

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7085709号

(P7085709)

(45)発行日 令和4年6月17日(2022.6.17)

(24)登録日 令和4年6月9日(2022.6.9)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C 1 2 N 15/13

Z N A

C 0 7 K 16/28 (2006.01)

C 0 7 K 16/28

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006.01)

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 1/21

請求項の数 20 (全91頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-518147(P2019-518147)

(86)(22)出願日 平成29年6月20日(2017.6.20)

(65)公表番号 特表2019-526273(P2019-526273
A)

(43)公表日 令和1年9月19日(2019.9.19)

(86)国際出願番号 PCT/EP2017/065073

(87)国際公開番号 WO2017/220569

(87)国際公開日 平成29年12月28日(2017.12.28)

審査請求日 令和2年6月12日(2020.6.12)

(31)優先権主張番号 62/352,482

(32)優先日 平成28年6月20日(2016.6.20)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 521490915

エフ・スター セラピューティクス リミ
テッドイギリス国 ケンブリッジ ケンブリッジ
シャー シーピー 2 2 3 エーティー パ
ブラハム リサーチ キャンパス エッデ
ヴァ ビー 9 2 0

(74)代理人 100079108

弁理士 稲葉 良幸

(74)代理人 100109346

弁理士 大貫 敏史

(74)代理人 100117189

弁理士 江口 昭彦

(74)代理人 100134120

弁理士 内藤 和彦

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 PD - L 1 及び L A G - 3 に結合する結合分子

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

プログラム死リガンド 1 (PD-L1) 及びリンパ球活性化遺伝子 3 (LAG-3) と結合する抗体分子であって、

(i) PD - L 1 に対する、C D R に基づいた抗原結合部位；及び

(ii) 当該抗体分子の C H 3 ドメインに位置する L A G - 3 抗原結合部位

を含み、前記 L A G - 3 結合部位が、アミノ酸配列 W D E P W G E D (配列番号 1) 及び P Y D R W V W P D E (配列番号 3) を含み、アミノ酸配列 W D E P W G E D が、前記 C H 3 ドメインの A B 構造ループに位置し、アミノ酸配列 P Y D R W V W P D E が、前記 C H 3 ドメインの E F 構造ループに位置する、抗体分子。

【請求項 2】

前記 L A G - 3 抗原結合部位が、前記 C H 3 ドメインの C D ループに以下の配列：

(i) S N G Q P E N N Y (配列番号 2、8、及び 18)；

(ii) S N G Q P E D N Y (配列番号 13)；

(iii) S N G Y P E I E F (配列番号 23)；

(iv) S N G I P E W N Y (配列番号 28)；

(v) S N G Y A E Y N Y (配列番号 33)；

(vi) S N G Y K E E N Y (配列番号 38)；

(vii) S N G V P E L N V (配列番号 43)；又は

(viii) S N G Y Q E D N Y (配列番号 48)；

の 1 つをさらに含む、請求項 1 に記載の抗体分子。

【請求項 3】

前記 L A G - 3 抗原結合部位が、前記 C H 3 ドメインの C D ループ中に、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 2 に記載の抗体分子。

【請求項 4】

免疫グロブリン G 1 (I g G 1) 分子である、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の抗体分子。

【請求項 5】

配列番号 5、10、15、20、25、30、35、40、45、又は 50 に示される C H 3 ドメインを含む、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の抗体分子。

10

【請求項 6】

配列番号 5 に示される前記 C H 3 ドメインを含む、請求項 5 に記載の抗体分子。

【請求項 7】

C H 2 ドメインを含み、前記 C H 2 ドメインが、配列番号 53 又は配列番号 54 に示される配列を有する、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の抗体分子。

【請求項 8】

配列番号 6、7、11、12、16、17、21、22、26、27、31、32、36、37、41、42、46、47、51、又は 52 に示される配列を含む、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の抗体分子。

【請求項 9】

配列番号 6 又は 7 に示される配列を含む、請求項 8 に記載の抗体分子。

20

【請求項 10】

配列番号 86 から 91 に示される前記 C D R を含む、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の抗体分子。

【請求項 11】

配列番号 92 及び 93 に示される V H 及び / 又は V L ドメインを含む、請求項 10 に記載の抗体分子。

【請求項 12】

配列番号 94 から 113 のいずれか 1 つに示される重鎖配列を含む、請求項 10 又は 11 に記載の抗体分子。

30

【請求項 13】

配列番号 94 又は 95 に示される重鎖配列を含む、請求項 12 に記載の抗体分子。

【請求項 14】

配列番号 116 に示される軽鎖配列を含む、請求項 10 から 13 のいずれか一項に記載の抗体分子。

【請求項 15】

当該抗体分子が、配列番号 94 に示される重鎖配列、及び配列番号 116 に示される軽鎖配列を含む、請求項 13 又は 14 に記載の抗体分子。

【請求項 16】

請求項 1 から 15 のいずれか一項に記載の抗体分子をコードする核酸、又は請求項 1 から 15 のいずれか一項に記載の抗体分子をコードする核酸を含むベクター。

40

【請求項 17】

請求項 16 に記載の核酸又はベクターを含む、組換え宿主細胞。

【請求項 18】

請求項 1 から 15 のいずれか一項に記載の抗体分子を産生する方法であって、請求項 17 に記載の組換え宿主細胞を、前記抗体分子の産生のための条件下で培養する工程を含み、任意で、前記抗体分子を単離及び / 又は精製する工程をさらに含む、方法。

【請求項 19】

50

請求項 1 から 15 のいずれか一項に記載の抗体分子及び薬学的に許容される賦形剤を含む、薬学的組成物。

【請求項 20】

患者においてがんを処置するための薬学的組成物であって、請求項 1 から 15 のいずれか一項に記載の抗体分子を含む、薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本ケースは、2016年6月20日に出願された米国特許出願第62/352482号に
10 関係し、その出願の内容は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【0002】

本発明は、プログラム死リガンド1 (PD-L1) 及びリンパ球活性化遺伝子3 (LAG-3) と結合する抗体分子に関する。抗体分子は、好ましくは、PD-L1 に対する、CDR に基づいた抗原結合部位、及び抗体分子のCH3ドメインの2個以上の構造ループに位置し得るLAG-3 抗原結合部位を含む。本発明の抗体分子は、例えば、がん治療に適用される。

【背景技術】

【0003】

リンパ球活性化遺伝子-3 (LAG-3; CD223) は、Ig スーパーファミリーのメンバーであり、CD4 に、遺伝子的及び構造的に関係している (もともと、たった20% 配列同一性を有するだけである)。CD4 のように、LAG-3 は、MHC クラスII 分子と結合するが、CD4 より高い親和性で結合する ($K_D = 60 \text{ nM}$)。LAG-3 は、活性化T細胞、NK細胞、pDC、B細胞、T細胞上に発現し、免疫抑制に、特に一定の割合の制御性T細胞 (Treg) における持続性の強い発現を通して、関与する (Liangら、2008)。
20

【0004】

LAG-3 遺伝子は、ヒト12番染色体上に、CD4 遺伝子に隣接して位置し、8個のエクソンに及ぶ。5個の選択的転写産物があり、そのうちの2個がタンパク質産物：完全長膜貫通タンパク質及び選択的にスプライシングされた可溶性単量体型を生じる。完全長転写産物は、70kDaの分子量をもつ、525アミノ酸のタンパク質をコードし、機能活性を有し、一方、可溶性型は、MHC クラスII 分子を結合しないと思われ、その機能はわかっていない。ヒト完全長LAG-3 タンパク質は、Macaca fascicularis (カニクイザル) LAG-3 との93% 配列同一性及びMus musculus (イエハツカネズミ) LAG-3 との70% 配列同一性を有する。
30

【0005】

LAG-3 は、4個の細胞外Ig様ドメイン (D1 ~ D4)、及びLAG-3 シグナル伝達に関与する細胞質部分を有する膜貫通タンパク質である。細胞質ドメインは、LAG-3 関連タンパク質 (LAP) に関連するEP (グルタミン酸/プロリン) モチーフ、及びT細胞機能のLAG-3 調節に必要とされたと考えられるKIEEL Eモチーフを有する。EPモチーフの役割に関するレポートは、それが、LAG-3 のT細胞表面膜への輸送に関与し得 (Baeら、2014)、又はT細胞活性化中のSTAT5の下流シグナル伝達を調節することに直接、関与し得 (Durhamら、2014)、又はもしかすると、両方であり得ると示唆している。
40

【0006】

T細胞上のLAG-3 の免疫抑制機構は、LAG-3 の活性化T細胞への架橋により作動され、その結果として、T細胞活性化中のカルシウム流及びIL-2放出の減少を生じると考えられている (Huardら、1997)。抗原提示細胞 (APC) 上において、LAG-3 陽性制御性T細胞によるMHC II 分子との結合は、IL-12分泌の減少、及び活性化の「二次シグナル」であるCD86の下方制御を引き起こし (Liangら、2008)、その結果、不適切な活性化及び/又はAPCによる抗原提示の低下からT細胞アネルギーを生
50

じる。LAG-3 ノックアウトマウスモデルは、穏やかなリンパ球過剰増殖だけで、生存可能であり (Workmanら、2003)、LAG-3 が中程度の免疫「ブレーキ」として働くことを示している。

【0007】

LAG-3 とMHCクラスII との間のこの抑制性相互作用はまた、Treg とCD4 陽性T細胞との間に起こることが提案されている (Segaら、2014)。Treg は、抑制性サイトカイン (IL-10 及びTGF など) の放出、炎症性代謝の操作 (CD73 異化アデノシンなど)、APC 成熟の制御、又は制御性T細胞とエフェクターT細胞との間の直接的相互作用のいずれかにより、免疫応答を抑制する。MHCクラスII 陽性Treg がMHCクラスII 陰性Treg より抑制性であり (Baecher-Allenら、2006)、エフェクターT細胞上に発現したLAG-3 との直接的相互作用を通して免疫応答を活発に抑制するという証拠がヒトにおいてある。LAG-3 陰性Treg は、通常のT細胞増殖を抑制することができるが、LAG-3 陰性CD4 及びCD8 T細胞は、Treg 免疫抑制に抵抗性である。この過程は、トロゴサイトーシスとして公知の過程を通してヒトT細胞間で起こり (Segaら、2014)、それにより、Treg がAPC 成熟を阻止するだけでなく、MHCクラスII を獲得して、プライミングされたLAG-3 陽性CD4 T細胞を抑制すると言われた。

【0008】

LAG-3 発現はまた、繰り返された抗原刺激のマーカーである。がんにおいて、T細胞は、一般的に、PD-1、CTLA-4、TIM-3、及びLAG-3 などの免疫抑制因子の発現を含む、「疲弊した」表現型の形をとり (Wherryら、2011)、その場合、その細胞は、抗原に应答して、適切に増殖し、かつケモカインを分泌する一般的能力をもたない。これらの免疫抑制因子の阻害は、免疫閾値を低下させ、T細胞による適切な抗がん应答を (再び) 可能にする。前臨床モデルにおいて、これは、LAG-3、CTLA-4、及びPD-1 に対するアンタゴニスト抗体を用いて裏付けられており、その場合、腫瘍量の減少が見られた。アンタゴニスト抗体によるLAG-3 阻害は、腫瘍微小環境において免疫応答を再活性化すると考えられ、CD4 陽性T細胞及びCD8 陽性T細胞上のLAG-3 の発現が、疲弊した表現型と関連しており、Treg 上のLAG-3 の発現が、強力な免疫抑制能力と関連している。LAG-3 をブロックする抗体は、Tエフェクター細胞の増殖、サイトカイン産生、細胞傷害性を増加させ、Treg 抑制因子活性を減少させて、腫瘍成長の減少をもたらす。

【0009】

ヒト腫瘍において、LAG-3 の発現の増加は、ヒト腎細胞癌、並びにメラノーマ及びリンパ腫などの他の腫瘍からの腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) 上に見出された (Demeureら、2001; Wolchockら、2013)。重要なことには、LAG-3 はまた、慢性ウイルス感染症 (Workmanら、2005) 及びがん (Workmanら、2003) を有する患者におけるT細胞機能不全と密接に相関している。LAG-3 はまた、様々なヒトがんにおいて腫瘍浸潤性Treg についての表面マーカーとして同定されている (Camisachiら、2010; Gandhiら、2006)。

【0010】

がん (固形及び血液系悪性腫瘍) において、免疫抑制をなくし、可能であれば抗原提示を増強するためのヒトLAG-3 に対するモノクローナル抗体が、臨床開発中である。

【0011】

LAG-525 及びIMP-701 (Novartis AG) は、LAG-3 に対するヒト抗体であり、腎がん (腎細胞がん); 非小細胞肺癌 (NSCLC); 上咽頭がん; 結腸直腸がん; メラノーマ; 胃がん、及び食道胃接合部腺癌において、それぞれ、第II相及び第I相臨床研究に進んでいる。

【0012】

抗LAG-3 抗体BMS-986016 (Bristol-Myers Squibb Company) は、現在、卵巣がん; NSCLC; 結腸直腸がん; 子宮頸がん; メラノーマ; 胃がん; 膀胱がん;

10

20

30

40

50

頭頸部がん；扁平上皮癌；腎細胞癌について第Ⅰ相臨床試験中であり、単剤療法としてか、又は併用療法の一部としてかのいずれかで、NSCLC；再発性慢性リンパ性白血病（CLL）；難治性慢性リンパ性白血病（CLL）；メラノーマ；非ホジキンリンパ腫；ホジキンリンパ腫；びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫；間慢性リンパ腫；マントル細胞リンパ腫；難治性多発性骨髄腫；及び間慢性多発性骨髄腫において第ⅠⅠ相研究中である。

【0013】

L A G - 3に対するさらなる抗体もまた、前臨床開発中である。

【0014】

プログラム細胞死1（PD-1）並びにそのリガンドPD-L1（CD274、B7-H1）及びPD-L2（B7-DC）は、T細胞活性化と寛容と免疫病理との間でのバランスを制御する阻害性シグナルを送達する。PD-L1は、全ての免疫細胞及びいくつかの腫瘍細胞上に一過性に発現する。

10

【0015】

PD-L1は、細胞外領域内の2個のIg様ドメイン、膜貫通ドメイン、及び短い細胞質ドメインを有するI型膜貫通タンパク質である。細胞質ドメインは、公知のシグナル伝達モチーフをもたず、リガンドのその受容体との相互作用に際し、PD-L1によるシグナル伝達がないことを示唆している。その分子量は、40kDa（290アミノ酸）であり、それは、マウス19番染色体及びヒト9番染色体それぞれにおけるCD274遺伝子によりコードされる。PD-L1は、B7タンパク質ファミリーのメンバーであり、B7.1及びB7.2とおおよそ20%のアミノ酸配列同一性を共有する。ヒトPD-L1は、PD-L1のマウス及びカニクイザルのオルソログそれぞれと、70%及び93%のアミノ酸同一性を共有する。

20

【0016】

PD-L1は、その受容体PD-1と770nMの親和性（K_D）で結合する。PD-1は、活性化T細胞、B細胞、及び骨髄系細胞上に発現し、細胞性免疫応答の活性化又は阻害を調節する。PD-L1のPD-1との結合は、阻害性シグナルを送達し、T細胞のサイトカイン産生及び増殖を低下させる。結果として、細胞によるPD-L1発現は、細胞傷害性Tリンパ球（CTL）殺害からの保護を媒介することができ、ウイルス感染中、慢性免疫応答を鈍らせる制御機構である。慢性かつ炎症促進性疾患としてのがんは、PD-L1発現の上方制御を通して、この免疫防御経路を破壊し、宿主免疫応答を逃れる。能動免疫応答の関連において、IFNもまた、PD-L1の発現を上方制御する。

30

【0017】

PD-L1はまた、別のタンパク質、B7.1（CD80としても知られている）との相互作用を通して免疫抑制を媒介し、T細胞へCD28を通して活性化の二次シグナルの1つを送達するB7.1の能力をブロックする。腫瘍細胞上のPD-L1発現及びそのB7.1との会合に関して、この特異的な相互作用の腫瘍免疫抵抗性における関連性はまだ明らかではない。

【0018】

PD-L1発現は、幅広い種類の固形腫瘍に示されている。異なる部位由来の19個の腫瘍に及ぶ、一つの研究において調べられた654個の試料のうち、89個（14%）がPD-L1陽性（5%頻度）であった。最も高いPD-L1陽性頻度は、頭頸部（17/54；31%）、子宮頸部（10/34；29%）、原発不明癌（CUP；8/29；28%）、多形神経膠芽腫（GBM；5/20；25%）、膀胱（8/37；21%）、食道（16/80；20%）、トリプルネガティブ（TN）乳房（6/33；18%）、及び肝細胞癌（6/41；15%）に見られた（Grossoら、2013）。PD-L1の腫瘍関連発現は、免疫抵抗性を与えることが示されており、T細胞媒介性アポトーシスから腫瘍細胞を保護する可能性がある。

40

【0019】

PD-L1を標的にする治療は、マウスのインビボ研究にいて優れた結果を示している。メラノーマのB16マウスモデルにおいて、GVAXか又はFVAXのいずれかのワクチ

50

ン接種戦略と組み合わせた抗PD-L1での処置は、その研究の終わりにおいて、生存（対照について30日間対PD-L1処置について52日間）と、腫瘍を含まない（5%）動物のパーセンテージの両方に有意な効果を生じた（Curranら、2010）。抗PD-L1治療はまた、P815マウス肥満細胞腫モデルにおける免疫抑制の機構を研究するために用いられている。マウスへ注射されたP815細胞は、正常には、強い免疫応答を引き起こし、彼らの拒絶を生じる。PD-L1がP815細胞上に発現している場合、これらの細胞は、免疫攻撃を逃避し、それは、次に、抗PD-L1抗体の投与を通して無効にすることができる（Iwaiら、2002）。免疫原性ヒトがんにおいてPD-1/PD-L1軸を標的にすること（Herbstら、2014）は、抗がん免疫応答の刺激を通して生存の優位を生じることが明白である（Wolchokら、2013; Larkinら、2015）。

10

【0020】

アテゾリズマブ（MPDL3280A、RG7466、TECENTRIQ）は、PD-L1に結合するヒト化IgG1抗体である。それは、固形がんの処置のための、単剤として、並びにまた、他の生物学的療法及び/又は小分子治療と組み合わせての臨床試験中であり、その固形がんには、結腸直腸がん、乳がん、非小細胞肺癌、膀胱がん、及び腎細胞癌が挙げられる。アテゾリズマブでの処置は、NSCLCにおける23%、メラノーマにおける36%、膀胱がんにおける33%、RCCにおける14%、及び頭頸部がんにおける13%の奏効率（ORR）を生じた（Herbstら、2014; Powlesら、2014）。

【0021】

アベルマブ（MSB0010718C）は、PD-L1と結合する完全ヒトIgG1抗体であり、膀胱がん、胃がん、頭頸部がん、中皮腫、非小細胞肺癌、卵巣がん、腎がん、及びメルケル細胞癌を含むいくつかのがんにおいて臨床試験中である。

20

【0022】

デュルバルマブ（MEDI4736）は、PD-L1と結合するヒトIgG1抗体であり、非小細胞肺癌、頭頸部の扁平上皮癌、膀胱がん、膵がんにおいて、単独で又はトレメリムマブと組み合わせて、臨床試験で試験されようとしており、並びに他の生物学的分子及び小分子と組み合わせて、胃がん、メラノーマ、及び切除不能な肝細胞癌などの追加の固形がんについて治験中である。

【0023】

BMS-936559を含むさらなる抗PD-L1抗体が、臨床試験において試験されており、他のものは、前臨床試験中である。

30

【0024】

しかしながら、現在、臨床試験において、抗LAG-3治療はわずかしがなく、治療として認可されたものはなく、それゆえ、LAG-3を標的とする追加の分子を開発する必要性が依然としてある。開発中のいくつかの抗PD-L1治療用物質があるが、現在のデータは、抗PD-L1単剤療法での全面処置が、がん患者の50%未満において応答を生じること示している。したがって、LAG-3及び/又はPD-L1を標的にすることができ、かつがん治療に適用される追加の分子についての必要性が依然として当技術分野に残っている。

【発明の概要】

40

【発明が解決しようとする課題】

【0025】

抗PD-1抗体及び抗PD-L1抗体は、主に、免疫寛容を破壊し、かつ抗腫瘍免疫応答を活性化することに関与する。活性化後T細胞上に発現し、疲弊したT細胞上に恒常的に発現するLAG-3は、これらの細胞を抑制状態でさらに維持する。他の確立された免疫抑制性分子（すなわち、PD-1、PD-L1）と組み合わせて使用される場合、LAG-3の遮断はまた、マウス腫瘍モデルにおいて相乗的な向上した免疫応答を与えることが示されている（Wooら、2012）。本発明者らは、これらの経路の両方を同時に標的にする治療が、T細胞疲弊を促進及び維持する機構に直接、対処するだろうと仮定した。加えて、本発明者らは、LAG-3を標的にすることが、LAG-3発現する制御性T細胞のAPCへ

50

の作用を通しての抗原提示を抑制し得ると予想し、発表された研究は、C D 8 6 の下方制御を実証している (Grossoら、2013)。この相互作用をブロックすることは、抗原提示を維持することが予想され、一方、P D - L 1 シグナル伝達をブロックすることが、寛容を破壊することが予想され、結果として、両方の経路が同時に阻害された時、有意な抗腫瘍応答を生じる。

【 0 0 2 6 】

抗 L A G - 3 抗体と抗 P D - L 1 抗体の組合せに関する発表されたデータは、前臨床の同系マウス腫瘍モデル及びウイルス負荷モデルからのいくつかの結果があるが、限られている。骨髄腫のマウスモデルにおいて、抗 P D - L 1 ブロッキング抗体と抗 L A G - 3 ブロッキング抗体の組合せが、低線量全身照射後に投与され、生存率を 8 0 % より高く向上させた (Jingら、2015)。全身性又は器官特異的自己免疫の証拠は観察されなかった。L A G - 3 及び P D - L 1 ノックアウトマウスは、複数の移植可能な腫瘍からの生存及びそのクリアランスの著しい増加を示した (Wooら、2012)。

【 0 0 2 7 】

本発明者らは、L A G - 3 と P D - L 1 の両方と結合する二重特異性抗体が、これらの抗原に対するモノクローナル抗体の組合せを越えるいくつかの利点を与えると仮定し、その利点には、以下が挙げられる：

1 . 指向型治療

活性化 T 細胞は、リンパ節において L A G - 3 を発現する。抗 L A G - 3 / P D - L 1 二重特異性抗体の一部は、リンパ節において、プライミングされた L A G - 3 陽性 T 細胞を標的にし、その後、その T 細胞は、腫瘍の部位へ移動して、二重特異性抗体を輸送する。いったん腫瘍微小環境内に入れば、二重特異性抗体を所有する T 細胞が、抗 P D - L 1 部分を介して腫瘍細胞上の P D - L 1 をすぐに会合し、ブロックすることができる。結果的に、腫瘍部位に移動した全ての T 細胞が、L A G - 3 シグナル伝達と P D - L 1 / P D - L 1 シグナル伝達の両方に抵抗性である。

2 . 橋渡し

プライミングされた C D 8 陽性 T 細胞は、腫瘍微小環境内で腫瘍抗原と遭遇し、そこで、それらは、抑制性シグナルの非存在下で腫瘍細胞を殺害することにより応答する。二重特異性抗体は、T 細胞と腫瘍細胞のこの接触を維持又は延長することにより個々のモノクローナル治療の組合せより優れていると予想される。T 細胞の活性化におけるシグナル強度は必須であり、がんにおける提示された抗原の場合には鍵となり得 (Engelsら、2013)、A P C 又はがん細胞上の標的と結合した二重特異性抗 L A G - 3 / P D - L 1 抗体の存在は、T 細胞が成功裏に抗原を認識し、かつ活性化し得る時間を増加させることが予想される。

3 . 局在化

炎症及び進行中の免疫応答のエリアにおいて、P D - L 1 発現は、局在性 I F N - γ 放出のために有意に増加する。標的がん細胞に関してであろうと、腫瘍関連マクロファージ (TAM) に関してであろうと、又は T 細胞集団の繰り返される刺激に関してであろうと、同じことが言える。P D - L 1 及び L A G - 3 をアンタゴナイズする二重特異性抗体は、局在化し、腫瘍における最も高い P D - L 1 発現のエリアに集中し、同時に、抗 L A G - 3 部分が、T 細胞に結合し、かつ T 細胞の L A G - 3 媒介性抑制を防ぐことを可能にすることが予想される。

【 0 0 2 8 】

広範なスクリーニング及び親和性成熟プログラム後、本発明者らは、分子の C H 3 ドメイン内に、L A G - 3 に特異的な結合部位を含む、1 0 個の特異的結合要素を同定することができた。これらの分子は、ヒト L A G - 3 とカニクイザル L A G - 3 の両方に対して高い親和性を有することが示された。ヒト L A G - 3 に対する高親和性は、ヒト患者における、例えば、L A G - 3 を発現する腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) を含有するがんの処置において有利であることが予想され、一方、ヒト L A G - 3 に対する親和性に匹敵する、カニクイザル L A G - 3 に対する高親和性は、カニクイザル疾患モデルにおける特異的結合要

10

20

30

40

50

素の性質の評価に有用であることが予想される。このことについての理由は、その得られた結果が、ヒト及びカニクイザルLAG-3に対するその親和性により高い変動性を有する分子がカニクイザルモデルで試験される場合より、ヒト患者における特異的結合要素の効果を予測する可能性がより高いということである。

【0029】

特異的結合要素はまた、T細胞活性化アッセイにおいて高い活性を有することが示され、そのことにより、LAG-3の阻害の増強を通してヒト患者において向上した効力を予測するものであると予想される。

【0030】

本発明者らはさらに、CH3ドメインにLAG-3に特異的な結合部位を含むこれらの特異的結合要素を、PD-L1に対するCDRに基づいた抗原結合部位を含む抗体Fabドメインと組み合わせて、LAG-3とPD-L1の両方に対する結合部位を含む二重特異性抗体分子を作製し、その二重特異性抗体分子は、上記で詳述された利点を有すると予想される。マウスLAG-3及びマウスPD-L1と結合するこれらの抗体分子の代替マウスバージョンもまた、本発明者らにより調製され、がんの同系マウスモデルにおいて腫瘍成長を有意に阻害する能力があることが示された。特に、これらの代替マウス分子の使用は、試験されたマウスモデルにおいて、LAG-3とPD-L1の両方に対する結合部位を含む抗体分子がマウスに投与された時、腫瘍成長抑制への相乗的効果があることを実証した。腫瘍環境におけるマウス及びヒトのLAG-3及びPD-L1の類似した作用機構に基づいて、腫瘍量を減少させる効力を示すマウス研究は、ヒトがん患者における臨床治療的利益へと変換されることが予想される。したがって、これらの結果に基づいて、本発明の抗体分子が、例えばLAG-3及びPD-L1それぞれに結合する2つの別々の分子の投与より、ヒト患者におけるがんの処置に、特に腫瘍成長を抑制することに、より優れた効果を示すだろうと予想される。

【課題を解決するための手段】

【0031】

したがって、第1の態様において、本発明は、PD-L1とLAG-3の両方と結合する抗体分子を提供する。具体的には、これらの抗体は、

(i) PD-L1に対する、CDRに基づいた抗原結合部位；及び

(ii) 抗体分子のCH3ドメインの2個以上の構造ループに位置し、又はそれらへと操作されたLAG-3抗原結合部位

を含む。LAG-3結合部位は、好ましくは、アミノ酸配列WDEPWGED（配列番号1）及びPYDRWVWPDE（配列番号3）を含む。

【0032】

抗体分子は、好ましくは、CH3ドメインのABループに、配列番号1に示されるアミノ酸配列、及びEFループに、配列番号3に示されるアミノ酸配列を含む。

【0033】

したがって、第1の態様において、本発明は、プログラム死リガンド1（PD-L1）及びリンパ球活性化遺伝子3（LAG-3）と結合する抗体分子を提供する。抗体分子は、好ましくは、(i) PD-L1に対する、CDRに基づいた抗原結合部位；及び(ii) 抗体分子のCH3ドメインに位置するLAG-3抗原結合部位を含む。

【0034】

LAG-3結合部位は、好ましくは、アミノ酸配列WDEPWGED（配列番号1）及びPYDRWVWPDE（配列番号3）を含む。アミノ酸配列WDEPWGEDは、好ましくは、CH3ドメインの第1の構造ループに位置し、アミノ酸配列PYDRWVWPDEは、好ましくは、CH3ドメインの第2の構造ループに位置する。

【0035】

例えば、LAG-3抗原結合部位は、抗体分子のCH3ドメインの構造ループ領域に位置し得、構造ループ領域は、好ましくは、2個以上の構造ループを含み、LAG-3結合部位は、好ましくは、アミノ酸配列WDEPWGED（配列番号1）及びPYDRWVWP

10

20

30

40

50

D E (配列番号 3) を含む。

【 0 0 3 6 】

さらなる例として、L A G - 3 抗原結合部位は、抗体分子の C H 3 ドメインの 2 個以上の構造ループへと操作され得、L A G - 3 結合部位は、好ましくは、アミノ酸配列 W D E P W G E D (配列番号 1) 及び P Y D R W V W P D E (配列番号 3) を含む。

【 0 0 3 7 】

上記で言及されているように、L A G - 3 結合部位の配列は、好ましくは、抗体分子の C H 3 ドメインの 2 個以上の構造ループに位置する。好ましい実施形態において、L A G - 3 抗原結合部位は、C H 3 ドメインの A B ループ中に、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を含み、E F ループ中に、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列を含む。

10

【 0 0 3 8 】

配列番号 1 に示されるアミノ酸配列は、好ましくは、C H 3 ドメインの残基 1 1 から 1 8 に位置し、及び / 又は配列番号 3 に示されるアミノ酸配列は、C H 3 ドメインの残基 9 2 から 1 0 1 に位置し、アミノ酸残基の番号付けは、I m M u n o G e n e T i c s (I M G T) の番号付けスキームによる。

【 0 0 3 9 】

抗体分子の L A G - 3 抗原結合部位は、以下の配列：

(i) S N G Q P E N N Y (配列番号 2 、 8 、 及び 1 8) ；

(ii) S N G Q P E D N Y (配列番号 1 3) ；

(iii) S N G Y P E I E F (配列番号 2 3) ；

(iv) S N G I P E W N Y (配列番号 2 8) ；

(v) S N G Y A E Y N Y (配列番号 3 3) ；

(vi) S N G Y K E E N Y (配列番号 3 8) ；

(vii) S N G V P E L N V (配列番号 4 3) ；又は

(viii) S N G Y Q E D N Y (配列番号 4 8)

の 1 つを、好ましくは抗体分子の C H 3 ドメインの C D ループ中にさらに含み得る。

【 0 0 4 0 】

好ましくは、抗体分子の L A G - 3 抗原結合部位は、以下の配列：C H 3 ドメインの C D ループにおける配列番号 2 、 2 8 、又は 3 8 に示されるアミノ酸配列の 1 つを、好ましくは抗体分子の C H 3 ドメインの C D ループ中にさらに含む。より好ましくは、抗体分子の L A G - 3 抗原結合部位は、C H 3 ドメインの C D ループ中に、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列をさらに含む。

20

30

【 0 0 4 1 】

配列番号 2 、 8 、 1 3 、 1 8 、 2 3 、 2 8 、 3 3 、 3 8 、 4 3 、又は 4 8 に示されるアミノ酸配列は、好ましくは、抗体分子の C H 3 ドメインの残基 4 3 から 7 8 に位置し、その残基は、I M G T の番号付けスキームに従って番号付けされる。

【 0 0 4 2 】

L A G - 3 抗原結合部位の配列以外の、抗体分子の C H 3 ドメインの配列は、特に限定されるということはない。好ましくは、C H 3 ドメインは、ヒト I g G 1 、 I g G 2 、 I g G 3 、又は I g G 4 C H 3 ドメインなどのヒト免疫グロブリン G ドメイン、最も好ましくは、ヒト I g G 1 C H 3 ドメインである。ヒト I g G 1 、 I g G 2 、 I g G 3 、又は I g G 4 C H 3 ドメインの配列は当技術分野において公知である。

40

【 0 0 4 3 】

好ましい実施形態において、抗体分子は、配列番号 5 、 1 0 、 1 5 、 2 0 、 2 5 、 3 0 、 3 5 、 4 0 、 4 5 、又は 5 0 に示される C H 3 ドメイン、より好ましくは、配列番号 5 、 3 0 、又は 4 0 に示される C H 3 ドメイン、最も好ましくは、配列番号 5 に示される C H 3 ドメインを含む。あるいは、抗体分子は、配列番号 5 、 1 0 、 1 5 、 2 0 、 2 5 、 3 0 、 3 5 、 4 0 、 4 5 、又は 5 0 、好ましくは配列番号 5 、 3 0 、又は 4 0 、より好ましくは配列番号 5 と少なくとも 7 0 % 、少なくとも 7 5 % 、少なくとも 8 0 % 、少なくとも 8 5 % 、少なくとも 9 0 % 、少なくとも 9 5 % 、少なくとも 9 6 % 、少なくとも 9 7 % 、少

50

なくとも 98%、又は少なくとも 99% 配列同一性を有するアミノ酸配列を有する C H 3 ドメインを含み得る。

【0044】

抗体分子は、C H 2 ドメインをさらに含み得る。C H 2 ドメインは、好ましくは、ヒト I g G 分子における場合のように、C H 3 ドメインの N 末端に位置する。抗体分子の C H 2 ドメインは、好ましくは、ヒト I g G 1、I g G 2、I g G 3、又は I g G 4 の C H 2 ドメイン、より好ましくは、ヒト I g G 1 の C H 2 ドメインである。ヒト I g G ドメインの配列は、当技術分野において公知である。好ましい実施形態において、抗体分子は、配列番号 53 若しくは配列番号 54 に示される配列を有する I g G C H 2 ドメイン、又は配列番号 53 若しくは配列番号 54 と少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、若しくは少なくとも 99% 配列同一性を有するアミノ酸配列を有する C H 2 ドメインを含む。

10

【0045】

好ましい実施形態において、抗体分子は、配列番号 6、7、11、12、16、17、21、22、26、27、31、32、36、37、41、42、46、47、51、若しくは 52 に示される配列、又は配列番号 6、7、11、12、16、17、21、22、26、27、31、32、36、37、41、42、46、47、51、若しくは 52 に示される配列と少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、若しくは少なくとも 99% 配列同一性を有する配列を含む。より好ましくは、抗体分子は、配列番号 6、7、31、32、41、若しくは 42 に示される配列、又は配列番号 6、7、31、32、41、若しくは 42 に示される配列と少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、若しくは少なくとも 99% 配列同一性を有する配列を含む。さらにより好ましくは、抗体分子は、配列番号 6 若しくは 7 に示される配列、又は配列番号 6 若しくは 7 に示される配列と少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、若しくは少なくとも 99% 配列同一性を有する配列を含む。

20

30

【0046】

好ましい実施形態において、抗体分子は、ヒト I g G 1、I g G 2、I g G 3、又は I g G 4 分子などのヒト免疫グロブリン G 分子、より好ましくは、ヒト I g G 1 分子である。ヒト免疫グロブリン G 分子の配列は、当技術分野において知られており、C H 3 ドメイン、又は本明細書に開示されているような C H 3 ドメイン配列をそのような分子に導入することは、当業者にいかなる困難も提示することはないだろう。

【0047】

抗体分子は、好ましくは、配列番号 92 及び 93 に示される V H ドメイン及び / 又は V L ドメインの C D R を含む。所定の V H 又は V L ドメインにおける C D R 配列を決定するための方法は、当技術分野において知られており、それには、K a b a t 及び I M G T 番号付けシステムが挙げられる。より好ましくは、抗体分子は、好ましくは、配列番号 86 から 91 に示される相補性決定領域の 1 個以上、2 個以上、3 個以上、4 個以上、5 個以上、又は全部の 6 個を含む。好ましくは、抗体分子は、配列番号 92 及び 93 それぞれに示される V H ドメイン及び / 又は V L ドメインを含む。

40

【0048】

好ましい実施形態において、抗体分子は、配列番号 94 から 113 のいずれか 1 つに示される重鎖配列、又は重鎖配列の V H ドメインが変化しないままであるという条件で、配列番号 94 から 113 のいずれか 1 つと少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、少なくとも 96%、少なくとも 97%、少なくとも 98%、若しくは少なくとも 99% 配列同一性を有するア

50

ミノ酸配列を有する重鎖を含む。より好ましくは、抗体分子は、配列番号 94、95、104、105、108、及び 109 のいずれか 1 つに示される重鎖配列、又は重鎖配列の V H ドメインが変化しないままであるという条件で、配列番号 94、95、104、105、108、及び 109 のいずれか 1 つと少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、若しくは少なくとも 99 % 配列同一性を有するアミノ酸配列を有する重鎖を含む。さらに好ましくは、抗体分子は、配列番号 94 若しくは 95 に示される重鎖配列、又は重鎖配列の V H ドメインが変化しないままであるという条件で、配列番号 94 若しくは 95 と少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、若しくは少なくとも 99 % 配列同一性を有するアミノ酸配列を有する重鎖を含む。

10

【0049】

さらなる好ましい実施形態において、抗体分子は、加えて、又は代替として、配列番号 116 に示される軽鎖配列、又は軽鎖配列の V L ドメインが変化しないままであるという条件で、配列番号 116 と少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、若しくは少なくとも 99 % 配列同一性を有するアミノ酸配列を有する軽鎖を含み得る。

【0050】

20

抗体分子は、好ましくは、PD-L1 及びLAG-3 と同時に結合する能力がある。PD-L1 及びLAG-3 は、例えば、2 つの異なる細胞上に存在し得る。理論に縛られるつもりはないが、これは、細胞間の架橋、並びにPD-L1 及び/又はLAG-3 を内部移行させて、それらを刺激に利用できないようにすることを生じると考えられる。

【0051】

本発明者らは、本発明による、(i) PD-L1 に対する、CDR に基づいた抗原結合部位；及び(ii) 抗体分子のCH3 ドメインに位置するLAG-3 抗原結合部位を含む抗体分子、FS18-7-9/84G09 が、驚くべきことに、LAG-3 発現細胞とPD-L1 発現細胞の混合物が試料に存在している場合でさえも、PD-L1 発現細胞の補体依存性細胞傷害(CDC)を媒介したが、LAG-3 発現細胞のそれを媒介しなかったことを示した。この性質は、FS18-7-9/84G09 の場合と同様に、抗体分子のCDR に基づいた抗原結合が、腫瘍細胞を標的にし、かつ抗体分子の定常ドメインに位置する結合部位が、免疫細胞を標的にする場合、有用であると予想され、これは、免疫細胞が、抗体分子との結合により媒介されるCDCから保護されると同時に、腫瘍細胞がCDCを受けるからである。

