(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2025年4月3日(03.04.2025)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2025/070636 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/62 (2006.01) *C12N 1/19* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01) *C12N 15/13* (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01) *C12N 15/63* (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01) *C12N 15/85* (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) *C12P 21/08* (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2024/034478

(22) 国際出願日： 2024年9月26日(26.09.2024)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2023-163666 2023年9月26日(26.09.2023) JP
特願 2024-061117 2024年4月4日(04.04.2024) JP

(71) 出願人: ブライトパス・バイオ株式会社(**BRIGHTPATH BIOTHERAPEUTICS CO., LTD.**) [JP/JP]; 〒2100821 神奈川県川崎市川崎区殿町３－２５－２２ (JP).

(72) 発明者: 三重 元弥(**MIE, Motoya**); 〒2100821 神奈川県川崎市川崎区殿町３－２５－２２ ブライトパス・バイオ株式会社 (JP). 中島 款冬(**NAKAJIMA, Kanto**); 〒2100821 神奈川県川崎市川崎区殿町３－２５－２２ ブライトパス・バイオ株式会社 (JP). 荒牧 峻彦(**ARAMAKI, Takahiko**); 〒2100821 神奈川県川崎市川崎区殿町３－２５－２２ ブライトパス・バイオ株式会社 (JP). 大平 悠太(**OHIRA, Yuta**); 〒2100821 神奈川県川崎市川崎区殿町３－２５－２２ ブライトパス・バイオ株式会社 (JP).

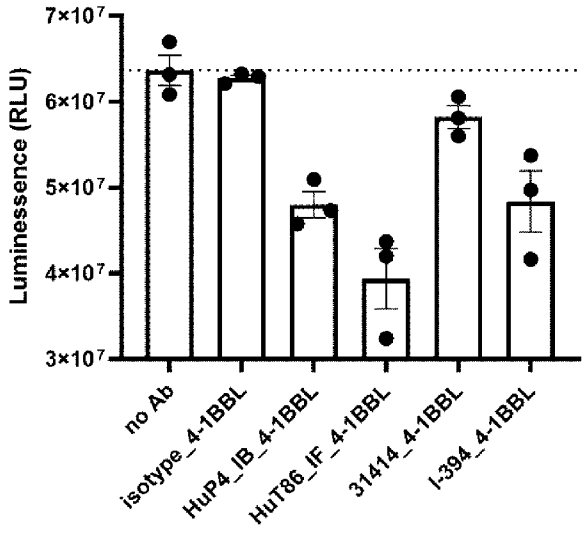
(74) 代理人: ＳＫ弁理士法人，外(**SK INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM** et al.); 〒1500021 東京都渋谷区恵比寿西二丁目２０番１７号 ヒューリック代官山ビル３階３０１号室 (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,

(54) **Title:** MULTISPECIFIC ANTIGEN-BINDING MOLECULE TARGETING CD39

(54) 発明の名称： ＣＤ３９を標的とする多重特異性抗原結合性分子

Fig. 19



(57) **Abstract:** The present invention makes it possible to obtain a novel CD39 binding domain usable for producing a multispecific antigen-binding molecule targeting CD39 on cancer cells, or an article or a method using the CD39 binding domain. Provided is: a CD39 binding domain that includes heavy chains CDR1-3 and light chains CDR1-3 comprising a specific amino acid sequence; or a multispecific molecule comprising the CD39 binding domain. The CD39 binding domain or the multispecific molecule may have binding ability to CD39 on the cancer cell surface.

(57) 要約：がん細胞上のCD39を標的とする多重特異性抗原結合分子の作製に利用可能な新規のCD39結合ドメイン、又はそのCD39結合ドメインを利用した物もしくは方法を得る。特定のアミノ酸配列を含む重鎖CDR1～3及び軽鎖CDR1～3を含むCD39結合ドメイン、又はそのCD39結合ドメインを含む多重特異性分子を提供する。このCD39結合ドメイン又は多重特異性分子は、がん細胞表面のCD39への結合性を有してもよい。

WO 2025/070636 A1

［続葉有］

BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告(条約第21条(3))

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト(規則5.2(a))

明　細　書

発明の名称 ： ＣＤ３９を標的とする多重特異性抗原結合性分子

技術分野

[0001] 本発明の技術分野は、CD39結合ドメイン又はCD39を標的とする多重特異性抗原結合性分子に関する。

背景技術

[0002] CD39は、2回膜貫通型の糖蛋白質であり、肺がん、胃がん、卵巣がん、メラノーマなどのがん細胞に発現することが報告されている（例えば非特許文献1及び2）。特許文献1及び2には、CD39に結合する抗体や、CD39酵素活性の阻害能を有する抗体が記載されている。

[0003] がん治療の分野では、二重特異性抗体などの複数の抗原への結合性を有する分子（多重特異性抗原結合性分子）の研究、開発がされている（例えば非特許文献3～12）。例えば、がん細胞表面抗原（例えばCD19）とT細胞表面抗原（例えばCD3）に結合する二重特異性抗体を患者に投与することによって、がん細胞の近傍にT細胞を引き寄せ、T細胞によってがん細胞を効果的に殺傷する技術が知られている。

[0004] 非特許文献3によれば、140以上の異なる分子が臨床試験中であり、非特許文献3の図1及び表1には臨床試験中の多重特異性抗体の多数のフォーマットが記載されている。米国で承認されているがん治療用の多重特異性抗原結合性分子としては、ブリナツモマブ、テクリスタマブ又はテベンタフスプがある。

[0005] ブリナツモマブは、悪性B細胞上のCD19を標的とする二重特異性抗体であり、CD19結合ドメインとCD3結合ドメインがリンカーを介して連結した構造を有する。テクリスタマブは、骨髄腫細胞上のBCMAを標的とする二重特異性抗体であり、BCMA結合ドメインとCD3結合ドメインがFc領域を介して連結した構造を有する。テベンタフスプは、メラノーマ上のgp100を標的とする二重特異性融合蛋白質であり、gp100結合ドメインとCD3結合ドメインがリンカーを介し

て連結した構造を有する。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：国際公開第2018/167267号

特許文献2：米国特許出願公開第2019/0062448号明細書

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Xia et al., Mol Cancer. 2023 Mar 2;22(1):44.

非特許文献2：Cai et al., Oncol Lett. 2016 Nov; 12(5): 4080-4086.

非特許文献3：Elshiaty et al., Int J Mol Sci. 2021 May 26;22(11):5632.

非特許文献4：Li et al., Cell Mol Immunol. 2020 May; 17(5): 451-461.

非特許文献5：Wei et al., Front Immunol. 2022; 13: 1035276.

非特許文献6：Nie et al., Antib Ther. 2020 Jan; 3(1): 18-62.

非特許文献7：Blanco et al., Clin Cancer Res. 2021 Oct 15; 27(20): 5457-5464.

非特許文献8：Kang et al.,Front Immunol. 2022 Oct 20;13:1020003.

非特許文献9：Brinkmann et al., MAbs. 2017 Feb/Mar;9(2):182-212.

非特許文献10：Salvaris et al., J Pers Med . 2021 Apr 29;11(5):355.

非特許文献11：Knudson et al., Oncoimmunology. 2018; 7(5): e1426519.

非特許文献12：Chen et al., Mol Ther Oncolytics. 2021 Apr 2;21:144-157.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 上記の通り、CD39はがん細胞において発現している。一方で、がん細胞を効果的に殺傷するために、がん細胞上のCD39を標的とする多重特異性抗原結合性分子を作製する場合、最適なCD39結合ドメインを準備する必要がある。

[0009] 本発明者らは、後述の実施例に記載の通り、新規の特定のCD39結合ドメインを作製し、そのCD39結合ドメインを有する多重特異性抗原結合性分子を作

製した。その結果、がん細胞膜上のCD39への親和性、又はがん細胞と免疫細胞のエンゲージに伴う抗腫瘍作用もしくはサイトカイン産生作用などの1つ以上の特性に優れた多重特異性抗原結合性分子が得られた。

[0010] 本発明は、がん細胞上のCD39を標的とする多重特異性抗原結合性分子の作製に利用可能な新規のCD39結合ドメイン、又はそのCD39結合ドメインを利用した物もしくは方法を提供すること等を目的とする。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明の一態様によれば、(a)配列番号1で示されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、配列番号2で示されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR2、配列番号3で示されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR3、配列番号4で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、配列番号5で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2、及び配列番号6で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を含む、CD39結合ドメイン、

(b)配列番号7で示されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、配列番号8で示されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR2、配列番号9で示されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR3、配列番号10で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、配列番号11で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2、及び配列番号12で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を含む、CD39結合ドメイン、

(c)配列番号13で示されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、配列番号14で示されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR2、配列番号15で示されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR3、配列番号16で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、配列番号17で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2、及び配列番号18で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を含む、CD39結合ドメイン、又は

(d)配列番号19で示されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、配列番号20で示されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR2、配列番号21で示されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR3、配列番号22で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、配列番号23で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2、及び配列番号24で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を含む、CD39結合ドメイン、

を含む、多重特異性抗原結合性分子が提供される。この多重特異性抗原結

合性分子を用いれば、優れた抗腫瘍作用を生じさせることができる。

[0012] 本発明の一態様によれば、上記の(a)～(d)のいずれかの重鎖CDR1～3及び軽鎖CDR1～3を含む、CD39結合ドメイン、を含む、多重特異性抗原結合性分子をコードする、ポリヌクレオチド又はベクターが提供される。本発明の一態様によれば、上記のポリヌクレオチド又はベクターを含む、細胞が提供される。本発明の一態様によれば、上記の細胞を増殖させる工程を含む、多重特異性抗原結合性分子の生産方法が提供される。本発明の一態様によれば、上記の多重特異性抗原結合性分子を含む、組成物が提供される。本発明の一態様によれば、上記の多重特異性抗原結合性分子を含む、悪性腫瘍の治療のための医薬組成物が提供される。本発明の一態様によれば、上記の多重特異性抗原結合性分子を含む、免疫細胞のサイトカイン産生促進用組成物が提供される。本発明の一態様によれば、上記の多重特異性抗原結合性分子を含む、キットが提供される。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]抗ヒトCD39抗体のエピトープビニングの結果を示した図である。エピトープビニングはBiacore 8Kを用いて行った。リコンビナントヒトCD39抗原をキャプチャーしたNi-NTAセンサーチップに、図１の縦に記載した抗体（1st Ab）、続けて図１の横に記載した抗体（2nd Ab）を流し、2nd Abの結合に伴うレスポンスの有無で評価した。レスポンスが見られなかった組み合わせを暗灰色、レスポンスが見られた組み合わせを白色で示した。流す順番を変えることでレスポンスに違いがあった組み合わせは淡灰色で示した。同様の競合を示すクローンをまとめ、4つのビンに分類した。

[図2]表面プラズモン共鳴による抗ヒトCD39抗体のリコンビナント抗原に対する親和性測定の結果を示した図である。Human Antibody Capture Kit(Cytiava)を用いて各抗ヒトCD39抗体をCM5センサーチップにキャプチャーさせ、50 nMあるいは12.5 nMから2倍希釈系列で5段階に調製したリコンビナントヒトCD39をアナライトとして流した。結合速度（ka）及び解離速度（kd）は単純な一対一のラングミュア結合モデルを用いて計算した。平衡解離定数（KD）はkd/

ka比として算出した。

[図3]抗ヒトCD39抗体の細胞膜上抗原への結合性の測定結果を示した図である。ヒトCD39を安定発現するHEK293T細胞に対する各抗CD39抗体の結合をフローサイトメトリーによって測定し、抗体濃度に対して平均蛍光強度をプロットした。

[図4]実施例2.1で設計した二重特異性分子の模式図である。二重特異性分子は、ヒトCD39を標的とする第一の抗原結合ドメイン（CD39結合ドメイン）と、免疫細胞表面抗原であるヒト4-1BBを標的とする第二の抗原結合ドメイン（4-1BB結合ドメイン）を有するように設計した。第一の抗原結合ドメインはscFv形状とした抗ヒトCD39抗体を使用した。第二の抗原結合ドメインはヒト4-1BBLの細胞外ドメインの三量体を使用した。第一の抗原結合ドメインを含むポリペプチド鎖のFc領域にKnob-into-Hole（US7183076B2, Knob: Seq No.2, Hole: Seq No.3）のうちHoleの変異を入れ（Hole変異Fc領域：配列番号38）、第二の抗原結合ドメインを含むポリペプチド鎖のFc領域にはKnobの変異を入れた（Knob変異Fc領域：配列番号45）。

[図5]表面プラズモン共鳴による二重特異性分子のヒトCD39及び4-1BBに対する親和性測定の結果を示した図である。Human Antibody Capture Kitを用いて各二重特異性分子をCM5センサーチップにキャプチャーさせ、アナライトとしてリコンビナントヒトCD39は50 nMあるいは12.5 nMから2倍希釈系列で5段階、あるいはリコンビナントヒト4-1BBは2uMから4倍希釈系列で4段階に調製して流した。結合速度（ka）及び解離速度（kd）は単純な一対一のラングミュア結合モデルを用いて計算した。平衡解離定数（KD）はkd/ka比として算出した。

[図6]二重特異性分子のヒトがん細胞株（OAW42）への結合性の測定結果を示した図である。OAW42細胞に対する各二重特異性分子の結合をフローサイトメトリーによって測定し、抗体濃度に対して平均蛍光強度をプロットした。

[図7]二重特異性分子のヒトがん細胞株（SKMEL28）への結合性の測定結果を示した図である。SKMEL28細胞に対する各二重特異性分子の結合をフローサイ

トメトリーによって測定し、抗体濃度に対して平均蛍光強度をプロットした。

[図8]二重特異性分子のヒトCD39酵素活性阻害能の測定結果を示した図である。OAW42細胞を96ウェルプレートに6.25x10^{3}細胞／ウェルとなるように播種し、段階希釈した二重特異性分子を添加した。さらにATPを添加し、30分後に上清中に残存しているATP量を、CellTiter-Glo（登録商標）2.0（Promega, G9242）で定量した。細胞を播種していないウェルのATP残存値を100%、細胞を播種し抗体を添加していないウェルのATP残存値を0%とし、測定サンプルのATP残存値の割合から、各二重特異性分子におけるATP分解の阻害率を算出した。

[図9]がん細胞とPBMCの共培養系におけるサイトカイン産生量の測定結果を示した図である。標的細胞として50GyのX線照射をしたSKMEL28細胞を96ウェルプレートに2x10^{4}細胞／ウェルとなるように播種し、エフェクター細胞／標的細胞比（E/T）が10となるように、エフェクター細胞としてPBMCを加えた。あるいはエフェクター細胞だけを加えたウェルを調製した。さらに、10ug/mLの各二重特異性分子および1nMの抗ヒトCD3抗体(OKT3)を加え、37℃で2日間インキュベートした。２日後の培養上清を回収し、Luminexでサイトカイン（IL-2、TNF-α、およびIFN-γ）濃度を測定した。

[図10]表面プラズモン共鳴によるヒト化抗ヒトCD39抗体のリコンビナント抗原に対する親和性測定の結果を示した図である。Human Antibody Capture Kitを用いて各抗ヒトCD39抗体をCM5センサーチップにキャプチャーさせ、40 nMあるいは10 nMから2倍希釈系列で5段階に調製したリコンビナントヒトCD39をアナライトとして流した。結合速度（ka）及び解離速度（kd）は単純な一対一のラングミュア結合モデルを用いて計算した。平衡解離定数（KD）はkd/ka比として算出した。

[図11]ヒト化抗ヒトCD39抗体の細胞膜上抗原への結合解析の結果を示した図である。ヒトCD39を安定発現するHEK293T細胞に対する各抗CD39抗体の結合をフローサイトメトリーによって測定し、抗体濃度に対して平均蛍光強度をプ

ロットした。

[図12]表面プラズモン共鳴による二重特異性分子のヒトCD39及び4-1BBに対する親和性測定の結果を示した図である。Human Antibody Capture Kitを用いて各二重特異性分子をCM5センサーチップにキャプチャーさせ、アナライトとしてリコンビナントヒトCD39は50 nMあるいは12.5 nMから2倍希釈系列で5段階、あるいはリコンビナントヒト4-1BBは2uMから4倍希釈系列で4段階に調製して流した。結合速度（ka）及び解離速度（kd）は単純な一対一のラングミュア結合モデルを用いて計算した。平衡解離定数（KD）はkd/ka比として算出した。

[図13]二重特異性分子のヒトがん細胞株（OAW42）への結合性の測定結果を示した図である。OAW42細胞に対する各二重特異性分子の結合をフローサイトメトリーによって測定し、抗体濃度に対して平均蛍光強度をプロットした。

[図14]二重特異性分子のヒトがん細胞株（SKMEL28）への結合性の測定結果を示した図である。SKMEL28細胞に対する各二重特異性分子の結合をフローサイトメトリーによって測定し、抗体濃度に対して平均蛍光強度をプロットした。

[図15]がん細胞とPBMCの共培養系におけるIL-2産生量の測定結果を示した図である。96ウェルプレートに標的細胞としてSKMEL28細胞を、$2x10^4$細胞／ウェルとなるように播種し、エフェクター細胞／標的細胞比（E/T）が1.6となるように、エフェクター細胞としてPBMCを加えた。あるいはエフェクター細胞だけを加えたウェルを調製した。さらに、1ug/mLの各二重特異性分子および1 nMの抗ヒトCD3抗体(OKT3)を加え、37℃で4日あるいは6日間インキュベートした。インキュベート後の培養上清を回収し、LuminexでIL-2濃度を測定した。

[図16]がん細胞とPBMCの共培養系におけるTNF-α産生量の測定結果を示した図である。条件は図15の説明を参照のこと。

[図17]がん細胞とPBMCの共培養系におけるIFN-γ産生量の測定結果を示した図である。条件は図15の説明を参照のこと。

[図18]図15、16、17におけるサイトカイン産生量測定の実験条件及びP値につ

いてまとめた図である。

[図19]二重特異性分子によるがん細胞の増殖抑制効果の測定結果を示した図である。SKMEL28細胞を96ウェルプレートに4 x10^3細胞／ウェルとなるように播種し、エフェクター細胞／標的細胞比（E/T）が2となるように、エフェクター細胞としてPBMCを加えた。さらに、1ug/mLの各二重特異性分子および1nMの抗ヒトCD3抗体(OKT3)を加え、37℃で7日間インキュベートした。7日後に培養上清を除去し、プレート底に残存している細胞数を、ATP量を指標にしてCellTiter-Glo（登録商標）2.0（Promega, G9242）で定量した。

[図20]図19における増殖抑制効果の測定結果におけるP値についてまとめた図である。

[図21]実施例で使用した分子のCDRのアミノ酸配列を示した図である。

[図22]実施例で使用した分子の可変領域のアミノ酸配列を示した図である。

[図23]実施例で使用した分子のFc領域のアミノ酸配列を示した図である。

[図24]実施例で使用した分子の各領域のアミノ酸配列を示した図である。

[図25]実施例で使用した抗CD3抗体の各領域のアミノ酸配列を示した図である。

[図26]表面プラズモン共鳴による二重特異性分子のリコンビナント抗原に対する親和性測定の結果を示した図である。Human Antibody Capture Kit(Cytiava)を用いて二重特異性分子をCM5センサーチップにキャプチャーさせ、50 nMあるいは12.5 nMから2倍希釈系列で5段階に調製したリコンビナントヒトCD39をアナライトとして流した。結合速度（ka）及び解離速度（kd）は単純な一対一のラングミュア結合モデルを用いて計算した。平衡解離定数（KD）はkd/ka比として算出した。

[図27]二重特異性分子のヒトがん細胞株（SKMEL28）への結合性の測定結果を示した図である。SKMEL28細胞に対する各二重特異性分子の結合をフローサイトメトリーによって測定し、抗体濃度に対して平均蛍光強度をプロットした。

[図28]二重特異性分子によるがん細胞の増殖抑制効果の測定結果を示した図

である。SKMEL28細胞を96ウェルプレートに4 x10^3細胞／ウェルとなるように播種し、エフェクター細胞／標的細胞比（E/T）が2となるように、エフェクター細胞としてPBMCを加えた。さらに、1ug/mLの各二重特異性分子および1nMの抗ヒトCD3抗体(OKT3)を加え、37℃で7日間インキュベートした。7日後に培養上清を除去し、プレート底に残存している細胞数を、ATP量を指標にしてCellTiter-Glo（登録商標）2.0（Promega, G9242）で定量した。

[図29]がん細胞とPBMCの共培養系におけるIL-2、TNF-α、又はIFN-γ産生量の測定結果を示した図である。96ウェルプレートに標的細胞としてSKMEL28細胞を、2x10^4細胞／ウェルとなるように播種し、エフェクター細胞／標的細胞比（E/T）が1.6となるように、エフェクター細胞としてPBMCを加えた。あるいはエフェクター細胞だけを加えたウェルを調製した。さらに、1ug/mLの各二重特異性分子および1nMの抗ヒトCD3抗体(OKT3)を加え、37℃で4日あるいは6日間インキュベートした。インキュベート後の培養上清を回収し、LuminexでIL-2、TNF-α、及びIFN-γ濃度を測定した。

[図30]がん細胞とPBMCの共培養系におけるGranzyme B又はPerforin産生量の測定結果を示した図である。条件は図29の説明を参照のこと。但し、濃度測定にはMILLIPLEX MAP 7-Plex Human CD8+/Cytokine Magnetic Bead Panel（Millipore, #HCD8MAG15K17PMX）を使用した。

[図31]フローサイトメトリー解析でCD4陽性T細胞及びCD8陽性T細胞の総数を算出し、それぞれをCD39とPD1の発現パターンで分類した結果を示す。

発明を実施するための形態

[0014] 以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。なお、同様な内容については繰り返しの煩雑を避けるために、適宜説明を省略する。

[0015] 本発明の一実施形態によれば、新規のCD39結合ドメイン、又は新規のCD39結合ドメインを含む多重特異性抗原結合性分子が提供される。このCD39結合ドメインは、

(a)配列番号1で示されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、配列番号2で示されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR2、配列番号3で示されるアミノ酸配列を含む重

鎖CDR3、配列番号4で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、配列番号5で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2、及び配列番号6で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3、

(b)配列番号7で示されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、配列番号8で示されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR2、配列番号9で示されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR3、配列番号10で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、配列番号11で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2、及び配列番号12で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3、

(c)配列番号13で示されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、配列番号14で示されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR2、配列番号15で示されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR3、配列番号16で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、配列番号17で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2、及び配列番号18で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3、又は

(d)配列番号19で示されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、配列番号20で示されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR2、配列番号21で示されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR3、配列番号22で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、配列番号23で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2、及び配列番号24で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3、（以下、略して(a)～(d)のいずれかのCDRセットと称することがある）

を含む、CD39結合ドメインであってもよい。そのようなCD39結合ドメインを用いれば、後述する実施例で実証されているように、優れた多重特異性抗原結合性分子を作製することができる。優れた多重特異性抗原結合性分子は、例えば、がん細胞膜上のCD39への高い親和性、がん細胞と免疫細胞のエンゲージに伴う高い抗腫瘍作用、又はがん細胞と免疫細胞のエンゲージに伴う高いサイトカイン産生作用を有する多重特異性抗原結合性分子を含む。

[0016] 本発明の一実施形態において、上記CD39は、別名としてENTPD1又はEctonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1で示される蛋白質を含む。CD39はがん細胞表面に発現し得る。CD39のアミノ酸配列等の詳細は、NCBI又はUni

Prot等のWEBサイトから確認できる。UniProtに記載されているCD39のPrimary accession numberは、例えば、P49961である。ヒトCD39のアミノ酸配列は、例えば、配列番号61である。CD39は、CD39活性を有していれば、その生物由来は限定されない。CD39活性は、例えば、ATP分解活性、ADP分解活性、又はATP又はADPのAMPへの変換活性を含む。CD39活性は、CD39とATPが接触可能な環境下でインキュベーションし、ATPの減少量を測定することで評価してもよい。ATPの減少量は、例えば、CellTiter-Glo（Promega）を用いて化学発光を測定することで評価してもよい。CD39は、例えば、ヒト又はサル由来のCD39を含む。

[0017] 本発明の一実施形態において、上記多重特異性抗原結合性分子による抗腫瘍作用は、例えば、CD39（がん細胞表面抗原）及び免疫細胞表面抗原に結合する多重特異性抗原結合性分子によって、がん細胞の近傍に免疫細胞が引き寄せられ、免疫細胞によってがん細胞が殺傷されることに起因してもよい。このようながん細胞と免疫細胞のエンゲージによるがん細胞の殺傷は、例えば、Elshiaty et al., Int J Mol Sci. 2021 May 26;22(11):5632.、Li et al., Cell Mol Immunol. 2020 May; 17(5): 451-461. 、Wei et al., Front Immunol. 2022; 13: 1035276.、Nie et al., Antib Ther. 2020 Jan; 3(1): 18-62.、Blanco et al., Clin Cancer Res. 2021 Oct 15; 27(20): 5457-5464.、Salvaris et al., J Pers Med . 2021 Apr 29;11(5):355.、Kang et al., Front Immunol. 2022 Oct 20;13:1020003.、又はBrinkmann et al., MAbs. 2017 Feb/Mar;9(2):182-212.に記載されているようなメカニズムやフォーマットを利用できる。

[0018] 本発明の一実施形態において、上記多重特異性抗原結合性分子による抗腫瘍作用は、例えば、CD39（がん細胞表面抗原）及び抗炎症性サイトカインに結合する多重特異性抗原結合性分子によって、抗炎症性サイトカインをトラップして、腫瘍微小環境における抗炎症性サイトカインのシグナル伝達を減少させることに起因してもよい。このシグナル伝達は、例えば、制御性T細胞を誘導するシグナルを含む。このような抗腫瘍作用は、例えば、Knudson et

al., Oncoimmunology. 2018; 7(5): e1426519.、Chen et al., Mol Ther Oncolytics. 2021 Apr 2;21:144-157.、又はElshiaty et al., Int J Mol Sci. 2021 May 26;22(11):5632.に記載されているようなメカニズムやフォーマットを利用できる。

[0019] 本発明の一実施形態において、多重特異性抗原結合性分子は、例えば、Knobs-into-Holes (KIH)法、quadroma技術、CrossMAb技術又は共培養法で作製してもよい。これらの作製方法を含め、多重特異性抗原結合性分子の作製方法は、例えば、Wang et al., Antibodies (Basel). 2019 Aug 2;8(3):43.、Brinkmann et al., MAbs. 2017 Feb/Mar;9(2):182-212.、又はKlein et al., MAbs. 2012 Nov 1; 4(6): 653-663.に記載の方法を使用できる。KIH法では重鎖の一方にKnob変異を、もう一方にHole変異を導入した組換え体抗体鎖を発現させる。HoleにKnobが挿入されるように設計されることで、優先的にヘテロダイマーが産生される。IgG様フォーマットの二重特異性抗体においてFc領域に連結する2つのFabは、その1つ又は2つをscFv、抗原に対するリガンド又はその抗原結合性フラグメントを含む、ポリペプチド、又は抗原に対する受容体又はその抗原結合性フラグメントを含む、ポリペプチドで置き換えることもできる。KIH法は、例えば、US7183076 B2に記載の方法を利用してもよい。

[0020] 本発明の一実施形態において、上記多重特異性抗原結合性分子は、複数種類の異なる抗原への結合性を有する分子を含む。多重特異性抗原結合性分子は、例えば、二重特異性抗原結合性分子又は三重特異性抗原結合性分子を含む。多重特異性抗原結合性分子は、例えば、多重特異性抗体又は多重特異性融合蛋白質を含む。多重特異性抗体は、例えば、二重特異性抗体又は三重特異性抗体を含む。多重特異性融合蛋白質は、例えば、二重特異性融合蛋白質又は三重特異性融合蛋白質を含む。多重特異性（multispecific）は2以上の異なる抗原への特異性があること、二重特異性（bispecific）は2つの異なる抗原への特異性があること、三重特異性（trispecific）は3つの異なる抗原への特異性があることを含む。

