診断剤、結合性化合物による、又は他の細胞による、細胞などのｉｎ　ｖｉｔｒｏ及びｅｘ　ｖｉｖｏ治療も意味する。本明細書中の「対象」という用語は、いずれかの生物、好ましくは動物、より好ましくは哺乳動物（たとえば、ラット、マウス、イヌ、ネコ、ウサギ）、最も好ましくはヒトを含む。いずれかの疾患又は障害を治療することとは、一態様では、疾患又は障害を寛解させること（すなわち、疾患又はその臨床症状の少なくとも１つの発生を緩徐化又は停止又は低減すること）を意味する。他の一態様では、「ｔｒｅａｔ（～を治療する）」、「ｔｒｅａｔｉｎｇ（～を治療すること）」、又は「ｔｒｅａｔｍｅｎｔ（治療）」とは、患者により識別できないおそれのあるものを含めて、少なくとも１つの物理的パラメーターを軽減又は寛解することを意味する。さらに他の一態様では、「ｔｒｅａｔ（～を治療する）」、「ｔｒｅａｔｉｎｇ（～を治療すること）」、又は「ｔｒｅａｔｍｅｎｔ（治療）」とは、疾患又は障害を物理的に（たとえば、識別可能な症状の安定化）、生理学的に（たとえば、物理的パラメーターの安定化）、又はその両方のどれかをモジュレートすることを意味する。さらに他の一態様では、「ｔｒｅａｔ（～を治療する）」、「ｔｒｅａｔｉｎｇ（～を治療すること）」、又は「ｔｒｅａｔｍｅｎｔ（治療）」とは、疾患又は障害の発症又は発生又は進行を予防又は遅延することを意味する。
【００６１】

本開示との関連での「対象」という用語は、哺乳動物、たとえば霊長動物、好ましくは高等霊長動物、たとえばヒト（たとえば、本明細書に記載の障害を有する又は有するリスクのある患者）のことである。

【００６２】

本明細書で用いられる「親和性」という用語は、抗体と抗原との相互作用の強度を意味する。抗原内では、抗体「アーム」の可変領域が非共有結合力を介して数多くの部位で抗原と相互作用し、相互作用が大きくなるほど親和性は強くなる。

【００６３】

本明細書で用いられる「抗体」という用語は、対応する抗原に非共有結合で、可逆的に、且つ特異的に結合可能であるイムノグロブリンファミリーのポリペプチドを意味する。たとえば、天然に存在するＩｇＧ抗体は、ジスルフィド結合により相互接続された少なくとも２本の重（Ｈ）鎖と２本の軽（Ｌ）鎖とを含むテトラマーである。各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書ではＶＨと略記される）と重鎖定常領域とで構成される。重鎖定常領域は、３つのドメインＣＨ１、ＣＨ２、及びＣＨ３で構成される。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書ではＶＬと略記される）と軽鎖定常領域とで構成される。軽鎖定常領域は、１つのドメインＣＬで構成される。ＶＨ及びＶＬ領域は、フレームワーク領域（ＦＲ）と称されるより保存された領域が介在する相補性決定領域（ＣＤＲ）と称される超可変性領域にさらに細分可能である。各ＶＨ及びＶＬは、アミノ末端からカルボキシル末端へ次の順序で配置された３つのＣＤＲ及び４つのＦＲ、すなわち、ＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３、及びＦＲ４で構成される。重鎖及び軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合性ドメインを含有する。抗体の定常領域は、免疫系の各種細胞（たとえばエフェクター細胞）及び古典的補体系の第１成分（Ｃ１ｑ）をはじめとする宿主組織又は因子へのイムノグロブリンの結合を媒介可能である。

【００６４】

「抗体」という用語は、限定されるものではないが、モノクローナル抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、及び抗イディオタイプ（抗Ｉｄ）抗体を含む。抗体は、いずれかのアイソタイプ／クラス（たとえば、ＩｇＧ、ＩｇＥ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＡ、及びＩｇＹ）又はサブクラス（たとえば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１、及びＩｇＡ２）でありうる。

【００６５】

いくつかの実施形態では、抗ＯＸ４０抗体は、少なくとも１つの抗原結合性部位又は少なくとも可変領域を含む。いくつかの実施形態では、抗ＯＸ４０抗体は、本明細書に記載のＯＸ４０抗体由来の抗原結合性フラグメントを含む。いくつかの実施形態では、抗ＯＸ４０抗体は、単離されているか又は組換えである。

【００６６】

本明細書中の「モノクローナル抗体」又は「ｍＡｂ」又は「Ｍａｂ」という用語は、実質的に均一な抗体の集団を意味する。すなわち、集団に含まれる抗体分子は、マイナー量で存在しうる天然に存在する可能性のある突然変異を除いてアミノ酸配列が同一である。これとは対照的に、従来の（ポリクローナル）抗体調製物は、典型的には、その可変ドメインに、とくに、異なるエピトープに対して特異的であることの多いその相補性決定領域（ＣＤＲ）に、異なるアミノ酸配列を有する多種多様な抗体を含む。「モノクローナル」という修飾語は、抗体の実質的に均一な集団から得られる抗体の特性を意味し、いかなる特定の方法による抗体の産生も必要とみなされるべきではない。モノクローナル抗体（ｍＡｂ）は、当業者に公知の方法により得ることが可能である。たとえば、Ｋｏｈｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ １９７５ ２５６：４９５－４９７、米国特許第４，３７６，１１０号明細書、Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．，ＣＵＲＲＥＮＴ ＰＲＯＴＯＣＯＬＳ ＩＮ ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＢＩＯＬＯＧＹ １９９２、Ｈａｒｌｏｗ ｅｔ ａｌ．，ＡＮＴＩＢＯＤＩＥＳ：Ａ ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ ＭＡＮＵＡＬ，Ｃｏｌｄ ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ １９８８、及びＣｏｌｌｉｇａｎ ｅｔ ａｌ．，ＣＵＲＲＥＮＴ ＰＲＯＴＯＣＯＬＳ ＩＮ ＩＭＭＵＮＯＬＯＧＹ １

９９３を参照されたい。本明細書に開示される抗体は、ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＡを含むいずれかのイムノグロブリンクラス、及びＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４などのそれらのいずれかのサブクラスでありうる。モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、ｉｎ ｖｉｔｒｏ又はｉｎ ｖｉｖｏで培養可能である。高力価のモノクローナル抗体は、ｉｎ ｖｉｖｏ産生で得ることが可能であり、この場合、個別ハイブリドーマ由来の細胞は、高濃度の所望の抗体を含有する腹水を生成するプリスティンプライムＢａｌｂ／ｃマウスなどのマウスに腹腔内注射される。アイソタイプＩｇＭ又はＩｇＧのモノクローナル抗体は、当業者に周知のカラムクロマトグラフィー法を用いてかかる腹水から又は培養上清から精製可能である。

【００６７】

一般的には、基本抗体構造単位はテトラマーを含む。各テトラマーは、ポリペプチド鎖の２つの同一対を含み、各対は、１本の「軽鎖」（約２５ｋＤａ）と１本の「重鎖」（約５０～７０ｋＤａ）とを有する。各鎖のアミノ末端部分は、主に抗原認識に関与する約１００～１１０アミノ酸又はそれ以上の可変領域を含む。重鎖のカルボキシ末端部分は、主にエフェクター機能に関与する定常領域を定義可能である。典型的には、ヒト軽鎖は、カッパ及びラムダ軽鎖として分類される。さらに、ヒト重鎖は、典型的には、α、δ、ε、γ、又はμとして分類され、且つ抗体のアイソタイプをそれぞれＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ、及びＩｇＭとして定義する。軽鎖内及び重鎖内では、可変領域及び定常領域は、約１２アミノ酸又はそれ以上の「Ｊ」領域により接合され、重鎖は、約１０アミノ酸以上の「Ｄ」領域も含む。

【００６８】

各軽鎖／重鎖（ＶＬ／ＶＨ）対の可変領域は、抗体結合性部位を形成する。そのため、一般的には、インタクト抗体は２つの結合性部位を有する。二機能性抗体又は二重特異的抗体以外は、２つの結合性部位は一般的には同一である。

【００６９】

典型的には、重鎖及び軽鎖の両方の可変ドメインは、比較的保存されたフレームワーク領域（ＦＲ）間に位置する「相補性決定領域」（ＣＤＲ）とも呼ばれる３つの超可変領域を含む。ＣＤＲは、通常はフレームワーク領域によりアライメントされ、特異的エピトープへの結合を可能にする。一般的には、Ｎ末端からＣ末端へ、軽鎖及び重鎖可変ドメインは両方とも、ＦＲ－１（又はＦＲ１）、ＣＤＲ－１（又はＣＤＲ１）、ＦＲ－２（ＦＲ２）、ＣＤＲ－２（ＣＤＲ２）、ＦＲ－３（又はＦＲ３）、ＣＤＲ－３（ＣＤＲ３）、及びＦＲ－４（又はＦＲ４）を含む。ＣＤＲ及びフレームワーク領域の位置は、当技術分野での周知の各種定義、たとえば、Ｋａｂａｔ、Ｃｈｏｔｈｉａ、及びＡｂＭを用いて決定可能である（たとえば、Ｊｏｈｎｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，２９：２０５－２０６（２００１）、Ｃｈｏｔｈｉａ ａｎｄ Ｌｅｓｋ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，１９６：９０１－９１７（１９８７）、Ｃｈｏｔｈｉａ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ，３４２：８７７－８８３（１９８９）、Ｃｈｏｔｈｉａ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２２７：７９９－８１７（１９９２）、Ａｌ－Ｌａｚｉｋａｎｉ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２７３：９２７－７４８（１９９７）を参照されたい）。抗原結合性部位の定義もまた、次のＲｕｉｚ ｅｔ ａｌ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，２８：２１９－２２１（２０００）、及びＬｅｆｒａｎｃ，Ｍ．Ｐ．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，２９：２０７－２０９（２００１）、ＭａｃＣａｌｌｕｍ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２６２：７３２－７４５（１９９６）、及びＭａｒｔｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８６：９２６８－９２７２（１９８９）、Ｍａｒｔｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．，２０３：１２１－１５３（１９９１）、及びＲｅｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎ Ｓｔｅｒｎｂｅｒｇ Ｍ．Ｊ．Ｅ．（ｅｄ．），Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ Ｐｒｅｄｉｃｔｉｏｎ，Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｏｘｆｏｒｄ，１４１－１７２（１９９６）に記載されている。組合せＫａｂａｔ及びＣｈｏｔｈｉａ番号付けスキームでは、いくつかの実施形態では、

ＣＤＲは、Ｋａｂａｔ　ＣＤＲ、Ｃｈｏｔｈｉａ　ＣＤＲ、又はその両方の一部であるアミノ酸残基に対応する。たとえば、ＣＤＲは、ＶＨ、たとえば哺乳動物ＶＨ、たとえばヒトＶＨでは、アミノ酸残基２６～３５（ＨＣ　ＣＤＲ１）、５０～６５（ＨＣ　ＣＤＲ２）、及び９５～１０２（ＨＣ　ＣＤＲ３）、並びにＶＬ、たとえば哺乳動物ＶＬ、たとえばヒトＶＬでは、アミノ酸残基２４～３４（ＬＣ　ＣＤＲ１）、５０～５６（ＬＣ　ＣＤＲ２）、及び８９～９７（ＬＣ　ＣＤＲ３）に対応する。

【００７０】

「超可変領域」という用語は、抗原結合に関与する抗体のアミノ酸残基を意味する。超可変領域は、「ＣＤＲ」由来のアミノ酸残基（すなわち、軽鎖可変ドメインのＶＬ－ＣＤＲ１、ＶＬ－ＣＤＲ２、及びＶＬ－ＣＤＲ３、並びに重鎖可変ドメインのＶＨ－ＣＤＲ１、ＶＨ－ＣＤＲ２、及びＶＨ－ＣＤＲ３及び）を含む。Ｋａｂａｔ　ｅｔ　ａｌ．（１９９１）Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，５ｔｈ　Ｅｄ．Ｐｕｂｌｉｃ　Ｈｅａｌｔｈ　Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ　ｏｆ　Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，Ｍｄ．（配列により抗体のＣＤＲ領域を定義する）を参照されたい。また、Ｃｈｏｔｈｉａ　ａｎｄ　Ｌｅｓｋ（１９８７）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６：９０１－９１７（構造により抗体のＣＤＲ領域を定義する）も参照されたい。「フレームワーク」又は「ＦＲ」残基という用語は、ＣＤＲ残基として本明細書で定義される超可変領域残基以外の可変ドメイン残基を意味する。

【００７１】

とくに指示がない限り、「抗原結合性フラグメント」とは、抗体の抗原結合性フラグメント、すなわち、全長抗体により結合される抗原に特異的に結合する能力を保持する抗体フラグメント、たとえば、１つ以上のＣＤＲ領域を保持するフラグメントを意味する。抗原結合性フラグメントの例としては、限定されるものではないが、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、及びＦｖフラグメント、ダイアボディー、線状抗体、一本鎖抗体分子、たとえば、一本鎖Ｆｖ（ＳｃＦｖ）、ナノボディー、並びに抗体フラグメントから形成される多重特異的抗体が挙げられる。

【００７２】

抗体は、標的タンパク質に「特異的に結合する」。つまり、抗体は、他のタンパク質と比較して、その標的への優先的結合を呈する。ただし、この特異性は、絶対的結合特異性を必要とするわけではない。抗体は、その結合がサンプル中の標的タンパク質の存在の決定因子であれば、たとえば、偽陽性などの望ましくない結果を生じることがなければ、その意図される標的に対して「特異的である」とみなされる。本開示に有用な抗体又はその抗原結合性フラグメントは、非標的タンパク質との親和性の少なくとも２倍、好ましくは少なくとも１０倍、より好ましくは少なくとも２０倍、最も好ましくは少なくとも１００倍の親和性で標的タンパク質に結合するであろう。本明細書中の抗体は、それが所与のアミノ酸配列を含むポリペプチドには結合するが、その配列の欠如したタンパク質には結合しないならば、所与のアミノ酸配列、たとえば、ヒトＯＸ４０分子のアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的に結合すると言われる。

【００７３】

本明細書中の「ヒト抗体」という用語は、ヒトイムノグロブリンタンパク質配列のみを含む抗体を意味する。ヒト抗体は、マウスで、マウス細胞で、又はマウス細胞に由来するハイブリドーマで産生されるのであれば、ネズミ炭水化物鎖を含有可能である。同様に、「マウス抗体」又は「ラット抗体」とは、それぞれ、マウス又はラットのイムノグロブリンタンパク質配列のみを含む抗体を意味する。

【００７４】

「ヒト化抗体」という用語は、非ヒト（たとえばネズミ）抗体さらにはヒト抗体に由来する配列を含有する抗体の形態を意味する。かかる抗体は、非ヒトイムノグロブリンに由来する最小限の配列を含有する。一般的には、ヒト化抗体は、超可変ループのすべて又は実質的にすべてが非ヒトイムノグロブリンものに対応し、且つＦＲ領域のすべて又は実質

的にすべてがヒトイムノグロブリン配列のものである、少なくとも１つ、典型的には２つの可変ドメインの実質的にすべてを含むであろう。ヒト化抗体はまた、任意に、イムノグロブリン定常領域（Ｆｃ）の少なくとも一部分、典型的にはヒトイムノグロブリンのものを含むであろう。接頭辞「ｈｕｍ」、「ｈｕ」、「Ｈｕ」、又は「ｈ」は、親齧歯動物抗体からヒト化抗体を区別する必要があるときに抗体クローン指定に付加される。齧歯動物抗体のヒト化形態は、一般に、親齧歯動物抗体と同一のＣＤＲ配列を含むであろうが、ヒト化抗体の親和性の増加、安定性の増加、翻訳後修飾の除去のために、又は他の理由で、ある特定のアミノ酸置換を含むことが可能である。

【００７５】

「対応するヒト生殖系配列」という用語は、ヒト生殖系イムノグロブリン可変領域配列によりコードされるすべての他の既知の可変領域アミノ酸配列と比較して、参照可変領域アミノ酸配列又はサブ配列に対して最高の決定されたアミノ酸配列同一性を共有するヒト可変領域アミノ酸配列又はサブ配列をコードする核酸配列を意味する。対応するヒト生殖系配列はまた、すべての他の評価された可変領域アミノ酸配列と比較して、参照可変領域アミノ酸配列又はサブ配列に対して最高アミノ酸配列同一性を有するヒト可変領域アミノ酸配列又はサブ配列も意味しうる。対応するヒト生殖系配列は、フレームワーク領域のみ、相補性決定領域のみ、フレームワーク及び相補性決定領域、可変セグメント（以上に定義される）、又は可変領域を構成する配列又はサブ配列の他の組合せでありうる。配列同一性は、本明細書に記載の方法を用いて、たとえば、ＢＬＡＳＴ、ＡＬＩＧＮ、又は当技術分野で公知の他のアライメントアルゴリズムを用いて２つの配列をアライメントすることにより決定可能である。対応するヒト生殖系核酸又はアミノ酸配列は、参照可変領域核酸又はアミノ酸配列に対して、少なくとも約９０％、９１、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の配列同一性を有することが可能である。

【００７６】

「平衡解離定数」（K_D、Ｍ）という用語は、解離速度定数（ｋｄ、時間$^{-1}$）を会合速度定数（ｋａ、時間$^{-1}$、Ｍ$^{-1}$）で除算したものを意味する。平衡解離定数は、当技術分野で公知の任意の方法を用いて測定可能である。本開示の抗体は、一般に、約10^{-7}又は10^{-8}Ｍ未満、たとえば、約10^{-9}Ｍ又は10^{-10}Ｍ未満、いくつかの態様では、約10^{-11}Ｍ、10^{-12}Ｍ、又は10^{-13}Ｍ未満の平衡解離定数を有するであろう。

【００７７】

本明細書中の「癌」又は「腫瘍」という用語は、当技術分野で理解される最広義の意味を有し、典型的には無制御の細胞成長により特徴付けられる哺乳動物の生理学的状態を意味する。本開示との関連では、癌は、ある特定のタイプ又は位置に制限されない。

【００７８】

本明細書で用いられる場合、「非競合」という用語は、抗体結合が存在し且つレセプターへのリガンド結合に干渉しないことを意味する。

【００７９】

「組合せ療法」という用語は、本開示に記載の治療対象の病態又は障害を治療するために２種以上の治療剤を投与することを意味する。かかる投与は、実質的に同時のこれらの治療剤の共投与を包含する。かかる投与はまた、複数回での又は各活性成分に対して個別容器（たとえば、カプセル剤、粉末剤、及び液体剤）での共投与を包含する。粉末剤及び／又は液体剤は、投与前に所望の用量に再構成又は希釈することが可能である。そのほか、かかる投与はまた、おおよそ同時又は異なる時点のどちらかの各タイプの治療剤の逐次的使用を包含する。どの場合でも、治療レジメンは、本明細書に記載の病態又は障害を治療するうえで薬剤の組合せの有益な効果を提供するであろう。

【００８０】

本開示との関連では、アミノ酸配列を参照するとき、「保存的置換」という用語は、抗体又はフラグメントの化学性、物理性、及び／又は機能性、たとえば、ＯＸ４０へのその

結合親和性を実質的に改変しない新しいアミノ酸による元のアミノ酸の置換を意味する。具体的には、アミノ酸の通常の保存的置換は、以下の表に示され、当技術分野で周知である。

【００８１】

【表１】

模範的保存的アミノ酸置換

元のアミノ酸残基	1 文字及び 3 文字コード	保存的置換
アラニン	A　又は　Ala	Gly; Ser
アルギニン	R　又は　Arg	Lys; His
アスパラギン	N　又は　Asn	Gln; His
アスパラギン酸	D　又は　Asp	Gln; Asn
システイン	C　又は　Cys	Ser; Ala
グルタミン	Q　又は　Gln	Asn
グルタミン酸	E　又は　Glu	Asp; Gln
グリシン	G　又は　Gly	Ala
ヒスチジン	H　又は　His	Asn; Gln
イソロイシン	I　又は　Ile	Leu; Val
ロイシン	L　又は　Leu	Ile; val
リシン	K　又は　Lys	Arg; His
メチオニン	M　又は　Met	Leu; Ile; Tyr
フェニルアラニン	F　又は　Phe	Tyr; Met; Leu
プロリン	P　又は　Pro	Ala
セリン	S　又は　Ser	Thr
トレオニン	T　又は　Thr	Ser
トリプトファン	W　又は　Trp	Tyr; Phe
チロシン	Y　又は　Tyr	Trp; Phe
バリン	V　又は　Val	Ile; Leu

【００８２】

パーセント配列同一性及び配列類似性の決定に好適なアルゴリズムの例としては、ＢＬＡＳＴアルゴリズムが挙げられ、それぞれ、Ａｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ，Ｎｕｃ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２５：３３８９－３４０２，１９７７、及びＡｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５：４０３－４１０，１９９０に記載されている。ＢＬＡＳＴ解析を実施するためのソフトウェアは、国立バイオテクノロジー情報センター（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ）を介して一般公開されている。このアルゴリズムは、最初に、データベース配列中の同一長さのワードにアライメントとしたときになんらかの正値の閾値スコアＴ

にマッチするか又はそれを満足するかのどちらかであるクエリー配列中の長さＷのショートワードを同定することにより、高スコアリング配列対（ＨＳＰ）を同定することが関与する。Ｔは、近傍ワードスコア閾値といわれる。これらの初期近傍ワードヒットは、それらを含有するより長いＨＳＰを見いだす検索を開始するための値として作用する。ワードヒットは、累積アラインメントスコアが増加可能である限り、各配列に沿って両方向に伸長される。累積スコアは、ヌクレオチド配列では、パラメーターＭ（マッチング残基対に対するリワードスコア、常に＞０）及びＮ（ミスマッチング残基に対するペナルティースコア、常に＜０）を用いて計算される。アミノ酸配列では、累積スコアを計算するためにスコアリングマトリックスが使用される。各方向へのワードヒットの伸長は、累積アラインメントスコアがその最大達成値から量Ｘだけ低下したとき、１つ以上の負スコアリング残基アラインメントの蓄積に起因して累積スコアがゼロ以下に移行したとき、又はどちらの配列も末端に達したとき、停止される。ＢＬＡＳＴアルゴリズムパラメーターＷ、Ｔ、及びＸは、アラインメントの感度及びスピードを決定する。ＢＬＡＳＴＮプログラム（ヌクレオチド配列に対して）は、ワード長（Ｗ）１１、期待値（Ｅ）１０、Ｍ＝５、Ｎ＝－４、及び両方の鎖の比較をデフォルトとして用いる。アミノ酸配列では、ＢＬＡＳＴプログラムは、ワード長３、及び期待値（Ｅ）１０、並びにＢＬＯＳＵＭ６２スコアリングマトリックス（Ｈｅｎｉｋｏｆｆ ａｎｄ Ｈｅｎｉｋｏｆｆ，（１９８９）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８９：１０９１５を参照されたい）アライメント（Ｂ）５０、期待値（Ｅ）１０、Ｍ＝５、Ｎ＝－４、及び両方の鎖の比較をデフォルトとして使用する。

【００８３】

ＢＬＡＳＴアルゴリズムはまた、２つの配列間の類似性の統計解析も実施する（たとえば、Ｋａｒｌｉｎ ａｎｄ Ａｌｔｓｃｈｕｌ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９０：５８７３－５７８７，１９９３を参照されたい）。ＢＬＡＳＴアルゴリズムにより提供される類似性の１つの尺度は、２つのヌクレオチド配列間又はアミノ酸配列間のマッチが偶然に発生する確率の指標を提供する最小和確率（Ｐ（Ｎ））である。たとえば、試験核酸と参照核酸との比較の最小和確率が約０．２未満、より好ましくは約０．０１未満、最も好ましくは約０．００１未満であれば、核酸は参照配列に類似してみなされる。

【００８４】

２つのアミノ酸配列間のパーセント同一性はまた、ＰＡＭ１２０重み残基表、ギャップ長ペナルティー１２、及びギャップペナルティー４を用いて、ＡＬＩＧＮプログラム（バージョン２．０）に組み込まれたＥ．Ｍｅｙｅｒｓ ａｎｄ Ｗ．Ｍｉｌｌｅｒ，Ｃｏｍｐｕｔ．Ａｐｐｌ．Ｂｉｏｓｃｉ．４：１１－１７，（１９８８）のアルゴリズムにより決定可能である。そのほか、２つのアミノ酸配列間のパーセント同一性は、ＢＬＯＳＵＭ６２マトリックス又はＰＡＭ２５０マトリックスのどちらか、並びにギャップ重み１６、１４、１２、１０、８、６、又は４、及び長さ重み１、２、３、４、５、又は６を用いて、ＧＣＧソフトウェアパッケージ中のＧＡＰプログラムに組み込まれたＮｅｅｄｌｅｍａｎ ａｎｄ Ｗｕｎｓｃｈ，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４８：４４４－４５３，（１９７０）アルゴリズムにより決定可能である。

【００８５】

「核酸」という用語は、本明細書では「ポリヌクレオチド」という用語と互換的に用いられ、デオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチド及び一本鎖又は二本鎖のどちらかの形態のそれらのポリマーを意味する。この用語は、合成の、天然に存在する、及び天然に存在しない、参照核酸と類似の結合性を有する、並びに参照ヌクレオチドに類似した形で代謝される、公知のヌクレオチドアナログ又は修飾骨格残基又は連結を含有する核酸を包含する。かかるアナログの例としては、限定されるものではないが、ホスホロチオエート、ホスホルアミデート、メチルホスホネート、キラルメチルホスホネート、２－Ｏ－メチルリボヌクレオチド、ペプチド核酸（ＰＮＡ）が挙げられる。

【００８６】

核酸との関連での「作動可能に連結された」という用語は、２つ以上のポリヌクレオチド（たとえばＤＮＡ）セグメント間の機能的関係を意味する。典型的には、それは、転写配列に対する転写レギュラトリー配列の機能的関係を意味する。たとえば、プロモーター配列又はエンハンサー配列は、それが適切な宿主細胞又は他の発現システムでコード配列の転写を刺激又はモジュレートするならば、コード配列に作動可能に連結されている。一般に、転写配列に作動可能に結合されたプロモーター転写レギュラトリー配列は、転写配列に物理的に連続する。すなわち、それらはシス作用性である。しかしながら、エンハンサーなどのいくつかの転写レギュラトリー配列は、その転写を増強するコード配列に物理的に連続する必要もなければ密に近接して位置する必要もない。

【００８７】

いくつかの態様では、本開示は、組成物、たとえば、少なくとも１種の薬学的に許容可能な賦形剤と一緒に製剤化された、本明細書に記載の抗ＯＸ４０抗体を含む薬学的に許容可能な組成物を提供する。本明細書で用いられる場合、「薬学的に許容可能な賦形剤」という用語は、生理学的に適合可能であるいかなる溶媒、分散媒、等張化剤、及び吸収遅延剤もすべて含む。賦形剤は、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、非経口投与、直腸投与、脊髄投与、又は表皮投与（たとえば、注射又は注入による）に好適でありうる。

【００８８】

本明細書に開示される組成物は、さまざまな形態でありうる。こうしたものとしては、たとえば、液状、半固形、及び固形製剤、たとえば、液状溶液剤（たとえば、注射用及び注入用溶液剤）、ディスパージョン剤又はサスペンジョン剤、リポソーム剤、及び坐剤が挙げられる。好適な形態は、意図される投与モード及び治療用途に依存する。典型的な好適な組成物は、注射用又は注入用溶液剤の形態である。１つの好適な投与モードは非経口である（たとえば、静脈内、皮下、腹腔内、筋肉内）。いくつかの実施形態では、抗体は、静脈内注入又は注射により投与される。ある特定の実施形態では、抗体は、筋肉内又は皮下注射により投与される。