30

【0052】

したがって、さらなる実施形態において、本発明は、腫瘍抗原及び免疫細胞抗原と結合する抗体分子であって、抗体分子が、

(i) 腫瘍抗原に対する、CDR に基づいた抗原結合部位；及び

(ii) 抗体分子の定常ドメイン、好ましくは、CH3 又はCH2 ドメイン、より好ましくはCH3 ドメインに位置する免疫細胞抗原に対する抗原結合部位

40

を含み、前記免疫細胞抗原を含む免疫細胞が抗体分子により結合されている場合、抗体分子が、前記免疫細胞の補体依存性細胞傷害を媒介せず、又は有意な補体依存性細胞傷害を媒介することはない、抗体分子に関する。

【0053】

好ましくは、抗体分子はさらに、前記腫瘍抗原を含む腫瘍細胞が抗体分子により結合されている場合、前記腫瘍細胞の補体依存性細胞傷害を媒介する。

【0054】

抗体分子のCDCを測定するための方法は当技術分野において公知であり、本明細書に記載されている。

50

【 0 0 5 5 】

本発明者らはさらに、本発明による、(i) P D - L 1 に対する、C D R に基づいた抗原結合部位；及び(ii) 抗体分子の C H 3 ドメインに位置する L A G - 3 抗原結合部位を含む抗体分子、F S 1 8 - 7 - 9 / 8 4 G 0 9 が、驚くべきことに、P D - L 1 発現細胞の抗体依存性細胞傷害 (ADCC) と比較して、L A G - 3 発現細胞の低い A D C C を媒介したことを示している。この場合もやはり、この性質は、F S 1 8 - 7 - 9 / 8 4 G 0 9 の場合と同様に、抗体分子の C D R に基づいた抗原結合が腫瘍細胞を標的にし、かつ抗体分子の定常ドメインに位置する結合部位が、免疫細胞を標的にする場合、有用であると予想され、これは、免疫細胞が、抗体により結合された腫瘍細胞より低い A D C C に曝されるからである。

10

【 0 0 5 6 】

本明細書に説明されているように、抗体分子の A D C C 活性を低下させ、又は抑止するための変異は、当技術分野において公知である。1つのそのような変異は、本明細書に記載された L A L A 変異である。F S 1 8 - 7 - 9 / 8 4 G 0 9 が、L A G - 3 発現細胞に対する低い A D C C 活性を有することが、予想外にも見出された。A D C C 活性を完全に抑止することが必要ではない場合、これは優位を表し得る。

【 0 0 5 7 】

したがって、さらなる実施形態において、本発明は、腫瘍抗原及び免疫細胞抗原と結合する抗体分子であって、抗体分子が、

(i) 腫瘍抗原に対する、C D R に基づいた抗原結合部位；及び

20

(ii) 抗体分子の定常ドメイン、好ましくは、C H 3 又は C H 2 ドメイン、より好ましくは C H 3 ドメインに位置する免疫細胞抗原に対する抗原結合部位

を含み、抗体分子が、前記腫瘍抗原を含む腫瘍細胞が抗体分子により結合されている場合の前記腫瘍細胞に応答しての A D C C より、前記免疫細胞抗原を含む免疫細胞が抗体分子により結合されている場合の前記免疫細胞に応答して、より低い A D C C を引き起こす、抗体分子に関する。好ましくは、抗体分子は、前記免疫細胞抗原を含む免疫細胞が抗体分子により結合されている場合の、前記免疫細胞の A D C C を媒介せず、又は有意な A D C C を媒介することはない。抗体分子はさらに、前記免疫細胞抗原を含む免疫細胞が抗体分子により結合されている場合、前記免疫細胞の補体依存性細胞傷害を媒介し得ず、若しくは有意な補体依存性細胞傷害を媒介し得ることはなく、及び/又は前記腫瘍抗原を含む腫瘍細胞が抗体分子により結合されている場合、前記腫瘍細胞の補体依存性細胞傷害を媒介し得る。

30

【 0 0 5 8 】

抗体分子の A D C C を測定するための方法は当技術分野において公知であり、本明細書に記載されている。

【 0 0 5 9 】

様々な腫瘍抗原及び免疫細胞抗原が当技術分野において公知である。腫瘍抗原及び免疫細胞抗原は、好ましくは、細胞表面抗原である。免疫細胞抗原は、好ましくは、腫瘍浸潤リンパ球上に存在する抗原である。

【 0 0 6 0 】

40

免疫細胞抗原に対する抗原結合部位は、好ましくは、抗体分子の定常ドメインの1つ又は複数の構造ループ、例えば、定常ドメインの A B、C D、及び/又は E F ループに、1個又は複数の改変を含む。例えば、結合部位は、本明細書に記載されているような L A G - 3 結合部位であり得る。

【 0 0 6 1 】

本発明の抗体分子は、免疫系調節物質、細胞傷害性分子、放射性同位元素、又は検出可能な標識にコンジュゲートされ得る。免疫系調節物質は、サイトカインであり得る。

【 0 0 6 2 】

本発明はまた、本発明の抗体分子をコードする核酸、加えて、そのような核酸を含むベクターを提供する。

50

【 0 0 6 3 】

本発明の核酸又はベクターを含む組換え宿主細胞もまた提供される。そのような組換え宿主細胞は、抗体分子を産生するために用いられ得る。したがって、本発明の抗体分子を産生する方法であって、抗体分子の産生のための条件下で組換え宿主細胞を培養する工程を含む、方法もまた提供される。方法は、抗体分子を単離及び／又は精製する工程をさらに含み得る。

【 0 0 6 4 】

本発明の抗体分子は、治療的適用、特にがん処置などのヒトにおける治療的適用に適用されることが予想される。したがって、本発明による特異的結合要素又は抗体分子及び薬学的に許容される賦形剤を含む薬学的組成物もまた提供される。

10

【 0 0 6 5 】

本発明はまた、患者においてがんを処置する方法における使用のための、本発明の抗体分子を提供する。患者においてがんを処置する方法であって、本発明による抗体分子の治療的有効量を患者に投与する工程を含む、方法もまた提供される。患者におけるがんの処置のための薬物の製造における使用のための、本発明による抗体分子の使用がさらに提供される。処置は、抗腫瘍ワクチン及び／又は化学療法剤を患者に投与する工程をさらに含み得る。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 6 6 】

【図 1 A】 2 回目の親和性成熟後に同定された以下の 9 個の F c a b : F S 1 8 - 7 - 3 2 ; F S 1 8 - 7 - 3 3 ; F S 1 8 - 7 - 3 6 ; F S 1 8 - 7 - 5 8 ; F S 1 8 - 7 - 6 2 ; F S 1 8 - 7 - 6 5 ; F S 1 8 - 7 - 7 8 ; F S 1 8 - 7 - 8 8 ; 及び F S 1 8 - 7 - 9 5 の、親 F c a b、F S 1 8 - 7 - 9 に対する配列アラインメントを示す図である。

20

【図 1 B】 これらの F c a b のそれぞれの、親 F c a b、F S 1 8 - 7 - 9 の配列とのパーセンテージ配列同一性を示す図である。

【図 2 A】 T 細胞活性化アッセイの結果を示す図である。具体的には、図 2 A は、m A b 2 F S 1 8 - 7 - 9 / 8 4 G 0 9 及び対照抗体で処理された細胞株のパネルにおける、T 細胞活性化を示す I L - 2 放出の代表的なプロットを示す。L A G - 3 及び P D - L 1 に関するアッセイは、活性化を生じるために、両方の標的の障害 (F S 1 8 - 7 - 9 / 8 4 G 0 9 L A L A、F S 1 8 - 7 - 9 / 4 4 2 0 L A L A + 8 4 G 0 9、2 5 F 7 + 8 4 G 0 9 L A L A、又は 2 5 F 7 + S 1 L A L A) を必要とした。

30

【図 2 B】 T 細胞活性化アッセイの結果を示す図である。具体的には、図 2 B は、m A b 2 F S 1 8 - 7 - 9 / 8 4 G 0 9 及び対照抗体で処理された細胞株のパネルにおける、T 細胞活性化を示す I L - 2 放出の代表的なプロットを示す。L A G - 3 のみに関するアッセイは、活性化のために L A G - 3 の障害 (F S 1 8 - 7 - 9 / 8 4 G 0 9 L A L A、F S 1 8 - 7 - 9 / 4 4 2 0 L A L A + 8 4 G 0 9、2 5 F 7 + 8 4 G 0 9 L A L A、2 5 F 7 + S 1 L A L A、2 5 F 7、F S 1 8 - 7 - 9 / 4 4 2 0 L A L A) を必要とした。

【図 2 C】 T 細胞活性化アッセイの結果を示す図である。具体的には、図 2 C は、m A b 2 F S 1 8 - 7 - 9 / 8 4 G 0 9 及び対照抗体で処理された細胞株のパネルにおける、T 細胞活性化を示す I L - 2 放出の代表的なプロットを示す。P D - L 1 のみに関するアッセイは、活性化のために P D - L 1 の障害 (F S 1 8 - 7 - 9 / 8 4 G 0 9 L A L A、F S 1 8 - 7 - 9 / 4 4 2 0 L A L A + 8 4 G 0 9、2 5 F 7 + 8 4 G 0 9 L A L A、2 5 F 7 + S 1 L A L A、8 4 G 0 9 L A L A) を必要とした。

40

【図 2 D】 T 細胞活性化アッセイの結果を示す図である。具体的には、図 2 D は、F S 1 8 - 7 - 6 2 / 8 4 G 0 9 又は F S 1 8 - 7 - 7 8 / 8 4 G 0 9、及び対照抗体で処理された細胞株のパネルにおける、T 細胞活性化を示す I L - 2 放出の代表的なプロットを示す。L A G - 3 及び P D - L 1 に関するアッセイは、活性化のために、両方の標的の障害 (F S 1 8 - 7 - 6 2 / 8 4 G 0 9 L A L A、F S 1 8 - 7 - 7 8 / 8 4 G 0 9 L A L A、F S 1 8 - 7 - 6 2 / 4 4 2 0 L A L A + 8 4 G 0 9、F S 1 8 - 7 - 7 8 / 4 4 2 0 L A L A + 8 4 G 0 9、2 5 F 7 + 8 4 G 0 9 L A L A、又は 2 5 F 7 + S 1 L A L A) を必要とした。

【図 2 E】 T 細胞活性化アッセイの結果を示す図である。具体的には、図 2 E は、F S 1

50

8 - 7 - 62 / 84G09又はFS18 - 7 - 78 / 84G09、及び対照抗体で処理された細胞株のパネルにおける、T細胞活性化を示すIL - 2放出の代表的なプロットを示す。LAG - 3のみに関するアッセイは、活性化のためにLAG - 3の阻害 (FS18-7-62 / 84G09LALA、FS18-7-62/4420LALA、FS18-7-78/84G09LALA、FS18-7-78/4420LALA、FS18-7-62/4420LALA+84G09、FS18-7-78/4420LALA+84G09、25F7+84G09LALA、又は25F7+S1LALA) を必要とした。

【図2F】T細胞活性化アッセイの結果を示す図である。具体的には、図2Fは、FS18 - 7 - 62 / 84G09又はFS18 - 7 - 78 / 84G09、及び対照抗体で処理された細胞株のパネルにおける、T細胞活性化を示すIL - 2放出の代表的なプロットを示す。PD - L1のみに関するアッセイは、活性化のためにPD - L1の阻害 (FS18-7-62 / 84G09LALA、FS18-7-78/84G09LALA、FS18-7-62/4420LALA+84G09、FS18-7-78/4420LALA+84G09、25F7+84G09LALA、又は25F7+S1LALA) を必要とした。

10

【図3】FS18 - 7 - 9 / 84G09は、cLAG - 3 + cPD - L1の両方、及びcLAG - 3又はcPD - L1の単独の存在下で、IL - 2放出により示されているように、T細胞活性化を誘導することができ、機能的にカニクイザル交差反応性を示したことを示す図である。

【図4】SEBアッセイからの代表的なプロットを示す図である。LAG - 3 / PD - L1 mAb²及びLAG - 3 / 4420 mAb² + 84G09LALAの組合せは、84G09LALA mAb単独より高い活性化を示したが、LAG - 3 / 4420 mAb²又は4420 mAbは、有意な活性化を示さなかった。

20

【図5】非定着MC38同系腫瘍モデルにおける20日目の最終腫瘍重量を示す図である。LAG - 3 / PD - L1 mAb² (FS18-29/S1) で処置されたマウスは、ベンチマークmAb、C9B7WとS1の組合せで処置されたマウスより有意により少ない重量をもつ最終腫瘍を有した。

【図6】非定着MC38同系腫瘍モデルの成長曲線を示す図である。LAG - 3 / PD - L1 mAb² (FS18-29/S1) で処置されたマウスは、ベンチマークmAb、C9B7WとS1の組合せで処置されたマウス、又はS1単独で処置されたマウスより小さい腫瘍を有した。LAG - 3 / 4420 mAb²及びベンチマーク抗LAG - 3 mAbは、腫瘍成長にほとんど影響を及ぼさなかった。

【図7】定着MC38同系腫瘍モデルにおける24日目の最終腫瘍重量を示す図である。LAG - 3 / PD - L1 mAb² (FS18-29/S1) は、ベンチマーク抗体、C9B7WとS1の組合せとちょうど同じくらい、腫瘍成長を抑制するのに効果的であった。FS18 - 29 / 4420単独は、腫瘍成長に顕著な影響を及ぼすことなく、S1及びC9B7Wのどちらも、生じる腫瘍成長に穏やかな効果を生じた。

30

【図8】定着MC38同系腫瘍モデルの腫瘍成長曲線を示す図である。LAG - 3 / PD - L1 mAb² (FS18-29/S1) で処置されたマウスは、ベンチマークmAb、C9B7WとS1の組合せで処置されたマウスと類似した腫瘍容積を有した。S1又はC9B7W単独で処置されたマウスは、中間の腫瘍容積を示したが、LAG - 3 / 4420 mAb²処置は、腫瘍成長に影響を及ぼさなかった。

【図9】非定着CT26同系腫瘍モデルにおける20日目の最終腫瘍重量を示す図である。LAG - 3 / PD - L1 mAb² (FS18-29/S1及びFS18-35/S1) は、ベンチマーク抗体、C9B7WとS1の組合せより高い程度で腫瘍成長を抑制した。

40

【図10】非定着CT26同系腫瘍モデルの腫瘍成長曲線を示す図である。腫瘍成長を抑制することにおけるFS18 - 35 / S1対IgG対照の統計的有意差が実証された。そのような統計的有意差は、IgG対照群に対するベンチマーク抗体の組合せに関しては観察されなかった。

【図11】mAb²におけるLALA変異の腫瘍成長阻害への効果を比較するために用いられた非定着MC38同系腫瘍モデルにおける22日目の最終腫瘍重量を示す図である。LALA変異を含むmAb²で処置されたマウスとLALA変異を含まないmAb²で処置されたマウスの間に最終腫瘍重量に統計的有意差はなかった。

50

【図 1 2】 L A L A 変異を含む m A b 2 及び L A L A 変異を含まない m A b 2 の腫瘍成長阻害への効果を比較するために用いられた非定着 M C 3 8 同系腫瘍モデルの腫瘍成長曲線を示す図である。 L A L A 変異を含む m A b 2 で処置されたマウスと L A L A 変異を含まない m A b 2 で処置されたマウスの間に腫瘍成長曲線の統計的有意差はなかったが、 L A L A 変異を含有する分子による腫瘍成長阻害の増加への傾向があった。

【図 1 3】 m A b 2 処理の T 細胞 L A G - 3 発現への効果を示す図である。 m A b 2 F S 1 8 - 2 9 / S 1、 F S 1 8 - 2 9 / 4 4 2 0、 S 1、 F S 1 8 - 2 9 / 4 4 2 0 と S 1、又は対照抗体 4 4 2 0 で処理された C D 8 (A)、 C D 4 (B)、及び F o x P 3 (C) 腫瘍浸潤リンパ球 (T I L) 上の L A G - 3 発現が、最後の m A b 2 / 抗体投与後 3 日目及び 7 日目それぞれに対応する、腫瘍接種後 1 9 日目及び 2 3 日目において示されている。 L A G - 3 発現は、 1 9 日目及び 2 3 日目において m A b 2 F S 1 8 - 2 9 / S 1 での処理後に減少した。 F S 1 8 - 2 9 / 4 4 2 0 と S 1 の組合せを与えられた動物は L A G - 3 発現の減少も示したが、その効果は 2 3 日目まで遅れ、一方、個々に投与された F S 1 8 - 2 9 / 4 4 2 0 又は S 1 は、 L A G - 3 発現の減少をほとんど又は全く生じなかった。

【図 1 4】 乳酸デヒドロゲナーゼ (L D H) 放出 C D C アッセイを用いる様々な抗体 / m A b 2 処理後の P D - L 1 発現 R a j i 細胞及び L A G - 3 発現 R a j i 細胞の溶解のパーセンテージを示す図である。 A 及び B は、 P D - L 1 発現 R a j i 細胞及び L A G - 3 発現 R a j i 細胞それぞれの C D C 媒介性溶解を示す。細胞を、抗 L A G - 3 抗体 2 5 F 7、抗 P D - L 1 抗体 8 4 G 0 9、 L A L A 変異を含む抗 P D - L 1 抗体 8 4 G 0 9、抗 C D 2 0 抗体リツキシマブ、 m A b 2 F S 1 8 - 7 - 9 / 8 4 G 0 9、 L A L A 変異を含む m A b 2 F S 1 8 - 7 - 9 / 8 4 G 0 9、又は L A L A 変異を含むリツキシマブとインキュベートした。 L D H の放出を、ベビーウサギ補体での処理から 4 時間後、測定し、全溶解と比較したパーセンテージとして表した。抗体 / m A b 2 処理の濃度は、 X 軸に示されている。曲線に渡って比較することができるように全ての曲線の傾きについて共有値を設定した。

【図 1 5】 フローサイトメトリに基づいた C D C アッセイを用いた、様々な処理後の死んだ P D - L 1 発現 R a j i 細胞及び死んだ L A G - 3 発現 R a j i 細胞のパーセンテージを示す図である。異なつて蛍光標識された P D - L 1 発現細胞及び L A G - 3 発現細胞の混合物を、対照抗体 4 4 2 0、抗 C D 2 0 抗体リツキシマブ (R I T)、抗 L A G - 3 抗体 2 5 F 7 と抗 P D - L 1 抗体 8 4 G 0 9 の組合せ、又は m A b 2 F S 1 8 - 7 - 9 / 8 4 G 0 9 とインキュベートした。その後、細胞を、ベビーウサギ補体で処理し、死細胞のみを染色する色素を用いて染色した。 2 つの細胞集団における死細胞のパーセンテージを、全細胞に占めるパーセンテージとして評価した。各処理後に評価された細胞型 (示差的蛍光標識により同定される P D - L 1 発現性又は L A G - 3 発現性) は、図 1 5 において、関連処理の名前の後に示されており、例えば、対照抗体 4 4 2 0 での処理後の P D - L 1 発現 R a j i 細胞の生存率の評価を指す、 4 4 2 0 P D L 1 を参照されたい。抗体 / m A b 2 処理の濃度は X 軸に示されている。

【図 1 6】 乳酸デヒドロゲナーゼ (L D H) 放出 A D C C アッセイを用いた、様々な処理後の P D - L 1 発現 R a j i 細胞及び L A G - 3 発現 R a j i 細胞のパーセンテージ溶解 (細胞傷害性) を示す図である。細胞を、抗 C D 2 0 抗体リツキシマブ、抗 P D - L 1 抗体 8 4 G 0 9、 m A b 2 F S 1 8 - 7 - 9 / 8 4 G 0 9、 L A L A 変異を含むリツキシマブ、 L A L A 変異を含む m A b 2 F S 1 8 - 7 - 9 / 8 4 G 0 9、抗 L A G - 3 抗体 2 5 F 7、 L A L A 変異を含む抗 P D - L 1 抗体 8 4 G 0 9、対照抗体 4 4 2 0、又は L A L A 変異を含む対照抗体 4 4 2 0 で処理した。その後、処理された細胞を、初代 N K 細胞と同時にインキュベートし、特異的 L D H 放出を、標的細胞の全溶解と比較したパーセンテージとして測定した。抗体 / m A b 2 処理の濃度は、 X 軸に示されている。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 6 7 】

本発明は、 P D - L 1 と L A G - 3 の両方と結合する抗体分子に関する。具体的には、本

発明の抗体分子は、PD-L1に対する、CDRに基づいた抗原結合部位、及び抗体分子の定常ドメインに位置するLAG-3抗原結合部位を含む。用語「PD-L1」及び「LAG-3」は、文脈上他の意味に解すべき場合を除き、ヒトPD-L1及びヒトLAG-3、マウスPD-L1及びマウスLAG-3、並びにノ又はカニクイザルPD-L1及びカニクイザルLAG-3を指し得る。好ましくは、用語「PD-L1」及び「LAG-3」は、文脈上他の意味に解すべき場合を除き、ヒトPD-L1及びヒトLAG-3を指す。

【0068】

用語「抗体分子」は、天然であろうと、部分的又は全体的に合成されようと、免疫グロブリンを記載する。抗体分子は、ヒト又はヒト化型であり得る。抗体分子は、好ましくは、モノクローナル抗体分子である。抗体の例は、免疫グロブリンGなどの免疫グロブリンアイソタイプ、並びにIgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4などのそれらのアイソタイプのサブクラス、加えてそれらの断片である。

10

【0069】

したがって、本明細書に用いられる場合、用語「抗体分子」は、抗体断片を含み、ただし、前記断片は、PD-L1に対する、CDRに基づいた抗原結合部位、及び抗体分子の定常ドメイン、例えば、CH1、CH2、又はCH3ドメイン、好ましくはCH3ドメインに位置するLAG-3抗原結合部位を含むという条件である。したがって、文脈上他の意味に解すべき場合を除き、本明細書に用いられる場合、用語「抗体分子」は、「抗体分子又はその断片」と等価である。

【0070】

モノクローナル抗体及び他の抗体を利用し、かつ組換えDNAテクノロジーの技術を用いて、最初の抗体の特異性を保持する他の抗体又はキメラ分子を作製することが可能である。そのような技術は、CDR若しくは可変領域、及びノ又はLAG-3抗原結合部位を提供する定常ドメイン配列を異なる免疫グロブリンへ導入することを含み得る。一つの免疫グロブリンのCDRの別の免疫グロブリンへの導入は、例えば、EP-A-184187、GB2188638A、又はEP-A-239400に記載されている。同様の技術が、関連の定常ドメイン配列に使用することができた。あるいは、抗体分子を産生するハイブリドーマ又は他の細胞は、遺伝子変異又は他の変化を受けやすくあり得、それは、産生する抗体の結合特異性を変化させる場合もあるし、変化させない場合もある。

20

【0071】

抗体は、いくつかの方法で改変することができるため、用語「抗体分子」は、天然であろうと、全体的又は部分的合成であろうと、免疫グロブリン結合ドメインを含む任意のポリペプチドを含む、抗体断片、抗体の誘導体、機能的等価物、及び相同体を網羅すると解釈されるべきである。したがって、別のポリペプチドと融合した、免疫グロブリン結合ドメインを含むキメラ分子、又は等価物が含まれる。キメラ抗体のクローニング及び発現は、EP-A-0120694及びEP-A-0125023に記載されている。

30

【0072】

CDR配列とCH3ドメインの両方を含む抗体断片の例はミニボディであり、それは、CH3ドメインに連結したscFvを含む(Huら(1996)、Cancer Res., 56(13):3055-61)。

40

【0073】

本発明の抗体分子は、PD-L1及びLAG-3と結合する。この関連における結合は、特異的結合を指し得る。用語「特異的」は、抗体分子が、その特異的結合パートナー、ここではPD-L1及びLAG-3、以外の分子とのいかなる有意な結合も示さないだろうという状況を指し得る。用語「特異的」はまた、抗体分子が、いくつかの抗原により所有される特定のエピトープ、例えば、PD-L1及びLAG-3上のエピトープに対して特異的である場合にも適用でき、その場合、抗体分子は、エピトープを所有する様々な抗原と結合することが可能になると予想される。

【0074】

LAG-3は、その最も密接に関連するタンパク質である、CD4と、40%配列同一性

50

を共有する。本発明者らは、配列番号 1 から 3 に示されるアミノ酸配列を含む F S 1 8 - 7 - 9 F c a b を C D 4 との結合について試験した。F S 1 8 - 7 - 9 F c a b は、C D 4 との結合を示さず、この分子が L A G - 3 を特異的に結合することを実証した。したがって、好ましい実施形態において、本発明の抗体分子の L A G - 3 結合部位は、C D 4 と結合せず、又は C D 4 とのいかなる有意な結合も示さない。

【 0 0 7 5 】

本発明の抗体分子は、好ましくは、L A G - 3 抗原結合部位を含む。L A G - 3 抗原結合部位は、C H 1、C H 2、C H 3、又は C H 4 ドメインなどの抗体分子の定常ドメインに位置する。好ましくは、L A G - 3 抗原結合部位は、抗体分子の C H 3 ドメインに位置する。L A G - 3 結合部位は、好ましくは、アミノ酸配列 W D E P W G E D (配列番号 1) 及び P Y D R W V W P D E (配列番号 3) を含む。これらの配列は、実施例に記載されているような広範なスクリーニング及び特徴付けのプログラム後に本発明者らにより同定されたリード抗 L A G - 3 F c a b クローンの全部に存在した。

10

【 0 0 7 6 】

配列番号 1 及び 2 に示されるアミノ酸配列は、好ましくは、抗体分子の定常ドメインの構造ループに位置する。新しい抗原結合部位を生じさせるための抗体定常ドメインの構造ループ領域への配列の導入は、例えば、W O 2 0 0 6 / 0 7 2 6 2 0 及び W O 2 0 0 9 / 1 3 2 8 7 6 に記載されている。

【 0 0 7 7 】

抗体定常ドメインの構造ループは、A B、C D、及び E F ループを含む。C H 3 ドメインにおいて、A B、C D、及び E F ループは、C H 3 ドメインの残基 1 1 から 1 8、4 3 から 7 8、及び 9 2 から 1 0 1 に位置し、そのアミノ酸残基の番号付けは I m M u n o G e n e T i c s (IMGT) の番号付けスキームによる。配列番号 1 に示されるアミノ酸配列は、好ましくは、定常ドメインの A B ループに位置する。配列番号 3 に示されるアミノ酸配列は、好ましくは、定常ドメインの E F ループに位置する。より好ましくは、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列は、C H 3 ドメインの残基 1 1 から 1 8 に位置し、及び / 又は配列番号 3 に示されるアミノ酸配列は、C H 3 ドメインの残基 9 2 から 1 0 1 に位置し、そのアミノ酸残基の番号付けは I M G T の番号付けスキームによる。

20

【 0 0 7 8 】

加えて、抗体分子は、好ましくは、抗体分子の定常ドメインの構造ループに、配列番号 2、8、1 3、1 8、2 3、2 8、3 3、3 8、4 3、又は 4 8、より好ましくは、配列番号 2、2 8、又は 3 8、さらにより好ましくは、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含む。構造ループは、好ましくは、C D ループであり、定常ドメインは、好ましくは、C H 3 ドメインである。配列番号 2、8、1 3、1 8、2 3、2 8、3 3、3 8、4 3、又は 4 8 に示されるアミノ酸配列は、好ましくは、C H 3 ドメインの残基 4 3 から 7 8 に位置し、そのアミノ酸残基の番号付けは I M G T の番号付けスキームによる。

30

【 0 0 7 9 】

本発明の抗体分子は、(図 1 A に示されているように) C H 3 ドメインの位置 3 6 にグルタミン酸残基 (E) 及び / 又は位置 8 5 . 2 にチロシン残基 (Y) をさらに含み得、そのアミノ酸残基の番号付けは I M G T の番号付けスキームによる。特に、配列番号 8 に示される C D 構造ループ領域を含む抗体分子は、好ましくは、C H 3 ドメインの位置 3 6 にグルタミン酸残基 (E) をさらに含む。同様に、配列番号 1 8 に示される C D 構造ループ領域を含む抗体分子は、好ましくは、C H 3 ドメインの位置 8 5 . 2 にチロシン残基 (Y) をさらに含む。

40

【 0 0 8 0 】

好ましい実施形態において、本発明の抗体分子は、配列番号 5、1 0、1 5、2 0、2 5、3 0、3 5、4 0、4 5、又は 5 0 に示される配列を含み、有し、又はそれからなる C H 3 ドメイン、好ましくは、配列番号 5、3 0、又は 4 0 に示される配列を有する C H 3 ドメイン、より好ましくは、配列番号 5 に示される配列を有する C H 3 ドメインを含む。

【 0 0 8 1 】

50

本発明の抗体分子は、配列番号 5、10、15、20、25、30、35、40、45、又は 50 に示される配列を含み、有し、又はそれからなる C H 3 ドメインを含み得、C H 3 ドメイン配列は、配列番号 5、10、15、20、25、30、35、40、45、又は 50 に示される配列の C 末端側すぐにリジン残基 (K) をさらに含む。したがって、例えば、本発明の抗体分子は、配列番号 5 に示される配列を含み、有し、又はそれからなる C H 3 ドメインを含み得、配列番号 5 に示される配列の C 末端にリジン残基を有する。その場合、そのような C H 3 ドメインの配列は以下の通りである：

GQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLD
SDGSFFFLYSKLTVPYDRWVWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 1 3
5)

10

【 0 0 8 2 】

加えて、本発明の抗体分子は、I g G 1、I g G 2、I g G 3、又は I g G 4 分子の C H 2 ドメインなどの免疫グロブリン G 分子の C H 2 ドメインを含み得る。好ましくは、本発明の抗体分子は、I g G 1 分子の C H 2 ドメインを含む。C H 2 ドメインは、配列番号 5 3 に示される配列を有し得る。

【 0 0 8 3 】

抗体分子の C H 2 ドメインは、F c R I、F c R I I a、F c R I I b、F c R I I I などの 1 つ若しくは複数の F c 受容体及び / 又は補体との C H 2 ドメインの結合を低下させ、又は抑止するための変異を含み得る。ヒト I g G ドメインの C H 2 ドメインは、通常、F c 受容体及び補体と結合し、本発明者らは、F c 受容体との結合の低下が、抗体依存性細胞性細胞傷害 (ADCC) を低下させ、補体との結合の低下が、抗体分子の補体依存性細胞傷害 (CDC) 活性を低下させるだろうと推論する。1 つ又は複数の F c 受容体及び補体への C H 2 ドメインの結合を低下させ、又は抑止するための変異は、公知であり、B r u h n s ら (2 0 0 9) 及び X u ら (2 0 0 0) に記載された「L A L A 変異」を含む。したがって、抗体分子は、C H 2 ドメインを含み得、C H 2 ドメインは、C H 2 ドメインの位置 4 及び 5 にアラニン残基を含み、その番号付けは、I M G T の番号付けスキームによる。例えば、抗体分子は、配列番号 5 4 に示される配列を含み、有し、又はそれからなる I g G 1 C H 2 ドメインを含む。

20

【 0 0 8 4 】

本発明による抗体分子は、C D R に基づいた P D - L 1 に対する抗原結合部位を含む。用語「C D R に基づいた抗原結合部位」は、6 個の C D R で構成される抗体分子可変領域の抗原結合部位を指す。P D - L 1 に対する抗体分子の調製、及びそのような抗体分子の C D R 配列の決定は、十分、当業者の能力の範囲内であり、多くの適切な技術が当技術分野において公知である。

30

【 0 0 8 5 】

好ましくは、本発明の抗体分子は、抗体 8 4 G 0 9 の H C D R 3 を含む。H C D R 3 は、抗体分子の特異性を決定することにおいて役割を果たすことが公知である (Segal ら、(1974)、PNAS、71:4298-4302; Amit ら、(1986)、Science、233:747-753; Chothia ら、(1987)、J. Mol. Biol.、196:901-917; Chothia ら、(1989)、Nature、342:877-883; Caton ら、(1990)、J. Immunol.、144:1965-1968; Sharon ら、(1990a)、PNAS、87:4814-4817; Sharon ら、(1990b)、J. Immunol.、144:4863-4869; Kabat ら、(1991b)、J. Immunol.、147:1709-1719)。

40

【 0 0 8 6 】

抗体分子は、抗体 8 4 G 0 9 の H C D R 1、H C D R 2、L C D R 1、L C D R 2、及び / 又は L C D R 3 をさらに含み得る。配列番号 9 2 及び 9 3 それぞれに示される、抗体 8 4 G 0 9 の V H ドメイン配列及び V L ドメイン配列由来の C D R の配列を決定することに当業者は何の困難もないだろう。C D R 配列は、例えば、K a b a t (Kabat, E.A. ら、(1991)) 又は I M G T 番号付けスキームにより決定され得る。

【 0 0 8 7 】

I M G T 番号付けスキームによる抗体 8 4 G 0 9 の H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3

50

、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3の配列は、それぞれ、配列番号86、87、88、89、90、及び91に示されている。

【0088】

Kabatによる抗体84G09のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3の配列は、それぞれ、配列番号136、137、138、139、140、及び141に示されている。

【0089】

抗体はまた、抗体84G09のVH及び/又はVLドメインを含み得る。抗体84G09のVHドメイン配列及びVLドメイン配列は、それぞれ、配列番号92及び93に示されている。

10

【0090】

好ましい実施形態において、本発明の抗体分子は、(i)抗体84G09のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3配列を含む、PD-L1に対する、CDRに基づいた抗原結合部位、並びに(ii)抗体分子のCH3ドメインに位置するLAG-3抗原結合部位を含み、LAG-3結合部位が、配列番号1及び3に示されるアミノ酸配列、並びに配列番号2、8、13、18、23、28、33、38、43、及び48からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0091】

より好ましくは、本発明の抗体分子は、(i)抗体84G09のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3配列を含む、PD-L1に対する、CDRに基づいた抗原結合部位、並びに(ii)抗体分子のCH3ドメインに位置するLAG-3抗原結合部位を含み、LAG-3結合部位が、配列番号1及び3に示されるアミノ酸配列、並びに配列番号2、28、及び38からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

20

【0092】

さらにより好ましくは、本発明の抗体分子は、(i)抗体84G09のHCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3配列を含む、PD-L1に対する、CDRに基づいた抗原結合部位、並びに(ii)抗体分子のCH3ドメインに位置するLAG-3抗原結合部位を含み、LAG-3結合部位が、配列番号1、2、及び3に示されるアミノ酸配列を含む。

30

【0093】

好ましい実施形態において、本発明の抗体分子は、配列番号92及び93それぞれに示される配列を含み、有し、又はそれからなるVHドメイン及びVLドメイン、並びに、配列番号5、10、15、20、25、30、35、40、45、又は50に示される配列を含み、有し、又はそれからなるCH3ドメイン、好ましくは、配列番号5、30、又は40に示される配列を含み、有し、又はそれからなるCH3ドメイン、より好ましくは、配列番号5に示される配列を含み、有し、又はそれからなるCH3ドメインを含む。

【0094】

さらなる好ましい実施形態において、抗体分子は、配列番号94から113に示される配列を含み、有し、又はそれからなる重鎖、及び配列番号116に示される配列を含み、有し、又はそれからなる軽鎖を含む。より好ましくは、抗体分子は、配列番号94、95、104、105、108、及び109に示される配列を含み、有し、又はそれからなる重鎖、並びに配列番号116に示される配列を含み、有し、又はそれからなる軽鎖を含む。最も好ましくは、抗体分子は、配列番号94又は95に示される配列を含み、有し、又はそれからなる重鎖、及び配列番号116に示される配列を含み、有し、又はそれからなる軽鎖を含む。

40

【0095】

本発明の抗体分子はまた、軽鎖配列及び重鎖配列のVLドメイン及びVHドメインがそれぞれ変化しないままであるという条件で、本明細書に開示された構造ループ、CH3ドメイン、CH2ドメイン、CH2及びCH3ドメイン、軽鎖、又は重鎖の配列のバリエーション

50

を含み得る。適切なバリエーションは、配列変化又は変異の方法、及びスクリーニングを用いて得ることができる。好ましい実施形態において、1つ又は複数のバリエーション配列を含む抗体分子は、LAG-3及びPD-L1に対する結合特異性及び/又は結合親和性などの、親の抗体分子の機能的特性の1つ又は複数保持する。例えば、1つ又は複数のバリエーション配列を含む抗体分子は、好ましくは、(親の)抗体分子と同じ親和性、又はそれより高い親和性で、LAG-3及びPD-L1と結合する。親の抗体分子は、バリエーション抗体分子へ組み込まれているアミノ酸置換、欠失、及び/又は挿入を含まない抗体分子である。

【0096】

例えば、本発明の抗体分子は、軽鎖配列及び重鎖配列のVLドメイン及びVHドメインがそれぞれ変化しないままであるという条件で、本明細書に開示された構造ループ、CH3ドメイン、CH2ドメイン、CH2及びCH3ドメイン、軽鎖、又は重鎖の配列と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.1%、少なくとも99.2%、少なくとも99.3%、少なくとも99.4%、少なくとも99.5%、少なくとも99.6%、少なくとも99.7%、少なくとも99.8%、又は少なくとも99.9%配列同一性を有する構造ループ、CH3ドメイン、CH2ドメイン、CH2及びCH3ドメイン、軽鎖、又は重鎖の配列を含み得る。

【0097】

好ましい実施形態において、本発明の抗体分子は、配列番号4、5、又は135に示されるCH3ドメイン配列と少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.1%、少なくとも99.2%、少なくとも99.3%、少なくとも99.4%、少なくとも99.5%、少なくとも99.6%、少なくとも99.7%、少なくとも99.8%、又は少なくとも99.9%配列同一性を有するCH3ドメイン配列を含む。

【0098】

さらなる好ましい実施形態において、本発明の抗体分子は、配列番号6又は7に示されるCH2及びCH3ドメイン配列と少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.1%、少なくとも99.2%、少なくとも99.3%、少なくとも99.4%、少なくとも99.5%、少なくとも99.6%、少なくとも99.7%、少なくとも99.8%、又は少なくとも99.9%配列同一性を有する、CH3及びCH2ドメイン配列を含む。

【0099】

配列同一性は、一般的に、アルゴリズムGAP (Wisconsin GCGパッケージ、Accelrys Inc、San Diego USA)を参照して定義される。GAPは、2つの完全な配列をアラインメントするために、マッチの数を最大限にし、かつギャップの数を最小限にするNeedleman及びWunschアルゴリズムを用いる。一般的に、ギャップ生成ペナルティー=12及びギャップ伸長ペナルティー=4を有するデフォルトパラメータが用いられる。GAPの使用は好ましくあり得るが、他のアルゴリズムが用いられてもよく、例えば、一般的にデフォルトパラメータを使用する、BLAST (Altschulら、(1990) J. Mol. Biol. 215: 405-410の方法を用いる)、FASTA (Pearson及びLipman (1988) PNAS USA 85: 2444-2448の方法を用いる)、又はSmith-Watermanアルゴリズム (Smith及びWaterman (1981) J. Mol Biol. 147: 195-197)、又はAltschulら (1990) 上記のTBLASTNプログラムである。特に、ps-BLASTアルゴリズム (Nucl. Acids Res. (1997) 25 3389-3402) が用いられ得る。