[0021] 本発明の一実施形態において、上記CD39結合ドメインは、上記(a)又は(b)

のCDRセットを含むCD39結合ドメインであることが好ましい。この場合、がん細胞膜上のCD39への高い親和性、がん細胞と免疫細胞のエンゲージに伴う高い抗腫瘍作用、又はがん細胞と免疫細胞のエンゲージに伴う高いサイトカイン産生作用の観点から、より優れた多重特異性抗原結合性分子が得られる。

[0022] 本発明の一実施形態において、上記CD39結合ドメインは、上記(b)のCDRセットを含むCD39結合ドメインであることがさらに好ましい。この場合、がん細胞膜上のCD39への高い親和性、がん細胞と免疫細胞のエンゲージに伴う高い抗腫瘍作用、又はがん細胞と免疫細胞のエンゲージに伴う高いサイトカイン産生作用の観点から、さらに優れた多重特異性抗原結合性分子が得られる。また、CD39酵素阻害に起因する副作用（例えば好中球減少）の抑制の観点から優れている。

[0023] 本発明の一実施形態において、上記CD39結合ドメインは、がん細胞表面のCD39への結合性を有することが好ましい。CD39結合ドメインの結合能を評価する方法として、リコンビナントCD39への結合評価（例えば、表面プラズモン共鳴によるAffinity解析やELISA）と細胞表面のCD39への結合評価（例えば、CD39強制発現細胞やCD39発現がん細胞への結合評価）があるが、CD39は後者の方がより生体内にある状態を反映しているため、多重特異性抗原結合性分子の標的として適している。

[0024] 本発明の一実施形態において、上記CD39結合ドメインは、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含むドメインを含む。この場合、上記(a)～(d)のいずれかのCDRセットは、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域内に含まれる。

[0025] 本発明の一実施形態において、上記CD39結合ドメインは、ヒト化されたCD39結合ドメインであってもよい。ヒト化されたドメインは、例えば、CDR以外のアミノ酸配列がヒト免疫グロブリン由来のアミノ酸配列を有していてもよい。ヒト化されたドメインは、例えば、非ヒト種由来の1つ以上のCDR、及びヒト免疫グロブリン由来のフレームワーク領域を有し、所望の抗原に結合するドメインを含んでもよい。ドメインのヒト化は、例えば、後述の実施例3.1に記載のような手順で実施できる。その他、当該技術分野で既知の種々の手

法を使用してもよい（例えば、Safdari et al., Biotechnol Genet Eng Rev. 2013;29:175-86.）。

[0026] 本発明の一実施形態において、上記CD39結合ドメイン又はCD39結合ドメインを含むポリペプチドの生産方法は特に限定されないが、例えば、(i)モデリング/シミュレーションソフトウェア（例えば、BIOVIA Discovery Studio 2020（Dassault Systems））を用いて、上記(a)～(d)のいずれかのCDRセットを含む抗体可変領域配列（例えば、ヒト化抗体可変領域配列）を設計する工程、(ii)抗体可変領域配列を（任意に定常領域（例えばヒト定常領域）をコードする）発現ベクターに組み込む工程、(iii)発現ベクターを細胞にトランスフェクションする工程、又は(iv)細胞から抗体可変領域を含むポリペプチドを回収及び精製する工程、を経て生産できる。CD39結合ドメイン又はCD39結合ドメインを含むポリペプチドは、Safdari et al., Biotechnol Genet Eng Rev. 2013;29:175-86.に記載されているようなグラフティング技術を用いて、上記(a)～(d)のいずれかのCDRセットを既存の抗体配列に移植する工程を経て生産してもよい。CD39結合ドメインを含むポリペプチドは、CD39を哺乳類に免疫し、抗CD39抗体細胞を取得する工程、を経て生産してもよい。CD39結合ドメインを含むポリペプチドは、CD39への結合強度又はCD39活性の阻害能を指標にポリペプチドをスクリーニングする工程、を経て生産してもよい。CDR、可変領域、Fc領域、又は定常領域は、典型的には抗体に由来する領域である。CD39結合ドメインを含むポリペプチドは、例えば、抗体（例えば、全長抗体、scFv又はFab）を含んでもよい。

[0027] 本発明の一実施形態において、上記多重特異性抗原結合性分子は、抗腫瘍活性を有する多重特異性抗原結合性分子を含む。この抗腫瘍活性は、多重特異性抗原結合性分子が複数種類の抗原に結合したことに起因して生じる抗腫瘍活性を含む。この抗腫瘍活性は、多重特異性抗原結合性分子が、がん細胞表面のCD39、及び免疫細胞表面抗原又は抗炎症性サイトカインに結合することによって生じる抗腫瘍活性を含む。この抗腫瘍活性は、例えば、細胞傷害活性を含む。抗腫瘍活性は、Fc領域とFc受容体の結合に起因して生じるもの

を含まなくてよい。多重特異性抗原結合性分子は、免疫細胞（例えばT細胞）の活性化能を有する多重特異性抗原結合性分子を含む。免疫細胞の活性化は、がん免疫応答が促進されることを含む。

[0028] 本発明の一実施形態において、上記多重特異性抗原結合性分子は、第一の抗原（例えばCD39）への結合性を有し、且つ第二の抗原（例えばCD39以外の抗原）への結合性を有する、多重特異性抗原結合性分子を含む。多重特異性抗原結合性分子は、上記第一の抗原への結合性を有するドメインを有し、且つ上記第二の抗原への結合性を有するドメインを含む、多重特異性抗原結合性分子を含む。第二の抗原は、例えば、免疫細胞表面抗原又は抗炎症性サイトカインを含む。

[0029] 本発明の一実施形態において、上記多重特異性抗原結合性分子は、第一の結合ドメイン及び第二の結合ドメインを含む、多重特異性抗原結合性分子を含む。多重特異性抗原結合性分子は、例えば、第一の結合ドメインとして上記CD39結合ドメインを含み、第二の結合ドメインとして免疫細胞表面抗原結合ドメイン又は抗炎症性サイトカイン結合ドメインを含む、多重特異性抗原結合性分子を含む。第一の結合ドメインと、第二の結合ドメインの間にリンカーが存在してもよい。第一の結合ドメインと、第二の結合ドメインとはFc領域を介して連結していてもよい。第一の結合ドメインと、第二の結合ドメインとはジスルフィド結合を介して連結していてもよい。第二の結合ドメインは、免疫細胞（例えばT細胞）の活性化能を有していてもよい。

[0030] 本発明の一実施形態において、上記免疫細胞は、例えば、リンパ球、単球、NK細胞、NKT細胞、樹状細胞又は顆粒球を含む。リンパ球は、例えば、T細胞又はB細胞を含む。T細胞は、例えば、キラーT細胞、ヘルパーT細胞、制御性T細胞又はγδT細胞を含む。顆粒球は、例えば、好酸球、好塩基球又は好中球を含む。免疫細胞表面抗原は、これら1つ以上の免疫細胞上に発現する抗原を含む。

[0031] 本発明の一実施形態において、上記免疫細胞表面抗原は、例えば、共刺激分子、免疫チェックポイント分子又はCD3を含む。共刺激分子は、例えば、4-

1BB、GITR、CD27、CD40又はNKp30を含む。免疫チェックポイント分子は、例えば、TIM-3、LAG-3、BTLA、CTLA-4又はCD73を含む。免疫細胞表面抗原結合ドメインは、これら1つ以上の免疫細胞表面抗原への結合性を有するドメインを含む。免疫細胞表面抗原は、例えば、免疫細胞（例えばT細胞）を活性化する分子を含む。

[0032] 本発明の一実施形態において、上記抗炎症性サイトカインは、例えば、制御性T細胞（Treg）を誘導する分子を含む。抗炎症性サイトカインは、例えば、TGFβ、IL-4、IL-10又はIL-11を含む。Tregは、例えば、抗炎症性サイトカイン（例えばTGFβ）の存在下における抗原刺激により末梢血中のナイーブT細胞から分化誘導され得る。

[0033] 本発明の一実施形態において、上記多重特異性抗原結合性分子は、例えば、第一の結合ドメインとして上記CD39結合ドメインを含み、第二の結合ドメインとして4-1BB、GITR、CD27、CD40、NKp30、TIM-3、LAG-3、BTLA、CTLA-4、CD73、CD3、又はTGFβ結合ドメインを含む、多重特異性抗原結合性分子を含む。この場合、特に優れた抗腫瘍作用を有する多重特異性抗原結合性分子が得られる。

[0034] 本発明の一実施形態において、上記4-1BBは、別名としてCD137で示される蛋白質を含む。4-1BBは、TNF受容体ファミリーに属する共刺激分子であり、T細胞やNK細胞の活性化や生存に関与することが報告されている。4-1BBのアミノ酸配列等の詳細は、NCBI又はUniProt等のWEBサイトから確認できる。UniProtに記載されている4-1BBのPrimary accession numberは、例えば、Q07011である。ヒト4-1BBのアミノ酸配列は、例えば、配列番号62である。4-1BBは、例えば、ヒト又はサル由来の4-1BBを含む。

[0035] 本発明の一実施形態において、上記4-1BB結合ドメインは、例えば、4-1BBに結合性を有するポリペプチドを含む。4-1BB結合ドメインは、例えば、4-1BBに対するリガンド又は抗4-1BB抗体内のアミノ酸配列を含んでもよい。4-1BB結合ドメインは、例えば、4-1BBに対するリガンド又は抗4-1BB抗体内の、4-1BBに結合性を有する領域もしくはドメイン、又は4-1BBへの結合性を決定する

領域を特に含んでもよい。4-1BBに対するリガンド内の4-1BBに結合性を有する領域は、例えば、細胞外ドメインであってもよい。4-1BBに対するリガンド内の4-1BBに結合性を有する領域は、例えば、配列番号39で示されるアミノ酸配列を含んでもよい。4-1BBに対するリガンドは、例えば、4-1BBLを含んでもよい。4-1BB結合ドメインは、例えば、4-1BBに対するリガンド由来のアミノ酸配列として、(i)配列番号39で示されるアミノ酸配列、(ii)配列番号39で示されるアミノ酸配列に対して90%以上の相同性を有するアミノ酸配列、又は(iii)配列番号39で示されるアミノ酸配列に対して数個以内のアミノ酸の欠失、置換、挿入又は付加を有するアミノ酸配列を含んでもよい。4-1BBに対するリガンドのアミノ酸配列は、例えば、配列番号40で示されるアミノ酸配列を含んでもよい。4-1BB結合ドメインは、例えば、4-1BBに対するリガンド由来のアミノ酸配列として、(i)配列番号40で示されるアミノ酸配列、(ii)配列番号40で示されるアミノ酸配列に対して90%以上の相同性を有するアミノ酸配列、又は(iii)配列番号40で示されるアミノ酸配列に対して1～数個のアミノ酸の欠失、置換、挿入又は付加を有するアミノ酸配列を含んでもよい。4-1BB結合ドメインは、例えば、4-1BBに対するリガンド由来のアミノ酸配列を含むポリペプチドの三量体を含んでもよい。4-1BBに対するリガンドは、例えば、4-1BBLを含んでもよい。抗4-1BB抗体内の4-1BBへの結合性を決定する領域は、例えば、重鎖CDR1～3及び軽鎖CDR1～3のアミノ酸配列を含んでもよい。抗4-1BB抗体内の4-1BBに結合性を有する領域は、例えば、可変領域（例えば重鎖可変領域又は軽鎖可変領域を含む）のアミノ酸配列を含んでもよい。4-1BB結合ドメインは、例えば、抗4-1BB抗体由来のアミノ酸配列として、重鎖CDR1～3及び軽鎖CDR1～3のアミノ酸配列を含んでもよい。4-1BB結合ドメインは、例えば、抗4-1BB抗体由来のアミノ酸配列として、可変領域（例えば重鎖可変領域又は軽鎖可変領域を含む。以下同様。）のアミノ酸配列を含んでもよい。4-1BB結合ドメインは、例えば、抗4-1BB抗体由来のアミノ酸配列として、(i)抗4-1BB抗体の可変領域のアミノ酸配列、(ii)そのアミノ酸配列に対して90%以上の相同性を有するアミノ酸配列、又は(iii)そのアミノ酸配列に対して1

～数個のアミノ酸の欠失、置換、挿入又は付加を有するアミノ酸配列を含んでもよい。4-1BB結合ドメインは、免疫細胞（例えばT細胞）の活性化能を有する4-1BB結合ドメインを含む。上記の抗4-1BB抗体は、アゴニスト抗体であってもよい。上記の抗4-1BB抗体は、例えば、文献に記載の又は市販の抗4-1BB抗体を使用できる（例えば、Bartkowiak et al., Front Oncol. 2015 Jun 8;5:117（例えばα4-1BB（PF-05082566)又はUrelumab）、WO/2000/029445（例えばHz4B4-1）又はShen et al., Am J Cancer Res. 2023 Jul 15;13(7):3246-3256. eCollection 2023.等）。

[0036] 本発明の一実施形態において、上記GITRは、別名としてCD357で示される蛋白質を含む。GITRのアミノ酸配列等の詳細は、NCBI又はUniProt等のWEBサイトから確認できる。UniProtに記載されているGITRのPrimary accession numberは、例えば、Q9Y5U5である。GITRは、例えば、ヒト又はサル由来のGITRを含む。

[0037] 本発明の一実施形態において、上記GITR結合ドメインは、例えば、GITRに結合性を有するポリペプチドを含む。GITR結合ドメインは、例えば、GITRに対するリガンド又は抗GITR抗体内のアミノ酸配列を含んでもよい。GITR結合ドメインは、例えば、GITRに対するリガンド又は抗GITR抗体内の、GITRに結合性を有する領域もしくはドメイン、又はGITRへの結合性を決定する領域を特に含んでもよい。GITRに対するリガンド内のGITRに結合性を有する領域は、例えば、細胞外ドメインであってもよい。GITRに対するリガンドは、例えば、GITRL（Q9UNG2, UniProt Primary accession number）を含んでもよい。GITR結合ドメインは、例えば、GITRに対するリガンド由来のアミノ酸配列として、(i)GITRに対するリガンド又はその細胞外ドメインのアミノ酸配列、(ii)そのアミノ酸配列に対して90％以上の相同性を有するアミノ酸配列、又は(iii)そのアミノ酸配列に対して1～数個のアミノ酸の欠失、置換、挿入又は付加を有するアミノ酸配列を含んでもよい。抗GITR抗体内のGITRへの結合性を決定する領域は、例えば、重鎖CDR1～3及び軽鎖CDR1～3のアミノ酸配列を含んでもよい。抗GITR抗体内のGITRに結合性を有する領域は、例えば、可変領

域（例えば重鎖可変領域又は軽鎖可変領域を含む）のアミノ酸配列を含んでもよい。GITR結合ドメインは、例えば、抗GITR抗体由来のアミノ酸配列として、重鎖CDR1～3及び軽鎖CDR1～3のアミノ酸配列を含んでもよい。GITR結合ドメインは、例えば、抗GITR抗体由来のアミノ酸配列として、可変領域（例えば重鎖可変領域又は軽鎖可変領域を含む。以下同様。）のアミノ酸配列を含んでもよい。GITR結合ドメインは、例えば、抗GITR抗体由来のアミノ酸配列として、(i)抗GITR抗体の可変領域のアミノ酸配列、(ii)そのアミノ酸配列に対して90％以上の相同性を有するアミノ酸配列、又は(iii)そのアミノ酸配列に対して1～数個のアミノ酸の欠失、置換、挿入又は付加を有するアミノ酸配列を含んでもよい。GITR結合ドメインは、免疫細胞（例えばT細胞）の活性化能を有するGITR結合ドメインを含む。上記の抗GITR抗体は、アゴニスト抗体であってもよい。上記の抗GITR抗体は、例えば、文献に記載の又は市販の抗GITR抗体を使用できる（例えば、Knee et al., Eur J Cancer . 2016 Nov; 67:1-10.又はSchaer et al., Curr Opin Investig Drugs.等）。

[0038] 本発明の一実施形態において、上記CD27は、別名としてTNFRSF7で示される蛋白質を含む。CD27のアミノ酸配列等の詳細は、NCBI又はUniProt等のWEBサイトから確認できる。UniProtに記載されているCD27のPrimary accession numberは、例えば、P26842である。CD27は、例えば、ヒト又はサル由来のCD27を含む。

[0039] 本発明の一実施形態において、上記CD27結合ドメインは、例えば、CD27に結合性を有するポリペプチドを含む。CD27結合ドメインは、例えば、CD27に対するリガンド又は抗CD27抗体内のアミノ酸配列を含んでもよい。CD27結合ドメインは、例えば、CD27に対するリガンド又は抗CD27抗体内の、CD27に結合性を有する領域もしくはドメイン、又はCD27への結合性を決定する領域を特に含んでもよい。CD27に対するリガンド内のCD27に結合性を有する領域は、例えば、細胞外ドメインであってもよい。CD27に対するリガンドは、例えば、CD27L (P32970, UniProt Primary accession number）を含んでもよい。CD27結合ドメインは、例えば、CD27に対するリガンド由来のアミノ酸配列と

して、(i)CD27に対するリガンド又はその細胞外ドメインのアミノ酸配列、(ii)そのアミノ酸配列に対して90%以上の相同性を有するアミノ酸配列、又は(iii)そのアミノ酸配列に対して1～数個のアミノ酸の欠失、置換、挿入又は付加を有するアミノ酸配列を含んでもよい。抗CD27抗体内のCD27への結合性を決定する領域は、例えば、重鎖CDR1～3及び軽鎖CDR1～3のアミノ酸配列を含んでもよい。抗CD27抗体内のCD27に結合性を有する領域は、例えば、可変領域（例えば重鎖可変領域又は軽鎖可変領域を含む）のアミノ酸配列を含んでもよい。CD27結合ドメインは、例えば、抗CD27抗体由来のアミノ酸配列として、重鎖CDR1～3及び軽鎖CDR1～3のアミノ酸配列を含んでもよい。CD27結合ドメインは、例えば、抗CD27抗体由来のアミノ酸配列として、可変領域（例えば重鎖可変領域又は軽鎖可変領域を含む。以下同様。）のアミノ酸配列を含んでもよい。CD27結合ドメインは、例えば、抗CD27抗体由来のアミノ酸配列として、(i)抗CD27抗体の可変領域のアミノ酸配列、(ii)そのアミノ酸配列に対して90%以上の相同性を有するアミノ酸配列、又は(iii)そのアミノ酸配列に対して1～数個のアミノ酸の欠失、置換、挿入又は付加を有するアミノ酸配列を含んでもよい。CD27結合ドメインは、免疫細胞（例えばT細胞）の活性化能を有するCD27結合ドメインを含む。上記の抗GITR抗体は、アゴニスト抗体であってもよい。上記の抗CD27抗体は、例えば、文献に記載の又は市販の抗CD27抗体を使用できる（例えば、Sanmamed et al., Semin Oncol . 2015 Aug;42(4):640-55.又はVogel et al., Eur J Immunol . 2022 Oct;52(10):1620-1629.等）。

[0040] 本発明の一実施形態において、上記CD40は、別名としてTNFRSF5で示される蛋白質を含む。CD40のアミノ酸配列等の詳細は、NCBI又はUniProt等のWEBサイトから確認できる。UniProtに記載されているCD40のPrimary accession numberは、例えば、P25942である。CD40は、例えば、ヒト又はサル由来のCD40を含む。

[0041] 本発明の一実施形態において、上記CD40結合ドメインは、例えば、CD40に結合性を有するポリペプチドを含む。CD40結合ドメインは、例えば、CD40に

対するリガンド又は抗CD40抗体内のアミノ酸配列を含んでもよい。CD40結合ドメインは、例えば、CD40に対するリガンド又は抗CD40抗体内の、CD40に結合性を有する領域もしくはドメイン、又はCD40への結合性を決定する領域を特に含んでもよい。CD40に対するリガンド内のCD40に結合性を有する領域は、例えば、細胞外ドメインであってもよい。CD40に対するリガンドは、例えば、CD40L（P29965, UniProt Primary accession number）を含んでもよい。CD40結合ドメインは、例えば、CD40に対するリガンド由来のアミノ酸配列として、(i)CD40に対するリガンド又はその細胞外ドメインのアミノ酸配列、(ii)そのアミノ酸配列に対して90%以上の相同性を有するアミノ酸配列、又は(iii)そのアミノ酸配列に対して1～数個のアミノ酸の欠失、置換、挿入又は付加を有するアミノ酸配列を含んでもよい。抗CD40抗体内のCD40への結合性を決定する領域は、例えば、重鎖CDR1～3及び軽鎖CDR1～3のアミノ酸配列を含んでもよい。抗CD40抗体内のCD40に結合性を有する領域は、例えば、可変領域（例えば重鎖可変領域又は軽鎖可変領域を含む）のアミノ酸配列を含んでもよい。CD40結合ドメインは、例えば、抗CD40抗体由来のアミノ酸配列として、重鎖CDR1～3及び軽鎖CDR1～3のアミノ酸配列を含んでもよい。CD40結合ドメインは、例えば、抗CD40抗体由来のアミノ酸配列として、可変領域（例えば重鎖可変領域又は軽鎖可変領域を含む。以下同様。）のアミノ酸配列を含んでもよい。CD40結合ドメインは、例えば、抗CD40抗体由来のアミノ酸配列として、(i)抗CD40抗体の可変領域のアミノ酸配列、(ii)そのアミノ酸配列に対して90%以上の相同性を有するアミノ酸配列、又は(iii)そのアミノ酸配列に対して1～数個のアミノ酸の欠失、置換、挿入又は付加を有するアミノ酸配列を含んでもよい。CD40結合ドメインは、免疫細胞（例えばT細胞）の活性化能を有するCD40結合ドメインを含む。上記の抗GITR抗体は、アゴニスト抗体であってもよい。上記の抗CD40抗体は、例えば、文献に記載の又は市販の抗CD40抗体を使用できる（例えば、Lang et a., Int J Mol Sci. 2022 Oct 25;23(21):12869.又はHassan et al., Immunopharmacol Immunotoxicol. 2014 Apr;36(2):96-104.等）。

[0042] 本発明の一実施形態において、上記NKp30は、別名としてCD337で示される蛋白質を含む。NKp30のアミノ酸配列等の詳細は、NCBI又はUniProt等のWEBサイトから確認できる。UniProtに記載されているNKp30のPrimary accession numberは、例えば、O14931である。NKp30は、例えば、ヒト又はサル由来のNKp30を含む。

[0043] 本発明の一実施形態において、上記NKp30結合ドメインは、例えば、NKp30に結合性を有するポリペプチドを含む。NKp30結合ドメインは、例えば、NKp30に対するリガンド又は抗NKp30抗体内のアミノ酸配列を含んでもよい。NKp30結合ドメインは、例えば、NKp30に対するリガンド又は抗NKp30抗体内の、NKp30に結合性を有する領域もしくはドメイン、又はNKp30への結合性を決定する領域を特に含んでもよい。NKp30に対するリガンド内のNKp30に結合性を有する領域は、例えば、細胞外ドメインであってもよい。NKp30に対するリガンドは、例えば、B7-H6 (Q68D85, UniProt Primary accession number) を含んでもよい。NKp30結合ドメインは、例えば、NKp30に対するリガンド由来のアミノ酸配列として、(i)NKp30に対するリガンド又はその細胞外ドメインのアミノ酸配列、(ii)そのアミノ酸配列に対して90%以上の相同性を有するアミノ酸配列、又は(iii)そのアミノ酸配列に対して1～数個のアミノ酸の欠失、置換、挿入又は付加を有するアミノ酸配列を含んでもよい。抗NKp30抗体内のNKp30への結合性を決定する領域は、例えば、重鎖CDR1～3及び軽鎖CDR1～3のアミノ酸配列を含んでもよい。抗NKp30抗体内のNKp30に結合性を有する領域は、例えば、可変領域（例えば重鎖可変領域又は軽鎖可変領域を含む）のアミノ酸配列を含んでもよい。NKp30結合ドメインは、例えば、抗NKp30抗体由来のアミノ酸配列として、重鎖CDR1～3及び軽鎖CDR1～3のアミノ酸配列を含んでもよい。NKp30結合ドメインは、例えば、抗NKp30抗体由来のアミノ酸配列として、可変領域（例えば重鎖可変領域又は軽鎖可変領域を含む。以下同様。）のアミノ酸配列を含んでもよい。NKp30結合ドメインは、例えば、抗NKp30抗体由来のアミノ酸配列として、(i)抗NKp30抗体の可変領域のアミノ酸配列、(ii)そのアミノ酸配列に対して90%以上の相同性を有するアミノ酸配列、

又は(iii)そのアミノ酸配列に対して1～数個のアミノ酸の欠失、置換、挿入又は付加を有するアミノ酸配列を含んでもよい。NKp30結合ドメインは、免疫細胞（例えばT細胞）の活性化能を有するNKp30結合ドメインを含む。上記の抗GITR抗体は、アゴニスト抗体であってもよい。上記の抗NKp30抗体は、例えば、文献に記載の又は市販の抗NKp30抗体を使用できる（例えば、Zou et al., PLoS One . 2015 Aug 4;10(8):e0134568.又はQueiroz t al., BMC Infect Dis . 2019 May 17;19(1):433.等）。

[0044] 本発明の一実施形態において、上記TIM-3は、別名としてCD366で示される蛋白質を含む。TIM-3のアミノ酸配列等の詳細は、NCBI又はUniProt等のWEBサイトから確認できる。UniProtに記載されているTIM-3のPrimary accession numberは、例えば、Q8TDQ0である。TIM-3は、例えば、ヒト又はサル由来のTIM-3を含む。

[0045] 本発明の一実施形態において、上記TIM-3結合ドメインは、例えば、TIM-3に結合性を有するポリペプチドを含む。TIM-3結合ドメインは、例えば、抗TIM-3抗体内のアミノ酸配列を含んでもよい。TIM-3結合ドメインは、例えば、抗TIM-3抗体内の、TIM-3に結合性を有する領域もしくはドメイン、又はTIM-3への結合性を決定する領域を特に含んでもよい。抗TIM-3抗体内のTIM-3への結合性を決定する領域は、例えば、重鎖CDR1～3及び軽鎖CDR1～3のアミノ酸配列を含んでもよい。抗TIM-3抗体内のTIM-3に結合性を有する領域は、例えば、可変領域（例えば重鎖可変領域又は軽鎖可変領域を含む）のアミノ酸配列を含んでもよい。TIM-3結合ドメインは、例えば、抗TIM-3抗体由来のアミノ酸配列として、重鎖CDR1～3及び軽鎖CDR1～3のアミノ酸配列を含んでもよい。TIM-3結合ドメインは、例えば、抗TIM-3抗体由来のアミノ酸配列として、可変領域（例えば重鎖可変領域又は軽鎖可変領域を含む。以下同様。）のアミノ酸配列を含んでもよい。TIM-3結合ドメインは、例えば、抗TIM-3抗体由来のアミノ酸配列として、(i)抗TIM-3抗体の可変領域のアミノ酸配列、(ii)そのアミノ酸配列に対して90%以上の相同性を有するアミノ酸配列、又は(iii)そのアミノ酸配列に対して1～数個のアミノ酸の欠失、置換、挿入又は付

加を有するアミノ酸配列を含んでもよい。TIM-3結合ドメインは、免疫細胞（例えばT細胞）の活性化能を有するTIM-3結合ドメインを含む。上記の抗TIM-3抗体は、アンタゴニスト抗体であってもよい。上記の抗TIM-3抗体は、例えば、文献に記載の又は市販の抗TIM-3抗体を使用できる（例えば、Bewersdorfet al., Genes Dev. 2022 Mar 1;36(5-6):259-277.又はBailly, Acta Trop. 2023 Feb;238:106792.等）。

