

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-530640

(P2019-530640A)

(43) 公表日 令和1年10月24日(2019.10.24)

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)

F 1

C07K 16/28
C12N 15/13
C12N 15/63
C07K 16/46
C12P 21/08

テーマコード(参考)

4B064
4B065
4C084
4C085
4C086

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 70 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2019-502573 (P2019-502573)
(86) (22) 出願日 平成29年7月20日 (2017.7.20)
(85) 翻訳文提出日 平成31年3月6日 (2019.3.6)
(86) 國際出願番号 PCT/US2017/043165
(87) 國際公開番号 WO2018/017888
(87) 國際公開日 平成30年1月25日 (2018.1.25)
(31) 優先権主張番号 62/364,763
(32) 優先日 平成28年7月20日 (2016.7.20)
(33) 優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(71) 出願人 517252624
アイジーエム バイオサイエンシズ イン
コーポレイテッド
アメリカ合衆国 94043 カリフォル
ニア州 マウンテン ビュー イースト
ミドルフィールド ロード 325
(74) 代理人 100102978
弁理士 清水 初志
(74) 代理人 100102118
弁理士 春名 雅夫
(74) 代理人 100160923
弁理士 山口 裕孝
(74) 代理人 100119507
弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】多量体OX40結合分子及びその使用

(57) 【要約】

本開示は、二量体、五量体、及び六量体OX40アゴニスト結合分子ならびに抗腫瘍免疫を誘導するためにそのような結合分子を使用する方法を提供する。

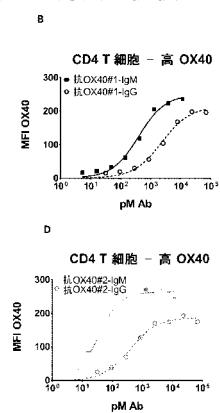
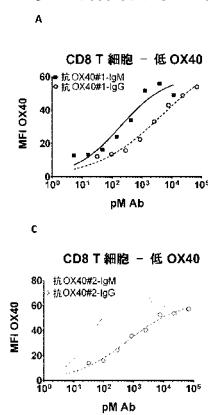


FIG. 3A

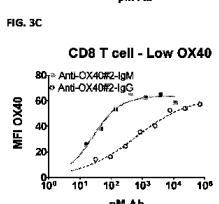
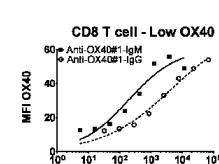


FIG. 3B

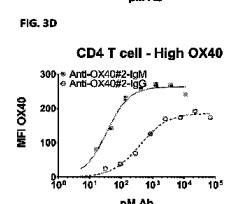
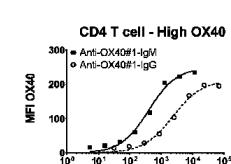


FIG. 3D

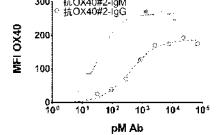
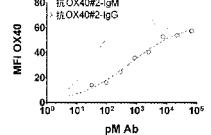


FIG. 3E



FIG. 3F

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

2個、5個、または6個の二価結合ユニットまたはそのバリエントもしくは断片を含む多量体結合分子であって、

各結合ユニットが、抗原結合ドメインとそれぞれ結合している2つのIgAまたはIgM重鎖定常領域またはその断片を含み、

前記結合分子の抗原結合ドメインのうちの少なくとも3個が、OX40を発現する細胞上のOX40モノマーに特異的に、かつアゴニスティックに結合し、かつ

前記結合分子が、二次架橋部分の非存在下で、前記細胞においてOX40媒介性シグナル伝達を誘導することができる、10

前記多量体結合分子。

【請求項 2】

二次架橋部分の非存在下で、前記細胞の表面上に発現される3個以上のOX40モノマーに結合し、かつそれらを会合させることができる、請求項1に記載の多量体結合分子。

【請求項 3】

OX40を発現する前記細胞がT細胞である、請求項1または請求項2に記載の多量体結合分子。20

【請求項 4】

前記T細胞が細胞傷害性Tリンパ球(CTL)である、請求項3に記載の多量体結合分子。20

【請求項 5】

前記細胞におけるOX40媒介性シグナル伝達が、OX40の表面発現を増加させることができる、CTL増殖を増加させることができ、炎症性サイトカインの産生を増加させることができる、CD4+CD25+FoxP3+Treg細胞の阻害作用に対する抵抗性を増加させることができる、腫瘍細胞の死滅を増加もしくは増強させることができる、またはそれらの組合せを可能にする、請求項3または請求項4に記載の多量体結合分子。

【請求項 6】

前記T細胞が、CD4+CD25+FoxP3+Treg細胞である、請求項3に記載の多量体結合分子。30

【請求項 7】

前記細胞におけるOX40媒介性シグナル伝達が、腫瘍微小環境において抗腫瘍免疫を抑制する前記細胞の能力を妨害することができる、請求項3または請求項6に記載の多量体結合分子。

【請求項 8】

2個の同等のOX40抗原結合ドメインを含む等量の二価IgG抗体またはその断片よりも高い効力で、OX40を発現する前記細胞においてOX40媒介性シグナル伝達を誘導することができる、請求項1~7のいずれか1項に記載の多量体結合分子。

【請求項 9】

前記細胞の表面上に発現されるOX40モノマーに特異的に、かつアゴニスティックに結合する少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも6個、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも11個、または12個の抗原結合ドメインを含み、それによって、前記細胞においてOX40媒介性シグナル伝達を活性化させる、請求項1~8のいずれか1項に記載の多量体結合分子。40

【請求項 10】

前記少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも6個、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも11個、または12個の抗原結合ドメインが、同じ細胞外OX40エピトープに結合する、請求項9に記載の多量体結合分子。

【請求項 11】

10

20

30

40

50

少なくとも 3 個、少なくとも 4 個、少なくとも 5 個、少なくとも 6 個、少なくとも 7 個、少なくとも 8 個、少なくとも 9 個、少なくとも 10 個、少なくとも 11 個、または 12 個の抗原結合ドメインがそれぞれ、2 つ以上の異なる細胞外 O X 4 0 エピトープの群のうちの 1 つに特異的に結合する、請求項 9 に記載の多量体結合分子。

【請求項 12】

前記 2 個、5 個、または 6 個の結合ユニットが、ヒト、ヒト化、またはキメラ免疫グロブリン結合ユニットである、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の多量体結合分子。

【請求項 13】

前記結合分子の少なくとも 3 個の抗原結合ドメインが、O X 4 0 アゴニスト結合ドメインであり、かつ少なくとも 1 個、少なくとも 2 個、少なくとも 3 個、少なくとも 4 個、少なくとも 5 個、少なくとも 6 個、少なくとも 7 個、少なくとも 8 個、少なくとも 9 個、少なくとも 10 個、少なくとも 11 個、または 12 個の抗原結合ドメインが重鎖可変領域 (V H) 及び軽鎖可変領域 (V L) を含み、前記 V H 及び V L が、6 つの免疫グロブリン相補性決定領域 H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3 を含み、前記 H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3 が、

それぞれ配列番号 9 及び配列番号 10；配列番号 11 及び配列番号 12；配列番号 13 及び配列番号 14；配列番号 15 及び配列番号 16；配列番号 17 及び配列番号 18；配列番号 19 及び配列番号 20；配列番号 21 及び配列番号 22；配列番号 23 及び配列番号 24；配列番号 25 及び配列番号 26；配列番号 25 及び配列番号 28；配列番号 27 及び配列番号 26；配列番号 27 及び配列番号 28；配列番号 29 及び配列番号 26；配列番号 29 及び配列番号 28；配列番号 30 及び配列番号 31；配列番号 30 及び配列番号 33；配列番号 32 及び配列番号 31；配列番号 32 及び配列番号 33；配列番号 35 及び配列番号 36；配列番号 37 及び配列番号 38；配列番号 39 及び配列番号 40；配列番号 41 及び配列番号 42；配列番号 43 及び配列番号 44；配列番号 45 及び配列番号 46；配列番号 47 及び配列番号 48；配列番号 49 及び配列番号 50；もしくは配列番号 51 及び配列番号 52 を含むもしくはそれらの中に含まれる V H 及び V L アミノ酸配列を含む抗体の C D R、または

C D R の 1 つもしくは複数における 1 つもしくは 2 つのアミノ酸置換を除いて、それぞれ配列番号 9 及び配列番号 10；配列番号 11 及び配列番号 12；配列番号 13 及び配列番号 14；配列番号 15 及び配列番号 16；配列番号 17 及び配列番号 18；配列番号 19 及び配列番号 20；配列番号 21 及び配列番号 22；配列番号 23 及び配列番号 24；配列番号 25 及び配列番号 26；配列番号 25 及び配列番号 28；配列番号 27 及び配列番号 26；配列番号 27 及び配列番号 28；配列番号 29 及び配列番号 26；配列番号 29 及び配列番号 28；配列番号 30 及び配列番号 31；配列番号 30 及び配列番号 33；配列番号 32 及び配列番号 31；配列番号 32 及び配列番号 33；配列番号 34 及び配列番号 31；配列番号 34 及び配列番号 33；配列番号 35 及び配列番号 36；配列番号 37 及び配列番号 38；配列番号 39 及び配列番号 40；配列番号 41 及び配列番号 42；配列番号 43 及び配列番号 44；配列番号 45 及び配列番号 46；配列番号 47 及び配列番号 48；配列番号 49 及び配列番号 50；もしくは配列番号 51 及び配列番号 52 を含むもしくはそれらの中に含まれる V H 及び V L アミノ酸配列を含む抗体の C D R を含む、

請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の多量体結合分子。

【請求項 14】

少なくとも 1 個、少なくとも 2 個、少なくとも 3 個、少なくとも 4 個、少なくとも 5 個、少なくとも 6 個、少なくとも 7 個、少なくとも 8 個、少なくとも 9 個、少なくとも 10 個、少なくとも 11 個、または 12 個の抗原結合ドメインが抗体 V H 及び V L を含み、前記 V H 及び V L が、それぞれ配列番号 9 及び配列番号 10；配列番号 11 及び配列番号 12；配列番号 13 及び配列番号 14；配列番号 15 及び配列番号 16；配列番号 17 及び

10

20

30

40

50

配列番号 1 8 ; 配列番号 1 9 及び配列番号 2 0 ; 配列番号 2 1 及び配列番号 2 2 ; 配列番号 2 3 及び配列番号 2 4 ; 配列番号 2 5 及び配列番号 2 6 ; 配列番号 2 5 及び配列番号 2 8 ; 配列番号 2 7 及び配列番号 2 6 ; 配列番号 2 7 及び配列番号 2 8 ; 配列番号 2 9 及び配列番号 2 6 ; 配列番号 2 9 及び配列番号 2 8 ; 配列番号 3 0 及び配列番号 3 1 ; 配列番号 3 0 及び配列番号 3 3 ; 配列番号 3 2 及び配列番号 3 1 ; 配列番号 3 2 及び配列番号 3 3 ; 配列番号 3 4 及び配列番号 3 1 ; 配列番号 3 4 及び配列番号 3 3 ; 配列番号 3 5 及び配列番号 3 6 ; 配列番号 3 7 及び配列番号 3 8 ; 配列番号 3 9 及び配列番号 4 0 ; 配列番号 4 1 及び配列番号 4 2 ; 配列番号 4 3 及び配列番号 4 4 ; 配列番号 4 5 及び配列番号 4 6 ; 配列番号 4 7 及び配列番号 4 8 ; 配列番号 4 9 及び配列番号 5 0 ; または配列番号 5 1 及び配列番号 5 2 を含むかまたはそれらの中に含まれる成熟 V H 及び V L アミノ酸配列と少なくとも 8 0 % 、少なくとも 8 5 % 、少なくとも 9 0 % 、少なくとも 9 5 % または 1 0 0 % 同一なアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の多量体結合分子。

10

【請求項 1 5】

2 個の二価 I g A 結合ユニットまたはその断片と J 鎖またはその断片もしくはバリアントとを含む二量体結合分子である多量体結合分子であって、ここで、各結合ユニットが、抗原結合ドメインとそれぞれ結合している 2 つの I g A 重鎖定常領域またはその断片を含む、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の多量体結合分子。

20

【請求項 1 6】

分泌成分またはその断片もしくはバリアントをさらに含む、請求項 1 5 に記載の多量体結合分子。

20

【請求項 1 7】

前記 I g A 重鎖定常領域またはその断片がそれぞれ、 C 2 ドメインまたは C 3 - t p ドメインを含む、請求項 1 5 または請求項 1 6 に記載の多量体結合分子。

30

【請求項 1 8】

1 つまたは複数の I g A 重鎖定常領域またはその断片が、 C 1 ドメインをさらに含む、請求項 1 7 に記載の多量体結合分子。

【請求項 1 9】

前記 I g A 重鎖定常領域がヒト I g A 定常領域である、請求項 1 5 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載の多量体結合分子。

30

【請求項 2 0】

各結合ユニットが、前記 I g A 定常領域またはその断片のアミノ末端側に位置する V H をそれぞれ含む 2 本の I g A 重鎖と、免疫グロブリン軽鎖定常領域のアミノ末端側に位置する V L をそれぞれ含む 2 本の免疫グロブリン軽鎖とを含む、請求項 1 5 ~ 1 9 のいずれか 1 項に記載の多量体結合分子。

40

【請求項 2 1】

5 または 6 個の二価 I g M 結合ユニットをそれぞれ含む五量体または六量体結合分子である多量体結合分子であって、ここで、各結合ユニットが、抗原結合ドメインとそれぞれ結合している 2 つの I g M 重鎖定常領域またはその断片を含む、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の多量体結合分子。

【請求項 2 2】

前記 I g M 重鎖定常領域またはその断片がそれぞれ、 C μ 3 ドメインまたはその断片もしくはバリアント及び C μ 4 - t p ドメインまたはその断片もしくはバリアントを含む、請求項 2 1 に記載の多量体結合分子。

【請求項 2 3】

1 つまたは複数の I g M 重鎖定常領域またはその断片が、 C μ 2 ドメイン、 C μ 1 ドメイン、またはそれらの任意の組合せをさらに含む、請求項 2 1 または請求項 2 2 に記載の多量体結合分子。

【請求項 2 4】

五量体であり、かつ J 鎖、またはその断片、またはそのバリアントをさらに含む、請求

50

項 21～23 のいずれか 1 項に記載の多量体結合分子。

【請求項 25】

前記 IgM 重鎖定常領域がヒト IgM 定常領域である、請求項 21～24 のいずれか 1 項に記載の多量体結合分子。

【請求項 26】

各結合ユニットが、前記 IgM 定常領域またはその断片のアミノ末端側に位置する VH をそれぞれ含む 2 本の IgM 重鎖と、免疫グロブリン軽鎖定常領域のアミノ末端側に位置する VL をそれぞれ含む 2 本の免疫グロブリン軽鎖とを含む、請求項 21～25 のいずれか 1 項に記載の多量体結合分子。

【請求項 27】

各結合ユニットが 2 本の重鎖及び 2 本の軽鎖を含み、前記重鎖及び軽鎖が、それぞれ配列番号 9 及び配列番号 10 ; 配列番号 11 及び配列番号 12 ; 配列番号 13 及び配列番号 14 ; 配列番号 15 及び配列番号 16 ; 配列番号 17 及び配列番号 18 ; 配列番号 19 及び配列番号 20 ; 配列番号 21 及び配列番号 22 ; 配列番号 23 及び配列番号 24 ; 配列番号 25 及び配列番号 26 ; 配列番号 25 及び配列番号 28 ; 配列番号 27 及び配列番号 26 ; 配列番号 27 及び配列番号 28 ; 配列番号 29 及び配列番号 26 ; 配列番号 29 及び配列番号 28 ; 配列番号 30 及び配列番号 31 ; 配列番号 30 及び配列番号 33 ; 配列番号 32 及び配列番号 31 ; 配列番号 32 及び配列番号 33 ; 配列番号 34 及び配列番号 31 ; 配列番号 34 及び配列番号 33 ; 配列番号 35 及び配列番号 36 ; 配列番号 37 及び配列番号 38 ; 配列番号 39 及び配列番号 40 ; 配列番号 41 及び配列番号 42 ; 配列番号 43 及び配列番号 44 ; 配列番号 45 及び配列番号 46 ; 配列番号 47 及び配列番号 48 ; 配列番号 49 及び配列番号 50 ; または配列番号 51 及び配列番号 52 を含むかまたはそれらの中に含まれる成熟 VH 及び VL アミノ酸配列と少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95% または 100% 同一な VH 及び VL アミノ酸配列を含む、請求項 1～26 のいずれか 1 項に記載の多量体結合分子。

【請求項 28】

五量体 IgM 分子であり、J鎖またはその断片もしくはバリアントをさらに含む、請求項 1～14 または 21～27 のいずれか 1 項に記載の多量体結合分子。

【請求項 29】

請求項 1～28 のいずれか 1 項に記載の多量体結合分子を含む、組成物。

【請求項 30】

請求項 1～28 のいずれか 1 項に記載の結合分子のポリペプチドサブユニットをコードする核酸配列を含む、ポリヌクレオチド。

【請求項 31】

前記ポリペプチドサブユニットが、IgM 重鎖定常領域と、前記多量体結合分子の前記抗原結合ドメインの少なくとも抗体 VH 部分とを含む、請求項 30 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 32】

前記ポリペプチドサブユニットが、

(a) 配列番号 9 、配列番号 11 、配列番号 13 、配列番号 15 、配列番号 17 、配列番号 19 、配列番号 21 、配列番号 23 、配列番号 25 、配列番号 27 、配列番号 29 、配列番号 30 、配列番号 32 、配列番号 34 、配列番号 35 、配列番号 37 、配列番号 39 、配列番号 41 、配列番号 43 、配列番号 45 、配列番号 47 、配列番号 49 、もしくは配列番号 51 を含むかもしくはその中に含まれる VH アミノ酸配列に含まれる CDR を含む、HCDR1 、HCDR2 、及び HCDR3 領域；または、HCDR の 1 つもしくは複数において 1 つもしくは 2 つの单一同族アミノ酸置換を有する、配列番号 9 、配列番号 11 、配列番号 13 、配列番号 15 、配列番号 17 、配列番号 19 、配列番号 21 、配列番号 23 、配列番号 25 、配列番号 27 、配列番号 29 、配列番号 30 、配列番号 32 、配列番号 34 、配列番号 35 、配列番号 37 、配列番号 39 、配列番号 41 、配列番号 43 、配列番号 45 、配列番号 47 、配列番号 49 、もしくは配列番号 51 を含むかもしくは

10

20

30

40

50

その中に含まれるV H アミノ酸配列に含まれる C D R を含む、H C D R 1、H C D R 2、及びH C D R 3 領域；あるいは

(b) 配列番号 9、配列番号 11、配列番号 13、配列番号 15、配列番号 17、配列番号 19、配列番号 21、配列番号 23、配列番号 25、配列番号 27、配列番号 29、配列番号 30、配列番号 32、配列番号 34、配列番号 35、配列番号 37、配列番号 39、配列番号 41、配列番号 43、配列番号 45、配列番号 47、配列番号 49、または配列番号 51 を含むかまたはその中に含まれる成熟 V H アミノ酸配列と少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 % または 100 % 同一なアミノ酸配列

を含む V H

10

の C 末端に融合されたヒト I g M 定常領域またはその断片を含む、

請求項 3 1 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 3 3】

前記ポリペプチドサブユニットが、軽鎖定常領域と、前記多量体結合分子の前記抗原結合ドメインの抗体 V L 部分とを含む、請求項 3 0 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 3 4】

前記ポリペプチドサブユニットが、

(a) 配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、配列番号 16、配列番号 18、配列番号 20、配列番号 22、配列番号 24、配列番号 26、配列番号 28、配列番号 31、配列番号 33、配列番号 36、配列番号 38、配列番号 40、配列番号 42、配列番号 44、配列番号 46、配列番号 48、配列番号 50、もしくは配列番号 52 を含むかもしくはその中に含まれる V L アミノ酸配列に含まれる C D R を含む、L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3 領域；または、L C D R の 1 つもしくは複数において 1 つもしくは 2 つの單一アミノ酸置換を有する、配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、配列番号 16、配列番号 18、配列番号 20、配列番号 22、配列番号 24、配列番号 26、配列番号 28、配列番号 31、配列番号 33、配列番号 36、配列番号 38、配列番号 40、配列番号 42、配列番号 44、配列番号 46、配列番号 48、配列番号 50、もしくは配列番号 52 を含むかもしくはその中に含まれる V L アミノ酸配列に含まれる C D R を含む、L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3 領域；あるいは

20

(b) 配列番号 10、配列番号 12、配列番号 14、配列番号 16、配列番号 18、配列番号 20、配列番号 22、配列番号 24、配列番号 26、配列番号 28、配列番号 31、配列番号 33、配列番号 36、配列番号 38、配列番号 40、配列番号 42、配列番号 44、配列番号 46、配列番号 48、配列番号 50、または配列番号 52 を含むかまたはその中に含まれる成熟 V L アミノ酸配列と少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 % または 100 % 同一なアミノ酸配列

30

を含む V L

の C 末端に融合されたヒトカッパまたはラムダ軽鎖定常領域またはその断片を含む、

40

請求項 3 3 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 3 5】

請求項 3 0 ~ 3 2 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド、及び請求項 3 0、3 3、または 3 4 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチドを含む、組成物。

【請求項 3 6】

前記ポリヌクレオチドが別々のベクター上にある、請求項 3 5 に記載の組成物。

【請求項 3 7】

前記ポリヌクレオチドが单一のベクター上にある、請求項 3 5 に記載の組成物。

【請求項 3 8】

J 鎖、またはその断片、またはそのバリアントをコードする核酸配列を含むポリヌクレ

50

オチドをさらに含む、請求項 35～37 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 39】

請求項 37 に記載のベクター。

【請求項 40】

請求項 36 に記載のベクター。

【請求項 41】

請求項 30～34 のいずれか 1 項に記載のポリヌクレオチド、請求項 35～38 のいずれか 1 項に記載の組成物、または請求項 39 または 40 のいずれか 1 項に記載のベクターを含み、請求項 1～28 のいずれか 1 項に記載の結合分子またはそのサブユニットを発現することができる、宿主細胞。

10

【請求項 42】

請求項 1～28 のいずれか 1 項に記載の結合分子を生成する方法であって、請求項 41 に記載の宿主細胞を培養すること、及び前記結合分子を回収することを含む、前記方法。

【請求項 43】

OX40 発現細胞において OX40 媒介性活性化を誘導する方法であって、前記 OX40 発現細胞を、請求項 1～28 のいずれか 1 項に記載の多量体結合分子と接触させることを含む、前記方法。

20

【請求項 44】

OX40 発現 T 細胞において OX40 の移動及びクラスター化を誘導する方法であって、OX40 発現 T 細胞を、請求項 1～28 のいずれか 1 項に記載の多量体結合分子と接触させることを含む、前記方法。

【請求項 45】

処置を必要とする対象に、請求項 1～28 のいずれか 1 項に記載の多量体結合分子の有効量を投与することを含む、がんを処置する方法であって、前記多量体結合分子は、OX40 発現エフェクター T 細胞を活性化させることができ、それによって、殺腫瘍性 CTL 応答を開始させる、前記方法。

【請求項 46】

前記対象がヒトである、請求項 45 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、その全体で参照によって本明細書に組み込まれる 2016 年 7 月 20 日出願の米国特許仮出願 62/364,763 号の利益を主張する。

【背景技術】

【0002】

背景

腫瘍壞死因子スーパーファミリー受容体 (TNFSFR) タンパク質は、腫瘍免疫治療薬のための重要な標的である。例えば、TNFSFR 標的、例えば、多くのなかでも、CD40、GITR、CD137、及び OX40 を指向するアゴニストモノクローナル抗体は現在、無数のがん適応症について治験中である。

40

【0003】

多くの事例において、TNFSFR 標的の活性化は、その受容体を発現する細胞の表面上で少なくとも 3 つの非相互作用性受容体モノマーが架橋して、安定な受容体三量体を形成し、細胞膜を通過するシグナル伝達が生じることを必要とする。TNFSFR タンパク質三量体がクラスター化して三量体の「ラフト」になると、シグナル伝達カスケードのより有効な活性化が生じる (Valley et al., J. Biol. Chem., 287(25): 21265-21278, 2012 (非特許文献1) を参照されたい)。典型的には、細胞の表面上での TNFSFR のクラスター化は、多量体、例えば、三量体リガンドによる会合を介して達成され得る。最近の研究によって、TNFSFR DR5

50

を指向する多量体アゴニスト IgM 抗体は、二次架橋の非存在下で、かつ同一の結合ドメインを有する IgG 分子を上回る細胞傷害性の上昇を伴って、細胞の表面上で多数の DR5 受容体モノマーに効果的に結合し得ることが実証されている。その全体で参照によって本明細書に組み込まれる 2016 年 1 月 20 日出願の PCT 出願番号 PCT/US16/14153 (特許文献 1) を参考されたい。

【0004】

CD134 または TNFRSF4 としても公知の OX40 は、活性化 T 細胞上に発現される TNFSFR である。OX40 は、活性化 CD4+ 及び CD8+ T 細胞の両方の上に発現されるが、休止ナイーブ T 細胞または多くの休止メモリー T 細胞では見い出されず、制御性 T 細胞 (Treg)、NKT 細胞、NK 細胞、及び好中球上にも発現される (Croft, M., et al., *Immuno Rev.* 229: 173 - 191 (2009)) (非特許文献 2))。OX40 発現は、マウス CD4+CD25+FoxP3+Treg 上で構成的であるが、活性化ヒト FoxP3+Treg でのみ発現される (Croft, M. Ann Rev Immunol 28: 57 - 78 (2010)) (非特許文献 3))。活性化させると、エフェクター T 細胞及び Treg は両方とも、動態の遅延を伴って、OX40 発現を上方制御する (同書)。活性化抗原提示細胞 (APC)、例えば、マクロファージ及び樹状細胞 (DC) 上に発現されるその三量体リガンド (OX40L、TNFSF4) との相互作用は、CD4+ 及び CD8+ エフェクター T 細胞において共刺激増殖、生存、及びエフェクター機能の増強をもたらす (同書、Stueber, E., et al., *Immunity* 2: 507 - 21 (1995)) (非特許文献 4))。適正なサイトカイン環境を与えられると、OX40 シグナル伝達はまた、Treg の免疫抑制能を遮断することができ、それによって、細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) 機能を増強する (Linch, S.N., et al., *Front. Oncol.* 5: doi: 10.3389/fonc.2015.00034 (2015)) (非特許文献 5))。OX40 アゴニスト mAb は、CTL のエフェクター機能及び増殖を増強することができ、かつ腫瘍内 CD25+CD4+FoxP3+Treg 細胞による免疫抑制を遮断することができる (Piconeese, S., et al., *J Exp Med.* 205: 825 - 839 (2008)) (非特許文献 6))。OX40 を指向するアゴニストモノクローナル抗体は、前臨床モデルにおいて治療活性を示している (例えば、Linch, S.N., et al., *Front. Oncol.* 5: doi: 10.3389/fonc.2015.00034 (2015)) (非特許文献 5) における引用を参考されたい)。さらに、これに限定されないが、9B12 (マウス抗 OX40 mAb、Curti BD, et al., *Cancer Res.* 73: 7189 - 98 (2013)) (非特許文献 7)) ; KHK4083 (完全ヒト抗 OX40 mAb、ClinicalTrials.gov # NCT02647866) ; Medi0562 (ヒト化抗 OX40 mAb、ClinicalTrials.gov # NCT02705482) ; PF-04518600 (完全ヒト抗 OX40 mAb、ClinicalTrials.gov # NCT02315066) ; 及び GSK3174998 (ヒト化抗 OX40 mAb、ClinicalTrials.gov # NCT02528357) を含む、いくつかの OX40 IgG アゴニスト mAb が、単独で、または他の治療法との組合せでヒト治験において調査中である。しかしながら、典型的な二価 IgG アゴニスト抗体は、細胞の表面上で TNFSFR を十分に会合させてシグナル伝達を開始するために、架橋を必要とする。

【0005】

がん免疫療法において使用するために、より効力のある、したがって、より有効な OX40 アゴニスト抗体を開発する必要が依然としてある。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献 1】 PCT/US16/14153

【非特許文献】

10

20

30

40

50

【0007】

【非特許文献1】Valley et al., J. Biol. Chem., 287(25): 21265 - 21278, 2012

【非特許文献2】Croft, M, et al., Immunol Rev. 229: 173 - 191 (2009)

【非特許文献3】Croft, M. Ann Rev Immunol 28: 57 - 78 (2010)

【非特許文献4】Stueber E, et al., Immunity 2: 507 - 21 (1995)

【非特許文献5】Linch, SN, et al. Front. Oncol. 5: doi : 10.3389/fonc.2015.00034 (2015) 10