【００８９】

本明細書で用いられる「治療有効量」という用語は、疾患又は疾患若しくは障害の臨床症状の少なくとも１つを治療するために対象に投与するときに、疾患、障害、又は症状に対してかかる治療を行うのに十分な抗体量を意味する。「治療有効量」は、抗体、疾患、障害、及び／又は疾患若しくは障害の症状、疾患、障害、及び／又は疾患若しくは障害の症状の重症度、治療される対象の年齢、及び／又は治療される対象の体重によって異なりうる。いずれの所与の場合の適切量も、当業者には明らかでありうるか、又はルーチンの実験により決定可能である。組合せ療法の場合には、「治療有効量」は、疾患、障害、又は病態の有効治療に見合った組合せ対象物の合計量を意味する。

【００９０】

本明細書で用いられる場合、「～との組合せで」という語句は、化合物１又は化合物２Ａの投与と同時に、その直前に、又はその直後に抗ＯＸ４０抗体が対象に投与されることを意味する。ある特定の実施形態では、化合物１又は化合物２Ａは、抗ＯＸ４０抗体との共製剤として投与される。

【００９１】

詳細な説明

本開示は、ヒトＯＸ４０に特異的に結合する抗体、抗原結合性フラグメントを提供する。さらに、本開示は、望ましい薬動学的特性及び他の望ましい属性を有し、ひいては癌の可能性を減少させるために又は癌を治療するために使用可能である、抗体を提供する。本開示は、前記抗体を含む医薬組成物、並びに癌及び関連障害の予防及び治療のためにかかる医薬組成物を作製及び使用する方法、をさらに提供する。

【００９２】

抗ＯＸ４０抗体

本開示は、ＯＸ４０に特異的に結合する抗体又はその抗原結合性フラグメントを提供する。本開示の抗体又は抗原結合性フラグメントは、限定されるものではないが、以下に記

載のように発生させた抗体又はその抗原結合性フラグメントを含む。

【００９３】

本開示は、ＯＸ４０に特異的に結合する抗体又は抗原結合性フラグメントであって、前記抗体又は抗体フラグメント（たとえば抗原結合性フラグメント）が、配列番号１４、２０、又は２６のアミノ酸配列を有するＶＨドメイン（表３）を含む、抗体又は抗原結合性フラグメントを提供する。本開示はまた、ＯＸ４０に特異的に結合する抗体又は抗原結合性フラグメントであって、前記抗体又は抗原結合性フラグメントが、表３に列挙されるＶＨ　ＣＤＲのいずれか１つのアミノ酸配列を有するＶＨ　ＣＤＲを含む、抗体又は抗原結合性フラグメントを提供する。一態様では、本開示は、ＯＸ４０に特異的に結合する抗体又は抗原結合性フラグメントであって、前記抗体が、表３に列挙されるＶＨ　ＣＤＲのいずれかのアミノ酸配列を有する１、２、３、又はそれ以上のＶＨ　ＣＤＲを含む（又は代替的にそれからなる）、抗体又は抗原結合性フラグメントを提供する。

【００９４】

本開示は、ＯＸ４０に特異的に結合する抗体又は抗原結合性フラグメントであって、前記抗体又は抗原結合性フラグメントが、配列番号１６、２２、又は２８のアミノ酸配列を有するＶＬドメイン（表３）を含む、抗体又は抗原結合性フラグメントを提供する。本開示はまた、ＯＸ４０に特異的に結合する抗体又は抗原結合性フラグメントであって、前記抗体又は抗原結合性フラグメントが、表３に列挙されるＶＬ　ＣＤＲのいずれか１つのアミノ酸配列を有するＶＬ　ＣＤＲを含む、抗体又は抗原結合性フラグメントを提供する。特定的には、本開示は、ＯＸ４０に特異的に結合する抗体又は抗原結合性フラグメントであって、前記抗体又は抗原結合性フラグメントが、表３に列挙されるＶＬ　ＣＤＲのいずれかのアミノ酸配列を有する１、２、３、又はそれ以上のＶＬ　ＣＤＲを含む（又は代替的にそれからなる）、抗体又は抗原結合性フラグメントを提供する。

【００９５】

本開示の他の抗体又はその抗原結合性フラグメントは、突然変異されているが、表３に記載の配列に表されるＣＤＲ領域に対して少なくとも６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、又は９９％のＣＤＲ領域パーセント同一性を有する、アミノ酸を含む。いくつかの態様では、それは、表３に記載の配列に表されるＣＤＲ領域と比較したときにＣＤＲ領域で１、２、３、４、又は５アミノ酸以下が突然変異されている、突然変異体アミノ酸配列を含む。

【００９６】

本開示の他の抗体は、アミノ酸又はアミノ酸をコードする核酸が突然変異されているが、表３に記載の配列に対して少なくとも６０％、７０％、８０％、９０％、９５％、又は９９％のパーセント同一性を有するものを含む。いくつかの態様では、それは、実質的に同一の治療的活性を保持しつつ、表３に記載の配列に表される可変領域と比較したときに可変領域で１、２、３、４、又は５アミノ酸以下が突然変異されている、突然変異体アミノ酸配列を含む。

【００９７】

本開示はまた、ＯＸ４０に特異的に結合する抗体のＶＨ、ＶＬ、全長重鎖、及び全長軽鎖をコードする核酸配列を提供する。かかる核酸配列は、哺乳動物細胞で発現させるように最適化可能である。

【００９８】

エピトープ及び同一エピトープに結合する抗体の同定

本開示は、ヒトＯＸ４０のエピトープに結合する抗体及びその抗原結合性フラグメントを提供する。ある特定の態様では、抗体及び抗原結合性フラグメントは、ＯＸ４０の同一エピトープに結合可能である。

【００９９】

本開示はまた、表３に記載の抗ＯＸ４０抗体が結合するのと同一のエピトープに結合する抗体及びその抗原結合性フラグメントを提供する。したがって、追加の抗体及びその抗原結合性フラグメントは、結合アッセイで他の抗体と交差競合する（たとえば、統計的に

有意にその結合を競合阻害する）それらの能力に基づいて同定可能である。ＯＸ４０への本開示の抗体及びその抗原結合性フラグメントの結合を阻害する試験抗体の能力は、ＯＸ４０への結合に関してその抗体又はその抗原結合性フラグメントと試験抗体が競合可能であることを実証する。かかる抗体は、いかなる一理論にも拘束されるものではないが、それが競合する抗体又は抗原結合性フラグメントとＯＸ４０上の同一の又は関連する（たとえば、構造的に類似した又は空間的に近接した）エピトープに結合可能である。ある特定の態様では、本開示の抗体又はその抗原結合性フラグメントとＯＸ４０上の同一のエピトープに結合する抗体は、ヒト又はヒト化モノクローナル抗体である。
かかるヒト又はヒト化モノクローナル抗体は、本明細書に記載のように調製及び単離が可能である。

【０１００】
Ｆｃ領域のフレームワークのさらなる改変
さらに他の態様では、Ｆｃ領域は、抗体のエフェクター機能を改変するために、少なくとも１つのアミノ酸残基を異なるアミノ酸残基に置き換えることにより改変される。たとえば、抗体がエフェクターリガンドに対する改変された親和性を有するが親抗体の抗原結合能を保持するように、１つ以上のアミノ酸を異なるアミノ酸残基と置き換えることが可能である。親和性が改変されるエフェクターリガンドは、たとえば、Ｆｃレセプター又はＣ１補体成分でありうる。このアプローチは、たとえば、両方ともＷｉｎｔｅｒらにより米国特許第５，６２４，８２１号明細書及び同第５，６４８，２６０号明細書に記載されている。

【０１０１】
他の一態様では、抗体が改変されたＣ１ｑ結合及び／又は低減若しくは消失された補体依存細胞傷害性（ＣＤＣ）を有するように、１つ以上のアミノ酸残基を１つ以上の異なるアミノ酸残基と置き換えることが可能である。このアプローチは、たとえば、Ｉｄｕｓｏｇｉｅらにより米国特許第６，１９４，５５１号明細書に記載されている。

【０１０２】
さらに他の一態様では、１つ以上のアミノ酸残基を改変することにより、補体を固定する抗体の能力を改変する。このアプローチは、たとえば、ＢｏｄｍｅｒらによりＰＣＴ国際公開第９４／２９３５１号パンフレットに記載されている。具体的態様では、ＩｇＧ１サブクラス及びカッパアイソタイプに対して、本開示の抗体又はその抗原結合性フラグメントの１つ以上のアミノ酸を１つ以上のアロタイプアミノ酸残基と置き換える。アロタイプアミノ酸残基はまた、限定されるものではないが、Ｊｅｆｆｅｒｉｓ ｅｔ ａｌ．，ＭＡｂｓ．１：３３２－３３８（２００９）に記載されるように、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、及びＩｇＧ３サブクラスの重鎖の定常領域、さらにはカッパアイソタイプの軽鎖の定常領域を含む。

【０１０３】
他の一態様では、抗体依存細胞性細胞傷害性（ＡＤＣＣ）を媒介する抗体の能力を増加させるために及び／又はＦｃγレセプターに対する抗体の親和性を増加させるために、１つ以上のアミノ酸を修飾することによりＦｃ領域を修飾する。このアプローチは、たとえば、ＰｒｅｓｔａによりＰＣＴ国際公開第００／４２０７２号パンフレットに記載されている。そのうえ、ＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩ、ＦｃγＲＩＩＩ、及びＦｃＲｎに対するヒトＩｇＧ１上の結合性部位がマッピングされており、改善された結合を有する変異体が記載されている（Ｓｈｉｅｌｄｓ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７６：６５９１－６６０４，２００１を参照されたい）。

【０１０４】
さらに他の一態様では、抗体のグリコシル化が修飾される。たとえば、アグリコシル化抗体を作製可能である（すなわち、抗体は、グリコシル化を欠如するか、又は低減されたグリコシル化を有する）。グリコシル化は、たとえば、「抗原」への抗体の親和性を増加させるように改変可能である。かかる炭水化物修飾は、たとえば、抗体配列内の１つ以上のグリコシル化部位を改変することにより、達成可能である。たとえば、１つ以上のアミ

ノ酸置換を行って、結果として、１つ以上の可変領域フレームワークグリコシル化部位を排除することにより、その部位でグリコシル化を排除することが可能である。かかるアグリコシル化は、抗原に対する抗体の親和性を増加させることが可能である。かかるアプローチは、たとえば、Ｃｏらにより米国特許第５，７１４，３５０号明細書及び同第６，３５０，８６１号明細書に記載されている。

【０１０５】

追加的又は代替的に、低減量のフコシル残基を有する低フコシル化抗体や増加した二分岐化ＧｌｃＮａｃ構造を有する抗体などの改変タイプのグリコシル化を有する抗体を作製可能である。かかる改変グリコシル化パターンは、抗体のＡＤＣＣ能を増加させることが実証されている。かかる炭水化物修飾は、たとえば、改変グリコシル化機構を有する宿主細胞内で抗体を発現することにより達成可能である。改変グリコシル化機構を有する細胞は、当技術分野で記載されており、組換え抗体を発現させることにより改変グリコシル化を有する抗体を産生する宿主細胞として使用可能である。たとえば、Ｈａｎｇらによる欧州特許第１，１７６，１９５号明細書には、フコシルトランスフェラーゼをコードするＦＵＴ８遺伝子が機能的に破壊された細胞系が記載されており、その結果として、かかる細胞系で発現される抗体は低フコシル化を呈する。ＰｒｅｓｔａによるＰＣＴ国際公開第０３／０３５８３５号パンフレットには、Ａｓｎ（２９７）連結炭水化物にフコースを装着する能力が低減された変異体ＣＨＯ細胞系Ｌｅｃｌ３細胞が記載されており、これもまた、その宿主細胞で発現される抗体の低フコシル化をもたらす（Ｓｈｉｅｌｄｓ ｅｔ ａｌ．，（２００２）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７７：２６７３３－２６７４０も参照されたい）。ＵｍａｎａらによるＰＣＴ国際公開第９９／５４３４２号パンフレットには、糖タンパク質修飾グリコシルトランスフェラーゼ（たとえば、ベータ（１，４）－ＮアセチルグルコサミニルトランスフェラーゼＩＩＩ（ＧｎＴＩＩＩ））を発現するように工学操作された細胞系が記載されており、その結果として、工学操作細胞系で発現される抗体は、抗体のＡＤＣＣ活性の増加をもたらす増加した二分岐化ＧｌｃＮａｃ構造を呈する（Ｕｍａｎａ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．１７：１７６－１８０，１９９９も参照されたい）。

【０１０６】

他の一態様では、ＡＤＣＣの低減が望まれる場合、ヒト抗体サブクラスＩｇＧ４は、ごく限られたＡＤＣＣを有し且つほとんどＣＤＣエフェクター機能を有しないことが多くの既報で示された（Ｍｏｏｒｅ Ｇ Ｌ，ｅｔ ａｌ．２０１０ ＭＡｂｓ，２：１８１－１８９）。一方、天然ＩｇＧ４は、酸性緩衝液中や昇温下などのストレス条件でそれほど安定でないことが判明した（Ａｎｇａｌ，Ｓ．１９９３ Ｍｏｌ Ｉｍｍｕｎｏｌ，３０：１０５－１０８、Ｄａｌｌ’Ａｃｑｕａ，Ｗ．ｅｔ ａｌ，１９９８ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，３７：９２６６－９２７３、Ａａｌｂｅｒｓｅ ｅｔ ａｌ．２００２ Ｉｍｍｕｎｏｌ，１０５：９－１９）。ＡＤＣＣの低減は、低減された若しくはヌルのＦｃγＲ結合又はＣ１ｑ結合活性を有する改変の組合せによりＡＤＣＣ及びＣＤＣエフェクター機能を低減又は排除するように工学操作されたＩｇＧ４に抗体を作動可能に連結することにより達成可能である。生物学的薬剤として抗体の物理化学的性質を考慮すると、それほど望ましくないＩｇＧ４固有の性質の１つは、半抗体を形成する溶液中でのその２本の重鎖の動的分離であり、これは「Ｆａｂアーム交換」と呼ばれるプロセスを介してｉｎ ｖｉｖｏで発生する二重特異的抗体をもたらす（Ｖａｎ ｄｅｒ Ｎｅｕｔ Ｋｏｌｆｓｃｈｏｔｅｎ Ｍ，ｅｔ ａｌ．２００７ Ｓｃｉｅｎｃｅ，３１７：１５５４－１５７）。位置２２８（ＥＵ番号付けシステム）でのセリンからプロリンへの突然変異は、ＩｇＧ４重鎖分離に対して阻害的であるように思われた（Ａｎｇａｌ，Ｓ．１９９３ Ｍｏｌ Ｉｍｍｕｎｏｌ，３０：１０５－１０８、Ａａｌｂｅｒｓｅ ｅｔ ａｌ．２００２ Ｉｍｍｕｎｏｌ，１０５：９－１９）。ヒンジ及びγＦｃ領域のアミノ酸残基のいくつかは、Ｆｃγレセプターとの抗体相互作用に影響を及ぼすと報告された（Ｃｈａｐｐｅｌ ＳＭ， ｅｔ ａｌ．１９９１ Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８８：９０３６－９０４０、Ｍｕｋｈｅｒｊｅｅ，Ｊ．ｅｔ ａｌ．，１９９５ ＦＡＳＥＢ

Ｊ，９：１１５－１１９、Ａｒｍｏｕｒ，Ｋ．Ｌ．ｅｔ ａｌ．１９９９ Ｅｕｒ Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ，２９：２６１３－２６２４、Ｃｌｙｎｅｓ，Ｒ．Ａ．ｅｔ ａｌ，２０００ Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ，６：４４３－４４６、Ａｒｎｏｌｄ Ｊ．Ｎ．，２００７ Ａｎｎｕ Ｒｅｖ ｉｍｍｕｎｏｌ，２５：２１－５０）。さらに、ヒト集団で稀に発生するいくつかＩｇＧ４アイソフォームもまた、異なる物理化学的性質を誘発可能である（Ｂｒｕｓｃｏ，Ａ．ｅｔ ａｌ．１９９８ Ｅｕｒ Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｇｅｎｅｔ，２５：３４９－５５、Ａａｌｂｅｒｓｅ ｅｔ ａｌ．２００２ Ｉｍｍｕｎｏｌ，１０５：９－１９）。低いＡＤＣＣ、ＣＤＣ、及び不安定性を有するＯＸ４０抗体を発生させるために、ヒトＩｇＧ４のヒンジ及びＦｃ領域を修飾し、いくつかの改変を導入することが可能である。これらの修飾ＩｇＧ４ Ｆｃ分子は、配列番号８３～８８、米国特許第８，７３５，５５３号明細書、Ｌｉ ｅｔ ａｌ．に見いだされうる。

【０１０７】

ＯＸ４０抗体産生

抗ＯＸ４０抗体及びその抗原結合性フラグメントは、限定されるものではないが、組換え発現、化学合成、及び抗体テトラマーの酵素消化をはじめとする当技術分野で公知のいずれかの手段により産生可能であり、一方、全長モノクローナル抗体は、たとえば、ハイブリドーマ又は組換え産生により得ることが可能である。組換え発現は、当技術分野で公知のいずれかの適切な宿主細胞、たとえば、哺乳動物宿主細胞、細菌宿主細胞、酵母宿主細胞、虫宿主細胞などから行いうる。

【０１０８】

本開示は、本明細書に記載の抗体をコードするポリヌクレオチド、たとえば、本明細書に記載の相補性決定領域を含む重鎖又は軽鎖の可変領域又はセグメントをコードするポリヌクレオチドをさらに提供する。いくつかの態様では、重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドは、配列番号１５、２１、又は２７からなる群から選択されるポリヌクレオチドに対して、少なくとも８５％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の核酸配列同一性を有する。いくつかの態様では、軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドは、配列番号１７、２３、又は２９からなる群から選択されるポリヌクレオチドに対して、少なくとも８５％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の核酸配列同一性を有する。

【０１０９】

本開示のポリヌクレオチドは、抗ＯＸ４０抗体の可変領域配列をコード可能である。それはまた、抗体の可変領域及び定常領域の両方をコード可能である。ポリヌクレオチド配列のいくつかは、例証された抗ＯＸ４０抗体の１つの重鎖及び軽鎖の両方の可変領域を含むポリペプチドをコードする。いくつかの他のポリヌクレオチドは、ネズミ抗体の１つの重鎖及び軽鎖の可変領域とそれぞれ実質的に同等の２つのポリペプチドセグメントをコードする。

【０１１０】

本開示ではまた、抗ＯＸ４０抗体を産生するための発現ベクター及び宿主細胞も提供される。発現ベクターの選択は、ベクターが発現されることが意図される宿主細胞に依存する。典型的には、発現ベクターは、抗ＯＸ４０抗体鎖又は抗原結合性フラグメントをコードするポリヌクレオチドに作動可能に連結されたプロモーター及び他のレギュラトリー配列（たとえばエンハンサー）を含有する。いくつかの態様では、誘導条件の制御下以外では挿入配列の発現を防止するように、誘導性プロモーターが採用される。誘導性プロモーターは、たとえば、アラビノース、ｌａｃＺ、メタロチオネインプロモーター、又は熱ショックプロモーターを含む。トランスフォーム生物の培養物は、宿主細胞が発現産物に十分な耐容性のあるコード配列の集団をバイアスすることなく非誘導条件下で拡大可能である。プロモーターのほか、他のレギュラトリーエレメントもまた、抗ＯＸ４０抗体又は抗原結合性フラグメントの効率的発現のために必要とされたり又は望まれたりすることがある。こうしたエレメントは、典型的には、ＡＴＧ開始コドン及び近接リボソーム結合部位

又は他の配列を含む。そのほか、発現の効率は、使用時に細胞システムに適したエンハンサーを含めることにより増強可能である（たとえば、Ｓｃｈａｒｆ　ｅｔ　ａｌ．，Ｒｅｓｕｌｔｓ　Ｐｒｏｂｌ．Ｃｅｌｌ　Ｄｉｆｆｅｒ．２０：１２５，１９９４、及びＢｉｔｔｎｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．，１５３：５１６，１９８７を参照されたい）。たとえば、ＳＶ４０エンハンサー又はＣＭＶエンハンサーを用いて、哺乳動物宿主細胞内での発現を増加させることが可能である。

【０１１１】

抗ＯＸ４０抗体鎖を保有及び発現するための宿主細胞は、原核細胞又は真核細胞のどちらかでありうる。Ｅ．コリ（Ｅ．ｃｏｌｉ）は、本開示のポリヌクレオチドのクローニング及び発現に有用な原核宿主の１つである。使用に好適な他の微生物宿主としては、桿菌、たとえば、バチルス・サブチリス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ｓｕｂｔｉｌｉｓ）及び他のエンテロバクテリア科細菌、たとえば、サルモネラ属（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ）、セラチア属（Ｓｅｒｒａｔｉａ）、及び各種シュードモナス属（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）の種が挙げられる。こうした原核宿主では、典型的には宿主細胞に適合可能な発現制御配列（たとえば複製起点）を含有する発現ベクターを作製することも可能である。そのほか、いずれかの数のさまざまな周知のプロモーター、たとえば、ラクトースプロモーターシステム、トリプトファン（ｔｒｐ）プロモーターシステム、ベータラクタマーゼプロモーターシステム、又はファージラムダ由来のプロモーターシステムが存在するであろう。プロモーターは、典型的には、任意にオペレーター配列とともに発現を制御し、転写及び翻訳を開始及び終了するためのリボソーム結合部位配列を有する。他の微生物たとえば酵母もまた、抗ＯＸ４０ポリペプチドを発現するように採用可能である。バキュロウイルスベクターとの組合せで昆虫細胞を使用することも可能である。

【０１１２】

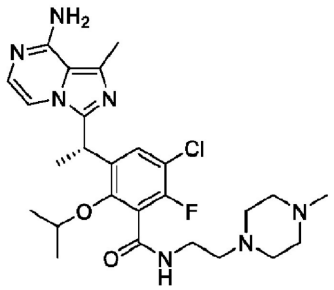
他の態様では、本開示の抗ＯＸ４０ポリペプチドを産生するために、哺乳動物宿主細胞が使用される。たとえば、それは、内因性イムノグロブリン遺伝子を発現するハイブリドーマ細胞系又は外因性発現ベクターを保有する哺乳動物細胞系のどちらかでありうる。こうしたものとしては、いずれかの正常可死性又は異常若しくは正常不死性の動物細胞又はヒト細胞が挙げられる。たとえば、ＣＨＯ細胞系、各種ＣＯＳ細胞系、ＨＥＫ２９３細胞、骨髄腫細胞系、トランスフォームＢ細胞、及びハイブリドーマを含めて、インタクトイムノグロブリンを分泌する能力のあるいくつかの好適な宿主細胞系が開発されてきた。ポリペプチドを発現するための哺乳動物組織細胞培養の使用は、たとえば、Ｗｉｎｎａｃｋｅｒ，Ｆｒｏｍ　Ｇｅｎｅｓ　ｔｏ　Ｃｌｏｎｅｓ，ＶＣＨ　Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ，ＮＹ，Ｎ．Ｙ．，１９８７で一般に考察されている。哺乳動物宿主細胞用の発現ベクターは、複製起点、プロモーター、エンハンサーなどの発現制御配列（たとえば、Ｑｕｅｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｒｅｖ．８９：４９－６８，１９８６を参照されたい）、及びリボソーム結合部位、ＲＮＡスプライス部位、ポリアデニル化部位、転写ターミネーター配列などの必要な情報処理部位を含みうる。こうした発現ベクターは、通常、哺乳動物遺伝子又は哺乳動物ウイルスに由来するプロモーターを含有する。好適なプロモーターは、構成的、細胞型特異的、ステージ特異的、及び／又はモジュレート可能若しくはレギュレート可能でありうる。有用なプロモーターとしては、限定されるものではないが、メタロチオネインプロモーター、構成的アデノウイルス主要後期プロモーター、デキサメタゾン誘導性ＭＭＴＶプロモーター、ＳＶ４０プロモーター、ＭＲＰ　ｐｏｌＩＩＩプロモーター、構成的ＭＰＳＶプロモーター、テトラサイクリン誘導性ＣＭＶプロモーター（たとえばヒト前初期ＣＭＶプロモーター）、が挙げられる。

【０１１３】

化合物１の調製

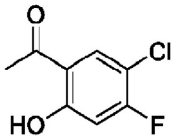
（Ｓ）－３－（１－（８－アミノ－１－メチルイミダゾ［１，５－ａ］ピラジン－３－イル）エチル）－５－クロロ－６－フルオロ－２－イソプロポキシ－Ｎ－（２－（４－メチルピペラジン－１－イル）エチル）ベンズアミド。

【化４】

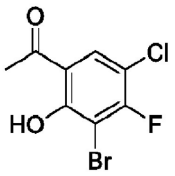


化合物1

【０１１４】
化合物１（９３ｍｇ、７２．１％）は、以下の工程及び２－（４－メチルピペラジン－１－イル）エタン－１－アミンを用いて調製された。
【０１１５】
工程１：　１－（５－クロロ－４－フルオロ－２－ヒドロキシフェニル）エタン－１－オン
【化５】



マグネチックスターラーを備えた２Ｌ三口フラスコに４－クロロ－３－フルオロフェノール（１６０ｇ、１．１ｍｏｌ）及びアセチルクロライド（１２９ｇ、１．６ｍｍｏｌ）を添加した。混合物を１ｈ撹拌した。次いで、塩化アルミニウム（２１９ｇ、１．６ｍｍｏｌ）を何回かに分けて混合物中に添加した。混合物を１６０℃に加熱し、１６０℃に２時間保った。混合物を冷却し、ＨＣｌ（２Ｍ、５００ｍＬ）で希釈した。得られた熱液体を冷却し、ＥｔＯＡｃ（５００ｍＬ×３）で抽出した。合わせた有機相を水（５００ｍＬ）及びブライン（５００ｍＬ）で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで脱水し、濾過し、そして濃縮して黄色固体として生成物（２００ｇ、粗製物）を与えた。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ３）δ　１２．４８－１２．４１（ｍ，１Ｈ），７．７８（ｄ，Ｊ＝８．１Ｈｚ，１Ｈ），６．７７（ｄ，Ｊ＝１０．３Ｈｚ，１Ｈ），２．６１（ｓ，３Ｈ）．
【０１１６】
工程２：　１－（３－ブロモ－５－クロロ－４－フルオロ－２－ヒドロキシフェニル）エタン－１－オン
【化６】



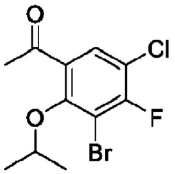
ＤＭＦ（１Ｌ）中の１－（５－クロロ－４－フルオロ－２－ヒドロキシフェニル）エタン－１－オン（１１０ｇ、５８３ｍｍｏｌ）の溶液に、何回かに分けてＮＢＳ（１１４ｇ、６４０ｍｍｏｌ）を添加した。混合物を室温で１ｈ撹拌した。混合物を水（３Ｌ）で希釈し、ＥｔＯＡｃ（１Ｌ×３）で抽出した。合わせた有機相をブライン（１Ｌ×３）で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで脱水し、濾過し、そして濃縮して黄色固体として生成物（１５０ｇ、粗製物）を与えた。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ３）δ　１３．２１（ｄ，ｂｒｓ，１Ｈ），７．８０（ｄ，Ｊ＝７．８Ｈｚ，１Ｈ），２．６６（ｓ，３Ｈ）

.