[0046] 本発明の一実施形態において、上記LAG-3は、別名としてCD223で示される蛋白質を含む。LAG-3のアミノ酸配列等の詳細は、NCBI又はUniProt等のWEBサイトから確認できる。UniProtに記載されているLAG-3のPrimary accession numberは、例えば、P18627である。LAG-3は、例えば、ヒト又はサル由来のLAG-3を含む。

[0047] 本発明の一実施形態において、上記LAG-3結合ドメインは、例えば、LAG-3に結合性を有するポリペプチドを含む。LAG-3結合ドメインは、例えば、抗LAG-3抗体内のアミノ酸配列を含んでもよい。LAG-3結合ドメインは、例えば、抗LAG-3抗体内の、LAG-3に結合性を有する領域もしくはドメイン、又はLAG-3への結合性を決定する領域を特に含んでもよい。抗LAG-3抗体内のLAG-3への結合性を決定する領域は、例えば、重鎖CDR1～3及び軽鎖CDR1～3のアミノ酸配列を含んでもよい。抗LAG-3抗体内のLAG-3に結合性を有する領域は、例えば、可変領域（例えば重鎖可変領域又は軽鎖可変領域を含む）のアミノ酸配列を含んでもよい。LAG-3結合ドメインは、例えば、抗LAG-3抗体由来のアミノ酸配列として、重鎖CDR1～3及び軽鎖CDR1～3のアミノ酸配列を含んでもよい。LAG-3結合ドメインは、例えば、抗LAG-3抗体由来のアミノ酸配列として、可変領域（例えば重鎖可変領域又は軽鎖可変領域を含む。以下同様。）のアミノ酸配列を含んでもよい。LAG-3結合ドメインは、例えば、抗LAG-3抗体由来のアミノ酸配列として、(i)抗LAG-3抗体の可変領域のアミノ酸配列、(ii)そのアミノ酸配列に対して90%以上の相同性を有するアミノ酸配列、又は(iii)そのアミノ酸配列に対して1～数個のアミノ酸の欠失、置換、挿入又は付加を有するアミノ酸配列を含んでもよい。LAG-3結合ドメインは、免疫細胞（

例えばT細胞）の活性化能を有するLAG-3結合ドメインを含む。上記の抗LAG-3抗体は、アンタゴニスト抗体であってもよい。上記の抗LAG-3抗体は、例えば、文献に記載の又は市販の抗LAG-3抗体を使用できる（例えば、Sauer et al., Int J Mol Sci. 2022 Sep 1;23(17):9958.又はKozlowski et al., Biomedicines. 2022 Nov 5;10(11):2826.等）。

[0048] 本発明の一実施形態において、上記BTLAは、別名としてCD272で示される蛋白質を含む。BTLAのアミノ酸配列等の詳細は、NCBI又はUniProt等のWEBサイトから確認できる。UniProtに記載されているBTLAのPrimary accession numberは、例えば、Q7Z6A9である。BTLAは、例えば、ヒト又はサル由来のBTLAを含む。

[0049] 本発明の一実施形態において、上記BTLA結合ドメインは、例えば、BTLAに結合性を有するポリペプチドを含む。BTLA結合ドメインは、例えば、抗BTLA抗体内のアミノ酸配列を含んでもよい。BTLA結合ドメインは、例えば、抗BTLA抗体内の、BTLAに結合性を有する領域もしくはドメイン、又はBTLAへの結合性を決定する領域を特に含んでもよい。抗BTLA抗体内のBTLAへの結合性を決定する領域は、例えば、重鎖CDR1～3及び軽鎖CDR1～3のアミノ酸配列を含んでもよい。抗BTLA抗体内のBTLAに結合性を有する領域は、例えば、可変領域（例えば重鎖可変領域又は軽鎖可変領域を含む）のアミノ酸配列を含んでもよい。BTLA結合ドメインは、例えば、抗BTLA抗体由来のアミノ酸配列として、重鎖CDR1～3及び軽鎖CDR1～3のアミノ酸配列を含んでもよい。BTLA結合ドメインは、例えば、抗BTLA抗体由来のアミノ酸配列として、可変領域（例えば重鎖可変領域又は軽鎖可変領域を含む。以下同様。）のアミノ酸配列を含んでもよい。BTLA結合ドメインは、例えば、抗BTLA抗体由来のアミノ酸配列として、(i)抗BTLA抗体の可変領域のアミノ酸配列、(ii)そのアミノ酸配列に対して90%以上の相同性を有するアミノ酸配列、又は(iii)そのアミノ酸配列に対して1～数個のアミノ酸の欠失、置換、挿入又は付加を有するアミノ酸配列を含んでもよい。BTLA結合ドメインは、免疫細胞（例えばT細胞）の活性化能を有するBTLA結合ドメインを含む。上記の抗BTLA抗体は、アンタゴニスト

抗体であってもよい。上記の抗BTLA抗体は、例えば、文献に記載の又は市販の抗BTLA抗体を使用できる（例えば、Sordo-Bahamonde et al., Mol Cancer. 2023 Aug 30;22(1):142.又はChen et a., J Immunother Cancer. 2019 Nov 21;7(1):313.等）。

[0050] 本発明の一実施形態において、上記CTLA-4は、別名としてCD152で示される蛋白質を含む。CTLA-4のアミノ酸配列等の詳細は、NCBI又はUniProt等のWEBサイトから確認できる。UniProtに記載されているCTLA-4のPrimary accession numberは、例えば、P16410である。CTLA-4は、例えば、ヒト又はサル来のCTLA-4を含む。

[0051] 本発明の一実施形態において、上記CTLA-4結合ドメインは、例えば、CTLA-4に結合性を有するポリペプチドを含む。CTLA-4結合ドメインは、例えば、抗CTLA-4抗体内のアミノ酸配列を含んでもよい。CTLA-4結合ドメインは、例えば、抗CTLA-4抗体内の、CTLA-4に結合性を有する領域もしくはドメイン、又はCTLA-4への結合性を決定する領域を特に含んでもよい。抗CTLA-4抗体内のCTLA-4への結合性を決定する領域は、例えば、重鎖CDR1～3及び軽鎖CDR1～3のアミノ酸配列を含んでもよい。抗CTLA-4抗体内のCTLA-4に結合性を有する領域は、例えば、可変領域（例えば重鎖可変領域又は軽鎖可変領域を含む）のアミノ酸配列を含んでもよい。CTLA-4結合ドメインは、例えば、抗CTLA-4抗体由来のアミノ酸配列として、重鎖CDR1～3及び軽鎖CDR1～3のアミノ酸配列を含んでもよい。CTLA-4結合ドメインは、例えば、抗CTLA-4抗体由来のアミノ酸配列として、可変領域（例えば重鎖可変領域又は軽鎖可変領域を含む。以下同様。）のアミノ酸配列を含んでもよい。CTLA-4結合ドメインは、例えば、抗CTLA-4抗体由来のアミノ酸配列として、(i)抗CTLA-4抗体の可変領域のアミノ酸配列、(ii)そのアミノ酸配列に対して90%以上の相同性を有するアミノ酸配列、又は(iii)そのアミノ酸配列に対して1～数個のアミノ酸の欠失、置換、挿入又は付加を有するアミノ酸配列を含んでもよい。CTLA-4結合ドメインは、免疫細胞（例えばT細胞）の活性化能を有するCTLA-4結合ドメインを含む。上記の抗CTLA-4抗体は、アンタゴニスト抗体であってもよい。上記

の抗CTLA-4抗体は、例えば、文献に記載の又は市販の抗CTLA-4抗体を使用できる（例えば、Seidel et al., Front Oncol. 2018 Mar 28;8:86.又はBlank et al., Int Immunol. 2015 Jan;27(1):3-10.等）。

[0052] 本発明の一実施形態において、上記CD73は、別名としてEcto-5'-nucleotidaseで示される蛋白質を含む。CD73のアミノ酸配列等の詳細は、NCBI又はUniProt等のWEBサイトから確認できる。UniProtに記載されているCD73のPrimary accession numberは、例えば、P21589である。CD73は、例えば、ヒト又はサル由来のCD73を含む。

[0053] 本発明の一実施形態において、上記CD73結合ドメインは、例えば、CD73に結合性を有するポリペプチドを含む。CD73結合ドメインは、例えば、抗CD73抗体内のアミノ酸配列を含んでもよい。CD73結合ドメインは、例えば、抗CD73抗体内の、CD73に結合性を有する領域もしくはドメイン、又はCD73への結合性を決定する領域を特に含んでもよい。抗CD73抗体内のCD73への結合性を決定する領域は、例えば、重鎖CDR1～3及び軽鎖CDR1～3のアミノ酸配列を含んでもよい。抗CD73抗体内のCD73に結合性を有する領域は、例えば、可変領域（例えば重鎖可変領域又は軽鎖可変領域を含む）のアミノ酸配列を含んでもよい。CD73結合ドメインは、例えば、抗CD73抗体由来のアミノ酸配列として、重鎖CDR1～3及び軽鎖CDR1～3のアミノ酸配列を含んでもよい。CD73結合ドメインは、例えば、抗CD73抗体由来のアミノ酸配列として、可変領域（例えば重鎖可変領域又は軽鎖可変領域を含む。以下同様。）のアミノ酸配列を含んでもよい。CD73結合ドメインは、例えば、抗CD73抗体由来のアミノ酸配列として、(i)抗CD73抗体の可変領域のアミノ酸配列、(ii)そのアミノ酸配列に対して90%以上の相同性を有するアミノ酸配列、又は(iii)そのアミノ酸配列に対して1～数個のアミノ酸の欠失、置換、挿入又は付加を有するアミノ酸配列を含んでもよい。CD73結合ドメインは、免疫細胞（例えばT細胞）の活性化能を有するCD73結合ドメインを含む。上記の抗CD73抗体は、アンタゴニスト抗体もしくは中和抗体であってもよい。上記の抗CD73抗体は、例えば、文献に記載の又は市販の抗CD73抗体を使用できる（例えば、Kurago et al., Fron

t Immunol. 2023 Jun 26;14:1212209.又はMinor et al., Am J Physiol Cell Physiol. 2019 Dec 1;317(6):C1079-C1092.等）。

[0054] 本発明の一実施形態において、上記CD3は、T細胞受容体（TCR）と非共有結合的に会合し、T細胞の共受容体としてとして機能する蛋白質複合体を含む。CD3はガンマ、デルタ、イプシロン、ゼータのサブユニットを含む。CD3のアミノ酸配列等の詳細は、NCBI又はUniProt等のWEBサイトから確認できる。UniProtに記載されているCD3のPrimary accession numberは、例えば、P07766である。ヒトCD3イプシロン（CD3E）のアミノ酸配列は、例えば、配列番号63で示されるアミノ酸配列を含む。CD3は、例えば、ヒト又はサル由来のCD3を含む。

[0055] 本発明の一実施形態において、上記CD3結合ドメインは、例えば、CD3に結合性を有するポリペプチドを含む。CD3結合ドメインは、例えば、抗CD3抗体内のアミノ酸配列を含んでもよい。CD3結合ドメインは、例えば、抗CD3抗体内の、CD3に結合性を有する領域もしくはドメイン、又はCD3への結合性を決定する領域を特に含んでもよい。抗CD3抗体内のCD3への結合性を決定する領域は、例えば、重鎖CDR1～3及び軽鎖CDR1～3のアミノ酸配列を含んでもよい。抗CD3抗体内のCD3に結合性を有する領域は、例えば、可変領域（例えば重鎖可変領域又は軽鎖可変領域を含む）のアミノ酸配列を含んでもよい。CD3結合ドメインは、例えば、抗CD3抗体由来のアミノ酸配列として、重鎖CDR1～3及び軽鎖CDR1～3のアミノ酸配列を含んでもよい。CD3結合ドメインは、例えば、抗CD3抗体由来のアミノ酸配列として、可変領域（例えば重鎖可変領域又は軽鎖可変領域を含む。以下同様。）のアミノ酸配列を含んでもよい。CD3結合ドメインは、例えば、抗CD3抗体由来のアミノ酸配列として、(i)抗CD3抗体の可変領域のアミノ酸配列、(ii)そのアミノ酸配列に対して90％以上の相同性を有するアミノ酸配列、又は(iii)そのアミノ酸配列に対して1～数個のアミノ酸の欠失、置換、挿入又は付加を有するアミノ酸配列を含んでもよい。CD3結合ドメインは、免疫細胞（例えばT細胞）の活性化能を有するCD3結合ドメインを含む。上記の抗CD3抗体は、アゴニスト抗体であってもよい。上記の

抗CD3抗体は、例えば、文献に記載の又は市販の抗CD3抗体を使用できる（例えば、Goebeler et al., Leuk Lymphoma . 2016 May;57(5):1021-32.、Sun et al., Sci Transl Med. 2015 May 13;7(287):287ra70.、Pessano et al., EMBO J. 1985 Feb;4(2):337-44、特表2018-501297、WO2007042261）。上記の抗CD3抗体は、例えば、OKT3、SP34、又はそれらの重鎖CDR1～3もしくは軽鎖CDR1～3を含む抗体を使用してもよい。上記の抗CD3抗体は、例えば、重鎖CDR1～3が配列番号46～48で示されるアミノ酸配列をそれぞれ含み、軽鎖CDR1～3が配列番号49～51で示されるアミノ酸配列をそれぞれ含んでもよい。上記の抗CD3抗体は、重鎖可変領域が配列番号52で示されるアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域が配列番号53で示されるアミノ酸配列を含んでもよい。上記の抗CD3抗体は、例えば、重鎖CDR1～3が配列番号70～72で示されるアミノ酸配列をそれぞれ含み、軽鎖CDR1～3が配列番号73～75で示されるアミノ酸配列をそれぞれ含んでもよい。上記の抗CD3抗体は、重鎖可変領域が配列番号76で示されるアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域が配列番号77で示されるアミノ酸配列を含んでもよい。

[0056] 本発明の一実施形態において、上記TGFβは、トランスフォーミング増殖因子βとも表記される蛋白質を含む。TGFβはアイソフォームであるTGFβ-1、TGFβ-2又はTGFβ-3を含む。TGFβのアミノ酸配列等の詳細は、NCBI又はUniProt等のWEBサイトから確認できる。UniProtに記載されているTGFβのPrimary accession numberは、例えば、アイソフォーム毎にP01137、P61812、又はP10600である。ヒトTGFβのアミノ酸配列は、例えば、アイソフォーム毎に配列番号64～66で示されるアミノ酸配列を含む。TGFβは、例えば、ヒト又はサル由来のTGFβを含む。

[0057] 本発明の一実施形態において、上記TGFβ結合ドメインは、例えば、TGFβに結合性を有するポリペプチドを含む。TGFβ結合ドメインは、例えば、TGFβに対する受容体又は抗TGFβ抗体内のアミノ酸配列を含んでもよい。TGFβ結合ドメインは、例えば、TGFβに対する受容体又は抗TGFβ抗体内の、TGFβに結合性を有する領域もしくはドメイン、又はTGFβへの結合性を決定する領

域を特に含んでもよい。TGFβに対する受容体内のTGFβに結合性を有する領域は、例えば、細胞外ドメイン（例えば23-166位のアミノ酸配列）であってもよい。TGFβに対する受容体内のTGFβに結合性を有する領域は、例えば、配列番号54で示されるアミノ酸配列を含んでもよい。TGFβに対する受容体は、例えば、TGFβR2（P37173, UniProt Primary accession number）を含んでもよい。TGFβ結合ドメインは、例えば、TGFβに対する受容体由来のアミノ酸配列として、(i)配列番号54で示されるアミノ酸配列、(ii)配列番号54で示されるアミノ酸配列に対して90%以上の相同性を有するアミノ酸配列、又は(iii)配列番号54で示されるアミノ酸配列に対して数個以内のアミノ酸の欠失、置換、挿入又は付加を有するアミノ酸配列を含んでもよい。TGFβに対する受容体のアミノ酸配列は、例えば、配列番号55で示されるアミノ酸配列を含んでもよい。TGFβ結合ドメインは、例えば、TGFβに対する受容体由来のアミノ酸配列として、(i)配列番号55で示されるアミノ酸配列、(ii)配列番号55で示されるアミノ酸配列に対して90%以上の相同性を有するアミノ酸配列、又は(iii)配列番号55で示されるアミノ酸配列に対して1～数個のアミノ酸の欠失、置換、挿入又は付加を有するアミノ酸配列を含んでもよい。抗TGFβ抗体内のTGFβへの結合性を決定する領域は、例えば、重鎖CDR1～3及び軽鎖CDR1～3のアミノ酸配列を含んでもよい。抗TGFβ抗体内のTGFβに結合性を有する領域は、例えば、可変領域（例えば重鎖可変領域又は軽鎖可変領域を含む）のアミノ酸配列を含んでもよい。TGFβ結合ドメインは、例えば、抗TGFβ抗体由来のアミノ酸配列として、重鎖CDR1～3及び軽鎖CDR1～3のアミノ酸配列を含んでもよい。TGFβ結合ドメインは、例えば、抗TGFβ抗体由来のアミノ酸配列として、可変領域（例えば重鎖可変領域又は軽鎖可変領域を含む。以下同様。）のアミノ酸配列を含んでもよい。TGFβ結合ドメインは、例えば、抗TGFβ抗体由来のアミノ酸配列として、(i)抗TGFβ抗体の可変領域のアミノ酸配列、(ii)そのアミノ酸配列に対して90%以上の相同性を有するアミノ酸配列、又は(iii)そのアミノ酸配列に対して1～数個のアミノ酸の欠失、置換、挿入又は付加を有するアミノ酸配列を含んでもよい。TGFβ結合ドメイン

は、免疫細胞（例えばT細胞）の活性化能を有するTGFβ結合ドメインを含む。上記の抗TGFβ抗体は、アゴニスト抗体であってもよい。上記の抗TGFβ抗体は、例えば、文献に記載の又は市販の抗TGFβ抗体を使用できる（例えば、Yi et al., J Hematol Oncol . 2022 Oct 8;15(1):142.又はNiu et al., J Hematol Oncol . 2023 Aug 12;16(1):94.等）。

[0058] 本発明の一実施形態において、多重特異性抗原結合性分子は、ヒト化された多重特異性抗原結合性分子であってもよい。ヒト化された多重特異性抗原結合性分子は、例えば、CDR以外のアミノ酸配列がヒト免疫グロブリン由来のアミノ酸配列を有していてもよい。ヒト化された多重特異性抗原結合性分子は、例えば、非ヒト種由来の1つ以上のCDR、及びヒト免疫グロブリン由来のフレームワーク領域、及び任意にヒト免疫グロブリン由来の定常領域を有し、所望の抗原に結合するドメインを含んでもよい。多重特異性抗原結合性分子のヒト化は、例えば、後述の実施例3.1に記載のような手順で実施できる。その他、当該技術分野で既知の種々の手法を使用してもよい（例えば、Safdari et al., Biotechnol Genet Eng Rev . 2013;29:175-86.）。

[0059] 本発明の一実施形態において、上記多重特異性抗原結合性分子は、例えば、Fc領域を含んでいてもよい。Fc領域は、例えば、IgG、IgA、IgM、IgE又はIgD型のFc領域であってもよい。IgGは、例えば、IgG1、IgG2、IgG3又はIgG4を含む。本発明の一実施形態において、上記Fc領域は、例えば、knob変異とhole変異とを別々の鎖内に有していてもよい。本発明の一実施形態において、上記Fc領域は、例えば、L234A変異とL235A変異とを有していてもよい。

[0060] 本発明の一実施形態において、上記多重特異性抗原結合性分子は、例えば、T細胞エンゲージャーであってもよい。多重特異性抗原結合性分子は、例えば、T細胞をリダイレクトすることで抗腫瘍作用を発揮してもよい。

[0061] 本発明の一実施形態において、上記多重特異性抗原結合性分子は、第一のアーム及び第二のアームを有していてもよい。第一のアームは、例えば、上記第一の結合ドメインを有していてもよい。第二のアームは、例えば、上記第二の結合ドメインを有していてもよい。

[0062] 本発明の一実施形態において、上記多重特異性抗原結合性分子は、第一の結合ドメイン及び第二の結合ドメインを含んでいてもよく、さらに第三の結合ドメイン又は第四の結合ドメインを含んでもよい。第一の結合ドメインは、多重特異性抗原結合性分子内のFc領域のN末端側に配置されていてもよい。第二の結合ドメインは、多重特異性抗原結合性分子内のFc領域のN末端側又はC末端側に配置されていてもよい。第三の結合ドメイン及び第四の結合ドメインは、多重特異性抗原結合性分子内のFc領域のC末端側に配置されていてもよい。

[0063] 本発明の一実施形態において、第一の結合ドメイン及び第二の結合ドメイン間、又は第一の結合ドメインを含むポリペプチド及び第二の結合ドメインを含むポリペプチド間は、リンカーを介して連結していてもよい。本発明の一実施形態において、リンカーは、2以上の物を架橋するための化合物であって、抗原との結合に直接的には関与しないものを含む。リンカーは、例えば、ペプチドリンカーを含む。ペプチドリンカーは、GSリンカー又はGリンカーであってもよい。GSリンカーは、例えば、グリシン(G)およびセリン(S)残基から構成されるリンカーを含む。GSリンカーは、例えば、GGGGSモチーフ（配列番号67）を含んでもよい。GSリンカーは、例えば、(GGGGS)nで示されるリンカーであってもよい（nは、個数を表し、例えば、1、2、3、4、5、6、7又は8であってもよく、それらいずれかの値以上、又はそれらいずれか2つの値の範囲内であってもよい）。Gリンカーは、例えば、Gnで示されるリンカーであってもよい（nは、個数を表し、例えば、3、4、5、6、7又は8であってもよく、それらいずれかの値以上、又はそれらいずれか2つの値の範囲内であってもよい）。ペプチドリンカーに含まれるアミノ酸残基は、例えば、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、又は40個であってもよく、それらいずれかの値以上、又はそれらいずれか2つの値の範囲内であってもよい。リンカーの役割を有するものとして、例えば、ペプチド、定常領域、Fc領域を利用することもできる。例えば、上記多重特異性抗原結合性分子は、N末からC末に順に第一の結合ドメイン-ペプチドリンカーを含む第一のアームと、N末からC末に順に

第二の結合ドメイン-ペプチドリンカー-定常領域を含む第二のアームと、がFc領域を挟んで連結した形態をとることもできる。これらのいずれかの間にさらにペプチドリンカーをさらに介在させてもよい。

[0064] 本発明の一実施形態において、上記多重特異性抗原結合性分子は、例えば、5.0×10^{-7}以下のK_D(M)で細胞膜上のヒトCD39に対して結合してもよい。この値は、例えば、5.0×10^{-7}、1.0×10^{-7}、5.0×10^{-8}、1.0×10^{-8}、5.0×10^{-9}、1.0×10^{-9}、5.0×10^{-10}、又は1.0×10^{-10}であってもよく、それらいずれかの値以下、又はそれらいずれか2つの値の範囲内であってもよい。K_D(M)は、フローサイトメトリーで得られた結果によって算出された値であってもよい。K_D(M)は表面プラズモン共鳴法 (SPR)で測定した値であってもよい。本発明の一実施形態において、上記多重特異性抗原結合性分子は、例えば、1.0×10^{-8}以下のK_D(M)で単離されたヒトCD39に対して結合してもよい。この値は、例えば、1.0×10^{-8}、5.0×10^{-9}、1.0×10^{-9}、5.0×10^{-10}、又は1.0×10^{-10}であってもよく、それらいずれかの値以下、又はそれらいずれか2つの値の範囲内であってもよい。

[0065] 本発明の一実施形態において、上記多重特異性抗原結合性分子は、例えば、5.0×10^{-6}以下のK_D(M)で単離されたヒトCD39以外の抗原（例えば免疫細胞表面抗原又は抗炎症性サイトカイン）に対して結合してもよい。この値は、例えば、5.0×10^{-6}、1.0×10^{-6}、5.0×10^{-7}、1.0×10^{-7}、5.0×10^{-8}、1.0×10^{-8}、5.0×10^{-9}、又は1.0×10^{-9}であってもよく、それらいずれかの値以下、又はそれらいずれか2つの値の範囲内であってもよい。

[0066] 本発明の一実施形態において、上記多重特異性抗原結合性分子は、例えば、多重特異性モノクローナル抗体の形態を含む。

[0067] 本発明の一実施形態において、上記多重特異性抗原結合性分子は、CD39の野生型又は変異型に結合性を有する多重特異性抗原結合性分子であってもよい。CD39の変異型は、SNPsのように、個体間のDNA配列の差異に起因するものを含む。

[0068] 本発明の一実施形態において、上記多重特異性抗原結合性分子は、IgGフォーマット、IgG様フォーマット（例えばFc領域を有するフォーマット）、又は

フラグメントベースのフォーマット（Fc領域フリーのフォーマット）であってもよい（例えばElshiaty et al., Int J Mol Sci. 2021 May 26;22(11):5632.、Nie et al., Antib Ther. 2020 Jan; 3(1): 18-62、Kang et al.,Front Immunol. 2022 Oct 20;13:1020003.、又はBrinkmann et al., MAbs. 2017 Feb/Mar;9(2):182-212.参照）。IgGフォーマットは、例えば、2つのアームとFc領域とを有するIgG様の分子において、第一のアームが第一の抗原を認識するFab領域を含み、第二のアームが第二の抗原を認識するFab領域を含む、フォーマットを含む。なお、第一の抗原と、第二の抗原は、異なる種類の抗原である。IgG様フォーマットは、例えば、(i)2つのアームとFc領域とを有するIgG様の分子において、第一のアームが第一の抗原を認識する可変領域（例えば重鎖可変領域又は軽鎖可変領域）を含むポリペプチド（例えばFab又はscFv）を含み、第二のアームが第二の抗原を認識する可変領域（例えば重鎖可変領域又は軽鎖可変領域）を含むポリペプチド（例えばFab又はscFv）を含み、片方のアームがFabの場合は他方のアームはFab以外のフォーマットである、フォーマット、(ii)Fc領域を有するIgG様の分子において、Fc領域に二重特異性のdiabody、scDb（shingle-chain Diabody）又はtandem scFvが連結した形状のフォーマット、(iii)2つのアームとFc領域とを有するIgG様の分子において、第一のアームが第一の抗原を認識する可変領域（例えば重鎖可変領域又は軽鎖可変領域）を含むポリペプチド（例えばFab又はscFv）を含み、第二のアームが第二の抗原に対するリガンドもしくは受容体又はその抗原結合性フラグメントを含む、ポリペプチドを含む、フォーマット、又は(iv)上記(i)～(iii)のIgG様フォーマットに対して、さらに1又は複数の抗原結合ドメインが連結した形状のフォーマットを含む。フラグメントベースのフォーマットは、例えば、(i)Fc領域を有さず、第一の抗原を認識する可変領域（例えば重鎖可変領域又は軽鎖可変領域）を含むポリペプチドと、第二の抗原を認識する可変領域（例えば重鎖可変領域又は軽鎖可変領域）を含むポリペプチドとを含み、それらポリペプチドがリンカーで連結されているか、複合体化しているフォーマット、又は(ii)Fc領域を有さず、第一の抗原を認識する可変領域

