(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2023-549316
(P2023-549316A)
(43)公表日　令和5年11月24日(2023.11.24)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C07K 16/28	*(2006.01)*	C07K	16/28		4C076
A61P 35/00	*(2006.01)*	A61P	35/00	ZNA	4C085
A61P 11/00	*(2006.01)*	A61P	11/00		4H045
A61K 39/395	*(2006.01)*	A61K	39/395	E	
A61P 43/00	*(2006.01)*	A61K	39/395	T	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全89頁）　最終頁に続く

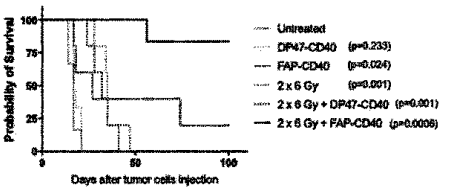
(21)出願番号　特願2023-524957(P2023-524957)
(86)(22)出願日　令和3年11月15日(2021.11.15)
(85)翻訳文提出日　令和5年5月8日(2023.5.8)
(86)国際出願番号　PCT/EP2021/081610
(87)国際公開番号　WO2022/101458
(87)国際公開日　令和4年5月19日(2022.5.19)
(31)優先権主張番号　20207768.1
(32)優先日　令和2年11月16日(2020.11.16)
(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　514099673
エフ・ホフマン－ラ・ロシュ・アクチェンゲゼルシャフト
スイス国 シーエイチ－４０７０ バーゼル グレンツァッハーシュトラーセ １２４
(74)代理人　110002077
園田・小林弁理士法人
(72)発明者　ラビアーノ アルミナーナ， サラ
スペイン国 ３１６２１ ナバラ サリグレン， カジェ エリズメンディ ５１，３階
(72)発明者　ロメロ， ペドロ
スイス国 １０１１ ローザンヌ， リュ デュ ビュニョン ４６， シー／オー ソントレ ホスピタリエ ユニヴェシテール
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ＦＡＰを標的としたＣＤ４０アゴニストとの併用療法

(57)【要約】
本開示は、ＦＡＰを標的としたＣＤ４０アゴニスト（特に、線維芽細胞活性化タンパク質（ＦＡＰ）に特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインとＣＤ４０に特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗原結合分子）及び放射線療法を用いる併用療法に関する。
【選択図】図２Ｂ

FIG.2B



【特許請求の範囲】
【請求項１】
個体における固形腫瘍の治療における使用のための二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子であって、放射線療法との併用で使用され、腫瘍関連抗原に特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインを含む、個体における固形腫瘍の治療における使用のための二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子。
【請求項２】
ＣＤ４０に特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインと、線維芽細胞活性化タンパク質（ＦＡＰ）に特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインとを含む、請求項１に記載の使用のための二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子。
【請求項３】
放射線療法との同時又は順次投与のためのものである、請求項１又は２に記載の使用のための二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子。
【請求項４】
放射線療法後の投与のためのものである、請求項１から３のいずれか一項に記載の使用のための二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子。
【請求項５】
放射線療法が、外部照射療法又は近接照射療法から選択される局所放射線療法を含む、請求項１から４のいずれか一項に記載の使用のための二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子。
【請求項６】
放射線療法が局所的な少分割放射線照射を含む、請求項１から５のいずれか一項に記載の使用のための二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子。
【請求項７】
放射線療法が、１．８から２０Ｇｙの範囲の線量での局所的な少分割放射線照射を含む、請求項１から６のいずれか一項に記載の使用のための二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子。
【請求項８】
放射線療法が、２×６Ｇｙの範囲の線量での局所的な少分割放射線照射を含む、請求項１から６のいずれか一項に記載の使用のための二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子。
【請求項９】
固形腫瘍が、頭頸部がん、メラノーマ、肺がん、腎臓がん、乳がん、結腸がん、卵巣がん、子宮頸がん、膵臓がん、肝臓がん、前立腺がん、膀胱がん、胃がん、膠芽細胞腫、及び肉腫から成る群より選択される、請求項１から８のいずれか一項に記載の使用のための二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子。
【請求項１０】
固形腫瘍が頭頸部がんである、請求項１から９のいずれか一項に記載の使用のための二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子。
【請求項１１】
固形腫瘍が肺がん、特に非小細胞肺がん（ＮＳＣＬＣ）である、請求項１から９のいずれか一項に記載の使用のための二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子。
【請求項１２】
二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子がＩｇＧ　Ｆｃドメイン、具体的にはＩｇＧ１　Ｆｃドメイン又はＩｇＧ４　Ｆｃドメインを含む抗原結合分子であり、Ｆｃドメインが当該抗体のＦｃ受容体への結合親和性及び／又はエフェクター機能を低減させる１又は複数のアミノ酸置換を含む、請求項１から１０のいずれか一項に記載の使用のための二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子。
【請求項１３】
アミノ酸変異Ｌ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ及びＰ３２９Ｇ（Ｋａｂａｔ　ＥＵインデックス

による番号付け）を有するヒトＩｇＧ１サブクラスのＦｃドメインを含む、請求項１２に記載の使用のための二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子。
【請求項１４】
ＣＤ４０に特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインを含む、請求項１から１３のいずれか一項に記載の使用のための二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子であって、前記抗原結合ドメインが、（ｉ）配列番号１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（V_HＣＤ４０）と、（ｉｖ）配列番号４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｖ）配列番号５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、及び（ｖｉ）配列番号６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（V_LＣＤ４０）とを含む、使用のための二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子。
【請求項１５】
ＣＤ４０に特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインを含む、請求項１から１４のいずれか一項に記載の使用のための二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子であって、前記抗原結合ドメインが、配列番号７のアミノ酸配列を含むＶＨと配列番号８のアミノ酸配列を含むＶＬとを含む、使用のための二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子。
【請求項１６】
ＦＡＰに特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインを含む、請求項１から１５のいずれか一項に記載の使用のための二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子であって、前記抗原結合ドメインが、
（ａ）（ｉ）配列番号９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号１０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号１１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（V_HＦＡＰ）と、（ｉｖ）配列番号１２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｖ）配列番号１３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、及び（ｖｉ）配列番号１４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（V_LＦＡＰ）、又は
（ｂ）（ｉ）配列番号１７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号１８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号１９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（V_HＦＡＰ）と、（ｉｖ）配列番号２０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｖ）配列番号２１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、及び（ｖｉ）配列番号２２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（V_LＦＡＰ）、又は
（ｃ）（ｉ）配列番号２５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号２６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号２７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（V_HＦＡＰ）と、（ｉｖ）配列番号２８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｖ）配列番号２９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、及び（ｖｉ）配列番号３０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（V_LＦＡＰ）と、
を含む、使用のための二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子。
【請求項１７】
ＦＡＰに特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインを含む、請求項１から１６のいずれか一項に記載の使用のための二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子であって、前記抗原結合ドメインが（ｉ）配列番号９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号１０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号１１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（V_HＦＡＰ）と、（ｉｖ）配列番号１２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｖ）配列番号１３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、及び（ｖｉ）配列番号１４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（V_LＦＡＰ）とを含む、使用のための二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分

子。
【請求項１８】
ＦＡＰに特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインを含む、請求項１から１７のいずれか一項に記載の使用のための二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子であって、前記抗原結合ドメインが、
（ａ）配列番号１５のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（V_HＦＡＰ）及び配列番号１６のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（V_LＦＡＰ）、
（ｂ）配列番号２３のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（V_HＦＡＰ）及び配列番号２４のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（V_LＦＡＰ）、又は
（ｃ）配列番号３１のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（V_HＦＡＰ）及び配列番号３２のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（V_LＦＡＰ）
を含む、使用のための二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子。
【請求項１９】
（ｉ）ＣＤ４０に特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインであって、配列番号７のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（V_HＣＤ４０）及び配列番号８のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（V_LＣＤ４０）を含む抗原結合ドメインと、
（ｉｉ）ＦＡＰに特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインであって、配列番号１５のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（V_HＦＡＰ）及び配列番号１６のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（V_LＦＡＰ）を含む抗原結合ドメインとを含む、
請求項１から１８のいずれか一項に記載の使用のための二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子。
【請求項２０】
（ａ）ＣＤ４０に特異的結合可能な少なくとも２つのＦａｂ断片であって、そのＣ末端でＦｃ領域のＮ末端に融合しているＦａｂ断片、及び
（ｂ）ＦＡＰに特異的結合可能な１つの抗原結合ドメインであって、そのＮ末端で前記Ｆｃ領域のＣ末端に融合している抗原結合ドメイン
を含む、請求項１から１９のいずれか一項に記載の使用のための二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子。
【請求項２１】
（ａ）ＣＤ４０に特異的結合可能な少なくとも２つのＦａｂ断片であって、そのＣ末端でＦｃ領域のＮ末端に融合しているＦａｂ断片、及び
（ｂ）ＦＡＰに特異的結合可能な交差ｆａｂ断片であって、前記Ｆｃ領域のＣ末端に融合している交差ｆａｂ断片
を含む、請求項１から２０のいずれか一項に記載の使用のための二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子。
【請求項２２】
ＦＡＰに特異的結合可能な交差ｆａｂ断片を含み、交差ｆａｂ断片のＶＨ－Ｃカッパ鎖が前記Ｆｃ領域のＣ末端に融合している、請求項２１に記載の使用のための二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子。
【請求項２３】
ＣＤ４０に特異的結合可能な４つのＦａｂ断片を含み、各２つのＦａｂ断片が互いに融合しており、そのＣ末端でＦｃ領域のＮ末端に融合している、請求項１から２２のいずれか一項に記載の使用のための二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子。
【請求項２４】
（ｉ）個体が、放射線療法と併用した治療的有効量の二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子で治療されると、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子を単独療法として受けた個体又は放射線療法を単独療法として受けた個体と比較して上昇した生存率を有するか、或いは
（ｉｉ）個体における固形腫瘍のサイズが、単独療法として使用される二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子及び単独療法として使用される放射線療法での治療による前

記サイズの縮小分である相加量よりも大きく縮小する、
請求項１から２３のいずれか一項に記載の使用のための二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子。
【請求項２５】
二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子を薬学的有効量で含む、固形腫瘍の治療における使用のための薬学的組成物であって、前記治療が放射線療法との併用を含み、前記二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子が、腫瘍関連抗原に特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインを含む、薬学的組成物。
【請求項２６】
個体における固形腫瘍を治療するための医薬の製造における二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子の使用であって、前記二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子が、放射線療法との併用のためのものであり、腫瘍関連抗原に特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインを含む、使用。
【請求項２７】
有効量の二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子と有効量の放射線療法とを対象に投与することを含む、個体における固形腫瘍を治療するための方法であって、前記二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子が、腫瘍関連抗原に特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインを含む、方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、ＦＡＰを標的としたＣＤ４０アゴニスト（特に、線維芽細胞活性化タンパク質（ＦＡＰ）に特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインとＣＤ４０に特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗原結合分子）及び放射線療法を使用する併用療法、並びに固形腫瘍の治療のためのこれらの併用療法の使用及び使用方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
がんは、世界的に最も多い死因の１つである。治療オプションの進歩にも関わらず、進行がん患者の予後は依然として芳しくない。したがって、許容できない毒性を引き起こすことなくがん患者の生存率を上昇させるための最適な治療法に対し、持続的で緊急の医学的必要性が存在する。臨床治験の最近の結果により、免疫療法ががん患者の全生存期間を延ばし、持続的な応答をもたらすことが示された。このような有望な結果にも関わらず、現行の免疫に基づく治療法は患者の一部にしか有効ではなく、治療効果を向上させるために併用戦略が必要とされている。
【０００３】
放射線療法（ＲＴ）は、限局した腫瘍に対する重要な処置様式である。ＲＴは通常、主に有糸分裂による細胞死を誘導するが、アポトーシス［９］及び腫瘍微小環境に対する複雑な影響ももたらし、抗原提示細胞とエフェクターＴ細胞のホーミングを促進することができる。亜致死量の電離放射線は、主要組織適合複合体（ＭＨＣ）の発現を直接刺激し、特異的Ｔ細胞による検出及び溶解に対する腫瘍細胞の感受性を高めることが報告されている。
【０００４】
年間８０万人以上の新規患者が発生している頭頸部がんは、世界で７番目に多いがんである。タバコ喫煙、アルコール摂取、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）感染は、ＨＮＳＣＣ発症の主な危険因子である（Chow, Head and Neck Cancer, N. Engl. J. Med. 2020, 382(1), 60-72）。ＨＰＶ関連頭頸部扁平上皮癌（ＨＰＶ＋　ＨＮＳＣＣ）は、ＨＰＶ陰性ＨＮＳＣＣと比較してより改善された転帰を有する頭頸部がんの特徴的なサブグループである。これは、ＨＰＶ＋　ＨＮＳＣＣの特異な生物学的特徴と、若年齢及びタバコやアルコールの乱用が少ないことなどの良好な患者特性との組み合わせによるもの

である。これらの患者においては放射線療法からの増大した持続的な恩恵が示されており、現在、線量漸減試験が進行中である（Ventz et al, Clin. Cancer Res. 2019, 25(24), 7281-7286）。しかし、治療指数を高め、毒性を抑えるためには、新しい併用戦略を統合することによる治療の更なる最適化が求められている。これらの新しいオプションの中で、免疫調節は、ＨＮＳＣＣの生検における腫瘍微小環境の特性評価からＨＮＳＣＣが１０大免疫浸潤性がんのうちの１つであることが明らかになっているため、有望なターゲットと思われる。この点については、少分割放射線療法の免疫賦活特性が証明されていることから、この治療様式は免疫療法の良好な併用パートナーとなる（Lhuillierら、Genome Med.2019;11(1), 40）。

【０００５】

ＨＰＶ$^{+}$頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）患者は放射線療法で良好な転帰を示したものの、彼らの多くは時間の経過とともに腫瘍の再発を経験している。したがって、新しい併用手法を含む治療の更なる最適化と治療関連毒性の低減が依然として必要である。

【０００６】

いくつかの共刺激分子の中でも、ＴＮＦＲファミリーメンバーのＣＤ４０は、抗原提示細胞（ＡＰＣ）細胞の成熟、生存、抗原提示、サイトカイン産生及び共刺激分子の発現を誘導し、ひいては炎症性サイトカインによる抗原特異的Ｔ細胞応答を作動させることにより、免疫応答を誘発するのに重要な役割を果たす。ＣＤ４０は、感染症、腫瘍、自己抗原に対する免疫応答を調節しており、その発現は、Ｂ細胞、樹状細胞（ＤＣ）、単球、マクロファージなどのＡＰＣや血小板、並びに筋線維芽細胞、線維芽細胞、上皮細胞及び内皮細胞などの非造血性細胞の表面で確認されている（Elgueta R.et al.,Immunol Rev.2009;229(1):152-72）。ＣＤ４０リガンドのＣＤ４０Ｌは、活性化ＣＤ４$^{+}$ヘルパーＴ細胞、血小板、単球細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、及び好塩基球に発現する（Carbone E.et.al.,J Exp Med.1997;1Carbone E. et. al., J Exp Med. 1997; 185(12): 2053-206又は Elgueta R. et al., Immunol Rev. 2009;229(1):152-72）。ＣＤ４０及びＣＤ４０Ｌの発現は、様々な免疫刺激シグナルに応答して強くアップレギュレートされ、ＡＰＣとＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞との間のＣＤ４０－ＣＤ４０Ｌ相互作用は、ＡＰＣ活性化及び抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞応答の増大に寄与する（Bevan MJ., Nat Rev Immunol. 2014;4(8):595-602）。同様の免疫刺激の結果は、ＣＤ４０アゴニスト抗体を使用することによって観察された（Vonderheide RH and Glennie MJ., Clin Cancer Res. 2013;19(5):1035-43）。

【０００７】

したがって、この所謂ＡＰＣのライセンシングを模倣できるアゴニスト抗ＣＤ４０抗体の使用は、がん免疫療法の文脈で有望な戦略である。特に、抗ＣＤ４０分子の、ＤＣを活性化し、その後腫瘍特異的Ｔ細胞の（クロス）プライミングを増加させる能力は、該分子を臨床開発において興味深いものたらしめている。ここ数年でいくつかのアゴニスト抗ＣＤ４０抗体が開発されている。すなわち、Ｃｈｉ　Ｌｏｂ　７／４（ＣＤ４０アゴニストＩｇＧ１キメラｍＡｂ； Cancer Research UK; Chowdhury F. et al., Cancer Immunol Res. 2013;2:229-40）、ＡＤＣ１０１３（完全ヒトＣＤ４０アゴニストＩｇＧ１抗体； Alligator Bioscience and Johnson & Johnson; Mangsbo SM. et al., Clin Cancer Res. 2015 Mar 1;21(5):1115-26）、ＡＰＸ－００５（完全ヒト化ＣＤ４０アゴニストＩｇＧ１　ｍＡｂ； Apexigen; Bjorck P. et al. J Immunother Cancer. 2015; 3(Suppl 2): P198)、ＳＥＡ－ＣＤ４０（ＣＤ４アゴニストＩｇＧ１キメラｍＡｂ； Seattle Genetics; Gardai SJ. et al. AACR 106th Annual Meeting 2015; April 18-22, abstract 2472）、及びＲＯ７００９７８９（完全ヒトＣＤ４０超アゴニストＩｇＧ２　ｍＡｂ）が第Ｉ相臨床試験実施中又は実施済みであり、ダセツズマブ（ＣＤ４０部分アゴニストＩｇＧ１キメラｍＡｂ； Seattle Genetics; Khubchandani S. et al., Curr Opin Investig Drugs. 2009;10,579-87）が第ＩＩ相臨床試験実施済みである。これらの試験の適格患者は、固形腫瘍、古典的ホジキンリンパ腫（ＨＬ）、びまん性大細胞型Ｂ細胞性リンパ腫（ＤＬＢＣＬ）又は緩徐進行

性リンパ腫（濾胞性リンパ腫を含む）を有していた。アゴニストＣＤ４０抗体の臨床開発では有望な初期結果が得られたものの、抗ＣＤ４０アゴニスト治療の大きな課題が明らかになった。様々な臨床試験において、サイトカイン放出症候群、肝毒性、血栓塞栓症などの用量制限的な副作用が観察されたため、使用された投与スケジュールと投与経路では、限られた臨床的有効性と抗体の局所投与しか可能にならないかもしれない。単剤応答の欠如は、部分的には、広範なＣＤ４０発現によって引き起こされるｏｎ　ｔａｒｇｅｔ／ｏｆｆ　ｔｕｍｏｒ効果が強いことによるものであり、その結果、用量制限毒性（例：サイトカイン放出症候群）をもたらす。ＣＤ４０が腫瘍特異的標的によって架橋されたときにＡＰＣを特異的に活性化するアゴニストＣＤ４０抗体の開発は、副作用を低減し、用量制限を減らし、効率的で持続性の抗がん免疫を生み出す可能性のある新しい治療オプションを提供する可能性がある。

【０００８】

ＣＤ４０及び線維芽細胞活性化タンパク質（ＦＡＰ）に特異的結合可能な二重特異性抗原結合分子は、国際公開第２０１８／１８５０４５号、国際公開第２０２０／０７００４１号又は国際公開第２０２０／０７００３５号に記載されている。上記分子は、ＦＡＰに結合可能な部分とＣＤ４０へのアゴニスト結合が可能な部分とを組み合わせており、ＣＤ４０を介したＡＰＣの活性化は、腫瘍間質細胞に発現したＦＡＰを介した架橋によってもたらされ、潜在的には二次リンパ組織に中程度に発現したＦＡＰを介した架橋によってももたらされる。活性化Ｔ細胞上のＣＴＬＡ－４又はＰＤ－１などの免疫チェックポイント受容体及びＣＤ４０に特異的結合可能な二重特異性抗原結合分子とは対照的に、ＦＡＰなどの腫瘍標的を標的にすると、線維芽細胞が他の組織と比較して増加したレベルのＦＡＰを発現する腫瘍間質及び腫瘍排出リンパ節で主にＣＤ４０を介したＡＰＣ活性化が可能になる。したがって、ＦＡＰを標的としたアゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、ＦｃγＲ架橋の必要性を克服することで副作用を低減しながら、効果的であるだけでなく、所望の部位において極めて選択的にＣＤ４０受容体を誘発することができる。

【０００９】

本発明者らは、ＦＡＰを標的としたＣＤ４０アゴニスト（特に、線維芽細胞活性化タンパク質（ＦＡＰ）に特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインとＣＤ４０に特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗原結合分子）及び放射線療法（特に局所少分割放射線療法）を用いる新しい併用療法をここに記載する。

【発明の概要】

【００１０】

本発明は、二重特異性アゴニストＣＤ４０－抗原結合分子（特に腫瘍関連抗原に特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインを含む二重特異性アゴニストＣＤ４０－抗原結合分子）と、その放射線療法との併用での使用、特に個体（特にヒト）における固形腫瘍の治療方法でのその使用に関する。本明細書に記載の併用療法は、腫瘍増殖の抑制及び腫瘍細胞の排除において、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子単独又は放射線療法単独による治療よりも有効であることが認められた。

【００１１】

したがって、個体における固形腫瘍の治療における使用のための二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子であって、放射線療法と併用で使用され、腫瘍関連抗原に特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインを含む二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子が提供される。具体的には、腫瘍関連抗原は線維芽細胞活性化タンパク質（ＦＡＰ）である。

【００１２】

いくつかの態様では、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、ＣＤ４０に特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインと、線維芽細胞活性化タンパク質（ＦＡＰ）に特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインとを含む。

【００１３】

いくつかの態様において、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、放射線療法

との同時投与又は順次投与のためのものである。いくつかの態様において、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、放射線療法後の投与のためのものである。いくつかの態様において、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、放射線照射後の単回投与のためのものである。いくつかの態様において、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、放射線照射の翌日の単回投与のためのものである。いくつかの態様において、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、放射線照射終了の翌日の投与のためのものである。いくつかの態様において、放射線療法は、局所放射線療法を含む。いくつかの態様において、局所放射線療法は、外部照射治療又は近接照射療法から選択される。ある態様において、放射線療法は、外部照射治療である。別の態様では、放射線療法は、近接照射療法である。いくつかの態様において、放射線療法は、１．８から２０Ｇｙの範囲、特に５から２０Ｇｙの範囲の線量での局所少分割放射線照射を含む。いくつかの態様において、放射線療法は、６Ｇｙ、好ましくは２×６Ｇｙの線量での局所少分割放射線照射を含む。いくつかの態様において、放射線療法は、１．８から２．２Ｇｙ、好ましくは２Ｇｙの範囲の線量での局所少分割放射線照射を含む。

【００１４】

いくつかの態様において、個体における固形腫瘍の治療における使用のための二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子であって、腫瘍関連抗原に特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインを含み、固形腫瘍が頭頸部がん、メラノーマ、肺がん、腎臓がん、乳がん、結腸がん、卵巣がん、子宮頸がん、すい臓がん、肝臓がん、前立腺がん、膀胱がん、胃がん、膠芽細胞腫から成る群より選択される二重特異性ＣＤ４０抗原結合分子が提供される。いくつかの態様において、腫瘍関連抗原はＦＡＰであり、腫瘍はＦＡＰを発現する間質によって特徴づけられる。いくつかの態様において、治療される固形腫瘍は、頭頸部がん又は肺がんである。特に、固形腫瘍は頭頸部がん、より具体的にはＨＰＶ$^{+}$頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）である。別の特定の態様では、固形腫瘍は肺がん、特に非小細胞肺がん（ＮＳＣＬＣ）である。

【００１５】

いくつかの態様では、個体における固形腫瘍の治療における使用のための二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、ＩｇＧ　Ｆｃドメイン、具体的にはＩｇＧ１　Ｆｃドメイン又はＩｇＧ４　Ｆｃドメインを含む抗原結合分子であり、Ｆｃドメインは、抗体のＦｃ受容体への結合親和性及び／又はエフェクター機能を低減させる１又は複数のアミノ酸置換を含む。特に、二重特異性アゴニストＣＤ４０結合分子は、アミノ酸置換Ｌ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ及びＰ３２９Ｇ（Ｋａｂａｔ　ＥＵインデックスによる番号付け）を有するヒトＩｇＧ１サブクラスのＦｃドメインを含む。

【００１６】

いくつかの態様において、個体における固形腫瘍の治療における使用のための二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、ＣＤ４０に特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインと線維芽細胞活性化タンパク質（ＦＡＰ）に特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインとを含む二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子であり、ここで、ＣＤ４０に特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインは、（ｉ）配列番号１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（V_HＣＤ４０）と、（ｉｖ）配列番号４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｖ）配列番号５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、及び（ｖｉ）配列番号６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（V_LＣＤ４０）とを含む。特に、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、配列番号７のアミノ酸配列を含むＶＨと配列番号８のアミノ酸配列を含むＶＬとを含む、ＣＤ４０に特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインを含む。

【００１７】

更なる態様において、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、ＦＡＰに特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインであって以下を含む少なくとも１つの抗原

結合ドメインを含む：
（ａ）（ｉ）配列番号９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号１０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号１１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（V_HＦＡＰ）と、（ｉｖ）配列番号１２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｖ）配列番号１３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、及び（ｖｉ）配列番号１４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（V_LＦＡＰ）、
又は
（ｂ）（ｉ）配列番号１７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号１８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号１９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（V_HＦＡＰ）と、（ｉｖ）配列番号２０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｖ）配列番号２１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、及び（ｖｉ）配列番号２２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（V_LＦＡＰ）、
又は
（ｃ）（ｉ）配列番号２５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号２６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号２７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（V_HＦＡＰ）と、（ｉｖ）配列番号２８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｖ）配列番号２９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、及び（ｖｉ）配列番号３０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（V_LＦＡＰ）
。

【００１８】

いくつかの態様において、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、（ｉ）配列番号９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号１０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号１１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（V_HＦＡＰ）と、（ｉｖ）配列番号１２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｖ）配列番号１３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、及び（ｖｉ）配列番号１４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（V_LＦＡＰ）とを含む、ＦＡＰに特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインを含む。別の態様において、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、（ｉ）配列番号１７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号１８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号１９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（V_HＦＡＰ）と、（ｉｖ）配列番号２０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｖ）配列番号２１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、及び（ｖｉ）配列番号２２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（V_LＦＡＰ）とを含む、ＦＡＰに特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインを含む。更に別の態様において、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、（ｉ）配列番号２５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号２６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号２７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（V_HＦＡＰ）と、（ｉｖ）配列番号２８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｖ）配列番号２９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、及び（ｖｉ）配列番号３０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（V_LＦＡＰ）とを含む、ＦＡＰに特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインを含む。

【００１９】

いくつかの態様において、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、
（ａ）配列番号１５のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（V_HＦＡＰ）及び配列番号１６のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（V_LＦＡＰ）、
（ｂ）配列番号２３のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（V_HＦＡＰ）及び配列番号２４のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（V_LＦＡＰ）、又は
（ｃ）配列番号３１のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（V_HＦＡＰ）及び配列番号３２のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（V_LＦＡＰ）
を含む、ＦＡＰに特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインを含む。

【００２０】

特定の態様では、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、配列番号１５のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（V_HＦＡＰ）と配列番号１６のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（V_LＦＡＰ）とを含む、ＦＡＰに特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインを含む。

【００２１】

したがって、特定の態様において、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、（ｉ）ＣＤ４０に特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインであって、配列番号７のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（V_HＣＤ４０）及び配列番号８のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（V_LＣＤ４０）を含む抗原結合ドメインと、（ｉｉ）ＦＡＰに特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインであって、配列番号１５のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（V_HＦＡＰ）及び配列番号１６のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（V_LＦＡＰ）を含む抗原結合ドメインとを含む。

【００２２】

別の態様において、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、（ｉ）ＣＤ４０に特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインであって、配列番号７のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（V_HＣＤ４０）及び配列番号８のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（V_LＣＤ４０）を含む抗原結合ドメインと、（ｉｉ）ＦＡＰに特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインであって、配列番号２３のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（V_HＦＡＰ）及び配列番号２４のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（V_LＦＡＰ）を含む抗原結合ドメインとを含む。他の態様において、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、（ｉ）ＣＤ４０に特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインであって、配列番号７のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（V_HＣＤ４０）及び配列番号８のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（V_LＣＤ４０）を含む抗原結合ドメインと、（ｉｉ）ＦＡＰに特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインであって、配列番号３１のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（V_HＦＡＰ）及び配列番号３２のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（V_LＦＡＰ）を含む抗原結合ドメインとを含む。

【００２３】

いくつかの態様において、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、
ａ）ＣＤ４０に特異的結合可能な少なくとも２つのＦａｂ断片であって、そのＣ末端でＦｃ領域のＮ末端に融合しているＦａｂ断片、及び
（ｂ）ＦＡＰに特異的結合可能な１つの抗原結合ドメインであって、そのＮ末端で上記Ｆｃ領域のＣ末端に融合している抗原結合ドメイン
を含む。

【００２４】

いくつかの態様において、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、
ａ）ＣＤ４０に特異的結合可能な少なくとも２つのＦａｂ断片であって、そのＣ末端でＦｃ領域のＮ末端に融合しているＦａｂ断片、及び
（ｂ）ＦＡＰに特異的結合可能な交差ｆａｂ断片であって、上記Ｆｃ領域のＣ末端に融合している交差ｆａｂ断片
を含む。

【００２５】

特定の態様では、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、ＦＡＰに特異的結合可能な交差ｆａｂ断片を含み、交差ｆａｂ断片のＶＨ－Ｃカッパ鎖が上記Ｆｃ領域のＣ末端に融合している。特定の態様では、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、ＣＤ４０に特異的結合可能な２つのＦａｂ断片であって、そのＣ末端でＦｃ領域のＮ末端に融合しているＦａｂ断片を含む。特定の態様において、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、ＣＤ４０への二価結合とＦＡＰへの一価結合によって特徴づけられる。

【００２６】

別の態様では、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、ＣＤ４０への四価又は三価結合とＦＡＰへの一価結合によって特徴づけられる。いくつかの態様において、二重

特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、ＣＤ４０への四価結合とＦＡＰへの一価結合によって特徴づけられる。いくつかの態様では、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、ＣＤ４０に特異的結合可能な４つのＦａｂ断片を含み、ここで、各２つのＦａｂ断片が互いに融合しており、そのＣ末端でＦｃ領域のＮ末端に融合している。

【００２７】

いくつかの態様において、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、固形腫瘍の治療の用途のためのものであり、ここで、（ｉ）個体が、放射線療法と併用した治療的有効量の二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子で治療されると、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子を単独療法として受けた個体又は放射線療法を単独療法として受けた個体と比較して上昇した生存率を有するか、或いは（ｉｉ）個体における固形腫瘍のサイズが、単独療法として使用される二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子及び単独療法として使用される放射線療法での治療による該サイズの縮小分である相加量（additive amount）よりも大きく縮小される。

【００２８】

更なる態様において、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子を薬学的有効量で含む、固形腫瘍の治療における使用のための組成物が提供され、ここで、治療は放射線療法との併用を含み、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、腫瘍関連抗原に特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインを含む。特に、腫瘍関連抗原はＦＡＰである。

【００２９】

いくつかの態様において、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子を薬学的有効量で含む、放射線療法と併用での個体における固形腫瘍の治療における使用のための薬学的組成物が提供され、ここで、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、腫瘍関連抗原に特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインを含む。特に、腫瘍関連抗原はＦＡＰである。

【００３０】

別の態様において、個体における固形腫瘍を治療するための医薬の製造における二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子の使用が提供され、ここで、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、放射線療法との併用のためのものであり、腫瘍関連抗原に特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインを含む。

【００３１】

別の態様において、有効量の二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子と有効量の放射線療法とを対象に投与することを含む、個体における固形腫瘍を治療する方法が提供され、ここで、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、腫瘍関連抗原に特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインを含む。

【００３２】

これらの全ての態様において、個体は好ましくはヒトである。

【図面の簡単な説明】

【００３３】

【図１】ヒトＣＤ４０に特異的に結合する抗原結合分子の概略図を示す。図１Ａは、クロスオーバーＦａｂ断片として１つのＦＡＰ結合部分と組み合わせた４つのＣＤ４０結合部分から成る４＋１フォーマットの二重特異性ＦＡＰ－ＣＤ４０抗体の概略図を示す。ここで、ＶＬ－ＣＨ１鎖がＦｃノブ鎖のＣ末端で融合されている（ＣＤ４０に対しては四価結合、ＦＡＰに対しては一価結合）。同じ構造を持つコントロール分子では、ＦＡＰ結合部分が生殖系列コントロールＤＰ４７のＶＨドメイン及びＶＬドメインによって置き換えられている。図１Ｂは、ＶＨドメイン及びＶＬドメインとして１つのＦＡＰ結合部分と組み合わせた４つのＣＤ４０結合部分から成る４＋１フォーマットの二重特異性ＦＡＰ－ＣＤ４０抗体の模式図を示し、ここで、ＶＨドメインはそのＮ末端でＦｃノブ鎖のＣ末端に融合しており、ＶＬドメインはそのＮ末端でＦｃホール鎖のＣ末端に融合している（ＣＤ４０に対しては四価結合、ＦＡＰに対しては一価結合）。コントロール分子では、ＦＡＰ結

合部分が生殖系列コントロールＤＰ４７のＶＨドメイン及びＶＬドメインにより置き換えられている。図１Ｃは、ＩｇＧ重鎖のＦｃドメインにアミノ酸置換Ｌ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ、Ｐ３２９Ｇ（「Ｐ３２９Ｇ　ＬＡＬＡ」、ＥＵ番号付け）を有する二重特異性ＣＤ４０抗体の模式図である（ＣＤ４０に対する二価結合）。図１Ｄは、クロスオーバーＦａｂ断片として１つのＦＡＰ結合部分と組み合わせた２つのＣＤ４０結合部分から成る２＋１フォーマットの二重特異性ＦＡＰ－ＣＤ４０抗体の概略図を示し、ここで、ＶＬ－ＣＨ１鎖がＦｃノブ鎖のＣ末端で融合されている（ＣＤ４０に対しては二価、ＦＡＰに対しては一価）。黒い点は、ノブ・イントゥ・ホール（knob-into-hole）突然変異を表している。コントロール分子では、ＦＡＰ結合部分が生殖系列コントロールＤＰ４７のＶＨドメイン及びＶＬドメインにより置き換えられている。

【図２Ａ－２Ｂ】図２Ａから２Ｈは、ＦＡＰ発現間質を有する同所性頭頸部腫瘍マウスモデル（ｍＥＥＲＬ９５）において、二重特異性ＦＡＰ－ＣＤ４０抗体（Ｐ１ＡＤ９１３９、図１Ｂ）の単独での又は放射線療法（ＲＴ）との併用での有効性を示す。図２Ａは、樹立された頤下ｍＥＥＲＬ９５マウス腫瘍に適用された治療スケジュールを示すスキームである。図２Ｂは、コントロール抗体ＤＰ４７－ＣＤ４０（（Ｐ１ＡＥ２４２５）を含む表記の治療を受けたｍＥＥＲＬ９５腫瘍保有マウスの生存率を、無治療グループと比較しログランク検定（ｐ＝０．２３３）で示している。放射療法（２×６Ｇｙ）単独では、ＦＡＰ－ＣＤ４０による療法単独（ｐ＝０．０２４）と同様に生存確率はあまり上昇しなかった（ｐ＝０．００１）が、ＲＴ（２×６Ｇｙ）とＦＡＰ－ＣＤ４０療法との併用は高い生存確率をもたらした（ｐ＝０．０００６）。統計解析には、表記のグループを無治療マウスと比較するログランク検定を用いた。ｎ＝５～６マウス／グループ。

【図２Ｃ－２Ｈ】表記の治療グループにおけるｍＥＥＲＬ９５腫瘍増殖曲線（腫瘍体積として表される）を示す。腫瘍を拒絶したマウスの数を各グループについて示す（図２Ｃ：無治療マウス、図２Ｄ：コントロールＤＰ４７－ＣＤ４０で治療したマウス、図２Ｅ：ＦＡＰ－ＣＤ４０で治療したマウス、図２Ｆ：ＲＴ（２×６Ｇｙ）及びＤＰ４７－ＣＤ４０で治療したマウス、図２Ｈ：ＲＴ（２×６Ｇｙ）及びＦＡＰ－ＣＤ４０で治療したマウス）。

【図２Ｉ－２Ｌ】更なる実験のｍＥＥＲＬ９５腫瘍増殖曲線（腫瘍体積として表される）を示し、抗ＦＡＰ－ＣＤ４０の１用量（図２Ｋ）又は２用量（図２Ｌ）を少分割放射線療法と併用して相互比較し、無治療（図２Ｉ）及び放射線療法単独（図２Ｊ）とも比較した。

【図３Ａ－３Ｆ】図３Ａから３Ｇは、二重特異性ＦＡＰ－ＣＤ４０抗体療法と従来の抗ＣＤ４０アゴニスト抗体による療法を比較する第２の実験に関する。非標的抗ＣＤ４０（ＦＧＫ４．５）ｍＡｂ及び対応するＩｇＧマッチコントロール抗体（ＩｇＧ　Ｃｔｒ）を含む表記の治療を受けたマウスにおけるｍＥＥＲＬ９５腫瘍増殖曲線。図３Ａ：ＩｇＧ　Ｃｔｒで治療したマウス、図３Ｂ：抗ＣＤ４０　ｍＡｂで治療したマウス、図３Ｃ：抗ＣＤ４０　ｍＡｂとＲＴ（２×６Ｇｙ）で治療したマウス、図３Ｄ：ＩｇＧ　ＣｔｒとＲＴ（２×６Ｇｙ）で治療したマウス、図３Ｅ：ＦＡＰ－ＣＤ４０で治療したマウス、図３Ｆ：ＲＴ（２×６Ｇｙ）とＦＡＰ－ＣＤ４０で治療したマウス。コントロールグループと比較した表記の治療によるマウスの体重の差異について、一方向ＡＮＯＶＡ試験を用いた。ｎ＝５～１０マウス／グループ。

【図３Ｇ】表記の治療による７２時間の体重増減率を示す。

【図４Ａ－４Ｃ】図４Ａから４Ｋは、腫瘍床の線維芽細胞によるＦＡＰ発現がＦＡＰ－ＣＤ４０の効率に与える影響を調べた実験結果である。図４Ａでは、接種後１０日目のＴＣ－１腫瘍細胞とｍＥＥＲＬ９５頤下腫瘍細胞におけるＤＡＰＩ、ＦＡＰ、及びαＳＭＡ免疫蛍光染色の比較を示している。ｑＰＣＲで測定したｍＥＥＲＬ９５及びＴＣ－１頤下腫瘍からのＦＡＰ　ｍＲＮＡレベルを図４Ｂに、ｑＰＣＲで測定したｍＥＥＲＬ９５及びＴＣ－１頤下腫瘍からのＣＤ４０　ｍＲＮＡレベルを図４Ｃに示す。

【図４Ｄ－４Ｈ】図２Ａにあるようなスケジュールに従った表記の治療を受けたマウスのＴＣ－１腫瘍増殖曲線（腫瘍体積として表される）を示す。腫瘍を拒絶したマウスの数が

グループごとに表示されている。図４Ｄ：無治療マウス、図４Ｅ：ＦＡＰ－ＣＤ４０で治療したマウス、図４Ｆ：ＲＴ（２×６Ｇｙ）で治療したマウス、図４Ｇ：ＲＴ（２×６Ｇｙ）及びＦＡＰ－ＣＤ４０で治療したマウス。図４Ｈは、ＦＡＰ－ＣＤ４０二重特異性がＴＣ－１腫瘍とｍＥＥＲＬ９５腫瘍でどのように蓄積されるかを示している。腫瘍から得られた蛍光発光の定量化を示している。ＦＩ：蛍光強度。ｎ＝２～３マウス／グループ。

【図４Ｉ－４Ｋ】頤下部にｍＥＥＲＬ９５及びＴＣ－１細胞接種後１０日目の頸部リンパ節で行ったＦＡＰのＩＨＣの結果を図４Ｉに示す。また、ナイーブ、ｍＥＥＲＬ９５及びＴＣ－１腫瘍保有マウスの頸部リンパ節のＦＲＣ（ｇｐ３８＋ＣＤ３１－）において接種１０日後にフローサイトメトリーで測定したＦＡＰ陽性細胞の割合（図４Ｊ）及びＦＡＰのＭＦＩ（図４Ｋ）を図示している。ＭＦＩ：平均蛍光強度。マン・ホイットニー検定；＊＊＊：ｐ＜０．００１；ｎ＝５～１０マウス／グループ。

【図５Ａ－５Ｃ】腫瘍リチャレンジ実験の結果を図５Ａから５Ｃに示す。図５Ａは、ＲＴ（２×６Ｇｙ）と抗ＦＡＰ－ＣＤ４０の併用治療に対する長期レスポンダーでの順次の腫瘍リチャレンジのスケジュールを示すスキームである。右脇腹（１×１０^{6}細胞）と左脇腹（１×１０^{5}細胞）にｍＥＥＲＬ９５腫瘍細胞（図５Ｂ）及びＴＣ－１腫瘍細胞（図５Ｃ）を順次リチャレンジした後の腫瘍増殖曲線をそれぞれ示している。

【図５Ｄ－５Ｅ】腫瘍リチャレンジ実験の結果を図５Ｄから５Ｅに示す。併用治療により、腫瘍特異的な記憶生成が認められる。図５Ｄは、Ｅ７ペプチドで８日間再刺激した治癒マウスのＰＭＢＣからの四量体陽性ＣＤ８　Ｔ細胞の割合を示す。図５Ｅは、表記の治療の６日後に得られたｍＥＥＲＬ９５保有マウスのＴＩＬにおける四量体陽性ＣＤ８　Ｔ細胞の割合を示す。＊＊：ｐ＜０．０１、＊＊＊：ｐ＜０．００１；統計解析には、クラスカル・ウォリス検定を使用。平均値±ＳＥＭ；ｎ＝５～８マウス／グループ。

