

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-511000
(P2025-511000A)

(43)公表日 令和7年4月15日(2025.4.15)

(51)国際特許分類			F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	C 0 7 K	19/00	Z N A	4 B 0 6 4
C 1 2 N	15/62	(2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z	4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/63	(2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	4 C 0 7 6
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15		4 C 0 8 4
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19		4 C 0 8 5
			審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全112頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2024-557573(P2024-557573)	(71)出願人	514099673
(86)(22)出願日	令和5年3月27日(2023.3.27)		エフ・ホフマンーラ・ロシュ・アクチュ
(85)翻訳文提出日	令和6年10月18日(2024.10.18)		ンゲゼルシャフト
(86)国際出願番号	PCT/EP2023/057751		スイス国 シーエイチー４０７０ バーゼ
(87)国際公開番号	WO2023/186756		ル グレンツァッハーシュトラーセ １２４
(87)国際公開日	令和5年10月5日(2023.10.5)	(74)代理人	110002077
(31)優先権主張番号	22164773.8		園田・小林弁理士法人
(32)優先日	令和4年3月28日(2022.3.28)	(72)発明者	カラブロ, サミュエル
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		スイス国 ８９５２ シュリーレン, ヴ
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV	(72)発明者	カンボス カラスコサ, ルシア
	最終頁に続く		スイス国 ８９５２ シュリーレン, ヴ
			アーギシュトラーセ １０, シー／オー
			ロシュ グリクアート アーゲー
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 インターフェロンガンマバリエントおよびこれを含む抗原結合分子

(57)【要約】

本発明は、（i）腫瘍関連抗原に特異的に結合する抗体、および（i i）C末端アミノ酸配列K R K R P（配列番号１）で終結するインターフェロンガンマ（I F N G）バリエントポリペプチドを含む新規抗原結合分子、そこに含まれる新規I F N Gバリエントポリペプチド、これらの分子を産生する方法、ならびにそれらを使用する方法に関する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗原結合分子であって、

(i) 腫瘍関連抗原に特異的に結合する抗体と、

(ii) インターフェロンガンマ (IFNG) バリエーションポリペプチドのホモ二量体であって、前記 IFNG バリエーションポリペプチドが、アミノ酸配列 KRKR P (配列番号 1) で C 末端が終結することを特徴とする、IFNG バリエーションポリペプチドのホモ二量体を含む抗原結合分子。

【請求項 2】

10

前記 IFNG バリエーションポリペプチドが、配列番号 2 または配列番号 3 のアミノ酸配列を含むかまたはこれからなる、請求項 1 に記載の抗原結合分子。

【請求項 3】

腫瘍関連抗原に特異的に結合する前記抗体が、線維芽細胞活性化タンパク質 (FAP) に特異的に結合する抗体である、請求項 1 または 2 に記載の抗原結合分子。

【請求項 4】

FAP に特異的に結合する前記抗体が、

(a) 配列番号 4 のアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域 (CDR-H1)、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む CDR-H2、および配列番号 6 のアミノ酸配列を含む CDR-H3 を含む重鎖可変領域 (V_HFAP)、ならびに配列番号 7 のアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域 (i v) CDR-L1、配列番号 8 のアミノ酸配列を含む CDR-L2、および配列番号 9 のアミノ酸配列を含む CDR-L3 を含む軽鎖可変領域 (V_LFAP)、または

20

(b) 配列番号 12 のアミノ酸配列を含む CDR-H1、配列番号 13 のアミノ酸配列を含む CDR-H2、および配列番号 14 のアミノ酸配列を含む CDR-H3 を含む重鎖可変領域 (V_HFAP)、ならびに配列番号 15 のアミノ酸配列を含む CDR-L1、配列番号 16 のアミノ酸配列を含む CDR-L2、および配列番号 17 のアミノ酸配列を含む CDR-L3 を含む軽鎖可変領域 (V_LFAP) を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【請求項 5】

30

FAP に特異的に結合する前記抗体が、配列番号 10 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V_HFAP) と配列番号 11 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V_LFAP) とを含むか、または配列番号 18 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V_HFAP) と配列番号 19 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V_LFAP) とを含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【請求項 6】

前記抗原結合分子が、IgG1 Fc ドメインまたは IgG4 Fc ドメインを含み、前記 Fc ドメインが、Fc 受容体に対する前記抗体の結合親和性および／またはエフェクター機能を低下させる 1 つ以上のアミノ酸置換を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

40

【請求項 7】

前記 Fc ドメインが、アミノ酸変異 L234A、L235A および P329G (Kabata E U インデックスによる E U ナンバリング) を有するヒト IgG1 サブクラスのものである、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【請求項 8】

前記第 1 の IFNG バリエーションポリペプチドが、その N 末端で第 1 の重鎖の C 末端に第 1 のリンカーを介して融合され、第 2 の IFNG バリエーションポリペプチドが、その N 末端で第 2 の重鎖の C 末端に第 2 のリンカーを介して融合されている、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【請求項 9】

50

前記第 1 のリンカーおよび前記第 2 のリンカーがペプチドリンカーである、請求項 8 に記載の抗原結合分子。

【請求項 10】

前記抗原結合分子が、プロテアーゼ活性化可能であり、プロテアーゼ認識部位およびマスキング部分を含む、請求項 1～9 のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【請求項 11】

前記プロテアーゼ認識部位がマトリプターゼの基質である、請求項 10 に記載の抗原結合分子。

【請求項 12】

前記プロテアーゼ認識部位が、P Q A R K（配列番号 20）または H Q A R K（配列番号 21）、特に P Q A R K（配列番号 20）を含むかまたはこれからなる、請求項 10 または 11 に記載の抗原結合分子。

【請求項 13】

前記プロテアーゼ認識部位が、前記マスキング部分を前記 I F N G バリエーションポリペプチドと接続する切断可能なペプチドリンカーの一部である、請求項 10～12 のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【請求項 14】

前記マスキング部分が、その N 末端において、前記切断可能なペプチドリンカーを介して前記 I F N G バリエーションポリペプチドの C 末端に融合されている、請求項 10～13 のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【請求項 15】

前記マスキング部分が、その N 末端において、安定なリンカーを介して前記 F c ドメインの C 末端に融合され、その C 末端において、前記切断可能なペプチドリンカーを介して前記 I F N G バリエーションポリペプチドの N 末端に融合されている、請求項 10～14 のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【請求項 16】

前記マスキング部分が、I F N G に特異的に結合する抗体または抗体断片である、請求項 10～15 のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【請求項 17】

前記マスキング部分が、I F N G に特異的に結合する s c F v である、請求項 10～16 のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【請求項 18】

I F N G に特異的に結合する前記 s c F v が、

（a）配列番号 22 のアミノ酸配列を含む C D R－H 1、配列番号 23 のアミノ酸配列を含む C D R－H 2、および配列番号 24 のアミノ酸配列を含む C D R－H 3 を含む重鎖可変領域（V_H I F N G）、ならびに配列番号 25 のアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域（i v）C D R－L 1、配列番号 26 のアミノ酸配列を含む C D R－L 2、および配列番号 27 のアミノ酸配列を含む C D R－L 3 を含む軽鎖可変領域（V_L I F N G）、または

（b）配列番号 30 のアミノ酸配列を含む C D R－H 1、配列番号 31 のアミノ酸配列を含む C D R－H 2、および配列番号 32 のアミノ酸配列を含む C D R－H 3 を含む重鎖可変領域（V_H I F N G）、ならびに配列番号 33 のアミノ酸配列を含む C D R－L 1、配列番号 34 のアミノ酸配列を含む C D R－L 2、および配列番号 35 のアミノ酸配列を含む C D R－L 3 を含む軽鎖可変領域（V_L I F N G）を含む、請求項 10～17 のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【請求項 19】

I F N G に特異的に結合する s c F v が、

（a）配列番号 28 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（V_H I F N G）および配列番号 29 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（V_L I F N G）、または

（b）配列番号 36 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（V_H I F N G）および配列番

10

20

30

40

50

号 37 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V_L I F N G)

を含む、請求項 10～18 のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

【請求項 20】

前記抗原結合分子が、

(i) 配列番号 40 のアミノ酸配列を含む 2 本の重鎖および配列番号 41 のアミノ酸配列を含む 2 本の軽鎖、または

(ii) 配列番号 42 のアミノ酸配列を含む 2 本の重鎖および配列番号 41 のアミノ酸配列を含む 2 本の軽鎖、または

(iii) 配列番号 43 のアミノ酸配列を含む 2 本の重鎖および配列番号 44 のアミノ酸配列を含む 2 本の軽鎖、または

(iv) 配列番号 45 のアミノ酸配列を含む 2 本の重鎖および配列番号 44 のアミノ酸配列を含む 2 本の軽鎖を含む、請求項 1～19 のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【請求項 21】

インターフェロンガンマ (I F N G) バリエーションポリペプチドであって、前記 I F N G バリエーションポリペプチドが、C 末端アミノ酸配列 K R K R P (配列番号 1) で終結することを特徴とする、I F N G バリエーションポリペプチド。

【請求項 22】

前記 I F N G バリエーションポリペプチドが、配列番号 2 または配列番号 3 のアミノ酸配列を含むかまたはこれからなる、請求項 21 に記載の I F N G バリエーションポリペプチド。

【請求項 23】

請求項 1～20 のいずれか一項に記載の抗原結合分子または請求項 21 もしくは 22 に記載の I F N G バリエーションポリペプチドをコードする 1 つ以上の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 24】

請求項 23 に記載の前記 1 つ以上の単離されたポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 25】

請求項 23 に記載の前記 1 つ以上の単離されたポリヌクレオチドまたは請求項 24 に記載の発現ベクターを含む原核生物宿主細胞または真核生物宿主細胞。

【請求項 26】

抗原結合分子または I F N G バリエーションポリペプチドを産生する方法であって、a) 請求項 25 に記載の原核生物宿主細胞または真核生物宿主細胞を、前記抗原結合分子または I F N G バリエーションポリペプチドの発現に適した条件下で培養する工程と、b) 任意に、前記抗原結合分子または I F N G バリエーションポリペプチドを回収する工程と、を含む、方法。

【請求項 27】

請求項 1～20 のいずれか一項に記載の抗原結合分子または請求項 21 もしくは 22 に記載の I F N G バリエーションポリペプチドと、薬学的に許容される賦形剤と、を含む、医薬組成物。

【請求項 28】

医薬品として使用するための、請求項 1～20 のいずれか一項に記載の抗原結合分子または請求項 21 もしくは 22 に記載の I F N G バリエーションポリペプチド。

【請求項 29】

がんの処置において使用するための、請求項 1～20 のいずれか一項に記載の抗原結合分子または請求項 21 もしくは 22 に記載の I F N G バリエーションポリペプチド。

【請求項 30】

前記抗原結合分子または I F N G バリエーションポリペプチドが、化学療法剤、放射線および／またはがん免疫療法で使用するための他の薬剤と組み合わせて投与されるものである、がんの処置において使用するための、請求項 1～20 のいずれか一項に記載の抗原結合分子または請求項 21 もしくは 22 に記載の I F N G バリエーションポリペプチド。

【請求項 31】

10

20

30

40

50

がんの処置において使用するための医薬品を製造するための、請求項 1～20 のいずれか一項に記載の抗原結合分子または請求項 21 もしくは 22 に記載の IFNG バリエントポリペプチドの使用。

【請求項 32】

個体における疾患を処置する方法であって、前記個体に、治療有効量の請求項 1～20 のいずれか一項に記載の抗原結合分子または請求項 21 もしくは 22 に記載の IFNG バリエントポリペプチドを薬学的に許容される形態で投与することを含む、方法。

【請求項 33】

前記疾患ががんである、請求項 32 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本発明は、(i) 腫瘍関連抗原に特異的に結合する抗体、および(ii) C末端アミノ酸配列 KRKR P (配列番号 1) で終結する新規インターフェロンガンマ(IFNG) バリエントポリペプチドを含む新規抗原結合分子、特に線維芽細胞活性化タンパク質(FAP) に特異的に結合する抗体および新規 IFNG バリエントポリペプチドを含む抗原結合分子に関する。さらに、本発明は、その分子に含まれる新規 IFNG バリエントポリペプチド、ならびに抗原結合分子または IFNG バリエントポリペプチドをコードするポリヌクレオチド分子、ならびにそのようなポリヌクレオチド分子を含むベクターおよび宿主細胞に関する。本発明のさらなる態様は、これらの分子を製造する方法およびこれらの分子を使用する方法である。

20

【背景技術】

【0002】

近年、がんへの免疫療法処置の適用は劇的に増加しており、がん免疫療法はがんと戦うための重要な戦略となっている。抗 PD-1 を含む免疫チェックポイント調節因子は、多くのがんの種類の標準治療として確立されている。しかしながら、がん免疫療法処置がここ数年進歩しているにもかかわらず、一部の患者は、内因性または適応性の耐性機序のために依然として利用可能な免疫療法に応答しない。特に、がん免疫療法に応答しない患者は、非炎症性免疫表現型を特徴とすることが多いことがより明らかになってきている。実際、腫瘍における免疫細胞浸潤と、患者が免疫療法処置に応答する能力との間に相関関係が示されている。全体として、免疫原性を増強し、腫瘍における免疫細胞浸潤を増加させることを目的とする新しい治療法を開発することは、患者にとって明らかに医療上の必要性がある。

30

【0003】

上記の開発と並行して、潜在的ながん処置としてのサイトカインに対する関心が急激に増加している。インターフェロンガンマ(IFNGまたはIFN- γ)は、炎症または免疫刺激に応答して、CD4⁺およびCD8⁺T細胞ならびにナチュラルキラー(NK)細胞などの活性化リンパ球によって主に産生および分泌されるサイトカインである。IFNGはホモ二量体であり、その受容体(IFNGR1およびIFNGR2)は造血細胞および非造血細胞にわたって発現される。IFNGR1は細胞表面に安定して発現されるのに対して、IFNGR2は示差的に発現され、IFNGシグナルを調節するために使用される。IFNGがその受容体に結合すると、STAT1をリン酸化して活性化するヤヌスキナーゼであるJAK1およびJAK2の動員および活性化が誘導される。リン酸化後、STAT1は核に移行し、そこで特異的プロモーターに結合し、IFNG調節遺伝子の転写を調節する。

40

【0004】

市販されている、および開発中の多くのがん治療とは対照的に、IFNGは、腫瘍細胞ならびにT細胞および樹状細胞を含む複数の免疫細胞の両方に作用する能力を有する。様々な細胞型に対するIFNGの効果にはいくつかの利点があり、それらの利点には、1) 腫瘍細胞および抗原提示細胞の両方の表面上のMHC-I分子の発現増強、2) CXCL

50

9、CXCL10およびCXCL11産生の誘導による腫瘍部位への免疫細胞の動員、ならびに3)腫瘍抗原交差提示を増加させ、その後の抗腫瘍免疫応答の増強が含まれる。これら全ての効果に加えて、IFNGは、Th1環境の生成、単球分化、マクロファージ極性化および血管新生において役割を果たす。その細胞増殖抑制機能、アポトーシス促進機能および抗増殖機能に基づいて、IFNGは、がんの治療において潜在的に有用であると考えられる。

【0005】

しかしながら、IFNGの受容体は、多くの異なる細胞型で発現され、したがって、その活性は、シンク効果によって低下し得る。IFNGはまた、望ましくない副作用を示し得る。さらに、投与、生物学的利用能および短い半減期に関する問題が生じ得る。したがって、腫瘍環境においてT細胞を選択的に活性化することができる新しいIFNG分子が必要とされている。国際公開第2017/139468号は、Her2結合scFvと、アミノ酸配列AKTGKRKRSQ(配列番号127)で終結するインターフェロンガンマモノマーを含む融合タンパク質を開示している。しかしながら、IFNG活性を維持するための高い安定性を有し、ヒト患者への投与により適した分子を提供することが依然として必要とされている。

10

【発明の概要】

【0006】

主に用量制限毒性およびシンク効果に関連する現在の課題を克服するために、本発明者らは、循環中および健康な組織において不活性であり、腫瘍部位においてのみ活性である、上記の利益を誘発する腫瘍標的化マスクされたIFNGを開発した。活性なIFNGを腫瘍環境に直接送達することにより、T細胞およびNK細胞の活性化後に産生されるIFNGの潜在的な用量制限が克服され、特に、現在、新規のがん免疫療法に対してより多くのニーズがある免疫砂漠腫瘍においても、効率的に対応できる機会を提供する。

20

【0007】

したがって、本発明は、免疫療法のための有利な特性を有するIFNGバリエーションを、腫瘍関連抗原、特に線維芽細胞活性化タンパク質(FAP)に結合する抗体へのIFNGバリエーションのコンジュゲーションによって、腫瘍細胞ではなく、細胞傷害性Tリンパ球などの免疫エフェクター細胞に直接標的化する新規なアプローチを提供する。これにより、腫瘍微小環境におけるT細胞の活性化がもたらされる。線維芽細胞活性化タンパク質(FAP)は、がん関連間質細胞の細胞表面上、および二次リンパ器官の線維芽細胞性細胞上に高度に発現されるセリンプロテアーゼであるが、正常組織での発現は非常に限られている。FAPは様々ながん適応症において非常に一般的であり、腫瘍間質内に蓄積するはずの薬物の標的化部分としてのその使用が可能になる。

30

【0008】

本発明の分子は、C末端アミノ酸配列KRKR(配列番号1)で終結するインターフェロンガンマ(IFNG)バリエーションポリペプチドのホモ二量体を含む。KRKRパッチ、すなわち、KRKRのアミノ酸配列(配列番号78)の存在がIFNGの活性のために重要であることが本明細書中では示されている。本発明者らは、タンパク質分解を回避するために、野生型IFNGのC末端を、IFNGバリエーションポリペプチドの配列がアミノ酸配列KRKR(配列番号1)で終結するようにプロリンキャップにより安定化しなければならぬことを見出した。

40

【0009】

したがって、本明細書において、抗原結合分子であって、

(i)腫瘍関連抗原に特異的に結合する抗体と、

(ii)インターフェロンガンマ(IFNG)バリエーションポリペプチドのホモ二量体であって、IFNGバリエーションポリペプチドが、C末端アミノ酸配列KRKR(配列番号1)によって特徴付けられ、これは、アミノ酸配列KRKR(配列番号1)でC末端が終結することを意味する、IFNGバリエーションポリペプチドのホモ二量体と、を含む抗原結合分子が提供される。

50

【0010】

したがって、これらの抗原結合分子は、野生型IFNGとは異なり、アミノ酸配列KRKRP（配列番号1）で終結する2つの同一のインターフェロンガンマ（IFNG）バリエーションポリペプチドが融合された抗体を含む。一態様では、インターフェロンガンマ（IFNG）バリエーションポリペプチドは、配列番号2または配列番号3のアミノ酸配列を含む。一態様では、インターフェロンガンマ（IFNG）バリエーションポリペプチドは、配列番号2または配列番号3のアミノ酸配列からなる。特定の一態様では、IFNGバリエーションポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸配列を含むかまたはこれからなる。

【0011】

一態様では、（i）腫瘍関連抗原に特異的に結合する抗体、および（ii）インターフェロンガンマ（IFNG）バリエーションポリペプチドのホモ二量体であって、IFNGバリエーションポリペプチドが、アミノ酸配列KRKRP（配列番号1）でC末端が終結し、第1のIFNGバリエーションポリペプチドが、そのN末端を第1の重鎖のC末端に第1のリンカーを介して融合され、第2のIFNGバリエーションポリペプチドが、そのN末端を第2の重鎖のC末端に任意にリンカーを介して融合されることを特徴とする、IFNGバリエーションポリペプチドのホモ二量体と、を含む、抗原結合分子が提供される。

【0012】

一態様では、腫瘍関連抗原に特異的に結合する抗体は、線維芽細胞活性化タンパク質（FAP）に特異的に結合する抗体である。一態様では、FAPに特異的に結合する抗体が、（a）配列番号4のアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域（CDR-H1）、配列番号5のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および配列番号6のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む重鎖可変領域（V_HFAP）、ならびに配列番号7のアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域（i v）CDR-L1、配列番号8のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および配列番号9のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含む軽鎖可変領域（V_LFAP）、または（b）配列番号12のアミノ酸配列を含むCDR-H1、配列番号13のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および配列番号14のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む重鎖可変領域（V_HFAP）、ならびに配列番号15のアミノ酸配列を含むCDR-L1、配列番号16のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および配列番号17のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含む軽鎖可変領域（V_LFAP）を含む抗原結合分子が提供される。一態様では、FAPに特異的に結合する抗体が、配列番号10のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（V_HFAP）と配列番号11のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（V_LFAP）とを含むか、または配列番号18のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（V_HFAP）と配列番号19のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（V_LFAP）とを含む抗原結合分子が提供される。特定の一態様では、FAPに特異的に結合する抗体が、配列番号10のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（V_HFAP）と配列番号11のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（V_LFAP）とを含む抗原結合分子が提供される。

【0013】

一態様では、抗原結合分子は、Fcドメイン、特にIgG1 FcドメインまたはIgG4 Fcドメインを含む。一態様では、Fcドメインは、Fc受容体に対する抗体の結合親和性および／またはエフェクター機能を低下させる1つ以上のアミノ酸置換を含む。一態様では、Fcドメインは、アミノ酸変異L234A、L235AおよびP329G（Kabatt EUインデックスによるEUNANバリング）を有するヒトIgG1サブクラスのものである。別の態様では、FcドメインはマウスFcドメインであり、アミノ酸変異D265AおよびP329G（Kabatt EUインデックスによるEUNANバリング）を含む。

【0014】

一態様では、抗原結合分子はプロテアーゼ活性化可能であり、プロテアーゼ認識部位およびマスキング部分を含む。したがって、抗原結合分子は、（i）腫瘍関連抗原に特異的に結合する抗体、（ii）インターフェロンガンマ（IFNG）バリエーションポリペプチドのホモ二量体であって、IFNGバリエーションポリペプチドが、アミノ酸配列KRKRP（

10

20

30

40

50

配列番号 1) で C 末端が終結することの特徴とする、I F N G バリエーションポリペプチドのホモ二量体、(i i i) プロテアーゼ認識部位および (i v) マスキング部分を含む。

【 0 0 1 5 】

一態様では、プロテアーゼ認識部位は、マトリプターゼの基質である。一態様では、プロテアーゼ認識部位は、アミノ酸配列 P Q A R K (配列番号 2 0) または H Q A R K (配列番号 2 1) を含むかまたはこれからなる。特定の一態様では、プロテアーゼ認識部位は、アミノ酸配列 P Q A R K (配列番号 2 0) を含むかまたはこれからなる。一態様では、プロテアーゼ認識部位は、マスキング部分を I F N G バリエーションポリペプチドと接続する切断可能なペプチドリンカーの一部である。

【 0 0 1 6 】

一態様では、マスキング部分が、その N 末端において、切断可能なペプチドリンカー (マスク放出フォーマット) を介して I F N G バリエーションポリペプチドの C 末端に融合されている抗原結合分子が提供される。一態様では、I F N G バリエーションポリペプチドは、その N 末端において、安定なリンカーを介して抗体の C 末端に融合される。

【 0 0 1 7 】

別の態様では、マスキング部分が、その N 末端において、安定なリンカーを介して F c ドメインの C 末端に融合され、その C 末端において、切断可能なペプチドリンカー (サイトカイン放出フォーマット) を介して I F N G バリエーションポリペプチドの N 末端に融合されている抗原結合分子が提供される。

【 0 0 1 8 】

一態様では、マスキング部分は、I F N G に特異的に結合する抗体断片である。特定の一態様では、マスキング部分は、I F N G に特異的に結合する s c F v である。

【 0 0 1 9 】

一態様では、I F N G に特異的に結合するマスキング部分、特に s c F v は、

(a) 配列番号 2 2 のアミノ酸配列を含む C D R - H 1、配列番号 2 3 のアミノ酸配列を含む C D R - H 2、および配列番号 2 4 のアミノ酸配列を含む C D R - H 3 を含む重鎖可変領域 (V_H I F N G)、ならびに配列番号 2 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域 (i v) C D R - L 1、配列番号 2 6 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2、および配列番号 2 7 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3 を含む軽鎖可変領域 (V_L I F N G)、または

(b) 配列番号 3 0 のアミノ酸配列を含む C D R - H 1、配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含む C D R - H 2、および配列番号 3 2 のアミノ酸配列を含む C D R - H 3 を含む重鎖可変領域 (V_H I F N G)、ならびに配列番号 3 3 のアミノ酸配列を含む C D R - L 1、配列番号 3 4 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2、および配列番号 3 5 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3 を含む軽鎖可変領域 (V_L I F N G) を含む。

【 0 0 2 0 】

一態様では、I F N G に特異的に結合するマスキング部分、特に s c F v は、(a) 配列番号 2 8 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V_H I F N G) および配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V_L I F N G)、または (b) 配列番号 3 6 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V_H I F N G) および配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V_L I F N G) を含む。特定の一態様では、I F N G に特異的に結合するマスキング部分、特に s c F v は、(a) 配列番号 2 8 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V_H I F N G) および配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V_L I F N G) を含む。

【 0 0 2 1 】

特定の一態様では、本明細書において、I F N G バリエーションポリペプチドを含有する抗原結合分子が提供され、当該抗原結合分子は、

(i) 配列番号 4 0 のアミノ酸配列を含む 2 本の重鎖および配列番号 4 1 のアミノ酸配列を含む 2 本の軽鎖、または

(i i) 配列番号 4 2 のアミノ酸配列を含む 2 本の重鎖および配列番号 4 1 のアミノ酸

10

20

30

40

50

配列を含む 2 本の軽鎖、または

(i i i) 配列番号 4 3 のアミノ酸配列を含む 2 本の重鎖および配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含む 2 本の軽鎖、または

(i v) 配列番号 4 5 のアミノ酸配列を含む 2 本の重鎖および配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含む 2 本の軽鎖を含む。

【 0 0 2 2 】

さらに、本明細書において、インターフェロンガンマ (I F N G) バリエーションポリペプチドであって、C 末端アミノ酸配列 K R K R P (配列番号 1) によって特徴付けられるインターフェロンガンマ (I F N G) バリエーションポリペプチドが提供される。一態様では、I F N G バリエーションポリペプチドはヒト I F N G バリエーションポリペプチドであり、配列番号 2 のアミノ酸配列を含むかまたはこれからなる。別の態様では、I F N G バリエーションポリペプチドはマウス I F N G バリエーションポリペプチドであり、配列番号 3 のアミノ酸配列を含むかまたはこれからなる。

10

【 0 0 2 3 】

本発明の別の態様によれば、本明細書にて上述した抗原結合分子をコードする単離された 1 つ以上の単離されたポリヌクレオチドが提供される。本明細書にて上述した I F N G バリエーションポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドもまた提供される。本発明はさらに、本発明の単離されたポリヌクレオチドを含むベクター、特に発現ベクター、および本発明の単離された核酸または発現ベクターを含む宿主細胞を提供する。いくつかの態様では、宿主細胞は真核細胞、特に哺乳動物細胞である。いくつかの態様では、宿主細胞は原核細胞である。別の態様では、本明細書にて上述した抗原結合分子または I F N G 変異体ポリペプチドを産生する方法であって、抗原結合分子または I F N G バリエーションポリペプチドの発現に適した条件下で上記の宿主細胞を培養すること、および抗原結合分子または I F N G バリエーションポリペプチドを単離することを含む方法が提供される。本発明はまた、I F N G バリエーションポリペプチドを含む抗原結合分子または本明細書に記載の方法によって産生される I F N G バリエーションポリペプチドを包含する。

20

【 0 0 2 4 】

本発明はさらに、本明細書にて上述した抗原結合分子または本明細書にて上述した I F N G バリエーションポリペプチドおよび薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を提供する。一態様では、医薬組成物は、さらなる治療薬を含む。一態様では、医薬組成物は、疾患を処置するためのものである。特定の一態様では、疾患はがんである。

30

【 0 0 2 5 】

医薬品として使用するための、本明細書にて上述した抗原結合分子もしくは I F N G バリエーションポリペプチド、または抗原結合分子もしくは I F N G バリエーションポリペプチドを含む医薬組成物も本発明に包含される。

【 0 0 2 6 】

一態様では、がんの処置に使用するための、本明細書にて上述した抗原結合分子または本明細書にて上述した I F N G バリエーションポリペプチドまたは本発明の医薬組成物が提供される。別の具体的な態様において、本発明は、がんの処置において使用するための本明細書にて上述した抗原結合分子または I F N G バリエーションポリペプチドを提供し、抗原結合分子または I F N G バリエーションポリペプチドは、化学療法剤、放射線および／またはがん免疫療法で使用するのための他の薬剤と組み合わせて投与される。

40

【 0 0 2 7 】

さらなる態様では、本発明は、個体における腫瘍細胞の増殖を阻害する方法であって、有効量の本明細書にて上述した抗原結合分子もしくは I F N G バリエーションポリペプチドまたは本発明の医薬組成物を個体に投与して、腫瘍細胞の増殖を阻害することを含む方法を提供する。別の態様では、本発明は、個体における疾患を処置する方法であって、治療有効量の本明細書にて上述した抗原結合分子もしくは I F N G バリエーションポリペプチドまたは本発明の医薬組成物を当該個体に投与することを含む方法を提供する。特定の態様では、疾患はがんである。

50

【0028】

疾患の処置を必要とする個体における疾患の処置のための医薬品の製造のための、特にがんの処置のための医薬品の製造のための、本明細書にて上述した抗原結合分子の使用も提供される。特定の態様では、疾患はがんである。上記態様のいずれかにおいて、個体は哺乳動物、特にヒトである。

【図面の簡単な説明】

【0029】

【図1A】IFNG C末端配列の操作の概要を提供する図である。

【図1B】IFNG C末端配列の操作の概要を提供する図である。

【図1C】IFNG C末端配列の操作の概要を提供する図である。図1Aでは、実施例1において調製されるIFNG分子のフォーマットの概略スキームが示される。IFNGは、標的化IgG抗体の重鎖のC末端に融合される。IgG融合IFNG野生型C末端は、シグナル伝達において不活性な切断バリエーションをもたらすタンパク質分解を起こしやすい。図1Bでは、特定のC末端アミノ酸の欠失を伴うIFNG C末端配列が示される。欠失系列では、C末端残基を徐々に除去した後、他のアミノ酸と置換してキャップを得た。KRKR配列は活性に重要であり、保存されなければならない。図1Cは、実施例1に記載されている変異系列のKRKR配列に導入されたアミノ酸変異の概要を示す。

【図1D】マスク放出フォーマットの概略スキームを示す図である。安定なリンカー（リンカー1）を介して標的化IgGの重鎖のC末端にIFNGを融合する。マスクされたフォーマットを作製するために、IFNG特異的scFvドメインを、切断可能なリンカー（PQARK切断部位を有するリンカー2）を介してIFNGのC末端に融合する。

【図1E】サイトカイン放出フォーマットの概略スキームを示す図である。IFNGは、安定なリンカー（リンカー1）を介して標的化IgGの重鎖に融合されたIFNG特異的scFvドメインのC末端に、切断可能なリンカー（PQARK切断部位を有するリンカー2）を介して融合される。

【図2A】HEK-blu IFNGレポーター細胞において測定されるヒトIFNG欠失系列バリエーションのシグナル伝達活性を示す図である。

【図2B】HEK-blu IFNGレポーター細胞において測定されるヒトIFNG欠失系列バリエーションのシグナル伝達活性を示す図である。

【図2C】HEK-blu IFNGレポーター細胞において測定されるヒトIFNG欠失系列バリエーションのシグナル伝達活性を示す図である。図2Aでは、野生型IFNG（P1AF3568）、不活性バリエーション（P1AF3569）および文献（Slodowskiら）に記載されるIFNGバリエーションを有する分子のシグナル伝達活性が比較される。図2Bは、野生型IFNG分子（P1AF3568）をプロリンキャッピングされたIFNGバリエーションを含有する分子と比較する。図2Cは、野生型IFNG分子（P1AF3568）をセリン-プロリンキャッピングされたIFNGバリエーションを含有する分子と比較する。

【図3A】HEK-blu IFNGレポーター細胞において測定されるヒトIFNG変異系列バリエーションのシグナル伝達活性を示す図である。

【図3B】HEK-blu IFNGレポーター細胞において測定されるヒトIFNG変異系列バリエーションのシグナル伝達活性を示す図である。

【図3C】HEK-blu IFNGレポーター細胞において測定されるヒトIFNG変異系列バリエーションのシグナル伝達活性を示す図である。図3Aでは、C末端KRKR Pを有するIFNGバリエーション（P1AF3574）のシグナル伝達活性が、KRKRパッチにおける1つまたは2つのアミノ酸がグルタミン酸によって置き換えられているIFNGバリエーション分子と比較される。図3Bは、C末端KRKR Pを有するIFNGバリエーション（P1AF3574）とIFNGバリエーション分子とのシグナル伝達活性を比較し、KRKRパッチにおける1つまたは2つのアミノ酸がプロリンによって置き換えられている。図3Cは、C末端KRKR Pを有するIFNGバリエーション（P1AF3574）とIFNGバリエーション分子とのシグナル伝達活性を比較し、KRKRパッチにおける1つまたは2

つのアミノ酸がセリンによって置き換えられている。

【図 4 A】ヒトおよびマウスの野生型 IFNG ならびに操作された IFNG バリエーションの多重配列アラインメントを示す図である。示されているアラインメントされた配列が、コンセンサス配列（配列番号 125）、ヒト IFNG KRKR P 1～132（配列番号 2）、マウス IFNG KRKR P 22～153（配列番号 3）、ヒト野生型 IFNG（配列番号 60）およびマウス野生型 IFNG（配列番号 61）である。

【図 4 B】FAP 標的化マスクされていない IFNG の活性と比較した、切断可能な PQARK リンカーを含有する FAP 標的化抗マウス IFNG-scFv マスクされた IFNG 化合物（マトリプターゼありおよびなし）による 2 日間の処置に応答したマウス MC38-huCEA 腫瘍細胞株における MHC-I の誘導を示す図である。

【図 4 C】FAP 標的化マスクされていない IFNG の活性と比較した、切断可能な PQARK リンカーを含有する FAP 標的化抗マウス IFNG-scFv マスクされた IFNG 化合物（マトリプターゼありおよびなし）による 2 日間の処置に応答したマウス MC38-huCEA 腫瘍細胞株における PD-L1 の誘導を示す図である。

【図 5】インビボで P1AG3755 の活性を試験するために行われたインビボ研究の重要な事象を強調する研究レイアウトを示す図である。KPC4662-huCEA 腫瘍モデルは、CD8 T 細胞が腫瘍の辺縁にのみ存在することを意味する除外腫瘍モデルである。MHC-I および PD-L1 発現はベースラインで低い。P1AG3755 を 2 つの異なる用量で 1 回投与して、MHC-I、PD-L1 発現および CD8 浸潤の変化を観察した。

【図 6 A】試験の異なる時点でのがん細胞（図 6 A）および線維芽細胞（図 6 B）における MHC-I 発現を示す図である。

【図 6 B】試験の異なる時点でのがん細胞（図 6 A）および線維芽細胞（図 6 B）における MHC-I 発現を示す図である。MHC-I 発現は、フローサイトメトリーによって測定した場合、治療投与後早期および後期（3 日目および 7 日目）にのみ、がん細胞および線維芽細胞において統計学的に有意に増加する。

【図 6 C】試験の異なる時点でのがん細胞（図 6 C）および線維芽細胞（図 6 D）における PD-L1 発現を示す図である。

【図 6 D】試験の異なる時点でのがん細胞（図 6 C）および線維芽細胞（図 6 D）における PD-L1 発現を示す図である。PD-L1 発現はまた、より高い用量で両方の細胞型で統計学的に有意に増加するが、処置後 3 日目のみであり、処置後 7 日目では増加しない。

【図 7】免疫蛍光法（3DIP）による組織学的分析の結果を示し、腫瘍切片における CD8 T 細胞浸潤および MHC I 発現を例示する図である。MHC I 発現は、P1AG3755 投与の 3 日後および 7 日後に用量依存的に増加し、フローサイトメトリーの結果を裏付けている。MHC I 発現の増加は局所的であり、腫瘍全体で同じではない。MHC I 発現パターンは、腫瘍コアにおける CD8 T 細胞の存在と相関する。

【図 8】腫瘍への CD8 浸潤は、フローサイトメトリーによって測定されるように、ビヒクル群と統計学的に有意に異ならなかったことを示す図である。CD8 T 細胞浸潤は、高度に局在化した MHC I 発現に続くため、これは予想されたことである。免疫蛍光イメージングにより、CD8 T 細胞が、治療後 7 日目と比較して、治療後 3 日目に MHC-I 陽性領域により強く存在することが明らかになる。

【図 9】サイトカイン分析に関し、T 細胞誘引性ケモカイン CXCL9 が、治療注射（10 mg/kg）の 7 日後にのみ血清において統計学的に有意に増加するが、それより前には増加せず、低用量では増加せず、腫瘍組織では増加しないことを示す図である。

【図 10 A】実施例 6 に記載されるような立体的にマスクされた IFNG（P1AG8692）の概略図を示す図である。IFNG バリエーションは、IgG1 抗体の上部ヒンジ領域と下部ヒンジ領域との間に挿入される。

【図 10 B】IFNG バリエーションがリンカー（リンカー 4）を介して Fab に融合されている、マスクされていない対照化合物（P1AG8697）の概略図を示す図である。

10

20

30

40

50

【図10C】HEK-blue IFNGレポーター細胞において測定される立体的にマスクされたIFNGバリエーションの活性を相対吸光度として示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0030】

定義

他の意味であると定義されない限り、本明細書で使用される技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野で一般的に使用されるのと同じ意味を有する。本明細書を解釈する目的で、以下の定義が適用され、適切な場合にはいつでも、単数形で使用される用語は、複数形も含み、その逆に、複数形で使用される用語は、単数形も含む。

【0031】

本明細書で使用する場合、「抗原結合分子」という用語は、その最も広い意味で、抗原決定基に特異的に結合する分子を指す。抗原結合分子の例は、抗体、二重特異性または多重特異性抗体、イムノコンジュゲート、抗体断片および足場抗原結合タンパク質である。

【0032】

本明細書で使用する場合、「腫瘍関連抗原に特異的に結合する抗体」または「腫瘍関連抗原に特異的に結合する部分」という用語は、抗原決定基に特異的に結合するポリペプチド分子を指す。一態様では、抗原結合ドメインは、その標的細胞抗原を介してシグナル伝達を活性化することができる。特定の態様では、抗原結合ドメインは、それが結合している実体（例えば、IFNGバリエーションポリペプチド）を標的部位、例えば抗原決定基を有する特定の種類の腫瘍細胞または腫瘍間質へ誘導することができる。腫瘍関連抗原に特異的に結合可能な抗原結合ドメインは、本明細書で更に定義される抗体およびそれらの断片を含む。さらに、腫瘍関連抗原に特異的に結合が可能な抗体は、本明細書でさらに定義される足場抗原結合タンパク質、例えば、設計された反復タンパク質または設計された反復ドメインに基づく結合ドメイン（例えば、国際公開第2002/020565号を参照されたい）を含む。特に、腫瘍関連抗原に特異的に結合が可能な抗体は、線維芽細胞活性化タンパク質（FAP）に特異的に結合が可能な抗体である。抗体またはその断片に関して、「腫瘍関連抗原に特異的に結合する抗体」という用語は、抗原の一部または全部に特異的に結合し、抗原の一部または全部に相補的である領域を含む分子の一部を指す。特異的に結合が可能な抗原結合ドメインは、例えば1つ以上の抗体可変ドメイン（抗体可変領域とも呼ばれる）により提供され得る。具体的には、特異的に結合が可能な抗原結合ドメインは、抗体軽鎖可変領域（VL）および抗体重鎖可変領域（VH）を含む。別の態様では、「腫瘍関連抗原への特異的に結合が可能な抗原結合ドメイン」は、Fab断片またはcross-Fab断片であってもよい。

【0033】

本明細書の「抗体」という用語は、最も広い意味で使用され、種々の抗体構造を包含し、限定されないが、所望の抗原結合活性を示す限り、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、単一特異性抗体および多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、および抗体断片を含む。

【0034】

本明細書で使用する場合、「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集合から得られる抗体を指し、すなわち、集合に含まれる個々の抗体が、同一であり、および／または同じエпитープに結合するが、但し、例えば、天然に存在する変異またはモノクローナル抗体製剤の産生中に生じる変異を含む、可能なバリエーション抗体を除き、そのようなバリエーションは、一般的に、少量存在する。典型的には異なる決定基（エпитープ）に対する異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対するものである。

【0035】

本明細書で使用する場合、「単一特異性」抗体という用語は、同じ抗原の同じエпитープにそれぞれ結合する1つ以上の結合部位を有する抗体を示す。「二重特異性」という用語は、抗原結合分子が少なくとも2つの異なる抗原決定基に特異的に結合することができ

10

20

30

40

50

ることを意味する。典型的には、二重特異性抗原結合分子は2つの抗原結合部位を含み、それらの各々が異なる抗原決定基に対して特異的である。特定の実施形態では、二重特異性抗原結合分子は、2つの抗原決定基に、特に2つの異なる細胞上に発現した2つの抗原決定基に同時に結合することができる。また、本明細書中に記載される二重特異性抗原結合分子は、多重特異性抗体の一部を形成することもできる。