【0100】

本発明の抗体分子は、軽鎖配列及び重鎖配列のVLドメイン及びVHドメインがそれぞれ変化しないままであるという条件で、本明細書に開示された構造ループ、CH3ドメイン、CH2ドメイン、CH2及びCH3ドメイン、軽鎖、又は重鎖の配列と比較して、1個又は複数のアミノ酸配列変化 (アミノ酸残基の付加、欠失、置換、及び/又は挿入)、好ましくは、20個若しくはそれ未満の変化、15個若しくはそれ未満の変化、10個若し

10

20

30

40

50

くはそれ未満の変化、5個若しくはそれ未満の変化、4個若しくはそれ未満の変化、3個若しくはそれ未満の変化、2個若しくはそれ未満の変化、又は1個の変化を有する構造ループ、CH₃ドメイン、CH₂ドメイン、CH₂及びCH₃ドメイン、軽鎖、又は重鎖の配列も含み得る。特に、VH及びVLドメイン配列以外の、抗体分子の1つ又は複数のフレームワーク領域に変化が生じ得る。

【0101】

好ましい実施形態において、本発明の抗体分子は、配列番号4、5、又は135に示されるCH₃ドメイン配列と比較して、1個又は複数のアミノ酸配列変化（アミノ酸残基の付加、欠失、置換、及び/又は挿入）、好ましくは、20個若しくはそれ未満の変化、15個若しくはそれ未満の変化、10個若しくはそれ未満の変化、5個若しくはそれ未満の変化、4個若しくはそれ未満の変化、3個若しくはそれ未満の変化、2個若しくはそれ未満の変化、又は1個の変化を有するCH₃ドメイン配列を含み得る。

10

【0102】

さらなる好ましい実施形態において、本発明の抗体分子は、配列番号6又は7に示されるCH₂及びCH₃ドメイン配列と比較して、1個又は複数のアミノ酸配列変化（アミノ酸残基の付加、欠失、置換、及び/又は挿入）、好ましくは、20個若しくはそれ未満の変化、15個若しくはそれ未満の変化、10個若しくはそれ未満の変化、5個若しくはそれ未満の変化、4個若しくはそれ未満の変化、3個若しくはそれ未満の変化、2個若しくはそれ未満の変化、又は1個の変化を有するCH₃及びCH₂ドメイン配列を含む。

【0103】

20

L A G - 3 及び/若しくは P D - L 1 との結合において本発明の抗体分子と競合し、又は L A G - 3 及び/若しくは P D - L 1 上の、本発明の抗体分子と同じエピトープと結合する抗体分子であって、P D - L 1 に対する、C D R に基づいた抗原結合部位と、抗体分子のCH₃ドメインに位置するL A G - 3 抗原結合部位の両方を含む、抗体分子も企図される。2つの抗体による抗原における競合を決定するための方法は、当技術分野において公知である。例えば、2つの抗体による抗原との結合の競合は、B I A c o r e を用いて決定することができる。抗体により結合されたエピトープをマッピングするための方法は、同様に、当技術分野において公知である。

【0104】

本発明の抗体分子は、好ましくは、 1×10^{-9} M の親和性 (K_D) 又はそれより高い親和性で、L A G - 3 と結合する。例えば、本発明の抗体分子は、 8×10^{-10} M の親和性 (K_D) 又はそれより高い親和性で、L A G - 3 と結合し得る。

30

【0105】

F c a b の結合部位は、極めて近接して位置する2つの結合部位を有する相対的にコンパクトな抗体断片を形成するため、F c a b はモノクローナル抗体より小さい結合界面を有する。対照的に、典型的なm A b のF a b アームは、可動性ヒンジ領域により隔てられている。F c a b の2つの抗原結合部位はまた、典型的なm A b のそれらと比較した場合、お互いに空間的に近接している。このより小さい結合界面及び2つの結合部位の可動性の低減に基づけば、抗L A G - 3 F c a b が、モノクローナル抗体ベンチマークと類似した親和性及び作用強度でL A G - 3 と結合し、かつそれを阻害することができることは驚くべきことであった。

40

【0106】

本発明の抗体分子は、好ましくは、 1×10^{-9} M の親和性 (K_D)、又はそれより高い親和性で、P D - L 1 と結合する。

【0107】

L A G - 3 又は P D - L 1 などの同族抗原との抗体分子の結合親和性は、例えば、表面プラズモン共鳴法 (SPR) により決定することができる。細胞表面上に発現したL A G - 3 又は P D - L 1 などの同族抗原との抗体分子の結合親和性は、フローサイトメトリにより決定することができる。

【0108】

50

本発明の抗体分子は、好ましくは、細胞の表面上に発現したLAG-3及びPD-L1と結合する能力がある。その細胞は、好ましくは、がん細胞である。

【0109】

本発明の抗体分子は、好ましくは、LAG-3及びPD-L1と同時に結合する能力がある。好ましい実施形態において、本発明の抗体分子は、LAG-3及びPD-L1と同時に結合する能力があり、LAG-3及びPD-L1が、単一細胞の表面上、又は2つの異なる細胞の表面上に発現している。

【0110】

本発明の抗体分子は、ヒトLAG-3、マウスLAG-3、及び/又はカニクイザルLAG-3と結合し得る。好ましくは、本発明の抗体分子は、ヒトLAG-3と結合する。最も好ましくは、本発明の抗体分子は、ヒトLAG-3及びヒトPD-L1と結合する。

【0111】

本発明の抗体分子は、(i)PD-L1に対する、CDRに基づいた抗原結合部位、及び(ii)抗体分子の定常ドメインに位置するLAG-3抗原結合部位を含む。したがって、抗体分子の、CH3ドメインなどの定常ドメインに位置するLAG-3抗原結合部位を含まない抗体分子は、本発明の一部を形成することはない。同様に、PD-L1に対する、CDRに基づいた抗原結合部位を含まない分子は、本発明の一部を形成することはない。

【0112】

本発明の抗体分子は、治療剤又は検出可能な標識とコンジュゲートされ得る。この場合、抗体分子は、コンジュゲートと呼ばれ得る。例えば、抗体分子は、免疫系調節物質、細胞傷害性分子、放射性同位元素、又は検出可能な標識とコンジュゲートされ得る。免疫系調節物質又は細胞傷害性分子はサイトカインであり得る。検出可能なマーカーは、放射性同位元素、例えば、非治療的放射性同位元素であり得る。

【0113】

抗体分子は、ペプチド結合又はリンカーを用いて、治療剤又は検出可能な標識とコンジュゲートされ得、すなわち、融合ポリペプチド内に、前記治療剤又は検出可能な標識、及び抗体分子又はそのポリペプチド鎖コンポーネントを含む。コンジュゲーションのための他の手段には、化学的コンジュゲーション、特に、二機能性試薬を用いる(例えば、DOUBLE-REAGENTS(商標)架橋試薬選択ガイド(Cross-linking Reagents Selection Guide)、Pierceを使用する)架橋が挙げられる。

【0114】

したがって、抗体分子及び治療剤又は検出可能な標識は、お互いに直接的に、例えば、任意の適切な化学結合を通して、又はリンカー、例えば、ペプチドリinkerを通して、接続され得る。

【0115】

ペプチドリinkerは、短くあり得る(アミノ酸の2から20個、好ましくは2から15個の残基ひと続き)。ペプチドリinker配列の適切な例は当技術分野において公知である。1つ又は複数の異なるリンカーが用いられ得る。リンカーは、約5アミノ酸長であり得る。

【0116】

化学結合は、例えば、共有結合又はイオン結合であり得る。共有結合の例には、ペプチド結合(アミド結合)及びジスルフィド結合が挙げられる。例えば、抗体分子と治療剤又は診断剤は、共有結合的に連結され得る。例えば、ペプチド結合(アミド結合)による。したがって、抗体分子及び治療剤又は診断剤は、単一鎖ポリペプチドとして産生(分泌)され得る。

【0117】

本発明はまた、本発明の抗体分子をコードする単離された核酸を提供する。当業者は、当技術分野で周知の方法を用いて、そのような核酸を調製することに困難もないだろう。単離された核酸は、本発明の抗体分子を、例えば、細菌、酵母、昆虫、又は哺乳類の宿主細胞における発現により発現するのに用いられ得る。好ましい宿主細胞は、CHO、HEK、又はNS0細胞などの哺乳類細胞である。核酸は、一般的に、発現のための組換えベク

10

20

30

40

50

ターの形をとって提供される。

【 0 1 1 8 】

単離された核酸は、例えば、F S 1 8 - 7 - 9 (C H O コドン最適化ヌクレオチド配列)、F S 1 8 - 7 - 9 (H E K 2 9 3 発現型ヌクレオチド配列)、F S 1 8 - 7 - 3 2、F S 1 8 - 7 - 3 3、F S 1 8 - 7 - 3 6、F S 1 8 - 7 - 5 8、F S 1 8 - 7 - 6 2、F S 1 8 - 7 - 6 5、F S 1 8 - 7 - 7 8、F S 1 8 - 7 - 8 8、及び F S 1 8 - 7 - 9 5 の C H 3 ドメイン、それぞれをコードする配列番号 1 4 2、4、9、1 4、1 9、2 4、2 9、3 4、3 9、4 4、又は 4 9 に示される配列を含み得る。

【 0 1 1 9 】

そのような核酸及びベクターを含むインビトロ宿主細胞は、本発明の抗体分子を発現するためのそれらの使用であるように、本発明の一部であり、その後、その抗体分子は、細胞培養から精製され、任意選択により薬学的組成物へ製剤化され得る。したがって、本発明は、本発明の組換え宿主細胞を抗体分子の産生のための条件下で培養する工程を含む、本発明の抗体分子を産生する方法をさらに提供する。上記で言及されているような適切な宿主細胞を培養するための方法は、当技術分野において周知である。方法は、抗体分子を単離及び / 又は精製する工程をさらに含み得る。方法はまた、抗体分子を、任意選択により薬学的に許容される賦形剤又は下記のような他の物質と共に、薬学的組成物へ製剤化する工程を含み得る。

【 0 1 2 0 】

P D - L 1 は、多くのがん細胞上に発現していることが公知であるが、がん細胞上の L A G - 3 の発現はより限られている。どちらも、免疫系の細胞上に発現している。特に、L A G - 3 は、腫瘍環境内の疲弊した T 細胞上に発現していることが公知である。加えて、本発明者らは、L A G - 3 と P D - L 1 の両方と結合する抗体分子の使用が、がんの同系マウスモデルにおいて腫瘍成長を抑制することに効果的であること、並びにそのような抗体分子が、L A G - 3 及び P D - L 1 それぞれに結合する 2 つの結合分子の投与より効果的であることを示している。

【 0 1 2 1 】

したがって、本発明の抗体分子は、患者においてがんを処置する方法に用いられ得る。患者は、好ましくは、ヒト患者である。

【 0 1 2 2 】

本発明の抗体分子を用いて処置されるがんの細胞は、例えばそれらの細胞表面上に、L A G - 3 を発現し得る。一実施形態において、処置されるがんの細胞は、例えばそれらの細胞表面上に、L A G - 3 を発現することが決定されている場合がある。例えば、B 細胞リンパ腫は、それらの細胞表面上に L A G - 3 を発現することが示されている。細胞表面上での抗原の発現を決定するための方法は、当技術分野において公知であり、それには、例えば、フローサイトメトリが挙げられる。

【 0 1 2 3 】

下記の実施例 4 は、本発明の抗体分子が、マウスにおいて、L A G - 3 発現 T I L などの、高レベルの L A G - 3 発現免疫細胞を有する腫瘍を処置するために用いることができることを示している。したがって、加えて、又は代替として、本発明の抗体分子を用いて処置されるがんの腫瘍は、L A G - 3 発現免疫細胞を含み得る。L A G - 3 発現 T I L などの L A G - 3 発現免疫細胞は、多くのがんにおける腫瘍細胞の間に存在する。一実施形態において、本発明の抗体分子を用いて処置されるがんの腫瘍は、L A G - 3 発現免疫細胞を含有することが決定されている。腫瘍において、又は腫瘍の周辺において、L A G - 3 発現免疫細胞の存在を決定するための方法は、当技術分野において公知である。

【 0 1 2 4 】

下記の実施例 4 は、本発明の抗体分子が、P D - L 1 を細胞表面上に発現する腫瘍を処置するために用いられ得ることも示す。したがって、加えて、又は代替として、本発明の抗体分子を用いて処置されるがんの細胞は、例えばそれらの細胞表面上に、P D - L 1 を発現し得る。加えて、又は代替として、処置されるがんの腫瘍は、P D - L 1 を発現する、

10

20

30

40

50

T I Lなどの免疫細胞を含み得る。処置されるがんの細胞は、例えばそれらの細胞表面上に、P D - L 1を発現することが決定されている場合がある。加えて、又は代替として、処置されるがんの腫瘍は、P D - L 1を発現する、T I Lなどの免疫細胞を含有することが決定されている場合がある。

【 0 1 2 5 】

L A G - 3 及び P D - L 1 の細胞表面発現は、抗体分子が、免疫細胞及び / 又はがん細胞の表面上に発現した L A G - 3 及び P D - L 1 と結合するのを可能にすることが予想される。これは、指向型治療、がん細胞と免疫細胞の橋渡し、及び局在化を生じると考えられる。

【 0 1 2 6 】

本発明の抗体分子を用いて処置されるがんは、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫（例えば、びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫、緩徐進行性非ホジキンリンパ腫、マンツル細胞リンパ腫）、卵巣がん、前立腺がん、結腸直腸がん、線維肉腫、腎細胞癌、メラノーマ、膵がん、乳がん、多形神経膠芽腫、肺がん（例えば、非小細胞肺がん）、頭頸部がん（例えば、頭頸部扁平上皮癌）、胃がん（stomach cancer）（胃がん（gastric cancer））、膀胱がん、子宮頸がん、子宮がん、外陰がん、精巣がん、陰茎がん、白血病（例えば、慢性リンパ性白血病、骨髄性白血病、急性リンパ芽球性白血病、又は慢性リンパ芽球性白血病）、多発性骨髄腫、扁平上皮がん、精巣がん、食道がん（例えば、食道胃接合部の腺癌）、カボジ肉腫、及び中枢神経系（CNS）リンパ腫、肝細胞癌、上咽頭がん、メルケル細胞癌、及び中皮腫からなる群から選択され得る。これらのがんの腫瘍は、それらの細胞表面上に P D - L 1 を発現し、並びに / 又は P D - L 1 及び / 若しくは L A G - 3 を発現する T I L などの免疫細胞を含有することが知られ、又は予想される。

【 0 1 2 7 】

抗 L A G - 3 抗体を用いる、腎細胞癌、肺がん（例えば、非小細胞肺がん）、上咽頭がん、結腸直腸がん、メラノーマ、胃がん（stomach cancer）（胃がん（gastric cancer））、食道がん（例えば、食道胃接合部の腺癌）、卵巣がん、子宮頸がん、膀胱がん、頭頸部がん（例えば、頭頸部扁平上皮癌）、白血病（例えば、慢性リンパ性白血病）、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫（例えば、びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫、緩徐進行性非ホジキンリンパ腫、マンツル細胞リンパ腫）、及び多発性骨髄腫の処置は、臨床試験において調べられており、有望な結果が示されている。したがって、本発明の抗体分子を用いて処置されるがんは、腎細胞癌、肺がん（例えば、非小細胞肺がん）、上咽頭がん、結腸直腸がん、メラノーマ、胃がん（stomach cancer）（胃がん（gastric cancer））、食道がん（例えば、食道胃接合部の腺癌）、卵巣がん、子宮頸がん、膀胱がん、頭頸部がん（例えば、頭頸部扁平上皮癌）、白血病（例えば、慢性リンパ性白血病）、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫（例えば、びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫、緩徐進行性非ホジキンリンパ腫、マンツル細胞リンパ腫）、又は多発性骨髄腫であり得る。

【 0 1 2 8 】

抗 P D - L 1 抗体を用いる、メラノーマ、結腸直腸がん、乳がん、膀胱がん、腎細胞癌、膀胱がん、胃がん、頭頸部がん（例えば、頭頸部扁平上皮癌）、中皮腫、肺がん（例えば、非小細胞肺がん）、卵巣がん、メルケル細胞癌、膵がん、メラノーマ、及び肝細胞癌の処置もまた、臨床試験で調べられて、有望な結果が示されている。したがって、本発明の抗体分子を用いて処置されるがんは、メラノーマ、結腸直腸がん、乳がん、膀胱がん、腎細胞癌、膀胱がん、胃がん、頭頸部がん（例えば、頭頸部扁平上皮癌）、中皮腫、肺がん（例えば、非小細胞肺がん）、卵巣がん、メルケル細胞癌、膵がん、メラノーマ、又は肝細胞癌であり得る。

【 0 1 2 9 】

本発明の抗体分子を用いる処置についての好ましいがんは、肺がん（例えば、非小細胞肺がん）、膀胱がん、頭頸部がん（頭頸部の扁平上皮癌）、びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫、胃がん（gastric cancer）、膵がん、及び肝細胞癌である。これらのがんの腫瘍は、L A G - 3 発現免疫細胞を含むこと、及びそれらの細胞表面上に P D - L 1 を発現する

10

20

30

40

50

か、又はPD-L1を発現する免疫細胞を含むかのいずれかであることがわかっている。

【0130】

適用が、乳がんなどの特定の型のがんを指す場合、これは、関連組織、この場合、乳房組織の悪性形質転換を指す。異なる組織、例えば卵巣組織の悪性形質転換が起源であるがんは、乳房などの身体の別の場所において転移性病変を生じ得るが、それにより、本明細書で言及されているような乳がんではなく、卵巣がんである。

【0131】

がんは原発性又は続発性がんであり得る。したがって、本発明の抗体分子は、患者においてがんを処置する方法に用いられ得、そのがんは原発性腫瘍及び/又は腫瘍転移である。

【0132】

本発明の抗体分子は、患者、好ましくはヒト患者の処置の方法に用いられるように設計される。抗体分子は、通常、薬学的組成物の形で投与され、その薬学的組成物は、抗体分子に加えて、薬学的に許容される賦形剤などの少なくとも1つのコンポーネントを含み得る。例えば、本発明の薬学的組成物は、活性成分に加えて、薬学的に許容される賦形剤、担体、バッファー、安定剤、又は当業者に周知の他の材料を含み得る。そのような材料は、無毒であるべきであり、かつ活性成分の効力に干渉すべきではない。担体又は他の材料の正確な性質は、投与経路に依存し、その投与経路は、注射、例えば、静脈内又は皮下注射により得る。抗体分子は、静脈内に、又は皮下に投与され得る。

【0133】

液体薬学的組成物は、一般的に、水、石油、動物油又は植物油、ミネラルオイル又は合成油などの液体担体を含む。生理食塩水、デキストロース若しくは他の糖類溶液、又はエチレングリコール、プロピレングリコール、若しくはポリエチレングリコールなどのグリコールが含まれ得る。

【0134】

静脈内注射、又は苦痛の部位における注射について、抗体分子、又は抗体分子を含む薬学的組成物は、好ましくは、発熱物質を含まず、かつ適切なpH、等張性、及び安定性を有する非経口的に許容される水溶液の形をとる。当業者は、例えば、塩化ナトリウム注射液、リンゲル注射液、乳酸リンゲル注射液などの等張性媒体を用いて適切な溶液を調製する能力が十分、ある。必要に応じて、保存剤、安定剤、バッファー、抗酸化剤、及び/又は他の添加剤が使用され得る。薬学的製剤の調製のための多くの方法は当業者に公知である。例えば、Robinson編、Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems、Marcel Dekker, Inc.、New York、1978を参照。

【0135】

本発明による抗体分子を含む組成物は、処置される状態に依存して、単独で、又は他の処置と組み合わせて、同時に若しくは逐次的に、又は別の治療剤との混合調製物として、投与され得る。例えば、本発明の抗体分子は、処置される疾患、例えば、上記で言及されているようながんについての既存の治療剤と組み合わせて、投与され得る。例えば、本発明の抗体分子は、化学療法、抗腫瘍ワクチン接種（がんワクチン接種とも呼ばれる）、放射線治療、免疫療法、腫瘍退縮ウイルス、キメラ抗原受容体（CAR）T細胞治療、又はホルモン治療などの第2の抗がん治療と組み合わせて、患者に投与され得る。

【0136】

本発明の抗体分子が、化学療法、抗腫瘍ワクチン接種、又は放射線治療などの抗がん治療におけるアジュバントとして働き得ることが予想される。理論に縛られるつもりはないが、化学療法、抗腫瘍ワクチン接種、又は放射線治療の一部としての抗体分子の患者への投与は、化学療法、抗腫瘍ワクチン接種、又は放射線治療の単独で達成されるものより大きい、がん関連抗原LAG-3及びPD-L1に対する免疫応答を引き起こすだろうことが考えられる。例えば、抗LAG-3治療は、マウスにおいて、ウイルスに基づいた病態を処置することに良い効力を示している（Blackburn SDら、2009）。

【0137】

10

20

30

40

50

したがって、患者においてがんを処置する方法は、化学療法剤、抗腫瘍ワクチン、放射線核種、免疫療法剤、腫瘍退縮ウイルス、C A R - T細胞、又はホルモン治療のための作用物質と組み合わせて、本発明による抗体分子の治療的有効量を患者に投与する工程を含み得る。化学療法剤、抗腫瘍ワクチン、放射線核種、免疫療法剤、腫瘍退縮ウイルス、C A R - T細胞、又はホルモン治療のための作用物質は、好ましくは、問題になっているがんについての化学療法剤、抗腫瘍ワクチン、放射線核種、免疫療法剤、腫瘍退縮ウイルス、C A R - T細胞、又はホルモン治療のための作用物質、すなわち、問題になっているがんの処置において有効であると示されている化学療法剤、抗腫瘍ワクチン、放射線核種、免疫療法剤、腫瘍退縮ウイルス、C A R - T細胞、又はホルモン治療のための作用物質である。問題になっているがんについて有効であると示されている適切な化学療法剤、抗腫瘍ワクチン、放射線核種、免疫療法剤、腫瘍退縮ウイルス、C A R - T細胞、又はホルモン治療のための作用物質の選択は、十分、当業者の能力の範囲内である。

10

【 0 1 3 8 】

例えば、方法が、化学療法剤と組み合わせて、本発明による抗体分子の治療的有効量を患者に投与する工程を含む場合、化学療法剤は、タキサン、細胞傷害性抗生物質、チロシンキナーゼ阻害剤、P A R P阻害剤、B _ R A F酵素阻害剤、アルキル化剤、白金類似体、ヌクレオシド類似体、サリドマイド誘導体、抗悪性腫瘍性化学療法剤その他からなる群から。タキサンには、ドセタキセル、パクリタキセル及びn a b - パクリタキセルが挙げられる；細胞傷害性抗生物質には、アクチノマイシン、プレオマイシン、アントラサイクリン、ドキソルビシン、及びバルルビシンが挙げられる；チロシンキナーゼ阻害剤には、エルロチニブ、ゲフィチニブ、アキシチニブ、P L X 3 3 9 7、イマチニブ、コビメチニブ (cobemitinib)、及びトラメチニブが挙げられる；P A R P阻害剤には、ニラバリブ (niraparib) が挙げられる；B - R a f酵素阻害剤には、ベムラフェニブ及びダブラフェニブが挙げられる；アルキル化剤には、ダカルバジン、シクロホスファミド、テモゾロミドが挙げられる；白金類似体には、カルボプラチン、シスプラチン、及びオキサリプラチンが挙げられる；ヌクレオシド類似体には、ゲムシタピン及びアザシチジンが挙げられる；抗悪性腫瘍剤には、フルダラビンが挙げられる。本発明における使用に適した他の化学療法剤には、メトトレキサート、デファクチニブ、エンチノスタット、ペメトレキセド、カペシタピン、エリブリン、イリノテカン、フルオロウラシル、及びビンブラスチンが挙げられる。

20

30

【 0 1 3 9 】

がんの処置のためのワクチン接種戦略は、診療所で実行されており、かつ科学文献 (例えば、Rosenberg, S. 2000 Development of Cancer Vaccines) 内で詳細に論じられている。これは、主に、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) 有り又は無しのどちらの場合にしても、ワクチン接種の方法として、自己又は同種異系のがん細胞を用いることにより、免疫系を促して、その自己又は同種異系のがん細胞により発現する様々な細胞マーカーに対して応答させるための戦略を含む。G M - C S Fは、抗原提示において強い応答を誘発し、前記戦略と共に使用される場合、特によく働く。

【 0 1 4 0 】

投与は、「治療的有効量」であり得、これは、患者に利益を示すのに十分である。そのような利益は、少なくとも1つの症状の寛解で少なくともあり得る。したがって、特定化された疾患の「処置」は、少なくとも1つの症状の寛解を指す。投与される実際の量、並びに投与の速度及び時間経過は、処置されることになっているものの性質及び重症度、処置されることになっている特定の患者、個々の患者の臨床状態、障害の原因、組成物の送達の部位、抗体分子の型、投与方法、投与のスケジューリング、並びに医師に知られた他の因子に依存する。処置の処方、例えば、投与量の決定などは、一般開業医及び他の医師の責任の範囲内であり、症状の重症度及び/又は処置されることになっている疾患の進行に依存し得る。抗体分子の適切な用量は、当技術分野において周知である (Ledermannら (1991) Int. J. Cancer 47: 659-664; 及びBagshaweら (1991) Antibody, Immu

40

50

noconjugates and Radiopharmaceuticals 4: 915-922)。本明細書中、又は投与されることになっている抗体分子に適切である場合にはPhysician's Desk Reference (2003) に示された特定の投与量が用いられ得る。抗体分子の治療的有効量又は適切な用量は、そのインビトロ活性と動物モデルにおけるインビボ活性を比較することにより決定することができる。マウス及び他の試験動物における有効な投与量のヒトへの外挿のための方法は公知である。正確な用量は、処置される領域のサイズ及び位置や、抗体分子の正確な性質などの数々の要因に依存する。処置は、毎日、週2回、毎週、又は毎月の間隔で、医師の裁量で繰り返される場合がある。処置は、手術の前及び/又は後に与えられる場合があり、外科的処置の解剖学的部位に直接、投与又は適用され得る。

10

【0141】

本発明のさらなる態様及び実施形態は、以下の実験的例証を含む本開示を考慮すれば、当業者に明らかであろう。

【0142】

本明細書で言及された全ての文書は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【0143】

本明細書に用いられる場合、「及び/又は」は、その他のものの有無に関わらず、その2つの特定された特徴又はコンポーネントのそれぞれの特定の開示として解釈されるべきである。例えば、「A及び/又はB」は、ちょうどあたかもそれぞれが本明細書に個々に示されているかのように、(i) A、(ii) B、及び(iii) AとBのそれぞれの特定の開示として解釈されるべきである。

20

【0144】

文脈が他に指示しない限り、上記で示された特徴の記載及び定義は、本発明のいかなる特定の態様又は実施形態にも限定されず、記載されている全ての態様及び実施形態に等しく適用される。

【0145】

以下、本発明のある特定の態様及び実施形態を、例として、上記の図を参照して例証する。

【実施例】

【0146】

実施例 1

F c a b 分子の選択及び特徴付け

1.1 抗ヒトLAG-3 F c a b のナイーブ選択及び親和性成熟

1.1.1 ナイーブ選択

A B (残基14から18)及びE F (残基92から101)ループ内にランダム化を有するヒトI g G 1のC H 3ドメイン (IMGTの番号付け1.4から130)を示すナイーブファージライブラリーを、組換えF c タグ付きヒトLAG-3 (LAG-3 Fc) 抗原 (R&D systems、2319-L3-050)での選択に用いた。ライブラリーを、プロテインA (Life Technologies、10002D)又はプロテインG (Life Technologies、10004D)ビーズ上に捕獲された抗原を用いて3ラウンドで選択した。そのアウトプットをE L I S Aによりスクリーニングし、陽性結合剤をサブクロニングし、E a s y S e l e c t ピキア発現キット (Life Technologies、K1740-01)を用いてピキア・パストリス (Pichia pastoris)において、可溶性F c a b (短縮型ヒンジを含有する)として発現させた。その後、F c a bを、B i a c o r e 3000 (GE Healthcare)において組換えヒトLAG-3 F c との結合についてスクリーニングした。簡単に述べれば、LAG-3 Fc (R&D systems、2319-L3-050)を、7200RUの密度で、アミンカップリング (GE Healthcare、BR-1000-50)を用いて、CM5チップ (GE Healthcare、BR-100012)にカップリングさせた。F c a bを、H B S - P (GE Healthcare、BR100368)バッファー中に希釈し、250nM、500nM、及び1000nMで3分間、注入し、その後、5分間、バッファー中で解離させた。参照を引いたデータ (LAG-3 Fcフローセル2 - ブランクフローセル)を、B I A e v a l u a t i o n 3.2ソフトウェアを用いて

30

40

50

分析して、結合を同定した。その後、F c a bを、H E K細胞に発現したヒトL A G - 3 (pcDNA5FRTベクター [Life Technologies、V6010-20] にクローニングされたLAG -3) との結合について試験した (方法論についてセクション1.4.5を参照)。簡単に述べれば、10% F B S (Life Technologies、10270-1-6)、100 μ g / ml ハイグロマイシンB (Melford Laboratories Ltd、Z2475)、15 μ g / ml プラストサイジン (Melford Laboratories Ltd、B1105)、及び1 μ g / ml ドキシサイクリン (Sigma、D9891) を含有するD M E M (Life Technologies、61965-026) 中で成長した、ヒトL A G - 3を過剰発現するH E K 293細胞を、細胞解離バッファー (Life Technologies、13151-014) を用いて組織培養フラスコから剥離し、細胞2 \times 10⁵個 / ウェルでV底96ウェルプレート中に播種した。F c a bを、100 μ l体積中、5 μ Mの細胞と、4 で1時間、インキュベートした。そのプレートを洗浄し、二次抗体 (抗ヒトFc-488、Jackson ImmunoResearch、109-546-098) をP B S中1 : 1000希釈し、100 μ lを細胞へ加え、4 で30分間、インキュベートした。そのプレートを洗浄し、細胞を、1 μ g / ml D A P I (Biotium、40043) を含有するP B S 100 μ l中に再懸濁した。そのプレートを、B D F A C S C a n t o I Iサイトメーター (BD Biosciences) において読み取り、データを、F l o w J o Xを用いて分析した。その後、F c a bを、リポフェクタミン (Life Technologies、11668-019) を用いるF l p - I n T - R e x 293細胞 (Life Technologies、R780-07) への形質転換により、哺乳類細胞内に発現させた。L A G - 3結合性F c a bを、A 375細胞 (ATCC、CRL-1619) 上のヒトM H CクラスI Iの組換えL A G - 3 F cとの結合の阻害について (実施例1.6における方法論を用いて) 試験した。3ラウンドのファージ選択から54個の固有のF c a b配列が同定され、これらのF c a bのうちの12個が、B I A c o r e分析によりL A G - 3 F cと結合し、及び / 又はL A G - 3発現H E K細胞と結合することが決定された。選択されたF c a bのうちの3個はまた、L A G - 3のM H CクラスI Iとの相互作用を阻害することができ、親和性成熟のために選択された。その3つのF c a bは、F S 18 - 3、F S 18 - 7、及びF S 18 - 21と名付けられた。

【0147】

1.1.2 親和性成熟

1回目の親和性成熟

6個のファージディスプレイ親和性成熟ライブラリーを、上記のナイーブ選択プロセスを用いて同定された3個のF c a bのそれぞれのA Bループにおける5個の残基 (残基14から18)、及びE Fループにおける5個の残基 (残基92から94及び97から98) か又は8個の残基 (残基92から94及び97から101) のいずれかの残基をランダム化することにより構築した。

【0148】

親和性成熟ライブラリーを、(上記のように) 組換えヒトL A G - 3 F c (R&D systems、2319-L3-050) 及びヒトL A G - 3を発現するH E K細胞を用いて選択した。そのアウトプットをファージE L I S Aによりスクリーニングし、陽性結合剤をサブクローニングし、H E K E x p i 293細胞において、可溶性F c a b (短縮型ヒンジを含有する) として発現させた (pTT5ベクター [National Research Council of Canada] にクローニングされたFcabは、ExpiFectamine 293トランスフェクションキット [Life Technologies、A14524] を用いて、Expi293F細胞 [Life technologies、A14527] へトランスフェクションされた)。その後、H E K発現可溶性F c a bを、細胞に発現したヒトL A G - 3との結合、細胞に発現したカニクイザルL A G - 3との結合 (実施例1.4.3のような方法論)、及びM H CクラスI Iの組換えL A G - 3 F cとの結合をブロックする能力 (実施例1.6においてのような方法論) についてスクリーニングした。ブロックするF c a bを、それらが、T細胞活性化アッセイにおいてI L - 2分泌のL A G - 3誘導性阻害を逆転させることができるかどうかを決定するためにさらに試験した (実施例2.1においてのような方法論)。これらのスクリーニング方法を用いて、6個の親和性成熟ライブラリーから61個の固有の抗L A G - 3 F c a bが同定された。F S 18 - 7系列由

10

20

30

40

50

来の親和性成熟したF c a bは、カニクイザルL A G - 3と最高レベルの交差反応性を生じることが示された。カニクイザルL A G - 3 F cとの最強の結合及びT細胞活性化アッセイにおける最高の活性を有する、この系列由来の3個のF c a b (FS18-7-7、FS18-7-9、及びFS18-7-11と名付けられた)を、さらなる親和性成熟のために選択した。これらの3個のF c a bはまた、L A G - 3 F cの、細胞に発現したM H CクラスI Iとの相互作用をブロックすることが示された。

【0149】

2回目の親和性成熟

1回目の親和性成熟からの3個のF c a b (FS18-7-7、FS18-7-9、及びFS18-7-11)のプールを用いて、さらなる親和性成熟ライブラリーを作製した。C Dループを、E L L A B i o t e c h製のランダム化プライマーを用いて、激しくランダム化した。C Dループにおけるアミノ酸位置の一部(残基45、1から78)を、システインを除くアミノ酸の等モルの配分を用いてランダム化した。変異性P C Rもまた、C H 3ドメイン配列全体に渡って実行して、結合を増強する可能性がある追加の変異を導入した。

【0150】

親和性成熟ライブラリーを、ファージにおいて作製し、ビオチン化組換えL A G - 3 a v v i - F c (BPS Bioscience、71147)及びH E K h L A G - 3細胞に対して選択を実施し、ファージE L I S Aにより、組換えL A G - 3 F c (R&D systems、2319-L3-050)との結合についてスクリーニングした。H E K 293 F細胞において86個の固有のF c a b (短縮型ヒンジを含有する)が発現した。選択されたF c a bをまた、上記のように、T細胞活性化アッセイにおいて活性についてスクリーニングした。T細胞活性化アッセイにおける最高活性を有する2回目の親和性成熟中に同定された9個のF c a b (FS18-7-32、FS18-7-33、FS18-7-36、FS18-7-58、FS18-7-62、FS18-7-65、FS18-7-78、FS18-7-88、及びFS18-7-95)、加えて親のF c a bクローン、F S 18 - 7 - 9をその後、下記のようにさらに特徴付けた。これらの9個のF c a bの、親のF c a bクローン、F S 18 - 7 - 9に対する配列アラインメントは、図1 Aに示されている。図1 Bは、9個のF c a bクローンのそれぞれの、親のF c a bクローン、F S 18 - 7 - 9とのパーセンテージ配列同一性を詳述する。その他の2個の親のF c a bクローン、F S 18 - 7 - 7及びF S 18 - 7 - 11の親和性成熟から生じたF c a bは、F S 18 - 7 - 9の親和性成熟から生じたものほど有望な候補ではなく、それゆえに、さらに探究されなかった。

【0151】

1.2 マウスL A G - 3に特異的な代替F c a bの選択

上記のナイーブ選択プロトコルを用いて選択されたF c a b F S 18 - 7を用いて、マウスL A G - 3に対して選択するためのファージライブラリーを作製した。2ラウンドの親和性成熟を実施し、高親和性、マウスL A G - 3との特異的結合を示したF c a bクローン、F S 18 - 7 - 108 - 29及びF S 18 - 7 - 108 - 35が、親和性成熟後に選択された。T細胞活性化アッセイにおけるマウスL A G - 3を阻害するF S 18 - 7 - 108 - 29及びF S 18 - 7 - 108 - 35の能力が確認された。O c t e t (Forteo Bio)を用いるエピトープマッピングにより、抗マウスL A G - 3 F c a bが、抗ヒトL A G - 3 F c a b (上記のように2回目の親和性成熟後に選択された)と、ヒトL A G - 3との結合において競合することが示された。抗ヒトL A G - 3 F c a bと抗マウスL A G - 3 F c a bとの間に4から8個の残基の違いがある。したがって、抗マウスL A G - 3 F c a bが、マウスにおいて、抗ヒトL A G - 3 F c a bの結合及び機能についての適切な代替となることが予想される。

【0152】

1.3 ニセm A b 2の構築及び発現

上記の1.1及び1.2で同定されたリード抗ヒトL A G - 3 F c a b及び抗マウスL A G - 3 F c a bを含む「ニセ」m A b 2を、m A b 2型式におけるこれらのF c a bの特徴付けを可能にするために調製した。これらのニセm A b 2を、抗L A G - 3 F c

a b、及び抗 F I T C 抗体 4 4 2 0 の可変領域（詳細として、配列番号 8 3、配列番号 8 4、及び配列番号 8 5 参照）から調製した（Bedzyk, W. D.ら、1989及びBedzyk, W. D.ら、1989）。重鎖の C H 2 ドメインにおいて L A L A 変異を含むニセ m A b ²（配列番号 6 3、6 5、6 7、6 9、7 1、7 3、7 5、7 7、7 9、及び 8 1）とそれを含まないニセ m A b ²（配列番号 6 4、6 6、6 8、7 0、7 2、7 4、7 6、7 8、8 0、及び 8 2）の両方が調製され（詳細として、下記のセクション 1.5 参照）、抗 F I T C m A b 4 4 2 0 の軽鎖（配列番号 8 5）をさらに含んだ。ニセ m A b ²を、H E K 2 9 3 - 6 E 細胞において一過性発現により産生させ、m A b S e l e c t S u R e プロテイン A カラムを用いて精製した。