【図６Ａ－６Ｂ】図６Ａから６Ｆは、ヒトＣＤ４０受容体を発現するトランスジェニックマウス（ｈｕＣＤ４０　Ｔｇマウス）と抗ヒトＦＡＰ－ＣＤ４０を２＋１フォーマット（Ｐ１ＡＥ２３０２）で用いた更なる実験に関するものである。図６Ａは、ｍＥＥＲＬ９５腫瘍保有ｈｕＣＤ４０　Ｔｇマウスに施した治療のスケジュールを示すスキームである。図６Ｂは、ｍＥＥＲＬ９５保有ｈｕＣＤ４０トランスジェニックマウスの、表記の治療による生存率をまとめたものである。腫瘍を拒絶したマウスの数がグループごとに表示されている。ログランク検定；ｎｓ：非有意、＊＊：ｐ＜０．０１、＊＊＊：ｐ＜０．００１；ｎ＝１０マウス／グループ。

【図６Ｃ－６Ｆ】図６Ｃから６Ｆは、ヒトＣＤ４０受容体を発現するトランスジェニックマウス（ｈｕＣＤ４０　Ｔｇマウス）と抗ヒトＦＡＰ－ＣＤ４０を２＋１フォーマット（Ｐ１ＡＥ２３０２）で用いた更なる実験に関するものである。ＭＥＥＲＬ９５保有ｈｕＣＤ４０トランスジェニックマウスの、表記の治療における腫瘍増殖曲線を、無治療マウス（図６Ｃ）、抗ヒトＦＡＰ－ｈｕＣＤ４０で治療したマウス（図６Ｄ）、ＲＴ（２×６Ｇｙ）のみで治療したマウス（図６Ｅ）、ＲＴ（２×６Ｇｙ）と抗ヒトＦＡＰ－ｈｕＣＤ４０との併用で治療したマウス（図６Ｆ）ごとに示している。

【図７】図７Ａから７Ｈは、図２Ａで説明した実験の治療法の抗腫瘍効果に関連する細胞成分及び分子免疫成分の分析結果を示す。ｍＥＥＲＬ９５腫瘍細胞接種後１８日目（すなわちＦＡＰ－ＣＤ４０治療後７日目）の腫瘍における表記の免疫集団のフローサイトメトリー解析。免疫細胞の数が、腫瘍１ｍｇあたりのＣＤ４５＋細胞（図７Ａ）、ＣＤ８　Ｔ細胞（図７Ｂ）、制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ、図７Ｃ）、ＣＤ４　Ｔ細胞（図７Ｆ）、樹状細胞（図７Ｇ）及びＮＫ細胞（図７Ｈ）それぞれについて示されている。ＣＤ８／Ｔｒｅｇの比率とＣＤ８／マクロファージの比率をそれぞれ図７Ｄと７Ｅに示す。

【図８Ａ－８Ｆ】細胞内ＦＡＣＳ染色で測定した、ｍＥＥＲＬ９５腫瘍細胞で１６時間再刺激した際の腫瘍浸潤ＣＤ８リンパ球によるＩＦＮγ、ＴＮＦα、及びグランザイムＢの産生の無治療マウスグループと、ＲＴとＦＡＰ－ＣＤ４０との併用で治療したマウスグループとの比較をそれぞれ図８Ａ、８Ｂ、８Ｃに示す。図８Ｄ、８Ｅ、及び８Ｆは、それぞれ腫瘍浸潤ＣＤ４リンパ球によるＩＦＮγ、ＴＮＦα、及びグランザイムＢの産生を示す。

【図８Ｇ－８Ｉ】図８Ｇは、Ｋｉ６７陽性細胞の頻度を、図８Ｈは、異なる治療で腫瘍に浸潤しているＣＤ８　Ｔ細胞集団におけるＰＤ１発現を示す。図８Ｉは、頸部リンパ節のＣＤ８　Ｔ細胞集団におけるＣＤ６２Ｌ　ＣＤ４４ダブル陽性細胞（記憶表現型）の頻度を示す。

【図９Ａ－９Ｃ】図９Ａ、図９Ｂ、図９Ｃは、それぞれマルチプレックスで測定した、異なる療法での治療後８日目の腫瘍微小環境におけるケモカインＣＸＣＬ９とＣＸＣＬ１０、サイトカイン（ＩＮＦγ）のレベルを示す。

【図９Ｄ－９Ｅ】図９Ｄ及び９Ｅは、表記の治療後の４日目のｍＥＥＲＬ９５腫瘍から表記の表面成熟マーカーＣＤ８０、ＣＤ８６をそれぞれ発現する樹状細胞（ＣＤ１１ｃ＋ＭＨＣＩＩ＋）の割合を示す。統計解析には、マン・ホイットニー検定、一方向ＡＮＯＶＡ又はクラスカル・ウォリス検定を使用。平均値±ＳＥＭ。＊：ｐ＜０．０５、＊＊：ｐ＜０．０１、＊＊＊：ｐ＜０．００１。ｎ＝３～６試料／グループ。

【図９Ｇ－９Ｈ】図９Ｇは、表記の治療の７日後のｍＥＥＲＬ９５腫瘍における異なる条件でのＦＡＰ＋領域及び位置の定量化を示す。図９Ｈは、表記の治療の４日後に腫瘍微小環境において差次的に発現した、ＤＣ成熟に関連する遺伝子シグネチャーのヒートマップである。

【図１０Ａ－１０Ｅ】図１０Ａ及び１０Ｂにおいて、併用療法投与の４８時間前から、抗ＣＤ８β、抗ＣＤ４又は対応するアイソタイプコントロール抗体を用いてｍＥＥＲＬ９５腫瘍保有マウスのＴリンパ球を枯渇させた。ＣＤ８　Ｔリンパ球の枯渇が併用療法で観察された治癒効果の消失をもたらしたことが示されている。ＣＤ４　Ｔリンパ球を枯渇させたマウスでは腫瘍が再発した。これは、持続的な抗腫瘍応答の形成におけるＣＤ４　Ｔ細胞の重要な役割を示している。図１０Ａから１０Ｄは、無治療（図１０Ａ）及びＲＴ（２×６Ｇｙ）とＦＡＰ－ＣＤ４０との併用治療でのｍＥＥＲＬ９５腫瘍増殖曲線（腫瘍体積として表される）を、枯渇させない場合（図１０Ｂ）と、ＣＤ８　Ｔ細胞を枯渇させた場合（図１０Ｃ）又はＣＤ４　Ｔ細胞を枯渇させた場合（図１０Ｄ）とで示した。図１０Ｅは、表記の枯渇抗体を含む併用治療を受けたマウスの生存期間を示す。ログランク検定；ｎｓ：非有意、＊＊：ｐ＜０．０１、＊＊＊：ｐ＜０．００１；ｎ＝７マウス／グループ。

【図１０Ｆ－１０Ｉ】クロスプライミングＤＣが存在しない場合の併用療法を試験した。図１０Ｆと１０Ｇは、無治療又はＲＴ（２×６Ｇｙ）とＦＡＰ－ＣＤ４０との併用で治療したＢａｔｆ３－／－マウス（ｃＤＣ１を欠く）のｍＥＥＲＬ９５腫瘍増殖曲線を示す。図１０Ｈと１０Ｉは、それぞれ無治療又はＲＴ（２×６Ｇｙ）とＦＡＰ－ＣＤ４０との併用で治療した腫瘍保有野生型マウスのｍＥＥＲＬ９５腫瘍増殖曲線を示す。これらは、ＦＡＰ－ＣＤ４０を介した強力な防御反応にはクロスプライミングＤＣが必要であることを示している。

【図１１Ａ－１１Ｃ】無治療マウス又はＲＴ（２×６Ｇｙ）とＦＡＰ－ＣＤ４０に加えてＩＬ－１２遮断抗体若しくは対応するアイソタイプマッチコントロールとの併用療法で治療されたマウスのｍＥＥＲＬ９５腫瘍増殖曲線を、それぞれ図１１Ａ、１１Ｂ、１１Ｃに示す。

【図１１Ｄ－１１Ｇ】各治療グループにおけるマウスの数及び腫瘍を拒絶したマウスの数を示す。腫瘍注射の２１日後にマルチプレックスによって測定された、これらの各治療グループのマウスの血清中の対応するケモカインのレベルを図１１Ｄ（ＣＸＣＬ９レベル）、図１１Ｅ（ＣＸＣＬ１０レベル）、図１１Ｆ（ＣＣＬ４レベル）、及び図１１Ｇ（ＣＣＬ２２レベル）に示す。統計解析には、一方向ＡＮＯＶＡ又はクラスカル・ウォリス検定を使用。平均値±ＳＥＭ。＊：ｐ＜０．０５、＊＊：ｐ＜０．０１。ｎ＝５～９試料／グループ。

【図１２】図１２Ａから１２Ｃは、ＦＡＰ発現間質を有する同所性ＳＶ２－ＯＶＡ肺腫瘍モデルにおいて、二重特異性ＦＡＰ－ＣＤ４０抗体（Ｐ１ＡＤ９１３９、図１Ｂ）の単独での又は放射線療法（ＲＴ）との併用での有効性を示す。図１２Ａは、樹立されたＳＶ２－ＯＶＡマウス腫瘍に適用された治療スケジュールを示すスキームである。図１２Ｂは、各治療グループの正常肺気量の減少率（％）を示す。肺活量の減少は、放射線療法（ＲＴ

、２×６Ｇｙ）を受けたマウスのグループ（ｎ＝７）では、無治療の動物（ｎ＝７）よりもかなり遅れて観察された。ＲＴ（２×６Ｇｙ）とＦＡＰ－ＣＤ４０治療（１４日目と１８日目に２回）の両方を受けたグループでは、肺気量の減少は４１日目以降にのみ観察され、ＲＴ単独の場合よりもかなり遅かった。図１２Ｃは、コントロール抗体ＤＰ４７－ＣＤ４０（（Ｐ１ＡＥ２４２５）を含む表記の治療を受けたＳＶ２－ＯＶＡ腫瘍保有マウスの生存率を、無治療グループと比較したログランク検定で示している。放射線療法（２×６Ｇｙ）単独でも生存確率は上昇したが、ＦＡＰ－ＣＤ４０治療と放射線療法（２×６Ｇｙ）との併用は大幅な生存確率の上昇をもたらした。

【発明を実施するための形態】

【００３４】

定義

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

【００３５】

本明細書で使用する場合、「抗原結合分子」という用語は、その最も広い意味で、抗原決定基に特異的に結合する分子を指す。抗原結合分子の例は、抗体、抗体断片及び足場抗原結合タンパク質である。

【００３６】

本明細書の「抗体」という用語は、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、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、単一特異性抗体及び多重特異性抗体（例：二重特異性抗体）、並びに抗体断片を含むがこれらに限定されない種々の抗体構造を包含する。

【００３７】

本明細書で使用する場合、「腫瘍関連抗原に特異的結合可能な抗原結合ドメイン」又は「腫瘍関連抗原に特異的結合可能な部分」という用語は、抗原決定基に特異的に結合するポリペプチド分子を指す。ある態様では、抗原結合ドメインは、その標的細胞抗原を介してシグナル伝達を活性化することができる。特定の態様において、抗原結合ドメインは、それが結合している実体（例：ＣＤ４０アゴニスト）を標的部位、例えば抗原決定基を有する特定のタイプの腫瘍細胞又は腫瘍間質へ誘導することができる。標的細胞抗原に特異的結合可能な抗原結合ドメインは、本明細書で更に定義される抗体及びそれらの断片を含む。更に、標的細胞抗原に特異的結合可能な抗原結合ドメインは、本明細書で更に定義される足場抗原結合タンパク質、例えば、設計リピートタンパク質又は設計リピートドメインに基づく結合ドメイン（例えば国際公開第２００２／０２０５６５号参照）を含む。特に、標的細胞抗原はＦＡＰである。

【００３８】

抗体又はその断片に関して、「抗原に特異的結合可能な抗原結合ドメイン」という用語は、抗原の一部又は全部に特異的に結合し、抗原の一部又は全部に相補的である領域を含む分子の一部を指す。特異的抗原結合が可能な抗原結合ドメインは、例えば１又は複数の抗体可変ドメイン（抗体可変領域とも呼ばれる）により提供され得る。具体的には、特異的抗原結合が可能な抗原結合ドメインは、抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）及び抗体重鎖可変領域（ＶＨ）を含む。また、別の態様において、「標的細胞抗原に特異的結合可能な抗原結合ドメイン」は、Ｆａｂ断片であっても交差Ｆａｂ断片でもあってもよい。

【００３９】

本明細書で使用される場合、「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均質な抗体の集団から得られた抗体を指す。すなわち、該集団に含まれる個々の抗体は同一であり且つ／又は同じエピトープに結合するが、但し、例えば天然に存在する変異を含むか又はモノクローナル抗体調製物の製造中に生じるような、あり得るバリアント抗体は除く。通常、そのようなバリアントは少量存在する。異なる決定基（エピトープ）に対する異なる

抗体を典型的には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。

【００４０】

本明細書で使用される「単一特異性」抗体という用語は、同じ抗原の同じエピトープにそれぞれ結合する１又は複数の結合部位を有する抗体を指す。「二重特異性」という用語は、抗原結合分子が少なくとも２つの異なる抗原決定基に特異的に結合することができることを意味する。典型的には、二重特異性抗原結合分子は２つの抗原結合部位を含み、それらの各々が異なる抗原決定基に対して特異的である。特定の実施態様では、二重特異性抗原結合分子は、２つの抗原決定基に、特に２つの異なる細胞上に発現した２つの抗原決定基に同時に結合することができる。また、本明細書に記載の二重特異性抗原結合分子は、多重特異性抗体の一部を形成することもあり得る。

【００４１】

本願で用いられる「～価」という用語は、１つの抗原決定基に対して特異的である抗原結合分子内に、１つの抗原決定基に対して特異的な結合部位が特定数存在することを示す。したがって、「二価」、「四価」、及び「六価」という用語は、抗原結合分子内に、それぞれ、特定の抗原決定基に対して特異的な２つの結合部位、４つの結合部位、及び６つの結合部位が存在することを示す。本発明の特定の態様では、二重特異性抗原結合分子は、特定の抗原決定基に対して一価（すなわち該分子が前記抗原決定基に対する結合部位を１つだけ有している）であってもよく、又は該分子は特定の抗原決定基に対して二価、三価若しくは四価（すなわち該分子が前記抗原決定基に対する結合部位をそれぞれ２つ、３つ若しくは４つ有している）であってもよい。

【００４２】

「完全長抗体」、「インタクト抗体」及び「全抗体」という用語は、天然の抗体構造に実質的に類似した構造を有する抗体を指すために、本明細書においては互換的に用いられる。「天然抗体」は、様々な構造を有する、天然に存在する免疫グロブリン分子を指す。例えば、天然ＩｇＧクラス抗体は、約１５０，０００ダルトンのヘテロテトラマー糖タンパク質であり、ジスルフィド結合した２つの重鎖と２つの軽鎖で構成される。Ｎ末端からＣ末端にかけて、各重鎖は、可変重鎖ドメイン又は重鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（ＶＨ）、続いて重鎖定常領域とも呼ばれる３つの定常ドメイン（ＣＨ１、ＣＨ２及びＣＨ３）を有する。同様に、Ｎ末端からＣ末端にかけて、各軽鎖は、可変軽鎖ドメイン又は軽鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（ＶＬ）、続いて軽鎖定常領域とも呼ばれる軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）を有する。抗体の重鎖は、α（ＩｇＡ）、δ（ＩｇＤ）、ε（ＩｇＥ）、γ（ＩｇＧ）又はμ（ＩｇＭ）と呼ばれる５種類のうちの１つに割り当てられてもよく、このいくつかは、例えば、γ１（ＩｇＧ１）、γ２（ＩｇＧ２）、γ３（ＩｇＧ３）、γ４（ＩｇＧ４）、α１（ＩｇＡ１）及びα２（ＩｇＡ２）等のサブタイプに更に分けられてもよい。抗体の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ（κ）及びラムダ（λ）と呼ばれる２種類のうちの１つに割り当てられてもよい。

【００４３】

「抗体断片」は、インタクト抗体が結合する抗原に結合するインタクト抗体の一部を含むインタクト抗体以外の分子を指す。抗体断片の例としては、Ｆｖ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆａｂ’－ＳＨ、Ｆ（ａｂ’）２；ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、交差Ｆａｂ断片；直鎖状抗体；単鎖抗体分子（例えばｓｃＦｖ）；及び単一ドメイン抗体が挙げられるが、これらに限定されない。特定の抗体断片の総説としては、Ｈｕｄｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｍｅｄ ９，１２９－１３４（２００３）を参照されたい。ｓｃＦｖ断片の総説としては、例えば、Ｐｌｕｅｃｋｔｈｕｎ，Ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ ｏｆ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，ｖｏｌ．１１３，Ｒｏｓｅｎｂｕｒｇ ａｎｄ Ｍｏｏｒｅ ｅｄｓ．，Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，２６９－３１５頁（１９９４）を参照されたい。また、国際公開第９３／１６１８５号及び米国特許第５５７１８９４号及び同第５５８７４５８号を参照されたい。サルベージ受容体結合エピトープ残基を含み、ｉｎ ｖｉｖｏでの半減期が長くなったＦａｂ及

びＦ（ａｂ’）２断片の説明については、米国特許第５８６９０４６号を参照されたい。ダイアボディは、二価又は二重特異性である２つの抗原結合部位を含む抗体断片であり、例えば、ＥＰ第４０４０９７号；国際公開第１９９３／０１１６１号；Ｈｕｄｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｍｅｄ ９，１２９－１３４（２００３）、及びＨｏｌｌｉｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ９０，６４４４－６４４８（１９９３）を参照されたい。トリアボディ及びテトラボディも、Ｈｕｄｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｍｅｄ ９，１２９－１３４（２００３）に説明されている。単一ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインの全部若しくは一部又は軽鎖可変ドメインの全部若しくは一部を含む抗体断片である。特定の実施態様では、単一ドメイン抗体は、ヒト単一ドメイン抗体である（Ｄｏｍａｎｔｉｓ社、マサチューセッツ州ウォルサム；例えば、米国特許第６２４８５１６号を参照されたい）。抗体断片は、本明細書に記載されるような、インタクト抗体のタンパク質分解消化及び組換え宿主細胞（例：大腸菌又はファージ）による産生を含むがこれらに限定されない種々の技術によって製造することができる。

【００４４】

インタクト抗体のパパイン消化により、重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインと、更に軽鎖の定常ドメイン及び重鎖の第１の定常ドメイン（ＣＨ１）とをそれぞれ含む、「Ｆａｂ」断片と呼ばれる２つの同一の抗原結合断片が生成される。したがって、本明細書で使用される場合、「Ｆａｂ断片」という用語は、軽鎖（ＣＬ）のＶＬドメイン及び定常ドメインを含む軽鎖断片と、重鎖のＶＨドメイン及び第１の定常ドメイン（ＣＨ１）とを含む抗体断片を指す。Ｆａｂ’断片は、抗体ヒンジ領域由来の１又は複数のシステインを含む重鎖ＣＨ１ドメインのカルボキシ末端にいくつかの残基が付加されている点でＦａｂ断片とは異なる。Ｆａｂ’－ＳＨとは、定常ドメインの１又は複数のシステイン残基が遊離チオール基を保持するＦａｂ’断片である。ペプシン処理により、２つの抗原結合部位（２つのＦａｂ断片）と、Ｆｃ領域の一部とを有するＦ（ａｂ’）$_2$断片が得られる。

【００４５】

「交差Ｆａｂ断片」又は「ｘＦａｂ断片」又は「クロスオーバーＦａｂ断片」という用語は、重鎖可変領域と軽鎖可変領域が交換されているか又は重鎖定常領域と軽鎖定常領域が交換されているＦａｂ断片を指す。クロスオーバーＦａｂ分子には２つの異なる鎖組成が可能であり、本発明の二重特異性抗体に含まれる。一方、Ｆａｂ重鎖の可変領域と軽鎖の可変領域は交換されており、すなわち、クロスオーバーＦａｂ分子は、軽鎖可変領域（ＶＬ）と重鎖定常領域（ＣＨ１）とで構成されるペプチド鎖と、重鎖可変領域（ＶＨ）と軽鎖定常領域（ＣＬ）とで構成されるペプチド鎖とを含む。このクロスオーバーＦａｂ分子は、交差Ｆａｂ（ＶＬＶＨ）とも呼ばれる。一方、Ｆａｂの重鎖定常領域と軽鎖定常領域が交換されている場合、クロスオーバーＦａｂ分子は、重鎖可変領域（ＶＨ）と軽鎖定常領域（ＣＬ）とで構成されるペプチド鎖と、軽鎖可変領域（ＶＬ）と重鎖定常領域（ＣＨ１）とで構成されるペプチド鎖とを含む。このクロスオーバー分子は、交差Ｆａｂ（ＣＬＣＨ１）とも呼ばれる。

【００４６】

「単鎖Ｆａｂ断片」又は「ｓｃＦａｂ」は、抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）、抗体定常ドメイン１（ＣＨ１）、抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）、抗体軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）及びリンカーから成るポリペプチドであり、前記抗体ドメイン及び前記リンカーは、Ｎ末端からＣ末端方向に次の順序：ａ）ＶＨ－ＣＨ１－リンカー－ＶＬ－ＣＬ、ｂ）ＶＬ－ＣＬ－リンカー－ＶＨ－ＣＨ１、ｃ）ＶＨ－ＣＬ－リンカー－ＶＬ－ＣＨ１、又はｄ）ＶＬ－ＣＨ１－リンカー－ＶＨ－ＣＬのうちの１つを有し；且つ前記リンカーは、少なくとも３０アミノ酸、好ましくは３２～５０アミノ酸のポリペプチドである。前記単鎖Ｆａｂ断片は、ＣＬドメインとＣＨ１ドメインとの間の天然ジスルフィド結合によって安定化される。これに加え、これらの単鎖Ｆａｂ分子は、システイン残基（例えば、Ｋａｂａｔ番号付けによる、可変重鎖の４４位及び可変軽鎖の１００位）の挿入による鎖間ジスルフィド結合の生成によって、更に安定化され得る。

【００４７】
「クロスオーバー単鎖Ｆａｂ断片」又は「ｘ－ｓｃＦａｂ」は、抗体重鎖可変ドメイン（ＶＨ）、抗体定常ドメイン１（ＣＨ１）、抗体軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）、抗体軽鎖定常ドメイン（ＣＬ）及びリンカーから成るポリペプチドであり、前記抗体ドメイン及び前記リンカーは、Ｎ末端からＣ末端方向に次の順序：ａ）ＶＨ－ＣＬ－リンカー－ＶＬ－ＣＨ１及びｂ）ＶＬ－ＣＨ１－リンカー－ＶＨ－ＣＬのうちの１つを有し；ＶＨとＶＬは一緒になって、ある抗原に特異的に結合する抗原結合部位を形成し、且つ前記リンカーは、少なくとも３０アミノ酸のポリペプチドである。これに加え、これらのｘ－ｓｃＦａｂ分子は、システイン残基（例えば、Ｋａｂａｔ番号付けによる、可変重鎖の４４位及び可変軽鎖の１００位）の挿入による鎖間ジスルフィド結合の生成によって、更に安定化され得る。

【００４８】
「単鎖可変断片（ｓｃＦｖ）」は、１０～約２５アミノ酸の短いリンカーペプチドを用いて連結された、抗体の重鎖可変領域（V_H）及び軽鎖可変領域（V_L）の融合タンパク質である。リンカーは、通常、可撓性のためにグリシンが豊富であり、溶解度のためにセリン又はスレオニンが豊富であり、V_HのＮ末端とV_LのＣ末端又はその逆を接続することができる。このタンパク質は、定常領域が除去され、リンカーが導入されているが、元々の抗体の特異性を保持している。ｓｃＦｖ抗体は、例えば、Ｈｏｕｓｔｏｎ，Ｊ．Ｓ．，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌ．２０３（１９９１）４６－９６）に記載されている。これに加え、抗体断片は、ＶＨドメインの特徴（すなわち、ＶＬドメインと一緒に集合することができる）又はＶＬドメインの特徴（すなわち、ＶＨドメインと一緒に機能的な抗原結合部位へと組み立てることができる）を有し、それにより完全長抗体の抗原結合特性を与える単鎖ポリペプチドを含む。

【００４９】
「足場抗原結合タンパク質」は当技術分野で既知であり、例えば、フィブロネクチン及び設計アンキリンリピートタンパク質（ＤＡＲＰｉｎ）は、抗原結合ドメインの代替的な足場として使用されてきた。例えば、Ｇｅｂａｕｅｒ ａｎｄ Ｓｋｅｒｒａ，Ｅｎｇｉｎｅｅｒｅｄ ｐｒｏｔｅｉｎ ｓｃａｆｆｏｌｄｓ ａｓ ｎｅｘｔ－ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ ａｎｔｉｂｏｄｙ ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ．Ｃｕｒｒ Ｏｐｉｎ Ｃｈｅｍ Ｂｉｏｌ １３：２４５－２５５（２００９）及びＳｔｕｍｐｐ ｅｔ ａｌ．，Ｄａｒｐｉｎｓ：Ａ ｎｅｗ ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ ｏｆ ｐｒｏｔｅｉｎ ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ．Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ Ｔｏｄａｙ １３：６９５－７０１（２００８）を参照されたい。本発明のある態様では、足場抗原結合タンパク質は、ＣＴＬＡ－４（エビボディ）、リポカリン（アンチカリン）、プロテインＡ由来分子、例えばプロテインＡのＺ－ドメイン（アフィボディ）、Ａ－ドメイン（アビマー／マキシボディ）、血清トランスフェリン（トランスボディ）；設計アンキリンリピートタンパク質（ＤＡＲＰｉｎ）、抗体軽鎖又は重鎖の可変ドメイン（単一ドメイン抗体、ｓｄＡｂ）、抗体重鎖の可変ドメイン（ナノボディ、ａＶＨ）、V_{NAR}断片、フィブロネクチン（アドネクチン）、Ｃ型レクチンドメイン（テトラネクチン）；新規抗原受容体ベータ－ラクタマーゼの可変ドメイン（V_{NAR}断片）、ヒトガンマ－クリスタリン又はユビキチン（アフィリン分子）；ヒトプロテアーゼ阻害剤のクニッツ型ドメイン、ミクロボディ、例えばノッチンファミリー由来のタンパク質、ペプチドアプタマー及びフィブロネクチン（アドネクチン）から成る群より選択される。ＣＴＬＡ－４（細胞傷害性Ｔリンパ球関連抗原４）は、主に$CD4^+$Ｔ細胞で発現するＣＤ２８ファミリー受容体である。その細胞外ドメインは、可変ドメイン様Ｉｇフォールドを有する。抗体のＣＤＲに対応するループを異種配列で置換して、異なる結合特性を付与することができる。異なる結合特異性を持つように工学的に操作されたＣＴＬＡ－４分子は、エビボディとしても知られている（例：米国特許第７１６６６９７号）。エビボディは、抗体（例えば、ドメイン抗体）の単離された可変領域とほぼ同じサイズである。更なる詳細については、Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ ２４８（１－２）、３１－４５（２００１）を参照さ

れたい。リポカリンは、ステロイド、ビリン、レチノイド及び脂質等の小さな疎水性分子を運ぶ細胞外タンパク質のファミリーである。リポカリンは、円錐構造の開放端に複数のループを有する強固なベーターシート二次構造を有し、これは、異なる標的抗原に結合するように工学的に操作することができる。アンチカリンは、１６０～１８０アミノ酸のサイズであり、リポカリンに由来する。更なる詳細については、Ｂｉｏｃｈｉｍ Ｂｉｏｐｈｙｓ Ａｃｔａ １４８２：３３７－３５０（２０００）、米国特許第７２５０２９７号及び米国特許出願公開第２００７０２２４６３３号を参照されたい。アフィボディは、黄色ブドウ球菌（Staphylococcus aureus）のプロテインＡ由来の足場であり、抗原に結合するように工学的に操作され得る。このドメインは、約５８アミノ酸の３ヘリックスバンドルから成る。ライブラリーは、表面残基のランダム化によって生成された。詳しくは、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ．Ｄｅｓ．Ｓｅｌ．２００４，１７，４５５－４６２及び欧州特許出願公開第１６４１８１８号を参照されたい。アビマーは、Ａドメイン足場ファミリー由来のマルチドメインタンパク質である。約３５アミノ酸の天然ドメインは、定義されているジスルフィド結合した構造を採る。多様性は、Ａ－ドメインのファミリーによって示される天然のバリエーションのシャッフルによって作られる。更なる詳細については、Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ２３（１２），１５５６－１５６１（２００５）及びＥｘｐｅｒｔ Ｏｐｉｎｉｏｎ ｏｎ Ｉｎｖｅｓｔｉｇａｔｉｏｎａｌ Ｄｒｕｇｓ １６（６），９０９－９１７（２００７年６月）を参照されたい。トランスフェリンは、単量体の血清輸送糖タンパク質である。トランスフェリンは、許容状態の表面ループへのペプチド配列の挿入によって異なる標的抗原に結合するように工学的に操作することができる。工学的に操作されたトランスフェリン足場の例としては、トランスボディが挙げられる。更なる詳細については、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ ２７４，２４０６６－２４０７３（１９９９）を参照されたい。設計アンキリンリピートタンパク質（ＤＡＲＰｉｎ）は、細胞骨格の内在性膜タンパク質の結合を媒介するタンパク質のファミリーであるアンキリンに由来する。単一のアンキリンリピートは、２つのアルファヘリックスと１つのベーターンとから成る３３残基モチーフである。設計アンキリンリピートタンパク質は、最初のアルファヘリックスの残基と各リピートのベータターンをランダム化することにより、異なる標的抗原に結合するように設計できる。その結合面は、モジュールの数を増やすことによって、増加させることができる（親和性成熟の方法）。更なる詳細については、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．３３２，４８９－５０３（２００３），ＰＮＡＳ １００（４），１７００－１７０５（２００３）及びＪ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．３６９，１０１５－１０２８（２００７）、並びに米国特許出願公開第２００４０１３２０２８号を参照されたい。単一ドメイン抗体は、一本の単量体可変抗体ドメインから成る抗体断片である。第１の単一ドメインは、ラクダ由来の抗体重鎖の可変ドメインから得られた（ナノボディ又はV_HH断片）。更に、単一ドメイン抗体という用語は、自律的なヒト重鎖可変ドメイン（ａＶＨ）又はサメ由来のV_{NAR}断片を含む。フィブロネクチンは、抗原に結合するように工学的に操作可能な足場である。アドネクチンは、ヒトフィブロネクチンＩＩＩ型（ＦＮ３）の１５リピート単位の１０番目のドメインの天然アミノ酸配列を有する主鎖からなる。ベータサンドイッチの一端にある３つのループを工学的に操作して、アドネクチンが目的の治療標的を特異的に認識できるようにすることが可能である。更なる詳細については、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ．Ｄｅｓ．Ｓｅｌ．１８，４３５－４４４（２００５）、米国特許出願公開第２００８０１３９７９１号、国際公開第２００５０５６７６４号、及び米国特許第６８１８４１８号を参照されたい。ペプチドアプタマーは、定常足場タンパク質、典型的には活性部位で挿入された拘束された可変ペプチドループを含むチオレドキシン（ＴｒｘＡ）から成るコンビナトリアル認識分子である。更なる詳細について、Ｅｘｐｅｒｔ Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｌ．Ｔｈｅｒ．５，７８３－７９７（２００５）を参照されたい。ミクロボディは、３～４のシステイン架橋を含む、２５～５０アミノ酸長の天然に存在する微小タンパク質に由来し、微小タンパク質の例としては、ＫａｌａｔａＢＩ、コノトキシン及びノッチンが挙げられる。微小タンパク質は、その全体的フォールドに影響を与えることなく、最大２５アミノ酸を含むように工学的に操作できるループを

有する。工学的に操作されたノッチンドメインの更なる詳細については、国際公開第２００８０９８７９６号を参照されたい。

【００５０】

参照分子と「同じエピトープに結合する抗原結合分子」は、競合アッセイにおいて、参照分子のその抗原に対する結合を５０％以上ブロックする抗原結合分子を指し、逆に、参照分子は、競合アッセイにおいて、抗原結合分子のその抗原に対する結合を５０％以上ブロックする。参照分子と「同じエピトープに結合しない抗原結合分子」は、競争アッセイにおいて、参照分子のその抗原に対する結合を５０％以上ブロックしない抗原結合分子を指し、逆に、参照分子は、競争アッセイにおいて、抗原結合分子のその抗原に対する結合を５０％以上ブロックしない。

【００５１】

用語「抗原結合ドメイン」は、抗原の一部又は全部に特異的に結合し且つ抗原の一部又は全部に相補的な領域を含む、抗体結合分子の部分を指す。抗原が大きい場合、抗原結合分子は抗原の特定の部分にしか結合しないことがあり、その部分はエピトープと呼ばれる。抗原結合ドメインは、例えば、１又は複数の可変ドメイン（可変領域とも呼ばれる）によって与えられてもよい。好ましくは、抗原結合ドメインは、抗体軽鎖可変領域（ＶＬ）と、抗体重鎖可変領域（ＶＨ）とを含む。

【００５２】

本明細書で使用される場合、「抗原決定基」という用語は、「抗原」及び「エピトープ」と同義であり、抗原結合部分－抗原複合体を形成する、抗原結合部分が結合するポリペプチド高分子上の部位（例えば、連続した一続きのアミノ酸、又は非連続アミノ酸の異なる領域から構成された立体構造（conformational configuration））を指す。有用な抗原決定基は、例えば、腫瘍細胞の表面に、ウイルス感染細胞の表面に、他の疾患細胞の表面に、免疫細胞の表面に、血清中で遊離して、及び／又は細胞外マトリックス（ＥＣＭ）内に見出すことができる。特に指定されない限り、本明細書において抗原として有用なタンパク質は、霊長類（例：ヒト）及びげっ歯類（例：マウス及びラット）などの哺乳動物を含む任意の脊椎動物源に由来する任意の天然型のタンパク質である。特定の実施態様では、抗原は、ヒトタンパク質である。この用語は、本明細書における特定のタンパク質を指す場合、「全長」、未加工のタンパク質も、細胞内でのプロセシングから得られるいかなる形態のタンパク質も包含する。この用語はまた、タンパク質の天然に存在するバリアント、例えばスプライスバリアント又は対立遺伝子バリアントも包含する。

【００５３】

「特異的結合」とは、結合が抗原に対して選択的であり、望ましくない相互作用又は非特異的な相互作用とは区別できることを意味する。抗原結合分子の特定の抗原への結合能は、酵素結合免疫吸着法（ＥＬＩＳＡ）又は当業者によく知られている他の技術、例えば、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）法（ＢＩＡｃｏｒｅ装置で解析される）（Liljeblad et al.,Glyco J 17,323-329(2000)）及び古典的な結合アッセイ（Heeley,Endocr Res 28,217-229(2002)）によって測定することができる。ある実施態様では、無関係なタンパク質に対する抗原結合分子の結合度は、例えばＳＰＲによって測定して、抗原に対する抗原結合分子の結合の約１０％未満である。特定の実施態様では、抗原に結合する分子は、解離定数（Ｋｄ）が≦１μＭ、≦１００ｎＭ、≦１０ｎＭ、≦１ｎＭ、≦０．１ｎＭ、≦０．０１ｎＭ又は≦０．００１ｎＭ（例えば10^{-8}Ｍ以下、例えば10^{-8}Ｍ～10^{-13}Ｍ、例えば10^{-9}Ｍ～10^{-13}Ｍ）である。

【００５４】

「親和性」又は「結合親和性」は、分子（例えば、抗体）の単一結合部位とその結合パートナー（例えば、抗原）との間の非共有結合相互作用の総和の強度を指す。本明細書で使用する場合、特に断らない限り、「結合親和性」は、結合対（例えば抗体と抗原）のメンバー間の１：１の相互作用を反映する固有の結合親和性を指す。一般に、分子Ｘのそのパートナー Ｙに対する親和性は、解離定数（Ｋｄ）によって表すことができ、解離速度定数と結合速度定数（それぞれｋｏｆｆ、ｋｏｎ）の比である。したがって、これらの速度

定数の比が同じである限り、同等の親和性は異なる速度定数を含み得る。親和性は、本明細書に記載するものを含めた当技術分野で一般的な方法によって測定することができる。親和性を測定するための特定の方法は、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）である。

【００５５】

「親和性成熟」抗体は、１又は複数の超可変領域（ＨＶＲ又はＣＤＲ）に１又は複数の変更を有しない親抗体と比較して、そのような変更を有する抗体を指す。そのような変更により、抗原に対する抗体の親和性が向上する。

【００５６】

「腫瘍関連抗原」とは、本明細書で使用する場合、標的細胞、特に、がん細胞又は腫瘍間質細胞などの腫瘍内の標的細胞の表面に提示される抗原決定基を指す。具体的には、腫瘍関連抗原は線維芽細胞活性化タンパク質（ＦＡＰ）である。

【００５７】

プロリルエンドペプチダーゼＦＡＰ又はセプラーゼ（ＥＣ　３．４．２１）としても知られている「線維芽細胞活性化タンパク質（ＦＡＰ）」という用語は、特に断りのない限り、霊長類（例：ヒト）、非ヒト霊長類（例：カニクイザル）及びげっ歯類（例：マウス及びラット）などの哺乳動物を含む任意の脊椎動物源に由来する、任意の天然ＦＡＰを指す。この用語は、「全長」、未加工のＦＡＰも、細胞内でのプロセシングから得られるいかなる形態のＦＡＰも包含する。この用語は、ＦＡＰの天然に存在するバリアント、例えばスプライスバリアント又は対立遺伝子バリアントも包含する。ある実施態様では、本発明の抗原結合分子は、ヒト、マウス及び／又はカニクイザルＦＡＰに特異的結合可能である。ヒトＦＡＰのアミノ酸配列は、ＵｎｉＰｒｏｔ（ｗｗｗ．ｕｎｉｐｒｏｔ．ｏｒｇ）アクセッション番号Ｑ１２８８４（バージョン１４９、配列番号３４）又はＮＣＢＩ（ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／）ＲｅｆＳｅｑ　ＮＰ＿００４４５１．２に示されている。ヒトＦＡＰの細胞外ドメイン（ＥＣＤ）は、アミノ酸２６位から７６０位まで伸びている。Ｈｉｓタグ付きヒトＦＡＰ　ＥＣＤのアミノ酸配列は、配列番号３５に示されている。マウスＦＡＰのアミノ酸配列は、ＵｎｉＰｒｏｔアクセッション番号Ｐ９７３２１（バージョン１２６、配列番号３６）又はＮＣＢＩ　ＲｅｆＳｅｑ　ＮＰ＿０３２０１２．１に示されている。マウスＦＡＰの細胞外ドメイン（ＥＣＤ）は、アミノ酸２６位から７６１位まで伸びている。配列番号３７は、Ｈｉｓタグ付きマウスＦＡＰ　ＥＣＤのアミノ酸配列を示している。配列番号３８は、Ｈｉｓタグ付きカニクイザルＦＡＰ　ＥＣＤのアミノ酸配列を示している。好ましくは、本発明の抗ＦＡＰ結合分子はＦＡＰの細胞外ドメインに結合している。

【００５８】

用語「可変領域」又は「可変ドメイン」は、抗原結合分子の抗原への結合に関与する、抗体重鎖又は軽鎖のドメインを指す。天然抗体の重鎖及び軽鎖の可変ドメイン（それぞれＶＨ、ＶＬ）は通常、類似の構造を有しており、各ドメインは、４つの保存されたフレームワーク領域（ＦＲ）と３つの超可変領域（ＨＶＲ）とを含む。例えば、Ｋｉｎｄｔ　ｅｔ　ａｌ．，Ｋｕｂｙ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，６ｔｈ　ｅｄ．，Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ　ａｎｄ　Ｃｏ．，９１頁（２００７）を参照されたい。抗原結合特異性を付与するのに、単一のＶＨドメイン又はＶＬドメインで十分な場合がある。

【００５９】

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

【００６０】

一般に、抗体は６つのＣＤＲを含み、３つがＶＨにあり（ＣＤＲ－Ｈ１、ＣＤＲ－Ｈ２、ＣＤＲ－Ｈ３）、３つがＶＬにある（ＣＤＲ－Ｌ１、ＣＤＲ－Ｌ２、ＣＤＲ－Ｌ３）。本明細書における例示的なＣＤＲは、以下を含む：

（ａ）アミノ酸残基２６～３２（Ｌ１）、５０～５２（Ｌ２）、９１～９６（Ｌ３）、２６～３２（Ｈ１）、５３～５５（Ｈ２）及び９６～１０１（Ｈ３）に存在する超可変ルー

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）及び９５～１０２（Ｈ３）に存在するＣＤＲ（Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)）；並びに
（ｃ）アミノ酸残基２７ｃ－３６（Ｌ１）、４６～５５（Ｌ２）、８９～９６（Ｌ３）、３０～３５ｂ（Ｈ１）、４７～５８（Ｈ２）及び９３～１０１（Ｈ３）に存在する抗原接触部（antigen contact）（MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996)）。

【００６１】
特に明記しない限り、ＣＤＲは前出のＫａｂａｔら、上掲書に従って決定される。当業者であれば、ＣＤＲの名称がＣｈｏｔｈｉａ、上掲書、ＭｃＣａｌｌｕｍ、上掲書又は他の任意の科学的に認められた命名法に従っても決定され得ることを理解するであろう。

【００６２】
「フレームワーク」又は「ＦＲ」は、超可変領域（ＨＶＲ）残基以外の可変ドメイン残基を指す。可変ドメインのＦＲは、通常、次の４つのＦＲドメイン：ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３、及びＦＲ４から成る。したがって、ＨＶＲ配列及びＦＲ配列は、一般に、ＶＨ（又はＶＬ）においてＦＲ１－Ｈ１（Ｌ１）－ＦＲ２－Ｈ２（Ｌ２）－ＦＲ３－Ｈ３（Ｌ３）－ＦＲ４の順序で出現する。