【0036】

本出願内で使用される「価」という用語は、1つの異なる抗原決定基に特異的な抗原結合分子中の1つの異なる抗原決定基に特異的な指定数の結合部位の存在を示す。したがって、「二価」、「四価」、および「六価」という用語は、抗原結合分子内中の特定の抗原決定基にそれぞれ特異的な2つの結合部位、4つの結合部位、および6つの結合部位が存在することを示す。本発明の特定の態様では、本発明による二重特異性抗原結合分子は、特定の抗原決定基に一価であり得、これは、当該抗原決定基に対して1つのみの結合部位を有することを意味し、または特定の抗原決定基に対して二価もしくは四価であり得、これは、当該抗原決定基に対してそれぞれ、2つの結合部位もしくは4つの結合部位を有することを意味する。

10

【0037】

「完全長抗体」、「インタクトな抗体」および「全抗体」という用語は、天然抗体構造に実質的に類似した構造を有する抗体を指すために、本明細書で互換的に使用される。「天然抗体」は、様々な構造を有する天然に存在する免疫グロブリン分子を指す。例えば、天然IgGクラス抗体は、約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質であり、ジスルフィド結合した2本の軽鎖と2本の重鎖で構成される。N末端からC末端に向かって、各重鎖は、可変重鎖ドメインまたは重鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域(VH)、続いて、重鎖定常領域とも呼ばれる3つの定常ドメイン(CH1、CH2およびCH3)を有する。同様に、N末端からC末端に向かって、各軽鎖は、可変軽鎖ドメインまたは軽鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域(VL)、続いて、軽鎖定常領域とも呼ばれる軽鎖定常ドメイン(CL)を有する。抗体の重鎖は、 α (IgA)、 δ (IgD)、 ϵ (IgE)、 γ (IgG)または μ (IgM)と呼ばれる5つのタイプのうちの1つに割り当てられてもよく、そのうちのいくつかは、例えば、 $\gamma 1$ (IgG1)、 $\gamma 2$ (IgG2)、 $\gamma 3$ (IgG3)、 $\gamma 4$ (IgG4)、 $\alpha 1$ (IgA1)および $\alpha 2$ (IgA2)などのサブタイプにさらに分けられてもよい。抗体の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ(κ)およびラムダ(λ)と呼ばれる2つのタイプのいずれかに割り当てられてもよい。

20

30

【0038】

「抗体断片」は、インタクトな抗体が結合する抗原に結合するインタクトな抗体の一部を含むインタクトな抗体以外の分子を指す。抗体断片の例としては、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab)₂ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、cross-Fab断片、直鎖抗体、単鎖抗体分子(例えばscFv)、および単ドメイン抗体が挙げられるが、これらに限定されない。特定の抗体断片の総説については、Hudsonら、Nat Med. 9、129-134(2003)を参照されたい。scFv断片の総説については、例えば、Pluckthun、The Pharmacology of Monoclonal Antibodies、vol. 113、RosenburgおよびMoore編、Springer-Verlag、New York、pp. 269-315(1994)を参照し、また、国際公開第93/16185号ならびに米国特許第5571894号および同第5587458号も参照されたい。サルベージ受容体結合エピトープ残基を含み、インビボでの半減期が長くなったFab断片およびF(ab')₂断片の説明については、米国特許第5,869,046号を参照されたい。ダイアボディは、二価または二重特異性であってもよい2つの抗原結合部位を有する抗体断片であり、例えば欧州特許第404097号；国際公開第1993/01161号；Hudsonら、Nat Med 9、129-134(2003)；およびHollingerら、Proc Natl Acad Sci USA 90、6444-644

40

50

8 (1993) を参照されたい。トリアボディおよびテトラボディも Hudson ら、Nat Med 9、129-134 (2003) に記載されている。単ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインの全部もしくは一部または抗体の軽鎖可変ドメインの全部もしくは一部を含む抗体断片である。特定の実施形態では、単ドメイン抗体は、ヒト単ドメイン抗体である (Domantis, Inc.、Waltham、MA; 例えば、米国特許第 6,248,516 号を参照されたい)。抗体断片は、限定されないが、本明細書中に記載されるように、インタクトな抗体のタンパク質分解による消化、および組み換え宿主細胞 (例えば、大腸菌またはファージ) による産生を含め、様々な技術によって作製することができる。

【0039】

インタクトな抗体のパパイン消化により、2つの同一の抗原結合断片が生成され、これは、それぞれ重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインと、さらに軽鎖の定常ドメインおよび重鎖の第1の定常ドメイン (CH1) とを含有する「Fab」断片と呼ばれる。したがって、本明細書で使用する場合、「Fab断片」という用語は、軽鎖 (CL) のVLドメインおよび定常ドメインを含む軽鎖断片と、重鎖のVHドメインおよび第1の定常ドメイン (CH1) を含む抗体断片を指す。Fab'断片は、抗体ヒンジ領域由来の1つ以上のシステインを含む重鎖CH1ドメインのカルボキシ末端での数個の残基の付加によって、Fab断片とは異なる。Fab'-SHは、定常ドメインのシステイン残基が遊離チオール基を担持するFab'断片である。ペプシン処理により、2つの抗原結合部位 (2つのFab断片) およびFc領域の一部を有するF(ab')₂断片が得られる。本発明によれば、「Fab断片」という用語は、以下で定義する「cross-Fab断片」または「クロスオーバーFab断片」も含む。

【0040】

「cross-Fab断片」または「xFab断片」または「クロスオーバーFab断片」という用語は、重鎖および軽鎖の可変領域または定常領域のいずれかが交換されたFab断片を指す。クロスオーバーFab分子の2つの異なる鎖組成が可能であり、本発明の二重特異性抗体に含まれる。一方、Fab重鎖および軽鎖の可変領域は交換されており、すなわち、クロスオーバーFab分子は、軽鎖可変領域 (VL) および重鎖定常領域 (CH1) で構成されるペプチド鎖と、重鎖可変領域 (VH) および軽鎖定常領域 (CL) で構成されるペプチド鎖とを含む。このクロスオーバーFab分子は、CrossFab (VLVH) とも呼ばれる。一方、Fab重鎖および軽鎖の定常領域が交換されている場合、クロスオーバーFab分子は、重鎖可変領域 (VH) および軽鎖定常領域 (CL) で構成されるペプチド鎖と、軽鎖可変領域 (VL) および重鎖定常領域 (CH1) で構成されるペプチド鎖とを含む。このクロスオーバーFab分子は、CrossFab (CLCH1) とも呼ばれる。

【0041】

「単鎖Fab断片」または「scFab」は、抗体重鎖可変ドメイン (VH)、抗体定常ドメイン1 (CH1)、抗体軽鎖可変ドメイン (VL)、抗体軽鎖定常ドメイン (CL) およびリンカーからなるポリペプチドであり、当該抗体ドメインおよび当該リンカーは、N末端からC末端方向に次の順序、a) VH-CH1-リンカー-VL-CL、b) VL-CL-リンカー-VH-CH1、c) VH-CL-リンカー-VL-CH1、または d) VL-CH1-リンカー-VH-CL のうちの1つを有し、当該リンカーは、少なくとも30アミノ酸、好ましくは32~50アミノ酸のポリペプチドである。当該単鎖Fab断片は、CLドメインとCH1ドメインとの間の天然ジスルフィド結合によって安定化されている。さらに、これらの単鎖Fab分子は、システイン残基の挿入 (例えば、Kababats のナンバリングに従う可変重鎖の44位および可変軽鎖の100位) による鎖間ジスルフィド結合の生成によって、さらに安定化されてもよい。

【0042】

「クロスオーバー単鎖Fab断片」または「x-scFab」は、抗体重鎖可変ドメイン (VH)、抗体定常ドメイン1 (CH1)、抗体軽鎖可変ドメイン (VL)、抗体軽鎖

10

20

30

40

50

定常ドメイン（CL）およびリンカーからなるポリペプチドであり、当該抗体ドメインおよび当該リンカーは、N末端からC末端方向に次の順序、a）VH-CL-リンカー-VL-CH1およびb）VL-CH1-リンカー-VH-CLのうちの1つを有し、VHとVLは一緒になって、ある抗原に特異的に結合する抗原結合部位を形成し、当該リンカーは、少なくとも30アミノ酸のポリペプチドである。さらに、これらのx-scfab分子は、システイン残基の挿入（例えば、Kabattのナンバリングに従う可変重鎖の44位および可変軽鎖の100位）による鎖間ジスルフィド結合の生成によって、さらに安定化されてもよい。

【0043】

「単鎖可変断片（scFv）」は、10～約25アミノ酸の短いリンカーペプチドを用いて接続された、抗体の重鎖（VH）および軽鎖（VL）の可変領域の融合タンパク質である。リンカーは、通常、柔軟性のためにグリシンが豊富であり、同様に可溶性のためにセリンまたはスレオニンが豊富であり、VHのN末端をVLのC末端に連結することができ、その逆も可能である。このタンパク質は、定常領域の除去およびリンカーの導入にもかかわらず、元の抗体の特性を保持する。scFv抗体は、例えば、Houston, J. S., *Methods in Enzymol.* 203 (1991) 46-96に記載されている。さらに、抗体断片は、VHドメインに特徴的な、すなわちVLドメインと一緒に集合することができる、またはVLドメインに特徴的な、すなわちVHドメインと一緒に集合して機能的抗原結合部位になり、それによって完全長抗体の抗原結合特性を提供することができる、単鎖ポリペプチドを含む。

【0044】

「足場抗原結合タンパク質」は、当該技術分野で既知であり、例えば、フィブロネクチンおよび設計されたアンキリンリピートタンパク質（DARPin）は、抗原結合ドメインの代替的な足場として使用されており、例えば、GebauerおよびSkerra, *Engineered protein scaffolds as next-generation antibody therapeutics. Curr Opin Chem Biol* 13:245-255 (2009) およびStumppら, *Darpins: A new generation of protein therapeutics. Drug Discovery Today* 13:695-701 (2008)を参照されたい。本発明の一態様では、足場抗原結合タンパク質は、CTLA-4（EviBody）、リポカリン（Anticalin）、プロテインA由来分子、例えば、プロテインAのZドメイン（Affibody）、Aドメイン（アビマー／マキシボディ）、血清トランスフェリン（トランスボディ）；設計されたアンキリンリピートタンパク質（DARPin）、抗体軽鎖または重鎖の可変ドメイン（単ドメイン抗体、sdAb）、抗体重鎖の可変ドメイン（ナノボディ、aVH）、VNAR断片、フィブロネクチン（アドネクチン）、C型レクチンドメイン（Tetranectin）；新規抗原受容体ベクターラクタマーゼの可変ドメイン（VNAR断片）、ヒトγクリスタリンまたはユビキチン（Affilin分子）；ヒトプロテアーゼ阻害剤のクニッツ型ドメイン、ミクロボディ、例えば、ノッチンファミリー由来のタンパク質、ペプチドアプタマーおよびフィブロネクチン（アドネクチン）からなる群から選択される。CTLA-4（細胞傷害性Tリンパ球関連抗原4）は、主にCD4⁺T細胞で発現するCD28ファミリー受容体である。その細胞外ドメインは、可変ドメイン様のIg折りたたみを有する。抗体のCDRに対応するループは、異なる結合特性を与えるために、異種配列と置換することができる。異なる結合特異性を有するように操作されたCTLA-4分子も、EviBodyとして知られている（例えば、米国特許第7166697号）。EviBodyは、抗体（例えば、ドメイン抗体）の単離された可変領域とほぼ同じサイズである。さらなる詳細については、*Journal of Immunological Methods* 248 (1-2), 31-45 (2001)を参照されたい。リポカリンは、ステロイド、ピリン、レチノイドおよび脂質などの小さな疎水性分子を輸送する細胞外タンパク質のファミリーである。それらは、異なる標的抗原に結合するように操作することができる円

10

20

30

40

50

錐構造の開口端にいくつかのループを有する剛性ベータシート二次構造を有する。Anticalinは、160～180アミノ酸のサイズであり、リポカリンに由来する。さらなる詳細については、Biochim Biophys Acta 1482:337-350 (2000)、米国特許第7250297号および米国特許出願公開第20070224633号を参照されたい。Affibodyは、抗原に結合するように操作することが可能な、スタフィロコッカス・アウレウス (Staphylococcus aureus) のプロテインAに由来する足場である。ドメインは、約58アミノ酸の3つの螺旋形の束からなる。ライブラリーは、表面残基のランダム化によって作られている。さらなる詳細については、Protein Eng. Des. Sel. 2004、17、455-462および欧州特許第1641818号を参照されたい。アビマーは、Aドメイン足場ファミリーに由来するマルチドメインタンパク質である。約35アミノ酸の天然ドメインは、規定のジスルフィド結合した構造をとる。多様性は、Aドメインのファミリーによって示される自然変動のシャッフリングによって生じる。さらなる詳細については、Nature Biotechnology 23 (12)、1556-1561 (2005) およびExpert Opinion on Investigational Drugs 16 (6)、909-917 (2007年6月)を参照されたい。トランスフェリンは、モノマー血清輸送糖タンパク質である。トランスフェリンは、許容状態の表面ループへのペプチド配列を挿入することによって、異なる標的抗原に結合するように操作することができる。操作されたトランスフェリン足場の例としては、トランスボディが挙げられる。更なる詳細については、J. Biol. Chem 274、24066-24073 (1999)を参照されたい。設計されたアンキリンリピートタンパク質 (DARPin) は、内在性膜タンパク質の細胞骨格への付着を媒介するタンパク質のファミリーであるアンキリンに由来する。単一のアンキリンリピートは、2つの α ヘリックスおよび β ターンからなる33残基のモチーフである。単一のアンキリンリピートは、各反復の第1の α ヘリックスおよび β ターンにおいて残基をランダム化することによって、異なる標的抗原に結合するように操作することができる。その結合界面は、モジュールの数を増やすことによって、増加させることができる (親和性成熟方法)。さらなる詳細については、J. Mol. Biol. 332、489-503 (2003)、PNAS 100 (4)、1700-1705 (2003) およびJ. Mol. Biol. 369、1015-1028 (2007)、ならびに米国特許出願公開第20040132028号を参照されたい。単一ドメイン抗体は、一本の単量体可変抗体ドメインからなる抗体断片である。第1の単一ドメインは、ラクダ由来の抗体重鎖の可変ドメインに由来した (ナノボディまたはV_HH断片)。さらに、単一ドメイン抗体という用語は、自律的なヒト重鎖可変ドメイン (aVH) またはサメ由来V_{NAR}断片を含む。フィブロネクチンは、抗原に結合するように操作することができる足場である。アドネクチンは、ヒトフィブロネクチンIII型 (FN3) の15反復単位の10番目のドメインの天然アミノ酸配列を有する骨格からなる。 β -サンドイッチの片方の端にある3つのループを、アドネクチンが目的の治療標的を特異的に認識することができるように操作することができる。さらなる詳細については、Protein Eng. Des. Sel. 18、435-444 (2005)、米国特許出願公開第20080139791号、国際公開第2005056764号および米国特許第6818418号を参照されたい。ペプチドアプタマーは、定常足場タンパク質、典型的には、活性部位に挿入される拘束された可変ペプチドループを含むチオレドキシン (TrxA) からなるコンビナトリアル認識分子である。さらなる詳細については、Expert Opin. Biol. Ther. 5、783-797 (2005)を参照されたい。マイクロボディは、3～4のシステイン架橋を含む、25～50アミノ酸長の天然に存在するマイクロタンパク質に由来し、マイクロタンパク質の例としては、KallataBIおよびコトキシシンおよびノッチンが挙げられる。マイクロタンパク質は、マイクロタンパク質の全体的な折りたたみに影響を与えることなく、25アミノ酸までを含むように操作することができるループを有する。操作されたノッチンドメインのさらなる詳細については、国際公開第2008098796号を参照されたい。

10

20

30

40

50

【0045】

参照分子と「同じエпитープに結合する抗体」は、競合アッセイにおいて、参照分子のその抗原に対する結合を50%以上遮断する抗原結合分子を指し、逆に、参照分子は、競合アッセイにおいて、抗原結合分子のその抗原に対する結合を50%以上遮断する。参照分子と「同じエпитープに結合しない抗体」は、競争アッセイにおいて、参照分子のその抗原に対する結合を50%以上遮しない抗原結合分子を指し、逆に、参照分子は、競争アッセイにおいて、抗原結合分子のその抗原に対する結合を50%以上遮しない。

【0046】

「抗原結合ドメイン」または「抗原結合部位」という用語は、抗原に特異的に結合し、抗原の一部または全て相補性である領域を含む抗原結合分子の一部を意味する。抗原が大きい場合、抗原結合分子は、抗原の特定の部分のみに結合してもよく、この部分は、エпитープと呼ばれる。抗原結合ドメインは、例えば、1つ以上の可変ドメイン（可変領域とも呼ばれる）によって与えられてもよい。好ましくは、抗原結合ドメインは、抗体軽鎖可変領域（VL）と、抗体重鎖可変領域（VH）とを含む。

10

【0047】

本明細書で使用する場合、「抗原決定基」という用語は、「抗原」および「エпитープ」と同義であり、抗原結合部分－抗原複合体を形成する、抗原結合部分が結合するポリペプチド高分子上の部位（例えば、アミノ酸の連続伸長部または異なる領域の非連続アミノ酸から構成される立体配座構造）を指す。有用な抗原決定基は、例えば、腫瘍細胞表面に、ウイルス感染した細胞表面に、他の疾患細胞表面に、免疫細胞表面に、血清中に遊離状態で、および／または細胞外マトリックス（ECM）内に見出すことができる。別途指定されない限り、本明細書において抗原として有用なタンパク質は、哺乳動物、例えば、霊長類（例えばヒト）および齧歯類（例えば、マウスおよびラット）を含め、任意の脊椎動物源由来の任意の天然形態のタンパク質であってもよい。特定の実施形態では、抗原は、ヒトタンパク質である。本明細書において特定のタンパク質が言及される場合、その用語は、「完全長」のプロセッシングされていないタンパク質だけではなく、細胞内でのプロセッシングから生じる任意の型のタンパク質を包含する。この用語はまた、天然に存在するタンパク質バリエーション、例えば、スプライスバリエーションまたは対立遺伝子バリエーションを包含する。

20

【0048】

「特異的結合」とは、結合が抗原について選択的であり、望ましくないまたは非特異的な相互作用とは区別可能であることを意味する。特定の抗原への抗原結合分子の結合能は、酵素結合免疫吸着法（ELISA）または当業者によく知られているその他の技術（例えば表面プラズモン共鳴（SPR）技術（BIAcore装置での解析）（Liljebladら、Glyco J 17、323-329（2000））および古典的結合アッセイ（Heeley、Endocr Res 28、217-229（2002））のいずれかにより測定することができる。一実施形態では、抗原結合分子の無関係なタンパク質への結合の程度は、例えばSPRによって測定した場合、抗原結合分子の抗原への結合の約10%未満である。特定の実施形態では、抗原に結合する分子は、解離定数（Kd）が、 $\leq 1 \mu\text{M}$ 、 $\leq 100 \text{ nM}$ 、 $\leq 10 \text{ nM}$ 、 $\leq 1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.01 \text{ nM}$ または $\leq 0.001 \text{ nM}$ （例えば、 10^{-8} M 以下、例えば、 $10^{-8} \text{ M} \sim 10^{-13} \text{ M}$ 、例えば、 $10^{-9} \text{ M} \sim 10^{-13} \text{ M}$ ）である。

30

40

【0049】

「親和性」または「結合親和性」は、分子の単一の結合部位（例えば、抗体）と、その結合対（例えば、抗原）との間の非共有結合性相互作用の合計強度を指す。別途指定されない限り、本明細書で使用する場合、「結合親和性」は、結合対（例えば、抗体と抗原）のメンバー間の1:1相互作用を反映する固有の結合親和性を指す。分子Xのその結合対Yに対する親和性は、一般的に、解離定数（Kd）によって表すことができ、脱離速度定数と解離速度定数（それぞれkoffおよびkon）の比である。したがって、速度定数の比率が同じままである限り、同等の親和性は、異なる速度定数を含み得る。親和性は、

50

本明細書に記載するものを含め、当技術分野で一般的な方法によって測定することができる。親和性を測定する特定の方法は、表面プラズモン共鳴（SPR）である。

【0050】

「親和性成熟した」抗体は、1つ以上の超可変領域（HVR）に1つ以上の変更を有する抗体を指し、これに対して、親抗体は、そのような変更を有しておらず、そのような変更によって、抗原に対する抗体の親和性が向上する。

【0051】

本明細書で使用する場合、「腫瘍関連抗原」またはTAAは、標的細胞、例えばがん細胞または腫瘍間質細胞などの腫瘍内の細胞の表面に提示された抗原決定基を指す。特定の実施形態では、標的細胞抗原は、腫瘍細胞の表面上の抗原である。一実施形態では、TAAは、線維芽細胞活性化タンパク質（FAP）、がん胎児性抗原（CEA）、葉酸受容体アルファ（FolR1）、メラノーマ関連コンドロイチン硫酸プロテオグリカン（MCSF）、上皮成長因子受容体（EGFR）、ヒト上皮成長因子受容体2（HER2）およびp95HER2からなる群から選択される。特に、腫瘍関連抗原は線維芽細胞活性化タンパク質（FAP）である。

【0052】

プロリルエンドペプチダーゼFAPまたはセブラーゼ（EC3.4.21）としても知られている「線維芽細胞活性化タンパク質（FAP）」という用語は、別途指定されない限り、霊長類（例えば、ヒト）、非ヒト霊長類（例えば、カニクイザル）および齧歯類（例えば、マウスおよびラット）などの哺乳動物を含む任意の脊椎動物源に由来する、任意の天然FAPを指す。この用語は、「完全長」のプロセッシングされていないFAP、ならびに細胞内でのプロセッシングから生じた任意の形態のFAPを包含する。この用語は、FAPの天然に存在するバリエーション、例えば、スプライスバリエーションまたは対立遺伝子バリエーションも包含する。一実施形態では、本発明の抗原結合分子は、ヒト、マウスおよび／またはカニクイザルFAPに特異的結合可能である。ヒトFAPのアミノ酸配列は、UniProt（www.uniprot.org）アクセッション番号Q12884（バージョン149、配列番号46）またはNCBI（www.ncbi.nlm.nih.gov/）RefSeq NP_004451.2に示されている。ヒトFAPの細胞外ドメイン（ECD）は、アミノ酸26位から760位まで伸びている。マウスFAPのアミノ酸配列は、UniProtアクセッション番号P97321（バージョン126、配列番号47）またはNCBI RefSeq NP_032012.1に示されている。マウスFAPの細胞外ドメイン（ECD）は、アミノ酸26位から761位まで伸びている。好ましくは、本発明の抗FAP結合分子はFAPの細胞外ドメインに結合している。

【0053】

「可変領域」または「可変ドメイン」という用語は、抗原に対する抗原結合分子の結合に関与する抗体重鎖または軽鎖のドメインを指す。天然の抗体の重鎖および軽鎖の可変ドメイン（それぞれVHおよびVL）は、一般に、類似の構造を有しており、各ドメインは、4つの保存されたフレームワーク領域（FR）および3つの超可変領域（HVR）を含む。例えば、Kindtら、Kuby Immunology、第6版、W. H. Freeman and Co.、page 91（2007）を参照されたい。単一のVHまたはVLドメインは、抗原結合特異性を付与するために十分であり得る。

【0054】

本明細書で使用する場合、「超可変領域」または「HVR」という用語は、配列内で超可変可能であり、抗原結合特異性を決定する抗体可変ドメインの領域、例えば「相補性決定領域」（CDR）の各々を指す。

【0055】

一般に、抗体は6つのCDRを含み、3つがVHにあり（CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3）、3つがVLにある（CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3）。本明細書の例示的なCDRには、以下の、

（a）アミノ酸残基26～32（L1）、50～52（L2）、91～96（L3）、

10

20

30

40

50

26～32 (H1)、53～55 (H2)、および96～101 (H3) に存在する超可変ループ (ChothiaおよびLesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)) ;

(b) アミノ酸残基24～34 (L1)、50～56 (L2)、89～97 (L3)、31～35b (H1)、50～65 (H2)、および95～102 (H3) に存在するCDR (Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、Public Health Service、National Institutes of Health、Bethesda、MD (1991)) ; ならびに

(c) アミノ酸残基27c～36 (L1)、46～55 (L2)、89～96 (L3)、30～35b (H1)、47～58 (H2)、および93～101 (H3) に存在する抗原接触部位 (MacCallumら、J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996)) が含まれる。

【0056】

別途指定されない限り、CDRは、上掲のKabatらに従い決定される。当業者は、CDRの表記は、上掲のChothia、上掲のMacCallum、または任意の他の科学的に認められた命名システムに従い決定することもできることを理解する。

【0057】

「フレームワーク」または「FR」は、相補性決定領域 (CDR) 以外の可変ドメイン残基を指す。可変ドメインのFRは、一般に、4つのFRドメイン、FR1ドメイン、FR2ドメイン、FR3ドメイン、およびFR4ドメインからなる。したがって、CDRおよびFR配列は、一般に、VH (またはVL) 中で以下の配列、FR1-CDR-H1 (CDR-L1)-FR2-CDR-H2 (CDR-L2)-FR3-CDR-H3 (CDR-L3)-FR4で現れる。

【0058】

「キメラ」抗体という用語は、重鎖および／または軽鎖の一部が、特定の供給源または種に由来し、一方、重鎖および／または軽鎖の残りが、異なる供給源または種に由来する抗体を指す。

【0059】

抗体の「クラス」は、その重鎖が有する定常ドメインまたは定常領域の種類を指す。抗体には5つの主なクラス、IgA、IgD、IgE、IgGおよびIgMが存在し、これらのいくつかは、サブクラス (アイソタイプ)、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2にさらに分けられてもよい。異なるクラスの免疫グロブリンに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、 α 、 δ 、 ϵ 、 γ および μ と呼ばれる。

【0060】

「ヒト化」抗体は、非ヒトHVRからのアミノ酸残基およびヒトFRからのアミノ酸残基を含むキメラ抗体を指す。特定の実施形態では、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含み、HVR (例えばCDR) の全てまたは実質的に全てが、非ヒト抗体に対応し、FRの全てまたは実質的に全てが、ヒト抗体に対応する。ヒト化抗体は、任意に、ヒト抗体由来の抗体定常領域の少なくとも一部を含んでもよい。抗体、例えば、非ヒト抗体の「ヒト化形態」は、ヒト化を受けた抗体を指す。本発明に包含される「ヒト化抗体」の他の形態は、特にC1q結合および／またはFc受容体 (FcR) 結合に関して、本発明による特性を生み出すために定常領域が元の抗体の定常領域からさらに修飾または変更されたものである。

【0061】

「CH1ドメイン」という用語は、おおよそEU位置118からEU位置215まで延びる抗体重鎖ポリペプチドの部分を表す (KabatによるEUN numberingシステム)。一態様では、CH1ドメインは、ASTKGPSPVFP LAPSSKSTSG GT AALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQS

10

20

30

40

50

S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D
K K V (配列番号48)のアミノ酸配列を有する。通常、E P K S C (配列番号49)の
アミノ酸配列を有するセグメントは、続いてC H 1ドメインをヒンジ領域に連結する。

【0062】

「ヒンジ領域」という用語は、野生型抗体重鎖においてC H 1ドメインとC H 2ドメインとを結合する抗体重鎖ポリペプチドの一部(例えば、K a b a tのE Uナンバースystemにより、約216位から約230位まで、または約226位から約230位まで)を表す。他のI g Gサブクラスのヒンジ領域は、I g G 1サブクラス配列のヒンジ領域システイン残基と整列させることによって決定することができる。ヒンジ領域は、通常、同一のアミノ酸配列を有する2つのポリペプチドからなる二量体分子である。ヒンジ領域は、一般に、25個までのアミノ酸残基を含み、柔軟であり、関連する標的結合部位が独立して動くことを可能にする。ヒンジ領域は、上部、中央、および下部ヒンジドメイン(例えば、R o u xら、J. Immunol. 161 (1998) 4083を参照されたい)の3つのドメインに細分することができる。一態様では、ヒンジ領域はアミノ酸配列D K T H T C P X C P (配列番号50)を有し、XはSまたはPのいずれかである。一態様では、ヒンジ領域はアミノ酸配列H T C P X C P (配列番号51)を有し、XはSまたはPのいずれかである。一態様では、ヒンジ領域はアミノ酸配列C P X C P (配列番号52)を有し、XはSまたはPのいずれかである。

【0063】

「F cドメイン」または「F c領域」という用語は、本明細書において、定常領域の少なくとも一部を含む抗体重鎖のC末端領域を定義するために使用される。この用語には、天然配列F c領域およびバリエーションF c領域が含まれる。I g G F c領域は、I g G C H 2およびI g G C H 3ドメインを含む。ヒトI g G F c領域の「C H 2ドメイン」は、通常、約231位のアミノ酸残基から、約340位のアミノ酸残基に及ぶ。(K a b a tによるE Uナンバリングシステム)。一態様では、C H 2ドメインは、A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V W D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q E S T Y R W S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K (配列番号53)のアミノ酸配列を有する。C H 2ドメインは、他のドメインと密接に対になっていないという点で特有である。むしろ、2つのN結合型分枝炭水化物鎖が、インタクトな天然F c領域の2つのC H 2ドメインの間に挟まれている。炭水化物がドメインドメイン対合の代替を提供し、C H 2ドメインを安定させるのに役立ち得ることが推測されている。B u r t o n、M o l. Immunol. 22 (1985) 161-206。一実施形態では、C H 2ドメインに炭水化物鎖が結合している。本明細書におけるC H 2ドメインは、天然配列C H 2ドメインであってもよく、またはバリエーションC H 2ドメインであってもよい。「C H 3ドメイン」は、F c領域中のC H 2ドメインに対するC末端側の残基のストレッチ(すなわち、I g GのK a b a tによるE Uナンバリングシステムに従って、約341位のアミノ酸残基から約447位のアミノ酸残基まで)を含む。一態様では、C H 3ドメインは、G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G (配列番号54)のアミノ酸配列を有する。本明細書におけるC H 3領域は、天然配列C H 3ドメインであってもよく、またはバリエーションC H 3ドメイン(例えば、その一方の鎖に「突起」(「ノブ」)が導入され、そのもう一方の鎖に対応する「空洞」(「ホール」)が導入されたC H 3ドメイン;本明細書において参照により明示的に援用される米国特許第5821333号を参照されたい)でもよい。そのようなバリエーションC H 3ドメインを使用して、本明細書に記載される2つの同一ではない抗体重鎖のヘテロ二量体化を促進し得る。一実施形態では、ヒトI g G重鎖F c領域は、C y s 226から、またはP r o 230から、重鎖のカルボキシル末端までに及ぶ。しかしながら、F c領域のC末端リジン(L y s 447)は、存在してもしなくてもよい。本明細書において別段の指定がない

10

20

30

40

50

限り、Fc領域または定常領域におけるアミノ酸残基のナンバリングは、Kabatら、*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991に記載されているような、EUインデックスとも呼ばれるEUNナンバリングシステムに従う。

【0064】

「野生型Fcドメイン」という用語は、自然界で見出されるFcドメインのアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を意味する。野生型ヒトFcドメインとしては、天然ヒトIgG1 Fc領域（非AおよびAアロタイプ）、天然ヒトIgG2 Fc領域、天然ヒトIgG3 Fc領域および天然ヒトIgG4 Fc領域ならびにその天然起源のバリエーションが挙げられる。野生型Fc領域は、配列番号55（IgG1、コーカサス型アロタイプ）、配列番号56（IgG1、アフロアメリカン型アロタイプ）、配列番号57（IgG2）、配列番号58（IgG3）および配列番号59（IgG4）に示される。「バリエーション（ヒト）Fcドメイン」という用語は、少なくとも1つの「アミノ酸変異」によって「野生型」（ヒト）Fcドメインアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を示す。一態様では、バリエーションFc領域は、天然Fc領域と比較して少なくとも1つのアミノ酸変異、例えば約1～約10個のアミノ酸変異、一態様では天然Fc領域中に約1～約5個のアミノ酸変異を有する。一態様では、（バリエーション）Fc領域は、野生型Fc領域と少なくとも約95%の相同性を有する。

【0065】

「ノブ・イントゥ・ホール」技術は、例えば、米国特許第5,731,168号；同第7,695,936号；Ridgwayら、*Prot Eng* 9,617-621（1996）およびCarter、*J Immunol Meth* 248,7-15（2001）に記載されている。一般に、この方法は、突起（「ノブ」）を第1のポリペプチドの界面に導入し、対応する空洞「ホール」を第2のポリペプチドの界面に導入し、これによって、突起が空洞内に位置付けられ、それによりヘテロ二量体形成を促進し、ホモ二量体形成を妨げることを伴う。突起は、第1のポリペプチドの界面にある小さなアミノ酸側鎖をより大きな側鎖（例えば、チロシンまたはトリプトファン）と置き換えることによって構築される。突起に対して同一または同様のサイズの代償的な空洞は、大きなアミノ酸側鎖を小さなアミノ酸側鎖（例えば、アラニンまたはスレオニン）に置き換えることによって、第2のポリペプチドの界面に作り出される。突起および空洞は、ポリペプチドをコードする核酸を改変することによって、例えば、部位特異的変異誘発によって、またはペプチド合成によって作製することができる。具体的な実施形態では、ノブ修飾は、Fcドメインの2つのサブユニットのうちの1つにアミノ酸置換T366Wを含み、ホール修飾は、Fcドメインの2つのサブユニットのうち他方の1つにアミノ酸置換T366S、L368AおよびY407Vを含む。さらに具体的な実施形態では、ノブ修飾を含むFcドメインのサブユニットは、アミノ酸置換S354Cをさらに含み、ホール修飾を含むFcドメインのサブユニットは、アミノ酸置換Y349Cをさらに含む。これら2つのシステイン残基の導入によってFc領域の2つのサブユニット間にジスルフィド架橋が形成され、それにより二量体をさらに安定化させる（Carter、*J Immunol Methods* 248,7-15（2001））。

【0066】

「免疫グロブリンのFc領域に相当する領域」は、免疫グロブリンのFc領域の天然に存在する対立遺伝子バリエーション、ならびに置換、付加、または欠失を生成するが、免疫グロブリンのエフェクター機能（抗体依存性細胞傷害性など）を媒介する能力を実質的に低下させない変更を有するバリエーションを含むことを意図している。例えば、1つ以上のアミノ酸を、生物学的機能を実質的に損なうことなく、免疫グロブリンのFc領域のN末端またはC末端から欠失させることができる。このようなバリエーションは、活性に対して最小限の影響を有するように、当技術分野で知られた一般的な規則に従って選択することができ

る（例えば、Bowie, J. U. ら、Science 247:1306-10 (1990) を参照されたい）。

【0067】

「エフェクター機能」という用語は、抗体アイソタイプによって変わる、抗体のFc領域に起因する生体活性を指す。抗体エフェクター機能の例としては、C1q結合および補体依存性細胞傷害(CDC)、Fc受容体結合；抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)、抗体依存性細胞食作用(ADCP)、サイトカイン分泌、抗原提示細胞による免疫複合体媒介抗原取り込み、細胞表面受容体（例えば、B細胞受容体）の下方制御、およびB細胞の活性化が挙げられる。

【0068】

Fc受容体結合依存性エフェクター機能は、抗体のFc領域と、造血細胞上の特殊な細胞表面受容体であるFc受容体(FcR)との相互作用により媒介され得る。Fc受容体は、免疫グロブリンスーパーファミリーに属し、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性(ADCC)を介した、免疫複合体の食作用による抗体でコーティングされた病原体の除去と、対応する抗体でコーティングされた赤血球および種々の他の細胞標的（例えば、腫瘍細胞）の溶解との両方を媒介することが示されている（例えば、Van de Winkel, J. G. およびAnderson, C. L.、J. Leukoc. Biol. 49 (1991) 511-524を参照されたい）。FcRは、免疫グロブリンアイソタイプに対するその特異性により定義される。IgG抗体に対するFc受容体は、FcγRと呼ばれる。Fc受容体結合は、例えばRavetch, J. V. およびKinet, J. P.、Annu. Rev. Immunol. 9 (1991) 457-492；Capel, P. J. ら、Immunomethods 4 (1994) 25-34；de Haas, M. ら、J. Lab. Clin. Med. 126 (1995) 330-341；およびGessner, J. E. ら、Ann. Hematol. 76 (1998) 231-248に記載されている。

【0069】

IgG抗体(FcγR)のFc領域に対する受容体の架橋は、ファゴサイトーシス、抗体依存性細胞傷害、および炎症性メディエータの放出、ならびに免疫複合体のクリアランスおよび抗体産生の制御を含む、多種多様なエフェクター機能を誘発する。ヒトにおいて、FcγRの3クラスが以下のように特徴付けられている。

【0070】

FcγRI(CD64)は、高い親和性で単量体IgGを結合し、マクロファージ、単球、好中球および好酸球上に発現する。アミノ酸残基E233~G236、P238、D265、N297、A327、およびP329(Kabat EUインデックスによるナンバリング)の少なくとも1つにおけるFc領域IgGの修飾がFcγRIへの結合を低減させる。IgG1およびIgG4へと置換された233~236位のIgG2残基は、FcγRIへの結合を103倍低減させ、抗体感作赤血球に対するヒト単球応答を排除し(Armour, K. L. ら、Eur. J. Immunol. 29 (1999) 2613-2624)、

-FcγRII(CD32)は、複合体化したIgGを中等度から低い親和性で結合し、広範に発現する。この受容体は、2つのサブタイプであるFcγRIIAおよびFcγRIIBに分けることができる。FcγRIIAは、殺傷に関与する多くの細胞（例えば、マクロファージ、単球、好中球）に見られ、殺傷プロセスを活性化することができるようである。FcγRIIBは、阻害プロセスにおいて役割を果たすようであり、B細胞、マクロファージ、ならびにマスト細胞および好酸球に見られる。B細胞上では、FcγRIIBは、さらなる免疫グロブリンの産生および例えばIgEクラスへのアイソタイプスイッチングを抑制するよう機能するようである。マクロファージ上では、FcγRIIBは、FcγRIIAによって媒介される食作用を阻害するように働く。好酸球およびマスト細胞上では、B形態は、その別の受容体に結合しているIgEを介して、これらの細胞の活性化を抑制するのに役立つ可能性がある。FcγRIIAに対する結合の低減は、例え

10

20

30

40

50

ば、少なくとも1つのアミノ酸残基 E 2 3 3 ~ G 2 3 6、P 2 3 8、D 2 6 5、N 2 9 7、A 3 2 7、P 3 2 9、D 2 7 0、Q 2 9 5、A 3 2 7、R 2 9 2 および K 4 1 4 (K a b a t E U インデックスによるナンバリング) において変異を有する I g G F c 領域を含む抗体で見られる。

【0071】

F c γ R I I I (C D 1 6) は、中等度から低い親和性で I g G と結合し、2つのタイプとして存在する。F c γ R I I I A は、NK 細胞、マクロファージ、好酸球ならびにいくつかの単球および T 細胞上で見られ、A D C C を媒介する。F c γ R I I I B は、好中球で多く発現する。F c γ R I I I A に対する結合の低減は、例えば、少なくとも1つのアミノ酸残基 E 2 3 3 - G 2 3 6、P 2 3 8、D 2 6 5、N 2 9 7、A 3 2 7、P 3 2 9、D 2 7 0、Q 2 9 5、A 3 2 7、S 2 3 9、E 2 6 9、E 2 9 3、Y 2 9 6、V 3 0 3、A 3 2 7、K 3 3 8 および D 3 7 6 (K a b a t E U インデックスによるナンバリング) において変異を有する I g G F c 領域を含む抗体で見られる。

10

【0072】

F c 受容体に対するヒト I g G 1 上の結合部位のマッピング、上述の変異部位、ならびに F c γ R I および F c γ R I I A への結合を測定するための方法は、S h i e l d s , R . L . ら、J . B i o l . C h e m . 2 7 6 (2 0 0 1) 6 5 9 1 - 6 6 0 4 において説明されている。

【0073】

「A D C C」または「抗体依存性細胞傷害」という用語は、F c 受容体結合によりもたらされる機能であり、エフェクター細胞の存在下での、本明細書で報告される抗体による標的細胞の溶解を指す。A D C C を媒介する初期工程を誘発する抗体の能力は、F c γ R I および / もしくは F c γ R I I A または (本質的に F c γ R I I I A を発現する) NK 細胞を組み換えにより発現する細胞などの、F c γ 受容体を発現する細胞への、抗体の結合を測定することにより調査される。特に、NK 細胞上での F c γ R への結合が測定される。

20

【0074】

「活性化 F c 受容体」は、抗体の F c 領域による係合の後に、エフェクター機能を発揮するために受容体を含む細胞を刺激するシグナル伝達事象を誘発する F c 受容体である。活性化 F c 受容体としては、F c γ R I I I a (C D 1 6 a)、F c γ R I (C D 6 4)、F c γ R I I a (C D 3 2) および F c α R I (C D 8 9) が挙げられる。特定の活性化 F c 受容体は、ヒト F c γ R I I I a である (U n i P r o t アクセッション番号 P 0 8 6 3 7、バージョン 1 4 1 を参照されたい)。

30

【0075】

本明細書で使用する場合、「I F N G」という用語は、組換え産生されたポリペプチド、合成的に産生されたポリペプチド、ならびに T リンパ球および NK 細胞および他の供給源からなどの細胞または組織から単離された I F N G を含む、任意のインターフェロンガンマポリペプチドを指す。任意の供給源から単離される場合、または産生される場合、I F N G ポリペプチドは、長さが不均一であってもよく、典型的には、1 2 4 ~ 1 4 6 アミノ酸長の範囲であってもよい。不均一性は、典型的には、N 末端では C y s - T y r - C y s アミノ酸の翻訳後除去により、および C 末端では可変タンパク質分解プロセッシングにより両方の末端で観察される。不均一性はまた、ポリペプチドの N - グリコシル化に起因して生じ得る。I F N G ポリペプチドの不均一性は、I F N G ポリペプチドの供給源に応じて異なり得る。したがって、I F N G ポリペプチドへの言及は、産生されたまたは単離された不均一な集団を指す。

