

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-528082
(P2019-528082A)

(43) 公表日 令和1年10月10日(2019.10.10)

(51) Int.Cl.	F 1		テーマコード (参考)
C 12 N 15/13 (2006.01)	C 12 N 15/13	Z N A	4 B 0 6 4
C 12 N 15/62 (2006.01)	C 12 N 15/62	Z	4 C 0 7 6
C 07 K 16/00 (2006.01)	C 07 K 16/00		4 C 0 8 5
C 07 K 16/46 (2006.01)	C 07 K 16/46		4 H 0 4 5
C 07 K 19/00 (2006.01)	C 07 K 19/00		

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 60 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2019-517135 (P2019-517135)	(71) 出願人	518436135 シャンハイ ジャオ トン ユニバーシティ スクール オブ メディシン 中華人民共和国 200025 シャンハイ ファンパー ディストリクト サウス チョンチン ロード 280
(86) (22) 出願日	平成29年6月8日(2017.6.8)	(74) 代理人	110000578 名古屋国際特許業務法人
(85) 翻訳文提出日	平成31年1月22日(2019.1.22)	(72) 発明者	リ フービン 中華人民共和国 200025 シャンハイ ファンパー ディストリクト サウス チョンチン ロード 280
(86) 國際出願番号	PCT/CN2017/087620		
(87) 國際公開番号	W02017/211321		
(87) 國際公開日	平成29年12月14日(2017.12.14)		
(31) 優先権主張番号	201610404956.7		
(32) 優先日	平成28年6月8日(2016.6.8)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】アゴニスト抗体の活性を増強する抗体重鎖定常領域配列

(57) 【要約】

本発明は、CH1ドメインと、ヒンジ領域と、CH2ドメインと、CH3ドメインとを含む重鎖定常領域も提供し、上記のCH1ドメインとヒンジ領域の配列は、ヒトIgG2由来のCH1ドメインとヒンジ領域の配列であり、上記のCH2ドメインとCH3ドメインの配列は、ヒトIgG由来のCH2ドメインとCH3ドメイン配列であり、かつ上記の抗体重鎖定常領域のヒトFcRIIIとの親和性は、ヒトIgG1のヒトFcRIIIとの親和性より大きい等しい、上記の抗体重鎖定常領域のI/A比率は、ヒトIgG1のI/A比率より大きい等しい。かつ上記の重鎖定常領域に基づく抗体或融合タンパク質を提供し、当該抗体重鎖定常領域は、著しく上記の抗体又は融合タンパク質のアゴニスト活性を増強でき、腫瘍と自己免疫などの他の疾患における抗体又は融合タンパク質の治療効果を向上できる。

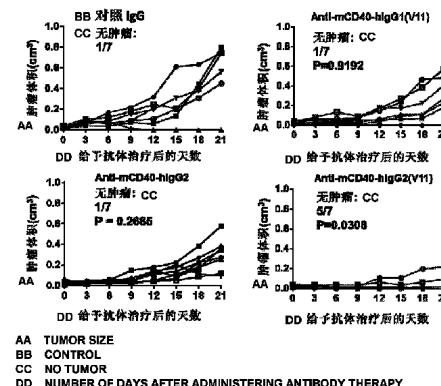


图 13

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

N端末からC端末まで順に配列させて連結されたCH1ドメインとヒンジ領域とCH2ドメインとCH3ドメインとを含む重鎖定常領域であって、上記のCH1ドメインとヒンジ領域との配列は、ヒトIgG2由来のCH1ドメインとヒンジ領域との配列であり、上記のCH2ドメインとCH3ドメインとの配列は、

a) ヒトIgG1由来のCH2ドメインとCH3ドメインとの配列、ただし、上記のCH2ドメインとCH3ドメインとが、G237DとP238DとP271GとA330Rとの変異を含む；或いは

b) ヒトIgG1由来のCH2ドメインとCH3ドメインとの配列、ただし、上記のCH2ドメインとCH3ドメインとが、G237DとP238DとH268DとP271GとA330Rとの変異を含む；或いは

c) ヒトIgG2由来のCH2ドメインとCH3ドメインとの配列、ただし、上記のCH2ドメインとCH3ドメインとが、S267EとL328Fとの変異を含む；或いは

d) ヒトIgG2由来のCH2ドメインとCH3ドメインとの配列、ただし、上記のCH2ドメインとCH3ドメインとが、H268DとP271Gとの変異を含む；

重鎖定常領域。

【請求項 2】

上記の抗体重鎖定常領域は、SEQ ID NO:11或いはSEQ ID NO:12或いはSEQ ID NO:13或いはSEQ ID NO:14に示される配列を有することを特徴とする請求項1に記載された重鎖定常領域。

【請求項 3】

N端末からC端末まで順に配列させて連結されたCH1ドメインとヒンジ領域とCH2ドメインとCH3ドメインとを含む重鎖定常領域であり、上記のCH1ドメインとヒンジ領域との配列は、ヒトIgG2由来のCH1ドメインとヒンジ領域との配列であり、上記のCH2ドメインとCH3ドメインとの配列は、ヒトIgG由来のCH2ドメインとCH3ドメインとの配列であり、かつ上記の抗体重鎖定常領域のヒトFc IIIBとの親和性は、ヒトIgG1のヒトFc IIIBとの親和性より大きいか等しく、上記の抗体重鎖定常領域のI/A比率は、ヒトIgG1のI/A比率より大きいか等しい、重鎖定常領域。

10

20

30

【請求項 4】

請求項1～3のいずれか一つに記載された重鎖定常領域及び上記の重鎖定常領域のN端及び/又はC端に位置する抗原結合モジュールを含む、融合タンパク質。

【請求項 5】

上記の抗原結合モジュールは、抗体の抗原結合断片、アドネクチン、ナノボディ、ミニ抗体、アフィボディー、アフィリン、受容体の標的結合領域、細胞接着分子、リガンド、酵素、サイトカイン或いはケモカインから選ばれる、請求項4に記載された融合タンパク質。

【請求項 6】

上記の抗原結合モジュールは、ナノボディである、請求項4に記載された融合タンパク質。

40

【請求項 7】

上記の抗原結合モジュールは、リガンドであり、上記のリガンドは、免疫共刺激分子であり、上記の免疫共刺激分子は、CD80、CD86、ICOSL、OX40L、CD137L、CD40L、CD30L、CD27L、CD244、CD150、CD48、CD84、CD319、Ly118CD229或いはSLAMF8から選ばれる、請求項4に記載された融合タンパク質。

【請求項 8】

上記の抗原結合モジュールが標的にする抗原は、CD40、DR5、OX40、CD137、CD27、CD30、GITR、HVEM、TACI、DR4又はFASから選ば

50

れる、請求項 4 に記載された融合タンパク質。

【請求項 9】

上記の抗原結合モジュールが標的にする抗原は、CD40である、請求項 4 に記載された融合タンパク質。

【請求項 10】

上記の抗原結合モジュールが標的にする抗原は、PD-1、CTLA-4、VISTA、TIM-3、BTLA或いはLAG-3から選ばれる、請求項 4 に記載された融合タンパク質。

【請求項 11】

上記の抗原結合モジュールは、リガンドであり、上記のリガンドは、免疫抑制性リガンド分子であり、上記の免疫抑制性リガンド分子は、PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、CD47、VISTA、HVEM又はGAL9から選ばれる、請求項 4 に記載された融合タンパク質。 10

【請求項 12】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一つに記載された重鎖定常領域を含む抗体。

【請求項 13】

上記の抗体は、アゴニスト抗体である、請求項 12 に記載された抗体。

【請求項 14】

上記の抗体は、IgGである、請求項 12 に記載された抗体。

【請求項 15】

上記の抗体は、ヒト抗体或いはヒト化抗体或いはキメラ抗体である、請求項 12 に記載された抗体。 20

【請求項 16】

上記の抗体が標的にする抗原は、CD40、DR5、OX40、CD137、CD27、CD30、GITR、HVEM、TACI、DR4又はFASから選ばれる、請求項 12 に記載された抗体。

【請求項 17】

上記の抗体が標的にする抗原はCD40である、請求項 12 に記載された抗体。

【請求項 18】

上記の抗体の軽鎖は、SEQ ID NO : 47 に示された配列を有し、上記の抗体的重鎖は、SEQ ID NO : 27 或いはSEQ ID NO : 43 に示された配列を有する、請求項 15 に記載された抗体。 30

【請求項 19】

上記の抗体が標的にする抗原はDR5である、請求項 12 に記載された抗体。

【請求項 20】

上記の抗体が標的にする抗原は、免疫抑制性受容体分子であり、かつ上記の免疫抑制性受容体分子は、PD-1、CTLA-4、VISTA、TIM-3、BTLA又はLAG-3から選ばれる、請求項 12 に記載された抗体。

【請求項 21】

抗がん薬物の調製における、請求項 4 ~ 9 のいずれか一つに記載された融合タンパク質又は請求項 12 ~ 19 のいずれか一つに記載された抗体の使用。 40

【請求項 22】

a) 治療有効量の請求項 4 ~ 9 のいずれか一つに記載された融合タンパク質又は請求項 12 ~ 19 のいずれか一つに記載された抗体；及び b) 薬学的に許容される薬物担体；を含む増殖性疾患を治療する薬物組成物。

【請求項 23】

請求項 9 に記載された融合タンパク質又は請求項 17 ~ 18 のいずれか一つに記載された抗体のワクチンアジュバントとしての使用。

【請求項 24】

a) 治療有効量の請求項 9 に記載された融合タンパク質又は請求項 17 ~ 18 のいずれ

50

か一つに記載された抗体；及び b) ワクチン；を含むワクチン組成物。

【請求項 25】

腫瘍の予防及び／又は治療における請求項 24 に記載されたワクチン組成物の使用。

【請求項 26】

炎症及び／又は自己免疫症状を軽減する薬物の調製における、請求項 10 或いは 11 に記載された融合タンパク質又は請求項 20 に記載された抗体の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、バイオ医薬品分野、特にアゴニスト抗体又はアゴニスト分子（重鎖定常領域配列を含む融合タンパク質）の活性を増強できる重鎖定常領域配列と分子、及び当該重鎖定常領域に基づき構築された抗体又は融合タンパク質に関わる。

10

【背景技術】

【0002】

抗体と重鎖定常領域（Fc断片を含む）に基づく分子標的療法は、抗体と重鎖定常領域融合タンパク質を含み、過去 30 年間にバイオ医薬品分野に大きな成功を収めながら、引き続き当該分野の焦点になり、複数の疾患の治療のための新しい方法と可能性を提供する。既に承認された重鎖定常領域に基づく生物治療手段（包括重鎖定常領域融合タンパク質的分子）は、約 30 個があり、ただし、臨床試験段階におけるのは 300 個超、作用方式より、これらの生物治療は、主に三類に分けられる：標的（分子と細胞）を取り除くエフェクター分子と、標的が関与するシグナル経路を遮断する阻断型分子と、標的の下流シグナル経路を活性化するアゴニスト分子。

20

【0003】

近年に、腫瘍の免疫療法が、重大な進展を遂げた。これは、免疫を抑制するノードを遮断することで、免疫細胞の活性を向上する、腫瘍を殺滅する抗体を使用することのかけである。しかしながら、ただいま相変わらず、多くののがん患者は、既存の治療手段に反応しない。そして、一方では、既存の腫瘍免疫療法の手段を最適化する必要があり、他方では、新しい腫瘍免疫療法の薬物を研究開発することは、急務である。特に、「アゴニスト抗体」と呼ばれる腫瘍免疫療法手段は、免疫細胞の表面との結合によって、免疫活性化シグナルの標的分子を転送し、かつそれに制御される重要な免疫活性化シグナル経路を活性化して、さらに抗腫瘍免疫応答を増強して、間接に腫瘍細胞を殺滅できる。しかしながら、アゴニスト腫瘍免疫療法の抗体の大きな可能性は、既に動物モデルに証明され、かつ広くに納得されだけではなく、将来性があるとみられる腫瘍免疫療法構想になるが、これらの抗体の研究開発がまだ成功していない、腫瘍免疫療法の分野における大きな課題です。また、アゴニスト抗体の活性化も、他の生物学過程における肝心なシグナル経路を介入・調整する有利な手段であり、疾患の予防と制御及び治療分野に広い応用見通しがある。たとえば、免疫抑制シグナル経路を活性化すると、炎症と自己免疫症状の軽減に役立つ可能性がある。

30

【発明の概要】

【0004】

発明の内容

本発明が主に解決しようとする技術問題は、バイオ医薬品分野、特にアゴニスト抗体又はアゴニスト分子（重鎖定常領域配列を含む融合タンパク質）の活性を増強できる重鎖定常領域配列と分子、及び当該重鎖定常領域に基づき構築された抗体又は融合タンパク質を提供することである。

40

【0005】

上記の技術問題を解決するために、本発明に採用された技術案の一つは：

C H 1 ドメインと、ヒンジ領域と、C H 2 ドメインと、C H 3 ドメインとを含む重鎖定常領域を提供し、上記の C H 1 ドメインとヒンジ領域の配列は、ヒト Ig G 2 由来の C H 1 ドメインとヒンジ領域の配列であり、上記の C H 2 ドメインと C H 3 ドメインの配列は

50

a) ヒト Ig G 1 由来の CH 2 ドメインと CH 3 ドメインの配列、ただし、上記の CH 2 ドメインと CH 3 ドメインが、G 2 3 7 D と、P 2 3 8 D と、P 2 7 1 G と、A 3 3 0 R 变異を含む；或いは

b) ヒト Ig G 1 由来の CH 2 ドメインと CH 3 ドメインの配列、ただし、上記の CH 2 ドメインと CH 3 ドメインが、G 2 3 7 D と、P 2 3 8 D と、H 2 6 8 D と、P 2 7 1 G と、A 3 3 0 R 变異を含む；或いは

c) ヒト Ig G 2 由来の CH 2 ドメインと CH 3 ドメインの配列、ただし、上記の CH 2 ドメインと CH 3 ドメインが、S 2 6 7 E と、L 3 2 8 F 变異を含む；或いは

d) ヒト Ig G 2 由来の CH 2 ドメインと CH 3 ドメインの配列、ただし、上記の CH 2 ドメインと CH 3 ドメインが、H 2 6 8 D と、P 2 7 1 G 变異を含む
から選べる。

【0006】

より好ましいのは、上記の重鎖定常領域が、SEQ ID NO: 11 に示されるような配列を有し、或いは上記の重鎖定常領域が、SEQ ID NO: 12 に示されるような配列を有し、或いは上記の重鎖定常領域が、SEQ ID NO: 13 に示されるような配列を有し、或いは上記の重鎖定常領域が、SEQ ID NO: 14 に示されるような配列を有する。

【0007】

なお、CH 1 ドメインと、ヒンジ領域と、CH 2 ドメインと、CH 3 ドメインとを含む重鎖定常領域も提供し、上記の CH 1 ドメインとヒンジ領域の配列は、ヒト Ig G 2 由来の CH 1 ドメインとヒンジ領域の配列であり、上記の CH 2 ドメインと CH 3 ドメインの配列は、ヒト Ig G 由来の CH 2 ドメインと CH 3 ドメイン配列であり、かつ上記の抗体重鎖定常領域のヒトFc RIIBとの親和性は、ヒト Ig G 1 のヒトFc RIIBとの親和性より大きいか等しいであり、上記の抗体重鎖定常領域の I / A 比率は、ヒト Ig G 1 の I / A 比率より大きいか等しいである。

【0008】

好ましくに、上記の抗体重鎖定常領域のヒトFc RIIBとの親和性は、ヒト Ig G 1 のヒトFc RIIBとの親和性の 3.2 倍又は以上であり、上記の抗体重鎖定常領域の I / A 比率は、0.32 より大きいか等しいである；同様に好ましくに、上記の抗体重鎖定常領域のヒトFc RIIBとの親和性は、ヒト Ig G 1 のヒトFc RIIBとの親和性より大きいか等しいであり、上記の抗体重鎖定常領域の I / A 比率は、1 より大きいか等しいである；より好ましくに、上記の抗体重鎖定常領域のヒトFc RIIBとの親和性は、ヒト Ig G 1 のヒトFc RIIBとの親和性の 30 倍又は以上であり、上記の抗体重鎖定常領域の I / A 比率は、1 より大きいか等しいである；より好ましくに、上記の抗体重鎖定常領域のヒトFc RIIBとの親和性は、ヒト Ig G 1 のヒトFc RIIBとの親和性の 60 倍又は以上であり、上記の抗体重鎖定常領域の I / A 比率は、40 より大きいか等しいである；特に好ましくに、上記の抗体重鎖定常領域のヒトFc RIIBとの親和性は、ヒト Ig G 1 のヒトFc RIIBとの親和性の 90 倍又は以上であり、上記の抗体重鎖定常領域の I / A 比率は、100 より大きいか等しいである。

【0009】

本発明の実施例による重鎖定常領域は、高い阻害型 Fc 受容体の親和性を有し、著しくにアゴニスト抗体或いはアゴニスト分子（たとえばアゴニスト融合タンパク質）と阻害性 Fc 受容体との架橋を増強でき、そして上記のアゴニスト抗体或いはアゴニスト分子のアゴニスト活性を向上する；同時に、低い活性化型 Fc 受容体の親和性も有し、活性化型受容体により結合することによる ADC C 等の細胞毒性を低減できる。本発明の実施例による重鎖定常領域は、より優れる活性を有するアゴニスト抗体或いはアゴニスト分子の開発に用いられる。

【0010】

本発明のもう一つは、上記の的重鎖定常領域及び上記の重鎖定常領域の N 端又は C 端に

10

20

30

40

50

位置する抗原結合モジュールを含む融合タンパク質を提供する。

好ましくに、上記の抗原結合モジュールは、抗体の抗原結合断片、*adnectin*、ナノボディ(*nobody*)、ミニ抗体、アフィボディー(*affibodies*)、*affilin*、受容体の標的結合領域、細胞接着分子、リガンド、酵素、サイトカイン又はケモカインから選ばれるいずれか一つである；より好ましくに、上記の抗原結合モジュールは、ナノボディである。

【0011】

ナノボディは、アルパカの抗体由来の重鎖可変領域であり、当該可変領域は、本発明の重鎖定常領域と融合し、完整なキャメル抗体構造(二つの重鎖からなる)を有するキメラ抗体分子を構築でき、このキメラ抗体分子は、同時にナノボディの高親和性と、高特異性及び本発明の重鎖可変領域のアゴニスト活性の増強された特性を有し、非常に良い開発見通しを持っている。10

【0012】

もう一つ的好ましい本発明の抗体の実施例において、上記の抗原結合モジュールは、リガンドであり、上記のリガンドは、免疫共刺激分子であり、上記の免疫共刺激分子は、CD80、CD86、ICOSL、OX40L、CD137L、CD40L、CD30L、CD27L、CD244、CD150、CD48、CD84、CD319、Ly118あるいはCD229から選ばれるいずれか一つである。これらの融合タンパク質は、抗がん薬物として使えられる。

【0013】

もう一つ的好ましい本発明の融合タンパク質の実施例において、上記の抗原結合モジュールが標的にする抗原は、CD40、DR5、OX40、CD137、CD27、CD30、GITR、HVEM、TACI、DR4又はFASから選ばれるいずれか一つである。20

【0014】

本発明によるCD40に標的するアゴニスト分子(融合タンパク質)は、免疫助成剤として使えられる。当該免疫助成剤は、ワクチン(たとえばOVA)と共同使用できて、ワクチン組成物にして、腫瘍と感染の予防及び/又は治療に使えられる。

【0015】

もう一つ的好ましい本発明の融合タンパク質の実施例において、上記の抗原結合モジュールが標的にする抗原は、PD-1、CTLA-4、VISTA、TIM-3、BTLA又はLAG-3から選ばれるいずれか一つである。これらの標的に用いられ際に、上記の融合タンパク質は、炎症及び/又は自身免疫症状を軽減する薬物、たとえば喘息を治療する薬物の調製に使えられる。30

【0016】

もう一つ的好ましい本発明の抗体の実施例において、上記の抗原結合モジュールは、リガンドであり、上記のリガンドは、免疫抑制性リガンドであり、上記の免疫抑制性リガンドは、PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、CD47、VISTA、HVEM又はGAL9から選ばれるいずれか一つである。これらの標的に用いられ際に、上記の抗体は、炎症及び/又は自身免疫症状を軽減する薬物、たとえば喘息を治療する薬物の調製に使えられる。40

【0017】

本発明のもう一つは、本発明の上記の重鎖定常領域を含む抗体を提供する。

好ましくに、上記の抗体は、アゴニスト抗体である。

好ましくに、上記の抗体は、IgGである。

【0018】

好ましくに、上記の抗体は、ヒト抗体又はヒト化抗体又はキメラ抗体である。

もう一つ的好ましい本発明の抗体の実施例において、上記の抗体が標的にする抗原は、CD40、DR5、OX40、CD137、CD27、CD30、GITR、HVEM、TACI、DR4、FASから選ばれるいずれか一つである。50

