(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2020年2月13日(13.02.2020)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2020/032230 A1

(51) 国際特許分類:
C07K 16/28 (2006.01) *C12N 1/19* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)
A61K 47/64 (2017.01) *C12N 5/10* (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01) *C12N 15/13* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C12N 15/63* (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) *C12P 21/08* (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2019/031554

(22) 国際出願日： 2019年8月9日(09.08.2019)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2018-152126 2018年8月10日(10.08.2018) JP

(71) 出願人:中外製薬株式会社(**CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA**) [JP/JP]; 〒1158543 東京都北区浮間５丁目５番１号 Tokyo (JP).

(72) 発明者:井川 智之(**IGAWA, Tomoyuki**); 138623 バイオポリス ドライブ ３ シナプス ＃０７－１１／１６ 中外ファーマボディ・リサーチ・ピーティーイー・リミテッド内 Singapore (SG). 櫻井 実香(**SAKURAI, Mika**); 〒4128513 静岡県御殿場市駒門１丁目１３５番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 清水 駿(**SHIMIZU, Shun**); 〒4128513 静岡県御殿場市駒門１丁目１３５番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 堀 裕次(**HORI, Yuji**); 〒4128513 静岡県御殿場市駒門１丁目１３５番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 廣庭 奈緒香(**HIRONIWA, Naoka**); 138623 バイオポリス ドライブ ３ シナプス ＃０７－１１／１６ 中外ファーマボディ・リサーチ・ピーティーイー・リミテッド内 Singapore (SG). セーボレー 那沙(**SAVORY, Nasa**); 〒4128513 静岡県御殿場市駒門１丁目１３５番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 成田 義規(**NARITA, Yoshinori**); 〒2478530 神奈川県鎌倉市梶原２００番地 中外製薬株式会社内 Kanagawa (JP). 上川 雄之(**KAMIKAWA, Takayuki**); 〒2478530 神奈川県鎌倉市梶原２００番地 中外製薬株式会社内 Kanagawa (JP). 宮崎 太郎(**MIYAZAKI, Taro**); 〒1038324 東京都中央区日本橋室町２丁目１番１号 中外製薬株式会社内 Tokyo (JP). 門野 正次郎(**KADONO, Shojiro**); 〒4128513 静岡県御殿場市駒門１丁目１３５番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 長谷川 雅巳(**HASEGAWA,**

(54) **Title:** ANTI-CD137 ANTIGEN-BINDING MOLECULE AND UTILIZATION THEREOF

(54) 発明の名称： 抗ＣＤ１３７抗原結合分子およびその使用

(57) **Abstract:** The purpose of the present disclosure is to provide anti-CD137 antigen-binding molecules that have an effect of activating immunocytes, a cytotoxic activity or an antitumor activity and yet scarcely affect non-tumor tissues such as normal tissues and have few side effects, and a method for using these molecules. By finding a CD137 antigen-binding molecule that shows a change in CD137-binding activity depending on various substances (for example, a low molecular compound) in a target tissue and producing the molecule, provided is an anti-CD137 antigen-binding molecule that has an effect of activating immunocytes, a cytotoxic activity or an antitumor activity and yet scarcely affects non-tumor tissues such as normal tissues and has few side effects. Also provided are a method for using the anti-CD137 antigen-binding molecule, a pharmaceutical formulation, etc. The present disclosure also provides an antigen-binding molecule showing a change in antigen-binding activity depending on a low molecular compound, a method for producing the molecule and utilization of the same.

(57) 要約：本開示は、免疫細胞の活性化作用、細胞傷害活性、または抗腫瘍活性を有しながら、正常組織等の非腫瘍組織に対する作用が低く、副作用が少ない抗CD137抗原結合分子、およびそれらを使用する方法を提供することを目的とする。 標的組織における各種の物質（例えば、低分子化合物）に依存してCD137への結合活性が変化するCD137抗原結合分子を見出し、製造することにより、免疫細胞の活性化作用、細胞傷害活性、または抗腫瘍活性を有しながら、正常組織等の非腫瘍組織に対する作用が低く、副作用が少ない抗CD137抗原結合分子を提供するとともに、その使用方法、薬学的製剤、等を提供する。 本開示はまた、抗原結合活性が低分子化合物に依存して変化する抗原結合分子、その製造方法、およびその使用を提供する。

WO 2020/032230 A1

［続葉有］

Masami); 〒2478530 神奈川県鎌倉市梶原２００番地 中外製薬株式会社内 Kanagawa (JP). 辰巳 加奈子**(TATSUMI, Kanako)**; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門１丁目１３５番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 早坂 昭**(HAYASAKA, Akira)**; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門１丁目１３５番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 河合 武揚**(KAWAI, Takeaki)**; 〒4128513 静岡県御殿場市駒門１丁目１３５番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 味元 風太**(MIMOTO, Futa)**; 138623 バイオポリス ドライブ ３ シナプス ＃０７－１１／１６ 中外ファーマボディ・リサーチ・ピーティーイー・リミテッド内 Singapore (SG). 丹波 茂郎**(TAMBA, Shigero)**; 〒2478530 神奈川県鎌倉市梶原２００番地 中外製薬株式会社内 Kanagawa (JP). 河内 宏樹**(KAWAUCHI, Hiroki)**; 〒2478530 神奈川県鎌倉市梶原２００番地 中外製薬株式会社内 Kanagawa (JP). 上村 将樹**(KAMIMURA, Masaki)**; 〒2478530 神奈川県鎌倉市梶原２００番地 中外製薬株式会社内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人：春名 雅夫，外**(HARUNA, Masao** et al.); 〒3000847 茨城県土浦市卸町１－１－１ 関鉄つくばビル６階 Ibaraki (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能)：AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, 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, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能)：ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

規則4.17に規定する申立て：
一　出願し及び特許を与えられる出願人の資格に関する申立て（規則4.17(ii)）

添付公開書類：
一　国際調査報告（条約第21条(3)）
一　明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則5.2(a)）

明　細　書

発明の名称 ： 抗ＣＤ１３７抗原結合分子およびその使用

技術分野

[0001] 本開示は、抗CD137抗原結合分子およびその使用方法に関する。

背景技術

[0002] 癌は、一部を除いて根治の難しい致死的疾病の一つである。主たる治療法である化学療法剤を用いた治療成績も決して高いとは言えない。癌の治療を困難としている要因として、癌細胞そのものの不均一性のみならず腫瘍微小環境が大きな役割を演じていることが示唆されている（非特許文献１）。近年、免疫応答を抑制するCTLA-4の機能を抑制してT細胞の活性化を促進させる抗CTLA-4抗体によって、切除不能な悪性黒色腫等の治癒の可能性が示された（非特許文献２）。2011年には抗ヒトCTLA-4モノクローナル抗体（イピリムマブ）が米国Food and Drug Asministration (FDA, 食品医薬品局)から世界初の免疫活性化抗体医薬として承認を受けた。さらには、CTLA-4以外の免疫チェックポイント分子であるPD-1やPD-L1に対しても、その阻害抗体の治療効果が報告されており（非特許文献３）、FDAにより承認を受けている。

腫瘍免疫に重要な役割を持つT細胞の活性化は、１）主要組織適合遺伝子複合体（MHC）クラスＩ分子により提示された抗原ペプチドに対するT細胞レセプター(TCR)の結合および活性化；２）抗原提示細胞上のそのリガンドに対するT細胞表面上の共刺激分子の結合と活性化、の二つのシグナルによりなされると理解されている。さらには、T細胞表面上のCD137(4-1BB)をはじめとする腫瘍壊死因子レセプタースーパーファミリー(TNFRSF)に属する副刺激分子の活性化がT細胞活性化に重要であることも述べられている（非特許文献４）。

[0003] TNFRSFには、CD137, CD40, OX40, RANK, GITR 等といった分子が含まれる。CD137はT細胞表面のみならず樹状細胞(DC)、B細胞、NK細胞、マクロファージ、好中球など他の免疫細胞表面にも発現していることが報告されている(非特許文献５)。

CD137アゴニスト抗体が抗腫瘍効果を示すことは既にマウスモデルにおいて実証されており、それが主にCD8陽性T細胞とNK細胞の活性化に依るものであることがマウスモデルで実験的に示されている（非特許文献６）。しかしながら、臨床ならびに非臨床においてCD137アゴニスト抗体の非特異的な肝毒性による副作用が問題となっており、薬剤の開発は思うように進んでいない（非特許文献７、非特許文献８）。この副作用の主たる原因としては、抗体定常領域を介したFcγレセプターへの結合が関与した肝臓など腫瘍以外の非免疫組織における免疫細胞の活性化が示唆されている（非特許文献９）。他方で、TNF受容体スーパーファミリーに属する受容体のアゴニスト抗体が生体内でアゴニスト活性を示すためにはFcγレセプター発現細胞（FcγRII発現細胞）による抗体の架橋が必要であることが報告されている（非特許文献１０）。すなわち、CD137アゴニスト抗体の抗腫瘍効果の薬効と肝毒性等の副作用は共に抗体のFcγレセプターへの結合が関与していることから、抗体のFcγレセプターの結合を上昇させれば薬効の向上は期待されるが肝毒性の副作用も増大し、抗体とFcγレセプターの結合を低減させれば、副作用は低減するものの薬効も低減してしまうと考えられ、これまで薬効と副作用を分離したCD137アゴニスト抗体は報告されていない。さらには、臨床においてはCD137アゴニスト抗体の抗腫瘍効果そのものについても決して強いものではなく、毒性の回避と同時に更なる薬効の増大が望まれている。したがって、こうした副作用を抑えつつ抗腫瘍免疫応答を誘導することが可能な新たな薬剤の開発が望まれている。

[0004] 治療用抗体を生体内に投与した場合、その標的となる抗原が病変部位にのみ特異的に発現していることが望ましいが、多くの場合、非病変部位である正常組織にも同じ抗原が発現しており、それが治療の観点からは望ましくない副作用の原因となりえる。例えば、腫瘍抗原に対する抗体は、ADCC等によって腫瘍細胞に対する傷害活性を示し得る一方で、正常組織にも同じ抗原が発現していた場合、正常細胞をも傷害してしまう可能性がある。上記のような問題を解決するために、標的となる組織（例えば腫瘍組織）に特定の化合

物が多量に存在する現象に着目し、そうした化合物の濃度に応じて抗原に対する結合活性が変化する抗原結合分子を捜索する技術が開発された（例えば、特許文献１）。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：国際公開WO2013/180200号公報

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Hanahan, Cell, 2011, 144, 646-74

非特許文献2：Prieto, Clin Cancer Res. 2012, 18, 2039-47

非特許文献3：Hamid, Expert Opin. Biol. Ther., 2013, 6, 847-61

非特許文献4：Summers, Nat Rev Immunol, 2012, 12, 339-51

非特許文献5：Vinay, Cellular & Molecular Immunology, 2011, 8, 281-284

非特許文献6：Houot, Blood, 2009, 114, 3431-8

非特許文献7：Ascierto, Semin Oncol, 2010, 37, 508-16

非特許文献8：Dubrot, Cancer Immunol Immunother, 2010, 59, 1223-33

非特許文献9：Schabowsky, Vaccine, 2009, 28, 512-22

非特許文献10：Li, Proc Natl Acad Sci U S A. 2013, 110(48), 19501-6

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本開示は、抗CD137抗原結合分子およびその使用方法に関する。

課題を解決するための手段

[0008] 本開示は、免疫細胞の活性化作用、細胞傷害活性、または抗腫瘍活性を有しながら、正常組織等の非腫瘍組織に対する作用が低く、副作用が少ない抗CD137抗原結合分子、およびそれらを使用する方法を提供するため、標的組織（例えば、腫瘍組織）における各種の物質（例えば、低分子化合物）に依存してCD137への結合活性が変化する特徴を備える抗CD137抗原結合分子を提供するとともに、その使用方法、薬学的製剤、等を提供するものである。一態

様において、本開示における抗CD137抗原結合分子は、副作用が少ないことから、副作用の懸念無く投与量を増加することができ、結果としてより強い薬効（細胞傷害活性または抗腫瘍活性）を発揮することが可能である。

即ち本開示は、具体的には、以下に例示的に記載する抗CD137抗原結合分子、その使用方法、薬学的製剤、等を提供するものである。

〔1〕

低分子化合物に依存したCD137結合活性を有する、抗CD137抗原結合分子。

〔2〕

10μM、50μM、100μM、150μM、200μM、または250μMの低分子化合物の存在下でのCD137に対する結合活性が、当該低分子化合物の非存在下でのCD137に対する結合活性と比べて、2倍以上高い、〔1〕に記載の抗CD137抗原結合分子。

〔2.1〕

10μM以上の低分子化合物の存在下でのCD137に対する結合活性が、当該低分子化合物の非存在下でのCD137に対する結合活性と比べて、2倍以上高い、〔1〕または〔2〕に記載の抗CD137抗原結合分子。

〔2.2〕

10μM以上の低分子化合物の存在下でのCD137に対するKD値が、$5x10^{-7}$M以下である、〔1〕乃至〔2.1〕のいずれかに記載の抗CD137抗原結合分子。

〔2.3〕

低分子化合物の非存在下でのCD137に対するKD値が、$1x10^{-6}$M以上である、〔1〕乃至〔2.2〕のいずれかに記載の抗CD137抗原結合分子。

〔2.4〕

低分子化合物の濃度が10μM以上となるように調製された溶液中でのCD137に対するKD値が$5x10^{-7}$M以下であり、かつ低分子化合物を添加しない溶液中でのCD137に対するKD値が$1x10^{-6}$M以上である、〔1〕に記載の抗CD137抗原結合分子。

〔2.5〕

低分子化合物の濃度が10μM以上となるように調製された溶液中でのCD137に対するKD値、および低分子化合物を添加しない溶液中でのCD137に対するKD値が、それぞれ、当該溶液中でCD137と抗CD137抗原結合分子を接触させた後24時間以内にBiacoreアッセイによって測定される、〔1〕に記載の抗CD137抗原結合分子。

〔2.6〕

低分子化合物およびCD137とともに三者複合体を形成する、〔1〕乃至〔2.5〕のいずれかに記載の抗CD137抗原結合分子。

〔2.7〕

ヒトおよびサル由来のCD137に結合する、〔1〕乃至〔2.6〕のいずれかに記載の抗CD137抗原結合分子。

〔2.8〕

前記低分子化合物が、アデノシン含有化合物である、〔1〕乃至〔2.7〕のいずれかに記載の抗CD137抗原結合分子。

〔2.9〕

前記低分子化合物が、ATPである、〔1〕乃至〔2.8〕のいずれかに記載の抗CD137抗原結合分子。

〔3〕

以下の(a)から(k)より選択されるいずれかのHVR-H1、HVR-H2、およびHVR-H3の組合せを含む、〔1〕乃至〔2.9〕のいずれかに記載の抗CD137抗原結合分子：

(a) 配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号：8のアミノ酸配列を含むHVR-H2、および配列番号：17のアミノ酸配列を含むHVR-H3；

(b) 配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号：9のアミノ酸配列を含むHVR-H2、および配列番号：17のアミノ酸配列を含むHVR-H3；

(c) 配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号：10のアミノ酸配列を含むHVR-H2、および配列番号：17のアミノ酸配列を含むHVR-H3；

(d) 配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号：11のアミノ酸配列

を含むHVR-H2、および配列番号：18のアミノ酸配列を含むHVR-H3；

(e) 配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号：8のアミノ酸配列を含むHVR-H2、および配列番号：18のアミノ酸配列を含むHVR-H3；

(f) 配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号：12のアミノ酸配列を含むHVR-H2、および配列番号：18のアミノ酸配列を含むHVR-H3；

(g) 配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号：13のアミノ酸配列を含むHVR-H2、および配列番号：18のアミノ酸配列を含むHVR-H3；

(h) 配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号：14のアミノ酸配列を含むHVR-H2、および配列番号：19のアミノ酸配列を含むHVR-H3；

(i) 配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号：15のアミノ酸配列を含むHVR-H2、および配列番号：20のアミノ酸配列を含むHVR-H3；

(j) 配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号：16のアミノ酸配列を含むHVR-H2、および配列番号：20のアミノ酸配列を含むHVR-H3；および

(k) 配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号：14のアミノ酸配列を含むHVR-H2、および配列番号：17のアミノ酸配列を含むHVR-H3。

〔3.1〕

以下の(a)から(g)より選択されるいずれかのHVR-L1、HVR-L2、およびHVR-L3の組合せを含む、〔1〕乃至〔3〕のいずれかに記載の抗CD137抗原結合分子：

(a) 配列番号：21のアミノ酸配列を含むHVR-L1、配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および配列番号：27のアミノ酸配列を含むHVR-L3；

(b) 配列番号：22のアミノ酸配列を含むHVR-L1、配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および配列番号：27のアミノ酸配列を含むHVR-L3；

(c) 配列番号：21のアミノ酸配列を含むHVR-L1、配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および配列番号：28のアミノ酸配列を含むHVR-L3；

(d) 配列番号：21のアミノ酸配列を含むHVR-L1、配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および配列番号：29のアミノ酸配列を含むHVR-L3；

(e) 配列番号：23のアミノ酸配列を含むHVR-L1、配列番号：26のアミノ酸配

列を含むHVR-L2、および配列番号：27のアミノ酸配列を含むHVR-L3；

(f) 配列番号：24のアミノ酸配列を含むHVR-L1、配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および配列番号：27のアミノ酸配列を含むHVR-L3；および

(g) 配列番号：25のアミノ酸配列を含むHVR-L1、配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および配列番号：27のアミノ酸配列を含むHVR-L3。

〔4〕

以下の(a)から(m)より選択されるいずれかのHVR-H1、HVR-H2、HVR-H3、HVR-L1、HVR-L2、およびHVR-L3の組合せを含む、抗CD137抗原結合分子：

(a) 配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号：8のアミノ酸配列を含むHVR-H2、配列番号：17のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号：21のアミノ酸配列を含むHVR-L1、配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および配列番号：27のアミノ酸配列を含むHVR-L3；

(b) 配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号：9のアミノ酸配列を含むHVR-H2、配列番号：17のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号：22のアミノ酸配列を含むHVR-L1、配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および配列番号：27のアミノ酸配列を含むHVR-L3；

(c) 配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号：10のアミノ酸配列を含むHVR-H2、配列番号：17のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号：22のアミノ酸配列を含むHVR-L1、配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および配列番号：27のアミノ酸配列を含むHVR-L3；

(d) 配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号：11のアミノ酸配列を含むHVR-H2、配列番号：18のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号：21のアミノ酸配列を含むHVR-L1、配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および配列番号：27のアミノ酸配列を含むHVR-L3；

(e) 配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号：8のアミノ酸配列を含むHVR-H2、配列番号：18のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号：21のアミノ酸配列を含むHVR-L1、配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および配列番号：27のアミノ酸配列を含むHVR-L3；

(f) 配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号：12のアミノ酸配列を含むHVR-H2、配列番号：18のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号：21のアミノ酸配列を含むHVR-L1、配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および配列番号：28のアミノ酸配列を含むHVR-L3；

(g) 配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号：13のアミノ酸配列を含むHVR-H2、配列番号：18のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号：21のアミノ酸配列を含むHVR-L1、配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および配列番号：29のアミノ酸配列を含むHVR-L3；

(h) 配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号：14のアミノ酸配列を含むHVR-H2、配列番号：19のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号：23のアミノ酸配列を含むHVR-L1、配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および配列番号：27のアミノ酸配列を含むHVR-L3；

(i) 配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号：15のアミノ酸配列を含むHVR-H2、配列番号：20のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号：24のアミノ酸配列を含むHVR-L1、配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および配列番号：27のアミノ酸配列を含むHVR-L3；

(j) 配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号：15のアミノ酸配列を含むHVR-H2、配列番号：20のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号：25のアミノ酸配列を含むHVR-L1、配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および配列番号：27のアミノ酸配列を含むHVR-L3；

(k) 配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号：16のアミノ酸配列を含むHVR-H2、配列番号：20のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号：25のアミノ酸配列を含むHVR-L1、配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および配列番号：27のアミノ酸配列を含むHVR-L3；

(l) 配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号：14のアミノ酸配列を含むHVR-H2、配列番号：19のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号：24のアミノ酸配列を含むHVR-L1、配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および配列番号：27のアミノ酸配列を含むHVR-L3；および

(m) 配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号：14のアミノ酸配列を含むHVR-H2、配列番号：17のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号：21のアミノ酸配列を含むHVR-L1、配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および配列番号：27のアミノ酸配列を含むHVR-L3。

〔5〕

(a) 配列番号：43乃至53のいずれか1つのアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するVH；または

(b) 配列番号：54乃至60のいずれか1つのアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するVLを含む、抗CD137抗原結合分子。

〔5.1〕

以下の(a)から(m)より選択されるいずれかのVHおよびVLの組合せを含む、抗CD137抗原結合分子：

(a) 配列番号：43のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するVH、および配列番号：54のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するVL；

(b) 配列番号：44のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するVH、および配列番号：55のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するVL；

(c) 配列番号：45のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するVH、および配列番号：55のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するVL；

(d) 配列番号：46のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するVH、および配列番号：54のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するVL；

(e) 配列番号：47のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するVH、および配列番号：54のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するVL；

(f) 配列番号：48のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するVH、

および配列番号：56のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するVL；

(g) 配列番号：49のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するVH、および配列番号：57のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するVL；

(h) 配列番号：50のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するVH、および配列番号：58のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するVL；

(i) 配列番号：51のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するVH、および配列番号：59のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するVL；

(j) 配列番号：51のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するVH、および配列番号：60のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するVL：

(k) 配列番号：52のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するVH、および配列番号：60のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するVL；

(l) 配列番号：50のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するVH、および配列番号：59のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するVL；および

(m) 配列番号：53のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するVH、および配列番号：54のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するVL。

〔5.2〕

以下の(a)から(m)より選択されるいずれかのVHおよびVLの組合せを含む、〔抗CD137抗原結合分子：

(a) 配列番号：43のアミノ酸配列を含むVH、および配列番号：54のアミノ酸配列を含むVL；

(b) 配列番号：44のアミノ酸配列を含むVH、および配列番号：55のアミノ酸配列を含むVL；

(c) 配列番号：45のアミノ酸配列を含むVH、および配列番号：55のアミノ酸配列を含むVL；

(d) 配列番号：46のアミノ酸配列を含むVH、および配列番号：54のアミノ酸配列を含むVL；

(e) 配列番号：47のアミノ酸配列を含むVH、および配列番号：54のアミノ酸配列を含むVL；

(f) 配列番号：48のアミノ酸配列を含むVH、および配列番号：56のアミノ酸配列を含むVL；

(g) 配列番号：49のアミノ酸配列を含むVH、および配列番号：57のアミノ酸配列を含むるVL；

(h) 配列番号：50のアミノ酸配列を含むVH、および配列番号：58のアミノ酸配列を含むVL；

(i) 配列番号：51のアミノ酸配列を含むVH、および配列番号：59のアミノ酸配列を含むVL；

(j) 配列番号：51のアミノ酸配列を含むVH、および配列番号：60のアミノ酸配列を含むVL：

(k) 配列番号：52のアミノ酸配列を含むVH、および配列番号：60のアミノ酸配列を含むVL；

(l) 配列番号：50のアミノ酸配列を含むVH、および配列番号：59のアミノ酸配列を含むVL；および

(m) 配列番号：53のアミノ酸配列を含むVH、および配列番号：54のアミノ酸配列を含むVL。

〔5.3〕

〔10μM以上の低分子化合物の存在下でのCD137に対する結合活性（結合量）〕／〔当該低分子化合物の非存在下でのCD137に対する結合活性（結合量）〕の値が、参照抗原結合分子と同じかそれより大きい、抗CD137抗原結合分子

であって、 ここで、参照抗原結合分子が、配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号：8のアミノ酸配列を含むHVR-H2、配列番号：17のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号：21のアミノ酸配列を含むHVR-L1、配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および配列番号：27のアミノ酸配列を含むHVR-L3；の組合せを含む抗CD137抗原結合分子である、抗CD137抗原結合分子。

〔5.4〕

前記参照抗原結合分子が、配列番号：43のアミノ酸配列を含むVH、および配列番号：54のアミノ酸配列を含むVLの組合せを含む抗CD137抗原結合分子である、〔5.3〕に記載の抗CD137抗原結合分子。

〔5.5〕

〔1μMの低分子化合物の存在下でのCD137に対する結合活性（KD）〕／〔10μM以上の当該低分子化合物の存在下でのCD137に対する結合活性（KD）〕の値が、参照抗原結合分子と同じかそれより大きい、抗CD137抗原結合分子であって、

ここで、参照抗原結合分子が、配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号：8のアミノ酸配列を含むHVR-H2、配列番号：17のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号：21のアミノ酸配列を含むHVR-L1、配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および配列番号：27のアミノ酸配列を含むHVR-L3；の組合せを含む抗CD137抗原結合分子である、抗CD137抗原結合分子。

〔5.6〕

前記参照抗原結合分子が、配列番号：43のアミノ酸配列を含むVH、および配列番号：54のアミノ酸配列を含むVLの組合せを含む抗CD137抗原結合分子である、〔5.5〕に記載の抗CD137抗原結合分子。

〔5.7〕

10μM以上、50μM以上、100μM以上、150μM以上、200μM以上、または250μM以上の低分子化合物の存在下で、CD137への結合に関して、〔3〕乃至〔5.2〕に記載のいずれかの抗原結合分子と競合する、当該低分子化合物依存した

CD137結合活性を有する抗CD137抗原結合分子。

〔5.8〕

10μM以上、50μM以上、100μM以上、150μM以上、200μM以上、または250μM以上の低分子化合物の存在下で、〔3〕乃至〔5.2〕に記載のいずれかの抗原結合分子によって結合されるのと同じCD137のエピトープに結合する、当該低分子化合物に依存したCD137結合活性を有する抗CD137抗原結合分子。

〔5.8A〕

前記低分子化合物が、アデノシン含有化合物である、〔5.3〕乃至〔5.8〕のいずれかに記載の抗CD137抗原結合分子。

〔5.8B〕

前記低分子化合物が、ATPである、〔5.3〕乃至〔5.8A〕のいずれかに記載の抗CD137抗原結合分子。

〔5.9〕

モノクローナル抗体またはその抗原結合断片である、〔1〕乃至〔5.8B〕のいずれかに記載の抗CD137抗原結合分子。

〔5.10〕

ヒト抗体、ヒト化抗体、またはキメラ抗体またはその抗原結合断片である、〔1〕乃至〔5.9〕のいずれかに記載の抗CD137抗原結合分子。

〔5.11〕

全長IgG1抗体である、〔1〕乃至〔5.10〕のいずれかに記載の抗CD137抗原結合分子。

〔5.12〕

少なくとも一つのアミノ酸が改変された改変Fc領域を含み、当該改変Fc領域が、当該アミノ酸改変を含まない親Fc領域と比較して、FcγRIIbに対する結合活性が上昇している、〔1〕乃至〔5.11〕のいずれかに記載の抗CD137抗原結合分子。

〔5.13〕

前記改変FcのFcγRIIbに対する結合活性が参照Fc領域と同じかそれより高

く、ここで参照Fcが、EUナンバリングに基づくG236N/H268D/A330Kのアミノ酸置換の組合せを含むヒトIgG1 Fc領域である、〔5.12〕に記載の抗CD137抗原結合分子。

〔5.14〕

参照Fc領域が配列番号：153のアミノ酸配列を含む、〔5.12〕または〔5.13〕に記載の抗CD137抗原結合分子。

〔5.15〕

前記少なくとも一つのアミノ酸改変が、EUナンバリングに基づくG236N、H268DおよびA330Kからなる群より選択される少なくとも一つのアミノ酸置換である、〔5.12〕に記載の抗CD137抗原結合分子。

〔5.16〕

前記少なくとも一つのアミノ酸改変が、EUナンバリングに基づくG236N/H268D/A330Kのアミノ酸置換の組合せである、〔5.12〕または〔5.15〕に記載の抗CD137抗原結合分子。

〔5.17〕

前記親Fc領域が、ヒトIgG1 Fc領域に由来する、〔5.12〕乃至〔5.16〕のいずれかに記載の抗CD137抗原結合分子。

〔5.18〕

少なくとも一つのアミノ酸が改変された改変Fc領域を含み、当該アミノ酸改変を含まない親Fc領域を含む親抗CD137抗原結合分子と比較して等電点(pI)が上昇している、〔1〕乃至〔5.17〕のいずれかに記載の抗CD137抗原結合分子。

〔5.19〕

前記少なくとも一つのアミノ酸改変が、親Fc領域の表面に露出し得るアミノ酸残基の改変である、〔5.18〕に記載の抗CD137抗原結合分子。

〔5.20〕

前記少なくとも一つのアミノ酸改変が、

(i) 親Fc領域の少なくとも一つの側鎖に負の電荷を有するアミノ酸残基を、

側鎖に電荷を有さないアミノ酸残基へ置換する改変、
(ii) 親Fc領域の少なくとも一つの側鎖に電荷を有さないアミノ酸残基を、側鎖に正の電荷を有するアミノ酸残基へ置換する改変、および／または、
(iii) 親Fc領域の少なくとも一つの側鎖に負の電荷を有するアミノ酸残基を、側鎖に正の電荷を有するアミノ酸残基へ置換する改変、
である、〔5.18〕または〔5.19〕に記載の抗CD137抗原結合分子。

〔5.21〕

前記少なくとも1つのアミノ酸改変が、複数のアミノ酸置換の組合せであり、かつ、当該複数のアミノ酸置換が互いに立体構造的に近接した位置に存在する、〔5.18〕乃至〔5.20〕のいずれかに記載の抗CD137抗原結合分子。

〔5.22〕

改変Fc領域のFcγ受容体（FcγR）への結合活性が、親Fc領域と比較して実質的に低下していない、〔5.18〕乃至〔5.21〕のいずれかに記載の抗CD137抗原結合分子。

〔5.23〕

前記Fcγ受容体（FcγR）が、FcγRIIbである、〔5.22〕に記載の抗CD137抗原結合分子。

〔5.24〕

前記少なくとも一つのアミノ酸改変が、EUナンバリングに基づくQ311R、P343R、およびD413K、からなる群より選択される少なくとも一つのアミノ酸置換である、〔5.18〕乃至〔5.23〕のいずれかに記載の抗CD137抗原結合分子。

〔5.25〕

前記少なくとも一つのアミノ酸改変が、EUナンバリングに基づく(i) P343Rのアミノ酸置換、(ii) Q311R/P343Rのアミノ酸置換、または、(iii) Q311R/D413Kのアミノ酸置換の組合せである、〔5.18〕乃至〔5.24〕のいずれかに記載の抗CD137抗原結合分子。

〔6〕

改変Fc領域を含み、当該改変Fc領域が、EUナンバリングに基づく、以下か

ら選択されるいずれか1つのアミノ酸改変の組合せを含む、〔1〕乃至〔5.25〕のいずれかに記載の抗CD137抗原結合分子：

L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/P343R/D413K；

K214R/L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/P343R/D413K；

L234Y/P238D/T250V/V264I/T307P/A330K/P343R/D413K；

L234Y/P238D/V264I/A330K/P343R/D413K；

L234Y/G237D/P238D/T250V/T307P/A330K/P343R/D413K；

L234Y/G237D/P238D/A330K/P343R/D413K；

L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/Q311R/P343R；

L234Y/P238D/T250V/V264I/T307P/A330K/Q311R/P343R；

L234Y/P238D/V264I/A330K/Q311R/P343R；

L234Y/G237D/P238D/T250V/T307P/A330K/Q311R/P343R；

L234Y/G237D/P238D/A330K/Q311R/P343R；

L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/P343R；

K214R/L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/P343R；

L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/D413K；

K214R/G236N/H268D/A330K/P343R；

K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/P343R；

K214R/G236N/H268D/A330K/D413K；

K214R/G236N/H268D/A330K/P343R/D413K；

K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/P343R/D413K；

K214R/G236N/H268D/A330K/Q311R；

K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/Q311R；

K214R/G236N/H268D/A330K/Q311R/P343R；

K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/Q311R/P343R；

K214R/G236N/H268D/A330K/Q311R/D413K；

K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/Q311R/D413K；および

K214R/L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/Q311R。

〔6.1〕

前記改変Fc領域が、ヒトIgG1 Fc領域に由来する、〔1〕乃至〔6〕のいずれかに記載の抗CD137抗原結合分子。

〔6.2〕

前記改変Fc領域が、さらに、EUナンバリングに基づく446位と447位の欠失を含む、〔1〕乃至〔6.1〕のいずれかに記載の抗CD137抗原結合分子。

〔7〕

配列番号64乃至85のいずれかひとつのアミノ酸配列を含む重鎖定常領域を含む、〔1〕乃至〔6.2〕のいずれかに記載の抗CD137抗原結合分子。

〔7.1〕

以下の(i)乃至(xxxviii)より選択されるいずれかのVH、VL、CHおよびCLの組合せを含む、抗CD137抗原結合分子：

(i) 配列番号：43のアミノ酸配列を含むVH、配列番号：64のアミノ酸配列を含むCH、配列番号：54のアミノ酸配列を含むVL、および配列番号：63のアミノ酸配列を含むCL；

(ii) 配列番号：43のアミノ酸配列を含むVH、配列番号：66のアミノ酸配列を含むCH、配列番号：54のアミノ酸配列を含むVL、および配列番号：63のアミノ酸配列を含むCL；

(iii) 配列番号：43のアミノ酸配列を含むVH、配列番号：67のアミノ酸配列を含むCH、配列番号：54のアミノ酸配列を含むVL、および配列番号：63のアミノ酸配列を含むCL；

(iv) 配列番号：43のアミノ酸配列を含むVH、配列番号：68のアミノ酸配列を含むCH、配列番号：54のアミノ酸配列を含むVL、および配列番号：63のアミノ酸配列を含むCL；

(v) 配列番号：43のアミノ酸配列を含むVH、配列番号：69のアミノ酸配列を含むCH、配列番号：54のアミノ酸配列を含むVL、および配列番号：63のアミノ酸配列を含むCL；

(vi) 配列番号：43のアミノ酸配列を含むVH、配列番号：70のアミノ酸配列

を含むCH、配列番号：54のアミノ酸配列を含むVL、および配列番号：63のアミノ酸配列を含むCL；

（vii）配列番号：43のアミノ酸配列を含むVH、配列番号：71のアミノ酸配列を含むCH、配列番号：54のアミノ酸配列を含むVL、および配列番号：63のアミノ酸配列を含むCL；

（viii）配列番号：43のアミノ酸配列を含むVH、配列番号：73のアミノ酸配列を含むCH、配列番号：54のアミノ酸配列を含むVL、および配列番号：63のアミノ酸配列を含むCL；

（ix）配列番号：43のアミノ酸配列を含むVH、配列番号：75のアミノ酸配列を含むCH、配列番号：54のアミノ酸配列を含むVL、および配列番号：63のアミノ酸配列を含むCL；

（x）配列番号：43のアミノ酸配列を含むVH、配列番号：78のアミノ酸配列を含むCH、配列番号：54のアミノ酸配列を含むVL、および配列番号：63のアミノ酸配列を含むCL；

（xi）配列番号：43のアミノ酸配列を含むVH、配列番号：80のアミノ酸配列を含むCH、配列番号：54のアミノ酸配列を含むVL、および配列番号：63のアミノ酸配列を含むCL；

（xii）配列番号：43のアミノ酸配列を含むVH、配列番号：82のアミノ酸配列を含むCH、配列番号：54のアミノ酸配列を含むVL、および配列番号：63のアミノ酸配列を含むCL；

（xiii）配列番号：43のアミノ酸配列を含むVH、配列番号：84のアミノ酸配列を含むCH、配列番号：54のアミノ酸配列を含むVL、および配列番号：63のアミノ酸配列を含むCL；

（xiv）配列番号：43のアミノ酸配列を含むVH、配列番号：85のアミノ酸配列を含むCH、配列番号：54のアミノ酸配列を含むVL、および配列番号：63のアミノ酸配列を含むCL；

（xv）配列番号：51のアミノ酸配列を含むVH、配列番号：65のアミノ酸配列を含むCH、配列番号：59のアミノ酸配列を含むVL、および配列番号：63のア

ミノ酸配列を含むCL；

（xvi）配列番号：51のアミノ酸配列を含むVH、配列番号：72のアミノ酸配列を含むCH、配列番号：59のアミノ酸配列を含むVL、および配列番号：63のアミノ酸配列を含むCL；

（xvii）配列番号：51のアミノ酸配列を含むVH、配列番号：74のアミノ酸配列を含むCH、配列番号：59のアミノ酸配列を含むVL、および配列番号：63のアミノ酸配列を含むCL；

（xviii）配列番号：51のアミノ酸配列を含むVH、配列番号：75のアミノ酸配列を含むCH、配列番号：59のアミノ酸配列を含むVL、および配列番号：63のアミノ酸配列を含むCL；

（xix）配列番号：51のアミノ酸配列を含むVH、配列番号：77のアミノ酸配列を含むCH、配列番号：59のアミノ酸配列を含むVL、および配列番号：63のアミノ酸配列を含むCL；

（xx）配列番号：51のアミノ酸配列を含むVH、配列番号：78のアミノ酸配列を含むCH、配列番号：59のアミノ酸配列を含むVL、および配列番号：63のアミノ酸配列を含むCL；

（xxi）配列番号：51のアミノ酸配列を含むVH、配列番号：79のアミノ酸配列を含むCH、配列番号：59のアミノ酸配列を含むVL、および配列番号：63のアミノ酸配列を含むCL；

（xxii）配列番号：51のアミノ酸配列を含むVH、配列番号：80のアミノ酸配列を含むCH、配列番号：59のアミノ酸配列を含むVL、および配列番号：63のアミノ酸配列を含むCL；

（xxiii）配列番号：51のアミノ酸配列を含むVH、配列番号：81のアミノ酸配列を含むCH、配列番号：59のアミノ酸配列を含むVL、および配列番号：63のアミノ酸配列を含むCL；

（xxiv）配列番号：51のアミノ酸配列を含むVH、配列番号：82のアミノ酸配列を含むCH、配列番号：59のアミノ酸配列を含むVL、および配列番号：63のアミノ酸配列を含むCL；

（xxv）配列番号：51のアミノ酸配列を含むVH、配列番号：83のアミノ酸配列を含むCH、配列番号：59のアミノ酸配列を含むVL、および配列番号：63のアミノ酸配列を含むCL；

（xxvi）配列番号：51のアミノ酸配列を含むVH、配列番号：84のアミノ酸配列を含むCH、配列番号：59のアミノ酸配列を含むVL、および配列番号：63のアミノ酸配列を含むCL；

（xxvii）配列番号：51のアミノ酸配列を含むVH、配列番号：72のアミノ酸配列を含むCH、配列番号：60のアミノ酸配列を含むVL、および配列番号：63のアミノ酸配列を含むCL；

（xxviii）配列番号：51のアミノ酸配列を含むVH、配列番号：74のアミノ酸配列を含むCH、配列番号：60のアミノ酸配列を含むVL、および配列番号：63のアミノ酸配列を含むCL；

（xxix）配列番号：51のアミノ酸配列を含むVH、配列番号：75のアミノ酸配列を含むCH、配列番号：60のアミノ酸配列を含むVL、および配列番号：63のアミノ酸配列を含むCL；

（xxx）配列番号：51のアミノ酸配列を含むVH、配列番号：77のアミノ酸配列を含むCH、配列番号：60のアミノ酸配列を含むVL、および配列番号：63のアミノ酸配列を含むCL；

（xxxi）配列番号：51のアミノ酸配列を含むVH、配列番号：78のアミノ酸配列を含むCH、配列番号：60のアミノ酸配列を含むVL、および配列番号：63のアミノ酸配列を含むCL；

（xxxii）配列番号：51のアミノ酸配列を含むVH、配列番号：79のアミノ酸配列を含むCH、配列番号：60のアミノ酸配列を含むVL、および配列番号：63のアミノ酸配列を含むCL；

（xxxiii）配列番号：51のアミノ酸配列を含むVH、配列番号：80のアミノ酸配列を含むCH、配列番号：60のアミノ酸配列を含むVL、および配列番号：63のアミノ酸配列を含むCL；

（xxxiv）配列番号：51のアミノ酸配列を含むVH、配列番号：81のアミノ酸

配列を含むCH、配列番号：60のアミノ酸配列を含むVL、および配列番号：63のアミノ酸配列を含むCL；

（xxxv）配列番号：51のアミノ酸配列を含むVH、配列番号：の82アミノ酸配列を含むCH、配列番号：60のアミノ酸配列を含むVL、および配列番号：63のアミノ酸配列を含むCL；

（xxxvi）配列番号：51のアミノ酸配列を含むVH、配列番号：の83アミノ酸配列を含むCH、配列番号：60のアミノ酸配列を含むVL、および配列番号：63のアミノ酸配列を含むCL；

（xxxvii）配列番号：51のアミノ酸配列を含むVH、配列番号：84のアミノ酸配列を含むCH、配列番号：60のアミノ酸配列を含むVL、および配列番号：63のアミノ酸配列を含むCL；および

（xxxviii）配列番号：51のアミノ酸配列を含むVH、配列番号：85のアミノ酸配列を含むCH、配列番号：60のアミノ酸配列を含むVL、および配列番号：63のアミノ酸配列を含むCL。

〔8〕

〔1〕乃至〔7.1〕のいずれかに記載の抗CD137抗原結合分子をコードする、単離された核酸。

〔9〕

〔8〕に記載の核酸を含むベクター。

〔10〕

〔8〕に記載の核酸、または〔9〕に記載のベクターを含む、宿主細胞。

〔11〕

抗CD137抗原結合分子を製造する方法であって、抗CD137抗原結合分子が製造されるように〔10〕に記載の宿主細胞を培養することを含む、方法。

〔12〕

〔1〕乃至〔7.1〕のいずれかに記載の抗CD137抗原結合分子および細胞傷害剤を含む、イムノコンジュゲート。

〔13〕

〔1〕乃至〔7.1〕のいずれかに記載の抗CD137抗原結合分子若しくは〔12〕に記載のイムノコンジュゲート；および薬学的に許容される担体を含む、薬学的製剤。

〔14〕

医薬品としての使用のための、〔1〕乃至〔7.1〕のいずれかに記載の抗CD137抗原結合分子または〔12〕に記載のイムノコンジュゲート。

〔14.1〕

腫瘍の治療における使用のための、〔1〕乃至〔7.1〕のいずれかに記載の抗CD137抗原結合分子、〔12〕に記載のイムノコンジュゲート、または〔13〕に記載の薬学的製剤。

〔14.2〕

腫瘍が、B細胞、樹状細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、および／またはCD8陽性T細胞が浸潤している固形腫瘍である、〔14.1〕に記載の抗CD137抗原結合分子、イムノコンジュゲート、または薬学的製剤。

〔14.3〕

腫瘍が、制御性T（Treg）細胞が浸潤している固形腫瘍である、〔14.1〕に記載の抗CD137抗原結合分子、イムノコンジュゲート、または薬学的製剤。

〔15〕

免疫細胞の活性化における使用のための、〔1〕乃至〔7.1〕のいずれかに記載の抗CD137抗原結合分子、〔12〕に記載のイムノコンジュゲート、または〔13〕に記載の薬学的製剤。

〔15.1〕

前記免疫細胞が、B細胞、樹状細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、および／またはT細胞である、〔15〕に記載の抗CD137抗原結合分子、イムノコンジュゲート、または薬学的製剤。

〔15.2〕

腫瘍組織における免疫細胞の活性化のための、〔1〕乃至〔7.1〕のいずれかに記載の抗CD137抗原結合分子、または〔13〕に記載の薬学的製剤。

〔15.3〕

前記免疫細胞が、B細胞、樹状細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、および／またはT細胞である、〔15.2〕に記載の抗CD137抗原結合分子、または薬学的製剤。

〔15.4〕

細胞の傷害における使用のための、〔1〕乃至〔7.1〕のいずれかに記載の抗CD137抗原結合分子、〔12〕に記載のイムノコンジュゲート、または〔13〕に記載の薬学的製剤。

〔16〕

低分子化合物に依存したCD137結合活性を有しない抗CD137抗原結合分子と比較して、非腫瘍組織における免疫の活性化のレベルが低い、〔1〕乃至〔7.1〕のいずれかに記載の抗CD137抗原結合分子、〔12〕に記載のイムノコンジュゲート、または〔13〕に記載の薬学的製剤。

〔16.1〕

前記非腫瘍組織が、リンパ節、脾臓、および／または肝臓である、〔16〕に記載の抗CD137抗原結合分子、イムノコンジュゲート、または薬学的製剤。

〔16.2〕

非腫瘍組織に発現しているCD137に実質的に結合しない、〔1〕乃至〔7.1〕のいずれかに記載の抗CD137抗原結合分子または〔12〕に記載のイムノコンジュゲート。

〔16.3〕

低分子化合物に依存したCD137結合活性を有しない抗CD137抗原結合分子と比較して、血中半減期が伸長している、〔1〕乃至〔7.1〕のいずれかに記載の抗CD137抗原結合分子または〔12〕に記載のイムノコンジュゲート。

〔17〕

低分子化合物に依存したCD137結合活性を有しない抗CD137抗原結合分子と比較して、副作用のレベルが低い、〔1〕乃至〔7.1〕のいずれかに記載の抗CD137抗原結合分子、〔12〕に記載のイムノコンジュゲート、または〔13〕に

記載の薬学的製剤。

〔17.1〕

副作用が、AST増加、ALT増加、熱、吐き気、急性肝炎、肝障害、脾腫（splenomegaly）、腸炎、皮膚の化膿性炎症、好中球減少、リンパ球減少、血小板減少、トランスアミノアーゼの発現、および／または高ビリルビン血症（hyperbilirubinemia）である、〔17〕に記載の抗CD137抗原結合分子、イムノコンジュゲート、または薬学的製剤。

〔18〕

低分子化合物に依存したCD137アゴニスト活性を有する、抗CD137抗原結合分子。

〔18.1〕

10μM、50μM、100μM、150μM、200μM、または250μMの低分子化合物の存在下でのCD137に対するアゴニスト活性が、当該低分子化合物の非存在下でのCD137に対するアゴニスト活性と比べて、2倍以上高い、〔18〕に記載の抗CD137抗原結合分子。

〔18.2〕

10μM以上の低分子化合物の存在下でのCD137に対するアゴニスト活性が、当該低分子化合物の非存在下でのCD137に対するアゴニスト活性と比べて、2倍以上高い、〔18〕または〔18.1〕に記載の抗CD137抗原結合分子。

〔18.3〕

50μM以上の低分子化合物の存在下でのCD137に対するアゴニスト活性が、当該低分子化合物の非存在下でのCD137に対するアゴニスト活性と比べて、2倍以上高い、〔18〕または〔18.1〕に記載の抗CD137抗原結合分子。

〔18.4〕

250μM以上の低分子化合物の存在下でのCD137に対するアゴニスト活性が、当該低分子化合物の非存在下でのCD137に対するアゴニスト活性と比べて、2倍以上高い、〔18〕または〔18.1〕に記載の抗CD137抗原結合分子。

〔18.5〕

前記CD137に対するアゴニスト活性が、CD137発現細胞によるIL-2および／またはIFN-γ産生量により評価される、〔18〕乃至〔18.4〕のいずれかに記載の抗CD137抗原結合分子。

〔18.6〕

前記CD137発現細胞が、単離されたヒト末梢血単核細胞（PBMC）またはヒト末梢血単核細胞（PBMC）由来T細胞である、〔18.5〕に記載の抗CD137抗原結合分子。

〔18.7〕

前記CD137に対するアゴニスト活性が、レポーター遺伝子アッセイにより評価される、〔18〕乃至〔18.4〕のいずれかに記載の抗CD137抗原結合分子。

〔18.8〕

低分子化合物の終濃度が50μM以上となるように調製された溶液中でCD137に対するアゴニスト活性を示し、かつ当該低分子化合物を添加しない溶液中でCD137に対するアゴニストを実質的に示さない、〔18〕に記載の抗CD137抗原結合分子。

〔18.9〕

低分子化合物の終濃度が50μM以上となるように調製された溶液中でのCD137に対するアゴニスト活性、および当該低分子化合物を添加しない溶液中でのCD137に対するアゴニスト活性が、それぞれ、当該溶液中でCD137発現細胞と抗CD137抗原結合分子を接触させた後72時間以内に測定されるIL-2、IFN-γ、および／またはIL-6の産生量により評価される、〔18.8〕に記載の抗CD137抗原結合分子。

〔18.10〕

低分子化合物の終濃度が50μM以上となるように調製された溶液中でのCD137に対するアゴニスト活性、および当該低分子化合物を添加しない溶液中でのCD137に対するアゴニスト活性が、それぞれ、NF-kappaB-ルシフェラーゼレポーター構築物及びCD137を発現するT細胞と抗CD137抗原結合分子を接触させた後6時間以内に測定されるルシフェラーゼ発光シグナルにより評価される、〔

18.8〕に記載の抗CD137抗原結合分子。

〔18.11〕

前記低分子化合物が、アデノシン含有化合物である、〔18〕乃至〔18.10〕のいずれかに記載の抗CD137抗原結合分子。

〔18.12〕

前記低分子化合物が、ATPである、〔18〕乃至〔18.11〕のいずれかに記載の抗CD137抗原結合分子。

〔19〕

低分子化合物に依存したCD137アゴニスト活性を有する、〔1〕乃至〔7.1〕のいずれかに記載の抗CD137抗原結合分子。

〔19.1〕

10μM、50μM、100μM、150μM、200μM、または250μMの低分子化合物の存在下でのCD137に対するアゴニスト活性が、当該低分子化合物の非存在下でのCD137に対するアゴニスト活性と比べて、2倍以上高い、〔19〕に記載の抗CD137抗原結合分子。

〔19.2〕

10μM以上の低分子化合物の存在下でのCD137に対するアゴニスト活性が、当該低分子化合物の非存在下でのCD137に対するアゴニスト活性と比べて、2倍以上高い、〔19〕または〔19.1〕に記載の抗CD137抗原結合分子。

〔19.3〕

50μM以上の低分子化合物の存在下でのCD137に対するアゴニスト活性が、当該低分子化合物の非存在下でのCD137に対するアゴニスト活性と比べて、2倍以上高い、〔19〕または〔19.1〕に記載の抗CD137抗原結合分子。

〔19.4〕

250μM以上の低分子化合物の存在下でのCD137に対するアゴニスト活性が、当該低分子化合物の非存在下でのCD137に対するアゴニスト活性と比べて、2倍以上高い、〔19〕または〔19.1〕に記載の抗CD137抗原結合分子。

〔19.5〕

前記CD137に対するアゴニスト活性が、CD137発現細胞によるIL-2および／またはIFN-γ産生量により評価される、〔19〕乃至〔19.4〕のいずれかに記載の抗CD137抗原結合分子。

〔19.6〕

前記CD137発現細胞が、単離されたヒト末梢血単核細胞（PBMC）またはヒト末梢血単核細胞（PBMC）由来T細胞である、〔19.5〕に記載の抗CD137抗原結合分子。

〔19.7〕

前記CD137に対するアゴニスト活性が、レポーター遺伝子アッセイにより評価される、〔19〕乃至〔19.4〕のいずれかに記載の抗CD137抗原結合分子。

〔19.8〕

低分子化合物の終濃度が50μM以上となるように調製された溶液中でCD137に対するアゴニスト活性を示し、かつ当該低分子化合物を添加しない溶液中でCD137に対するアゴニストを実質的に示さない、〔19〕に記載の抗CD137抗原結合分子。

〔19.9〕

低分子化合物の終濃度が50μM以上となるように調製された溶液中でのCD137に対するアゴニスト活性、および当該低分子化合物を添加しない溶液中でのCD137に対するアゴニスト活性が、それぞれ、当該溶液中でCD137発現細胞と抗CD137抗原結合分子を接触させた後72時間以内に測定されるIL-2、IFN-γ、および／またはIL-6の産生量により評価される、〔19.8〕に記載の抗CD137抗原結合分子。

〔19.10〕

低分子化合物の終濃度が50μM以上となるように調製された溶液中でのCD137に対するアゴニスト活性、および当該低分子化合物を添加しない溶液中でのCD137に対するアゴニスト活性が、それぞれ、NF-kappaB-ルシフェラーゼレポーター構築物及びCD137を発現するT細胞と抗CD137抗原結合分子を接触させた後6時間以内に測定されるルシフェラーゼ発光シグナルにより評価される、〔

19.8〕に記載の抗CD137抗原結合分子。

〔19.11〕

前記低分子化合物が、アデノシン含有化合物である、〔19〕乃至〔19.10〕のいずれかに記載の抗CD137抗原結合分子。

〔19.12〕

前記低分子化合物が、ATPである、〔19〕乃至〔19.11〕のいずれかに記載の抗CD137抗原結合分子。

〔20〕

改変Fc領域を含むアゴニスト抗原結合分子であって、当該改変Fc領域が、親Fc領域を含む親アゴニスト抗原結合分子と比較して等電点（pI）の上昇をもたらす少なくとも一つのアミノ酸改変を含み、親アゴニスト抗原結合分子と比較してアゴニスト活性が上昇している、アゴニスト抗原結合分子。

〔20.1〕

前記少なくとも一つのアミノ酸改変が、親Fc領域の表面に露出し得るアミノ酸残基の改変である、〔20〕に記載のアゴニスト抗原結合分子。

〔20.2〕

前記少なくとも一つのアミノ酸改変が、

(i) 親Fc領域の少なくとも一つの側鎖に負の電荷を有するアミノ酸残基を、側鎖に電荷を有さないアミノ酸残基へ置換する改変、

(ii) 親Fc領域の少なくとも一つの側鎖に電荷を有さないアミノ酸残基を、側鎖に正の電荷を有するアミノ酸残基へ置換する改変、および／または、

(iii) 親Fc領域の少なくとも一つの側鎖に負の電荷を有するアミノ酸残基を、側鎖に正の電荷を有するアミノ酸残基へ置換する改変、

である、〔20〕または〔20.1〕に記載のアゴニスト抗原結合分子。

〔20.3〕

前記少なくとも1つのアミノ酸改変が、複数のアミノ酸置換の組合せであり、かつ、当該複数のアミノ酸置換が互いに立体構造的に近接した位置に存在する、〔20〕乃至〔20.2〕のいずれかに記載のアゴニスト抗原結合分子。

〔20.4〕

改変Fc領域のFcγ受容体への結合活性が、親Fc領域と比較して実質的に低下していない、〔20〕乃至〔20.3〕のいずれかに記載のアゴニスト抗原結合分子。

〔20.5〕

前記Fcγ受容体が、FcγRIIbである、〔20.4〕に記載のアゴニスト抗原結合分子。

〔20.6〕

前記少なくとも一つのアミノ酸改変が、EUナンバリングに基づく、Q311R、P343R、およびD413Kからなる群より選択される少なくとも一つのアミノ酸置換である、〔20〕乃至〔20.4〕のいずれかに記載のアゴニスト抗原結合分子。

〔20.7〕

前記少なくとも一つのアミノ酸改変が、EUナンバリングに基づく、(i)P343R/D413K、(ii)Q311R/P343R、(iii)P343R、(iv)D413K、(v)Q311R、または(vi)Q311R/D413Kのアミノ酸改変またはその組み合わせである〔20〕乃至〔20.6〕のいずれかに記載のアゴニスト抗原結合分子。

〔20.8〕

抗CD137抗原結合分子である、〔20〕乃至〔20.7〕のいずれかに記載のアゴニスト抗原結合分子。

〔20.9〕

抗CD137抗体である、〔20〕乃至〔20.8〕のいずれかに記載のアゴニスト抗原結合分子。

〔21〕

改変Fc領域を含むアゴニスト抗原結合分子を製造する方法であって、

親Fc領域に、親Fc領域を含む親アゴニスト抗原結合分子と比較して等電点（pI）の上昇をもたらす少なくとも一つのアミノ酸改変を導入することを含み、

改変Fc領域を含むアゴニスト抗原結合分子のアゴニスト活性が、親アゴニス

ト抗原結合分子と比較して上昇している、方法。

〔21.1〕

アゴニスト抗原結合分子の、10μM、50μM、100μM、150μM、200μM、または250μMの低分子化合物の存在下での抗原に対するアゴニスト活性が、当該低分子化合物の非存在下での抗原に対するアゴニスト活性と比べて、2倍以上高い、〔21〕に記載の方法。

〔21.2〕

アゴニスト抗原結合分子の、10μM以上の低分子化合物の存在下での抗原に対するアゴニスト活性が、当該低分子化合物の非存在下での抗原に対するアゴニスト活性と比べて、2倍以上高い、〔21〕または〔21.1〕に記載の方法。

〔21.3〕

アゴニスト抗原結合分子の、50μM以上の低分子化合物の存在下での抗原に対するアゴニスト活性が、当該低分子化合物の非存在下での抗原に対するアゴニスト活性と比べて、2倍以上高い、〔21〕または〔21.1〕に記載の方法。

〔21.4〕

アゴニスト抗原結合分子の、250μM以上の低分子化合物の存在下での抗原に対するアゴニスト活性が、当該低分子化合物の非存在下での抗原に対するアゴニスト活性と比べて、2倍以上高い、〔21〕または〔21.1〕に記載の方法。

〔21.5〕

前記抗原に対するアゴニスト活性が、抗原発現細胞によるIL-2および／またはIFN-γ産生量により評価される、〔21〕乃至〔21.4〕のいずれかに記載の方法。

〔21.6〕

前記抗原発現細胞が、単離されたヒト末梢血単核細胞（PBMC）またはヒト末梢血単核細胞（PBMC）由来T細胞である、〔21.5〕に記載の方法。

〔21.7〕

前記抗原に対するアゴニスト活性が、レポーター遺伝子アッセイにより評

価される、〔21〕乃至〔21.4〕のいずれかに記載の方法。

〔21.8〕

さらに、

(i)〔21〕乃至〔21.7〕のいずれかに記載の方法で作製された前記アゴニスト抗原結合分子をコードする遺伝子と作動可能に連結された適切なプロモーターを含む発現ベクターを取得し、

(ii) 当該ベクターを宿主細胞に導入し、当該宿主細胞を培養して前記アゴニスト抗原結合分子を生産させ、

(iii) 宿主細胞培養物から前記アゴニスト抗原結合分子を回収する、

ことを含む、〔21〕乃至〔21.7〕のいずれかに記載の方法。

〔21.9〕

前記アゴニスト抗原結合分子が、抗CD137抗原結合分子である、〔21〕乃至〔21.8〕のいずれかに記載の方法。

〔21.10〕

前記アゴニスト抗原結合分子が、抗CD137抗体である、〔21〕乃至〔21.9〕のいずれかに記載の方法。

〔21.11〕

前記低分子化合物が、アデノシン含有化合物である、〔21.1〕乃至〔21.10〕のいずれかに記載の方法。

〔21.12〕

前記低分子化合物が、ATPである、〔21.1〕乃至〔21.11〕のいずれかに記載の方法。

〔22〕

Fc領域を含むアゴニスト抗原結合分子のアゴニスト活性を上昇させる方法であって、当該Fc領域に、親Fc領域を含む親アゴニスト抗原結合分子と比較して等電点（pI）の上昇をもたらす少なくとも一つのアミノ酸改変を導入することを含む、方法。

〔22.1〕

アゴニスト抗原結合分子の、10μM、50μM、100μM、150μM、200μM、または250μMの低分子化合物の存在下での抗原に対するアゴニスト活性が、当該低分子化合物の非存在下での抗原に対するアゴニスト活性と比べて、2倍以上高い、〔22〕に記載の方法。

〔22.2〕

アゴニスト抗原結合分子の、10μM以上の低分子化合物の存在下での抗原に対するアゴニスト活性が、当該低分子化合物の非存在下での抗原に対するアゴニスト活性と比べて、2倍以上高い、〔22〕または〔22.1〕に記載の方法。

〔22.3〕

アゴニスト抗原結合分子の、50μM以上の低分子化合物の存在下での抗原に対するアゴニスト活性が、当該低分子化合物の非存在下での抗原に対するアゴニスト活性と比べて、2倍以上高い、〔22〕または〔22.1〕に記載の方法。

〔22.4〕

アゴニスト抗原結合分子の、250μM以上の低分子化合物の存在下での抗原に対するアゴニスト活性が、当該低分子化合物の非存在下での抗原に対するアゴニスト活性と比べて、2倍以上高い、〔22〕または〔22.1〕に記載の方法。

〔22.5〕

前記抗原に対するアゴニスト活性が、抗原発現細胞によるIL-2および／またはIFN-γ産生量により評価される、〔22〕乃至〔22.4〕のいずれかに記載の方法。

〔22.6〕

前記抗原発現細胞が、単離されたヒト末梢血単核細胞（PBMC）またはヒト末梢血単核細胞（PBMC）由来T細胞である、〔22.5〕に記載の方法。

〔22.7〕

前記抗原に対するアゴニスト活性が、レポーター遺伝子アッセイにより評価される、〔22〕乃至〔22.4〕のいずれかに記載の方法。

〔22.8〕

前記アゴニスト抗原結合分子が、抗CD137抗原結合分子である、〔22〕乃至〔22.7〕のいずれかに記載の方法。

〔22.9〕

前記アゴニスト抗原結合分子が、抗CD137抗体である、〔22〕乃至〔22.8〕のいずれかに記載の方法。

〔22.10〕

前記低分子化合物が、アデノシン含有化合物である、〔22.1〕乃至〔22.9〕のいずれかに記載の方法。

〔22.11〕

前記低分子化合物が、ATPである、〔22.1〕乃至〔22.10〕のいずれかに記載の方法。

〔23〕

Fc領域を含むアゴニスト抗原結合分子のアゴニスト活性を上昇させるための、少なくとも一つのアミノ酸改変の使用であって、当該アミノ酸可変が親Fc領域を含む親アゴニスト抗原結合分子と比較して等電点（pI）の上昇をもたらすものである、方法。

〔23.1〕

アゴニスト抗原結合分子の、10μM、50μM、100μM、150μM、200μM、または250μMの低分子化合物の存在下での抗原に対するアゴニスト活性が、当該低分子化合物の非存在下での抗原に対するアゴニスト活性と比べて、2倍以上高い、〔23〕に記載の方法。

〔23.2〕

アゴニスト抗原結合分子の、10μM以上の低分子化合物の存在下での抗原に対するアゴニスト活性が、当該低分子化合物の非存在下での抗原に対するアゴニスト活性と比べて、2倍以上高い、〔23〕または〔23.1〕に記載の方法。

〔23.3〕

アゴニスト抗原結合分子の、50μM以上の低分子化合物の存在下での抗原に対するアゴニスト活性が、当該低分子化合物の非存在下での抗原に対するア

ゴニスト活性と比べて、2倍以上高い、〔23〕または〔23.1〕に記載の方法。

〔23.4〕

アゴニスト抗原結合分子の、250μM以上の低分子化合物の存在下での抗原に対するアゴニスト活性が、当該低分子化合物の非存在下での抗原に対するアゴニスト活性と比べて、2倍以上高い、〔23〕または〔23.1〕に記載の方法。

〔23.5〕

前記抗原に対するアゴニスト活性が、抗原発現細胞によるIL-2および／またはIFN-γ産生量により評価される、〔23〕乃至〔23.4〕のいずれかに記載の方法。

〔23.6〕

前記抗原発現細胞が、単離されたヒト末梢血単核細胞（PBMC）またはヒト末梢血単核細胞（PBMC）由来T細胞である、〔23.5〕に記載の方法。

〔23.7〕

前記抗原に対するアゴニスト活性が、レポーター遺伝子アッセイにより評価される、〔23〕乃至〔23.4〕のいずれかに記載の方法。

〔23.8〕

前記アゴニスト抗原結合分子が、抗CD137抗原結合分子である、〔23〕乃至〔23.7〕のいずれかに記載の方法。

〔23.9〕

前記アゴニスト抗原結合分子が、抗CD137抗体である、〔23〕乃至〔23.8〕のいずれかに記載の方法。

〔23.10〕

前記低分子化合物が、アデノシン含有化合物である、〔23.1〕乃至〔23.9〕のいずれかに記載の方法。

〔23.11〕

前記低分子化合物が、ATPである、〔23.1〕乃至〔23.10〕のいずれかに記載の方法。

〔24〕

低分子化合物に依存した抗原結合活性を有する抗原結合ドメインまたは抗原結合分子のスクリーニング方法であって、

(a) 低分子化合物の存在下において、融合パートナー分子1単位あたり、2単位以上の抗原が融合した融合分子に、抗原結合ドメイン若しくは抗原結合分子またはそれらのライブラリを接触させ、

(b) 前記工程(a)で該融合分子中の抗原と結合した抗原結合ドメインまたは抗原結合分子を当該低分子化合物の非存在下または低濃度存在下に置き、および

(c) 前記工程(b)で解離した抗原結合ドメインまたは抗原結合分子を単離する、

ことを含む、スクリーニング方法。

〔24.1〕

前記融合パートナー分子が、二量体のFc領域である、〔24〕に記載の方法。

〔24.2〕

前記Fc領域が、第一のFcサブユニット及び第二のFcサブユニットを含み、前記抗原が、第一及び第二のFcサブユニットに一つずつ融合されている、〔24.1〕に記載の方法。

〔24.3〕

前記抗原が、第一及び第二のFcサブユニットのN末端に一つずつ融合されている、〔24.1〕または〔24.2〕に記載の方法。

〔24.4〕

前記抗原結合ドメインまたは抗原結合分子のライブラリが、ファージライブラリである、〔24〕乃至〔24.3〕のいずれかに記載の方法。

〔24.5〕

前記ファージライブラリに含まれるファージが、2以上の抗原結合ドメインまたは抗原結合分子をその表面に提示するファージである、〔24〕乃至〔24.

4〕のいずれかに記載の方法。

〔24.6〕

前記ファージライブラリに含まれるファージが、ヘルパーファージ由来pIII遺伝子に欠損を有するファージである、〔24〕乃至〔24.5〕のいずれかに記載の方法。

〔25〕

2以上の異なる低分子化合物に依存した抗原結合活性を有する抗原結合ドメインまたは抗原結合分子のスクリーニング方法であって、

(a) 第1の低分子化合物の存在下において、抗原に、抗原結合ドメイン若しくは抗原結合分子またはそれらのライブラリを接触させ、

(b) 前記工程(a)で抗原に結合した抗原結合ドメインまたは抗原結合分子を当該第1の低分子化合物の非存在下または低濃度存在下に置き、

(c) 前記工程(b)で解離した抗原結合ドメインまたは抗原結合分子を単離する工程、

(d) 前記工程(c)で単離された抗原結合ドメインまたは抗原結合分子を、第2の低分子化合物の存在下において、前記抗原に接触させ、

(e) 前記工程(d)で抗原に結合した抗原結合ドメインまたは抗原結合分子を当該第2の低分子化合物の非存在下または低濃度存在下に置き、

(f) 前記工程(e)で解離した抗原結合ドメインまたは抗原結合分子を単離する、

ことを含み、

ここで、前記(c)および(d)の間に、前記(c)で単離された抗原結合ドメインまたは抗原結合分子をコードする遺伝子を増幅することを含まない、

スクリーニング方法。

〔25.1〕

前記抗原結合ドメインまたは抗原結合分子のライブラリが、ファージライブラリである、〔25〕に記載の方法。

〔26〕

低分子化合物に依存した抗原結合活性を有する抗原結合ドメインまたは抗原結合分子のスクリーニング方法であって、

(a) 低分子化合物の存在下において、抗原に、抗原結合ドメインまたは抗原結合分子のナイーブライブラリを接触させ、

(b) 前記工程(a)で抗原に結合した抗原結合ドメインまたは抗原結合分子を当該低分子化合物の非存在下または低濃度存在下に置き、および

(c) 前記工程(b)で解離した抗原結合ドメインまたは抗原結合分子を単離する、

ことを含み

ここで、前記ナイーブライブラリが、2以上の抗原結合ドメインまたは抗原結合分子をその表面に提示するファージを含むファージライブラリである、スクリーニング方法。

〔27〕

低分子化合物に依存した抗原結合活性を有する抗原結合ドメインまたは抗原結合分子のスクリーニング方法であって、

(a) 低分子化合物の存在下において、抗原に、抗原結合ドメインまたは抗原結合分子のライブラリを接触させ、

(b) 前記工程(a)で抗原に結合した抗原結合ドメインまたは抗原結合分子を当該低分子化合物の非存在下または低濃度存在下に置き、および

(c) 前記工程(b)で解離した抗原結合ドメインまたは抗原結合分子を単離する、

ことを含み、

ここで、前記ライブラリが、ヘルパーファージ由来pIII遺伝子に欠損を有するファージを含むライブラリである、スクリーニング方法。

〔28〕

低分子化合物に依存した抗原結合活性を有する抗原結合ドメインまたは抗原結合分子のスクリーニング方法であって、

(a) 低分子化合物の存在下において、抗原に、抗原結合ドメインまたは抗原

結合分子のライブラリを接触させ、

(b) 前記工程(a)で抗原に結合した抗原結合ドメインまたは抗原結合分子を当該低分子化合物の非存在下または低濃度存在下に置き、および

(c) 前記工程(b)で解離した抗原結合ドメインまたは抗原結合分子を単離する、

ことを含み、

ここで、前記ライブラリが、抗原結合ドメインまたは抗原結合分子の発現を、該抗原結合ドメインまたは抗原結合分子の発現を制御しているプロモーターからの発現量を上昇させる低分子添加物によって増大させて調製されたファージを含むライブラリである、スクリーニング方法。

〔28.1〕

前記低分子添加物が、イソプロピル-β-チオガラクトピラノシド（IPTG）またはarabinoseである、〔28〕に記載のスクリーニング方法。

〔28.2〕

前記低分子化合物が、アデノシン含有化合物である、〔24〕乃至〔28.1〕のいずれかに記載の方法。

〔28.3〕

前記低分子化合物が、ATPである、〔24〕乃至〔28.2〕のいずれかに記載の方法。

〔29〕

腫瘍組織特異的化合物の濃度に依存した抗原結合活性を有する抗原結合分子であって、100 μMの当該化合物の存在下における抗原結合活性が、当該化合物の非存在下における抗原結合活性と比べて、2倍以上高い、抗原結合分子。

〔29.1〕

100 μMの当該化合物の存在下におけるKD値が5×10^{-7} M以下である、〔29〕に記載の抗原結合分子。

〔29.2〕

当該化合物の非存在下におけるKD値が1×10^{-6} M以上である、〔29〕または〔29.1〕に記載の抗原結合分子。

〔29.3〕

抗原に対して中和活性を有する、〔29〕から〔29.2〕のいずれかに記載の抗原結合分子。

〔29.4〕

抗原を発現する細胞に対して細胞傷害活性を有する、〔29〕から〔29.3〕のいずれかに記載の抗原結合分子。

〔29.5〕

抗原が、腫瘍組織における腫瘍細胞、免疫細胞、間質細胞のいずれかが発現または分泌する抗原である、〔29〕から〔29.4〕のいずれかに記載の抗原結合分子。

〔29.6〕

当該化合物が、アデノシン含有化合物である、〔29〕から〔29.5〕のいずれかに記載の抗原結合分子。

〔29.7〕

Fc領域を含む、〔29〕から〔29.6〕のいずれかに記載の抗原結合分子。

〔29.8〕

Fc領域がアミノ酸改変を含む変異Fc領域であって、当該変異Fc領域が天然型Fc領域に比べて、FcγRIa、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIIaからなる群より選択される少なくとも一つのFcγ受容体に対する結合活性が増強している、〔29.7〕に記載の抗原結合分子。

〔29.9〕

抗原結合分子が抗体または抗体断片である、〔29〕から〔29.8〕のいずれかに記載の抗原結合分子。

〔30〕

〔29〕から〔29.9〕のいずれかに記載の抗原結合分子および薬学的に許容される担体を含む、薬学的製剤。

〔30.1〕

腫瘍の治療における使用のための、〔30〕に記載の薬学的製剤。

〔30.2〕

対照となる抗原結合分子を含む薬学的製剤と比較して、非腫瘍組織における細胞傷害活性が低い、〔30.1〕に記載の薬学的製剤。

〔30.3〕

対照となる抗原結合分子を含む薬学的製剤と比較して、副作用のレベルが低い、〔30.1〕または〔30.2〕に記載の薬学的製剤。

〔30.4〕

対照となる抗原結合分子が、腫瘍組織特異的化合物の濃度に依存した抗原結合活性を有していない抗原結合分子である、〔30.2〕または〔30.3〕に記載の薬学的製剤。

〔31〕

腫瘍の治療における使用のための抗原結合分子を製造する方法であって、100 μMの腫瘍組織特異的化合物の存在下における抗原結合活性が、当該化合物の非存在下における抗原結合活性と比べて、2倍以上高い抗原結合分子を選択する工程を含む、方法。

〔32〕

腫瘍の治療における使用のための薬学的製剤を製造する方法であって、〔29〕から〔29.9〕のいずれかに記載の抗原結合分子を、薬学的に許容される担体と混合する工程を含む、方法。

〔33〕

標的組織特異的化合物の濃度に依存した抗原結合活性を有する抗原結合分子であって、1 μMの当該化合物の存在下における抗原結合活性が、十分量の当該化合物の存在下における抗原結合活性と比べて、2倍以上低い、抗原結合分子。

〔33.1〕

1 μMの当該化合物の存在下におけるKD値が2×10^{-7} M以上である、〔33〕に

記載の抗原結合分子。

〔33.2〕

十分量の当該化合物の存在下におけるKD値が1×10^{-7} M以下である、〔33〕または〔33.1〕に記載の抗原結合分子。

〔33.3〕

当該化合物が腫瘍組織特異的化合物である、〔33〕から〔33.2〕のいずれかに記載の抗原結合分子。

〔33.4〕

当該化合物がアデノシン含有化合物である、〔33.3〕に記載の抗原結合分子。

〔33.5〕

対照の抗原結合分子と比較して、高い血漿中滞留性を有する、および／または低い血漿中抗原蓄積能を有する、〔33〕から〔33.4〕のいずれかに記載の抗原結合分子。

〔33.6〕

対照の抗原結合分子が、標的組織特異的化合物の濃度に依存した抗原結合活性を有していない抗原結合分子である、〔33.5〕に記載の抗原結合分子。

〔33.7〕

抗原結合分子が抗体または抗体断片である、〔33〕から〔33.6〕のいずれかに記載の抗原結合分子。

〔34〕

〔33〕から〔33.7〕のいずれかに記載の抗原結合分子および薬学的に許容される担体を含む、薬学的製剤。

〔35〕

対照の抗原結合分子と比較して、高い血漿中滞留性を有する、および／または低い血漿中抗原蓄積能を有する抗原結合分子を製造する方法であって、(a) 標的組織特異的化合物の濃度が高まるにつれて抗原結合活性が増大する抗原結合分子を製造する工程、および(b) (a)で製造された抗原結合分子の血漿

中滞留性、および／または血漿中抗原蓄積能を測定する工程を含む、方法。

〔35.1〕

1 μMの標的組織特異的化合物の存在下における抗原結合活性が、十分量の当該化合物の存在下における抗原結合活性と比べて、2倍以上低い抗原結合分子を選択する工程を含む、〔35〕に記載の方法。

〔35.2〕

対照の抗原結合分子が、標的組織特異的化合物の濃度に依存した抗原結合活性を有していない抗原結合分子である、〔35〕または〔35.1〕に記載の方法。

〔36〕

薬学的製剤を製造する方法であって、〔33〕から〔33.7〕のいずれかに記載の抗原結合分子を、薬学的に許容される担体と混合する工程を含む、方法。

〔37〕

溶液中におけるATP濃度を測定する方法であって、(i) P2Y11を発現するsplit Luc/HEK293細胞を当該溶液に接触させる工程、および (ii) 当該細胞内のルシフェラーゼ活性を測定する工程を含む、方法。

〔37.1〕

ルシフェラーゼ基質を含む溶液を当該細胞に接触させる工程をさらに含む、〔37〕に記載の方法。

〔37.2〕

溶液がin vivoの組織中における細胞間液である、〔37〕または〔37.1〕に記載の方法。

〔37.3〕

組織が腫瘍組織である、〔37.2〕に記載の方法。

〔37.4〕

工程(i)が、P2Y11を発現するsplit Luc/HEK293細胞をin vivoの組織中に移植する工程である、〔37.2〕または〔37.3〕に記載の方法。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]Jurkat細胞を用いて試験したATP存在下または非存在下での各種の抗CD137抗体のアゴニスト活性を示す図。　X軸は抗体の濃度（μg/mL）、Y軸は相対発光量を示す。

[図2]Jurkat細胞を用いて試験したADP存在下または非存在下での各種の抗CD137抗体のアゴニスト活性を示す図。　X軸は抗体の濃度（μg/mL）、Y軸は相対発光量を示す。

[図3]ヒトT細胞を用いて試験したADPbetaS存在下または非存在下での各種の抗CD137抗体のアゴニスト活性を示す図。

[図4]ヒトT細胞を用いて試験したADPbetaS存在下または非存在下でのdBBAT119-P253/dBBAT119L-LamLib（低分子スイッチ抗CD137抗体）またはNS1-P253（ノンスイッチ抗CD137抗体）のアゴニスト活性を示す図。　X軸は抗体の濃度（μg/mL）、Y軸はIFNγ産生量（ng/mL）を示す。

[図5]ファージELISAにより試験した、各種の抗CD137抗体（結合活性が向上されたスイッチ抗CD137抗体）のATP依存的な抗原結合活性を示す図。　Y軸は、ATP存在下／非存在下における吸光度のS/N比を、X軸は、抗原存在下／非存在下でのS/N比を示す。

[図6]抗CD137抗体（dBBAT119H-P253/dBBAT119L-LamLib）の各種改変体のATP存在下または非存在下におけるヒトCD137への結合活性を示す図。　上段は、ATP非存在下でのヒトCD137への結合活性を、下段は、ATP存在下でのヒトCD137への結合活性を示す。

[図7]ヒトT細胞を用いて試験したADPbetaS存在下または非存在下でのdBBAT119H-P253/dBBAT119L-LamLib、dBBATk119H024-P253/dBBATk119L020-LamLib、IC17HdK-hIgG1/IC17L-k0（コントロール）、またはNS1-P253（ノンスイッチ抗CD137抗体）のアゴニスト活性を示す図。　分図（A)は、ADPbetaS非存在下での試験結果を、分図（B)は、ADPbetaS存在下での試験結果を示す。　X軸は抗体の濃度（μg/mL）、Y軸はIFNγ産生量（ng/mL）を示す。

[図8]4-1BB Jurkatレポータージーンアッセイを用いて試験したATP存在下ま

たは非存在下での各種スイッチ抗CD137抗体のアゴニスト活性を示す図。　分図（A)は、ATP非存在下での試験結果を、分図（B)は、ATP存在下での試験結果を示す。

[図9]ヒト末梢血単核球細胞を用いて試験した、重鎖定常領域のFcγ受容体への結合活性の上昇による、各種スイッチ抗CD137抗体のATP存在下でのアゴニスト活性の増強を示す図。　分図（A)は、IL-2産生量を指標に測定したアゴニスト活性を、分図（B）は、IFN-γの産生量を指標に測定したアゴニスト活性を示す。

[図10]ヒト末梢血単核球細胞を用いて試験した、重鎖定常領域のFcγ受容体への結合活性の上昇、または重鎖定常領域のｐIの上昇による、各種スイッチ抗CD137抗体のATP存在下でのアゴニスト活性の増強を示す図。　分図（A)は、IL-2産生量を指標に測定したアゴニスト活性を、分図（B）は、IFN-γの産生量を指標に測定したアゴニスト活性を示す。

[図11]ヒト末梢血単核球細胞を用いて試験した、重鎖定常領域のFcγ受容体への結合活性の上昇による、各種スイッチ抗CD137抗体のATP存在下または非存在下でのアゴニスト活性の増強を示す図。　分図（A)は、IL-2産生量を指標に測定したアゴニスト活性を、分図（B）は、IFN-γの産生量を指標に測定したアゴニスト活性を示す。

[図12]ヒト末梢血単核球細胞を用いて試験した、重鎖定常領域のFcγ受容体への結合活性の上昇による、各種スイッチ抗CD137抗体のATP存在下または非存在下でのアゴニスト活性の増強を示す図。　分図（A)は、IL-2産生量を指標に測定したアゴニスト活性を、分図（B）は、IFN-γの産生量を指標に測定したアゴニスト活性を示す。

[図13]ヒト末梢血単核球細胞を用いて試験した、重鎖定常領域のFcγ受容体への結合活性の上昇による、各種スイッチ抗CD137抗体のATP存在下または非存在下でのアゴニスト活性の増強を示す図。　分図（A)は、IL-2産生量を指標に測定したアゴニスト活性を、分図（B）は、IFN-γの産生量を指標に測定したアゴニスト活性を示す。

[図14]ヒト末梢血単核球細胞を用いて試験した、重鎖定常領域のFcγ受容体への結合活性の上昇による、各種スイッチ抗CD137抗体のATP存在下または非存在下でのアゴニスト活性の増強を示す図。　分図（A)は、IL-2産生量を指標に測定したアゴニスト活性を、分図（B）は、IFN-γの産生量を指標に測定したアゴニスト活性を示す。

[図15]ヒト末梢血単核球細胞を用いて試験した、重鎖定常領域のFcγ受容体への結合活性の上昇による、各種スイッチ抗CD137抗体のATP存在下または非存在下でのアゴニスト活性の増強を示す図。　分図（A)は、IL-2産生量を指標に測定したアゴニスト活性を、分図（B）は、IFN-γの産生量を指標に測定したアゴニスト活性を示す。

[図16]ヒト末梢血単核球細胞を用いて試験した、重鎖定常領域のｐIの上昇による、各種スイッチ抗CD137抗体のATP存在下または非存在下でのアゴニスト活性の増強を示す図。　分図（A)は、IL-2産生量を指標に測定したアゴニスト活性を、分図（B）は、IFN-γの産生量を指標に測定したアゴニスト活性を示す。

[図17]ヒト末梢血単核球細胞を用いて試験した、重鎖定常領域のｐIの上昇による、各種スイッチ抗CD137抗体のATP存在下または非存在下でのアゴニスト活性の増強を示す図。　分図（A)は、IL-2産生量を指標に測定したアゴニスト活性を、分図（B）は、IFN-γの産生量を指標に測定したアゴニスト活性を示す。

[図18]ヒト末梢血単核球細胞を用いて試験した、重鎖定常領域のｐIの上昇による、各種スイッチ抗CD137抗体のATP存在下または非存在下でのアゴニスト活性の増強を示す図。　分図（A)は、IL-2産生量を指標に測定したアゴニスト活性を、分図（B）は、IFN-γの産生量を指標に測定したアゴニスト活性を示す。

[図19]ヒト末梢血単核球細胞を用いて試験した、重鎖定常領域のｐIの上昇による、各種スイッチ抗CD137抗体のATP存在下または非存在下でのアゴニスト活性の増強を示す図。　分図（A)は、IL-2産生量を指標に測定したアゴニス

ト活性を、分図（B）は、IFN-γの産生量を指標に測定したアゴニスト活性を示す。

[図20]ヒト末梢血単核球細胞を用いて試験した、重鎖定常領域のｐIの上昇による、各種スイッチ抗CD137抗体のATP存在下または非存在下でのアゴニスト活性の増強を示す図。　分図（A)は、IL-2産生量を指標に測定したアゴニスト活性を、分図（B）は、IFN-γの産生量を指標に測定したアゴニスト活性を示す。

[図21]ヒト末梢血単核球細胞を用いて試験した、重鎖定常領域のｐIの上昇による、各種スイッチ抗CD137抗体のATP存在下または非存在下でのアゴニスト活性の増強を示す図。　分図（A)は、IL-2産生量を指標に測定したアゴニスト活性を、分図（B）は、IFN-γの産生量を指標に測定したアゴニスト活性を示す。

[図22]ヒト末梢血単核球細胞を用いて試験した、重鎖定常領域のｐIの上昇による、各種スイッチ抗CD137抗体のATP存在下または非存在下でのアゴニスト活性の増強を示す図。　分図（A)は、IL-2産生量を指標に測定したアゴニスト活性を、分図（B）は、IFN-γの産生量を指標に測定したアゴニスト活性を示す。

[図23]ヒト末梢血単核球細胞を用いて試験した、重鎖定常領域のFcγ受容体への結合活性の上昇による、各種スイッチ抗CD137抗体のATP存在下または非存在下でのアゴニスト活性の増強を示す図。　分図（A)は、IL-2産生量を指標に測定したアゴニスト活性を、分図（B）は、IFN-γの産生量を指標に測定したアゴニスト活性を示す。

[図24]ヒトCD137ノックインマウスを用いて試験した、各種スイッチ、ノンスイッチ抗CD137抗体の血漿中抗体濃度を示す図。　FcはいずれもmIgG1である。

[図25]ヒトCD137ノックインマウスを用いて試験した、各種スイッチ、ノンスイッチ抗CD137抗体の血漿中抗体濃度を示す図。　FcはいずれもMB110である。

[図26]ヒトCD137ノックインマウスを用いて試験した、各種スイッチ、ノンスイッチ抗CD137抗体の血漿中抗体濃度を示す図。　FcはいずれもMB492である。

[図27]MC38細胞を移植したマウスモデルにおけるA375-mIgG1/B167-ml0rの抗腫瘍効果を示す図。　各点は一群（n=5）の腫瘍体積の平均値を示す。

[図28]MC38細胞を移植したマウスモデルにおける抗体（NO1-mIgG1、またはA375-mIgG1/B167-ml0r）の投与による臓器重量を示す図。　分図（A)は、リンパ節の、分図（B)は、脾臓の重量を示す。

[図29]MC38細胞を移植したマウスモデルにおける、NO1-mIgG1、またはA375-mIgG1/B167-ml0rの投与によるリンパ節でのT細胞活性化の程度を示す図。　分図（A)は、CD8陽性T細胞のPD-1陽性T細胞の割合を、分図（B)は、CD8陽性T細胞のICOS陽性T細胞の割合を、分図（C）は、CD8陽性T細胞のGranzymeB陽性T細胞の割合を示す。

[図30]MC38細胞株を移植したマウスモデルにおける、NO1-mIgG1、またはA375-mIgG1/B167-ml0rの投与による脾臓でのT細胞活性化の程度を示す図。　分図（A)は、CD8陽性T細胞のPD-1陽性T細胞の割合を、分図（B)は、CD8陽性T細胞のICOS陽性T細胞の割合を、分図（C)は、CD8陽性T細胞のGranzymeB陽性Tの割合を示す。

[図31]MC38細胞株を移植したマウスモデルにおける、NO1-mIgG1、またはA375-mIgG1/B167-ml0rの投与による肝臓でのT細胞活性化の程度を示す図。　分図（A)は、CD8陽性T細胞のPD-1陽性T細胞の割合を、分図（B)は、CD8陽性T細胞のGranzymeB陽性T細胞の割合を示す。

[図32]MC38細胞株を移植したマウスモデルにおける、A356-MB110/B040-ml0rの抗腫瘍効果を示す図。　各点は一群（n=5）の腫瘍体積の平均値を示す。

[図33]MC38細胞株を移植したマウスモデルにおける、NS2-MB110、またはA356-MB110/B040-ml0r投与による臓器重量を示す図。　分図（A)は、リンパ節の、分図（B）は、脾臓の重量を示す。

[図34]MC38細胞株を移植したマウスモデルにおける、NS2-MB110、またはA356

-MB110/B040-ml0r投与による肝臓でのT細胞活性化の程度を示す図。　分図（A)は、CD8陽性T細胞のPD-1陽性Tの割合を、分図（B)は、CD8陽性T細胞のICOS陽性T細胞の割合を示す。

[図35]MC38細胞株を移植したマウスモデルにおける、A372-mIgG1/B040-ml0rの抗腫瘍効果を示す図。　各点は1群 n=5 の腫瘍体積の平均値を示す。

[図36]MC38細胞株を移植したマウスモデルにおける、A372-mIgG1/B040-ml0r投与によるリンパ節の細胞数（分図（A））、および脾臓の重量（分図（B））を示す。

[図37]MC38細胞株を移植したマウスモデルにおけるA372-mIgG1/B040-ml0r投与による肝臓でのT細胞活性化の程度（CD8陽性T細胞のGranzymeB陽性T細胞の割合）を示す図。

[図38]MC38細胞株を移植したマウスモデルにおけるA372-MB110/B040-ml0rの抗腫瘍効果を示す図。　各点は1群 n=5 の腫瘍体積の平均値を示す。

[図39]MC38細胞株を移植したマウスモデルにおける、NS2-MB110、またはA372-MB110/B040-ml0r投与による臓器重量を示す図。　分図（A)は、リンパ節の、分図（B)は、脾臓の重量を示す。

[図40]MC38細胞株を移植したマウスモデルにおける、NS2-MB110、またはA372-MB110/B040-ml0r投与による肝臓でのT細胞活性化の程度（CD8陽性T細胞のPD-1陽性T細胞の割合）を示す図。

[図41]MC38細胞株を移植したマウスモデルにおけるA372-MB492/B040-ml0rの抗腫瘍効果を示す図。　各点は1群（n=5）の腫瘍体積の平均値を示す。

[図42]MC38細胞株を移植したマウスモデルにおける、NS1-MB492、またはA372-MB492/B040-ml0r投与によるリンパ節の細胞数、および脾臓の臓器重量を示す図。　分図(A)は、リンパ節の細胞数を、および分図(B)は、脾臓の臓器重量を示す。

[図43]MC38細胞株を移植したマウスモデルにおける、 NS1-MB492、またはA372-MB492/B040-ml0r投与による肝臓でのT細胞活性化の程度（CD8陽性T細胞のGranzymeB陽性T細胞の割合）を示す図。

[図44]MC38細胞株を移植したマウスモデルにおける、A486-MB492/B167-ml0rまたはA488-MB492/B226-ml0rの抗腫瘍効果を示す図。　各点は1群（n=5）の腫瘍体積の平均値を示す。

[図45]MC38細胞株を移植したマウスモデルにおける、NS1-MB492、A486-MB492/B167-ml0rまたはA488-MB492/B226-ml0r投与によるリンパ節1つあたりの細胞数および脾臓重量を示す図。　分図（A)は、リンパ節1つあたりの細胞数を、また分図（B)は、脾臓重量を示す。

[図46]MC38細胞株を移植したマウスモデルにおける、NS1-MB492、A486-MB492/B167-ml0rまたはA488-MB492/B226-ml0r投与による肝臓でのエフェクター細胞の浸潤レベル（CD45陽性T細胞中のCD3陽性CD8陽性T細胞等の割合）を示す図。

[図47]MC38細胞株を移植したマウスモデルにおける、A489-MB492/B223-ml0rの抗腫瘍効果を示す図。　各点は一群（n=5）の腫瘍体積の平均値を示す。

[図48]MC38細胞株を移植したマウスモデルにおける、NS1-MB492、またはA489-MB492/B223-ml0r投与によるリンパ節の細胞数および脾臓のリンパ球画分の細胞数を示す図。　分図(A)は、リンパ節の細胞数を、および分図（B)は、脾臓のリンパ球画分の細胞数を示す

[図49]MC38細胞株を移植したマウスモデルにおける、NS1-MB492、またはA489-MB492/B223-ml0r投与による肝臓でのT細胞活性化の程度（CD45陽性T細胞のCD8陽性T細胞の割合）を示す図。

[図50]MC38細胞株を移植したマウスモデルにおけるA548-mIgG1/B256-ml0r およびA551-mIgG1/B256-ml0rの抗腫瘍効果を示す図。　分図(A)は、A548-mIgG1/B256-ml0rの抗腫瘍効果を、および分図(B)は、A551-mIgG1/B256-ml0rの抗腫瘍効果を示す。

[図51]MC38細胞株を移植したマウスモデルにおける、NS1-mIgG1、A548-mIgG1/B256-ml0rまたはA551-mIgG1/B256-ml0r投与による臓器重量を示す図。　分図（A)は、リンパ節の、分図（B)は、脾臓の重量を示す。

[図52]MC38細胞株を移植したマウスモデルにおける、NS1-mIgG1、A548-mIgG1

/B256-ml0r、またはA551-mIgG1/B256-ml0r投与による肝臓でのT細胞活性化の程度を示す図。　分図（A)は、CD8陽性T細胞のPD-1陽性T細胞の割合を、分図（B)は、CD8陽性T細胞のGranzyme B陽性T細胞の割合を示す。

[図53]MC38細胞株を移植したマウスモデルにおける、A551-MB110/B379-ml0rの抗腫瘍効果を示す図。

[図54]MC38細胞株を移植したマウスモデルにおける、NS1-mIgG1またはA551-MB110/B379-ml0r投与による臓器重量を示す図。　分図（A)は、リンパ節の、分図（B)は、脾臓の重量を示す。

[図55]MC38細胞株を移植したマウスモデルにおける、NS1-mIgG1またはA551-MB110/B379-ml0r投与による脾臓でのT細胞活性化の程度を示す図。　分図（A)は、CD8陽性T細胞のPD-1陽性T細胞の割合を、分図（B)は、CD8陽性T細胞のICOS陽性T細胞の割合を、分図（C)は、CD8陽性T細胞のGranzyme B陽性T細胞の割合を示す。

[図56]MC38細胞株を移植したマウスモデルにおける、NS1-mIgG1またはA551-MB110/B379-ml0r投与による肝臓でのT細胞活性化の程度を示す図。　分図（A)は、CD8陽性T細胞のPD-1陽性T細胞の割合を、分図（B)は、CD8陽性T細胞のICOS陽性T細胞の割合を、分図（C)は、CD8陽性T細胞のGranzyme B陽性T細胞の割合を示す。

[図57]Jurkat細胞を用いて試験したL-キヌレニン存在下または非存在下での各種の抗CD137抗体のアゴニスト活性を示す図。　X軸は抗体の濃度（μg/mL）、Y軸は相対発光量を示す。

[図58]4-1BB Jurkat細胞を用いて試験した低分子化合物（ATPまたはADP）存在下または非存在下での各種の抗CD137抗体のアゴニスト活性を示す図。　X軸は抗体の濃度（μg/mL）、Y軸は相対発光量を示す。

[図59]細胞外ATPレベルの測定用に作製されたP2Y11 split Luc/HEK293細胞のATP応答性（ATP濃度に依存したルシフェリン発光）を示す図である。

[図60]P2Y11 split Luc/HEK293細胞をマウスの皮下に移植した際のin vivoでのATP応答性（ATP濃度に依存したルシフェリン発光）を示す図である。

[図61]既定濃度のATPおよびP2Y11 split Luc/HEK293細胞を皮下に移植されたマウス、ならびにP2Y11 split Luc/HEK293細胞を皮下に移植されたFM3A担癌マウスの発光イメージング測定の結果を示す図である。マウスの腹側部におけるマークが検出された発光を示す。

[図62]抗hIL6R抗体であるMRAH-G4T1/MRAL-k0（コントロール抗体）、H0002-G4T1/L1058-lam1、H0041-G4T1/L1088-lam1、およびH0052-G4T1/L1083-lam1（いずれもスイッチ抗体）のATP濃度に依存したhIL6Rに対する結合活性（KD値）を示す図である。

[図63]抗hIL6R抗体であるMRAH-G4T1/MRAL-k0（コントロール抗体）、H0002-G4T1/L1058-lam1、H0041-G4T1/L1088-lam1、およびH0052-G4T1/L1083-lam1（いずれもスイッチ抗体）のADP濃度に依存したhIL6Rに対する結合活性（KD値）を示す図である。

[図64]抗hIL6R抗体であるMRAH-G4T1/MRAL-k0（コントロール抗体）、H0002-G4T1/L1058-lam1、H0041-G4T1/L1088-lam1、およびH0052-G4T1/L1083-lam1（いずれもスイッチ抗体）のAMP濃度に依存したhIL6Rに対する結合活性（KD値）を示す図である。

[図65]抗hIL6R抗体であるMRAH-mFa55/MRAL-mk0（コントロール抗体）、H0002-mFa55/L1058-ml0、H0041-mFa55/L1088-ml0、およびH0052-mFa55/L1083-ml0（いずれもスイッチ抗体）のATP濃度に依存したADCC活性を示す図である。

[図66]抗hIL6R抗体であるMRAH-mFa55/MRAL-mk0（コントロール抗体）、H0002-mFa55/L1058-ml0、H0041-mFa55/L1088-ml0、およびH0052-mFa55/L1083-ml0（いずれもスイッチ抗体）のin vivoにおける抗腫瘍活性を示す図である。IC17Hdk-mFa55/IC17L-mk1は陰性コントロール抗体である。

[図67]抗hIL6R抗体であるMRAH-mFa55/MRAL-mk0（コントロール抗体）の正常マウスおよびhIL6Rトランスジェニックマウスでの血漿中動態の比較を示す図である。グラフの縦軸は抗体の血漿中濃度を示す。

[図68]抗hIL6R抗体であるH0002-mFa55/L1058-ml0（スイッチ抗体）の正常マウスおよびhIL6Rトランスジェニックマウスでの血漿中動態の比較を示す図で

ある。グラフの縦軸は抗体の血漿中濃度を示す。

[図69]抗hIL6R抗体であるH0041-mFa55/L1088-ml0（スイッチ抗体）の正常マウスおよびhIL6Rトランスジェニックマウスでの血漿中動態の比較を示す図である。グラフの縦軸は抗体の血漿中濃度を示す。

[図70]抗hIL6R抗体であるH0052-mFa55/L1083-ml0（スイッチ抗体）の正常マウスおよびhIL6Rトランスジェニックマウスでの血漿中動態の比較を示す図である。グラフの縦軸は抗体の血漿中濃度を示す。

[図71]抗hIL6R non-switch抗体であるMRAH-mFa55/MRAL-mk0（コントロール抗体）、抗hIL6R switch抗体であるH0002-mFa55/L1058-ml0、H0041-mFa55/L1088-ml0、およびH0052-mFa55/L1083-ml0（いずれもスイッチ抗体）をそれぞれ投与した後のhIL6Rトランスジェニックマウスにおける抗原の蓄積を示す図である。グラフの縦軸は可溶型hIL6Rの血漿中濃度を示す。陰性コントロール抗体としてIC17Hdk-mFa55/IC17L-mk1（図中ではKLH-mFa55と表記）が用いられている。

[図72]抗hIL6R non-switch抗体であるMRAH-mFa55/MRAL-mk0（コントロール抗体）、抗hIL6R switch抗体であるH0002-mFa55/L1058-ml0、およびH0041-mFa55/L1088-ml0（いずれもスイッチ抗体）のin vivoにおける抗腫瘍活性を示す図である。IC17Hdk-mFa55/IC17L-mk1は陰性コントロール抗体である。

[図73]抗hIL6R non-switch抗体であるMRAH-mFa55/MRAL-mk0（コントロール抗体）、抗hIL6R switch抗体であるH0002-mFa55/L1058-ml0、およびH0041-mFa55/L1088-ml0（いずれもスイッチ抗体）の血漿中動態の比較を示す図である。グラフの縦軸は抗体の血漿中濃度を示す。

[図74]抗hIL6R non-switch抗体であるMRAH-mFa55/MRAL-mk0（コントロール抗体）、抗hIL6R switch抗体であるH0002-mFa55/L1058-ml0、およびH0041-mFa55/L1088-ml0（いずれもスイッチ抗体）をそれぞれ投与した後の抗原の蓄積を示す図である。グラフの縦軸は可溶型hIL6Rの血漿中濃度を示す。陰性コントロール抗体としてIC17Hdk-mFa55/IC17L-mk1（図中ではKLH-mFa55と表記）が用いられている。

[図75]抗hIL6R non-switch抗体であるMRAH-mFa55/MRAL-mk0（コントロール抗体）、抗hIL6R switch抗体であるH0041-mFa55/L1088-ml0、およびH0052-mFa55/L1083-ml0（いずれもスイッチ抗体）のin vivoにおける抗腫瘍活性を示す図である。IC17Hdk-mFa55/IC17L-mk1は陰性コントロール抗体である。

[図76]抗hIL6R non-switch抗体であるMRAH-mFa55/MRAL-mk0（コントロール抗体）、抗hIL6R switch抗体であるH0052-mFa55/L1083-ml0（スイッチ抗体）の血漿中動態の比較を示す図である。グラフの縦軸は抗体の血漿中濃度を示す。

[図77]抗hIL6R non-switch抗体であるMRAH-mFa55/MRAL-mk0（コントロール抗体）、抗hIL6R switch抗体であるH0052-mFa55/L1083-ml0（スイッチ抗体）をそれぞれ投与した後の抗原の蓄積を示す図である。グラフの縦軸は可溶型hIL6Rの血漿中濃度を示す。陰性コントロール抗体としてIC17Hdk-mFa55/IC17L-mk1（図中ではKLH-mFa55と表記）が用いられている。

[図78]抗PD1抗体であるmPD1F2VH-mF18/mPD1F2VL-mk1（コントロール抗体）とH5029-mFa31/L3021-ml0（スイッチ抗体）のATP濃度に依存したPD-1/PDL-1結合阻害活性を示す図である。

[図79]抗PD1抗体であるmPD1F2VH-mF18/mPD1F2VL-mk1（コントロール抗体）とH5041-mFa31/L3021-ml0（スイッチ抗体）のATP濃度に依存したPD-1/PDL-1結合阻害活性を示す図である。

[図80]抗PD1抗体であるmPD1F2VH-mF18/mPD1F2VL-mk1（コントロール抗体）、H5029-mFa31/L3021-ml0、H5041-mFa31/L3021-ml0（いずれもスイッチ抗体）のAMP濃度に依存したin vitroでの中和活性を示す図である。

[図81]抗PD1抗体であるmPD1F2VH-mF18/mPD1F2VL-mk1（コントロール抗体）、H5029-mFa31/L3021-ml0、H5041-mFa31/L3021-ml0（いずれもスイッチ抗体）のATP濃度に依存したin vitroでの中和活性を示す図である。

[図82]抗PD1抗体であるmPD1F2VH-mFa55/mPD1F2VL-mk1（コントロール抗体）、H5041-mFa55/L3023-ml0（スイッチ抗体）のin vivoにおける抗腫瘍活性を示す図である。IC17Hdk-mFa55/IC17L-mk1は陰性コントロール抗体である。

[図83]抗PD1抗体であるmPD1F2VH-mFa55/mPD1F2VL-mk1（コントロール抗体）、H5041-mFa55/L3023-ml0（スイッチ抗体）の（A）腫瘍および（B）脾臓でのPD-1発現細胞の除去活性を示す図である。図中の表記として、isotypeは陰性コントロール抗体（IC17Hdk-mFa55/IC17L-mk1）を表す。

[図84]抗hIL6R スイッチ抗体であるH0041L1088 Fab断片とATPとの結合の様式を示す図である。図中、ATPを球棒モデルで示し、ATPと相互作用を形成するアミノ酸残基をスティックモデルで示した。破線は、当該抗体とATPとの間の水素結合を示す。

[図85]抗hIL6R スイッチ抗体であるH0041L1088のエピトープを、hIL6R細胞外ドメイン（shIL6R）のアミノ酸配列上にマッピングした図である。図中、灰色で網掛けしたアミノ酸残基は、結晶構造においてH0041L1088 FabあるいはATPのいずれかから4.2Å以内の距離に位置する非水素原子を1個以上含むshIL6Rのアミノ酸残基（エピトープ残基）を示す。

[図86]ATPが結合したH0041L1088 Fab断片とshIL6Rとの結合の詳細を示す図である。図中、当該抗体の重鎖を黒色、軽鎖を灰色、shIL6Rを白色で描画した。図中、ATPは球モデルで示し、当該抗体あるいはATPから4.2Å以内にあるshIL6Rのエピトープ残基と、エピトープ残基から4.2Å以内にある当該抗体のパラトープ残基をスティックモデルで示した。また、破線は当該抗体とshIL6Rとの間の水素結合を示す。なお、shIL6RのF298のみ球モデルで示し、ATPとの相互作用の様子をわかりやすくした。

[図87]上記図８６の構造を180度回転した（裏から見た）場合の構造を示す図である。

[図88]4-1BB Jurkatレポータージーンアッセイを用いて試験したATP存在下での各種スイッチ抗CD137抗体のアゴニスト活性を示す図。

[図89]抗CD137 スイッチ抗体であるA375-SCF041aPh /B167-LamlibおよびA375-MY201aPh/B167-Lamlibのそれぞれのの血漿中動態の比較を示す図である。グラフの縦軸は抗体の血漿中濃度を示す。

[図90]LLC1/OVA/GPC3細胞株をhCD137KI/mFcγR2bKO/hFcγR2bTg#90マウスに

移植して作製したマウスモデルにおける、A375/B167-SCF041aPhおよびA375/B167-MY201aPhのそれぞれの抗腫瘍効果を示す図。　各点は1群 n=5 の腫瘍体積の平均値を示す。

[図91]T cell activation Bioassay (NFAT)を用いたレポータージーンアッセイにより試験したATP存在下での各種スイッチ抗CD3抗体のアゴニスト活性を示す図。

発明を実施するための形態

[0010] Ⅰ．定義

[0011] 用語「結合活性（binding activity）」 は、分子（例えば、抗体）の１個またはそれ以上の結合部位と、分子の結合パートナー（例えば、抗原）との間の、非共有結合的な相互作用の合計の強度のことをいう。ここで、「結合活性（binding activity）」は、ある結合対のメンバー（例えば、抗体と抗原）の間の１：１相互作用に厳密に限定されない。例えば、結合対のメンバーが１価での１：１相互作用を反映する場合、この結合活性を特に、固有の結合アフィニティ（「アフィニティ」） と呼ぶ 。結合対のメンバーが、１価での結合および多価での結合の両方が可能である場合、結合活性は、これらの結合力の総和となる。分子Xのそのパートナーに対する結合活性は、一般的に、解離定数（KD）または「単位リガンド量当たりのアナライト結合量」（以下「結合量」と呼ぶことがある）により表すことができる。一般に、解離定数（KD）は、その数値が低いほど結合活性は高くなり、「単位リガンド量当たりのアナライト結合量」または「結合量」は、その数値が高いほど結合活性が高くなることが当業者に理解されよう。結合活性は、本明細書に記載のものを含む、当該技術分野において知られた通常の方法によって測定され得る。結合活性を測定するための具体的な実例となるおよび例示的な態様については、下で述べる。

[0012] 「結合活性成熟」抗原結合分子または抗体、もしくは、「結合活性上昇（増強）」抗原結合分子または抗体は、改変を備えていない親抗原結合分子または親抗体と比較して、1つまたは複数の超可変領域（hypervariable region

：HVR）中に抗原結合分子または抗体の抗原に対する結合活性の改善をもたらす1つまたは複数の改変を伴う、抗体のことをいう。

[0013] 用語「抗CD137抗原結合分子」「抗CD137抗体」または「CD137に結合する抗原結合分子」「CD137結合する抗体」は、充分な結合活性でCD137と結合することのできる抗原結合分子または抗体であって、その結果その抗原結合分子または抗体がCD137を標的化したときに診断剤および／または治療剤として有用であるような、抗原結合分子または抗体のことをいう。特定の態様において、抗CD137抗体は、異なる種からのCD137間で保存されているCD137のエピトープに結合する。

[0014] 用語「低分子化合物に依存したCD137結合活性を有する」抗CD137抗原結合分子または抗CD137抗体は、当該低分子化合物の存在下でのCD137に対する結合活性が、当該低分子化合物の非存在下でのCD137に対する結合活性と比べて高い抗原結合分子または抗体をいう。一態様において、「低分子化合物の存在下」とは、当該低分子化合物が、10μM以上、50μM以上、100μM以上、150μM以上、200μM以上、または250μM以上存在する条件下をいう。一態様において、低分子化合物の存在下における、無関係な非CD137タンパク質への抗CD137抗原結合分子または抗体の結合活性の程度は、（例えば、放射免疫測定法（radioimmunoassay: RIA)または表面プラズモン共鳴分析法（surface plasmon resonance: SPR）により）測定したとき、抗原結合分子または抗体のCD137への結合の約10%未満である。特定の態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体は、低分子化合物の存在下において、≦1μM、≦100nM、≦10nM、≦1nM、≦0.1nM、≦0.01nM、または≦0.001nM（例えば、10^{-6}M以下、10^{-7}M以下、10^{-8}M以下、10^{-9}M以下、10^{-10}M以下、例えば10^{-6}M ～10^{-10}M、10^{-7}M ～10^{-9}M例えば、10^{-7}M～10^{-8}M）の解離定数（KD）を有する。

[0015] 本明細書で用語「抗原結合分子」は、その最も広い意味において使用され、抗原決定基に特異的に結合する分子を指す。一態様において、抗原結合分子は、抗体、抗体断片、または抗体誘導体である。

[0016] 本明細書で用いられる「アゴニスト抗原結合分子」または「アゴニスト抗

体」は、それが結合する抗原（例えば、CD137、CD3）の生物学的活性を有意に誘導または増強する抗原結合分子または抗体である。

従って、例えば、抗原が、CD137の場合には、斯かるアゴニスト作用を有する抗原結合分子または抗体を、それぞれ「CD137アゴニスト抗原結合分子」または「CD137アゴニスト抗体」と称する。同様に、例えば、抗原が、CD3の場合には、斯かるアゴニスト作用を有する抗原結合分子または抗体を、それぞれ「CD3アゴニスト抗原結合分子」または「CD3アゴニスト抗体」と称する。

[0017] 本明細書で用語「抗体」は、最も広い意味で使用され、所望の抗原結合活性を示す限りは、これらに限定されるものではないが、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）および抗体断片を含む、種々の抗体構造を包含する。

[0018] 「抗体断片」は、完全抗体が結合する抗原に結合する当該完全抗体の一部分を含む、当該完全抗体以外の分子のことをいう。抗体断片の例は、これらに限定されるものではないが、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、$F(ab')_2$；ダイアボディ；線状抗体；単鎖抗体分子（例えば、scFv）；および、抗体断片から形成された多重特異性抗体を含む。

[0019] 参照抗原結合分子または参照抗体と「同じエピトープに結合する抗原結合分子」または「同じエピトープに結合する抗体」は、競合アッセイにおいてその参照抗体または参照抗原結合分子が自身の抗原へする結合を50%以上阻止する抗体または抗原結合分子のことをいい、また逆にいえば、参照抗体は、競合アッセイにおいて前述の抗体が自身の抗原へする結合を50%以上阻止する。例示的な競合アッセイが、本明細書で提供される。一態様において、参照抗原結合分子または参照抗体が、低分子化合物に依存した抗原結合活性を有する場合、競合アッセイは、当該低分子化合物の存在下において行われる。

[0020] 用語「キメラ」抗体は、重鎖および／または軽鎖の一部分が特定の供給源または種に由来する一方で、重鎖および／または軽鎖の残りの部分が異なった供給源または種に由来する抗体のことをいう。

[0021] 抗体の「クラス」は、抗体の重鎖に備わる定常ドメインまたは定常領域の

タイプのことをいう。抗体には5つの主要なクラスがある：IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgMである。そして、このうちいくつかはさらにサブクラス（アイソタイプ）に分けられてもよい。例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、およびIgA2である。異なるクラスの免疫グロブリンに対応する重鎖定常ドメインを、それぞれ、α、δ、ε、γ、およびμと呼ぶ。

[0022] 「エフェクター機能」は、抗体のFc領域に起因する、抗体のアイソタイプによって異なる生物学的活性のことをいう。抗体のエフェクター機能の例には次のものが含まれる：C1q結合および補体依存性細胞傷害（complement dependent cytotoxicity:CDC）；Fc受容体結合；抗体依存性細胞介在性細胞傷害（antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity: ADCC）；貪食作用；細胞表面受容体（例えば、B細胞受容体）の下方制御；および、B細胞活性化。

[0023] 「細胞傷害活性」は、細胞の機能を阻害するまたは妨げる、および／または細胞の死または破壊を引き起こす活性をいう。細胞傷害活性は、例えば抗体依存性細胞介在性細胞傷害（antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity：ADCC）活性、補体依存性細胞傷害（complement-dependent cytotoxicity：CDC）活性、およびT細胞による細胞傷害活性等でもよいし、イムノコンジュゲートなどのように、細胞傷害剤（例えば、放射性同位体や化学療法剤など）によって引き起こされるものであってもよい。

[0024] 本明細書で用語「Fc領域」は、少なくとも定常領域の一部分を含む免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために用いられる。この用語は、天然型配列のFc領域および変異体Fc領域を含む。一態様において、ヒトIgG重鎖Fc領域はCys226から、またはPro230から、重鎖のカルボキシル末端まで延びる。ただし、Fc領域のC末端のリジン（Lys447）またはグリシン－リジン（Gly446-Lys447）は、存在していてもしていなくてもよい。本明細書では別段特定しない限り、Fc領域または定常領域中のアミノ酸残基の番号付けは、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD 1991 に記載の、EUナンバリングシステム（EUインデックスとも呼ばれる）にしたがう

。

[0025] 本明細書で用語「変異Fc領域」は、少なくとも1つのアミノ酸修飾、好ましくは1つまたは複数のアミノ酸置換によって天然型配列Fc領域のそれと相違するアミノ酸配列を含む。好ましくは、変異Fc領域は、天然型配列Fc領域または親ポリペプチドのFc領域と比較して、天然型配列Fc領域中または親ポリペプチドのFc領域中に少なくとも1つのアミノ酸置換、例えば約1～約10個のアミノ酸置換、好ましくは約1～約5個のアミノ酸置換を有する。本明細書の変異Fc領域は、好ましくは、天然型配列Fc領域および／または親ポリペプチドのFc領域と少なくとも約80％の相同性、最も好ましくはそれらと少なくとも約90％の相同性、より好ましくはそれらと少なくとも約95％の相同性を備える。

[0026] 本明細書において、Fc領域または定常領域中のアミノ酸改変または置換は、EUナンバリングシステムとアミノ酸との組合せによって表され得る。たとえば、S424Nは、EUナンバリング424位のセリン（Ser）のアスパラギン（Asn）への置換を表す。また、EU424Nは、424位のアミノ酸（種類を問わない）のアスパラギン（Asn）への置換を表す。

[0027] 本明細書で用語「Fc領域含有抗体」は、Fc領域を含む抗体のことをいう。Fc領域のC末端リジン（EUナンバリングシステムにしたがえば残基447）またはFc領域のC末端グリシン－リジン（残基446-447）は、例えば抗体の精製の間にまたは抗体をコードする核酸の組み換え操作によって除去され得る。したがって、本開示によるFc領域を有する抗体を含む組成物は、G446-K447を伴う抗体、G446を伴いK447を伴わない抗体、G446-K447が完全に除去された抗体、または上記3つのタイプの抗体の混合物を含み得る。

[0028] 用語「全長抗体」、「完全抗体」、および「全部抗体」は、本明細書では相互に交換可能に用いられ、天然型抗体構造に実質的に類似した構造を有する、または本明細書で定義するFc領域または変異Fc領域を含む重鎖を有する抗体のことをいう。

[0029] 「ヒト抗体」は、ヒトもしくはヒト細胞によって産生された抗体またはヒ

ト抗体レパートリーもしくは他のヒト抗体コード配列を用いる非ヒト供給源に由来する抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を備える抗体である。このヒト抗体の定義は、非ヒトの抗原結合残基を含むヒト化抗体を、明確に除外するものである。

[0030] 「フレームワーク」または「FR」は、超可変領域（HVR）残基以外の、可変ドメイン残基のことをいう。可変ドメインのFRは、通常4つのFRドメイン：FR1、FR2、FR3、およびFR4からなる。それに応じて、HVRおよびFRの配列は、通常次の順序でVH（またはVL）に現れる：FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

[0031] 本明細書の趣旨での「アクセプターヒトフレームワーク」は、下で定義するヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークに由来する、軽鎖可変ドメイン（VL）フレームワークまたは重鎖可変ドメイン（VH）フレームワークのアミノ酸配列を含む、フレームワークである。ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークに「由来する」アクセプターヒトフレームワークは、それらの同じアミノ酸配列を含んでもよいし、またはアミノ酸配列の変更を含んでいてもよい。いくつかの態様において、アミノ酸の変更の数は、10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下、または2以下である。いくつかの態様において、VLアクセプターヒトフレームワークは、VLヒト免疫グロブリンフレームワーク配列またはヒトコンセンサスフレームワーク配列と、配列が同一である。

[0032] 「ヒトコンセンサスフレームワーク」は、ヒト免疫グロブリンVLまたはVHフレームワーク配列の選択群において最も共通して生じるアミノ酸残基を示すフレームワークである。通常、ヒト免疫グロブリンVLまたはVH配列の選択は、可変ドメイン配列のサブグループからである。通常、配列のサブグループは、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3におけるサブグループである。一態様において、VLについて、サブグループ

は上記のKabatらによるサブグループκIである。一態様において、VHについて、サブグループは上記のKabatらによるサブグループIIIである。

[0033] 「ヒト化」抗体は、非ヒトHVRからのアミノ酸残基およびヒトFRからのアミノ酸残基を含む、キメラ抗体のことをいう。ある態様では、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的にすべてを含み、当該可変領域においては、すべてのもしくは実質的にすべてのHVR（例えばCDR）は非ヒト抗体のものに対応し、かつ、すべてのもしくは実質的にすべてのFRはヒト抗体のものに対応する。ヒト化抗体は、任意で、ヒト抗体に由来する抗体定常領域の少なくとも一部分を含んでもよい。抗体（例えば、非ヒト抗体）の「ヒト化された形態」は、ヒト化を経た抗体のことをいう。

[0034] 用語「可変領域」または「可変ドメイン」は、抗体を抗原へと結合させることに関与する、抗体の重鎖または軽鎖のドメインのことをいう。天然型抗体の重鎖および軽鎖の可変ドメイン（それぞれVHおよびVL）は、通常、各ドメインが4つの保存されたフレームワーク領域（FR）および3つの超可変領域（HVR）を含む、類似の構造を有する。（例えば、Kindt et al. Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007) 参照。）1つのVHまたはVLドメインで、抗原結合特異性を与えるに充分であろう。さらに、ある特定の抗原に結合する抗体は、当該抗原に結合する抗体からのVHまたはVLドメインを使ってそれぞれVLまたはVHドメインの相補的ライブラリをスクリーニングして、単離されてもよい。例えばPortolano et al., J. Immunol. 150:880-887 (1993); Clarkson et al., Nature 352:624-628 (1991) 参照。

[0035] 本明細書で用いられる用語「超可変領域」または「HVR」は、配列において超可変であり（「相補性決定領域」または「CDR」(complementarity determining region)）、および／または構造的に定まったループ（「超可変ループ」）を形成し、および／または抗原接触残基（「抗原接触」）を含む、抗体の可変ドメインの各領域のことをいう。通常、抗体は6つのHVRを含む：VHに3つ（H1、H2、H3）、およびVLに3つ（L1、L2、L3）である。本明細書での例示的なHVRは、以下のものを含む：

(a) アミノ酸残基26-32 (L1)、50-52 (L2)、91-96 (L3)、26-32 (H1)、53-55 (H2)、および96-101 (H3)のところで生じる超可変ループ (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)) ;

(b) アミノ酸残基24-34 (L1)、50-56 (L2)、89-97 (L3)、31-35b (H1)、50-65 (H2)、 および95-102 (H3)のところで生じるCDR (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)) ;

(c) アミノ酸残基27c-36 (L1)、46-55 (L2)、89-96 (L3)、30-35b (H1)、47-58 (H2)、および93-101 (H3) のところで生じる抗原接触 (MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996)) ; ならびに、

(d) HVRアミノ酸残基46-56 (L2)、47-56 (L2)、48-56 (L2)、49-56 (L2)、26-35 (H1)、26-35b (H1)、49-65 (H2)、93-102 (H3)、および94-102 (H3)を含む、(a)、(b)、および／または(c)の組合せ。

別段示さない限り、HVR残基および可変ドメイン中の他の残基（例えば、FR残基）は、本明細書では上記のKabatらにしたがって番号付けされる。また、本明細書において、HVR残基および可変ドメイン中の他の残基（例えば、FR残基）、および当該残基におけるアミノ酸改変または置換は、Kabatナンバリングシステムとアミノ酸との組合せによって表されうる。例えば、N99は、Kabatナンバリング99位のアスパラギン（Asn）を表し、N99Aは、Kabatナンバリング99位のアスパラギン（Asn）のアラニン（Ala）への置換を表す。

[0036] 「イムノコンジュゲート」は、1つまたは複数の異種の分子にコンジュゲートされた抗体である（異種の分子は、これに限定されるものではないが、細胞傷害剤を含む）。

[0037] 本明細書でいう用語「細胞傷害剤」は、細胞の機能を阻害するまたは妨げる、および／または細胞の死または破壊の原因となる物質のことをいう。細胞傷害剤は、これらに限定されるものではないが、放射性同位体（例えば、^{211}At、^{131}I、^{125}I、^{90}Y、^{186}Re、^{188}Re、^{153}Sm、^{212}Bi、^{32}P、^{212}PbおよびLuの放射性同位体）；化学療法剤または化学療法薬（例えば、メトトレキサート、アドリア

マイシン、ビンカアルカロイド類（ビンクリスチン、ビンブラスチン、エトポシド）、ドキソルビシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブシル、ダウノルビシン、または他のインターカレート剤）；増殖阻害剤；核酸分解酵素などの酵素およびその断片；抗生物質；例えば、低分子毒素または細菌、真菌、植物、または動物起源の酵素的に活性な毒素（その断片および／または変異体を含む）などの、毒素；および、以下に開示される、種々の抗腫瘍剤または抗がん剤を含む。

[0038] 「単離された」抗体は、そのもともとの環境の成分から分離されたものである。いくつかの態様において、抗体は、例えば、電気泳動（例えば、SDS-PAGE、等電点分離法（isoelectric focusing: IEF)、キャピラリー電気泳動）またはクロマトグラフ（例えば、イオン交換または逆相HPLC）で測定して、95%または99%を超える純度まで精製される。抗体の純度の評価のための方法の総説として、例えば、Flatman et al., J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007) を参照のこと。

[0039] 「単離された」核酸は、そのもともとの環境の成分から分離された核酸分子のことをいう。単離された核酸は、その核酸分子を通常含む細胞の中に含まれた核酸分子を含むが、その核酸分子は染色体外に存在しているかまたは本来の染色体上の位置とは異なる染色体上の位置に存在している。

[0040] 本明細書で用いられる用語「ベクター」は、それが連結されたもう1つの核酸を増やすことができる、核酸分子のことをいう。この用語は、自己複製核酸構造としてのベクター、および、それが導入された宿主細胞のゲノム中に組み入れられるベクターを含む。あるベクターは、自身が動作的に連結された核酸の、発現をもたらすことができる。そのようなベクターは、本明細書では「発現ベクター」とも称される。

[0041] 「抗CD137抗原結合分子をコードするコードされた核酸」は、抗原結合分子を構成するポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸分子のことをいう。「抗CD137抗体をコードする単離された核酸」は、抗体の重鎖および軽鎖（またはその断片）をコードする1つまたは複数の核酸分子のことをいい、1つ

のベクターまたは別々のベクターに乗っている核酸分子、および、宿主細胞中の1つまたは複数の位置に存在している核酸分子を含む。

[0042] 用語「宿主細胞」、「宿主細胞株」、および「宿主細胞培養物」は、相互に交換可能に用いられ、外来核酸を導入された細胞（そのような細胞の子孫を含む）のことをいう。宿主細胞は「形質転換体」および「形質転換細胞」を含み、これには初代の形質転換細胞および継代数によらずその細胞に由来する子孫を含む。子孫は、親細胞と核酸の内容において完全に同一でなくてもよく、変異を含んでいてもよい。オリジナルの形質転換細胞がスクリーニングされたまたは選択された際に用いられたものと同じ機能または生物学的活性を有する変異体子孫も、本明細書では含まれる。

[0043] 本明細書でいう用語「モノクローナル抗体」は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体のことをいう。すなわち、その集団を構成する個々の抗体は、生じ得る変異抗体（例えば、自然に生じる変異を含む変異抗体、またはモノクローナル抗体調製物の製造中に発生する変異抗体。そのような変異体は通常若干量存在している。）を除いて、同一でありおよび／または同じエピトープに結合する。異なる決定基（エピトープ）に対する異なる抗体を典型的に含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対するものである。したがって、修飾語「モノクローナル」は、実質的に均一な抗体の集団から得られるものである、という抗体の特徴を示し、何らかの特定の方法による抗体の製造を求めるものと解釈されるべきではない。例えば、本開示にしたがって用いられるモノクローナル抗体は、これらに限定されるものではないが、ハイブリドーマ法、組換えDNA法、ファージディスプレイ法、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の全部または一部を含んだトランスジェニック動物を利用する方法を含む、様々な手法によって作成されてよく、モノクローナル抗体を作製するためのそのような方法および他の例示的な方法は、本明細書に記載されている。

[0044] 「裸抗体」は、異種の部分（例えば、細胞傷害部分）または放射性標識に

コンジュゲートされていない抗体のことをいう。裸抗体は、薬学的製剤中に存在していてもよい。

[0045] 「天然型抗体」は、天然に生じる様々な構造を伴う免疫グロブリン分子のことをいう。例えば、天然型IgG抗体は、ジスルフィド結合している2つの同一の軽鎖と2つの同一の重鎖から構成される約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。N末端からC末端に向かって、各重鎖は、可変重鎖ドメインまたは重鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（VH）を有し、それに3つの定常ドメイン（CH1、CH2、およびCH3）が続く。同様に、N末端からC末端に向かって、各軽鎖は、可変軽鎖ドメインまたは軽鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（VL）を有し、それに定常軽鎖（CL）ドメインが続く。抗体の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ（κ）およびラムダ（λ）と呼ばれる、2つのタイプの1つに帰属させられてよい。

[0046] 参照ポリペプチド配列に対する「パーセント（％）アミノ酸配列同一性」は、最大のパーセント配列同一性を得るように配列を整列させてかつ必要ならギャップを導入した後の、かつ、いかなる保存的置換も配列同一性の一部と考えないとしたときの、参照ポリペプチド配列中のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基の、百分率比として定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決める目的のアラインメントは、当該技術分野における技術の範囲内にある種々の方法、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN、Megalign（DNASTAR）ソフトウェア、またはGENETYX（登録商標）（株式会社ゼネティックス）などの、公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成することができる。当業者は、比較される配列の全長にわたって最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、配列のアラインメントをとるための適切なパラメーターを決定することができる。

[0047] ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムは、ジェネンテック社の著作であり、そのソースコードは米国著作権庁（U.S. Copyright Office, Wasington D.C., 20559）に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号TXU510

087として登録されている。ALIGN-2プログラムは、ジェネンテック社（Genentech, Inc., South San Francisco, California）から公に入手可能であるし、ソースコードからコンパイルしてもよい。ALIGN-2プログラムは、Digital UNIX V4.0Dを含むUNIXオペレーティングシステム上での使用のためにコンパイルされる。すべての配列比較パラメーターは、ALIGN-2プログラムによって設定され、変動しない。

アミノ酸配列比較にALIGN-2が用いられる状況では、所与のアミノ酸配列Aの、所与のアミノ酸配列Bへの、またはそれとの、またはそれに対する％アミノ酸配列同一性（あるいは、所与のアミノ酸配列Bへの、またはそれとの、またはそれに対する、ある％アミノ酸配列同一性を有するまたは含む所与のアミノ酸配列A、ということもできる）は、次のように計算される：分率X／Yの100倍。ここで、Xは配列アラインメントプログラムALIGN-2によって、当該プログラムのAおよびBのアラインメントにおいて同一である一致としてスコアされたアミノ酸残基の数であり、YはB中のアミノ酸残基の全数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さと等しくない場合、AのBへの％アミノ酸配列同一性は、BのAへの％アミノ酸配列同一性と等しくないことが、理解されるであろう。別段特に明示しない限り、本明細書で用いられるすべての％アミノ酸配列同一性値は、直前の段落で述べたとおりALIGN-2コンピュータプログラムを用いて得られるものである。

[0048] 用語「薬学的製剤」は、その中に含まれた有効成分の生物学的活性が効果を発揮し得るような形態にある調製物であって、かつ製剤が投与される被験体に許容できない程度に毒性のある追加の要素を含んでいない、調製物のことをいう。

[0049] 「薬学的に許容される担体」は、被験体に対して無毒な、薬学的製剤中の有効成分以外の成分のことをいう。薬学的に許容される担体は、これらに限定されるものではないが、緩衝液、賦形剤、安定化剤、または保存剤を含む。

[0050] ある剤（例えば、薬学的製剤）の「有効量」は、所望の治療的または予防

的結果を達成するために有効である、必要な用量におけるおよび必要な期間にわたっての、量のことをいう。

[0051] 「個体」または「被験体」は哺乳動物である。哺乳動物は、これらに限定されるものではないが、飼育動物（例えば、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ、ウマ）、霊長類（例えば、ヒト、およびサルなどの非ヒト霊長類）、ウサギ、ならびに、げっ歯類（例えば、マウスおよびラット）を含む。特定の態様では、個体または被験体は、ヒトである。

[0052] 本明細書でいう用語「CD137」は、別段示さない限り、霊長類（例えば、ヒト）およびげっ歯類（例えば、マウスおよびラット）などの哺乳動物を含む、任意の脊椎動物供給源からの任意の天然型CD137のことをいう。この用語は、「全長」のプロセシングを受けていないCD137も、細胞中でのプロセシングの結果生じるいかなる形態のCD137も包含する。この用語はまた、自然に生じるCD137の変異体、例えば、スプライス変異体や対立遺伝子変異体も包含する。例示的なヒトCD137の全長アミノ酸配列を、配列番号：１（NCBI Reference Sequence: NP_001552.2）、例示的なヒトCD137の細胞外領域のアミノ酸配列を、配列番号：２に示した。例示的なマウスCD137の全長アミノ酸配列を、配列番号：３（NCBI Reference Sequence: NP_035742.1）、例示的なマウスCD137の細胞外領域のアミノ酸配列を、配列番号：４に示した。例示的なサルCD137の全長アミノ酸配列を、配列番号：５（NCBI Reference Sequence: ABY47575.1）、例示的なサルCD137の細胞外領域のアミノ酸配列を、配列番号：６に示した。

CD137は、腫瘍壊死因子（TNF）受容体ファミリーのメンバーである。その代替の名称は、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー９（TNFRSF9）、4-1BB、ILAである。活性化されたCD4+およびCD8+T細胞上でのその発現に加えて、CD137はまた、B細胞、樹状細胞、ナチュラルキラー（NK）およびNK-T細胞、マクロファージ、単球、好中球、CD4+CD25+制御性Ｔ細胞、および血管内皮細胞において発現される。癌細胞においても発現されることも示されている（Labianoら、Oncoimmunology、24巻：e1062967（2015年））。その天

然のリガンドであるCD137Lは、B細胞、単球／マクロファージ、および樹状細胞などの抗原提示細胞上に示している（Wattsら、Annu. Rev. Immunol. 、23巻:23-68頁（2005年））。そのリガンドとの相互作用において、CD137は、TCR誘導性のT細胞増殖の増加、サイトカイン産生、機能的成熟、アポトーシスの抑制、および長期のCD8+T細胞生存をもたらす（Namら、Curr. Cancer Drug Targets、5巻:357-363頁（2005年）、Wattsら、Annu. Rev. Immunol. 、23巻:23-68頁（2005年））。

[0053] 用語「癌」、「がん」および「がん性」は、調節されない細胞成長／増殖によって典型的に特徴づけられる哺乳動物における生理学的状態のことをいうまたは説明するものである。

[0054] 用語「腫瘍」は、悪性か良性かによらず、すべての新生物性細胞成長および増殖ならびにすべての前がん性およびがん性細胞および組織のことをいう。用語「癌」、「がん」、「がん性」、「細胞増殖性障害」、「増殖性障害」および「腫瘍」は、本明細書でいう場合、相互に排他的でない。

[0055] 用語「細胞増殖性障害」および「増殖性障害」は、一定程度の異常な細胞増殖に関連する障害のことをいう。一態様において、細胞増殖性障害は、がんである。

[0056] 本明細書で用いられる「治療」（および、その文法上の派生語、例えば「治療する」、「治療すること」など）は、治療される個体の自然経過を改変することを企図した臨床的介入を意味し、予防のためにも、臨床的病態の経過の間にも実施され得る。治療の望ましい効果は、これらに限定されるものではないが、疾患の発生または再発の防止、症状の軽減、疾患による任意の直接的または間接的な病理的影響の減弱、転移の防止、疾患の進行速度の低減、疾患状態の回復または緩和、および寛解または改善された予後を含む。いくつかの態様において、本開示の抗体は、疾患の発症を遅らせる、または疾患の進行を遅くするために用いられる。

[0057] <u>ＩＩ．組成物および方法（抗CD137アゴニスト抗原結合分子）</u>

一局面において、本開示は、抗CD137アゴニスト抗原結合分子、およびそれ

らの使用一部基づくものである。特定の態様において、CD137に結合する抗体が提供される。本開示の抗体は、免疫細胞の活性化作用、細胞傷害活性、または抗腫瘍活性を発揮し得ることから、例えば、がんの診断または治療のために、有用である。

[0058] A．例示的抗CD137抗原結合分子または抗体

一局面において、本開示はCD137に結合する、単離された抗原結合分子または抗体を提供する。特定の態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体は、