【 0 1 5 3 】

1 . 4 L A G - 3 に対する F c a b の結合親和性

1 . 4 . 1 表面プラズモン共鳴法（SPR）により決定される場合のヒト L A G - 3 に対する F c a b の結合親和性

B I A c o r e T 2 0 0（GE Healthcare）を用いて、ヒト L A G - 3 に対するニセ m A b ² 型式における抗ヒト L A G - 3 F c a b の親和性を測定した。アミンカップリングキット（GE Healthcare、BR-1000-50）を用いて、C M 5 センサーチップ（GE Healthcare、BR1005-30）のフローセル 4 にヒト L A G - 3 - F c（R&D Systems、2319-L3-050）を固定化し、フローセル 3 に参照としてのバッファーを固定化した。L A G - 3 - F c を、酢酸ナトリウム、p H 5（ForteoBio、18-1069）中 5 μ g / m l に希釈し、1 0 μ l / 分の流速で 1 2 秒間、注入し、続いて、エタノールアミンの注入による表面の非活性化を 4 2 0 秒間、行った。固定化レベルは 1 5 8 R U であった。ニセ m A b ²（又は対照抗ヒト L A G - 3 m A b、25F7）を、H B S - P バッファー（GE Healthcare、BR-1003-68）中に、4 μ g / m l から 2 倍希釈系列で希釈した。対照 m A b / ニセ m A b ² を注入し、3 0 μ l / 分で 2 4 0 秒間の会合時間、及び 3 0 μ l / 分で 3 0 0 秒間の解離時間であった。表面を、2 5 m M N a O H を 1 0 0 μ l / 分で 3 0 秒間、用いて、再生した。データは、速度定数を計算するために、B I A e v a l u a t i o n 3 . 2 ソフトウェアを用いて、二重参照を引き算され、分析された。ニセ m A b ² 型式における F c a b は、0 . 8 から 1 . 1 n M の範囲の、ヒト L A G - 3 に対する親和性を有し（表 1）、その親和性は、ベンチマーク抗ヒト L A G - 3 m A b 2 5 F 7 の親和性と類似している。これは、驚くべきことであり、なぜなら、F c a b の結合部位は、極めて接近して位置する 2 つの結合部位を有する相対的にコンパクトな抗体断片を形成するため、F c a b は、モノクローナル抗体より小さい結合界面を有するからである。対照的に、典型的な m A b の F a b アームは、可動性ヒンジ領域により隔てられている。このより小さい結合界面及びその関連した、F c 領域における 2 つの結合部位の可動性の低減に基づけば、抗 L A G - 3 F c a b が、ベンチマーク抗体 2 5 F 7 と類似した親和性及び作用強度で L A G - 3 と結合し、かつそれを阻害することができることは予想外であった。

【 0 1 5 4 】

【表 1】

表 1: ヒト L A G - 3 に対するニセ m A b ² 型式における L A G - 3 特異的 F c a b の結合親和性

ニセ m A b ² 型式における抗ヒト L A G - 3 F c a b 及びベンチマーク抗ヒト L A G - 3 m A b、25F7	K _D (M)
FS18-7-9	8.3×10 ⁻¹⁰
FS18-7-62	9.5×10 ⁻¹⁰
FS18-7-78	8.4×10 ⁻¹⁰
FS18-7-32	8.6×10 ⁻¹⁰
FS18-7-36	8.9×10 ⁻¹⁰
FS18-7-65	1.1×10 ⁻⁹
25F7	3.2×10 ⁻¹⁰

10

20

30

40

50

【 0 1 5 5 】

1 . 4 . 2 S P Rにより決定された場合の、マウス L A G - 3 に対するマウス L A G - 3 に特異的な代替 F c a b の結合親和性

B i a c o r e 3 0 0 0 (G E H e a l t h c a r e) を用いて、マウス L A G - 3 に対するマウス L A G - 3 に特異的な代替 F c a b の親和性を測定した。アミンカップリング (アミンカップリングキット、G E H e a l t h c a r e 、 B R - 1 0 0 0 - 5 0) を用いて、1 0 m M 酢酸ナトリウム p H 5 . 0 (F o r t e B i o 、 1 8 - 1 0 6 9) 中に希釈された m L A G - 3 F c (R & D S y s t e m s 、 3 3 2 8 - L 3 - 0 5 0) を C M 5 チップ (G E H e a l t h c a r e 、 B R - 1 0 0 0 - 1 2) に直接、コーティングした。フローセル 1 を、9 5 0 R U で、マウス F c (S i n o B i o l o g i c a l 、 5 1 0 9 4 - M N A H) でコーティングし、フローセル 2 を、m L A G - 3 F c でコーティングした。F c a b を、H B S - P バッファー (G E H e a l t h c a r e 、 B R - 1 0 0 3 - 6 8) 中に希釈し、様々な濃度 (1 0 0 n M から 4 倍希釈) で、2 0 μ l / 分で 3 分間、注入し、その後、バッファー中で 1 2 分間、解離させた。チップを、1 0 m M グリシン p H 2 . 5 の 3 0 μ l / 分、3 0 秒間の注入により再生した。データは、速度定数を計算するために、B I A e v a l u a t i o n 3 . 2 ソフトウェアを用いて、二重参照を引き算され、分析された。試験された代替 F c a b は、表 2 に示されているように、1 桁のナノモル濃度親和性でマウス L A G - 3 と結合した。

10

【 0 1 5 6 】

【表 2】

表 2: マウス LAG-3 に対する代替 LAG-3 特異的 Fcab の結合親和性(K_D)

20

マウス LAG-3 に特異的な代替 Fcab	親和性 K _D
FS18-7-108-29	1.5
FS18-7-108-35	2.1

【 0 1 5 7 】

1 . 4 . 3 フローサイトメトリにより決定される場合の、細胞上に発現したヒト L A G - 3 に対する F c a b の結合親和性

L A G - 3 を過剰発現する細胞株の作製

レンチウイルス形質導入方法論を用い、L e n t i - X H T X パッケージングシステム (Clontech 、 カタログ番号 6 3 1 2 4 9) を使用して、ヒト、カニクイザル、又はマウスの L A G - 3 を過剰発現する D O 1 1 . 1 0 細胞 (N a t i o n a l J e w i s h H e a l t h) を作製した。マウス L A G - 3 c D N A (配列番号 9 6) 、ヒト L A G - 3 c D N A (配列番号 9 5) 、又はカニクイザル L A G - 3 c D N A (配列番号 9 7) を含有する L e n t i - X 発現ベクター (p L V X) (Clontech 、 カタログ番号 6 3 1 2 5 3) を、L e n t i - X H T X パッケージングミックスを用いて、L e n t i - X 2 9 3 T 細胞株 (Clontech 、 カタログ番号 6 3 2 1 8 0) へ同時トランスフェクションして、ウイルスを作製した。D O 1 1 . 1 0 細胞株に、L e n t i - X H T X パッケージングシステムで、作製されたレンチウイルスベクターを用いて形質導入した。

30

【 0 1 5 8 】

ニセ m A b 2 型式における抗ヒト L A G - 3 F c a b の、ヒト L A G - 3 を発現する細胞 (ヒト L A G - 3 をトランスフェクションされた D O 1 1 . 1 0 細胞株) に対する親和性を、フローサイトメトリを用いて測定した。m A b 2 希釈溶液及び対照 m A b 希釈溶液 (2 × 最終濃度) を、1 × D P B S (G i b c o 、 1 4 1 9 0 - 0 9 4) 中に 3 連で調製した。D O 1 1 . 1 0 : L A G - 3 細胞懸濁液を、P B S + 2 % B S A (S i g m a 、 A 7 9 0 6) 中に調製し、V 底 9 6 ウェルプレート (C o s t a r 、 3 8 9 7) 中、5 0 μ l / ウェル、細胞 4 × 1 0 ⁻⁶ 個 / m l で播種した。m A b 2 希釈溶液又は対照 m A b (抗ヒト L A G - 3 m A b 、 2 5 F 7) 希釈溶液 5 0 μ l を、細胞を含有するウェルに加え (最終体積 1 0 0 μ l) 、4 で 1 時間、インキュベートした。プレートを洗浄し、その後、P B S + 2 % B S A 中 1 : 1 0 0 0 希釈された 1 0 0 μ l / ウェルの二次抗体 (抗ヒト F c - 4 8 8 抗体、J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h 、 1

40

50

09-546-098)を加え、暗闇中4で30分間、インキュベートした。プレートを洗浄し、DAPI (Biotium、40043)を含有するPBS 100 µl中、1 mg/mlで再懸濁した。プレートを、Canto IIフローサイトメーター (BD Bioscience)を用いて読み取った。死細胞を除去し、FITCチャネル (488nm/530/30)における蛍光を測定した。データを、GraphPad Prismソフトウェアにおけるlog (アゴニスト) 対応答 (log (agonist) vs response)を用いてフィッティングした。全ての試験された、ニセmAb²型式におけるFcab、及びベンチマーク抗ヒトLAG-3 mAb、25F7は、表3に示されているように、1.2から2.1 nMの範囲の類似した親和性 (EC₅₀)でヒトLAG-3を結合した。

【0159】

【表3】

表3:フローサイトメトリにより決定された場合の、ヒトLAG-3を発現するDO11.10細胞に対するニセmAb²型式における抗ヒトLAG-3 Fcabの結合親和性

ニセmAb ² 型式における抗ヒトLAG-3 Fcab 及びベンチマーク抗ヒトLAG-3 mAb、25F7	EC ₅₀ (nM)
FS18-7-9	1.2
FS18-7-32	1.6
FS18-7-33	1.5
FS18-7-36	1.5
FS18-7-62	2.1
FS18-7-65	1.6
FS18-7-78	1.7
25F7	2.1

【0160】

1.4.4 フローサイトメトリにより決定された場合の、細胞上に発現したカニクイザルLAG-3に対するFcabの結合親和性
ニセmAb²型式における抗ヒトLAG-3 Fcabの、カニクイザルLAG-3を発現する細胞 (カニクイザルLAG-3をトランスフェクションされたDO11.10細胞株) に対する親和性を、フローサイトメトリを用いて測定した。mAb²希釈溶液及び対照mAb希釈溶液 (2×最終濃度)を、1×DPBS (Gibco、14190-094)中に3連で調製した。DO11.10:LAG-3細胞懸濁液を、PBS+2%BSA (Sigma、A7906)中に調製し、V底96ウェルプレート (Costar、3897)中、50 µl/ウェル、細胞4×10⁶個/mlで播種した。mAb²希釈溶液又は対照mAb (抗ヒトLAG-3 mAb、25F7)希釈溶液50 µlを、細胞を含有するウェルに加え (最終体積100 µl)、4で1時間、インキュベートした。プレートを洗浄し、その後、PBS+2%BSA中1:1000希釈された100 µl/ウェルの二次抗体 (抗ヒトFc-488抗体、Jackson ImmunoResearch、109-546-098)を加え、暗闇中4で30分間、インキュベートした。プレートを洗浄し、DAPI (Biotium、40043)を含有するPBS 100 µl中、1 mg/mlで再懸濁した。プレートを、Canto IIフローサイトメーター (BD Bioscience)を用いて読み取った。死細胞を除去し、FITCチャネル (488nm/530/30)における蛍光を測定した。データを、GraphPad Prismソフトウェアにおけるlog (アゴニスト) 対応答を用いてフィッティングした。試験された、ニセmAb²型式におけるFcabは、0.5から0.6 nM親和性でカニクイザルLAG-3と結合し、カニクイザルにおける毒性学研究は、ヒトに見られた効果を予測すると予想されることを示している (表4参照)。ベンチマーク抗ヒトLAG-3 mAb、25F7は、カニクイザルLAG-3を15分の1の親和性 (EC₅₀)で結合する (表4)。

【0161】

10

20

30

40

50

【表 4】

表 4: フローサイトメトリによる、カニクイザル LAG-3 を発現する DO11.10 細胞に対する抗 LAG-3 Fcab の結合親和性

ニセ mAb ² 型式における抗ヒト LAG-3 Fcab 及びベンチマーク抗ヒト LAG-3 mAb、25F7	EC ₅₀ (nM)
FS18-7-9	0.6
FS18-7-62	0.5
FS18-7-78	0.5
25F7	9.0

10

【0162】

1.4.5 フローサイトメトリにより決定された場合の、細胞上に発現したマウス LAG-3 に対する、代替抗マウス LAG-3 Fcab 及び抗ヒト LAG-3 Fcab の結合親和性

mLAG-3 を過剰発現する HEK 細胞の作製

マウス LAG-3 配列 (配列番号 96) を、pCDNA5 FRT ベクター (Life Technologies、V6010-20) に、KpnI (NEB、R0142) 及び NotI (NEB、R0146) 制限消化を用いてサブクローニングした。その後、ベクターを、Flp-In T-REx 293 HEK 細胞株 (Life Technologies、R780-07) へ、リポフェクタミン 2000 (Life Technologies、11668-019) を用いて形質転換した。形質転換された Flp-In T-REx 293 細胞を、10% FBS (Life Technologies、10270-1-6)、100 µg/ml ハイグロマイシン B (Melford Laboratories Ltd、Z2475)、15 µg/ml プラストサイジン (Melford Laboratories Ltd、B1105) を含有する DMEM (Life Technologies、61965-026) 中、3 から 4 週間、安定的に形質転換された細胞のコロニーが明らかになるまで成長させた。これらのコロニーを、1 µg/ml ドキシサイクリン (Sigma、D9891) の存在下で増幅し、PE コンジュゲート化抗マウス LAG-3 (クローン C9B7W、BD Biosciences、552380) を用いて、マウス LAG-3 発現について試験した。

20

【0163】

代替抗マウス LAG-3 Fcab (短縮型ヒンジを含有する; 配列番号 58) の、細胞に発現したマウス LAG-3 に対する親和性を、フローサイトメトリを用いて決定した。10% FBS (Life Technologies、10270-1-6)、100 µg/ml ハイグロマイシン B (Melford Laboratories Ltd、Z2475)、15 µg/ml プラストサイジン (Melford Laboratories Ltd、B1105)、及び 1 µg/ml ドキシサイクリン (Sigma、D9891) を含有する DMEM (Life Technologies、61965-026) 中で成長した、mLAG-3 を発現する HEK 細胞を、組織培養フラスコから細胞解離バッファー (Life Technologies、13151-014) を用いて、剥離し、細胞 2 × 10⁵ 個/ウェルで V 底 96 ウェルプレート (Costar、3897) に播種した。プレートを、1500 rpm、4 で 3 分間、遠心分離して、細胞をペレット化した。Fcab (又は対照 mAb) の希釈系列を、100 µl 体積中で細胞と 4 で 1 時間、インキュベートした。プレートを洗浄し、二次抗体 (Fcab について、抗ヒト Fc-488、Jackson ImmunoResearch、109-546-098、又は C9B7W について、抗ラット IgG (H+L)、Alexa Fluor 488 コンジュゲート、ThermoFisher、A-11006) を PBS 中 1:1000 希釈し、100 µl を、4 で 30 分間、細胞に加えた (プレートは暗闇中に保った)。その後、プレートを洗浄し、細胞を、1 µg/ml DAPI (Biotium、40043) を含有する PBS 100 µl 中に再懸濁した。プレートを、Canto II フローサイトメーター (BD Bioscience) を用いて読み取った。死細胞を除去し、FITC チャネル (488nm/530/30) における蛍光を測定した。データを、GraphPad Prism ソフトウェアにおける log (アゴニスト) 対応答を用いてフィッティングした。試験された Fcab は、マウス LAG-3 と類似

30

40

50

した親和性で結合した（表 5 参照）。ベンチマーク L A G - 3 m A b、C 9 B 7 W（2B Scientific、BE0174-50MG）は、マウス L A G - 3 を、F c a b の 1 7 分の 1 の親和性（EC₅₀）で結合する（表 5）。

【 0 1 6 4 】

【表 5】

表 5:フローサイトメトリによる、マウス LAG-3 を発現する HEK 細胞に対する代替抗マウス LAG-3 Fcab の結合親和性

抗マウス LAG-3 Fcab 及びベンチマーク抗マウス LAG-3 mAb、C9B7W	EC ₅₀ (nM)
FS18-7-108-29	4.5
FS18-7-108-35	4.5
C9B7W	79

10

【 0 1 6 5 】

ニセ m A b² 型式における抗ヒト L A G - 3 F c a b F S 1 8 - 7 - 9 の、細胞に発現したマウス L A G - 3 に対する親和性を、フローサイトメトリを用いて決定した。10% F B S（Life Technologies、10270-1-6）、100 µg / ml ハイグロマイシン B（Melford Laboratories Ltd、Z2475）、15 µg / ml プラストサイジン（Melford Laboratories Ltd、B1105）、及び 1 µg / ml ドキシサイクリン（Sigma、D9891）を含有する D M E M（Life Technologies、61965-026）中で成長した、m L A G - 3 を発現する H E K 細胞を、組織培養フラスコから細胞解離バッファー（Life Technologies、13151-014）を用いて、剥離した。細胞を、1500 rpm、4、3 分間で遠心分離して、細胞をペレット化することにより収集し、その後、1 × D P B S 中に再懸濁し、その後、V 底 9 6 ウェルプレート（Costar、3897）に 30 µl において細胞 1.2 × 10⁵ 個 / ウェルで播種した。m A b²（又は対照 mAb）の希釈系列の 1 : 1 体積を加え、細胞と 4 で 1 時間、インキュベートした。プレートを洗浄し、二次抗体（抗ヒト Fc-488、Jackson ImmunoResearch、109-546-098）を P B S 中 1 : 1000 希釈し、60 µl を、4 で 30 分間、細胞に加えた（プレートは暗闇中に保った）。その後、プレートを洗浄し、細胞を、1 µg / ml D A P I（Biotium、40043）を含有する P B S 60 µl 中に再懸濁した。プレートを、C a n t o I I フローサイトメーター（BD Bioscience）を用いて読み取った。死細胞を除去し、F I T C チャネル（488nm/530/30）における蛍光を測定した。データを、G r a p h P a d P r i s m ソフトウェアにおける log（アゴニスト）対応答を用いてフィッティングした。ニセ m A b² 型式における抗ヒト L A G - 3 F c a b F S 1 8 - 7 - 9 は、代替抗マウス L A G - 3 F c a b F S 1 8 - 7 - 9 - 108 についての 2.6 nM の EC₅₀ と比較して、19 nM の EC₅₀ でマウス L A G - 3 と結合した（表 6）。ヒト m A b、25 F 7 は、マウス L A G - 3 との少しの検出可能な結合も示さず、ヒト L A G - 3 F c a b、F S 1 8 - 7 - 9 が、25 F 7 のエピトープとは異なる、L A G - 3 上の結合エピトープを有することを示している。

20

30

40

【 0 1 6 6 】

【表 6】

表 6:フローサイトメトリによる、マウス LAG-3 を発現する HEK 細胞に対するヒト抗 LAG-3 Fcab FS18-7-9 の結合親和性

抗ヒト LAG-3 Fcab、抗マウス LAG-3 Fcab、及びベンチマーク抗ヒト LAG-3 mAb、25F7	EC ₅₀ (nM)
FS18-7-108-29	2.6
FS18-7-9	19
25F7	結合なし

50

【 0 1 6 7 】

1.5 Fc受容体に対するFcabの結合親和性

ヒトIgG1のCH2ドメインにおけるLALA変異の導入は、Fc受容体結合を低下させることが公知である(Bruhns, P.ら(2009)及びXu, D.ら(2000))。BiAcCoreを用いて、LALA変異が、Fc受容体に対するFcab(ニセmAb²型式における)の結合親和性を低下させていることを確認した。ヒトFcR結合アッセイを、BiAcCore T200装置(GE Healthcare)において、ニセmAb²型式におけるFcabを用いて実施した。ヒトFcR(R&D Systems、1257-FC、1330-CD、1875-CD、4325-FC)を、アミンカップリング(アミンカップリングキット、GE Healthcare、BR-1000-50)を用いて、Series S CM5チップ(GE Healthcare、BR-1005-30)上に、FcRIについて370RU、FcRIIについて264RU(高親和性ヒトFcR)、並びにFcRIIa及びFcRIIbについて500RU(低親和性ヒトFcR)の表面密度で固定化した。各固定化されたチップについて、1つのフローセルを、バックグラウンドの引き算のためにブランクのままにしておいた。FcRを、酢酸ナトリウム pH 5 (ForteBio、18-1069)中5 µg/mlの濃度を用いて固定化し、10 µl/分の流速、15秒サイクルで、必要とされる固定化レベルに達するまで、注入した。

10

【 0 1 6 8 】

高親和性FcRI及びFcRIIについて、200 µg/mlのmAb又はニセmAb²を、チップに渡って、30 µl/分の流速で3分間、流し、続いて、5分間の解離を行った。ランニングバッファーは、HBS-P(0.01 M HEPES pH 7.4、0.15 M NaCl、0.005% v/v Surfactant P20、GE Healthcare、BR-1003-68)であった。低親和性FcRIIa及びFcRIIbについて、ニセmAb²の濃度を、500 µg/mlまで増加した。

20

【 0 1 6 9 】

陽性対照は、野生型IgG1アイソタイプmAbであり、それを、対照LALA IgG1 mAb並びに無関係の標的に対するモノクローナルIgG2及びIgG4アイソタイプmAbと比較した。フローセルを、10 mM 水酸化ナトリウム(VWR、28244.262)を100 µl/分の流速で30秒間、注入することにより再生した。データ分析を、BiEvaluationソフトウェアバージョン3.2 RC1を用いて、ブランクフローセル(固定化FcRを含まない)に対して二重参照し、試験mAb²からバッファーサイクルを引き算することにより実施した。結果は表7に示されている。

30

【 0 1 7 0 】

【表7】

表7:SPRによる、ニセmAb²型式における抗ヒトLAG-3 Fcab(上で詳述したようなLALA変異を含む)のヒトFcγ受容体に対する結合応答

mAb/ニセ mAb ²	会合の終了時における結合応答(RU)			
	FcγRI	FcγRIII	FcγRIIa	FcγRIIb
FS18-7-9	1.4	6.6	-9.8	-8.5
FS18-7-62	-0.9	0.7	-10	-8.5
FS18-7-78	-0.3	4.0	-10.7	-9.2
ニセ mAb LALA	2	8.0	-12.7	-9.6
IgG2	0	1.9	9.7	7.4
IgG4	9	3.1	4.3	15.1
ニセ mAb IgG1	26	44	13	17.7

40

【 0 1 7 1 】

試験された全てのニセmAb²(全て、上記に示されているようなLALA変異を含む)は、LALA変異を含まない対照抗体(ニセmAb IgG1)と比較して、試験されたFc受容体との結合の有意な低下を示し、LALA変異が、これらのニセmAb²によるFc

50

受容体結合を低下させており、したがって、そのmAb 2のADCC活性を低下させることが予想されることを示している。

【0172】

1.6 MHCクラスIIのLAG-3との結合のブロック

Fcab (短縮型ヒンジを有する;配列番号58)の、組換えヒト又はマウスLAG-3 FcとヒトMHCクラスIIとの間の相互作用をブロックする能力を、ヒトMHCクラスIIを発現するメラノーマ細胞株である、A375細胞とのLAG-3 Fcの結合を測定することにより研究した。10% FBS (Life Technologies、10270-106)を含有するDMEM (Life Technologies、61965-026)中で成長したA375 (ATCC、CRL-1619)細胞を、細胞培養フラスコから細胞解離バッファー (Life Technologies、13151-014)を用いて、剥離し、細胞 2×10^5 個/ウェルでV底96ウェルプレート (Costar、3897)に播種した。プレートを、1500rpm、4℃で3分間、遠心分離して、細胞をペレット化した。関連濃度のFcab又は対照mAbを、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ LAG-3 Fc (ヒトLAG-3-Fc R&D Systems、2319-L3-050、又はマウスLAG-3 Fc R&D Systems、3328-L3-050)と、10% FBSを含有するDMEM $100 \mu\text{l}$ 中、4℃で1時間、インキュベートした。LAG-3/Fcab混合物をA375細胞に加え、4℃で1時間、インキュベートした。細胞を洗浄した。二次抗体 (Alexa Fluor 488 コンジュゲート化ヤギ抗ヒトFc F(ab')₂、Jackson Immunoresearch、109-546-098、又はヤギ抗マウスIgG (H+L) 488コンジュゲート、Life Technologies、A-1101)をPBS中に1:1000希釈し、 $100 \mu\text{l}$ を細胞に、4℃で30分間、加えた (プレートを暗闇中に保った)。細胞をPBS中で1回、洗浄し、PBS $100 \mu\text{l} + 1 \mu\text{g}/\text{ml}$ DAPI (Biotium、40043)中に再懸濁した。プレートをBD FACSCanto IIサイトメーター (BD Biosciences)で読み取り、データを、FlowJoソフトウェアを用いて、解析した。

【0173】

両方の抗マウスLAG-3 Fcabは、ヒトMHCクラスIIのマウスLAG-3との相互作用を阻害することができたが、対照抗マウスLAG-3 mAb (C9B7W、2B Scientific、BE0174-50MG)は阻害することができなかった (表8参照)。

【0174】

【表8】

表8:代替抗マウスLAG-3 Fcabは、マウスLAG-3のMHCクラスIIとの結合を阻害する

代替抗マウスLAG-3 Fcab 及び対照抗マウスLAG-3 mAb C9B7W	IC ₅₀ (nM)
FS18-7-108-29	0.6
FS18-7-108-35	0.7
C9B7W	ブロックなし

【0175】

試験された抗ヒトLAG-3 Fcabもまた、ヒトMHCクラスIIのヒトLAG-3との相互作用を、対照抗ヒトLAG-3 mAb (25F7)と類似した作用強度で阻害することができた。

【0176】

10

20

30

40

50

【表 9】

表 9: 抗ヒト LAG-3 Fcab は、ヒト LAG-3 の MHC クラス II との結合を阻害する

抗ヒト LAG-3 Fcab 及び対照抗ヒト LAG-3 mAb 25F7	IC ₅₀ (nM)
FS18-7-108-33	2.6
FS18-7-108-78	2.4
25F7	3.6

【0177】

実施例 2 : mAb 及び mAb² 分子の調製及び特徴付け

10

2.1 mAb 84G09 の調製

2.1.1 DNA 構築物の作製

84G09 の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域をコードする DNA 挿入断片を、哺乳類発現のためにコドン最適化し、DNA 2.0 (Menlo Park, CA, USA) により合成した。pJ-Amp-high 宿主ベクターに供給された挿入断片を、発現ベクター pFS-hHC2.1-G1m17(z) LALA (LALA 変異を含有する IgG 重鎖) 又は pFS-hHC2.1-G1m17(z) (LALA 変異を含まない IgG 重鎖) 及び pFS-hK1.0 (IgG 軽鎖) へ EcoRI 及び NheI 制限消化によりサブクローニングした。

【0178】

20

クローニングの忠実度を、コロニー PCR、及びその後、第三者 (GATC Biotech) によるヌクレオチドシーケンシング分析により検証した。

【0179】

2.1.2 細胞維持

HEK293-6E 細胞 (NRCC) を、4 mM の GlutaMAX-1 (Invitrogen、35050-038)、0.1% の Pluronic F-68 (Invitrogen A13835-01) 及び 25 µg/ml のジェネティシン (Invitrogen、10131-027) を追加した、予熱された F17 培地 (Invitrogen、A13835-01) 中で継代培養した。細胞を、37、140 rpm、5% CO₂ でインキュベートし、3日間、その後、4日間のレジメンにおいて細胞 0.3 × 10⁶ 個/ml で継代培養した。

30

【0180】

2.1.3 一過性トランスフェクション

HEK293-6E 細胞を、1 mg/ml の PEI pro (Polyplus、PPLU115) を用いて一過性にトランスフェクションした。トランスフェクションの 24 時間前に、細胞を、培地中、細胞 0.8 × 10⁶ 個/ml で播種した。細胞培養物の 200 ml ごとに、DNA 混合物を、温められた Opti-MEM I (Invitrogen、11058-021) 10 ml、重鎖をコードする、内毒素を含まない DNA 100 µg、及び軽鎖をコードする、内毒素を含まない DNA 100 µg を混合することにより調製した。PEI 混合物を、温められた Opti-MEM I 10 ml 及び PEI pro 200 µl を混合し、ボルテックスすることにより調製した。DNA 混合物を、ボルテックスされた PEI 混合物に素早く加え、ボルテックスパルス 1 秒間、3 回、行うことにより混合し、室温で 3 分間、インキュベートし、一滴ずつ、細胞に加えた。トランスフェクションから 48 時間後、0.5% トリプトン N1 (TekniScience Inc.、19553) を含む F17 + サプリメント 20 ml を各フラスコに加えた。

40

【0181】

トランスフェクションから 6 日後、細胞を、4500 rpm で 40 分間の遠心分離により収集した。その後、上清を、0.22 µm ポリエーテルスルホンフィルターユニット (Millipore、SCGPU01RE、SCGPU02RE、SCGPU05RE、SCGPU11RE) で濾過し、精製まで +4 で保存した。

【0182】

50

2.1.4 プロテインAクロマトグラフィー

透明化された上清を、AKTA Explorer 又は AKTA Express において、あらかじめ充填された 5 ml HiTrap MabSelect SuRe カラム (GE Healthcare、11-0034-95) を用いて精製した。簡単に述べれば、カラムを、50 mM Tris-HCl、250 mM NaCl、pH 7.0 で平衡化し、結合していない材料を、同じバッファーを用いて 5 ml / 分で洗浄した。その産物を、10 mM ギ酸ナトリウム、pH 3.0 を用いて 5 ml / 分で溶出した。溶出した試料をすぐに、製造会社の推奨に従って、PBS pH 7.4 であらかじめ平衡化された PD-10 カラム (GE Healthcare、17-0851-01) を用いて PBS pH 7.4 へバッファー交換した。

【0183】

10

2.1.5 分光光度法による産物濃度測定

各精製された産物の 280 nm における吸光度を、DropPlate 96 D+ (PerkinElmer、CLS135136) と共に LabChip DS (PerkinElmer、133089) を用いて測定した。産物濃度を、Vector NTI Advance v11.5.4 ソフトウェア (ThermoFisher Scientific、A13784) を用いて計算された消衰係数 (1 mg/ml の A280) を用いて、計算した。

【0184】

2.1.6 産物濃度

必要に応じて、精製された画分を、Amicon Ultra-4 遠心フィルターユニット 30 K (Millipore、UFC803024) を用いて濃縮した。3000 rpm での 10 分間の遠心分離による PBS pH 7.4 での Ultracel 再生セルロース膜の平衡化後、試料を、4 ml ユニットへ負荷し、所望のタンパク質濃度に達するまで 3000 rpm で遠心分離した。

20

【0185】

2.1.6 フィルター滅菌

最終試料を、あらかじめ湿らせた Millex-GV PVDF シリンジフィルター (Millipore、SLGV013SL) を用いて濾過した。

【0186】

2.2 ヒトLAG-3 / PD-L1 mAb² の調製

mAb² 分子 FS18-7-9 / 84G09 (配列番号 94 及び 95)、FS18-7-32 / 84G09 (配列番号 96 及び 97)、FS18-7-33 / 84G09 (配列番号 98 及び 99)、FS18-7-36 / 84G09 (配列番号 100 及び 101)、FS18-7-58 / 84G09 (配列番号 102 及び 103)、FS18-7-62 / 84G09 (配列番号 104 及び 105)、FS18-7-65 / 84G09 (配列番号 106 及び 107)、FS18-7-78 / 84G09 (配列番号 108 及び 109)、FS18-7-88 / 84G09 (配列番号 110 及び 111)、並びに FS18-7-95 / 84G09 (配列番号 112 及び 113) の重鎖は、ヒト IgG1 の非改変 CH3 ドメインの配列に存在する XhoI 部位と BamHI 部位の範囲内において、モノクローナル抗体 84G09 (LALA 変異を含む、及び含まない) の CH3 ドメインを、ヒトLAG-3 特異的 Fcab FS18-7-9、FS18-7-32、FS18-7-33、FS18-7-36、FS18-7-58、FS18-7-62、FS18-7-65、FS18-7-78、FS18-7-88、及び FS18-7-95 の CH3 ドメインに置き換えることにより調製された。上記のセクション 2.1 において mAb 84G09 について記載されているように、mAb² の重鎖を、84G09 の軽鎖 (配列番号 116) と同時トランスフェクションした。その後、上記のセクション 2.1 において mAb 84G09 について記載されているように、mAb² を発現させ、精製した。

30

40

【0187】

2.3 ヒトLAG-3 / ニセ mAb² の調製

抗FITC mAb (LALA 変異を含む、及び含まない) を、上記のセクション 2.1 において mAb 84G09 について記載されているように、mAb 4420 の重鎖 (配

50

列番号 83 及び 84 ; L A L A 変異を含む、及び含まない) 及び軽鎖 (配列番号 85) を用いて調製した。

【0188】

mAb 2 分子 F S 18 - 7 - 9 / 4420 (配列番号 63 及び 64)、F S 18 - 7 - 32 / 4420 (配列番号 65 及び 66)、F S 18 - 7 - 33 / 4420 (配列番号 67 及び 68)、F S 18 - 7 - 36 / 4420 (配列番号 69 及び 70)、F S 18 - 7 - 58 / 4420 (配列番号 71 及び 72)、F S 18 - 7 - 62 / 4420 (配列番号 73 及び 74)、F S 18 - 7 - 65 / 4420 (配列番号 75 及び 76)、F S 18 - 7 - 78 / 4420 (配列番号 77 及び 78)、F S 18 - 7 - 88 / 4420 (配列番号 79 及び 80) 及び F S 18 - 7 - 95 / 4420 (配列番号 81 及び 82) の重鎖は、ヒト Ig G 1 の非改変 CH3 ドメインの配列に存在する X h o I 部位と B a m H I 部位の範囲内において、モノクローナル抗体 4420 (L A L A 変異を含む、及び含まない) の CH3 ドメインを、ヒト L A G - 3 特異的 F c a b F S 18 - 7 - 9、F S 18 - 7 - 32、F S 18 - 7 - 33、F S 18 - 7 - 36、F S 18 - 7 - 58、F S 18 - 7 - 62、F S 18 - 7 - 65、F S 18 - 7 - 78、F S 18 - 7 - 88、及び F S 18 - 7 - 95 の CH3 ドメインに置き換えることにより調製された。上記のセクション 2.1 において mAb 84 G 09 について記載されているように、mAb 2 の重鎖を、mAb 4420 の軽鎖と同時にトランスフェクションした。その後、上記のセクション 2.1 において mAb 84 G 09 について記載されているように、そのタンパク質を発現させ、精製した。

【0189】

2.4 マウス L A G - 3 / P D - L 1 mAb 2 の調製

マウス抗 P D - L 1 mAb (L A L A 変異を含む、及び含まない) を、上記のセクション 2.1 において mAb 84 G 09 について記載されているように、mAb S 1 の重鎖 (配列番号 122 及び 123) 及び軽鎖 (配列番号 119) を用いて調製した。

【0190】

mAb 2 分子 F S 18 - 7 - 108 - 29 / S 1 (配列番号 117 及び 118) 及び F S 18 - 7 - 108 - 35 / S 1 (配列番号 120 及び 121) の重鎖は、ヒト Ig G 1 の非改変 CH3 ドメインの配列に存在する X h o I 部位と B a m H I 部位の範囲内において、モノクローナル抗体 S 1 (L A L A 変異を含む、及び含まない) の CH3 ドメインを、マウス L A G - 3 特異的 F c a b F S 18 - 7 - 108 - 29 及び F S 18 - 7 - 108 - 35 の CH3 ドメインと置き換えることにより調製された。上記のセクション 2.1 において mAb 84 G 09 について記載されているように、mAb 2 の重鎖を、S 1 の軽鎖と同時にトランスフェクションした。その後、上記のセクション 2.1 において mAb 84 G 09 について記載されているように、そのタンパク質を発現させ、精製した。

【0191】

2.5 ヒト L A G - 3 及びヒト P D - L 1 に対する mAb 2 の結合親和性及び動態

B I A c o r e T 200 装置についての製造会社の使用説明書に従うことにより、プロテイン L (Thermo、21189) を、2000RU の表面密度まで、アミンカップリング (GE Healthcare、BR-1000-50) により、S e r i e s S C M 5 チップ (GE Healthcare、BR-1005-30) のフローセル 1 及び 2 上へ固定化した。L A G - 3 結合について、mAb 2 試料 (全て、L A L A 変異を含有する) を、フローセル 2 上のみに捕獲し、0.5 nM から開始した 2 倍希釈系列での 4 つの濃度でのヒト L A G - 3 F c (R&D Systems、2319-L3) を、30 µl / 分の流速でフローセル 1 と 2 の両方に渡って流した。会合時間は 3 分であり、解離時間は 6 分であった。ランニングバッファーは、H B S - P (GE Healthcare、BR-1003-68) であった。両方のフローセルを、10 mM 水酸化ナトリウム (NaOH) を 100 µl / 分の流速で 20 秒間、注入することにより再生した。データは、ブランクフローセルに対して二重参照することにより分析した。

【0192】

P D - L 1 結合について、40 nM から開始した P D - L 1 F c (R&D Systems、156

10

20

30

40

50

-B7) の 2 倍希釈系列における 4 つの濃度を、同じプロテイン L チップ上に捕獲された mAb² に渡って流した。全ての他の条件は、LAG-3 結合についてと同じであった(上記参照)。

【0193】

結合動態を、1:1 ラングミュアモデルを用いてフィッティングして、結合の会合速度(k_a)及び解離速度(k_d)を導いた。平衡結合定数(K_D)を、各試料について解離速度を会合速度で割ることにより計算した。データ分析を、BiaEvaluationソフトウェアバージョン3.2で実施した。結果は表10及び11に示されている。

【0194】

【表10】

10

表 10: SPR によって決定された場合の、mAb² のヒト LAG-3 との結合親和性及び動態

mAb ²	K_D (pM)	k_a (1/Ms) $\times 10^5$	k_d (1/s) $\times 10^{-4}$
84G09LALA	結合なし	-	-
FS18-7-09/84G09LALA	56	6.3	3.5
FS18-7-32/84G09LALA	49	5.6	2.8
FS18-7-33/84G09LALA	43	4.2	1.8
FS18-7-36/84G09LALA	38	4.4	1.7
FS18-7-62/84G09LALA	36	5.4	2.0
FS18-7-65/84G09 LALA	39	5.9	2.3
FS18-7-78/84G09 LALA	29	4.8	1.4

20

【0195】

【表11】

表 11: SPR によって決定された場合の、mAb² のヒト PD-L1 との結合親和性及び動態

mAb ²	K_D (nM)	k_a (1/Ms) $\times 10^5$	k_d (1/s) $\times 10^{-4}$
84G09LALA	1.2	3.8	4.6
FS18-7-09/84G09LALA	1.0	3.8	3.9
FS18-7-32/84G09LALA	1.0	3.4	3.2
FS18-7-33/84G09LALA	1.1	3.7	4.2
FS18-7-36/84G09LALA	3.5	1.6	5.6
FS18-7-62/84G09LALA	1.3	1.7	2.2
FS18-7-65/84G09 LALA	1.1	1.3	1.4
FS18-7-78/84G09 LALA	1.0	1.0	1.0

30

【0196】

ヒト PD-L1 及びヒト LAG-3 に対する結合親和性は、試験された全ての mAb² について類似していた。ヒト PD-L1 に対する mAb² 結合親和性は、84G09 に匹敵し、LAG-3 結合部位の CH3 ドメインへの導入が PD-L1 結合に影響しなかったことを示した。

40

【0197】

2.6 ヒト LAG-3 及びヒト PD-L1 との mAb² の同時結合

mAb² (FS18-7-09/84G09、FS18-7-32/84G09、FS18-7-33/84G09、FS18-7-36/84G09、FS18-7-62/84G09、FS18-7-65/84G09、及びFS18-7-78/84G09、全て、LALA変異を含む)のLAG-3及びPD-L1と同時に結合する能力を、SPRにより試験した。製造会社の使用説明書に従うことにより、ヒト PD-L1 Fc (R&D Systems、156-B7)を、150 RUの表面密度まで Series SCM5チップ(GE He