【非特許文献6】Piconeese S, et al., J Exp Med. 205: 825 - 839 (2008)

【非特許文献7】Curti BD, et al., Cancer Res. 73: 7189 - 98 (2013)

【発明の概要】

【0008】

概要

本開示は、多量体、例えば、2、5、または6個の二価結合ユニットまたはそのバリアントもしくは断片を含む二量体、五量体、または六量体結合分子であって、各結合ユニットが、抗原結合ドメインとそれぞれ結合している2つのIgAもしくはIgM重鎖定常領域またはその断片を含み、結合分子の抗原結合ドメインのうちの少なくとも3個が、活性化T細胞、例えば、CTLの表面上に、または休止または活性化Treg上に発現されるOX40に特異的に、かつアゴニスティックに結合し、結合分子が、二次架橋部分の非存在下で、Tregまたは活性化CTL上に発現される多数の、例えば、3個以上のOX40モノマーに結合し、それによって、抗腫瘍免疫応答を誘発することができる多量体結合分子を提供する。

【0009】

本開示は、2、5、または6個の二価結合ユニットまたはそのバリアントもしくは断片を含む多量体結合分子であって、各結合ユニットが、抗原結合ドメインとそれぞれ結合している2つのIgAまたはIgM重鎖定常領域またはその断片を含み、結合分子の抗原結合ドメインのうちの少なくとも3個が、OX40を発現する細胞上のOX40モノマーに特異的に、かつアゴニスティックに結合することができ、結合分子が、二次架橋部分の非存在下で、細胞においてOX40媒介性シグナル伝達を誘導することができる多量体結合分子を提供する。ある種の態様では、本明細書で提供するとおりの多量体結合分子は、二次架橋部分の非存在下で、細胞の表面上に発現される3個以上のOX40モノマーに結合し、かつそれらを会合させることができる。ある種の態様では、OX40を発現する細胞は、T細胞、細胞傷害性Tリンパ球(CTL)、またはCD4+CD25+FoxP3+T調節性(Treg)細胞である。ある種の態様では、細胞におけるOX40媒介性シグナル伝達は、OX40の表面発現を増加させることができる、CTL増殖を増加させることができ、炎症性サイトカインの産生を増加させることができる、CD4+CD25+FoxP3+Treg細胞の阻害作用に対する抵抗性を増加させることができる、腫瘍細胞の死滅を増強させることができる、またはそれらの組合せを可能にする。ある種の態様では、CD4+CD25+FoxP3 Treg細胞におけるOX40媒介性シグナル伝達は、腫瘍微小環境において抗腫瘍免疫を抑制する細胞の能力を妨害することができる。ある種の態様では、本明細書で提供するとおりの多量体結合分子は、2個の同等のOX40抗原結合ドメインを含む等量の二価IgG抗体またはその断片よりも高い効力で、OX40を発現する細胞においてOX40媒介性T細胞活性化を誘導することができる。

【0010】

10

20

30

40

50

ある種の態様では、本明細書で提供するとおりの多量体結合分子は、細胞の表面上に発現されるOX40モノマーに特異的に、かつアゴニスティックに結合する少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、または12個の抗原結合ドメインを含み、それによって、細胞においてOX40媒介性シグナル伝達を活性化させる。ある種の態様では、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12個の抗原結合ドメインは、同じ細胞外OX40エピトープに結合する。ある種の態様では、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12個の抗原結合ドメインはそれぞれ、2つ以上の異なる細胞外OX40エピトープの群のうちの1つに特異的に結合する。

【0011】

10

ある種の態様では、本明細書で提供するとおりの多量体結合分子の2、5、または6個の結合ユニットは、ヒト、ヒト化、またはキメラ免疫グロブリン結合ユニットである。

【0012】

ある種の態様では、本明細書で提供するとおりの多量体結合分子の少なくとも3個の抗原結合ドメインは、OX40アゴニスト結合ドメインであり、少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、または12個の抗原結合ドメインは、重鎖可変領域(VH)及び軽鎖可変領域(VL)を含み、そのVH及びVLはまとめて、それぞれ配列番号9及び配列番号10；配列番号11及び配列番号12；配列番号13及び配列番号14；配列番号15及び配列番号16；配列番号17及び配列番号18；配列番号19及び配列番号20；配列番号21及び配列番号22；配列番号23及び配列番号24；配列番号25及び配列番号26；配列番号25及び配列番号28；配列番号27及び配列番号26；配列番号27及び配列番号28；配列番号30及び配列番号31；配列番号30及び配列番号33；配列番号32及び配列番号31；配列番号32及び配列番号33；配列番号34及び配列番号31；配列番号34及び配列番号33；配列番号35及び配列番号36；配列番号37及び配列番号38；配列番号39及び配列番号40；配列番号41及び配列番号42；配列番号43及び配列番号44；配列番号45及び配列番号46；配列番号47及び配列番号48；配列番号49及び配列番号50；もしくは配列番号51及び配列番号52を含むかもしくはそれらの中に含まれるVH及びVLアミノ酸配列を含む抗体の6つの免疫グロブリン相補性決定領域HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2、及びLCDR3、またはCDRのうちの1つもしくは複数における1つもしくは2つのアミノ酸置換を除いて、それぞれ配列番号9及び配列番号10；配列番号11及び配列番号12；配列番号13及び配列番号14；配列番号15及び配列番号16；配列番号17及び配列番号18；配列番号19及び配列番号20；配列番号21及び配列番号22；配列番号23及び配列番号24；配列番号25及び配列番号26；配列番号25及び配列番号28；配列番号27及び配列番号26；配列番号27及び配列番号28；配列番号29及び配列番号26；配列番号29及び配列番号28；配列番号30及び配列番号31；配列番号30及び配列番号33；配列番号32及び配列番号31；配列番号32及び配列番号33；配列番号34及び配列番号31；配列番号34及び配列番号33；配列番号35及び配列番号36；配列番号37及び配列番号38；配列番号39及び配列番号40；配列番号41及び配列番号42；配列番号43及び配列番号44；配列番号45及び配列番号46；配列番号47及び配列番号48；配列番号49及び配列番号50；もしくは配列番号51及び配列番号52を含むかもしくはそれらの中に含まれるVH及びVLアミノ酸配列を含む抗体のCDRを有する。

【0013】

40

ある種の態様では、本明細書で提供するとおりの多量体結合分子の少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、または12個の抗原結合ドメインは、抗体VH及びVLを含み、そのVH及びVLは、それぞれ配列番号9及び

50

配列番号 1 0 ; 配列番号 1 1 及び配列番号 1 2 ; 配列番号 1 3 及び配列番号 1 4 ; 配列番号 1 5 及び配列番号 1 6 ; 配列番号 1 7 及び配列番号 1 8 ; 配列番号 1 9 及び配列番号 2 0 ; 配列番号 2 1 及び配列番号 2 2 ; 配列番号 2 3 及び配列番号 2 4 ; 配列番号 2 5 及び配列番号 2 6 ; 配列番号 2 5 及び配列番号 2 8 ; 配列番号 2 7 及び配列番号 2 6 ; 配列番号 2 7 及び配列番号 2 8 ; 配列番号 2 9 及び配列番号 2 6 ; 配列番号 2 9 及び配列番号 2 8 ; 配列番号 3 0 及び配列番号 3 1 ; 配列番号 3 0 及び配列番号 3 3 ; 配列番号 3 2 及び配列番号 3 1 ; 配列番号 3 2 及び配列番号 3 3 ; 配列番号 3 4 及び配列番号 3 1 ; 配列番号 3 4 及び配列番号 3 3 ; 配列番号 3 5 及び配列番号 3 6 ; 配列番号 3 7 及び配列番号 3 8 ; 配列番号 3 9 及び配列番号 4 0 ; 配列番号 4 1 及び配列番号 4 2 ; 配列番号 4 3 及び配列番号 4 4 ; 配列番号 4 5 及び配列番号 4 6 ; 配列番号 4 7 及び配列番号 4 8 ; 配列番号 4 9 及び配列番号 5 0 ; または配列番号 5 1 及び配列番号 5 2 を含むかまたはそれらの中に含まれる成熟 V H 及び V L アミノ酸配列と少なくとも 8 0 % 、少なくとも 8 5 % 、少なくとも 9 0 % 、少なくとも 9 5 % または 1 0 0 % 同一なアミノ酸配列を有する。

10

【 0 0 1 4 】

ある種の態様では、本明細書で提供するとおりの多量体結合分子は、2 個の二価 I g A 結合ユニットまたはその断片と J 鎖またはその断片もしくはバリアントとを含む二量体結合分子であり、その際、各結合ユニットは、それぞれ抗原結合ドメインと結合した2つの I g A 重鎖定常領域またはその断片を有する。ある種の態様では、この多量体結合分子はさらに、分泌成分またはその断片もしくはバリアントを含む。ある種の態様では、I g A 重鎖定常領域またはその断片はそれぞれ、C 2 ドメインまたは C 3 - t p ドメインを含み、さらに C 1 ドメインを含むことができる。ある種の態様では、I g A 重鎖定常領域は、ヒト I g A 定常領域である。ある種の態様では、この多量体結合分子の各結合ユニットは、I g A 定常領域またはその断片のアミノ末端側に位置する V H をそれぞれ有する2本の I g A 重鎖、及び免疫グロブリン軽鎖定常領域のアミノ末端側に位置する V L をそれぞれ有する2本の免疫グロブリン軽鎖を含むことができる。

20

【 0 0 1 5 】

ある種の態様では、本明細書で提供するとおりの多量体結合分子は、5 または 6 個の二価 I g M 結合ユニットをそれぞれ含む五量体または六量体結合分子であり、その際、各結合ユニットは、抗原結合ドメインとそれぞれ結合している2つの I g M 重鎖定常領域またはその断片を含む。ある種の態様では、この多量体結合分子の I g M 重鎖定常領域またはその断片はそれぞれ、C μ 3 ドメイン及び C μ 4 - t p ドメインまたはその断片もしくはバリアントを含み、さらに、C μ 2 ドメイン、C μ 1 ドメイン、またはそれらの任意の組合せを含むことができる。結合分子が五量体である態様では、これはさらに、J 鎖、またはその断片、もしくはそのバリアントを含むことができる。ある種の態様では、I g M 重鎖定常領域は、ヒト I g M 定常領域である。ある種の態様では、この多量体結合分子の各結合ユニットは、I g M 定常領域またはその断片のアミノ末端側に位置する V H をそれぞれ含む2本の I g M 重鎖、及び免疫グロブリン軽鎖定常領域のアミノ末端側に位置する V L をそれぞれ含む2本の免疫グロブリン軽鎖を含む。

30

【 0 0 1 6 】

ある種の態様では、本明細書で提供するとおりの多量体結合分子の各結合ユニットは、2本の重鎖及び2本の軽鎖を含み、その重鎖及び軽鎖は、それぞれ配列番号 9 及び配列番号 1 0 ; 配列番号 1 1 及び配列番号 1 2 ; 配列番号 1 3 及び配列番号 1 4 ; 配列番号 1 5 及び配列番号 1 6 ; 配列番号 1 7 及び配列番号 1 8 ; 配列番号 1 9 及び配列番号 2 0 ; 配列番号 2 1 及び配列番号 2 2 ; 配列番号 2 3 及び配列番号 2 4 ; 配列番号 2 5 及び配列番号 2 6 ; 配列番号 2 5 及び配列番号 2 8 ; 配列番号 2 7 及び配列番号 2 6 ; 配列番号 2 7 及び配列番号 2 8 ; 配列番号 2 9 及び配列番号 2 6 ; 配列番号 2 9 及び配列番号 2 8 ; 配列番号 3 0 及び配列番号 3 1 ; 配列番号 3 0 及び配列番号 3 3 ; 配列番号 3 2 及び配列番号 3 1 ; 配列番号 3 2 及び配列番号 3 3 ; 配列番号 3 5 及び配列番号 3 6 ; 配列番号 3 7 及び配列番号 3 8 ; 配列番号 3 9 及び配列番号 4 0 ; 配列番号 4 1 及び配列番号 4 2 ; 配列番号 4 3 及び配列番

40

50

号 4 4 ; 配列番号 4 5 及び配列番号 4 6 ; 配列番号 4 7 及び配列番号 4 8 ; 配列番号 4 9 及び配列番号 5 0 ; または配列番号 5 1 及び配列番号 5 2 を含むかまたはそれらの中に含まれる成熟 V H 及び V L アミノ酸配列と少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 % または 1 0 0 % 同一な V H 及び V L アミノ酸配列を含む。

【 0 0 1 7 】

本明細書で提供するとおりの多量体結合分子が五量体 I g M 分子である態様では、これはさらに、 J 鎖またはそのバリエントを含み得る。

【 0 0 1 8 】

本開示はさらに、本明細書で提供するとおりの多量体結合分子を含む組成物を提供する。

10

【 0 0 1 9 】

本開示はさらに、本明細書で提供するとおりの多量体結合分子のポリペプチドサブユニットをコードする核酸配列を含むポリヌクレオチドを提供する。

【 0 0 2 0 】

ある種の態様では、ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドサブユニットは、 I g M 重鎖定常領域と、多量体結合分子の抗原結合ドメインの少なくとも抗体 V H 部分とを含む。ある種の態様では、ポリペプチドサブユニットは、配列番号 9 、配列番号 1 1 、配列番号 1 3 、配列番号 1 5 、配列番号 1 7 、配列番号 1 9 、配列番号 2 1 、配列番号 2 3 、配列番号 2 5 、配列番号 2 7 、配列番号 2 9 、配列番号 3 0 、配列番号 3 2 、配列番号 3 4 、配列番号 3 5 、配列番号 3 7 、配列番号 3 9 、配列番号 4 1 、配列番号 4 3 、配列番号 4 5 、配列番号 4 7 、配列番号 4 9 、もしくは配列番号 5 1 を含むかもしくはその中に含まれる V H アミノ酸配列に含有される H C D R 1 、 H C D R 2 、及び H C D R 3 領域；または H C D R の 1 つもしくは複数における 1 つもしくは 2 つの單一アミノ酸置換を伴う、配列番号 9 、配列番号 1 1 、配列番号 1 3 、配列番号 1 5 、配列番号 1 7 、配列番号 1 9 、配列番号 2 1 、配列番号 2 3 、配列番号 2 5 、配列番号 2 7 、配列番号 2 9 、配列番号 3 0 、配列番号 3 2 、配列番号 3 4 、配列番号 3 5 、配列番号 3 7 、配列番号 3 9 、配列番号 4 1 、配列番号 4 3 、配列番号 4 5 、配列番号 4 7 、配列番号 4 9 、もしくは配列番号 5 1 を含むかもしくはその中に含まれる V H アミノ酸配列に含有される C D R を含む V H の C 末端に融合された、ヒト I g M 定常領域またはその断片を含むか、またはポリペプチドサブユニットは、配列番号 9 、配列番号 1 1 、配列番号 1 3 、配列番号 1 5 、配列番号 1 7 、配列番号 1 9 、配列番号 2 1 、配列番号 2 3 、配列番号 2 5 、配列番号 2 7 、配列番号 2 9 、配列番号 3 0 、配列番号 3 2 、配列番号 3 4 、配列番号 3 5 、配列番号 3 7 、配列番号 3 9 、配列番号 4 1 、配列番号 4 3 、配列番号 4 5 、配列番号 4 7 、配列番号 4 9 、もしくは配列番号 5 1 を含むかもしくはその中に含まれる成熟 V H アミノ酸配列と少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 % もしくは 1 0 0 % 同一なアミノ酸配列を含む V H の C 末端に融合された、ヒト I g M 定常領域またはその断片を含む。

20

【 0 0 2 1 】

ある種の態様では、ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドサブユニットは、軽鎖定常領域と、多量体結合分子の抗原結合ドメインの抗体 V L 部分とを含む。ある種の態様では、ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドサブユニットは、配列番号 1 0 、配列番号 1 2 、配列番号 1 4 、配列番号 1 6 、配列番号 1 8 、配列番号 2 0 、配列番号 2 2 、配列番号 2 4 、配列番号 2 6 、配列番号 2 8 、配列番号 3 1 、配列番号 3 3 、配列番号 3 6 、配列番号 3 8 、配列番号 4 0 、配列番号 4 2 、配列番号 4 4 、配列番号 4 6 、配列番号 4 8 、配列番号 5 0 、もしくは配列番号 5 2 を含むかもしくはその中に含まれる V L アミノ酸配列に含有される L C D R 1 、 L C D R 2 、及び L C D R 3 領域、または L C D R の 1 つもしくは複数における 1 つもしくは 2 つの單一アミノ酸置換を伴う、配列番号 1 0 、配列番号 1 2 、配列番号 1 4 、配列番号 1 6 、配列番号 1 8 、配列番号 2 0 、配列番号 2 2 、配列番号 2 4 、配列番号 2 6 、配列番号 2 8 、配列番号 3 1 、配列番号 3 3 、配列番号 3 6 、配列番号 3 8 、配列番号 4 0 、配列番号 4 2 、配列番号 4 4

30

40

50

、配列番号 4 6 、配列番号 4 8 、配列番号 5 0 、もしくは配列番号 5 2 を含むかもしくはその中に含まれる V L アミノ酸配列に含有される C D R を含む V L の C 末端に融合された、ヒトカッパもしくはラムダ軽鎖定常領域またはその断片を含むか；またはポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドサブユニットは、配列番号 1 0 、配列番号 1 2 、配列番号 1 4 、配列番号 1 6 、配列番号 1 8 、配列番号 2 0 、配列番号 2 2 、配列番号 2 4 、配列番号 2 6 、配列番号 2 8 、配列番号 3 1 、配列番号 3 3 、配列番号 3 6 、配列番号 3 8 、配列番号 4 0 、配列番号 4 2 、配列番号 4 4 、配列番号 4 6 、配列番号 4 8 、配列番号 5 0 、もしくは配列番号 5 2 を含むかもしくはその中に含まれる成熟 V L アミノ酸配列と少なくとも 8 0 % 、少なくとも 8 5 % 、少なくとも 9 0 % 、少なくとも 9 5 % もしくは 1 0 0 % 同一な V L アミノ酸配列の C 末端に融合された、ヒトカッパまたはラムダ軽鎖定常領域またはその断片を含む。

10

【 0 0 2 2 】

本開示はさらに、V H をコードするポリヌクレオチド及び V L をコードするポリヌクレオチドを含む組成物を提供する。ある種の態様では、ポリヌクレオチドは、別々のベクター上にある。ある種の態様では、ポリヌクレオチドは、単一のベクター上にある。ある種の態様では、組成物はさらに、V H 及び / または V L と同じか、または別々のベクター上にあってよい、J 鎖、またはその断片、またはそのバリエントをコードする核酸配列を含むポリヌクレオチドを含む。このベクターまたはこれらのベクターも提供する。

20

【 0 0 2 3 】

本開示はさらに、提供するポリヌクレオチド、提供する組成物、及び / または提供する 1 つもしくは複数のベクターの 1 つまたは複数を含む宿主細胞を提供する。ある種の態様では、提供する宿主細胞は、本明細書で提供する多量体結合分子を発現することができる。本開示はさらに、本明細書で提供する多量体結合分子を生成する方法であって、提供する宿主細胞を培養すること、及び結合分子を回収することを含む方法を提供する。

30

【 0 0 2 4 】

本開示はさらに、O X 4 0 発現細胞において O X 4 0 の移動及びクラスター化を誘導する方法であって、O X 4 0 発現細胞を、本明細書で提供するとおりの多量体結合分子と接触させることを含む方法を提供する。

【 0 0 2 5 】

本開示はさらに、処置を必要とする対象に、本明細書で提供する多量体結合分子の有効量を投与することを含む、がんを処置する方法であって、その多量体結合分子は、O X 4 0 発現エフェクター T 細胞を活性化させることができ、それによって、殺腫瘍性 C T L 応答を開始させる、方法を提供する。ある種の態様では、対象は、ヒトである。別の態様では、本開示は、がんを処置するための医薬の調製における、本明細書で提供する多量体結合分子の使用であって、その多量体結合分子は、O X 4 0 発現エフェクター T 細胞を活性化させることができ、それによって、殺腫瘍性 C T L 応答を開始させる、使用を提供する。別の態様では、本開示は、がんの処置において使用するための、本明細書で提供する多量体結合分子を提供する。

30

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 6 】

【図 1】抗 O X 4 0 I g M の生成。A : 還元型ゲルは、抗 O X 4 0 # 1 - I g M 及び抗 O X 4 0 # 2 - I g M 重鎖及び軽鎖を示す。B : 抗 J 鎖ウエスタンプロットによって、I g M 五量体における J 鎖の存在が確認される。C : 精製抗体、フロースルー及び洗浄液を含む、精製抗 O X 4 0 # 1 - I g M WT J 及び抗 O X 4 0 # 2 - I g M WT J の非還元型ゲル。

40

【図 2 A】抗 O X 4 0 I g M 抗体による、O X 4 0 についての特異性の上昇。O X 4 0 についての抗 O X 4 0 # 1 及び抗 O X 4 0 # 2 の I g G 及び I g M バージョンの特異性を E L I S A アッセイにおいて 2 つの異なる抗原密度で測定した。E L I S A プレートを 0 . 4 n g / mL の O X - 4 0 - F c で終夜コーティングし、抗 O X 4 0 # 1 - I g G 及び抗 O X 4 0 # 1 - I g M (A) または抗 O X 4 0 # 2 - I g G 及び抗 O X 4 0 # 2 - I g M

50

(C)と共にインキュベートした。別法では、ELISAプレートを1.6ng/mLのOX-40-Fcで終夜コーティングし、抗OX40#1-IgG及び抗OX40#1-IgM(B)または抗OX40#2-IgG及び抗OX40#2-IgM(D)と共にインキュベートした。白抜きの円形：抗OX40#1-IgG；塗り潰した円形：抗OX40#1-IgM。

【図2B】抗OX40IgM抗体による、OX40についての特異性の上昇。OX40についての抗OX40#1及び抗OX40#2のIgG及びIgMバージョンの特異性をELISAアッセイにおいて2つの異なる抗原密度で測定した。ELISAプレートを0.4ng/mLのOX-40-Fcで終夜コーティングし、抗OX40#1-IgG及び抗OX40#1-IgM(A)または抗OX40#2-IgG及び抗OX40#2-IgM(C)と共にインキュベートした。別法では、ELISAプレートを1.6ng/mLのOX-40-Fcで終夜コーティングし、抗OX40#1-IgG及び抗OX40#1-IgM(B)または抗OX40#2-IgG及び抗OX40#2-IgM(D)と共にインキュベートした。白抜きの円形：抗OX40#1-IgG；塗り潰した円形：抗OX40#1-IgM。

【図2C】抗OX40IgM抗体による、OX40についての特異性の上昇。OX40についての抗OX40#1及び抗OX40#2のIgG及びIgMバージョンの特異性をELISAアッセイにおいて2つの異なる抗原密度で測定した。ELISAプレートを0.4ng/mLのOX-40-Fcで終夜コーティングし、抗OX40#1-IgG及び抗OX40#1-IgM(A)または抗OX40#2-IgG及び抗OX40#2-IgM(C)と共にインキュベートした。別法では、ELISAプレートを1.6ng/mLのOX-40-Fcで終夜コーティングし、抗OX40#1-IgG及び抗OX40#1-IgM(B)または抗OX40#2-IgG及び抗OX40#2-IgM(D)と共にインキュベートした。白抜きの四角形：抗OX40#2-IgG；塗り潰した四角形：抗OX40#2-IgM。

【図2D】抗OX40IgM抗体による、OX40についての特異性の上昇。OX40についての抗OX40#1及び抗OX40#2のIgG及びIgMバージョンの特異性をELISAアッセイにおいて2つの異なる抗原密度で測定した。ELISAプレートを0.4ng/mLのOX-40-Fcで終夜コーティングし、抗OX40#1-IgG及び抗OX40#1-IgM(A)または抗OX40#2-IgG及び抗OX40#2-IgM(C)と共にインキュベートした。別法では、ELISAプレートを1.6ng/mLのOX-40-Fcで終夜コーティングし、抗OX40#1-IgG及び抗OX40#1-IgM(B)または抗OX40#2-IgG及び抗OX40#2-IgM(D)と共にインキュベートした。白抜きの四角形：抗OX40#2-IgG；塗り潰した四角形：抗OX40#2-IgM。

【図3A】T細胞への抗OX40IgM抗体の結合の増強。A及びC：T細胞をActivator Dynabeadsで活性化させてCD8+T細胞上で低レベルのOX40発現を誘導し、OX40の結合を抗OX40#1-IgG及び抗OX40#1-IgM(A)または抗OX40#2-IgG及び抗OX40#2-IgM(C)について測定した。暗色の白抜きの円形：抗OX40#1-IgG；暗色の塗り潰した四角形：抗OX40#1-IgM。

【図3B】T細胞への抗OX40IgM抗体の結合の増強。B及びD：T細胞をActivator Dynabeadsで活性化させてCD4+T細胞上で高レベルのOX40発現を誘導し、OX40の結合を抗OX40#1-IgG及び抗OX40#1-IgM(B)または抗OX40#2-IgG及び抗OX40#2-IgM(D)について測定した。暗色の白抜きの円形：抗OX40#1-IgG；暗色の塗り潰した四角形：抗OX40#1-IgM。

【図3C】T細胞への抗OX40IgM抗体の結合の増強。A及びC：T細胞をActivator Dynabeadsで活性化させてCD8+T細胞上で低レベルのOX40発現を誘導し、OX40の結合を抗OX40#1-IgG及び抗OX40#1-IgM(C)について測定した。暗色の白抜きの円形：抗OX40#1-IgG；暗色の塗り潰した四角形：抗OX40#1-IgM。

10

20

30

40

50

A) または抗OX40 # 2 - IgG 及び抗OX40 # 2 - IgM (C) について測定した。薄色の白抜きの円形：抗OX40 # 2 - IgG ; 灰色の塗り潰した四角形：抗OX40 # 2 - IgM。

【図3D】T細胞への抗OX40 IgM抗体の結合の増強。B及びD : T細胞をActivator Dynabeadsで活性化させてCD4+T細胞上で高レベルのOX40発現を誘導し、OX40の結合を抗OX40 # 1 - IgG 及び抗OX40 # 1 - IgM (B) または抗OX40 # 2 - IgG 及び抗OX40 # 2 - IgM (D) について測定した。薄色の白抜きの円形：抗OX40 # 2 - IgG ; 灰色の塗り潰した四角形：抗OX40 # 2 - IgM。

【図4A】抗OX40 IgM抗体はNF-B経路の活性を上昇させる。抗OX40 # 1 - IgG 及び抗OX40 # 1 - IgMの希釈物をOX40シグナル伝達アッセイでインキュベートし、Abの最高濃度からのRLUを使用して、IgGと比較してのIgMによるシグナル伝達の強度の上昇(変化倍率)を計算した。図の説明：白抜きの円形：抗OX40 # 1 - IgG ; 塗り潰した円形：抗OX40 # 1 - IgM ; 白抜きの四角形：抗OX40 # 1 - IgG + クロスリンカー。

【図4B】抗OX40 IgM抗体はNF-B経路の活性を上昇させる。抗OX40 # 2 - IgG 及び抗OX40 # 2 - IgMの希釈物をOX40シグナル伝達アッセイでインキュベートし、Abの最高濃度からのRLUを使用して、IgGと比較してのIgMによるシグナル伝達の強度の上昇(変化倍率)を計算した。図の説明：白抜きの四角形：抗OX40 # 2 - IgG ; 塗り潰した四角形：抗OX40 # 2 - IgM ; 白抜きの円形：抗OX40 # 2 - IgG + クロスリンカー。

【発明を実施するための形態】

【0027】

詳細な説明

定義

「1つの(a)」または「1つの(an)」という用語を付された物は、その物の1つまたは複数を指すことに留意されたい；例えば、「1個の結合分子(a binding molecule)」は、1個または複数の結合分子を表すと理解される。したがって、「1つの(a)」(または「an」)、「1つまたは複数」、及び「少なくとも1つ」という用語は、本明細書において互換的に使用され得る。

【0028】

さらに、「及び/または」は、本明細書において使用する場合、他方を伴うか、または伴わない、2つの指定された特徴または成分のそれぞれの具体的な開示とみなされるべきである。したがって、本明細書において「A及び/またはB」などの語句で使用されるとおりの「及び/または」という用語は、「A及びB」、「AまたはB」、「A」(単独)、及び「B」(単独)を含むことが意図されている。同様に、「A、B、及び/またはC」などの語句において使用されるとおりの「及び/または」という用語は、次の実施形態のそれぞれを包含することが意図されている：A、B、及びC；A、B、またはC；AまたはC；AまたはB；BまたはC；A及びC；A及びB；B及びC；A(単独)；B(単独)；及びC(単独)。

【0029】

別段に定義されていない限り、本明細書において使用する技術用語及び科学用語は、本開示が関連する分野の当業者が一般に理解する意味と同じ意味を有する。例えば、Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; 及びthe Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Pressが、当業者に、本開示において使用される用