・低分子化合物に依存したCD137結合活性を有する；

・CD137の細胞外領域に結合する；

・低分子化合物およびCD137とともに三者複合体を形成する；

・ヒトおよびサル由来のCD137に結合する；

・CD137活性のアゴニストである；

・低分子化合物の存在下で、CD137に対するアゴニスト活性を示す；

・低分子化合物の非存在下で、CD137に対するアゴニスト活性が低い；および／または

・低分子化合物の非存在下で、CD137に対するアゴニスト活性を実質的に示さない。

[0059] ［抗原結合分子または抗体の結合活性］

特定の態様において、本明細書で提供される抗原結合分子または抗体の結合活性（binding activity）は、低分子化合物の存在下において、≦1μM、≦100nM、≦10nM、≦1nM、≦0.1nM、≦0.01nMまたは≦0.001nM（例えば、10^{-6}M以下、10^{-7}M以下、10^{-8}M以下、10^{-9}M以下、10^{-10}M以下、例えば10^{-6}M ～10^{-10}M、10^{-7}M～10^{-9}M例えば、10^{-7}M ～10^{-8}M）の解離定数（KD）を有する。

[0060] 一態様において、抗原結合分子または抗体の結合活性（binding activity）は、放射性標識抗原結合測定法（radiolabeled antigen binding assay: RIA）によって測定され、KDで表される。一態様において、RIAは、目的の抗体のFabバージョンおよびその抗原を用いて実施される。例えば、抗原に対する

Fabの溶液中結合アフィニティは、非標識抗原の漸増量系列の存在下で最小濃度の（^{125}I）標識抗原によりFabを平衡化させ、次いで結合した抗原を抗Fab抗体でコーティングされたプレートにより捕捉することによって測定される。（例えば、Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881(1999) を参照のこと）。測定条件を構築するために、MICROTITER（登録商標）マルチウェルプレート（Thermo Scientific）を50mM炭酸ナトリウム（pH9.6）中5μg/mlの捕捉用抗Fab抗体（Cappel Labs）で一晩コーティングし、その後に室温（およそ23℃）で2～5時間、PBS中2%（w/v）ウシ血清アルブミンでブロックする。非吸着プレート（Nunc #269620）において、100 pMまたは26 pMの [^{125}I]-抗原を、（例えば、Presta et al., Cancer Res. 57:4593-4599（1997）における抗VEGF抗体、Fab-12の評価と同じように）目的のFabの段階希釈物と混合する。次いで、目的のFabを一晩インキュベートするが、このインキュベーションは、平衡が確実に達成されるよう、より長時間（例えば、約65時間）継続され得る。その後、混合物を、室温でのインキュベーション（例えば、1時間）のために捕捉プレートに移す。次いで溶液を除去し、プレートをPBS中0.1%のポリソルベート20（TWEEN-20（登録商標））で8回洗浄する。プレートが乾燥したら、150μl/ウェルのシンチラント（MICROSCINT-20（商標）、Packard）を添加し、TOPCOUNT（商標）ガンマカウンター（Packard）においてプレートを10分間カウントする。最大結合の20%以下を与える各Fabの濃度を、競合結合アッセイにおいて使用するために選択する。

[0061] 一態様において、抗体の結合活性（binding activity）は表面プラズモン共鳴分析法を測定原理とする例えばBIACORE（商標登録）T200またはBIACORE（商標登録）4000（GE Healthcare, Uppsala, Sweden）を用いたリガンド捕捉法が用いられる。機器操作にはBIACORE（商標登録）Control Softwareが用いられる。一態様においてアミンカップリングキット（GE Healthcare, Uppsala, Sweden）を供給元の指示にしたがって使用し、カルボキシメチルデキストランをコーティングしたセンサーチップ（GE Healthcare, Uppsala, Sweden）にリガンド捕捉用分子、たとえば抗タグ抗体、抗IgG抗体、プロテインAな

ど、を固相化する。リガンド捕捉分子は適切なpHの10 mM酢酸ナトリウム溶液を用いて希釈され、適切な流速および注入時間で注入される。結合活性測定は0.05%ポリソルベート20（その他の名称としてTween（商標登録）-20）含有緩衝液を測定用緩衝液として使用し、流速は10- 30 μL/分、測定温度は好ましくは25℃や37℃で測定される。リガンド捕捉用分子に抗体をリガンドとして捕捉させて測定を実施する場合は、抗体を注入して目的量を捕捉させたのち、測定用緩衝液を用いて調製された抗原およびまたはFc受容体の段階希釈物（アナライト）が注入される。リガンド捕捉用分子に抗原およびまたはFc受容体をリガンドとして捕捉させて測定を実施する場合は、抗原およびまたはFc受容体を注入して目的量を捕捉させたのち、測定用緩衝液を用いて調製された抗体の段階希釈物（アナライト）が注入される。

[0062] 一態様において、測定結果はBIACORE（登録商標）Evaluation Softwareを用いて解析される。速度論的パラメータ（kinetics parameter）算出は1:1 Bindingのモデルを用いて、結合および解離のセンサーグラムを同時にフィッティングすることによって実施され、結合速度（konもしくはka）、解離速度（koffもしくはkd）、平衡解離定数（KD)が計算され得る。結合活性が弱い、特に解離が早く速度論的パラメータ算出が困難な場合はSteady stateモデルを用いて平衡解離定数（KD)を計算しても良い。結合活性の他のパラメータとしては、特定の濃度のアナライトの結合量（resonance unit：RU）をリガンドの捕捉量（RU）で除して「単位リガンド量当たりのアナライト結合量」も算出され得る。

[0063] ［低分子化合物に依存した結合活性］

一局面において、抗CD137抗原結合分子または抗体は、低分子化合物に依存したCD137結合活性を有する。非限定の一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体は、低分子化合物の存在下でのCD137に対する結合活性が、当該低分子化合物の非存在下でのCD137の結合活性と比べて高い。異なる一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体は、高濃度低分子化合物の存在下でのCD137に対する結合活性が、低濃度の当該低分子化合物化合物の存在下での

CD137の結合活性と比べて高い。好ましい一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体は、低分子化合物化合物の存在下でのCD137に対する結合活性が、当該低分子化合物化合物の非存在下でのCD137の結合活性の、2倍以上、3倍以上、5倍以上、10倍以上、15倍以上、20倍以上、25倍以上、30倍以上、50倍以上、100倍以上、200倍以上、300倍以上、500倍以上、1×10^3倍以上、2×10^3倍以上、上、3×10^3倍以上、5×10^3倍以上、1×10^4倍以上、2×10^4倍以上、3×10^4倍以上、5×10^4倍以上、または1×10^5倍以上である。異なる好ましい一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体は、低分子化合物化合物の存在下でのCD137に対する結合活性が、当該低分子化合物化合物の非存在下でのCD137の結合活性の、2倍より高い、3倍より高い、5倍より高い、10倍より高い、15倍より高い、20倍より高い、25倍より高い、30倍より高い、50倍より高い、100倍より高い、200倍より高い、300倍より高い、500倍より高い、1×10^3倍より高い、2×10^3倍より高い、上、3×10^3倍より高い、5×10^3倍より高い、1×10^4倍より高い、2×10^4倍より高い、3×10^4倍より高い、5×10^4倍より高い、または1×10^5倍より高い。

[0064] 低分子化合物の濃度としては、抗CD137抗原結合分子または抗体の結合活性に差が検出される限り、任意の濃度を選択することができる。一態様において、「低分子化合物の存在下」および／または「高濃度低分子化合物の存在下」における低分子化合物の濃度としては、例えば、100nM以上、500nM以上、1μM以上、3μM以上、5μM以上、10μM以上、50μM以上、100μM以上、150μM以上、200μM以上、250μM以上、300μM以上、400μM以上、500μM以上、または1mM以上の濃度を挙げることができる。あるいは、それぞれの抗CD137抗原結合分子または抗体が最大の結合活性を示すような十分量をここでの濃度とすることもできる。また、一態様において、「低濃度低分子化合物の存在下」における低分子化合物の濃度としては、例えば、500μM以下、250μM以下、200μM以下、150μM以下、100μM以下、50μM以下、10μM以下、1μM以下、500nM以下、100nM以下、50nM以下、10nMまたは1nM以下の濃度を挙げることができる。低分子化合物の濃度がゼロまたは実質的な濃度がゼロの場合

を、低濃度の一態様として選択することもできる。

ここで、「実質的な濃度がセロ」とは、例えば、低分子化合物が存在するものの、現在の技術ではその濃度を検出することができない程度の極めて微量な濃度を挙げることができる。

[0065] 一態様において、10μM、50μM、100μM、150μM、200μM、または250μMの低分子化合物の存在下でのCD137に対する結合活性は、当該低分子化合物の非存在下でのCD137に対する結合活性の、2倍以上、5倍以上、10倍以上、15倍以上、16倍以上、17倍以上、18倍以上、19倍以上、または20倍以上である。一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体は、10μM以上の低分子化合物の存在下でのCD137に対する結合活性が、当該低分子化合物の非存在下でのCD137に対する結合活性の、2倍以上、5倍以上、10倍以上、15倍以上、16倍以上、17倍以上、18倍以上、19倍以上、または20倍以上である。一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体は、100μM以上の低分子化合物の存在下でのCD137に対する結合活性が、当該低分子化合物の非存在下でのCD137に対する結合活性の、2倍以上、5倍以上、10倍以上、15倍以上、16倍以上、17倍以上、18倍以上、19倍以上、または20倍以上である。

[0066] 一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体は、10μM以上の低分子化合物の存在下でのCD137に対する結合活性（KD）が、$9x10^{-7}$M以下、$8x10^{-7}$M以下、$7x10^{-7}$M以下、$6x10^{-7}$M以下、$5x10^{-7}$M以下、または$4x10^{-7}$M以下の解離定数（KD）であり、好ましくは、$5x10^{-7}$M以下の解離定数（KD)である。更なる一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体は、当該低分子化合物の非存在下でのCD137に対する結合活性が（KD）が、Biacoreでは計算不可能なほど大きい（結合活性が弱い）か、$1x10^{-7}$M以上、$5x10^{-7}$M以上、 $7x10^{-7}$M以上、$8x10^{-7}$M以上、$9x10^{-7}$M以上、$1x10^{-6}$M以上、$2x10^{-6}$M以上、$3x10^{-6}$M以上、または$4x10^{-6}$M以上の解離定数（KD）であり、好ましくは、$1x10^{-6}$M以上の解離定数（KD)である。別の一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体は、100μM以上の低分子化合物の存在下でのCD137に対する結合活性（KD）が、$9x10^{-7}$M以下、$8x10^{-7}$M以下、$7x10^{-7}$M以下、$6x10^{-7}$M以下、$5x10^{-7}$M以下、$4x10^{-7}$M以下、$3x10^{-7}$M以下、2x1

0^{-7}M以下、または$1x10^{-7}$M以下の解離定数（KD）であり、好ましくは、$2x10^{-7}$M以下の解離定数（KD)である。更なる一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体は、さらに、当該低分子化合物の非存在下でのCD137に対する結合活性が（KD）が、Biacoreでは計算不可能なほど大きい（結合活性が弱い）か、$1x10^{-7}$M以上、$5x10^{-7}$M以上、$7x10^{-7}$M以上、$8x10^{-7}$M以上、$9x10^{-7}$M以上、$1x10^{-6}$M以上、$2x10^{-6}$M以上、$3x10^{-6}$M以上、または$4x10^{-6}$M以上の解離定数（KD）であり、好ましくは、$1x10^{-6}$M以上の解離定数（KD)である。

[0067] 一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体は、10μM以上の低分子化合物の存在下でのCD137に対する結合活性（KD）が、$8x10^{-8}$M以下の解離定数（KD）であり、当該低分子化合物の非存在下でのCD137に対する結合活性が（KD）が、Biacoreでは計算不可能なほど大きい（結合活性が弱い）。別の一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体は、100μM以上の低分子化合物の存在下でのCD137に対する結合活性（KD）が、$2x10^{-8}$M以下の解離定数（KD）であり、当該低分子化合物の非存在下でのCD137に対する結合活性が（KD）が、Biacoreでは計算不可能なほど大きい（結合活性が弱い）。

[0068] 一局面において、本開示は、〔10μM 以上の低分子化合物の存在下でのCD137に対する結合活性（結合量）〕／〔当該低分子化合物の非存在下でのCD137に対する結合活性（結合量）〕の値が、参照抗CD137抗原結合分子と同じかそれより大きい、抗CD137抗原結合分子または抗体を提供する。異なる一局面において、本開示は、〔100μM 以上の低分子化合物の存在下でのCD137に対する結合活性（結合量）〕／〔当該低分子化合物の非存在下でのCD137に対する結合活性（結合量）〕の値が、参照抗CD137抗原結合分子と同じかそれより大きい、抗CD137抗原結合分子または抗体を提供する。上記いずれの局面においても、参照抗CD137抗原結合分子は、表１７に記載のA375/B167、A372/B040、A356/B040、A486/B167、A487/B167、A488/B226、A489/B223、A548/B376、A551/B256、A551/B379、A555/B379、A548/B256、またはA549/B167に含まれる、HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2及びHVR-L3のアミノ酸配列と同じHVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2及びHVR-L3を含む抗CD137抗体から選

択し得る。

[0069] 一態様において、参照抗CD137抗原結合分子は、重鎖可変領域／軽鎖可変領域の組合せとして、表１７に記載のA375/B167、A372/B040、A356/B040、A486/B167、A487/B167、A488/B226、A489/B223、A548/B376、A551/B256、A551/B379、A555/B379、A548/B256、またはA549/B167のアミノ酸配列を含む抗体である。好ましい一態様において、参照抗原結合分子は、A375/B167に含まれるHVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2及びHVR-L3のアミノ酸配列と同じHVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2及びHVR-L3を含む抗CD137抗体である。更なる一態様において、参照抗CD137抗原結合分子は、重鎖可変領域／軽鎖可変領域の組合せとして、A375/B167を含む抗CD137抗体である。異なる好ましい一態様において、参照抗CD137抗原結合分子は、A551/B379に含まれるHVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2及びHVR-L3のアミノ酸配列と同じHVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2及びHVR-L3を含む抗CD137抗体である。更なる一態様において、参照抗CD137抗原結合分子は、重鎖可変領域／軽鎖可変領域の組合せとして、A551/B379を含む抗CD137抗体である。好ましい一態様において、参照抗原結合分子は、ヒト由来の重鎖定常領域及び軽鎖定常領域（例えば、重鎖定常領域としてG1T3（配列番号：138)、軽鎖定常領域としてヒトλ鎖Lamlib（配列番号：63））を含む。

[0070] 一局面において、本開示は、低分子化合物の非存在下でのCD137に対する結合活性（結合量）が参照抗CD137抗原結合分子と同じかそれより低く、かつ、10μM以上の当該低分子化合物の存在下でのCD137に対する結合活性（結合量）が、同一条件下での参照抗CD137抗原結合分子のCD137に対する結合活性と同じかそれより高い、抗CD137抗原結合分子または抗体を提供する。異なる一局面において、本開示は、低分子化合物の非存在下でのCD137に対する結合活性が参照抗CD137抗原結合分子と同じかそれより低く、かつ、10μM以上の当該低分子化合物の存在下でのCD137に対する結合活性（結合量）が、同一条件下での参照抗CD137抗原結合分子のCD137に対する結合活性（結合量）と同じかそれより高い、抗CD137抗原結合分子または抗体を提供する。上記いずれの

局面においても、参照抗CD137抗原結合分子は、表１７に記載のA375/B167、A372/B040、A356/B040、A486/B167、A487/B167、A488/B226、A489/B223、A548/B376、A551/B256、A551/B379、A555/B379、A548/B256、またはA549/B167に含まれる、HVR-H1，HVR-H2，HVR-H3，HVR-L1，HVR-L2及びHVR-L3のアミノ酸配列と同じHVR-H1，HVR-H2，HVR-H3，HVR-L1，HVR-L2及びHVR-L3を含む抗CD137抗体から選択し得る。

[0071] 一態様において、参照抗CD137抗原結合分子は、重鎖可変領域／軽鎖可変領域の組合せとして、表１７に記載のA375/B167、A372/B040、A356/B040、A486/B167、A487/B167、A488/B226、A489/B223、A548/B376、A551/B256、A551/B379、A555/B379、A548/B256、またはA549/B167のアミノ酸配列を含む抗CD137抗体である。好ましい一態様において、参照抗CD137抗原結合分子は、A375/B167に含まれるHVR-H1，HVR-H2，HVR-H3，HVR-L1，HVR-L2及びHVR-L3のアミノ酸配列と同じHVR-H1，HVR-H2，HVR-H3，HVR-L1，HVR-L2及びHVR-L3を含む抗CD137抗体である。更なる一態様において、参照抗CD137抗原結合分子は、重鎖可変領域／軽鎖可変領域の組合せとして、A375/B167を含む抗CD137抗体である。異なる好ましい一態様において、参照抗CD137抗原結合分子は、A551/B379に含まれるHVR-H1，HVR-H2，HVR-H3，HVR-L1，HVR-L2及びHVR-L3のアミノ酸配列と同じHVR-H1，HVR-H2，HVR-H3，HVR-L1，HVR-L2及びHVR-L3を含む抗CD137抗体である。更なる一態様において、参照抗CD137抗原結合分子は、重鎖可変領域／軽鎖可変領域の組合せとして、A551/B379を含む抗CD137抗体である。好ましい一態様において、参照抗原結合分子は、ヒト由来の重鎖定常領域及び軽鎖定常領域（例えば、重鎖定常領域としてG1T3（配列番号：138)、軽鎖定常領域としてヒトλ鎖Lamlib（配列番号：63））を含む。

[0072] 一局面において、本開示は、〔1μMの低分子化合物の存在下でのCD137に対する結合活性（KD）〕／〔10μM以上の当該低分子化合物の存在下でのCD137に対する結合活性（KD）〕の値が、参照抗原結合分子と同じかそれより大きい、抗CD137抗原結合分子または抗体を提供する。異なる一局面において、本開示は、〔1μMの低分子化合物の存在下でのCD137に対する結合活性（KD）〕

／〔100μM以上の当該低分子化合物の存在下でのCD137に対する結合活性（KD）〕の値が、参照抗原結合分子と同じかそれより大きい、抗CD137抗原結合分子または抗体を提供する。上記いずれの局面においても、参照抗原結合分子は、表１７に記載のA375/B167、A372/B040、A356/B040、A486/B167、A487/B167、A488/B226、A489/B223、A548/B376、A551/B256、A551/B379、A555/B379、A548/B256、またはA549/B167に含まれる、HVR-H1，HVR-H2，HVR-H3，HVR-L1，HVR-L2及びHVR-L3のアミノ酸配列と同じHVR-H1，HVR-H2，HVR-H3，HVR-L1，HVR-L2及びHVR-L3を含む抗体から選択し得る。

[0073] 一態様において、参照抗原結合分子は、重鎖可変領域／軽鎖可変領域の組合せとして、表１７に記載のA375/B167、A372/B040、A356/B040、A486/B167、A487/B167、A488/B226、A489/B223、A548/B376、A551/B256、A551/B379、A555/B379、A548/B256、またはA549/B167のアミノ酸配列を含む抗体である。好ましい一態様において、参照抗原結合分子は、A375/B167に含まれるHVR-H1，HVR-H2，HVR-H3，HVR-L1，HVR-L2及びHVR-L3のアミノ酸配列と同じHVR-H1，HVR-H2，HVR-H3，HVR-L1，HVR-L2及びHVR-L3を含む抗体である。更なる一態様において、参照抗原結合分子は、重鎖可変領域／軽鎖可変領域の組合せとして、A375/B167を含む抗体である。異なる好ましい一態様において、参照抗原結合分子は、A551/B379に含まれるHVR-H1，HVR-H2，HVR-H3，HVR-L1，HVR-L2及びHVR-L3のアミノ酸配列と同じHVR-H1，HVR-H2，HVR-H3，HVR-L1，HVR-L2及びHVR-L3を含む抗体である。更なる一態様において、参照抗原結合分子は、重鎖可変領域／軽鎖可変領域の組合せとして、A551/B379を含む抗体である。好ましい一態様において、参照抗原結合分子は、ヒト由来の重鎖定常領域及び軽鎖定常領域（例えば、重鎖定常領域としてG1T3（配列番号：138)、軽鎖定常領域としてヒトλ鎖Lamlib（配列番号：63））を含む。

[0074] 一態様において、低分子化合物の存在下、非存在下、高濃度存在下および／または低濃度存在下における、抗CD137抗体のCD137に対する結合活性は、表面プラズモン共鳴分析法を測定原理とする、例えばBIACORE（商標登録）T200を用いたリガンド捕捉法により測定される。

[0075] 例示的な、抗CD137抗体のCD137に対する結合活性の測定法の詳細を以下に述べる。一態様において、抗CD137抗体のCD137に対する結合活性は、BIACORE（商標登録）T200で評価される。好ましい一態様において、この測定は、ランニングバッファーとして20 mM ACES (pH 7.4), 150 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$, 0.05 % Tween20が用いられ、37℃で実施される。一態様において、本測定では、リガンド捕捉用分子に抗体をリガンドとして捕捉させて測定を実施する。具体的には、まず、Series S Sensor Chip CM3 (GE Healthcare) にSure Protein A (GE Healthcare) を固定化したチップに対して、ランニングバッファーで調製した抗体溶液を相互作用させることで、適量（例えば100RU、200RU、300RU、400RU、または500RU程度）の抗体が捕捉される。

[0076] 好ましい一態様において、約100～500RU、好ましくは約250～400RUの抗体が捕捉される。次に、目的濃度（例えば、1μM、10μM、50μMまたは100μM）になるように低分子化合物が添加されたランニングバッファーで調製されたCD137溶液、あるいは当該低分子化合物を含まないランニングバッファーで調製されたCD137溶液を相互作用させることで、低分子化合物存在下、および当該低分子化合物非存在下でのCD137との結合活性が評価される。CD137溶液中のCD137の濃度は適宜決定され得るが、例えば、hCD137-HisBAP（実施例1-1参照）を抗原として用いる場合、抗原濃度は0 nM、15.625 nM、62.5 nM、250 nM、および1000nMでそれぞれ測定が実施される。一態様において、抗CD137抗体のヒトCD137に対する解離定数（KD）は、Biacore T200 Evaluation Software 2.0 を用いて算出される。具体的には、測定により得られたセンサーグラムを1:1 Langmuir binding modelでglobal fittingさせることで結合速度定数ka(L/mol/s)、解離速度定数kd(1/s) が算出され、その値から解離定数KD (mol/L) が算出される。

[0077] さらなる例示的な、抗CD137抗体のCD137に対する結合活性の測定法の詳細を以下に述べる。抗CD137抗体の、ヒトCD137に対する結合がBiacore T200で評価される。ヒトCD137に対する結合測定は、ランニングバッファーとして20 mM ACES (pH 7.4), 150 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$, 0.05 % Tween20が用いられ、

37℃で実施された。まずSeries S Sensor Chip CM3 (GE Healthcare) にSure Protein A (GE Healthcare) を固定化したチップに対して、ランニングバッファーで調製した抗体溶液を相互作用させることで、250～400RU程度の抗体が捕捉される。次に目的濃度（例えば、1μM、10μM、50μMまたは100μM）になるようにATPが添加されたランニングバッファーで調製されたヒトCD137溶液、あるいはATPを含まないランニングバッファーで調製されたヒトCD137溶液を相互作用させることで、ATP存在下、およびATP非存在下でのヒトCD137との結合活性が評価される。抗原であるヒトCD137は実施例(1-1)の方法で調製されるhCD137-HisBAPを使用し、抗原濃度0 nM、 15.625 nM、 62.5 nM、 250 nM、および 1000nMでそれぞれ測定が実施される。チップは25 mM NaOH と 10 mM Glycine-HCl (pH 1.5) を用いて再生され、繰り返し抗体を捕捉して測定が行われる。各抗体のヒトCD137に対する解離定数は、Biacore T200 Evaluation Software 2.0 を用いて算出される。具体的には、測定により得られたセンサーグラムを1:1 Langmuir binding modelでglobal fittingさせることで結合速度定数ka(L/mol/s)、解離速度定数kd(1/s) が算出され、その値から解離定数KD (mol/L) が算出される。

[0078] 一態様において、抗CD137抗体のCD137（好ましくはヒトCD137）に対する結合活性は、「単位抗体量当たりのCD137結合量」で表すこともできる。具体的には、上述上述のBIACORE（商標登録）T200を用いた測定法により得られたセンサーグラムを用いて、CD137の抗体への結合量（RU）を抗体の捕捉量（RU）で除すことにより、「単位抗体量当たりのCD137結合量」が算出される。一態様において、抗CD137抗体のCD137（好ましくはヒトCD137）に対する結合活性は、実施例5-3または6-2に記載の方法で測定することもできる。

[0079] 本明細書中の用語「低分子」、「低分子化合物」は、生体に存在する「生体高分子」以外の天然由来の化学物質又は非天然由来の化学物質をいう。好ましくは、標的組織特異的な化合物又は非天然化合物であるが、これに限定されるものではない。一態様において、本開示における「低分子化合物」は、「癌組織特異的化合物」または「癌組織特異的代謝産物」である。本開示

における用語「癌組織特異的な化合物（癌組織特異的化合物）」とは、非癌組織と比較して癌組織中に差示的に存在する化合物をいう。本明細書において、「癌」という用語は、一般に、悪性新生物を表すために用いられ、それは、転移性または非転移性であってよい。用語「代謝」は、生物の組織内で生ずる化学変化のことをいい、「同化」および「異化」が含まれる。同化とは、分子の生合成または蓄積のことをいい、異化は分子の分解のことをいう。「代謝産物」は、物質代謝に起因する中間体または生成物である。

[0080] 用語「標的組織」とは、本発明の抗原結合分子が送達されることを目的とする生体内の任意の組織を意味する。標的組織は、各種臓器などの組織学的に区別される組織であってもよいし、健常な組織と疾患状態にある組織などの病理学的に区別される組織であってもよい。特定の態様において、標的組織は腫瘍組織である。一方、「非標的組織」とは、生体内における標的組織以外の組織を意味する。

[0081] 用語「腫瘍組織」とは、少なくとも一つの腫瘍細胞を含む組織を意味する。腫瘍組織は、通常、腫瘍の主体をなす腫瘍細胞の集団（実質）と、これらの間に存在して腫瘍を支持する結合組織や血管（間質）とから成り立っている。両者の区別が明らかなものもあれば、両者が入り混じっているものもある。腫瘍組織内には免疫細胞などが浸潤していることもある。一方、「非腫瘍組織」とは、生体内における腫瘍組織以外の組織を意味する。疾患状態にない健常組織／正常組織は非腫瘍組織の代表的な例である。

[0082] 本開示で使用される癌組織特異的化合物、または癌組織特異的代謝産物の非限定な一態様として以下に詳述する化合物から選択される少なくとも一つの化合物が好適に挙げられる。少なくとも一つの化合物とは、後述する同一の抗原結合ドメインによる抗原に対する結合活性が、一種の癌組織特異的化合物、または癌組織特異的代謝産物に依存的であるほか、複数の種類の癌組織特異的化合物、または癌組織特異的代謝産物に依存的である場合を含むことを意味する。

[0083] 本明細書中で用いられる、用語「標的組織特異的化合物」とは、非標的組

織と比較して標的組織中に差示的に存在する化合物をいう。いくつかの態様において、標的組織特異的化合物は、標的組織に存在するが非標的組織には存在しない、または非標的組織に存在するが標的組織には存在しない等の定性的な標的組織特異性で規定される化合物であり得る。別の態様において、標的組織特異的化合物は、非標的組織と比較して異なる濃度（例えば、高濃度または低濃度）で標的組織に存在する等の定量的な標的組織特異性で規定される化合物であり得る。特定の態様において、標的組織特異的化合物は、非標的組織に比べて、例えば1.05倍以上、1.1倍以上、1.15倍以上、1.2倍以上、1.25倍以上、1.3倍以上、1.35倍以上、1.4倍以上、1.45倍以上、1.5倍以上、1.55倍以上、1.6倍以上、1.65倍以上、1.7倍以上、1.75倍以上、1.8倍以上、1.85倍以上、1.9倍以上、1.95倍以上、2倍以上、2.1倍以上、2.2倍以上、2.3倍以上、2.4倍以上、2.5倍以上、3倍以上、5倍以上、10倍以上、50倍以上、100倍以上、10^3倍以上、10^4倍以上、10^5倍以上、10^6倍以上、またはそれ以上高い濃度で、標的組織に存在する。別の態様において、標的組織特異的化合物は、標的組織に比べて、例えば1.05倍以上、1.1倍以上、1.15倍以上、1.2倍以上、1.25倍以上、1.3倍以上、1.35倍以上、1.4倍以上、1.45倍以上、1.5倍以上、1.55倍以上、1.6倍以上、1.65倍以上、1.7倍以上、1.75倍以上、1.8倍以上、1.85倍以上、1.9倍以上、1.95倍以上、2倍以上、2.1倍以上、2.2倍以上、2.3倍以上、2.4倍以上、2.5倍以上、3倍以上、5倍以上、10倍以上、50倍以上、100倍以上、10^3倍以上、10^4倍以上、10^5倍以上、10^6倍以上、またはそれ以上高い濃度で、非標的組織に存在する。特定の態様において、標的組織特異的化合物は、非標的組織に比べて、統計的に有意に高いまたは低い濃度（すなわち、ウェルチのt検定またはウィルコクソンの順位和検定のいずれかを用いて決定されるように、p値は0.05未満および/またはq値は0.10未満）で、標的組織に存在する。特定の態様において、標的組織特異的化合物は腫瘍組織特異的化合物である。

[0084] 特定の態様において、腫瘍組織特異的化合物は、腫瘍細胞に特異的な代謝によって生成される代謝産物である。代謝産物は、生命活動に必須の代謝に

よって生成される産物（一次代謝産物）であってもよいし、生命活動に必ずしも必要ではない代謝によって生成される産物（二次代謝産物）であってもよい。一次代謝産物の例としては、糖、タンパク質、脂質、核酸などを挙げることができる。二次代謝産物の例としては、抗生物質や色素などを挙げることができる。代謝産物は、生体高分子であってもよいし、低分子であってもよい。特定の態様において、生体高分子は、一種類以上の反復単位からなる分子量およそ5000以上の分子であり、例えば多糖類、ポリペプチド、およびポリヌクレオチドなどが含まれる。特定の態様において、低分子は、分子量およそ500以下の分子であって、生体内に存在する化学物質である。さらなる態様において、腫瘍組織特異的化合物は、腫瘍細胞において特異的に生成される低分子代謝産物である（Eva Gottfried, Katrin Peter and Marina P. Kreutz, From Molecular to Modular Tumor Therapy (2010) 3 (2), 111-132）。さらなる態様において、腫瘍組織特異的化合物は、腫瘍組織に浸潤する細胞（例えば、免疫細胞など）や腫瘍組織内に存在する間質細胞（癌間質線維芽細胞（CAF）など）が特異的に生成する代謝産物である。腫瘍組織に浸潤する免疫細胞としては、樹状細胞、抑制性樹状細胞、制御性T細胞（regulatory T cell）、疲弊T細胞（exhausted T cell）、骨髄由来抑制細胞（myeloma derived suppressor cell、MDSC）等が例示される。さらなる態様において、腫瘍組織内に存在する細胞（例えば、腫瘍細胞、免疫細胞、間質細胞など）が生成する代謝産物であって、それらの細胞がアポトーシスやネクローシス等によって細胞死した際に細胞外に放出される代謝産物も、本開示の腫瘍組織特異的化合物に含まれ得る。

[0085] 腫瘍組織特異的化合物を同定するため、トランスクリプトーム・レベルでの解析（例えば、Dhanasekaranら（Nature (2001) 412, 822-826）、Lapointeら（Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2004) 101, 811-816）、またはPerouら（Nature (2000) 406, 747-752）が例示される）もしくはプロテオーム・レベルでの解析（例えば、Ahramら（Mol. Carcinog. (2002) 33, 9-15）、Hodら（Mol. Cell. Proteomics (2005) 4, 1741-1753））のほか、代謝学的プ

ロファイリングを中心とする代謝学（メタボロミックス）解析が、適宜使用される。すなわち、被験試料中の代謝産物を同定するために、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、核磁気共鳴（NMR）（Brindleら（J. Mol. Recognit.（1997）10, 182-187））、質量分析法（GC/MSおよび LC/MS）（GatesおよびSweeley（Clin. Chem.（1978）24, 1663-1673））およびELISA等を単独でおよび/または組み合わせて用いる代謝学的プロファイリングが適宜使用され得る。

[0086] 特定の態様において、腫瘍組織特異的化合物は、プリン環構造を有するヌクレオシド、アミノ酸およびその代謝産物、脂質およびその代謝産物、糖代謝の一次代謝産物、ならびにニコチンアミドおよびその代謝産物からなる群より選択される少なくとも一つの化合物である。さらなる態様において、腫瘍組織特異的化合物は、以下の（１）～（６）から選択される少なくとも一つの化合物である：

（１）アデノシン（ADO）、アデノシン3リン酸（ATP）、アデノシン2リン酸（ADP）、アデノシン1リン酸（AMP）、イノシン等のプリン環構造を有するヌクレオシド、

（２）アラニン、グルタミン酸、アスパラギン酸等のアミノ酸、

（３）キヌレニン、アントラニル酸、3-ヒドロキシキヌレニン、キヌレン酸等のアミノ酸の代謝産物、

（４）プロスタグランジンE2等のアラキドン酸の代謝産物、

（５）乳酸、コハク酸、クエン酸等の解糖系またはクレブス回路の一次代謝産物、ならびに

（６）1－メチルニコチンアミド等のニコチンアミドの代謝産物。

[0087] （１）アデノシン（ADO）、アデノシン3リン酸（ATP）、アデノシン2リン酸（ADP）、アデノシン1リン酸（AMP）、イノシン等のプリン環構造を有するヌクレオシド

腫瘍細胞が細胞死すると、細胞内の大量のATPが細胞外に漏出することが知られている。そのため、腫瘍組織におけるATP濃度は正常組織と比較して著し

く高い（PLoS One.（2008）3, e2599）。AMPは細胞外-5'-ヌクレオチダーゼ（eco-5'-nucleotidase）（CD73）のような細胞表面の酵素によって代謝される（RestaおよびThompson（Immunol. Rev.（1998）161, 95-109）ならびにSadejら（Melanoma Res.（2006）16, 213-222））。アデノシンは低濃度で細胞外環境に構成的に存在するプリンヌクレオシドであるが、固形腫瘍で見出される低酸素組織では細胞外アデノシン濃度の顕著な増加が報告されている（BlayおよびHoskin（Cancer Res.（1997）57, 2602-2605））。CD73は腫瘍および免疫細胞の表面に発現しており（Kobieら（J. Immunol.（2006）177, 6780-6786））、乳癌（Canbolatら（Breast Cancer Res. Treat.（1996）37, 189-193））、胃癌（Durakら（Cancer Lett.（1994）84, 199-202））、膵臓癌（FlockeおよびMannherz（Biochim. Biophys. Acta（1991）1076, 273-281））およびグリオブラストーマ（Bardotら（Br. J. Cancer（1994）70, 212-218））において活性の上昇が見出されている。腫瘍組織におけるアデノシンの蓄積は、細胞質の5'-ヌクレオチダーゼによってAMPの脱リン酸化が増加することに起因している可能性が提唱されている（HeadrickおよびWillis（Biochem. J.（1989）261, 541-550））。さらに腫瘍組織に浸潤している制御性T細胞もATP分解酵素を発現しており、アデノシンを産生している（Proc. Natl. Acad. Sci. USA（2006）103(35), 13132-13137、Curr. Med. Chem.（2011）18, 5217-5223）。産生されたアデノシンは、A2Aレセプター等のアデノシンレセプターを介して腫瘍組織を免疫抑制的な環境にしていると考えられている（Curr. Med. Chem.（2011）18, 5217-5223）。以上のことから、プリンヌクレオチドの代謝によって腫瘍組織において高濃度に蓄積していると考えられるATP、ADP、AMP、またはアデノシン等が、本開示で使用される腫瘍組織特異的化合物の例として挙げられる。さらにアデノシンは、adenosine deaminaseによってイノシンに分解されるため、イノシンが高濃度に蓄積する。

[0088] 特定の態様において、プリン環構造を有するヌクレオシドは、アデノシン含有化合物を含む。特定の態様において、アデノシン含有化合物としては、例えば、アデノシン（ADO）、アデノシン3リン酸（ATP）、アデノシン2リン

酸（ADP）、アデノシン1リン酸（AMP）、環状アデノシン1リン酸（cAMP）、デオキシアデノシン（dADO）、デオキシアデノシン3リン酸（dATP）、デオキシアデノシン2リン酸（dADP）、デオキシアデノシン1リン酸（dAMP）、アデノシンγチオ三リン酸（ATPγS）などを挙げることができる。別の態様において、プリン環構造を有するヌクレオシドは、アデノシンの代謝産物であるイノシンを含む。

さらには、特定の態様において、プリン環構造を有するヌクレオシドには、ADPbetaS（Sigma社）等、市販されているプリン環構造を有するヌクレオシドも含まれる。

[0089] （２）アラニン、グルタミン酸、アスパラギン酸等のアミノ酸

腫瘍細胞では、生体内における窒素運搬体として作用するグルタミンの細胞内への取込み速度が上昇しており、こうしたグルタミンの取込みとその結果起こるグルタミン酸および乳酸への変換（グルタミン分解（glutaminolysis））は、腫瘍細胞の特徴であると考えられている（MazurekおよびEigenbrodt（Anticancer Res.（2003）23, 1149-1154、ならびにMazurekら（J. Cell. Physiol.（1999）181, 136-146））。癌患者では、血漿中のグルタミンレベルが減少している一方、グルタミン酸濃度が増大しており（Drogeら（Immunobiology（1987）174, 473-479））、また、肺癌組織の^{13}C放射標識されたグルコースの代謝研究によって、^{13}C標識コハク酸、^{13}C標識アラニン、^{13}C標識グルタミン酸、および^{13}C標識クエン酸の濃度間で相関が観察された。以上のことから、グルタミン分解等によって腫瘍組織において高濃度に蓄積していると考えられるアラニン、グルタミン酸、アスパラギン酸等が、本開示で使用される腫瘍組織特異的化合物の例として挙げられる。

[0090] （３）キヌレニン、アントラニル酸、3-ヒドロキシキヌレニン、キヌレン酸等のアミノ酸の代謝産物

インドールアミン2, 3-ジオキシゲナーゼ（IDO）はメラノーマ、結腸癌、および腎臓癌等の多くの癌で高発現しているトリプトファン代謝酵素であり（Uyttenhoveら（Nat. Med.（2003）9, 1269-1274））、IDOはトリプトファ

ンのキヌレニンへの変換を触媒する。また、IDOを発現しないグリオーマでは肝臓のトリプトファン2, 3-ジオキシゲナーゼ（TDO）によって、トリプトファンからキヌレニンが生成する（Opitzら（Nature（2011）478(7368), 197-203））。またIDOは腫瘍組織に浸潤している樹状細胞にも発現しており、樹状細胞もキヌレニンを産生する（J. Immunol.（2008）181, 5396-5404）。また、IDOは腫瘍組織の骨髄由来抑制細胞（MDSC）にも発現しており、MDSCもキヌレニンを産生する（Yuら（J. Immunol.（2013）190, 3783-3797））。キヌレニンはキヌレニダーゼによってアントラニル酸に、およびキヌレニン3-ヒドロキシラーゼによって3-ヒドロキシキヌレニンに変換される。アントラニル酸、および3-ヒドロキシキヌレニンはともにNADの前駆体となる3-ヒドロキシアントラニル酸に変換される。キヌレニンはキヌレニンアミノトランスフェラーゼによってキヌレン酸に変換される。以上のことから、キヌレニン、ならびにその代謝産物である、アントラニル酸、3-ヒドロキシキヌレニン、およびキヌレン酸等が、本開示で使用される腫瘍組織特異的化合物、特に腫瘍細胞特異的代謝産物の例として挙げられる。

[0091] （４）プロスタグランジンE2（Prostaglandin E2）等のアラキドン酸の代謝産物

プロスタグランジンE2（PGE2）は結腸癌細胞の増殖を促進し、そのアポトーシスを抑制する（Shengら（Cancer Res.（1998）58, 362-366））。 PGE2合成酵素のうち、COX-1はほぼすべての組織において構成的に発現しているのに対して、COX-2は腫瘍においてある種の炎症性サイトカインおよび癌遺伝子によって誘導されることが主に見出されている（WarnerおよびMitchell（FASEB J.（2004）18, 790-804））。COX-2の過剰発現は乳癌の予後の悪さ（Denkertら（Clin. Breast Cancer（2004）4, 428-433））、および卵巣癌の急速な疾患の進行（Denkerら（Mod. Pathol.（2006）19, 1261-1269））と関連性があることも報告されている。また腫瘍組織に浸潤している制御性T細胞もPGE2を産生している（Curr. Med. Chem.（2011）18, 5217-5223）。以上のことから、PGE2等のアラキドン酸の代謝産物が、本開示で使用される腫瘍組織特

異的化合物、特に腫瘍細胞特異的代謝産物や腫瘍組織に浸潤している免疫細胞特異的代謝産物の例として挙げられる。PGE2以外にも、トロンボキサンA2（TXA2）が大腸癌等の腫瘍組織で産生が亢進している（J. Lab. Clin. Med. (1993) 122, 518-523）。

[0092] （５）乳酸、コハク酸、クエン酸等の解糖系またはクレブス回路の一次代謝産物

ピルビン酸キナーゼ、ヘキソキナーゼ、および乳酸脱水素酵素（LDH）等の解糖系（Embden－Myerhof経路）酵素の上方調節（アップレギュレーション）として特徴付けられる解糖系表現型は、Warburg効果として固形腫瘍の特徴であることが従来から知られている。解糖系の最終産物である乳酸、クレブス回路によって生成されるコハク酸およびクエン酸が、腫瘍組織において蓄積していることが知られている（Teresaら（Mol. Cancer (2009) 8, 41-59））。以上のことから、解糖系によって生成される一次代謝産物である、乳酸、コハク酸、クエン酸等が、本開示で使用される腫瘍組織特異的化合物、特に腫瘍細胞特異的代謝産物の例として挙げられる。また、細胞死により細胞内に高濃度で存在するコハク酸が細胞外に漏出することが知られている（Nature Immunology, (2008) 9, 1261-1269）。そのため、細胞死が頻繁に起こっている腫瘍組織において、コハク酸の濃度が上昇していると考えられる。

[0093] （６）1－メチルニコチンアミド等のニコチンアミドの代謝産物

複数のヒト腫瘍組織において、ニコンチンアミドN-メチルトランスフェラーゼが高発現していることが知られている。本酵素によるニコチンアミドの安定的な代謝産物である1-メチルニコチンアミドは、腫瘍細胞の細胞外に分泌されることが知られている（Yamadaら（J. Nutr. Sci. Vitaminol. (2010) 56, 83-86））。以上のことから、ニコチンアミドの代謝によって腫瘍組織において高濃度に蓄積していると考えられる1-メチルニコチンアミド等が、本開示で使用される腫瘍組織特異的化合物の例として挙げられる。

[0094] 本開示の「抗原結合分子」は「抗原結合ドメイン」を含む。「抗原結合ドメイン」は、目的とする抗原に結合する限り、どのような構造のドメインも

使用され得る。一態様において、本開示の抗原結合ドメインとしては、例えば、抗体の重鎖および／または軽鎖の可変領域、生体内の多様な細胞膜タンパクに含まれる35アミノ酸程度のモジュール（Aドメイン）を含むAvimer（国際公開WO2004/044011、WO2005/040229）、細胞膜に発現する糖タンパク質であるfibronectin中の10Fn3ドメインを含むAdnectin（国際公開WO2002/032925）、Protein Aの58アミノ酸からなるIgG結合ドメインをscaffoldとするAffibody（国際公開WO1995/001937）、33アミノ酸の繰り返し配列であるアンキリン反復（ankyrin repeat：AR）を骨格として含むDARPins（Designed Ankyrin Repeat proteins）（国際公開WO2002/020565）、好中球ゲラチナーゼ結合リポカリン（neutrophil gelatinase-associated lipocalin（NGAL））等のリポカリンを骨格として含むAnticalin（国際公開WO2003/029462）、ヤツメウナギ、ヌタウナギなど無顎類の獲得免疫システムにおいて機能するタンパク質で、ロイシン残基に富んだリピート（leucine-rich-repeat（LRR））モジュールを含む可変性リンパ球受容体（variable lymphocyte receptor（VLR））（国際公開WO2008/016854）などが挙げられる。特定の態様において、本開示の抗原結合ドメインは、抗体の重鎖および軽鎖の可変領域を含む。さらなる態様において、本開示の抗原結合ドメインとしては、例えばscFv（single chain Fv）、単鎖抗体（single chain antibody）、Fv、scFv2（single chain Fv 2）、Fab、またはF(ab')2などが挙げられる。

[0095] ［HVRおよび可変領域］

一局面において、本開示は、(a)配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号：8、9、10、11、12、13、14、15、および16から選択されるいずれか１つのアミノ酸配列を含むHVR-H2；および、(c)配列番号：17、18、19、または20から選択されるいずれか１つのアミノ酸配列を含むHVR-H3より選択される、少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つすべてのVH HVR配列を含む、抗CD137抗原結合分子または抗体を提供する。一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体は、(a)配列番号：７のアミノ酸配列を含むHVR-H1と；(b)配列番号：8、9、10、11、12、13、14、15、および16から選択される

いずれか１つのアミノ酸配列を含むHVR-H2と；(c)配列番号：17、18、19、または20から選択されるいずれか１つのアミノ酸配列を含むHVR-H3とを含む。

[0096] 一態様において、抗CD137抗原結合分子は、重鎖可変領域／軽鎖可変領域の組合せとして、表１７に記載のA375/B167、A372/B040、A356/B040、A486/B167、A487/B167、A488/B226、A489/B223、A548/B376、A551/B256、A551/B379、A555/B379、A548/B256、またはA549/B167のアミノ酸配列を含む抗体である。好ましい一態様において、抗CD137抗原結合分子は、A375/B167に含まれるHVR-H1，HVR-H2，HVR-H3，HVR-L1，HVR-L2及びHVR-L3のアミノ酸配列と同じHVR-H1，HVR-H2，HVR-H3，HVR-L1，HVR-L2及びHVR-L3を含む抗CD137抗体である。更なる一態様において、抗CD137抗原結合分子は、重鎖可変領域／軽鎖可変領域の組合せとして、A375/B167を含む抗CD137抗体である。異なる好ましい一態様において、抗CD137抗原結合分子は、A551/B379に含まれるHVR-H1，HVR-H2，HVR-H3，HVR-L1，HVR-L2及びHVR-L3のアミノ酸配列と同じHVR-H1，HVR-H2，HVR-H3，HVR-L1，HVR-L2及びHVR-L3を含む抗CD137抗体である。

[0097] 一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体は、(a)配列番号：７のアミノ酸配列を含むHVR-H1と；(b)配列番号：8のアミノ酸配列を含むHVR-H2と；(c)配列番号：17のアミノ酸配列を含むHVR-H3とを含む。

[0098] 一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体は、(a)配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1と；(b)配列番号：9のアミノ酸配列を含むHVR-H2と；および(c)配列番号：17のアミノ酸配列を含むHVR-H3とを含む。

[0099] 一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体は、(a)配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1と；(b)配列番号：10のアミノ酸配列を含むHVR-H2と；および(c)配列番号：17のアミノ酸配列を含むHVR-H3とを含む。

[0100] 一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体は、(a)配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1と；(b)配列番号：11のアミノ酸配列を含むHVR-H2と；および(c)配列番号：18のアミノ酸配列を含むHVR-H3とを含む。

[0101] 一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体は、(a)配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1と；(b)配列番号：8のアミノ酸配列を含むHVR-H2と

；および(c)配列番号：18のアミノ酸配列を含むHVR-H3とを含む。

[0102] 一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体は、(a)配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1と；(b)配列番号：12のアミノ酸配列を含むHVR-H2と；および(c)配列番号：18のアミノ酸配列を含むHVR-H3とを含む。

[0103] 一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体は、(a)配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1と；(b)配列番号：13のアミノ酸配列を含むHVR-H2と；および(c)配列番号：18のアミノ酸配列を含むHVR-H3とを含む。

[0104] 一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体は、(a)配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1と；(b)配列番号：14のアミノ酸配列を含むHVR-H2と；および(c)配列番号：19のアミノ酸配列を含むHVR-H3とを含む。

[0105] 一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体は、(a)配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1と；(b)配列番号：15のアミノ酸配列を含むHVR-H2と；および(c)配列番号：20のアミノ酸配列を含むHVR-H3とを含む。

[0106] 一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体は、(a)配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1と；(b)配列番号：16のアミノ酸配列を含むHVR-H2と；および(c)配列番号：20のアミノ酸配列を含むHVR-H3とを含む。

[0107] 一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体は、(a)配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1と；(b)配列番号：14のアミノ酸配列を含むHVR-H2と；および(c)配列番号：17のアミノ酸配列を含むHVR-H3とを含む。

[0108] 別の局面において、本開示は、(a)配列番号：21、22、23、24、および25から選択されるいずれか１つのアミノ酸配列を含むHVR-L1；(b)配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2；および(c)配列番号：27、28および29から選択されるいずれか１つのアミノ酸配列を含むHVR-L3より選択される、少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つすべてのVL HVR配列を含む、抗CD137抗原結合分子または抗体を提供する。一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体は、(a)配列番号：21、22、23、24、および25から選択されるいずれか１つのアミノ酸配列を含むHVR-L1と；(b)配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2と；(c)配列番号：27、28および29から選択されるいずれか１つのアミノ酸

配列を含むHVR-L3とを含む。

[0109] 一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体は、(a)配列番号：21のアミノ酸配列を含むHVR-L1と；(b) 配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2と；および(c)配列番号：27のアミノ酸配列を含むHVR-L3とを含む。

[0110] 一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体は、(a)配列番号：22のアミノ酸配列を含むHVR-L1と；(b) 配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2と；および(c)配列番号：27のアミノ酸配列を含むHVR-L3とを含む。

[0111] 一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体は、(a)配列番号：21のアミノ酸配列を含むHVR-L1と；(b) 配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2と；および(c)配列番号：28のアミノ酸配列を含むHVR-L3とを含む。

[0112] 一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体は、(a)配列番号：21のアミノ酸配列を含むHVR-L1と；(b) 配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2と；および(c)配列番号：29のアミノ酸配列を含むHVR-L3とを含む。

[0113] 一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体は、(a)配列番号：23のアミノ酸配列を含むHVR-L1と；(b) 配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2と；および(c)配列番号：27のアミノ酸配列を含むHVR-L3とを含む。

[0114] 一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体は、(a)配列番号：24のアミノ酸配列を含むHVR-L1と；(b) 配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2と；および(c)配列番号：27のアミノ酸配列を含むHVR-L3とを含む。

[0115] 一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体は、(a)配列番号：25のアミノ酸配列を含むHVR-L1と；(b) 配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2と；および(c)配列番号：27のアミノ酸配列を含むHVR-L3とを含む。

[0116] 別の局面において、本開示の抗CD137抗原結合分子または抗体は、(a)VHドメインであって、(i)配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(ii)配列番号：8、9、10、11、12、13、14、15、および１６から選択されるいずれか１つのアミノ酸配列を含むHVR-H2；および、(iii)配列番号：17、18、19、または20から選択されるいずれか１つのアミノ酸配列を含むHVR-H3より選択される、少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つすべてのVH HVR配列を含む、

VHドメインと；(b)VLドメインであって、(i)配列番号：21、22、23、24、および25から選択されるいずれか１つのアミノ酸配列を含むHVR-L1；(ii)配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2；および(iii)配列番号：27、28および29から選択されるいずれか１つのアミノ酸配列を含むHVR-L3より選択される、少なくとも1つ、少なくとも2つ、または3つすべてのVL HVR配列を含むVLドメインとを含む。

[0117] 別の局面において、本開示は、(a)配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1と；(b) 配列番号：8のアミノ酸配列を含むHVR-H2と；(c)配列番号：17のアミノ酸配列を含むHVR-H3と；(d)配列番号：21のアミノ酸配列を含むHVR-L1と；(e)配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2と；および(f)配列番号：27のアミノ酸配列を含むHVR-L3とを含む、抗CD137抗原結合分子または抗体を提供する。

[0118] 別の局面において、本開示は、(a)配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1と；(b) 配列番号：9のアミノ酸配列を含むHVR-H2と；(c)配列番号：17のアミノ酸配列を含むHVR-H3と；(d)配列番号：22のアミノ酸配列を含むHVR-L1と；(e)配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2と；および(f)配列番号：27のアミノ酸配列を含むHVR-L3とを含む、抗CD137抗原結合分子または抗体を提供する。

[0119] 別の局面において、本開示は、(a)配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1と；(b) 配列番号：10のアミノ酸配列を含むHVR-H2と；(c)配列番号：17のアミノ酸配列を含むHVR-H3と；(d)配列番号：22のアミノ酸配列を含むHVR-L1と；(e)配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2と；および(f)配列番号：27のアミノ酸配列を含むHVR-L3とを含む、抗CD137抗原結合分子または抗体を提供する。

[0120] 別の局面において、本開示は、(a)配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1と；(b) 配列番号：11のアミノ酸配列を含むHVR-H2と；(c)配列番号：18のアミノ酸配列を含むHVR-H3と；(d)配列番号：21のアミノ酸配列を含むHVR-L1と；(e)配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2と；および(f)配列番

号：27のアミノ酸配列を含むHVR-L3とを含む、抗CD137抗原結合分子または抗体を提供する。

[0121] 別の局面において、本開示は、(a)配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1と；(b) 配列番号：8のアミノ酸配列を含むHVR-H2と；(c)配列番号：18のアミノ酸配列を含むHVR-H3と；(d)配列番号：21のアミノ酸配列を含むHVR-L1と；(e)配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2と；および(f)配列番号：27のアミノ酸配列を含むHVR-L3とを含む、抗CD137抗原結合分子または抗体を提供する。

[0122] 別の局面において、本開示は、(a)配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1と；(b) 配列番号：12のアミノ酸配列を含むHVR-H2と；(c)配列番号：18のアミノ酸配列を含むHVR-H3と；(d)配列番号：21のアミノ酸配列を含むHVR-L1と；(e)配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2と；および(f)配列番号：28のアミノ酸配列を含むHVR-L3とを含む、抗CD137抗原結合分子または抗体を提供する。

[0123] 別の局面において、本開示は、(a)配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1と；(b) 配列番号：13のアミノ酸配列を含むHVR-H2と；(c)配列番号：18のアミノ酸配列を含むHVR-H3と；(d)配列番号：21のアミノ酸配列を含むHVR-L1と；(e)配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2と；(f)配列番号：29のアミノ酸配列を含むHVR-L3とを含む、抗CD137抗原結合分子または抗体を提供する。

[0124] 別の局面において、本開示は、(a)配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1と；(b) 配列番号：14のアミノ酸配列を含むHVR-H2と；(c)配列番号：19のアミノ酸配列を含むHVR-H3と；(d)配列番号：23のアミノ酸配列を含むHVR-L1と；(e)配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2と；(f)配列番号：27のアミノ酸配列を含むHVR-L3とを含む、抗CD137抗原結合分子または抗体を提供する。

[0125] 別の局面において、本開示は、(a)配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1と；(b) 配列番号：15のアミノ酸配列を含むHVR-H2と；(c)配列番号：20

のアミノ酸配列を含むHVR-H3と；(d)配列番号：24のアミノ酸配列を含むHVR-L1と；(e)配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2と；(f)配列番号：27のアミノ酸配列を含むHVR-L3とを含む、抗CD137抗原結合分子または抗体を提供する。

[0126] 別の局面において、本開示は、(a)配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1と；(b) 配列番号：15のアミノ酸配列を含むHVR-H2と；(c)配列番号：20のアミノ酸配列を含むHVR-H3と；(d)配列番号：25のアミノ酸配列を含むHVR-L1と；(e)配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2と；(f)配列番号：27のアミノ酸配列を含むHVR-L3とを含む、抗CD137抗原結合分子または抗体を提供する。

[0127] 別の局面において、本開示は、(a)配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1と；(b) 配列番号：16のアミノ酸配列を含むHVR-H2と；(c)配列番号：20のアミノ酸配列を含むHVR-H3と；(d)配列番号：25のアミノ酸配列を含むHVR-L1と；(e)配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2と；(f)配列番号：27のアミノ酸配列を含むHVR-L3とを含む、抗CD137抗原結合分子または抗体を提供する。

[0128] 別の局面において、本開示は、(a)配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1と；(b) 配列番号：14のアミノ酸配列を含むHVR-H2と；(c)配列番号：19のアミノ酸配列を含むHVR-H3と；(d)配列番号：24のアミノ酸配列を含むHVR-L1と；(e)配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2と；(f)配列番号：27のアミノ酸配列を含むHVR-L3とを含む、抗CD137抗原結合分子または抗体を提供する。

[0129] 別の局面において、本開示は、(a)配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1と；(b) 配列番号：14のアミノ酸配列を含むHVR-H2と；(c)配列番号：17のアミノ酸配列を含むHVR-H3と；(d)配列番号：21のアミノ酸配列を含むHVR-L1と；(e)配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2と；(f)配列番号：27のアミノ酸配列を含むHVR-L3とを含む、抗CD137抗原結合分子または抗体を提供する。

[0130] 特定の態様において、以下のHVRポジションのところで、上述の抗CD137抗体の任意の1つまたは複数のアミノ酸が置換されている：_

-HVR-H2（配列番号：30）において：ポジション5、6、7、10、13、14、および／または17

-HVR-H3（配列番号：31）において：ポジション3、および／または6

-HVR-L1（配列番号：32）において：ポジション4、5、9、および／または11

-HVR-L3（配列番号：33）において：ポジション6、7、および／または8。

[0131] 特定の態様において、本明細書で提供される置換は、保存的置換である。特定の態様において、以下のいずれか1つまたは複数の置換が、任意の組み合わせで行われてもよい：

-HVR-H2（配列番号：8）において：K5HまたはS; S6G; T7S; E10Y; D13E; S14Q; V17GまたはL

-HVR-H3（配列番号：17）において：A3P、KまたはI; F6E

-HVR-L1（配列番号：21）において：R4S; Y5T; Y9F; E11N

-HVR-L3（配列番号：27）において：E6P; H7A; Q8I

[0132] 上述の置換の可能なすべての組み合わせは、HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1およびHVR-L3に関してそれぞれ、配列番号30、31、32および33のコンセンサス配列に包含される。

[0133] 上述の態様の任意のものにおいて、抗CD137抗原結合分子または抗体は、ヒト化されている。一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体は、上述の態様の任意のものにおけるHVRを含み、かつさらに、アクセプターヒトフレームワーク（例えば、ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワーク）を含む。別の態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体は上述の態様の任意のものにおけるHVRを含み、かつさらに、フレームワーク（FR）配列を含む重鎖可変領域（VH）または軽鎖可変領域（VL）を含む。一態様において、重鎖可変領域のFR1は配列番号：35のアミノ酸配列を含み、FR2は配列番号：36のアミノ酸配列を含み、FR3は配列番号：37のアミ

ノ酸配列を含み、FR4は配列番号：38のアミノ酸配列を含む。一態様において、軽鎖可変領域のFR1は配列番号：39のアミノ酸配列を含み、FR2は配列番号：40のアミノ酸配列を含み、FR3は配列番号：41のアミノ酸配列を含み、FR4は配列番号：42のアミノ酸配列を含む。

[0134] 別の局面において、抗CD137抗原結合分子または抗体は、配列番号：43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、または５３のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン（VH）配列を含む。特定の態様において、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有するVH配列は、参照配列に対して、置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含むが、当該配列を含む抗CD137抗原結合分子または抗体は、CD137に結合する能力を保持する。特定の態様において、合計1個から10個のアミノ酸が、配列番号：配列番号：43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、または５３において、置換、挿入、および／または欠失される。特定の態様において、置換、挿入、または欠失は、HVRの外側の領域（すなわち、FRの中）で生じる。任意で、抗CD137抗体は、配列番号：配列番号：43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、または５３におけるVH配列を、当該配列の翻訳後修飾を含んだものも含めて、含む。ある特定の態様では、VHは、(a)配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1；(b)配列番号：8、9、10、11、12、13、14、15、および16から選択されるいずれか１つのアミノ酸配列を含むHVR-H2；および、(c)配列番号：17、18、19、または20から選択されるいずれか１つのアミノ酸配列を含むHVR-H3より選択される、1つ、2つ、または3つのHVRを含む。翻訳後修飾は、重鎖又は軽鎖Ｎ末端のグルタミン又はグルタミン酸のピログルタミル化によるピログルタミン酸への修飾を含むが、これに限定されない。

[0135] 別の局面において、配列番号：54、55、56、57、58、59、または60のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン（VL）を含む、抗

CD137抗原結合分子または抗体が提供される。特定の態様において、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有するVL配列は、参照配列に対して、置換（例えば、保存的置換）、挿入、または欠失を含むが、当該配列を含む抗CD137抗原結合分子または抗体は、CD137に結合する能力を保持する。特定の態様において、合計1個から10個のアミノ酸が、配列番号：54、55、56、57、58、59、または60において、置換、挿入、および／または欠失される。特定の態様において、置換、挿入、または欠失は、HVRの外側の領域（すなわち、FRの中）で生じる。任意で、抗CD137抗原結合分子または抗体は、配列番号：54、55、56、57、58、59、または60におけるVL配列を、当該配列の翻訳後修飾を含んだものも含めて、含む。ある特定の態様では、VLは、(a)配列番号:21、22、23、24、および25から選択されるいずれか１つのアミノ酸配列を含むHVR-L1と；(b)配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2と；(c)配列番号：27、28および29から選択されるいずれか１つのアミノ酸配列を含むHVR-L3より選択される、1つ、2つ、または3つのHVRを含む。翻訳後修飾は、重鎖又は軽鎖Ｎ末端のグルタミン又はグルタミン酸のピログルタミル化によるピログルタミン酸への修飾を含むが、これに限定されない。

[0136] 別の局面において、上述の態様の任意のものにおけるVH、および上述の態様の任意のものにおけるVLを含む、抗CD137抗原結合分子または抗体が提供される。

・一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体はそれぞれ配列番号：43および 配列番号：54のVHおよびVL配列を、当該配列の翻訳後修飾を含んだものも含めて、含む。

・一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体はそれぞれ配列番号：44および 配列番号：55のVHおよびVL配列を、当該配列の翻訳後修飾を含んだものも含めて、含む。

・一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体はそれぞれ配列番号：45および 配列番号：55VHおよびVL配列を、当該配列の翻訳後修飾を含んだもの

も含めて、含む。

・一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体はそれぞれ配列番号：46および 配列番号：54のVHおよびVL配列を、当該配列の翻訳後修飾を含んだものも含めて、含む。

・一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体はそれぞれ配列番号：47および 配列番号：54のVHおよびVL配列を、当該配列の翻訳後修飾を含んだものも含めて、含む。

・一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体はそれぞれ配列番号：48および 配列番号：56のVHおよびVL配列を、当該配列の翻訳後修飾を含んだものも含めて、含む。

・一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体はそれぞれ配列番号：49および 配列番号：57のVHおよびVL配列を、当該配列の翻訳後修飾を含んだものも含めて、含む。

・一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体はそれぞれ配列番号：50および 配列番号：58のVHおよびVL配列を、当該配列の翻訳後修飾を含んだものも含めて、含む。

・一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体はそれぞれ配列番号：51および 配列番号：59のVHおよびVL配列を、当該配列の翻訳後修飾を含んだものも含めて、含む。

・一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体はそれぞれ配列番号：51および 配列番号：60のVHおよびVL配列を、当該配列の翻訳後修飾を含んだものも含めて、含む。

・一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体はそれぞれ配列番号：52および 配列番号：60のVHおよびVL配列を、当該配列の翻訳後修飾を含んだものも含めて、含む。

・一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体はそれぞれ配列番号：50および 配列番号：59のVHおよびVL配列を、当該配列の翻訳後修飾を含んだものも含めて、含む。

・一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体はそれぞれ配列番号：53および 配列番号：54のVHおよびVL配列を、当該配列の翻訳後修飾を含んだものも含めて、含む。

上述の翻訳後修飾は、重鎖又は軽鎖Ｎ末端のグルタミン又はグルタミン酸のピログルタミル化によるピログルタミン酸への修飾を含むが、これに限定されない。

[0137] 本開示の好ましい抗CD137抗原結合分子または抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域、ならびにこれらのHVR1、2、および3のアミノ酸解列と、配列番号との対応を以下の一覧表に示す。

[0138] [表1]

重鎖／軽鎖可変領域	可変領域の配列番号		超可変領域(HVR)の配列番号					
	重鎖	軽鎖	H1	H2	H3	L1	L2	L3
A375/B167	43	54	7	8	17	21	26	27
A372/B040	44	55	7	9	17	22	26	27
A356/B040	45	55	7	10	17	22	26	27
A486/B167	46	54	7	11	18	21	26	27
A487/B167	47	54	7	8	18	21	26	27
A488/B226	48	56	7	12	18	21	26	28
A489/B223	49	57	7	13	18	21	26	29
A548/B376	50	58	7	14	19	23	26	27
A551/B256	51	59	7	15	20	24	26	27
A551/B379	51	60	7	15	20	25	26	27
A555/B379	52	60	7	16	20	25	26	27
A548/B256	50	59	7	14	19	24	26	27
A549/B167	53	54	7	14	17	21	26	27

[0139] 本明細書で提供される抗CD137抗原結合分子または抗体の重鎖又は軽鎖Ｎ末端のアミノ酸がグルタミンの場合、当該アミノ酸はグルタミン酸に置換されてもよい。本明細書で提供される抗CD137抗体の重鎖又は軽鎖Ｎ末端のアミノ酸がグルタミン酸の場合、当該アミノ酸はグルタミンに置換されてもよい。

[0140] 好ましい一態様において、上述されるHVR、重鎖可変領域、および／または

軽鎖可変領域を含む抗CD137抗原結合分子または抗体のいずれも、上述される低分子化合物に依存したCD137に対する結合活性を有する。

[0141] ［定常領域］

別の局面において、抗CD137抗原結合分子または抗体は、定常領域を含む。定常領域は、重鎖定常領域（Fc領域を含む）、軽鎖定常領域、あるいはその両者であってもよい。さらなる局面において、抗CD137抗原結合分子または抗体は、Fc領域を含む。いくつかの態様において、定常領域は、天然型配列の定常領域である。天然型抗体に由来する例示的な重鎖定常領域として、例えばヒトIgG1（配列番号：61、62）、ヒトIgG2、ヒトIgG3、ヒトIgG4などの重鎖定常領域を挙げることができる。また、天然型抗体に由来する例示的な軽鎖定常領域として、例えばヒトκ鎖、ヒトλ鎖（例えば配列番号：63）を挙げることができる。

[0142] 本明細書で用いられる「親定常領域」または「親Fc領域」とは、本明細書に記載のアミノ酸改変の導入前の定常領域またはFc領域を指す。また、「親抗原結合分子」とは、親定常領域または親Fc領域を含む抗原結合分子を指す。いくつかの態様において、親Fc領域は、天然型配列のFc領域（あるいは天然型抗体のFc領域）である。抗体は、例えば、IgA（IgA1、IgA2）、IgD、IgE、IgG（IgG1、IgG2、IgG3、IgG4）、およびIgMなどを含む。抗体は、ヒトまたはサル（例えば、カニクイザル、アカゲザル、マーモセット、チンパンジー、またはヒヒ）に由来し得る。天然型抗体は、天然に存在する変異を含んでいてもよい。遺伝子多型によるIgGの複数のアロタイプ配列が、「Sequences of proteins of immunological interest」、NIH PublicationNo. 91-3242に記載されているが、そのいずれも、本開示において使用され得る。一態様において、親Fc領域は、配列番号：61、62または182のヒトIgG1重鎖定常領域に由来するFc領域である。

[0143] 一局面において、抗CD137抗原結合分子または抗体は、天然型配列のFc領域または親Fc領域を含む抗CD137抗原結合分子または抗体と比較して、等電点（pI）が上昇している。いくつかの態様において、変異Fc領域は、少なくとも1

つのアミノ酸改変を含む。さらなる態様において、当該アミノ酸改変は、親Fc領域と比較して、変異Fc領域の等電点（pI）を上昇させる。特定の理論に拘束されることなく、生体液（例えば血漿）のpHは中性のpH範囲内にあると考えられる。生体液において、pIが上昇した抗原結合分子または抗体の正味の正電荷は、上昇したpIに起因して増加しており、その結果、当該抗原結合分子または抗体は、pIが上昇していない抗原結合分子または抗体と比べて、物理化学的クーロン相互作用によって、正味の負電荷を有する内皮細胞表面により強く引き付けられる。これにより、アゴニスト抗原結合分子（または抗体）、もしくは抗原に結合したアゴニスト抗原結合分子（または抗体）、Fcγ受容体発現細胞表面により近づき、抗原結合分子または抗体のFcγ受容体発現細胞への結合が上昇され得る。Fcγ受容体への結合活性がCD137アゴニスト活性に寄与する抗CD137アゴニスト抗原結合分子または抗体においては、pIを上昇させるアミノ酸改変によってFcγ受容体発現細胞への結合が上昇した抗CD137アゴニスト抗原結合分子または抗体が、当該pIを上昇させるアミノ酸改変を含まない抗CD137アゴニスト抗原結合分子または抗体と比較して、より高いCD137アゴニスト活性を示すことが可能である。

[0144] 本開示において、pIは理論pIでも実測pIでもよい。pIの値は、例えば、当業者に公知の等電点分離法によって測定することができる。理論pIの値は、例えば、遺伝子およびアミノ酸の配列解析ソフトウェア（Genetyxなど）を用いて算出することができる。その際、抗体の特性を計算式に反映してもよい。例えば、（i）通常、抗体内において保存されているCysはジスルフィド結合を形成し、側鎖の電荷を持たない。そのようなCysは計算からは除外し、ジスルフィド結合を形成していないフリー型のCysのみを計算に加えてもよい。また、（ii）抗体に関しては、翻訳後修飾により荷電状態、すなわち等電点が変化することがありうる。このような翻訳後修飾を考慮し、次のとおり計算式を改変しても良い：(a)重鎖のN末端がQ（グルタミン）の場合は、ピログルタミル化が起こるものとして、N末端のアミノ基は計算から除外する、(b)重鎖のC末端がK（リジン）の場合は、切断が起こるものとして、K（1残基分）を

計算から除外する、および、(c) 一般的に保存されている箇所のC（システイン）は全て、分子内でジスルフィド結合を形成しているものとして、これらのCの側鎖は計算から除外する。好ましい一態様において、上記(i)および(ii)の両方を計算式に反映しても良い。

[0145] 一態様において、pI値は、改変前と比べて、例えば少なくとも0.01、0.03、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、もしくはそれ以上、少なくとも0.6、0.7、0.8、0.9、もしくはそれ以上、少なくとも1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、もしくはそれ以上、または少なくとも1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、3.0もしくはそれ以上、上昇し得る。

[0146] 一態様において、pI上昇に関するアミノ酸改変、および抗原結合分子または抗体のpIを上昇させるための方法は、本明細書のＩＩＩ．組成物および方法（等電点（pI）上昇変異Fc領域を含むアゴニスト抗原結合分子）に詳述されている。ＩＩＩ．組成物および方法（等電点（pI）上昇変異Fc領域を含むアゴニスト抗原結合分子）に記載の任意のアミノ酸改変およびpIを上昇させるための方法を、抗CD137抗原結合分子または抗体に適用可能であることが当業者に理解されよう。

[0147] 一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体はpIが上昇した変異Fc領域を有し、当該変異Fc領域は、EUナンバリングで表される位置285、311、312、315、318、333、335、337、341、342、343、384、385、388、390、399、400、401、402、413、420、422、および431からなる群より選択される少なくとも1つの位置の少なくとも1つのアミノ酸改変を含む。さらなる態様において、pIが上昇した変異Fc領域は、選択された位置のそれぞれにおいてArgまたはLysを含む。

[0148] さらなる態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体はpIが上昇した変異Fc領域を有し、当該変異Fc領域は、EUナンバリングで表される位置311、343、および413からなる群より選択される少なくとも1つの位置の少なくとも1つのアミノ酸改変を含む。さらなる態様において、pIが上昇した変異Fc領域は、EUナンバリングで表される位置311、343、または413におけるアミノ酸改

変を含む。さらなる態様において、pIが上昇した変異Fc領域は、選択された位置のそれぞれにおいてArgまたはLysを含む。

[0149] 別の局面において、本開示は、以下（1）～（3）のいずれか1つのアミノ酸改変を含む、pIが上昇した変異Fc領域を含む抗CD137抗原結合分子または抗体を提供する：EUナンバリングで表される、（1）位置311および343；(2)位置311および413；ならびに（3）位置343および413。さらなる態様において、pIが上昇した変異Fc領域は、選択された位置のそれぞれにおいてArgまたはLysを含む。

[0150] 一態様において、本開示の抗CD137抗原結合分子または抗体は、下記表２に記載されるアミノ酸改変を含む、変異Fc領域を含む。

[0151] Fc領域のpIを上昇させるアミノ酸改変

[表2]

番号	アミノ酸置換（EU ナンバリング）
1	P343R/D413K
2	Q311R/P343R
3	P343R
4	D413K
5	Q311R
6	Q311R/D413K

[0152] 一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体は、天然型配列のFc領域にアミノ酸改変を加えて作製された変異Fc領域を含む。一態様おいて、変異Fc領域は、天然型配列のFc領域または親Fc領域に比べて、FcγRIa、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIIa、FcγRIIIbからなる群より選択される少なくとも一つのFcγ受容体に対する結合活性が上昇している。好ましくは、変異Fc領域は、天然型配列のFc領域または親Fc領域に比べて、FcγRIIbに対する結合活性が上昇している。FcγRIIbに対する結合活性が上昇した変異Fc領域を含む抗CD137抗体は、天然型配列のFc領域を含む抗CD137抗体と比較して、アゴニスト活性が上昇することが報告されている。一態様において、FcγRIIｂに対する結合活性が上昇するアミノ酸改変は、例えば、WO2012/115241、WO2014/0

30728、WO2014/163101および／またはWO2017/104783に記載されているアミノ酸改変を用いても良い。好ましい一態様において、FcγRIIbに対する結合活性を上昇させる改変は、EUナンバリングで表される位置234、235、236、237、238、264、268、295、326、および330からなる群から選択される少なくとも一つの位置におけるアミノ酸改変である。

[0153] 「Fcγ受容体」（本明細書において、Fcγ受容体、FcγR、またはFcgRと称する）とは、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4モノクローナル抗体のFc領域に結合し得る受容体を指し、Fcγ受容体遺伝子にコードされるタンパク質ファミリーの任意のメンバーを事実上意味する。ヒトでは、このファミリーには、アイソフォームFcγRIa、FcγRIb、およびFcγRIcを含むFcγRI（CD64）；アイソフォームFcγRIIa（アロタイプH131（H型）とR131（R型）を含む)、FcγRIIb（FcγRIIb-1とFcγRIIb-2を含む）、およびFcγRIIcを含むFcγRII（CD32）；ならびに、アイソフォームFcγRIIIa（アロタイプV158とF158を含む）およびFcγRIIIb（アロタイプFcγRIIIb-NA1とFcγRIIIb-NA2を含む）を含むFcγRIII（CD16）、さらに、未発見のあらゆるヒトFcγR、FcγRアイソフォームまたはアロタイプが含まれるが、これらに限定されるわけではない。FcγRIIb1およびFcγRIIb2は、ヒトFcγRIIbのスプライシング変異体として報告されている。さらに、FcγRIIb3と称するスプライシング変異体が報告されている（J Exp Med, 1989, 170: 1369-1385）。これらのスプライシング変異体に加えて、ヒトFcγRIIbは、NCBIに登録されたAAI46679.1、およびNCBIに登録された全てのスプライシング変異体、NP_001002273.1、NP_001002274.1、NP_001002275.1、NP_001177757.1、およびNP_003992.3を含む。さらに、ヒトFcγRIIbは、FcγRIIbに加えて、過去に報告された全ての遺伝的多型（Arthritis Rheum. 48: 3242-3252 (2003)；Kono et al., Hum. Mol. Genet. 14: 2881-2892 (2005)；およびKyogoju et al., Arthritis Rheum. 46: 1242-1254 (2002)）と、将来報告されるであろう全ての遺伝的多型とを含む。

[0154] FcγRIIaには2つのアロタイプが存在し、一方は、FcγRIIaの位置131のアミノ酸がヒスチジンであり（H型）、他方は、位置131のアミノ酸がアルギニ

ンで置換されている（R型）（Warrmerdam, J. Exp. Med. 172: 19-25 (1990)）。

[0155] FcγRは、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、およびサル由来のFcγRを含むが、これらに限定されるわけではなく、任意の生物体に由来してよい。マウスFcγRは、FcγRI（CD64）、FcγRII（CD32）、FcγRIII（CD16）、およびFcγRIII-2（CD16-2）、ならびに、任意のマウスFcγRまたはFcγRアイソフォームを含むが、これらに限定されるわけではない。

[0156] 別の局面において、本開示は、以下（1）～（8）のいずれか1つのアミノ酸改変を含む、FcγRIIbに対する結合活性が上昇した変異Fc領域を含む抗CD137抗原結合分子または抗体を提供する：EUナンバリングで表される、(1)位置234、238、264、および330；(2)位置234、238、および330；(3)位置234、237、238、および330；(4)位置236、268、および330；(5)位置235、236、268、295、326、および330；

[0157] 一態様において、本開示の抗CD137抗原結合分子または抗体は、下記表３に記載されるアミノ酸改変を含む、変異Fc領域を含む。更なる一態様において、本開示の抗CD137抗原結合分子または抗体は、表２（FcのpI上昇を伴うアミノ酸改変）に記載されるアミノ酸改変に加えて、さらに、下記表３に記載されるいずれかのアミノ酸改変の組合せを含む、変異Fc領域を含む。

[0158] Fc領域のFcγRIIb結合活性を上昇させるアミノ酸改変

[表3]

番号	アミノ酸置換（EU ナンバリング）
1	L234Y/P238D/V264I/A330K
2	L234Y/P238D/A330K
3	L234Y/G237D/P238D/A330K
4	G236N/H268D/A330K
5	L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K

[0159] 一態様において、本開示は、少なくとも一つのアミノ酸が改変された改変Fc領域を含み、当該改変Fc領域のFcgammaRIIbに対する結合活性が、参照Fc領域と同じかそれより高い、改変Fc領域を提供する。一態様において、参照Fc

領域は、上記表３に記載されるいずれかのアミノ酸改変の組合せを含むFc領域である。好ましい一態様において、参照Fc領域は、重鎖定常領域であるTT14(配列番号：149)、TT16（配列番号：150）、MY201（配列番号：153）またはMY518（配列番号：154）に含まれるFc領域である。好ましい一態様において、参照Fc領域は、重鎖定常領域であるMY201（配列番号：153）またはMY518（配列番号：154）に含まれるFc領域である。

[0160] 別の局面において、本開示は、Fcγ受容体（好ましくはFcγRIIb）結合活性の上昇とpI上昇とを伴う変異Fc領域を含む単離されたアゴニスト抗原結合分子または抗体を提供する。特定の態様において、本明細書に記載される変異Fc領域は、親Fc領域において少なくとも2つのアミノ酸改変を含む。前述のとおり、pIが上昇した抗原結合分子または抗体は、pIが上昇していない抗原結合分子または抗体と比べて、物理化学的クーロン相互作用によって、正味の負電荷を有する内皮細胞表面により強く引き付けられる。このことから、Fcγ受容体（好ましくはFcγRIIb）への結合活性がアゴニスト活性に寄与するアゴニスト抗原結合分子または抗体においては、Fcγ受容体（好ましくはFcγRIIb）を上昇させるアミノ酸改変とpIを上昇させるアミノ酸改変を組み合わせることによって、当該抗原結合分子または抗体のアゴニスト活性を上昇させることが可能である。

[0161] 一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体は、上述の、Fcγ受容体（例えばFcγRIIb）に対する結合活性を上昇させるアミノ酸改変、および等電点（pI）を上昇させるアミノ酸改変の両方を含む、変異Fc領域を含む。前述のとおり、pIが上昇した抗原結合分子または抗体は、pIが上昇していない抗原結合分子または抗体と比べて、物理化学的クーロン相互作用によって、正味の負電荷を有する内皮細胞表面により強く引き付けられる。このことから、Fcγ受容体（好ましくはFcγRIIb）への結合活性がCD137アゴニスト活性に寄与する抗CD137アゴニスト抗原結合分子または抗体においては、Fcγ受容体（好ましくはFcγRIIb）を上昇させるアミノ酸改変とpIを上昇させるアミノ酸改変を組み合わせることによって、当該抗CD137抗原結合分子または抗体

のアゴニスト活性を上昇させることが可能である。

[0162] 一局面において、本開示は、(a) EUナンバリングで表される、位置234、235、236、237、238、264、268、295、326、および330からなる群より選択される少なくとも1つの位置の少なくとも1つのアミノ酸改変と、(b) EUナンバリングで表される、位置311、343、および413からなる群より選択される少なくとも2つの位置の少なくとも2つのアミノ酸改変とを含む少なくとも3つのアミノ酸改変を含む、FcγRIIb結合活性の上昇とpI上昇とを伴う変異Fc領域を含むポリペプチドを提供する。

[0163] 別の局面において、本開示は、以下(1)～(26)のいずれか1つのアミノ酸改変を含む、FcγRIIb結合活性の上昇とpI上昇とを伴う変異Fc領域を含むポリペプチドを提供する：EUナンバリングで表される、

(1) 位置235、236、268、295、326、330、343、および413；

(2) 位置214、235、236、268、295、326、330、343、および413；

(3) 位置234、238、250、264、307、330、343、および413；

(4) 位置234、238、264、330、343、および413；

(5) 位置234、237、238、250、307、330、343、および413；

(6) 位置234、237、238、330、343、および413；

(7) 位置235、236、268、295、326、330、311、および343；

(8) 位置234、238、250、264、307、330、311、および343；

(9) 位置234、238、264、330、311、および343；

(10) 位置234、237、238、250、307、330、311、および343；

(11) 位置234、237、238、330、311、および343；

(12) 位置235、236、268、295、326、330、および343；

(13) 位置214、235、236、268、295、326、330、および343；

(14) 位置235、236、268、295、326、330、および413；

(15) 位置214、236、268、330、および343；

(16) 位置214、235、236、268、330、および343；

(17) 位置214、236、268、330、および413；

(18) 位置214、236、268、330、343、および413；

(19) 位置214、235、236、268、330、343、および413；

(20) 位置214、236、268、330、および311；

(21) 位置214、235、236、268、330、および311；

(22) 位置214、236、268、330、311、および343；

(23) 位置214、235、236、268、330、311、および343；

(24) 位置214、236、268、330、311、および413；

(25) 位置214、235、236、268、330、311、および413；

(26) 位置214、235、236、268、295、326、330、および311。

[0164] 一態様において、本開示の変異Fc領域は、下記表４に記載されるいずれかのアミノ酸改変の組合せを含む。

[0165]

[表4]

番号	アミノ酸置換(EU ナンバリング)
1	L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/P343R/D413K
2	K214R/L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/P343R/D413K
3	L234Y/P238D/T250V/V264I/T307P/A330K/P343R/D413K
4	L234Y/P238D/V264I/A330K/P343R/D413K
5	L234Y/G237D/P238D/T250V/T307P/A330K/P343R/D413K
6	L234Y/G237D/P238D/A330K/P343R/D413K
7	L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/Q311R/P343R
8	L234Y/P238D/T250V/V264I/T307P/A330K/Q311R/P343R
9	L234Y/P238D/V264I/A330K/Q311R/P343R
10	L234Y/G237D/P238D/T250V/T307P/A330K/Q311R/P343R
11	L234Y/G237D/P238D/A330K/Q311R/P343R
12	L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/P343R
13	K214R/L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/P343R
14	L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/D413K
15	K214R/G236N/H268D/A330K/P343R
16	K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/P343R
17	K214R/G236N/H268D/A330K/D413K
18	K214R/G236N/H268D/A330K/P343R/D413K
19	K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/P343R/D413K
20	K214R/G236N/H268D/A330K/Q311R
21	K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/Q311R
22	K214R/G236N/H268D/A330K/Q311R/P343R
23	K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/Q311R/P343R
24	K214R/G236N/H268D/A330K/Q311R/D413K
25	K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/Q311R/D413K
26	K214R/L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/Q311R

[0166] 一態様において、上記表４に記載されるいずれかのアミノ酸改変の組合せを含む変異Fc領域は、EUナンバリングに基づく447位のアミノ酸が欠失している。好ましい一態様において、上記表４に記載されるいずれかのアミノ酸改変の組合せを含む変異Fc領域は、EUナンバリングに基づく446位と447位のアミノ酸が欠失している。

[0167] 上記で例示される改変のほか、例えばWO2013/047752、WO2013/125667、WO2014/030728、WO2014/163101、またはWO2017104783に記載されるかまたは示唆される、親Fc領域と比較してFcγRIIbを含むFcγRへの結合活性を上昇させる少なくとも1つのアミノ酸改変、および、例えばWO2017/104783、WO2017/046994に記載されるかまたは示唆される、親Fc領域と比較してpIを上昇させる少なくとも1つのアミノ酸改変、および、それらのアミノ酸改変の組合せが用いられ得ることが、当業者に理解されよう。

[0168] さらに、他の目的のために実施されるアミノ酸改変を、本明細書に記載の変異Fc領域において組み合わせることができる。例えば、FcRn結合活性を上昇させるアミノ酸置換（Hinton et al., J. Immunol. 176(1): 346-356 (2006)；Dall'Acqua et al., J. Biol. Chem. 281(33): 23514-23524 (2006)；Petkova et al., Intl. Immunol. 18(12): 1759-1769(2006)；Zalevsky et al., Nat. Biotechnol. 28(2): 157-159 (2010)；WO2006/019447;WO2006/053301；およびWO2009/086320）、および、抗体のヘテロジェニティーまたは安定性を改善するためのアミノ酸置換（WO2009/041613）を加えてもよい。あるいは、WO2011/122011、WO2012/132067、WO2013/046704、またはWO2013/180201に記載される抗原クリアランスを促進する特性を有するポリペプチド、WO2013/180200に記載される標的組織への特異的結合特性を有するポリペプチド、WO2009/125825、WO2012/073992、またはWO2013/047752に記載される複数の抗原分子に対して繰り返し結合する特性を有するポリペプチドを、本明細書に記載の変異Fc領域と組み合わせることができる。あるいは、他の抗原に対する結合活性を付与する目的で、EP1752471およびEP1772465に開示されたアミノ酸改変を、本明細書に記載の変異Fc領域のCH3において組み合わせてもよい。

[0169] 一態様において、本開示の抗CD137抗原結合分子または抗体は、配列番号：６４～８５から選択されるいずれか１つのアミノ酸配列を含む、重鎖定常領域を含む。好ましくは、本開示の抗CD137抗原結合分子または抗体は、配列番号：７５または８２のアミノ酸配列を含む重鎖定常領域を含む。

[0170] 好ましい一態様において、上述される変異Fc領域を含む抗CD137抗原結合分

子または抗体は、上述される低分子化合物に依存したCD137に対する結合活性を有する。

[0171] 一態様において、本開示の抗CD137抗原結合分子または抗体は、次の可変領域及び定常領域を含む：上述のHVR、重鎖可変領域、および／または軽鎖可変領域を含む可変領域と；上述の変異Fc領域。好ましい一態様において、本開示の抗CD137抗原結合分子または抗体は、表５２に記載される抗体から選択されるいずれか一つの抗CD137抗体であってもよい。

[0172] さらなる局面において、本開示は、低分子化合物の存在下（例えば、10 μM以上、50μM以上、100μM以上、150μM以上、200μM以上、または250μM以上の低分子化合物の存在下）で、本明細書で提供される抗CD137抗原結合分子または抗体と同じCD137のエピトープに結合する抗原結合分子または抗体を提供する。例えば、特定の態様において、重鎖可変領域／軽鎖可変領域の組合せとして、表１７に記載のA375/B167、A372/B040、A356/B040、A486/B167、A487/B167、A488/B226、A489/B223、A548/B376、A551/B256、A551/B379、A555/B379、A548/B256、および／またはA549/B167を含む抗CD137抗原結合分子または抗体と同じエピトープに結合する抗原結合分子または抗体が提供される。一態様において、本開示の低分子化合物に依存した抗原結合活性に依存したCD137結合活性を有する抗CD137抗原結合分子または抗体は、抗原（例えば、CD137）と低分子化合物（例えば、ATP）の複合体によって形成されるエピトープを認識する。

[0173] さらなる局面において、本開示は、低分子化合物の存在下（例えば、10 μM以上、50μM以上、100μM以上、150μM以上、200μM以上、または250μM以上の低分子化合物の存在下）で、CD137への結合に関して、本明細書で提供される抗CD137抗原結合分子または抗体と競合する抗原結合分子または抗体を提供する。例えば、特定の態様において、CD137への結合位に関して、重鎖可変領域／軽鎖可変領域の組合せとして、表１７に記載のA375/B167、A372/B040、A356/B040、A486/B167、A487/B167、A488/B226、A489/B223、A548/B376、A551/B256、A551/B379、A555/B379、

A548/B256、および／またはA549/B167を含む抗CD137抗原結合分子または抗体と競合する。

[0174] 本開示のさらなる局面において、上述の態様の任意のものによる抗CD137抗原結合分子または抗体は、キメラ、ヒト化、またはヒト抗体を含む、モノクローナル抗体である。一態様において、抗CD137抗体は、例えば、Fv、Fab、Fab'、scFv、ダイアボディ、またはF(ab')$_2$断片などの、抗体断片である。別の態様において、抗体は、例えば、完全IgG1抗体や、本明細書で定義された他の抗体クラスまたはアイソタイプの、全長抗体である。

[0175] さらなる局面において、上述の態様の任意のものによる抗CD137抗原結合分子または抗体は、単独または組み合わせで、以下の項目1～7に記載の任意の特徴を取り込んでもよい。

[0176] 1．抗CD137抗原結合分子または抗体のアゴニスト活性

特定の態様において、本開示における抗CD137抗原結合分子または抗体は、CD137アゴニスト活性を有する。CD137シグナル伝達は、NK細胞のIFN-γ分泌及び増殖を刺激するだけでなく（Buechele et al., 2012; Lin et al., 2008; Melero et al., 1998）、それらの生存の増加並びにサイトカインの分泌及び共刺激分子の上方制御によって示されるDC活性化を促進することが知られている（Choi et al., 2009; Futagawa et al., 2002; Wilcox et al., 2002）。しかし、CD137は、T細胞のCD4＋サブセット及びCD8＋サブセットの両方においてTCR誘導活性化を調節する共刺激分子として最もよく特徴づけられる。TCR誘発と組み合わせて、抗CD137アゴニスト抗体は、T細胞の増殖を増強し、リンホカイン分泌を刺激し、活性化誘導細胞死に対するTリンパ球の感受性を低下させる（Snell et al., 2011に総説される）。これらの現象のうち、T細胞上でのCD137シグナル伝達の後に観察される生理現象は、CD137シグナルにより活性化する下流シグナルであるTRAF2、TRAF1、特にNF-kappaB、JNK、Erk、Akt、survivin、Bcl-XL、および／またはBcl-2等によって媒介される（Ward-Kavanaghら、Immunity、44巻：1005頁（2016年））。

[0177] 一態様において、「抗CD137アゴニスト抗原結合分子」または「抗CD137ア

ゴニスト抗体」は、CD137に結合することにより、CD137シグナルを伝達し、NK細胞のIFN-γ分泌、増殖、生存増加；サイトカインの分泌及び共刺激分子の上方制御によって示されるDC活性化；TCR誘導；T細胞増殖；および／またはリンホカイン分泌を有意に誘導または増強する抗原結合分子または抗体である。異なる一態様において、「抗CD137アゴニスト抗原結合分子」または「抗CD137アゴニスト抗体」はT細胞上のCD137に結合することによりCD137シグナルを伝達し、当該T細胞のNF-kappaBの活性化を有意に誘導する抗原結合分子または抗体である。また、抗原結合分子または抗体が「CD137アゴニスト活性を示す」とは、当該抗原結合分子または抗体が、CD137に結合することにより、上述の生理現象のいずれかが観察されることをいう。CD137アゴニスト活性の測定方法については、後述する「Ｃ．測定法（アッセイ）」の項で詳述される。

[0178] 特定の態様において、本開示における抗CD137抗原結合分子または抗体は、低分子化合物に依存したCD137アゴニスト活性を有する。非限定の一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体は、低分子化合物の存在下でのCD137に対するCD137アゴニスト活性が、当該低分子化合物の非存在下でのCD137のCD137アゴニスト活性と比べて高い。異なる一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体は、高濃度低分子化合物の存在下でのCD137アゴニスト活性が、低濃度の当該低分子化合物化合物の存在下でのCD137アゴニスト活性と比べて高い。さらなる一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体は、低分子化合物化合物の存在下でのCD137アゴニスト活性が、当該低分子化合物化合物の非存在下でのCD137アゴニスト活性の、2倍以上、3倍以上、5倍以上、10倍以上、20倍以上、30倍以上、50倍以上、100倍以上、200倍以上、300倍以上、500倍以上、1×10^3倍以上、2×10^3倍以上、上、3×10^3倍以上、5×10^3倍以上、1×10^4倍以上、2×10^4倍以上、3×10^4倍以上、5×10^4倍以上、または1×10^5倍以上である。

[0179] 低分子化合物の濃度としては、抗CD137抗原結合分子または抗体の結合活性に差が検出される限り、任意の濃度を選択することができる。一態様におい

て、抗CD137抗原結合分子または抗体は、細胞表面上のCD137に結合することにより、CD137シグナルを伝達する。したがって、低分子化合物に依存したCD137結合活性を有する抗CD137抗原結合分子または抗体は、当該低分子化合物に依存したCD137アゴニスト活性を有することが当業者に理解されよう。しかし、他方で、結合活性の測定と、アゴニスト活性の測定とでは測定法が異なることから、結合活性について差が検出される低分子化合物の濃度と、アゴニスト活性について差が検出される低分子化合物濃度は、異なりうることが当業者に理解されよう（例えば、10μMの低分子化合物の存在下でのCD137結合活性が、当該低分子化合物の非存在下でのCD137結合活性の2倍以上である抗CD137抗原結合分子または抗体において、10μMの低分子化合物の存在下でのCD137アゴニスト活性（測定値）が、当該低分子化合物の非存在下でのCD137アゴニスト活性（測定値）の2倍未満であることがある）。また、CD137アゴニスト活性の測定法（C.測定法（アッセイ）参照）により、アゴニスト活性の判断が異なりうることが当業者に理解されよう。

[0180] 一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体は、(i)10μM、50μM、100μM、150μM、200μM、または250μMの低分子化合物の存在下でCD137に対するアゴニスト活性を示し、かつ、(ii)当該低分子化合物の非存在下でCD137に対するアゴニスト活性を実質的に示さない、または当該低分子化合物の非存在下でCD137に対するアゴニスト活性が（当該低分子化合物の存在下と比較して）低い。

[0181] 一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体のアゴニスト活性が、C.測定法（アッセイ）に詳述されるa)アゴニスト活性測定法（PBMC）において評価される場合、抗CD137抗原結合分子または抗体は、(i)250μMの低分子化合物の存在下でCD137に対するアゴニスト活性を示し、かつ、(ii)当該低分子化合物の非存在下でCD137に対するアゴニスト活性が（当該低分子化合物の存在下と比較して）低い。更なる一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体は、(i)250μMの低分子化合物の存在下でCD137に対するアゴニスト活性を示し、かつ、(ii)当該低分子化合物の非存在下でCD137に対するアゴニスト

活性を実質的に示さない。

[0182] 一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体のアゴニスト活性が、C.測定法（アッセイ）に詳述されるb)アゴニスト活性測定法（レポーター遺伝子アッセイ）において評価される場合、抗CD137抗原結合分子または抗体は、(i) 10μM、50μM、100μM、150μM、200μM、または250μMの低分子化合物の存在下でCD137に対するアゴニスト活性を示し、かつ、(ii)当該低分子化合物の非存在下でCD137に対するアゴニスト活性を実質的に示さないか、アゴニスト活性が（当該低分子化合物の存在下と比較して）低い。レポーター遺伝子アッセイにおける抗体濃度は任意に選択することができ、例えば、抗体の最終濃度は、0、0.001、0.01、0.1、1、または10μg/mLである。好ましい一態様において、抗体の最終濃度は、0.1μg/mLまたは1μg/mLである。

[0183] 一態様において、C.測定法（アッセイ）に詳述されるb)アゴニスト活性測定法（レポーター遺伝子アッセイ）において、抗体の最終濃度を0.1μg/mLとする場合、(i) 10μMの低分子化合物存在下での抗CD137抗原結合分子または抗体のCD137アゴニスト活性（相対発光量）は、(ii) 当該低分子化合物の非存在下でのCD137アゴニスト活性（相対発光量）と比べて、2倍以上、3倍以上、5倍以上、10倍以上、20倍以上、30倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、または90倍以上高い。一態様において、C.測定法（アッセイ）に詳述されるb)アゴニスト活性測定法（レポーター遺伝子アッセイ）において、抗体の最終濃度を0.1μg/mLとする場合、(i) 100μMの低分子化合物存在下での抗CD137抗原結合分子または抗体のCD137アゴニスト活性（相対発光量）は、(ii) 当該低分子化合物の非存在下でのCD137アゴニスト活性（相対発光量）と比べて、2倍以上、3倍以上、5倍以上、10倍以上、20倍以上、30倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、または90倍以上高い。一態様において、C.測定法（アッセイ）に詳述されるb)アゴニスト活性測定法（レポーター遺伝子アッセイ）において、抗体の最終濃度を0.1μg/mLとする場合、(i) 250μMの低分子化合物存在下での抗CD137抗原結合分子または抗体のCD137アゴニスト活性（相対発光量）は、(ii) 当該低分子化合物の非存在下

でのCD137アゴニスト活性（相対発光量）と比べて、2倍以上、3倍以上、5倍以上、10倍以上、20倍以上、30倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、または90倍以上高い。上記いずれかの態様において、さらに、0.1μg/mLの抗CD137抗原結合分子または抗体は、当該低分子化合物の非存在下において、CD137アゴニスト活性を実質的に示さない。

[0184] 一態様において、C.測定法（アッセイ）に詳述されるb)アゴニスト活性測定法（レポーター遺伝子アッセイ）において、抗体の最終濃度を1μg/mLとする場合、（i）10μMの低分子化合物存在下での抗CD137抗原結合分子または抗体のCD137アゴニスト活性（相対発光量）は、（ii）当該低分子化合物の非存在下でのCD137アゴニスト活性（相対発光量）と比べて、2倍以上、3倍以上、5倍以上、10倍以上、20倍以上、30倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、または90倍以上高い。一態様において、C.測定法（アッセイ）に詳述されるb)アゴニスト活性測定法（レポーター遺伝子アッセイ）において、抗体の最終濃度を0.1μg/mLとする場合、（i）100μMの低分子化合物存在下での抗CD137抗原結合分子または抗体のCD137アゴニスト活性（相対発光量）は、（ii）当該低分子化合物の非存在下でのCD137アゴニスト活性（相対発光量）と比べて、2倍以上、3倍以上、5倍以上、10倍以上、20倍以上、30倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、または90倍以上高い。一態様において、C.測定法（アッセイ）に詳述されるb)アゴニスト活性測定法（レポーター遺伝子アッセイ）において、抗体の最終濃度を0.1μg/mLとする場合、（i）250μMの低分子化合物存在下での抗CD137抗原結合分子または抗体のCD137アゴニスト活性（相対発光量）は、（ii）当該低分子化合物の非存在下でのCD137アゴニスト活性（相対発光量）と比べて、2倍以上、3倍以上、5倍以上、10倍以上、20倍以上、30倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、または90倍以上高い。上記いずれかの態様において、さらに、1μg/mLの抗CD137抗原結合分子または抗体は、当該低分子化合物の非存在下において、CD137アゴニスト活性を実質的に示さない。

[0185] ２．抗体断片

特定の態様において、本明細書で提供される抗体は、抗体断片である。抗体断片は、これらに限定されるものではないが、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')$_2$、Fv、および scFv断片、ならびに、後述する他の断片を含む。特定の抗体断片についての総説として、Hudson et al. Nat. Med. 9:129-134 (2003) を参照のこと。scFv断片の総説として、例えば、Pluckthun, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp.269-315 (1994)；加えて、WO93/16185；ならびに米国特許第5,571,894号および第5,587,458号を参照のこと。サルベージ受容体結合エピトープ残基を含みインビボ（in vivo）における半減期の長くなったFabおよびF(ab')$_2$断片についての論説として、米国特許第5,869,046号を参照のこと。

[0186] ダイアボディは、二価または二重特異的であってよい、抗原結合部位を2つ伴う抗体断片である。例えば、EP404,097号; WO1993/01161; Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003); Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993) 参照。トリアボディ（triabody）やテトラボディ（tetrabody）も、Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003) に記載されている。

[0187] シングルドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインのすべてもしくは一部分、または軽鎖可変ドメインのすべてもしくは一部分を含む、抗体断片である。特定の態様において、シングルドメイン抗体は、ヒトシングルドメイン抗体である（Domantis, Inc., Waltham, MA；例えば、米国特許第6,248,516号B1参照）。

[0188] 抗体断片は、これらに限定されるものではないが、本明細書に記載の、完全抗体のタンパク質分解的消化、組み換え宿主細胞（例えば、大腸菌（E. coli）またはファージ）による産生を含む、種々の手法により作ることができる。

[0189] ３．キメラおよびヒト化抗体

特定の態様において、本明細書で提供される抗体は、キメラ抗体である。

特定のキメラ抗体が、例えば、米国特許第4,816,567号；および、Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984) に記載されている。一例では、キメラ抗体は、非ヒト可変領域（例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、またはサルなどの非ヒト霊長類に由来する可変領域）およびヒト定常領域を含む。さらなる例において、キメラ抗体は、親抗体のものからクラスまたはサブクラスが変更された「クラススイッチ」抗体である。キメラ抗体は、その抗原結合断片も含む。

[0190] 特定の態様において、キメラ抗体は、ヒト化抗体である。典型的には、非ヒト抗体は、親非ヒト抗体の特異性およびアフィニティを維持したままでヒトへの免疫原性を減少させるために、ヒト化される。通常、ヒト化抗体は1つまたは複数の可変ドメインを含み、当該可変ドメイン中、HVR（例えばCDR（またはその部分））は非ヒト抗体に由来し、FR（またはその部分）はヒト抗体配列に由来する。ヒト化抗体は、任意で、ヒト定常領域の少なくとも一部分を含む。いくつかの態様において、ヒト化抗体中のいくつかのFR残基は、例えば、抗体の特異性またはアフィニティを回復または改善するために、非ヒト抗体（例えば、HVR残基の由来となった抗体）からの対応する残基で置換されている。

[0191] ヒト化抗体およびその作製方法は、Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)において総説されており、また、例えば、Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988)； Queen et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989)； 米国特許第5,821,337号、第7,527,791号、第6,982,321号、および第7,087,409号；Kashmiri et al., Methods 36:25-34 (2005) (特異性決定領域 (specificity determining region: SDR) グラフティングを記載）；Padlan, Mol. Immunol. 28:489-498 (1991) （リサーフェイシングを記載）； Dall'Acqua et al., Methods 36:43-60 (2005) （FRシャッフリングを記載）；ならびに、Osbourn et al., Methods 36:61-68 (2005) およびKlimka et al., Br. J. Cancer, 83:252-260 (2000) （FRシャッフリングのための「ガイドセレクション」アプローチを記載） において、

さらに記載されている。

[0192] ヒト化に使われ得るヒトフレームワーク領域は、これらに限定されるものではないが：「ベストフィット」法（Sims et al. J. Immunol. 151:2296（1993）参照）を用いて選択されたフレームワーク領域；軽鎖または重鎖可変領域の特定のサブグループのヒト抗体のコンセンサス配列に由来するフレームワーク領域（Carter et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992) および Presta et al. J. Immunol., 151:2623 (1993) 参照）；ヒト成熟（体細胞変異）フレームワーク領域またはヒト生殖細胞系フレームワーク領域（例えば、Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008) 参照）；および、FRライブラリのスクリーニングに由来するフレームワーク領域（Baca et al., J. Biol. Chem. 272:10678-10684 (1997) および Rosok et al., J. Biol. Chem. 271:22611-22618 (1996) 参照）を含む。

[0193] ４．ヒト抗体

特定の態様において、本明細書で提供される抗体は、ヒト抗体である。ヒト抗体は、当該技術分野において知られる種々の手法によって製造され得る。ヒト抗体は、van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5: 368-74 (2001) および Lonberg, Curr. Opin. Immunol. 20:450-459 (2008) に、概説されている。

[0194] ヒト抗体は、抗原チャレンジ（負荷）に応答して完全ヒト抗体またはヒト可変領域を伴う完全抗体を産生するように改変されたトランスジェニック動物へ免疫原を投与することにより、調製されてもよい。そのような動物は、典型的にはヒト免疫グロブリン遺伝子座の全部もしくは一部分を含み、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の全部もしくは一部分は、内因性の免疫グロブリン遺伝子座を置き換えるか、または、染色体外にもしくは当該動物の染色体内にランダムに取り込まれた状態で存在する。そのようなトランスジェニックマウスにおいて、内因性の免疫グロブリン遺伝子座は、通常不活性化されている。トランスジェニック動物からヒト抗体を得る方法の総説として、Lonberg, Nat. Biotech. 23:1117-1125 (2005) を参照のこと。また、例えば、XEN

OMOUSE（商標）技術を記載した米国特許第6,075,181号および第6,150,584号；HUMAB（登録商標）技術を記載した米国特許第5,770,429号；K-M MOUSE（登録商標）技術を記載した米国特許第7,041,870号；ならびに、VELOCIMOUSE（登録商標）技術を記載した米国特許出願公開第2007/0061900号を、併せて参照のこと。このような動物によって生成された完全抗体からのヒト可変領域は、例えば、異なるヒト定常領域と組み合わせるなどして、さらに修飾されてもよい。

[0195] ヒト抗体は、ハイブリドーマに基づいた方法でも作ることができる。ヒトモノクローナル抗体の製造のための、ヒトミエローマおよびマウス－ヒトヘテロミエローマ細胞株は、既に記述されている。（例えば、Kozbor J. Immunol., 133: 3001 (1984)；Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp.51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)；およびBoerner et al., J. Immunol., 147: 86 (1991) 参照。）ヒトB細胞ハイブリドーマ技術を介して生成されたヒト抗体も、Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006) に述べられている。追加的な方法としては、例えば、米国特許第7,189,826号（ハイブリドーマ細胞株からのモノクローナルヒトIgM抗体の製造を記載）、および、Ni, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268 (2006)（ヒト－ヒトハイブリドーマを記載）に記載されたものを含む。ヒトハイブリドーマ技術（トリオーマ技術）も、Vollmers and Brandlein, Histology and Histopathology, 20(3):927-937 (2005) およびVollmers and Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27(3):185-91 (2005)に記載されている。

[0196] ヒト抗体は、ヒト由来ファージディスプレイライブラリから選択されたFvクローン可変ドメイン配列を単離することでも生成できる。このような可変ドメイン配列は、次に所望のヒト定常ドメインと組み合わせることができる。抗体ライブラリからヒト抗体を選択する手法を、以下に述べる。

[0197] ５．ライブラリ由来抗体

本開示の抗体は、所望の1つまたは複数の活性を伴う抗体についてコンビナ

トリアルライブラリをスクリーニングすることによって単離してもよい。例えば、ファージディスプレイライブラリの生成や、所望の結合特性を備える抗体についてそのようなライブラリをスクリーニングするための、様々な方法が当該技術分野において知られている。そのような方法は、Hoogenboom et al. in Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) において総説されており、さらに例えば、McCafferty et al., Nature 348:552-554 ; Clackson et al., Nature 352: 624-628 (1991) ; Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1992) ; Marks and Bradbury, in Methods in Molecular Biology 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003) ; Sidhu et al., J. Mol. Biol. 338(2): 299-310 (2004) ; Lee et al., J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093 (2004) ; Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34):12467-12472 (2004) ; およびLee et al., J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132(2004) に記載されている。

[0198] 特定のファージディスプレイ法において、VHおよびVL遺伝子のレパートリーは、ポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction: PCR) により別々にクローニングされ、無作為にファージライブラリ中で再結合され、当該ファージライブラリは、Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994) に述べられているようにして、抗原結合ファージについてスクリーニングされ得る。ファージは、典型的には、単鎖Fv (scFv) 断片としてまたはFab断片としてのいずれかで、抗体断片を提示する。免疫化された供給源からのライブラリは、ハイブリドーマを構築することを要さずに、免疫源に対する高アフィニティ抗体を提供する。あるいは、Griffiths et al., EMBO J, 12: 725-734 (1993) に記載されるように、ナイーブレパートリーを (例えば、ヒトから) クローニングして、免疫化することなしに、広範な非自己および自己抗原への抗体の単一の供給源を提供することもできる。最後に、ナイーブライブラリは、Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992) に記載されるように、幹細胞から再編成前のV-遺伝子セグメントをク

ローニングし、超可変CDR3領域をコードしかつインビトロ（in vitro）で再構成を達成するための無作為配列を含んだPCRプライマーを用いることにより、合成的に作ることもできる。ヒト抗体ファージライブラリを記載した特許文献は、例えば：米国特許第5,750,373号、ならびに、米国特許出願公開第2005/0079574号、2005/0119455号、第2005/0266000号、第2007/0117126号、第2007/0160598号、第2007/0237764号、第2007/0292936号、および第2009/0002360号を含む。

[0199] ヒト抗体ライブラリから単離された抗体または抗体断片は、本明細書ではヒト抗体またはヒト抗体断片と見なす。

[0200] 本開示の、低分子化合物に依存した抗原結合活性を有する抗原結合分子または抗体は、抗原結合分子のライブラリからスクリーニングすることによって選択してもよい。ライブラリとしては、上記のコンビナトリアルライブラリを用いてもよい。また、抗原結合分子のライブラリは、抗原結合分子のレパートリーにバイアスがかけられていないライブラリ（ナイーブライブラリー）であってもよいし、バイアスがかけられたライブラリであってもよい。後者のライブラリの例としては、所定の化合物に対する結合活性が予め付与された抗原結合分子のライブラリを挙げることができる。特定の態様において、抗原結合分子のライブラリは、所定の化合物に対する結合活性を付与するためのアミノ酸改変が予め導入されている抗原結合分子のライブラリである。そのようなライブラリの例として、例えば、国際公開WO2015/083764に記載のライブラリが参照され得る

[0201] ６．多重特異性抗体

特定の態様において、本明細書で提供される抗体は、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）である。多重特異性抗体は、少なくとも2つの異なる部位に結合特異性を有する、モノクローナル抗体である。特定の態様において、結合特異性の1つは、CD137に対するものであり、もう1つは他の任意の抗原へのものである。特定の態様において、二重特異性抗体は、CD137の異なった2つのエピトープに結合してもよい。二重特異性抗体は、CD137を発現する

細胞に細胞傷害剤を局在化するために使用されてもよい。二重特異性抗体は、全長抗体としてまたは抗体断片として調製され得る。

[0202] 一態様において、本開示の抗CD137抗原結合分子または抗体は、一方のArmが低分子化合物依存的なCD137結合活性を有し、他方のArmがCD137とは異なる抗原に結合する、二重特異性抗体である。CD137と異なる「抗原」は、その構造は特定の構造に限定されない。別の意味では、抗原は無機物でもあり得るし有機物でもあり得る。例示的な抗原が、本明細書（例えば、「ＩＶ．組成物および方法（化合物の濃度に応じて抗原に対する結合活性が変化する抗原結合分子）、Ｂ．抗原」）において開示される。一態様において、抗原としては癌組織または炎症性組織における癌細胞・免疫細胞・ストローマ細胞等に発現する抗原が好ましい。

[0203] 多重特異性抗体を作製するための手法は、これらに限定されるものではないが、異なる特異性を有する2つの免疫グロブリン重鎖－軽鎖ペアの組み換え共発現（Milstein and Cuello, Nature 305: 537 (1983)、WO93/08829、およびTraunecker et al., EMBO J. 10: 3655 (1991) 参照）、およびknob-in-hole技術（例えば、米国特許第5,731,168号参照）を含む。多重特異性抗体は、Fcヘテロ二量体分子を作製するために静電ステアリング効果（electrostatic steering effects）を操作すること（WO2009/089004A1）；2つ以上の抗体または断片を架橋すること（米国特許第4,676,980号およびBrennan et al., Science, 229: 81 (1985)参照）；ロイシンジッパーを用いて2つの特異性を有する抗体を作成すること（Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992) 参照）；「ダイアボディ」技術を用いて二重特異性抗体断片を作製すること（Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993) 参照）；および、単鎖Fv（scFv）二量体を用いること（Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994) 参照）；および、例えばTutt et al. J. Immunol. 147: 60 (1991) に記載されるように三重特異性抗体を調製すること、によって作製してもよい。

[0204] 「オクトパス抗体」を含む、3つ以上の機能的抗原結合部位を伴う改変抗体

も、本明細書では含まれる（例えば、米国特許出願公開第2006/0025576号A1参照）。

[0205] 本明細書で抗体または断片は、CD137と別の異なる抗原とに結合する1つの抗原結合部位を含む、「デュアルアクティングFab」または「DAF」も含む（例えば、米国特許出願公開第2008/0069820号参照）。

[0206] ７．抗体変異体

特定の態様において、本明細書で提供される抗体のアミノ酸配列変異体も、考慮の内である。例えば、抗体の結合アフィニティおよび／または他の生物学的特性を改善することが、望ましいこともある。抗体のアミノ酸配列変異体は、抗体をコードするヌクレオチド配列に適切な修飾を導入すること、または、ペプチド合成によって、調製されてもよい。そのような修飾は、例えば、抗体のアミノ酸配列からの欠失、および／または抗体のアミノ酸配列中への挿入、および／または抗体のアミノ酸配列中の残基の置換を含む。最終構築物が所望の特徴（例えば、抗原結合性）を備えることを前提に、欠失、挿入、および置換の任意の組合せが、最終構築物に至るために行われ得る。

[0207] ａ）置換、挿入、および欠失変異体

特定の態様において、1つまたは複数のアミノ酸置換を有する抗体変異体が提供される。置換的変異導入の目的部位は、HVRおよびFRを含む。保存的置換を、表１の「好ましい置換」の見出しの下に示す。より実質的な変更を、表１の「例示的な置換」の見出しの下に提供するとともに、アミノ酸側鎖のクラスに言及しつつ下で詳述する。アミノ酸置換は目的の抗体に導入されてもよく、産物は、例えば、保持／改善された抗原結合性、減少した免疫原性、または改善したADCCまたはCDCなどの、所望の活性についてスクリーニングされてもよい。

[0208]

[表5]

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

[0209] アミノ酸は、共通の側鎖特性によって群に分けることができる：

(1) 疎水性：ノルロイシン、メチオニン (Met)、アラニン (Ala)、バリン (Val)、ロイシン (Leu)、イソロイシン (Ile)；

(2) 中性の親水性：システイン (Cys)、セリン (Ser)、トレオニン (Thr)、アスパラギン (Asn)、グルタミン (Gln)；

(3) 酸性：アスパラギン酸 (Asp)、グルタミン酸 (Glu)；

(4) 塩基性：ヒスチジン (His)、リジン (Lys)、アルギニン (Arg)；

(5) 鎖配向に影響する残基：グリシン (Gly)、プロリン (Pro)；

(6) 芳香族性：トリプトファン（Trp)、チロシン（Tyr)、フェニルアラニン(Phe)。

非保存的置換は、これらのクラスの1つのメンバーを、別のクラスのものに交換することをいう。

[0210] 置換変異体の1つのタイプは、親抗体（例えば、ヒト化またはヒト抗体）の1つまたは複数の超可変領域残基の置換を含む。通常、その結果として生じ、さらなる研究のために選ばれた変異体は、親抗体と比較して特定の生物学的特性における修飾（例えば、改善）（例えば、増加したアフィニティ、減少した免疫原性）を有する、および／または親抗体の特定の生物学的特性を実質的に保持しているであろう。例示的な置換変異体は、アフィニティ成熟抗体であり、これは、例えばファージディスプレイベースのアフィニティ成熟技術（例えば本明細書に記載されるもの）を用いて適宜作製され得る。簡潔に説明すると、1つまたは複数のHVR残基を変異させ、そして変異抗体をファージ上に提示させ、特定の生物学的活性（例えば、結合アフィニティ）に関してスクリーニングを行う。

[0211] 改変（例えば、置換）は、例えば抗体のアフィニティを改善するために、HVRにおいて行われ得る。そのような改変は、HVRの「ホットスポット」、すなわち、体細胞成熟プロセスの間に高頻度で変異が起こるコドンによってコードされる残基（例えば、Chowdhury, Methods Mol. Biol. 207:179-196 (2008) を参照のこと）および／または抗原に接触する残基において行われ得、得られた変異VHまたはVLが結合アフィニティに関して試験され得る。二次ライブラリからの構築および再選択によるアフィニティ成熟が、例えば、Hoogenboom et al. in Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001)) に記載されている。アフィニティ成熟のいくつかの態様において、多様性は、任意の様々な方法（例えば、エラープローンPCR、チェーンシャッフリングまたはオリゴヌクレオチド指向変異導入）によって成熟のために選択された可変遺伝子に導入される。次いで、二次ライブラリが作製される。次いで、このライブラリは、所望のアフィ

ニティを有する任意の抗体変異体を同定するためにスクリーニングされる。多様性を導入する別の方法は、いくつかのHVR残基（例えば、一度に4～6残基）を無作為化するHVR指向アプローチを含む。抗原結合に関与するHVR残基は、例えばアラニンスキャニング変異導入またはモデリングを用いて、具体的に特定され得る。特に、CDR-H3およびCDR-L3がしばしば標的化される。

[0212] 特定の態様において、置換、挿入、または欠失は、そのような改変が抗原に結合する抗体の能力を実質的に減少させない限り、1つまたは複数のHVR内で行われ得る。例えば、結合アフィニティを実質的に減少させない保存的改変（例えば、本明細書で提供されるような保存的置換）が、HVRにおいて行われ得る。そのような改変は、例えば、HVRの抗原接触残基の外側であり得る。上記の変異VHおよびVL配列の特定の態様において、各HVRは改変されていないか、わずか1つ、2つ、もしくは3つのアミノ酸置換を含む。

[0213] 変異導入のために標的化され得る抗体の残基または領域を同定するのに有用な方法は、Cunningham and Wells (1989) Science, 244:1081-1085によって記載される、「アラニンスキャニング変異導入」と呼ばれるものである。この方法において、一残基または一群の標的残基（例えば、荷電残基、例えばアルギニン、アスパラギン酸、ヒスチジン、リジン、およびグルタミン酸）が同定され、中性または負に荷電したアミノ酸（例えば、アラニンもしくはポリアラニン）で置き換えられ、抗体と抗原の相互作用が影響を受けるかどうかが決定される。この初期置換に対して機能的感受性を示したアミノ酸位置に、さらなる置換が導入され得る。あるいはまたは加えて、抗体と抗原の間の接触点を同定するために、抗原抗体複合体の結晶構造を解析してもよい。そのような接触残基および近隣の残基を、置換候補として標的化してもよく、または置換候補から除外してもよい。変異体は、それらが所望の特性を含むかどうかを決定するためにスクリーニングされ得る。

[0214] アミノ酸配列の挿入は、配列内部への単一または複数のアミノ酸残基の挿入と同様、アミノ末端および／またはカルボキシル末端における1残基から100残基以上を含むポリペプチドの長さの範囲での融合も含む。末端の挿入の例

は、N末端にメチオニル残基を伴う抗体を含む。抗体分子の他の挿入変異体は、抗体のN-またはC-末端に、酵素（例えば、ADEPTのための）または抗体の血漿半減期を増加させるポリペプチドを融合させたものを含む。

[0215] ｂ）グリコシル化変異体

特定の態様において、本明細書で提供される抗体は、抗体がグリコシル化される程度を増加させるまたは減少させるように改変されている。抗体へのグリコシル化部位の追加または削除は、1つまたは複数のグリコシル化部位を作り出すまたは取り除くようにアミノ酸配列を改変することにより、簡便に達成可能である。

[0216] 抗体がFc領域を含む場合、そこに付加される炭水化物が改変されてもよい。哺乳動物細胞によって産生される天然型抗体は、典型的には、枝分かれした二分岐のオリゴ糖を含み、当該オリゴ糖は通常Fc領域のCH2ドメインのAsn297にN-リンケージによって付加されている。例えば、Wright et al. TIBTECH 15:26-32（1997）参照。オリゴ糖は、例えば、マンノース、N－アセチルグルコサミン（GlcNAc)、ガラクトース、およびシアル酸などの種々の炭水化物、また、二分岐のオリゴ糖構造の「幹」中のGlcNAcに付加されたフコースを含む。いくつかの態様において、本開示の抗体中のオリゴ糖の修飾は、特定の改善された特性を伴う抗体変異体を作り出すために行われてもよい。

[0217] 一態様において、Fc領域に（直接的または間接的に）付加されたフコースを欠く炭水化物構造体を有する抗体変異体が提供される。例えば、そのような抗体におけるフコースの量は、1％～80％、1％～65％、5％～65％または20％～40％であり得る。フコースの量は、例えばWO2008/077546に記載されるようにMALDI-TOF質量分析によって測定される、Asn297に付加されたすべての糖構造体（例えば、複合、ハイブリッド、および高マンノース構造体）の和に対する、Asn297における糖鎖内のフコースの平均量を計算することによって決定される。Asn297は、Fc領域の297位のあたりに位置するアスパラギン残基を表す（Fc領域残基のEUナンバリング）。しかし、複数の抗体間のわずかな配列の多様性に起因して、Asn297は、297位の±3アミノ酸上流または下流、

すなわち294位～300位の間に位置することもあり得る。そのようなフコシル化変異体は、改善されたADCC機能を有し得る。例えば、米国特許出願公開第2003/0157108号（Presta, L.）；第2004/0093621号（Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd）を参照のこと。「脱フコシル化」または「フコース欠損」抗体変異体に関する刊行物の例は、US2003/0157108; WO2000/61739; WO2001/29246; US2003/0115614; US2002/0164328; US2004/0093621; US2004/0132140; US2004/0110704; US2004/0110282; US2004/0109865; WO2003/085119; WO2003/084570; WO2005/035586; WO2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004) を含む。脱フコシル化抗体を産生することができる細胞株の例は、タンパク質のフコシル化を欠くLec13 CHO細胞（Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986)；米国特許出願公開第US2003/0157108号A1、Presta, L；およびWO2004/056312A1、Adams et al.、特に実施例11）およびノックアウト細胞株、例えばアルファ-1,6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子FUT8ノックアウトCHO細胞（例えば、Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)；Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006)；およびWO2003/085107を参照のこと）を含む。

[0218] 例えば抗体のFc領域に付加された二分枝型オリゴ糖がGlcNAcによって二分されている、二分されたオリゴ糖を有する抗体変異体がさらに提供される。そのような抗体変異体は、減少したフコシル化および／または改善されたADCC機能を有し得る。そのような抗体変異体の例は、例えば、WO2003/011878（Jean-Mairet et al.）；米国特許第6,602,684号（Umana et al.）；およびUS2005/0123546（Umana et al.）に記載されている。Fc領域に付加されたオリゴ糖中に少なくとも1つのガラクトース残基を有する抗体変異体も提供される。そのような抗体変異体は、改善されたCDC機能を有し得る。そのような抗体変異体は、例えば、WO1997/30087（Patel et al.）；WO1998/58964（Raju, S.）；およびWO1999/22764（Raju, S.）に記載されている。

[0219] ｃ）Fc領域変異体

特定の態様において、本明細書で提供される抗体のFc領域に1つまたは複数のアミノ酸修飾を導入して、それによりFc領域変異体（または「改変Fc領域」と呼称することもある。）を生成してもよい。Fc領域変異体は、1つまたは複数のアミノ酸ポジションのところでアミノ酸修飾（例えば、置換）を含む、ヒトFc領域配列（例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4のFc領域）を含んでもよい。

[0220] 特定の態様において、すべてではないがいくつかのエフェクター機能を備える抗体変異体も、本開示の考慮の内であり、当該エフェクター機能は、抗体を、そのインビボでの半減期が重要であるが、特定のエフェクター機能（補体およびADCCなど）は不要または有害である場合の適用に望ましい候補とするものである。CDCおよび／またはADCC活性の減少／欠乏を確認するために、インビトロ および／またはインビボ の細胞傷害測定を行うことができる。例えば、Fc受容体（FcR）結合測定は、抗体がFcγR結合性を欠く（よってADCC活性を欠く蓋然性が高い）一方でFcRn結合活性を維持することを確かめるために行われ得る。ADCCを媒介するプライマリ細胞であるNK細胞はFcγRIIIのみを発現するが、一方単球はFcγRI、FcγRII、FcγRIIIを発現する。造血細胞上のFcRの発現は、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492（1991）の第464頁のTable 3にまとめられている。目的の分子のADCC活性を評価するためのインビトロ測定法（アッセイ）の非限定的な例は、米国特許第5,500,362号（例えば、 Hellstrom, I. et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059-7063（1986）参照）および Hellstrom, I et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502（1985）；米国特許第5,821,337号（Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166:1351-1361（1987）参照）に記載されている。あるいは、非放射性の測定法を用いてもよい（例えば、ACT1（商標）non-radioactive cytotoxicity assay for flow cytometry（CellTechnology, Inc. Mountain View, CA）；および、CytoTox 96（登録商標）non-radioactive cytotoxicity assays 法（Promega, Madison, WI）参照）。このような測定法

に有用なエフェクター細胞は、末梢血単核細胞（peripheral blood mononuclear cell: PBMC）およびナチュラルキラー（natural killer: NK）細胞を含む。あるいはまたは加えて、目的の分子のADCC活性は、例えば、Clynes et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998) に記載されるような動物モデルにおいて、インビボで評価されてもよい。また、抗体がC1qに結合できないこと、よってCDC活性を欠くことを確認するために、C1q結合測定を行ってもよい。例えば、WO2006/029879 および WO2005/100402のC1qおよびC3c結合ELISAを参照のこと。また、補体活性化を評価するために、CDC測定を行ってもよい（例えば、Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996)；Cragg, M.S. et al., Blood 101:1045-1052 (2003)；およびCragg, M.S. and M.J. Glennie, Blood 103:2738-2743 (2004) 参照）。さらに、FcRn結合性およびインビボでのクリアランス／半減期の決定も、当該技術分野において知られた方法を用いて行い得る（例えばPetkova, S.B. et al., Int'l. Immunol. 18(12):1759-1769 (2006) 参照）。

[0221] 減少したエフェクター機能を伴う抗体は、Fc領域残基238、265、269、270、297、327、および329の1つまたは複数の置換を伴うものを含む（米国特許第6,737,056号）。このようなFc変異体は、残基265および297のアラニンへの置換を伴ういわゆる「DANA」Fc変異体（米国特許第7,332,581号）を含む、アミノ酸ポジション265、269、270、297、および327の2つ以上の置換を伴うFc変異体を含む。

[0222] FcRsへの増加または減少した結合性を伴う特定の抗体変異体が、記述されている。（米国特許第6,737,056号；WO2004/056312、およびShields et al., J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001) を参照のこと。）

[0223] 特定の態様において、抗体変異体は、ADCCを改善する1つまたは複数のアミノ酸置換（例えば、Fc領域のポジション298、333、および／または334（EUナンバリングでの残基）のところでの置換）を伴うFc領域を含む。

[0224] いくつかの態様において、例えば米国特許第6,194,551号、WO99/51642、およびIdusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000) に記載されるよ

うに、改変された（つまり、増加したか減少したかのいずれかである）C1q結合性および／または補体依存性細胞傷害（CDC）をもたらす改変が、Fc領域においてなされる。

[0225] 増加した半減期、および新生児型Fc受容体（FcRn：母体のIgG類を胎児に移行させる役割を負う（Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) and Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)））に対する増加した結合性を伴う抗体が、米国特許出願公開第2005/0014934号A1(Hinton et al.）に記載されている。これらの抗体は、Fc領域のFcRnへの結合性を増加する1つまたは複数の置換をその中に伴うFc領域を含む。このようなFc変異体は、Fc領域残基：238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424、または434の1つまたは複数のところでの置換（例えば、Fc領域残基434の置換（米国特許第7,371,826号））を伴うものを含む。

[0226] Fc領域変異体の他の例については、Duncan & Winter, Nature 322:738-40 (1988)；米国特許第5,648,260号；米国特許第5,624,821号；およびWO94/29351も参照のこと。

[0227] 一態様において、抗体Fc領域（変異Fc領域を含む。以下同様。）の各ヒトFcγ受容体（FcγR）に対する結合活性は、表面プラズモン共鳴分析法を測定原理とする、例えばBIACORE（商標登録）T200を用いたリガンド捕捉法により測定される。

[0228] 例示的な、抗体Fc領域の各ヒトFcγ受容体（FcγR）に対する結合活性の測定法の詳細を以下に述べる。一態様において、抗体Fc領域のFcγRに対する結合活性は、BIACORE（商標登録）T200で評価される。好ましい一態様において、この測定は、測定用緩衝液として50 mMリン酸、150 mM NaCl、0.05 w/v%-P20、pH7.4が用いられ、25℃で実施される。具体的には、まず、リガンド捕捉用分子としてCaptureSelect(商標) Human Fab-lambda Kinetics Biotin Conjugate (ThermoFisher scientific) を固相化したセンサーチップを用いて、改変Fc領域を含む抗体が約1000 RU捕捉される。ヒトFcγRは測定用緩衝液でF

cγRIaは8nMに、それ以外のFcγRは1000nMに希釈し、捕捉された抗体に結合させる。各抗体の各FcγRに対する結合活性はBiacore T200 Evaluation Software 2.0を用いて単位抗体量当たりのFcγR結合量（RU）を算出することにより評価される。一態様において、抗体Fc領域の各ヒトFcγ受容体（FcγR）に対する結合活性は、実施例7-4に記載の方法で測定することができる。

[0229] 好ましい一態様において、上記測定法に用いられるFcγRは、以下の方法で調製されるFcγRの細胞外ドメインであってもよい。まずFcγRの細胞外ドメインの遺伝子の合成が当業者公知の方法で実施される。その際、各FcγRの配列はNCBIに登録されている情報に基づき作製される。具体的には、FcγRIについてはNCBIのaccession # NM_000566.3の配列、FcγRIIaについてはNCBIのaccession # NM_001136219.1の配列、FcγRIIbについてはNCBIのaccession # NM_004001.3の配列、FcγRIIIaについてはNCBIのaccession # NM_001127593.1の配列に基づいて作製され、C末端にHisタグが付加される。またFcγRIIaの多型部位についてはJ. Exp. Med., 1990, 172, 19-25を、FcγRIIIaの多型部位についてはJ. Clin. Invest., 1997, 100, 1059-1070を参考にして作製される。得られた遺伝子断片を動物細胞発現ベクターに挿入することで、発現ベクターが作製される。作製された発現ベクターがヒト胎児腎癌細胞由来FreeStyle293細胞（Invitrogen社）に、一過性に導入され、目的タンパク質が発現される。培養上清は回収された後、0.22 μmフィルターに通され、原則として次の4ステップで精製される。第1ステップは陽イオン交換カラムクロマトグラフィー（SP Sepharose FF）、第2ステップはHisタグに対するアフィニティカラムクロマトグラフィー（HisTrap HP）、第3ステップはゲルろ過カラムクロマトグラフィー（Superdex200）、第4ステップは無菌ろ過が実施される。ただし、FcγRIについては、第1ステップにQ sepharose FFを用いた陰イオン交換カラムクロマトグラフィーが実施される。精製されたタンパク質の濃度は、分光光度計を用いて280 nmでの吸光度を測定し、得られた値からPACE等の方法により算出された吸光係数を用いることで算出される（Protein Science, 1995, 4, 2411-2423）。

[0230] 一態様において、抗体Fc領域のヒトFcRnに対する結合活性は、表面プラズモン共鳴分析法を測定原理とする、例えばBIACORE（商標登録）T200を用いたリガンド捕捉法により測定される。

[0231] 例示的な、抗体Fc領域のヒトFcRnに対する結合活性の測定法の詳細を以下に述べる。一態様において、抗体Fc領域のヒトFcRnに対する結合活性は、BIACORE（商標登録）T200で評価される。好ましい一態様において、この測定は、測定用緩衝液として50 mMリン酸、150 mM NaCl、0.05 w/v%-P20, pH6.0が用いられ、25℃で実施される。具体的には、まず、リガンド捕捉用分子としてCaptureSelect（商標） Human Fab-lambda Kinetics Biotin Conjugate（ThermoFisher scientific）を固相化したセンサーチップを用いて、Fc領域を含む抗体が約400 RU捕捉され、測定用緩衝液で希釈されたヒトFcRnを結合させる。各抗体のFcRnに対する結合活性はBiacore T200 Evaluation Software 2.0を用いてSteady stateモデルによりKD（M）を算出することにより評価される。好ましい一態様において、本測定に用いたヒトFcRnタンパク質はWO2010107110の参考例2に記載の手法で調製される。一態様において、抗体Fc領域のヒトFcRnに対する結合活性は、実施例7-5に記載の方法で測定することができる。

[0232] ｄ）システイン改変抗体変異体

特定の態様において、抗体の1つまたは複数の残基がシステイン残基で置換された、システイン改変抗体（例えば、「thioMAbs」）を作り出すことが望ましいだろう。特定の態様において、置換を受ける残基は、抗体の、アクセス可能な部位に生じる。それらの残基をシステインで置換することによって、反応性のチオール基が抗体のアクセス可能な部位に配置され、当該反応性のチオール基は、当該抗体を他の部分（薬剤部分またはリンカー－薬剤部分など）にコンジュゲートして本明細書でさらに詳述するようにイムノコンジュゲートを作り出すのに使用されてもよい。特定の態様において、以下の残基の任意の1つまたは複数が、システインに置換されてよい：軽鎖のV205（Kabatナンバリング）；重鎖のA118（EUナンバリング）；および重鎖Fc領域のS4

00（EUナンバリング）。システイン改変抗体は、例えば、米国特許第7,521,541号に記載されるようにして生成されてもよい。

[0233] ｅ）抗体誘導体

特定の態様において、本明細書で提供される抗体は、当該技術分野において知られておりかつ容易に入手可能な追加の非タンパク質部分を含むように、さらに修飾されてもよい。抗体の誘導体化に好適な部分は、これに限定されるものではないが、水溶性ポリマーを含む。水溶性ポリマーの非限定的な例は、これらに限定されるものではないが、ポリエチレングリコール（PEG）、エチレングリコール／プロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ１,3ジオキソラン、ポリ1,3,6,トリオキサン、エチレン／無水マレイン酸コポリマー、ポリアミノ酸（ホモポリマーまたはランダムコポリマーのいずれでも）、および、デキストランまたはポリ（n-ビニルピロリドン）ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド／エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール類（例えばグリセロール）、ポリビニルアルコール、および、これらの混合物を含む。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは、その水に対する安定性のために、製造において有利であるだろう。ポリマーは、いかなる分子量でもよく、枝分かれしていてもしていなくてもよい。抗体に付加されるポリマーの数には幅があってよく、1つ以上のポリマーが付加されるならそれらは同じ分子であってもよいし、異なる分子であってもよい。一般的に、誘導体化に使用されるポリマーの数および／またはタイプは、これらに限定されるものではないが、改善されるべき抗体の特定の特性または機能、抗体誘導体が規定の条件下での療法に使用されるか否か、などへの考慮に基づいて、決定することができる。

[0234] 別の態様において、抗体と、放射線に曝露することにより選択的に熱せられ得る非タンパク質部分との、コンジュゲートが提供される。一態様において、非タンパク質部分は、カーボンナノチューブである（Kam et al., Proc.