50

althcare、BR-1005-30)のフローセル2上へ固定化した。フローセル1を、バックグラウンドの引き算のために、いかなるタンパク質も固定化することなく、活性化し、かつ非活性化した。各試料について、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ のmAb²を、フローセル1及び2に渡って、 $10\mu\text{l}/\text{分}$ の流速で3分間、流した。続いて、 40nM のLAG-3Fc(R&D Systems、2319-L3)を、フローセル1と2の両方に渡って、 $10\mu\text{l}/\text{分}$ の流速で3分間、流した。各結合工程について、解離は3分間、追跡された。センサーチップを、各サイクル後に、 $100\mu\text{l}/\text{分}$ の流速で 25mM NaOHの15秒間の注入で再生した。

【0198】

試験された全てのmAb²は、LAG-3及びPD-L1と同時に結合する能力があった。親の抗PD-L1 mAb、84G09は、PD-L1と結合するだけである。

10

【0199】

2.7 マウスLAG-3及びマウスPD-L1との代替mAb²の同時結合

2つの代替マウスmAb²(FS18-7-108-29/S1及びFS18-7-108-35/S1、どちらもLALA変異を含有する)の、マウスLAG-3及びマウスPD-L1と同時に結合する能力を、BIAcore 3000(GE Healthcare)においてSPRにより試験した。製造会社の使用説明書に従って、マウスPD-L1Fc(R&D Systems、1019-B7-100)を、830RUの表面密度までCM5チップのフローセル4上へ固定化した。フローセル3を、バックグラウンドの引き算のために、820RUのヒトFc(R&D system、110-HG)で固定化した。各試料について、 50nM のmAb²を、フローセル1及び2に渡って、 $20\mu\text{l}/\text{分}$ の流速で150秒間、流した。続いて、 50nM のマウスLAG-3Fc(R&D Systems、3328-L3-050)を、フローセル3と4の両方に渡って、 $20\mu\text{l}/\text{分}$ の流速で150秒間、流した。各結合工程について、解離は3分間、追跡された。センサーチップを、各サイクル後に、 50mM NaOH $10\mu\text{l}$ の2回で再生した。試験されたどちらのmAb²も、マウスLAG-3及びマウスPD-L1と同時に結合する能力があり、したがって、ヒトLAG-3/PD-L1 mAb²についての適切な代替である。

20

【0200】

2.8 LALA変異を含むmAb²によるヒトFc 受容体との結合

BIAcore 3000装置についての製造会社の使用説明書に従って、ヒトFc 受容体を、CM5チップ上に、FcRI(R&D Systems、1257-FC)及びFcRIIa(R&D Systems、4325-FC)についておよそ200RU、並びにFcRIIb/c(R&D Systems、1875-CD)についておよそ500RUの表面密度まで固定化した。FcRI及びFcRIIaについて、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ のmAb又はmAb²を、チップに渡って、 $10\mu\text{l}/\text{分}$ の流速で3分間、流し、解離を、5分間、追跡した。ランニングバッファーはPBS(Lonza、BE17-516F)+0.05%(v/v) P20表面活性剤(GE Healthcare、BR-1000-54)であった。陽性対照は、野生型IgG1 4420-mAbであった。無関係の標的(20H4及びMOR7490)に対するモノクローナルIgG2及びIgG4 mAb、並びにマウスIgG1(Sigma、P5305)が、参照点として含まれた。結合複合体の速い解離速度のために、再生は必要とされなかった。FcRIIa及びFcRIIb/c試験について、mAb²の濃度を、これらの2つの受容体とのより弱い結合を補償するために $500\mu\text{g}/\text{ml}$ に増加させた。結果は表12に示されている。

30

40

【0201】

【表 1 2】

表 12: SPR によって決定された場合の、抗 LAG-3/PD-L1 mAb² のヒト Fcγ 受容体に対する結合応答

mAb/mAb ²	会合の終わりにおける結合応答 (RU)			
	FcγRI	FcγRIII	FcγRIIa	FcγRIIb/c
FS18-7-9/84G09 LALA	<1	<5	<1	<2
FS18-7-33/84G09 LALA	<1	<5	<1	<2
FS18-7-62/84G09 LALA	<1	<5	<1	<2
FS18-7-78/84G09 LALA	<1	<5	<1	<2
84G09 mAb LALA	<1	<5	<1	<2
IgG2	<1	<5	9	<2
IgG4	8	<5	8	9
4420 mAb IgG1	30	28	29	18
マウス IgG1	<1	<5	7	<2

10

【0 2 0 2】

予想された通り、mAb 又は mAb² へ導入された LALA バリエーションは、これらの分子のヒト Fcγ 受容体に結合する能力を低下させた。

20

【0 2 0 3】

2.9 ヒト LAG-3 を発現する細胞及びカニクイザル LAG-3 を発現する細胞との mAb² の結合

ヒト LAG-3 配列（配列番号 126）又はカニクイザル LAG-3 配列（配列番号 128）を、pCDNA5 FRT ベクター（Life Technologies、V6010-20）へ、KpnI（NEB、R0142）及び NotI（NEB、R0146）制限消化を用いてサブクローニングした。その後、ベクターを、Flp-In T-REx 293 HEK 細胞株（Life Technologies、R780-07）へ、Lipofectamine 2000（Life Technologies、11668-019）を用いて形質転換した。形質転換された Flp-In T-REx 293 細胞を、10% FBS（Life Technologies、10270-1-6）、100 μg/ml ハイグロマイシン B（Melford Laboratories Ltd、Z2475）、15 μg/ml プラスチジン（Melford Laboratories Ltd、B1105）を含有する DMEM（Life Technologies、61965-026）中、安定的に形質転換された細胞のコロニーが明らかになるまで 3 から 4 週間、成長させた。これらのコロニーを、1 μg/ml ドキシサイクリン（Sigma、D9891）の存在下で増幅し、LAG-3 発現について試験し、フローサイトメトリにより確認した。

30

【0 2 0 4】

細胞に発現したヒト又はカニクイザル LAG-3 に対する mAb²（全て、LALA 変異を含有する）の親和性を、フローサイトメトリを用いて決定した。10% FBS（Life Technologies、10270-1-6）、100 μg/ml ハイグロマイシン B（Melford Laboratories Ltd、Z2475）、15 μg/ml プラスチジン（Melford Laboratories Ltd、B1105）、及び 1 μg/ml ドキシサイクリン（Sigma、D9891）を含有する DMEM（Life Technologies、61965-026）中で成長した、ヒト又はカニクイザル LAG-3 を発現する HEK 細胞を、組織培養フラスコから細胞解離バッファー（Life Technologies、13151-014）を用いて、剥離し、細胞 2 × 10⁵ 個/ウェルで V 底 96 ウェルプレート（Costar、3897）に播種した。プレートを、1500 rpm、4 で 3 分間、遠心分離して、細胞をペレット化した。mAb²（又は対照 mAb）の希釈系列を、100 μl 体積中で細胞と 4 で 1 時間、インキュベートした。プレートを洗浄し、二次抗体（抗ヒト Fc-488、Jackson ImmunoResearch、109-546-098）を PBS 中 1 : 1000 希

40

50

釈し、100 μ l を、4 で30分間、細胞に加えた（プレートは暗闇中に保った）。プレートを洗浄し、その後、細胞を、1 μ g/ml DAPI（Biotium、40043）を含有するPBS 100 μ l 中に再懸濁した。プレートを、Canto IIフローサイトメーター（BD Bioscience）を用いて読み取った。死細胞を除去し、FITCチャネル（488 nm/530/30）における蛍光を測定した。データを、GraphPad Prismソフトウェアにおけるlog (agonist) vs responseを用いてフィッティングした。プレートを、BD FACSCanto IIサイトメーター（BD Biosciences）において読み取り、データを、FlowJoを用いて分析した。結果は表13に示されている。

【0205】

10

【表13】

表13: フローサイトメトリにより決定された場合の、ヒト又はカニクイザルLAG-3を発現するHEK細胞に対する抗LAG-3/PD-L1 mAb²の結合親和性

	ヒトLAG-3		カニクイザルLAG-3	
	EC ₅₀ (nM)	95%信頼区間	EC ₅₀ (nM)	95%信頼区間
FS18-7-09/84G09LALA	3.179	2.311~4.372	29.9	22.16~40.35
FS18-7-62/84G09LALA	4.079	2.736~6.083	26.37	15.80~44.02
FS18-7-78/84G09LALA	2.526	1.474~4.329	24.75	19.31~31.73
25F7	4.192	2.791~6.297	156.5	107.3~228.2

20

【0206】

結果は、HEK細胞上に発現したヒト及びカニクイザルLAG-3とのmAb²結合を確認している。計算されたEC₅₀値に関して、試験されたmAb²は、対照抗LAG-3抗体25F7と比較した場合、ヒトLAG-3とのより良い、又は匹敵する結合、及びカニクイザルLAG-3との少なくとも2倍より良い結合を示している。HEK細胞株の表面上に発現した他のタンパク質との交差反応性は観察されなかった。

30

【0207】

2.10 ヒトPD-L1を発現する細胞及びカニクイザルPD-L1を発現する細胞とのmAb²の結合

ヒトPD-L1配列（配列番号129）又はカニクイザルPD-L1配列（配列番号131）を、pcDNA5FRTベクター（Life Technologies、V6010-20）へ、KpnI（NEB、R0142）及びNotI（NEB、R0146）制限消化を用いてサブクローニングした。その後、ベクターを、Flp-In T-REx 293 HEK細胞株（Life Technologies、R780-07）へ、Lipofectamine 2000（Life Technologies、11668-019）を用いて形質転換した。形質転換されたFlp-In T-REx 293細胞を、10% FBS（Life Technologies、10270-1-6）、100 μ g/ml ハイグロマイシンB（Melford Laboratories Ltd、Z2475）、15 μ g/ml プラスチジン（Melford Laboratories Ltd、B1105）を含有するDMEM（Life Technologies、61965-026）中、安定的に形質転換された細胞のコロニーが明らかになるまで3から4週間、成長させた。これらのコロニーを、1 μ g/ml ドキシサイクリン（Sigma、D9891）の存在下で増幅し、LAG-3発現を、フローサイトメトリにより確認した。

40

【0208】

細胞に発現したヒト若しくはカニクイザルPD-L1との、又は親（形質転換されていない細胞）とのmAb²（全て、LALA変異を含有する）結合の親和性を、フローサイトメトリを用いて決定した。10% FBS（Life Technologies、10270-1-6）、100 μ g/ml ハイグロマイシンB（Melford Laboratories Ltd、Z2475）、15 μ g/ml

50

1 プラスチシジン (Melford Laboratories Ltd、B1105)、及び $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ドキシサイクリン (Sigma、D9891) を含有する DMEM (Life Technologies、61965-026) 中で成長した、ヒト又はカニクイザル PD-L1 を発現する HEK 細胞を、組織培養フラスコから細胞解離バッファー (Life Technologies、13151-014) を用いて、剥離し、2 細胞 $\times 10^5$ 個/ウェルで V 底 96 ウェルプレート (Costar、3897) に播種した。プレートを、 1500 rpm 、4 で 3 分間、遠心分離して、細胞をペレット化した。mAb² (又は対照 mAb) の希釈系列を、 $100 \mu\text{l}$ 体積中で細胞と 4 で 1 時間、インキュベートした。プレートを洗浄し、二次抗体 (抗ヒト Fc-488、Jackson ImmunoResearch、109-546-098) を PBS 中 1 : 1000 希釈し、 $100 \mu\text{l}$ を、4 で 30 分間、細胞に加えた (プレートは暗闇中に保った)。プレートを洗浄し、その後、細胞を、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ DAPI (Biotium、40043) を含有する PBS $100 \mu\text{l}$ 中に再懸濁した。プレートを、Canto II フローサイトメーター (BD Bioscience) を用いて読み取った。死細胞を除去し、FITC チャンネル ($488\text{nm}/530/30$) における蛍光を測定した。データを、GraphPad Prism ソフトウェアにおける $\log(\text{agonist})$ vs response を用いてフィッティングした。プレートを、BD FACSCanto II サイトメーター (BD Biosciences) において読み取り、データを、FlowJo を用いて分析した。結果は表 14 に示されている。

【0209】

【表 14】

表 14: フローサイトメトリにより決定された場合の、ヒト又はカニクイザル PD-L1 を発現する HEK 細胞に対する抗 LAG-3/PD-L1 mAb² の結合親和性

	ヒト PD-L1 HEK		カニクイザル PD-L1	
	EC ₅₀ (nM)	95%信頼区間	EC ₅₀ (nM)	95%信頼区間
84G09	3.107	2.230~4.331	1.641	1.244~2.164
FS18-7-09/84G09	3.19	2.208~4.610	1.674	1.393~2.012
FS18-7-09/84G09	3.51	2.570~4.794	1.814	1.503~2.189
FS18-7-33/84G09	3.448	2.436~4.881	1.895	1.566~2.292
FS18-7-32/84G09	3.816	2.749~5.298	1.984	1.644~2.393
FS18-7-58/84G09	3.775	2.957~4.820	1.861	1.541~2.247
FS18-7-33/84G09	3.225	2.214~4.700	1.733	1.397~2.150
FS18-7-65/84G09	3.999	2.782~5.750	1.845	1.455~2.339
FS18-7-36/84G09	3.907	2.844~5.367	1.999	1.580~2.528
FS18-7-88/84G09	3.492	2.541~4.800	1.814	1.464~2.247
FS18-7-58/84G09	3.907	2.998~5.093	2.033	1.622~2.550
84G09 (親)	3.051	2.181~4.267	1.959	1.515~2.533

【0210】

試験された LAG-3/PD-L1 mAb² の全部が、ヒト PD-L1 及びカニクイザル PD-L1 と、84G09 mAb の EC₅₀ に近い EC₅₀ で結合し、PD-L1 結合親和性が、mAb² の CH3 ドメインへの LAG-3 結合部位の導入により影響されないことを実証した。

【0211】

2.11 マウス LAG-3 又はマウス PD-L1 を発現する細胞との代替マウス mAb² の結合

マウスLAG-3配列(配列番号127)又はマウスPD-L1配列(配列番号130)を、pcDNA5FRTベクター(Life Technologies、V6010-20)へ、KpnI(NEB、R0142)及びNotI(NEB、R0146)制限消化を用いてサブクローニングした。その後、ベクターを、Flp-In-T-REx 293 HEK細胞株(Life Technologies、R780-07)へ、Lipofectamine 2000(Life Technologies、11668-019)を用いて形質転換した。形質転換されたFlp-In-T-REx 293細胞を、10% FBS(Life Technologies、10270-1-6)、100 µg/ml ハイグロマイシンB(Melford Laboratories Ltd、Z2475)、15 µg/ml プラスチジン(Melford Laboratories Ltd、B1105)を含有するDMEM(Life Technologies、61965-026)中、安定的に形質転換された細胞のコロニーが明らかになるまで3から4週間、成長させた。これらのコロニーを、1 µg/ml ドキシサイクリン(Sigma、D9891)の存在下で増幅し、LAG-3又はPD-L1発現を、フローサイトメトリにより確認した。

【0212】

細胞に発現したマウスLAG-3又はマウスPD-L1とのmAb²(全て、LALA変異を含有する)結合の親和性を、フローサイトメトリを用いて決定した。10% FBS(Life Technologies、10270-1-6)、100 µg/ml ハイグロマイシンB(Melford Laboratories Ltd、Z2475)、15 µg/ml プラスチジン(Melford Laboratories Ltd、B1105)、及び1 µg/ml ドキシサイクリン(Sigma、D9891)を含有するDMEM(Life Technologies、61965-026)中で成長した、マウスLAG-3又はマウスPD-L1を発現するHEK細胞を、組織培養フラスコから細胞解離バッファー(Life Technologies、13151-014)を用いて、剥離し、細胞2×10⁵個/ウェルでV底96ウェルプレート(Costar、3897)に播種した。プレートを、1500 rpm、4分で3分間、遠心分離して、細胞をペレット化した。mAb²(又は対照mAb)の希釈系列を、60 µl体積中で細胞と4分で1時間、インキュベートした。プレートを洗浄し、二次抗体(mAb²について、抗ヒトFc-488、Jackson ImmunoResearch、109-546-098、又は抗LAG-3対照、C9B7Wについて、抗ラットIgG(H+L)、Alexa Fluor 488、ThermoFisher、A-11006)をPBS中1:1000希釈し、50 µlを、4で30分間、細胞に加えた(プレートは暗闇中に保った)。プレートを洗浄し、その後、細胞を、FACS Cell Fix(BD Bioscience、340181)50 µl中に15分間、再懸濁し、その後、洗浄し、1 µg/ml DAPI(Biotium、40043)を含有するPBS 100 µl中に再懸濁した。プレートを、Canto IIフローサイトメーター(BD Bioscience)を用いて読み取った。死細胞を除去し、FITCチャネル(488nm/530/30)における蛍光を測定した。データを、GraphPad Prismソフトウェアにおけるlog(agonist) vs responseを用いてフィッティングした。プレートを、BD FACSCanto IIサイトメーター(BD Biosciences)において読み取り、データを、FlowJoを用いて分析した。結果は表15に示されている。

【0213】

10

20

30

40

50

【表 15】

表 15: フローサイトメトリによる、マウス LAG-3 又はマウス PD-L1 を発現する HEK 細胞に対する代替抗マウス LAG-3/PD-L1 mAb² の結合親和性

	マウス LAG-3 HEK		マウス PD-L1 HEK	
	EC ₅₀ (nM)	95%信頼区間	EC ₅₀ (nM)	95%信頼区間
C9B7W	27	12.27~58.04	N/A	-
FS18-7-108-29/S1	2.27	1.064~4.857	11.9	7.627~18.68
FS18-7-108-29/4420	2.29	1.256~4.164	N/A	-
FS18-7-108-35/S1	3.84	2.126~6.926	12.3	8.873~17.16
FS18-7-108-35/4420	2.38	0.7819~7.239	N/A	-

10

【0214】

代替 mAb² は、細胞に発現したマウス LAG-3 及び細胞に発現したマウス PD-L1 と結合することができた。細胞に発現したマウス LAG-3 との代替 mAb² の結合親和性は、抗ヒト LAG-3 / PD-L1 mAb² のヒト LAG-3 に対する親和性とおおよそ同じであり (2.5 から 4.2 nM と比較して 2.3 から 3.8 nM)、細胞に発現したマウス PD-L1 に対する代替 mAb² の結合親和性は、抗ヒト LAG-3 / PD-L1 mAb² のヒト PD-L1 に対する親和性の 3 倍以内であり (3.1 から 4.0 nM と比較して 11.9 から 12.3 nM)、これらの mAb² が、マウスにおけるインビボ研究での使用のための、抗ヒト LAG-3 / PD-L1 mAb² の適切な代替であることを実証している。

20

【0215】

実施例 3: T 細胞活性化アッセイ及び SEB アッセイにおける mAb² 分子の活性

3.1 T 細胞活性化アッセイ

DO11.10 OVA T リンパ球ハイブリドーマ細胞株及び LK35.2 B リンパ球ハイブリドーマ細胞株に基づいた IL-2 放出アッセイを、mAb² の機能的スクリーニングのために用いた。IL-2 放出は T 細胞活性化のマーカーである。内因性マウス PD-1 を発現する T 細胞に、空ベクター (pLVX) 又はヒト LAG-3 構築物をトランスフェクションした。B 細胞に、空ベクター (pLVX) 又はヒト PD-L1 構築物をトランスフェクションした。

30

【0216】

これらの 4 個の細胞株の 3 つの組合せを、mAb² による T 細胞活性化を試験するために並べて用いた:

- ・抗 PD-L1 活性についての DO11.10 pLVX + LK35.2 hPD-L1;
- ・抗 LAG-3 活性についての DO11.10 hLAG-3 + LK35.2 pLVX;
- ・同時の抗 LAG-3 / 抗 PD-L1 活性についての DO11.10 hLAG-3 + LK35.2 hPD-L1

40

【0217】

全ての mAb² (全て、LALA 変異を含有する) を、この T 細胞活性化アッセイにおいて 2 回、試験した。カニクイザル LAG-3 及び PD-L1 との交差反応性を、機能性 T 細胞活性化アッセイにおいて、カニクイザル標的 (cPD-L1 及び cLAG-3) を過剰発現する細胞を用いて試験した。

【0218】

LAG-3 を過剰発現する T 細胞株の作製

レンチウイルス形質導入方法論を用いて、ヒト、カニクイザル、又はマウス LAG-3 を過剰発現する DO11.10 細胞 (National Jewish Health) を、Lenti-X H

50

TXパッケージングシステム（カタログ番号631249）を用いて作製した。マウスLAG-3 cDNA（配列番号127）、ヒトLAG-3 cDNA（配列番号126）、又はカニクイザルLAG-3 cDNA（配列番号128）を含有するLenti-X発現ベクター（pLVX）（カタログ番号631253）を、Lenti-X HTXパッケージングミックスを用いて、Lenti-X 293T細胞株（カタログ番号632180）へ同時トランスフェクションして、ウイルスを作製した。DO11.10細胞株に、作製されたレンチウイルスベクターを用いて、Lenti-X HTXパッケージングシステムで形質導入した。

【0219】

PD-L1を過剰発現する抗原提示細胞の作製

10

レンチウイルス形質導入方法論を用いて、ヒト、カニクイザル、又はマウスPD-L1を過剰発現するLK35.2 B細胞リンパ腫（ATCC、HB-98）を、Lenti-X HTXパッケージングシステム（カタログ番号631249）を用いて作製した。マウスPD-L1 cDNA（配列番号130）、ヒトPD-L1 cDNA（配列番号129）、又はカニクイザルPD-L1 cDNA（配列番号131）を含有するLenti-X発現ベクター（pLVX）（カタログ番号631253）を、Lenti-X HTXパッケージングミックスを用いて、Lenti-X 293T細胞株（カタログ番号632180）へ同時トランスフェクションして、ウイルスを作製した。LK35.2細胞株に、作製されたレンチウイルスベクターを用いて、Lenti-X HTXパッケージングシステムで形質導入した。

20

【0220】

培地及びペプチド

細胞培養培地：DMEM（Gibco、61965-026） 10% FBS（Gibco、10270-106）、1mM ピルビン酸ナトリウム（Gibco、11360-070）、1µg/ml プューロマイシン（Gibco、A11138-03）

実験培地：プューロマイシンを含まない完全DO11.10培養培地

OVAペプチド（MW = 1773.9Da）：H-ISQAVHAHAHA EINEAGR-OH（Pepscan）

【0221】

細胞：

30

- ・DO11.10 hLAG-3：ヒトLAG-3を過剰発現するためにレンチウイルスベクターを形質導入されたDO11.10 T細胞ハイブリドーマ；
- ・DO11.10 pLVX：空レンチウイルスベクターを形質導入されたDO11.10 T細胞ハイブリドーマ；
- ・DO11.10 cLAG-3：カニクイザルLAG-3を過剰発現するためにレンチウイルスベクターを形質導入されたDO11.10 T細胞ハイブリドーマ
- ・LK35.2 hPD-L1：ヒトPD-L1を過剰発現するために、hPD-L1を含有するレンチウイルスベクターを形質導入されたB細胞ハイブリドーマ；
- ・LK35.2 pLVX：空レンチウイルスベクター（pLVX）を形質導入されたB細胞ハイブリドーマ；
- ・LK35.2 cPD-L1：カニクイザルPD-L1を過剰発現するためにレンチウイルスベクターを形質導入されたB細胞ハイブリドーマ。

40

【0222】

細胞0.3×10⁶個/mlでのDO11.10細胞（DO11.10 pLVX細胞又はDO11.10 hLAG-3細胞）を、3×最終濃度での抗体と1：1比で混合した。抗体及びDO11.10細胞を、37℃、5% CO₂で1時間、インキュベートした。LK35.2細胞（pLVX及びPD-L1-pLVXの両方）を、細胞3×10⁵個/ml実験培地において、1.5µMのOVAペプチドと30分間、インキュベートした。LK35.2細胞+OVAを、DO11.10細胞/処理混合物に、以下の組合せにおいて1：2比で加えた：

ヒト機能的スクリーニング

50

DO11.10 pLVX + LK35.2 hPD-L1、
 DO11.10 hLAG-3 + LK35.2 pLVX、
 DO11.10 hLAG-3 + LK35.2 hPD-L1

カニクイザル交差反応性スクリーニング

DO11.10 pLVX + LK35.2 cPD-L1、
 DO11.10 cLAG-3 + LK35.2 pLVX、
 DO11.10 cLAG-3 + LK35.2 cPD-L1

【0223】

細胞を、37℃、5% CO₂で24時間、インキュベートした。上清を収集し、マウス IL-2 ELISAキット (eBioscience、88-7024-88、又はR&D systems、SM2000) を用いて、製造会社の使用説明書に従ってアッセイした。プレートを、Gen5ソフトウェア、BioTekでプレートリーダーを用いて、450nmで読み取った。570nmの吸光度値を、450nmの吸光度値から引き算した(補正)。サイトカイン濃度の計算のための標準曲線は、4パラメータのロジスティック曲線フィットに基づいた(Gen5ソフトウェア、BioTek)。mIL-2の濃度を、Fcab又はmAbのlog濃度に対してプロットし、その結果生じた曲線を、GraphPad Prismにおけるlog(アゴニスト)対応方程式を用いてフィッティングした。表16は、対照(84G09 + 25F7)に対するパーセンテージとして計算された、mAb²及び対照mAbのEC₅₀値及び最大IL-2放出を示す。図2AからFは、FS18-7-9/84G09、FS18-7-62/84G09、又はFS18-7-78/84G09、及び対照で処理された細胞株のパネルによるIL-2放出の代表的なプロットを示す。両方の標的が存在する(DO11.10 hLAG-3 + LK35.2 hPD-L1) T細胞活性化アッセイにおいて、LAG-3とPD-L1の両方が阻害された場合だけ、例えば、mAb²、又はLAG-3抗体とPD-L1抗体の組合せが用いられた場合だけ、IL-2放出が誘導された。したがって、mAb²は、単剤の単独を越える利益を生じる。LAG-3(DO11.10 hLAG-3 + LK35.2 pVlx)だけ又はPD-L1(DO11.10 pVlx + LK35.2 PD-L1)だけに関するアッセイにおいて、mAb²は、これらの標的を阻害することにおいて単剤と類似した活性を示し、mAb²が、LAG-3、PD-L1、又はLAG-3 + PD-L1の存在下でT細胞活性化をもたらすことができる唯一の単一分子であることを実証した。

【0224】

10

20

30

40

50

【表 16】

表 16: 9 個の mAb² についての EC₅₀ 及び最大 IL-2 放出(対照 - 84G09+25F7 と比較した IL2 放出のパーセンテージにより計算された場合)

mAb ² /対照 mAbs	平均	SD	平均	SD
	EC ₅₀		対照(84G09+25F7)に対する%として計算された最大 IL2 放出	
FS18-7-09/84G09LALA	0.75	0.20	65.89	24.04
FS18-7-33/84G09LALA	0.82	0.35	63.95	36.56
FS18-7-78/84G09LALA	0.82	0.38	64.39	39.28
FS18-7-62/84G09LALA	0.65	0.02	58.97	18.13
FS18-7-65/84G09LALA	0.81	0.20	70.25	2.22
FS18-7-95/84G09LALA	1.10	-	79.77	-
FS18-7-32/84G09LALA	1.19	0.00	82.94	14.67
FS18-7-36/84G09LALA	1.05	0.32	71.56	8.83
FS18-7-58/84G09LALA	1.16	0.21	79.40	0.10
84G09LALA + 25F7	1.32	0.25	100.00	

【0225】

DO11.1-LK35.2 T細胞活性化アッセイにおいて、mAb²のうちの1個(LALA変異を含有するFS18-7-9/84G09)を、カニクイザル機能的交差反応性について試験した。図3AからCは、3つの、細胞に基づいたアッセイのパネルにおける結果を示す。FS18-7-9/84G09は、cLAG-3+cPD-L1の両方、及びcLAG-3又はcPD-L1の単独の存在下で、T細胞活性化を誘導することができ、mAb²が、機能的にカニクイザル交差反応性であり、したがって、霊長類に基づいた安全性研究における使用に適していることを示した。

【0226】

3.2 ブドウ球菌エンテロトキシンBアッセイ

3個のmAb²(全て、LALA変異を含有する)を、ヒトPBMCに基づいたブドウ球菌エンテロトキシンBアッセイ(SEBアッセイ)において試験した。ブドウ球菌エンテロトキシンBは、スーパー抗原であり、抗原提示細胞(APC)上のMHCクラスII分子及びT細胞受容体(TCR)の α 鎖と結合し、T細胞の非特異的活性化及びサイトカイン放出を引き起こす。T細胞活性化を見るために存在すべき抗原についての必要条件はない。SEBアッセイは、生理的レベルのチェックポイント阻害剤と共に、刺激されたヒト細胞(PBMC)を用い、ヒト系においてT細胞活性化がmAb²により増強されることを確認するために用いることができる。3個のmAb²を、4人の異なるドナーに由来する細胞を用いるSEBシステムにおいて試験した。

【0227】

増殖したT細胞の産生

PBMCを、フィコール勾配分離により白血球コーン(leukocyte cone)から単離した。CD4⁺T細胞を、ヒトCD4⁺T細胞単離キット(Miltenyi Biotec Ltd、130-096-533)を用いて、製造会社の使用説明書に従って単離した。ヒトT活性化因子CD3/CD28 Dynabeads(Life technologies、11131D)を、ボルテックスすることにより再懸濁した。ビーズを、無菌15mlチューブに移し、10% FBS(Life Technologies、10270106)及び1xペニシリン ストレプトマイシン(Life Technologies、15140122)を含むRPMI(Life Technologies、61870044)10mlを加えて、Dynabeadsを洗浄した。上清を捨てた。3:1のビーズ対細胞の比での、

10% FBS及び1×ペニシリン ストレプトマイシン溶液、並びに50 IU/ml 組換えヒトIL2 (Peprotech、200-02-50ug)を含むRPMI中細胞 1.0×10^6 個/mlのCD4+ T細胞の必要とされる量を、T75フラスコ (Greiner Bio-one、690195)に移し、37 + 5% CO₂でインキュベートした。3日後、細胞を優しく再懸濁し、カウントした。細胞密度を、必要に応じて新鮮な培地 (RPMI-10% FBS + ペニシリン ストレプトマイシン溶液1× + 50IU/mL rhIL2)を加えることにより、細胞0.8から 1×10^6 個/mlに維持した。7日目又は8日目において、CD3/28ビーズを除去し、CD4+ T細胞を、低減した10 IU/ml rhIL2を含む、10% FBS + ペニシリン ストレプトマイシン溶液 1×を含む新鮮な培地RPMIの細胞 1×10^6 個/mlで、一晩、休止させた。細胞を、必要とされるまで凍結保存した。

10

【0228】

Mo i D Cの作製

手付かずの (Untouched) 単球を、ヒトPBMCからヒトPan Monocyte Isolation Kit (Miltenyi Biotec Ltd、130-096-537)を用いて、製造会社の使用説明書に従って単離した。単球を、ヒトMo - DC分化培地 (Miltenyi Biotec Ltd、130-094-812)を用いて製造会社の使用説明書に従って、iDCへ分化させた。

【0229】

SEBアッセイ

増殖したT細胞を、実験の1日前に解凍し、AIM培地 (Gibco、12055-091)で洗浄し、AIM培地中細胞 1×10^6 個/mlで、37、5% CO₂、一晩、インキュベートした。2 μM濃度の各抗体/混合物を、DPBS (Gibco、14190-169)中に調製し、培地 (30 μl + 270 μl)中に1:10希釈して、200 nMを得た。96ウェルプレートにおいて、段階希釈を、1:10 (30 μl + 270 μl実験培地; 2×最終濃度)で行った。Mo i D Cを解凍し、AIM培地で洗浄し、同じドナー由来のT細胞と1:10比で混合した (細胞 2×10^5 個/mlのiDC 5 mlを、細胞 2×10^6 個/mlのT細胞 5 mlと組み合わせた)。0.1 μg/mlのSEB (Sigma、S4881) 20 μlを、細胞10 mlに加えた。丸底96ウェルプレートにおいて、細胞/SEB混合物 100 μlを、抗体希釈溶液 100 μlに加え、ウェルあたりAIM培地 200 μl中0.1 ng/ml SEBと共に、 10^4 個のiDC細胞対 10^5 個のT細胞の比が得られ、100 nM、10 nM、1 nM、0.1 nM、0.01 nM、0.001 nMの最終抗体濃度であった。細胞を、37、5% CO₂で3日間、インキュベートした。上清を収集し、すぐに、ヒトIFN ELISAキット (R&D Systems、PDIF50)でアッセイし、又はさらなる分析のために-20 で凍結した。アッセイは、PBA (DPBS、2% BSA (Sigma、A7906-100G))で1:30希釈された上清を用いて、キットの製造会社の使用説明書に従って、実施された。ヒトIFN の濃度を、mAb²又はmAbのlog濃度に対してプロットし、生じた曲線を、Graph Pad Prismソフトウェアにおけるlog (アゴニスト) 対応答方程式を用いてフィッティングした。表17は、4人の異なる細胞ドナー (ドナーAからD) 由来の細胞に関する、SEBアッセイにおけるEC₅₀値及びIFN 放出のスパンを示す。図4は、単一のドナーに関する、SEBアッセイの代表的なプロットを示す。全ての6つのアッセイにおいて、LAG-3 / PD-L1 mAb²及びLAG-3 / FITC mAb² + 84G09LALAの組合せは、84G09LALA mAb単独より高い活性化を示したが、LAG-3 / FITC mAb²又は4420 mAbがアッセイされた場合、それらは、有意な活性化を示さなかった。したがって、SEBアッセイの結果は、より生理学的な系において、DO11.10 / LK35.2アッセイの結果を確認した。

20

30

40

【0230】

【表 17 - 1】

表 17. 4 人の異なる細胞ドナーに関する、6 つの SEB アッセイに基づいて 6 個の mAb²について
計算された EC₅₀ 値

アッセイ 1 ドナーA				
	EC ₅₀ (nM)	95%信頼区間	スパン	95%信頼区間
FS18-7-09/84G09LALA	0.1551	0.08521~0.2824	12280	10802~13758
FS18-7-62/84G09LALA	0.1424	0.08665~0.2340	12120	10897~13342
FS18-7-78/84G09LALA	0.2774	0.1220~0.6310	14156	11970~16341
84G09 LALA	0.1884	0.08960~0.3962	10077	8612~11542
FS18-7-09/4420LALA	-	-	1010	384.8~1635
FS18-7-62/4420LALA	-	-	416.1	-443.1~1275
FS18-7-78/4420LALA	-	-	411	-1103~1925
84G09 LALA + FS18-7-09/4420LAL	0.2455	0.1030~0.5850	11836	9888~13785
84G09 LALA + FS18-7-62/4420LAL	0.1601	0.05399~0.4750	11448	8958~13937
84G09 LALA + FS18-7-78/4420LAL	0.1774	0.06863~0.4587	12250	9955~14544
4420 LALA	-	-	218.6	-35.91~473.1
アッセイ 1 ドナーB				
	EC ₅₀ (nM)	95%信頼区間	スパン	95%信頼区間
FS18-7-09/84G09LALA	0.07316	0.02255~0.2374	11825	8919~14730
FS18-7-62/84G09LALA	0.03236	0.007146~0.1465	12170	8419~15921
FS18-7-78/84G09LALA	0.09718	0.03128~0.3019	15198	11594~18802
84G09 LALA	0.08562	0.03403~0.2154	12343	9957~14730
FS18-7-09/4420LALA	-	-	1337	-195.8~2870
FS18-7-62/4420LALA	-	-	2508	-2118~7133
FS18-7-78/4420LALA	-	-	1425	-58.52~2908
84G09 LALA + FS18-7-09/4420LAL	0.2861	0.1005~0.8143	16037	12890~19184
84G09 LALA + FS18-7-62/4420LAL	0.1431	0.02857~0.7172	13907	9358~18455
84G09 LALA + FS18-7-78/4420LAL	0.3775	0.08929~1.596	14418	10502~18334
4420 LALA	-	-	2293	1028~3558

【 0 2 3 1 】

10

20

30

40

【表 1 7 - 2】

アッセイ 2 ドナーA				
	EC ₅₀ (nM)	95%信頼区間	スパン	95%信頼区間
FS18-7-09/84G09LALA	0.2761	0.1654~0.4611	20727	18729~22724
FS18-7-33/84G09LALA	0.1934	0.07990~0.4681	171 03	14156~20049
FS18-7-78/84G09LALA	0.2384	0.1596~0.3560	19822	18311~21333
84G09 LALA	0.3788	0.1166~1.230	11745	9138~14352
FS18-7-09/4420LALA	-	-	1991	-1927~5909
FS18-7-33/4420LALA	-	-	約 1.053e+006	(非常に幅広い)
FS18-7-78/4420LALA	-	-	約 72657	(非常に幅広い)
84G09 LALA + FS18-7-09/4420LALA	0.5202	0.2624~1.031	23346	20230~26462
84G09 LALA + FS18-7-33/4420LALA	0.2881	0.1529~0.5428	22529	19853~25205
84G09 LALA + FS18-7-78/4420LALA	0.4335	0.2089~0.8996	20955	18038~23873
アッセイ 2 ドナーB				
	EC ₅₀ (nM)	95%信頼区間	スパン	95%信頼区間
FS18-7-09/84G09LALA	0.139	0.04157~0.4646	21572	16269~26874
FS18-7-33/84G09LALA	0.07278	0.01615~0.3280	19554	13408~25699
FS18-7-78/84G09LALA	0.1356	0.03552~0.5178	22319	16212~28426
84G09 LALA	0.1959	0.03365~1.140	12077	7938~16216
FS18-7-09/4420LALA	-	-	1272	-963.4~3507
FS18-7-33/4420LALA	-	-	2272	-190.8~4735
FS18-7-78/4420LALA	-	-	1960	-1287~5207
84G09 LALA + FS18-7-09/4420LALA	0.2889	0.07772~1.074	23661	17835~29488
84G09 LALA + FS18-7-33/4420LALA	0.3	0.06936~1.298	26145	18971~33320
84G09 LALA + FS18-7-78/4420LALA	0.271	0.03980~1.845	25489	16292~34686

【 0 2 3 2 】

10

20

30

40

【表 17 - 3】

アッセイ 1 ドナーC				
	EC ₅₀ (nM)	95%信頼区間	スパン	95%信頼区間
FS18-7-09/84G09LALA	0.06739	0.01933~0.2349	2987	15107~27710
84G09 LALA	0.08347	0.0331~0.2105	1509	11046~17414
84G09 LALA + FS18-7-09/4420LALA	0.1618	0.06635~0.3944	1744	13346~20704
アッセイ 1 ドナーD				
	EC ₅₀ (nM)	95%信頼区間	スパン	95%信頼区間
FS18-7-09/84G09LALA	0.04373	0.01797~0.1064	1850	15995~23799
84G09 LALA	0.07043	0.03483~0.1424	1045	10996~15405
84G09 LALA + FS18-7-09/4420LALA	0.1351	0.08359~0.2182	968	15318~19403