40

【0076】

I F N G は、ウイルス感染またはがん性増殖に応答して分泌されるサイトカインである。I F N G は、T 細胞クラス I および I I の M H C 抗原発現、F c 受容体、ならびにマクロファージを調節する。I F N G シグナルは、2つの異なる鎖、I F N G 受容体結合サブユニット (I F N G R、I F N G R 1) および膜貫通補助因子 (I F N G R 2) からなる

50

多量体受容体複合体を介して伝達される。IFNGシグナル伝達複合体は、IFNG受容体のリガンド駆動二量体化の際に形成される。本明細書で使用する場合、「IFNGポリペプチド」という用語は、必要に応じて、その単量体形態または二量体形態を含んでもよい。本明細書で使用する場合、「ヒトIFNG」(huIFNG)という用語は、IFNG、対立遺伝子バリエーションアイソフォーム、合成分子、ヒト組織および細胞から単離されたタンパク質、ならびにそれらの改変形態を含み、例示的なヒト野生型IFNGポリペプチドを配列番号60に示す。本明細書で使用する場合、「マウスIFNG」(muIFNG)という用語は、IFNG、対立遺伝子バリエーションアイソフォーム、合成分子、マウスの組織および細胞から単離されたタンパク質、ならびにそれらの改変形態を含み、例示的なマウス野生型IFNGポリペプチドを配列番号61に示す。

10

【0077】

本明細書で使用する場合、「IFNGバリエーションポリペプチド」という用語は、野生型IFNGポリペプチドのアミノ酸配列と比較して、1つ以上のアミノ酸が切断されている、および／またはアミノ酸の置換、欠失または挿入が存在する単量体IFNGポリペプチドを指す。

【0078】

「抗IFNG抗体」、「抗IFNG」、「IFNG抗体」および「IFNGに特異的に結合する抗体」という用語は、抗体または抗体断片がIFNGを標的とする際の診断薬および／または治療薬として有用であるように十分な親和性でIFNGに特異的に結合する抗体または抗体断片を指す。IFNGを含む分子と会合する場合、抗IFNG抗体は、その分子のマスキング部分として機能することができる。サイトカインの活性を遮断することができる、IFNGに特異的なscFvが、本明細書中に具体的に開示される。一態様では、無関係な非IFNGタンパク質に対する抗IFNG抗体の結合の程度は、例えば、ラジオイムノアッセイ(RIA)またはフローサイトメトリー(FACS)によって測定する場合、IFNGに対する抗体の結合の約10%未満である。一定の実施形態では、IFNGに結合する抗体は、 $\leq 1 \mu\text{M}$ 、 $\leq 100 \text{ nM}$ 、 $\leq 10 \text{ nM}$ 、 $\leq 1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.01 \text{ nM}$ または $\leq 0.001 \text{ nM}$ (例えば 10^{-6} M 以下、例えば $10^{-6.8} \text{ M} \sim 10^{-1.3} \text{ M}$ 、例えば $10^{-8} \text{ M} \sim 10^{-1.0} \text{ M}$)の解離定数(K_D)を有する。一態様では、抗IFNG抗体は抗体断片、特にscFvである。

20

【0079】

「リンカー」または「ペプチドリンカー」という用語は、1つ以上のアミノ酸、典型的には約2~30アミノ酸を含むペプチドを指す。ペプチドリンカーは、当技術分野で知られているか、または本明細書に記載される。好適な非免疫原性リンカーペプチドは、例えば、 $(G_4S)_n$ 、 $(SG_4)_n$ または $G_4(SG_4)_n$ ペプチドリンカーであり、式中、「n」は一般に1~10、典型的には2~5、特に3の数であり、すなわち、ペプチドは、GGGGS(配列番号62)、GGGGSGGGGS(配列番号63)、SGGGGS(配列番号64)、GGGGSGGGGS(配列番号65)、 $(G_4S)_3$ (配列番号66)、 $(G_4S)_4$ (配列番号67)および $(G_4S)_5$ (配列番号68)、GGGGSGGGGS(配列番号69)、およびGGGGSGGG(配列番号72)からなる群から選択されるが、LEVLFGQ(配列番号73)またはGGGGSGGGGS(配列番号74)などのペプチドリンカーもまた含む。特に興味深いペプチドリンカーは、プロテアーゼ切断可能リンカー(「切断可能リンカー」)GGGGSGGGGS(配列番号70)またはGGGGSGGGGS(配列番号71)である。「切断不可能なリンカー」は、プロテアーゼによって認識されず、タンパク質分解に対して安定なペプチドリンカーである。

30

40

【0080】

本出願で使用する場合、「アミノ酸」という用語は、アラニン(3文字コード:ala、1文字コード:A)、アルギニン(arg、R)、アスパラギン(asn、N)、アス

50

パラギン酸 (asp、D)、システイン (cys、C)、グルタミン (gln、Q)、グルタミン酸 (glu、E)、グリシン (gly、G)、ヒスチジン (his、H)、イソロイシン (ile、I)、ロイシン (leu、L)、リジン (lys、K)、メチオニン (met、M)、フェニルアラニン (phe、F)、プロリン (pro、P)、セリン (ser、S)、トレオニン (thr、T)、トリプトファン (trp、W)、チロシン (tyr、Y) およびバリン (val、V) を含む天然に存在するカルボキシ α -アミノ酸の群を表す。

【0081】

「融合している」または「連結している」とは、構成成分（例えば、抗体の重鎖と Fab 断片）が、直接または1つ以上のペプチドリンカーを介して、ペプチド結合によって連結されていることを意味する。

【0082】

参照ポリペプチド（タンパク質）配列に対する「パーセント（%）アミノ酸配列同一性」は、最大パーセント配列同一性を達成するために、必要に応じて配列をアライメントさせ、ギャップを導入した後、配列同一性の一部として保存的置換を考慮せず、アライメントの目的のために配列同一性の一部として保存的置換を考慮しない、参照ポリペプチド配列中のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセンテージとして定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを決定するためのアライメントは、当分野の技術範囲内にある種々の方法、例えば、BLAST、BLAST-2、Clustal W、Megalign (DNASTAR) ソフトウェアまたはFASTAプログラムパッケージなどの公的に入受可能なコンピュータソフトウェアを使用して達成することができる。当業者であれば、比較される配列の全長にわたって最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、配列のアラインメントのための適切なパラメータを決定することができる。代替的に、同一性パーセント値は、配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を使用して生成することができる。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムは、Genentech, Inc. によって作成され、ソースコードは、米国著作権局、Washington D. C.、20559にユーザドキュメントと共に提出され、ここで米国著作権登録番号TXU510087で登録され、国際公開第2001/007611号に記載されている別途指定されない限り、本明細書における目的のために、アミノ酸配列同一性パーセント値は、FASTAパッケージバージョン36.3.8cのggsearchプログラムを使用して、またはその後のBLOSUM50比較マトリックスを用いて作成される。FASTAプログラムパッケージは、W. R. PearsonおよびD. J. Lipman (1988)、「Improved Tools for Biological Sequence Analysis」、PNAS 85:2444-2448; W. R. Pearson (1996)「Effective protein sequence comparison」Meth. Enzymol. 266:227-258; およびPearsonら (1997) Genomics 46:24-36により書かれ、www.fasta.bioch.virginia.edu/fastawww2/fastadown.shtmlまたはwww.ebi.ac.uk/Tools/sss/fastaから一般に入手可能である。代替的に、fasta.bioch.virginia.edu/fastawww2/index.cgiでアクセス可能な公的なサーバーを使用して、ggsearch(global protein:protein)プログラムおよびデフォルトオプション(BLOSUM50; オープン:-10; ext:-2; Ktup=2)を用いて配列を比較し、ローカルではなくグローバルのアラインメントを確実に実行することができる。アミノ酸同一性パーセントは、出力アラインメントヘッダに記載される。

【0083】

特定の実施形態では、本明細書で提供される二重特異性抗原結合分子のアミノ酸配列バリエーションが企図される。例えば、TNFリガンド三量体含有抗原結合分子の結合親和性、および／または他の生物学的性質を改善するのが望ましい場合がある。TNFリガンド三

10

20

30

40

50

量体含有抗原結合分子のアミノ酸配列バリエーションは、分子をコードするヌクレオチド配列に適切な改変を導入することによって、またはペプチド合成によって調製され得る。そのような改変としては、例えば、抗体のアミノ酸配列内の残基からの欠失および／または抗体のアミノ酸配列内の残基への挿入および／または抗体のアミノ酸配列内の残基の置換が挙げられる。欠失、挿入および置換の任意の組み合わせは、最終的な構築物が、所望の特性、例えば、抗原結合を有する限り、最終的な構築物に到達するように行うことができる。置換による変異誘発のための目的の部位には、HVRおよびフレームワーク（FR）が含まれる。保存的置換は、「好ましい置換」の見出しで表Bに与えられており、アミノ酸側鎖クラス（1）～（6）を参照して以下にさらに記載される。アミノ酸置換を目的の分子に導入し、生成物を所望の活性、例えば、抗原結合の保持／改善、免疫原性の低減、またはADCCもしくはCDCの改善についてスクリーニングしてもよい。

10

【0084】

【表1】

表A

元の残基	例示的な置換	好ましい置換
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; ノルロイシン	Leu
Leu (L)	ノルロイシン; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; ノルロイシン	Leu

20

30

40

【0085】

アミノ酸は、一般的な側鎖特性に従って分類され得る。

- (1) 疎水性：ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile
- (2) 中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln
- (3) 酸性：Asp、Glu
- (4) 塩基性：His、Lys、Arg
- (5) 鎖配向に影響を及ぼす残基：Gly、Pro
- (6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe

【0086】

50

非保存的置換は、これらのクラスのうちの1つのメンバーを別のクラスと交換することを伴う。

【0087】

「アミノ酸配列バリエーション」という用語は、親抗原結合分子（例えば、ヒト化抗体またはヒト抗体）の1つ以上の超可変領域残基中にアミノ酸置換が存在する実質的なバリエーションを含む。一般的に、さらなる試験のために選択され、得られたバリエーションは、親抗原結合分子と比較して、特定の生物学的特性の修飾（例えば、改善）（例えば、親和性の増加、免疫原性の低下）を有し、および／または親抗原結合分子の特定の生物学的特性を実質的に保持する。例示的な置換型バリエーションは、親和性成熟した抗体であり、例えば、本明細書に記載されるようなファージディスプレイに基づく親和性成熟技法を使用して、簡便に生成され得る。簡単に言えば、1つ以上のCDR残基が変異しており、バリエーション抗原結合分子がファージ上に提示され、特定の生物活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングされる。特定の実施形態では、置換、挿入、または欠失は、そのような変更が抗原に結合する抗原結合分子の能力を実質的に低下させない限り、1つ以上のHVR内で生じ得る。例えば、結合親和性を実質的に低減しない保存的变化（例えば、本明細書に提供される保存的置換）がCDR中で行われてよい。変異誘発を標的とし得る抗体の残基または領域の同定のための有用な方法は、Cunningham and Wells (1989) Science, 244:1081-1085によって記載されるように、「アラニンスキャンニング変異誘発」と呼ばれる。この方法では、抗体と抗原との相互作用が影響を受けるかどうかを決定するために、残基または標的残基群（例えば、帯電した残基、例えば、Arg、Asp、His、LysおよびGlu）を同定し、中性または負に帯電したアミノ酸（例えば、アラニンまたはポリアラニン）によって置き換える。さらなる置換を、最初の置換に対する機能的感受性を示すアミノ酸位置に導入してもよい。あるいは、またはこれに加えて、抗体と抗原との間の接触点を同定するための抗原-抗原結合分子複合体の結晶構造。このような接触残基および隣接残基は、置換の候補として標的にしても排除してもよい。バリエーションをスクリーニングして、所望の特性を有するか否かを決定してもよい。

【0088】

アミノ酸配列挿入には、1個の残基から100個以上の残基を含むポリペプチドまでの長さの範囲のアミノ末端および／またはカルボキシル末端融合、ならびに単一または複数のアミノ酸残基の配列内挿入が含まれる。末端挿入の例としては、N末端メチオニル残基を有する、本発明の二重特異性抗原結合分子が挙げられる。分子の他の挿入バリエーションとしては、二重特異性抗原結合分子の血清半減期を増加させるNまたはC末端へのポリペプチドへの融合が挙げられる。

【0089】

特定の態様では、本明細書で提供される二重特異性抗原結合分子は、抗体がグリコシル化される程度を増大させるために、または低下させるために変更される。分子のグリコシル化バリエーションは、1つ以上のグリコシル化部位が作成されるか、または除去されるようにアミノ酸配列を変えることによって、簡便に得られてもよい。TNFリガンド三量体含有抗原結合分子がFc領域を含む場合、それに付着した炭水化物は変化し得る。哺乳動物細胞によって産生された天然型抗体は、典型的には、N結合によってFc領域のCH2ドメインのAsn297に一般に付着される分岐状の二分岐オリゴ糖を含む。例えば、Wrightら、TIBTECH 15:26-32 (1997)を参照されたい。オリゴ糖としては、様々な炭水化物、例えば、マンノース、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、ガラクトース、およびシアル酸、ならびに二分岐オリゴ糖構造の「幹」のGlcNAcに付着したフコースが挙げられ得る。いくつかの実施形態では、TNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子におけるオリゴ糖の修飾は、特定の改善された性質を有するバリエーションを作製するために行われ得る。一態様では、Fc領域に（直接または間接的に）結合したフコースを欠く炭水化物構造を有する、本発明の二重特異性抗原結合分子または抗体のバリエーションが提供される。そのようなフコシル化バリエーションは、改良されたA

DCC機能を有していてもよく、例えば、米国特許出願公開第2003/0157108号(Presta, L.)または米国特許出願公開第2004/0093621号(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)を参照されたい。別の態様では、本発明の二重特異性抗原結合分子または抗体のバリエーションは、例えばFc領域に結合した二分岐オリゴ糖がGlcNAcによって二分割されている、二分割オリゴ糖が提供される。このようなバリエーションは、フコシル化の低下および/またはADCC機能の改善を有していてもよく、例えば、国際公開第2003/011878号(Jean-Mairetら)、米国特許第6,602,684号(Umanaら)および米国特許出願公開第2005/0123546号(Umanaら)を参照されたい。Fc領域に付着したオリゴ糖中に少なくとも1つのガラクトース残基を有するバリエーションも提供される。このような抗体バリエーションは、CDC機能の改善を有していてもよく、例えば、国際公開第1997/30087号(Patelら)、国際公開第1998/58964号(Raju, S.)および国際公開第1999/22764(Raju, S.)に記載されている。

10

20

30

40

50

【0090】

特定の態様では、本発明の二重特異性抗原結合分子のシステイン操作されたバリエーション、例えば、分子の1つ以上の残基がシステイン残基で置換されている「チオMAB」を作製することが望ましい場合がある。特定の態様では、置換された残基は、分子の利用しやすい部位で生じる。これらの残基をシステインで置換することにより、反応性チオール基は、それによって抗体のアクセス可能な部位に配置され、抗体を薬物部位またはリンカー薬物部位などの他の部位にコンジュゲートしてイムノコンジュゲートを作製するために使用され得る。特定の態様では、1つ以上の以下の残基のいずれかがシステインで置換されていてもよい。軽鎖のV205(Kabatナンバリング)、重鎖のA118(EUナンバリング)、および重鎖Fc領域のS400(EUナンバリング)。システイン操作された抗原結合分子は、例えば、米国特許第7,521,541号に記載されるように作製されてもよい。

【0091】

インターフェロンガンマ(IFNG)バリエーションを含む抗原結合分子に関して、本明細書で使用する場合、「プロテアーゼ活性化可能」は、IFNGバリエーションがIFNG受容体に結合する能力を低減または抑止するマスキング部分に起因して、IFNG受容体に結合する能力が低減または抑止されたIFNGバリエーションを含む分子を示す。タンパク質分解性の切断によって、例えば、IFNGバリエーションを含む分子にマスキング部分を接続するリンカーのタンパク質分解的切断によってマスキング部分が解離すると、IFNG受容体への結合が回復し、それによってIFNGバリエーションを活性化することができる。

【0092】

本明細書で使用する場合、「可逆的に隠すこと」は、IFNGバリエーションポリペプチドがその受容体に結合することが防止されるような、IFNGバリエーションポリペプチドへのマスキング部分の結合を指す。この隠すことは、マスキング部分がIFNGバリエーションポリペプチドから、例えば、プロテアーゼ切断によって遊離することができ、それによってIFNGバリエーションポリペプチドが遊離してその受容体に結合することができるという点で可逆的である。

【0093】

本明細書で使用する場合、「プロテアーゼ」または「タンパク質分解酵素」は、認識部位でリンカーを切断し、標的細胞によって発現される任意のタンパク質分解酵素を指す。このようなプロテアーゼは、標的細胞によって分泌されても、例えば標的細胞表面に、標的細胞と会合したまま残ってもよい。プロテアーゼの例としては、メタロプロテイナーゼ、例えばマトリックスメタロプロテイナーゼ1~28およびAジスインテグリンおよびメタロプロテイナーゼ(ADAM)2、7~12、15、17~23、28~30および33、セリンプロテアーゼ、例えばウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子およびマトリプターゼ、システインプロテアーゼ(例えば、カテプシンS)およびマトリックスメタロプロテイナーゼ(例えば、MMP-2およびMMP-9)が挙げられるが、これらに限

定されない。マトリプターゼ、マトリックスメタロプロテイナーゼ 2 (MMP-2、ゼラチナーゼ A) およびマトリックスメタロプロテイナーゼ 9 (MMP-9、ゼラチナーゼ B) は、例えば、乳がんおよび卵巣がんにおいて過剰発現される。MMP-2 および MMP-9 活性は、子宮頸がん、乳がんおよび卵巣がん、上皮性卵巣がん (EOC) 患者の腹水とで検出されたが、これらの患者の血清では検出されなかった (Demeter, A. ら、Anticancer Res. 2005, 25, 2885-2889)。マトリプターゼは正常な上皮細胞で検出できるが、マトリプターゼ活性は主にがんで検出される (Le Beau, A. M. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2013, 110, 93-98)。

【0094】

「核酸」または「ポリヌクレオチド」という用語は、ヌクレオチドのポリマーを含む任意の化合物および／または物質を含む。各ヌクレオチドは、塩基、具体的には、プリン塩基またはピリミジン塩基 (すなわち、シトシン (C)、グアニン (G)、アデニン (A)、チミン (T) またはウラシル (U))、糖 (すなわち、デオキシリボースまたはリボース)、およびリン酸基から構成されている。多くの場合、核酸分子は塩基の配列によって記述され、当該塩基は核酸分子の一次構造 (線状構造) を表す。塩基の配列は、典型的には、5' から 3' に向かって表される。本明細書において、核酸分子という用語は、例えば、相補性 DNA (cDNA) およびゲノム DNA を含むデオキシリボ核酸 (DNA) リボ核酸 (RNA)、特に、メッセンジャー RNA (mRNA)、DNA または RNA の合成形態、およびこれらの分子の 2 つ以上を含む混合ポリマーを包含する。核酸分子は線状または環状であってもよい。さらに、核酸分子という用語は、センス鎖およびアンチセンス鎖、ならびに一本鎖形態および二本鎖形態の両方を含む。さらに、本明細書で記載される核酸分子は、天然に存在するヌクレオチドまたは天然に存在しないヌクレオチドを含むことができる。天然に存在しないヌクレオチドの例としては、誘導体化された糖もしくはリン酸骨格結合または化学的に修飾された残基を有する修飾されたヌクレオチド塩基が挙げられる。核酸分子はまた、インビトロおよび／またはインビボにおいて、例えば宿主または患者において、本発明の抗体を直接発現させるためのベクターとして適している DNA および RNA 分子を包含する。そのような DNA (例えば、cDNA) または RNA (例えば、mRNA) ベクターは、修飾されていなくてもよく、または修飾されていてもよい。例えば、mRNA は、RNA ベクターの安定性および／またはコードされた分子の発現を増強するために化学的に修飾することができ、その結果、mRNA を対象に注入してインビボで抗体を産生することができる (例えば、2017 年 6 月 12 日にオンラインで公開された Stadler ら、Nature Medicine 2017、doi: 10.1038/nm.4356、または欧州特許第 2101823 号を参照されたい)。

【0095】

「単離された」核酸は、その天然環境の構成要素から分離された核酸分子を指す。単離された核酸は、核酸分子を通常含む細胞に含まれる核酸分子を含むが、その核酸分子は、染色体外に、またはその自然の染色体上の位置とは異なる染色体位置に存在している。

【0096】

「二重特異性抗原結合分子または抗体をコードする単離された核酸」とは、二重特異性抗原結合分子または抗体の重鎖および軽鎖 (またはその断片) をコードする 1 つ以上の核酸分子を指し、単一のベクターまたは別々のベクターにそのような核酸分子を含み、そのような核酸分子は宿主細胞内の 1 つ以上の位置に存在する。

【0097】

本発明の参照ヌクレオチド配列と、例えば、少なくとも 95% 「同一」であるヌクレオチド配列を有する核酸またはポリヌクレオチドとは、ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が、参照ヌクレオチド配列の各 100 ヌクレオチドあたり 5 つまでの点変異を含み得ること以外は、参照配列と同一であることを意味する。言い換えると、参照ヌクレオチド配列と少なくとも 95% 同一のヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを得るために、参照配列内のヌクレオチドの 5% までが欠失していてもよく、もしくは別のヌクレオチド

10

20

30

40

50

で置換されていてもよく、または参照配列内の全ヌクレオチドの5%までが、参照配列内へと挿入されていてもよい。参照配列のこのような変更は、参照ヌクレオチド配列の5'もしくは3'末端位置で発生しても、これらの末端位置の間の任意の位置で発生してもよく、参照配列内の残基間に個別に散在しているかまたは参照配列内に1つ以上の連続したグループで散在しているかのいずれかである。実際問題として、任意の特定のポリヌクレオチド配列が、本発明のヌクレオチド配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一であるかどうかは、既知のコンピュータプログラム、例えば、ポリペプチドについて上述したもの（例えば、ALIGN-2）を使用して従来法で決定することができる。

【0098】

「発現カセット」という用語は、標的細胞内の特定の核酸の転写を可能にする一連の特定の核酸エレメントを用いて、組換えまたは合成により生成されたポリヌクレオチドを指す。組み換え発現カセットは、プラスミド、染色体、ミトコンドリアDNA、プラスチドDNA、ウイルス、または核酸断片に組み込むことができる。典型的には、発現ベクターの組み換え発現カセット部分には、他の配列の中でも特に、転写される核酸配列およびプロモーターが含まれる。特定の実施形態では、本発明の発現カセットは、本発明の二重特異性抗原結合分子またはその断片をコードするポリヌクレオチド配列を含む。

【0099】

「ベクター」または「発現ベクター」という用語は、「発現構築物」と同義であり、標的細胞内においてそれが作動可能に結合する特定の遺伝子の発現を導入および誘導するために使用されるDNA分子を指す。この用語は、自己複製する核酸構造としてのベクター、およびベクターが導入された宿主細胞のゲノム内へと組み込まれたベクターを含む。本発明の発現ベクターは、発現カセットを含む。発現ベクターによって、安定したmRNAの多量の転写が可能となる。発現ベクターが標的細胞内部に入ると、遺伝子によってコードされるリボ核酸分子またはタンパク質が、細胞転写および／または翻訳機構によって産生される。一実施形態では、本発明の発現ベクターは、本発明の二重特異性抗原結合分子またはその断片をコードするポリヌクレオチド配列を含む発現カセットを含む。

【0100】

「宿主細胞」、「宿主細胞株」および「宿主細胞培養物」という用語は、互換的に使用され、外因性の核酸が導入されている細胞を指し、そのような細胞の子孫も含む。宿主細胞には、「形質転換体」および「形質転換細胞」が含まれ、これらには、初代形質転換細胞、および継代の数に関係なく、それに由来する子孫が含まれる。子孫は、親細胞と核酸含量が完全に同一でなくてもよく、変異を含んでいてもよい。最初に形質転換された細胞においてスクリーニングまたは選択されたものと同じ機能または生物活性を有する変異子孫が、本明細書に含まれる。宿主細胞は、本発明の二重特異性抗原結合分子を作製するのに使用できる任意の種類の細胞系である。宿主細胞としては、培養細胞、例えば、哺乳動物培養細胞、例えばCHO細胞、BHK細胞、NSO細胞、SP2/O細胞、YO骨髓腫細胞、P3X63マウス骨髓腫細胞、PER細胞、PER.C6細胞またはハイブリドーマ細胞、酵母細胞、昆虫細胞、および植物細胞が挙げられ、ほんの数例を挙げると、トランスジェニック動物、トランスジェニック植物または培養植物もしくは動物組織に含まれる細胞も挙げられる。

【0101】

ある薬剤の「有効量」は、その薬剤が投与される細胞または組織において、ある生理学的変化を引き起こすのに必要な量を指す。

【0102】

薬剤、例えば医薬組成物の「治療有効量」とは、所望の治療的または予防的結果を達成するために、必要な投薬量および期間での有効な量を指す。治療有効量の薬剤は、例えば、疾患の有害作用を除去し、減少させ、遅延させ、最小限にし、または防止する。

【0103】

「個体」または「対象」は、哺乳動物である。哺乳動物としては、家畜（例えば、ウシ

10

20

30

40

50

、ヒツジ、ネコ、イヌおよびウマ）、霊長類（例えば、ヒトおよび非ヒト霊長類、例えばサル）、ウサギ、および齧歯類（例えば、マウスおよびラット）が挙げられるが、これらに限定されない。特に、個体または対象は、ヒトである。

【0104】

「医薬組成物」または「医薬製剤」という用語は、その中に含有される有効成分の生物活性が有効になるような形態であり、医薬組成物が投与される対象にとって許容できないほど毒性であるさらなる成分を含有しない調製物を指す。

【0105】

「薬学的に許容される担体」は、医薬組成物または製剤中の有効成分以外の成分であって、対象にとって非毒性である成分を指す。薬学的に許容される担体としては、緩衝剤、添加物、安定剤、または防腐剤が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0106】

「添付文書」という用語は、治療製品の市販パッケージに通常含まれる説明書で、そのような治療製品の使用に関する適応症、使用、投薬量、投与、併用療法、禁忌および／または警告に関する情報を含む説明書を指すために使用される。

【0107】

本明細書で使用する場合、「処置」（およびその文法的な変形語、例えば、「処置する」または「処置すること」）は、処置される個体において本来の経過を変える試みにおける臨床的介入を指し、予防のために、または臨床病理の経過の間に行うことができる。処置の望ましい効果としては、限定されないが、疾患の発症または再発の予防、症候の緩和、疾患の直接的または間接的な病理学的帰結の縮小、転移の予防、疾患進行速度の低下、疾患状態の改善または緩和、および寛解または予後の改善が挙げられる。いくつかの実施形態では、本発明の分子を使用して、疾患の発症を遅らせるか、または疾患の進行を遅らせる。

20

【0108】

「がん」という用語は、本明細書で使用する場合、増殖性疾患、例えば、リンパ腫、リンパ性白血病、肺がん、非小細胞肺（NSCL）がん、肺胞細胞性肺がん、骨がん、膵臓がん、皮膚がん、頭部または頸部のがん、皮膚または眼内黒色腫、子宮がん、卵巣がん、直腸がん、肛門領域のがん、胃がん、消化器がん、結腸がん、乳がん、子宮がん、卵管癌腫、子宮内膜癌腫、頸部の癌腫、膣の癌腫、陰門の癌腫、ホジキン病、食道がん、小腸がん、内分泌系のがん、甲状腺がん、副甲状腺がん、副腎がん、軟組織の肉腫、尿道のがん、陰茎がん、前立腺がん、膀胱がん、腎臓または尿管のがん、腎細胞癌腫、腎盂癌腫、中皮腫、肝細胞がん、胆管がん、中枢神経系（CNS）の新生物、脊髄軸腫瘍、脳幹神経膠腫、多形性膠芽腫、星状細胞腫、神経鞘腫、上衣腫、髄芽腫、髄膜腫、扁平上皮癌腫、下垂体腺腫およびユーイング肉腫（上述のいずれかのがんの難治性態様を含む）、または上述のがんの1つ以上の組み合わせを指す。

30

【0109】

本明細書で使用する場合、「化学療法剤」という用語は、がんの処置に有用な化学化合物を指す。一態様では、化学療法剤は、代謝拮抗剤である。一態様では、代謝拮抗剤は、アミノプテリン、メトトレキサート、ペメトレキセド、ラルチトレキセド、クラドリビン、クロファラビン、フルダラビン、メルカプトプリン、ペントスタチン、チオグアニン、カペシタビン、シタラビン、フルオロウラシル、フロクスウリジン、およびゲムシタビンからなる群から選択される。特定の一態様では、代謝拮抗剤は、カペシタビンまたはゲムシタビンである。別の態様では、代謝拮抗剤は、フルオロウラシルである。一態様では、化学療法剤は、微小管形成に影響を及ぼす薬剤である。一態様では、微小管形成に影響を及ぼす薬剤は、パクリタキセル、ドセタキセル、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビンデシン、ビノレルビン、タキソテール、エトポシド、およびテニポシドからなる群から選択される。別の態様では、化学療法剤は、シクロホスファミドなどのアルキル化剤である。一態様では、化学療法剤は、トポイソメラーゼII阻害剤などの細胞傷害性抗生物質である。一態様では、トポイソメラーゼII阻害剤は、ドキソルビシンである。

40

50

【0110】

「がん免疫療法に使用するための薬剤」という用語は、免疫系に影響を与えるモノクローナル抗体を含む任意の物質を指す。本明細書中に記載される抗原結合分子は、そのような作用物質と見なされ得る。がん免疫療法に使用するための薬剤は、がんを処置するための抗腫瘍剤として使用することができる。一態様では、当該薬剤としては、抗CTLA4抗体（例えば、イピリマブ）、抗PD1抗体（例えば、ニボルマブまたはペンブロリズマブ）、PD-L1抗体（例えば、アテゾリズマブ、アベルマブまたはデュルバルマブ）、LAG3抗体（例えば、relatlimab）、PD1-LAG3二重特異性抗体およびTIGIT抗体（例えば、チラコルマブ）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0111】

インターフェロンガンマ（IFNG）バリエーションポリペプチドを含有する抗原結合分子
本発明は、腫瘍関連抗原、特に線維芽細胞活性化タンパク質（FAP）に特異的に結合することができ、したがって、FAPに特異的に結合する抗体を新たなIFNGバリエーションポリペプチドホモ二量体と組み合わせるインターフェロンガンマ（IFNG）バリエーションポリペプチドを含有する新たな抗原結合分子を提供する。本明細書中に記載される抗原結合分子は、産生性、安定性、結合親和性、生物活性、標的化効率、低下したシンク効果、優れた薬物動態（PK）特性、低下した毒性、延長された治療域およびそれによる場合により増強された有効性などの特に有利な特性を有する。

【0112】

例示的な抗原結合分子

一態様では、インターフェロンガンマ（IFNG）バリエーションポリペプチドのホモ二量体を含むことによって特徴付けられる抗原結合分子が本明細書中に開示され、IFNGバリエーションポリペプチドは、C末端アミノ酸配列KRKR P（配列番号1）によって特徴付けられる。KRKR Pッチ、すなわち、KRKRのアミノ酸配列（配列番号78）の存在がIFNGの活性のために重要であることが本明細書中では示されている。最近、KRKR Pッチは、細胞外マトリックスのヘパラン硫酸部分へのIFNGの結合に関連し、それによって致命的な全身毒性を防ぐことが確認された（J. Kemnaら、Nature Immunology、2023、24、414-422）。タンパク質分解を回避するために、野生型IFNGのC末端を、IFNGバリエーションポリペプチドの配列がアミノ酸配列KRKR P（配列番号1）で終結するようにプロリンキャップにより安定化した。

【0113】

さらに、抗原結合分子は、腫瘍関連抗原、特にFAPに対する標的化部分を含む。さらに、本明細書中に記載される抗原結合分子は、エフェクター機能を低下させる変異を含むFc領域を含む。エフェクター機能を低下または無効にする変異を含むFc領域の使用により、Fc受容体を介した架橋によって非特異的アゴニズムが防止され、FAP発現細胞のADCCが防止される。本明細書中に記載される抗原結合分子は、典型的には腫瘍間質にある、すなわち腫瘍に近接している標的細胞において免疫応答を選択的に誘導するという点で、従来のIFNGを超える利点を有する。

【0114】

FAP発現細胞の存在下において、本明細書中に記載される抗原結合分子は、MHC IおよびPD L1の発現を上方制御することができる（実施例5）。MHC I発現の上方制御に続いて、抗原結合分子は腫瘍組織中のCD8⁺ T細胞の量を増加させる（実施例5）。さらに、本明細書に記載の抗原結合分子による処置は、免疫浸潤カスケードにとって重要な治療後のCXCL9（T細胞誘引ケモカイン）レベルの増加をもたらす。

【0115】

本明細書において、抗原結合分子であって、

（i）腫瘍関連抗原に特異的に結合する抗体と、

（ii）インターフェロンガンマ（IFNG）バリエーションポリペプチドのホモ二量体であって、IFNGバリエーションポリペプチドが、C末端アミノ酸配列KRKR P（配列番号1）によって特徴付けられる、IFNGバリエーションポリペプチドのホモ二量体と、を含む

10

20

30

40

50

、抗原結合分子が提供される。

【0116】

したがって、(i) 腫瘍関連抗原に特異的に結合する抗体と、(ii) インターフェロンガンマ (IFNG) バリエーションポリペプチドのホモ二量体であって、IFNG バリエーションポリペプチドが、アミノ酸配列 KRKR P (配列番号 1) で C 末端が終結することの特徴とする、IFNG バリエーションポリペプチドのホモ二量体と、を含む、抗原結合分子が提供される。

【0117】

IFNG バリエーションポリペプチドは、C 末端で切断され、タンパク質分解から保護するために C 末端でプロリンで保護される。

【0118】

一態様では、腫瘍関連抗原に特異的に結合する抗体は、線維芽細胞活性化タンパク質 (FAP) に特異的に結合する抗体である。一態様では、FAP に特異的に結合する抗体が、(a) 配列番号 4 のアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域 (CDR-H1)、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む CDR-H2、および配列番号 6 のアミノ酸配列を含む CDR-H3 を含む重鎖可変領域 (V_HFAP)、ならびに配列番号 7 のアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域 (i v) CDR-L1、配列番号 8 のアミノ酸配列を含む CDR-L2、および配列番号 9 のアミノ酸配列を含む CDR-L3 を含む軽鎖可変領域 (V_LFAP)、または (b) 配列番号 12 のアミノ酸配列を含む CDR-H1、配列番号 13 のアミノ酸配列を含む CDR-H2、および配列番号 14 のアミノ酸配列を含む CDR-H3 を含む重鎖可変領域 (V_HFAP)、ならびに配列番号 15 のアミノ酸配列を含む CDR-L1、配列番号 16 のアミノ酸配列を含む CDR-L2、および配列番号 17 のアミノ酸配列を含む CDR-L3 を含む軽鎖可変領域 (V_LFAP) を含む抗原結合分子が提供される。一態様では、FAP に特異的に結合する抗体が、配列番号 10 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V_HFAP) と配列番号 11 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V_LFAP) とを含むか、または配列番号 18 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V_HFAP) と配列番号 19 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V_LFAP) とを含む抗原結合分子が提供される。特定の一態様では、FAP に特異的に結合する抗体が、配列番号 10 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V_HFAP) と配列番号 11 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V_LFAP) とを含む抗原結合分子が提供される。

【0119】

一態様では、抗原結合分子は、Fc ドメイン、特に IgG1 Fc ドメインまたは IgG4 Fc ドメインを含む。一態様では、Fc ドメインは、Fc 受容体に対する抗体の結合親和性および／またはエフェクター機能を低下させる 1 つ以上のアミノ酸置換を含む。一態様では、Fc ドメインは、アミノ酸変異 L234A、L235A および P329G (Kabata E U インデックスによる E U ナンバリング) を有するヒト IgG1 サブクラスのものである。別の態様では、Fc ドメインはマウス Fc ドメインであり、アミノ酸変異 D265A および P329G (Kabata E U インデックスによる E U ナンバリング) を含む。

【0120】

一態様では、抗原結合分子はプロテアーゼ活性化可能であり、プロテアーゼ認識部位およびマスキング部分を含む。したがって、抗原結合分子は、(i) 腫瘍関連抗原に特異的に結合する抗体、(ii) インターフェロンガンマ (IFNG) バリエーションポリペプチドのホモ二量体であって、IFNG バリエーションポリペプチドが、アミノ酸配列 KRKR P (配列番号 1) で C 末端が終結することの特徴とする、IFNG バリエーションポリペプチドのホモ二量体、(iii) プロテアーゼ認識部位および (iv) マスキング部分を含む。

【0121】

プロテアーゼ認識部位

一態様では、プロテアーゼ認識部位は、マトリプターゼの基質である。一態様では、プロテアーゼ認識部位は、アミノ酸配列 PQARK (配列番号 20) または HQARK (配

10

20

30

40

50

列番号 21) を含むかまたはこれからなる。特定の一態様では、プロテアーゼ認識部位は、アミノ酸配列 P Q A R K (配列番号 20) を含むかまたはこれからなる。一態様では、プロテアーゼ認識部位は、マスキング部分を I F N G バリエーションポリペプチドと接続する切断可能なペプチドリンカーの一部である。一態様では、切断可能ペプチドリンカーは、配列番号 70 または配列番号 71 のアミノ酸配列を含み、特定の一態様では、切断可能ペプチドリンカーは、配列番号 70 のアミノ酸配列を含む。

【0122】

一態様では、マスキング部分が、その N 末端において、切断可能なペプチドリンカー (マスク放出フォーマット) を介して I F N G バリエーションポリペプチドの C 末端に融合されている抗原結合分子が提供される。一態様では、I F N G バリエーションポリペプチドは、その N 末端において、安定なリンカーを介して抗体の C 末端に融合される。

10

【0123】

別の態様では、マスキング部分が、その N 末端において、安定なリンカーを介して F c ドメインの C 末端に融合され、その C 末端において、切断可能なペプチドリンカー (サイトカイン放出フォーマット) を介して I F N G バリエーションポリペプチドの N 末端に融合されている抗原結合分子が提供される。

【0124】

マスキング部分

プロテアーゼ活性化可能抗原結合分子は、マスキング部分、特に I F N G バリエーションホモ二量体のための 2 つのマスキング部分を含む。一態様では、マスキング部分は、I F N G バリエーションポリペプチドに特異的に結合し、それをマスクすることができる抗体断片である。特定の一態様では、マスキング部分は、I F N G バリエーションポリペプチドに特異的に結合する s c F v である。

20

【0125】

一態様では、I F N G バリエーションポリペプチドに特異的に結合するマスキング部分、特に s c F v は、

(a) 配列番号 22 のアミノ酸配列を含む C D R - H 1、配列番号 23 のアミノ酸配列を含む C D R - H 2、および配列番号 24 のアミノ酸配列を含む C D R - H 3 を含む重鎖可変領域 (V_H I F N G)、ならびに配列番号 25 のアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域 (i v) C D R - L 1、配列番号 26 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2、および配列番号 27 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3 を含む軽鎖可変領域 (V_L I F N G)、または

30

(b) 配列番号 30 のアミノ酸配列を含む C D R - H 1、配列番号 31 のアミノ酸配列を含む C D R - H 2、および配列番号 32 のアミノ酸配列を含む C D R - H 3 を含む重鎖可変領域 (V_H I F N G)、ならびに配列番号 33 のアミノ酸配列を含む C D R - L 1、配列番号 34 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2、および配列番号 35 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3 を含む軽鎖可変領域 (V_L I F N G) を含む。

【0126】

一態様では、I F N G バリエーションポリペプチドに特異的に結合するマスキング部分、特に s c F v は、(a) 配列番号 28 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V_H I F N G) および配列番号 29 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V_L I F N G)、または (b) 配列番号 36 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V_H I F N G) および配列番号 37 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V_L I F N G) を含む。特定の一態様では、I F N G バリエーションポリペプチドに特異的に結合するマスキング部分、特に s c F v は、(a) 配列番号 28 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V_H I F N G) および配列番号 29 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V_L I F N G) を含む。

40

【0127】

一態様では、I F N G バリエーションポリペプチドに特異的に結合し、I F N G バリエーションポリペプチドをマスクするマスキング部分は、配列番号 38 と少なくとも約 95%、96%、97%、98%、99% または 100% 同一であるアミノ酸配列を含む。一態様では

50

、IFNGバリエーションポリペプチドに特異的に結合するマスキング部分は、配列番号38のアミノ酸配列を含む。

【0128】

別の態様では、IFNGバリエーションポリペプチドに特異的に結合し、IFNGバリエーションポリペプチドをマスクするマスキング部分は、配列番号39と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるアミノ酸配列を含む。一態様では、IFNGバリエーションポリペプチドに特異的に結合するマスキング部分は、配列番号39のアミノ酸配列を含む。

【0129】

マスク放出フォーマットおよびサイトカイン放出フォーマット

一態様では、マスキング部分が、そのN末端において、切断可能なペプチドリンカー（マスク放出フォーマット）を介してIFNGバリエーションポリペプチドのC末端に融合されている抗原結合分子が提供される。一態様では、IFNGバリエーションポリペプチドは、そのN末端において、安定なリンカーを介して抗体のC末端に融合される。フォーマットの概略スキームを図1Dに示す。