Natl. Acad. Sci. USA 102: 11600-11605 (2005)) 。放射線はいかなる波長でもよく、またこれらに限定されるものではないが、通常の細胞には害を与えないが抗体－非タンパク質部分に近接した細胞を死滅させる温度まで非タンパク質部分を熱するような波長を含む。

[0235] B．組み換えの方法および構成

例えば、米国特許第4,816,567号に記載されるとおり、抗体は組み換えの方法や構成を用いて製造することができる。一態様において、本明細書に記載の抗CD137抗原結合分子または抗体をコードする、単離された核酸が提供される。そのような核酸は、抗体のVLを含むアミノ酸配列および／またはVHを含むアミノ酸配列（例えば、抗体の軽鎖および／または重鎖）をコードしてもよい。さらなる態様において、このような核酸を含む1つまたは複数のベクター（例えば、発現ベクター）が提供される。さらなる態様において、このような核酸を含む宿主細胞が提供される。このような態様の1つでは、宿主細胞は、(1)抗体のVLを含むアミノ酸配列および抗体のVHを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含むベクター、または、(2)抗体のVLを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第一のベクターと抗体のVHを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第二のベクターを含む（例えば、形質転換されている）。一態様において、宿主細胞は、真核性である（例えば、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞）またはリンパ系の細胞（例えば、Y0、NS0、Sp2/0細胞））。一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体の発現に好適な条件下で、上述のとおり当該抗体をコードする核酸を含む宿主細胞を培養すること、および任意で、当該抗体を宿主細胞（または宿主細胞培養培地）から回収することを含む、抗CD137抗原結合分子または抗体を作製する方法が提供される。

[0236] 抗CD137抗原結合分子または抗体の組み換え製造のために、（例えば、上述したものなどの）抗体をコードする核酸を単離し、さらなるクローニングおよび／または宿主細胞中での発現のために、1つまたは複数のベクターに挿入する。そのような核酸は、従来の手順を用いて容易に単離および配列決定さ

れるだろう（例えば、抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを用いることで）。

[0237] 抗体をコードするベクターのクローニングまたは発現に好適な宿主細胞は、本明細書に記載の原核細胞または真核細胞を含む。例えば、抗体は、特にグリコシル化およびFcエフェクター機能が必要とされない場合は、細菌で製造してもよい。細菌での抗体断片およびポリペプチドの発現に関して、例えば、米国特許第5,648,237号、第5,789,199号、および第5,840,523号を参照のこと。（加えて、大腸菌における抗体断片の発現について記載したCharlton, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp.245-254も参照のこと。）発現後、抗体は細菌細胞ペーストから可溶性フラクション中に単離されてもよく、またさらに精製することができる。

[0238] 原核生物に加え、部分的なまたは完全なヒトのグリコシル化パターンを伴う抗体の産生をもたらす、グリコシル化経路が「ヒト化」されている菌類および酵母の株を含む、糸状菌または酵母などの真核性の微生物は、抗体コードベクターの好適なクローニングまたは発現宿主である。Gerngross, Nat. Biotech. 22:1409-1414 (2004)および Li et al., Nat. Biotech. 24:210-215 (2006) を参照のこと。

[0239] 多細胞生物（無脊椎生物および脊椎生物）に由来するものもまた、グリコシル化された抗体の発現のために好適な宿主細胞である。無脊椎生物細胞の例は、植物および昆虫細胞を含む。昆虫細胞との接合、特にSpodoptera frugiperda細胞の形質転換に用いられる、数多くのバキュロウイルス株が同定されている。

[0240] 植物細胞培養物も、宿主として利用することができる。例えば、米国特許第5,959,177号、第6,040,498号、第6,420,548号、第7,125,978号、および第6,417,429号（トランスジェニック植物で抗体を産生するための、PLANTIBODIES（商標）技術を記載）を参照のこと。

[0241] 脊椎動物細胞もまた宿主として使用できる。例えば、浮遊状態で増殖する

ように適応された哺乳動物細胞株は、有用であろう。有用な哺乳動物宿主細胞株の他の例は、SV40で形質転換されたサル腎CV1株（COS-7）；ヒト胎児性腎株（Graham et al., J. Gen Virol. 36:59（1977）などに記載の293または293細胞）；仔ハムスター腎細胞（BHK）；マウスセルトリ細胞（Mather, Biol. Reprod. 23:243-251（1980）などに記載のTM4細胞）；サル腎細胞（CV1）；アフリカミドリザル腎細胞（VERO-76）；ヒト子宮頸部癌細胞（HELA）；イヌ腎細胞（MDCK）；Buffalo系ラット肝細胞（BRL 3A）；ヒト肺細胞（W138）；ヒト肝細胞（Hep G2）；マウス乳癌（MMT 060562）；TRI細胞（例えば、Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68（1982）に記載）；MRC5細胞；および、FS4細胞などである。他の有用な哺乳動物宿主細胞株は、DHFR－ CHO細胞（Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216（1980））を含むチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞；およびY0、NS0、およびSp2/0などの骨髄腫細胞株を含む。抗体産生に好適な特定の哺乳動物宿主細胞株の総説として、例えば、Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003) を参照のこと。

[0242] C．測定法（アッセイ）

本明細書で提供される抗CD137抗原結合分子または抗体は、当該技術分野において知られている種々の測定法によって、同定され、スクリーニングされ、または物理的／化学的特性および／または生物学的活性について明らかにされてもよい。

[0243] 1．結合測定法およびその他の測定法

一局面において、本開示の抗原結合分子または抗体は、例えばELISA、ウエスタンブロット等の公知の方法によって、その抗原結合活性に関して試験される。

[0244] 別の局面において、低分子化合物の存在下（例えば、10 μM以上、50μM以上、100μM以上、150μM以上、200μM以上、または250μM以上の低分子化合物の存在下）で、CD137への結合に関して重鎖可変領域／軽鎖可変領域の組合

せとして、表１７に記載のA375/B167、A372/B040、A356/B040、A486/B167、A487/B167、A488/B226、A489/B223、A548/B376、A551/B256、A551/B379、A555/B379、A548/B256、および／またはA549/B167を含む抗CD137抗原結合分子または抗体と競合する抗原結合分子または抗体を同定するために、低分子化合物存在下での競合アッセイが使用され得る。特定の態様において、そのような競合抗原結合分子または抗体は、重鎖可変領域／軽鎖可変領域の組合せとして、表１７に記載のA375/B167、A372/B040、A356/B040、A486/B167、A487/B167、A488/B226、A489/B223、A548/B376、A551/B256、A551/B379、A555/B379、A548/B256、および／またはA549/B167を含む抗CD137抗原結合分子または抗体によって結合されるのと同じエピトープ（例えば、線状または立体構造エピトープ）に結合する。抗原結合分子または抗体が結合するエピトープをマッピングする、詳細な例示的方法は、Morris (1996) “Epitope Mapping Protocols,” in Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ)に提供されている。一態様において、本開示の低分子化合物に依存した抗原結合活性に依存したCD137結合活性を有する抗CD137抗原結合分子または抗体は、抗原（例えば、CD137）と低分子化合物（例えば、ATP）の複合体によって形成されるエピトープを認識する。

[0245] 抗体を用いた例示的な競合アッセイにおいて、固定化されたCD137は、低分子化合物の存在下（例えば、10 μM以上、50μM以上、100μM以上、150μM以上、200μM以上、または250μM以上の低分子化合物の存在下）で、CD137に結合する第1の標識された抗体（例えば、重鎖可変領域／軽鎖可変領域の組合せとして、表１７に記載のA375/B167、A372/B040、A356/B040、A486/B167、A487/B167、A488/B226、A489/B223、A548/B376、A551/B256、A551/B379、A555/B379、A548/B256、および／またはA549/B167を含む抗CD137抗体）およびCD137への結合に関して第1の抗体と競合する能力に関して試験される第2の未標識の抗体を含む溶液中でインキュベートされる。第2の抗体は、ハイブリドーマ上清に存在し得る。対照として、固定化されたCD137が、第1の標識された抗体を含むが第2の未標識の抗体を含まない溶液中でインキュベートされる。第

1の抗体のCD137に対する結合を許容する条件下でのインキュベーションの後、余分な未結合の抗体が除去され、固定化されたCD137に結合した標識の量が測定される。固定化されたCD137に結合した標識の量が対照サンプルと比較して試験サンプルにおいて実質的に減少している場合、それは第2の抗体がCD137への結合に関して第1の抗体と競合していることを示す。Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) を参照のこと。当該アッセイは、抗体以外の抗原結合分子についても同様に実施できることが当業者に理解されよう。

[0246] ２．活性測定法

一局面において、生物学的活性を有する抗CD137抗原結合分子または抗体のそれを同定するための測定法が提供される。生物学的活性は、例えば、CD137アゴニスト活性；血漿中半減期；抗腫瘍活性；および、低いまたは抑制された腫瘍以外の組織での全身反応を含んでよい。また、このような生物学的活性をインビボおよび／またはインビトロで有する抗原結合分子または抗体が、提供される。

[0247] 特定の態様において、本開示の抗原結合分子（例えば、抗CD137抗原結合分子）または抗体は、このような生物学的活性について試験される。

[0248] a) アゴニスト活性測定法(PBMC)

一態様において、CD137に対するアゴニスト活性は、低分子化合物が添加された、または添加されていない溶液中で、CD137発現細胞と抗CD137抗原結合分子または抗体を接触させることにより、測定される。一態様において、低分子化合物が添加された溶液中でのCD137に対するアゴニスト活性、および低分子化合物を添加しない溶液中でのCD137に対するアゴニスト活性は、それぞれ、当該溶液中でCD137発現細胞と抗CD137抗原結合分子または抗体を接触させた後、18時間、24時間、36時間、48時間または72時間以内に測定されるサイトカイン産生量（例えば、IL-2、IFN-γ、および／またはIL-6産生量）により評価される。一態様において、低分子化合物が添加された溶液は、調整後の低分子化合物濃度が、10μM、50μM、100μM、150μM、200μM、または2

50μMとなるように調整される。さらなる一態様において、前記CD137発現細胞は、単離されたヒト抹消血単核細胞（PBMC）、または単離されたヒトPBMCから拡大培養されたT細胞が用いられる。

[0249] 一態様において、ヒトPBMCは、健常人の採血から、400xg、30分間、室温にて遠心分離されることにより単離されたものが用いられる。好ましくは、ヒトPBMCは、次の2ステップで単離されたものが用いられる。第1ステップはFicoll-Paque PLUS（GE Healthcare）を添加されたLeucosep（greiner bio-one）が1000xg、1分間、室温にて遠心されたのちにPBSで希釈された血液を添加され、400xg、30分間、室温にて遠心が行われる。第2ステップでは遠心後のチューブよりバフィーコートが採取された後に、60 mLのPBS（Wako）により洗浄される。

例示的な、ヒトPBMCを用いたCD137アゴニスト活性の測定法の詳細を以下に述べる。なお、以下の例では、低分子化合物として、ATPを例示的に用いているが、他の低分子化合物を排除するものではない。一態様において、単離されたヒトPBMCは、培地（5%ヒト血清（SIGMA）、95%AIM-V（Thermo Fischer Scientific）にて細胞密度5x10^6 /mLに希釈される。その後、当該単離されたヒトPBMCは、抗ヒトCD3ε抗体および／または抗ヒトCD28抗体と接触させられる。これにより、ヒトPBMCにCD137発現が誘導される。好ましくは、当該単離されたヒトPBMC（細胞密度5x10^6/mLで100μL）に、培地で希釈された0.04μg/mL抗ヒトCD3ε抗体（BD社製、クローンSP34）および20μg/mL抗ヒトCD28抗体（BD、クローン：CD28.2）が50μL添加される。

[0250] 抗ヒトCD3ε抗体および／または抗ヒトCD28抗体が添加されたヒトPBMCは、その後さらに、（i）ATPを含む、または含まない培地；および（ii）抗CD137抗原結合分子または抗体が添加される。当該ATPを含む、または含まない培地は、好ましくは、25μLが添加される。抗CD137抗原結合分子または抗体は、好ましくは、40μg/mLで25μLが添加される。さらに好ましくは、前記(i)および(ii)は、ヒトPBMCに抗ヒトCD3ε抗体および／または抗ヒトCD28抗体を接触させてから約6時間後に添加される。一態様において、好ましくは、IL-2産

生量は、IFN-γ産生量より先に測定される。一態様において、IL-2産生量は、ヒトPBMCに抗ヒトCD3ε抗体および／または抗ヒトCD28抗体を接触させた後、約24時間以内に測定される。好ましくは、IL-2産生量は、ヒトPBMCに抗ヒトCD3ε抗体および／または抗ヒトCD28抗体を接触させてから約24時間後、かつ、抗CD137抗原結合分子または抗体が添加されてから約18時間後に測定される。

[0251] 別の一態様において、IFN-γ産生量は、ヒトPBMCに抗ヒトCD3ε抗体および／または抗ヒトCD28抗体を接触させた後、約48時間以内に測定される。好ましくは、IFN-γ産生量は、ヒトPBMCに抗ヒトCD3ε抗体および／または抗ヒトCD28抗体を接触させてから約48時間後、かつ、抗CD137抗原結合分子または抗体が添加されてから約42時間後に測定される。一態様において、IL-2産生量および／またはIFN-γ産生量は、回収された培養上清中にIL-2産生量および／またはIFN-γ産生量が測定される。一態様において、抗ヒトCD3ε抗体および／または抗ヒトCD28抗体が添加されたヒトPBMCは、全ての測定が完了するまで、5%CO_2インキュベーター内にて37℃で静置される。

[0252] さらなる例示的な、ヒトPBMCを用いたCD137アゴニスト活性の測定法の詳細を以下に述べる。単離されたヒトPBMCは、培地（5%ヒト血清（SIGMA）、95%AIM-V（Thermo Fischer Scientific）にて細胞密度5x10^6 /mLに希釈される。その後、ヒトPBMCは細胞密度5x10^6/mLに調整され、100μLずつ96 ウェルマルチプルウェルプレート平底フタ付き（Corning）に播種される。その後、ヒトPBMCにCD137発現を誘導する操作が行われる。例えば、培地で希釈された0.04μg/mL抗ヒトCD3ε抗体（BD社製、クローンSP34）および20μg/mL抗ヒトCD28抗体（BD、クローン：CD28.2）が50μL添加されることにより、ヒトPBMCにCD137発現が誘導される。

[0253] ヒトPBMCにCD137発現が誘導された後、プレートは振盪され、5%CO_2インキュベーター内にて37℃で6時間静置される。その後各ウェルに培地で希釈した2 mM ATP（SIGMA）もしくはATPを含まない培地のみ25μLと40μg/mLの各抗体25μLが添加され、プレートが振盪されたのちに5%CO_2インキュベーター内にて37

℃で18時間静置される。その後、培養上清を一部回収し、培養上清を用いて培養上清中に含まれるIL-2量がHuman IL-2 DuoSetELISAキット（R&D systems）もしくはHuman IL-2 ELISA Set（BD Biosciences)を用いて定量される。培養上清を回収した後のプレートは再び5%CO_2インキュベーター内にて37℃で24時間静置される。その後、培養上清が一部回収され、培養上清中に含まれるIFN-γ量がHuman IFN-γ DuoSetELISAキット（R&D systems）もしくはHuman IFN-γ ELISA Development Kit（PeproTech）を用いて定量される。ELISAは基本的にキット付属のプロトコルに従い、実施される。Human IL-2 DuoSetELISAキット（R&D systems）およびHuman IFN-γ DuoSetELISAキット（R&D systems）に関しては、H_2O_2およびtetramethylbenzidineを含むsubstrate solution（R&D systems）および1N H_2SO_4（Wako）を用いて、プロトコルに従い発色と発色停止を行う。Human IL-2 ELISA Set（BD Biosciences）に関しては、1N H_2SO_4（Wako）を用いて発色停止を行う。

[0254] IFN-γ ELISA Development Kit（PeproTech）関してはTMB Chromogen Solution（Thermo Fischer Scientific）および1N H_2SO_4（Wako）を用いて発色と発色停止が行う。その後吸光度の測定がEnVision（PerkinElmer）にて行われ、プロトコルに従い作製された検量線を用いて、培養上清中のIL-2およびIFN-γ量（pg/mL）がそれぞれ計算される。当該PBMCアッセイにおいて、CD137アゴニスト活性は、培養上清中のIL-2量およびIFN-γ量の、陰性コントロール抗体（CD137に結合しない抗体）に対するfold changeで表され得る。一態様において、CD137アゴニスト活性は、実施例5-5-1および5-5-2に記載の方法で測定することができる。

[0255] 一態様において、CD137に対するアゴニスト活性が、ヒトPBMCアッセイにおけるサイトカイン産生量（例えば、IL-2、IFN-γ、および／またはIL-6産生量）で評価される場合、抗CD137抗原結合分子または抗体を添加した場合の、10μM、50μM、100μM、150μM、200μM、または250μMの低分子化合物の存在下でのサイトカイン産生量が、陰性コントロール抗体を添加した場合のサイトカイン産生量の、1.01倍以上、1.02倍以上、1.03倍以上、1.05倍以上、1

.06倍以上、1.07倍以上、1.08倍以上、1.09倍以上、1.1倍以上、1.11倍以上、1.12倍以上、1.13倍以上、1.14倍以上または1.15倍以上、1.5倍以上、2倍以上、または3倍以上である場合、当該抗CD137抗原結合分子または抗体は、当該低分子化合物の存在下でCD137に対するアゴニスト活性を示すと評価できる。

[0256] 一態様において、CD137に対するアゴニスト活性が、ヒトPBMCアッセイにおけるIL-2産生量で評価される場合、抗CD137抗原結合分子または抗体を添加した場合の、10μM、50μM、100μM、150μM、200μM、または250μMの低分子化合物の存在下でのIL-2産生量が、陰性コントロール抗体を添加した場合のIL-2産生量の、1.01倍以上、1.02倍以上、1.03倍以上または1.05倍以上である場合、好ましい一態様においては1.05倍以上である場合に、当該抗CD137抗原結合分子または抗体は、当該低分子化合物の存在下でCD137に対するアゴニスト活性を示すと評価できる。

[0257] 一態様において、CD137に対するアゴニスト活性が、ヒトPBMCアッセイにおけるIFN-γ産生量で評価される場合、抗CD137抗原結合分子または抗体を添加した場合の、10μM、50μM、100μM、150μM、200μM、または250μMの低分子化合物の存在下でのIFN-γ産生量が、陰性コントロール抗体を添加した場合のIFN-γ産生量の、1.1倍以上、1.11倍以上、1.12倍以上、1.13倍以上、1.14倍以上または1.15倍以上である場合、好ましい一態様においては1.15倍以上である場合に、当該抗CD137抗原結合分子または抗体は、当該低分子化合物の存在下でCD137に対するアゴニスト活性を示すと評価できる。

[0258] さらなる一態様において、上述の陰性コントロール抗体との比較において低分子化合物の存在下でCD137に対するアゴニスト活性を示すと評価された抗CD137抗原結合分子または抗体から、さらに、当該低分子不存在下においてCD137アゴニスト活性を示さない、またはCD137アゴニスト活性が（当該低分子化合物の存在下と比較して）低いと評価される抗体が決定される。具体的には、次の(ii)が(i)より大きい場合に、抗CD137抗原結合分子または抗体は、低分子不存在下においてCD137アゴニスト活性を示さない、またはCD137アゴ

ニスト活性が低いと評価される：

(i)〔抗CD137抗原結合分子または抗体を添加した場合の、低分子化合物の非存在下でのサイトカイン産生量〕／〔陰性コントロール抗体を添加した場合の、低分子化合物の非存在下でのサイトカイン産生量〕

(ii)〔抗CD137抗原結合分子または抗体を添加した場合の、低分子化合物の存在下でのサイトカイン産生量〕／〔陰性コントロール抗体を添加した場合の、当該低分子化合物の存在下でのサイトカイン産生量〕

[0259] 異なる一態様において、第一の抗CD137抗原結合分子または抗体および第二の抗CD137抗原結合分子または抗体のCD137アゴニスト活性が、ヒトPBMCアッセイにおけるサイトカイン産生量（例えば、IL-2、IFN-γ、および／またはIL-6産生量）で比較される場合、(i)10μM、50μM、100μM、150μM、200μM、または250μMの低分子化合物の存在下で第一の抗CD137抗原結合分子または抗体を添加した場合のサイトカイン産生量が、(ii)同一条件下で第二の抗CD137抗原結合分子または抗体を添加した場合のサイトカイン産生量の、1.01倍以上、1.02倍以上、1.03倍以上、1.04倍以上、1.05倍以上、1.06倍以上、1.07倍以上、1.08倍以上、1.09倍以上、1.1倍以上、1.11倍以上、1.12倍以上、1.13倍以上、1.14倍以上または1.15倍以上、1.5倍以上、2倍以上、または3倍以上である場合、第一の抗CD137抗原結合分子または抗体は、第二の抗CD137抗原結合分子または抗体より高いアゴニスト活性を示すと評価できる。

[0260] 一態様において、CD137に対するアゴニスト活性が、ヒトPBMCアッセイにおけるIL-2産生量で評価される場合、(i)10μM、50μM、100μM、150μM、200μM、または250μMの低分子化合物の存在下で第一の抗CD137抗原結合分子または抗体を添加した場合のサイトカイン産生量が、(ii)同一条件下で第二の抗CD137抗原結合分子または抗体を添加した場合のIL-2産生量の、1.01倍以上、1.02倍以上、1.03倍以上または1.04倍以上である場合、好ましい一態様においては1.04倍以上である場合、第一の抗CD137抗原結合分子または抗体は、第二の抗CD137抗原結合分子または抗体より高いアゴニスト活性を示すと評価できる。

[0261] 一態様において、CD137に対するアゴニスト活性が、ヒトPBMCアッセイにおけるIFN-γ産生量で評価される場合、(i)10μM、50μM、100μM、150μM、200μM、または250μMの低分子化合物の存在下で第一の抗CD137抗原結合分子または抗体を添加した場合のサイトカイン産生量が、(ii)同一条件下で第二の抗CD137抗原結合分子または抗体を添加した場合の1.05倍以上、1.06倍以上、1.07倍以上、1.08倍以上、1.09倍以上または1.1倍以上、である場合、好ましい一態様においては1.1倍以上である場合に、第一の抗CD137抗原結合分子または抗体は、第二の抗CD137抗原結合分子または抗体より高いアゴニスト活性を示すと評価できる。一態様において、第一の抗CD137抗原結合分子または抗体は、親Fc領域を含む抗原結合分子または抗体であり、第二の抗CD137抗原結合分子は、変異Fc領域を含む抗原結合分子または抗体である。

[0262] 一態様において、ヒトPBMCを用いたCD137アゴニスト活性の測定法は、実施例5-5-1及び5-5-2に記載の方法を用いることができ、単離されたヒトPBMCから拡大培養されたT細胞を用いたCD137アゴニスト活性の測定法は、実施例2-6に記載の方法を用いることができる。

[0263] また一態様において、CD137に対するアゴニスト活性は、低分子化合物が添加された、または添加されていない溶液中で、ヒトPBMCから単離されたCD8陽性T細胞、あるいはCD4陽性T細胞と、抗CD137抗原結合分子または抗体を接触させることにより、測定されてもよい。このとき、さらに、溶液中にFcγRIIb発現細胞を加えてもよい。あるいは、CD137に対するアゴニスト活性は、B細胞（ヒトPBMCから単離されたものでも良いし、公知のB細胞株を用いても良い）と抗CD137抗原結合分子または抗体を接触させることにより、測定されてもよい。一態様において、CD137に対するアゴニスト活性は、溶液中で、CD8陽性T細胞、CD4陽性T細胞、またはB細胞と抗CD137抗原結合分子または抗体を接触させた後に測定されるサイトカイン産生量（例えば、IL-2、IFN-γ産生量および／またはIL-6産生量）により評価される。

[0264] 一態様において、ヒト末梢血単核細胞（PBMC）を用いたアゴニスト活性測定は、健常人の採血から単離される。したがって、上記いずれの態様におい

ても、当該測定法による測定結果は、血液試料の提供者（ドナー）毎に差異が生じうることが、当業者に理解されよう。この点を考慮し、複数のドナーから単離されたヒトPBMCの一部又は過半数についてCD137アゴニスト活性が示されなかった抗体については、他の一部のヒトPBMCにおいてアゴニスト活性の基準に合致していても、CD137アゴニスト活性が示されたと判断しないことができるものとしてもよい。また、複数のドナーから単離されたヒトPBMCについて上記方法による測定を行い、過半数のドナーにおいてCD137アゴニスト活性の基準に合致する場合に、CD137アゴニスト活性が示されたと判断してもよい。あるいは、複数のドナーから単離されたヒトPBMCについて上記方法による測定を行い、その測定値（例えば、IL-2、IFN-γ産生量および／またはIL-6産生量）の平均値または中央値を用いて、CD137アゴニスト活性の有無を決定してもよい。一態様において、複数のドナーから単離されたヒトPBMCについて上記方法による測定を行う場合、ドナー数は、例えば、2人以上、3人以上、4人以上、5人以上、10人以上、15人以上または20人以上であってもよい。

[0265] b）アゴニスト活性測定法（レポーター遺伝子アッセイ）

一態様において、CD137に対するアゴニスト活性は、低分子化合物が添加された、または添加されていない溶液中で、レポーター遺伝子アッセイにより評価される。一態様において、低分子化合物が添加された溶液中でのCD137に対するアゴニスト活性、および低分子化合物を添加しない溶液中でのCD137に対するアゴニスト活性は、それぞれ、当該溶液中でそれぞれ、NF-kappaB-ルシフェラーゼレポーター構築物及びCD137を発現するT細胞と抗CD137抗原結合分子を接触させた後、一定時間静置された後に測定されるルシフェラーゼ発光シグナルにより評価される。一態様において、低分子化合物が添加された溶液は、調整後の低分子化合物濃度が、10μM、50μM、100μM、150μM、200μM、または250μMとなるように調整される。NF-kappaB-ルシフェラーゼレポーター構築物及びCD137を発現するT細胞は、好ましくは、GloResponse™ NF-kappaB-Luc2/4-1BB Jurkat cell line (Promega, CS196004) である。

[0266] 例示的な、レポーター遺伝子アッセイを用いたCD137アゴニスト活性の測定法の詳細を以下に述べる。なお、以下の例では、低分子化合物として、ATPを例示的に用いているが、他の低分子化合物を排除するものではない。一態様において、まず、FcγRIIB発現細胞が、培地（CHO culture medium（90% Ham's F12, 10% FBS））により5×10^4/mLに濃度を調製され、5% CO_2インキュベーター内にて37℃で一晩静置される。一態様において、FcgRIIB発現細胞としては、FcgRIIB強制発現細胞だけではなく、B細胞ラインなどの内因性にFcgRIIBを発現するセルラインや、生体内から分離したB細胞等も使用できる。好ましい一態様において、FcγRIIB発現細胞は、FcγRIIB CHO-K1 Cells（Promega）である。次に、培地が吸引除去された後、異なる培地（99% RPMI, 1% FBS)で2×10^6/mLに調製されたGloResponse™ NF-kappaB-Luc2/4-1BB Jurkat cell line（以下、「4-1BB Jurkat」という。）が添加される。好ましい一態様において、培地で調整されたFcγRIIB発現細胞200μLあたり、培地で調整されたGloResponse™ NF-kappaB-Luc2/4-1BB Jurkat cell lineが25 μL添加される。続いて、目的の濃度（例えば、最終濃度が0、0.001、0.01、0.1、1、10μg/mL）となるように前記培地（99% RPMI, 1% FBS)で希釈された抗CD137抗原結合分子がそれぞれ25μL加えられ、さらに、目的の濃度（例えば、最終濃度が0、10、50、100、150、200、250μM）となるように前記培地（99% RPMI, 1% FBS)で希釈されたATP溶液が25 μL加えられる。一態様において、ルシフェラーゼ発光シグナルは、4-1BB Jurkatに抗CD137抗原結合分子を添加したのち、2時間またはそれより短い時間、4時間またはそれより短い時間、6時間またはそれより短い時間、あるいは24時間またはそれより短い時間静置された後に測定される。好ましい一態様において、4-1BB Jurkat は、5% CO_2インキュベーター内にて37℃で6時間静置される。静置された後、Bio-Glo reagentが75 μLずつ加えられ、発光量がプレートリーダーで測定される。好ましい一態様において、Bio-Glo reagentは、Bio-Glo Luciferase Assay System (Buffer and Substrate)である。一態様において、反応時の温度を均一にするため、4-1BB Jurkatは、インキュベータから取り出された後、5分、10分、15分また

は20分室温で静置されても良い。好ましい一態様において、4-1BB Jurkatは、インキュベータから取り出された後、15分室温で静置される。一態様において、抗CD137抗原結合分子を添加した4-1BB Jurkatの発光の値を、抗CD137抗原結合分子未添加の4-1BB Jurkatの発光の値で割った値をFold induction（相対発光量）とし、各抗原結合分子のCD137アゴニスト活性を評価する指標とすることができる。

[0267] さらなる例示的な、レポーター遺伝子アッセイを用いたCD137アゴニスト活性の測定法の詳細を以下に述べる。96ウェルプレートの各ウェルに、培地により5×10^4/mLに濃度を調製したFcγRIIB CHO-K1 Cells (Promega) が200 μLずつ加えられ、5% CO_2インキュベーター内にて37℃で一晩静置する。培地にはCHO culture medium (90% Ham's F12, 10% FBS)が用いる。次に、培地がすべて吸引除去されたのち、Assay medium (99% RPMI, 1% FBS)で2×10^6/mLに調製されたGloResponse™ NF-κB-Luc2/4-1BB Jurkat cell lineが各ウェルに対して25 μL加えられる。続いて、最終濃度が0、0.001、0.01、0.1、1、10μg/mLとなるようにAssay mediumで希釈された各抗体溶液がそれぞれ25μL加えられ、最後に最終濃度が0、250μMとなるようにAssay mediumで希釈されたATP溶液が25 μL加えられる。プレートは5% CO_2インキュベーター内にて37℃で6時間静置されたのち、室温で15分静置され、各ウェルにBio-Glo reagentが75 μLずつ加えられる。Bio-Glo reagentには、例えば、Bio-Glo Luciferase Assay System (Buffer and Substrate)を使用してよい。その後、各ウェルの発光量がプレートリーダーで測定される。各ウェルの発光の値を抗体未添加ウェルの発光の値で割った値をFold inductionとする。当該レポーター遺伝子アッセイにおいて、CD137アゴニスト活性は、各抗体を添加したウェルの発光量の、抗体未添加ウェルの発光量に対するfold change（相対発光量）で評価され得る。

[0268] さらなる例示的な、レポーター遺伝子アッセイを用いたCD137アゴニスト活性の測定法の詳細を以下に述べる。384ウェルプレートの各ウェルに、Assay medium (99% RPMI, 1% FBS)で2×10^6/mLに濃度を調製されたFcγRIIB CHO-K1

Cells (Promega) が10μLずつ加えられる。続いて、ADPを含む抗体溶液またはATPを含む抗体溶液またはATPあるいはADPを含まない抗体溶液がそれぞれのウェルに10μL加えられる。次に、Assay medium (99% RPMI, 1% FBS)で2×10^6/mLに調製されたGloResponse™ NF-κB-Luc2/4-1BB Jurkat cell lineが各ウェルに対して10 μL加えられる。ADPは最終濃度50μM、ATPは最終濃度50μMである。プレートは5% CO_2インキュベーター内にて37℃で6時間静置されたのち、室温で15分静置され、各ウェルにBio-Glo reagentが30μLずつ加えられる。Bio-Glo reagentにはBio-Glo Luciferase Assay System (Buffer and Substrate)が使用された。その後、各ウェルの発光量がプレートリーダーで測定される。CD137アゴニスト活性は、各抗体を添加したウェルの発光量の、抗体未添加ウェルの発光量に対する相対発光量 (Luminescence foldまたはfold changeと呼称することもある) で評価され得る。

[0269] さらなる例示的な、レポーター遺伝子アッセイを用いたCD137アゴニスト活性の測定法の詳細を以下に述べる。384ウェルプレートの各ウェルに、Assay medium (99% RPMI, 1% FBS)で4×10^5/mLに濃度を調製されたFcγRIIB CHO-K1 Cells (Promega) が10μLずつ加えられる。続いて、ADPを含む抗体溶液またはATPを含む抗体溶液またはATPあるいはADPを含まない抗体溶液がそれぞれのウェルに10μL加えられる。次に、Assay medium (99% RPMI, 1% FBS)で2×10^6/mLに調製されたGloResponse™ NF-κB-Luc2/4-1BB Jurkat cell lineが各ウェルに対して10 μL加えられる。ADPは最終濃度10μM、ATPは最終濃度10μMである。プレートは5% CO_2インキュベーター内にて37℃で6時間静置されたのち、室温で15分静置され、各ウェルにBio-Glo reagentが30μLずつ加えられる。Bio-Glo reagentにはBio-Glo Luciferase Assay System (Buffer and Substrate)が使用された。その後、各ウェルの発光量がプレートリーダーで測定される。CD137アゴニスト活性は、各抗体を添加したウェルの発光量の、抗体未添加ウェルの発光量に対する相対発光量 (Luminescence foldまたはfold changeと呼称することもある) で評価され得る。

[0270] 一態様において、CD137に対するアゴニスト活性が、レポーター遺伝子アッ

セイを用いて測定される場合、（i）10μM、50μM、100μM、150μM、200μM、または250μMの低分子化合物の存在下でCD137に対するアゴニスト活性（相対発光量）が、（ii）当該低分子化合物の非存在下でのCD137アゴニスト活性（相対発光量）と比べて、1.1倍以上、1.2倍以上、1.3倍以上、1.5倍以上、2倍以上、3倍以上、5倍以上、10倍以上、20倍以上、30倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、または90倍以上高い場合に、当該抗CD137抗原結合分子または抗体は、当該低分子化合物の存在下でCD137に対するアゴニスト活性を示すと評価できる。一態様において、上記(i)および(ii)における抗体の最終濃度は、0、0.001、0.01、0.1、1、または10μg/mLであり、好ましい一態様においては、0.1μg/mLまたは1μg/mLである。

[0271] さらなる一態様において、特定の濃度（例えば、最終濃度が0.001、0.01、0.1、1、10μg/mL、好ましい一態様においては、0.1μg/mLまたは1μg/mL）で抗CD137抗原結合分子または抗体を添加した場合の、低分子化合物の非存在下でのFold induction（相対発光量）が、10以下である場合、9以下である場合、8以下である場合、好ましい一態様においては5以下である場合、さらに好ましい一態様においては実質的に1である場合に、当該抗CD137抗原結合分子または抗体は、低分子化合物の非存在下において、CD137アゴニスト活性を実質的に示さないと評価される。一態様において、「低分子化合物の非存在下でのFold induction（相対発光量）が、実質的に1である」とは、低分子化合物の非存在下でのFold induction（相対発光量）が、2倍未満、1.9倍未満、1.8倍未満、1.7倍未満、1.6倍未満、1.5倍未満、1.4倍未満、1.3倍未満、1.2倍未満または1.1倍未満である場合をいう。

[0272] c）血漿中濃度

一態様において、本開示の抗CD137抗原結合分子または抗体の血中動態は、ヒトCD137ノックインマウスを用いて測定および／または比較される。ヒトCD137ノックインマウスは、例えば、マウス胚性幹細胞（ES細胞）へのヒトCD137遺伝子置換ベクターの導入により、マウスCD137遺伝子をヒトCD137遺伝子に置換して作製される。一態様において、本開示のCD137抗原結合分子または抗

体は、ヒトCD137ノックインマウスに単回静脈内投与され、投与直後から、約5日、10日、15日、20日、25日または30日後まで、経時的に複数回血液が採取される。好ましい一態様において、本開示のCD137抗原結合分子または抗体は、ヒトCD137ノックインマウスに単回静脈内投与され、投与後5分後から28日後にわたり、経時的に複数回血液が採取される。採取された血液からは速やかに血漿が分離され、血漿中の抗体濃度が電気化学発光(ECL)法で測定される。一態様において、血漿中の抗体濃度は、実施例6-3-2を参照に記載の方法で測定することができる。

[0273] ヒトCD137ノックインマウスを用いた血漿中半減期の測定において、抗CD137抗原結合分子または抗体が、参照分子よりも遅い血漿中からの消失を示した場合、当該抗CD137抗原結合分子または抗体は、参照分子よりも改善された血中動態を有すると評価することができる。また、低分子化合物に依存した結合活性を有する抗CD137抗原結合分子または抗体（スイッチ分子またはスイッチ抗体）が、低分子化合物に依存した結合活性を有しない抗CD137抗原結合分子または抗体（ノンスイッチ分子またはノンスイッチ抗体）よりも遅い血漿中からの消失を示した場合、スイッチ分子（またはスイッチ抗体）は、ノンスイッチ分子（またはノンスイッチ抗体）に比べ、腫瘍以外の組織に発現するCD137に結合しないと評価できる。

[0274] ｄ）抗腫瘍活性

一局面において、抗CD137抗原結合分子または抗体は、インビボで細胞成長または増殖を阻害するその能力に関して試験される。特定の態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体は、インビボで腫瘍成長を阻害するその能力に関して試験される。同種移植モデル、または異種移植モデルなどのインビボモデルシステムが、そのような試験に使用され得る。例示的な異種移植システムにおいて、ヒト腫瘍細胞を、適切に免疫不全化された非ヒト動物、例えば無胸腺「ヌード」マウスに導入する。本開示の抗体を、この動物に投与する。腫瘍成長を阻害するまたは減少させる抗体の能力を測定する。上記の異種移植システムの特定の態様において、ヒト腫瘍細胞は、ヒト患者由来の

腫瘍細胞である。そのような異種移植モデルは、Oncotest GmbH (Frieberg, Germany) から市販されている。特定の態様において、ヒト腫瘍細胞は、皮下注射によってまたは乳房脂肪パッドなどの適切な部位への移植によって、適切に免疫不全化された非ヒト動物に導入される。

一態様において、本開示の抗CD137抗原結合分子または抗体の抗腫瘍活性は、上記のヒトCD137ノックインマウスを用いた同系腫瘍細胞移植モデルを用いて測定および／または比較される。試験に用いる癌細胞株は適宜選択されて良いが、好ましくは、マウス大腸がん細胞株MC38細胞株である。一態様において、MC38細胞株はマウスの腹部皮下に移植され、腫瘍体積がおよそ50-300 mm^3になった時点でモデル成立とする。モデル成立後、MC38細胞株移植マウスは群分けが実施されたのちに、各種抗CD137抗原結合分子または抗体が投与される。一態様において、抗腫瘍活性評価のため、腫瘍体積測定は週1-2回の頻度で実施される。また、腫瘍体積は次の計算式にて算出される：腫瘍体積＝長径×短径×短径/2。一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体の抗腫瘍活性は、実施例6-4に記載の方法で試験および評価することができる。

[0275] 一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体投与群における腫瘍体積がVehicle群と比較して小さい、または、抗CD137抗原結合分子または抗体投与群における腫瘍体積の増加量がVehicle群と比較して小さい場合に、当該抗CD137抗原結合分子または抗体が抗腫瘍活性を示したと評価できる。

[0276] ｅ）全身反応

一態様において、本開示の抗CD137抗原結合分子または抗体の全身反応は、上記のヒトCD137ノックインマウスを用いた同系腫瘍細胞移植モデルを用いて測定および／または比較される。全身反応を測定するための臓器は、適宜選択されてよいが、好ましくは、肝臓、脾臓および／またはリンパ節である。一態様において、全身反応の評価は、抗CD137抗原結合分子または抗体投与後の適切なタイミングで、ヒトCD137ノックインマウスから、肝臓、脾臓、および／またはリンパ節を摘出することにより行われる。摘出される臓器が脾臓および／またはリンパ節の場合、これら臓器の重量測定および／またはリン

パ球画分の細胞数測定が実施される。このとき、好ましくは、脾臓については溶血後のリンパ球画分を、リンパ節についてはすりつぶされて得られたリンパ球画分を用いる。摘出される臓器が肝臓の場合、Liver dissociation kit, mouse (Milteny Biotec)を用いて得られたリンパ球画分の細胞数測定が実施される。さらに、各種臓器（肝臓、脾臓、および／またはリンパ節）のリンパ球画分を用いて、フローサイトメトリー（FCM）を使ったT細胞解析を行っても良い。FCM解析においては、例えばCD8α陽性 T細胞でのGranzyme B発現またはPD-1発現またはICOS発現、もしくはCD45陽性細胞に対するCD8α陽性T細胞の割合が用いられる。一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体の全身反応は実施例6-4に記載の方法で試験および評価することができる。

[0277] 一態様において、上記各指標の評価において、抗CD137抗原結合分子または抗体投与群が、同量の参照分子投与群と比較して低値である場合に、当該抗CD137抗原結合分子または抗体は、参照分子よりも全身反応および／または腫瘍以外の組織（例えば、肝臓、脾臓および／またはリンパ節）での免疫細胞の活性化が抑制されたと評価できる。また、上記各指標の評価において、低分子化合物に依存した結合活性を有する抗CD137抗原結合分子または抗体（スイッチ分子またはスイッチ抗体）投与群が、同量の低分子化合物に依存した結合活性を有しない抗CD137抗原結合分子または抗体（ノンスイッチ分子またはノンスイッチ抗体）投与群と比較して低値である場合、スイッチ分子（またはスイッチ抗体）は、ノンスイッチ分子（またはノンスイッチ抗体）よりも、全身反応および／または腫瘍以外の組織（例えば、肝臓、脾臓および／またはリンパ節）での免疫細胞の活性化が抑制されたと評価できる。

[0278] 上記の測定法のいずれのものも、抗CD137抗原結合分子または抗体の代わりにまたは抗CD137抗原結合分子または抗体に加えて本開示のイムノコンジュゲートを用いて実施され得ることが理解される。

[0279] D．イムノコンジュゲート

本開示はまた、1つまたは複数の細胞傷害剤（例えば化学療法剤または化学療法薬、増殖阻害剤、毒素（例えば細菌、真菌、植物もしくは動物起源のタ

ンパク質毒素、酵素的に活性な毒素、もしくはそれらの断片）または放射性同位体）にコンジュゲートされた本明細書の抗CD137抗原結合分子または抗体を含むイムノコンジュゲートを提供する。

[0280] 一態様において、イムノコンジュゲートは、抗体が、これらに限定されるものではないが以下を含む1つまたは複数の薬剤にコンジュゲートされた、抗体－薬剤コンジュゲート（antibody-drug conjugate: ADC）である：メイタンシノイド（米国特許第5,208,020号、第5,416,064号、および欧州特許第0,425,235号B1参照）；例えばモノメチルオーリスタチン薬剤部分DEおよびDF（MMAEおよびMMAF）（米国特許第5,635,483号および第5,780,588号および第7,498,298号参照）などのオーリスタチン；ドラスタチン；カリケアマイシンまたはその誘導体（米国特許第5,712,374号、第5,714,586号、第5,739,116号、第5,767,285号、第5,770,701号、第5,770,710号、第5,773,001号、および第5,877,296号；Hinman et al., Cancer Res. 53:3336-3342 (1993)；ならびにLode et al., Cancer Res. 58:2925-2928 (1998) 参照）；ダウノマイシンまたはドキソルビシンなどのアントラサイクリン（Kratz et al., Current Med. Chem. 13:477-523 (2006)；Jeffrey et al., Bioorganic & Med. Chem. Letters 16:358-362 (2006)；Torgov et al., Bioconj. Chem. 16:717-721 (2005)；Nagy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:829-834 (2000)；Dubowchik et al., Bioorg. & Med. Chem. Letters 12:1529-1532 (2002)；King et al., J. Med. Chem. 45:4336-4343 (2002)；および米国特許第6,630,579号参照）；メトトレキサート；ビンデシン；ドセタキセル、パクリタキセル、ラロタキセル、テセタキセル、およびオルタタキセルなどのタキサン；トリコテセン；ならびにCC1065。

[0281] 別の態様において、イムノコンジュゲートは、これらに限定されるものではないが以下を含む酵素的に活性な毒素またはその断片にコンジュゲートされた、本明細書に記載の抗体を含む：ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、外毒素A鎖（緑膿菌（Pseudomonas aeruginosa）由来）、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシンA鎖、アルファ-サルシン、シナアブラギリ（Ale

urites fordii）タンパク質、ジアンチンタンパク質、ヨウシュヤマゴボウ（Phytolacca americana）タンパク質（PAPI、PAPIIおよびPAP-S）、ツルレイシ（momordica charantia）阻害剤、クルシン（curcin)、クロチン、サボンソウ（saponaria officinalis）阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン（mitogellin)、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、ならびにトリコテセン。

[0282] 別の態様において、イムノコンジュゲートは、放射性コンジュゲートを形成するために放射性原子にコンジュゲートされた本明細書に記載の抗体を含む。様々な放射性同位体が放射性コンジュゲートの製造に利用可能である。例は、^{211}At、^{131}I、^{125}I、^{90}Y、^{186}Re、^{188}Re、^{153}Sm、^{212}Bi、^{32}P、^{212}PbおよびLuの放射性同位体を含む。放射性コンジュゲートを検出のために使用する場合、放射性コンジュゲートは、シンチグラフィー検査用の放射性原子（例えばTc-99mもしくは^{123}I）、または、核磁気共鳴（NMR）イメージング（磁気共鳴イメージング、MRIとしても知られる）用のスピン標識（例えばここでもヨウ素-123、ヨウ素-131、インジウム-111、フッ素-19、炭素-13、窒素-15、酸素-17、ガドリニウム、マンガン、または鉄）を含み得る。

[0283] 抗体および細胞傷害剤のコンジュゲートは、様々な二官能性タンパク質連結剤を用いて作製され得る。例えばN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート（SPDP)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート（SMCC)、イミノチオラン（IT)、イミドエステルの二官能性誘導体（例えば、アジプイミド酸ジメチルHCl）、活性エステル（例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル）、アルデヒド（例えば、グルタルアルデヒド）、ビス-アジド化合物（例えば、ビス（p-アジドベンゾイル）ヘキサンジアミン）、ビス-ジアゾニウム誘導体（例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン）、ジイソシアネート（例えば、トルエン2,6-ジイソシアネート）、およびビス活性フッ素化合物（例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン）である。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta et al., Science 238:1098（1987）に記載されるようにして調製され

得る。炭素-14標識された1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミン五酢酸（MX-DTPA）は、抗体への放射性核種のコンジュゲーションのための例示的なキレート剤である。WO94/11026を参照のこと。リンカーは、細胞内での細胞傷害薬の放出を促進する「切断可能なリンカー」であり得る。例えば、酸不安定性リンカー、ペプチダーゼ感受性リンカー、光不安定性リンカー、ジメチルリンカー、またはジスルフィド含有リンカー（Chari et al., Cancer Res. 52:127-131（1992）；米国特許第5,208,020号）が使用され得る。

[0284] 本明細書のイムノコンジュゲートまたはADCは、（例えば、Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.Aから）市販されているBMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、スルホ-EMCS、スルホ-GMBS、スルホ-KMUS、スルホ-MBS、スルホ-SIAB、スルホ-SMCC、およびスルホ-SMPB、ならびにSVSB（スクシンイミジル-(4-ビニルスルホン)ベンゾエート）を含むがこれらに限定されない架橋試薬を用いて調製されるコンジュゲートを明示的に考慮するが、これらに限定されない。

[0285] <u>E．診断および検出のための方法および組成物</u>

特定の態様において、本明細書で提供される抗CD137抗原結合分子または抗体のいずれも、生物学的サンプルにおけるCD137抗原結合分子またはの存在を検出するのに有用である。本明細書で用いられる用語「検出」は、定量的または定性的な検出を包含する。特定の態様において、生物学的サンプルは、細胞または組織を含む。

[0286] 一態様において、診断方法または検出方法において使用するための抗CD137抗原結合分子または抗体が提供される。さらなる局面において、生物学的サンプル中のCD137の存在を検出する方法が提供される。特定の態様において、この方法は、CD137への抗CD137抗原結合分子または抗体の結合が許容される条件下で本明細書に記載の抗CD137抗原結合分子または抗体と生物学的サンプルを接触させること、および抗CD137抗原結合分子または抗体とCD137の間で複合体が形成されたかどうかを検出することを含む。そのような方法は、イ

ンビトロの方法またはインビボの方法であり得る。一態様において、抗CD137抗原結合分子または抗体は、例えばCD137が患者を選択するためのバイオマーカーである場合、抗CD137抗原結合分子または抗体を用いる治療に適合する被験体を選択するために使用される。

[0287] 本開示の抗体を用いて診断され得る例示的な障害は、癌である。

[0288] 特定の態様において、標識された抗CD137抗原結合分子または抗体が提供される。標識は、直接的に検出される標識または部分（例えば、蛍光標識、発色標識、高電子密度標識、化学発光標識、および放射性標識）ならびに、例えば酵素反応または分子間相互作用を通じて間接的に検出される部分（例えば酵素またはリガンド）を含むが、これらに限定されない。例示的な標識は、これらに限定されるものではないが、以下を含む：放射性同位体^{32}P、^{14}C、^{125}I、^{3}Hおよび^{131}I、希土類キレートなどの発蛍光団またはフルオレセインおよびその誘導体、ローダミンおよびその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン、ホタルルシフェラーゼおよび細菌ルシフェラーゼ（米国特許第4,737,456号）などのルシフェラーゼ、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフタラジンジオン、西洋ワサビペルオキシダーゼ（horseradish peroxidase: HRP)、アルカリホスファターゼ、β-ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、単糖オキシダーゼ（例えばグルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼおよびグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ）、ウリカーゼおよびキサンチンオキシダーゼなどの複素環オキシダーゼ、過酸化水素を用いて色素前駆体を酸化する酵素（例えばHRP、ラクトペルオキシダーゼ、またはミクロペルオキシダーゼ）と連結されたもの、ビオチン／アビジン、スピン標識、バクテリオファージ標識、安定なフリーラジカル類、ならびにこれらに類するもの。

[0289] <u>Ｆ．薬学的製剤</u>

本明細書に記載の抗CD137抗原結合分子または抗体の薬学的製剤は、所望の純度を有する抗体を、1つまたは複数の任意の薬学的に許容される担体（Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)）と混合することによって、凍結乾燥製剤または水溶液の形態で、調製される。

薬学的に許容される担体は、概して、用いられる際の用量および濃度ではレシピエントに対して非毒性であり、これらに限定されるものではないが、以下のものを含む：リン酸塩、クエン酸塩、および他の有機酸などの緩衝液；アスコルビン酸およびメチオニンを含む、抗酸化剤；保存料（オクタデシルジメチルベンジル塩化アンモニウム；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム；塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチル、またはベンジルアルコール；メチルまたはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン；カテコール；レソルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；およびm-クレゾールなど）；低分子（約10残基未満）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、またはリジンなどのアミノ酸；グルコース、マンノース、またはデキストリンを含む、単糖、二糖、および他の炭水化物；EDTAなどのキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロース、ソルビトールなどの、砂糖類；ナトリウムなどの塩形成対イオン類；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）；および／またはポリエチレングリコール（PEG）などの非イオン系表面活性剤。本明細書の例示的な薬学的に許容される担体は、さらに、可溶性中性活性型ヒアルロニダーゼ糖タンパク質（sHASEGP）（例えば、rHuPH20（HYLENEX（登録商標）、Baxter International, Inc.）などのヒト可溶性PH-20ヒアルロニダーゼ糖タンパク質）などの間質性薬剤分散剤を含む。特定の例示的sHASEGPおよびその使用方法は（rHuPH20を含む）、米国特許出願公開第2005/0260186号および第2006/0104968号に記載されている。一局面において、sHASEGPは、コンドロイチナーゼなどの1つまたは複数の追加的なグリコサミノグリカナーゼと組み合わせられる。

[0290] 例示的な凍結乾燥抗体製剤は、米国特許第6,267,958号に記載されている。水溶液抗体製剤は、米国特許第6,171,586号およびWO2006/044908に記載のものを含み、後者の製剤はヒスチジン－アセテート緩衝液を含んでいる。

[0291] 有効成分は、例えば液滴形成（コアセルベーション）手法によってまたは

界面重合によって調製されたマイクロカプセル（それぞれ、例えば、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチンマイクロカプセル、およびポリ（メタクリル酸メチル）マイクロカプセル）に取り込まれてもよいし、コロイド状薬剤送達システム（例えば、リポソーム、アルブミン小球体、マイクロエマルション、ナノ粒子、およびナノカプセル）に取り込まれてもよいし、マクロエマルションに取り込まれてもよい。このような手法は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980) に開示されている。

[0292] 徐放性製剤を調製してもよい。徐放性製剤の好適な例は、抗体を含んだ固体疎水性ポリマーの半透過性マトリクスを含み、当該マトリクスは例えばフィルムまたはマイクロカプセルなどの造形品の形態である。

[0293] 生体内（in vivo）投与のために使用される製剤は、通常無菌である。無菌状態は、例えば滅菌ろ過膜を通して濾過することなどにより、容易に達成される。

[0294] G．治療的方法および治療用組成物

本明細書で提供される抗CD137抗原結合分子または抗体のいずれも、治療的な方法において使用されてよい。

一局面において、本開示においては、医薬品としての使用のための、抗CD137抗原結合分子または抗体が提供される。本開示においては、該医薬品は、具体的には、抗CD137抗原結合分子または抗体が、Ｔ細胞等の免疫細胞上に発現するCD137へ結合することによる細胞の活性化を介して、抗腫瘍作用、例えば、腫瘍内の血管新生の阻害、腫瘍細胞増殖の阻害、腫瘍性B細胞枯渇、などを誘導するためのものを一例として挙げることができる。さらなる局面において、本開示においては、腫瘍の治療における使用のための、抗CD137抗原結合分子または抗体が提供される。特定の態様において、治療方法における使用のための、抗CD137抗原結合分子または抗体が提供される。特定の態様において、本開示は、腫瘍を有する個体を治療する方法であって、当該個体に抗CD137抗原結合分子または抗体の有効量を投与する工程を含む方法における使

用のための、抗CD137抗原結合分子または抗体を提供する。さらなる態様において、本開示においては、該腫瘍は、B細胞、樹状細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、CD8陽性Ｔ細胞および／または制御性Ｔ細胞（Ｔreg細胞）が浸潤している固形腫瘍を一例として挙げることができる。

さらなる局面において、本開示は、個体において免疫細胞の活性化のための方法であって、B細胞、樹状細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、および／またはCD8陽性Ｔ細胞等の免疫細胞（より具体的には腫瘍組織に浸潤しているこれらの免疫細胞）を活性化するために当該個体に抗CD137抗原結合分子または抗体の有効量を投与する工程を含む方法における使用のための、抗CD137抗原結合分子または抗体を提供する。

さらなる局面において、本開示は、個体において細胞（例えば、腫瘍細胞）の傷害のための方法であって、当該個体に抗CD137抗原結合分子または抗体の有効量を投与する工程を含む方法における使用のための抗CD137抗原結合分子または抗体を提供する。特定の態様において、該腫瘍は、B細胞、樹状細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、CD8陽性Ｔ細胞および／または制御性Ｔ細胞（Ｔreg細胞）が浸潤している固形腫瘍を一例として挙げることができる。上記態様の任意のものによる「個体」は、好適にはヒトである。

[0295] さらなる局面において、本開示は医薬品の製造または調製における抗CD137抗原結合分子または抗体の使用を提供する。一態様において、医薬品は、腫瘍（場合により、癌と称するのが適切な場合もある。以下同じ。）の治療のためのものである。さらなる態様において、医薬品は、腫瘍（場合により癌と称する）を治療する方法であって、腫瘍（場合により癌と称する）を有する個体に医薬品の有効量を投与する工程を含む方法における使用のためのものである。さらなる態様において、医薬品は、抗CD137抗原結合分子または抗体が、Ｔ細胞等の免疫細胞上に発現するCD137へ結合することによる細胞の活性化を介して、例えば、腫瘍内の血管新生の阻害、腫瘍細胞増殖の阻害、腫瘍性B細胞枯渇、などの抗腫瘍作用を誘導するためのものである。さらなる態様において、医薬品は、個体において、抗CD137抗原結合分子または抗体が、

Ｔ細胞等の免疫細胞上に発現するCD137へ結合することによる細胞の活性化を介して、例えば、腫瘍内の血管新生を阻害する、腫瘍細胞増殖を阻害する、腫瘍性B細胞を枯渇させる、などのための方法であって、そのために当該個体に医薬品の有効量を投与する工程を含む方法における使用のためのものである。上記態様の任意のものによる「個体」は、ヒトであってもよい。

[0296] さらなる局面において、本開示は腫瘍を治療する方法を提供する。一態様において、方法は、そのような腫瘍を有する個体に抗CD137抗原結合分子または抗体の有効量を投与する工程を含む。さらなる態様において、本開示においては、該腫瘍は、B細胞、樹状細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、CD8陽性Ｔ細胞および／または制御性Ｔ細胞（Ｔreg細胞）が浸潤している固形腫瘍を一例として挙げることができる。

さらなる局面において、本開示は、個体において免疫細胞の活性化のための方法を提供する。一態様において、該方法は、個体に抗CD137抗原結合分子または抗体の有効量を投与する工程を含む方法を含む。さらなる態様において、本開示においては、該免疫細胞は、B細胞、樹状細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、および／またはCD8陽性Ｔ細胞等の免疫細胞（より具体的には腫瘍組織に浸潤しているこれらの免疫細胞）を挙げることができる。

さらなる局面において、本開示は、個体において細胞（具体的には、腫瘍細胞）を傷害するための方法を提供する。一態様において、該方法は、個体に抗CD137抗原結合分子または抗体の有効量を投与する工程を含む方法を含む。特定の態様において、該腫瘍は、B細胞、樹状細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、CD8陽性Ｔ細胞および／または制御性Ｔ細胞（Ｔreg細胞）が浸潤している固形腫瘍を一例として挙げることができる。上記態様の任意のものによる「個体」は、ヒトであってもよい。

[0297] さらなる局面において、本開示においては、上述した治療方法、治療における使用、医薬品にもちいるための抗CD137抗原結合分子または抗体を含む薬学的製剤は、低分子化合物に依存したCD137結合活性を有しない抗CD137抗原

結合分子と比較して、非腫瘍組織における免疫の活性化のレベルが低い、抗CD137抗原結合分子またはその抗体の有効量を含むことができる。

一態様において、該非腫瘍組織は、リンパ節、脾臓、および／または肝臓を挙げることができる。

さらなる態様において、上述した治療方法、治療における使用、医薬品にもちいるための抗CD137抗原結合分子または抗体を含む薬学的製剤は、非腫瘍組織に発現しているCD137に実質的に結合しない抗CD137抗原結合分子または抗体の有効量を含むことができる。

さらなる態様において、上述した治療方法、治療における使用、医薬品にもちいるための抗CD137抗原結合分子または抗体を含む薬学的製剤は、低分子化合物に依存したCD137結合活性を有しない抗CD137抗原結合分子と比較して、血中半減期が伸長している抗CD137抗原結合分子または抗体の有効量を含むことができる。

さらなる態様において、上述した治療方法、治療における使用、医薬品にもちいるための抗CD137抗原結合分子または抗体を含む薬学的製剤は、低分子化合物に依存したCD137結合活性を有しない抗CD137抗原結合分子と比較して、副作用のレベルが低い、抗CD137抗原結合分子または抗体の有効量を含むことができる。

さらなる態様において、該副作用は、AST増加、ALT増加、熱、吐き気、急性肝炎、肝障害、脾腫（splenomegaly）、腸炎、皮膚の化膿性炎症、好中球減少、リンパ球減少、血小板減少、トランスアミノアーゼの発現、および／または高ビリルビン血症（hyperbilirubinemia）を挙げることができる。

一態様において、本開示における抗CD137抗原結合分子は、副作用が少ないことから、副作用の懸念無く投与量を増加することができ、結果としてより強い薬効（細胞傷害活性または抗腫瘍活性）を発揮することが可能である。

[0298] さらなる局面において、本開示は、本明細書で提供される抗CD137抗原結合分子または抗体の任意のものを含む、薬学的製剤を提供する（例えば上述の治療的方法の任意のものにおける使用のための）。一態様において、薬学的

製剤は、本明細書で提供される抗CD137抗原結合分子または抗体の任意のものと、薬学的に許容される担体とを含む。

[0299] 本開示の抗原結合分子または抗体は、非経口投与、肺内投与、および経鼻投与、また局所的処置のために望まれる場合は病巣内投与を含む、任意の好適な手段によって投与され得る。非経口注入は、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、または皮下投与を含む。投薬は、投与が短期か長期かに一部応じて、例えば、静脈内注射または皮下注射などの注射によるなど、任意の好適な経路によってなされ得る。これらに限定されるものではないが、単回投与または種々の時点にわたる反復投与、ボーラス投与、および、パルス注入を含む、種々の投薬スケジュールが本明細書の考慮の内である。

[0300] 本開示の抗体は、優良医療規範（good medical practice）に一致したやり方で、製剤化され、投薬され、また投与される。この観点から考慮されるべきファクターは、治療されているその特定の障害、治療されているその特定の哺乳動物、個々の患者の臨床症状、障害の原因、剤を送達する部位、投与方法、投与のスケジュール、および医療従事者に公知の他のファクターを含む。抗体は、必ずしもそうでなくてもよいが、任意で、問題の障害を予防するまたは治療するために現に使用されている1つまたは複数の剤とともに、製剤化される。そのような他の剤の有効量は、製剤中に存在する抗体の量、障害または治療のタイプ、および上で論じた他のファクターに依存する。これらは通常、本明細書で述べたのと同じ用量および投与経路で、または本明細書で述べた用量の約1から99%で、または経験的／臨床的に適切と判断される任意の用量および任意の経路で、使用される。

[0301] 疾患の予防または治療のために、本開示の抗体の適切な用量は、治療される疾患のタイプ、抗体のタイプ、疾患の重症度および経過、抗体が予防的目的で投与されるのか治療的目的で投与されるのか、薬歴、患者の臨床歴および抗体に対する応答、ならびに、主治医の裁量に依存するだろう。抗体は、患者に対して、1回で、または一連の処置にわたって、好適に投与される。疾患のタイプおよび重症度に応じて、例えば、1回または複数回の別々の投与に

よるにしても連続注入によるにしても、約1μg/kgから15 mg/kg（例えば、0.1mg/kg～10mg/kg）の抗体が、患者に対する投与のための最初の候補用量とされ得る。1つの典型的な1日用量は、上述したファクターに依存して、約1μg/kgから100mg/kg以上まで、幅があってもよい。数日またはより長くにわたる繰り返しの投与の場合、状況に応じて、治療は通常疾患症状の所望の抑制が起きるまで維持される。抗体の1つの例示的な用量は、約0.05mg/kg から約 10mg/kgの範囲内である。よって、約0.5mg/kg、2.0mg/kg、4.0mg/kg、もしくは 10mg/kgの1つまたは複数の用量（またはこれらの任意の組み合わせ）が、患者に投与されてもよい。このような用量は、断続的に、例えば1週間毎にまたは3週間毎に（例えば、患者が約2から約20、または例えば約6用量の抗体を受けるように）、投与されてもよい。高い初回負荷用量の後に、1回または複数回の低用量が投与されてもよい。この療法の経過は、従来の手法および測定法によって、容易にモニタリングされる。

[0302] 上述の製剤または治療的方法のいずれについても、抗CD137抗原結合分子または抗体の代わりにまたはそれに追加して、本開示のイムノコンジュゲートを用いて実施してもよいことが、理解されよう。

[0303] H．製品

本開示の別の局面において、上述の障害の治療、予防、および／または診断に有用な器材を含んだ製品が、提供される。製品は、容器、および当該容器上のラベルまたは当該容器に付属する添付文書を含む。好ましい容器としては、例えば、ボトル、バイアル、シリンジ、IV溶液バッグなどが含まれる。容器類は、ガラスやプラスチックなどの、様々な材料から形成されていてよい。容器は組成物を単体で保持してもよいし、また、無菌的なアクセスポートを有していてもよい（例えば、容器は、皮下注射針によって突き通すことのできるストッパーを有する静脈内投与用溶液バッグまたはバイアルであってよい）。組成物中の少なくとも1つの有効成分は、本開示の抗体である。ラベルまたは添付文書は、組成物が選ばれた症状を治療するために使用されるものであることを示す。本開示のこの態様における製品は、さらに、組成

物が特定の症状を治療するために使用され得ることを示す、添付文書を含んでもよい。あるいはまたは加えて、製品はさらに、注射用制菌水（BWFI)、リン酸緩衝生理食塩水、リンガー溶液、およびデキストロース溶液などの、薬学的に許容される緩衝液を含む、第二の（または第三の）容器を含んでもよい。他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針、およびシリンジなどの、他の商業的観点またはユーザの立場から望ましい器材をさらに含んでもよい。

[0304] 用語「添付文書」は、治療用品の商用パッケージに通常含まれ、そのような治療用品の使用に関する、適応症、用法、用量、投与方法、併用療法、禁忌、および／または警告についての情報を含む使用説明書のことをいうために用いられる。

[0305] 上述の製品のいずれについても、抗CD137抗原結合分子または抗体の代わりにまたはそれに追加して、本開示のイムノコンジュゲートを含んでもよいことが、理解されよう。

[0306] <u>ＩＩＩ．組成物および方法（等電点（pI）上昇変異Fc領域を含むアゴニスト抗原結合分子および細胞傷害性抗原結合分子）</u>

一局面において、本開示は、等電点（pI）上昇変異Fc領域を含むアゴニスト抗原結合分子または抗体、およびその使用方法を提供する。いくつかの態様において、pIが上昇した変異Fc領域を含むポリペプチドは、親Fc領域において少なくとも1つのアミノ酸改変を含む。さらなる態様において、当該アミノ酸改変のそれぞれは、親Fc領域と比較して、変異Fc領域の等電点（pI）を上昇させる。特定の理論に拘束されることなく、生体液（例えば血漿）のpHは中性のpH範囲内にあると考えられる。生体液において、pIが上昇した抗原結合分子または抗体の正味の正電荷は、上昇したpIに起因して増加しており、その結果、当該抗原結合分子または抗体は、pIが上昇していない抗原結合分子または抗体と比べて、物理化学的クーロン相互作用によって、正味の負電荷を有する内皮細胞表面により強く引き付けられる。これにより、アゴニスト抗原結合分子（または抗体）、もしくは抗原に結合したアゴニスト抗原結合分子（または抗体）が、Fcγ受容体発現細胞表面により近づき、抗原結

合分子または抗体のFcγ受容体発現細胞への結合が上昇され得る。Fcγ受容体への結合活性がアゴニスト活性に寄与するアゴニスト抗原結合分子または抗体においては、pIを上昇させるアミノ酸改変によってFcγ受容体発現細胞への結合が上昇したアゴニスト抗原結合分子または抗体が、当該pIを上昇させるアミノ酸改変を含まないアゴニスト抗原結合分子または抗体と比較して、より高いアゴニスト活性を示すことが可能である。一態様において、アゴニスト抗原結合分子は、抗CD137抗原結合分子、または抗CD3抗原結合分子である。更なる態様において、アゴニスト抗原結合分子は、抗CD137抗体、または抗CD3抗体である。

[0307] 異なる局面において、本開示は、等電点（pI）上昇変異Fc領域を含み、細胞傷害性抗原結合分子または抗体、およびその使用方法を提供する。生体液において、pIが上昇した抗原結合分子または抗体の正味の正電荷は、上昇したpIに起因して増加しており、その結果、当該抗原結合分子または抗体は、pIが上昇していない抗原結合分子または抗体と比べて、物理化学的クーロン相互作用によって、正味の負電荷を有する内皮細胞表面により強く引き付けられる。これにより、細胞傷害性抗原結合分子（または抗体）、もしくは抗原に結合した細胞傷害性抗原結合分子（または抗体）が、Fcγ受容体発現細胞表面により近づき、抗原結合分子または抗体のFcγ受容体発現細胞への結合が上昇され得る。Fcγ受容体への結合活性が細胞傷害活性に寄与する細胞傷害性抗原結合分子または抗体においては、pIを上昇させるアミノ酸改変によってFcγ受容体発現細胞への結合が上昇した細胞傷害性抗原結合分子または抗体が、当該pIを上昇させるアミノ酸改変を含まない細胞傷害性抗原結合分子または抗体と比較して、より高いアゴニスト活性を示すことが可能である。

[0308] 一態様において、細胞傷害性抗原結合分子が有する細胞傷害活性は、抗体依存性細胞傷害活性（antibody-dependent cellular cytotoxicity; ADCC）や抗体依存性細胞貪食活性（antibody-dependent cellular phagocytosis; ADCP）などのように、エフェクター細胞によって引き起こされるものを含む。

[0309] 本開示において、pIは理論pIでも実測pIでもよい。pIの値は、例えば、当業者に公知の等電点分離法によって測定することができる。理論pIの値は、例えば、遺伝子およびアミノ酸の配列解析ソフトウェア（Genetyxなど）を用いて算出することができる。その際、抗体の特性を計算式に反映してもよい。例えば、(i) 通常、抗体内において保存されているCysはジスルフィド結合を形成し、側鎖の電荷を持たない。そのようなCysは計算からは除外し、ジスルフィド結合を形成していないフリー型のCysのみを計算に加えてもよい。また、(ii) 抗体に関しては、翻訳後修飾により荷電状態、すなわち等電点が変化することがありうる。このような翻訳後修飾を考慮し、次のとおり計算式を改変しても良い：(a)重鎖のN末端がQ（グルタミン）の場合は、ピログルタミル化が起こるものとして、N末端のアミノ基は計算から除外する、(b)重鎖のC末端がK（リジン）の場合は、切断が起こるものとして、K（1残基分）を計算から除外する、および、(c) 一般的に保存されている箇所のC（システイン）は全て、分子内でジスルフィド結合を形成しているものとして、これらのCの側鎖は計算から除外する。好ましい一態様において、上記(i)および(ii)の両方を計算式に反映しても良い。

[0310] 一態様において、pI値は、改変前と比べて、例えば少なくとも0.01、0.03、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、もしくはそれ以上、少なくとも0.6、0.7、0.8、0.9、もしくはそれ以上、少なくとも1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、もしくはそれ以上、または少なくとも1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、3.0もしくはそれ以上、上昇し得る。

[0311] 特定の態様において、pI上昇に関するアミノ酸は、変異Fc領域の表面に露出し得る。本開示において、表面に露出し得るアミノ酸とは、通常、変異Fc領域を構成するポリペプチドの表面に位置するアミノ酸残基を指す。ポリペプチドの表面に位置するアミノ酸残基とは、その側鎖が溶媒分子（通常、ほとんどが水分子である）に接触できるアミノ酸残基を指す。しかしながら、側鎖は必ずしも全体的に溶媒分子と接触していなければならないわけではなく、たとえ側鎖の一部が溶媒分子と接触している場合であっても、アミノ酸

は「表面に位置するアミノ酸残基」と規定される。また、ポリペプチドの表面に位置するアミノ酸残基には、表面近くに位置し、それによって、たとえ部分的にでもその側鎖が溶媒分子と接触している別のアミノ酸残基からの電荷の影響を受け得る、アミノ酸残基も含まれる。当業者は、例えば市販のソフトウェアを使用してポリペプチドの相同性モデルを作成することができる。あるいは、Ｘ線結晶学などの当業者に公知の方法を使用することができる。表面に露出し得るアミノ酸残基は、例えばInsightIIプログラム（Accelrys）等のコンピュータープログラムを用いた三次元モデル由来の座標を用いて決定される。表面に露出可能な部位は、当技術分野で公知のアルゴリズム（例えば、Lee and Richards（J. Mol. Biol. 55:379-400（1971））；Connolly（J. Appl. Cryst. 16:548-558（1983））を用いて決定されてもよい。表面に露出可能な部位は、タンパク質モデリングに適したソフトウェアおよび三次元構造情報を用いて決定することができる。そのような目的のために使用可能なソフトウェアは、例えば、SYBYL Biopolymer Moduleソフトウェア（Tripos Associates）を含む。アルゴリズムにユーザー入力サイズパラメータが必要である場合、計算において使われるプローブの「サイズ」は半径約1.4オングストローム（Å）以下に設定され得る。さらに、パーソナルコンピュータ用のソフトウェアを使用して、表面に露出可能な領域を決定するための方法が、Pacios（Comput. Chem. 18(4):377-386（1994）；J. Mol. Model. 1:46-53（1995））によって記載されている。上記したそのような情報に基づいて、変異Fc領域を構成するポリペプチドの表面に位置する適切なアミノ酸残基を選択することができる。

[0312] 抗体定常領域に一アミノ酸置換を加えてpIを上昇させる方法としては、特に限定されないが、例えばWO2014/145159に記載の方法により実施可能である。定常領域に導入するアミノ酸置換としては、可変領域の場合と同様に、負電荷を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン酸またはグルタミン酸）の数を減らす一方で、正電荷を有するアミノ酸（例えば、アルギニンまたはリジン）を増やすためのアミノ酸置換を導入することが好ましい。

[0313] 限定されないが、定常領域におけるアミノ酸置換の導入位置としては、抗体分子の表面にアミノ酸側鎖が露出し得る位置が好ましい。好ましい例には、このような抗体分子表面に露出し得る箇所に、複数のアミノ酸置換を組み合わせて導入する方法が挙げられる。あるいは、導入される複数のアミノ酸置換は、互いに立体構造的に近接した位置であることが好ましい。また、限定されないが、導入される複数のアミノ酸置換は、立体構造的に近接した位置に複数の正電荷を有する状態が場合によってはもたらされるような、正電荷を有するアミノ酸への置換であることが好ましい。本開示における「立体構造的に近接した位置」の定義としては、特に限定はされないが、互いから例えば45Å以内、40Å以内、30Å以内、20Å以内、好ましくは15Å以内、またはより好ましくは10Å以内に、単一アミノ酸置換または複数のアミノ酸置換が導入されている状態が意味され得る。目的のアミノ酸置換が抗体分子表面に露出したある位置にあるかどうか、あるいは複数位置のアミノ酸置換が近接した位置にあるかどうかは、X線結晶構造解析など、公知の方法により決定可能である。

[0314] 一態様において、pIが上昇した変異Fc領域は、EUナンバリングで表される位置285、311、312、315、318、333、335、337、341、342、343、384、385、388、390、399、400、401、402、413、420、422、および431からなる群より選択される少なくとも1つの位置の少なくとも1つのアミノ酸改変を含む。さらなる態様において、pIが上昇した変異Fc領域は、選択された位置のそれぞれにおいてArgまたはLysを含む。

[0315] さらなる態様において、pIが上昇した変異Fc領域は、EUナンバリングで表される位置311、343、および413からなる群より選択される少なくとも1つの位置の少なくとも1つのアミノ酸改変を含む。さらなる態様において、pIが上昇した変異Fc領域は、EUナンバリングで表される位置311、343、または413におけるアミノ酸改変を含む。さらなる態様において、pIが上昇した変異Fc領域は、選択された位置のそれぞれにおいてArgまたはLysを含む。

[0316] 別の局面において、本開示は、以下（1）～（3）のいずれか1つのアミノ酸

改変を含む、pIが上昇した変異Fc領域を含むポリペプチドを提供する：EUナンバリングで表される、（1）位置311および343；(2)位置311および413；ならびに（3）位置343および413。さらなる態様において、pIが上昇した変異Fc領域は、選択された位置のそれぞれにおいてArgまたはLysを含む。

[0317] タンパク質のpIを上昇させるための方法とは、例えば、中性pH条件において、側鎖が負電荷を有するアミノ酸（例えばアスパラギン酸およびグルタミン酸）の数を減らすこと、および/または、側鎖が正電荷を有するアミノ酸（例えばアルギニン、リジン、およびヒスチジン）の数を増やすことである。側鎖が負電荷を有するアミノ酸は、その側鎖pKaよりも十分に高いpH条件において-1と表される負電荷を有し、これは当業者に周知の理論である。例えば、アスパラギン酸の側鎖の理論pKaは3.9であり、該側鎖は、中性pH条件で（例えばpH7.0の溶液中で）-1と表される負電荷を有する。逆に、側鎖が正電荷を有するアミノ酸は、その側鎖pKaよりも十分に低いpH条件において+1と表される正電荷を有する。例えば、アルギニンの側鎖の理論pKaは12.5であり、該側鎖は、中性pH条件で（例えばpH7.0の溶液中で）+1と表される正電荷を有する。それに対して、中性pH条件で（例えばpH7.0の溶液中で）側鎖が電荷を有さないアミノ酸は、15種類の天然アミノ酸、すなわちアラニン、システイン、フェニルアラニン、グリシン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、アスパラギン、プロリン、グルタミン、セリン、トレオニン、バリン、トリプトファン、およびチロシンを含むことが知られている。当然ながら、pIを上昇させるためのアミノ酸は非天然アミノ酸でもよいことが理解される。

[0318] 上に述べたことから、中性pH条件で（例えばpH7.0の溶液中で）タンパク質のpIを上昇させるための方法は、例えばタンパク質のアミノ酸配列中のアスパラギン酸またはグルタミン酸（その側鎖が-1の負電荷を有する）を、側鎖が電荷を有さないアミノ酸で置換することによって、関心対象のタンパク質に+1の電荷改変を付与することができる。さらに、例えば、側鎖が電荷を有さないアミノ酸をアルギニンまたはリジン（その側鎖が+1の正電荷を有する）で置換することによって、タンパク質に+1の電荷改変を付与することがで

きる。加えて、アスパラギン酸またはグルタミン酸（その側鎖が-1の負電荷を有する）をアルギニンまたはリジン（その側鎖が+1の正電荷を有する）で置換することによって、タンパク質に+2の電荷改変を一度に付与することができる。あるいは、タンパク質のpIを上昇させるために、側鎖が電荷を有さないアミノ酸および/もしくは好ましくは側鎖が正電荷を有するアミノ酸をタンパク質のアミノ酸配列に付加もしくは挿入することができ、または、タンパク質のアミノ酸配列中に存在する、側鎖が電荷を有さないアミノ酸および/もしくは好ましくは側鎖が負電荷を有するアミノ酸を欠失させることができる。例えば、タンパク質のN末端およびC末端のアミノ酸残基は、その側鎖由来の電荷に加えて、主鎖由来の電荷（N末端におけるアミノ基のNH_3^+およびC末端におけるカルボニル基のCOO^-）を有することが理解される。したがって、主鎖由来の官能基に対して何らかの付加、欠失、置換、または挿入を実施することによっても、タンパク質のpIを上昇させることができる。

[0319] pIを上昇させるためのアミノ酸の置換には、例えば、親Fc領域のアミノ酸配列において、側鎖が負電荷を有するアミノ酸を側鎖が電荷を有さないアミノ酸で置換すること、側鎖が電荷を有さないアミノ酸を側鎖が正電荷を有するアミノ酸で置換すること、および、側鎖が負電荷を有するアミノ酸を側鎖が正電荷を有するアミノ酸で置換することが含まれ、これらは単独で、または適宜組み合わせて実施される。

[0320] pIを上昇させるためのアミノ酸の挿入または付加には、例えば、親Fc領域のアミノ酸配列における、側鎖が電荷を有さないアミノ酸の挿入または付加、ならびに/あるいは、側鎖が正電荷を有するアミノ酸の挿入または付加が含まれ、これらは単独で、または適宜組み合わせて実施される。

[0321] pIを上昇させるためのアミノ酸の欠失には、例えば、親Fc領域のアミノ酸配列における、側鎖が電荷を有さないアミノ酸の欠失、および/または、側鎖が負電荷を有するアミノ酸の欠失が含まれ、これらは単独で、または適宜組み合わせて実施される。

[0322] 一態様において、pIを上昇させるために使用される天然アミノ酸は、以下

のように分類することができる：（a）側鎖が負電荷を有するアミノ酸はGlu（E）またはAsp（D）であり得；（b）側鎖が電荷を有さないアミノ酸はAla（A）、Asn（N）、Cys（C）、Gln（Q）、Gly（G）、His（H）、Ile（I）、Leu（L）、Met（M）、Phe（F）、Pro（P）、Ser（S）、Thr（T）、Trp（W）、Tyr（Y）、またはVal（V）であり得；ならびに（c）側鎖が正電荷を有するアミノ酸はHis（H）、Lys（K）、またはArg（R）であり得る。一態様において、修飾後のアミノ酸の挿入または置換はLys（K）またはArg（R）である。

[0323] 別の局面において、本発明は、Fcγ受容体（好ましくはFcγRIIb）結合活性の上昇とpI上昇とを伴う変異Fc領域を含む単離されたアゴニスト抗原結合分子または抗体を提供する。特定の態様において、本明細書に記載される変異Fc領域は、親Fc領域において少なくとも2つのアミノ酸改変を含む。前述のとおり、pIが上昇した抗原結合分子または抗体は、pIが上昇していない抗原結合分子または抗体と比べて、物理化学的クーロン相互作用によって、正味の負電荷を有する内皮細胞表面により強く引き付けられる。このことから、Fcγ受容体（好ましくはFcγRIIb）への結合活性がアゴニスト活性に寄与するアゴニスト抗原結合分子または抗体においては、Fcγ受容体（好ましくはFcγRIIb）を上昇させるアミノ酸改変とpIを上昇させるアミノ酸改変を組み合わせることによって、当該抗原結合分子または抗体のアゴニスト活性を上昇させることが可能である。用語「Fcγ受容体」については、ＩＩ．組成物および方法（抗CD137アゴニスト抗原結合分子）に記載の説明が同様に適用される。

[0324] 一態様において、一局面において、本開示は、（a）EUナンバリングで表される、位置231、232、233、234、235、236、237、238、239、264、266、267、268、271、295、298、325、326、327、328、330、331、332、334、および396からなる群より選択される少なくとも1つの位置の少なくとも1つのアミノ酸改変と、（b）EUナンバリングで表される、位置285、311、312、315、318、333、335、337、341、342、343、384、385、388、390、399、400、401、402、413、420、422、および431からなる群より選択される少なくとも2つの位

置の少なくとも2つのアミノ酸改変とを含む少なくとも3つのアミノ酸改変を含む、FcγRIIb結合活性の上昇とpI上昇とを伴う変異Fc領域を含むポリペプチドを提供する。

[0325] 一局面において、本開示は、（a）EUナンバリングで表される、位置234、235、236、237、238、264、268、295、326、および330からなる群より選択される少なくとも1つの位置の少なくとも1つのアミノ酸改変と、（b）EUナンバリングで表される、位置311、343、および413からなる群より選択される少なくとも2つの位置の少なくとも2つのアミノ酸改変とを含む少なくとも3つのアミノ酸改変を含む、FcγRIIb結合活性の上昇とpI上昇とを伴う変異Fc領域を含むポリペプチドを提供する。

[0326] 別の局面において、本開示は、以下（1）～（26）のいずれか1つのアミノ酸改変を含む、FcγRIIb結合活性の上昇とpI上昇とを伴う変異Fc領域を含むポリペプチドを提供する：EUナンバリングで表される、

（1）位置235、236、268、295、326、330、343、および413；

（2）位置214、235、236、268、295、326、330、343、および413；

（3）位置234、238、250、264、307、330、343、および413；

（4）位置234、238、264、330、343、および413；

（5）位置234、237、238、250、307、330、343、および413；

（6）位置234、237、238、330、343、および413；

（7）位置235、236、268、295、326、330、311、および343；

（8）位置234、238、250、264、307、330、311、および343；

（9）位置234、238、264、330、311、および343；

（10）位置234、237、238、250、307、330、311、および343；

（11）位置234、237、238、330、311、および343；

（12）位置235、236、268、295、326、330、および343；

（13）位置214、235、236、268、295、326、330、および343；

（14）位置235、236、268、295、326、330、および413；

（15）位置214、236、268、330、および343；

(16) 位置214、235、236、268、330、および343；

(17) 位置214、236、268、330、および413；

(18) 位置214、236、268、330、343、および413；

(19) 位置214、235、236、268、330、343、および413；

(20) 位置214、236、268、330、および311；

(21) 位置214、235、236、268、330、および311；

(22) 位置214、236、268、330、311、および343；

(23) 位置214、235、236、268、330、311、および343；

(24) 位置214、236、268、330、311、および413；

(25) 位置214、235、236、268、330、311、および413；

(26) 位置214、235、236、268、295、326、330、および311。

[0327] 一態様において、本開示の変異Fc領域は、下記表６に記載されるアミノ酸改変を含む。

[0328] Fc領域のpIを上昇させるアミノ酸改変

[表6]

番号	アミノ酸置換(EU ナンバリング)
1	P343R/D413K
2	Q311R/P343R
3	P343R
4	D413K
5	Q311R
6	Q311R/D413K

[0329] 一態様において、本開示の変異Fc領域は、表６（FcのpI上昇を伴うアミノ酸改変）に記載されるアミノ酸改変に加えて、さらに、下記表７に記載されるアミノ酸改変を含む。

[0330] Fc領域のFcγRIIb結合活性を上昇させるアミノ酸改変

[表7]

番号	アミノ酸置換(EU ナンバリング)
1	L234Y/P238D/V264I/A330K
2	L234Y/P238D/A330K
3	L234Y/G237D/P238D/A330K
4	G236N/H268D/A330K
5	L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K

[0331] 一態様において、本開示の変異Fc領域は、下記表８に記載されるアミノ酸改変を含む。好ましい一態様において、本開示の変異Fc領域は、下記表８に記載されるアミノ酸改変に加えて、EUナンバリング447位のアミノ酸欠失を含む。さらに好ましい一態様において、本開示の変異Fc領域は、下記表８に記載されるアミノ酸改変に加えて、EUナンバリング446位および447位のアミノ酸の欠失を含む。

[0332]

[表8]

番号	アミノ酸置換(EU ナンバリング)
1	L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/P343R/D413K
2	K214R/L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/P343R/D413K
3	L234Y/P238D/T250V/V264I/T307P/A330K/P343R/D413K
4	L234Y/P238D/V264I/A330K/P343R/D413K
5	L234Y/G237D/P238D/T250V/T307P/A330K/P343R/D413K
6	L234Y/G237D/P238D/A330K/P343R/D413K
7	L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/Q311R/P343R
8	L234Y/P238D/T250V/V264I/T307P/A330K/Q311R/P343R
9	L234Y/P238D/V264I/A330K/Q311R/P343R
10	L234Y/G237D/P238D/T250V/T307P/A330K/Q311R/P343R
11	L234Y/G237D/P238D/A330K/Q311R/P343R
12	L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/P343R
13	K214R/L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/P343R
14	L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/D413K
15	K214R/G236N/H268D/A330K/P343R
16	K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/P343R
17	K214R/G236N/H268D/A330K/D413K
18	K214R/G236N/H268D/A330K/P343R/D413K
19	K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/P343R/D413K
20	K214R/G236N/H268D/A330K/Q311R
21	K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/Q311R
22	K214R/G236N/H268D/A330K/Q311R/P343R
23	K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/Q311R/P343R
24	K214R/G236N/H268D/A330K/Q311R/D413K
25	K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/Q311R/D413K
26	K214R/L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/Q311R

[0333] 上記で例示される改変のほか、例えばWO2013/047752、WO2013/125667、WO2014/030728、WO2014/163101、またはWO2017104783に記載されるかまたは示唆される、親Fc領域と比較してFcγRIIbを含むFcγRへの結合活性を上昇させる少なくとも1つのアミノ酸改変、および、例えばWO2017/104783、WO2017/046994に記載されるかまたは示唆される、親Fc領域と比較してpIを上昇させる少

なくとも1つのアミノ酸改変、および、それらのアミノ酸改変の組合せが用いられ得ることが、当業者に理解されよう。

[0334] 一態様において、アゴニスト抗原結合分子または抗体は変異Fc領域および抗原結合ドメインの両方を含む。さらなる態様において、抗原は膜抗原である。さらなる態様において、抗原は細胞表面に発現する受容体である。いくつかの態様において、親Fc領域はヒトIgG1に由来する。さらなる態様において、ポリペプチドは抗体である。さらなる態様において、ポリペプチドはFc融合タンパク質である。

[0335] 一局面において、本開示は、上記に詳述した改変Fc領域（等電点（pI）上昇変異Ｆｃ領域）を含むアゴニスト抗原結合分子を製造する方法を提供する。

斯かる本開示の方法は、一態様において、親Fc領域に、親Fc領域を含む親アゴニスト抗原結合分子と比較して等電点（pI）の上昇をもたらす少なくとも一つのアミノ酸改変（上述したとおり）を導入し、その結果得られる改変Fc領域を含むアゴニスト抗原結合分子のアゴニスト活性が、親アゴニスト抗原結合分子と比較して上昇しているアゴニスト抗原結合分子を同定、単離することを特徴とする。

一態様において、斯かる本開示の方法は、斯様にして同定、単離された前記アゴニスト抗原結合分子をコードする遺伝子と作動可能に連結された適切なプロモーターを含む発現ベクターを取得し、当該ベクターを宿主細胞に導入し、当該宿主細胞を培養して前記アゴニスト抗原結合分子を生産させ、宿主細胞培養物から前記アゴニスト抗原結合分子を回収することを特徴とする。

[0336] 一態様において、斯かる本開示の方法により、10μM、50μM、100μM、150μM、200μM、または250μMの低分子化合物の存在下での抗原に対するアゴニスト活性が、低分子化合物の非存在下での抗原に対するアゴニスト活性と比べて、2倍以上、3倍以上、5倍以上、10倍以上、20倍以上、30倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、または90倍以上高い、アゴニスト抗原

結合分子を製造することができる。

一態様において、斯かる本開示の方法により、10μM以上の低分子化合物の存在下での抗原に対するアゴニスト活性が、低分子化合物の非存在下での抗原に対するアゴニスト活性と比べて、2倍以上、3倍以上、5倍以上、10倍以上、20倍以上、30倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、または90倍以上高い、アゴニスト抗原結合分子を製造することができる。

一態様において、斯かる本開示の方法により、50μM以上の低分子化合物の存在下での抗原に対するアゴニスト活性が、低分子化合物の非存在下での抗原に対するアゴニスト活性と比べて、2倍以上、3倍以上、5倍以上、10倍以上、20倍以上、30倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、または90倍以上高い、アゴニスト抗原結合分子を製造することができる。

[0337] 一態様において、斯かる本開示の方法により、250μM以上の低分子化合物の存在下での抗原に対するアゴニスト活性が、低分子化合物の非存在下での抗原に対するアゴニスト活性と比べて、2倍以上、3倍以上、5倍以上、10倍以上、20倍以上、30倍以上、50倍以上、60倍以上、70倍以上、80倍以上、または90倍以上高い、アゴニスト抗原結合分子を製造することができる。

一態様において、斯かる方法において、アゴニスト抗原結合分子抗原に対するアゴニスト活性は、抗原発現細胞によるIL-2および／またはIFN-γ産生量により評価することができる。

一態様において、斯かる方法において、アゴニスト抗原結合分子抗原に対するアゴニスト活性は、単離されたヒト末梢血単核細胞（PBMC）またはヒト末梢血単核細胞（PBMC）由来T細胞によるIL-2および／またはIFN-γ産生量により評価することができる。

一態様において、斯かる方法において、アゴニスト抗原結合分子抗原に対するアゴニスト活性は、レポーター遺伝子アッセイにより評価することができる。

[0338] ＩＶ．組成物および方法（低分子化合物の濃度に応じて抗原に対する結合活性が変化する抗原結合分子）

[0339] A．低分子化合物の濃度に応じて抗原に対する結合活性が変化する抗原結合分子

一局面において、本発明は、低分子化合物の濃度に応じて抗原結合活性が変化する抗原結合分子を提供する。本分子は、低分子化合物依存的な（低分子化合物の濃度に依存した抗原結合活性を有する）抗原結合分子と言い換えることもできる。いくつかの局面において、抗原結合分子は抗体である。いくつかの態様において、本発明の抗原結合分子は、低分子化合物の濃度が高まるにつれて抗原結合活性が増大する。いくつかの態様において、本発明の抗原結合分子は、低分子化合物の濃度が高まるにつれて抗原結合活性が減少する。一態様において、低分子化合物の存在下における抗原結合分子の結合活性と、低分子化合物の非存在下における抗原結合分子の結合活性を比較した場合、一方の値がもう一方の値より高い。別の態様において、高濃度の低分子化合物の存在下における抗原結合分子の結合活性と、低濃度の低分子化合物の存在下における抗原結合分子の結合活性を比較した場合、一方の値がもう一方の値より高い。特定の態様において、本発明における低分子化合物は、標的組織特異的化合物である。さらなる態様において、本発明における低分子化合物は、腫瘍組織特異的化合物である。

[0340] 別の局面において、本発明は、高い血漿中滞留性を有する抗原結合分子を提供する。さらなる局面において、当該抗原結合分子は、低分子化合物の濃度が高まるにつれて抗原結合活性が増大する。特定の態様において、低分子化合物は、標的組織特異的化合物である。さらなる態様において、当該抗原結合分子は、非標的組織における抗原結合活性に比べて、標的組織における抗原結合活性がより高い。いくつかの局面において、抗原結合分子は抗体である。特定の理論に拘束されるわけではないが、上述の血漿中における動態の変化は以下のように解釈することができる。抗原結合分子の標的組織特異的化合物の濃度に依存した抗原結合活性が高まるにつれて、当該抗原結合分子の標的組織以外の組織における抗原結合能が低下する。その結果、当該抗原結合分子の標的組織以外の組織における抗原依存的な消失（クリアランス

）が低下することになる。生体内の大部分の組織（標的組織以外の組織）において、抗原依存的な消失（クリアランス）が低下することは、総合的に見れば、当該抗原結合分子の高い血漿中滞留性につながる。本発明における抗原結合分子が高い血漿中滞留性を有しているかどうかの判断は、対照となる抗原結合分子との相対的な比較によって行うことができる。いくつかの態様において、標的組織特異的化合物の濃度が高まるにつれて抗原結合活性が増大する抗原結合分子は、対照となる抗原結合分子と比べて、高い血漿中滞留性を有する。一態様において、対照となる抗原結合分子は、低分子化合物の濃度に依存した抗原結合活性を有していない抗原結合分子である。特定の態様において、低分子化合物の濃度に依存した抗原結合活性を有していない抗原結合分子とは、当該低分子化合物の存在下と非存在下における抗原結合活性の差が、例えば2倍より小さい、1.8倍より小さい、1.5倍より小さい、1.3倍より小さい、1.2倍より小さい、または1.1倍より小さい抗原結合分子を意味する。比較の観点からすると、本発明の抗原結合分子と、対照となる抗原結合分子とでは、十分量の低分子化合物の存在下における抗原結合活性が互いに実質的に等しいことが望ましい。

[0341] ここで、生体内で検出される抗原結合分子の抗原依存的な消失の大きさは、血漿中に存在する抗原と抗原結合分子の量的なバランスに応じて変化すると考えられる。一般的に、血漿中に存在する抗原が多いほど／抗原結合分子が少ないほど、抗原結合分子の抗原依存的な消失は検出されやすくなり、逆に、血漿中に存在する抗原が少ないほど／抗原結合分子が多いほど、抗原結合分子の抗原依存的な消失は検出されにくくなると考えられる。本発明の抗原結合分子は、全ての条件で高い血漿中滞留性を示す必要はなく、十分な抗原依存的な消失が検出されるような適切な条件下において高い血漿中滞留性を示せばよい。血漿中の抗原量が少ない場合は、何らかの人為的な手段によって抗原量を増やしてから血漿中滞留性を評価してもよい。

[0342] 別の局面において、本発明は、低い血漿中抗原蓄積能を有する抗原結合分子を提供する。さらなる局面において、当該抗原結合分子は、低分子化合物

の濃度が高まるにつれて抗原結合活性が増大する。特定の態様において、低分子化合物は、標的組織特異的化合物である。さらなる態様において、当該抗原結合分子は、非標的組織における抗原結合活性に比べて、標的組織における抗原結合活性がより高い。いくつかの局面において、抗原結合分子は抗体である。特定の理論に拘束されるわけではないが、上述の血漿中における動態の変化は以下のように解釈することができる。抗原結合分子の標的組織特異的化合物の濃度に依存した抗原結合活性が高まるにつれて、当該抗原結合分子の標的組織以外の組織における抗原結合能が低下する。その結果、当該抗原結合分子の標的組織以外の組織における抗原－抗体複合体の形成能が低下することになる。一般的に、抗体などの抗原結合分子が抗原と結合すると、抗原のクリアランスが低下して血漿中の抗原濃度が上昇（抗原が蓄積）することが知られている。生体内の大部分の組織（標的組織以外の組織）において、抗原－抗体複合体の形成能が低下することは、総合的に見れば、抗原の低い蓄積（言い換えると、抗原結合分子の低い抗原蓄積能）につながる。本発明における抗原結合分子が低い血漿中抗原蓄積能を有しているかどうかの判断は、対照となる抗原結合分子との相対的な比較によって行うことができる。いくつかの態様において、標的組織特異的化合物の濃度が高まるにつれて抗原結合活性が増大する抗原結合分子は、対照となる抗原結合分子と比べて、低い血漿中抗原蓄積能を有する。一態様において、対照となる抗原結合分子は、低分子化合物の濃度に依存した抗原結合活性を有していない抗原結合分子である。特定の態様において、低分子化合物の濃度に依存した抗原結合活性を有していない抗原結合分子とは、当該低分子化合物の存在下と非存在下における抗原結合活性の差が、例えば2倍より小さい、1.8倍より小さい、1.5倍より小さい、1.3倍より小さい、1.2倍より小さい、または1.1倍より小さい抗原結合分子を意味する。比較の観点からすると、本発明の抗原結合分子と、対照となる抗原結合分子とでは、十分量の低分子化合物の存在下における抗原結合活性が互いに実質的に等しいことが望ましい。

[0343] ここで、生体内で形成される抗原－抗体複合体の量は、血漿中に存在する

抗原および抗体の量に依存すると考えられる。一般的に、血漿中の抗原・抗体量が増加するほど、形成される抗原－抗体複合体量も増加し、逆に、血漿中の抗原・抗体量が減少するほど、形成される抗原－抗体複合体量も減少すると考えられる。本発明の抗原結合分子は、全ての条件で低い血漿中抗原蓄積能を示す必要はなく、十分な抗原－抗体複合体が形成されるような適切な条件下において低い血漿中抗原蓄積能を示せばよい。血漿中の抗原量が少ない場合は、何らかの人為的な手段によって抗原量を増やしてから血漿中抗原蓄積能を評価してもよい。

[0344] いくつかの態様において、本発明の抗原結合分子の、低分子化合物の濃度に依存した抗原結合活性の差は、例えば2倍以上、3倍以上、5倍以上、10倍以上、20倍以上、30倍以上、50倍以上、100倍以上、200倍以上、300倍以上、500倍以上、1×10^{3}倍以上、2×10^{3}倍以上、3×10^{3}倍以上、5×10^{3}倍以上、1×10^{4}倍以上、2×10^{4}倍以上、3×10^{4}倍以上、5×10^{4}倍以上、または1×10^{5}倍以上である。

[0345] いくつかの態様において、抗原結合分子の結合活性はKD（Dissociation constant：解離定数）値で表すことができる。さらなる態様において、低分子化合物の存在下における抗原結合分子のKD値と、低分子化合物の非存在下における抗原結合分子のKD値を比較した場合、一方の値がもう一方の値より小さい。あるいは別の態様において、高濃度の低分子化合物の存在下における抗原結合分子のKD値と、低濃度の低分子化合物の存在下における抗原結合分子のKD値を比較した場合、一方の値がもう一方の値より小さい。さらなる態様において、抗原結合分子のKD値の差は、例えば2倍以上、3倍以上、5倍以上、10倍以上、20倍以上、30倍以上、50倍以上、100倍以上、200倍以上、300倍以上、500倍以上、1×10^{3}倍以上、2×10^{3}倍以上、3×10^{3}倍以上、5×10^{3}倍以上、1×10^{4}倍以上、2×10^{4}倍以上、3×10^{4}倍以上、5×10^{4}倍以上、または1×10^{5}倍以上である。より小さい方のKD値は、例えば9×10^{-7}M以下、8×10^{-7}M以下、7×10^{-7}M以下、6×10^{-7}M以下、5×10^{-7}M以下、4×10^{-7}M以下、3×10^{-7}M以下、2×10^{-7}M以下、1×10^{-7}M以下、9×10^{-8}M以下、8×10^{-8}M以下、7×10^{-8}M以下、6×10^{-8}M以

下、5×10^{-8}M以下、4×10^{-8}M以下、3×10^{-8}M以下、2×10^{-8}M以下、1×10^{-8}M以下、9×10^{-9}M以下、8×10^{-9}M以下、7×10^{-9}M以下、6×10^{-9}M以下、5×10^{-9}M以下、4×10^{-9}M以下、3×10^{-9}M以下、2×10^{-9}M以下、1×10^{-9}M以下、9×10^{-10}M以下、8×10^{-10}M以下、7×10^{-10}M以下、6×10^{-10}M以下、5×10^{-10}M以下、4×10^{-10}M以下、3×10^{-10}M以下、2×10^{-10}M以下、1×10^{-10}M以下であることができる。より大きい方のKD値は、例えば1×10^{-8}M以上、2×10^{-8}M以上、3×10^{-8}M以上、4×10^{-8}M以上、5×10^{-8}M以上、6×10^{-8}M以上、7×10^{-8}M以上、8×10^{-8}M以上、9×10^{-8}M以上、1×10^{-7}M以上、2×10^{-7}M以上、3×10^{-7}M以上、4×10^{-7}M以上、5×10^{-7}M以上、6×10^{-7}M以上、7×10^{-7}M以上、8×10^{-7}M以上、9×10^{-7}M以上、1×10^{-6}M以上、2×10^{-6}M以上、3×10^{-6}M以上、4×10^{-6}M以上、5×10^{-6}M以上、6×10^{-6}M以上、7×10^{-6}M以上、8×10^{-6}M以上、9×10^{-6}M以上であることができる。

[0346] 別の態様において、抗原結合分子の結合活性を、KD値の代わりにkd（Dissociation rate constant：解離速度定数）値で表してもよい。

[0347] 別の態様において、抗原結合分子の結合活性は、抗原結合分子への抗原の結合量などで表してもよい。例えば、表面プラズモン共鳴アッセイにおいては、センサーチップ上に固定された抗原結合分子の結合量、およびさらにそこに結合した抗原の結合量がそれぞれ反応単位（resonance unit: RU）として測定される。そこでの抗原の結合量を指標に抗原結合活性を表してもよいし、あるいは、抗原の結合量を抗原結合分子の結合量で除した値（すなわち、抗原結合分子の単位量あたりの抗原の結合量）を指標に抗原結合活性を表してもよい。そうした結合量の測定および算出の具体的な方法は後述の実施例に記載されている。いくつかの態様において、低分子化合物の存在下における抗原の結合量と、低分子化合物の非存在下における抗原の結合量を比較した場合、一方の値がもう一方の値より大きい。あるいは別の態様において、高濃度の低分子化合物の存在下における抗原の結合量と、低濃度の低分子化合物の存在下における抗原の結合量を比較した場合、一方の値がもう一方の値より大きい。さらなる態様において、抗原の結合量の差は、例えば2倍以上、3倍以上、5倍以上、10倍以上、20倍以上、30倍以上、50倍以上、100倍以

上、200倍以上、300倍以上、500倍以上、1×10^{3}倍以上、2×10^{3}倍以上、3×10^{3}倍以上、5×10^{3}倍以上、1×10^{4}倍以上、2×10^{4}倍以上、3×10^{4}倍以上、5×10^{4}倍以上、または1×10^{5}倍以上である。より大きい方の抗原の結合量は、例えば0.01以上、0.02以上、0.03以上、0.04以上、0.05以上、0.06以上、0.07以上、0.08以上、0.09以上、0.1以上、0.2以上、0.3以上、0.4以上、0.5以上、0.6以上、0.7以上、0.8以上、0.9以上、1以上であることができる。より小さい方の抗原の結合量は、例えば0.5以下、0.4以下、0.3以下、0.2以下、0.1以下、0.09以下、0.08以下、0.07以下、0.06以下、0.05以下、0.04以下、0.03以下、0.02以下、0.01以下、0.009以下、0.008以下、0.007以下、0.006以下、0.005以下、0.004以下、0.003以下、0.002以下、0.001以下であることができる。

[0348] いくつかの態様において、本明細書で表されるKD値やkd値、結合量の値などは、表面プラズモン共鳴アッセイを25℃または37℃で実施することにより、測定あるいは算出される（例えば、本明細書の実施例を参照のこと）。

[0349] 低分子化合物の濃度としては、抗原結合分子の結合活性に差が検出される限り、任意の濃度を選択することができる。特定の態様において、高濃度としては、例えば1 nMまたはそれより高い濃度、3 nMまたはそれより高い濃度、10 nMまたはそれより高い濃度、30 nMまたはそれより高い濃度、100 nMまたはそれより高い濃度、300 nMまたはそれより高い濃度、1 μMまたはそれより高い濃度、3 μMまたはそれより高い濃度、10 μMまたはそれより高い濃度、30 μMまたはそれより高い濃度、100 μMまたはそれより高い濃度、300 μMまたはそれより高い濃度、1 mMまたはそれより高い濃度、3 mMまたはそれより高い濃度、10 mMまたはそれより高い濃度、30 mMまたはそれより高い濃度、100 mMまたはそれより高い濃度、300 mMまたはそれより高い濃度、1 Mまたはそれより高い濃度を挙げることができる。あるいは、それぞれの抗原結合分子が最大の結合活性を示すような十分量をここでの高濃度とすることもできる。一態様において、1 μM、10 μM、100 μM、1 mM、あるいは、それぞれの抗原結合分子が最大の結合活性を示すような十分量をここでの高濃度と

して選択することができる。特定の態様において、低濃度としては、例えば1 mMまたはそれより低い濃度、300 μMまたはそれより低い濃度、100 μMまたはそれより低い濃度、30 μMまたはそれより低い濃度、10 μMまたはそれより低い濃度、3 μMまたはそれより低い濃度、1 μMまたはそれより低い濃度、300 nMまたはそれより低い濃度、100 nMまたはそれより低い濃度、30 nMまたはそれより低い濃度、10 nMまたはそれより低い濃度、3 nMまたはそれより低い濃度、1 nMまたはそれより低い濃度、300 pMまたはそれより低い濃度、100 pMまたはそれより低い濃度、30 pMまたはそれより低い濃度、10 pMまたはそれより低い濃度、3 pMまたはそれより低い濃度、1 pMまたはそれより低い濃度などを挙げることができる。あるいは、それぞれの抗原結合分子が最小の結合活性を示す際の濃度をここでの低濃度とすることもできる。実質的な濃度がゼロ（低分子化合物の非存在下）の場合を、低濃度の一態様として選択することもできる。一態様において、1 mM、100 μM、10 μM、1 μM、それぞれの抗原結合分子が最小の結合活性を示す際の濃度、あるいは低分子化合物の非存在下をここでの低濃度として選択することができる。別の態様において、高濃度と低濃度の比としては、例えば例えば3倍またはそれ以上、10倍またはそれ以上、30倍またはそれ以上、100倍またはそれ以上、300倍またはそれ以上、1×10^{3}倍またはそれ以上、3×10^{3}倍またはそれ以上、1×10^{4}倍またはそれ以上、3×10^{4}倍またはそれ以上、1×10^{5}倍またはそれ以上、3×10^{5}倍またはそれ以上、1×10^{6}倍またはそれ以上、3×10^{6}倍またはそれ以上、1×10^{7}倍またはそれ以上、3×10^{7}倍またはそれ以上、1×10^{8}倍またはそれ以上、3×10^{8}倍またはそれ以上、1×10^{9}倍またはそれ以上、3×10^{9}倍またはそれ以上、1×10^{10}倍またはそれ以上、3×10^{10}倍またはそれ以上、1×10^{11}倍またはそれ以上、3×10^{11}倍またはそれ以上、1×10^{12}倍またはそれ以上の値を選択することができる。

[0350] 別の態様において、本発明の抗原結合分子は、当該抗原を発現する細胞に対して細胞傷害活性を示す。標的となる細胞の表面に当該抗原が発現していて、そこに本発明の抗原結合分子が結合した場合、当該細胞が傷害され得る

。細胞への傷害は、抗体依存性細胞傷害活性（antibody-dependent cellular cytotoxicity; ADCC）や抗体依存性細胞貪食活性（antibody-dependent cellular phagocytosis; ADCP）などのように、エフェクター細胞によって引き起こされるものであってもよいし、補体依存性細胞傷害活性（complement-dependent cytotoxicity; CDC）などのように、補体によって引き起こされるものであってもよい。あるいはイムノコンジュゲートなどのように、細胞傷害剤（例えば、放射性同位体や化学療法剤など）によって引き起こされるものであってもよい。ここでの細胞傷害は、細胞死を誘導する作用や細胞増殖を抑制する作用、細胞機能に障害を与える作用などを含み得る。本発明の抗原結合分子が十分な量で存在する場合、例えば10%以上、15%以上、20%以上、25%以上、30%以上、35%以上、40%以上、45%以上、50%以上、55%以上、60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、または95%以上の当該抗原を発現する細胞に対して傷害を引き起こすことができる。そのような細胞傷害活性の測定は、本発明の抗原結合分子の非存在下、あるいは陰性対照となる抗原結合分子の存在下での測定と比較して行うことができる。例示的な細胞傷害アッセイが、本明細書で提供される。

[0351] 別の態様において、本発明の抗原結合分子は、当該抗原に対して中和活性を示す。中和活性とは当該抗原が関連する何らかの生物学的活性を中和（あるいは阻害、阻止）する活性を意味する。一態様において、生物学的活性はリガンドとレセプターの結合によってもたらされる。特定の態様において、本発明の抗原結合分子は、当該リガンドとレセプターの結合を阻害する。本発明の抗原結合分子が十分な量で存在する場合、生物学的活性を例えば10%以上、15%以上、20%以上、25%以上、30%以上、35%以上、40%以上、45%以上、50%以上、55%以上、60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、または95%以上阻害し得る。そのような阻害活性の測定は、本発明の抗原結合分子の非存在下、あるいは陰性対照となる抗原結合分子の存在下での測定と比較して行うことができる。中和活性の測定の具体的な方法が本明細書で提供される。

[0352] 別の態様において、本発明の抗原結合分子はFc領域を含む。さらなる態様において、本発明の抗原結合分子は定常領域を含む。定常領域は、重鎖定常領域（Fc領域を含む）、軽鎖定常領域、あるいはその両者であってもよい。いくつかの態様において、Fc領域は、天然型配列のFc領域である。天然型抗体に由来する例示的な重鎖定常領域として、例えばヒトIgG1（配列番号：219）、ヒトIgG2（配列番号：220）、ヒトIgG3（配列番号：221）、ヒトIgG4（配列番号：222）などの重鎖定常領域を挙げることができる。また、他の例示的な重鎖定常領域として、配列番号：215、配列番号：217などの重鎖定常領域を挙げることができる。天然型抗体に由来する例示的な軽鎖定常領域として、例えばヒトκ鎖（配列番号：186、配列番号：199、配列番号：218）、ヒトλ鎖（配列番号：189、配列番号：216）などの軽鎖定常領域を挙げることができる。

[0353] 別の態様において、Fc領域は、天然型配列のFc領域にアミノ酸改変を加えて作製された変異Fc領域である。特定の態様において、変異Fc領域は、天然型配列のFc領域に比べて、FcγRIa、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIIaからなる群より選択される少なくとも一つのFcγ受容体に対する結合活性が増強している。

[0354] さらなる態様において、本発明の抗原結合分子は抗体である。特定の態様において、抗体はキメラ、ヒト化、またはヒト抗体を含む、モノクローナル抗体である。一態様において、抗体は、例えば、Fv、Fab、Fab'、scFv、ダイアボディ、またはF(ab')2断片などの、抗体断片である。別の態様において、抗体は、例えば、完全IgG1抗体や完全IgG4抗体、本明細書で定義された他の抗体クラスまたはアイソタイプなどの、全長抗体である。

[0355] 別の態様において、本発明の抗原結合分子は、低分子化合物および抗原とともに三者複合体を形成する。特定の態様において、抗原結合分子は抗体である。一態様において、本発明の抗原結合分子は、重鎖CDR1、CDR2、CDR3を介して低分子化合物に結合する。一態様において、本発明の抗原結合分子は、低分子化合物に対する結合モチーフを有する。低分子化合物に対する結合

モチーフは、例えばKabatナンバリングで表される33位、52位、52a位、53位、55位、56位、58位、95位、96位、98位、100a位、100b位、100c位に存在する少なくとも一つのアミノ酸から構成され得る。さらなる態様において、本発明の抗原結合分子は、例えばKabatナンバリングで表される33位、52位、52a位、53位、55位、56位、58位、95位、96位、98位、100a位、100b位、100c位からなる群より選択される少なくとも一つのアミノ酸を介して低分子化合物に結合する。本発明の抗原結合分子と低分子化合物が結合して形成された複合体に対して、さらに抗原が結合してもよい。また、低分子化合物は、抗原結合分子と抗原が相互作用する界面に存在して、それらの両者に結合していてもよい。本発明の抗原結合分子が、低分子化合物および抗原とともに三者複合体を形成していることは、例えば後述の結晶構造解析などの手法により確認することができる（実施例参照のこと）。特定の態様において、低分子化合物はアデノシン含有化合物である。

[0356] 一態様において、本開示の低分子化合物は、「標的組織特異的化合物」である。更なる態様において、「標的組織特異的化合物」は、腫瘍組織特異的化合物である。例示的な標的組織特異的化合物および腫瘍組織特異的化合物が、本明細書（例えば、「ＩＩ．組成物および方法（抗CD137アゴニスト抗原結合分子）、Ａ．例示的抗CD137抗原結合分子または抗体、［低分子化合物に依存した結合活性］」において開示される。

[0357] Ｂ．抗原

本明細書において、「抗原」は、本発明の抗原結合分子が結合するエピトープを含む限りその構造は特に限定されない。抗原は無機物であってもよいし、有機物であってもよい。いくつかの態様において、抗原としては、17-IA、4-1BB、4Dc、6-ケト-PGF1a、8-イソ-PGF2a、8-オキソ-dG、A1アデノシン受容体、A33、ACE、ACE-2、アクチビン、アクチビンA、アクチビンAB、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンRIA、アクチビンRIA ALK-2、アクチビンRIB ALK-4、アクチビンRIIA、アクチビンRIIB、ADAM、ADAM10、ADAM12、ADAM15、ADAM17/TACE、ADAM8、ADAM9、ADAMTS、ADAMTS4、ADAMTS5、アドレシン、aF

GF、ALCAM、ALK、ALK-1、ALK-7、アルファ-1-アンチトリプシン、アルファ-V/ベータ-1 アンタゴニスト、ANG、Ang、APAF-1、APE、APJ、APP、APRIL、AR、ARC、ART、アルテミン、抗Id、ASPARTIC、心房性ナトリウム利尿因子、av/b3インテグリン、Axl、b2M、B7-1、B7-2、B7-H、B-リンパ球刺激因子（BlyS）、BACE、BACE-1、Bad、BAFF、BAFF-R、Bag-1、BAK、Bax、BCA-1、BCAM、Bcl、BCMA、BDNF、b-ECGF、bFGF、BID、Bik、BIM、BLC、BL-CAM、BLK、BMP、BMP-2、BMP-2a、BMP-3 オステオゲニン（Osteogenin）、BMP-4、BMP-2b、BMP-5、BMP-6、Vgr-1、BMP-7（OP-1）、BMP-8（BMP-8a、OP-2）、BMPR、BMPR-IA（ALK-3）、BMPR-IB（ALK-6）、BRK-2、RPK-1、BMPR-II（BRK-3）、BMP、b-NGF、BOK、ボンベシン、骨由来神経栄養因子、BPDE、BPDE-DNA、BTC、補体因子3（C3）、C3a、C4、C5、C5a、C10、CA125、CAD-8、カルシトニン、cAMP、癌胎児性抗原（CEA）、癌関連抗原、カテプシンA、カテプシンB、カテプシンC/DPPI、カテプシンD、カテプシンE、カテプシンH、カテプシンL、カテプシンO、カテプシンS、カテプシンV、カテプシンX/Z/P、CBL、CCI、CCK2、CCL、CCL1、CCL11、CCL12、CCL13、CCL14、CCL15、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL2、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23、CCL24、CCL25、CCL26、CCL27、CCL28、CCL3、CCL4、CCL5、CCL6、CCL7、CCL8、CCL9/10、CCR、CCR1、CCR10、CCR10、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CD1、CD2、CD3、CD3E、CD4、CD5、CD6、CD7、CD8、CD10、CD11a、CD11b、CD11c、CD13、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD27L、CD28、CD29、CD30、CD30L、CD32、CD33（p67タンパク質）、CD34、CD38、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD46、CD49a、CD52、CD54、CD55、CD56、CD61、CD64、CD66e、CD74、CD80（B7-1）、CD89、CD95、CD123、CD137、CD138、CD140a、CD146、CD147、CD148、CD152、CD164、CEACAM5、CFTR、cGMP、CINC、ボツリヌス菌毒素、ウェルシュ菌毒素、CKb8-1、CLC、CMV、CMV UL、CNTF、CNTN-1、COX、C-Ret、CRG-2、CT-1、CTACK、CTGF、CTLA-4、PD1、PDL1、LAG3、TIM3、galectin-9、CX3CL1、CX3CR1、CXCL、CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、CXCL6、CXCL7、CXCL8、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、CXCL15、CXCL16、

CXCR、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、サイトケラチン腫瘍関連抗原、DAN、DCC、DcR3、DC-SIGN、補体制御因子（Decay accelerating factor）、des(1-3)-IGF-I（脳IGF-1）、Dhh、ジゴキシン、DNAM-1、Dnase、Dpp、DPPIV/CD26、Dtk、ECAD、EDA、EDA-A1、EDA-A2、EDAR、EGF、EGFR（ErbB-1）、EMA、EMMPRIN、ENA、エンドセリン受容体、エンケファリナーゼ、eNOS、Eot、エオタキシン1、EpCAM、エフリンB2/EphB4、EPO、ERCC、E-セレクチン、ET-1、ファクターIIa、ファクターVII、ファクターVIIIc、ファクターIX、線維芽細胞活性化タンパク質（FAP）、Fas、FcR1、FEN-1、フェリチン、FGF、FGF-19、FGF-2、FGF-3、FGF-8、FGFR、FGFR-3、フィブリン、FL、FLIP、Flt-3、Flt-4、卵胞刺激ホルモン、フラクタルカイン、FZD1、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9、FZD10、G250、Gas6、GCP-2、GCSF、GD2、GD3、GDF、GDF-1、GDF-3（Vgr-2）、GDF-5（BMP-14、CDMP-1）、GDF-6（BMP-13、CDMP-2）、GDF-7（BMP-12、CDMP-3）、GDF-8（ミオスタチン）、GDF-9、GDF-15（MIC-1）、GDNF、GDNF、GFAP、GFRa-1、GFR-アルファ1、GFR-アルファ2、GFR-アルファ3、GITR、グルカゴン、Glut4、糖タンパク質IIb/IIIa（GPIIb/IIIa）、GM-CSF、gp130、gp72、GRO、成長ホルモン放出因子、ハプテン（NP-capまたはNIP-cap）、HB-EGF、HCC、HCMV gBエンベロープ糖タンパク質、HCMV gHエンベロープ糖タンパク質、HCMV UL、造血成長因子（HGF）、Hep B gp120、ヘパラナーゼ、Her2、Her2/neu（ErbB-2）、Her3（ErbB-3）、Her4（ErbB-4）、単純ヘルペスウイルス（HSV） gB糖タンパク質、HSV gD糖タンパク質、HGFA、高分子量黒色腫関連抗原（HMW-MAA）、HIV gp120、HIV III B gp 120 V3ループ、HLA、HLA-DR、HM1.24、HMFG PEM、HRG、Hrk、ヒト心臓ミオシン、ヒトサイトメガロウイルス（HCMV）、ヒト成長ホルモン（HGH）、HVEM、I-309、IAP、ICAM、ICAM-1、ICAM-3、ICE、ICOS、IFNg、Ig、IgA受容体、IgE、IGF、IGF結合タンパク質、IGF-1R、IGFBP、IGF-I、IGF-II、IL、IL-1、IL-1R、IL-2、IL-2R、IL-4、IL-4R、IL-5、IL-5R、IL-6、IL-6R、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-18R、IL-21、IL-23、IL-27、インターフェロン（INF）-アルファ、INF-ベータ、INF-ガンマ、インヒビ

ン、iNOS、インスリンA鎖、インスリンB鎖、インスリン様増殖因子1、インテグリンアルファ2、インテグリンアルファ3、インテグリンアルファ4、インテグリンアルファ4/ベータ1、インテグリンアルファ4/ベータ7、インテグリンアルファ5（アルファV）、インテグリンアルファ5/ベータ1、インテグリンアルファ5/ベータ3、インテグリンアルファ6、インテグリンベータ1、インテグリンベータ2、インターフェロンガンマ、IP-10、I-TAC、JE、カリクレイン2、カリクレイン5、カリクレイン6、カリクレイン11、カリクレイン12、カリクレイン14、カリクレイン15、カリクレインL1、カリクレインL2、カリクレインL3、カリクレインL4、KC、KDR、ケラチノサイト増殖因子（KGF）、ラミニン5、LAMP、LAP、LAP（TGF-1）、潜在的TGF-1、潜在的TGF-1 bp1、LBP、LDGF、LECT2、レフティ、ルイス-Y抗原、ルイス-Y関連抗原、LFA-1、LFA-3、Lfo、LIF、LIGHT、リポタンパク質、LIX、LKN、Lptn、L-セレクチン、LT-a、LT-b、LTB4、LTBP-1、肺表面、黄体形成ホルモン、リンホトキシンベータ受容体、Mac-1、MAdCAM、MAG、MAP2、MARC、MCAM、MCAM、MCK-2、MCP、M-CSF、MDC、Mer、METALLOPROTEASES、MGDF受容体、MGMT、MHC（HLA-DR）、MIF、MIG、MIP、MIP-1-アルファ、MK、MMAC1、MMP、MMP-1、MMP-10、MMP-11、MMP-12、MMP-13、MMP-14、MMP-15、MMP-2、MMP-24、MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-9、MPIF、Mpo、MSK、MSP、ムチン（Muc1）、MUC18、ミュラー管抑制物質、Mug、MuSK、NAIP、NAP、NCAD、N-Cアドヘリン、NCA 90、NCAM、NCAM、ネプリライシン、ニューロトロフィン-3、-4、または-6、ニューレルツリン、神経成長因子（NGF）、NGFR、NGF-ベータ、nNOS、NO、NOS、Npn、NRG-3、NT、NTN、OB、OGG1、OPG、OPN、OSM、OX40L、OX40R、p150、p95、PADPr、副甲状腺ホルモン、PARC、PARP、PBR、PBSF、PCAD、P-カドヘリン、PCNA、PDGF、PDGF、PDK-1、PECAM、PEM、PF4、PGE、PGF、PGI2、PGJ2、PIN、PLA2、胎盤性アルカリホスファターゼ（PLAP）、PlGF、PLP、PP14、プロインスリン、プロレラキシン、プロテインC、PS、PSA、PSCA、前立腺特異的膜抗原（PSMA）、PTEN、PTHrp、Ptk、PTN、R51、RANK、RANKL、RANTES、RANTES、レラキシンA鎖、レラキシンB鎖、レニン、呼吸器多核体ウイルス（RSV）F、RSV Fgp、Ret、リウマイド因子

、RLIP76、RPA2、RSK、S100、SCF/KL、SDF-1、SERINE、血清アルブミン、sFRP-3、Shh、SIGIRR、SK-1、SLAM、SLPI、SMAC、SMDF、SMOH、SOD、SPARC、Stat、STEAP、STEAP-II、TACE、TACI、TAG-72（腫瘍関連糖タンパク質-72）、TARC、TCA-3、T細胞受容体（例えば、T細胞受容体アルファ/ベータ）、TdT、TECK、TEM1、TEM5、TEM7、TEM8、TERT、睾丸PLAP様アルカリホスファターゼ、TfR、TGF、TGF-アルファ、TGF-ベータ、TGF-ベータ Pan Specific、TGF-ベータRI（ALK-5）、TGF-ベータRII、TGF-ベータRIIb、TGF-ベータRIII、TGF-ベータ1、TGF-ベータ2、TGF-ベータ3、TGF-ベータ4、TGF-ベータ5、トロンビン、胸腺Ck-1、甲状腺刺激ホルモン、Tie、TIMP、TIQ、組織因子、TMEFF2、Tmpo、TMPRSS2、TNF、TNF-アルファ、TNF-アルファベータ、TNF-ベータ2、TNFc、TNF-RI、TNF-RII、TNFRSF10A（TRAIL R1 Apo-2、DR4）、TNFRSF10B（TRAIL R2 DR5、KILLER、TRICK-2A、TRICK-B）、TNFRSF10C（TRAIL R3 DcR1、LIT、TRID）、TNFRSF10D（TRAIL R4 DcR2、TRUNDD）、TNFRSF11A（RANK ODF R、TRANCE R）、TNFRSF11B（OPG OCIF、TR1）、TNFRSF12（TWEAK R FN14）、TNFRSF13B（TACI）、TNFRSF13C（BAFF R）、TNFRSF14（HVEM ATAR、HveA、LIGHT R、TR2）、TNFRSF16（NGFR p75NTR）、TNFRSF17（BCMA）、TNFRSF18（GITR AITR）、TNFRSF19（TROY TAJ、TRADE）、TNFRSF19L（RELT）、TNFRSF1A（TNF RI CD120a、p55-60）、TNFRSF1B（TNF RII CD120b、p75-80）、TNFRSF26（TNF RH3）、TNFRSF3（LTbR TNF RIII、TNFC R）、TNFRSF4（OX40 ACT35、TXGP1 R）、TNFRSF5（CD40 p50）、TNFRSF6（Fas Apo-1、APT1、CD95）、TNFRSF6B（DcR3 M68、TR6）、TNFRSF7（CD27）、TNFRSF8（CD30）、TNFRSF9（4-1BB CD137、ILA）、TNFRSF21（DR6）、TNFRSF22（DcTRAIL R2 TNFRH2）、TNFRST23（DcTRAIL R1 TNFRH1）、TNFRSF25（DR3 Apo-3、LARD、TR-3、TRAMP、WSL-1）、TNFSF10（TRAIL Apo-2リガンド、TL2）、TNFSF11（TRANCE/RANKリガンド ODF、OPGリガンド）、TNFSF12（TWEAK Apo-3リガンド、DR3リガンド）、TNFSF13（APRIL TALL2）、TNFSF13B（BAFF BLYS、TALL1、THANK、TNFSF20）、TNFSF14（LIGHT HVEMリガンド、LTg）、TNFSF15（TL1A/VEGI）、TNFSF18（GITRリガンド AITRリガンド、TL6）、TNFSF1A（TNF-a コネクチン（Conectin）、DI

F、TNFSF2）、TNFSF1B（TNF-b LTa、TNFSF1）、TNFSF3（LTb TNFC、p33）、TNFSF4（OX40リガンド gp34、TXGP1）、TNFSF5（CD40リガンド CD154、gp39、HIGM1、IMD3、TRAP）、TNFSF6（Fasリガンド Apo-1リガンド、APT1リガンド）、TNFSF7（CD27リガンド CD70）、TNFSF8（CD30リガンド CD153）、TNFSF9（4-1BBリガンド CD137リガンド）、TP-1、t-PA、Tpo、TRAIL、TRAIL-R、TRAIL-R1、TRAIL-R2、TRANCE、トランスフェリン受容体、TRF、Trk、TROP-2、TLR（Toll-like receptor）1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、TSG、TSLP、腫瘍関連抗原CA125、腫瘍関連抗原発現ルイスY関連炭水化物、TWEAK、TXB2、Ung、uPAR、uPAR-1、ウロキナーゼ、VCAM、VCAM-1、VECAD、VE-Cadherin、VE-cadherin-2、VEFGR-1（flt-1）、VEGF、VEGFR、VEGFR-3（flt-4）、VEGI、VIM、ウイルス抗原、VLA、VLA-1、VLA-4、VNRインテグリン、フォン・ヴィレブランド因子、WIF-1、WNT1、WNT2、WNT2B/13、WNT3、WNT3A、WNT4、WNT5A、WNT5B、WNT6、WNT7A、WNT7B、WNT8A、WNT8B、WNT9A、WNT9A、WNT9B、WNT10A、WNT10B、WNT11、WNT16、XCL1、XCL2、XCR1、XCR1、XEDAR、XIAP、XPD、HMGB1、IgA、Aβ、CD81、CD97、CD98、DDR1、DKK1、EREG、Hsp90、IL-17/IL-17R、IL-20/IL-20R、酸化LDL、PCSK9、prekallikrein、RON、TMEM16F、SOD1、Chromogranin A、Chromogranin B、tau、VAP1、高分子キニノーゲン、IL-31、IL-31R、Nav1.1、Nav1.2、Nav1.3、Nav1.4、Nav1.5、Nav1.6、Nav1.7、Nav1.8、Nav1.9、EPCR、C1、C1q、C1r、C1s、C2、C2a、C2b、C3、C3a、C3b、C4、C4a、C4b、C5、C5a、C5b、C6、C7、C8、C9、factor B、factor D、factor H、properdin、sclerostin、fibrinogen、fibrin、prothrombin、thrombin、組織因子、factor V、factor Va、factor VII、factor VIIa、factor VIII、factor VIIIa、factor IX、factor IXa、factor X、factor Xa、factor XI、factor Xia、factor XII、factor XIIa、factor XIII、factor XIIIa、TFPI、antithrombin III、EPCR、トロンボモデュリン、TAPI、tPA、plasminogen、plasmin、PAI-1、PAI-2、GPC3、Syndecan-1、Syndecan-2、Syndecan-3、Syndecan-4、LPA、S1Pなどが挙げられる。いくつかの態様において、抗原としては、ホルモンおよび成長因子のための受容体などが挙