10

20

【0233】

実施例 4：マウス腫瘍モデルにおける mAb 2 分子のインビボ活性

4.1 MC38 の非定着腫瘍モデルにおける mAb 2 分子の活性

MC38 腫瘍が、それらの細胞表面上に PD-L1 を発現すること、並びに腫瘍及び腫瘍周辺における免疫細胞上の LAG-3 発現の増加を生じる高度に免疫原性であることが公知であるため、MC38 同系腫瘍モデルをこの実験に用いた。

【0234】

FS18-29/S1 と呼ばれる、LALA 変異を含有する代替マウス mAb 2 FS18-7-108-29/S1 (配列番号 117 及び 119) を、MC38 同系マウス腫瘍成長モデルを用いてインビボ活性について試験した。mAb 2 の腫瘍成長を阻害する能力を、FS18-29/4420 と呼ばれる、LALA 変異を含有する LAG-3/ニセ mAb 2、FS18-7-108-29/4420 (配列番号 132 及び 85)、ベンチマーク抗 LAG-3 mAb C9B7W (2B scientific; カタログ番号 BE0174-50MG)、LALA 変異を含有するベンチマーク抗 PD-L1 mAb S1 (配列番号 122 及び 119)、及び mAb C9B7W と S1 の組合せのそれと比較した。

30

【0235】

それぞれ、週齢 8 から 10 週間かつ体重 20 から 25 g の C57BL/6 雌マウス (Charles River) を、研究開始の前の 1 週間、休養させた。全ての動物に、マイクロチップを埋め、固有の識別名を与えた。各コホートは 10 匹のマウスを有した。MC38 結腸癌細胞株 (S. Rosenberg, NIH) は、初めに、増殖され、保存され、その後、IMPACT I プロトコルを用いる病原体についての IDEXX BioResearch によりプレスクリーニングされ、病原体が含まれないことが示された。MC38 細胞を、-150 保存から解凍し、T175 組織培養フラスコにおける 10% FCS (Gibco, 10270-106) を含む DMEM (Gibco, 61965-026) 20 ml に加えた。マウスは、イソフルラン (Abbott Laboratories) を用いて麻酔され、各動物は、左脇腹に細胞 2×10^6 個の皮下注射を受けた。腫瘍細胞接種から 7 から 8 日後、この時点で腫瘍を有しないマウスを、研究から除いた。

40

【0236】

mAb 2 分子及び対照抗体の全部を、注射前の 24 時間以内に SEC-HPLC プロファイリングにより分析し、不純物についてチェックした。抗体を、PBS 中 10 mg/kg

50

の最終濃度に調製し、組合せ研究において第2の抗体と組み合わせた。mAb²分子及び対照抗体を、マウスに、腫瘍接種後8日目、11日目、及び14日目に腹腔内（IP）注射により投与した。腫瘍の正確な測定値をとり、問題になっている日における任意の薬物投与を実施し、マウスは、治験のリマインダーとして緻密な観察を受けた。腫瘍容積測定値を、ノギスで計って、腫瘍の最長軸及び最短軸を決定した。以下の式を用いて、腫瘍容積を計算した：

$$L \times (S^2) / 2$$

式中、L = 最長軸；S = 最短軸。

【0237】

試験は、腫瘍量が制限に近いと見なされた時点の20日目に停止された。全てのマウスを、安楽死させ、腫瘍を切除し、重量を測定した。

10

【0238】

結果は図5及び6に示されている。LAG-3/PD-L1 mAb²（FS18-29/S1）処置されたマウスは、ベンチマークmAb、C9B7WとS1の組合せで処置されたマウスより有意に少ない重量の最終腫瘍を有した。具体的には、最終腫瘍重量の統計的分析を、GraphPad Prismソフトウェアパッケージ内の両側スチューデントt検定を用いて実施し、FS18-29/S1の投与と、ベンチマーク抗体C9B7WとS1の組合せの投与との間の統計的有意差（ $p = 0.0125$ ）を実証し、同じ分子により提供されるLAG-3及びPD-L1阻害が、別々の分子により提供されるLAG-3及びPD-L1阻害と比較して、最終腫瘍重量に相乗的効果を生じることを示した。

20

【0239】

代替mAb² FS18-29/S1はまた、8個の成長するMC38腫瘍のうちの6個において定着を阻止し、及び残りの2個の成長を遅らせる、腫瘍成長への著しい効果を生じた。ベンチマーク抗LAG-3抗体と抗PD-L1抗体の組み合わせでの投与は、7匹の動物において腫瘍成長を遅らせ、腫瘍を含まない動物はなかった。

【0240】

FS18-29/4420単独は、腫瘍成長に著しい効果を生じず、最大効力のために、そのmAb²が抗PD-L1 Fabを必要とすることを示した。ベンチマーク抗マウスLAG-3抗体単独は、生じる腫瘍成長にほとんど、又は全く効果を生じず、一方、ベンチマーク抗マウスPD-L1は、このコホートにおいて7個の腫瘍のうちの1個の定着を阻止し、腫瘍成長を遅らせるといういくらかの全体的効果を生じた。

30

【0241】

同系マウスモデルは、治療的標的を阻害する抗腫瘍効果を試験するための適切なマウス系として受け入れられ、ヒト治療用物質の開発を検証するために広く用いられている。

【0242】

4.2 MC38の定着腫瘍モデルにおけるmAb²分子の活性

FS18-29/S1と呼ばれる、LALA変異を含有する代替マウスmAb² FS18-7-108-29/S1（配列番号117及び119）を、MC38同系マウス腫瘍成長モデルにおいてインビボ活性について試験した。そのmAb²の腫瘍成長を阻害する能力を、FS18-29/4420と呼ばれる、LALA変異を含有するLAG-3/ニセmAb²、FS18-7-108-29/4420（配列番号132及び85）、ベンチマークLAG-3 mAb C9B7W、LALA変異を含有するベンチマークPD-L1 mAb S1（配列番号122及び119）、及びC9B7WとS1の組合せのそれと比較した。

40

【0243】

それぞれ、週齢8から10週間かつ体重20から25gのC57BL/6雌マウス（Charles River）を、研究開始前の1週間、休養させた。全ての動物に、マイクロチップを埋め、固有の識別名を与えた。各コホートは10匹のマウスを有した。MC38結腸癌細胞株（S. Rosenberg、NIH）は、初めに、増殖され、保存され、その後、IMPACT Iプロトコルを用いて病原体についてIDEXX BioResearchによりプレスク

50

リーニングされ、病原体が含まれないことが示された。MC38細胞（およそ 3×10^6 から 5×10^6 個）を、-150℃保存から解凍し、T175組織培養フラスコにおける10% FCS（Gibco、10270-106）を含むDMEM（Gibco、61965-026）20mlに加えた。マウスは、イソフルラン（Abbott Laboratories）を用いて麻酔され、各マウスの左脇腹へ100μl中 2×10^6 個の細胞が皮下注射された。腫瘍細胞接種から7から8日後、マウスを、研究の開始のために適当な健康及び腫瘍成長について日常的にモニターした。マウスの大部分が、直径5から10mmの腫瘍を示した時、それらを分類し、再び、研究コホートヘランダム化した。この時点で適切なサイズの腫瘍をもたなかったいかなるマウスも研究から除いた。

【0244】

mAb2分子及び対照抗体の全部を、注射前の24時間以内にSEC-HPLCプロファイリングにより分析し、不純物についてチェックした。抗体を、PBS中10mg/kgの最終濃度に調製し、組合せ研究のために第2の抗体と組み合わせた。mAb2分子及び対照抗体を、マウスに、腫瘍接種後15日目、18日目、及び21日目にIP注射により投与した。動物を、盲検方式で週3回、麻酔下、健康スクリーニングし、その時間中に、腫瘍の正確な寸法を計った。腫瘍容積測定値をノギスで計って、腫瘍の最長軸及び最短軸を決定した。腫瘍容積を計算するために用いられた式は、上記のセクション4.1に示されている通りであった。

【0245】

試験は、腫瘍量が制限に近いと見なされた時点の24日目に停止された。全てのマウスを、安楽死させ、腫瘍を切除し、重量を測定した。結果は図7及び8に示されている。

【0246】

マウスでの同系腫瘍モデルにおける腫瘍成長の効果的な制御又は抑制は、初期時点での（40mm³未満の腫瘍容積で開始する）治療介入を通して最も良く達成される。介入の投与が遅くなればなるほど、腫瘍成長に関してプラス効果を観察することが難しくなり、やはり、おそらく、これは、ヒト臨床設定における状況により類似している。

【0247】

FS18-29/S1は、C57BL/6マウスにおいて、初期時点で与えられた場合、免疫能力のあるマウスで、MC38結腸癌の腫瘍成長を抑制すること、及びその定着を阻止することの両方にプラス効果を生じた。より遅い時点で（50から125mm³の腫瘍容積で開始する）投与された場合、FS18-29/S1は、ベンチマーク抗体の組合せとちょうど同じくらい、腫瘍成長を抑制することに効果的であった。FS18-29/4420単独は、腫瘍成長に顕著な影響を生じることはなく、S1及びC9B7Wのどちらも、生じた腫瘍成長に穏やかな効果を生じた。

【0248】

4.3 CT26非定着腫瘍モデルにおけるmAb2分子の活性
CT26腫瘍は、それらの細胞表面上にPD-L1を発現すること、並びに腫瘍及び周辺における免疫細胞上のLAG-3発現の増加を生じる高度に免疫原性であることが公知であるため、CT26同系腫瘍モデルをこの実験に用いた。

【0249】

FS18-29/S1と呼ばれる、LALA変異を含有する代替マウスmAb2 FS18-7-108-29/S1（配列番号117及び119）、及びFS18-35/S1と呼ばれる、LALA変異を含有するFS18-7-108-35/S1（配列番号120及び119）を、CT26同系マウス腫瘍成長モデルにおいてインビボ活性について試験した。そのmAb2の腫瘍成長を阻害する能力を、FS18-29/4420と呼ばれる、LALA変異を含有するLAG-3/ニセmAb2、FS18-7-108-29/4420（配列番号132及び85）、及びFS18-35/4420と呼ばれる、LALA変異を含有するFS18-7-108-35/4420（配列番号133及び85）、ベンチマークLAG-3 mAb C9B7W、LALA変異を含有するベンチマークPD-L1 mAb S1（配列番号122及び119）、並びにC9B7WとS1の組合せ

10

20

30

40

50

のそれと比較した。

【0250】

それぞれ、週齢8から10週間かつ体重20から25gのBALB/c雌マウス(Charles River)を、研究開始前の1週間、休養させた。全ての動物に、マイクロチップを埋め、固有の識別名を与えた。各コホートは10匹のマウスを有した。CT26結腸癌細胞株(ATCC、CRL-2638)は、初めに、増殖され、保存され、その後、IMPACT Iプロトコールを用いて病原体についてIDEXX BioResearchによりプレスクリーニングされ、病原体が含まれないことが示された。CT26細胞(およそ 3×10^6 から 5×10^6 個)を、-150℃保存から解凍し、T175組織培養フラスコにおける10% FCS(Gibco、10270-106)を含むDMEM(Gibco、61965-026)20mlに

10

【0251】

mAb2分子及び対照抗体の全部を、注射前の24時間以内にSEC-HPLCプロファイリングにより分析し、不純物についてチェックした。抗体を、PBS中10mg/kgの最終濃度に調製し、組合せ研究のために第2の抗体と組み合わせた。mAb2分子及び対照抗体を、マウスに、腫瘍接種後8日目、11日目、及び14日目に投与した。動物を、健康スクリーニングし、その時間中に、腫瘍の正確な寸法を計った。腫瘍容積測定値をノギスで計って、腫瘍の最長軸及び最短軸を決定した。腫瘍容積を計算するために用いられた式は、上記のセクション4.1に示されている通りであった。

20

【0252】

試験は、腫瘍量が制限に近いと見なされた時点の20日目に停止された。全てのマウスを、安楽死させ、腫瘍を切除し、重量を測定した。結果は図9及び10に示されている。

【0253】

最終腫瘍重量の統計的分析を、GraphPad Prismソフトウェアパッケージ内の両側スチューデントt検定を用いて実施した。腫瘍成長曲線の統計的解析を、統計的計算のためのR Projectから利用できる統計的モデリングパッケージ、statmod(Elsoら、2004及びBaldwinら、2007)からの比較成長曲線関数を用いて決定した。

30

【0254】

腫瘍成長を抑制することにおいて、FS18-35/S1 mAb2とIgG対照(通常の成長)との間に実証された統計的有意差があった。そのような統計的有意差は、IgG対照群に対する、又はこの試験における任意の他のコホートに対する、ベンチマーク抗体の組合せ又はFS18-29/S1 mAb2のいずれに関しても観察されなかった。

【0255】

CT26腫瘍モデルは、活動的で速く成長する腫瘍モデルであり、本質的に、マウスの腸転移を発生させる傾向にあり、結果として、非常に限られた治療濃度域を有するものである。

40

【0256】

驚くべきことに、ベンチマークLAG-3抗体とPD-L1抗体の組合せは、IgG対照コホートと比較して腫瘍成長を有意に抑制することはなかった。しかしながら、FS18-35/S1処置されたコホートは、IgG対照と比較して、成長の有意な抑制を示した。FS18-29/S1は、IgG対照と比較して、同様に腫瘍成長を抑制したが、それは、統計的に有意ではなかった。この試験は、マウス反応性LAG-3/PD-L1 mAb2が、ベンチマークモノクローナル抗体の組合せの投与と少なくとも同じ程度で、腫瘍成長を遅らせることにおいてプラス効果を実証したという第2の腫瘍モデルを示している。

【0257】

50

4.4 MC38非定着腫瘍モデルにおける腫瘍成長阻害へのLALA変異の効果

2個のmAb² (FS18-7-108-29/S1 LALA及びFS18-7-108-29/S1) を、Fc領域にLALA変異を含む、及び含まないこれらのmAb²の抗腫瘍活性における潜在的な差を調べるために試験した。LALA変異を含む(配列番号117及び119)、及びLALA変異を含まない(配列番号118及び119)、FS18-29/S1と呼ばれる、代替マウスmAb² FS18-7-108-29/S1を、MC38同系マウス腫瘍成長モデルを用いてインビボ活性について試験した。そのmAb²の腫瘍成長を阻害する能力を、FS18-29/4420 LALA及びFS18-29/4420と呼ばれる、LALA変異を含む(配列番号132及び85)、及びLALA変異を含まない(配列番号134及び85)、LAG-3/ニセmAb²、FS18-7-108-29/4420、並びにLALA変異を含む、及び含まないLAG-3/ニセmAb²と、LALA変異を含む(配列番号122及び119)、及びLALA変異を含まない(配列番号123及び119)、ベンチマークPD-L1 mAb S1との組合せのそれと比較した。

【0258】

それぞれ、週齢8から10週間かつ体重20から25gのC57BL/6雌マウス(Charles River)を、研究開始前の1週間、休養させた。全ての動物に、マイクロチップを埋め、固有の識別名を与えた。各コホートは10匹のマウスを有した。MC38結腸癌細胞株(S. Rosenberg、NIH)は、初めに、増殖され、保存され、その後、IMPACTプロトコルを用いて病原体についてIDEXX BioResearchによりプレスクリーニングされ、病原体が含まれないことが示された。MC38細胞(およそ 3×10^6 から 5×10^6 個)を、-150℃保存から解凍し、T175組織培養フラスコにおける10% FCS(Gibco、10270-106)を含むDMEM(Gibco、61965-026)20mlに加えた。マウスは、イソフルラン(Abbott Laboratories)を用いて麻酔され、各マウスの左脇腹へ $100 \mu\text{l}$ 中 2×10^6 個の細胞が皮下注射された。マウスを、観察の下、回復させ、接種日付を0日目と表した。腫瘍細胞接種から7から8日後、マウスを、研究の開始のために適当な健康及び腫瘍成長について日常的にモニターした。この時点で腫瘍をもたなかったいかなるマウスも研究から除いた。

【0259】

mAb²分子及び対照抗体の全部を、注射前の24時間以内にSEC-HPLCプロファイリングにより分析し、不純物についてチェックした。抗体を、PBS中10mg/kgの最終濃度に調製し、組合せ研究において第2の抗体と組み合わせた。mAb²分子及び対照抗体を、マウスに、腫瘍接種後8日目、11日目、及び14日目にIP注射により投与した。動物を、盲検方式で週3回、麻酔下、健康スクリーニングし、その時間中に、腫瘍の正確な寸法を計った。腫瘍容積測定値をノギスで計って、腫瘍の最長軸及び最短軸を決定した。腫瘍容積を計算するために用いられた式は、セクション4.1に示されている通りであった。

【0260】

全てのマウスを、安楽死させ、腫瘍を切除し、重量を測定した。結果は図11及び12に示されている。

【0261】

この試験は、ADCC活性を抑止するLALA変異の存在又は非存在が、MC38結腸癌モデルにおいて腫瘍成長に統計的に有意な効果を生じないことを確認したが、LALA変異を含むそれらのmAb²は、腫瘍成長抑制の増加を生じる傾向があった。それでもやはり、LAG-3又はPD-L1を発現するT細胞に対するADCC活性を阻害する可能性がある変異を含むための論理的根拠は、LALA変異が、LAG-3/PD-L1 mAb²の抗腫瘍活性への有害な効果を生じないとして正当化される。LALA変異の包含が、PD-L1抗体についてのみ重大な意味をもつことを示唆するいくつかの証拠があった。

【0262】

この試験はまた、LAG-3/PD-L1 mAb²が、個々の抗体(LAG-3 LALA + PD-L1 LALA)の投与を越える効力の増加を生じ得るかどうかを調べた。この場合、これら

10

20

30

40

50

の2つのコホートの間で有意差はなかった。どちらの群も、MC38結腸癌モデルにおいて成長を抑制した。

【0263】

4.5 結論

全体的に見て、LAG-3とPD-L1の両方に対する結合部位を含むmAb2分子が、試験されたマウスモデルにおけるマウスに投与された場合、腫瘍成長抑制に相乗の効果があることは、上記結果から明らかである。これらの結果に基づいて、本発明の抗体分子が、LAG-3及びPD-L1をそれぞれ、結合する2つの別々の分子の投与より、ヒト患者におけるがんの処置に、特に腫瘍成長を抑制することに、より優れた効果を示すだろうことが予想される。

【0264】

実施例5

T細胞LAG-3発現へのmAb2処置の効果

FS18-29/S1と呼ばれる、LALA変異を含有する、代替マウスmAb2 FS18-7-108-29/S1(配列番号117及び119)が腫瘍量の減少をもたらした機構を、オポアルブミンを発現するMC38同系マウス腫瘍成長モデル(MC38.OVA)において試験した。FS18-29/S1の効果を、FS18-29/4420と呼ばれる、LALA変異を含有するLAG-3/ニセmAb2、FS18-7-108-29/4420(配列番号132及び85)、LALA変異を含有するベンチマークPD-L1 mAb S1(配列番号122及び119)、及びFS18-29/4420とS1の組合せの効果と比較した。

【0265】

移植の当日、培養されたMC38.OVA細胞を、対数期成長(培養密度約75%)中に採取し、PBS中、細胞 1×10^7 個/mLの濃度で再懸濁した。まず各動物をイソフルランで麻酔し、その後、続いて、 1×10^6 MC38.OVA細胞(懸濁液0.1mL)を各試験動物の左脇腹へ皮下移植することにより腫瘍を惹起した。腫瘍細胞移植から11日後、動物を、決定論的ランダム化方法を用いて、32から62.5mm³の個々の腫瘍容積を有する5つの群へランダム化した。動物に、腫瘍接種後12日目、14日目、及び16日目に10mg/kg 抗体又はmAb2で投与し、腫瘍接種後19日目及び23日目に3匹の動物/群から腫瘍を収集した。GentleMACS(商標)分散装置(Dissociator)を用いて、腫瘍を分散させ、その後、細胞を、70µm細胞ストレーナーを通して篩にかけて、単細胞懸濁液を得た。96ウェルプレート上の細胞 1×10^6 個/ウェルを、FACSバッファー中に再懸濁し、1:3000生存率染色及びFcブロック(抗CD16/32抗体)を行った。FACS分析のために細胞を、CD43、CD8a、CD4、FoxP3、及びLAG-3に対する標識抗体を含むマスターミックスを用いて染色した。FoxP3細胞内染色について、細胞を固定し、FoxP3抗体での染色の前に透過処理した。試料を、コンペンセーションマトリックスを有し、かつ最低限500,000個の事象がカウントされるCanto IIフローサイトメーターに流した。

【0266】

この実験において、TILは、抗体/mAb2の3回目の用量が投与された後のLAG-3発現について調べられ、その時、対照処置とmAb2処置の間で腫瘍の成長の分離が見られるが、その前に腫瘍サイズ間に大きな差があり、それは結果を歪め得る。この時点において、TIL上のLAG-3発現は、mAb2 FS18-29/S1、又はFS18-29/4420とS1の組合せで処置された動物において、著しく減少することが見出された。具体的には、図13に示されているように、CD8、CD4、及びFoxP3腫瘍浸潤リンパ球(TIL)上のLAG-3発現が、最後の抗体/mAb2投与から3日後及び7日後それぞれに対応する、腫瘍接種後19日目及び23日目に、FS18-29/S1での処置後に減少した。LAG-3発現の減少は、23日目においてよりはっきりしていたが、19日目においてもなお明白であった。FS18-29/4420とS1の組合せを与えられた動物もまた、TIL上のLAG-3発現の減少を示すが、その効果は、2

10

20

30

40

50

3日目まで遅れ、一方、個々に投与された F S 1 8 - 2 9 / 4 4 2 0 又は S 1 での処置は、T I L 上の L A G - 3 発現へほとんど、又は全く効果を生じなかった。

【 0 2 6 7 】

これらの結果は、L A G - 3 及び P D - L 1 の二重阻害が、T I L による L A G - 3 発現の減少に必要とされることを示しているが、この現象は、L A G - 3 又は P D - L 1 に対する単一作用物質で処置された動物において見られなかったためである。理論に縛られるつもりはないが、二重の抗 L A G - 3 と抗 P D - L 1 の処置が、T I L 上の L A G - 3 発現の減少をもたらし、それにより、L A G - 3 の阻害効果を低下させ、T I L が疲弊を克服することを可能にすると考えられる。いったん T I L が活性化すると、それらは、腫瘍により発現したネオ抗原を認識し、それに対して応答を開始することができる。したがって、これは、抗 L A G - 3 / P D - L 1 m A b 2 での処置が、腫瘍量の低減を生じる機構であると考えられる。

10

【 0 2 6 8 】

実施例 6 : m A b 2 の抗体依存性細胞傷害及び補体依存性細胞傷害活性

I g G 1 抗体は、通常、その分子の定常領域内の保存された相互作用部位を介してエフェクター機能を示す。これらには、単球 / マクロファージ、樹状細胞、N K 細胞、好中球、及び他の顆粒球上に発現した F c R との結合により媒介される抗体依存性細胞傷害 (A D C C)、並びに、C 1 q 補体成分との結合により惹起される補体カスケードの誘導により媒介される補体依存性細胞傷害 (C D C) が挙げられる。L A G - 3 は、主に、活性化 T 細胞上に発現し、P D - L 1 は、これらだけでなく、腫瘍細胞上にも高レベルで発現するため、m A b 2 F S 1 8 - 7 - 9 / 8 4 G 0 9 (配列番号 9 4 及び 1 1 6) の A D C C 及び C D C を誘導する能力を調べた。

20

【 0 2 6 9 】

具体的には、L A G - 3 又は P D - L 1 を発現する細胞の F S 1 8 - 7 - 9 / 8 4 G 0 9 処理、続いて、N K 細胞が補体のいずれかとのインキュベーションが、それぞれの標的細胞の溶解を誘導するかどうかを試験された。加えて、F S 1 8 - 7 - 9 / 8 4 G 0 9 は、二重特異性抗体であるため、その特異性の一方への標的会合が、他方の特異性についての標的を発現する細胞に対するエフェクター機能に影響するかどうかにもまた試験された。

【 0 2 7 0 】

m A b 2 F S 1 8 - 7 - 9 / 8 4 G 0 9 のエフェクター機能を理解することは、いくつかの理由のために有用であり、その理由には、L A L A 変異などのエフェクター機能を低下させる変異が、腫瘍殺害に関与する L A G - 3 発現エフェクター T 細胞を、F S 1 8 - 7 - 9 / 8 4 G 0 9 媒介性 A D C C 及び / 又は C D C から保護するために、その分子に含まれるべきかどうかを決定することが挙げられる。

30

【 0 2 7 1 】

6 . 1 研究デザイン

L A G - 3 又は P D - L 1 を組換え的に発現する R a j i 細胞を、全てのアッセイに用い、標的タンパク質の組換え発現とは無関係に、加えられた補体及び N K 細胞調製物の機能活性を実証するために、リツキシマブのジェネリックバージョンで標的にするための対照として C D 2 0 のそれらの内因性発現を用いた。標的発現は、これらの実験の前に確認された。

40

【 0 2 7 2 】

L A G - 3 又は P D - L 1 を発現する細胞への基本的 C D C 活性を決定するために、この活性を、基質の蛍光色素 (Promega 製の CytoTox-ONE (商標)) への変換により測定される L D H 放出を用いて、測定した。L A G - 3 発現細胞と P D - L 1 発現細胞の両方を含む細胞混合物におけるどの標的細胞が、溶解されることになるかを測定するために、生細胞から排除される蛍光色素を用いて死細胞を検出する、m A b 2 / 抗体とのインキュベーション後の、異なって蛍光標識された標的細胞のフローサイトメトリにより、示差的 C D C が測定された。

【 0 2 7 3 】

50

L A G - 3 又は P D - L 1 を発現する細胞への A D C C 活性を決定するために、この活性を、凍結 P B M C から単離された N K 細胞を用いて測定し、L D H 放出を、比色分析 (P r o m e g a 製の C y t o T o x 9 6) で測定した。全てのこれらの研究について、様々なアイソタイプ及び F c 配置におけるリツキシマブを対照として用いた。A D C C を示差的に測定するための信頼できる方法は知られておらず、それゆえに、示差的 A D C C 活性は測定されなかった。

【 0 2 7 4 】

全ての実験において、P D - L 1 特異的 m A b (8 4 G 0 9) 及び L A G - 3 特異的 m A b (2 5 F 7) を対照として用いた。陰性対照としてか、又は C D C バックグラウンド活性を導くためのいずれかとして用いられる I g G アイソタイプ対照 (4 4 2 0) もまた用いた。それぞれの抗体及び m A b 2 (2 5 F 7 を除く) の L A L A バージョンもまた、C D C 及び A D C C アッセイにおいて、この変異のこれらのエフェクター機能への効果を決定するために、I g G 1 野生型と比較した。

【 0 2 7 5 】

6 . 2 材料及び方法

6 . 2 . 1 C D C アッセイ

リツキシマブを含む全ての抗体 / m A b 2 を、1 0 点の 1 / 2 段階希釈で希釈した。用いられる最高濃度での I g G (4 4 2 0 L A L A) を含有する対照ウェルもまた調製した。L A G - 3 又は P D - L 1 をそれぞれ、組換え的に発現する R a j i 細胞の細胞懸濁液を、L D H 放出アッセイのために無血清培地中に調製し、調製された抗体 / m A b 2 の同体積に加えた。

【 0 2 7 6 】

フローサイトメトリに基づいた C D C アッセイについて、 5×10^7 細胞の細胞懸濁液を調製し、無血清培地中 $0.5 \mu\text{M}$ C e l l T r a c k e r d e e p r e d (C e l l T r a c k e r (商 標) D e e p R e d , T h e r m o F i s h e r , # C 3 4 5 6 5) か又は $5 \mu\text{M}$ C e l l T r a c k e r G r e e n (C e l l T r a c k e r (商 標) G r e e n C M F D A (5 - クロロメチルフルオレセインジアセテート、T h e r m o F i s h e r , # C 7 0 2 5) に再懸濁した。3 7 °C で 3 0 分間のインキュベーション後、細胞を無血清培地中で洗浄し、調製された抗体 / m A b 2 含有ウェルに、直接、加えるか、又は同体積の他の、異なって染色された細胞株と組み合わせて、その後、上記のような抗体 / m A b 2 含有ウェルに加えた。両方のアッセイについて、細胞培養条件下での 3 0 分間のインキュベーション後、無血清培地中 1 0 % のベビーウサギ補体 (ベビーウサギ補体、T E B U - b i o , # C L 3 4 4 1) の同体積をウェルにつぎ足した。プレートを、細胞培養条件で 4 時間、インキュベートした。L D H 放出 C D C アッセイについて、1 0 0 % 溶解対照を、4 4 2 0 L A L A 処理されたウェルの半分に T r i t o n X 1 0 0 を加えることにより作製し、C y t o t o x アッセイを、製造会社の使用説明書 (C y t o t o x O n e , P r o m e g a , G 7 8 9 1) に従って実施した。読み取りを得た後、1 0 0 % 溶解対照からのシグナルを、1 0 0 % に設定し、試料ウェルからのシグナルを、そのレベルに対するパーセンテージとして計算した。

【 0 2 7 7 】

フローサイトメトリに基づいた C D C アッセイについて、インキュベーション時間の終わりに、死細胞色素 (S Y T O X (登録商標) B l u e D e a d C e l l S t a i n , T h e r m o F i s h e r , # S 3 4 8 5 7) を、P B S 中 5 0 0 / 1 に希釈し、ウェルに同体積をつぎ足した。F S C 及び S S C に基づいて無傷細胞集団に関してゲーティングする C y t o f l e x フローサイトメーターでフローサイトメトリを実施し、C e l l T r a c k e r (商 標) D e e p R e d 陽性細胞集団と C e l l T r a c k e r (商 標) G r e e n C M F D A 陽性細胞集団の両方の S y t o x 陽性細胞 (チャネル P B 4 5 0) のパーセンテージを検出した。

【 0 2 7 8 】

6 . 3 . 2 A D C C アッセイ

A D C C を、以前に記載されているように測定した (B r o u s s a s , M a t t h i e u ; B r o y e r , L u c i l e ; 及び G o e t s c h , L i l i a n e . (2 0 1 3) E v a l u a t i o n o f A n t i b o d y - D e p e n d e n t C e l l C y

10

20

30

40

50

toxicity Using Lactate Dehydrogenase (LDH) Measurement in Glycosylation Engineering of Biopharmaceuticals: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. New York: Springer Science + Business Media. 988巻、305-317ページ)。簡単に述べれば、標的細胞を、抗体とプレインキュベートし、その後、ヒト P B M C から単離された初代 N K 細胞 (NK細胞単離キット、Miltenyi Biotec、130-092-657) を 20 対 1 の比で、4 時間、加えた。細胞傷害性アッセイを、製造会社の使用説明書 (CytoTox 96 非放射性細胞傷害性アッセイ、Promega、G1780) に従って実施した。％溶解を、エフェクター細胞及び標的細胞の自発性溶解を考慮に入れて、100％標的細胞溶解に基づいて計算した。

【0279】

6.3 結果及び結論

6.3.1 C D C アッセイ

P D - L 1 発現 R a j i 細胞は、抗 C D 20 抗体リツキシマブにより標的にされ、その結果、一般的な L D H 放出により C D C を測定する場合、60％未満の最大溶解を生じた。抗 P D - L 1 抗体 84 G 0 9 (mAb² FS18-7-9/84G09のF(ab)₂部分を含む)、及び I g G 1 型式における F S 1 8 - 7 - 9 / 84 G 0 9 は、より高い最大溶解及びまた、より高い溶解作用強度を示し、I g G 1 型式におけるリツキシマブにより必要とされる最大半量の用量の約半分の最大半量の用量と推定された。これは、L A G - 3 結合部位の 84 G 0 9 抗体への導入が、その P D - L 1 ターゲティング活性を作用強度又は最大応答に関して変化させなかったことを示しており、どちらも、84 G 0 9 と F S 1 8 - 7 - 9 / 84 G 0 9 が比較された場合、非常に類似していたからである。L A L A 変異の導入は、リツキシマブ、84 G 0 9、及び F S 1 8 - 7 - 9 / 84 G 0 9 についての最大応答の低下を示したが、作用強度は、84 G 0 9 及び F S 1 8 - 7 - 9 / 84 G 0 9 についてのみ低下した。予想通り、抗 L A G - 3 抗体 25 F 7 は、P D - L 1 発現 R a j i 細胞の細胞生存率に効果を生じず、これらの細胞がヒト L A G - 3 を発現していなかったためである。これらの結果は図 14 A に示されている。

【0280】

L A G - 3 発現 R a j i 細胞は、抗 C D 20 抗体、リツキシマブにより C D C について標的にされるが、L A G - 3 抗体 25 F 7 は、さらにより良い作用強度を示し、リツキシマブについて必要とされる最大半量の用量の約半分の最大半量の用量の推定値であった。F S 1 8 - 7 - 9 / 84 G 0 9 を含むその他の抗体のいずれも、L A G - 3 発現 R a j i 細胞に対して少しの C D C 活性も示さなかった。L A L A 変異の導入は、リツキシマブの C D C 活性に非常に限られた効果を生じた (図 14 B)。

【0281】

6.3.2 示差的 C D C アッセイ

F S 1 8 - 7 - 9 / 84 G 0 9 又は対照抗体で処理された時、どの標的発現細胞が溶解されたかを区別するために、フローサイトメトリを使用する示差的 C D C アッセイを本発明者らは開発した。このアッセイを用いて、上記の基本的 L D H 放出 C D C アッセイからの結果を確認した。生細胞のパーセンテージに効果を生じない I g G アイソタイプ対照抗体 (4420) と比較して、リツキシマブは、P D - L 1 発現細胞と L A G - 3 発現細胞の両方の、生細胞の低減及び死細胞の増加を媒介した。しかしながら、F S 1 8 - 7 - 9 / 84 G 0 9 は、L A G - 3 発現細胞に効果を生じなかったが、P D - L 1 発現細胞を非常に効率的に溶解した。同様に、L A G - 3 特異的抗体 25 F 7 と P D - L 1 抗体 84 G 0 9 の混合物もまた、生細胞における用量依存性減少、及び死細胞における相互交換の増加を示したが、L A G - 3 発現細胞の最大溶解は、かろうじて細胞の 50％を超えるだけであったが、試験された全ての抗体の最大溶解を達成するための最低用量である、およそ 1 n M の濃度ですでに達成された。これは、F S 1 8 - 7 - 9 / 84 G 0 9 の C H 3 ドメインにおける L A G - 3 結合部位が、L A G - 3 発現標的細胞の C D C 媒介性溶解を誘導しないという前の所見を確認している。加えて、この実験は、L A G - 3 発現細胞の存在が、F S 1 8 - 7 - 9 / 84 G 0 9 の P D - L 1 発現細胞への C D C 活性に効果を生じないこ

10

20

30

40

50

とを示している。結果は、図 15 に示されている。

【0282】

6.3.3 ADCCアッセイ

PD-L1 発現 Raji 細胞は、抗 CD20 抗体 リツキシマブ、FS18-7-9/84G09、及び 84G09 により ADCC について、非常に類似した効力及び作用強度で標的にされ、細胞のおよそ 40% の最大溶解を生じた。LALA 変異を含有する、リツキシマブ及び 84G09 は、PD-L1 発現標的細胞の ADCC 媒介性溶解を示さず、LALA 変異を含有する FS18-7-9/84G09 は、皆無か又は非常に低い ADCC 媒介性溶解を示した。LALA 変異を含む、及び含まない LAG-3 特異的抗体 25F7 及びアイソタイプ対照 4420 は、このアッセイにおいて活性を示さなかった。

10

【0283】

これらの結果は、LAG-3 結合部位の抗体 84G09 への導入が、その PD-L1 標的型 ADCC 活性を、作用強度又は最大応答において変化させなかったことを示しているが、これは、どちらも PD-L1 特異的抗体 84G09 と非常に類似していたからである。LALA 変異の導入は、ADCC 活性の抑止を生じた (図 16A)。

【0284】

LAG-3 発現 Raji 細胞は、リツキシマブ及び 25F7 により、ADCC 媒介性溶解について標的にされ、約 40% の最大溶解を生じた。FS18-7-9/84G09 もまた、LAG-3 発現細胞の溶解を ADCC により媒介するが、それは、ずっとより低い作用強度及び効力であり、2.5 nM 濃度で 20% 弱の溶解に達するのみであった。LALA 変異の導入は、リツキシマブ及び FS18-7-9/84G09 の全ての ADCC 活性を抑止した。LALA 変異を含む、及び含まない 84G09 及びアイソタイプ対照 4420 は、予想通り、このアッセイにおいて ADCC 活性を示さず、これらの抗体は LAG-3 に結合しないためである (図 16B)。

20

【0285】

配列表

Fcab FS18-7-9 ループ領域のアミノ酸配列

FS18-7-9 AB ループ - WDEPWGED (配列番号 1)

FS18-7-9 CD ループ - SNGQPENNY (配列番号 2)

FS18-7-9 EF ループ - PYDRWVWPDE (配列番号 3)。

30

Fcab FS18-7-9 CH3 ドメインのヌクレオチド配列 (配列番号 4)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCTGGGATGAGCCGTGGGG
TGAAGACGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGG
AGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGACAACAAGACACGCCTCCCGTGCTGGAC
TCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGCCGTATGATAGGTGGGTTTG
GCCGATGAGTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGA
AGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

Fcab FS18-7-9 CH3 ドメインの CHO コドン最適化ヌクレオチド配列 (配列番号 142)

GGCCAGCCCCGGGAACCCAGGTGTACACACTGCCTCCATCCTGGGATGAGCCCTGGGG
CGAGGATGTGTCTCTGACCTGTCTCGTGAAAGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGG
AATGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAAGACACCCCCCTGTGCTGGAC
TCCGACGGCTCATTCTTCTGTACAGCAAGCTGACAGTGCCCTACGACAGATGGGTGTG
GCCGACGAGTTCTCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGA
AGTCCCTGTCCCTGAGCCCCGGC

40

Fcab FS18-7-9 CH3 ドメインのアミノ酸配列 (配列番号 5)

GQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD
SDGSFFLYSKLTPYDRWVWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

C 末端リジンを含む Fcab FS18-7-9 CH3 ドメインのアミノ酸配列 (配列番号 135)

50

GQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
SDGSFFLYSKLTPYDRWVWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

L A L A 変異 (下線) を含む F c a b F S 1 8 - 7 - 9 C H 2 及び C H 3 ドメインのア
ミノ酸配列 (配列番号 6)

APEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLY
SKLTPYDRWVWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

L A L A 変異を含まない F c a b F S 1 8 - 7 - 9 C H 2 及び C H 3 ドメインのアミノ
酸配列 (配列番号 7)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLY
SKLTPYDRWVWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

F c a b F S 1 8 - 7 - 3 2 ループ領域のアミノ酸配列

F S 1 8 - 7 - 3 2 A B ループ - W D E P W G E D (配列番号 1)

F S 1 8 - 7 - 3 2 C D ループ - S N G Q P E N N Y (配列番号 8)