【0130】

特定の態様では、本明細書において、IFNGバリエーション体ポリペプチドを含有する抗原結合分子が提供され、当該抗原結合分子は、

配列番号40と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるアミノ酸配列を含む2本の重鎖と、配列番号41と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるアミノ酸配列を含む2本の軽鎖とを含む。一態様では、抗原結合分子は、配列番号40のアミノ酸配列を含む2本の重鎖と、配列番号41のアミノ酸配列を含む2本の軽鎖とを含む。

【0131】

別の特定の態様では、本明細書において、IFNGバリエーション体ポリペプチドを含有する抗原結合分子が提供され、当該抗原結合分子は、

配列番号43と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるアミノ酸配列を含む2本の重鎖と、配列番号44と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるアミノ酸配列を含む2本の軽鎖とを含む。一態様では、抗原結合分子は、配列番号43のアミノ酸配列を含む2本の重鎖と、配列番号44のアミノ酸配列を含む2本の軽鎖とを含む。

【0132】

別の態様では、マスキング部分が、そのN末端において、安定なリンカーを介してFcドメインのC末端に融合され、そのC末端において、切断可能なペプチドリンカー（サイトカイン放出フォーマット）を介してIFNGバリエーションポリペプチドのN末端に融合されている抗原結合分子が提供される。フォーマットの概略スキームを図1Eに示す。

【0133】

特定の態様では、本明細書において、IFNGバリエーション体ポリペプチドを含有する抗原結合分子が提供され、当該抗原結合分子は、

配列番号42と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるアミノ酸配列を含む2本の重鎖と、配列番号41と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるアミノ酸配列を含む2本の軽鎖とを含む。一態様では、抗原結合分子は、配列番号42のアミノ酸配列を含む2本の重鎖と、配列番号41のアミノ酸配列を含む2本の軽鎖とを含む。

【0134】

別の特定の態様では、本明細書において、IFNGバリエーション体ポリペプチドを含有する抗原結合分子が提供され、当該抗原結合分子は、

配列番号45と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるアミノ酸配列を含む2本の重鎖と、配列番号44と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるアミノ酸配列を含む2本の軽鎖と

10

20

30

40

50

を含む。一態様では、抗原結合分子は、配列番号 45 のアミノ酸配列を含む 2 本の重鎖と、配列番号 44 のアミノ酸配列を含む 2 本の軽鎖とを含む。

【0135】

立体的にマスクされた IFNG バリエーションポリペプチドを含むフォーマット

また、本明細書において、抗原結合分子であって、

(i) 腫瘍関連抗原に特異的に結合する抗体と、

(ii) インターフェロンガンマ (IFNG) バリエーションポリペプチドのホモ二量体であって、IFNG バリエーションポリペプチドが、アミノ酸配列 KRKR P (配列番号 1) で C 末端が終結し、IFNG バリエーションポリペプチドが抗体の上部ヒンジ領域と下部ヒンジ領域との間に挿入されることを特徴とする、IFNG バリエーションポリペプチドのホモ二量体と、を含む抗原結合分子が提供される。

10

【0136】

これらの抗原結合分子は、立体的に隠された、すなわち立体的にマスクされた IFNG バリエーションポリペプチドを含むことを特徴とする。

【0137】

一態様では、IFNG バリエーションポリペプチドが、その N 末端において、第 1 のリンカーを介して、腫瘍関連抗原、特に FAP に特異的に結合する Fab ドメインの VHCH1 鎖の C 末端に融合されている、抗原結合分子が提供される。さらに、IFNG バリエーションポリペプチドは、その C 末端において、第 2 のリンカーを介して、N 末端に、Fc ドメインの下部ヒンジ領域に融合される。フォーマットの概略スキームを図 10A に示す。

20

【0138】

一態様では、第 1 のリンカーはグリシン-セリンリンカーである。特定の一態様では、第 1 のリンカーは、配列番号 69 のアミノ酸配列を有する。

【0139】

一態様では、第 2 のリンカーは、グリシン-セリンリンカーまたは切断可能なリンカーである。特定の一態様では、第 2 のリンカーは、配列番号 72、配列番号 73 または配列番号 75 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する。

【0140】

一態様では、下部ヒンジ領域は、配列番号 76 のアミノ酸配列を有する。別の態様では、下側ヒンジ領域が短縮され、配列番号 77 のアミノ酸配列を有する。

30

【0141】

一態様では、本明細書において、IFNG バリエーションポリペプチドを含有する抗原結合分子が提供され、当該抗原結合分子は、

配列番号 119 と少なくとも約 95%、96%、97%、98%、99% または 100% 同一であるアミノ酸配列を含む 2 本の重鎖と、配列番号 41 と少なくとも約 95%、96%、97%、98%、99% または 100% 同一であるアミノ酸配列を含む 2 本の軽鎖とを含む。一態様では、抗原結合分子は、配列番号 119 のアミノ酸配列を含む 2 本の重鎖と、配列番号 41 のアミノ酸配列を含む 2 本の軽鎖とを含む。

【0142】

別の態様では、本明細書において、IFNG バリエーションポリペプチドを含有する抗原結合分子が提供され、当該抗原結合分子は、

配列番号 120 と少なくとも約 95%、96%、97%、98%、99% または 100% 同一であるアミノ酸配列を含む 2 本の重鎖と、配列番号 41 と少なくとも約 95%、96%、97%、98%、99% または 100% 同一であるアミノ酸配列を含む 2 本の軽鎖とを含む。一態様では、抗原結合分子は、配列番号 120 のアミノ酸配列を含む 2 本の重鎖と、配列番号 41 のアミノ酸配列を含む 2 本の軽鎖とを含む。

40

【0143】

別の態様では、本明細書において、IFNG バリエーションポリペプチドを含有する抗原結合分子が提供され、当該抗原結合分子は、

配列番号 121 と少なくとも約 95%、96%、97%、98%、99% または 100

50

%同一であるアミノ酸配列を含む2本の重鎖と、配列番号41と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるアミノ酸配列を含む2本の軽鎖とを含む。一態様では、抗原結合分子は、配列番号121のアミノ酸配列を含む2本の重鎖と、配列番号41のアミノ酸配列を含む2本の軽鎖とを含む。

【0144】

さらに別の態様では、本明細書において、IFNGバリエーション体ポリペプチドを含有する抗原結合分子が提供され、当該抗原結合分子は、

配列番号122と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるアミノ酸配列を含む2本の重鎖と、配列番号41と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるアミノ酸配列を含む2本の軽鎖とを含む。一態様では、抗原結合分子は、配列番号122のアミノ酸配列を含む2本の重鎖と、配列番号41のアミノ酸配列を含む2本の軽鎖とを含む。

【0145】

別の態様では、本明細書において、IFNGバリエーション体ポリペプチドを含有する抗原結合分子が提供され、当該抗原結合分子は、

配列番号123と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるアミノ酸配列を含む2本の重鎖と、配列番号41と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるアミノ酸配列を含む2本の軽鎖とを含む。一態様では、抗原結合分子は、配列番号124のアミノ酸配列を含む2本の重鎖と、配列番号41のアミノ酸配列を含む2本の軽鎖とを含む。

【0146】

Fc受容体の結合および／またはエフェクター機能を低下させるFcドメイン修飾

本発明の抗原結合分子は、第1および第2のサブユニットから構成され、Fc受容体に対する抗原結合分子の結合親和性および／またはエフェクター機能を低下させる1つ以上のアミノ酸置換を含むFcドメインをさらに含む。したがって、1つ以上のアミノ酸修飾が本明細書に提供される抗体のFc領域に導入され、それによって、Fc領域バリエーションが生成され得る。Fc領域バリエーションは、1つ以上のアミノ酸位置にアミノ酸修飾（例えば、置換）を含むヒトFc領域配列（例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4のFc領域）を含み得る。

【0147】

Fcドメインは、本発明の二重特異性抗体に、標的組織への良好な蓄積に寄与する長い血清半減期、望ましい組織－血液分布比を含む、望ましい薬物動態特性を与える。しかしながら、同時に、好ましい抗原を担持する細胞ではなく、Fc受容体を発現する細胞に対する本発明の二重特異性抗体の望ましくない標的化をもたらし得る。したがって、特定の実施形態では、本発明の二重特異性抗体のFcドメインは、天然IgG Fcドメイン、特に、IgG1 FcドメインまたはIgG4 ドメインと比較して、Fc受容体に対する結合親和性の低下および／またはエフェクター機能の低下を示す。より具体的には、FcドメインはIgG1 Fcドメインである。

【0148】

そのような一態様では、Fcドメイン（または当該Fcドメインを含む本発明の二重特異性抗原結合分子）は、天然IgG1 Fcドメイン（または天然IgG1 Fcドメインを含む本発明の二重特異性抗原結合分子）と比較して、Fc受容体に対する結合親和性の50%未満、好ましくは20%未満、より好ましくは10%未満、最も好ましくは5%未満の結合親和性を示し、および／または天然IgG1 Fcドメイン（または天然IgG1 Fcドメインを含む本発明の二重特異性抗原結合分子）と比較して、50%未満、好ましくは20%未満、より好ましくは10%未満、最も好ましくは5%未満のエフェクター機能を示す。一態様では、Fcドメイン（または当該Fcドメインを含む本発明の二重特異性抗原結合分子）は、Fc受容体に実質的に結合せず、および／またはエフェクター機能を誘導しない。特定の態様では、Fc受容体は、Fcγ受容体である。一態様では、Fc受容体は、ヒトFc受容体である。一態様では、Fc受容体は、活性化Fc受容体

である。特定の態様では、Fc受容体は、活性化ヒトFcγ受容体、より具体的にはヒトFcγRIIIa、FcγRIまたはFcγRIIIa、最も具体的にはヒトFcγRIIIaである。一態様では、Fc受容体は、阻害性Fc受容体である。特定の態様では、Fc受容体は、阻害性ヒトFcγ受容体、より具体的には、ヒトFcγRIIBである。一態様では、エフェクター機能は、CDC、ADCC、ADCP、およびサイトカイン分泌のうちの1つ以上である。特定の態様では、エフェクター機能はADCCである。一態様では、Fcドメインのドメインは、天然IgG1 Fcドメインと比較して、新生児Fc受容体(FcRn)に対して実質的に同様の結合親和性を示す。Fcドメイン(または当該Fcドメインを含む本発明の二重特異性抗原結合分子)が、天然IgG1 Fcドメイン(または天然IgG1 Fcドメインを含む本発明の二重特異性抗原結合分子)と比較して、FcRnに対して約70%より大きく、特に約80%より大きく、より詳しくは約90%より大きい結合親和性を示す場合、FcRnに対する実質的に同様の結合が達成される。

10

【0149】

特定の態様では、Fcドメインは、操作されていないFcドメインと比較して、Fc受容体に対する結合親和性が低下し、および／またはエフェクター機能が低下するように操作される。特定の態様では、本発明の二重特異性抗原結合分子のFcドメインは、Fc受容体に対するFcドメインの結合親和性および／またはエフェクター機能を低下させる1つ以上のアミノ酸変異を含む。典型的には、同じ1つ以上のアミノ酸突然変異が、Fcドメインの2つのサブユニットのそれぞれに存在する。一態様では、アミノ酸変異は、FcドメインのFc受容体への結合親和性を低下させる。別の態様では、アミノ酸変異は、Fc受容体に対するFcドメインの結合親和性を、少なくとも2分の1、少なくとも5分の1、または少なくとも10分の1に低下させる。一態様では、操作されたFcドメインを含む本発明の二重特異性抗原結合分子は、操作されていないFcドメインを含む本発明の二重特異性抗体と比較して、20%未満、特に10%未満、より詳しくは5%未満のFc受容体に対する結合親和性を示す。特定の態様では、Fc受容体は、Fcγ受容体である。別の態様では、Fc受容体は、ヒトFc受容体である。一態様では、Fc受容体は、阻害性Fc受容体である。特定の態様では、Fc受容体は、阻害性ヒトFcγ受容体、より具体的には、ヒトFcγRIIBである。いくつかの態様では、Fc受容体は、活性化Fc受容体である。特定の態様では、Fc受容体は、活性化ヒトFcγ受容体、より具体的にはヒトFcγRIIIa、FcγRIまたはFcγRIIIa、最も具体的にはヒトFcγRIIIaである。好ましくは、これらの受容体のそれぞれへの結合が低下する。いくつかの態様では、補体成分に対する結合親和性(具体的には、C1qに対する結合親和性)も低下する。一態様では、新生児Fc受容体(FcRn)への結合親和性は低下しない。Fcドメイン(または当該Fcドメインを含む本発明の二重特異性抗原結合分子)が、FcRnに対するFcドメインの操作されていない形態(またはFcのこの操作されていない形態を含む本発明の二重特異性抗原結合分子)の結合親和性の約70%を超える結合親和性を示す場合、FcRnに対する実質的に同様の結合(すなわち、上記受容体に対するFcドメインの結合親和性の保存)が達成される。Fcドメイン、または当該Fcドメインを含む本発明の二重特異性抗原結合分子は、そのような親和性の約80%より大きく、さらに約90%より大きい親和性を示してもよい。特定の実施形態では、本発明の二重特異性抗原結合分子のFcドメインは、操作されていないFcドメインと比較して、エフェクター機能が低下するように操作される。エフェクター機能の低下としては、補体依存性細胞障害(CDC)の低下、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)の低下、抗体依存性細胞貪食(ADCP)の低下、サイトカイン分泌の低下、抗原提示細胞による免疫複合体媒介性抗原取り込みの低下、NK細胞への結合の低下、マクロファージへの結合の低下、単球への結合の低下、多形核細胞への結合の低下、アポトーシスを誘導する直接シグナル伝達の低下、樹状細胞の成熟の低下、またはT細胞プライミングの減少のうちの1つ以上が挙げられるが、これらに限定されない。

20

30

40

【0150】

50

エフェクター機能が低下した抗体には、Fc領域残基238、265、269、270、297、327および329のうちの1つ以上が置換されたものが含まれる（米国特許第6,737,056号）。そのようなFc変異体は、残基265および297のアラニンへの置換を有するいわゆる「DANA」Fc変異体を含む、アミノ酸265位、269位、270位、297位、および327位のうちの2つ以上に置換を有するFc変異体を含む（米国特許第7,332,581号）。FcRに対する結合が改善または減少した特定の抗体バリエーションが記載されている（例えば、米国特許第6,737,056号；国際公開第2004/056312号、およびShields, R. L.ら、J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604）。

【0151】

本発明の一態様では、Fcドメインは、E233位、L234位、L235位、N297位、P331位およびP329位にアミノ酸置換を含む。いくつかの態様では、Fcドメインは、アミノ酸置換L234AおよびL235A（「LALA」）を含む。そのような一実施形態では、FcドメインはIgG1 Fcドメイン、特にヒトIgG1 Fcドメインである。一態様では、Fcドメインは、P329位にアミノ酸置換を含む。より具体的な態様では、アミノ酸置換は、P329AまたはP329G、特にP329Gである。一実施形態では、Fcドメインは、P329位にアミノ酸置換を含み、E233P、L234A、L235A、L235E、N297A、N297DまたはP331Sからなる群から選択されるさらなるアミノ酸置換を含む。より好ましい態様では、Fcドメインはアミノ酸変異L234A、L235AおよびP329G（「P329G LALA」）を含む。アミノ酸置換の組み合わせ「P329G LALA」は、PCT出願国際公開第2012/130831A1号に記載されるように、ヒトIgG1 FcドメインのFcγ受容体の結合をほぼ完全に消失させる。当該文献はまた、このような変異体Fcドメインを調製する方法およびFc受容体の結合またはエフェクター機能などの特性を決定する方法も記載する。このような抗体は、変異L234AおよびL235A、または変異L234A、L235AおよびP329Gを有するIgG1である（EU index of Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、5th Ed. Public Health Service、National Institutes of Health、Bethesda、MD、1991によるナンバリング）。

【0152】

一態様では、Fcドメインは、IgG4 Fcドメインである。より具体的な実施形態では、Fcドメインは、S228位（Kabatナンバリング）にアミノ酸置換、特にアミノ酸置換S228Pを含むIgG4 Fcドメインである。より具体的な実施形態では、Fcドメインは、アミノ酸置換L235EおよびS228PおよびP329Gを含む、IgG4 Fcドメインである。このアミノ酸置換は、インビボでのIgG4抗体のFabアーム交換を減少させる（Stubenrauchら、Drug Metabolism and Disposition 38、84-91（2010）を参照されたい）。

【0153】

半減期が増加し、母体IgGの胎児への移行を担う新生児Fc受容体（FcRn）への結合が改善された抗体（Guyer, R. L.ら、J. Immunol. 117（1976）587-593、およびKim, J. K.ら、J. Immunol. 24（1994）2429-2434）は、米国特許出願公開第2005/0014934号に記載されている。それらの抗体は、FcRnへのFc領域の結合を改善する1つ以上の置換をFc領域内に有するFc領域を含む。そのようなFcバリエーションとしては、Fc領域残基、238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424または434のうちの1つ以上における置換、例えば、Fc領域残基434の置換を有するものが挙げられる（米国特許第7,371,826号）。Fc領域バリエーションの他の例に関して、Duncan, A. R. およびWinter, G.、Nature 322

10

20

30

40

50

(1988) 738-740; 米国特許第5,648,260号; 米国特許第5,624,821号; および国際公開第94/29351号も参照されたい。

【0154】

Fc受容体への結合は、例えば、ELISAによって、またはBIAcore機器(GE Healthcare)などの標準的な機器を使用する表面プラズモン共鳴(SPR)によって容易に決定することができ、Fc受容体などは組換え発現により得られ得る。好適なそのような結合アッセイを本明細書中に記載する。あるいは、Fc受容体に対するFcドメインまたはFcドメインを含む細胞活性化二重特異性抗原結合分子の結合親和性は、FcγRIIIa受容体を発現するヒトNK細胞などの特定のFc受容体を発現することが知られている細胞株を使用して評価されてもよい。Fcドメイン、またはFcドメインを含む本発明の二重特異性抗原結合分子のエフェクター機能は、当技術分野で公知の方法により測定することができる。ADCCを測定するための好適なアッセイは、本明細書に記載されている。目的の分子のADCC活性を評価するためのインビトロアッセイの他の例は、米国特許第5,500,362号、Hellstromら、Proc Natl Acad Sci USA 83、7059-7063(1986)およびHellstromら、Proc Natl Acad Sci USA 82、1499-1502(1985)、米国特許第5,821,337号、Bruggemannら、J Exp Med 166、1351-1361(1987)に記載される。あるいは、非放射性アッセイ方法を使用してもよい(例えば、フローサイトメトリーのためのACTI(商標)非放射性細胞毒性アッセイ(Cell Technology, Inc., Mountain View, CA)、およびCytotox 96(登録商標)非放射性細胞毒性アッセイ(Promega, Madison, WI))。このようなアッセイに有用なエフェクター細胞としては、末梢血単核球(PBMC)およびナチュラルキラー(NK)細胞が挙げられる。あるいは、またはこれに加えて、目的の分子のADCC活性は、インビボで、例えば、Clynes, R.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95、652-656(1998)に開示されているような動物モデルで評価してもよい。

【0155】

以下のセクションは、Fc受容体結合および/またはエフェクター機能を低下させるFcドメイン修飾を含む本明細書に記載の抗原結合分子の好ましい態様を記載する。一態様では、(i)腫瘍関連抗原に特異的に結合する抗体、および(ii)インターフェロンガンマ(IFNG)バリエーションポリペプチドのホモ二量体であって、IFNGバリエーションポリペプチドが、C末端アミノ酸配列KRKRP(配列番号1)によって特徴付けられる、IFNGバリエーションポリペプチドのホモ二量体と、を含む、抗原結合分子であって、抗原結合分子がIgG1 FcドメインまたはIgG4 Fcドメインを含み、Fcドメインが、Fc受容体に対する抗体の結合親和性および/またはエフェクター機能を低下させる1つ以上のアミノ酸置換を含む、抗原結合分子が提供される。別の態様では、(i)腫瘍関連抗原に特異的に結合する抗体、および(ii)インターフェロンガンマ(IFNG)バリエーションポリペプチドのホモ二量体であって、IFNGバリエーションポリペプチドが、アミノ酸配列KRKRP(配列番号1)でC末端が終結することを特徴とする、IFNGバリエーションポリペプチドのホモ二量体と、を含む、抗原結合分子であって、Fcドメインが、アミノ酸変異L234A、L235AおよびP329Gを有するヒトIgG1サブクラスのものであることを特徴とする、抗原結合分子が提供される(Kabat EUインデックスによるEUNanバーリング)。

【0156】

例示的なIFNGバリエーションポリペプチド

一態様では、アミノ酸配列KRKRP(配列番号1)でC末端が終結することを特徴とするIFNGバリエーションポリペプチドが提供される。KRKRPパッチ、すなわち、KRKRのアミノ酸配列(配列番号78)の存在がIFNGの活性のために重要であることが本明細書中では示されている。タンパク質分解を回避するために、野生型IFNGのC末端を、IFNGバリエーションポリペプチドの配列がアミノ酸配列KRKRP(配列番号1)で

終結するようにプロリンキャップにより安定化した。

【0157】

一態様では、配列番号2のアミノ酸配列を含むかまたはこれからなるIFNGバリエーションポリペプチドが提供される。別の態様では、配列番号3のアミノ酸配列を含むかまたはこれからなるIFNGバリエーションポリペプチドが提供される。

【0158】

また、本明細書において、アミノ酸配列KRKRP（配列番号1）でC末端が終結することを特徴とするIFNGバリエーションポリペプチドの変異または挿入バリエーションが提供される。

【0159】

一態様では、本明細書において、アミノ酸配列KRKRP（配列番号1）でC末端が終結することを特徴とするIFNGバリエーションポリペプチドが提供され、配列番号1におけるアミノ酸の1つまたは2つが、セリン（S）、プロリン（P）およびグルタミン酸（E）からなる群から選択されるアミノ酸で置換されている。したがって、本明細書において、AKTGSRKRP（配列番号137）、AKTGKSKRP（配列番号138）、AKTGKRSRP（配列番号139）、AKTGKRKSP（配列番号134）、AKTGPRKRP（配列番号140）、AKTGKPKRP（配列番号141）、AKTGKRPRP（配列番号142）、AKTGKRPPP（配列番号143）、AKTGERKRP（配列番号144）、AKTGKEKRP（配列番号145）、AKTGKRERP（配列番号146）、AKTGKRKEP（配列番号147）、AKTGSRSRP（配列番号148）、AKTGPRPRP（配列番号149）、AKTGERERP（配列番号150）、AKTGKSKSP（配列番号151）、AKTGKPKPP（配列番号152）、AKTGKEKEP（配列番号153）、AKTGSSSKRP（配列番号154）、AKTGPPKRP（配列番号155）、AKTGEKRP（配列番号156）、AKTGKRSSP（配列番号157）、AKTGKRPPP（配列番号158）およびAKTGKREEP（配列番号159）からなる群から選択されるアミノ酸配列でC末端が終結することを特徴とするIFNGバリエーションポリペプチドが提供される。

【0160】

好ましい一態様では、本明細書において、アミノ酸配列KRKRP（配列番号1）でC末端において終結することを特徴とするIFNGバリエーションポリペプチドが提供され、配列番号1におけるアミノ酸の1つまたは2つが、セリン（S）またはプロリン（P）から選択されるアミノ酸で置換されている。これには、AKTGSRKRP（配列番号137）、AKTGKSKRP（配列番号138）、AKTGKRSRP（配列番号139）、AKTGKRKSP（配列番号134）、AKTGPRKRP（配列番号140）、AKTGKPKRP（配列番号141）、AKTGKRPRP（配列番号142）、AKTGKRPPP（配列番号143）、AKTGSRSRP（配列番号148）、AKTGPRPRP（配列番号149）、AKTGKSKSP（配列番号151）、AKTGKPKPP（配列番号152）、AKTGSSSKRP（配列番号154）、AKTGPPKRP（配列番号155）、AKTGKRSSP（配列番号157）およびAKTGKRPPP（配列番号158）からなる群から選択されるアミノ酸配列でC末端が終結することを特徴とするIFNGバリエーションポリペプチドが含まれる。

【0161】

また、本明細書において、抗原結合分子であって、

（i）腫瘍関連抗原に特異的に結合する抗体と、

（ii）インターフェロンガンマ（IFNG）バリエーションポリペプチドのホモ二量体であって、IFNGバリエーションポリペプチドが、アミノ酸配列KRKRP（配列番号1）でC末端が終結することを特徴とし、配列番号1におけるアミノ酸の1つまたは2つが、セリン（S）、プロリン（P）およびグルタミン酸（E）からなる群から選択されるアミノ酸で置換されている、IFNGバリエーションポリペプチドのホモ二量体と、を含む、抗原結合分子が提供される。

10

20

30

40

50

【0162】

特定の一態様では、抗原結合分子であって、

(i) 腫瘍関連抗原に特異的に結合する抗体と、

(ii) インターフェロンガンマ (IFNG) バリエーションポリペプチドのホモ二量体であって、IFNGバリエーションポリペプチドが、アミノ酸配列KRKRP (配列番号1) でC末端が終結することを特徴とし、配列番号1におけるアミノ酸の1つまたは2つが、セリン (S) またはプロリン (P) から選択されるアミノ酸で置換されている、IFNGバリエーションポリペプチドのホモ二量体と、を含む、抗原結合分子が提供される。

【0163】

一態様では、抗原結合分子であって、

(i) 腫瘍関連抗原に特異的に結合する抗体と、

(ii) インターフェロンガンマ (IFNG) バリエーションポリペプチドのホモ二量体であって、IFNGバリエーションポリペプチドが、AKTGSRKRP (配列番号137)、AKTGKSKRP (配列番号138)、AKTGKRSRP (配列番号139)、AKTGKRKSP (配列番号134)、AKTGPRKRP (配列番号140)、AKTGKPKRP (配列番号141)、AKTGKRP RP (配列番号142)、AKTGKRP PP (配列番号143)、AKTGSRSRP (配列番号148)、AKTGPRRP P (配列番号149)、AKTGKSKSP (配列番号151)、AKTGKPKPP (配列番号152)、AKTGSSKRP (配列番号154)、AKTGPPKRP (配列番号155)、AKTGKRSSP (配列番号157) および AKTGKRP PP (配列番号158) からなる群から選択されるC末端アミノ酸配列によって特徴付けられる、IFNGバリエーションポリペプチドのホモ二量体と、を含む、抗原結合分子が提供される。

【0164】

一態様では、本明細書において、IFNGバリエーションポリペプチドを含有する抗原結合分子が提供され、当該抗原結合分子は、

配列番号91と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるアミノ酸配列を含む2本の重鎖と、配列番号41と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるアミノ酸配列を含む2本の軽鎖とを含む。一態様では、抗原結合分子は、配列番号91のアミノ酸配列を含む2本の重鎖と、配列番号41のアミノ酸配列を含む2本の軽鎖とを含む。

【0165】

一態様では、本明細書において、IFNGバリエーションポリペプチドを含有する抗原結合分子が提供され、当該抗原結合分子は、

配列番号92と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるアミノ酸配列を含む2本の重鎖と、配列番号41と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるアミノ酸配列を含む2本の軽鎖とを含む。一態様では、抗原結合分子は、配列番号92のアミノ酸配列を含む2本の重鎖と、配列番号41のアミノ酸配列を含む2本の軽鎖とを含む。

【0166】

一態様では、本明細書において、IFNGバリエーションポリペプチドを含有する抗原結合分子が提供され、当該抗原結合分子は、

配列番号93と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるアミノ酸配列を含む2本の重鎖と、配列番号41と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%または100%同一であるアミノ酸配列を含む2本の軽鎖とを含む。一態様では、抗原結合分子は、配列番号93のアミノ酸配列を含む2本の重鎖と、配列番号41のアミノ酸配列を含む2本の軽鎖とを含む。

【0167】

一態様では、本明細書において、IFNGバリエーションポリペプチドを含有する抗原結合分子が提供され、当該抗原結合分子は、

配列番号94と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%または100%

10

20

30

40

50

10

20

30

40

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

50

配列番号 104 と少なくとも約 95 %、96 %、97 %、98 %、99 % または 100 % 同一であるアミノ酸配列を含む 2 本の重鎖と、配列番号 41 と少なくとも約 95 %、96 %、97 %、98 %、99 % または 100 % 同一であるアミノ酸配列を含む 2 本の軽鎖

とを含む。一態様では、抗原結合分子は、配列番号 104 のアミノ酸配列を含む 2 本の重鎖と、配列番号 41 のアミノ酸配列を含む 2 本の軽鎖とを含む。

【0174】

一態様では、本明細書において、IFNG バリエーション体ポリペプチドを含有する抗原結合分子が提供され、当該抗原結合分子は、

配列番号 106 と少なくとも約 95 %、96 %、97 %、98 %、99 % または 100 % 同一であるアミノ酸配列を含む 2 本の重鎖と、配列番号 41 と少なくとも約 95 %、96 %、97 %、98 %、99 % または 100 % 同一であるアミノ酸配列を含む 2 本の軽鎖とを含む。一態様では、抗原結合分子は、配列番号 106 のアミノ酸配列を含む 2 本の重鎖と、配列番号 41 のアミノ酸配列を含む 2 本の軽鎖とを含む。

10

【0175】

一態様では、本明細書において、IFNG バリエーション体ポリペプチドを含有する抗原結合分子が提供され、当該抗原結合分子は、

配列番号 107 と少なくとも約 95 %、96 %、97 %、98 %、99 % または 100 % 同一であるアミノ酸配列を含む 2 本の重鎖と、配列番号 41 と少なくとも約 95 %、96 %、97 %、98 %、99 % または 100 % 同一であるアミノ酸配列を含む 2 本の軽鎖とを含む。一態様では、抗原結合分子は、配列番号 107 のアミノ酸配列を含む 2 本の重鎖と、配列番号 41 のアミノ酸配列を含む 2 本の軽鎖とを含む。

【0176】

一態様では、本明細書において、IFNG バリエーション体ポリペプチドを含有する抗原結合分子が提供され、当該抗原結合分子は、

配列番号 109 と少なくとも約 95 %、96 %、97 %、98 %、99 % または 100 % 同一であるアミノ酸配列を含む 2 本の重鎖と、配列番号 41 と少なくとも約 95 %、96 %、97 %、98 %、99 % または 100 % 同一であるアミノ酸配列を含む 2 本の軽鎖とを含む。一態様では、抗原結合分子は、配列番号 109 のアミノ酸配列を含む 2 本の重鎖と、配列番号 41 のアミノ酸配列を含む 2 本の軽鎖とを含む。

20

【0177】

一態様では、本明細書において、IFNG バリエーション体ポリペプチドを含有する抗原結合分子が提供され、当該抗原結合分子は、

配列番号 110 と少なくとも約 95 %、96 %、97 %、98 %、99 % または 100 % 同一であるアミノ酸配列を含む 2 本の重鎖と、配列番号 41 と少なくとも約 95 %、96 %、97 %、98 %、99 % または 100 % 同一であるアミノ酸配列を含む 2 本の軽鎖とを含む。一態様では、抗原結合分子は、配列番号 110 のアミノ酸配列を含む 2 本の重鎖と、配列番号 41 のアミノ酸配列を含む 2 本の軽鎖とを含む。

30

【0178】

一態様では、本明細書において、IFNG バリエーション体ポリペプチドを含有する抗原結合分子が提供され、当該抗原結合分子は、

配列番号 112 と少なくとも約 95 %、96 %、97 %、98 %、99 % または 100 % 同一であるアミノ酸配列を含む 2 本の重鎖と、配列番号 41 と少なくとも約 95 %、96 %、97 %、98 %、99 % または 100 % 同一であるアミノ酸配列を含む 2 本の軽鎖とを含む。一態様では、抗原結合分子は、配列番号 112 のアミノ酸配列を含む 2 本の重鎖と、配列番号 41 のアミノ酸配列を含む 2 本の軽鎖とを含む。

40

【0179】

一態様では、本明細書において、IFNG バリエーション体ポリペプチドを含有する抗原結合分子が提供され、当該抗原結合分子は、

配列番号 113 と少なくとも約 95 %、96 %、97 %、98 %、99 % または 100 % 同一であるアミノ酸配列を含む 2 本の重鎖と、配列番号 41 と少なくとも約 95 %、96 %、97 %、98 %、99 % または 100 % 同一であるアミノ酸配列を含む 2 本の軽鎖とを含む。一態様では、抗原結合分子は、配列番号 113 のアミノ酸配列を含む 2 本の重鎖と、配列番号 41 のアミノ酸配列を含む 2 本の軽鎖とを含む。

50

【0180】

ポリヌクレオチド

また、本明細書において、本明細書中に記載される抗原結合分子もしくはその断片をコードする単離されたポリヌクレオチド、または本明細書中に記載されるIFNGバリエーションポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドが提供される。

【0181】

本明細書に開示される抗原結合分子をコードする単離されたポリヌクレオチドは、抗原結合分子全体をコードする単一のポリヌクレオチドとして、または共発現される複数（例えば、2つ以上）のポリヌクレオチドとして発現され得る。共発現されるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドは、例えば、ジスルフィド結合または他の手段を介して会合し、機能的な抗原結合分子を形成してもよい。例えば、免疫グロブリンの軽鎖部分は、免疫グロブリンの重鎖部分とは別のポリヌクレオチドによってコードされ得る。共発現されると、重鎖ポリペプチドは軽鎖ポリペプチドと会合して免疫グロブリンを形成する。

10

【0182】

いくつかの態様では、単離されたポリヌクレオチドは、本明細書中に記載される抗原結合分子に含まれるポリペプチドをコードする。一態様では、IFNGバリエーションポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドであって、IFNGバリエーションポリペプチドが、C末端アミノ酸配列KRKRP（配列番号1）によって特徴付けられるIFNGバリエーションポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドが提供される。

20

【0183】

一態様では、(i) 腫瘍関連抗原に特異的に結合する抗体、および(ii) IFNGバリエーションポリペプチドのホモ二量体であって、IFNGバリエーションポリペプチドが、C末端アミノ酸配列KRKRP（配列番号1）によって特徴付けられる、IFNGバリエーションポリペプチドのホモ二量体と、を含む、抗原結合分子をコードする単離されたポリヌクレオチドが提供される。一態様では、抗原結合分子をコードする1つ以上の単離されたポリヌクレオチドであって、(i) 腫瘍関連抗原に特異的に結合する抗体および(ii) インターフェロンガンマ(IFNG)バリエーションポリペプチドのホモ二量体であって、IFNGバリエーションポリペプチドが、C末端アミノ酸配列KRKRP（配列番号1）によって特徴付けられる二量体、(iii) プロテアーゼ認識部位、および(iv) マスキング部分を含む、単離されたポリヌクレオチドが提供される。

30

【0184】

特定の実施形態では、ポリヌクレオチドまたは核酸はDNAである。他の実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、例えばメッセンジャーRNA(mRNA)の形態のRNAである。本発明のRNAは、一本鎖であっても二本鎖であってもよい。

【0185】

組み換え法

本明細書中に記載される二重特異性抗原結合分子は例えば、組換え産生により入手し得る。組換え産生のために、抗原結合分子またはそのポリペプチド断片をコードする1つ以上のポリヌクレオチドが提供される。二重特異性抗原結合分子をコードする1つ以上のポリヌクレオチドを単離して、宿主細胞におけるクローニングおよび／または発現のために1つ以上のベクターに挿入する。そのようなポリヌクレオチドは、従来の手順を使用して容易に単離および配列決定され得る。本発明の一態様では、本発明の1つ以上のポリヌクレオチドを含むベクター、好ましくは発現ベクターが提供される。当業者に周知の方法を用いて、適切な転写／翻訳調節シグナルに従い、抗原結合分子(断片)のコード配列を含む発現ベクターを構築することができる。このような方法には、インビトロでの組換えDNA技術、合成技術、およびインビボでの組換え／遺伝子組換えが含まれる。例えば、Maniatisら、MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL、Cold Spring Harbor Laboratory、N.Y. (1989)；およびAusubelら、CURRENT PROTOCOLS

40

50

IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N. Y. (1989)に記載されている技術を参照されたい。発現ベクターは、プラスミド、ウイルスの一部とすることができるか、または核酸断片であり得る。発現ベクターは、抗原結合分子またはそのポリペプチド断片（すなわち、コード領域）をコードするポリヌクレオチドが、プロモーターおよび／または他の転写もしくは翻訳制御要素と作動可能に結合してクローニングされる発現カセットを含む。本明細書で使用する場合、「コード領域」は、アミノ酸中に翻訳されたコドンからなる核酸の一部である。「停止コドン」(TAG、TGAまたはTAA)は、アミノ酸に翻訳されないが、存在する場合、コード領域の一部であると見なされ得るが、任意の隣接配列、例えばプロモーター、リボソーム結合部位、転写ターミネーター、イントロン、5'および3'未翻訳領域などは、コード領域の一部ではない。2つ以上のコード領域が、単一のポリヌクレオチド構築物中に、例えば単一のベクター上に、または別々のポリヌクレオチド構築物中に、例えば別々の（異なる）ベクター上に存在し得る。さらに、任意のベクターは、単一のコード領域を含んでいてもよく、または2つ以上のコード領域を含んでいてもよく、例えば、本発明のベクターは、タンパク質分解切断を介して翻訳後または翻訳と同時に最終タンパク質に分離される1つ以上のポリペプチドをコードしてもよい。さらに、本発明のベクター、ポリヌクレオチドまたは核酸は、本明細書中に開示される抗原結合分子もしくはそのポリペプチド断片、またはまたはそのバリエーションもしくは誘導体をコードするポリヌクレオチドに融合されたまたは融合されていない異種コード領域をコードし得る。異種コード領域には、限定されないが、分泌シグナルペプチドまたは異種機能性ドメインなどの特殊な要素またはモチーフが含まれる。作動可能な会合とは、ポリペプチドなどの遺伝子産物のコード領域が、遺伝子産物の発現を制御配列の影響下または制御下に置くように、1つ以上制御配列と会合している場合である。2つのDNA断片（ポリペプチドコード領域とそれに関連付けられたプロモーターなど）は、プロモーター機能の誘導により所望の遺伝子産物をコードするmRNAが転写される場合、および2つのDNA断片間の結合の性質が、遺伝子産物の発現を指示する発現調節配列の能力を妨げないか、またはDNAテンプレートの転写能力を妨げない場合、「作動可能に会合」している。したがって、プロモーターが、ポリペプチドをコードする核酸の転写を行うことができた場合、プロモーター領域は、ポリペプチドをコードする核酸と作用可能に会合していると思われる。プロモーターは、所定の細胞においてのみDNAの実質的な転写を指示する細胞特異的プロモーターであり得る。プロモーター以外の他の転写調節要素、例えばエンハンサー、オペレーター、リプレッサー、および転写終結シグナルをポリヌクレオチドと作動可能に会合させて、細胞特異的転写を指示することができる。

【0186】

適切なプロモーターおよび他の転写調節領域が本明細書に開示されている。様々な転写調節領域が当業者に知られている。これらには、限定されないが、脊椎動物細胞において機能する転写調節領域、例えば、限定されないが、サイトメガロウイルス由来のプロモーターおよびエンハンサーセグメント（例えば、最初期プロモーターとイントロンA）、シミアンウイルス40（例えば最初期プロモーター）、およびレトロウイルス（例えばラウス肉腫ウイルスなど）が含まれる。他の転写調節領域としては、脊椎動物遺伝子から誘導されるもの、例えば、アクチン、ヒートショックタンパク質、ウシ成長ホルモンおよびウサギα-グロビン、および真核細胞において遺伝子発現を制御することが可能な他の配列が挙げられる。さらなる適切な転写調節領域には、組織特異的プロモーターおよびエンハンサー、ならびに誘導性プロモーター（例えば、プロモーター誘導性テトラサイクリン）が含まれる。同様に、種々の翻訳制御要素は当業者に知られている。これらには、限定されないが、リボソーム結合部位、翻訳開始および終結コドン、およびウイルス系由来の要素（特に、CITE配列とも呼ばれる内部リボソーム侵入部位またはIRES）が含まれる。発現カセットはまた、複製起点、および／またはレトロウイルスの長い末端反復（LTR）またはアデノ随伴ウイルス（AAV）逆方向末端反復（ITR）などの染色体組み

込み要素などの他の特徴を含み得る。

【0187】

本発明のポリヌクレオチドおよび核酸コード領域は、本明細書で提供されるポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの分泌を指示する分泌ペプチドまたはシグナルペプチドをコードするさらなるコード領域と関連し得る。例えば、抗原結合分子またはそのポリペプチド断片の分泌が所望される場合、シグナル配列をコードするDNAを、抗原結合分子またはそのポリペプチド断片をコードする核酸の上流に配置され得る。シグナル仮説によれば、哺乳動物細胞によって分泌されるタンパク質は、粗面小胞体を横切る成長中のタンパク質鎖の輸送が開始されると、成熟タンパク質から切断されるシグナルペプチドまたは分泌リーダー配列を有する。当業者は、脊椎動物細胞によって分泌されるポリペ

10

【0188】

後での精製（例えば、ヒスチジンタグ）を容易にする、または融合タンパク質の標識を補助するために使用可能な、短いタンパク質配列をコードするDNAは、本発明の二重特異性抗原結合分子またはそのポリペプチド断片をコードするポリヌクレオチドの中に、またはその末端に含まれていてもよい。