【００６３】
用語「キメラ」抗体は、重鎖及び／又は軽鎖の一部分が特定の供給源又は種に由来し、重鎖及び／又は軽鎖の残りの部分が異なる供給源又は種に由来する抗体を指す。

【００６４】
抗体の「クラス」は、その重鎖が有する定常ドメイン又は定常領域の種類を指す。抗体には、次の５種類の主要なクラス：ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ、及びＩｇＭがあり、これらのうちのいくつかは、サブクラス（アイソタイプ）、例えば、$Ig G_1$、$Ig G_2$、$Ig G_3$、$Ig G_4$、$Ig A_1$、及び$Ig A_2$に更に分けることができる。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれα、δ、ε、γ、及びμと呼ばれる。

【００６５】
「ヒト化」抗体は、非ヒトＨＶＲからのアミノ酸残基及びヒトＦＲからのアミノ酸残基を含むキメラ抗体を指す。特定の実施態様では、ヒト化抗体は、ＨＶＲ（例えばＣＤＲ）の全て又は実質的に全てが非ヒト抗体のものに対応し、ＦＲの全て又は実質的に全てがヒト抗体のものに対応する、少なくとも１つ、典型的には２つの可変ドメインの実質的に全てを含む。ヒト化抗体は、ヒト抗体に由来する抗体定常領域の少なくとも一部を任意選択で含み得る。抗体（例えば非ヒト抗体）の「ヒト化型」とは、ヒト化を遂げた抗体を指す。本発明に包含される「ヒト化抗体」の他の形態は、特にＣ１ｑ結合及び／又はＦｃ受容体（ＦｃＲ）結合に関して、本発明による特性を生み出すために定常領域が元の抗体の定常領域から更に改変又は変更されたものである。

【００６６】
本明細書の用語「Ｆｃドメイン」又は「Ｆｃ領域」は、定常領域の少なくとも一部を含む、抗体重鎖のＣ末端領域を示すために使用される。この用語は、天然配列Ｆｃ領域及びバリアントＦｃ領域を含む。ＩｇＧ　Ｆｃ領域は、ＩｇＧ　ＣＨ２及びＩｇＧ　ＣＨ３ドメインを含む。通常、ヒトＩｇＧ　Ｆｃ領域の「ＣＨ２ドメイン」は、およそ２３１位のアミノ酸残基からおよそ３４０位のアミノ酸残基に及ぶ。ある実施態様では、ＣＨ２ドメインに炭水化物鎖が結合している。本明細書におけるＣＨ２ドメインは、天然配列ＣＨ２ドメインでもバリアントＣＨ２ドメインでもよい。「ＣＨ３ドメイン」は、Ｆｃ領域のＣ末端からＣＨ２ドメインまでの一続きの残基（すなわち、ＩｇＧのおよそ３４１位のアミノ酸残基からおよそ４４７位のアミノ酸残基まで）を含む。本明細書におけるＣＨ３領域

は、天然配列ＣＨ３ドメインでもバリアントＣＨ３ドメイン（例えば、その一方の鎖に「隆起」（「ノブ」）が導入され、そのもう一方の鎖に対応する「空洞」（「ホール」が導入されたＣＨ３ドメイン；本明細書において参照により明示的に援用される米国特許第５８２１３３３号を参照されたい）でもよい。そのようなバリアントＣＨ３ドメインを使用して、本明細書に記載される２つの同一ではない抗体重鎖のヘテロ二量体化を促進してもよい。ある実施態様では、ヒトＩｇＧ重鎖Ｆｃ領域は、Ｃｙｓ２２６から又はＰｒｏ２３０から、重鎖のカルボキシル末端にまで及ぶ。しかしながら、Ｆｃ領域のＣ末端リジン（Ｌｙｓ４４７）は、存在していても存在していなくてもよい。本明細書で明記されない限り、Ｆｃ領域又は定常領域における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に記載されている、ＥＵインデックスとも呼ばれるＥＵ番号付けシステムに従う。

【００６７】

「ノブ・イントゥ・ホール」技術は、例えば、米国特許第５７３１１６８号、米国特許第７６９５９３６号、Ｒｉｄｇｗａｙ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｔ Ｅｎｇ ９，６１７－６２１（１９９６）及びＣａｒｔｅｒ，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｍｅｔｈ ２４８，７－１５（２００１）に記載されている。概して、該方法は、ヘテロ二量体の形成を促進し、ホモ二量体の形成を妨げるために、隆起を空洞内に配置することができるよう、第１のポリペプチドの境界面に隆起（「ノブ」）を導入し、第２のポリペプチドの境界面に対応する空洞（「ホール」）を導入することを伴う。隆起は、第１のポリペプチドの境界面からの小さなアミノ酸側鎖をより大きな側鎖（例：チロシン又はトリプトファン）で置き換えることによって構築される。大きなアミノ酸側鎖を小さなアミノ酸側鎖（例：アラニン又はスレオニン）で置き換えることにより、隆起と同じ又は類似のサイズの補償空洞が第２のポリペプチドの境界面に作られる。隆起及び空洞は、ポリペプチドをコードする核酸を変更することによって、例えば部位特異的変異誘発によって、又はペプチド合成によって作製することができる。具体的な実施態様では、ノブ改変は、Ｆｃドメインの２つのサブユニットの一方にアミノ酸置換Ｔ３６６Ｗを含み、ホール改変は、Ｆｃドメインの２つのサブユニットのもう一方にアミノ酸置換Ｔ３６６Ｓ、Ｌ３６８Ａ及びＹ４０７Ｖを含む。更なる特定の実施態様において、ノブ改変を含むＦｃドメインのサブユニットは、アミノ酸置換Ｓ３５４Ｃを更に含み、ホール改変を含むＦｃドメインのサブユニットは、アミノ酸置換Ｙ３４９Ｃを更に含む。これら２つのシステイン残基の導入によってＦｃ領域の２つのサブユニット間にジスルフィド架橋が形成され、それにより二量体を更に安定化させる（Carter,J Immunol Methods 248,7-15(2001)）。

【００６８】

「免疫グロブリンのＦｃ領域に相当する領域」は、免疫グロブリンのＦｃ領域の天然に存在する対立遺伝子バリアントと、置換、付加又は欠失を生成するが免疫グロブリンのエフェクター機能（例えば抗体依存性細胞傷害性）の媒介能を実質的に低下させない変更を有するバリアントとを含むことが意図される。例えば、１又は複数のアミノ酸を、生物学的機能を実質的に損なうことなく、免疫グロブリンのＦｃ領域のＮ末端又はＣ末端から欠失させることができる。このようなバリアントは、活性に対して最小限の影響を有するように、当技術分野で知られた一般的な規則に従って選択され得る（例えば、Bowie,J.U. et al.,Science 247:1306-10(1990)を参照されたい）。

【００６９】

用語「エフェクター機能」は、抗体のアイソタイプによって異なる、抗体のＦｃ領域に起因する生物学的活性の機能を指す。抗体エフェクター機能の例としては、Ｃ１ｑ結合及び補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）、Ｆｃ受容体結合、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ＡＤＣＣ）、抗体依存性細胞食作用（ＡＤＣＰ）、サイトカイン分泌、抗原提示細胞による免疫複合体を介した抗原の取り込み、細胞表面受容体（例：Ｂ細胞受容体）のダウンレギ

ュレーション、及びＢ細胞の活性化が挙げられる。

【００７０】

Ｆｃ受容体結合依存性エフェクター機能は、抗体のＦｃ領域と、造血細胞上の専門化した細胞表面受容体であるＦｃ受容体（ＦｃＲ）との相互作用によりもたらされ得る。Ｆｃ受容体は免疫グロブリンスーパーファミリーに属し、免疫複合体の食作用による抗体でコートされた病原体の除去と、抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）による、対応する抗体でコートされた赤血球及び他の様々な細胞標的（例：腫瘍細胞）の溶解の両方を媒介することが示されている（例えば、Van de Winkel,J.G.and Anderson,C.L.,J.Leukoc.Biol.49(1991)511-524を参照されたい）。ＦｃＲは、免疫グロブリンのアイソタイプに対する特異性が特徴であり、ＩｇＧ抗体のＦｃ受容体はＦｃγＲと呼ばれる。Ｆｃ受容体結合は、例えばＲａｖｅｔｃｈ，Ｊ．Ｖ．ａｎｄ Ｋｉｎｅｔ，Ｊ．Ｐ．，Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．９（１９９１）４５７－４９２、Ｃａｐｅｌ，Ｐ．Ｊ．，ｅｔ ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｍｅｔｈｏｄｓ ４（１９９４）２５－３４；ｄｅ Ｈａａｓ，Ｍ．，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｌａｂ．Ｃｌｉｎ．Ｍｅｄ．１２６（１９９５）３３０－３４１；及びＧｅｓｓｎｅｒ，Ｊ．Ｅ．，ｅｔ ａｌ．，Ａｎｎ．Ｈｅｍａｔｏｌ．７６（１９９８）２３１－２４８に記載されている。

【００７１】

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

－ＦｃγＲＩ（ＣＤ６４）は、単量体ＩｇＧに高い親和性で結合し、マクロファージ、単球、好中球、及び好酸球にて発現する。アミノ酸残基Ｅ２３３～Ｇ２３６、Ｐ２３８、Ｄ２６５、Ｎ２９７、Ａ３２７、及びＰ３２９（ＫａｂａｔのＥＵインデックスによる番号付け）の少なくとも１つにおけるＦｃ領域ＩｇＧの改変がＦｃγＲＩへの結合を低減させる。２３３位～２３６位のＩｇＧ２残基がＩｇＧ１及びＩｇＧ４に置換されて、ＦｃγＲＩへの結合が10^3分の１低減し、抗体感作赤血球に対するヒト単球の応答が消失した（Armour,K.L.,et al.,Eur.J.Immunol.29(1999)2613-2624）。

【００７２】

－ＦｃγＲＩＩ（ＣＤ３２）は、複合ＩｇＧに中程度から低度の親和性で結合し、広く発現する。この受容体は２つのサブタイプ：ＦｃγＲＩＩＡ及びＦｃγＲＩＩＢに分けることができる。ＦｃγＲＩＩＡは殺傷に関与する多くの細胞（例えばマクロファージ、単球、好中球）に認められ、殺傷プロセスを活性化することができると考えられる。ＦｃγＲＩＩＢは、阻害プロセスにおいて役割を果たすようであり、Ｂ細胞、マクロファージ、並びにマスト細胞及び好酸球に認められる。Ｂ細胞上では、ＦｃγＲＩＩＢは、更なる免疫グロブリン産生と、例えばＩｇＥクラスへのアイソタイプスイッチとを抑制する働きをするようである。マクロファージ上では、ＦｃγＲＩＩＢは、ＦｃγＲＩＩＡによって媒介される食作用を阻害するように働く。好酸球及びマスト細胞上では、該Ｂ形態は、その別の受容体に結合しているＩｇＥを介して、これらの細胞の活性化を抑制するのに役立つ可能性がある。ＦｃγＲＩＩＡに対する結合の低減は、例えば、アミノ酸残基Ｅ２３３～Ｇ２３６、Ｐ２３８、Ｄ２６５、Ｎ２９７、Ａ３２７、Ｐ３２９、Ｄ２７０、Ｑ２９５、Ａ３２７、Ｒ２９２及びＫ４１４（ＫａｂａｔのＥＵインデックスによる番号付け）のうちの少なくとも１つにおいて変異を有するＩｇＧ　Ｆｃ領域を含む抗体に関して認められる。

【００７３】

－ＦｃγＲＩＩＩ（ＣＤ１６）はＩｇＧに、中程度～低度の親和性で結合し、２つの種類として存在する。ＦｃγＲＩＩＩＡは、ＮＫ細胞、マクロファージ、好酸球、並びにいくつかの単球及びＴ細胞上に認められ、ＡＤＣＣを媒介する。ＦｃγＲＩＩＩＢは、好中球で高度に発現する。ＦｃγＲＩＩＩＡに対する結合の低減は、例えば、アミノ酸残基Ｅ２３３～Ｇ２３６、Ｐ２３８、Ｄ２６５、Ｎ２９７、Ａ３２７、Ｐ３２９、Ｄ２７０、Ｑ

２９５、Ａ３２７、Ｓ２３９、Ｅ２６９、Ｅ２９３、Ｙ２９６、Ｖ３０３、Ａ３２７、Ｋ３３８、及びＤ３７６（ＫａｂａｔのＥＵインデックスによる番号付け）の少なくとも１つに変異を有するＩｇＧ　Ｆｃ領域を含む抗体に関して認められる。

【００７４】

Ｆｃ受容体に対するヒトＩｇＧ１上の結合部位のマッピング、上述の変異部位、並びにＦｃγＲＩ及びＦｃγＲＩＩＡへの結合を測定するための方法は、Ｓｈｉｅｌｄｓ，Ｒ．Ｌ．，ｅｔ　ａｌ．Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７６（２００１）６５９１－６６０４に記載されている。

【００７５】

「ＡＤＣＣ」又は「抗体依存性細胞傷害」という用語は、Ｆｃ受容体結合によりもたらされる機能であり、エフェクター細胞の存在下での、本明細書で報告される抗体による標的細胞の溶解を指す。ＡＤＣＣを媒介する初期ステップを誘発する抗体の能力は、ＦｃγＲＩ及び／又はＦｃγＲＩＩＡ又は（本質的にＦｃγＲＩＩＩＡを発現する）ＮＫ細胞を組み換えにより発現する細胞といった、Ｆｃγ受容体を発現する細胞への、抗体の結合を測定することによって調べられる。特に、ＮＫ細胞上でのＦｃγＲへの結合が測定される。

【００７６】

「活性化Ｆｃ受容体」は、抗体のＦｃ領域による関与に続いて、受容体保有細胞を刺激してエフェクター機能を実行するシグナル伝達事象を引き起こすＦｃ受容体である。活性化Ｆｃ受容体には、ＦｃγＲＩＩＩａ（ＣＤ１６ａ）、ＦｃγＲＩ（ＣＤ６４）、ＦｃγＲＩＩａ（ＣＤ３２）、及びＦｃαＲＩ（ＣＤ８９）が含まれる。特定の活性化Ｆｃ受容体は、ヒトＦｃγＲＩＩＩａである（ＵｎｉＰｒｏｔアクセッション番号Ｐ０８６３７、バージョン１４１参照）。

【００７７】

本明細書で使用される「ＣＤ４０」という用語は、特に明記しない限り、霊長類（例：ヒト）及びげっ歯類（例：マウス及びラット）などの哺乳動物を含む任意の脊椎動物源に由来する任意の天然ＣＤ４０を指す。この用語は、「完全長」の未加工のＣＤ４０だけでなく、細胞内でのプロセシングから生じる任意の形態のＣＤ４０も含む。この用語は、ＣＤ４０の天然に存在するバリアント、例えば、スプライスバリアント又は対立遺伝子バリアントも包含する。例示的なヒトＣＤ４０のアミノ酸配列は、配列番号３３（Ｕｎｉｐｒｏｔ　Ｐ２５９４２、バージョン２００）に示され、例示的なマウスＣＤ４０のアミノ酸配列は、配列番号３９（Ｕｎｉｐｒｏｔ　Ｐ２７５１２、バージョン１６０）に示される。ＣＤ４０抗原は、腫瘍壊死因子受容体（ＴＮＦ－Ｒ）ファミリーに属する５０ｋＤａの細胞表面糖タンパク質である。（Stamenkovic et al. (1989), EMBO J. 8: 1403-10）。ＣＤ４０は、Ｂリンパ球、樹状細胞、単球、マクロファージ、胸腺上皮、内皮細胞、線維芽細胞、平滑筋細胞などを含む、多くの正常細胞及び腫瘍細胞タイプに発現する。ＣＤ４０は、全てのＢリンパ腫で発現し、且つ全ての固形腫瘍の７０％で発現し、ＩＦＮガンマ及びＧＭ－ＣＳＦなどの成熟シグナルによって抗原提示細胞（ＡＰＣ）内でアップレギュレートされる。ＣＤ４０の活性化はまた、単球の機能的樹状細胞（ＤＣ）への分化を誘導し、ＡＰＣ－ＣＤ４０誘導サイトカインを介してＮＫ細胞の細胞溶解活性を増強する。したがって、ＣＤ４０は、ＡＰＣの成熟、ヘルパーサイトカインの分泌、共刺激分子のアップレギュレーション、及びエフェクター機能の増強を誘導することにより、免疫応答の開始と増強に重要な役割を果たす。

【００７８】

本明細書で使用される「ＣＤ４０アゴニスト」という用語は、ＣＤ４０／ＣＤ４０Ｌ相互作用をアゴナイズする任意の部分を含む。この文脈で使用されるＣＤ４０は、好ましくはヒトＣＤ４０を指し、したがってＣＤ４０アゴニストは好ましくは、ヒトＣＤ４０のアゴニストである。通常、この部分はアゴニストＣＤ４０抗体又は抗体断片であろう。

【００７９】

用語「抗ＣＤ４０抗体」、「抗ＣＤ４０」、「ＣＤ４０抗体」及び「ＣＤ４０に特異的

に結合する抗体」とは、抗体がＣＤ４０の標的化において診断及び／又は治療剤として有用であるような充分な親和性でＣＤ４０に結合可能である抗体を指す。ある態様において、無関係な非ＣＤ４０タンパク質に対する抗ＣＤ４０抗体の結合の程度は、例えばラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）又はフローサイトメトリー（ＦＡＣＳ）により測定して、ＣＤ４０に対する該抗体の結合の約１０％未満である。特定の実施態様において、ＣＤ４０に結合する抗体は、≦１μＭ、≦１００ｎＭ、≦１０ｎＭ、≦１ｎＭ、≦０．１ｎＭ、≦０．０１ｎＭ、又は≦０．００１ｎＭ（例えば10^{-6}Ｍ以下、例えば10^{-6}Ｍ～10^{-13}Ｍ、例えば10^{-8}Ｍ～10^{-10}Ｍ）の解離定数（K_D）を有する。

【００８０】

用語「ペプチドリンカー」は、１又は複数のアミノ酸、典型的には約２から２０アミノ酸を含むペプチドを指す。ペプチドリンカーは当技術分野において既知のものであっても、本願明細書に記載されているものであってもよい。好適な、非免疫原性リンカーペプチドは例えば、$(G_4S)_n$、$(SG_4)_n$又は$G_4(SG_4)_n$ペプチドリンカーであり、式中、「ｎ」は一般に、１～１０、典型的には２～４の数字、特に２であり、すなわち、該ペプチドは、ＧＧＧＧＳ（配列番号４０）、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号４１）、ＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧ（配列番号４２）及びＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧＧ（配列番号４３）から成る群から選択されるが、配列ＧＳＰＧＳＳＳＳＧＳ（配列番号４４）、$(G4S)_3$（配列番号４５）、$(G4S)_4$（配列番号４６）、ＧＳＧＳＧＳＧＳ（配列番号４７）、ＧＳＧＳＧＮＧＳ（配列番号４８）、ＧＧＳＧＳＧＳＧ（配列番号４９）、ＧＧＳＧＳＧ（配列番号５０）、ＧＧＳＧ（配列番号５１）、ＧＧＳＧＮＧＳＧ（配列番号５２）、ＧＧＮＧＳＧＳＧ（配列番号５３）及びＧＧＮＧＳＧ（配列番号５４）も含む。特に興味深いペプチドリンカーは、（Ｇ４Ｓ）（配列番号４０）、$(G_4S)_2$又はＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号４１）、$(G4S)_3$（配列番号４５）及び$(G4S)_4$（配列番号４６）である。

【００８１】

本願内で使用される用語「アミノ酸」は、アラニン（３文字コード：ａｌａ、１文字コード：Ａ）、アルギニン（ａｒｇ、Ｒ）、アスパラギン（ａｓｎ、Ｎ）、アスパラギン酸（ａｓｐ、Ｄ）、システイン（ｃｙｓ、Ｃ）、グルタミン（ｇｌｎ、Ｑ）、グルタミン酸（ｇｌｕ、Ｅ）、グリシン（ｇｌｙ、Ｇ）、ヒスチジン（ｈｉｓ、Ｈ）、イソロイシン（ｉｌｅ、Ｉ）、ロイシン（ｌｅｕ、Ｌ）、リジン（ｌｙｓ、Ｋ）、メチオニン（ｍｅｔ、Ｍ）、フェニルアラニン（ｐｈｅ、Ｆ）、プロリン（ｐｒｏ、Ｐ）、セリン（ｓｅｒ、Ｓ）、スレオニン（ｔｈｒ、Ｔ）、トリプトファン（ｔｒｐ、Ｗ）、チロシン（ｔｙｒ、Ｙ）及びバリン（ｖａｌ、Ｖ）を含む、天然に存在するカルボキシα－アミノ酸の群を示す。

【００８２】

「融合している」又は「連結している」とは、構成成分（例えば、抗体の重鎖とＦａｂ断片）が、直接又は１若しくは複数のペプチドリンカーを介して、ペプチド結合によってつながっていることを意味する。

【００８３】

参照ポリペプチド（タンパク質）配列に対する「アミノ酸配列同一性パーセント（％）」は、配列を整列させ、最大の配列同一性パーセントを得るために必要ならばギャップを導入した後、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場合の、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パーセントであると定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを決定するためのアライメントは、例えば、公的に入手可能なＢＬＡＳＴ、ＢＬＡＳＴ－２、ＡＬＩＧＮ、ＳＡＷＩ又はＭｅｇａｌｉｇｎ（ＤＮＡＳＴＡＲ）ソフトウェアなどのコンピューターソフトウェアを使用して、当技術分野の技術の範囲内にある様々な方法で達成され得る。当業者であれば、比較される配列の全長にわたって最大のアライメントを達成するために必要なアルゴリズムを含む、配列を整列させるための適切なパラメーターを決定することができる。但し、本明細書では、アミノ酸配列同一性％値は、配列比較コンピュータープログラムＡＬＩＧＮ－２

を用いて生成されている。ＡＬＩＧＮ－２配列比較コンピュータープログラムはジェネンテック社が作成したものであり、そのソースコードは、ユーザードキュメントと共に米国著作権局、Ｗａｓｈｉｎｇｔｏｎ　Ｄ．Ｃ．，２０５５９に提出され、米国著作権登録番号ＴＸＵ５１００８７で登録されている。ＡＬＩＧＮ－２プログラムは、ジェネンテック社（カリフォルニア州サウス・サンフランシスコ）から公的に入手可能であり、又はそのソースコードからコンパイルすることもできる。デジタルＵＮＩＸ　Ｖ４．０Ｄを含めたＵＮＩＸオペレーティングシステムでの使用のためには、ＡＬＩＧＮ－２プログラムはコンパイルする必要がある。全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ており、変化しない。ＡＬＩＧＮ－２がアミノ酸配列比較に用いられる状況では、所与のアミノ酸配列Ｂへの、所与のアミノ酸配列Ｂとの、又は所与のアミノ酸配列Ｂに対する、所与のアミノ酸配列Ａのアミノ酸配列同一性％（或いは、所与のアミノ酸配列Ｂへの、所与のアミノ酸配列Ｂとの、又は所与のアミノ酸配列Ｂに対する、特定のアミノ酸配列同一性％を有する又は含む、所与のアミノ酸配列Ａ、とも言える）は、以下のように計算される：

　　１００×分数Ｘ／Ｙ

式中、Ｘは、配列アライメントプログラムＡＬＩＧＮ－２によって、該プログラムのＡとＢのアライメントにおいて完全一致とされたアミノ酸残基の数であり、Ｙは、Ｂのアミノ酸残基の総数である。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に対するアミノ酸配列同一性％は、ＢのＡに対するアミノ酸配列同一性％とは等しくないことが理解されよう。特に断りのない限り、本明細書で使用される全てのアミノ酸配列同一性％値は、ＡＬＩＧＮ－２コンピュータープログラムを使用して、直前の段落で説明したように得られる。

【００８４】

特定の実施態様では、本明細書において提供される二重特異性抗原結合分子のアミノ酸配列バリアントが企図される。例えば、本抗原結合分子の結合親和性及び／又は他の生物学的特性を改善するのが望ましい場合がある。本二重特異性抗原結合分子のアミノ酸配列バリアントは、該分子をコードするヌクレオチド配列に適切な改変を導入することによって、又はペプチド合成によって調製され得る。このような改変には、例えば、本二重特異性抗原結合分子のアミノ酸配列内の残基からの欠失、及び／又はそれへの挿入、及び／又はその置換が含まれる。最終的な抗原結合分子が所望の特徴（例：抗原結合性）を有する限り、欠失、挿入及び置換を任意に組み合わせて、最終的な抗原結合分子を得ることができる。置換変異誘発の対象となる部位には、ＣＤＲ及びフレームワーク（ＦＲ）が含まれる。表Ａの「好ましい置換」という見出しの下に保存的置換を示し、その下の（１）～（６）のアミノ酸側鎖の種類に基づいて更に説明する。アミノ酸置換は目的の分子に導入することができ、その生成物を所望の活性、例えば、抗原結合性の保持／改善、免疫原性の低下、又はＡＤＣＣ若しくはＣＤＣの改善についてスクリーニングすることができる。

表Ａ

元の 残基	例示的な 置換	好ましい 置換
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; ﾉﾙﾛｲｼﾝ	Leu
Leu (L)	ﾉﾙﾛｲｼﾝ; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (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

アミノ酸は以下の共通の側鎖特性に従って分類することができる。
（１）疎水性：ノルロイシン、Ｍｅｔ、Ａｌａ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ；
（２）中性親水性：Ｃｙｓ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ；
（３）酸性：Ａｓｐ、Ｇｌｕ；
（４）塩基性：Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ａｒｇ；
（５）鎖配向に影響する残基：Ｇｌｙ、Ｐｒｏ；
（６）芳香族：Ｔｒｐ、Ｔｙｒ、Ｐｈｅ

【００８５】

非保存的置換は、これらの種類のうち１つの種類のメンバーを別の種類のメンバーと交換することを伴う。

【００８６】

用語「アミノ酸配列バリアント」は、親抗原結合分子（例：ヒト化又はヒト抗体）の１又は複数の超可変領域残基にアミノ酸置換が存在する実質的バリアントを含む。一般的に、更なる試験のために選択された結果として得られた１又は複数のバリアントは、親抗原

結合分子と比較して、特定の生物学的特性（例：増加した親和性、低下した免疫原性）の改変（例：改善）を有し、且つ／又は親抗原結合分子の保存された特定の生物学的特性を実質的に保持しているであろう。例示的な置換型バリアントは親和性成熟抗体であり、例えば本明細書に記載されているようなファージディスプレイに基づく親和性成熟技術を用いて、簡便に生成することができる。端的に言えば、１又は複数のＣＤＲ残基が変異し、該バリアント抗原結合分子がファージ上に提示され、特定の生物活性（例：結合親和性）についてスクリーニングされる。特定の実施態様では、置換、挿入又は欠失は、これらの変更が抗原に対する抗原結合分子の結合能を実質的に低減させない限り、１又は複数のＣＤＲ内で生じ得る。例えば、実質的に結合親和性を低減させない保存的変更（例えば本明細書において提供される保存的置換）をＣＤＲ内で行うことができる。変異誘発の標的になり得る抗体の残基又は領域を同定するために有用な方法は「アラニンスキャニング変異誘発」と呼ばれ、Ｃｕｎｎｉｎｇｈａｍ ａｎｄ Ｗｅｌｌｓ（１９８９）Ｓｃｉｅｎｃｅ、２４４：１０８１－１０８５に記載されている。この方法では、抗体と抗原との相互作用が影響を受けるかどうかを決定するために、残基又は標的残基のグループ（例：Ａｒｇ、Ａｓｐ、Ｈｉｓ、Ｌｙｓ及びＧｌｕなどの荷電残基）を同定し、中性又は負に帯電したアミノ酸（例：アラニン又はポリアラニン）で置き換える。最初の置換に対して機能的感受性を示すアミノ酸の位置に、更なる置換を導入することができる。これに代えて、又はこれに加えて、抗体と抗原との間の接触点を同定するための、抗原－抗原結合分子複合体の結晶構造。このような接触残基及び隣接残基は、置換の候補として標的にしても排除してもよい。バリアントは、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る場合がある。

【００８７】

アミノ酸配列挿入には、１個の残基から１００個以上の残基を含むポリペプチドまでの長さの範囲のアミノ末端及び／又はカルボキシル末端融合、並びに単一又は複数のアミノ酸残基の配列内挿入が含まれる。末端挿入の例には、Ｎ末端メチオニル残基を有する抗原結合分子が含まれる。抗原結合分子の他の挿入バリアントとしては、抗原結合分子の血清半減期を延ばすポリペプチドのＮ末端又はＣ末端への融合体が含まれる。

【００８８】

特定の実施態様では、本明細書に提供される抗原結合分子を変化させて、抗体のグリコシル化度を上昇又は低下させる。該分子のグリコシル化バリアントは、簡便には、１又は複数のグリコシル化部位が生成又は除去されるようにアミノ酸配列を変化させることにより得られる。抗原結合分子がＦｃ領域を含む場合、それに結合する糖（炭水化物）を変化させることができる。典型的には、哺乳動物細胞によって産生される天然抗体は、Ｎ結合によってＦｃ領域のＣＨ２ドメインのＡｓｎ２９７に通常結合している分岐状の二分岐オリゴ糖を含む。例えば、Ｗｒｉｇｈｔ ｅｔ ａｌ．ＴＩＢＴＥＣＨ １５：２６－３２（１９９７）を参照されたい。オリゴ糖には、様々な炭水化物、例えば、マンノース、Ｎ－アセチルグルコサミン（ＧｌｃＮＡｃ）、ガラクトース、及びシアル酸、並びに二分岐型オリゴ糖構造の「幹」のＧｌｃＮＡｃに結合したフコースが含まれ得る。いくつかの実施態様では、抗原結合分子中のオリゴ糖の修飾は、特定の改善された特性を有するバリアントを作成するためになされ得る。ある態様において、Ｆｃ領域に（直接的又は間接的に）結合するフコースを欠く糖鎖構造を有する抗原結合分子のバリアントが提供される。このようなフコシル化バリアントは、改善されたＡＤＣＣ機能を有し得る。例えば、米国特許出願公開番号第２００３／０１５７１０８号（Ｐｒｅｓｔａ，Ｌ．）又は同大２００４／００９３６２１号（協和発酵工業社）を参照のこと。本発明の抗原結合分子の更なるバリアントは、二分されたオリゴ糖を含むもの、例えば、Ｆｃ領域に結合する二分岐オリゴ糖がＧｌｃＮＡｃにより二分されているものを含む。このようなバリアントは、低減されたフコシル化及び／又は改善されたＡＤＣＣ機能を有していてもよく、例えば、国際公開第２００３／０１１８７８号（Ｊｅａｎ－Ｍａｉｒｅｔら）、米国特許第６６０２６８４号（Ｕｍａｎａら）、及び米国特許出願公開第２００５／０１２３５４６号（Ｕｍａｎａら）を参照されたい。Ｆｃ領域に結合したオリゴ糖中に少なくとも１つのガラクトース残

基を有するバリアントも提供される。このような抗体バリアントは、改善されたＣＤＣ機能を有し、例えば、国際公開第１９９７／３００８７号（Ｐａｔｅｌら）；国際公開第１９９８／５８９６４号（Ｒａｊｕ，Ｓ．）；及び国際公開第１９９９／２２７６４号（Ｒａｊｕ，Ｓ．）に記載されている。

【００８９】

特定の実施態様では、本発明の抗原結合分子のシステイン操作バリアント、例えば、分子の１又は複数の残基がシステイン残基で置換された「チオＭＡｂ」を作製することが望ましい場合がある。特定の実施態様では、置換された残基は、該分子の接近可能な部位で生じる。これらの残基をシステインで置換することによって、反応性チオール基が抗体の接近可能な部位に配置され、その反応性チオール基を用いて抗体を他の部分、例えば薬物部分又はリンカー－薬物部分にコンジュゲートさせて、イムノコンジュゲートを作製することができる。特定の実施態様では、以下の残基のいずれか１つ又はそれ以上が、システインで置換されていてもよい：軽鎖のＶ２０５（Ｋａｂａｔ番号付け）；重鎖のＡ１１８（ＥＵ番号付け）；及び重鎖Ｆｃ領域のＳ４００（ＥＵ番号付け）。システイン操作された抗原結合分子は、例えば、米国特許第７５２１５４１号に記載されるように作製されてもよい。「イムノコンジュゲート」は、細胞傷害性剤を含むがそれに限定されない、１又は複数の異種分子にコンジュゲートした抗体である。

【００９０】

「核酸」又は「ポリヌクレオチド」という用語は、ヌクレオチドのポリマーを含む任意の化合物及び／又は物質を含む。各ヌクレオチドは、塩基、具体的にはプリン塩基又はピリミジン塩基（すなわち、シトシン（Ｃ）、グアニン（Ｇ）、アデニン（Ａ）、チミン（Ｔ）又はウラシル（Ｕ））、糖（すなわち、デオキシリボース又はリボース）、及びリン酸基で構成されている。多くの場合、核酸分子は塩基の配列によって記述される。したがって、前記塩基は核酸分子の一次構造（線状構造）を表す。塩基の配列は、典型的には、５’から３’に向かって表される。本明細書では、核酸分子という用語は、例えば相補的ＤＮＡ（ｃＤＮＡ）及びゲノムＤＮＡを含むデオキシリボ核酸（ＤＮＡ）、リボ核酸（ＲＮＡ）、特にメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）、ＤＮＡ又はＲＮＡの合成形態、及びこれらの分子の２つ以上を含む混合ポリマーを包含する。核酸分子は線状でも環状でもよい。核酸分子という用語は、更に、センス鎖とアンチセンス鎖の両方、並びに一本鎖形態及び二本鎖形態も含む。更に、本明細書に記載される核酸分子は、天然又は非天然のヌクレオチドを含有してもよい。非天然ヌクレオチドの例としては、誘導体化された糖若しくはリン酸骨格結合を有する修飾ヌクレオチド塩基又は化学的に修飾された残基が挙げられる。また、核酸分子は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ及び／又はｉｎ　ｖｉｖｏ（例えば宿主又は患者において）での本発明の抗体の直接発現のためのベクターとして適したＤＮＡ分子及びＲＮＡ分子も包含する。そのようなＤＮＡ（例：ｃＤＮＡ）又はＲＮＡ（例：ｍＲＮＡ）ベクターは、改変されていてもいなくてもよい。例えば、ｍＲＮＡは、ｉｎ　ｖｉｖｏで抗体を産生するために対象にｍＲＮＡを注入することができるように、ＲＮＡベクターの安定性及び／又はコードされた分子の発現を高めるように化学的に改変することができる（例えば、２０１７年６月１２日にオンラインで公開されたＳｔａｄｌｅｒ　ｅｒｔ　ａｌ，Ｎａｔｕｒｅ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ　２０１７、ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎｍ．４３５６又は欧州特許第２１０１８２３号参照）。

【００９１】

「単離された」核酸とは、核酸分子であって、その天然の環境の構成成分から分離されたものを指す。単離された核酸は、通常核酸分子を含む細胞に含まれる核酸分子を含むが、その核酸分子は、染色体外に存在するか又はその天然の染色体位置とは異なる染色体位置に存在する。

【００９２】

「二重特異性抗原結合分子又は抗体をコードする単離された核酸」とは、二重特異性抗原結合分子又は抗体の重鎖及び軽鎖（又はその断片）をコードする１又は複数の核酸分子を指し、かかる１又は複数の核酸分子を単一のベクター又は別々のベクターに含み、かか

る１又は複数の核酸分子が宿主細胞内の１又は複数の場所に存在するものをいう。
【００９３】
本発明の参照ヌクレオチド配列と、少なくとも、例えば、９５％「同一」のヌクレオチド配列を有する核酸又はポリヌクレオチドとは、ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が、参照ヌクレオチド配列の各１００ヌクレオチドあたり５つまでの点変異を含み得ること以外は、参照配列と同一であることを意味する。換言すれば、参照ヌクレオチド配列と少なくとも９５％同一であるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを得るために、参照配列中最大５％のヌクレオチドが欠失しているか又は別のヌクレオチドで置換されていてもよく、或いは参照配列中の全ヌクレオチドの最大５％までのヌクレオチドが参照配列に挿入されていてもよい。参照配列のこのような変更は、参照ヌクレオチド配列の５’若しくは３’末端位置で発生しても、これらの末端位置の間の任意の位置で発生してもよく、参照配列内の残基間に個別に散在しているか又は参照配列内に１若しくは複数の連続したグループで散在しているかのいずれかである。実際には、任意の特定のポリヌクレオチド配列が、本発明のヌクレオチド配列と少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％又は９９％同一であるかどうかは、従来通り既知のコンピュータープログラム、例えばポリペプチドについて上述したもの（例：ＡＬＩＧＮ－２）を用いて決定することができる。
【００９４】
用語「発現カセット」は、組換えにより又は合成により、標的細胞内の特定の核酸の転写を可能にする一連の特定の核酸要素を用いて生成されたポリヌクレオチドを指す。組換え発現カセットは、プラスミド、染色体、ミトコンドリアＤＮＡ、プラスチドＤＮＡ、ウイルス又は核酸断片に組み込むことができる。典型的には、発現ベクターの組換え発現カセット部分には、他の配列の中でも、転写される核酸配列及びプロモーターが含まれる。特定の実施態様では、本発明の発現カセットは、本発明の二重特異性抗原結合分子をコードするポリヌクレオチド配列又はその断片を含む。
【００９５】
用語「ベクター」又は「発現ベクター」は、「発現コンストラクト」と同義であり、標的細胞内でそれが操作可能に結合する特定の遺伝子の発現を導入及び誘導するために使用されるＤＮＡ分子を指す。この用語は、自己複製する核酸構造としてのベクター、及びベクターが導入された宿主細胞のゲノム内へと組み込まれたベクターを含む。本発明の発現ベクターは、発現カセットを含む。発現ベクターは、大量の安定なｍＲＮＡの転写を可能にする。発現ベクターが標的細胞内部に入ると、遺伝子によってコードされているリボ核酸分子又はタンパク質が、細胞転写及び／又は翻訳機構によって産生される。ある実施態様では、本発明の発現ベクターは、本発明の二重特異性抗原結合分子又はその断片をコードするポリヌクレオチド配列含む発現カセットを含む。
【００９６】
用語「宿主細胞」、「宿主細胞株」及び「宿主細胞培養物」は、互換的に使用され、外因性の核酸が導入された細胞とその子孫を指す。宿主細胞は、「形質転換体」及び「形質転換細胞」を含み、これらは、継代数にかかわらず、初代の形質転換細胞と、初代の形質転換細胞から誘導された子孫とを含む。子孫は、親細胞と核酸含有量の点で完全に同一でない場合があるが、変異を含んでいてもよい。本明細書には、最初に形質転換された細胞においてスクリーニング又は選択されたものと同じ機能又は生物活性を有する変異体子孫が含まれる。宿主細胞は、本発明の二重特異性抗原結合分子を生成するのに使用できる任意の種類の細胞系である。宿主細胞には、培養細胞、例えば、ほんの数例を挙げると、ＣＨＯ細胞、ＢＨＫ細胞、ＮＳ０細胞、ＳＰ２／０細胞、ＹＯ骨髄腫細胞、Ｐ３Ｘ６３マウス骨髄腫細胞、ＰＥＲ細胞、ＰＥＲ．Ｃ６細胞又はハイブリドーマ細胞、酵母細胞、昆虫細胞及び植物細胞などの哺乳動物培養細胞が含まれるが、トランスジェニック動物、トランスジェニック植物又は培養植物若しくは動物組織に含まれる細胞も含まれる。
【００９７】
「有効量の」薬剤は、それが投与される細胞又は組織中に生理的変化をもたらすために

必要な量を指す。

【００９８】

本発明による併用療法は、相乗効果を有する。２つの化合物の「相乗効果」とは、２つの薬剤の併用の効果が、それらの個々の効果の和よりも大きく、コントロールや単剤と統計的に異なるものをいう。別の実施態様では、本明細書に開示されている併用療法は、相加効果を有する。２つの化合物の「相加効果」とは、２つの薬剤の併用の効果が、それらの個々の効果の和であり、コントロール及び／又は単剤のいずれとも統計的に異なるものである。

【００９９】

薬剤、例えば薬学的組成物の「治療的有効量」とは、所望の治療的又予防的結果を達成するために必要な投与量及び期間において有効な量を指す。薬剤の治療的有効量は、例えば、疾患の副作用を除去し、低下させ、遅延させ、最小限にし、又は予防する。

【０１００】

「個体」又は「対象」は、哺乳動物である。哺乳動物には、限定されないが、家畜動物（例：ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ、ウマ）、霊長類（例：ヒト、及びサルなどの非ヒト霊長類）、ウサギ、げっ歯類（例：マウス及びラット）が含まれる。特に、個体又は対象はヒトである。

【０１０１】

「薬学的組成物」という用語は、中に含まれる有効成分の生物活性が有効になるような形態の調製物であり、且つ、製剤が投与される対象にとって許容できないほど毒性である追加の成分を含まない調製物を指す。

【０１０２】

「薬学的に許容される担体」は、対象に非毒性である、有効成分以外の薬学的組成物の成分を指す。薬学的に許容される添加物には、限定されないが、バッファー、安定剤又は保存剤が含まれる。

【０１０３】

「添付文書」という用語は、治療製品の商品包装に通例含まれる説明書を指すのに用いられ、そのような治療製品の適応症、用法、投与量、投与、併用療法、使用に関する禁忌及び／又は注意事項についての情報を含む。

【０１０４】

本明細書において用いられる場合、「治療」（及び「治療する（treat）」又は「治療している（treating）」などの文法的変形）は、治療されている個体の自然経過を変えようと試みる臨床的介入を指し、予防のために、又は臨床病理の過程において実行できる。治療の望ましい効果には、限定されないが、疾患の発症若しくは再発を予防すること、症状の緩和、疾患の直接的若しくは間接的な病理学的帰結の縮小、転移を予防すること、疾患の進行の速度を遅らせること、疾患状態の改善若しくは緩和、及び寛解又は予後の改善が含まれる。いくつかの実施態様において、本発明の分子は、疾患の発症を遅延させるか又は疾患の進行を遅くするために使用される。