F S 1 8 - 7 - 3 2 E F ループ - P Y D R W V W P D E (配列番号 3)

F c a b F S 1 8 - 7 - 3 2 C H 3 ドメインのヌクレオチド配列 (配列番号 9)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCTGGGATGAGCCGTGGGG
TGAAGACGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGAAATCGCCGTGG
AGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGAC
TCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGCCGTATGATAGGTGGGTTTG
GCCGGATGAGTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGA
AGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

F c a b F S 1 8 - 7 - 3 2 C H 3 ドメインのアミノ酸配列 (配列番号 1 0)

GQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS
SDGSFFLYSKLTPYDRWVWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

L A L A 変異 (下線) を含む F c a b F S 1 8 - 7 - 3 2 C H 2 及び C H 3 ドメインの
アミノ酸配列 (配列番号 1 1)

APEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYS
KLTPYDRWVWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

L A L A 変異を含まない F c a b F S 1 8 - 7 - 3 2 C H 2 及び C H 3 ドメインのア
ミノ酸配列 (配列番号 1 2)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYS
KLTPYDRWVWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

F c a b F S 1 8 - 7 - 3 3 ループ領域のアミノ酸配列

F S 1 8 - 7 - 3 3 A B ループ - W D E P W G E D (配列番号 1)

F S 1 8 - 7 - 3 3 C D ループ - S N G Q P E D N Y (配列番号 1 3)

F S 1 8 - 7 - 3 3 E F ループ - P Y D R W V W P D E (配列番号 3)。

F c a b F S 1 8 - 7 - 3 3 C H 3 ドメインのヌクレオチド配列 (配列番号 1 4)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCTGGGATGAGCCGTGGGG
TGAAGACGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGG
AGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGAC
TCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGCCGTATGATAGGTGGGTTTG
GCCGGATGAGTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGA

10

20

30

40

50

AGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

F c a b F S 1 8 - 7 - 3 3 C H 3 ドメインのアミノ酸配列 (配列番号 1 5)

GQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEDNYKTTTPPVLD
SDGSFFLYSKLTPYDRWVWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

L A L A 変異 (下線) を含む F c a b F S 1 8 - 7 - 3 3 C H 2 及び C H 3 ドメインの
アミノ酸配列 (配列番号 1 6)

APEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEDNYKTTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTPYDRWVWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

10

L A L A 変異を含まない F c a b F S 1 8 - 7 - 3 3 C H 2 及び C H 3 ドメインのアミ
ノ酸配列 (配列番号 1 7)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEDNYKTTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTPYDRWVWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

F c a b F S 1 8 - 7 - 3 6 ループ領域のアミノ酸配列

F S 1 8 - 7 - 3 6 A B ループ - W D E P W G E D (配列番号 1)

F S 1 8 - 7 - 3 6 C D ループ - S N G Q P E N N Y (配列番号 1 8)

F S 1 8 - 7 - 3 6 E F ループ - P Y D R W V W P D E (配列番号 3)。

20

F c a b F S 1 8 - 7 - 3 6 C H 3 ドメインのヌクレオチド配列 (配列番号 1 9)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCTGGGATGAGCCGTGGGG
TGAAGACGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGG
AGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGACAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGAC
TCCGACGGCTCCTACTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGCCGTATGATAGGTGGGTTTG
GCCGGATGAGTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGA
AGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

F c a b F S 1 8 - 7 - 3 6 C H 3 ドメインのアミノ酸配列 (配列番号 2 0)

GQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLD
SDGSYFLYSKLTPYDRWVWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

30

L A L A 変異 (下線) を含む F c a b F S 1 8 - 7 - 3 6 C H 2 及び C H 3 ドメインの
C H 2 + C H 3 のアミノ酸配列 (配列番号 2 1)

APEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSYFLY
SKLTPYDRWVWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

L A L A 変異を含まない F c a b F S 1 8 - 7 - 3 6 C H 2 及び C H 3 ドメインのアミ
ノ酸配列 (配列番号 2 2)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSYFLY
SKLTPYDRWVWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

40

F c a b F S 1 8 - 7 - 5 8 ループ領域のアミノ酸配列

F S 1 8 - 7 - 5 8 A B ループ - W D E P W G E D (配列番号 1)

F S 1 8 - 7 - 5 8 C D ループ - S N G Y P E I E F (配列番号 2 3)

F S 1 8 - 7 - 5 8 E F ループ - P Y D R W V W P D E (配列番号 3)。

F c a b F S 1 8 - 7 - 5 8 C H 3 ドメインのヌクレオチド配列 (配列番号 2 4)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCTGGGATGAGCCGTGGGG
TGAAGACGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGG
AGTGGGAGAGCAATGGGTATCCAGAAATCGAATTCAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGAC

50

TCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGCCTTATGATAGGTGGGTTTG
GCCGGATGAGTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGA
AGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

F c a b F S 1 8 - 7 - 5 8 C H 3 ドメインのアミノ酸配列 (配列番号 2 5)

GQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGYPEIEFKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
PYDRWVWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

L A L A 変異 (下線) を含む F c a b F S 1 8 - 7 - 5 8 C H 2 及び C H 3 ドメインの
アミノ酸配列 (配列番号 2 6)

APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGYPEIEFKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVPYDRWVWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

10

L A L A 変異を含まない F c a b F S 1 8 - 7 - 5 8 C H 2 及び C H 3 ドメインのアミ
ノ酸配列 (配列番号 2 7)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGYPEIEFKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVPYDRWVWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

F c a b F S 1 8 - 7 - 6 2 ループ領域のアミノ酸配列

F S 1 8 - 7 - 6 2 A B ループ - W D E P W G E D (配列番号 1)

20

F S 1 8 - 7 - 6 2 C D ループ - S N G I P E W N Y (配列番号 2 8)

F S 1 8 - 7 - 6 2 E F ループ - P Y D R W V W P D E (配列番号 3)。

F c a b F S 1 8 - 7 - 6 2 C H 3 ドメインのヌクレオチド配列 (配列番号 2 9)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCTGGGATGAGCCGTGGGG
TGAAGACGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGG
AGTGGGAGAGCAATGGGATCCCAGAATGGAACCTATAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGAC
TCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGCCGTATGATAGGTGGGTTTG
GCCGGATGAGTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGA
AGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

F c a b F S 1 8 - 7 - 6 2 C H 3 ドメインのアミノ酸配列 (配列番号 3 0)

30

GQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGIPEWNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
PYDRWVWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

L A L A 変異 (下線) を含む F c a b F S 1 8 - 7 - 6 2 C H 2 及び C H 3 ドメインの
アミノ酸配列 (配列番号 3 1)

APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGIPEWNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVPYDRWVWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

L A L A 変異を含まない F c a b F S 1 8 - 7 - 6 2 C H 2 及び C H 3 ドメインのアミ
ノ酸配列 (配列番号 3 2)

40

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGIPEWNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVPYDRWVWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

F c a b F S 1 8 - 7 - 6 5 ループ領域のアミノ酸配列

F S 1 8 - 7 - 6 5 A B ループ - W D E P W G E D (配列番号 1)

F S 1 8 - 7 - 6 5 C D ループ - S N G Y A E Y N Y (配列番号 3 3)

F S 1 8 - 7 - 6 5 E F ループ - P Y D R W V W P D E (配列番号 3)。

F c a b F S 1 8 - 7 - 6 5 C H 3 ドメインのヌクレオチド配列 (配列番号 3 4)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCTGGGATGAGCCGTGGGG

50

TGAAGACGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGG
AGTGGGAGAGCAATGGGTATGCAGAATAAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGAC
TCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGCCGTATGATAGGTGGGTTTG
GCCGGATGAGTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGA
AGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

F c a b F S 1 8 - 7 - 6 5 C H 3 ドメインのアミノ酸配列 (配列番号 3 5)

GQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGYAEYNYKTTTPVLD
SDGSFFLYSKLTPYDRWVWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

L A L A 変異 (下線) を含む F c a b F S 1 8 - 7 - 6 5 C H 2 及び C H 3 ドメインの
アミノ酸配列 (配列番号 3 6)

APEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGYAEYNYKTTTPVLDSDGSFFLYS
KLTPYDRWVWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

L A L A 変異を含まない F c a b F S 1 8 - 7 - 6 5 C H 2 及び C H 3 ドメインのアミ
ノ酸配列 (配列番号 3 7)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGYAEYNYKTTTPVLDSDGSFFLYS
KLTPYDRWVWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

F c a b F S 1 8 - 7 - 7 8 ループ領域のアミノ酸配列

F S 1 8 - 7 - 7 8 A B ループ - W D E P W G E D (配列番号 1)

F S 1 8 - 7 - 7 8 C D ループ - S N G Y K E E N Y (配列番号 3 8)

F S 1 8 - 7 - 7 8 E F ループ - P Y D R W V W P D E (配列番号 3)。

F c a b F S 1 8 - 7 - 7 8 C H 3 ドメインのヌクレオチド配列 (配列番号 3 9)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCTGGGATGAGCCGTGGGG
TGAAGACGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGG
AGTGGGAGAGCAATGGGTATAAAGAAGAAAAGTATAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGAC
TCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGCCGTATGATAGGTGGGTTTG
GCCGGATGAGTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGA
AGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

F c a b F S 1 8 - 7 - 7 8 C H 3 ドメインのアミノ酸配列 (配列番号 4 0)

GQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGYKEENYKTTTPVLD
SDGSFFLYSKLTPYDRWVWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

L A L A 変異 (下線) を含む F c a b F S 1 8 - 7 - 7 8 C H 2 及び C H 3 ドメインの
アミノ酸配列 (配列番号 4 1)

APEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGYKEENYKTTTPVLDSDGSFFLYS
KLTPYDRWVWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

L A L A 変異を含まない F c a b F S 1 8 - 7 - 7 8 C H 2 及び C H 3 ドメインのアミ
ノ酸配列 (配列番号 4 2)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGYKEENYKTTTPVLDSDGSFFLYS
KLTPYDRWVWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

F c a b F S 1 8 - 7 - 8 8 ループ領域のアミノ酸配列

F S 1 8 - 7 - 8 8 A B ループ - W D E P W G E D (配列番号 1)

F S 1 8 - 7 - 8 8 C D ループ - S N G V P E L N V (配列番号 4 3)

F S 1 8 - 7 - 8 8 E F ループ - P Y D R W V W P D E (配列番号 3)。

F c a b F S 1 8 - 7 - 8 8 C H 3 ドメインのヌクレオチド配列 (配列番号 4 4)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCTGGGATGAGCCGTGGGG
TGAAGACGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGG
AGTGGGAGAGCAATGGGGTTCCAGAACTGAACGTTAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGAC
TCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGCCGTATGATAGGTGGGTTTG
GCCGGATGAGTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGA
AGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

F c a b F S 1 8 - 7 - 8 8 C H 3 ドメインのアミノ酸配列 (配列番号 4 5)

GQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGVPELNVKTTTPPVLD
SDGSFFLYSKLTPYPYDRWVWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

10

L A L A 変異 (下線) を含む F c a b F S 1 8 - 7 - 8 8 C H 2 及び C H 3 ドメインの
アミノ酸配列 (配列番号 4 6)

APEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGVPELNVKTTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTPYPYDRWVWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

L A L A 変異を含まない F c a b F S 1 8 - 7 - 8 8 C H 2 及び C H 3 ドメインのアミ
ノ酸配列 (配列番号 4 7)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGVPELNVKTTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTPYPYDRWVWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

20

F c a b F S 1 8 - 7 - 9 5 ループ領域のアミノ酸配列

F S 1 8 - 7 - 9 5 A B ループ - W D E P W G E D (配列番号 1)

F S 1 8 - 7 - 9 5 C D ループ - S N G Y Q E D N Y (配列番号 4 8)

F S 1 8 - 7 - 9 5 E F ループ - P Y D R W V W P D E (配列番号 3)。

F c a b F S 1 8 - 7 - 9 5 C H 3 ドメインのヌクレオチド配列 (配列番号 4 9)

GGCCAGCCTCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCTGGGATGAGCCGTGGGG
TGAAGACGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGG
AGTGGGAGAGCAATGGGTATCAGGAAGATAACTATAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGAC
TCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGCCGTATGATAGGTGGGTTTG
GCCGGATGAGTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGA
AGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT

30

F c a b F S 1 8 - 7 - 9 5 C H 3 ドメインのアミノ酸配列 (配列番号 5 0)

GQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGYQEDNYKTTTPPVLD
SDGSFFLYSKLTPYPYDRWVWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

L A L A 変異 (下線) を含む F c a b F S 1 8 - 7 - 9 5 C H 2 及び C H 3 ドメインの
アミノ酸配列 (配列番号 5 1)

APEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGYQEDNYKTTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTPYPYDRWVWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

40

L A L A 変異を含まない F c a b F S 1 8 - 7 - 9 5 C H 2 及び C H 3 ドメインのアミ
ノ酸配列 (配列番号 5 2)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV
YTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGYQEDNYKTTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTPYPYDRWVWPDEFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

野生型ヒト I g G 1 C H 2 ドメインのアミノ酸配列 (配列番号 5 3)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT

50

KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

「LALA変異」(下線)を含むヒトIgG1 CH2ドメインのアミノ酸配列(配列番号54)

APEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK

LALA変異を含まない「野生型」Fcab CH2及びCH3ドメインのアミノ酸配列(配列番号55)

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

10

LALA変異(下線)を含む「野生型」Fcab CH2及びCH3ドメインのアミノ酸配列(配列番号56)

APEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

ヒトIgG1ヒンジ領域のアミノ酸配列(配列番号57)

EPKSCDKTHTCPPCP

ヒトIgG1短縮型ヒンジ領域のアミノ酸配列(配列番号58)

20

TCPPCP

LALA変異(下線)を含む抗マウスLAG-3 Fcab FS18-7-108-29のアミノ酸配列(配列番号59)

CH3ドメインはイタリック体で示される。CH3ドメインのAB、CD、及びEFループは、太字と下線で示される。

【表18】

TCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS**WDEPWGED**VSLTCLVKGFYPSD *IVVEWES***SNGQPENNY**KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV**PFERWWPDE**FCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

30

LALA変異を含まない抗マウスLAG-3 Fcab FS18-7-108-29のアミノ酸配列(配列番号60)

CH3ドメインはイタリック体で示される。CH3ドメインのAB、CD、及びEFループは、太字と下線で示される。

【表19】

TCPPCPAPELLGGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS**WDEPWGED**VSLTCLVKGFYPSD *IVVEWES***SNGQPENNY**KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV**PFERWWPDE**FCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

LALA変異(下線)を含む抗マウスLAG-3 Fcab FS18-7-108-35のアミノ酸配列(配列番号61)

40

CH3ドメインはイタリック体で示される。AB、CD、及びEFループ領域は、太字と下線で示される。

【表20】

TCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS**WDEPWGED**VSLTCLVKGFYPSD *ISVEWES***SNGQPENNY**KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV**PFERWWPDE**FCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

LALA変異を含まない抗マウスLAG-3 Fcab FS18-7-108-35のアミノ酸配列(配列番号62)

50

C H 3 ドメインはイタリック体で示される。A B、C D、及び E F ループ領域は、太字と下線で示される。

【表 2 1】

TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSD
ISVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVPYDRWVWPDEFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

L A L A 変異を含む抗ヒト L A G - 3 / F I T C m A b ² F S 1 8 - 7 - 9 / 4 4 2 0
の重鎖のアミノ酸配列 (配列番号 6 3)

C D R の位置は下線が引かれ、A B、C D、及び E F ループ配列は、太字と下線で示され
る。L A L A 変異の位置は太字で示される。

10

【表 2 2】

EVKLDDETGGGLVQPGRPMKLSCVASGFTFSDYWMNWVRQSPEKGLEWVAQIRNKPYNYETYYSDSVKGRFTISRDD
SKSSVYLQMNLRVEDMGIYYCTGSIYGMIDYWGQTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
PCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVPYDRWVWPDEFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

L A L A 変異を含まない抗ヒト L A G - 3 / F I T C m A b ² F S 1 8 - 7 - 9 / 4 4
2 0 の重鎖のアミノ酸配列 (配列番号 6 4)

C D R の位置は下線が引かれ、A B、C D、及び E F ループ配列は、太字と下線で示され
る。

20

【表 2 3】

EVKLDDETGGGLVQPGRPMKLSCVASGFTFSDYWMNWVRQSPEKGLEWVAQIRNKPYNYETYYSDSVKGRFTISRDD
SKSSVYLQMNLRVEDMGIYYCTGSIYGMIDYWGQTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVPYDRWVWPDEFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

L A L A 変異を含む抗ヒト L A G - 3 / F I T C m A b ² F S 1 8 - 7 - 3 2 / 4 4 2
0 の重鎖のアミノ酸配列 (配列番号 6 5)

C D R の位置は下線が引かれ、A B、C D、及び E F ループ配列は、太字と下線で示され
る。L A L A 変異の位置は太字で示される。

30

【表 2 4】

EVKLDDETGGGLVQPGRPMKLSCVASGFTFSDYWMNWVRQSPEKGLEWVAQIRNKPYNYETYYSDSVKGRFTISRDD
SKSSVYLQMNLRVEDMGIYYCTGSIYGMIDYWGQTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
PCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVPYDRWVWPDEFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

抗ヒト L A G - 3 / F I T C m A b ² F S 1 8 - 7 - 3 2 / L A L A 変異なしの重鎖の
アミノ酸配列 (配列番号 6 6)

C D R の位置は下線が引かれ、A B、C D、及び E F ループ配列は、太字と下線で示され
る。

40

【表 2 5】

EVKLDETGGGLVQPGRPMKLSCVASGFTFSDYWMNWVRQSPEKGLEWVAQIRNKPYNYETYYSDSVKGRFTISRDD
 SKSSVYLQMNLRVEDMGIYYCTGSIYGMIDYWGQGTSTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
 EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
 PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAV
 EWESSNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVPYDRWVWPDEFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

L A L A 変異を含む抗ヒト L A G - 3 / F I T C m A b ² F S 1 8 - 7 - 3 3 / 4 4 2
 0 の重鎖のアミノ酸配列 (配列番号 6 7)

C D R の位置は下線が引かれ、A B、C D、及び E F ループ配列は、太字と下線で示され
 る。L A L A 変異の位置は太字で示される。

10

【表 2 6】

EVKLDETGGGLVQPGRPMKLSCVASGFTFSDYWMNWVRQSPEKGLEWVAQIRNKPYNYETYYSDSVKGRFTISRDD
 SKSSVYLQMNLRVEDMGIYYCTGSIYGMIDYWGQGTSTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
 EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
 PCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAV
 EWESSNGQPEDNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVPYDRWVWPDEFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

L A L A 変異を含まない抗ヒト L A G - 3 / F I T C m A b ² F S 1 8 - 7 - 3 3 / 4
 4 2 0 の重鎖のアミノ酸配列 (配列番号 6 8)

C D R の位置は下線が引かれ、A B、C D、及び E F ループ配列は、太字と下線で示され
 る。

20

【表 2 7】

EVKLDETGGGLVQPGRPMKLSCVASGFTFSDYWMNWVRQSPEKGLEWVAQIRNKPYNYETYYSDSVKGRFTISRDD
 SKSSVYLQMNLRVEDMGIYYCTGSIYGMIDYWGQGTSTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
 EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
 PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAV
 EWESSNGQPEDNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVPYDRWVWPDEFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

L A L A 変異を含む抗ヒト L A G - 3 / F I T C m A b ² F S 1 8 - 7 - 3 6 / 4 4 2
 0 の重鎖のアミノ酸配列 (配列番号 6 9)

C D R の位置は下線が引かれ、A B、C D、及び E F ループ配列は、太字と下線で示され
 る。L A L A 変異の位置は太字で示される。

30

【表 2 8】

EVKLDETGGGLVQPGRPMKLSCVASGFTFSDYWMNWVRQSPEKGLEWVAQIRNKPYNYETYYSDSVKGRFTISRDD
 SKSSVYLQMNLRVEDMGIYYCTGSIYGMIDYWGQGTSTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
 EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
 PCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAV
 EWESSNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVPYDRWVWPDEFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

L A L A 変異を含まない抗ヒト L A G - 3 / F I T C m A b ² F S 1 8 - 7 - 3 6 / 4
 4 2 0 の重鎖のアミノ酸配列 (配列番号 7 0)

C D R の位置は下線が引かれ、A B、C D、及び E F ループ配列は、太字と下線で示され
 る。

40

【表 29】

EVKLDETGGGLVQPGRPMKLSCVASGFTFSDYWMNWVRQSPEKGLEWVAQIRNKPYNYETYYSDSVKGRFTISRDD
 SKSSVYLQMNLRVEDMGIYYCTGSIYGMIDYWGQGTSTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
 EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
 PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAV
 EWESSNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFLYSLKLTVPYDRWVWPDEFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

L A L A 変異を含む抗ヒト L A G - 3 / F I T C m A b ² F S 1 8 - 7 - 5 8 / 4 4 2
 0 の重鎖のアミノ酸配列 (配列番号 7 1)

C D R の位置は下線が引かれ、A B、C D、及び E F ループ配列は、太字と下線で示され
 る。L A L A 変異の位置は太字で示される。

10

【表 30】

EVKLDETGGGLVQPGRPMKLSCVASGFTFSDYWMNWVRQSPEKGLEWVAQIRNKPYNYETYYSDSVKGRFTISRDD
 SKSSVYLQMNLRVEDMGIYYCTGSIYGMIDYWGQGTSTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
 EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
 PCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAV
 EWESSNGYPEIEFKTTTPVLDSDGSFFLYSLKLTVPYDRWVWPDEFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

L A L A 変異を含まない抗ヒト L A G - 3 / F I T C m A b ² F S 1 8 - 7 - 5 8 / 4
 4 2 0 の重鎖のアミノ酸配列 (配列番号 7 2)

C D R の位置は下線が引かれ、A B、C D、及び E F ループ配列は、太字と下線で示され
 る。

20

【表 31】

EVKLDETGGGLVQPGRPMKLSCVASGFTFSDYWMNWVRQSPEKGLEWVAQIRNKPYNYETYYSDSVKGRFTISRDD
 SKSSVYLQMNLRVEDMGIYYCTGSIYGMIDYWGQGTSTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
 EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
 PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAV
 EWESSNGYPEIEFKTTTPVLDSDGSFFLYSLKLTVPYDRWVWPDEFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

L A L A 変異を含む抗ヒト L A G - 3 / F I T C m A b ² F S 1 8 - 7 - 6 2 / 4 4 2
 0 の重鎖のアミノ酸配列 (配列番号 7 3)

C D R の位置は下線が引かれ、A B、C D、及び E F ループ配列は、太字と下線で示され
 る。L A L A 変異の位置は太字で示される。

30

【表 32】

EVKLDETGGGLVQPGRPMKLSCVASGFTFSDYWMNWVRQSPEKGLEWVAQIRNKPYNYETYYSDSVKGRFTISRDD
 SKSSVYLQMNLRVEDMGIYYCTGSIYGMIDYWGQGTSTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
 EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
 PCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAV
 EWESSNGIPEWNYKTTTPVLDSDGSFFLYSLKLTVPYDRWVWPDEFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

L A L A 変異を含まない抗ヒト L A G - 3 / F I T C m A b ² F S 1 8 - 7 - 6 2 / 4
 4 2 0 の重鎖のアミノ酸配列 (配列番号 7 4)

C D R の位置は下線が引かれ、A B、C D、及び E F ループ配列は、太字と下線で示され
 る。

40

【表 3 3】

EVKLDETGGGLVQPGRPMKLSCVASGFTFSDYWMNWVRQSPEKGLEWVAQIRNKPYNYETYYSDSVKGRFTISRDD
 SKSSVYLQMNLRVEDMGIYYCTGSIYGMIDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
 EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
 PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSALTCLVKGFYPSDIAV
 EWESSNGIPEWNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVPYDRWVWPDEFSFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

L A L A 変異を含む抗ヒト L A G - 3 / F I T C m A b ² F S 1 8 - 7 - 6 5 / 4 4 2
 0 の重鎖のアミノ酸配列 (配列番号 7 5)

C D R の位置は下線が引かれ、A B、C D、及び E F ループ配列は、太字と下線で示され
 る。L A L A 変異の位置は太字で示される。

10

【表 3 4】

EVKLDETGGGLVQPGRPMKLSCVASGFTFSDYWMNWVRQSPEKGLEWVAQIRNKPYNYETYYSDSVKGRFTISRDD
 SKSSVYLQMNLRVEDMGIYYCTGSIYGMIDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
 EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
 PCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSALTCLVKGFYPSDIAV
 EWESSNGYAEYNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVPYDRWVWPDEFSFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

L A L A 変異を含まない抗ヒト L A G - 3 / F I T C m A b ² F S 1 8 - 7 - 6 5 / 4
 4 2 0 の重鎖のアミノ酸配列 (配列番号 7 6)

C D R の位置は下線が引かれ、A B、C D、及び E F ループ配列は、太字と下線で示され
 る。

20

【表 3 5】

EVKLDETGGGLVQPGRPMKLSCVASGFTFSDYWMNWVRQSPEKGLEWVAQIRNKPYNYETYYSDSVKGRFTISRDD
 SKSSVYLQMNLRVEDMGIYYCTGSIYGMIDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
 EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
 PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSALTCLVKGFYPSDIAV
 EWESSNGYAEYNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVPYDRWVWPDEFSFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

L A L A 変異を含む抗ヒト L A G - 3 / F I T C m A b ² F S 1 8 - 7 - 7 8 / 4 4 2
 0 の重鎖のアミノ酸配列 (配列番号 7 7)

C D R の位置は下線が引かれ、A B、C D、及び E F ループ配列は、太字と下線で示され
 る。L A L A 変異の位置は太字で示される。

30

【表 3 6】

EVKLDETGGGLVQPGRPMKLSCVASGFTFSDYWMNWVRQSPEKGLEWVAQIRNKPYNYETYYSDSVKGRFTISRDD
 SKSSVYLQMNLRVEDMGIYYCTGSIYGMIDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
 EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
 PCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSALTCLVKGFYPSDIAV
 EWESSNGYKEENYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVPYDRWVWPDEFSFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

L A L A 変異を含まない抗ヒト L A G - 3 / F I T C m A b ² F S 1 8 - 7 - 7 8 / 4
 4 2 0 の重鎖のアミノ酸配列 (配列番号 7 8)

C D R の位置は下線が引かれ、A B、C D、及び E F ループ配列は、太字と下線で示され
 る。

40

【表 3 7】

EVKLDETGGGLVQPGRPMKLSCVASGFTFSDYWMNWVRQSPEKGLEWVAQIRNKPYNYETYYSDSVKGRFTISRDD
 SKSSVYLQMNLRVEDMGIYYCTGSIYGMIDYWGQGTSTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
 EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
 PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAV
 EWESSNGYKEENYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVPYDRWVWPDEFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

L A L A 変異を含む抗ヒト L A G - 3 / F I T C m A b ² F S 1 8 - 7 - 8 8 / 4 4 2
 0 の重鎖のアミノ酸配列 (配列番号 7 9)

C D R の位置は下線が引かれ、A B、C D、及び E F ループ配列は、太字と下線で示され
 る。L A L A 変異の位置は太字で示される。

10

【表 3 8】

EVKLDETGGGLVQPGRPMKLSCVASGFTFSDYWMNWVRQSPEKGLEWVAQIRNKPYNYETYYSDSVKGRFTISRDD
 SKSSVYLQMNLRVEDMGIYYCTGSIYGMIDYWGQGTSTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
 EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
 PCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAV
 EWESSNGVPELVNKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVPYDRWVWPDEFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

L A L A 変異を含まない抗ヒト L A G - 3 / F I T C m A b ² F S 1 8 - 7 - 8 8 / 4
 4 2 0 の重鎖のアミノ酸配列 (配列番号 8 0)

C D R の位置は下線が引かれ、A B、C D、及び E F ループ配列は、太字と下線で示され
 る。

20

【表 3 9】

EVKLDETGGGLVQPGRPMKLSCVASGFTFSDYWMNWVRQSPEKGLEWVAQIRNKPYNYETYYSDSVKGRFTISRDD
 SKSSVYLQMNLRVEDMGIYYCTGSIYGMIDYWGQGTSTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
 EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
 PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAV
 EWESSNGVPELVNKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVPYDRWVWPDEFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

L A L A 変異を含む抗ヒト L A G - 3 / F I T C m A b ² F S 1 8 - 7 - 9 5 / 4 4 2
 0 の重鎖のアミノ酸配列 (配列番号 8 1)

C D R の位置は下線が引かれ、A B、C D、及び E F ループ配列は、太字と下線で示され
 る。L A L A 変異の位置は太字で示される。

30

【表 4 0】

EVKLDETGGGLVQPGRPMKLSCVASGFTFSDYWMNWVRQSPEKGLEWVAQIRNKPYNYETYYSDSVKGRFTISRDD
 SKSSVYLQMNLRVEDMGIYYCTGSIYGMIDYWGQGTSTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
 EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
 PCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAV
 EWESSNGYQEDNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVPYDRWVWPDEFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

L A L A 変異を含まない抗ヒト L A G - 3 / F I T C m A b ² F S 1 8 - 7 - 9 5 / 4
 4 2 0 の重鎖のアミノ酸配列 (配列番号 8 2)

C D R の位置は下線が引かれ、A B、C D、及び E F ループ配列は、太字と下線で示され
 る。

40

【表 4 1】

EVKLDETGGGLVQGRPMKLSCVASGFTFSDYWMNWVRQSPEKGLEWVAQIRNKPYNYETIYSDSVKGRFTISRDD
 SKSSVYLQMNLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
 EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
 PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAV
 EWESNGYQEDNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVPYDRWWVPDEFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

L A L A 変異を含む抗 F I T C m A b 4 4 2 0 の重鎖のアミノ酸配列 (配列番号 8 3)
 C D R の位置は下線が引かれている。L A L A 変異の位置は太字で示される。

【表 4 2】

EVKLDETGGGLVQGRPMKLSCVASGFTFSDYWMNWVRQSPEKGLEWVAQIRNKPYNYETIYSDSVKGRFTISRDD
 SKSSVYLQMNLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
 EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
 PCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
 EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

L A L A 変異を含まない抗 F I T C m A b 4 4 2 0 の重鎖のアミノ酸配列 (配列番号 8 4)

C D R の位置は下線が引かれている。

EVKLDETGGGLVQGRPMKLSCVASGFTFSDYWMNWVRQSPEKGLEWVAQIRNKPYNY
 ETIYSDSVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQGTSTVTVS
 SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
 SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
 GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
 DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
 RWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

抗 F I T C m A b 4 4 2 0 軽鎖のアミノ酸配列 (配列番号 8 5)

C D R の位置は下線が引かれている。

DVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLRWYLQKPGQSPKVLIIYKVSNR
 FSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPWTFGGGKLEIKRTVAAPSVF
 IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
 STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

抗 P D - L 1 抗体 8 4 G 0 9 の C D R のアミノ酸配列 (IMGTによる)

HCDR1 GFTFDDYA (配列番号 8 6)
 HCDR2 ISWKSNI (配列番号 8 7)
 HCDR3 ARDITGSGSYGWFD (配列番号 8 8)
 LCDR1 QSISSY (配列番号 8 9)
 LCDR2 VAS (配列番号 9 0)
 LCDR3 QSYSNPIT (配列番号 9 1)

抗 P D - L 1 抗体 8 4 G 0 9 の C D R のアミノ酸配列 (Kabatによる)

HCDR1 DYAMH (配列番号 1 3 6)
 HCDR2 GISWKSNIIGYADSVKG (配列番号 1 3 7)
 HCDR3 DITGSGSYGWFD (配列番号 1 3 8)
 LCDR1 RASQSISSYLN (配列番号 1 3 9)
 LCDR2 VASSLQS (配列番号 1 4 0)
 LCDR3 QSYSNPIT (配列番号 1 4 1)

抗 P D - L 1 抗体 8 4 G 0 9 V H ドメインのアミノ酸配列 (配列番号 9 2)

EVQLVESGGGLVQGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQTPGKGLEWVSGISWKSNIIG
 YADSVKGRFTISRDNALNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDITGSGSYGWFDPWGQGT

10

20

30

40

50

TVSS

抗PD-L1抗体84G09 VLDメインのアミノ酸配列（配列番号93）

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKPLIYVASSLQSGVPSS
FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSNPITFGQGTRLEIK

LALA変異を含む抗ヒトLAG-3/PD-L1 mAb² FS18-7-9/84G09 重鎖のアミノ酸配列（配列番号94）

CDRの位置は下線が引かれ、AB、CD、及びEFループ配列は太字と下線で示される。
LALA変異の位置は太字で示される。

【表43】

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQTPGKGLEWVSGISWKSNIIGYADSVKGRFTISRDNK
NSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDITGSGSYGWFDPPWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
HTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWEWSNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTPYDRWVWPDEFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

10

抗ヒトLAG-3/PD-L1 mAb² FS18-7-9/84G09 重鎖のアミノ酸配列（配列番号95）

CDRの位置は下線が引かれ、AB、CD、及びEFループ配列は太字と下線で示される。

【表44】

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQTPGKGLEWVSGISWKSNIIGYADSVKGRFTISRDNK
NSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDITGSGSYGWFDPPWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWEWSNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTPYDRWVWPDEFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

20

LALA変異を含む抗ヒトLAG-3/PD-L1 mAb² FS18-7-32/84G09 重鎖のアミノ酸配列（配列番号96）

CDRの位置は下線が引かれ、AB、CD、及びEFループ配列は太字と下線で示される。
LALA変異の位置は太字で示される。

【表45】

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQTPGKGLEWVSGISWKSNIIGYADSVKGRFTISRDNK
NSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDITGSGSYGWFDPPWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
HTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPS
EIAVEWEWSNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTPYDRWVWPDEFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

30

抗ヒトLAG-3/PD-L1 mAb² FS18-7-32/84G09 重鎖のアミノ酸配列（配列番号97）

CDRの位置は下線が引かれ、AB、CD、及びEFループ配列は太字と下線で示される。

【表46】

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQTPGKGLEWVSGISWKSNIIGYADSVKGRFTISRDNK
NSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDITGSGSYGWFDPPWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPS
EIAVEWEWSNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTPYDRWVWPDEFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

40

LALA変異を含む抗ヒトLAG-3/PD-L1 mAb² FS18-7-33/84G09 重鎖のアミノ酸配列（配列番号98）

CDRの位置は下線が引かれ、AB、CD、及びEFループ配列は太字と下線で示される。
LALA変異の位置は太字で示される。

50

【表 4 7】

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQTPGKGLEWVSGISWKSNIIGYADSVKGRFTISRDNK
 NSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDITGSGSYGWFDPPWQGGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
 DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
 HTCPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
 YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPS
 DIAVEWESNGQPEDNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVPYDRWVWPDEFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

抗ヒトLAG - 3 / PD - L1 mAb² FS18 - 7 - 33 / 84 G09 重鎖のアミノ酸配列 (配列番号 99)

CDRの位置は下線が引かれ、AB、CD、及びEFループ配列は太字と下線で示される。

10

【表 4 8】

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQTPGKGLEWVSGISWKSNIIGYADSVKGRFTISRDNK
 NSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDITGSGSYGWFDPPWQGGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
 DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
 HTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
 YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPS
 DIAVEWESNGQPEDNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVPYDRWVWPDEFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

LALA変異を含む抗ヒトLAG - 3 / PD - L1 mAb² FS18 - 7 - 36 / 84 G09 重鎖のアミノ酸配列 (配列番号 100)

CDRの位置は下線が引かれ、AB、CD、及びEFループ配列は太字と下線で示される。
 LALA変異の位置は太字で示される。

20

【表 4 9】

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQTPGKGLEWVSGISWKSNIIGYADSVKGRFTISRDNK
 NSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDITGSGSYGWFDPPWQGGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
 DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
 HTCPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
 YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPS
 DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVPYDRWVWPDEFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

抗ヒトLAG - 3 / PD - L1 mAb² FS18 - 7 - 36 / 84 G09 重鎖のアミノ酸配列 (配列番号 101)

CDRの位置は下線が引かれ、AB、CD、及びEFループ配列は太字と下線で示される。

30

【表 5 0】

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQTPGKGLEWVSGISWKSNIIGYADSVKGRFTISRDNK
 NSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDITGSGSYGWFDPPWQGGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
 DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
 HTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
 YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPS
 DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVPYDRWVWPDEFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

LALA変異を含む抗ヒトLAG - 3 / PD - L1 mAb² FS18 - 7 - 58 / 84 G09 重鎖のアミノ酸配列 (配列番号 102)

CDRの位置は下線が引かれ、AB、CD、及びEFループ配列は太字と下線で示される。
 LALA変異の位置は太字で示される。

40

【表 5 1】

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQTPGKGLEWVSGISWKSNIIGYADSVKGRFTISRDNK
 NSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDITGSGSYGWFDPPWQGGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
 DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
 HTCPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
 YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPS
 DIAVEWESNGYPEIEFKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVPYDRWVWPDEFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

抗ヒトLAG - 3 / PD - L1 mAb² FS18 - 7 - 58 / 84 G09 重鎖のアミノ酸配列 (配列番号 103)

50

ノ酸配列（配列番号 103）

C D R の位置は下線が引かれ、A B、C D、及び E F ループ配列は太字と下線で示される。

【表 5 2】

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQTPGKGLEWVSGISWKSNIIGYADSVKGRFTISRDN
NSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDITGSGSYGWFDPWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGYPEIEFKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVPYDRWVWPDEFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

L A L A 変異を含む抗ヒト L A G - 3 / P D - L 1 m A b ² F S 1 8 - 7 - 6 2 / 8 4
G 0 9 重鎖のアミノ酸配列（配列番号 104）

C D R の位置は下線が引かれ、A B、C D、及び E F ループ配列は太字と下線で示される。
L A L A 変異の位置は太字で示される。

【表 5 3】

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQTPGKGLEWVSGISWKSNIIGYADSVKGRFTISRDN
NSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDITGSGSYGWFDPWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGIPEWNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVPYDRWVWPDEFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

抗ヒト L A G - 3 / P D - L 1 m A b ² F S 1 8 - 7 - 6 2 / 8 4 G 0 9 重鎖のア
ミノ酸配列（配列番号 105）

C D R の位置は下線が引かれ、A B、C D、及び E F ループ配列は太字と下線で示される。

【表 5 4】

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQTPGKGLEWVSGISWKSNIIGYADSVKGRFTISRDN
NSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDITGSGSYGWFDPWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGIPEWNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVPYDRWVWPDEFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

L A L A 変異を含む抗ヒト L A G - 3 / P D - L 1 m A b ² F S 1 8 - 7 - 6 5 / 8 4
G 0 9 重鎖のアミノ酸配列（配列番号 106）

C D R の位置は下線が引かれ、A B、C D、及び E F ループ配列は太字と下線で示される。
L A L A 変異の位置は太字で示される。

【表 5 5】

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQTPGKGLEWVSGISWKSNIIGYADSVKGRFTISRDN
NSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDITGSGSYGWFDPWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGYAEYNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVPYDRWVWPDEFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