（例えば重鎖可変領域又は軽鎖可変領域）を含むポリペプチドと、第二の抗原に対するリガンドもしくは受容体又はその抗原結合性フラグメントを含む、ポリペプチドとを含み、それらポリペプチドがリンカーで連結されているか、複合体化しているフォーマットを含む。多重特異性抗原結合性分子は、scFv-Lig-Fc、Fab-Lig-Fc、scFv-Fab-Fc、scFv-scFv-Fc、Fab-Fab-Fc、diabody-Lig-Fc、diabody-Fab-Fc、又はdiabody-diabody-Fc（第一のアーム-第二のアーム-アーム間の介在配列を示す）のフォーマットであってもよい。ここでLigは、抗原に対するリガンドもしくは受容体又はその抗原結合性フラグメントを含む、ポリペプチドである。多重特異性抗原結合性分子は、例えば、二重特異性のdiabody、scDb（shingle-chain Diabody）、tandem scFvのフォーマットであってもよい。多重特異性抗原結合性分子は、例えば、N末からC末の順に第一の結合ドメイン、任意にリンカー、及びFc領域を構成する第一の鎖、並びにN末からC末の順に第二の結合ドメイン、任意にリンカー、定常領域、及びFc領域を構成する第二の鎖を含み、第一の鎖及び第二の鎖がジスルフィド結合で連結しているようなフォーマットであってもよい。上記定常領域は、例えば、第一の定常領域（例えば重鎖定常領域（例えばCH1））と、第二の定常領域（例えば軽鎖定常領域（例えばCκ））とが複合体化（例えばジスルフィド結合で連結）した形態であってもよい。第二の結合ドメインは、例えば、三量体（第一～第三の鎖）を形成し、そのうち第一の鎖及び第二の鎖はリンカーで連結し、第一の鎖及び第二の鎖の一方は第一の定常領域とリンカーを介して連結してもよい。第三の鎖は、例えば、第二の定常領域とリンカーを介して連結してもよい。多重特異性抗原結合性分子は、例えば、Wang et al., Antibodies (Basel). 2019 Aug 2;8(3):43.に記載の方法を利用して作製できる。

[0069] 本発明の一実施形態において、上記多重特異性抗原結合性分子は、指定した場合には、TIM-3（T-cell immunoglobulin and mucin domain 3）を標的とする分子、又は結合性を有する分子を含まなくてもよい。本発明の一実施形態において、上記多重特異性抗原結合性分子は、指定した場合には、TIM-3の

機能を阻害する分子を含まなくてもよい。本発明の一実施形態において、上記免疫細胞表面抗原は、指定した場合には、TIM-3を含まなくてもよい。TIM-3の由来は限定されず、TIM-3は、例えば、哺乳類（例えば、ヒト又はサル）由来のTIM-3を含む。

[0070] 別の観点からは、本発明の一実施形態によれば、上記(a)～(d)のいずれかのCDRセットを含む、CD39への結合性を有するCD39結合ドメインを含む、多重特異性ポリペプチドが提供される。別の観点からは、本発明の一実施形態によれば、上記(a)～(d)のいずれかのCDRセットを含む、CD39への結合性を有するCD39結合ドメインを含む、多重特異性複合体が提供される。この多重特異性複合体は、上記の多重特異性抗原結合分子に関して記載したいずれの実施形態も適用できる。

[0071] 別の観点からは、本発明の一実施形態によれば、抗原結合性分子であって、複数の抗原結合ドメインを有し、前記抗原結合ドメインの1つは、CD39への結合性を有するCD39結合ドメインであり、前記CD39結合ドメインは、前記(a)～(d)のいずれかのCDRセットを有する、抗原結合性分子が提供される。この抗原結合性分子は、上記の多重特異性抗原結合分子に関して記載したいずれの実施形態も適用できる。

[0072] 別の観点からは、本発明の一実施形態によれば、前記(a)～(d)のいずれかのCDRセットを含む、ポリペプチドが提供される。このポリペプチドは、例えば、多重特異性抗原結合性分子であってもよい。このポリペプチドは、例えば、多重特異性抗体、多重特異性融合蛋白質であってもよい。このポリペプチドは、例えば、抗体であってもよい。このポリペプチドは、例えば、scFv又はFabであってもよい。このポリペプチドは、上記の多重特異性抗原結合性分子に関して記載したいずれの実施形態も適用できる。

[0073] 別の観点からは、本発明の一実施形態によれば、第一の結合ドメイン、及び第二の結合ドメインを含む、ポリペプチド又は複合体が提供される。第一の結合ドメインは、例えば、前記(a)～(d)のいずれかのCDRセットを含む、ドメインを含む。このポリペプチド又は複合体は、上記の多重特異性抗原結合

性分子に関して記載したいずれの実施形態も適用できる。

[0074] 別の観点からは、本発明の一実施形態によれば、第一のポリペプチド、及び第二のポリペプチドを含む、多重特異性抗原結合性分子が提供される。第一のポリペプチドは、例えば、前記(a)～(d)のいずれかのCDRセットを含む、ポリペプチドを含む。第一の結合ポリペプチドと、第二の結合ポリペプチドの間にリンカーが存在してもよい。第一の結合ポリペプチドと、第二の結合ポリペプチドとはFc領域を介して連結していてもよい。第一の結合ポリペプチドと、第二の結合ポリペプチドとはジスルフィド結合を介して連結していてもよい。この多重特異性抗原結合性分子は、上記の多重特異性抗原結合性分子に関して記載したいずれの実施形態も適用できる。

[0075] 別の観点からは、本発明の一実施形態によれば、前記(a)～(d)のいずれかのCDRセットを含む、抗CD39抗体を含む、多重特異性抗原結合性分子が提供される。この多重特異性抗原結合性分子は、上記の多重特異性抗原結合性分子に関して記載したいずれの実施形態も適用できる。

[0076] 別の観点からは、本発明の一実施形態によれば、上記多重特異性抗原結合性分子の抗原結合性断片が提供される。この抗原結合性フラグメントは、CD39への結合性と、免疫細胞表面抗原又は抗炎症性サイトカインへの結合性を有してもよい。

[0077] 別の観点からは、本発明の一実施形態によれば、前記(a)～(d)のいずれかのCDRセットを含む、ドメインが提供される。このドメインは、CD39への結合性を有するCD39結合ドメインであってもよい。このCD39結合ドメインは、多重特異性抗原結合性分子の構成要素として用いられる、又は組み込まれているCD39結合ドメインであってもよい。このドメインは、上記のCD39結合ドメインに関して記載したいずれの実施形態も適用できる。

[0078] 別の観点からは、本発明の一実施形態によれば、本発明の実施形態に係るCD39結合ドメイン（例えば、上記(a)～(d)のいずれかのCDRセットを有するCD39結合ドメイン）を含む多重特異性抗原結合性分子（以下、参照分子と称することもある）と、CD39への結合に関して競合する多重特異性抗原結合性分子

が提供される。競合は、多重特異性抗原結合性分子が抗原に結合することによって、別の多重特異性抗原結合性分子の同抗原への結合を阻害することを含む。競合する多重特異性抗原結合性分子は、例えば、競合結合アッセイによって確認できる。競合結合アッセイは、例えば、競合ELISA、競合FACS分析を含む（例えばZhou et al., J Gen Virol. 2008 Feb;89(Pt 2):500-508.参照）。結合は、例えば、表面プラズモン共鳴法で測定してもよい。競合結合アッセイは、例えば、抗原をマイクロプレート上にコーティング後、被検多重特異性抗原結合性分子（以下、被検分子と称することもある）を添加してインキュベートし、抗原と被検分子との結合を形成させる工程、標識された参照分子をウェルに添加し、インキュベート及び洗浄する工程、又は標識された参照分子の抗原への結合量を定量する工程を含んでもよい。このとき、例えば、ビオチン化参照抗体の結合量を、HRP結合ストレプトアビジンと3,3',5,5'-テトラメチルベンジジンを使用して、測定波長450nmの吸光度測定によって検出してもよい。標識された参照分子の結合量が、被検多分子を非添加、又は陰性コントロールを添加した場合と比較して減少した割合を、阻害率として評価してもよい。競合する抗体の参照分子に対する阻害は、20、30、40、50、60、70、80、90%以上、又は100%の阻害を含む。この阻害は、好ましくは40%以上、特に好ましくは50%以上である。競合する多重特異性抗原結合性分子は、参照分子が結合するエピトープに対して結合性を有していてもよい。

[0079] 別の観点からは、本発明の一実施形態によれば、上記(a)～(d)のいずれかのCDRセットを含むポリペプチドが提供される。ポリペプチドは、CD39結合ドメイン、多重特異性抗原結合性分子、可変領域、又は抗体であってもよい。

[0080] 別の観点からは、本発明の一実施形態によれば、上記(a)～(d)のいずれかのCDRセットを含むポリペプチドを含む、免疫細胞を悪性腫瘍細胞の近傍に送達するために使用される組成物が提供される。別の観点からは、本発明の一実施形態によれば、上記(a)～(d)のいずれかのCDRセットを含むポリペプチドを、悪性腫瘍細胞及び免疫細胞と接触させることを含む、免疫細胞を悪性腫

瘍細胞の近傍に送達する方法が提供される。

[0081] 別の観点からは、本発明の一実施形態によれば、上記(a)～(d)のいずれかのCDRセットを含むポリペプチドを含む、悪性腫瘍細胞及び免疫細胞を架橋するために使用される組成物が提供される。別の観点からは、本発明の一実施形態によれば、上記(a)～(d)のいずれかのCDRセットを含むポリペプチドを、悪性腫瘍細胞及び免疫細胞と接触させることを含む、悪性腫瘍細胞及び免疫細胞を架橋する方法が提供される。

[0082] 別の観点からは、本発明の一実施形態によれば、多重特異性抗原結合性分子を含む組成物であって、組成物中の90又は95%以上の多重特異性抗原結合性分子が、上記の多重特異性抗原結合性分子（例えば、上記(a)～(d)のいずれかのCDRセットを有する）と同一のアミノ酸配列を有する、組成物が提供される。別の観点からは、本発明の一実施形態によれば、多重特異性抗原結合性分子を含む組成物であって、組成物中の90又は95%以上の抗原結合ドメインを含む分子が、上記の多重特異性抗原結合性分子（例えば、上記(a)～(d)のいずれかのCDRセットを有する）と同一のアミノ酸配列を有する、組成物が提供される。

[0083] 別の観点からは、本発明の一実施形態によれば、組成物中の、上記のCD39結合ドメイン又は多重特異性抗原結合性分子（例えば、上記(a)～(d)のいずれかのCDRセットを有する）の割合を増加させる工程を含む、組成物の悪性腫瘍細胞の増殖抑制能を促進させる方法が提供される。

[0084] 別の観点からは、本発明の一実施形態によれば、P4、T86、I67、Tre291、P4_sc、T86_sc、I67_sc、Tre291_sc、HuP4_IB、又はHuT86_IFのアミノ酸配列内の、Kabatの定義（Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)）で規定される重鎖及び軽鎖のCDR1～3のアミノ酸配列、又は可変領域のアミノ酸配列を有する、CD39結合ドメイン、多重特異性抗原結合性分子、又は抗CD39抗体が提供される。本発明の一実施形態において、CDRは、特に指定がない限り、Kabatの定義で規定される。

[0085] 別の観点からは、本発明の一実施形態によれば、CD39結合ドメイン及び免疫細胞表面抗原結合ドメインを含む、ポリペプチドが提供される。このポリペプチドは、例えば、多重特異性抗原結合性分子であってもよい。この多重特異性抗原結合性分子が取り得る実施形態は、上記で説明した通りであり、例えば、CD39結合ドメインは抗CD39抗体内のアミノ酸配列（例えばCDR又は可変領域のアミノ酸配列）を含んでもよく、免疫細胞表面抗原結合ドメインは免疫細胞表面抗原に対するリガンド内のアミノ酸配列又は免疫細胞表面抗原に対する抗体内のアミノ酸配列（例えばCDR又は可変領域のアミノ酸配列）を含んでもよい。

[0086] 別の観点からは、本発明の一実施形態によれば、CD39結合ドメイン及び4-1BB結合ドメインを含む、ポリペプチドが提供される。このポリペプチドは、例えば、多重特異性抗原結合性分子であってもよい。この多重特異性抗原結合性分子が取り得る実施形態は、上記で説明した通りであり、例えば、CD39結合ドメインは抗CD39抗体内のアミノ酸配列（例えばCDR又は可変領域のアミノ酸配列）を含んでもよく、4-1BB結合ドメインは4-1BBに対するリガンド内のアミノ酸配列又は抗4-1BB抗体内のアミノ酸配列（例えばCDR又は可変領域のアミノ酸配列）を含んでもよい。

[0087] 別の観点からは、本発明の一実施形態によれば、CD39結合ドメイン及びCD3結合ドメインを含む、ポリペプチドが提供される。このポリペプチドは、例えば、多重特異性抗原結合性分子であってもよい。この多重特異性抗原結合性分子が取り得る実施形態は、上記で説明した通りであり、例えば、CD39結合ドメインは抗CD39抗体内のアミノ酸配列（例えばCDR又は可変領域のアミノ酸配列）を含んでもよく、CD3結合ドメインはCD3に対するリガンド内のアミノ酸配列又は抗CD3抗体内のアミノ酸配列（例えばCDR又は可変領域のアミノ酸配列）を含んでもよい。

[0088] 本発明の一実施形態において、CDR（相補性決定領域）は、抗原との結合部位を形成している領域である。典型的には、CDRは抗体のFv（可変領域：重鎖可変領域（VH）及び軽鎖可変領域（VL）を含む）上に位置している。典型的

には、CDRは3～30アミノ酸残基程度からなるCDR1、CDR2、CDR3が重鎖及び軽鎖それぞれに存在する。重鎖のCDRが抗体の抗原への結合に特に寄与していることが知られている。CDRの中でも、CDR3が抗体の抗原への結合における寄与が最も高いことが知られている。CDR以外のFv領域はフレームワーク領域と呼ばれ、FR1、FR2、FR3及びFR4を含み、抗体間で比較的よく保存されている（例えば、Kindt et al., Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co.）。

[0089] 本発明の一実施形態において、二重特異性抗体は、2つの異なる種類の抗原への結合性を有する抗体を含む。二重特異性抗体は、第一の結合ドメインとしてCD39結合ドメインを有してもよい。二重特異性抗体は、第二の結合ドメインとして免疫細胞表面抗原結合ドメイン又は抗炎症性サイトカイン結合ドメインを有してもよい。二重特異性抗体は、上記第一の結合ドメインと、上記第二の結合ドメインとが、1つの分子内に存在するか、複合体化している形態であってもよい。このとき、上記第一の結合ドメインと、上記第二の結合ドメインとの間に介在配列（例えば、リンカー、Fc領域、又は定常領域）が存在してもよい。二重特異性抗体は、2つの結合ドメインが、抗体由来の配列（例えば、CDR、可変領域）を有する抗体を含む。二重特異性抗体は、上述の多重特異性抗原結合性分子のいずれかのフォーマットを形成してもよい。

[0090] 本発明の一実施形態において、二重特異性抗原結合性融合蛋白質は、2つの異なる種類の抗原への結合性を有する融合蛋白質を含む。二重特異性抗原結合性融合蛋白質は、第一の結合ドメインとしてCD39結合ドメインを有してもよい。二重特異性抗原結合性融合蛋白質は、第二の結合ドメインとして免疫細胞表面抗原結合ドメイン又は抗炎症性サイトカイン結合ドメインを有してもよい。二重特異性抗原結合性融合蛋白質は、上記第一の結合ドメインと、上記第二の結合ドメインとが、1つの分子内に存在するか、複合体化している形態であってもよい。このとき、上記第一の結合ドメインと、上記第二の結合ドメインとの間に介在配列（例えば、リンカー、Fc領域、又は定常領域）が存在してもよい。二重特異性抗原結合性融合蛋白質は、少なくとも1つのド

メイン（例えば第二の結合ドメイン）が、抗体由来の配列（例えば、CDR、可変領域）を有さない融合蛋白質を含む。二重特異性抗原結合性融合蛋白質は、少なくとも1つのドメイン（例えば第二の結合ドメイン）が、抗原に対するリガンドもしくは受容体又はその抗原結合性フラグメントを含んでもよい。二重特異性抗原結合性融合蛋白質は、上述の多重特異性抗原結合性分子のいずれかのフォーマットを形成してもよい。

[0091] 本発明の一実施形態において、抗体は、抗原上の特定のエピトープに特異的に結合することができる分子又はその集団を含む。抗体は、モノクローナル抗体であってもよい。抗体は、様々な形態で存在することができ、例えば、全長抗体（Fab領域とFc領域を有する抗体）、Fv抗体、Fab抗体、$F(ab')_2$抗体、Fab'抗体、diabody、一本鎖抗体（例えばscFv）、dsFv、scFvFc、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、抗原結合性を有するペプチド又はポリペプチド、キメラ抗体、マウス抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、又はそれらの同等物（又は等価物）からなる群から選ばれる1種以上の形態であってもよい。また抗体は、抗体修飾物又は抗体非修飾物を含む。抗体修飾物は、抗体と、例えばポリエチレングリコール等の各種分子が結合していてもよい。抗体修飾物は、抗体に公知の手法を用いて化学的な修飾を施すことによって得ることができる。また抗体は、融合蛋白質の形態であってもよい。融合蛋白質の形態は、抗体のN又はC末端に、ポリペプチド又はオリゴペプチド（例えばHisタグ）が結合したものであってもよい。また融合蛋白質の形態は、抗体の片方のアームがFab以外のポリペプチド（例えばリガンドもしくは受容体）で置換されたものであってもよい。また抗体は、コンジュゲート抗体（例えば、抗体薬物複合体）であってもよい。薬物は、例えば、細胞傷害性薬剤又は抗がん剤であってもよい。そのような抗体修飾物、融合蛋白質、コンジュゲート抗体も、抗体の一形態に含まれる。抗体のアミノ酸配列、クラス、又はサブクラスは、例えば、ヒト又はヒトを除く哺乳類（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ウシ、サル等）由来であってもよい。また抗体は、例えば、単離抗体、精製抗体、又は組換抗体を含む。また抗体は、例えば、in vitro

又はin vivoで使用できる。

[0092] 本発明の一実施形態において、上記モノクローナル抗体は、集団を構成する個々の抗体が、実質的に同じエピトープに反応する場合の抗体を含む。二重特異性モノクローナル抗体の場合は、1つの抗体が2つのエピトープに反応してもよい。又は、集団を構成する個々の抗体が、実質的に同一（自然発生可能な突然変異は許容される）である場合の抗体であってもよい。モノクローナル抗体の作製方法は特に限定されないが、例えば、”Kohler G, Milstein C., Nature. 1975 Aug 7;256(5517):495-497.”に掲載されているようなハイブリドーマ法と同様の方法によって作製してもよい。あるいは、モノクローナル抗体は、米国特許第4816567号に記載されているような組換え法と同様の方法によって作製してもよい。又は、モノクローナル抗体は、”Clackson et al., Nature. 1991 Aug 15;352(6336):624-628.”、又は”Marks et al., J Mol Biol. 1991 Dec 5;222(3):581-597.”に記載されているような技術と同様の方法を用いてファージ抗体ライブラリーから単離してもよい。又は、”タンパク質実験ハンドブック, 羊土社(2003):92-96.”に掲載されている方法によって作製してもよい。

[0093] 本発明の一実施形態において、上記キメラ抗体は、例えば、異種生物間における抗体の可変領域と、抗体の定常領域とを連結したもので、遺伝子組換え技術によって構築できる。例えば、非ヒト哺乳類とヒト由来のキメラ抗体（例えば、マウス-ヒトキメラ抗体）が挙げられる。マウス-ヒトキメラ抗体は、例えば、”Roguska et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Feb 1;91(3):969-973.”に記載の方法で作製できる。マウス-ヒトキメラ抗体を作製するための基本的な方法は、例えば、クローン化されたcDNAに存在するマウスリーダー配列及び可変領域配列を、哺乳類細胞の発現ベクター中にすでに存在するヒト抗体定常領域をコードする配列に連結する。又は、クローン化されたcDNAに存在するマウスリーダー配列及び可変領域配列をヒト抗体定常領域をコードする配列に連結した後、哺乳類細胞発現ベクターに連結してもよい。ヒト抗体定常領域のフラグメントは、任意のヒト抗体のH鎖定常領域及びヒ

ト抗体のL鎖定常領域のものとすることができ、例えばヒトH鎖のものについてはCγ1、Cγ2、Cγ3又はCγ4を、L鎖のものについてはCλ又はCκを各々挙げることができる。

[0094] 本発明の一実施形態において、上記ヒト化抗体は、例えば、非ヒト種由来の1つ以上のCDR、及びヒト免疫グロブリン由来のフレームワーク領域、及びヒト免疫グロブリン由来の定常領域を有し、所望の抗原に結合する抗体を含む。その他、当該技術分野で既知の種々の手法を使用してもよい（例えば、Safdari et al., Biotechnol Genet Eng Rev . 2013;29:175-86.）。

[0095] 本発明の一実施形態において、上記scFv（single chain Fv）は、重鎖可変領域（VH）と軽鎖可変領域（VL）とが適当なペプチドリンカーを介して連結した形態の抗体を含む。scFvは、例えば、VH及びVL（例えば、上記の(a)～(d)のいずれかのCDRセットを含むVH及びVL）をコードするcDNAを取得し、VH-ペプチドリンカー-VLをコードするポリヌクレオチドを構築し、そのポリヌクレオチドをベクターに組み込み、発現用の細胞を用いて生産できる。

[0096] 本発明の一実施形態において、上記Fabは、Fc領域を除いた重鎖と軽鎖とがジスルフィド結合を介して連結した形体の抗体を含む。Fabは、例えば、VH-CH1領域、及び軽鎖をコードするベクターを用いて生産できる。

[0097] 本発明の一実施形態において、上記diabodyは、scFvが二量体化した形態をし、二価の抗原結合活性を有する抗体を含む。二価の抗原結合活性は、同一であることもできるし、一方を異なる抗原結合活性とすることもできる。diabodyは、例えば、scFvをコードするポリヌクレオチドをペプチドリンカーのアミノ酸配列の長さが8～4残基（好ましくは5残基）となるように構築し、得られたポリヌクレオチドをベクターに組み込み、発現用の細胞を用いて生産できる。二重特異性のdiabodyは、異なる2種類のscFvのVH及びVLのDNAを組み合わせてscFvを発現させることにより作製できる。

[0098] 本発明の一実施形態において、上記scFvFcは、scFvとFc領域とが適当なリンカーを介して連結した形態の抗体を含む。例えば、scFv、リンカー、及びFc領域をコードするポリヌクレオチドをベクターに組み込み、発現用の細胞を

用いて生産できる。また、例えば、後述の1.2に記載のような手順で生産できる。

[0099] 本発明の一実施形態において、上記重鎖可変領域は、例えば、配列番号25、27、29、31、33、又は35で示されるアミノ酸配列を含んでもよく、及び軽鎖可変領域は配列番号26、28、30、32、34、又は36で示されるアミノ酸配列を含んでもよい。本発明の一実施形態において、上記重鎖可変領域及び軽鎖可変領域は、例えば、配列番号25及び26で示されるアミノ酸配列に対して90％以上の相同性を有するアミノ酸配列をそれぞれ含んでもよく、配列番号25及び26で示されるアミノ酸配列に対して数個以内のアミノ酸の欠失、置換、挿入又は付加を有するアミノ酸配列をそれぞれ含んでもよく、配列番号27及び28で示されるアミノ酸配列に対して90％以上の相同性を有するアミノ酸配列をそれぞれ含んでもよく、配列番号27及び28で示されるアミノ酸配列に対して数個以内のアミノ酸の欠失、置換、挿入又は付加を有するアミノ酸配列をそれぞれ含んでもよく、配列番号29及び30で示されるアミノ酸配列に対して90％以上の相同性を有するアミノ酸配列をそれぞれ含んでもよく、配列番号29及び30で示されるアミノ酸配列に対して数個以内のアミノ酸の欠失、置換、挿入又は付加を有するアミノ酸配列をそれぞれ含んでもよく、配列番号31及び32で示されるアミノ酸配列に対して90％以上の相同性を有するアミノ酸配列をそれぞれ含んでもよく、配列番号31及び32で示されるアミノ酸配列に対して数個以内のアミノ酸の欠失、置換、挿入又は付加を有するアミノ酸配列をそれぞれ含んでもよく、配列番号33及び34で示されるアミノ酸配列に対して90％以上の相同性を有するアミノ酸配列をそれぞれ含んでもよく、配列番号33及び34で示されるアミノ酸配列に対して数個以内のアミノ酸の欠失、置換、挿入又は付加を有するアミノ酸配列をそれぞれ含んでもよく、配列番号35及び36で示されるアミノ酸配列に対して90％以上の相同性を有するアミノ酸配列をそれぞれ含んでもよく、又は配列番号35及び36で示されるアミノ酸配列に対して数個以内のアミノ酸の欠失、置換、挿入又は付加を有するアミノ酸配列をそれぞれ含んでもよい。

[0100] 本発明の一実施形態において、上記重鎖可変領域は、例えば、FR1～4が、配列番号25、27、29、31、33、又は35で示されるアミノ酸配列内のFR1～4のアミノ酸配列、そのアミノ酸配列に対して90%以上の相同性を有するアミノ酸配列、又はそのアミノ酸配列に対して数個以内のアミノ酸の欠失、置換、挿入又は付加を有するアミノ酸配列を有し、且つCDR1～3が、配列番号25、27、29、31、33、又は35で示されるアミノ酸配列内のCDR1～3のアミノ酸配列と一致するアミノ酸配列を有していてもよい。本発明の一実施形態において、上記軽鎖可変領域は、例えば、FR1～4が、配列番号26、28、30、32、34、又は36で示されるアミノ酸配列内のFR1～4のアミノ酸配列、そのアミノ酸配列に対して90%以上の相同性を有するアミノ酸配列、又はそのアミノ酸配列に対して数個以内のアミノ酸の欠失、置換、挿入又は付加を有するアミノ酸配列を有し、且つCDR1～3が、配列番号26、28、30、32、34、又は36で示されるアミノ酸配列内のCDR1～3のアミノ酸配列と一致するアミノ酸配列を有していてもよい。

[0101] 本発明の一実施形態において、上記Fc領域は、例えば、配列番号37、38又は45で示されるアミノ酸配列、そのアミノ酸配列に対して90%以上の相同性を有するアミノ酸配列、又はそのアミノ酸配列に対して数個以内のアミノ酸の欠失、置換、挿入又は付加を有するアミノ酸配列を含んでもよい。

[0102] 本発明の一実施形態において、上記第一の定常領域は、例えば、配列番号43で示されるアミノ酸配列、そのアミノ酸配列に対して90%以上の相同性を有するアミノ酸配列、又はそのアミノ酸配列に対して数個以内のアミノ酸の欠失、置換、挿入又は付加を有するアミノ酸配列を含んでもよい。本発明の一実施形態において、上記第二の定常領域は、配列番号41で示されるアミノ酸配列、そのアミノ酸配列に対して90%以上の相同性を有するアミノ酸配列、又はそのアミノ酸配列に対して数個以内のアミノ酸の欠失、置換、挿入又は付加を有するアミノ酸配列を含んでもよい。

[0103] 本発明の一実施形態において、上記相同性(%)は、例えば、複数のアミノ酸配列間で相同なアミノ酸数の割合を、当該技術分野で公知の方法に従って

算定してもよい。割合を算定する前には、比較する配列群を整列させ、相同/同一アミノ酸の割合を最大にするために必要である場合は配列の一部に間隙を導入する。整列方法、割合の算定方法、及びそれらに関連するコンピュータプログラムは、当該技術分野で従来からよく知られている（例えば、BLAST、GENETYX等）。本明細書において相同性は同一性を含み、相同性の割合は同一性の割合で置き換え可能である。相同性は、（相同な残基数／比較元のアミノ酸配列の残基数）×100で表してもよい。より好ましくは、相同性はBLASTPのデフォルト設定で測定された値で表してもよい（The BLAST Sequence Analysis Tool. The NCBI Handbook, 2nd edition. March 15, 2013.、Altschul et al., Nucleic Acids Res0. 1997 Sep 1;25(17):3389-402）。