20

【0189】

さらなる態様では、本発明の1つ以上のポリヌクレオチドを含む宿主細胞が提供される。特定の態様では、1つ以上のベクターを含む宿主細胞が提供される。ポリヌクレオチドおよびベクターには、ポリヌクレオチドおよびベクターのそれぞれに関連して本明細書に記載される特徴のいずれかを、単独でまたは組み合わせて組み込むことができる。一態様では、宿主細胞は、本明細書に記載の抗原結合分子（の一部）をコードするポリヌクレオチドを含むベクターを含む（例えば、ベクターで形質転換またはトランスフェクトされている）。抗原結合分子の複製および発現の支援に適した宿主細胞は、当技術分野で周知である。このような細胞は、必要に応じて特定の発現ベクターでトランスフェクトまたは形質導入されてもよく、大量のベクターを含む細胞は、大規模発酵槽に播種するために増殖させ、臨床応用に十分な量の抗原結合分子を得ることができる。適切な宿主細胞には、大腸菌などの原核微生物、またはチャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）、昆虫細胞などの種々の真核細胞が含まれる。例えば、ポリペプチドは、特にグリコシル化が必要でないとき、細菌中で産生され得る。発現後、ポリペプチドは、可溶性画分中の細菌細胞ペストから単離され得、さらに精製され得る。原核生物に加えて、糸状菌または酵母菌などの真核微生物は、グリコシル化経路が「ヒト化」された真菌および酵母株を含む、ポリペ

30

40

【0190】

（グリコシル化）ポリペプチドの発現に適した宿主細胞はまた、多細胞生物（無脊椎動物および脊椎動物）に由来する。無脊椎動物細胞の例としては、植物細胞および昆虫細胞が挙げられる。数多くのバキュロウイルス株が同定されており、これらは、特にスピドプテラ・フルギペルダ（*Spodoptera frugiperda*）細胞のトランスフェクションのために、昆虫細胞と組み合わせて使用され得る。植物細胞培養物も、宿主と

50

して利用することができる。例えば、米国特許第5,959,177号、第6,040,498号、第6,420,548号、第7,125,978号、および第6,417,429号（トランスジェニック植物において抗体を生成するためのPLANTIBODIES（商標）技術を記載）を参照されたい。脊椎動物細胞も宿主として使用され得る。例えば、懸濁液中で増殖するように適合されている哺乳動物細胞株は有用であり得る。有用な哺乳動物宿主細胞株の他の例は、SV40（COS-7）によって形質転換されたサル腎臓CV1株、ヒト胚腎臓株（例えば、Grahamら、J Gen Virol 36、59（1977）に記載の293細胞または293T細胞）、ベビーハムスター腎臓細胞（BHK）、マウスセルトリ細胞（例えばMather、Biol Reprod 23、243-251（1980）に記載のTM4細胞）、サル腎臓細胞（CV1）、アフリカミドリザル腎臓細胞（VERO-76）、ヒト子宮頸がん細胞（HELA）、イヌ腎臓細胞（MDCK）、バッファローラット肝臓細胞（BRL 3A）、ヒト肺細胞（W138）、ヒト肝臓細胞（Hep G2）、マウス乳房腫瘍細胞（MMT 060562）、TRI細胞（例えば、Mather ら、Annals N.Y. Acad Sci 383、44-68（1982））に記載のTRI細胞、MRC5細胞、およびFS4細胞である。他の有用な哺乳動物宿主細胞株としては、dhfr-CHO細胞（Urlaubら、Proc Natl Acad Sci USA 77、4216（1980））を含むチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞および骨髓腫細胞株、例えばYO、NS0、P3X63およびSp2/0が挙げられる。タンパク質産生に適した特定の哺乳動物宿主細胞株の総説については、例えば、YazakiおよびWu、Methods in Molecular Biology、Vol. 248（B. K. C. Lo編、Humana Press、Totowa、NJ）、pp. 255-268（2003）を参照されたい。宿主細胞としては、培養細胞、例えば、哺乳動物培養細胞、酵母細胞、昆虫細胞、細菌細胞および植物が挙げられ、ほんの数例を挙げると、トランスジェニック動物、トランスジェニック植物または培養植物もしくは動物組織に含まれる細胞も挙げられる。一実施形態では、宿主細胞は、真核細胞、好ましくは、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、ヒト胚腎臓（HEK）細胞またはリンパ系細胞（例えばYO、NS0、Sp20細胞）などの哺乳動物細胞である。これら系で外来遺伝子を発現させるための標準的な技術は、当技術分野で公知である。免疫グロブリンの重鎖または軽鎖いずれかをを含むポリペプチドを発現する細胞は、発現産物が重鎖および軽鎖の両方を有する免疫グロブリンであるように、免疫グロブリン鎖の他方も発現するように操作され得る。

10

20

30

40

50

【0191】

一態様では、本明細書中に開示される抗原結合分子またはそのポリペプチド断片を産生する方法であって、本明細書に提供される抗原結合分子またはそのポリペプチド断片をコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞を、抗原結合分子またはそのポリペプチド断片の発現に適した条件下で培養する工程と、本発明の抗原結合分子またはそのポリペプチド断片を宿主細胞（または宿主細胞培養培地）から回収する工程とを含む方法が提供される。

【0192】

本明細書中に記載されるように調製された抗原結合分子は、高速液体クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、アフィニティークロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィーなどの当技術分野で公知の技術によって精製され得る。特定のタンパク質を精製するのに使用される実際の条件は、部分的には、正味電荷、疎水性、親水性などの要因に依拠し、当業者には明らかである。アフィニティークロマトグラフィー精製のために、抗原結合分子が結合する抗体、リガンド、受容体または抗原を使用することができる。例えば、本発明の融合タンパク質のアフィニティークロマトグラフィー精製のために、プロテインAまたはプロテインGを有するマトリックスが使用され得る。連続的なプロテインAまたはGアフィニティークロマトグラフィーおよびサイズ排除クロマトグラフィーを使用して、本質的に実施例に記載の抗原結合分子を単離することができる。抗原結合分子またはその断片の純度は、ゲル電気泳動、高圧液体クロマトグラフィ

一などを含む、多種多様の周知の分析技術のいずれかにより測定することができる。例えば、実施例に記載されるように発現させた抗原結合分子は、還元および非還元 SDS-PAGE によって実証されるように、インタクトであり、適切にアSEMBLしたことが示された。

【0193】

アッセイ

本明細書で提供される抗原結合分子は、当技術分野で公知の様々なアッセイによってこれらの結合特性および／または生物活性について特徴付けられ得る。特に、それらは、実施例でより詳細に記載されているアッセイによって特徴付けられる。

【0194】

1. 結合アッセイ

対応する標的発現細胞への本明細書中に提供される抗原結合分子および IFNG バリアントポリペプチドの結合を、例えば、ヒト線維芽細胞活性化タンパク質 (FAP) を発現するマウス線維芽細胞株およびフローサイトメトリー (FACS) 分析を使用することによって評価することができる。IFNGR1 および IFNGR1 / 2 に対する IFNG バリエーションの結合挙動を、実施例に記載されるように表面プラズモン共鳴 (SPR) によって評価することができる。

【0195】

2. 活性アッセイ

本明細書中に記載される抗原結合分子および IFNG バリエーションポリペプチドを生物活性について試験する。生物活性は、二重特異性抗原結合分子の有効性および特異性を含み得る。IFNG バリエーションポリペプチドの活性を、実施例に記載されるような HEK Blue IFNG レポーター細胞アッセイによって測定することができる。さらに、IFNG バリエーションポリペプチドおよび抗原結合分子の活性は、実施例に記載されているように、マウス MC38-huCEA 腫瘍細胞株に対する MHC-I および PD-L1 の上方制御、ならびに化学誘引物質 (CXCL9) の上方制御によって測定することができる。

【0196】

医薬組成物、製剤、および投与経路

さらなる態様では、例えば、以下の治療方法のいずれかに使用するための、本明細書で提供される抗原結合分子のいずれかを含む医薬組成物が提供される。一態様では、医薬組成物は、本明細書で提供される抗原結合分子のいずれかと、少なくとも1つの薬学的に許容される賦形剤とを含む。別の態様では、医薬組成物は、本明細書で提供される抗原結合分子のいずれかと、例えば下記に記載されるような少なくとも1つのさらなる治療薬とを含む。

【0197】

本明細書中に記載される医薬組成物は、薬学的に許容される担体に溶解または分散した治療有効量の1つ以上の抗原結合分子を含む。「薬学的に許容されるまたは薬理的に許容される」という語句は、使用される投薬量および濃度でレシipientに対して一般に非毒性である、すなわち、必要に応じて動物、例えばヒトに投与した場合に、有害なアレルギー反応または他の不都合な反応を生じない分子実体および組成物を指す。本明細書中に開示される少なくとも1つの抗原結合分子、および任意にさらなる有効成分を含有する医薬組成物の調製は、参照により本明細書に組み込まれる Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990 により例示されているように、本開示に照らして当業者には既知であろう。特に、組成物は、凍結乾燥された製剤または水溶液である。本明細書で使用する場合、「薬学的に許容される賦形剤」としては、当業者に知られているように、あらゆる溶媒、緩衝液、分散媒、コーティング、界面活性剤、酸化防止剤、防腐剤（例えば、抗菌剤、抗真菌剤）、等張剤、塩、安定剤およびそれらの組み合わせが挙げられる。

【0198】

10

20

30

40

50

非経口組成物としては、注射（例えば皮下、皮内、病変内、静脈内、動脈内、筋肉内、髄腔内または腹腔内注射）による投与のために設計されたものが挙げられる。注射のために、本明細書中に開示される抗原結合分子は水溶液中で、好ましくは、ハンクス溶液、リンゲル液、または生理食塩水緩衝液などの、生理学的に適合性の緩衝剤中で製剤化し得る。溶液は、懸濁剤、安定化剤および／または分散剤などの製剤化剤を含有していてもよい。代替的には、抗原結合分子は、使用前に、好適なビヒクル、例えばパイロジェンフリー滅菌水で構成するための粉末形態であってもよい。滅菌注射用溶液は、本発明の抗原結合分子を、必要に応じて、以下に列挙する様々な他の成分と共に、適切な溶媒中に必要な量で組み込むことによって調製される。滅菌性は、例えば、滅菌濾過膜による濾過によって、容易に達成され得る。一般に、分散液は、種々の滅菌された有効成分を、塩基性分散媒および／または他の成分を含む滅菌ビヒクルに組み込むことによって調製される。滅菌注射用溶液、懸濁液またはエマルジョンを調製するための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、既に滅菌濾過した液体媒体から有効成分と任意のさらなる所望の成分の粉末が得られる減圧乾燥または凍結乾燥技術である。液体媒体は、必要に応じて適切に緩衝されるべきであり、注射する前に、十分な生理食塩水またはグルコースで液体希釈剤を最初に等張性にする。組成物は、製造および貯蔵条件下で安定でなければならず、細菌および真菌などの微生物の汚染作用から保護されなければならない。エンドトキシン汚染は、安全なレベル、例えば $0.5 \text{ ng} / \text{mg}$ 未満のタンパク質で最小限に保たれるべきであることが理解される。薬学的に許容される好適な添加物には、限定されないが、リン酸塩、クエン酸塩および他の有機酸などの緩衝液、アスコルビン酸およびメチオニンを含む抗酸化剤、防腐剤（例えばオクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド、ヘキサメトニウムクロリド、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、フェノール、ブチルまたはベンジルアルコール、アルキルパラベン類、例えばメチルまたはプロピルパラベン、カテコール、レゾルシノール、シクロヘキサノール、3-ペンタノール、およびm-クレゾール）、低分子量（約10残基未満）のポリペプチド、タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリン、親水性ポリマー類、例えばポリビニルピロリドン、アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニンまたはリジン、単糖類、二糖類、およびグルコース、マンノースまたはデキストリンを含む他の炭水化物、キレート剤、例えばEDTA、糖、例えばスクロース、マンニトール、トレハロースまたはソルビトール、塩形成対イオン、例えばナトリウム、金属錯体（例えばZn-タンパク質錯体）、および／またはポリエチレングリコール（PEG）などの非イオン性界面活性剤が挙げられる。水性注射懸濁液は、懸濁液の粘度を増加させる化合物、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、デキストランなどを含有し得る。任意に、懸濁液はまた、高濃度溶液の調製を可能にするために化合物の溶解度を増加させる適切な安定剤または薬剤を含有してもよい。さらに、活性化合物の懸濁液は、適切な油注射懸濁液として調製されてもよい。好適な親油性溶媒またはビヒクルとしては、ゴマ油などの脂肪油、またはオレイン酸エチルもしくはトリグリセリドなどの合成脂肪酸エステル、またはリポソームが挙げられる。

【0199】

有効成分は、例えばコアセルベーション技術によって、または界面重合によって調製されたマイクロカプセル、例えば、それぞれヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン-マイクロカプセルおよびポリ-（メチルメタクリレート）マイクロカプセルの、コロイド薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル）またはマクロエマルジョンに封入され得る。そのような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences (18th Ed. Mack Printing Company, 1990) に開示される。徐放性製剤を調製してもよい。徐放性製剤の好適な例としては、ポリペプチドを含有する固体疎水性ポリマーの半透過性マトリックスが挙げられ、このマトリックスは、成型物品、例えば、フィルムまたはマイクロカプセルの形態である。特定の態様では、注射用組成物の持続性吸収は、吸収を遅らせる薬剤（例えばアルミニウムモノステアレート、ゼラ

10

20

30

40

50

チンまたはこれらの組み合わせ)の組成物における使用によってもたらされ得る。

【0200】

前述の組成物に加えて、抗原結合分子はデポー調製物として製剤化されてもよい。そのような長時間作用性製剤は、移植(例えば、皮下または筋肉内)または筋肉内注射によって投与され得る。したがって、例えば、抗原結合分子は、適切なポリマー材料もしくは疎水性材料(例えば、許容可能な油中のエマルジョンとして)もしくはイオン交換樹脂、または難溶性誘導体として、例えば、難溶性塩として製剤化され得る。

【0201】

本明細書中に記載される抗原結合分子を含む医薬組成物は、従来の混合、溶解、乳化、カプセル化、封入または凍結乾燥プロセスによって製造することができる。医薬組成物は、タンパク質を薬学的に使用することができる調製物に加工することを容易にする1つ以上生理学的に許容される担体、希釈剤、賦形剤または補助剤を使用して従来の方法で製剤化することができる。適切な製剤は、選択した投与経路に依存する。

【0202】

本明細書中に開示される抗原結合分子は、遊離酸または遊離塩基、中性または塩形態で組成物に製剤化され得る。薬学的に許容される塩は、遊離酸または遊離塩基の生物活性を実質的に保持する塩である。薬学的に許容される塩としては、酸付加塩、例えば、タンパク質性組成物の遊離アミノ基と形成される酸付加塩、または例えば塩酸またはリン酸の無機酸と形成されるか、または酢酸、シュウ酸、酒石酸またはマンデル酸などの有機酸と形成されるものが挙げられる。遊離カルボキシル基と形成される塩はまた、例えばナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウムもしくは水酸化第二鉄などの無機塩基、またはイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジンもしくはプロカインなどの有機塩基に由来し得る。医薬塩は、対応する遊離塩基形態よりも、水性および他のプロトン性溶媒に溶解しやすい傾向がある。本発明の組成物はまた、処置される特定の適応症に必要な2つ以上の多い有効成分も含んでいてもよく、好ましくは、互いに有害な影響を与えない相補的な活性を有するものも含んでいてもよい。このような有効成分は、意図する目的に有効な量で組み合わせて適切に存在する。インビボ投与に使用される製剤は一般に、滅菌される。滅菌性は、例えば、滅菌濾過膜による濾過によって、容易に達成され得る。

【0203】

治療方法および組成物

本明細書において提供する抗原結合分子のいずれかも、治療方法において使用され得る。治療方法で使用するために、本明細書中に記載される抗原結合分子を、優れた医療行為に一致する様式で製剤化、用量化、および投与することができる。この文脈において考慮すべき因子には、処置される特定の障害、処置される特定の哺乳動物、個々の患者の臨床症状、障害の原因、薬剤の送達部位、投与方法、投与スケジューリング、および医療従事者に既知の他の因子が含まれる。

【0204】

一態様では、医薬品として使用するための本明細書中に開示される抗原結合分子またはIFNGバリエーションポリペプチドが提供される。

【0205】

さらなる態様では、CXCL9の上方制御で使用するための本明細書中に記載される抗原結合分子またはIFNGバリエーションポリペプチドが提供される。さらには、本明細書中に記載される抗原結合分子が、(i)がんの処置、(ii)がんの進行の遅延、および(iii)がん罹患している患者の生存の延長のために、特にFAP発現細胞の存在下で提供される。特定の態様では、疾患の処置に使用するのための、特にがんの処置に使用するのための、本明細書中に開示される抗原結合分子またはIFNGバリエーションポリペプチドが提供される。

【0206】

特定の態様では、処置方法における使用のための本明細書中に記載される抗原結合分子またはIFNGバリエーションポリペプチドが提供される。一態様では、疾患の処置を必要と

10

20

30

40

50

する個体における疾患の処置において使用するための、本明細書中に記載される抗原結合分子またはIFNGバリエーションポリペプチドが提供される。特定の態様では、治療有効量の二重特異性抗原結合分子を個体に投与することを含む、疾患を有する個体を処置する方法において使用するための抗原結合分子またはIFNGバリエーションポリペプチドが提供される。特定の態様では、処置される疾患はがんである。処置を必要とする対象、患者または「個体」は、典型的には哺乳動物であり、より具体的にはヒトである。

【0207】

さらなる態様では、本発明は、疾患の処置を必要とする個体における疾患を処置するための医薬品の製造または調製における、本明細書中に記載される抗原結合分子またはIFNGバリエーションポリペプチドの使用を提供する。一態様では、医薬品は、疾患を有する個体に、治療有効量の医薬品を投与することを含む、疾患を処置する方法で使用するものである。特定の態様では、処置される疾患は増殖性障害、特にがんである。がんの例としては、膀胱がん、脳腫瘍、頭頸部がん、膵臓がん、肺がん、乳がん、卵巣がん、子宮がん、子宮頸がん、子宮内膜がん、食道がん、結腸がん、結腸直腸がん、肛門がん、胃がん、前立腺がん、血液がん、皮膚がん、扁平細胞癌腫、骨がんおよび腎臓がんが挙げられるが、これらに限定されない。がんの他の例としては、癌腫、リンパ腫（例えば、ホジキンおよび非ホジキンリンパ腫）、芽腫、肉腫、および白血病が挙げられる。本発明の二重特異性抗原結合分子または抗体を使用して処置することができる他の細胞増殖性疾患としては、腹部、骨、乳房、消化系、肝臓、膵臓、腹膜、内分泌腺（副腎、副甲状腺、脳下垂体、精巣、卵巣、胸腺、甲状腺）、眼、頭頸部、神経系（中枢および末梢）、リンパ系、骨盤、皮膚、軟組織、脾臓、胸部領域および泌尿生殖器系に位置する新生物が挙げられるが、これらに限定されない。前がん状態または病変およびがん転移も含まれる。特定の実施形態では、がんは、腎細胞がん、皮膚がん、肺がん、結腸直腸がん、乳がん、脳がん、頭頸部がんからなる群から選択される。当業者であれば、多くの場合、本明細書中に記載されるような抗原結合分子またはIFNGバリエーションポリペプチドは、治療をもたらさないかもしれないが、利益をもたらすことを容易に認識する。いくつかの態様では、何らかの利益をもたらす生理学的変化も、治療上有益であると考えられる。したがって、いくつかの態様では、生理学的変化をもたらす抗原結合分子またはIFNGバリエーションポリペプチドの量を、「有効量」または「治療有効量」とみなす。

【0208】

疾患を予防または処置するため、（単独でまたは1つ以上の他のさらなる治療薬と組み合わせる場合）本明細書中に記載される抗原結合分子の適切な投薬量は、処置される疾患の種類、投与経路、患者の体重、特異的分子、疾患の重症度および経過、本明細書中に記載される抗原結合分子を予防目的で投与するか治療目的で投与するか、以前のまたは同時の治療介入、患者の病歴および二重特異性抗原結合分子に対する応答、ならびに主治医の裁量に依存する。投与を担当する医師は、いずれにせよ、組成物中の有効成分の濃度および個々の対象に対する適切な用量を決定する。本明細書では、単回投与または様々な時点にわたる複数回投与、ボラス投与、およびパルス注入を含むがこれらに限定されない種々の投薬スケジュールが企図される。

【0209】

本明細書中に開示される抗原結合分子またはIFNGバリエーションポリペプチドは、一度に、または一連の処置にわたって患者に適切に投与される。疾患の種類および重症度に応じ、例えば、1回または複数回の個別投与、または連続点滴にかかわらず、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ ～ $15\text{mg}/\text{kg}$ （例えば $0.1\text{mg}/\text{kg}$ ～ $10\text{mg}/\text{kg}$ ）の抗原結合分子またはIFNGバリエーションポリペプチドが、患者への投与への最初の候補投薬量となることができる。上記の要因に応じて、典型的な1日あたりの投薬量は、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ ～ $100\text{mg}/\text{kg}$ またはそれ以上の範囲であり得る。数日間またはそれ以上にわたる反復投与の場合、処置は通常、状態に応じて、疾患症状の所望の抑制が生じるまで続けられる。抗原結合分子またはIFNGバリエーションポリペプチドの例示的な投薬量の一例は、約 $0.005\text{mg}/\text{kg}$ ～約 $10\text{mg}/\text{kg}$ の範囲である。他の例では、投薬量はまた、投与あたり、

約 $1 \mu\text{g} / \text{kg}$ 体重、約 $5 \mu\text{g} / \text{kg}$ 体重、約 $10 \mu\text{g} / \text{kg}$ 体重、約 $50 \mu\text{g} / \text{kg}$ 体重、約 $100 \mu\text{g} / \text{kg}$ 体重、約 $200 \mu\text{g} / \text{kg}$ 体重、約 $350 \mu\text{g} / \text{kg}$ 体重、約 $500 \mu\text{g} / \text{kg}$ 体重、約 $1 \text{mg} / \text{kg}$ 体重、約 $5 \text{mg} / \text{kg}$ 体重、約 $10 \text{mg} / \text{kg}$ 体重、約 $50 \text{mg} / \text{kg}$ 体重、約 $100 \text{mg} / \text{kg}$ 体重、約 $200 \text{mg} / \text{kg}$ 体重、約 $350 \text{mg} / \text{kg}$ 体重、約 $500 \text{mg} / \text{kg}$ 体重から約 $1000 \text{mg} / \text{kg}$ 体重またはそれ以上、およびその間の誘導可能な任意の範囲を含んでいてもよい。本明細書に列挙される数から誘導可能な範囲の例では、上記の数字に基づいて、約 $0.1 \text{mg} / \text{kg} / \text{体重} \sim$ 約 $20 \text{mg} / \text{kg} / \text{体重}$ 、約 $5 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{体重} \sim$ 約 $1 \text{mg} / \text{kg} / \text{体重}$ などの範囲が投与され得る。したがって、約 $0.5 \text{mg} / \text{kg}$ 、 $2.0 \text{mg} / \text{kg}$ 、 $5.0 \text{mg} / \text{kg}$ または $10 \text{mg} / \text{kg}$ （またはそれらの任意の組み合わせ）の1つ以上の用量を患者に投与することができる。このような用量を、断続的に、例えば、毎週、または3週間ごとに投与してもよい（例えば、患者は、約2～約20回、または例えば約6回の融合タンパク質の投薬を受ける）。特定の態様では、二重特異性抗原結合分子は3週間ごとに投与される。最初のより高い負荷用量、続いて1つ以上のより低い用量を投与することができる。しかしながら、他の投薬レジメンが有用な場合もある。この治療法の進行は、従来の技術およびアッセイによって容易に監視される。

10

【0210】

本明細書中に記載される抗原結合分子またはIFNGバリエーションポリペプチドは一般に、意図される目的を達成するために有効な量で使用される。疾患症状を処置または予防するのに使用するため、抗原結合分子もしくはIFNGバリエーションポリペプチド、またはその医薬組成物は、治療有効量で投与または適用される。治療有効量の決定は、特に本明細書に提供される詳細な開示に照らして、十分に当業者の能力の範囲内である。全身投与の場合、治療有効用量は、最初に細胞培養アッセイなどのインビトロアッセイから推定することができる。次いで、細胞培養物で決定されるような IC_{50} を含む循環濃度範囲を達成するために、投薬量を動物モデルで設定してもよい。そのような情報を使用し、ヒトにおける有用な用量をさらに正確に決定することができる。初期投薬量も、インビボデータから、例えば、動物モデルから、当技術分野で周知の技術を用いて推定することができる。当業者であれば、動物データに基づいて、ヒトへの投与を容易に最適化することができる。

20

【0211】

投薬量および投薬間隔は、治療効果を維持するために十分である本明細書中に開示される抗原結合分子またはIFNGバリエーションポリペプチドの血漿レベルを提供するために個々に調整され得る。注射による投与のための通常の患者投薬量は、約 $0.1 \sim 50 \text{mg} / \text{kg} / \text{日}$ 、典型的には約 $0.1 \sim 1 \text{mg} / \text{kg} / \text{日}$ の範囲である。治療に有効な血漿レベルは、毎日複数回投与することによって達成され得る。血漿中のレベルは、例えば、HPLCによって測定されてもよい。局所投与または選択的取り込みの場合、抗原結合分子またはIFNGバリエーションポリペプチドの有効な局所濃度は、血漿濃度に関連しない場合がある。当業者は、過度な実験を行うことなく、治療に有効な局所投薬量を最適化し得る。

30

【0212】

本明細書中に記載される抗原結合分子またはIFNGバリエーションポリペプチドの治療有効用量は、一般に、実質的な毒性を引き起こすことなく治療的利益をもたらす。融合タンパク質の毒性および治療有効性は、細胞培養物または実験動物における標準的な薬学的手順によって決定することができる。細胞培養アッセイおよび動物実験を使用して、 LD_{50} （集団の50%に対して致死的な用量）および ED_{50} （集団の50%において治療上有効な用量）を決定することができる。毒性効果と治療効果との間の用量比は、治療指数であり、比 $\text{LD}_{50} / \text{ED}_{50}$ として表すことができる。大きな治療指数を示す抗原結合分子が好ましい。一態様では、本明細書中に開示される抗原結合分子またはIFNGバリエーションポリペプチドは、高い治療指数を示す。細胞培養アッセイおよび動物研究から得られたデータは、ヒトでの使用に適した投薬量の範囲を製剤化するために使用できる。投薬量は、好ましくは毒性がほとんどまたは全くない ED_{50} を含む循環濃度の範囲内にある

40

50

。投薬量は、種々の要因、例えば、使用される剤形、利用される投与経路、対象の症状などに応じて、この範囲内で変動し得る。正確な製剤、投与経路および投薬量は、患者の症状を考慮して個々の医師が選択することができる（例えば、その全体が参考により本明細書に組み込まれる、Fingler、1975、The Pharmacological Basis of Therapeutics、Ch. 1、p. 1を参照されたい）。

【0213】

抗原結合分子で処置される患者の主治医は、毒性、臓器不全などによって、どのように、いつ投与を中止するか、中断するか、または調整するかを知っている。逆に、主治医は、臨床応答が適切でない場合、処置をより高いレベルに調整することも知っている（毒性を除いて）。対象となる障害の管理における投与用量の大きさは、処置される症状の重症度、および投与経路などによって変わる。症状の重症度は、例えば、標準的な予後評価方法によって部分的に評価することができる。さらに、用量およびおそらく投与頻度も、個々の患者の年齢、体重、および応答に応じて変化する。

10

【0214】

他の薬剤および処置

本明細書中に開示される抗原結合分子またはIFNGバリエーションポリペプチドは、治療において1つ以上の他の薬剤と組み合わせて投与され得る。例えば、抗原結合分子またはIFNGバリエーションポリペプチドは、少なくとも1つのさらなる治療薬と同時に投与され得る。「治療薬」という用語は、このような処置が必要な個体において、症状または疾患を処置するために投与することが可能な任意の薬剤を包含する。このようなさらなる治療薬は、処置される特定の適応症に適した任意の有効成分、好ましくは、互いに有害な影響を与えない相補的な活性を有するものを含み得る。特定の実施形態では、さらなる治療薬は、別の抗がん剤、例えば、微小管破壊剤、代謝拮抗剤、トポイソメラーゼ阻害剤、DNAインターカレーター、アルキル化剤、ホルモン療法、キナーゼ阻害剤、受容体アンタゴニスト、腫瘍細胞アポトーシスの活性化剤、または抗血管形成剤である。特定の態様では、さらなる治療薬は、免疫調節剤、細胞増殖抑制剤、細胞接着の阻害剤、細胞傷害剤もしくは細胞増殖抑制剤、細胞アポトーシスの活性化剤、またはアポトーシス誘発因子に対する細胞の感受性を増加させる薬剤である。

20

【0215】

したがって、がんの処置における使用のための、本明細書中に記載される抗原結合分子もしくはIFNGバリエーションポリペプチドまたはそれらを含む医薬組成物が提供され、抗原結合分子またはIFNGバリエーションポリペプチドは、がん免疫療法において使用するための化学療法剤、放射線および／または他の薬剤と組み合わせて投与される。

30

【0216】

そのような他の薬剤は、意図する目的に有効な量で組み合わせて適切に存在する。そのような他の薬剤の有効量は、使用される二重特異性抗体の量、障害または処置の種類、および上記で論じた他の要因に依存する。本発明の二重特異性抗原結合分子または抗体は、一般に、本明細書中に記載される同一用量および投与経路、もしくは本明細書で記載される投薬量の1～99%、または実験的／臨床的に適切と測定される任意の投薬量および任意の経路で使用される。上記のこのような併用療法は、併用投与（2つ以上の治療薬が同じ組成物または別個の組成物に含まれる）および別個の投与を包含し、この場合、抗原結合分子またはIFNGバリエーションポリペプチドの投与は、さらなる治療薬および／またはアジュバントの投与の前、同時および／または後に行うことができる。

40

【0217】

さらなる態様では、がんの処置において使用するための本明細書にて上述した抗原結合分子またはIFNGバリエーションポリペプチドが提供され、抗原結合分子またはIFNGバリエーションポリペプチドは、別の免疫調節剤と組み合わせて投与される。

【0218】

「免疫調節剤」という用語は、免疫系に影響を与えるモノクローナル抗体を含む任意の物質を指す。本明細書に記載される分子は、免疫調節剤とみなすことができる。免疫調節

50

剤は、がんの処置のための抗腫瘍剤として使用され得る。一態様では、免疫調節剤としては、抗CTLA4抗体（例えば、イピリマブ）、抗PD1抗体（例えば、ニボルマブまたはペンブロリズマブ）、PD-L1抗体（例えば、アテゾリズマブ、アベルマブまたはデュルバルマブ）、LAG3抗体（例えば、relatlimab）、PD1-LAG3二重特異性抗体またはTIGIT抗体（例えば、tiragolumab）が挙げられるが、これらに限定されない。さらなる態様では、がんの処置において使用するための本明細書中に記載される抗原結合分子またはIFNGバリエーションポリペプチドが提供され、抗原結合分子またはIFNGバリエーションポリペプチドは、PD-L1/PD-1相互作用を遮断する薬剤と組み合わせて投与される。一態様では、PD-L1/PD-1相互作用を遮断する薬剤は、抗PD-L1抗体または抗PD1抗体である。より具体的には、PD-L1/PD-1相互作用を遮断する薬剤は、アテゾリズマブ、デュルバルマブ、ペンブロリズマブおよびニボルマブからなる群より選択される抗体である。特定の一態様では、PD-L1/PD-1相互作用を遮断する薬剤はアテゾリズマブ（MPDL3280A、RG7446）である。別の態様では、PD-L1/PD-1相互作用を遮断する薬剤は、抗PD1抗体、特にペンブロリズマブまたはニボルマブから選択される抗PD1抗体である。別の態様では、PD-L1/PD-1相互作用を遮断する薬剤は、抗PD1/抗LAG3二重特異性抗体である。そのような他の薬剤は、意図する目的に有効な量で組み合わせて適切に存在する。このような他の薬剤の有効量は、使用される抗原結合分子の量、障害または処置の種類、および上記で論じた他の要因に依存する。本明細書にて上述した抗原結合分子またはIFNGバリエーションポリペプチドは、一般に、本明細書中に記載される同一用量および投与経路、もしくは本明細書で記載される投薬量の1〜99%、または実験的/臨床的に適切と測定される任意の投薬量および任意の経路で使用される。

10

20

【0219】

上記のこのような併用療法は、併用投与（2つ以上の治療薬が同じ組成物または別個の組成物に含まれる）、および別個の投与を包含し、この場合、二重特異性抗原結合分子の投与は、さらなる治療薬および/またはアジュバントの投与前、同時および/または後に行うことができる。

【0220】

製造品

本発明の別の態様では、上述の障害の処置、予防および/または診断に有用な材料を含む製造品が提供される。製造品は、容器と、容器に貼られているかまたは付随しているラベルまたは添付文書とを含む。適切な容器としては、例えば、ボトル、バイアル、シリンジ、IV溶液バッグなどが挙げられる。容器は、ガラスまたはプラスチックなどの様々な材料から形成され得る。容器は、症状の処置、予防、および/または診断に有効な、単独のまたはその他の組成物と併用される組成物を保持し、無菌のアクセスポートを有し得る（例えば、容器は、静脈内溶液バッグまたは皮下注射針により穿刺可能なストッパを有するバイアルでバイアルであってよい）。組成物中の少なくとも1つの活性剤は、本明細書中に記載される抗原結合分子である。

30

【0221】

ラベルまたは添付文書は、組成物が選択される症状を処置するために使用されることを示す。さらに、製造品は、（a）本明細書中に記載される抗原結合分子を含む組成物を含有する第1の容器、および（b）組成物が含有された第2の容器であって、組成物がさらなる細胞傷害剤または他の治療薬を含む、第2の容器を含み得る。本発明のこの実施形態における製造品は、特定の症状を処置するために上記組成物が使用され得ることを示す添付文書をさらに含み得る。

40

【0222】

あるいは、またはこれに加えて、製造品は、注射用静菌水（BWFI）、リン酸緩衝生理食塩水、リンゲル液およびデキストロース溶液などの薬学的に許容され得る緩衝液を第2の（または第3の）容器をさらに含み得る。他の緩衝液、希釈剤、フィルタ、針、およびシリンジを含め、商業的およびユーザの観点から望ましい他の材料をさらに含んでいて

50

もよい。

【 0 2 2 3 】

【 表 2 】

表 B (配列) :

配列番号	名称	配列
1	I F N G C 末端配列	KRKR P
2	ヒト I F N G - K R K R P	QDPYVKEAENLK KYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEES DRKIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKEDMNVK

10

配列番号	名称	配列
		FFNSNKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHEL IQVMAEL SPA AKTGKRKR P
3	マウス I F N G - K R K R P	HGTVIESLES LN NYFNSSGIDVEEKSLFLDIWRNWQKDGD MKILQSQIISFYLR LFEVLKDNQAISNNISVIESHLITTF FSNSKAKKDAFMSIAKFEVNNPQVQRQAFNELIRVVHQLL PESSLRKRKR P
4	FAP(4B9) CDR-H1	SYAMS
5	FAP(4B9) CDR-H2	AIIGSGASTYYADSVKG
6	FAP(4B9) CDR-H3	GWFGGFNY
7	FAP(4B9) CDR-L1	RASQSVTSSYLA
8	FAP(4B9) CDR-L2	VGSRRAT
9	FAP(4B9) CDR-L3	QQGIMLPPT
10	FAP(4B9) VH	EVQLLES GGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGLVTVSS
11	FAP(4B9) VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLA WYQQK PGQAPRLLIIGASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIK
12	FAP (28H1) CDR-H1	SHAMS
13	FAP (28H1) CDR-H2	AIWASGEQYYADSVKG
14	FAP (28H1) CDR-H3	GWLG NFDY
15	FAP (28H1) CDR-L1	RASQSVSRSYLA
16	FAP (28H1) CDR-L2	GASTRAT
17	FAP (28H1) CDR-L3	QQGQVIPPT
18	FAP(28H1) VH	EVQLLES GGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQA PGKGLEWVSAIWASGEQYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKGWLG NFDYWGQGLVTVSS
19	FAP(28H1) VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSRSYLA WYQQK PGQAPRLLIIGASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQGQVIPPTFGQGTKVEIK
20	プロテアーゼ認識部位 1	PQARK
21	プロテアーゼ認識部位 2	HQARK
22	抗 h u I F N G CDR - H 1	SSWIN

20

30

40

50

配列番号	名称	配列
23	抗h u I F N G CDR-H2	RIDPSDGEVHYNQDFKD
24	抗h u I F N G CDR-H3	GFLPWFAD
25	抗h u I F N G CDR-L1	KASENVDITYVS
26	抗h u I F N G CDR-L2	GASNRYT
27	抗h u I F N G CDR-L3	GQSYNYPFT
28	抗h u I F N G VH	EVQLVQSGAELKKPGSSVKVSCASGYIFTSSWINWVKQA PGQCLEWIGRIDPSDGEVHYNQDFKDKATLTVDKSTNTAY MELSSLRSEDTAVYYCARGFLPWFADWGQGTLVTVSS
29	抗h u I F N G VL	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCKASENVDITYVSWYQQKP GKAPKLLIYGASNRYTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPD DDFATYYCGQSYNYPFTFGCGTKVEVK
30	抗m u I F N G CDR-H1	TNSVH
31	抗m u I F N G CDR-H2	AVWTDGTTDYNALKS
32	抗m u I F N G CDR-H3	EHVYYGLV
33	抗m u I F N G CDR-L1	KASQNVGNIA
34	抗m u I F N G CDR-L2	YASNRT
35	抗m u I F N G CDR-L3	QRIFNAPNT
36	抗m u I F N G VH	QVQLQESGPGLVQASQPLSLTCTVSGFSLTNSVHWIRQP AGKCLEWMGAVWTDGTTDYNALKSRLTISRDTSKSQVFL EMSSLQTEDVATYYCAREHVYYGLVWGQGTLVTVSA
37	抗m u I F N G VL	NIVMTQSPKMSISVGDRVTMNCKASQNVGNIAWYQQNP GQSPKLLIYYASNRTGVPRFTGGGYGTDFTLTINNVT EDAASYCQRIFNAPNTFGCGTKLELK
38	抗h u I F N G s c F v	EVQLVQSGAELKKPGSSVKVSCASGYIFTSSWINWVKQA PGQCLEWIGRIDPSDGEVHYNQDFKDKATLTVDKSTNTAY MELSSLRSEDTAVYYCARGFLPWFADWGQGTLVTVSSGGG GSGGGSGGGGSDIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCKASEN VDITYVSWYQQKPGKAPKLLIYGASNRYTGVPSRFSGSGSG TDFTLTISLQPDDEATYYCGQSYNYPFTFGCGTKVEVK
39	抗m u I F N G s c F v	QVQLQESGPGLVQASQPLSLTCTVSGFSLTNSVHWIRQP AGKCLEWMGAVWTDGTTDYNALKSRLTISRDTSKSQVFL EMSSLQTEDVATYYCAREHVYYGLVWGQGTLVTVSAGGG GSGGGSGGGGSDIIVMTQSPKMSISVGDRVTMNCKASQ VGNIAWYQQNPQSPKLLIYYASNRTGVPRFTGGGYG TDFTLTINNVTEDAASYCQRIFNAPNTFGCGTKLELK
40	P1AG7568 重鎖	EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNKNTLY LQMSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQTLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS

10

20

30

40

50

配列番号	名称	配列
		GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGGQDPY VKEAENLKRYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKI MQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKEDMNKFFNS NKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPA KTGKRKRPGGGGSGGGSGGGSGGGPQARKGGGGSGGGGGEV QLVQSGAELKKPGSSVKVSCASGYIFTSSWINWVKQAPG QCLEWIGRIDPSDGEVHYNQDFKDKATLTVDKSTNTAYME LSSLRSEDVAVYYCARGFLPWFADWGQGTLLTVVSSGGGGS GGGSGGGSDIQMTQSPSTLSASVGDRTITCKASENVD TYVSWYQQKPGKAPKLLIYGASNRYTGVPSTRFSGSGSGTD FTLTISSLQPDDEFATYYCGQSYNYPFTFGCGTKVEVK
41	FAP (4B9) 軽鎖	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAWYQQK PGQAPRLINVGSRRTATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
42	P1AG7571 重鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGTLLTVVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGGEVQL VQSGAELKKPGSSVKVSCASGYIFTSSWINWVKQAPGQC LEWIGRIDPSDGEVHYNQDFKDKATLTVDKSTNTAYMELS SLRSEDVAVYYCARGFLPWFADWGQGTLLTVVSSGGGGSGG GSGGGSDIQMTQSPSTLSASVGDRTITCKASENVDY VSWYQQKPGKAPKLLIYGASNRYTGVPSTRFSGSGSGTDFT LTISSLQPDDEFATYYCGQSYNYPFTFGCGTKVEVKGGGGS GGGSGGGPQARKGGGGSGGGGGQDPYVKEAENLKRYF NAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFK LFKNFKDDQSIQKSVETIKEDMNKFFNSNKKKRDDFEKL TNYSVTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPAAGTKGRKRP
43	P1AG3766 重鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQA PGKGLEWVSAIWASGEQYYADSVKGRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKGWLGNDYWGQGTLLTVVSSAKTT PPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTWNSG SLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQTVTCNV AHPASSTKVDKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFFPKP KDVLITITLTPKVTCTVVAISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTA

10

20

30

40

50

配列番号	名称	配列
		QTKPREEQINSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAA FGAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTC MITNFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVY SKLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSPGK GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGGHGTVIESLES LNNYFNSSGIDVEEKSFLDIWRNWQKDGDMKILQSQIIS FYLRLEFVLKDNQAISSNISVIESHLITTFSSNSKAKKDA FMSIAKFEVNNPQVQRQAFNELIRVVHQLLPESLKRKR PGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGQVQLQESGP GLVQASQPLSLTCTVSGFSLTTNSVHWIRQPAGKCLEWMG AVWTDGTTDYNALSRLTISRDTSKSQVFLEMSSLQTED VATYYCAREHVYYGLVGWGQGTTLVTVSAGGGSGGGSGGG GGSNIVMTQSPKSMISVGDRTMNCKASQNVGNNAIYQ QNPQQSPKLLIYYASNRTGVPDRFTGGGYGTDFTLTINN VQTEDAASYCQRIFNAPNTFGCGTKLELK
44	FAP (28H1) mu 軽鎖	EIVLTQSPGTLSTSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQK PGQAPRLLIIGASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQGVIPPTFGQGTKEIKRADAAPTVISIFP PSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVWKIDGSEKQNGV LNSWTDQDSKSTYSMSSTLTLTKEYERHNSYTCEATHK TSTSPIVKSFNRNEC
45	P1AG3755 重鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQA PGKGLEWVSAIWASGEQYYADSVKGRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKGLGNFDYWGQGTTLVTVSSAKTT PPSVYPLAPGSAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTVNSG SLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTPSSTWPSQTVTCNV AHPASSTKVDKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIKPKP KDVLTITLTLPKVTCTVVAISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTA QTKPREEQINSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAA FGAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTC MITNFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVY SKLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSPGK GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGQVQLQESGPG LVQASQPLSLTCTVSGFSLTTNSVHWIRQPAGKCLEWMGA VWTDGTTDYNALSRLTISRDTSKSQVFLEMSSLQTEDV ATYYCAREHVYYGLVGWGQGTTLVTVSAGGGSGGGSGGG GSNIVMTQSPKSMISVGDRTMNCKASQNVGNNAIYQ NPGQSPKLLIYYASNRTGVPDRFTGGGYGTDFTLTINN VQTEDAASYCQRIFNAPNTFGCGTKLELKGGGGSGGGSG GGPQARKGGGGSGGGGGHGTVIESLESNNYFNSSGID VEEKSFLDIWRNWQKDGDMKILQSQIISFYLRLEFVLKD NQAISSNISVIESHLITTFSSNSKAKKDAFMSIAKFEVNN PQVQRQAFNELIRVVHQLLPESLKRKRKP
46	ヒトFAP、 UniProt Q12884	MKTWVKIVFG VATSAVLALL VMCIVLRPSR VHNSEENTMR ALTLKDILNG TFSYKTFPPN WISGQEYLHQ SADNNIVLYN IETGQSYTIL SNRTMKSVNA SNYGLSPDRQ FVYLESYDYSK LWRYSYTATY YIIDLSNGEF VRGNELPRPI QYLCWSPVGS KLAYVYQNNI YLKQRPDPP FQITFNGREN KIFNGIPDWV YEEEMLATKY ALWWSPPNGKF LAYAEFNDTD IPVIAISYYG DEQYPRITNI PYPKAGAKNP VVRIFIIDTT YPAYVGPQEV PVPAMIASSD YYFSWLTWVT

10

20

30

40

配列番号	名称	配列
		DERVCLQWLK RVQNVSVLSI CDFREDWQTW DCPKTQEHIE ESRTGWAGGF FVSTPVFSYD AISYYKIFSD KDGXKHIHYI KDTVENAIQI TSGKWEAINI FRVTQDSLFI SSNEFEEYPG RRNIYRISIG SYPPSKKCVT CHLRKERCQY YTASFSDYAK YYALVCYGP G IPISTLHDGR TDQEIKILEE NKELENALKN IQLPKKEIKK LEVDEITLWY KMILPPQFDR SKKYPLLIQV YGGPCSQSVR SVFAVNWISY LASKEGMVIA LVDGRGTAFQ GDKLLYAVYR KLGVEVEDQ ITAVRKFIEM GFIDEKRIAI WGWSYGGYVS SLALASGTGL FKCGIAPV SWEYYASVY TERFMGLPTK DDNLEHYKNS TVMAREYFR NVDYLLIHGT ADDNVHFQNS AQIAKALVNA QVDFQAMWYS DQNHGLSGLS TNHLYTHMT FLKQCFSLSD
47	マウスFAP、 UniProt P97321	MKTWLKTVFG VTTLAALALV VICIVLRPSR VYKPEGNTKR ALTLKDILNGTFSYKTYFPN WISEQEYLHQ SEDDNIVFYN IETRESYIIL SNSTMKSVNA TDYGLSPDRQ FVYLEDYSK LWRYSYTATY YIYDLQNGEF VRGYELPRPI QYLCWSPVGS KLAYVYQNNI YLKQRP GDPP FQITYTGREN RIFNGIPDWV YEEEMLATKY ALWWSPDGKF LAYVEFNDS IPIIAYSYYG DGQYPTINI PYPKAGAKNP VVRVFIVDTT YPHHVGPMEV PVP EMIASSD YFWSLWTVS SERVCLQWLK RVQNVSVLSI CDFREDWHAW ECPKNQEHVE ESRTGWAGGF FVSTPAFSQD ATSYKIFSD KDGXKHIHYI KDTVENAIQI TSGKWEAIYI FRVTQDSLFI SSNEFEGYPG RRNIYRISIG NSPPSKKCVT CHLRKERCQY YTASFYSKAK YYALVCYGP G LPISTLHDGR TDQEIQVLEE NKELENSLRN IQLPKVEIKK LKDGGLTFWY KMILPPQFDR SKKYPLLIQV YGGPCSQSVK SVFAVNWITY LASKEGIVIA LVDGRGTAFQ GDKFLHAVYR KLGVEVEDQ LTAVRKFIEM GFIDEERIAI WGWSYGGYVS SLALASGTGL FKCGIAPV SWEYYASIY SERFMGLPTK DDNLEHYKNS TVMAREYFR NVDYLLIHGT ADDNVHFQNS AQIAKALVNA QVDFQAMWYS DQNHGISSGR SQNHLYTHMT HFLKQCFSLSD
48	CH1ドメイン	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKV
49	CH1コネクタ C末端	EPKSC
50	ヒンジフル	DKTHTCPXCP with X being S or P

10

20

30

40

50

配列番号	名称	配列
51	ヒンジ中央	HTCPXCP with X being S or P
52	ヒンジショート	CPXCP with X being S or P
53	CH2ドメイン	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQESTYRWSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
54	CH3ドメイン	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSP
55	Fc IgG1、 白人アロタイプ	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMEALHNHYT QKSLSLSPGK
56	Fc IgG1、 アフロアメリカン アロタイプ	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMEALHNHYT QKSLSLSPGK
57	Fc IgG2	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQT YTCNVNHHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPPCPAPPVAGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKC KVSNGKLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN QVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTPMLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMEALHNHYTQKSL SLSPGK
58	Fc IgG3	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YTCNVNHHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTHTCPRCPEPKSC DTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHED PEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENN YNTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVME ALHNRFTQKSLSLSPGK
59	Fc IgG4	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKT YTCNVNHHKPSNTKVDKRVESKYGPCPSCPAPEFLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD

10

20

30

40

配列番号	名称	配列
		DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSLGK
60	ヒト I F N G	MKYTSYILAFQLCIVLGSLGCYCQDPYVKEAENLKKYFNA GHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLF KNFKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKRDDFEKLTN YSVTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPAAGTGRKRKRSQMLFR GRRASQ
61	マウス I F N G、 U n i p r o t P 0 1 5 8 0	MNATHCILALQLFLMAVSGCYCHGTVIESLES LN NYFNSS GIDVEEKSLFLDIWRNWQKDGDMKILQSQIISFYLRLEFV LKDNQAISNNISVIESHLITTFNSNKAKKDAFMSIAKFE VNNPQVQRQAFNELIRVVHQLLPESSLRKRKR SRC
62	ペプチドリンカー (G 4 S)	GGGGS
63	ペプチドリンカー (G 4 S) ₂	GGGGS GGGGS
64	ペプチドリンカー (S G 4) ₂	SGGGSGGGG
65	ペプチドリンカー-G 4 (S G 4) ₂	GGGGS GGGGS GGGG
66	(G 4 S) ₃ ペプチド リンカー	GGGGS GGGGS GGGGS
67	(G 4 S) ₄ ペプチド リンカー	GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS
68	(G 4 S) ₅ ペプチド リンカー	GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS
69	(G 4 S) ₅ G G G G Gペプチドリンカー	GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGG
70	P Q A R K リンカー	GGGGS GGGGS GGGPQARKGGGGGS GGGG
71	H Q A R K リンカー	GGGGS GGGGS GGGHQARKGGGGGS GGGG
72	ペプチドリンカー	GGGGS GGG
73	ペプチドリンカー-A	LEVLFQG
74	ペプチドリンカー-B	GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GLEVLFQGP GGGGS GGGG
75	ペプチドリンカー-C	QARK
76	ヒンジ1	TCPPCP
77	ヒンジ2	PCP
78	K R K R パッチ	KRKR
79	P 1 A G 3 7 6 8 重鎖	EVQLLES GGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGT LVT VSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT P PVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGGGSGGGSGGGSGQDPYVKEAENLKKYFNAGH SDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKN

10

20

30

40

50

配列番号	名称	配列
		FKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYS VTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPAAGTGRKRSSQMLFRG
80	P 1 A G 3 7 6 9 重鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGT LVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGGGGSGGGSGGGSGGGSDPYVKEAENLKKYFNAGH SDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKN FKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYS VTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPAAGTG
81	P 1 A F 3 5 7 0 重鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGT LVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGGGGSGGGSGGGSGGGSDPYVKEAENLKKYFNAGH SDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKN FKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYS VTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPAAGTGRKRSSQ
82	P 1 A F 3 5 7 1 重鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGT LVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGGGGSGGGSGGGSGGGSDPYVKEAENLKKYFNAGH SDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKN FKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYS VTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPAAGTGRKRSL
83	P 1 A F 3 5 7 4 重鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGT LVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV

10

20

30

40

50

配列番号	名称	配列
		FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNNHYTQKS LSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGQDPYVKEAENLKYYFNAGH SDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKN FKDDQSIQKSVETIKEDMNKFFNSNKKRDDFEKLTNYS VTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPAAKTGKRKP
84	P 1 A F 3 5 7 5 重鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNNHYTQKS LSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGQDPYVKEAENLKYYFNAGH SDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKN FKDDQSIQKSVETIKEDMNKFFNSNKKRDDFEKLTNYS VTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPAAKTGKRKP
85	P 1 A F 3 5 7 6 重鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNNHYTQKS LSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGQDPYVKEAENLKYYFNAGH SDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKN FKDDQSIQKSVETIKEDMNKFFNSNKKRDDFEKLTNYS VTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPAAKTGKRKP
86	P 1 A F 3 5 7 7 重鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNNHYTQKS LSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGQDPYVKEAENLKYYFNAGH SDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKN

10

20

30

40

50

配列番号	名称	配列
		FKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYS VTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPAAKTGKP
87	P 1 A F 3 5 7 8 重鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGT LVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGGGGSGGGSGGGSGQDPYVKEAENLK KYFNAGH SDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKN FKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYS VTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPAAKTGKRKRSP
88	P 1 A F 9 4 7 0 重鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGT LVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGGGGSGGGSGGGSGQDPYVKEAENLK KYFNAGH SDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKN FKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYS VTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPAAKTGKRKSP
89	P 1 A F 3 5 8 0 重鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGT LVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGGGGSGGGSGGGSGQDPYVKEAENLK KYFNAGH SDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKN FKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYS VTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPAAKTGKRSP
90	P 1 A F 3 5 8 1 重鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGT LVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV

10

20

30

40

50

配列番号	名称	配列
		FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGGSGGGGSGGGGSDPYVKEAENLK KYNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKN FKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKRDDFEKLTNYS VTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPAAKTGKSP
91	P 1 A F 9 4 6 4 重鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGGSGGGGSGGGGSDPYVKEAENLK KYNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKN FKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKRDDFEKLTNYS VTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPAAKTGSRKRP
92	P 1 A F 9 4 6 9 重鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGGSGGGGSGGGGSDPYVKEAENLK KYNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKN FKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKRDDFEKLTNYS VTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPAAKTGKSKRP
93	P 1 A F 9 4 6 5 重鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGGSGGGGSGGGGSDPYVKEAENLK KYNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKN

10

20

30

40

50

配列番号	名称	配列
		FKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYS VTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPAAKTGKRSRP
94	P 1 A F 9 4 7 0 重鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGT LVT VSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLN GKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMHEALHNHYTQKS LSLSPGGGGSGGGSGGGGSQDPYVKEAENLKKYFNAGH SDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKN FKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYS VTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPAAKTGKRKSP
95	P 1 A F 9 4 7 5 重鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGT LVT VSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLN GKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMHEALHNHYTQKS LSLSPGGGGSGGGSGGGGSQDPYVKEAENLKKYFNAGH SDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKN FKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYS VTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPAAKTGPRKRP
96	P 1 A F 9 4 7 6 重鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGT LVT VSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLN GKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMHEALHNHYTQKS LSLSPGGGGSGGGSGGGGSQDPYVKEAENLKKYFNAGH SDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKN FKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYS VTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPAAKTGKPKRP
97	P 1 A F 9 4 7 7 重鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGT LVT VSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV

10

20

30

40

50

配列番号	名称	配列
		FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNNHYTQKS LSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGQDPYVKEAENLKYYFNAGH SDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKN FKDDQSIQKSVETIKEDMNKFFNSNKKRDDFEKLTNYS VTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPAAKTGKRPRP
98	P 1 A F 9 4 7 8 重鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNNHYTQKS LSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGQDPYVKEAENLKYYFNAGH SDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKN FKDDQSIQKSVETIKEDMNKFFNSNKKRDDFEKLTNYS VTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPAAKTGKRKPP
99	P 1 A F 9 4 8 3 重鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNNHYTQKS LSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGQDPYVKEAENLKYYFNAGH SDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKN FKDDQSIQKSVETIKEDMNKFFNSNKKRDDFEKLTNYS VTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPAAKTGKRKP
100	P 1 A F 9 4 8 4 重鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNNHYTQKS LSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSGQDPYVKEAENLKYYFNAGH SDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKN

10

20

30

40

50

配列番号	名称	配列
		FKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYS VTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPAAKTGKEKRP
101	P 1 A F 9 4 8 5 重鎖	EVQLLES G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y A M S W V R Q A P G K G L E W V S A I I G S G A S T Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K G W F G G F N Y W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P C P A P E A A G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L G A P I E K T I S K A K Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G G G G S G G G S G G G S Q D P Y V K E A E N L K K Y F N A G H S D V A D N G T L F L G I L K N W K E E S D R K I M Q S Q I V S F Y F K L F K N F K D D Q S I Q K S V E T I K E D M N V K F F N S N K K R D D F E K L T N Y S V T D L N V Q R K A I H E L I Q V M A E L S P A A K T G K R E R P
102	P 1 A F 9 4 8 6 重鎖	EVQLLES G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y A M S W V R Q A P G K G L E W V S A I I G S G A S T Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K G W F G G F N Y W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P C P A P E A A G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L G A P I E K T I S K A K Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G G G G S G G G S G G G S Q D P Y V K E A E N L K K Y F N A G H S D V A D N G T L F L G I L K N W K E E S D R K I M Q S Q I V S F Y F K L F K N F K D D Q S I Q K S V E T I K E D M N V K F F N S N K K R D D F E K L T N Y S V T D L N V Q R K A I H E L I Q V M A E L S P A A K T G K R K E P
103	P 1 A F 9 4 7 3 重鎖	EVQLLES G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y A M S W V R Q A P G K G L E W V S A I I G S G A S T Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K G W F G G F N Y W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P C P A P E A A G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L G A P I E K T I S K A K Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G G G G S G G G S G G G S Q D P Y V K E A E N L K K Y F N A G H S D V A D N G T L F L G I L K N W K E E S D R K I M Q S Q I V S F Y F K L F K N F K D D Q S I Q K S V E T I K E D M N V K F F N S N K K R D D F E K L T N Y S V T D L N V Q R K A I H E L I Q V M A E L S P A A K T G S R S R P
104	P 1 A F 9 4 8 1 重鎖	EVQLLES G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y A M S W V R Q A P G K G L E W V S A I I G S G A S T Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K G W F G G F N Y W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P C P A P E A A G G P S V

10

20

30

40

50

配列番号	名称	配列
		FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGSGGGGSQDPYVKEAENLK KYNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKRDDFEKLTNYS VTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPAAKTGPRPRP
105	P 1 A F 9 4 8 9 重鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGSGGGGSQDPYVKEAENLK KYNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKRDDFEKLTNYS VTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPAAKTGERERP
106	P 1 A F 9 4 7 4 重鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGSGGGGSQDPYVKEAENLK KYNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKRDDFEKLTNYS VTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPAAKTGKSKSP
107	P 1 A F 9 4 8 2 重鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGSGGGGSQDPYVKEAENLK KYNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKN

10

20

30

40

50

配列番号	名称	配列
		FKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYS VTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPAAKTGKPKPP
108	P 1 A F 9 4 9 0 重鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGT LVT VSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMHEALHNHYTQKS LSLSPGGGGSGGGSGGGSGGGSDPYVKEAENLK KYFNAGH SDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKN FKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYS VTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPAAKTGKEKEP
109	P 1 A F 9 4 7 1 重鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGT LVT VSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMHEALHNHYTQKS LSLSPGGGGSGGGSGGGSGGGSDPYVKEAENLK KYFNAGH SDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKN FKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYS VTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPAAKTGSSKRP
110	P 1 A F 9 4 7 9 重鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGT LVT VSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSC SVMHEALHNHYTQKS LSLSPGGGGSGGGSGGGSGGGSDPYVKEAENLK KYFNAGH SDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKN FKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYS VTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPAAKTGPPKRP
111	P 1 A F 9 4 8 7 重鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGT LVT VSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV

10

20

30

40

50

配列番号	名称	配列
		FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGGSGGGGSGGGGSDPYVKEAENLK KYNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKN FKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKRDDFEKLTNYS VTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPAAKTGEEKRP
112	P 1 A F 9 4 7 2 重鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGGSGGGGSGGGGSDPYVKEAENLK KYNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKN FKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKRDDFEKLTNYS VTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPAAKTGKRSSP
113	P 1 A F 9 4 8 0 重鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGGSGGGGSGGGGSDPYVKEAENLK KYNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKN FKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKRDDFEKLTNYS VTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPAAKTGKRPPP
114	P 1 A F 9 4 8 8 重鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGGSGGGGSGGGGSDPYVKEAENLK KYNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKN

10

20

30

40

50

配列番号	名称	配列
		FKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKLTNYS VTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPAAKTGKREEP
115	P 1 A G 7 5 6 7 重鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGLTVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC NVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDNLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMH EALHNHYTQKS LSLSLPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGQDPY VKEAENLK KYFNAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKI MQSQIVSFYFKL FKNFKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNS NKKKRDDFEKLTNYSVTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPA KTGKRKRPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGEV QLVQSGAELKKPGSSVKVSCASGYIFTSSWINWVKQAPG QCLEWIGRIDPSDGEVHYNQDFKDKATLTVDKSTNTAYME LSSLRSED TAVYYCARGFLPFWADWGQGLTVTVSSGGGGS GGGSGGGGSDIQMTQSPSTLSASVGDRVITITKASENVDY TVGSWYQQKPGKAPKLLIYGASNRYTGVP SRFSGSGSGTD FTLTISSLQPD DFATYYCGQSYNYPFTFGCGTKVEVK
116	P 1 A G 7 5 7 0 重鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGLTVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC NVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDNLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMH EALHNHYTQKS LSLSLPGGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGEVQL VQSGAELKKPGSSVKVSCASGYIFTSSWINWVKQAPGQC LEWIGRIDPSDGEVHYNQDFKDKATLTVDKSTNTAYMELS LSRSED TAVYYCARGFLPFWADWGQGLTVTVSSGGGGSGG GGSGGGSDIQMTQSPSTLSASVGDRVITITKASENVDY VSWYQQKPGKAPKLLIYGASNRYTGVP SRFSGSGSGTDFT LTISSLQPD DFATYYCGQSYNYPFTFGCGTKVEVKGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGGQDPYVKEAENLK KYF NAGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFK L FKNFKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKKRDDFEKLT NYSVTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPAAKTGKRRP
117	P 1 A G 1 3 1 0 重鎖	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGLTVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC NVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD

40

配列番号	名称	配列
		LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHTQKSLSLSPGK
121	P 1 A G 8 6 9 4 重鎖	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTYMHWVRQA PGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGRVTITADTSTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGTILVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGQDPYVKEAENLKRYFNAGHSDVADNG TLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSI QKSVETIKEDMNVKFFNSNKKRRDDFEKLTNYSVTDLNVQ RKAIHEL IQVMAELSPAAGTGRKRPLEVLFQGPAPPAE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVHLQDW LNGKEYCKVSNKALGAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALH NYHTQKSLSLSPGK
122	P 1 A G 8 6 9 5 重鎖	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTYMHWVRQA PGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGRVTITADTSTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGTILVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGQDPYVKEAENLKRYFNAGHSDVADNG TLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSI QKSVETIKEDMNVKFFNSNKKRRDDFEKLTNYSVTDLNVQ RKAIHEL IQVMAELSPAAGTGRKRPLEVLFQGPAPPAE GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVHLQDWLNG KEYCKVSNKALGAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNY HTQKSLSLSPGK
123	P 1 A G 8 6 9 6 重鎖	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTYMHWVRQA PGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGRVTITADTSTSTAY MELSSLRSEDTAVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGTILVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSGGGGQDPYVKEAENLKRYFNAGHSDVADNG TLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKLFKNFKDDQSI QKSVETIKEDMNVKFFNSNKKRRDDFEKLTNYSVTDLNVQ RKAIHEL IQVMAELSPAAGTGRKRPLEVLFQGPAPPAE AGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVHLQDWL NGKEYCKVSNKALGAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALH NYHTQKSLSLSPGK
124	P 1 A G 8 6 9 7 重鎖	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGFNIKDTYMHWVRQA PGQGLEWMGRIDPANGNSKYVPKFQGRVTITADTSTSTAY

10

20

30

40

50

配列番号	名称	配列
		MELSSLRSED TAVYYCAPFGYYVSDYAMAYWGQGTILVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCGGGSGGGGSGGGGSG GGGSGLEVL FQGPGGGGSGGGGGQDPYVKEAENLK YFN AGHSDVADNGTLFLGILKNWKEESDRKIMQSQIVSFYFKL FKNFKDDQSIQKSVETIKEDMNVKFFNSNKKRDDFEKLT NYSVTDLNVQRKAIHELIQVMAELSPA AKTGKRKRP
125	P 1 A F 3 5 6 8 I F N G C 末端	AKTGKRKRSQMLFRG
126	P 1 A F 3 5 6 9 I F N G C 末端	AKTG
127	P 1 A F 3 5 7 0 I F N G C 末端	AKTGKRKRSQ
128	P 1 A F 3 5 7 1 I F N G C 末端	AKTGKRKRSL
129	P 1 A F 3 5 7 4 I F N G C 末端	AKTGKRKRP
130	P 1 A F 3 5 7 5 I F N G C 末端	AKTGKRKRP
131	P 1 A F 3 5 7 6 I F N G C 末端	AKTGKRP
132	P 1 A F 3 5 7 7 I F N G C 末端	AKTGKP
133	P 1 A F 3 5 7 8 I F N G C 末端	AKTGKRKRSP
134	P 1 A F 9 4 7 0 I F N G C 末端	AKTGKRKSP
135	P 1 A F 3 5 8 0 I F N G C 末端	AKTGKRSP
136	P 1 A F 3 5 8 1 I F N G C 末端	AKTGKSP
137	P 1 A F 9 4 6 4 I F N G C 末端	AKTGSRKRP
138	P 1 A F 9 4 6 9 I F N G C 末端	AKTGKSKRP
139	P 1 A F 9 4 6 5 I F N G C 末端	AKTGKRSRP
140	P 1 A F 9 4 7 5 I F N G C 末端	AKTGPRKRP
141	P 1 A F 9 4 7 6 I F N G C 末端	AKTGKPKRP
142	P 1 A F 9 4 7 7 I F N G C 末端	AKTGKRPRP
143	P 1 A F 9 4 7 8 I F N G C 末端	AKTGKRPPP
144	P 1 A F 9 4 8 3 I F N G C 末端	AKTGERKRP

10

20

30

40

50

配列番号	名称	配列
145	P 1 A F 9 4 8 4 I F N G C 末端	AKTGKEKRP
146	P 1 A F 9 4 8 5 I F N G C 末端	AKTGKRERP
147	P 1 A F 9 4 8 6 I F N G C 末端	AKTGKRKEP
148	P 1 A F 9 4 7 3 I F N G C 末端	AKTGSRSRP
149	P 1 A F 9 4 8 1 I F N G C 末端	AKTGPRPRP
150	P 1 A F 9 4 8 9 I F N G C 末端	AKTGERERP
151	P 1 A F 9 4 7 4 I F N G C 末端	AKTGKSKSP
152	P 1 A F 9 4 8 2 I F N G C 末端	AKTGKPKPF
153	P 1 A F 9 4 9 0 I F N G C 末端	AKTGKEKEP
154	P 1 A F 9 4 7 1 I F N G C 末端	AKTGSSKRP
155	P 1 A F 9 4 7 9 I F N G C 末端	AKTGPPKRP
156	P 1 A F 9 4 8 7 I F N G C 末端	AKTGEEKRP
157	P 1 A F 9 4 7 2 I F N G C 末端	AKTGKRSSP
158	P 1 A F 9 4 8 0 I F N G C 末端	AKTGKRPPP
159	P 1 A F 9 4 8 8 I F N G C 末端	AKTGKREEP
160	I F N G C 末端を 1 アミノ酸短縮	AKTGKRKRSQMLFR
161	I F N G C 末端を 2 アミノ酸短縮	AKTGKRKRSQMLF
162	I F N G C 末端を 3 アミノ酸短縮	AKTGKRKRSQML
163	I F N G C 末端を 4 アミノ酸短縮	AKTGKRKRSQM

10

20

30

40

50

配列番号	名称	配列
164	I F N G C末端を 8アミノ酸短縮	AKTGKRRK
165	I F N G C末端を 9アミノ酸短縮	AKTGKR
166	I F N G C末端を 10アミノ酸短縮	AKTGK

10

【0224】

以下の段落（項）は、本発明の態様である。

【0225】

1. 抗原結合分子であって、

（i）腫瘍関連抗原に特異的に結合する抗体と、

20

（ii）インターフェロンガンマ（IFNG）バリエーションポリペプチドのホモ二量体であって、IFNGバリエーションポリペプチドが、C末端アミノ酸配列KRKR（配列番号1）によって特徴付けられる、IFNGバリエーションポリペプチドのホモ二量体と、を含む、抗原結合分子が提供される。

【0226】

2. IFNGバリエーションポリペプチドが、配列番号2または配列番号3のアミノ酸配列を含むかまたはこれからなる、項1に記載の抗原結合分子。

【0227】

3. 腫瘍関連抗原に特異的に結合する抗体が、線維芽細胞活性化タンパク質（FAP）に特異的に結合する抗体である、項1または2に記載の抗原結合分子。

30

【0228】

4. FAPに特異的に結合する抗体が、

（a）配列番号4のアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域（CDR-H1）、配列番号5のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および配列番号6のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む重鎖可変領域（V_HFAP）、ならびに配列番号7のアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域（i v）CDR-L1、配列番号8のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および配列番号9のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含む軽鎖可変領域（V_LFAP）、または

（b）配列番号12のアミノ酸配列を含むCDR-H1、配列番号13のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および配列番号14のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む重鎖可変領域（V_HFAP）、ならびに配列番号15のアミノ酸配列を含むCDR-L1、配列番号16のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および配列番号17のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含む軽鎖可変領域（V_LFAP）を含む、項1～3のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

40

【0229】

5. FAPに特異的に結合する抗体が、配列番号10のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（V_HFAP）と配列番号11のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（V_LFAP）とを含むか、または配列番号18のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（V_HFAP）と配列番号19のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（V_LFAP）とを含む、項1～4のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

50

【0230】

6. 抗原結合分子が、IgG1 FcドメインまたはIgG4 Fcドメインを含み、Fcドメインが、Fc受容体に対する抗体の結合親和性および／またはエフェクター機能を低下させる1つ以上のアミノ酸置換を含む、項1～5のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【0231】

7. Fcドメインが、アミノ酸変異L234A、L235AおよびP329G (Kabata EUIンデックスによるEUIナンバリング) を有するヒトIgG1サブクラスのものである、項1～6のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【0232】

8. 抗原結合分子が、プロテアーゼ活性化可能であり、プロテアーゼ認識部位およびマスキング部分を含む、項1～5のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【0233】

9. プロテアーゼ認識部位がマトリプターゼの基質である、項8に記載の抗原結合分子。

【0234】

10. プロテアーゼ認識部位が、PQARK (配列番号20) またはHQARK (配列番号21)、特にPQARK (配列番号20) を含むかまたはこれからなる、項8または9に記載の抗原結合分子。

【0235】

11. プロテアーゼ認識部位が、マスキング部分をIFNGバリエーションポリペプチドと接続する切断可能なペプチドリinkerの一部である、項8～10のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【0236】

12. マスキング部分が、そのN末端において、切断可能なペプチドリinkerを介してIFNGバリエーションポリペプチドのC末端に融合されている、項8～11のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【0237】

13. マスキング部分が、そのN末端において、安定なリンカーを介してFcドメインのC末端に融合され、そのC末端において、切断可能なペプチドリinkerを介してIFNGバリエーションポリペプチドのN末端に融合されている、項8～11のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【0238】

14. マスキング部分が、IFNGに特異的に結合する抗体または抗体断片である、項8～13のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【0239】

15. マスキング部分が、IFNGに特異的に結合するscFvである、項8～14のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【0240】

16. IFNGに特異的に結合するscFvが、

(a) 配列番号22のアミノ酸配列を含むCDR-H1、配列番号23のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および配列番号24のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む重鎖可変領域(V_HIFNG)、ならびに配列番号25のアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域(i_v) CDR-L1、配列番号26のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および配列番号27のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含む軽鎖可変領域(V_LIFNG)、または

(b) 配列番号30のアミノ酸配列を含むCDR-H1、配列番号31のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および配列番号32のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む重鎖可変領域(V_HIFNG)、ならびに配列番号33のアミノ酸配列を含むCDR-L1、配列番号34のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および配列番号35のアミノ酸配列を

10

20

30

40

50

含む C D R - L 3 を含む軽鎖可変領域 (V_L I F N G) を含む。

【0241】

17. I F N G に特異的に結合する s c F v が、

(a) 配列番号 28 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V_H I F N G) および配列番号 29 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V_L I F N G)、または

(b) 配列番号 36 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V_H I F N G) および配列番号 37 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V_L I F N G)

を含む、項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

【0242】

18. I F N G バリエーションポリペプチドを含有する抗原結合分子であって、当該抗原結合分子が、

(i) 配列番号 40 のアミノ酸配列を含む 2 本の重鎖および配列番号 41 のアミノ酸配列を含む 2 本の軽鎖、または

(i i) 配列番号 42 のアミノ酸配列を含む 2 本の重鎖および配列番号 41 のアミノ酸配列を含む 2 本の軽鎖、または

(i i i) 配列番号 43 のアミノ酸配列を含む 2 本の重鎖および配列番号 44 のアミノ酸配列を含む 2 本の軽鎖、または

(i v) 配列番号 45 のアミノ酸配列を含む 2 本の重鎖および配列番号 44 のアミノ酸配列を含む 2 本の軽鎖を含む。

【0243】

19. インターフェロンガンマ (I F N G) バリエーションポリペプチドであって、I F N G バリエーションポリペプチドが、C 末端アミノ酸配列 K R K R P (配列番号 1) によって特徴付けられる、I F N G バリエーションポリペプチド。

【0244】

20. I F N G バリエーションポリペプチドが、配列番号 2 または配列番号 3 のアミノ酸配列を含むかまたはこれからなる、項 19 に記載の I F N G バリエーションポリペプチド。

【0245】

21. 項 1 ~ 18 のいずれか一項に記載の抗原結合分子または項 19 もしくは 20 に記載の I F N G バリエーションポリペプチドをコードする 1 つ以上の単離されたポリヌクレオチド。

【0246】

22. 項 21 に記載の 1 つ以上の単離されたポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【0247】

23. 項 21 に記載の 1 つ以上の単離されたポリヌクレオチドまたは項 22 に記載の発現ベクターを含む原核生物宿主細胞または真核生物宿主細胞。

【0248】

24. 抗原結合分子または I F N G バリエーションポリペプチドを産生する方法であって、

a) 項 23 に記載の原核生物宿主細胞または真核生物宿主細胞を、抗原結合分子または I F N G バリエーションポリペプチドの発現に適した条件下で培養する工程と、b) 任意に、抗原結合分子または I F N G バリエーションポリペプチドを回収する工程と、を含む、方法。

【0249】

25. 項 1 ~ 18 のいずれか一項に記載の抗原結合分子または項 19 もしくは 20 に記載の I F N G バリエーションポリペプチドと、薬学的に許容される賦形剤と、を含む、医薬組成物。

【0250】

26. 医薬品として使用するための、項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の抗原結合分子または項 19 もしくは 20 に記載の I F N G バリエーションポリペプチド。

【0251】

27. がんの処置において使用するための、項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の抗原結合分子または項 19 もしくは 20 に記載の I F N G バリエーションポリペプチド。

10

20

30

40

50

【0252】

28. 抗原結合分子またはIFNGバリエーションポリペプチドが、化学療法剤、放射線および／またはがん免疫療法で使用するための他の薬剤と組み合わせて投与されるものである、がんの処置において使用するための、項1～17のいずれか一項に記載の抗原結合分子または項19もしくは20に記載のIFNGバリエーションポリペプチド。

【0253】

29. がんの処置において使用するための医薬品を製造するための、項1～17のいずれか一項に記載の抗原結合分子または項19もしくは20に記載のIFNGバリエーションポリペプチドの使用。

【0254】

30. 個体における疾患を処置する方法であって、個体に、治療有効量の項1～17のいずれか一項に記載の抗原結合分子または項19もしくは20に記載のIFNGバリエーションポリペプチドを薬学的に許容される形態で投与することを含む、方法。

【0255】

31. 疾患ががんである、項30に記載の方法。

【実施例】

【0256】

以下は、本発明の方法および組成物の実施例である。本明細書に提供される概要を考慮して、様々な他の実施形態が実施され得ることが理解される。

【0257】

組換えDNA技術および配列決定

標準的な方法を使用して、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York、1989に記載されるように、DNAを操作した。分子生物学的試薬を製造者の指示書に従って使用した。ヒト免疫グロブリンの軽鎖および重鎖のヌクレオチド配列に関する一般的な情報は、Kabat, E. A. ら、(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest、Fifth Ed.、NIH Publication No 91-3242で得られる。DNA配列は、二本鎖配列決定によって決定した。

【0258】

遺伝子合成

所望の遺伝子セグメントは、適切なテンプレートを使用してPCRによって生成されるか、または自動遺伝子合成によって合成オリゴヌクレオチドおよびPCR産物からGenScript (中国) によって合成された。特異的な制限エンドヌクレアーゼ切断部位に隣接する遺伝子セグメントを、標準的なクローニング／配列決定ベクター中にクローニングした。プラスミドDNAを形質転換細菌から精製し、濃度をUV分光法によって測定した。サブクローニングされた遺伝子断片のDNA配列をDNA配列決定によって確認した。それぞれの発現ベクターへのサブクローニングを可能にするために、適切な制限部位を有する遺伝子セグメントを設計した。全ての構築物は、真核細胞における分泌のためのタンパク質を標的とするリーダーペプチドをコードする、5'末端DNA配列を用いて設計された。

【0259】

細胞培養技術

Current Protocols in Cell Biology (2000)、Bonifacino, J. S.、Dasso, M.、Harford, J. B.、Lippincott-Schwartz, J. および Yamada, K. M. (編)、John Wiley & Sons, Inc. に記載されているように、標準的な細胞培養技術を使用した。

【0260】

タンパク質精製

標準的なプロトコルを参照して、濾過した細胞培養上清からタンパク質を精製した。簡単に記載すると、Fc含有タンパク質を、プロテインA－アフィニティークロマトグラフィー（平衡化緩衝液：20mMクエン酸ナトリウム、20mMリン酸ナトリウム、pH7.5；溶出緩衝液：20mMクエン酸ナトリウム、pH3.0）によって細胞培養上清から精製した。溶出をpH3.0で達成し、続いて試料のpHを直ちに中和した。タンパク質を遠心分離（Millipore Amicon（登録商標）ULTRA-15（Art. Nr. : UFC903096）によって濃縮し、凝集したタンパク質を、20mMヒスチジン、140mM塩化ナトリウム、pH6.0中でサイズ排除クロマトグラフィー（Superdex 200, GE Healthcare）によって単量体タンパク質から分離した。単量体化合物画分をプールし、（必要に応じて）例えばMILLIPORE Amicon Ultra（30MWCO）遠心濃縮器を使用して濃縮し、凍結し、-80℃で保存した。試料の一部は、その後のタンパク質分析およびCE-SDS、サイズ排除クロマトグラフィー（SE-HPLC）および質量分析（LC-MS）による分析的特徴付けのために提供された。

10

20

30

40

50

【0261】

あるいは、遺伝子合成、クローニング、トランスフェクションおよび回収をevitria AG（Schlieren, Switzerland）に外注した。対応するcDNAを、従来の（非PCRベース）クローニング技術を使用してevitriaのベクター系にクローニングした。evitriaベクタープラスミドを遺伝子合成した。プラスミドDNAを、陰イオン交換クロマトグラフィーに基づく低エンドトキシン条件下で調製した。DNA濃度は、波長260nmでの吸収を測定することによって決定した。配列の正確性は、サンガー配列決定（プラスミド1つ当たり2つの配列決定反応による）により検証した。懸濁液適合CHO K1細胞（入手元であるATCCから受け取ったものを、evitriaにおいて懸濁培養での無血清増殖に適合させた）を生成に使用した。シードを、化学的に定義された動物成分を含まない無血清培地であるeviGrow培地中で増殖させた。細胞を、eviFect（evitriaの特注の独自のトランスフェクション試薬）でトランスフェクトし、トランスフェクション後、動物成分を含まない無血清培地であるeviMake2で増殖させた。遠心分離およびその後の濾過（0.2μmフィルタ）により、上清を回収した。

【0262】

あるいは、目的の化合物を、従来の（非PCRベースの）クローニング技術を用いた独自のベクター系を使用し、懸濁液適合HEK293細胞を使用して、Wuxi Biologicsによって調製した。全ての遺伝子の発現は、ヒトCMVプロモーターの制御下にあった。産生のために、Wuxi Biologicsは、市販の化学的に定義された培地を使用し、36.5℃および6%二酸化炭素でトランスフェクション後に細胞を培養した。遠心分離およびその後の濾過（0.2μmフィルタ）により上清を回収し、標準的な方法により、回収した上清からタンパク質を精製した。

【0263】

上清中のFc含有コンストラクトの定量は、UV検出器を備えたAgilent HPLCシステムでプロテインA-HPLCにより行った。上清をPOROS 20 A（Applied Biosystems）に注入した。280nmの溶出ピーク面積を積分し、同じランで分析した標準を用いた検量線を使用して濃度に変換した。

【0264】

標準的なプロトコルを参照して、濾過した細胞培養上清からタンパク質を精製した。簡単に記載すると、Fc含有タンパク質を、プロテインAアフィニティークロマトグラフィーにより細胞培養上清から精製した。溶出後、試料のpHを直ちに中和した。タンパク質を遠心分離（Millipore Amicon（登録商標）ULTRA-15（Art. Nr. : UFC903096）によって濃縮し、凝集したタンパク質を、20mMヒスチジン、140mM塩化ナトリウム、pH6.0中でサイズ排除クロマトグラフィー（A

k t a P u r e & H i L o a d 2 6 / 6 0 0 S u p e r d e x 2 0 0 ; 両方とも C y t i v a から) によって単量体タンパク質から分離した。

【0265】

精製したタンパク質の濃度は、P a c e ら、P r o t e i n S c i . 1 9 9 5、4 (1 1)、2 4 1 1 - 2 4 2 3 に従ってアミノ酸配列に基づいて計算された質量吸光係数を使用して280nmでの吸収を測定することによって決定した (L i t t l e L u n a t i c、U n c h a i n e d l a b s)。L a b C h i p G X I I (P e r k i n E l m e r) を使用して、還元剤の存在下および非存在下にて、C E - S D S により、タンパク質の純度および分子量を分析した。凝集体含有量の決定を、分析用サイズ排除カラム (T S K g e l G 3 0 0 0 S W X L) を使用して、25℃でHPLCクロマトグラフィーにより行った。