【０１０５】

「がん」及び「がん性」という用語は、哺乳動物の生理的状態であって、典型的には無秩序な細胞増殖を特徴とするもの、すなわち、固形腫瘍又はメラノーマなどの増殖性疾患を指すか又は記述する。「腫瘍」は、１又は複数のがん性細胞を含む。本明細書で使用される用語「固形腫瘍」は、通常は嚢胞又は液体領域を含まない組織の異常な腫瘤を指す。固形腫瘍は、良性も悪性もあり得る。がんの例としては、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、及び白血病又はリンパ系悪性腫瘍が挙げられるが、これらに限定されない。そのようながんのより具体的な例としては、乳がん、扁平上皮細胞がん（例：上皮扁平細胞がん）、小細胞肺がん、非小細胞肺がん（「ＮＳＣＬＣ」）、肺の腺癌、及び肺の扁平上皮癌を含む肺がん、腹膜のがん、肝細胞がん、消化管がんを含む胃がん（gastric or stomach cancer）、膵臓がん、膠芽腫、子宮頸がん、卵巣がん、肝臓がん、膀胱がん、肝がん、乳癌、結腸がん、直腸がん、結腸直腸がん、子宮内膜癌又は子宮癌、唾液腺癌、腎臓

がん（kidney or renal cancer）、前立腺がん、外陰部がん、甲状腺がん、肝癌、肛門癌、陰茎癌、及び頭頸部がんが挙げられる。好ましい実施態様では、がんは頭頸部がんである。

【０１０６】

腫瘍又はがんを、「ステージ０」、「ステージＩ」、「ステージＩＩ」、「ステージＩＩＩ」又は「ステージＩＶ」及びこの分類の中の様々なサブステージとして言及することは、当技術分野で既知の全体的な病期分類（Overall Stage Grouping）又はローマ数字病期分類法（Roman Numeral Staging methods）を使用する腫瘍又はがんの分類を示す。がんの実際の病期はがんの種類に依存するが、一般に、０期がんはｉｎ ｓｉｔｕ病変であり、Ｉ期がんは小さな限局性腫瘍であり、ＩＩ期及びＩＩＩ期がんは局所リンパ節の関与を示す局所進行性腫瘍であり、ＩＶ期がんは転移性がんを表す。腫瘍の各種類に関する具体的な病期は、熟練した臨床医であれば知っていることである。

【０１０７】

「進行」がんとは、元の部位又は器官の外に、局所浸潤又は転移のいずれかによって広がったがんである。したがって、「進行」がんという用語は、局所進行性疾患と転移性疾患の両方を含む。「難治性」がんとは、化学療法剤などの抗腫瘍剤ががん患者に投与されているにもかかわらず進行するがんである。難治性がんの例は、プラチナ抵抗性のがんである。「再発」がんは、手術等の初期療法への応答後に、初期部位又は遠位部位のいずれかにおいて再増殖したものである。「局所再発」がんは、以前に治療されたがんと同じ場所で治療後に再発するがんである。「手術可能な」又は「切除可能な」がんは、原発臓器に限定され、手術（切除）に適したがんである。「切除不能な（non-resectable）」又は「切除不能な（unresectable）」がんは、手術によって除去（切除）されることができない。

【０１０８】

好ましくは、「患者」又は「対象」は、ヒト患者である。該患者は、「がん患者」、すなわち、がん、特に頭頸部がんの１又は複数の症状に罹患しているか又は罹患するリスクがある者であり得る。

【０１０９】

「患者母集団」は、がん患者のグループを指す。そのような母集団を使用して、ペルツズマブなどの薬物の統計的に有意な有効性及び／又は安全性を実証することができる。「再発」患者は、寛解後にがんの兆候又は症状を有する者である。任意選択で、患者は、アジュバント又はネオアジュバント療法後に再発した者である。

【０１１０】

本明細書で使用する用語「併用療法」又は「併用治療」又は「併用で」は、少なくとも２つの異なる治療剤による同時又は並行治療の任意の形態を示す。

【０１１１】

本明細書における「ネオアジュバント療法」又は「術前療法」は、手術前に行われる療法を指す。ネオアジュバント療法の目的は、直ちに全身治療を提供することであり、手術の後に全身療法を行うという標準的な順序に従えば増殖してしまう微小転移を根絶する可能性がある。ネオアジュバント療法はまた、腫瘍サイズの縮小にも役立つ可能性があり、それにより当初切除不能だった腫瘍の完全切除又は臓器とその機能の一部の保存を可能にする。更に、ネオアジュバント療法では、薬物有効性のｉｎ ｖｉｖｏ評価ができるため、その後の治療法の選択の指針となる可能性がある。

【０１１２】

本明細書における「アジュバント療法」とは、根治手術後、残存疾患のエビデンスが検出されない場合に、疾患再発のリスクを低下させるために行う治療法を指す。アジュバント療法の目的は、がんの再発を防ぎ、したがってがん関連死の可能性を低下させることである。本明細書におけるアジュバント療法は、ネオアジュバント療法を特に除外する。

【０１１３】

「化学療法」は、がんの治療に有用な化学療法剤の使用をいう。

【０１１４】
「化学療法剤」は、作用機序に関わらず、がんの治療に有用な化合物である。化学療法剤の分類としては、アルキル化剤、代謝拮抗剤、紡錘体毒植物アルカロイド、細胞傷害性／抗腫瘍抗生物質、トポイソメラーゼ阻害剤、抗体、光増感剤、及びキナーゼ阻害剤が挙げられるが、これらに限定されない。
【０１１５】
本発明で使用するための、ＦＡＰを標的とした例示的なＣＤ４０アゴニスト
腫瘍関連抗原に特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインを含む二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子及び放射線療法との併用でのその使用、特に個体における固形腫瘍の治療方法でのその使用が提供される。
【０１１６】
いくつかの態様において、個体における固形腫瘍の治療における使用のための二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、ＣＤ４０に特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインと線維芽細胞活性化タンパク質（ＦＡＰ）に特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインとを含む二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子であり、ここで、ＣＤ４０に特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインは、（ｉ）配列番号１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（V_HＣＤ４０）と、（ｉｖ）配列番号４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｖ）配列番号５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、及び（ｖｉ）配列番号６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（V_LＣＤ４０）とを含む。特に、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、配列番号７のアミノ酸配列を含むＶＨと配列番号８のアミノ酸配列を含むＶＬとを含む、ＣＤ４０に特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインを含む。
【０１１７】
更なる態様において、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、ＦＡＰに特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインであって以下を含む少なくとも１つの抗原結合ドメインを含む：
（ａ）（ｉ）配列番号９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号１０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号１１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（V_HＦＡＰ）と、（ｉｖ）配列番号１２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｖ）配列番号１３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、及び（ｖｉ）配列番号１４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（V_LＦＡＰ）、又は
（ｂ）（ｉ）配列番号１７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号１８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号１９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（V_HＦＡＰ）と、（ｉｖ）配列番号２０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｖ）配列番号２１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、及び（ｖｉ）配列番号２２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（V_LＦＡＰ）、又は
（ｃ）（ｉ）配列番号２５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号２６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号２７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（V_HＦＡＰ）と、（ｉｖ）配列番号２８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｖ）配列番号２９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、及び（ｖｉ）配列番号３０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（V_LＦＡＰ）。
【０１１８】
いくつかの態様において、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、（ｉ）配列番号９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号１０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号１１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重

鎖可変領域（V_HＦＡＰ）と、（ｉｖ）配列番号１２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｖ）配列番号１３のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、及び（ｖｉ）配列番号１４のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（V_LＦＡＰ）とを含む、ＦＡＰに特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインを含む。別の態様において、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、（ｉ）配列番号１７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号１８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号１９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（V_HＦＡＰ）と、（ｉｖ）配列番号２０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｖ）配列番号２１のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、及び（ｖｉ）配列番号２２のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（V_LＦＡＰ）とを含む、ＦＡＰに特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインを含む。更に別の態様において、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、（ｉ）配列番号２５のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ１、（ｉｉ）配列番号２６のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ２、及び（ｉｉｉ）配列番号２７のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｈ３を含む重鎖可変領域（V_HＦＡＰ）と、（ｉｖ）配列番号２８のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１、（ｖ）配列番号２９のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２、及び（ｖｉ）配列番号３０のアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３を含む軽鎖可変領域（V_LＦＡＰ）とを含む、ＦＡＰに特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインを含む。

【０１１９】

いくつかの態様において、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、ＦＡＰに特異的結合可能な、以下を含む少なくとも１つの抗原結合ドメインを含む：

（ａ）配列番号１５のアミノ酸を含む重鎖可変領域（V_HＦＡＰ）と配列番号１６のアミノ酸を含む軽鎖可変領域（V_LＦＡＰ）、

（ｂ）配列番号２３のアミノ酸を含む重鎖可変領域（V_HＦＡＰ）と配列番号２４のアミノ酸を含む軽鎖可変領域（V_LＦＡＰ）、又は

（ｃ）配列番号３１のアミノ酸を含む重鎖可変領域（V_HＦＡＰ）と配列番号３２のアミノ酸を含む軽鎖可変領域（V_LＦＡＰ）、又は

（ｄ）配列番号８０のアミノ酸を含む重鎖可変領域（V_HＦＡＰ）と配列番号８１のアミノ酸を含む軽鎖可変領域（V_LＦＡＰ）。

【０１２０】

ある態様では、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、配列番号８０のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（V_HＦＡＰ）と配列番号８１のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（V_LＦＡＰ）とを含む、ＦＡＰに特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインを含む。

【０１２１】

特定の態様では、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、配列番号１５のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（V_HＦＡＰ）と配列番号１６のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（V_LＦＡＰ）とを含む、ＦＡＰに特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインを含む。

【０１２２】

したがって、特定の態様において、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、（ｉ）ＣＤ４０に特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインであって、配列番号７のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（V_HＣＤ４０）及び配列番号８のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（V_LＣＤ４０）を含む抗原結合ドメインと、（ｉｉ）ＦＡＰに特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインであって、配列番号１５のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（V_HＦＡＰ）及び配列番号１６のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（V_LＦＡＰ）を含む抗原結合ドメインとを含む。

【０１２３】

他の態様において、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、（ｉ）ＣＤ４０に特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインであって、配列番号７のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（V_HＣＤ４０）及び配列番号８のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領

域（V_LＣＤ４０）を含む抗原結合ドメインと、（ｉｉ）ＦＡＰに特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインであって、配列番号２３のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（V_HＦＡＰ）及び配列番号２４のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（V_LＦＡＰ）を含む抗原結合ドメインとを含む。更なる別の態様において、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、（ｉ）ＣＤ４０に特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインであって、配列番号７８のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（V_HＣＤ４０）及び配列番号７９のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（V_LＣＤ４０）を含む抗原結合ドメインと、（ｉｉ）ＦＡＰに特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインであって、配列番号２３のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（V_HＦＡＰ）及び配列番号２４のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（V_LＦＡＰ）を含む抗原結合ドメインとを含む。

【０１２４】

別の態様において、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、（ｉ）ＣＤ４０に特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインであって、配列番号７のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（V_HＣＤ４０）及び配列番号８のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（V_LＣＤ４０）を含む抗原結合ドメインと、（ｉｉ）ＦＡＰに特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインであって、配列番号２３のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（V_HＦＡＰ）及び配列番号２４のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（V_LＦＡＰ）を含む抗原結合ドメインとを含む。他の態様において、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、（ｉ）ＣＤ４０に特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインであって、配列番号７のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（V_HＣＤ４０）及び配列番号８のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（V_LＣＤ４０）を含む抗原結合ドメインと、（ｉｉ）ＦＡＰに特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインであって、配列番号３１のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（V_HＦＡＰ）及び配列番号３２のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（V_LＦＡＰ）を含む抗原結合ドメインとを含む。

【０１２５】

いくつかの態様において、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、
ａ）ＣＤ４０に特異的結合可能な少なくとも２つのＦａｂ断片であって、そのＣ末端でＦｃ領域のＮ末端に融合している少なくとも２つのＦａｂ断片、及び
（ｂ）ＦＡＰに特異的結合可能な１つの抗原結合ドメインであって、そのＮ末端でＦｃ領域のＣ末端に融合している１つの抗原結合ドメイン
を含む。

【０１２６】

いくつかの態様において、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、
ａ）ＣＤ４０に特異的結合可能な少なくとも２つのＦａｂ断片であって、そのＣ末端でＦｃ領域のＮ末端に融合しているＦａｂ断片、及び
（ｂ）ＦＡＰに特異的結合可能な交差ｆａｂ断片であって、上記Ｆｃ領域のＣ末端に融合している交差ｆａｂ断片
を含む。

【０１２７】

特定の態様では、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、ＦＡＰに特異的結合可能な交差ｆａｂ断片を含み、交差ｆａｂ断片のＶＨ－Ｃカッパ鎖が上記Ｆｃ領域のＣ末端に融合している。特定の態様では、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、ＣＤ４０に特異的結合可能な２つのＦａｂ断片であって、そのＣ末端でＦｃ領域のＮ末端に融合しているＦａｂ断片を含む。特定の態様において、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、ＣＤ４０への二価結合とＦＡＰへの一価結合によって特徴づけられる。

【０１２８】

ある態様において、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、（ａ）ＣＤ４０及びＦｃドメインに特異的結合可能な２つのＦａｂ断片を含む抗体の２つの軽鎖及び２つの重鎖、並びに（ｂ）標的細胞抗原に特異的結合可能なＶＨ及びＶＬドメインであって、ＶＨドメイン及びＶＬドメインが各々、ペプチドリンカーを介して、該２つの重鎖のＣ末端

の一方に連結しているＶＨ及びＶＬドメイン、を含む。
【０１２９】
更なる態様において、提供されるのは、以下のものを含む二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子である：
（ａ）２つの重鎖であって、各重鎖がＣＤ４０とＦｃ領域サブユニットに特異的結合可能なＦａｂ断片のＶＨ及びＣＨ１ドメインを含む、２つの重鎖、
（ｂ）２つの軽鎖であって、各軽鎖がＣＤ４０に特異的結合可能なＦａｂ断片のＶＬ及びＣＬドメインを含む、２つの軽鎖、並びに
（ｃ）ＦＡＰに特異的結合可能な交差ｆａｂ断片であって、ＶＬ－ＣＨ１鎖とＶＨ－ＣＬ鎖を含み、ＶＨ－ＣＬ鎖が（ａ）の２つの重鎖の一方のＣ末端に連結している、交差ｆａｂ断片。
【０１３０】
ある態様では、ＶＨ－ＣＬ（ＶＨ－Ｃカッパ）鎖は、Ｆｃノブ重鎖のＣ末端に連結している。
【０１３１】
ある特定の態様では、本発明は、二重特異性抗原結合分子であって、（ａ）各々が配列番号６２のアミノ酸配列を含む２つの軽鎖、配列番号６１のアミノ酸配列を含む１つの軽鎖、配列番号６３のアミノ酸配列を含む第１の重鎖、及び配列番号６４のアミノ酸配列を含む第２の重鎖を含む、二重特異性抗原結合分子を提供する。
【０１３２】
別の態様では、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、ＣＤ４０への四価又は三価結合とＦＡＰへの一価結合によって特徴づけられる。いくつかの態様において、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、ＣＤ４０への四価結合とＦＡＰへの一価結合によって特徴づけられる。いくつかの態様では、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、ＣＤ４０に特異的結合可能な４つのＦａｂ断片を含み、ここで、各２つのＦａｂ断片が互いに融合しており、そのＣ末端でＦｃ領域のＮ末端に融合している。
【０１３３】
放射線療法
本発明の態様において、本明細書に記載のＦＡＰを標的としたＣＤ４０アゴニストは、放射線療法と組み合わせて使用される。
【０１３４】
放射線療法又は放射線治療（しばしばＲＴと略される）は電離放射線を使用する療法であり、電離放射線は、一般にがん治療の一環として悪性細胞を制御又は死滅させるもので、通常は直線加速器によって送達される。放射線療法は、数種類のがんが体のある１つの部位に限局している場合に、それらに効く可能性がある。また、放射線療法は、原発性悪性腫瘍（例えば初期乳がん）を摘出する手術後、腫瘍の再発を防ぐためのアジュバントの一環として使用されることもある。放射線療法は化学療法と相乗効果があり、影響を受けやすいがんでは化学療法の前、最中、後に使用されてきた。
【０１３５】
放射線療法は、細胞増殖を制御する能力があるため、癌性腫瘍に一般的に適用されます。電離放射線は、がん性組織のＤＮＡを傷つけ、細胞死に至らしめる作用がある。正常な組織（腫瘍を治療するために放射線が通過しなければならない皮膚又は臓器など）を温存するように、整形された放射線ビームをいくつかの照射角度から照射して腫瘍に交差させ、周囲の健康な組織よりもはるかに多い吸収線量を提供することができる。腫瘍自体の他に、流入領域リンパ節が臨床的若しくは放射線学的に腫瘍に関与している場合又は不顕性悪性腫瘍の転移のリスクがあると考えられる場合には、照射野に流入領域リンパ節を含めることもある。日々のセットアップ及び体内の腫瘍の動きの不確実性を考慮して、腫瘍周囲の正常組織のマージンを含めることが必要である。これらの不確実性は、体内の動きや腫瘍の位播種置に対する外側の皮膚マークの動きに起因し得る。放射線に対するがんの反応は、放射線感受性によって表される。放射線感受性の高いがん細胞は、適度な線量の放

射線で速やかに死滅する。白血病、ほとんどのリンパ腫、及び生殖細胞腫瘍などがこれに含まれる。大多数の上皮性がんは中程度の放射線感受性しかなく、根治を目指すにはかなり多くの線量（６０～７０Ｇｙ）の放射線が必要である。一部の種類のがんは、放射線抵抗性が大きい。すなわち、根治させるためには、臨床上安全な量よりもはるかに多い線量を必要とする。ある腫瘍の放射線感受性は、ある程度実験室での測定値であり、実際の臨床現場でのがんの放射線「治癒力」とは区別することが重要である。例えば、白血病は全身に播種されるため、一般に放射線療法では治らない。リンパ腫は、体のある１つの部位に限局している場合は、根治する可能性がある。同様に、通常の中程度の放射線反応性の腫瘍の多くは、早期であれば治癒可能な線量の放射線療法で日常的に治療されている。皮膚がん、頭頸部がん、乳がん、非小細胞肺がん、子宮頸がん及び前立腺がんなどのがんは、放射線療法では全身を治療することができないため、治らないことが多い。

【０１３６】

放射線療法に対する腫瘍の反応は、腫瘍のサイズに依存する。非常に大きな腫瘍は、小さな腫瘍又は顕微鏡的疾患よりも、放射線にあまり反応しない。この結果を克服するために、様々な戦略が採られている。最も一般的な手法は、放射線療法の前の外科的切除である。これは、乳房切除術の後にアジュバント放射線療法を行う乳がんの治療で最もよく見られるものである。別の方法としては、根治的な放射線療法の前に、ネオアジュバント化学療法で腫瘍を縮小させる方法もある。第三の手法は、一連の放射線療法中に特定の薬物を投与することによって、がんの放射線感受性を高めるというものである。放射線増感薬の例としては、シスプラチン、ニモラゾール、及びセツキシマブが挙げられる。

【０１３７】

放射線療法は通常、最小限の副作用しか引き起こさないか、全く副作用を引き起こさないが、治療後の数日間は、治療部位の神経を圧迫する浮腫のために短期的に痛みが再燃することがある。高線量では、治療中（急性副作用）、治療後数ヶ月～数年（長期副作用）、再治療後（累積副作用）と、様々な副作用が出る可能性がある。副作用の性質、重さ及び長さは、放射線を受ける臓器、治療そのもの（放射線の種類、線量、分割照射）、及び患者に依存する。報告されている主な副作用には、疲労、軽度から中等度の日焼けのような皮膚刺激などがある。疲労は一連の治療の途中で出てくることが多く、治療終了後も数週間続くことがある。刺激を受けた皮膚は回復するが、それ以前のような弾力は得ることはできない。放射線の副作用は、多くの場合、治療を受けている患者の体の部位に限定され、線量に依存する。例えば、頭頸部放射線の高線量は、心血管合併症、甲状腺機能障害、及び下垂体軸機能障害と関連する可能性がある。したがって、より低線量の放射線療法が好まれる場合がある。

【０１３８】

光子放射線療法で使用される放射線量は、グレイ（Ｇｙ）単位で測定され、治療するがんの種類及び病期によって異なる。治療例では、固形上皮腫瘍に対する典型的な線量は６０～８０Ｇｙの範囲であるが、リンパ腫は２０～４０Ｇｙの範囲で治療される。予防線量は通常、４５～６０Ｇｙの範囲であって、１．８～２Ｇｙで分割照射される（乳がん、頭頸部のがんの場合）。放射線腫瘍医が線量を選択する際には、患者が化学療法を受けているかどうか、患者の併存疾患、放射線療法が手術の前に実施されるのか、手術の後に実施されるのかなど、多くの要因が考慮される。処方線量の送達パラメーターは、治療計画（線量測定の一部）中に決定される。治療計画は、一般に、専用の治療計画ソフトを使い、専用コンピューターで行われる。放射線の送達方法に応じて、必要な総線量を合計するために複数の角度又は線源が使用される場合がある。プランナーは、腫瘍に均一な処方線量を送達し、周囲の健康な組織への線量を最小限に抑える計画を立てようとするであろう。

【０１３９】

総線量は、いくつかの重要な理由から分割（時間をかけて照射すること）される。分割照射は、正常な細胞には回復する時間を与えるが、腫瘍細胞は通常、照射と照射の間に修復効率が低くなる。また、分割照射は、１回の治療で細胞周期の比較的放射線抵抗性の段階にあった腫瘍細胞を、次の分割照射が行われる前に細胞周期の感受性段階へと循環させ

ることができる。同様に、慢性又は急性の低酸素状態にあった腫瘍細胞（すなわち放射線抵抗性が比較的高い）は、分割照射の合間に再酸素化し、腫瘍細胞の殺傷力が向上する。成人の典型的な分割照射スケジュールは、１日１．８～２Ｇｙ、週５日である。がんの種類によっては、長すぎる分割照射スケジュールは腫瘍に再増殖の開始を許してしまい、頭頸部及び子宮頸部扁平上皮がんを含む腫瘍型の場合、一定時間内に放射線療法を終了することが好ましい。分割サイズが小さいほど正常組織における遅発性副作用の発生率と重症度が低下することから、小児の場合、典型的な分割サイズは１日あたり１．５～１．８Ｇｙである。場合によっては、一連の治療の終了間際には、１日に２回の分割照射を使用する。このスケジュールは、同時ブーストレジメン又は過分割照射法として知られており、腫瘍が小さいほど急速に再生する腫瘍に使用される。特に、頭頸部の腫瘍は、このような挙動を示す。

【０１４０】

最近ますます使用されるようになり、研究が続けられている分割照射スケジュールの１つに、少分割照射法がある。これは、照射の総線量が高線量に分割されている放射線療法である。典型的な線量はがんの種類によって大きく異なり、１．８Ｇｙ／分割照射～２０Ｇｙ／分割照射までであるが、後者は頭蓋下病変に対する定位治療（体幹部定位放射線治療、すなわちＳＡＢＲ（ｓｔｅｒｅｏｔａｃｔｉｃ ａｂｌａｔｉｖｅ ｂｏｄｙ ｒａｄｉｏｔｈｅｒａｐｙ）―これは、ＳＢＲＴ（ｓｔｅｒｅｏｔａｃｔｉｃ ｂｏｄｙ ｒａｄｉｏｔｈｅｒａｐｙ）としても知られる）の、又は頭蓋内病変に対するＳＲＳ（ｓｔｅｒｅｏｔａｃｔｉｃ ｒａｄｉｏｓｕｒｇｅｒｙ：定位放射線手術）の典型的な線量である。５～２０Ｇｙの範囲の線量での少分割照射が好ましい。治療するがんによっては、１．８～２．２Ｇｙの範囲の線量で行う少分割照射が特に注目されることがある。少分割照射の理論的根拠は、クローン化可能細胞が繁殖するのに必要な時間を与えないことで局所再発の確率を下げることと、一部の腫瘍の放射線感受性を利用することである。特に、定位治療では、常套的な放射線療法のようにクローン化可能細胞の分裂の過程を繰り返し妨害する（アポトーシス）のではなく、アブレーションの過程、すなわち、クローン化可能細胞を直接破壊することを意図した線量の送達によって、クローン化可能細胞を破壊することが意図されている。

【０１４１】

局所放射線療法には、外部ビーム放射線療法と内部放射線療法の２つの形態がある。外部ビーム放射線療法（ＥＢＲＴ）は、放射線療法の中で最も一般的な形態である。電離放射線の外部源を患者の体の特定部位に向ける。放射線源が体内にある近接照射療法（密封小線源治療）及び非密封小線源治療と対照的に、外部ビーム放射線療法は体外から腫瘍に放射線を照射する。オルソボルテージ（「表在性」）Ｘ線は、皮膚がん及び表層構造の治療のために使用される。Ｘ線と電子ビームは、外部ビーム放射線療法で最も広く使われている線源である。

【０１４２】

内部放射線療法（近接照射療法）は、密封された放射線源が治療の必要な部位の内部又は隣に配置されている放射線療法の一形態である。近接照射療法の利点は、照射が放射線源の周囲のごく局所的な部位にしか影響しないことである。そのため、線源から遠く離れた健康な組織への被ばくが少なくなり、周囲の健康な組織に不必要なダメージを与える可能性を減らしながら、かなり高線量の局所的な放射線で腫瘍を治療することができる。また、治療中に患者が動いたり、体内の腫瘍が動いたりしても、放射線源は腫瘍に対して正しい位置を保つことができる。

【０１４３】

全身放射線療法やラジオアイソトープ療法（ＲＩＴ）も放射線療法の別の形態である。標的化は、甲状腺に特異的に（体内の他の臓器の１０００倍も）吸収される放射性ヨウ素などの同位体の化学的特性によって、又は放射性同位体を別の分子若しくは抗体に結合させて標的組織に誘導することによって、実現することができる。放射性同位体は、点滴（血流に入れる）又は摂取によって送達される。例えば、神経芽細胞腫の治療にはメタヨー

ドベンジルグアニジン（ＭＩＢＧ）の点滴、甲状腺がん又は甲状腺中毒症の治療にはヨウ素１３１の内服、並びに神経内分泌腫瘍の治療にはホルモン結合性ルテチウム１７７及びイットリウム９０の点滴（ペプチド受容体放射性核種療法）がある。他には、放射性イットリウム９０又はホルミウム１６６の微小球を肝動脈に注入して、肝腫瘍又は肝転移に放射線塞栓を行う例もある。これらの微小球は、選択的内部照射療法として知られる治療手法に使用される。直径約３０μｍ（ヒトの毛髪の３分の１程度）の微小球を、腫瘍に血液を供給する動脈に直接送り込む。これらの治療は、まず脚の大腿動脈からカテーテルを挿入して目的の部位まで到達させ、それから治療を投与する。腫瘍に栄養を送っている血液がこれらの微小球を腫瘍に直接運ぶため、従来の全身化学療法よりも更に選択的な手法が可能となる。現在、ＳＩＲ－Ｓｐｈｅｒｅ、ＴｈｅｒａＳｐｈｅｒｅ、及びＱｕｉｒｅｍ Ｓｐｈｅｒｅの３種類の異なる微小球がある。全身放射線療法の主な用途は、がんからの骨転移の治療である。放射性同位体は、損傷した骨の部位に選択的に移動し、損傷していない正常な骨は温存する。骨転移の治療によく使われる同位体は、ラジウム２２３、ストロンチウム８９、サマリウム（^{153}Ｓｍ）レキシドロナムである。

【０１４４】

本発明における使用のための二重特異性抗原結合分子の調製

組み合わせて使用される本発明の治療剤は、多重特異性抗原結合分子、例えば二重特異性抗原結合分子を含む。多重特異性抗体は、少なくとも２つの異なる部位に対して結合特異性を有するモノクローナル抗体である。特定の態様では、結合特異性は、異なる抗原に対するものである。特定の態様では、結合特異性は、同じ抗原上の異なるエピトープに対するものである。二重特異性抗原結合分子は、完全長抗体又は抗体断片として調製され得る。

【０１４５】

多重特異性抗体を作製するための技術としては、限定されないが、異なる特異性を有する２つの免疫グロブリン重鎖－軽鎖対の組換え共発現（Milstein and Cuello, Nature 305: 537 (1983)）、国際公開第９３／０８８２９号、及びＴｒａｕｎｅｃｋｅｒ ｅｔ ａｌ．，ＥＭＢＯ Ｊ．１０：３６５５（１９９１）参照）及び「ノブ・イン・ホール（knob-in-hole）」操作（例えば、米国特許第５７３１１６８号参照）が挙げられる。組換え産生のために、二重特異性抗原結合分子又はそのポリペプチド断片をコードする１又は複数のポリヌクレオチドが提供される。二重特異性抗原結合分子をコードする１又は複数のポリヌクレオチドを単離して、宿主細胞におけるクローニング及び／又は発現のために１又は複数のベクターに挿入する。このようなポリヌクレオチドは、従来の手順を使用して容易に単離及び配列決定することができる。本発明のある態様において、本発明の１又は複数のポリヌクレオチドを含むベクター、好ましくは発現ベクターが提供される。当業者によく知られている方法を使用して、適切な転写／翻訳制御シグナルと共に、二重特異性抗原結合分子（断片）のコード配列を含む発現ベクターを構築することができる。このような方法には、ｉｎ ｖｉｔｒｏでの組換えＤＮＡ技術、合成技術、及びｉｎ ｖｉｖｏでの組換え／遺伝子組換えが含まれる。例えば、Ｍａｎｉａｔｉｓ ｅｔ ａｌ．，ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＣＬＯＮＩＮＧ：Ａ ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ ＭＡＮＵＡＬ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｎ．Ｙ．（１９８９）；及びＡｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．，ＣＵＲＲＥＮＴ ＰＲＯＴＯＣＯＬＳ ＩＮ ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＢＩＯＬＯＧＹ，Ｇｒｅｅｎｅ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ ａｎｄ Ｗｉｌｅｙ Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ，Ｎ．Ｙ．（１９８９）に記載の技術を参照されたい。発現ベクターは、プラスミド、ウイルスの一部であっても、核酸断片であってもよい。発現ベクターには、二重特異性抗原結合分子をコードするポリヌクレオチド又はそのポリペプチド断片（すなわちコード領域）が、プロモーター及び／又は他の転写若しくは翻訳制御エレメントと操作可能に結合してクローニングされる発現カセットが含まれる。本発明で使用される場合、「コード領域」は、アミノ酸に翻訳されるコドンから成る核酸の一部である。「終止コドン」（ＴＡＧ、ＴＧＡ又はＴＡＡ）は、アミノ酸に翻訳されないが、存在する場合、コード領域の一部と考えられる。但し、例え

ばプロモーター、リボソーム結合部位、転写ターミネーター、イントロン、５’及び３’非翻訳領域等の任意の隣接配列はコード領域の一部ではない。２つ以上のコード領域が、単一のポリヌクレオチドコンストラクト中（例えば単一のベクター上）に、又は別々のポリヌクレオチドコンストラクト中（例えば別々の（異なる）ベクター上）に存在することができる。更に、任意のベクターは、単一のコード領域を含んでいてもよいし、２つ以上のコード領域を含んでいてもよく、例えば本発明のベクターは、タンパク質分解性切断によって翻訳後又は翻訳と同時に最終タンパク質に分離される１又は複数のポリペプチドをコードしてもよい。加えて、本発明のベクター、ポリヌクレオチド又は核酸は、本発明の二重特異性抗原結合分子をコードするポリヌクレオチド若しくはそのポリペプチド断片又はそのバリアント若しくは誘導体をコードするポリヌクレオチドに融合しているか又は融合していない異種コード領域をコードすることができる。異種コード領域には、限定されないが、例えば分泌シグナルペプチド又は異種機能ドメインなどの専門化したエレメント又はモチーフが含まれる。操作可能な結合とは、遺伝子産物、例えばポリペプチドのコード領域が、遺伝子産物の発現を１又は複数の調節配列の影響下又は制御下に置くような方法で、１又は複数の調節配列と結合している場合である。２つのＤＮＡ断片（ポリペプチドコード領域とそれと結合したプロモーターなど）は、プロモーター機能の誘導が所望の遺伝子産物をコードするｍＲＮＡの転写をもたらす場合と、２つのＤＮＡ断片間の連結の性質が、遺伝子産物の発現を誘導する発現調節配列の能力を妨げないか又はＤＮＡテンプレートの転写される能力を妨げない場合、「操作可能に結合している」。したがって、プロモーターがポリペプチドをコードする核酸の転写を行うことができる場合、プロモーター領域は、その核酸と操作可能に結合している。プロモーターは、所定の細胞においてのみＤＮＡの実質的な転写を誘導する細胞特異的プロモーターであってもよい。プロモーター以外の他の転写制御エレメント、例えばエンハンサー、オペレーター、リプレッサー、及び転写終結シグナルをポリヌクレオチドと操作可能に結合させて、細胞特異的転写を誘導することができる。

【０１４６】

適切なプロモーター及び他の転写制御領域が本明細書に開示されている。様々な転写制御領域が当業者に知られている。これには、脊椎動物細胞で機能する、限定されないが、サイトメガロウイルス（例：イントロンＡと組み合わせた最初期プロモーター）、シミアンウイルス４０（例：初期プロモーター）及びレトロウイルス（例：ラウス肉腫ウイルスなど）からのプロモーター及びエンハンサーセグメントなどの転写制御領域が含まれる。他の転写制御領域としては、アクチン、熱ショックタンパク質、ウシ成長ホルモン、及びウサギアルファグロビン遺伝子の５’フランキング領域及び内部領域などの脊椎動物遺伝子に由来する領域、並びに真核細胞における遺伝子発現を制御できる他の配列が挙げられる。更なる適切な転写制御領域としては、組織特異的なプロモーター及びエンハンサー、並びに誘発性プロモーター（例：プロモーター誘発性テトラサイクリン）が挙げられる。同様に、様々な翻訳制御エレメントが当業者に知られている。これには、限定されないが、リボソーム結合部位、翻訳開始コドン及び終結コドン、及びウイルス系由来のエレメント（特に、ＣＩＴＥ配列とも呼ばれる配列内リボソーム進入部位又はＩＲＥＳ）が含まれる。発現カセットはまた、複製起点、及び／又はレトロウイルスの長い末端反復（ＬＴＲ）若しくはアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）逆方向末端反復（ＩＴＲ）などの染色体組み込みエレメントなどの他の特徴を含み得る。

【０１４７】

ポリヌクレオチド及び核酸コード領域は、ポリヌクレオチドによってコードされているポリペプチドの分泌を誘導する分泌ペプチド又はシグナルペプチドをコードする追加のコード領域と結合し得る。例えば、二重特異性抗原結合分子又はそのポリペプチド断片の分泌が所望される場合、シグナル配列をコードするＤＮＡを、二重特異性抗原結合分子又はそのポリペプチド断片をコードする核酸の上流に配置することができる。シグナル仮説によれば、哺乳動物細胞によって分泌されるタンパク質は、粗い小胞体を横切る成長中のタンパク質鎖の輸送が開始されると成熟タンパク質から切断される、シグナルペプチド又は

分泌リーダー配列を有する。当業者であれば、脊椎動物細胞によって分泌されるポリペプチドは、一般にポリペプチドのＮ末端に融合するシグナルペプチドを有し、翻訳されたポリペプチドから切断されて、ポリペプチドの分泌型又は「成熟」型を生成することを知っている。特定の実施態様では、天然シグナルペプチド、例えば免疫グロブリン重鎖若しくは軽鎖シグナルペプチドが使用されるか、又はそれと操作可能に結合するポリペプチドの分泌を誘導する能力を保持するその配列の機能的誘導体が使用される。或いは、異種哺乳動物シグナルペプチド又はその機能的誘導体を使用することもできる。例えば、野生型リーダー配列は、ヒト組織プラスミノーゲン活性化因子（ＴＰＡ）又はマウスβ－グルクロニダーゼのリーダー配列で置換されていてもよい。後の精製を容易にするのに使用可能な短いタンパク質配列（例：ヒスチジンタグ）をコードするＤＮＡ又は融合タンパク質の標識化を助けるのに使用可能な短いタンパク質配列コードするＤＮＡは、本発明の二重特異性抗原結合分子又はそのポリペプチド断片をコードするポリヌクレオチドの中かその両末端に含まれ得る。ある態様では、宿主細胞は、本発明の二重特異性抗原結合分子（の一部）をコードするポリヌクレオチドを含むベクターを含む（例えば、該ベクターで形質転換又はトランスフェクトされている）。本明細書で使用される「宿主細胞」という用語は、二重特異性抗原結合分子又はその断片を生成するように工学的に操作可能な、任意の種類の細胞系を指す。抗原結合分子の複製に適し且つ抗原結合分子の発現の補助に適した宿主細胞は、当技術分野でよく知られている。このような細胞は、適切な場合、特定の発現ベクターをトランスフェクトされるか又は形質導入されてもよく、大量のベクターを含む細胞は、増殖させて大規模発酵槽に播種し、臨床応用に十分な量の抗原結合分子を得ることができる。適切な宿主細胞としては、原核微生物、例えば大腸菌、又は様々な真核細胞、例えばチャイニーズハムスター卵巣細胞（ＣＨＯ）、昆虫細胞等が挙げられる。例えば、グリコシル化が必要でない場合は特に、細菌中でポリペプチドを製造してもよい。発現後、ポリペプチドは、細菌細胞のペーストから可溶性画分として単離し、次に精製することができる。原核生物に加えて、糸状菌又は酵母菌のような真核微生物は、菌類や酵母菌株を含むポリペプチドをコードするベクターのための適切なクローニング宿主又は発現宿主であり、そのグリコシル化経路は「ヒト化」されており、部分的に又は完全にヒトのグリコシル化パターンを有するポリペプチドの生成をもたらす。Ｇｅｒｎｇｒｏｓｓ，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈ ２２，１４０９－１４１４（２００４）及びＬｉ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈ ２４，２１０－２１５（２００６）を参照されたい。

【０１４８】

（グリコシル化）ポリペプチドの発現に適した宿主細胞はまた、多細胞生物（無脊椎動物及び脊椎動物）に由来する。無脊椎動物細胞の例としては、植物細胞及び昆虫細胞が挙げられる。複数のバキュロウイルス株が同定されており、これらを、特にヨトウガ細胞のトランスフェクションのために、昆虫細胞と組み合わせて使用してもよい。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５９５９１７７号、第６０４０４９８号、第６４２０５４８号、第７１２５９７８号、及び第６４１７４２９号（トランスジェニック植物において抗体を産生するためのＰＬＡＮＴＩＢＯＤＩＥＳ（商標）技術を記載）を参照されたい。脊椎動物細胞も宿主として用いることができる。例えば、懸濁液中で増殖するように適合させた哺乳動物細胞株が有用な場合もある。有用な哺乳動物宿主細胞株の他の例には、ＳＶ４０（ＣＯＳ－７）によって形質転換されたサル腎臓ＣＶ１株；ヒト胚腎臓株（例えばGraham et al.,J Gen Virol 36,59(1977)に記載の２９３又は２９３Ｔ細胞）、ベビーハムスター腎臓細胞（ＢＨＫ）、マウスセルトリ細胞（例えばMather,Biol Reprod 23、243-251(1980)に記載のＴＭ４細胞）、サル腎臓細胞（ＣＶ１）、アフリカミドリザル腎臓細胞（ＶＥＲＯ－７６）、ヒト子宮頸癌細胞（ＨＥＬＡ）、イヌ腎臓細胞（ＭＤＣＫ）、バッファローラット肝臓細胞（ＢＲＬ ３Ａ）、ヒト肺細胞（Ｗ１３８）、ヒト肝臓細胞（Ｈｅｐ Ｇ２）、マウス乳房腫瘍細胞（ＭＭＴ ０６０５６２）、ＴＲＩ細胞（例えばMather et al.,Annals N.Y.Acad Sci 383,44-68(1982)に記載のもの）、ＭＲＣ ５細胞、及びＦＳ４細胞がある。他の有用な哺乳動物宿主細胞株としては、ｄｈｆｒ－ＣＨＯ細胞（Urlaub et al.,Proc Natl A

cad Sci USA 77,4216(1980)）を含むチャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞及び骨髄腫細胞株、例えばＹＯ、ＮＳ０、Ｐ３Ｘ６３及びＳｐ２／０が挙げられる。タンパク質産生に適した特定の哺乳動物宿主細胞の総説としては、例えば、Ｙａｚａｋｉ ａｎｄ Ｗｕ，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｖｏｌ．２４８（Ｂ．Ｋ．Ｃ．Ｌｏ，ｅｄ．，Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ，Ｔｏｔｏｗａ，ＮＪ），２５５－２６８頁（２００３）を参照されたい。宿主細胞には、培養細胞、ほんの数例を挙げると、例えば哺乳動物培養細胞、酵母細胞、昆虫細胞、細菌細胞及び植物細胞が含まれるが、トランスジェニック動物、トランスジェニック植物又は培養した植物若しくは動物組織内に含まれる細胞も含まれる。ある実施態様では、宿主細胞は、真核細胞、好ましくは、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、ヒト胚腎臓（ＨＥＫ）細胞又はリンパ球細胞（例えばＹ０、ＮＳ０、Ｓｐ２０細胞）などの哺乳動物細胞である。これらの系において外来遺伝子を発現する標準的な技術が当技術分野で知られている。免疫グロブリンの重鎖又は軽鎖を含むポリペプチドを発現する細胞は、発現された産物が重鎖及び軽鎖の両方を有する免疫グロブリンであるように、免疫グロブリン鎖の他方も発現するように工学的に操作することができる。本発明で用いられる二重特異性抗原結合分子の製造方法は、本明細書で提供される二重特異性抗原結合分子又はそのポリペプチド断片をコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞を、二重特異性抗原結合分子又はそのポリペプチド断片の発現に適した条件で培養することと、本発明の二重特異性抗原結合分子、又はそのポリペプチド断片をコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞を培養することと、二重特異性抗原結合分子又はそのポリペプチド断片を宿主細胞（又は宿主細胞培養培地）から回収することとを含む。