10

20

30

40

50

語の多くの一般的な辞書を提供している。

【0030】

単位、接頭辞、及び記号は、それらの国際単位系(SI)で認められた形態で示されている。数値範囲は、その範囲を定義する数値を包括する。別段に示さない限り、アミノ酸配列は、アミノからカルボキシの方向で、左から右へ記載されている。本明細書で提供する見出しが、様々な様相または本開示の様相の限定ではなく、本明細書を全体として参照することによって備えることができる。したがって、この直後に定義する用語は、明細書をその全体で参照することによって、より十分に定義される。

【0031】

本明細書で使用する場合、「ポリペプチド」という用語は、単数の「ポリペプチド」、さらには複数の「ポリペプチド」を包含することが意図されており、アミド結合(ペプチド結合としても公知)によって直線状に連結されたモノマー(アミノ酸)から構成される分子を指す。「ポリペプチド」という用語は、2個以上のアミノ酸の任意の1つまたは複数の鎖を指し、産物の具体的な長さを指すものではない。したがって、ペプチド、ジペプチド、トリペプチド、オリゴペプチド、「タンパク質」、「アミノ酸鎖」、または2個以上のアミノ酸の1本または複数の鎖を指すために使用される任意の他の用語は、「ポリペプチド」の定義の範囲内に含まれ、「ポリペプチド」という用語は、これらの用語のいずれかの代わりに、またはそれらと互換的に使用され得る。「ポリペプチド」という用語はまた、限定ではないが、グリコシリ化、アセチル化、リン酸化、アミド化、及び既知の保護/プロック基による誘導体化、タンパク質分解性切断、または天然に存在しないアミノ酸による修飾を含む、ポリペプチドの発現後修飾の産物を指すことが意図されている。ポリペプチドは、生物源に由来しても、または組換え技術によって生成されていてもよいが、必ずしも、指定の核酸配列から翻訳されるものではない。これは、化学合成による手法を含む、任意の手法で生成することができる。

10

20

30

30

40

【0032】

本明細書に開示のとおりのポリペプチドは、約3以上、5以上、10以上、20以上、25以上、50以上、75以上、100以上、200以上、500以上、1,000以上、または2,000以上のアミノ酸のサイズであってよい。ポリペプチドは、規定の三次元構造を有し得るが、それらは、必ずしもそのような構造を有するものではない。規定の三次元構造を有するポリペプチドは、折り畳まれている、と称され、規定の三次元構造を有さないが、むしろ、多数の異なる立体配置を探ることができるポリペプチドは、折り畳まれていない、と称される。本明細書で使用する場合、糖タンパク質という用語は、アミノ酸、例えば、セリンまたはアスパラギンの酸素含有または窒素含有側鎖を介してタンパク質に結合している少なくとも1つの炭水化物部分にカップリングしているタンパク質を指す。

【0033】

「単離」ポリペプチドまたはその断片、バリアント、もしくは誘導体では、その天然環境にはないポリペプチドが意図されている。特定の精製レベルは必要ない。例えば、単離ポリペプチドを、その天然または自然環境から取り出すことができる。組換え生成されたポリペプチド及び宿主細胞で発現されたタンパク質は、任意の適切な技術によって分離されている、画分されている、または部分的に、もしくは実質的に精製されている天然または組換えポリペプチドであるので、本明細書に開示のとおり、単離と判断される。

【0034】

本明細書で使用する場合、「天然に存在しないポリペプチド」という用語またはその任意の文法的な変異形は、審査官によって、または行政機関もしくは司法機関によって「天然に存在する」と決定または解釈されるか、決定または解釈されるであろうポリペプチドの形態を明確に排除するが、排除するに過ぎない条件付き定義である。

【0035】

本明細書において開示する他のポリペプチドは、上述のポリペプチドの断片、誘導体、類似体、またはバリアント、及びそれらの任意の組合せである。本明細書に開示のとおり

50

の「断片」、「バリエント」、「誘導体」及び「類似体」という用語は、対応する天然の抗体またはポリペプチドの特性（例えば、抗原への特異的結合）の少なくとも一部を保持する任意のポリペプチドを含む。ポリペプチドの断片には、本明細書の他の箇所で論述する特異的抗体断片に加えて、例えば、タンパク質分解性断片、さらには、欠失断片が含まれる。例えば、ポリペプチドのバリエントには、上記のとおりの断片、及び他にも、アミノ酸置換、欠失、または挿入によって変更されたアミノ酸配列を有するポリペプチドが含まれる。ある種の態様では、バリエントは、天然に存在しなくてよい。天然に存在しないバリエントを、当分野で公知の変異誘発技術を使用して生成することができる。バリエントポリペプチドは、保存的または非保存的アミノ酸置換、欠失または付加を含むことができる。誘導体は、元のポリペプチドでは見い出されない追加の特徴を示すように変更されているポリペプチドである。例には、融合タンパク質が含まれる。バリエントポリペプチドは、本明細書では「ポリペプチド類似体」とも称され得る。本明細書で使用する場合、ポリペプチドの「誘導体」は、官能性側基の反応によって化学的に誘導体化された1個または複数のアミノ酸を有する本ポリペプチドも指し得る。20種の標準アミノ酸の1つまたは複数の誘導体を含有するペプチドも、「誘導体」として含まれる。例えば、4-ヒドロキシプロリンをプロリンの代わりに用いることができ；5-ヒドロキシリシンをリシンの代わりに用いることができ；3-メチルヒスチジンをヒスチジンの代わりに用いることができ；ホモセリンをセリンの代わりに用いることができ；オルニチンをリシンの代わりに用いることができる。

10

20

30

【0036】
 「保存的アミノ酸置換」は、あるアミノ酸が、同様の側鎖を有する別のアミノ酸に置き換えられる置換である。塩基性側鎖（例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、ベータ-分枝側鎖（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）及び芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を含む、同様の側鎖を有するアミノ酸のファミリーは、当技術分野で定義されている。例えば、チロシンでのフェニルアラニンの置換は、保存的置換である。ある種の実施形態では、本開示のポリペプチド及び抗体の配列における保存的置換は、結合分子が結合する抗原への、そのアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたは抗体の結合を排除するものではない。抗原結合性を消去しないヌクレオチド及びアミノ酸保存的置換を同定する方法は、当技術分野で周知である（例えば、Brumme1 et al., Biochem. 32: 1180-1187 (1993); Kobayashi et al., Protein Eng. 12 (10): 879-884 (1999); and Burks et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 412-417 (1997) を参照されたい）。

40

【0037】
 「ポリヌクレオチド」という用語は、単数の核酸、さらには、複数の核酸を包含することが意図されており、単離核酸分子または構築物、例えば、メッセンジャーRNA(mRNA)、cDNA、またはプラスミドDNA(pDNA)を指す。ポリヌクレオチドは、従来型のホスホジエステル結合または非従来型の結合（例えば、アミド結合、例えば、ペプチド核酸(PNA)において見い出されるものなど）を含むことができる。「核酸」または「核酸配列」という用語は、ポリヌクレオチド中に存在するいずれか1つまたは複数の核酸セグメント、例えば、DNAまたはRNA断片を指す。

50

【0038】
 「単離」核酸またはポリヌクレオチドでは、その天然環境から分離された核酸またはポリヌクレオチドの任意の形態が意図されている。例えば、ゲル精製されたポリヌクレオチド、またはベクター中に含有されるポリペプチドをコードする組換えポリヌクレオチドは、「単離」と考えられるであろう。また、クローニングのために制限部位を有するよう

操作されているポリヌクレオチドセグメント、例えば、P C R 産物は、「単離」と考えられる。単離ポリヌクレオチドのさらなる例には、異種の宿主細胞において維持される組換えポリヌクレオチド、または緩衝液または生理食塩水などの非天然溶液中で（部分的に、または実質的に）精製されたポリヌクレオチドが含まれる。単離R N A 分子には、ポリヌクレオチドのインビボまたはインビトロR N A 転写物が含まれ、その際、その転写物は、天然に見い出されるものではない。単離ポリヌクレオチドまたは核酸にはさらに、合成で生成されたそのような分子が含まれる。加えて、ポリヌクレオチドまたは核酸は、調節エレメント、例えば、プロモーター、リボソーム結合部位、または転写ターミネーターであり得るか、またはそれらを含み得る。

【0039】

10

本明細書で使用する場合、「天然に存在しないポリヌクレオチド」という用語またはその任意の文法的変異形は、審査官によって、または行政機関または司法機関によって「天然に存在する」と決定または解釈されるか、解釈されるであろう核酸またはポリヌクレオチドの形態を明確に排除するが、排除するに過ぎない条件付き定義である。

【0040】

本明細書で使用する場合、「コード領域」は、アミノ酸に翻訳されるコドンからなる核酸の部分である。「停止コドン」（T A G、T G A、またはT A A）は、アミノ酸に翻訳されないと見え、これは、コード領域の一部と考慮することができるが、ただし、いずれのフランкиング配列、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は、単一のポリヌクレオチド構築物に、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、任意のベクターが、単一のコード領域を含有することができるか、または2つ以上のコード領域を含むことができ、例えば、単一のベクターが、免疫グロブリン重鎖可変領域及び免疫グロブリン軽鎖可変領域を別々にコードすることができる。加えて、ベクター、ポリヌクレオチド、または核酸が、別のコード領域に融合された、または融合されていない異種のコード領域を含むことができる。異種のコード領域には、限定ではないが、特殊エレメントまたはモチーフをコードするもの、例えば、分泌シグナルペプチドまたは異種機能ドメインが含まれる。

20

【0041】

30

ある種の実施形態では、ポリヌクレオチドまたは核酸は、D N A である。D N A の場合、ポリペプチドをコードする核酸を含むポリヌクレオチドは通常、1つまたは複数のコード領域と作動可能に結合しているプロモーター及び／または他の転写または翻訳制御エレメントを含み得る。作動可能な結合とは、遺伝子産物、例えば、ポリペプチドのためのコード領域が、制御配列（複数可）の影響または制御下で遺伝子産物を発現するような様式で、1つまたは複数の制御配列と結合していることである。プロモーター機能の誘導が、所望の遺伝子産物をコードするm R N A の転写をもたらす場合、及び2個のD N A 断片間の連結の性質が、伝子産物の発現を指示する発現制御配列の能力を妨害しない場合、または転写されるD N A テンプレートの能力を妨害しない場合、2個のD N A 断片（例えば、ポリペプチドコード領域と、それと結合しているプロモーター）は、「作動可能に結合して」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るならば、プロモーター領域は、その核酸と作動可能に結合しているであろう。プロモーターは、所定の細胞においてD N A の実質的な転写を指示する細胞特異的なプロモーターであり得る。プロモーター以外の他の転写制御エレメント、例えば、エンハンサー、オペレーター、リプレッサー及び転写停止シグナルは、細胞特異的転写を指示するために、ポリヌクレオチドと作動可能に結合していくよ。

40

【0042】

50

様々な転写制御領域が、当業者に公知である。これらには、限定ではないが、脊椎動物の細胞で機能する転写制御領域、例えば、これに限定されないが、サイトメガロウイルス由来のプロモーター及びエンハンサーセグメント（イントロン - A と併せて前初期プロモ

ーター)、サルウイルス40(初期プロモーター)、及びレトロウイルス(例えば、ラウス肉腫ウイルス)が含まれる。他の転写制御領域には、脊椎動物の遺伝子から誘導されるもの、例えば、アクチン、熱ショックタンパク質、ウシ成長ホルモン及びウサギ - グロビン、さらには、真核細胞中の遺伝子発現を制御することができる他の配列が含まれる。追加の適切な転写制御領域には、組織特異的なプロモーター及びエンハンサー、さらには、リンホカイン誘導性プロモーター(例えば、インターフェロンまたはインターロイキンによって誘導されるプロモーター)が含まれる。

【0043】

同様に、様々な翻訳制御エレメントが、当業者に公知である。これらには、これに限定されないが、リボソーム結合部位、翻訳開始コドン及び停止コドン、ならびにピコルナウイルスに由来するエレメント(特に、配列内リボソーム進入部位、またはIRESは、CITE配列とも称される)。

10

【0044】

他の実施形態では、ポリヌクレオチドは、RNAであり、例えば、メッセンジャーRNA(mRNA)、トランスファーRNA、またはリボソームRNAの形態のRNAであつてよい。

【0045】

ポリヌクレオチド及び核酸コード領域は、分泌ペプチドまたはシグナルペプチドをコードし、本明細書に開示のとおりの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追加のコード領域と結合していくてもよい。シグナルの仮説によれば、粗面小胞体全体で成長するタンパク質鎖の外への輸送が開始されると、哺乳類細胞によって分泌されるタンパク質は、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プチドが、ポリペプチドのN末端に融合するシグナルペプチドを有し得て、このペプチドが、完全または「全長」ポリペプチドから切断されて、ポリペプチドの分泌形態または「成熟」形態を產生することに気づいている。ある種の実施形態では、天然のシグナルペプチド、例えば、免疫グロブリン重鎖または軽鎖のシグナルペプチドを使用するか、またはこれに作動可能に結合したポリペプチドの分泌を指示する能力を保持する、この配列の機能性誘導体を使用する。別法では、異種哺乳類のシグナルペプチド、またはその機能性誘導体を使用することができる。例えば、野生型リーダー配列を、ヒト組織プラスミノーゲンアクトベーター(TPA)またはマウス - グルクロニダーゼのリーダー配列と置き換えることができる。

20

【0046】

本明細書で使用する場合、「TNFスーパーファミリー受容体タンパク質」、「TNFSFR」、「TNF受容体ファミリー」、「TNF受容体」という用語またはそのような語句の任意の組合せは、様々な細胞及び組織の表面上に発現される腫瘍壞死因子膜貫通受容体タンパク質のファミリーを指す。このスーパーファミリーのファミリーメンバーには、リガンド結合またはアゴニスト抗体結合による活性化時に、受容体タンパク質が発現される細胞において、活性化、炎症応答、アポトーシス(またはアポトーシスの阻害)、増殖、及び/または形態形成を開始させることができるものが含まれる。TNFSFRには、これに限定されないが、TNFR1(DR1)、TNFR2、TNFR1/2、CD40(p50)、Fas(CD95、APO1、DR2)、CD30、4-1BB(CD137、ILA)、TRAILR1(DR4、APO2)、TRAILR2(DR5)、TRAILR3(DcR1)、TRAILR4(DcR2)、OPG(OCDF)、TWEAK(FN14)、LIGHT(HVEM)、DcR3、DR3、EDAR、XEDAR、LT-R、GITR(AITR)、TACI、BCMA、CD27、OX40(CD134)、RANK(TRANCEER)、RELT、及びBAFF-Rが含まれる。例えば、Wajant, H. Cell Death and Differentiation 22: 1727 - 1741 (2015)を参照されたい。

30

40

【0047】

50

T N F S F R O X 4 0 にアゴニスティックに結合し、それによって、例えば、O X 4 0 を発現する活性化 C T L において増殖及びそのエフェクター機能の増強、ならびに例えば、腫瘍周囲の微小環境において C D 2 5 + C D 4 + F o x P 3 + T r e g による免疫抑制の低減を誘発し、したがって、抗腫瘍免疫を促進することができる、ある種の結合分子、またはその抗原結合断片、バリアント、もしくは誘導体を本明細書において開示する。フルサイズ抗体に具体的に言及していない限り、「結合分子」という用語は、フルサイズ抗体、さらには、そのような抗体の抗原結合サブユニット、断片、バリアント、類似体、または誘導体、例えば、抗体分子と同様の手法で抗原に結合するが、異なるスキヤフォールドを使用する、操作された抗体分子または断片を包含する。

【 0 0 4 8 】

10

ヒト O X 4 0 のアイソフォーム 1 の前駆体型は、アミノ酸配列の配列番号 7 (U n i P r o t K B / S w i s s - P r o t : P 4 3 4 8 9 . 1) を含む。成熟タンパク質は、配列番号 7 のアミノ酸 2 9 ~ 2 7 7 を含み、その際、アミノ酸 1 ~ 2 8 は、シグナルペプチドを含む。ヒト O X 4 0 の細胞外ドメインは、配列番号 7 のアミノ酸 2 9 ~ 2 1 4 を含む。ヒト O X 4 0 の膜貫通ドメインは、配列番号 7 のアミノ酸 2 1 5 ~ 2 3 5 を含む。ヒト O X 4 0 の細胞質ドメインは、配列番号 7 のアミノ酸 2 3 6 ~ 2 7 7 を含む。

配列番号 7

20

MCVGARRLGRGPCAALLLGLGLSTVTGLHCVGDTY
PSNDRCCHECRPGNGMVSRCRSQNTVCRPCPGPFY
NDVSSKPKCCKPCTWCNLRSGSERKQLCTATQDTVCR
CRAGTQPLDSYKPGVDCAPCPPGHFSPGDNQACKPW
TNCTLAGKHTLQPASNSSDAICEDRDPPATQPQETQG
PPARPITVQPTAEWPRTSQGPSTRPVEVPGGRAVAAIL
GLGLVLGLLGPLAILLALYLLRRDQRLLPPDAHKPPGG
GSFRTPIQEEQADAHSTLAKI

【 0 0 4 9 】

30

マウス O X 4 0 の前駆体型は、アミノ酸配列の配列番号 8 (N C B I R e f e r e n c e S e q u e n c e : N P _ 0 3 5 7 8 9 . 1) を含む。成熟タンパク質は、配列番号 8 のアミノ酸 2 0 ~ 2 7 2 を含み、その際、アミノ酸 1 ~ 1 9 は、シグナルペプチドを含む。マウス O X 4 0 の細胞外ドメインは、配列番号 8 のアミノ酸 2 0 ~ 2 1 1 を含む。マウス O X 4 0 の膜貫通ドメインは、配列番号 8 のアミノ酸 2 1 2 ~ 2 3 6 を含む。マウス O X 4 0 の細胞質ドメインは、配列番号 8 のアミノ酸 2 3 7 ~ 2 7 2 を含む。

配列番号 8

40

MYVVVQQPTALLLGLTLGVTAARRLNCVKHTYPSG
HKCCRECQPGHGMVSRCDHTRDTLCHPCETGFYNEA
VNYDTCKQCTQCNCNRSGSELKQNCTPTQDTVCRCRP
GTQPRQDSGYKLGVDCCVPCPPGHFSPGNNQACKPWT
NCTLSGKQTRHPASDSLAVCEDRSLLATLLWETQRP
TFRPTTVQSTTVWPRTSELPSPPTLVTPEGPAFAVLLG
LGLGLLAPLTVLLALYLLRKAWRLPNTPKPCWGNSF
RTPIQEEHTDAHFTLAKI

【 0 0 5 0 】

本明細書で使用する場合、「結合分子」という用語は、その最も広い意味では、受容体、例えばエピトープまたは抗原決定基に特異的に結合する分子を指す。本明細書においてさらに記載するとおり、結合分子は、本明細書に記載の複数の「抗原結合ドメイン」のうちの 1 つを含み得る。結合分子の非限定的例は、抗体、または抗原特異的結合を保持するその断片である。

【 0 0 5 1 】

50

本明細書で使用する場合、「結合ドメイン」または「抗原結合ドメイン」という用語は、エピトープに特異的に結合するために必要かつ十分である結合分子の領域を指す。例え

ば、「Fv」、例えば、2つの別々のポリペプチドサブユニットとして、または一本鎖としてのいずれかの、抗体の可変重鎖及び可変軽鎖は、「結合ドメイン」であると見なされる。他の結合ドメインには、限定ではないが、ラクダ科種に由来する抗体の可変重鎖(VHH)、またはフィプロネクチンキャリフォールドにおいて発現される6つの免疫グロブリン相補性決定領域(CDR)が含まれる。本明細書に記載のとおりの「結合分子」は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12個以上の「抗原結合ドメイン」を含み得る。

【0052】

「抗体」及び「免疫グロブリン」という用語は、本明細書において互換的に使用され得る。抗体(または本明細書に開示のとおりのその断片、バリアント、もしくは誘導体)は、少なくとも重鎖の可変ドメイン(ラクダ種に関して)または少なくとも重鎖及び軽鎖の可変ドメインを含む。脊椎動物系における基本的な免疫グロブリン構造は、比較的よく理解されている。例えば、Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988)を参照されたい。別段に述べない限り、「抗体」という用語は、抗体の小さな抗原結合断片からフルサイズ抗体に至るまでのあらゆるもの、例えば、2本の完全な重鎖及び2本の完全な軽鎖を含むIgG抗体、4本の完全な重鎖及び4本の完全な軽鎖を含み、任意選択でJ鎖及び/または分泌成分を含むIgA抗体、または10本もしくは12本の完全な重鎖及び10本もしくは12本の完全な軽鎖を含み、任意選択でJ鎖を含むIgM抗体を包含する。

10

20

30

40

【0053】

以下でより詳細に論述するとおり、「免疫グロブリン」という用語は、生化学的に区別され得る様々な幅広いクラスのポリペプチドを含む。当業者は、重鎖がガンマ、ミュー、アルファ、デルタ、またはイプシロン(、μ、、、)に分類され、それらの中にはいくつかのサブクラス(例えば、1~4または1~2)があることを認識するであろう。この鎖の性質が、抗体の「アイソタイプ」をそれぞれIgG、IgM、IgA、IgG、またはIgEとして決定する。免疫グロブリンサブクラス(サブタイプ)、例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、IgA₂などは、十分に特徴づけられており、機能的特殊化を付与することが知られている。これらの免疫グロブリンのそれぞれの修飾型は、本開示を考慮すれば当業者には容易に識別可能であり、したがって、それらは本開示の範囲内である。

【0054】

軽鎖は、カッパまたはラムダ(、)のいずれかに分類される。各重鎖クラスは、カッパまたはラムダ軽鎖のいずれかに結合し得る。一般的に、軽鎖及び重鎖は共有結合で相互に結合しており、免疫グロブリンが例えばハイブリドーマ、B細胞、または遺伝子操作された宿主細胞によって発現されるときに、2本の重鎖の「尾」部分は、ジスルフィド共有結合または非共有結合によって相互に結合される。重鎖では、アミノ酸配列は、Y構造の分岐末端にあるN末端から始まり、それぞれの鎖の底部にあるC末端まで続く。ある種の抗体、例えば、IgG抗体の基本構造は、ジスルフィド結合による共有結合によって接続して、本明細書において「H2L2」構造、または「結合ユニット」とも称される「Y」構造を形成している2本の重鎖サブユニット及び2本の軽鎖サブユニットを含む。

【0055】

「結合ユニット」という用語は、標準的な「H2L2」免疫グロブリン構造、すなわち、2本の重鎖またはその断片及び2本の軽鎖またはその断片に対応する結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片の部分を指すために本明細書において使用される。ある種の態様では、例えば、結合分子が二価IgG抗体またはその抗原結合断片である場合、「結合分子」及び「結合ユニット」という用語は、同等である。他の態様では、例えば、結合分子がIgA二量体、IgM五量体、またはIgM六量体である場合、結合分子は、2個以上の「結合ユニット」を含む。IgA二量体の場合には、2個であり、またはIgM五量体もしくは六量体の場合にはそれぞれ、5個もしくは6個である。結合ユニットは、

50

全長抗体重鎖及び軽鎖を必要としないが、典型的には、二価であり、すなわち、上記で定義したとおりの2つの「結合ドメイン」を含む。本明細書で使用する場合、本開示で提供するある種の結合分子は、「二量体」であり、IgA定常領域またはその断片を含む2個の二価結合ユニットを含む。本開示で提供するある種の結合分子は、「五量体」または「六量体」であり、IgM定常領域またはその断片を含む5または6個の二価結合ユニットを含む。2個以上、例えば、2、5、または6個の結合ユニットを含む結合分子は本明細書において、「多量体」と称される。

【0056】

「結合価」、「二価」、「多価」という用語及び文法的等価物は、所与の結合分子または結合ユニットにおける結合ドメインの数を指す。したがって、所与の結合分子、例えばIgM抗体またはその断片に関する、「二価」、「四価」、及び「六価」という用語は、それぞれ2つの結合ドメイン、4つの結合ドメイン、及び6つの結合ドメインの存在を示す。各結合ユニットが二価である典型的なIgM由来結合分子では、結合分子自体は10または12の結合価を有し得る。二価または多価結合分子は、単一特異性であってもよい、すなわち、結合ドメインのすべてが同じであってもよいし、または二重特異性もしくは多重特異性であってもよく、例えば、その際、2つ以上の結合ドメインが異なり、例えば同じ抗原上の異なるエピトープに結合するか、もしくは完全に異なる抗原に結合する。

10

【0057】

「エピトープ」という用語は、抗体に特異的に結合することができる任意の分子決定基を含む。ある種の態様では、エピトープは、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリル、またはスルホニルなどの、分子の化学的に活性な表面基を含み得、ある種の態様では、三次元構造特性及びまたは特異的電荷特性を有し得る。エピトープは、抗体が結合する標的の領域である。

20

【0058】

「標的」という用語は、その最も広い意味で使用され、結合分子が結合し得る物質を含む。標的は、例えば、ポリペプチド、核酸、炭水化物、脂質、または他の分子であってよい。さらに、「標的」は、例えば、結合分子が結合し得るエピトープを含む細胞、器官、または生物であってよい。

【0059】

軽鎖及び重鎖は両方とも、構造的及び機能的相同性の領域に分割される。「定常」及び「可変」という用語は、機能的に用いられる。これに関して、可変軽(VL)鎖及び可変重(VH)鎖部分の両方の可変ドメインは、抗原認識及び特異性を決定することは分かるであろう。逆に、軽鎖の定常ドメイン(CL)及び重鎖の定常ドメイン(例えば、CH1、CH2、またはCH3)は、分泌、経胎盤移動性、Fc受容体結合、補体結合などの生物学的特性を付与する。慣例では、定常領域ドメインの番号付けは、それらが抗体の抗原結合部位またはアミノ末端から遠ざかるにつれて増加する。N末端部分は可変領域であり、C末端部分は定常領域である; CH3(またはIgMの場合にはCH4)ドメイン及びCLドメインは実際に、それぞれ重鎖及び軽鎖のカルボキシ末端を含む。

30

【0060】

「全長IgM抗体重鎖」は、N末端からC末端の方向に、抗体重鎖可変ドメイン(VH)、抗体定常重鎖定常ドメイン1(CM1またはCμ1)、抗体重鎖定常ドメイン2(CM2またはCμ2)、抗体重鎖定常ドメイン3(CM3またはCμ3)、及び尾片を含み得る抗体重鎖定常ドメイン4(CM4またはCμ4)を含むポリペプチドである。

40

【0061】

「全長IgA抗体重鎖」は、N末端からC末端の方向に、抗体重鎖可変ドメイン(VH)、抗体定常重鎖定常ドメイン1(CA1またはC1)、抗体重鎖定常ドメイン2(CA2またはC2)、及び尾片を含み得る抗体重鎖定常ドメイン3(CA3またはC3)を含むポリペプチドである。

【0062】

上に示したとおり、可変領域(複数可)は、結合分子が抗原上のエピトープを選択的に

50

認識し、それに特異的に結合することを可能にする。すなわち、結合分子、例えば、抗体のV L ドメイン及びV H ドメイン、または相補性決定領域（ C D R ）のサブセットが組み合わさって、抗原結合ドメインを形成する。より具体的には、抗原結合ドメインは、V H 鎖及びV L 鎖のそれぞれにある3つのC D R によって規定され得る。ある種の抗体は、より大きな構造を形成する。例えば、I g A は、2個のH 2 L 2 結合ユニット及びジスルフィド結合によって共有結合しているJ 鎖を含む分子を形成することができ、これは分泌成分とさらに結合させることができ、I g M は、5または6個のH 2 L 2 結合ユニット及び任意選択でジスルフィド結合によって共有結合しているJ 鎖を含む五量体または六量体分子を形成することができる。

【0063】

10

抗体の抗原結合ドメインに存在する6つの「相補性決定領域」または「C D R 」は、抗体が水性環境においてその三次元配置をとる場合に、結合ドメインを形成するように特異的に配置されている、アミノ酸の短い非連続的な配列である。「フレームワーク」領域と称される、結合ドメイン中のアミノ酸の残りの部分は、より小さな分子間変動性を示す。フレームワーク領域は主にシート高次構造をとり、C D R は、シート構造を連結し、場合によってはシート構造の一部を形成するループを形成する。したがって、フレームワーク領域は、鎖間の非共有結合相互作用によってC D R を正しい方向に配置することを提供するスキヤフォールドを形成するように働く。配置されたC D R によって形成される結合ドメインは、免疫反応性抗原上のエピトープと相補的な表面を規定する。この相補的な表面は、抗体のその同族エピトープに対する非共有結合を促進する。それぞれC D R 及びフレームワーク領域を構成するアミノ酸は、様々な異なる方法で定義されているため、当業者によって任意の所与の重鎖または軽鎖可変領域について容易に同定され得る（その全体で参照によって本明細書に組み込まれる "Sequences of Proteins of Immunological Interest," Kabat, E., et al., U.S. Department of Health and Human Services, (1983)；及びChothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196: 901-917 (1987)を参照されたい）。