10

【0266】

I g G 様タンパク質の組成物の分析

精製したタンパク質の濃度は、P a c e ら、P r o t e i n S c i e n c e、1 9 9 5、4 (1 1)、2 4 1 1 - 1 4 2 3 に従ってアミノ酸配列に基づいて計算された質量吸光係数を使用して280nmでの吸収を測定することによって決定した。タンパク質の純度および分子量を、製造者のプロトコルに従い、r a p i d P N G a s e F での事前処理ありまたはなしで、L a b C h i p G X I I または L a b C h i p G X T o u c h (P e r k i n E l m e r) (P e r k i n E l m e r) を使用し、還元剤の存在下および非存在下で、C E - S D S により分析した。凝集物含有量の決定を、ランニング緩衝液 (2 0 0 m M K H ₂ P O ₄、2 5 0 m M K C l (p H 6 . 2)、0 . 0 2 % N a N ₃) 中で平衡化した分析用サイズ排除クロマトグラフィー (T S K g e l G 3 0 0 0 S W X L カラムまたは U P - S W 3 0 0 0 カラム) を使用して、25℃でS E - H P L C クロマトグラフィーにより実施した。

20

【0267】

E S I - M S による質量決定

精製した化合物のインタクト／脱グリコシル化および脱グリコシル化／還元質量を決定するために、質量分析によって試料を分析した。ヒトFcおよび通常のFcグリコシル化を有する化合物の場合、25μgのタンパク質をM i l l i - Q T y p e 1 U l t r a p u r e W a t e r で40μLの体積まで希釈した。次いで、9μLの250mM リン酸ナトリウムpH7.5および1μLのP N G a s e F P R I M E (商標) (N - Z y m e S c i e n t i f i c s、N Z P P 5 5 0、ロット番号N Z - 2 0 1 9 - 0 1 2 3、0 . 2 g / L) を添加し、混合物を37℃で一晩インキュベートした。非ヒトFcを有するタンパク質および／または通常のN-グリコサイトより多くを含有する化合物の場合、10μgのタンパク質をM i l l i - Q T y p e 1 U l t r a p u r e W a t e r を使用して8μLまで希釈し、2μLの「非還元」緩衝液 (R a p i d P N G a s e F 非還元緩衝液、N E B # P 0 7 1 1 S、ロット10085473、10 / 21) と混合し、70℃で5分間インキュベートした。次いで、1μLのR a p i d P N G a s e F を添加し、50℃で10分間インキュベートした。脱グリコシル化後、試料をM i l l i - Q T y p e 1 U l t r a p u r e W a t e r を使用して20μLまで希釈した。システイン結合を還元するために、20μLのヒトFcタンパク質を20μLの新たに調製した還元剤 (7 M グアニジン、0 . 4 M トリスpH8.0、0 . 5 M D T T) と混合した。r a p i d P N G a s e F によって消化された試料については、7μLを7μLの還元剤と混合した。全ての種類の試料について、還元および変性を70℃で5分間行った。試料をジビニルベンゼンカラム (A g i l e n t、P L R P - S 1 0 0 0 Å、2 . 1 × 1 5 0 m m、8 μ m、0 . 7 m L / 分、7 5 ° C、カラム上1 μ g) での逆相クロマトグラフィーによって脱塩し、Q T O F 型質量分析計 (A g i l e n t 6 5 4 5 X T A d v a n c e B i o L C / Q - T O F) を使用して質量スペクトルを記録した。質量分析計は、各試料の配列前に較正し、ロックマス補正を適用して高い質量精度を得た。データ分析のために、R o c h e M a s s A n a l y z e r を使用してクロマ

30

40

50

トグラフィーピークのマススペクトルを合計し、検出された質量を解釈した。次いで、決定された質量を計算された理論質量と比較した。

【0268】

あるいは、LC-MS特性評価をNMI技術移転(Reutlingen, Germany)で行った。インタクトな質量を決定するために、試料あたり12.5~25 µgを、rapidPNGase F酵素キット(Rapid PNGase F non-reducing, NEB#P0711S、ロット10085472, 10/21)に含まれる「非還元」緩衝液で1:4 (v/v)に希釈し、80℃で2分間変性させた。続いて、0.3 µLのrapidPNGase F(「非還元」)を添加し、化合物を50℃で10分間脱グリコシル化した。その後、試料を再蒸留水で希釈して、最終容量を31.25~62.5 µLにした。還元鎖の質量を決定するために、試料あたり12.5~25 µgを、rapidPNGase F酵素キット(Rapid PNGase F reducing, NEB#P0710S、ロット10079163 07/21)に含まれる1:4 (v/v)「還元」緩衝液で希釈し、80℃で2分間変性させた。続いて、0.3 µLのrapidPNGase F(「還元」)を添加し、化合物を50℃で10分間脱グリコシル化した。その後、試料を再蒸留水で希釈して、最終容量を31.25~62.5 µLにした。試料を、C4カラム(Acquity BEH300 C4、1mm 50mm、1.7 µm Charge 133380461; 150 µL/分、75℃、カラム上1.6 µg)で逆相クロマトグラフィーにより脱塩し、質量スペクトルを、QTOF型質量分析計(MAXIS、Bruker Daltonics)を使用して記録した。質量分析計は、各試料の配列前に校正し、ロックマス補正を適用して高い質量精度を得た。データ分析は、クロマトグラフピークの質量スペクトルを合計し、MaxEntによりそれらをデコンボリューションすることにより実施された。同一性および完全性は、実験上の質量と理論上の質量とを比較することにより検査した。

10

20

【0269】

表面プラズモン共鳴

IFNGR1およびIFNGR1/2に対するIFNGバリエーションの結合挙動を表面プラズモン共鳴(SPR)によって評価した。全てのSPR実験は、ランニング緩衝液としてHBS-EP(0.01M HEPES pH7.4、0.15M NaCl、3mM EDTA、0.005%界面活性剤P20、Biacore、Freiburg/Germany)を用いて、Biacore 8Kデバイスで25℃にて実施した。IFNG受容体に対するIFNGバリエーションの結合親和性を決定するために、ビオチン化Fc(kih)-IFNG化合物(50nM)をストレプトアビジン(SA)センサーチップ(接触時間80秒、流量10 µL/分)のフローセルに捕捉した。IFNG変異系列化合物を25nM、80秒の接触時間および10 µL/分の濃度で固定化した。450共鳴単位(RU)までの固定化レベルを使用した。続いて、Fc(kih)-IFNGR1モノマーまたはFc(kih)-IFNGR1/2ヘテロ二量体の濃度を減少させながら(800~3.13nM)、30 µL/分の流速により120秒間にわたって第2の分析物として注入し、解離を500秒間監視した。バルク屈折率差は、タンパク質が固定化されていない参照フローセルで得られた応答を差し引くことによって補正した。親和定数は、1:1ラングミュア結合に適合させることによって速度定数から導出した。

30

40

【0270】

HEK Blueレポーターアッセイ

HEK Blue IFNGレポーター細胞アッセイは、IFNGの活性を特異的に測定することを可能にする。HEK blue検出培地は、経時的なSEAPの産生を検出するために使用される。HEK-Blue(商標)検出培地は、50mLファルコンチューブにHEK-Blue(商標)検出パウチ1袋の内容物を入れ、50mLのエンドトキシン非含有水に粉末を可溶化することによって調製した。溶液をボルテックスまたはスワリングによって均質化した。再構成されたHEK-Blue(商標)検出を20~60分間にわたって37℃まで加温した。培地を滅菌濾過した(0.2 µmメンブレンを滅菌バ

50

イアル／ボトルに入れた)。HEK-blue (商標) 検出培地を使用前に 37℃ に保ち、2～8℃ で最大 2 週間保存した。HEKblue 細胞を激しいピペティングによって剥離して均一な細胞懸濁液を作製し、細胞数および生存率を、ViCell Cell Viability Analyzer を使用して決定した。必要量の HEKblue 細胞を遠心分離し、0.55 Mio/mL の HEKblue 検出培地に再懸濁した。プレートスキームに従ってウェルあたり 180 μL の細胞 (100,000 個の細胞に対応する) を分配し、20 μL の試験化合物 (PBS で希釈) を各ウェルに添加した。プレートを CO₂ インキュベーターにおいて 37℃ で 20～24 時間インキュベートし、経時的な SEAP レベルを 620～655 nm で分光光度計を使用して分析した。

【0271】

10

活性アッセイ

このアッセイを組み合わせて、または HEKblue レポーター細胞アッセイの代わりに使用して、IFNG 化合物の活性を評価した。マウス MC38-huCEA 腫瘍細胞株に対する MHC-I および PD-L1 の誘導を、切断可能なリンカー 2 (PQARK 切断部位) を含有する抗マウス IFNG scFv マスクされた FAP-IFNG 化合物による 2 日間の処理に应答して評価し、マスクされていない IgG 融合 IFNG の活性と比較した。処置前に、構築物を組換えマトリプターゼと共に 37℃ で 2 時間インキュベートした。FAP-IFNG scFv マスクされた PQARK 構築物は、PQARK リンカーをマトリプターゼで消化した場合、腫瘍細胞株において MHC-I および PD-L1 を誘導した。対照的に、組換えマトリプターゼとのプレインキュベーションなしの FAP-IFNG scFv マスクされた構築物は、MHC-I または PD-L1 上方制御を誘導しなかった。

20

【0272】

MC38-huCEA 細胞を、DMEM 10% FCS 中で培養し、細胞解離緩衝液を使用して回収した。細胞を DMEM 10% FCS で洗浄し、DMEM 10% FCS に再懸濁し、続いて Eve 細胞カウンタを使用して細胞生存率および細胞数を評価した。細胞を DMEM 10% FCS で 50,000/mL の濃度に希釈し、この細胞懸濁液 100 μL を、細胞培養物処理した 96 F ウェルプレートに播種した。細胞を 37℃、5% CO₂ で一晩インキュベートして、細胞を確実に付着させた。選択された濃度の FAP-IFNG 構築物を、マトリプターゼ緩衝液 (50 mM トリス、50 mM NaCl、0.01% Tween 20、pH 9.0) 中で、163 nM / 4.4 ng の組み換えマトリプターゼ (4735-SE、ロット RIK071951、0.44 mg/mL) を用いてまたは用いずに 37℃ で 2 時間消化した。インキュベーション後、消化したサイトカイン Fc 融合溶液を、DMEM 10% FCS で濃度 30 nM に希釈し、100 μL の DMEM 10% FCS 中で事前播種した細胞のウェルあたり 50 μL を加え、ウェルあたりの最終最大濃度を 10 nM にした。サイトカイン Fc 融合溶液を、ウェルあたりの最終最小濃度が 0.1 pM になるまで、1:10 の比で段階希釈した。細胞をインキュベーター内で 48 時間インキュベートした。48 時間後、細胞を PBS で洗浄し、続いて 50 μL の Trypsin EDTA と 10 分間インキュベートした。剥離した細胞を、DMEM 10% FCS に回収し、丸底 96 ウェルプレートに移した。細胞を遠心分離し (500 g、2 分)、上清を捨て、ウェルあたり 150 μL の PBS を添加した後、遠心分離した (500 g、2 分)。細胞を、Zombie Near IR fixable Viability Dye (Invitrogen、L10119) を含有する 50 μL 染色混合物に再懸濁した。その後、細胞を FACS 緩衝液で洗浄し、抗 muH-2Kb / H-2D-PE (BioLegend、114608 年) および抗 muCD274-APC (BioLegend、124312) を含有する 50 μL 抗体染色混合物を 4℃ で 20 分間添加した。その後、細胞を、PBS で洗浄し、100 μL の PFA に再懸濁し、25 分間 RT でインキュベートした。その後、細胞を 100 μL の FACS 緩衝液で洗浄し、100 μL の FCS 緩衝液に再懸濁し、BD FACS Canto で測定した。

30

40

【0273】

50

実施例 1

1. 1 均一性および活性を調節するための IFNG の C 末端の操作

IFNG は、様々な免疫学的疾患を処置するために使用される重要な免疫調節サイトカインである。しかしながら、とりわけ、IFNG を体全体に捕捉し、腫瘍部位でのその濃縮を防止する IFNG 受容体 1 (IFNGR1) の分布のために、抗がん剤としてのその臨床応用は限定されている。本発明者らが観察した別の課題は、産生細胞株に存在するプロテアーゼに対する IFNG C 末端の固有の感受性であり、これは、最終産物の不均一性をもたらす切断型 C 末端配列を有するかなりの量の部分的に切断された副産物をもたらす (図 1 A)。化合物の均一性および安定性を高めるために、本発明者らは、IFNG C 末端に配列工学を適用し、分化した副産物プロファイルおよび選択的な機能的挙動を有する IFNG バリエーションを同定した (図 1 B)。本発明者らは、最初に、シグナル伝達アッセイにおいて機能活性を維持した IFNG の最短 C 末端配列を特定するために、一連の IFNG C 末端欠失バリエーションを設計した (表 1 A)。IFNG のいくつかの C 末端バリエーションが既に記載され、IFNG の C 末端における KRKR 残基の重要性を強調した (図 1)。KRKR 配列 (配列番号 78) の欠失は、IFNG を下流シグナル伝達において不活性にする (Dobelli ら、Journal of Biotechnology、1988、7 (3)、199-216)。しかしながら、短縮型 IFNG バリエーションは、野生型 IFNG と同様の活性を有することが示された (Slodowski ら、Eur. J. Biochem. 1991、202、1133-1140)。したがって、本発明者らは、KRKR パッチの系統的短縮をプロリンまたはセリン-プロリンキャッピングと組み合わせ、IgG の C 末端について記載される方法と同様に、C 末端安定性および配列均一性を最大化した (van den Bremer ら、mAbs 2015、7:4、672-680)。所望の候補は、最も少ない数の副産物および野生型 IFNG に匹敵するシグナル伝達活性を示すべきである。

10

20

30

40

50

【0274】

【表 3】

表 1 A: 欠失系列における IFNG 融合化合物の C 末端重鎖配列。配列 GGGGSGGGGSGGGGS (配列番号 66) を有する 15 アミノ酸リンカーを使用して、IFNG バリエーションを IgG の C 末端に連結した。

欠失系列			
化合物番号	配列番号	C 末端 IFNG 配列	説明
P1AF3568	79, 41	...AKTGKRKRSQMLFRG	野生型、参照
P1AF3569	80, 41	...AKTG	不活性バリエーション
P1AF3570	81, 41	...AKTGKRKRSQ	Slodowski ら、1991
P1AF3571	82, 41	...AKTGKRKRSL	Slodowski ら、1991
P1AF3574	83, 41	...AKTGKRKRP	インタクト KRKR、P キャップ
P1AF3575	84, 41	...AKTGKRKP	短縮 KRKR、P キャップ
P1AF3576	85, 41	...AKTGKRP	短縮 KRKR、P キャップ
P1AF3577	86, 41	...AKTGKP	短縮 KRKR、P キャップ
P1AF3578	87, 41	...AKTGKRKRSP	インタクト KRKR、SP キャップ
P1AF9470	88, 41	...AKTGKRKSP	短縮 KRKR、SP キャップ
P1AF3580	89, 41	...AKTGKRSP	短縮 KRKR、SP キャップ
P1AF3581	90, 41	...AKTGKSP	短縮 KRKR、SP キャップ

【0275】

第 2 の系列は、欠失系列からの P1AF3574 に基づいており、本発明者らは、タンパク質分解安定性をさらに増加させる目的で KRKR 配列にさらなる点変異を導入した (

表 1 B および図 1 B)。系統的配列バリエーションアプローチでは、K R K R 配列の 1 つまたは 2 つの位置をセリン、プロリンまたはグルタミン酸で置き換えた。セリンを中性アミノ酸として選択し、タンパク質分解認識配列を立体的に妨害する目的でプロリンを導入し、K R K R 配列（配列番号 7 8）の電荷を部分的に逆転させるためにグルタミン酸を導入した。

【0276】

【表 4】

表 1 B：欠失系列における I F N G 融合化合物の C 末端重鎖配列。位置は、K R K R 配列（配列番号 7 8）を指す。配列 G G G G S G G G G S G G G G S（配列番号 6 6）を有する 1 5 アミノ酸リンカーを使用して、I F N G バリエーションを I g G の C 末端に連結した。

変異系列			
化合物番号	配列番号	C 末端 I F N G 配列	説明
P 1 A F 9 4 6 4	9 1, 4 1	…A K T G S R K R P	1 位の S
P 1 A F 9 4 6 9	9 2, 4 1	…A K T G K S K R P	2 位の S
P 1 A F 9 4 6 5	9 3, 4 1	…A K T G K R S R P	3 位の S
P 1 A F 9 4 7 0	9 4, 4 1	…A K T G K R K S P	4 位の S
P 1 A F 9 4 7 5	9 5, 4 1	…A K T G P R K R P	1 位の P
P 1 A F 9 4 7 6	9 6, 4 1	…A K T G K P K R P	2 位の P
P 1 A F 9 4 7 7	9 7, 4 1	…A K T G K R P R P	3 位の P
P 1 A F 9 4 7 8	9 8, 4 1	…A K T G K R P P P	4 位の P
P 1 A F 9 4 8 3	9 9, 4 1	…A K T G E R K R P	1 位の E
P 1 A F 9 4 8 4	1 0 0, 4 1	…A K T G K E K R P	2 位の E
P 1 A F 9 4 8 5	1 0 1, 4 1	…A K T G K R E R P	3 位の E
P 1 A F 9 4 8 6	1 0 2, 4 1	…A K T G K R K E P	4 位の E
P 1 A F 9 4 7 3	1 0 3, 4 1	…A K T G S R S R P	1 位および 3 位の S
P 1 A F 9 4 8 1	1 0 4, 4 1	…A K T G P R P R P	1 位および 3 位の P
P 1 A F 9 4 8 9	1 0 5, 4 1	…A K T G E R E R P	1 位および 3 位の E
P 1 A F 9 4 7 4	1 0 6, 4 1	…A K T G K S K S P	2 位および 4 位の S
P 1 A F 9 4 8 2	1 0 7, 4 1	…A K T G K P K P P	2 位および 4 位の P
P 1 A F 9 4 9 0	1 0 8, 4 1	…A K T G K E K E P	2 位および 4 位の E
P 1 A F 9 4 7 1	1 0 9, 4 1	…A K T G S S K R P	1 位および 2 位の S
P 1 A F 9 4 7 9	1 1 0, 4 1	…A K T G P P K R P	1 位および 2 位の P
P 1 A F 9 4 8 7	1 1 1, 4 1	…A K T G E E K R P	1 位および 2 位の E
P 1 A F 9 4 7 2	1 1 2, 4 1	…A K T G K R S S P	3 位および 4 位の S
P 1 A F 9 4 8 0	1 1 3, 4 1	…A K T G K R P P P	3 位および 4 位の P
P 1 A F 9 4 8 8	1 1 4, 4 1	…A K T G K R E E P	3 位および 4 位の E

【0277】

1. 2 I g G 融合 I F N G 欠失および変異バリエーションの作製および精製

全ての I F N G 欠失および変異系列バリエーションを作製し、精製し、副産物プロファイルおよびシグナル伝達活性に対する操作された変化の影響を特徴付けた（実施例 2）。I F N G 配列バリエーションを、グリシン-セリンリンカーを介して、線維芽細胞活性化タンパク質（F A P）に特異的な I g G 抗体、すなわち、抗 F A P クローン 4 B 9（国際公開第 2 0 1 2 / 0 2 0 0 0 6 号に開示される）重鎖の C 末端および P 3 2 9 G L A L A 変異を

含有するFcドメイン（Schlothauerら、Protein Eng Des Sel. 2016、29（10）、457–466）のに融合させた（図1A）。化合物を、一過性CHO発現系を用いてevitriaで発現させた。欠失シリーズの化合物（表1A）は118mg/Lの力価中央値に達し、変異系列の化合物（表1B）は45.5mg/L（中央値）で表された。表2Aおよび2Bは、各化合物について得られた個々の力価を列挙している。次に、化合物をMabSelectSure HPによって捕捉し、pH3.0までのpH勾配で溶出した。画分を中和し、CE-SDSによる組成およびSE-HPLCによるHMW含有量について分析した。最も高いモノマー含有量を有する画分をプールし、SECによってさらに精製した。最も高いモノマー含有量を有するSEC画分を最終バッチとしてプールした。欠失系列の化合物についてSE-HPLCによって決定されたモノマー含有量の中央値は88.9%であり、変異系列の化合物は、99.8%の均一性の中央値まで精製された。LC-MS特性評価により、両方の系列について配列同一性が確認された。化合物の詳細なLC-MS品質プロファイルを実施例2、表3に提供する。各化合物の発現力価およびモノマー含有量を表2Aおよび2Bに列挙する。

【0278】

10

【表5】

表2A：欠失系列の精製化合物の品質プロファイル。産生力価をプロテインA SE-HPLCによって決定し、モノマー含有量をSE-HPLCによって評価した。LC-MSにより正しい化合物同一性が確認され、詳細な副産物プロファイルを表3に列挙する。

20

欠失系列				
		E-HPLC品質プロファイル		
化合物番号	力価 (mg/L)	モノマー%	HMW%	LMW%
P1AF3568	36.1	98.7	1.3	0
P1AF3569	143.1	99.3	0.7	0
P1AF3570	103.3	87.1	0.2	12.6
P1AF3571	107.2	85.3	0.4	14.4
P1AF3574	76.2	86.7	0.2	13.1
P1AF3575	106.3	88.3	0.2	11.6
P1AF3576	126.5	92.4	0.1	7.5
P1AF3577	119.8	88.9	0.1	11
P1AF3578	116.5	87.6	0.1	12.3
P1AF9470	125.4	90.6	0.4	9.1
P1AF3580	133.8	88.9	0.2	10.9
P1AF3581	135.1	91	0.3	8.8

30

【0279】

40

50

【表 6】

表 2 B：変異系列の精製化合物の品質プロファイル。産生力価をプロテイン A SE-HPLC によって決定し、モノマー含有量を SE-HPLC によって評価した。LC-MS により正しい化合物同一性が確認され、詳細な副産物プロファイルを表 3 に列挙する。

変異系列				
化合物番号	力価 (mg/L)	SE-HPLC 品質プロファイル		
		モノマー%	HMW%	LMW%
P1AF9464	32.75	99.7	0.3	0
P1AF9469	24.75	99.7	0.3	0
P1AF9465	24.75	99.7	0.3	0
P1AF9470	32.5	99.8	0.2	0
P1AF9475	38	99.8	0.2	0
P1AF9476	39	99.7	0.3	0
P1AF9477	38.75	99.8	0.2	0
P1AF9478	16	99.2	0.8	0
P1AF9483	56.1	99.8	0.2	0
P1AF9484	56.7	99.8	0.2	0
P1AF9485	55.6	99.8	0.2	0
P1AF9486	55.6	99.8	0.2	0
P1AF9473	33	99.6	0.4	0
P1AF9481	51.9	99.8	0.2	0
P1AF9489	65.1	99.8	0.2	0
P1AF9474	36.75	99.7	0.3	0
P1AF9482	57.9	99.8	0.2	0
P1AF9490	96	99.9	0.1	0
P1AF9471	35.75	99.7	0.3	0
P1AF9479	57.4	99.8	0.2	0
P1AF9487	67.4	99.8	0.2	0
P1AF9472	35.75	99.7	0.3	0
P1AF9480	57.3	99.8	0.2	0
P1AF9488	62.3	99.8	0.2	0

10

20

30

【0280】

実施例 2

40

2.1 品質プロファイルが改善された IFNG の C 末端バリエーションの同定

IFNG の C 末端の配列完全性を最大化するために、本発明者らは、好ましい重鎖副産物プロファイルを有する IFNG 配列を同定した。したがって、本発明者らは、プロリンまたはセリン-プロリンカップリングを KRKR 配列の体系的な短縮と組み合わせた（図 1 B、表 1 A）。全ての化合物を発現させ、精製し、最終バッチを LC-MS によって分析して重鎖副産物を同定および定量した（表 3）。野生型ヒト IFNG を含む化合物は、7% のインタクトな重鎖および 8 つの切断された重鎖副産物を様々な量で含有した。公開された IFNG バリエーション（P1AF3570 および P1AF3571 に含まれる）はまた、3 つおよび 4 つの副産物を伴うタンパク質分解に起因する重鎖配列不均一性をそれぞれ示した。副産物の数は IFNG C 末端配列の長さに関連し、C 末端の短縮は切断され

50

た重鎖の数を減少させ、K R K R 配列を有しない化合物は 1 0 0 % 正確であった。C 末端プロリンキャッピングにより、セリン-プロリンキャッピングされた等価物と比較して重鎖副産物が少なくなった（表 3）。

【 0 2 8 1 】

【表 7】

表 3：I F N G ベンチマーク分子（P 1 A F 3 5 7 0、P 1 A F 3 5 7 1）および異なる C 末端配列を有する欠失系列分子の副産物プロファイル。各化合物の太字の配列は、C 末端全長配列に対応し、観察された切断産物を続いて列挙する。質量ピーク強度を使用して、各副産物の相対量（%）を推定した。

化合物番号	C 末端 HC 配列	相対量 (%)
P 1 A F 3 5 6 8	…AKTGKRKRSQMLFRG	7
	…AKTGKRKRSQMLFR	1 5
	…AKTGKRKRSQMLF	1 4
	…AKTGKRKRSQML	2 9
	…AKTGKRKRSQM	5
	…AKTGKRK	1 6
	…AKTGKR	1
	…AKTGK	1 1
	…AKTG	1
P 1 A F 3 5 6 9	…AKTG	1 0 0
P 1 A F 3 5 7 0	…AKTGKRKRSQ	7 6
	…AKTGKRK	1 0
	…AKTGK	1 1
	…AKTG	3
P 1 A F 3 5 7 1	…AKTGKRKRS L	3
	…AKTGKRK	5 4
	…AKTGKR	5
	…AKTGK	3 3
	…AKTG	5
P 1 A F 3 5 7 4	…AKTGKRKR P	9 5
	…AKTGK	5
P 1 A F 3 5 7 5	…AKTGKRK P	1 0 0
P 1 A F 3 5 7 6	…AKTGKR P	1 0 0
P 1 A F 3 5 7 7	…AKTGK P	1 0 0
P 1 A F 3 5 7 8	…AKTGKRKR S P	6 0
	…AKTGKRK	2 0
	…AKTGK	1 7
	…AKTG	3
P 1 A F 9 4 7 0	…AKTGKRK S P	9 8
	…AKTGK	2
P 1 A F 3 5 8 0	…AKTGKR S P	1 0 0
P 1 A F 3 5 8 1	…AKTGK S P	1 0 0

10

20

30

40

【 0 2 8 2 】

2. 2 I F N G 欠失バリエーションのシグナル伝達活性

H E K b l u e アッセイを使用して、I F N G シグナル伝達を誘導する能力について、ベンチマーク化合物および欠失系列の他の化合物をさらに特徴付けた。機能活性は、C 末端配列の長さに関連しており、K R K R 配列全体を含む化合物のみが、野生型 I F N G に匹敵する活性レベルを保持し（図 2 および表 4）、一方、K R K R 配列の体系的な短縮は、機能活性を徐々に低下させた。

【 0 2 8 3 】

50

【表 8】

表 4：HEK blue アッセイで測定される野生型 I g G－I F N G と比較したシグナル伝達活性（曲線下面積）

化合物番号	C末端HC配列	相対活性
P 1 A F 3 5 6 8 野生型	…AKTGKRKRSQMLFRG	1 0 0 %
P 1 A F 3 5 6 9	…AKTG	9 %
P 1 A F 3 5 7 0	…AKTGKRKRSQ	8 1 %
P 1 A F 3 5 7 1	…AKTGKRKRSL	3 2 %
P 1 A F 3 5 7 4	…AKTGKRKRKP	8 4 %
P 1 A F 3 5 7 5	…AKTGKRKP	3 5 %
P 1 A F 3 5 7 6	…AKTGKRKP	1 3 %
P 1 A F 3 5 7 7	…AKTGKP	9 %
P 1 A F 3 5 7 8	…AKTGKRKRSP	7 9 %
P 1 A F 9 4 7 0	…AKTGKRKSP	4 0 %
P 1 A F 3 5 8 0	…AKTGKRSP	1 2 %
P 1 A F 3 5 8 1	…AKTGKSP	9 %

10

20

【0 2 8 4】

品質データ（表 3）と組み合わせて、最良のプロファイル、すなわち、最小量の副産物と組み合わせた最も高い活性が、KRKRKPで終結するプロリンキャッピングされたIFNGバリエーション（P 1 A F 3 5 7 4）について観察された。この化合物は、95%の正しい重鎖、5%の切断された副産物を含有し、野生型IFNGと比較して84%の活性を示した。その結果、この配列は、変異系列におけるさらなる安定性工学の基礎として選択された（実施例 2. 4）。

【0 2 8 5】

2. 3 IFNG－KRKRKPおよび野生型IFNGは、IFNG受容体に対して同等の結合挙動を示す

30

IFNGは、JAK／STATシグナル伝達経路を活性化するためにIFNG受容体とのシグナル伝達複合体の形成を開始する構成的ホモ二量体である。シグナル伝達複合体は、中心にIFNGホモ二量体を有する2つのIFNGR1／2ヘテロ二量体の対称配置からなる。各IFNGモノマーは、両方の受容体サブユニットと接触する1つのIFNGR1／2ヘテロ二量体と相互作用する。シグナル伝達複合体の集合が、IFNGとIFNGR1との最初の相互作用によって引き起こされることが示唆され、この相互作用は、IFNGR2についての結合表面を作り出す（Mendozaら、Nature、2019、567（7746）、56－60）。シグナル伝達複合体の集合は主にIFNGの構造化ドメインによって駆動されるが、IFNGの非構造化C末端はまた、細胞膜により近いIFNGR1／2における部位と相互作用することによって、おそらくは能動的なシグナル伝達に寄与する。しかしながら、正確な結合様式は未知であり、利用可能な結晶構造において解像されていない。

40

【0 2 8 6】

野生型IFNGおよびC末端KRKRKP（配列番号1）を有する本発明者らの操作された化合物の類似する特性をさらに評価するために、本発明者らは、SPRによってIFNG受容体に対するIFNGバリエーションの結合親和性を決定した。そのため、野生型IFNG（P 1 A G 2 6 5 1）およびIFNG KRKRKP（P 1 A G 1 5 5 0）をC末端Fc（kih）融合タンパク質として産生および精製し、フローセルに固定化した。ノブ・イントゥ・ホール（kih）変異は、2つの異なる重鎖のヘテロ二量体化の増強を可能にす

50

るFcドメイン（「ノブ」鎖における変異S354CおよびT366W EUナンバリングならびに「ホール」鎖における変異Y349C、T366S、L368AおよびY410V EUナンバリング）における特異的変異である（Merchantら、Nature Biotechnology、1998、16（7）、677～681）。第2の分析物として、IFNGR1モノマー（P1AF7104）またはIFNGR1／2ヘテロ二量体（P1AF8126）のどちらかを異なる濃度でフローセルに通し、解離定数（KD）を、観察された会合挙動および解離挙動に基づいて計算した。Fc（kih）-IFNG KRKR PはIFNGR1に154 nMの見かけのKDで結合し、これは、177 nMのKDを有する野生型Fc（kih）-IFNGと同様の範囲であった。IFNGR1／2ヘテロ二量体については、より大きい見かけの結合親和性が観察された。Fc（kih）-IFNG-KRKR P（P1AG1550）は54.4 nMのKDで結合し、野生型Fc（kih）-IFNG（P1AF2651）は73.8 nMのKDで結合した。

10

2.4 IFNG KRKR配列の変異はIFNG受容体の結合およびシグナル伝達に差次的に影響を及ぼす

【0287】

最小のC末端配列長を特定したので、プロテアーゼに対する安定性をさらに改善するために、KRKR配列にさらなる点変異を導入した。変異系列の全ての化合物をIgG融合タンパク質として発現および精製した（実施例1参照）。LC-MSによる品質プロファイルの分析により、この変異系列の化合物ではタンパク質分解副産物が検出されなかったため、C末端プロリンキャップの有益な効果が確認された。

20

【0288】

KRKR配列の変異は、SPRによって決定される受容体結合に影響を及ぼした。結合親和性を測定するために、変異系列の化合物をフローセルに固定化した。第2の分析物として、Fc（kih）-IFNGR1モノマーまたはFc（kih）-IFNGR1／R2ヘテロ二量体をフローセルに通し、結合親和性（KD）を、観察された会合定数および解離定数に基づいて計算した。既に単一の点変異は、C末端KRKR Pを有する化合物と比較して、受容体に対する見かけの結合親和性を低下させた。二重点変異は、受容体結合に対してさらなる負の効果を有した。IFNGR1およびIFNGR1／2に対する変異系列の化合物の結合挙動が表5にまとめられる。

【0289】

30

40

50

【表 9】

表 5：Fc (k i h) - IFNGR1 モノマーおよび Fc (k i h) - IFNGR1 / 2 ヘテロ二量体に対する変異系列の化合物の見かけの結合親和性

化合物番号	C 末端	Kd IFNGR1 (nM)	Kd IFNGR1 / R2 (nM)
P1AG1310	...KRKRP	475	167
P1AF9464	...SRKRP	614	459
P1AF9475	...PRKRP	643	320
P1AF9483	...EKKRP	3160	1080
P1AF9469	...KSKRP	708	652
P1AF9476	...KPKRP	1020	456
P1AF9484	...KEKRP	3260	1150
P1AF9465	...KRSRP	597	431
P1AF9477	...KRPRP	539	312
P1AF9485	...KRERP	1200	608
P1AF9470	...KRKSP	604	535
P1AF9478	...KRKPP	564	284
P1AF9486	...KRKEP	1370	598
P1AF9471	...SSKRP	1730	1420
P1AF9479	...PPKRP	3600	204
P1AF9487	...EEKRP	1030000	1750
P1AF9472	...KRSSP	1080	885
P1AF9480	...KRPPP	1420	683
P1AF9488	...KREEP	6220	2870
P1AF9473	...SRSRP	1100	793
P1AF9481	...PRPRP	977	486
P1AF9489	...ERERP	10700	5960
P1AF9474	...KSKSP	4560	864
P1AF9482	...KPKPP	2710	950
P1AF9490	...KEKEP	216000	4750

【0290】

変異系列バリエーションの機能障害は、レポーター細胞アッセイでさらに明らかであった（図 3）。機能的特徴付けにより、単一のセリンまたはプロリン変異のいずれかが、KRKR 配列におけるそれらの位置に関係なく良好に耐容されることが明らかになった。対照的に、既に単一のグルタミン酸変異は、交換されたアミノ酸に関係なく全ての二重変異と同様に、化合物を不活性にした。

【0291】

2.5 IFNG KRKR 配列における変異は、マトリプターゼによるタンパク質分解から保護する

KRKR モチーフのタンパク質分解安定性に対する変異の効果を評価するために、変異系列の全ての化合物を、マトリプターゼ（Ceptor Biopartners による公開されたプロトコルによるカスタム精製）で、酵素対基質のモル比 1：3500 で 37℃ で 1 時間処理した。続いて、主なタンパク質分解副産物（IFNG-K / KRKR 間で

切断された I g G - I F N G) の遊離を、脱グリコシル化還元状態で L C - M S によって検出および定量した。1 位または 2 位の点変異はタンパク質分解安定性にプラスの効果を及ぼし、選択された条件ではタンパク質分解は観察されなかったが、参照分子については K / R K R モチーフの 3 5 % 切断が検出された (表 6)。3 位または 4 位のセリン、プロリンまたはグルタミン酸変異はタンパク質分解をあまり効率的に妨害せず、2 ~ 1 1 % のタンパク質分解産物が検出された。1 位または 2 位を含む二重変異もタンパク質分解を効率的に防止したが、3 位および 4 位の二重変異は許容された。それにもかかわらず、標的結合の非存在下における変異系列化合物のより低い機能活性を考慮すると、I F N G K R K R P は依然として好ましい配列であり、マスクされた I F N G 化合物を作製するために使用された (実施例 3)。

10

【0292】

【表 10】

表 6 : K R K R 配列モチーフの 1 位および 2 位の変異は、K R K R パッチのタンパク質分解安定性を改善する。化合物をマトリプターゼと共にインキュベートし、タンパク質分解プロファイル进行分析し、L C - M S によって定量した。位置は K R K R 配列 (配列番号 X) を指す。

変異型	1 時間後の K / R K R タンパク質分解度
I F N G - K R K R P	3 5 % (参照分子)
1 位の S / P / E	0 %, 0 %, 0 %
2 位の S / P / E	2 %, 0 %, 0 %
3 位の S / P / E	6 %, 9 %, 3 %
4 位の S / P / E	5 %, 1 1 %, 2 %
1 位および 2 位の S S / P P / E E	0 %, 0 %, 0 %
3 位および 4 位の S S / P P / E E	4 %, 1 %, 0 %
1 位および 3 位の S S / P P / E E	0 %, 0 %, 0 %
2 位および 4 位の S S / P P / E E	0 %, 0 %, 0 %

20

【0293】

30

実施例 3

3. 1 腫瘍標的化マスクされた I F N G 化合物の設計

より治療的可能性の高い I F N G を開発するために、本発明者らは、I F N G R 1 に対する I F N G の結合が I F N G 特異的マスクングドメインによって妨げられた腫瘍標的化 I F N G 化合物を設計した。本発明者らは、効率的なマスクングが関連するシンク効果を打ち消し、腫瘍部位での化合物の濃縮を可能にして、最終的に所望の下流効果を誘発すると仮定した。マスクングドメインは、I F N G 特異的 s c F v ドメインに基づいており、I F N G - K R K R P の C 末端 (マスク放出フォーマット) または N 末端 (サイトカイン放出フォーマット) のいずれかに導入した (図 1 C)。マスクされた化合物は、I F N G とそのマスクとを接続する切断可能なリンカーのタンパク質分解によって腫瘍微小環境で活性化されるように設計された。

40

【0294】

マスク放出フォーマットを作製するために、I F N G - K R K R P を、グリシン-セリンリンカー (リンカー 1、G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G G G、配列番号 69) を介して、線維芽細胞活性化タンパク質 (F A P) に特異的な I g G 抗体である標的化抗体、すなわち、抗 F A P クローン 4 B 9 (国際公開第 2 0 1 2 / 0 2 0 0 0 6 号に開示される) および P 3 2 9 G L A L A 変異を含有する F c ドメイン (S c h l o t h a u e r ら、P r o t e i n E n g D e s S e l . 2 0 1 6、2 9 (1 0)、4 5 7 - 4 6 6) の C 末端に融合した。抗ヒト I F N G s c F v - マスク (米国特許第 6, 3 2 9, 5 1 1 B 1 に基づく) を、第 2 のグリシン-セリンリンカー (

50

リンカー 2、GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGG、配列番号 69) を介して IFNG-KRKR P の C 末端に融合した。サイトカイン放出フォーマットを作製するために、scFv マスクを、グリシン-セリンリンカー (リンカー 1) を介して標的化 IgG 抗体の C 末端に融合し、IFNG-KRKR P を、第 2 のグリシン-セリンリンカー (リンカー 2) を介して C 末端に連結した。腫瘍微小環境におけるマスクされた化合物のタンパク質分解活性化を可能にするために、マトリプターゼ切断部位 (PQAR/K、配列番号 20) を両方の形式でリンカー 2 に導入した。この切断可能なリンカーは、アミノ酸配列 GGGGSGGGGSGGGGPQARKGGGGGGSGGGGG (リンカー 2'、PQARK リンカー、配列番号 70) を有する。マスク放出フォーマットでのリンカー 2' のタンパク質分解により、IgG 融合したマスクされていない IFNG が得られ、一方、サイトカイン放出フォーマットでのリンカー 2' のタンパク質分解により、遊離 IFNG-KRKR P ホモ二量体を得られる。

10

【0295】

【表 11】

表 7 A: 腫瘍標的化マスクされた IFNG 化合物の識別子およびそれらのフォーマット

識別子	フォーマット	構造	配列番号
P1AG7568	切断可能なリンカーによるマスク放出	FAP 4B9 IgG-リンカー1-IFNG KRKR P-PQARK リンカー-scFv マスク	40, 41
P1AG7571	切断可能なリンカーによるサイトカイン放出	FAP 4B9 IgG-リンカー1-scFv マスク-PQARK リンカー-IFNG KRKR P	42, 41
P1AG7567	切断不可能なリンカーによるマスク放出	FAP 4B9 IgG-リンカー1-IFNG KRKR P-リンカー2-scFv マスク	115, 41
P1AG7570	切断不可能なリンカーによるサイトカイン放出	FAP 4B9 IgG-リンカー1-scFv マスク-リンカー2-IFNG KRKR P	116, 41
P1AG1310	マスクされていない	FAP 4B9 IgG-リンカー1-IFNG KRKR P	117, 41

20

【0296】

30

3.2 マスク放出およびサイトカイン放出フォーマットの作製および精製

切断可能な (P1AG7568、P1AG7571) リンカー配列および切断不可能な (P1AG7567、P1AG7570) リンカー配列を有するマスクされたフォーマットを、WuXi Biologics の一過性発現系を使用して発現および精製した。マスクされていない陽性対照化合物 (P1AG1310) を evitria AG で発現させ、社内で精製した。全ての化合物を Mab Select Sure HP によって捕捉し、pH 3.0 までの pH 勾配で溶出した。画分を中和し、CE-SDS による組成および SE-HPLC による HMW 含有量について分析した。最も高いモノマー含有量を有する溶出画分をプールし、SEC によってさらに精製した。最も高いモノマー含有量を有する SEC 画分を最終バッチとしてプールした (表 7 B)。フォーマットに応じて、異なる発現力価および品質プロファイルに達し、マスクされていない化合物について最も高い産生力価が観察された (152 mg/L)。マスクされたフォーマットは、より低いレベル (6.9~54.6 mg/L) で表された。LC-MS により、正しい鎖組成が確認され、タンパク質分解副産物は検出されなかった。