【0019】

さらに、上記の抗体が標的にする抗原は C D 4 0 である。

より好ましくは、上記の抗体の重鎖は、S E Q I D N O : 2 7 に示されるような配列を有し、上記の抗体の軽鎖は、S E Q I D N O : 4 7 に示されるような配列を有する；或いは上記の抗体の重鎖は、S E Q I D N O : 4 3 に示されるような配列を有し、上記の抗体の軽鎖は、S E Q I D N O : 4 7 に示されるような配列を有する。

【0020】

本発明による C D 4 0 を標的にするアゴニスト抗体は、免疫助成剤として使えられる。当該免疫助成剤は、ワクチン（たとえば O V A ）と共同使用できて、ワクチン組成物にして、腫瘍と感染の予防及び／又は治療に使えられる。

10

【0021】

もう一つの好ましい本発明の抗体の実施例において、上記の抗体が標的にする抗原は、免疫抑制性受容体分子であり、かつ上記の免疫抑制性受容体分子は、P D - 1、C T L A - 4、V I S T A、T I M - 3、B T L A、L A G - 3 から選ばれるいずれか一つである。これらの標的に用いられ際に、上記の抗体は、炎症及び／又は自身免疫症状を軽減する薬物、たとえば喘息を治療する薬物の調製に使えられる。

【0022】

本発明は、さらに抗がん薬物の調製における、本発明の融合タンパク質或いは抗体の応用を提供する。

好ましくは、抗結腸がん薬物或いは抗線維肉腫薬物の調製に使用する。

20

【0023】

本発明は、さらに、本発明の融合タンパク質或いは抗体、及び薬学的に許容される薬物担体を含む薬物組成物を提供する。当該薬物組成物は、がんを治療する薬物の調製に使えられる。好ましくは、抗結腸がん薬物或いは抗線維肉腫薬物の調製に使用する。

【0024】

本発明は、さらに、人体に治療の有効投与量の本発明の融合タンパク質或いは抗体を適用することを含む人の内源性免疫応答を増強する方法を提供する。

本発明は、さらに、人体に治療の有効投与量の本発明の融合タンパク質或いは抗体を適用することを含む免疫治療方法を提供する。

【0025】

本発明の有益効果は：本発明に提供される重鎖定常領域配列が、アゴニスト抗体又はアゴニスト分子（重鎖定常領域配列を含む融合タンパク質）の活性を著しくに増強でき、報道された類似の分子と比べて、より優れる活性を増強する効果を有する；かつ本発明の重鎖定常領域配列を有するアゴニスト抗体又は融合タンパク質が、より優れる活性を有しながら、より広い有効投与量の範囲及びより良い安全性を有し、重要な市場価値を備える。

30

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1】図1は、抗体の基本な構造の模式図である。

【図2】図2は重鎖定常領域の配列アラインメント図であり、異なる人IgGサブタイプ（IgG1、IgG2、IgG3とIgG4）の重鎖定常領域の構造を示す。

40

【図3】図3は、抗原結合活性テストであり、本発明によるアゴニスト抗マウスC D 4 0 と抗ヒトC D 4 0 抗体の実施例には、それぞれにマウスとヒトC D 4 0 抗原を特異性に結合できることを示す。抗C D 4 0 抗体とC D 4 0 抗原の結合は、E L I S Aで分析され、勾配のように希釈された各種の抗体が、コーティングされたマウスC D 4 0 (A)又はヒトC D 4 0 (B)と結合した後に、抗ヒトIgGに検出されたE L I S Aシグナル(A650)を示す。

【図4】図4は、O V A 特異性C D 8 陽性T細胞増幅モデルにおける各IgGサブタイプの活性テストであり、アゴニスト抗マウスC D 4 0 抗体の生体内活性は、抑制型F c 受容体F c R I I Bに特異性に依存することを示す。まず、図に示されたマウスは、O V A 特異性C D 8 陽性T細胞(O T - I T 細胞)に養子送達を行われ、1日後、パターン

50

抗原OVA (DEC-OVAの形式で、OVAと抗DEC205抗体の融合タンパク質であり、OVA抗原を有効的に送達する手段である)とコントロール (Ctl IgG)あるいは図に示された抗体定常領域を有する抗CD40抗体で、マウスを免疫して、6日後、フロー技術で脾臓におけるOT-I T細胞の増幅状況を分析する。OT-I T細胞の増幅程度が、アゴニスト抗マウスCD40抗体が、OVAに免疫されたマウスにおける、OVAパターン抗原特異性CD8陽性T細胞の活性化・増幅する活性を促進することを反映する。実験に使用された抗マウスCD40抗体の投与量は、30 μg / マウスである。
 (A) アゴニスト抗CD40抗体の活性には、Fc受容体の参与と相互作用は必要；
 (B) Fc受容体と結合する能力を有しないヒトIgG2 (G2-Na)抗体は、免疫を活性化する活性がない；
 (C) 抑制型Fc受容体を発現しないマウス (R2-/-)において、アゴニスト抗CD40抗体は活性を有しないが、ヒト化抑制型Fc受容体のマウス (R2-/-hR2BTg)において、抑制型Fc受容体は、免疫を活性化する活性を単独に駆動できる。

【図5】図5は、マウス脾臓細胞の生体外刺激実験であり、人のアゴニスト抗CD40抗体の生体外活性は、抑制型Fc受容体に依存することを示す。B細胞を活性化する活性分析は、アゴニスト抗ヒトCD40抗体の生体内活性が、ヒト抑制型Fc受容体の生体内活性の駆動に依存することを示す。図に示された遺伝子型を有するマウス (hCD40^{Tg} / hFCGR^{Tg} : 同時にヒトCD40とFcRsを発現するもの ; hCD40^{Tg} / hR2B-/- : ヒトCD40と人のFc受容体 (FcRIIBを除く)を発現するもの)から脾臓細胞を分離して、図に示されたコントロール或抗ヒトCD40抗体を有する培地に、48時間にかけて培養して、その後、フロー技術でB細胞活性化標識分子CD80、CD86の発現水平を分析して、CD80とCD86発現レベルの上昇の程度は、抗CD40抗体の活性を反映する。2B6は、ヒト抑制性Fc受容体FcRIIB特異性な遮断抗体である。

【図6】図6は、本発明の実施例による重鎖定常領域実施例のELISA分析試験であり、異なる重鎖定常領域 (JAC3とJAC4を含む)とヒトFc受容体 (FcRI、FcRIIA-R131及びFcRIIB)の結合特性が異なることを示す。テスト方法はELISAであり、図に示された組換え抗ヒトCD40抗体でコーティングして、ビオチンにマークされた図に示されたようなヒトFc受容体分子と、コーティングされた抗体と、の結合を検出する。

【図7】図7は、OVA特異性CD8陽性T細胞増幅モデルにおける活性テストであり、JAC1配列を有する抗CD40抗体は、ヒトIgG2抗CD40抗体の活性より優れることを示す。分析方法は、図4に示されたが、使用されたマウスは、それぞれにhFCGR^{Tg}マウス (A) と hCD40^{Tg} / hFCGR^{Tg}マウス (B) であり、抗CD40抗体の投与量は、10 μg / マウスである。示されたOT-I T細胞の数量が、抗CD40抗体に誘導されたOT-I T細胞の活性化と増幅の活性を反映する。

【図8】図8は、JAC3 (anti-hCD40-hIgG2-SELF)とJAC4 (anti-hCD40-hIgG2-HDPG)を含む抗ヒトCD40抗体が、hIgG2より強いアゴニスト活性を有することを示す。図に示された抗ヒトCD40抗体が、B細胞を活性化する活性は、それぞれに、hCD40^{Tg} hFCGR^{Tg}脾臓細胞 (A) とPMBc細胞 (B)において、検出された。B細胞を活性化する活性分析は、ヒトhIgG2と比べて、anti-hCD40-hIgG2-SELF、anti-hCD40-hIgG2-HDPGがアゴニスト抗CD40抗体活性をもっとサポートできることを示す。図に示された抗ヒトCD40抗体が、B細胞を活性化する活性は、それぞれに、hCD40^{Tg} hFCGR^{Tg}脾臓細胞 (A) とPMBc細胞 (B)において、検出された。図に示された勾配のように希釈された濃度のコントロール或いはアゴニスト抗ヒトCD40抗体を有する培養液で、細胞を48時間にかけて培養して、その後、フロー技術で、マウスB細胞活性化標識分子CD86の発現レベル (A) 或いは人B細胞活性化標識分子CD54の発現レベルを分析する。これらの分子の発現レベルの上昇の程度は、抗CD40抗体の活性を反映する。

10

20

30

40

50

【図9】図9は、h Ig G 3と比べて、h Ig G 2のCH1-ヒンジ領域が、アゴニスト抗CD40抗体に、強い生体内の免疫を活性化する活性を与えることを示す。図4と同じ方法で、h F C G R^{Tg}マウスには、OVAワクチンモデルでそれぞれに、図に示された異なる抗マウスCD40抗体の活性を分析して、OT-I T細胞の増幅程度が、抗CD40抗体の活性を反映する。抗体の投与量は、10 μg / マウスである。(A)4つのh Ig Gサブタイプには、h Ig G 2サブタイプが、かなり強い免疫を活性化する活性を示すが、ほかのh Ig Gサブタイプ、すなわちh Ig G 1、h Ig G 3とh Ig G 4は、基本的に活性を有しない。(B)コントロールグループと比べて、h Ig G 2は、明らかな活性を有するが、h Ig G 2のCH1-ヒンジ領域がh Ig G 3のCH1-ヒンジ領域に置換されたバリエントh Ig G 2(H3)は、基本的に活性を有しない。

10

【図10】図10は、Ig G 1とIg G 3のCH1-ヒンジ領域と比べて、ヒトIg G 2のCH1-ヒンジ領域が、OVAワクチンモデルにおける抗CD40抗体の免疫アゴニスト活性をもっとサポートできることを示す。図4と同じ方法で、h F C G R^{Tg}マウスには、OVAワクチンモデルでそれぞれに、図に示された異なる抗マウスCD40抗体の活性を分析して、OT-I T細胞の増幅程度(A)とCD8 : CD4割合(B)が、抗CD40抗体の活性を反映する。抗体の投与量は、10 μg / マウスである。

【図11】図11は、OVAワクチンモデルにおいて、ヒトIg G 2(Anti-mCD40-h Ig G 2)と、V11(H1)を含む抗マウスCD40抗体(Anti-mCD40-h Ig G 1(V11))と比べて、JAC1を含む抗マウスCD40抗体(Anti-mCD40-h Ig G 2(V11))は、より優れる活性を有することを示す。図4と同じ方法で、h F C G R^{Tg}マウスには、OVAワクチンモデルでそれぞれに、図に示された異なる抗マウスCD40抗体の活性を分析して、OT-I T細胞の増幅程度(A)とCD8 : CD4割合(B)が、抗CD40抗体の活性を反映する。抗体の投与量は、10 μg / マウスである。

20

【図12】図12は、PBM C生体外刺激実験において、ヒトIg G 2(Anti-h CD40-h Ig G 2)と、V11(H1)を含む抗ヒトCD40抗体(Anti-h CD40-h Ig G 1(V11))と比べて、JAC1を含む抗ヒトCD40抗体(Anti-h CD40-h Ig G 2(V11))は、より優れる活性を有することを示す。

【図13】図13は、MC38腫瘍成長曲線であり、MC38腫瘍モデルにおいて、ヒトIg G 2(Anti-mCD40-h Ig G 2)と、V11(H1)を含む抗マウスCD40抗体(Anti-mCD40-h Ig G 1(V11))と比べて、JAC1を含む抗マウスCD40抗体(Anti-mCD40-h Ig G 2(V11))は、より優れる活性を有することを示す。h F C G R^{Tg}マウスは、0日目にMC38腫瘍細胞を皮下移植され、腫瘍形成後に、7日目と10日目に、二回に腹腔内注射で図に示された抗体を投与して、治療を行って、投与量は、マウス1匹あたり毎回31.6 μgであり、その後、腫瘍の体積(Tumor Volume)の変化(グループあたりは7匹マウス)を測量する。

30

【図14】図14は、図13に示された試験結果の別の表現形式である。

【図15】図15は、MO4腫瘍成長曲線であり、MO4マウス線維肉腫モデルにおいて、ヒトIg G 2(Anti-mCD40-h Ig G 2)と、V11(H1)を含む抗マウスCD40抗体(Anti-mCD40-h Ig G 1(V11))と比べて、JAC1を含む抗マウスCD40抗体(Anti-mCD40-h Ig G 2(V11))は、より優れる活性を有することを示す。h F C G R^{Tg}マウスは、0日目にMO4腫瘍細胞を皮下移植され、腫瘍形成後に、7日目に、腹腔内注射で図に示された抗体とパターン抗原OVA(OVAと抗DEC205抗体の融合タンパク質の形式として)を投与して、治療を行って、投与量は、マウス1匹あたり31.6 μg抗体と、2 μg OVAパターン抗原であり、その後、腫瘍の体積を測量する。

40

【図16】図16は、MC38腫瘍成長曲線であり、Ig G Fc受容体ノックアウトマウス(FcR^{-/-})には、アゴニスト抗マウスCD40抗体が抗腫瘍活性を有しないことを示す。

50

【図17】図17は、OVAワクチンモデルにおいて、低い投与量の、JAC1を含む抗マウスCD40抗体(Anti-mCD40-hIgG2(V11))が活性を有することを示す。図4と図7と同じ方法で、hFCGR^{Tg}マウスには、OVAワクチンモデルでそれぞれに、図に示された異なる投与量のコントロールとJAC1抗マウスCD40抗体の活性を分析して、OT-I T細胞の増幅程度が、抗CD40抗体の活性を反映する。

【図18】図18は、OVAワクチンモデルにおいて、JAC4を含む抗マウスCD40抗体は強いアゴニスト活性を有することを示す。図4と図7と同じ方法で、hFCGR^{Tg}マウスには、OVAワクチンモデルでそれぞれに、図に示された異なる抗マウスCD40抗体の活性を分析して、OT-I T細胞の増幅程度が、抗CD40抗体の活性を反映する。

【図19】図19は、JAC1を含む抗DR5抗体は、より強いアポトーシスを促進する能力を有することを示す。抗DR5抗体活性をサポートする能力は、ヒトIgG2より優れて、かつヒト抑制性Fc受容体に依存する。コントロールと異なる抗マウスDR5抗体が、それぞれに、図に示された遺伝子型マウス脾臓細胞(Fcgr-/-或hFCGR^{Tg})を存在しない又は存在する場合に、及びヒト抑制性Fc受容体特異性遮断抗体2B6存在しない又は存在する場合に、MC38細胞を処理して、その後、MC38細胞におけるCaspase-3の活性化状況(Active caspase-3 (%))、抗DR5抗体が、DR5下流細胞アポトーシスシグナルの活性を活性化することを反映するものを分析する。

【図20】図20は、抗体定常領域と活性化型Fc受容体の結合能力の向上(I/A比率の低下)が、アゴニスト抗CD40的活性を低減させることを示す。図において、バリアントanti-mCD40-hIgG1-SDIEとバリアントanti-mCD40-hIgG1-GASDALIEは、活性化型Fc受容体とのより強い結合能力と、より低いI/A比率を有して、その生体内免疫活性化活性は、より高いI/A比率を有する抗体anti-mCD40-G1(H2)より低い、そして、OT1細胞の割合と、OT1細胞の絶対数及びCD8+T細胞の割合がいずれも著しく低下することを表して、活性化型Fc受容体との結合能力が抗体の活性に重要な影響を有することを示す。

【発明を実施するための形態】

【0027】

特に記載がない限り、本明細書で使用される科学用語および技術用語は、当業者によって一般的に理解される意味を有するものとする。また、本明細書に特に限定されていない限り、単数の用語は複数を含み、複数の用語は単数を含む。一般に、本明細書に記載される細胞および組織培養、分子生物学、免疫学、およびタンパク質と核酸化学に関わる命名法および技術は、当技術分野において公知なものであり、一般的に用いられている。

【0028】

本発明の方法および技術は、一般に、当技術分野で公知の従来の方法に従って行われ、特に限定されていない限り、本明細書に列挙された一般的および専門的な参考文献に記載されている。たとえば、SambrookなどのMolecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版(Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N.Y.(1989))及びAusubelなどのCurrent Protocols in Molecular Biology(Greene Publishing Associates(1992)、及びHarlowとLaneのAntibodies: A Laboratory Manual(Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N.Y.(1990))を参照して、その内容は引用の方式で本明細書に取り入れる。酵素反応および精製技術は、製造者の指示に従って行われ、一般に、当該分野で公知の方法または本明細書に記載の方法に従って実施することができる。本明細書に記載される生物学、薬理学、および医学および薬学に関連する命名法、ならびに実験方法と技術は、当技術分野にお

10

20

30

40

50

いて公知なものであり、一般的に用いられている。化学合成方法、化学分析方法、医薬品製造方法、調製方法および送達方法、および患者の治療方法には、いずれも標準的な技術が用いられる。

【0029】

特に断りのない限り、以下の用語は以下の定義を有する：

用語「抗体」（「mAb」）又は「モノクローナル抗体」とは、単一な分子組成を有する抗体分子（すなわち、一次配列が基本的に同じで、かつ特定なエピトープに対して、単一な結合特異性と、親和性を表す抗体分子）の調製品である。抗体は、ハイブリドーマ、組換え、トランスジーン又は当業者が既知した他の技術より製造できる。

【0030】

「抗体」が、免疫グロブリン（Ig）を含むが、それに限定されない。物理化学性質と生物学的な機能によって、抗体は、IgM、IgG、IgA、IgE、IgDの五種類に分けられる。ヒトIgGが、IgG1、IgG2、IgG3とIgG4の四つのサブクラスを含む（Vidarsson G, Dekkers G and Rispens T (2014) IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. Front. Immunol. 5:520）。本発明には、hIgG1、hIgG2、hIgG3とhIgG4は、それぞれに、人のIgG1、IgG2、IgG3とIgG4を表す。

【0031】

「抗体」が、特異性に抗原と結合し、かつ少なくともジスルフィド結合で互いに連結する二つの重鎖（H）と二つの軽鎖（L）を含む。各重鎖が、重鎖可変領域（本明細書には、単にVHという）と、重鎖定常領域（本明細書には、単にCHという）を含む；各軽鎖が、軽鎖可変領域（VL）と軽鎖定常領域（CL）を含む。抗体の「重鎖定常領域」は、CH1、CH2とCH3の三つのドメイン、及びCH1ドメインとCH2ドメインの間に位置するヒンジ領域（Hinge）を含む。図1は、IgG抗体の基本構造の模式図を示す。

【0032】

Kabatなどが、重鎖と軽鎖可変領域の多くの一次配列を集めた。彼らは、配列の保存程度に基づき、各の一次配列をCDRとフレームに分けて、かつそれらのリストを作成する（SEQUENCES OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 第5版, NIH publication, No. 91-3242, E. A. Kabatなどを参照して、全てを取り入れて参考になる）。IMGTデータには、ヒトIgGの各ドメインのEU指数は整理された（<http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/HuIGHGnumber.html>）。IgG抗体の背景において、重鎖定常領域のCH1ドメインとは、KabatのEU指数に基づき番号をつけられたサイト118-215である；重鎖定常領域のCH2ドメインとは、KabatのEU指数に基づき番号をつけられたサイト231-340である；重鎖定常領域とCH3ドメインとは、KabatのEU指数に基づき番号をつけられたサイト341-447である；重鎖定常領域のヒンジ領域（Hinge）が、サイト216（IgG1中のE216）-230（IgG1中のP230）を含み、ただしKabatなどのEU指数に基づき番号をつけられた。図2は、ヒトのIgG1、IgG2、IgG3とIgG4の重鎖可変領域の配列アラインメント図を示す。

【0033】

各軽鎖は、「軽鎖可変領域」（本明細書には、単にVLという）と「軽鎖定常領域」を含む。軽鎖定常領域は、一つのドメインCLからなるものである。VHとVL領域は、更に、相補性決定領域（CDR）と呼ばれる高度可変な領域に細かく分かれ、それらの間に、比較的に保存な、フレーム領域（FR）と呼ばれる領域が散在してある。各VHとVLは、三つのCDRと四つのFRからなり、アミノ末端からカルボキシ末端まで、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4の順に並べる。重鎖と軽鎖の可

10

20

30

40

50

変領域は、抗原と互いに作用する結合ドメインを含む。

【0034】

「F c 領域」（結晶化可能領域）又は「F c ドメイン」又は「F c」とは、抗体の重鎖におけるC - 末端領域であり、それが、免疫システムの各種の細胞（たとえば、エフェクター細胞）に位置するF c 受容体との結合、或いは古典的補体系の第一成分（C 1 q）との結合を含む、免疫グロブリンと宿主組織或いは因子との結合を仲介する。Ig G、Ig AとIg D抗体のアイソタイプには、F c 領域は、抗体の二つの重鎖のCH 2 ドメインと、CH 3 ドメインの二つの同一のタンパク質断片からなる；Ig MとIg EのF c 領域は、各ポリペプチド鎖に三つの重鎖恒定ドメイン（CH ドメイン2 - 4）を含む。免疫グロブリンの重鎖のF c 領域の限界は変化できるが、ヒトIg G重鎖のF c 領域は、通常に、重鎖のC 226 或 P 230 位置のアミノ残基からカルボキシ末端までの配列断片と定義され、ただし、当該番号は、Kabatのように、EU指標に基づくものである。本明細書に使用されたように、F c 領域は、天然配列のF c であっても良い、或いはバリエントF c であっても良い。10