20

【0064】

30

当技術分野において使用される、及び／または許容される用語の定義が2つ以上存在する場合、本明細書で使用されるとおりの用語の定義は、反対のことが明記されていない限り、すべてのそのような意味を含むことが意図される。具体的な例は、重鎖及び軽鎖の両方のポリペプチドの可変領域内に見出される非連続的な抗原結合部位を説明するための「相補性決定領域」（「C D R 」）という用語の使用である。これらの特定の領域は、例えば、Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983) 及びChothia et al., J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987) によって記載されており、これらは、参照によって本明細書に組み込まれる。Kabat及びChothiaの定義は、相互に比較した場合のアミノ酸の重複またはサブセットを含む。それにもかかわらず、抗体またはそのバリエントのC D R を指すためのいずれの定義（または当業者に公知の他の定義）の適用も、別段に示さない限り、本明細書で定義及び使用されるとおりの用語の範囲内であることが意図される。上記の引用参考文献のそれぞれによって定義されるとおりのC D R を包含する適切なアミノ酸を、比較として以下の表1に記載する。特定のC D R を包含する正確なアミノ酸番号は、C D R の配列及びサイズに応じて変動する。当業者は、抗体の可変領域アミノ酸配列が与えられると、どのアミノ酸が特定のC D R を構成するかをルーチン的に決定することができる。

40

【0065】

(表1) C D R 定義 *

	Kabat	Chothia
VH CDR1	31-35	26-32
VH CDR2	50-65	52-58
VH CDR3	95-102	95-102
VL CDR1	24-34	26-32
VL CDR2	50-56	50-52
VL CDR3	89-97	91-96

* 表1におけるすべてのCDR定義の番号付けは、Kabatらによって記載された番号付けの規則に従う（以下を参照されたい）。

【0066】

Kabatらはまた、任意の抗体に適用可能である可変ドメイン配列の番号付けシステムを定義した。当業者は、配列自体以外のいかなる実験データにも頼ることなく、任意の可変ドメイン配列に「Kabat番号付け」のこのシステムを一義的に割り当てることができる。本明細書で使用する場合、「Kabat番号付け」は、Kabat et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, 'Sequence of Proteins of Immunological Interest' (1983) によって記載される番号付けシステムを指す。しかしながら、Kabat番号付けシステムの使用が明記されていない限り、本開示では、連続した番号付けがすべてのアミノ酸配列について使用される。

【0067】

結合分子、例えば、抗体、またはその抗原結合断片、バリアント、もしくは誘導体には、これに限定されないが、ポリクローナル、モノクローナル、ヒト、ヒト化、またはキメラ抗体、一本鎖抗体、エピトープ結合断片、例えば、Fab、Fab'及びF(ab')₂、Fd、Fv、一本鎖Fv(scFv)、一本鎖抗体、ジスルフィド結合Fv(sdFv)、VLドメインまたはVHドメインのいずれかを含む断片、Fab発現ライブライアリーよりて産生される断片が含まれる。ScFv分子は当技術分野で公知であり、例えば米国特許第5,892,019号に記載されている。

【0068】

「特異的に結合する」とは、一般的に、結合分子、例えば、抗体、またはその断片、バリアント、もしくは誘導体が、その抗原結合ドメインを介してエピトープに結合すること、及びその結合が抗原結合ドメインとエピトープとの間で多少の相補性を必要とする意を意味する。この定義によれば、結合分子は、それが無作為の無関係なエピトープに結合するよりも容易に、その抗原結合ドメインを介してそのエピトープに結合する場合に、エピトープに「特異的に結合する」と言われる。「特異性」という用語は、ある種の結合分子がある種のエピトープに結合する際の相対的親和性を表すために、本明細書において使用される。例えば、結合分子「A」は、所与のエピトープについて結合分子「B」よりも高い特異性を有すると見なすことができるか、または結合分子「A」は、関連エピトープ「D」について有する特異性よりも高い特異性でエピトープ「C」に結合すると言われ得る。

【0069】

本明細書において開示する結合分子、例えば、抗体、またはその断片、バリアント、もしくは誘導体は、 5×10^{-2} 秒⁻¹、 10^{-2} 秒⁻¹、 5×10^{-3} 秒⁻¹、 10^{-3} 秒⁻¹、 5×10^{-4} 秒⁻¹、 10^{-4} 秒⁻¹、 5×10^{-5} 秒⁻¹、もしくは 10^{-5} 秒⁻¹、 5×10^{-6} 秒⁻¹、 10^{-6} 秒⁻¹、 5×10^{-7} 秒⁻¹、または 10^{-7} 秒⁻¹以下のオフ速度(k(off))で標的抗原に結合すると言われ得る。

【0070】

本明細書において開示する結合分子、例えば、抗体、または抗原結合断片、バリアント、もしくは誘導体は、 $10^3 M^{-1}$ 秒⁻¹、 $5 \times 10^3 M^{-1}$ 秒⁻¹、 $10^4 M^{-1}$ 秒⁻¹、 $5 \times 10^4 M^{-1}$ 秒⁻¹、 $10^5 M^{-1}$ 秒⁻¹、 $5 \times 10^5 M^{-1}$ 秒⁻¹、 $10^6 M^{-1}$ 秒⁻¹、もしくは $5 \times 10^6 M^{-1}$ 秒⁻¹、または $10^7 M^{-1}$ 秒⁻¹以上のオン速

10

20

30

40

50

度(k_{on})で標的抗原に結合すると言われ得る。

【0071】

結合分子、例えば、抗体、またはその断片、バリアント、もしくは誘導体は、所与のエピトープに対する参照抗体または抗原結合断片の結合をある程度遮断する程度まで、そのエピトープに優先的に結合するのであれば、そのエピトープに対する参照抗体または抗原結合断片の結合を競合阻害すると言われる。競合阻害は、当技術分野で公知の任意の方法、例えば、競合ELISAアッセイによって決定することができる。結合分子は、所与のエピトープに対する参照抗体または抗原結合断片の結合を、少なくとも90%、少なくとも80%、少なくとも70%、少なくとも60%、または少なくとも50%競合阻害すると言われ得る。

10

【0072】

本明細書で使用する場合、「親和性」という用語は、個々のエピトープと、例えば、免疫グロブリン分子の1つまたは複数の結合ドメインとの結合の強さの尺度を指す。例えば、Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988)の27~28ページを参照されたい。本明細書で使用する場合、「結合活性」という用語は、結合ドメインの集団と抗原との複合体の全体的な安定性を指す。例えば、Harlowの29~34ページを参照されたい。結合活性は、集団中の個々の結合ドメインと特定のエピトープとの親和性、ならびにまた免疫グロブリン及び抗原の結合価の両方に関係する。例えば、2価モノクローナル抗体と、重合体などの高度反復エピトープ構造を有する抗原との相互作用は、高い結合活性の1つである。2価モノクローナル抗体と、細胞表面上に高密度で存在する受容体との相互作用もまた、高い結合活性のものである。

20

【0073】

本明細書に開示のとおりの結合分子、またはその抗原結合断片、バリアント、もしくは誘導体はまた、それらの交差反応性に関して説明または特定され得る。本明細書で使用する場合、「交差反応性」という用語は、ある抗原に特異的な結合分子、例えば、抗体、またはその断片、バリアント、もしくは誘導体が第2の抗原と反応する能力；2つの異なる抗原物質間の関連性の尺度を指す。したがって、結合分子が、その形成を誘導したエピトープ以外のエピトープに結合するのであれば、その結合分子は交差反応性である。交差反応性エピトープは、一般的に、誘導エピトープと同じ相補的構造的特徴の多くを含有しており、場合によっては、元のエピトープよりも実際には良好に適合し得る。

30

【0074】

結合分子、例えば、抗体、またはその断片、バリアント、もしくは誘導体はまた、抗原に対するそれらの結合親和性に関して説明または特定され得る。例えば、結合分子は、 $5 \times 10^{-2} M$ 、 $10^{-2} M$ 、 $5 \times 10^{-3} M$ 、 $10^{-3} M$ 、 $5 \times 10^{-4} M$ 、 $10^{-4} M$ 、 $5 \times 10^{-5} M$ 、 $10^{-5} M$ 、 $5 \times 10^{-6} M$ 、 $10^{-6} M$ 、 $5 \times 10^{-7} M$ 、 $10^{-7} M$ 、 $5 \times 10^{-8} M$ 、 $10^{-8} M$ 、 $5 \times 10^{-9} M$ 、 $10^{-9} M$ 、 $5 \times 10^{-10} M$ 、 $10^{-10} M$ 、 $5 \times 10^{-11} M$ 、 $10^{-11} M$ 、 $5 \times 10^{-12} M$ 、 $10^{-12} M$ 、 $5 \times 10^{-13} M$ 、 $10^{-13} M$ 、 $5 \times 10^{-14} M$ 、 $10^{-14} M$ 、 $5 \times 10^{-15} M$ 、または $10^{-15} M$ 以下の解離定数または K_D で抗原に結合し得る。

40

【0075】

一本鎖抗体または他の結合ドメインを含む抗体断片は、単独で、または以下：ヒンジ領域、CH1、CH2、CH3、もしくはCH4ドメイン、J鎖、または分泌成分のうちの1つまたは複数との組み合わせで存在し得る。可変領域（複数可）と、ヒンジ領域、CH1、CH2、CH3、もしくはCH4ドメイン、J鎖、または分泌成分のうちの1つまたは複数との任意の組み合わせを含み得る抗原結合断片も含まれる。結合分子、例えば、抗体またはその抗原結合断片は、鳥類及び哺乳類を含む任意の動物起源に由来し得る。抗体は、ヒト、マウス、ロバ、ウサギ、ヤギ、モルモット、ラクダ、ラマ、ウマ、またはニワトリ抗体であってよい。別の実施形態では、可変領域は軟骨魚類（condroicthyo

50

i d) 起源(例えば、サメ由来)であってもよい。本明細書で使用する場合、「ヒト」抗体には、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有する抗体が含まれ、ならびにヒト免疫グロブリンライブラリーから単離された抗体、または以下に記載の、及び例えば K u c h e r l a p a t i e t a l . による米国特許第 5 , 9 3 9 , 5 9 8 号に記載のとおりの、1つもしくは複数のヒト免疫グロブリンに関してトランスジェニックであり、場合によっては内因性免疫グロブリンを発現することができ、場合によってはできない動物から単離された抗体が含まれる。

【 0 0 7 6 】

本明細書で使用する場合、「重鎖サブユニット」という用語は、免疫グロブリン重鎖に由来するアミノ酸配列を含み、重鎖サブユニットを含む結合分子、例えば、抗体は、V H ドメイン、C H 1 ドメイン、ヒンジ(例えば、上部、中間、及び/または下部ヒンジ領域)ドメイン、C H 2 ドメイン、C H 3 ドメイン、C H 4 ドメイン、またはそのバリアントもしくは断片の少なくとも1つを含み得る。例えば、結合分子、例えば、抗体、またはその断片、バリアント、もしくは誘導体は、限定ではないが、V H ドメインに加えて、C H 1 ドメイン；C H 1 ドメイン、ヒンジ、及びC H 2 ドメイン；C H 1 ドメイン及びC H 3 ドメイン；C H 1 ドメイン、ヒンジ、及びC H 3 ドメイン；またはC H 1 ドメイン、ヒンジドメイン、C H 2 ドメイン、及びC H 3 ドメインを含み得る。ある種の態様では、結合分子、例えば、抗体、またはその断片、バリアント、もしくは誘導体は、V H ドメインに加えて、C H 3 ドメイン及びC H 4 ドメイン；またはC H 3 ドメイン、C H 4 ドメイン、及びJ鎖を含み得る。さらに、本開示において使用するための結合分子は、一定の定常領域部分、例えば、C H 2 ドメインのすべてまたは一部を欠いていてもよい。これらのドメイン(例えば、重鎖サブユニット)が、元の免疫グロブリン分子とアミノ酸配列が異なるように修飾され得ることは、当業者によって理解されるであろう。

10

20

30

40

【 0 0 7 7 】

本明細書で使用する場合、「軽鎖サブユニット」という用語は、免疫グロブリン軽鎖に由来するアミノ酸配列を含む。軽鎖サブユニットは、少なくともV L を含み、C L (例えば、C またはC) ドメインをさらに含み得る。

【 0 0 7 8 】

結合分子、例えば、抗体、またはその抗原結合断片、バリアント、もしくは誘導体は、それらが認識するか、または特異的に結合する抗原のエピトープ(複数可)または部分(複数可)に関して説明または特定され得る。抗体の抗原結合ドメインと特異的に相互作用する標的抗原の部分が、「エピトープ」または「抗原決定基」である。標的抗原は、單一のエピトープまたは少なくとも2つのエピトープを含み得、抗原のサイズ、高次構造、及び種類に応じて、任意の数のエピトープを含み得る。

【 0 0 7 9 】

すでに示したとおり、様々な免疫グロブリンクラスの定常領域のサブユニット構造及び三次元配置は周知である。本明細書で使用する場合、「V H ドメイン」という用語は、免疫グロブリン重鎖のアミノ末端の可変ドメインを含み、「C H 1 ドメイン」という用語は、免疫グロブリン重鎖の最初の(最もアミノ末端側の)定常領域ドメインを含む。C H 1 ドメインはV H ドメインに隣接しており、典型的なI g G重鎖分子のヒンジ領域のアミノ末端側にある。

【 0 0 8 0 】

本明細書で使用する場合、「C H 2 ドメイン」という用語は、例えば、従来の番号付けスキームを用いて、I g G 抗体の例えば、アミノ酸のおよそ 2 4 4 位からアミノ酸のおよそ 3 6 0 位に及ぶ重鎖分子の部分を含む(アミノ酸 2 4 4 ~ 3 6 0 、K a b a t 番号付けシステム；及びアミノ酸 2 3 1 ~ 3 4 0 、E U 番号付けシステム；K a b a t E A e t a l . 、前掲書を参照されたい)。C H 3 ドメインは、C H 2 ドメインからI g G 分子のC 末端に及び、およそ 1 0 8 アミノ酸を含む。特定の免疫グロブリンクラス、例えばI g M はさらに、C H 4 領域を含む。

【 0 0 8 1 】

50

本明細書で使用する場合、「ヒンジ領域」という用語は、IgG、IgA、及びIgD重鎖においてCH1ドメインをCH2ドメインに連結する重鎖分子の部分を含む。このヒンジ領域はおよそ25アミノ酸を含み、可動性であり、したがって、2つのN末端の抗原結合領域は独立して動くことが可能である。

【0082】

本明細書で使用する場合、「ジスルフィド結合」という用語は、2つの硫黄原子間に形成される共有結合を含む。アミノ酸システインは、第2のチオール基とジスルフィド結合または架橋を形成し得るチオール基を含む。

【0083】

本明細書で使用する場合、「キメラ抗体」という用語は、免疫反応領域または部位が第1の種から得られているか、またはそれに由来し、かつ定常領域（インタクト、部分的、または修飾型であってよい）が第2の種から得られている抗体を指す。一部の実施形態では、標的結合領域または部位は非ヒト供給源（例えば、マウスまたは靈長類）に由来し、定常領域はヒトである。

10

【0084】

「多重特異性抗体」または「二重特異性抗体」という用語は、単一の抗体分子内に、2つ以上の異なるエピトープに対する結合ドメインを有する抗体を指す。標準的な抗体構造に加えて、2つの結合特異性を有する他の結合分子を構築することができる。二重特異性または多重特異性抗体によるエピトープ結合は、同時または逐次的であってよい。トリオーマ及びハイブリッドハイブリドーマは、二重特異性抗体を分泌し得る細胞系の2つの例である。二重特異性抗体はまた、組換え手段によって構築することもできる（Strohlein and Heiss, Future Oncol. 6: 1387-94 (2010); Mabry and Snavely, IDrugs. 13: 543-9 (2010)）。二重特異性抗体はまた、ダイアボディであってよい。

20

【0085】

本明細書で使用する場合、「操作された抗体」という用語は、重鎖及び軽鎖のいずれか一方またはその両方の可変ドメインが、CDRまたはフレームワーク領域のいずれかにおいて1個または複数のアミノ酸の少なくとも部分置換によって改変されている抗体を指す。ある種の態様では、公知の特異性の抗体に由来するCDR全体を、異種抗体のフレームワーク領域にグラフトすることができる。代替CDRは、フレームワーク領域が由来する抗体と同じクラスまたはさらにはサブクラスの抗体に由来してよいが、CDRはまた、異なるクラスの抗体、例えば異なる種からの抗体に由来してもよい。公知の特異性の非ヒト抗体からの1つまたは複数の「ドナー」CDRがヒト重鎖または軽鎖フレームワーク領域にグラフトされた、操作された抗体は、本明細書において「ヒト化抗体」と称される。ある種の態様では、CDRのすべてが、ドナー可変領域由来の完全なCDRで置き換えるわけではないが、それでも、ドナーの抗原結合能をレシピエント可変ドメインに移行させることができる。例えば、米国特許第5,585,089号、同第5,693,761号、同第5,693,762号、及び同第6,180,370号に記載された説明を考慮すると、ルーチン的な実験の実行または試行錯誤の試験のいずれかによって、機能的な操作された抗体またはヒト化抗体を得ることは、十分に当業者の能力の範囲内である。

30

【0086】

本明細書で使用する場合、「操作された」という用語は、合成手段による（例えば、組換え技法、インビトロペプチド合成、ペプチドの酵素的もしくは化学的カップリング、またはこれらの技法のいくつかの組み合わせによる）核酸またはポリペプチド分子の操作を含む。

40

【0087】

本明細書で使用する場合、「連結された」、「融合された」、もしくは「融合」という用語、または他の文法的等価物は、互換的に使用され得る。これらの用語は、化学的結合または組換え手段を含むどのような手段であれ、2つ以上の要素または成分を共に連結することを指す。「インフレーム融合」は、元のオープンリーディングフレーム（ORF）

50

の翻訳リーディングフレームを維持する様式で、2つ以上のポリヌクレオチドORFを連結して、連續したより長いORFを形成することを指す。したがって、組換え融合タンパク質は、元のORFによってコードされるポリペプチドに対応する2つ以上のセグメントを含有する単一のタンパク質である（これらのセグメントは通常、天然ではそのように連結されていない）。リーディングフレームはこのように融合セグメント全体にわたって連續しているが、これらのセグメントは、例えばインフレームのリンカー配列によって、物理的または空間的に分離されていてもよい。例えば、免疫グロブリン可変領域のCDRをコードするポリヌクレオチドは、インフレームで融合させることができると、「融合された」CDRが連續ポリペプチドの一部として同時翻訳される限り、少なくとも1つの免疫グロブリンフレームワーク領域またはさらなるCDR領域をコードするポリヌクレオチドによって分離されていてもよい。

10

【0088】

本明細書で使用する場合、「架橋された」という用語は、2個以上の分子を第3の分子によって共に連結することを指す。例えば、同じ抗原に特異的に結合する2つの結合ドメインを有する二価抗体は、例えばその抗原の2コピーが細胞上に発現されている場合に、それらを「架橋」し得る。TNFSFRを介してのシグナル伝達は典型的には、3つ以上の受容体モノマーが細胞の表面上で近接することを必要とする。これは天然では、ホモ三量体リガンドを介しての受容体モノマーの会合によって達成される。典型的な二価IgG抗体は、細胞の表面上で、2個のTNFSFRモノマーを会合させることしかできず、したがって、そのような二価抗体は、受容体を効果的に活性化させるためには、それ自体が架橋されることを必要とする。そのような架橋は、例えば、二価抗体のFc領域に結合する二次抗体で、またはFcガンマ受容体によって達成され得る。「二次架橋部分」は、本明細書で使用する場合、結合分子、例えば、TNFSFRについて特異的な結合分子を架橋することができる任意の物質であってよい。本明細書で提供するとおりの二量体、五量体、または六量体結合分子は、単一の共有結合分子中に最高4、10、または12個の同一の抗原結合ドメインを含む。各抗原結合ドメインは、TNFSFRモノマーに会合して、モノマーを近接させてクラスター化することができる。したがって、本明細書で提供するとおりの二量体、五量体、または六量体結合分子は例えば、同時に少なくとも3、例えば、4、10、または12個のTNFSFRに特異的に結合し、それらを架橋し、それによつて、二次架橋部分の非存在下でシグナル伝達を活性化させることができる。

20

【0089】

ポリペプチドとの関連で、「線状配列」または「配列」は、ポリペプチドにおけるアミノ末端からカルボキシル末端方向へのアミノ酸の順序であり、配列内で相互に隣接するアミノ酸は、ポリペプチドの一次構造において連續している。ポリペプチドの別の部分に対して「アミノ末端側」または「N末端側」にあるポリペプチドの部分は、連續的なポリペプチド鎖において先に来る部分である。同様に、ポリペプチドの別の部分に対して「カルボキシル末端側」または「C末端側」にあるポリペプチドの部分は、連續的なポリペプチド鎖において後に来る部分である。例えば、定型抗体において、可変ドメインは定常領域の「N末端側」にあり、定常領域は可変ドメインの「C末端側」にある。

30

【0090】

「発現」という用語は、本明細書で使用する場合、遺伝子が生化学物質、例えば、ポリペプチドを産生するプロセスを指す。このプロセスは、限定ではないが、遺伝子ノックダウン、さらには、一過性発現及び安定発現の両方を含む、細胞内での遺伝子の機能的存在の任意の顕在化を含む。これには、限定ではないが、遺伝子のRNA、例えば、メッセンジャーRNA(mRNA)への転写、及びそのようなmRNAのポリペプチド(複数可)への翻訳が含まれる。所望の最終産物が生化学物質である場合、発現は、その生化学物質及び任意の前駆体の作出を含む。遺伝子の発現によって、「遺伝子産物」が生成される。本明細書で使用する場合、遺伝子産物は、核酸、例えば遺伝子の転写によって生成されるメッセンジャーRNA、または転写物から翻訳されるポリペプチドのいずれかであつてよい。本明細書に記載の遺伝子産物にはさらに、転写後修飾、例えばポリアデニル化を受け

40

50

た核酸、または翻訳後修飾、例えば、メチル化、グリコシル化、脂質の添加、他のタンパク質サブユニットとの結合、タンパク質分解性切断などを受けたポリペプチドが含まれる。

【0091】

「処置すること」または「処置」または「処置するため」または「緩和すること」または「緩和するため」などの用語は、既存の診断された病理学的状態または障害を治癒する、減速させる、その症状を減少させる、及び／またはその進行を停止させるか、もしくは遅らせる治療的手段を指す。「予防する」、「予防」、「回避する」、「抑止」などの用語は、未診断の、標的とする病理学的状態または障害の発生を防ぐ予防的または防止的手段を指す。したがって、「処置を必要とするもの」には、その障害を既に有するもの；その障害を有する傾向があるもの；及びその障害が予防されるべきものが含まれ得る。

10

【0092】

「対象」または「個体」または「動物」または「患者」または「哺乳類」は、診断、予後診断、または治療が望まれる任意の対象、特に哺乳類対象を意味する。哺乳類対象には、ヒト、家庭用動物、家畜、牧場動物、及び動物園、運動競技、または愛玩用の動物、例えば、イヌ、ネコ、モルモット、ウサギ、ラット、マウス、ウマ、ブタ、ウシ、クマなどが含まれる。

20

【0093】

本明細書で使用する場合、「治療から恩恵を受ける対象」及び「処置を必要とする動物」などの語句は、すべての予期される対象のなかから、1つまたは複数の抗原結合ドメインを含む、所与の治療薬、例えば、結合分子、例えば抗体の投与から恩恵を受けるであろう対象のサブセットを指す。例えば、疾患の診断手順及び／または処置もしくは予防のために、そのような結合分子、例えば抗体を使用することができる。

20

【0094】

IgM結合分子

IgMは、抗原による刺激に応答してB細胞によって產生される最初の免疫グロブリンであり、5日の半減期で血清中におよそ1.5mg/mlで存在する。IgMは五量体または六量体分子である。IgM結合ユニットは、2つの軽鎖及び2つの重鎖を含む。IgGが3つの重鎖定常ドメイン(CH1、CH2、及びCH3)を含有する一方で、IgMの重(μ)鎖は追加で、C末端の「尾片」を含む第4の定常ドメイン(CH4)を含有する。ヒトIgM定常領域は典型的に、アミノ酸配列の配列番号1を含む。ヒトCμ1領域は、配列番号1のアミノ酸のおよそ5位からアミノ酸のおよそ102位までの範囲であり；ヒトCμ2領域は、配列番号1のアミノ酸のおよそ114位からアミノ酸のおよそ205位までの範囲であり、ヒトCμ3領域は、配列番号1のアミノ酸のおよそ224位からアミノ酸のおよそ319位までの範囲であり、Cμ4領域は、配列番号1のアミノ酸のおよそ329位からアミノ酸のおよそ430位までの範囲であり、かつ尾片は、配列番号1のアミノ酸のおよそ431位からアミノ酸のおよそ453位までの範囲である。配列番号1を下に示す。

30

```
GSASAPTLFPLVSCENSPESTSSAVGCLAQDFLPDSI
TLSWKYKNNSDISSTRGFPSVLRGKYAATSQVLLPS
KDVMQGTDEHVVCKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPP
KVSVFVPPRPGFFGNPRKSKLICQATGFSRQIQVSWL
REGKQVGSGVTTDQVQAEAKESGPTTYKVTSTLTIKE
SDWLGQSMFTCRVDHRGLTFQQNASSMCVPDQDTAI
RVFAIPPSFASIFLTKSTKLCLVTDLTTYDSVTISWTR
QNGEAVKTHTNISESHPNATFSAVGEASICEDDWNSG
ERFTCTVHTDLPSPLKQTISRPKGVALHRPDVYLLPP
AREQLNLRESATITCLVTGFSPADVFWQMQRGQPLS
PEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVSEEWNTGET
YTCVAHEALPNRVTERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSD
TAGTCY
```

40

50

【 0 0 9 5 】

5つのIgM結合ユニットは、追加の小さいポリペプチド鎖（J鎖）と複合体を形成して、IgM抗体を形成し得る。ヒトJ鎖は、アミノ酸配列の配列番号2を含む。J鎖がなければ、IgM結合ユニットは典型的に、集合して六量体になる。理論によって縛られることは望まないが、IgM結合ユニットの五量体または六量体結合分子への構築には、C μ 3及びC μ 4ドメインが関与すると考えられている。したがって、本開示で提供する五量体または六量体結合分子は典型的に、少なくともC μ 3及びC μ 4ドメインを含むIgM定常領域を含む。配列番号2を下に示す。

MKNHLLFWGVLA¹VFIKAVHVKAQEDERIVLV²DNKC
KC³ARITSRIIRSS⁴EDPNE⁵DIVERNIRIIVPLNNRENISDPT
SPLRTRFVYHLS⁶DLCKKCDPTEVELDNQIVTATQS⁷NIC
DEDSATETCYTYDRNKCYTAVVPLVYGG⁸ETKM⁹VET
ALTPDACYPD

10

【 0 0 9 6 】

IgM重鎖定常領域は追加で、C μ 2ドメインもしくはその断片、C μ 1ドメインもしくはその断片、及び／または他のIgM重鎖ドメインを含み得る。ある種の態様では、本明細書で提供する結合分子は、完全なIgM重（μ）鎖定常ドメイン、例えば配列番号1、またはそのバリアント、誘導体、もしくは類似体を含み得る。

【 0 0 9 7 】

20

アゴニスト五量体または六量体OX40結合分子

本開示は、3個以上、例えば、4個以上、例えば、5、6、7、8、9、10、11、または12個のOX40モノマー、例えば、マウス及び／またはヒトOX40モノマーに特異的に結合し得る五量体または六量体結合分子、すなわち本明細書で定義するとおりの5または6個の「結合ユニット」を有する結合分子を提供する。ある種の態様では、OX40が、細胞、例えば、T細胞、例えば、T_{reg}または活性化工フェクター-CTL上に発現される場合、本明細書で提供するとおりの五量体または六量体結合分子は、その細胞上の多数の、例えば、3個以上のOX40モノマーを十分に会合させて、二次架橋部分の非存在下でシグナル伝達経路を開始させ、それによって、抗腫瘍免疫を誘導することができる。本明細書で提供するとおりの結合分子は、単一の結合ユニットから構成される結合分子、例えば二価IgG抗体と比較して、改善された結合特性または生物活性を有し得る。例えば、五量体または六量体結合分子は、細胞の表面上の多数の、3個以上のOX40受容体をより効率的に架橋することができ、及び／または、例えば、これに限定されないが、Fc_Rなどの二次架橋部分の非存在下で細胞の表面上の多数の、例えば、3個以上のOX40受容体を効果的に架橋することができ、それによって、抗腫瘍免疫を促進することができる。