【０１１７】

工程３：　１－（３－ブロモ－５－クロロ－４－フルオロ－２－イソプロポキシフェニル）エタン－１－オン

【化７】

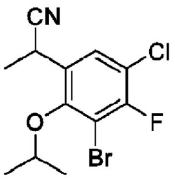


ＤＭＦ（１Ｌ）中の１－（３－ブロモ－５－クロロ－４－フルオロ－２－ヒドロキシフェニル）エタン－１－オン（１５０ｇ、５６０ｍｍｏｌ）及び２－ヨードプロパン（１４３ｇ、８４１ｍｍｏｌ）の溶液に、ＮａＨＣＯ３（７１ｇ、８４５ｍｍｏｌ）を添加した。混合物を６０℃で一晩撹拌した。混合物を冷却し、水（３Ｌ）で希釈し、ＥｔＯＡｃ（１Ｌ×３）で抽出した。合わせた有機相をブライン（１Ｌ×３）で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで脱水し、濾過し、そして濃縮した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン／エチルアセテート＝５０／１で溶出）により残渣を精製して、黄色油として生成物（１４０ｇ、８０％）を与えた。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ３）δ　７．５７（ｄ，Ｊ＝８．２Ｈｚ，１Ｈ），４．４５－４．３９（ｍ，１Ｈ），２．６１（ｓ，３Ｈ），１．３１（ｔ，Ｊ＝６．７Ｈｚ，６Ｈ）．

【０１１８】

工程４：　２－（３－ブロモ－５－クロロ－４－フルオロ－２－イソプロポキシフェニル）プロパンニトリル

【化８】

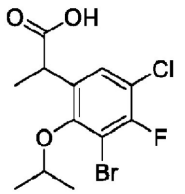


ＤＭＥ（４２０ｍＬ）中の１－（３－ブロモ－５－クロロ－４－フルオロ－２－イソプロポキシフェニル）エタン－１－オン（１６５ｇ、５３３ｍｍｏｌ）にＴＯＳＭＩＣ（１５６ｇ、７９９ｍｍｏｌ）を添加し、溶液を０℃で撹拌した。ｔ－ＢｕＯＨ（８４０ｍＬ）中のｔ－ＢｕＯＫ（１１９．６ｇ、１０６６ｍｍｏｌ）の溶液を以上の溶液にN_2下で滴下し、温度を１０℃未満に維持し、得られた溶液を室温で一晩撹拌した。完了後、反応混合物を水（１Ｌ）で洗浄し、エチルアセテート（５００ｍＬ×３）で抽出し、ＭｇＳＯ４で脱水し、濾過し、そして真空蒸発させた。カラムクロマトグラフィー（ＰＥ／ＥＡ＝２０：１～１０：１）により残渣を精製して、黄色固体として生成物（１１８ｇ、６９．２％）を与えた。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ３）δ　７．５１（ｄ，Ｊ　＝７．８Ｈｚ，１Ｈ），４．６９（ｄｔ，Ｊ＝１２．３，６．２Ｈｚ，１Ｈ），４．３１（ｑ，Ｊ＝７．２Ｈｚ，１Ｈ），１．５６（ｄ，Ｊ＝７．２Ｈｚ，３Ｈ），１．４４（ｄ，Ｊ＝６．２Ｈｚ，３Ｈ），１．３０（ｄ，Ｊ＝６．２Ｈｚ，３Ｈ）．

【０１１９】

工程５：　２－（３－ブロモ－５－クロロ－４－フルオロ－２－イソプロポキシフェニル）プロパン酸

【化９】

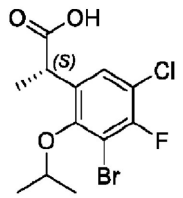


ＥｔＯＨ（３０７ｍＬ）中の２－（３－ブロモ－５－クロロ－４－フルオロ－２イソプロポキシフェニル）プロパンニトリル（１１８ｇ、３６９ｍｍｏｌ）にａ．ｑ．ＮａＯＨ（６Ｎ、３０７ｍＬ）を添加し、得られた溶液を１００℃で一晩撹拌した。完了後、反応を室温に冷却し、１Ｎ　ＨＣｌの添加によりｐＨを３～４に調整し、エチルアセテート（５００ｍＬ×３）で抽出し、合わせたエチルアセテート相をＭｇＳＯ４で脱水し、濾過し、蒸発させて黄色油として粗生成物（１２２ｇ、９７．４％）を与え、さらなる精製を行うことなくこれを次の工程で使用した。ＬＣ－ＭＳ（Ｍ－Ｈ）$^{+}$＝３３６．９．

【０１２０】

工程６：　（Ｓ）－２－（３－ブロモ－５－クロロ－４－フルオロ－２－イソプロポキシフェニル）プロパン酸

【化１０】

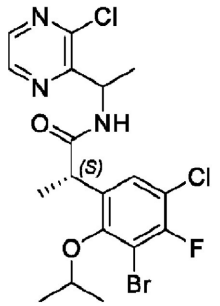


ｉ－ＰｒＯＨ（５００ｍＬ）中の２－（３－ブロモ－５－クロロ－４－フルオロ－２イソプロポキシフェニル）プロパン酸（１２２ｇ、３５９ｍｍｏｌ）及び（１Ｒ，２Ｓ）－１－アミノ－２，３－ジヒドロ－１Ｈ－インデン－２－オール（５４ｇ、３５９ｍｍｏｌ）を１００℃で１ｈ撹拌し、室温に冷却し、濃縮して粗塩を与え、これをＰＥ／ＥＡ＝１０：１（５００ｍＬ）中で１～２ｈスラリー化し、非溶解固形分を捕集してＰＥ／ＥＡ／ｉ－ＰｒＯＨ＝２０：２：１（２３０ｍＬ）中でさらに１ｈ還流し、固形分を濾過により捕集し、そして真空中で乾燥させてキラル塩を与え、これをａｑ．ＨＣｌ（１Ｎ）の添加によりｐＨ２～３に中和し、エチルアセテート（２００ｍＬ×３）で抽出し、ＭｇＳＯ４で脱水し、濃縮して黄色油（４４．２ｇ、３６．２％）として生成物を与えた。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ６），δ　１２．５９（ｓ，１Ｈ），７．５２（ｄ，Ｊ＝８．４Ｈｚ，１Ｈ），４．５５（ｄｔ，Ｊ＝１２．３，６．１Ｈｚ，１Ｈ），４．０４（ｑ，Ｊ＝７．０，１Ｈ），１．３８（ｄ，Ｊ＝７．３Ｈｚ，３Ｈ），１．３４－１．２６（ｍ，６Ｈ）．ＬＣ－ＭＳ（Ｍ－Ｈ）＋＝３３６．９．キラルＨＰＬＣのＲｅｔＴｉｍｅ：２．６１分。単結晶のＸ線分析によりキラル中心の絶対（Ｓ）配置を確認した。

【０１２１】

工程７：　（２Ｓ）－２－（３－ブロモ－５－クロロ－４－フルオロ－２－イソプロポキシフェニル）－Ｎ－（１－（３－クロルピラジン－２－イル）エチル）プロパンアミド

【化１１】

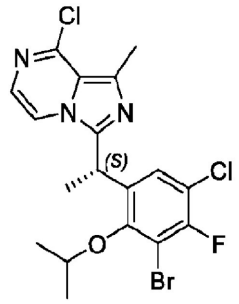


ＤＣＭ（５００ｍＬ）中の（Ｓ）－２－（３－ブロモ－５－クロロ－４－フルオロ－２－イソプロポキシフェニル）プロパン酸（５２ｇ、１５３ｍｍｏｌ）、１－（３－クロルピラジン－２－イル）エタン－１－アミン塩酸塩（２９．７ｇ、１５３ｍｍｏｌ）、ＥＤＣＩ（４３．９ｇ、２２９．７ｍｍｏｌ）、ＨＯＢＴ（３１ｇ、２２９．７ｍｍｏｌ）、及びＥｔ３Ｎ（４９．５ｇ、４８９．６ｍｍｏｌ）をN_2下、室温で一晩撹拌した。完了後、反応溶液をＨ２Ｏ（５００ｍＬ）で洗浄し、ＤＣＭ（５００ｍＬ×３）で抽出し、合わせたＤＣＭ相を$MgSO_4$で脱水し、濃縮し、そしてカラムクロマトグラフィー（ＰＥ／ＥＡ＝１０：１～５：１）により精製して黄色油として生成物（６９ｇ、９４％）を与えた。ＬＣ－ＭＳ（Ｍ＋Ｈ）＋＝４７９．６．

【０１２２】

工程８：　（Ｓ）－３－（１－（３－ブロモ－５－クロロ－４－フルオロ－２－イソプロポキシフェニル）エチル）－８－クロロ－１－メチルイミダゾ［１，５－ａ］ピラジン

【化１２】

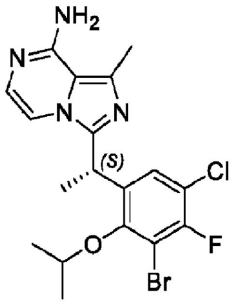


ＤＣＭ（１Ｌ）中の（２Ｓ）－２－（３－ブロモ－５－クロロ－４－フルオロ－２－イソプロポキシフェニル）－Ｎ－（１－（３－クロルピラジン－２－イル）エチル）プロパンアミド（６９ｇ、１４４ｍｍｏｌ）に０℃でTf_2O（８９．４ｇ、３１７ｍｍｏｌ）を滴下し、次いで、ピリジン（２８．５ｇ、３６０ｍｍｏｌ）を０℃で滴下し、ＴＬＣで反応完了を示し、H_2O（５００ｍＬ）を添加し、ＤＣＭ（５００ｍＬ×３）で抽出し、合わせたＤＣＭ相を$MgSO_4$で脱水し、濃縮して粗生成物を与え、これをｉ－ＰｒＯＨ（６０ｍＬ）中で１～２ｈスラリー化し、濾過して白色固体（５５ｇ、８３．４％）として純生成物を与えた。ＬＣ－ＭＳ（Ｍ＋Ｈ）＋＝４６１．９．

【０１２３】

工程９：　（Ｓ）－３－（１－（３－ブロモ－５－クロロ－４－フルオロ－２－イソプロポキシフェニル）エチル）－１－メチルイミダゾ［１，５－ａ］ピラジン－８－アミン

【化１３】

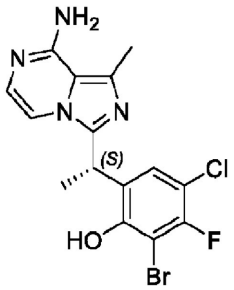


マグネチックスターラーを備えた圧力タンクに、ｉ－ＰｒＯＨ（ｗ／ｗ３０％、３００ｍＬ、過剰）中の（Ｓ）－３－（１－（３－ブロモ－５－クロロ－４－フルオロ－２－イソプロポキシフェニル）エチル）－８－クロロ－１－メチルイミダゾ［１，５－ａ］ピラジン（４５ｇ、９７．６ｍｍｏｌ）及びNH_3を添加した。次いで、混合物を９０℃で２日間撹拌した。混合物を冷却してＤＣＭ（５００ｍＬ）で希釈し、水（１００ｍＬ×３）、ブライン（１００ｍＬ）で洗浄し、Na_2SO_4で脱水し、濾過し、濃縮して黄色固体として生成物（４１ｇ、９５％）を与え、さらなる精製を行うことなくこれを次の工程で使用した。^1H ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ３）δ ７．２７（ｄ，Ｊ＝７．６Ｈｚ，１Ｈ），７．１５（ｄ，Ｊ＝５．１Ｈｚ，１Ｈ），６．８８（ｄ，Ｊ＝５．０Ｈｚ，１Ｈ），４．７８－４．６９（ｍ，２Ｈ），２．７２（ｓ，３Ｈ），１．８０（ｄ，Ｊ＝７．２Ｈｚ，３Ｈ），１．４９（ｄ，Ｊ＝６．２Ｈｚ，３Ｈ），１．３９（ｄ，Ｊ＝６．２Ｈｚ，３Ｈ）．ＬＣ－ＭＳ（Ｍ＋Ｈ）＋＝４４１．０，４４３．０．

【０１２４】

工程１０： （Ｓ）－６－（１－（８－アミノ－１－メチルイミダゾ［１，５－ａ］ピラジン－３－イル）エチル）－２－ブロモ４－クロロ－３－フルオロフェノール

【化１４】



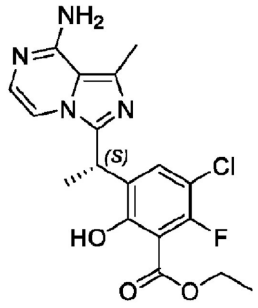
ＤＣＭ（５００ｍＬ）中の（Ｓ）－３－（１－（３－ブロモ－５－クロロ－４－フルオロ－２－イソプロポキシフェニル）エチル）－１－メチルイミダゾ［１，５－ａ］ピラジン－８－アミン（４１ｇ、９２．８ｍｍｏｌ）の混合物に、０℃でBBr_3（７０ｇ、２７９ｍｍｏｌ）を滴下した。次いで、混合物を室温で一晩撹拌した。混合物を０℃に冷却し、次いで、ＭｅＯＨ（４００ｍＬ）でクエンチした。混合物を濃縮し、残渣をＤＣＭ（５００ｍＬ）とｉ－ＰｒＯＨ（１００ｍＬ）との混合物で希釈した。次いで、混合物を飽和$NaHCO_3$溶液（１００ｍＬ×２）で洗浄した。有機層を分離し、ブラインで洗浄し、Na_2SO_4で脱水し、濾過し、そして濃縮して黄色固体として生成物（３８ｇ、１００％）を与え、さらなる精製を行うことなくこれをこの次の工程に使用した。^1H ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＣＤＣｌ３）δ ７．１８（ｄ，Ｊ＝５．２Ｈｚ，１Ｈ），７．１２（ｄ，Ｊ＝７．９Ｈｚ，１Ｈ），７．０２（ｄ，Ｊ＝５．１Ｈｚ，１Ｈ），４．２８（ｑ，Ｊ＝７．３Ｈｚ，１Ｈ），４．０８ －３９８（ｍ，１Ｈ），２．７２（ｓ，３Ｈ），１．７０（ｄ，Ｊ＝７．３Ｈｚ，３Ｈ），１．２１（ｄ，Ｊ＝６．１Ｈｚ，６Ｈ）．ＬＣ

－ＭＳ（Ｍ＋Ｈ）＋＝３９９．０，４０１．０．

【０１２５】

工程１１： エチル（Ｓ）－３－（１－（８－アミノ－１－メチルイミダゾ［１，５－ａ］ピラジン－３－イル）エチル）－５－クロロ－６－フルオロ－２－ヒドロキシベンゾエート

【化１５】

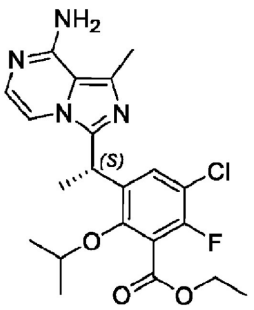


ＥｔＯＨ（１０００ｍＬ）中の（Ｓ）－６－（１－（８－アミノ－１－メチルイミダゾ［１，５－ａ］ピラジン－３－イル）エチル）－２－ブロモ－４－クロロ－３－フルオロフェノール（３８ｇ、３２．５ｍｍｏｌ）の混合物に、Ｐｄ（ｄｐｐｆ）Ｃｌ２（３．５ｇ、４．８ｍｍｏｌ）及びＮａＯＡｃ（１１．７ｇ、１４３ｍｍｏｌ）を添加した。混合物を脱ガスし、ＣＯ（１ａｔｍ）で再充填した。混合物を７０℃で一晩撹拌した。混合物を冷却し、真空中で濃縮した。残渣を水（２００ｍＬ）で希釈し、ＥｔＯＡｃ（２００ｍＬ×３）で抽出した。合わせた有機相をブラインで洗浄し、Na_2SO_4で脱水し、濾過し、そして濃縮した。カラムクロマトグラフィー（ＤＣＭ１００％から２０／１までのＤＣＭ／ＭｅＯＨ）により残渣を精製して、黄色固体として生成物（３２ｇ、８２％）を与えた。^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，$CDCl_3$）δ ７．２８－７．２４（ｍ，１Ｈ），７．０７（ｄ，Ｊ＝５．１Ｈｚ，１Ｈ），６．８５（ｄ，Ｊ＝５．１Ｈｚ，１Ｈ），５．３０（ｓ，１Ｈ），４．８１（ｑ，Ｊ＝７．１Ｈｚ，１Ｈ），４．４８（ｑ，Ｊ＝７．１Ｈｚ，２Ｈ），２．７５（ｓ，３Ｈ），１．７４（ｄ，Ｊ＝７．１Ｈｚ，３Ｈ），１．４３（ｔ，Ｊ＝７．１Ｈｚ，３Ｈ）．ＬＣ－ＭＳ（Ｍ＋Ｈ）＋＝３９３．１．

【０１２６】

工程１２： エチル（Ｓ）－３－（１－（８－アミノ－１－メチルイミダゾ［１，５－ａ］ピラジン－３－イル）エチル）－５－クロロ－６－フルオロ－２－イソプロポキシベンゾエート

【化１６】



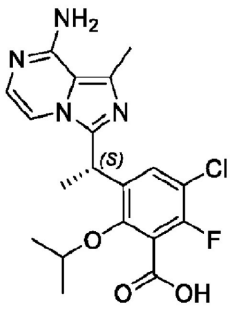
トルエン（４００ｍＬ）中のエチル（Ｓ）－３－（１－（８－アミノ－１－メチルイミダゾ［１，５－ａ］ピラジン－３－イル）エチル）－５－クロロ－６－フルオロ－２－ヒドロキシベンゾエート（３２ｇ、８１．５ｍｍｏｌ）、ｉ－ＰｒＯＨ（２４．４ｇ、４０６．７ｍｍｏｌ）、PPh_3（４９．１ｇ、１８７．５ｍｍｏｌ）に、室温でジ－ｔｅｒｔ－ブチル（Ｅ）－ジアゼン－１，２－ジカルボン酸（４３．２ｇ、１８７．５ｍｍｏｌ

）を添加した。得られた溶液を６０℃でN_2下で３ｈｒ撹拌した。完了後、反応混合物を真空濃縮し、H_2O（５００ｍＬ）で洗浄し、ＥｔＯＡｃ（５００ｍＬ×３）で抽出し、合わせたＥｔＯＡｃ相を$MgSO_4$で脱水し、カラムクロマトグラフィー（ＰＥ／ＥＡ＝２０：１）により精製して黄色固体として生成物（２５．４ｇ、７１．８％）を与えた。ＬＣ－ＭＳ（Ｍ＋Ｈ）＋＝４３５．１．

【０１２７】

工程１３：（Ｓ）－３－（１－（８－アミノ－１－メチルイミダゾ［１，５－ａ］ピラジン－３－イル）エチル）－５－クロロ－６－フルオロ－２－イソプロポキシ安息香酸

【化１７】

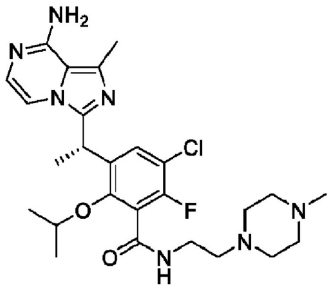


ＭｅＯＨ（１００ｍＬ）中のエチル（Ｓ）－３－（１－（８－アミノ－１－メチルイミダゾ［１，５－ａ］ピラジン－３－イル）エチル）－５－クロロ－６－フルオロ－２－イソプロポキシベンゾエート（２５．４ｇ、５８．５ｍｍｏｌ）及びH_2O（１００ｍＬ）に、ＮａＯＨ（１８．７ｇ、４６８ｍｍｏｌ）を添加し、得られた溶液を室温で一晩撹拌した。完了後、反応溶液を真空濃縮してＭｅＯＨのほとんどを除去し、残留溶液をＥｔＯＡｃ（１００ｍＬ×２）で抽出し、水性相をｐＨ２～３に調整し、褐色固体を沈殿させ、濾過により捕集し、真空中で乾燥させて生成物（１５．８ｇ）を与え、水性相をＤＣＭ（１００ｍＬ×５）で抽出し、合わせたＤＣＭ相を$MgSO_4$で脱水し、そして真空中で濃縮して生成物（２．２ｇ）の他の部分を与え、合計収率（１８ｇ、７５．６％）とした。^{1}Ｈ ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ６）δ ７．７８（ｂｒｓ，２Ｈ），７．４０－７．３２（ｍ，２Ｈ），６．９３（ｄ，Ｊ＝５．３Ｈｚ，１Ｈ），４．８０（ｑ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，１Ｈ），４．５５（ｄｔ，Ｊ＝１２．１，６．０Ｈｚ，１Ｈ），２．６０（ｓ，３Ｈ），１．６０（ｄ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，３Ｈ），１．２０（ｄ，Ｊ＝６．０Ｈｚ，３Ｈ），１．１３（ｄ，Ｊ＝６．０Ｈｚ，３Ｈ）．ＬＣ－ＭＳ（Ｍ＋Ｈ）＋＝４０７．１．

【０１２８】

（Ｓ）－３－（１－（８－アミノ－１－メチルイミダゾ［１，５－ａ］ピラジン－３－イル）エチル）－５－クロロ－６－フルオロ－２－イソプロポキシ－Ｎ－（２－（４－メチルピペラジン－１－イル）エチル）ベンズアミド

【化１８】



化合物1

この化合物（９３ｍｇ、７２．１％）は２－（４－メチルピペラジン－１－イル）エタ

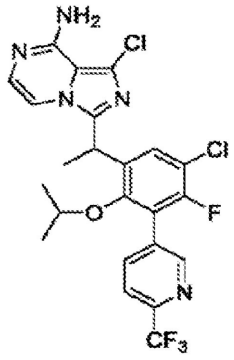
ン－１－アミンから調製された。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ６）δ　８．６４－８．６１（ｔ，１Ｈ），７．３９－７．３７（ｄ，Ｊ＝８．８Ｈｚ，１Ｈ），７．２５－７．２４（ｄ，Ｊ＝５．２Ｈｚ，１Ｈ），６．８６－６．８５（ｄ，Ｊ＝４．８Ｈｚ，１Ｈ），６．４３（ｂｒｓ，２Ｈ），４．８０－４．７４（ｍ，１Ｈ），４．５２－４．４６（ｍ，１Ｈ），３．４１－３．２８（ｍ，４Ｈ），２．５６（ｓ，３Ｈ），２．４３－２．１８（ｍ，８Ｈ），２．１４（ｓ，３Ｈ），１．５９－１．５７（ｄ，Ｊ＝６．８Ｈｚ，３Ｈ），１．１９－１．１８（ｄ，Ｊ＝５．６Ｈｚ，３Ｈ），１．１０－１．０８（ｄ，Ｊ＝５．６Ｈｚ，３Ｈ）．ＬＣ－ＭＳ（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$＝５３２．１．ＨＰＬＣ：２１４ｎｍ、９６．７９％、２５４ｎｍ、１００％。キラルＨＰＬＣのＲｅｔＴｉｍｅ：３．６７分。

【０１２９】

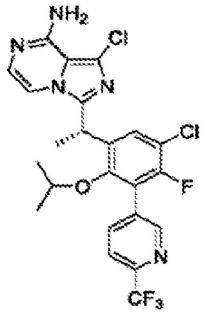
化合物２の調製

化合物２、化合物２Ａ、及び化合物２Ｂは、国際公開第２０１８／１０３６８８号パンフレットに開示されている。化合物２、化合物２Ａ、及び化合物２Ｂは、１－クロロ－３－（１－（５－クロロ－４－フルオロ－２－イソプロポキシ－３－（６－（トリフルオロメチル）ピリジン－３－イル）フェニル）エチル）イミダゾ［１，５－ａ］ピラジン－８－アミンを生成する以下の工程を用いて調製された。

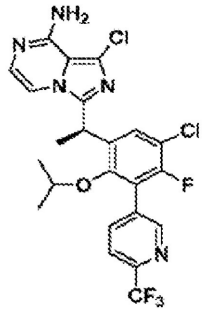
【化１９】



化合物2



化合物2A

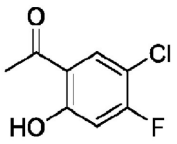


化合物2B

【０１３０】

工程１：　１－（５－クロロ－４－フルオロ－２－ヒドロキシフェニル）エタン－１－オン。

【化２０】



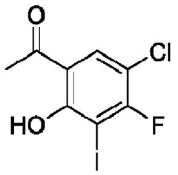
４－クロロ－３フルオロフェノール（１４６．５ｇ、１ｍｏｌ）及びアセチルクロライド（１５７ｇ、２ｍｏｌ）の反応混合物を６０℃で２ｈｒ撹拌した。次いで、混合物を０℃に冷却してＡｌＣｌ$_{3}$（２４０ｇ、１．８ｍｏｌ）を何回かに分けて添加した。反応混合物を１８０℃で２ｈｒ撹拌した。混合物を室温に冷却して１Ｎ　ＨＣｌ（１．５Ｌ）を添加した。得られた混合物をエチルアセテートで抽出した。合わせた有機層をブラインで洗浄し、Ｎａ$_{2}$ＳＯ$_{4}$で脱水し、濾過し、そして真空蒸発させた。残渣をヘキサンに溶解させ、シリカゲルに通して濾過した。溶媒を真空蒸発させ、黄色固体として生成物（９３％の収率で１７７ｇ）を与えた。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ６）δ　１２．１６（ｓ，１Ｈ），８．０７（ｄ，Ｊ＝８．６Ｈｚ，１Ｈ），７．０５（ｄ，Ｊ＝１

０．９Ｈｚ，１Ｈ），２．６４（ｓ，３Ｈ）．

【０１３１】

工程２：　１－（５－クロロ－４－フルオロ－２－ヒドロキシ－３－ヨードフェニル）エタン－１－オン。

【化２１】

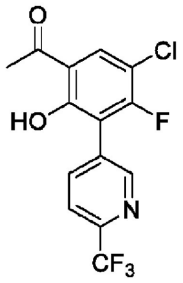


ＡｃＯＨ（９００ｍＬ）中の１－（５－クロロ－４－フルオロ－２－ヒドロキシフェニル）エタン－１－オン（８８ｇ、０．４６７ｍｏｌ）及び１－ヨードピロリジン－２，５－ジオン（１５７ｇ、０．７ｍｏｌ）の反応混合物を８０℃で２０ｈｒ、次いで１１０℃で２０ｈｒ撹拌した。次いで、溶媒を真空蒸発させて残渣をエチルアセテートで溶解させた。混合物を飽和Na_2CO_3水性溶液で２回、飽和$Na_2S_2O_3$水性溶液及びブラインで洗浄し、Na_2SO_4で脱水し、濾過し、そして真空蒸発させた。残渣をカラムクロマトグラフィー（ＰＥ→ＰＥ／ＥＡ：５０／１）により精製し、黄色固体として生成物（３１％収率で４３ｇ）を与えた。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ６）δ　１３．３６（ｓ，１Ｈ），８．２８（ｄｄ，Ｊ＝８．４，０．９Ｈｚ，１Ｈ），２．７０（ｄ，Ｊ＝０．６Ｈｚ，３Ｈ）．ＭＳ（Ｍ＋Ｈ）$^+$　３１４．９．

【０１３２】

工程３：　１－（５－クロロ－４－フルオロ－２－ヒドロキシ－３－（６－（トリフルオロメチル）ピリジン－３－イル）フェニル）エタン－１－オン。

【化２２】

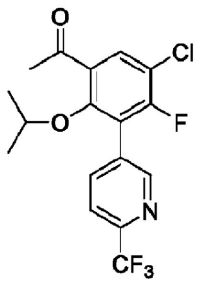


１，４－ジオキサン／水（７００ｍＬ／１００ｍＬ）中の１－（５－クロロ－４－フルオロ－２－ヒドロキシ－３－ヨードフェニル）エタン－１－オン（６８ｇ、２１６ｍｍｏｌ）、（６－（トリフルオロメチル）ピリジン－３－イル）ボロン酸（４５ｇ、２３８ｍｍｏｌ）、Ｐｄ（ｄｐｐｆ）Ｃｌ２（９．５ｇ、１３ｍｍｏｌ）、及びNa_2CO_3（５７ｇ、１０６ｍｍｏｌ）の反応混合物を、窒素下、８０℃で一晩撹拌した。完了後、混合物を真空蒸発させた。残渣をエチルアセテート及び水で希釈し、次いで、得られた混合物を濾過した。有機層を分離して水性層をエチルアセテートで抽出した。有機層を合わせてブラインで洗浄し、Na_2SO_4で脱水し、濾過し、そして真空蒸発させた。残渣をカラムクロマトグラフィー（ＰＥ／ＥＡ：５０／１～１０／１）により精製し、黄色固体（８１％の収率で５９ｇ）として生成物を与えた。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ６）δ　１３．０１（ｓ，１Ｈ），８．８８（ｓ，１Ｈ），８．３９（ｄ，Ｊ＝８．４Ｈｚ，１Ｈ），８．２４（ｄ，Ｊ＝８．１Ｈｚ，１Ｈ），８．０７（ｄ，Ｊ＝８．１Ｈｚ，１Ｈ），２．７４（ｓ，３Ｈ），ＭＳ（Ｍ＋Ｈ）$^+$　３３４．０．