【0035】

「F c 受容体」又は「F c R」は、免疫グロブリンのF c 領域と結合する受容体である。Ig G抗体と結合するF c Rは、F c Rファミリーの受容体を含み、これらの受容体の対立遺伝子バリエントと選択的スプライシング形式も含む。ヒトF c 受容体ファミリーは、いくつのメンバーを含む： F c RI (CD 64)、F c RIIIA (CD 32a)、F c RIIIB (CD 32b)、F c RIIIA (CD 16a)、F c RIIIB (CD 16b)。その中、F c RIIIBは、唯一の抑制性F c 受容体であり、他のは、いずれも活性型F c 受容体である。大多数の自然エフェクター細胞型が、一種又は多種の活性化性F c Rと抑制性F c RIIIBを共発現するが、ナチュラルキラー（NK）細胞が、選択的に一つの活性化性F c 受容体（在マウス中是F c RIII、在人中是F c RIIIA）を発現しつつ、マウスとヒトに、抑制性F c RIIIBを発現しない。これらのF c 受容体の分子構造が異なるから、各Ig G抗体サブクラスに対する異なる親和性を有する。これらのF c 受容体の中、F c RIは、高親和性の受容体であるが、F c RIIIA、F c RIIIBとF c RIIIAは、低親和性の受容体である。遺伝子多型も、これらの異なるF c 受容体に存在しつつ、それらの結合親和性に影響する。最も一般的な遺伝子多型は、F c RIIIAのR 131 / H 131と、F c RIIIAのV 158 / F 158などの多型形式である。これらの多型形式の中、多種の疾患に関係することを見つかることもあり、一部の特定な治療抗体の効果も、患者が特定なF c 受容体遺伝子多型形式を持つか否かに依存する。2030

【0036】

本発明に記載された「配列」は、本発明の配列と実質的に同一の配列を含むと理解され、上記の「実質的に同一の配列」とは、最適化アラインメントされた後に、例えばGAP又はBESTFITプログラムを採用し、使用デフォルトギャップ値で測定する際に、二種類のペプチド配列の間に、少なくとも70、75或80%の配列同一性を有し、好ましくに、少なくとも90或95%の配列同一性を有し、より好ましくに、少なくとも97、98或99%の配列同一性を有する。好ましくに、異なる残基位置の相違は、保存性のアミノ酸置換であると思わしい。「保存性のアミノ酸置換」とは、その中のアミノ酸残基は、別の化学的な性質（たとえば：電荷又は親水性）が類似する側鎖のR基を有するアミノ酸残基で置換されることである。一般的に、保存性のアミノ酸置換は、実質的にタンパク質の機能と性質を変わらない。その中の二種類又は複数種のアミノ酸配列の相違は、保存性の置換である場合に、配列の同一性百分比或いは類似性は向上され、置換作用の保存性を訂正する。たとえば、Pearson, Methods Mol. Biol. 243: 307 - 31 (1994) を参照する。化学的な性質が類似する側鎖を有するアミノ酸基の実例は、1) 脂肪族側鎖：グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、ヒソロイシン；2) 脂肪族 - ヒドロキシル基側鎖：セリンとトレオニン；3) アミドを含有する側鎖：アスパラギンとグルタミン；4) 芳香族側鎖：フェニルアラニン、チロシン、トリプトフ4050

アン；5)アルカリ側鎖：リシン、アルギニン、ヒスチジン；6)酸性側鎖：アスパラギン酸とグルタミン酸；及び7)硫黄を含有する側鎖：システイン与メチオニンを含む。好ましい保存性のアミノ酸置換のグループは、バリン-ロイシン-イソロイシン、フェニルアラニン-チロシン、リシン-アルギニン、アラニン-バリン、グルタミン酸-アスパラギン酸、及びアスパラギン-グルタミンである。

【0037】

本発明の抗体及びその断片或いはドメインのアミノ酸のシリアルナンバーは、IgG EU番号(<http://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/HumanIGHGnber.html>)に基づくものである。抗体は、一般的に高親和性でその関連する抗原と特異性に結合し、 10^{-5} - 10^{-11} M又はより小さい解離定数(KD)を表す。約 10^{-4} M⁻¹より大きい、任意なKDは、一般的に非特異性の結合を指示する。本明細書に使用されたように、抗原と「特異性に結合」する抗体とは、高親和性で、抗原や基本的に同一の抗原と結合する抗体であり、それは、KDは、 10^{-7} M又はより小さい、好ましくに 10^{-8} M又はより小さい、より好ましくに 5×10^{-9} M又はより小さい、最も好ましくに 10^{-8} - 10^{-10} M又はより小さいことを表すが、高親和性で関係がない抗原と結合しない。抗原が、指定された抗原と、高い配列同一性を表し、たとえば、指定された抗原の配列と、少なくとも80%、少なくとも90%、好ましくに少なくとも95%、より好ましくに少なくとも97%、又はより好ましくに少なくとも99%の配列同一性を表すと、当該抗原は、指定された抗原とは、「基本的に同一」なものである。

10

20

30

【0038】

本発明に記載された「抑制性Fc受容体及び活性化性Fc受容体に対する親和性の比率」或いは「I/A比率」とは、タンパク質分子が、抑制性Fc受容体に対する親和性と、活性化性Fc受容体に対する親和性との比率であり、本発明には、I/A比率は、以下のように計算される：I/A比率 = [KD(hFcRIIA)或いはKD(hFcRIIIA)の中に比較に低いKD値] / KD(hFcRIIB)；ただし、KD(hFcRIIA)は、当該分子がhFcRIIA受容体(バリアントhFcRIIA-R131を代表とする)に対する平衡解離定数であり、KD(hFcRIIIA)は、当該分子がhFcRIIIA受容体(バリアントhFcRIIIA-F158を代表とする)に対する平衡解離定数であり、KD(hFcRIIB)は、当該分子が、hFcRIIB受容体に対する平衡解離定数である；hFcRIIAとは、ヒトのFcRIIA受容体であり、hFcRIIIAとは、ヒトのFcRIIIA受容体であり、hFcRIIBとは、ヒトのFcRIIB受容体である。上記の「親和性」とは、二つの分子の間の結合能の大きさであり、通常に、KDで計測する。

40

【0039】

「KD」とは、二つの分子が(たとえば：特定な抗体と抗原、或いはリガンドと受容体)互いに作用する平衡解離定数である。「抗原結合モジュール」とは、高親和性で特異性に抗原と結合するタンパク質であり、抗体の抗原結合断片、adnectin、ナノボディ(nanobody)、ミニ抗体、アフィボディー(affibodies)、affilin、受容体の標的結合領域、細胞接着分子、リガンド、酵素、サイトカイン、とケモカインなどを含むが、それらに限らない。抗原結合モジュールが標的にする抗原は、TNF受容体スーパーファミリーメンバー、免疫抑制性受容体分子などを含むが、それらに限らない。

【0040】

用語「抗体の抗原結合部分」とは、抗原と結合する責任をもつ抗体のアミノ酸残基である。抗体の抗原結合部分は、「相補性決定領域」又は「CDR」由来のアミノ酸残基を含む。「フレームワーク」又は「FR」領域は、本明細書に定義された高度可変領域に属しない、これらの可変領域である。したがって、抗体の軽鎖と重鎖可変ドメインは、N末端からC末端まで、領域FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3とFR4を含む。特に、重鎖のCDR3は、抗原の結合と、抗体の性能を定義することに最も寄与

50

する領域である。CDRとFRは、Kabatなどの、SEQ ID NO: uence s of Proteins of Immunological Interest、第5版、Public Health Service、National Institutes of Health、Bethesda、MD(1991)の標準定義及び/又は「高度可変環」の残基より確定される。

【0041】

本発明の「抗体」は、たとえば天然に存在する、或いは天然に存在しない抗体；モノクローナルとポリクローナル抗体；キメラとヒト化抗体；ヒト或いは非ヒト抗体；完全合成抗体を含む。

【0042】

「ヒト」抗体とは、その可変領域は、ヒト生殖系免疫グロブリン配列由来のフレーム領域とCDR領域を有する抗体である。なお、抗体が定常領域を含有すると、定常領域もヒト生殖系免疫グロブリン配列由来のものである。本発明のヒト抗体は、ヒト生殖系免疫グロブリン配列によってコードされていないアミノ酸残基（たとえば、生体外でのランダムまたは部位特異的突然変異や、生体内での体細胞突然変異によって、導入された突然変異）を含んでも良い。しかしながら、本明細書に使用されたように、用語「ヒト抗体」は、他の哺乳動物種（マウスのような）種系由来のCDR配列を、ヒトフレーム配列に移植してなる抗体を含むことを意図しない。用語「ヒト」抗体は、「完全ヒト」抗体との同義語として使用される。

【0043】

「ヒト化」抗体とは、その中の非ヒト抗体CDRドメインを除く一部、大部分或いは全部のアミノ酸は、ヒト免疫グロブリン由来の相応のアミノ酸に取り替えられる抗体である。ヒト化形式抗体の一つの実施の形態において、CDRドメインを除く一部、大部分或いは全部のアミノ酸は、ヒト免疫グロブリン由来のアミノ酸に取り替えられるが、一つ又は以上のCDR領域のうちの一部、大部分又は全部のアミノ酸は変わらない。抗体が、特定な抗原と結合する能を取り除かない限り、アミノ酸に対する小さい付加、欠失、挿入、置換または修飾は許容される。「ヒト化」抗体は、オリジナル抗体に類似する抗原特異性を保留する。

【0044】

「キメラ抗体」とは、可変領域と定常領域は、それぞれに異なる種に由来する抗体であり、たとえば可変領域は、マウス抗体に由来するが、定常領域はヒト抗体に由来する抗体である。

【0045】

「アゴニスト抗体」は、受容体と結合し、かつ受容体を活性化する抗体である。アゴニスト抗体の機能の実例は、1) 抗DR5のアゴニスト抗体が、DR5と結合し、かつDR5受容体を発現する細胞のアポトーシスを誘導する；2) 抗CD40のアゴニスト抗体が、免疫細胞の表面と結合することで、免疫活性化シグナルの標的分子を転送し、かつそれに制御された重要な免疫活性化シグナル経路を活性化し、そして抗腫瘍免疫応答を増強し、間接に腫瘍細胞を殺滅できることを含むが、それらに限定されない。

【0046】

臨床研究段階に入ったアゴニスト抗体の一部の実例を、以下の表1に示す。

【0047】

10

20

30

40

【表1】

表1：臨床研究段階に入ったアゴニスト抗体。

TNF受容体ファミリー	製品（開発ユニット）	抗体タイプ	適応症
OX40	MEDI 6469 (Providence Health & Services)	マウス抗体	がん(固体腫瘍、前立腺癌)
CD27	CDX-1127 (Celldex Therapeutics)	ヒト抗体	複数のがん
CD40	Dacetuzumab / SGN-40 (Genentech)	ヒト化抗体	がん (CLL、非ホジキンリンパ腫、多発性骨髓腫)
	HCD122 (Novartis)		多発性骨髓腫
	ASKP1240 (Astellas Pharma / Kyowa Hakko Kirin Company)		
	Chi-Lob 7/4 (Cancer Research UK)	キメラ抗体	がん (非ホジキンリンパ腫)
	CP-870893 (Pfizer)	ヒト抗体	がん (黒色腫、膵臓がん)
	ADC-1013 (Alligator Bioscience)	完全ヒト抗体	腫瘍；固体腫瘍
	RO7009789 (Roche)		末期／転移性固体腫瘍
	SEA-CD40 (Seattle Genetics)		がん
	APX005M (Apexigen)		がん
CD30	SGN-30 (Seattle Genetics)	キメラ抗体	がん (非ホジキンリンパ腫)
	XmAb 2513 (Xencor)	ヒト化抗体	がん (非ホジキンリンパ腫)
	MDX-1401 (Bristol-Meyers Squibb)	ヒト抗体	がん (非ホジキンリンパ腫)
4-1BB	BMS-663513 (Bristol-Meyers Squibb)	ヒト抗体	がん (黒色腫、固体腫瘍)
	PF-05082566 (Pfizer / Kyowa Hakko Kirin Company)	ヒト抗体	がん (非ホジキンリンパ腫)

DR 4	Ma p a t u m u m a b / H G S - E T R 1 (H u m a n G e n o m e S c i e n c e s I n c / G S K)	ヒト抗体	複数のがん
DR 5	Co n a t u m u m a b / A M G 6 5 5 (A m g e n)	ヒト抗体	複数のがん
	D r o z i t u m a b / A p o m a b / P R O 9 5 7 8 0 (G e n e n t e c h)	ヒト抗体	複数のがん
	L e x a t u m u m a b / H G S - E T R 2 (N a t i o n a l C a n c e r I n s t i t u t e)	ヒト抗体	がん
OPG	T i g a t u z u m a b / C S - 1 0 0 8 / T R A - 8 (L u d w i g I n s t i t u t e f o r C a n c e r R e s e a r c h / D a i i c h i S a n k y o I n c)	ヒト化抗体	複数のがん
F n 1 4	E n a v a t u z u m a b / P D L 1 9 2 (A b b o t t)	ヒト化抗体	がん(固形腫瘍)
G I T R	T R X 5 1 8 (G I T R)	ヒト化抗体	がん(黒色腫、 膵臓がん)
	M E D I 1 8 7 3 (M e d I mm u n e)		末期固形腫瘍

10

20

30

40

50

【 0 0 4 9 】

上記の表に示されたアゴニスト抗体は、重鎖定常領域を本発明の重鎖定常領域に取り替えることで、より高いアゴニスト活性を得られる。或いは、本発明のアゴニスト抗体は、上記の表に示されたアゴニスト抗体の抗原結合断片を採用し、特定な TNF 受容体スーパー・ファミリー・メンバーに対する活性を増強されたアゴニスト抗体を構成できる。

【 0 0 5 0 】

「免疫共刺激因子」とは、免疫細胞活化に、第二活化シグナルを提供するリガンド分子である。MHC / 抗原ペプチド - T 細胞受容体 (TCR) に第一シグナルを提供する以外に、T 細胞の活化には、さらに B7 / CD28 、 ICOSL / ICOS 、 OX40L / OX40 、 4 - 1BBL / 4 - 1BB などを含むものが共刺激シグナルを提供することも必要がある。B 細胞の活化には、抗原 / B 細胞受容体 (BCR) 以外に、 CD40L / CD40 などが提供する共刺激シグナルも必要がある。こんなシグナル経路におけるリガンド分子は、免疫共刺激因子である。本発明には、好ましい免疫共刺激因子の実例は、 B7 (CD80 、 CD86) 、 ICOSL 、 OX40L / CD134 、 4 - 1BBL / CD137L 、 CD40L / CD154 、 CD30L / CD153 、 CD27L / CD70 或いは SLAM ファミリー分子 (CD244 、 CD150 、 CD48 、 CD84 、 CD319 、 Ly108 、 CD229 、 SLAMF8) など含むが、それらに限定されない。

【 0 0 5 1 】

本明細書の「腫瘍壊死因子受容体スーパー・ファミリー」或いは「TNF 受容体スーパー・ファミリー」とは、 TNF ファミリーのサイトカインと結合できる受容体ポリペプチドである。一般的に、これらの受容体は、その細胞外領域に一つ又は以上のシステイン豊富の重複配列を有する I 型膜貫通受容体である。 TNF 遺伝子ファミリーの中のサイトカインの実例は、腫瘍壊死因子 - (TNF-) 、腫瘍壊死因子 - (TNF- 又はリンパ毒素) 、 CD30 リガンド、 CD27 リガンド、 CD40 リガンド、 OX - 40 リガンド

、4-1BBリガンド、Apo-1リガンド(Fasリガンド又はCD95リガンドとも言う)、Apo-2リガンド(TRAILとも言う)、Apo-3リガンド(TWEAKとも言う)、osteoprotegerin(OPG)、APRIL、RANKリガンド(TRANCEとも言う)、とTALL-1(BlyS、BAFF又はTHANKとも言う)を含む。TNF受容体スーパーファミリーの中の受容体の実例は、1型腫瘍壞死因子受容体(TNFR1)、2型腫瘍壞死因子受容体(TNFR2)、p75神経成長因子受容体(NGFR)、B細胞表面抗原CD40、T細胞抗原OX-40、Apo-1受容体(Fas又はCD95)、Apo-3受容体(DR3、sw1-1、TRAMPとLARDとも言う)、「膜貫通型の活性化因子およびCAMLインタラクタ(interactor)」又は「TACI」と呼ばれる受容体、BCMAタンパク質、DR4、DR5(或いは、Apo-2；TRAIL-R2、TR6、Tango-63、hAPO8、TRICK2又はKILLERとも言う)、DR6、DCR1(TRID、LIT又はTRAIL-R3とも言う)、DCR2(TRAIL-R4又はTRUNDDとも言う)、OPG、DCR3(TR6又はM68とも言う)、CAR1、HVEM(ATAR又はTR2とも言う)、GITR、ZTNFR-5、NTR-1、TNFL1、CD30、リンパ毒素受容体(LTB_r)、4-1BB受容体和TR9(EP988, 371-A1)を含む。本発明には、好ましいTNF受容体スーパーファミリーメンバーの実例は、CD40、DR5、OX40、CD137、CD27、CD30、GITR、HVEM、TACI、DR4或いはFASなどを含むが、それらに限定されない。

10

20

30

40

【0052】

「免疫抑制性受容体」は、膜貫通糖タンパク質の一つであり、免疫細胞内の活化シグナルの伝達を抑制或いは遮断でき、本発明の実施例において、免疫抑制性受容体分子は、PD-1、CTLA-4、VISTA、TIM-3、BTLA或いはLAG-3などを含むが、それらに限定されない。

【0053】

「免疫抑制性リガンド」は、免疫抑制性受容体のリガンドであり、免疫抑制性受容体と結合し、かつその下流の抑制性シグナルを活性化でき、本発明の実施例において、免疫抑制性リガンド分子は、PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、VISTA、HVEM或いはGAL9のいずれかの一つを含むが、それらに限定されない。

【0054】

「免疫応答」とは、脊椎動物生体内における、外来の作用媒介に対する生物学応答であり、当該応答が、生物体を、これらの作用媒介或いはそれによる疾患の傷害から保護できる。免疫応答は、免疫システムの細胞(たとえば、T淋巴細胞、B淋巴細胞、ナチュラルキラーNK)細胞、マクロファージ、好酸球、肥満細胞、樹状細胞或好中球)とこれらの細胞のいずれか一つ又は肝臓に產生される可溶性巨大分子(抗体、サイトカインと補体を含む)の作用によるものであり、それが、脊椎動物生命体が病原体、細胞又は病原体に感染される組織、がん細胞或いは他の異常細胞に侵入すること、或いは自己免疫性又は病理学的炎症に、正常のヒト細胞又は組織を選択性に標的、結合、損害、破壊、及び/又は除去することを引く。

【0055】

「免疫療法」とは、免疫応答を誘導、強化、抑制或いは修飾することを含む方法で、疾患有し、疾患が発生するリスクがあり、或いは疾患を再発する被験者を治療することである。

【0056】

「内因性免疫応答を増強」とは、被験者の生体内に既存の免疫応答の有効性又は強度を強化することである。こんな効率と潜在力の強化は、たとえば、内因性の宿主免疫応答に対する抑制を克服する機構で、或いは内因性の宿主免疫応答に対する強化を刺激する機構で達成できる。

【0057】

薬物又は治療剤(たとえば本発明の融合タンパク質或いは抗体)の「治療有効量」又は

50

「治療有効投与量」とは、薬物の以下のように記載された任意の量である：当該量の薬物を、単独に使用し、又は別の治療剤と組み合わせて使用する際に、疾患の退行を促進できる；疾患の退行は、疾患の症状の重症度の軽減、疾患の症状がない期間の頻度と期間の増加、或いは疾患による障害又は不自由の防止に表れる。薬物の治療有効量又は投与量は、「予防有効量」又は「予防有効投与量」を含み、「予防有効量」又は「予防有効投与量」とは、薬物の以下のように記載された任意の量である：当該量の薬物を、単独に、又は別の治療剤と組み合わせて、疾患が発生するリスクがあり、或いは疾患を再発する被験者に給与する際に、疾患の発生または再発を阻害できる。治療剤が、疾患の退行を促進する、又は疾患の進展や再発を阻害する能は、当業者が既知の各方法で評価でき、たとえば人被験者の臨床試験において、人における效力を予測する動物モデルシステムに、或いは生体外の測定システムに、試薬の活性を測定できる。