30

【 0 0 9 8 】

40

本明細書で提供するとおりの結合分子は、同様に、合成またはキメラ構造から構成される多価結合分子と比較して、特有の特徴を有し得る。例えば、ヒトIgM定常領域の使用は、キメラ定常領域または合成構造を含有する結合分子と比べて、免疫原性の低下、したがって安全性の増加を提供し得る。さらに、IgMベースの結合分子は一貫して、六量体または五量体オリゴマーを形成し、より均一な発現産物をもたらし得る。優れた補体結合も、IgMベースの結合分子の有利なエフェクター機能であり得る。

【 0 0 9 9 】

40

ある種の態様では、本開示は、それぞれ5または6個の二価結合ユニットを含む五量体または六量体結合分子であって、各結合ユニットが2つのIgM重鎖定常領域またはその断片を含む、五量体または六量体結合分子を提供する。ある種の態様では、2つのIgM重鎖定常領域はヒト重鎖定常領域である。

【 0 1 0 0 】

50

本明細書で提供する結合分子が五量体である場合、その結合分子はさらに、J鎖またはその断片もしくはそのバリアントを含み得る。ある種の態様では、J鎖は、本明細書の他

の箇所で論述するにあり、修飾されていてもよい。

【0101】

IgM重鎖定常領域は、この定常領域が、結合分子において所望の機能を果たし得る、例えば、第2のIgM定常領域と結合して結合ドメインを形成し得る、または他の結合ユニットと結合して六量体もしくは五量体を形成し得る限り、C μ 1ドメインまたはその断片もしくはバリアント、C μ 2ドメインまたはその断片もしくはバリアント、C μ 3ドメインまたはその断片もしくはバリアント、及び／またはC μ 4ドメインまたはその断片もしくはバリアントのうちの1つまたは複数を含み得る。ある種の態様では、個々の結合ユニット内の2つのIgM重鎖定常領域またはその断片もしくはバリアントはそれぞれ、C μ 3ドメインまたはその断片もしくはバリアント、C μ 4ドメインまたはその断片もしくはバリアント、尾片(TP)またはその断片もしくはバリアント、あるいはC μ 3ドメイン、C μ ドメイン、及びTP、またはその断片もしくはバリアントの任意の組み合わせを含む。ある種の態様では、個々の結合ユニット内の2本のIgM重鎖定量領域またはその断片もしくはバリアントはそれぞれさらに、C μ 2ドメインまたはその断片もしくはバリアント、C μ 1ドメインまたはその断片もしくはバリアント、あるいはC μ 1ドメインまたはその断片もしくはバリアント及びC μ 2ドメインまたはその断片もしくはバリアントを含む。

10

【0102】

ある種の態様では、所与の結合ユニット中の2つのIgM重鎖定常領域のそれぞれは、抗原結合ドメイン、例えば、抗体のFv部分、例えばヒトまたはマウス抗体のVH及びVLと結合しており、その際、VLは軽鎖定常領域と結合していてよい。本明細書で提供する結合分子において、結合分子の少なくとも3個の抗原結合ドメインは、OX40、例えば、ヒト及び／またはマウスOX40に特異的に、かつアゴニスティックに結合し得るOX40結合ドメインである。

20

【0103】

IgA結合分子

IgAは、粘膜免疫において重要な役割を果たし、產生される全免疫グロブリンの約15%を占める。IgAは、単量体または二量体分子である。IgA結合ユニットは、2本の軽鎖及び2本の重鎖を含む。IgAは、3つの重鎖定常ドメイン(C1、C2、及びC3)を含有し、C末端の「尾片」を含む。ヒトIgAには、2つのサブタイプ、IgA1及びIgA2がある。ヒトIgA1定常領域は典型的に、アミノ酸配列の配列番号3を含む。ヒトC1領域は、配列番号3のアミノ酸のおよそ6位からアミノ酸のおよそ98位までの範囲であり；ヒトC2領域は、配列番号3のアミノ酸のおよそ125位からアミノ酸のおよそ220位までの範囲であり、ヒトC3領域は、配列番号3のアミノ酸のおよそ228位からアミノ酸のおよそ330位までの範囲であり、かつ尾片は、配列番号3のアミノ酸のおよそ331位からアミノ酸のおよそ352位までの範囲である。ヒトIgA2定常領域は典型的に、アミノ酸配列の配列番号4を含む。ヒトC1領域は、配列番号4のアミノ酸のおよそ6位からアミノ酸のおよそ98位までの範囲であり；ヒトC2領域は、配列番号4のアミノ酸のおよそ112位からアミノ酸のおよそ207位までの範囲であり、ヒトC3領域は、配列番号4のアミノ酸のおよそ215位からアミノ酸のおよそ317位までの範囲であり、かつ尾片は、配列番号4のアミノ酸のおよそ318位からアミノ酸のおよそ340位までの範囲である。配列番号3及び4を下に示す。

30

配列番号3

40

ASPTSPKVFPQLCSTQPDGNVVIACLVQGFFPQEPLS
 VTWSESGQQVTARNFPPSQDASGDLYTTSSQLTPAT
 QCLAGKSVTCHVKHYTNPSQDVPCPVPSTPPTPSP
 STPPPTSPSCCHPRLSLHRPALEDLLLGEANLTCTLTG
 LRDASGVFTWTPSSGKSAVQGPPERDLCGCYSVSSV
 LPGCAEPWNHGTFTCTAAYPEKPLTATLSKSGNT
 FRPEVHLLPPPSEELALNELVTLTCLARGFSPKDVLVR
 WLQGSQELPREKYLTwASRQEPMQGTTFAVTSILRV
 AAEDWKKGDTFSCMVGHEALPLAFTQKTIDRLAGKP
 THVNVSVVMAEVGDGTCY

10

配列番号 4

ASPTSPKVFPQLCSTQPDGNVVIACLVQGFFPQEPLS
 VTWSESGQNVNTARNFPPSQDASGDLYTTSSQLTPAT
 QCPDGKSVTCHVKHYTNPSQDVPCPVPFFFFCCHP
 RLSLHRPALEDLLLGEANLTCTLTGLRDASGATFTW
 TPSSGKSAVQGPPERDLCGCYSVSSVLPGCAQPWNH
 GETFTCTAAHPELKTPLTANITKSGNTFRPEVHLLPPP
 SEELALNELVTLTCLARGFSPKDVLVRWLQGSQELPR
 EKYLTwASRQEPMQGTTFAVTSILRVAAEDWKKGD
 TFSCMVGHEALPLAFTQKTIDRMAGKPTHVNVSVM
 AEVDGTCY

20

【0104】

2 個の Ig A 結合ユニットは、2 本の追加のポリペプチド鎖、J 鎖（配列番号 2）及び分泌成分（前駆体、配列番号 5、成熟体、配列番号 6）と複合体を形成して、分泌型 Ig A（s Ig A）抗体を形成し得る。理論によって縛られることは望まないが、Ig A 結合ユニットの二量体 s Ig A 結合分子への構築には、C 3 及び尾片ドメインが関与すると考えられている。したがって、本開示で提供する二量体 s Ig A 結合分子は典型的に、少なくとも C 3 及び尾片ドメインを含む Ig A 定常領域を含む。配列番号 5 及び配列番号 6 を下に示す。

配列番号 5

30

MLLFVLTCLLAVFPAISTKSPIFGPEEVNSVEGNSVISIT
 CYYPPTSVNRHTRKYWCRQGARGGCITLISSEGYVSS
 KYAGRANLTNPENGTFFVNIAQLSQDDSGRYKCGL
 GINSRGLSFDSLEVSQGPGLLNDTKVYTVDLGRTVT
 INCPKTENAQKRKSLYKQIGLYPVVIDSSGYVNPN
 YTGRIRLDIQGTGQLLFSVVINQLRLSDAGQYLCQAG
 DDSNSNKKNADLQVLKPEPELVYEDLRGSVTFH
 GPEVANVAKFLCRQSSGENCDVVNTLGKRAPAFEG
 RILLNPQDKDGSFSVITGLRKEDAGRYLCGAHSDGQ
 LQEGSPIQAWQLFVNEESTIPRSPTVVKGVAGGSVAV
 LCPYNRKESKSIKYWCLWEGAQNRCPLLVDSEG
 WVKAQYEGRSLLEPGNGTFTVILNQLTSRDAGFYWCL
 TNGDTLWRTTVEIKIIEGEPNLKVPGNVTAVLGETLK
 VPCHPCKFSSYEKYWCKWNNTGCQALPSQDEGPSK
 AFVNCDENSRLVSLTLNLVTRADEGWYWCGVKQGH
 FYGETAAVYVAVEERKAAGSRDVSLAKADAAPDEK
 VLDSGFREIENKAIQDPRLFEEKAVALTRDQADGSR
 ASVDSGSSEEQGGSSRALVSTLVPLGLVLAGAVAV
 GVARARHRKNVDRVSIRSYRTDISMSDFENSREFGAN
 DNMGASSITQETSLGGKEEFVATTESTTETKEPKKAK
 RSSKEEAEMAYKDFLLQSSTVAAEAQDGPQEA

40

50

配列番号 6

KSPIFGPEEVNSVEGNSVSITCYYPPTSVNRHTRKYWC
RQGARGGCITLISSEGYVSSKYAGRANLTNFPENGTF
VVNIAQLSQDDSGRYKCGLGINSRGLSFDVSLEVSQG
PGLLNDTKVYTVDLGRVTINC PKTENAQKRKSLYK
QIGLYPVLDSSGYVNPNTGRIRLDI QGTGQLLFSV
VINQLRLSDAGQYLCQAGDDNSNSNKKNADLQVLKPE
PELVYEDLRGSVTFH CALGPEVANVAKFLCRQSSGEN
CDVVVNTL GKRAPAFEGRILLNPQDKDGSFSVVITGL
RKEDAGRYLCGAHSDGQLQEGSPIQAWQLFVNEESTI
PRSPTVVKGVAGGSVA VLPY NRKESKS IKY WCLWE
GAQN GRC PLLVDSEG WVK A QYEGR LS LEEP GNGTF
TVIL NQLTS RDAGFYW CLT NGDTL WRTT VEIKIIEGE P
NLKV PGN VTAVL GETLK VPCH FPCK FSS YEK YWCKW
NN TGC QALPSQ DEGPSKA FVN C DENS RL VSL TLNL V
RADE GWY WCGVKQGHFYGETAA VY VAVEER KAAG
SRDV SLAKADA APDEK VLD SGFREIEN KAI QDPR

10

【0105】

IgA重鎖定常領域は追加で、C2ドメインもしくはその断片、C1ドメインもしくはその断片、及び／または他のIgA重鎖ドメインを含み得る。ある種の態様では、本明細書で提供する結合分子は、完全なIgA重()鎖定常ドメイン（例えば、配列番号3または配列番号4）、またはそのバリアント、誘導体、もしくは類似体を含み得る。

20

【0106】

アゴニスト二量体OX40結合分子

本開示は、3個以上または最高4個のOX40モノマー、例えば、ヒトまたはマウスOX40モノマーに特異的に結合し得る二量体結合分子、例えば本明細書で定義するとおりの2個のIgA「結合ユニット」を有する結合分子を提供する。ある種の態様では、OX40が細胞、例えば、T細胞、例えば、Tregまたは活性化エフェクター CTL上に発現される場合、その細胞上の多数のOX40受容体と、本明細書で提供するとおりの結合分子との接触は、二次架橋部分の非存在下でシグナル伝達経路を開始させ、それによって、抗腫瘍免疫を誘導することができる。本明細書で提供するとおりの二量体結合分子は、単一の結合ユニットから構成される結合分子、例えば、二価IgG抗体と比較して、改善された結合特性または生物活性を有し得る。例えば、IgA結合分子は、細胞の表面上の多数の、例えば、3個以上のOX40受容体をより効率的に架橋することができ、及び／または二次架橋部分、例えば、これに限定されないが、FcRの非存在下で細胞の表面上の多数の、例えば、3個以上のOX40受容体を効率的に架橋し、それによって、抗腫瘍免疫を促進することができる。さらに、IgA結合分子は、粘膜部位に到達し、本明細書で提供する結合分子のより多大な組織分布を提供し得る。IgAベースの結合分子の使用は、例えば、本明細書で提供する結合分子のより多大な組織分布を可能にし得る。粘膜分布は、ある種のがん、例えば、肺癌、卵巣癌、結腸直腸癌、または扁平上皮癌の腫瘍微小環境に達するために有益であり得る。同様に、本明細書で提供するとおりの二量体結合分子は、5または6個の結合ユニットを含む結合分子、例えば六量体または五量体IgM抗体と区別され得る結合特性または生物活性を有し得る。例えば、二量体結合分子はより小さく、例えば、固形腫瘍においてより良好な組織浸透を達成し得る。

30

【0107】

ある種の態様では、本開示は、2個の二価結合ユニットを含む二量体結合分子であって、各結合ユニットが2つのIgA重鎖定常領域またはその断片もしくはバリアントを含む二量体結合分子を提供する。ある種の態様では、2つのIgA重鎖定常領域はヒト重鎖定常領域である。

40

【0108】

50

本明細書で提供するとおりの二量体 I g A 結合分子はさらに、J鎖またはその断片もしくはそのバリエント、例えば、本明細書の他の箇所において開示するとおりの修飾 J鎖を含み得る。本明細書で提供するとおりの二量体 I g A 結合分子はさらに、分泌成分またはその断片もしくはそのバリエントを含み得る。

【0109】

I g A 重鎖定常領域は、この定常領域が、結合分子において所望の機能を果たし得る、例えば、軽鎖定常領域と結合して抗原結合ドメインの形成を促進し得る、または別の I g A 結合ユニットと結合して二量体結合分子を形成し得る限り、C 1 ドメイン、C 2 ドメイン、及び / または C 3 ドメインのうちの 1つまたは複数を含み得る。ある種の態様では、個々の結合ユニット内の 2つの I g A 重鎖定常領域またはその断片もしくはバリエントはそれぞれ、C 3 ドメインまたはその断片もしくはバリエント、尾片 (TP) またはその断片もしくはバリエント、あるいは C 3 ドメイン、TP、またはそれらの断片もしくはバリエントの任意の組み合わせを含む。ある種の態様では、個々の結合ユニット内の 2つの I g A 重鎖定量領域またはその断片はそれぞれさらに、C 2 ドメインまたはその断片もしくはバリエント、C 1 ドメインまたはその断片もしくはバリエント、あるいは C 1 ドメインまたはその断片もしくはバリエント及び C 2 ドメインまたはその断片もしくはバリエントを含む。

10

【0110】

ある種の態様では、所与の結合ユニット中の 2つの I g A 重鎖定常領域のそれぞれは、抗原結合ドメイン、例えば、抗体の Fv 部分、例えばヒトまたはマウス抗体の VH 及び VL と結合しており、この場合、VL は軽鎖定常領域と結合していてよい。本明細書で提供するとおりの結合分子において、結合分子の少なくとも 3 個の抗原結合ドメインは、OX 40、例えば、ヒト及び / またはマウス OX 40 に特異的に、かつアゴニスティックに結合する。

20

【0111】

多重特異性二量体、五量体または六量体 OX 40 アゴニスト結合分子

本明細書で提供するとおりの多重特異性、例えば、二重特異性二量体 OX 40 アゴニスト結合分子は、IgA 抗体の二量体型に基づくことができ、その際、結合した軽鎖配列を伴って、または伴わずに、2対の IgA 重鎖配列が存在し得る。例えば、本明細書で提供するとおりの二重特異性二量体 OX 40 アゴニスト結合分子は、J鎖、例えば、本明細書の他の箇所で提供するとおりの修飾 J鎖を含む、2つの IgA (IgA1 または IgA2) 二量体から構成されてよい。

30

【0112】

本明細書で提供するとおりの多重特異性、例えば、二重特異性二量体 OX 40 アゴニスト結合分子は、その分子が全体として、少なくとも 2つの結合特異性を、例えば、少なくとも 2つの同一でない抗原結合ドメイン、例えば、OX 40 の異なるエピトープ、他の TNFSFR 分子、または異種の抗原からのエピトープを含む限り、単一及び二重特異性結合ユニットを含むことができる。

【0113】

したがって、一実施形態では、本明細書で提供するとおりの多重特異性、例えば、二重特異性二量体結合分子は、異なる結合標的に対して二価結合特異性をそれぞれ有する 2 個の単一特異性結合ユニット (AA、BB) を含むことができる。別の実施形態では、本明細書で提供するとおりの多重特異性、例えば、二重特異性二量体結合分子は、各結合ユニットが同じ 2つの結合標的に結合する 2 個の二重特異性結合ユニット (AB、AB) を含んで、二重特異性二量体結合分子を形成することができる。さらなる一実施形態では、本明細書で提供するとおりの多重特異性二量体結合分子に存在する 1 個の結合ユニットは、単一特異性 (AA) である一方で、他の結合ユニットは、二重特異性 (BC) であり、3 つの (A、B、C) 結合特異性を有する多重特異性結合分子が生じている。さらなる一実施形態では、各結合ユニットは、二重特異性であるが、1つの特異性が重複していて (例えば、AB、AC)、3 つの (A、B、C) 結合特異性を有する多重特異性結合分子が生

40

50

じている。例えば、4つの同一でない抗原結合ドメイン（A、B、C、D）を有する他の組合せも、本開示に基づき容易に作製することができる。

【0114】

本明細書で提供するとおりの多重特異性、例えば、二重特異性五量体または六量体OX40アゴニスト結合分子は、IgM抗体の五量体型または六量体型に基づくことができ、その際、結合した軽鎖配列を伴って、または伴わずに、5対または6対のIgM重鎖配列が存在し得る。例えば、本明細書で提供するとおりの二重特異性6量体または五量体OX40アゴニスト結合分子は、J鎖、例えば、本明細書の他の箇所で提供するとおりの修飾J鎖を含む、5つのIgM二量体、または6つのIgM二量体から構成されてよい。

10

【0115】

本明細書で提供するとおりの多重特異性、例えば、二重特異性五量体または六量体OX40アゴニスト結合分子は、その分子が全体として、少なくとも2つの結合特異性を、例えば、少なくとも2つの同一でない抗原結合ドメイン、例えば、OX40の異なるエピトープ、他のTNFSFR分子、または異種の抗原からのエピトープを含む限り、単一及び二重特異性結合ユニットを含むことができる。

20

【0116】

多重特異性二量体結合分子について上記で論述したとおり、5または6個の結合ユニットのそれぞれは独立に、単一特異性または二重特異性（例えば、AA、BB、CCなど）であってもよいし、または1個または複数の結合ユニットは、二重特異性（例えば、AB、AB、AC、CDなど）であってもよい。したがって、本明細書で提供するとおりの多重特異性、例えば、二重特異性五量体または六量体結合分子は、少なくとも2つの独立した抗原結合ドメイン、及び最高12個の異なる独立した抗原結合ドメインを含むことができる。

30

【0117】

修飾J鎖

ある種の態様では、本明細書で提供するとおりの二量体または五量体結合分子のJ鎖は、その結合標的（複数可）と会合及び結合するIgMまたはIgA結合分子の能力を妨害することなく、例えば、異種部分、または2つ以上の異種部分の導入によって修飾されていてよい。それぞれ、その全体で参照によって本明細書に組み込まれるPCT出願番号PCT/US2015/024149（公報WO2015/153912）、PCT出願番号PCT/US2016/055053（公報WO2017/059387）、及びPCT出願番号PCT/US2016/055041（公報WO2017/059380）を参照されたい。したがって、本明細書の他の箇所で記載するとおりの多重特異性二量体または五量体結合分子を含む、本明細書で提供するとおりの二量体または五量体結合分子は、J鎖またはその断片に導入された異種部分を含む修飾J鎖またはその機能性断片を含むことができる。ある種の態様では、異種部分は、フレームでJ鎖に融合している、またはJ鎖に化学的にコンジュゲートしているペプチドまたはポリペプチド配列であってよい。ある種の態様では、異種部分は、J鎖にコンジュゲートしている化学的部分であってよい。J鎖に結合される異種部分には、限定ではないが、結合部分、例えば、抗体もしくはその抗原結合断片、例えば、一本鎖Fv（ScFv）分子、二量体もしくは五量体結合分子の半減期を増大させ得る安定化ペプチド、または化学的部分、例えば、ポリマーもしくは細胞毒素が含まれ得る。

40

【0118】

一部の実施形態では、修飾J鎖は、限定ではないが、標的抗原に特異的に結合することができるポリペプチド（低分子ペプチドを含む）を含むことができる抗原結合ドメインを含むことができる。ある種の態様では、修飾J鎖と結合している抗原結合ドメインは、本明細書の他の箇所で記載するとおりの抗体またはその抗原結合断片であってよい。ある種の態様では、抗原結合ドメインは、例えば、ラクダ科または軟骨魚類抗体に由来するscFv結合ドメインまたは一本鎖結合ドメインであってよい。抗原結合ドメインは、J鎖の機能、または結合しているIgMもしくはIgA抗体の機能を妨害することなく、抗原結

50

合ドメインがその結合標的に結合することを可能にする任意の位置で、J鎖に導入することができる。挿入位置には、これに限定されないが：C末端もしくはその付近、N末端もしくはその付近、またはJ鎖の三次元構造に基づきアクセス可能である内部位置が含まれる。ある種の態様では、抗原結合ドメインを、配列番号2のヒトJ鎖に、配列番号2のシステイン残基92から101の間で導入することができる。さらなる一態様では、抗原結合ドメインは、配列番号2のヒトJ鎖に、グリコシル化部位またはその付近で導入することができる。さらなる一態様では、抗原結合ドメインを、配列番号2のヒトJ鎖に、C末端から約10のアミノ酸残基内で導入することができる。

【0119】

OX40結合ドメイン

10

本明細書で提供するとおりのOX40アゴニスト結合分子は、それぞれ2、5、または6個の二価結合ユニットを含む二量体、五量体、または六量体であってよい。結合ユニットは、全長またはその、結合機能を保持しているバリエントもしくは断片であってよい。

【0120】

各結合ユニットは、抗原結合ドメインとそれぞれ結合している2つのIgAまたはIgM重鎖定常領域またはその断片を含む。上述のとおり、抗原結合ドメインは、エピトープに特異的に結合するために必要で、かつ十分である結合分子の領域である。本明細書に記載のとおりの「結合分子」は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12個以上の「抗原結合ドメイン」を含むことができる。

【0121】

本明細書で提供するとおりの二量体、五量体、または六量体結合分子は、OX40、例えば、ヒト及び／またはマウスOX40に特異的に、かつアゴニスティックに結合する少なくとも3個の抗原結合ドメインを含むことができる。上述のとおり、本明細書で提供するとおりの二量体、五量体、または六量体OX40アゴニスト結合分子は、多数の、例えば、3個以上のOX40モノマーに特異的に結合し、かつそれらを会合させることができる。ある種の態様では、OX40が細胞、例えば、T細胞、例えば、Tregまたは活性化エフェクターCTL上に発現される場合、細胞上の多数の、例えば、3個以上のOX40受容体と本明細書で提供するとおりの結合分子との接触は、シグナル伝達経路を開始させ、それによって、抗腫瘍免疫を誘導することができる。シグナルが細胞膜を通過してOX40発現細胞のサイトゾルへと伝達されるように、複数の受容体タンパク質が一緒に結合して受容体分子の架橋をもたらすと、シグナル伝達経路は開始され得る。

20

30

【0122】

本明細書で提供するとおりの二量体、五量体、または六量体結合分子は、細胞の表面上に発現される少なくとも3個のOX40モノマーを架橋することができる。その二量体、五量体、または六量体の性質によって、本明細書で提供するとおりのOX40アゴニスト結合分子は、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12個もの多くのOX40モノマーを架橋することができる。OX40モノマーは、必然的に空間的に相互に近接して、多くの場合に、脂質ラフトになり、この脂質ラフトが、それらの架橋に寄与し、活性化をさらに増強することができる。本明細書で提供するとおりの五量体または六量体OX40アゴニスト結合分子の5個すべて、または6個すべての二価結合ユニットが、単一の細胞上の最大10または12個のOX40モノマーに結合する場合に、受容体の架橋及び活性化が高い効率で起こり得る。

40

【0123】

結合ユニットのそれぞれは二価であるので、各結合分子は、10個（五量体結合分子で）または12個（六量体結合分子で）もの多くのOX40モノマーに結合し得る。

【0124】

本明細書で提供するとおりの二量体、五量体、または六量体結合分子の結合による受容体の活性化時に、細胞、例えば、T細胞、例えば、Tregまたは活性化エフェクターCTLは、活性化され、それによって、例えば、CTL活性化（増殖、腫瘍細胞死滅）またはTreg免疫抑制の妨害を介して、抗腫瘍免疫を誘導することができる。

50

【0125】

ある種の態様では、本明細書で提供するとおりの二量体、五量体、または六量体結合分子は、同じOX40エピトープと同じく特異的に結合し、それをアゴナイズさせる等量の二価IgG抗体またはその断片よりも高い効力で、OX40発現細胞においてシグナル伝達を誘導することができる。理論によって縛られることは望まないが、提供する結合分子は二量体、五量体、または六量体であるので、及び各結合ユニットは二価であるので、そのような結合分子は、同等のIgG結合ユニットなどの任意の単独の单一結合ユニットよりも高い効力で、OX40について以前に特徴づけられた受容体媒介性機能を誘導することができる。IgG結合ユニットは、2つの結合部位を含有して二価であるが、以前の臨床試験が示したとおり、2個のOX40モノマーと单一IgG分子との結合は、クロスリンクカーナーなどの他の成分の添加がなければ無効であり得る。

10

【0126】

「効力」または「改善された結合特性」とは、所与のアッセイ、例えば、T細胞シグナル伝達アッセイ、T細胞増殖アッセイ、T細胞活性化及びサイトカイン分泌アッセイ、細胞傷害性アッセイ、または以下の実施例において提供するとおりの他のアッセイにおいて、所与の生物学的結果、例えば、OX40シグナル伝達活性の20%、50%、または90%の活性化を達成するために必要な、所与の結合分子の最少量を意味する。

【0127】

本明細書で提供するとおりの結合分子は二量体、五量体、または六量体であるので、それはそれぞれ4、10、または12もの多くのOX40特異的抗原結合ドメインを含有し得る。抗原結合ドメインのそれぞれは、OX40モノマーに特異的に結合し、モノマーと一緒に寄せ集めて、アゴニスト活性をもたらし得る。さらに、異なる抗原結合ドメインは、2つ以上の特定のOX40エピトープについて特異的であり得る。

20

【0128】

したがって、単一の二量体、五量体、または六量体結合分子は、a)多くのOX40モノマー上の単一のエピトープと同時に結合し得るか、またはb)単一のOX40モノマー上の異なるエピトープに結合し得るか、またはc)OX40に加えて、異なるTNFSFRタンパク質上の異なるエピトープに結合し得る。実施形態a)では、本明細書で提供するとおりのOX40アゴニスト結合分子は、多数のOX40モノマーに結合して、それによって、単一の位置においてそのようなモノマーのラフトを形成し、その受容体が活性化される可能性を増大させることができる。他の実施形態、例えば、実施形態c)では、本明細書で提供するとおりの二量体、五量体、または六量体結合分子は、OX40、さらには、他のTNFSFRタンパク質、例えば、GITR及び/またはCD137/4-1BBと接触し、それによって、様々な標的受容体を通じて1つよりも多い経路を活性化させて、細胞において所望の生物学的応答を達成するために使用することができる。これらの実施形態では、本明細書で提供するとおりのOX40アゴニスト結合分子は、すべて1つの単一細胞上にあるか、または複数の細胞にわたる、そのような受容体と接触し、それらをアゴナイズすることができる。

30

【0129】

したがって、本明細書で提供するとおりの二量体、五量体、または六量体結合分子は、1個または複数の細胞の表面上に発現されるOX40、及び任意選択で1個または複数の追加のTNFSFRタンパク質に特異的に、かつアゴニスティックに結合する、3、4、5、6、7、8、9、10個の、または六量体結合分子の場合には11もしくは12個もの多くの抗原結合ドメインを含むことができ、それによって、その細胞(複数可)において意図された、または所望の生物学的応答を誘導することができる。

40

【0130】

本明細書で提供するとおりの二量体、五量体、または六量体結合分子の結合ユニットは、ヒト、ヒト化、またはキメラ免疫グロブリン結合ユニットであってよい。免疫グロブリン配列をヒト化する方法は、当技術分野で周知である。したがって、二量体、五量体、または六量体結合分子ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、直接ヒト配列に由来