げられる。特定の態様において、抗原は、腫瘍組織に含まれる細胞（例えば腫瘍細胞、免疫細胞、間質細胞など）が発現または分泌する抗原である。

[0358] C．活性、組成物および方法

一態様において、本発明における細胞傷害活性としては、例えば抗体依存性細胞介在性細胞傷害（antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity：ADCC）活性、抗体依存性細胞貪食活性（antibody-dependent cellular phagocytosis; ADCP）、補体依存性細胞傷害（complement-dependent cytotoxicity：CDC）活性、およびT細胞による細胞傷害活性等が挙げられる。CDC活性とは補体系による細胞傷害活性を意味する。一方、ADCC活性とは、標的細胞の細胞表面に存在する抗原に抗原結合分子が結合し、さらに当該抗原結合分子にエフェクター細胞が結合することによって、当該エフェクター細胞が標的細胞に傷害を与える活性を意味する。目的の抗原結合分子がADCC活性を有するか否か、又はCDC活性を有するか否かは公知の方法により測定され得る（例えば、Current Protocols in Immunology, Chapter 7. Immunologic studies in humans、Coliganら編(1993)等）。

[0359] 一態様において、本発明における中和活性とは、何らかの生物学的活性に関与する分子に抗原結合分子が結合することによって、当該生物学的活性を阻害する活性をいう。いくつかの態様において、生物学的活性はリガンドとレセプターの結合によってもたらされる。特定の態様において、抗原結合分子が当該リガンドまたはレセプターに結合することによって、当該リガンドとレセプターの結合を阻害する。抗原結合分子が抗体である場合、このような中和活性を有する抗原結合分子は中和抗体と呼ばれる。ある被検物質の中和活性は、リガンドの存在下における生物学的活性をその被検物質の存在又は非存在下の条件の間で比較することにより測定され得る。

[0360] 一局面において、本発明は、化合物の濃度に応じて抗原結合活性が変化する抗原結合分子を製造する方法を提供する。化合物が標的組織特異的化合物の場合、本発明は、標的組織において特異的に作用する抗原結合分子を製造する方法を提供する。特定の態様において、標的組織は腫瘍組織である。化

合物が腫瘍組織特異的化合物の場合、本発明は、腫瘍の治療における使用のための抗原結合分子を製造する方法を提供する。いくつかの局面において、当該製造方法は、化合物の存在下における抗原結合活性が、化合物の非存在下における抗原結合活性と異なる抗原結合分子を選択する工程を含む。いくつかの局面において、当該製造方法は、高濃度の化合物の存在下における抗原結合活性が、低濃度の化合物の存在下における抗原結合活性と異なる抗原結合分子を選択する工程を含む。いくつかの態様において、当該製造方法は、(a) 化合物の存在下における抗原結合分子の抗原結合活性を得る工程、(b) 化合物の非存在下における抗原結合分子の抗原結合活性を得る工程、および(c)化合物の存在下における抗原結合活性が、化合物の非存在下における抗原結合活性と異なる抗原結合分子を選択する工程を含む。いくつかの態様において、当該製造方法は、(a) 高濃度の化合物の存在下における抗原結合分子の抗原結合活性を得る工程、(b) 低濃度の化合物の存在下における抗原結合分子の抗原結合活性を得る工程、および (c)高濃度の化合物の存在下における抗原結合活性が、低濃度の化合物の存在下における抗原結合活性と異なる抗原結合分子を選択する工程を含む。

[0361] さらなる局面において、本発明は、化合物の濃度が高まるにつれて抗原結合活性が増大する抗原結合分子を製造する方法を提供する。あるいは別の局面において、本発明は、化合物の濃度が高まるにつれて抗原結合活性が減少する抗原結合分子を製造する方法を提供する。当該製造方法は、化合物の存在下における抗原結合活性が、化合物の非存在下における抗原結合活性より高い抗原結合分子を選択する工程を含む。別の態様において、当該製造方法は、化合物の非存在下における抗原結合活性が、化合物の存在下における抗原結合活性より低い抗原結合分子を選択する工程を含む。別の局面において、当該製造方法は、化合物の非存在下における抗原結合活性が、化合物の存在下における抗原結合活性より高い抗原結合分子を選択する工程を含む。別の態様において、当該製造方法は、化合物の存在下における抗原結合活性が、化合物の非存在下における抗原結合活性より低い抗原結合分子を選択する

工程を含む。さらなる局面において、当該製造方法は、高濃度の化合物の存在下における抗原結合活性が、低濃度の化合物の存在下における抗原結合活性より高い抗原結合分子を選択する工程を含む。別の態様において、当該製造方法は、低濃度の化合物の存在下における抗原結合活性が、高濃度の化合物の存在下における抗原結合活性より低い抗原結合分子を選択する工程を含む。別の局面において、当該製造方法は、低濃度の化合物の存在下における抗原結合活性が、高濃度の化合物の存在下における抗原結合活性より高い抗原結合分子を選択する工程を含む。別の態様において、当該製造方法は、高濃度の化合物の存在下における抗原結合活性が、低濃度の化合物の存在下における抗原結合活性より低い抗原結合分子を選択する工程を含む。

[0362] 別の局面において、本発明は、高い血漿中滞留性を有する抗原結合分子を製造する方法を提供する。いくつかの態様において、当該製造方法は、化合物の濃度が高まるにつれて抗原結合活性が増大する抗原結合分子を製造する工程を含む。さらなる態様において、当該製造方法は、(a) 化合物の濃度が高まるにつれて抗原結合活性が増大する抗原結合分子を製造する工程、および (b) (a)で製造された抗原結合分子の血漿中滞留性を測定する工程を含む。特定の態様において、化合物は、標的組織特異的化合物である。さらなる態様において、化合物は、腫瘍組織特異的化合物である。本発明における抗原結合分子が高い血漿中滞留性を有しているかどうかの判断は、対照となる抗原結合分子との相対的な比較によって行うことができる。いくつかの態様において、標的組織特異的化合物の濃度が高まるにつれて抗原結合活性が増大する抗原結合分子は、対照となる抗原結合分子と比べて、高い血漿中滞留性を有する。一態様において、対照となる抗原結合分子は、化合物の濃度に依存した抗原結合活性を有していない抗原結合分子である。特定の態様において、化合物の濃度に依存した抗原結合活性を有していない抗原結合分子とは、当該化合物の存在下と非存在下における抗原結合活性の差が、例えば2倍より小さい、1.8倍より小さい、1.5倍より小さい、1.3倍より小さい、1.2倍より小さい、または1.1倍より小さい抗原結合分子を意味する。比較の観点か

らすると、本発明の抗原結合分子と、対照となる抗原結合分子とでは、十分量の化合物の存在下における抗原結合活性が互いに実質的に等しいことが望ましい。

[0363] 別の局面において、本発明は、低い血漿中抗原蓄積能を有する抗原結合分子を製造する方法を提供する。いくつかの態様において、当該製造方法は、化合物の濃度が高まるにつれて抗原結合活性が増大する抗原結合分子を製造する工程を含む。さらなる態様において、当該製造方法は、(a) 化合物の濃度が高まるにつれて抗原結合活性が増大する抗原結合分子を製造する工程、および (b) (a)で製造された抗原結合分子の血漿中抗原蓄積能を測定する工程を含む。特定の態様において、化合物は、標的組織特異的化合物である。さらなる態様において、化合物は、腫瘍組織特異的化合物である。本発明における抗原結合分子が低い血漿中抗原蓄積能を有しているかどうかの判断は、対照となる抗原結合分子との相対的な比較によって行うことができる。いくつかの態様において、標的組織特異的化合物の濃度が高まるにつれて抗原結合活性が増大する抗原結合分子は、対照となる抗原結合分子と比べて、低い血漿中抗原蓄積能を有する。一態様において、対照となる抗原結合分子は、化合物の濃度に依存した抗原結合活性を有していない抗原結合分子である。特定の態様において、化合物の濃度に依存した抗原結合活性を有していない抗原結合分子とは、当該化合物の存在下と非存在下における抗原結合活性の差が、例えば2倍より小さい、1.8倍より小さい、1.5倍より小さい、1.3倍より小さい、1.2倍より小さい、または1.1倍より小さい抗原結合分子を意味する。比較の観点からすると、本発明の抗原結合分子と、対照となる抗原結合分子とでは、十分量の化合物の存在下における抗原結合活性が互いに実質的に等しいことが望ましい。

[0364] いくつかの態様において、本発明の方法により製造される抗原結合分子の、化合物の濃度に依存した抗原結合活性の差は、例えば2倍以上、3倍以上、5倍以上、10倍以上、20倍以上、30倍以上、50倍以上、100倍以上、200倍以上、300倍以上、500倍以上、1×10^3倍以上、2×10^3倍以上、3×10^3倍以上、5×10

^{3}倍以上、1×10^{4}倍以上、2×10^{4}倍以上、3×10^{4}倍以上、5×10^{4}倍以上、または1×10^{5}倍以上である。

[0365] いくつかの態様において、抗原結合活性はKD（Dissociation constant：解離定数）値を用いて表してもよいし、kd（Dissociation rate constant：解離速度定数）値を用いて表してもよい。あるいは上述されたような、抗原結合分子への抗原の結合量を用いて表してもよい。あるいは別の態様において、抗原結合分子の細胞傷害活性や中和活性を抗原結合活性の代わりの指標として用いてもよい。

[0366] 特定の態様において、より高い方の抗原結合活性としては、例えば、KD値が9×10^{-7}M以下、8×10^{-7}M以下、7×10^{-7}M以下、6×10^{-7}M以下、5×10^{-7}M以下、4×10^{-7}M以下、3×10^{-7}M以下、2×10^{-7}M以下、1×10^{-7}M以下、9×10^{-8}M以下、8×10^{-8}M以下、7×10^{-8}M以下、6×10^{-8}M以下、5×10^{-8}M以下、4×10^{-8}M以下、3×10^{-8}M以下、2×10^{-8}M以下、1×10^{-8}M以下、9×10^{-9}M以下、8×10^{-9}M以下、7×10^{-9}M以下、6×10^{-9}M以下、5×10^{-9}M以下、4×10^{-9}M以下、3×10^{-9}M以下、2×10^{-9}M以下、1×10^{-9}M以下、あるいは、抗原の結合量が0.01以上、0.02以上、0.03以上、0.04以上、0.05以上、0.06以上、0.07以上、0.08以上、0.09以上、0.1以上、0.2以上、0.3以上、0.4以上、0.5以上、0.6以上、0.7以上、0.8以上、0.9以上、1以上などを挙げることができる。

[0367] 特定の態様において、より低い方の抗原結合活性としては、例えば、KD値が1×10^{-8}M以上、2×10^{-8}M以上、3×10^{-8}M以上、4×10^{-8}M以上、5×10^{-8}M以上、6×10^{-8}M以上、7×10^{-8}M以上、8×10^{-8}M以上、9×10^{-8}M以上、1×10^{-7}M以上、2×10^{-7}M以上、3×10^{-7}M以上、4×10^{-7}M以上、5×10^{-7}M以上、6×10^{-7}M以上、7×10^{-7}M以上、8×10^{-7}M以上、9×10^{-7}M以上、1×10^{-6}M以上、2×10^{-6}M以上、3×10^{-6}M以上、4×10^{-6}M以上、5×10^{-6}M以上、6×10^{-6}M以上、7×10^{-6}M以上、8×10^{-6}M以上、9×10^{-6}M以上、あるいは、抗原の結合量が0.5以下、0.4以下、0.3以下、0.2以下、0.1以下、0.09以下、0.08以下、0.07以下、0.06以下、0.05以下、0.04以下、0.03以下、0.02以下、0.01以下、0.009以下、0.008以下、0.007以下、0.006以下、0.005以下、0.004以下、0.003以下、0.002以下、0.001以下などを

挙げることができる。

[0368] 化合物の濃度としては、抗原結合分子の結合活性に差が検出される限り、任意の濃度を選択することができる。例示的な濃度（高濃度および低濃度）が本明細書中に挙げられている。特定の態様において、高濃度としては、例えば1 μMまたはそれより高い濃度、3 μMまたはそれより高い濃度、10 μMまたはそれより高い濃度、30 μMまたはそれより高い濃度、100 μMまたはそれより高い濃度、300 μMまたはそれより高い濃度、1 mMまたはそれより高い濃度を挙げることができる。あるいは、それぞれの抗原結合分子が最大の結合活性を示すような十分量をここでの高濃度とすることもできる。特定の態様において、低濃度としては、例えば1 mMまたはそれより低い濃度、300 μMまたはそれより低い濃度、100 μMまたはそれより低い濃度、30 μMまたはそれより低い濃度、10 μMまたはそれより低い濃度、3 μMまたはそれより低い濃度、1 μMまたはそれより低い濃度などを挙げることができる。あるいは、それぞれの抗原結合分子が最小の結合活性を示す際の濃度をここでの低濃度とすることもできる。実質的な濃度がゼロ（化合物の非存在下）の場合を、低濃度の一態様とすることもできる。

[0369] さらなる局面において、当該製造方法は、化合物の存在下における抗原結合活性が、化合物の非存在下における抗原結合活性と異なる抗原結合分子を、抗原結合分子のライブラリから選択する工程を含む。抗原結合分子のライブラリは、抗原結合分子のレパートリーにバイアスがかけられていないライブラリ（ナイーブライブラリー）であってもよいし、バイアスがかけられたライブラリであってもよい。後者のライブラリの例としては、所定の化合物に対する結合能が予め付与された抗原結合分子のライブラリを挙げることができる。特定の態様において、抗原結合分子のライブラリは、所定の化合物に対する結合能を付与するためのアミノ酸改変が予め導入されている抗原結合分子のライブラリである。そのようなライブラリの例として、例えば、国際公開WO2015/083764に記載のライブラリが参照され得る。

[0370] 特定の態様において、当該製造方法は、さらに（d）(c)で選択された抗原

結合分子をコードする核酸を得る工程、(e)(d)に記載の核酸を宿主細胞に導入する工程、および(f)抗原結合分子が発現するように(e)に記載の細胞を培養する工程を含む。(d)に記載の核酸は、一以上の核酸であってもよく、また一以上のベクター(例えば、発現ベクター)に含まれていてもよい。特定の態様において、当該製造方法は、さらに(g)(f)に記載の細胞培養物から抗原結合分子を回収する工程を含む。

[0371] 本発明の製造方法によって製造された抗原結合分子も、本発明に含まれる。

[0372] さらなる局面において、本発明は、本明細書で提供される抗原結合分子を含む、薬学的製剤を提供する。一態様において、前記の薬学的製剤は、さらに薬学的に許容される担体を含む。さらなる態様において、本発明は、腫瘍の治療における使用のための薬学的製剤を提供する。

[0373] さらなる局面において、本発明は、本明細書で提供される抗原結合分子を、薬学的に許容される担体と混合する工程を含む、薬学的製剤を製造する方法を提供する。さらなる態様において、本発明は、腫瘍の治療における使用のための薬学的製剤を製造する方法を提供する。

[0374] 一態様において、本明細書で提供される抗原結合分子が生体内に投与された場合、当該抗原結合分子は、非腫瘍組織に比べて、腫瘍組織においてより強い抗原結合活性を示す。このような反応の違いは、当該抗原結合分子の全ての用量で観察される必要はなく、ある特定の範囲の用量で観察されればよい。別の態様において、非腫瘍組織に比べて、腫瘍組織において標的となる細胞(抗原を発現する細胞)がより強く傷害される。別の態様において、非腫瘍組織に比べて、腫瘍組織においてより低い用量で標的となる細胞が傷害される。あるいは別の態様において、副作用が観察されるよりも低い用量で、治療効果が観察される。ここでの治療効果とは抗腫瘍効果(例えば、腫瘍の退縮、腫瘍細胞に対する細胞死の誘導あるいは増殖抑制など)の発現であり、副作用とは正常組織における有害事象(例えば、正常組織への傷害など)の発生である。

[0375] 一態様において、本明細書で提供される抗原結合分子によってもたらされる医薬品としての効果の程度は、化合物依存的な（すなわち、化合物の濃度に応じて変化する）抗原結合活性を有しているか否かによって異なる。いくつかの態様において、本発明の抗原結合分子は、化合物の濃度が高まるにつれて抗原結合活性が増大する抗原結合分子である。いくつかの態様において、対照となる抗原結合分子は、化合物の濃度に依存した抗原結合活性を有していない抗原結合分子である。特定の態様において、化合物は腫瘍組織特異的化合物である。特定の態様において、化合物の濃度に依存した抗原結合活性を有していない抗原結合分子とは、当該化合物の存在下と非存在下における抗原結合活性の差が、例えば2倍より小さい、1.8倍より小さい、1.5倍より小さい、1.3倍より小さい、1.2倍より小さい、または1.1倍より小さい抗原結合分子を意味する。本発明の抗原結合分子と、対照となる抗原結合分子とでは、十分量の化合物の存在下における抗原結合活性が互いに実質的に等しいことが望ましい。

[0376] 一態様において、本発明の抗原結合分子と対照となる抗原結合分子とでは、それぞれによってもたらされる医薬品としての効果が異なる。特定の態様において、化合物の濃度が低い組織において、医薬品としての効果が異なる。化合物の濃度が低い組織として、例えば正常組織などの非腫瘍組織が挙げられる。抗原結合分子は、それを含む薬学的製剤として提供され得る。いくつかの態様において、化合物の濃度が低い組織においては、対照の抗原結合分子と比較して、本発明の抗原結合分子では、標的となる細胞（抗原を発現する細胞）を傷害する活性が低い。いくつかの態様において、化合物の濃度が低い組織においては、対照の抗原結合分子と比較して、本発明の抗原結合分子では、細胞を傷害するために必要な用量が高い。いくつかの態様において、化合物の濃度が低い組織においては、対照の抗原結合分子と比較して、本発明の抗原結合分子では、副作用のレベルが低い。いくつかの態様において、化合物の濃度が低い組織においては、対照の抗原結合分子と比較して、本発明の抗原結合分子では、副作用が観察される際の用量が高い。このよう

な反応の違いは、全ての組織（例えば、化合物の濃度が低い全ての組織）で観察される必要はなく、いくつかの組織で観察されればよい。特定の態様において、副作用とは正常組織における有害事象（例えば、正常組織への傷害など）である。

[0377] 一態様において、本発明の抗原結合分子と、対照となる抗原結合分子とでは、それぞれによってもたらされる医薬品としての効果が実質的に等しい。特定の態様において、化合物の濃度が高い組織において、医薬品としての効果が実質的に等しい。化合物の濃度が高い組織として、例えば腫瘍組織が挙げられる。抗原結合分子は、それを含む薬学的製剤として提供され得る。いくつかの態様において、化合物の濃度が高い組織においては、本発明の抗原結合分子と対照の抗原結合分子とでは、標的となる細胞（抗原を発現する細胞）を傷害する活性が実質的に等しい。いくつかの態様において、化合物の濃度が高い組織においては、本発明の抗原結合分子と対照の抗原結合分子とでは、細胞を傷害するために必要な用量が実質的に等しい。いくつかの態様において、化合物の濃度が高い組織においては、本発明の抗原結合分子と対照の抗原結合分子とでは、治療効果のレベルが実質的に等しい。いくつかの態様において、化合物の濃度が高い組織においては、本発明の抗原結合分子と対照の抗原結合分子とでは、治療効果が観察される際の用量が実質的に等しい。特定の態様において、治療効果とは抗腫瘍効果（例えば、腫瘍の退縮、腫瘍細胞に対する細胞死の誘導あるいは増殖抑制など）である。

[0378] さらなる局面において、医薬品としての使用のための抗原結合分子が提供される。さらなる局面において、腫瘍の治療における使用のための抗原結合分子が提供される。さらなる局面において、医薬品の製造における抗原結合分子の使用が提供される。さらなる局面において、腫瘍を治療するための抗原結合分子の使用が提供される。さらなる局面において、腫瘍を治療する方法であって、腫瘍を有する個体に抗原結合分子の有効量を投与する工程を含む方法が提供される。上記態様の任意のものによる「個体」は、好適にはヒトである。

＜ATP濃度を測定する方法＞

[0379] 一局面において、本発明は、溶液中におけるATP濃度を測定する方法を提供する。いくつかの態様において、前記の方法は、(a) P2Y受容体を発現するsplit Luc/HEK293細胞を当該溶液に接触させる工程、および (b) 当該細胞内のルシフェラーゼ活性を測定する工程を含む。P2Y受容体は、細胞外のプリンヌクレオチド（ATP、ADP）、ピリミジンヌクレオチド（UTP、UDP）、糖ヌクレオチドなどを内因性リガンドとする細胞表面受容体であって、7回膜貫通型のGタンパク質共役型受容体（GPCR)である。さらなる態様において、P2Y受容体は、P2Y1 (Accession No. U42029)、P2Y2 (Accession No. U07225)、P2Y4 (Accession No. X91852)、P2Y6 (Accession No. X97058)、P2Y11 (Accession No. AF030335)、P2Y12 (Accession No. AJ320495)、P2Y13 (Accession No. AF295368)、P2Y14 (Accession No. D13626) のいずれかである。特定の態様において、P2Y受容体は、P2Y11 (Accession No. AF030335) である。split Luc/HEK293細胞は、ProbeX社保有のスプリットルシフェラーゼ技術を用いて作製された組換え細胞であり (Misawa et al., Anal. Chem. (2010) 82, 2552-2560)、以下の２つのタンパク質を発現している：(i) P2Y受容体のC末端に、ルシフェラーゼ分子を２分割したうちのC末端側の断片が連結した融合タンパク質、および (ii) βアレスチン (Accession No. NM_004313) のN末端に、ルシフェラーゼ分子を２分割したうちのN末端側の断片が連結した融合タンパク質。

[0380] P2Y受容体を発現するsplit Luc/HEK293細胞にATPを添加すると、細胞膜近傍においてP2Y受容体とβアレスチンの相互作用が起こり、その結果、分割されたルシフェラーゼが会合して、活性なルシフェラーゼ分子が細胞内で再構成される。ルシフェラーゼの活性は、例えばルシフェリンなどのルシフェラーゼ基質を用いて測定することができる。いくつかの態様において、前記の方法は、ルシフェラーゼ基質を含む溶液を当該細胞に接触させる工程をさらに含む。ルシフェラーゼ基質を含む溶液は、工程(a)の前に当該細胞に接触させてもよいし、工程(a)の後に当該細胞に接触させてもよい。

[0381] いくつかの態様において、ATP濃度が測定される溶液は、in vitroの溶液であってもよいし、in vivoの組織中における体液であってもよい。さらなる態様において、体液は、血液、リンパ液、組織液（組織間液、細胞間液、間質液）、体腔液（漿膜腔液、胸水、腹水、心嚢液）、脳脊髄液（髄液）、関節液（滑液）、眼房水（房水）からなる群より選択され得る。特定の態様において、体液は、細胞間液である。別の態様において、組織は健常組織／正常組織であってもよいし、疾患組織（例えば、腫瘍組織など）であってもよい。一態様において、前記の方法が、in vivo組織中の体液におけるATP濃度を測定する方法である場合、工程(i)は、P2Y受容体を発現するsplit Luc/HEK293細胞をin vivoの組織中に移植する工程であってもよい。

[0382] いくつかの態様において、ルシフェラーゼ活性は、それがルシフェリンなどの基質と反応する際に発する光を検出することによって測定することができる。溶液がin vitroの溶液である場合、そのような発光は、プレートリーダーなどの発光検出用機器を用いて測定することができる。溶液がin vivoの組織中における体液である場合、そのような発光は、in vivo発光イメージング装置などを用いて測定することができる。測定値の定量化は、例えば当業者周知の方法として、既定濃度のATPを含む溶液を測定して、ATP濃度と発光量との相関を示す検量線を作成することで行うことができる。

[0383] <u>Ｖ．スクリーニング方法</u>

（１） 多価な抗原を利用した分子化合物に依存した抗原結合活性を有する抗原結合ドメインまたは抗原結合分子のスクリーニング方法

一局面において、本開示は、１分子（１単位）の融合パートナー分子に、２分子（２単位）以上の抗原をを融合させて得られる融合分子を用いて、分子化合物に依存した抗原結合活性を有する抗原結合ドメインまたは抗原結合分子を高効率、高精度にスクリーニング、同定、取得する方法を提供する。

一態様において、本開示の方法は、分子化合物に依存した抗原結合活性を有する抗原結合ドメインまたは抗原結合分子のスクリーニング方法は、

(a) 低分子化合物の存在下において、融合パートナー分子1単位あたり2単位

以上の抗原を融合した融合分子に、抗原結合ドメイン若しくは抗原結合分子またはそれらのライブラリを接触させ、

(b) 前記工程(a)で該融合分子中の抗原と結合した抗原結合ドメインまたは抗原結合分子を当該化合物の非存在下または低濃度存在下に置き、および

(c) 前記工程(b)で解離した抗原結合ドメインまたは抗原結合分子を単離する、

ことを含むことを特徴とする。

[0384] 一態様において、斯かる本開示の方法においては、２分子（２単位）以上の抗原を融合させる融合パートナー分子は、二量体のFc領域であることを特徴とする。

一態様において、斯かる本開示の方法においては、該Fc領域は、第一のFcサブユニット及び第二のFcサブユニットを含み、第一及び第二のFcサブユニットのそれぞれに抗原一つずつ融合されていることを特徴とする。

一態様において、斯かる本開示の方法においては、該抗原は、第一及び第二のFcサブユニットのN末端に一つずつ融合されていることを特徴とする。

一態様において、斯かる本開示の方法においては、該抗原結合ドメインまたは抗原結合分子のライブラリが、ファージライブラリであることを特徴とする。

一態様において、斯かる本開示の方法においては、該ファージライブラリに含まれるファージは、2以上の抗原結合ドメインまたは抗原結合分子をその表面に提示するファージであることを特徴とする。

一態様において、斯かる本開示の方法においては、該ファージライブラリに含まれるファージは、ヘルパーファージ由来pIII遺伝子に欠損を有するファージであることを特徴とする。

[0385] 一態様において、斯かる本開示の方法においては、抗原は、上述したとおりの任意の抗原であっても良く、例えば、前述の「ＩＶ．組成物および方法（化合物の濃度に応じて抗原に対する結合活性が変化する抗原結合分子）、Ｂ．抗原」に記載されている各種の「抗原」を挙げることができる。一態様

において、好ましくは膜型抗原（例えば、CD137、CTLA4、CD40、OX40、RANK、GITR、ICOSなどの副刺激分子）を挙げることができる。

一態様において、斯かる本開示の方法においては、Fc領域（Fcサブユニット）と抗原との融合は、上述したとおりの遺伝子組み換え技術を用いて常法により作製することができる。

[0386] 一態様において、斯かる本開示の方法においては、該低分子化合物は、上述したとおりの種々の化合物（例えば、アデノシン（ADO）、アデノシン3リン酸（ATP）、アデノシン2リン酸（ADP）、アデノシン1リン酸（AMP）、イノシン、さらには、市販のADPbetaS（Sigma製）等のプリン環構造を有するヌクレオシド、アラニン、グルタミン酸、アスパラギン酸等のアミノ酸、キヌレニン、アントラニル酸、3-ヒドロキシキヌレニン、キヌレン酸等のアミノ酸の代謝産物、プロスタグランジンE2等のアラキドン酸の代謝産物、乳酸、コハク酸、クエン酸等の解糖系またはクレブス回路の一次代謝産物、1－メチルニコチンアミド等のニコチンアミドの代謝産物、等の腫瘍組織特異的化合物）を挙げることができる。

一態様において、斯かる本開示の方法においては、抗原（例えば、Fc領域と抗原との融合分子）の、抗原結合ドメインまたは抗原結合分子のファージライブラリーへの接触、抗原に結合した抗原結合ドメインまたは抗原結合分子の単離、単離された抗原結合ドメインまたは抗原結合分子の低分子化合物の存在下または非存在下でのアッセイは、上述した方法および以下の実施例に記載される方法に従い、本願発明の属する技術分野で公知の方法を参照しながら行うことができる。

一態様において、斯かる本開示の方法は、実施例２に記載される方法を挙げることができる。

[0387] （２） ２以上の異なる低分子化合物に依存した抗原結合活性を有する抗原結合ドメインまたは抗原結合分子のスクリーニング方法

一局面において、本開示は、２以上の異なる低分子化合物に依存した抗原結合活性を有する抗原結合ドメインまたは抗原結合分子のスクリーニング方

法を提供する。

一態様において、本開示の方法は、

(a) 第1の低分子化合物の存在下において、抗原に、抗原結合ドメイン若しくは抗原結合分子またはそれらのライブラリを接触させ、

(b) 前記工程(a)で抗原に結合した抗原結合ドメインまたは抗原結合分子を当該第1の化合物の非存在下または低濃度存在下に置き、

(c) 前記工程(b)で解離した抗原結合ドメインまたは抗原結合分子を単離する工程、

(d) 前記工程(c)で単離された抗原結合ドメインまたは抗原結合分子を、第2の低分子化合物の存在下において、前記抗原に接触させ、

(e) 前記工程(d)で抗原に結合した抗原結合ドメインまたは抗原結合分子を当該第2の化合物の非存在下または低濃度存在下に置き、

(f) 前記工程(e)で解離した抗原結合ドメインまたは抗原結合分子を単離する、

ことを含み、前記(c)および(d)の間に、前記(c)で単離された抗原結合ドメインまたは抗原結合分子をコードする遺伝子を増幅することを含まない、

ことを特徴とする

[0388] 一態様において、斯かる本開示の方法においては、該抗原結合ドメインまたは抗原結合分子のライブラリが、ファージライブラリであることを特徴とする。

一態様において、斯かる本開示の方法においては、抗原は、上述したとおりの任意の抗原であっても良く、好ましくは膜型抗原（例えば、CD137、CTLA4、CD40、OX40、RANK、GITR、ICOSなどの副刺激分子）を挙げることができる。

一態様において、斯かる本開示の方法においては、該低分子化合物は、上述したとおりの種々の化合物（例えば、アデノシン（ADO）、アデノシン3リン酸（ATP）、アデノシン2リン酸（ADP）、アデノシン1リン酸（AMP）、イノシン等のプリン環構造を有するヌクレオシド、アラニン、グルタミン酸、ア

スパラギン酸等のアミノ酸、キヌレニン、アントラニル酸、3-ヒドロキシキヌレニン、キヌレン酸等のアミノ酸の代謝産物、プロスタグランジンE2等のアラキドン酸の代謝産物、乳酸、コハク酸、クエン酸等の解糖系またはクレブス回路の一次代謝産物、1－メチルニコチンアミド等のニコチンアミドの代謝産物、等の腫瘍組織特異的化合物）を挙げることができる。

[0389] 一態様において、斯かる本開示の方法においては、該第１の低分子化合物および第２の低分子化合物は、上記の種々の低分子化合物から選択された任意の2種類の異なる化合物であり得る。

一態様において、斯かる本開示の方法においては、抗原の、抗原結合ドメインまたは抗原結合分子のファージライブラリーへの接触、抗原に結合した抗原結合ドメインまたは抗原結合分子の単離、単離された抗原結合ドメインまたは抗原結合分子の第1の低分子化合物の存在下または非存在下でのアッセイ、および第２の低分子化合物の存在下または非存在下でのアッセイは、上述した方法および以下の実施例に記載される方法に従い、本願発明の属する技術分野で公知の方法を参照しながら行うことができる。

一態様において、斯かる本開示の方法は、実施例９に記載される方法を挙げることができる。

[0390] （３） ナイーブライブラリーを用いた低分子化合物に依存した抗原結合活性を有する抗原結合ドメインまたは抗原結合分子のスクリーニング方法

一局面において、本開示は、抗原刺激を受けたことのないヒトリンパ球（例えば、ヒトPBMC）から作製した互いに異なるヒト抗体配列の抗原結合ドメインまたは抗原結合分子（例えば、Fabドメイン）を提示する複数のファージからなるナイーブライブラリ（naive library）を用いて、低分子化合物に依存した抗原結合活性を有する抗原結合ドメインまたは抗原結合分子のスクリーニング方法を提供する。

一態様において、本開示の方法は、

(a) 低分子化合物の存在下において、抗原に、抗原結合ドメインまたは抗原結合分子のナイーブライブラリを接触させ、

(b) 前記工程(a)で抗原に結合した抗原結合ドメインまたは抗原結合分子を当該化合物の非存在下または低濃度存在下に置き、および

(c) 前記工程(b)で解離した抗原結合ドメインまたは抗原結合分子を単離する、

ことを含むことを特徴とする。

一態様において、斯かる本開示の方法においては、該ナイーブライブラリは、２以上の抗原結合ドメインまたは抗原結合分子をその表面に提示するファージを含むファージライブラリであることを特徴とする。

一態様において、斯かる本開示の方法においては、該ナイーブライブラリは、ヘルパーファージ由来pIII遺伝子に欠損を有するファージを含むライブラリであることを特徴とする

[0391] 一態様において、斯かる本開示の方法においては、該ナイーブライブラリは、抗原結合ドメインまたは抗原結合分子の発現を、該抗原結合ドメインまたは抗原結合分子の発現を制御しているプロモーターからの発現量を上昇させる低分子添加物によって増大させて調製されたファージを含むライブラリであるであることを特徴とする。

一態様において、斯かる本開示の方法においては、該低分子添加物は、イソプロピル-β-チオガラクトピラノシド（IPTG）またはarabinoseであることを特徴とする。

一態様において、斯かる本開示の方法においては、抗原は、上述したとおりの任意の抗原であっても良く、好ましくは膜型抗原（例えば、CD137、CTLA4、CD40、OX40、RANK、GITR、ICOSなどの副刺激分子）を挙げることができる。

[0392] 一態様において、斯かる本開示の方法においては、該低分子化合物は、上述したとおりの種々の化合物（例えば、アデノシン（ADO）、アデノシン3リン酸（ATP）、アデノシン2リン酸（ADP）、アデノシン1リン酸（AMP）、イノシン等のプリン環構造を有するヌクレオシド、アラニン、グルタミン酸、アスパラギン酸等のアミノ酸、キヌレニン、アントラニル酸、3-ヒドロキシキ

ヌレニン、キヌレン酸等のアミノ酸の代謝産物、プロスタグランジンE2等のアラキドン酸の代謝産物、乳酸、コハク酸、クエン酸等の解糖系またはクレブス回路の一次代謝産物、1－メチルニコチンアミド等のニコチンアミドの代謝産物、等の腫瘍組織特異的化合物）を挙げることができる。

一態様において、斯かる本開示の方法においては、抗原の、抗原結合ドメインまたは抗原結合分子のファージライブラリへの接触、抗原に結合した抗原結合ドメインまたは抗原結合分子の単離、単離された抗原結合ドメインまたは抗原結合分子の低分子化合物の存在下または非存在下でのアッセイは、上述した方法および以下の実施例に記載される方法に従い、本願発明の属する技術分野で公知の方法を参照しながら行うことができる。

一態様において、斯かる本開示の方法は、実施例１０に記載される方法を挙げることができる。

実施例

[0393] 以下は、本開示の方法および組成物の実施例である。上述の一般的な記載に照らし、種々の他の態様が実施され得ることが、理解されるであろう。

[0394] 実施例1：抗原の調製

(1-1) ヒトCD137細胞外領域の調製

ヒトCD137細胞外領域（hCD137とも呼ぶ）は当業者公知の方法で調製された。具体的には、ヒトCD137の細胞外領域をコードする遺伝子断片の下流にヒスチジンタグをコードする遺伝子断片とビオチンが付加される特異的な配列（AviTag配列、配列番号：86）をコードする遺伝子断片が連結された。ヒトCD137の細胞外領域、ヒスチジンタグとAvitagが連結されたタンパク質（ヒトCD137またはhCD137-HisBAP、配列番号：87）をコードする遺伝子断片が動物細胞発現用ベクターに組み込まれた。構築されたプラスミドベクターは293フェクチン（Invitrogen）を用いてFreeStyle293細胞（Invitrogen)に導入された。このときEBNA1（配列番号：88）を発現する遺伝子を含むプラスミドベクターが同時に導入された。前述の手順に従って遺伝子が導入された細胞が37℃、8％ CO_2で培養され、目的のタンパク質（ヒトCD137細胞外領域）が培養上清中に

分泌された。この細胞培養液が0.22μmフィルターでろ過され、培養上清が得られた。

培養上清はHisTrap-HP(GE healthcare)にアプライされ、ヒトCD137細胞外領域がカラムに結合された。20mMリン酸ナトリウム、500mM塩化ナトリウム、500mMイミダゾール、pH7.5溶液を用いてヒトCD137細胞外領域が溶出された。次に、Superdex 200 26/600 (GE healthcare)を用いたゲルろ過クロマトグラフィーによって会合体が除去され、精製ヒトCD137細胞外領域が得られた。

ヒトCD137の濃度は、配列番号：８７から推測されるシグナルシークエンスを除いたアミノ酸配列（配列番号：183）をもとにPaceらの方法で算出した。（Pace, C.N., et al. Protein Science 1995; 4; 2411-2423)

[0395] (1-2) ヒトCD137細胞外領域 (hCD137(FXa digested)) の調製

ヒトCD137細胞外領域（hCD137(FXa digested)とも呼ぶ）は当業者公知の方法で調製された。具体的には、ヒトCD137の細胞外領域をコードする遺伝子断片の下流にFactor Xa切断配列をコードする遺伝子断片と抗体の定常領域をコードする遺伝子断片が連結された。ヒトCD137の細胞外領域、FactorXa切断配列と抗体定常領域が連結されたタンパク質（hCD137-F-Fc、配列番号：89）をコードする遺伝子断片が動物細胞発現用ベクターに組み込まれた。構築されたプラスミドベクターが293フェクチン（Invitrogen）を用いてFreeStyle293細胞（Invitrogen)に導入された。このときEBNA1（配列番号：88）を発現する遺伝子を含むプラスミドベクターが同時に導入された。前述の手順に従って遺伝子が導入された細胞が37℃、8% CO_2で培養され、hCD137-F-Fcが培養上清中に分泌された。この細胞培養液は0.22μmフィルターでろ過され、培養上清が回収された。

[0396] 培養上清がProtein A（MabSelect SuRe、GEヘルスケア）が充填されているカラムにアプライされた。hCD137-F-Fcがカラムに結合され、50mM酢酸溶液で溶出された。溶出液が1MTris-HCl, pH8.0で中和されたあと、hCD137-F-Fcの溶媒が20mMTris, 100mM 塩化ナトリウム、2mM塩化カルシウム、pH8.0に置換された。次に、Factor Xa Protease(NEW ENGLAND BioLabs, Cat#.P8010L)が

添加され、hCD137-F-Fcが消化された。その後プロテアーゼ阻害剤（DNS-GGACK, calbiochem, Cat#251700）が添加されて反応が停止された。プロテアーゼ反応液に5M塩化ナトリウムが添加され、調製された溶液全量がHiTrap Benzamidine（GEヘルスケア, Cat# 17-5143-01）にアプライされた。カラムを通った溶液がさらにProtein A（MabSelect SuRe、GEヘルスケア）カラムにアプライされ、パス画分が回収された。パス画分はSuperdex 200 Increase、10/30(GEヘルスケア、Cat#28990944)を用いたゲルろ過クロマトグラフィーによって会合体が除去され、精製ヒトCD137細胞外領域が得られた。

[0397] (1-3) ビオチン化Fc融合型ヒトCD137の調製

ビオチン化Fc融合型ヒトCD137（「ビオチン化hCD137-Fc」または「bio-hCD137-Fc」、hCD137-Fc-Bioとも呼ぶ）は当業者公知の方法で調製された。具体的には、ヒトCD137の細胞外領域をコードする遺伝子断片の下流に抗体の定常領域をコードする遺伝子断片とビオチンが付加される特異的な配列（AviTag配列、配列番号：86）をコードする遺伝子断片が連結された。ヒトCD137の細胞外領域、抗体の定常領域とAvitagが連結されたタンパク質（Fc融合型ヒトCD137、配列番号：90）をコードする遺伝子断片が動物細胞発現用ベクターに組み込まれた。構築されたプラスミドベクターは293フェクチン（Invitrogen）を用いてFreeStyle293細胞（Invitrogen)に導入された。このときEBNA1（配列番号：88）を発現する遺伝子およびビオチンリガーゼ（BirA、配列番号：91）を発現する遺伝子が同時に導入され、さらにFc融合型ヒトCD137をビオチン化する目的でビオチンが添加された。前述の手順に従って遺伝子が導入された細胞が37℃、8% CO_2で培養され、目的のタンパク質（ビオチン化Fc融合型ヒトCD137）が培養上清中に分泌された。この細胞培養液は0.22μmフィルターでろ過され、培養上清が得られた。

培養上清はProtein A（MabSelect SuRe、GEヘルスケア）が充填されているカラムにアプライされ、ビオチン化Fc融合型ヒトCD137がカラムに結合された。50mM酢酸溶液を用いてビオチン化Fc融合型ヒトCD137が溶出された。次に、Superdex 200、26/600（GE healthcare)を用いたゲルろ過クロマトグラフィ

ーによって会合体が除去され、精製ビオチン化Fc融合型ヒトCD137が得られた。

[0398] (1-4) Fc融合型ヒトCD137の調製

Fc融合型ヒトCD137（hCD137-Fcとも呼ぶ）は当業者公知の方法で調製された。具体的には、ヒトCD137の細胞外領域をコードする遺伝子断片の下流に抗体の定常領域をコードする遺伝子断片とビオチンが付加される特異的な配列（AviTag配列、配列番号：86）をコードする遺伝子断片が連結された。ヒトCD137の細胞外領域、抗体の定常領域とAvitagが連結されたタンパク質（Fc融合型ヒトCD137、配列番号：90）をコードする遺伝子断片が動物細胞発現用ベクターに組み込まれた。構築されたプラスミドベクターは293フェクチン（Invitrogen）を用いてFreeStyle293F細胞（Invitrogen)に導入された。このときEBNA1（配列番号：88）を発現する遺伝子を発現する遺伝子が同時に導入された。前述の手順に従って遺伝子が導入された細胞が37℃、8% CO_2で培養され、目的のタンパク質（Fc融合型ヒトCD137）が培養上清中に分泌された。この細胞培養液は0.22μmフィルターでろ過され、培養上清が得られた。

培養上清はProtein A（MabSelect SuRe、GEヘルスケア）が充填されているカラムにアプライされ、Fc融合型ヒトCD137がカラムに結合された。50mM酢酸溶液を用いてFc融合型ヒトCD137が溶出された。次に、Superdex 200、26/600（GE healthcare)を用いたゲルろ過クロマトグラフィーによって会合体が除去され、精製Fc融合型ヒトCD137が得られた。

[0399] (1-5) ビオチン化Fc融合型サルCD137の調製

ビオチン化Fc融合型サルCD137（「cyCD137-Fc-BAP」とも呼ぶ）は当業者公知の方法で調製された。具体的には、サルCD137の細胞外領域をコードする遺伝子断片の下流に抗体の定常領域をコードする遺伝子断片とビオチンが付加される特異的な配列（AviTag配列、配列番号：86）をコードする遺伝子断片が連結された。サルCD137の細胞外領域、抗体の定常領域とAvitagが連結されたタンパク質（Fc融合型サルCD137、配列番号：92）をコードする遺伝子断片が動物細胞発現用ベクターに組み込まれた。

構築されたプラスミドベクターが、293フェクチン（Invitrogen）を用いてFreeStyle293細胞（Invitrogen)に導入された。このときEBNA1（配列番号：88）を発現する遺伝子およびビオチンリガーゼ（BirA、配列番号：91）を発現する遺伝子が同時に導入され、さらにFc融合型サルCD137をビオチン標識する目的でビオチンが添加された。前述の手順に従って遺伝子が導入された細胞が37℃、8% CO_2で培養され、目的のタンパク質（ビオチン化Fc融合型サルCD137）が培養上清中に分泌された。この細胞培養液は0.22μmフィルターでろ過され、培養上清が得られた。

培養上清はProtein A（MabSelect SuRe、GEヘルスケア）が充填されているカラムにアプライされ、ビオチン化Fc融合型サルCD137がカラムに結合された。50mM酢酸溶液を用いてビオチン化Fc融合型サルCD137が溶出された。次に、Superdex 200 increase 10/300 (GE healthcare)を用いたゲルろ過クロマトグラフィーによって会合体が除去され、精製ビオチン化Fc融合型サルCD137が得られた。

[0400] 実施例2：ATP依存性CD137抗体の取得

(2-1) ATPを利用したラショナルデザインライブラリからの、低分子に依存的な抗原結合活性を有する抗体（低分子スイッチ抗体）の取得(1)

(2-1-1) パンニング

先行特許WO2015/083764において構築されたラショナルデザイン抗体ファージディスプレイライブラリから、アデノシン3リン酸（adenosine 5'-triphosphate; ATP）存在下で抗原に対する結合活性を示す抗体が取得された。なお、低分子依存的な抗原（例えばCD137）結合活性を有する抗体は、「スイッチ抗体」または「低分子スイッチ抗体」と呼称され、ATP依存的な抗原（例えばCD137）結合活性を有する抗体は「スイッチ抗体」または「ATPスイッチ抗体」と呼称されることがある。取得のために、ATP存在下でビーズに捕捉された抗原に対して結合活性を示す抗体を提示しているファージが回収された。その後、ATPの非存在下でビーズから溶出された溶出液からファージが回収された。

[0401] 構築されたファージディスプレイ用ファージミドを保持する大腸菌からファージが一般的な方法で産生された。具体的には、構築されたファージミドベクターを保持する大腸菌に対して、M13KO7ΔpIII（「ハイパーファージ」と呼称）（PROGEN Biotechnik）を感染させ、30℃で一晩培養した上清からファージが回収された。ファージ産生が行われた大腸菌の培養液に2.5 M NaCl/10 %PEGを添加することによって沈殿させたファージの集団をTris Buffered Saline（TBS）にて希釈することによってファージライブラリ液が得られた。次に、当該ファージライブラリ液に終濃度4%となるようにBSAが添加された。磁気ビーズに固定化された抗原を用いてパンニングが実施された。磁気ビーズとして、Sera-Mag NeutrAvidin beads（Thermo Fisher Scientific）、もしくはDynabeads M-280 StreptAvidin（Life Technologies）が用いられた。抗原として、Jena Bioscience社から購入されたビオチン化されたアデノシン3リン酸（adenosine 5'-triphosphate; ATP）、実施例1-2および1-3で作製された hCD137-Fc-Bio（配列番号：90）またはhCD137(FXa digested)をNo weight Premeasured NHS-PEO4-Biotin(PIERCE)を利用してビオチン化したbio-hCD137（配列番号：89）が使用された。

[0402] 癌組織においてスイッチの役割を果たすことができる低分子に依存的な低分子スイッチ抗体を効率的に取得するためのパンニングが実施された。具体的には、低分子であるATP存在下で抗原に結合し、ATP非存在下では抗原に結合しない抗体を濃縮するパンニングが先行特許WO2015/083764で示された方法を参考に実施された。Round1ではビオチン化hCD137（bio-hCD137）、hCD137-Fc-BioおよびビオチンATP（bio-ATP）はすべて、先にビオチン化抗原を磁性ビーズ上に固相化した後に調製されたファージライブラリ溶液が添加される方法（「ビーズ固相法」と呼称）でパンニングが実施された。Bio-ATPについては、低分子化合物としてのATPの非存在下で、抗原（Bio-ATP）に結合できる抗体を濃縮するパンニングが上述の先行特許WO2015/083764に記載の方法を参考に実施された。hCD137-Fc-Bioについては、Fc領域に結合する抗体を除去するためにビオチン化されていないヒトIgG1 Fc領域4 nmolが添加された。

回収されたファージは大腸菌株ER2738に添加されファージを大腸菌に感染させた後、回収された大腸菌に対してハイパーファージを感染させ、30℃で一晩培養した上清からファージが回収された。

[0403] Round2以降ではビオチン化hCD137（bio-hCD137）およびhCD137-Fc-Bioに対してのみ、ビーズ固相法にてATP存在下で抗原に結合し、ATP非存在下では抗原に結合しない抗体を濃縮するパンニングが先行特許WO2015/083764で示された方法を参考に実施された。いずれの場合もhCD137-Fc-Bioについては、Fc領域に結合する抗体を除去するためにビオチン化されていないヒトIgG1 Fc領域4 nmolが添加された。同様のパンニングがRound5まで繰り返され、目的の抗体配列が濃縮された。

[0404] (2-1-2) ファージELISAによるATPの存在下および非存在下における結合活性評価

上記の方法によって得られた大腸菌のシングルコロニーから、常法（Methods Mol. Biol.（2002）178, 133-145）に倣い、ファージ含有培養上清が回収された。NucleoFast 96（MACHEREY-NAGEL）を用いて、回収された培養上清が限外ろ過された。培養上清各100μLが各ウェルにアプライされたNucleoFast 96を遠心分離（4,500 g、45分間）することによってフロースルーが除去された。100 μLのH_2Oが各ウェルに加えられた当該NucleoFast 96が、再度遠心分離（4,500 g、30分間）によって洗浄された。最後にTBS 100 μLが加えられ、室温で5分間静置された当該NucleoFast 96の各ウェルの上清に含まれるファージ液が回収された。

[0405] TBS、またはATP/TBSが加えられた精製ファージが以下の手順でELISAに供された。384 well Microplates Streptavidin-coated（Greiner）が実施例1で作製されたビオチン化抗原（bio-hCD137, hCD137-Fc-BioおよびBio-Fc）を含む10μLのTBSにて一晩コートされた。当該プレートの各ウェルをTris Buffered Saline with Tween 20（TBST）にて洗浄することによってプレートに結合しなかったビオチン化抗原が除かれた後、当該ウェルが80 μLの2 % SkimMilk-TBSにて1時間以上ブロッキングされた。2 % SkimMilk-TBSはTBST洗浄にて

除かれ、その後、各ウェルに調製された精製ファージが加えられた当該プレートを室温で1時間静置することによって、抗体を提示したファージを、各ウェルに存在するビオチン化抗原にATPの非存在下および存在下において結合させた。TBSTまたはATP/TBSTにて洗浄された各ウェルに、TBSまたはATP/TBSによって希釈されたHRP結合抗M13抗体（GE Healthcare 27-9421-01）が添加されたプレートを1時間インキュベートさせた。TBSTまたはATP/TBSTにて洗浄後、TMB single溶液（ZYMED）が添加された各ウェル中の溶液の発色反応が硫酸の添加により停止された後、450 nmの吸光度によって当該発色が測定された。

[0406] その結果、bio-hCD137もしくはhCD137-Fc-Bio に対して、ATP存在下と非存在下で結合活性が変化する抗体が複数確認された。

パンニングRound 4および5後のクローンを用いたファージELISAの結果を表９に示した。

ここで、ATP存在下での吸光度が0.2以上であり、かつ抗原の存在下/非存在下における吸光度のS/N比が2より高いクローンが陽性クローンと判定された。さらに、当該陽性クローンのうち、ATPの存在下/非存在下における吸光度のS/Nが2.より高いクローンがATPに依存的な抗原結合活性を有するクローン（スイッチクローン）と判定された。

[0407] [表9]

パンニングに使用した抗原	ビオチン化 hCD137		hCD137-Fc-Bio	
Round	4	5	4	5
ELISA 実施クローン数	384	384	384	384
陽性クローン数 (ATP+での吸光度≧0.2; 抗原+/-比 ＞ 2.0)	31	4	125	169
スイッチクローン数(ATP+/-比 ＞ 2)	12	2	118	164

[0408] (2-1-3) ATPの存在／非存在によって抗原に対する結合活性が変化するスイッチ抗体の配列解析

ファージELISAの結果、ATPに依存的な抗原結合活性を有するクローン（ス

イッチクローン）から特異的なプライマーpBAD-F, G1seq-Rを用いて増幅された遺伝子の塩基配列が解析された。解析の結果、解析の結果、ATP存在下でヒトCD137に結合し、ATP非存在下ではヒトCD137に結合しないと判断されたクローンの塩基配列が取得された。

[0409] (2-2) ATPを利用したラショナルデザインライブラリからの低分子存在下において抗原に結合する抗体の取得(2)

(2-2-1) パンニング

先行特許WO2015/083764において構築されたラショナルデザイン抗体ファージディスプレイライブラリから、ATP存在下で抗原に対する結合活性を示す抗体が取得された。取得のために、ATP存在下で抗原に対して結合活性を示す抗体を提示しているファージが回収され、その後ATPの非存在下でビーズから溶出された溶出液からファージが回収された。

[0410] 構築されたファージディスプレイ用ファージミドを保持する大腸菌からファージが一般的な方法で産生された。具体的には、構築されたファージミドベクターを保持する大腸菌に対して、M13KO7TC（WO2015046554A1）もしくはM13KO7ΔpIII（ハイパーファージ）（PROGEN Biotechnik）を感染させ、30℃で一晩培養した上清からファージが回収された。ファージ産生が行われた大腸菌の培養液に2.5 M NaCl/10 %PEGを添加することによって沈殿させたファージの集団をTBSにて希釈することによってファージライブラリ液が得られた。次に、当該ファージライブラリ液に終濃度4%となるようにBSAが添加された。磁気ビーズに固定化された抗原を用いてパンニングが実施された。磁気ビーズとして、NeutrAvidin coated beads (Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated)、NeutrAvidin beads (TAMAGAWA SEIKI) もしくはDynabeads MyOne StreptAvidin T1 (Thermo Fisher Scientific) が用いられた。抗原として、実施例1で作製されたhCD137-Fc-BioまたはBio-hCD137が使用された。

[0411] 癌組織においてスイッチの役割を果たすことができる低分子に依存的な低分子スイッチ抗体を効率的に取得するためのパンニングが実施された。具体的には、低分子であるアデノシン3リン酸（adenosine 5'-triphosphate; ATP

）存在下で抗原に結合し、ATP非存在下では抗原に結合しない抗体を濃縮するパンニングが先行特許WO2015/083764で示された方法を参考に実施された。bio-hCD137については、先にビオチン化抗原を磁性ビーズ上に固相化した後に調製されたファージライブラリ溶液が添加される方法（「ビーズ固相法」と呼称）及び、先にビオチン化抗原と調製されたファージライブラリ溶液が混合された後に磁性ビーズが添加される方法（「液相法」と呼称）が実施された。hCD137-Fc-Bioについては、Fc領域に結合する抗体を除去するためにビオチン化していないヒトIgG1 Fc領域4 nmolが添加され、パンニングは液相法でのみ実施された。回収されたファージは大腸菌株ER2738に添加されファージを大腸菌に感染させた後、回収された大腸菌に対してM13KO7TC（WO2015046554A1）もしくはM13KO7ΔpIII（ハイパーファージ）（PROGEN Biotechnik）を感染させ、30℃で一晩培養した上清からファージが回収された。同様のパンニングが、Round5まで繰り返された。

[0412] (2-2-2) ファージELISAによるATPの存在下および非存在下における結合活性評価

上記の方法によって得られた各Round後の大腸菌のシングルコロニーから、常法（Methods Mol. Biol. (2002) 178, 133-145）に倣い、ファージ含有培養上清が回収された。NucleoFast 96（MACHEREY-NAGEL）を用いて、回収された培養上清が限外ろ過された。培養上清各100 μLが各ウェルにアプライされたNucleoFast 96を遠心分離（4,500 g、45分間）することによってフロースルーが除去された。100μL のH_2Oが各ウェルに加えられた当該NucleoFast 96が、再度遠心分離（4,500 g、30分間）によって洗浄された。最後にTBS 100 μLが加えられ、室温で5分間静置された当該NucleoFast 96の各ウェルの上清に含まれるファージ液が回収された。

[0413] TBS、またはATP/TBSが加えられた精製ファージが以下の手順でELISAに供された。StreptaWell 96マイクロタイタープレート（Roche）が実施例1で作製されたビオチン化抗原（hCD137-Fc-BioまたはBio-hCD137 ）を含む100μLのTBSにて一晩固相化された。当該プレートの各ウェルをTBSTにて洗浄すること

によってプレートに結合しなかったビオチン化抗原が除かれた後、当該ウェルが250 μLの2 % SkimMilk-TBSにて1時間以上ブロッキングされた。2 % SkimMilk-TBSが除かれ、その後、各ウェルに調製された精製ファージが加えられた当該プレートが37℃で1時間静置されることによって、抗体を提示したファージが、各ウェルに存在するビオチン化抗原に、ATPの非存在下および存在下において結合された。TBSTまたはATP/TBSTにて洗浄された各ウェルに、TBSまたはATP/TBSによって希釈されたHRP結合抗M13抗体（GE Healthcare 27-9421-01）が添加されたプレートを1時間インキュベートさせた。TBSTまたはATP/TBSTにて洗浄後、TMB single溶液（ZYMED）が添加された各ウェル中の溶液の発色反応が硫酸の添加により停止された後、450 nmの吸光度によって当該発色が測定された。

その結果、bio-hCD137またはhCD137-Fc-Bio に対して、ATP存在下と非存在下で結合活性が変化する抗体が複数確認された。

例示として、パンニングRound5後のクローンを用いたファージELISAの結果を表１０に示した。

ここで、ATPの存在下における吸光度が0.2以上で、かつ抗原の存在下／非存在下における吸光度のS/N比が2より高いクローンが陽性クローンと判定された。さらに、当該陽性クローンのうち、ATPの存在下/非存在下における吸光度のS/N比が2より高いものがATPに依存的な抗原結合活性を有するクローン（スイッチクローン）と判定された。

[0414]

[表10]

パンニングに使用した抗原	hCD137-Fc-Bio	hCD137-Fc-Bio	ビオチン化 hCD137	ビオチン化 hCD137
パンニング方法	液相	液相	液相	ビーズ固相
パンニングに使用したヘルパーファージ	M13KO7ΔpIII	M13KO7ΔpIII 及び M13KO7TC	M13KO7ΔpIII	M13KO7ΔpIII
ELISA 実施クローン数	384	96	96	96
陽性クローン数 (ATP+での吸光度≧0.2; 抗原+/− 比>2)	383	79	41	29
スイッチクローン数 (ATP+/−比>2)	375	77	40	29

[0415] (2-2-3) ATPの存在／非存在によって抗原に対する結合活性が変化するスイッチ抗体の配列解析

ファージELISAの結果、ATPに依存的な抗原結合活性を有するクローン（スイッチクローン）から特異的なプライマー pBAD-F, G1seq-Rを用いて増幅された遺伝子の塩基配列が解析された。解析の結果、ATP存在下でヒトCD137に結合し、ATP非存在下ではヒトCD137に結合しないと判断されたクローンの塩基配列が取得された。

[0416] (2-3) スイッチ抗体の選抜

実施例2-1-3及び2-2-3の解析の結果取得された、ATPに依存的な抗原結合活性を有すると判断されたクローンの中から17検体が選抜され、表１１に記載の通りクローン名が再付与された。

[0417]

[表11]

	ファージ名	抗体可変領域クローン名
1	dBBATk14-4_003	dBBAT007
2	dBBATk14-4_089	dBBAT013
3	dBBATk17-4_002	dBBAT015
4	dBBATk17-4_009	dBBAT017
5	dBBATk17-4_075	dBBAT019
6	dBBATk05-5_052	dBBAT021
7	dBBATk05-5_076	dBBAT025
8	dBBATk12-5_038	dBBAT029
9	dBBATk12-5_048	dBBAT031
10	dBBATk14-5_012	dBBAT037
11	dBBATk14-5_053	dBBAT042
12	dBBAHk14SF-3_016	dBBAT053
13	dBBAHk14SF-3_032	dBBAT056
14	dBBAHk14FF-4_028	dBBAT091
15	dBBAHk14FS-5_074	dBBAT112
16	dBBAHk14MS-5_034	dBBAT118
17	dBBAHk14MS-5_093	dBBAT119

[0418] (2-4) ATPの存在／非存在によって抗原に対する結合活性が変化するスイッチ抗体の発現と精製

ラショナルデザインファージライブラリから取得された、表１１に記載の抗体の可変領域をコードする遺伝子は、ヒトIgG1/Lambdaの動物発現用プラスミドへ挿入された。以下の方法を用いて抗体が発現された。FreeStyle 293 Expression Medium培地（Invitrogen）に1.33 x 10^6細胞/mLの細胞密度で懸濁されて、6well plateの各ウェルへ3 mLずつ播種されたヒト胎児腎細胞由来FreeStyle 293-F株（Invitrogen）に対して、調製されたプラスミドがリポフェクション法により導入された。CO_2インキュベーター（37℃、8 %CO_2, 90 rpm）で4日間培養された培養上清から、rProtein A Sepharose™ Fast Flow (Ame

rsham Biosciences）を用いて当業者公知の方法で抗体が精製された。分光光度計を用いて、精製された抗体溶液の280 nmでの吸光度が測定された。得られた測定値からPACE法により算出された吸光係数を用いて精製された抗体の濃度が算出された（Protein Science (1995) 4, 2411-2423）。

[0419] (2-5) ファージディスプレイ法で同定された抗CD137抗体の評価

(2-5-1) ATPおよびその代謝物の有無によって抗原に対する結合が変化するスイッチ抗体の発現と精製

ヒトラショナルデザインファージライブラリから取得された抗体の可変領域をコードする遺伝子は改変ヒトIgG1(P253)（配列番号：93）の下流にGlyとLysをコードする遺伝子が融合された重鎖定常領域、および軽鎖定常領域であるLambda鎖Lamlib（配列番号：63）を有する動物発現用プラスミドへ挿入された。表１２にクローン名と配列番号が記された。

[0420] 評価クローン

[表12]

	クローン名	重鎖配列番号(全長)	軽鎖配列番号(全長)
1	dBBAT007-P253	94	113
2	dBBAT013-P253	95	114
3	dBBAT015-P253	96	115
4	dBBAT017-P253	97	116
5	dBBAT019-P253	98	117
6	dBBAT025-P253	99	118
7	dBBAT029-P253	100	119
8	dBBAT031-P253	100	119
9	dBBAT037-P253	101	120
10	dBBAT042-P253	102	121
11	dBBAT053-P253	103	122
12	dBBAT056-P253	104	123
13	dBBAT021-P253	105	124
14	dBBAT091-P253	106	125
15	dBBAT112-P253	107	126
16	dBBAT118-P253	108	127
17	dBBAT119-P253	109	128
18	dBBAT121-P253	110	129
19	dBBAT122-P253	111	130
20	dBBAT134-P253	112	131

[0421] 当業者公知の方法を用いて抗体が発現され、精製された。分光光度計を用いて、精製された抗体溶液の280 nmでの吸光度が測定された。得られた測定値からPACE法により算出された吸光係数を用いて精製された抗体の濃度が算出された (Protein Science (1995) 4, 2411-2423) 。

[0422] (2-5-2) 表面プラズモン共鳴によるヒトCD137に対する結合のATP、ADP、AMPの影響の評価

Biacore T200 (GE Healthcare) を用いて、抗CD137抗体とhCD137(FXa digest)との抗原抗体反応の相互作用が解析された。アミンカップリング法でProtein G (CALBIOCHEM) が適当量固定化されたSensor chip CM3 (GE Healthcare) に抗CD137抗体を捕捉させ、実施例1-2で調製されたhCD137(FXa digest)を相互作用させた。ランニングバッファーには20mM ACES, 150mM NaCl, 2mM Mg

Cl2, 0.05% Tween20 (pH7.4)が用いられ、再生溶液としては10 mM Glycine-HCl (pH 1.5)が用いられた。

TBSに懸濁した抗CD137抗体が捕捉された後に、500 nMのhCD137(FXa digest)が各flow cellに流速10 μL/minで3分間インジェクトされた。この3分間がhCD137(FXa digest)の結合相とされ、結合相終了後、ランニングバッファーに切り替えられた2分間がhCD137(FXa digest)の解離相とされた。解離相終了後、再生溶液が流速30 μl/minで30秒間インジェクトされた。以上が抗CD137抗体の結合活性測定サイクルとされた。結合相で抗CD137抗体に相互作用したhCD137(FXa digest)の結合量は捕捉された抗体量に対して補正された。Biacore T200 Evaluation Software Version:2.0を用いてcapture ligand 1RUあたりのbinding量（RU）を表示させ、抗体捕捉量（捕捉された抗体量）、抗原結合量の数値が得られた。抗原結合量が表１３に示された。抗原結合量は結合活性を反映することから、低分子なしの値と比較し、低分子（ATP、ADPあるいはAMP）が存在するときの値が高い場合に、各低分子依存性が認められるといえる。特に差が大きいほど低分子依存性が高いと言える。

[0423]

[表13]

クローンの名前	小分子の種類、濃度の条件						
	1mM ATP	100 μM ATP	100 μM ADP	10 μM ADP	1mM AMP	100 μM AMP	小分子なし
dBBAT007-P253	49.2	29.5	89.0	70.0	28.5	16.5	3.6
dBBAT013-P253	26.2	8.1	77.3	48.5	13.8	6.6	2.7
dBBAT015-P253	8.3	3.1	41.8	17.9	11.9	5.5	1.5
dBBAT017-P253	9.8	5.0	39.7	18.8	6.8	4.8	4.4
dBBAT019-P253	3.8	3.0	25.7	7.4	11.1	4.6	3.7
dBBAT021-P253	9.2	2.4	56.6	19.6	5.7	3.0	2.9
dBBAT025-P253	28.5	10.0	89.1	55.7	16.4	6.1	4.4
dBBAT029-P253	10.9	6.9	53.3	38.5	17.4	11.4	3.7
dBBAT031-P253	8.4	5.0	47.8	33.3	14.8	8.3	2.8
dBBAT037-P253	27.5	15.9	72.1	62.9	21.7	13.8	3.8
dBBAT042-P253	11.7	4.3	58.7	19.1	7.8	4.7	2.9
dBBAT053-P253	15.0	8.4	46.9	40.4	9.6	6.9	1.9
dBBAT056-P253	20.3	13.4	59.4	50.7	12.8	9.7	3.7
dBBAT118-P253	27.7	14.1	76.9	62.9	14.9	8.7	3.3
dBBAT121-P253	11.5	4.8	42.3	24.7	6.1	2.6	1.9
dBBAT122-P253	11.5	4.7	55.5	19.2	5.7	4.1	3.3
dBBAT134-P253	5.2	4.4	29.3	16.2	3.7	4.5	3.0
dBBAT091-P253	6.2	3.0	33.0	20.0	2.9	3.3	1.5
dBBAT112-P253	12.6	6.3	43.0	27.4	6.5	4.8	3.7
dBBAT119-P253	45.7	12.9	112.5	67.2	58.6	26.9	3.3

[0424] (2-5-3) サルCD137抗原への結合活性評価

取得された抗体がサルCD137に結合するかELISAで評価された。はじめに、実施例1で調製されたcyCD137-Fc-BAPがStreptawellマイクロタイタープレートに固相化された。当該プレートの各ウェルをWash bufferにて洗浄することによってプレートへ結合していない抗原が除かれた後、当該ウェルがBlocking Buffer（2%BSAを含むTBS） 150 μLにて1時間以上ブロッキングされた。Blocking Bufferが除かれた各ウェルに、終濃度1 mM ADPを含むTBSまたは終濃度1 mM ADPを含むTBSで希釈された精製抗体が各ウェル100μL添加された。抗体が添加された当該プレートは600rpmで1時間振盪された。終濃度1 mM ADPを含むWash Buffer（0.1%Tween20を含むTBS）にて洗浄された後に、終濃度1 mM ADPを含むTBSによって希釈されたAP結合抗ヒトラムダ抗体（BETHYL）が各ウェルに添加された。1時間インキュベートされたのち終濃度1 mM ATPを含むWash Bufferにて洗浄後、BluePhos phosphate substrate(KPL)が添加された。600 nmの吸光度によって当該発色が測定された。抗体濃度が0μg/mLのときの吸光度に対する増加率が表１４に示されている。濃度依存的に吸光度の比が上昇しているサンプルは、サルのCD137に結合しているといえる。

[0425] 吸光度の比

[表14]

サルCD137		dBBAT007	dBBAT013	dBBAT015	dBBAT017	dBBAT019	dBBAT021	dBBAT025	dBBAT029	dBBAT037	dBBAT042
抗体濃度[μg/mL]	10	30.5	43.2	42.9	25.6	40.5	40.5	72.0	50.3	32.5	41.8
	2.5	30.2	42.4	32.4	8.7	40.3	14.0	67.6	42.7	12.7	40.0
	0.625	29.2	33.3	14.4	3.1	39.1	4.6	49.7	26.7	4.6	31.3
	0.156	22.0	15.3	3.6	1.4	23.7	1.7	20.7	9.7	1.9	12.2
	0.039	0.7	4.2	1.5	1.2	8.2	1.2	4.5	2.0	1.3	2.9
	0.010	3.8	1.5	1.1	1.2	2.5	0.9	1.6	1.1	1.1	1.3
	0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

		dBBAT053	dBBAT056	dBBAT091	dBBAT112	dBBAT118	dBBAT119	dBBAT121	dBBAT122	dBBAT134	
抗体濃度[μg/mL]	10	17.9	23.1	15.1	19.8	35.4	55.3	26.0	31.9	33.9	
	2.5	6.9	10.7	5.5	8.1	30.6	56.6	16.4	16.7	16.8	
	0.625	2.3	3.6	1.7	2.8	18.1	57.2	5.9	5.7	5.8	
	0.156	1.0	1.3	0.7	1.0	7.1	47.7	1.3	1.9	2.2	
	0.039	0.7	0.8	0.5	0.6	1.8	26.6	0.6	1.0	1.2	
	0.010	0.8	1.2	0.6	0.6	1.0	10.2	0.6	0.9	1.0	
	0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	

[0426] (2-5-4) Jurkat細胞を用いたCD137アゴニスト活性の評価

In vitro抗体活性測定にはGloResponse™ NF-κB-Luc2/4-1BB Jurkat cell line (Promega)が用いられた。384ウェルプレートの各ウェルに、Assay medium (99% RPMI, 1% FBS)で2×10^6/mLに濃度を調製されたFcγRIIB CHO-K1 Cells (Promega) が10μLずつ加えられた。続いて、ADPを含む抗体溶液またはATPを含む抗体溶液またはATPあるいはADPを含まない抗体溶液がそれぞれのウェルに10μL加えられた。次に、Assay medium (99% RPMI, 1% FBS)で2×10^6/mLに調製されたGloResponse™ NF-κB-Luc2/4-1BB Jurkat cell lineが各ウェルに対して10 μL加えられた。ADPは最終濃度50μM、ATPは最終濃度50μMである。プレートは5% CO_2インキュベーター内にて37℃で6時間静置されたのち、室温で15分静置され、各ウェルにBio-Glo reagentが30μLずつ加えられた。Bio-Glo reagentにはBio-Glo Luciferase Assay System (Buffer and Substrate)が使用された。その後、各ウェルの発光量がプレートリーダーで測定された。各ウェルの発光の値を抗体未添加ウェルの発光の値で割った値をLuminescence foldとし、各抗体の活性を評価する指標とした。

得られた結果を図１および図２に示す。図１および図２より、ノンスイッチ抗体であるNS1-P253を除くすべての抗体が、ATPおよびADP依存的にヒトCD137アゴニスト活性を示すことが確認された。

[0427] (2-6) パンニングから取得されたスイッチ抗体の、ヒトT細胞を用いたin vitroにおけるCD137アゴニスト活性の評価

(2-6-1) ヒトT細胞の拡大培養

健常なボランティア採血より単離したヒト末梢血単核細胞が用いられた。50 mLの血液に0.5 mLのヘパリンが混和され、さらに50 mLのPBSで希釈された。ヒト末梢血単核細胞は次の２ステップで単離された。第1ステップはFicoll-Paque PLUS (GE Healthcare) を添加されたLeucosep (greiner bio-one) が1000xg、1分間、室温にて遠心されたのちにPBSで希釈された血液を添加され、400xg、30分間、室温にて遠心が行われた。第2ステップでは遠心後のチューブよりバフィーコートが採取された後に、60 mLのPBS (Wako) により洗浄された。その後T cell activation/ expansion kit/ human(MACS Miltenyi b

iotec)を用いてT細胞の拡大培養が行なわれた。

[0428] (2-6-2) ヒトT細胞を用いたin vitroにおけるCD137アゴニスト活性の評価

ヒト末梢血単核細胞由来T細胞2x10^{4}個及びREC-1細胞2x10^{4}個が、コントロール抗体であるIC17HdK-hIgG1/IC17L-k0、ATP非依存的なヒトCD137結合活性を有する抗体（実施例を通じて「ノンスイッチ抗体」または「ノンスイッチCD137抗体」と呼称することがある。）であるNS1-P253、もしくは表１２に記載のクローンのいずれか；及び、30 U/mLヒトIL-2 (SIGMA)、10 ng/mL PMA (SIGMA)、0.5 μg/mL Ionomycin、500 μM ADPbetaS (Sigma)、10% FBS (Sigma) を含むRPMI1640培地100 μLに懸濁され、96 ウェルマルチプルウェルプレート平底フタ付き (Corning) に播種された。NS1-P253、IC17HdK-hIgG1/IC17L-k0、及び表１２に記載のクローンは10 μg/mLが評価された。ADPbetaSを含まない培地中でのIFN-γ産生も評価された。プレートは振盪されたのちに5%CO_2インキュベーター内にて37℃で72時間静置された。その後、培養上清を回収し、培養上清中に含まれるIFN-γ量がHuman IFN-γ ELISA Development Kit (PeproTech) を用いて定量された。ELISAはキット製造業者(PeproTech)の指示に従い実施した。吸光度の測定はEnVision (PerkinElmer) にて行われた。

結果を図３に示す。

dBBAT007-P253、dBBAT013-P253、dBBAT015-P253、dBBAT019-P253、dBBAT021-P253、dBBAT025-P253、dBBAT031-P253、dBBAT042-P253、dBBAT056-P253、dBBAT118-P253、dBBAT121-P253、dBBAT122-P253、dBBAT119-P253はADPbetaS依存的にヒトCD137アゴニスト活性を示すことが確認された。ADPbetaSは、ADPと比べ加水分解を受けにくいADPのアナログである。このことから、これらのヒトCD137スイッチ抗体は、ATP、ADP、AMPなどの低分子依存的にヒトCD137アゴニスト活性を示す可能性が示された。

[0429] (2-6-3) ヒトT細胞を用いたin vitroにおけるCD137アゴニスト活性の評価(2)

ヒト末梢血単核細胞由来T細胞2x10^{4}個及びREC-1細胞2x10^{4}個が、NS1-P253（ノンスイッチ抗体）もしくはdBBAT119-P253のいずれか；及び、30 U/mLヒトI

L-2 (SIGMA) 、10 ng/mL PMA (SIGMA) 、0.5 μg/mL Ionomycin、500 μM ADPbetaS (Sigma) 、10% FBS (Sigma) を含むRPMI1640培地100 μLに懸濁され、96 ウェルマルチプルウェルプレート平底フタ付き (Corning) に播種された。NS1-P253及びdBBAT119-P253は10, 2, 0.4, 0.08, 0.016, 0.0032, 0.00064 μg/mLが評価された。プレートは振盪されたのちに5%CO_2インキュベーター内にて37℃で72時間静置された。その後、培養上清を回収し、培養上清中に含まれるIFN-γ量がHuman IFN-γ ELISA Development Kit (PeproTech) を用いて定量された。ELISAはキット製造業者(PeproTech)の指示に従い実施した。吸光度の測定はEnVision (PerkinElmer) にて行われた。

結果を図４に示す。

dBBAT119-P253はADPβS存在下においてヒトCD137アゴニスト活性を示すことが確認された。このことから、dBBAT119-P253は、ATP、ADP、AMPなどの低分子依存的にヒトCD137アゴニスト活性を示す可能性が示された。

[0430] 実施例3：ラショナルデザイン軽鎖及び重鎖ライブラリを使用した低分子存在下において抗原に結合する抗体の結合活性向上

(3-1) ラショナルデザイン軽鎖ライブラリを使用した結合活性向上用ライブラリの構築

実施例2-2-1において回収された、ATPに依存的な抗原結合活性を有する抗体が多数含まれる抗体ライブラリについて、再度抗体軽鎖をライブラリ化することにより結合活性の向上が実施された。

先行特許WO2015/083764において構築されたラショナルデザイン抗体ファージディスプレイライブラリの軽鎖領域および重鎖領域が結合活性向上のための抗体軽鎖ライブラリ及び抗体重鎖ライブラリを構築するために使用された。上記軽鎖ライブラリまたは実施例2-2-1において回収されたファージミドベクターライブラリの軽鎖領域または重鎖領域に導入され、大腸菌ER2738株にエレクトロポレーションにより導入された。

[0431] (3-2) ラショナルデザインライブラリを用いた、ATP依存的な抗原結合活性を有する抗体の結合活性向上

構築されたファージディスプレイ用ファージミドを保持する大腸菌からファージが一般的な方法で産生された。具体的には、構築されたファージミドベクターを保持する大腸菌に対して、M13KO7TC（WO2015/046554）もしくはM13KO7ΔpIII（ハイパーファージ）（PROGEN Biotechnik）を感染させ、30℃で一晩培養した上清からファージが回収された。ファージ産生が行われた大腸菌の培養液に2.5 M NaCl/10 %PEGを添加することによって沈殿させたファージの集団をTBSにて希釈することによってファージライブラリ液が得られた。次に、当該ファージライブラリ液に終濃度4%となるようにBSAが添加された。磁気ビーズに固定化された抗原を用いてパンニングが実施された。磁気ビーズとして、NeutrAvidin coated beads（Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated）、NeutrAvidin beads（TAMAGAWA SEIKI）もしくはDynabeads MyOne StreptAvidin T1（Thermo Fisher Scientific）が用いられた。抗原として、ビオチン化hCD137-Fcが使用された。

[0432] 癌組織においてスイッチの役割を果たすことができる低分子に依存的な低分子スイッチ抗体を効率的に取得するためのパンニングが実施された。具体的には、低分子であるアデノシン3リン酸（adenosine 5'-triphosphate; ATP）存在下で抗原に結合し、ATP非存在下では抗原に結合しない抗体を濃縮するパンニングが先行特許WO2015/083764で示された方法を参考に実施された。

[0433] (3-3) ファージELISAによるATPの存在下および非存在下における結合活性評価

上記の方法によって得られた大腸菌のシングルコロニーから、常法（Methods Mol. Biol.（2002）178, 133-145）に倣い、ファージ含有培養上清が回収された。その後、実施例2-2-2に記載の方法により、ATPの存在下および非存在下におけるヒトCD137への結合活性がファージELISAにより確認された。

その結果を図５に示す。

抗原の存在下／非存在下における吸光度のS/N比が2より高く、かつ、ATPの存在下/非存在下における吸光度のS/N比が2より高い、ATPに依存的な抗原結合活性を有するクローン（スイッチクローン）と判定されるクローンが多数

取得された。

[0434] 実施例4：改変されたCD137抗体の作製およびその活性評価

(4-1) dBBAT119H-P253/dBBAT119L-LamLibの改変による結合活性の上昇

実施例2-4で取得された抗CD137抗体（クローン名：dBBAT119H-P253/dBBAT119L-LamLib）の重鎖可変領域であるdBBAT119H、軽鎖可変領域であるdBBAT119Lの改変体がPCR等当業者公知の方法により作製された。重鎖可変領域では、dBBAT119HのD10（10位（Kabat番号）のアスパラギン酸（Asp）を指す。）およびG17（17位（Kabat番号）のグリシン（Gly）を指す。）をそれぞれグリシン（Gly）およびセリン（Ser）に置換したdBBAT119H010のN99（99位（Kabat番号）のアスパラギン（Asn）を指す。）、M100a（100a位（Kabat番号）のメチオニン（Met）を指す。）、およびN100b（100b位（Kabat番号）のアスパラギン（Asn）を指す。）を他のアミノ酸に置換した改変体が作製された。軽鎖可変領域では、dBBAT119L のF87（87位（Kabat番号）のフェニルアラニン（Phe）を指す。）をチロシン（Tyr）に置換したdBBAT119L010のD27b（27b位（Kabat番号）のアスパラギン酸（Asp）を指す。）、N31（31位（Kabat番号）のアスパラギン（Asn）を指す。）、およびD94（94位（Kabat番号）のアスパラギン酸（Asp）を指す。）を、他のアミノ酸に置換した改変体が作製された。

[0435] 重鎖可変領域の改変体については、表面プラズモン共鳴分析機器であるBiacoreT200（GEヘルスケア)によってヒトCD137に対する結合活性が測定された。Series S Sensor Chip CM3（GEヘルスケア)にProtein G（CALBIOCHEM）を固定化したチップに対して、精製された改変体を相互作用させて抗体が捕捉された。次にATP を添加したヒトCD137(FXa digested)あるいはATPを添加していないヒトCD137(FXa digested)溶液を相互作用させ、ATP存在下およびATP非存在下での改変体とヒトCD137(FXa digested)との結合活性が評価された。ランニングバッファーとして20 mM ACES, 150 mM NaCl, 0.05% Tween20, 2 mM $MgCl_2$, pH7.4を用い、25℃で測定が行われた。測定の結果、L100a改変体（100a位（Kabat番号）のメチオニン（Met）をロイシン（Leu）に置換した改変体）は、ATP存在下でのみ、ヒトCD137への結合活性が向上した（図６）。当

該L100a改変体の重鎖可変領域は、dBBATk119H024（配列番号：132）である。なおヒトCD137結合量は、各改変体の捕捉量（1000RU）で補正された。

[0436] 軽鎖可変領域の改変体については、BiacoreT200によって同様の上記条件でヒトCD137(FXa digested)に対する結合活性が測定された。測定の結果、E94改変体（94位（Kabat番号）のアスパラギン酸（Asp）をグルタミン酸（Glu）に置換した改変体）は、ATP存在下でのみ、ヒトCD137への結合活性が向上した（図６）。当該E94改変体の軽鎖可変領域は、dBBATk119L020（配列番号：133）である。

これら重鎖改変体および軽鎖改変体を組み合わせた当該改変体をdBBATk119H024-P253/dBBATk119L020-LamLibと略称する（重鎖可変領域配列番号：132、軽鎖可変領域配列番号：133、重鎖定常領域配列番号：93、軽鎖定常領域配列番号：63）

なお、本明細書における抗体は、以下の規則に従い命名されている；（重鎖可変領域）－（重鎖定常領域）／（軽鎖可変領域）－（軽鎖定常領域）。

例えば、dBBAT119H-P253/dBBAT119L-LamLibという抗体名であれば、本抗体の重鎖可変領域はdBBAT119H、重鎖定常領域はP253、軽鎖可変領域はdBBAT119L、軽鎖定常領域はLamLibであることを意味する。

[0437] (4-2) 改変された抗ヒトCD137抗体の、ヒトT細胞を用いたin vitroにおけるCD137アゴニスト活性の評価

(4-2-1) ヒトT細胞の拡大培養

実施例2-6-1に記載の方法でヒトT細胞が拡大培養された。

(4-2-2) ヒトT細胞を用いたin vitroにおけるCD137アゴニスト活性の評価

実施例2-6-2に記載の方法で、NS1-P253（ノンスイッチ抗体）もしくはdBBAT119H-P253/dBBAT119L-LamLibもしくはdBBATk119H024-P253/dBBATk119L020-LamLibもしくはコントロール抗体であるIC17HdK-hIgG1/IC17L-k0それぞれ10, 2, 0.4, 0.08, 0.016 μg/mL存在下におけるIFN-γ産生が評価された。ADPbetaSを含まない培地中でのIFN-γ産生も評価された。

合わせて結果を図７に示す。

改変されたdBBATk119H024-P253/dBBATk119L020-LamLibは、dBBAT119H-P253/dBBAT119L-LamLibよりも強いADPbetaS依存的なアゴニスト活性を示した。このことからdBBATk119H024-P253/dBBATk119L020-LamLibは、dBBAT119H-P253/dBBAT119L-LamLibよりも強いATP、ADP、AMPなどの低分子依存的なヒトCD137アゴニスト活性を示す可能性が示された。

[0438] 実施例5：CD137抗体の更なる改変

(5-1) 網羅的改変の導入による結合活性を上昇させる改変の探索

より優れた抗CD137抗体を作製するため、実施例4-1において作製された抗CD137抗体の重鎖可変領域であるdBBATk119H024および軽鎖可変領域であるdBBATk119L020に対してアミノ酸改変が網羅的に導入された。PCR等当業者公知の方法により、dBBATk119H024およびdBBATk119L020のCDRを構成する全アミノ酸残基の各々に対して、システインを除く全18アミノ酸へ置換した改変体が各々作製された。作製された約1200個の改変体のヒトCD137への結合測定がBiacore4000を用いて実施された。Series S Sensor Chip CM3 (GEヘルスケア)にProtein G (CALBIOCHEM)を固定化したチップに対して、改変体の培養上清を相互作用させて抗体が捕捉された。次に低分子(ATP) が添加されたヒトCD137溶液、あるいは低分子が添加されていないヒトCD137溶液を相互作用させ、低分子存在下、および低分子非存在下での抗体のヒトCD137に対する結合活性が評価された。ランニングバッファーとして20 mM ACES, 150 mM NaCl, 0.02% Tween20, 2 mM $MgCl_2$, pH7.4に$CaCl_2$を添加された溶液が使用され、25℃で測定が行われた。

[0439] (5-2) ATP結合の上昇

重鎖可変領域としてdBBATk119H024 (配列番号：132) を有し、重鎖定常領域としてヒトIgG1に対してS267E/L328Fの改変が導入され、且つC末端のGlyおよびLysを除去したP253 (配列番号：93)を有するdBBATk119H024-P253 の遺伝子に対して、実施例5-1で見出された低分子存在下でのヒトCD137に対する結合活性を上昇させる改変を組み合わせて、抗体重鎖遺伝子A002-P253 (配列番号：134) が作製された。また、軽鎖可変領域としてdBBATk119L020 (配列番

号：133）を有し、軽鎖定常領域としてヒトλ鎖Lamlib（配列番号：63）を有する抗体軽鎖dBBATk119L020-Lamlibに対して、実施例5-1で見出された低分子存在下でのヒトCD137に対する結合活性を上昇させる改変を組み合わせて、抗体軽鎖遺伝子B040-Lamlib(配列番号：135）が作製された。これらの遺伝子を組み合わせて当業者公知の方法で抗体が発現、精製され、目的とする抗CD137抗体、A002-P253/B040-Lamlibが作製された。A002-P253/B040-Lamlibの重鎖可変領域はA002（配列番号：136）、軽鎖可変領域はB040（配列番号：137）、重鎖定常領域はP253（配列番号：93）、軽鎖定常領域はヒトλ鎖Lamlib（配列番号：63）である。

本項目において作製されたA002-P253/B040-Lamlibの重鎖可変領域に対して、ATP結合活性を上昇させることを目的として、Kabat番号における53番目、54番目または55番目のアミノ酸が別のアミノ酸に置換された各種改変体が作製された。表１５は作製された抗体の重鎖可変領域における、A002からのアミノ酸改変（Kabat番号）を示す。

[0440] [表15]

重鎖可変領域	A002 からのアミノ酸改変(Kabat 番号)
A002	—
A146	S54A / N55S
A159	R53S / N55S
A160	R53T / N55S
A161	R53Q / N55S
A162	R53K / N55S
A163	R53H / N55S
A164	R53S / N55T
A165	R53T / N55T
A166	R53Q / N55T
A167	R53K / N55T
A168	R53H / N55T
A169	R53S / N55H
A170	R53T / N55H
A171	R53Q / N55H

[0441] 作製された改変体の、ATPに対する結合活性、およびヒトCD137に対する結合活性が、Biacore T200で評価された。

ATPに対する結合活性の測定は、ランニングバッファーとして20 mM ACES (pH 7.4), 150 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$, 0.05 % Tween20が用いられ、37℃で実施された。まずSeries S Sensor Chip CM3 (GE Healthcare) にSure Protein A (GE Healthcare) を固定化したチップに対して、ランニングバッファーで調製した抗体溶液を相互作用させることで、抗体が捕捉された。次にランニングバッファーで調製されたATP溶液を相互作用させることで、抗体との結合活性が評価された。チップは25 mM NaOH と 10 mM Glycine-HCl (pH 1.5) を用いて再生され、繰り返し抗体を捕捉して測定が行われた。各抗体のATPに対する結合量は、ATPを100 nMの濃度でインジェクトした際の結合量をチップ表面に捕捉した抗体の量で補正することで、単位抗体量あたりのATPの結合量が算出された。

[0442] ヒトCD137に対する結合活性の測定は、ランニングバッファーとして20 mM ACES (pH 7.4), 150 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$, 0.05 % Tween20が用いられ、37℃で実施された。まずSeries S Sensor Chip CM3 (GE Healthcare) にSure Protein A (GE Healthcare) を固定化したチップに対して、ランニングバッファーで調製した抗体溶液を相互作用させることで、抗体が捕捉された。次に低分子として100 μM ATP を添加したヒトCD137溶液を相互作用させ、ヒトCD137との結合活性が評価された。抗原であるヒトCD137は実施例(1-1)で調製されたhCD137-HisBAPを使用し、抗原濃度0, 15.625, 62.5, 250, 1000nMで測定が実施された。チップは25 mM NaOH と 10 mM Glycine-HCl (pH 1.5) を用いて再生され、繰り返し抗体を捕捉して測定が行われた。各抗体のヒトCD137に対する解離定数 (KD) は、Biacore T200 Evaluation Software 2.0 を用いて算出された。具体的には、測定により得られたセンサーグラムを1:1 Langmuir binding modelでglobal fittingさせることで結合速度定数ka(L/mol/s)、解離速度定数kd(1/s) が算出され、それらの値から解離定数KD (mol/L) が算出された。

表１６はこれらの測定結果を示す。

[0443] ATPおよびヒトCD137に対する結合解析

[表16]

		ヒト CD137 に対する結合パラメーター(ATP = 100 μM)		
抗体名称	ATP への結合	ka	kd	KD
A002-P253/B040-Lamlib	-0.0001	3.94E+04	2.89E-03	7.35E-08
A146-P253/B040-Lamlib	-0.0001	7.80E+04	2.32E-02	2.97E-07
A159-P253/B040-Lamlib	0.0013	8.21E+04	3.83E-02	4.66E-07
A160-P253/B040-Lamlib	-0.0001	9.59E+03	2.46E-02	2.56E-06
A161-P253/B040-Lamlib	0.0010	1.87E+04	2.35E-02	1.25E-06
A162-P253/B040-Lamlib	0.0002	1.47E+05	3.17E-02	2.16E-07
A163-P253/B040-Lamlib	0.0016	5.60E+04	1.36E-02	2.43E-07
A164-P253/B040-Lamlib	0.0017	9.81E+04	4.38E-02	4.46E-07
A165-P253/B040-Lamlib	0.0002	1.14E+04	1.96E-02	1.72E-06
A166-P253/B040-Lamlib	0.0011	1.21E+04	1.92E-02	1.59E-06
A167-P253/B040-Lamlib	0.0001	8.45E+04	3.96E-02	4.69E-07
A168-P253/B040-Lamlib	0.0017	7.01E+04	1.81E-02	2.58E-07
A169-P253/B040-Lamlib	0.0011	1.15E+04	5.88E-03	5.11E-07
A170-P253/B040-Lamlib	0.0000	5.13E+03	5.36E-03	1.04E-06
A171-P253/B040-Lamlib	0.0012	4.93E+03	5.24E-03	1.06E-06

[0444] 表１６のとおり、重鎖可変領域のKabat番号における53, 54, または55番目のアミノ酸が別のアミノ酸に置換された改変体はA146-P253/B040-LamlibおよびA160-P253/B040-Lamlibを除いてどの改変体も、改変導入前の抗体A002-P253/B040-Lamlib に比較してATPに対する結合活性が上昇していた。また結合速度定数ka(L/mol/s) の比較から、上記で評価した抗体のうち、A146-P253/B040-Lamlib, A159-P253/B040-Lamlib, A162-P253/B040-Lamlib, A163-P253/B040-Lamlib, A164-P253/B040-Lamlib, A167-P253/B040-Lamlib および A168-P253/B040-Lamlib に関しては、ヒトCD137への結合速度定数が増加することが示された。

[0445] (5-3) 網羅的改変の導入による結合活性の上昇

より優れた抗CD137抗体を作製するため、実施例5-1で見出された低分子存在下でのヒトCD137に対する結合活性を上昇させる改変、および低分子が存在しない条件下でのヒトCD137に対する結合を低減する改変、および実施例5-2で見出されたATPへの結合活性を上昇させ、ヒトCD137への結合速度定数を増加する改変が組み合わされ、より優れたプロファイルを示す抗ヒトCD137抗体

が作製された。重鎖可変領域としてA002(配列番号：136)を有し、重鎖定常領域としてヒトIgG1に対してK214R/Q419Eの改変が導入され、且つC末端のGlyおよびLysを除去したG1T3（配列番号：138）を有する抗体重鎖A002-G1T3の遺伝子に対して実施例5-1および5-2で見出された改変を組み合わせた抗体重鎖遺伝子が作製された。また軽鎖可変領域としてB040(配列番号：137)を有し、軽鎖定常領域としてヒトλ鎖Lamlibを有する抗体軽鎖B040-Lamilibに対して実施例5-1で見出された改変を組み合わせた抗体軽鎖遺伝子が作製された。

[0446] また比較対象としてUS8137667に記載の既存の抗CD137抗体の重鎖可変領域20H4.9（配列番号：139）および重鎖定常領域としてP253（配列番号：93）を有する抗体重鎖20H4.9-P253の遺伝子と、軽鎖可変領域20H4.9LC（配列番号：140）と軽鎖定常領域としてヒトκ鎖k0（配列番号：141)を組み合わせた抗体軽鎖の遺伝子が作製された。また別の比較対象としてUS8337850に記載の既存の抗CD137抗体MOR-7480.1を構成する重鎖可変領域MOR-7480.1H（配列番号：142）および重鎖定常領域としてP253（配列番号：93）を有する抗体重鎖MOR-7480.1H-P253の遺伝子と、軽鎖可変領域MOR-7480.1L（配列番号：143）と軽鎖定常領域としてヒトλ鎖lam（配列番号：63)を組み合わせた抗体軽鎖MOR-7480.1L-lam の遺伝子が作製された（なお、ヒトλ鎖Lamlibとlamはいずれも同じアミノ酸配列（配列番号：63）である。

これらの遺伝子を組み合わせて当業者公知の方法で抗体が発現、精製され、目的とする抗CD137抗体が作製された。表１７は作製された抗体の重鎖可変領域、軽鎖可変領域、重鎖定常領域、軽鎖定常領域、および超可変領域（Hyper Variable Region; HVRまたはCDRともいう。）の配列番号の一覧である。

[0447] 重鎖、軽鎖、およびそれらの超可変領域のアミノ酸配列（配列番号で示す）

[表17]

抗体名称	可変領域		定常領域		超可変領域（HVR）					
	重鎖	軽鎖	重鎖	軽鎖	H1	H2	H3	L1	L2	L3
A375-G1T3/B167-Lamlib	43	54	138	63	7	8	17	21	26	27
A372-G1T3/B040-Lamlib	44	55	138	63	7	9	17	22	26	27
A356-G1T3/B040-Lamlib	45	55	138	63	7	10	17	22	26	27
A486-G1T3/B167-Lamlib	46	54	138	63	7	11	18	21	26	27
A487-G1T3/B167-Lamlib	47	54	138	63	7	8	18	21	26	27
A488-G1T3/B226-Lamlib	48	56	138	63	7	12	18	21	26	28
A489-G1T3/B223-Lamlib	49	57	138	63	7	13	18	21	26	29
A548-G1T3/B376-Lamlib	50	58	138	63	7	14	19	23	26	27
A551-G1T3/B256-Lamlib	51	59	138	63	7	15	20	24	26	27
A551-G1T3/B379-Lamlib	51	60	138	63	7	15	20	25	26	27
A555-G1T3/B379-Lamlib	52	60	138	63	7	16	20	25	26	27
A548-G1T3/B256-Lamlib	50	59	138	63	7	14	19	24	26	27
A549-G1T3/B167-Lamlib	53	54	138	63	7	14	17	21	26	27

[0448] 作製された改変体のATPに対する結合およびヒトCD137に対する結合がBiacore T200で評価された。ヒトCD137に対する結合測定は、ランニングバッファーとして20 mM ACES (pH 7.4), 150 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$, 0.05 % Tween20が用いられ、37℃で実施された。まずSeries S Sensor Chip CM3 (GE Healthcare) にSure Protein A (GE Healthcare) を固定化したチップに対して、ランニングバッファーで調製した抗体溶液を相互作用させることで、250～400RUの抗体が捕捉された。次に目的濃度になるようにATPが添加されたランニングバッファーで調製されたヒトCD137溶液、あるいはATPを含まないランニングバッファーで調製されたヒトCD137溶液を相互作用させることで、ATP存在下、およびATP非存在下でのヒトCD137との結合活性が評価された。抗原であるヒトCD137は実施例(1-1)で調製されたhCD137-HisBAPを使用し、抗原濃度0, 15.625, 62.5, 250, 1000nMでKD値の測定が実施された。結合量の評価に関しては抗原濃度0, 1000nMで測定が実施された。チップは25 mM NaOH と 10 mM Glycine-HCl (pH 1.5) を用いて再生され、繰り返し抗体を捕捉して測定が行われた。各抗体のヒトCD137に対する解離定数は、Biacore T200 Evaluation

Software 2.0 を用いて算出された。具体的には、測定により得られたセンサーグラムを1:1 Langmuir binding modelでglobal fittingさせることで結合速度定数ka(L/mol/s)、解離速度定数kd(1/s) が算出され、それらの値から解離定数KD (mol/L) が算出された。

表１８はこれらの測定結果を示す。

[0449] 改変抗体のヒトCD137に対する結合解析

[表18]

	ヒトCD137に対する結合						ヒトCD137に対する K_D (M)					
抗体名称	ATPなし	ATP = 1 μM	ATP = 10 μM	ATP = 100 μM	ADP = 10 μM	AMP = 10 μM	ATPなし	ATP = 1 μM	ATP = 10 μM	ATP = 100 μM	ADP = 10 μM	AMP = 10 μM
20H4.9-P253/20H4.9LC-k0	0.280	0.283	0.283	0.283	0.287	0.287	2.68E-08	2.17E-08	2.03E-08	2.04E-08	1.90E-08	2.17E-08
MOR-7480.1H-P253/MOR-7480.1L-lam	0.260	0.261	0.261	0.261	0.266	0.266	8.22E-08	8.40E-08	7.50E-08	6.31E-08	7.30E-08	8.46E-08
A375-G1T3/B167-Lamlib	0.053	0.179	0.255	0.275	0.280	0.276	N.A.	4.43E-07	6.17E-08	1.35E-08	5.43E-09	8.91E-09
A372-G1T3/B040-Lamlib	0.017	0.135	0.242	0.269	0.284	0.245	N.A.	1.14E-06	1.58E-07	5.25E-08	9.36E-09	1.47E-07
A356-G1T3/B040-Lamlib	0.008	0.083	0.211	0.262	0.278	0.255	N.A.	N.A.	4.90E-07	1.19E-07	3.31E-08	1.34E-07
A486-G1T3/B167-Lamlib	0.128	0.260	0.282	0.292	0.294	0.289	1.04E-06 *	7.30E-08	1.08E-08	3.22E-09	2.48E-09	4.33E-09
A487-G1T3/B167-Lamlib	0.110	0.229	0.270	0.282	0.283	0.279	1.43E-06 *	1.63E-07	2.70E-08	7.33E-09	3.01E-09	3.86E-09
A488-G1T3/B226-Lamlib	0.042	0.135	0.232	0.268	0.281	0.261	N.A.	4.24E-07	1.33E-07	5.77E-08	1.60E-08	6.80E-08
A489-G1T3/B223-Lamlib	0.004	0.095	0.214	0.257	0.276	0.261	N.A.	4.42E-06	3.45E-07	1.59E-07	5.45E-08	1.05E-07
A548-G1T3/B376-Lamlib	0.012	0.149	0.245	0.270	0.270	0.262	N.A.	6.75E-07	7.69E-08	1.53E-08	1.55E-08	3.71E-08
A551-G1T3/B256-Lamlib	0.006	0.133	0.254	0.285	0.285	0.275	N.A.	1.23E-06	1.44E-07	2.91E-08	2.81E-08	6.12E-08
A551-G1T3/B379-Lamlib	0.014	0.173	0.271	0.290	0.291	0.283	N.A.	5.59E-07	7.17E-08	1.58E-08	1.51E-08	3.25E-08
A555-G1T3/B379-Lamlib	0.017	0.180	0.267	0.282	0.282	0.274	N.A.	4.77E-07	5.84E-08	1.35E-08	1.31E-08	2.75E-08
A548-G1T3/B256-Lamlib	0.009	0.156	0.257	0.284	0.287	0.276	N.A.	9.31E-07	1.08E-07	2.63E-08	2.14E-08	4.61E-08
A549-G1T3/B167-Lamlib	0.048	0.209	0.261	0.277	0.279	0.272	N.A.	2.04E-07	2.83E-08	6.12E-09	5.53E-09	1.35E-08

N.A.: KD 値の決定には弱すぎる。

＊ KD 値は、steady state モデルで決定した。

[0450] 上記表１８中の「ヒトCD137に対する結合」の値は、記載されている各ATP濃度条件においてヒトCD137を1000 nMで相互作用させた際の単位抗体量あたりのヒトCD137の結合量を示し、「ヒトCD137に対するKD（M）」は各ATP濃度

条件におけるヒトCD137への解離定数を示す。表中の＊印を付したKD値は、steady state model で算出された。作製された改変体はいずれもATPが 1 μM で存在する条件よりも10 μMで存在下における結合量が多く、さらに100 μM 存在下における結合量が多かったことから、ATP濃度依存的にヒトCD137に結合することが示された。一方、比較対象である20H4.9-P253/20H4.9LC-k0およびMOR-7480.1H-P253/MOR-7480.1L-lamはATP濃度依存的なヒトCD137への結合は示さなかった。

[0451] (5-4) 改変された抗ヒトCD137抗体の、4-1BB Jurkatレポータージーンアッセイを用いたin vitroにおけるATP依存的なCD137アゴニスト活性の評価

作製された改変体のIn vitro活性測定には、GloResponse™ NF-κB-Luc2/4-1BB Jurkat cell line (Promega, CS196004)が用いられた。96ウェルプレートの各ウェルに、培地により5×10^4/mLに濃度を調製したFcγRIIB CHO-K1 Cells (Promega) が200 μLずつ加えられ、5% CO_2インキュベーター内にて37℃で一晩静置された。培地にはCHO culture medium (90% Ham's F12, 10% FBS) が用いられた。次に、培地がすべて吸引除去されたのち、Assay medium (99% RPMI, 1% FBS)で2×10^6/mLに調製されたGloResponse™ NF-κB-Luc2/4-1BB Jurkat cell lineが各ウェルに対して25 μL加えられた。続いて、最終濃度が0、0.001、0.01、0.1、1、10 μg/mLとなるようにAssay mediumで希釈された各抗体溶液がそれぞれ25μL加えられ、最後に最終濃度が0、250 μMとなるようにAssay mediumで希釈されたATP溶液が25μL加えられた。プレートは5% CO_2インキュベーター内にて37℃で6時間静置されたのち、室温で15分静置され、各ウェルにBio-Glo reagentが75 μLずつ加えられた。Bio-Glo reagentにはBio-Glo Luciferase Assay System (Buffer and Substrate)が使用された。その後、各ウェルの発光量がプレートリーダーで測定された。各ウェルの発光の値を抗体未添加ウェルの発光の値で割った値を相対発光量 (Fold induction) とし、各抗体のCD137アゴニスト活性を評価する指標とした。

結果を図８に示す。

[0452] (5-5) 改変された抗ヒトCD137抗体の、ヒト末梢血単核細胞を用いたin vitro

におけるATP依存的なCD137アゴニスト活性の評価

(5-5-1) ヒト末梢血単核細胞の単離

実施例2-6-1に記載の方法で、出願人社内の健常なボランティア採血より単離したヒト末梢血単核細胞（PBMC）が単離された。その後、培地（5%ヒト血清（SIGMA）、95%AIM-V（Thermo Fischer Scientific）にて細胞密度5x10^6 /mLに希釈された。

[0453] (5-5-2) ヒト末梢血単核細胞を用いた、CD137アゴニスト活性の評価

ヒト末梢血単核細胞は細胞密度5x10^6/mLに調整され、100 μLずつ96 ウェルマルチプルウェルプレート平底フタ付き（Corning）に播種された。その後、培地で希釈された0.04 μg/mL抗ヒトCD3ε抗体（BD社製、クローンSP34）および20 μg/mL抗ヒトCD28抗体（BD、クローン：CD28.2）が50 μL添加された。プレートは振盪されたのちに5%CO_2インキュベーター内にて37℃で6時間静置された。その後各ウェルに培地で希釈した2 mM ATP（SIGMA）もしくはATPを含まない培地のみ25 μLと40 μg/mLの各抗体25 μLが添加され、プレートが振盪されたのちに5%CO_2インキュベーター内にて37℃で18時間静置された。その後、培養上清を一部回収し、培養上清を用いて培養上清中に含まれるIL-2量がHuman IL-2 DuoSetELISAキット（R&D systems）もしくはHuman IL-2 ELISA Set (BD Biosciences)を用いて定量された。培養上清を回収した後のプレートは再び5%CO_2インキュベーター内にて37℃で24時間静置された。その後、培養上清が一部回収され、培養上清中に含まれるIFN-γ量がHuman IFN-γ DuoSetELISAキット（R&D systems）もしくはHuman IFN-γ ELISA Development Kit（PeproTech）を用いて定量された。ELISAは基本的にキット付属のプロトコルに従い、実施された。Human IL-2 DuoSetELISAキット（R&D systems）およびHuman IFN-γ DuoSetELISAキット（R&D systems）に関しては、H2O2およびtetramethylbenzidineを含むsubstrate solution（R&D systems）および1N H_2SO_4（Wako）を用いて、プロトコルに従い発色と発色停止が行われた。Human IL-2 ELISA Set（BD Biosciences）に関しては、1N H_2SO_4（Wako）を用いて発色停止が行われた。IFN-γ ELISA Development Kit（PeproTech）関しては

TMB Chromogen Solution (Thermo Fischer Scientific) および1N H_2SO_4 (Wako) を用いて発色と発色停止が行われた。その後吸光度の測定がEnVision (PerkinElmer) にて行われた。

結果を実施例5-5-3以下で詳述する。

[0454] (5-5-3) 重鎖定常領域のFcγ受容体への結合活性を上昇させることによるアゴニスト活性の増強の評価

実施例5-5-1および実施例5-5-2に記載の、ヒト末梢血単球を用いたin vitro評価により、重鎖定常領域のFcγRIIbへの結合活性を様々に上昇させたP587、MY518、TT14、TT16を用いることによるCD137アゴニスト活性への影響が評価された。

評価された抗体は表１９の通りである。

表１９に記載された抗体の作製は、実施例7-1に記載されている。250 μM ATP存在条件下にて、陰性コントロール抗体 (IC17HdK-MY518/IC17L-k0、IC17HdK-G4d/IC17L-k0) を添加した場合の培養上清中のIL-2およびIFN-γの量と比較して、当該抗体の添加により培養上清中のIL-2の量が1.05倍以上上昇かつIFN-γの量が1.15倍以上上昇させたことが確認された抗体に関して、CD137アゴニスト活性が示されたと判断された。なお、ヒト末梢血単核細胞 (PBMC) を用いたアゴニスト活性測定は、血液試料の提供者 (ドナー) 毎に差異が生じうる。この点を考慮し、複数のドナーから単離されたヒトPBMCの一部又は過半数についてCD137アゴニスト活性が示されなかった抗体については、他の一部のヒトPBMCにおいてアゴニスト活性の基準に合致していても、CD137アゴニスト活性が示されたと判断しないことができるものとした。

[0455] ATP 250 μM存在条件下でCD137アゴニスト活性を示すと判断された抗体は表１９の通りである。このことから重鎖定常領域のFcγRIIbへの結合活性が上昇したP587、TT16を組み合わせることでCD137アゴニスト活性が増強されることが示された (図９および図１０)。抗体がCD137発現細胞に対してアゴニスト活性を示す際に必要な、架橋の足場となるFcγRIIb発現細胞への結合活性が増加することによって、アゴニスト活性が増強されたと考えられる。(P

rotein Eng Des Sel. 2013 Oct; 26(10): 589-598. Published online 2013 Jun 5. doi: 10.1093/protein参照)

[0456] [表19]

評価された抗体の名称	ATP存在下で活性ありと 判断された抗体の名称
A375-MY518/B167-LamLib	A375-P587/B167-LamLib
A356-MY518/B040-LamLib	A356-P587/B040-LamLib
A375-P587/B167-LamLib	A375-TT16/B167-LamLib
A356-P587/B040-LamLib	A356-TT16/B040-LamLib
A375-TT16/B167-LamLib	
A356-TT16/B040-LamLib	
A375-TT14/B167-LamLib	

[0457] (5-5-4) 可変領域のATP依存的なCD137アゴニスト活性の評価

実施例5-5-1および実施例5-5-2に記載の、ヒト末梢血単球を用いたin vitro評価により、重鎖定常領域P587およびP253に様々な可変領域を組み合わせ、各可変領域のATP依存的なCD137アゴニスト活性が評価された。

評価された抗体は表２０の通りである。表２０に記載された抗体の作製は、実施例7-1に記載されている。250 μM ATP存在条件下にて、陰性コントロール抗体（IC17HdK-P253/IC17L-k0、IC17HdK-P587/IC17L-k0）を添加した場合の培養上清中のIL-2およびIFN-γの量と比較して、当該抗体の添加により培養上清中のIL-2の量が1.05倍以上上昇かつIFN-γの量が1.15倍以上上昇させたことが確認された抗体に関して、CD137アゴニスト活性が示されたと判断された。なお、ヒト末梢血単核細胞（PBMC）を用いたアゴニスト活性測定は、血液試料の提供者（ドナー）毎に差異が生じうる。この点を考慮し、複数のドナーから単離されたヒトPBMCの一部又は過半数についてCD137アゴニスト活性が示されなかった抗体については、他の一部のヒトPBMCにおいてアゴニスト活性の基準に合致していても、CD137アゴニスト活性が示されたと判断しないことができるものとした。ATP 250 μM存在条件下でCD137アゴニスト活性を示すと判断された抗体は表２０の通りである（図１１、図１２、図１３、図１４および図１５）。

[0458] さらに、250 μM ATP存在下にてCD137アゴニスト活性が示されたと判断さ

れた抗体のうち、ATP添加なしの条件下にて培養上清中のIL-2およびIFN-γのいずれの量に関しても陰性コントロール抗体（IC17HdK-P253/IC17L-k0、IC17HdK-P587/IC17L-k0）添加群に対するfold changeが、250 μM ATP存在条件下における陰性コントロールに対するfold changeよりも小さい抗体は、ATP非存在条件下にてCD137アゴニスト活性が低いと判断された。ATP 250 μM存在条件下にてCD137アゴニスト活性を示し、かつATP非存在条件下にてCD137アゴニスト活性が低いと判断された抗体は表２０の通りである（図１１、図１２、図１３、図１４および図１５）。これらの抗体は、ATP依存的なCD137アゴニスト活性を示したと判断された。

これらのことから、可変領域については、（重鎖可変領域／軽鎖可変領域）の組み合わせとして、（A375/B167）、（A356/B040）、（A372/B040）、（A486/B167）、（A488/B226）、（A489/B223）、（A551/B256）、（A548/B256）、および（A551/B379）がATP依存的にCD137アゴニスト活性を示すことが確認された。

[0459] [表20]

評価された抗体の名称	ATP存在下で活性ありと判断された抗体の名称	ATP非存在下で活性が低いと判断された抗体の名称
A372-P253/B040-LamLib	A372-P253/B040-LamLib	A372-P253/B040-LamLib
A486-P253/B167-LamLib	A486-P253/B167-LamLib	A486-P253/B167-LamLib
A488-P253/B226-LamLib	A488-P253/B226-LamLib	A488-P253/B226-LamLib
A489-P253/B223-LamLib	A489-P253/B223-LamLib	A489-P253/B223-LamLib
A551-P587/B256-LamLib	A551-P587/B256-LamLib	A551-P587/B256-LamLib
A375-P587/B167-LamLib	A375-P587/B167-LamLib	A375-P587/B167-LamLib
A548-P587/B256-LamLib	A548-P587/B256-LamLib	A548-P587/B256-LamLib
A356-P587/B040-LamLib	A356-P587/B040-LamLib	A356-P587/B040-LamLib
A551-P587/B379-LamLib	A551-P587/B379-LamLib	A551-P587/B379-LamLib

[0460] (5-5-5) Fcγ受容体への結合活性を上昇させた重鎖定常領域に重鎖定常領域のpIを上昇させる改変を組み合わることによるCD137アゴニスト活性の増強効果の評価

実施例5-5-1および実施例5-5-2に記載の、ヒト末梢血単球を用いたin vitro評価により、様々にFcγRIIbへの結合活性が上昇した重鎖定常領域に対して、重鎖定常領域のpIを上昇させる各種アミノ酸改変を導入した際の、CD137アゴニスト活性への影響が評価された。重鎖定常領域TT16、MY518、TT14へpIを上昇させるアミノ酸改変が導入された重鎖定常領域TT16+P343R/D413K（SCF02

8)、TT16+Q311R/P343R(SCF033)、MY518+P343R/D413K (SCF025)、MY518+Q311R/P343R (SCF030)、TT14+P343R/D413K (SCF027)、TT14+Q311R/P343R (SCF032)が作製された。pIを上昇させるアミノ酸改変が導入された評価された抗体の名称および対応するpIを上昇させるアミノ酸改変が導入される前の抗体の名称は表２１の通りである。表２１に記載された抗体の作製は、実施例7-2に記載されている。

[0461] pIを上昇させるアミノ酸改変が導入されたことによるアゴニスト活性の増強の評価に関しては、当該アミノ酸改変を含まない重鎖定常領域を含む抗体であるA375-TT16/B167-LamLib、A375-MY518/B167-LamLib、A375-TT14/B167-LamLib添加群に対して、その抗体の添加により培養上清中のIL-2の量が1.04倍以上上昇かつIFN-γの量が1.1倍以上上昇させたことが確認されたものに関して、CD137アゴニスト活性が増強されたと判断された。ATP 250 μM存在条件下において、pIを上昇させるアミノ酸改変を含まない重鎖定常領域を含む抗体と比較して、CD137アゴニスト活性が増強していることが示されたアミノ酸改変が導入された重鎖定常領域を含む抗体は表２２の通りである（図１０）。

[0462] このことから重鎖定常領域のFcγRIIbへの結合活性の上昇の程度に依存せず、重鎖定常領域のpIを上昇させる改変の導入が、抗ヒトCD137抗体のCD137アゴニスト活性を増強することが示された。重鎖定常領域のFcγRIIbへの結合を上昇させる改変に重鎖定常領域のpIを上昇させる改変を組み合わせることで、負に帯電したFcγRIIb発現細胞表面との相互作用を増強し、抗体、あるいは抗原一に結合した抗体の免疫複合体がFcγRIIb発現細胞表面により近づくことにより、抗体がCD137発現細胞に対してアゴニスト活性を示す際に必要な、架橋の足場となるFcγRIIb発現細胞への結合性がさらに増加することによって、アゴニスト活性がさらに増強されたとことが示唆された。

[0463]

[表21]

pIを上昇させるアミノ酸改変が導入された評価された重鎖定常領域の名称	pIを上昇させるアミノ酸改変が導入される前の対応する重鎖定常領域の名称	導入されたpI改変
A375-SCF028/B167-LamLib	A375-TT16/B167-LamLib	P343R/D413K
A375-SCF033/B167-LamLib	A375-TT16/B167-LamLib	Q311R/P343R
A375-SCF025/B167-LamLib	A375-MY518/B167-LamLib	P343R/D413K
A375-SCF030/B167-LamLib	A375-MY518/B167-LamLib	Q311R/P343R
A375-SCF027/B167-LamLib	A375-TT14/B167-LamLib	P343R/D413K
A375-SCF032/B167-LamLib	A375-TT14/B167-LamLib	Q311R/P343R

[0464] [表22]

アゴニスト活性が増強されたと判断された抗体の名称
A375-SCF028/B167-LamLib
A375-SCF033/B167-LamLib
A375-SCF025/B167-LamLib
A375-SCF030/B167-LamLib
A375-SCF027/B167-LamLib
A375-SCF032/B167-LamLib

[0465] (5-5-6) 重鎖定常領域のpIを上昇させる各改変の導入によるアゴニスト活性への影響の評価

実施例5-5-1および実施例5-5-2に記載の、ヒト末梢血単球を用いたin vitro評価により、重鎖定常領域MY201aPhおよびMY518にpIを上昇させるための各種アミノ酸改変を導入し、当該アミノ酸改変がCD137アゴニスト活性に与える影響が評価された。重鎖定常領域MY518およびMY518aおよびMY201aPhにpIを上昇させるアミノ酸改変を導入した、MY518+P343R/D413K (SCF025)、MY518+Q311R/P343R (SCF030)、MY518+P343R (SCF039)、MY518+D413K (SCF040)、MY518a+Q311R (SCF060a)、MY201aPh+P343R (SCF041aPh)、MY201aPh+P343R/D413K (SCF043aPh)、MY201aPh+Q311R (SCF056aPh)、MY201aPh+Q311R/P343R (SCF057aPh)、MY201aPh+Q311R/D413K (SCF059aPh)が作製された。pIを上昇させるアミノ酸改変が導入された評価された抗体の名称および対応するpIを上昇させるアミノ酸改変が導入される前の抗体の名称は表２３の通りである。表２３に記載された抗体の作製は、実施例7-2に記載されている。

[0466] pIを上昇させるアミノ酸改変が導入されたことによるアゴニスト活性の増強の評価に関しては、当該アミノ酸改変を含まない重鎖定常領域を含む抗体

であるA375-MY518a/B167-LamLib、A375-MY201aPh/B167-LamLib添加群に対して、その抗体の添加により培養上清中のIL-2の量が1.04倍以上上昇かつIFN-γの量が1.1倍以上上昇させたことが確認されたものに関して、CD137アゴニスト活性が増強されたと判断された。ATP 250 μM存在条件下においてpIを上昇させるアミノ酸改変を含まない重鎖定常領域を含む抗体と比較して、CD137アゴニスト活性の増強が示されたアミノ酸改変が導入された重鎖定常領域を含む抗体は、表２４の通りである（図１６および図１７）。

[0467] [表23]

pIを上昇させるアミノ酸改変が導入された評価された重鎖定常領域の名称	pIを上昇させるアミノ酸改変が導入される前の対応する重鎖定常領域の名称	導入されたpI改変
A375-SCF025/B167-LamLib	A375-MY518/B167-LamLib	P343R/D413K
A375-SCF030/B167-LamLib	A375-MY518/B167-LamLib	Q311R/P343R
A375-SCF039/B167-LamLib	A375-MY518/B167-LamLib	P343R
A375-SCF040/B167-LamLib	A375-MY518/B167-LamLib	D413K
A375-SCF060a/B167-LamLib	A375-MY518a/B167-LamLib	Q311R
A375-SCF041aPh/B167-LamLib	A375-MY201aPh/B167-LamLib	P343R
A375-SCF043aPh/B167-LamLib	A375-MY201aPh/B167-LamLib	P343R/D413K
A375-SCF056aPh/B167-LamLib	A375-MY201aPh/B167-LamLib	Q311R
A375-SCF057aPh/B167-LamLib	A375-MY201aPh/B167-LamLib	Q311R/P343R
A375-SCF059aPh/B167-LamLib	A375-MY201aPh/B167-LamLib	Q311R/D413K

[0468] [表24]

アゴニスト活性が増強されたと判断された抗体名
A375-SCF025/B167-LamLib
A375-SCF030/B167-LamLib
A375-SCF039/B167-LamLib
A375-SCF040/B167-LamLib
A375-SCF060a/B167-LamLib
A375-SCF041aPh/B167-LamLib
A375-SCF043aPh/B167-LamLib
A375-SCF056aPh/B167-LamLib
A375-SCF057aPh/B167-LamLib
A375-SCF059aPh/B167-LamLib

[0469] (5-5-7) 作製された可変領域と定常領域を組み合わせた抗ヒトCD137抗体の、ATP依存的CD137アゴニスト活性の評価

実施例5-5-1および実施例5-5-2に記載の、ヒト末梢血単球を用いたin vitro評価により、上述で作製された各可変領域と、pIを上昇させる重鎖定常領域を組み合わせて作製された抗ヒトCD137抗体の、ATP依存的なCD137アゴニスト活性が評価された。評価された抗体は表２５の通りである。

250 μM ATP存在条件下にて、陰性コントロール抗体（IC17HdK-MY518a/IC17L-k0、IC17HdK-MY201aPh/IC17L-k0、IC17HdK-MY201/IC17L-k0、IC17HdK-G4d/IC17L-k0、IC17HdK-MY518/IC17L-k0、またはIC17HdK-TT16/IC17L-k0）を添加した場合の培養上清中のIL-2およびIFN-γの量と比較して、当該抗体の添加により培養上清中のIL-2の量が1.05倍以上上昇かつIFN-γの量が1.15倍以上上昇させたことが確認された抗体に関して、CD137アゴニスト活性が示されたと判断された。なお、ヒト末梢血単核細胞（PBMC）を用いたアゴニスト活性測定は、血液試料の提供者（ドナー）毎に差異が生じうる。この点を考慮し、複数のドナーから単離されたヒトPBMCの一部又は過半数についてCD137アゴニスト活性が示されなかった抗体については、他の一部のヒトPBMCにおいてアゴニスト活性の基準に合致していても、CD137アゴニスト活性が示されたと判断しないことができるものとした。ATP 250 μM存在条件下でCD137アゴニスト活性を示すと判断された抗体は表２５の通りである（図１６、図１７、図１８、図１９、図２０、図２１、図２２および図２３）。

[0470] さらに、これらの抗体のうち、250 μM ATP存在下にてCD137アゴニスト活性が示されたと判断された抗体のうち、ATP添加なしの条件下にて培養上清中のIL-2およびIFN-γのいずれの量に関しても陰性コントロール（IC17HdK-MY518a/IC17L-k0、IC17HdK-MY201aPh/IC17L-k0、IC17HdK-MY201/IC17L-k0、IC17HdK-G4d/IC17L-k0、IC17HdK-MY518/IC17L-k0、またはIC17HdK-TT16/IC17L-k0）添加群に対するfold changeが、250 μM ATP存在条件下における陰性コントロールに対するfold changeよりも小さい抗体は、ATP非存在条件下にてCD137アゴニスト活性が低いと判断された。ATP非存在条件下にてCD137アゴニスト活性が低いと判断された抗体は表２５の通りである（図１６、図１７、図１８、図１９、図２０、図２１、図２２および図２３）。これらの抗体はATP依存的にCD137アゴニスト活性を示すことが示された。

[0471]

[表25]

評価された抗体の名称	ATP存在下で活性ありと判断された抗体の名称	ATP非存在下で活性が低いと判断された抗体の名称
A375-MY518/B167-LamLib	A375-SCF025/B167-LamLib	A375-SCF025/B167-LamLib
A375-SCF025/B167-LamLib	A375-SCF030/B167-LamLib	A375-SCF030/B167-LamLib
A375-SCF030/B167-LamLib	A375-SCF039/B167-LamLib	A375-SCF039/B167-LamLib
A375-SCF039/B167-LamLib	A375-SCF040/B167-LamLib	A375-SCF040/B167-LamLib
A375-SCF040/B167-LamLib	A375-MY518a/B167-LamLib	A375-MY518a/B167-LamLib
A375-MY518a/B167-LamLib	A375-SCF060a/B167-LamLib	A375-SCF060a/B167-LamLib
A375-SCF060a/B167-LamLib	A375-SCF041aPh/B167-LamLib	A375-SCF041aPh/B167-LamLib
A375-MY201aPh/B167-LamLib	A375-SCF043aPh/B167-LamLib	A375-SCF043aPh/B167-LamLib
A375-SCF041aPh/B167-LamLib	A375-SCF056aPh/B167-LamLib	A375-SCF056aPh/B167-LamLib
A375-SCF043aPh/B167-LamLib	A375-SCF057aPh/B167-LamLib	A375-SCF057aPh/B167-LamLib
A375-SCF056aPh/B167-LamLib	A375-SCF059aPh/B167-LamLib	A551-SCF041a/B256-LamLib
A375-SCF057aPh/B167-LamLib	A551-SCF041a/B256-LamLib	A551-SCF057a/B256-LamLib
A375-SCF059aPh/B167-LamLib	A551-SCF057a/B256-LamLib	A551-SCF059a/B256-LamLib
A551-SCF041a/B256-LamLib	A551-SCF059a/B256-LamLib	A551-SCF057aPh/B256-LamLib
A551-SCF056a/B256-LamLib	A551-SCF057aPh/B256-LamLib	A551-SCF025a/B256-LamLib
A551-SCF057a/B256-LamLib	A551-SCF059aPh/B256-LamLib	A551-SCF039a/B256-LamLib
A551-SCF059a/B256-LamLib	A551-SCF025a/B256-LamLib	A551-SCF043a/B256-LamLib
A551-SCF056aPh/B256-LamLib	A551-SCF039a/B256-LamLib	A551-SCF041aPh/B256-LamLib
A551-SCF057aPh/B256-LamLib	A551-MY201a/B256-LamLib	A551-SCF043aPh/B256-LamLib
A551-SCF059aPh/B256-LamLib	A551-SCF043a/B256-LamLib	A551-SCF039a/B379-LamLib
A551-MY518/B256-LamLib	A551-SCF041aPh/B256-LamLib	A551-SCF041a/B379-LamLib
A551-SCF025a/B256-LamLib	A551-SCF043aPh/B256-LamLib	A551-SCF043a/B379-LamLib
A551-SCF039a/B256-LamLib	A551-SCF039a/B379-LamLib	A551-SCF041aPh/B379-LamLib
A551-MY201a/B256-LamLib	A551-SCF041a/B379-LamLib	A551-SCF043aPh/B379-LamLib
A551-SCF043a/B256-LamLib	A551-SCF043a/B379-LamLib	A551-SCF060a/B379-LamLib
A551-MY201aPh/B256-LamLib	A551-SCF041aPh/B379-LamLib	A551-SCF057a/B379-LamLib
A551-SCF041aPh/B256-LamLib	A551-SCF043aPh/B379-LamLib	A551-SCF059a/B379-LamLib
A551-SCF043aPh/B256-LamLib	A551-SCF060a/B379-LamLib	A551-SCF056aPh/B379-LamLib
A551-MY518a/B379-LamLib	A551-SCF057a/B379-LamLib	A551-SCF057aPh/B379-LamLib
A551-SCF039a/B379-LamLib	A551-SCF059a/B379-LamLib	A551-SCF059aPh/B379-LamLib
A551-SCF041a/B379-LamLib	A551-SCF056aPh/B379-LamLib	A375-TT16/B167-LamLib
A551-SCF043a/B379-LamLib	A551-SCF057aPh/B379-LamLib	A356-TT16/B040-LamLib
A551-SCF041aPh/B379-LamLib	A551-SCF059aPh/B379-LamLib	A551-TT16/B379-LamLib
A551-SCF043aPh/B379-LamLib	A375-TT16/B167-LamLib	
A551-SCF060a/B379-LamLib	A356-TT16/B040-LamLib	
A551-SCF056a/B379-LamLib	A551-TT16/B379-LamLib	
A551-SCF057a/B379-LamLib		
A551-SCF059a/B379-LamLib		
A551-SCF056aPh/B379-LamLib		
A551-SCF057aPh/B379-LamLib		
A551-SCF059aPh/B379-LamLib		
A375-TT16/B167-LamLib		
A356-TT16/B040-LamLib		
A551-TT16/B379-LamLib		

[0472] 実施例6：抗ヒトCD137スイッチ抗体の、ヒトCD137 ノックインマウス投与試験

(6-1) ヒトCD137 ノックインマウス投与試験のための抗体の作製

ヒトCD137ノックインマウス投与試験のために、マウス定常領域を有する抗ヒトCD137スイッチ抗体およびノンスイッチ抗体が作製された。具体的には、

抗ヒトCD137ノンスイッチ抗体（20H4.9-mIgG1/20H4.9LC-mk0 略名：NS1-mIgG1、20H4.9-MB110/20H4.9LC-mk0 略名：NS1-MB110、20H4.9-MB492/20H4.9LC-mk0 略名：NS1-MB492、MOR-7480.1H-MB110/MOR-7480.1L-ml0r 略名：NS2-MB110、MOR-7480.1H-MB492/MOR-7480.1L-ml0r 略名：NS2-MB492)、および抗ヒトCD137スイッチ抗体（A375-mIgG1/B167-ml0r、A372-mIgG1/B040-ml0r、A372-MB110/B040-ml0r、A372-MB492/B040-ml0r、A356-MB110/B040-ml0r、A486-MB492/B167-ml0r、A488-MB492/B226-ml0r、A489-MB492/B223-ml0r、A551-mIgG1/B256-ml0r、A551-MB110/B379-ml0r、およびA548-mIgG1/B256-ml0r）が作製された。

[0473] NS1-mIgG1、NS1-MB110およびNS1-MB492抗体の重鎖は、重鎖可変領域20H4.9（配列番号：139)に、重鎖定常領域として、

(i) マウスIgG1の重鎖定常領域であるmIgG1（配列番号：144)、

(ii) WO2014030750に記載のMB110（配列番号：145）、または

(iii) WO2014030750に記載のMB492（配列番号：146）

のいずれかを組み合わせた抗体重鎖の遺伝子が作製された。すなわち、20H4.9-mIgG1、20H4.9-MB110、および20H4.9-MB492の遺伝子が作製された。

NS1-mIgG1、NS1-MB110およびNS1-MB492抗体の軽鎖は、軽鎖可変領域20H4.9LC（配列番号：140）に、軽鎖定常領域としてマウスκ鎖mk0（配列番号：147）を組み合わせた抗体軽鎖20H4.9LC-mk0の遺伝子が作製された。これら重鎖及び軽鎖の遺伝子を組み合わせることで当業者公知の方法により各抗体が発現、精製された。

[0474] NS2-MB110 およびNS2-MB492抗体の重鎖は、重鎖可変領域MOR-7480.1H（配列番号：142）に、重鎖定常領域として（i）MB110（配列番号：145）あるいは

(ii) MB492（配列番号：146）

のいずれかを組み合わせた抗体重鎖の遺伝子が作製された。すなわち、MOR-7480.1H-MB110およびMOR-7480.1H-MB492の遺伝子が作製された。

NS2-MB110 およびNS2-MB492抗体の軽鎖は、軽鎖可変領域MOR-7480.1L（配

列番号：143）に軽鎖定常領域としてマウスλ鎖ml0r（配列番号：148)を組み合わせた抗体軽鎖MOR-7480.1L-ml0r の遺伝子が作製された。これら重鎖及び軽鎖の遺伝子を組み合わせることで当業者公知の方法により各抗体が発現、精製された。

抗CD137スイッチ抗体は、下記表２６および表２７の抗体重鎖および抗体軽鎖の遺伝子が作製され、これらの遺伝子を組み合わせることで当業者公知の方法により各抗体が発現、精製された。

[0475] マウス定常領域を有する抗CD137スイッチ抗体の抗体重鎖

[表26]

重鎖全長	A375-mIgG1	可変領域	A375(配列番号:43)
		定常領域	mIgG1（配列番号:144）
重鎖全長	A372-mIgG1	可変領域	A372(配列番号:44)
		定常領域	mIgG1（配列番号:144）
重鎖全長	A372-MB110	可変領域	A372(配列番号:44)
		定常領域	MB110（配列番号:145）
重鎖全長	A372-MB492	可変領域	A372(配列番号:44)
		定常領域	MB492（配列番号:146）
重鎖全長	A356-MB110	可変領域	A356(配列番号:45)
		定常領域	MB110（配列番号:145）
重鎖全長	A486-MB492	可変領域	A486(配列番号:46)
		定常領域	MB492（配列番号:146）
重鎖全長	A488-MB492	可変領域	A488(配列番号:48)
		定常領域	MB492（配列番号:146）
重鎖全長	A489-MB492	可変領域	A489(配列番号:49)
		定常領域	MB492（配列番号:146）
重鎖全長	A548-mIgG1	可変領域	A548(配列番号:50)
		定常領域	mIgG1（配列番号:144）
重鎖全長	A551-mIgG1	可変領域	A551(配列番号:51)
		定常領域	mIgG1（配列番号:144）
重鎖全長	A551-MB110	可変領域	A551(配列番号:51)
		定常領域	MB110（配列番号:145）

[0476] マウス定常領域を有する抗CD137スイッチ抗体の抗体軽鎖

[表27]

軽鎖全長	B040-mI0r	可変領域	B040 (配列番号:55)
		定常領域	mI0r (配列番号:148)
軽鎖全長	B167-mI0r	可変領域	B167 (配列番号:54)
		定常領域	mI0r (配列番号:148)
軽鎖全長	B226-mI0r	可変領域	B226 (配列番号:56)
		定常領域	mI0r (配列番号:148)
軽鎖全長	B223-mI0r	可変領域	B223 (配列番号:57)
		定常領域	mI0r (配列番号:148)
軽鎖全長	B256-mI0r	可変領域	B256 (配列番号:59)
		定常領域	mI0r (配列番号:148)
軽鎖全長	B379-mI0r	可変領域	B379 (配列番号:60)
		定常領域	mI0r (配列番号:148)