10

【0058】

例を挙げると、抗がん剤（治療がんの薬物組成物）が、被験者の生体内の腫瘍の退行を促進する。好ましい実施の形態において、治療有効量の薬物が癌細胞の退行ないしがんの消除を促進する。「がんの退行を促進」とは、単独に、又は抗腫瘍剤（anti-neoplastic agent）と組み合わせて、治療有効量の薬物を投与することで、腫瘍の成長や大きさの減少、腫瘍の壊死、少なくとも一つの疾患の症状の重症度の軽減、疾患の症状がない期間の頻度と期間の増加、疾患による障害又は不自由の防止を引き、或いは他の方式で患者の疾患の症状を改善することである。また、治療に関する「有効」と「有効性」という用語は、薬理学的な有効性と生理学的な安全性を含む。薬理学的な有効性とは、薬物が、患者がんの退行を促進する能を指す。生理学的な安全性とは、薬物の使用による細胞、器官及び／又は生物体レベルの毒性、或いは他の有害な生理效果（有害作用）のレベルを指す。

20

【0059】

腫瘍を治療する例として、治療されていない被験者と比べて、治療有効量又は投与量の薬物は、好ましくに、少なくとも約20%、より好ましくに少なくとも約40%、さらに好ましくに少なくとも約60%、かつもっとより好ましくに少なくとも約80%ほどに、細胞の成長、又は腫瘍の成長を抑制する。最も好ましい実施の形態において、治療有効量又は投与量の薬物は、完全に細胞の成長又は腫瘍の成長を抑制でき、すなわち、好ましくに、100%ほど細胞の成長又は腫瘍の成長を抑制する。化合物が、腫瘍の成長を抑制する能を、動物モデルシステムで評価でき、たとえば本明細書に記載されたMC38結腸腺癌マウス腫瘍モデルは、ヒト腫瘍における効力を予測できる。代わりに、組成物の当該性質は、化合物が細胞の成長を抑制する能を検出ことで評価でき、こんな抑制は、当業者が既知の測定方法で生体外に測量できる。本発明の他の好ましい実施の形態において、腫瘍の退行は、観察されて、かつこんな退行は、少なくとも約20日、より好ましくに少なくとも約40日、又はさらに好ましくに少なくとも約60日にかけて続ける。

30

【0060】

被験者に対する「治療」又は「療法」とは、疾患に関する症状、合併症、病気又は生化学的な指標の出現、進展、発展、重症度又は再発を、逆転、緩和、改善、抑制、減速または予防することを目的として、被験者にいずれかタイプの介入又は処理し、或いは活性剤を投与することである。

40

【0061】

本発明の免疫治療方法の好ましい実施の形態において、被験者は人である。

「がん」とは、異常な細胞が生体内に制御されなく成長することを特徴とする多様な疾患を指す。制御されない細胞分裂と成長が、悪性腫瘍又は細胞の形成を引き、それらが、近傍の組織に侵入しながら、リンパ系又は血流より、身体の遠位部分に転移する。本発明には、「がんを治療」の別の同等の記述は、「腫瘍を治療」或いは「抗がん」或いは「抗腫瘍」である。

【0062】

上記に記載されたように、本発明は、本発明の重鎖定常領域配列の抗体又は融合タンパ

50

ク質が、がんのような増殖性疾患を治療する応用を含む。がんは、身体の器官とシステムの正常機能細胞の成長を、制御されていないに障害する病症である。がんを有する被験者は、がん細胞が、被験者の生物体内に、客観的に測定可能に存在する被験者である。がんが進展する危険がある被験者は、がん（たとえば家族歴、遺伝的素因に基づき）が進展しやすい被験者や、放射線又は他のがんをもたらす試薬を接觸する被験者である。元の部位から転移し、かつ重要な器官に接種するがんは、影響された器官の機能の退化で、最終的に被験者の死亡を引き起こす。造血器がん（例えば白血病）が、被験者の正常な造血器との競合に勝ち得り、そして、（貧血、血小板減少症と好中球減少症の形式で）造血不全になり、最終に死亡を引き起こす。

【0063】

10

本発明は、以下の内容を含む：多様ながん、又はがんが進展する危険がある被験者を治療するために、本発明の重鎖定常領域配列の抗体又は融合タンパク質を使用すること。こんながんの例としては、乳がん、前立腺がん、肺がん、卵巣がん、子宮頸がん、皮膚がん、黒素瘤、結腸がん、胃がん、肝がん、食道がん、腎臓がん、咽喉がん、甲状腺がん、脾臓がん、精巣がん、脳がん、骨がん和血液かん（例えば白血病、慢性リンパ球性白血病）などを含む。一つの実施例において、本発明のワクチン組成物は、免疫反応を刺激するために用いられ、腫瘍の成長の抑制又は遷延や、腫瘍の大きさの減少で、腫瘍を治療する。腫瘍に関する抗原は、主に（それらに限定されない）腫瘍細胞が発現する抗原であっても良い。

【0064】

20

他のがんは、基底細胞がん、胆道がん、膀胱がん、骨がん、脳および中枢神経系（CNS）がん、子宮頸がん、絨毛がん、結腸直腸がん、結合組織がん、消化器系がん、子宮内膜がん、食道がん、目がん、頭頸部がん、胃がん、上皮性腫瘍、腎臓がん、喉がん、肝がん、（小細胞、大細胞）肺がん、リンパ腫（ホジキンリンパ腫および非ホジキンリンパ腫を含む）；黒素瘤；神経芽細胞腫；口腔がん（たとえば唇、舌、口、及びのど）；卵巣がん；脾臓がん；網膜芽細胞腫；横紋筋肉腫；直腸がん；呼吸器系がん；肉腫；皮膚がん；胃がん；精巣がん；甲状腺がん；子宮がん；泌尿器系がん；及び他のがんと肉腫を含むが、それらに限定されない。

【0065】

30

「ワクチン」とは、単独に投与し、又は補助剤と結合して投与する際に、免疫的な抗原特異性効果を引き起こす組成物である。保護を与える予防性ワクチンと、治療性ワクチンを含む。

【0066】

40

本発明のワクチン組成物が、治療又は予防できる感染は、バクテリア、ウイルス、真菌又は寄生虫を含む。他の珍しいタイプの感染は、リケッチャ（rickettsiae）、マイコプラズマ（mycoplasma）と病原体（agents）に引かれるスクレイピー（scrappie）、牛海綿状脳症（BSE）及びプリオン病（たとえばクールー病（kuru）とクロイツフェルト・ヤコブ病（Creutzfeldt-Jacob disease））を含む。人を感染するバクテリア、ウイルス、真菌又は寄生虫の例は、既知されたものである。感染は、急性、亜急性、慢性または潜在的なものであってよい、かつ局所または全身性なものであってよい。また、感染は、宿主における感染性生物因子のライフサイクルの少なくとも一つの段階に、主に細胞内又は細胞外に位置しても良い。

【0067】

50

本発明のワクチン組成物と方法で対抗できるバクテリア感染は、グラム陰性とグラム陽性菌を含む。グラム陽性菌の例として、パステウレラ属（*Pasteurella*）種、ブドウ球菌（*Staphylococcus*）種とレンサ球菌（*Streptococcus*）種を含むが、それらに限定されない。グラム陰性菌の例として、大腸菌（*Escherichia coli*）、シュードモナス属（*Pseudomonas*）種とサルモネラ属（*Salmonella*）種を含むが、それらに限定されない。感染性バクテリアの特定の例として、ヘリコバクター・ピロリ（*Helicobacter pylori*）、ボレリ

ア・ブルグドルフェリ (*Borrelia burgdorferi*)、レジオネラ・ニューモフィラ (*Legionella pneumophilia*)、マイコバクテリア属 (*Mycobacteria*)種(たとえばマイコバクテリウム・ツベルクローシス (*M. tuberculosis*)、マイコバクテリウム・アビウム (*M. avium*)、マイコバクテリウム・イントラセルラーエ (*M. intracellulare*)、マイコバクテリウム・カンサシ (*M. kansaii*)、マイコバクテリウム・ゴルドネ (*M. gordoniæ*))、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、淋菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、髄膜炎菌 (*Neisseria meningitidis*)、リステリア・モノサイトゲネス (*Listeria monocytogenes*)、 streptococcus)、ストレプトコッカス・ピオゲネス (*Streptococcus pyogenes*) (A群レンサ球菌属)、ストレプトコッカス・アガラクティエ (*Streptococcus agalactiae*) (B群レンサ球菌属)、レンサ球菌属(綠膿菌群)、大便レンサ球菌 (*Streptococcus faecalis*)、ウシレンサ球菌 (*Streptococcus bovis*)、レンサ球菌属 (*Streptococcus*) (aerobic spp.)、肺炎レンサ球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、病原性カンピロバクター属 (*pathogenic Campylobacter*)種、エンテロコッカス属 (*Enterococcus*)種、インフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*)、炭疽菌 (*Bacillus anthracis*)、ジフテリア菌 (*Corynebacterium diphtheriae*)、コリネバクテリウム属 (*Corynebacterium*)種、豚丹毒菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*)、ウエルシュ菌 (*Clostridium perfringens*)、破傷風菌 (*Clostridium tetani*)、エンテロバクター・エロゲネス (*Enterobacter aerogenes*)、クレブシエラ・ニューモニエ (*Klebsiella pneumoniae*)、パストレラ・ムルトシダ (*Pasteurella multocida*)、バクテロイデス属 (*Bacteroides*)種、フソバクテリウム・ヌクレアタム (*Fusobacterium nucleatum*)、トレプトバチルス・モニリフォルミス (*Streptobacillus moniliformis*)、梅毒トレポネーマ (*Treponema pallidum*)、トレポネーマ・ペルテヌエ (*Treponema pertenue*)、レプトスピラ属 (*Leptospira*)、リケッチャ属 (*Rickettsia*)とアクチノマイセス・イスラエリー (*Actinomycetisraelii*)を含むが、それらに限定されない。

【0068】

人の感染を引き起こすウイルスの例として、レトロウイルス科 (*Retroviridae*) (たとえばHIV-1 (HTLV-IIIとも言う)、HIV-II、LAC或IDLV-III/LAV或HIV-IIのようなヒト免疫不全ウイルス、及びHIV-LPのような他の分離株)、ピコルナウイルス科 (*Picornaviridae*) (たとえばポリオウイルス (*poliovirus*)、A型肝炎ウイルス、エンテロウイルス (*enteroviruses*)、ヒトコクサッキーウイルス (*human Coxsackieviruses*)、ライノウイルス (*rhinoviruses*)、エコーウィルス (*echoviruses*))、カリシウイルス科 (*Caliciviridae*) (たとえば胃腸炎を引き起こす菌株)、トガウイルス科 (*Togaviridae*) (たとえばウマ脳炎ウイルス (*equine encephalitis viruses*)、風疹ウイルス (*rubellavirus*))、フラビウイルス科 (*Flaviviridae*) (たとえばデング熱ウイルス (*dengue viruses*)、脳炎ウイルス (*encephalitis viruses*)、黄熱病ウイルス (*yellow fever viruses*))、コロナウイルス科 (*Coronaviridae*) (たとえばコロナウイルス (*coronaviruses*))、ラブドウイルス科 (*Rhabdoviridae*) (たとえば水疱性口内炎ウイルス (*vesicular stomatitis viruses*))、狂犬病ウイルス科 (*rabies viruses*))、フィロウイルス科 (*F* 50

iloviridae) (たとえばエボラウイルス (Ebola viruses))、パラミクソウイルス科 (Paramyxoviridae) (たとえばパラインフルエンザウイルス (parainfluenzaviruses)、流行性耳下腺炎ウイルス (mumps viruses)、麻疹ウイルス (measlesvirus)、呼吸器合胞体ウイルス (respiratory syncytialvirus))、オルソミクソウイルス科 (Orthomyxoviridae) (たとえばインフルエンザウイルス (influenzaviruses))、ブニヤウイルス科 (Bunyaviridae) (たとえばハンターンウイルス (Hantaanviruses)、ブニヤウイルス (bungaviruses)、フレボウイルス (phlebovirus) とナイロウイルス))、アレナウイルス科 (Arenaviridae) (出血熱ウイルス (hemorrhagic fever viruses))、レオウイルス科 (Reoviridae) (たとえばレオウイルス (reoviruses))、オルビウイルス (orbivirus)、ロタウイルス (rotavirus))、ビマウイルス科 (Bimaviridae)、ヘパドナウイルス科 (Hepadnaviridae) (B型肝炎ウイルス)、パルボウイルス科 (Parvoviridae) (パルボウイルス (parvoviruses))、パポバウイルス科 (Papovaviridae) (パピローマウイルス (papillomaviruses))、ポリオーマウイルス (polyomaviruses))、アデノウイルス科 (Adenoviridae) (アデノウイルス (adenoviruses))、ヘルペスウイルス科 (Herpesviridae) (たとえば単純ヘルペスウイルス (herpes simplex virus) (HSV) I と II、水痘帶状疱疹ウイルス (varicellazoster virus)、ポックスウイルス (poxviruses))とイリドウイルス科 (Iridoviridae) (たとえばアフリカ豚熱ウイルス (African swine fever virus))と未分類ウイルス (たとえば海綿状脳症の病原因子 (etiologic agents))、D型肝炎ウイルスの因子、非A非B型肝炎の因子 (1類腸管伝染; 2類腸管外伝染、例えばD型肝炎) ; ノーウォーク (Norwalk) 及び関連するウイルスとアストロウイルス (astroviruses))を含むが、それらに限定されない。

【0069】

真菌の例として、アスペルギルス属 (Aspergillus) 種、コクシジオイデス・イミチス (Coccidioides immitis)、クリプトコックス・ネオフォルマンス (Cryptococcus neoformans)、カンジダ・アルビカンス (Candida albicans) 及び他のカンジダ属種、ブラストミセス・デルマチジス (Blastomyces dermatidis)、ヒストプラズマ・カプスラーツム (Histoplasma capsulatum)、クラミジア・トラコマチス (Chlamydiateachomatis)、ノカルディア属 (Nocardia) 種とニューモシスチス・カリニ (Pneumocystis carinii) を含む。

【0070】

寄生虫として、血液感染性及び / 又は組織寄生虫を含み、例えばバベシア・ミクロチ (Babesiamicroti)、バベシ・ディベルガンス (Babesidivergens)、赤痢アーマバ (Entamoebahistolytica)、ランブル鞭毛虫 (Giardalamblia)、リーシュマニア・トロピカ (Leishmania tropica)、リーシュマニア属 (Leishmania) 種、ブラジルリーシュマニア (Leishmaniabraziliensis)、ドノバンリーシュマニア (Leishmaniadonovdnii)、熱帯熱マラリヤ原虫 (Plasmodiumfalciparum)、四日熱マラリア原虫 (Plasmodiummalariae)、卵形マラリア原虫 (Plasmodiumovale)、三日熱マラリア原虫 (Plasmodium vivax)、トキソプラズマ (Toxoplasmagondii)、ガンビアトリパノソーマ (Trypanosoma gambiense)、ローデシアトリパノソーマ (Trypanosoma rhodesiense) (アフリカ睡眠病)、クルーズトリパノソーマ (Trypanosoma cruzi) (シャーガス病 (Chal-

10

20

30

40

50

gus' disease))とトキソプラズマ(Toxoplasma gondii)、ヒラムシ(flatworms)と回虫(roundworms)を含むが、それらに限定されない。

【0071】

「薬学的に許容される薬物担体」は、生理的に相容するいずれか及び全ての溶媒、分散媒体、コーティング、抗バクテリア剤と抗真菌剤、等張剤と吸收遅延剤などを含む。好ましい担体は、静脈内、筋肉内、皮下、非経口、脊髄(spinal)または表皮投与(たとえば注射や輸液の方式)に適用する。

【0072】

本発明の薬物組成物/ワクチン組成物は、本分野に既知された多種の方法で投与できる。当業者が理解するように、投与経路及び/又は方式は、所望の結果に応じて変化する。ある投与経路で本発明の化合物を投与するために、化合物の失活を防止する材料をそれにコーティングし、又は化合物と共に投与することもある。たとえば、被験者に、たとえばリボソームや希釈剤のような適切な担体にある化合物を投与しても良い。薬学的に許容される希釈剤は、塩溶液および水性緩衝液を含む。

【0073】

薬学的に許容される担体は、無菌水溶液または分散液、ならびに無菌注射用溶液または分散液の一時的調製のための無菌粉末を含む。薬物活性物質におけるこんな媒体と薬剤の応用は、当分野に公知なものである。

【0074】

以下、添付図面を参照して、本発明の好適な実施の形態を詳細に説明し、本発明の利点および特徴を、当業者により容易に理解させ、本発明の範囲をより明確に定義する。

材料と方法

本発明の具体的な実施例に採用された一部の材料と、試験方法は、以下に示される。本明細書に挙げられた材料と方法における言及されていないもの、及び本明細書に関する他の材料と方法は、いずれも先行技術に一般的な技術手段であり、本分野の当業者が、先行技術に従って得ることができ、ここで詳しく説明しない。

1、抗体

具体的な実施例には、抗マウスCD40とDR5抗体の重鎖可変領域と軽鎖配列は、既に前の研究に得られたものである(Li F, Ravetch JV. 2011. Inhibitory Fc gamma receptor engagement drives adjuvant and anti-tumor activities of agonistic CD40 antibodies. Science 333: 1030-4; Li F, Ravetch JV. 2012. Apoptotic and antitumor activity of death receptor antibodies require inhibitory Fc gamma receptor engagement. Proc Natl Acad Sci U S A 109: 10966-71)。抗ヒトCD40抗体の重鎖可変領域と軽鎖配列は、US7338660に開示された。

【0075】

本発明のヒトIgGの抗体重鎖定常領域配列(ヒトIgG1、IgG2、IgG3とIgG4の抗体重鎖定常領域を含む)は、既に前の研究に得られたものである(Li F, Ravetch JV. 2011. Inhibitory Fc gamma receptor engagement drives adjuvant and anti-tumor activities of agonistic CD40 antibodies. Science 333: 1030-4; Li F, Ravetch JV. 2012. Apoptotic and antitumor activity of death receptor antibodies require inhibitory Fc gamma receptor engagement. Proc Natl Acad Sci U S A 109: 10966-

10

20

30

30

40

50

71)が、無ければ遺伝子で合成する。本発明の抗体重鎖定常領域のバリエントは、上記のヒト Ig G の抗体の重鎖定常領域配列に基づき、点突然変異などの方法で構築するものである。用いられる抗体は、いずれも HEK 293T 細胞の一過性トランスフェクションで発現され、かつ protein G Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare) で上清を精製することで得られる。コントロールマウスとヒト Ig G 抗体は、Jackson ImmunoResearch Laboratory から購入したものである。

2、マウス

Fc 受容体欠損マウス、すなわち Fc 受容体 鎮欠損マウス (Fcgr^{-/-})、と Fc 受容体ヒト化マウス (Fcgr^{-/- hFCGR^{Tg}、hFCGR^{Tg}とも言う) は、既に文献に述べられた (Smith P, Dilillo DJ, Bourne S, Li F, Ravetch JV. 2012. Mouse model recapitulating human Fc gamma receptor structural and functional diversity. Proc Natl Acad Sci U S A 109: 6181-6)。Fc II受容体欠損マウス R2^{-/-} (Fcgr2b^{-/-}) と Fc RIIIB受容体ヒト化マウス R2^{-/- hR2B^{Tg} (Fcgr2b^{-/- hFCGR2B^{Tg}) は、既に文献に述べられた (Li F, Ravetch JV. 2011. Inhibitory Fc gamma receptor engagement drives adjuvant and anti-tumor activities of agonistic CD40 antibodies. Science 333: 1030-4; Li F, Ravetch JV. 2012. Apoptotic and antitumor activity of death receptor antibodies require inhibitory Fc gamma receptor engagement. Proc Natl Acad Sci U S A 109: 10966-71)。ヒトCD40 を発現するトランスジーンマウスは、ヒトCD40 を発現する BAC トランスジーンマウス (hCD40^{Tg}) である。hCD40⁺ マウスと hFCGR^{Tg} マウスとの交雑は、CD40 及び Fc 受容体均ヒト化のマウス (hCD40^{Tg} hFCGR^{Tg}) を得られ、同時に、hCD40⁺ マウスと、hFCGR2B^{Tg} を除く他の hFCGR^{Tg} を発現するマウス (hCD40^{Tg} hR2B^{-/-}) も得られる。全ての実験用マウスは、上海交通大学医学部動物科学センターに養殖され、全ての実験の開展は、中国法律と各規制に合致しつつ、上海交通大学医学部動物介護と使用委員会の許可を得る上に行われる。}}}

3、酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA) で抗 CD40 抗体の CD40 と結合する能の測定を分析する

抗ヒト CD40 抗体を分析する際に、組換えヒト CD40 タンパク質 (近岸タンパク質科技有限会社) で酵素プレートをコーティングし、常温において一晩し、室温で 1% BSA で 2 h ブロッキングした後に、PBST (0.05% Tween 20 を含む PBS) で三回洗浄し、各穴に、100 μL の勾配のように希釈されたヒトアゴニスト CD40 抗体を添加し、室温で 1 h で孵育した後に、PBST で四回洗浄し、濃度 100 ng / ml ビオチンでマークされた抗ヒト Ig G 軽鎖的二抗を添加し、室温で 1 h インキュベートした後に、PBST で四回洗浄し、適当な濃度の SAV-HRP を添加し、室温で 1 h インキュベートした後に、発色基質を添加し、5 分間後に、650 nm における吸光値を測定した。