50

してよいか、またはヒト化され得るか、もしくはキメラであってよく、すなわち、複数の異なる種に由来する配列によってコードされてよい。

【0131】

O X 4 0 を発現する細胞は、任意の動物細胞であってよい。例えば、一実施形態では、細胞は、ヒト細胞、例えば、ヒトT細胞、例えば、ヒトC T Lである。例えば、細胞は、靈長類、げっ歯類、イヌ、ウマなどの細胞の任意の1つまたは複数であってよい。

【0132】

本明細書で提供するとおりの二量体、五量体、または六量体結合分子は、その抗原結合ドメインが、O X 4 0 、例えば、ヒト及び／またはマウスO X 4 0 に特異的に結合することが公知である配列によってコードされるように、遺伝子操作され得る。特徴づけられていて、O X 4 0 に特異的に結合することが公知である、大部分がI g Gアイソタイプであるモノクローナル抗体の可変領域の配列を、多くのグループが公表している。O X 4 0 に特異的に結合することが公知である非限定的な免疫グロブリン可変ドメイン配列を、表2に提供する。O X 4 0 について特異的な他のモノクローナル抗体配列も公表されている。当業者は、これらの公表された配列を操作して、I g G、I g A、I g M構造などの免疫グロブリン構造、またはその生物学的活性断片もしくは機能的断片（上記で論述したとおりのs c F v 断片など）にすることができる。クローニングされた可変領域を遺伝子操作して免疫グロブリンドメインにする方法、及びそのような構築物を発現させ精製する方法は、公表されており、当業者の能力の範囲内である。

10

【0133】

したがって、ある種の態様では、本明細書で提供するとおりのO X 4 0 結合ドメインは、それぞれ配列番号9及び配列番号10；配列番号11及び配列番号12；配列番号13及び配列番号14；配列番号15及び配列番号16；配列番号17及び配列番号18；配列番号19及び配列番号20；配列番号21及び配列番号22；配列番号23及び配列番号24；配列番号25及び配列番号26；配列番号25及び配列番号28；配列番号27及び配列番号26；配列番号27及び配列番号28；配列番号29及び配列番号26；配列番号29及び配列番号28；配列番号30及び配列番号31；配列番号30及び配列番号33；配列番号32及び配列番号31；配列番号32及び配列番号33；配列番号34及び配列番号31；配列番号34及び配列番号33；配列番号35及び配列番号36；配列番号37及び配列番号38；配列番号39及び配列番号40；配列番号41及び配列番号42；配列番号43及び配列番号44；配列番号45及び配列番号46；配列番号47及び配列番号48；配列番号49及び配列番号50；または配列番号51及び配列番号52を含むかまたはそれらの中に含まれる成熟V H及びV Lアミノ酸配列を含む抗O X 4 0 m A b の6つの免疫グロブリン相補性決定領域H C D R 1、H C D R 2、H C D R 3、L C D R 1、L C D R 2、及びL C D R 3、またはそのC D Rの1つもしくは複数において1、2、3、4、もしくは5つの单一アミノ酸置換を有する6つの免疫グロブリン相補性決定領域を含む。

20

30

【0134】

（表2）抗O X 4 0 アゴニスト抗体V H及びV L配列

参照文献	VH 配列番号	VH (または完全重鎖)	VL 配列番号	VL (または完全重鎖)
US20160137740A1	9	QVQLKESGPGLVQPSQTLSLITCTVSG FSLTGYNLHWVRQPPGKGLEWMGR MRYDGDYYNSVLKSRLSISRDTSK NQVFILKMMNSLQTDITAIYCYTRDGR GDSFDYWGQQGVMTVSS	10	DIVMTQGALPNPVPSGESASITCRSSQ SLVYKDGQTLYLNWFLQRPGQSPQLL TYWMSTRASGVSDRFSGSGSGTYFTL KISRVRRAEDAGVYYCQQVREYPFTFG SGTKLEIK
USP 7550140	11	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSNYTMNWVRQAPGKGLEWVS AISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNS KNITLYLQMNLRAEDTAVYYCAKD RYSQVHYALDYWGQGTLVTVSSAST KGPSVVFPLAPSSKSTSGGTAAIGCLV KDYFPEPVTVSWNSNGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSLGTQT YICNVNHHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPHEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVVDGVEVHNNAKTKPREQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTIASKAKGQPREPQVY TLPSSREEMTKKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESENQOPENNYKTTPPVLD DGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALTHNHYTQKSLSLSPGK	12	DIVMTQSPDSLPTGEPAISCRSSQ SLLHSNGNYLDWYLQKAQGQSPQLL IYLGSNRASGVVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDEVGYYYCQQYYNHPTTF GQGTTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCVCLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGCGNSQESVTEQDSKDSTYSLS STLTLISKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC

参照文献	VH 配列番号	VH (または完全重鎖)	VL 配列番号	VL (または完全重鎖)
USP 7550140	13	EVQLVESGGGLVQPRGSLRLSCAAS GFTFSSYAMNWRQAPGKGLEWVA VISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN KNITLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKD RYITLPNA LDYWGQGTLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KD YTFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVN NHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPHEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVVDGVEVHNAAKTKPREEQYNST YR VVSVLTIVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVY TLPSSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVWEWESNGOPENNYKJTPPVLD DG SFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	14	DIQMTQSPVSLPVTGPGEPASISCRSSQ SLLHSNGNYLDWYLQKPGQSPQLI YLGSNRASGV PDRFSGSGSGTDFTLK ISRVEAEDVGVYYCQQYKSNPPTFGQ GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLIKS GTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDKSTYSSL TTL SKA DYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC

参照文献	VH 配列番号	VH (または完全重鎖)	VL 配列番号	VL (または完全重鎖)
USP 7550140	15	EVQLVESGGGLVHPGGSLRLSCAGS GFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVS AIGTGGGTYYADSVMGRFTISRDNSK NTIYLQMNSLRAEDTAVYYCARYD NVMGLYWFDYWGQGTLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYTFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTPSSSLGTQT YICNVVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVVDGVEVHNAAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVY TLPSSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWEENGQOPENNYKTPPPVLD DGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSPGK	16	EIVLTQSPATLSSLSPGERATLSCRASQ SVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDAS NRATGIPARFGSGSGTDFLTLSLEP EDFAVYYCQQRSNWPPAFGGGTKE IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSSPVTKS FNRGEC
USP 7960515	17	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVS YISSSSSTIDYADSVKGRFTISRDNAK NSIYLQMNSLRDEDTAVYYCARESG WYLFDYWGQGTLVTVSS	18	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQ GISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAAASS LQSGVPSPRFSGSGSGTDFLTLSLQPE DFATYYCQQQNSYPPTFGGGTKEIK

参照文献	VH 配列番号	VH (または完全重鎖)	VL 配列番号	VL (または完全重鎖)
USP 7960515	19	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAAS GFTFDDYAMMHWVRQAPGKGLEWVS GISWNNSGSIGYADSVKGRFTISRDNA KNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKD QSTADYYFYGGMDVWGQGTTVTVSS	20	EIVVTQSPATLSLSPGERATLSCRASQ SVSSYLAWSYQQKPGQAPRLLIYDAS NRATGIPARFSGSGSGTDFLTISLEP EDFAVYYCQQRSSNWPTFGQGTTKVEIK
USP 9006399	21	QVQLVQSGSELKKPGASVVKVSCKAS GYTFDYSMMHWVRQAPGQQLKWM GWINTETGEPTYADDFKGRFVFSLDT SVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCANY YDYVSYAYMDYWGQGTTVTVSS	22	DIQMTQSPSSLASVGDRVITICKASQ DVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSAAS YLYTGVPSPRSFGSGSGTDFFTFTISLQ PEDIATYYCQQHYSTIPRTIFGQGTTKLEIK
USP 9006399	23	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASE YEFPSHDMSWVRQAPGKGLELVAII NSDGGSTYYPDITMERRFTISRDNAK NSIYLQMNSLRAEDTAVYYCARHY DDYYAWFAYWGQGTMVTVSS	24	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASK SVSTSGSYSYMHWYQQKPGQAPRLLI YLASNLSEGVPARFSGSGSGTDFTLTI SSLEPEDFAVYYCQHSREPLPTFGGG TKVEIK
US20140377284A1	25	QVQLVQSGAEVKPGASVVKVSCKAS GYFTSYVMHWVRQAPGQRLEWMG YINPYNDGTYNEKFKGRTVITTSDT ASTAYMELSSLRSEDTAVYYCANY GSSLSMDYWGQGTLVTVSS	26	DIQMTQSPSSLASVGDRVITICRASQ DISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYSR LHSGVVPSPRSFGSGSGTDFLTISLQ EDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTTKVEIKR

参照文献	VH 配列番号	VH (または完全重鎖)	VL 配列番号	VL (または完全重鎖)
US20140377284A1	25	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTSYVMHWVRQAPGQRLEWMGYINPYNDGTKYNEKFKGRTITSDTS ASTAYMELSSLRSEDTAVYYCANYYGSSLMDYWGQGTLVTVSS	28	DIQMTQSPPSSLASVGDRVTITCRASQ DISNYLNWYQQQKPGKAVKLIIYTSRLHSGVPSPFSGSGSGTDTLTISLQ PEDFATYFCQQGNLTPWTFGQGTTKVEIKR
US20140377284A1	27	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTSYVMHWVRQAPGQRLEWIGYINPYNDGTKYNEKFKGRTITSDTS ASTAYMELSSLRSEDTAVYYCANYYGSSLMDYWGQGTLVTVSS	26	DIQMTQSPPSSLASVGDRVTITCRASQ DISNYLNWYQQQKPGKAVKLIIYTSRLHSGVPSPFSGSGSGTDTLTISLQ EDFATYFCQQGNLTPWTFGQGTTKVEIKR
US20140377284A2	27	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTSYVMHWVRQAPGQRLEWIGYINPYNDGTKYNEKFKGRTITSDTS ASTAYMELSSLRSEDTAVYYCANYYGSSLMDYWGQGTLVTVSS	28	DIQMTQSPPSSLASVGDRVTITCRASQ DISNYLNWYQQQKPGKAVKLIIYTSRLHSGVPSPFSGSGSGTDTLTISLQ PEDFATYFCQQGNLTPWTFGQGTTKVEIKR
US20140377284A3	29	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTSYVMHWVRQAPGQRLEWIGYINPYNDGTKYNEKFKGRTITSDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCANYYGSSLMDYWGQGTLVTVSS	26	DIQMTQSPPSSLASVGDRVTITCRASQ DISNYLNWYQQQKPGKAVKLIIYTSRLHSGVPSPFSGSGSGTDTLTISLQ EDFATYFCQQGNLTPWTFGQGTTKVEIKR

参照文献	VH 配列番号	VH (または完全重鎖)	VL 配列番号	VL(または完全重鎖)
US20140377284A4	29	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFKDYTMHWVRQAPGQRLEWIG YTNPYNDGTYNEKFKGRTATLTSOK SASTAYMELSSLRSEDTAVYYCANY YGSSLSDYWGQQGTLVTVSS	28	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQ DISNYLNWYQQKPGKAVKLLIYITS RLHSGVPNSRFSGSGSGTDTLTISLQ PEDEFATYFCQQGNNTLPWTFGQGTKV EIKR
US20140377284A1	30	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS GYTFKDYTMHWVRQAPGQGLEWM GGIYPNNNGGSTYNQNQNFKDRVTTAD KSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR MGYHGPFLDFDVWVGQGTTTVSS	31	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQ DVGAIAVAWYQQKPGKAPKLLIYWA STRHTGVPSRFSGGSGSGTDFTLTISL QPEDFATYYCQQYINYPLTFGGGTKV EIKR
US20140377284A1	30	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS GYTFKDYTMHWVRQAPGQGLEWM GGIYPNNNGGSTYNQNQNFKDRVTTAD KSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR MGYHGPFLDFDVWVGQGTTTVSS	33	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQ DVGAIAVAWYQQKPGKAPKLLIYWA STRHTGVPSRFSGGSGSGTDFTLTISL QPEDFATYYCQQYINYPLTFGGGTKV EIKR
US20140377284A1	32	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS GYTFKDYTMHWVRQAPGQGLEWIG GIYPNNNGGSTYNQNQNFKDRVTLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARM GYHGPFLDFDVWVGQGTTTVSS	31	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQ DVGAIAVAWYQQKPGKAPKLLIYWA STRHTGVPSRFSGGSGSGTDFTLTISL QPEDFATYYCQQYINYPLTFGGGTKV EIKR
US20140377284A1	32	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS GYTFKDYTMHWVRQAPGQGLEWIG GIYPNNNGGSTYNQNQNFKDRVTLTADK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARM GYHGPFLDFDVWVGQGTTTVSS	33	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQ DVGAIAVAWYQQKPGKAPKLLIYWA STRHTGVPSRFSGGSGSGTDFTLTISL QPEDFATYYCQQYINYPLTFGGGTKV EIKR

参照文献	VH 配列番号	VH (または完全重鎖)	VL 配列番号	VL (または完全重鎖)
US20140377284A1	34	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS GYTFKDYTMHWVRQAPGQGLEWIG GIYPNNNGGSTYNQNFKDRATLTVDK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARM GYHGPHLDFDVWGGQGTTTVSS	31	DIQMTQSPSSLASVGDRVTITCKASQ DVGAHAVAWYQQKPGKAPKLLIYWA STRHTGVPSRFSGSQGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQINYPLTFGGTKV EIKR
US20140377284A1	34	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKAS GYTFKDYTMHWVRQAPGQGLEWIG GIYPNNNGGSTYNQNFKDRATLTVDK STSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARM GYHGPHLDFDVWGGQGTTTVSS	33	DIQMTQSPSSLASVGDRVTITCKASQ DVGAHAVAWYQQKPGKAPKLLIYWA STRHTGVPSRFSGSQGTDFTLTISSL QPEDFATYYCQQINYPLTFGGTKV EIKR
US20150038682A1	35	MGRILTSSFLLLIVPAYVLSQVTLRES GPALVKPTQILTLCTTFSGFSLSTSGV GVGWIROPPGKALEWLAIHWWD KYNTALKSGLTISKDTSKNQVVL MTNMDPVIDTAYYCARIDWDGIA WGQGTLTVSS	36	MDFFQVQIFSFLLISASVIMSRGEIVLT QSPATLSSLSPGERATLSCRAASSVSYM HWYQQKPGQAPRPWIYATSNLASGIP ARFGSGSGSGTDFYLTISSLEPEDFAVY YCQQWSSNPWTGGGIKVEIK
USP 8,283,450	37	MEWGPCWVFLVVITLEGVQCGVQLV ESGGGLVQPGGSSLRLSCAASGFTFSS YSMNVWRQAPGKGLEWVSYISSSS TIYYADSVIKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRDEDTAVYYCARGVYTHNGWS FFDYWGQGTLLTVSS	38	MDMRVLAQLLGILLCFPGARCDIQ MTQSPSSLASVGNRVTITCRASQDIS SWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF ATYYCQQQNSYPLTFGQGTRLEIKR

参照文献	VH 配列番号	VH (または完全重鎖)	VL 配列番号	VL (または完全重鎖)
USP 8,283,450	39	MDTLCSTLLLTIPTSWVLSQITLKESG PTLVKPKQTLTLCFTSGFSLSTSGM GVGWRQPPGKALEWLAVIYWDHH QLYSPLSKSRLTTIKDTSKNQVVLTM TNMDPVDTATYYCAHRRGAFQHWG QGTIVTVSSASTKG	40	METPAQLLFLLLWLPDTTGEIVLTQ SPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSY AWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGI PDRFSGSGSGTDFLTLSRLEPEDFAV YCYQQYDSSLTFGGTKVEIKRT
USP 8,283,450	41	MDTLCSTLLLTIPTSWVLSQITLKESG PTLVKPTQTLTLCCTESGFSLSTSGVG VGWIRQPPGKALEWLALIHWDDAER YSPSLKSRLTTIKDTSKNQVVLTMN MDLVDTATYYCAHTRGAFDIWGQG TMVTVSS	42	METPAQLLFLLLWLPDTTGEIVLTQ SPGTLSSLSPGERAHLSCRASQSVSSFL AWYQQKPGQAPRLLIYGAFSRATGIP DRFSGSGSGTDFLTLSRLEPEDFAVY YCQQYDSSRTFGQGTTKVEIK
USP 8,283,450	43	MDTLCSTLLLTIPTSWVLSQITLKESG PTLVKPTQTLTLCCTESGFSLSTSGVG VGWIRQPPGKALEWLALIYWDHHSP YSPSLKSRLTTIKDTSKNQVVLTMN MDPVDTATYYCARTRGAFDIWGQG TMVTVSS	44	MEAPAQLLFLLLWLPDTTGEIVLTQ SPATLSLSPGERATLSCRASQGVSSYL AWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAATGIP ARFSGSGPGTDFLTLSLEPEDFAVY YCQQRSNWHPTFGQGTTKVEIK
USP 8,283,450	45	MTMITPSLVPSDDPLVTAASVLEFAL LIRLTIGQAVVSTQSTGGGLVQPGRS LRLSCAASGFTLDDYGMHWVRQAP GKGLEWVSGISWNSDSIGYVDSVKG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRVEDTA LYYCVKDISGWYSFDYWGQGTLVT VSS	46	MEAPAQLLFLLLWLPDTTGEIVLTQ SPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYL AWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAATGIP ARFSGSGSGTDFLTLSLEPEDFAVY YCQQRSNWHPTFGQGTTKVEIK

参考文献	VH 配列番号	VH (または完全重鎖)	VL 配列番号	VL (または完全重鎖)
US20160137740A1	47	EVQLQESGPSLVKPSQTLSSLTCVVTG DSFTSGYWNWIRKFPGNRLEYMGYI SYNGITYHNPNPSLKSRISITRDTSKNHY YLQLNSVTTEDTATYFCARYRYDYD GGHAMDYWGQGTIVTVSS	48	DIQMTQTTSLSASLGDRVTITCRASQ DISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSK LHSGVPSRFSGSGSRTDYSLTITDLDQ EDIATYFCQQGSALPWTFGQGTTKVEIK
US20160137740A1	49	QVQLQESGPGLVKPSQTLSSLTCAVY GGSFSSSGYWNNWIRKHPGKGLEYIGYI SYNGITYHNPNPSLKSRITINRDTSKNQY SLQLNSVTPEDTAVYYCARYKYDYD GGHAMDYWGQGTIVTVSS	50	DIQMTQSPSSLASVGDRVTITCRASQ DISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSK LHSGVPSRFSGSGSGTDTLTISSSLQP EDFATYYCQQGSALPWTFGQGTTKVEIK
US20150307617A1	51	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS GYTFTDSYMSWVRQAPGQGLEWIG DMYPDNGDSSYNQKFRRERVTRDT STSTAYLELSSLRSEDTAVYYCVLAP RWYFSVWQGTTIVTVSS	52	DIQMTQSPSSLASVGDRVTITCRASQ DISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSR LRSGVPSRFSGSGSGTDFLTISSSLQP DFATYYCQQGHTLPPTFGQGTTKVEIK

【 0 1 3 5 】

ある種の態様では、VHは、それぞれ配列番号9、配列番号11、配列番号13、配列番号15、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、配列番号27、配列番号29、配列番号30、配列番号32、配列番号34、配列番号35、配列番号37、配列番号39、配列番号41、配列番号43、配列番号45、配列番号47、配列番号49、または配列番号51を含むかまたはその中に含まれる成熟VHアミノ酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%

%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95% または 100% 同一なアミノ酸配列を含み得る。

【0136】

ある種の態様では、VLは、それぞれ配列番号10、配列番号12、配列番号14、配列番号16、配列番号18、配列番号20、配列番号22、配列番号24、配列番号26、配列番号28、配列番号31、配列番号33、配列番号36、配列番号38、配列番号40、配列番号42、配列番号44、配列番号46、配列番号48、配列番号50、または配列番号52を含むかまたはその中に含まれる成熟VLアミノ酸配列と少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95% または 100% 同一なアミノ酸配列を含み得る。

10

【0137】

ある種の態様では、VH及びVLアミノ酸配列は、それぞれ配列番号9及び配列番号10；配列番号11及び配列番号12；配列番号13及び配列番号14；配列番号15及び配列番号16；配列番号17及び配列番号18；配列番号19及び配列番号20；配列番号21及び配列番号22；配列番号23及び配列番号24；配列番号25及び配列番号26；配列番号25及び配列番号28；配列番号27及び配列番号26；配列番号27及び配列番号28；配列番号29及び配列番号26；配列番号29及び配列番号28；配列番号30及び配列番号31；配列番号30及び配列番号33；配列番号32及び配列番号31；配列番号32及び配列番号33；配列番号34及び配列番号31；配列番号34及び配列番号33；配列番号35及び配列番号36；配列番号37及び配列番号38；配列番号39及び配列番号40；配列番号41及び配列番号42；配列番号43及び配列番号44；配列番号45及び配列番号46；配列番号47及び配列番号48；配列番号49及び配列番号50；または配列番号51及び配列番号52を含むかまたはそれらの中に含まれる成熟VH及びVLアミノ酸配列と少なくとも少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95% または 100% 同一なアミノ酸配列を含み得る。

20

【0138】

ある種の態様では、本明細書で提供するとおりの二量体、六量体、または五量体結合分子のOX40抗原結合ドメインは、それぞれ配列番号9及び配列番号10；配列番号11及び配列番号12；配列番号13及び配列番号14；配列番号15及び配列番号16；配列番号17及び配列番号18；配列番号19及び配列番号20；配列番号21及び配列番号22；配列番号23及び配列番号24；配列番号25及び配列番号26；配列番号25及び配列番号28；配列番号27及び配列番号26；配列番号27及び配列番号28；配列番号29及び配列番号26；配列番号29及び配列番号28；配列番号30及び配列番号31；配列番号30及び配列番号33；配列番号32及び配列番号31；配列番号32及び配列番号33；配列番号34及び配列番号31；配列番号34及び配列番号33；配列番号35及び配列番号36；配列番号37及び配列番号38；配列番号39及び配列番号40；配列番号41及び配列番号42；配列番号43及び配列番号44；配列番号45及び配列番号46；配列番号47及び配列番号48；配列番号49及び配列番号50；もしくは配列番号51及び配列番号52を含むかもしくはそれらの中に含まれる成熟VH及びVLアミノ酸配列のHCDR1、HCDR2、及びHCDR3領域、または1つもしくは2つの単一アミノ酸置換を含有するHCDR1、HCDR2、及びHCDR3領域、ならびにLCDR1、LCDR2、及びLCDR3領域、または1つもしくは2つの単一アミノ酸置換を含有するLCDR1、LCDR2、及びLCDR3を含む。

30

【0139】

ある種の態様では、本明細書で提供するとおりの二量体、六量体、または五量体結合分子のOX40抗原結合ドメインは、アミノ酸配列の配列番号49を含むVH、及びアミノ酸配列の配列番号50を含むVLを含む（「抗OX40 #1」）。

40

【0140】

50

ある種の態様では、本明細書で提供するとおりの二量体、六量体、または五量体結合分子のOX40抗原結合ドメインは、アミノ酸配列の配列番号51を含むVH、及びアミノ酸配列の配列番号52を含むVLを含む（「抗OX40 #2」）。

【0141】

「成熟VHアミノ酸配列」または「成熟VLアミノ酸配列」とは、分泌シグナルペプチドが切断された後に残るVHまたはVLアミノ酸配列を意味する。

【0142】

様々な異なる二量体、五量体、及び六量体結合分子が、本開示に基づいて当業者によって企図され得、したがって本開示に含まれる一方で、ある種の態様では、各結合ユニットが、IgAもしくはIgM定常領域またはその断片のアミノ末端側に位置するVHをそれぞれ含む2本のIgAまたはIgM重鎖と、免疫グロブリン軽鎖定常領域のアミノ末端側に位置するVLをそれぞれ含む2本の免疫グロブリン軽鎖とを含む、上記のとおりの結合分子を提供する。
10

【0143】

さらにある種の態様では、結合分子の少なくとも1個の結合ユニット、または結合分子の少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、もしくは少なくとも6個の結合ユニットは、上記のとおりのOX40結合ドメインを2つ含む。ある種の態様では、結合分子の少なくとも1個の結合ユニット、または結合分子の少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、もしくは少なくとも6個の結合ユニットにおける2つのOX40結合ドメインは、相互に異なってもよいし、またはそれらは同一であってもよい。
20

【0144】

ある種の態様では、結合分子の少なくとも1個の結合ユニット、または結合分子の少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、もしくは少なくとも6個の結合ユニット内の2本のIgAまたはIgM重鎖は、同一である。ある種の態様では、結合分子の少なくとも1個の結合ユニット内の、または少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、もしくは少なくとも6個の結合ユニット内の2本の同一のIgAまたはIgM重鎖は、表2に開示のとおりの重鎖可変ドメインアミノ酸配列を含む。

【0145】

ある種の態様では、結合分子の少なくとも1個の結合ユニット、または結合分子の少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、もしくは少なくとも6個の結合ユニット内の2本の軽鎖は、同一である。ある種の態様では、結合分子の少なくとも1個の結合ユニット内の、または少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、もしくは少なくとも6個の結合ユニット内の2本の同一の軽鎖は、カッパ軽鎖、例えば、ヒトカッパ軽鎖、またはラムダ軽鎖、例えばヒトラムダ軽鎖である。ある種の態様では、結合分子の少なくとも1個の結合ユニット内の、または少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、もしくは少なくとも6個の結合ユニット内の2本の同一の軽鎖はそれぞれ、表2に開示のとおりの軽鎖可変ドメインアミノ酸配列を含む。
30

【0146】

ある種の態様では、本開示が提供する二量体、五量体、または六量体結合分子の少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、または少なくとも6個の結合ユニットは、表2に開示のとおりの同一の重鎖可変ドメインアミノ酸配列をそれぞれ含む2つの同一のIgAまたはIgM重鎖定常領域、ならびに表2に開示のとおりの同一の重鎖可変ドメインアミノ酸配列をそれぞれ含む2本の同一の軽鎖を含むか、またはそれぞれが含む。この態様によれば、結合分子の少なくとも1個の結合ユニット、または結合分子の少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、もしくは少なくとも6個の結合ユニット中のOX40結合ドメインは、同一であってよい。さらにこの態様によれば、本明細書で提供するとおりの二量体、五量体、または六量体結合分子は、上記のとおりのOX40結合ドメインを少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9
40

、少なくとも 10、少なくとも 11、または少なくとも 12 コピー含み得る。ある種の態様では、少なくとも 2、少なくとも 3、少なくとも 4、少なくとも 5、または少なくとも 6 個の結合ユニットは同一であってよく、ある種の態様では、結合ユニットは同一の結合ドメインを含んでよく、例えば、少なくとも 2、少なくとも 3、少なくとも 4、少なくとも 5、少なくとも 6、少なくとも 7、少なくとも 8、少なくとも 9、少なくとも 10、少なくとも 11、または少なくとも 12 個の O X 4 0 結合ドメインは同一であってよい。

【 0 1 4 7 】

ある種の態様では、本明細書で提供するとおりの二量体、五量体、または六量体 O X 4 0 アゴニスト結合分子は、同じ抗原結合ドメインを有する対応する二価結合分子と比較して、有利な構造的または機能的特性を有し得る。ある種の態様では、本明細書で提供するとおりの二量体、五量体、または六量体結合分子は、同じ結合ドメインを含む等量の单一特異性二価 Ig G 抗体またはその断片よりも高い効力で、O X 4 0 発現細胞、例えば、T 細胞、例えば、T reg または活性化工フェクター CTL の活性化を開始させ得る。ある種の態様では、本明細書で提供するとおりの二量体、五量体、または六量体結合分子は、細胞の表面上の複数の、例えば、3 個以上の O X 4 0 受容体をより効率的に架橋させることができ、及び／または二次架橋部分、例えば、これに限定されないが、Fc R の非存在下で、細胞の表面上の複数の、例えば、3 個以上の O X 4 0 受容体を効果的に架橋させることができ、それによって、抗腫瘍免疫を促進することができる。本明細書で提供するとおりの二量体、五量体、または六量体結合分子の結合によって受容体が活性化されると、細胞、例えば、T 細胞、例えば、T reg または活性化工フェクター CTL は、同じ抗原結合ドメインを含む等量の单一特異性二価 Ig G 抗体またはその断片（この場合、この抗体は、表 2 に示されている抗体と同じ VH 及び VL 領域を含むか、またはこの抗体は、例えば、9B12、KHK4083、Medi0562、PF-04518600、及び／または GS K3174998 である）よりも、より効果的に活性化され得、次いで、改善された抗腫瘍免疫を誘導することができる。

10

20

30

40

50

【 0 1 4 8 】

ポリヌクレオチド、ベクター、及び宿主細胞

本開示はさらに、上記のとおりの二量体、五量体、または六量体結合分子のポリペプチドサブユニットをコードする核酸配列を含むポリヌクレオチド、例えば、単離された、組換え、及び／または天然に存在しないポリヌクレオチドをさらに提供する。「ポリペプチドサブユニット」とは、独立して翻訳され得る、結合分子、結合ユニット、または抗原結合ドメインの部分を意味する。例には、限定ではないが、抗体可変ドメイン、例えば、VH または VL、J鎖、分泌成分、一本鎖 Fv、抗体重鎖、抗体軽鎖、抗体重鎖定常領域、抗体軽鎖定常領域、及び／またはその任意の断片、バリエント、もしくは誘導体が含まれる。