[0477] (6-2) ヒト CD137 ノックインマウス投与試験用に調製された抗体の、ヒトCD137に対する結合活性の評価

実施例6-1で作製された抗ヒトCD137ノンスイッチ抗体および抗CD137スイッチ抗体の、ヒトCD137に対する結合活性が評価された。ヒトCD137に対する結合測定は、ランニングバッファーとして20 mM ACES (pH 7.4), 150 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$, 0.05 % Tween20が用いられ、37℃で実施された。まずSeries S Sensor Chip CM5 (GE Healthcare) にRabbit Anti-Mouse IgG (Thermo Scientific) を固定化したチップに対して、ランニングバッファーで調製した抗体溶液を相互作用させることで、抗体が捕捉された。次に目的濃度になるようにATPが添加されたランニングバッファーで調製されたヒトCD137溶液、あるいはATPを含まないランニングバッファーで調製されたヒトCD137溶液を相互作用させることで、ATP存在下、およびATP非存在下でのヒトCD137との結合活性が評価された。抗原であるヒトCD137は実施例(1-2)で調製されたhCD137(FXa digested)を使用し、抗原濃度0, 15.625, 62.5, 250, 1000nMで測定が実施された。チップは25 mM NaOH と 10 mM Glycine-HCl (pH 1.5) を用いて再生され、繰り返し抗体を捕捉して測定が行われた。各抗体のヒトCD137に対する解離定数 (KD) は、Biacore T200 Evaluation Software 2.0 を用いて算出さ

れた。具体的には、測定により得られたセンサーグラムを1:1 Langmuir binding modelでglobal fittingさせることで結合速度定数ka(L/mol/s)、解離速度定数kd(1/s）が算出され、それらの値から解離定数KD（mol/L）が算出された。

表２８はこれらの測定結果を示す。

[0478] マウス定常領域を有する抗CD137抗体のヒトCD137に対する結合解析

[表28]

	ヒトCD137に対するK_D(M)			
抗体名称	No ATP	ATP = 1 μM	ATP = 10 μM	ATP = 100 μM
NS1-mIgG1	6.17E-08	5.62E-08	5.44E-08	5.36E-08
NS1-MB110	6.10E-08	5.65E-08	5.39E-08	5.19E-08
NS1-MB492	6.16E-08	5.49E-08	5.35E-08	5.04E-08
NS2-MB110	1.88E-07	1.44E-07	1.02E-07	1.04E-07
NS2-MB492	2.16E-07	1.70E-07	1.12E-07	1.12E-07
A375-mIgG1/B167-mI0r	N.A.	3.43E-07	1.14E-07	2.92E-08
A372-mIgG1/B040-mI0r	N.A.	4.78E-07	2.59E-07	1.08E-07
A372-MB110/B040-mI0r	N.A.	6.11E-07	2.64E-07	1.12E-07
A372-MB492/B040-mI0r	N.A.	7.82E-07	2.51E-07	1.04E-07
A356-MB110/B040-mI0r	N.A.	1.01E-06	4.10E-07	1.68E-07
A486-MB492/B167-mI0r	N.A.	1.31E-07	2.70E-08	7.67E-09
A488-MB492/B226-mI0r	N.A.	N.D.	1.36E-07	8.25E-08
A489-MB492/B223-mI0r	N.A.	1.62E-06	3.58E-07	1.54E-07
A551-mIgG1/B256-mI0r	N.A.	7.55E-07	2.31E-07	6.22E-08
A551-MB110/B379-mI0r	N.A.	5.12E-07	1.43E-07	3.51E-08
A548-mIgG1/B256-mI0r	N.A.	8.61E-07	2.19E-07	5.58E-08

N.A.: KD 値の決定には弱すぎる。
N.D.: 未決定

[0479] 上記で作製された、マウス定常領域を含む抗ヒトCD137ノンスイッチ抗体および抗ヒトCD137スイッチ抗体はいずれも、ヒトCD137に結合することが確認された。また抗ヒトCD137スイッチ抗体はいずれも、ATP濃度依存的にヒトCD137に結合することが示された。一方ノンスイッチ抗体においてはそのようなATP濃度依存的なヒトCD137への結合は観察されず、どのATP濃度においてもほぼ同等の結合を示した。

[0480] (6-3) 改変された抗体のヒトCD137 ノックインマウスにおける血漿中動態評価

(6-3-1) ヒトCD137ノックインマウスの作製

マウス胚性幹細胞（ES細胞）へのヒトCD137遺伝子置換ベクターの導入により

、マウスCD137遺伝子をヒトCD137遺伝子に置換したヒトCD137ノックインマウスを作製した。このマウスをhCD137 KIマウスと記載する。

[0481] (6-3-2) hCD137KIマウスモデルにおける、血漿中の抗ヒトCD137抗体濃度の測定

実施例6-3-1のhCD137KIマウス作製後、表２９のとおり、各抗体がhCD137KIマウスに単回静脈内投与された。表２９のうち、NS1-mIgG1, NS1-MB110, NS1-MB492はいずれもノンスイッチ抗体、その他はスイッチ抗体である。投与後5分後から28日後にわたり、経時的に複数回血液が採取された。得られた血液は遠心され、血漿が分離された。血漿は測定まで-20℃以下に設定されたフリーザーに保存された。

[0482] 血漿中動態評価試験のための群詳細

[表29]

群	匹数	薬剤	用量 [mg/kg]
1	3	NS1-mIgG1	7.5 単回投与
2	3	NS1-MB110	7.5 単回投与
3	3	NS1-MB492	7.5 単回投与
4	3	A375-mIgG1/B167-mIOr	7.5 単回投与
5	3	A356-MB110/BO40-mIOr	7.5 単回投与
6	3	A372-mIgG1/BO40-mIOr	7.5 単回投与
7	3	A372-MB110/BO40-mIOr	7.5 単回投与
8	3	A372-MB492/BO40-mIOr	7.5 単回投与
9	3	A486-MB492/B167-mIOr	7.5 単回投与
10	3	A488-MB492/B226-mIOr	7.5 単回投与
11	3	A489-MB492/B223-mIOr	7.5 単回投与
12	3	A548-mIgG1/B256-mIOr	7.5 単回投与
13	3	A551-mIgG1/B256-mIOr	7.5 単回投与
14	3	A551-MB110/B379-mIOr	7.5 単回投与

[0483] 血漿中の各スイッチ抗体の濃度は電気化学発光(ECL)法で測定された。具体的には、hCD137 (Sino Biological Inc.) はPBS(-)で希釈され、MULTI-ARRAY 96-well Plate (Meso Scale Diagnostics, LLC) に添加された。hCD137が添加されたプレートは、室温で1時間振とうされ、hCD137はプレートに固相された。その後、ブロッキングのため、1%BSA, 0.05% Tween20含有PBS溶液が添加され、室温で1時間振とうされた。各スイッチ抗体の検量線は、血漿中濃度と

して64, 32, 16, 8, 4, 2, 1 ng/mLに調製された。hCD137固相プレートに3mM ADP, 1%BSA, 0.05% Tween20含有PBS溶液が添加された後、2倍量の1%BSA, 0.05% Tween20含有PBS溶液で希釈された血漿サンプルならびに検量線試料が添加された。その後、当該プレートは室温で1時間振とうされた後、ビオチン化抗マウスIgG抗体（Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.）が添加された。さらに、当該プレートは室温で1時間振とうされた後、SULFO-TAG Labeled Streptavidin（Meso Scale Diagnostics, LLC）が添加された。さらに、当該プレートは室温で1時間振とうされた後、2mM ADP, 1%BSA, 0.05% Tween20含有PBS溶液で2倍希釈したRead buffer T（Meso Scale Diagnostics, LLC）が加えられた。hCD137KIマウス血漿中の各抗体濃度の測定は、SULFO-TAGをSECTOR Imager（Meso Scale Diagnostics, LLC）を用いて検出することにより行われた。マウス血漿中の各抗体濃度の算出は、SOFTmax PRO（Molecular Devices）を用いて行われた。

[0484] 血漿中の各ノンスイッチ抗体濃度は電気化学発光(ECL)法で測定された。具体的には、hCD137（Sino Biological Inc.）はPBS(-)で希釈され、MULTI-ARRAY 96-well Plate（Meso Scale Diagnostics, LLC)に添加された。hCD137が添加されたプレートは、室温で1時間振とうされ、hCD137はプレートに固相された。その後、ブロッキングのため、1%BSA, 0.05% Tween20含有PBS溶液が添加され、室温で1時間振とうされた。各ノンスイッチ抗体の検量線は、血漿中濃度として32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5 ng/mLに調製された。hCD137固相プレートに1%BSA, 0.05% Tween20含有PBS溶液で希釈された血漿サンプルならびに検量線試料が添加された。その後、当該プレートは室温で1時間振とうされた後、ビオチン化抗マウスIgG抗体（Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.）が添加された。さらに、当該プレートは室温で1時間振とうされた後、SULFO-TAG Labeled Streptavidin（Meso Scale Diagnostics, LLC）が添加された。さらに、当該プレートは室温で1時間振とうされた後、2倍希釈したRead buffer T（Meso Scale Diagnostics, LLC）が加えられた。hCD137KIマウス血漿中の各抗体濃度の測定は、上述のスイッチ抗体と同様に行われた。

[0485] 結果を図２４、図２５および図２６に示す。

表２９に示した各抗体のうち、FcがmIgG1である抗体（ノンスイッチ抗体としてNS1-mIgG1、スイッチ抗体としてA375-mIgG1/B167-ml0r、A372-mIgG1/B040-ml0r、A548-mIgG1/B256-ml0r、およびA551-mIgG1/B256-ml0r）の、hCD137 KIマウスにおける平均血漿中濃度の推移を表したのが図２４である。FcがMB110である抗体（ノンスイッチ抗体としてNS1-MB110、スイッチ抗体としてA356-MB110/B040-ml0r、A372-MB110/B040-ml0r、およびA551-MB110/B379-ml0r）の、hCD137 KIマウスにおける平均血漿中濃度の推移を表したのが図２５である。FcがMB492である抗体（ノンスイッチ抗体としてNS1-MB492、スイッチ抗体としてA372-MB492/B040-ml0r、A486-MB492/B167-ml0r、A488-MB492/B226-ml0r、およびA489-MB492/B223-ml0r）の、hCD137 KIマウスにおける平均血漿中濃度の推移を表したのが図２６である。なお、図２６において、A488-MB492/B226-ml0rについては、1例でADAによるものと疑われる血漿中濃度推移の急激な減少が確認されたので2例の平均値とした。

[0486] hCD137 KIマウスでは、いずれのFcにおいても、スイッチ抗体がノンスイッチ抗体よりも遅い血漿中からの消失を示した。これは、ノンスイッチ抗体がスイッチ抗体と比較し、体内に発現するCD137に結合したため、より早く血漿中から消失したためと考えられる。また、正常組織における細胞外ATP濃度は、本実験に用いたスイッチ抗体がCD137に結合を示さない程度に十分に低いことが示唆された。このことから、スイッチ抗体を用いることにより、全身に発現する抗原への結合性を低減でき、それにより血中動態のよい抗体を作製できることが示唆された。

[0487] (6-4) hCD137KIマウスを用いた同系腫瘍細胞移植モデルによる抗CD137抗体の薬効および全身反応マーカーの動き

(6-4-1) 細胞株および同系腫瘍移植マウスモデルの作製、ならびに、抗腫瘍効果および全身反応の評価方法

各種試験にはアメリカ国立がん研究所からライセンス供与されたマウス大腸がん細胞株MC38細胞と実施例6-3-1に記載されたhCD137 KIマウスが使用さ

れた。MC38細胞株はマウスの腹部皮下に移植され、腫瘍体積がおよそ50-300 mm^3になった時点でモデル成立とした。モデル成立後、MC38細胞株移植マウスは群分けが実施されたのちに、各種抗CD137抗体が投与された。

[0488] 抗腫瘍効果評価のため、腫瘍体積測定は週1-2回の頻度で実施された。また、腫瘍体積は以下の計算式にて算出された。

腫瘍体積（mm3）＝長径(mm)×短径(mm)×短径(mm)/2

[0489] 全身反応は、抗体投与後の適切なタイミングで肝臓及び脾臓またはリンパ節などが摘出され、臓器重量やリンパ球画分細胞数、またはフローサイトメトリー（FCM） を使ったＴ細胞解析により評価された。これらの各指標の評価においては、対象スイッチ抗体が、同量のノンスイッチ抗体（ATP依存的なヒトCD137結合活性を有しない抗ヒトCD137コントロール抗体）と比較して、全身反応を示す指標が低値である場合に、全身反応および／または腫瘍以外の組織（例えば、リンパ節、脾臓および肝臓）でのT細胞の活性化が抑制されたと評価された。

なお、各種試験には実施例6-1（ヒトCD137 ノックインマウス投与試験のための抗体の作製）にて作製された抗体が用いられた。

[0490] (6-4-2) MC38細胞株移植マウスからの各種臓器の摘出とリンパ球画分の調製

摘出された脾臓、リンパ節は重量測定もしくはリンパ球画分の細胞数測定が実施された。また、肝臓での活性化評価にはLiver dissociation kit, mouse (Milteny Biotec)を用いて得られたリンパ球画分が使用された。脾臓での活性化評価は溶血後のリンパ球画分が用いられ、リンパ節での活性化評価はすりつぶされて得られたリンパ球画分が用いられた。

[0491] (6-4-3) 各種臓器のリンパ球画分を用いたFCM解析

FCMによる活性化マーカー評価にはCD8α陽性 T細胞でのGranzyme B発現またはPD-1発現またはICOS発現、もしくはCD45陽性細胞に対するCD8α陽性T細胞の割合が用いられた。このためFCM解析では蛍光標識された抗Granzyme B抗体、抗PD-1抗体、抗ICOS抗体、抗CD8α抗体および抗CD45抗体等が用いられた。測定はBD LSRFortessa（商標）X-20（BD Biosciences）にて行われた。

[0492] (6-4-4) A375-mIgG1/B167-ml0r抗体に関する薬効（抗腫瘍効果）試験

実施例6-4-1のMC38移植マウスモデル作製後、表３０に示された用量で、Vehicle及びA375-mIgG1/B167-ml0rが投与された。抗体投与は群分け当日と群分け4日後の計2回、尾静脈経路より実施された。Vehicleには0.05% Tween-20含有PBSが用いられた。

[0493] A375-mIgG1/B167-ml0r抗体薬効試験のための群詳細

[表30]

群	匹数	薬剤	用量 [mg/kg]	投与日
1	5	Vehicle	-	群分け当日、及び４日後
2	5	A375-mIgG1/B167-ml0r	22.5	群分け当日、及び４日後
3	5	A375-mIgG1/B167-ml0r	7.5	群分け当日、及び４日後
4	5	A375-mIgG1/B167-ml0r	2.5	群分け当日、及び４日後
5	5	A375-mIgG1/B167-ml0r	0.83	群分け当日、及び４日後
6	5	A375-mIgG1/B167-ml0r	0.28	群分け当日、及び４日後

[0494] 各群における抗腫瘍効果は、実施例6-4-1に記載の方法で算出された腫瘍体積により評価された。その結果、A375-mIgG1/B167-ml0r抗体の用量依存的な抗腫瘍効果が確認された（図２７）。

[0495] (6-4-5) A375-mIgG1/B167-ml0rの全身作用評価のための抗体投与と採材、並びにFCM解析

実施例6-4-1のMC38移植マウスモデル作製後、表３１に示された通りにVehicle、NS1-mIgG1（ノンスイッチ抗体）及びA375-mIgG1/B167-ml0rが投与された。抗体投与は群分け当日と群分け3日後の計二回、尾静脈経路から実施された。Vehicleには0.05% Tween-20含有PBSが用いられた。

初回投与後5日後に実施例6-4-2（MC38細胞株移植マウスからの各種臓器の摘出とリンパ球画分の調製に示される方法で肝臓、リンパ節、脾臓が摘出された。なお、脾臓、リンパ節においては３匹分の臓器がpoolされ、実施例6-4-3（各種臓器のリンパ球画分を用いたFCM解析）に示される方法でFCM解析がなされた。

[0496] A375-mIgG1/B167-ml0r抗体による全身反応評価のための群詳細

[表31]

群	匹数	薬剤	用量 [mg/kg]	投与日	採材日
1	3	Vehicle	-	群分け当日、及び3日後	群分け5日後
2	3	NS1-mIgG1	0.06	群分け当日、及び3日後	群分け5日後
3	3	NS1-mIgG1	0.3	群分け当日、及び3日後	群分け5日後
4	3	NS1-mIgG1	1.5	群分け当日、及び3日後	群分け5日後
5	3	NS1-mIgG1	7.5	群分け当日、及び3日後	群分け5日後
6	3	NS1-mIgG1	37.5	群分け当日、及び3日後	群分け5日後
7	3	A375-mIgG1/B167-ml0r	1.5	群分け当日、及び3日後	群分け5日後
8	3	A375-mIgG1/B167-ml0r	7.5	群分け当日、及び3日後	群分け5日後
9	3	A375-mIgG1/B167-ml0r	37.5	群分け当日、及び3日後	群分け5日後

[0497] 上記投与抗体の全身作用が評価された。リンパ節、脾臓の臓器重量評価の結果、NS1-mIgG1投与時には0.3 mg/kgで臓器重量の増加が認められ、1.5 mg/kg, 7.5 mg/kgではさらに強い臓器肥大化現象が観察された。一方で、A375-mIgG1/B167-ml0r投与時には1.5 mg/kg, 7.5 mg/kg, 37.5 mg/kgいずれの投与量においても臓器の肥大化が観察されなかった（図２８）。

また、FCM評価によるT細胞活性化評価の結果、PD-1, ICOS, Granzyme Bいずれのマーカーにおいても NS1-mIgG1投与時には0.3 mg/kgにて発現上昇が観察された。一方で、A375-mIgG1/B167-ml0r投与時には1.5 mg/kg, 7.5 mg/kg, 37.5 mg/kgいずれの投与量においてもPD-1, ICOS, Granzyme B全てのマーカーで顕著な発現抑制が認められた（図２９、図３０）。なお、A375-mIgG1/B167-ml0rの結果より、リンパ節と脾臓においては臓器重量とT細胞活性化マーカーが相関する結果が示されたため、以降の抗体評価ではリンパ節および脾臓由来免疫細胞活性化の指標として、臓器重量を主に用いた。

[0498] 肝臓におけるT細胞活性化評価の結果、PD-1, Granzyme BいずれもNS1-mIgG1投与時には0.3 mg/kgにて発現上昇が観察された。一方で、A375-mIgG1/B167-ml0r投与時には1.5 mg/kg, 7.5 mg/kg, 37.5 mg/kgいずれの投与量においても発現抑制が認められた（図３１）。

以上より、当該スイッチ抗体は、同量のノンスイッチ抗体と比較して、リン

パ節、脾臓および肝臓においてT細胞の活性化を抑制させた。

[0499] (6-4-6) A356-MB110/B040-ml0r抗体に関する薬効（抗腫瘍効果）試験

実施例6-4-1のMC38移植マウスモデル作製後、表３２に示された用量でVehicle及びA356-MB110/B040-ml0rが投与された。抗体投与は群分け当日と群分け3日後の計2回、尾静脈経路より実施された。Vehicleには0.05% Tween-20含有PBSが用いられた。

[0500] A356-MB110/B040-ml0r抗体薬効試験のための群詳細

[表32]

群	匹数	薬剤	用量 [mg/kg]	投与日
1	5	Vehicle	-	群分け当日、及び３日後
2	5	A356-MB110/B040-ml0r	7.5	群分け当日、及び３日後
3	5	A356-MB110/B040-ml0r	2.5	群分け当日、及び３日後

[0501] 各群における抗腫瘍効果は、実施例6-4-1に記載の方法で算出された腫瘍体積により評価された。その結果、A356-MB110/B040-ml0rの用量依存的な抗腫瘍効果が確認された（図３２）。

[0502] (6-4-7) A356-MB110/B040-ml0rの全身作用評価のための抗体投与と採材、並びにFCM解析

実施例6-4-1のMC38移植マウスモデル作製後、表３３に示された通りにVehicle、NS2-MB110（ノンスイッチ抗体）及びA356-MB110/B040-ml0rが投与された。抗体投与は群分け当日と群分け3日後の計2回、尾静脈経路から実施された。Vehicleには0.05% Tween-20含有PBSが用いられた。

初回投与7日後に実施例6-4-2（MC38細胞株移植マウスからの各種臓器の摘出とリンパ球画分の調製）に示される方法で肝臓、リンパ節、脾臓が摘出された。なお、脾臓、リンパ節は臓器重量測定のみ実施された。

[0503] A356-MB110/B040-ml0r抗体による全身反応評価のための群詳細

[表33]

群	匹数	薬剤	用量 [mg/kg]	投与日	採材日
1	3	Vehicle	-	群分け当日、及び３日後	群分け７日後
2	3	NS2-MB110	7.5	群分け当日、及び３日後	群分け７日後
3	3	NS2-MB110	2.5	群分け当日、及び３日後	群分け７日後
4	3	NS2-MB110	0.3	群分け当日、及び３日後	群分け７日後
5	3	A356-MB110/B040-ml0r	7.5	群分け当日、及び３日後	群分け７日後
6	3	A356-MB110/B040-ml0r	2.5	群分け当日、及び３日後	群分け７日後

[0504] 上記投与抗体の全身作用が評価された。NS2-MB110及びA356-MB110/B040-ml0r投与時のリンパ節、脾臓の臓器重量評価の結果、NS2-MB110投与時には2.5 mg/kg投与時にも肥大化が観察された。一方で、A356-MB110/B040-ml0r投与時には7.5 mg/kg投与でもリンパ節肥大化抑制が認められ、脾臓については2.5 mg/kg投与時に肥大化抑制が認められた（図３３）。

また、肝臓におけるT細胞活性化評価の結果、NS2-MB110投与時には0.3 mg/kg投与時にもCD8α陽性細胞におけるPD-1発現の上昇が観察された。一方で、A356-MB110/B040-ml0r投与時には7.5 mg/kgでPD-1発現抑制、2.5 mg/kg投与時には顕著な発現抑制が認められた。CD8α陽性細胞におけるICOS発現ではNS2-MB110抗体 0.3 mg/kg投与時にもわずかな上昇が観察された。一方で、A356-MB110/B040-ml0r投与時には2.5 mg/kg投与時にはVehicle程度の発現に抑制されている事が観察された（図３４）。

以上より、当該スイッチ抗体は、ノンスイッチ抗体と比較して、リンパ節、脾臓および肝臓においてT細胞の活性化を抑制させた。

[0505] (6-4-8) A372-mIgG1/B040-ml0r抗体に関する薬効（抗腫瘍効果）試験

実施例6-4-1のMC38移植マウスモデル作製後、表３４に示された用量でVehicle及びA372-mIgG1/B040-ml0rが投与された。抗体投与は群分け当日と群分け4日後、7日後、10日後の計4回、尾静脈経路より実施された。Vehicleには0.05% Tween-20含有PBSが用いられた。

[0506] A372-mIgG1/B040-ml0r抗体薬効試験のための群詳細

[表34]

群	匹数	薬剤	用量 [mg/kg]	投与日
1	5	Vehicle	-	群分け当日、4 日後、7 日後、10 日後
2	5	A372-mIgG1/B040-ml0r	7.5	群分け当日、4 日後、7 日後、10 日後

[0507] 各群における抗腫瘍効果は、実施例6-4-1に記載の方法で算出された腫瘍体積により評価された。その結果、7.5 mg/kg投与において、A372-mIgG1/B040-ml0r抗体の抗腫瘍効果が認められた（図３５）。

[0508] (6-4-9) A372-mIgG1/B040-ml0rの全身作用評価のための抗体投与と採材、並びにFCM解析

実施例6-4-1のMC38移植マウスモデル作製後、表３５に示された通りにVehicle及びA372-mIgG1/B040-ml0rが投与された。抗体投与は群分け当日と群分け3日後後、6日後の計3回、尾静脈経路より実施された。Vehicleには0.05% Tween-20含有PBSが用いられた。

初回投与後７日後に実施例6-4-2（MC38細胞株移植マウスからの各種臓器の摘出とリンパ球画分の調製）に示される方法で肝臓、リンパ節、脾臓が摘出された。なお、脾臓は臓器重量のみ実施され、リンパ節は3匹のものをpoolしたのち、リンパ球画分の細胞数測定のみ実施された。

[0509] A372-mIgG1/B040-ml0r抗体による全身反応評価のための群詳細

[表35]

群	匹数	薬剤	用量 [mg/kg]	投与日	採材日
1	3	Vehicle	-	群分け当日、3 日後、6 日後	群分け 7 日後
2	3	A372-mIgG1/B040-ml0r	7.5	群分け当日、3 日後、6 日後	群分け 7 日後

[0510] 上記投与抗体の全身作用が評価された。リンパ節の細胞数測定、脾臓の臓器重量評価の結果、A372-mIgG1/B040-ml0r投与時にはリンパ節の細胞数増加、並びに脾臓重量の増加は認められず、Vehicle群と同等の臓器重量であることが確認された（図３６）。

肝臓におけるT細胞活性化評価の結果、A372-mIgG1/B040-ml0r投与時にはVe

hicle群と同程度のGranzyme B発現レベルであった（図３７）。

以上より、当該スイッチ抗体は、リンパ節、脾臓および肝臓においてT細胞の活性化抑制が確認された。

[0511] (6-4-10) A372-MB110/B040-ml0r抗体に関する薬効（抗腫瘍効果）試験

実施例6-4-1のMC38移植マウスモデル作製後、表３６に示された用量でVehicle及びA372-MB110/B040-ml0rが投与された。抗体投与は群分け当日と群分け4日後の計2回、尾静脈経路より実施された。Vehicleには0.05% Tween-20含有PBSが用いられた。

[0512] A372-MB110/B040-ml0r抗体薬効試験のための群詳細

[表36]

群	匹数	薬剤	用量 [mg/kg]	投与日
1	5	Vehicle	-	群分け当日、及び 3 日後
2	5	A372-MB110/B040-ml0r	7.5	群分け当日、及び 3 日後

[0513] 各群における抗腫瘍効果は、実施例6-4-1に記載の方法で算出された腫瘍体積により評価された。その結果、A372-MB110/B040-ml0rの抗腫瘍効果が確認された（図３８）。

[0514] (6-4-11) A372-MB110/B040-ml0rの全身作用評価のための抗体投与と採材、並びにFCM解析

実施例6-4-1のMC38移植マウスモデル作製後、表３７に示された通りにVehicle、NS2-MB110（ノンスイッチ抗体）及びA372-MB110/B040-ml0rが投与された。抗体投与は群分け当日と群分け3日後の計2回、尾静脈経路から実施された。Vehicleには0.05% Tween-20含有PBSが用いられた。

初回投与後7日後に実施例6-4-2（MC38細胞株移植マウスからの各種臓器の摘出とリンパ球画分の調製）に示されるように肝臓、リンパ節、脾臓が摘出された。なお、脾臓、リンパ節は重量測定のみ実施された。

[0515] A372-MB110/B040-ml0r抗体による全身反応評価のための群詳細

[表37]

群	匹数	薬剤	用量 [mg/kg]	投与日	採材日
1	3	Vehicle	-	群分け当日、及び３日後	群分け７日後
2	3	NS2-MB110	7.5	群分け当日、及び３日後	群分け７日後
3	3	NS2-MB110	2.5	群分け当日、及び３日後	群分け７日後
4	3	NS2-MB110	0.3	群分け当日、及び３日後	群分け７日後
5	3	A372-MB110/B040-ml0r	7.5	群分け当日、及び３日後	群分け７日後
6	3	A372-MB110/B040-ml0r	2.5	群分け当日、及び３日後	群分け７日後

[0516] 上記投与抗体の全身作用が評価された。リンパ節、脾臓の臓器重量評価の結果、NS2-MB110投与時には2.5 mg/kg, 7.5 mg/kgで臓器重量の増加が認められた。一方で、A372-MB110/B040-ml0r投与時には2.5 mg/kg, 7.5 mg/kgいずれの投与量においても臓器肥大化の抑制が観察された（図３９）。

肝臓におけるT細胞活性化評価の結果、PD-1はNS2-MB110投与時には発現上昇が観察された。これはA372-MB110/B040-ml0r投与時にも同様にみられていた（図４０）。

以上より、当該スイッチ抗体は、ノンスイッチ抗体と比較して、リンパ節、脾臓においてはT細胞の活性化抑制が確認された。

[0517] (6-4-12) A372-MB492/B040-ml0r抗体に関する薬効（抗腫瘍効果）試験

実施例6-4-1のMC38移植マウスモデル作製後、表３８に示された用量でVehicle及びA372-MB492/B040-ml0rが投与された。抗体投与は群分け当日と群分け3日後の計2回、尾静脈経路より実施された。Vehicleには0.05% Tween-20含有PBSが用いられた。

[0518] A372-MB492/B040-ml0r抗体薬効試験のための群詳細

[表38]

群	匹数	薬剤	用量 [mg/kg]	投与日
1	5	Vehicle	-	群分け当日、及び３日後
2	5	A372-MB492/B040-ml0r	1.5	群分け当日、及び３日後
3	5	A372-MB492/B040-ml0r	3.0	群分け当日、及び３日後
4	5	A372-MB492/B040-ml0r	7.5	群分け当日、及び３日後

[0519] 各群における抗腫瘍効果は、実施例6-4-1に記載の方法で算出された腫瘍体

積により評価された。その結果、いずれの投与量においてもA372-MB492/B040-ml0r抗体の抗腫瘍効果が認められた（図４１）。

[0520] (6-4-13) A372-MB492/B040-ml0r抗体の全身作用評価のための抗体投与と採材、並びにFCM解析

実施例6-4-1のMC38移植マウスモデル作製後、表３９に示された通りにVehicle、NS1-MB492（ノンスイッチ抗体）及びA372-MB492/B040-ml0rが投与された。抗体投与は群分け当日と群分け3日後の計2回、尾静脈経路から実施された。Vehicleには0.05% Tween-20含有PBSが用いられた。

初回投与後8日後に実施例6-4-2（MC38細胞株移植マウスからの各種臓器の摘出とリンパ球画分の調製）に示される方法で肝臓、リンパ節、脾臓が摘出された。なお、脾臓は臓器重量測定のみ、リンパ節はリンパ球画分調製後の細胞数測定のみ実施された。

[0521] A372-MB492/B040-ml0r抗体による全身反応評価のための群詳細

[表39]

群	匹数	薬剤	用量 [mg/kg]	投与日	採材日
1	3	Vehicle	-	群分け当日、及び３日後	群分け８日後
2	3	NS1-MB492	7.5	群分け当日、及び３日後	群分け８日後
3	3	A372-MB492/B040-ml0r	1.5	群分け当日、及び３日後	群分け８日後
4	3	A372-MB492/B040-ml0r	3.0	群分け当日、及び３日後	群分け８日後
5	3	A372-MB492/B040-ml0r	7.5	群分け当日、及び３日後	群分け８日後

[0522] 上記投与抗体の全身作用が評価された。脾臓の臓器重量よりNS1-MB492投与時には臓器重量の増加、細胞数測定によってNS1-MB492投与時にリンパ球画分の増加が認められた。一方で、A372-MB492/B040-ml0r投与時には1.5 mg/kg, 3.0 mg/kg, 7.5 mg/kgいずれの投与量においてもNS1-MB492と比較して、臓器肥大化抑制が観察された（図４２）。

肝臓におけるT細胞活性化評価の結果、NS1-MB492、A372-MB492/B040-ml0r投与時ともVehicleと比較してGranzyme Bの発現上昇が観察された（図４３）。

以上より、当該スイッチ抗体は、ノンスイッチ抗体と比較して、リンパ節、脾臓においてはT細胞の活性化抑制が確認された。

[0523] (6-4-14) A486-MB492/B167-ml0r及びA488-MB492/B226-ml0r抗体に関する薬効（抗腫瘍効果）試験

実施例6-4-1のMC38移植マウスモデル作製後、表４０に示された用量でVehicle及びA486-MB492/B167-ml0r、A488-MB492/B226-ml0rが投与された。細胞移植後10日後に群分けが実施され、抗体投与は細胞移植後11日後、15日後、18日後、22日後の計4回、尾静脈経路より実施された。Vehicleには0.05% Tween-20含有PBSが用いられた。

[0524] A486-MB492/B167-ml0r、A488-MB492/B226-ml0r抗体薬効試験のための群詳細

[表40]

群	匹数	薬剤	用量 [mg/kg]	投与日
1	5	Vehicle	-	移植後 11 日後、15 日後, 18 日後, 22 日後
2	5	A486-MB492/B167-ml0r	7.5	移植後 11 日後、15 日後, 18 日後, 22 日後
3	5	A488-MB492/B226-ml0r	7.5	移植後 11 日後、15 日後, 18 日後, 22 日後

[0525] 各群における抗腫瘍効果は、実施例6-4-1に記載の方法で算出された腫瘍体積により評価された。結果、A486-MB492/B167-ml0r及びA488-MB492/B226-ml0rによる抗腫瘍効果が確認された（図４４）。

[0526] (6-4-15) A486-MB492/B167-ml0r及びA488-MB492/B226-ml0rの全身作用評価のための抗体投与と採材、並びにFCM解析

実施例6-4-1のMC38移植マウスモデル作製後、表４１に示された通りにVehicle、NS1-MB492（ノンスイッチ抗体）及びA486-MB492/B167-ml0r及びA488-MB492/B226-ml0rが投与された。細胞移植後10日後に群分けが実施され、抗体投与は細胞移植後11日後、15日後、18日後、22日後の計4回、尾静脈経路より実施された。Vehicleには0.05% Tween-20含有PBSが用いられた。

初回投与後13日後に実施例6-4-2（MC38細胞株移植マウスからの各種臓器の摘出とリンパ球画分の調製）に示される方法で肝臓、リンパ節、脾臓が摘出された。なお、脾臓は臓器重量測定、リンパ節はリンパ球画分細胞数測定のみ実施された。

[0527] A486-MB492/B167-ml0r及びA488-MB492/B226-ml0r抗体による全身反応評価のための群詳細

[表41]

群	匹数	薬剤	用量 [mg/kg]	投与日	採材日
1	3	Vehicle	-	移植後 11 日後、15 日後, 18 日後, 22 日後	移植後 24 日後 (初回投与後 13 日後)
2	3	NS1-MB492	7.5	移植後 11 日後、15 日後, 18 日後, 22 日後	移植後 24 日後 (初回投与後 13 日後)
3	3	A486-MB492/B167-ml0r	7.5	移植後 11 日後、15 日後, 18 日後, 22 日後	移植後 24 日後 (初回投与後 13 日後)
4	3	A488-MB492/B226-ml0r	7.5	移植後 11 日後、15 日後, 18 日後, 22 日後	移植後 24 日後 (初回投与後 13 日後)

[0528] リンパ節のリンパ球画分細胞数数測定と脾臓重量測定の結果、NS1-MB492投与時にはリンパ球細胞数ならびに脾臓重量の増加が認められた。一方で、A486-MB492/B167-ml0r及びA488-MB492/B226-ml0r投与時にはNS1-MB492投与時と比較して、リンパ球数や脾臓重量の増加が抑制されていることが観察された（図４５）。

肝臓におけるT細胞活性化評価の結果、NS1-MB492及びA486-MB492/B167-ml0r、A488-MB492/B226-ml0r投与時ともVehicleと比較してCD8α陽性細胞の割合上昇が観察された（図４６）。

以上より、当該スイッチ抗体は、ノンスイッチ抗体と比較して、リンパ節、脾臓においてはT細胞の活性化抑制が確認された。

[0529] (6-4-16) A489-MB492/B223-ml0r抗体に関する薬効（抗腫瘍効果）試験

実施例6-4-1のMC38移植マウスモデル作製後、表４２に示された用量でVehicle及びA489-MB492/B223-ml0rが投与された。抗体は群分け翌日と群分け4日後、7日後、10日後の計4回、尾静脈経路より実施された。Vehicleには0.05% Tween-20含有PBSが用いられた。

[0530] A489-MB492/B223-ml0r抗体薬効試験のための群詳細

[表42]

群	匹数	薬剤	用量 [mg/kg]	投与日
1	5	Vehicle	-	群分け翌日、4 日後、7 日後、10 日後
2	5	A489-MB492/B223-ml0r	7.5	群分け翌日、4 日後、7 日後、10 日後

[0531] 各群における抗腫瘍効果は、実施例6-4-1に記載の方法で算出された腫瘍体積により評価された。結果、7.5 mg/kg投与において抗腫瘍効果が確認された（図４７）。

[0532] (6-4-17) A489-MB492/B223-ml0r抗体の全身作用評価のための抗体投与と採材、並びにFCM解析

実施例6-4-1のMC38移植マウスモデル作製後、表４３に示された通りにVehicle、NS1-MB492（ノンスイッチ抗体）及びA489-MB492/B223-ml0rが投与された。抗体投与は群分け当日と群分け3日後、6日後の計3回、尾静脈経路から実施された。Vehicleには0.05% Tween-20含有PBSが用いられた。

初回投与後7日後に実施例6-4-2（MC38細胞株移植マウスからの各種臓器の摘出とリンパ球画分の調製）に示される方法で肝臓、リンパ節、脾臓が摘出された。なお、脾臓、リンパ節はリンパ球画分調製後の細胞数測定のみ実施された。

[0533] A489-MB492/B223-ml0r抗体による全身反応評価のための群詳細

[表43]

群	匹数	薬剤	用量 [mg/kg]	投与日	採材日
1	3	Vehicle	-	群分け当日、3 日後、6 日後	群分け7日後
2	3	NS1-MB492	7.5	群分け当日、3 日後、6 日後	群分け7日後
3	3	A489-MB492/B223-ml0r	7.5	群分け当日、3 日後、6 日後	群分け7日後

[0534] リンパ節、脾臓のリンパ球画分細胞数数測定の結果、NS1-MB492投与時には細胞増加が認められた。一方で、A489-MB492/B223-ml0r投与時にはNS1-MB492投与時と比較して、リンパ球増加抑制の現象が観察された（図４８）。

肝臓におけるT細胞活性化評価の結果、NS1-MB492、A489-MB492/B223-ml0r投与時ともVehicleと比較してCD8α陽性細胞の割合上昇が観察された（図４

９）。

以上より、当該スイッチ抗体は、ノンスイッチ抗体と比較して、リンパ節、脾臓においてはT細胞の活性化抑制が確認された。

[0535] (6-4-18) A548-mIgG1/B256-ml0r及びA551-mIgG1/B256-ml0r抗体に関する薬効（抗腫瘍効果）試験

実施例6-4-1のMC38移植マウスモデル作製後、表４４に示された用量でVehicle及びA548-mIgG1/B256-ml0r 、A551-mIgG1/B256-ml0rが投与された。抗体投与は群分け当日と群分け3日後の計2回、尾静脈経路より実施された。Vehicleには0.05% Tween-20含有PBSが用いられた。

[0536] A548-mIgG1/B256-ml0r、 A551-mIgG1/B256-ml0r抗体薬効試験のための群詳細

[表44]

群	匹数	薬剤	用量 [mg/kg]	投与日
1	5	Vehicle	-	群分け当日、及び３日後
2	5	A548-mIgG1/B256-ml0r	7.5	群分け当日、及び３日後
3	5	A548-mIgG1/B256-ml0r	37.5	群分け当日、及び３日後
4	4	A548-mIgG1/B256-ml0r	100	群分け当日、及び３日後
5	5	A551-mIgG1/B256-ml0r	7.5	群分け当日、及び３日後
6	5	A551-mIgG1/B256-ml0r	37.5	群分け当日、及び３日後
7	4	A551-mIgG1/B256-ml0r	100	群分け当日、及び３日後

[0537] 各群における抗腫瘍効果は、実施例6-4-1に記載の方法で算出された腫瘍体積により評価された。結果、A548-mIgG1/B256-ml0r 投与では37.5 mg/kg、100 mg/kgにおいて、抗腫瘍効果が認められた。また、A551-mIgG1/B256-ml0rでは100 mg/kgにおいて顕著な抗腫瘍効果が認められた（図５０）。

[0538] (6-4-19) A548-mIgG1/B256-抗体およびA551-mIgG1/B256-抗体の全身作用評価のための抗体投与と採材、並びにFCM解析

実施例6-4-1のMC38移植マウスモデル作製後、表４５に示された通りにVehicle、NS1-mIgG1（ノンスイッチ抗体）及びA548-mIgG1/B256-ml0r 、A551-mIgG1/B256-ml0rが投与された。抗体投与は群分け当日と群分け3日後の計2回、尾静脈経路から実施された。Vehicleには0.05% Tween-20含有PBSが用いられ

た。

初回投与後5日後に実施例6-4-2（MC38細胞株移植マウスからの各種臓器の摘出とリンパ球画分の調製）に示される方法で肝臓、リンパ節、脾臓が摘出された。なお、脾臓、リンパ節は臓器重量測定のみ実施された。

[0539] A548-mIgG1/B256-ml0r 、A551-mIgG1/B256-ml0r抗体による全身反応評価のための群詳細

[表45]

群	匹数	薬剤	用量 [mg/kg]	投与日	採材日
1	3	Vehicle	-	群分け当日、及び３日後	群分け５日後
2	3	NS1-mIgG1	0.3	群分け当日、及び３日後	群分け５日後
3	3	NS1-mIgG1	1.5	群分け当日、及び３日後	群分け５日後
4	3	NS1-mIgG1	7.5	群分け当日、及び３日後	群分け５日後
5	3	A548-mIgG1/B256-ml0r	1.5	群分け当日、及び３日後	群分け５日後
6	3	A548-mIgG1/B256-ml0r	7.5	群分け当日、及び３日後	群分け５日後
7	3	A548-mIgG1/B256-ml0r	37.5	群分け当日、及び３日後	群分け５日後
8	3	A548-mIgG1/B256-ml0r	100	群分け当日、及び３日後	群分け５日後
9	3	A551-mIgG1/B256-ml0r	1.5	群分け当日、及び３日後	群分け５日後
10	3	A551-mIgG1/B256-ml0r	7.5	群分け当日、及び３日後	群分け５日後
11	3	A551-mIgG1/B256-ml0r	37.5	群分け当日、及び３日後	群分け５日後
12	3	A551-mIgG1/B256-ml0r	100	群分け当日、及び３日後	群分け５日後

[0540] リンパ節、脾臓の臓器重量評価の結果、NS1-mIgG1投与時には0.3 mg/kg, 1.5 mg/kg, 7.5 mg/kgで臓器重量の増加が認められた。一方で、A548-mIgG1/B256-ml0r、A551-mIgG1/B256-ml0r投与時には1.5 mg/kg, 7.5 mg/kg, 37.5 mg/kg, 100 mg/kgいずれの投与量においても臓器の肥大化が観察されなかった（図５１）。

肝臓におけるT細胞活性化評価の結果、Granzyme B , PD-1いずれもNS1-mIgG1投与時には0.3 mg/kgにて発現上昇が観察された。一方で、A548-mIgG1/B256-ml0r 、A551-mIgG1/B256-ml0r投与時には1.5 mg/kg, 7.5 mg/kg, 37.5 mg/kg, 100 mg/kgいずれの投与量においても発現抑制が認められた（図５２）。

以上より、当該スイッチ抗体は、ノンスイッチ抗体と比較して、リンパ節、脾臓および肝臓においてT細胞の活性化を抑制させた。

[0541] (6-4-20) A551-MB110/B379-ml0r抗体に関する薬効（抗腫瘍効果）試験

実施例6-4-1のMC38移植マウスモデル作製後、表４６に示された用量でVehicle及びA551-MB110/B379-ml0rが投与された。抗体投与は群分け当日と群分け3日後の計2回、尾静脈経路より実施された。Vehicleには0.05% Tween-20含有PBSが用いられた。

[0542] A551-MB110/B379-ml0r抗体薬効試験のための群詳細

[表46]

群	匹数	薬剤	用量 [mg/kg]	投与日
1	6	Vehicle	-	群分け当日、及び３日後
2	5	A551-MB110/B379-ml0r	2.5	群分け当日、及び３日後
3	6	A551-MB110/B379-ml0r	7.5	群分け当日、及び３日後
4	6	A551-MB110/B379-ml0r	22.5	群分け当日、及び３日後

[0543] 各群における抗腫瘍効果は、実施例6-4-1に記載の方法で算出された腫瘍体積により評価された。結果、いずれの用量においても抗腫瘍効果が確認された（図５３）。

[0544] (6-4-21) 全身作用評価のための抗体投与と採材、並びにFCM解析

実施例6-4-1のMC38移植マウスモデル作製後、表４７に示された通りにVehicle、NS1-mIgG1（ノンスイッチ抗体）及びA551-MB110/B379-ml0rが投与された。抗体投与は群分け当日と群分け3日後の計2回、尾静脈経路から実施された。Vehicleには0.05% Tween-20含有PBSが用いられた。

初回投与後5日後に（実施例6-4-2（MC38細胞株移植マウスからの各種臓器の摘出とリンパ球画分の調製）に示される方法で肝臓、リンパ節、脾臓が摘出され、実施例6-4-3（各種臓器のリンパ球画分を用いたFCM解析）に示される方法でFCM解析がなされた。

[0545] A551-MB110/B379-ml0r抗体による全身反応評価のための群詳細

[表47]

群	匹数	薬剤	用量 [mg/kg]	投与日	採材日
1	3	Vehicle	-	群分け当日、及び3日後	群分け5日後
2	3	NS1-mIgG1	7.5	群分け当日、及び3日後	群分け5日後
3	3	A551-MB110/B379-ml0r	0.83	群分け当日、及び3日後	群分け5日後
4	3	A551-MB110/B379-ml0r	2.5	群分け当日、及び3日後	群分け5日後
5	3	A551-MB110/B379-ml0r	7.5	群分け当日、及び3日後	群分け5日後
6	3	A551-MB110/B379-ml0r	22.5	群分け当日、及び3日後	群分け5日後

[0546] リンパ節、脾臓の臓器重量評価の結果、NS1-mIgG1投与時には7.5 mg/kgで臓器重量の増加が認められた。一方で、A551-MB110/B379-ml0r投与時には0.83 mg/kg, 2.5 mg/kg, 7.5 mg/kg, 22.5 mg/kgいずれの投与量においても臓器の肥大化が観察されなかった（図５４）。また、脾臓でのFCM評価によるT細胞活性化評価においても、NS1-mIgG1投与時に観察された活性化マーカー（PD-1, ICOS, Granzyme B）上昇がA551-MB110/B379-ml0r投与時にはいずれの投与量においても確認されなかった（図５５）。

肝臓におけるT細胞活性化評価では、NS1-mIgG1投与時にはPD-1, ICOSいずれも7.5 mg/kgにて発現上昇が観察された。一方で、A551-MB110/B379-ml0r投与時には0.83 mg/kg, 2.5 mg/kgにおいてVehicleレベルまで発現抑制が認められ、7.5 mg/kg投与時にもNS1-mIgG1よりも発現増加が抑制された（図５６）。

以上より、当該スイッチ抗体は、ノンスイッチ抗体と比較して、リンパ節、脾臓および肝臓においてT細胞の活性化を抑制させた。

[0547] 実施例7：アゴニスト活性増強を可能にする改変Fcの作製

(7-1) FcγRへの結合活性を上昇させた改変体の作製

WO2017104783に記載されているFcγRIIbへの結合活性を上昇させた重鎖定常領域TT14（配列番号：182のアミノ酸配列を含むFc領域において、T250V/T307Pのアミノ酸改変、およびFcγRIIbへの結合活性を上昇させるアミノ酸改変としてL234Y/P238D/V264I/A330Kを含む重鎖定常領域である（改変位置はいずれもEU番号）。）（配列番号：149)、WO2017104783に記載されているFcγRIIb

への結合活性を上昇させた重鎖定常領域TT11（配列番号：182のアミノ酸配列を含むFc領域において、T250V/T307Pのアミノ酸改変、およびFcγRIIbへの結合活性を上昇させる改変としてL234Y/P238D/A330Kを含む重鎖定常領域である（改変位置はいずれもEU番号）。）にG237Dのアミノ酸変異が導入されたTT16(配列番号：150)、WO2014163101に記載されているFcγRIIbへの結合活性を上昇させた重鎖定常領域P587(配列番号：151)、および既存のFcγRIIbへの結合活性を上昇させた重鎖定常領域であるP253(配列番号：93)が、スイッチ抗体の重鎖可変領域（A375、A372、A356、A486、A488、A489、A548、およびA551）、あるいは陰性コントロール抗体の重鎖可変領域（IC17HdK（配列番号：152））とが組み合わせられた。これにより、次のとおり各定常領域と各重鎖可変領域とを組み合わせた遺伝子が作製された。

[0548] [表48]

重鎖全長	重鎖可変領域(配列番号)	重鎖定常領域(配列番号)
A375-TT14	A375(配列番号:43)	TT14(配列番号:149)
A375-TT16	A375(配列番号:43)	TT16(配列番号:150)
A375-P587	A375(配列番号:43)	P587(配列番号:151)
A372-P253	A372(配列番号:44)	P253(配列番号:93)
A356-TT16	A356(配列番号:45)	TT16(配列番号:150)
A356-P587	A356(配列番号:45)	P587(配列番号:151)
A486-P253	A486(配列番号:46)	P253(配列番号:93)
A488-P253	A488(配列番号:48)	P253(配列番号:93)
A489-P253	A489(配列番号:49)	P253(配列番号:93)
A548-P587	A548(配列番号:50)	P587(配列番号:151)
A551-TT16	A551(配列番号:51)	TT16(配列番号:150)
A551-P587	A551(配列番号:51)	P587(配列番号:151)
IC17HdK-TT16	IC17HdK(配列番号:152)	TT16(配列番号:150)
IC17HdK-P587	IC17HdK(配列番号:152)	P587(配列番号:151)
IC17HdK-P253	IC17HdK(配列番号:152)	P253(配列番号:93)

[0549] また、WO2017104783に記載されているFcγRへの結合活性を上昇させた重鎖定常領域MY201（配列番号：182のアミノ酸配列を含むFc領域において、FcγRIIbへの結合活性を上昇させるアミノ酸改変としてG236N/H268D/A330Kを含む

重鎖定常領域である（改変位置はいずれもEU番号）。）（配列番号：153)、MY518（配列番号：182のアミノ酸配列を含むFc領域において、FcγRIIbへの結合活性を上昇させるアミノ酸改変としてL235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330Kを含む重鎖定常領域である（改変位置はいずれもEU番号）。）（配列番号：154)、およびそれらにK214Rの改変が導入されたMY201a(配列番号：155)、MY518a(配列番号：156)、あるいはMY201aにL235Wの改変が導入されたMY201aPh(配列番号：157)と、スイッチ抗体の重鎖可変領域（A375、A356、およびA551）、あるいは陰性コントロール抗体の重鎖可変領域（IC17HdK（配列番号：152））とが組み合わせられた。これにより、次のとおり各定常領域と各重鎖可変領域とを組み合わせた遺伝子が作製された。

[0550] [表49]

重鎖全長	重鎖可変領域(配列番号)	重鎖定常領域(配列番号)
A375-MY201aPh	A375(配列番号:43)	MY201aPh(配列番号:157)
A375-MY518	A375(配列番号:43)	MY518(配列番号:154)
A375-MY518a	A375(配列番号:43)	MY518a(配列番号:156)
A356-MY518	A356(配列番号:45)	MY518(配列番号:154)
A551-MY201a	A551(配列番号:51)	MY201a 配列番号:155)
A551-MY201aPh	A551(配列番号:51)	MY201aPh(配列番号:157)
A551-MY518	A551(配列番号:51)	MY518(配列番号:154)
A551-MY518a	A551(配列番号:51)	MY518a(配列番号:156)
IC17HdK-MY201	IC17HdK(配列番号:152)	MY201(配列番号:153)
IC17HdK-MY201aPh	IC17HdK(配列番号:152)	MY201aPh(配列番号:157)
IC17HdK-MY518	IC17HdK(配列番号:152)	MY518(配列番号:154)
IC17HdK-MY518a	IC17HdK(配列番号:152)	MY518a(配列番号:156)

[0551] これらの抗体重鎖遺伝子と、スイッチ抗体の抗体軽鎖遺伝子（実施例5-2および5-3で作製されたB040-Lamlib、B167-Lamlib、B226-Lamlib、B223-Lamlib、B256-Lamlib、ならびにB379-Lamlib）、および陰性コントロール抗体の抗体軽鎖遺伝子（軽鎖可変領域IC17L(配列番号：158)に軽鎖定常領域としてヒトκ鎖k0(配列番号：141)を組み合わせることで作製された、IC17L-k0を組み合わせることで、当業者公知の方法により、表５０のとおり、目的とする抗体が発現、精製された。

[0552] FcγRへの結合活性を上昇させた各改変体

[表50]

可変領域(重鎖／軽鎖)	重鎖定常領域	軽鎖定常領域	抗体名
A375 / B167	MY201aPh	Lamlib	A375-MY201aPh/B167-Lamlib
	MY518	Lamlib	A375-MY518/B167-Lamlib
	MY518a	Lamlib	A375-MY518a/B167-Lamlib
	P587	Lamlib	A375-P587/B167-Lamlib
	TT14	Lamlib	A375-TT14/B167-Lamlib
	TT16	Lamlib	A375-TT16/B167-Lamlib
A372 / B040	P253	Lamlib	A372-P253/B040-Lamlib
A356 / B040	MY518	Lamlib	A356-MY518/B040-Lamlib
	P587	Lamlib	A356-P587/B040-Lamlib
	TT16	Lamlib	A356-TT16/B040-Lamlib
A486 / B167	P253	Lamlib	A486-P253/B167-Lamlib
A488 / B226	P253	Lamlib	A488-P253/B226-Lamlib
A489 / B223	P253	Lamlib	A489-P253/B223-Lamlib
A548 / B256	P587	Lamlib	A548-P587/B256-Lamlib
A551 / B256	MY201a	Lamlib	A551-MY201a/B256-Lamlib
	MY201aPh	Lamlib	A551-MY201aPh/B256-Lamlib
	MY518	Lamlib	A551-MY518/B256-Lamlib
	P587	Lamlib	A551-P587/B256-Lamlib
A551 / B379	MY518a	Lamlib	A551-MY518a/B379-Lamlib
	P587	Lamlib	A551-P587/B379-Lamlib
	TT16	Lamlib	A551-TT16/B379-Lamlib
IC17HdK / IC17L	MY201	k0	IC17HdK-MY201/IC17L-k0
	MY201aPh	k0	IC17HdK-MY201aPh/IC17L-k0
	MY518	k0	IC17HdK-MY518/IC17L-k0
	MY518a	k0	IC17HdK-MY518a/IC17L-k0
	P253	k0	IC17HdK-P253/IC17L-k0
	P587	k0	IC17HdK-P587/IC17L-k0
	TT16	k0	IC17HdK-TT16/IC17L-k0

[0553] (7-2) 定常領域のアミノ酸改変によりpIを上昇させた改変体の作製

WO2017046994に記載されているFcγRへの結合活性を大きく変化させることなくpIを上昇させるアミノ酸変異であるQ311R、P343R、D413Kを実施例7-1で

作製されたFcγRへの結合活性を上昇させた重鎖定常領域と組み合わせた重鎖定常領域が作製された。

具体的には、下記のとおり各抗体重鎖定常領域の遺伝子にアミノ酸変異を導入した重鎖定常領域の遺伝子が作製された。

[0554] ・MY518(配列番号：154) にP343R/D413Kを導入：SCF025(配列番号：64)

・MY518a(配列番号：156) にP343R/D413Kを導入：SCF025a(配列番号：65)

・TT14(配列番号：149) にP343R/D413Kを導入：SCF027(配列番号：66)

・TT16(配列番号：150) にP343R/D413Kを導入：SCF028(配列番号：67)

・MY518(配列番号：154) にQ311R/P343Rを導入：SCF030(配列番号：68)

・TT14(配列番号：149) にQ311R/P343Rを導入：SCF032(配列番号：69)

・TT16(配列番号：150) にQ311R/P343Rを導入：SCF033(配列番号：70)

・MY518(配列番号：154) にP343Rを導入：SCF039 (配列番号：71)

・MY518a(配列番号：156) にP343Rを導入：SCF039a (配列番号：72)

・MY518(配列番号：154) にD413Kを導入：SCF040 (配列番号：73)

・MY201a(配列番号：155) にP343Rを導入：SCF041a (配列番号：74)

・MY201aPh(配列番号：157) にP343Rを導入：およびSCF041aPh (配列番号：75)

・MY201a(配列番号：155) にD413Kを導入：SCF042a (配列番号：76)

・MY201a(配列番号：155) にP343R/D413Kを導入：SCF043a(配列番号：77)

・MY201aPh(配列番号：157) にP343R/D413Kを導入：SCF043aPh(配列番号：78)

・MY201a(配列番号：155) にQ311Rを導入：SCF056a (配列番号：79)

・MY201aPh(配列番号：157) にQ311Rを導入：SCF056aPh (配列番号：80)

・MY201a(配列番号：155) にQ311R/P343Rを導入：SCF057a(配列番号：81)

・MY201aPh(配列番号：157) にQ311R/P343Rを導入：SCF057aPh(配列番号：82)

・MY201a(配列番号：155) にQ311R/D413Kを導入：SCF059a (配列番号：83)

・MY201aPh(配列番号：157) にQ311R/D413Kを導入：SCF059aPh (配列番号：8

4)

・MY518a(配列番号：156) にQ311Rを導入：SCF060a (配列番号：85)

[0555] ここで作製された重鎖定常領域の遺伝子と、各重鎖可変領域A375(配列番号：43)、またはA551(配列番号：51)の遺伝子とが組み合わせられることで、次の表５１のとおり、各抗体重鎖遺伝子が作製された。

[0556] [表51]

重鎖全長	重鎖可変領域(配列番号)	重鎖定常領域(配列番号)
A375-SCF025	A375(配列番号:43)	SCF025(配列番号:64)
A375-SCF027	A375(配列番号:43)	SCF027(配列番号:66)
A375-SCF028	A375(配列番号:43)	SCF028(配列番号:67)
A375-SCF030	A375(配列番号:43)	SCF030(配列番号:68)
A375-SCF032	A375(配列番号:43)	SCF032(配列番号:69)
A375-SCF033	A375(配列番号:43)	SCF033(配列番号:70)
A375-SCF039	A375(配列番号:43)	SCF039(配列番号:71)
A375-SCF040	A375(配列番号:43)	SCF040(配列番号:73)
A375-SCF041aPh	A375(配列番号:43)	SCF041aPh(配列番号:75)
A375-SCF043aPh	A375(配列番号:43)	SCF043aPh(配列番号:78)
A375-SCF056aPh	A375(配列番号:43)	SCF056aPh(配列番号:80)
A375-SCF057aPh	A375(配列番号:43)	SCF057aPh(配列番号:82)
A375-SCF059aPh	A375(配列番号:43)	SCF059aPh(配列番号:84)
A375-SCF060a	A375(配列番号:43)	SCF060a(配列番号:85)
A551-SCF025a	A551(配列番号:51)	SCF025a(配列番号:65)
A551-SCF039a	A551(配列番号:51)	SCF039a(配列番号:72)
A551-SCF041a	A551(配列番号:51)	SCF041a(配列番号:74)
A551-SCF041aPh	A551(配列番号:51)	SCF041aPh(配列番号:75)
A551-SCF043a	A551(配列番号:51)	SCF043a(配列番号:77)
A551-SCF043aPh	A551(配列番号:51)	SCF043aPh(配列番号:78)
A551-SCF056a	A551(配列番号:51)	SCF056a(配列番号:79)
A551-SCF056aPh	A551(配列番号:51)	SCF056aPh(配列番号:80)
A551-SCF057a	A551(配列番号:51)	SCF057a(配列番号:81)
A551-SCF057aPh	A551(配列番号:51)	SCF057aPh(配列番号:82)
A551-SCF059a	A551(配列番号:51)	SCF059a(配列番号:83)
A551-SCF059aPh	A551(配列番号:51)	SCF059aPh(配列番号:84)
A551-SCF060a	A551(配列番号:51)	SCF060a(配列番号:85)

[0557] さらに、これらの抗体重鎖遺伝子と、抗体軽鎖遺伝子として実施例5-3で作

製されたB167-Lamlib、B256-Lamlib、B379-Lamlib の遺伝子とが組み合わせられることで、当業者公知の方法により、表５２のとおり目的とする抗体が発現、精製された。

[0558]

[表52]

可変領域（重鎖／軽鎖）	重鎖定常領域	軽鎖定常領域	抗体名
A375 / B167（A375 配列番号：43）（B167 配列番号：54）	SCF025（配列番号：64）	Lamlib（配列番号：63）	A375-SCF025/B167-LamLib
	SCF027（配列番号：66）	Lamlib（配列番号：63）	A375-SCF027/B167-LamLib
	SCF028（配列番号：67）	Lamlib（配列番号：63）	A375-SCF028/B167-LamLib
	SCF030（配列番号：68）	Lamlib（配列番号：63）	A375-SCF030/B167-LamLib
	SCF032（配列番号：69）	Lamlib（配列番号：63）	A375-SCF032/B167-LamLib
	SCF033（配列番号：70）	Lamlib（配列番号：63）	A375-SCF033/B167-LamLib
	SCF039（配列番号：71）	Lamlib（配列番号：63）	A375-SCF039/B167-LamLib
	SCF040（配列番号：73）	Lamlib（配列番号：63）	A375-SCF040/B167-LamLib
	SCF041aPh（配列番号：75）	Lamlib（配列番号：63）	A375-SCF041aPh/B167-LamLib
	SCF043aPh（配列番号：78）	Lamlib（配列番号：63）	A375-SCF043aPh/B167-LamLib
	SCF056aPh（配列番号：80）	Lamlib（配列番号：63）	A375-SCF056aPh/B167-LamLib
	SCF057aPh（配列番号：82）	Lamlib（配列番号：63）	A375-SCF057aPh/B167-LamLib
	SCF059aPh（配列番号：84）	Lamlib（配列番号：63）	A375-SCF059aPh/B167-LamLib
	SCF060a（配列番号：85）	Lamlib（配列番号：63）	A375-SCF060a/B167-LamLib
A551 / B256（A551 配列番号：51）（B256 配列番号：59）	SCF025a（配列番号：65）	Lamlib（配列番号：63）	A551-SCF025a/B256-LamLib
	SCF039a（配列番号：72）	Lamlib（配列番号：63）	A551-SCF039a/B256-LamLib
	SCF041a（配列番号：74）	Lamlib（配列番号：63）	A551-SCF041a/B256-LamLib
	SCF041aPh（配列番号：75）	Lamlib（配列番号：63）	A551-SCF041aPh/B256-LamLib
	SCF043a（配列番号：77）	Lamlib（配列番号：63）	A551-SCF043a/B256-LamLib
	SCF043aPh（配列番号：78）	Lamlib（配列番号：63）	A551-SCF043aPh/B256-LamLib
	SCF056a（配列番号：79）	Lamlib（配列番号：63）	A551-SCF056a/B256-LamLib
	SCF056aPh（配列番号：80）	Lamlib（配列番号：63）	A551-SCF056aPh/B256-LamLib
	SCF057a（配列番号：81）	Lamlib（配列番号：63）	A551-SCF057a/B256-LamLib
	SCF057aPh（配列番号：82）	Lamlib（配列番号：63）	A551-SCF057aPh/B256-LamLib
	SCF059a（配列番号：83）	Lamlib（配列番号：63）	A551-SCF059a/B256-LamLib
	SCF059aPh（配列番号：84）	Lamlib（配列番号：63）	A551-SCF059aPh/B256-LamLib
A551 / B379（A551 配列番号：51）（B379 配列番号：60）	SCF039a（配列番号：72）	Lamlib（配列番号：63）	A551-SCF039a/B379-LamLib
	SCF041a（配列番号：74）	Lamlib（配列番号：63）	A551-SCF041a/B379-LamLib
	SCF041aPh（配列番号：75）	Lamlib（配列番号：63）	A551-SCF041aPh/B379-LamLib
	SCF043a（配列番号：77）	Lamlib（配列番号：63）	A551-SCF043a/B379-LamLib
	SCF043aPh（配列番号：78）	Lamlib（配列番号：63）	A551-SCF043aPh/B379-LamLib
	SCF056a（配列番号：79）	Lamlib（配列番号：63）	A551-SCF056a/B379-LamLib
	SCF056aPh（配列番号：80）	Lamlib（配列番号：63）	A551-SCF056aPh/B379-LamLib
	SCF057a（配列番号：81）	Lamlib（配列番号：63）	A551-SCF057a/B379-LamLib
	SCF057aPh（配列番号：82）	Lamlib（配列番号：63）	A551-SCF057aPh/B379-LamLib
	SCF059a（配列番号：83）	Lamlib（配列番号：63）	A551-SCF059a/B379-LamLib
	SCF059aPh（配列番号：84）	Lamlib（配列番号：63）	A551-SCF059aPh/B379-LamLib
	SCF060a（配列番号：85）	Lamlib（配列番号：63）	A551-SCF060a/B379-LamLib

[0559] (7-3) アゴニスト活性の比較対照用のコントロール抗体の作製

アゴニスト活性の比較対照用のコントロール抗体として実施例7-1で作製されたIC17HdK（配列番号：152）を重鎖可変領域に持つ抗体（IC17HdK-MY201/IC17L-k0、IC17HdK-MY201aPh/IC17L-k0、IC17HdK-MY518/IC17L-k0、IC17HdK-MY518a/IC17L-k0、IC17HdK-P253/IC17L-k0、IC17HdK-P587/IC17L-k0、IC17HdK-TT16/IC17L-k0）が作製された。また、重鎖可変領域IC17HdK（配列番号：152）の遺伝子と、ヒトIgG4の重鎖定常領域のC末端のGlyおよびLysを除去したG4d（配列番号：159）の遺伝子が組み合わせられることで作製された抗体重鎖IC17HdK-G4dと、抗体軽鎖IC17L-k0（可変領域の配列番号：158、定常領域の配列番号：141）の遺伝子を組み合わせることで当業者公知の方法により目的とする抗体（IC17HdK-G4d/IC17L-k0）が発現、精製された。これらのコントロール抗体は、実施例5において使用された。

[0560] (7-4) 定常領域のアミノ酸改変によりpIを上昇させた改変体の各ヒトFcγ受容体結合の評価

Biacore T200（GE Healthcare）を用いて、各ヒトFcγ受容体（以下FcγRと示す）に対する結合活性が評価された。測定用緩衝液として50 mMリン酸、150 mM NaCl、0.05 w/v%-P20、pH7.4が用いられ、25℃で実施された。リガンド捕捉用分子としてCaptureSelect（商標）Human Fab-lambda Kinetics Biotin Conjugate（ThermoFisher scientific）を固相化したセンサーチップを用いて抗体を約1000 RU捕捉させた。ヒトFcγRは測定用緩衝液でFcγRIaは8nMに、それ以外のFcγRは1000nMに希釈し、捕捉させた抗体に相互作用させた。各抗体の各FcγRに対する結合活性は、Biacore T200 Evaluation Software 2.0を用いて単位抗体量当たりのFcγR結合量（RU）を算出することにより評価された。

[0561] FcγRの細胞外ドメインは以下の方法で調製された。まずFcγRの細胞外ドメインの遺伝子の合成が当業者公知の方法で実施された。その際、各FcγRの配列はNCBIに登録されている情報に基づき作製された。具体的には、FcγRIについてはNCBIのaccession # NM_000566.3の配列、FcγRIIaについてはNCB

Iのaccession # NM_001136219.1の配列、FcγRIIbについてはNCBIのaccession # NM_004001.3の配列、FcγRIIIaについてはNCBIのaccession # NM_001127593.1の配列に基づいて作製され、C末端にHisタグが付加された。またFcγRIIaの多型部位についてはJ. Exp. Med., 1990, 172, 19-25を、FcγRIIIaの多型部位についてはJ. Clin. Invest., 1997, 100, 1059-1070を参考にして作製された。得られた遺伝子断片を動物細胞発現ベクターに挿入することで、発現ベクターが作製された。作製された発現ベクターがヒト胎児腎癌細胞由来FreeStyle293細胞（Invitrogen社）に、一過性に導入され、目的タンパク質が発現された。培養上清は回収された後、0.22 μmフィルターに通され、原則として次の4ステップで精製された。第1ステップは陽イオン交換カラムクロマトグラフィー（SP Sepharose FF）、第2ステップはHisタグに対するアフィニティカラムクロマトグラフィー（HisTrap HP）、第3ステップはゲルろ過カラムクロマトグラフィー（Superdex200）、第4ステップは無菌ろ過が実施された。ただし、FcγRIについては、第1ステップにQ sepharose FFを用いた陰イオン交換カラムクロマトグラフィーが実施された。精製されたタンパク質の濃度は、分光光度計を用いて280 nmでの吸光度を測定し、得られた値からPACE等の方法により算出された吸光係数を用いることで算出された（Protein Science, 1995, 4, 2411-2423）。

[0562] 表５３に単位抗体量あたりの結合量、ならびにA375-G1T3/B167-Lamlibの結合量に対する相対量を示す。表５３中のいずれの抗体も単位抗体量当たりのヒトFcγRIIb 結合量はA375-G1T3/B167-Lamlib のそれよりも多く、A375-G1T3/B167-Lamlib のヒトFcγRIIb結合量を1.0とした場合の相対値として2.85-14.26であった。定常領域のpIを上昇させるアミノ酸改変の有無で単位抗体量当たりのヒトFcγRIIb 結合量ならびに結合量の相対値は同程度であった。また、L235Wの改変を含む抗体のhFcgRIaへの結合量はA375-TT14/B167-Lamlibのそれと比較して低下していた。

[0563] 各ヒトFcγRの結合活性

[表53]

略名	抗体1RUあたりの結合量 (RU)						結合量の相対値					
	hFcgRIa	hFcgRIIaH	hFcgRIIaR	hFcgRIIb	hFcgRIIIaF	hFcgRIIIaV	hFcgRIa	hFcgRIIaH	hFcgRIIaR	hFcgRIIb	hFcgRIIIaF	hFcgRIIIaV
A375-G1T3/B167-Lamlib	0.0813	0.0567	0.0463	0.0110	0.0213	0.0700	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
A375-MY201a/B167-Lamlib	0.0396	0.0534	0.0338	0.0401	0.0007	0.0024	0.49	0.94	0.73	3.66	0.04	0.03
A375-MY201aPh/B167-Lamlib	0.0040	0.0328	0.0335	0.0313	0.0007	0.0011	0.05	0.58	0.72	2.85	0.03	0.02
A375-MY518/B167-Lamlib	0.0020	0.0466	0.0460	0.0482	0.0009	0.0015	0.02	0.82	0.99	4.40	0.04	0.02
A375-MY518a/B167-Lamlib	0.0033	0.0479	0.0470	0.0489	0.0006	0.0009	0.04	0.84	1.01	4.46	0.03	0.01
A375-TT11/B167-Lamlib	0.0075	0.0020	0.0041	0.0477	-0.0009	-0.0010	0.09	0.03	0.09	4.35	-0.04	-0.01
A375-TT14/B167-Lamlib	0.0045	0.0042	0.0067	0.0805	0.0000	0.0003	0.05	0.07	0.14	7.34	0.00	0.00
A375-TT16/B167-Lamlib	0.0034	0.0126	0.0359	0.1090	0.0001	-0.0002	0.04	0.22	0.77	9.94	0.00	0.00
A375-P587/B167-Lamlib	0.0962	0.0029	0.0371	0.1427	0.0001	0.0001	1.18	0.05	0.80	13.02	0.00	0.00
A375-P253/B167-Lamlib	0.0937	0.0497	0.1678	0.1563	0.0056	0.0019	1.15	0.88	3.62	14.26	0.26	0.03
A375-SCF025/B167-Lamlib	0.0022	0.0514	0.0519	0.0512	0.0012	0.0014	0.03	0.91	1.12	4.67	0.06	0.02
A375-SCF025a/B167-Lamlib	0.0021	0.0514	0.0518	0.0511	0.0009	0.0016	0.03	0.91	1.12	4.67	0.04	0.02
A375-SCF027/B167-Lamlib	0.0044	0.0031	0.0058	0.0766	-0.0005	-0.0006	0.05	0.06	0.12	6.99	-0.02	-0.01
A375-SCF028/B167-Lamlib	0.0027	0.0101	0.0299	0.0995	-0.0009	-0.0010	0.03	0.18	0.64	9.08	-0.04	-0.01
A375-SCF030/B167-Lamlib	0.0020	0.0533	0.0532	0.0532	0.0017	0.0020	0.02	0.94	1.15	4.85	0.08	0.03
A375-SCF032/B167-Lamlib	0.0049	0.0030	-0.0004	0.0782	-0.0007	-0.0007	0.06	0.05	-0.01	7.14	-0.03	-0.01
A375-SCF033/B167-Lamlib	0.0033	0.0103	0.0255	0.0979	0.0000	0.0002	0.04	0.18	0.55	8.94	0.00	0.00
A375-SCF039/B167-Lamlib	0.0018	0.0535	0.0542	0.0531	0.0008	0.0013	0.02	0.94	1.17	4.85	0.04	0.02
A375-SCF039a/B167-Lamlib	0.0018	0.0542	0.0554	0.0540	0.0012	0.0013	0.02	0.96	1.20	4.93	0.06	0.02
A375-SCF040/B167-Lamlib	0.0016	0.0454	0.0446	0.0465	0.0010	0.0013	0.02	0.80	0.96	4.24	0.05	0.02
A375-SCF041a/B167-Lamlib	0.0446	0.0571	0.0376	0.0433	0.0009	0.0022	0.55	1.01	0.81	3.95	0.04	0.03
A375-SCF042a/B167-Lamlib	0.0396	0.0522	0.0327	0.0393	0.0003	0.0014	0.49	0.92	0.71	3.59	0.01	0.02
A375-SCF043a/B167-Lamlib	0.0429	0.0552	0.0361	0.0419	0.0011	0.0025	0.53	0.97	0.78	3.82	0.05	0.04
A375-SCF056a/B167-Lamlib	0.0395	0.0529	0.0331	0.0399	0.0011	0.0023	0.49	0.93	0.71	3.64	0.05	0.03
A375-SCF057a/B167-Lamlib	0.0405	0.0525	0.0367	0.0412	0.0013	0.0025	0.50	0.93	0.79	3.76	0.06	0.04
A375-SCF059a/B167-Lamlib	0.0380	0.0502	0.0319	0.0358	0.0010	0.0021	0.47	0.88	0.69	3.27	0.05	0.03
A375-SCF060a/B167-Lamlib	0.0021	0.0463	0.0459	0.0472	0.0011	0.0008	0.03	0.82	0.99	4.31	0.05	0.01
A375-SCF041aPh/B167-Lamlib	0.0013	0.0371	0.0371	0.0350	0.0007	0.0005	0.02	0.65	0.80	3.20	0.03	0.01
A375-SCF043aPh/B167-Lamlib	0.0011	0.0349	0.0349	0.0339	0.0001	0.0001	0.01	0.62	0.75	3.10	0.00	0.00
A375-SCF056aPh/B167-Lamlib	0.0019	0.0314	0.0299	0.0292	0.0010	0.0010	0.02	0.55	0.64	2.67	0.05	0.01
A375-SCF057aPh/B167-Lamlib	0.0021	0.0365	0.0364	0.0345	-0.0003	0.0005	0.03	0.64	0.79	3.15	-0.02	0.01
A375-SCF059aPh/B167-Lamlib	0.0089	0.0332	0.0319	0.0291	0.0003	0.0028	0.11	0.59	0.69	2.66	0.01	0.04

[0564] (7-5) 定常領域のアミノ酸改変によりpIを上昇させた改変体のヒトFcRn結合の評価

Biacore T200 (GE Healthcare) を用いて、ヒトFcRnに対する結合活性が評価された。測定用緩衝液として50 mMリン酸、150 mM NaCl、0.05 w/v%-P20, pH6.0が用いられ、25℃で実施された。本測定に用いたヒトFcRnタンパク質はWO2010107110に記載の手法で調製された。リガンド捕捉用分子としてCapture Select (商標) Human Fab-lambda Kinetics Biotin Conjugate (ThermoFisher scientific) を固相化したセンサーチップを用いて抗体を約400RU捕捉させたのち、測定用緩衝液で希釈されたヒトFcRnを結合させた。各抗体のFcRnに対する結合活性は、Biacore T200 Evaluation Software 2.0を用いてSteady stateモデルによりKD (mol/L) を算出することにより評価された。定常領域のpIを上昇させるアミノ酸改変の有無でKD値は同程度であった。表５４にヒトFcRnと各抗体のKD (mol/L) を示す。

[0565]

[表54]

略名	K_D (mol/L)
A375-G1T3/B167-Lamlib	1.27E-06
A375-MY201a/B167-Lamlib	1.19E-06
A375-MY201aPh/B167-Lamlib	1.18E-06
A375-MY518/B167-Lamlib	1.27E-06
A375-MY518a/B167-Lamlib	1.32E-06
A375-TT11/B167-Lamlib	1.56E-06
A375-TT14/B167-Lamlib	1.77E-06
A375-TT16/B167-Lamlib	1.51E-06
A375-P587/B167-Lamlib	1.70E-06
A375-P253/B167-Lamlib	1.42E-06
A375-SCF025/B167-Lamlib	1.10E-06
A375-SCF025a/B167-Lamlib	1.13E-06
A375-SCF027/B167-Lamlib	1.33E-06
A375-SCF028/B167-Lamlib	1.27E-06
A375-SCF030/B167-Lamlib	8.63E-07
A375-SCF032/B167-Lamlib	9.66E-07
A375-SCF033/B167-Lamlib	8.74E-07
A375-SCF039/B167-Lamlib	1.09E-06
A375-SCF039a/B167-Lamlib	1.11E-06
A375-SCF040/B167-Lamlib	1.46E-06
A375-SCF041a/B167-Lamlib	1.10E-06
A375-SCF042a/B167-Lamlib	1.49E-06
A375-SCF043a/B167-Lamlib	1.18E-06
A375-SCF056a/B167-Lamlib	9.56E-07
A375-SCF057a/B167-Lamlib	9.28E-07
A375-SCF059a/B167-Lamlib	1.03E-06
A375-SCF060a/B167-Lamlib	1.01E-06
A375-SCF041aPh/B167-Lamlib	1.13E-06
A375-SCF043aPh/B167-Lamlib	1.21E-06
A375-SCF056aPh/B167-Lamlib	1.00E-06
A375-SCF057aPh/B167-Lamlib	9.09E-07
A375-SCF059aPh/B167-Lamlib	1.05E-06

[0566] 実施例8：キヌレニン（Kyn）依存性CD137抗体の取得

(8-1) ラショナルデザイン抗体ライブラリからのキヌレニンに依存的なヒトCD137結合活性を有する抗体の取得

国際公開WO2015/083764号に記載の方法で構築された、キヌレニンに対する

パンニングを利用したキヌレニンスイッチ抗体取得用ラショナルデザイン抗体ファージディスプレイライブラリ（キヌレニンライブラリ）から、キヌレニン存在下でヒトCD137に対する結合活性を示し、キヌレニン非存在下で結合活性を示さない抗体が取得された。取得のために、キヌレニン存在下でファージが結合したビオチン化抗原がビーズに捕捉され、キヌレニン存在下で抗原に対して結合活性を示す抗体を提示しているファージが回収された。その後、ビーズから溶出された溶出液からファージが回収された。

[0567] 構築されたファージディスプレイ用ファージミドを保持する大腸菌からファージが一般的な方法で産生された。具体的には、構築されたファージミドベクターを保持する大腸菌に対して、M13KO7ΔpIII（「ハイパーファージ」と呼称）（PROGEN Biotechnik）を感染させ、30℃で一晩培養した上清からファージが回収された。ファージ産生が行われた大腸菌の培養液に2.5 M NaCl/10 %PEGを添加することによって沈殿させたファージの集団をTris Buffered Saline（TBS）にて希釈することによってファージライブラリ液が得られた。次に、当該ファージライブラリ液に終濃度4%となるようにBSAが添加された。磁気ビーズに固定化された抗原を用いてパンニングが実施された。磁気ビーズとして、Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated（Thermo Fisher Scientific）、FG beads NeutrAvidin（多摩川精機)、もしくはDynabeads MyOne Streptavidin T1（Life Technologies）が用いられた。抗原として、実施例1-3（ビオチン化Fc融合型ヒトCD137の調製)に記載の方法で調製されたビオチン化hCD137-Fc（hCD137-Fc-Bio)が使用された。

[0568] 癌組織においてスイッチの役割を果たすことができる低分子に依存的な低分子スイッチ抗体を効率的に取得するためのパンニングが実施された。具体的には、低分子であるキヌレニン存在下で抗原に結合し、キヌレニン非存在下では抗原に結合しない抗体を濃縮するパンニングが先行特許WO2015/083764で示された方法を参考に実施された。Round1ではhCD137-Fc-Bioまたはビオチン化キヌレニン(bio-Kyn)（WO2015/083764に記載の化合物028（[化28]で表される）、029（[化29]で表される）および036（[化36]で表される））に対す

るパニングが実施された。hCD137-Fc-Bioに対するパニングでは、先に抗原にファージ溶液が添加された後に磁性ビーズで抗原と結合したファージを回収する方法で実施されbio-Kynに対するパニングは先にビオチン化抗原を磁性ビーズ上に固相化した後に調製されたファージライブラリ溶液が添加される方法でパンニングが実施された。Bio-Kynについては低分子としてのキヌレニンは非存在下で抗原結合できる抗体を濃縮するパンニングが上述の先行特許WO2015/083764に記載の方法を参考に実施された。hCD137-Fc-Bioについては、Fc領域に結合する抗体を除去するためにビオチン化されていないヒトIgG1 Fc領域4 nmolが添加された。回収されたファージは大腸菌株ER2738に添加されファージを大腸菌に感染させた後、回収された大腸菌に対してハイパーファージを感染させ、30℃で一晩培養した上清からファージが回収された。

[0569] Round2以降ではhCD137-Fc-Bioに対して、キヌレニン存在下で抗原に結合し、キヌレニン非存在下では抗原に結合しない抗体を濃縮するパンニングが先行特許WO2015/083764で示された方法を参考に実施された。いずれの場合もhCD137-Fc-Bioについては、Fc領域に結合する抗体を除去するためにビオチン化されていないヒトIgG1 Fc領域4 nmolが添加された。同様のパンニングがRound5まで繰り返され、目的の抗体配列が濃縮された。

[0570] (8-2) 抗体ライブラリからのキヌレニン存在下においてhCD137に結合する抗体の取得

(8-2-1) hCD137p12-FX-Fc-Bioの調製

hCD137p12-FX-Fc-Bioは当業者公知の方法で調製された。具体的には、ヒトCD137細胞外部分領域をコードする遺伝子断片の下流にFactor Xa切断配列をコードする遺伝子断片と抗体の定常領域をコードする遺伝子断片が連結された。ヒトCD137の細胞外部分領域、FactorXa切断配列と抗体定常領域が連結されたタンパク質（hCD137p12-FX-Fc-Bio、配列番号：160）をコードする遺伝子断片が動物細胞発現用ベクターに組み込まれた。構築されたプラスミドベクターが293フェクチン（Invitrogen）を用いてFreeStyle293細胞（Invitrogen)に導入された。このときBirAとEBNA1（配列番号：88）を発現する遺伝子

を含むプラスミドベクターが同時に導入された。培養中にビオチンが添加された。前述の手順に従って遺伝子が導入された細胞が37℃、8% CO_2で培養され、hCD137p12-FX-Fc-Bio が培養上清中に分泌された。この培養上清が回収された。培養上清からプロテインAを用いてhCD137p12-FX-Fc-Bioが精製された。

[0571] ラショナルデザインライブラリを用いれば、抗原結合活性を示す抗体を低分子存在下でのみパニングすることによって、低分子存在下で抗原結合活性を示す低分子スイッチ抗体を取得することができると考えられた。すなわち、国際公開WO2015/083764号に記載の方法で構築されたキヌレニンライブラリから、ビーズに捕捉されたhCD137に対してキヌレニン存在下で結合活性を示す抗体を提示しているファージが回収された。本取得方法では、抗原として実施例1-3(ビオチン標識Fc融合型ヒトCD137の調製)に記載の方法で調製されたビオチン化hCD137-Fc (hCD137-Fc-Bio)がまたはhCD137p12-FX-Fc-Bio用いられた。

[0572] 国際公開WO2015/083764号に記載の方法で構築されたファージディスプレイファージミドベクターを保持する大腸菌に対して、M13KO7ΔpIII (ハイパーファージ) (PROGEN Biotechnik) を感染させ、30℃で一晩培養した上清からファージが回収された。ファージ産生が行われた大腸菌の培養液に2.5 M NaCl/10% PEGを添加することによって沈殿させたファージの集団をTBSにて希釈することによって、抗体多価提示ファージライブラリ液が調製された。次に、当該ファージライブラリ液に終濃度4%となるようにBSAが添加された。磁気ビーズに固定化された抗原を用いたパンニングが実施された。磁気ビーズとしてFG beads NeutrAvidin (多摩川精機)、もしくはDynabeads MyOne Streptavidin T1 (Life Technologies) が用いられた。

[0573] Round1のパンニングではキヌレニン存在下で抗原に対して結合可能なファージの濃縮が行われた。具体的には、調製したファージライブラリ液0.8 mLに125 pmolのビオチン標識抗原とともに終濃度500 μMのキヌレニンおよび4 nmolのビオチン化されていないヒトIgG1 Fc領域 (hFc)を加えることによって

、ファージライブラリを室温で1時間抗原及びキヌレニンと接触させた。BSAでブロッキングされた磁気ビーズ（FG beads NeutrAvidin）が加えられ、抗原とファージとの複合体を磁気ビーズと室温で15分間結合させた。ビーズは0.5 mLのキヌレニン/TBSTにて2回、キヌレニン/TBSにて1回洗浄された。その後、1 mg/mLのトリプシン溶液0.5 mLが当該混合液に加えられた。当該混合液は室温で15分懸濁された後、即座に磁気スタンドを用いて分離されたビーズからファージ溶液が回収された。回収されたファージが、対数増殖期（OD600が0.4-0.7）となった20 mL の大腸菌株ER2738に添加された。37℃で1時間緩やかに上記大腸菌の攪拌培養を行うことによって、ファージを大腸菌に感染させた。感染させた大腸菌は225 mm x 225 mmのプレートへ播種された。次に、播種された大腸菌の培養液に対してM13KO7TC（WO2015046554A1）（ヘルパーファージ）（Takara）を感染させ、30℃で一晩培養した上清からファージを回収することによって、抗体一価提示ファージライブラリ液が調製された。

[0574] Round2のパンニングでは、調製したファージライブラリ液0.8 mLに40 pmolのビオチン標識抗原とともに終濃度500 μMのキヌレニンおよび4 nmolのビオチン非標識のヒトIgG1 Fc領域を加えることによって、ファージライブラリを室温で1時間抗原及びキヌレニンと接触させた。BSAでブロッキングされた磁気ビーズ（Dynabeads MyOne Streptavidin T1）が加えられ、抗原とファージとの複合体を磁気ビーズと室温で15分間結合させた。ビーズは0.5 mLのキヌレニン/TBSTにて2回、キヌレニン/TBSにて1回洗浄された。その後、1 mg/mLのトリプシン溶液0.5 mLが当該混合液に加えられた。当該混合液は室温で15分懸濁された後、即座に磁気スタンドを用いて分離されたビーズからファージ溶液が回収された。その後、上記Round1と同じ方法で、抗体一価提示ファージライブラリ液が調製された。

[0575] Round3のパンニングでは、調製したファージライブラリ液0.8 mLに10 pmolのビオチン標識抗原とともに終濃度500 μMのキヌレニンおよび4 nmolのビオチン非標識のヒトIgG1 Fc領域を加えることによって、ファージライブラリを室温で1時間抗原及びキヌレニンと接触させた。BSAでブロッキングされた磁

気ビーズ（FG beads NeutrAvidin）が加えられ、抗原とファージとの複合体を磁気ビーズと室温で15分間結合させた。ビーズは0.5 mLのキヌレニン/TBSTにて3回、キヌレニン/TBSにて2回洗浄された。その後、1 mg/mLのトリプシン溶液0.5 mLが当該混合液に加えられた。当該混合液は室温で15分懸濁された後、即座に磁気スタンドを用いて分離されたビーズからファージ溶液が回収された。その後、上記Round1と同じ方法で、抗体一価提示ファージライブラリ液が調製された。

Round4のパンニングでは、Round3のパンニングと同様の条件によるパンニングが実施された。 ただし、磁気ビーズはDynabeads MyOne Streptavidin T1が用いられた。

[0576] (8-3) SSビオチン化抗原とネガティブセレクション法を利用した抗体ライブラリからのキヌレニン存在下においてヒトCD137に結合する抗体の取得

(8-3-1) hCD137p12-FX-Fcの調製

hCD137p12-FX-Fcは当業者公知の方法で調製された。具体的には、ヒトCD137細胞外部分領域をコードする遺伝子断片の下流にFactor Xa切断配列をコードする遺伝子断片と抗体の定常領域をコードする遺伝子断片が連結された。ヒトCD137の細胞外部分領域、FactorXa切断配列と抗体定常領域が連結されたタンパク質（hCD137p12-FX-Fc、配列番号：160）をコードする遺伝子断片が動物細胞発現用ベクターに組み込まれた。構築されたプラスミドベクターが293フェクチン（Invitrogen）を用いてFreeStyle293細胞（Invitrogen)に導入された。このときEBNA1（配列番号：88）を発現する遺伝子を含むプラスミドベクターが同時に導入された。前述の手順に従って遺伝子が導入された細胞が37℃、8% CO_2で培養され、hCD137p12-FX-Fc-Bio が培養上清中に分泌された。この細胞培養上清からプロテインAを用いてhCD137p12-FX-Fc-Bioが精製された。

[0577] (8-3-2) SSビオチン化抗原とネガティブセレクション法を利用した抗体ライブラリからのキヌレニン存在下においてヒトCD137に結合する抗体の取得

低分子存在下で抗原結合活性を示す低分子スイッチ抗体を取得する際に、ジ

スルフィド結合（SS結合）有するリンカーを介してビオチン化（SSビオチン化）した抗原を用い、磁性ビーズで抗原に結合した抗体ディスプレイファージをキ捕捉した後に、dithiothreitol（DTT）などを用いて還元条件でSS結合を切断することで、抗原に結合した抗体ディスプレイファージのみをビーズから溶出できると考えられた。国際公開WO2015/083764号に記載の方法で構築されたキヌレニンライブラリから、キヌレニンが存在する条件下で抗原に対する結合活性を示す抗体のスクリーニングが行われた。スクリーニングのために、まず抗体ファージディスプレイライブラリを、キヌレニン非存在下でビオチン標識抗原－磁気ビーズと接触させ、キヌレニン非存在下でも抗原に対して結合活性を有する抗体を提示しているファージが除去された。それに続き、キヌレニンの存在する条件下で同様にパンニングを行うことによって、キヌレニンが存在する条件下でのみ抗原に対して結合活性を有する抗体のスクリーニングが実施された。 本取得方法では、抗原として実施例1-4記載の方法で調製されたhCD137-Fcまたは(8-3-1)で調製されたhCD137p12-FX-FcをEZ-Link Sulfo-NHS-SS-Biotinylation kit（Thermo Fisher Scientific）を用いて添付のプロトコルに従いビオチン標識した抗原（SSビオチン化抗原）が用いられた。なお、ネガティブセレクションには実施例1-3の方法で調製されたhCD137-Fc-Bioまたは(8-2-1)で調製されたhCD137p12-FX-Fc-Bioが用いられた。

[0578] 国際公開WO2015/083764号に記載の方法で構築されたファージディスプレイファージミドベクターを保持する大腸菌に対して、M13KO7ΔpIII（ハイパーファージ）（PROGEN Biotechnik）を感染させ、30℃で一晩培養した上清からファージが回収された。ファージ産生が行われた大腸菌の培養液に2.5 M NaCl/10% PEGを添加することによって沈殿させたファージの集団をTBSにて希釈することによって、抗体多価提示ファージライブラリ液が調製された。次に、当該ファージライブラリ液に終濃度4%となるようにBSAが添加された。磁気ビーズに固定化された抗原を用いたパンニングが実施された。磁気ビーズとして、Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated（Thermo Fisher Scientifi

c）、FG beads NeutrAvidin（多摩川精機)、もしくはDynabeads MyOne Streptavidin T1（Life Technologies）が用いられた。

Round1のパンニングでは、ネガティブセレクション法を利用したキヌレニン存在下でのみ抗原に対して結合可能なファージの濃縮が行われた。具体的には、予めStreptavidin （Roche）とインキュベートされたスキムミルクでブロッキングされたSera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coatedに800 pmolのhCD137-Fc-Bioまたは hCD137p12-FX-Fc-Bioを加え、室温で15分間結合させた。TBSTで3回洗浄されたビーズに対して、BSAにてブロッキングが行われたファージライブラリ液0.8 mLを加え室温にて1時間結合させた。磁気スタンドを用いてビーズを分離することによって、抗原およびビーズに結合しないファージが回収された。

[0579] 次に、Streptavidin （Roche）とインキュベートされたスキムミルクでブロッキングされたFG beads NeutrAvidinに225 pmolのSSビオチン化hCD137-Fcまたは450 pmolのSSビオチン化hCD137p12-FX-Fc-Bioを加え、室温で15分間結合させた。TBSTで3回洗浄されたビーズに対して、回収されたファージとともに終濃度0.2 mMのキヌレニンおよび4 nmolのhFcが添加され、ファージライブラリを室温で1時間抗原ならびにキヌレニンと接触させた。ビーズは0.5 mLのキヌレニン /TBST（0.2 mMキヌレニン、0.1% Tween20、TBS、pH7.4）にて2回、キヌレニン /TBS（0.2 mMキヌレニン、TBS、pH7.4）にて1回洗浄された。その後、終濃度25 mMのDTTを含むTBS溶液500μLが添加され、室温で5分間撹拌された後、磁気スタンドを使用して分離されたビーズからファージが回収された。その後終濃度1 mg/mLになるようにTrypsinが当該混合液に加えられた。当該混合液は室温で15分間攪拌された後、磁気スタンドを使用して分離されたビーズからファージが回収された。回収されたファージは、対数増殖期（OD600が0.4-0.7）となった20 mLの大腸菌株ER2738に添加された。37℃で1時間緩やかに上記大腸菌の攪拌培養を行うことによって、ファージを大腸菌に感染させた。感染させた大腸菌は225 mm x 225 mmのプレートへ播種された。次に、播種された大腸菌の培養液に対して、ハイパーファージを感染させ

、30℃で一晩培養した上清からファージを回収することによって、抗体多価提示ファージライブラリ液が調製された。

[0580] Round2のパンニングでは、予めStreptavidin (Roche) とインキュベートされたスキムミルクでブロッキングされたSera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coatedに400 pmolのhCD137-Fc-BioまたはhCD137p12-FX-Fc-Bioを加え、室温で15分間結合させた。TBSTで3回洗浄されたビーズに対して、BSAにてブロッキングが行われたファージライブラリ液0.4 mLを加え室温にて1時間結合させた。磁気スタンドを用いてビーズを分離することによって、抗原およびビーズに結合しないファージが回収された。回収したファージは再度同様の操作で400 pmolのhCD137-Fc-BioまたはhCD137p12-FX-Fc-Bioとインキュベートされ、Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coatedとインキュベートされた後、磁気スタンドを用いて抗原およびビーズに結合しないファージが回収された。Streptavidin (Roche) とインキュベートされたスキムミルクでブロッキングされたFG beads NeutrAvidinに56.3 pmolのSSビオチン化hCD137-Fcまたは113 pmolのSSビオチン化hCD137p12-FX-Fcを加え、室温で15分間結合させた。TBSTで3回洗浄されたビーズに対して、回収されたファージとともに終濃度0.2 mMのキヌレニンおよび4 nmolのビオチン化されていないヒトIgG1 Fc領域が添加され、ファージライブラリを室温で1時間抗原ならびにキヌレニンと接触させた。ビーズは0.5 mLのキヌレニン /TBST (0.2 mMキヌレニン、0.1% Tween20、TBS、pH7.4) にて3回、キヌレニン /TBS (0.2 mMキヌレニン、TBS、pH7.4) にて2回洗浄された。その後、終濃度25 mMのDTTを含むTBS溶液500μLが添加され、室温で5分間撹拌された後、磁気スタンドを使用して分離されたビーズからファージが回収された。その後、上記Round1と同じ方法で、抗体多価提示ファージライブラリ液が調製された。

[0581] Round3のパンニングでは、予めStreptavidin (Roche) とインキュベートされたスキムミルクでブロッキングされたSera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coatedに200 pmolのhCD137-Fc-BioまたはhCD137p12-FX-Fc-Bioを加え、室温で15分間結合させた。TBSTで3回洗浄されたビーズに対して、BSAにてブロッ

キングが行われたファージライブラリ液0.2 mLを加え室温にて1時間結合させた。磁気スタンドを用いてビーズを分離することによって、抗原およびビーズに結合しないファージが回収された。回収したファージは再度同様の操作で200 pmolのhCD137-Fc-BioまたはhCD137p12-FX-Fc-Bioとインキュベートされ Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coatedとインキュベートされた後、磁気スタンドを用いて抗原およびビーズに結合しないファージが回収された。Streptavidin （Roche）とインキュベートされたスキムミルクでブロッキングされたFG beads NeutrAvidinに12.5 pmolのSSビオチン化hCD137-Fcまたは25 pmolのSSビオチン化hCD137p12-FX-Fcを加え、室温で15分間結合させた。TBSTで3回洗浄されたビーズに対して、回収されたファージとともに終濃度0.2 mMのキヌレニンおよび4 nmolのビオチン化されていないヒトIgG1 Fc領域が添加され、ファージライブラリを室温で1時間抗原ならびにキヌレニンと接触させた。

[0582] ビーズは0.5 mLのキヌレニン /TBST（0.2 mMキヌレニン、0.1% Tween20、TBS、pH7.4）にて5回、キヌレニン /TBS（0.2 mMキヌレニン、TBS、pH7.4）にて5回洗浄された。その後、終濃度25 mMのDTTを含むTBS溶液500μLが添加され、室温で5分間撹拌された後、磁気スタンドを使用して分離されたビーズからファージが回収された。その後、上記Round1と同じ方法で、抗体多価提示ファージライブラリ液が調製された。Round4のパンニングでは、Round3のパンニングと同様の条件によるパンニングが実施された。ただし、磁気ビーズはFG beads NeutrAvidin の代わりにDynabeads MyOne Streptavidin T1が用いられた。

Round5のパンニングでは、Round3のパンニングと同様の条件によるパンニングが実施された。

[0583] (8-4) ファージディスプレイ法で同定されたキヌレニン依存性抗CD137抗体の評価

(8-4-1) キヌレニンの存在／非存在によって抗原に対する結合が変化するスイッチ抗体の発現と精製

本明細書に記載のキヌレニンライブラリから取得された抗体の可変領域をコードする遺伝子はヒトIgG1または改変ヒトIgG1(P253)、Kappa鎖を有する動物発現用プラスミドへ挿入された。表５５にクローン名と配列番号が記された。

[0584] 評価クローン

[表55]

クローン名	重鎖配列番号(全長)	軽鎖配列番号(全長)	実施例
dBBK026-P253	161	169	8-1
dBBK051-P253	162	170	8-1
dBBK054-P253	163	171	8-1
dBBK060-P253	164	172	8-1
dBBK070-P253	165	173	8-1
dBBK101-P253	166	174	8-2
dBBK102-P253	167	175	8-2
dBBK143-P253	168	176	8-2

[0585] 当業者公知の方法を用いて抗体が発現され、精製された。分光光度計を用いて、精製された抗体溶液の280 nmでの吸光度が測定された。得られた測定値からPACE法により算出された吸光係数を用いて精製された抗体の濃度が算出された（Protein Science (1995) 4, 2411-2423）。

[0586] (8-4-2) 表面プラズモン共鳴によるヒトCD137に対する結合のキヌレニンの影響の評価

Biacore T200（GE Healthcare）を用いて、抗CD137抗体とhCD137-His-BAP（配列番号：87）との抗原抗体反応の相互作用が解析された。アミンカップリング法でSure protein Aが適当量固定化されたSensor chip CM3（GE Healthcare）に抗CD137抗体を捕捉させ、実施例1-1で調製されたhCD137-His-BAPを相互作用させた。ランニングバッファーにはTBSが用いられ、再生溶液としては10 mM Glycine-HCl (pH 1.5) と25mM NaOHが用いられた。

TBSに懸濁した抗CD137抗体が捕捉された後に、500 nMのhCD137-His-BAPが各flow cellに流速10 μL/minで3分間インジェクトされた。この3分間がhCD137-

His-BAPの結合相とされ、結合相終了後、ランニングバッファーに切り替えられた5分間がhCD137-His-BAPの解離相とされた。解離相終了後、再生溶液が流速30 μl/minで10秒間インジェクトされた。以上が抗CD137抗体の結合活性測定サイクルとされた。Biacore T200 Evaluation Software Version:2.0で解析された、結合相で抗CD137抗体に相互作用したhCD137-His-BAPの結合量が表５６に示された。

[0587] キヌレニン存在下での抗原結合量を示す表である。

[表56]

クローン名	小分子なし	500μM Kynurenin
dBBK026-P253	18.2	60
dBBK047-P253	-2	10.4
dBBK051-P253	-2.3	30
dBBK054-P253	-2.2	3.6
dBBK060-P253	2.8	38.5
dBBK070-P253	-1.4	2.6
dBBK101-P253	-3.6	21.2
dBBK102-P253	-2.5	9.9
dBBK143-P253	-1.9	44.3

[0588] (8-4-3) 取得された抗体のCD137部分配列に対する結合活性評価

(8-4-3-1) CD137の部分配列を有する抗原の調製

CD137の部分配列を有する抗原は当業者公知の方法で調製した。具体的には、ヒトCD137の細胞外領域の一部をコードする遺伝子断片の下流に抗体定常領域をコードする遺伝子断片が連結された。ヒトCD137の細胞外領域部分配列と抗体定常領域が連結されたタンパク質（表５７）をコードする遺伝子断片が動物細胞発現用ベクターに組み込まれた。構築されたプラスミドベクターはExpiFectamine293 (Invitrogen) を用いて Expi293細胞 (Invitrogen)に導入され、目的のタンパク質を培養上清中に分泌させた。培養液上清からプロテインAを用いて、目的タンパク質が精製された。

[0589] CD137の部分配列を有する抗原

[表57]

CD137の部分配列を有する抗原の名前	配列番号
hCD137.1-F-G1d	177
hCD137.1.2-F.G1d	178
hCD137.2.4-F.G1d	179
hCD137.2.3-F.G1d	180
hCD137.3.4-F.G1d	181

[0590] (8-4-3-2) 結合の確認

取得された抗体がCD137の部分配列を有する抗原に結合するかどうかがELISAで評価された。はじめに、実施例1または実施例8-4-3-1で調製された各種抗原がMaxisorp 384マイクロタイタープレートに固相された。当該プレートの各ウェルをWash bufferにて洗浄することによってプレートへ結合していない抗原が除かれた後、当該ウェルがBlocking Buffer (BlockAceを含むTBS) 50 μLにて1時間以上ブロッキングされた。Blocking Bufferが除かれた各ウェルに、終濃度500μM L-キヌレニンを含むTBSまたは終濃度500μM キヌレニンを含むTBSで10 μg/mLに調製された精製抗体が各ウェル10 μL添加され、1時間静置された。終濃度500μM キヌレニンを含むWash Buffer (0.1%Tween20を含むTBS) にて洗浄された後に、終濃度500μM キヌレニンを含むTBSによって希釈されたAP結合抗ヒトKappa抗体 (BIOSOURCE) が各ウェルに添加された。1時間インキュベートされたのち終濃度500μM キヌレニンを含むWash Bufferにて洗浄後、BluePhos phosphate substrate(KPL)が添加された。各ウェル中の溶液の発色反応が、BluePhos Stop Solutionの添加により停止された後、620 nmの吸光度によって当該発色が測定された。抗体濃度が0μg/mLのウェルの値を1としたときの吸光度の比を示した。比が2以上の場合に結合していると判定すると、評価したクローンの中に異なる結合特性を示す抗体が含まれることが示された。

[0591]

[表58]

クローン名	hCD137.1-F.G1d	hCD137.1.2-F.G1d	hCD137.2.4-F.G1d	hCD137.2.3-F.G1d	hCD137.3.4-F.G1d	hCD137-Fc	cyCD137-Fc-BAP
dBBK026-P253	1.0	1.2	1.2	1.1	4.2	5.7	8.3
dBBK047-P253	1.2	1.2	2.1	4.0	4.8	2.4	1.2
dBBK051-P253	1.2	1.2	1.2	1.2	3.3	3.7	5.9
dBBK054-P253	3.3	10.1	1.3	1.1	1.3	8.6	1.1
dBBK060-P253	1.2	1.4	1.4	1.2	1.2	4.9	1.0
dBBK070-P253	1.8	2.0	1.3	1.1	1.2	9.2	3.1
dBBK101-P253	1.3	1.2	1.1	1.0	1.1	3.7	5.3
dBBK102-P253	1.2	1.2	1.1	1.1	1.1	2.8	4.3

[0592] (8-5) 取得された抗体のIn vitro活性評価

In vitro抗体活性測定にはGloResponse™ NF-κB-Luc2/4-1BB Jurkat cell line (Promega)が用いられた。384ウェルプレートの各ウェルに、Assay medium (99% RPMI, 1% FBS)で2×10^6/mLに濃度を調製されたFcγRIIB CHO-K1 Cellsが10μLずつ加えられた。キヌレニンを含む抗体溶液またはキヌレニンを含まない抗体溶液がそれぞれのウェルに10 μL加えられた。次に、Assay medium (99% RPMI, 1% FBS)で2×10^6/mLに調製されたGloResponse™ NF-κB-Luc2/4-1BB Jurkat cell lineが各ウェルに対して10 μL加えられた。キヌレニンは最終濃度500μMである。プレートは5% CO_2インキュベーター内にて37℃で6時間静置されたのち、室温で15分静置され、各ウェルにBio-Glo reagentが30μLずつ加えられた。Bio-Glo reagentにはBio-Glo Luciferase Assay System (Buffer and Substrate)が使用された。その後、各ウェルの発光量がプレートリーダーで測定された。各ウェルの発光の値を抗体未添加ウェルの発光の値で割った値をLuminescence foldとし、各抗体の活性を評価する指標とした。

得られた結果を図５７に示す。

L-キヌレニンの濃度が500μMである時にLuminescence foldが0μMである時よりも高いことから、キヌレニンの濃度あるいは存在によりアゴニスト活性が変化したことが示された。

[0593] 実施例9：Double round selection法によるATP及びAMP依存性CD137結合抗体の取得

(9-1) Double round selection法を利用したラショナルデザインライブラリからのATP及びAMP存在下においてそれぞれ抗原に結合する抗体の取得

これまでに特定の低分子存在下において抗原に対して結合活性を示す抗体が取得されているが、複数の異なる低分子について、それぞれの存在下において抗原に対して結合活性を示す抗体の取得については報告されたことが無い。この課題を解決するための方法の一つとして、パニングラウン毎に使用される低分子、例えばATPとAMP、を変える交互パニングが考えられるが、この場合、各ラウンド毎にそれぞれの低分子に対する選択圧がかけられるため、同時に両方の低分子に対する選択圧を等しくかけることが出来ないという課題が存在する。この課題を解決するために、Double round selection法を実施した。Double round selection法とは、パニング１ラウンド内で一つの抗原に対して２回パニングが繰り返される手法である(J Mol Biol. 1992 Aug 5;226(3):889-96.)。ここで１ラウンドとは、例えばファージディスプレイ法の場合、大腸菌からファージを回収してから、パニング後のファージを再度大腸菌に感染させるまでのステップのことを指し、例えばリボソームディスプレイ法の場合はin vitro転写からPCRによる遺伝子増幅までのステップのことを指す。これまでに、一種類の抗原に対するdouble round selectionは報告されていたが低分子依存性抗体の取得に応用された報告はなく、当然複数の異なる低分子に依存性を示す抗体の取得に応用された報告もない。しかし我々は、double round selection法を改変し、１ラウンドにおいてATPとAMPの双方に対する選択圧をかけることによって、より効率的にATP及びAMPに依存的に抗原結合活性を示す抗体を取得することが出来ると考えた。

[0594] 先行特許WO2015/083764において構築されたラショナルデザイン抗体ファージディスプレイライブラリから、ATP及びAMP存在下で抗原に対する結合活性を示す抗体が取得された。パニング条件を表59に示す。条件１及び２は従来通りのパニング条件および上記交互パニング条件が適用され、一方条件３では上記double round selection法が適用された。ここで、double round selectionはラウンド２及びラウンド３にて実施された。抗原としてはビオチン化hCD137-Fcが使用された。

表５９において、ATPとはATPを使用したパニング、AMPとはAMPを使用したパニング、Doubleとはdouble round selectionを使用したパニングがそれぞれ実施されたことを示している。

[0595] [表59]

条件	ラウンド1	ラウンド 2	ラウンド3
1	ATP	ATP	ATP
2	ATP	AMP	ATP
3	ATP	Double	Double

[0596] 構築されたファージディスプレイ用ファージミドを保持する大腸菌からファージが一般的な方法で産生された。具体的には、構築されたファージミドベクターを保持する大腸菌に対して、M13KO7TC（WO2015046554A1）もしくはM13KO7ΔpIII（ハイパーファージ）（PROGEN Biotechnik）を感染させ、30℃で一晩培養した上清からファージが回収された。ファージ産生が行われた大腸菌の培養液に2.5M NaCl/10%PEGを添加することによって沈殿させたファージの集団を、TBSにて希釈することによって抗体提示ファージライブラリ液が調製された。

次に、当該ファージライブラリ液に終濃度4%となるようにBSAが添加された。磁気ビーズに固定化された抗原を用いてパンニングが実施された。磁気ビーズとして、NeutrAvidin beads（TAMAGAWA SEIKI）もしくはDynabeads My One StreptAvidin T1（Thermo Fisher Scientific）が用いられた。

[0597] 調製されたファージライブラリ液にビオチン化hCD137-Fcと終濃度1 mMのAT

Pが加え、室温で60分間反応させた。ブロッキングされた磁気ビーズをファージと抗原の反応液に加え室温で15分反応させた。ビーズは1 mM ATPを含むTBS/0.1%Tween20 bufferにて2回もしくは3回、及び1 mM ATPを含むTBSにて1回もしくは2回洗浄された。その後TBSが加えられたビーズが室温で懸濁され、磁気スタンドを用いて分離されたビーズからファージ溶液が回収された。この作業が2回繰り返された後、溶出されたファージ溶液が混合された。回収されたファージ溶液に最終濃度1mg/mLのトリプシンが加えられた。回収されたファージが、対数増殖期（OD600が0.4-0.7）となった20mLの大腸菌株ER2738に添加された。37℃で1時間上記大腸菌の撹拌培養を行うことによって、ファージを大腸菌に感染させた。大腸菌は225 mm x 225 mmのプレートへ播種された。回収された大腸菌に対してM13KO7TC（WO2015046554A1）もしくはM13KO7ΔpIII（ハイパーファージと呼称される）（PROGEN Biotechnik）を感染させ、30℃で一晩培養した上清からファージが回収された。条件１においてはこの作業が3回繰り返された。条件２においては、上記作業を1度行われた後、ATPをAMPに変えて上記作業が再度実施され（ラウンド２）、その後さらに上記作業がATPでもう1度行われた（ラウンド３）。

[0598] 一方条件３においては、上記作業が1度行われた後ラウンド２及びラウンド３においてはdouble round selectionが実施された。具体的には、まず調製されたファージライブラリ液にビオチン化hCD137-Fcと終濃度1 mMのAMPを加え、室温で60分間反応させた。ブロッキングされた磁気ビーズをファージと抗原の反応液に加え室温で15分反応させた。ビーズは1 mM AMPを含むTBS/0.1%Tween20 bufferにて2回もしくは3回、及び1 mM AMPを含むTBSにて1回もしくは2回洗浄された。その後TBSが加えられたビーズが室温で懸濁され、磁気スタンドを用いて分離されたビーズからファージ溶液が回収された。この作業が2回繰り返された後、溶出されたファージ溶液が混合された。さらにその後、回収されたファージライブラリ液にビオチン化hCD137-Fcと終濃度1 mMのATPを加え、室温で60分間反応させた。ブロッキングされた磁気ビーズをファージと抗原の反応液に加え室温で15分反応させた。ビーズは1 mM ATPを含むTBS

/0.1%Tween20 bufferにて2回もしくは3回、及び1 mM ATPを含むTBSにて1回もしくは2回洗浄された。その後TBSが加えられたビーズが室温で懸濁され、磁気スタンドを用いて分離されたビーズからファージ溶液が回収された。この作業が2回繰り返された後、溶出されたファージ溶液が混合された。回収されたファージ溶液に最終濃度1mg/mLのトリプシンが加えられた。回収されたファージが、対数増殖期（OD600が0.4-0.7）となった20mLの大腸菌株ER2738に添加された。37℃で1時間上記大腸菌の撹拌培養を行うことによって、ファージを大腸菌に感染させた。大腸菌は225 mm x 225 mmのプレートへ播種された。回収された大腸菌に対してM13KO7TC（WO2015046554A1）もしくはM13KO7ΔpIII（ハイパーファージと呼称される）（PROGEN Biotechnik）を感染させ、30℃で一晩培養した上清からファージが回収された。

[0599] (9-2) ファージELISAによるATPもしくはAMPの存在下および非存在下における結合活性評価

上記の方法によって得られた大腸菌のシングルコロニーから、常法（Methods Mol. Biol.（2002）178, 133-145）に倣い、ファージ含有培養上清が回収された。NucleoFast 96（MACHEREY-NAGEL）を用いて、回収された培養上清が限外ろ過された。培養上清各100 μLが各ウェルにアプライされたNucleoFast 96を遠心分離（4,500g、45分間）することによってフロースルーが除去された。100 μlH_2Oが各ウェルに加えられた当該NucleoFast 96が、再度遠心分離（4,500g、30分間）によって洗浄された。最後にTBS 100 μLが加えられ、室温で5分間静置された当該NucleoFast 96の各ウェルの上清に含まれるファージ液が回収された。

[0600] TBS、1 mM AMP/TBSまたは1 mM ATP/TBSが加えられた精製ファージが以下の手順でELISAに供された。384 Well Microplates Streptavidin-coated (greiner, 781990)が実施例1で作製されたビオチン化hCD137-Fcを含む100 μLのTBSにて一晩コートされた。当該プレートの各ウェルをTBSTにて洗浄することによってプレートへ結合していない抗原が除かれた後、当該ウェルが250 μLの0.4% block ace, 1% BSA, 0.02%Tween , 0.05% ProClin 300-TBSにて1時間以

上ブロッキングされた。その後、各ウェルに調製された精製ファージが加えられた当該プレートを37℃で1時間静置することによって、抗体を提示したファージを各ウェルに存在する抗原にATPもしくはAMPの非存在下および存在下において結合させた。TBST、1 mM ATP/TBSTまたは1 mM AMP/TBSTにて洗浄された各ウェルに、TBS、1 mM AMP/TBSまたは1 mM ATP/TBSによって希釈されたHRP結合抗M13抗体（Amersham Pharmacia Biotech）が添加され、1時間インキュベートさせた。TBST、1 mM ATP/TBSTまたは1 mM AMP/TBSTにて洗浄後、TMB single溶液（ZYMED）が添加された各ウェル中の溶液の発色反応が硫酸の添加により停止された後、450 nmの吸光度によって当該発色が測定された。

ファージELISAの結果を表６０に示した。

[0601] ここで、ATP存在下における吸光度のS/N比（抗原存在下での吸光度と、抗原非存在下での吸光度の比）が2より高いクローンが結合陽性と判定され、ATPまたはAMP存在下の/非存在下における吸光度の比が3以上のものがATPまたはAMPに依存的な抗原結合活性を有するクローン（スイッチクローン）と判定された。その結果、hCD137-Fcに対して、条件１から得られたクローンのほとんどはATP存在下では結合を示してもAMP存在下では結合を示すことが出来なかった。条件２から得られたATP存在下で結合を示し非存在下では結合を示さないクローンの中には、AMP存在下でも結合を示す抗体が複数認められたが、その割合は50%以下であった。一方double round selectionが実施された条件３では、ATP存在下で結合を示し非存在下では結合を示さないクローンの65%以上が、AMP存在下でも結合を示すことが出来た。

また、得られたクローンについて、特異的なプライマーpBAD-F, G1seq-Rを用いて増幅された抗体重鎖遺伝子の塩基配列が解析された。

その結果、Double round selectionが実施された条件３においては、ATPのみで実施された条件１の3倍、ATPとAMPが交互に使用されて実施された条件２と比べても約1.5倍も多くの、ATPとAMPの双方に依存的なhuman CD137結合を示す抗体重鎖配列が得られていた。このことより、複数の異なる低分子に依存的な抗原結合活性を示す抗体を取得する際に、double round selectionが

より有用な手法であることが示された。

[0602] [表60]

	条件1	条件2	条件3
ELISA 実施クローン数	96	96	96
陽性クローン数(S/N 比>2, ATP)	69	88	91
ATP スイッチクローン数(ATP+/-比>=3)	65	84	82
ATP,AMP スイッチクローン数 (ATP+/-比>=3 かつ AMP+/-比>=3)	13	40	54
ATP,AMP スイッチクローン比	20.0%	47.6%	65.9%
ATP,AMP スイッチクローン配列数 (ATP+/-比>=3 かつ AMP+/-比>=3)	13	25	38

[0603] 実施例10：ナイーブライブラリからのATP依存性抗マウスCTLA4結合抗体の取得

(10-1) ビーズパンニングによるナイーブヒト抗体ライブラリからの低分子存在下においてマウスCTLA4に結合する抗体の取得

ヒトPBMCから作成したポリA RNAや、市販されているヒトポリA RNAなどを鋳型として当業者に公知な方法に従い、互いに異なるヒト抗体配列のFabドメインを提示する複数のファージからなるヒト抗体ファージディスプレイライブラリが構築された。

[0604] 構築されたナイーブヒト抗体ファージディスプレイライブラリから、低分子存在下でマウスCTLA4細胞外領域（mCTLA4）に対する結合活性を示す抗体がスクリーニングされた。すなわち、ビーズに捕捉されたmCTLA4に対して低分子存在下で結合活性を示す抗体を提示しているファージが集められた。低分子非存在の条件でビーズから溶出されたファージ溶出液からファージが回収された。本取得方法では、抗原としてビオチン化されたmCTLA4(mCTLA4-His-Biotin）が用いられた。mCTLA4-His-Biotinは、mCTLA4の細胞外領域にHisタグが融合されたmCTLA4-His（Sino Biologics Inc. 50503-M08H, Accession No. NP_033973.2）が、アミンカップリング法によりビオチン化された（PIERCE Cat.No.21329）ものである。

[0605] 構築されたファージディスプレイ用ファージミドを保持した大腸菌から産生されたファージは一般的な方法により精製された。その後TBSで透析処理されたファージライブラリ液が得られた。磁気ビーズに固定化された抗原を用いたパンニングが実施された。磁気ビーズとして、NeutrAvidin coated beads (Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated) もしくはStreptavidin coated beads (Dynabeads M-280 Streptavidin) が用いられた。

[0606] 癌組織においてスイッチの役割を果たすことができる低分子に依存的な低分子スイッチ抗体を効率的に取得するために、アデノシン3リン酸 (adenosine 5'-triphosphate; ATP) およびATP代謝物存在下で抗原に結合し、ATP非存在下では抗原に結合しない抗体を濃縮するパンニングが先行特許WO2013/180200で示された方法で実施された。

具体的には、調製されたファージライブラリ液にビオチン化mCTLA4と終濃度1 mMのATP及びATP代謝物が加え、室温で60分間反応させた。ブロッキングされた磁気ビーズをファージと抗原の反応液に加え室温で15分反応させた。ビーズは1 mM ATPを含むTBS/0.1%Tween20 bufferにて2回もしくは3回、及び1 mM ATPを含むTBSにて1回もしくは2回洗浄された。その後、Round1においては最終濃度1 mg/mLのトリプシンが、Round2以降においてはTBSが加えられたビーズが室温で懸濁され、磁気スタンドを用いて分離されたビーズからファージ溶液が回収された。TBSが使用された場合はこの作業が2回繰り返された後、溶出されたファージ溶液が混合され、回収されたファージ溶液に最終濃度1mg/mLのトリプシンが加えられた。回収されたファージが、対数増殖期 (OD600が0.4-0.7) となった10mLの大腸菌株ER2738に添加された。37℃で1時間上記大腸菌の撹拌培養を行うことによって、ファージを大腸菌に感染させた。大腸菌は225 mm x 225 mmのプレートへ播種された。回収された大腸菌に対してM13KO7TC (WO2015046554A1) もしくはM13KO7ΔpIII (ハイパーファージと呼称される) (PROGEN Biotechnik) を感染させ、30℃で一晩培養した上清からファージが回収された。培養の際には、lac promoterからのFab遺伝子の発現誘導をかけるために、100 μM IPTGを添加した条件、及び添加していな

い条件が用いられた。この作業が4回繰り返された。

[0607] (10-2) ファージELISAによる低分子存在下および非存在下における結合活性の評価

実施例10-1で得られた大腸菌のシングルコロニーから、常法（Methods Mol. Biol. (2002) 178, 133-145）に習い、ファージ含有培養上清が回収された。NucleoFast 96 (MACHERY-NAGEL)を用いて回収された培養上清が限外濾過された。培養上清各100 μLがNucleoFast 96の各ウェルにアプライされ、4,500 g, 45分間遠心分離を行いフロースルーが除去された。H_2O 100 μLを加え、再度4,500g, 30分間遠心分離による洗浄が行われた。その後、TBS 100 μLを加え、室温で5分間静置した後、上清に含まれるファージ液が回収された。

[0608] TBSが加えられた精製ファージが以下の手順でELISAに供された。StreptaWell 96マイクロタイタープレート（Roche）がmCTLA4-His-Biotinを含む100 μLのTBSにて一晩コートされた。当該プレートの各ウェルをTBSTにて洗浄することによってプレートへ結合していないmCTLA4-His-Biotinが除かれた後、当該ウェルが250 μLの2%スキムミルク-TBSにて1時間以上ブロッキングされた。2%スキムミルク-TBSを除き、その後、各ウェルに調製された精製ファージが加えられた当該プレートを室温で1時間静置することによって、抗体を提示するファージを各ウェルに存在するmCTLA4-His-BiotinにATP非存在もしくは存在下において結合させた。TBSTもしくはATP/TBSTにて洗浄された各ウェルに、TBSもしくはATP/TBSによって希釈されたHRP結合抗M13抗体（Amersham Pharmacia Biotech）が添加されたプレートを１時間インキュベートさせた。TBSTもしくはATP/TBSTにて洗浄後、TMB single溶液（ZYMED）が添加された各ウェル中の溶液の発色反応が硫酸の添加により停止された後、450 nmの吸光度によって当該発色が測定された。その結果、mCTLA4に対して、ATP存在下でのみ結合する抗体が複数確認された。

ファージELISAの結果を表６１に示した。

ここで、ATP存在下における吸光度が0.2より高いクローンが陽性と判定され、ATP存在下/非存在下における吸光度の比が2より高いものがATP依存的な

抗原結合活性を有するクローン（スイッチクローン）と判定された。

[0609] [表61]

パニングに使用した ヘルパーファージ	M13KO7TC	M13KO7TC	M13KO7ΔpIII
パニング培養時の IPTG 濃度	0 μM	100 μM	0 μM
ELISA 実施クローン数	96	96	96
陽性クローン数(吸光度 ＞ 0.2)	20	41	62
スイッチクローン数(SM+/-比>2)	0	12	16

[0610] 前述の発明は、明確な理解を助ける目的のもと、実例および例示を用いて詳細に記載したが、本明細書における記載および例示は、本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。本明細書で引用したすべての特許文献および科学文献の開示は、その全体にわたって、参照により明示的に本明細書に組み入れられる。

[0611] 実施例１１：改変された抗ヒトCD137抗体の、4-1BB Jurkatレポータージーンアッセイを用いたin vitroにおけるATPおよびADP依存的なCD137アゴニスト活性の評価

実施例７－２（表５２）において作製された改変体のIn vitro活性測定には、GloResponse™ NF-κB-Luc2/4-1BB Jurkat cell line (Promega, CS196004)が用いられた。384ウェルプレートの各ウェルに、Assay medium (99% RPMI, 1% FBS)で4×10^5/mLに濃度を調製されたFcγRIIB CHO-K1 Cells (Promega)が10μLずつ加えられる。続いて、ADPを含む抗体溶液またはATPを含む抗体溶液またはATPあるいはADPを含まない抗体溶液がそれぞれのウェルに10μL加えられる。次に、Assay medium (99% RPMI, 1% FBS)で2×10^6/mLに調製されたGloResponse™ NF-κB-Luc2/4-1BB Jurkat cell lineが各ウェルに対して10 μL加えられる。ADPは最終濃度10μM、ATPは最終濃度10μMである。プレートは5% CO_2インキュベーター内にて37℃で6時間静置されたのち、室温で15分静置され、各ウェルにBio-Glo reagentが30μLずつ加えられる。Bio-Glo reagentにはBio-Glo Luciferase Assay System (Buffer and Substrate)が使用された。その後、各ウェルの発光量がプレートリーダーで測定された。各ウェルの

発光の値を抗体未添加ウェルの発光の値で割った値を相対発光量（Fold induction）とし、各抗体のCD137アゴニスト活性を評価する指標とした。

結果を図58に示す。図58よりA375-P587/B167-LamLib、A551-P587/B256-LamLib、A551-P587/B379-LamLib、A375-SCF041aPh/B167-LamLib、A551-SCF041aPh/B256-LamLib、A551-SCF041aPh/B379-LamLib、A375-SCF043aPh/B167-LamLib、A551-SCF043aPh/B256-LamLib、A551-SCF043aPh/B379-LamLib、A375-SCF057aPh/B167-LamLib、A551-SCF057aPh/B256-LamLib、A551-SCF057aPh/B379-LamLibはATPおよびADP依存的にヒトCD137アゴニスト活性を示すことが確認された。

[0612] 〔実施例１２〕腫瘍部における細胞外ATPレベルの測定

ATPスイッチ型抗体はATP存在下において標的分子に結合し薬効を示す。腫瘍組織部位における細胞外ATPレベルの評価をP2Y11 split Luc/HEK293細胞を用いて行った。本細胞は、ProbeX社にて同社保有のスプリットルシフェラーゼ技術を用いて作製され、ATPをリガンドとするプリンレセプターP2Y11（Accession No. AF030335）を結合したルシフェラーゼのC末端タンパクとβ-arrestin-2 isoform 1（Accession No. NM_004313）を結合したルシフェラーゼN末端タンパクを発現しており、ATP刺激により細胞内で２つに分かれていたルシフェラーゼ断片が会合することで活性を持つルシフェラーゼが生成され、ルシフェリンを基質とした発光を得ることができる。

[0613] （１２－１）P2Y11 split Luc/HEK293細胞のATP応答性

P2Y11 split Luc/HEK293細胞は、10% 牛胎児血清、0.8 mg/mL G418（Geneticin™）、および0.05 mg/mLフレオマイシンD1（Zeocin™）を含むダルベッコ改変イーグル培地（Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose : D5796 / Sigma-Aldrich)にて培養、継代維持した。P2Y11 split Luc/HEK293細胞を96 well microplate（μCLEAR（登録商標）, WHITE, CELLSTAR（登録商標） / Greiner Bio-One）に30000 cells/well で播き一晩培養した後、各ウェルより培養液を取り除き、ルシフェリン（VivoGlo™ Luciferin, In Vivo Grade / Promega）を0.5 mg/mLで含む培養液0.18 mLと交換した。最終濃度が0, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 mMになるようにアデノシン、AMP、ADP、もし

くは、ATPの各溶液0.02 mLを加え、CO_2インキュベーター（37℃、5% CO_2）にて30分間培養した後、プレートリーダーEnVision（Perkin Elmer）にて発光値の測定をした。

図59はその結果を示す。P2Y11 split Luc/HEK293細胞は、ATP特異的にリガンド濃度依存性に発光値を増加させた。

[0614] （１２－２）腫瘍組織部位における細胞外ATP濃度の評価

P2Y11 split Luc/HEK293細胞はCell Dissociation Buffer, enzyme-free, PBS（Thermo Fisher Scientific）にて培養フラスコよりはがし、HBSSで洗浄後、HBSSの細胞懸濁液とし、in vivo細胞外ATPレベル測定に用いた。

[0615] （１２－２－１）in vivo ATP検量線の作製

既定濃度のATP、1 mg/mL ルシフェリン（VivoGlo, Promega）、および、1.0×10^7 cells/mLのP2Y11 split Luc/HEK293細胞を含む細胞懸濁液の0.2 mLをC3H/HeNマウスの腹側部皮下に移植し、20分後イソフルラン麻酔下in vivoイメージング装置IVIS spectrum CTにて発光イメージング測定を行った。取得したイメージング画像をLiving Image Softwareにて解析し、算出された発光値と添加したATP濃度よりin vivo測定条件でのATP検量線を作製した。

図60はその結果を示す。P2Y11 split Luc/HEK293細胞は、C3H/HeNマウス皮下に移植したin vivo条件でもATP濃度に依存した発光を示し、in vivoでATPレベル評価ができる検量線とすることができた。

[0616] （１２－２－２）腫瘍組織部位における細胞外ATPレベルの評価

1 mg/mL ルシフェリン（VivoGlo, Promega）と1.0×10^7 cells/mLのP2Y11 split Luc/HEK293細胞を含む細胞懸濁液の0.2 mLをFM3A担癌マウスの腫瘍部皮下に移植し（腫瘍体積が200～300 mm^3）、20分後イソフルラン麻酔下in vivoイメージング装置IVIS spectrum CTにて発光イメージング測定を行った。取得したイメージング画像をLiving Image Softwareにて解析し、腫瘍部の発光値よりATPレベルをin vivo ATP検量線を用いて算出し、腫瘍部位における細胞外ATPレベルとした。

発光イメージング測定の結果を図61に、ATPの検量線から算出された、腫瘍

部位における細胞外ATPレベルを表62に示す。バックグラウンド（正常部位）に比べ、腫瘍組織部位（FM3A tumor bearing mouse）における発光レベルは高く、FM3A移植モデルでの腫瘍組織部位の細胞外ATPレベルは作製したin vivo ATP検量線より平均で1.31 mMと算出された。

[0617] [表62]

FM3A 担癌マウス	1	2	3	平均 ± SD
細胞外 ATP (mM)	0.81	1.26	1.86	1.31 ± 0.53

[0618] 〔実施例１３〕ATP依存的結合特性を有する抗hIL6R抗体によるATP依存的抗腫瘍活性

（１３－１）ATP依存的な結合特性を有する抗hIL6R抗体の作製

WO2015/083764およびWO2013/180200に記載の方法を参考に、取得された抗体を最適化し、ATP依存的な結合特性を有する抗ヒトインターロイキン6受容体（hIL6R）抗体を作製した。表63に示されたように重鎖と軽鎖が組み合わされて、当業者公知の方法で抗hIL6R抗体が発現および精製された。

[0619] 抗体の重鎖と軽鎖の組み合わせ

[表63]

抗体名称	VH	CH	VL	CL
MRAH-G4T1/MRAL-k0	MRAH 配列番号:190	G4T1 配列番号:198	MRAL 配列番号:191	k0 配列番号:199
H0002-G4T1/L1058-lam1	H0002 配列番号:192		L1058 配列番号:193	lam1 配列番号:189
H0041-G4T1/L1088-lam1	H0041 配列番号:194		L1088 配列番号:195	
H0052-G4T1/L1083-lam1	H0052 配列番号:196		L1083 配列番号:197	

[0620] 抗原としてhIL6R（配列番号：200）が遺伝子合成され、動物発現用プラスミドへ挿入された後、CHO細胞に導入され恒常的に抗原を発現する、安定発現株（hIL6R-CHO）がクローン化された。抗原タンパク質は以下の方法を用いて発現、精製された。hIL6R-CHO株は適切な細胞密度で懸濁されて、フラスコに

播種および培養され、その培養上清から、当業者公知の方法で抗原が精製された。分光光度計を用いて、精製された抗原溶液の280 nmでの吸光度が測定された。得られた測定値からPACE法により算出された吸光係数を用いて精製された抗原の濃度が算出された（Protein Science (1995) 4, 2411-2423）。

[0621] （１３－２）抗hIL6R抗体に対するATP濃度依存的なKD値算出

表63に記載の抗体を用いて、Biacore T200を用いて0, 1, 10, 100 μMの各ATP濃度存在下でのhIL6Rに対するaffinity解析を行った。測定は流速10 μL/min、相互作用時間1分、解離時間1分、single cycle kineticsで37℃で行い、バッファーは異なる濃度（0, 1, 10, 100 μM）のATPをそれぞれ含む20 mM ACES, 150 mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$, 0.05% Tween20, pH 7.4を用いた。解析にはBiacore T200付属のBiacore Evaluation Softwareを用い、fitting modelには1:1 Langmuir binding modelを用いた。その解析結果を表64、図62に示す。