【０１３３】

工程４：　１－（５－クロロ－４－フルオロ－２－イソプロポキシ－３－（６－（トリフルオロメチル）ピリジン－３－イル）フェニル）エタン－１－オン。

【化２３】

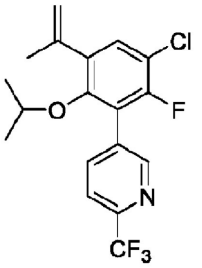


ＤＭＦ（１５０ｍＬ）中の１－（５－クロロ－４－フルオロ－２－ヒドロキシ－３－（６－（トリフルオロメチル）ピリジン－３－イル）フェニル）エタン－１－オン（５９ｇ、１７６．８ｍｍｏｌ）、２－ヨードプロパン（１２０ｇ、７０７．２ｍｍｏｌ）、及びK_2CO_3（４９ｇ、３５３．６ｍｍｏｌ）の反応混合物を、N_2下、７０℃で一晩撹拌した。完了後、混合物を濾過して濾液を真空蒸発させた。残渣をカラムクロマトグラフィー（ＰＥ／ＥＡ：６／１）により精製し、褐色油（９３％の収率で６２ｇ）として生成物を与えた。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ６）δ　８．９３（ｓ，１Ｈ），８．３１（ｄ，Ｊ＝８．３Ｈｚ，１Ｈ），８．１１（ｄ，Ｊ＝８．２Ｈｚ，１Ｈ），７．８６（ｄ，Ｊ＝８．６Ｈｚ，１Ｈ），３．７７－３．５９（ｍ，１Ｈ），２．６３（ｓ，３Ｈ），０．８７（ｄ，Ｊ＝６．１Ｈｚ，６Ｈ）．ＭＳ（Ｍ＋Ｈ）$^+$　３７６．０．

【０１３４】

工程５：　５－（３－クロロ－２－フルオロ－６－イソプロポキシ－５－（プロプ－１－エン－２－イル）フェニル）－２－（トリフルオロメチル）ピリジン。

【化２４】

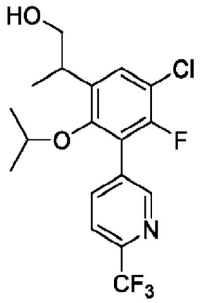


ＴＨＦ（７００ｍＬ）中のメチルトリフェニルホスホニウムブロマイド（１７７ｇ、４９５ｍｍｏｌ）の溶液に、ｎ－ＢｕＬｉ（１８６ｍＬ、４４５．５ｍｍｏｌ）をN_2下、０℃で添加して１ｈｒ撹拌した。次いで、ＴＨＦ（３００ｍＬ）中の１－（５－クロロ－４－フルオロ－２－イソプロポキシ－３－（６－（トリフルオロメチル）ピリジン－３－イル）フェニル）エタン－１－オン（６２ｇ、１６５ｍｍｏｌ）の溶液を添加し、室温で一晩撹拌した。反応を飽和NH_4Cl水性溶液でクエンチし、混合物をエチルアセテートで抽出した。合わせた有機層をブラインで洗浄し、Na_2SO_4で脱水し、濾過し、そして真空蒸発させた。残渣をカラムクロマトグラフィー（ＰＥ／ＥＡ：５０／１）により精製して白色固体（４０％の収率で２５ｇ）として生成物を与え、原材料を回収した。^{1}ＨＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ６）δ　８．８５（ｓ，１Ｈ），８．２３（ｄ，Ｊ＝８．１Ｈｚ，１Ｈ），８．０６（ｄ，Ｊ＝８．１Ｈｚ，１Ｈ），７．５５（ｄ，Ｊ＝８．７Ｈｚ，１Ｈ），５．２９（ｓ，１Ｈ），５．２２（ｓ，１Ｈ），３．９０（ｄｔ，Ｊ＝１２．２，６．１Ｈｚ，１Ｈ），２．１４（ｓ，３Ｈ），０．８２（ｄ，Ｊ＝６．１Ｈｚ，６Ｈ）．ＭＳ（Ｍ＋Ｈ）$^+$　３７４．１．

【０１３５】

工程６：　２－（５－クロロ－４－フルオロ－２－イソプロポキシ－３－（６－（トリフルオロメチル）ピリジン－３－イル）フェニル）プロパン－１－オール。

【化２５】

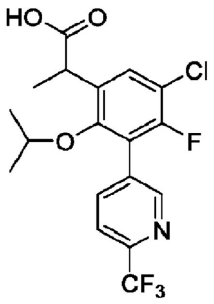


窒素下の５－（３－クロロ－２－フルオロ－６－イソプロポキシ－５－（プロプ－１－エン－２－イル）フェニル）－２－（トリフルオロメチル）ピリジン（２５ｇ、６６．９ｍｍｏｌ）及びBH_3／ＴＨＦ（３３４ｍＬ、３３４ｍｍｏｌ）の反応混合物を室温で一晩撹拌した。次いで、水中（１Ｍ）の$NaOH$（５．２５ｇ、１３３．８ｍｍｏｌ）の溶液、続いてH_2O_2（５０ｍＬ）を添加した。混合物を室温で３ｈｒ撹拌した。完了後、反応を飽和Na_2SO_3水性溶液でクエンチし、混合物をエチルアセテートで抽出した。合わせた有機層をブラインで洗浄し、Na_2SO_4で脱水し、濾過し、そして真空蒸発させた。残渣をカラムクロマトグラフィー（CH_2Cl_2／ＭｅＯＨ＝５０／１、アンモニア水）により精製して無色油として生成物を与え、これを室温で固化した。ＭＳ（Ｍ＋Ｈ）$^+$３９２．１

【０１３６】

工程７：　２－（５－クロロ－４－フルオロ－２－イソプロポキシ－３－（６－（トリフルオロメチル）ピリジン－３－イル）フェニル）プロパン酸。

【化２６】

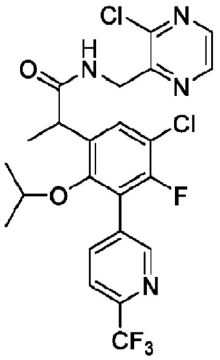


ＭｅＣＮ（８０ｍＬ）中の２－（５－クロロ－４－フルオロ－２－イソプロポキシ－３－（６－（トリフルオロメチル）ピリジン－３－イル）フェニル）プロパン－１－オール（６．７ｇ、１７．２ｍｍｏｌ）の溶液に、緩衝剤溶液（８０ｍＬ、水中のNa_2HPO_4（０．２５Ｍ）及びNaH_2PO_4（０．５Ｍ））、２，２，６，６－テトラメチルピペリジノオキシ（５３７ｍｇ、３．４４ｍｍｏｌ）を添加し、次いで、ＮａＣｌＯ（１４５ｍＬ、１７２ｍｍｏｌ）中の$NaClO_2$（１６ｇ、１７２ｍｍｏｌ）の溶液を滴下し、室温で一晩撹拌した。混合物を水で希釈し、エチルアセテートで抽出した。合わせた有機層をブラインで洗浄し、Na_2SO_4で脱水し、濾過し、そして真空蒸発させて生成物（６．２ｇ）を与えた。ＭＳ（Ｍ＋Ｈ）$^+$４０６．０．

【０１３７】

工程８：　２－（５－クロロ－４－フルオロ－２－イソプロポキシ－３－（６－（トリフルオロメチル）ピリジン－３－イル）フェニル）－Ｎ－（（３－クロルピラジン－２－イル）メチル）プロペンアミド。

【化２７】

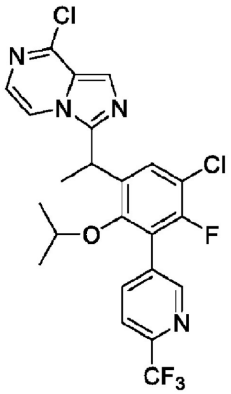


ＤＭＦ（２０ｍＬ）中の２－（５－クロロ－４－フルオロ－２－イソプロポキシ－３－（６－（トリフルオロメチル）ピリジン－３－イル）フェニル）プロパン酸（５２０ｍｇ、１．２８ｍｍｏｌ）、（３－クロロピラジン－２－イル）メタンアミン塩酸塩（２９３ｍｇ、２．０５ｍｍｏｌ）、ベンゾトリアゾール－１－イル－オキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェート（９９８ｍｇ、１．９２ｍｍｏｌ）、及びＮ，Ｎ－ジイソプロピルエチルアミン（３３０ｍｇ、２．５６ｍｍｏｌ）の反応混合物を、室温で一晩撹拌した。完了後、溶媒を真空蒸発させ、残渣をエチルアセテートで溶解させた。混合物を水及びブラインで洗浄し、Na_2SO_4で脱水し、濾過し、そして真空蒸発させて生成物を与え、さらなる精製を行うことなくこれをこの次の工程に直接使用した。ＭＳ（Ｍ＋Ｈ）$^+$５３１．１．

【０１３８】

工程９：　８－クロロ－３－（１－（５－クロロ－４－フルオロ－２－イソプロポキシ－３－（６－（トリフルオロメチル）ピリジン－３－イル）フェニル）エチル）イミダゾ［１，５－ａ］ピラジン。

【化２８】



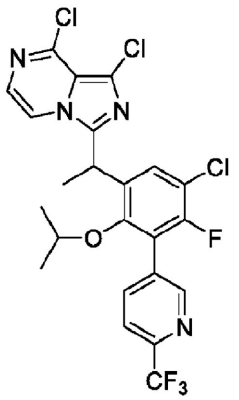
CH_2Cl_2（２０ｍＬ）中の２－（５－クロロ－４－フルオロ－２－イソプロポキシ－３－（６－（トリフルオロメチル）ピリジン－３－イル）フェニル）－Ｎ－（（３－クロロピラジン－２－イル）メチル）プロパンアミド（粗製物）の溶液に、トリフルオロメタンスルホン酸無水物（２ｍＬ）を室温で添加した。次いで、ピリジン（２ｍＬ）を徐々に滴下し、混合物を２０分撹拌した。混合物を飽和$NaHCO_3$水性溶液及びブラインで洗浄し、Na_2SO_4で脱水し、濾過し、そして真空蒸発させた。残渣をカラムクロマトグラフィー（ＰＥ／ＥＡ＝６／１～１／１）により精製し、灰白色固体として生成物（６３％の２工程収率で４２０ｍｇ）を与えた。^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，$CDCl_3$）δ　８．８３（ｓ，１Ｈ），７．９９（ｄ，Ｊ＝８．１Ｈｚ，１Ｈ），７．９０　－７．７５（ｍ，３Ｈ），７．４５（ｄ，Ｊ＝８．３Ｈｚ，１Ｈ），７．３６（ｄ，Ｊ＝５．１Ｈｚ，１Ｈ），４．９１（ｑ，Ｊ＝７．１Ｈｚ，１Ｈ），３．７２（ｄｔ，Ｊ＝１２．２

，６．１Ｈｚ，１Ｈ），１．９１（ｄ，Ｊ＝７．２Ｈｚ，３Ｈ），１．１８（ｄ，Ｊ＝６．１Ｈｚ，３Ｈ），１．００（ｄ，Ｊ＝６．１Ｈｚ，３Ｈ）．ＭＳ（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$　５１３．１，５１５．０．

【０１３９】

工程１０：　１，８－ジクロロ－３－（１－（５－クロロ－４－フルオロ－２－イソプロポキシ３－（６－（トリフルオロメチル）ピリジン－３－イル）フェニル）エチル）イミダゾ［１，５－ａ］ピラジン。

【化２９】

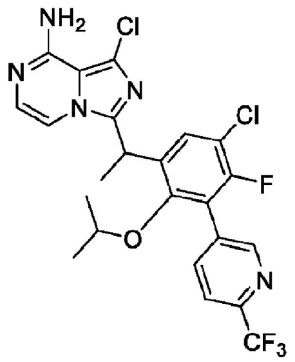


ＤＭＦ（１０ｍＬ）中の８－クロロ－３－（１－（５－クロロ－４－フルオロ－２－イソプロポキシ－３－（６－（トリフルオロメチル）ピリジン－３－イル）フェニル）エチル）イミダゾ［１，５－ａ］ピラジン（４２０ｍｇ、０．８２ｍｍｏｌ）及び１－クロロピロリジン－２，５－ジオン（１３１ｍｇ、０．９８ｍｍｏｌ）の反応混合物を５０℃で１ｈ撹拌した。完了後、溶媒を真空蒸発させ、残渣をカラムクロマトグラフィー（ＰＥ／ＥＡ＝３／１）により精製し、黄色固体として生成物（７８％の収率で３５０ｍｇ）を与えた。ＬＣ－ＭＳ（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$５４７．０，５４９．０．

【０１４０】

工程１１：　１－クロロ－３－（１－（５－クロロ－４－フルオロ－２－イソプロポキシ－３－（６－（トリフルオロメチル）ピリジン－３－イル）フェニル）エチル）イミダゾ［１，５－ａ］ピラジン－８－アミン。

【化３０】



鋼管内のｉ－ＰｒＯＨ（１０ｍＬ）中の１，８－ジクロロ－３－（１－（５－クロロ－４－フルオロ－２－イソプロポキシ－３－（６－（トリフルオロメチル）ピリジン－３－イル）フェニル）エチル）イミダゾ［１，５－ａ］ピラジン（３５０ｍｇ、０．６４ｍｍｏｌ）及びNH_3の反応混合物を９０℃で一晩撹拌した。完了後、混合物を真空蒸発させた。残渣をカラムクロマトグラフィー（CH_2Cl_2／ＭｅＯＨ＝２０／１）により精製して所望の生成物（２００ｍｇ）を得て、これをキラルＨＰＬＣにより分離して白色固体として化合物２Ａ（６６ｍｇ、第１の速い異性体）及び化合物２Ｂ（６８ｍｇ、第２の遅

い異性体）の２種の化合物を与えた。化合物２Ａのキラル中心の絶対構造は、以上に示されており、（Ｓ）配置として決定された。

【０１４１】

化合物２：^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ６）δ　８．８６（ｓ，１Ｈ），８．２４（ｄ，Ｊ＝８．０Ｈｚ，１Ｈ），８．０８（ｄ，Ｊ＝８．２Ｈｚ，１Ｈ），７．６０（ｄ，Ｊ＝８．５Ｈｚ，１Ｈ），７．５０（ｄ，Ｊ＝４．９Ｈｚ，１Ｈ），７．０７（ｓ，１Ｈ），６．７４（ｓ，２Ｈ），４．９１（ｑ，Ｊ＝６．８Ｈｚ，１Ｈ），３．５８（ｄｔ，Ｊ＝１２．１，６．０Ｈｚ，１Ｈ），１．６７（ｄ，Ｊ＝７．１Ｈｚ，３Ｈ），０．９８（ｄ，Ｊ＝６．１Ｈｚ，３Ｈ），０．７６（ｄ，Ｊ＝６．１Ｈｚ，３Ｈ）．ＬＣ－ＭＳ（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$　５２８．０．

【０１４２】

化合物２Ａ：^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ６）δ　８．８６（ｓ，１Ｈ），８．２４（ｄ，Ｊ＝８．１Ｈｚ，１Ｈ），８．０８（ｄ，Ｊ＝８．１Ｈｚ，１Ｈ），７．６０（ｄ，Ｊ＝８．４Ｈｚ，１Ｈ），７．４９（ｄ，Ｊ＝５．０Ｈｚ，１Ｈ），７．０６（ｄ，Ｊ＝５．０Ｈｚ，１Ｈ），６．７４（ｓ，２Ｈ），４．９１（ｑ，Ｊ＝６．９Ｈｚ，１Ｈ），３．５８（ｄｔ，Ｊ＝１２．１，６．０Ｈｚ，１Ｈ），１．６７（ｄ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，３Ｈ），０．９８（ｄ，Ｊ＝６．０Ｈｚ，３Ｈ），０．７６（ｄ，Ｊ＝６．１Ｈｚ，３Ｈ）．ＬＣ－ＭＳ（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$　５２８．０．

【０１４３】

化合物２Ｂ：^{1}Ｈ　ＮＭＲ（４００ＭＨｚ，ＤＭＳＯ－ｄ６）δ　８．８６（ｓ，１Ｈ），８．２４（ｄ，Ｊ＝８．０Ｈｚ，１Ｈ），８．０８（ｄ，Ｊ＝８．１Ｈｚ，１Ｈ），７．６０（ｄ，Ｊ＝８．４Ｈｚ，１Ｈ），７．４９（ｄ，Ｊ＝５．０Ｈｚ，１Ｈ），７．０６（ｄ，Ｊ＝５．０Ｈｚ，１Ｈ），６．７４（ｓ，２Ｈ），４．９１（ｑ，Ｊ＝６．９Ｈｚ，１Ｈ），３．５８（ｄｔ，Ｊ＝１２．０，６．０Ｈｚ，１Ｈ），１．６７（ｄ，Ｊ＝７．０Ｈｚ，３Ｈ），０．９８（ｄ，Ｊ＝６．０Ｈｚ，３Ｈ），０．７６（ｄ，Ｊ＝６．０Ｈｚ，３Ｈ）．ＬＣ－ＭＳ（Ｍ＋Ｈ）$^{+}$　５２８．０．

【０１４４】

【表２】

カラム	CHIRALART Cellulose-SB
カラムサイズ	2cm × 25 cm
注入	0.3ML
移動相	Hex:EtOH=95:5
流量	20ml/分
波長	UV 220 nm
温度	35 °C
サンプル溶液	移動相中30.9mg/ml
Prep-HPLC装置	BJ-Prep-Gilson-HPLC

【０１４５】

検出及び診断の方法

本開示の抗体又は抗原結合性フラグメントは、限定されるものではないが、ＯＸ４０の検出方法をはじめとするさまざまな用途に有用である。一態様では、抗体又は抗原結合性フラグメントは、生物学的サンプル中のＯＸ４０の存在を検出するのに有用である。本明細書で用いられる「ｄｅｔｅｃｔｉｎｇ（～を検出すること）」という用語は、定量的又は定性的な検出を含む。ある特定の態様では、生物学的サンプルは、細胞又は組織を含む。他の態様では、かかる組織は、他の組織と比べてより高レベルのＯＸ４０を発現する正常組織及び／又は癌性組織を含む。

【０１４６】
一態様では、本開示は、生物学的サンプル中のＯＸ４０の存在を検出する方法を提供する。ある特定の態様では、本方法は、抗原への抗体の結合を許容する条件下で生物学的サンプルと抗ＯＸ４０抗体とを接触させることと、抗体と抗原との間に複合体が形成されるかを検出することと、を含む。生物学的サンプルとしては、限定されるものではないが、尿又は血液サンプルが挙げられる。
【０１４７】
また、ＯＸ４０の発現に関連する障害を診断する方法も含まれる。ある特定の態様では、本方法は、試験細胞と抗ＯＸ４０抗体とを接触させることと、ＯＸ４０ポリペプチドへの抗ＯＸ４０抗体の結合を検出することにより、試験細胞中のＯＸ４０の発現レベル（定量的又は定性的のどちらかで）を決定することと、試験細胞中の発現レベルと対照細胞（たとえば、試験細胞と同一の組織起源の正常細胞又は非ＯＸ４０発現細胞）中のＯＸ４０発現レベルとを比較することと、を含み、コントロール細胞と比較して試験細胞中のより高レベルのＯＸ４０発現が、ＯＸ４０の発現に関連する障害の存在の指標となる。
【０１４８】
治療方法
本開示の抗体又は抗原結合性フラグメントは、限定されるものではないが、ＯＸ４０関連障害又は疾患の治療方法をはじめとするさまざまな用途に有用である。一態様では、ＯＸ４０関連障害又は疾患は癌である。
【０１４９】
一態様では、本開示は、癌を治療する方法を提供する。ある特定の態様では、本方法は、有効量の抗ＯＸ４０抗体又は抗原結合性フラグメントを必要とされる患者に投与することを含む。癌は、限定されるものではないが、乳癌、頭頸部癌、胃癌、腎癌、肝癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、皮膚癌、中皮腫、リンパ腫、白血病、骨髄腫、及び肉腫を含みうる。
【０１５０】
本発明の抗体又は抗原結合性フラグメントは、非経口、肺内、及び鼻内、並びに局所治療が望まれる場合には病変内投与を含めて、いずれかの好適な手段により投与可能である。非経口注入は、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、又は皮下投与を含む。投与は、部分的には投与が短期であるか長期であるかに依存して、いずれかの好適な経路、たとえば、静脈内注射や皮下注射などの注射によることが可能である。限定されるものではないが、単回投与又は各種時間点にわたる複数回投与、ボーラス投与、及びパルス注入をはじめとする各種投与スケジュールが本明細書で企図される。
【０１５１】
本発明の抗体又は抗原結合性フラグメントは、適正医療規範に準拠して、製剤化、用量設定、及び投与されるであろう。これとの関連での考慮因子としては、治療される特定障害、治療される特定哺乳動物、個々の患者の臨床病態、障害の原因、作用剤の送達部位、投与方法、投与のスケジューリング、及び医師に公知の他の因子が挙げられる。抗体は、問題の障害を予防又は治療するために現在使用されている１種以上の作用剤とともに任意に製剤化される。かかる他の作用剤の有効量は、製剤中に存在する抗体の量、障害又は治療のタイプ、及び以上で考察された他の因子に依存する。これらは、本明細書に記載のものと同一の投与量及び投与経路で、又は本明細書に記載の投与量の約１～９９％で、又は経験的／臨床的に適切であると決定されたいずれかの投与量及びいずれかの経路で、一般に使用される。
【０１５２】
疾患の予防又は治療では、本発明の抗体又は抗原結合性フラグメントの適切投与量は、治療される疾患のタイプ、抗体のタイプ、疾患の重症度及び経過、抗体が予防目的又は治療目的で投与されるか、以前の治療、患者の臨床歴及び抗体に対する反応、並びに担当医の自由裁量に依存するであろう。抗体は、好適には、１回で又は一連の治療にわたり患者に投与される。たとえば、１回以上の個別投与によるか又は連続注入によるかにもかかわ

らず、疾患のタイプ及び重症度に依存して、約１μｇ／ｋｇ～１００ｍｇ／ｋｇの抗体は、患者に投与するための初期候補投与量でありうる。典型的な一日投与量は、以上に挙げた因子に依存して、約１μｇ／ｋｇ～１００ｍｇ／ｋｇ又はそれ以上の範囲内でありうる。数日間以上にわたる繰返し投与では、病態に依存して、治療は、一般に疾患症状の所望の抑制を生じるまで継続されるであろう。かかる用量は、断続的に、たとえば、週１回又は３週間に１回投与可能である（たとえば、患者が約２～約２０用量又はたとえば６用量の抗体を摂取するように）。初期の高ローディング用量、続いて１回以上のより低用量を投与可能である。しかしながら、他の投与レジメンが有用でありうる。この治療の進行状況は、従来の技術及びアッセイにより容易にモニターされる。

【０１５３】

組合せ療法

一態様では、本開示のＯＸ４０抗体は、他の治療剤との組合せで使用可能である。本開示のＯＸ４０抗体とともに使用可能な他の治療剤としては、限定されるものではないが、化学療法剤（たとえば、パクリタキセル又はパクリタキセル剤、（たとえば、Ａｂｒａｘａｎｅ（登録商標））、ドセタキセル、カルボプラチン、トポテカン、シスプラチン、イリノテカン、ドキソルビシン、レナリドマイド、５－アザシチジン、イホスファミド、オキサリプラチン、ペメトレキセドニナトリウム、シクロホスファミド、エトポシド、デシタビン、フルダラビン、ビンクリスチン、ベンダムスチン、クロラムブシル、ブスルファン、ゲムシタビン、メルファラン、ペントスタチン、マイトキサントロン、ペメトレキセドニナトリウム）、チロシンキナーゼ阻害剤（たとえばＥＧＦＲ阻害剤（たとえばエルロチニブ）、マルチキナーゼ阻害剤（たとえば、ＭＧＣＤ２６５、ＲＧＢ－２８６６３８）、ＣＤ－２０標的化剤（たとえば、リツキシマブ、オファツムマブ、ＲＯ５０７２７５９、ＬＦＢ－Ｒ６０３）、ＣＤ５２標的化剤（たとえばアレムツズマブ））、プレドニゾロン、ダルベポエチンアルファ、レナリドマイド、Ｂｃｌ－２阻害剤（たとえばオブリマーセンナトリウム）、オーロラキナーゼ阻害剤（たとえば、ＭＬＮ８２３７、ＴＡＫ－９０１）、プロテアソーム阻害剤（たとえばボルテゾミブ）、ＣＤ－１９標的化剤（たとえば、ＭＥＤＩ－５５１、ＭＯＲ２０８）、ＭＥＫ阻害剤（たとえばＡＢＴ－３４８）、ＪＡＫ－２阻害剤（たとえばＩＮＣＢ０１８４２４）、ｍＴＯＲ阻害剤（たとえばテムシロリムス、エベロリムス）、ＢＣＲ／ＡＢＬ阻害剤（たとえば、イマチニブ）、ＥＴ－Ａレセプターアンタゴニスト（たとえばＺＤ４０５４）、ＴＲＡＩＬレセプター２（ＴＲ－２）アゴニスト（たとえばＣＳ－１００８）、ＨＧＦ／ＳＦ阻害剤（たとえばＡＭＧ１０２）、ＥＧＥＮ－００１、Ｐｏｌｏ様キナーゼ１阻害剤（たとえばＢＩ６７２）が挙げられる。

【０１５４】

本開示のＯＸ４０抗体は、他の治療剤との組合せで使用可能である。本開示のＯＸ４０抗体と共に使用可能な他の治療剤としては、ＰＩ３キナーゼ阻害剤、たとえば、限定されるものではないが、（Ｓ）－３－（１－（８－アミノ－１－メチルイミダゾ［１，５－ａ］ピラジン－３－イル）エチル）－５－クロロ－６－フルオロ－２－イソプロポキシ－Ｎ－（２－（４－メチルピペラジン－１－イル）エチル）ベンズアミド（化合物１）が挙げられる。他の治療剤、たとえば、１－クロロ－３－（１－（５－クロロ－４－フルオロ－２－イソプロポキシ－３－（６－（トリフルオロメチル）ピリジン－３－イル）フェニル）エチル）イミダゾ［１，５－ａ］ピラジン－８－アミン（化合物２Ａ）は、抗ＯＸ４０抗体との組合せで使用可能である。

【０１５５】

本明細書に開示される抗ＯＸ４０抗体及び化合物１又は化合物２Ａは、各種公知の方式で、たとえば、経口、局所、直腸、非経口、吸入スプレー、又は植込みリザーバーで投与可能であるが、いずれの所与の症例でも最も好適な経路は、特定宿主並びに活性成分が投与される病態の性質及び重症度に依存するであろう。本明細書で用いられる「非経口」という用語は、皮下、皮内、静脈内、筋肉内、関節内、動脈内、滑液嚢内、胸骨内、髄腔内、病変内、及び頭蓋内の注射又は注入技術を含む。