【0076】

抗マウス CD40 抗体を分析する際に、組換えマウス CD40 タンパク質 (近岸タンパク質科技有限会社) でコーティングし、HRP でマークされたヤギ抗ヒト Ig G - Fc 抗体を二次抗体として検出を行う以外に、上記の実験方法と同じように行った。

4、OVA 特異性 CD8 陽性 T 細胞増幅モデル

2 - 4 月齢のマウスに、尾静脈注射より、2 × 10⁶ 個の、200 マイクロリットルの

10

20

30

40

50

PBSに再懸濁されたOT-I脾臓細胞(CD45.1⁺)を養子転移し、その後、腹腔内注射で免疫した。コントロールグループに、2マイクログラムのDEC-OVAタンパク質とコントロール抗体(Lif, Ravetch JV. 2011. Inhibitory Fc gamma receptor engagement drives adjuvant and anti-tumor activities of agonistic CD40 antibodies. Science 333: 1030-4)を注射し、残るグループに、2マイクログラムのDEC-OVAタンパク質と抗CD40抗体を注射した。6日後、マウス脾臓細胞を採取し、かつACK細胞溶解液で、赤血球を溶解した後に、FACS緩衝液(PBSに0.5%FBS、2mM EDTAと0.1%NaN₃を添加してなるもの)に再懸濁し、単個脾臓細胞の浮遊液を調製した；そして、フロー染色でOVA特異性CD8⁺T細胞(OT-1)の増幅を分析した。使われた抗体は、蛍光標識された抗マウスCD45.1、CD4、CD8、とTCR-V2抗体を含む。フロー分析には、DAPI染色で、死細胞を取り除き、CD45.1⁺/CD8⁺/TCR-V2⁺は、OT-1/CD8⁺T細胞に識別された。

5、マウス脾臓細胞の生体外刺激実験

マウス脾臓細胞を採取し、ACK細胞溶解液で赤血球を溶解した後に、脾臓細胞培養液(RPMI+10%FBS+1%P/S二重抗体)に再懸濁し、各穴に 2×10^5 細胞を播種し、勾配のように希釈されたアゴニスト抗CD40抗体で処理を行い、37度で48時間培養し、そしてFACSでマウスB細胞表面活化標識分子(CD80、CD86)の発現状況を分析した。活化標識分子の発現状況は、平均蛍光強度(MFI)に表れ、アゴニスト抗CD40抗体がB細胞を活性化する活性と正の相関関係である。

6、PBMC生体外刺激実験

Ficoll分離で、健康な人の末梢血单核細胞(PBMC)を得、各穴に 2×10^5 細胞を播種し、勾配のように希釈されたアゴニスト抗CD40抗体で処理し、37度で48時間培養し、そしてFACSでPBMCにおけるB細胞表面活化標識分子(CD54、CD80、CD86、HLA-DR)の発現状況を分析し、活化標識分子の発現状況は、平均蛍光強度(MFI)に表れ、アゴニスト抗CD40抗体がB細胞を活性化する活性と正の相関関係である。

7、ELISAで抗体とFcRとの結合特性を分析する

酵素プレートに、適当な濃度の100μLの抗体を添加し、一晩でコーティングし、上清を捨て、1%BSAを含むPBSで2時間ブロッキングし、PBST(0.05%Tween 20を含むPBS)で洗浄し、そして適当な濃度のbiotinにマークされたFcR細胞外ドメインタンパク質(北京義翹神州生物技術有限会社)を添加し、室温で1時間インキュベートした後に、上清を捨て、PBSTで洗浄した。Streptavidin-HRP(BD Biosciences)を添加し、室温で1時間インキュベートし、biotinタンパク質を検出し、上清を捨て、発色液を添加し、20-40分間発色した後、650nmにおける吸光値A650を測定した。

8、表面プラズモン共鳴

全ての表面プラズモン共鳴(SPR)分析実験に使用された緩衝システムは：10mM Hepes(pH 7.4)、150 mM NaCl、3.4 mM EDTA、0.005%界面活性剤P20、実験は、いずれもBiacore T100(GEヘルスケア)SPRシステムを行い、温度を25度に設定した。pH 4.5の条件において、アミンカップリングで、約2000の応答単位(response units、RUs)密度になるように、Hisにマークされた可溶性マウスFcR細胞外ドメインタンパク質(北京義翹神州生物技術有限会社)をCM5チップに固定した。二倍に勾配のように希釈された、適当な濃度範囲を有する抗体サンプルを、30 μL/minの速度で移動相に注入し、3分間結合した後に、5分間解離した。各分析サイクル終了の後、一定の濃度のNaOHを、50 μL/minの流速でセンサー表面に30秒間注入し、それを再生した。Biacore T100分析ソフトウェア(バージョン1.1、GEヘルスケア)に、チャネルが決まらない背景結合シグナルを排除した後、1:1の結

10

20

30

40

50

合動力学モードを採用し、フィッティング計算を行い、親和定数 K D 値を得た。

9、M C 3 8 腫瘍モデル

M C 3 8 は、マウス結腸がん細胞株であり、2～4月齢の h F C G R T g マウスに、皮下注射で 2×10^6 個の M C 3 8 細胞を接種し、3日ごとに、ノギスで腫瘍の大きさを測量し、かつ公式 ($L_1^2 \times L_2$) / 2 で腫瘍の体積を計算した；ただし、L 1 は、腫瘍組織の最短直径であり、L 2 は、最長直径である。腫瘍細胞を接種した7日後、腫瘍の大きさより、マウスをランダムにグループに分け(0日目)、腹腔内注射で、コントロールグループマウスに、31.6 μg のアイソタイプコントロール IgG を投与し、残るグループに 31.6 μg の相応抗体を投与した。3日目、0日目と同じ処理を与え、すなわちコントロールグループマウスにアイソタイプコントロール IgG を投与し、残るグループに相応抗体を投与した。その後、続けて腫瘍の大きさを測量し、腫瘍の体積を計算した。
10

【0077】

10、M O 4 腫瘍モデル

M O 4 は、マウス線維肉腫細胞株であり、2～4月齢の h F C G R T g マウスに、皮下注射で 2×10^6 個の M O 4 細胞を接種し、3日ごとに、ノギスで腫瘍の大きさを測量し、かつ公式 ($L_1^2 \times L_2$) / 2 で腫瘍の体積を計算した；ただし、L 1 は、腫瘍組織の最長直径であり、L 2 は、最短直径である。腫瘍細胞を接種した7日後、腫瘍の大きさより、マウスをランダムにグループに分け(0日目)、腹腔内注射で、コントロールグループマウスに、31.6 μg のアイソタイプコントロール IgG と 2 μg OVA 抗原 (DEC 205 抗体と OVA 融合タンパク質の形式として) を投与し、残るグループに 31.6 μg の相応抗体と 2 μg OVA 抗原 (DEC 205 抗体と OVA 融合タンパク質の形式として) を投与した。その後、続けて腫瘍の大きさを測量し、腫瘍の体積を計算した。
20

11、抗 D R 5 抗体の D R 5 と結合する能を分析する

異なる抗 D R 5 抗体が、D R 5 に対する結合能を分析するために、アイス F A C S 緩衝液 (P B S + 0.5% F B S + 2 mM E D T A + 0.1% N a N 3) で M C 3 8 細胞を再懸濁し、3.16倍の勾配のように希釈されたコントロールと抗 D R 5 抗体を添加し、濃度範囲を 2 n g - 20 μg / mL にし、室温で 15 分間インキュベートした後、アイス F A C S 緩衝液で二回洗浄した；そして、F I T C マークされたヤギ抗ヒト抗体 (V E C T O R F I - 3080) でフロー染色し、氷上に、暗所で 25 分間インキュベートし、F A C S 緩衝液で二回洗浄し、そしてフロー分析を行った。抗体が D R 5 と結合する能は、F I T C 平均蛍光強度 (M F I) と正の相関関係であり、結果としては、抗 D R 5 抗体の D R 5 と結合する能は、同等であることを表す。
30

12、抗 D R 5 抗体が、アポトーシスを促進する活性を分析する

抗 D R 5 抗体が、アポトーシスを促進する活性を分析するために、M C 3 8 細胞を、平底 96 ウェルプレートに播種し、一晩に培養し、培養液を捨て、各穴に 100 μL の新しい培養液 (当該培養液には、それぞれに 10^6 個の F c g R - / - 、h F C G R T g 遺伝子型 (B 6 背景) のマウス赤血球を溶解したなる脾臓細胞を含む/含まない) を添加し、同時に、各穴に別に、1 μg / mL 2 B 6 抗体を含む/含まない 1 μg / mL コントロール又は抗 D R 5 抗体を有する 100 μL 新しい培養液を添加し、37℃ で 4 時間インキュベートした。96 ウェルプレートを取り出し、氷上に置き、静かに上清を吸引して捨て、200 μL のアイス P B S で洗浄した；100 μL のトリプシンで 3 - 5 分間消化し、等体積の全培養液で終了し、細胞を採取し、4℃、400 × g で 5 分間遠心分離し、収集し、そして、C D 4 5 抗体 (clone : 30 - F 11 ; Bi o l e g e n d) で表面分子フロー染色を行い、さらに活性化された caspase - 3 の細胞内染色 (抗体 clone C 9 2 - 6 0 5 ; B D B i o s c i e n c e s) を行い、フロー分析した。M C 3 8 細胞に、順に前方散乱角 F S C と側散乱角 S S C 、及び C D 4 5 陰性で丸をつけ、活性化された caspase - 3 (活性化型カスパー) の発現を分析した。アポトーシスを促進する能は、活性化された caspase - 3 の染色の平均蛍光強度 (M F I) と正の相関関係である。
40

実施例 1 . 本発明の重鎖定常領域、及び本発明の重鎖定常領域配列を含むアゴニスト抗体

上記に言及された遺伝子クローニングと発現精製技術によって、本発明が、一連の異なる重鎖定常領域の具体的な実施例を構築して、これらの重鎖定常領域に基づき、抗ヒトC D 4 0 或いは抗マウス C D 4 0 の抗体、及び抗マウス D R 5 の抗体を構築した。

【0078】

要するに、本発明の具体的な実施例において、重鎖定常領域は、C H 1 - ヒンジ領域部分及びC H 2 - C H 3 ドメイン部分を含む二つの部分に分けられ、最適化を研究した。上記のC H 1 - ヒンジ領域部分とは、抗体C H 1 ドメインとヒンジ領域からなるセクションであり、C H 2 - C H 3 ドメイン部分とは、抗体C H 2 ドメインとC H 3 ドメインからなるセクションである。具体的な実施例において、C H 1 - ヒンジ領域が、突然変異がないh I g G 1 のC H 1 - ヒンジ領域 (SEQ ID NO: 1)、或いはh I g G 2 のC H 1 - ヒンジ領域 (SEQ ID NO: 2)、或いはh I g G 3 のC H 1 - ヒンジ領域 (SEQ ID NO: 3)、或いはh I g G 4 のC H 1 - ヒンジ領域 (SEQ ID NO: 4) を採用する；C H 2 - C H 3 ドメインが、突然変異がないh I g G 1 のC H 2 - C H 3 ドメイン (SEQ ID NO: 5)、或いはh I g G 2 のC H 2 - C H 3 ドメイン (SEQ ID NO: 6)、或いはh I g G 3 のC H 2 - C H 3 ドメイン (SEQ ID NO: 7)、或いはh I g G 4 のC H 2 - C H 3 ドメイン (SEQ ID NO: 8)、或いはh I g G 1 のC H 2 - C H 3 ドメインに基づきアミノ酸突然変異があるC H 2 - C H 3 ドメインを採用する；h I g G 1 のC H 2 - C H 3 ドメインに基づきアミノ酸突然変異があるC H 2 - C H 3 ドメインとは、たとえば：V 1 1 突然変異を有するC H 2 - C H 3 ドメイン (SEQ ID NO: 9) は、h I g G 1 のC H 2 - C H 3 ドメインに基づき、G 2 3 7 D / P 2 3 8 D / H 2 6 8 D / P 2 7 1 G / A 3 3 0 R が突然変異して得るC H 2 - C H 3 ドメイン；V 9 突然変異を有するC H 2 - C H 3 ドメイン (SEQ ID NO: 10) は、h I g G 1 のC H 2 - C H 3 ドメインに基づきG 2 3 7 D / P 2 3 8 D / P 2 7 1 G / A 3 3 0 R が突然変異して得るC H 2 - C H 3 ドメインである。

【0079】

本発明の重鎖定常領域の実施例において、重鎖定常領域の配列は、相応的なC H 1 - ヒンジ領域配列及びC H 2 - C H 3 ドメイン配列を組み合わせて得るものである。本発明の重鎖定常領域の実施例の詳しい情報について、表2を参照する。

【0080】

注意すべきのは、表2に関わる重鎖定常領域の実施例は、いずれもヒトのI g G に基づき構築され、h I g G 1、h I g G 2、h I g G 3 とh I g G 4 は、それぞれにヒトのI g G 1、I g G 2、I g G 3 とI g G 4 を表示する。表2には、一部の配列が、突然変異を有して、具体的な突然変異列は、括弧に記載され、かつ突然変異する具体的なアミノ酸のシリアルナンバーは、I g G EU番号に基づくものである。

【0081】

以下に、具体的な例を挙げて、表2に記載された重鎖定常領域の構造を説明する。G 1 と呼ばれる重鎖定常領域のC H 1 - ヒンジ領域の由来は、h I g G 1 であり、C H 2 - C H 3 ドメインの由来は、h I g G 1 であり、そして、G 1 の配列は、突然変異がないh I g G 1 のC H 1 - ヒンジ領域の配列と、突然変異がないh I g G 1 C H 2 - C H 3 ドメインの配列とを寄せ集めてなるものである。V 1 1 (H 2)と呼ばれる重鎖定常領域（本明細書には、J A C 1 とも言う）のC H 1 - ヒンジ領域の由来は、h I g G 2 であり、C H 2 - C H 3 ドメインの由来は、G 2 3 7 D / P 2 3 8 D / H 2 6 8 D / P 2 7 1 G / A 3 3 0 R 突然変異を有するh I g G 1 であり、そして、V 1 1 (H 2)の配列 (SEQ ID NO: 11) は、突然変異がないh I g G 2 のC H 1 - ヒンジ領域の配列と、G 2 3 7 D / P 2 3 8 D / H 2 6 8 D / P 2 7 1 G / A 3 3 0 R 突然変異を有するh I g G 1 C H 2 - C H 3 ドメインの配列とを寄せ集めてなるものである。他の重鎖定常領域の実施例の配列は、いずれも表2及び本発明に添付された配列表から得る。

【0082】

【表2】

表2：本発明の重鎖定常領域の実施例。

重鎖定常領域名称	CH1－ヒンジ領域の由来	CH2－CH3ドメインの由来 (CH2－CH3ドメインが有する突然変異)	配列番号
G 1	h Ig G 1	h Ig G 1	
G 2	h Ig G 2	h Ig G 2	
G 3	h Ig G 3	h Ig G 3	
G 4	h Ig G 4	h Ig G 4	
V 1 1 (H 1)	h Ig G 1	h Ig G 1 (G 2 3 7 D / P 2 3 8 D / H 2 6 8 D / P 2 7 1 G / A 3 3 0 R)	
V 9 (H 1)	h Ig G 1	h Ig G 1 (G 2 3 7 D / P 2 3 8 D / P 2 7 1 G / A 3 3 0 R)	
V 1 1 (H 2)、JAC 1とも言う	h Ig G 2	h Ig G 1 (G 2 3 7 D / P 2 3 8 D / H 2 6 8 D / P 2 7 1 G / A 3 3 0 R)	SEQ ID NO : 11
V 9 (H 2)、JAC 2とも言う	h Ig G 2	h Ig G 1 (G 2 3 7 D / P 2 3 8 D / P 2 7 1 G / A 3 3 0 R)	SEQ ID NO : 12
V 1 1 (H 3)	h Ig G 3	h Ig G 1 (G 2 3 7 D / P 2 3 8 D / H 2 6 8 D / P 2 7 1 G / A 3 3 0 R)	
G 3 (H 2)	h Ig G 2	h Ig G 3	
G 2 (H 3)	h Ig G 3	h Ig G 2	
G 1 (H 2)	h Ig G 2	h Ig G 1	
G 1－NA	h Ig G 1	h Ig G 1 (N 2 9 7 A)	
G 2－NA	h Ig G 2	h Ig G 2 (N 2 9 7 A)	
G 2－SELF、JAC 3とも言う	h Ig G 2	h Ig G 2 (S 2 6 7 E / L 3 2 8 F)	SEQ ID NO : 13
G 2－SE	h Ig G 2	h Ig G 2 (S 2 6 7 E)	
G 2－LF	h Ig G 2	h Ig G 2 (L 3 2 8 F)	
G 2－HD PG、JAC 4とも言う	h Ig G 2	h Ig G 2 (H 2 6 8 D / P 2 7 1 G)	SEQ ID NO : 14
G 2－PG	h Ig G 2	h Ig G 2 (P 2 7 1 G)	
G 2－HD	h Ig G 2	h Ig G 2 (H 2 6 8 D)	
G 2－GDP DH	h Ig G 2	h Ig G 2 (G 2 3 7 D / P 2 3 8 D / H 2 6 8 D / P 2 7 1 G)	
G 1－SELF	h Ig G 1	h Ig G 1 (S 2 6 7 E / L 3 2 8 F)	
G 1－SDIE	h Ig G 1	h Ig G 1 (S 2 3 9 D / I 3 3 2 E)	
G 1－SE	h Ig G 1	h Ig G 1 (S 2 6 7 E)	
G 1－SDSE	h Ig G 1	h Ig G 1 (S 2 3 9 D / S 2 6 7 E)	
G 1－S 2 3 6 D	h Ig G 1	h Ig G 1 (S 2 3 6 D / S 2 6 7 E)	

10

20

30

40

S E			
G 1-GASDA L I E	h I g G 1	h I g G 1 (G 2 3 6 A / S 2 3 9 D / A 3 3 0 L / I 3 3 2 E)	
G 2-GASDA L I E	h I g G 2	h I g G 1 (G 2 3 6 A / S 2 3 9 D / A 3 3 0 L / I 3 3 2 E)	
G 2-S D I E	h I g G 2	h I g G 1 (S 2 3 9 D / I 3 3 2 E)	

【 0 0 8 4 】

本発明の具体的な実施例に構築された抗体は、いずれもヒト抗体或いはキメラ抗体（全ての抗体定常領域は、ヒト由来であり、抗ヒトCD40抗体のCDRは、ヒト由来であり、抗マウスCD40と抗マウスDR5抗体のCDRは、マウス由来である）であり、ただし、ヒト抗ヒトCD40或いはヒト抗マウスCD40の抗体及びヒト抗マウスDR5の抗体は、いずれも相応的な本発明の重鎖定常領域に基づくものであり、そして、相応的な番号は、主に異なる重鎖定常領域によって分けられ、本発明の実施例に関わる抗体の具体的な情報は、表3を参照する。本発明の実施例において、同じ抗原に対する抗体は、同じ軽鎖配列及び同じ重鎖可変領域配列を有するが、重鎖定常領域の配列は異なる。たとえば：本発明の実施例において、ヒト抗ヒトCD40の抗体（Anti-hCD40-hIgG）は、同じ軽鎖配列（SEQ ID NO: 47）及び同じ重鎖可変領域配列を有する；実際に、本発明の抗ヒトCD40抗体（Anti-hCD40-hIgG）の軽鎖配列、重鎖可変領域配列は、アゴニスト抗体CP-870893の軽鎖配列、重鎖可変領域配列と同じが、CP-870893は、最初にPfizerに開発され、hCD40標的に対する全ヒトIgG2アゴニスト抗体であり、固形腫瘍の免疫療法及びワクチン活性の増強に用いられる。本発明の実施例において、ヒト抗マウスCD40の抗体（Anti-mCD40-hIgG）は、同じ軽鎖配列（SEQ ID NO: 48）及び同じ重鎖可変領域配列を有する；本発明の実施例において、ヒト抗マウスDR5の抗体（Anti-mDR5-hIgG）は、同じ軽鎖配列（SEQ ID NO: 49）及び同じ重鎖可変領域配列を有する。

10

20

30

【 0 0 8 5 】

注意すべきのは、本発明の一部の抗体の実施例は、実際に異なる抗体セクションを応用して構築された融合タンパク質と見なされても良い、それは、構造の形式に、抗体の特徴をとどめられるが、具体的な各の機能部分は、異なる抗体IgGサブタイプ由來のものである可能性があり、一部が、更にアミノ酸突然変異を有する。したがって、本発明の実施例の重鎖定常領域の配列は、さらに他の本発明以外の、上記の実施例に提供されたアゴニスト抗体又は融合タンパク質に応用されたも良いことが理解される。