【 0 1 4 9 】

ある種の態様では、ポリペプチドサブユニットは、Ig M もしくは Ig A 重鎖定常領域またはその断片、及び O X 4 0 抗原結合ドメインの VH 部分を含むことができる。ある種の態様では、ポリヌクレオチドは、VH の C 末端に融合されたヒト Ig M もしくは Ig A 定常領域またはその断片を含むポリペプチドサブユニットをコードすることができ、その際、VH は、アミノ酸配列の配列番号 9、配列番号 11、配列番号 13、配列番号 15、配列番号 17、配列番号 19、配列番号 21、配列番号 23、配列番号 25、配列番号 27、配列番号 29、配列番号 30、配列番号 32、配列番号 34、配列番号 35、配列番号 37、配列番号 39、配列番号 41、配列番号 43、配列番号 45、配列番号 47、配列番号 49、または配列番号 51 を含むかまたはその中に含まれる HCDR1、HCDR2、及び HCDR3 領域、または VH の 1 つもしくは 2 つの單一アミノ酸置換を含有する HCDR1、HCDR2、及び HCDR3 領域を含む。

【 0 1 5 0 】

ある種の態様では、ポリペプチドサブユニットは、上記のとおりの O X 4 0 抗原結合ドメインの抗体 VL 部分を含むことができる。ある種の態様では、ポリペプチドサブユニッ

トは、V L の C 末端に融合されたヒト抗体軽鎖定常領域またはその断片を含むことができ、その際、V L は、アミノ酸配列の配列番号 1 0、配列番号 1 2、配列番号 1 4、配列番号 1 6、配列番号 1 8、配列番号 2 0、配列番号 2 2、配列番号 2 4、配列番号 2 6、配列番号 2 8、配列番号 3 1、配列番号 3 3、配列番号 3 6、配列番号 3 8、配列番号 4 0、配列番号 4 2、配列番号 4 4、配列番号 4 6、配列番号 4 8、配列番号 5 0、または配列番号 5 2 を含むかまたはその中に含まれる L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3 領域、または V L の 1 つまたは 2 つの单一アミノ酸置換を含有する L C D R 1、L C D R 2、及び L C D R 3 領域を含む。

【0151】

ある種の態様では、ポリヌクレオチドは、V H の C 末端に融合されたヒト I g M もしくは I g A 定常領域またはその断片を含むポリペプチドサブユニットをコードすることができ、その際、V H は、配列番号 9、配列番号 1 1、配列番号 1 3、配列番号 1 5、配列番号 1 7、配列番号 1 9、配列番号 2 1、配列番号 2 3、配列番号 2 5、配列番号 2 7、配列番号 2 9、配列番号 3 0、配列番号 3 2、配列番号 3 4、配列番号 3 5、配列番号 3 7、配列番号 3 9、配列番号 4 1、配列番号 4 3、配列番号 4 5、配列番号 4 7、配列番号 4 9、または配列番号 5 1 を含むかまたはその中に含まれる成熟 V H アミノ酸配列のいずれか 1 つまたは複数と少なくとも 6 0 %、少なくとも 6 5 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 % または 1 0 0 % 同一なアミノ酸配列を含む。

【0152】

ある種の態様では、ポリヌクレオチドは、V L の C 末端に融合されたヒト軽鎖定常領域またはその断片を含むポリペプチドサブユニットをコードすることができ、その際、V L は、配列番号 1 0、配列番号 1 2、配列番号 1 4、配列番号 1 6、配列番号 1 8、配列番号 2 0、配列番号 2 2、配列番号 2 4、配列番号 2 6、配列番号 2 8、配列番号 3 1、配列番号 3 3、配列番号 3 6、配列番号 3 8、配列番号 4 0、配列番号 4 2、配列番号 4 4、配列番号 4 6、配列番号 4 8、配列番号 5 0、または配列番号 5 2 を含むかまたはその中に含まれる成熟 V L アミノ酸配列のいずれか 1 つまたは複数と少なくとも 6 0 %、少なくとも 6 5 %、少なくとも 7 0 %、少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 % または 1 0 0 % 同一なアミノ酸配列を含む。

【0153】

したがって、抗原結合ドメインを形成するために、O X 4 0 に特異的に結合する抗体の可変領域を、I g M 及び / または I g A 構造のための発現ベクターテンプレートに挿入し、それによって、少なくとも 2 個の二価結合ユニットを有する多量体結合分子を作製することができる。簡略には、重鎖及び軽鎖可変ドメイン配列をコードする核酸配列を既存の分子から合成または增幅させ、適性な方向で、かつ発現すると、ベクターが全長重鎖または軽鎖をもたらすであろうインフレームで、ベクターに挿入することができる。これらの目的のために有用なベクターは、当技術分野で公知である。そのようなベクターはまた、所望の鎖の発現を達成するために必要なエンハンサー及び他の配列を含むことができる。多数のベクターまたは単一のベクターを使用することができる。これらのベクターを宿主細胞に遺伝子導入し、次いで、鎖を発現させ、精製する。文献において報告されてきたとおり、発現すると、鎖は十分に機能性の多量体結合分子を形成する。次いで、完全に組み立てられた多量体結合分子を標準的な方法によって精製することができる。発現及び精製プロセスを、必要ならば、商業規模で行うことができる。

【0154】

本開示はさらに、2 つ以上のポリヌクレオチドを含む組成物であって、その 2 つ以上のポリヌクレオチドが上記のとおりの二量体、五量体、または六量体結合分子をまとめてコードし得る組成物を提供する。ある種の態様では、組成物は、O X 4 0 抗原結合ドメインの少なくとも V H を含む I g M 及び / もしくは I g A 重鎖またはその断片、例えば、上記のとおりのヒト I g M 重鎖をコードするポリヌクレオチド、及び O X 4 0 抗原結合ドメインの少なくとも V L を含む軽鎖またはその断片、例えば、ヒトカッパまたはラムダ軽鎖を

10

20

30

40

50

コードするポリヌクレオチドを含み得る。提供するとおりのポリヌクレオチド組成物はさらに、J鎖、例えばヒトJ鎖、またはその断片、バリアント、もしくは誘導体をコードするポリヌクレオチドを含み得る。ある種の態様では、本明細書で提供するとおりの組成物を構成するポリヌクレオチドは、2つ、3つ以上の別々のベクター、例えば、発現ベクター上に位置し得る。そのようなベクターは本開示によって提供される。ある種の態様では、本明細書で提供するとおりの組成物を構成するポリヌクレオチドの2つ以上は、単一のベクター、例えば、発現ベクター上に位置し得る。そのようなベクターは本開示によって提供される。

【0155】

本開示はさらに、本明細書で提供するとおりの二量体、五量体、もしくは六量体のOX40アゴニスト結合分子またはその任意のサブユニットをコードする1つのポリヌクレオチドまたは2つ以上のポリヌクレオチド、本明細書で提供するとおりのポリヌクレオチド組成物、あるいは本明細書で提供するとおりの二量体、五量体、もしくは六量体OX40アゴニスト結合分子またはその任意のサブユニットをまとめてコードする1つのベクターまたは2つ、3つ以上のベクターを含む宿主細胞、例えば原核または真核宿主細胞を提供する。ある種の態様では、本開示によって提供される宿主細胞は、本開示が提供するとおりの二量体、五量体、もしくは六量体のOX40アゴニスト結合分子、またはそのサブユニットを発現し得る。

10

【0156】

関連態様では、本開示は、本開示が提供するとおりの二量体、五量体、または六量体OX40アゴニスト結合分子を生成する方法であって、上記のとおりの宿主細胞を培養すること、及び結合分子を回収することを含む方法を提供する。

20

【0157】

使用の方法

本開示は、本明細書で提供するとおりの二量体、五量体、または六量体IgAまたはIgMベースのOX40アゴニスト結合分子を使用して、OX40を発現する細胞においてシグナル伝達を活性化させるための改善された方法を提供する。下記の方法は、限定ではないが、表2に示されている抗体、またはそのバリアント、誘導体、もしくは類似体を含む任意の既存のOX40抗体に由来するOX40結合ドメインを含む結合分子を利用することができます、その際、二量体、五量体、または六量体OX40アゴニスト結合分子は、同等の二価抗体、断片、バリアント、誘導体、または類似体と比較して、OX40発現細胞において、改善された活性を提供し得る。例えば、本明細書で提供するとおりの二量体、五量体、または六量体結合分子が3つ以上の受容体モノマーに結合することによって受容体が活性化すると、細胞、例えば、T細胞、例えば、Tregまたは活性化工エフェクターCTLは、細胞においてシグナル伝達経路を開始させることができ、それによって、抗腫瘍免疫を誘導することができる。ある種の態様では、二量体、五量体、または六量体OX40アゴニスト結合分子の使用は、同等の単一結合ユニット分子よりも、効力のあるT細胞活性化をもたらすことができ、次いで、腫瘍微小環境において、例えば、サイトカイン放出、CTL増殖、腫瘍細胞の死滅、及び/またはTreg細胞の抑制作用の中止によって、より効力のある抗腫瘍免疫を誘導することができる。本開示に基づいて、目的の任意のOX40結合ドメインを含む、二量体、五量体、または六量体IgAまたはIgMベースのOX40アゴニスト結合分子の構築は、十分に当業者の能力の範囲内である。活性の改善により、例えば、使用される用量の低減を可能にできるか、以前は治療不可能なままであったがんを処置することができるか、またはより有効か、もしくは長期持続する抗腫瘍免疫をもたらすことができる。

30

【0158】

ある種の態様では、本開示は、OX40を発現する細胞、例えば、T細胞、例えば、Tregまたは活性化工エフェクターCTLを活性化させる方法であって、OX40発現細胞を、本明細書に記載のとおりの二量体、五量体、または六量体OX40アゴニスト結合分子と接触させることを含み、その際、結合分子が、OX40発現細胞の活性化、または活

40

50

性化の増強を開始させ得る方法を提供する。細胞が CTL である場合、「活性化」には、限定ではないが、OX40 の表面発現、増殖、炎症性サイトカインの産生、CD4 + CD25 + FoxP3 + Treg 細胞の阻害作用に対する抵抗性の増加、及び / または腫瘍細胞の死滅の増強が含まれ得る。細胞が Treg である場合、「活性化」には、限定ではないが、腫瘍微小環境において抗腫瘍免疫を抑制する細胞の能力の妨害が含まれ得る。ある種の態様では、OX40 発現細胞と、本明細書に記載のとおりの二量体、五量体、または六量体 OX40 アゴニスト結合分子との接触は、OX40 発現の増加、及び細胞表面上での OX40 の多量体化、及び細胞表面の脂質ラフトへの OX40 モノマーの移動 (Crot, M, et al., Immunol Rev. 229: 173 - 191 (2009)) を誘導し得る。ある種の態様では、本明細書に記載のとおりの二量体、五量体、または六量体 OX40 アゴニスト結合分子と、OX40 発現細胞、例えば、T 細胞、例えば、OX40 を発現する Treg または活性化工フェクター CTL との接触は、同じく、または同等の OX40 結合ドメインを含む等量の单一特異性二価 IgG 抗体またはその断片よりも高い効力で、細胞の活性化をもたらし得る。ある種の態様では、本明細書で提供するとおりの二量体、五量体、または六量体 OX40 アゴニスト結合分子と、OX40 発現細胞、例えば、T 細胞、例えば、OX40 を発現する Treg または活性化工フェクター CTL との接触は、例えば、FcR による二次架橋を必要とせずに、細胞の活性化をもたらし得、その際、同等の OX40 結合ドメインを含む等量の单一特異性二価 IgG 抗体またはその断片は、二次架橋を必要とするであろう。

10

20

30

【0159】

また別の態様では、本明細書で提供するとおりの二量体、五量体、または六量体 OX40 アゴニスト結合分子は、がん処置を必要とする対象に有効用量として投与された場合に、例えば、腫瘍成長を遅らせる、腫瘍成長を失速させる、または既存腫瘍のサイズを減少させることによって、がん処置を促進し得る。本開示は、処置を必要とする対象に、本明細書で提供するとおりの二量体、五量体、または六量体 OX40 アゴニスト結合分子の有効用量を投与することを含む、がんを処置する方法を提供する。

【0160】

「がん」、「腫瘍」、「がん性」、及び「悪性」という用語は、典型的に未制御の細胞成長によって特徴付けられる哺乳類における生理的状態を指すか、または説明する。がんの例には、これに限定されないが、腺癌を含む癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、黒色腫、肉腫、及び白血病が含まれる。そのようながんのより詳細な例には、扁平上皮癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、胃腸癌、ホジキン及び非ホジキンリンパ腫、膵臓癌、神経膠芽細胞腫、膠腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝細胞癌及び肝細胞癌などの肝癌、膀胱癌、乳癌（ホルモン媒介性乳癌を含む、例えばInnes et al. (2006) Br. J. Cancer 94: 1057 - 1065 を参照されたい）、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、骨髄腫（多発性骨髄腫など）、唾液腺癌、腎細胞癌及びウィルムス腫瘍などの腎臓癌、基底細胞癌、黒色腫、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、睾丸癌、食道癌、これに限定されないが扁平上皮細胞癌を含む様々な型の頭頸部癌、ならびに粘液性卵巣癌、胆管癌（肝臓）、及び乳頭状腎癌などの粘液起源の癌が含まれる。

40

【0161】

本開示はさらに、それを必要とする対象においてがんを予防または処置する方法であって、本明細書で提供するとおりの二量体、五量体、または六量体 OX40 アゴニスト結合分子またはその多量体抗原結合断片、その結合分子、または本明細書に記載のとおりのポリヌクレオチド、ベクター、もしくは宿主細胞を含む組成物または製剤の有効量を対象に投与することを含む方法を提供する。

【0162】

「治療上有効な用量または量」または「有効量」では、投与された場合に、がん患者の処置に関して、プラスの免疫治療反応をもたらす二量体、五量体、または六量体 OX40 アゴニスト結合分子の量が意図されている。

【0163】

50

がんを処置するための組成物の有効用量は、投与手段、標的部位、患者の生理的状態、患者がヒトであるかまたは動物であるか、投与されている他の薬物、及び処置が予防的であるかまたは治療的であるかを含む、多くの異なる因子に応じて変動する。通常、患者はヒトであるが、トランスジェニック哺乳類を含む非ヒト哺乳類を処置することもできる。安全性及び有効性を最適化するために、当業者に公知のルーチン的な方法を用いて、処置投薬量を用量設定することができる。

【0164】

処置されるべき対象は、処置を必要とする任意の動物、例えば哺乳類であってよく、ある種の態様では、対象はヒト対象である。

【0165】

その最も簡単な形態では、対象に投与されるべき調製物は、従来の剤形で投与される、本明細書で提供するとおりの二量体、五量体、もしくは六量体結合分子、またはその多量体抗原結合断片であり、これは本明細書の他の箇所で記載するとおりの医薬賦形剤、担体、または希釈剤と組み合わせることができる。

【0166】

ある種の態様では、本明細書で提供するとおりの二量体、五量体、もしくは六量体結合分子を、これに限定されないが、化学療法、放射線療法、または他の免疫調節療法、例えば、がんワクチン、免疫チェックポイント遮断阻害薬、免疫刺激薬、またはCAR-T細胞などの養子細胞移植を包含する、他のがん療法と組み合わせて投与してもよい。

【0167】

本開示の組成物は、任意の適切な方法によって、例えば、非経口で、脳室内で、経口で、吸入スプレーによって、局所で、直腸内で、経鼻で、頬側で、膣内で、または埋め込み式レザバーを介して投与することができる。「非経口」という用語は、本明細書で使用する場合、皮下、静脈内、筋肉内、関節内、滑液嚢内、胸骨内、髄腔内、肝臓内、病変内、及び頭蓋内への注射または注入技法を含む。ある種の態様では、本明細書で提供するとおりのOX40アゴニスト結合分子またはその多量体抗原結合断片を局所で、腫瘍内に、または腫瘍細胞の近傍に、例えば、腫瘍微小環境(TME)内に導入することができる。

【0168】

上述のとおり、限定ではないが、乳房、肺、脾臓、卵巣、腎臓、結腸、及び膀胱の癌、さらには黒色腫、肉腫、及びリンパ腫を含む、すべての型の腫瘍が、潜在的にこのアプローチによる処置に適している。粘膜分布は、ある種のがん、例えば、肺癌、卵巣癌、結腸直腸癌、または扁平上皮癌に対して有益であり得る。本明細書で提供するとおりのOX40アゴニスト結合分子またはその多量体抗原結合断片は、有効となるためにがん細胞または腫瘍自体と接触する必要はなく、本明細書で提供する処置方法が、OX40を発現するがん細胞で有効であり得るとおり、OX40を発現しないがん細胞にも有効であり得ることに留意することが重要である。

【0169】

本明細書で提供する方法において使用するための二量体、五量体、または六量体結合分子は、OX40、例えば、ヒト及び/またはマウスOX40に特異的に結合し得る、本明細書で定義するとおりの2、5、または6個の「結合ユニット」を有する結合分子である。ある種の態様では、本明細書で提供する方法において使用するための二量体、五量体、または六量体結合分子は、それぞれ2、5、または6個の二価結合ユニットを含み、その際、各結合ユニットは2つのIgAもしくはIgM重鎖定常領域またはその断片を含む。ある種の態様では、2つのIgAまたはIgM重鎖定常領域は、ヒト重鎖定常領域である。

【0170】

本明細書で提供する方法において使用するための結合分子が二量体のIgAベースの結合分子である場合、結合分子は、J鎖またはその断片もしくはそのバリエントをさらに含み得、かつ分泌成分またはその断片もしくはそのバリエントをさらに含み得る。

【0171】

10

20

30

40

50

本明細書で提供する方法において使用するための結合分子が五量体の IgM ベースの結合分子である場合、結合分子は、J鎖またはその断片もしくはそのバリアントをさらに含み得る。

【0172】

本明細書で提供する方法において使用するための結合分子の IgA 重鎖定常領域は、その定常領域が、結合分子において所望の機能を果たし得る、例えば、軽鎖定常領域と結合して結合ドメインの形成を促進し得る、または別の結合ユニットと結合して二量体を形成し得る限り、C₁ドメイン、C₂ドメイン、及び／またはC₃ドメインのうちの1つまたは複数を含み得る。ある種の態様では、個々の結合ユニット内の2つのIgA重鎖定常領域またはその断片はそれぞれ、C₃ドメインもしくはその断片、尾片(TP)もしくはその断片、またはC₃ドメイン及びTPもしくはそれらの断片の任意の組み合わせを含む。ある種の態様では、個々の結合ユニット内の2つのIgA重鎖定常領域またはその断片はそれぞれ、C₂ドメインもしくはその断片、C₁ドメインもしくはその断片、またはC₁ドメインもしくはその断片及びC₂ドメインもしくはその断片をさらに含む。

10

【0173】

本明細書で提供する方法において使用するための結合分子の IgM 重鎖定常領域は、その定常領域が、結合分子において所望の機能を果たし得る、例えば、軽鎖定常領域と結合して結合ドメインの形成を促進し得る、または他の結合ユニットと結合して六量体もしくは五量体を形成し得る限り、C_{μ1}ドメイン、C_{μ2}ドメイン、C_{μ3}ドメイン、及び／またはC_{μ4}ドメインのうちの1つまたは複数を含み得る。ある種の態様では、個々の結合ユニット内の2つのIgM重鎖定常領域またはその断片はそれぞれ、C_{μ3}ドメインもしくはその断片、C_{μ4}ドメインもしくはその断片、尾片(TP)もしくはその断片、またはC_{μ3}ドメイン、C_{μ4}ドメイン、及びTP、もしくはそれらの断片の任意の組み合わせを含む。ある種の態様では、個々の結合ユニット内の2つのIgM重鎖定常領域またはその断片はそれぞれ、C_{μ2}ドメインもしくはその断片、C_{μ1}ドメインもしくはその断片、またはC_{μ1}ドメインもしくはその断片及びC_{μ2}ドメインもしくはその断片をさらに含む。

20

【0174】

本明細書で提供する方法において使用するための様々な異なる二量体、五量体、及び六量体結合分子が、本開示に基づいて当業者によって企図され得、したがって本開示に含まれる一方で、ある種の態様では、各結合ユニットが、IgAもしくはIgM定常領域またはその断片のアミノ末端側に位置するVHをそれぞれ含む2つのIgAまたはIgM重鎖と、免疫グロブリン軽鎖定常領域のアミノ末端側に位置するVLをそれぞれ含む2つの免疫グロブリン軽鎖とを含む、本明細書で提供する方法において使用するための結合分子を提供する。

30

【0175】

さらにある種の態様では、本明細書で提供する方法において使用するための結合分子の少なくとも2個の結合ユニット、または本明細書で提供する方法において使用するための結合分子の少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、もしくは少なくとも6個の結合ユニットは、上記のとおりのOX40結合ドメインを2つ含む。ある種の態様では、本明細書で提供する方法において使用するために、本明細書で提供する方法において使用するための結合分子の少なくとも2個の結合ユニット、または少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、もしくは少なくとも6個の結合ユニットにおける2つのOX40結合ドメインは、相互に異なってよく、またはそれらは同一であってもよい。

40

【0176】

ある種の態様では、本明細書で提供する方法において使用するための結合分子の少なくとも2個の結合ユニット、または結合分子の少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、もしくは少なくとも6個の結合ユニット内の2つのIgAまたはIgM重鎖は、同一である。

50

【0177】

ある種の態様では、本明細書で提供する方法において使用するための結合分子の少なくとも2個の結合ユニット、または結合分子の少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、もしくは少なくとも6個の結合ユニット内の2本の軽鎖は、同一である。ある種の態様では、本明細書で提供する方法において使用するための結合分子の少なくとも2個の結合ユニット内の、または少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、もしくは少なくとも6個の結合ユニット内の2本の同一の軽鎖は、カッパ軽鎖、例えばヒトカッパ軽鎖、またはラムダ軽鎖、例えばヒトラムダ軽鎖である。

【0178】

本明細書で提供する方法において使用するための二量体、五量体、または六量体OX40アゴニスト結合分子は、他の結合分子と比較して、有利な構造的または機能的特性を有し得る。例えば、本明細書で提供する方法において使用するための二量体、五量体、または六量体OX40アゴニスト結合分子は、本明細書の他の箇所で記載するとおりの対応するIgG結合分子よりも、インビトロまたはインビボのいずれかでのバイオアッセイにおいて、改善された活性を有し得る。

10

【0179】

医薬組成物及び投与方法

本明細書で提供するとおりの二量体、五量体、または六量体OX40アゴニスト結合分子を調製する方法、及びそれを必要とする対象に投与する方法は、当業者に周知であるか、または本開示を考慮して当業者によって容易に決定される。TNF受容体結合分子の投与経路は、例えば、腫瘍内で、経口で、非経口で、吸入による、または局所であつてよい。非経口という用語は、本明細書で使用する場合、例えば、静脈内、動脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、直腸内、または膣内投与を含む。これらの投与形態が適切な形態として企図される一方で、投与形態の別の例は、注射用の、特に、腫瘍内、静脈内または動脈内の注射または点滴用の液剤である。適切な医薬組成物は、緩衝液（例えば、酢酸、リン酸、またはクエン酸緩衝液）、界面活性剤（例えば、ポリソルベート）、任意選択で安定剤（例えば、ヒトアルブミン）などを含み得る。

20

【0180】

本明細書において論述するとおり、本明細書で提供するとおりの二量体、五量体、または六量体OX40アゴニスト結合分子は、がんのインビボ免疫治療処置のために薬学的有効量で投与することができる。これに関して、開示の結合分子は、投与を容易にするように、及び活性薬剤の安定性を促進するように製剤化できることは分かるであろう。したがって、医薬組成物は、生理食塩水、非毒性緩衝液、防腐剤などの、薬学的に許容される非毒性の滅菌担体を含み得る。本明細書で提供するとおりの二量体、五量体、または六量体TNF受容体結合分子の薬学的有効量は、標的への効率的な結合を達成するために、及び治療効果を達成するために十分な量を意味する。適切な製剤は、Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co.) 16th ed. (1980) に記載されている。

30

【0181】

本明細書で提供するある種の医薬組成物は、例えば、カプセル剤、錠剤、水性懸濁剤、または液剤を含む、許容される剤形で経口投与することができる。ある種の医薬組成物はまた、経鼻エアロゾルまたは吸入によって投与することもできる。そのような組成物は、ベンジルアルコールもしくは他の適切な防腐剤、生物学的利用能を高めるための吸収促進剤、及び/または他の従来の可溶化剤もしくは分散剤を用いて、生理食塩水中の溶液として調製することができる。

40

【0182】

単一剤形を生成するために担体材料と組み合わせることができる、二量体、五量体、または六量体OX40アゴニスト結合分子の量は、例えば処置される対象及び特定の投与様式に応じて変動する。組成物は、単回用量として、複数回用量として、または確立された期間にわたり注入で投与することができる。投薬計画をまた、最適な所望の応答（例えば

50

、治療応答または予防応答)を提供するように調整することもできる。

【0183】

本開示の範囲と一致して、本明細書で提供するとおりの二量体、五量体、または六量体OX40アゴニスト結合分子を、治療効果をもたらすのに十分な量で、治療を必要とする対象に投与することができる。本明細書で提供するとおりの二量体、五量体、または六量体OX40アゴニスト結合分子を、公知の技法に従って、本開示の抗体、またはその多量体抗原結合断片、バリアント、もしくは誘導体を従来の薬学的に許容される担体または希釈剤と組み合わせることによって調製された従来の剤形において、対象に投与することができる。薬学的に許容される担体または希釈剤の形態及び特徴は、それと組み合わされるべき活性成分の量、投与経路、及び他の周知の変数によって規定され得る。

10

【0184】

本開示はまた、がんを処置する、予防する、または管理するための医薬の製造における、本明細書で提供するとおりの二量体、五量体、または六量体OX40アゴニスト結合分子の使用を提供する。

【0185】

本開示は、別段に示さない限り、当技術分野の技能の範囲内にある、細胞生物学、細胞培養、分子生物学、トランスジェニック生物学、微生物学、組換えDNA、及び免疫学の従来技法を用いる。そのような技法は、文献において十分に説明されている。例えば、Sambrook et al., ed. (1989) Molecular Cloning in A Laboratory Manual (2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press); Sambrook et al., ed. (1992) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (Cold Springs Harbor Laboratory, NY); D.N. Glover ed., (1985) DNA Cloning, Volumes I and II; Gait, ed. (1984) Oligonucleotide Synthesis; Mullis et al.、米国特許第4,683,195号明細書; Hames and Higgins, eds. (1984) Nucleic Acid Hybridization; Hames and Higgins, eds. (1984) Transcription And Translation; Freshney (1987) Culture Of Animal Cells (Alan R. Liss, Inc.); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press) (1986); Perbal (1984) A Practical Guide To Molecular Cloning; the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Miller and Calos eds. (1987) Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells, (Cold Spring Harbor Laboratory); Wu et al., eds., Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155; Mayer and Walker, eds. (1987) Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Academic Press, London); Weir and Blackwell, eds., (1986) Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I - IV; Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986); 及びAusubel et al. (1989) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, Baltimore, Md.)を参照されたい。

20

30

40

【0186】

抗体工学の一般的原理は、Borrebaeck, ed. (1995) Antibod

50

y Engineering (2nd ed.; Oxford Univ. Press)に明記されている。タンパク質工学の一般的原理は、Rickwood et al., eds. (1995) Protein Engineering, A Practical Approach (IRL Press at Oxford Univ. Press, Oxford, Eng.)に明記されている。抗体及び抗体-ハプテン結合の一般的原理は、Nisonoff (1984) Molecular Immunology (2nd ed.; Sinauer Associates, Sunderland, Mass.) 及び Steward (1984) Antibodies, Their Structure and Function (Chapman and Hall, New York, N.Y.) に明記されている。加えて、当技術分野において公知であり、かつ具体的に記載されていない免疫学における標準的方法は、Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York; Stites et al., eds. (1994) Basic and Clinical Immunology (8th ed.; Appleton & Lange, Norwalk, Conn.)、及び Mishell and Shiigi (eds.) (1980) Selected Methods in Cellular Immunology (W.H. Freeman and Co., NY)においてのとおり従い得る。
10