【０１５６】
抗ＯＸ４０抗体と化合物１又は化合物２Ａとの組合せは、異なる経路で投与可能である。一実施形態では、化合物１又は化合物２Ａは、経口投与され、且つ抗ＯＸ４０抗体は、皮下、皮内、静脈内、腹腔内などに非経口投与される。
【０１５７】
一実施形態では、化合物１又は化合物２Ａは、１日１回（毎日１回、ＱＤ）、１日２回（毎日２回、ＢＩＤ）、１日３回、１日４回、又は１日５回投与される。
【０１５８】
医薬組成物及び製剤
また、抗ＯＸ４０抗体若しくは抗原結合性フラグメントを含む医薬製剤又は抗ＯＸ４０抗体若しくは抗原結合性フラグメントをコードする配列を含むポリヌクレオチドを含めて、組成物も提供される。ある特定の実施形態では、組成物は、ＯＸ４０に結合する１種以上の抗体若しくは抗原結合性フラグメント、又はＯＸ４０に結合する１種以上の抗体若しくは抗原結合性フラグメントをコードする配列を含む１種以上のポリヌクレオチドを含む。こうした組成物は、好適な担体、たとえば、当技術分野で周知の緩衝剤を含む薬学的に許容可能な賦形剤をさらに含みうる。
【０１５９】
本明細書に記載のＯＸ４０抗体又は抗原結合性フラグメントの医薬製剤は、所望の純度を有するかかる抗体又は抗原結合性フラグメントと、１種以上の任意の薬学的に許容可能な担体（Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ　１６ｔｈ　ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｏｓｏｌ，Ａ．Ｅｄ．（１９８０））と、を混合することにより、凍結乾燥製剤又は水性溶液剤の形態で調製される。薬学的に許容可能な担体は、採用された投与量及び濃度でレシピエントに対して一般に非毒性であり、限定されるものではないが、緩衝剤、たとえば、リン酸、クエン酸、及び他の有機酸、抗酸化剤（アスコルビン酸及びメチオニンを含む）、保存剤（たとえば、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロライド、ヘキサメトニウムクロライド、ベンザルコニウムクロライド、ベンゼトニウムクロライド、フェノール、ブチル又はベンジルアルコール、アルキルパラベン、たとえば、メチル又はプロピルパラベン、カテコール、レゾルシノール、シクロヘキサノール、３－ペンタノール、及びｍ－クレゾール）、低分子量（約１０残基未満）ポリペプチド、タンパク質、たとえば、血清アルブミン、ゼラチン、又はイムノグロブリン、親水性ポリマー、たとえば、ポリビニルピロリドン、アミノ酸、たとえば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、又はリシン、単糖、二糖、及び他の炭水化物（グルコース、マンノース、又はデキストリンを含む）、キレート化剤、たとえば、ＥＤＴＡ、糖、たとえば、スクロース、マンニトール、トレハロース、又はソルビトール、塩形成性カウンターイオン、たとえば、ナトリウム、金属複合体（たとえばＺｎタンパク質複合体）、及び／又は非イオン性界面活性剤、たとえば、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）を含む。本明細書中の模範的な薬学的に許容可能な担体としては、間質薬剤分散剤、たとえば、可溶性中性活性ヒアルロニダーゼ糖タンパク質（ｓＨＡＳＥＧＰ）、たとえば、ヒト可溶性ＰＨ－２０ヒアルロニダーゼ糖タンパク質、たとえば、ｒＨｕＰＨ２０（ＨＹＬＥＮＥＸ（登録商標）、Ｂａｘｔｅｒ　Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ，Ｉｎｃ．）がさらに挙げられる。ｒＨｕＰＨ２０を含むある特定の模範的ｓＨＡＳＥＧＰ及び使用方法は、米国特許第７，８７１，６０７号明細書及び米国特許出願公開第２００６／０１０４９６８号明細書に記載されている。一態様では、ｓＨＡＳＥＧＰは、コンドロイチナーゼなどの１種以上の追加のグリコサミノグリカナーゼと組み合わされる。
【０１６０】
模範的凍結乾燥抗体製剤は、米国特許第６，２６７，９５８号明細書に記載されている。水性抗体製剤は、米国特許第６，１７１，５８６号明細書及び国際公開第２００６／０４４９０８号パンフレットに記載のものを含み、後者の製剤は、ヒスチジン酢酸緩衝剤を含む。
【０１６１】

持続放出製剤を調製可能である。持続放出製剤の好適例は、抗体を含有する固形疎水性ポリマーの半透性マトリックスを含み、そのマトリックスは、フィルムや又はマイクロカプセルなどの造形品の形態である。

【０１６２】

ｉｎ ｖｉｖｏ投与に使用される製剤は、一般に無菌である。無菌性は、たとえば、滅菌濾過膜に通して濾過することによる簡単に達成可能である。

【０１６３】

「薬学的に許容可能な塩」という用語は、限定されるものではないが、たとえば、塩酸塩、リン酸塩、二リン酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、スルフィン酸塩、及び硝酸塩から選択される無機酸との塩、さらには、たとえば、マレイン酸塩、フマル酸塩、乳酸塩、メタンスルホン酸塩、ｐ－トルエンスルホン酸塩、２－ヒドロキシエチルスルホン酸塩、安息香酸塩、サリチル酸塩、ステアリン酸塩、酢酸塩などのアルカン酸塩、及びＨＯＯＣ－（CH_2）$_n$－ＣＯＯＨ（式中、ｎは０～４から選択される）との塩から選択される有機酸との塩を含む。同様に、薬学的に許容可能なカチオンの例は、限定されるものではないが、ナトリウム、カリウム、カルシウム、アルミニウム、リチウム、及びアンモニウムを含む。

【０１６４】

そのほか、化合物が酸付加塩として得られる場合、遊離塩基は、酸塩の溶液を塩基性化することにより得ることが可能である。反対に、生成物が遊離塩基である場合、付加塩、たとえば、薬学的に許容可能な付加塩は、塩基化合物から酸付加塩を調製するための従来手順に従って、遊離塩基を好適な有機溶媒中に溶解させて溶液を酸で処理することにより生成されうる。当業者であれば、非毒性の薬学的に許容可能な付加塩を調製するために過度の実験を行うことなく使用可能な各種合成法が分かるであろう。

【実施例】

【０１６５】

実施例１： 抗ＯＸ４０モノクローナル抗体の発生

マイナー変更を施して従来のハイブリドーマ融合技術（ｄｅ Ｓｔ Ｇｒｏｔｈ ａｎｄ Ｓｃｈｅｉｄｅｇｇｅｒ，１９８０ Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ ３５：１、Ｍｅｃｈｅｔｎｅｒ，２００７ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ ３７８：１）に基づいて、抗ＯＸ４０モノクローナル抗体を発生させた。酵素連結イムノソルベントアッセイ（ＥＬＩＳＡ）及び蛍光活性化細胞選別（ＦＡＣＳ）アッセイで高い結合活性を有する抗体を選択し、さらなる特徴付けに供した。

【０１６６】

免疫化及び結合アッセイのためのＯＸ４０組換えタンパク質

ＧｅｎＢａｎｋ配列（アクセッション番号：Ｘ７５９６２．１）に基づいて、全長ヒトＯＸ４０をコードするｃＤＮＡ（配列番号１）をＳｉｎｏ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ（Ｂｅｉｊｉｎｇ，Ｃｈｉｎａ）により合成した。ＯＸ－４０のアミノ酸（ＡＡ）１～２１６（配列番号２）からなるシグナルペプチド及び細胞外ドメイン（ＥＣＤ）のコード領域をＰＣＲ増幅し、マウスＩｇＧ２ａのＦｃドメイン、ヒトＩｇＧ１野生型重鎖のＦｃドメイン、又はＨｉｓタグに融合されたＣ末端とともにインハウス開発発現ベクター中にクローニングし、それぞれ、３つの組換え融合タンパク質発現プラスミドＯＸ４０－ｍＩｇＧ２ａ、ＯＸ４０－ｈｕＩｇＧ１、及びＯＸ４０－Ｈｉｓを得た。ＯＸ４０融合タンパク質の模式図は図１に示される。組換え融合タンパク質産生のために、ＯＸ４０－ｍＩｇＧ２ａ、ＯＸ４０－ｈｕＩｇＧ１、及びＯＸ４０－Ｈｉｓの発現プラスミドを２９３Ｇ細胞に一過的にトランスフェクトし、回転シェーカーを備えたCO_2インキュベーターで７日間培養した。組換えタンパク質を含有する上清を捕集し、遠心分離により清澄化した。プロテインＡカラム（Ｃａｔ：１７－５４３８－０２，ＧＥ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）を用いて、ＯＸ４０－ｍＩｇＧ２ａ及びＯＸ４０－ｈｕＩｇＧ１を精製した。Ｎｉセファロースカラム（Ｃａｔ：１７－５３１８－０２，ＧＥ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ）を用いてＯＸ４０－Ｈｉｓを精製した。リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）に対してＯＸ４０－ｍＩ

ｇＧ２ａ、ＯＸ４０－ｈｕＩｇＧ、及びＯＸ４０－Ｈｉｓタンパク質を透析し、少量のアリコートで－８０℃フリーザーに保存した。

【０１６７】

安定発現細胞系

全長ヒトＯＸ４０（ＯＸ４０）又はカニクイザルＯＸ４０（ｃｙｎｏＯＸ４０）を発現する安定細胞系を発生させるために、これらの遺伝子をレトロウイルスベクターｐＦＢ－Ｎｅｏ（Ｃａｔ：２１７５６１，Ａｇｉｌｅｎｔ，ＵＳＡ）にクローニングした。以上に記載のプロトコルに基づいてレトロウイルストランスダクションを実施した（Ｚｈａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，２００５）。ＨｕＴ７８及びＨＥＫ２９３細胞を、それぞれ、ヒトＯＸ４０又はｃｙｎｏＯＸ４０を含有するウイルスを用いてレトロウイルスによりトランスデュースし、ＨｕＴ７８／ＯＸ４０、ＨＥＫ２９３／ＯＸ４０、及びＨｕＴ７８／ｃｙｎｏＯＸ４０細胞系を発生させた。

【０１６８】

免疫化、ハイブリドーマ融合、及びクローニング

１０μｇのＯＸ４０－ｍＩｇＧ２ａ及びＱｕｉｃｋ－Ａｎｔｉｂｏｄｙ　Ｉｍｍｕｎｏ－Ａｄｊｕｖａｎｔ（Ｃａｔ：ＫＸ０２１００４１，ＫａｎｇＢｉＱｕａｎ，Ｂｅｉｊｉｎｇ，Ｃｈｉｎａ）を含有する２００μＬの混合物抗原で８～１２週齢のＢａｌｂ／ｃマウス（ＨＦＫ　ＢＩＯＳＣＩＥＮＣＥ　ＣＯ．，ＬＴＤ，Ｂｅｉｊｉｎｇ，Ｃｈｉｎａ製）に腹腔内免疫した。手順を３週間繰り返した。２回目の免疫化の２週間後、ＥＬＩＳＡ及びＦＡＣＳによりＯＸ４０結合に関してマウス血清を評価した。血清スクリーニングの１０日後、最高抗ＯＸ４０抗体血清中力価を有するマウスを１０μｇのＯＸ４０－ｍＩｇＧ２ａでｉ．ｐ．注射によりブーストした。ブースティングの３日後、脾細胞を単離し、標準的技術（Ｓｏｍａｔ　Ｃｅｌｌ　Ｇｅｎｅｔ，１９７７　３：２３１）を用いてネズミ骨髄腫細胞系ＳＰ２／０細胞（ＡＴＣＣ，Ｍａｎａｓｓａｓ　ＶＡ）に融合した。

【０１６９】

ＥＬＩＳＡ及びＦＡＣＳによる抗体のＯＸ４０結合活性のアセスメント

いくつかの修正を加えて（Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ（２００７）３７８：３３－５２）に記載のように、ハイブリドーマクローンの上清をＥＬＩＳＡにより最初にスクリーニングした。簡潔に述べると、ＯＸ４０－Ｈｉｓタンパク質を９６ウェルプレートに４℃で一晩コーティングした。ＰＢＳ／０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０で洗浄後、プレートを２時間にわたりＰＢＳ／３％ＢＳＡにより室温でブロックした。続いて、プレートをＰＢＳ／０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０で洗浄し、細胞上清とともに室温で１時間インキュベートした。ＨＲＰ連結抗マウスＩｇＧ抗体（Ｃａｔ：１１５０３５－００８，Ｊａｃｋｓｏｎ　ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ　Ｉｎｃ，Ｐｅｒｏｘｉｄａｓｅ　ＡｆｆｉｎｉＰｕｒｅ　Ｇｏａｔ　Ａｎｔｉ－Ｍｏｕｓｅ　ＩｇＧ，Ｆｃγ　ｆｒａｇｍｅｎｔ　ｓｐｅｃｉｆｉｃ）及び基質（Ｃａｔ：００－４２０１－５６，ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ，ＵＳＡ）を用いて４５０ｎｍの波長で色吸光度シグナルを発生させ、それをプレートリーダー（ＳｐｅｃｔｒａＭａｘ　Ｐａｒａｄｉｇｍ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｅｖｉｃｅｓ／ＰＨＥＲＡｓｔａｒ，ＢＭＧ　ＬＡＢＴＥＣＨ）を用いることにより測定した。間接ＥＬＩＳＡによる融合スクリーニングから陽性親クローンを取り出した。以上に記載のＨｕＴ７８／ＯＸ４０及びＨｕＴ７８／ｃｙｎｏＯＸ４０細胞を用いてＦＡＣＳによりＥＬＩＳＡ陽性クローンをさらに検証した。ＯＸ４０発現細胞（10^5細胞／ウェル）をＥＬＩＳＡ陽性ハイブリドーマ上清とともにインキュベートし、続いて、抗マウスＩｇＧ　ｅＦｌｕｏｒ（登録商標）６６０抗体（Ｃａｔ：５０－４０１０－８２，ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ，ＵＳＡ）を結合させた。細胞蛍光をフローサイトメーター（Ｇｕａｖａ　ｅａｓｙＣｙｔｅ　８ＨＴ，Ｍｅｒｃｋ－Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ，ＵＳＡ）を用いて定量した。

【０１７０】

ヒト免疫細胞ベースアッセイで良好な機能活性を有する抗体を同定するために、ＥＬＩＳＡ及びＦＡＣＳスクリーニングの両方で陽性シグナルを示したハイブリドーマからの馴

化培地を機能アッセイに付した（以下のセクションを参照されたい）。所望の機能活性を有する抗体をさらにサブクローニングし、特徴付けた。

【０１７１】

ハイブリドーマのサブクローニング及び血清フリー培地又は低血清培地への適応

以上に記載のＥＬＩＳＡ、ＦＡＣＳ、及び機能アッセイによる一次スクリーニングの後、クローン性を確保するために限界希釈により陽性ハイブリドーマクローンをサブクローニングした。トップ抗体サブクローンを機能アッセイにより検証し、３％ＦＢＳを有するＣＤＭ４ＭＡｂ培地（Ｃａｔ：ＳＨ３０８０１．０２，Ｈｙｃｌｏｎｅ，ＵＳＡ）での成長に適合化させた。

【０１７２】

モノクローナル抗体の発現及び精製

トップ抗体クローンを発現するハイブリドーマ細胞をＣＤＭ４ＭＡｂ培地（Ｃａｔ：ＳＨ３０８０１．０２，Ｈｙｃｌｏｎｅ）で培養し、３７℃で５～７日間にわたりCO_2インキュベーターでインキュベートした。遠心分離を介して馴化培地を捕集し、０．２２μｍ膜に通して濾過してから精製した。製造業者の説明書に従って上清中のネズミ抗体をプロテインＡカラム（Ｃａｔ：１７－５４３８－０２，ＧＥ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）に適用し結合させた。手順は、通常、純度９０％超で抗体を生成した。プロテインＡ親和性精製抗体は、ＰＢＳに対して透析されたか、又は必要であれば、凝集物を除去するためにＨｉＬｏａｄ １６／６０ Ｓｕｐｅｒｄｅｘ２００カラム（Ｃａｔ：２８－９８９３－３５，ＧＥ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）を用いてさらに精製された。タンパク質濃度は、２８０ｎｍで吸光度を測定することにより決定された。最終的抗体調製物は、－８０℃フリーザー中にアリコートで貯蔵された。

【０１７３】

実施例２： 抗ＯＸ４０抗体のクローニング及び配列解析

ネズミハイブリドーマクローンを採取し、製造業者のプロトコルに基づいてＵｌｔｒａｐｕｒｅ ＲＮＡキット（Ｃａｔ：７４１０４，ＱＩＡＧＥＮ，Ｇｅｒｍａｎｙ）を用いて全細胞ＲＮＡを調製した。Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ製のｃＤＮＡ合成キット（Ｃａｔ：１８０８０－０５１）を用いて第一鎖ｃＤＮＡを合成し、ＰＣＲキット（Ｃａｔ：ＣＷ０６８６，ＣＷＢｉｏ，Ｂｅｉｊｉｎｇ，Ｃｈｉｎａ）を用いてハイブリドーマ抗体のＶＨ及びＶＬのＰＣＲ増幅を実施した。重鎖可変領域（ＶＨ）及び軽鎖可変領域（ＶＬ）の抗体ｃＤＮＡクローニングに用いたオリゴプライマーは、既報の配列（Ｂｒｏｃｋｓ ｅｔａｌ．２００１ Ｍｏｌ Ｍｅｄ ７：４６１）に基づいてＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎ（Ｂｅｉｊｉｎｇ，Ｃｈｉｎａ）により合成された。ＰＣＲ産物は、シーケンシングに直接使用されたか、又はｐＥＡＳＹ－Ｂｌｕｎｔクローニングベクター（Ｃａｔ：ＣＢ１０１ ＴｒａｎｓＧｅｎ，Ｃｈｉｎａ）にサブクローニングされてからＧｅｎｅｗｉｚ（Ｂｅｉｊｉｎｇ，Ｃｈｉｎａ）によりシーケンシングされた。ＶＨ及びＶＬ領域のアミノ酸配列は、ＤＮＡシーケンシング結果から推測された。

【０１７４】

ネズミ抗体の相補性決定領域（ＣＤＲ）は、配列アノテーションにより及びコンピュータープログラム配列解析によりＫａｂａｔ（Ｗｕ ａｎｄ Ｋａｂａｔ １９７０ Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１３２：２１１－２５０）システムに基づいて定義された。代表的トップクローンＭｕ４４５（ＶＨ及びＶＬ）のアミノ酸配列は、表１（配列番号９及び１１）に列挙された。Ｍｕ４４５のＣＤＲ配列は、表２（配列番号３～８）に列挙された。

【０１７５】

【表３】

表1. Mu445 VH及びVL領域のアミノ酸配列

Mu445 VH	配列番号9	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYKFTSYII HWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDGTRYNEKFKG KATLTSDKSSSTAYMEYSSLTSEDSAVYYCARG YYGSSYAMDYWGQGTSVTVSS
Mu445 VL	配列番号11	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCSASQGISNYLN WYQQKPDGTIKLLIYDTSTLYSGVPSRFSGSGSG TDYFLTISNLEPEDIATYYCQQYSKLPYTFGGGT KLEKK

【０１７６】

【表４】

表2. マウスモノクローナル抗体Mu445 *VH*及び*VL*領域のCDR配列(アミノ酸)

抗体	配列番号	CDR	配列
Mu445	配列番号3	HCDR1 (Kabat)	SYIIH
	配列番号4	HCDR2 (Kabat)	YINPYNDGTRYNEKFKG
	配列番号5	HCDR3 (Kabat)	GYYGSSYAMDY
	配列番号6	LCDR1 (Kabat)	SASQGISNYLN
	配列番号7	LCDR2 (Kabat)	DTSTLYS
	配列番号8	LCDR3 (Kabat)	QQYSKLPYT

【０１７７】

実施例３： ネズミ抗ヒトＯＸ４０抗体４４５のヒト化

抗体ヒト化及び工学操作

Ｍｕ４４５のヒト化のために、ＩＭＧＴのヒトイムノグロブリン遺伝子データベースに対する配列比較によりＭｕ４４５可変領域のｃＤＮＡ配列に対して高度の相同性を共有する配列に関して、ヒト生殖系ＩｇＧ遺伝子を探索した。高頻度でヒト抗体レパートリーに存在し（Ｇｌａｎｖｉｌｌｅ ｅｔ ａｌ．，２００９ ＰＮＡＳ １０６：２０２１６－２０２２１）且つ高度にＭｕ４４５に相同的であるヒトＩＧＨＶ及びＩＧＫＶ遺伝子をヒト化のためのテンプレートとして選択した。

【０１７８】

ＣＤＲ移植によりヒト化を行い（Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ，Ｖｏｌ ２４８：Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ）、インハウス開発発現ベクターを用いることによりヒトＩｇＧ１野生型フォーマットとしてヒト化抗体を工学操作した。ヒト化の初期ラウンドでは、シミュレート３Ｄ構造解析によりフレームワーク領域でネズミからヒトアミノ酸残基への突然変異をガイドし、ＣＤＲのカノニカル構造を維持する構造重要性を有するネズミフレームワーク残基をヒト化抗体４４５の最初のバージョンで保持した（表３の４４５－１を参照されたい）。４４５－１の６つのＣＤＲは、ＨＣＤＲ１（配列番号３）、ＨＣＤＲ２（配列番号１３）、ＨＣＤＲ３（配列番号５）、並びにＬＣＤＲ１（配列番号６）、ＬＣＤＲ２（配列番号７）、及びＬＣＤＲ３（配列番号８）のアミノ酸配列を有する。４４５－１の重鎖可変領域は、配列番号１５のヌクレオチド配列によりコードされる（ＶＨ）配列番号１４のアミノ酸配列を有し、軽鎖可変領域は、配列番号１７のヌクレオチド配列によりコードされる（ＶＬ）配列番号１６のアミノ酸配列を有する。具体的には、Ｍｕ４４５のＬＣＤＲ（配列番号６～８）は、ヒト生殖系可変遺伝子ＩＧＶＫ１－３９のフレームワークに移植され、２つのネズミフレームワーク残基（I_{44}及びY_{71}）は保持された（配列番号１６）。ＨＣＤＲ１（配列番号３）、ＨＣ

ＤＲ２（配列番号１３）、及びＨＣＤＲ３（配列番号５）は、ヒト生殖系可変遺伝子ＩＧＨＶ１－６９のフレームワークに移植され、２つのネズミフレームワーク（L_{70}及びS_{72}）残基は保持された（配列番号１４）。Ｎ末端側半分のみがシミュレート３Ｄ構造に従って抗原結合に重要であると予測されたので、４４５ヒト化変異体（４４５－１）では、Ｋａｂａｔ　ＨＣＤＲ２のＮ末端側半分のみが移植された。

【０１７９】

４４５－１は、容易適応サブクローニング部位をそれぞれ有するヒト野生型ＩｇＧ１（ＩｇＧ１ｗｔ）及びカッパ鎖の定常領域を含有するインハウス開発発現ベクターを用いて、ヒト化全長抗体として構築された。４４５－１抗体は、２９３Ｇ細胞への以上の２つの構築物の共トランスフェクションにより発現され、プロテインＡカラム（Ｃａｔ：１７－５４３８－０２，ＧＥ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）を用いて精製された。精製抗体は、ＰＢＳ中で０．５～１０ｍｇ／ｍＬに濃縮され、－８０℃フリーザーにアリコートで保存された。

【０１８０】

４４５－１抗体を用いて、ＶＬ中のＩ４４Ｐ及びＹ７１Ｆ並びにＶＨ中のＬ７０Ｉ及びＳ７２Ａなど、いくつかの単一アミノ酸変化を行って、ＶＨ及びＶＬのフレームワーク領域中の保持ネズミ残基を対応するヒト生殖系残基に変換した。そのほか、潜在的異性化リスクを低減するために及びヒト化レベルを増加させるために、ＣＤＲでいくつかの単一アミノ酸変化を行った。たとえば、ＬＣＤＲ２でＴ５１Ａ及びＤ５０Ｅの改変を行い、且つＨＣＤＲ２でＤ５６Ｅ、Ｇ５７Ａ、及びＮ６１Ａの改変を行った。ヒト化変化はすべて、特異的位置に突然変異を含有するプライマー及び部位指向突然変異誘発キットを用いて行われた（Ｃａｔ：ＡＰ２３１－１１，ＴｒａｎｓＧｅｎ，Ｂｅｉｊｉｎｇ，Ｃｈｉｎａ）。所望の変化は、シーケンシングにより検証された。

【０１８１】

４４５－１抗体中のアミノ酸変化は、ＯＸ４０への結合及び熱安定性に関して評価された。配列番号３のＨＣＤＲ１、配列番号１８のＨＣＤＲ２、配列番号５のＨＣＤＲ３、配列番号６のＬＣＤＲ１、配列番号１９のＬＣＤＲ２、及び配列番号８のＬＣＤＲ３を含む抗体４４５－２（表３参照）は、以上に記載の特異的変化の組合せから構築された。２つの抗体を比較すると、結果は、抗体４４５－２及び４４５－１の両方が同程度の結合親和性を呈すること示した（以下の表４及び表５を参照されたい）。

【０１８２】

４４５－２抗体から始めて、結合親和性／速度論をさらに改善するために、ＶＬのフレームワーク領域でいくつかの追加のアミノ酸変化、たとえば、アミノ酸Ｇ４１Ｄ及びＫ４２Ｇの改変を行った。そのほか、免疫原性リスクを低下させるために及び熱安定性を増加させるために、ＶＨ及びＶＬの両方のＣＤＲでいくつかの単一アミノ酸変化、たとえば、ＬＣＤＲ１中のＳ２４Ｒ及びＨＣＤＲ２中のＡ６１Ｎを行った。得られた変化は、４４５－２と比較して改善された結合活性又は熱安定性のどちらかを示した。

【０１８３】

ヒト化４４５抗体は、ヒトにおける治療的使用に関する分子的及び生物物理学的性質を改善するために、ＣＤＲ及びフレームワーク領域で特異的アミノ酸変化を導入することによりさらに工学操作された。考慮点には、結合活性を維持しつつ、有害な翻訳後修飾の除去、熱安定性（T_m）、表面疎水性、及び等電点（ｐＩ）の改善を行うことが含まれていた。

【０１８４】

配列番号３のＨＣＤＲ１、配列番号２４のＨＣＤＲ２、配列番号５のＨＣＤＲ３、配列番号２５のＬＣＤＲ１、配列番号１９のＬＣＤＲ２、及び配列番号８のＬＣＤＲ３を含むヒト化モノクローナル抗体４４５－３（表３参照）は、以上に記載の成熟プロセスから構築され、詳細に特徴付けられた。抗体４４５－３は、ヒトＩｇＧ２の野生型重鎖のＦｃドメインを含むＩｇＧ２バージョン（４４５－３ＩｇＧ２）、並びにＳ２２８Ｐ及びＲ４０９Ｋの突然変異を有するヒトＩｇＧ４のＦｃドメインを含むＩｇＧ４バージョン（４４５

－３ＩｇＧ４）も作製された。結果は、４４５－３及び４４５－２が同程度の結合親和性を呈すること示した（表４及び表５を参照されたい）。

【０１８５】

【表５】

表3. 445抗体配列

抗体	配列番号		配列
445-1	配列番号3	HCDR1 (Kabat)	SYIIH
	配列番号13	HCDR2 (Kabat)	YINPYNDGTRYNQKFQG
	配列番号5	HCDR3 (Kabat)	GYYGSSYAMDY
	配列番号6	LCDR1 (Kabat)	SASQGISNYLN
	配列番号7	LCDR2 (Kabat)	DTSTLYS
	配列番号8	LCDR3 (Kabat)	QQYSKLPYT
	配列番号14	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYKFT SYIIHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNDGTRY NQKFQGRVTLTSDKSTSTAYMELSSLRSEDT AVYYCARGYYGSSYAMDYWGQGTTVTVSS
	配列番号16	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQGISNY LNWYQQKPGKAIKLLIYDTSTLYSGVPSRFS GSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQYSKLP YTFGGGTKVEIK

【０１８６】

【表６】

445-2	配列番号3	HCDR1 (Kabat)	SYIIH
	配列番号18	HCDR2 (Kabat)	YINPYNEGTRYAQKFQG
	配列番号5	HCDR3 (Kabat)	GYYGSSYAMDY
	配列番号6	LCDR1 (Kabat)	SASQGISNYLN
	配列番号19	LCDR2 (Kabat)	DASTLYS
	配列番号8	LCDR3 (Kabat)	QQYSKLPYT
	配列番号20	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYKFT SYIIHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNEGTRY AQKFQGRVTLTADKSTSTAYMELSSLRSEDT AVYYCARGYYGSSYAMDYWGQGTTVTVSS
	配列番号22	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQGISNY LNWYQQKPGKAIKLLIYDASTLYSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSKLP YTFGGGTKVEIK
445-3	配列番号3	HCDR1 (Kabat)	SYIIH
	配列番号24	HCDR2 (Kabat)	YINPYNEGTRYNQKFQG
	配列番号5	HCDR3 (Kabat)	GYYGSSYAMDY
	配列番号25	LCDR1 (Kabat)	RASQGISNYLN
	配列番号19	LCDR2 (Kabat)	DASTLYS
	配列番号8	LCDR3 (Kabat)	QQYSKLPYT
	配列番号26	VH	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYKFT SYIIHWVRQAPGQGLEWMGYINPYNEGTRY NQKFQGRVTLTADKSTSTAYMELSSLRSEDT AVYYCARGYYGSSYAMDYWGQGTTVTVSS
	配列番号28	VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNY LNWYQQKPDGAIKLLIYDASTLYSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSKLP YTFGGGTKVEIK