40

【 0 0 8 6 】

一つの具体的な実施例において、特異性結合抗原の抗体の重鎖可変領域と軽鎖が、本発明に提供された重鎖定常領域に融合され、効果が増強された他の抗体を得っても良い、たとえば：上記の表1の記載された研究中のアゴニスト抗体の重鎖可変領域と軽鎖が、本発明に提供されたJAC1と融合して、活性が増強された、異なるTNFRに対する抗体を得られる。

【 0 0 8 7 】

他の一つの具体的な実施例において、特異性結合抗原の抗原結合モジュールが、本発明に提供された重鎖定常領域と融合して、効果が増強された融合タンパク質を得っても良い、たとえば：CD40と特異性に結合するナノボディ（nanobody）が、本発明に提供されたJAC1と融合して、活性が増強された融合タンパク質を得られる。

50

【 0 0 8 8 】

もう一つの実施例において、本発明の抗体は、ヒト抗体であっても良く、キメラ抗体、ヒト化抗体などであっても良い。

【 0 0 8 9 】

50

【表3】

表3：本発明の抗体の実施例の具体的な情報。

抗体名称	抗原	軽鎖配列番号	重鎖配列番号	重鎖定常領域名 称
Anti-mCD 40-hIgG1	マウスCD40	SEQ ID NO: 48	SEQ ID NO: 15	G1
Anti-hCD 40-hIgG1	ヒトCD40	SEQ ID NO: 47	SEQ ID NO: 16	G1
Anti-mCD 40-hIgG2	マウスCD40	SEQ ID NO: 48	SEQ ID NO: 17	G2
Anti-hCD 40-hIgG2	ヒトCD40	SEQ ID NO: 47	SEQ ID NO: 18	G2
Anti-mCD 40-hIgG3	マウスCD40	SEQ ID NO: 48	SEQ ID NO: 19	G3
Anti-hCD 40-hIgG3	ヒトCD40	SEQ ID NO: 47	SEQ ID NO: 20	G3
Anti-mCD 40-hIgG4	マウスCD40	SEQ ID NO: 48	SEQ ID NO: 21	G4
Anti-hCD 40-hIgG4	ヒトCD40	SEQ ID NO: 47	SEQ ID NO: 22	G4
Anti-hCD 40-hIgG1 (V9)	ヒトCD40	SEQ ID NO: 47	SEQ ID NO: 23	V9 (H1)
Anti-mCD 40-hIgG1 (V11)	マウスCD40	SEQ ID NO: 48	SEQ ID NO: 24	V11 (H1)
Anti-hCD 40-hIgG1 (V11)	ヒトCD40	SEQ ID NO: 47	SEQ ID NO: 25	V11 (H1)
Anti-mCD 40-hIgG2 (V11)	マウスCD40	SEQ ID NO: 48	SEQ ID NO: 26	V11 (H2)、 JAC1とも言 う
Anti-hCD 40-hIgG2 (V11)	ヒトCD40	SEQ ID NO: 47	SEQ ID NO: 27	V11 (H2)、 JAC1とも言 う
Anti-mCD 40-hIgG3 (V11)	マウスCD40	SEQ ID NO: 48	SEQ ID NO: 28	V11 (H3)
Anti-hCD	ヒトCD	SEQ ID	SEQ ID	V11 (H3)

10

20

30

40

【0090】

4 0 - h I g G 3 (V 1 1)	4 0	NO : 4 7	NO : 2 9	
A n t i - m C D 4 0 - h I g G 2 (H 3)	マウス C D 4 0	S E Q NO : 4 8	I D NO : 3 0	G 2 (H 3)
A n t i - h C D 4 0 - h I g G 2 (H 3)	ヒト C D 4 0	S E Q NO : 4 7	I D NO : 3 1	G 2 (H 3)
A n t i - m C D 4 0 - h I g G 3 (H 2)	マウス C D 4 0	S E Q NO : 4 8	I D NO : 3 2	G 3 (H 2)
A n t i - h C D 4 0 - h I g G 3 (H 2)	ヒト C D 4 0	S E Q NO : 4 7	I D NO : 3 3	G 3 (H 2)
A n t i - m C D 4 0 - h I g G 1 -NA	マウス C D 4 0	S E Q NO : 4 8	I D NO : 3 4	G 1-NA
A n t i - h C D 4 0 - h I g G 1 -NA	ヒト C D 4 0	S E Q NO : 4 7	I D NO : 3 5	G 1-NA
A n t i - m C D 4 0 - h I g G 2 -NA	マウス C D 4 0	S E Q NO : 4 8	I D NO : 3 6	G 2-NA
A n t i - h C D 4 0 - h I g G 2 -NA	ヒト C D 4 0	S E Q NO : 4 7	I D NO : 3 7	G 2-NA
A n t i - h C D 4 0 - h I g G 2 -SE	ヒト C D 4 0	S E Q NO : 4 7	I D NO : 3 8	G 2-SE
A n t i - h C D 4 0 - h I g G 2 -LF	ヒト C D 4 0	S E Q NO : 4 7	I D NO : 3 9	G 2-LF
A n t i - h C D 4 0 - h I g G 2 -SELF	ヒト C D 4 0	S E Q NO : 4 7	I D NO : 4 0	G 2-S E L F、JAC3と も言う
A n t i - h C D 4 0 - h I g G 2 -HD	ヒト C D 4 0	S E Q NO : 4 7	I D NO : 4 1	G 2-HD
A n t i - h C D 4 0 - h I g G 2 -PG	ヒト C D 4 0	S E Q NO : 4 7	I D NO : 4 2	G 2-PG

10

20

30

40

A n t i - h C D 4 0 - h I g G 2 -H D P G	ヒト C D 4 0	S E Q I D NO : 4 7	S E Q I D NO : 4 3	G 2 - H D P G、 J A C 4 と も言う
A n t i - m D R 5 - h I g G 2	マウス D R 5	S E Q I D NO : 4 9	S E Q I D NO : 4 4	G 2
A n t i - m D R 5 - h I g G 1 (V 1 1)	マウス D R 5	S E Q I D NO : 4 9	S E Q I D NO : 4 5	V 1 1 (H 1)
A n t i - m D R 5 - I g G 2 (V 1 1)	マウス D R 5	S E Q I D NO : 4 9	S E Q I D NO : 4 6	V 1 1 (H 2)、 J A C 1 とも言 う
A n t i - m C D 4 0 - h I g G 1 - S D I E	マウス C D 4 0	S E Q I D NO : 4 8	S E Q I D NO : 5 0	G 1 - S D I E
A n t i - m C D 4 0 - h I g G 2 - S D I E	マウス C D 4 0	S E Q I D NO : 4 8	S E Q I D NO : 5 1	G 1 - S D I E
A n t i - m C D 4 0 - h I g G 2 - G A S D A L I E	マウス C D 4 0	S E Q I D NO : 4 8	S E Q I D NO : 5 2	G 1 - G A S D A L I E
A n t i - m C D 4 0 - h I g G 1 (H 2)	マウス C D 4 0	S E Q I D NO : 4 8	S E Q I D NO : 5 3	G 1 (H 2)
A n t i - m D R 5 - h I g G 1 - G A S D A L I E	マウス D R 5	S E Q I D NO : 4 9	S E Q I D NO : 5 4	G 1 - G A S D A L I E

10

20

30

【 0 0 9 2 】

上記に言及された酵素結合免疫吸着検定（E L I S A）方法を応用して、本発明の抗 C D 4 0 抗体の実施例の C D 4 0 と結合する能を測定した。図 3 に示されたように、抗マウス C D 4 0 の抗体（図 3 A）及び抗ヒト C D の抗体（図 3 B）は、いずれも C D 4 0 と結合する能のテストを行った。結果は、本発明の実施例に構築された抗 C D 4 0 の抗体は、いずれも C D 4 0 に対する結合能を有することを示す。注意すべきのは、本実験の E L I S A 分析が、他のバリエントと比べて、A n t i - h C D 4 0 - h I g G 2 と A n t i - h C D 4 0 - h I g G 2 (V 1 1) の h C D 4 0 に対する結合能は、より低いことを示す。結合能が比較的に低い A n t i - h C D 4 0 - h I g G 2 (V 1 1) が、生体内外の実験に、いずれも活性に優位を示したことを考慮すると、抗ヒト C D 4 0 抗体（A n t i - h C D 4 0 - h I g G ）のバリエントが、ヒト C D 4 0 に対する結合能には、著しくい格差を有しないと判断した。

実施例 2 . ヒト I g G アゴニスト抗体の活性が、抗体 F c と F c 受容体との互いに作用に依存する

ヒト I g G アゴニスト抗体の活性は、抗体 F c と F c 受容体との互いに作用に調節されるかどうかを研究するために、四種の I g G サブタイプ（h I g G 1、h I g G 2、h I g G 3、h I g G 4）のアゴニスト抗マウス C D 4 0 抗体（A n t i - m C D 4 0 - h I g G 1、A n t i - m C D 4 0 - h I g G 2、A n t i - m C D 4 0 - h I g G 3、A n t i - m C D 4 0 - h I g G 4）は、モデル抗体（図 2 A）として、真っ先に、その免

40

50

疫活性化活性は、Fc受容体の発現に影響されるかどうかという研究に用いられる。

【0093】

アゴニストCD40が、抗原特異性の細胞活性を促進し、かつ抗原特異性CD8陽性T細胞の活性と増幅する免疫活性化活性を有するから、アゴニストヒト抗マウスCD40抗体(Anti-mCD40-hIgG)が、OVA免疫されたマウスに、OVAパターン抗原特異性CD8陽性T細胞の活性と増幅を促進する能は、その免疫活性化活性(Science. 2011 Aug 19; 333(6045): 1030-4)の評価に使用された。当該分析において、マウスは、まずOVA特異性CD8陽性T細胞(OT-I T細胞)に養子送達を行われ、1日後、抗原DEC-OVA(OVAと抗DEC205抗体の融合タンパク質であり、OVA抗原を有効的に送達する手段である)と抗CD40抗体に免疫され、そして、マウスが免疫された6日後、OT-I T細胞の増幅を分析する。

10

【0094】

図4に示されたように、投与量が比較に高い(30μg/マウス)Anti-mCD40-hIgG1、Anti-mCD40-hIgG2、Anti-mCD40-hIgG4抗体のいずれかは、Fc受容体ヒト化マウス(hFCGR^{Tg})に活性を有するが、同じ条件において、Anti-mCD40-hIgG1、Anti-mCD40-hIgG2、Anti-mCD40-hIgG4は、Fc受容体欠損マウス(Fcgr^{-/-})に明らかな活性を見られなかった(図3A)。アゴニストヒトIgG抗マウスCD40抗体の活性に対して、Fc受容体の発現は必要なものであることを表す。

20

【0095】

研究アゴニストヒトIgG抗マウスCD40抗体は、Fc受容体と結合する能を有する必要があるかどうかを研究するために、N297のグリコシル化サイトの点突然変異(N297A)は、ヒトIgG2抗マウスCD40抗体(Anti-mCD40-hIgG2)に導入され、そして、Anti-mCD40-hIgG2-NAを得た。Anti-mCD40-hIgG2-NA抗体Fcの、Fc受容体と結合する能が失せて(図6)、OVAワクチンモデルにおける、Anti-mCD40-hIgG2-NA抗体が誘導する、OT-I T細胞を活性化と増幅する活性も完全に失せて(図3B)、ヒトAnti-mCD40-hIgG2抗体の免疫活性化能は、抗体FcのFc受容体と結合する能に依存することを表す。

30

実施例3.ヒト抑制性Fc受容体(hFcRIIB)と抗体Fcとの特異性互いに作用がアゴニストヒト抗CD40抗体の活性を促進する。

【0096】

Fc受容体ファミリーに、具体的にヒトIgGアゴニスト抗体の活性依存を提供する、Fc-Fc受容体と互いに作用する特定なFc受容体を分析するために、ヒト抑制性Fc受容体hFcRIIBの貢献は、更に分析された。抑制性Fc受容体ヒト化マウス(Fcgr2b^{-/-}-hFCGR2B^{Tg})とコントロールマウス(Fcgr2b^{-/-})において、Anti-mCD40-hIgG2抗体は、Fcgr2b^{-/-}マウスにおける活性(図4C)を有しないが、抑制性Fc受容体ヒト化マウス(Fcgr2b^{-/-}-hFCGR2B^{Tg})における活性(約80%近いOT-I CD8⁺、図4C)は、全てのヒトFc受容体を発現するヒト化マウス(hFCGR^{Tg})における活性(約60-80%近いOT-I CD8⁺、図4A)と相当する；それは、ヒト抑制性Fc受容体は、Anti-mCD40-hIgG2をサポートする活性を十分に提供できることを説明した。

40

【0097】

同時に、Anti-hCD40-hIgG1、Anti-hCD40-hIgG2、Anti-hCD40-hIgG3、Anti-hCD40-hIgG4が、生体外に、マウスB細胞促進活性化標識分子(CD80、CD86)の発現を刺激する際に、異なるFc受容体環境(hCD40^{Tg}hFCGR^{Tg}、hCD40^{Tg}hR2B^{-/-})は、抗体の活性に著しくに影響した(図5)。ヒトAnti-hCD40-hIgG1、An

50

t i - h C D 4 0 - h I g G 2 及び A n t i - h C D 4 0 - h I g G 4 の活性は、 h C D 4 0 T g / h F C G R T g に良いが、 h C D 4 0 T g h R 2 B - / - の環境に弱くて、 ほぼ完全に消えた；同時にヒト抑制性 F c 受容体 (h F c g R I I B) の特異性抗体 2 B 6 も、著しくに A n t i - h C D 4 0 - h I g G 抗体の活性を抑制でき、ヒト抑制性 F c 受容体が、ヒト I g G (h I g G 1 、 h I g G 2 、 h I g G 4) の抗ヒト C D 4 0 抗体の活性に対して、決定的な正の調節作用を有する。これは、ヒト I g G (h I g G 1 、 h I g G 2 、 h I g G 4) の抗マウス C D 4 0 抗体に基づく研究結果と一致し、ヒト抑制性 F c 受容体と、 I g G 抗体 F c との相互作用が、ヒト I g G (h I g G 1 、 h I g G 2 、 h I g G 4) 抗 C D 4 0 抗体活性に正の調節を行うことは、一般的な規則であることを更に説明した。

10

【 0 0 9 8 】

既存の他の文献が、アゴニスト抗体のアゴニスト活性は、それと抑制性 F c 受容体との結合に依存することを記載して、かつ本発明の試験は、当該規則を更に検証しただけではなく、かつ同じ重鎖定常領域を移植することで、異なる抗原に対するアゴニスト抗体は、基本的に類似する F c 結合モード及びアゴニスト活性を有させる傾向があることを表す。たとえば：上記の実施例において、 A n t i - m C D 4 0 - h I g G 2 と A n t i - h C D 4 0 - h I g G 2 が、同じ重鎖定常領域を有するが、 A n t i - m C D 4 0 - h I g G 2 の抗原は m C D 4 0 で、 A n t i - h C D 4 0 - h I g G 2 の抗原は h C D 4 0 である。 E L I S A 、 O V A モデル及び P M B C 刺激試験が、 A n t i - m C D 4 0 - h I g G 2 と A n t i - h C D 4 0 - h I g G 2 は基本的に類似する F c 結合モード及びアゴニスト活性を有することを示す。そして、重鎖定常領域は、アゴニスト抗体のアゴニスト活性を最適化する要所であり、かつ好ましい重鎖定常領域は、異なる抗原に対するアゴニスト抗体に広くに応用され、類似する F c 結合モード及びアゴニスト活性を得る。そのため、本発明が、重鎖定常領域を選別した。

20

実施例 4 . 好ましい、より良いヒト抑制性 F c 受容体結合能と傾向性を有するヒト I g G 重鎖定常領域の選択。

【 0 0 9 9 】

より良い活性のアゴニスト抗体は、高い F c R I I B 受容体親和性を有することを要求する以外に、更に高い抑制性 F c 受容体：活性化性 F c 受容体親和性比率 (I : A 比率) を有することも必要とすることを表明した研究は、かなりがある。ヒト抑制性 F c 受容体と I g G 抗体 F c との相互作用が、ヒト I g G (h I g G 1 、 h I g G 2 、 h I g G 4) 抗 C D 4 0 抗体活性に対する正の調節作用は、抗体活性の増強に応用できることを分析するために、より良いヒト抑制性 F c 受容体結合能と傾向性を有する重鎖定常領域配列を取捨選択を行う必要が有る。ヒト I g G 1 に基づく複数な重鎖定常領域配列バリエントは、既により良いヒト抑制性 F c 受容体結合能と傾向性を有することを報道されたが、他の I g G サブタイプ (h I g G 2 、 3 、 4) 重鎖定常領域配列に基づく、より良いヒト抑制性 F c 受容体結合能と傾向性を有する定常領域配列は、まだ明確されない。そのため、選別と分析する必要が有る。ヒト I g G 重鎖定常領域と抑制性 F c 受容体の結合能は、親和性で計測するが、抑制性 F c 受容体の傾向性は、 I / A 比率で計測する。より良い抑制性 F c 受容体結合能と傾向性を有するヒト I g G (h I g G 2 、 h I g G 4) 重鎖定常領域を取捨選択するために、まず、選択されようとする重鎖定常領域或いは定常領域の F c 部分が、ヒト F c 受容体 (抑制性 F c 受容体 (ヒト F c R I I B)) と、ならびに活性化性 F c 受容体 (ヒト F c R I 、 F c R I I A 、 F c R I I I A 、 F c R I I I B を含む) を含む) と結合する能を比較し、より良いヒト抑制性 F c 受容体結合能 (結合親和性は、ヒト I g G 1 と相当し、或いはより高い) と傾向性 (I / A 比率は、ヒト I g G 1 より大きいか等しい) を有するヒト I g G 重鎖定常領域或いは定常領域の F c 部分を選択する。好ましくに、上記の抗体重鎖定常領域のヒト F c R I I B との親和性は、ヒト I g G 1 のヒト F c R I I B との親和性の 3 . 2 倍又は以上であり、上記の抗体重鎖定常領域の I / A 比率は、 0 . 3 2 より大きいか等しいである；同様に好ましくに、上記の抗体重鎖定常領域のヒト F c R I I B との親和性は、ヒト I g G 1

30

40

50

のヒト F c R I I B との親和性より大きいか等しいであり、上記の抗体重鎖定常領域の I / A 比率は、1 より大きいか等しいである；より好ましくに、上記の抗体重鎖定常領域のヒト F c R I I B との親和性は、ヒト Ig G 1 のヒト F c R I I B との親和性の 30 倍又は以上であり、上記の抗体重鎖定常領域の I / A 比率は、1 より大きいか等しいである；より好ましくに、上記の抗体重鎖定常領域のヒト F c R I I B との親和性は、ヒト Ig G 1 のヒト F c R I I B との親和性の 60 倍又は以上であり、上記の抗体重鎖定常領域の I / A 比率は、40 より大きいか等しいである；特に好ましくに、上記の抗体重鎖定常領域のヒト F c R I I B との親和性は、ヒト Ig G 1 のヒト F c R I I B との親和性の 90 倍又は以上であり、上記の抗体重鎖定常領域の I / A 比率は、100 より大きいか等しいである。

10

【 0100 】

選択されようとする重鎖定常領域配列は、自然の、一つ又は以上の部位特異的突然変異を有する、或いは一つ又は以上のランダム突然変異を有するヒト Ig G 重鎖定常領域配列を含む；選択されようとする重鎖定常領域の F c 部分は、自然の、一つ又は以上の部位特異的突然変異を有する、或いは一つ又は以上のランダム突然変異を有する各 F c 配列を含む。選択されようとする重鎖定常領域或いは定常領域の F c 部分の、F c 受容体結合能を分析することで、ヒト Ig G 1 定常領域の F c 部分に基づく突然変異体 V 1 1、V 9 は、より良いヒト抑制性 F c 受容体結合能と傾向性を有することは見出され（表 4）、これらの重鎖定常領域の F c 部分は、ヒト Ig G 重鎖定常領域の他の部分（C H 1 - ヒンジ領域）と結合でき、選択されようとするヒト Ig G 重鎖定常領域を得る。更に、選択されようとする完全なヒト Ig G 重鎖定常領域配列の F c 受容体結合能を分析し、これらの抗体は、より良いヒト抑制性 F c 受容体結合能と傾向性を有するか否かを検証し、J A C 1（V 1 1 F c 配列を有するヒト Ig G 2 重鎖定常領域）と J A C 2（V 9 F c 配列を有するヒト Ig G 2 重鎖定常領域）を有する重鎖定常領域は、より良いヒト抑制性 F c 受容体結合能と傾向性を有するヒト Ig G 2 重鎖定常領域配列（図 6）であることを見出した。同時に、選択されようとするヒト Ig G 2 重鎖定常領域配列には、J A C 3（S 2 6 7 E / L 3 2 8 F 点突然変異を有するヒト Ig G 2 重鎖定常領域配列）和 J A C 4（H 2 6 8 D / P 2 7 1 G 点突然変異を有するヒト Ig G 2 重鎖定常領域配列）重鎖定常領域配列も、より良いヒト抑制性 F c 受容体結合能と傾向性を有する（図 6）ことを見出された。