【0187】

免疫学の一般的原理を明記している標準的な参考図書には、Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York; Klein (1982) J., Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination (John Wiley & Sons, NY); Kennett et al., eds. (1980) Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyses (Plenum Press, NY); Campbell (1984) "Monoclonal Antibody Technology" in Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, ed. Burden et al., (Elsevier, Amsterdam); Goldsby et al., eds. (2000) Kuby Immunology (4th ed.; W.H. Freeman and Co., NY); Roitt et al. (2001) Immunology (6th ed.; London: Mosby); Abbas et al. (2005) Cellular and Molecular Immunology (5th ed.; Elsevier Health Sciences Division); Kontermann and Dubel (2001) Antibody Engineering (Springer Verlag); Sambrook and Russell (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press); Lewin (2003) Genes VIII (Prentice Hall, 2003); Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press); Dieffenbach and Dveksler (2003) PCR Primer (Cold Spring Harbor Press) が含まれる。
20
30
40

【0188】

上記で引用した参考文献のすべて、さらには本明細書において引用したすべての参考文献は、その全体で参照によって本明細書に組み込まれる。

【0189】

以下の実施例は、実例として提供するものであり、限定として提供するものではない。

50

【実施例】

【0190】

実施例1：抗体生成及び精製

抗OX40 IgM及び抗OX40 IgG #1及び#2

標準的なクローニングプロトコルに従って、例示的な構築物として、表2からの2つの抗OX40抗体のVH及びVL領域をIgM（野生型J鎖を含む）及びIgG型に組み込んだ。抗OX40 #1は、それぞれVH及びVLアミノ酸配列の配列番号49及び配列番号50を含み、抗OX40 #2は、それぞれVH及びVLアミノ酸配列の配列番号51及び配列番号52を含む。これらの抗体構築物を発現させ、下記のとおりに精製した。IgM（J鎖を含む）分子を、次のとおり、還元型及び非還元型ゲル上で分割した。精製抗OX40 IgM抗体を還元及び非還元条件下でSDS-PAGEゲル上で分析した。図1Aは、IgM重鎖及び軽鎖を示すための還元型ゲルを示しており、図1Cは、高分子量IgMを分割するための非還元型ゲルを示している。非還元型ゲルサンプルをNuPage LDS Sample Buffer (Life Technologies #NP0007)と混合し、Native Page Novex 3~12% Bis-Tris Gel (Life Technologies #BN1003)に装填した。Novex Tris-Acetate SDS Running Buffer (Life Technologies #LA0041)をゲル電気泳動のために使用し、ゲルをColloidal Blue Stain (Life Technologies #LC6025)で染色した。還元型ゲルでは、サンプルをサンプル緩衝液及びNuPage還元剤 (Life Technologies #NP0004)と混合し、10分間にわたって80℃に加熱し、NuPage Novex 4~12% Bis-Tris Gel (Life Technologies #NP0322)に装填した。NuPage MES SDS Running Buffer (Life Technologies #NP0002)をゲル電気泳動のために使用し、ゲルをColloidal Blueで染色した。結果は、抗OX40 IgM五量体が均一に集合して、IgM重鎖及び軽鎖を示すことを実証している。

【0191】

IgM五量体におけるJ鎖の存在を確認するために、抗J鎖ウエスタンプロットを行った（図1B）。ウエスタンプロット法では、タンパク質を、製造者指示に従ってiBlot system (Life Technologies)を使用して膜に移動させた。膜を、0.05%Tween-20を含むPBS中2%BSAでブロックし、次いで、iBind system (Life Technologies)を使用して、抗J鎖抗体（Thermo #MA5-16419）と共に、続いて、HRPコンジュゲートした二次抗体（Jackson Immuno Research #111-035-144）と共にインキュベートした。結果は、J鎖が精製抗OX40 IgM抗体に存在したことを実証している。

【0192】

追加の抗OX40 IgM及びIgG構築物

OX86は、それぞれVH及びVLアミノ酸配列の配列番号9及び配列番号10を含むIgG1アイソタイプのラット抗マウスOX40モノクローナル抗体（例えば、eBioscience, Inc.、San Diego、CAから入手可能）である。標準的なクローニングプロトコルに従って、VH及びVLを、ラット、マウス、またはヒトIgM及びIgG型に組み込む。標準的なクローニングプロトコルに従って、選択されたVH及びVL配列、例えば、表2に列挙されているものをヒトIgM及びIgG型に組み込むことによって、抗ヒトOX40 IgMを生成する。加えて、ヒトOX40に対する新たな抗体を生成し、例えば、OX40-OX40L相互作用を妨害する、及び/またはT細胞シグナル伝達の成熟、T細胞増殖、及び/またはサイトカイン分泌を可能にするそれらの能力に基づき選択する。選択された抗体結合ドメインを、従来どおりIgM結合分子として再フォーマットする。

10

20

20

30

40

50

【0193】

タンパク質の発現、精製及び特徴づけ

遺伝子導入。重鎖、軽鎖、及び修飾または未修飾J鎖DNA(IgM五量体構築物で)を、例えば、CHO細胞またはHEK293細胞に遺伝子導入する。発現ベクターのためのDNAをポリエチルアミン(PEI)試薬と混合し、次いで、細胞に添加する。確立された技法に従って、CHO-S細胞でのPEI遺伝子導入を行う(「Biotechnology and Bioengineering, Vol. 87, 553-545」を参照されたい)。

【0194】

例えば、製造者の推奨に従ってMab Select Sure affinity matrix(GE Life Sciences Catalog #17-5438-01)を使用して、IgG発現産物を精製する。

【0195】

例えば、製造者の推奨に従って、Capture Select IgM affinity matrix(BAC、Thermo Fisher Catalog #2890.05)を使用して、J鎖を含むか、または含まないIgM発現産物を精製する。

【0196】

実施例2：抗体の特徴づけ

ELISAによる抗体特異性の測定

ヒトOX40についての、抗OX40 #1及び抗OX40 #2のIgG及びIgMバージョンの特異性を次のとおり、2つの異なる抗原密度で、ELISAアッセイにおいて測定した。ELISAプレートを100mM炭酸水素ナトリウムpH9.5中で希釈された0.4または1.6ng/mLのOX40-Fc(R&D)で終夜コーティングした。すべての後続の洗浄液はPBS+0.05%Tweenを使用し、すべてのインキュベーションステップをブロック緩衝液(PBS中2%BSA)中で行った。プレートを3回洗浄し、1時間にわたってブロックし、次いで、再度洗浄した。次いで、プレートを抗OX40 #1-IgG、抗OX40 #1-IgM、抗OX40 #2-IgG、及び抗OX40 #2-IgMの4倍希釈曲線で、1時間にわたってインキュベートした。洗浄後に、プレートを1:6000のマウス抗ヒトカッパ軽鎖-HRP(Southern Biotech)と共に1時間にわたってインキュベートした。プレートを5回洗浄し、ELISAを、2N H₂SO₄停止溶液を用いるTMB(BD Biosciences)を使用して展開した。プレートをSpectraMax 340(Molecular Devices)で、SoftMax Proソフトウェアを使用してOD450で読み取った。1つの代表的実験からの技術的反復の平均±SEMが示されている。3つの独立した実験を行った。次いで、各コーティング密度で、GraphPad Prismソフトウェアにおいて、Hello勾配で1サイト特異的結合を使用して、Bmaxを計算した。IgM量が抗原感受性を上昇させることを実証するために、IgMに対するIgGの比として、変化倍率を計算した。

【0197】

結果を図2A及び図2B(抗OX40 #1-IgG及び抗OX40 #1-IgM、それぞれ0.4ng/mL及び1.6ng/mL抗原密度)、及び図2C及び図2D(抗OX40 #2-IgG及び抗OX40 #2-IgM、それぞれ0.4ng/mL及び1.6ng/mL抗原密度)に示す。抗OX40 #1-IgMでは、抗体は、0.4ng/mL抗原密度では抗OX40 #1-IgGよりも約2.8倍良好に、かつ1.6ng/mL抗原密度では1.2倍良好に結合した。抗OX40 #2-IgMは、低いほうの密度では抗OX40 #2-IgGよりも4倍良好に、かつ高いほうの密度では約3倍良好に結合した。すべての構築物が、ヒトOX40に特異的に結合した。結果は、特に低い抗原密度で、IgM構築物が、IgGよりもかなり強い結合活性でOX40に結合することを示している。

【0198】

OX86のキメラIgG及びIgMバージョンの特異性を、例えば、次のとおりに、E

10

20

30

40

50

L I S A アッセイにおいて測定する。ヒトまたはマウスOX40の細胞外ドメインは、*h i s* タグタンパク質として利用可能である（例えば、Creative Biomart 製、Shirley、NY）。抗体の多量体型が、低い抗原密度への結合について利点を有するかどうかを決定するために、抗原をプレート上に一連の漸減濃度でコーティングする。この方法では、96 ウェル白色ポリスチレン E L I S A プレート（Pierce 15042）を1 ウェル当たり、10 μg / mL または 0.3 μg / mL の*h i s* タグマウスOX40 細胞外ドメイン 100 μL で終夜、4℃ でコーティングする。次いで、プレートを 0.05% PBS-Tween で洗浄し、2% BSA-PBS でブロックする。プロッキングの後に、OX86-IgM、OX86-IgG（または上記のとおりの他の抗ヒト抗体）、標準、及び対照の系列希釈液 100 μL をウェルに添加し、室温で2 時間にわたってインキュベートする。次いで、プレートを洗浄し、HRP コンジュゲートしたマウス抗ヒトカッパ（Southern Biotech、9230-05。2% BSA-PBS 中で 1:6000 希釈）と共に 30 分間にわたってインキュベートする。0.05% PBS-Tween を使用する 10 回の最終洗浄の後に、プレートを、SuperSignal chemiluminescent substrate（Thermo Fisher、37070）を使用して読み取る。発光データを EnVision plate reader（Perkin-Elmer）に収集し、GraphPad Prism で 4-パラメータロジスティックモデルを使用して解析する。

10

20

30

40

50

【0199】

E L I S A プレートに添付されている*h i s* タグヒトOX40 細胞外ドメインを使用することにより、他の抗ヒトOX40 抗体を使用して同様の実験を実施する。

【0200】

抗原親和性及び選択性の測定

ヒトまたはマウスOX40-Ig（Enzo Life Sciences, Inc.、Farmingdale、NY）、及び対照タンパク質を Maxisorb E L I S A プレート（Nunc、VWR）上に、炭酸水素緩衝液中で 0.2~2.0 μg / mL の濃度でコーティングし、終夜、4℃ でインキュベートする。使用前に、プレートを解凍し、一度洗浄し、次いで、洗浄緩衝液（0.05% Tween-20 を含む PBS）中 0.5% BSA でブロックする。様々な濃度の、実施例 1 に記載のとおりに生成した抗OX40 MAb または対照抗KLH 抗体を添加し、サンプルを 1 時間にわたって室温でインキュベートし、3 回洗浄し、ブロッキング緩衝液中のビオチン化抗ヒトカッパ（Southern Biotech、Birmingham、AL）の 1:7,000 希釈液と共に 1 時間にわたってインキュベートする。次いで、ストレプトアビシン-HRP（Jackson ImmunoResearch、West Grove、PA）を TMB 基質（Thermo Scientific、Rockford、IL）と共に添加し、光学密度を Spectramax plate reader で 650 nm で読み取る。OX40 に対する正味シグナルと他の標的に対する正味シグナルとの比として、選択性を計算する。

【0201】

ForTe Bio Octet 機器を使用し、Biolayer Interferometry (BLI) を使用し、固定化マウスまたはヒトOX40-Ig を使用して、さらなる親和性測定を実施する。市販の抗ヒトOX40 抗体、例えば、Ber-ACT35（BioLegend）または 443318（R&D Systems）、さらには、OX40 リガンド（TNFSF4、BioLegend から入手可能）に対して、エピトープマッピングを評価する。

【0202】

OX40 発現の試験

末梢血単核細胞（PBMC）を、実施例 1 に記載のとおりに生成した抗OX40 MAb で 30 分間にわたって 4℃ で染色する。細胞を洗浄し、抗カッパ-A647 検出抗体で 15 分間にわたって 4℃ で染色し、再び洗浄する。CD4+ 及び CD8+ エフェクター T 細

胞及びCD4+FoxP3+調節性T細胞への結合をフローサイトメトリーによって評価する。

【0203】

T細胞結合アッセイ

活性化T細胞上のOX40に結合する抗OX40#1及び抗OX40#2のIgG及びIgMバージョンの能力を評価するために、結合アッセイを行った。CD8+T細胞で低レベルのOX40(図3A、3C)またはCD4+T細胞で高レベルのOX40(図3B、3D)を誘導するためにHuman T cell Activator Dynabeads(Thermo-Fisher)で3日間にわたって活性化させたPBMCで、Ab結合を試験した。0.5×10⁵細胞/条件を抗OX40#1及び抗OX40#2のIgG及びIgMバージョンの3倍希釈、続いて、20μg/mL Alexa Fluor(登録商標)488抗ヒトIg軽鎖抗体MHK-49で染色した。PBMCでは、CD4+CD3+CD4T細胞及びCD4-CD3+CD8T細胞でゲートするために、抗CD3-A647(Biolegend)及びCD4-PerCP-CY5.5(Biolegend)も含まれた。FACSデータをFACSCalibur(BD)で取得し、FlowJo(TreeStar)で解析し、GraphPad Prismでプロットした。代表的な実験の1つをCD8T細胞(n=3ドナー)及びCD4T細胞(n=5ドナー)について示した。各抗体で、GraphPad Prismソフトウェアにおいて、Hill勾配で1サイト特異的結合を使用して、Kdを計算した。IgM量が抗原感受性を上昇させることを実証するために、IgMに対するIgGの比として、変化倍率を計算した。10 20

【0204】

図3A～Dに示す結果は、抗OX40 IgM抗体が抗OX40 IgG抗体と比較してT細胞への結合の増強を示すことを実証している。図3A及び3Cは、それぞれ、低OX40発現CD8+T細胞を抗OX40#1-IgM及び抗OX40#1-IgGで、または抗OX40#2-IgM及び抗OX40#2-IgGで染色した場合のFACS結果を示している。図3B及び3Dは、高OX40発現CD4+T細胞をそれぞれ抗OX40#1-IgM及び抗OX40#1-IgG、または抗OX40#2-IgM、または抗OX40#2-IgGで染色した場合のFACS結果を示している。抗OX40#1-IgMでは、抗体は、低OX40発現CD8+T細胞では抗OX40#1-IgGよりも約25倍良好に、及び高OX40発現CD4+T細胞では抗OX40#1-IgGよりも6倍良好に結合した。抗OX40#2-IgMは、CD8+T細胞では抗OX40#2-IgGよりも24倍良好に、及びCD4+T細胞では抗OX40#2-IgGよりも約11倍良好に結合した。これらの結果は、IgMがT細胞への結合の増加を示すことを実証している。30

【0205】

実施例1に記載のとおり生成した抗OX40MAbも同様に細胞結合について、例えば、次のとおりに評価することができる。抗体を、刺激された(+抗CD3)または休止(抗CD3なし)T細胞と共に30分間にわたって4℃でインキュベートする。洗浄した後に、細胞を抗カッパA647検出抗体で15分間にわたって4℃で染色する。細胞を再び洗浄し、次いで、フローサイトメトリーによってアッセイする。40

【0206】

T細胞シグナル伝達アッセイ

市販のOX40 Signaling Assay NF-Bリポーターアッセイ(DiscoverX)を使用して、抗体のアゴニスト活性を決定する。製造者プロトコルに従って、アッセイを行った。抗OX40#1-IgG及び抗OX40#1-IgMまたは抗OX40#2-IgG及び抗OX40#2-IgMの2倍希釈液を単独で、または他にも10μg/mLのプレート結合抗ヒトIgG Fcクロスリンカー(Biolegend #409302)と共に、PathHunter U20S OX40 Signaling Assay(DiscoverX)で16時間にわたって、続いて、PK/PL50

基質と共に1時間にわたってインキュベートした。細胞を溶解し、ルミノメータで読み取った。抗体の最高濃度からのRLUを使用して、IgGと比較して、IgMによるシグナル伝達の強度(変化倍率)の上昇を計算した。

【0207】

図4に示されている結果は、抗OX40 IgM抗体が、架橋及び非架橋抗OX40 IgG抗体の両方と比較して、NF-B経路の活性の上昇を示すことを実証している。抗OX40 #1-IgMでは、抗体は、非架橋抗OX40 #1-IgGと比較すると、NF-B活性の23倍の上昇、及び架橋抗OX40 #1-IgG抗体と比較すると、シグナル伝達活性の13倍の上昇を示した(図4A)。抗OX40 #2-IgMでは、抗体は、非架橋抗OX40 #2-IgGと比較すると、NF-kB活性化の4倍の増加、及び架橋抗OX40 #2-IgG抗体ではシグナル伝達活性化の2倍の増加を示した(図4B)。これらの結果は、スーパーアゴニストとして作用するIgM構築物の能力を実証している。

10

【0208】

別法では、市販のOX40発現NF-kBリポーター・アッセイ(Promega)を使用して、抗体のアゴニスト活性を実証する。実施例1に記載のとおりに生成された抗OX40 Mabをプレート上に、抗CD3 Mabを伴って、または伴わずに1時間にわたってコーティングし、次いで、プレートをレポーター細胞と共に4時間にわたって37℃でインキュベートする。次いで、細胞を溶解し、ルミノメータで読み取る。

20

【0209】

T細胞増殖アッセイ

実施例1において記載したとおりに生成された抗OX40 Mabをプレート上に、抗CD3 Mabを伴って、または伴わずに1時間にわたってコーティングし、次いで、ナイーブT細胞をプレーティングする。15時間後に、T細胞増殖を、Cell Titer Glo luminescent reagent(Promega)を使用して測定する。調節性T細胞の存在下でのエフェクターT細胞増殖を評価するために、エフェクタ-T細胞をカルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル(CFSE)色素で標識し、調節性T細胞と1:1の比で混合し、次いで、抗CD3を伴うか、または伴わずに抗OX40 Mabで事前コーティングされたプレートに添加する。エフェクターT細胞増殖をフローサイトメトリーによってモニターする。

30

【0210】

T細胞活性化及びサイトカイン分泌

T細胞を、抗CD3抗体の存在下または非存在下で、実施例1において記載したとおりに生成された抗OX40 Mabで刺激する。24時間後に、IFN+及びTNF+T細胞をフローサイトメトリーによって解析する。加えて、上清に分泌されたサイトカインIL-2及びIFN-を、標準的なELISAキットを使用して測定する。

40

【0211】

T細胞媒介性細胞傷害性

エフェクターT細胞を、腫瘍細胞特異的ペプチドで7日間にわたって刺激する。マウスCT26結腸腫瘍細胞またはA20B細胞リンパ腫細胞をCFSE色素で標識し、次いで、活性化T細胞及び実施例1において記載したとおりに生成された抗OX40 Mabと混合する。24時間後に、腫瘍細胞細胞傷害性をフローサイトメトリーによって測定する。

【0212】

インビボ活性

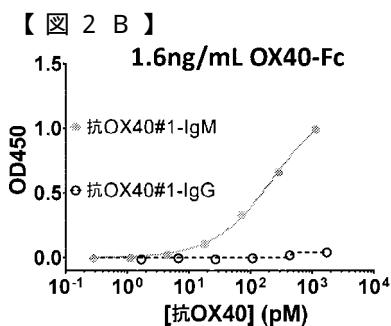
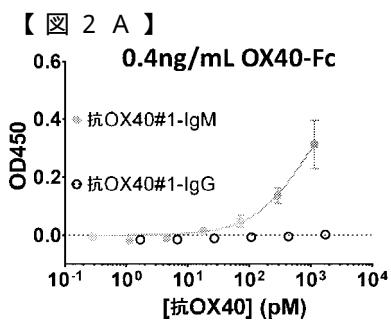
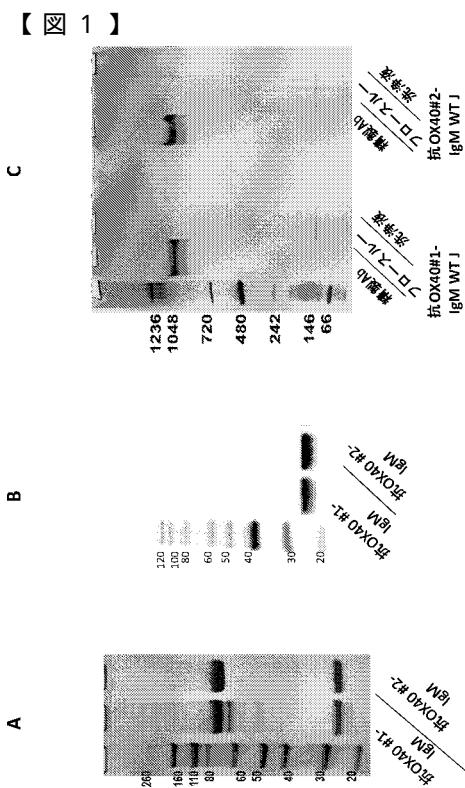
OX86 IgM及びOX86 IgG抗体では、同系マウスマodelを使用する。Balb/cマウスに、CT26またはA20腫瘍細胞を皮下移植し、次いで、マウスを腫瘍サイズに従って無作為化する。次いで、動物にOX86 IgG、OX86 IgM、またはビヒクル対照を投与し、腫瘍体積を測定する。

【0213】

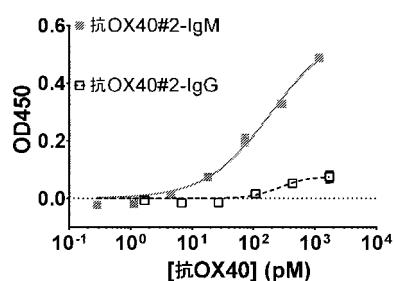
実施例1において記載したとおりに生成された抗ヒトOX40 Mabでは、OX40ノックインHugemmマウスマodelを使用する(Crown Bio)。マウスマodelで

50

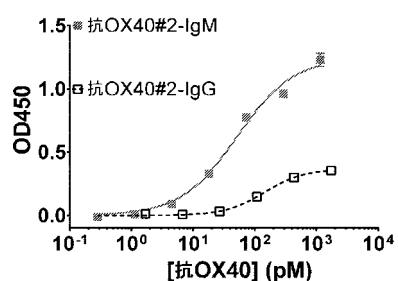
は、マウスOX40をノックアウトし、ヒトOX40に置き換える。CT26またはA20腫瘍を皮下移植し、マウスに、抗OX40 IgGまたはIgMまたはビヒクルを投与し、腫瘍体積を測定する。



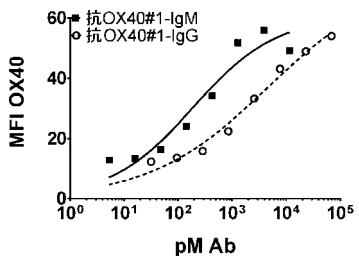
【図 2 C】
0.4ng/mL OX40-Fc



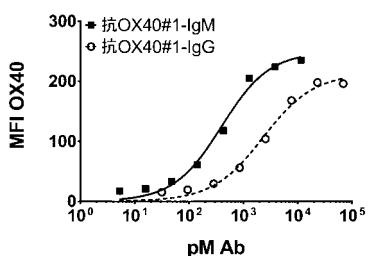
【図 2 D】
1.6ng/mL OX40-Fc



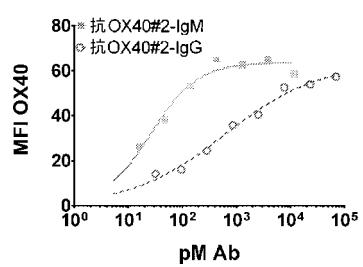
【図 3 A】
CD8 T 細胞 - 低 OX40



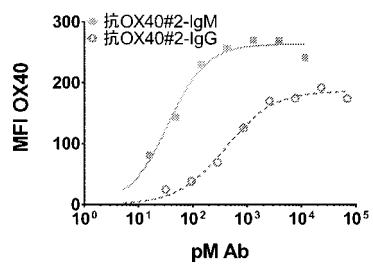
【図 3 B】
CD4 T 細胞 - 高 OX40



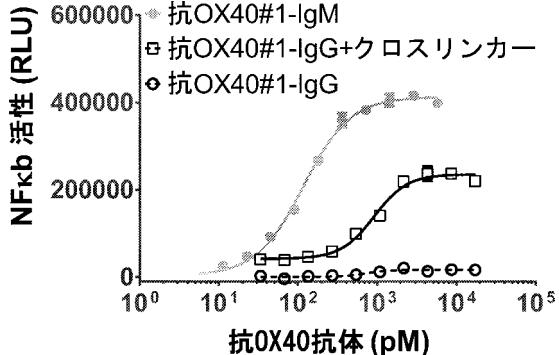
【図 3 C】
CD8 T 細胞 - 低 OX40



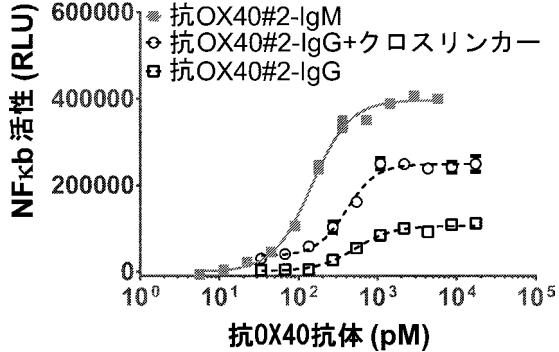
【図 3 D】
CD4 T 細胞 - 高 OX40



【図 4 A】
NF_κb 活性 (RLU)



【図 4 B】
NF_κb 活性 (RLU)



【手続補正書】

【提出日】平成31年3月19日(2019.3.19)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2019530640000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US17/43165
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC - A61K 39/395; C07K 16/28, 16/46; C12N 5/0783, 5/09; G01N 33/50, 33/53, 33/566 (2017.01) CPC - A61K 39/395, 39/39558; C07K 16/28, 16/2896, 16/30, 16/468; C12N 5/0636, 5/0637, 5/0693; G01N 33/5041, 33/505, 33/53, 33/563, 33/566		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2015/0098942 A1 (CURTI, B et al.) 9 April 2015; paragraphs [0011], [0023], [0025], [0040], [0049], [0052], [0053], [0057], [0073], [0078], [0081], [0082], [0136], [00156]; Figure 7	1-2, 3/1-2, 4/3/1-2 6/3/1-2
Y	US 2015/0132288 A1 (SIMONS, PJ et al.) 14 May 2015; abstract; paragraphs [0009], [0040], [0169]	6/3/1-2
P, X	(ZHANG, D et al.) Fc Engineering Approaches to Enhance the Agonism and Effector Functions of an Anti-OX40 Antibody. Journal of Biological Chemistry. 30 December 2016, Epub 17 November 2016, Vol. 291, No. 53; pages 27134-27146; DOI: 10.1074/jbc.M116.757773	1-2, 3/1-2, 4/3/1-2, 6/3/1-2
E, X	WO 2017/123673 A2 (INHIBRX LP) 20 July 2017; entire document	1-2, 3/1-2, 4/3/1-2, 6/3/1-2
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 16 October 2017 (16.10.2017)	Date of mailing of the international search report 02 NOV 2017	
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US17/43165

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

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

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

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

3. Claims Nos.: 5, 7-46 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51) Int.CI.	F	I	テマコード(参考)
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K	31/7088	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 7
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	Y
	A 6 1 K	39/395	T

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT

(特許序注：以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

(74)代理人	100142929 弁理士 井上 隆一
(74)代理人	100148699 弁理士 佐藤 利光
(74)代理人	100128048 弁理士 新見 浩一
(74)代理人	100129506 弁理士 小林 智彦
(74)代理人	100205707 弁理士 小寺 秀紀
(74)代理人	100114340 弁理士 大関 雅人
(74)代理人	100114889 弁理士 五十嵐 義弘
(74)代理人	100121072 弁理士 川本 和弥
(72)発明者	ワン ベアトリス テン - イー アメリカ合衆国 9 4 0 4 0 カリフォルニア州 マウンテンビュー ウィリアムズ ウェー 8 6 0 # 4
(72)発明者	ロスナー ダリア リブカ アメリカ合衆国 9 4 0 6 1 カリフォルニア州 レッドウッド シティ オーク アベニュー 4 5 3
(72)発明者	バリガ ラメッシュ アメリカ合衆国 9 4 0 6 2 カリフォルニア州 レッドウッド シティ ホプキンス アベニュー - 2 2 3 7

(72)発明者 ケイト ブルース アラン

アメリカ合衆国 94010 カリフォルニア州 ヒルズバラ レイクビュー ドライブ 118
0

F ターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 DA01
4B065 AA91X AA93X AB01 AC14 BA02 CA25 CA44
4C084 AA13 MA13 MA31 MA52 MA56 MA59 MA60 MA65 MA66 MA67
NA14 ZB221 ZB222 ZB261 ZB262
4C085 AA02 AA16 BB33 BB37 CC22 CC23 DD62 EE01 GG02 GG03
GG04 GG06 GG08
4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB22 ZB26
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 DA76 EA28 FA74