【０１８７】

実施例４：　ＳＰＲによる抗ＯＸ４０抗体の結合速度論及び親和性決定

抗ＯＸ４０抗体は、ＢＩＡｃｏｒｅ（商標）Ｔ－２００（ＧＥ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）を用いてＳＰＲアッセイによりその結合速度論及び親和性に関して特徴付けられた。簡潔に述べると、抗ヒトＩｇＧ抗体は、活性化ＣＭ５バイオセンサーチップ（Ｃａｔ：ＢＲ１００５３０，ＧＥ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）上に固定された。ヒトＩｇＧＦｃ領域を有する抗体は、チップ表面上で流動され、抗ヒトＩｇＧ抗体によりキャプチャーされた。次いで、Ｈｉｓタグを有する組換えＯＸ４０タンパク質（Ｃａｔ：１０４８１－Ｈ０８Ｈ，Ｓｉｎｏ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ）の段階希釈物は、チップ表面上で流動さ

れ、表面プラズモン共鳴シグナルの変化は、１対１ラングミュア結合モデル（ＢＩＡ　Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ，ＧＥ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）を用いることにより会合速度（ｋａ）及び解離速度（ｋｄ）を計算すべく分析された。平衡解離定数（K_D）は、比ｋｄ／ｋａとして計算された。抗ＯＸ４０抗体のＳＰＲ決定結合プロファイルの結果は、図２及び表４にまとめられる。抗体４４５－３の平均K_D（９．４７ｎＭ）を有する結合プロファイルは、わずかに抗体４４５－２（１３．５ｎＭ）及び４４５－１（１７．１ｎＭ）よりも良好であり、ｃｈ４４５のものに類似していた。４４５－３ＩｇＧ４の結合プロファイルは４４５－３（ＩｇＧ１Ｆｃを有する）に類似していたことから、ＩｇＧ４とＩｇＧ１との間のＦｃの変化は、４４５－３抗体の特異的結合を改変しないことが示唆された。

【０１８８】

【表７】

表 4. SPR による抗 OX40 抗体の結合親和性

試験パラメーター		ch445*	445-1	445-2	445-3	445-3 IgG4
試験 1	*ka* ($M^{-1}s^{-1}$)	1.74 x 10^5	1.56 x 10^5	2.76 x 10^5	1.82 x 10^5	1.61 x 10^5
	kd (s^{-1})	1.43 x 10^{-3}	2.77 x 10^{-3}	3.90 x 10^{-3}	1.67 x 10^{-3}	1.61 x 10^{-3}
	K_D (nM)	8.26	17.8	14.2	9.16	10.0
	K_A (M^{-1})	1.22 x 10^8	0.56 x 10^8	0.71 x 10^8	1.09 x 10^8	1.00 x 10^8
試験 2	*ka* ($M^{-1}s^{-1}$)	2.65 x 10^5	2.37 x 10^5	2.06 x 10^5	1.63 x 10^5	_
	kd (s^{-1})	1.67 x 10^{-3}	3.89 x 10^{-3}	2.64 x 10^{-3}	1.59 x 10^{-3}	_
	K_D(nM)	6.3	16.4	12.8	9.77	_
	K_A (M^{-1})	1.59 x 10^8	0.61 x 10^8	0.78 x 10^8	1.03 x 10^8	_
平均	K_D(nM)	7.28	17.1	13.5	9.47	10.0
	K_A (M^{-1})	1.41 x 10^8	0.59 x 10^8	0.75 x 10^8	1.06 x 10^8	1.00 x 10^8

*ch445 はヒト IgG1wt/カッパ定常領域に融合された Mu445 可変ドメインで構成される

【０１８９】

実施例５：　ＨｕＴ７８細胞上に発現されるＯＸ４０への抗ＯＸ４０抗体の結合親和性の決定

生細胞の表面上に発現されるＯＸ４０に結合する抗ＯＸ４０抗体の結合活性を評価するために、ＨｕＴ７８細胞を実施例１に記載のヒトＯＸ４０でトランスフェクトし、ＯＸ４０発現系を生成した。生存ＨｕＴ７８／ＯＸ４０細胞を９６ウェルプレートに播種し、各種抗ＯＸ４０抗体の段階希釈物とともにインキュベートした。細胞表面への抗体結合を検出するために、ヤギ抗ヒトＩｇＧ－ＦＩＴＣ（Ｃａｔ：Ａ０５５６，Ｂｅｙｏｔｉｍｅ）を二次抗体として使用した。ヒトＯＸ４０への用量依存結合のEC_{50}値は、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍで用量－反応データを４パラメーターロジスティックモデルに当てはめることにより決定された。図３及び表５に示されるように、ＯＸ４０抗体は、ＯＸ４０への高い親和性を有していた。本開示のＯＸ４０抗体は、フローサイトメトリーにより測定された比較的高いトップレベルの蛍光強度を有していたことから（表５の最後のカラムを参照されたい）、望ましい結合プロファイルであるＯＸ４０からの抗体のより遅い解離が示唆されることも判明した。

【０１９０】

【表８】

表 5. OX40 へのヒト化 445 変異体の用量依存結合の EC_{50}

抗体	EC_{50}(μg/mL)			トップ(MFI)
	試験 1	試験 2	平均	平均
ch445	0.321	0.277	0.299	725
445-1	0.293	0.278	0.285	525
445-2	0.323	0.363	0.343	620
445-3	0.337	0.319	0.328	910
445-3 IgG4	0.263	N/A	0.263	892

【０１９１】

実施例６：　抗ＯＸ４０抗体の交差反応性の決定

ヒト及びカニクイザル（ｃｙｎｏ）サルＯＸ４０への抗体４４５－３の交差反応性を評価するために、ヒトＯＸ４０（ＨｕＴ７８／ＯＸ４０）及びｃｙｎｏＯＸ４０（ＨｕＴ７８／ｃｙｎｏＯＸ４０）を発現する細胞を９６ウェルプレートに播種し、ＯＸ４０抗体の一連の希釈物とともにインキュベートした。ヤギ抗ヒトＩｇＧ－ＦＩＴＣ（Ｃａｔ：Ａ０５５６，Ｂｅｙｏｔｉｍｅ）を検出用二次抗体として使用した。ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍで用量－反応データを４パラメーターロジスティックモデルに当てはめることにより、ヒト及びカニクイザル天然ＯＸ４０への用量依存結合の$ＥＣ_{５０}$値を決定した。結果は、図４及び以下の表６に示される。抗体４４５－３は、以下に示されるように、ヒト及びカニクイザルＯＸ４０の両方と類似の$ＥＣ_{５０}$値で交差反応する。

【０１９２】

【表９】

表 6. ヒト及びカニクイザル OX40 への抗体 445-3 結合の EC_{50}

細胞系	445-3 の EC_{50} (ug/mL)	トップ(MFI)
HuT78/OX40	0.174	575
HuT78/cynoOX40	0.171	594

【０１９３】

実施例７：　ＯＸ４０と４４５－３Ｆａｂとの共結晶化及び構造決定

本開示の抗体へのＯＸ４０の結合機序を理解するために、ＯＸ４０と４４５－３のＦａｂとの共結晶構造を解明した。ＯＸ４０のグリコシル化をブロックし、タンパク質の均一性を改善するために、残基Ｔ１４８及びＮ１６０に突然変異を導入した。突然変異体ヒトＯＸ４０（２つの突然変異部位Ｔ１４８Ａ及びＮ１６０Ａを有する残基Ｍ１－Ｄ１７０）をコードするＤＮＡをヘキサｈｉｓタグを含めて発現ベクターにクローニングし、この構築物を２９３Ｇ細胞に一過的にトランスフェクトし、３７℃で７日間にわたりタンパク質発現に供した。細胞を採取し、上清を捕集し、４℃で１時間にわたりＨｉｓタグ親和性樹脂とともにインキュベートした。２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、ｐＨ８．０、３００ｍＭ　ＮａＣｌ、及び３０ｍＭイミダゾールを含有する緩衝液で樹脂を３回濯いだ。次いで、２０ｍＭＴｒｉｓ、ｐＨ８．０、３００ｍＭ　ＮａＣｌ、及び２５０ｍＭイミダゾールを含有する

緩衝液でＯＸ４０タンパク質を溶出させ、続いて、２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、ｐＨ８．０、１００ｍＭ　ＮａＣｌを含有する緩衝液中でＳｕｐｅｒｄｅｘ２００（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）によりさらなる精製に供した。

【０１９４】

重鎖のＣ末端にヘキサｈｉｓタグを含めて４４５－３Ｆａｂの重鎖及び軽鎖のコード配列を発現ベクターにクローニングし、これを一過的に２９３Ｇ細胞にコトランスフェクトし、３７℃で７日間にわたりタンパク質発現に供した。４４５－３Ｆａｂの精製工程は、以上の突然変異体ＯＸ４０タンパク質に用いたものと同一であった。

【０１９５】

精製されたＯＸ４０及び４４５－３Ｆａｂを１：１のモル比で混合し、氷上で３０分間インキュベートし、続いて、２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、ｐＨ８．０、１００ｍＭ　ＮａＣｌを含有する緩衝剤中でＳｕｐｅｒｄｅｘ２００（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）によりさらなる精製に供した。複合ピークを捕集し、おおよそ３０ｍｇ／ｍｌに濃縮した。

【０１９６】

タンパク質複合体とリザーバー溶液とを１：１の体積比で混合することにより、共結晶スクリーンを実施した。０．１Ｍ　ＨＥＰＥＳ、ｐＨ７．０、１％ＰＥＧ２，０００ＭＭＥ、及び０．９５Ｍナトリウムスクシネートを含有するリザーバー溶液を用いて蒸気拡散により２０℃で培養されたハンギングドロップから共結晶を得た。

【０１９７】

ナイロンループを用いて共結晶を採取し、２０％グリセロールが補充されたリザーバー溶液中に結晶を１０秒間浸漬した。ＢＬ１７Ｕ１，Ｓｈａｎｇｈａｉ　Ｓｙｎｃｈｒｏｔｒｏｎ　Ｒａｄｉａｔｉｏｎ　Ｆａｃｉｌｉｔｙで回折データを収集し、ＸＤＳプログラムで処理した。分子置換検索モデルとしてＩｇＧ　Ｆａｂの構造（ＰＤＢ：５ＣＺＸの鎖Ｃ及びＤ）とＯＸ４０の構造（ＰＤＢ：２ＨＥＶの鎖Ｒ）とを用いて、プログラムＰＨＡＳＥＲにより相を解明した。Ｐｈｅｎｉｘ．ｒｅｆｉｎｅグラフィカルインターフェースを用いてＸ線データに対して剛体ＴＬＳ及び拘束リファインメントを実施し、続いて、ＣＯＯＴプログラムで調整し、そしてＰｈｅｎｉｘ．ｒｅｆｉｎｅプログラムでさらにリファインメントを行った。Ｘ線データ収集及びリファインメント統計は、表７にまとめられる。

【０１９８】

【表１０】

表 7. データ収集及びリファインメント統計

データ収集	
ビームライン	BL17U1, SSRF
空間群	P 31 2 1
セル寸法 (Å)	a=183.96 b=183.96 c=79.09
角度 (°)	α=90.00 β=90.00 γ=120.00
分解能 (Å)	159.3-2.55 (2.63-2.55)
合計反射数	988771 (81305)
ユニーク反射数	50306 (4625)
完全性 (%)	99.9 (99.9)
平均冗長性	19.7 (17.6)
Rmerge[a]	0.059 (0.962)
I/シグマ (I)	29.4 (3.5)
ウィルソン B 因子 (Å)	73.9
リファインメント	
分解能 (Å)	60.22-2.55
反射数	50008
rmsd 結合長 (Å)	0.010
rmsd 結合角 (°)	0.856
R_{work}[b] (%)	19.27
R_{free}[c] (%)	21.60
タンパク質の平均 B 因子	97.10
ラマチャンドランプロット (%)	
有利値	96.34
許容値	3.48
外れ値	0.17

括弧内の値は最高分解能シェルを意味する。

[a] $Rmerge=\sum\sum_i|I(h)_i-\langle I(h)\rangle|/\sum\sum_i|I(h)_i|$、式中、$\langle I(h)\rangle$は等価なものの平均強度である。

[b] $R_{work}=\sum|Fo-Fc|/\sum|Fo|$、式中、Fo 及び Fc は、それぞれ、観測及び計算された構造因子振幅である。

[c] $R_{free}=\sum|Fo-Fc|/\sum|Fo|$、観測された反射から合計データの 5%がランダムに選択された試験データセットを用いて計算される。

【０１９９】

実施例８： ＳＰＲによる抗体４４５－３のエピトープ同定

ＯＸ４０及び抗体４４５－３Ｆａｂの共結晶構造によりガイドして、ヒトＯＸ４０タンパク質中の一連の単一突然変異を選択及び発生し、本開示の抗ＯＸ４０抗体の主要エピトープをさらに同定した。部位指向突然変異誘発キット（Ｃａｔ：ＡＰ２３１－１１，ＴｒａｎｓＧｅｎ）を用いてヒトＯＸ４０／ＩｇＧ１融合構築物に単一点突然変異を行った。シーケンシングにより所望の突然変異を検証した。２９３Ｇ細胞へのトランスフェクションによりＯＸ４０突然変異体の発現及び調製を達成し、プロテインＡカラム（Ｃａｔ：１７－５４３８－０２，ＧＥ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）を用いて精製した。

【０２００】
ＢＩＡｃｏｒｅ ８Ｋ（ＧＥ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）を用いて、４４５－３ＦａｂへのＯＸ４０点突然変異体の結合親和性をＳＰＲアッセイにより特徴付けした。簡潔に述べると、ＥＤＣ及びＮＨＳを用いてＣＭ５バイオセンサーチップ（Ｃａｔ：ＢＲ１００５３０，ＧＥ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）上にＯＸ４０突然変異体及び野生型ＯＸ４０を固定した。次いで、１８０秒の接触時間及び６００秒の解離時間を用いて３０μｌ／分でＨＢＳ－ＥＰ＋緩衝液（Ｃａｔ：ＢＲ－１００８－２６，ＧＥ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）中の４４５－３Ｆａｂの段階希釈物をチップ表面上で流動させた。表面プラズモン共鳴シグナルの変化を分析し、１対１ラングミュア結合モデル（ＢＩＡ Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ Ｓｏｆｔｗａｒｅ，ＧＥ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）を用いることにより会合速度（ｋａ）及び解離速度（ｋｄ）を計算した。平衡解離定数（K_D）は、比ｋｄ／ｋａとして計算された。突然変異体のK_Dシフト倍率を突然変異体K_D／ＷＴ K_D比として計算した。ＳＰＲにより決定されたエピトープ同定のプロファイルは、図５及び表８にまとめられる。ＯＸ４０中の残基Ｈ１５３、Ｉ１６５、及びＥ１６７からアラニンへの突然変異は、ＯＸ４０への抗体４４５－３結合を有意に低減し、且つ残基Ｔ１５４及びＤ１７０からアラニンへの突然変異は、ＯＸ４０への抗体４４５－３結合の中程度の低減を有していたことが、結果から示唆された。

【０２０１】
抗体４４５－３とＸ４０の残基Ｈ１５３、Ｔ１５４、Ｉ１６５、ＯＥ１６７、及びＤ１７０との間の詳細な相互作用は、図６に示される。ＯＸ４０上のＨ１５３の側鎖は、相互作用界面上の４４５－３の小さなポケットに取り囲まれ、ｈｅａｖｙＳ３１及びｈｅａｖｙＧ１０２との水素結合並びにｈｅａｖｙＹ１０１とのパイ－パイスタッキングを形成する。Ｅ１６７の側鎖は、ｈｅａｖｙＹ５０及びｈｅａｖｙＮ５２と水素結合を形成し、一方、Ｄ１７０は、ｈｅａｖｙＳ３１及びｈｅａｖｙＫ２８とそれぞれ水素結合及び塩ブリッジを形成し、複合体をさらに安定化させることが可能である。Ｔ１５４とｈｅａｖｙＹ１０５及びＩ１６５とｈｅａｖｙＲ５９のファンデルワールス（ＶＤＷ）相互作用は、ＯＸ４０への抗体４４５－３の高親和性に寄与した。

【０２０２】
結論として、ＯＸ４０の残基Ｈ１５３、Ｉ１６５、及びＥ１６７は、抗体４４５－３と相互作用するための重要な残基として同定された。そのほか、ＯＸ４０のアミノ酸Ｔ１５４及びＤ１７０もまた、抗体４４５－３に対する重要な接触残基である。抗体４４５－３のエピトープは、ＯＸ４０の残基Ｈ１５３、Ｔ１５４、Ｉ１６５、Ｅ１６７、及びＤ１７０であることが、このデータから示唆された。これらのエピトープは、配列

【化３１】
HTLQPASNSSDA**I**C**E**DR**D** (配列番号30)

の中に存在し、重要な接触残基は、下線付き太字で示される。

【０２０３】

【表１１】

表 8. SPR により決定された抗体 445-3 のエピトープ同定

突然 変異体	突然変異体 K_D/WT K_D
H153A	結合は検出されなかった
T154A	8
Q156A	1.9
S161A	1.1
S162A	0.6
I165A	28
E167A	135
D170A	8

有意な影響: 結合は検出されなかったか、又は突然変異体 K_D/WT K_D の値は 10 超であった。中程度の影響: 突然変異体 K_D/WT K_D は 5～10 の値であった。非有意な影響: 突然変異体 K_D/WT K_D の値は 5 未満であった。

【０２０４】

実施例９： 抗ＯＸ４０抗体４４５－３はＯＸ４０－ＯＸ４０Ｌ相互作用をブロックしない。

抗体４４５－３がＯＸ４０－ＯＸ４０Ｌ相互作用に干渉するかを決定するために、細胞ベースフローサイトメトリーアッセイを確立した。このアッセイでは、ネズミＩｇＧ２ａＦｃとのヒトＯＸ４０融合タンパク質（ＯＸ４０－ｍＩｇＧ２ａ）とともに、抗体４４５－３、参照抗体１Ａ７．ｇｒ１、コントロールｈｕＩｇＧ、又は培地単独をプレインキュベートした。次いで、抗体及び融合タンパク質複合体をＯＸ４０Ｌ発現ＨＥＫ２９３細胞に添加した。ＯＸ４０抗体がＯＸ４０－ＯＸ４０Ｌ相互作用に干渉しなければ、ＯＸ４０抗体－ＯＸ４０ ｍＩｇＧ２ａ複合体は、依然として表面ＯＸ４０Ｌに結合するであろうから、この相互作用は、抗マウスＦｃ二次抗体を用いて検出可能である。

【０２０５】

図７に示されるように、抗体４４５－３は、高濃度でさえも、ＯＸ４０ＬへのＯＸ４０の結合を低減しなかったことから、４４５－３は、ＯＸ４０－ＯＸ４０Ｌ相互作用に干渉しないことが示唆される。このことから、４４５－３は、ＯＸ４０Ｌ結合性部位に結合しないか、又はＯＸ４０Ｌ結合を立体障害するのに十分な程度に近づいて結合しないことが示唆される。これとは対照的に、陽性コントロール抗体１Ａ７．ｇｒ１は、図７に示されるようにＯＸ４０ＬへのＯＸ４０結合を完全にブロックする。

【０２０６】

そのほか、４４５－３Ｆａｂとの複合体でのＯＸ４０の共結晶構造を解明し、図８に示されるようにＯＸ４０／ＯＸ４０Ｌ複合体（ＰＤＢコード：２ＨＥＶ）でアライメントした。ＯＸ４０リガンドトリマーは、主に、ＯＸ４０のＣＲＤ１（システインリッチドメイン）、ＣＲＤ２、及び部分的ＣＲＤ３領域を介してＯＸ４０と相互作用し（Ｃｏｍｐａａｎ ａｎｄ Ｈｙｍｏｗｉｔｚ，２００６）、一方、抗体４４５－３は、ＣＲＤ４領域のみを介してＯＸ４０と相互作用する。まとめると、４４５－３抗体及びＯＸ４０Ｌトリマーは、ＯＸ４０のそれぞれ異なる領域に結合し、抗体４４５－３は、ＯＸ４０／ＯＸ４０Ｌ相互作用に干渉しない。この結果は、以上の実施例に記載のエピトープマッピングデー

タに相関する。ＯＸ４０のＣＲＤ４は、アミノ酸１２７～１６７にあり、抗体４４５－３のエピトープは、この領域に部分的にオーバーラップする。ＯＸ４０　ＣＲＤ４の配列（アミノ酸１２７～１６７）は、以下に示されており、４４５－３エピトープの部分的オーバーラップは、下線付き太字で示される。

【化３２】

PCPPGHFSPGDNQACKPWTNCTLAGK**HT**LQPASNSSDA**I**C**E** (配列番号31)

【０２０７】

実施例１０：　抗ＯＸ４０抗体４４５－３のアゴニスティック活性

抗体４４５－３のアゴニスティック機能を調べるために、４４５－３又は１Ａ７．ｇｒ１の存在下又は不在下でＯＸ４０陽性Ｔ細胞系ＨｕＴ７８／ＯＸ４０を人工抗原提示細胞（ＡＰＣ）系（ＨＥＫ２９３／ＯＳ８^{low}－ＦｃγＲＩ）とともに一晩共培養し、Ｔ細胞刺激に対するリードアウトとしてＩＬ－２産生を使用した。ＨＥＫ２９３／ＯＳ８^{low}－ＦｃγＲＩ細胞では、膜結合抗ＣＤ３抗体ＯＫＴ３（ＯＳ８）（米国特許第８，７３５，５５３号明細書に開示される）及びヒトＦｃγＲＩ（ＣＤ６４）をコードする遺伝子は、ＨＥＫ２９３細胞に安定的にコトランスデュースされた。抗ＯＸ４０抗体誘発免疫活性化は、抗体架橋に依存するので（Ｖｏｏ　ｅｔ　ａｌ．，２０１３）、ＨＥＫ２９３／ＯＳ８^{low}－ＦｃγＲＩ上のＦｃγＲＩは、ＯＸ４０及びＦｃγＲＩの両方への抗ＯＸ４０抗体のデュアルエンゲージメントによるＯＸ４０の抗ＯＸ４０抗体媒介架橋の基礎を提供する。図９に示されるように、抗ＯＸ４０抗体４４５－３は、０．０６ｎｇ／ｍＬのＥＣ$_{50}$で用量依存的にＴＣＲシグナリングを増強する効力が高い。参照Ａｂ１Ａ７．ｇｒ１のわずかに弱い活性も観測された。これとは対照的に、コントロールヒトＩｇＧ（１０μｇ／ｍＬ）又はブランクは、ＩＬ－２産生に影響を示さなかった。

【０２０８】

実施例１１：　抗ＯＸ４０抗体４４５－３は混合リンパ球反応（ＭＬＲ）アッセイで免疫反応を促進した

抗体４４５－３がＴ細胞活性化を刺激可能であるかを決定するために、混合リンパ球反応（ＭＬＲ）アッセイを構築した（Ｔｏｕｒｋｏｖａ　ｅｔ　ａｌ．，２００１）。簡潔に述べると、ＧＭ－ＣＳＦ及びＩＬ－４とともに培養してからＬＰＳ刺激を行うことにより、ヒトＰＢＭＣ誘導ＣＤ１４$^{+}$ミエロイド細胞から成熟ＤＣを誘導した。その次に、抗ＯＸ４０　４４５－３抗体（０．１～１０μｇ／ｍｌ）の存在下で、同種異系ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞とともにマイトマイシンＣ処理ＤＣを２日間共培養した。ＭＬＲ反応のリードアウトとして共培養でのＩＬ－２産生をＥＬＩＳＡにより検出した。

【０２０９】

図１０に示されるように、抗体４４５－３は、ＩＬ－２産生を有意に促進したことから、ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞を活性化する４４５－３の能力が示唆される。これとは対照的に、参照抗体１Ａ７．ｇｒ１は、ＭＬＲアッセイで有意に（Ｐ＜０．０５）より弱い活性を示した。

【０２１０】

実施例１２：　抗ＯＸ４０抗体４４５－３はＡＤＣＣ活性を示した

抗体４４５－３がＯＸ４０^{Hi}発現標的細胞を死滅させることができるかを調べるために、乳酸デヒドロゲナーゼ（ＬＤＨ）放出ベースＡＤＣＣアッセイを構成した。ＣＤ１６ｖ１５８（Ｖ１５８対立遺伝子）及びＦｃＲγ遺伝子をＮＫ細胞系ＮＫ９２ＭＩ（ＡＴＣＣ，Ｍａｎａｓｓａｓ　ＶＡ）にコトランスデュースすることにより、ＮＫ９２ＭＩ／ＣＤ１６Ｖ細胞系をエフェクター細胞として発生させた。ＯＸ４０発現Ｔ細胞系ＨｕＴ７８／ＯＸ４０を標的細胞として使用した。等しい数（３×１０^{4}）の標的細胞及びエフェクター細胞を抗ＯＸ４０抗体（０．００４～３μｇ／ｍｌ）又はコントロールＡｂの存在下で５時間共培養した。ＣｙｔｏＴｏｘ　９６　Ｎｏｎ－Ｒａｄｉｏａｃｔｉｖｅ　Ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ　Ａｓｓａｙキット（Ｐｒｏｍｅｇａ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）を用いてＬＤＨ放出により細胞傷害性を評価した。以下に示される式により特異的ライシスを

計算した。

【数１】

$$\%\text{特異的ライシス} = \frac{\text{実験値 - エフェクター自然値 - 標的自然値}}{\text{標的最大値 - 標的自然値}} \times 100$$

【０２１１】

図１１に示されるように、抗体４４５－３は、ＡＤＣＣを介してＯＸ４０^{Hi}標的を用量依存的に死滅させる高い効力を示した（EC_{50}：０．０２７μｇ／ｍＬ）。抗体４４５－３のＡＤＣＣ作用は、１Ａ７．ｇｒｌコントロール抗体のものに類似していた。これとは対照的に、Ｓ２２８Ｐ及びＲ４０９Ｋ突然変異を有するＩｇＧ４　Ｆｃフォーマットの４４５－３（４４５－３－ＩｇＧ４）は、コントロールヒトＩｇＧ又はブランクと比較してなんら有意なＡＤＣＣ作用を示さなかった。結果は、ＩｇＧ４　ＦｃがＡＤＣＣに対して弱い又はサイレントであるという従来の知見と一致する（Ａｎ　Ｚ，ｅｔ　ａｌ．ｍＡｂｓ　２００９）。

【０２１２】

実施例１３：　抗ＯＸ４０抗体４４５－３はｉｎ　ｖｉｔｒｏで優先的にＣＤ４$^{+}$Ｔｒｅｇを枯渇させてＣＤ８$^{+}$Ｔｅｆｆ／Ｔｒｅｇ比を増加させる

いくつかの動物腫瘍モデルでは、抗ＯＸ４０抗体は、腫瘍浸潤ＯＸ４０^{Hi}ＴｒｅｇをＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞対Ｔｒｅｇ比を増加させうることが示されている（Ｂｕｌｌｉａｒｄ　ｅｔ　ａｌ．，２０１４、Ｃａｒｂｏｎｉ　ｅｔ　ａｌ．，２００３、Ｊａｃｑｕｅｍｉｎ　ｅｔ　ａｌ．，２０１５、Ｍａｒａｂｅｌｌｅ　ｅｔ　ａｌ．，２０１３ｂ）。そのため、免疫反応が増強されて腫瘍退縮及び改善された生存がもたらされる。