【０１４９】

本明細書に記載のように調製された、本発明で使用される二重特異性抗原結合分子は、高速液体クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、アフィニティークロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー等の、当技術分野にて既知の技術により精製することができる。特定のタンパク質を精製するために使用される実際の条件は、正味の電荷、疎水性、親水性などの要因に部分的に依存し、当業者には明らかであろう。アフィニティークロマトグラフィー精製では、二重特異性抗原結合分子が結合する抗体、リガンド、受容体又は抗原が使用され得る。例えば、本発明の融合タンパク質のアフィニティークロマトグラフィー精製では、プロテインＡ又はプロテインＧを含むマトリックスが使用され得る。連続プロテインＡ又はＧアフィニティークロマトグラフィー及びサイズ排除クロマトグラフィーを用いて、基本的に実施例に記載されているように、抗原結合分子を単離することができる。二重特異性抗原結合分子又はその断片の純度は、ゲル電気泳動、高圧液体クロマトグラフィーなどを含む任意の様々な周知の分析方法によって決定され得る。例えば、実施例に記載されるように発現させた二重特異性抗原結合分子は、還元及び非還元ＳＤＳ－ＰＡＧＥによって実証されるように、インタクトであり、適切に組み立てられていることが示された。

【０１５０】

Ｆｃ受容体の結合及び／又はエフェクター機能を低減させるＦｃドメイン改変

本発明で使用される抗原結合分子のＦｃドメインは、免疫グロブリン分子の重鎖ドメインを含む一対のポリペプチド鎖から成る。例えば、免疫グロブリンＧ（ＩｇＧ）分子のＦｃドメインは二量体であり、その各サブユニットはＣＨ２及びＣＨ３ ＩｇＧ重鎖定常ドメインを含む。Ｆｃドメインの２つのサブユニットは、互いに安定した結合が可能である。

【０１５１】

Ｆｃドメインは、本発明の抗原結合分子に望ましい薬物動態特性を付与し、そのような薬物動態特性には、標的組織中への良好な蓄積に寄与する長い血清半減期及び望ましい組織－血液分配比が含まれる。しかし同時に、それは、二重特異性抗原結合分子の、好ましい抗原保有細胞ではなく、Ｆｃ受容体を発現する細胞への望ましくない標的化をもたらす場合がある。したがって、特定の態様では、本発明の抗原結合分子のＦｃドメインは、天

然ＩｇＧ１のＦｃドメインと比較して、Ｆｃ受容体に対する低減された結合親和性及び／又は低減されたエフェクター機能を呈する。ある態様では、該Ｆｃは、Ｆｃ受容体に実質的に結合しない且つ／又はエフェクター機能を誘導しない。特定の態様では、Ｆｃ受容体はＦｃγ受容体である。ある態様では、Ｆｃ受容体はヒトＦｃ受容体である。具体的な態様では、Ｆｃ受容体は活性化ヒトＦｃγ受容体であり、更に具体的にはヒトＦｃγＲＩＩＩａ、ＦｃγＲＩ又はＦｃγＲＩＩａ、最も具体的にはヒトＦｃγＲＩＩＩａである。ある態様では、Ｆｃドメインはエフェクター機能を誘導しない。エフェクター機能の低減は、限定されないが、補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）の低減、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ＡＤＣＣ）の低減、抗体依存性細胞貪食（ＡＤＣＰ）の低減、サイトカイン分泌の低減、抗原提示細胞による免疫複合体媒介性抗原取り込みの低減、ＮＫ細胞に対する結合の低減、マクロファージに対する結合の低減、単球に対する結合の低減、多形核細胞に対する結合の低減、アポトーシスを誘導する直接的シグナル伝達の低減、樹状細胞成熟の低減、又はＴ細胞プライミングの低減のうちの１又は複数を含み得る。

【０１５２】

特定の態様では、１又は複数のアミノ酸改変が、本明細書で提供される二重特異性抗原結合分子のＦｃ領域に導入されてもよく、それにより、Ｆｃ領域バリアントが生成する。Ｆｃ領域バリアントは、１又は複数のアミノ酸位置にアミノ酸改変（例：置換）を含むヒトＦｃ領域配列（例：ヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３又はＩｇＧ４　Ｆｃ領域）を含み得る。特定の態様では、本発明は、ＦｃドメインがＦｃ受容体への、特にＦｃγ受容体に対する結合を低減させる１又は複数のアミノ酸置換を含む、二重特異性抗原結合分子を提供する。

【０１５３】

ある態様では、二重特異性抗原結合分子のＦｃドメインは、Ｆｃ受容体に対するＦｃドメインの結合親和性及び／又はエフェクター機能を低減させる１又は複数のアミノ酸変異を含む。典型的には、同じ１又は複数のアミノ酸変異がＦｃドメインの２つのサブユニットの各々に存在する。特に、Ｆｃドメインは、Ｅ２３３、Ｌ２３４、Ｌ２３５、Ｎ２９７、Ｐ３３１及びＰ３２９の位置（ＥＵ番号付け）にアミノ酸置換を含む。特に、Ｆｃドメインは、ＩｇＧ重鎖の２３４及び２３５（ＥＵ番号付け）並びに／又は３２９の位置（ＥＵ番号付け）にアミノ酸置換を含む。より詳細には、ＩｇＧ重鎖にアミノ酸置換Ｌ２３４Ａ、Ｌ２３５Ａ及びＰ３２９Ｇ（「Ｐ３２９Ｇ　ＬＡＬＡ」、ＥＵ番号付け）を有するＦｃドメインを含む、本発明による抗体が提供される。アミノ酸置換Ｌ２３４Ａ及びＬ２３５Ａは、所謂ＬＡＬＡ変異を指す。アミノ酸置換の「Ｐ３２９Ｇ　ＬＡＬＡ」の組み合わせは、ヒトＩｇＧ１　ＦｃドメインのＦｃγ受容体結合をほぼ完全に消失させ、そのような変異体Ｆｃドメインを調製する方法及びＦｃ受容体結合又はエフェクター機能などのその特性を決定するための方法も記載している国際公開第２０１２／１３０８３１号に記載されている。

【０１５４】

Ｆｃ受容体結合及び／又はエフェクター機能が低減されたＦｃドメインは、Ｆｃドメイン残基２３８、２６５、２６９、２７０、２９７、３２７、及び３２９のうちの１又は複数の置換を有するものも含む（米国特許第６７３７０５６号）。そのようなＦｃ変異体は、残基２６５及び２９７のアラニンへの置換を有する所謂「ＤＡＮＡ」Ｆｃ変異体を含め、アミノ酸位２６５、２６９、２７０、２９７及び３２７のうちの２つ以上に置換を有するＦｃ変異体を含む（米国特許第７３３２５８１号）。

【０１５５】

別の態様では、ＦｃドメインはＩｇＧ４　Ｆｃドメインである。ＩｇＧ４抗体は、ＩｇＧ１抗体と比較して、Ｆｃ受容体に対する低減された結合親和性及び低減されたエフェクター機能を呈する。より具体的な態様では、Ｆｃドメインは、Ｓ２２８位（Ｋａｂａｔ番号付け）にアミノ酸置換、特にアミノ酸置換Ｓ２２８Ｐを含むＩｇＧ４　Ｆｃドメインである。より具体的な態様では、Ｆｃドメインは、アミノ酸置換Ｌ２３５Ｅ及びＳ２２８Ｐ及びＰ３２９Ｇ（ＥＵ番号付け）を含むＩｇＧ４　Ｆｃドメインである。このようなＩｇ

Ｇ４　Ｆｃドメイン変異体及びそれらのＦｃγ受容体結合特性は、国際公開第２０１２／１３０８３１号にも記載されている。

【０１５６】

変異体Ｆｃドメインは、当技術分野で周知の遺伝学的又は化学的方法を使用して、アミノ酸の欠失、置換、挿入又は改変によって調製することができる。遺伝学的方法は、コード化ＤＮＡ配列の部位特異的変異誘発、ＰＣＲ、遺伝子合成等を含み得る。正確なヌクレオチドの変化は、例えば配列決定により検証することができる。

【０１５７】

Ｆｃ受容体への結合は、例えばＥＬＩＳＡによって、又はＢＩＡｃｏｒｅ装置（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）などの標準的な装置を用いた表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）によって容易に決定することができ、そのようなＦｃ受容体は組換え発現によって得ることができる。或いは、Ｆｃドメイン又はＦｃドメインを含む細胞活性化抗体のＦｃ受容体に対する結合親和性は、特定のＦｃ受容体を発現することが知られている細胞株（例えば、ＦｃγＩＩＩａ受容体を発現するヒトＮＫ細胞）を用いて評価されてもよい。

【０１５８】

Ｆｃドメインの、又はＦｃドメインを含む二重特異性抗原結合分子のエフェクター機能は、当技術分野で既知の方法によって測定することができる。ＡＤＣＣを測定するための適切なアッセイは、本明細書に記載されている。目的の分子のＡＤＣＣ活性を評価するためのｉｎ ｖｉｔｒｏアッセイの他の例は、米国特許第５５００３６２号；Ｈｅｌｌｓｔｒｏｍ ｅｔ ａｌ．Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ８３，７０５９－７０６３（１９８６）及びＨｅｌｌｓｔｒｏｍ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ８２，１４９９－１５０２（１９８５）；米国特許第５８２１３３７号；Ｂｒｕｇｇｅｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．，Ｊ Ｅｘｐ Ｍｅｄ １６６，１３５１－１３６１（１９８７）に記載されている。或いは、非放射性アッセイ法を用いることができる（例えば、フローサイトメトリー用のＡＣＴＩ™非放射性細胞傷害性アッセイ（ＣｅｌｌＴｅｃｈｎｏｌｏｇｙ社、カリフォルニア州マウンテンビュー）；及びＣｙｔｏＴｏｘ ９６（登録商標）非放射性細胞傷害性アッセイ（Ｐｒｏｍｅｇａ、ウィスコンシン州マディソン）参照）。そのようなアッセイに有用なエフェクター細胞としては、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）及びナチュラルキラー（ＮＫ）細胞が挙げられる。これに代えて、又はこれに加えて、目的の分子のＡＤＣＣ活性は、ｉｎ ｖｉｖｏで、例えば、Ｃｌｙｎｅｓ ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ９５，６５２－６５６（１９９８）に開示されているような動物モデルにおいて評価されてもよい。

【０１５９】

いくつかの態様では、補体成分に対するＦｃドメインの結合、具体的にはＣ１ｑに対する結合が低減する。したがって、Ｆｃドメインが低減されたエフェクター機能を有するように工学的に操作されているいくつかの実施態様では、前記低減されたエフェクター機能は低減されたＣＤＣを含む。Ｃ１ｑ結合アッセイは、本発明の二重特異性抗体がＣ１ｑに結合することができ、したがってＣＤＣ活性を有するかどうかを決定するために実施され得る。例えば、国際公開第２００６／０２９８７９号及び国際公開第２００５／１００４０２号のＣ１ｑ及びＣ３ｃ結合ＥＬＩＳＡを参照。補体活性化を評価するために、ＣＤＣアッセイを行ってもよい（例えば、Gazzano-Santoro et al.,J Immunol Methods 202、163 (1996);Cragg et al.,Blood 101、1045-1052(2003);及びCragg and Glennie、Blood 103、2738-2743(2004)を参照されたい）。

【０１６０】

ヘテロ二量体化を促進するＦｃドメイン改変

本発明で使用される二重特異性抗原結合分子は、Ｆｃドメインの２つのサブユニットの一方又は他方に融合した異なる抗原結合部位を含んでおり、したがって、Ｆｃドメインの２つのサブユニットは、２つの非同一ポリペプチド鎖に含まれていてもよい。これらのポリペプチドの組換え共発現及びその後の二量体化により、２つのポリペプチドのいくつかの可能な組み合わせが生じる。したがって、組換え生産における本発明の二重特異性抗体

の収率及び純度を高めるために、本発明の二重特異性抗原結合分子のＦｃドメインに、所望のポリペプチドの結合を促す改変を導入することが有利であろう。したがって、二重特異性抗原結合分子は、安定した結合が可能な第１及び第２のサブユニットから構成されるＦｃドメインを含み、Ｆｃドメインは、Ｆｃドメインの第１のサブユニットと第２のサブユニットの結合を促進する改変を含む。ヒトＩｇＧ　Ｆｃドメインの２つのサブユニット間のタンパク質間相互作用が最も広範囲に及ぶ部位は、ＦｃドメインのＣＨ３ドメインにある。したがって、ある態様では、前記改変はＦｃドメインのＣＨ３ドメイン内にある。

【０１６１】

特定の態様では、前記改変は、Ｆｃドメインの２つのサブユニットの一方に「ノブ」改変を、Ｆｃドメインの２つのサブユニットの他方に「ホール」改変を含む、所謂「ノブ・イントゥ・ホール」改変である。したがって、二重特異性抗原結合分子は、安定した結合が可能な第１及び第２のサブユニットから構成されるＦｃドメインを含み、Ｆｃドメインの第１のサブユニットが、ノブ・イントゥ・ホール法によるノブを含み、Ｆｃドメインの第２のサブユニットがノブ・イントゥ・ホール法によるホールを含む。特定の態様では、Ｆｃドメインの第１のサブユニットは、アミノ酸置換Ｓ３５４Ｃ及びＴ３６６Ｗ（ＥＵ番号付け）を含み、Ｆｃドメインの第２のサブユニットは、アミノ酸置換Ｙ３４９Ｃ、Ｔ３６６Ｓ、及びＹ４０７Ｖ（Ｋａｂａｔ　ＥＵインデックスによる番号付け）を含む。

【０１６２】

ノブ・イントゥ・ホール技術は、例えば、米国特許第５７３１１６８号；米国特許第７６９５９３６号；Ｒｉｄｇｗａｙ　ｅｔ　ａｌ．，Ｐｒｏｔ　Ｅｎｇ　９，６１７－６２１（１９９６）及びＣａｒｔｅｒ，Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｌ　Ｍｅｔｈ　２４８，７－１５（２００１）に記載されている。概して、該方法は、ヘテロ二量体の形成を促進し、ホモ二量体の形成を妨げるために、隆起（「ノブ」）を空洞（「ホール」）内に配置することができるよう、第１のポリペプチドの境界面に隆起を導入し、第２のポリペプチドの境界面に対応する空洞を導入することを伴う。隆起は、第１のポリペプチドの境界面からの小さなアミノ酸側鎖をより大きな側鎖（例：チロシン又はトリプトファン）で置き換えることによって構築される。大きなアミノ酸側鎖を小さなアミノ酸側鎖（例：アラニン又はスレオニン）で置き換えることにより、隆起と同じ又は類似のサイズの補償空洞が第２のポリペプチドの境界面に作られる。したがって、ある態様では、本発明の二重特異性抗原結合分子のＦｃドメインの第１のサブユニットのＣＨ３ドメインにおいて、アミノ酸残基がより大きな側鎖体積を有するアミノ酸残基で置き換えられ、それにより、第１のサブユニットのＣＨ３ドメイン内部に、第２のサブユニットのＣＨ３ドメイン内部の空洞内に配置可能な隆起が生成され、Ｆｃドメインの第２のサブユニットのＣＨ３ドメインにおいて、アミノ酸残基がより小さな側鎖体積を有するアミノ酸残基で置き換えられ、それにより、第２のサブユニットのＣＨ３ドメイン内部に、第１のサブユニットのＣＨ３ドメイン内部の隆起を配置可能な空洞が生成される。隆起と空洞は、例えば部位特異的変異誘発又はペプチド合成によりポリペプチドをコードする核酸を変化させることによって、作製され得る。特定の態様では、Ｆｃドメインの第１のサブユニットのＣＨ３ドメインにおいて、３６６位のスレオニン残基がトリプトファン残基で置き換えられており（Ｔ３６６Ｗ）、Ｆｃドメインの第２のサブユニットのＣＨ３ドメインにおいて、４０７位のチロシン残基がバリン残基で置き換えられている（Ｙ４０７Ｖ）。ある態様では、Ｆｃドメインの第２のサブユニットにおいて、更に、３６６位のスレオニン残基がセリン残基と置き換えられており（Ｔ３６６Ｓ）、３６８位のロイシン残基がアラニン残基で置き換えられている（Ｌ３６８Ａ）。

【０１６３】

なお更なる態様では、Ｆｃドメインの第１のサブユニットにおいて更に、３５４位のセリン残基がシステイン残基で置き換えられており（Ｓ３５４Ｃ）、Ｆｃドメインの第２のサブユニットにおいて更に、３４９位のチロシン残基がシステイン残基で置き換えられている（Ｙ３４９Ｃ）。これら２つのシステイン残基の導入によって、Ｆｃドメインの２つのサブユニット間にジスルフィド架橋が形成され、二量体を更に安定させる（Carter(2

001),J Immunol Methods 248,7-15）。特定の態様では、Ｆｃドメインの第１のサブユニットは、アミノ酸置換Ｓ３５４Ｃ及びＴ３６６Ｗ（ＥＵ番号付け）を含み、Ｆｃドメインの第２のサブユニットは、アミノ酸置換Ｙ３４９Ｃ、Ｔ３６６Ｓ及びＹ４０７Ｖを含む（Ｋａｂａｔ　ＥＵインデックスによる番号付け）。

【０１６４】

代替的な態様では、Ｆｃドメインの第１のサブユニットと第２のサブユニットの結合を促す改変は、例えば国際公開第２００９／０８９００４号に記載されているような静電ステアリング効果（electrostatic steering effect）を媒介する改変を含む。通常、この方法は、ホモ二量体形成が静電的に望ましくなくなり、ヘテロ二量体化が静電的に望ましくなるような、荷電アミノ酸残基による２つのＦｃドメインサブユニットの境界面における１又は複数のアミノ酸残基の置き換えを伴う。

【０１６５】

本明細書に記載の二重特異性抗原結合分子の重鎖のＣ末端は、アミノ酸残基ＰＧＫで終結する完全なＣ末端であり得る。重鎖のＣ末端は、Ｃ末端アミノ酸残基のうち１つ又は２つが除去された、短くなったＣ末端であってもよい。好ましい態様では、重鎖のＣ末端は、ＰＧで終端する短縮されたＣ末端である。本明細書に記載の全態様のうちのある態様では、本明細書に明記されるＣ末端ＣＨ３ドメインを含む重鎖を含む二重特異性抗体は、Ｃ末端グリシン－リジンジペプチドを含む（Ｇ４４６及びＫ４４７、Ｋａｂａｔ　ＥＵインデックスによる番号付け）。本明細書に記載の全態様のうちのある実施態様では、本明細書に明記されるＣ末端ＣＨ３ドメインを含む重鎖を含む二重特異性抗体は、Ｃ末端グリシン残基を含む（Ｇ４４６、Ｋａｂａｔ　ＥＵインデックスによる番号付け）。

【０１６６】

Ｆａｂドメイン内の改変

ある態様において、本発明は、（ａ）ＣＤ４０に特異的結合可能な第１のＦａｂ断片、（ｂ）ＦＡＰに特異的結合可能な第２のＦａｂ断片、及び（ｃ）安定した結合が可能な第１のサブユニットと第２のサブユニットで構成されたＦｃドメインとを含む二重特異性抗原結合分子であって、Ｆａｂ断片の１つにおいて、可変ドメインＶＨとＶＬが交換されているか又は定常ドメインＣＨ１とＣＬが交換されているかのいずれかである二重特異性抗原結合分子に関する。二重特異性抗体は、Ｃｒｏｓｓｍａｂ技術に従って調製される。

【０１６７】

１つの結合アームにドメインの置き換え／交換を有する多重特異性抗体（ＣｒｏｓｓＭａｂ　ＶＨ－ＶＬ又はＣｒｏｓｓＭａｂ　ＣＨ－ＣＬ）は、国際公開第２００９／０８０２５２号及びＳｃｈａｅｆｅｒ，Ｗ．ｅｔ　ａｌ、ＰＮＡＳ、１０８（２０１１）１１１８７－１１９１に記載されている。これらの多重特異性抗体は、明らかに、第１抗原に対する軽鎖と第２抗原に対する誤った重鎖とのミスマッチにより生じる副産物を減らす（このようなドメイン交換がない手法と比較して）。

【０１６８】

ある態様において、本発明は、（ａ）ＣＤ４０に特異的結合可能な第１のＦａｂ断片、（ｂ）ＦＡＰに特異的結合可能な第２のＦａｂ断片、及び（ｃ）安定した結合が可能な第１のサブユニットと第２のサブユニットで構成されるＦｃドメインを含む二重特異性抗原結合分子であって、Ｆａｂ断片の１つにおいて、定常ドメインＣＬとＣＨ１が、ＣＨ１ドメインが軽鎖の一部でありＣＬドメインが重鎖の一部であるように、互いに置き換えられている二重特異性抗原結合分子に関する。より具体的には、標的細胞抗原に特異的結合可能な第２のＦａｂ断片において、定常ドメインＣＬとＣＨ１が、ＣＨ１ドメインが軽鎖の一部でありＣＬドメインが重鎖の一部であるように、互いに置き換えられている。

【０１６９】

特定の態様において、本発明は、（ａ）ＣＤ４０に特異的結合可能な第１のＦａｂ断片、（ｂ）ＦＡＰに特異的結合可能な第２のＦａｂ断片を含む、二重特異性抗原結合分子であって、定常ドメインＣＬとＣＨ１が、ＣＨ１ドメインが軽鎖の一部でありＣＬドメインが重鎖の一部であるように、互いに置き換えられている二重特異性抗原結合分子に関する

。このような分子は、ＣＤ４０とＦＡＰの両方に一価で結合する。

【０１７０】

別の態様において、本発明は、（ａ）ＣＤ４０及びＦｃドメインに特異的結合可能な２つのＦａｂ断片を含む抗体の２つの軽鎖及び２つの重鎖、並びに（ｂ）ＦＡＰに特異的結合可能な２つの追加的なＦａｂ断片を含む、二重特異性抗原結合分子であって、前記追加的なＦａｂ断片が各々、ペプチドリンカーを介して（ａ）の重鎖のＣ末端に連結している二重特異性抗原結合分子に関する特定の態様において、追加的なＦａ断片は、Ｆａｂ断片であって、可変ドメインＶＬとＶＨが、ＶＨドメインが軽鎖の一部でありＶＬドメインが重鎖の一部であるように、互いに置き換えられているＦａｂ断片である。

【０１７１】

したがって、特定の態様において、本発明は、（ａ）ＣＤ４０及びＦｃドメインに特異的結合可能な２つのＦａｂ断片を含む、抗体の２つの軽鎖及び２つの重鎖と、（ｂ）ＦＡＰに特異的結合可能な２つの追加的なＦａｂ断片とを含む二重特異性抗原結合分子を含み、標的細胞抗原に特異的結合可能な前記２つの追加的なＦａｂ断片は、可変ドメインＶＬとＶＨが互いに置き換えられており、ＶＬ－ＣＨ鎖が各々、ペプチドリンカーを介して（ａ）の重鎖のＣ末端に連結されているクロスオーバーＦａｂ断片である。

【０１７２】

別の態様において、正確な対合を更に改善するために、（ａ）ＣＤ４０に特異的結合可能な第１のＦａｂ断片、（ｂ）ＦＡＰに特異的結合可能な第２のＦａｂ断片、並びに（ｃ）安定した結合が可能な第１及び第２のサブユニットで構成されたＦｃドメインを含む二重特異性抗原結合分子は、異なる荷電アミノ酸置換（所謂「荷電残基」）を含み得る。これらの改変は、交差又非交差のＣＨ１ドメイン及びＣＬドメインに導入される。特定の態様において、本発明は、ＣＬドメインの１つにおいて、１２３位（ＥＵ番号付け）のアミノ酸がアルギニン（Ｒ）で置き換えられており、１２４位（ＥＵ番号付け）のアミノ酸がリジン（Ｋ）で置き換えられており、ＣＨ１ドメインの１つにおいて、１４７位（ＥＵ番号付け）及び／又は２１３位（ＥＵ番号付け）のアミノ酸がグルタミン酸（Ｅ）で置き換えられている、二重特異性抗原結合分子に関する。

【０１７３】

アッセイ

本明細書で提供される抗原結合分子は、当技術分野で既知の様々なアッセイによって、その物理的／化学的性質及び／又は生物学的活性について同定、スクリーニング又は特性評価することができる。

【０１７４】

１．結合アッセイ

本明細書で提供される二重特異性抗原結合分子の対応する標的発現細胞との結合は、例えば、ヒト線維芽細胞活性化タンパク質（ＦＡＰ）を発現するマウス線維芽細胞株及びフローサイトメトリー（ＦＡＣＳ）解析を用いることによって評価することができる。本明細書で提供される二重特異性抗原結合分子のＣＤ４０への結合は、初代Ｂ細胞を使用することによって決定することができる。

【０１７５】

２．活性のアッセイ

本発明の二重特異性抗原結合分子を生物活性について試験する。生物活性には、二重特異性抗原結合分子の有効性と特異性が含まれ得る。有効性と特異性は、標的抗原の結合時にＣＤ４０受容体を介したアゴニストシグナル伝達を示すアッセイによって実証される。更に、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでのＴ細胞プライミングアッセイは、二重特異性抗原結合分子とインキュベートされた樹状細胞（ＤＣ）を使用して実施される。

【０１７６】

薬学的組成物、製剤及び投与経路

更なる態様において、本発明は、例えば下記の治療法のいずれかに使用される、本明細書で提供される二重特異性抗原結合分子のいずれかを含む薬学的組成物を提供する。ある

実施態様では、薬学的組成物は、本明細書で提供されるいずれかの二重特異性抗原結合分子と、少なくとも１つの薬学的に許容される添加物とを含む。別の実施態様において、薬学的組成物は、本明細書で提供される二重特異性抗原結合分子のいずれかと、例えば後述するような、少なくとも１つの追加の治療剤とを含む。

【０１７７】

本発明の薬学的組成物は、薬学的に許容される担体に溶解又は分散した、治療的有効量の１又は複数の二重特異性抗原結合分子を含む。「薬学的に許容される又は薬理学的に許容される」という語句は、用いられる投与量及び濃度でレシピエントに対して一般に無毒である、すなわち、例えばヒトなどの動物に必要に応じて投与されたとき、副作用、アレルギー反応又は他の有害反応を生じない分子実体及び組成物を指す。本発明による少なくとも１つの二重特異性抗原結合分子と、任意選択で追加の有効成分とを含有する薬学的組成物の調製は、参照により本明細書に援用されるＲｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ（１８ｔｈ　Ｅｄ．Ｍａｃｋ　Ｐｒｉｎｔｉｎｇ　Ｃｏｍｐａｎｙ，１９９０）により例示されているとおりであり、本開示に照らして当業者には既知であろう。特に、該組成物は、凍結乾燥製剤又は水溶液である。本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される添加物」としては、当業者には知られているように、あらゆる溶媒、バッファー、分散媒体、コーティング、界面活性剤、酸化防止剤、防腐剤（例：抗菌剤、抗真菌剤）、等張性剤、塩、安定化剤、及びこれらの組み合わせが挙げられる。

【０１７８】

非経口組成物としては、注射（例えば皮下、皮内、病変内、静脈内、動脈内、筋肉内、髄腔内又は腹腔内注射）による投与のために設計されたものが挙げられる。注射の場合、本発明の二重特異性抗原結合分子は、水溶液、好ましくは、ハンクス液、リンゲル液又は生理食塩水バッファーなどの生理的に適合性のバッファーに配合されていてもよい。該溶液は、懸濁剤、安定化剤及び／又は分散剤などの調合剤を含有していてもよい。代替的には、二重特異性抗原結合分子は、使用前に、好適なビヒクル（例えばパイロジェンフリー滅菌水）で構成するための粉末形態であってもよい。滅菌注射用溶液は、必要な場合には以下に列挙する他の様々な成分と共に、本発明の抗原結合分子を必要な量、適切な溶媒に組み込むことによって調製される。滅菌は、例えば滅菌濾過膜による濾過によって容易に達成され得る。一般に、分散体は、様々な滅菌された有効成分を、塩基性分散媒及び／又は他の成分を含有する滅菌ビヒクルに組み込むことによって調製される。滅菌注射用溶液、懸濁液又はエマルションの調製のための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、事前に滅菌濾過した液体培地から、活性成分＋任意の追加的な所望の成分の粉末を得る真空乾燥又は凍結乾燥技術である。必要に応じて液体培地を適切に緩衝し、十分な生理食塩水又はブドウ糖を注入する前に、まず液体希釈剤を等張にする必要がある。本発明の組成物は、製造及び保管の条件下で安定していなければならず、細菌及び真菌などの微生物の汚染作用から守られなければならない。エンドトキシンの混入は、最小限安全なレベル、例えば、０．５ｎｇ／ｍｇタンパク質未満に保たれるべきであることが理解されよう。薬学的に許容される適切な添加物としては、限定されないが、リン酸、クエン酸及び他の有機酸等のバッファー；アスコルビン酸及びメチオニンを含む抗酸化剤；防腐剤（例えばオクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；ヘキサメトニウムクロリド；塩化ベンザルコニウム；塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチル又はベンジルアルコール；アルキルパラベン、例えばメチル又はプロピルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；３－ペンタノール；及びｍ－クレゾール）；低分子量（約１０残基未満）のポリペプチド；タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチン又は免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えばポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン又はリジン；単糖類、二糖類、及びグルコース、マンノース又はデキストリンを含む他の炭水化物；キレート剤、例えばＥＤＴＡ；糖、例えばスクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトール；塩形成対イオン、例えばナトリウム；金属錯体（例えばＺｎ－タンパク質錯体）；及び／又はポリエチレングリコ

ール（ＰＥＧ）等の非イオン性界面活性剤が挙げられる。水性注射懸濁液は、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、デキストランなどの、懸濁液の粘度を増加させる化合物を含んでもよい。任意選択的に、懸濁液は、化合物の溶解度を高めて高濃度溶液の調製を可能にする適切な安定剤又は薬剤を含んでもよい。加えて、活性化合物の懸濁液は、適切な油性注射懸濁液として調製することができる。適切な親油性溶媒又はビヒクルには、ゴマ油などの脂肪油、又はオレイン酸エチル（etyl cleats）若しくはトリグリセリドなどの合成脂肪酸エステル、又はリポソームが含まれる。

【０１７９】

活性成分は、例えばコアセルベーション技術によって又は界面重合によって調製されたマイクロカプセル、例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロースマイクロカプセル又はゼラチンマイクロカプセル、及びポリ（メチルメタクリレート）マイクロカプセルに、コロイド状ドラッグデリバリーシステム（例えば、リポソーム、アルブミン微小球、マイクロエマルション、ナノ粒子及びナノカプセル）に、又はマクロエマルションに封入することができる。このような技術は、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ（１８ｔｈ Ｅｄ．Ｍａｃｋ Ｐｒｉｎｔｉｎｇ Ｃｏｍｐａｎｙ，１９９０）に開示されている。徐放性調製物が調製されてもよい。徐放性調製物の適切な例には、ポリペプチドを含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスが含まれ、このマトリックスは、成形品（例えばフィルム）又はマイクロカプセルの形態である。特定の実施態様では、注射可能な組成物の持続性吸収は、吸収を遅らせる薬剤（例えばアルミニウムモノステアレート、ゼラチン又はこれらの組み合わせ）の組成物における使用によってもたらすことができる。

【０１８０】

本発明の薬学的に許容される、例示的な添加物は、更に、組織内薬物分散剤（interstitial drug dispersion agent）、例えば、可溶性中性活性ヒアルロニダーゼ糖タンパク質（ｓＨＡＳＥＧＰ）、例えば、ヒト可溶性ＰＨ－２０ヒアルロニダーゼ糖タンパク質、例えば、ｒＨｕＰＨ２０（ＨＹＬＥＮＥＸ（登録商標）、Ｂａｘｔｅｒ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ社）を含む。ｒＨｕＰＨ２０を含む、ある特定の例示的なｓＨＡＳＥＧＰ及び使用方法は、米国特許出願公開第２００５／０２６０１８６号及び同第２００６／０１０４９６８号に記載されている。ある態様では、ｓＨＡＳＥＧＰを、１又は複数の追加のグリコサミノグリカナーゼ（例えば、コンドロイチナーゼ）と組み合わせる。

【０１８１】

例示的な凍結乾燥抗体製剤は、米国特許第６２６７９５８号に記載されている。水性抗体製剤としては、米国特許第６１７１５８６号及び国際公開第２００６／０４４９０８号に記載されるものが挙げられ、後者の製剤は、ヒスチジン酢酸バッファーを含む。

【０１８２】

上述した組成物に加えて、抗原結合分子をデポー調製物として製剤化することも可能である。そのような持続性製剤は、移植（例えば、皮下又は筋肉内）又は筋肉内注射によって投与することができる。したがって、例えば、融合タンパク質を、好適なポリマー若しくは疎水性材料（例えば、許容される油中のエマルションとして）又はイオン交換樹脂を用いて、又は難溶性の誘導体として、例えば難溶性の塩として、製剤化することも可能である。

【０１８３】

本発明の二重特異性抗原結合分子を含む薬学的組成物は、従来の混合、溶解、乳化、カプセル化、封入又は凍結乾燥プロセスにより製造することができる。薬学的組成物は、１又は複数の生理学的に許容される担体、希釈剤、添加物を使用して、又はタンパク質の薬学的に使用可能な調製物への加工を容易にする助剤を使用して、従来の方法で製剤化することができる。適切な製剤は、選択された投与経路に依存する。

【０１８４】

二重特異性抗原結合分子は、遊離酸又は塩基、中性又は塩形態で、組成物に配合され得る。薬学的に許容される塩は、遊離酸又は塩基の生物活性を実質的に保持する塩である。

これらには、酸付加塩、例えばタンパク質性組成物の遊離アミノ基と形成されたもの、又は例えば塩酸若しくはリン酸といった無機酸、又は酢酸、シュウ酸、酒石酸若しくはマンデル酸といった有機酸と形成されたものが含まれる。遊離カルボキシル基と形成される塩は、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム若しくは水酸化第二鉄などの無機塩基；又はイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン又はプロカインなどの有機塩基から誘導することができる。薬学的塩は、対応する遊離塩基形態よりも、水性溶媒及び他のプロトン性溶媒に溶け易い。

【０１８５】

本明細書の組成物は、治療される特定の徴候に必要な１より多い活性成分、好ましくは、互いに悪影響を及ぼさない補完的活性を有するものも含有し得る。そのような活性成分は、適切には、意図された目的に有効な量で、組み合わせとして存在する。

【０１８６】

ｉｎ　ｖｉｖｏ投与に使用される製剤は、一般に、滅菌されている。滅菌状態は、例えば、滅菌濾過膜を通して濾過することにより、容易に達成される。

【０１８７】

ＦＡＰを標的としたＣＤ４０アゴニストの、放射線療法との併用投与

腫瘍関連抗原に特異的結合可能な少なくとも１つの抗原結合ドメインを含む二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、非経口投与、肺内投与、及び鼻腔内投与と、局所治療に望まれる場合には、病巣内投与を含む任意の適切な手段によって投与することができる。特に、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、非経口注入、特に静脈内注入で投与することができる。

【０１８８】

非経口注入としては、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内又は皮下投与が挙げられる。投薬は、投与が短期か長期かに部分的に依存し、任意の好適な経路によるもの、例えば、静脈内注射又は皮下注射などの注射によるものであり得る。単回又は様々な時点にわたる複数回投与、ボーラス投与、及びパルスインフュージョンを含むがこれらに限定されない様々な投薬スケジュールが、本明細書では企図される。ある態様では、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、非経口投与、特に静脈内投与される。特定の態様において、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、静脈内注入で投与される。

【０１８９】

二重特異性アゴニストＣＤ４０結合分子は、医療実施基準（good medical practice）に合致するように製剤化され、用量決定され、投与される。これに関連して考慮すべき因子としては、治療される特定の障害、治療される特定の哺乳動物、個々の患者の臨床症状、障害の原因、薬剤の送達部位、投与方法、投与スケジュール、及び医療従事者に既知の他の因子が挙げられる。二重特異性アゴニストＣＤ４０結合分子は、必ずではないが任意選択で、問題の障害を予防又は治療するために現在使用されている１又は複数の薬剤と一緒に製剤化される。このような他の薬剤の有効量は、製剤中に存在する治療剤の量、疾患又は治療の種類、及び上述のその他の因子によって決まる。これらは、一般に、本明細書に記載のものと同じ投与量及び投与経路で、又は本明細書に記載の投与量の約１～９９％で、又は適切であると経験的／臨床的に判断される任意の投与量及び任意の経路で使用される。

【０１９０】

疾患の予防又は治療において、二重特異性アゴニストＣＤ４０結合分子の適切な投与量（１又は複数の他の追加の治療剤と併用で又は一緒に使用する場合）は、治療される疾患の種類、疾患の重症度及び経過、予防目的で投与されるのか又は治療目的で投与されるのか、治療歴、患者の病歴、該治療剤に対する応答、並びに主治医の裁量によって決まる。二重特異性ＣＤ４０アゴニスト結合分子は、一度に、又は一連の治療にわたって、患者に好適に投与される。疾患の種類及び重症度に応じて、約１μｇ／ｋｇ～１５ｍｇ／ｋｇ（例：０．１ｍｇ／ｋｇ～１０ｍｇ／ｋｇ）の物質が、例えば、１回若しくは複数回の個別投与によるか持続注入によるかに関わらず、対象に投与するための初回投与量の候補であ

り得る。典型的な１日投与量は、上述の因子に依存して、約１μｇ／ｋｇ～１００ｍｇ／ｋｇの範囲であってもよい。数日間又はそれ以上にわたる反復投与において、状態に応じ、治療は一般に、病状の所望の抑制が生じるまで続けられるであろう。二重特異性ＣＤ４０抗原結合分子の１つの例示的な投与量は、約０．００５ｍｇ／ｋｇ～約１０ｍｇ／ｋｇの範囲である。したがって、約０．５ｍｇ／ｋｇ、１．０ｍｇ／ｋｇ、２．０ｍｇ／ｋｇ、３．０ｍｇ／ｋｇ、４．０ｍｇ／ｋｇ、５．０ｍｇ／ｋｇ、６．０ｍｇ／ｋｇ、７．０ｍｇ／ｋｇ、８．０ｍｇ／ｋｇ、９．０ｍｇ／ｋｇ又は１０ｍｇ／ｋｇ（又はそれらの任意の組み合わせ）のうちの１又は複数の用量を対象に投与することができる。このような用量は、断続的に、例えば毎週、２週毎又は３週毎に（例えば、対象が約２～約２０用量又は、例えば、約６用量を受けるように）投与してもよい。初回の高負荷量と、それに続く１若しくは複数の低用量が投与されても、又は初回の低用量と、それに続く１又は複数の高用量が投与されてもよい。例示的な投与レジメンは、初回量約１０ｍｇ／ｋｇの治療剤と、それに続く隔週約２０ｍｇ／ｋｇの治療剤を投与することを含む。しかしながら、他の投薬レジメンが有用である場合もある。この治療の進行状況は、従来の技術とアッセイによって簡単に監視できる。

【０１９１】

ある態様において、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子の投与は、単回投与のためのものである。いくつかの態様において、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、放射線療法と同時に投与される。「同時に」とは、同じ時に、又は通常１時間未満の短い時間内に、という意味である。いくつかの態様において、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、放射線療法後に同時に投与される。「放射線療法後」とは、放射線が終了してから３時間以上、好ましくは数日、好ましくは１日後、ただし放射線が終了してから１～２週間以内の期間を意味する。特定の態様において、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子の投与は、２回以上の投与である。１つ以上の他の薬物と「同時に」投与される薬物は、同一治療サイクル中、１つ以上の他の薬物と同じ治療日に、及び任意に、１つ以上の他の薬物と同じ時間に投与される。例えば、３週毎に付与される療法の場合、同時に投与される薬物は各々が、３週間のサイクルの１日目に投与される。ある態様において、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子の投与は、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子の第１の用量の初期投与と、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子の第２の用量の１回又は複数回の後続投与とを含んでおり、第１の用量は第２の用量より低くない。

【０１９２】

放射線療法と二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子の両方を順次共投与する場合、それらは「特定の期間」を隔てた２回の個別投与で行われる。特定の期間という用語は、１時間から１５日間のどこかを意味する。例えば、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、放射線療法の投与から約１、２、３、４、５、６若しくは７日以内又は１～２４時間以内に投与することができ、ある態様では、該特定の期間は、１から３日又は２～８時間である。

【０１９３】

特定の態様において、放射線療法は、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子の投与前に投与される。ある態様では、放射線療法は、二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子の投与と同時に投与される。

【０１９４】

治療方法及び組成物

ある態様では、本明細書に記載の二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子の有効量と本明細書に記載の放射線療法の有効量とを対象に投与することを含む、個体における固形腫瘍を治療する方法が提供される。

【０１９５】

そのような態様では、上記方法は、有効量の少なくとも１の追加の治療剤を個体に投与することを更に含む。適切な追加の薬剤には、次の１つ以上が含まれる：ドキソルビシン

及びエピルビシン（ファモルビシン（登録商標））などのアントラサイクリン薬；パクリタキセル（タキソール（登録商標））及びドセタキセル（タキソテール（登録商標））などのタキサン薬；フルオロウラシル（５ＦＵ）；シクロホスファミド；メトトレキサート；シスプラチン；並びにカペシタビン。他の適切な追加の治療用剤としては、キナーゼ阻害剤のラパチニブ（タイケルブ）及びネラチニブ（ネルリンクス）が挙げられる。更なる実施態様において、本明細書に記載の有効量の二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子と放射線療法を、本明細書に記載のように、対象に投与することを含む、腫瘍の縮小方法が本明細書で提供される。上記の態様にいずれに記載の「個体」又は「対象」も、好ましくはヒトである。