[0622] 抗hIL6R抗体に対するATP濃度依存的なKD値(M)算出

[表64]

抗体名称		ATP 濃度 (μM)			
		0	1	10	100
MRAH-G4T1/MRAL-k0	平均	1.70E-08	1.88E-08	1.79E-08	1.80E-08
	SD	3.81E-09	4.07E-09	4.08E-09	4.00E-09
H0002-G4T1/L1058-lam1	平均	N.A.*	N.A.*	N.A.*	1.16E-06
	SD	N.A.*	N.A.*	N.A.*	4.23E-07
H0041-G4T1/L1088-lam1	平均	N.A.*	2.38E-06	3.20E-07	4.83E-08
	SD	N.A.*	6.00E-07	7.45E-08	1.16E-08
H0052-G4T1/L1083-lam1	平均	N.A.*	1.45E-06	5.05E-08	8.31E-09
	SD	N.A.*	1.17E-06	1.41E-08	2.84E-09

*Biacoreの解析上でKinetic constants cannot be uniquely determined. とコメントが出たものはRejectedとし、その結果はN.A.とした。

[0623] この結果からMRAH-G4T1/MRAL-k0のhIL6Rに対するKDはアッセイ中におけるATP濃度の影響を受けないが、H0002-G4T1/L1058-lam1、H0041-G4T1/L1088-lam

1、H0052-G4T1/L1083-lam1のhIL6Rに対するKDはアッセイ中におけるATP濃度が高ければ高いほど小さくなる、すなわち結合活性がATP濃度が高いほど強くなることが示された。この結果から、H0002-G4T1/L1058-lam1、H0041-G4T1/L1088-lam1、H0052-G4T1/L1083-lam1はATP依存的なhIL6Rに対する結合活性を有することが確認された。

以降では、MRAH-G4T1/MRAL-k0のようにその抗原に対する結合活性がATP濃度に依存しない抗体をnon-switch抗体と表記し、H0002-G4T1/L1058-lam1、H0041-G4T1/L1088-lam1、H0052-G4T1/L1083-lam1のようにその抗原に対する結合活性がATP濃度に依存する抗体をswitch抗体と表記する場合がある。

[0624] （１３－３）抗hIL6R抗体に対するADP、AMP濃度依存的なKD値算出

次に表63に記載の抗体を用いて、Biacore T200を用いて上述の条件に従ってATPの代わりに10，100 μMの各ADP、AMP濃度存在下でのhIL6Rに対するaffinity解析を行った。ADPを用いた測定の解析結果を表65、図63に、AMPを用いた測定の解析結果を表66、図64に示した。なお、測定時に10 RU以下の反応しかない抗体については解析不能と判断し、N.D.と表記した。

[0625] 抗hIL6R抗体に対するADP濃度依存的なKD値(M)算出

[表65]

抗体名称	ADP 濃度 (μM)	
	10	100
MRAH-G4T1/MRAL-lam1	5.64E-09	5.96E-09
H0002-G4T1/L1058-lam1	N.D.	N.D.
H0041-G4T1/L1088-lam1	1.03E-05	2.96E-07
H0052-G4T1/L1083-lam1	5.81E-08	1.01E-08

[0626] 抗hIL6R抗体に対するAMP濃度依存的なKD値(M)算出

[表66]

抗体名称	AMP 濃度 (μM)	
	10	100
MRAH-G4T1/MRAL-lam1	5.33E-09	5.46E-09
H0002-G4T1/L1058-lam1	N.D.	N.D.
H0041-G4T1/L1088-lam1	N.D.	1.81E-06
H0052-G4T1/L1083-lam1	6.64E-06	1.18E-07

[0627] この結果からMRAH-G4T1/MRAL-k0のhIL6Rに対するKDはアッセイ中におけるADPおよびAMP濃度の影響を受けないが、ATPと同様にアッセイ中におけるADPまたはAMP濃度が高くなるに伴い、H0002-G4T1/L1058-lam1、H0041-G4T1/L1088-lam1、H0052-G4T1/L1083-lam1 のhIL6Rに対するKDは小さくなる、すなわち結合活性が強くなることが示された。この結果から、H0002-G4T1/L1058-lam1、H0041-G4T1/L1088-lam1、H0052-G4T1/L1083-lam1はADPまたはAMP依存的なhIL6Rに対する結合活性を有することが確認された。

[0628] （１３－４）抗hIL6R抗体のATP濃度に依存したADCC活性の評価

次に、これらの抗体の重鎖定常領域を、mIgG2aにFcγRIVに対する結合を増強する改変を加えてADCC活性を増強したmFa55（配列番号：184）に変更し、軽鎖定常領域をヒトからマウスに変更した抗体が表67のように当業者公知の方法で調製された。また、合わせて陰性コントロールとしてKLH-mFa55（IC17Hdk-mFa55/IC17L-mk1）が用意された。

[0629] 抗体の重鎖と軽鎖の組み合わせ

[表67]

抗体名称	VH	CH	VL	CL
IC17HdK-mFa55/IC17VL-mk1	IC17HdK 配列番号:187	mFa55 配列番号:184	IC17VL 配列番号:188	mk1 配列番号:185
MRAH-mFa55/MRAL-mk0	MRAH 配列番号:190		MRAL 配列番号:191	mk0 配列番号:211
H0002-mFa55/L1058-ml0	H0002 配列番号:192		L1058 配列番号:193	ml0 配列番号:212
H0041-mFa55/L1088-ml0	H0041 配列番号:194		L1088 配列番号:195	
H0052-mFa55/L1083-ml0	H0052 配列番号:196		L1083 配列番号:197	

[0630] これらの抗体を用いて、当業者公知の方法で調製したhIL6R全長（配列番号：213）を発現させたマウス肝癌株Hepa1-6（hIL6R-Hepa1-6）に対して、以下の方法に従ってADCCを評価した。

[0631] 以下の測定にはmFcγRIV ADCC Reporter Bioassay, Core Kit (Promega)を用いた。96ウェルプレートの各ウェルに、培地で2×10^5/mLに濃度を調製した hIL6R-Hepa1-6を100 μLずつ加え、37 ℃で21時間静置した。培地には90 % DMEM, 10 % FBS, 600 μg Geneticin, 500 μg Zeocinを使用した。プレートを200×g, 4℃で5分遠心した後、各ウェルの上清を吸引し、最終濃度が0.2 μg/mLとなるようにassay bufferで希釈された表67に記載の抗体溶液、最終濃度が0, 1, 10, 100 μMとなるようにassay bufferで希釈されたATP溶液、および3.82 mLのassay bufferに0.69 mL添加したキット付属のeffector cell溶液25 μLをそれぞれ合計75 μLとなるように混合し、各ウェルに加え6時間37℃で静置した。Assay bufferにはキット付属のlow IgG serum 1.5 mLを36 mLのRPMI1640に添加したものを使用した。その後プレートを室温で15分静置し、各ウェルにBio-Glo reagentを75 μLずつ加えた。Bio-Glo reagentにはBio-glo Luciferase Assay System (Buffer and Substrate)を使用した。その後各ウェルの発光をプレートリーダーで測定した。各ウェルの発光の値を抗体未添加ウェルの発光の値で割った値をFold inductionとし、各抗体のADCCを評価する指標とした。

得られた結果を図65に示す。図中では、Fold inductionを相対発光量（RLU

）と表記する。

[0632] この結果からnon-switch抗体であるMRAH-mFa55/MRAL-mk0のhIL6R発現細胞に対するADCCはアッセイ中におけるATP濃度の影響を受けないが、switch抗体であるH0002-mFa55/L1058-ml0、H0041-mFa55/L1088-ml0、H0052-mFa55/L1083-ml0のADCCはアッセイ中におけるATP濃度が高ければ高いほど強くなることが示された。この結果から、H0002-mFa55/L1058-ml0、H0041-mFa55/L1088-ml0、H0052-mFa55/L1083-ml0はATP依存的なhIL6Rに対する細胞傷害活性を有することが確認された。

[0633] （１３－５）抗hIL6R抗体のin vivoにおける抗腫瘍活性の評価

各抗体のADCCが確認されたことから、以下の方法に従ってhIL6R-Hepa1-6をC57BL/6マウスに担癌させたマウスモデルを使って、これらの抗体のin vivoでの抗腫瘍活性を評価する試験を行った。

[0634] 抗アシアロGM1抗体（和光純薬工業）を1 mLの蒸留水（大塚製薬工場）に溶解後、4 mLのPBSで希釈した。このように調製した抗アシアロGM1抗体をC57BL/6マウス100匹に、1匹につき0.1 mL腹腔内投与した。一日後にHanks’ Balanced Salt solution (Sigma) に1×10^{8}/mLになるように懸濁されたhIL6R-Hepa1-6に、細胞懸濁液と同容量のMatrigel Matrix (Corning) を添加した混合液を調製した。この混合液をC57BL/6マウス100匹に対し、1匹につき0.2 mL皮下に注入し細胞を移植した。以降マウスの腫瘍径はノギスによって測定され、長径×短径×短径×1/2を腫瘍体積と定義した。またこの腫瘍径測定は各マウスに投与された薬液の内容を知らない者が実施した。細胞移植後11日目に上記C57BL/6マウス100匹の腫瘍径及び体重を測定した。この値を基にマウスのランダマイズを実施し、10匹ごとの4群と8匹の1群の、計5群にマウスを群分けし、それぞれの群に表67に示された抗体液を尾静脈投与した。ここで8匹の群にはH0002-mFa55/L1058-ml0を投与した。また抗体液の投与用量(mL)は0.01(mL/g)×各マウスの体重(g)とした。以降同様の方法で上記群分けされたC57BL/6マウスの腫瘍径及び体重を、移植後14, 18, 21, 25日目に測定した。また、移植後18日目には測定された体重データを基に上記と同様の計算式により定

義される投与用量の表67に示された抗体液を、対応する群に尾静脈投与した。各抗体投与群の各測定日における腫瘍体積の平均値を算出し、各抗体のin vivoでの抗腫瘍活性を評価する指標とした。

得られた結果を図66に示す。

[0635] この結果からATP依存的なADCCが確認されたswitch抗体のうち、H0041-mFa55/L1088-ml0、H0052-mFa55/L1083-ml0は、non-switch抗体であるMRAH-mFa55/MRAL-mk0と同程度のhIL6R発現細胞に対する抗腫瘍活性を示すことが確認された。この結果から、腫瘍近傍の細胞外ATPはH0041-mFa55/L1088-ml0、H0052-mFa55/L1083-ml0がMRAH-mFa55/MRAL-mk0と同様に機能する程度の濃度で存在することが示唆された。

[0636] 〔実施例１４〕ATP依存的結合特性を有する抗hIL6R抗体の全身作用の評価

ATP依存的結合特性を有する抗hIL6R抗体の正常組織における作用を評価するために、正常マウス（C57BL/6）およびhIL6Rを全身に過剰発現させたトランスジェニックマウス（以下hIL6R-tgm）（Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 May 23; 92(11): 4862-4866.）が用いられて抗体の血漿中動態を評価した。この評価のために、表67に記載された抗体が、正常マウス（C57BL/6）およびhIL6R-tgm に投与され、血漿中動態が比較された。hIL6R-tgmにおいてはhIL6Rに結合する通常の抗体は全身に発現する膜型hIL6Rに結合した結果、膜型hIL6Rを介して消失することが報告されている(Nature Biotechnology volume 28, pages 1203-1207 (2010))。

[0637] 2 mg/mL のMRAH-mFa55/MRAL-mk0、H0002-mFa55/L1058-ml0、H0041-mFa55/L1088-ml0、H0052-mFa55/L1083-ml0が正常マウスおよびhIL6R-tgmに10 mL/kgで単回静脈内投与された。正常マウスではMRAH-mFa55/MRAL-mk0群、H0002-mFa55/L1058-ml0群、H0041-mFa55/L1088-ml0群、H0052-mFa55/L1083-ml0群の全群で投与後5分、7, 24, 48, 72, 168時間後に血液が採取された。hIL6R-tgmについてはMRAH-mFa55/MRAL-mk0群で投与後5分、7, 24, 48, 52, 55, 72, 168時間後に、H0002-mFa55/L1058-ml0群、H0041-mFa55/L1088-ml0群、H0052-mFa55/L1083-ml0群で投与後5分、7, 24, 48, 72, 168時間後に血液が採取され

た。得られた血液は4℃、12,000 rpm、10分で速やかに遠心し、血漿が分離された。血漿は測定まで-20℃以下に設定されたフリーザーで保存された。

[0638] 血漿中の各抗体濃度は電気化学発光（ECL）法で測定された。hIL6R溶液がMULTI-ARRAY PR Plate (Meso Scale Diagnostics, LLC) に添加され、37℃、1時間静置され、hIL6Rはプレート上に固相された。検量線としてMRAH-mFa55/MRAL-mk0、H0041-mFa55/L1088-ml0、H0052-mFa55/L1083-ml0は血漿中濃度として8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 μg/mL で、H0002-mFa55/L1058-ml0は血漿中濃度として64, 32, 16, 8, 4, 2, 1 μg/mL として調製した。hIL6R 固相プレートに0.05% Tween20, 1% BSA含有1 M Tris-HCl溶液 pH 8.0が添加された後、速やかに0.3 M 酢酸溶液で250倍希釈した血漿サンプルならびに検量線試料が添加され、さらにATP溶液が添加され混和された。室温で1時間静置された後、ビオチンラベル抗マウスIgG抗体（Southern Biotechnology Associates, Inc）が添加され、室温で1時間静置された。その後、Streptavidin SULFO-TAG Labeled (Meso Scale Diagnostics, LLC) が添加され室温で1時間静置された後、Read buffer T (Meso Scale Diagnostics, LLC) が加えられて、電気化学発光装置SECTOR Imager 6000 (Meso Scale Diagnostics, LLC) で測定された。SOFTmax PRO (Molecular Devices)が用いられてマウス血漿中の各抗体濃度が算出された。

[0639] 血漿中の可溶性抗原濃度がECLで測定された。50倍に希釈したマウス血漿サンプルとSULFO-TAG (Meso Scale Diagnostics, LLC)-ラベル化抗ヒトIL6R抗体（R&D Systems)、ビオチンラベル化抗ヒトIL6R抗体（R&D Systems）および過剰の抗ヒトIL6R抗体トシリズマブ（自社製造品）が混合され、37℃、オーバーナイトでインキュベーションされた。ブロッキングしたStreptavidin-coated standard 96-well plate (Meso Scale Diagnostics, LLC) に添加された後、Read bufferが加えられてSECTOR Imager 6000 (Meso Scale Diagnostics, LLC) で測定された。SOFTmax PRO (Molecular Devices)が用いられてマウス血漿中の可溶性抗原濃度が算出された。

[0640] MRAH-mFa55/MRAL-mk0、H0002-mFa55/L1058-ml0、H0041-mFa55/L1088-ml0、

H0052-mFa55/L1083-ml0の正常マウスおよびhIL6R-tgmにおける血中濃度が比較された結果をそれぞれ図67，図68，図69，図70に示す。

[0641] 正常マウスと比較して全身でhIL6Rを発現したhIL6R-tgmにおいてnon-switch抗体であるMRAH-mFa55/MRAL-mk0は速い消失を示した（図67）。この結果は、non-switch抗体は全身の正常組織に発現する膜型のhIL6Rに結合し、hIL6Rを介して消失したことが原因で生じると考えられた。

その一方で、switch抗体であるH0002-mFa55/L1058-ml0、H0041-mFa55/L1088-ml0、H0052-mFa55/L1083-ml0の場合は、non-switch抗体のように、正常マウスと比較したときにhIL6R-tgmにおいては著しく速い抗体濃度の消失は観察されなかった。この結果は、non-switch抗体の結果とは対照的に、switch抗体は全身に発現する膜型hIL6Rに結合せず、hIL6Rを介した消失も生じないことを示唆している。

Switch抗体であるH0002-mFa55/L1058-ml0、H0041-mFa55/L1088-ml0、H0052-mFa55/L1083-ml0を比較すると、低いATP濃度でのより強い結合を示すH0052-mFa55/L1083-ml0でのみ正常マウスと比較してhIL6R-tgmにおいて抗体の消失の加速が観察された。

これらの結果は、正常組織における細胞外ATP濃度はswitch抗体がhIL6Rに結合するには低い濃度であることを示唆している。

[0642] 次に、各抗体が投与された後の、hIL6R-tgmにおける可溶型hIL6Rの血漿中濃度が比較された。結果を図71に示す。

[0643] アイソタイプコントロールであるIC17HdK-mFa55/IC17L-mk1が投与されたマウスの可溶型hIL6R濃度と比較して、non-switch抗体であるMRAH-mFa55/MRAL-mk0が投与されたマウスでは可溶型hIL6R濃度の蓄積が観察された。これはnon-switch抗体が可溶型hIL6Rに結合し、通常の代謝経路を防いだことが原因で生じると考えられた。

その一方で、switch抗体であるH0002-mFa55/L1058-ml0、H0041-mFa55/L1088-ml0、H0052-mFa55/L1083-ml0が投与されたマウスでは、non-switch抗体のような抗原の顕著な蓄積は観察されなかった。Switch抗体であるH0002-mFa55

/L1058-ml0、H0041-mFa55/L1088-ml0、H0052-mFa55/L1083-ml0が比較されると、低いATP濃度でのより強い結合を示す抗体の方が抗原を蓄積する傾向が観察された。

これらの結果は、正常組織や血液中における細胞外ATP濃度はswitch抗体が膜型、可溶型のhIL6Rに結合するには低い濃度であることを示唆している。

[0644] 〔実施例１５〕ATP依存的結合特性を有する抗hIL6R抗体の抗腫瘍作用と全身作用の同時評価

腫瘍存在下でのATP依存的結合特性を有する抗hIL6R抗体の全身作用を評価するために、抗腫瘍作用と全身作用が同時に評価された。この評価のために、hIL6R-Hepa1-6をhIL6R-tgmに移植したモデルを用い、表67に記載の抗体が投与された。

[0645] 抗アシアロGM1抗体（和光純薬工業）が1 mlの蒸留水（大塚製薬工場）に溶解後、4 mlのPBSで希釈された。このように調製した抗アシアロGM1抗体がhIL6R-tgm 83匹に、1匹につき0.1 ml腹腔内投与された。一日後にHanks' Balanced Salt solution (Sigma) に1×10^{8}/mlになるように懸濁したhIL6R-Hepa1-6に、細胞懸濁液と同容量のMatrigel Matrix (Corning) を添加した混合液が調製された。この混合液をhIL6R-tgm 83匹に対し、1匹につき0.2 ml皮下に注入され細胞が移植された。これ以降、マウスの腫瘍径の測定はノギスによって実施され、長径×短径×短径×1/2が腫瘍体積として定義された。またこの腫瘍径測定は各マウスに投与された薬液の内容を知らない者が実施した。細胞移植後10日目に上記hIL6R-tgm 83匹の腫瘍径及び体重が測定された。この値を基にマウスのランダマイズが実施され、10匹ごとの4群にマウスが群分けされ、それぞれの群に表67に示された抗体液のうち、H0052-mFa55/L1083-ml0を除く4種の抗体液がそれぞれの群に尾静脈投与された。抗体液の投与用量(ml)は0.01(ml/g)×各マウスの体重(g)として計算された。これ以降、同様の方法で上記群分けされたhIL6R-tgmの腫瘍径及び体重が、移植後13, 17, 20日目に測定された。また、移植後17日目には測定された体重データを基に上記と同様の計算式により定義される投与用量の表67に示された抗体液の内H0052-m

Fa55/L1083-ml0を除く4種の抗体液が、対応する群に尾静脈投与された。各抗体投与群の各測定日における腫瘍体積の平均値が算出され、各抗体のin vivoでの抗腫瘍活性を評価する指標として用いられた。

また上記実験において、イソフルラン麻酔下で上記群分けされたhIL6R-tgmから眼窩採血により血液が、初回の抗体液投与から1時間後、及び1，2，3，7日目に採取された。採取された血液は個体番号毎に8連チューブに移し、氷上で静置された。8連チューブは1900×g、4℃で10分遠心された後、遠心後の上清は血漿成分として取得して別の8連チューブに個体番号毎に移され-30℃で保管された。

血漿中の各抗体濃度は電気化学発光（ECL）法で測定された。hIL6R溶液がMULTI-ARRAY PR Plate（Meso Scale Diagnostics，LLC）に添加され、37℃、1時間静置されhIL6Rはプレートに固相された。検量線としてMRAH-mFa55/MRAL-mk0、H0041-mFa55/L1088-ml0は血漿中濃度として8，4，2，1，0.5，0.25，0.125 μg/mL で、H0002-mFa55/L1058-ml0は血漿中濃度として64，32，16，8，4，2，1 μg/mL に調製された。hIL6R 固相プレート に0.05% Tween20，1% BSA含有1 M Tris-HCl溶液 pH 8.0 が添加された後、速やかに0.3 M 酢酸溶液で250倍希釈された血漿サンプルならびに検量線試料が添加され、さらにATP溶液が添加され混和された。室温で1時間静置された後、ビオチンラベル抗マウスIgG抗体（Southern Biotechnology Associates，Inc)が添加され、室温で1時間静置された。その後、Streptavidin SULFO-TAG Labeled（Meso Scale Diagnostics，LLC）が添加され室温で1時間静置された後、Read buffer T（Meso Scale Diagnostics，LLC）が加えられてSECTOR Imager 6000（Meso Scale Diagnostics，LLC）で測定された。SOFTmax PRO（Molecular Devices)が用いられてマウス血漿中の各抗体濃度が算出された。

[0646] また同様に、抗アシアロGM1抗体（和光純薬工業）は1 mlの蒸留水（大塚製薬工場）に溶解後、4 mlのPBSで希釈された。このように調製された抗アシアロGM1抗体はhIL6R-tgm 91匹に、1匹につき0.1 ml腹腔内投与された。一日後にHanks’ Balanced Salt solution（Sigma）に1×10^{8}/mlになるように懸濁さ

れたhIL6R-Hepa1-6に、細胞懸濁液と同容量のMatrigel Matrix (Corning) が添加された混合液が調製された。この混合液をhIL6R-tgm 91匹に対し、1匹につき0.2 ml皮下に注入し細胞が移植された。以降、マウスの腫瘍径の測定はノギスによって実施され、長径×短径×短径×1/2が腫瘍体積と定義された。またこの腫瘍径測定は各マウスに投与された薬液の内容を知らない者が実施した。細胞移植後10日目に上記hIL6R-tgm 91匹の腫瘍径及び体重が測定された。この値を基にマウスのランダマイズが実施され、6匹ごとの4群にマウスが群分けされ、それぞれの群に表67に示された抗体液の内H0002-mFa55/L1058-ml0を除く4種の抗体液がそれぞれの群に尾静脈投与された。抗体液の投与用量(ml)は0.01(ml/g)×各マウスの体重(g)として計算された。以降、同様の方法で上記群分けされたhIL6R-tgmの腫瘍径及び体重が、移植後13, 17, 20日目に測定された。また、移植後17日目には測定された体重データを基に上記と同様の計算式により定義される投与用量の表67に示された抗体液の内H0002-mFa55/L1058-ml0を除く4種の抗体液が、対応する群に尾静脈投与された。各抗体投与群の各測定日における腫瘍体積の平均値が算出され、各抗体のin vivoでの抗腫瘍活性を評価する指標として用いられた。

また上記実験において、イソフルラン麻酔下で上記群分けされたhIL6R-tgmから眼窩採血により血液が、初回の抗体液投与から1時間後、及び3, 7日目に採取された。採取された血液は個体番号毎に8連チューブに移され、氷上で静置された。8連チューブは1900×g、4℃で10分遠心された後、遠心後の上清は血漿成分として取得され別の8連チューブに個体番号毎に移され-30℃で保管された。

血漿中の各抗体濃度は電気化学発光 (ECL) 法で測定された。hIL6R溶液はMULTI-ARRAY PR Plate (Meso Scale Diagnostics, LLC) に添加され、37℃、1時間静置され、hIL6Rはプレートに固相された。検量線として、MRAH-mFa55/MRAL-mk0、H0041-mFa55/L1088-ml0、H0052-mFa55/L1083-ml0は血漿中濃度として8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 μg/mL に調製された。hIL6R 固相プレート に0.05% Tween20, 1% BSA含有1 M Tris-HCl溶液 pH 8.0 が添加された後

、速やかに0.3 M 酢酸溶液で250倍希釈された血漿サンプルならびに検量線試料が添加され、さらにATP溶液が添加され混和された。室温で1時間静置された後、ビオチンラベル抗マウスIgG抗体（Southern Biotechnology Associates, Inc）が添加され、室温で1時間静置された。その後、Streptavidin SULFO-TAG Labeled（Meso Scale Diagnostics, LLC）が添加され室温で1時間静置された後、Read buffer T（Meso Scale Diagnostics, LLC）が加えられてSECTOR Imager 6000（Meso Scale Diagnostics, LLC）で測定された。SOFTmax PRO（Molecular Devices)を用いてマウス血漿中の各抗体濃度は算出された。

[0647] 血漿中の可溶性抗原濃度はECLで測定された。50倍に希釈したマウス血漿サンプルとSULFO-TAG（Meso Scale Diagnostics, LLC)-ラベル化抗ヒトIL6R抗体（R&D Systems)、ビオチンラベル化抗ヒトIL6R抗体（R&D Systems）および過剰の抗ヒトIL6R抗体トシリズマブ（自社製造品）が混合され、37℃、オーバーナイトでインキュベーションされた。ブロッキングしたStreptavidin-coated standard 96-well plate（Meso Scale Diagnostics, LLC）に添加された後、Read bufferが加えられてSECTOR Imager 6000（Meso Scale Diagnostics, LLC）で測定された。SOFTmax PRO（Molecular Devices)を用いてマウス血漿中の可溶性抗原濃度が算出された。

[0648] 最初に、IC17HdK-mFa55/IC17L-mk1、MRAH-mFa55/MRAL-mk0、H0002-mFa55/L1058-ml0、H0041-mFa55/L1088-ml0の抗腫瘍作用、血漿中の抗体濃度、および血漿中の抗原濃度が比較された。それぞれの結果を図72、図73、および図74に図示する。

[0649] この試験においてはアイソタイプコントロールであるIC17HdK-mFa55/IC17L-mk1が投与された群と比較して、MRAH-mFa55/MRAL-mk0、H0002-mFa55/L1058-ml0が投与された群ではより大きな腫瘍増殖抑制率（TGI : Tumor Growth Inhibition）を示さなかった。その一方で、switch抗体であるH0041-mFa55/L1088-ml0を投与した群ではより大きなTGIが確認された（図72）。H0041-mFa55/L1088-ml0と比較して、MRAH-mFa55/MRAL-mk0が投与されたマウス群でより弱い薬効しか観察されなかったのは、H0041-mFa55/L1088-ml0と比較してMRAH-mFa

55/MRAL-mk0は消失が速く、薬効を示すのに十分な濃度を維持することができなかったためであることが示唆された（図73）。

また、H0002-mFa55/L1058-ml0投与群では可溶型hIL6Rの蓄積は観察されなかった。H0041-mFa55/L1083-ml0投与群ではMRAH-mFa55/MRAL-mk0投与群より少ない量しか可溶型IL6Rが蓄積しなかった（図74）。

[0650] 次に、IC17HdK-mFa55/IC17L-mk1、MRAH-mFa55/MRAL-mk0、H0041-mFa55/L1088-ml0、H0052-mFa55/L1083-ml0の抗腫瘍作用、血漿中の抗体濃度、および血漿中の抗原濃度が比較された。それぞれの結果を図75、図76、および図77に図示する。

[0651] この試験においてはアイソタイプコントロールであるIC17HdK-mFa55/IC17L-mk1が投与された群と比較して、MRAH-mFa55/MRAL-mk0、H0041-mFa55/L1088-ml0、H0052-mFa55/L1083-ml0が投与された群ではより大きな腫瘍増殖抑制率（TGI : Tumor Growth Inhibition）が観察された（図75）。一方で、その血漿中濃度を比較すると、MRAH-mFa55/MRAL-mk0はH0052-mFa55/L1083-ml0よりも速い消失を示しており、より低い血中濃度が観察された（図76）。

また、MRAH-mFa55/MRAL-mk0と比較して、H0052-mFa55/L1083-ml0はより少ない量しか可溶型IL6Rを蓄積しなかった（図77）。

[0652] これらの結果から、担癌マウスにおいて、switch抗体はnon-switch抗体と同様かそれよりも強い抗腫瘍作用を示す一方で、non-switch抗体とは異なり、正常組織においてhIL6Rに結合しないことが示唆された。この結果は、がんが存在したとしても、正常組織や血液中における細胞外ATP濃度がswitch抗体の結合を促すほどには上昇しないことを示唆している。

[0653] 〔実施例１６〕ATP依存的結合特性を有する抗PD1抗体によるATP依存的中和活性

表68に示すように重鎖と軽鎖を組み合わせて、当業者公知の方法で抗PD-1抗体を発現し精製した。

[0654] 抗体の重鎖と軽鎖の組み合わせ

[表68]

抗体名称	VH	CH	VL	CL
mPD1F2VH-mF18/ mPD1F2VL-mk1	mPD1F2VH 配列番号:201	mF18 配列番号:203	mPD1F2VL 配列番号:202	mk1 配列番号:185
H5029-mFa31/ L3021-ml0	H5029 配列番号:204	mFa31 配列番号:208	L3021 配列番号:205	ml0 配列番号:212
H5041-mFa31/ L3023-ml0	H5041 配列番号:206		L3023 配列番号:207	

[0655] 以下の方法に従ってPDL1-PD1の相互作用に対する表68に記載した各抗体の中和活性を評価した。

初めに抗原としてmPD1-G1CH2（配列番号：209）および mPDL1-G1dCH2His（配列番号：210）が遺伝子合成され、動物発現用プラスミドへ挿入された。抗原タンパク質は以下の方法を用いて発現、精製された。FreeStyle 293 Expression Medium培地（Invitrogen）に適切な細胞密度で懸濁されて、フラスコに播種されたヒト胎児腎細胞由来FreeStyle 293-F株（Invitrogen）に対して、調製されたプラスミドがリポフェクション法により導入された。CO_2インキュベーター（37℃、8% CO_2, 125 rpm）で4日間培養された培養上清から、当業者公知の方法で抗原が精製された。分光光度計を用いて、精製された抗原溶液の280 nmでの吸光度が測定された。得られた測定値からPACE法により算出された吸光係数を用いて精製された抗原の濃度が算出された（Protein Science (1995) 4, 2411-2423）。

[0656] 96ウェルのプレートに、マウスPD1にFcを融合させたmPD1-G1CH2（配列番号：209）を0.1 M $NaHCO_3$, 0.05% NaN_3で5 μg/mL（55 nM）に希釈した溶液を100 μLずつ加え、4℃で一晩静置し、プレート表面に固定化した。各ウェルをTBS, 0.1% Tween20で3回washしたのちに、TBSで2%に希釈したBSA溶液を各ウェルに250 μL加え、プレート表面をブロッキングした。その後、3回washが実施された。最終濃度が55 nMになるようにTBSで希釈したマウスPDL1に抗体のFcおよびHisタグを融合させたmPDL1-G1dCH2His（配列番号：210）、最終濃度が6.25, 1.56, 0.390, 0.0977, 0.0061, 0 μg/mLとなるように希釈した表68に記載の抗体溶液、および最終濃度が0, 1, 10, 100 μMとなるように希釈したATP溶液とをそれぞれ合計100 μLとなるように混合し、各ウェルに加えて

、1時間37℃で静置した。その後、各ウェルに加えられた溶液のATP濃度と同じATP濃度を含むように調製されたTBS, 0.1% Tween20で各ウェルを3回washした。各ウェルに加えられた溶液のATP濃度と同じATP濃度を含むようにブロッキングバッファーで10000倍に希釈したanti-His-tag mAb-HRP-Direct（MBLライフサイエンス）を各ウェルに100 μL加え1時間37℃で静置した。その後、各ウェルに加えられた溶液のATP濃度と同じATP濃度を含むように調製されたTBS, 0.1% Tween20で各ウェルを3回washした。そこへTMB溶液を各ウェルに100 μL加え1時間37℃で静置し、1M H_2SO_4を各ウェルに50 μL加え反応を停止させた。その後、各ウェルは吸光マイクロプレートリーダーWako Sunriseで450 nmの吸光度を検出した。

同ATP濃度条件下での、抗体未添加ウェルの吸光度の値をPD1-PDL1結合率100%とし、抗体添加でその結合率がどの程度低下するかを評価した。その結果を図78、図79に示す。

[0657] この結果からmPD1F2VH-mF18/mPD1F2VL-mk1のPD1/PDL-1の相互作用に対する中和活性はATP濃度の影響を受けないが、H5029-mFa31/L3021-ml0、H5041-mFa31/L3021-ml0の中和活性はアッセイ中におけるATP濃度が高ければ高いほど強くなることが示された。この結果から、H5029-mFa31/L3021-ml0、H5041-mFa31/L3021-ml0はATP依存的な結合活性および中和活性を有することが確認された。

[0658] In vitro 中和活性測定にはluciferase assay system（Promega）が用いられた。エフェクター細胞として、PD-1/PD-L1 Blockade Bioassay, Core Kit（Promega）付属のhPDL1-CHOが用いられた。ターゲット細胞として、自社で作製したJurkat-NFAT-Luc2-mPD1細胞が用いられた。最初にJurkat-NFAT-Luc2細胞（Promega）に、細胞外mPD1と細胞内hPD1の融合タンパク質遺伝子（配列番号：214）が当業者公知の方法で導入されJurkat-NFAT-Luc2-mPD1細胞が作製された。hPDL1-CHO上のhPDL1と、Jurkat-NFAT-Luc2-mPD1上の細胞外mPD1及び細胞内hPD1の融合タンパク質との相互作用がPD-1/PDL-1の相互作用として、in vitro 中和活性評価に用いられた。

[0659] 96ウェルプレートの各ウェルに、培地により4×10^5/mLに濃度を調製したキット付属のhPDL1-CHOを100 μLずつ加え、37℃で一晩静置した。培地には90% Ham's F-12, 10% FBS, 250 μg Geneticin, 200 μg Hygromycinを使用した。各ウェルの上清を吸引し、最終濃度が7.5 μg/mLとなるようにassay bufferで希釈された表68に記載の抗体溶液20 μL、最終濃度が0, 1, 10, 100 μMとなるようにassay bufferで希釈されたAMP溶液20 μL、および細胞数が5×10^4/well となるようにassay buffer で調製されたNFAT-Luc2-hPD1-mPD1-Jurkat cell溶液40 μLを混合し、各ウェルに加え4時間37℃で静置した。Assay bufferには98% RPMI1640, 2% FBSを使用した。その後プレートを室温で10分静置し、各ウェルにBio-Glo reagentを80 μLずつ加えた。Bio-Glo reagentにはBio-glo Luciferase Assay System (Buffer and Substrate)を使用した。その後各ウェルの発光をプレートリーダーで測定した。

各AMP濃度条件下での各ウェルの発光の値を、抗体未添加ウェルの発光の値で割った値をFold inductionとし、各抗体のPD-1/PDL-1の相互作用に対する中和活性を評価する指標とした。その結果を図80に示した。図中では、Fold inductionを相対発光量（RLU）と表記する。

[0660] ATPについてもAMPと同様に試験を実施し、96ウェルプレートの各ウェルに、培地により4×10^5/mLに濃度を調製したhPDL1-CHOを100 μLずつ加え、37℃で一晩静置した。培地には90% Ham's F-12, 10% FBS, 250 μg Geneticin, 200 μg Hygromycinを使用した。各ウェルの上清を吸引し、最終濃度が10 μg/mLとなるようにassay bufferで希釈された表68に記載の抗体溶液20 μL、最終濃度が0, 12.5, 125 μMとなるようにassay bufferで希釈されたATP溶液20 μL、および細胞数が5×10^4/well となるようにassay buffer で調製されたNFAT-Luc2-hPD1-mPD1-Jurkat cell溶液40 μLを混合し、各ウェルに加え4時間37℃で静置した。Assay bufferには98% RPMI1640, 2% FBSを使用した。その後プレートを室温で10分静置し、各ウェルにBio-Glo reagentを80 μLずつ加えた。Bio-Glo reagentにはBio-glo Luciferase Assay System (Buffer and Substrate)を使用した。その後各ウェルの発光をプレートリーダーで測定し

た。

各ATP濃度条件下での各ウェルの発光の値を、抗体未添加ウェルの発光の値で割った値をFold inductionとし、各抗体のPD-1/PDL-1の相互作用に対する中和活性を評価する指標とした。その結果を図81に示した。図中では、Fold inductionを相対発光量（RLU）と表記する。

[0661] 〔実施例１７〕ATP依存的結合特性を有する抗PD1抗体によるATP依存的ADCCによる抗腫瘍活性

表69に示したように重鎖と軽鎖を組み合わせて、当業者公知の方法で抗PD-1抗体を発現し精製した。

[0662] 抗体の重鎖と軽鎖の組み合わせ

[表69]

抗体名称	VH	CH	VL	CL
IC17HdK-mFa55/ IC17VL-mk1	IC17HdK 配列番号:187	mFa55 配列番号:184	IC17VL 配列番号:188	mk1 配列番号:185
mPD1F2VH-mFa55/ mPD1F2VL-mk1	mPD1F2VH 配列番号:201		mPD1F2VL 配列番号:202	
H5041-mFa55/ L3023-ml0	H5041 配列番号:206		L3023 配列番号:207	ml0 配列番号:212

[0663] これらの抗体の重鎖定常領域は、FcγRIVに対する結合を増強する改変をmIgG2aに加えてADCC活性を増強したmFa55に変更したものである。そのため、PD-1発現細胞に対してADCC活性を発揮し、PD-1発現細胞を除去することが可能であると考えられた。これらの抗体を用いて以下の方法に従ってin vivoでの抗腫瘍活性の評価およびPD-1発現細胞の除去を評価した。

[0664] マウス大腸癌株Colon38（NCI）5×10^6個をマトリゲル（Corning）とともに，C57BL/6Jマウス（日本チャールスリバー）の右側腹部皮下に移植し，固形腫瘍を形成させた。移植後14日目に，IC17HdK-mFa55/IC17L-mk1を15 mg/kgで、mPD1F2VH-mFa55/mPD1F2VL-mk1を1.5，5，15 mg/kgで，H5041-mFa55/L3023-ml0を25.5，100 mg/kgでそれぞれ静脈内（i.v.）へ投与した（各群n=7）。さらに，H5041-mFa55/L3023-ml0投与群へは移植後17日目に、同抗体が25.5，100 mg/kgでそれぞれ静脈内（i.v.）へ再度投与された。その結果，陰性コントロール群を除くすべての抗体投与群において抗腫瘍効果が観察された（図82

）。

[0665] 各抗体投与後の腫瘍組織中のPD1発現細胞の除去をFlow cytometryを用いて評価した。上述の通りColon38の固形腫瘍を形成させ，移植後14日目にIC17HdK-mFa55/IC17L-mk1（isotype control）を15 mg/kgで、mPD1F2VH-mFa55/mPD1F2VL-mk1を1.5，5，15 mg/kgで，H5041-mFa55/L3023-ml0を25.5，100 mg/kgでそれぞれ静脈内（i.v.）へ投与した（各群n=3）。抗体投与3日後に各マウスの脾臓および腫瘍組織を採取した。脾臓はピンセットを用いて細分化され、10% FBS添加RPMI-1640を加えて400×gで5分間遠心分離し、その後、上清を除去した。ACK Lysing Buffer（Thermo Fisher Scientific）を2 mL加え、室温で2.5分間静置した後に、溶血したサンプルを脾臓細胞としてFlow cytometry解析に用いた。腫瘍組織は鋏を用いて細分化されたのち、Tumor Dissociation Kit（Miltenyi）のプロトコルに従って酵素を加え，gentleMACS Dissociator（Miltenyi Biotec）でさらに細分化された。10% FBS添加RPMI-1640を加えて400×gで5分間遠心分離し、上清を除去し，腫瘍細胞としてFlow cytometry解析に用いた。脾臓細胞と腫瘍細胞をV bottom plate（Corning）に移し、400×gで5分間遠心分離し、上清を除去した。1% FBS、2 mM EDTA（Sigma）を含むPBS（FACS buffer）で10倍希釈したFcR blocking reagent（Miltenyi Biotec）100 μLにて、細胞を再懸濁した。細胞は10分間室温でインキュベートされた後、BUV737 Anti-Mouse CD3ε（BD）を0.4 μL、Zombie Aqua（Biolegend）を0.1 μL、PerCP/Cy5.5 Anti-Mouse CD8a（Biolegend）を0.4 μL、PE/Cy7 Anti-Mouse CD4（Biolegend）を0.4 μL、APC-R700 Anti-mouse CD45（BD）を0.2 μL、FITC anti-human/mouse/rat CD278（Biolegend）を0.4 μL、APC/Fire™ 750 anti-mouse CD25（Biolegend）を0.4 μL、さらに投与された各PD1抗体と競合しないことがすでに確認されているAPC anti-mouse CD279（Biolegend）を0.4 μL、各ウェルに加え，FACS Bufferを20 μL/ウェルとなるように加えた。4℃で30分間インキュベートした後、100 μLのFACS bufferを加え、400×gで5分間遠心分離し上清を除去した。Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set（eBioscience）のプロトコルに基づき、Fixa

tion/Permeabilization ConcentrateとFixation/Permeabilization Diluentを混合し、混合液を各ウェルに200 μL加えた。4℃で30分間インキュベートした後、400×gで5分間遠心分離し、上清を除去した。Permeabilization bufferを200 μL加え、400×gで5分間遠心分離し、上清を除去した。この洗浄操作がもう1回行われた。eFluor450 Anti-Mouse/Rat Foxp3 (eBioscience) を0.4 μL、PE Anti-Mouse CD152 (BD) を0.4 μL, 各ウェルに加え, FACS Bufferを20 μL/ウェルとなるように加えた。4℃で30分間インキュベートした後、100 μLのFACS bufferを加え、400×gで5分間遠心分離し上清を除去した。Permeabilization bufferを200 μLで各ウェルに加えて400×gで5分間遠心分離し上清を除去した。サンプルは200 μLのFACS bufferで再懸濁され、FACS Fortessaフローサイトメーター (BD) で測定された。発現解析はFlowJoソフトウェアを用いた。解析対象となる細胞集団に対してCD4陽性細胞をゲーティングし、Foxp3およびPD1の発現を解析した。$CD4^+$ $Foxp3^-$の細胞集団におけるPD1発現量が蛍光強度から算出された。その結果、mPD1F2VH-mFa55/mPD1F2VL-mk1 5, 15 mg/kg投与群では脾臓細胞、腫瘍細胞ともにPD1発現量が減少傾向にあったが、H5041-mFa55/L3023-ml0 25.5, 100 mg/kg投与群では腫瘍細胞でのみPD1発現量が減少傾向にあった（図83AおよびB）。当該ATP依存的にPD1に結合するswitch抗体はいずれも腫瘍に対する薬効を示す一方で、全身での反応（PD1発現量の減少）は起こさないことが確認され、switch抗体は腫瘍局所で特異的に活性を示すという性質を有することが確認された。

[0666] 〔実施例１８〕ATP依存的結合特性を有するhIL6R結合抗体の結晶構造解析

実施例１３で取得された、ATPをスイッチとするヒトIL6レセプター (hIL6R) 結合抗体H0041L1088のFab断片とATP、hIL6R細胞外ドメイン (shIL6R) との複合体のX線結晶構造解析が行われた。

[0667] （１８－１）H0041L1088全長抗体の調製

ヒトIgG1フォーマットをもつH0041L1088全長抗体 (VH; 配列番号：194、CH; 配列番号：217、VL; 配列番号：195、CL; 配列番号：189) の調製及び精製は、当業者公知の方法により行われた。

[0668] （１８－２）H0041L1088 Fab断片の調製

H0041L1088全長抗体サンプルは、Papain （SIGMA-ALDRICH, 10108014001）を用いて、35℃、約18時間の条件でFabとFcに断片化され、次にHiTrap SP HP 1 mL （GE Healthcare）、およびHiTrap MabSelect SuRe 1 mL （GE Healthcare）によるカラム精製とHiLoad 16/600 Superdex 200 pg（GE Healthcare）によるSEC精製を経て、Fabサンプルが調製された。

[0669] （１８－３）shIL6Rの調製

UniProtKB: P08887 （IL6RA_HUMAN）のアミノ酸配列（配列番号：213）をもとに、そのドメイン２および３（アミノ酸111-320）が遺伝子合成され、発現用ベクターへ組み込まれた。遺伝子合成にあたっては、N末端に分泌発現のためのシグナル配列、C末端に精製のためのFLAGタグ + His×8タグが付加され、さらにドメイン１の除去に由来するCys-Cysペアの不完全化への対応のため、C193S改変が導入された。得られた発現プラスミドを用い、Kifunensine [Santa Cruz Biotechnology]存在下、Expi293™ Expression System （Thermo Fisher Scientific）によるタンパク発現がおこなわれ、目的タンパクを含む発現培養上清が得られた。そこから、cOmplete™ His-Tag Purification Column 5 mL （SIGMA-ALDRICH）によるアフィニティー精製ならびにHiLoad 16/600 Superdex 200 pg （GE Healthcare）によるSEC精製を経て、shIL6Rサンプルが調製された。

[0670] （１８－４）H0041L1088 Fab - shIL6R - ATP三者複合体の調製

shIL6Rサンプルに対し、N型糖鎖切断のためのEndoglycosidase F1 (Endo F1) とHis×8タグ切断のためのEnterokinase （SIGMA-ALDRICH, 11334115001）が加えられ、室温にて１日静置したのち、HisTrap EXCEL 1 mL （GE Healthcare）スルー処理とSuperdex 200 Increase 10/300 GL （GE Healthcare）によるSEC精製が実施された。得られた精製フラクションは、H0041L1088 Fabサンプルを加えたのち、限外濾過により濃縮され、20 mM HEPES pH 7.3, 100 mM NaCl, 0.5 mM ATPをバッファーとして用いたSuperdex 200 Increase 10/300 GL （GE Healthcare）によるSEC精製を経て、複合体（Complex）サンプ

ルが調製された。得られた精製フラクションから限外濾過濃縮により結晶化用Complexサンプルが調製された。

[0671] （１８－５）H0041L1088 Fab - shIL6R - ATP三者複合体結晶の作製

結晶化用Complexサンプルを用いて、21℃条件下、シッティングドロップ蒸気拡散法による結晶化がおこなわれ、60 mM Tris pH 7.5, 12.0 %w/v ポリエチレングリコール1500 (Polyethylene glycol 1,500), 60 mM 硫酸アンモニウム (Ammonium sulfate) のリザーバー条件で、X線結晶構造解析に適した結晶が得られた。

[0672] （１８－６）H0041L1088 Fab - shIL6R - ATP三者複合体結晶からのX線回折データ測定および結晶構造決定

得られた結晶は、68 mM Tris pH 7.5, 13.6 %w/v ポリエチレングリコール1500 (Polyethylene glycol 1,500), 68 mM硫酸アンモニウム (Ammonium sulfate), 14.6 % エチレングリコール (Ethylen Glycol), 0.375 mM ATPの溶液に浸漬されたのち、液体窒素にて凍結され、高エネルギー加速器研究機構放射光施設フォトンファクトリーBL-17AにてX線回折データが測定された。測定中、結晶は常に－178℃の窒素流下に置くことで、凍結状態が維持された。得られた回折画像は、autoPROC (Acta Cryst. D67: 293-302 (2011)) を用いて処理され、分解能2.76Åまでの回折強度データが取得された。

得られたX線回折強度データを用い、既知のFabの結晶構造とPDB ID=1N26のshIL6Rの結晶構造を探索モデルとして、Phaser (J. Appl. Cryst. (2007) 40, 658-674) を用いた分子置換法を実施し、初期構造が決定された。その後、coot (Acta Cryst. D66: 486-501 (2010)) 、refmac5 (Acta Cryst. D67: 355-367 (2011)) ならびにphenix.refine (Acta Cryst. D68: 352-367 (2012)) によるモデル構築と精密化が繰り返され、最終的な精密化座標が得られた。その結晶学的統計値は表70に示される。なお、結晶構造座標中、Fabのアミノ酸の残基番号はKabat番号付けスキームに基づいて付与され、抗原であるshIL6Rのアミノ酸の残基番号はUniProtKB: P08887 (IL6RA_HUMAN) のアミノ酸の残基番号と一致するよう付与された。本結晶の非対称単位には2つのcomple

xが存在するが、shIL6Rのドメイン２においてドメインスワッピングと呼ばれる特殊なダイマー形成が観察された。このようなダイマーは、PDB ID=1N26のshIL6Rの結晶構造には見られず、ここで用いたshIL6Rコンストラクトに特有の構造となっている。

[0673]

[表70]

＜データ測定＞	
測定波長（Å）	0.98
測定結晶数	1
空間群	C222
格子定数	
a b c （Å）	103.043 185.612 152.085
α β γ （°）	90.00 90.00 90.00
非対称単位中の複合体数	2
分解能（Å）	90.09 - 2.757 (2.86 - 2.76)
観測反射数／独立反射数	508114 / 38008
冗長性	13.37 (13.66)
完全性（%）	99.99 (100.00)
回折強度 S/N 比	18.9 (3.1)
Rマージ	0.106 (0.868)
＜精密化＞	
Rwork / Rfree	0.1923 / 0.2656
原子数	9244
水分子以外	9181
水分子	63
理論値からの平均二乗偏差	
結合距離（Å）	0.008
結合角（°）	1.05
ラマンチャンドランプロット	
良好領域（%）	95.95
許容領域（%）	3.72
非許容領域（%）	0.34
	括弧内の値は、最外殻分解能での値。

[0674] （１８－７）H0041L1088とATPの相互作用

図84に示すように、ATPは、主に当該抗体の重鎖によって認識されている。具体的には、ATPのアデニン環部分は、当該抗体の重鎖CDR1：T33、CDR3：Y95、L98、N100B、W100Cの各側鎖、ならびにG96、L100A、W100Cの各主鎖により認識される。特に、G96ならびにL100Aの主鎖のカルボニル酸素とATPの6位NH_2との間、W100Cの主鎖アミドNH基とATPの1位Nとの間で水素結合を形成されるとともに、Y95、L98、W100Cの各側鎖とアデニン環部分との間で、CH-π、π-πといった相互作用が形成されており、当該抗体はATPのアデニン環部分を強固に認識している。リボース部分は重鎖CDR1：T33、CDR2：H56、Y58の各側鎖とのファンデルワールス相互作用により認識される。また、３リン酸基部分は重鎖CDR2：S52、S52A、Y55、H56の各側鎖、ならびにS52A、Q53の主鎖によって認識される。特に、S52側鎖、S52A側鎖、ならびに主鎖NH基、Q53主鎖NH基は、３リン酸基部分と強固な水素結合ネットワークを形成しており、３リン酸基部分の認識に重要な役割を果たしている。

[0675] （１８－８）H0041L1088とhIL6Rの相互作用

今回の結晶構造をもとに、H0041L1088 FabあるいはATPのいずれかから4.2Å以内の距離に位置する非水素原子を1個以上含むshIL6Rのアミノ酸残基がエピトープ残基として選ばれ、それをshIL6Rのアミノ酸配列上に示した（図85）。これらエピトープ残基と当該抗体との相互作用の詳細は図86および図87に示され、これらエピトープ残基は、当該抗体の軽鎖CDR1：D27B、G28、D29、A31、Y32、CDR3：R91、S92、P93、G94、P95や重鎖CDR2：H56、Y58、CDR3：L98、Y99、N100B、W100Cといった残基とファンデルワールス相互作用や水素結合、静電相互作用等を形成し、当該抗体と強固に結合している。

[0676] （１８－９）ATP依存的な抗原結合機構について

また、図86および図87に示すように、H0041L1088 FabとshIL6Rとの結合においては、H0041L1088 Fabに結合するATPとshIL6RのF298との間で大きな分子間接触が形成されている。ATP非結合状態では本相互作用は失われることから、このH0041L1088 Fab に結合するATPと抗原との直接の相互作用が、ATP依存

的結合の大きな要因と推測される。また、構造的にみて、ATPは重鎖CDR3残基との水素結合やファンデルワールス相互作用を介して、重鎖CDR3の構造安定化に寄与していると考えられる。ATP結合により重鎖CDR3構造が抗原との結合型に安定化されることは、重鎖CDR3：L98やY99等とshIL6Rとの直接相互作用の実質的な強化につながり、ATP依存的結合の要因になっていると考えられる。

[0677] 実施例１９：改変された抗CD137抗体によるアゴニスト活性の増強

(19-1) 評価用抗体の調製

__FcγRIIbへの結合活性を上昇させた重鎖定常領域に、pIを上昇させるための各種アミノ酸改変を導入した場合における、当該アミノ酸改変の、CD137アゴニスト活性への影響、およびhCD137KI/mFcγR2bKO/hFcγR2bTg#90マウスにおける血漿中動態と薬効への影響が評価された。まず、実施例7-1、実施例7-2および実施例7-3に記載の通り、A375-MY201aPh/B167-Lamlib、A375-SCF041aPh/B167-Lamlib、A375-SCF057aPh/B167-LamlibおよびIC17HdK-MY201aPh/IC17L-k0が調製された。

[0678] (19-2) 改変された抗ヒトCD137抗体の、4-1BB Jurkatレポータージーンアッセイを用いたin vitroにおけるATP依存的なCD137アゴニスト活性の評価

__FcγRIIbへの結合活性を上昇させた重鎖定常領域に、pIを上昇させるための各種アミノ酸改変を導入した場合における、当該アミノ酸改変がCD137アゴニスト活性に与える影響を評価するため、A375-MY201aPh/B167-Lamlib、A375-SCF041aPh/B167-Lamlib、A375-SCF057aPh/B167-Lamlib、およびIC17HdK-MY201aPh/IC17L-k0のCD137アゴニスト活性が評価された。

作製された抗体のIn vitro活性測定には、GloResponse™ NF-κB-Luc2/4-1BB Jurkat cell line (Promega, CS196004)が用いられた。96ウェルプレートの各ウェルに、培地により5×10^4/mLに濃度が調製されたFcγRIIB CHO-K1 Cells (Promega) が200 μLずつ加えられ、5% CO_2インキュベーター内にて37℃で一晩静置された。培地にはCHO culture medium (90% Ham's F12, 10% FBS) が用いられた。次に、培地がすべて吸引除去されたのち、Assay medium (99%

RPMI, 1% FBS)で2×10^6/mLに調製されたGloResponse™ NF-κB-Luc2/4-1BB Jurkat cell lineが各ウェルに対して25 μL加えられた。続いて、最終濃度が0、0.001、0.01、0.1、1、10 μg/mLとなるようにAssay mediumで希釈された各抗体溶液がそれぞれ25μL加えられた。最後に、最終濃度が250 μMとなるようにAssay mediumで希釈されたATP溶液が25μL加えられた。プレートは5% CO_2インキュベーター内にて37℃で6時間静置されたのち、室温で15分静置され、各ウェルにBio-Glo reagentが75 μLずつ加えられた。Bio-Glo reagentにはBio-Glo Luciferase Assay System (Buffer and Substrate)が使用された。その後、各ウェルの発光量がプレートリーダーで測定された。各ウェルの発光の値を抗体未添加ウェルの発光の値で割った値が相対発光量とされ、各抗体のCD137アゴニスト活性を評価する指標とされた。

結果を図88に示す。この結果より、pIを上昇させるための各種アミノ酸改変を導入することにより、CD137アゴニスト活性が上昇することが示された。

[0679] (19-3) 改変された抗ヒトCD137抗体のマウスでの動態評価

(19-3-1) hCD137KI/mFcγR2bKO/hFcγR2bTg#90マウスの作製

まず、マウス胚性幹細胞（ES細胞）へ、マウスCd137を標的とするZinc Finger Nuclease（ZFN）とともにヒトCD137遺伝子置換ベクターを導入することにより、マウスCd137遺伝子をヒトCD137遺伝子に置換したヒトCD137ノックインマウスが作製された。次に、マウスFcgr2b遺伝子をターゲットとするZFN mRNAをマウス受精卵に顕微注入して、標的領域に変異が導入された個体を選別することによって、マウスFcgr2b ノックアウトマウスが作製された。さらに、ヒトFCGR2B遺伝子がクローニングされたBAC vectorをマウス受精卵に顕微注入し、これにより得られた個体よりヒトFCGR2B遺伝子ゲノム領域が導入された個体を選抜することによって、ヒトFCGR2Bトランスジェニックマウスが作製されたた(Iwayanagi. et al., J Immunol, 2015, 195, 3198-3205)。

これら3系統のマウスを交雑することにより、ヒトCD137ノックインFcgr2bノックアウト・ヒトFCGR2Bトランスジェニックマウスが樹立された。このマウスをhCD137KI/mFcγR2bKO/hFcγR2bTg#90マウスと記載する。

[0680] (19-3-2) hCD137KI/mFcγR2bKO/hFcγR2bTg#90マウスモデルにおける血漿中の抗ヒトCD137抗体濃度の測定

CD137KI/mFcγR2bKO/hFcγR2bTg#90マウスに、各抗ヒトCD137抗体が、表71のとおり単回静脈内投与された。投与後5分後から28日後にわたり、経時的に複数回血液が採取された。得られた血液は遠心され、血漿が分離された。血漿は測定まで-20℃以下に設定されたフリーザーに保存された。

[0681] [表71]

群	匹数	薬剤	用量 [mg/kg]
1	3	A375-MY201aPh/B167-Lamlib	7.5 単回投与
2	3	A375-SCF041aPh/B167-Lamlib	7.5 単回投与

[0682] 血漿中の各抗ヒトCD137抗体の濃度は、電気化学発光(ECL)法で測定された。hCD137 (Sino Biological Inc.) は、PBS(-)で希釈され、MULTI-ARRAY 96-well Plate (Meso Scale Diagnostics, LLC) に添加された。hCD137が添加されたプレートは、室温で1時間振とうされ、hCD137はプレートに固相された。その後ブロッキングのため、1mM ADP, 1%BSA, 0.05% Tween20含有PBS溶液が添加され、室温で1時間振とうされた。各抗ヒトCD137抗体の検量線は、血漿中濃度として640, 320, 160, 80, 40, 20, 10 ng/mLに調製された。hCD137固相プレートに1mM ADP, 1%BSA, 0.05% Tween20含有PBS溶液で希釈された血漿サンプルならびに検量線試料が添加された。その後、当該プレートは室温で1時間振とうされた後、これら抗ヒトCD137抗体の定常領域を特異的に認識するWO2019112027に記載の抗体が、二次抗体として添加された。さらに、当該プレートは室温で1時間振とうされた後、SULFO-TAG Labeled Goat Anti-Rabbit Antibody (Meso Scale Diagnostics, LLC) が添加された。さらに、当該プレートは室温で1時間振とうされた後、1mM ADPを含有する2倍希釈したRead buffer T (Meso Scale Diagnostics, LLC) が加えられた。マウス血漿中の各抗体濃度の測定は、SULFO-TAGをSECTOR Imager (Meso Scale Diagnostics, LLC) を用いて検出することにより行われた。マウス血漿中の各抗体濃度の算出は、SOFTmax PRO (Molecular Devices) を用いて行われた。

結果を図89に示す。A375-SCF041aPh/B167-Lamlibは、A375-MY201aPh/B167-Lamlibよりも早い消失を示した。これは、A375-SCF041aPh/B167-Lamlibの重鎖定常領域にpIを上昇させるアミノ酸改変が導入されているためであると考えられた。

[0683] (19-4) 改変された抗ヒトCD137抗体のマウスでの薬効評価

(19-4-1) 細胞株および同系腫瘍株移植マウスモデルの作製

細胞は、マウス肺癌細胞由来細胞株LLC1 [LL/2 (別名：LLC1), 販売元：ATCC, カタログ番号：CRL-1642] に対して、ニワトリovalbumin (OVA) の発現プラスミド及びヒトGlypican-3 (GPC3) の発現プラスミドを導入したLLC1/OVA/GPC3 clone C5 (LLC1/OVA/GPC3) 細胞株が使用された。マウスは、上記 (19-3-1) に記載されたhCD137KI/mFcγR2bKO/hFcγR2bTg#90マウス (11週齢、雌) が使用された。LLC1/OVA/GPC3細胞株は9.8% Fetal Bovine Serum (Sigma-Aldrich, Co. LLC.)、0.44 mg/mL G418 (Nacalai Tesque, Inc.) 及び0.88 mg/mL Zeocin (Thermo Fisher Scientific, Inc.) を含むRPMI1640培地 (Sigma-Aldrich, Co. LLC.) にて維持継代された。LLC1/OVA/GPC3細胞株はマウスの腹部皮下に移植され、腫瘍体積がおよそ250-500 mm^3になった時点でモデル成立とした。モデル成立後、LLC1/OVA/GPC3細胞株移植マウスは群分けが実施されたのちに、Vehicle及び各抗ヒトCD137抗体が投与された。

[0684] (19-4-2) 投与薬剤の調製と投与及び腫瘍測定

LLC1/OVA/GPC3細胞株移植モデルに対し、表72に示された用量となるように0.05% Tween 20含有PBSによって調製された、A375-MY201aPh/B167-Lamlib またはA375-SCF041aPh /B167-Lamlibが、腫瘍移植後11日目および14日目に投与された。Vehicle群には、0.05% Tween 20含有PBSが投与された。調製した投与液は、10 mL/kgの用量で尾静脈より投与された。

[0685] LLC1/OVA/GPC3細胞株移植モデルでの抗腫瘍効果測定

[表72]

群	匹数	薬剤	用量	投与方法	投与日
1	5	0.05% Tween-20 含有 PBS	—	尾静脈	移植後 11 日及び 14 日
2	5	A375-MY201aPh/B167-Lamlib	2.50 mg/kg	尾静脈	移植後 11 日及び 14 日
3	5	A375-SCF041aPh/B167-Lamlib	2.50 mg/kg	尾静脈	移植後 11 日及び 14 日

[0686] 抗腫瘍効果評価のため、腫瘍体積測定は週1-2回の頻度で実施された。また、腫瘍体積は以下の計算式にて算出された。

腫瘍体積（mm^3）= 長径（mm）× 短径（mm）× 短径（mm）/2

[0687] その結果、実施例（19-3-2）の結果から、A375-SCF041aPh/B167-Lamlib投与マウスにおける血中濃度推移は、A375-MY201aPh/B167-Lamlibと比べて低くなるにもかかわらず、A375-SCF041aPh/B167-LamlibはA375-MY201aPh/B167-Lamlibよりも強い抗腫瘍効果が観察された（図90）。

以上の結果から、重鎖定常領域にpIを上昇させるアミノ酸改変を導入することにより、本マウスモデルにおいて、抗ヒトCD137抗体の抗腫瘍効果が向上することが示された。

[0688] 実施例２０：改変された抗ヒトCD3抗体によるアゴニスト活性の増強

FcγRIIbへの結合活性を上昇させた重鎖定常領域に、pIを上昇させるためのアミノ酸改変を組み合わせることによる、抗CD3抗体のアゴニスト活性の向上が検討された。

実施例7-1で作製されたFcγRIIbへの結合活性を上昇させた重鎖定常領域である、MY201aPhおよびMY201aPhに対して、pIを上昇させるためのアミノ酸改変であるQ311R/P343Rを導入したSCF057aPhが用いられた。また、天然型ヒトIgG1の定常領域としてG1T6（配列番号：223)が用いられた。抗ヒトCD3抗体の重鎖可変領域としてTR01H113（配列番号：224）を、重鎖定常領域としてMY201aPh, SCF057aPh, またはG1T6を、軽鎖としてL0011-k0（配列番号：225）を有する、各抗ヒトCD3抗体が作製された。陰性対照としてはIC17HdK-MY201aPh/IC17L-k0が用いられた。

作製された抗体のIn vitro活性測定には、T cell activation Bioassay (N

FAT) (Promega, CS176401)が用いられた。96ウェルプレートの各ウェルに、培地により5×10^4/mLに濃度を調製したFcγRIIB CHO-K1 Cells (Promega) が200 μLずつ加えられ、5% CO2インキュベーター内にて37℃で一晩静置された。培地にはCHO culture medium (90% Ham's F12, 10% FBS)が用いられた。次に、培地がすべて吸引除去されたのち、Assay medium (99% RPMI, 1% FBS)で2×10^6/mLに調製されたNFAT-RE-Luc2 cellsが各ウェルに対して25 μL加えられた。続いて、最終濃度が0、0.0001、 0.001、0.01、0.1、1、10 μg/mLとなるようにAssay mediumで希釈された各抗体溶液がそれぞれ25μL加えられた。プレートは5% CO2インキュベーター内にて37℃で6時間静置されたのち、室温で15分静置され、各ウェルにBio-Glo reagentが75 μLずつ加えられた。Bio-Glo reagentにはBio-Glo Luciferase Assay System (Buffer and Substrate)が使用された。その後、各ウェルの発光量がプレートリーダーで測定された。各ウェルの発光の値を抗体未添加ウェルの発光の値で割った値を相対発光量とし、各抗体のCD3アゴニスト活性を評価する指標とした。

結果を図91に示す。天然型ヒトIgG1の定常領域を有するTR01H113-G1T6/L0011-k0と比較してFcγRIIbへの結合が増強されたTR01H113-MY201aPh/L0011-k0はより高いCD3アゴニスト活性を示した。またpIを上昇させるアミノ酸改変を導入したTR01H113-SCF057aPh/L0011-k0はアミノ酸改変導入前のTR01H113-MY201aPh/L0011-k0と比較してより高いCD3アゴニスト活性を示した。

産業上の利用可能性

[0689] 本開示の抗CD137抗原結合分子、およびそれらを使用する方法は、免疫細胞の活性化作用、細胞傷害活性、または抗腫瘍活性を有しながら、正常組織等の非腫瘍組織に対する作用が低く、副作用が少ない医薬の開発、製造、提供、使用、等において利用可能である。

請求の範囲

[請求項1] 低分子化合物に依存したCD137結合活性を有する、抗CD137抗原結合分子。

[請求項2] 10μM、50μM、100μM、150μM、200μM、または250μMの低分子化合物の存在下でのCD137に対する結合活性が、当該低分子化合物の非存在下でのCD137に対する結合活性と比べて、2倍以上高い、請求項１に記載の抗CD137抗原結合分子。

[請求項3] 以下の(a)から(k)より選択されるいずれかのHVR-H1、HVR-H2、およびHVR-H3の組合せを含む、請求項１または２に記載の抗CD137抗原結合分子：

(a) 配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号：8のアミノ酸配列を含むHVR-H2、および配列番号：17のアミノ酸配列を含むHVR-H3；

(b) 配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号：9のアミノ酸配列を含むHVR-H2、および配列番号：17のアミノ酸配列を含むHVR-H3；

(c) 配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号：10のアミノ酸配列を含むHVR-H2、および配列番号：17のアミノ酸配列を含むHVR-H3；

(d) 配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号：11のアミノ酸配列を含むHVR-H2、および配列番号：18のアミノ酸配列を含むHVR-H3；

(e) 配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号：8のアミノ酸配列を含むHVR-H2、および配列番号：18のアミノ酸配列を含むHVR-H3；

(f) 配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号：12のアミノ酸配列を含むHVR-H2、および配列番号：18のアミノ酸配列を含むHVR-H3；

(g) 配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号：13のアミノ酸配列を含むHVR-H2、および配列番号：18のアミノ酸配列を含むHVR-H3；

(h) 配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号：14のアミノ酸配列を含むHVR-H2、および配列番号：19のアミノ酸配列を含むHVR-H3；

(i) 配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号：15のアミノ酸配列を含むHVR-H2、および配列番号：20のアミノ酸配列を含むHVR-H3；

(j) 配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号：16のアミノ酸配列を含むHVR-H2、および配列番号：20のアミノ酸配列を含むHVR-H3；および

(k) 配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号：14のアミノ酸配列を含むHVR-H2、および配列番号：17のアミノ酸配列を含むHVR-H3。

[請求項4] 以下の(a)から(m)より選択されるいずれかのHVR-H1、HVR-H2、HVR-H3、HVR-L1、HVR-L2、およびHVR-L3の組合せを含む、抗CD137抗原結合分子：

(a) 配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号：8のアミノ酸配列を含むHVR-H2、配列番号：17のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号：21のアミノ酸配列を含むHVR-L1、配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および配列番号：27のアミノ酸配列を含むHVR-L3；

(b) 配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号：9のアミノ酸配列を含むHVR-H2、配列番号：17のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号：22のアミノ酸配列を含むHVR-L1、配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および配列番号：27のアミノ酸配列を含むHVR-L3；

(c) 配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号：10のアミノ酸配列を含むHVR-H2、配列番号：17のアミノ酸配列を含むHVR-H3、

配列番号：22のアミノ酸配列を含むHVR-L1、配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および配列番号：27のアミノ酸配列を含むHVR-L3；

(d) 配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号：11のアミノ酸配列を含むHVR-H2、配列番号：18のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号：21のアミノ酸配列を含むHVR-L1、配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および配列番号：27のアミノ酸配列を含むHVR-L3；

(e) 配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号：8のアミノ酸配列を含むHVR-H2、配列番号：18のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号：21のアミノ酸配列を含むHVR-L1、配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および配列番号：27のアミノ酸配列を含むHVR-L3；

(f) 配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号：12のアミノ酸配列を含むHVR-H2、配列番号：18のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号：21のアミノ酸配列を含むHVR-L1、配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および配列番号：28のアミノ酸配列を含むHVR-L3；

(g) 配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号：13のアミノ酸配列を含むHVR-H2、配列番号：18のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号：21のアミノ酸配列を含むHVR-L1、配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および配列番号：29のアミノ酸配列を含むHVR-L3；

(h) 配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号：14のアミノ酸配列を含むHVR-H2、配列番号：19のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号：23のアミノ酸配列を含むHVR-L1、配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および配列番号：27のアミノ酸配列を含むHVR-L3；

(i) 配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号：15のアミ

ノ酸配列を含むHVR-H2、配列番号：20のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号：24のアミノ酸配列を含むHVR-L1、配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および配列番号：27のアミノ酸配列を含むHVR-L3；

(j) 配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号：15のアミノ酸配列を含むHVR-H2、配列番号：20のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号：25のアミノ酸配列を含むHVR-L1、配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および配列番号：27のアミノ酸配列を含むHVR-L3；

(k) 配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号：16のアミノ酸配列を含むHVR-H2、配列番号：20のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号：25のアミノ酸配列を含むHVR-L1、配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および配列番号：27のアミノ酸配列を含むHVR-L3；

(l) 配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号：14のアミノ酸配列を含むHVR-H2、配列番号：19のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号：24のアミノ酸配列を含むHVR-L1、配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および配列番号：27のアミノ酸配列を含むHVR-L3；および

(m) 配列番号：7のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号：14のアミノ酸配列を含むHVR-H2、配列番号：17のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号：21のアミノ酸配列を含むHVR-L1、配列番号：26のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および配列番号：27のアミノ酸配列を含むHVR-L3。

[請求項5] (a) 配列番号：43乃至53のいずれか1つのアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するVH；または

(b) 配列番号：54乃至60のいずれか1つのアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するVLを含む、抗CD137抗原結合分子。

[請求項6] 改変Fc領域を含み、当該改変Fc領域が、以下から選択されるいずれか1つのアミノ酸改変の組合せを含む、請求項１乃至５のいずれか一項に記載の抗CD137抗原結合分子：

L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/P343R/D413K；

K214R/L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/P343R/D413K；

L234Y/P238D/T250V/V264I/T307P/A330K/P343R/D413K；

L234Y/P238D/V264I/A330K/P343R/D413K；

L234Y/G237D/P238D/T250V/T307P/A330K/P343R/D413K；

L234Y/G237D/P238D/A330K/P343R/D413K；

L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/Q311R/P343R；

L234Y/P238D/T250V/V264I/T307P/A330K/Q311R/P343R；

L234Y/P238D/V264I/A330K/Q311R/P343R；

L234Y/G237D/P238D/T250V/T307P/A330K/Q311R/P343R；

L234Y/G237D/P238D/A330K/Q311R/P343R；

L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/P343R；

K214R/L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/P343R；

L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/D413K；

K214R/G236N/H268D/A330K/P343R；

K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/P343R；

K214R/G236N/H268D/A330K/D413K；

K214R/G236N/H268D/A330K/P343R/D413K；

K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/P343R/D413K；

K214R/G236N/H268D/A330K/Q311R；

K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/Q311R；

K214R/G236N/H268D/A330K/Q311R/P343R；

K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/Q311R/P343R；

K214R/G236N/H268D/A330K/Q311R/D413K；

K214R/L235W/G236N/H268D/A330K/Q311R/D413K；および

K214R/L235W/G236N/H268D/Q295L/K326T/A330K/Q311R。

[請求項7] 配列番号64乃至85のいずれかひとつのアミノ酸配列を含む重鎖定常領域を含む、請求項１乃至６のいずれか一項に記載の抗CD137抗原結合分子。

[請求項8] 請求項１乃至７のいずれか一項に記載の抗CD137抗原結合分子をコードする、単離された核酸。

[請求項9] 請求項８に記載の核酸が導入されたベクター。

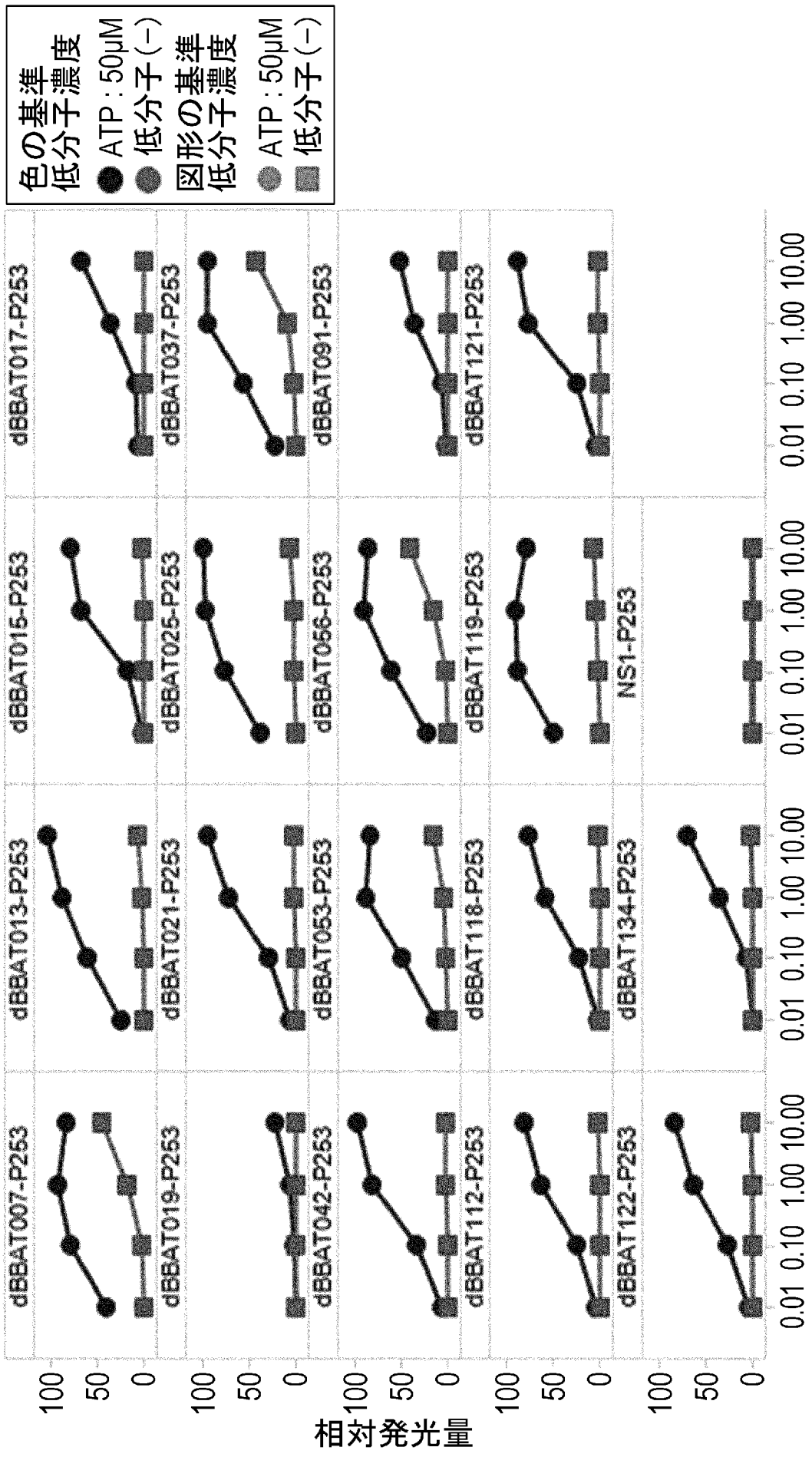
[請求項10] 請求項８に記載の核酸、または請求項９に記載のベクターを含む、宿主細胞。

[請求項11] 抗CD137抗原結合分子を製造する方法であって、抗CD137抗原結合分子が製造されるように請求項１０に記載の宿主細胞を培養することを含む、方法。

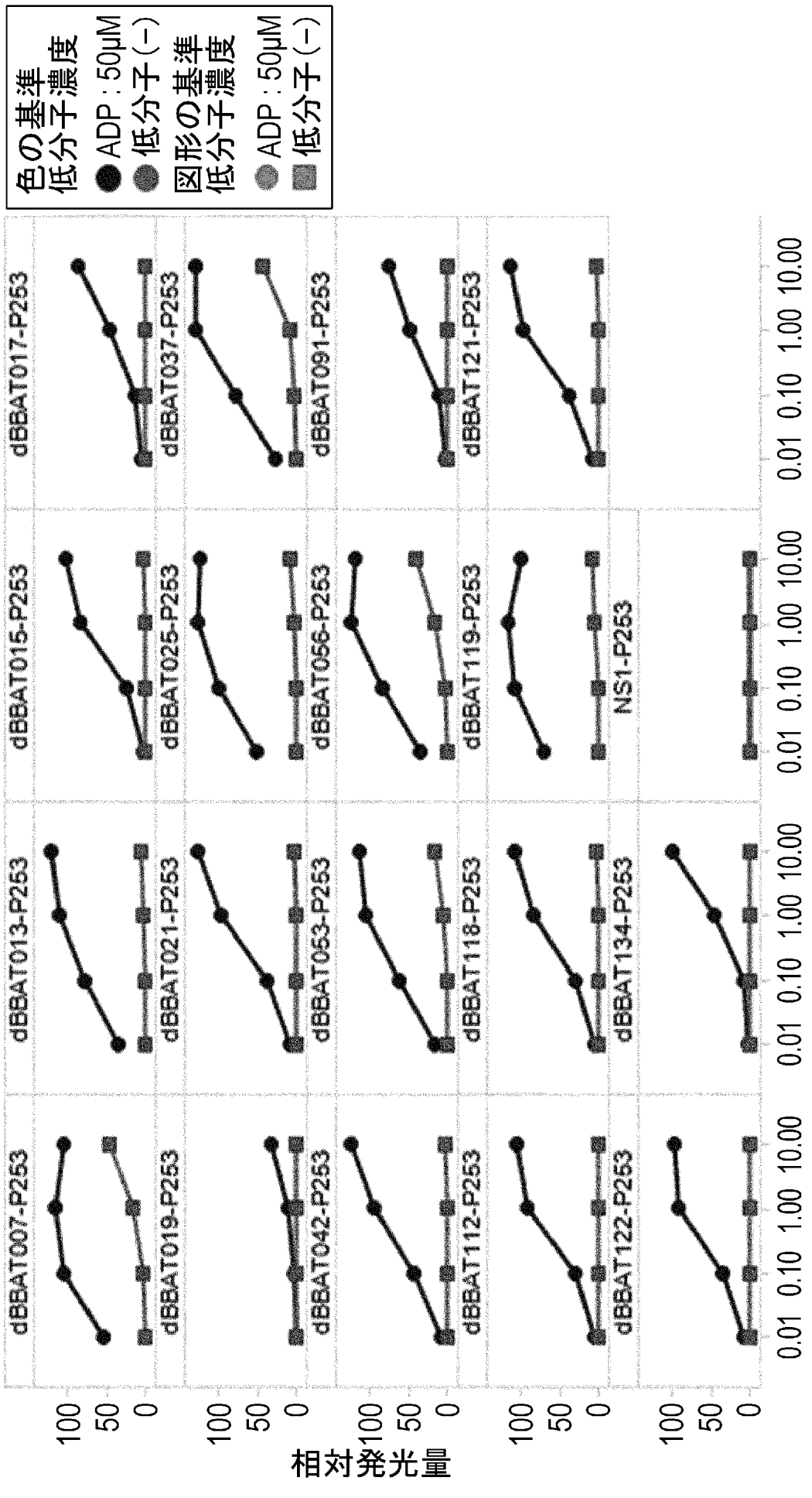
[請求項12] 請求項１乃至７のいずれか一項記載の抗CD137抗原結合分子および細胞傷害剤を含む、イムノコンジュゲート。

[請求項13] 請求項１乃至７のいずれか一項に記載の抗CD137抗原結合分子若しくは請求項１２に記載のイムノコンジュゲート；および薬学的に許容される担体を含む、薬学的製剤。

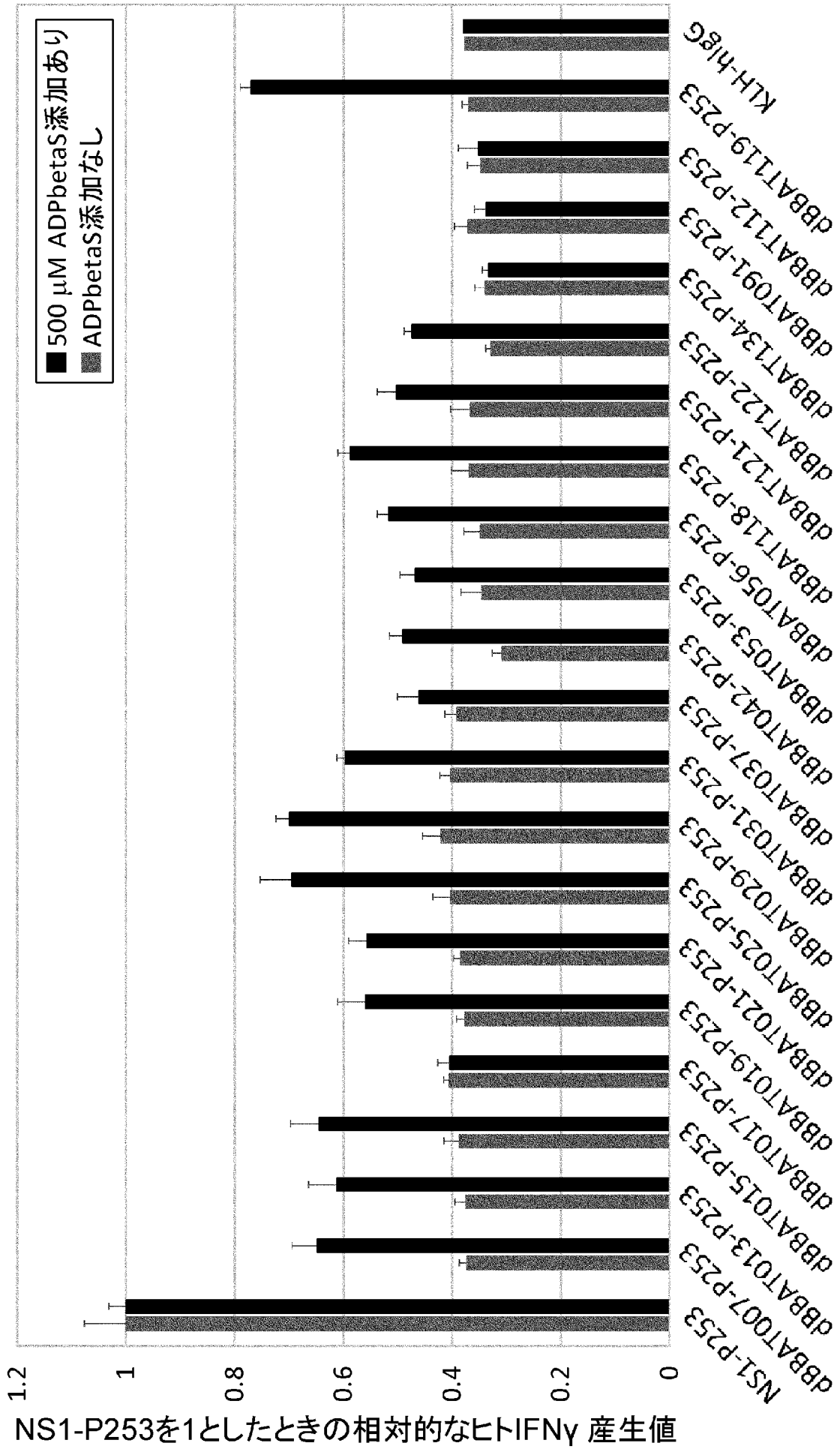
[図1]


色の基準
低分子濃度
ATP：50μM
低分子(－)
図形の基準
低分子濃度
ATP：50μM
低分子(－)
dBBAT007-P253
dBBAT013-P253
dBBAT015-P253
dBBAT017-P253
dBBAT019-P253
dBBAT021-P253
dBBAT025-P253
dBBAT037-P253
dBBAT042-P253
dBBAT053-P253
dBBAT056-P253
dBBAT091-P253
dBBAT112-P253
dBBAT118-P253
dBBAT119-P253
dBBAT121-P253
dBBAT122-P253
dBBAT134-P253
NS1-P253
100
50
0
0.01 0.10 1.00 10.00
相対発光量
抗体濃度(μg/mL)

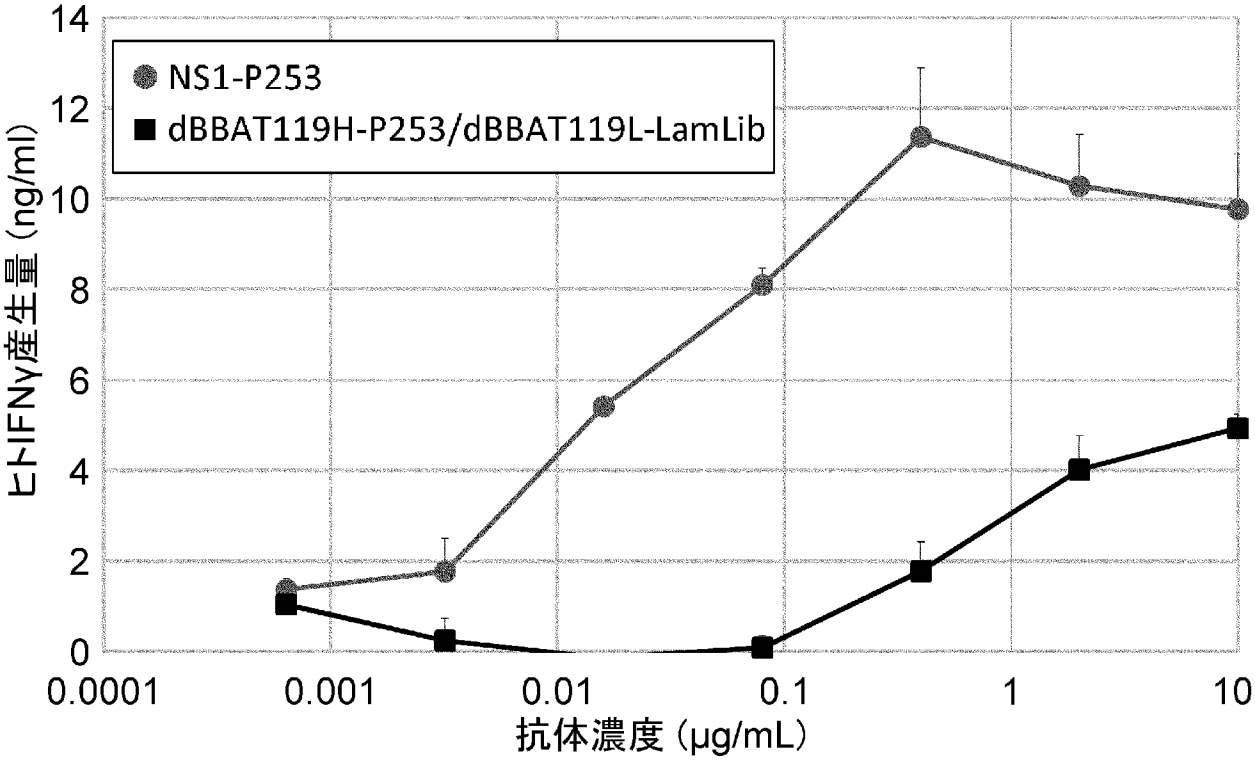
[図2]


色の基準
低分子濃度
ADP：50μM
低分子(−)
図形の基準
低分子濃度
ADP：50μM
低分子(−)
dBBAT007-P253
dBBAT013-P253
dBBAT015-P253
dBBAT017-P253
dBBAT019-P253
dBBAT021-P253
dBBAT025-P253
dBBAT037-P253
dBBAT042-P253
dBBAT053-P253
dBBAT056-P253
dBBAT091-P253
dBBAT112-P253
dBBAT118-P253
dBBAT119-P253
dBBAT121-P253
dBBAT122-P253
dBBAT134-P253
NS1-P253
100
50
0
0.01 0.10 1.00 10.00
相対発光量
抗体濃度(μg/mL)

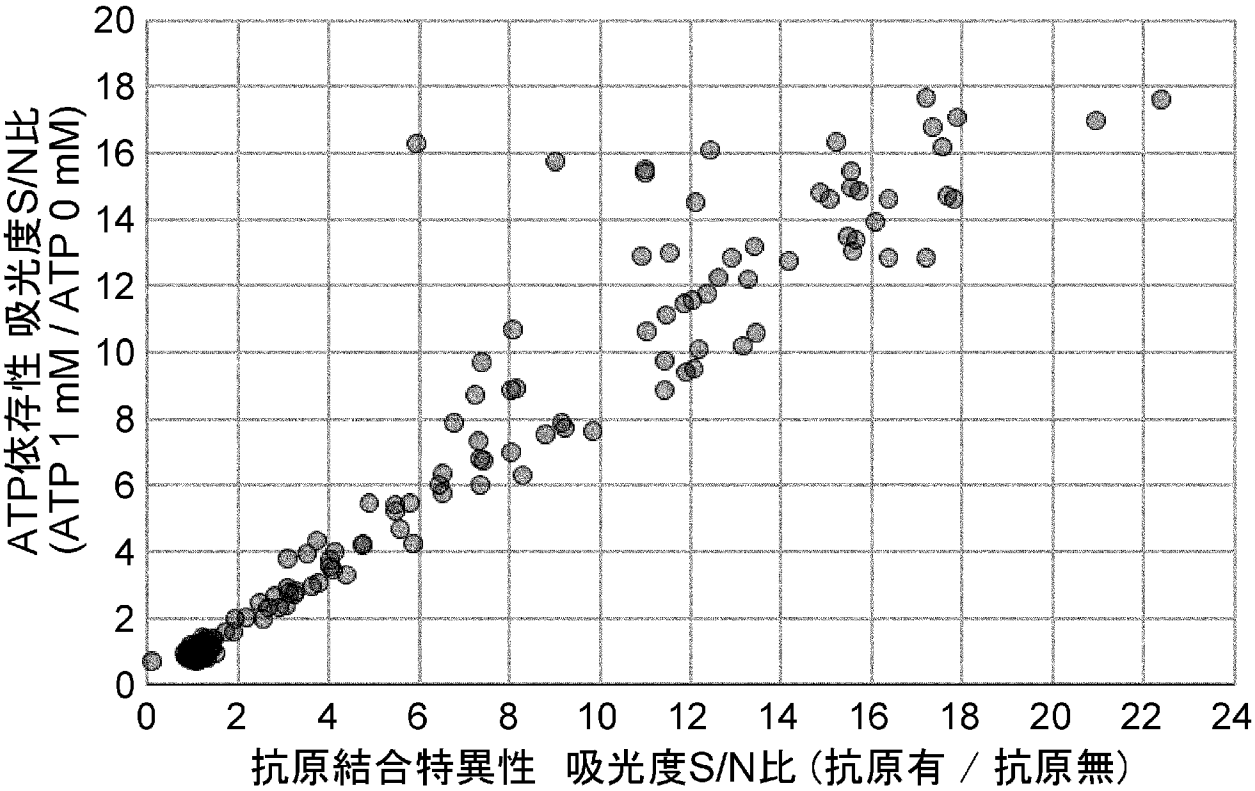
[図3]


■500 μM ADPbetaS添加あり
■ADPbetaS添加なし
KLH-hIgG
dBBAT119-P253
dBBAT112-P253
dBBAT091-P253
dBBAT134-P253
dBBAT122-P253
dBBAT121-P253
dBBAT118-P253
dBBAT056-P253
dBBAT053-P253
dBBAT042-P253
dBBAT037-P253
dBBAT031-P253
dBBAT029-P253
dBBAT025-P253
dBBAT021-P253
dBBAT019-P253
dBBAT017-P253
dBBAT015-P253
dBBAT013-P253
dBBAT007-P253
NS1-P253
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
NS1-P253を1としたときの相対的なヒトIFNγ 産生値

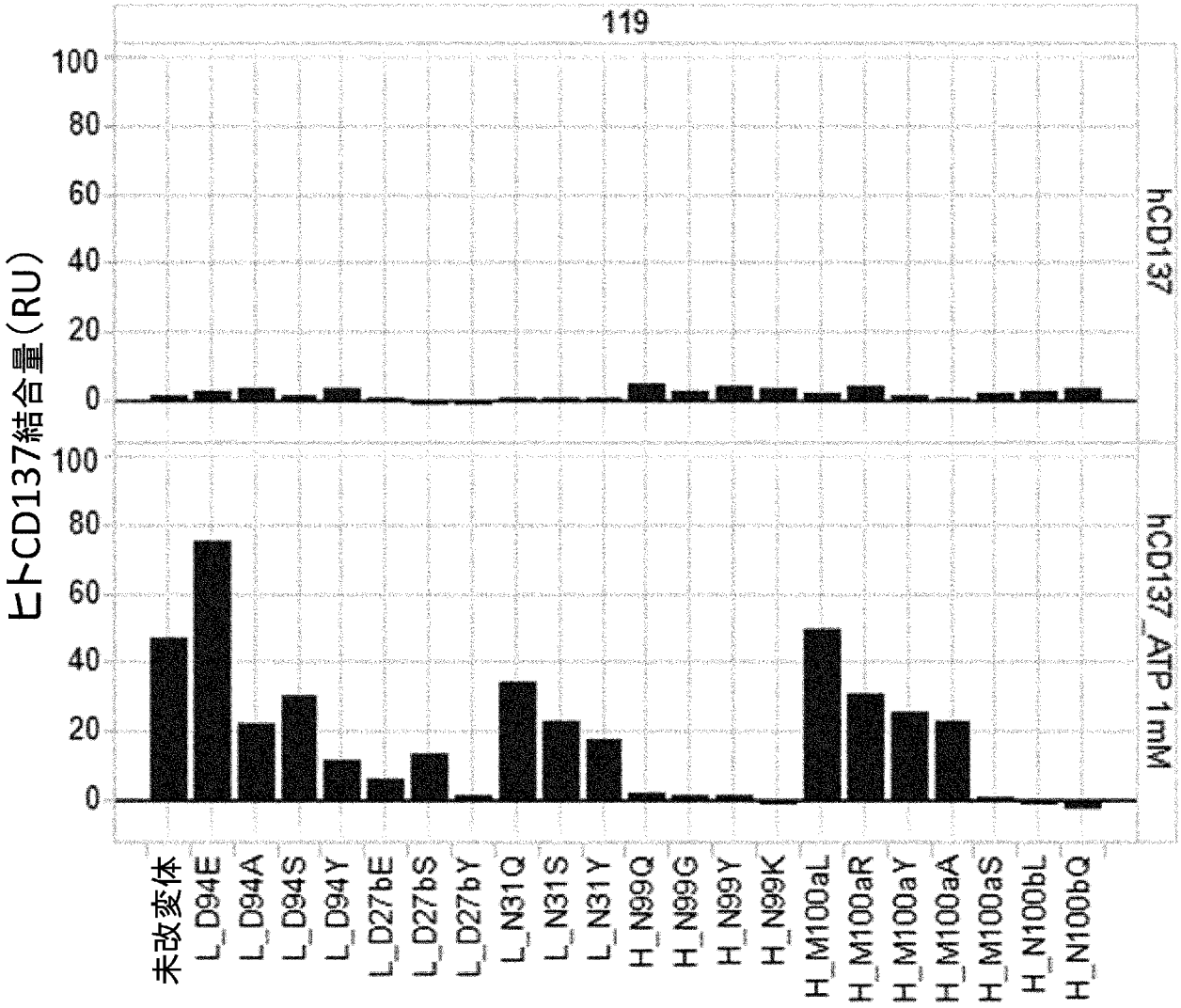
[図4]


NS1-P253
dBBAT119H-P253/dBBAT119L-LamLib
ヒトIFNγ産生量 (ng/ml)
0
2
4
6
8
10
12
14
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
抗体濃度 (μg/mL)

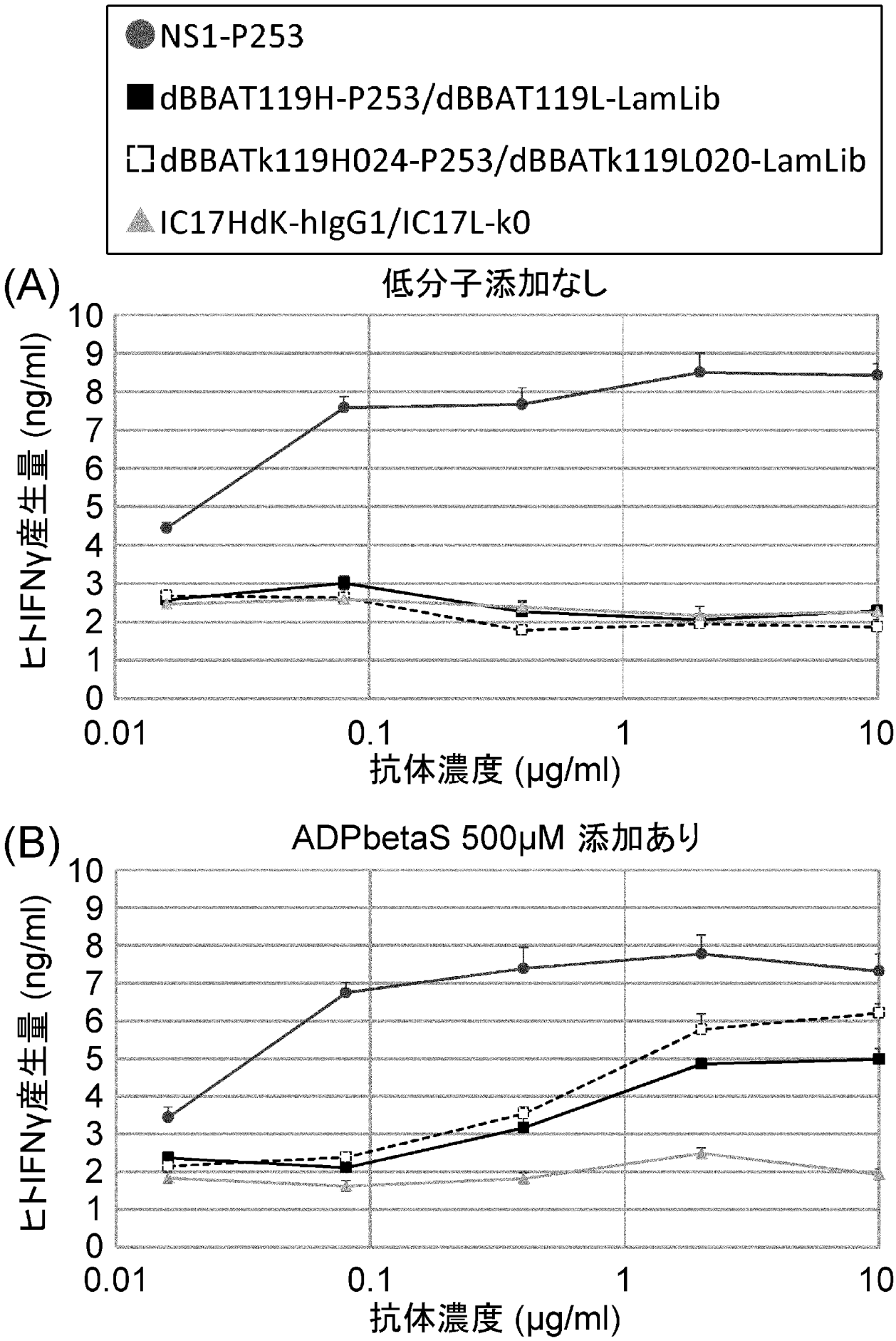
[図5]


ATP依存性 吸光度S/N比
(ATP 1 mM / ATP 0 mM)
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
抗原結合特異性 吸光度S/N比 (抗原有 / 抗原無)

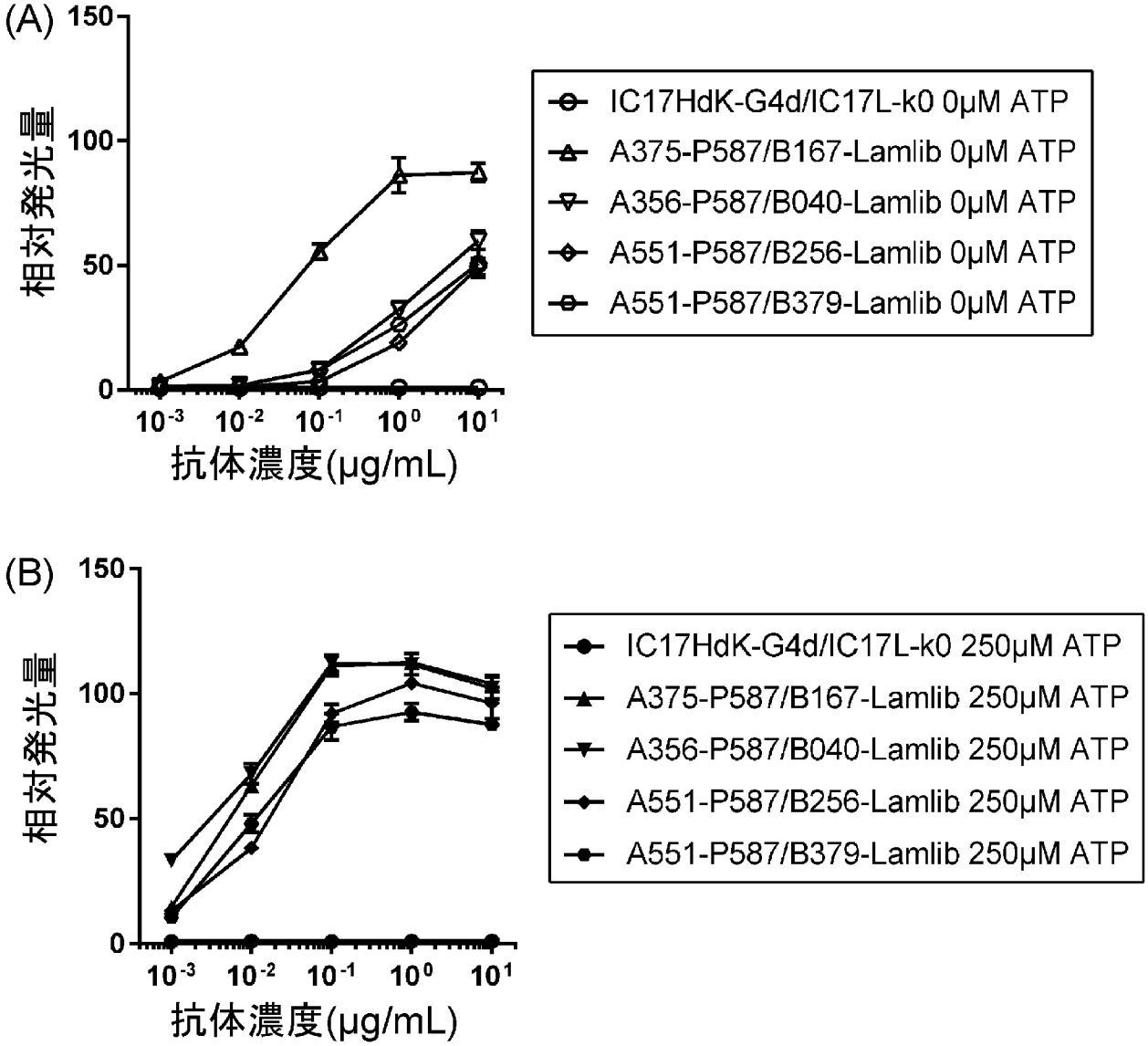
[図6]


119
ヒトCD137結合量(RU)
100
80
60
40
20
0
hCD137
hCD137_ATP 1 mM
未改変体
L_D94E
L_D94A
L_D94S
L_D94Y
L_D27bE
L_D27bS
L_D27bY
L_N31Q
L_N31S
L_N31Y
H_N99Q
H_N99G
H_N99Y
H_N99K
H_M100aL
H_M100aR
H_M100aY
H_M100aA
H_M100aS
H_N100bL
H_N100bQ

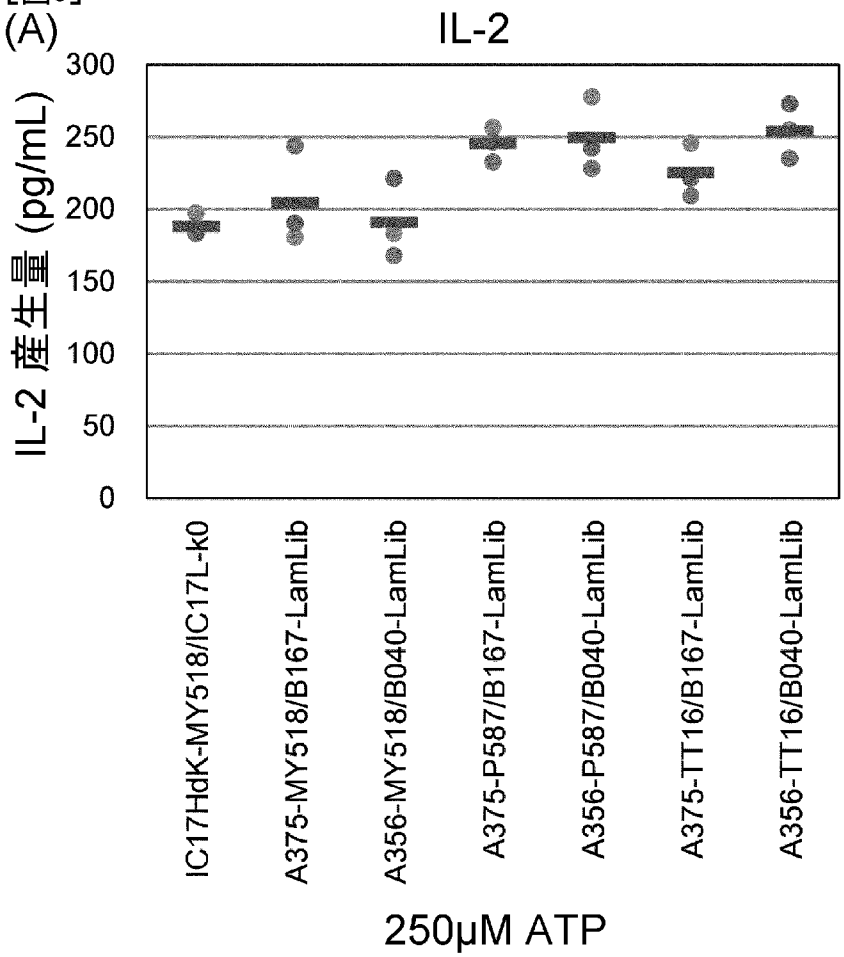
[図7]

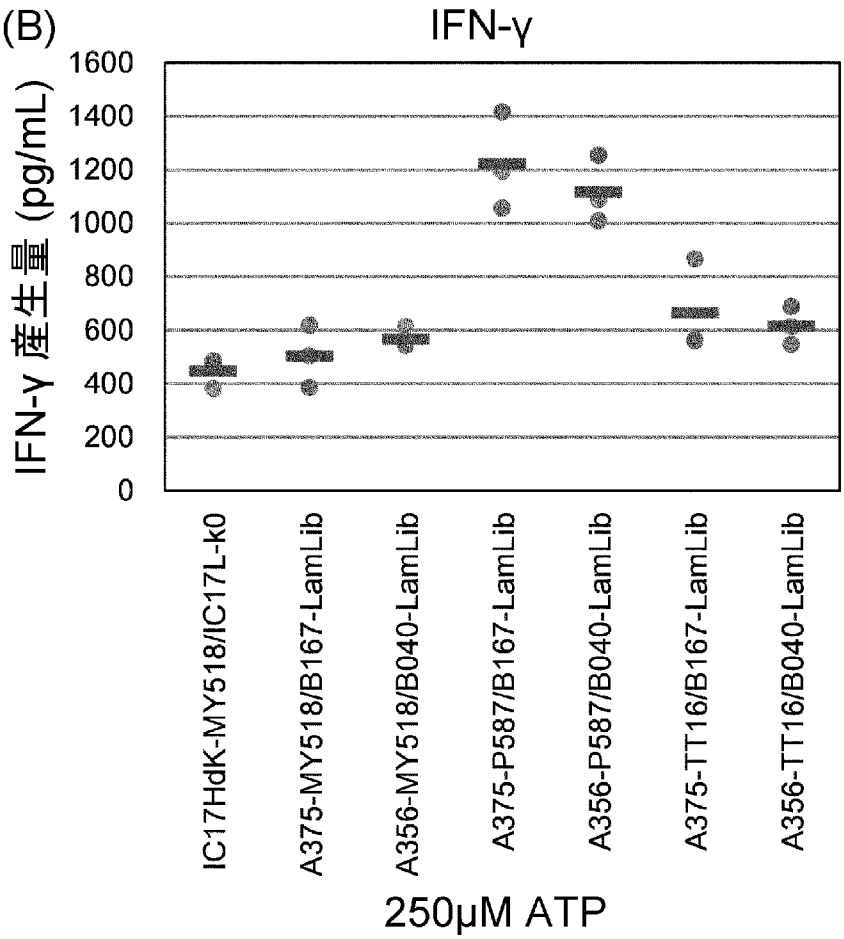

NS1-P253
dBBAT119H-P253/dBBAT119L-LamLib
dBBATk119H024-P253/dBBATk119L020-LamLib
IC17HdK-hIgG1/IC17L-k0
(A)
低分子添加なし
ヒトIFNγ産生量 (ng/ml)
抗体濃度 (μg/ml)
(B)
ADPbetaS 500μM 添加あり
ヒトIFNγ産生量 (ng/ml)
抗体濃度 (μg/ml)

[図8]

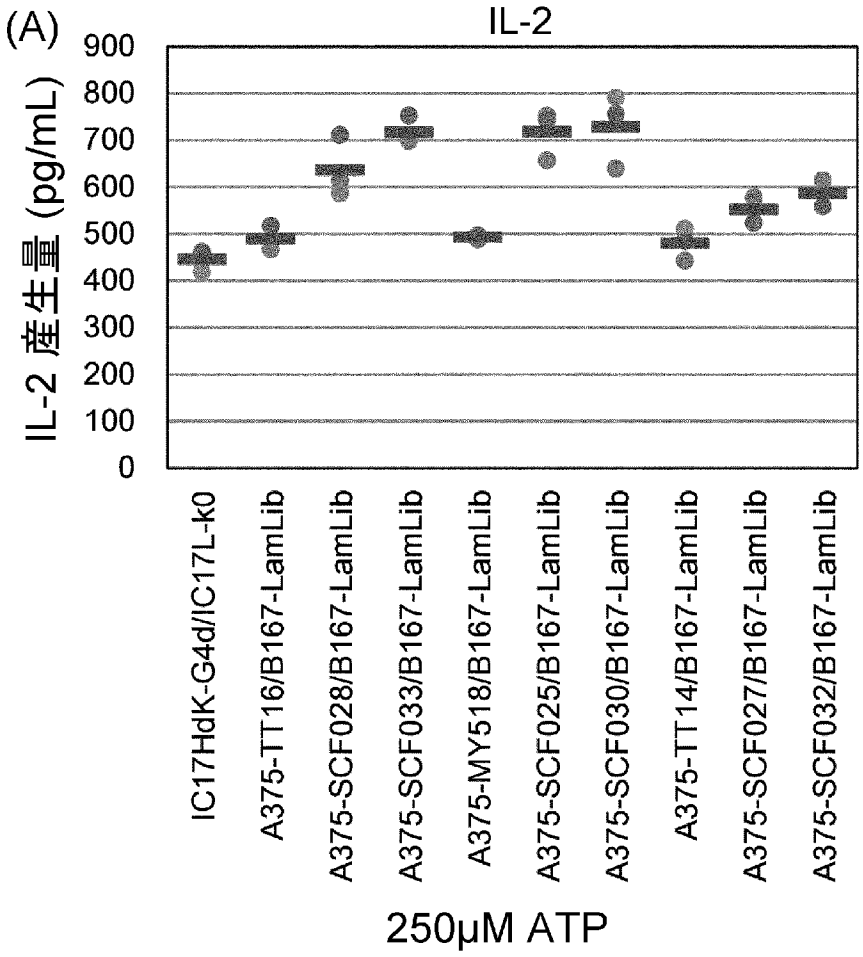

(A)
150
100
50
0
相対発光量
10-3
10-2
10-1
100
101
抗体濃度(μg/mL)
IC17HdK-G4d/IC17L-k0 0μM ATP
A375-P587/B167-Lamlib 0μM ATP
A356-P587/B040-Lamlib 0μM ATP
A551-P587/B256-Lamlib 0μM ATP
A551-P587/B379-Lamlib 0μM ATP
(B)
150
100
50
0
相対発光量
10-3
10-2
10-1
100
101
抗体濃度(μg/mL)
IC17HdK-G4d/IC17L-k0 250μM ATP
A375-P587/B167-Lamlib 250μM ATP
A356-P587/B040-Lamlib 250μM ATP
A551-P587/B256-Lamlib 250μM ATP
A551-P587/B379-Lamlib 250μM ATP

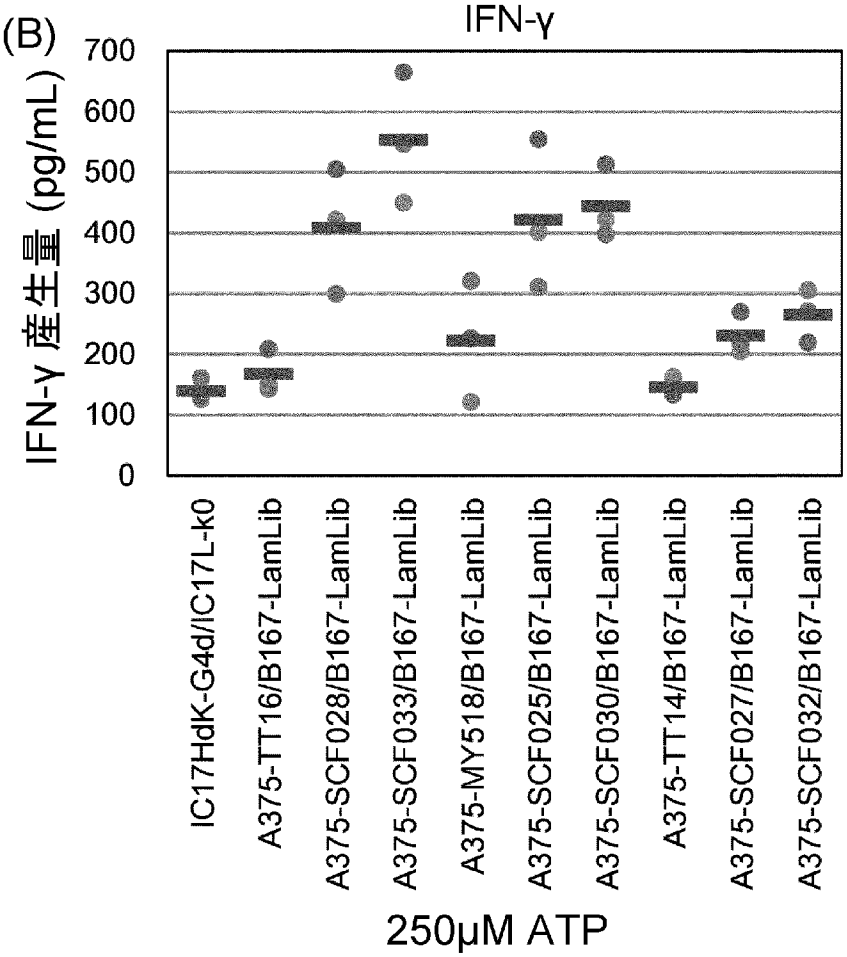
[図9]


(A)
IL-2
IL-2 産生量 (pg/mL)
300
250
200
150
100
50
0
IC17HdK-MY518/IC17L-k0
A375-MY518/B167-LamLib
A356-MY518/B040-LamLib
A375-P587/B167-LamLib
A356-P587/B040-LamLib
A375-TT16/B167-LamLib
A356-TT16/B040-LamLib
250μM ATP

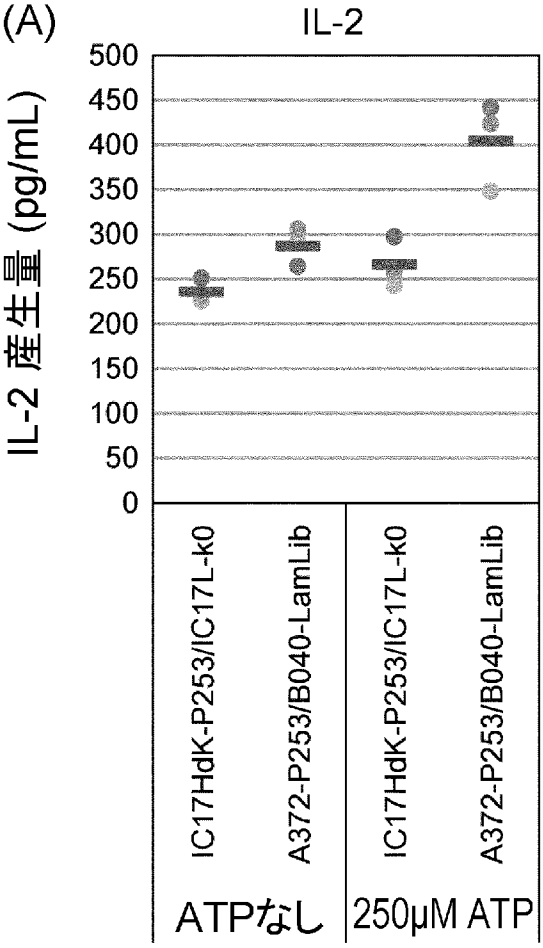

(B)
IFN-γ
IFN-γ 産生量 (pg/mL)
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
IC17HdK-MY518/IC17L-k0
A375-MY518/B167-LamLib
A356-MY518/B040-LamLib
A375-P587/B167-LamLib
A356-P587/B040-LamLib
A375-TT16/B167-LamLib
A356-TT16/B040-LamLib
250μM ATP

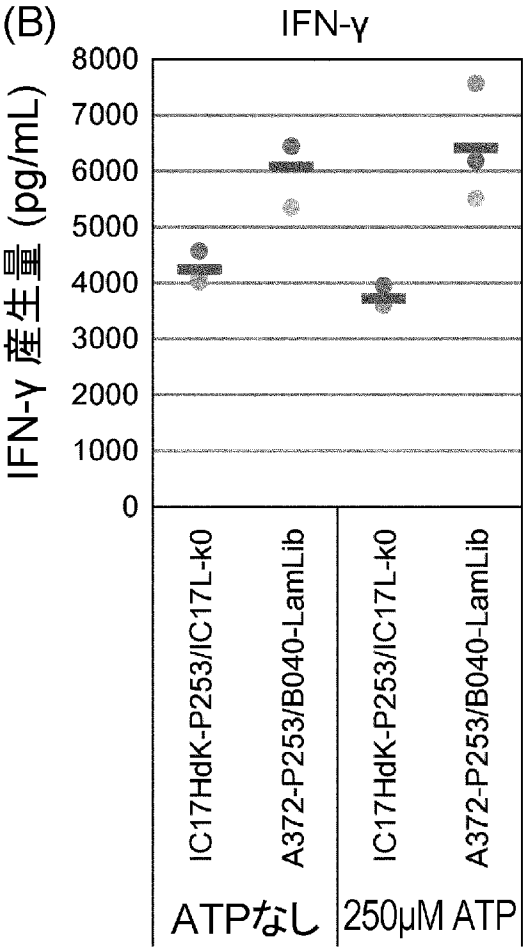
[図10]


(A)
IL-2
IL-2 産生量 (pg/mL)
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
IC17HdK-G4d/IC17L-k0
A375-TT16/B167-LamLib
A375-SCF028/B167-LamLib
A375-SCF033/B167-LamLib
A375-MY518/B167-LamLib
A375-SCF025/B167-LamLib
A375-SCF030/B167-LamLib
A375-TT14/B167-LamLib
A375-SCF027/B167-LamLib
A375-SCF032/B167-LamLib
250μM ATP

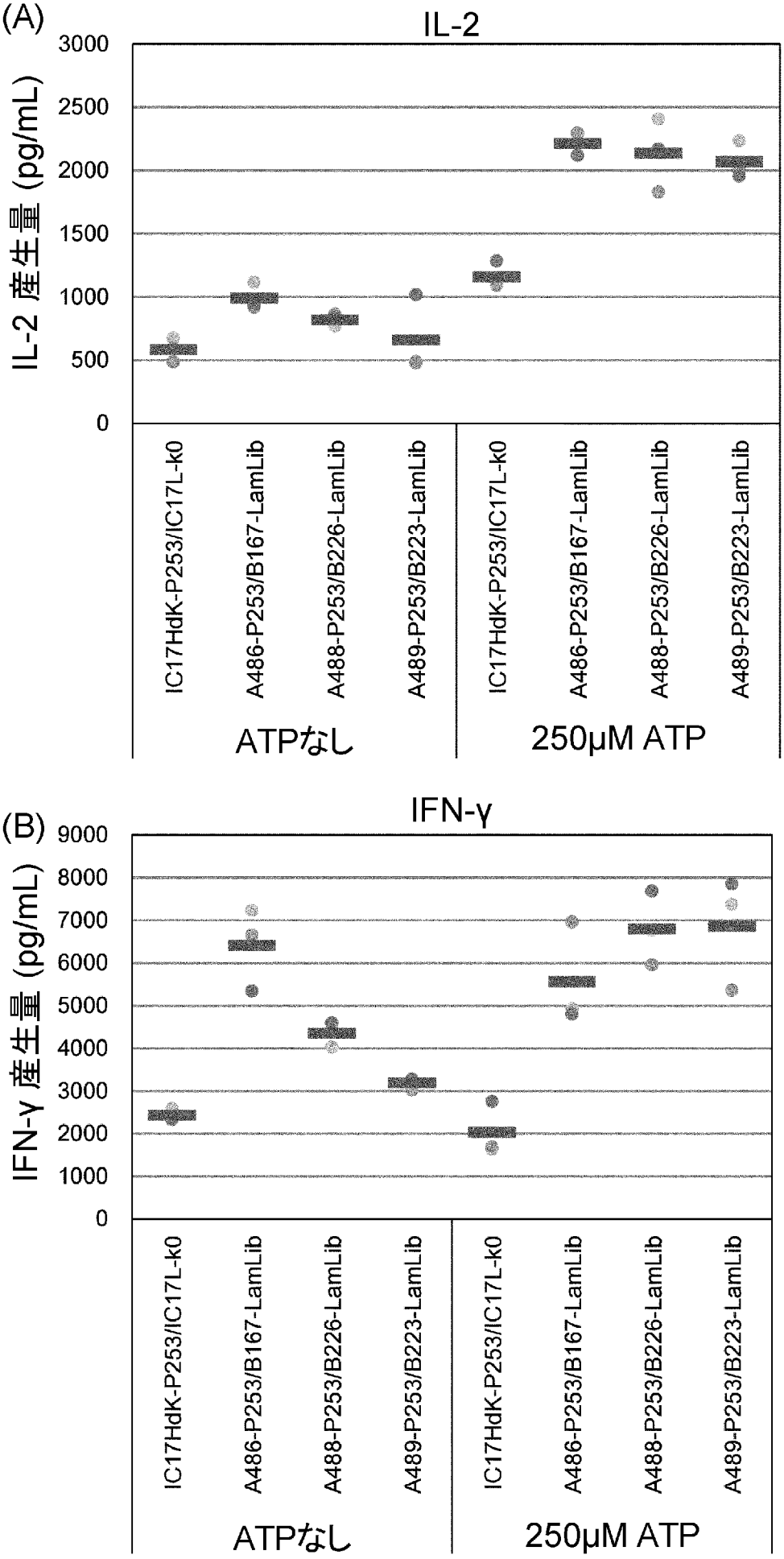

(B)
IFN-γ
IFN-γ 産生量 (pg/mL)
700
600
500
400
300
200
100
0
IC17HdK-G4d/IC17L-k0
A375-TT16/B167-LamLib
A375-SCF028/B167-LamLib
A375-SCF033/B167-LamLib
A375-MY518/B167-LamLib
A375-SCF025/B167-LamLib
A375-SCF030/B167-LamLib
A375-TT14/B167-LamLib
A375-SCF027/B167-LamLib
A375-SCF032/B167-LamLib
250μM ATP

[図11]

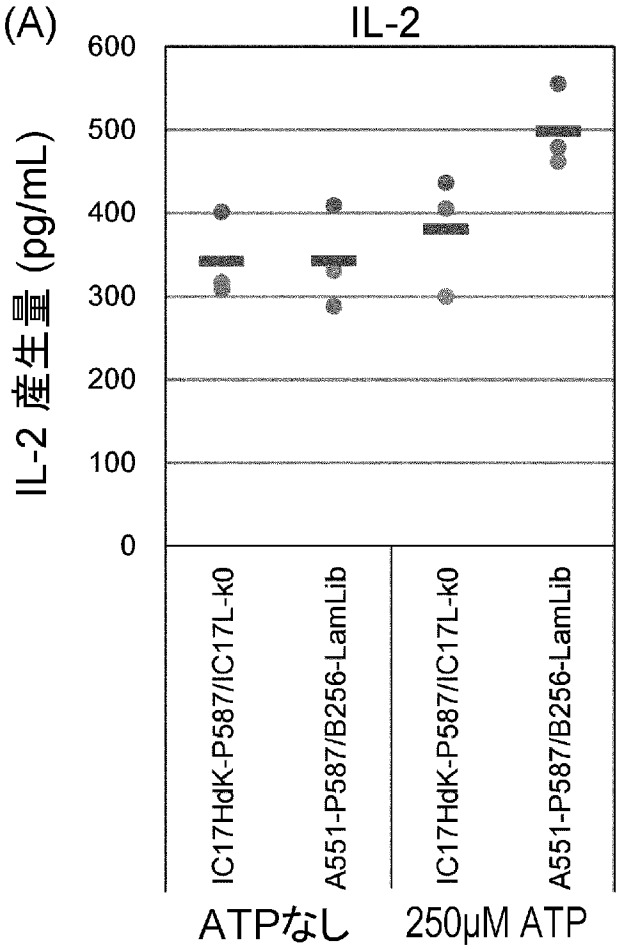

(A)
IL-2
IL-2 産生量 (pg/mL)
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
IC17HdK-P253/IC17L-k0
A372-P253/B040-LamLib
IC17HdK-P253/IC17L-k0
A372-P253/B040-LamLib
ATPなし
250μM ATP

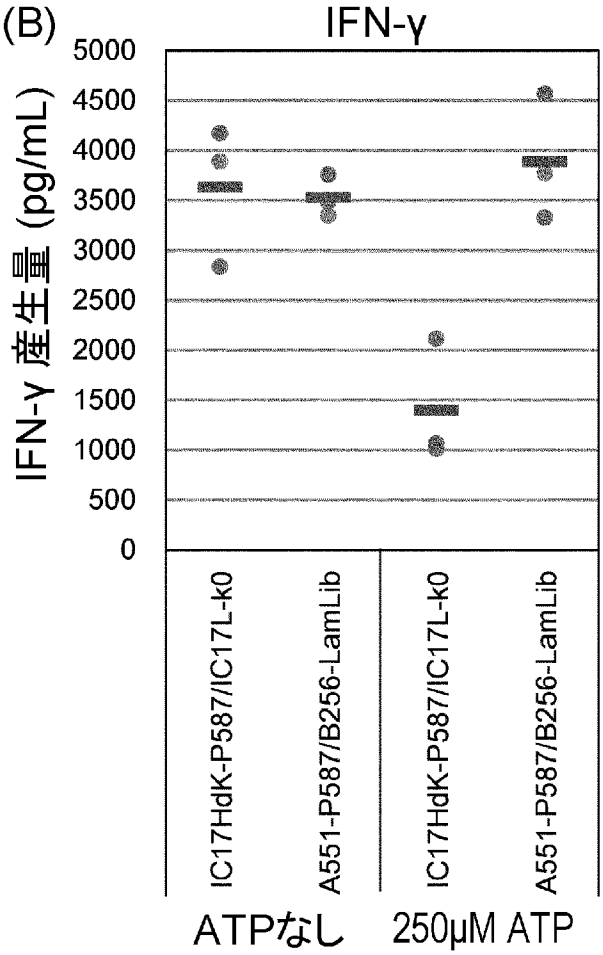

(B)
IFN-γ
IFN-γ 産生量 (pg/mL)
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
IC17HdK-P253/IC17L-k0
A372-P253/B040-LamLib
IC17HdK-P253/IC17L-k0
A372-P253/B040-LamLib
ATPなし
250μM ATP

[図12]

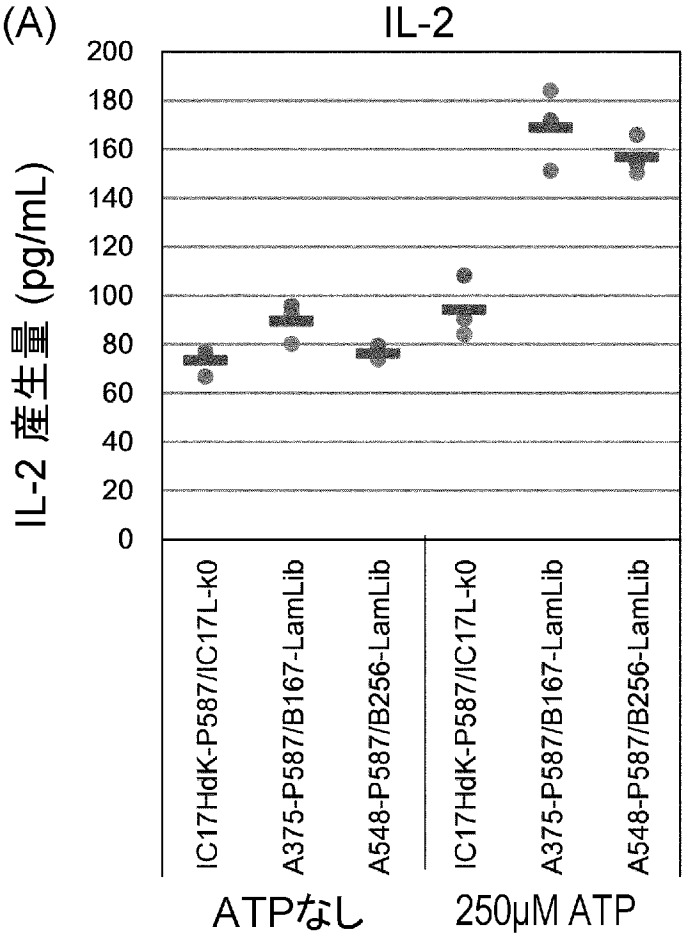

(A)
IL-2
IL-2 産生量 (pg/mL)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
IC17HdK-P253/IC17L-k0
A486-P253/B167-LamLib
A488-P253/B226-LamLib
A489-P253/B223-LamLib
IC17HdK-P253/IC17L-k0
A486-P253/B167-LamLib
A488-P253/B226-LamLib
A489-P253/B223-LamLib
ATPなし
250μM ATP
(B)
IFN-γ
IFN-γ 産生量 (pg/mL)
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
IC17HdK-P253/IC17L-k0
A486-P253/B167-LamLib
A488-P253/B226-LamLib
A489-P253/B223-LamLib
IC17HdK-P253/IC17L-k0
A486-P253/B167-LamLib
A488-P253/B226-LamLib
A489-P253/B223-LamLib
ATPなし
250μM ATP