[0104] 本発明の一実施形態において、上記90%以上は、例えば、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、又は100%であってもよく、それらいずれかの値以上、又はそれらいずれか2つの値の範囲内であってもよい。この割合は、機能的同等性をより維持する観点から85%以上が好ましく、90%以上がより好ましく、95%以上がさらに好ましく、98%以上が特に好ましい。本発明の一実施形態において、上記数個以内は、例えば、15、10、8、6、5、4、3、2、1、又は0個であってもよく、それらいずれかの値以下、又はそれらいずれか2つの値の範囲内であってもよい。この数は、機能的同等性をより維持する観点から15個以下が好ましく、10個以下がより好ましく、5個以下が特に好ましい。

[0105] 本発明の一実施形態において、元の配列に対して置換が生じる場合、保存的アミノ酸置換（例えば、French et al., J Mol Evol (1983) 19, 171-175参照）が好ましい。本発明の一実施形態において、保存的アミノ酸置換は、あるアミノ酸残基を、同様の性質の側鎖を有するアミノ酸残基に置換することを含む。アミノ酸残基はその側鎖によって、塩基性側鎖（例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパルギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、グリシン、ア

ラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、β分岐側鎖（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）、芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン）のように、いくつかのファミリーに分類されている。保存的アミノ酸置換は、好ましくは、同一のファミリー内のアミノ酸残基間の置換である。

[0106] 別の観点からは、本発明の一実施形態によれば、上記のCD39結合ドメイン又は多重特異性抗原結合性分子（例えば、上記(a)～(d)のいずれかのCDRセットを有する）をコードするポリヌクレオチド又はベクターが提供される。このポリヌクレオチド又はベクターを細胞に導入することによって、形質転換体を作製できる。形質転換体は、ヒト又はヒトを除く哺乳動物（例えば、サル等）の細胞であってもよい。哺乳動物細胞としては、例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO細胞)、サル細胞COS-7、ヒト胎児由来腎臓細胞（例えば、HEK293細胞）などが挙げられる。又は、形質転換体はEscherichia属菌、酵母等であってもよい。上記ポリヌクレオチド又はベクターは、抗CD39抗体を発現可能に構築されていてもよい。上記ポリヌクレオチド又はベクターは、例えば、プロモーター、エンハンサー、複製開始点、又は抗生物質耐性遺伝子など、蛋白質発現に必要な構成要素を含んでいてもよい。

[0107] 上記のベクターとしては、例えば大腸菌由来のプラスミド（例えばpET-Blue）、枯草菌由来のプラスミド（例えばpUB110）、酵母由来プラスミド（例えばpSH19）、動物細胞発現プラスミド（例えばpA1-11、pcDNA3.1-V5/His-TOPO）、λファージなどのバクテリオファージ、ウイルス由来のベクターなどを用いることができる。ベクターは発現ベクターであってもよく、環状であってもよい。

[0108] 上記のポリヌクレオチド又はベクターの細胞への導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法、アデノウイルスによる方法、レトロウイルスによる方法、又はマイクロインジェクションなどを使用できる（改訂第4版 新 遺伝子工学ハンドブック,

羊土社(2003):152-179.）。細胞を用いた抗体の生産方法としては、例えば、”タンパク質実験ハンドブック,羊土社(2003):128-142.”に記載の方法を使用できる。

[0109] 別の観点からは、本発明の一実施形態によれば、上記の本発明の実施形態に係るポリヌクレオチド又はベクターを含有する細胞を増殖させる工程を含む、CD39結合ドメイン又は多重特異性抗原結合性分子の生産方法が提供される。上記増殖させる工程は、培養する工程を含む。またこの生産方法は、CD39結合ドメイン又は多重特異性抗原結合性分子を回収する工程を含んでいてもよい。またこの生産方法は、細胞培養液を調製する工程を含んでいてもよい。またこの生産方法は、CD39結合ドメイン又は多重特異性抗原結合性分子を精製する工程を含んでいてもよい。

[0110] 本発明の一実施形態において、CD39結合ドメイン又は多重特異性抗原結合性分子の精製は、例えば、硫酸アンモニウム沈殿、エタノール沈殿、プロテインA、プロテインG、ゲルろ過クロマトグラフィー、陰イオン、陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、又はレクチンクロマトグラフィーなどを用いることができる（タンパク質実験ハンドブック，羊土社(2003):27-52.）。

[0111] 別の観点からは、本発明の一実施形態によれば、上記のCD39結合ドメイン又は多重特異性抗原結合性分子（例えば、上記(a)～(d)のいずれかのCDRセットを有する）を含む、組成物が提供される。この組成物を用いれば、優れた抗腫瘍作用を生じさせることができる。この組成物が含有する成分は特に限定されず、例えば、緩衝液を含んでいてもよい。この組成物に対して、後述の阻害剤及び医薬組成物に係る種々の実施形態（例えば担体を含有可能なこと等）の1つ以上を適用してもよい。この組成物は、悪性腫瘍細胞の増殖抑制用、免疫細胞活性化用、免疫細胞のサイトカイン産生促進用、又は細胞溶解性顆粒放出促進用の組成物を含む。サイトカインは、例えば、IL-2、TNF-α

又はIFN-γを含む。細胞溶解性顆粒は、例えば、Granzyme B又はPerforinを含む。別の観点からは、本発明の一実施形態によれば、悪性腫瘍細胞（例えばCD39発現悪性腫瘍細胞）と上記のCD39結合ドメイン又は多重特異性抗原結合性分子（例えば、上記(a)～(d)のいずれかのCDRセットを有する）を接触させる工程を含む、悪性腫瘍細胞の増殖抑制方法、免疫細胞活性化方法、免疫細胞のサイトカイン産生促進方法、又は細胞溶解性顆粒放出促進方法が提供される。免疫細胞活性化が生じたことは、例えば、免疫細胞のがん細胞に対する細胞傷害性の上昇、免疫細胞からのサイトカイン分泌の上昇、又はCD4もしくはCD8陽性T細胞のPD1（programmed cell death-1）の発現亢進によって評価してもよい。免疫細胞活性化は、例えば、免疫細胞のがん細胞に対する細胞傷害性の上昇、免疫細胞からのサイトカイン分泌の上昇、又はCD4もしくはCD8陽性T細胞の増殖促進、又はCD4もしくはCD8陽性T細胞のPD1の発現亢進を伴う活性化であってもよい。

[0112] 別の観点からは、本発明の一実施形態によれば、上記のCD39結合ドメイン又は多重特異性抗原結合性分子（例えば、上記(a)～(d)のいずれかのCDRセットを有する）を含む、医薬組成物が提供される。この医薬組成物は、薬理学的に許容される1つ以上の担体を含んでいてもよい。医薬組成物は、例えば、悪性腫瘍の治療のための医薬組成物を含む。悪性腫瘍は、CD39陽性の悪性腫瘍を含む。別の観点からは、本発明の一実施形態によれば、上記のCD39結合ドメイン又は多重特異性抗原結合性分子（例えば、上記(a)～(d)のいずれかのCDRセットを有する）を患者に投与する工程を含む、疾患の治療方法が提供される。治療は、例えば、悪性腫瘍の治療、がん免疫療法を含む。別の観点からは、本発明の一実施形態によれば、医薬組成物を生産するための、上記のCD39結合ドメイン又は多重特異性抗原結合性分子の使用が提供される。治療は、多重特異性抗原結合性分子が複数種類の抗原に結合したことに起因して生じる抗腫瘍活性によって実施されてもよい。

[0113] 別の観点からは、本発明の一実施形態によれば、上記のCD39結合ドメイン又は多重特異性抗原結合性分子（例えば、上記(a)～(d)のいずれかのCDRセッ

トを有する）を含む、キットが提供される。このキットを用いれば、優れた抗腫瘍作用を生じさせることができる。このキットは、悪性腫瘍の治療用、悪性腫瘍細胞の増殖抑制用、免疫細胞活性化用、免疫細胞のサイトカイン産生促進用、又は細胞溶解性顆粒放出促進用のキットを含む。このキットは、例えば、取扱説明書、緩衝液、容器、又は包装を含んでいてもよい。

[0114] 本発明の一実施形態において、治療は、患者の疾患、もしくは疾患に伴う1つ以上の症状の、症状改善効果、抑制効果、又は予防効果を発揮しうることを含む。本発明の一実施形態において、医薬組成物は、例えば、有効成分と薬理学的に許容される1つ以上の担体とを混合し、製剤学の技術分野において知られる任意の方法により製造してもよい。また医薬組成物は、治療のために用いられる物であれば使用形態は限定されず、有効成分単独であってもよいし、有効成分と任意の成分との混合物であってもよい。また上記担体の形状は特に限定されず、例えば、固体又は液体（例えば、緩衝液）であってもよい。上記担体の含有量は、例えば、製剤学上有効量であってもよい。有効量は、例えば、有効成分の製剤学的な安定性又は送達のために十分量であってもよい。投与量、投与間隔、投与方法、投与経路は、特に限定されず、患者の年齢や体重、症状、対象臓器等により、適宜選択できる。また医薬組成物は、治療有効量、又は所望の作用を発揮する有効量の有効成分を含むことが好ましい。

[0115] 本発明の一実施形態において、対象（患者を含む）は、ヒト又はヒトを除く哺乳動物（例えば、サル、マーモセット又はチンパンジー等の1種以上）を含む。また患者は、悪性腫瘍を発症していると診断された患者、又は悪性腫瘍の治療を必要としている患者であってもよい。

[0116] 悪性腫瘍細胞の増殖抑制効果は、例えば、医薬組成物投与後の悪性腫瘍細胞増殖の経時変化を観察することにより評価してもよい。細胞の増殖が抑制されている状態は、被験細胞の増殖速度が、医薬組成物処理前に比べて有意に減少している状態を含む。増殖速度は、例えば、吸光度を指標にして測定しても良く、画像データから判断してもよい。悪性腫瘍の治療効果は、例え

ば、医薬組成物投与後の腫瘍重量の減少を観察することにより評価してもよい。このとき、医薬組成物投与前又は陰性コントロール投与時と比較して、腫瘍重量が有意に低下した場合に、治療効果があると判断してもよい。悪性腫瘍の治療効果は、例えば、患者又は患者由来サンプル中の悪性腫瘍マーカーの量を指標にして測定してもよい。このとき、医薬組成物投与前又は陰性コントロール投与時と比較して、マーカー量が有意に低下した場合に治療効果があると判断してもよい。医薬組成物投与後の腫瘍重量又はマーカー量は、投与前又は陰性コントロール投与時と比較して、0.9、0.7、0.5、0.3、又は0.1倍以下に低下していてもよい。治療効果は画像診断で評価してもよい。

[0117] 本発明の一実施形態において、悪性腫瘍は、例えば、正常な細胞が突然変異を起こして発生する腫瘍を含む。悪性腫瘍は全身のあらゆる臓器や組織から生じ得る。この悪性腫瘍は、例えば、肺がん、食道がん、胃がん、肝臓がん、膵臓がん、腎臓がん、副腎がん、胆道がん、乳がん、大腸がん、小腸がん、卵巣がん、子宮がん、膀胱がん、前立腺がん、尿管がん、腎盂がん、尿管がん、陰茎がん、精巣がん、脳腫瘍、中枢神経系のがん、末梢神経系のがん、頭頸部がん、グリオーマ、多形性膠芽腫、皮膚がん、メラノーマ、甲状腺がん、唾液腺がん、悪性リンパ腫、癌腫、肉腫、骨髄腫、及び血液悪性腫瘍からなる群から選ばれる1種以上を含む。悪性腫瘍は、CD39陽性の悪性腫瘍を含む。

[0118] 本発明の一実施形態において、2つの異なる種類の抗原は、例えば、両抗原間のアミノ酸配列の相同性が90、80、70、60、50、又は40％であってもよく、それらいずれかの値未満、又はそれらいずれか2つの値の範囲内であってもよい。

[0119] 本発明の一実施形態において、「蛋白質の名称」の直後に「結合ドメイン」が続く場合、その結合ドメインはその蛋白質を認識する又はその蛋白質への結合性を有するドメインを含む。例えば、CD39結合ドメインは、CD39を認識するドメイン又はCD39への結合性を有するドメインを含む。ドメインの特性をより明確に記述するために、CD39を認識するCD39結合ドメインと表記す

ることもできる。

[0120] 本発明の一実施形態において、多重は、例えば、二重、三重又は四重を含む。本発明の一実施形態では、細胞表面の抗原、細胞膜上の抗原、及び細胞上の抗原は実質的に同じ意図で使用され得、互換的に使用できる。本発明の一実施形態では、多重特異性抗原結合性分子、及び多重特異性分子は実質的に同じ意図で使用され得、互換的に使用できる。本発明の一実施形態では、第一（又は第二）の結合ドメイン、及び第一（又は第二）の抗原結合ドメインは実質的に同じ意図で使用され得、互換的に使用できる。本発明の一実施形態において、抗原は、例えば、抗原性を有し得るものを含む。本発明の一実施形態において、抗原結合性分子は、例えば、少なくとも1つの抗原への結合性を有する分子を含む。例えば、CD39への特異性を有する多重特異性抗原結合性分子は、CD39への結合性を有する分子であるため、抗原結合性分子の一種といえる。

[0121] 本発明の一実施形態において、アミノ酸は、アミノ基とカルボキシル基を持つ有機化合物の総称である。本発明の実施形態に係る抗体が「特定のアミノ酸配列」を含むとき、そのアミノ酸配列中のいずれかのアミノ酸が化学修飾を受けていてもよい。また、そのアミノ酸配列中のいずれかのアミノ酸が塩、又は溶媒和物を形成していてもよい。また、そのアミノ酸配列中のいずれかのアミノ酸がL型、又はD型であってもよい。それらのような場合でも、本発明の実施形態に係る抗体は、上記「特定のアミノ酸配列」を含むといえる。蛋白質に含まれるアミノ酸が生体内で受ける化学修飾としては、例えば、N末端修飾（例えば、アセチル化、ミリストイル化等）、C末端修飾（例えば、アミド化、グリコシルホスファチジルイノシトール付加等）、又は側鎖修飾（例えば、リン酸化、糖鎖付加等）等が挙げられる。

[0122] 本発明の一実施形態において結合は、共有結合又は非共有結合のいずれであってもよく、例えば、イオン結合、水素結合、疎水性相互作用、又は親水性相互作用であってもよい。

[0123] 本発明の一実施形態において「有意に」は、例えば、統計学的有意差をス

チューデントのt検定（片側又は両側）を使用して評価し、p＜0.05又はp＜0.01である状態であってもよい。又は、実質的に差異が生じている状態であってもよい。

[0124] 本明細書において、(a)、(b)、(c)又は(d)は、(a)～(d)からなる群から選択される1以上と同義である。

[0125] 本明細書において引用しているあらゆる刊行物は、その全体を参照により援用する。本明細書において「又は」は、文章中に列挙されている事項の「少なくとも1つ以上」を採用できるときに使用される。「もしくは」も同様である。本明細書において「2つの値の範囲内」と明記した場合、その範囲には2つの値自体も含む。本明細書において「A～B」は、A及びBを含む。

[0126] 以上、本発明の実施形態について述べたが、これらは本発明の例示であり、上記以外の様々な構成を採用することもできる。また、上記実施形態に記載の構成を組み合わせて採用することもできる。

実施例

[0127] 以下、実施例によりさらに説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

[0128] 実施例1.1：リコンビナントヒトCD39の調製

リコンビナントヒトCD39をFS293細胞（Thermo Fisher Scientific）に一過性に発現させて精製した。詳細は次の通りである。ヒトCD39（Accession No. NM_001776.6/ NP_001767.3）（配列番号61）の細胞膜外ドメイン（アミノ酸番号38～478）（配列番号60）を発現ベクターに挿入し、MaxCyte-STX（MaxCyte）によるエレクトロポレーション法でFS293細胞に形質転換し、4-6日間培養した。培養上清中のリコンビナントヒトCD39を、Ni-NTAアガロースレジン（FujiFilm-Wako）でバッチ精製した後、サイズ排除クロマトグラフィーで精製した。

[0129] 実施例1.2：マウス抗ヒトCD39抗体作製

ヒトCD39に特異的に結合するモノクローナル抗体を、免疫したマウスの脾臓またはリンパ節から、ファージディスプレイ法を用いて作製した。詳細は

次の通りである。マウス（BALB/cまたはMRL/lpr）にリコンビナントヒトCD39（in house/実施例1.1）又はヒトCD39抗原一過性発現Expi293細胞を免疫し、血清抗体価の上昇を確認して、脾臓又はリンパ節を回収した。免疫マウスの脾臓又はリンパ節からtotal RNAを抽出し、cDNAに変換して抗体遺伝子配列（VH及びVκ）をPCRで増幅した。VH及びVκはリンカーでつないでsingle chain Fv（以下scFv）とし、pTZ19R由来のPhagemidに挿入した。scFv挿入Phagemidで大腸菌（DH12S株）を形質転換し、さらにヘルパファージ（M13KO7）を感染させてscFvファージライブラリー（サイズ：約1×10^8種類）を作製した。scFv抗体ファージライブラリーはリコンビナントヒトCD39によるパニングを実施し、パニング後のPhagemidを抽出してscFv部分をPCRで増幅してscFv分泌発現ベクターに載せ替えた。scFv分泌発現ベクターを導入した大腸菌はIPTG誘導でscFvを培養上清中に分泌するため、その培養上清を用いてCD39抗原結合およびCD39酵素阻害活性を指標にscFvクローンをスクリーニングした。スクリーニングで陽性だったクローンのうち4種のscFvについて塩基配列を決定した。この4種のscFvのクローンIDをP4、T86、I67又はTre291とした。これらの抗体のCDRのアミノ酸配列を図21に示す（CDRはKabatナンバリングに基づく）。また、実施例で使用した全ての抗体の可変領域のアミノ酸配列は図22に示す通りである。

[0130] 上記4種のscFvを、改変型の抗体Fc領域（配列番号37、ヒトIgG1のFc領域にL234A変異とL235A変異とを持つFc-LALA）と短いリンカーでつないだscFv-Fc-LALA型抗体の形状で、ExpiCHO細胞（Thermo Fisher Scientific）に発現させ、Protein Aカラムを使用してアフィニティー精製した。得られた4種の抗ヒトCD39抗体のクローンIDをP4_sc、T86_sc、I67_sc又はTre291_scとした。この4種の抗ヒトCD39抗体はそれぞれP4、T86、I67又はTre291に由来するものであり、CDRのアミノ酸配列はそれらと同じである。

[0131] 実施例1.3：CD39阻害活性の評価

CD39阻害活性は、ヒトCD39を発現する野性型SKMEL28細胞を使用し、ATP定量により評価した。詳細は次の通りである。SKMEL28細胞を、E-MEM培地を用

いて5x10³細胞/ウェルに調製して、96ウェルV底プレートに50 μlずつ播種した。そこに、各種抗体の希釈系列を50 μlずつ添加し、37℃のインキュベーターで1時間静置した。次に、E-MEM培地で200 μMに調製したATP（SIGMA, A2383）5 μlを添加し、室温で30分静置した。その後、プレートを700 gで3分間遠心して、上清50 μlを96ウェルポリスチレン（白）プレートへ回収した。ATP定量用のCellTiter-Glo（登録商標）2.0（Promega, G9242）50 μlを培養上清へ添加し、室温で10分静置し、マイクロプレートリーダーによる発光検出で、ATP量を測定した。細胞を播種していないウェルのATP残存値を100%とし、細胞を播種し抗体を添加していないウェルのATP残存値を0%とし、測定サンプルのATP残存値の割合から、各種抗体におけるATP分解の阻害率を算出し、抗体によるヒトCD39のATP分解の阻害活性を評価した。

[0132] 実施例1.4：エピトープビニング

実施例1.2で得られた抗ヒトCD39抗体をエピトープによって分類するため、Biacore 8K（Cytiva）を使用し、表面プラズモン共鳴（SPR）による分子間相互作用解析によりエピトープビニングを実施した。詳細は次の通りである。抗体は、P4_sc、T86_sc、I67_sc、Tre291_sc、I-394（WO2018/167267に記載されているI-394の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列（それぞれ配列番号56、57）を有する抗CD39抗体）、及び31414（US2019/0062448に記載されている31414の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列（それぞれ配列番号58、59）を有する抗CD39抗体）の6種を使用した。Ni-NTA Sensor chipにリコンビナントヒトCD39（in house）をキャプチャーし、上記6種の抗ヒトCD39抗体を1次抗体として添加し、飽和するまで結合させた。続いて上記6種の抗体を2次抗体として添加させ、その結合反応の有無を判定した。

[0133] 図1に結果を示す。各抗体は、（１）P4_sc、I67_sc、及びTre291c_sc、（２）T86_sc、（３）I-394、及び（４）31414の4つのエピトープビンに分類された。このことから、実施例1.2で得られた4種の抗ヒトCD39抗体は、従来の抗体とは異なるエピトープを認識することが示された。また、4種の中でもT86_scは独自のエピトープを認識することが示された。

[0134] 実施例1.5：抗ヒトCD39抗体のリコンビナント抗原結合能

実施例1.2で得られた抗ヒトCD39抗体のヒトCD39への親和性を、Biacore 8Kを使用し、表面プラズモン共鳴（SPR）による相互作用解析で測定した。詳細は次の通りである。抗ヒトIgG抗体を固定化したセンサーチップ（Cytiva, #29234600）に、作製した4種の抗ヒトCD39抗体をキャプチャーし、リコンビナントヒトCD39（in house）をアナライトとした。データの解析には一対一のラングミュア結合モデルを用いて、各抗体のヒトCD39に対する結合速度定数（ka）、解離速度定数（kd）、及び解離定数（KD＝kd／ka）を算出した（図2）。

[0135] 実施例1.6：抗ヒトCD39抗体の細胞膜上抗原への結合解析

実施例1.2で得られた抗ヒトCD39抗体の細胞膜上に発現したヒトCD39への結合を、ヒトCD39安定発現HEK293T細胞を使用し、フローサイトメトリーで解析した。詳細は次の通りである。ヒトCD39発現HEK293T細胞は$2x10^5$細胞/ウェルで96ウェルV底プレートに分取し、200μlのPBS(-)で1回洗浄した。次に、Staining Buffer（PBS(-), 1% BSA, 0.09% NaN_3）で抗ヒトCD39抗体の希釈系列を10倍希釈5段階で調製し、100μl/ウェルずつ細胞に添加した。4℃で30分間静置後、Staining Bufferで1回洗浄し、Staining Bufferで100倍希釈した染色抗体（PE AffiniPure F(ab')2 Fragment Goat Anti-Human IgG, Fcγ fragment specific（Jackson ImmunoResearch, #109-116-170）を100μl/ウェルずつ細胞に添加した。4℃で20分間静置後、Staining Bufferで2回洗浄し、Fixation Buffer（BioLegend, #420801）を50μl添加し、室温に20分静置して固定化した。染色細胞はStaining Bufferに懸濁し、フローサイトメーターで蛍光強度（MFI）を測定した。各抗体濃度に対応するMFIをプロットし、Kd値を算出した。

[0136] 図3に結果を示す。4種の抗ヒトCD39抗体（P4_sc、T86_sc、I67_sc及びTre291_sc）は、いずれもCD39に対して良好な親和性を示した。

[0137] 実施例2.1:CD39/4-1BB二重特異性分子の作製

実施例1.2で得られた抗ヒトCD39抗体をもとに、二重特異性分子を作製した

。二重特異性分子は、ヒトCD39を標的とする第一の抗原結合ドメイン（CD39結合ドメイン）と、免疫細胞表面抗原であるヒト4-1BBを標的とする第二の抗原結合ドメイン（4-1BB結合ドメイン）を有するように設計した（模式図を図4に示す）。作成手順の詳細は次の通りである。実施例1.2で得られた4種の抗ヒトCD39抗体（scFv-Fcの形状）を発現する第一のベクターをそれぞれ作製した。ヒト4-1BBに対するリガンド（4-1BBL; Accession No. NM_003811.3/ NP_003802.1）（配列番号40）の細胞外ドメイン（71～254位のアミノ酸配列（配列番号39））の三量体を発現する第二のベクターを作製した。第二のベクターからは、4-1BBL単量体とヒトIgGのCκ鎖（配列番号41）とを短いリンカーで繋いたポリペプチド鎖（配列番号42）、及び短いリンカーで繋いだ4-1BBL二量体とヒトIgGのCH鎖（配列番号43）とを短いリンカーで繋いだポリペプチド鎖（配列番号44）が発現し、それらのポリペプチド鎖がジスルフィド結合することで三量体が形成される。このとき、抗ヒトCD39抗体及びヒト4-1BBLがヘテロダイマーを形成するように、抗ヒトCD39抗体のFc領域に、Knob-into-Hole（US7183076B2, Knob: Seq No.2, Hole: Seq No.3）のうちHoleの変異を入れ（Hole変異Fc領域：配列番号38）、ヒト4-1BBL三量体のFc領域にはKnobの変異を入れた（Knob変異Fc領域：配列番号45）。得られた抗ヒトCD39抗体を発現するベクター、及びヒト4-1BBL三量体を発現するベクターをExpiCHO細胞（Thermo Fisher Scientific）に同時に導入し、発現させた。CD39/4-1BB二重特異性分子を、抗IgG-CH1カラム（Thermo Fisher Scientific, 49434620 1）、サイズ排除クロマトグラフィー、及びイオン交換クロマトグラフィーで精製した。得られた4種の二重特異性分子のクローンIDをP4_4-1BBL、T86_4-1BBL、I67_4-1BBL又はTre291_4-1BBLとした。この4種の二重特異性分子のCD39結合ドメインはそれぞれP4_sc、T86_sc、I67_sc又はTre291_scに由来するものであり、CDRのアミノ酸配列はそれらと同じである。

[0138] 実施例2.2：ヒトCD39及び4-1BBに対する親和性測定

実施例2.1で得られたCD39/4-1BB二重特異性分子の、ヒトCD39及びヒト4-1BBへの親和性を、実施例1.5に記載の方法で測定した。ただし、アナライトと

してリコンビナントヒトCD39（in house）及びリコンビナントヒト4-1BB（R&D Systems社, 9220-4B-100）を用いた。データは一対一のラングミュア結合モデルを用いて解析した。各二重特異性分子の抗ヒトCD39及びヒト4-1BBLに対する結合速度定数（ka）、解離速度定数（kd）、及び解離定数（KD＝kd／ka）を算出した。

[0139] 図5に結果を示す。4種のCD39/4-1BB二重特異性分子（P4_4-1BBL、T86_4-1BBL、I67_4-1BBL及びTre291_4-1BBL）は、いずれもCD39及び4-1BBに対して良好な親和性を示した。

[0140] 実施例2.3：ヒトがん細胞株への結合性測定

実施例2.1で得られたCD39/4-1BB二重特異性分子の細胞膜上に発現したヒトCD39への結合を、ヒトCD39を発現するがん細胞（OAW42細胞（ECACC：85073102）あるいはSKMEL28細胞（ATCC：HTB-72））を使用を使用し、フローサイトメトリーで解析した。詳細は次の通りである。OAW42細胞あるいはSKMEL28細胞は$2x10^5$細胞/ウェルで96ウェルV底プレートに分取し、200μlのPBS(-)で1回洗浄した。次に、Staining Buffer（PBS(-), 1% BSA, 0.09% NaN_3）でCD39/4-1BB二重特異性分子の希釈系列を10倍希釈5段階で調製し、100μl/ウェルずつ細胞に添加した。4℃で1時間静置後、Staining Bufferで1回洗浄し、Staining Bufferで25倍希釈した染色抗体（PE AffiniPure F(ab')2 Fragment Goat Anti-Human IgG, Fcγ fragment specific（Jackson ImmunoResearch, #109-116-170）を100μl/ウェルずつ細胞に添加した。4℃で30分間静置後、Staining Bufferで2回洗浄し、Fixation Buffer（BioLegend, #420801）を50μl添加し、室温に20分静置して固定化した。染色細胞はStaining Bufferに懸濁し、フローサイトメーターで蛍光強度を測定した。各二重特異性分子濃度に対応する幾何平均蛍光強度（gMFI: geometric MFI）をプロットし、Kd値を算出した。