【０１９６】

ある態様では、本発明は、がんの治療を治療するため又は進行を遅延させるための方法における使用のための、本明細書に記載の二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子を提供し、ここで、本明細書に記載の二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、放射線療法と併用して使用される。いくつかの態様において、本明細書に記載の二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子及び放射線療法は、追加の治療剤と組み合わされる。

【０１９７】

更なる態様において、本明細書に記載の二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子と本明細書に記載の放射線療法とを含む、がん免疫療法における使用のための併用療法が提供される。

【０１９８】

更なる態様では、併用療法における使用のための医薬の製造又は調製における、本明細書に記載の二重特異性アゴニストＣＤ４０結合分子の使用が本明細書で提供される。いくつかの態様では、医薬は、がんの治療のためのものである。いくつかの実施態様では、医薬は、固形腫瘍の治療のためのものである。更なる態様では、医薬は、固形腫瘍を有する個体に有効量の医薬を投与することを含む、腫瘍の縮小方法における使用のためのものである。そのような態様では、該方法は、有効量の少なくとも１の追加の治療剤を個体に投与することを更に含む。いくつかの態様では、医薬は、固形腫瘍を治療するためのものである。

【０１９９】

特定の態様において、個体は、腫瘍間質におけるＦＡＰ発現によって特徴づけられるがんを有する。いくつかの態様において、腫瘍は、ＦＡＰを過剰発現する間質を含み得る。いくつかの態様では、がんは、固形腫瘍を含む。いくつかの態様では、固形腫瘍は、進行性及び／又は転移性固形腫瘍である。いくつかの態様において、ＦＡＰ発現がんは、頭頸部がん、メラノーマ、肺がん、腎臓がん、乳がん、結腸がん、卵巣がん、子宮頸がん、すい臓がん、肝臓がん、前立腺がん、膀胱がん、及び胃がんから成る群より選択される。いくつかの態様では、該がんは、頭頸部がんである。いくつかの事例では、該がんは、非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）である。いくつかの態様において、固形腫瘍は、従前の治療後の再発がんからの腫瘍である。いくつかの態様において、該腫瘍は、従前の治療後の再発頭頸部がんからである。

【０２００】

治療は、固形腫瘍の発症又は増殖の予防を目的とし得る。このように、本明細書に記載の二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子を放射線療法と併用して使用して、固形腫瘍の再発の発生に対して個体を予防的に治療することができる。いくつかの態様において、本明細書に記載の二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子は、放射線療法と相乗的に作用する。

【０２０１】

本明細書に記載の二重特異性アゴニストＣＤ４０結合分子は、医療実施基準に合致するように製剤化され、用量決定され、投与される。これに関連して考慮すべき因子としては、治療される特定の障害、治療される特定の哺乳動物、個々の患者の臨床症状、障害の原因、薬剤の送達部位、投与方法、投与スケジュール、及び医療従事者に既知の他の因子が

挙げられる。抗体は、必ずではないが任意選択で、問題の障害を予防又は治療するために現在使用されている１又は複数の薬剤と一緒に製剤化される。このような他の薬剤の有効量は、製剤中に存在する抗体の量、障害又は治療の種類、及び上述のその他の因子によって決まる。これらは、一般に、本明細書に記載のものと同じ投与量及び投与経路で、又は本明細書に記載の投与量の約１～９９％で、又は適切であると経験的／臨床的に判断される任意の投与量及び任意の経路で使用される。

【０２０２】

製造品（キット）

本発明の別の態様では、上述した障害の治療、予防、及び／又は診断に有用な材料を含むキットが提供される。このキットは、少なくとも１つの容器と、該容器に貼られているか又は付随するラベル又は添付文書を備える。適切な容器としては、例えば、ボトル、バイアル、シリンジ、ＩＶ液バッグ等が含まれる。これらの容器は、ガラス又はプラスチックなどの様々な材料から形成されたものでよい。容器は、単独で又は別の組成物との併用で、状態の治療、予防及び／又は診断に有効な組成物を収容し、無菌のアクセスポートを有していてもよい（例えば、容器は、皮下注射針により穿孔可能な、ストッパーを有する静注液バッグ又はバイアルであってよい）。キット中の活性剤は、本明細書に記載の二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子である。更に、本キットには、本明細書に記載の二重特異性アゴニストＣＤ４０抗原結合分子を放射線療法と併用して使用するための説明書が含まれる。ラベル又は添付文書は、選択した状態を治療するために本発明の組成物がどのように使用されるかを示し、併用療法で該組成物を使用するための指示書を提供する。

【０２０３】

代替的に又は追加的に、キットは、薬学的に許容されるバッファー、例えば注射用静菌水（ＢＷＦＩ）、リン酸緩衝生理食塩水、リンゲル液及びブドウ糖液を含む第２の（又は第３の）容器を更に備えていてもよい。キットは、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針、及びシリンジを含む、商業的な及び使用者の観点から望ましい他の材料を更に含んでいてもよい。

表Ｂ（配列）：

配列番号	名称	配列
1	hu CD40 CDR-H1	GYYIH
2	hu CD40 CDR-H2	RVIPNAGGTSYNQKFKG
3	hu CD40 CDR-H3	EGIYW
4	hu CD40 CDR-L1	RSSQSLVHSNGNTFLH
5	hu CD40 CDR-L2	TVSNRFS
6	hu CD40 CDR-L3	SQTTHVPWT
7	hu CD40 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGY YIHWVRQAPGQSLEWMGRVIPNAGGTSYNQKF KGRVTLTVDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYC AREGIYWWGQGTTVTVSS
8	hu CD40 VL	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLVHS NGNTFLHWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFSGVP DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQT THVPWTFGGGTKVEIK
9	FAP(212) CDR-H1	DYNMD
10	FAP(212) CDR-H2	DIYPNTGGTIYNQKFKG
11	FAP(212) CDR-H3	FRGIHYAMDY
12	FAP(212) CDR-L1	RASESVDNYGLSFIN
13	FAP(212) CDR-L2	GTSNRGS
14	FAP(212) CDR-L3	QQSNEVPYT
15	ヒト化 FAP (212)VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTLTDY NMDWVRQAPGQGLEWIGDIYPNTGGTIYNQKF KGRVTMTIDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYC TRFRGIHYAMDYWGQGTTVTVSS
16	ヒト化 FAP (212)VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDNY GLSFINWFQQKPGQAPRLLIYGTSNRGSGIPA RFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYFCQQSN EVPYTFGGGTKVEIK
17	FAP(28H1)CDR-H1	SHAMS
18	FAP(28H1)CDR-H2	AIWASGEQYYADSVKG
19	FAP(28H1)CDR-H3	GWLGNFDY
20	FAP(28H1)CDR-L1	RASQSVSRSYLA
21	FAP(28H1)CDR-L2	GASTRAT
22	FAP(28H1)CDR-L3	QQGQVIPPT
23	FAP(28H1) VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSH AMSWVRQAPGKGLEWVSAIWASGEQYYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA KGWLGNFDYWGQGTLVTVSS
24	FAP(28H1) VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSRS YLAWYQQKPGQAPRLLIIGASTRATGIPDRFS GSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGQVIP PTFGQGTKVEIK
25	FAP(4B9) CDR-H1	SYAMS
26	FAP(4B9) CDR-H2	AIIGSGASTYYADSVKG
27	FAP(4B9) CDR-H3	GWFGGFNY
28	FAP(4B9) CDR-L1	RASQSVTSSYLA
29	FAP(4B9) CDR-L2	VGSRRAT

配列番号	名称	配列
30	FAP(4B9) CDR-L3	QQGIMLPPT
31	FAP(4B9) VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY AMSWVRQAPGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSV KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKGWFGGFNYWGQGTLVTVSS
32	FAP(4B9) VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSS YLAWYQQKPGQAPRLLINVGSRRATGIPDRFS GSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLP PTFGQGTKVEIK
33	hu CD40	UniProt 番号 P25942、ﾊﾞｰｼﾞｮﾝ 200 MVRLPLQCVL WGCLLTAVHP EPPTACREKQ YLINSQCCSL CQPGQKLVSD CTEFTETECL PCGESEFLDT WNRETHCHQH KYCDPNLGLR VQQKGTSETD TICTCEEGWH CTSEACESCV LHRSCSPGFG VKQIATGVSD TICEPCPVGF FSNVSSAFEK CHPWTSCETK DLVVQQAGTN KTDVVCGPQD RLRALVVIPI IFGILFAILL VLVFIKKVAK KPTNKAPHPK QEPQEINFPD DLPGSNTAAP VQETLHGCQP VTQEDGKESR ISVQERQ
34	hu FAP	UniProt 番号 Q12884、ﾊﾞｰｼﾞｮﾝ 168 MKTWVKIVFG VATSAVLALL VMCIVLRPSR VHNSEENTMR ALTLKDILNG TFSYKTFFPN WISGQEYLHQ SADNNIVLYN IETGQSYTIL SNRTMKSVNA SNYGLSPDRQ FVYLESDYSK LWRYSYTATY YIYDLSNGEF VRGNELPRPI QYLCWSPVGS KLAYVYQNNI YLKQRPGDPP FQITFNGREN KIFNGIPDWV YEEEMLATKY ALWWSPNGKF LAYAEFNDTD IPVIAYSYYG DEQYPRTINI PYPKAGAKNP VVRIFIIDTT YPAYVGPQEV PVPAMIASSD YYFSWLTWVT DERVCLQWLK RVQNVSVLSI CDFREDWQTW DCPKTQEHIE ESRTGWAGGF FVSTPVFSYD AISYYKIFSD KDGYKHIHYI KDTVENAIQI TSGKWEAINI FRVTQDSLFY SSNEFEEYPG RRNIYRISIG SYPPSKKCVT CHLRKERCQY YTASFSDYAK YYALVCYGPG IPISTLHDGR TDQEIKILEE NKELENALKN IQLPKEEIKK LEVDEITLWY KMILPPQFDR SKKYPLLIQV YGGPCSQSVR SVFAVNWISY LASKEGMVIA LVDGRGTAFQ GDKLLYAVYR KLGVYEVEDQ ITAVRKFIEM GFIDEKRIAI WGWSYGGYVS SLALASGTGL FKCGIAVAPV SSWEYYASVY TERFMGLPTK DDNLEHYKNS TVMARAEYFR NVDYLLIHGT ADDNVHFQNS AQIAKALVNA QVDFQAMWYS DQNHGLSGLS TNHLYTHMTH FLKQCFSLSD
35	huFAP 外部ﾄﾞﾒｲﾝ+ﾎﾟﾘ-lys-ﾀｸﾞ+his_6-ﾀｸﾞ	RPSRVHNSEENTMRALTLKDILNGTFSYKTFF PNWISGQEYLHQSADNNIVLYNIETGQSYTIL SNRTMKSVNASNYGLSPDRQFVYLESDYSKLW

配列番号	名称	配列
		RYSYTATYYIYDLSNGEFVRGNELPRPIQYLC WSPVGSKLAYVYQNNIYLKQRPGDPPFQITFN GRENKIFNGIPDWVYEEEMLATKYALWWSPNG KFLAYAEFNDTDIPVIAYSYYGDEQYPRTINI PYPKAGAKNPVVRIFIIDTTYPAYVGPQEVPV PAMIASSDYYFSWLTWVTDERVCLQWLKRVQN VSVLSICDFREDWQTWDCPKTQEHIEESRTGW AGGFFVSTPVFSYDAISYYKIFSDKDGYKHIH YIKDTVENAIQITSGKWEAINIFRVTQDSLFY SSNEFEEYPGRRNIYRISIGSYPPSKKCVTCH LRKERCQYYTASFSDYAKYYALVCYGPGIPIS TLHDGRTDQEIKILEENKELENALKNIQLPKE EIKKLEVDEITLWYKMILPPQFDRSKKYPLLI QVYGGPCSQSVRSVFAVNWISYLASKEGMVIA LVDGRGTAFQGDKLLYAVYRKLGVYEVEDQIT AVRKFIEMGFIDEKRIAIWGWSYGGYVSSLAL ASGTGLFKCGIAVAPVSSWEYYASVYTERFMG LPTKDDNLEHYKNSTVMARAEYFRNVDYLLIH GTADDNVHFQNSAQIAKALVNAQVDFQAMWYS DQNHGLSGLSTNHLYTHMTHFLKQCFSLSDGK KKKKKGHHHHHH
36	ﾏｳｽ FAP	UniProt 番号 P97321
37	ﾏｳｽ FAP 外部ﾄﾞﾒｲﾝ+ﾎﾟﾘ-lys-ﾀｸﾞ+his_6-ﾀｸﾞ	RPSRVYKPEGNTKRALTLKDILNGTFSYKTYF PNWISEQEYLHQSEDDNIVFYNIETRESYIIL SNSTMKSVNATDYGLSPDRQFVYLESDYSKLW RYSYTATYYIYDLQNGEFVRGYELPRPIQYLC WSPVGSKLAYVYQNNIYLKQRPGDPPFQITYT GRENRIFNGIPDWVYEEEMLATKYALWWSPDG KFLAYVEFNDSDIPIIAYSYYGDGQYPRTINI PYPKAGAKNPVVRVFIVDTTYPHHVGPMEVPV PEMIASSDYYFSWLTWVSSERVCLQWLKRVQN VSVLSICDFREDWHAWECPKNQEHVEESRTGW AGGFFVSTPAFSQDATSYYKIFSDKDGYKHIH YIKDTVENAIQITSGKWEAIYIFRVTQDSLFY SSNEFEGYPGRRNIYRISIGNSPPSKKCVTCH LRKERCQYYTASFSYKAKYYALVCYGPGLPIS TLHDGRTDQEIQVLEENKELENSLRNIQLPKV EIKKLKDGGLTFWYKMILPPQFDRSKKYPLLI QVYGGPCSQSVKSVFAVNWITYLASKEGIVIA LVDGRGTAFQGDKFLHAVYRKLGVYEVEDQLT AVRKFIEMGFIDEERIAIWGWSYGGYVSSLAL ASGTGLFKCGIAVAPVSSWEYYASIYSERFMG LPTKDDNLEHYKNSTVMARAEYFRNVDYLLIH GTADDNVHFQNSAQIAKALVNAQVDFQAMWYS DQNHGILSGRSQNHLYTHMTHFLKQCFSLSDG KKKKKKGHHHHHH
38	ｶﾆｸｲｻﾞﾙ FAP 外部ﾄﾞﾒｲﾝ+ﾎﾟﾘ-lys-ﾀｸﾞ+his_6-ﾀｸﾞ	RPPRVHNSEENTMRALTLKDILNGTFSYKTFF PNWISGQEYLHQSADNNIVLYNIETGQSYTIL SNRTMKSVNASNYGLSPDRQFVYLESDYSKLW RYSYTATYYIYDLSNGEFVRGNELPRPIQYLC

配列番号	名称	配列
		WSPVGSKLAYVYQNNIYLKQRPGDPPFQITFN GRENKIFNGIPDWVYEEEMLATKYALWWSPNG KFLAYAEFNDTDIPVIAYSYYGDEQYPRTINI PYPKAGAKNPFVRIFIIDTTYPAYVGPQEVPV PAMIASSDYYFSWLTWVTDERVCLQWLKRVQN VSVLSICDFREDWQTWDCPKTQEHIEESRTGW AGGFFVSTPVFSYDAISYYKIFSDKDGYKHIH YIKDTVENAIQITSGKWEAINIFRVTQDSLFY SSNEFEDYPGRRNIYRISIGSYPPSKKCVTCH LRKERCQYYTASFSDYAKYYALVCYGPGIPIS TLHDGRTDQEIKILEENKELENALKNIQLPKE EIKKLEVDEITLWYKMILPPQFDRSKKYPLLI QVYGGPCSQSVRSVFAVNWISYLASKEGMVIA LVDGRGTAFQGDKLLYAVYRKLGVYEVEDQIT AVRKFIEMGFIDEKRIAIWGWSYGGYVSSLAL ASGTGLFKCGIAVAPVSSWEYYASVYTERFMG LPTKDDNLEHYKNSTVMARAEYFRNVDYLLIH GTADDNVHFQNSAQIAKALVNAQVDFQAMWYS DQNHGLSGLSTNHLYTHMTHFLKQCFSLSDGK KKKKKGHHHHHH
39	ﾏｳｽ CD40	UniProt P27512、ﾊﾞｰｼﾞｮﾝ 160 MVSLPRLCAL WGCLLTAVHL GQCVTCSDKQ YLHDGQCCDL CQPGSRLTSH CTALEKTQCH PCDSGEFSAQ WNREIRCHQH RHCEPNQGLR VKKEGTAESD TVCTCKEGQH CTSKDCEACA QHTPCIPGFG VMEMATETTD TVCHPCPVGF FSNQSSLFEK CYPWTSCEDK NLEVLQKGTS QTNVICGLKS RMRALLVIPV VMGILITIFG VFLYIKKVVK KPKDNEILPP AARRQDPQEM EDYPGHNTAA PVQETLHGCQ PVTQEDGKES RISVQERQVT DSIALRPLV
40	ﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞﾘﾝｶｰ(G4S)	GGGGS
41	ﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞﾘﾝｶｰ $(G4S)_2$	GGGGSGGGGS
42	ﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞﾘﾝｶｰ $(SG4)_2$	SGGGGSGGGG
43	ﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞﾘﾝｶｰ $G4(SG4)_2$	GGGGSGGGGSGGGG
44	ﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞﾘﾝｶｰ	GSPGSSSSGS
45	$(G4S)_3$ ﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞﾘﾝｶｰ	$GGGGSGGGGSGGGGS_3$
46	$(G4S)_4$ ﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞﾘﾝｶｰ	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
47	ﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞﾘﾝｶｰ	GSGSGSGS
48	ﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞﾘﾝｶｰ	GSGSGNGS
49	ﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞﾘﾝｶｰ	GGSGSGSG
50	ﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞﾘﾝｶｰ	GGSGSG
51	ﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞﾘﾝｶｰ	GGSG
52	ﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞﾘﾝｶｰ	GGSGNGSG
53	ﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞﾘﾝｶｰ	GGNGSGSG
54	ﾍﾟﾌﾟﾁﾄﾞﾘﾝｶｰ	GGNGSG

配列番号	名称	配列
55	mu CD40 CDR-H1	DYYMA
56	mu CD40 CDR-H2	SISYDGSSTYYRDSVKG
57	mu CD40 CDR-H3	HSSYFDY
58	mu CD40 CDR-L1	RASDSVSTLMH
59	mu CD40 CDR-L2	LASHLES
60	mu CD40 CDR-L3	QQSWNDPWT
61	(P1AE1689)軽鎖交差 VH-C ｶｯﾊﾟ	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTLTDY NMDWVRQAPGQGLEWIGDIYPNTGGTIYNQKF KGRVTMTIDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYC TRFRGIHYAMDYWGQGTTVTVSSASVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC
62	VL(CD40)軽鎖(荷電)	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLVHS NGNTFLHWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFSGVP DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQT THVPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDR KLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
63	VH(CD40)(VHCH1 荷電)Fc ﾉﾌﾞ _PGLALA_(P1AE1689)(VL-CH1)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGY YIHWVRQAPGQSLEWMGRVIPNAGGTSYNQKF KGRVTLTVDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYC AREGIYWWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCR DELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGE RATLSCRASESVDNYGLSFINWFQQKPGQAPR LLIYGTSNRGSGIPARFSGSGSGTDFTLTISS LEPEDFAVYFCQQSNEVPYTFGGGTKVEIKSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSC
64	VH(CD40)(VHCH1 荷電)Fc ﾎｰﾙ_PGLALA	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGY YIHWVRQAPGQSLEWMGRVIPNAGGTSYNQKF KGRVTLTVDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYC AREGIYWWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCP

配列番号	名称	配列
		PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSR DELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
65	VH(CD40)(VHCH1荷電_VH1a(CD40)(VHCH1荷電)-Fcノブ_PGLALA_(P1AE1689)(VL-CH1)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGY YIHWVRQAPGQSLEWMGRVIPNAGGTSYNQKF KGRVTLTVDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYC AREGIYWWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDGGGGSG GGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYS FTGYYIHWVRQAPGQSLEWMGRVIPNAGGTSY NQKFKGRVTLTVDKSISTAYMELSRLRSDDTA VYYCAREGIYWWGQGTTVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKT HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSL SPGERATLSCRASESVDNYGLSFINWFQQKPG QAPRLLIYGTSNRGSGIPARFSGSGSGTDFTL TISSLEPEDFAVYFCQQSNEVPYTFGGGTKVE IKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKVEPKSC
66	VH(CD40)(VHCH1荷電)_VH(CD40)(VHCH1荷電)-Fcホール_PGLALA	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGY YIHWVRQAPGQSLEWMGRVIPNAGGTSYNQKF KGRVTLTVDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYC AREGIYWWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDGGGGSG GGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYS FTGYYIHWVRQAPGQSLEWMGRVIPNAGGTSY NQKFKGRVTLTVDKSISTAYMELSRLRSDDTA VYYCAREGIYWWGQGTTVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKT HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR

配列番号	名称	配列
		TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTL PPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
67	28H1 軽鎖交差 VH-C ｶｯﾊﾟ	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSH AMSWVRQAPGKGLEWVSAIWASGEQYYADSVK GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA KGWLGNFDYWGQGTLVTVSSASVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
68	VH(CD40)(VHCH1 荷電)Fc ﾉﾌﾞ _PGLALA_28H1(VL-CH1)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTGY YIHWVRQAPGQSLEWMGRVIPNAGGTSYNQKF KGRVTLTVDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYC AREGIYWWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCP PCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCR DELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGS GGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSLSPGE RATLSCRASQSVSRSYLAWYQQKPGQAPRLLI IGASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP EDFAVYYCQQGQVIPPTFGQGTKVEIKSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE PKSC
69	muCD40(FGK4.5)軽鎖	DTVLTQSPAL AVSPGERVTI SCRASDSVST LMHWYQQKPG QQPKLLIYLA SHLESGVPAR FSGSGSGTDF TLTIDPVEAD DTATYYCQQS WNDPWTFGGG TKLELKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEKHKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC
70	muCD40 VHCH1 荷電 _muCD40 VHCH1 荷電-Fc ﾉﾌﾞ _PGLALA_VH (28H1)	EVQLVESDGG LVQPGRSLKL PCAASGFTFS DYYMAWVRQA PTKGLEWVAS ISYDGSSTYY RDSVKGRFTI SRDNAKSTLY LQMDSLRSED TATYYCGRHS SYFDYWGQGV MVTVSSASTK GPSVFPLAPS SKSTSGGTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS LSSVVTVPSS SLGTQTYICN VNHKPSNTKV DKKVEPKSCD GGGGSGGGGS EVQLVESDGG

配列番号	名称	配列
		LVQPGRSLKL PCAASGFTFS DYYMAWVRQA PTKGLEWVAS ISYDGSSTYY RDSVKGRFTI SRDNAKSTLY LQMDSLRSED TATYYCGRHS SYFDYWGQGV MVTVSSASTK GPSVFPLAPS SKSTSGGTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS LSSVVTVPSS SLGTQTYICN VNHKPSNTKV DKKVEPKSCD KTHTCPPCPA PEAAGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALGAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPCRDELTKN QVSLWCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTPPVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGGGGGS GGGGSGGGGS GGGGSEVQLL ESGGGLVQPG GSLRLSCAAS GFTFSSHAMS WVRQAPGKGL EWVSAIWASG EQYYADSVKG RFTISRDNSK NTLYLQMNSL RAEDTAVYYC AKGWLGNFDY WGQGTLVTVS S
71	muCD40 VHCH1 荷電_muCD40 VHCH1 荷電-Fcﾌﾞ_PGLALA_VL (28H1)	EVQLVESDGG LVQPGRSLKL PCAASGFTFS DYYMAWVRQA PTKGLEWVAS ISYDGSSTYY RDSVKGRFTI SRDNAKSTLY LQMDSLRSED TATYYCGRHS SYFDYWGQGV MVTVSSASTK GPSVFPLAPS SKSTSGGTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS LSSVVTVPSS SLGTQTYICN VNHKPSNTKV DKKVEPKSCD GGGGSGGGGS EVQLVESDGG LVQPGRSLKL PCAASGFTFS DYYMAWVRQA PTKGLEWVAS ISYDGSSTYY RDSVKGRFTI SRDNAKSTLY LQMDSLRSED TATYYCGRHS SYFDYWGQGV MVTVSSASTK GPSVFPLAPS SKSTSGGTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS LSSVVTVPSS SLGTQTYICN VNHKPSNTKV DKKVEPKSCD KTHTCPPCPA PEAAGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALGAP IEKTISKAKG QPREPQVCTL PPSRDELTKN QVSLSCAVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTPPVLDSD GSFFLVSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGGGGGS GGGGSGGGGS GGGGSEIVLT QSPGTLSLSP GERATLSCRA SQSVSRSYLA WYQQKPGQAP RLLIIGASTR ATGIPDRFSG SGSGTDFTLT ISRLEPEDFA VYYCQQGQVI PPTFGQGTKV EIK
72	muCD40 VHCH1 荷電_muCD40 VHCH1 荷電-Fcﾌﾞ_PGLALA_VH (DP47)	EVQLVESDGG LVQPGRSLKL PCAASGFTFS DYYMAWVRQA PTKGLEWVAS ISYDGSSTYY RDSVKGRFTI SRDNAKSTLY LQMDSLRSED TATYYCGRHS SYFDYWGQGV MVTVSSASTK

配列番号	名称	配列
		GPSVFPLAPS SKSTSGGTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS LSSVVTVPSS SLGTQTYICN VNHKPSNTKV DKKVEPKSCD GGGGSGGGGS EVQLVESDGG LVQPGRSLKL PCAASGFTFS DYYMAWVRQA PTKGLEWVAS ISYDGSSTYY RDSVKGRFTI SRDNAKSTLY LQMDSLRSED TATYYCGRHS SYFDYWGQGV MVTVSSASTK GPSVFPLAPS SKSTSGGTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS LSSVVTVPSS SLGTQTYICN VNHKPSNTKV DKKVEPKSCD KTHTCPPCPA PEAAGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALGAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPCRDELTKN QVSLWCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTPPVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGGGGGS GGGGSGGGGS GGGGSEVQLL ESGGGLVQPG GSLRLSCAAS GFTFSSYAMS WVRQAPGKGL EWVSAISGSG GSTYYADSVK GRFTISRDNS KNTLYLQMNS LRAEDTAVYY CAKGSGFDYW GQGTLVTVSS
73	muCD40 VHCH1 荷電_muCD40 VHCH1 荷電-Fcﾌﾞ_PGLALA_VL (DP47)	EVQLVESDGG LVQPGRSLKL PCAASGFTFS DYYMAWVRQA PTKGLEWVAS ISYDGSSTYY RDSVKGRFTI SRDNAKSTLY LQMDSLRSED TATYYCGRHS SYFDYWGQGV MVTVSSASTK GPSVFPLAPS SKSTSGGTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS LSSVVTVPSS SLGTQTYICN VNHKPSNTKV DKKVEPKSCD GGGGSGGGGS EVQLVESDGG LVQPGRSLKL PCAASGFTFS DYYMAWVRQA PTKGLEWVAS ISYDGSSTYY RDSVKGRFTI SRDNAKSTLY LQMDSLRSED TATYYCGRHS SYFDYWGQGV MVTVSSASTK GPSVFPLAPS SKSTSGGTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS LSSVVTVPSS SLGTQTYICN VNHKPSNTKV DKKVEPKSCD KTHTCPPCPA PEAAGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALGAP IEKTISKAKG QPREPQVCTL PPSRDELTKN QVSLSCAVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTPPVLDSD GSFFLVSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGGGGGS GGGGSGGGGS GGGGSEIVLT QSPGTLSLSP GERATLSCRA SQSVSSSYLA WYQQKPGQAP RLLIYGASSR ATGIPDRFSG SGSGTDFTLT ISRLEPEDFA VYYCQQYGSS PLTFGQGTKV EIK

配列番号	名称	配列
74	FAP(28H1)軽鎖交差 VH-CL	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SHAMSWVRQA PGKGLEWVSA IWASGEQYYA DSVKGRFTIS RDNSKNTLYL QMNSLRAEDT AVYYCAKGWL GNFDYWGQGT LVTVSSASDA APTVSIFPPS SEQLTSGGAS VVCFLNNFYP KDINVKWKID GSERQNGVLN SWTDQDSKDS TYSMSSTLTL TKDEYERHNS YTCEATHKTS TSPIVKSFNR NEC
75	VL (CD40)軽鎖 (電荷あり)	DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCRSSQSLV HSNGNTFLHW YLQKPGQSPQ LLIYTVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YFCSQTTHVP WTFGGGTKVE IKRADAAPTV SIFPPSSRKL TSGGASVVCF LNNFYPKDIN VKWKIDGSER QNGVLNSWTD QDSKDSTYSM SSTLTLTKDE YERHNSYTCE ATHKTSTSPI VKSFNRNEC
76	VH (CD40) (VHCH1 荷電) Fc ﾉﾌﾞ_PGLALA FAP(28H1) (VL-CH1)	QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT GYYIHWVRQA PGQSLEWMGR VIPNAGGTSY NQKFKGRVTL TVDKSISTAY MELSRLRSDD TAVYYCAREG IYWWGQGTTV TVSSAKTTPP SVYPLAPGSA AQTNSMVTLG CLVEGYFPEP VTVTWNSGSL SSGVHTFPAV LQSDLYTLSS SVTVPSSTWP SQTVTCNVAH PASSTKVDEK IVPRDCGCKP CICTVPEVSS VFIFPPKPKD VLTITLTPKV TCVVVAISKD DPEVQFSWFV DDVEVHTAQT KPREEQINST FRSVSELPIM HQDWLNGKEF KCRVNSAAFG APIEKTISKT KGRPKAPQVY TIPPPKEQMA KDKVSLTCMI TNFFPEDITV EWQWNGQPAE NYDNTQPIMD TDGSYFVYSD LNVQKSNWEA GNTFTCSVLH EGLHNHHTEK SLSHSPGGGG GSGGGGSGGG GSGGGGSEIV LTQSPGTLSL SPGERATLSC RASQSVSRSY LAWYQQKPGQ APRLLIIGAS TRATGIPDRF SGSGSGTDFT LTISRLEPED FAVYYCQQGQ VIPPTFGQGT KVEIKSSAKT TPPSVYPLAP GSAAQTNSMV TLGCLVKGYF PEPVTVTWNS GSLSSGVHTF PAVLQSDLYT LSSSVTVPSS TWPSQTVTCN VAHPASSTKV DKKIVPRDC
77	VH(CD40)(VHCH1 電荷あり)Fc ﾎｰﾙ_PGLALA	QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT GYYIHWVRQA PGQSLEWMGR VIPNAGGTSY NQKFKGRVTL TVDKSISTAY MELSRLRSDD TAVYYCAREG IYWWGQGTTV TVSSAKTTPP SVYPLAPGSA AQTNSMVTLG CLVEGYFPEP VTVTWNSGSL SSGVHTFPAV LQSDLYTLSS SVTVPSSTWP SQTVTCNVAH PASSTKVDEK IVPRDCGCKP CICTVPEVSS VFIFPPKPKD VLTITLTPKV TCVVVAISKD DPEVQFSWFV DDVEVHTAQT KPREEQINST FRSVSELPIM HQDWLNGKEF KCRVNSAAFG APIEKTISKT KGRPKAPQVY TIPPPKKQMA KDKVSLTCMI

配列番号	名称	配列
		TNFFPEDITV EWQWNGQPAE NYKNTQPIMK TDGSYFVYSK LNVQKSNWEA GNTFTCSVLH EGLHNHHTEK SLSHSPG
78	mu CD40 VH	EVQLVESDGG LVQPGRSLKL PCAASGFTFS DYYMAWVRQA PTKGLEWVAS ISYDGSSTYY RDSVKGRFTI SRDNAKSTLY LQMDSLRSED TATYYCGRHS SYFDYWGQGV MVTVSS
79	mu CD40 VL	DTVLTQSPAL AVSPGERVTI SCRASDSVST LMHWYQQKPG QQPKLLIYLA SHLESGVPAR FSGSGSGTDF TLTIDPVEAD DTATYYCQQS WNDPWTFGGG TKLELK
80	FAP(212) VH	EVLLQQSGPELVKPGASVKIACKASGYTLTDY NMDWVRQSHGKSLEWIGDIYPNTGGTIYNQKF KGKATLTIDKSSSTAYMDLRSLTSEDTAVYYC TRFRGIHYAMDYWGQGTSVTVSS
81	FAP(212) VL	DIVLTQSPVSLAVSLGQRATISCRASESVDNY GLSFINWFQQKPGQPPKLLIYGTSNRGSGVPA RFSGSGSGTDFSLNIHPMEEDDTAMYFCQQSN EVPYTFGGGTNLEIK

【０２０４】

ヒト免疫グロブリン軽鎖及び重鎖のヌクレオチド配列に関する一般的な情報は、以下に記載されている：Ｋａｂａｔ，Ｅ．Ａ．，ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，５ｔｈ ｅｄ．，Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ（１９９１）。抗体鎖のアミノ酸は、上記のＫａｂａｔ（Ｋａｂａｔ，Ｅ．Ａ．，ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，５ｔｈ Ｅｄ．Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅ，Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ（１９９１））による番号付けシステムに従って番号付けされ、呼ばれる。

＊＊＊

【０２０５】

以下は、本発明の方法及び組成物の例である。先に提供した一般的な説明を前提として様々な他の実施態様が実施され得ることが理解される。

【０２０６】

組換えＤＮＡ技術

Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ ｍａｎｕａｌ；Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９８９に記載されているように、標準的な方法を用いてＤＮＡを操作した。分子生物学的試薬を製造業者の説明書に従って使用した。ヒト免疫グロブリンの軽鎖及び重鎖のヌクレオチド配列に関する一般的な情報は、Ｋａｂａｔ，Ｅ．Ａ．ｅｔ ａｌ．，（１９９１）Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，Ｆｉｆｔｈ Ｅｄ．，ＮＩＨ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ Ｎｏ９１－３２４２に記載されている。

【０２０７】

ＤＮＡ配列決定
ＤＮＡ配列を、二本鎖配列決定によって決定した。
【０２０８】
遺伝子合成
所望の遺伝子セグメントは、適切なテンプレートを使用したＰＣＲによって生成されたか、又はＧｅｎｅａｒｔ社（ドイツ、レーゲンスブルク）によって、合成オリゴヌクレオチド及びＰＣＲ産物から自動遺伝子合成で合成された。正確な遺伝子配列が入手できない場合は、最も近いホモログの配列に基づいてオリゴヌクレオチドプライマーを設計し、適切な組織に由来するＲＮＡから、ＲＴ－ＰＣＲにより遺伝子を単離した。特異な制限エンドヌクレアーゼ切断部位に隣接する遺伝子セグメントを、標準的なクローニングベクター／配列決定ベクター内へとクローニングした。形質転換した細菌からプラスミドＤＮＡを精製し、ＵＶ分光法により濃度を決定した。サブクローニングした遺伝子断片のＤＮＡ配列を、ＤＮＡ配列決定によって確認した。対応する発現ベクターへのサブクローニングを可能にする適切な制限部位を有する遺伝子セグメントが設計された。全てのコンストラクトは、真核細胞における分泌のためのタンパク質を標的とするリーダーペプチドをコードする、５’末端ＤＮＡ配列を有するように設計された。
【０２０９】
細胞培養技術
Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌｏｇｙ（２０００），Ｂｏｎｉｆａｃｉｎｏ，Ｊ．Ｓ．，Ｄａｓｓｏ，Ｍ．，Ｈａｒｆｏｒｄ，Ｊ．Ｂ．，Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ－Ｓｃｈｗａｒｔｚ，Ｊ．ａｎｄ Ｙａｍａｄａ，Ｋ．Ｍ．（ｅｄｓ．），Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．に記載されているように、標準的な細胞培養技術を使用した。
【０２１０】
全ての遺伝子は、ＣＭＶプロモーターエンハンサー断片と組み合わされたＭＰＳＶコアプロモーターから成るキメラＭＰＳＶプロモーターの制御下で一過性に発現する。発現カセットには、ｃＤＮＡの３’末端の合成ポリＡシグナルも含まれている。発現ベクターは、ＥＢＮＡ（エプスタイン・バーウイルス核抗原）含有宿主細胞内にエピソーム複製のためのｏｒｉＰ領域も含んでいる。
【０２１１】
タンパク質精製
標準的なプロトコールを参照して、濾過された細胞培養上清からタンパク質を精製した。簡潔に述べると、抗体を、プロテインＡ－セファロースカラム（ＧＥ ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）に適用し、ＰＢＳで洗浄した。抗体の溶出はｐＨ２．８で達成され、その直後に試料を中和した。凝集したタンパク質を、サイズ排除クロマトグラフィー（Ｓｕｐｅｒｄｅｘ ２００、ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）によって、ＰＢＳ中、又は２０ｍＭ ヒスチジン、１５０ｍＭ ＮａＣｌ（ｐＨ６．０）中、単量体抗体から分離させた。単量体抗体画分をプールし、（必要な場合）例えばＭＩＬＬＩＰＯＲＥ Ａｍｉｃｏｎ Ｕｌｔｒａ（３０ ＭＷＣＯ）遠心濃縮機を使用して濃縮し、－２０℃又は－８０℃で凍結保存した。これらの試料の一部が、例えばＳＤＳ－ＰＡＧＥ、サイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）又は質量分析によるその後のタンパク質解析及び分析的特性評価のために提供された。
【０２１２】
ＳＤＳ－ＰＡＧＥ
ＮｕＰＡＧＥ（登録商標）Ｐｒｅ－Ｃａｓｔゲルシステム（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を、製造業者の説明書に従って使用した。特に、１０％又は４～１２％ＮｕＰＡＧＥ（登録商標）Ｎｏｖｅｘ（登録商標）Ｂｉｓ－ＴＲＩＳ Ｐｒｅ－Ｃａｓｔゲル（ｐＨ６．４）及びＮｕＰＡＧＥ（登録商標）ＭＥＳ（還元型ゲル、ＮｕＰＡＧＥ（登録商標）酸化防止剤ランニングバッファー添加剤含有）又はＭＯＰＳ（非還元型ゲル）ランニングバッファーを使用した。

【０２１３】
分析用サイズ排除クロマトグラフィー
抗体の凝集及びオリゴマー状態を決定するためのサイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）は、ＨＰＬＣクロマトグラフィーによって行った。簡潔に述べると、プロテインＡ精製抗体を、Ａｇｉｌｅｎｔ ＨＰＬＣ １１００システムの３００ｍＭ ＮａＣｌ、５０ｍＭ KH_2PO_4／K_2HPO_4（ｐＨ７．５）中のＴｏｓｏｈ ＴＳＫｇｅｌ Ｇ３０００ＳＷカラムに、又はＤｉｏｎｅｘ ＨＰＬＣシステムの２×ＰＢＳ中のＳｕｐｅｒｄｅｘ ２００カラム（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）に適用した。溶出したタンパク質をＵＶ吸光度とピーク面積の積分によって定量した。ＢｉｏＲａｄ Ｇｅｌ Ｆｉｌｔｒａｔｉｏｎ Ｓｔａｎｄａｒｄ １５１－１９０１を標準とした。
【０２１４】
質量分析
このセクションでは、正確な組み立てに重点を置いて、ＶＨ／ＶＬ交換を含む多重特異性抗体（ＶＨ／ＶＬ ＣｒｏｓｓＭａｂ）の特性評価について記載する。脱グリコシル化されたインタクトＣｒｏｓｓＭａｂ及び脱グリコシル化／プラスミン消化ＣｒｏｓｓＭａｂ或いは脱グリコシル化／ＬｙｓＣ限定消化ＣｒｏｓｓＭａｂのエレクトロスプレーイオン化質量分析（ＥＳＩ－ＭＳ）により、予想される一次構造の解析を行った。
【０２１５】
ＶＨ／ＶＬ ＣｒｏｓｓＭａｂを、Ｎ－グリコシダーゼＦを用い、リン酸又はＴｒｉｓバッファー中、３７℃で最大１７時間、タンパク質濃度１ｍｇ／ｍｌで脱グリコシル化した。プラスミン消化又はＬｙｓＣ（Ｒｏｃｈｅ）限定消化を、１００μｇの脱グリコシル化ＶＨ／ＶＬ ＣｒｏｓｓＭａｂを用い、Ｔｒｉｓバッファー（ｐＨ８）中で、それぞれ、室温で１２０時間、３７℃で４０分間行った。質量分析の前に、試料をセファデックスＧ２５カラム（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）でのＨＰＬＣによって脱塩した。ＴｒｉＶｅｒｓａ ＮａｎｏＭａｔｅ源（Ａｄｖｉｏｎ）を備えたｍａＸｉｓ ４Ｇ ＵＨＲ－ＱＴＯＦ ＭＳシステム（Ｂｒｕｋｅｒ Ｄａｌｔｏｎｉｋ）でのＥＳＩ－ＭＳによって、総質量を決定した。
【０２１６】
表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）（ＢＩＡＣＯＲＥ）を用いた、対応抗原に対する多重特異性抗体の結合及び結合親和性の決定
生成された抗体の対応抗原に対する結合が、ＢＩＡＣＯＲＥ装置（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ社、スウェーデン、ウプサラ）を用いる表面プラズモン共鳴により調査される。簡潔には、親和性測定のために、ヤギ抗ヒトＩｇＧ、ＪＩＲ １０９－００５－０９８抗体を、アミンカップリングでＣＭ５チップに固定化し、対応抗原に対する抗体を提示する。結合を、ＨＢＳバッファー（ＨＢＳ－Ｐ（１０ｍＭ ＨＥＰＥＳ、１５０ｍＭ ＮａＣｌ、０．００５％Ｔｗｅｅｎ ２０、ｐｈ７．４）、２５℃（又は代替的に３７℃）中で測定する。抗原（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ又は社内精製）を溶液中で様々な濃度で添加した。８０秒から３分の抗原注入により結合を測定し；３～１０分間にわたりＨＢＳバッファーでチップ表面を洗浄することにより解離を測定し、ラングミュア１：１結合モデルを用いてＫＤ値を測定した。システム固有のベースラインドリフトの補正及びノイズシグナル低減のために、ネガティブコントロールデータ（例：緩衝曲線）が試料曲線から差し引かれる。センサーグラムの解析のため及び親和性データの計算のために、対応するＢｉａｃｏｒｅ Ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ Ｓｏｆｔｗａｒｅが使用される。
【実施例】
【０２１７】
実施例１
線維芽細胞活性化タンパク質（ＦＡＰ）及びＣＤ４０を標的とする二重特異性抗原結合分子の調製、精製及び特性評価
線維芽細胞活性化タンパク質（ＦＡＰ）及びＣＤ４０を標的とする二重特異性抗原結合