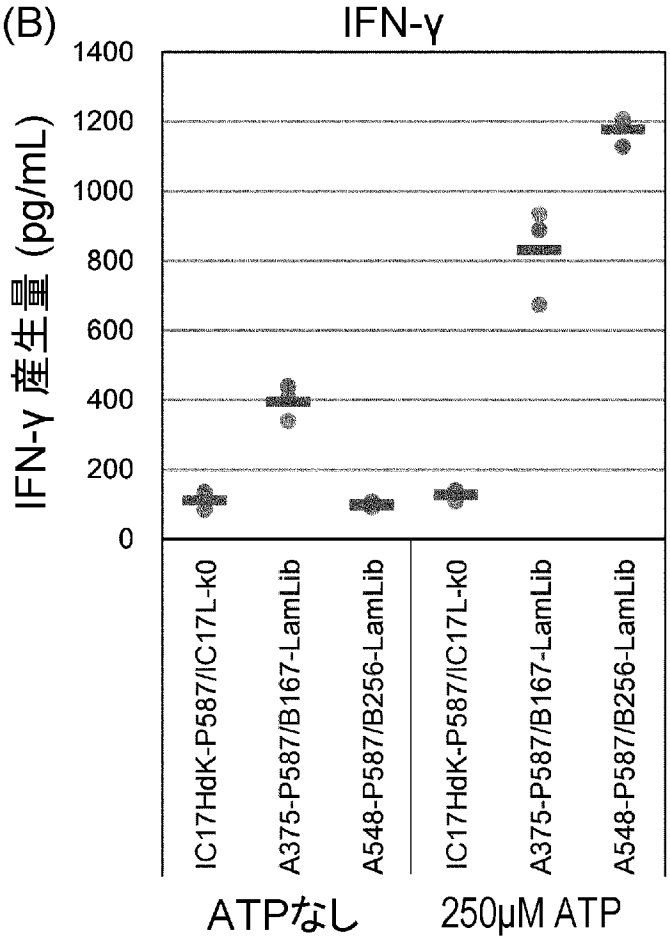
[図13]


(A)
IL-2
IL-2 産生量 (pg/mL)
600
500
400
300
200
100
0
IC17HdK-P587/IC17L-k0
A551-P587/B256-LamLib
IC17HdK-P587/IC17L-k0
A551-P587/B256-LamLib
ATPなし
250μM ATP

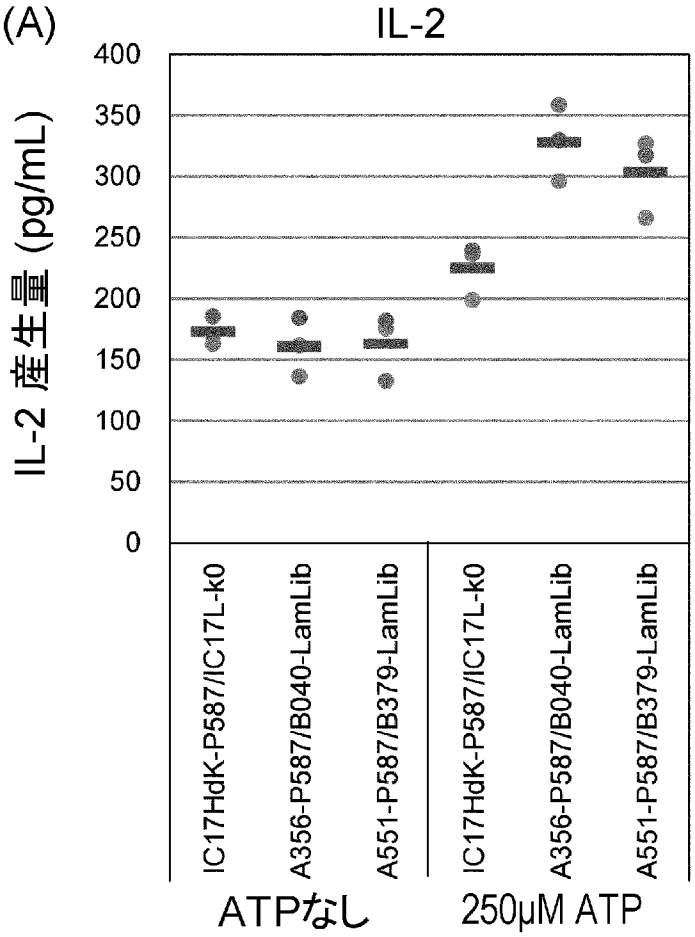

(B)
IFN-γ
IFN-γ 産生量 (pg/mL)
5000
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
IC17HdK-P587/IC17L-k0
A551-P587/B256-LamLib
IC17HdK-P587/IC17L-k0
A551-P587/B256-LamLib
ATPなし
250μM ATP

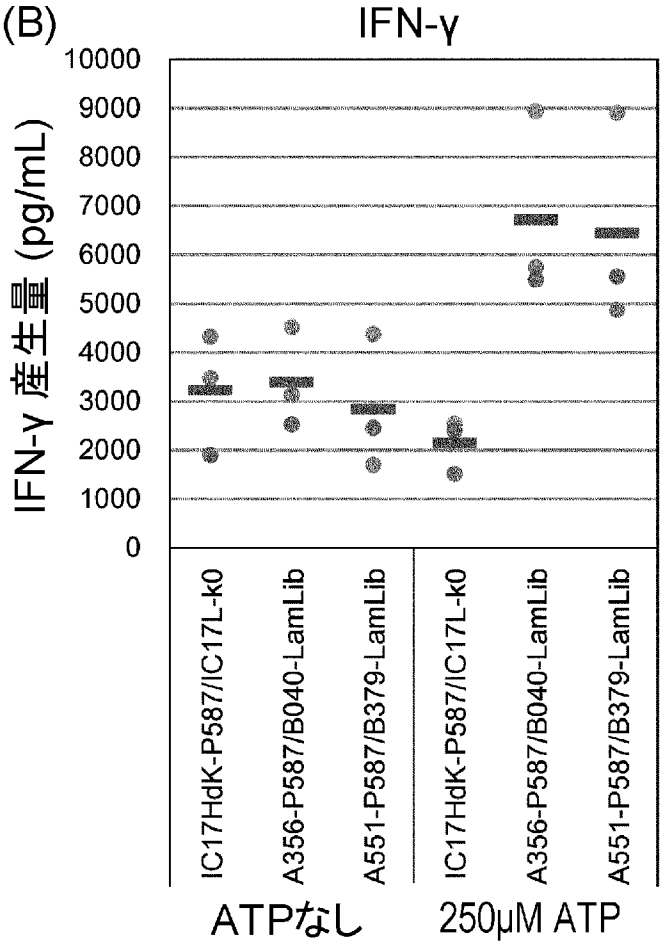
[図14]


(A)
IL-2
IL-2 産生量 (pg/mL)
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
IC17HdK-P587/IC17L-k0
A375-P587/B167-LamLib
A548-P587/B256-LamLib
IC17HdK-P587/IC17L-k0
A375-P587/B167-LamLib
A548-P587/B256-LamLib
ATPなし
250μM ATP

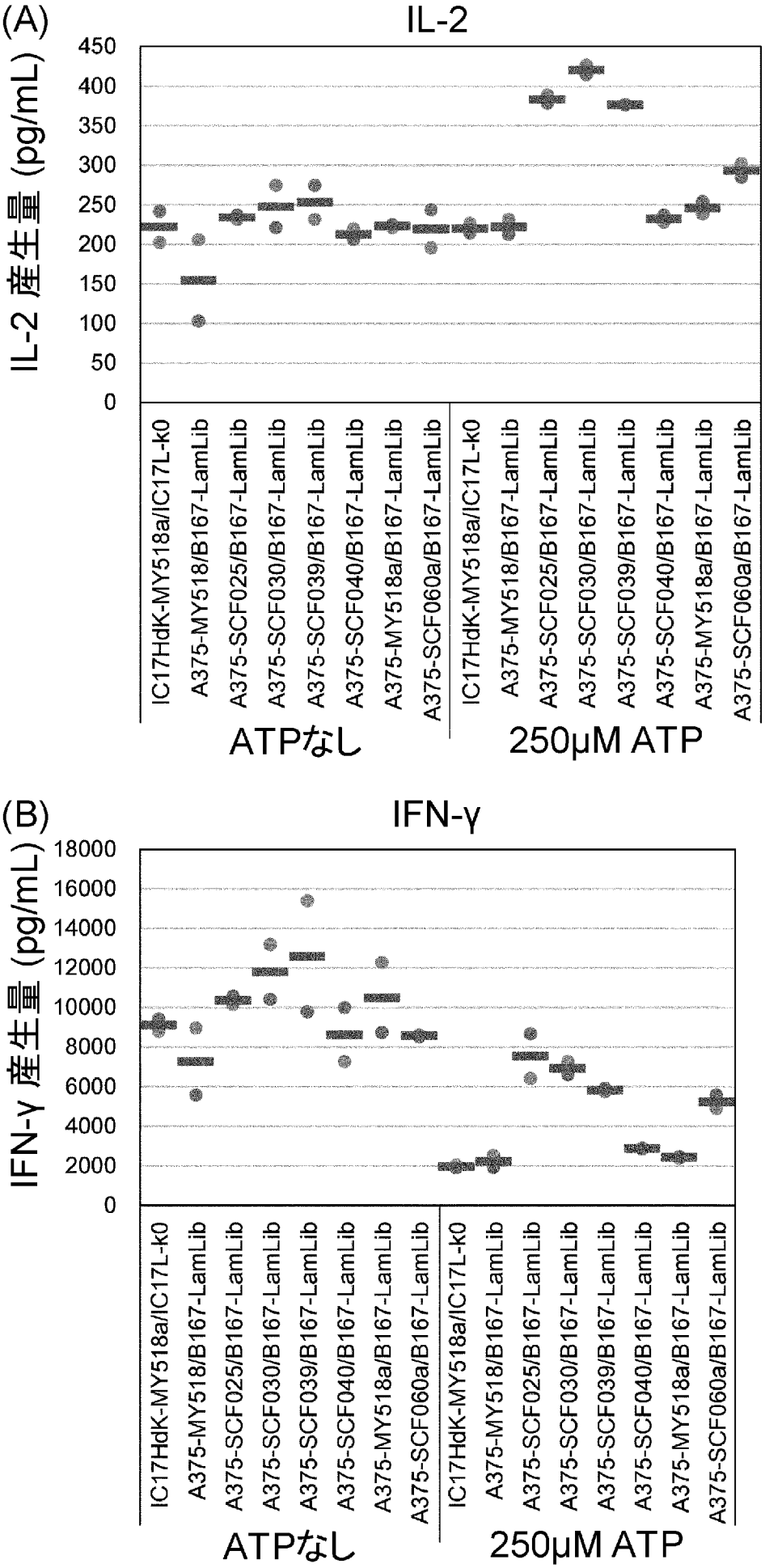

(B)
IFN-γ
IFN-γ 産生量 (pg/mL)
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
IC17HdK-P587/IC17L-k0
A375-P587/B167-LamLib
A548-P587/B256-LamLib
IC17HdK-P587/IC17L-k0
A375-P587/B167-LamLib
A548-P587/B256-LamLib
ATPなし
250μM ATP

[図15]

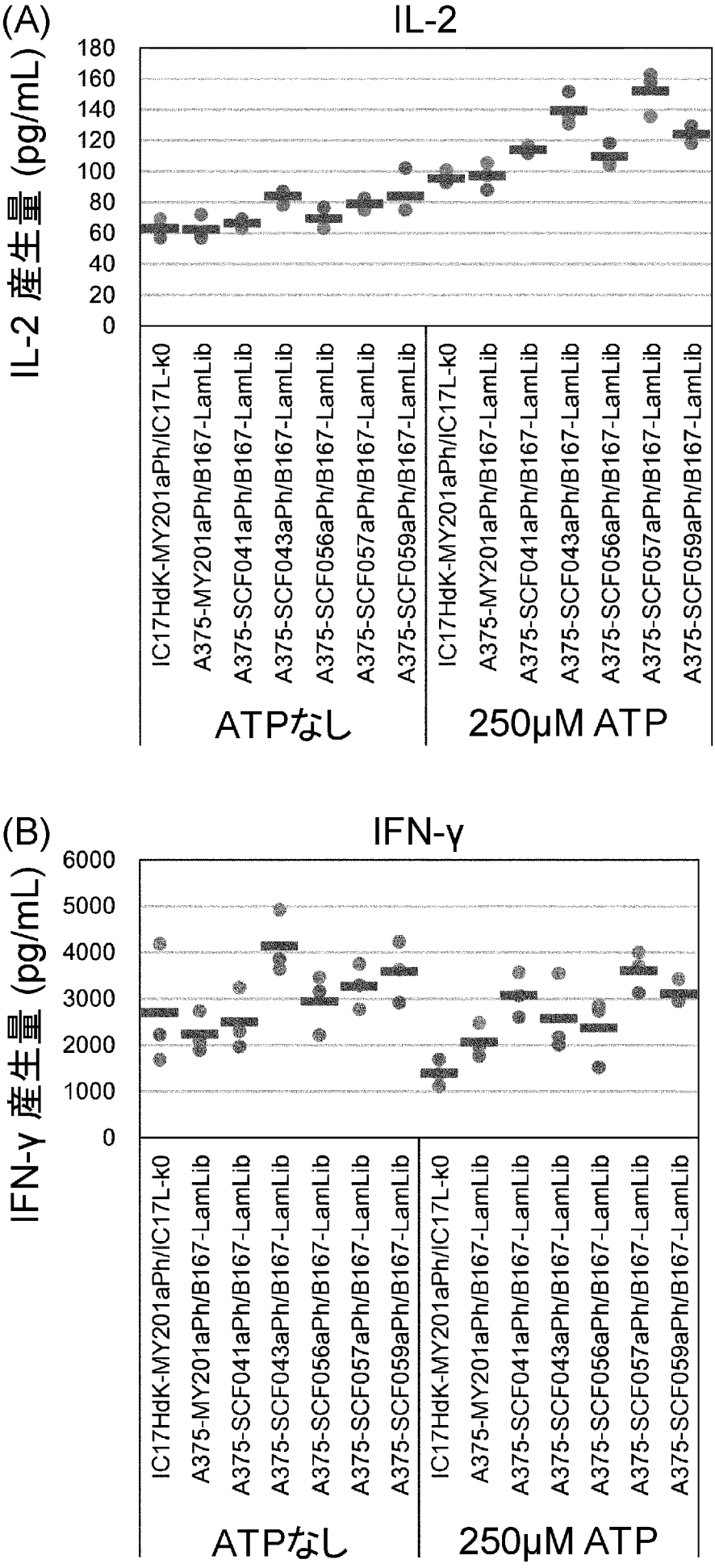

(A)
IL-2
IL-2 産生量 (pg/mL)
400
350
300
250
200
150
100
50
0
IC17HdK-P587/IC17L-k0
A356-P587/B040-LamLib
A551-P587/B379-LamLib
IC17HdK-P587/IC17L-k0
A356-P587/B040-LamLib
A551-P587/B379-LamLib
ATPなし
250μM ATP


(B)
IFN-γ
IFN-γ 産生量 (pg/mL)
10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
IC17HdK-P587/IC17L-k0
A356-P587/B040-LamLib
A551-P587/B379-LamLib
IC17HdK-P587/IC17L-k0
A356-P587/B040-LamLib
A551-P587/B379-LamLib
ATPなし
250μM ATP

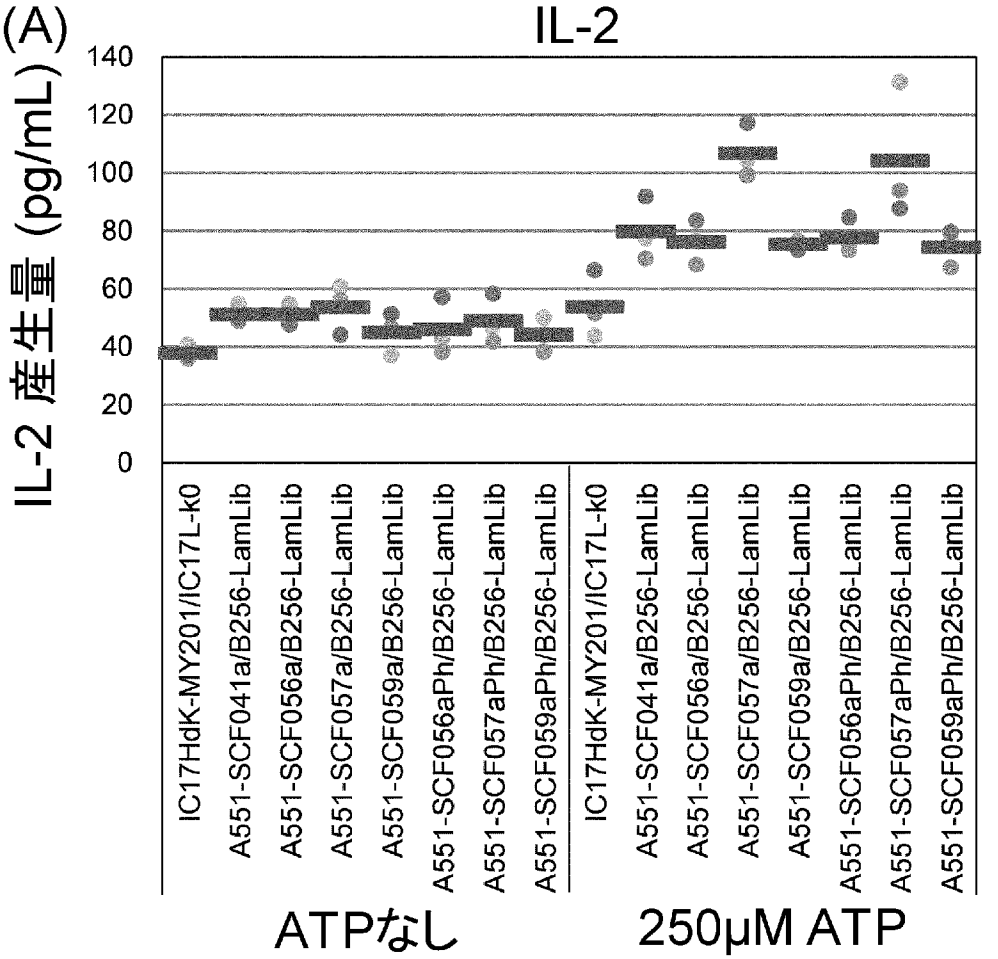
[図16]

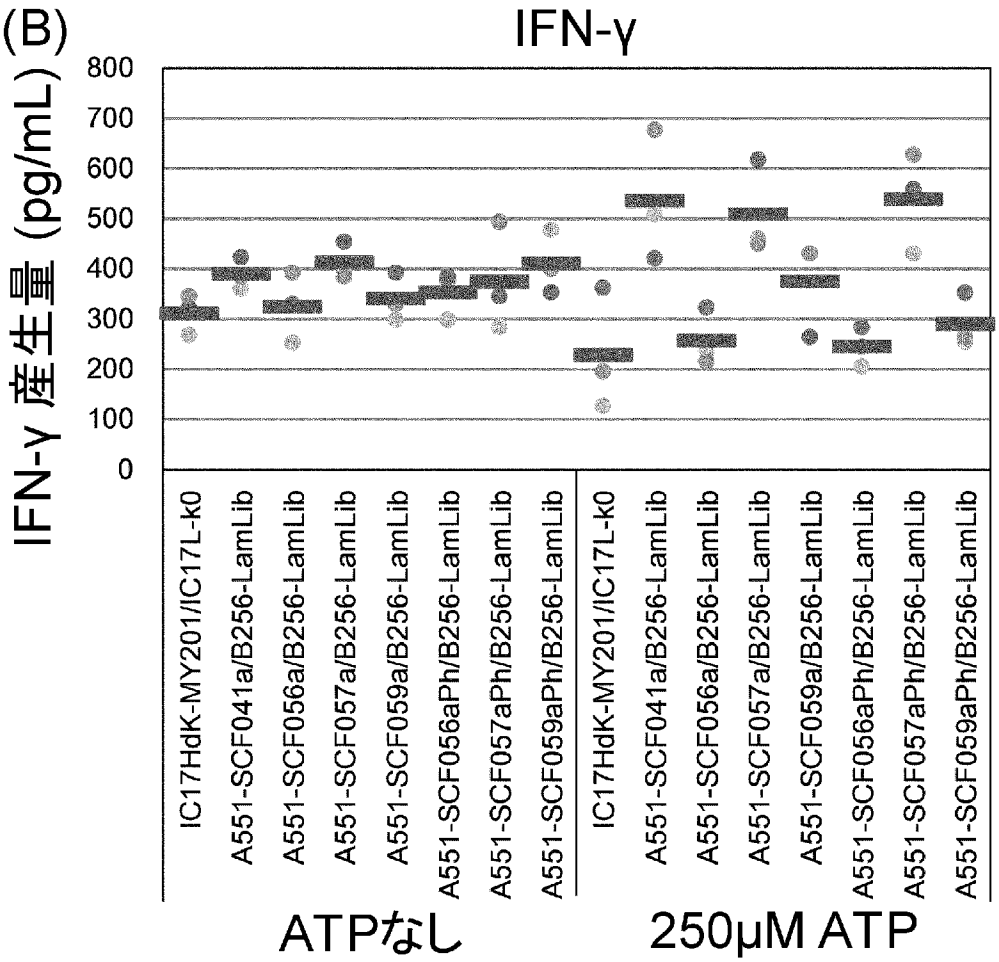

(A)
IL-2
IL-2 産生量 (pg/mL)
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
IC17HdK-MY518a/IC17L-k0
A375-MY518/B167-LamLib
A375-SCF025/B167-LamLib
A375-SCF030/B167-LamLib
A375-SCF039/B167-LamLib
A375-SCF040/B167-LamLib
A375-MY518a/B167-LamLib
A375-SCF060a/B167-LamLib
ATPなし
250μM ATP
(B)
IFN-γ
IFN-γ 産生量 (pg/mL)
18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
IC17HdK-MY518a/IC17L-k0
A375-MY518/B167-LamLib
A375-SCF025/B167-LamLib
A375-SCF030/B167-LamLib
A375-SCF039/B167-LamLib
A375-SCF040/B167-LamLib
A375-MY518a/B167-LamLib
A375-SCF060a/B167-LamLib
ATPなし
250μM ATP

[図17]

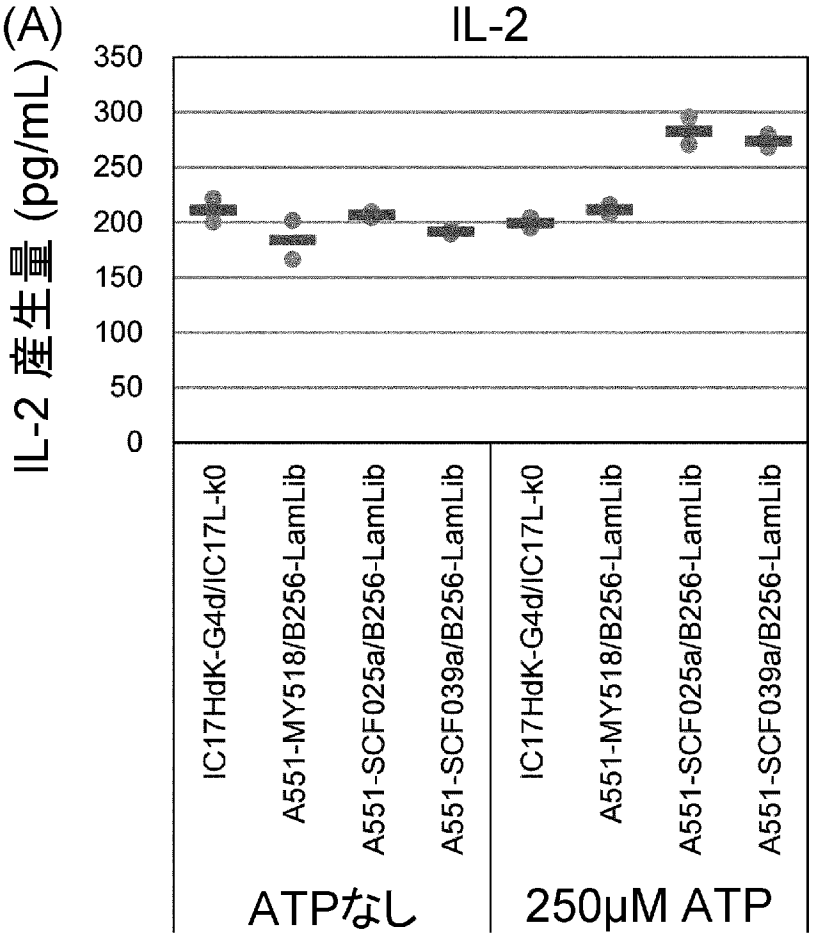

(A)
IL-2
IL-2 産生量 (pg/mL)
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
IC17HdK-MY201aPh/IC17L-k0
A375-MY201aPh/B167-LamLib
A375-SCF041aPh/B167-LamLib
A375-SCF043aPh/B167-LamLib
A375-SCF056aPh/B167-LamLib
A375-SCF057aPh/B167-LamLib
A375-SCF059aPh/B167-LamLib
ATPなし
250μM ATP
(B)
IFN-γ
IFN-γ 産生量 (pg/mL)
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
IC17HdK-MY201aPh/IC17L-k0
A375-MY201aPh/B167-LamLib
A375-SCF041aPh/B167-LamLib
A375-SCF043aPh/B167-LamLib
A375-SCF056aPh/B167-LamLib
A375-SCF057aPh/B167-LamLib
A375-SCF059aPh/B167-LamLib
ATPなし
250μM ATP

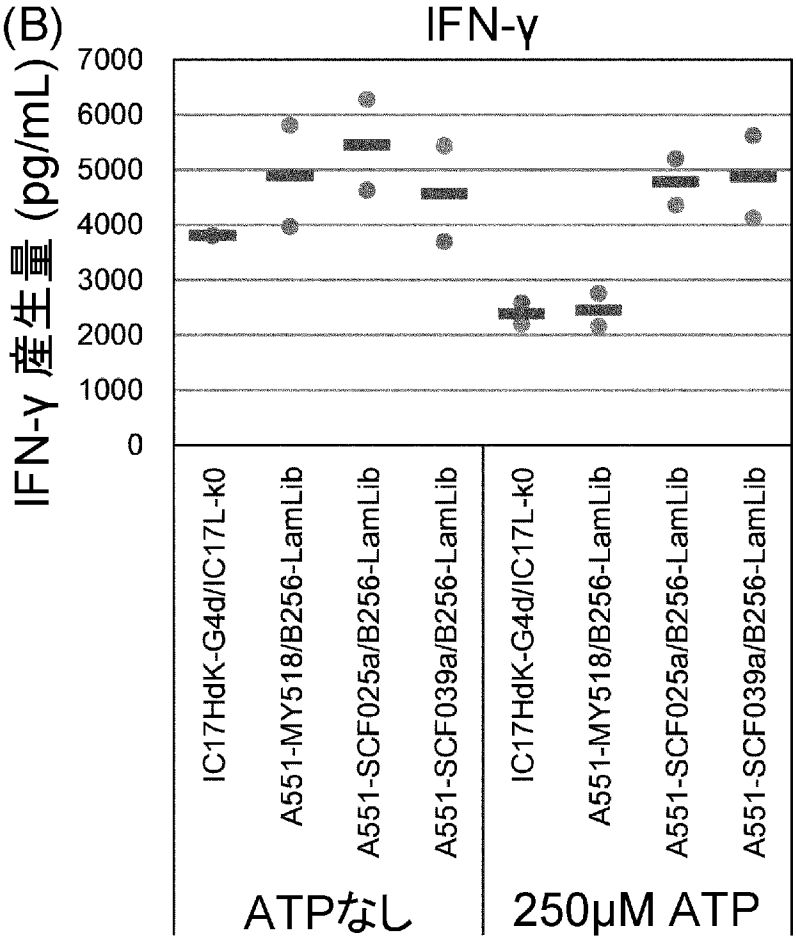
[図18]


(A)
IL-2
IL-2 産生量 (pg/mL)
140
120
100
80
60
40
20
0
IC17HdK-MY201/IC17L-k0
A551-SCF041a/B256-LamLib
A551-SCF056a/B256-LamLib
A551-SCF057a/B256-LamLib
A551-SCF059a/B256-LamLib
A551-SCF056aPh/B256-LamLib
A551-SCF057aPh/B256-LamLib
A551-SCF059aPh/B256-LamLib
ATPなし
250μM ATP

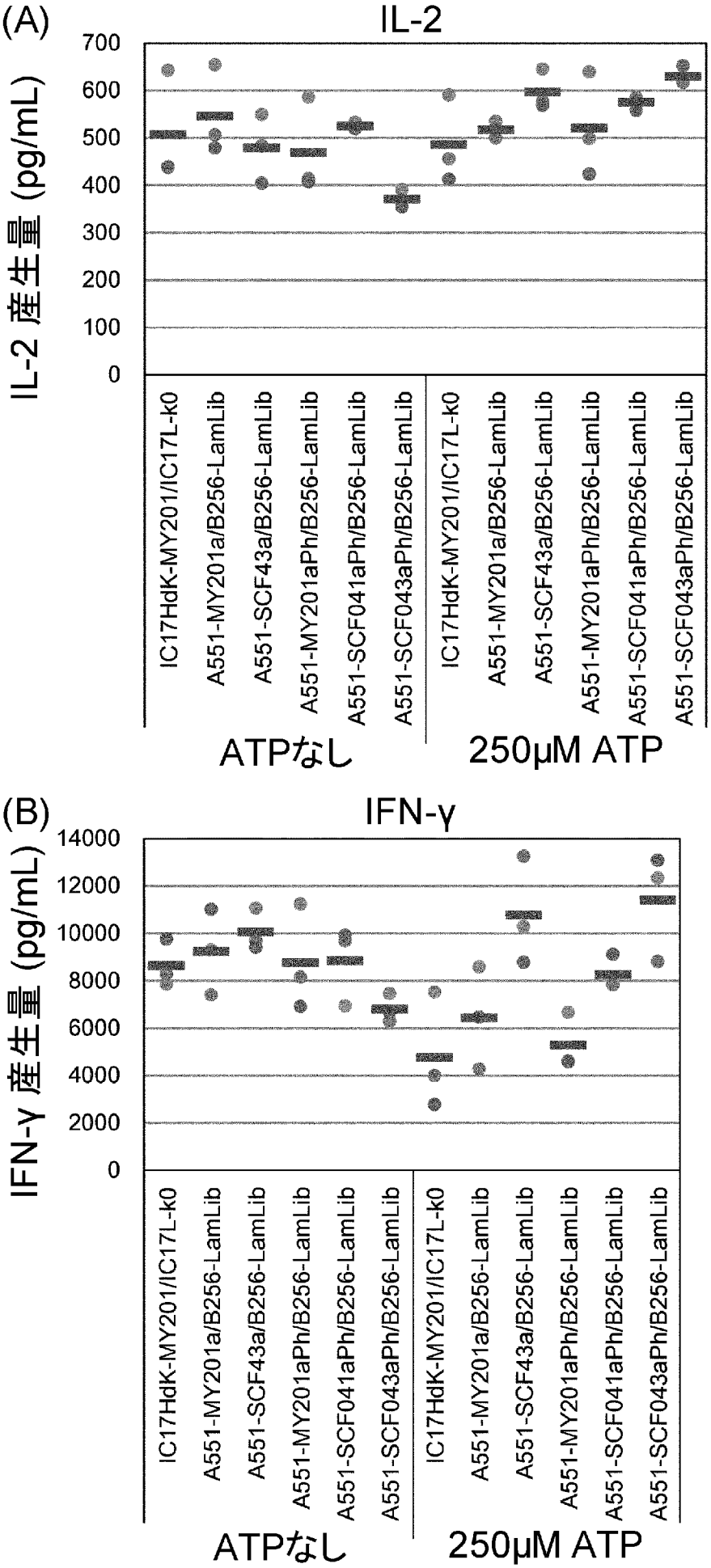

(B)
IFN-γ
IFN-γ 産生量 (pg/mL)
800
700
600
500
400
300
200
100
0
IC17HdK-MY201/IC17L-k0
A551-SCF041a/B256-LamLib
A551-SCF056a/B256-LamLib
A551-SCF057a/B256-LamLib
A551-SCF059a/B256-LamLib
A551-SCF056aPh/B256-LamLib
A551-SCF057aPh/B256-LamLib
A551-SCF059aPh/B256-LamLib
ATPなし
250μM ATP

[図19]

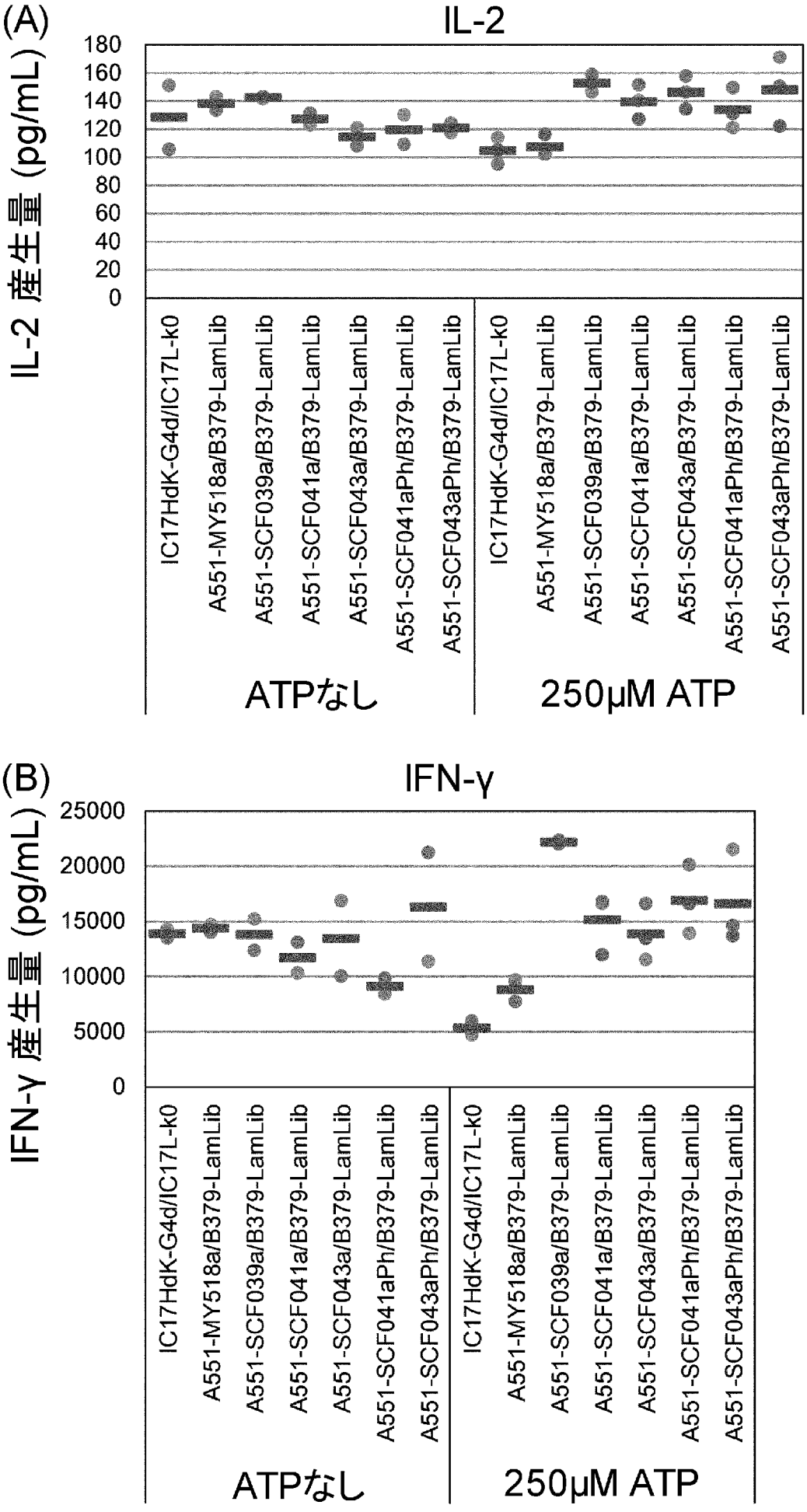

(A)
IL-2
IL-2 産生量 (pg/mL)
350
300
250
200
150
100
50
0
IC17HdK-G4d/IC17L-k0
A551-MY518/B256-LamLib
A551-SCF025a/B256-LamLib
A551-SCF039a/B256-LamLib
IC17HdK-G4d/IC17L-k0
A551-MY518/B256-LamLib
A551-SCF025a/B256-LamLib
A551-SCF039a/B256-LamLib
ATPなし
250μM ATP


(B)
IFN-γ
IFN-γ 産生量 (pg/mL)
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
IC17HdK-G4d/IC17L-k0
A551-MY518/B256-LamLib
A551-SCF025a/B256-LamLib
A551-SCF039a/B256-LamLib
IC17HdK-G4d/IC17L-k0
A551-MY518/B256-LamLib
A551-SCF025a/B256-LamLib
A551-SCF039a/B256-LamLib
ATPなし
250μM ATP

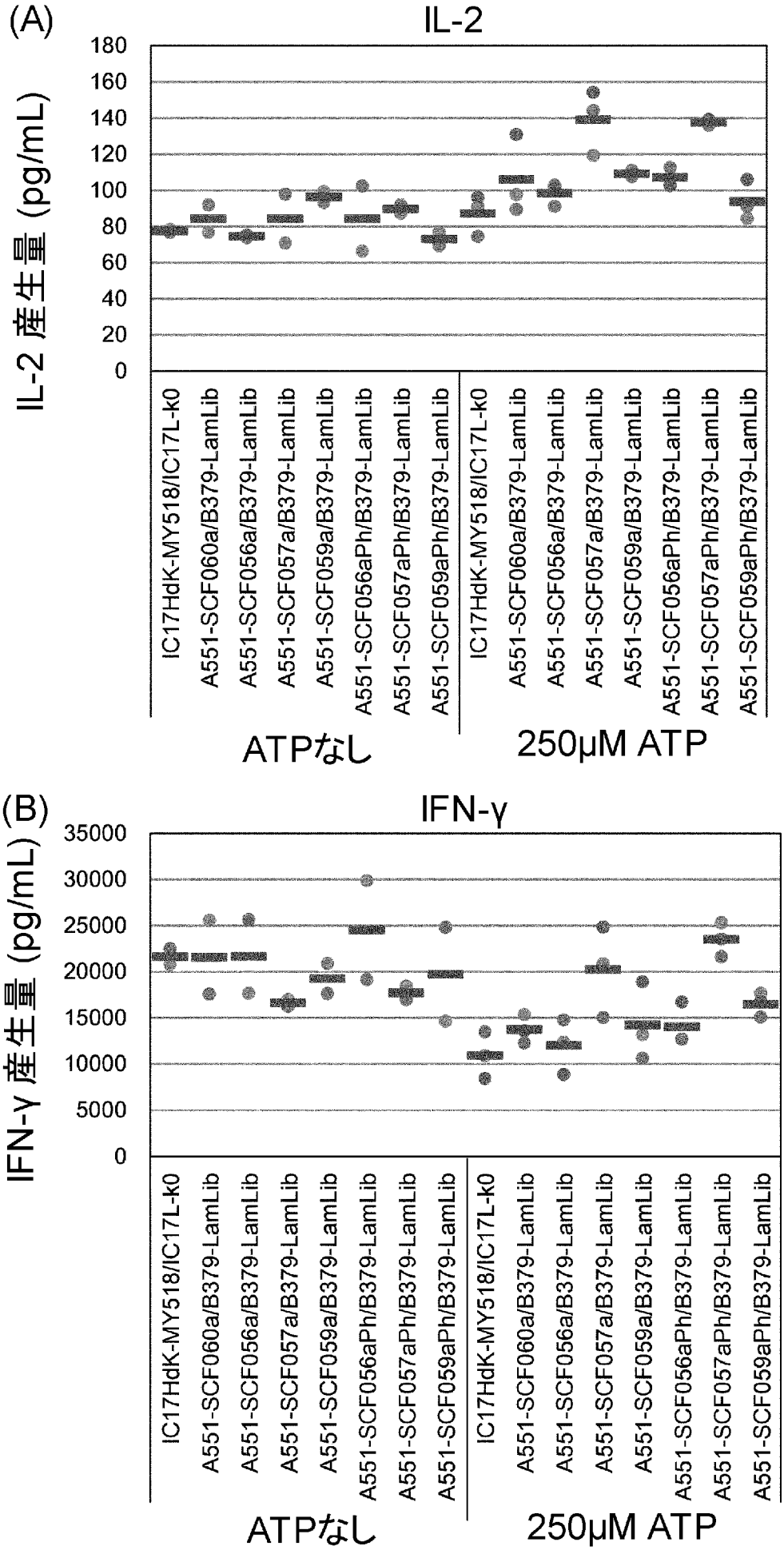
[図20]


(A)
IL-2
IL-2 産生量 (pg/mL)
700
600
500
400
300
200
100
0
IC17HdK-MY201/IC17L-k0
A551-MY201a/B256-LamLib
A551-SCF43a/B256-LamLib
A551-MY201aPh/B256-LamLib
A551-SCF041aPh/B256-LamLib
A551-SCF043aPh/B256-LamLib
ATPなし
250μM ATP
(B)
IFN-γ
IFN-γ 産生量 (pg/mL)
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0

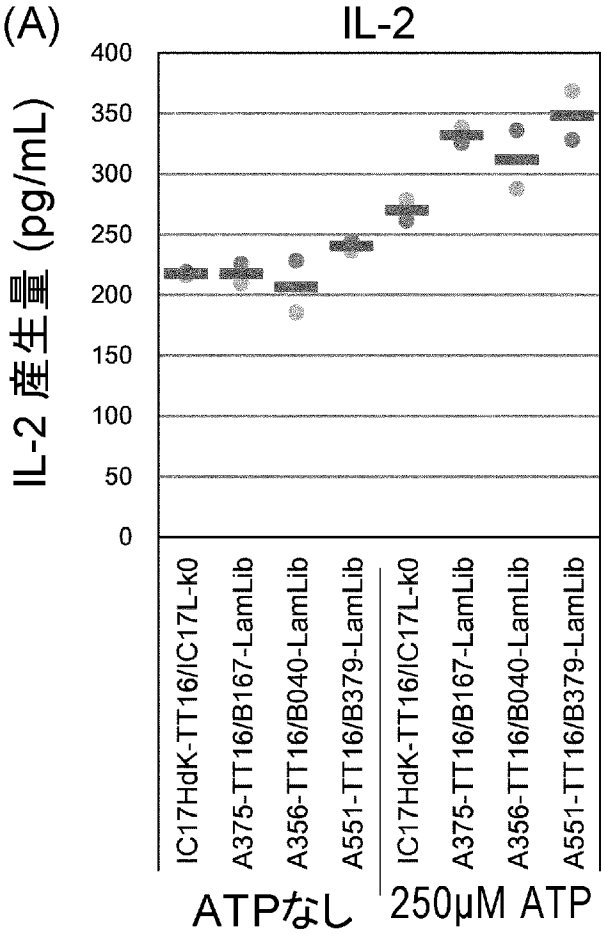
[図21]

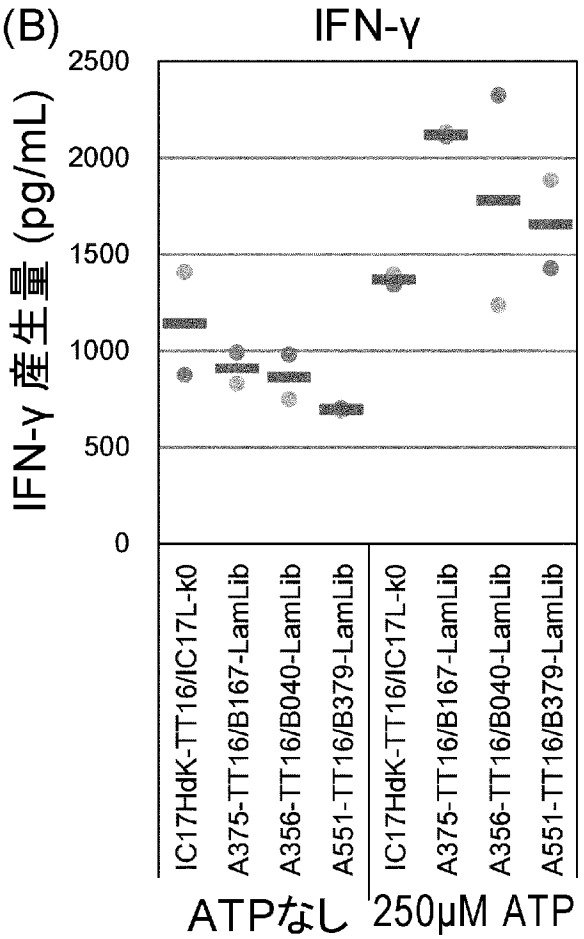

(A)
IL-2
IL-2 産生量 (pg/mL)
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
IC17HdK-G4d/IC17L-k0
A551-MY518a/B379-LamLib
A551-SCF039a/B379-LamLib
A551-SCF041a/B379-LamLib
A551-SCF043a/B379-LamLib
A551-SCF041aPh/B379-LamLib
A551-SCF043aPh/B379-LamLib
ATPなし
250μM ATP
(B)
IFN-γ
IFN-γ 産生量 (pg/mL)
25000
20000
15000
10000
5000
0
IC17HdK-G4d/IC17L-k0
A551-MY518a/B379-LamLib
A551-SCF039a/B379-LamLib
A551-SCF041a/B379-LamLib
A551-SCF043a/B379-LamLib
A551-SCF041aPh/B379-LamLib
A551-SCF043aPh/B379-LamLib
ATPなし
250μM ATP

[図22]

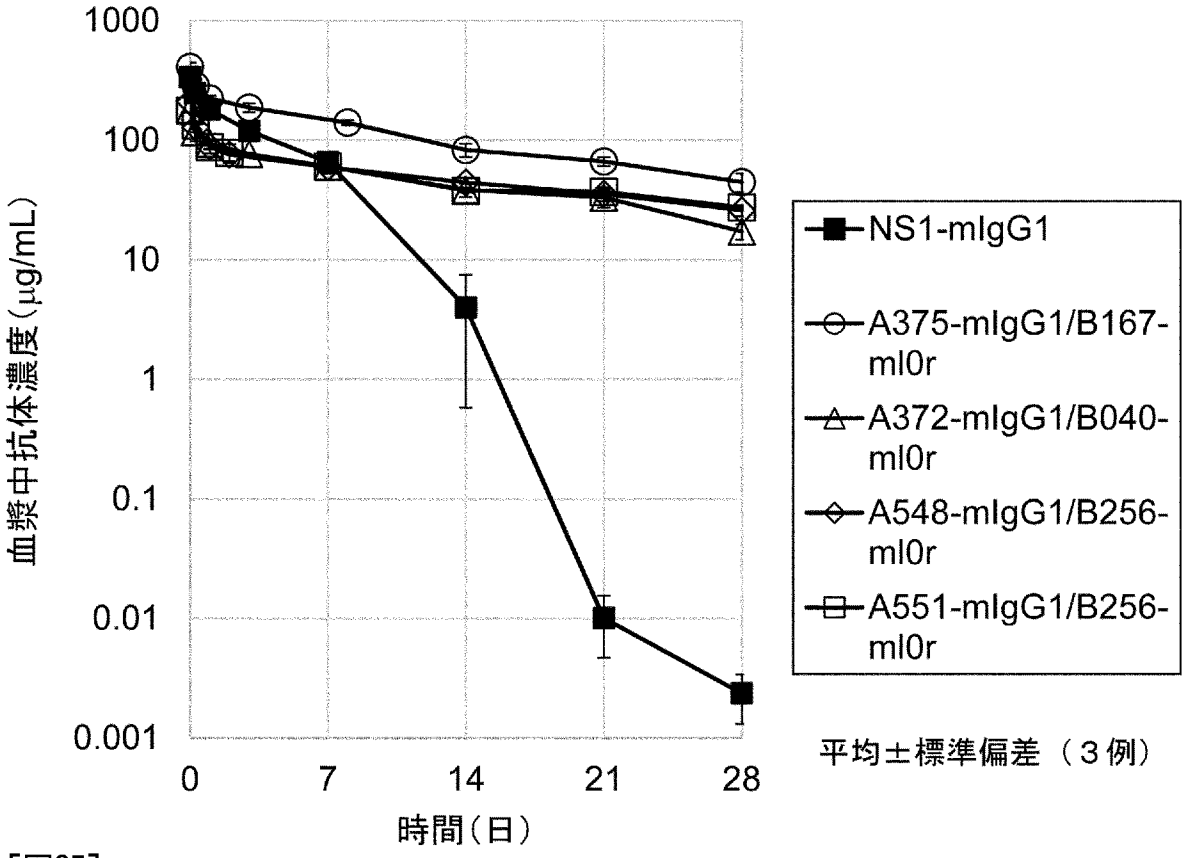

(A)
IL-2
IL-2 産生量 (pg/mL)
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
IC17HdK-MY518/IC17L-k0
A551-SCF060a/B379-LamLib
A551-SCF056a/B379-LamLib
A551-SCF057a/B379-LamLib
A551-SCF059a/B379-LamLib
A551-SCF056aPh/B379-LamLib
A551-SCF057aPh/B379-LamLib
A551-SCF059aPh/B379-LamLib
ATPなし
250μM ATP
(B)
IFN-γ
IFN-γ 産生量 (pg/mL)
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
IC17HdK-MY518/IC17L-k0
A551-SCF060a/B379-LamLib
A551-SCF056a/B379-LamLib
A551-SCF057a/B379-LamLib
A551-SCF059a/B379-LamLib
A551-SCF056aPh/B379-LamLib
A551-SCF057aPh/B379-LamLib
A551-SCF059aPh/B379-LamLib
ATPなし
250μM ATP

[図23]

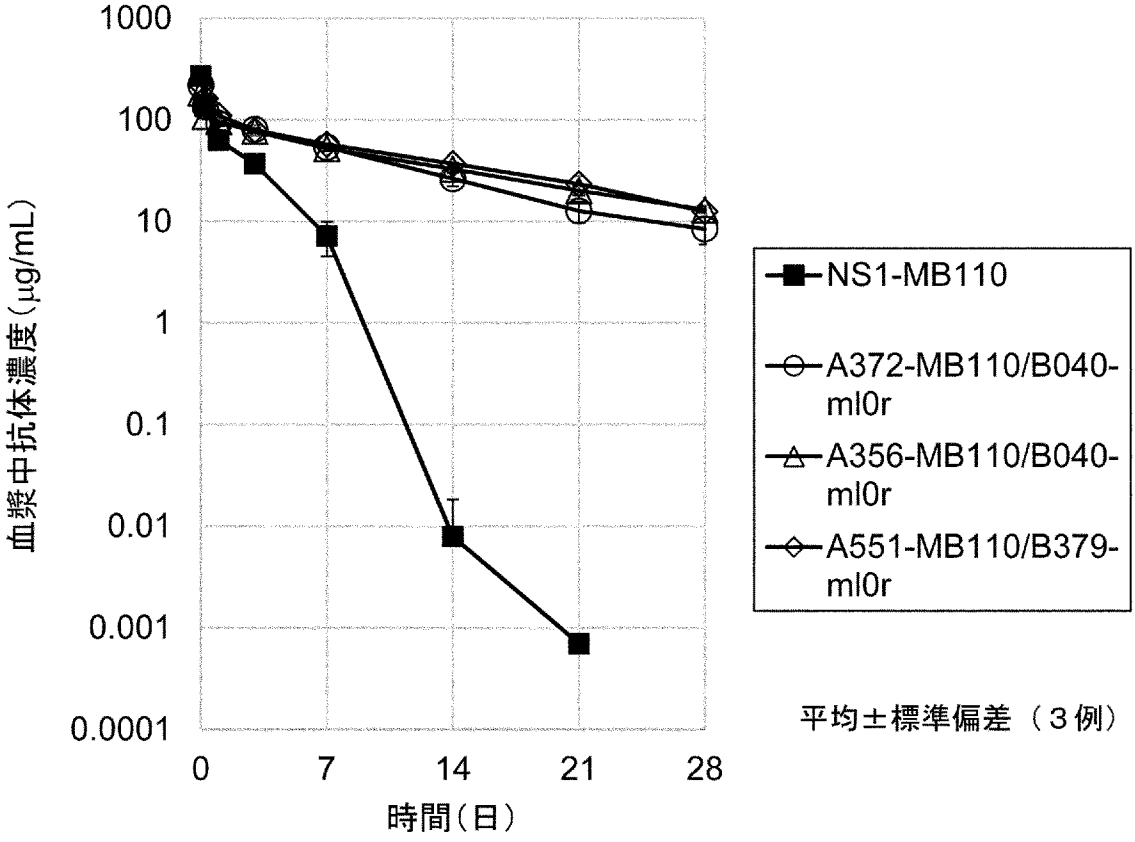

(A)
IL-2
IL-2 産生量 (pg/mL)
400
350
300
250
200
150
100
50
0
IC17HdK-TT16/IC17L-k0
A375-TT16/B167-LamLib
A356-TT16/B040-LamLib
A551-TT16/B379-LamLib
IC17HdK-TT16/IC17L-k0
A375-TT16/B167-LamLib
A356-TT16/B040-LamLib
A551-TT16/B379-LamLib
ATPなし
250μM ATP


(B)
IFN-γ
IFN-γ 産生量 (pg/mL)
2500
2000
1500
1000
500
0
IC17HdK-TT16/IC17L-k0
A375-TT16/B167-LamLib
A356-TT16/B040-LamLib
A551-TT16/B379-LamLib
IC17HdK-TT16/IC17L-k0
A375-TT16/B167-LamLib
A356-TT16/B040-LamLib
A551-TT16/B379-LamLib
ATPなし
250μM ATP

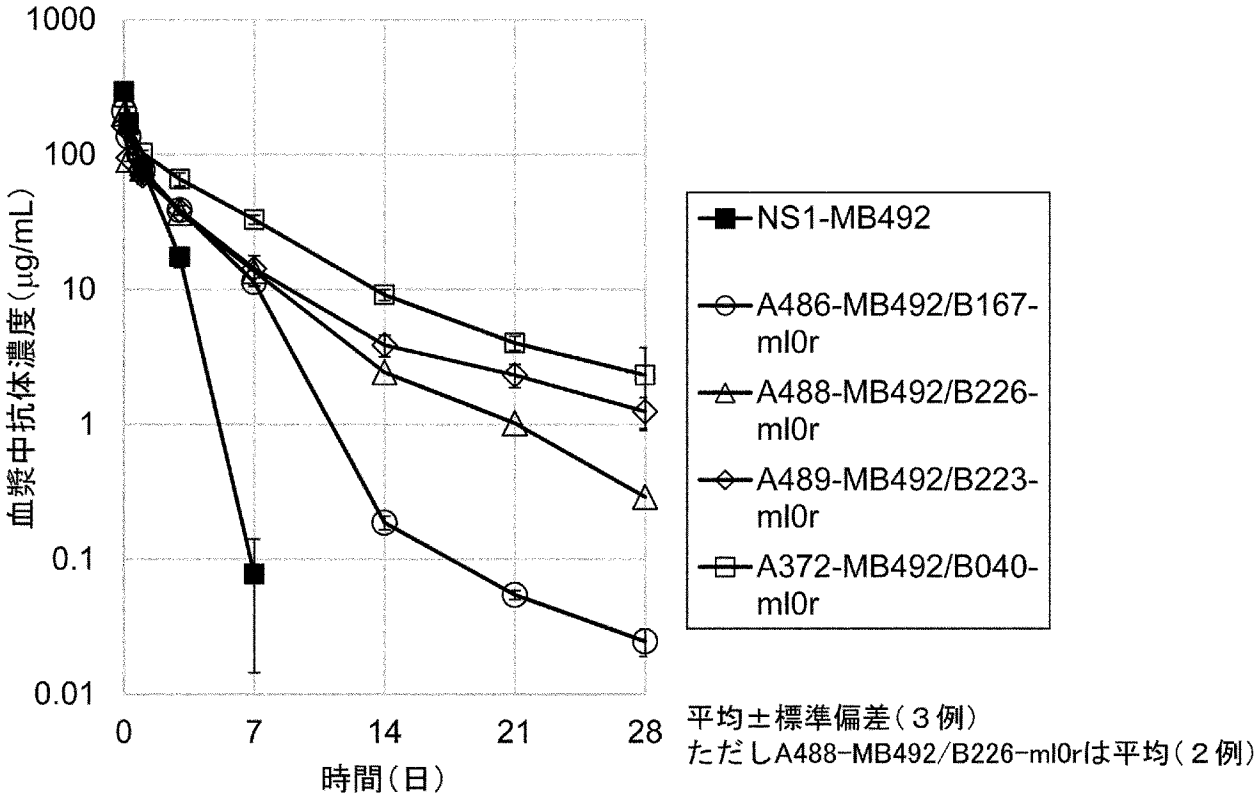
[図24]


1000
100
10
1
0.1
0.01
0.001
血漿中抗体濃度（μg/mL）
0
7
14
21
28
時間（日）
NS1-mIgG1
A375-mIgG1/B167-mI0r
A372-mIgG1/B040-mI0r
A548-mIgG1/B256-mI0r
A551-mIgG1/B256-mI0r
平均±標準偏差（３例）

[図25]

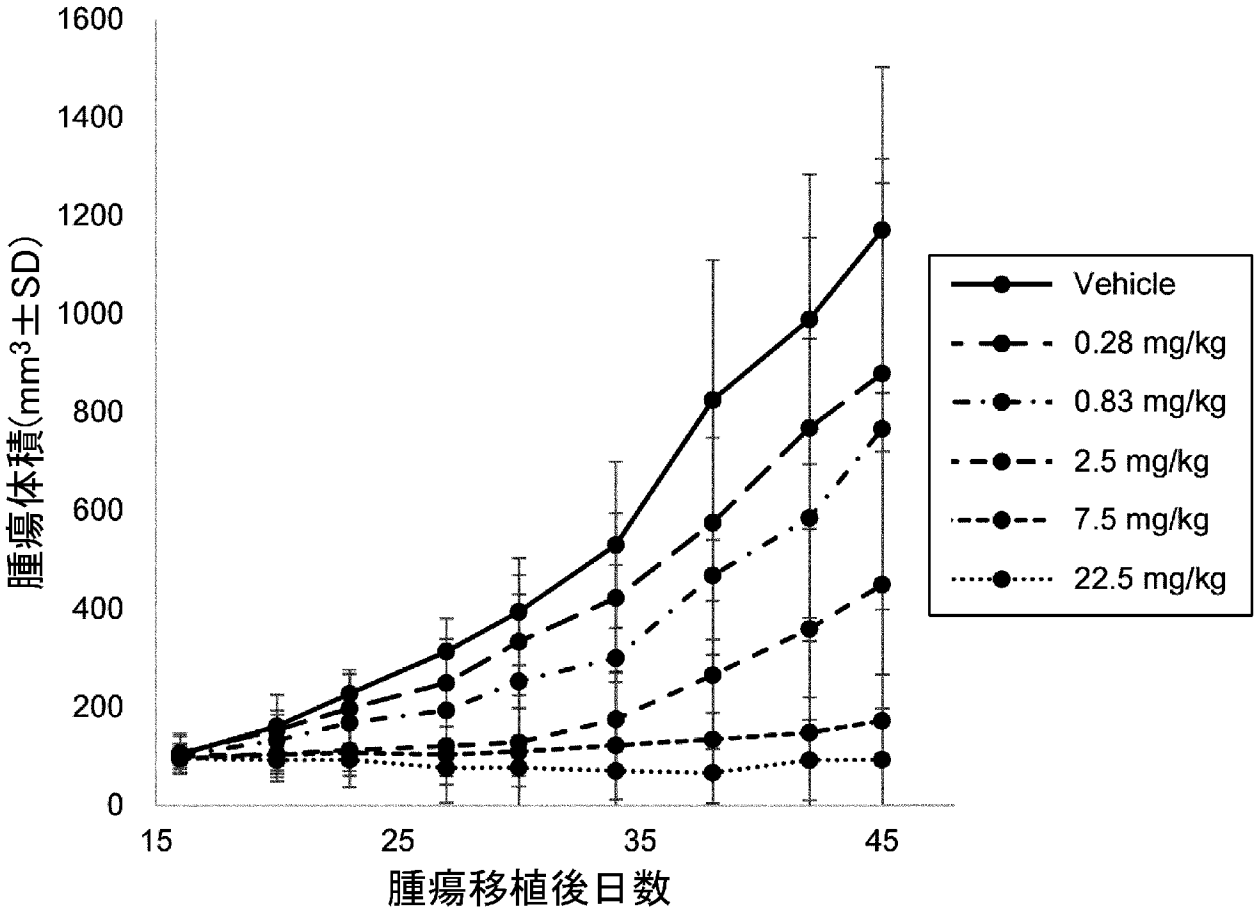

1000
100
10
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
血漿中抗体濃度（μg/mL）
0
7
14
21
28
時間（日）
NS1-MB110
A372-MB110/B040-mI0r
A356-MB110/B040-mI0r
A551-MB110/B379-mI0r
平均±標準偏差（３例）

[図26]

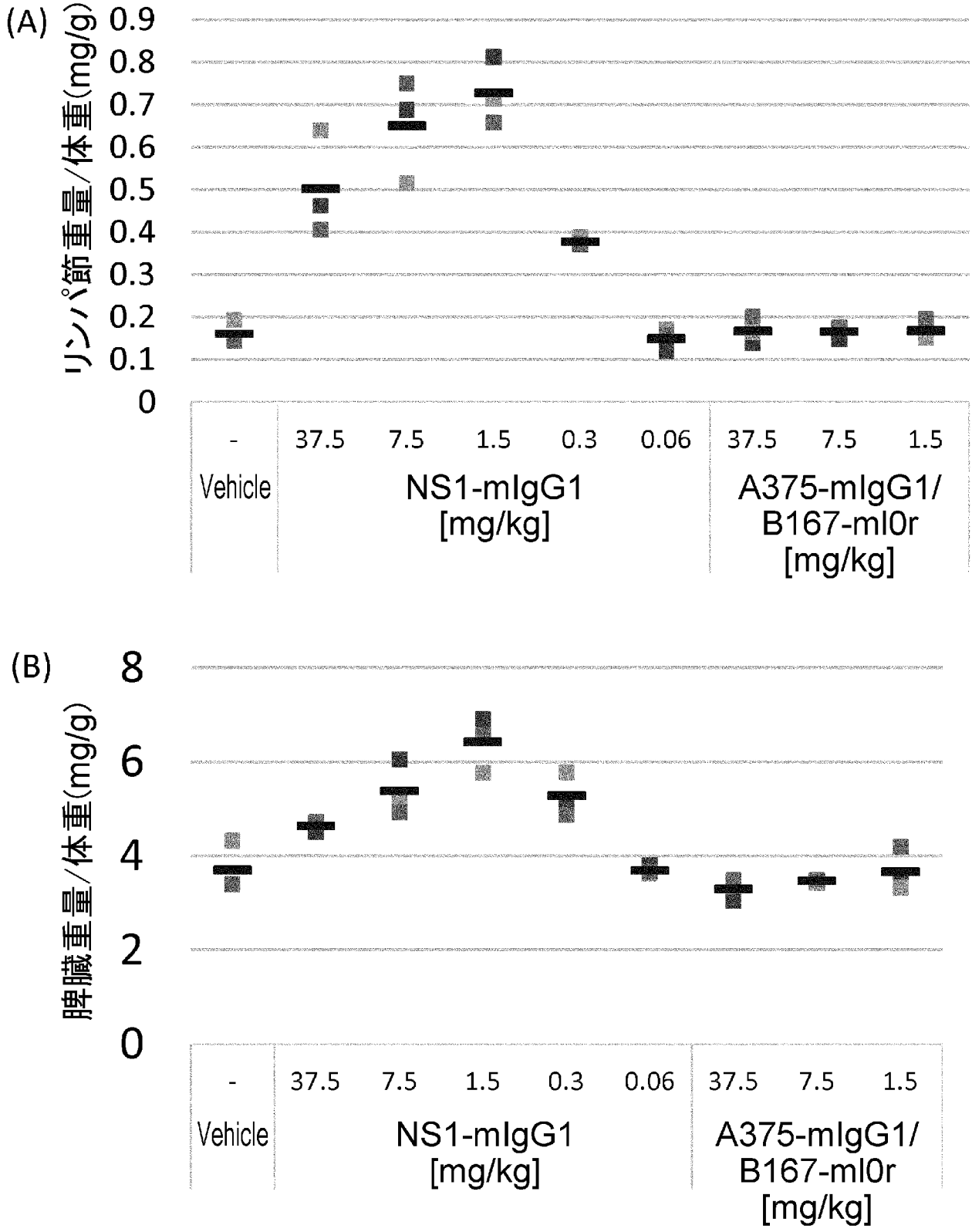


平均±標準偏差（３例）
ただしA488-MB492/B226-ml0rは平均（２例）

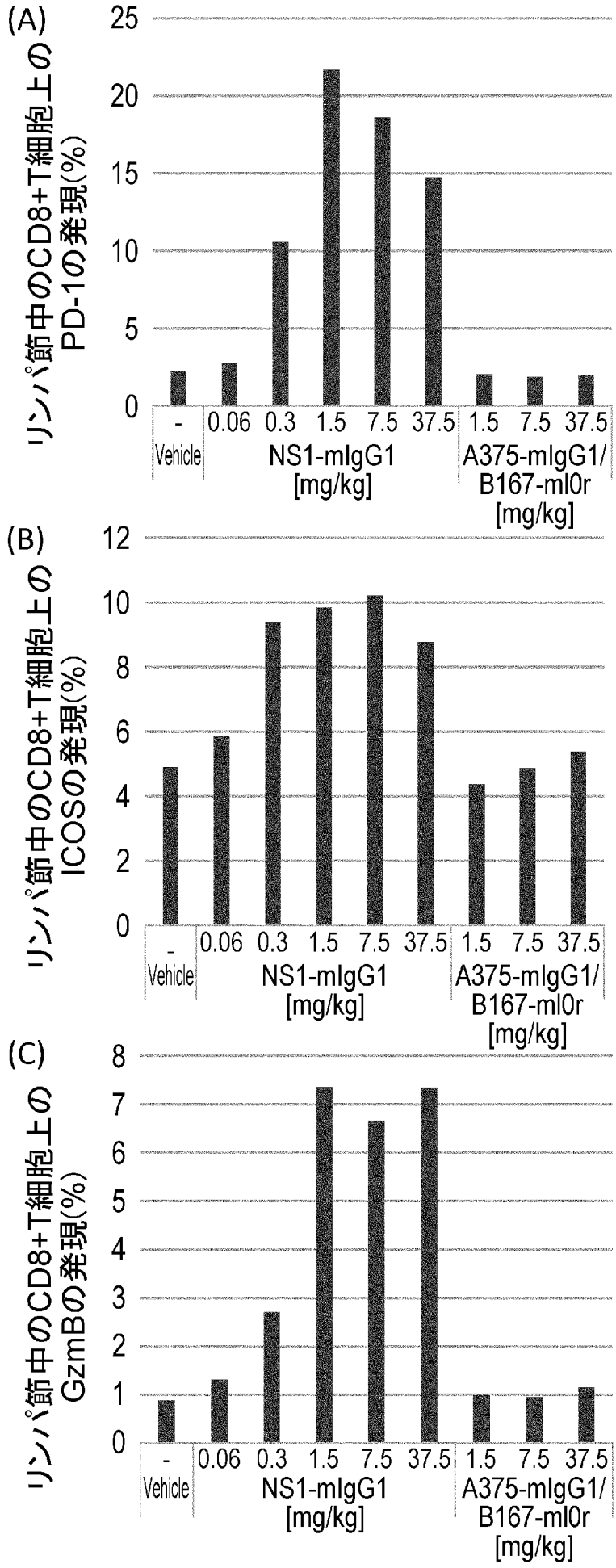
[図27]



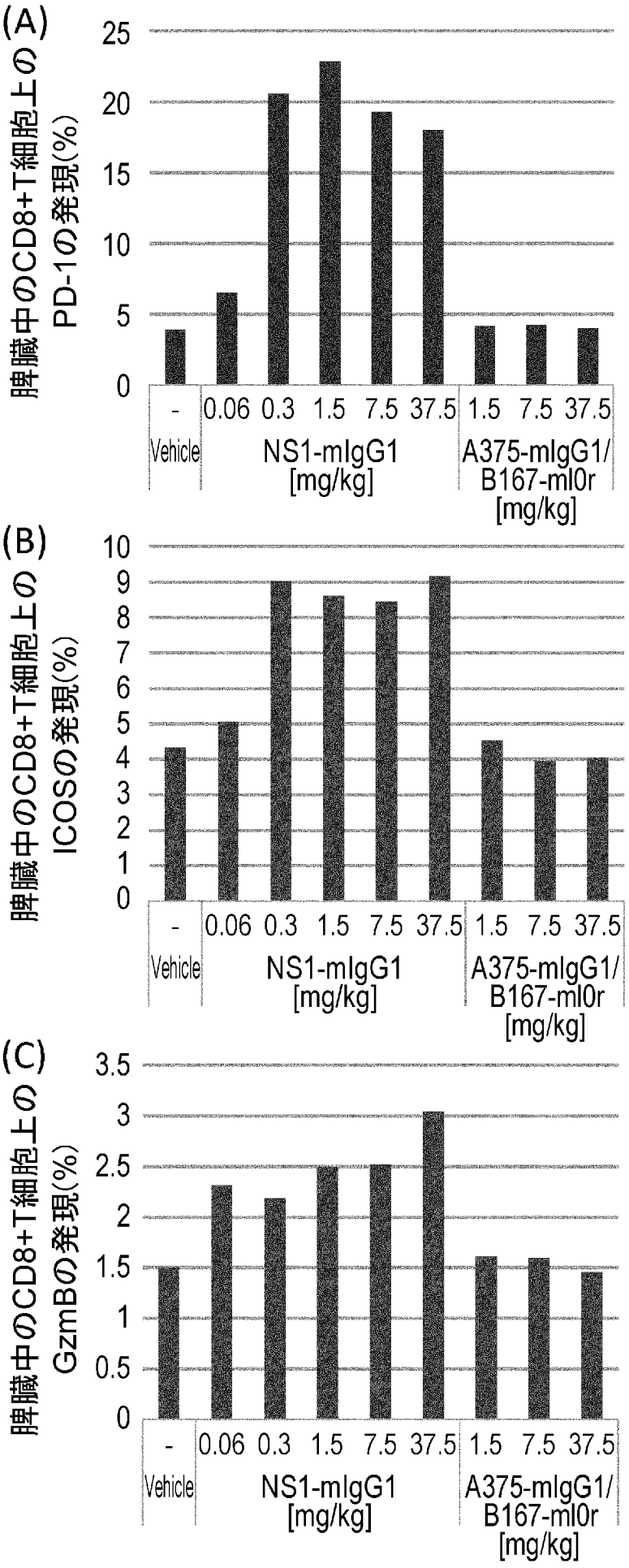
[図28]


(A)
リンパ節重量/体重(mg/g)
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
-
Vehicle
37.5
7.5
1.5
0.3
0.06
NS1-mIgG1
[mg/kg]
37.5
7.5
1.5
A375-mIgG1/
B167-mI0r
[mg/kg]
(B)
脾臓重量/体重(mg/g)
8
6
4
2
0
-
Vehicle
37.5
7.5
1.5
0.3
0.06
NS1-mIgG1
[mg/kg]
37.5
7.5
1.5
A375-mIgG1/
B167-mI0r
[mg/kg]

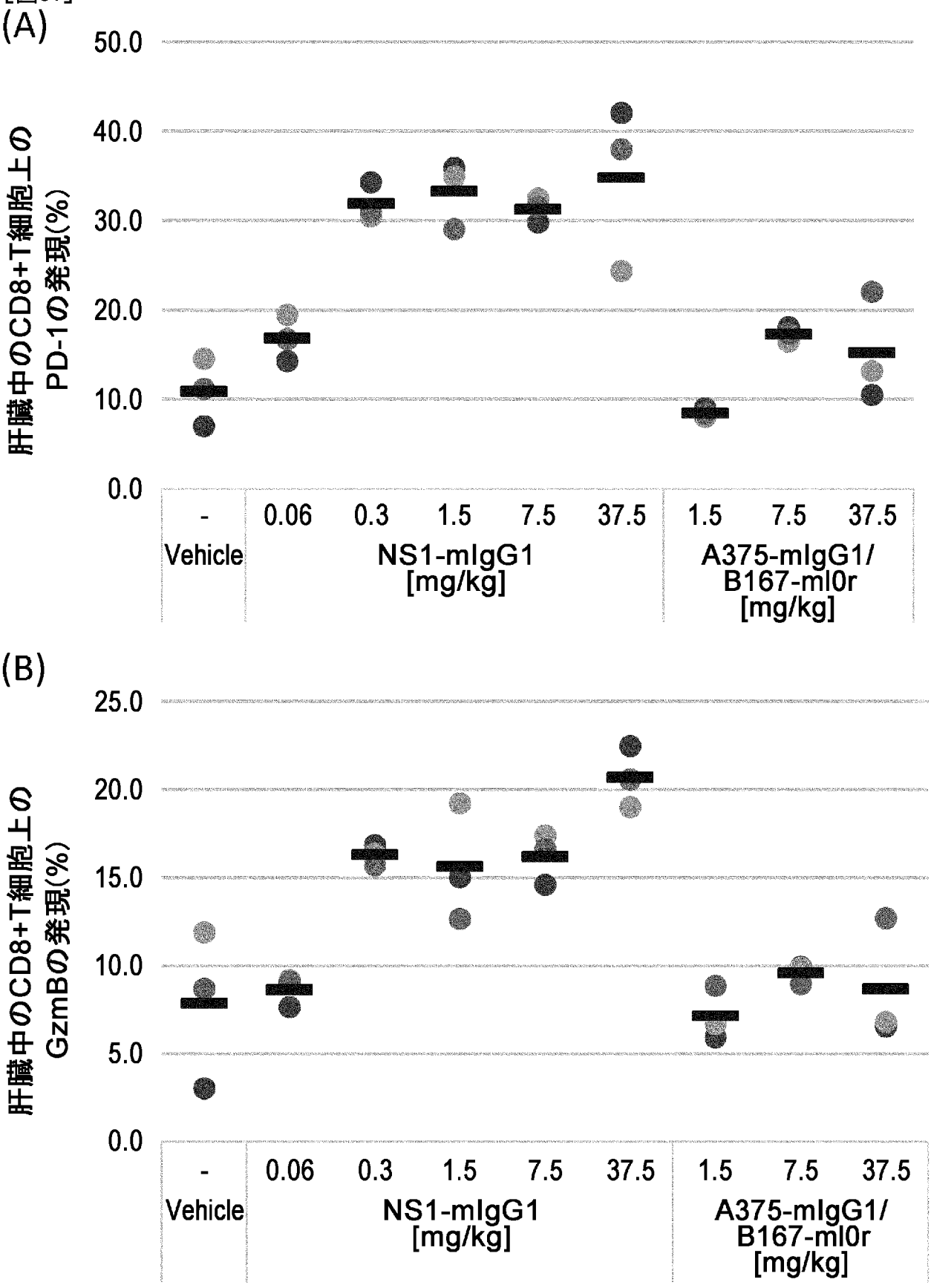
[図29]


(A)
リンパ節中のCD8+T細胞上のPD-1の発現(%)
25
20
15
10
5
0
-
Vehicle
0.06 0.3 1.5 7.5 37.5
NS1-mIgG1
[mg/kg]
1.5 7.5 37.5
A375-mIgG1/
B167-mI0r
[mg/kg]
(B)
リンパ節中のCD8+T細胞上のICOSの発現(%)
12
10
8
6
4
2
0
-
Vehicle
0.06 0.3 1.5 7.5 37.5
NS1-mIgG1
[mg/kg]
1.5 7.5 37.5
A375-mIgG1/
B167-mI0r
[mg/kg]
(C)
リンパ節中のCD8+T細胞上のGzmBの発現(%)
8
7
6
5
4
3
2
1
0
-
Vehicle
0.06 0.3 1.5 7.5 37.5
NS1-mIgG1
[mg/kg]
1.5 7.5 37.5
A375-mIgG1/
B167-mI0r
[mg/kg]

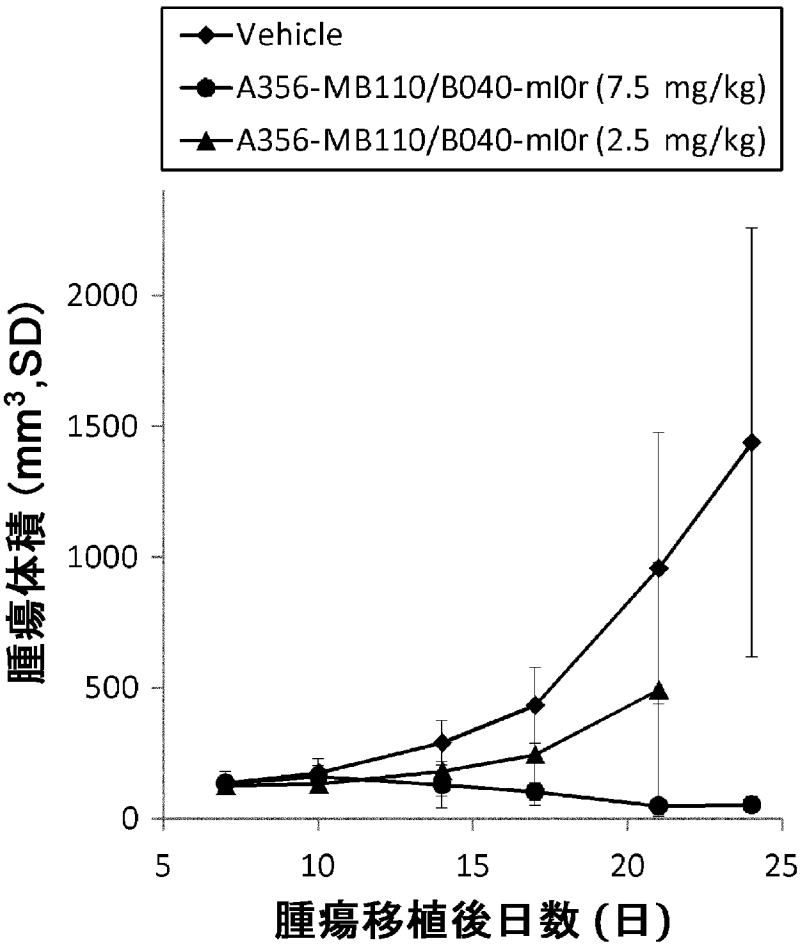
[図30]


(A)
脾臓中のCD8+T細胞上のPD-1の発現(%)
25
20
15
10
5
0
-
Vehicle
0.06 0.3 1.5 7.5 37.5
NS1-mIgG1 [mg/kg]
1.5 7.5 37.5
A375-mIgG1/B167-mI0r [mg/kg]
(B)
脾臓中のCD8+T細胞上のICOSの発現(%)
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
-
Vehicle
0.06 0.3 1.5 7.5 37.5
NS1-mIgG1 [mg/kg]
1.5 7.5 37.5
A375-mIgG1/B167-mI0r [mg/kg]
(C)
脾臓中のCD8+T細胞上のGzmBの発現(%)
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
-
Vehicle
0.06 0.3 1.5 7.5 37.5
NS1-mIgG1 [mg/kg]
1.5 7.5 37.5
A375-mIgG1/B167-mI0r [mg/kg]

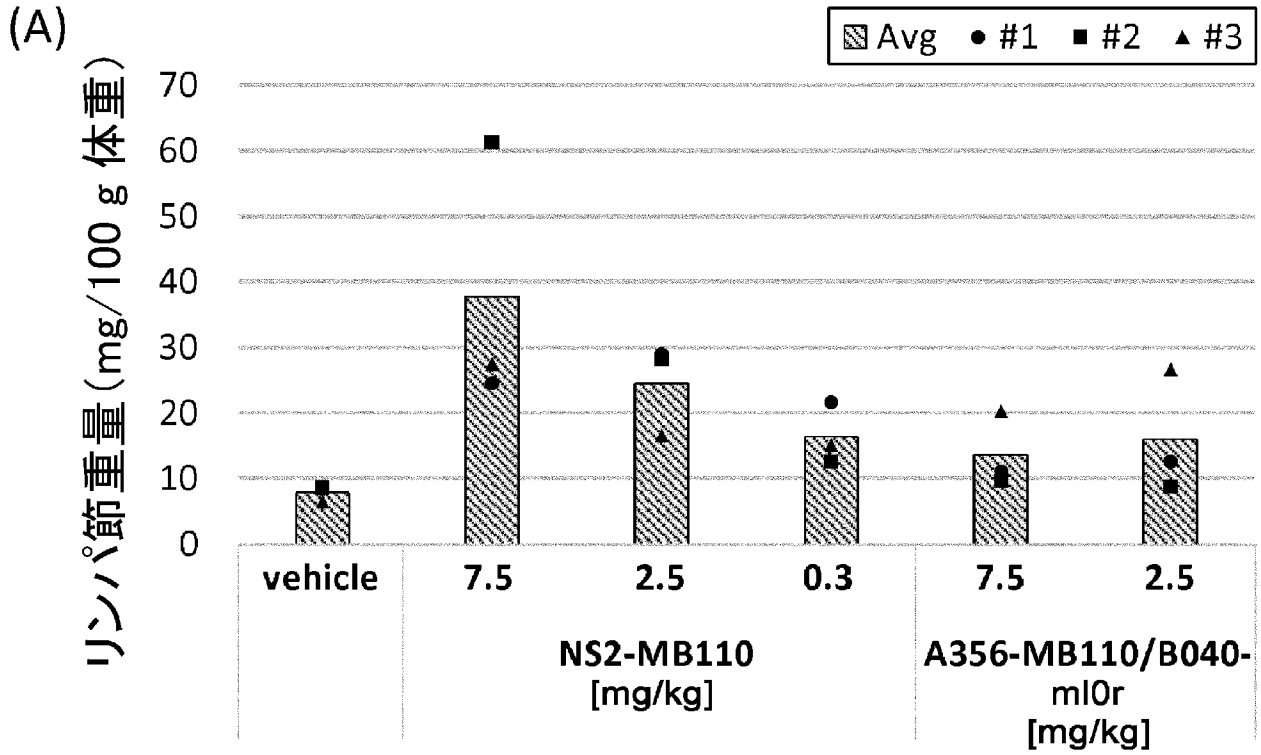
[図31]

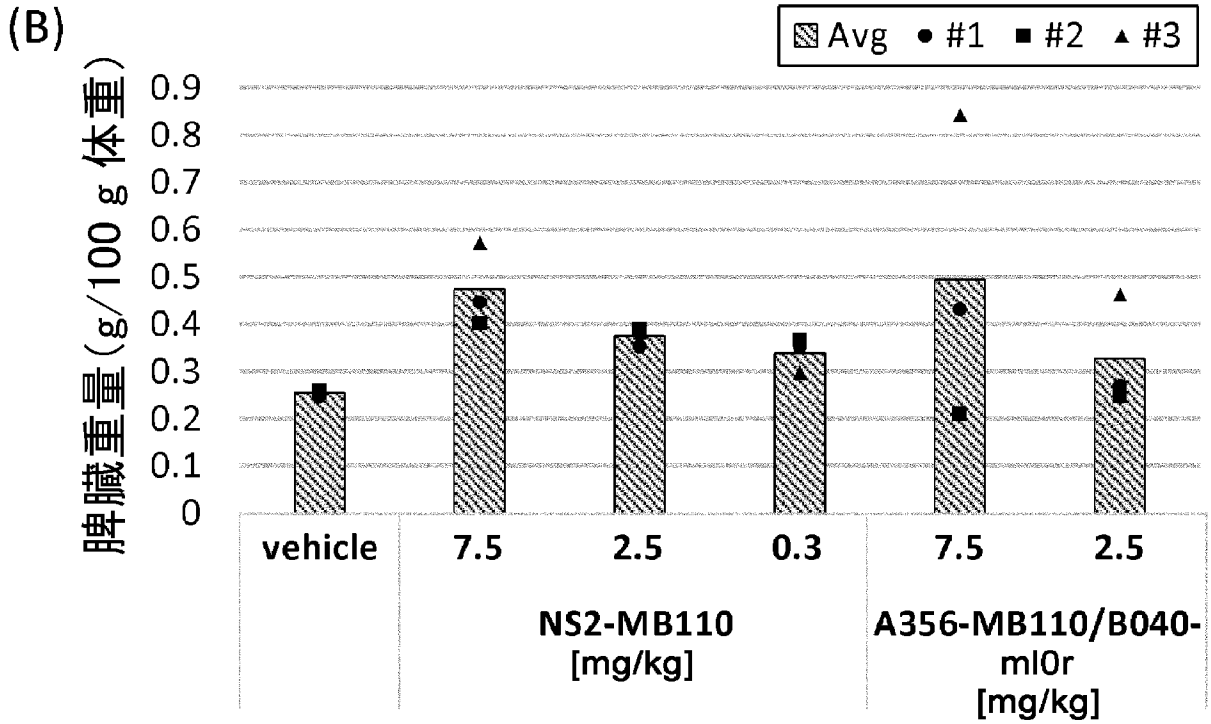

(A)
肝臓中のCD8+T細胞上のPD-1の発現(%)
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
-
Vehicle
0.06
0.3
1.5
7.5
37.5
NS1-mIgG1 [mg/kg]
1.5
7.5
37.5
A375-mIgG1/ B167-mI0r [mg/kg]
(B)
肝臓中のCD8+T細胞上のGzmBの発現(%)
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
-
Vehicle
0.06
0.3
1.5
7.5
37.5
NS1-mIgG1 [mg/kg]
1.5
7.5
37.5
A375-mIgG1/ B167-mI0r [mg/kg]

[図32]

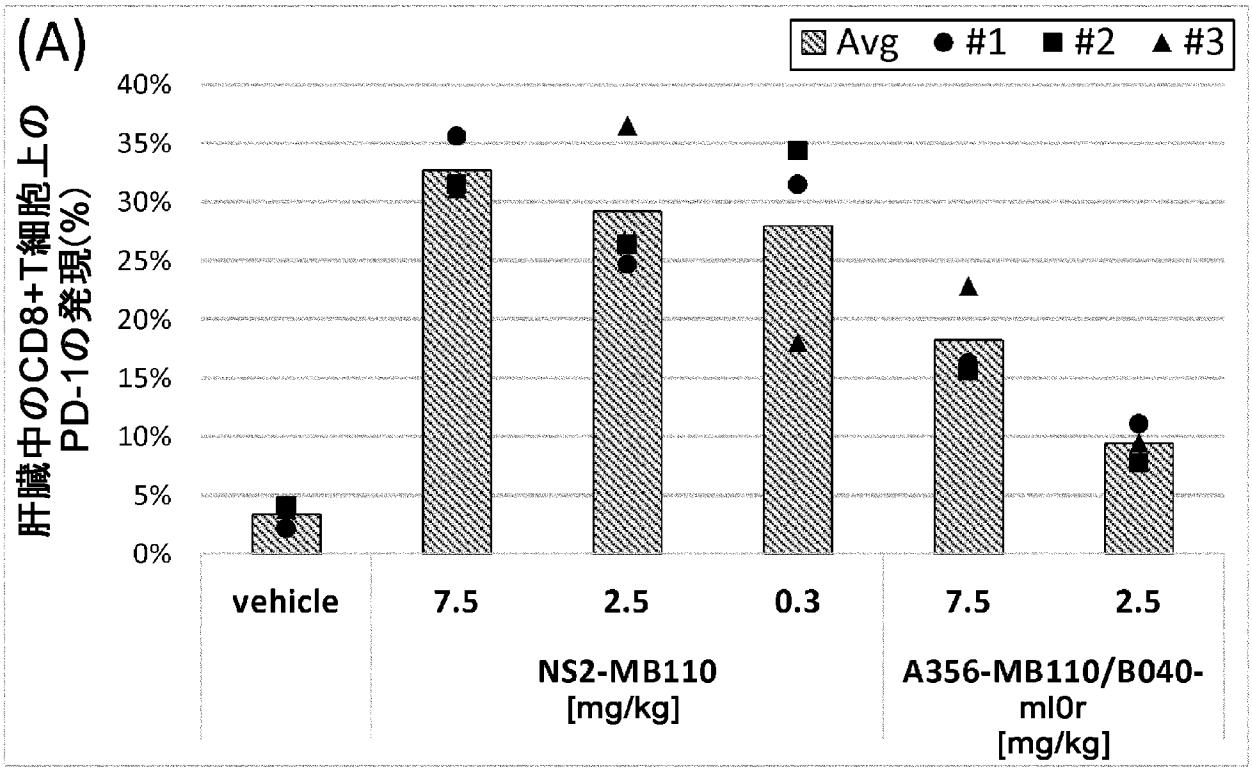

Vehicle
A356-MB110/B040-ml0r (7.5 mg/kg)
A356-MB110/B040-ml0r (2.5 mg/kg)
腫瘍体積 (mm3,SD)
2000
1500
1000
500
0
5
10
15
20
25
腫瘍移植後日数 (日)

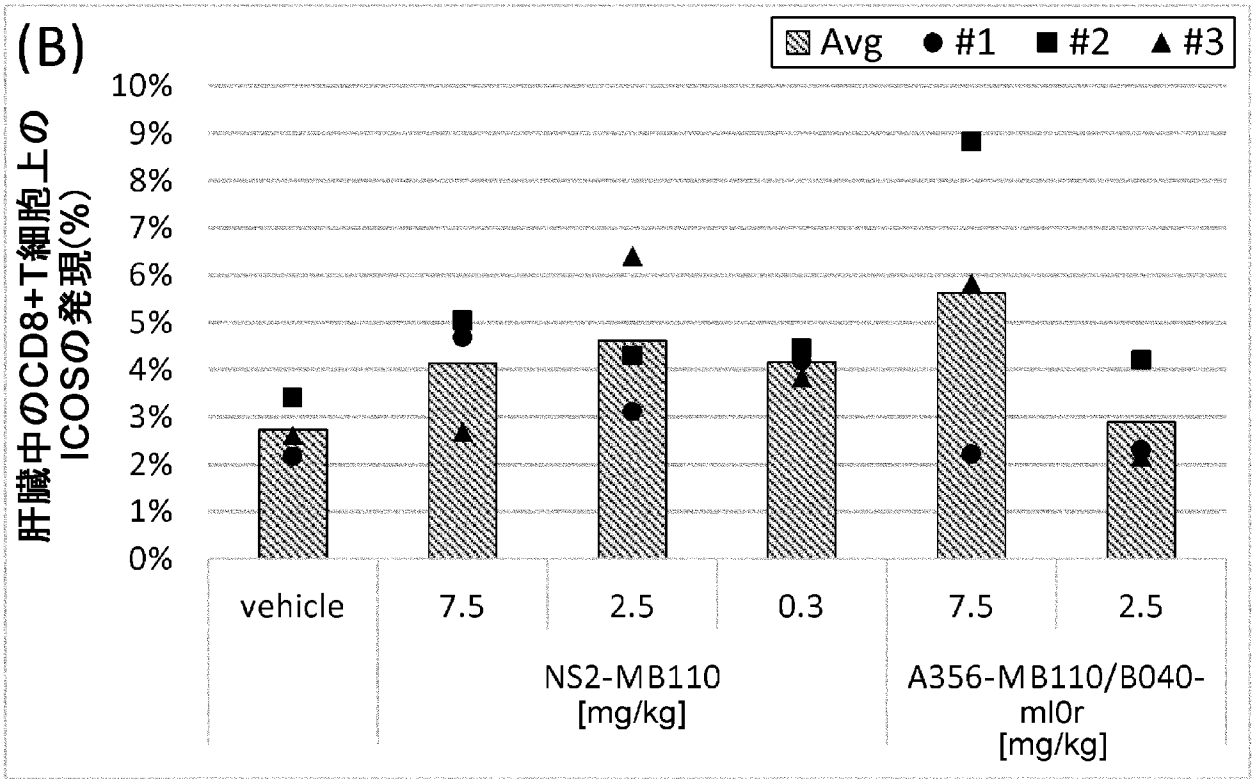
[図33]


(A)
Avg
#1
#2
#3
リンパ節重量(mg/100ｇ体重)
70
60
50
40
30
20
10
0
vehicle
7.5
2.5
0.3
7.5
2.5
NS2-MB110
[mg/kg]
A356-MB110/B040-
ml0r
[mg/kg]

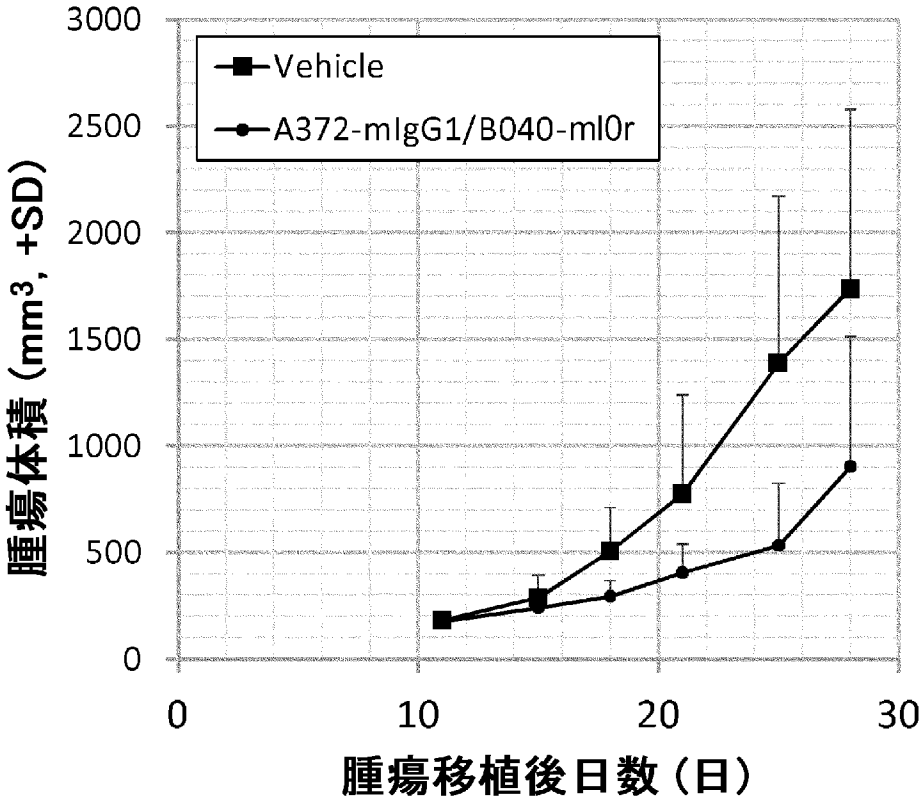

(B)
Avg
#1
#2
#3
脾臓重量(g/100ｇ体重)
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
vehicle
7.5
2.5
0.3
7.5
2.5
NS2-MB110
[mg/kg]
A356-MB110/B040-
ml0r
[mg/kg]

[図34]

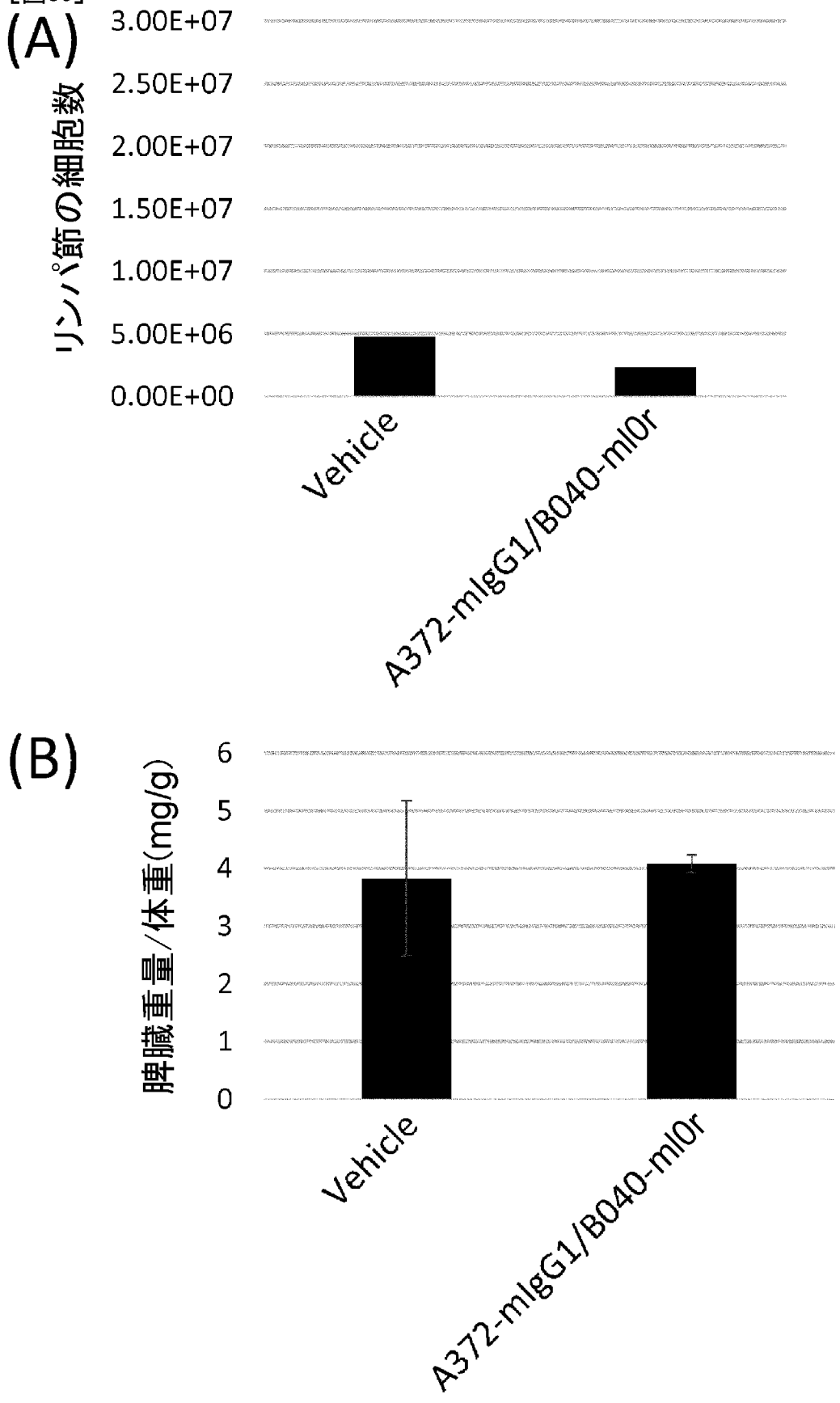

(A)
肝臓中のCD8+T細胞上のPD-1の発現(%)
Avg
#1
#2
#3
40%
35%
30%
25%
20%
15%
10%
5%
0%
vehicle
7.5
2.5
0.3
7.5
2.5
NS2-MB110 [mg/kg]
A356-MB110/B040-ml0r [mg/kg]


(B)
肝臓中のCD8+T細胞上のICOSの発現(%)
Avg
#1
#2
#3
10%
9%
8%
7%
6%
5%
4%
3%
2%
1%
0%
vehicle
7.5
2.5
0.3
7.5
2.5
NS2-MB110 [mg/kg]
A356-MB110/B040-ml0r [mg/kg]

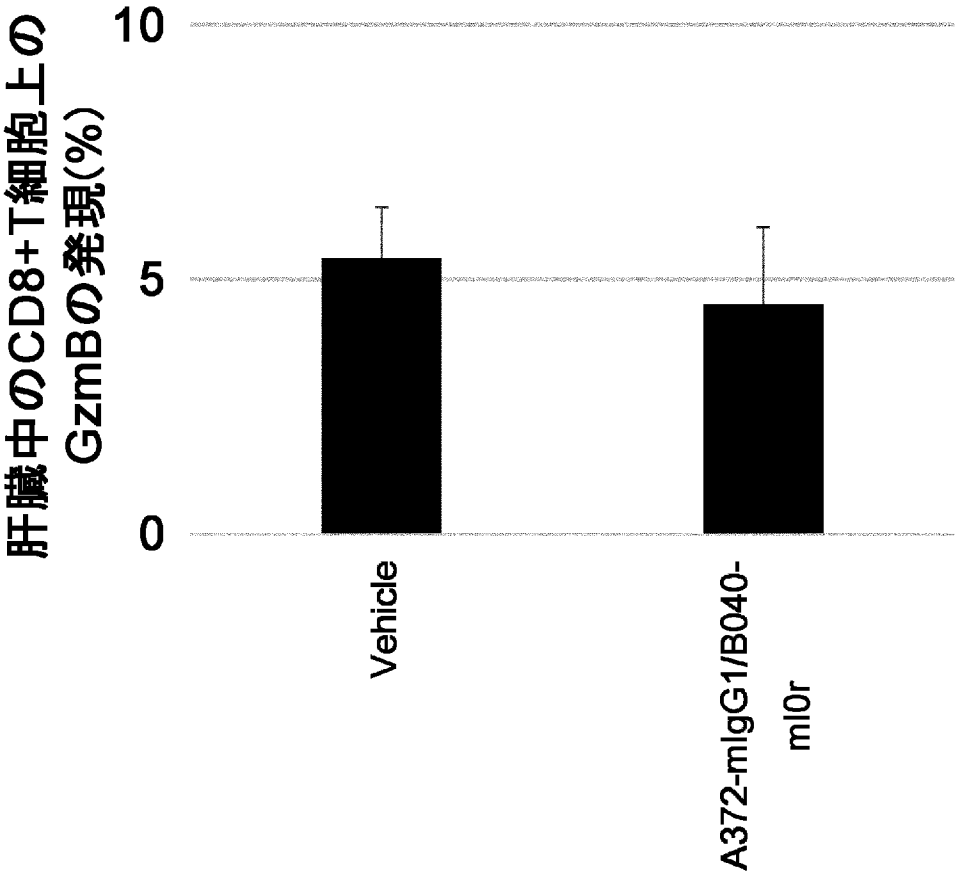
[図35]


Vehicle
A372-mIgG1/B040-ml0r
腫瘍体積（mm3, +SD）
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
腫瘍移植後日数（日）

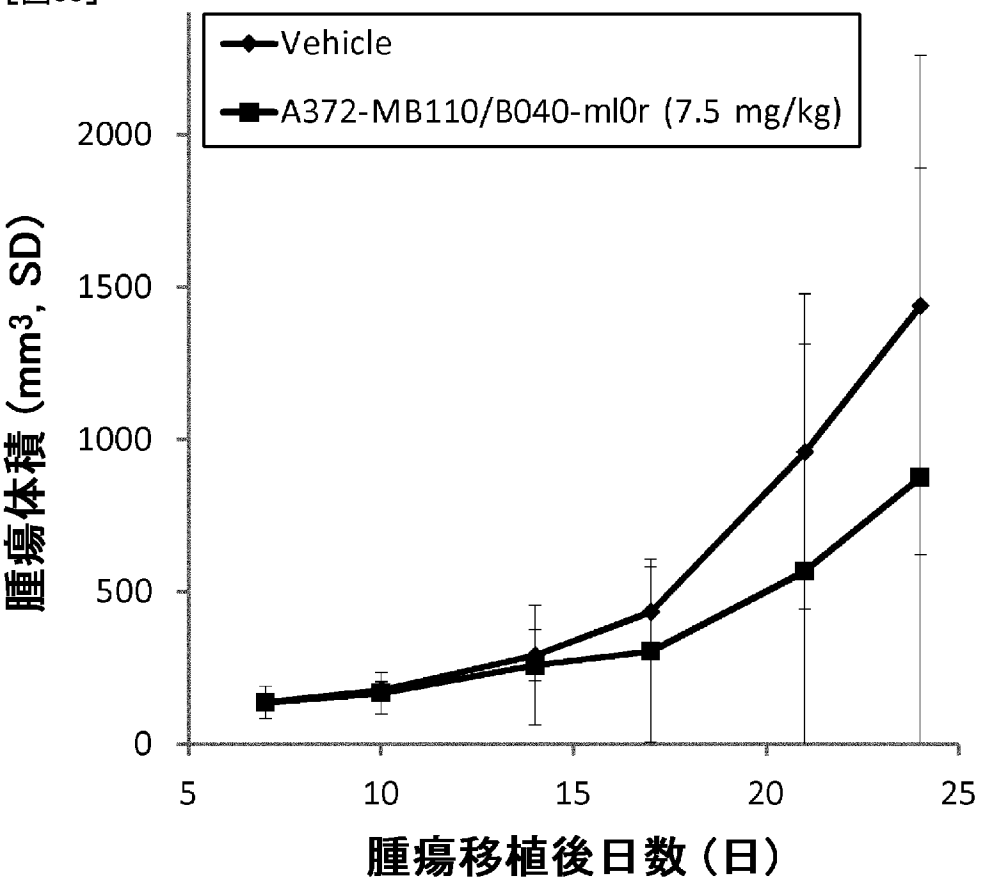
[図36]


(A)
リンパ節の細胞数
3.00E+07
2.50E+07
2.00E+07
1.50E+07
1.00E+07
5.00E+06
0.00E+00
Vehicle
A372-mIgG1/B040-mI0r
(B)
脾臓重量/体重(mg/g)
6
5
4
3
2
1
0
Vehicle
A372-mIgG1/B040-mI0r

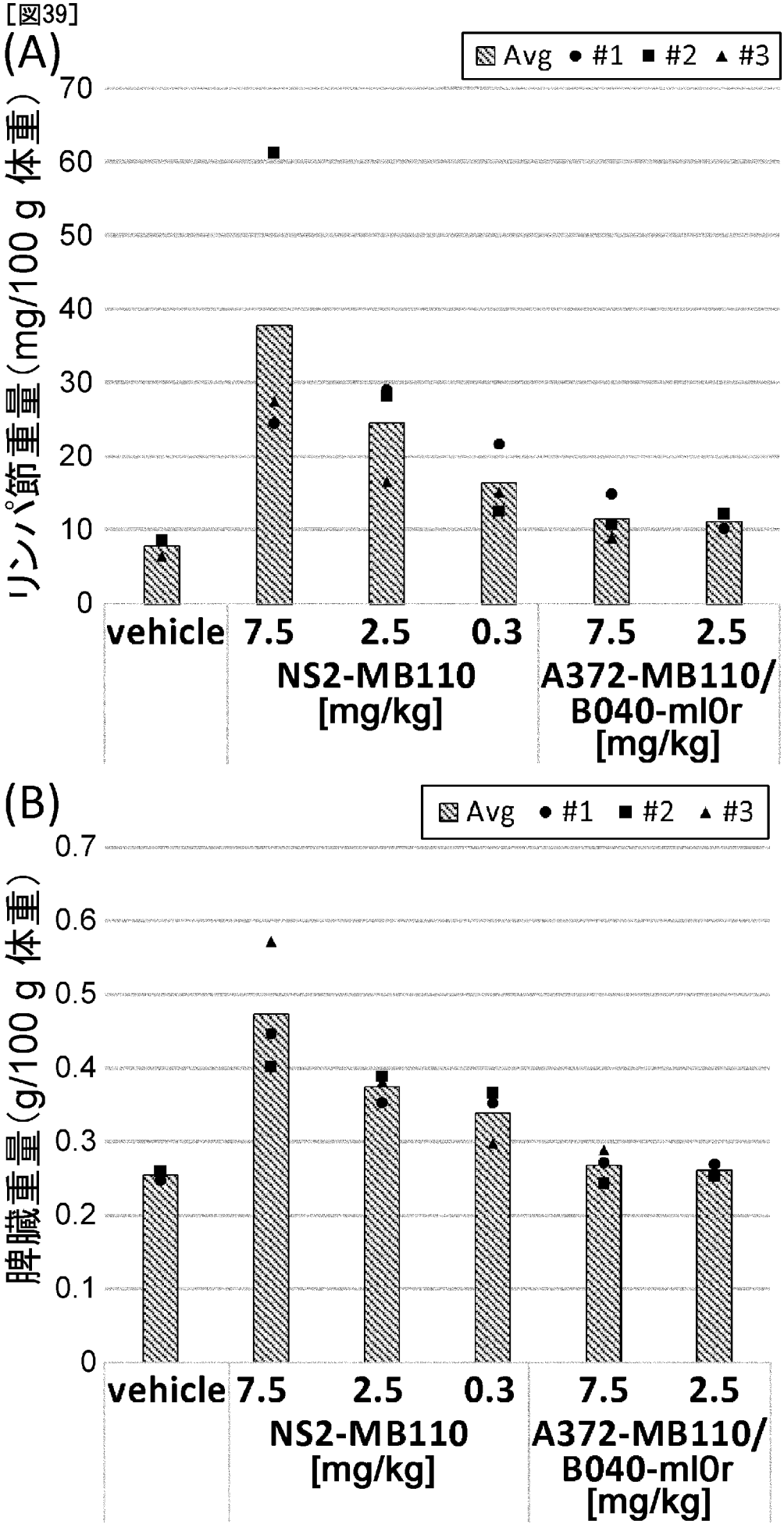
[図37]


肝臓中のCD8+T細胞上のGzmBの発現(%)
10
5
0
Vehicle
A372-mIgG1/B040-ml0r

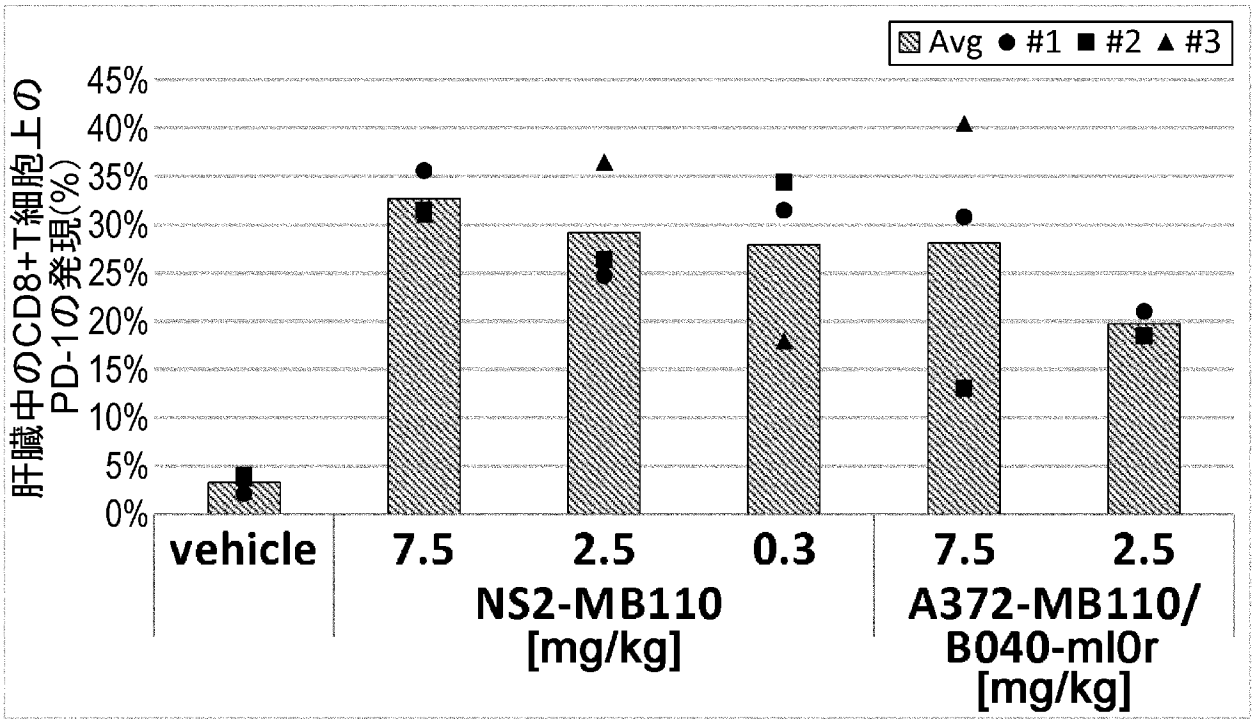
[図38]


Vehicle
A372-MB110/B040-ml0r (7.5 mg/kg)
腫瘍体積 (mm3, SD)
2000
1500
1000
500
0
5
10
15
20
25
腫瘍移植後日数 (日)

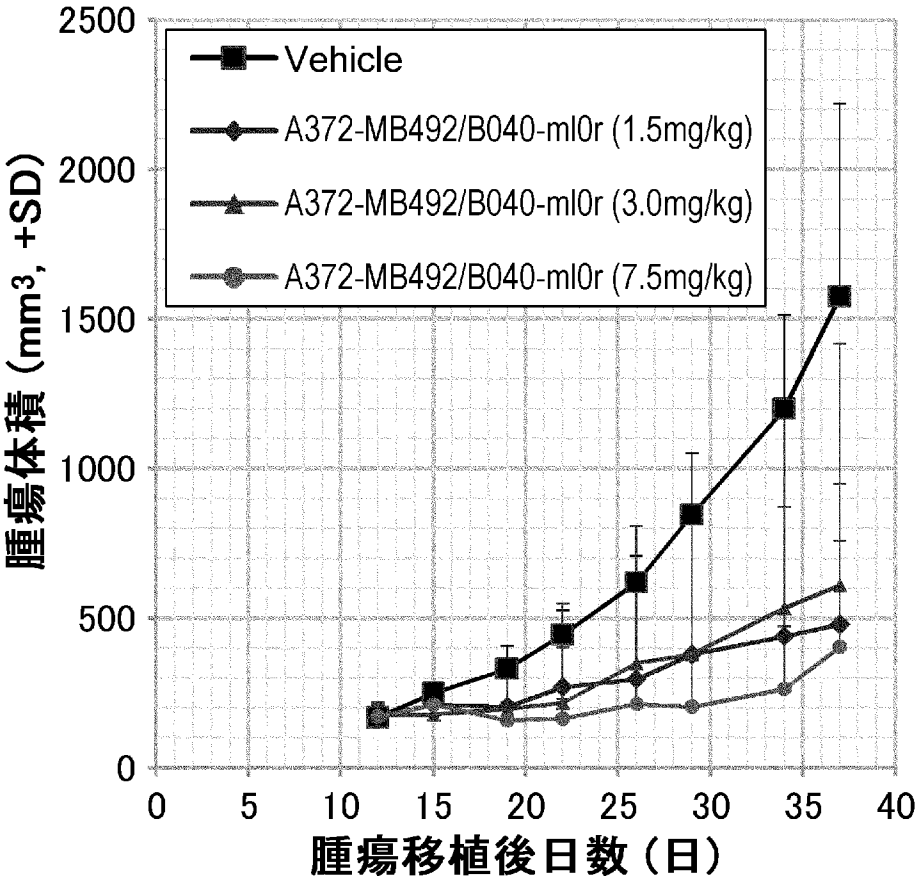
[図39]


(A)
Avg
#1
#2
#3
リンパ節重量(mg/100 g 体重)
70
60
50
40
30
20
10
0
vehicle
7.5
2.5
0.3
7.5
2.5
NS2-MB110
[mg/kg]
A372-MB110/
B040-ml0r
[mg/kg]
(B)
Avg
#1
#2
#3
脾臓重量(g/100 g 体重)
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
vehicle
7.5
2.5
0.3
7.5
2.5
NS2-MB110
[mg/kg]
A372-MB110/
B040-ml0r
[mg/kg]

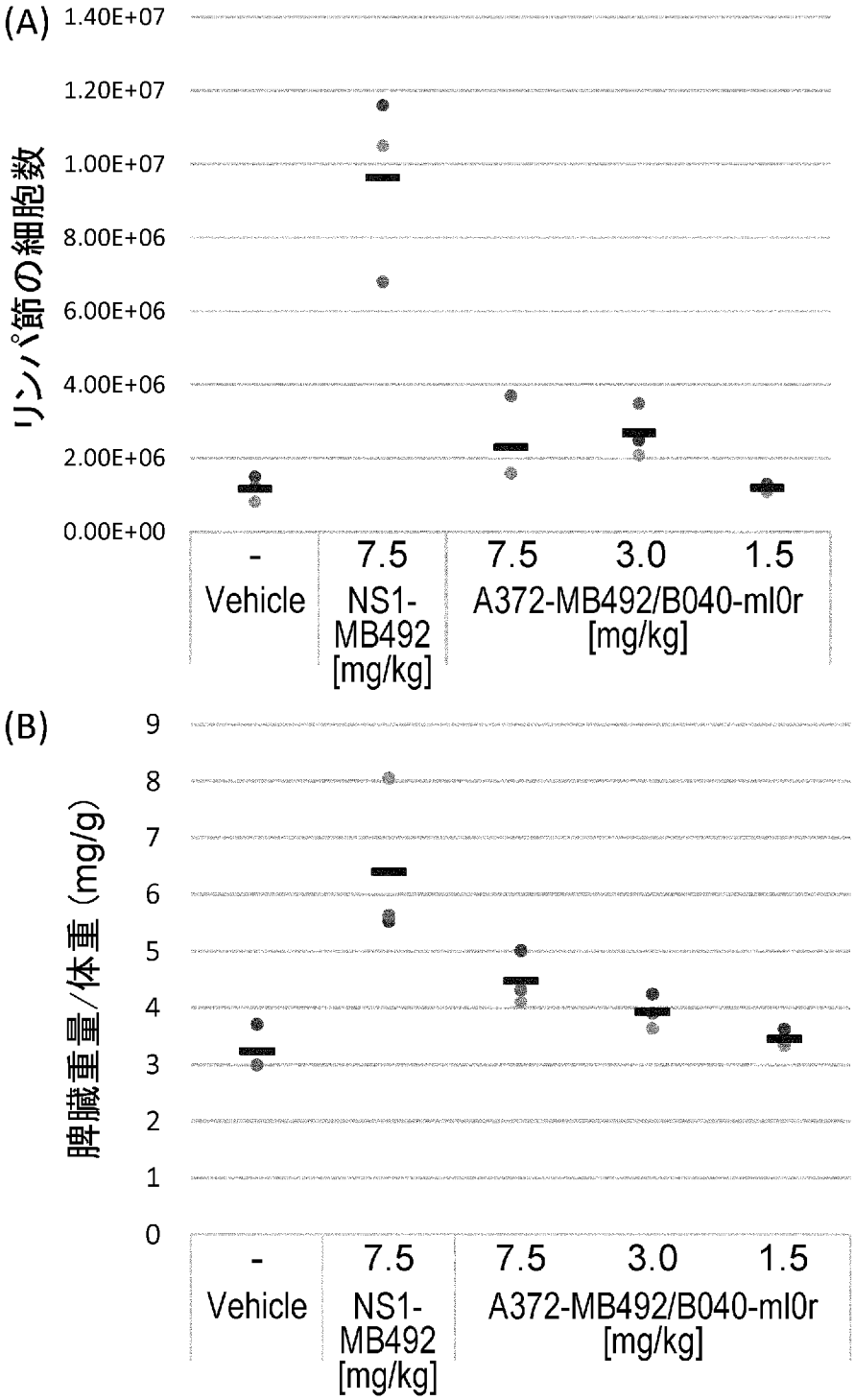
[図40]


Avg ● #1 ■ #2 ▲ #3
肝臓中のCD8+T細胞上のPD-1の発現(%)
45%
40%
35%
30%
25%
20%
15%
10%
5%
0%
vehicle
7.5
2.5
0.3
7.5
2.5
NS2-MB110 [mg/kg]
A372-MB110/B040-ml0r [mg/kg]

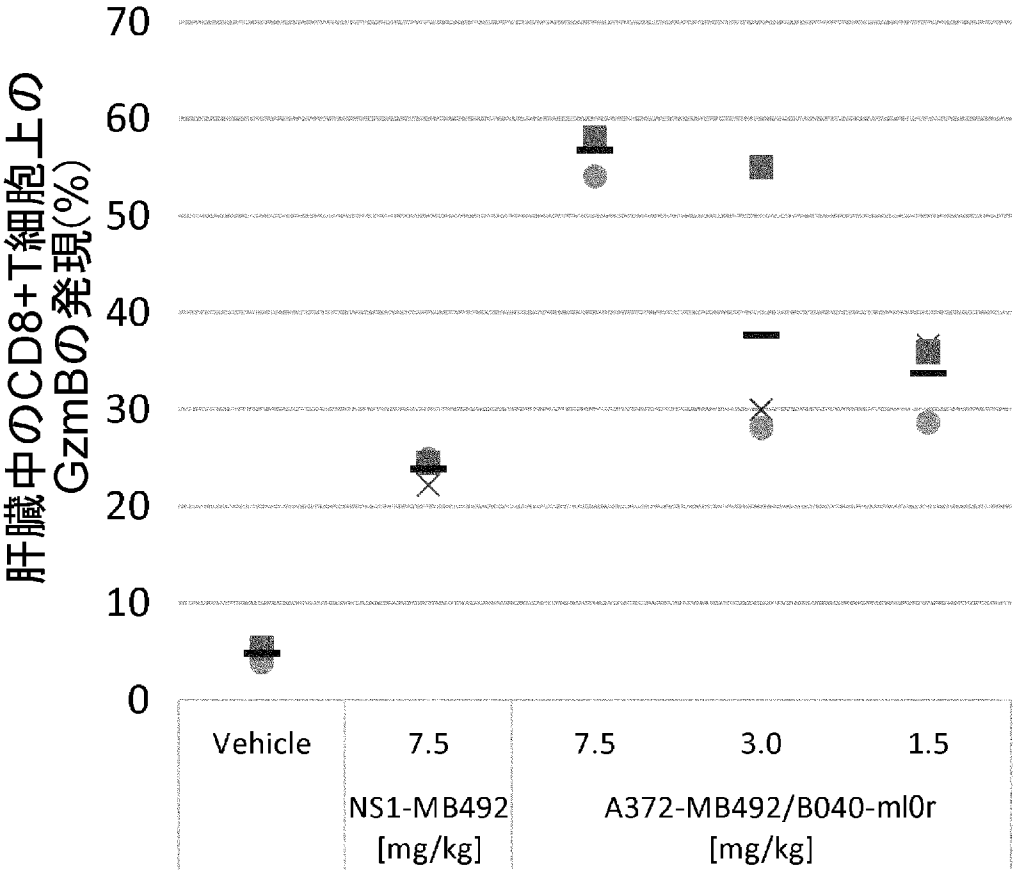
[図41]


Vehicle
A372-MB492/B040-ml0r (1.5mg/kg)
A372-MB492/B040-ml0r (3.0mg/kg)
A372-MB492/B040-ml0r (7.5mg/kg)
腫瘍体積 (mm3, +SD)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
腫瘍移植後日数 (日)

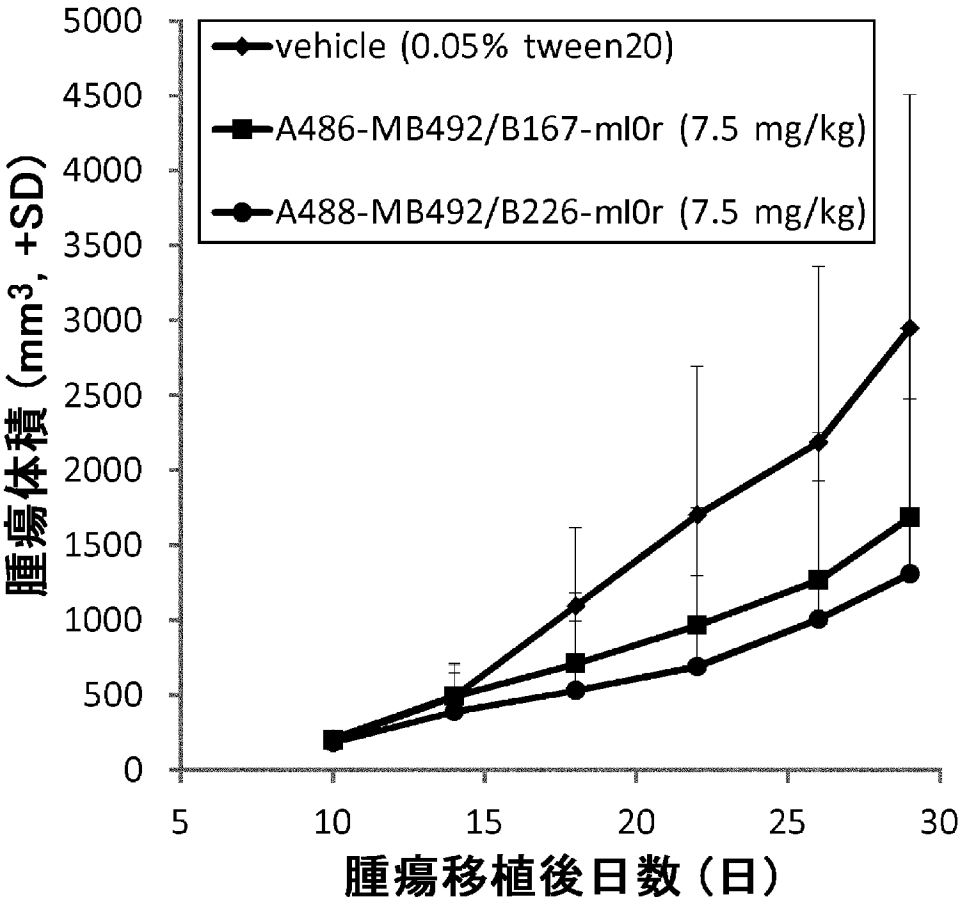
[図42]


(A)
リンパ節の細胞数
1.40E+07
1.20E+07
1.00E+07
8.00E+06
6.00E+06
4.00E+06
2.00E+06
0.00E+00
-
Vehicle
7.5
NS1-MB492 [mg/kg]
7.5
3.0
1.5
A372-MB492/B040-mI0r [mg/kg]
(B)
脾臓重量/体重 (mg/g)
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
-
Vehicle
7.5
NS1-MB492 [mg/kg]
7.5
3.0
1.5
A372-MB492/B040-mI0r [mg/kg]

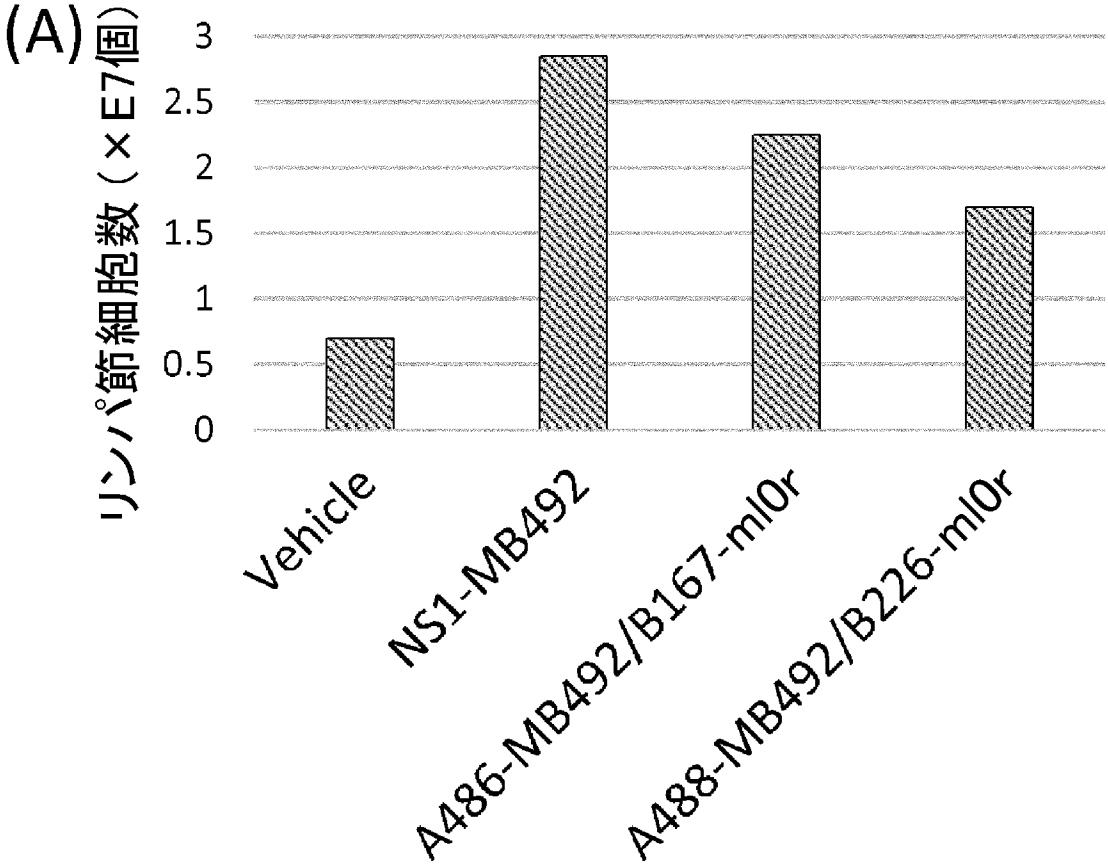
[図43]

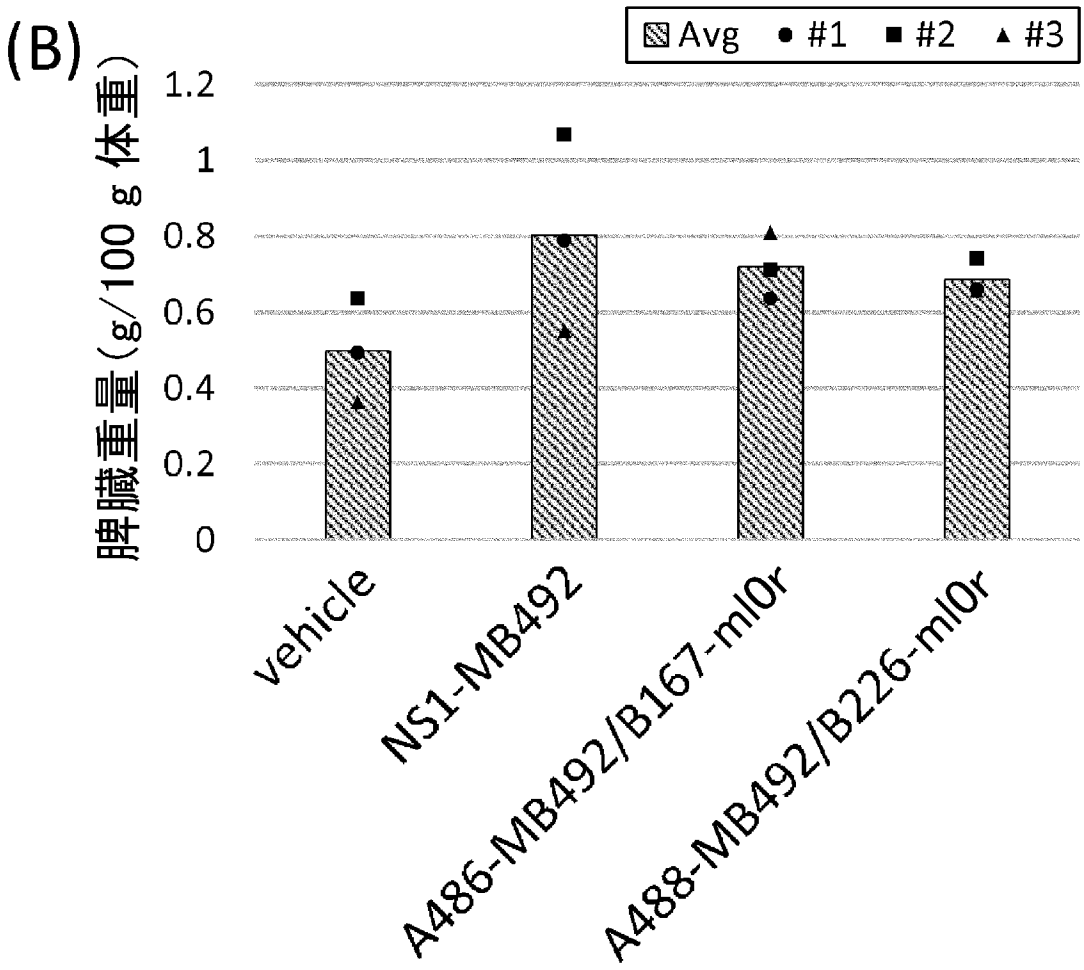

肝臓中のCD8+T細胞上のGzmBの発現(%)
70
60
50
40
30
20
10
0
Vehicle
7.5
NS1-MB492 [mg/kg]
7.5
3.0
1.5
A372-MB492/B040-ml0r [mg/kg]

[図44]