[0141] 図6及び7に結果を示す。4種のCD39/4-1BB二重特異性分子（P4_4-1BBL、T86_4-1BBL、I67_4-1BBL及びTre291_4-1BBL）は、いずれもがん細胞膜上のCD39に対して良好な親和性を示した。4種の中でも、T86_4-1BBLの親和性は顕著に

高かった。このことは、実施例1.5、実施例1.6、実施例2.2の親和性測定の結果とは傾向が異なっており、予想外の結果であった。T86_4-1BBLのCD39結合ドメインは、片方のアームだけに位置した場合でもCD39発現細胞に結合しやすいエピトープを認識していると考えられる。

[0142] 実施例2.4：OAW42細胞株におけるCD39酵素阻害活性測定

実施例2.1で得られたCD39/4-1BB二重特異性分子のヒトCD39酵素活性阻害能を、実施例1.3に記載の方法で測定した。ただし、ヒトCD39発現細胞としてOAW42細胞株を6.25x10^3細胞/ウェルで用いて評価した。

[0143] 図8に結果を示す。3種のCD39/4-1BB二重特異性分子（P4_4-1BBL、I67_4-1BBL及びTre291_4-1BBL）はCD39酵素阻害活性を示した。一方で、予想外なことにT86_4-1BBLはCD39酵素阻害活性が非常に弱かった。このことは、T86_4-1BBLが副作用抑制の観点から優れていることを示唆している。

[0144] 実施例2.5：SKMEL28細胞とPBMC共培養系におけるサイトカイン産生量測定

実施例2.1で得られたCD39/4-1BB二重特異性分子の、がん細胞とPBMCの共培養系における抗腫瘍作用への影響を評価した。詳細は次の通りである。評価には、50GyのX線照射をしたSKMEL28細胞株（標的細胞）を用いた。事前に凍結保管して準備した標的細胞を評価開始日に解凍し、Assay培地（10% FCS, 1x NEAA, 1x GlutaMax, 1% ペニシリンーストレプトマイシン含有RPMI-1640培地）に懸濁し、96ウェルプレートに播種した。次に健常人ボランティア由来のPBMCを、Assay培地に懸濁後、標的細胞の10倍量になるように96ウェルプレートに添加した。標的細胞とPBMC、あるいはPBMCのみを播種したウェルに、終濃度10 μg/mlのCD39/4-1BB二重特異性分子あるいは、対照としてisotype_4-1BBLを添加した。CD39/4-1BB二重特異性分子として、P4_4-1BBL、T86_4-1BBL、I67_4-1BBLあるいはTre291_4-1BBLを使用した。その後、終濃度1nMとなるように抗CD3抗体（OKT3, BioLegend, #317326）を添加し、37℃、5% CO_2の条件で2日間共培養を行った。共培養終了後、培養上清と非付着細胞を回収し、遠心により細胞成分を除去後、培養上清中のIL-2、TNF-α、及びIFN-γをLuminexにより測定した。濃度既知のリコンビナントIL-2、TNF-α、及びIFN-

γを用いて検量線を作成し、各サイトカイン濃度を算出した。

[0145] 図9に結果を示す。2種のCD39/4-1BB二重特異性分子（P4_4-1BBL及びT86_4-1BBL）は、いずれもサイトカイン（IL-2、TNF-α、及びIFN-γ）を特に多く産生した。このことは、機能的なT細胞が多く誘導されたことを示している。

[0146] 実施例3.1：ヒト化抗体の調製

実施例1.2で作製した抗ヒトCD39抗体のヒト化を、CDRグラフティング法で実施した。詳細は次の通りである。抗ヒトCD39抗体のうち特にサイトカイン産生の促進が見られたP4_sc及びT86_scに関して、Discovery Studio（ダッソー・システムズ(株)）を使用して、CDRグラフティングによりヒト化を実施した。各々複数の候補が得られたうち、オリジナルのマウス抗体と同等以上の親和性及び生理活性があるものを選択した。ヒト化抗体は、実施例1.2に記載の方法でscFv-Fc-LALA型抗体の形状として調製した。得られた2種のヒト化抗体のクローンIDをHuP4_IB又はHuT86_IFとした。この2種のヒト化抗体はそれぞれP4_sc又はT86_scに由来するものであり、CDRのアミノ酸配列はそれらと同じである。

[0147] 実施例3.2：ヒト化抗ヒトCD39抗体のリコンビナント抗原結合能

実施例3.1で得られたヒト化抗ヒトCD39抗体のヒトCD39への親和性を、実施例1.5に記載の方法で測定した。データは一対一のラングミュア結合モデルを用いて解析し、各ヒト化抗体のヒトCD39に対する結合速度定数（ka）、解離速度定数（kd）、及び解離定数（KD＝kd／ka）を算出した（図10）。

[0148] 実施例3.3：ヒト化抗ヒトCD39抗体の細胞膜上抗原への結合解析

実施例3.1で得られたヒト化抗ヒトCD39抗体の細胞膜上に発現したヒトCD39への結合を、実施例1.6に記載の方法で測定した。各抗体濃度に対応する幾何平均蛍光強度（gMFI: geometric MFI）をプロットし、Kd値を算出した。

[0149] 図11に結果を示す。2種のヒト化抗ヒトCD39抗体（HuP4_IB及びHuT86_IF）は、いずれもCD39に対して良好な親和性を示した。

[0150] 実施例4.1:ヒト化抗ヒトCD39抗体を用いたCD39/4-1BB二重特異性分子の作製

実施例3.1で得られたヒト化抗ヒトCD39抗体をもとに、実施例2.1と同様の

手順でCD39/4-1BB二重特異性分子を作製した。このとき、第一のベクターとして、HuP4_IB又はHuT86_IFを発現するベクターをそれぞれ作製し、使用した。得られた2種の二重特異性分子のクローンIDをそれぞれHuP4_IB_4-1BBL又はHuT86_IF_4-1BBLとした。この2種の二重特異性分子のCD39結合ドメインはそれぞれHuP4_IB又はHuT86_IFに由来するものであり、CDRのアミノ酸配列はそれらと同じである。

[0151] また、抗ヒトCD39抗体として31414又はI-394を用いて、実施例2.1と同様の手順でCD39/4-1BB二重特異性分子を作製した。このとき、第一のベクターとして、31414又はI-394を発現するベクターをそれぞれ作製し、使用した。得られた2種の二重特異性分子のクローンIDをそれぞれ31414_4-1BBL又はI-394_4-1BBLLとした。

[0152] 実施例4.2：ヒトCD39及び4-1BBに対する親和性測定

実施例4.1で得られたCD39/4-1BB二重特異性分子の、ヒトCD39及びヒト4-1BBへの親和性を実施例2.2に記載の方法で測定した。データは1：1結合モデルを用いて解析した。各二重特異性分子の抗ヒトCD39及びヒト4-1BBLに対する結合速度定数（ka）、解離速度定数（kd）、及び解離定数（KD＝kd／ka）を算出した。

[0153] 図12に結果を示す。2種のCD39/4-1BB二重特異性分子（HuP4_IB_4-1BBL及びHuT86_IF_4-1BBL）は、いずれもCD39及び4-1BBに対して良好な親和性を示した。

[0154] 実施例4.3：ヒトがん細胞株への結合性測定

実施例4.1で得られたCD39/4-1BB二重特異性分子のヒトCD39への結合を、実施例2.3に記載の方法で測定した。各二重特異性分子濃度に対応する幾何平均蛍光強度（gMFI: geometric MFI）をプロットし、Kd値を算出した。

[0155] 図13及び14に結果を示す。2種のCD39/4-1BB二重特異性分子（HuP4_IB_4-1BBL及びHuT86_IF_4-1BBL）は、いずれもがん細胞上のCD39に対して良好な親和性を示した。特に、HuT86_IF_4-1BBLの親和性は顕著に高かった。このことは、実施例4.2における単離されたCD39に対する親和性測定の結果とは傾向が異

なっていた。実施例2.3の結果とは同様の傾向であった。

[0156] 実施例4.4：SKMEL28細胞とPBMC共培養系におけるサイトカイン産生量測定

実施例4.1で得られたCD39/4-1BB二重特異性分子の、がん細胞とPBMCの共培養系における抗腫瘍作用への影響を評価した。詳細は次の通りである。標的細胞（SKMEL28）をAssay培地（10% FCS、1% ペニシリンーストレプトマイシン含有E-MEM培地）に懸濁し、96ウェルプレートに播種した。次に健常人ボランティア由来のPBMCを、Assay培地に懸濁後、標的細胞の1.6倍量になるように96ウェルプレートに添加した。標的細胞とPBMC、あるいはPBMCのみを播種したウェルに、終濃度1 μg/mlのCD39/4-1BB二重特異性分子あるいは、対照としてisotype_4-1BBLを添加した。CD39/4-1BB二重特異性分子として、HuP4_IB_4-1BBL、HuT86_IF_4-1BBL、31414_4-1BBL、又はI-394_4-1BBLを使用した。その後、終濃度1nMとなるように抗CD3抗体（OKT3, BioLegend, #317326）を添加し、37℃、5% CO_2の条件で4日、又は6日間共培養を行った。共培養終了後、培養上清と非付着細胞を回収し、遠心により細胞成分を除去後、培養上清中のIL-2、TNF-α、及びIFN-γをLuminexにより測定した。濃度既知のリコンビナントIL-2、TNF-α、及びIFN-γを用いて検量線を作成し、各サイトカイン濃度を算出した。

[0157] 図15～18に結果を示す。2種のCD39/4-1BB二重特異性分子（P4_4-1BBL及びT86_4-1BBL）は、どちらもサイトカイン（IL-2、TNF-α、及びIFN-γ）を多く産生した。特に、HuT86_IF_4-1BBLによる産生量が顕著に高かった。

[0158] 実施例4.5：SKMEL28細胞株に対する細胞増殖抑制効果測定

実施例4.1で得られたCD39/4-1BB二重特異性分子の、PBMCとがん細胞の共培養系における抗腫瘍作用への影響を評価した。詳細は次の通りである。評価用のCD39/4-1BB二重特異性分子として、HuP4_IB_4-1BBL、HuT86_IF_4-1BBL、31414_4-1BBL、I-394_4-1BBLを使用し、対照としてisotype_4-1BBLを使用した。評価開始前日に、SKMEL28細胞株を、10% FCS、1% ペニシリンーストレプトマイシン含有E-MEM培地に懸濁し、96ウェルプレートに播種し、37℃、5% CO_2の条件下で培養した。評価開始日に、健常人ボランティア由来のPBMCを、1

0% FCS、1% ペニシリンーストレプトマイシン含有E-MEM培地に懸濁後、PBMCの数が前日播種したがん細胞の1.6倍の細胞数となるように96ウェルプレートに添加した。がん細胞とPBMCを添加したウェルに、終濃度1 μg/mlの評価用の二重特異性分子あるいはisotype_4-1BBLを添加した。その後、終濃度1nMとなるように抗CD3抗体を添加し、37℃、5% CO_2の条件で7日間共培養を行った。共培養終了後、培養上清と非付着細胞を回収し、さらにPBSで2回ウェルを洗浄した後、70μLのPBSを添加した。さらに70μLのCellTiter-Glo（登録商標）2.0（Promega, G9243）を添加し室温で10分間振盪した後、ウェルの内容物各100μLを白色の96ウェルプレートに分取し、マイクロプレートリーダーによる発光検出で、生細胞に由来するATP量を測定した。

[0159] 図19及び20に結果を示す。2種のCD39/4-1BB二重特異性分子（P4_4-1BBL及びT86_4-1BBL）は、PBMCとがん細胞の共培養系において、いずれも抗腫瘍効果を示した。特に、HuT86_IF_4-1BBLによる抗腫瘍効果が顕著に高かった。

[0160] 実施例5.1：CD39/CD3二重特異性分子の作製

実施例3.1で得られた抗ヒトCD39抗体をもとに、二重特異性分子を作製した。二重特異性分子は、ヒトCD39を標的とする第一の抗原結合ドメイン（CD39結合ドメイン）と、ヒトCD3を標的とする第二の抗原結合ドメイン（CD3結合ドメイン）を有するように設計した。作製手順の詳細は次の通りである。実施例3.1で得られた抗ヒトCD39抗体（scFv-Fcの形状）を発現する第一のベクターとして、実施例4.1で作製したものを用いた。ヒトCD3に対する抗体（OKT3）を発現する第二のベクターを作製した。第二のベクターからは、OKT3のVκ鎖（配列番号53）とヒトIgGのCκ鎖（配列番号41）とから成るポリペプチド鎖（配列番号69）、及びOKT3のVH鎖（配列番号52）とヒトIgGのCH鎖（配列番号43）とから成るポリペプチド鎖（配列番号68）が発現し、それらのポリペプチド鎖がジスルフィド結合することで二量体が形成される。このとき、抗ヒトCD39抗体及び抗ヒトCD3抗体がヘテロダイマーを形成するように、抗ヒトCD3抗体のFc領域に、Knob-into-Hole（US7183076B2, Knob: Seq No.2, Hole: Seq No.3）のうちKnobの変異を入れた（Knob変異Fc領域：配列番号45）。

抗ヒトCD39抗体を発現するベクター、及び抗ヒトCD3抗体を発現するベクターをExpiCHO細胞（Thermo Fisher Scientific）に同時に導入し、発現させた。CD39/CD3二重特異性分子を、抗IgG-CH1カラム（Thermo Fisher Scientific, 494346201）、及び陽イオン交換クロマトグラフィーで精製した。得られた二重特異性分子のクローンIDをOKT3-HuT86_IF_Fsc、及びOKT3-I-394_Fscとした。OKT3-HuT86_IF-FscのCD39結合ドメインはT86_scに由来するものであり、それらのCDRのアミノ酸配列は同じである。

[0161] 実施例5.2：ヒトCD39に対する親和性測定

実施例5.1で得られたCD39/CD3二重特異性分子OKT3-HuT86_IF_Fscの、ヒトCD39への親和性を、実施例1.5に記載の方法で測定した。データは一対一のラングミュア結合モデルを用いて解析した。二重特異性分子の抗ヒトCD39に対する結合速度定数（ka）、解離速度定数（kd）、及び解離定数（KD＝kd／ka）を算出した。

[0162] 図26に結果を示す。CD39/CD3二重特異性分子OKT3-HuT86_IF_Fscは、CD39に対して良好な親和性を示した。

[0163] 実施例5.3：ヒトがん細胞株への結合性測定

実施例5.1で得られたCD39/CD3二重特異性分子OKT3-HuT86_IF_Fscの細胞膜上に発現したヒトCD39への結合を、実施例2.3に記載の方法で測定した。対照として実施例4.1で作製したHuT86_IF_4-1BBLを用いた。二重特異性分子濃度に対応する幾何平均蛍光強度（gMFI: geometric MFI）をプロットし、Kd値を算出した。

[0164] 図27に結果を示す。CD39/CD3二重特異性分子OKT3-HuT86_IF_Fscは、がん細胞膜上のCD39に対して、実施例4.3で示したHuT86_IF_4-1BBLと同程度の親和性を示した。このことは、HuT86_IF_4-1BBLと同様に、OKT3-HuT86_IF_FscにおいてもHuT86_IFは、もう片方のアームの影響を受けずに片方のアームだけでもCD39発現細胞に結合しやすいエピトープを認識していると考えられる。

[0165] 実施例5.4：SKMEL28細胞株に対する細胞傷害活性測定

実施例5.1で得られたCD39/CD3二重特異性分子の、PBMCとがん細胞の共培養

系における抗腫瘍作用への影響を、実施例4.5に記載の方法で測定した。ただし、CD39/CD3二重特異性分子添加群において抗CD3抗体（OKT3, BioLegend, #317326）は添加しなかった。また、添加するPBMCの細胞数は標的細胞と等倍とした。二重特異性分子、及び抗CD3抗体を添加していないウェル中の、生細胞に由来するATP量を100%とし、測定サンプルのATP量から、各ウェルにおける生細胞残存率を算出し、その生細胞残存率を1から引いた値を、二重特異性分子、及び抗CD3抗体によるがん細胞傷害活性として評価した。

[0166] 図28に結果を示す。2種のCD39/CD3二重特異性分子（OKT3-HuT86_IF_Fsc、及びOKT3-I-394_Fsc）は、PBMCとがん細胞の共培養系において、いずれも抗腫瘍効果を示した。特に、OKT3-I-304_Fscが最高濃度にて傷害活性が落ちるのに対し、OKT3-HuT86_IF_Fscによる抗腫瘍効果は最高濃度においても濃度依存的に活性が高かった。

[0167] 実施例5.5：SKMEL28細胞とPBMC共培養系におけるサイトカイン産生量、及び細胞溶解性顆粒放出量の測定

実施例5.4の培養上清を用いて、実施例4.4に記載の方法でサイトカイン産生量、及び細胞溶解性顆粒放出量を測定した。ただし、CD39/CD3二重特異性分子添加群において抗CD3抗体（OKT3, BioLegend, #317326）は添加しなかった。また、添加するPBMCの細胞数は標的細胞と等倍とした。また、Granzyme B及びPerforinに関しては、MILLIPLEX MAP 7-Plex Human CD8+/Cytokine Magnetic Bead Panel（Millipore, #HCD8MAG15K17PMX）を使用して測定した。濃度既知のリコンビナントIL-2、TNF-α、IFN-γ、Granzyme B及びPerforinを用いて検量線を作成し、各サイトカイン、及び細胞溶解性顆粒濃度を算出した。

[0168] 図29及び30に結果を示す。OKT3-HuT86_IF_Fscによるサイトカイン産生量、及び細胞溶解性顆粒放出量は顕著に高かった。

[0169] 実施例6.1：SKMEL28細胞とPBMC共培養系におけるT細胞の活性化の測定

実施例5.1で得られたCD39/CD3二重特異性分子の、PBMCとがん細胞の共培養系におけるエフェクター細胞に対する影響を評価した。詳細は次の通りであ

る。評価用のCD39/CD3二重特異性分子としてOKT3-HuT86_IF_Fsc、OKT3-I-394_Fscを使用し、対照としてOKT3を使用した。評価開始前日に、SKMEL28細胞株を、10% FCS、1% ペニシリンーストレプトマイシン含有E-MEM培地に懸濁し、24ウェルプレートに2.4x10^4細胞/ウェルとなるように播種し、37℃、5% CO2の条件下で培養した。評価開始日に、健常人ボランティア由来のPBMCを、10% FCS、1% ペニシリンーストレプトマイシン含有E-MEM培地に懸濁後、PBMCの細胞数が前日播種したがん細胞と等倍になるように添加した。がん細胞とPBMCを添加したウェルに、終濃度1 μg/mlの評価用の二重特異性分子あるいはOKT3を添加し、37℃、5% CO2の条件で共培養を行った。5日目の染色前日にBrefeldin A (BioLegend) を最終濃度1xになるように添加し、37℃, 5% CO2で17時間培養した。6日目に細胞を96ウェルV底プレートに回収し、200μlのPBS (-) で1回洗浄した。死細胞染色としてPBS (-) で1,000倍希釈したZombie-NIR (BioLegend) を50μl添加し、室温で15分間静置し、200ulのStaining Buffer [PBS(-), 1% BSA, 0.09% NaN3] で1回洗浄した。次に、Staining Bufferで20倍希釈したHuman TruStain FcX (BioLegend) を50μl添加して室温で20分間処理後、T細胞染色抗体 (BioLegend, anti-CD3: UCHT1, anti-CD4: RPA-T4, anti-CD8a: HIT8a, anti-CD39: A1, anti-PD-1: EH12) をStaining Bufferで適宜希釈して50ulずつ添加し、4℃で30分間、暗所で静置した。次に、Staining Bufferで1回洗浄し、Fixation Bufferを50μl添加して室温20分静置して固定化した。さらに、Intracellular Staining Permeabilization Wash Buffer (BioLegend, #421002) で2回洗浄し、サイトカイン染色抗体 (BioLegend, anti-IFN-γ: B27, anti-IL2: MQ1-17H12) をIntracellular Staining Permeabilization Wash Bufferで適宜希釈し、100ulを添加して4℃で40分間、暗所で静置した。Intracellular Staining Permeabilization Wash Bufferで2回洗浄後、Staining Bufferに懸濁し、細胞数計測用のビーズ (Thermo Fisher Scientific, #C36950) を添加して、フローサイトメーターで解析した。

[0170] 図31に、フローサイトメトリー解析でCD4陽性T細胞及びCD8陽性T細胞の総数を算出し、それぞれをCD39とPD1の発現パターンで分類した結果を示す。本

実施例で作製した抗ヒトCD39/CD3二重特異性分子OKT3-HuT86_IF_FscはOKT3-I-394_Fsc、及びOKT3と比較して、CD4陽性T細胞、及びCD8陽性T細胞のどちらも有意に増加させた。さらに、その差はT細胞の活性化により発現が亢進するPD1およびCD39の陽性画分の増加によるものであった。このことから本実施例で作製した抗ヒトCD39/CD3二重特異性分子OKT3-HuT86_IF_Fscは、CD39発現細胞存在下でT細胞を活性化し増加させること、さらにはT細胞中のCD39陽性画分は抗ヒトCD39/CD3二重特異性分子の標的細胞となりうるが、驚くべきことに活性化したCD39陽性T細胞への影響は少ないことが明らかとなった。

[0171] 以上、本発明を実施例に基づいて説明した。この実施例はあくまで例示であり、種々の変形例が可能なこと、またそうした変形例も本発明の範囲にあることは当業者に理解されるところである。

請求の範囲

[請求項1] (a)配列番号1で示されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、配列番号2で示されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR2、配列番号3で示されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR3、配列番号4で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、配列番号5で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2、及び配列番号6で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を含む、CD39結合ドメイン、

(b)配列番号7で示されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、配列番号8で示されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR2、配列番号9で示されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR3、配列番号10で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、配列番号11で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2、及び配列番号12で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を含む、CD39結合ドメイン、

(c)配列番号13で示されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、配列番号14で示されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR2、配列番号15で示されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR3、配列番号16で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、配列番号17で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2、及び配列番号18で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を含む、CD39結合ドメイン、又は

(d)配列番号19で示されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、配列番号20で示されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR2、配列番号21で示されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR3、配列番号22で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、配列番号23で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2、及び配列番号24で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を含む、CD39結合ドメイン、

を含む、多重特異性抗原結合性分子。

[請求項2] 前記(a)又は(b)のCD39結合ドメインを含む、請求項1に記載の多重特異性抗原結合性分子。

[請求項3] 前記(b)のCD39結合ドメインを含む、請求項1又は2に記載の多重特異性抗原結合性分子。

[請求項4] 前記CD39結合ドメインは、CD39を認識するドメインである、請求項1～3のいずれかに記載の多重特異性抗原結合性分子。

[請求項5] がん細胞表面のCD39への結合性を有する、請求項1～4のいずれかに記載の多重特異性抗原結合性分子。

[請求項6] 抗腫瘍活性を有する、請求項1～5のいずれかに記載の多重特異性抗原結合性分子。

[請求項7] 前記抗腫瘍活性は、前記多重特異性抗原結合性分子が複数種類の抗原に結合したことに起因して生じる抗腫瘍活性である、請求項6に記載の多重特異性抗原結合性分子。

[請求項8] 前記多重特異性抗原結合性分子は、がん細胞表面のCD39と、免疫細胞表面抗原又は抗炎症性サイトカインとに結合することによって抗腫瘍作用を生じさせる、請求項1～7のいずれかに記載の多重特異性抗原結合性分子。

[請求項9] 前記CD39結合ドメインは重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む、請求項1～8のいずれかに記載の多重特異性抗原結合性分子。

[請求項10] 二重特異性抗原結合性分子である、請求項1～9のいずれかに記載の多重特異性抗原結合性分子。

[請求項11] 二重特異性抗体又は二重特異性抗原結合性融合蛋白質である、請求項1～10のいずれかに記載の多重特異性抗原結合性分子。

[請求項12] CD39以外の抗原への結合性を有するドメインをさらに含む、請求項1～11のいずれかに記載の多重特異性抗原結合性分子。

[請求項13] 第一の結合ドメインとして前記CD39結合ドメインを含み、第二の結合ドメインとして免疫細胞表面抗原結合ドメイン又は抗炎症性サイトカイン結合ドメインを含む、請求項1～12のいずれかに記載の多重特異性抗原結合性分子。

[請求項14] 前記CD39結合ドメインと、前記免疫細胞表面抗原結合ドメイン又は

抗炎症性サイトカイン結合ドメインとの間に介在配列が存在する、請求項13に記載の多重特異性抗原結合性分子。

[請求項15] 前記免疫細胞は、T細胞である、請求項8、13及び14のいずれかに記載の多重特異性抗原結合性分子。

[請求項16] 前記免疫細胞表面抗原は、共刺激分子、免疫チェックポイント分子又はCD3である、請求項8及び13～15のいずれかに記載の多重特異性抗原結合性分子。

[請求項17] 前記抗炎症性サイトカインは、制御性T細胞を誘導するサイトカインである、請求項8及び13～16のいずれかに記載の多重特異性抗原結合性分子。

[請求項18] 第一の結合ドメインとして前記CD39結合ドメインを含み、第二の結合ドメインとして4-1BB、GITR、CD27、CD40、NKp30、TIM-3、LAG-3、BTLA、CTLA-4、CD73、CD3、又はTGFβへの結合性を有するドメインを含む、請求項1～17のいずれかに記載の多重特異性抗原結合性分子。

[請求項19] 第一の結合ドメインとして前記CD39結合ドメインを含み、第二の結合ドメインとして4-1BBへの結合性を有するドメインを含む、請求項1～18のいずれかに記載の多重特異性抗原結合性分子。

[請求項20] 第一の結合ドメインとして前記CD39結合ドメインを含み、第二の結合ドメインとしてCD3への結合性を有するドメインを含む、請求項1～18のいずれかに記載の多重特異性抗原結合性分子。

[請求項21] CD39結合ドメインは、ヒト化されたCD39結合ドメインである、請求項1～20のいずれかに記載の多重特異性抗原結合性分子。

[請求項22] 請求項1～21のいずれかに記載の多重特異性抗原結合性分子をコードする、ポリヌクレオチド又はベクター。

[請求項23] 請求項22に記載のポリヌクレオチド又はベクターを含む、細胞。

[請求項24] 請求項23に記載の細胞を増殖させる工程を含む、多重特異性抗原結合性分子の生産方法。

[請求項25] 請求項1～21のいずれかに記載の多重特異性抗原結合性分子を含む

、組成物。

[請求項26] 請求項1～21のいずれかに記載の多重特異性抗原結合性分子を含む、悪性腫瘍の治療のための医薬組成物。

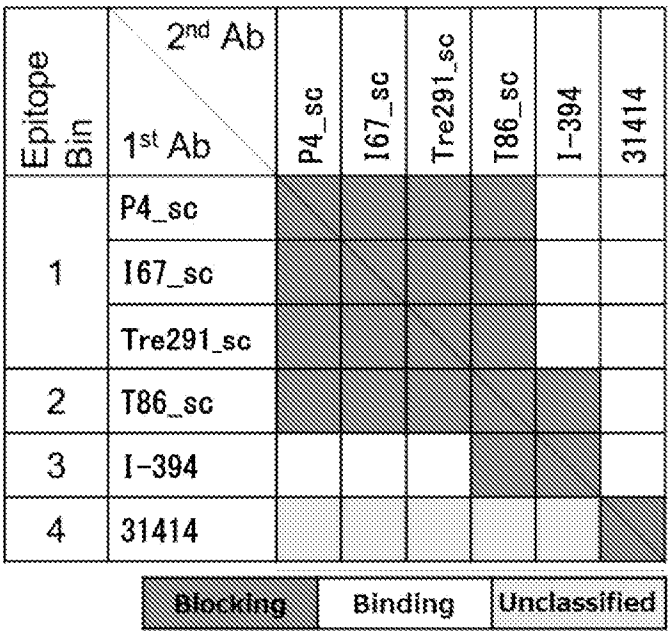
[請求項27] 前記治療は、前記多重特異性抗原結合性分子が複数種類の抗原に結合したことに起因して生じる抗腫瘍活性によって実施される、請求項26に記載の医薬組成物。