20

【 0101 】

30

【表4】

表4 : IgG 重鎖定常領域のFc断片と人Fc γ 受容体との親和性(KD) ; 全ての親和性は、解離定数(KD)に表示され、KD値は、表面プラスモン共鳴試験で測定された。

抗体Fc 断片	hFc γ RI	hFc γ RIIA -R13 1	hFc γ RIIB	hFc γ R111 A-F158	hFc γ R IIB結合 を向上する 倍率	I/A比率 *
G1	5.2 × 10 ⁻⁹	1.2 × 10 ⁻⁶	3.0 × 10 ⁻⁶	6.7 × 10 ⁻⁶	1	0.40
G2	結合しない	>10 ⁻⁵	>10 ⁻⁵	>10 ⁻⁵	<0.4	~1
G1-S E	2.6 × 10 ⁻⁹	9.8 × 10 ⁻⁸	8.3 × 10 ⁻⁸	結合しない	3.6	1.18
G1-S DIE	2.0 × 10 ⁻¹¹	1.2 × 10 ⁻⁷	1.7 × 10 ⁻⁷	3.0 × 10 ⁻⁸	1.4	0.18
G1-S ELF	3.7 × 10 ⁻⁹	1.8 × 10 ⁻⁸	4.3 × 10 ⁻⁸	結合しない	7.0	0.42
V9(H 1)	5.8 × 10 ⁻⁷	4.1 × 10 ⁻⁶	9.4 × 10 ⁻⁸	結合しない	3.2	4.3
V11 (H1)	2.3 × 10 ⁻⁷	3.8 × 10 ⁻⁶	1.4 × 10 ⁻⁸	結合しない	9.4	2.71
G1-G ASDA LIE	未測定	6.3 × 10 ⁻⁸	7.4 × 10 ⁻⁷	1.0 × 10 ⁻⁷	1	0.09

【0102】

* : I/A比率 = [KD(hFc RIIA - R131)或いはKD(hFc RIIA - F158)の中の最小値)] / KD(hFc RIIB)。上記の表4の抗体Fc断片の名称は、表2の重鎖定常領域の名称と相応するもので表示するものであり、相応な名称のFc断片は、表2の相応な名称の重鎖定常領域のFc断片と理解される。

【0103】

本発明による判断方法を採用すると、その他のCH1-ヒンジ領域及びCH2-CH3ドメインを取捨選択できて、そして他のより良いヒト抑制性Fc受容体結合能と傾向性を有するヒトIgG (hIgG2, hIgG4)重鎖定常領域を得られる。同時に、本発明の好ましい重鎖定常領域は、高いI/A比率、即より低い活化型Fc受容体の結合力を有するから、本発明の好ましい重鎖定常領域から構築されたアゴニスト抗体は、より低いADCCを誘導する活性や、より少ない非特異性細胞毒性を有する可能性がある。

実施例5. より良いヒト抑制性Fc受容体(hFc RIIB)結合能と傾向性を有するヒトIgG重鎖定常領域が、より強いアゴニスト抗CD40抗体活性をサポートする

より良いヒト抑制性Fc受容体(hFc RIIB)結合能と傾向性を有するヒトIgG (hIgG2, hIgG4)重鎖定常領域は、より強いアゴニスト抗CD40抗体の活性をサポートできるか否かを分析するために、OVAワクチンモデルには、JAC1重鎖定常領域を有する抗マウスCD40抗体(Anti-mCD40-hIgG2(V1))と抗ヒトCD40抗体(Anti-hCD40-hIgG2(V11))が、OT-I T細胞活性化と増幅を誘導する活性は分析され、結果として、Anti-mCD40-hIgG2(V11)は、Anti-mCD40-hIgG2(V1)の活性(図7A)より著しくに優れることを表明した; Anti-hCD40-hIgG2(V11)は、Anti-hCD40-hIgG2(V1)の活性より著しくに優れ(図7B)、刺激免疫システム能力

10

20

30

40

50

を増強することを表し、ただし、O T 1 細胞絶対数とC D 8 + T 細胞割合は、いずれも明らかに向上した。同時に、J A C 3 とJ A C 4 の抗ヒトC D 4 0 抗体(A n t i - h C D 4 0 - h I g G 2 - S E L F、A n t i - h C D 4 0 - h I g G 2 - H D P G)を有するB 細胞活性化活性に対する分析は、A n t i - h C D 4 0 - h I g G 2 - S E L FとA n t i - h C D 4 0 - h I g G 2 - H D P Gの活性も明らかにヒトI g G 2 抗体より優れる(図8)ことを表明し、これは、刺激マウスB 細胞に発現されたより高い表面活性化分子C D 8 6 や、ヒトB 細胞に発現されたより高いレベルの表面活性化分子h C D 5 4 に表現された。これらの結果は、より良いヒト抑制性F c 受容体(h F c R I I B)結合能と傾向性を有するヒトI g G(h I g G 2、h I g G 4)重鎖定常領域が、より強いアゴニスト抗C D 4 0 抗体活性をサポートすることを証明した

実施例6 . C H 1 - ヒンジ領域が、アゴニストヒトI g G 抗C D 4 0 抗体の活性を調節できる

低い投与量のアゴニストヒトI g G 抗C D 4 0 抗体(1 0 μ g / マウス)の活性に対する分析が、A n t i - m C D 4 0 - h I g G 1、A n t i - m C D 4 0 - h I g G 2、A n t i - m C D 4 0 - h I g G 3とA n t i - m C D 4 0 - h I g G 4には、F c 受容体ヒト化マウス(h F C G R T g)において、A n t i - m C D 4 0 - h I g G 2の活性は最も高いが、A n t i - m C D 4 0 - h I g G 3の活性は、最も弱い(図9 A)。ヒトI g G 抗体C H 1 - ヒンジ領域が、アゴニストヒトI g G 抗C D 4 0 抗体を調節する活性を有するか否かことを分析するために、ヒトI g G 3 のC H 1 - ヒンジセクション部分は、ヒトI g G 2 抗体のC H 1 - ヒンジ領域を置換するために使用され、置換されたアゴニストヒトI g G 2 抗マウスC D 4 0 抗体(A n t i - m C D 4 0 - h I g G 2 (H 3))は、免疫活性化活性を喪失し(図9 B)、C H 1 - ヒンジ領域が、アゴニストヒトI g G 抗C D 4 0 抗体の活性を調節できることを説明する。

実施例7 . I g G 1 とI g G 3 のヒンジ領域と比べて、ヒトI g G 2 ヒンジ領域は、より強いアゴニストヒトI g G 抗C D 4 0 抗体活性をサポートできる

ヒトI g G 1、2、3のC H 1 - ヒンジセクションが、アゴニストヒトI g G 抗C D 4 0 抗体活性をサポートする能を比較するために、同じF c と異なるC H 1 - ヒンジ領域を有する抗C D 4 0 抗体は、調製された。活性分析より、これらの抗体の活性は、著しくに異なり、ただし、ヒトI g G 2 のC H 1 - ヒンジ領域を有する抗体(A n t i - m C D 4 0 - h I g G 2 (V 1 1))の活性は最高であり、ヒトI g G 1 のC H 1 - ヒンジ領域を有する抗体の活性は、副次なものであるが(A n t i - m C D 4 0 - h I g G 1 (V 1 1))、ヒトI g G 3 のC H 1 - ヒンジ領域を有するの抗体(A n t i - m C D 4 0 - h I g G 3 (V 1 1))の活性は、最低であり(図10)、I g G 1 とI g G 3 のヒンジ領域と比べて、ヒトI g G 2 ヒンジ領域は、より強いアゴニストヒトI g G 抗C D 4 0 抗体活性をサポートできることを説明した。

実施例8 . 好ましいヒトI g G 2 ヒンジ領域と、より良いヒト抑制性F c 受容体結合能と傾向性を有するF c とは、相乗的に、より強いアゴニストヒトI g G 抗C D 4 0 抗体活性を提供できる

ヒトI g G のF c とC H 1 - ヒンジセクションは、いずれもアゴニストヒトI g G 抗C D 4 0 抗体の活性に影響できるから、より良いヒト抑制性F c 受容体結合能と傾向性を有するF c と、より良いC H 1 - ヒンジ領域との併用が、アゴニストヒトI g G 抗C D 4 0 抗体の活性を更に向上できるか否かを研究する必要がある。最も良いヒト抑制性F c 受容体結合能と傾向性を有するヒトI g G 1 抗体バリアント(A n t i - m C D 4 0 - h I g G 1 (V 1 1)、即ヒトI g G 1 のV 1 1バリアント)、最も良いC H 1 - ヒンジ領域を有するヒトI g G 2 抗体(A n t i - m C D 4 0 - h I g G 2)、及びV 1 1 のF c

受容体結合能とI g G 2 のC H 1 - ヒンジ領域(J A C 1)とを結び付けてなる抗体(A n t i - m C D 4 0 - h I g G 2 (V 1 1))の活性を比較すると、結果としては、最適化のF c と好ましいC H 1 - ヒンジ領域とを結び付けてなるA n t i - m C D 4 0 - h I g G 2 (V 1 1)は、明らかにより強い活性を有することを示し、O V Aワクチンモデルにおいて、O T - I 細胞の絶対数及びC D 8 + T 細胞の割合は、著しくに向上された

ことに表現された(図11)。同時に、P M B C細胞刺激試験には、Anti-hCD40-hIgG1(V11)、Anti-hCD40-hIgG2及びAnti-hCD40-hIgG2(V11)の免疫刺激活性を比較し(図12)、結果として、同様に、最適化のFcと好ましいCH1-ヒンジ領域とを結び付けてなるAnti-hCD40-hIgG2(V11)は、明らかにより強い活性を有することを示した。

【0104】

hIgG2(V11)のような、より強い活性は、hIgG1(V11)とhIgG2の活性の単純な加算を超えて、好ましいヒトIgG2 CH1-ヒンジ領域と、より良いヒト抑制性Fc受容体結合能と傾向性を有するFcは、相乗的に、より強い他のアゴニストヒトIgG抗体活性を提供できることを説明した。

10

【0105】

M C 3 8腫瘍モデルにおいて、Anti-mCD40-hIgG1(V11)、Anti-mCD40-hIgG2及びAnti-mCD40-hIgG2(V11)の三つの抗体の抗腫瘍活性を更に分析し(試験方法は、上記の「材料と方法」部分を参照)、Anti-mCD40-hIgG2(V11)の抗腫瘍活性も、著しくにAnti-mCD40-hIgG1(V11)とAnti-mCD40-hIgG2抗体の抗腫瘍活性を超える(図13、14)、Anti-mCD40-hIgG2(V11)治療グループに、7匹の受試マウスのうち、5匹マウスの生体内の腫瘍は、完全に取り除かれて、優れた腫瘍治療活性を示した。

20

【0106】

同様に、M O 4腫瘍モデルにおいて、Anti-mCD40-hIgG1(V11)、Anti-mCD40-hIgG2及びAnti-mCD40-hIgG2(V11)の三つの抗体の抗腫瘍活性を更に分析し(試験方法は、上記の「材料と方法」部分を参照)、当該モデルには、Anti-mCD40-hIgG2(V11)の抗腫瘍活性も、同様に、Anti-mCD40-hIgG1(V11)とAnti-mCD40-hIgG2抗体の抗腫瘍活性を著しくに超えた(図15)。

30

【0107】

上記の抗腫瘍活性テストの結果は、O V Aワクチンモデルに基づく分析の結果(図11)とほぼ一致する。かつAnti-mCD40-hIgG1(V11)、Anti-mCD40-hIgG2及びAnti-mCD40-hIgG2(V11)の三つの抗体は、Fc受容体ノックアウトマウス(FcR-/-)のM C 3 8腫瘍モデルには、抗腫瘍活性を示していない(図16)。これは、アゴニスト抗体の抗腫瘍活性に対して、Fc受容体との結合は、必要なものであることを説明し、本発明の重鎖定常領域、たとえば：G2(V11)(J A C 1とも言う)は、ヒトIgG抗体CD40抗体の、ワクチンにおける佐剤とする活性を向上できるだけなく、当該抗体の抗腫瘍活性も向上できる。

30

【0108】

なお、O V Aワクチンモデル試験は、投与量を3.16 μ g / マウス及び1 μ g / マウスにする場合に、Anti-mCD40-hIgG2(V11)が、著しい活性を有するが(図17)、投与量を10 μ g / マウスにする場合に、Anti-mCD40-IgG1抗体は、もう活性を有しない(図9A)ことを表明する。

40

【0109】

O V Aワクチンモデルを利用する際に、J A C 4配列を含む抗CD40抗体(Anti-mCD40-hIgG2-H D P G)と、突然変異がないIgG2抗CD40抗体(Anti-mCD40-hIgG2)との免疫アゴニスト活性を比較し、結果として、Anti-mCD40-hIgG2と比べて、Anti-mCD40-hIgG2-H D P Gは、明らかにより強い活性を有することを示し、CD8⁺T細胞におけるO T - I細胞の割合、及びCD8⁺T細胞の割合は著しく向上したことにより表現される(図18)。同時に、Anti-mCD40-hIgG2-H D P G抗体の活性は、少なくともAnti-mCD40-hIgG1(V11)と相当し、或いはより高い(図18)。

【0110】

50

そして、本発明の重鎖定常領域（たとえば：JAC1或いはJAC4）に基づき構築されたアゴニスト抗CD40抗体は、より良い免疫刺激活性及び抗腫瘍活性を有し、その最小有効投与量は、現在研究されている、IgG1に基づくアゴニスト抗体の最小有効投与量の1/10又はより低い量であるから、より良い活性、より広い有効投与量の範囲、及びより優れる安全性を有し、抗腫瘍薬物として開発されても良く、腫瘍ワクチン或いは感染性疾患に対するワクチンの免疫効果を増強するための免疫助成剤として用いられても良い。

実施例9. 好ましいヒトIgG2CH1-ヒンジ領域と、より良いヒト抑制性Fc受容体結合能と傾向性を有するFcとは、相乗的に、より強い他のアゴニストヒトIgG抗体活性を提供できる

Fc受容体結合能が、他のヒトアゴニスト抗体活性に対する影響、及び好ましいヒトIgG2CH1-ヒンジ領域とより良いヒト抑制性Fc受容体結合能と傾向性を有するFcとは、より強い他のアゴニストヒトIgG抗体活性を相乗に提供できるか否かを研究するために、異なるCH1-ヒンジ領域とFcを有するアゴニスト抗DR5抗体（Anti-mDR5-IgG）は調製され、かつ抗DR5抗体が、MC38のプログラム細胞死を誘導する活性を分析した。結果として、ヒトIgG2抗DR5抗体（Anti-mDR5-IgG2（V11））は、活性を有しない；JAC1配列を有する抗DR5抗体（Anti-mDR5-IgG2（V11））は、活性を有するが、Fc受容体（hFCGR^{Tg}）を発現する環境は必要のものである（図19）。また、ヒト抑制性Fc受容体特異性抗体2B6が、こんな活性を完全に遮断でき、JAC1配列を有する抗DR5抗体（Anti-mDR5-IgG2（V11））の活性は、ヒト抑制性Fc受容体との相互作用に特異性に調節されることを説明し、アゴニスト抗DR5抗体活性の調節機構は、抗CD40抗体の調節機構と一致することをさらに説明した。そして、好ましいヒトIgG2CH1-ヒンジ領域と、より良いヒト抑制性Fc受容体結合能と傾向性を有するFcとは、より強いアゴニストヒトIgG抗DR5抗体活性を提供できる

実施例10. 好ましい抗体定常領域が、好ましいヒトIgG2CH1-ヒンジ領域と良いヒト抑制性Fc受容体結合能のFcを有することは十分ではなく、Fcとして、良いヒト抑制性Fc受容体結合の傾向性、即より高いI/A比率も必要とする。

【0111】

ヒト抑制性Fc受容体結合の傾向性が、増強された抑制性Fc受容体結合能を有する抗体重鎖定常領域の活性化活性に対する影響を研究するために、それぞれに、重鎖定常領域G2-SDIEと、G2-GASDALIEと、G1(H2)に基づく抗マウスCD40抗体Anti-mCD40-hIgG2-SDIEと、Anti-mCD40-hIgG2-GASDALIEと、Anti-mCD40-hIgG1(H2)は構築され、かつOVAワクチンモデルにおいて、異なる抗体を有するものの免疫活性化活性は、比較された。三つの抗体は、いずれも好ましいヒトIgG2のCH1-ヒンジ領域を有する；Anti-mCD40-hIgG1(H2)と比べて、Anti-mCD40-hIgG2-SDIEとAnti-mCD40-hIgG2-GASDALIEは、より良いヒト抑制性Fc受容体結合能を有するが（表4）、同時に、より強いヒト活化性Fc受容体と結合する能を有し（表4）、そしてより低いI/A比率を有する（表4）。OVAワクチンモデルの分析結果として、Anti-mCD40-hIgG2-SDIEとAnti-mCD40-hIgG2-GASDALIE抗体の活性は、Anti-mCD40-hIgG1(H2)抗体より優れているわけではないが、逆に劣ることを示し（図20）、好ましい抗体は、増強されたヒト抑制性Fc受容体結合能を必要だけではなく、ヒト抑制性Fc受容体結合の傾向性も必要とすることを説明した。こんな傾向性は、より高いI/A比率に表現され、例えば0.32或いはより高い。

【0112】

本発明に提供された好ましい抗体重鎖定常領域の実施例は、アゴニスト抗CD40とDR5抗体の活性の向上に用いられても良いだけではなく、OX40、CD137、CD27、CD30、GITR、HVEM、TACI、DR4、FAS等のような他のTNF受

10

20

30

40

50

容体スーパーファミリーメンバーに対するアゴニスト抗体、ならびに非TNF受容体スーパーファミリーメンバー(CD28、SLAMファミリー分子)に対するアゴニスト抗体に用いられても良い。免疫活性化を調節するや、プログラム細胞死を誘導する受容体分子に対するアゴニスト抗体だけではなく、他の生物学機能を有する受容体分子に対するアゴニスト抗体に用いられても良い、例えば免疫抑制性受容体分子(免疫チェックポイント)(例えばPD-1、CTLA-4、VISTA、TIM-3、BTLA、LAG-3等)に対するアゴニスト抗体。ヒトIgG抗体に基づくアゴニスト抗体ではなく、他の種の配列を含むキメラ抗体に基づくアゴニスト抗体に用いられても良い。二つの重鎖と二つの軽鎖を有する典型的なIgGアゴニスト抗体だけではなく、重鎖のみ含むIgGアゴニスト抗体、及び他のIgGから誘導したバリアント形式のアゴニスト抗体(例えば、三つ以上の抗原結合サイトを有する抗体、抗体重鎖のC端に抗原結合サイトを有する二重特異性抗体或いは多特異性抗体)も含む。抗体配列に基づくアゴニスト抗体ではなく、抗体定常領域配列を有する、標的を活性化する機能を有する融合タンパク質も含む、例えばCD40L-Fc融合タンパク質、OX40L-Fc融合タンパク質、4-1BBL-Fc融合タンパク質、CD27L-Fc融合タンパク質、CD30L-Fc融合タンパク質、CD95L-Fc融合タンパク質、TRAIL-Fc融合タンパク質、PD-L1-Fc融合タンパク質等;具体的に、CD40L-JAC1、CD40L-JAC4、OX40L-JAC1、OX40L-JAC4、PD-L1-JAC1、PD-L1-JAC4等にしてもよい。(表5)

【0113】

【表5】

表5 本発明の重鎖定常領域に基づく融合タンパク質の例。

融合タンパク質	抗原結合モジュール	重鎖定常領域
CD40L-JAC1	CD40L	JAC1
CD40L-JAC4	CD40L	JAC4
OX40L-JAC1	OX40L	JAC1
OX40L-JAC4	OX40L	JAC4
PD-L1-JAC1	PDL1	JAC1
PD-L1-JAC4	PDL1	JAC4
Anti-CD40 SCFV-JAC1	Anti-CD40 SCFV	JAC1
Anti-CD40 nanobody-JAC1	Anti-CD40 nanobody	JAC1
Anti-CD40 SCFV-JAC4	Anti-CD40 SCFV	JAC4
Anti-CD40 nanobody-JAC4	Anti-CD40 nanobody	JAC4
Anti-OX40 SCFV-JAC1	Anti-CD40 SCFV	JAC1
Anti-OX40 nanobody-JAC1	Anti-CD40 nanobody	JAC1
Anti-OX40 SCFV-JAC4	Anti-CD40 SCFV	JAC4
Anti-OX40 nanobody-JAC4	Anti-CD40 nanobody	JAC4
Anti-PD1-SCFV-JAC1	Anti-PD1 SCFV	JAC1
Anti-PD1 nanobody-JAC1	Anti-PD1 nanobody	JAC1
Anti-PD1 SCFV-JAC4	Anti-PD1 SCFV	JAC4
Anti-PD1 nanobody-JAC4	Anti-PD1 nanobody	JAC4