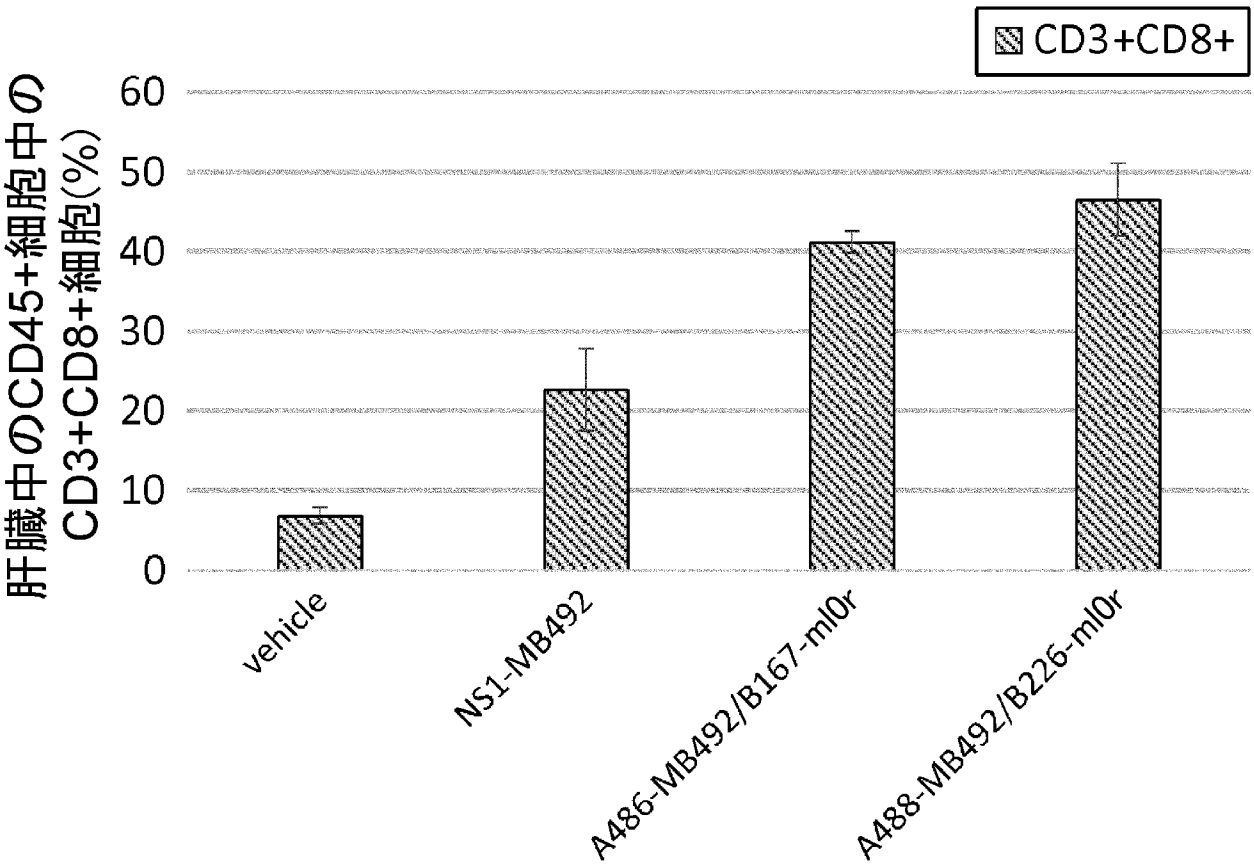

腫瘍体積（mm3, +SD)
5000
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
vehicle (0.05% tween20)
A486-MB492/B167-ml0r (7.5 mg/kg)
A488-MB492/B226-ml0r (7.5 mg/kg)
5
10
15
20
25
30
腫瘍移植後日数（日）

[図45]

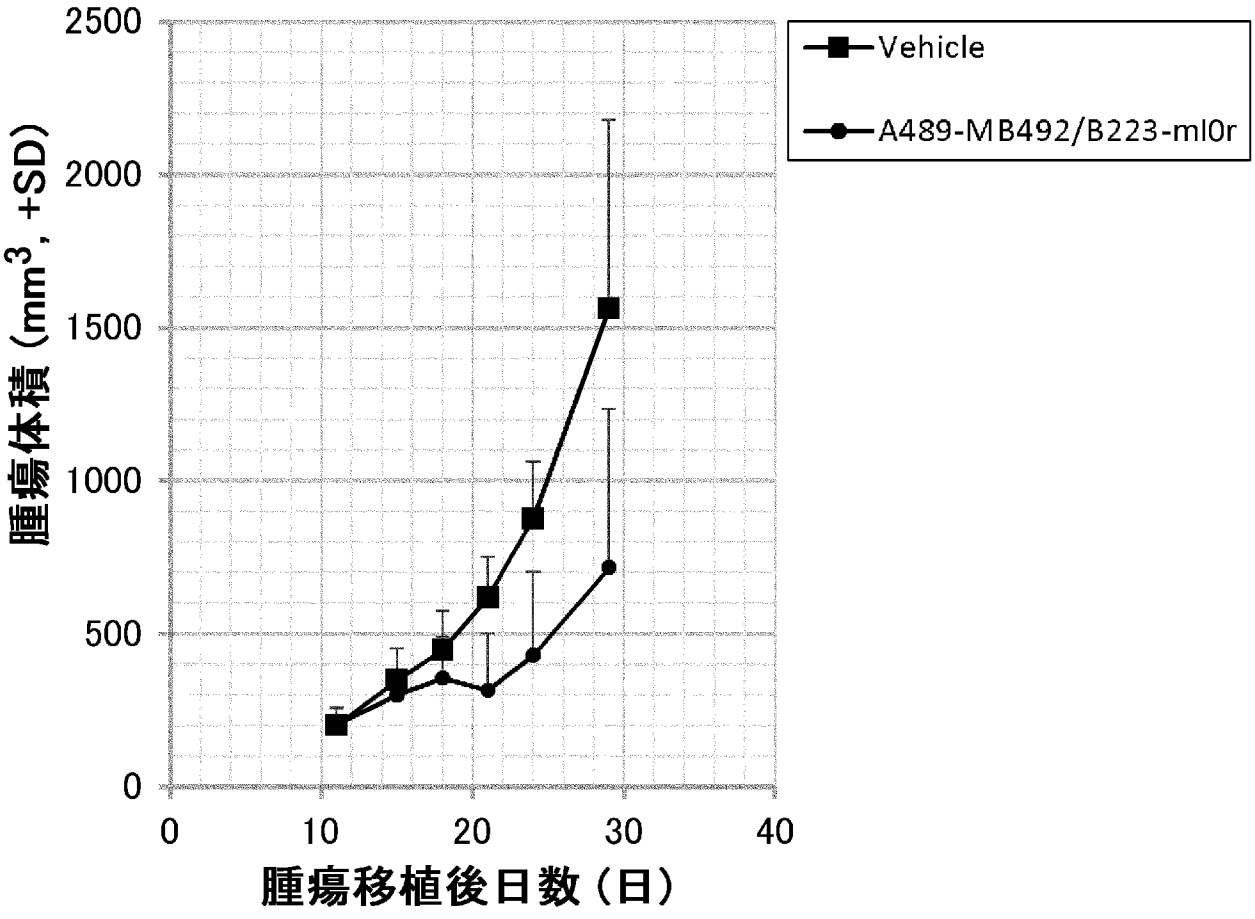

(A)
リンパ節細胞数（×E7個）
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
Vehicle
NS1-MB492
A486-MB492/B167-ml0r
A488-MB492/B226-ml0r


(B)
脾臓重量（g/100ｇ体重）
Avg
#1
#2
#3
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
vehicle
NS1-MB492
A486-MB492/B167-ml0r
A488-MB492/B226-ml0r

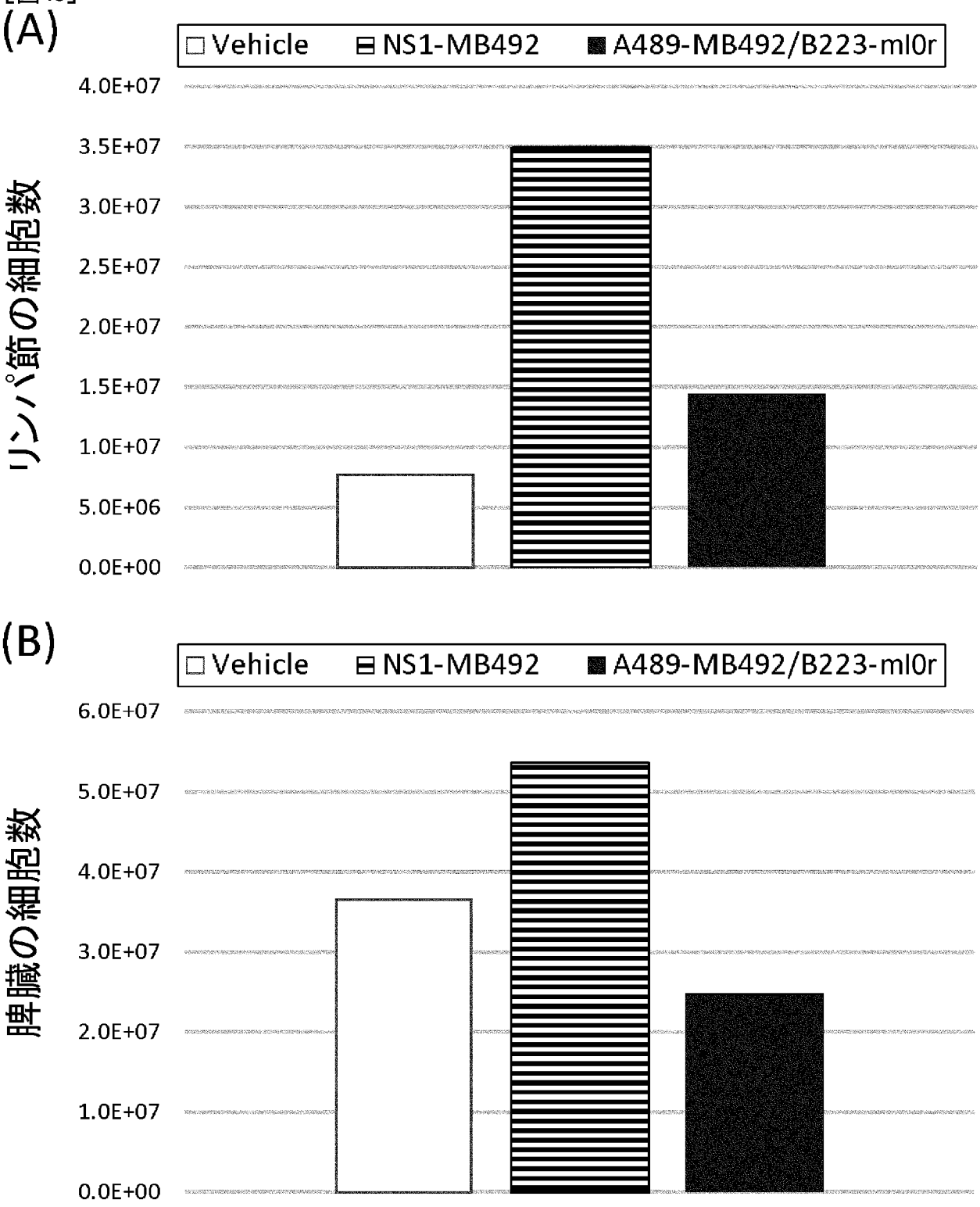
[図46]


CD3+CD8+
肝臓中のCD45+細胞中の
CD3+CD8+細胞(%)
60
50
40
30
20
10
0
vehicle
NS1-MB492
A486-MB492/B167-ml0r
A488-MB492/B226-ml0r

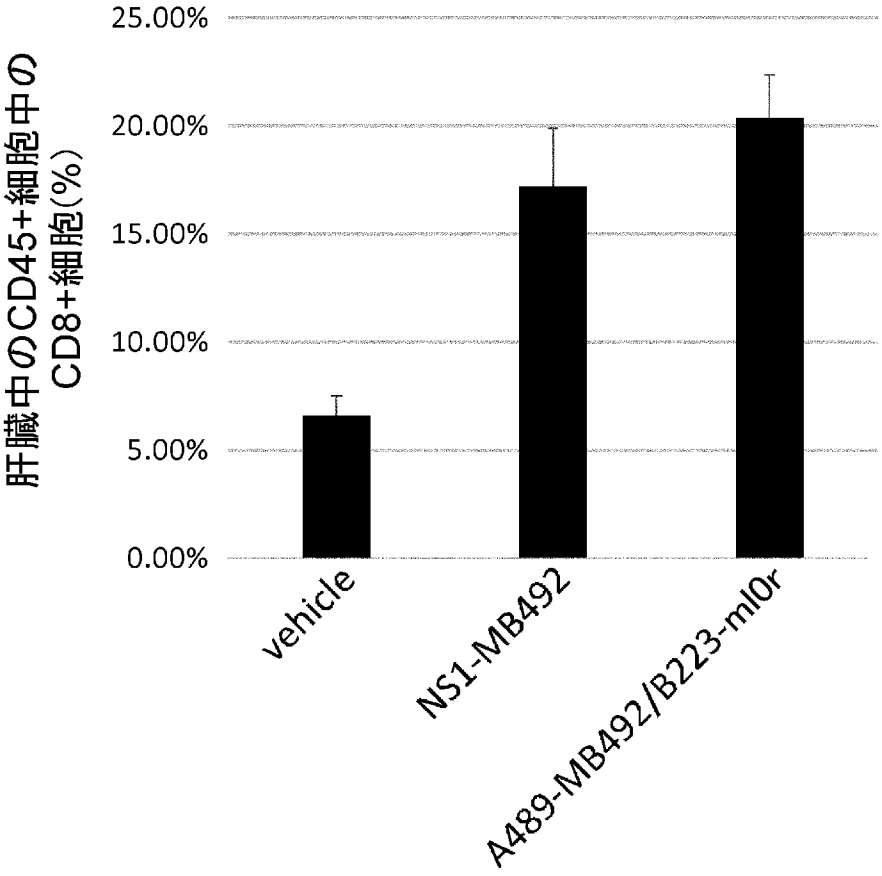
[図47]


Vehicle
A489-MB492/B223-ml0r
腫瘍体積 (mm3, +SD)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
腫瘍移植後日数 (日)

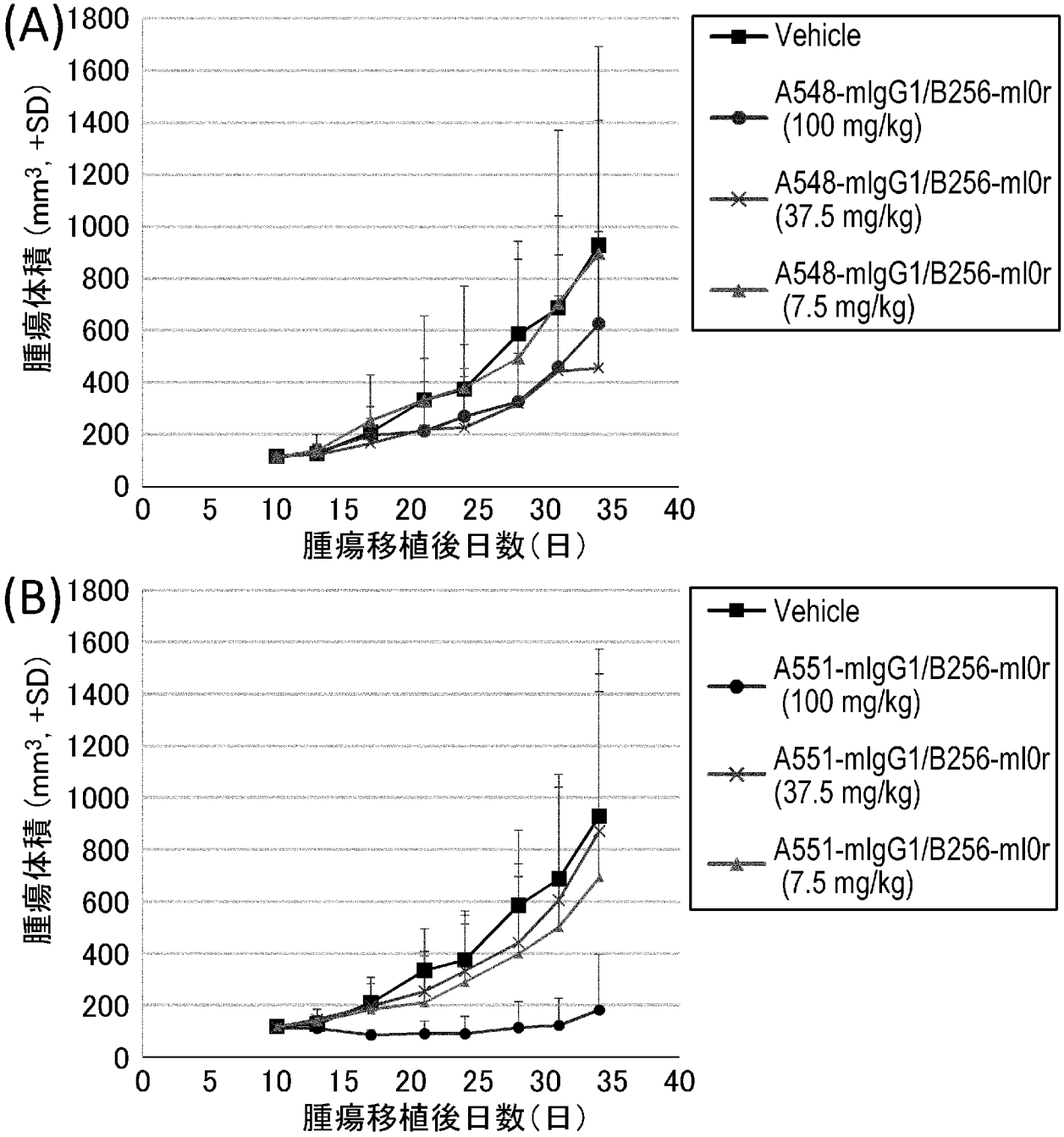
[図48]


(A)
□Vehicle
⊟NS1-MB492
■A489-MB492/B223-ml0r
リンパ節の細胞数
4.0E+07
3.5E+07
3.0E+07
2.5E+07
2.0E+07
1.5E+07
1.0E+07
5.0E+06
0.0E+00
(B)
□Vehicle
⊟NS1-MB492
■A489-MB492/B223-ml0r
脾臓の細胞数
6.0E+07
5.0E+07
4.0E+07
3.0E+07
2.0E+07
1.0E+07
0.0E+00

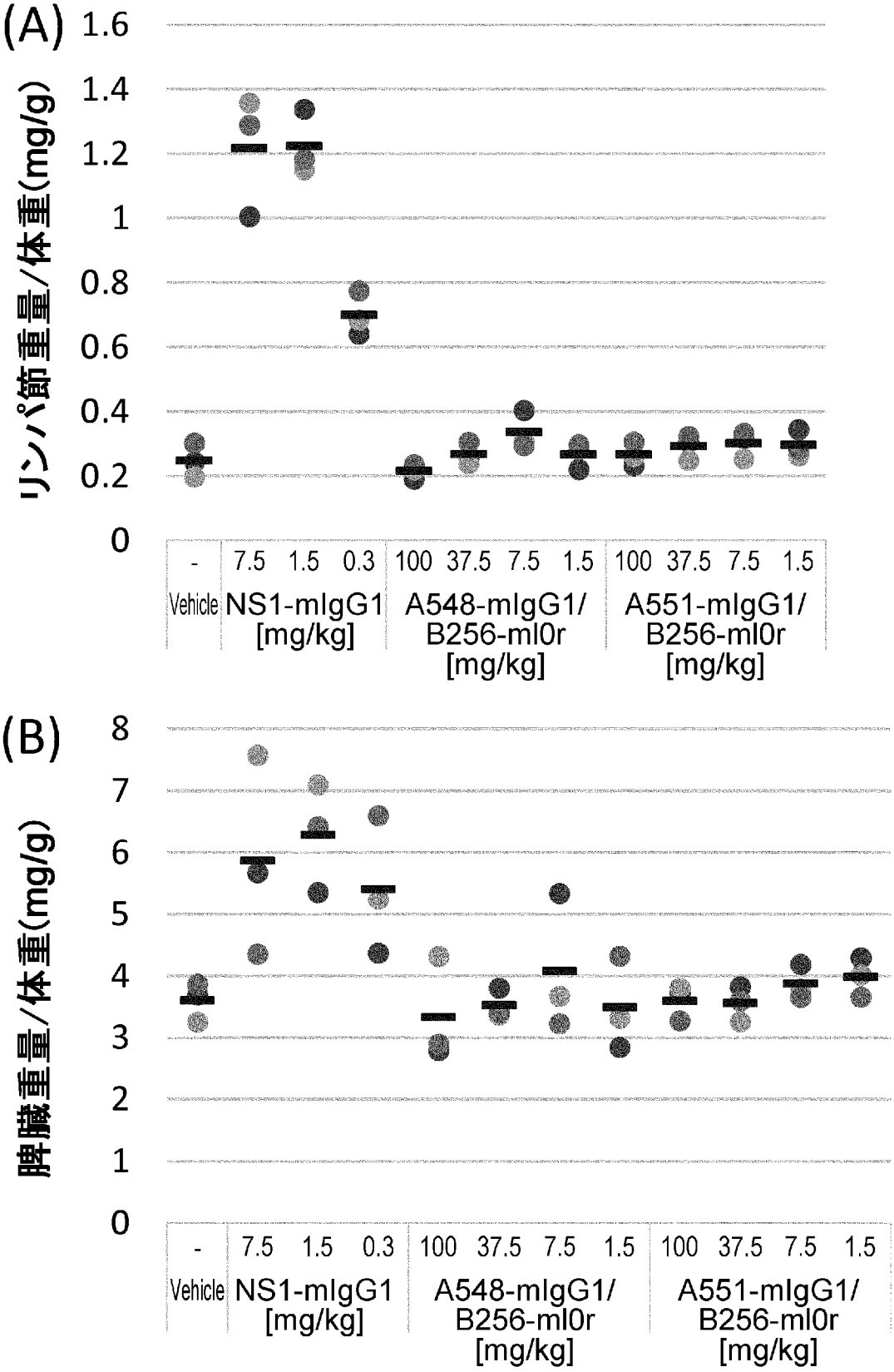
[図49]


肝臓中のCD45+細胞中のCD8+細胞(%)
25.00%
20.00%
15.00%
10.00%
5.00%
0.00%
vehicle
NS1-MB492
A489-MB492/B223-ml0r

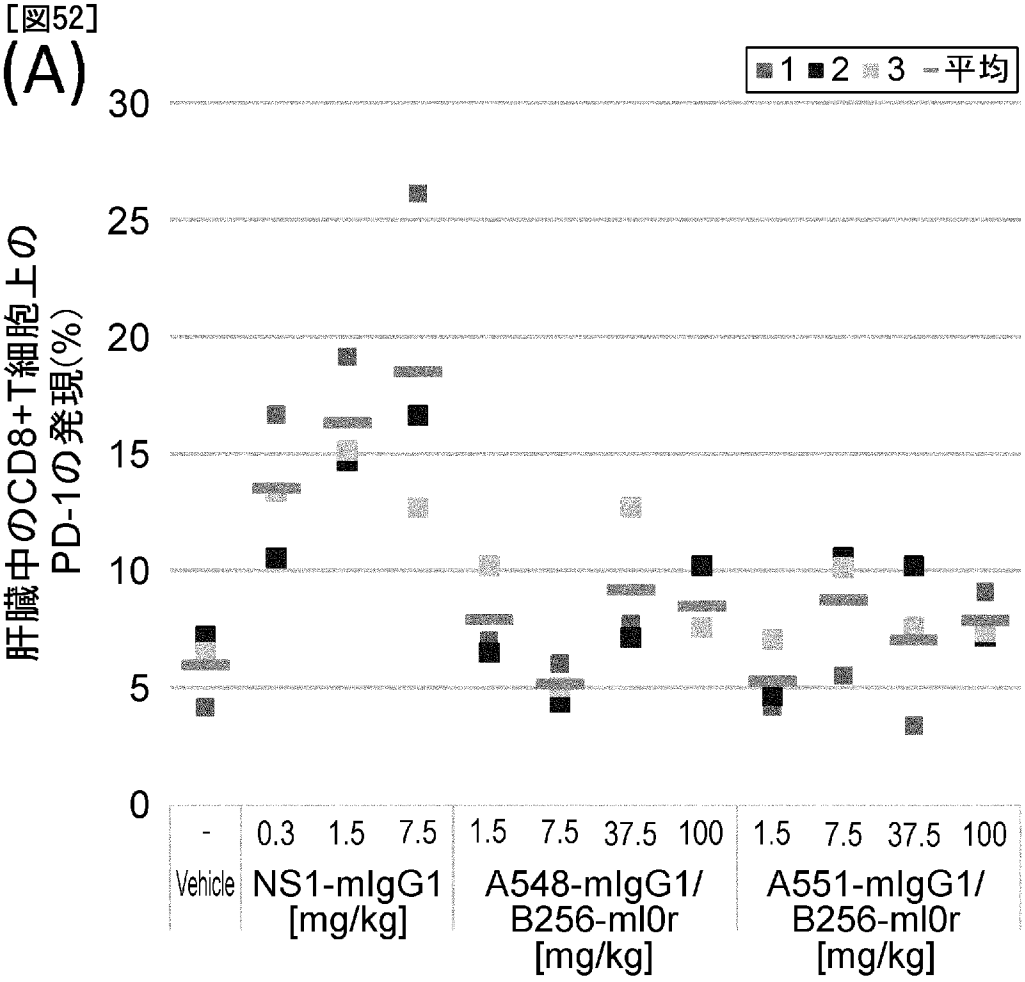
[図50]

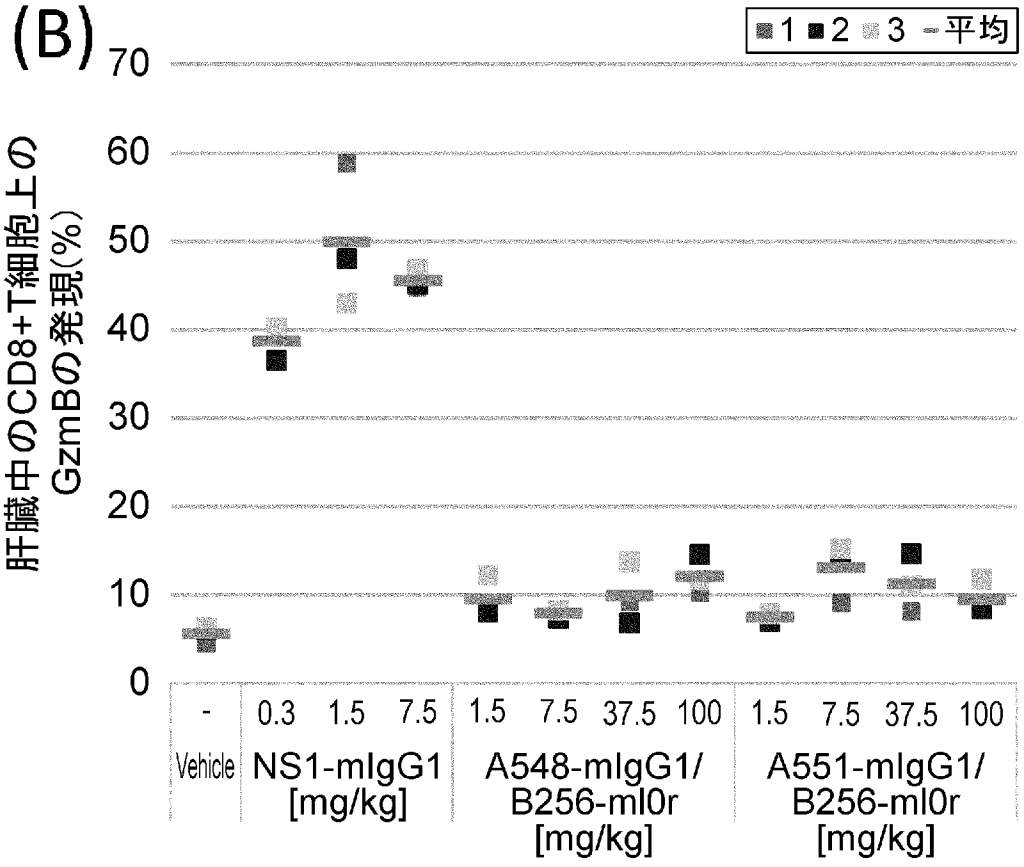

(A)
腫瘍体積 (mm3, +SD)
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40
腫瘍移植後日数(日)
Vehicle
A548-mIgG1/B256-mI0r (100 mg/kg)
A548-mIgG1/B256-mI0r (37.5 mg/kg)
A548-mIgG1/B256-mI0r (7.5 mg/kg)
(B)
腫瘍体積 (mm3, +SD)
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40
腫瘍移植後日数(日)
Vehicle
A551-mIgG1/B256-mI0r (100 mg/kg)
A551-mIgG1/B256-mI0r (37.5 mg/kg)
A551-mIgG1/B256-mI0r (7.5 mg/kg)

[図51]

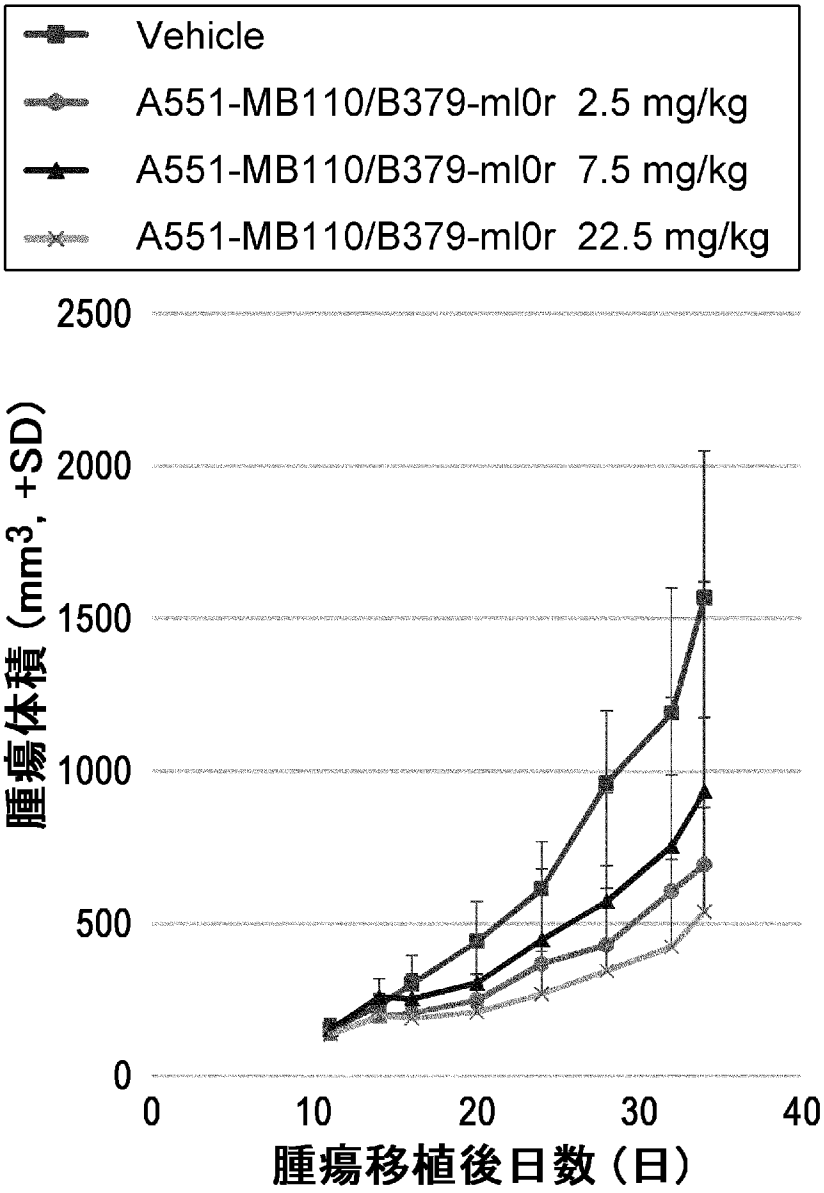

(A)
リンパ節重量/体重(mg/g)
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
-
7.5 1.5 0.3
100 37.5 7.5 1.5
100 37.5 7.5 1.5
Vehicle
NS1-mIgG1 [mg/kg]
A548-mIgG1/ B256-mI0r [mg/kg]
A551-mIgG1/ B256-mI0r [mg/kg]
(B)
脾臓重量/体重(mg/g)
8
7
6
5
4
3
2
1
0
-
7.5 1.5 0.3
100 37.5 7.5 1.5
100 37.5 7.5 1.5
Vehicle
NS1-mIgG1 [mg/kg]
A548-mIgG1/ B256-mI0r [mg/kg]
A551-mIgG1/ B256-mI0r [mg/kg]

[図52]

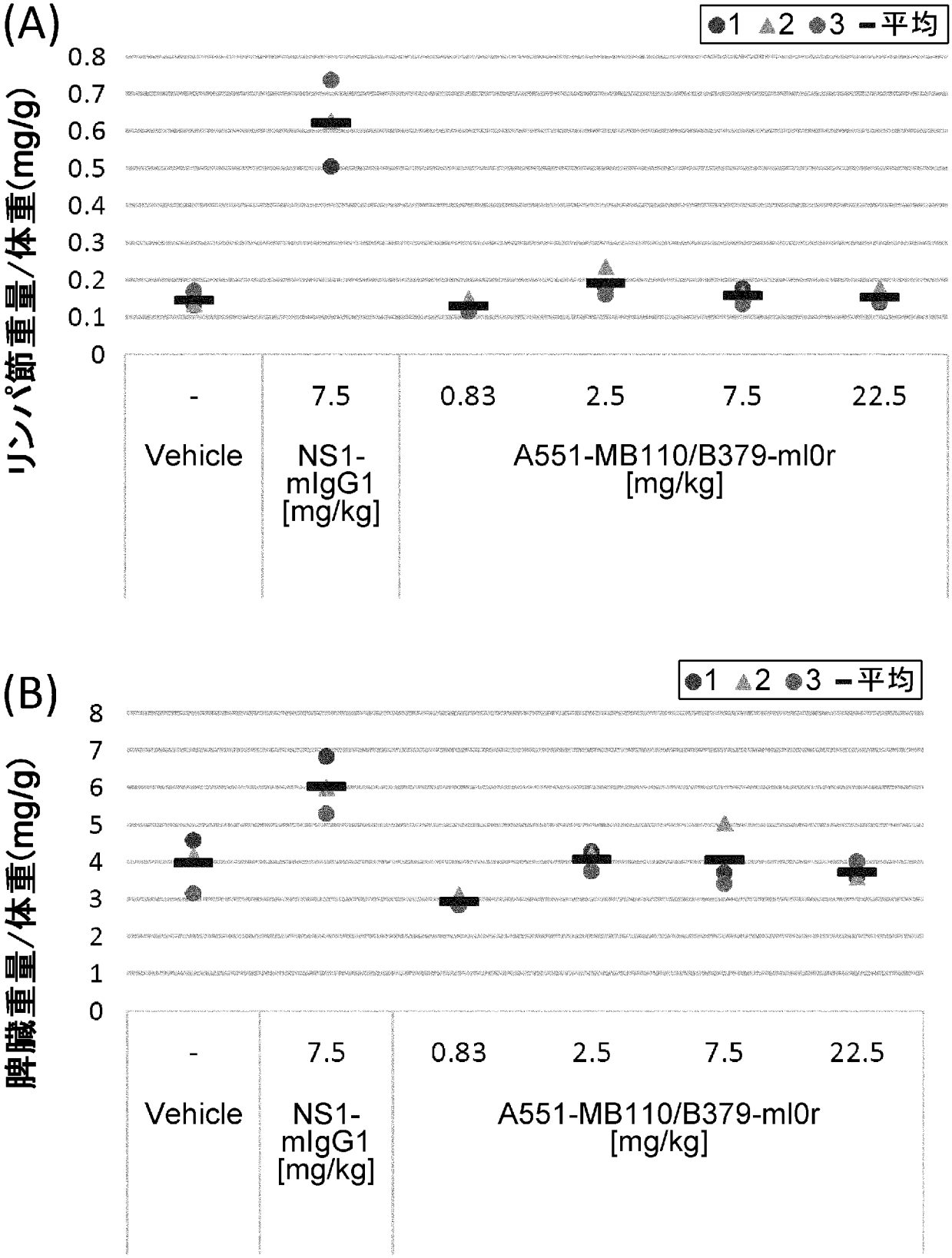

(A)
1 2 3 平均
肝臓中のCD8+T細胞上のPD-1の発現(%)
30
25
20
15
10
5
0
-
Vehicle
0.3 1.5 7.5
NS1-mIgG1 [mg/kg]
1.5 7.5 37.5 100
A548-mIgG1/B256-mI0r [mg/kg]
1.5 7.5 37.5 100
A551-mIgG1/B256-mI0r [mg/kg]


(B)
1 2 3 平均
肝臓中のCD8+T細胞上のGzmBの発現(%)
70
60
50
40
30
20
10
0
-
Vehicle
0.3 1.5 7.5
NS1-mIgG1 [mg/kg]
1.5 7.5 37.5 100
A548-mIgG1/B256-mI0r [mg/kg]
1.5 7.5 37.5 100
A551-mIgG1/B256-mI0r [mg/kg]

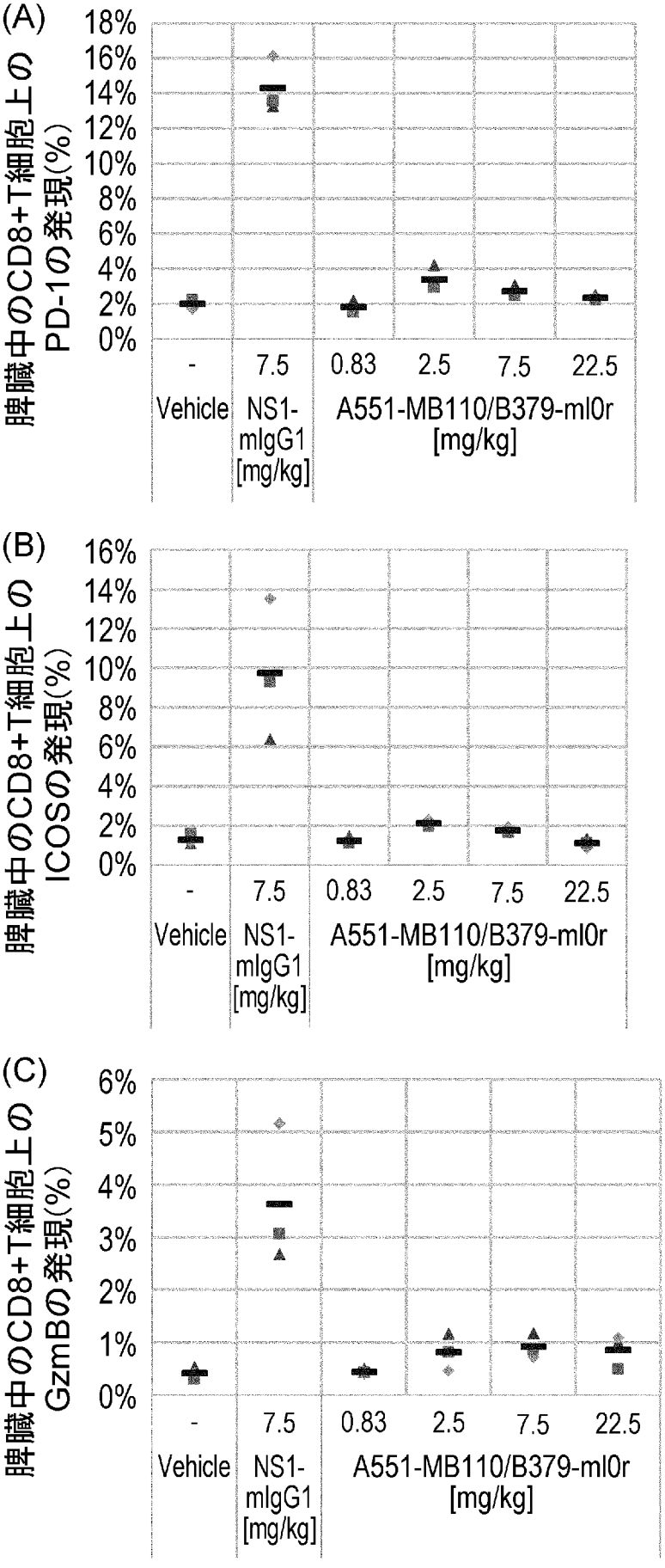
[図53]


Vehicle
A551-MB110/B379-ml0r 2.5 mg/kg
A551-MB110/B379-ml0r 7.5 mg/kg
A551-MB110/B379-ml0r 22.5 mg/kg
2500
2000
1500
1000
500
0
腫瘍体積（mm3, +SD）
0
10
20
30
40
腫瘍移植後日数（日）

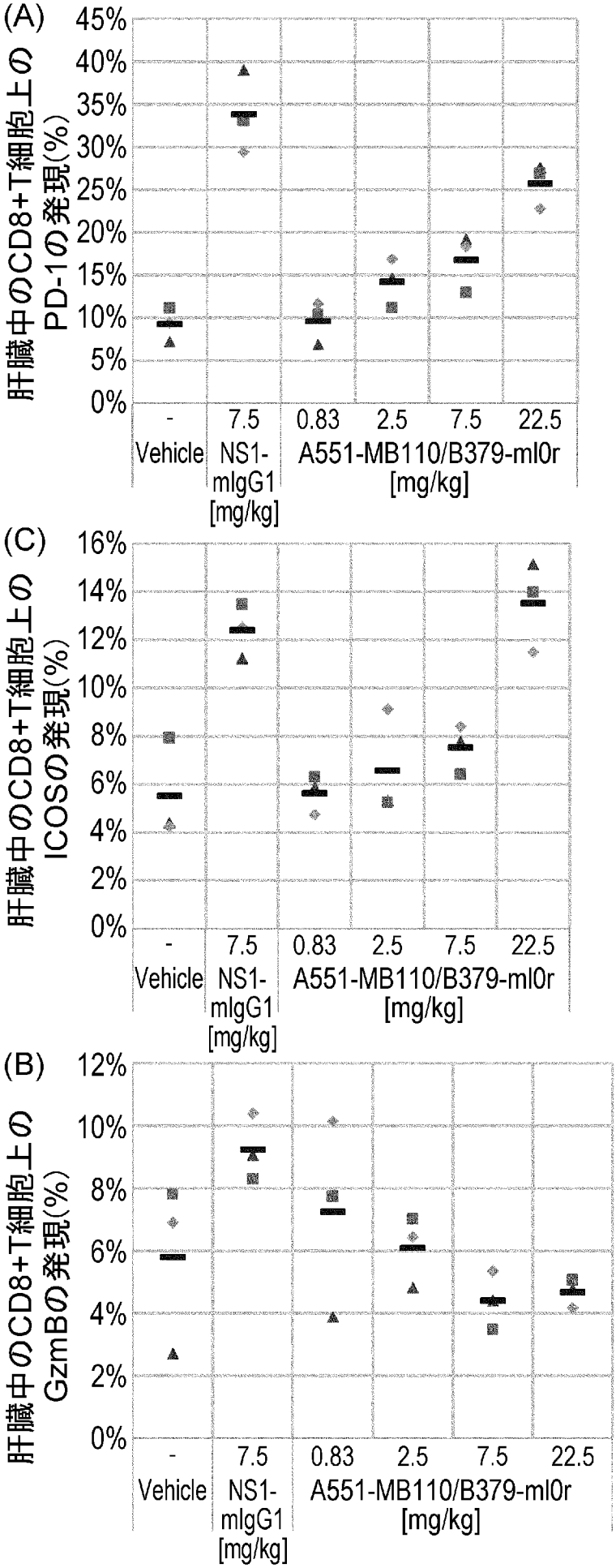
[図54]


(A)
●1 ▲2 ●3 −平均
リンパ節重量/体重(mg/g)
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
-
7.5
0.83
2.5
7.5
22.5
Vehicle
NS1-mIgG1 [mg/kg]
A551-MB110/B379-ml0r [mg/kg]
(B)
●1 ▲2 ●3 −平均
脾臓重量/体重(mg/g)
8
7
6
5
4
3
2
1
0
-
7.5
0.83
2.5
7.5
22.5
Vehicle
NS1-mIgG1 [mg/kg]
A551-MB110/B379-ml0r [mg/kg]

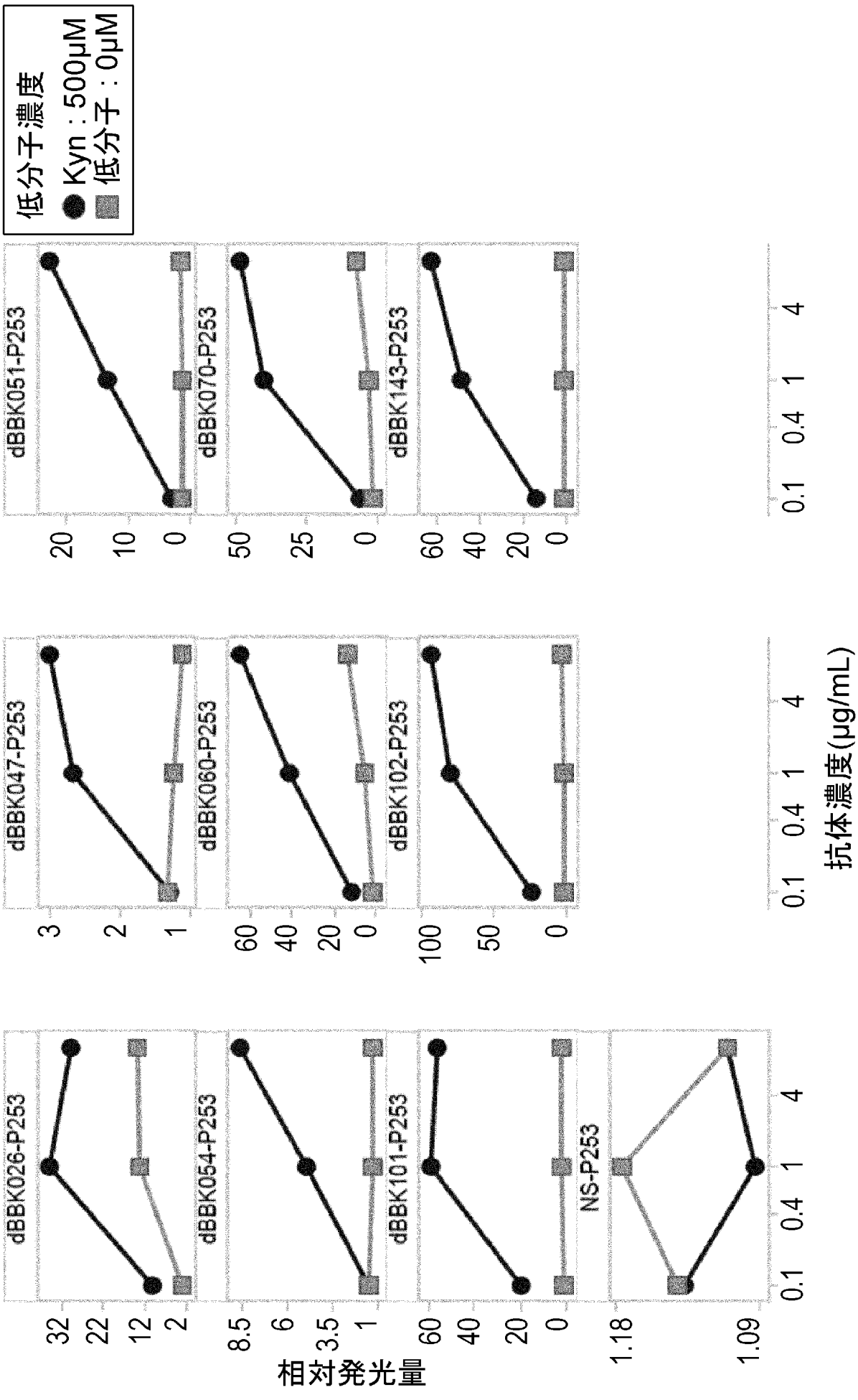
[図55]


(A)
脾臓中のCD8+T細胞上のPD-1の発現(%)
18%
16%
14%
12%
10%
8%
6%
4%
2%
0%
-
7.5
0.83
2.5
7.5
22.5
Vehicle
NS1-mIgG1 [mg/kg]
A551-MB110/B379-mI0r [mg/kg]
(B)
脾臓中のCD8+T細胞上のICOSの発現(%)
16%
14%
12%
10%
8%
6%
4%
2%
0%
-
7.5
0.83
2.5
7.5
22.5
Vehicle
NS1-mIgG1 [mg/kg]
A551-MB110/B379-mI0r [mg/kg]
(C)
脾臓中のCD8+T細胞上のGzmBの発現(%)
6%
5%
4%
3%
2%
1%
0%
-
7.5
0.83
2.5
7.5
22.5
Vehicle
NS1-mIgG1 [mg/kg]
A551-MB110/B379-mI0r [mg/kg]

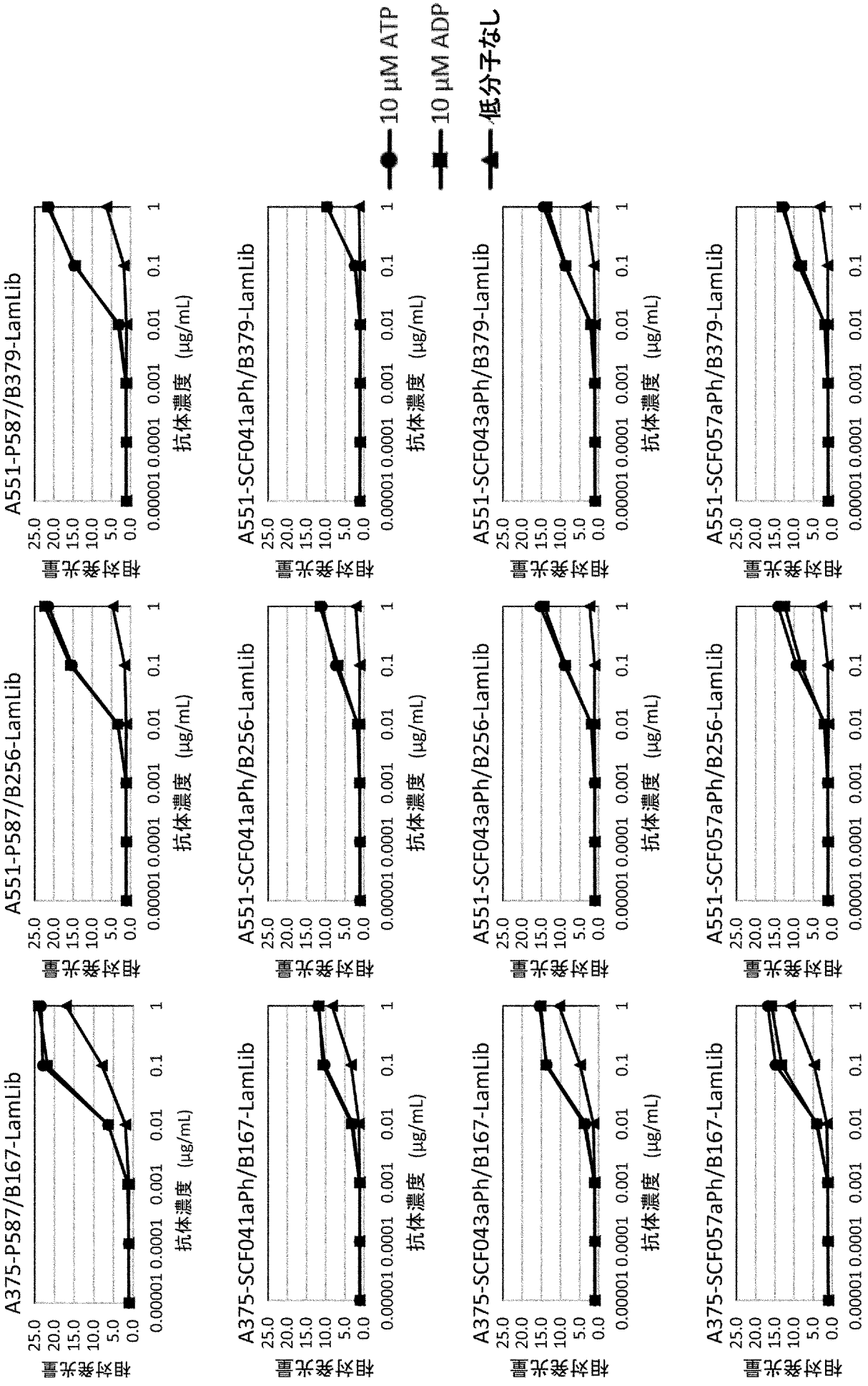
[図56]


(A)
肝臓中のCD8+T細胞上のPD-1の発現(%)
45%
40%
35%
30%
25%
20%
15%
10%
5%
0%
-
Vehicle
7.5
NS1-mIgG1 [mg/kg]
0.83
2.5
7.5
22.5
A551-MB110/B379-mI0r [mg/kg]
(C)
肝臓中のCD8+T細胞上のICOSの発現(%)
16%
14%
12%
10%
8%
6%
4%
2%
0%
(B)
肝臓中のCD8+T細胞上のGzmBの発現(%)
12%
10%
8%
6%
4%
2%
0%

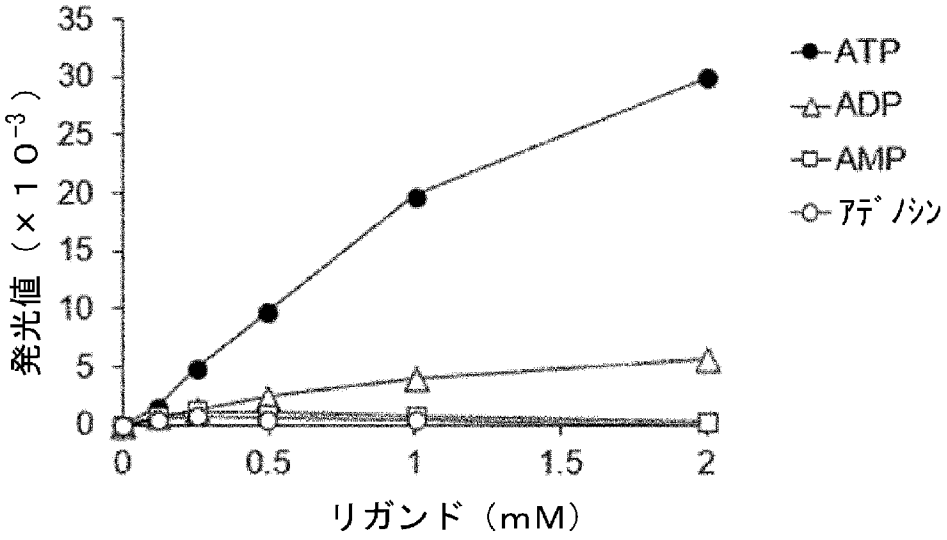
[図57]


低分子濃度
Kyn：500μM
低分子：0μM
dBBK026-P253
dBBK047-P253
dBBK051-P253
dBBK054-P253
dBBK060-P253
dBBK070-P253
dBBK101-P253
dBBK102-P253
dBBK143-P253
NS-P253
相対発光量
抗体濃度(μg/mL)
0.1
0.4
1
4

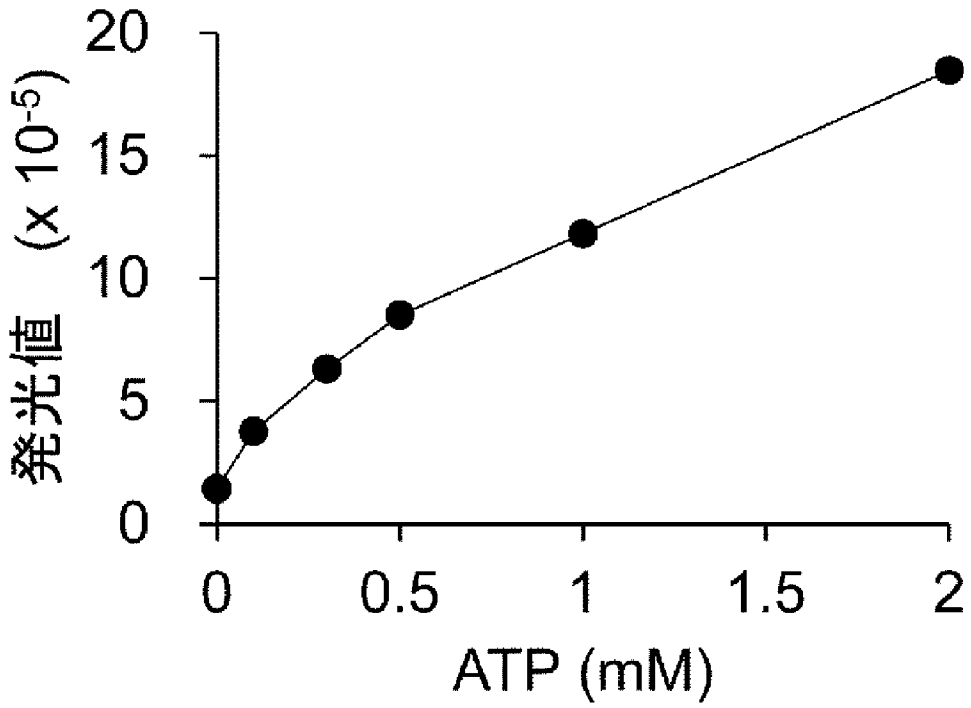
[図58]


A375-P587/B167-LamLib
A551-P587/B256-LamLib
A551-P587/B379-LamLib
A375-SCF041aPh/B167-LamLib
A551-SCF041aPh/B256-LamLib
A551-SCF041aPh/B379-LamLib
A375-SCF043aPh/B167-LamLib
A551-SCF043aPh/B256-LamLib
A551-SCF043aPh/B379-LamLib
A375-SCF057aPh/B167-LamLib
A551-SCF057aPh/B256-LamLib
A551-SCF057aPh/B379-LamLib
相対発光量
抗体濃度 (μg/mL)
0.00001 0.0001 0.001 0.01 0.1 1
0.0 5.0 10.0 15.0 20.0 25.0
10 μM ATP
10 μM ADP
低分子なし

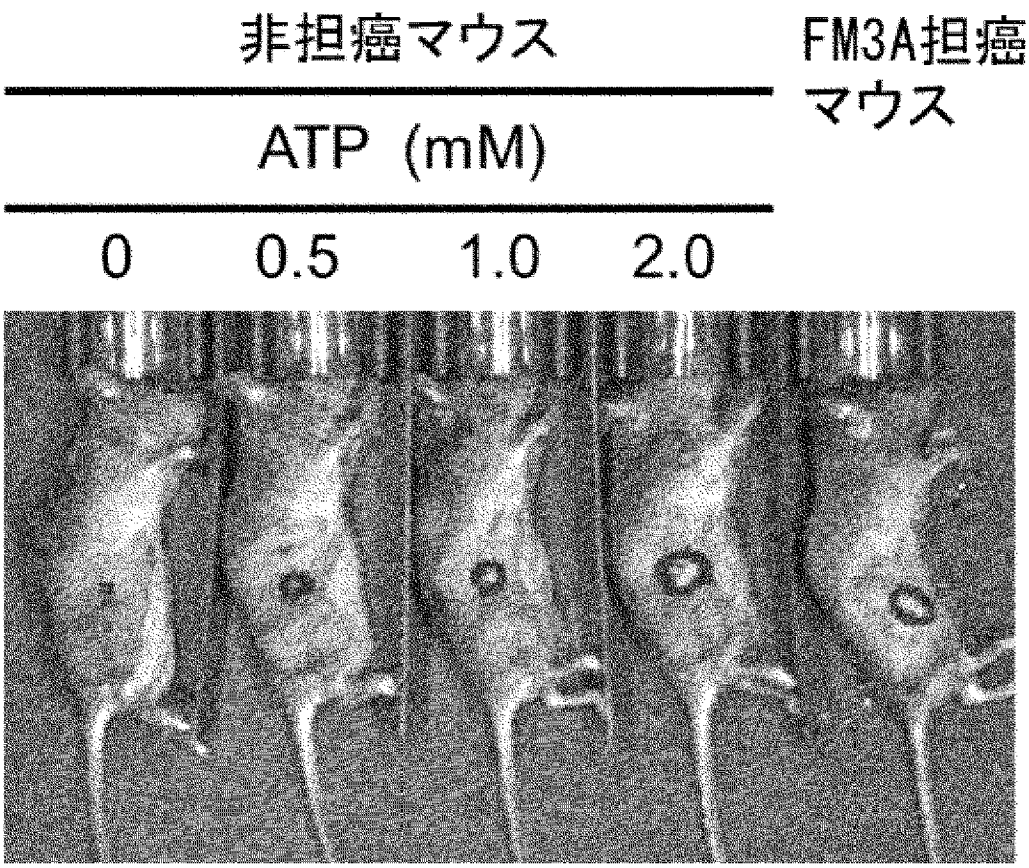
[図59]


35
30
25
20
15
10
5
0
発光値（×１０$^{-3}$）
0
0.5
1
1.5
2
リガンド（mM）
ATP
ADP
AMP
ｱﾃﾞﾉｼﾝ

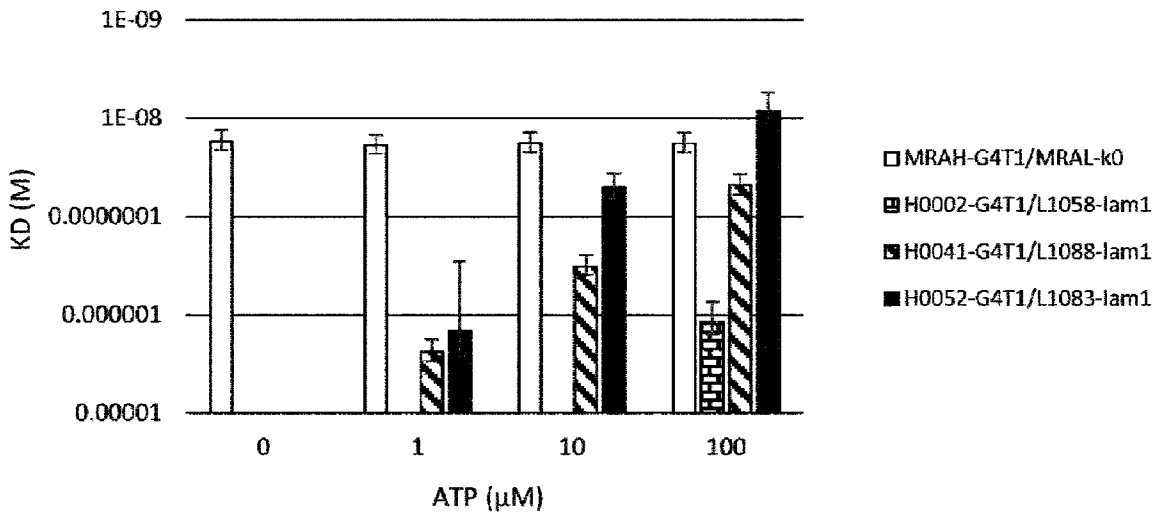
[図60]


20
15
10
5
0
発光値 (x 10-5)
0
0.5
1
1.5
2
ATP (mM)

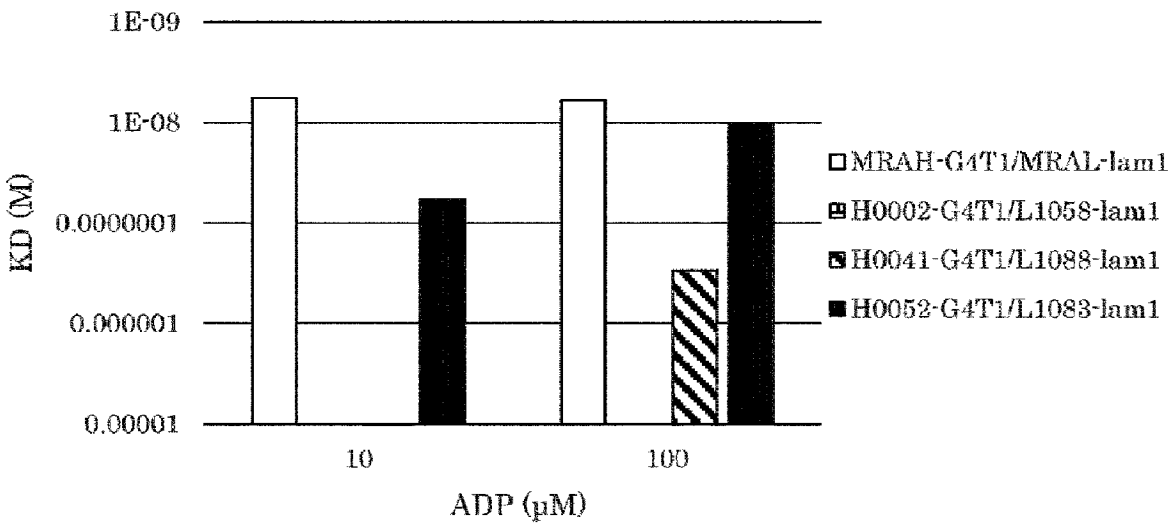
[図61]


非担癌マウス
FM3A担癌マウス
ATP (mM)
0
0.5
1.0
2.0

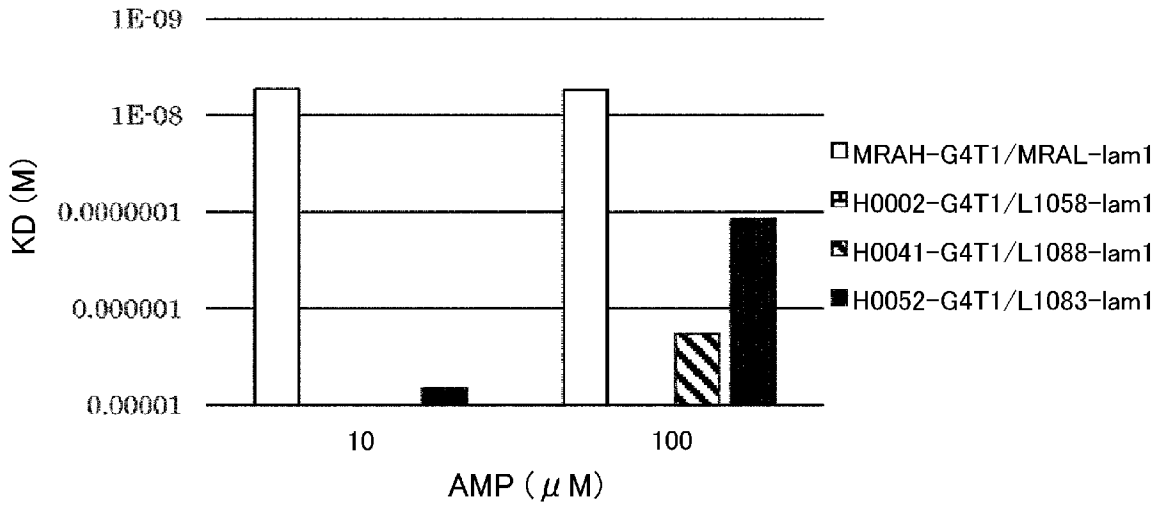
[図62]


1E-09
1E-08
0.0000001
0.000001
0.00001
KD (M)
0
1
10
100
ATP (μM)
MRAH-G4T1/MRAL-k0
H0002-G4T1/L1058-lam1
H0041-G4T1/L1088-lam1
H0052-G4T1/L1083-lam1

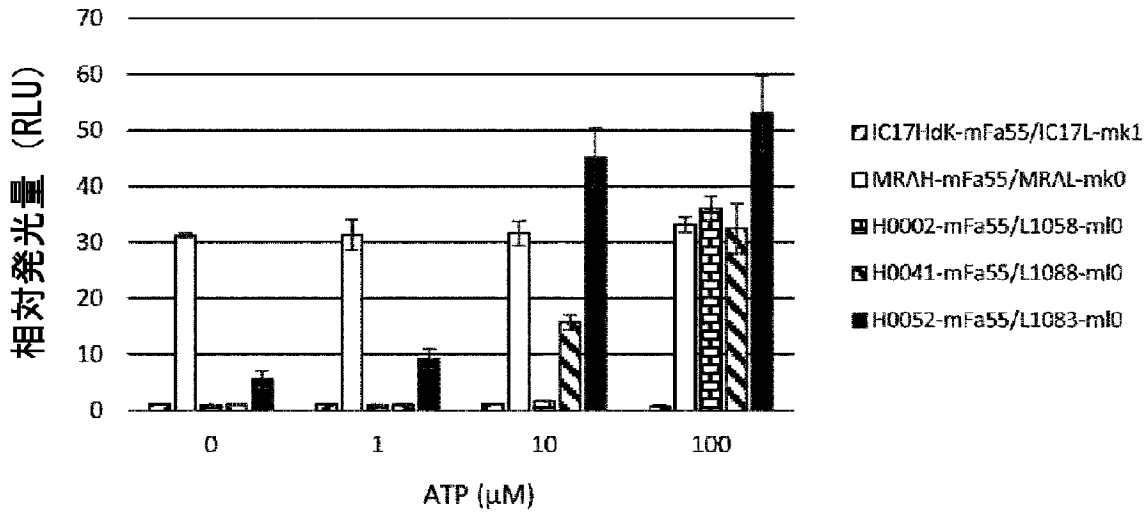
[図63]


1E-09
1E-08
0.0000001
0.000001
0.00001
KD (M)
10
100
ADP (μM)
MRAH-G4T1/MRAL-lam1
H0002-G4T1/L1058-lam1
H0041-G4T1/L1088-lam1
H0052-G4T1/L1083-lam1

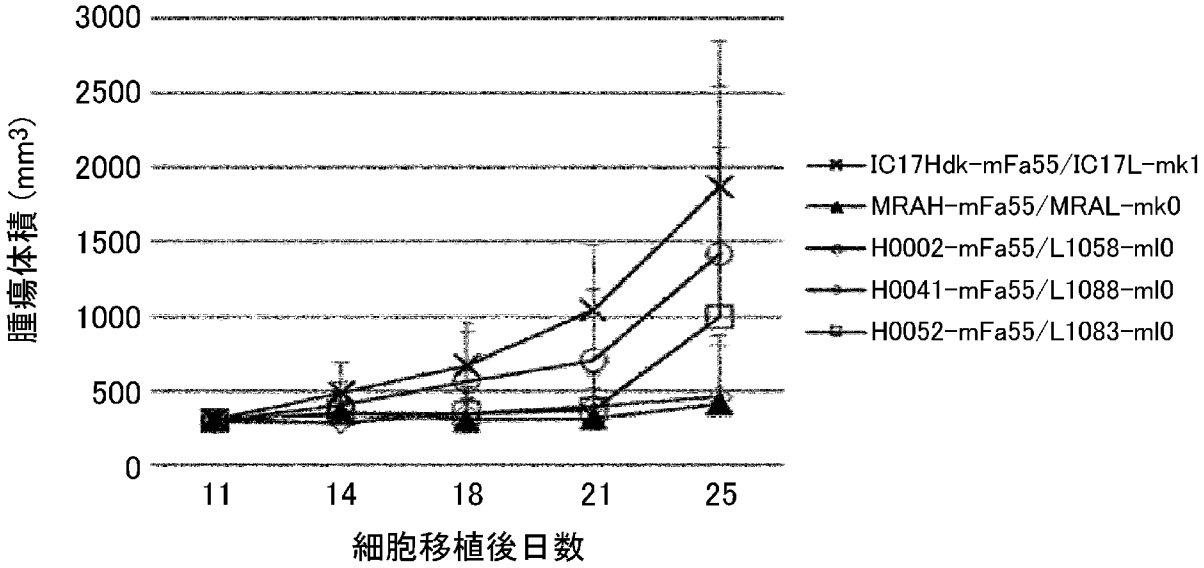
[図64]


1E-09
1E-08
0.0000001
0.000001
0.00001
KD (M)
10
100
AMP (μM)
MRAH-G4T1/MRAL-lam1
H0002-G4T1/L1058-lam1
H0041-G4T1/L1088-lam1
H0052-G4T1/L1083-lam1

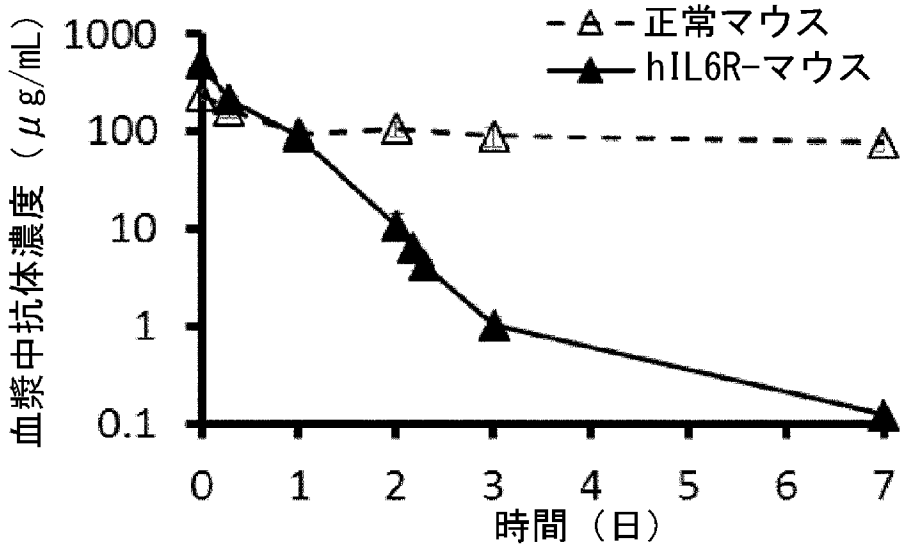
[図65]


70
60
50
40
30
20
10
0
相対発光量 (RLU)
0
1
10
100
ATP (μM)
IC17HdK-mFa55/IC17L-mk1
MRAH-mFa55/MRAL-mk0
H0002-mFa55/L1058-ml0
H0041-mFa55/L1088-ml0
H0052-mFa55/L1083-ml0

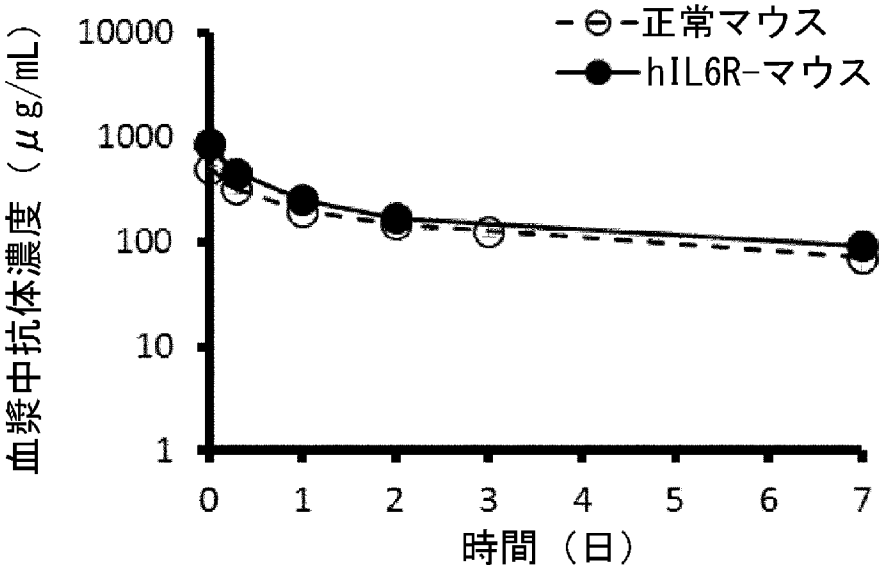
[図66]


3000
2500
2000
1500
1000
500
0
腫瘍体積（mm3）
11
14
18
21
25
細胞移植後日数
IC17Hdk-mFa55/IC17L-mk1
MRAH-mFa55/MRAL-mk0
H0002-mFa55/L1058-ml0
H0041-mFa55/L1088-ml0
H0052-mFa55/L1083-ml0

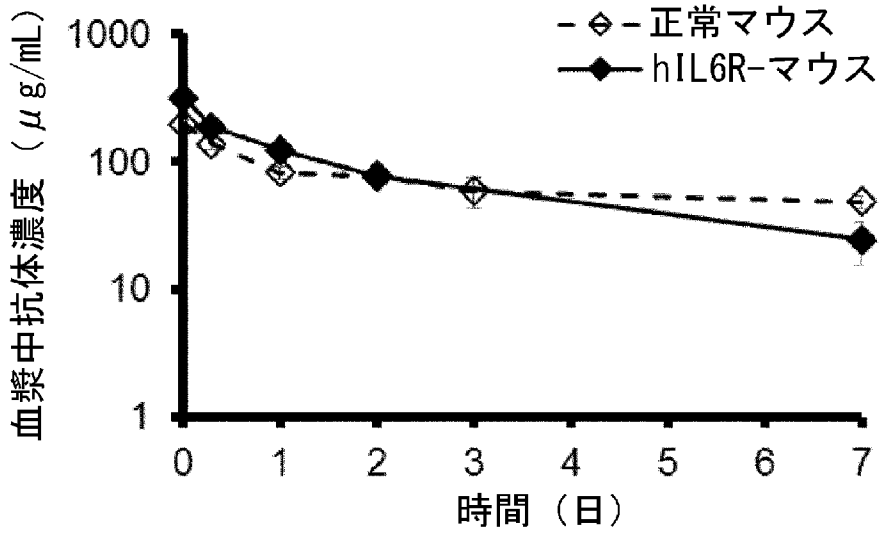
[図67]


1000
100
10
1
0.1
血漿中抗体濃度（μg/mL）
0
1
2
3
4
5
6
7
時間（日）
正常マウス
hIL6R-マウス

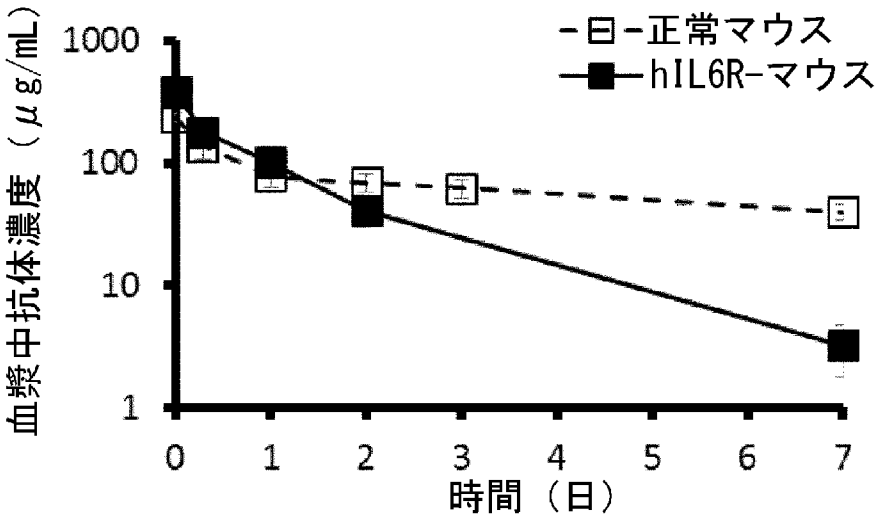
[図68]


正常マウス
hIL6R-マウス
血漿中抗体濃度（μg/mL）
10000
1000
100
10
1
0
1
2
3
4
5
6
7
時間（日）

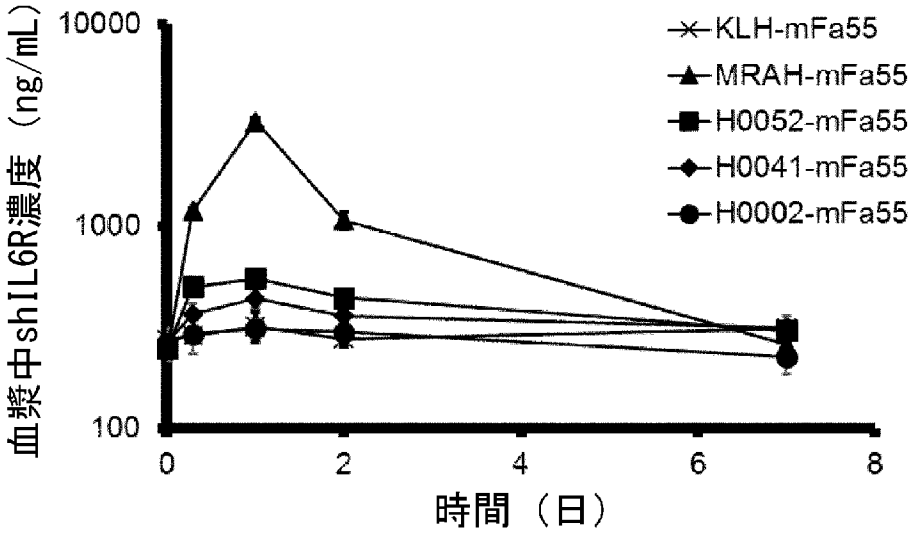
[図69]


正常マウス
hIL6R-マウス
血漿中抗体濃度（μg/mL）
1000
100
10
1
0
1
2
3
4
5
6
7
時間（日）

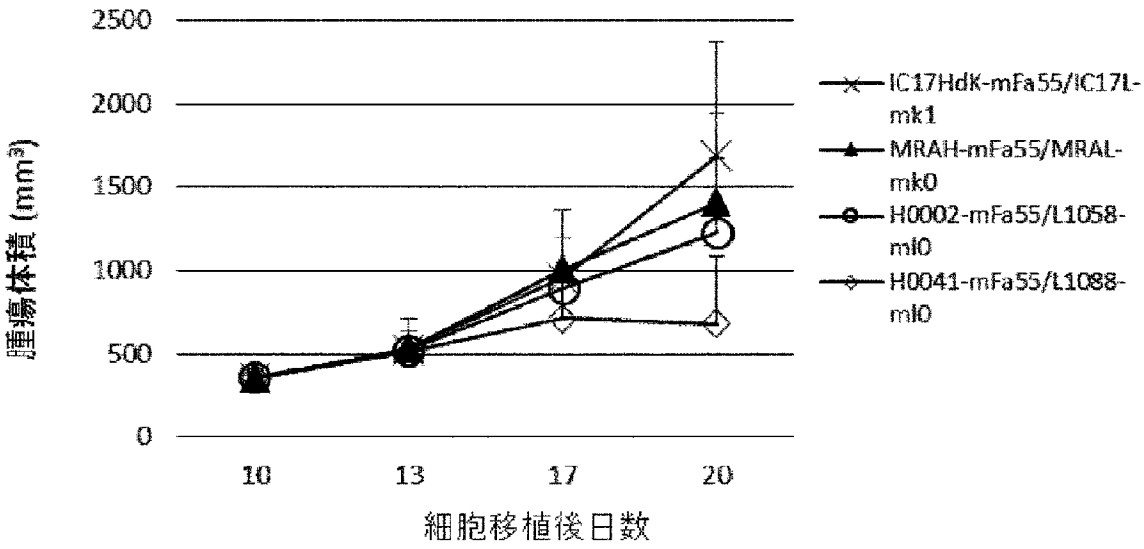
[図70]


血漿中抗体濃度（μg/mL）
1000
100
10
1
0
1
2
3
4
5
6
7
時間（日）
-□-正常マウス
-■-hIL6R-マウス

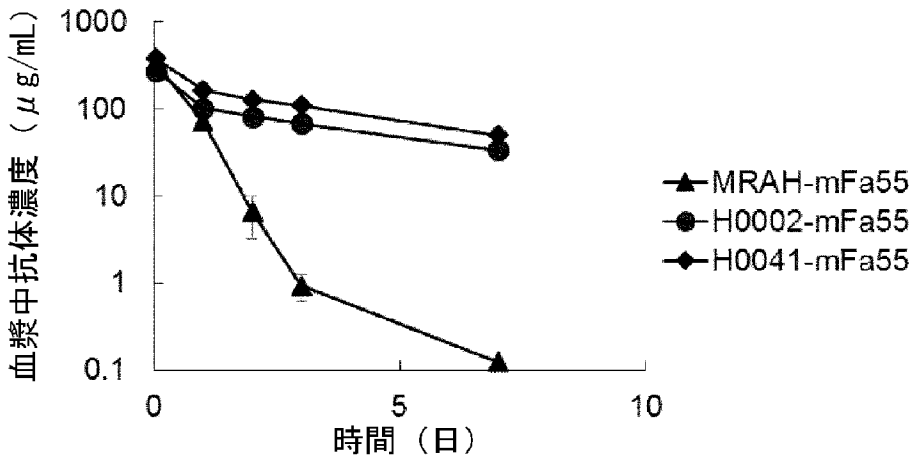
[図71]


血漿中shIL6R濃度（ng/mL）
10000
1000
100
0
2
4
6
8
時間（日）
KLH-mFa55
MRAH-mFa55
H0052-mFa55
H0041-mFa55
H0002-mFa55

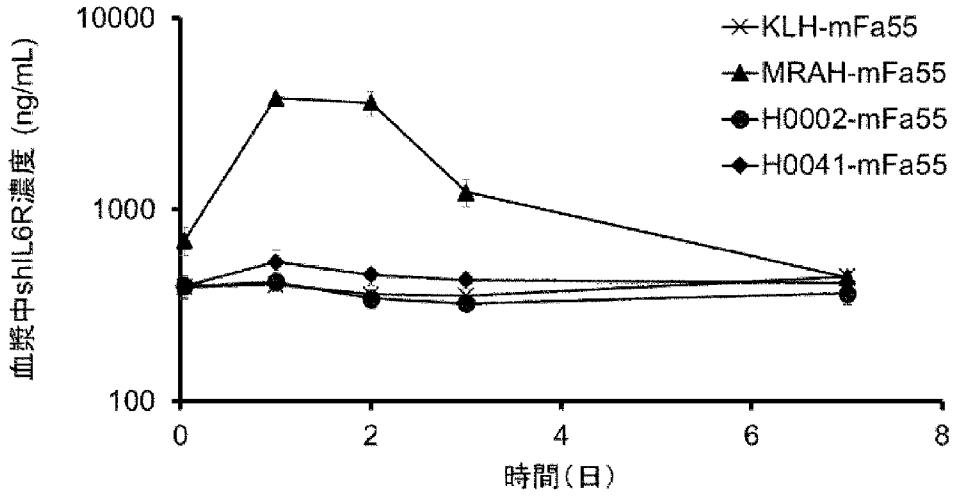
[図72]


腫瘍体積 (mm³)
2500
2000
1500
1000
500
0
10
13
17
20
細胞移植後日数
IC17HdK-mFa55/IC17L-mk1
MRAH-mFa55/MRAL-mk0
H0002-mFa55/L1058-mI0
H0041-mFa55/L1088-mI0

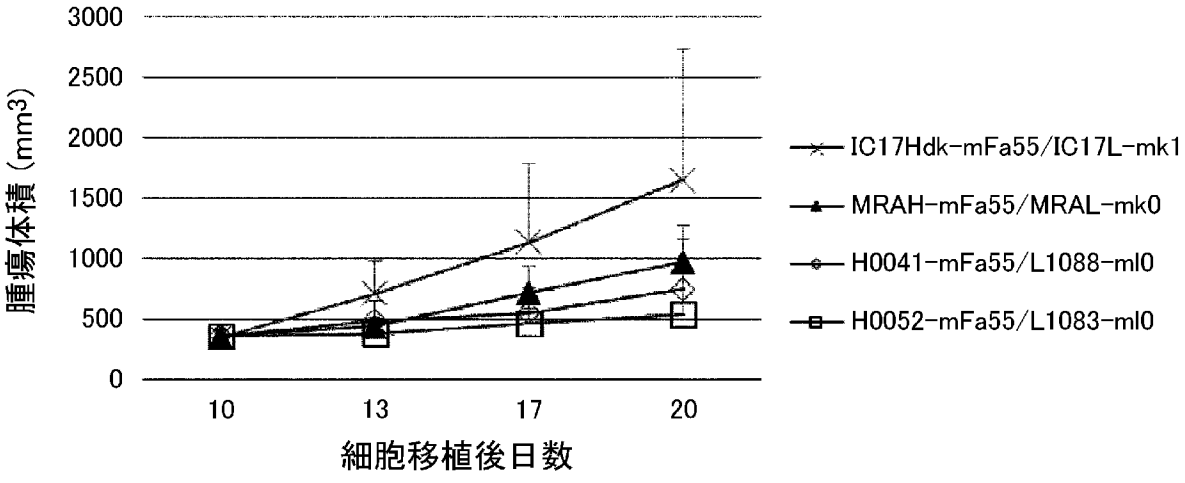
[図73]


血漿中抗体濃度（μg/mL）
1000
100
10
1
0.1
0
5
10
時間（日）
MRAH-mFa55
H0002-mFa55
H0041-mFa55

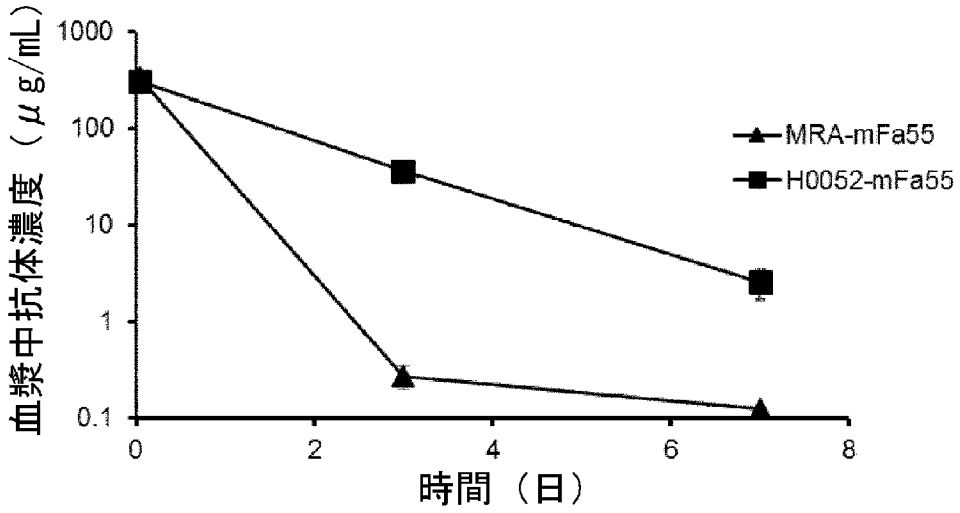
[図74]


血漿中shIL6R濃度（ng/mL）
10000
1000
100
0
2
4
6
8
時間（日）
KLH-mFa55
MRAH-mFa55
H0002-mFa55
H0041-mFa55

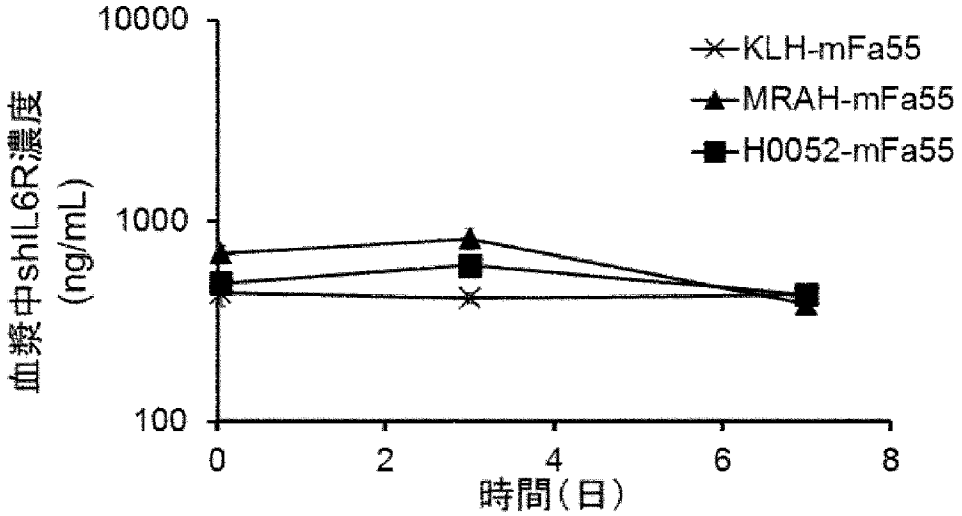
[図75]


腫瘍体積（mm3）
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
10
13
17
20
細胞移植後日数
IC17Hdk-mFa55/IC17L-mk1
MRAH-mFa55/MRAL-mk0
H0041-mFa55/L1088-ml0
H0052-mFa55/L1083-ml0

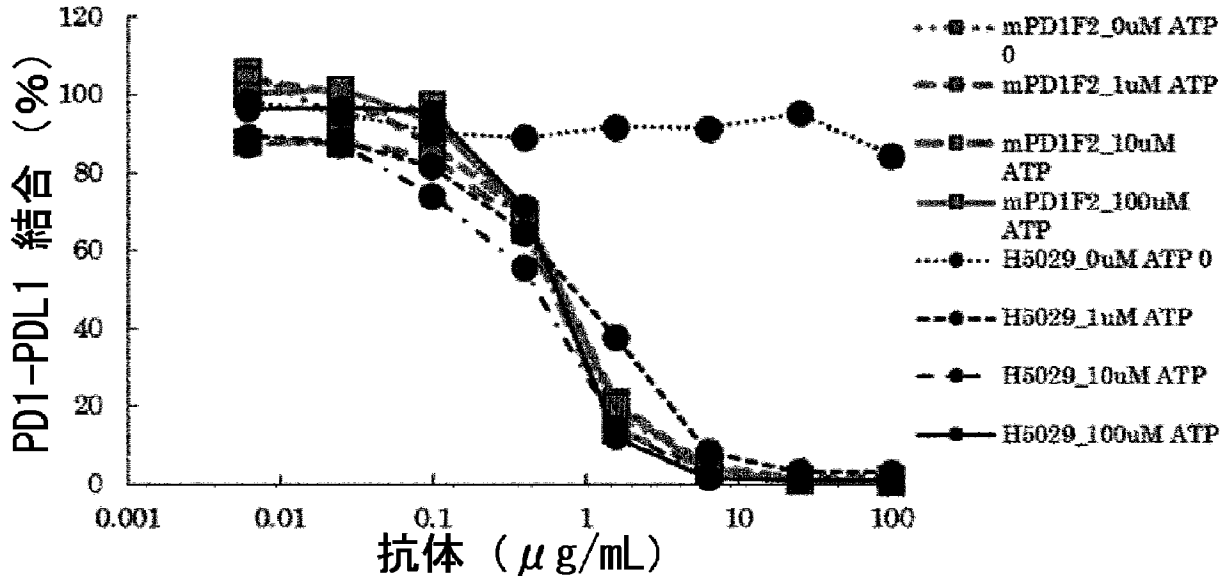
[図76]


血漿中抗体濃度（μg/mL）
1000
100
10
1
0.1
0
2
4
6
8
時間（日）
MRA-mFa55
H0052-mFa55

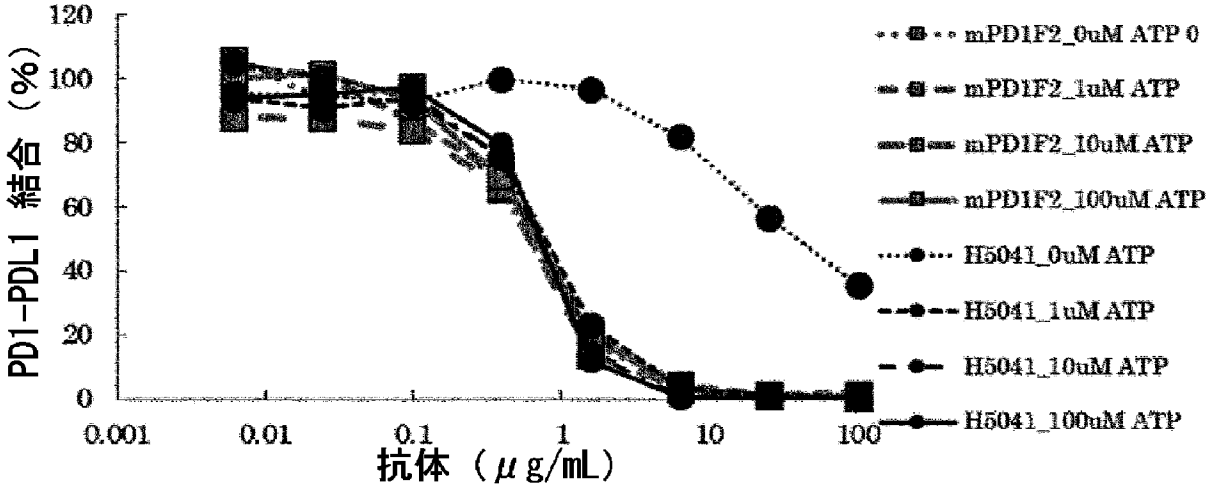
[図77]


血漿中shIL6R濃度
(ng/mL)
10000
1000
100
0
2
4
6
8
時間(日)
KLH-mFa55
MRAH-mFa55
H0052-mFa55

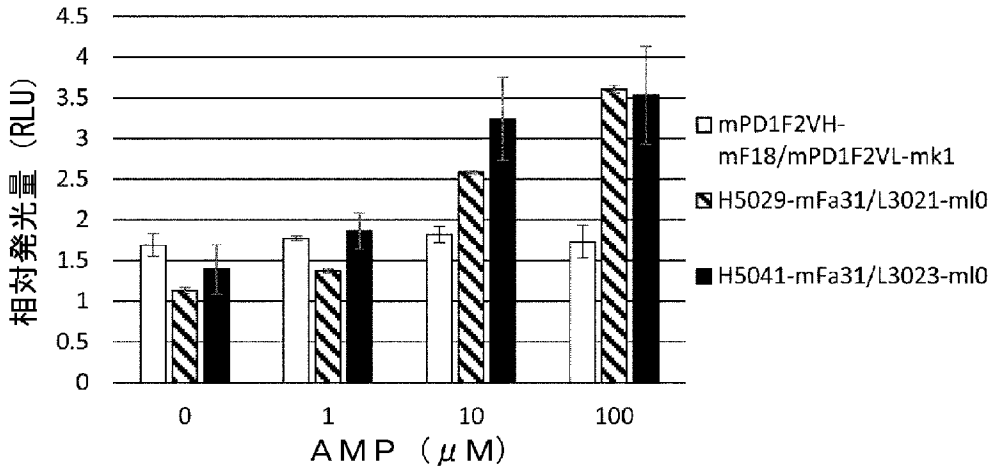
[図78]


PD1-PDL1 結合（%）
120
100
80
60
40
20
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
抗体（μg/mL）
mPD1F2_0uM ATP 0
mPD1F2_1uM ATP
mPD1F2_10uM ATP
mPD1F2_100uM ATP
H5029_0uM ATP 0
H5029_1uM ATP
H5029_10uM ATP
H5029_100uM ATP

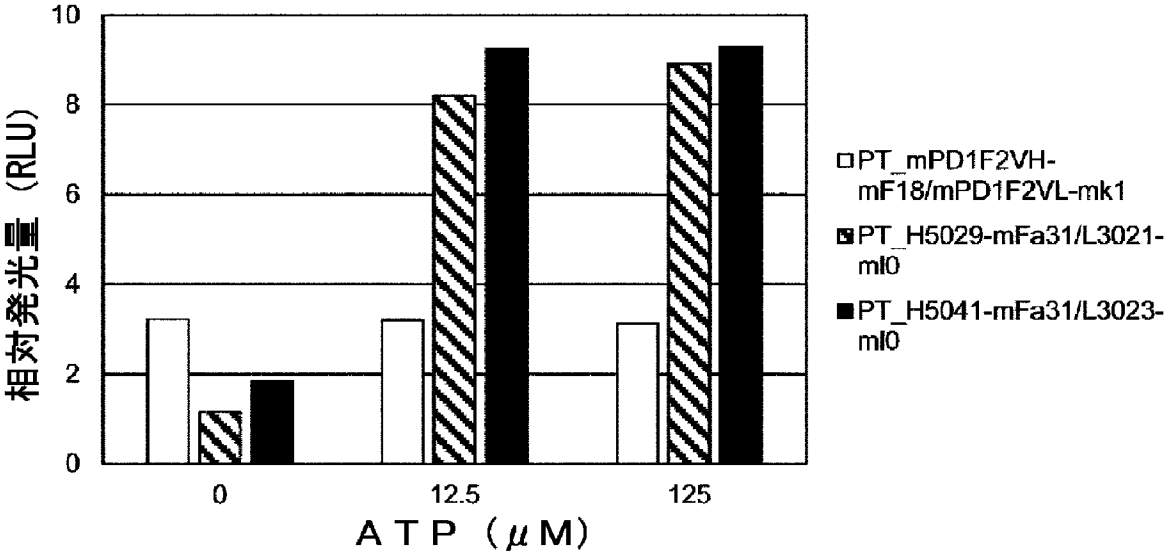
[図79]


PD1-PDL1 結合（%）
120
100
80
60
40
20
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
抗体（μg/mL）
mPD1F2_0uM ATP 0
mPD1F2_1uM ATP
mPD1F2_10uM ATP
mPD1F2_100uM ATP
H5041_0uM ATP
H5041_1uM ATP
H5041_10uM ATP
H5041_100uM ATP

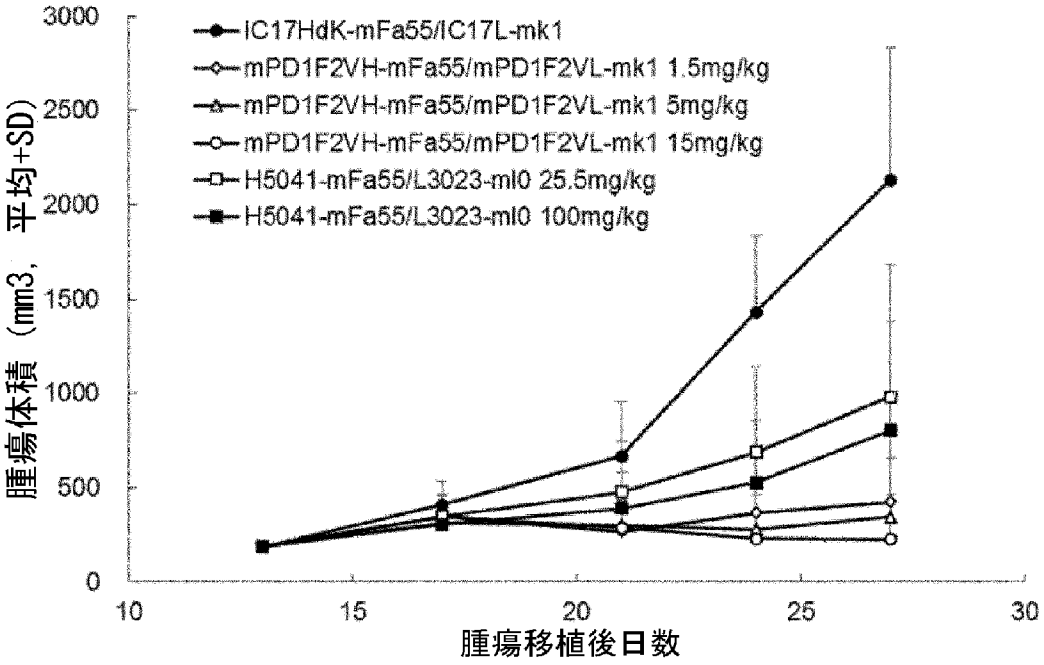
[図80]


相対発光量（RLU）
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
1
10
100
AMP（μM）
mPD1F2VH-mF18/mPD1F2VL-mk1
H5029-mFa31/L3021-ml0
H5041-mFa31/L3023-ml0

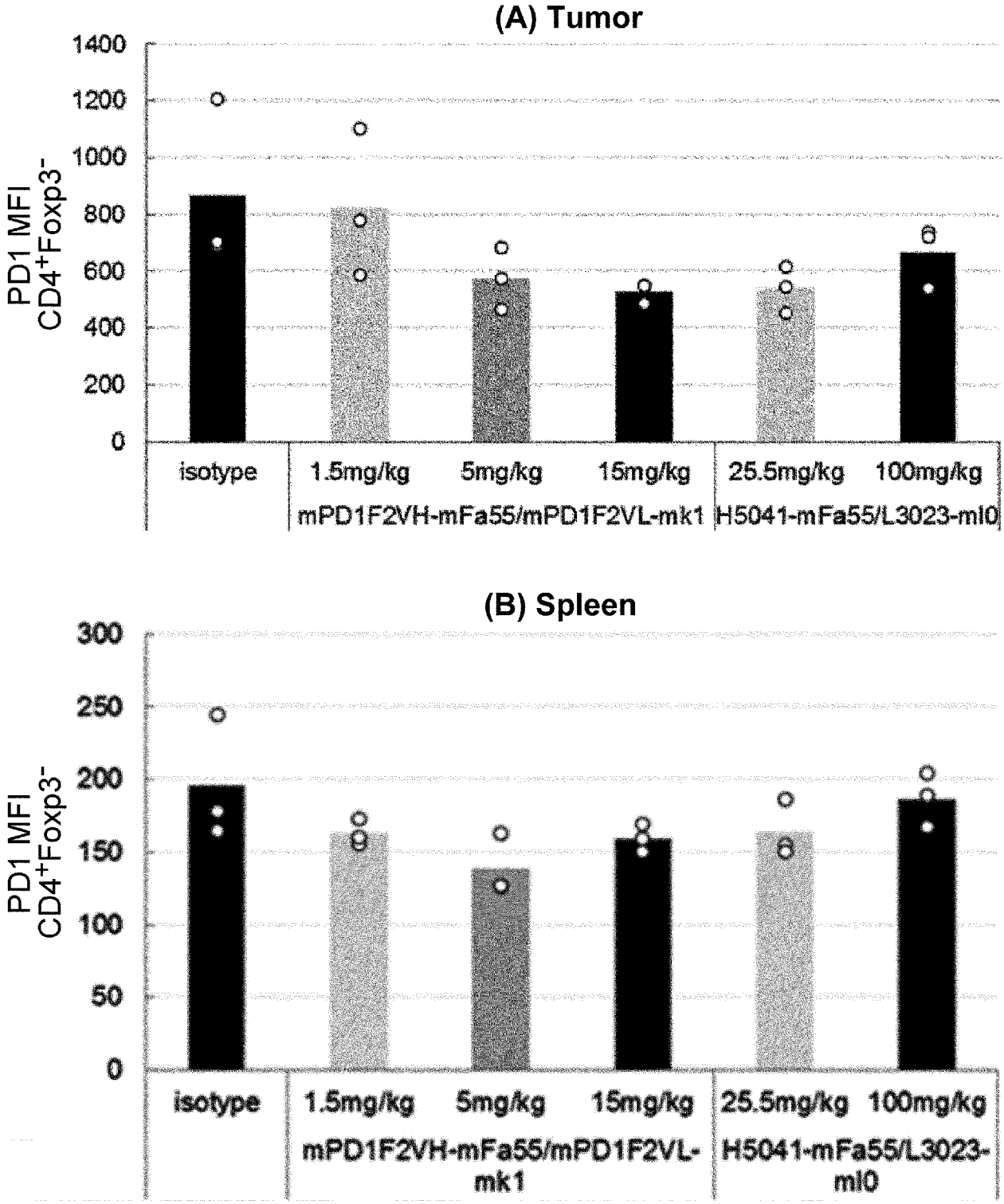
[図81]


相対発光量（RLU）
10
8
6
4
2
0
0
12.5
125
ATP（μM）
PT_mPD1F2VH-mF18/mPD1F2VL-mk1
PT_H5029-mFa31/L3021-ml0
PT_H5041-mFa31/L3023-ml0

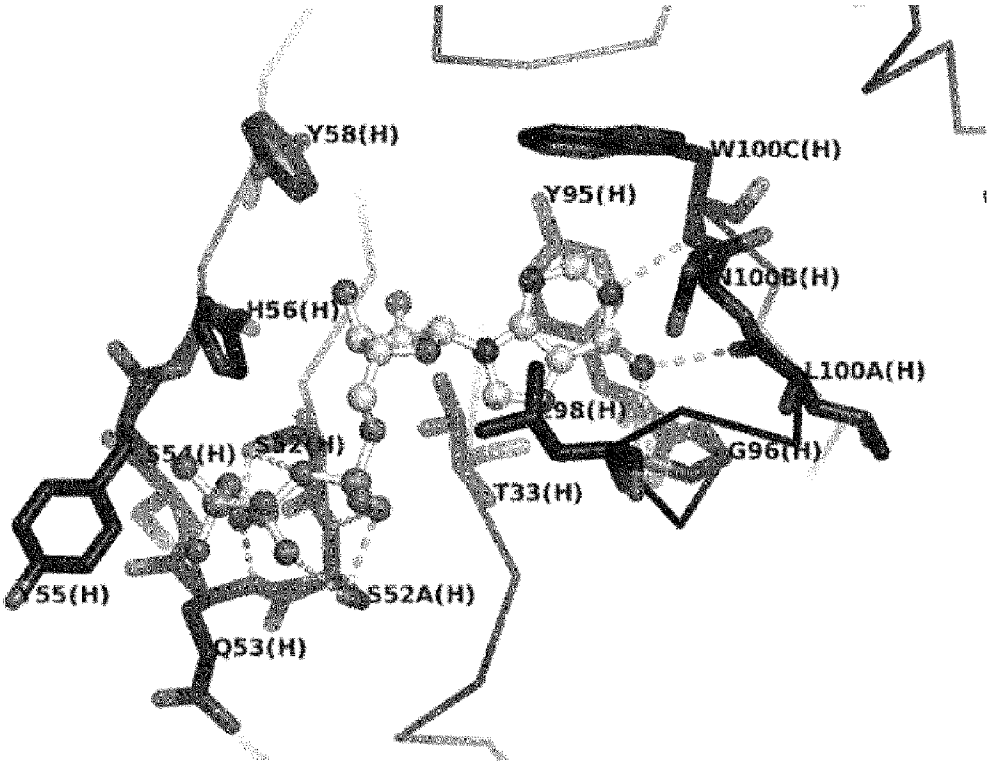
[図82]


IC17HdK-mFa55/IC17L-mk1
mPD1F2VH-mFa55/mPD1F2VL-mk1 1.5mg/kg
mPD1F2VH-mFa55/mPD1F2VL-mk1 5mg/kg
mPD1F2VH-mFa55/mPD1F2VL-mk1 15mg/kg
H5041-mFa55/L3023-ml0 25.5mg/kg
H5041-mFa55/L3023-ml0 100mg/kg
腫瘍体積（mm3，平均+SD）
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
10
15
20
25
30
腫瘍移植後日数

[図83]

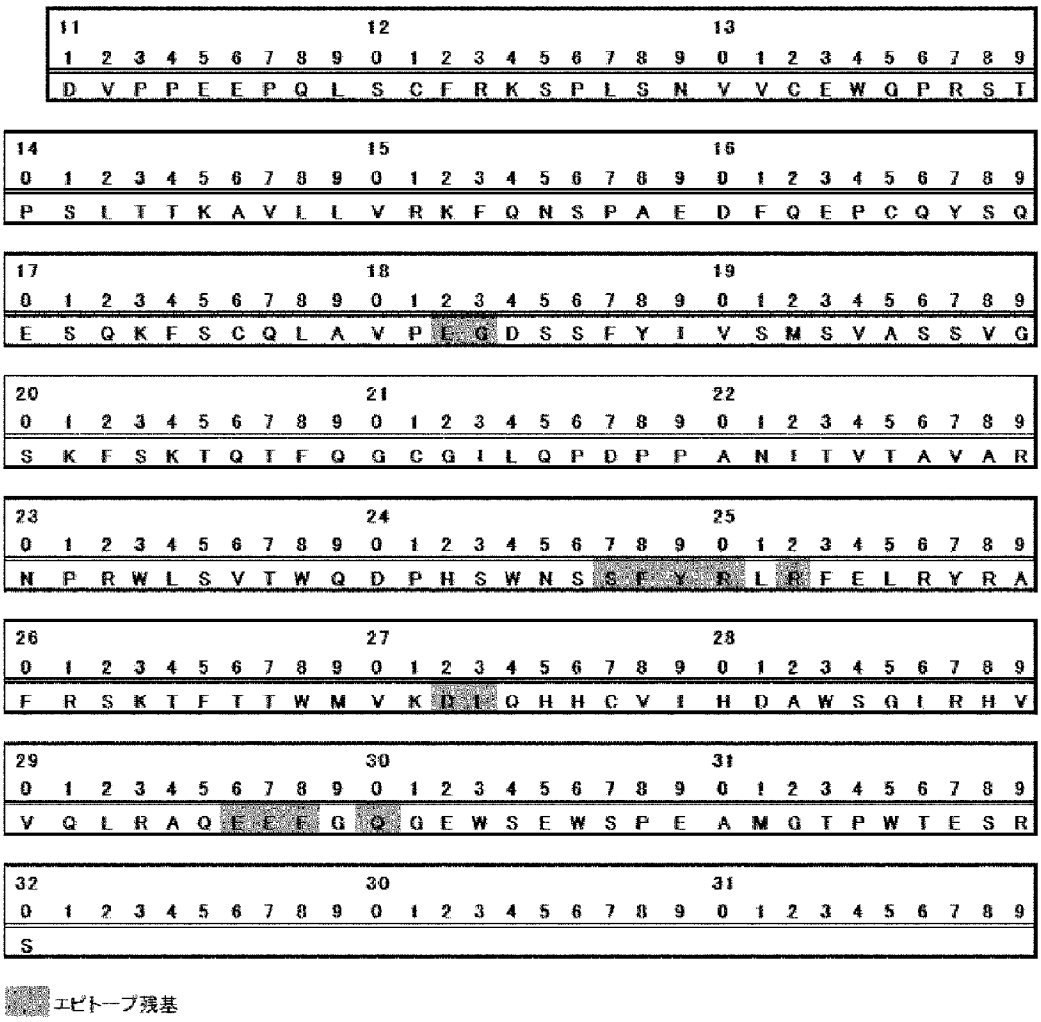

(A) Tumor
PD1 MFI
CD4+Foxp3-
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
isotype
1.5mg/kg
5mg/kg
15mg/kg
mPD1F2VH-mFa55/mPD1F2VL-mk1
25.5mg/kg
100mg/kg
H5041-mFa55/L3023-ml0
(B) Spleen
PD1 MFI
CD4+Foxp3-
300
250
200
150
100
50
0
isotype
1.5mg/kg
5mg/kg
15mg/kg
mPD1F2VH-mFa55/mPD1F2VL-mk1
25.5mg/kg
100mg/kg
H5041-mFa55/L3023-ml0

[図84]



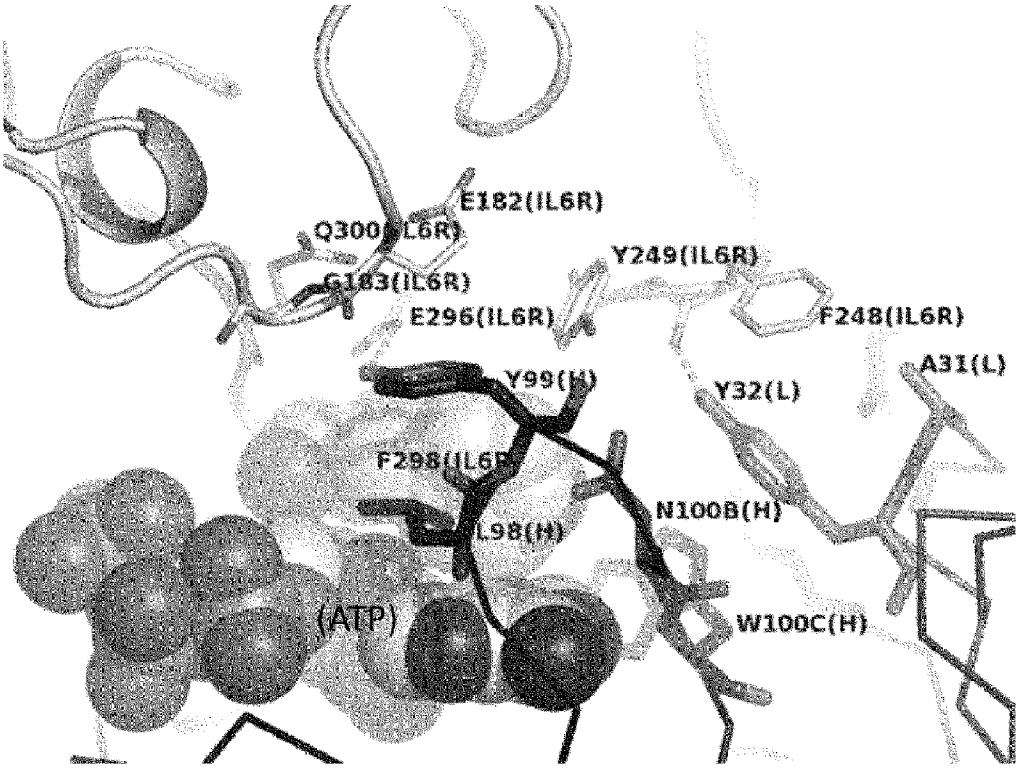
[図85]

shIL6R

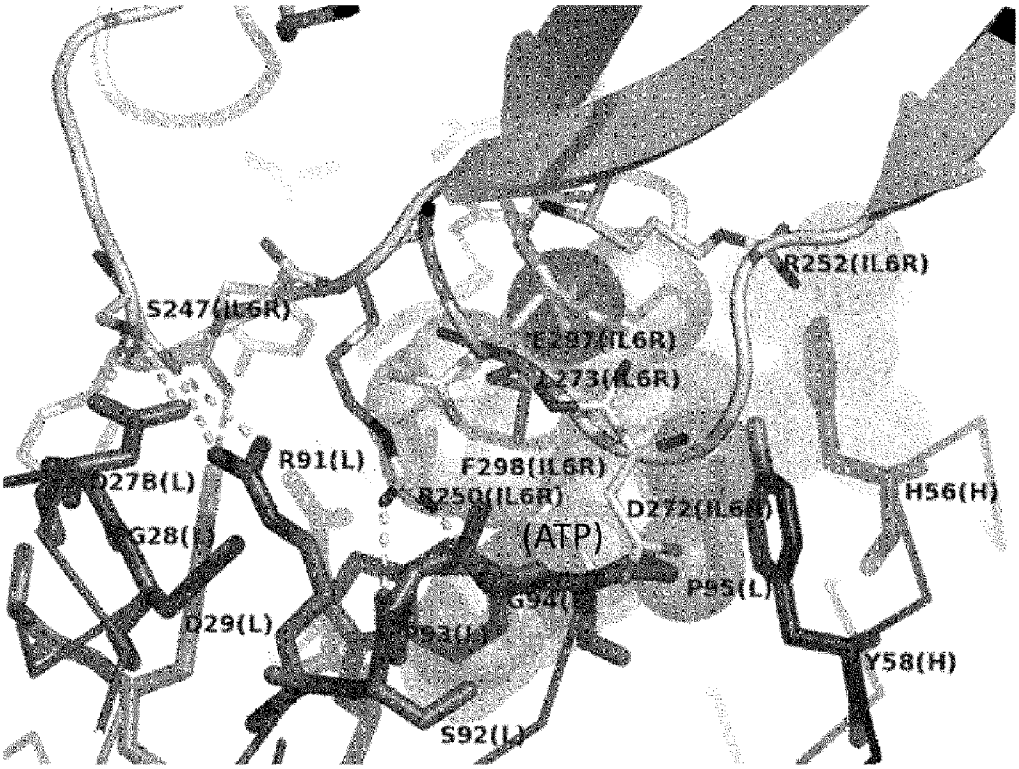


エピトープ残基

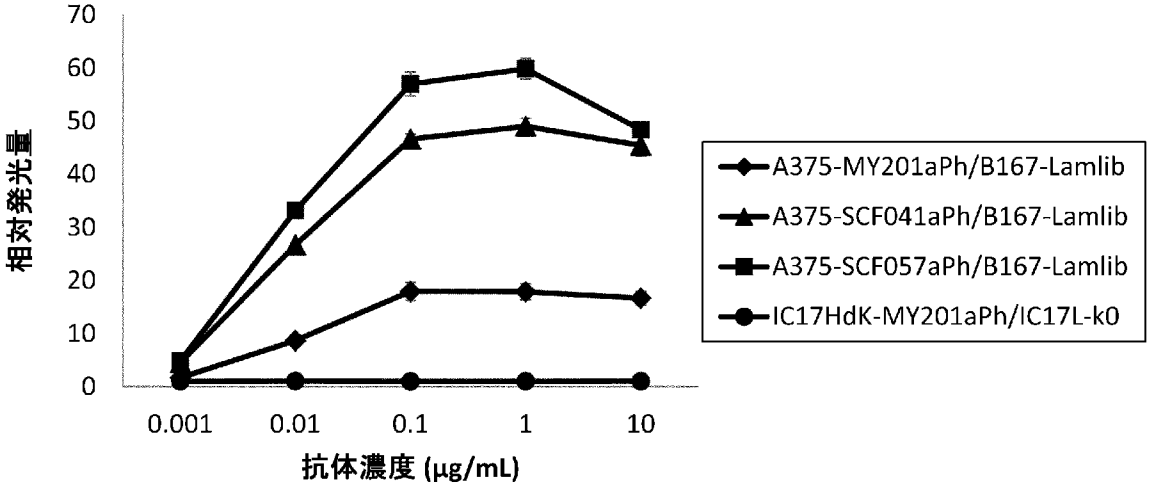
[図86]


E182(IL6R)
Q300(IL6R)
Y249(IL6R)
G183(IL6R)
E296(IL6R)
F248(IL6R)
A31(L)
Y99(H)
Y32(L)
F298(IL6R)
N100B(H)
L98(H)
(ATP)
W100C(H)

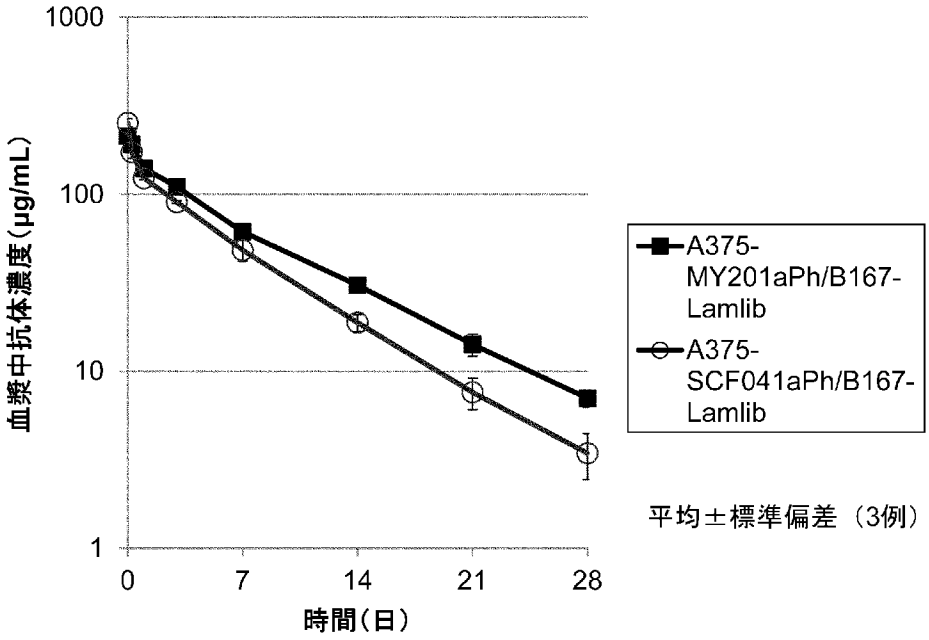
[図87]


R252(IL6R)
S247(IL6R)
E287(IL6R)
D273(IL6R)
R91(L)
F298(IL6R)
D27B(L)
R250(IL6R)
H56(H)
G28(L)
(ATP)
P95(L)
G94(L)
D29(L)
Y58(H)
S92(L)

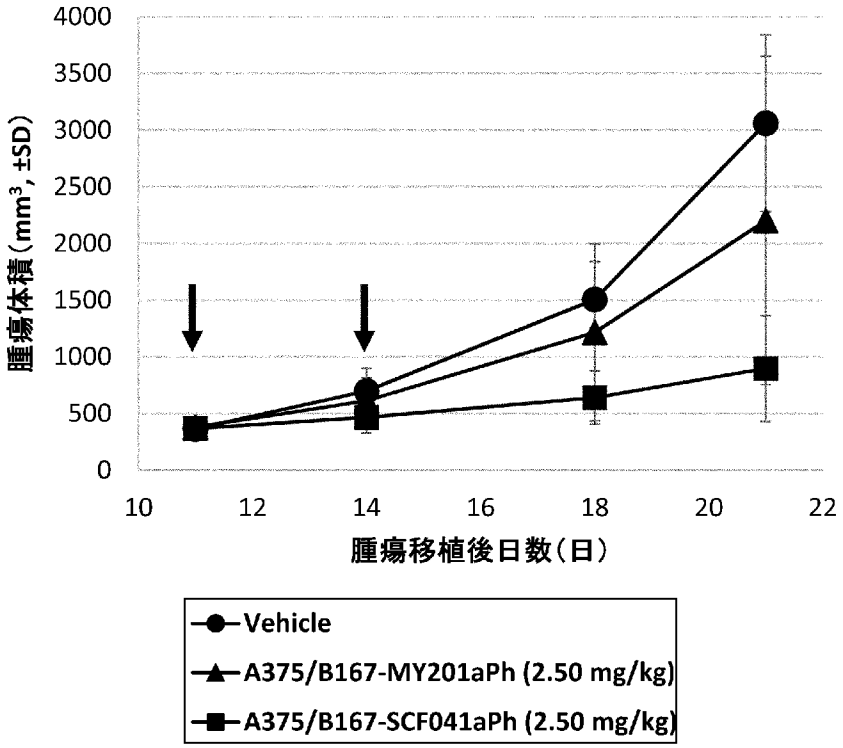
[図88]


相対発光量
70
60
50
40
30
20
10
0
0.001
0.01
0.1
1
10
抗体濃度 (μg/mL)
A375-MY201aPh/B167-Lamlib
A375-SCF041aPh/B167-Lamlib
A375-SCF057aPh/B167-Lamlib
IC17HdK-MY201aPh/IC17L-k0

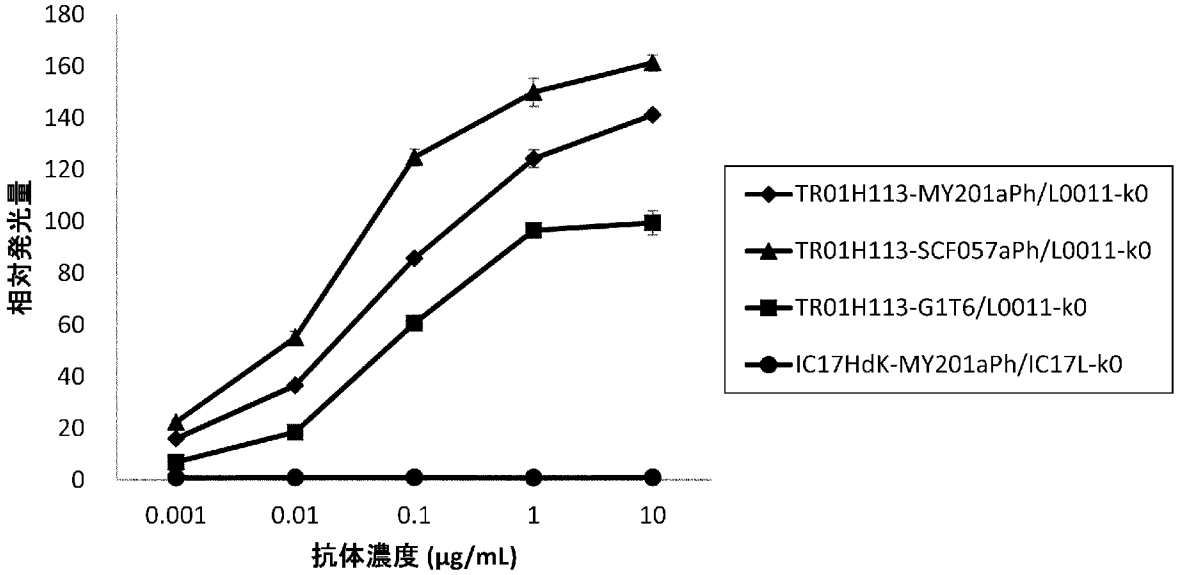
[図89]


血漿中抗体濃度(μg/mL)
1000
100
10
1
0
7
14
21
28
時間(日)
A375-MY201aPh/B167-Lamlib
A375-SCF041aPh/B167-Lamlib
平均±標準偏差（3例）

[図90]


腫瘍体積(mm3, ±SD)
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
10
12
14
16
18
20
22
腫瘍移植後日数(日)
Vehicle
A375/B167-MY201aPh (2.50 mg/kg)
A375/B167-SCF041aPh (2.50 mg/kg)

[図91]


180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
相対発光量
0.001
0.01
0.1
1
10
抗体濃度 (μg/mL)
TR01H113-MY201aPh/L0011-k0
TR01H113-SCF057aPh/L0011-k0
TR01H113-G1T6/L0011-k0
IC17HdK-MY201aPh/lC17L-k0

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2019/031554

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl. C07K16/28(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61K47/64(2017.01)i, A61K47/68(2017.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/13(2006.01)i, C12N15/63(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl. C07K16/28, A61K39/395, A61K47/64, A61K47/68, A61P35/00, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N15/13, C12N15/63, C12P21/08

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2019
Registered utility model specifications of Japan	1996-2019
Published registered utility model applications of Japan	1994-2019

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/REGISTRY/WPIDS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2013/180200 A1 (CHUGAI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 05 December 2013, claims, background art, paragraphs [0020], [0051]-[0075], examples & US 2015/0166654 A1, claims, background art, paragraphs [0091], [0123]-[0142], examples & EP 2857420 A1 & AU 20132688418 A & CA 284721 A & KR 10-2015-0016579 A & CN 104487457 A & TW 201326209 A & RU 2014154067 A & MX 2014014678 A	1-13

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

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
25 October 2019 (25.10.2019)	05 November 2019 (05.11.2019)

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2019/031554

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2015/083764 A1 (CHUGAI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 11 June 2015, claims, background art, paragraphs [0022], [0056]-[0081], [0320], examples, reference examples & US 2016/0304862 A1, claims, background art, paragraphs [0147], [0186]-[0202], [0561], examples, reference examples & EP 3078744 A1 & AU 2014358191 A & CA 2931296 A & KR 10-2016-0093666 A & CN 105980557 A & TW 201610247 A	1-13
A	WO 2016/194992 A1 (CHUGAI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 08 December 2016, claims, paragraph [0010], examples & US 2018/0171017 A1, claims, paragraph [0025], examples & EP 3305322 A1	1-13
A	JP 2018-517674 A (CUREVAC AG) 05 July 2018, claims, examples & WO 2016/170176 A1, claims, examples & US 2016/0331844 A1 & EP 3173092 A1 & TW 201704250 A & CA 2975333 A & KR 10-2017-0138548 A & CN 108064176 A & MX 2017013321 A	1-13
A	WO 2015/190538 A1 (IDAC THERANOSTICS, INC.) 17 December 2015, entire text & US 2017/0145099 A1, whole document & EP 3156072 A1	1-13

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１９／０３１５５４

A.　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C07K16/28(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61K47/64(2017.01)i, A61K47/68(2017.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/13(2006.01)i, C12N15/63(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i

B.　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C07K16/28, A61K39/395, A61K47/64, A61K47/68, A61P35/00, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, C12N15/13, C12N15/63, C12P21/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１９年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１９年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１９年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/REGISTRY/WPIDS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), UniProt/GeneSeq

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	WO 2013/180200 A1 (中外製薬株式会社) 2013.12.05, 請求の範囲, 背景技術, [0020], [0051]-[0075], 実施例, & US 2015/0166654 A1, claims, background art, [0091],[0123]-[0142], examples, & EP 2857420 A1 & AU 20132688418 A & CA 284721 A & KR 10-2015-0016579 A & CN 104487457 A & TW 201326209 A & RU 2014154067 A & MX 2014014678 A	1-13

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
２５．１０．２０１９	０５．１１．２０１９

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｂ　９４５１
坂崎　恵美子
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

C（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	WO 2015/083764 A1（中外製薬株式会社）2015.06.11, 請求の範囲，背景技術，[0022]，[0056]-[0081]，[0320]，実施例，参考実施例， & US 2016/0304862 A1，claims，background art， [0147],[0186]-[0202]，[0561]，examples，reference examples， & EP 3078744 A1 & AU 2014358191 A & CA 2931296 A & KR 10-2016-0093666 A & CN 105980557 A & TW 201610247 A	1-13
A	WO 2016/194992 A1（中外製薬株式会社）2016.12.08, 請求の範囲，[0010]，実施例， & US 2018/0171017 A1，claims，[0025]，examples， & EP 3305322 A1	1-13
A	JP 2018-517674 A（キュアバック　アーゲー）2018.07.05, 請求の範囲，実施例， & WO 2016/170176 A1，claims，examples， & US 2016/0331844 A1 & EP 3173092 A1 & TW 201704250 A & CA 2975333 A & KR 10-2017-0138548 A & CN 108064176 A & MX 2017013321 A	1-13
A	WO 2015/190538 A1（ＩＤＡＣセラノスティクス株式会社） 2015.12.17, 文献全体， & US 2017/0145099 A1，whole document， & EP 3156072 A1	1-13