[請求項28] 請求項1～21のいずれかに記載の多重特異性抗原結合性分子を含む、免疫細胞のサイトカイン産生促進用組成物。

[請求項29] 前記サイトカインは、IL-2、TNF-αまたはIFN-γである、請求項28に記載の組成物。

[請求項30] 請求項1～21のいずれかに記載の多重特異性抗原結合性分子を含む、キット。

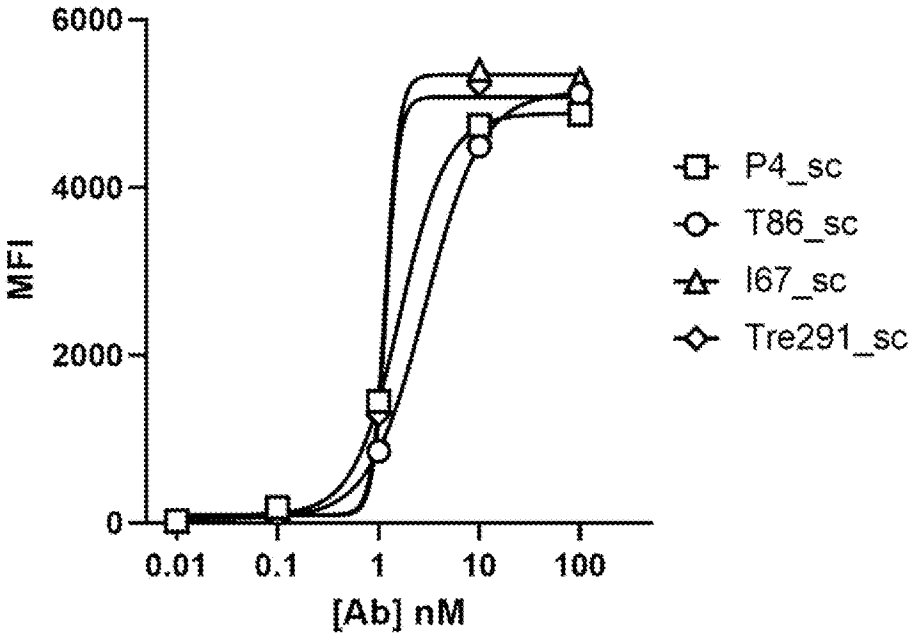
[図1]
Fig. 1



[図2]
Fig. 2

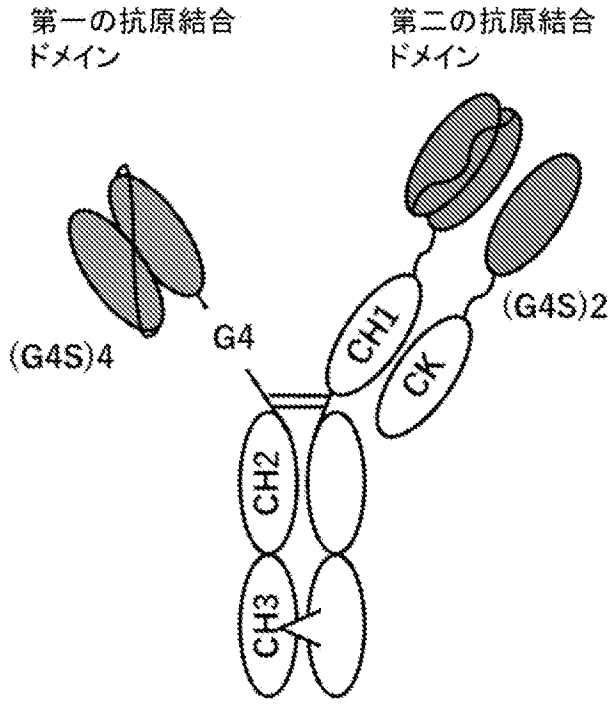
clone ID	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
P4_sc	1.44E+06	4.42E-04	3.07E-10
T86_sc	1.92E+05	8.23E-04	4.28E-09
I67_sc	1.78E+06	2.94E-03	1.65E-09
Tre291_sc	1.40E+06	3.10E-03	2.22E-09

[図3]
Fig. 3



clone ID	MFI_{max}	Kd (nM)
P4_sc	5,396	2.3
T86_sc	5,657	3.6
I67_sc	6,029	2.4
Tre291_sc	5,755	2.4

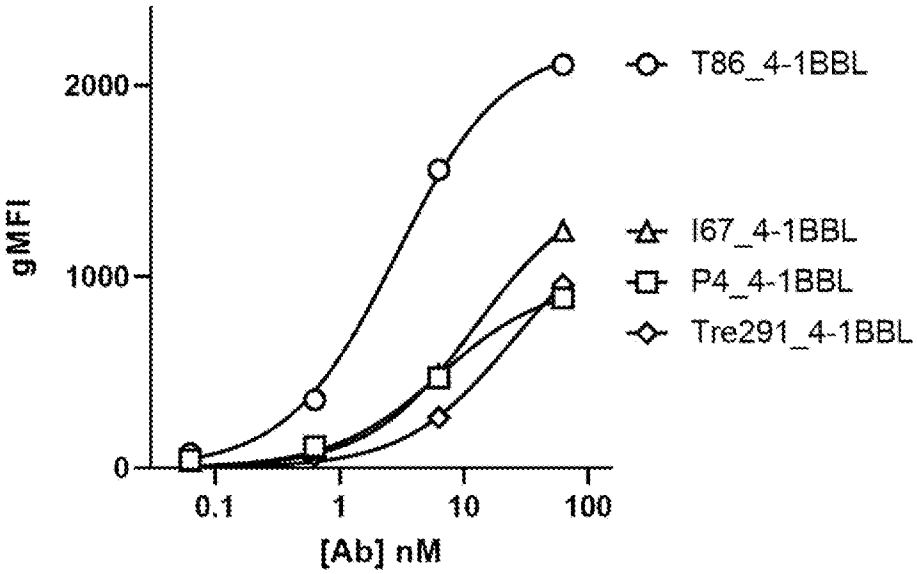
[図4]
Fig. 4



[図5]
Fig. 5

clone ID	vs hCD39			vs h4-1BB		
	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
P4_4-1BBL	1.29E+06	2.49E-04	1.94E-10	1.05E+05	2.26E-02	2.14E-07
T86_4-1BBL	3.74E+05	8.21E-04	2.20E-09	1.09E+05	1.96E-02	1.81E-07
I67_4-1BBL	1.51E+06	2.59E-03	1.72E-09	1.07E+05	2.33E-02	2.19E-07
Tre291_4-1BBL	1.24E+06	2.93E-03	2.36E-09	9.95E+04	1.72E-02	1.72E-07
isotype_4-1BBL	--	--	--	1.16E+05	2.45E-02	2.12E-07

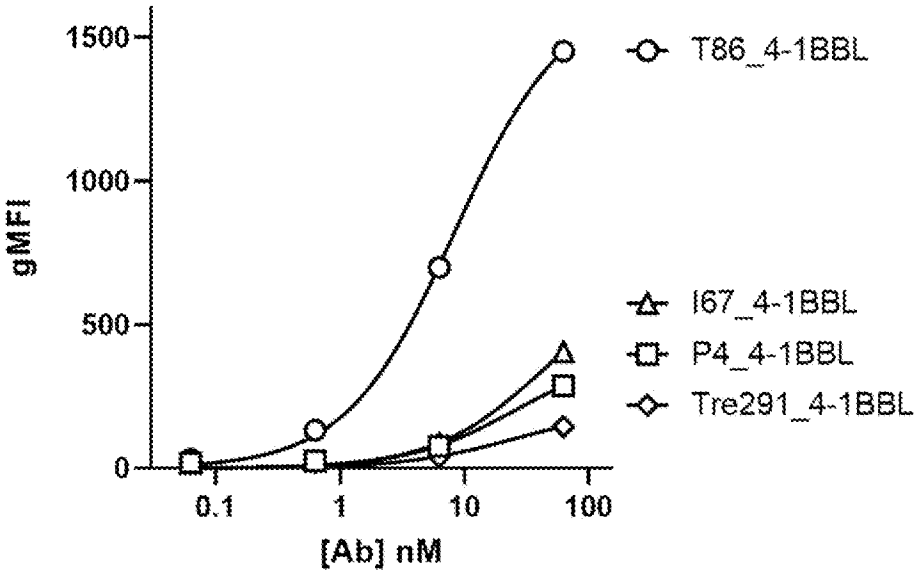
[図6]
Fig. 6



clone ID	OAW42	
	$gMFI_{Max}$	Kd (nM)
P4_4-1BBL	976	6.4
T86_4-1BBL	2,217	2.8
I67_4-1BBL	1,487	12.4
Tre291_4-1BBL	1,336	24.7

[図7]

Fig. 7



clone ID	SKMEL28	
	$gMFI_{Max}$	Kd (nM)
P4_4-1BBL	405	25.7
T86_4-1BBL	1,643	8.3
I67_4-1BBL	674	41.6
Tre291_4-1BBL	200	23.9

[図8]

Fig. 8

clone ID	% of inhibition	
	1 ug/mL	10 ug/mL
P4_4-1BBL	30.0%	48.6%
T86_4-1BBL	0.2%	1.1%
I67_4-1BBL	21.6%	42.3%
Tre291_4-1BBL	16.3%	43.4%

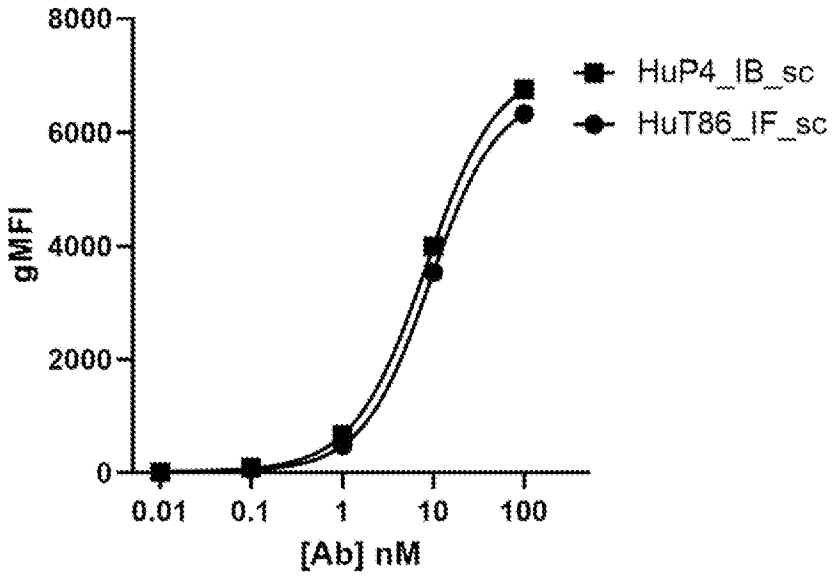
[図9]
Fig. 9

clone ID	PBMC only (pg/mL)			Co-culture of SKMEL28 and PBMC (pg/mL)				[Co-culture] / [PBMC only]		
	IL-2	TNF-α	IFN-γ	IL-2	TNF-α	IFN-γ	IL-2	TNF-α	IFN-γ
P4_4-1BBL	210	15,876	727	9,053	24,963	2,107	24.1	1.6	2.9
T86_4-1BBL	268	17,765	730	9,432	24,607	2,254	20.2	1.4	3.1
I67_4-1BBL	19	23,404	783	90	25,076	1,314	4.7	0.9	1.7
Tre291_4-1BBL	90	31,687	1,144	150	24,830	2,276	1.7	0.8	2.0
Isotype_4-1BBL	159	14,012	539	1,627	16,914	1,323	9.8	1.1	2.5

[図10]
Fig. 10

clone ID	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
HuP4_IB_sc	9.51E+05	4.17E-04	4.39E-10
HuT86_IF_sc	1.31E+05	5.41E-04	4.13E-09

[図11]
Fig. 11

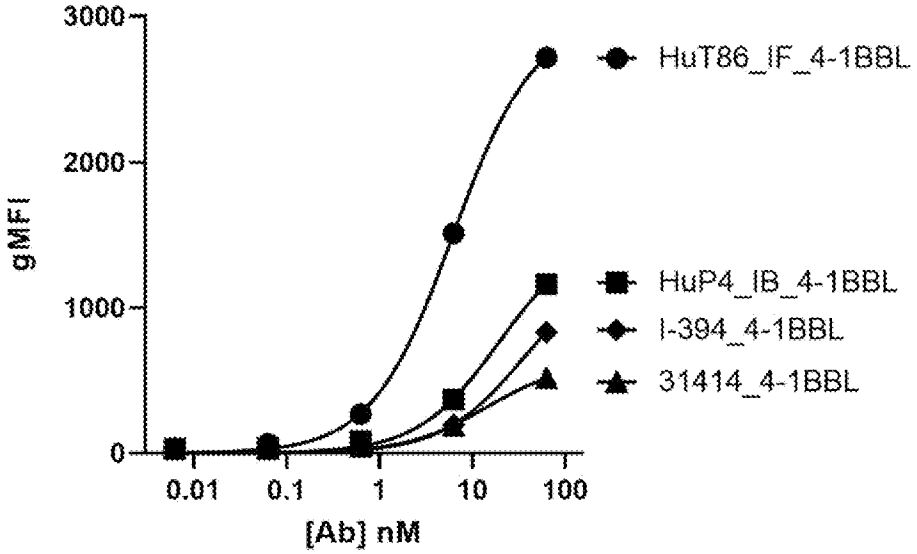


clone ID	$gMFI_{Max}$	Kd (nM)
HuP4_IB_sc	7,334	8.4
HuT86_IF_sc	6,968	9.7

[図12]
Fig. 12

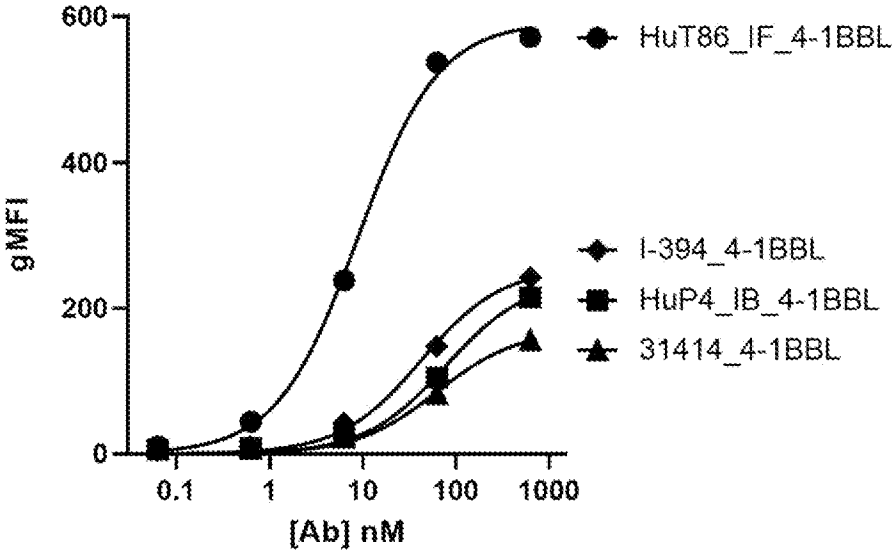
clone ID	vs hCD39				vs h4-1BB			
	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)		k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	
HuP4_IB_4-1BBL	2.18E+06	5.72E-04	2.63E-10		9.73E+04	2.31E-02	2.38E-07	
HuT36_IF_4-1BBL	1.76E+06	5.78E-04	3.29E-09		1.01E+05	2.21E-02	2.18E-07	

[図13]
Fig. 13



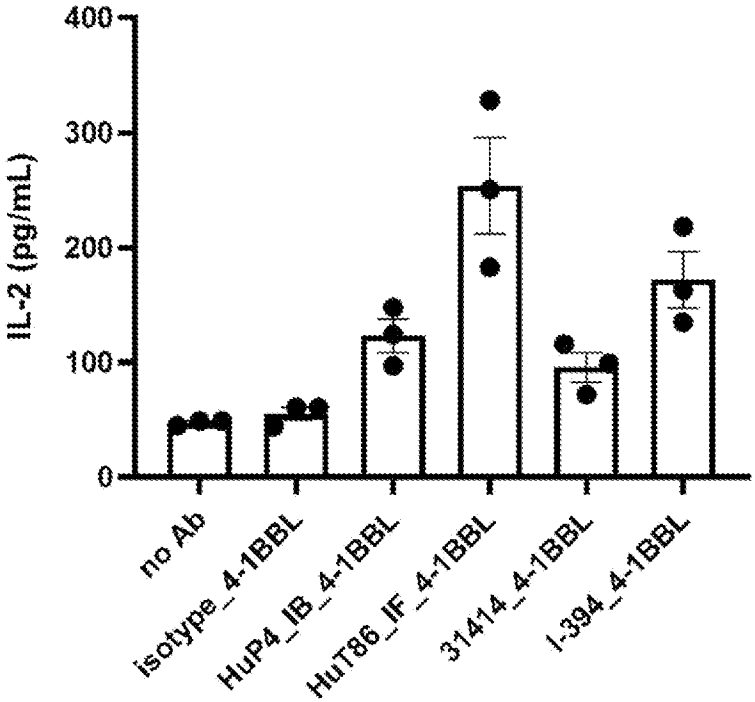
clone ID	OAW42	
	$gMFI_{Max}$	Kd (nM)
HuP4_IB_4-1BBL	1515	19.0
HuT86_IF_4-1BBL	2984	6.1
31414_4-1BBL	632	14.1
I-394_4-1BBL	1293	34.5

[図14]
Fig. 14

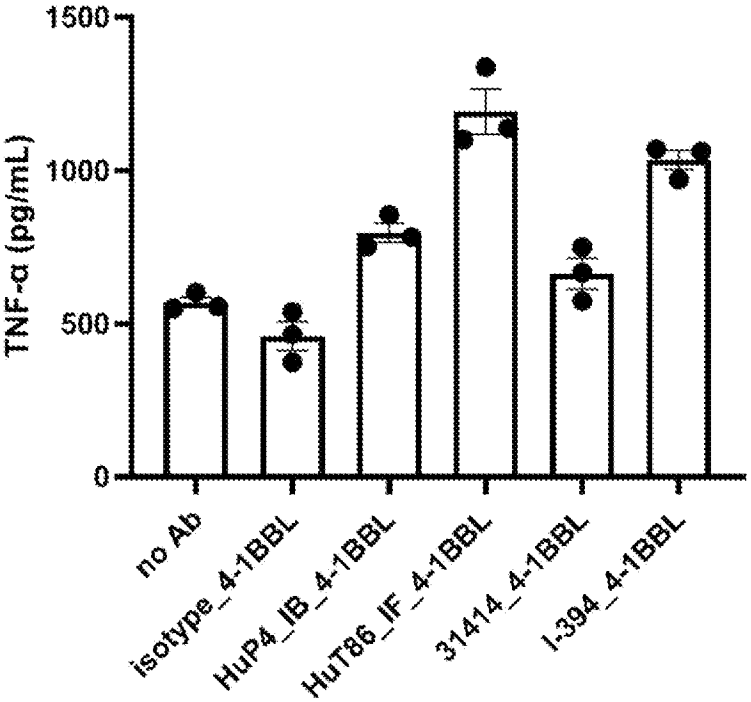


clone ID	SKMEL28	
	$gMFI_{Max}$	Kd (nM)
HuP4_IB_4-1BBL	241	77.0
HuT86_IF_4-1BBL	593	8.8
31414_4-1BBL	171	62.6
I-394_4-1BBL	256	41.9

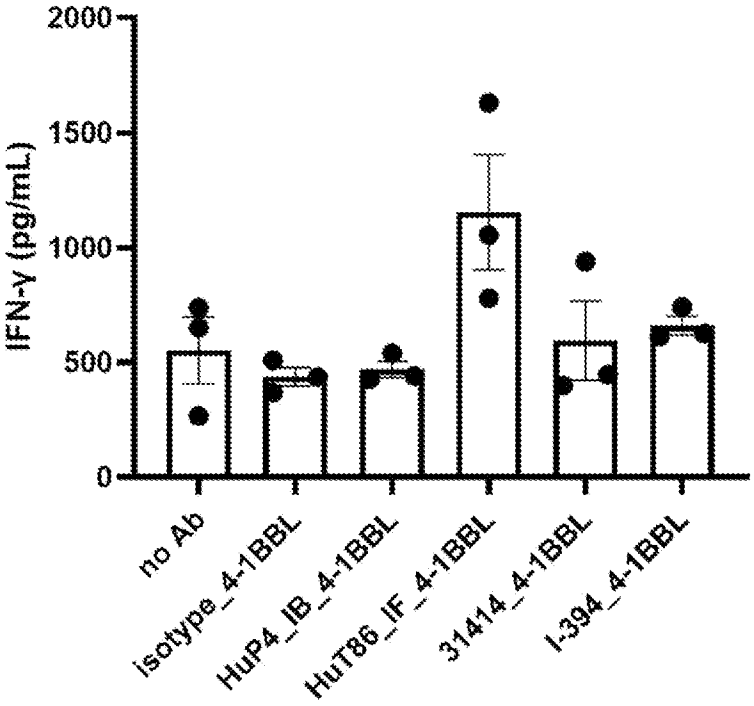
[図15]
Fig. 15



[図16]
Fig. 16



[図17]
Fig. 17

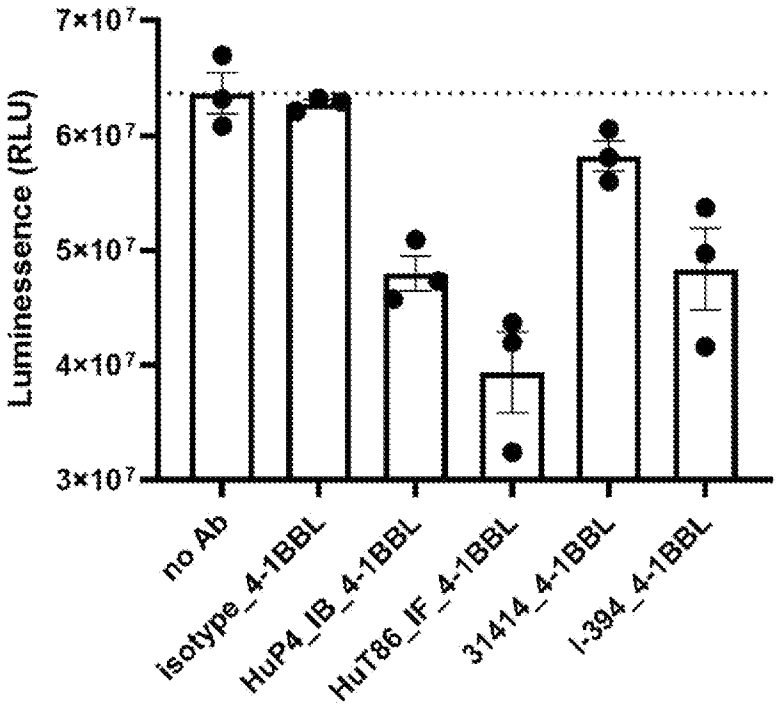


[図18]
Fig. 18

	IL-2	TNF-α	IFN-γ
Condition			
Target cells (/well)	1x10^4cells	2x10^4cells	2x10^4cells
E/T ratio	1.6	1.6	1.6
Days after start of co-culture	4 days	6 days	6 days
Tukey's multiple comparisons test	Adjusted P Value	Adjusted P Value	Adjusted P Value
HuT86_IF_4-1BBL vs. no Ab	0.0002**	<0.0001***	0.0850
HuT86_IF_4-1BBL vs. HuP4_IB_4-1BBL	0.0101*	0.0006***	0.0423*
HuT86_IF_4-1BBL vs. isotype_4-1BBL	0.0003***	<0.0001***	0.0324*
HuT86_IF_4-1BBL vs. 31414_4-1BBL	0.0023**	<0.0001***	0.1202
HuT86_IF_4-1BBL vs. I-394_4-1BBL	0.1475	0.2135	0.1996
no Ab vs. I-394_4-1BBL	0.0144*	0.0001***	0.9930
HuP4_IB_4-1BBL vs. I-394_4-1BBL	0.6063	0.0285*	0.9213
isotype_4-1BBL vs. I-394_4-1BBL	0.0220*	<0.0001***	0.8637
31414_4-1BBL vs. I-394_4-1BBL	0.1941	0.001***	0.9994
no Ab vs. HuP4_IB_4-1BBL	0.2034	0.0372*	0.9979
no Ab vs. isotype_4-1BBL	0.9998	0.5512	0.9907
no Ab vs. 31414_4-1BBL	0.6244	0.6907	>0.9999
HuP4_IB_4-1BBL vs. isotype_4-1BBL	0.2914	0.0022**	>0.9999
HuP4_IB_4-1BBL vs. 31414_4-1BBL	0.9385	0.3691	0.9859
isotype_4-1BBL vs. 31414_4-1BBL	0.7642	0.0681	0.9634

*: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$

[図19]
Fig. 19



[図20]
Fig. 20

Tukey's multiple comparisons test	Adjusted P Value
HuT86_IF_4-1BBL vs. no Ab	<0.0001***
HuT86_IF_4-1BBL vs. HuP4_IB_4-1BBL	0.1634
HuT86_IF_4-1BBL vs. isotype_4-1BBL	0.0001***
HuT86_IF_4-1BBL vs. 31414_4-1BBL	0.0010**
HuT86_IF_4-1BBL vs. I-394_4-1BBL	0.1378
no Ab vs. I-394_4-1BBL	0.0057**
HuP4_IB_4-1BBL vs. I-394_4-1BBL	>0.9999
isotype_4-1BBL vs. I-394_4-1BBL	0.0090**
31414_4-1BBL vs. I-394_4-1BBL	0.0905
no Ab vs. HuP4_IB_4-1BBL	0.0048**
no Ab vs. isotype_4-1BBL	0.9997
no Ab vs. 31414_4-1BBL	0.5836
HuP4_IB_4-1BBL vs. isotype_4-1BBL	0.0075**
HuP4_IB_4-1BBL vs. 31414_4-1BBL	0.0756
isotype_4-1BBL vs. 31414_4-1BBL	0.7387

***: $p<0.01$, ***: $p<0.001$*

[図21]