分子を、国際公開第２０１８／１８５０４５号、国際公開第２０２０／０７００４１号又は国際公開第２０２０／０７００３５号に記載されているように調製した。

【０２１８】

特に、以下の分子を作製した。

ａ）線維芽細胞活性化タンパク質（ＦＡＰ）及びＣＤ４０を標的とする二重特異性抗原結合分子

二重特異性ＦＡＰ－ＣＤ４０抗体は、ＦｃのＣ末端にある１つのＦＡＰ結合部分と組み合わされた２つのＣＤ４０結合部分から成る２＋１フォーマット（図１Ｄ）又はＦｃのＣ末端にある１つのＦＡＰ結合部分と組み合わされた４つのＣＤ４０結合部分から成る４＋１フォーマットで調製した（図１Ａ又は１Ｂ）。二重特異性ＣＤ４０－ＦＡＰ抗体は、国際公開第２０２０／０７００４１号に開示されている抗ＦＡＰクローン２１２、又は国際公開第２０１２／０２０００６号に記載されたＦＡＰクローン４Ｂ９及び２８Ｈ１を含んでいた。４＋１及び２＋１分子を生成するために、ノブ・イントゥー・ホール技術を使用してヘテロ二量体化を実現した。Ｓ３５４Ｃ／Ｔ３６６Ｗ変異は第１の重鎖ＨＣ１（Ｆｃノブ重鎖）に導入され、Ｙ３４９Ｃ／Ｔ３６６Ｓ／Ｌ３６８Ａ／Ｙ４０７Ｖ変異は第２の重鎖ＨＣ２（Ｆｃホール重鎖）に導入された。二重特異性フォーマットとは無関係に、ＩｇＧ１については、国際公開第２０１２／１３０８３１号に記載されている方法に従って、エフェクターサイレントＦｃ（Ｐ３２９Ｇ；Ｌ２３４、２３４Ａ）を用いてＦｃγ受容体への結合を消失させた。二重特異性分子の配列を表１に示す。コントロール分子として、非標的バージョンもＦＡＰクローンを生殖系列ＤＰ４７に置き換えることによって適宜作製した。

表１：ＦＡＰ－ＣＤ４０二重特異性抗体

ｺﾝｽﾄﾗｸﾄ	構成要素
CD40 (P1AE0817) × FAP (P1AE1689) 2+1 二重特異性抗体(VH/VL 交差を有する C 末端交差 fab)	1 × 配列番号 61 の LC、2×配列番号 62 の LC 1 × 配列番号 63 の HC と 1×配列番号 64 の HC
CD40 (P1AE0817) × FAP (P1AE1689) 4+1 二重特異性抗体(VH/VL 交差を有する C 末端交差 fab)	1 × 配列番号 61 の LC、4×配列番号 62 の LC 1 × 配列番号 65 の HC と 1×配列番号 66 の HC
CD40 (P1AE0817) × FAP (28H1) 2+1 二重特異性抗体(VH/VL 交差を有する C 末端交差 fab)	1 × 配列番号 67 の LC、2×配列番号 62 の LC 1 × 配列番号 68 の HC と 1×配列番号 64 の HC

ｂ）マウスサロゲートとコントロール分子

同様に、マウスＣＤ４０（ＦＧＫ４．５）に結合する１つのＣＤ４０クローンとＦＡＰクローン２８Ｈ１とを含む二重特異性ＦＡＰ－ＣＤ４０抗体を調製し、マウスを用いた試験に使用した。これらの分子は、ＦｃのＣ末端にある１つのＦＡＰ結合部分と組み合わされた２つのＣＤ４０結合部分から成る２＋１フォーマット（図１Ｄ）又は１つのＦＡＰ結

合部分と組み合わされた４つのＣＤ４０結合部分から成る４＋１フォーマット（ＶＨとＶＬがＦｃのＣ末端で接続されている；図１Ｂ）で調製した。これらの二重特異性分子の配列を表２に示す。コントロール分子として、非標的バージョンもＦＡＰクローンを生殖系列ＤＰ４７に置き換えることによって適宜作製した。

表２：マウスサロゲートとコントロール分子

ｺﾝｽﾄﾗｸﾄ	構成要素
muCD40 × FAP (28H1) 4+1 二重特異性抗体(ﾉﾌﾞに VH､ﾎｰﾙに VL) (P1AD9139)	4 × 配列番号 69 の LC 1 × 配列番号 70 の HC､及び 1 × 配列番号 71 の HC
muCD40 × DP47 4+1 二重特異性抗体 (ﾉﾌﾞに VH､ﾎｰﾙに VL) (P1AE2425)	4 × 配列番号 69 の LC 1 × 配列番号 72 の HC､及び 1 × 配列番号 73 の HC
CD40 (P1AE0817) × FAP (28H1) 2+1 mu IgG1 DAPG 二重特異性抗体 (VH/VL 交差を有する C 末端交差 fab)(P1AE2302)	1 × 配列番号 74 の LC､2 × 配列番号 75 の LC 1 × 配列番号 76 の HC と 1 × 配列番号 77 の HC

【０２１９】

実施例２

ｍＥＥＲＬ９５腫瘍モデルで示された、ＦＡＰを標的とした抗ＣＤ４０抗原結合分子の放射線療法との併用によるｉｎ　ｖｉｖｏ　抗腫瘍有効性

２．１　材料及び方法

ＨＰＶ関連頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）の臨床関連マウスモデルであるｍＥＥＲＬ９５腫瘍細胞株を有するマウスにおける二重特異性ＦＡＰ標的抗ＣＤ４０抗原結合分子の、単独で又は少分割放射線療法レジメンとの併用によって治療有効性を得る能力を試験した。

【０２２０】

７～１１週齢の雌Ｃ５７ＢＬ／６Ｊマウスを Ｊａｎｖｉｅｒ　Ｌａｂｓから購入した。ヒト化ｈＣＤ４０Ｔｇマウスは、Ｒｏｃｈｅ　Ｇｌｙｃａｒｔ社（チューリッヒ）より提供された。Ｂａｔｆ３－／－マウスは、Ｈａｎｓ　Ａｃｈａ　Ｏｒｂｅａ博士（ローザンヌ大学）の好意により贈られたもので、ローザンヌ大学の施設内で飼育された。全ての動物実験は、スイスのヴォー州の獣医学当局により承認されたライセンスＶＤ３１７３ｊの下で実施された。

【０２２１】

ｍＥＥＲＬ９５細胞株は、ｍＥＥＲＬ保有Ｃ５７ＢＬ／６Ｊ雌の腫瘍外植片（Ｍｅｒｍｏｄ ｅｔ ａｌ., Ｉｎｔ. Ｊ. Ｃａｎｃｅｒ ２０１８, １４２, ２５１８-２５２８）に由来し、５％ウシ胎児血清（ＦＢＳ、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）及び１×ヒト角化細胞増殖補助剤（ＨＫＧＳ、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を補充したＤＭＥＭ／栄養混合Ｆ－１２（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）培地で培養された。ＴＣ－１細胞（Ｌｉｎ ｅｔ ａｌ., Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ １９９６, ５６, ２１-２６)は、２００９年にＴ．Ｃ．Ｗｕ（ジョンズ・ホプキンス大学）の好意により提供され、１０％ＦＢＳ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）、ペニシリン／ストレプトマイシン（Ｌｉｆｅ

Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）及び５×１０$^{-5}$Ｍ　２－メルカプトエタノール（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を補充したＲＰＭＩ　１６４０培地で培養された。両細胞株は、インキュベーター内で３７℃、５％CO_2で培養され、マイコプラズマを廃棄するために日常的に試験された。９０％のコンフルエンスに達した時点で細胞を採取し、マウスに接種した。

【０２２２】

腫瘍モデル及びｉｎ　ｖｉｖｏ治療

３０μＬのＨＢＳＳ（Ｈａｎｋ’ｓ　Ｂａｌａｎｃｅｄ　Ｓａｌｔ　Ｓｏｌｕｔｉｏｎ、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び２０μＬのマトリゲル（Ｃｏｒｎｉｎｇ）で再懸濁させた１×１０^{5}個のｍＥＥＲＬ９５又はＴＣ１細胞をマウスの頤下部に皮下注射した。腫瘍は、腫瘍移植後１０日目と１１日目に６Ｇｙの２回連続照射（２×６Ｇｙ）から成る少分割レジメンで照射された。Ｘｒａｄ－２２５ＣＸ－ＰＸｉ装置で、腫瘍を局所的に照射可能な１５ｍｍコリメーターを使用し、線量を送達した。

【０２２３】

１１日目に、ＦＡＰを標的とした二重特異性抗ｍｕＣＤ４０抗体（ＦＡＰ－ＣＤ４０）又は対応する非標的抗ＣＤ４０コントロール抗体（ＤＰ４７－ＣＤ４０）をそれぞれＰＢＳ中１８．３ｍｇ／ｋｇ、１０ｍｇ／ｋｇで単回ｉ．ｐ注射により、マウスを治療した。ｍＥＥＲＬ９５保有ｈｕＣＤ４０Ｔｇマウスに２×６Ｇｙレジメンで放射線を照射し、１３ｍｇ／ｋｇのＦＡＰ－ｈｕＣＤ４０を含むＰＢＳを１回ｉ．ｐ投与して治療した。腫瘍のサイズは週２回ノギスを用いて経過観察し、以下の式で体積を算出した：

Ｖ＝（縦×横^{2}）／２（Ｖ＝腫瘍体積）

【０２２４】

枯渇研究としては、免疫グロブリンアイソタイプコントロールとして用いた抗ＣＤ８βｍＡｂ（クローンＨ３５－１７－２）、抗ＣＤ４（クローンＧＫ１．５）又はＲａｔ　ＩｇＧ２ａ（クローン２Ａ３、ＢｉｏＸＣｅｌｌ）を２００μｇ／回、治療開始日の２日前と治療開始日当日にｍＥＥＲＬ９５保有マウスに投与した。これらの抗体の投与は、３日毎に２週間行われた。枯渇の効率は、１８日目に末梢血リンパ球のフローサイトメトリーで確認した。ＩＬ－１２を遮断するｉｎ　ｖｉｖｏ実験では、治療抗体投与の当日から１週間、ＰＢＳで希釈した５００μｇの抗ＩＬ－１２（クローンＣ１７．８、ＢｉｏＸＣｅｌｌ）をマウスに毎日投与した。免疫グロブリンアイソタイプコントロールとして、ラットＩｇＧ２ａ（クローン２Ａ３、ＢｉｏＸＣｅｌｌ）を同量使用した。

【０２２５】

腫瘍リチャレンジ

免疫記憶の発達を特徴づけるために、ＰＢＳで再懸濁させた１０^{6}個のｍＥＥＲＬ９５又は１０^{5}個のＴＣ－１腫瘍細胞を、治療後に原発腫瘍を拒絶したマウスの脇腹に皮下移植した。腫瘍の接種は、完全な応答の発生から約４０日後に実施した。腫瘍増殖は、ノギスで２～３日毎に測定することにより、した。

【０２２６】

細胞単離

腫瘍及び所属リンパ節を、腫瘍移植後１０、１６又は１８日目に採取した。採取した腫瘍とリンパ節を、１ｍｇ／ｍｌのＣｏｌｌａｇｅｎａｓｅ－Ｄ及び４０μｇ／ｍｌのＤＮａｓｅ－Ｉ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）と、それぞれ４５分間及び２０分間、３７℃でインキュベートした。その後、機械的に脱凝集させ、７０μｍのセルストレーナー（ファルコン、ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）を用いて濾過し、単一細胞懸濁液を得た。更に、腫瘍浸潤リンパ球を３５％パーコール勾配で間質細胞から分離した。必要に応じて、フローサイトメトリー染色前に、赤血球をＲＢＣバッファー（Ｑｉａｇｅｎ）を用いてＲＴで３分間溶解させた。

【０２２７】

フローサイトメトリー

単一細胞懸濁液を、まずＦＡＣＳバッファー（２％ＦＣＳと２ｍＭ　ＥＤＴＡを含むＰ

ＢＳ）中、氷上で１５分間ＦｃＲ－Ｂｌｏｃｋ（抗ＣＤ１６／３２　クローン２．４Ｇ２、自家製）と共にインキュベートした．免疫集団の特徴を特徴づけるため、試料を次の抗体パネルで、氷上、暗所で２０分間、表面染色した：Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ製のＣＤ１１ｃ－ＢＶ４２１（クローンＮ４１８）、ＣＤ８－ＢＶ５１０（クローン５３－６．７）、Ｆ４／８０－ＢＶ６０５（クローンＢＭ８）、ＮＫ１．１－ＢＶ６５０（クローンＰＫ１３６）、ＣＤ１１ｂ－ＢＶ７１１（クローンＭ１／７０）、ＣＤ４－ＢＶ７８５（クローンＲＭ４－５）、ＣＤ１９－ＢＶ７８５（クローン６Ｄ５）、Ｌｙ６Ｇ－ＦＩＴＣ（クローン１Ａ８）、ＣＤ４５－ＰｅｒＣＰ（クローン３０－Ｆ１１）、Ｌｙ６Ｃ－ＡＦ７００（クローンＨＫ１．４）、ＩＡ／ＩＥ－ＡＰＣ－Ｃｙ７（クローンＭ５／１１４．１５．２）、及びＢ２２０－ＡＰＣ（クローンＲＡ３－Ｂ２）；Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ製のＣＤ８０－Ｐｅ－Ｖｉｏ７７０（クローン１６－１０Ａ）；ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ製のＣＤ１０３－ＰＥ（クローン２Ｅ７）、ＣＤ３－ＰＥ－Ｃｙ５．５（クローン１４５－２Ｃ１１）、及びＦｏｘｐ３－ＰｅＦｌｕｏｒ－６１０（クローンＦＪＫ－１６５）。Ｆｏｘｐ３の細胞内染色を、Ｆｏｘｐ３／Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎ　Ｆａｃｔｏｒ　Ｓｔａｉｎｉｎｇ　Ｂｕｆｆｅｒ　Ｓｅｔ（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）を用いて、製造者の説明書に従い行った。生存能マーカーとして、ＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ™　Ｆｉｘａｂｌｅ　Ｂｌｕｅ　Ｄｅａｄ　Ｃｅｌｌ　Ｓｔａｉｎ　Ｋｉｔ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を使用した。

【０２２８】

ｅｘ　ｖｉｖｏ刺激アッセイとしては、腫瘍及びリンパ節由来のリンパ球をｍＥＥＲＬ９５細胞と１０：１の比率で共培養した。ｍＥＥＲＬ９５細胞は、予めＩＦＮ－γ（２００ｎｇ／ｍｌ；ＩｍｍｕｎｏＴｏｏｌｓ）と２４時間インキュベートしておいた。共培養は、１μｇ／ｍｌの抗ＣＤ２８（クローン３７．５１）と１０μｇ／ｍｌの抗ＰＤ１（クローンＲＭＰ１－１４、ＢｉｏＸＣｅｌｌ）の存在下で行われ、複合培地で３７℃、１６時間維持された。無刺激細胞をネガティブコントロールとして使用した。染色開始の４時間前にＧｏｌｇｉＰｌｕｇとＧｏｌｇｉＳｔｏｐを上記細胞に添加した（いずれも１：１０００；ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）。ＣＤ４５－ＢＶ６５０（クローン１０４、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）、ＣＤ３－（クローン１７Ａ２、ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）、ＣＤ８－（クローン５３－６．７、ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）、ＣＤ４－（クローンＧＫ１．５、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）での表面染色後、氷上で２０分間、固定用バッファー（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）で細胞を固定及び透過処理した。その後、細胞懸濁液を、Ｐｅｒｍ／ｗａｓｈバッファー　１×（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）で希釈した次の細胞内抗体を用い、氷上で３０分間染色した：ＩＦＮγ－ＰｅｒＣｐ－Ｃｙ５．５（クローンＸＭＧ１．２、ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）、ＴＮＦα－ＰＢ（クローンＭＰ６－ＸＴ２２、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）及びＧｒａｎｚｙｍｅ　Ｂ－ＰｅｒＣｐ－Ｃｙ５．５（クローンＱＡ１６Ａ０２、ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ）。試料は、ＬＳＲＩＩ－ＳＯＲＰとＦｏｒｔｅｓｓａフローサイトメーター（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）のいずれかで入手した。データ解析は、ＦｌｏｗＪｏ　ｖ１０（ＦｌｏｗＪｏ　ＬＬＣ）を使用して行った。

【０２２９】

免疫蛍光及びイメージング

腫瘍片をＣｅｌｌｐａｔｈ™ＯＣＴ凍結切片包埋マトリックス（Ｃｅｌｌ　Ｐａｔｈ社、英国、ポーイス州ニュートン）に埋め込み、ドライアイス上で凍結させた。１０マイクロメートルの凍結切片を２％パラホルムアルデヒド（ＰＦＡ、Ｓｉｇｍａ）で１０分間固定し、リン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ）で３回洗浄した。一次抗体を、ウシ血清アルブミン０．５％（ＢＳＡ、Ｓｉｇｍａ）、Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００　０．３％（ＡｐｐｌｉＣｈｅｍ社、ドイツ）、及び二次抗体の同じ宿主種からの血清１％を含むＰＢＳでインキュベートした。スライドは、４℃の湿度室で一晩保管した。試料は、ＰＢＳで３回洗浄した後、二次抗体を用いてＲＴで１時間染色した。組織スライスをＰＢＳで更に３回洗浄し、４′，６－ジアミジノ－２－フェニルインドール（ＤＡＰＩ）含有Ｐｒｏｌｏｎｇ™　Ｇｏｌｄ退色防止試薬でマウントした。免疫蛍光の後、スライドをＺＥＩＳＳ　Ａｘｉｏ

Ｓｃａｎ　Ｚ１でデジタル化した。下流解析は、生体画像解析のためのオープンソースプラットフォームであるＦＩＪＩ（Schindelin et al., Nature Methods 2012, 9, 676-682）で、カスタムメイドのスクリプトを使用して行った。簡単に説明すると、ＤＡＰＩ染色を使用して切片の総面積を推定し、Ｅ－カドヘリン染色を使用して腫瘍面積を測定した。免疫細胞などの境界明瞭な細胞の定量化については、解析領域あたりの陽性細胞の検出数に基づいて浸潤指数を算出した。間葉細胞などの識別不能な細胞のグループについては、免疫染色陽性領域のサイズを解析領域の総面積で割った比率を計算することにより定量化を行った。

【０２３０】

免疫組織化学

リンパ節を採取し、１％ＰＦＡで４℃、一晩固定した後、ＰＢＳで２回洗浄し、３０％スクロース溶液中で４℃、３～６時間インキュベートした。その後、リンパ節をＯＣＴ包埋マトリックス（Ｃｅｌｌ　Ｐａｔｈ社、英国、ポーイス州ニュートン）に埋め込み、ドライアイス上で凍結させた。８マイクロメートルの凍結切片をマウスＦＡＰに対する一次抗体（クローン４Ｂ９、Ｒｏｃｈｅ　Ｇｌｙｃａｒｔ社）と直接、４℃で１６時間インキュベートした。洗浄後、試料を二次抗体としてのビオチンコンジュゲートヤギ抗ウサギとインキュベートし、Ｖｅｃｔａｓｔｉｎ　ＡＢＳキット（Ｖｅｃｔｏｒ　ｌａｂｓ）を用いて露出させた。

【０２３１】

マルチプレックスアッセイ

血清及び腫瘍からのサイトカイン及びケモカイン濃度を、ＬｅｇｅｎｄＰｌｅｘ™ Ｍｏｕｓｅ　Ｐｒｏｉｎｆｌａｍｍａｔｏｒｙ　Ｃｈｅｍｏｋｉｎｅ　Ｐａｎｅｌ及びＬｅｇｅｎｄＰｌｅｘ™ Ｍｏｕｓｅ　Ｉｎｆｌａｍｍａｔｉｏｎ　Ｐａｎｅｌ（いずれもＢｉｏｌｅｇｅｎｄ社）を用いて、製造業者の説明書に従って測定した。解析は、ＬｅｇｅｎｄＰｌｅｘ™ データ解析ソフトウェア（Ｂｉｏｌｅｇｅｎｄ社、カリフォルニア州サンディエゴ）を用いて行った。

【０２３２】

ＲＮＡ抽出、リアルタイム遺伝子発現解析

ＤｉｒｅｃｔＺｏｌ™ ＲＮＡ　ＭｉｎｉＰｒｅｐ　Ｋｉｔ（ＺｙｍｏＲｅｓｅａｒｃｈ）を用いて、腫瘍片から全ＲＮＡを抽出した。Ｍ－ＭＬＶ逆転写酵素（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いて逆転写を行い、ＡＢＩ　Ｐｒｉｓｍ　７５００　Ｆａｓｔ装置（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）でＦａｓｔ　ＳｙｂｅｒＧｒｅｅｎ　ＰＣＲ　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いて定量的リアルタイムＰＣＲ（ｑ－ＰＣＲ）を実施した。ｑＰＣＲは、発現量がマウスＴｂｐレベル（順方向：５’－ＣＣＴＴＧＴＡＣＣＣＴＴＣＡＣＣＡＡＴＧＡＣ－３’、逆方向：５’－ＡＣＡＧＣＣＡＡＧＡＴＴＣＡＣＧＧＴＡＧＡ－３’）で正規化されたマウスＦａｐ　ｃＤＮＡのプライマー（順方向：５’－ＧＴＣＡＣＣＴＧＡＴＣＧＧＣＡＡＴＴＴＧＴ－３’、逆方向：５’－ＣＣＣＣＡＴＴＣＴＧＡＡＧＧＴＣＧＴＡＧＡＴ－３’）を用いて実施された。該発現量は次式によって表された。

$$2^{\Delta Ct(Ct\ tbp-Ctfap)}$$

（式中、Ｃｔはサイクル数に相当する。）

【０２３３】

腫瘍微小環境における免疫関連遺伝子の発現を調べるために、１４日目の腫瘍から抽出した１００ｎｇの全ＲＮＡをｎＣｏｕｎｔｅｒ（登録商標）ＰａｎＣａｎｃｅｒ免疫プロファイリングパネル（ＮａｎｏＳｔｒｉｎｇ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）にハイブリダイズした。遺伝子数は、ｎＳｏｌｖｅｒ™ ２．６ソフトウェア（ＮａｎｏＳｔｒｉｎｇ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、シアトル）を用いて、パネルから選択したハウスキーピング遺伝子で正規化した。

【０２３４】

統計解析

免疫細胞の頻度、腫瘍増殖及びマウス生存率の差を、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ（

ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ、カリフォルニア州ラ・ホーヤ）を用いて解析した。Ｔ検定、多重比較のためのＡＮＯＶＡ又は対応するノンパラメトリック検定（マン・ホイットニー又はクラスカル・ウォリス）を使用した。生存率解析にはログランク検定を使用した。０．０５未満のＰ値を有意とみなした。

【０２３５】

２．２　結果

ＲＴ併用療法と組み合わせたＦＡＰ－ＣＤ４０は、安全で効率的であり、腫瘍増殖の制御を媒介するためにＦＡＰを介した架橋を要する

ＦＡＰを標的としたＣＤ４０二重特異性抗体（ＦＡＰ－ＣＤ４０）の治療的可能性を試験するために、以前に作成され（Ｍｅｒｍｏｄ　ｅｔ　ａｌ．，Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ　２０１８，１４２，２５１８－２５２８）、ＦＡＰ陽性間質を含む、疾患の主要臨床状況を再現している同所性頭頸部腫瘍モデル（ｍＥＥＲＬ９５）が使用された。最初の実験では、ＦＡＰ－ＣＤ４０の抗腫瘍有効性と安全性を、ＦＡＰ－ＣＤ４０単独で、又は（６Ｇｙの２回連続照射から成る）少分割放射線療法と併用で、又は併用せずに、図２Ａに示すスキームに従って調べた。非標的ＤＰ４７－ＣＤ４０コントロール二重特異性抗体（ＤＰ４７は生殖系列のコントロール）は、ＰＢＳのみの処理と同様に腫瘍保有マウスにいて抗腫瘍効果を示さなかった（図２Ｃ及び２Ｄ）。逆に、ＦＡＰ－ＣＤ４０は、治療したマウスの４０％で完全な腫瘍縮小をもたらし、その後、１頭のマウスにおける腫瘍の再発をもたらした（図２Ｅ）。これらの結果は、ＦＡＰ－ＣＤ４０が治療的に有効であるためには、ＦＡＰを介した架橋が必要であることを示している。

【０２３６】

局所放射線療法単独（図２Ｆ）又はコントロールＤＰ４７－ＣＤ４０抗体と組み合わさった局所放射線療法（図２Ｇ）は、コントロールグループ、すなわちＰＢＳ未処理及びＤＰ４７－ＣＤ４０治療マウス（図２Ｃ及び２Ｄ）と比較して、腫瘍増殖の遅延と生存率の上昇をもたらした。しかし、ｍＥＥＲＬ９５腫瘍移植後２０日目から、２×６Ｇｙ及び２×６Ｇｙ＋ＤＰ４７－ＣＤ４０治療腫瘍は再発し始め、客観的完全奏効（ＣＲ）は得られなかった。興味深いことに、全ての腫瘍保有マウスは、放射線療法（２×６Ｇｙ）とＦＡＰ－ＣＤ４０抗体との併用に応答し、当該動物の８３％（５／６）で腫瘍の完全な縮小と持続的なｉ制御を誘導した（図２Ｈ）。１３日目に抗ＦＡＰ－ＣＤ４０を追加投与しても、併用の転帰は改善しなかった（図２Ｋ及び２Ｌ）。全体として、ＦＡＰ－ＣＤ４０単剤で治療されたマウスにおいては、ＰＢＳ及びＤＰ４７－ＣＤ４０コントロールグループと比較して、５ＣＲ中２ＣＲで全生存率が有意に上昇した（図２Ｂ）。注目すべきことには、長期の観察（９０日超）後も、併用治療のレスポンダーマウスは全て無再発のままであった。このことは、このＦＡＰ－ＣＤ４０放射性免疫療法の併用が、高い腫瘍縮小率をもたらしただけでなく、動物の生存期間を延長させたことも示している（図２Ｂ）。

【０２３７】

ＦＡＰ－ＣＤ４０抗体の単剤としての又は少分割放射線療法との併用での有効性は、ＣＤ４０アゴニストモノクローナル抗体での治療でよく見られる特徴である全身毒性の非存在を伴っていた（Ｖｏｎｄｅｒｈｅｉｄｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．２００７，２５（７），８７６－８８３；Ｍｅｄｉｎａ－Ｅｃｈｅｖｅｒｚ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｒｅｓ．２０１５，３（５），５５７－５６６、又はＶｏｎｄｅｒｈｅｉｄｅ　ｅｔ　ａｌ．，Ｏｎｃｏｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　２０１３，２（１）：ｅ２３０３３）。第２の比較実験では、ＦＡＰ－ＣＤ４０抗体で治療した腫瘍保有マウスは体重減少を示さなかったのに対し、（同じモル濃度の）ＣＤ４０　ｍＡｂをＲＴと併用して又は併用せずに１回注射すると、二重特異性ＦＡＰ－ＣＤ４０抗体療法によってもたらされるものと同等と腫瘍増殖制御を伴って体重の有意な減少を引き起こした。第２の実験の結果を図３Ａ～３Ｆに示し、図３Ｇでは対応する体重の変化を示している。

【０２３８】

効率的なＦＡＰ－ＣＤ４０活性には、腫瘍間質におけるＦＡＰ発現線維芽細胞の存在が

必要
プロリルエンドペプチダーゼであるＦＡＰは、図４Ａに示すように、ヒトＨＮＳＣＣのがん関連線維芽細胞（ＣＡＦ）で高発現し、ｍＥＥＲＬ９５モデルで再現されている。ＦＡＰ－ＣＤ４０を介した抗腫瘍活性がＦＡＰ発現間質線維芽細胞を必要としたかどうかを更に調べるために、変異体Ｈ－ｒａｓ、ＨＰＶ１６　Ｅ６及びＥ７タンパク質（Lin et al., Cancer Research 1996, 56, 21-26)を発現するがＦＡＰ発現がないマウスＴＣ－１肺がん細胞（Dupperet et al., Clin. Cancer Res. 2018, 24(5), 1190-1201）を使用した。ＴＣ－１腫瘍細胞を頤下部に移植した結果として、腫瘍周囲にαＳＭＡ発現ＣＡＦを有し、腫瘍内のいくつかの部位にαＳＭＡ陽性、ＦＡＰ陰性細胞を有する腫瘍が得られた（図４Ａ及び４Ｂ）。免疫染色の結果と同様に、Ｆａｐ遺伝子のｍＲＮＡ発現レベルは、ＴＣ－１腫瘍で有意に低い（図４Ｂ）。

【０２３９】
一貫して、ｍＥＥＲＬ９５モデルで観察された結果とは異なり、ＴＣ－１腫瘍はＦＡＰ－ＣＤ４０単独では応答せず、ＲＴ単独又は２×６ＧｙとＦＡＰ－ＣＤ４０との併用でわずか９％（１／１１）の完全寛解（ＣＲ）を示した（図４Ｄ～４Ｇ）。ＴＣ－１腫瘍へのＦＡＰ－ＣＤ４０抗体のアクセスを評価するため、Ａｌｅｘａ６４７で標識した抗ＦＡＰ－ＣＤ４０抗体を、局所照射を受けたＴＣ－１及びｍＥＥＲＬ９５保有腫瘍マウスに腹腔内注射した。該抗体は、投与後４日目に両方の腫瘍で検出された。同様のＣＤ４０　ｍＲＮＡ発現レベルを示す（図４Ｃ）、ＴＣ－１とｍＥＥＲＬ９５の両腫瘍（図４Ｈ）では、蛍光強度に有意差は認められなかった。これらの結果は、ＦＡＰ－ＣＤ４０が、ＴＣ－１腫瘍の微小環境に存在するＣＤ４０発現細胞を標的とすることはできるが、ＦＡＰを介した架橋がない場合にはＣＤ４０シグナル伝達の活性化が起こらないため、保護免疫を促進できないことを示す。

【０２４０】
ＦＡＰはリンパ節の間質区画にも、特に線維芽細網細胞（ＦＲＣ）にも存在するため（Denton et al., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 2014, 111(33), 12139-12144）、これら２つの腫瘍モデルの所属リンパ節におけるＦＡＰのレベルを調べた。ＦＡＰ発現は、接種後１０日目のｍＥＥＲＬ９５及びＴＣ－１頤下腫瘍の両方の頸部リンパ節でＩＨＣにより検出された（図４Ｉ）。フローサイトメトリーで測定したＦＲＣ（ｇｐ３８＋ＣＤ３１－）上のＦＡＰの頻度及び発現量も、ＴＣ－１保有マウスとｍＥＥＲＬ９５保有マウスで同様だった（図４Ｊ及び図４Ｋ）。これらの結果から、腫瘍間質におけるＦＡＰ発現の必要性が強調される。

【０２４１】
ＦＡＰ－ＣＤ４０と放射線療法との併用は、長期的な抗腫瘍保護免疫を促進する。
放射線療法（２×６Ｇｙ）の抗ＦＡＰ－ＣＤ４０治療との併用がｍＥＥＲＬ９５腫瘍保有マウスにおいて腫瘍特異的な長期保護免疫記憶を誘導できるかどうかを決定するために、併用時にｍＥＥＲＬ９５原発腫瘍を拒絶したマウス（長期レスポンダー）の右脇腹に同種腫瘍をリチャレンジした（図５Ａ）。全てのマウスが腫瘍増殖を制御し、最終的には該腫瘍を拒絶した。これは、特異的な免疫記憶の存在を示している（図５Ｂ）。ｍＥＥＲＬ９５細胞はＨＰＶ１６　Ｅ７タンパク質を発現していることから、本発明者らは、当該タンパク質が、観測された免疫記憶の免疫優性な標的抗原である可能性があるという仮定を立てた。この仮説を検証するため、治癒したマウスの左脇腹に、同じくＥ７タンパク質を発現するＴＣ－１細胞株で２度目のリチャレンジを行った（図５Ａ）。８頭中３頭だけがＴＣ１細胞を拒絶できたことは、Ｅ７がこの状況では免疫優性抗原ではない可能性を示唆している（図５Ｃ）。更に、（ＦＡＰ－ＣＤ４０を単剤で又はＲＴと併用で用いた治療でｍＥＥＲＬ９５原発腫瘍を拒絶した）長期レスポンダーマウスの約４０～６０％が、ＰＢＭＣのｉｎ　ｖｉｔｒｏ増殖ではＥ７特異的Ｔリンパ球を提示した（図５Ｄ）。実際、Ｅ７特異的ＣＤ８　Ｔ細胞（特異的四量体染色により検出）の頻度は、無治療腫瘍と比較して、併用時にはｍＥＥＲＬ９５腫瘍微小環境で減少する（図５Ｅ）。

【０２４２】

これらの有望な結果を受け、この併用療法の臨床応用を促進する目的で、抗マウスＦＡＰ部分で構成されているとヒトＣＤ４０受容体を標的とするサロゲート二重特異性抗体（ＦＡＰ－ｈｕＣＤ４０）の抗腫瘍特性を更なる実験で試験した。そこで、ヒトＣＤ４０受容体を発現するトランスジェニックマウス（ｈｕＣＤ４０　Ｔｇマウス）の頤下部に、ｍＥＥＲＬ９５腫瘍細胞を接種した。野生型の腫瘍保有マウスと同じスケジュールに従って、６Ｇｙを２回連続で腫瘍に局所照射した。その後、２回目の放射線療法セッションと同時にＦＡＰ－ｈｕＣＤ４０抗体のｉ．ｐ．注射をマウスに投与した（図６Ａ）。完全寛解は観察されず、単剤としてのＦＡＰ－ｈｕＣＤ４０は、無治療マウスと腫瘍の増殖又は生存率に差はなかった（図６Ｂ及び図６Ｄ）。２×６Ｇｙを受けたマウスは、ＦＡＰ－ＣＤ４０マウス及びコントロールマウスと比較して、腫瘍増殖を遅らせ、腫瘍の縮小を誘導し、生存率を高めた。しかし、いずれも腫瘍を完全には拒絶しなかった（図６Ｂ及び図６Ｅ）。２×６ＧｙとＦＡＰ－ｈｕＣＤ４０の併用は、他のグループと比較して４０％の完全寛解（４／１０）と、著しく延長された長期生存期間をもたらした（図６Ｆ及び６Ｂ）。

【０２４３】

ＦＡＰ－ＣＤ４０と放射線療法の併用は、腫瘍免疫微小環境をより免疫抑制的でないランドスケープにリモデリングする

最初の実験（図２Ａ）に基づき、併用の抗腫瘍効果に関連する細胞性及び分子性免疫成分を調べた。最初の放射線療法投与から８日後に腫瘍内免疫浸潤を解析した。フローサイトメトリーベースの１６色抗体パネルを用いると、ＰＢＳ及びＤＰ４７－ＣＤ４０と比較して、腫瘍１ｍｇあたりの免疫細胞（ＣＤ４５＋細胞）の数の全体的な増加が全ての治療グループで観察された（図７Ａ）。ＰＢＳ及びＤＰ４７－ＣＤ４０コントロールと比較して、ＣＤ８　Ｔ細胞の数は照射により有意に増加した。この増加は、ＦＡＰ－ＣＤ４０単独療法及び併用治療ではあまり顕著ではなかった（図７Ｂ）。腫瘍内に存在する制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）の数は、放射線療法によってのみ、コントロールマウスと比較して増加し（図７Ｃ）、ＦＡＰ－ＣＤ４０、ＲＴ及び併用治療グループにおけるＣＤ８／Ｔｒｅｇ比の増加を生じさせた（図７Ｄ）。興味深いことに、ＣＤ８細胞／マクロファージ比は、ＦＡＰ－ＣＤ４０＋２×６Ｇｙグループでのみ増加し、この併用が腫瘍へのＣＤ８　Ｔ細胞の浸潤を有利にするようバランスを変化させるという考えをサポートする（図７Ｅ）。これに関連して、ＣＤ４　Ｔ細胞（図７Ｆ）、樹状細胞（ＤＣ、図７Ｇ）、及びＮＫ（図７Ｈ）の頻度は無治療マウスに比べ、異なる治療で減少したものの、腫瘍１ｍｇあたりの数は、全グループで同等であった。

【０２４４】

更に、ＦＡＰ－ＣＤ４０とＲＴで治療した腫瘍の腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）からのＣＤ８及びＣＤ４　Ｔ細胞によるＩＦＮγの産生の増加は、ｍＥＥＲＬ９５細胞に対するｅｘ　ｖｉｖｏ再刺激アッセイで観察された（図８Ａ及び８Ｄ）。ＴＮＦα及びグランザイムＢは、エフェクター及び細胞傷害性の表現型を示すいずれのＴ細胞サブセットでも増強された（図８Ｂ、８Ｃ、８Ｅ、８Ｆ）。Ｋｉ６７陽性細胞として測定したＣＤ８　ＴＩＬの増殖（図８Ｇ）は全ての治療グループでコントロールと比較して増加している一方、ＰＤ－１の発現は、ＦＡＰ－ＣＤ４０に依存的に低いままであり、疲弊度が低い表現型である（図８Ｈ）。併用療法は、所属リンパ節からのＣＤ８　Ｔ細胞の記憶表現型（ＣＤ６２Ｌ$^{+}$ＣＤ４４$^{+}$）を促進した（図８Ｉ）。

【０２４５】

この併用療法は、免疫関連遺伝子を３９個アップレギュレート、３９個ダウンレギュレートすることにより、腫瘍微小環境の分子リモデリングを、無治療腫瘍と比較して著しく増大させた。この併用療法によって誘発されたこの分子インプリントは、適応免疫応答、抗原プロセシング、インターフェロンシグナル伝達、炎症、ケモカイン及びサイトカイン又はＤＣの機能に関わる様々な経路の発現における誘導を包含していた。Ｃｄ４０、Ｃｃｌ２２、Ｉｌ１２ｂ、Ｉｒｆ８及びＣｃｒ７のアップレギュレーションを含むＦＡＰ－ＣＤ４０治療と２×６Ｇｙとの併用療法を受けた腫瘍では、樹状細胞特異的炎症遺伝子シグネチャーの著しい濃縮が認められた。マルチプレックスサイトカイン／ケモカインアッセ

イにより、ＩＦＮγレベルの腫瘍内レベルと特定のケモカイン（ＣＸＣＬ９及びＣＸＣＬ１０など）の腫瘍内レベルの、併用療法によって誘発されたアップレギュレーションが確認された（図９Ａ、９Ｂ及び９Ｃ）。また、２×６Ｇｙ＋ＦＡＰ－ＣＤ４０により、ｍＥＥＲＬ９５浸潤のＤＣの表面にＣＤ８０及びＣＤ８６などの成熟マーカーの誘導が認められた（図９Ｅ及び９Ｆ）。

【０２４６】

まとめると、これらのデータは、ＦＡＰ－ＣＤ４０療法と２×６ＧｙによるＲＴとの併用による顕著な有効性は免疫抑制の減少、ＣＤ８　Ｔ細胞の浸潤と増殖の増加、サイトカイン産生、及びＤＣの成熟を含む腫瘍免疫ランドスケープの広範なリモデリングに関連していることを示している。

【０２４７】

併用の治療有効性は、ＣＤ８　Ｔ細胞とクロスプライミングＤＣに依存し、再発予防についてはＣＤ４　Ｔ細胞に依存する。

ｉｎ　ｖｉｖｏでの選択的枯渇より、併用療法の抗腫瘍有効性へのＴリンパ球の寄与が試験された。治療開始の４８時間前から、ｍＥＥＲＬ９５腫瘍保有マウスに、抗ＣＤ８β、抗ＣＤ４又は対応するＩｇＧコントロール抗体のいずれかを、治療処置の４８時間前から開始して３日ごとにｉ．ｐ．注射した。ＣＤ８　Ｔリンパ球標的抗体によるマウスの枯渇治療は、併用療法で観察された治癒効果の消失をもたらした（図１０Ｃ）。ＣＤ４　Ｔ細胞を枯渇させたマウスは、治療後３０日目までに完全寛解を示した（図１０Ｄ）。しかし、ＩｇＧコントロールグループの７頭中５頭（７１％）と比較して、このグループの７頭中２頭（２８％）が腫瘍を再発させ（図１０Ｂ）、生存期間が短縮された（図１０Ｅ）。これらの結果では、持続的な抗腫瘍応答の形成におけるＣＤ４　Ｔ細胞の不可欠な役割が強調されている。

【０２４８】

併用療法時の腫瘍におけるＤＣ成熟転写シグネチャーの濃縮により、ＣＤ８　Ｔ細胞媒介性応答における活性化されたＢａｔｆ３依存性ＤＣの役割とＣＤ８　Ｔ細胞－ｃＤＣ１クロストークの必要性が示唆された。そこで、本発明者らは、そのような免疫集団の非存在下で本併用療法を試験しようとした。図１０Ｆ～１０Ｉが示すように、Ｂａｔｆ３－／－マウス（ｃＤＣ１欠損）では、ＲＴ（２×６Ｇｙ）とＦＡＰ－ＣＤ４０治療の併用の治療効果は消失した。併用療法の抗腫瘍効果は、治療したＢａｔｆ３－／－マウスの一部では腫瘍増殖速度が無治療の腫瘍保有Ｂａｔｆ３－／－マウスと比較して低下したものの、治療した腫瘍を保有する野生型マウスとは対照的に、消失した。これは、ＦＡＰ－ＣＤ４０を介した強力な防御反応にはクロスプライミングＤＣが必要なことを示している。