【０２１３】

ｉｎ　ｖｉｔｒｏ活性化又は腫瘍内ＣＤ４$^{+}$Ｆｏｘｐ３$^{+}$Ｔｒｅｇが他のＴ細胞サブセットよりも優先的にＯＸ４０を発現するという事実を考慮して（Ｌａｉ　ｅｔ　ａｌ．，２０１６、Ｍａｒａｂｅｌｌｅ　ｅｔ　ａｌ．，２０１３ｂ、Ｍｏｎｔｌｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，２０１６、Ｓｏｒｏｏｓｈ　ｅｔ　ａｌ．，２００７、Ｔｉｍｐｅｒｉ　ｅｔ　ａｌ．，２０１６）、ＯＸ４０^{Hi}細胞とくにＴｒｅｇを死滅させる抗体４４５－３の能力を調べるために、ヒトＰＢＭＣベースアッセイを構成した。簡潔に述べると、ＯＸ４０発現の誘導のためにＰＨＡ－Ｌ（１μｇ／ｍＬ）によりＰＢＭＣをあらかじめ１日間活性化し、標的細胞として使用した。次いで、抗ＯＸ４０抗体（０．００１～１０μｇ／ｍＬ）又はプラセボの存在下で等しい数の標的細胞とともにエフェクターＮＫ９２ＭＩ／ＣＤ１６Ｖ細胞（実施例１２に記載の通り、5×10^{4}）を一晩共培養した。フローサイトメトリーにより各Ｔ細胞サブセットのパーセンテージを決定した。図１２Ａ及び１２Ｂに示されるように、抗体４４５－３による処理は、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞のパーセンテージの増加及びＣＤ４$^{+}$Ｆｏｘｐ３$^{+}$Ｔｒｅｇのパーセンテージの減少を用量依存的に誘発した。結果として、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞対Ｔｒｅｇ比は大きく改善された（図１２Ｃ）。１Ａ７．ｇｒ１処理ではより弱い結果が得られた。この結果は、ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞機能をブーストするがＴｒｅｇ媒介免疫寛容を制限することにより抗腫瘍免疫を誘発する４４５－３の治療用途を実証する。

【０２１４】

実施例１４：　抗ＯＸ４０抗体４４５－３はマウス腫瘍モデルで用量依存抗腫瘍活性を発揮する

抗ＯＸ４０抗体４４５－３の効能は、マウス腫瘍モデルで示された。ヒト化ＯＸ４０ノックインマウスの皮下にネズミＭＣ３８結腸腫瘍細胞を植え込んだ（Ｂｉｏｃｙｔｏｇｅｎ，Ｂｅｉｊｉｎｇ　Ｃｈｉｎａ）。腫瘍細胞の植込み後、腫瘍体積を週２回測定し、式：$V = 0.5(a \times b^{2})$（式中、ａ及びｂは、それぞれ、腫瘍の長直径及び短直径であった）を用いてmm^{3}単位で計算した。腫瘍がおおよそ１９０mm^{3}サイズの平均体積に達したとき、マウスをランダムに７群に割り付け、週１回で３週間にわたり４４５－３又

は１Ａ７．ｇｒ１抗体のどちらかで腹腔内注射した。アイソタイプコントロールとしてヒトＩｇＧを投与した。部分退縮（ＰＲ）は、３回連続測定で投与の初日の開始腫瘍体積の５０％未満の腫瘍体積として定義された。腫瘍成長阻害（ＴＧＩ）は、下記式を用いて計算された。

【数２】

$$\%成長阻害 = 100 \times \left(1 - \left(\frac{(治療t)-(治療t0)}{(プラセボt)-(プラセボt0)}\right)\right)$$

治療t = 時間tの治療腫瘍体積
治療t_0 = 時間0の治療腫瘍体積
プラセボt = 時間tのプラセボ腫瘍体積
プラセボt_0 = 時間0のプラセボ腫瘍体積

【０２１５】

４４５－３は、０．４ｍｇ／ｋｇ、２ｍｇ／ｋｇ、及び１０ｍｇ／ｋｇの用量の腹腔内注射として用量依存抗腫瘍効能を有することが、結果から実証された。４４５－３の投与は、５３％（０．４ｍｇ／ｋｇ）、６９％（２ｍｇ／ｋｇ）、及び９４％（１０ｍｇ／ｋｇ）腫瘍成長阻害をもたらし、ベースラインからの０％（０．４ｍｇ／ｋｇ）、１７％（２ｍｇ／ｋｇ）、及び３３％（１０ｍｇ／ｋｇ）部分退縮をもたらした。これとは対照的に、抗体１Ａ７．ｇｒ１による部分退縮は観測されなかった。リガンド非ブロッキング抗体４４５－３は、ＯＸ４０－ＯＸ４０Ｌブロッキング抗体１Ａ７．ｇｒ１よりも抗腫瘍療法に好適であることが、ｉｎ　ｖｉｖｏデータから示唆さる（図１３Ａ及び１３Ｂ、表９）。

【０２１６】

【表１２】

表 9. ネズミ MC38 結腸腫瘍マウスモデルにおける 445-3 及び 1A7.gr1 の効能

治療	QW 用量 (mg/kg)	N	部分退縮率	21 日目の平均腫瘍体積 (mm^3)	21 日目の TGI (%)
445-3	0.4	6	0%	953	53
	2	6	17%	696	69
	10	6	33%	280	94
1A7.gr1	0.4	6	0%	886	57
	2	6	0%	1163	41
	10	6	0%	1030	49

【０２１７】

実施例１５：　抗ＯＸ４０抗体のアミノ酸改変

ＯＸ４０抗体の改善のために、改変に供されるいくつかのアミノ酸を選んだ。親和性を改善するために又はヒト化を増加させるために、アミノ酸変化を行った。適切なアミノ酸改変が行われるようにＰＣＲプライマーセットを設計し、合成し、そして抗ＯＸ４０抗体を修飾するために使用した。たとえば、重鎖でのＫ２８Ｔ及び軽鎖でのＳ２４Ｒの改変は、ＦＡＣＳにより決定されるＥＣ$_{50}$を元の４４５－２抗体の１．７倍に増加させた。重

鎖でのＹ２７Ｇ及び軽鎖でのＳ２４Ｒの改変は、Ｂｉａｃｏｒｅにより決定されＫ$_D$を元の４４５－２抗体の１．７倍に増加させた。これらの変化は、図１４Ａ～１４Ｂにまとめられる。

【０２１８】

実施例１６：　乳癌異種移植マウスモデルでの抗ＯＸ４０抗体とＰＩ３Ｋδ阻害剤との組合せ

ＥＭＴ－６細胞はネズミ乳癌起源である。雌ＢＡＬＢ／ｃマウスにおいて１００μＬＰＢＳ当たり５×１０^{4}ＥＭＴ－６細胞をマウス第２右乳頭で乳房内に植え込んだ。接種後、接種順序に従ってマウスを各群２５匹の動物で４群にランダム化した。

【０２１９】

ＯＸ８６は、国際公開第２０１６／０５７６６７号パンフレットにすでに開示されているラット抗マウスＯＸ４０抗体であり、これは、その免疫原性を低減するために、さらにはマウス試験でそのＦｃ媒介機能を保つために、マウスＩｇＧ２ａ定常領域でさらに工学操作された。ＯＸ８６のＶＨ及びＶＬ領域は、以下に提供される。科学文献ですでに報告されているように、ＯＸ８６は、ＯＸ４０とＯＸ４０リガンドとの相互作用をブロックしないという点で、抗体４４５－３に類似した作用機序を有する（ａｌ－Ｓｈａｍｋｈａｎｉ　Ａｌ，ｅｔ　ａｌ．，Ｅｕｒｏ　Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ（１９９６）２６（８）、１６９５－９，Ｚｈａｎｇ，Ｐ．ｅｔ　ａｌ．Ｃｅｌｌ　Ｒｅｐｏｒｔｓ　２７，３１１７－３１２３）。

【０２２０】

【表１３】

OX86VH	配列番号 32	QVQLKESGPGLVQPSQTLSLTCTVSGFSLTGYNLHWVRQPPGKGLEWMGR MRYDGDTYYNSVLKSRLSISRDTSKNQVFLKMNSLQTDDTAIYYCTRDGRG DSFDYWGQGVMVTVSS
OX86VL	配列番号 33	DIVMTQGALPNPVPSGESASITCRSSQSLVYKDGQTYLNWFLQRPGQSPQLLT YWMSTRASGVSDRFSGSGSGTYFTLKISRVRAEDAGVYYCQQVREYPFTFGS GTKLEIK

【０２２１】

それぞれ、媒体（０．５％ＭＣ）、ＯＸ８６（ネズミ特異的抗ＯＸ４０抗体）、化合物１（ＰＩ３Ｋデルタ阻害剤）、及びＯＸ８６と化合物１との組合せでマウスを治療した。ＯＸ８６は、腹腔内（ｉ．ｐ．）注射により０．４ｍｇ／ｋｇで週１回（ＱＷ）与えられ、化合物１は、経口胃管投与（ｐ．ｏ．）により３０ｍｇ／ｋｇで１日２回（ＢＩＤ）投与された。腫瘍体積は、週２回決定され、腫瘍成長阻害は、以上の実施例１４に記載の式を用いて決定された。

【０２２２】

ＯＸ８６と化合物１との組合せ治療に対するＥＭＴ－６同種同系モデルの反応は、図１５及び表１０に示される。２２日目、単剤治療としてＯＸ８６（０．４ｍｇ／ｋｇ　ＱＷ×４）、化合物１（３０ｍｇ／ｋｇ　ＢＩＤ×２２）、及びＯＸ８６／化合物１の組合せ治療は、それぞれ、７９％、２６％、及び９３％腫瘍成長阻害をもたらした。そのほか、化合物１との組合せのＯＸ８６で治療されたマウスの７６％は、腫瘍フリーであった。ＥＭＴ－６モデルにおけるＯＸ４０抗体と化合物１との組合せ療法の効能が、このことから実証される。毒性は、全治療の過程で観測されなかった。

【０２２３】

【表１４】

表 10. EMT-6 同種同系モデルにおける OX86 及び化合物 1 の組合せ効能

試験品	用量 (mg/kg)	N	腫瘍フリー動物 (%)	22 日目の TGI (%)	22 日目の平均腫瘍体積(mm^3; 平均 ± SEM)	p (*vs* 組合せ群)
媒体	0	15	0	0	1020.0 ± 116.2	0.0000
OX86	0.4	25	40	79	210.5 ± 43.9	0.0136
化合物 1	30	25	4	26	758.1 ± 100.6	0.0000
OX86 + 化合物 1	0.4 + 30	25	76	93	71.7 ± 31.4	N/A[a]

[a] 適用不可

【０２２４】

実施例１７： Ｂ細胞リンパ腫異種移植マウスモデルでの抗ＯＸ４０抗体とＰＩ３Ｋδ阻害剤との組合せ

Ａ２０細胞はＢ細胞リンパ腫起源である。雌ＢＡＬＢ／ｃマウスにおいて１５０μＬＰＢＳ中１×１０^{5}Ａ２０細胞をマウス右側腹部で皮下に植え込んだ。接種後、接種順序に従ってマウスを各群２５匹の動物で４群にランダム化した。媒体（０．５％ＭＣ）、ＯＸ８６（ネズミ特異的抗ＯＸ４０抗体）、化合物１、及びＯＸ８６と化合物１との組合せでマウスを治療した。ＯＸ８６は、腹腔内注射により０．４ｍｇ／ｋｇで週１回与えられ、化合物１は、経口胃管投与により１０ｍｇ／ｋｇで１日２回投与された。腫瘍体積は、週２回決定され、ＴＧＩは、以上に記載のように計算された。

【０２２５】

ＯＸ８６及び化合物１治療に対するＡ２０同種同系モデルの反応は、図１６及び表１１に示される。２６日目、ＯＸ８６（０．４ｍｇ／ｋｇ ＱＷ×４）、化合物１（１０ｍｇ／ｋｇ ＱＤ×２６）、及びＯＸ８６／化合物１の組合せ治療は、それぞれ、９３％、７％、及び９８％腫瘍成長阻害をもたらした。２０００ｍｍ^{3}超の腫瘍体積を有する動物は殺され、残りの動物は、腫瘍成長のさらなるモニタリングのために飼育された。４７日目、単剤としてＯＸ８６は、８０％のマウスで腫瘍フリーをもたらし、ＯＸ８６と化合物１との組合せで治療されたマウスでは、９２％が腫瘍フリーであった。Ａ２０マウスモデルにおける抗ＯＸ４０抗体と化合物１との組合せ療法の効能が、このことから実証される。毒性は、全治療の過程で観測されなかった。

【０２２６】

【表１５】

表 11. A20 同種同系モデルにおける OX86 及び化合物 1 の組合せ効能

試験品	用量 (mg/kg)	N	26 日目の TGI (%)	26 日目の平均腫瘍体積(mm^3; 平均 ± SEM)	47 日目の腫瘍フリー動物(%)
媒体	0	25	0	739.0 ± 99.7	0
OX86	0.4	25	93	53.4 ± 28.7	80
化合物 1	10	24	7	683.9 ± 89.7	0
OX86 + 化合物 1	0.4 + 10	25	98	18.3 ± 10.3	92

【０２２７】

実施例１８： 結腸癌異種移植マウスモデルでの抗ＯＸ４０抗体とＰＩ３Ｋδ阻害剤との組合せ

ＣＴ２６ＷＴ細胞は結腸癌起源である。雌ＢＡＬＢ／ｃマウスにおいて１００μＬ ＰＢＳ中１×１０^{5}ＣＴ２６ＷＴ細胞を右側腹部で皮下に植え込んだ。接種後、接種順序に従ってマウスを４群にランダム化した。マウスは、コントロールとして媒体（０．５％ＭＣ）で治療された。抗体１Ａ７．ｇｒ１（米国特許出願公開第２０１５／０３０７６１７号明細書に開示される配列）は、インハウスでマウスＯＸ４０に結合することが確認された。

【０２２８】

マウスＯＸ４０への抗体１Ａ７．ｇｒ１の結合は、ＥＬＩＳＡにより特徴付けられた。簡潔に述べると、マウスＯＸ４０－Ｈｉｓ（Ｃａｔ：ａｂ２２１０２８，Ａｂｃａｍ）タンパク質を９６ウェルプレートに４℃で一晩コーティングした。ＰＢＳ／０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０で洗浄後、プレートを２時間にわたりＰＢＳ／３％ＢＳＡにより室温でブロックした。続いて、プレートをＰＢＳ／０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０で洗浄し、１Ａ７．ｇｒ１と共に室温で１時間インキュベートした。ＨＲＰ連結抗マウスＩｇＧ抗体（Ｃａｔ：１１５０３５－００８，Ｊａｃｋｓｏｎ ＩｍｍｕｎｏＲｅｓｅａｒｃｈ Ｉｎｃ，Ｐｅｒｏｘｉｄａｓｅ ＡｆｆｉｎｉＰｕｒｅ Ｇｏａｔ Ａｎｔｉ－Ｍｏｕｓｅ ＩｇＧ，Ｆｃγ ｆｒａｇｍｅｎｔ ｓｐｅｃｉｆｉｃ）及び基質（Ｃａｔ：００－４２０１－５６，ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ，ＵＳＡ）を用いて４５０ｎｍの波長で色吸光度シグナルを発生させ、それをプレートリーダー（ＳｐｅｃｔｒａＭａｘ Ｐａｒａｄｉｇｍ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｄｅｖｉｃｅｓ／ＰＨＥＲＡｓｔａｒ，ＢＭＧ ＬＡＢＴＥＣＨ）を用いることにより測定した。EC_{50}値は、ＧｒａｐｈＰａｄ Ｐｒｉｓｍで用量－反応データを４パラメーターロジスティックモデルに当てはめることにより決定された。抗体１Ａ７．ｇｒ１は、０．１１μｇ／ｍＬのＥＣ５０でコーティングマウスＯＸ４０に結合された。この結果は図１８に示される。

【０２２９】

１Ａ７．ｇｒ１抗体は、腹腔内注射により０．４ｍｇ／ｋｇで単独療法として週１回投与された。化合物２Ａは、経口胃管投与により１０ｍｇ／ｋｇで単剤として１日２回投与された。化合物２Ａとの組合せの１Ａ７．ｇｒ１抗体は、単剤として与えられた各治療剤に対して以上に記載されたものと同一の用量で組合せ療法として投与された。腫瘍体積は、週２回決定され、ＴＧＩは、以上に記載のように計算された。

【０２３０】
１Ａ７．ｇｒ１抗体と化合物２Ａとの組合せによる治療に対するＣＴ２６ＷＴ同種同系モデルの反応は、図１７及び表１２に示される。２５日目、１Ａ７．ｇｒ１（２ｍｇ／ｋｇ　ＱＷ×４）、化合物２Ａ（１０ｍｇ／ｋｇ　ＱＤ×２６）、及びそれらの組合せ治療は、それぞれ、７４％、５８％、及び８９％腫瘍成長阻害をもたらした。２０００ｍｍ^{3}超の腫瘍体積を有する動物は　　殺され、残りの動物は、腫瘍成長のさらなるモニタリングのために飼育された。３５日目までに、１Ａ７．ｇｒ１と化合物２Ａとの組合せで治療されたマウスの５４％は、腫瘍フリーであった。ＣＴ２６ＷＴマウスモデルにおける抗ＯＸ４０抗体（１Ａ７．ｇｒ１）と化合物２Ａとの組合せ療法の効能が、このことから実証される。毒性は、全治療の過程で観測されなかった。

【０２３１】
【表１６】

表 12.　CT26WT 同種同系モデルにおける 1A7.gr1 及び化合物 2 の組合せ効能

試験品	用量 (mg/kg)	N	25 日目の TGI (%)	25 日目の平均腫瘍体積(mm^3; 平均± SEM)	35 日目の腫瘍フリー動物 (%)
媒体	0	12	0	2234.1 ± 248.7	0
1A7.gr1	2	35	74	574.4 ± 91.2	17
化合物 2A	10	15	58	941.6 ± 207.8	7
1A7.gr1 + 化合物 2A	2 + 10	35	89	235.9 ± 59.4	54

【０２３２】
参考文献
al－Shamkhani A1，Birkeland ML，Puklavec M，Brown MH，James W，Barclay AN.（1996）OX40 is differentially expressed on activated rat and mouse T cells and is the sole receptor for the OX40 ligand.European Journal of Immunology 26（8）：1695－9.
al－Shamkhani，A.，Birkeland，M.L.，Puklavec，M.，Brown，M.H.，James，W.，and Barclay，A.N.（1996）.OX40 is differentially expressed on activated rat and mouse T cells and is the sole receptor for the OX40 ligand.European journal of immunology 26，1695－1699.
An Z，Forrest G，Moore R，Cukan M，Haytko P，Huang L，Vitelli S，Zhao JZ，Lu P，Hua J，Gibson CR，Harvey BR，Montgomery D，Zaller D，Wang F，Strohl W.（2009）.IgG2m4，an engineered antibody isotype with reduced Fc function.MAbs.1，572－579.

Arch, R. H., and Thompson, C. B. (1998). 4-1BB and Ox40 are members of a tumor necrosis factor (TNF)-nerve growth factor receptor subfamily that bind TNF receptor-associated factors and activate nuclear factor kappaB. Molecular and cellular biology 18, 558-565.
Aspeslagh, S., Postel-Vinay, S., Rusakiewicz, S., Soria, J. C., Zitvogel, L., and Marabelle, A. (2016). Rationale for anti-OX40 cancer immunotherapy. Eur J Cancer 52, 50-66.
Bulliard, Y., Jolicoeur, R., Zhang, J., Dranoff, G., Wilson, N. S., and Brogdon, J. L. (2014). OX40 engagement depletes intratumoral Tregs via activating FcgammaRs, leading to antitumor efficacy. Immunology and cell biology 92, 475-480.
Calderhead, D. M., Buhlmann, J. E., van den Eertwegh, A. J., Claassen, E., Noelle, R. J., and Fell, H. P. (1993). Cloning of mouse Ox40: a T cell activation marker that may mediate T-B cell interactions. J Immunol 151, 5261-5271.
Carboni, S., Aboul-Enein, F., Waltzinger, C., Killeen, N., Lassmann, H., and Pena-Rossi, C. (2003). CD134 plays a crucial role in the pathogenesis of EAE and is upregulated in the CNS of patients with multiple sclerosis. Journal of neuroimmunology 145, 1-11.
Compaan, D. M., andHymowitz, S. G. (2006). The crystal structure of the costimulatory OX40-OX40L complex. Structure 14, 1321-1330.
Croft, M. (2010). Control of immunity by the TNFR-related molecule OX40 (CD134). Annual review of immunology 28, 57-78.
Croft, M., So, T., Duan, W., and Soroosh, P. (2009). The significance of OX40 and OX40L to T-cell biology and immune disease. Immunological reviews 229, 173-191.
Curti, B. D., Kovacsovics-Bankowski, M., Morris, N., Walker, E., Chisholm, L., Floyd, K., Walker, J., Gonzalez, I., Meeuwsen, T., Fox, B. A., et al. (2013). OX40 is a potent immune-stimulating target in late-stage cancer patients. Cancer research 73, 7189-7198.
Durkop, H., Latza, U., Himmelreich, P., and Stein, H. (1995). Expression of theHuman OX40 (hOX40) antigen in normal and neoplastic tissues. British journal ofHaematology 91, 927-931.

Gough, M. J., and Weinberg, A. D. (2009). OX40 (CD134) and OX40L. Advances in experimental medicine and biology 647, 94-107.
Gramaglia, I., Weinberg, A. D., Lemon, M., and Croft, M. (1998). Ox-40 ligand: a potent costimulatory molecule for sustaining primary CD4 T cell responses. J Immunol 161, 6510-6517.
Guo, Z., Cheng, D., Xia, Z., Luan, M., Wu, L., Wang, G., and Zhang, S. (2013). Combined TIM-3 blockade and CD137 activation affords the long-term protection in a murine model of ovarian cancer. Journal of translational medicine 11, 215.
Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. Science 299, 1057-1061.
Huddleston, C. A., Weinberg, A. D., and Parker, D. C. (2006). OX40 (CD134) engagement drives differentiation of CD4+ T cells to effector cells. European journal of immunology 36, 1093-1103.
Ito, T., Amakawa, R., Inaba, M., Hori, T., Ota, M., Nakamura, K., Takebayashi, M., Miyaji, M., Yoshimura, T., Inaba, K., and Fukuhara, S. (2004). Plasmacytoid dendritic cells regulate Th cell responses through OX40 ligand and type I IFNs. J Immunol 172, 4253-4259.
Ito, T., Wang, Y. H., Duramad, O., Hanabuchi, S., Perng, O. A., Gilliet, M., Qin, F. X., and Liu, Y. J. (2006). OX40 ligand shuts down IL-10-producing regulatory T cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103, 13138-13143.
Jacquemin, C., Schmitt, N., Contin-Bordes, C., Liu, Y., Narayanan, P., Seneschal, J., Maurouard, T., Dougall, D., Davizon, E. S., Dumortier, H., et al. (2015). OX40 Ligand Contributes toHuman Lupus Pathogenesis by Promoting T FollicularHelper Response. Immunity 42, 1159-1170.
Kjaergaard, J., Tanaka, J., Kim, J. A., Rothchild, K., Weinberg, A., and Shu, S. (2000). Therapeutic efficacy of OX-40 receptor antibody depends on tumor immunogenicity and anatomic site of tumor growth. Cancer research 60, 5514-5521.
Ladanyi, A., Somlai, B., Gilde, K., Fejos, Z., Gaudi, I., and Timar, J. (2004). T-cell activa

tion marker expression on tumor-infiltrating lymphocytes as prognostic factor in cutaneous malignant melanoma. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 10, 521-530.
Lai, C., August, S., Albibas, A., Behar, R., Cho, S. Y., Polak, M. E., Theaker, J., MacLeod, A. S., French, R. R., Glennie, M. J., et al. (2016). OX40+ Regulatory T Cells in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Suppress Effector T-Cell Responses and Associate with Metastatic Potential. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 22, 4236-4248.
Marabelle, A., Kohrt, H., and Levy, R. (2013a). Intratumoral anti-CTLA-4 therapy: enhancing efficacy while avoiding toxicity. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 19, 5261-5263.
Marabelle, A., Kohrt, H., Sagiv-Barfi, I., Ajami, B., Axtell, R. C., Zhou, G., Rajapaksa, R., Green, M. R., Torchia, J., Brody, J., et al. (2013b). Depleting tumor-specific Tregs at a single site eradicates disseminated tumors. The Journal of clinical investigation 123, 2447-2463.
Montler, R., Bell, R. B., Thalhofer, C., Leidner, R., Feng, Z., Fox, B. A., Cheng, A. C., Bui, T. G., Tucker, C., Hoen, H., and Weinberg, A. (2016). OX40, PD-1 and CTLA-4 are selectively expressed on tumor-infiltrating T cells inHead and neck cancer. Clinical & translational immunology 5, e70.
Morris, N. P., Peters, C., Montler, R., Hu, H. M., Curti, B. D., Urba, W. J., and Weinberg, A. D. (2007). Development and characterization of recombinantHuman Fc:OX40L fusion protein linked via a coiled-coil trimerization domain. Molecular immunology 44, 3112-3121.
Ohshima, Y., Tanaka, Y., Tozawa, H., Takahashi, Y., Maliszewski, C., and Delespesse, G. (1997). Expression and function of OX40 ligand onHuman dendritic cells. J Immunol 159, 3838-3848.
Petty, J. K., He, K., Corless, C. L., Vetto, J. T., and Weinberg, A. D. (2002). Survival inHuman colorectal cancer correlates with expr

ession of the T-cell costimulatory molecule OX-40 (CD134). American journal of surgery 183, 512-518.
Redmond, W. L., and Weinberg, A. D. (2007). Targeting OX40 and OX40L for the treatment of autoimmunity and cancer. Critical reviews in immunology 27, 415-436.
Rogers, P. R., Song, J., Gramaglia, I., Killeen, N., and Croft, M. (2001). OX40 promotes Bcl-xL and Bcl-2 expression and is essential for long-term survival of CD4 T cells. Immunity 15, 445-455.
Ruby, C. E., and Weinberg, A. D. (2009). OX40-enhanced tumor rejection and effector T cell differentiation decreases with age. J Immunol 182, 1481-1489.
Sarff, M., Edwards, D., Dhungel, B., Wegmann, K. W., Corless, C., Weinberg, A. D., and Vetto, J. T. (2008). OX40 (CD134) expression in sentinel lymph nodes correlates with prognostic features of primary melanomas. American journal of surgery 195, 621-625; discussion 625.
Sato, T., Ishii, N., Murata, K., Kikuchi, K., Nakagawa, S., Ndhlovu, L. C., and Sugamura, K. (2002). Consequences of OX40-OX40 ligand interactions in langerhans cell function: enhanced contactHypersensitivity responses in OX40L-transgenic mice. European journal of immunology 32, 3326-3335.
Smyth, M. J., Ngiow, S. F., and Teng, M. W. (2014). Targeting regulatory T cells in tumor immunotherapy. Immunology and cell biology 92, 473-474.
Song, A., Tang, X., Harms, K. M., and Croft, M. (2005a). OX40 and Bcl-xL promote the persistence of CD8 T cells to recall tumor-associated antigen. J Immunol 175, 3534-3541.
Song, J., So, T., Cheng, M., Tang, X., and Croft, M. (2005b). Sustained survivin expression from OX40 costimulatory signals drives T cell clonal expansion. Immunity 22, 621-631.
Song, J., So, T., and Croft, M. (2008). Activation of NF-kappaB1 by OX40 contributes to antigen-driven T cell expansion and survival. J Immunol 180, 7240-7248.
Soroosh, P., Ine, S., Sugamura, K., and Ishii, N. (2007). Differential requirements for OX40 signals on generation of effector and central memory CD4+ T cells. J Immunol 17

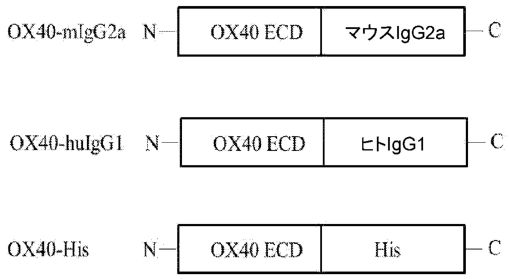
9, 5014-5023.
St Rose, M.C., Taylor, R.A., Bandyopadhyay, S., Qui, H.Z., Hagymasi, A.T., Vella, A.T., and Adler, A.J. (2013). CD134/CD137 dual costimulation-elicited IFN-gamma maximizes effector T-cell function but limits Treg expansion. Immunology and cell biology 91, 173-183.
Stuber, E., Neurath, M., Calderhead, D., Fell, H.P., and Strober, W. (1995). Cross-linking of OX40 ligand, a member of the TNF/NGF cytokine family, induces proliferation and differentiation in murine splenic B cells. Immunity 2, 507-521.
Szypowska, A., Stelmaszczyk-Emmel, A., Demkow, U., and Luczynski, W. (2014). High expression of OX40 (CD134) and 4-1BB (CD137) molecules on CD4 (+) CD25 (high) cells in children with type 1 diabetes. Advances in medical sciences 59, 39-43.
Timperi, E., Pacella, I., Schinzari, V., Focaccetti, C., Sacco, L., Farelli, F., Caronna, R., Del Bene, G., Longo, F., Ciardi, A., et al. (2016). Regulatory T cells with multiple suppressive and potentially pro-tumor activities accumulate inHuman colorectal cancer. Oncoimmunology 5, e1175800.
Tourkova, I.L., Yurkovetsky, Z.R., Shurin, M.R., and Shurin, G.V. (2001). Mechanisms of dendritic cell-induced T cell proliferation in the primary MLR assay. Immunology letters 78, 75-82.
Vetto, J.T., Lum, S., Morris, A., Sicotte, M., Davis, J., Lemon, M., and Weinberg, A. (1997). Presence of the T-cell activation marker OX-40 on tumor infiltrating lymphocytes and draining lymph node cells from patients with melanoma andHead and neck cancers. American journal of surgery 174, 258-265.
Voo, K.S., Bover, L., Harline, M.L., Vien, L.T., Facchinetti, V., Arima, K., Kwak, L.W., and Liu, Y.J. (2013). Antibodies targetingHuman OX40 expand effector T cells and block inducible and natural regulatory T cell function. J Immunol 191, 3641-3650.
Weinberg, A.D., Rivera, M.M., Prell, R., Morris, A., Ramstad, T., Vetto, J.T., Urba, W.J., Alvord, G., Bunce, C., and Shields, J. (2000). Engagement of the OX-40 receptor in vivo enh

ances antitumor immunity. J Immunol 164, 2160-2169.
Weinberg, A. D., Wegmann, K. W., Funatake, C., and Whitham, R. H. (1999). Blocking OX-40/OX-40 ligand interaction in vitro and in vivo leads to decreased T cell function and amelioration of experimental allergic encephalomyelitis. J Immunol 162, 1818-1826.
Willoughby, J., Griffiths, J., Tews, I., and Cragg, M. S. (2017). OX40: Structure and function-What questions remain? Molecular immunology 83, 13-22.
Zander, R. A., Obeng-Adjei, N., Guthmiller, J. J., Kulu, D. I., Li, J., Ongoiba, A., Traore, B., Crompton, P. D., and Butler, N. S. (2015). PD-1 Co-inhibitory and OX40 Co-stimulatory Crosstalk RegulatesHelper T Cell Differentiation and Anti-PlasmodiumHumoral Immunity. CellHost & microbe 17, 628-641.
Zhang, T., Lemoi, B. A., and Sentman, C. L. (2005). Chimeric NK-receptor-bearing T cells mediate antitumor immunotherapy. Blood 106, 1544-1551.
Zhang, P., TuH. G., Wei. J., Chaparro-Riggers J., Salek-Ardakani S., Yeung Y. A. (2019) Ligand-Blocking and Membrane-Proximal Domain Targeting Anti-OX40 Antibodies Mediate Potent T Cell-Stimulatory and Anti-Tumor Activity. Cell Reports 27, 3117-3123.