Fig. 21

SEQ ID NO:	Clone ID	Region	Amino acid sequence
1	P4, P4_sc, P4_4-1BBL, HuP4_IB, or HuP4_IB_4-1BBL	HCDR 1	NYGVH
2	P4, P4_sc, P4_4-1BBL, HuP4_IB, or HuP4_IB_4-1BBL	HCDR 2	VILRRGSTDYNAAFMS
3	P4, P4_sc, P4_4-1BBL, HuP4_IB, or HuP4_IB_4-1BBL	HCDR 3	TAVVAGDYFDY
4	P4, P4_sc, P4_4-1BBL, HuP4_IB, or HuP4_IB_4-1BBL	LCDR 1	KASQNVGTNVA
5	P4, P4_sc, P4_4-1BBL, HuP4_IB, or HuP4_IB_4-1BBL	LCDR 2	SASYRYS
6	P4, P4_sc, P4_4-1BBL, HuP4_IB, or HuP4_IB_4-1BBL	LCDR 3	QQYNSYPLT
7	T86, T86_sc, T86_4-1BBL, HuT86_IF, or HuT86_IF_4-1BBL, OKT3-HuT86_IF_Fsc	HCDR 1	NYGMN
8	T86, T86_sc, T86_4-1BBL, HuT86_IF, or HuT86_IF_4-1BBL, OKT3-HuT86_IF_Fsc	HCDR 2	WINTYTGEPTYADDFKG
9	T86, T86_sc, T86_4-1BBL, HuT86_IF, or HuT86_IF_4-1BBL, OKT3-HuT86_IF_Fsc	HCDR 3	KGYYGYPNYYAMDY
10	T86, T86_sc, T86_4-1BBL, HuT86_IF, or HuT86_IF_4-1BBL, OKT3-HuT86_IF_Fsc	LCDR 1	KASQNVGTAVA
11	T86, T86_sc, T86_4-1BBL, HuT86_IF, or HuT86_IF_4-1BBL, OKT3-HuT86_IF_Fsc	LCDR 2	SASNRYT
12	T86, T86_sc, T86_4-1BBL, HuT86_IF, or HuT86_IF_4-1BBL, OKT3-HuT86_IF_Fsc	LCDR 3	QQYSSYPIT
13	I67, I67_sc, or I67_4-1BBL	HCDR 1	SYGVH
14	I67, I67_sc, or I67_4-1BBL	HCDR 2	VIWRRGSTDYNAAFMS
15	I67, I67_sc, or I67_4-1BBL	HCDR 3	GISTATSWFAY
16	I67, I67_sc, or I67_4-1BBL	LCDR 1	KASQNVGTNVA
17	I67, I67_sc, or I67_4-1BBL	LCDR 2	SASYRYS
18	I67, I67_sc, or I67_4-1BBL	LCDR 3	QQYNSYPLT
19	Tre291, Tre291_sc, or Tre291_4-1BBL	HCDR 1	SYGVH
20	Tre291, Tre291_sc, or Tre291_4-1BBL	HCDR 2	VIWRRGSTDYNAAFMS
21	Tre291, Tre291_sc, or Tre291_4-1BBL	HCDR 3	VRGDAMDY
22	Tre291, Tre291_sc, or Tre291_4-1BBL	LCDR 1	KASQNVGTNVA
23	Tre291, Tre291_sc, or Tre291_4-1BBL	LCDR 2	SASYRYS
24	Tre291, Tre291_sc, or Tre291_4-1BBL	LCDR 3	QQYNSYPLT

[図22]

Fig. 22

SEQ ID NO:	Clone ID	Region	Amino acid sequence
25	P4, P4_sc, or P4_4-1BBL	VH	QVQLKESGPSLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHW VRQSPGKGLEWLGVILRRGSTDYNAAFMSRLSITKD NSKSQVFFKMNSLQADDTAIYYCAKTAVVAGDYFDY WGQGTTLTVSS
26	P4, P4_sc, or P4_4-1BBL	VL	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWY QQKPGQSPKALIYSASYRYSGVPDRFTGSGSGTDFT LTISNVQSEDLAEYFCQQYNSYPLTFGTGTKLEIK
27	T86, T86_sc, or T86_4-1BBL, OKT3-HuT86_IF_Fsc	VH	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCEASGYTFINYGMNW VKQAPGKGLKWMGWINTYTGEPTYADDFKGRFAFSL ETSANTAYLQINNLKNEDTATYFCARKGYYGYPNYY AMDYWGQGTSVTVSS
28	T86, T86_sc, or T86_4-1BBL, OKT3-HuT86_IF_Fsc	VL	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSITCKASQNVGTAVAWY QQKPGQSPKLLIYSASNRYTGVPDRFTGSGSGTDFT LTISNMQSEDLADYFCQQYSSYPITFGTGTKLEIK
29	I67, I67_sc, or I67_4-1BBL	VH	DVQLQESGPSLVQPSQSLSINCTVSGFSLSSYGVHW VRQSPGKGLEWLGVIWRRGSTDYNAAFMSRLSITKD NSKSQVFFKMNRLQADDTATYYCAKGISTATSWFAY WGQGTLVTVSA
30	I67, I67_sc, or I67_4-1BBL	VL	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWY QQKPGQSPKALIYSASYRYSGVPDRFTGSGSGTDFT LTISNVQSEDLAEYFCQQYNSYPLTFGAGTKLELK
31	Tre291, Tre291_sc, or Tre291_4-1BBL	VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTSYGVHW VRQSPGKGLEWLGVIWRRGSTDYNAAFMSRLSITKD TSKSQVFFKMNSLQTDDTAIYYCAGVRGDAMDYWGQ GTSVTVSS
32	Tre291, Tre291_sc, or Tre291_4-1BBL	VL	DIVMTQSHKSMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWY QQKPGQSPKALIYSASYRYSGVPDRFTGSGSGTDFT LTISNVQSEDLAEYFCQQYNSYPLTFGGGTKLEIK
33	HuP4_IB, or HuP4_IB_4-1BBL	VH	QVQLLESGPELVKPSATLSITCTVSGFSLTNYGVHW IRQAPGKGLEWLGVILRRGSTDYNAAFMSRFTISKD NSKNQVYFKLRSVTAEDTAVYYCAKTAVVAGDYFDY WGQGTMVTVSS
34	HuP4_IB, or HuP4_IB_4-1BBL	VL	DIQMTQSHSTLSLSVGDRVTITCKASQNVGTNVAWY QQKPGQPPKALIYSASYRYSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSVQAEDVAVYYCQQYNSYPLTFGPGTKLEIK
35	HuT86_IF, or HuT86_IF_4-1BBL	VH	QIQLVQSGGELKKPGESVKLSCAASGYTFINYGMNW VRQAPGKGLEWMGWINTYTGEPTYADDFKGRFTFSL DTSKNTAYLQINSLKAEDTAVYYCARKGYYGYPNYY AMDYWGQGTLVTVSS
36	HuT86_IF, or HuT86_IF_4-1BBL	VL	DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVGTAVAWY QQKPGQAPKLLIYSASNRYTGVPDRFSGSGSGTDFT LTISSMQSEDFAVYYCQQYSSYPITFGQGTKLEIK

[図23]

Fig. 23

SEQ ID NO:	Region	Amino acid sequence
37	Fc (IgG1-lala)	EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK
38	Fc (IgG1-lala)× Hole	EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCT LPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK

[図24]

Fig. 24

SEQ ID NO:	Region	Amino acid sequence
39	71-254aa	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSY KEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALT VDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLF RVTPEIPAGLPSPRSE
40	Full length	MEYASDASLDPEAPWPPAPRARACRVLPWALVAGLLLLLLLAAACAVFLACPWAVS GARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSD PGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQ PLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARH AWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSE
41	Cκ	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
42	Polypeptide	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSY KEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALT VDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLF RVTPEIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
43	CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
44	Polypeptide	REGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSY KEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALT VDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLF RVTPEIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGSREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNV LLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGE GSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRL GVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPSPRSEGGGGSGGGGSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
45	Fc (IgG1-lala)×Knob	EPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK

[図25]

Fig. 25

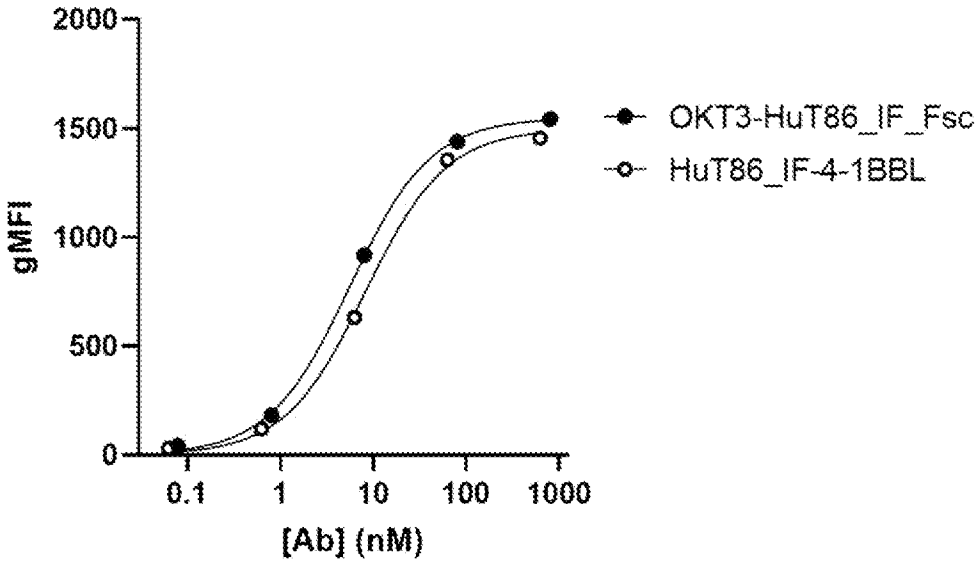
SEQ ID NO:	Region	Amino acid sequence
46	HCDR 1	RYTMH
47	HCDR 2	YINPSRGYTNYNQKFKD
48	HCDR 3	YYDDHYCLDY
49	LCDR 1	SASSSVSYMN
50	LCDR 2	DTSKLAS
51	LCDR 3	QQWSSNPFT
52	VH	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPS RGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDY WGQGTTLTVSS
53	VL	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLA SGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEIN
68	Heavy Chain	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPS RGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDY WGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
69	Light Chain	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLA SGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[図26]

Fig. 26

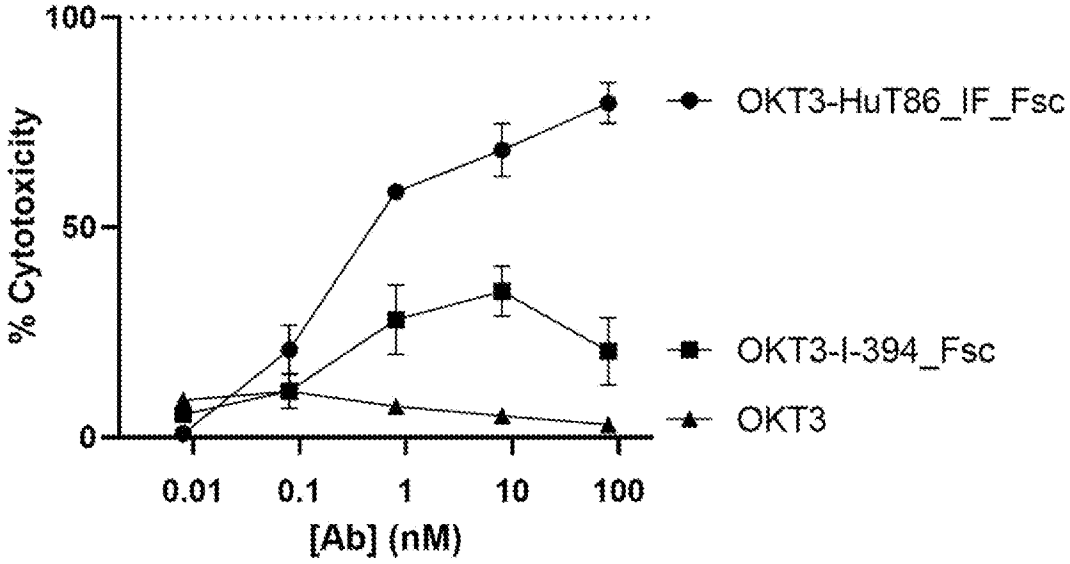
clone ID	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
OKT3-HuT86_IF_Fsc	1.82E+05	5.14E-04	2.83E-09

[図27]
Fig. 27



clone ID	$gMFI_{1000}$	Kd (nM)
OKT3-HuT86_IF_Fsc	1549	5.6
HuT86_IF_4-1BBL	1498	8.2

[図28]
Fig. 28

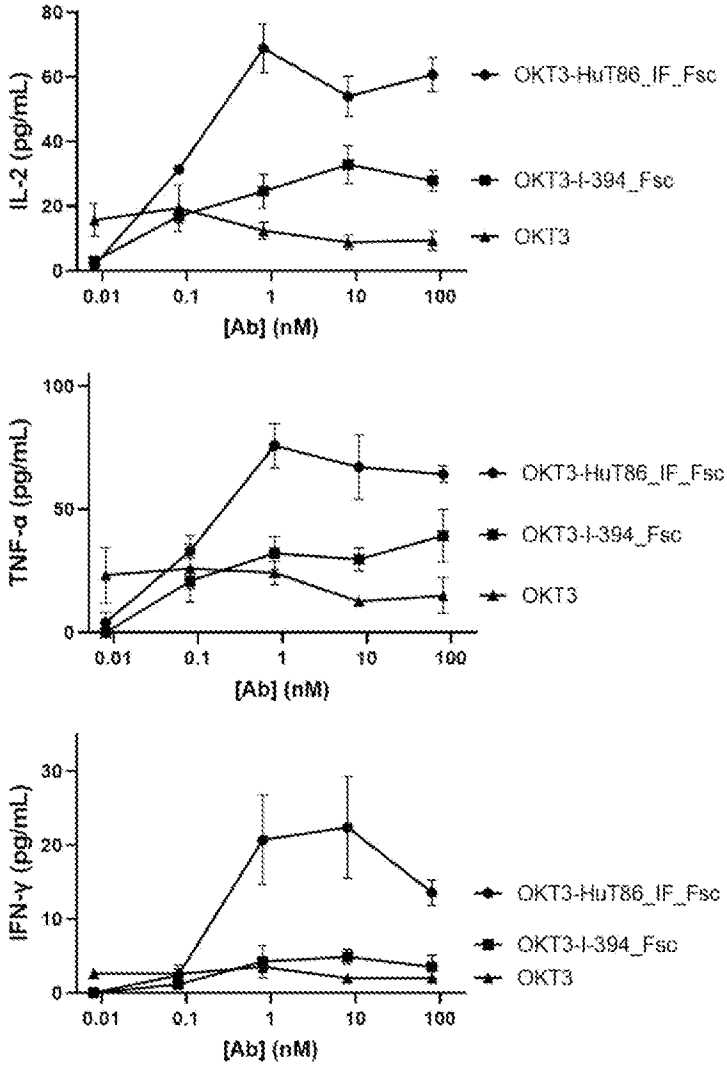


80nMのデータ間の有意差検定結果

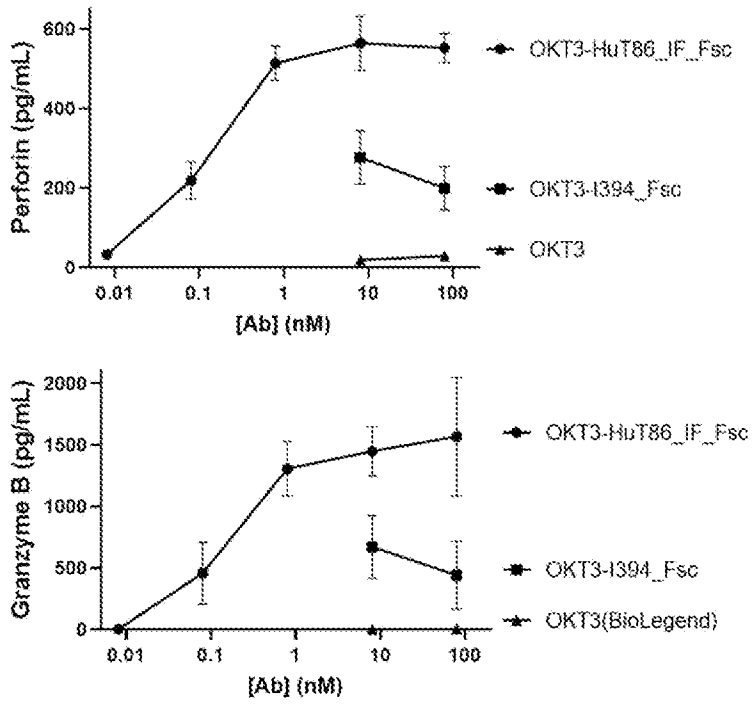
Tukey's multiple comparisons test	Adjusted P Value
OKT3-HuT86_IF_Fsc vs. OKT3-I-394_Fsc	<0.0001***
OKT3-HuT86_IF_Fsc vs. OKT3	<0.0001***
OKT3-I-394_Fsc vs. OKT3	0.1114

***: *p<0.001*

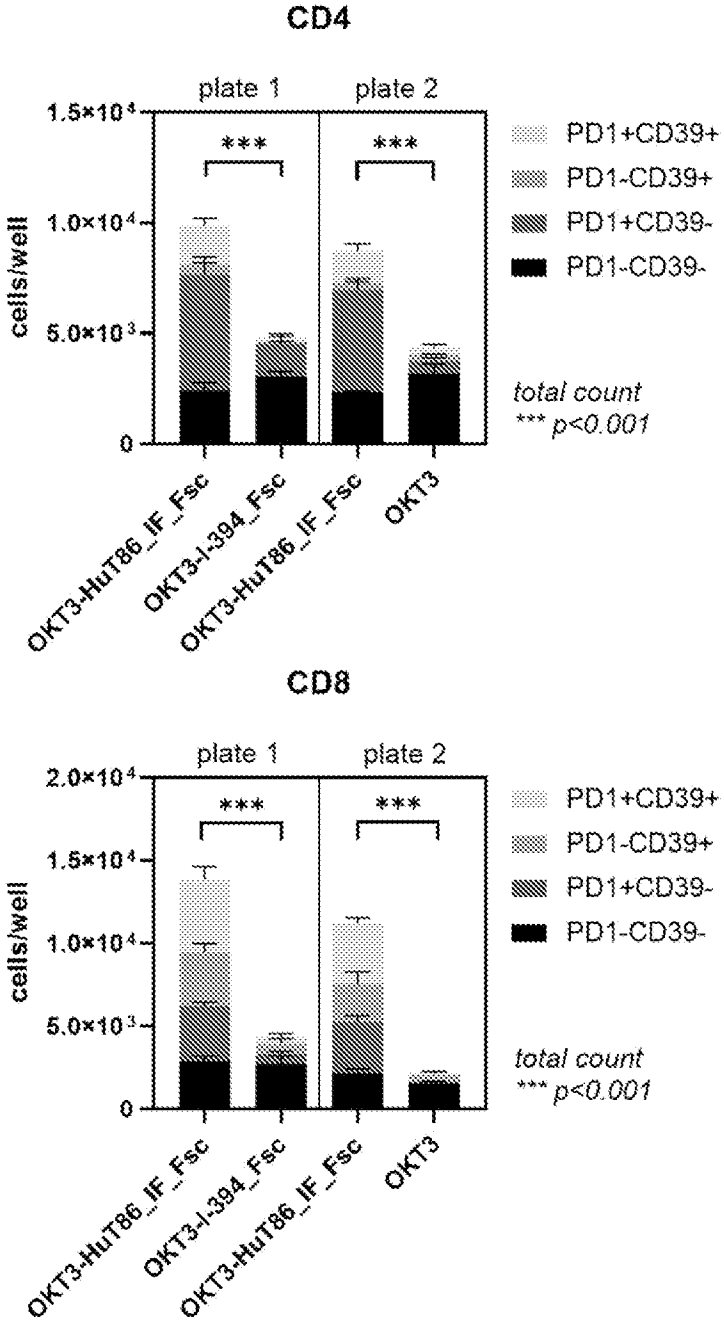
[図29]
Fig. 29



[図30]
Fig. 30



[図31]
Fig. 31


CD4
plate 1
plate 2
1.5×10⁴
1.0×10⁴
5.0×10³
0
cells/well
***
***
PD1+CD39+
PD1-CD39+
PD1+CD39-
PD1-CD39-
total count
*** p<0.001
OKT3-HuT86_IF_Fsc
OKT3-I-394_Fsc
OKT3-HuT86_IF_Fsc
OKT3
CD8
plate 1
plate 2
2.0×10⁴
1.5×10⁴
1.0×10⁴
5.0×10³
0
cells/well
***
***
PD1+CD39+
PD1-CD39+
PD1+CD39-
PD1-CD39-
total count
*** p<0.001
OKT3-HuT86_IF_Fsc
OKT3-I-394_Fsc
OKT3-HuT86_IF_Fsc
OKT3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/034478

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/62(2006.01)i; ***A61K 39/395***(2006.01)i; ***A61P 35/00***(2006.01)i; ***C07K 16/24***(2006.01)i; ***C07K 16/30***(2006.01)i; ***C07K 16/46***(2006.01)i; ***C12N 1/15***(2006.01)i; ***C12N 1/19***(2006.01)i; ***C12N 1/21***(2006.01)i; ***C12N 5/10***(2006.01)i; ***C12N 15/13***(2006.01)i; ***C12N 15/63***(2006.01)i; ***C12N 15/85***(2006.01)i; ***C12P 21/08***(2006.01)i

FI: C12N15/62 Z ZNA; C12N15/85 Z; C12N5/10; C07K16/24; C07K16/30; C12P21/08; A61K39/395 T; A61P35/00; C12N15/63 Z; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N15/13; C07K16/46 ZNA

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)

C12N15/62; A61K39/395; A61P35/00; C07K16/24; C07K16/30; C07K16/46; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/13; C12N15/63; C12N15/85; C12P21/08

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024
Registered utility model specifications of Japan 1996-2024
Published registered utility model applications of Japan 1994-2024

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MATSUMOTO, N. et al., Bispecific antibodies against TIM-3 and CD39 induce anti-tumor efficacy and immune response by blocking multiple suppressive mechanisms, ブライトパス・バイオ株式会社 プレスリリース 2022年度米国癌免疫療法学会（SITC, Society for Immunotherapy of Cancer）の発表資料, 10 November 2022, #1364, <https://www.brightpathbio.com/ file/20221111_sitc2022_bp1212.pdf>, non-official translation (BRIGHTPATH BIOTHERAPEUTICS CO., LTD. Press Release: Presentation materials of the 2022 Society for Immunotherapy of Cancer) "BP1212 Enhances the expansion of IFNγ-producing T cells", "Conclusion"	1-18, 21-30
Y		1-30

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"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
22 November 2024	**10 December 2024**

Name and mailing address of the ISA/JP	Authorized officer
Japan Patent Office (ISA/JP) **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MATSUMOTO, N. et al. BISPECIFIC ANTIBODIES THAT BLOCK TIM-3 AND CD39 INDUCE ANTI-TUMOR EFFICACY AND IMMUNE RESPONSE BY BLOCKING MULTIPLE SUPPRESSIVE MECHANISMS. Journal for ImmunoTherapy of Cancer. November 2022, vol. 10, supple. 2, p. A1415, abstract number 1364, <DOI 10.1136/jitc-2022-SITC2022.1364> "Background", "Results"	1-18, 21-30
Y		1-30
Y	JP 2021-527138 A (BETH ISRAEL DEACONESS MEDICAL CENTER, INC.) 11 October 2021 (2021-10-11) claims 14, 19, 20, 22, paragraphs [0055], [0057], [0058], examples, particularly, paragraphs [0415]-[0420]	1-30
Y	JP 2022-537019 A (REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.) 23 August 2022 (2022-08-23) claim 1, paragraphs [0001], [0004], example 2, particularly, paragraphs [0245], [0246]	20-30
A		1-19
P, X	WO 2023/195532 A1 (BRIGHTPATH BIOTHERAPEUTICS CO., LTD.) 12 October 2023 (2023-10-12) claims, examples	1-30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/034478

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed.
   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2024/034478

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2021-527138 A	11 October 2021	US 2021/0253731 A1 claims 14, 19, 20, 22, paragraphs [0063], [0115], [0116], examples, particularly, paragraphs [0512]-[0524], fig. 2 WO 2019/241707 A1	
JP 2022-537019 A	23 August 2022	US 2020/0399372 A1 claim 1, paragraphs [0002], [0005], example 2, particularly, paragraphs [0275], [0276] WO 2020/257681 A1	
WO 2023/195532 A1	12 October 2023	(Family: none)	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2024/034478

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12N 15/62(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; C07K 16/24(2006.01)i; C07K 16/30(2006.01)i; C07K 16/46(2006.01)i; C12N 1/15(2006.01)i; C12N 1/19(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12N 15/85(2006.01)i; C12P 21/08(2006.01)i

FI: C12N15/62 Z ZNA; C12N15/85 Z; C12N5/10; C07K16/24; C07K16/30; C12P21/08; A61K39/395 T; A61P35/00; C12N15/63 Z; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N15/13; C07K16/46 ZNA

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12N15/62; A61K39/395; A61P35/00; C07K16/24; C07K16/30; C07K16/46; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/13; C12N15/63; C12N15/85; C12P21/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２４年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２４年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２４年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	MATSUMOTO N. et al., Bispecific antibodies against TIM-3 and CD39 induce anti-tumor efficacy and immune response by blocking multiple suppressive mechanisms, ブライトパス・バイオ株式会社 プレスリリース 2022年度米国癌免疫療法学会（SITC, Society for Immunotherapy of Cancer）の発表資料, 2022.11.10, #1364, <https://www.brightpathbio.com/ file/20221111_sitc2022_bp1212.pdf> 「BP1212 Enhances the expansion of IFNγ-producing T cells」、「Conclusion」	1-18,21-30
Y		1-30

☑ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
22.11.2024	10.12.2024

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
松村　真里 4B 5375
電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	MATSUMOTO N. et al., BISPECIFIC ANTIBODIES THAT BLOCK TIM-3 AND CD39 INDUCE ANTI-TUMOR EFFICACY AND IMMUNE RESPONSE BY BLOCKING MULTIPLE SUPPRESSIVE MECHANISMS, Journal for ImmunoTherapy of Cancer, 2022.11, Vol.10, Supple.2, p.A1415, Abstract number 1364, <DOI 10.1136/jitc-2022-SITC2022.1364>「Background」、「Results」	1-18,21-30
Y		1-30
Y	JP 2021-527138 A (ベス イスラエル デアコネス メディカル センター インコーポレイティッド) 11.10.2021 (2021-10-11) 請求項14,19,20,22,[0055],[0057],[0058],実施例,特に[0415]-[0420]	1-30
Y	JP 2022-537019 A (リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド) 23.08.2022 (2022-08-23) 請求項1,[0001],[0004],実施例2,特に[0245],[0246]	20-30
A		1-19
P, X	WO 2023/195532 A1 (ブライトパス・バイオ株式会社) 12.10.2023 (2023-10-12) 請求の範囲、実施例	1-30

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2024/034478

第Ⅰ欄　　ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第１ページの１．ｃの続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

a. ☑ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
b. ☐ 国際出願日後に、国際調査のために提出された配列表（ＰＣＴ規則13の3.1(a)）
☐ 配列表が出願時の国際出願の開示の範囲を超えるものではない旨の陳述書が添付されていた。

2. ☐ この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、この国際調査報告は、WIPO標準ST.26に準拠する配列表なしで有意義な国際調査をすることができる限度において作成された。

3. 補足意見:

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2024/034478

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2021-527138 A	11.10.2021	US 2021/0253731 A1 請求項14,19,20,22,[0063],[0115],[0116],実施例,特に[0512]-[0524],Fig.2 WO 2019/241707 A1	
JP 2022-537019 A	23.08.2022	US 2020/0399372 A1 請求項1,[0002],[0005],実施例2,特に[0275],[0276] WO 2020/257681 A1	
WO 2023/195532 A1	12.10.2023	（ファミリーなし）	