抗ヒト L A G - 3 / P D - L 1 m A b ² F S 1 8 - 7 - 6 5 / 8 4 G 0 9 重鎖のア
ミノ酸配列（配列番号 107）

C D R の位置は下線が引かれ、A B、C D、及び E F ループ配列は太字と下線で示される。

10

20

30

40

【表 5 6】

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQTPGKGLEWVSGISWKSNIIGYADSVKGRFTISRDNALNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDITGSGSYGWFDPPWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESENGYAEYNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVPYDRWVWPDEFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

L A L A 変異を含む抗ヒト L A G - 3 / P D - L 1 m A b 2 F S 1 8 - 7 - 7 8 / 8 4 G 0 9 重鎖のアミノ酸配列 (配列番号 1 0 8)

C D R の位置は下線が引かれ、A B、C D、及び E F ループ配列は太字と下線で示される。
。L A L A 変異の位置は太字で示される。

10

【表 5 7】

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQTPGKGLEWVSGISWKSNIIGYADSVKGRFTISRDNALNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDITGSGSYGWFDPPWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESENGYKEENYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVPYDRWVWPDEFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

抗ヒト L A G - 3 / P D - L 1 m A b 2 F S 1 8 - 7 - 7 8 / 8 4 G 0 9 重鎖のアミノ酸配列 (配列番号 1 0 9)

C D R の位置は下線が引かれ、A B、C D、及び E F ループ配列は太字と下線で示される。

20

【表 5 8】

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQTPGKGLEWVSGISWKSNIIGYADSVKGRFTISRDNALNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDITGSGSYGWFDPPWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESENGYKEENYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVPYDRWVWPDEFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

L A L A 変異を含む抗ヒト L A G - 3 / P D - L 1 m A b 2 F S 1 8 - 7 - 8 8 / 8 4 G 0 9 重鎖のアミノ酸配列 (配列番号 1 1 0)

C D R の位置は下線が引かれ、A B、C D、及び E F ループ配列は太字と下線で示される。
。L A L A 変異の位置は太字で示される。

30

【表 5 9】

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQTPGKGLEWVSGISWKSNIIGYADSVKGRFTISRDNALNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDITGSGSYGWFDPPWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESENGVPELVNKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVPYDRWVWPDEFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

抗ヒト L A G - 3 / P D - L 1 m A b 2 F S 1 8 - 7 - 8 8 / 8 4 G 0 9 重鎖のアミノ酸配列 (配列番号 1 1 1)

C D R の位置は下線が引かれ、A B、C D、及び E F ループ配列は太字と下線で示される。

40

【表 6 0】

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQTPGKGLEWVSGISWKSNIIGYADSVKGRFTISRDNALNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDITGSGSYGWFDPPWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESENGVPELVNKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVPYDRWVWPDEFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

L A L A 変異を含む抗ヒト L A G - 3 / P D - L 1 m A b 2 F S 1 8 - 7 - 9 5 / 8 4

50

G 0 9 重鎖のアミノ酸配列 (配列番号 1 1 2)

C D R の位置は下線が引かれ、A B、C D、及び E F ループ配列は太字と下線で示される。
L A L A 変異の位置は太字で示される。

【表 6 1】

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQTPGKGLEWVSGISWKSNIIGYADSVKGRFTISRDN
NSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDITGSGSYGWFDPWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
HTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESENGYQEDNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVPYDRWVWPDEFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

10

抗ヒト L A G - 3 / P D - L 1 m A b 2 F S 1 8 - 7 - 9 5 / 8 4 G 0 9 重鎖のアミノ酸配列 (配列番号 1 1 3)

C D R の位置は下線が引かれ、A B、C D、及び E F ループ配列は太字と下線で示される。
L A L A 変異の位置は太字で示される。

【表 6 2】

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQTPGKGLEWVSGISWKSNIIGYADSVKGRFTISRDN
NSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDITGSGSYGWFDPWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
HTCPPCPAPELLGGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESENGYQEDNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVPYDRWVWPDEFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG

20

L A L A 変異を含む抗ヒト P D - L 1 m A b 8 4 G 0 9 重鎖のアミノ酸配列 (配列番号 1 1 4)

C D R の位置は下線が引かれている。L A L A 変異の位置は太字で示される。

【表 6 3】

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQTPGKGLEWVSGISWKSNIIGYADSVKGRFTISRDN
NSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDITGSGSYGWFDPWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
HTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

30

抗ヒト P D - L 1 m A b 8 4 G 0 9 重鎖のアミノ酸配列 (配列番号 1 1 5)

C D R の位置は下線が引かれている。

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQTPGKGLEWVSGISWKSNIIGYADSVKGRFTISRDN
AKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCARDITGSGSYGWFDPWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
HTCPPCPAPELLGGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

40

抗ヒト P D - L 1 m A b 8 4 G 0 9 軽鎖のアミノ酸配列 (配列番号 1 1 6)

C D R の位置は下線が引かれている。

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKPLIYVASSLQSGVPSSFSGSGSDFTLT
ISSQLQPEDFATYYCQQSYSNPITFGQGRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ
WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

L A L A 変異重鎖を含む抗マウス L A G - 3 / P D - L 1 m A b 2 F S 1 8 - 7 - 1 0 8 - 2 9 / S 1 のアミノ酸配列 (配列番号 1 1 7)

C D R の位置は下線が引かれ、A B、C D、及び E F ループ配列は、太字と下線で示され

50

る。L A L A 変異の位置は太字で示される。

【表 6 4】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSK
NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
PCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIVV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVPFERWMWPDEFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

抗マウス L A G - 3 / P D - L 1 m A b ² F S 1 8 - 7 - 1 0 8 - 2 9 / S 1 重鎖のアミノ酸配列 (配列番号 1 1 8)

10

C D R の位置は下線が引かれ、A B、C D、及び E F ループ配列は、太字と下線で示される。

【表 6 5】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSK
NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIVV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVPFERWMWPDEFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

抗マウス P D - L 1 m A b S 1 軽鎖のアミノ酸配列 (配列番号 1 1 9)

20

C D R の位置は下線が引かれている。

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPS
RFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLEFTPPTFGGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLS
KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

L A L A 変異重鎖を含む抗マウス L A G - 3 / P D - L 1 m A b ² F S 1 8 - 7 - 1 0 8 - 3 5 / S 1 のアミノ酸配列 (配列番号 1 2 0)

C D R の位置は下線が引かれ、A B、C D、及び E F ループ配列は、太字と下線で示される。L A L A 変異の位置は太字で示される。

【表 6 6】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSK
NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
PCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIVV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVPFERWMWPDEFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

30

抗マウス L A G - 3 / P D - L 1 m A b ² F S 1 8 - 7 - 1 0 8 - 3 5 / S 1 重鎖のアミノ酸配列 (配列番号 1 2 1)

C D R の位置は下線が引かれ、A B、C D、及び E F ループ配列は、太字と下線で示される。

40

【表 6 7】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSK
NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIVV
EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVPFERWMWPDEFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

L A L A 変異重鎖を含む対照 P D - L 1 m A b S 1 アミノ酸配列 (配列番号 1 2 2)

C D R の位置は下線が引かれている。L A L A 変異の位置は太字で示される。

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTY

50

YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGGGTLVTVS
 AASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
 SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG
 GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
 DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKS
 RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

対照 P D - L 1 m A b S 1 重鎖のアミノ酸配列 (配列番号 1 2 3)

C D R の位置は下線が引かれている。L A L A 変異の位置は太字で示される。

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS**CAASGFTFSDSWI**HWVRQAPGKGLEWVAVWISPYGGSTY
 YADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGGGTLVTVS
 AASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS
 SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
 GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
 DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKS
 RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

10

対照抗ヒト L A G - 3 m A b 2 5 F 7 重鎖のアミノ酸配列 (配列番号 1 2 4)

C D R の位置は下線が引かれている。

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWNWIRQPPGKGLEWIGEINHRGSTNS
 NPSLKSRLVTLSDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAFGYSDYEYNWFDPWGQGTTLTV
 SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
 SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA
 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
 QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
 RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDK
 SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

20

対照抗ヒト L A G - 3 m A b 2 5 F 7 軽鎖のアミノ酸配列 (配列番号 1 2 5)

C D R の位置は下線が引かれている。

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSISSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARF
 SGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGQGTNLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
 QLKSGTASVCLLNFPYFREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSK
 ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

30

ヒト L A G - 3 のアミノ酸配列 (配列番号 1 2 6)

MWEAQFLGLLFLQPLWVAPVKPLQPGAEPVWVAQEGAPAQLPCSPTIPLQDLSLLRR
 AGVTWQHQPDSGPPAAAPGHPLAPGPHPAAPSSWGPRPRRYTVLSVGPGLRSGRLPL
 QPRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAAVHLRDRALSCRLRLRLGQASMTASP
 PGS LRASDWVILNCSFSRPDRPASVHWFRNRGQGRVPVRESPPHHHLAESFLFLPQVSPM
 DSGPWGCILTYRDGFNVSIMYNLTVLGLPPTPLTVYAGAGSRVGLPCRLPAGVGTRSF
 TAKWTPPGGGPDLLVTGDNGDFTLRLEDVSQAQAGTYTCHIHLQEQLNATVTLAIITV
 TPKSFGSPGSLGKLLCEVTPVSGQERFVWSSLDTPSQRSFSGPWLEAQEAQLLSQPWQC
 QLYQGERLLGAAYFTELSSPGAQRSGRAPGALPAGHLLLFLILGVLSLLLVTGAFGFHL
 WRRQWRPRRFSALEQGIHPPQAQSKIEELEQEPEPEPEPEPEPEPEPEPEPEQL

40

マウス L A G - 3 のアミノ酸配列 (配列番号 1 2 7)

MREDLLLGFLLLGLLWEAPVVSSGPGKELPVWVAQEGAPVHLPCSLKSPNLDPNFLRRG
 GVIWQHQPDSGQPTPIPALDLHQGMPSRQPAPGRYTVLSVAPGGLRSGRQPLHPHVQL
 EERGLQRGDFSLWLRPALRTDAGEYHATVRLPNRALSCSLRLRVGQASMIASPSGVKLK
 DWVLLNCSFSRPDRPVSVHWFQGGQNRVPVYNsprhFLAETFLLLPQVSPLDSGTWGCV
 LTYRDGFNVSITYNLKVLGLEPVAPLTVYAAEGSRVELPCHLPPGVGTPSLLIAKWTPPG
 GGPELPVAGKSGNFTLHLEAVGLAQAGTYTCSIHLQGGQLNATVTLAVITVTPKSFGPLPG

50

SRGKLLCEVTPASGKERFVWRPLNNLSRSCPGPVLEIQEARLLAERWQCQLYEGQRLLGA
TVYAAESSGAHSARRISGDLKGGHLVLVLILGALSFLLVAGAFGFHWWRKQLLLRRFS
ALEHGIQPFPAQRKIEELERELETEMGQEPEPEPEPQLEPEPRQL

カニクイザル L A G - 3 のアミノ酸配列 (配列番号 1 2 8)

MWEAQFLGLLFLQPLWVAPVKPPQPGAEISVVWAQEGAPAQLPCSPTIPLQDLSLLRRA
GVTWQHQPDSGPPAAAPGHPPVPGHRPAAPYSWGPRPRRYTVLSVGPGLRSGRLPLQ
PRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRATVHLRDRALSCRLRLRVGQASMTASPP
GSLRTSDWVILNCSFSRPDRPASVHWFRSRGQGRVPVQGSPPHHLAESFLFLPHVGPMD
SGLWGCILTYRDGFNVSIMYNLTVLGLEPATPLTVYAGAGSRVELPCRLPPAVGTQSFLT
AKWAPPGGGPDLLVAGDNGDFTLRLEDVSAQAQAGTYICHIRLQGGQQLNATVTLAIITVTP
KSFGSPGSLGKLLCEVTPASGQEHFVWSPNTPSQRFSFGPWLEAQEAQLLSQPWQCQL
HQGERLLGAADVFTTELSSPGAQRSGRAPGALRAGHLPLFLILGVLFLLLLVTGAFGFHLW
RRQWRPRRFSALEQGIHPPQAQSKIEELEQEPELEPEPELERELGPEPEPGPEPEPEQL

10

ヒト P D - L 1 のアミノ酸配列 (配列番号 1 2 9)

MRIFAVFIFMTYWHLLNAFTVTVPKDLVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEM
EDKNIIQFVHGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYG
GADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDPTSEHELTCAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKT
TTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHPNERTH
LVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET

マウス P D - L 1 のアミノ酸配列 (配列番号 1 3 0)

20

MRIFAGIIFTACCHLLRAFTITAPKDLVVEYGSNVTMECRFPVERELDLLALVVYWEKE
DEQVIQFVAGEEDLKPDHNSNFRGRASLPKDQLLKGNAAALQITDVKLQDAGVYCCIIISYGG
ADYKRITLKVNPYRKINQRISVDPATSEHELICAEGYPEAEVIWTNSDHQPVSGKRSVT
TSRTEGMLLNVTSSLRVNATANDVFYCTFWRSQPGQNHTAELIPELPATHPPQNRTHW
VLLGSILLFLIVVSTVLLFLRKQVRMLDVEKCGVEDTSSKNRNDTQFEET

カニクイザル P D - L 1 のアミノ酸配列 (配列番号 1 3 1)

MRIFAVFIFTIYWHLLNAFTVTVPKDLVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLTSLIVYWEME
DKNIIQFVHGEEDLKVQHSNYRQRAQLLKDQLSLGNAALRITDVKLQDAGVYRCMISYGG
ADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDPTSEHELTCAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTT
TTNSKREEKLLNVTSTLRINTTANEIFYCIFRRLDPEENHTAELVIPELPLALPPNERTHLV
ILGAIFLLLGVALTFFIFRLRKGRMMMDMKCGIRVTNSKKQRDTQLEET

30

L A L A 変異を含む抗マウス L A G - 3 / F I T C m A b ² F S 1 8 - 7 - 1 0 8 - 2
9 / 4 4 2 0 の重鎖のアミノ酸配列 (配列番号 1 3 2)

C D R の位置は下線が引かれ、A B、C D、及び E F ループ配列は太字と下線で示される。
L A L A 変異の位置は太字で示される。

【表 6 8】

EVKLDETGGGLVQPGRPMKLSVCASGFTFS^WDMNWVRQSPEKGLEWVAQ^{IR}NKP^{NY}ET^YYSDSVKGRFTISRDD
SKSSVYLQMNLRVEDMGIIYCT^GSY^{YG}MD^YWGQTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
PCPAPEAA^{GG}PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS^{WDEPWGED}VSLTCLVKGFYPSDIVV
EWE^{SNGQPENNY}KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV^{PFERWMWPDE}FSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

40

L A L A 変異を含む抗マウス L A G - 3 / F I T C m A b ² F S 1 8 - 7 - 1 0 8 - 3
5 / 4 4 2 0 の重鎖のアミノ酸配列 (配列番号 1 3 3)

C D R の位置は下線が引かれ、A B、C D、及び E F ループ配列は太字と下線で示される。
L A L A 変異の位置は太字で示される。

【表 6 9】

EVKLDETGGGLVQGRPMKLSCVASGFTFSDYWMNWVRQSPEKGLEWVAQIRNKPYNYETYYSDSVKGRFTISRDD
 SKSSVYLQMNLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQGTSTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
 EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
 PCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDISV
 EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVPFERWMPDEFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

抗マウスLAG-3/FITC mAb² FS18-7-108-29/4420の重鎖のアミノ酸配列(配列番号134)

CDRの位置は下線が引かれ、AB、CD、及びEFループ配列は太字と下線で示される。

10

【表 7 0】

EVKLDETGGGLVQGRPMKLSCVASGFTFSDYWMNWVRQSPEKGLEWVAQIRNKPYNYETYYSDSVKGRFTISRDD
 SKSSVYLQMNLRVEDMGIYYCTGSYYGMDYWGQGTSTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
 EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
 PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSWDEPWGEDVSLTCLVKGFYPSDIVV
 EWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVPFERWMPDEFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

【0286】

参考文献

本明細書で言及された全ての文書は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

20

Bae J, Lee SJ, Park CG, Lee YS, Chun T. Trafficking of LAG-3 to the surface on activated T cells via its cytoplasmic domain and protein kinase C signaling. J Immunol. 193(6),3101-12 (2014).

Baecher-Allan C, Wolf E, Hafler DA. MHC class II expression identifies functionally distinct human regulatory T cells. J Immunol. 176(8),4622-31 (2006).

Camisaschi C, Casati C, Rini F, Perego M, De Filippo A, Triebel F, Parmiani G, Belli F, Rivoltini L, Castelli C. LAG-3 expression defines a subset of CD4(+)CD25(high)Foxp3(+) regulatory T cells that are expanded at tumor sites. J Immunol. 184(11),6545-51 (2010).

Curran MA, Montalvo W, Yagita H, Allison JP. PD-1 and CTLA-4 combination blockade expands infiltrating T cells and reduces regulatory T and myeloid cells within B16 melanoma tumors. Proc Natl Acad Sci U S A. 107(9),4275-80 (2010).

30

Demeure, C. E., Wolfers, J., Martin-Garcia, N., Gaulard, P. & Triebel, F. T Lymphocytes infiltrating various tumour types express the MHC class II ligand lymphocyte activation gene-3 (LAG-3): role of LAG-3/MHC class II interactions in cell-cell contacts. European journal of cancer 37, 1709-1718 (2001).

Durham NM, Nirschl CJ, Jackson CM, Elias J, Kochel CM, Anders RA, Drake CG. Lymphocyte Activation Gene 3 (LAG-3) modulates the ability of CD4 T cells to be suppressed in vivo. PLoS One. 9(11), e109080 (2015).

40

Engels B, Engelhard VH, Sidney J, Sette A, Binder DC, Liu RB, Kranz DM, Meredith SC, Rowley DA, Schreiber H. Relapse or eradication of cancer is predicted by peptide-major histocompatibility complex affinity. Cancer Cell. 23(4),516-26 (2013).

Gandhi MK, Lambley E, Duraiswamy J, Dua U, Smith C, Elliott S, Gill D, Marlton P, Seymour J, Khanna R. Expression of LAG-3 by tumor-infiltrating lymphocytes is coincident with the suppression of latent membrane antigen-specific CD8+ T cell function in Hodgkin lymphoma patients. Blood 108(7),2280-9 (2006).

Grosso J, Inzunza D, Wu Q, et al. Programmed death-ligand 1 (PD-L1) expression in various tumor types. Journal for Immunotherapy of Cancer. 1(Suppl 1):

50

P53. (2013).

Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, Sosman JA, McDermott DF, Powderly JD, Gettinger SN, Kohrt HE, Horn L, Lawrence DP, Rost S, Leabman M, Xiao Y, Mokatrinn A, Koeppen H, Hegde PS, Mellman I, Chen DS, Hodi FS. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* 515(7528),563-7 (2014).

Huard B, Mastrangeli R, Prigent P, et al. Characterization of the major histocompatibility complex class II binding site on LAG-3 protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 94,5744-9 (1997).

Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(19),12293-7.

Jing W, Gershan JA, Weber J, Tlomak D, McOlash L, Sabatos-Peyton C, Johnson BD1. Combined immune checkpoint protein blockade and low dose whole body irradiation as immunotherapy for myeloma. *J Immunother Cancer*. 3(1):2 (2015).

Kabat, E.A. et al., In: Sequences of Proteins of Immunological Interest. NIH Publication, 91-3242 (1991).

Larkin J, Hodi FS, Wolchok JD. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med*. 373(13),1270-1 (2015).

Huard B, Mastrangeli R, Prigent P, et al. Characterization of the major histocompatibility complex class II binding site on LAG-3 protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 94,5744-9 (1997).

Powles T, Eder JP, Fine GD, Braiteh FS, Loriot Y, Cruz C, Bellmunt J, Burris HA, Petrylak DP, Teng SL, Shen X, Boyd Z, Hegde PS, Chen DS, Vogelzang NJ. MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. *Nature*. 515(7528),558-62 (2014).

Sega EI, Leveson-Gower DB, Florek M, Schneidawind D, Luong RH, Negrin RS. Role of lymphocyte activation gene-3 (Lag-3) in conventional and regulatory T cell function in allogeneic transplantation. *PLoS One*. 9(1), e86551 (2014).

Wolchok J et al; Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med*. 369(2),122-33 (2013).

Woo SR, Turnis ME, Goldberg MV, Bankoti J, Selby M, Nirschl CJ, Bettini ML, Gravano DM, Vogel P, Liu CL, Tangsombatvisit S, Grosso JF, Netto G, Smeltzer MP, Chaux A, Utz PJ, Workman CJ, Pardoll DM, Korman AJ, Drake CG, Vignali DA. Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T cell function to promote tumoral immune escape. *Cancer Res*. 72(4),917-2 (2012).

Workman CJ, Vignali DA. Negative regulation of T cell homeostasis by lymphocyte activation gene-3 (CD223). *J Immunol*. 2005 Jan 15;174(2):688-95.

Workman CJ, Vignali DA. The CD4-related molecule, LAG-3 (CD223), regulates the expansion of activated T cells. *Eur J Immunol*. 2003 Apr;33(4):970-9.

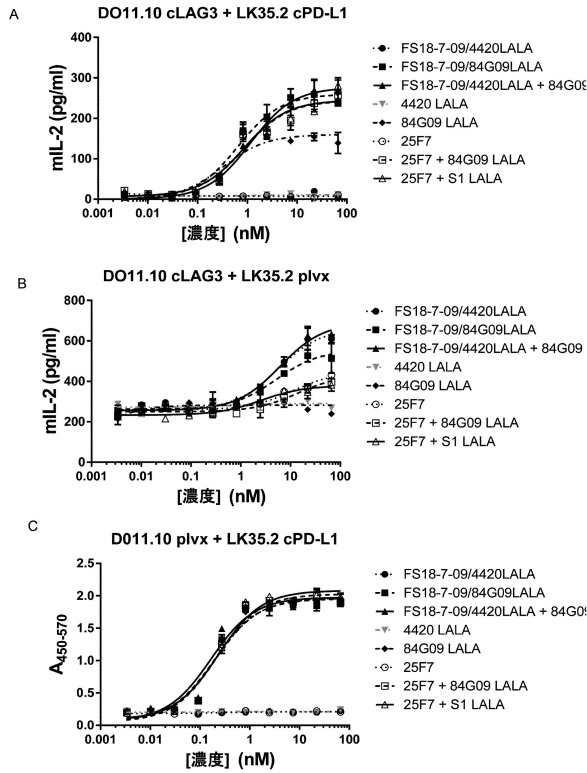
10

20

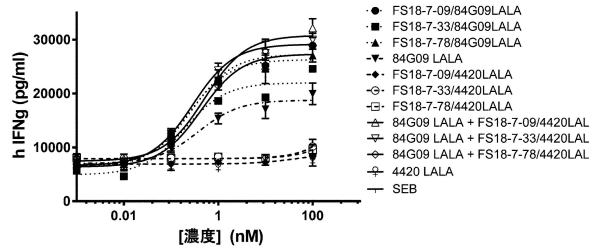
30

40

【図 3】



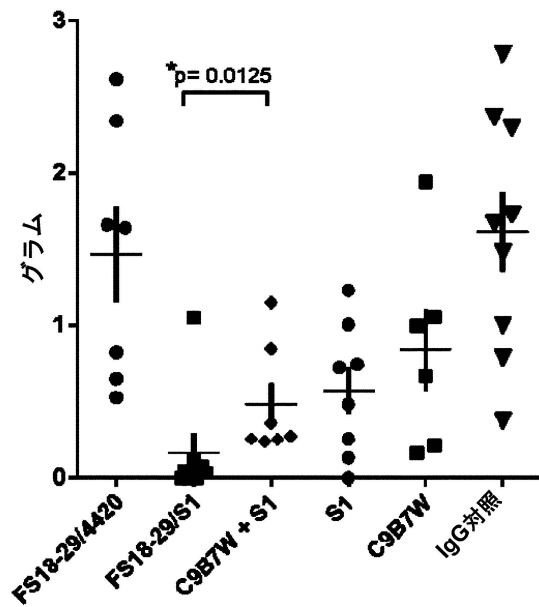
【図 4】



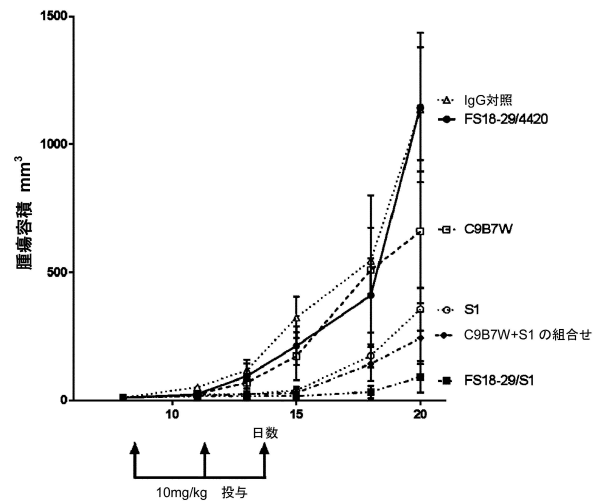
10

20

【図 5】



【図 6】

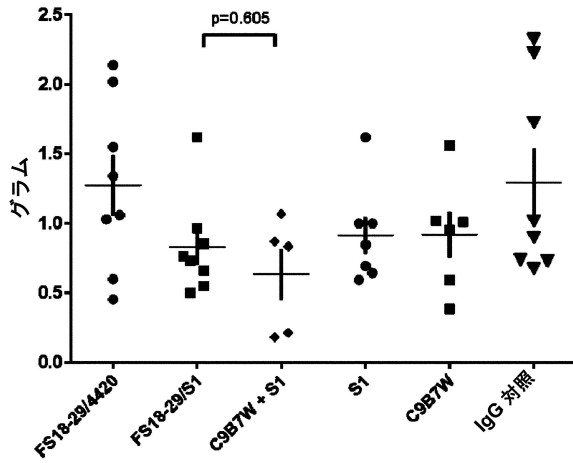


30

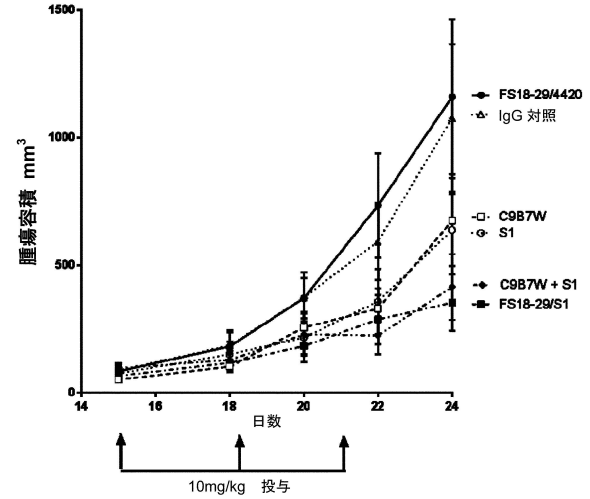
40

50

【 図 7 】

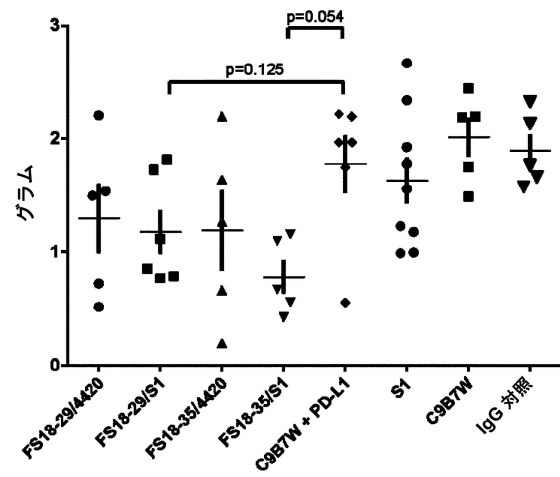


【 図 8 】

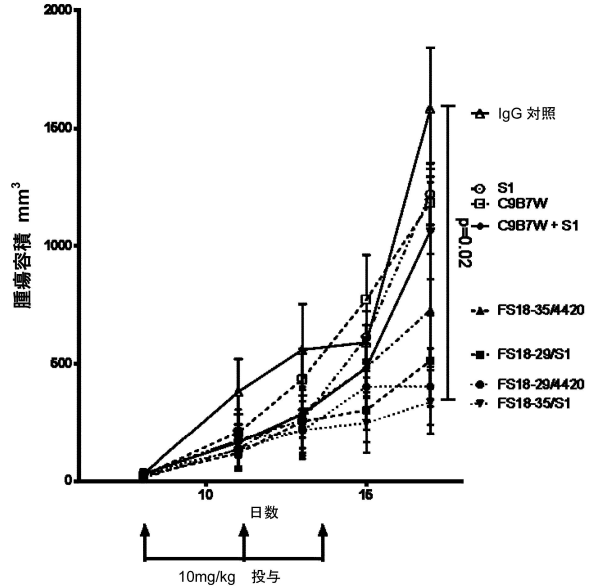


10

【 図 9 】



【 図 10 】



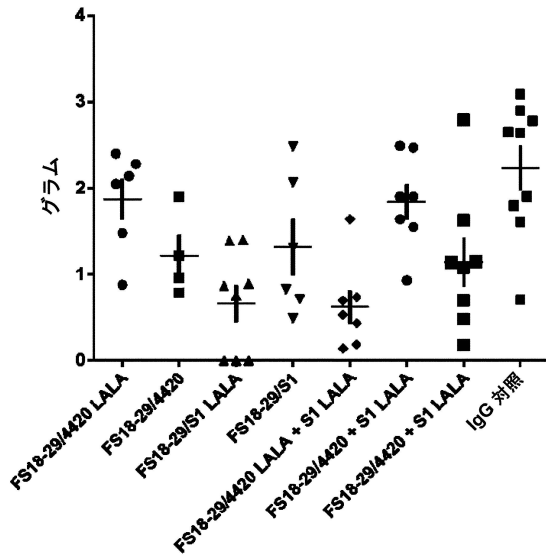
20

30

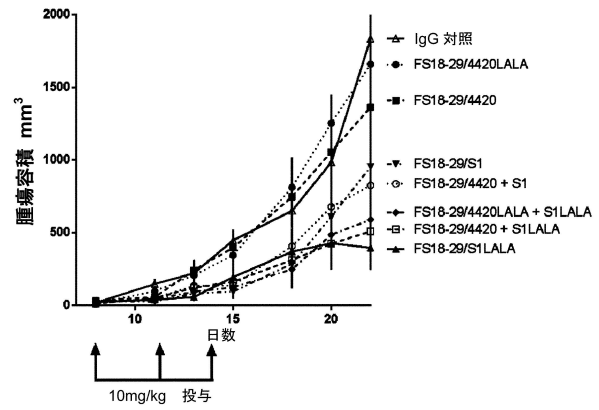
40

50

【図 1 1】

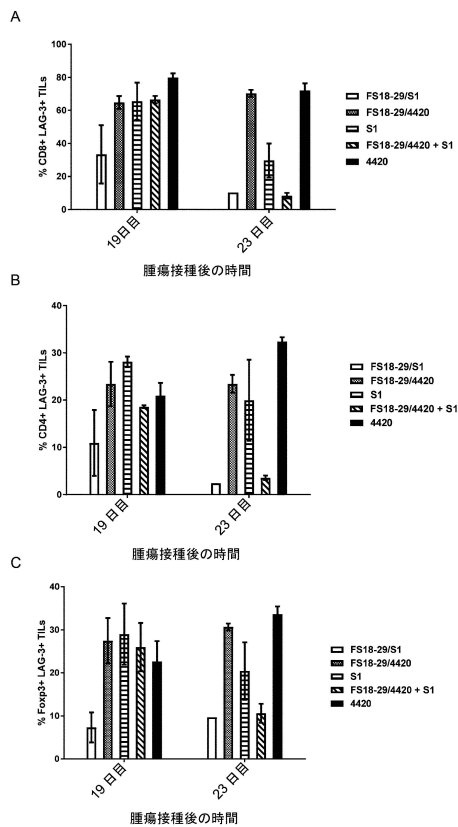


【図 1 2】

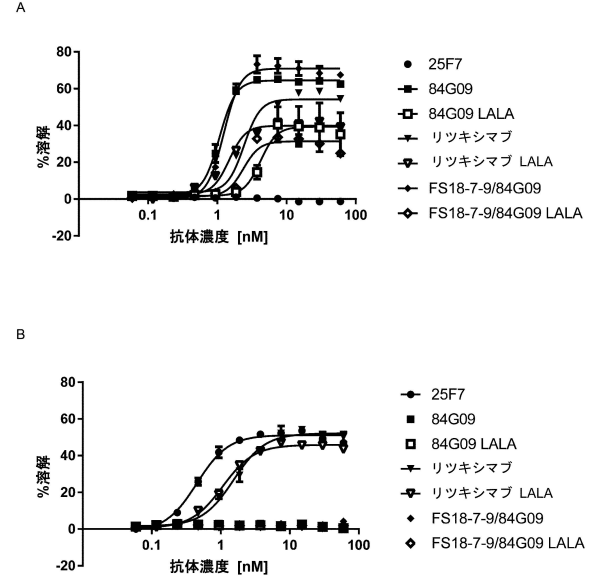


10

【図 1 3】



【図 1 4】



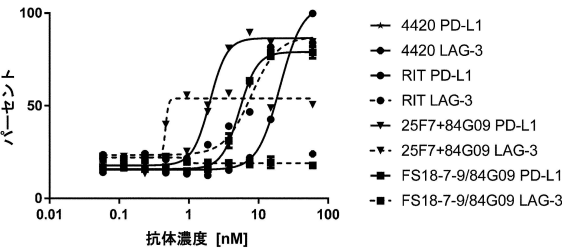
20

30

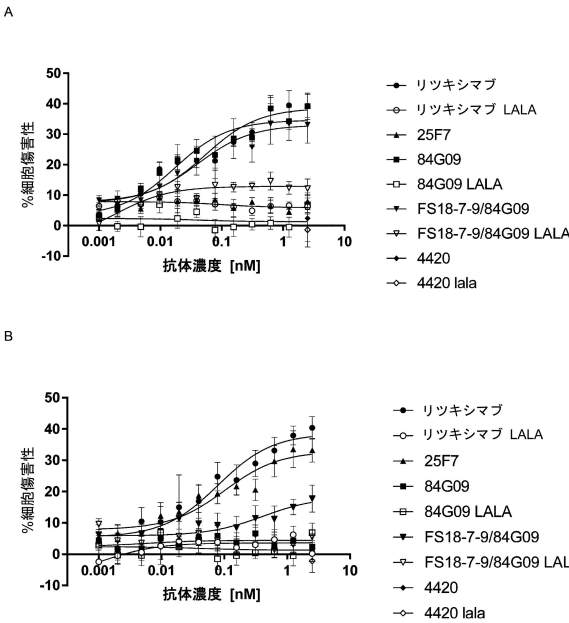
40

50

【図 15】



【図 16】



10

【配列表】

0007085709000001.app

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08	
C 0 7 K	14/52 (2006.01)	C 0 7 K	14/52	
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/02	
A 6 1 K	47/68 (2017.01)	A 6 1 K	47/68	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	L
A 6 1 K	39/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	T
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/00	H
		A 6 1 K	45/00	

- (72)発明者 キャンベル, ジェイミー
イギリス国, ケンブリッジ, ケンブリッジシャー シービー 2 2 3 エーティー, バブラハム リサーチ キャンパス, ザ ベネット ビルディング (ビー 9 3 0), カイマブ リミテッド内
- (72)発明者 サンディ, ニコル
イギリス国, ケンブリッジ, ケンブリッジシャー シービー 2 2 3 エーティー, バブラハム リサーチ キャンパス, ザ ベネット ビルディング (ビー 9 3 0), カイマブ リミテッド内
- (72)発明者 ツナ, ミフリバン
イギリス国, ケンブリッジ, ケンブリッジシャー シービー 2 2 3 エーティー, バブラハム リサーチ キャンパス, エッデヴァ ビー 9 2 0, エフ - スター バイオテクノロジー リミテッド内
- (72)発明者 ウォラートン ヴァン ホルク, フランシスカ
イギリス国, ケンブリッジ, ケンブリッジシャー シービー 2 2 3 エーティー, バブラハム リサーチ キャンパス, エッデヴァ ビー 9 2 0, エフ - スター バイオテクノロジー リミテッド内
- (72)発明者 エヴェレット, ケイティ ルーズ
イギリス国, ケンブリッジ, ケンブリッジシャー シービー 2 2 3 エーティー, バブラハム リサーチ キャンパス, エッデヴァ ビー 9 2 0, エフ - スター バイオテクノロジー リミテッド内
- (72)発明者 ガスパール, ミゲル
イギリス国, ケンブリッジ, ケンブリッジシャー シービー 2 2 3 エーティー, バブラハム リサーチ キャンパス, エッデヴァ ビー 9 2 0, エフ - スター バイオテクノロジー リミテッド内
- (72)発明者 クラマン, マシュー
イギリス国, ケンブリッジ, ケンブリッジシャー シービー 2 2 3 エーティー, バブラハム リサーチ キャンパス, エッデヴァ ビー 9 2 0, エフ - スター バイオテクノロジー リミテッド内
- (72)発明者 クミエシク, カタジナ
イギリス国, ケンブリッジ, ケンブリッジシャー シービー 2 2 3 エーティー, バブラハム リサーチ キャンパス, エッデヴァ ビー 9 2 0, エフ - スター バイオテクノロジー リミテッド内
- (72)発明者 ファロウディ, ムスターファ
イギリス国, ケンブリッジ, ケンブリッジシャー シービー 2 2 3 エーティー, バブラハム リサーチ キャンパス, エッデヴァ ビー 9 2 0, エフ - スター バイオテクノロジー リミテッド内
- (72)発明者 フォッシュ, ナタリー
イギリス国, ケンブリッジ, ケンブリッジシャー シービー 2 2 3 エーティー, バブラハム リサーチ キャンパス, エッデヴァ ビー 9 2 0, エフ - スター バイオテクノロジー リミテッド内
- (72)発明者 ヘベイス, バーバラ
イギリス国, ケンブリッジ, ケンブリッジシャー シービー 2 2 3 エーティー, バブラハム リサーチ キャンパス, エッデヴァ ビー 9 2 0, エフ - スター バイオテクノロジー リミテッド内

審査官 大久保 智之

(56)参考文献 特表 2 0 1 2 - 5 0 0 0 0 6 (J P , A)

A LAG-3/PD-L1 bispecific antibody inhibits tumour growth in two syngeneic colon carcino

ma models , 2016年11月09日 , <https://www.f-star.com/media/73722/A-LAG-3-PD-L1-bispecific-antibody-inhibits-tumour-growth-in-two-syngeneic-colon-carcinoma-models.pdf>参照
Protein Engineering, Design & Selection , 2010年 , Vol.23, No.4 , pp.289-297

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

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

C 1 2 N 1 / 0 0 - 3 8

C 1 2 N 5 / 0 0 - 2 8

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

C 0 7 K 1 4 / 0 0 - 8 2 5

C 0 7 K 1 9 / 0 0

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

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

S w i s s P r o t / G e n e S e q