40

【0297】

50

表 7 B：精製したマスクされた化合物および対照分子の品質プロファイル。産生力価をプロテイン A SE-HPLC によって決定し、モノマー含有量を SE-HPLC および CE-SDS によって評価した。LC-MS により、正しい化合物の同一性が確認された。

化合物番号	力価 (mg/L)	SE-HPLC			CE-SDS
		モノマー%	HMW%	LMW%	主ピーク (%)
P1AG7568	6.9	97.3	2.7	0	97.8
P1AG7571	20	99.32	0.68	0	100
P1AG7567	17.7	96.4	3.6	0	100
P1AG7570	54.6	98.44	1.55	0	100
P1AG1310	152	99.8	0.2	0	100

10

实施例 4

4. 1 マウスサロゲートとしてのマスクされたマウスIFNGフォーマットの作製
インビボでのマスクされたフォーマットの治療的可能性評価するために、本発明者らは、マウスサロゲートモデルに注目した（実施例5）。マスキングドメインは、マウスIFNGに特異的なs c F vドメインに基づいており、マスクをマウスIFNG-KRKR PのC末端（マスク放出フォーマット）またはN末端（サイトカイン放出フォーマット）のいずれかに導入した（図1、図4A）。ヒト対応物に関しては、マスクされたマウス化合物は、IFNGとそのマスクとを接続する切断可能なリンカーのタンパク質分解によって腫瘍微小環境で活性化されるように設計された。

20

サロゲート分子は、ヒトのマスクされた化合物に類似して設計され、マスク放出フォーマット（P1AG3766）を作製するために、マウスIFNG-KRKRPを、グリシン-セリン-リinker（リinker-1、GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS、配列番号69）を介して、線維芽細胞活性化タンパク質（FAP）に特異的な標的化IgG抗体、すなわち、抗FAPクローン28H1（国際公開第2012／020006号に開示される）のマウスIgG1重鎖のC末端に融合した。例えばBaudinoら、J. Immunol.（2008）、181、6664-6669、または国際公開第2016／030350号に記載されている方法に従って、DAPG変異を重鎖の定常領域に導入し、マウスFcガンマ受容体への結合を消失させた。抗マウスIFNG-scFvマスクを、第2のグリシン-セリンリinker（リinker-2、GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS、配列番号69）を介してマウスIFNG-KRKRPのC末端に融合した。サイトカイン放出フォーマット（P1AG3755）を作製するために、scFvマスクを、グリシン-セリンリinker（リinker-1）を介して標的化IgGのC末端に融合し、マウスIFNG-KRKRPを、第2のグリシン-セリンリinker（リinker-2）を介してC末端に連結した。腫瘍微小環境におけるタンパク質分解活性化を可能にするために、マトリプターゼ切断部位（PQAR/K）を両方の形式のリinker-2（リinker-2'）に導入した。切断可能なリinkerは、アミノ酸配列GGGSGGGSGGGSGGGGPQARKGGGGGGSGGGGGSGGGGG（リinker-2'、PQARKリinker、配列番号70）を有する。マスク放出フォーマットでのリinker-2'のタンパク質分解により、IgG融合したマスクされていないマウスIFNG-KRKRPが得られ、一方、サイトカイン放出フォーマットでのリinker-2'のタンパク質分解により、遊離マウスIFNG-KRKRPホモ二量体が得られる。陽性対照として、マウスIFNG-KRKRPを、マスクドメインを含まないC末端IgG融合物としても発現させた（P1AF9672）。

30

40

50

【表 1 3】

表 8 A：腫瘍標的化マスクされたマウス I F N G 化合物の特定およびそれらのフォーマット

識別子	フォーマット	構造	配列番号
P 1 A G 3 7 6 6	切断可能なリンカーによるマスク放出	F A P 2 8 H 1 m u I g Gーリンカー1ー m u I F N G K R K R PーP Q A R K リンカー 2ー s c F v マスク}	4 3, 4 4
P 1 A G 3 7 5 5	切断可能なリンカーによるサイトカイン放出	F A P 2 8 H 1 m u I g Gーリンカー1ー s c F v マスクーP Q A R K リンカー2ーm u I F N G K R K R P	4 5, 4 4
P 1 A G 9 6 7 2	切断不可能なリンカーによるマスク放出	F A P 2 8 H 1 m u I g Gーリンカー1ー m u I F N G K R K R P	1 1 8, 4 4

10

【0 3 0 1】

4. 2 マウスサロゲートの作製および精製

全てのマウスサロゲート化合物を、e v i t r i aで一過性C H O発現系を使用して発現させた。回収直後に、c o m p l e t eプロテアーゼ阻害剤カクテル（R o c h e）を0. 5 倍濃度で添加し、化合物をM a b S e l e c t S u r e H Pを使用して捕捉し、p H 3. 0までのp H勾配で溶出した。画分を中和し、C EーS D Sによる組成およびS EーH P L CによるH M W含有量について分析した。最も高いモノマー含有量を有する画分をプールし、S E Cによってさらに精製した。各S E C精製後、それぞれのピーク画分をS EーH P L CおよびC EーS D Sによって分析した。最も高いモノマー含有量を有するS E C画分を最終バッチとしてプールした。S EーH P L Cは、両方のフォーマット（P 1 A G 3 7 6 6およびP 1 A G 3 7 5 5）ならびにマスクされていない対照（P 1 A F 9 6 7 2）について9 5 %超のモノマー含有量を明らかにし、C EーS D SおよびL CーM Sにより正しい鎖組成を確認した（表 8 B）。サイトカイン放出フォーマット（P 1 A G 3 7 5 5）について、L CーM Sは、1 0 %の化合物において、2つの切断可能なリンカーのうちの1つが意図された切断部位で既に切断されていることを明らかにした（P Q A R / K、配列番号 2 0）。

20

【0 3 0 2】

【表 1 4】

表 8 B：精製したマウスサロゲート化合物の品質プロファイル。産生力価をプロテイン A S EーH P L Cによって決定し、モノマー含有量をS EーH P L CおよびC EーS D Sによって評価した。L CーM Sにより、正しい化合物の同一性が確認された。

化合物番号	力価 (m g / L)	S EーH P L C			C EーS D S
		モノマー%	H M W%	L M W%	主ピーク (%)
P 1 A G 3 7 6 6	1 9. 7	9 5. 1	4. 8	0	9 6. 6
P 1 A G 3 7 5 5	2 0. 1	9 6. 8	3. 1	0	9 2. 0
P 1 A G 9 6 7 2	9 4	9 8. 8	1. 2	0	8 1. 2

40

【0 3 0 3】

4. 3 マウスサロゲートの機能的特徴付け

切断可能なリンカーを含有するF A P 標的化 s c F vーマスクされたF A P 抗マウス I F N G 化合物のインビトロ活性を評価するために、M C 3 8ーh u C E A 細胞をインビトロで前述のサロゲート分子で処理した。抗マウス I F N G s c F v + マスクされたF A Pーm u I F N G 化合物を、1 6 3 n M の組換えマウスマトリプターゼの非存在下または存在下において3 7 °Cで2 時間インキュベートした。4 8 時間の培養期間後、M C 3 8ーh u C E A 細胞上のM H CーI およびP DーL 1 発現を、フローサイトメトリーを使用して定量した。マスクされていないF A Pーm u I F N G 化合物による処理は陽性対照とし

50

て役立ち、MC38-huCEA細胞上のMHC-IおよびPD-L1発現が処理時に誘導されたことを実証した（図4Aおよび4B）。

【0304】

組換えマウスマトリプターゼで前処理されなかった抗マウスIFNG scFv-マスキされたFAP-muIFNG分子は、MHC-IレベルもPD-L1レベルも増強しなかった（図4Aおよび4B）。抗マウスIFNG scFv-マスキされたFAP-muIFNGとマトリプターゼとのプレインキュベーションは、MC38-huCEA細胞上のMHC-IおよびPD-L1の発現増加によって実証されるように、活性を部分的に回復させた（図4Aおよび4B）。

【0305】

実施例5

5.1 マウスサロゲート分子のインビボ特徴付け

インビボ実験のために、1.25または10mg/kgのP1AG3755の1用量を、処置の開始の21日前に細胞懸濁液として皮下注射されたKPC-4662 huCEA腫瘍（低CD8 T細胞浸潤を有する除外腫瘍モデル）を有するヒトCEAを発現するC57BL/6マウスに静脈内注射した（図5）。

【0306】

KPC4662細胞をペンシルベニア大学から入手し、ヒトCEAを発現させるために社内で操作した。細胞をDMEM+10%FBS+ハイグロマイシン500μg/ml中で培養し、計数し、RPMIおよびマトリゲルとの1:1混合物中、300,000個の細胞を総体積100μLでマウスの脇腹に皮下注射した。キャリパーを用いて腫瘍増殖を少なくとも週2回測定し、腫瘍体積を以下のように計算した。腫瘍体積 = $(W^2 / 2) \times L$ (W:幅、L:長さ)。

【0307】

初期腫瘍成長マウスの21日後、腫瘍サイズが約225mm³に達した時点で、マウスを3つの群に無作為化し、異なる用量のP1AG3755またはヒスチジン緩衝液（ビヒクル）で週に3回処置した。全てのマウスに、200μLの適切な溶液を静脈内注射した。200μLあたりの化合物の適切な量を得るために、ストック溶液をヒスチジン緩衝液（20mMヒスチジン、140mM NaCl pH6.0）で希釈した。治療注射後3日目および7日目に、少なくとも5匹のマウスを殺した（7日目=終了）。これらのマウスのうち、腫瘍および血液を下流分析のために採取した。

【0308】

5.2 エクスビボ読み出し

フローサイトメトリー分析専用の腫瘍の半分を秤量し、リベラーゼおよびDNaseで消化した。次いで、単一細胞懸濁液を、とりわけDAPI、ポドプラニンPE-Cy7、EカドヘリンBV421、CD45 AF700、TCRb PE-Cy5およびCD8a BV711で染色し、BD Fortessa Flow Cytometerで分析した。プロットおよび統計試験は、GraphPad PRISM 8で行った。

【0309】

免疫蛍光法（3DIP）による組織学的分析のために、腫瘍の半分をPBSで1:4に希釈したBD Cytofix溶液で約20時間固定した。洗浄し、PBSに移した後、腫瘍を4%低ゲル化温度のアガロースに包埋した。一般的なカミソリ刃を備えたLeica VT1200sビブラトームを使用して、これらのブロックから腫瘍切片（厚さ70μm）を切断した。続いて、切片を透過処理し（TBS+0.3%Triton-X）、BSAおよびマウス血清（各1%）を使用して2時間ブロッキングした後、とりわけ以下の抗体、CD8a BV421、EカドヘリンCF488、MHC I PEを使用して室温で一晩（約15時間）染色した。画像取得は、Leica SP8倒立共焦点顕微鏡で行った。

【0310】

サイトカイン分析のために、群あたり5匹のマウスから血清試料を回収し（治療注射後

10

20

30

40

50

3日目および7日目に再度)、アッセイに必要とされるまで -20°C で保存した。群あたり5匹のマウスからの腫瘍片を同じ日に液体窒素中に回収し、さらなる使用まで -80°C で保存した。 $5\mu\text{L}$ の血清(1/10希釈)および腫瘍溶解物由来の $40\mu\text{g}$ のタンパク質を使用してアッセイを行った。腫瘍溶解物を、Bio-plex細胞溶解キット(171304012、BioRad)およびPrecellys evolutionホモジナイザー溶解デバイス(Bertin instruments)を使用して得た。腫瘍溶解物を遠心分離し、上清を保持し、その後 -80°C で保存した。タンパク質レベルは、Pierce BCAタンパク質アッセイキット(Thermo Fisher Scientific)およびELISAリーダー(PerkinElmer、EnVision 2104マルチラベルリーダー)を使用して決定した。腫瘍溶解物を、それに応じてキットからの試料希釈剤で希釈して、試料あたり $40\mu\text{g}$ のタンパク質の最終量を得た。製造業者のプロトコルに従ってLuminex Flexmap 3D機器でProcartaPlex Simplex Kit(参照EPX010-26061-901、Thermo Fisher)を用いてアッセイを行った。

10

【0311】

統計分析

フローサイトメトリーおよびサイトカイン分析のために、処置群対ビヒクル群の多重比較分析を用いた一元配置分散分析試験を、多重試験のためのDunnett補正を用いて行った。プロットおよび統計試験は、GraphPad PRISM 8で行った。

20

【0312】

5.3 観察

IFNGシグナル伝達の近位バイオマーカーは、MHC IおよびPDL1発現の上方制御である。マウスサロゲート分子を使用してKPC4662-huCEA腫瘍を処置すると(図5)、本発明者らは、がん細胞および線維芽細胞上の高用量群において、治療投与の3日後にフローサイトメトリーによってMHC IおよびPDL1の上方制御を容易に観察することができた(図6)。MHC I発現の増加も治療投与の7日後に観察可能であったが、PDL1レベルは治療投与の7日後にビヒクル群と統計的に有意に異ならなかった。

【0313】

次に、本発明者らは、免疫蛍光顕微鏡法によって、腫瘍組織におけるMHC I発現の増加が非常に不均一であり、CD8 T細胞の存在が腫瘍組織におけるMHC I陽性領域と相関することを観察した(図7)。

30

【0314】

全体的なCD8 T細胞の存在は、フローサイトメトリーによって処置群とビヒクル群との間で統計学的に有意に異ならなかったが、本発明者らは、特に処置後早期に、腫瘍のMHC I発現領域に存在するCD8 T細胞の量が増加することをイメージングによって再び示した(図8)。この腫瘍と同様に、CD8 T細胞はベースラインおよびビヒクル群でも腫瘍の端部に存在するため、フローサイトメトリーによる非局所定量は、処置群とビヒクルとの間の統計学的に有意な差を拾い上げることができなかった。

40

【0315】

最後に、本発明者らは、マウスサロゲートによる処置が、マウスの血清における治療投与後7日でのCXCL9(T細胞誘引性ケモカイン)レベルの増加をもたらしたことを観察することができ(図9)、このことは、がん細胞が変化し、腫瘍免疫環境が変化するだけでなく、サイトカイン環境も腫瘍標的化IFNGによって影響を受けることを示している。

【0316】

実施例6

6.1 立体的にマスクされたIFNGの設計

IFNGの種特異性を考えると、種特異的マスキングドメインもまた、腫瘍微小環境外での受容体結合を防止するために必要とされる。したがって、本発明者らは、種非依存的

50

なマスキングを調査し、一連の立体的にマスクされた、標的化された I F N G 化合物を設計した。I F N G シグナル伝達複合体の利用可能な結晶構造に基づいて (M e n d o z a ら、N a t u r e、2019、567 (7746)、56-60)、本発明者らは、集合した複合体において、I F N G の C 末端が膜の近くに位置し、したがって、嵩高なドメインの C 末端への融合が I F N G R 1 結合を妨害し得ると仮定した。標的化され、マスクされた分子を作製するために、本発明者らは、I g G 1 の上部ヒンジ領域と下部ヒンジ領域との間に I F N G ドメインを挿入した。N 末端および C 末端において、I F N G を、グリシン-セリンリンカーを使用して連結した。さらに、本発明者らは、いくつかのヒンジバリエーションを調査した。

【0317】

【表15】

表 9 A：腫瘍標的化マスクされたマウス I F N G 化合物の特定およびそれらのフォーマット

識別子	配列番号	構造
P1AG8692	119, 41	F a b-リンカー1-I F N G K R K R P-リンカー2-ヒンジ1-F c
P1AG8693	120, 41	F a b-リンカー1-I F N G K R K R P-リンカー3-ヒンジ1-F c
P1AG8694	121, 41	F a b-リンカー1-I F N G K R K R P-リンカー3-ヒンジ2-F c
P1AG8695	122, 41	F a b-リンカー1-I F N G K R K R P-リンカー3-F c
P1AG8696	123, 41	F a b-リンカー1-I F N G K R K R P-リンカー5-ヒンジ1-F c
P1AG8697	124, 41	F a b-リンカー4-I F N G K R K R P

【0318】

異なるリンカーのアミノ酸配列は以下の通りであり、リンカー1は G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G G (配列番号69) であり、リンカー2は G G G G S G G G (配列番号72) であり、リンカー3は L E V L F Q G P (配列番号73) であり、リンカー4は G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S G L E V L F Q G P G G G G S G G G G G (配列番号74) であり、リンカー5は Q A R K (配列番号75) である。ヒンジ1のアミノ酸配列は T C P P C P (配列番号76) であり、ヒンジ2のアミノ酸配列は P C P (配列番号77) である。

【0319】

6.2 立体的にマスクされた I F N G の作製および精製

立体的にマスクされた化合物を、一過性 C H O 発現系を使用して e v i t r i a で発現させ、M a b S e l e c t S u r e H P によって捕捉し、p H 3.0 までの p H 勾配で溶出した。画分を中和し、C E-S D S による組成および S E-H P L C による H M W 含有量について分析した。最も高いモノマー含有量を有する画分をプールし、S E C によってさらに精製した。場合によっては、全ての H M W 不純物を除去するために第2および第3の S E C 工程が必要であった。各 S E C 精製後、それぞれのピーク画分を S E-H P L C および C E-S D S によって分析した。最も高いモノマー含有量を有する画分を最終バッチとしてプールした。全化合物についてモノマー含有量の中央値は 98% 超であり (S E-H P L C、C E-S D S による 100%)、L C-M S によって配列同一性を確認した。詳細な品質属性を表 9 B に要約する。

【0320】

10

20

30

40

50

【表 16】

表 9 B：精製された立体的にマスクされた化合物の品質プロファイル。産生力価をプロテイン A SE-HPLC によって決定し、モノマー含有量を SE-HPLC および CE-SDS によって評価した。LC-MS により、正しい化合物の同一性が確認された。

化合物番号	力価 (mg/L)	SE-HPLC			CE-SDS
		モノマー%	HMW%	LMW%	主ピーク (%)
P1AG8692	14.0	98	2	0	100
P1AG8693	13.0	98.1	1.9	0	100
P1AG8694	11.0	98.2	1.8	0	100
P1AG8695	13.0	98.8	1.2	0	100
P1AG8696	41.0	98.9	1.1	0	100
P1AG8697	2.0	99.4	0.6	0	84.7

10

【0321】

6.3 立体的にマスクされた IFNG のブロッキング効率

立体的にマスクされた IFNG のインビトロ阻止効率を評価するために、HEK Blue IFNG レポーター細胞を、それぞれ、陽性対照として使用されるマスクされていない IFNG (P1AG8697) および立体的にマスクされた IFNG 分子 (P1AG8692) により 20 時間～24 時間刺激した。IFNG に応答する SEAP レポーター活性を、分光光度計を使用して 620～655 nm で測定した。得られた結果は、立体的にマスクされた IFNG が、陽性対照と比較して IFNG 活性が低下していることを示した (図 10B)。

20

【0322】

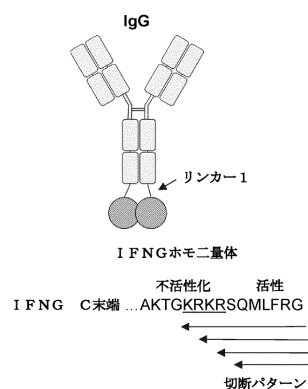
前述の発明は、理解を明確にするために例示および実施例によってある程度詳細に記載されたが、記載および実施例は、本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。本明細書に引用される全ての特許および科学文献の開示は、参照によりその全体が明示的に組み込まれる。

30

【図面】

【図 1 A】

【図 1 B】



欠失系列
...AKTGKRKRSQMLFRG
...AKTGKRKR-キャップ
...AKTGKRK-キャップ
...AKTGKR-キャップ
...AKTGK-キャップ
...AKTG
キャップ=P; SP; SQ; SL

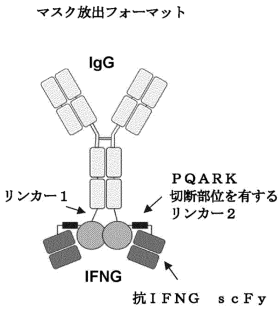
40

50

【図 1 C】

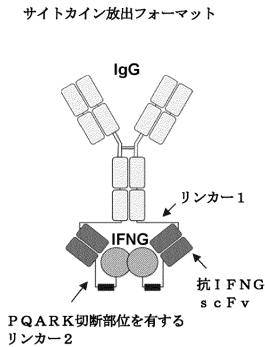
変異系列	
単一	二重
X R K R	X R X R
K X K R	K X K X
K R X R	X X K R
K R K X	K R X X
X = S; P; E	

【図 1 D】

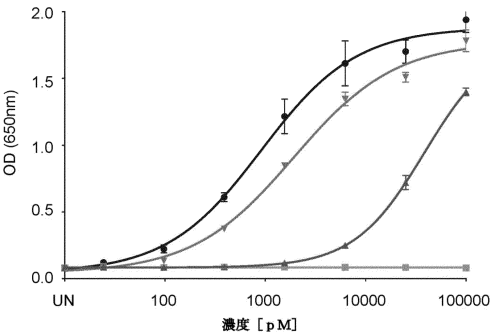


10

【図 1 E】



【図 2 A】



20

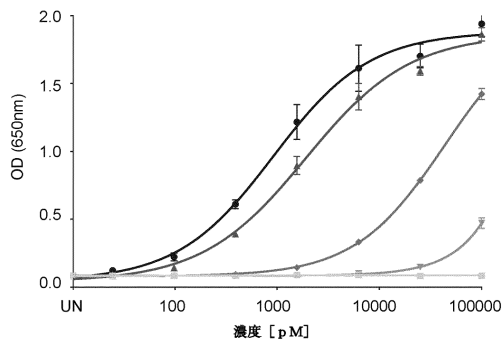
- P1AF3568 野生型 AKTGKRKRSQMLRFG
- ▲ P1AF3570 C末端 AKTGKRKRSQ
- ★ P1AF3571 C末端 AKTGKRKRS L
- P1AF3569 C末端 AKTG

30

40

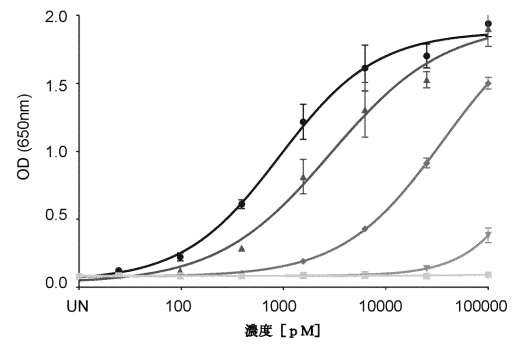
50

【図 2 B】



- P1AF3568野生型AKTGKRKRSQMLRFG
- ▲ P1AF3574 PキヤップAKTGKRKRP
- ◆ P1AF3575 PキヤップAKTGKRKP
- ▼ P1AF3576 PキヤップAKTGKRP
- P1AF3577 PキヤップAKTGKP

【図 2 C】

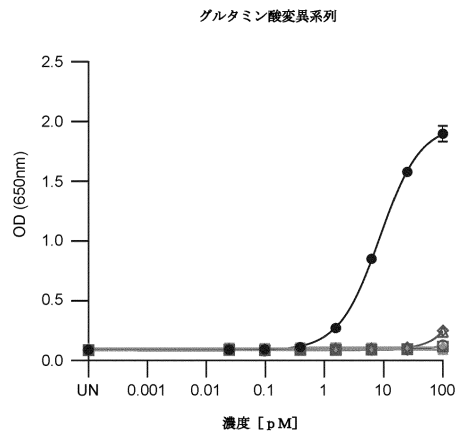


- P1AF3568野生型AKTGKRKRSQMLRFG
- ▲ P1AF3578 SPキヤップAKTGKRKRS
- ◆ P1AF9470 SPキヤップAKTGKRKSP
- ▼ P1AF3580 SPキヤップAKTGKRSP
- P1AF3581 SPキヤップAKTGKSP

10

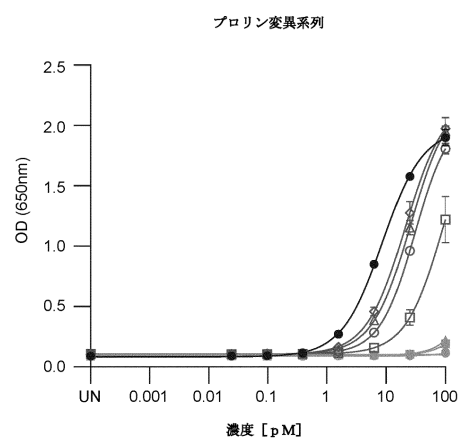
20

【図 3 A】



- P1AF3574 FAP-IFNg (KRKRP)
- P1AF9483 FAP-IFNg (ERKRP)
- P1AF9484 FAP-IFNg (KEKRP)
- △ P1AF9485 FAP-IFNg (KRERP)
- ◇ P1AF9486 FAP-IFNg (KRKEP)
- P1AF9487 FAP-IFNg (EEKRP)
- P1AF9488 FAP-IFNg (KREEP)
- ▲ P1AF9489 FAP-IFNg (ERERP)
- ◆ P1AF9490 FAP-IFNg (KEKEP)

【図 3 B】



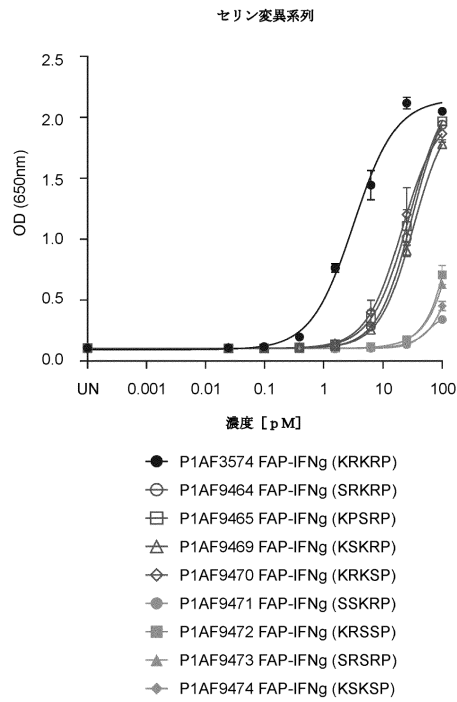
- P1AF3574 FAP-IFNg (KRKRP)
- P1AF9475 FAP-IFNg (PRKRP)
- P1AF9476 FAP-IFNg (KPKRP)
- △ P1AF9477 FAP-IFNg (KRPRP)
- ◇ P1AF9478 FAP-IFNg (KRKPP)
- P1AF9479 FAP-IFNg (PPKRP)
- P1AF9480 FAP-IFNg (KRPPP)
- ▲ P1AF9481 FAP-IFNg (PRPRP)
- ◆ P1AF9482 FAP-IFNg (KPKPP)

30

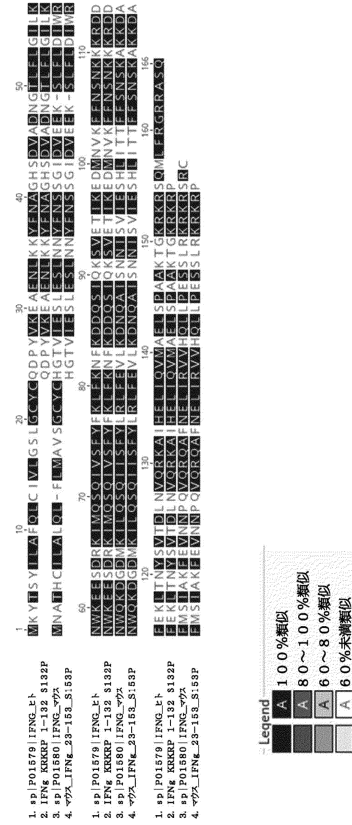
40

50

【図 3 C】



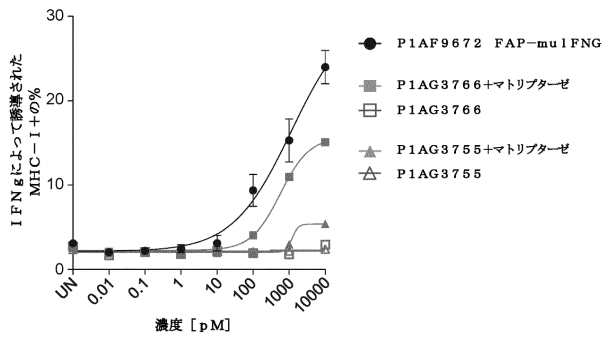
【図 4 A】



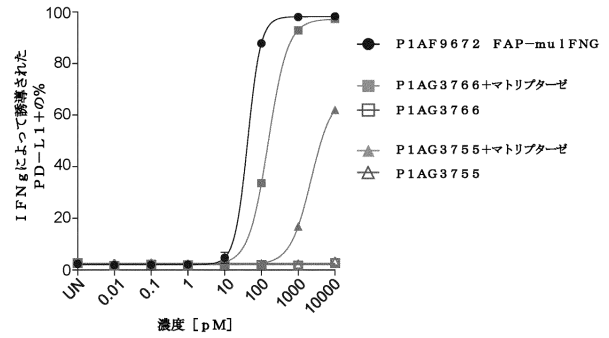
10

20

【図 4 B】



【図 4 C】

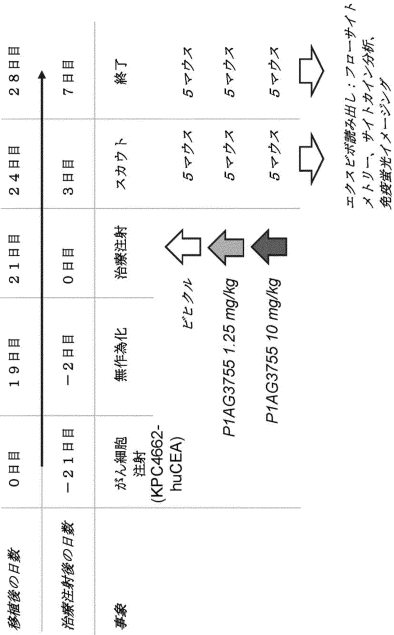


30

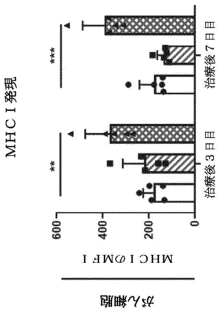
40

50

【図 5】

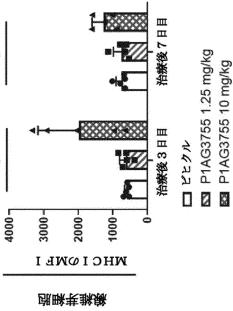


【図 6 A】

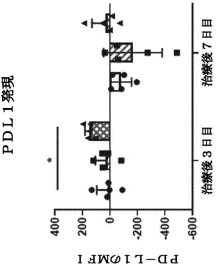


10

【図 6 B】



【図 6 C】



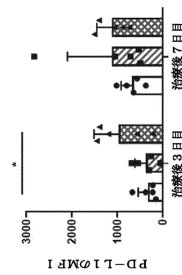
20

30

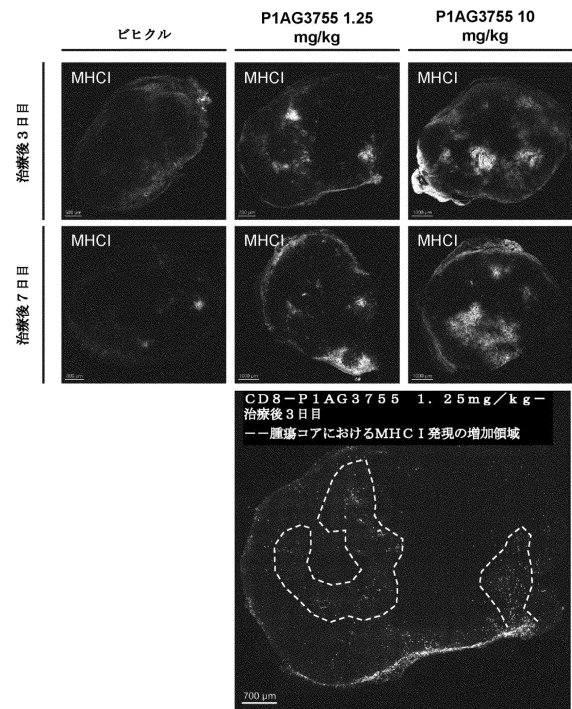
40

50

【図 6 D】



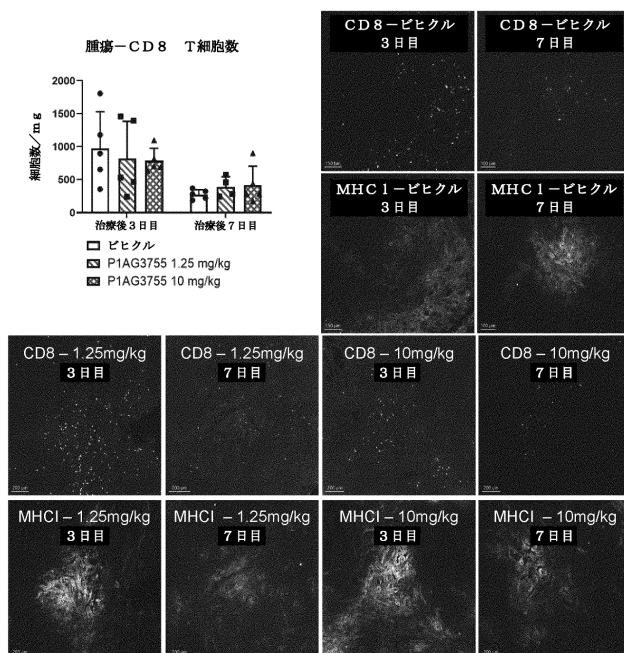
【図 7】



10

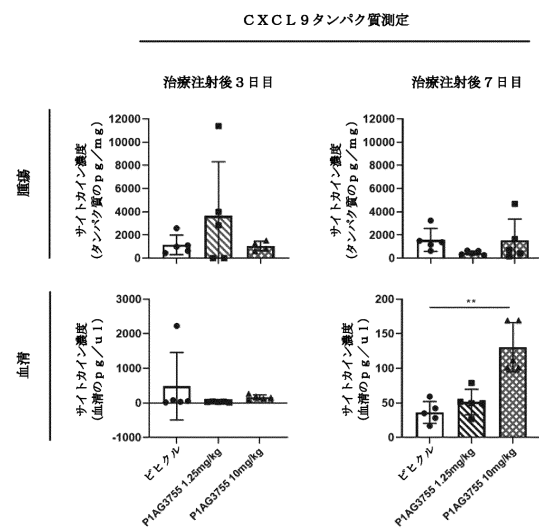
20

【図 8】



30

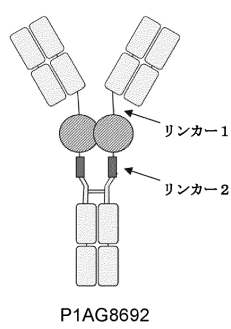
【図 9】



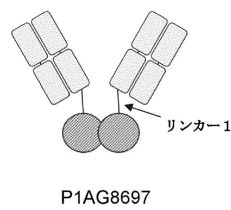
40

50

【図 1 0 A】

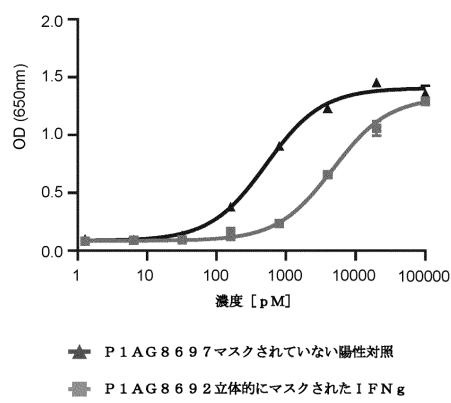


【図 1 0 B】



10

【図 1 0 C】



20

【配列表】

2025511000000001.xml

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/057751

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61P35/00 C07K14/57 C07K16/40 C07K19/00 C07K16/24 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61P C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2017/139468 A1 (UNIV PENNSYLVANIA [US]; TSUCHIYA HIROMICHI [US]; RUNKLE AARON [US]) 17 August 2017 (2017-08-17)	1, 2, 10-15, 17-19, 21-33
Y	page 6, lines 2-12 ; page 14, lines 8-19 ; Examples 4-6 ; Example 7, page 172-180; claims 1-73; sequences 2, 5 -----	3-7
X	WO 2017/194438 A1 (BRUENKER PETER [CH] ET AL) 16 November 2017 (2017-11-16)	1, 2, 8-20, 27-33
Y	figures 2, 3C; examples 4-6; sequence 106 ----- -/--	3-7
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
13 June 2023		26/06/2023
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Le Flao, Katell

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/057751

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHRISTINA CLAUS ET AL: "Tumor-targeted 4-1BB agonists for combination with T cell bispecific antibodies as off-the-shelf therapy", SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE, vol. 11, no. 496, 12 June 2019 (2019-06-12), page eaav5989, XP055722436, ISSN: 1946-6234, DOI: 10.1126/scitranslmed.aav5989 the whole document	1-20, 27-33
X	P. BRU NKER ET AL: "RG7386, a Novel Tetraivalent FAP-DR5 Antibody, Effectively Triggers FAP-Dependent, Avidity-Driven DR5 Hyperclustering and Tumor Cell Apoptosis", MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS, vol. 15, no. 5, 1 April 2016 (2016-04-01), pages 946-957, XP055373631, US ISSN: 1535-7163, DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-15-0647 the whole document	1-20, 27-33
X	WO 2019/086499 A1 (DUERR HARALD [DE] ET AL) 9 May 2019 (2019-05-09)	1,2, 10-20, 26-33
Y	figure 1; example 4	3-7
A	TILMAN SCHLOTHAUER ET AL: "Novel human IgG1 and IgG4 Fc-engineered antibodies with completely abolished immune effector functions", PROTEIN ENGINEERING, DESIGN AND SELECTION, vol. 29, no. 10, 29 August 2016 (2016-08-29), pages 457-466, XP055414310, GB ISSN: 1741-0126, DOI: 10.1093/protein/gzw040 the whole document	1-33
X,P	WO 2022/207521 A1 (HOFFMANN LA ROCHE [CH]; HOFFMANN LA ROCHE [US]) 6 October 2022 (2022-10-06) example 8; sequences 100, 104	1-33

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2023/057751

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2017139468 A1	17-08-2017	US 2018057603 A1 WO 2017139468 A1	01-03-2018 17-08-2017
WO 2017194438 A1	16-11-2017	CN 109311973 A EP 3243836 A1 EP 3455253 A1 JP 7043422 B2 JP 2019521655 A US 2019194291 A1 US 2021009656 A1 WO 2017194438 A1	05-02-2019 15-11-2017 20-03-2019 29-03-2022 08-08-2019 27-06-2019 14-01-2021 16-11-2017
WO 2019086499 A1	09-05-2019	CN 111246884 A EP 3703746 A1 JP 2021500902 A US 2020347115 A1 WO 2019086499 A1	05-06-2020 09-09-2020 14-01-2021 05-11-2020 09-05-2019
WO 2022207521 A1	06-10-2022	NONE	

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2023/057751

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed.
- b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

4 H 0 4 5

C 1 2 N 1/21 (2006.01)
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 C 1 2 P 21/08 (2006.01)
 C 1 2 P 21/02 (2006.01)
 A 6 1 K 39/395 (2006.01)
 A 6 1 K 47/68 (2017.01)
 A 6 1 K 47/65 (2017.01)
 A 6 1 K 48/00 (2006.01)
 A 6 1 P 37/02 (2006.01)
 C 0 7 K 16/30 (2006.01)
 C 0 7 K 14/57 (2006.01)
 C 1 2 N 15/13 (2006.01)
 C 1 2 N 15/23 (2006.01)

C 1 2 N 1/21
 C 1 2 N 5/10
 C 1 2 P 21/08
 C 1 2 P 21/02
 A 6 1 K 39/395
 A 6 1 K 47/68
 A 6 1 K 47/65
 A 6 1 K 48/00
 A 6 1 P 37/02
 C 0 7 K 16/30
 C 0 7 K 14/57
 C 1 2 N 15/13
 C 1 2 N 15/23

F
N

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T W E E N

2. T R I T O N

(72)発明者 ガッサー, シュテファン

スイス国 8 9 5 2 シュリーレン, ヴァーギシュトラーセ 1 0, シー／オー ロシュ グリクア
ート アーゲー

(72)発明者 クンツ, レオ フレデリク

スイス国 8 9 5 2 シュリーレン, ヴァーギシュトラーセ 1 0, シー／オー ロシュ グリクア
ート アーゲー

(72)発明者 メスナー, エッケハルト

スイス国 8 9 5 2 シュリーレン, ヴァーギシュトラーセ 1 0, シー／オー ロシュ グリクア
ート アーゲー

(72)発明者 ザウアー, エブリン

スイス国 8 9 5 2 シュリーレン, ヴァーギシュトラーセ 1 0, シー／オー ロシュ グリクア
ート アーゲー

(72)発明者 ウマーニャ, パブロ

スイス国 8 9 5 2 シュリーレン, ヴァーギシュトラーセ 1 0, シー／オー ロシュ グリクア
ート アーゲー

(72)発明者 ヴェネッツ, ダリオ

スイス国 8 9 5 2 シュリーレン, ヴァーギシュトラーセ 1 0, シー／オー ロシュ グリクア
ート アーゲー

F ターム (参考)

4B064 AG12 AG27 CA19 CC24 DA01

4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44

4C076 AA95 CC07 EE41 EE59

4C084 AA13 NA13 NA14 ZB071 ZB072

4C085 AA14 BB01 BB11 DD72 EE01

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA18 DA76 EA20

FA74