【図面】

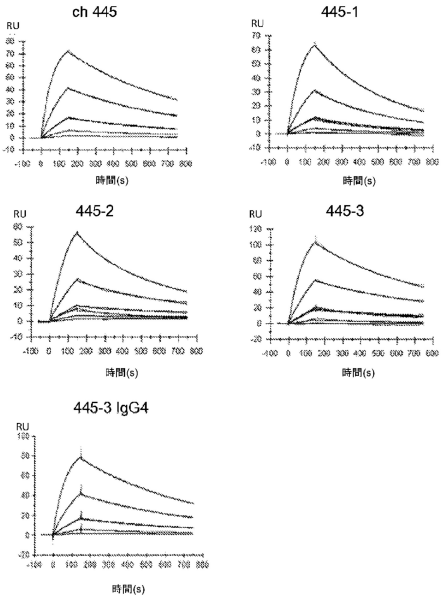
【図１】

図1



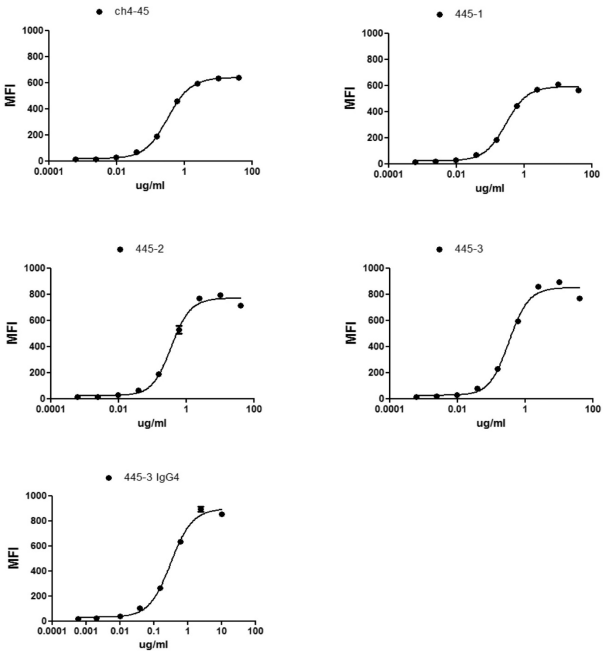
【図２】

図2



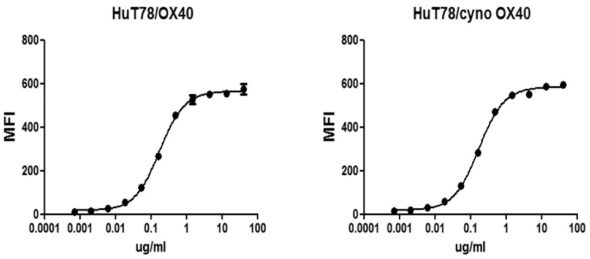
【図３】

図3



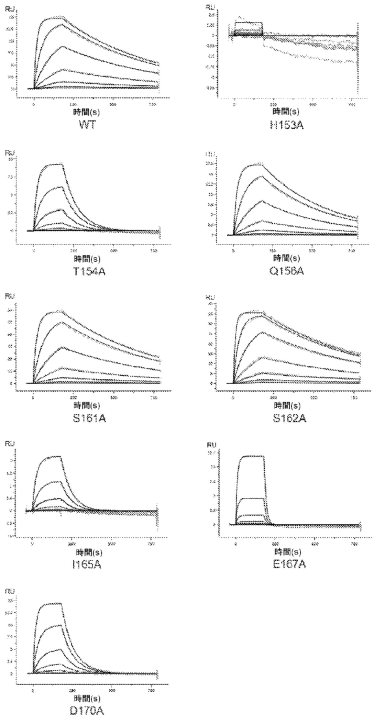
【図４】

図4



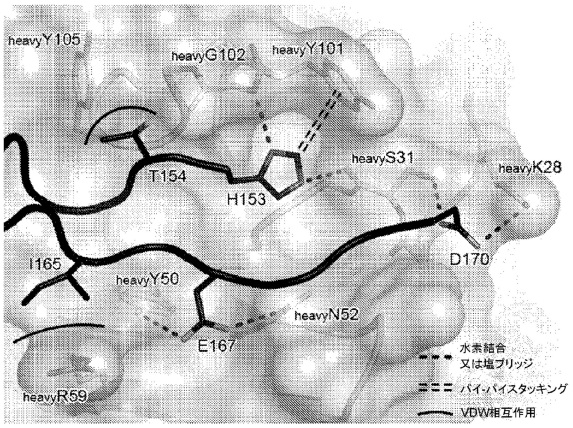
【図５】

図5



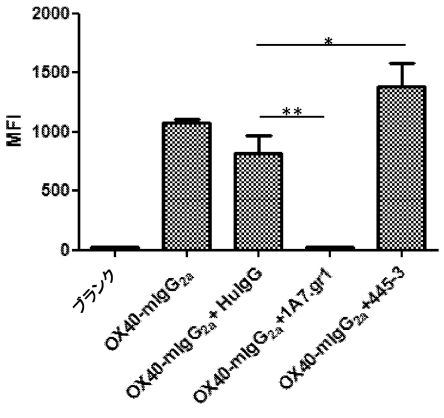
【図６】

図6



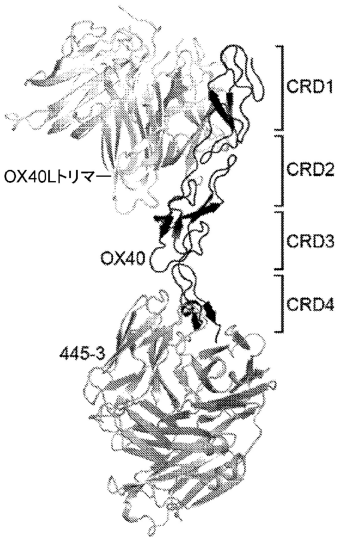
【図７】

図7



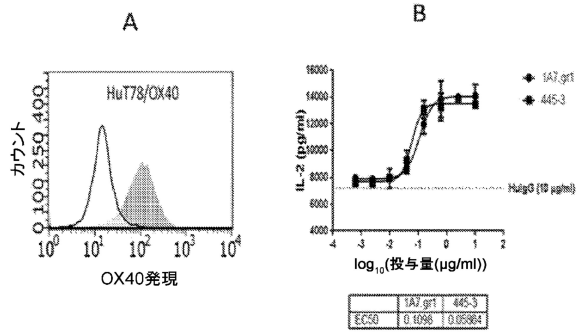
【図８】

図8



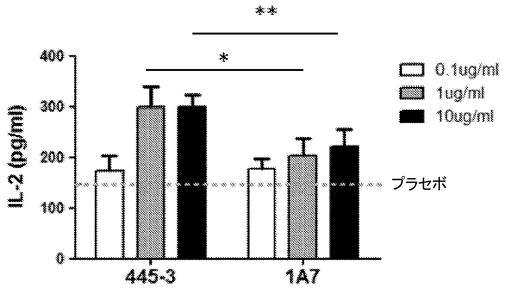
【図９】

図 9A-B



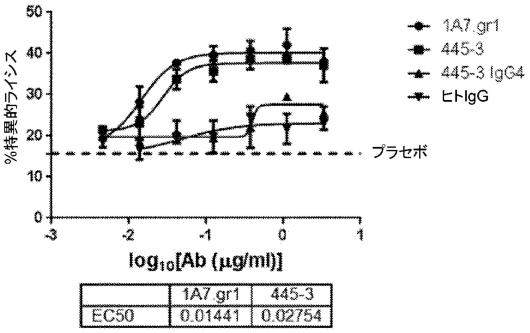
【図１０】

図 10



【図１１】

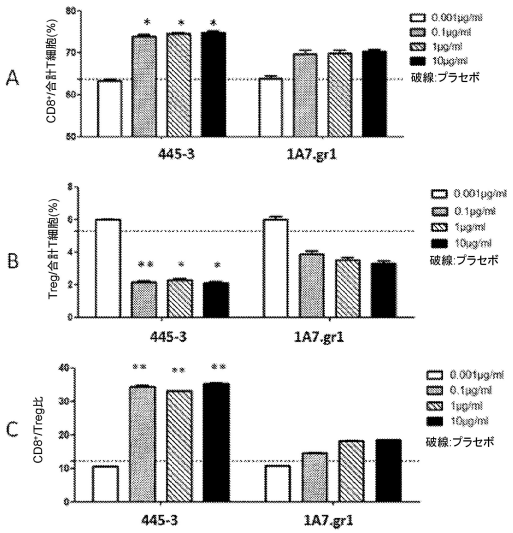
図 11



	1A7.gr1	445-3
EC50	0.01441	0.02754

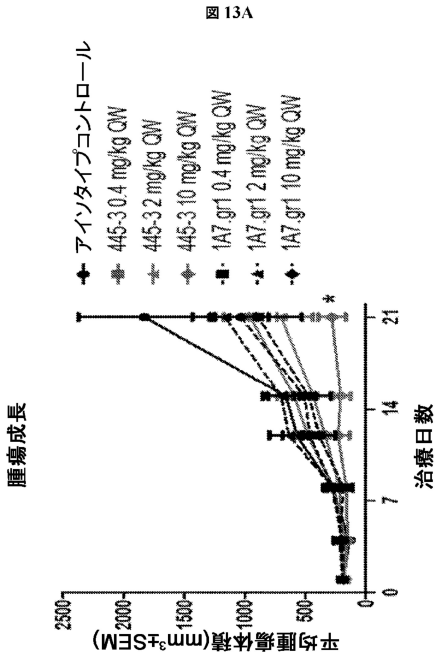
【図１２】

図 12A-12C



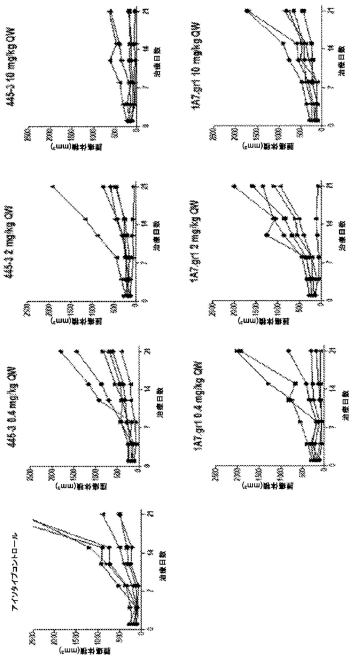
【図１３Ａ】

図 13A



【図１３Ｂ】

図 13B



【図１４Ａ】

図 14A

変異		軽鎖			変異及び修飾のコドンカスタムセクション	FACS		Biacore		
ID	CDR/FR	ID	CDR/FR	Ab ID	EC50(ng/ml)	ヘック(MFI)	ka ($M^{-1}s^{-1}$)	kd (s^{-1})	Ko (M)
445-VH	-	445-VL	-	445-1	336	500	2.37E+05	3.80E-03	1.60E-08
445-VH-M4R	FR2	445-VL	-	445-2(M4R)-1 (VH:CM4R)変異箇所及び変異を有するmAb 445-1)	353	480	2.30E+05	3.36E-03	1.55E-08
445-VH	-	445-VL-S24G	CDR1	445-2-1(S24G) (VL:CS24G)変異箇所及び変異を有するmAb 445-1)	307	470	2.22E+05	3.60E-03	1.62E-08
445-VH	-	445-VL-S10T/E8D/D70E	FR1/FR3	445-2-2(S10T/E8D/D70D) (VL:S10T、E8D、及びD70E)変異箇所及び変異を有するmAb 445-1)	280	510	2.28E+05	3.40E-03	1.49E-08

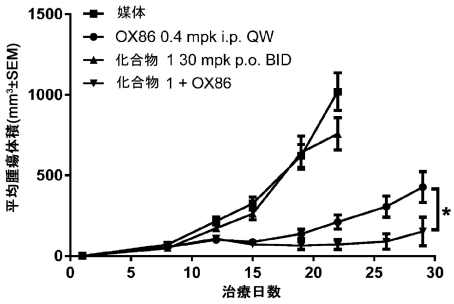
【図１４Ｂ】

図 14B

変異		軽鎖			変異及び修飾のコドンカスタムセクション	FACS		Biacore		
ID	CDR/FR	ID	CDR/FR	Ab ID	EC50(ng/ml)	ヘック(MFI)	ka ($M^{-1}s^{-1}$)	kd (s^{-1})	Ko (M)
445-2VH	-	445-2VL	-	445-2	397	760	2.06E+05	2.64E-03	1.28E-08
445-2VH-Q62E/Q65K	CDR2	445-2VL-S24R	CDR1	445-2(Q62E/Q65K)-2(S24R) (VH:Q62E及びQ65K)変異箇所及び(VL:S24R)変異箇所を有するmAb 445-2)	318	790	1.87E+05	2.32E-03	1.24E-08
445-2VH-Q62E	CDR2	445-2VL-S24R	CDR1	445-2(Q62E)-2(S24R) (VH:Q62E)変異箇所及び(VL:S24R)変異箇所を有するmAb 445-2)	363	760	1.94E+05	2.27E-03	1.17E-08
445-2VH-K28T	FR1	445-2VL-S24R	CDR1	445-2(K28T)-2(S24R) (VH:K28T)変異箇所及び(VL:S24R)変異箇所を有するmAb 445-2)	660	750	4.44E+05	5.74E-03	1.29E-08
445-2VH-Y27G	FR1	445-2VL-S24R	CDR1	445-2(Y27G)-2(S24R) (VH:Y27G)変異箇所及び(VL:S24R)変異箇所を有するmAb 445-2)	755	630	6.26E+04	1.35E-03	2.15E-08
445-2VH-T30S	FR1	445-2VL-S24R	CDR1	445-2(T30S)-2(S24R) (VH:T30S)変異箇所及び(VL:S24R)変異箇所を有するmAb 445-2)	405	800	2.91E+05	3.81E-03	1.31E-08
445-3VH	-	445-3VL	-	445-3	462	990	1.78E+05	1.48E-03	8.31E-09
445-3VH-A61N-K28R	CDR2/FR1	445-3VL	-	445-3(A61N-K28R)-3 (A61N及びK28R)変異箇所を有するmAb 445-2VH及び(445-3VL)	369	1080	1.97E+05	1.13E-03	7.33E-09
445-3VH-A61N-K63R	CDR2	445-3VL	-	445-3(A61N-K63R)-3 (A61N及びK63R)変異箇所を有するmAb 445-2VH及び(445-3VL)	483	1100	1.61E+05	1.53E-03	9.63E-09
445-3VH	-	445-3VL-G41D-K42S-S24R-K45R	FR2/CDR1/CDR3	445-3-2(G41D-K42S-S24R-K45R) (445-3VHまたはG41D、K42S、S24R、及びK45R)変異箇所を有するmAb 445-2VL)	337	1050	2.12E+05	1.68E-03	7.90E-09

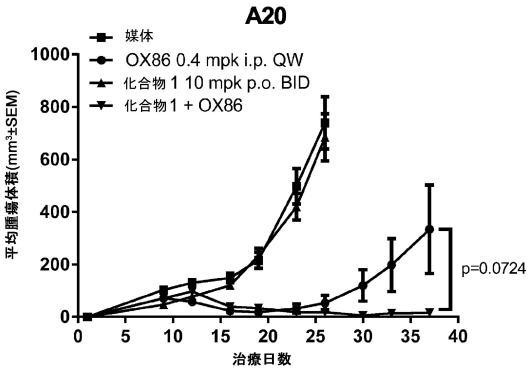
【図１５】

図15



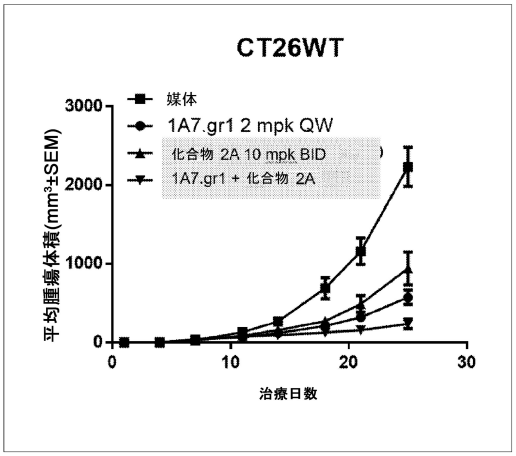
【図１６】

図16



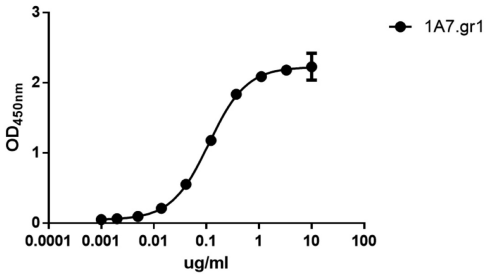
【図１７】

図17



【図１８】

図18



	1A7.gr1
EC50 (ug/ml)	0.11

【配列表】

<u>20235032300000001.app</u>

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2020/130103

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/28(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K; A61K; A61P

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS,VEN,STN,NCBI,ISI web of science,pubmed,cnki,wanfangdata:seq 3-28, Beigene, Liu Ye, Li Jing, Song Xiaomin, Jiang Beibei, OX40, ACT35, CD134, TNFRSF4, anti-OX40, OX86, competitive, non-competitive, OX40L, PI3K delta, PI3K, inhibitor, antibody, antibodies, A20.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PY	WO 2019223733 A1 (BEIGENE, LTD. et al.) 28 November 2019 (2019-11-28) Claims 1-31, description, Table 1, Table 2, Table 3	2-3
X	PACHTER, J.A.et al. "the dual PI3K-δ, γ inhibitor Duvelisib stimulates anti-tumor immunity and enhances efficacy of immune checkpoint and co-stimulatory antibodies in a B cell lymphoma model" *BLOOD*, Vol. 130, No. Supplement 1, 07 December 2017 (2017-12-07), abstract	1, 4-16
Y	PACHTER, J.A.et al. "the dual PI3K-δ, γ inhibitor Duvelisib stimulates anti-tumor immunity and enhances efficacy of immune checkpoint and co-stimulatory antibodies in a B cell lymphoma model" *BLOOD*, Vol. 130, No. Supplement 1, 07 December 2017 (2017-12-07), abstract	2-3
X	PACHTER, J.A.et al. "Synergistic efficacy of duvelisib with checkpoint or co-stimulatory antibodies in a B cell lymphoma model: advantages of dual inhibition of PI3K-δ and PI3K-γ" *The 33rd Annual meeting of the society for immunotherapy of cancer*, 09 November 2018 (2018-11-09), the whole document	1, 4-16

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
08 January 2021	**27 January 2021**
Name and mailing address of the ISA/CN **National Intellectual Property Administration, PRC** **6, Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing** **100088** **China** Facsimile No. **(86-10)62019451**	Authorized officer **LUO,Yang** Telephone No. **86-(10)-53961959**

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2020/130103

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PACHTER, J.A.et al. "Synergistic efficacy of duvelisib with checkpoint or co-stimulatory antibodies in a B cell lymphoma model: advantages of dual inhibition of PI3K-δ and PI3K-γ" *The 33rd Annual meeting of the society for immunotherapy of cancer,* 09 November 2018 (2018-11-09), the whole document	2-3
X	CN 106103486 A (F. HOFFMAN-LA ROCHE AG) 09 November 2016 (2016-11-09) Claims 1-74, description, paragraphs 159, 468	1, 4-16
Y	CN 106103486 A (F. HOFFMAN-LA ROCHE AG) 09 November 2016 (2016-11-09) Claims 1-74, description, paragraphs 159, 468	2-3
A	ZHANG, P.et al. "Ligand-blocking and membrane-proximal domain targeting anti-OX40 antibodies mediated potent T cell-stimulatory and anti-Tumor activity" *Cell Reports,* Vol. 27, 11 June 2019 (2019-06-11), pages 3117-3123	1-16
A	WO 2016057667 A1 (MEDIMMUNE, LLC) 14 April 2016 (2016-04-14) the whole document	1-16

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2020/130103

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

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

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2020/130103

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

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

1. ☑ Claims Nos.: **1-16**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] Claims 1-16 relate to a method of cancer treatment and therefore do not warrant an international search according to the criteria set out in PCT Rule 39.1(iv). An international search is still carried out on the basis of the composition in the manufacture of a medicament for treating cancer.

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2020/130103

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2019223733	A1	28 November 2019	TW	202016133	A	01 May 2020
CN	106103486	A	09 November 2016	TW	I680985	B	01 January 2020
				TW	201620937	A	16 June 2016
				EP	3126394	B1	30 October 2019
				JP	2017514461	A	08 June 2017
				AU	2015241037	A1	13 October 2016
				UA	121112	C2	10 April 2020
				PE	20161571	A1	07 February 2017
				SG	11201607969X	A	28 October 2016
				SI	3126394	T1	31 January 2020
				DK	3126394	T3	13 January 2020
				HU	E046767	T2	30 March 2020
				LT	3126394	T	27 January 2020
				AU	2015241037	A9	03 November 2016
				EA	201691974	A1	28 April 2017
				WO	2015153513	A8	13 October 2016
				BR	112016022658	A2	17 October 2017
				ES	2763898	T3	01 June 2020
				CL	2016002462	A1	23 June 2017
				CA	2943262	A1	08 October 2015
				RS	59738	B1	28 February 2020
				HR	P20192285	T1	06 March 2020
				PL	3126394	T3	18 May 2020
				EP	3632934	A1	08 April 2020
				EP	3126394	A1	08 February 2017
				PT	3126394	T	19 December 2019
				MX	2016012781	A	14 December 2016
				CN	106103486	B	21 April 2020
				JP	6637439	B2	29 January 2020
				JP	2020072678	A	14 May 2020
				PH	12016501894	A1	09 January 2017
				IL	247898	D0	30 November 2016
				WO	2015153513	A1	08 October 2015
				CR	20160500	A	14 December 2016
				KR	20160145624	A	20 December 2016
WO	2016057667	A1	14 April 2016	US	2018072808	A1	15 March 2018
				CA	2963798	A1	14 April 2016
				BR	112017007170	A2	19 December 2017
				US	2016137740	A1	19 May 2016
				SG	11201702826X	A	30 May 2017
				CN	107074953	A	18 August 2017
				CL	2017000885	A1	15 December 2017
				EP	3204422	A4	15 August 2018
				MX	2017004715	A	19 June 2017
				GB	201517855	D0	25 November 2015
				IL	251537	D0	29 May 2017
				EP	3204422	A1	16 August 2017
				US	2019169303	A1	06 June 2019
				KR	20170064550	A	09 June 2017
				RU	2017115662	A	13 November 2018

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2020/130103

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
		US	10150815	B2	11 December 2018
		AU	2015328090	A1	27 April 2017
		TW	201619200	A	01 June 2016
		US	9738723	B2	22 August 2017
		RU	2017115662	A3	20 May 2019
		AR	102239	A1	15 February 2017
		GB	2536324	A	14 September 2016
		RU	2709742	C2	19 December 2019
		JP	2017532037	A	02 November 2017

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
A61P 35/02 (2006.01)		A61K	39/395	N	
A61K 31/52 (2006.01)		A61P	35/02		
A61K 31/519 (2006.01)		A61K	31/52		
A61K 31/4985 (2006.01)		A61K	31/519		
A61K 31/5377 (2006.01)		A61K	31/4985		
C12N 15/13 (2006.01)		A61P	43/00	111	
C12N 9/99 (2006.01)		A61K	31/5377		
C07K 16/28 (2006.01)		C12N	15/13	ZNA	
		C12N	9/99		
		C07K	16/28		

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

（特許庁注：以下のものは登録商標）

１．ＴＷＥＥＮ

、チャンピン、チョングアンクン ライフ サイエンス パーク、サイエンス パーク ロード、ナンバー ３０

(72)発明者 リ、ジン

中華人民共和国 ベイジン １０２２０６、チャンピン、チョングアンクン ライフ サイエンス パーク、サイエンス パーク ロード、ナンバー ３０

(72)発明者 ソン、シャオミン

中華人民共和国 ベイジン １０２２０６、チャンピン、チョングアンクン ライフ サイエンス パーク、サイエンス パーク ロード、ナンバー ３０

Ｆターム（参考） 4C084 AA19 MA02 NA05 ZB09 ZB26 ZB27 ZC20 ZC41 ZC75
4C085 AA13 AA14 BB31 CC23 EE03
4C086 AA01 AA02 CB05 CB06 CB07 MA02 MA04 NA05 ZB09 ZB26
ZB27 ZC20 ZC41 ZC75
4H045 AA30 BA10 DA76 EA22 EA28 FA74