【０２４９】

Ｔ細胞エフェクター期中のＩＬ－１２の遮断は、併用療法の有効性を消失させる。

ＩＬ１２ｂは併用療法時に腫瘍で差次的に発現する遺伝子として上位の一角を占める遺伝子であり、ＩＬ－１２の細胞溶解活性が知られていることを考慮して、ＲＴ（２×６Ｇｙ）とＦＡＰ－ＣＤ４０の併用に対する治療応答における機能的関連性を調べた。そこで、放射線療法の１日前から７日間、ＩＬ－１２遮断抗体が投与された。図１１Ｃに示すように、併用療法とＩＬ－１２の中和により全てのマウスで腫瘍が縮小したが、８５％のマウス（７頭中６頭）で腫瘍の増殖が再開された。このことから、併用療法がもたらす抗腫瘍効果を最大限に発揮させる上でのＩＬ－１２の重要な役割が強くサポートされている。興味深いことに、ＩＬ－１２の遮断は、抗腫瘍活性が主に放射線療法によるものとみられる初期での応答には影響を及ぼさない。ＩＬ－１２中和による治療有効性の喪失は、Ｔ細胞の動員、遊走及びプライミグに関連するＣＸＣＬ９、ＣＸＣＬ１０、ＣＣＬ４及びＣＣＬ２２といった、樹状細胞によって産生される特定のケモカインの血清レベルの減少（図１１Ｄ～１１Ｇ）を伴っていた。

【０２５０】

２．３　結果の考察

二重特異性ＦＡＰ－ＣＤ４０抗体のＲＴとの併用はＨＰＶ＋　ＨＮＳＣＣにおいて放射

線療法を強化し、持続的な保護免疫記憶を得るための安全で有効な新しい戦略であることが示された。この併用の重要な要素は、ＦＡＰ発現間質細胞を標的とすることにより、腫瘍微小環境に対するＣＤ４０アゴニストの活性を制限することに基づいている。本発明者らは、適切な治療レジメンを特定することができ、腫瘍でのＩＬ１２誘導時にＣＤ８　Ｔ細胞－ＤＣ１軸が主な細胞作用機構を作動させることを示した。まとめると、これらの結果は、この治療手法を臨床に応用するための強力な生物学的根拠を提供している。更に、放射線療法と二重特異性サロゲートＦＡＰ－ｈｕＣＤ４０抗体の併用の際にヒトＣＤ４０シグナル伝達によりもたらされた顕著な効果は、この手法が、頭頸部がん患者の治療だけでなくＦＡＰ発現線維芽細胞の間質蓄積を特徴とする他のがん種の患者の治療にも応用できることをサポートしている。

【０２５１】

更に、本療法が腫瘍免疫細胞ランドスケープに与える影響と作用機序を調べた。頭頸部がんの同所性モデル（ｍＥＥＲＬ９５）を選んだ理由は、該同所性モデルが、第一に、原発腫瘍の再発の有病率が高いという点でヒトの疾患を模倣していること、第二に、ｍＥＥＲＬ９５間質で高レベルのＦＡＰが認められることであった。この最後の特徴は、ＦＡＰ－ＣＤ４０抗体の治療有効性を検証するための鍵であった。

【０２５２】

ＦＡＰ－ＣＤ４０は、ＦＡＰ$^{+}$細胞への架橋時にのみＣＤ４０共刺激を誘導する。ＦＡＰ発現細胞とＣＤ４０発現細胞が共局在する腫瘍領域にＣＤ４０治療抗体を標的化するという本二重特異性抗体の固有の特徴は、ＣＤ４０アゴニストの使用で見られる全身毒性の古典的なパターンを回避する鍵である。ＦＡＰ（線維芽細胞活性化タンパク質）は、主に腫瘍間質の前腫瘍性（ｐｒｏｔｕｍｏｒａｌ）活性化線維芽細胞によって発現されるエンドペプチダーゼであるが、リンパ節のＦＲＣなど他の間質区画に存在することもある。本併用療法の最小限の有効性が腫瘍内ＦＡＰ発現量の低さと一致するＴＣ－１腫瘍モデルの治療により、ＦＡＰ－ＣＤ４０抗体の抗腫瘍効果には、ＦＡＰを介した腫瘍間質での架橋が必須であることが認められた。ＦＡＰ－ＣＤ４０抗体はｉｎ　ｖｉｖｏ蛍光イメージングにより腫瘍領域で検出されたが、近隣のリンパ節での存在を正式に除外することはできなかった。しかし、ＴＣ－１腫瘍とｍＥＥＲＬ９５腫瘍の所属リンパ節におけるＦＡＰ陽性細胞の同等の存在と、治療に対するそれらの正反対の応答は、ＦＡＰ－ＣＤ４０$^{+}$　ＲＴ媒介性抗腫瘍免疫活性化が、これらの試験した腫瘍モデルの腫瘍床で起こることを間接的に証明するものである。免疫学的に「冷たい」腫瘍でＦＡＰ－ＣＤ４０がどのように機能するかを調べることは興味深い。

【０２５３】

ｍＥＥＲＬ９５腫瘍で報告された有効性の大きさ及びレスポンダーマウスに再発がないことは、生物学的なレベルでの更なる調査に値する。ＦＡＰ－ＣＤ４０とＲＴの併用で治療した動物の長期生存と、リチャレンジした治癒マウスにおける同種腫瘍の拒絶反応は、局所リンパ節で認められたＴ細胞記憶表現型の誘導と一致し、長期免疫記憶に対する本併用の影響をサポートするものである。特定の抗原の同定は研究の範囲を超えていたが、本発明者らは、ｍＥＥＲＬ９５がＨＰＶ$^{+}$であるという事実を考慮すると、明らかな抗原であるＥ７の関わり合いは問題外とした。これらのデータは、本ペプチドを単独で又は他の免疫療法と併用で接種することで、腫瘍前臨床モデルにおいてＥ７特異的応答を増強するという他の報告とも一致するものであった。

【０２５４】

また、Ｔ細胞枯渇マウスにおいては本併用の効果が消失したことから、Ｔ細胞集団が治療結果にとって重要であることが確認された。ＣＤ８　Ｔ細胞はコンボの抗腫瘍効果に必要であったが、ＣＤ４　Ｔリンパ球は、ワクチン及びウイルス感染の設定で実証されたように、持続的な応答の生成と再発の予防、それに続く強力な免疫学的ＣＤ８－Ｔ記憶に不可欠である（Ahrends et al., Nat. Commun. 2019, 10(1), 5531）。このような知見は、抗ＣＤ４０療法においてＣＤ４　Ｔ細胞媒介性免疫応答が重要であったというこれまでの前臨床試験でもサポートされている。

【０２５５】
放射線療法と抗ＦＡＰ－ＣＤ４０との併用療法の治療効果は、腫瘍免疫ランドスケープの大幅なリモデリングを伴っていた。制御性Ｔ細胞とマクロファージの減少は、本併用がエフェクターＴリンパ球の機能に有利に働く、より免疫抑制的な状況を促したことを示した。この点に関して、ＦＡＰ－ＣＤ４０と放射線療法の併用によって治療された腫瘍からの再刺激ＴＩＬで、ＩＦＮγの腫瘍内レベルの上昇（当該サイトカインの産生の増加と一致していた）及びＰＤ－１の低発現レベルが認められた。実際、ＩＬ－１２との併用でＣＤ４０を介した抗腫瘍応答の重要な因子として仮定されているＩＦＮγ（Garris, Immunity 2018, 49(6), 1149-1161）は、ＦＡＰ－ＣＤ４０特異的に併用時に誘導された。興味深いことに、該応答のエフェクター期にＩＬ－１２を中和すると併用治療の治療効果が消失したことは、ＦＡＰ－ＣＤ４０が有効性に関して当該サイトカインに依存していることを示している。活性化クロスプライミング樹状細胞は、ヒト及びマウスにおいてＩＬ－１２の主な産生細胞であることが知られている（Maier et al. Nature 2020, 580, 257-262）。その意味では、２つの注目すべき知見が、これらの細胞が本併用の作用機序において重要であることが明らかにしている。第一に、腫瘍微小環境におけるＦＡＰ－ＣＤ４０と放射線療法での併用治療による活性化クロスプライミング樹状細胞特異的遺伝子シグネチャーの濃縮と、第二に、ｃＤＣ１細胞を欠くＢａｔｆ３ｋｏマウスにおける抗腫瘍応答の喪失である。これらの観察は、抗ＣＤ４０療法のクロスプライミング樹状細胞への依存性を報告した先行研究（Garris, Immunity 2018, 49(6), 1149-1161）と一致する。マクロファージがＣＤ４０を介した応答に関与しているとことが既に記載されているが（Beatty et al., Science 2011, 331, 1612-1616）、その数の減少とＩＬ－１２の重要な役割から、本発明者らの設定における放射免疫療法効果が主に樹状細胞によって媒介されていることが示唆された。

【０２５６】
安全性と抗腫瘍応答に関して本併用治療で得られた結果は、代表的治療である放射線治療と、新規且つ安全な分子工学的に操作されたＣＤ４０標的免疫療法とを組み合わせたこの新しい治療手法の臨床への応用をサポートするものである。

【０２５７】
実施例３
ＳＶ２肺腫瘍モデルで示された、ＦＡＰを標的とした抗ＣＤ４０抗原結合分子の放射線療法との併用によるｉｎ　ｖｉｖｏ　抗腫瘍有効性
３．１　材料及び方法
非小細胞肺がん（ＮＳＣＬＣ）のマウスモデルであるＳＶ２腫瘍細胞株を有するマウスにおける二重特異性ＦＡＰ標的抗ＣＤ４０抗原結合分子の、少分割放射線療法レジメンとの併用によって治療有効性を得る能力を試験した。

【０２５８】
１０週齢の雄Ｃ５７ＢＬ／６ＪマウスをＣｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ　Ｌａｂｓから購入した。全ての動物実験は、スイスのヴォー州の獣医学当局により承認されたライセンスＶＤ３１７３．１の下で実施された。ＳＶ２細胞株は、ＫＰ腫瘍（$Kras^{LSL.G12D/wt;p53^{frt/frt}}$）由来で、Ｍｅｙｌａｎ　Ｌａｂ．から入手した。ＳＶ２細胞株は、前述（Martinez-Usatorre A, Romero P, Generation of affinity ranged antigen-expressing tumor cell lines, Methods Enzymol. 2020, 632, 503-519, doi: 10.1016/bs.mie.2019.12.001. Epub 2019 Dec 18. PMID: 32000912）のようにＯＶＡで形質導入し、ＧｌｕｔａＭＡＸ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）含有１０％ＦＢＳ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）補充ＤＭＥＭ培地で培養した。細胞を、インキュベーター内で３７℃、５％CO_2で培養した。

【０２５９】
腫瘍モデル及びｉｎ　ｖｉｖｏ治療
マウスに、ＰＢＳ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）に再懸濁さ

せた１×１０^{6}個のＳＶ２－ＯＶＡ細胞を尾静脈に静脈内注射した。１２日目に、ナイーブ脾臓から単離した１×１０^{5}個のＯＴ１細胞をマウスに静脈内注射した。肺は、腫瘍細胞移植後１３日目と１４日目に６Ｇｙの２回連続照射から成る少分割レジメンで照射された。Ｘｒａｄ－２２５ＣＸ－ＰＸｉ装置で、肺を局所的に照射可能な２０ｍｍコリメーターを使用し、線量を送達した。１４日目と１８日目に、ＰＢＳ中１８．３ｍｇ／ｋｇの抗ＦＡＰ－ＣＤ４０（Ｐ１ＡＤ９１３９）の腹腔内注射でマウスを治療した。Ｕ－ＣＴシステム（ＭＩＬａｂｓ社）を用いて腫瘍サイズを週２回フォローアップし、画像解析はＩｍａｌｙｔｉｃｓ　Ｐｒｅｃｌｉｎｉｃａｌを用いて行った。

【０２６０】

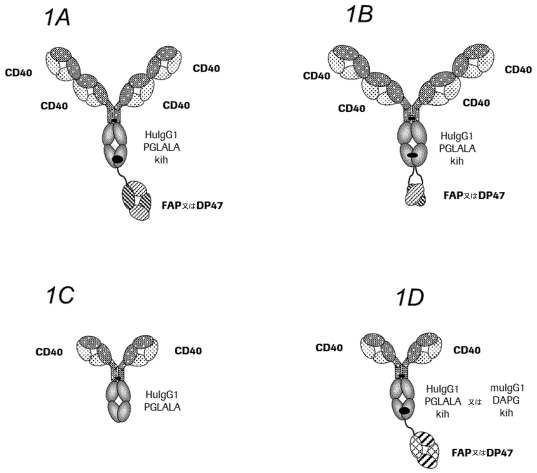
３．２　結果

ＦＡＰ－ＣＤ４０とＲＴの併用は、ＳＶ２肺腫瘍モデルにおいて腫瘍増殖を大幅に遅延させる

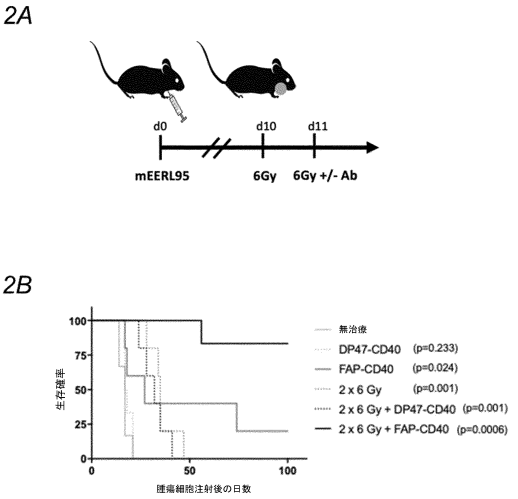
ＦＡＰを標的としたＣＤ４０二重特異性抗体（ＦＡＰ－ＣＤ４０）の治療的可能性を検証するため、マウスに１５０万個のＳＶ２－ＯＶＡを移植し、６Ｇｙの準最適線量を２回とＦＡＰ－ＣＤ４０を２用量投与した。治療前に、マウスに１０００００個のＯＴ１をｉ．ｖ．投与した。治療スケジュールを図３Ａに示す。ＲＴと抗ＦＡＰ－ＣＤ４０の併用は、ＲＴ単独での治療と比較して腫瘍増殖を遅らせることが観察された（図３Ｂ）。また、この併用は、無治療マウスと比較して生存期間を２０日以上延長させる（図３Ｃ）。

【図面】

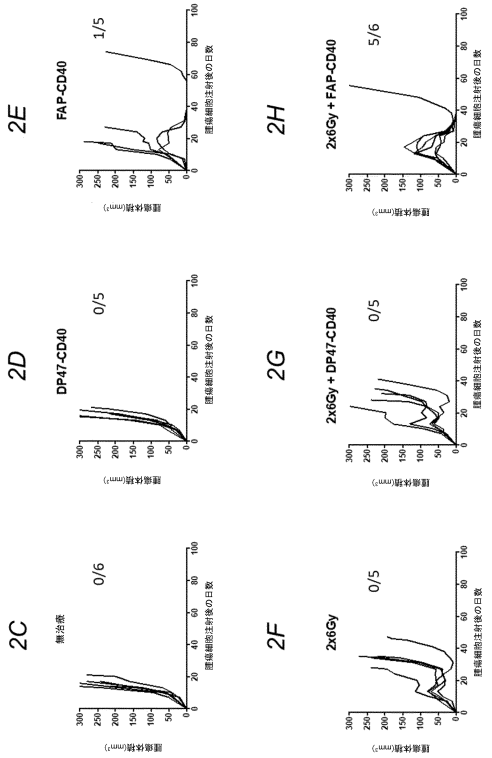
【図１】



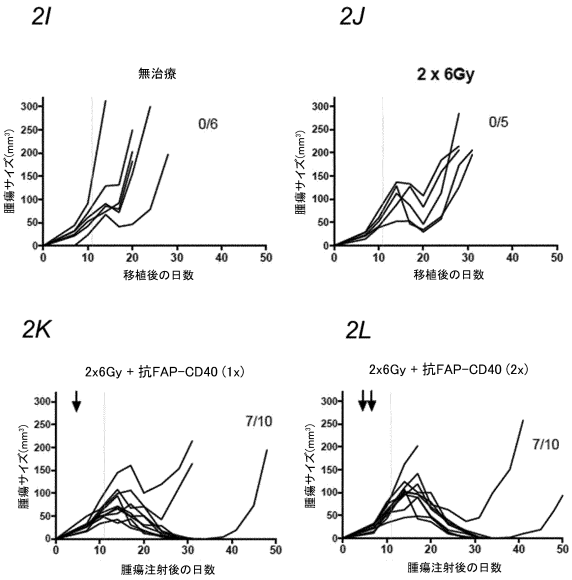
【図２Ａ－２Ｂ】



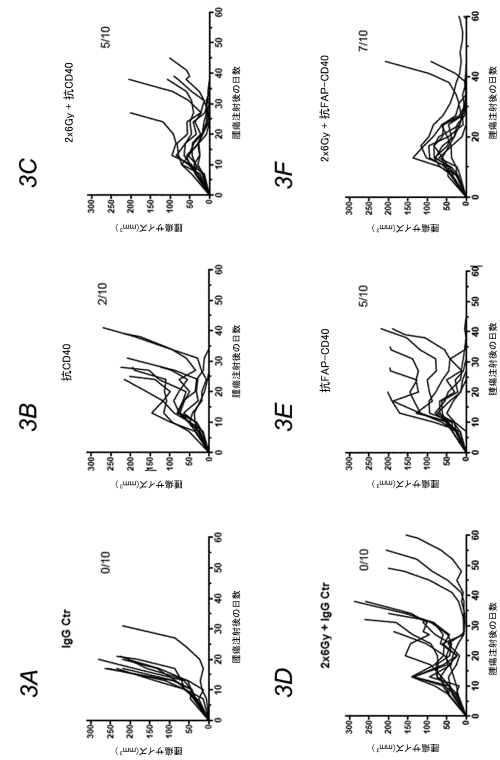
【図２Ｃ－２Ｈ】



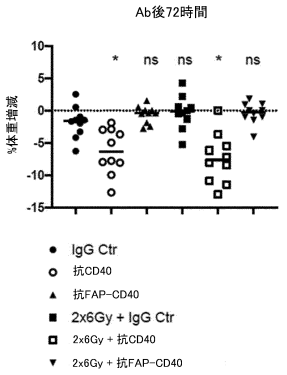
【図２Ｉ－２Ｌ】



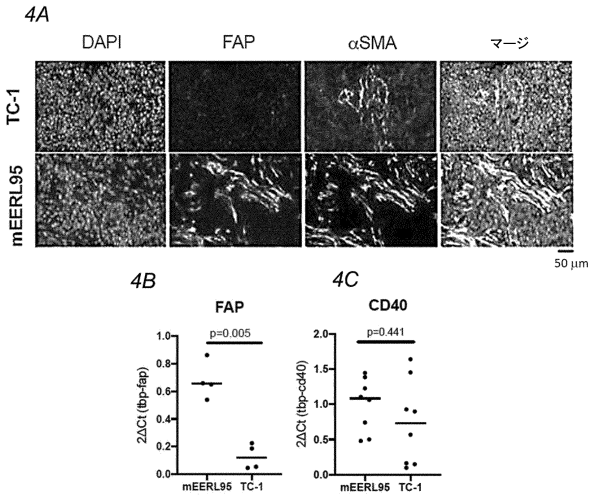
【図３Ａ－３Ｆ】



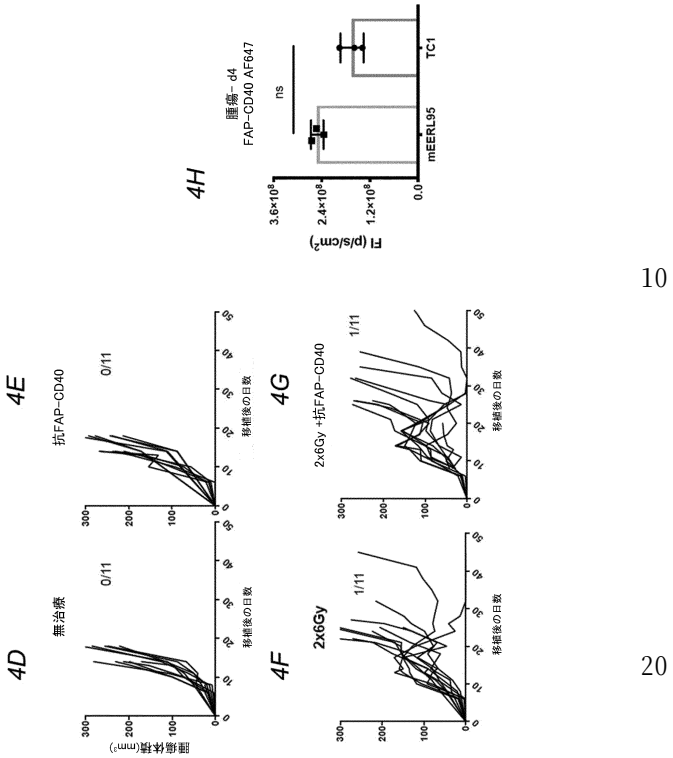
【図３Ｇ】



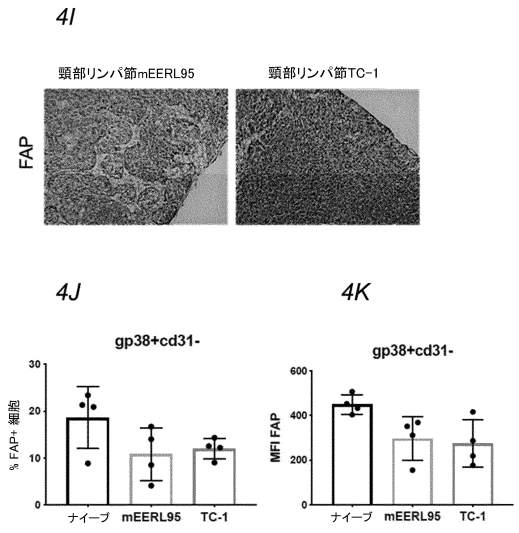
【図４Ａ－４Ｃ】



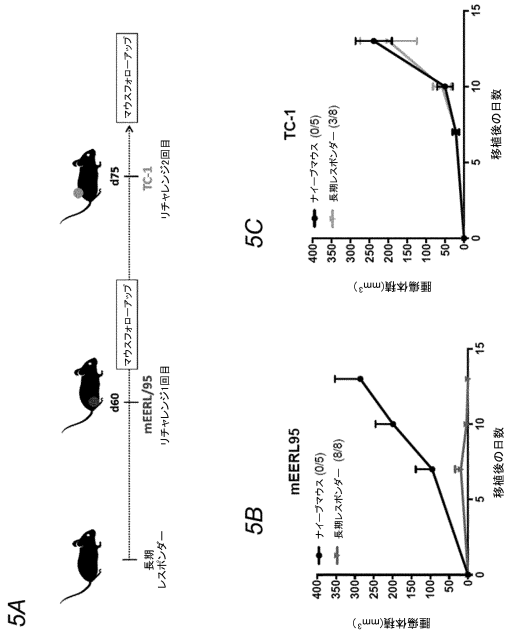
【図４Ｄ－４Ｈ】



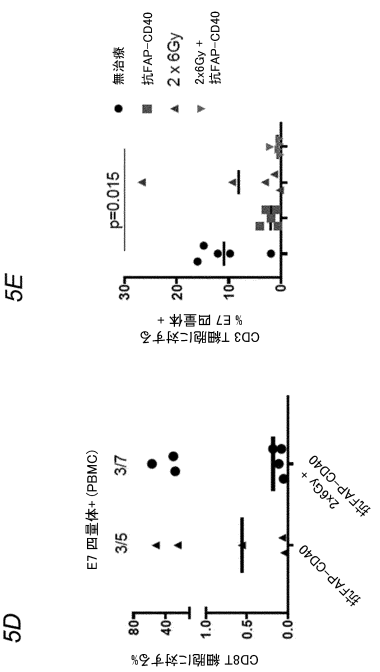
【図４Ｉ－４Ｋ】



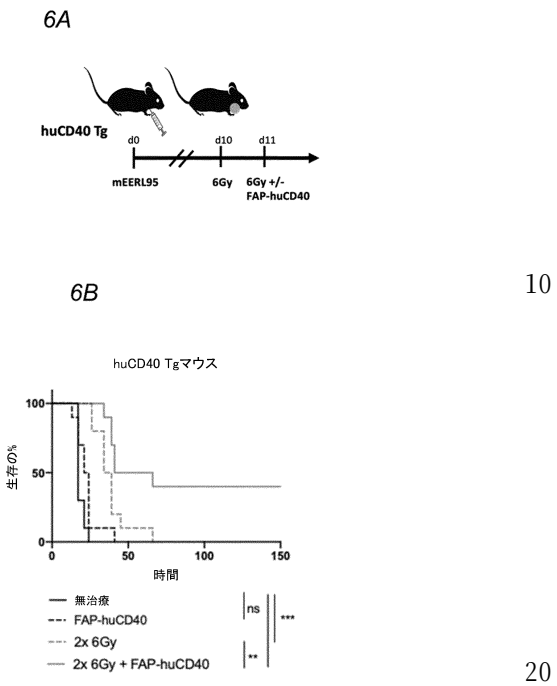
【図５Ａ－５Ｃ】



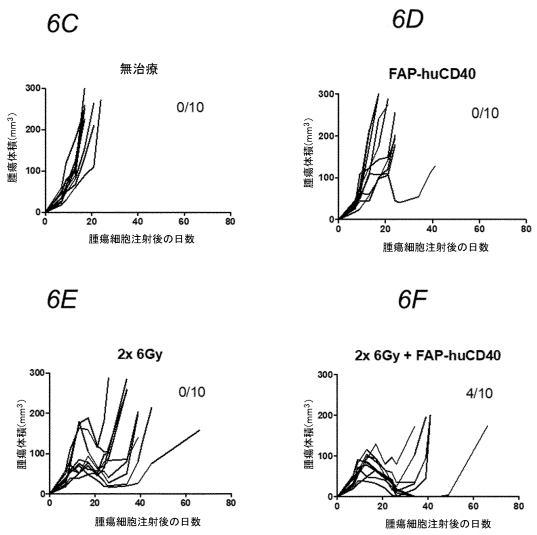
【図５Ｄ－５Ｅ】



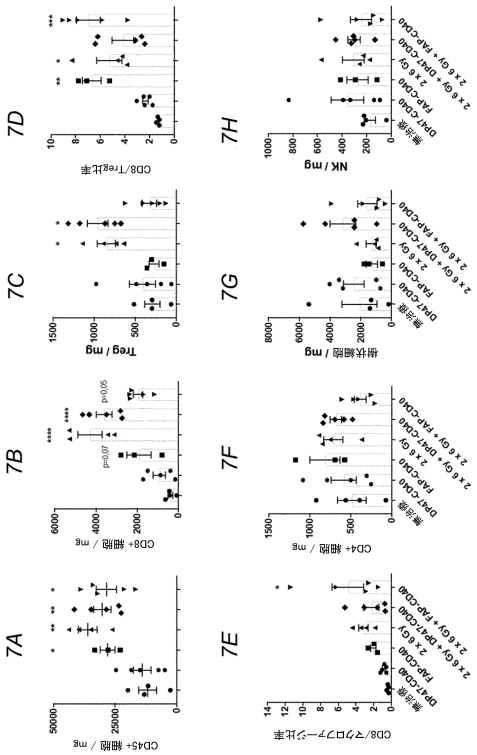
【図６Ａ－６Ｂ】



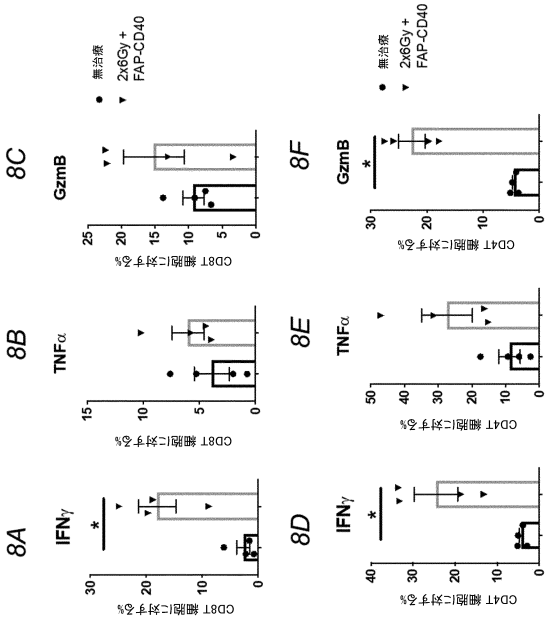
【図６Ｃ－６Ｆ】



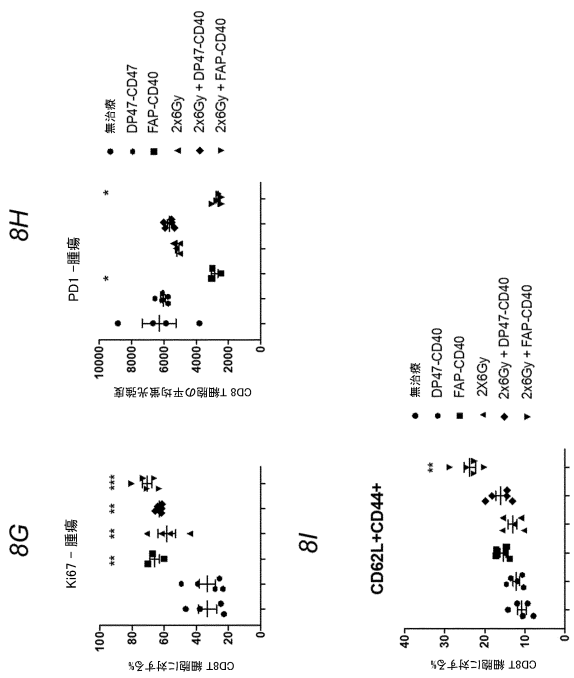
【図７】



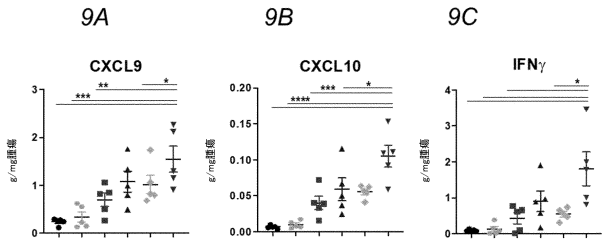
【図８Ａ－８Ｆ】



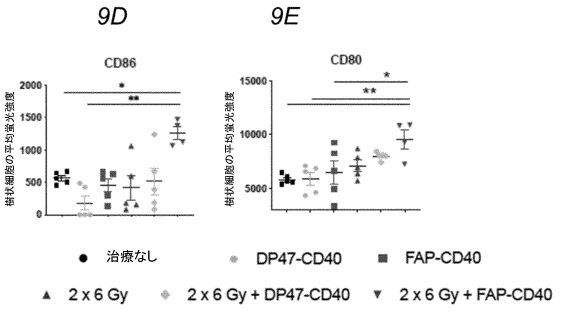
【図８Ｇ－８Ｉ】



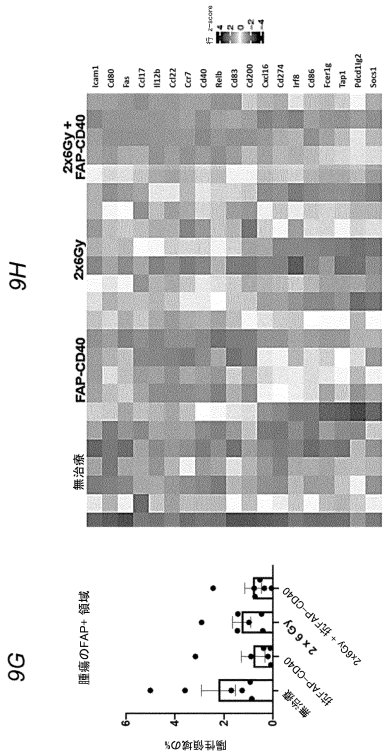
【図９Ａ－９Ｃ】



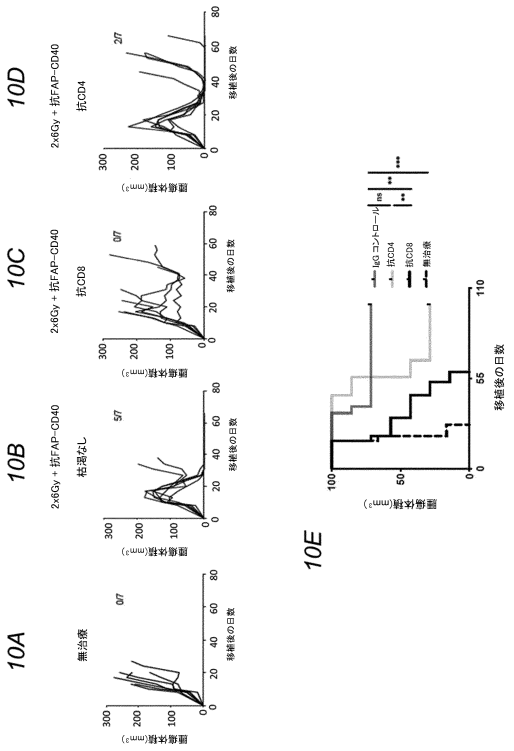
【図９Ｄ－９Ｅ】



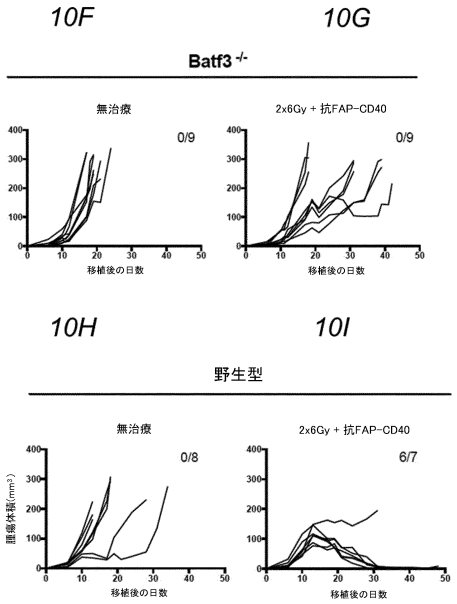
【図９Ｇ－９Ｈ】



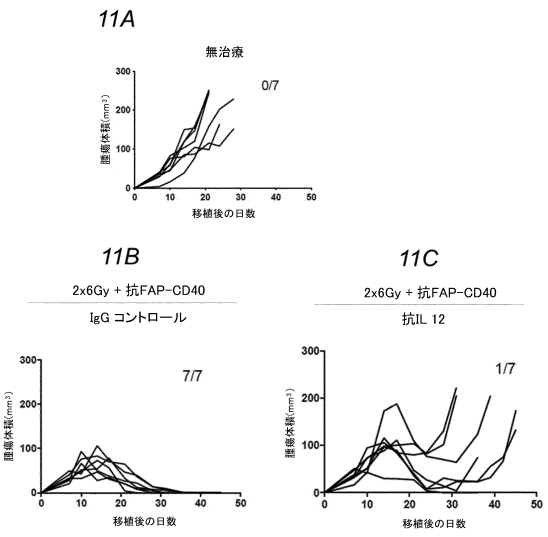
【図１０Ａ－１０Ｅ】



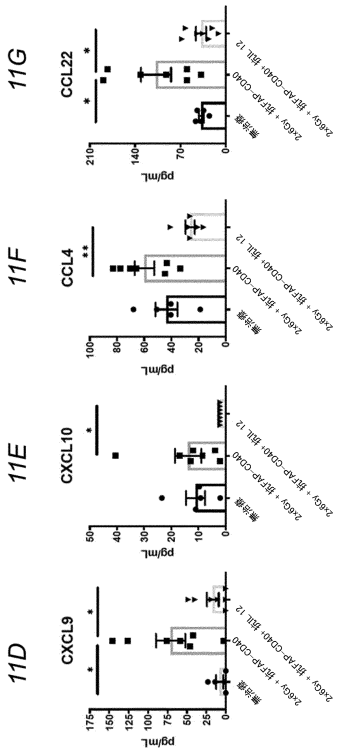
【図１０Ｆ－１０Ｉ】



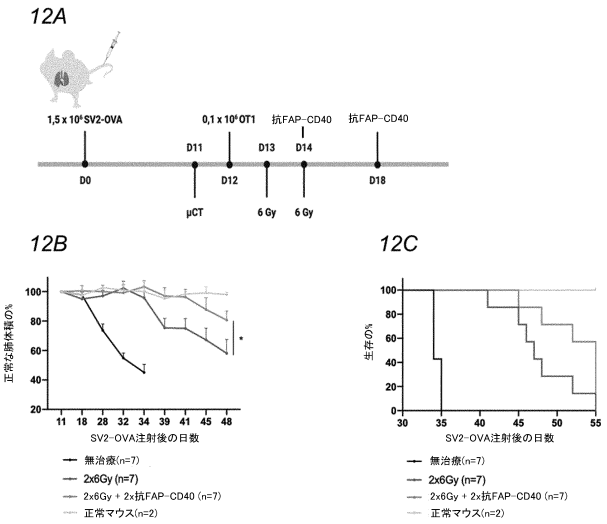
【図１１Ａ－１１Ｃ】



【図１１Ｄ－１１Ｇ】



【図１２】



【配列表】

2023549316000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/081610

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/28 C07K16/40 A61K35/00 A61K39/395 A61N5/10
C07K16/24 A61P35/00
ADD. A61K39/00
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K A61K A61N A61P

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2018/185045 A1 (HOFFMANN LA ROCHE [CH]; HOFFMANN LA ROCHE [US]) 11 October 2018 (2018-10-11) cited in the application	1-27
Y	page 16, line 8; claim 3; figure 1C; examples 1-3 page 95, line 18	1-27
	----- -/--	

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.
[X] 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
7 February 2022	16/02/2022

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Siaterli, Maria

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2021/081610

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HONEYCHURCH JAMIE ET AL: "Anti-CD40 monoclonal antibody therapy in combination with irradiation results in a CD8 T-cell-dependent immunity to B-cell lymphoma", BLOOD, vol. 102, no. 4, 15 August 2003 (2003-08-15), pages 1449-1457, XP055878444, US ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood-2002-12-3717 Retrieved from the Internet: URL:https://ashpublications.org/blood/article-pdf/102/4/1449/1690032/h81603001449.pdf>	1-27
Y	the whole document paragraph [discussion]	1-27
X	YAO HAO ET AL: "Enhancing radiotherapy for lung cancer using immunoadjuvants deliveredfrom new design radiotherapy biomaterials: a preclinical study", PHYSICS IN MEDICINE AND BIOLOGY, INSTITUTE OF PHYSICS PUBLISHING, BRISTOL GB, vol. 61, no. 24, 2 December 2016 (2016-12-02), XP020311568, ISSN: 0031-9155, DOI: 10.1088/1361-6560/61/24/N697 [retrieved on 2016-12-02] the whole document	1-27

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2021/081610

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2018185045 A1	11-10-2018	AU 2018247796 A1	29-08-2019
		BR 112019017753 A2	07-04-2020
		CA 3053358 A1	11-10-2018
		CL 2019002542 A1	31-01-2020
		CN 110402255 A	01-11-2019
		CO 2019009432 A2	18-09-2019
		CR 20190427 A	01-11-2019
		EP 3606956 A1	12-02-2020
		JP 2020515276 A	28-05-2020
		KR 20190137125 A	10-12-2019
		MA 49039 A	12-02-2020
		PE 20200006 A1	06-01-2020
		PH 12019502294 A1	06-07-2020
		RU 2019134352 A	05-05-2021
		SG 11201908787W A	30-10-2019
		TW 201841939 A	01-12-2018
		US 2018340030 A1	29-11-2018
		US 2021188992 A1	24-06-2021
		WO 2018185045 A1	11-10-2018

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*47/55*	*(2017.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｄ	
Ｃ０７Ｋ	*16/46*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｎ	
Ｃ０７Ｋ	*16/40*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１２１	
Ｃ１２Ｎ	*15/13*	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	47/55		
			Ｃ０７Ｋ	16/46		
			Ｃ０７Ｋ	16/40		
			Ｃ１２Ｎ	15/13		

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

（特許庁注：以下のものは登録商標）

１．ＴＷＥＥＮ

ヴォードワ

(72)発明者　トルストノーグ， ゲンリッヒ
スイス国 １０１１ ローザンヌ， リュ デュ ビュニョン ４６， シー／オー ソントレ ホスピタリエ ユニヴェシテール ヴォードワ
(72)発明者　トランプフェラー， クリスティーン
スイス国 ８９５２ シュリーレン， ヴァーギシュトラーセ １０， シー／オー ロッシュ グリクアート アーゲー
(72)発明者　ウマーニャ， パブロ
スイス国 ８９５２ シュリーレン， ヴァーギシュトラーセ １０， シー／オー ロッシュ グリクアート アーゲー
(72)発明者　ヴォゼニン， マリー カトリーヌ
スイス国 １０１１ ローザンヌ， リュ デュ ビュニョン ４６， シー／オー ソントレ ホスピタリエ ユニヴェシテール ヴォードワ

Ｆターム（参考）　4C076　BB11 CC27 EE59
4C085　AA13 AA14 AA16 BB31 BB36 BB41 BB42 EE01 GG01 GG02 GG04
4H045　AA11 AA20 AA30 BA10 BA40 CA40 DA56 DA76 EA28 FA74