10

20

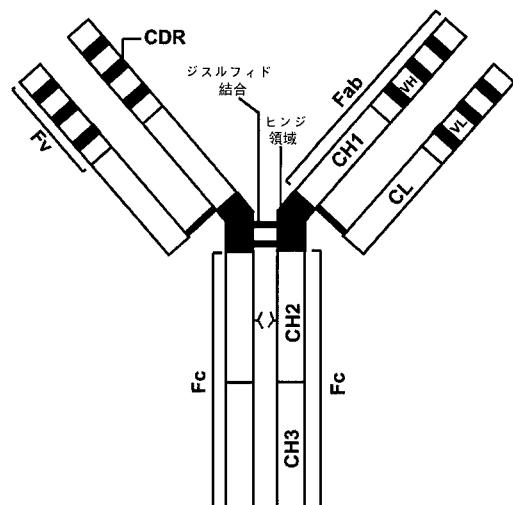
30

40

【0114】

以上に、例で説明するために、本発明の詳しい実施形態を説明したが、当業者にとって、特許請求の範囲に記載された本発明から逸脱することなく、詳細に多くの変更を加えることができる。

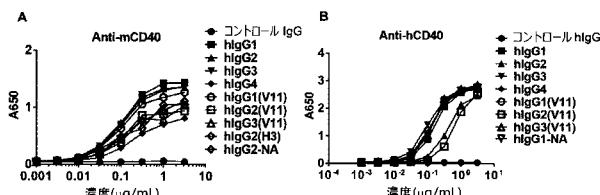
【図1】



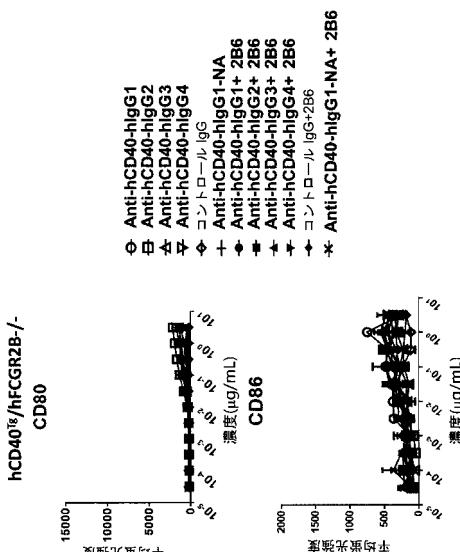
【図2】

EU 指数 118 ← 10 20 30 40 50 60
セクション1
G1 (1) ASTKGPSVFLAPSKTSSTGTAAL GCLVKDYFPEPVTVWSWSNSGALTSGVHTFPAVLQSS
G2 (1) ASTKGPSVFLAPCSRSTESESTAAL GCLVKDYFPEPVTVWSWSNSGALTSGVHTFPAVLQSS
G3 (1) ASTKGPSVFLAPCSRSTESESTAAL GCLVKDYFPEPVTVWSWSNSGALTSGVHTFPAVLQSS
G4 (1) ASTKGPSVFLAPCSRSTESESTAAL GCLVKDYFPEPVTVWSWSNSGALTSGVHTFPAVLQSS
コンセンサス (1) ASTKGPSVFLAPCSRSTSSTGAAAGCLVKDYFPEPVTVWSWSNSGALTSGVHTFPAVLQSS
セクション2
(G1) 61 → 70 80 90 100 110 120
EU 指数 61 70 80 90 100 110 120
G1 (61) GLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKRVE
G2 (61) GLYSLSSVTVPPSSNFGTQTYTCNVNDHKPSNTKVDKTVER
G3 (61) GLYSLSSVTVPPSSNLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPCKPEPKSC
G4 (61) GLYSLSSVTVPPSSNLGTQTYTCNVNDHKPSNTKVDKRVE
コンセンサス (61) GLYSLSSVTVPPSSNLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVE
セクション3
(121) 121 130 140 150 160 170 180
EU 指数 121 130 140 150 160 170 180
G1 (100) PKSCDKTHTCCPCPAPELLGGPSVFLFPKPKD
G2 (100) KCCVECPCPAPPVAG-PSVFLFPKPKD
G3 (121) DTPPPCPRCPKSCDTPPPCPRCPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPKPKD
G4 (100) KYGPCKPSCPAPAEFILGGPSVFLFPKPKD
コンセンサス (121) PKSCK PPCPPCPAPELLGGPSVFLFPKPKD
セクション4
(181) 181 190 200 210 220 230 240
EU 指数 181 190 200 210 220 230 240
G1 (134) LMI SRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFVNYYDVGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLH
G2 (130) LMI SRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFVNYYDVGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVLH
G3 (181) LMI SRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFVNYYDVGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLH
G4 (131) LMI SRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFVNYYDVGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVLH
コンセンサス (181) LMI SRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFVNYYDVGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVLH
セクション5
(241) 241 250 260 270 280 290 300
EU 指数 241 250 260 270 280 290 300
G1 (194) QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISAKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
G2 (190) QDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISAKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
G3 (241) QDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISAKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
G4 (191) QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISAKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
コンセンサス (241) QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISAKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
セクション6
(301) 301 310 320 330 340 350 360
EU 指数 301 310 320 330 340 350 360
G1 (254) GFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPVPLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVMHE
G2 (250) GFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPVPLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVMHE
G3 (301) GFYPSDI AVEWESGQPENNYNTPPPMLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNI FSCSVMHE
G4 (251) GFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPVPLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVMHE
コンセンサス (301) GFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPVPLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSVMHE
セクション7
(361) 361 → 378
EU 指数 361 → 378
G1 (314) ALHNHYTQKSLSSLSPGK-
G2 (310) ALHNHYTQKSLSSLSPGK-
G3 (361) ALHNRFQTQKSLSSLSPGK-
G4 (311) ALHNHYTQKSLSSLSPGK-
コンセンサス (361) ALHNHYTQKSLSSLSPGK

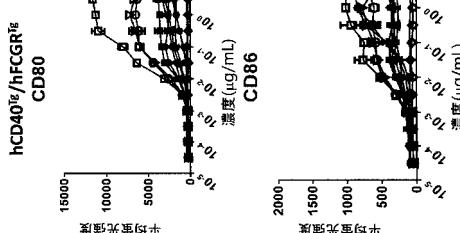
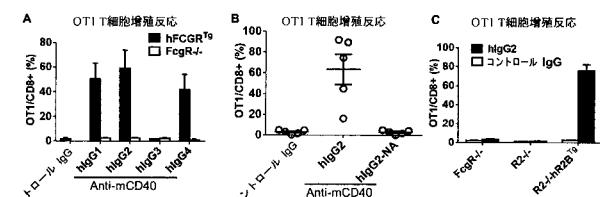
【図3】



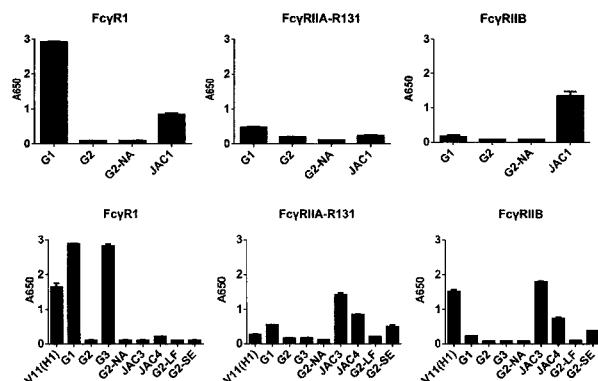
【図5】



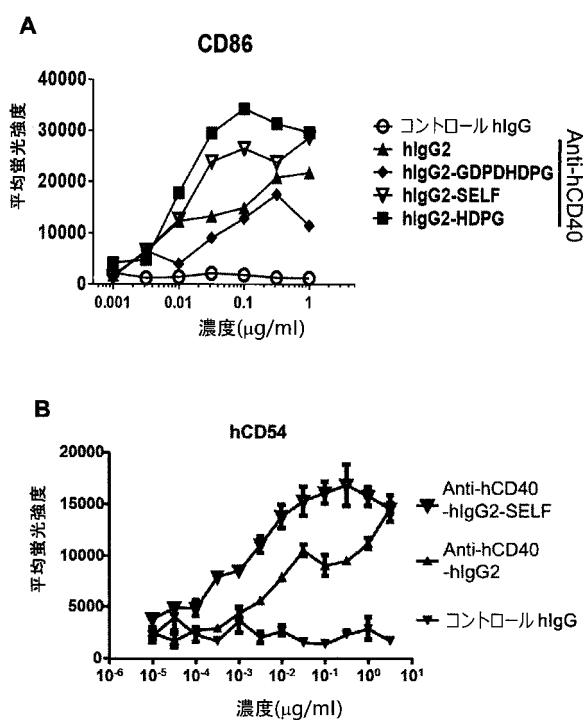
【図4】



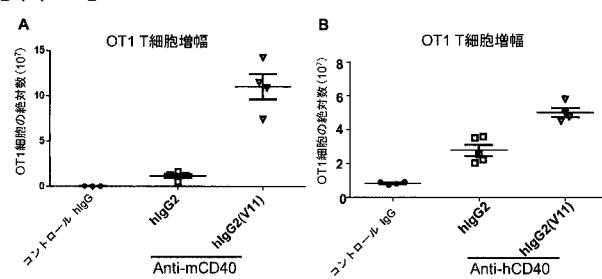
【図 6】



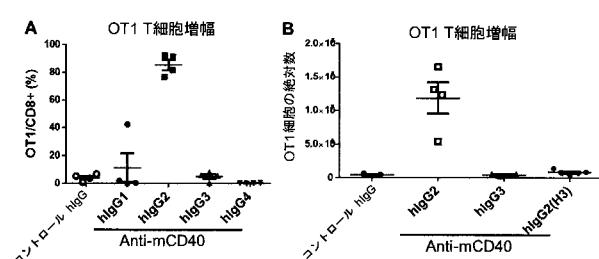
【図 8】



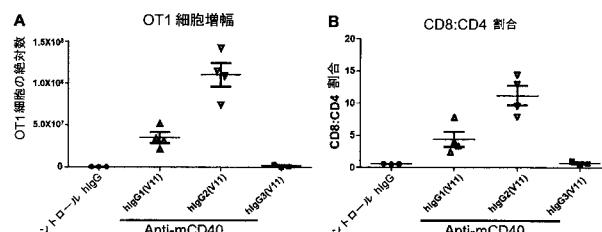
【図 7】



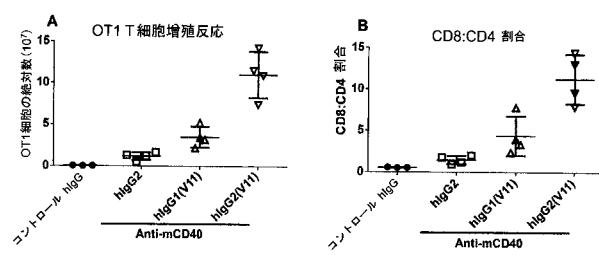
【図 9】



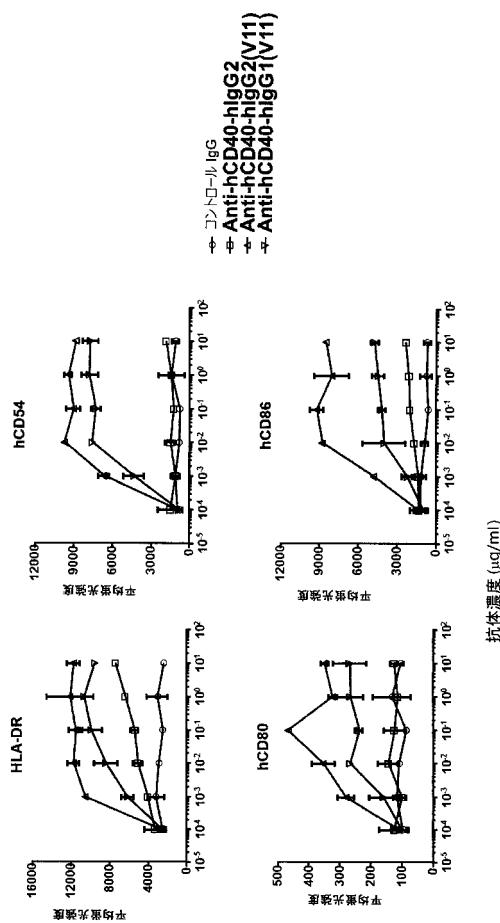
【図 10】



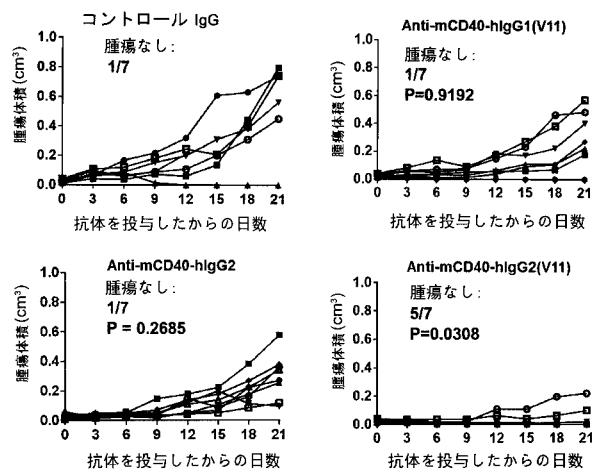
【図 11】



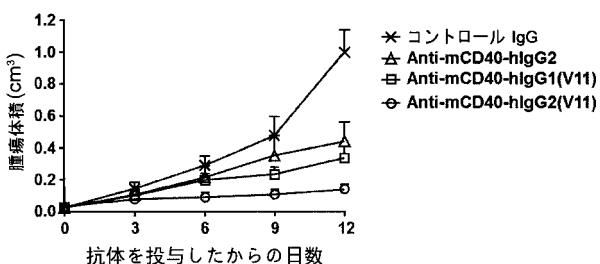
【図 12】



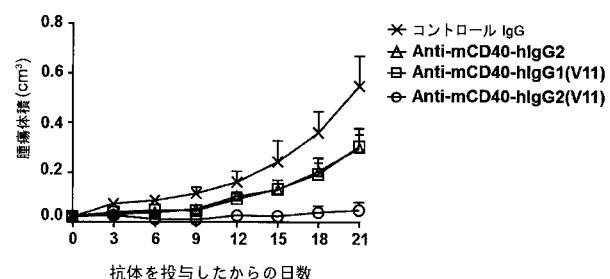
【図13】



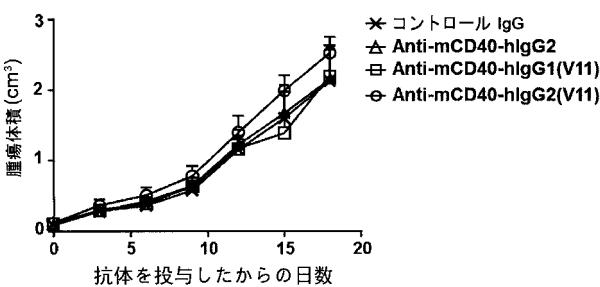
【図15】



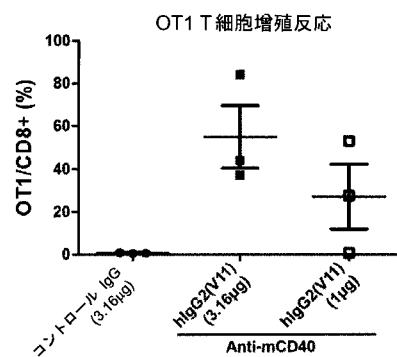
【図14】



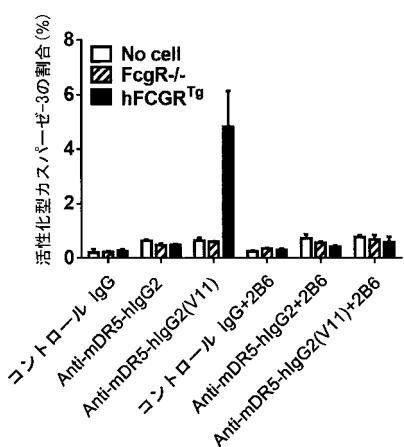
【図16】



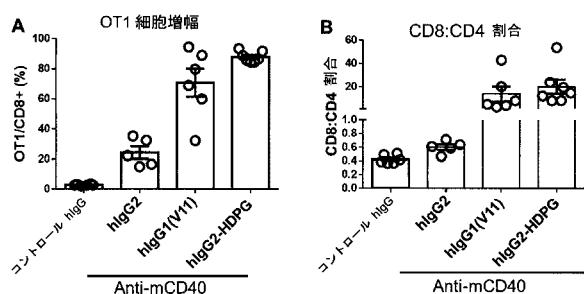
【図17】



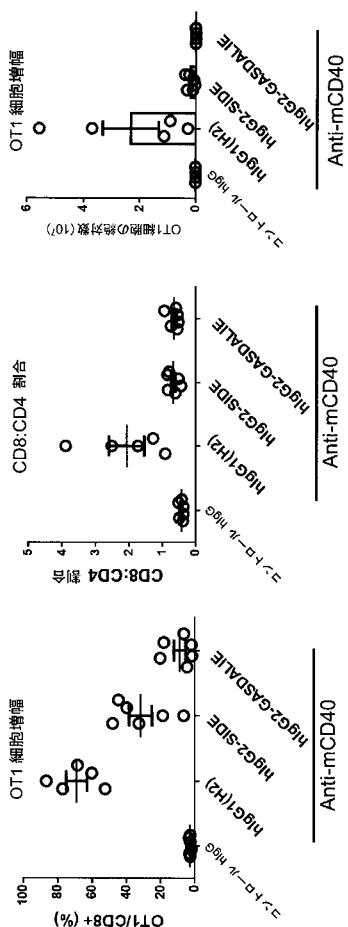
【図19】



【図18】



【図20】



【配列表】

2019528082000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成31年2月26日(2019.2.26)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

N端末からC端末まで順に配列させて連結されたCH1ドメインとヒンジ領域とCH2ドメインとCH3ドメインとを含む重鎖定常領域であって、上記のCH1ドメインとヒンジ領域との配列は、ヒトIgG2由来のCH1ドメインとヒンジ領域との配列であり、上記のCH2ドメインとCH3ドメインとの配列は、

a) ヒトIgG1由来のCH2ドメインとCH3ドメインとの配列、ただし、上記のCH2ドメインとCH3ドメインとが、G237DとP238DとP271GとA330Rとの変異を含む；或いは

b) ヒトIgG1由来のCH2ドメインとCH3ドメインとの配列、ただし、上記のCH2ドメインとCH3ドメインとが、G237DとP238DとH268DとP271GとA330Rとの変異を含む；或いは

c) ヒトIgG2由来のCH2ドメインとCH3ドメインとの配列、ただし、上記のCH2ドメインとCH3ドメインとが、S267EとL328Fとの変異を含む；或いは

d) ヒトIgG2由来のCH2ドメインとCH3ドメインとの配列、ただし、上記のCH2ドメインとCH3ドメインとが、H268DとP271Gとの変異を含む；

重鎖定常領域。

【請求項 2】

上記の抗体重鎖定常領域は、SEQ ID NO: 11或いはSEQ ID NO: 12或いはSEQ ID NO: 13或いはSEQ ID NO: 14に示される配列を有することを特徴とする請求項1に記載された重鎖定常領域。

【請求項 3】

N端末からC端末まで順に配列させて連結されたCH1ドメインとヒンジ領域とCH2ドメインとCH3ドメインとを含む重鎖定常領域であり、上記のCH1ドメインとヒンジ領域との配列は、ヒトIgG2由来のCH1ドメインとヒンジ領域との配列であり、上記のCH2ドメインとCH3ドメインとの配列は、ヒトIgG由来のCH2ドメインとCH3ドメインとの配列であり、かつ上記の抗体重鎖定常領域のヒトFc IIBとの親和性は、ヒトIgG1のヒトFc IIBとの親和性より大きいか等しく、上記の抗体重鎖定常領域のI/A比率は、ヒトIgG1のI/A比率より大きいか等しい、重鎖定常領域。

【請求項 4】

請求項1～3のいずれか一つに記載された重鎖定常領域及び上記の重鎖定常領域のN端及び/又はC端に位置する抗原結合モジュールを含む、融合タンパク質。

【請求項 5】

上記の抗原結合モジュールは、抗体の抗原結合断片、アドネクチン、ナノボディ、ミニ抗体、アフィボディー、アフィリン、受容体の標的結合領域、細胞接着分子、リガンド、酵素、サイトカイン或いはケモカインから選ばれる、請求項4に記載された融合タンパク質。

【請求項 6】

上記の抗原結合モジュールは、ナノボディである、請求項4に記載された融合タンパク質。

【請求項 7】

上記の抗原結合モジュールは、リガンドであり、上記のリガンドは、免疫共刺激分子であり、上記の免疫共刺激分子は、CD80、CD86、ICOSL、OX40L、CD137L、CD40L、CD30L、CD27L、CD244、CD150、CD48、CD84、CD319、Ly118CD229或いはSLAMF8から選ばれる、請求項4に記載された融合タンパク質。

【請求項 8】

上記の抗原結合モジュールが標的にする抗原は、CD40、DR5、OX40、CD137、CD27、CD30、GITR、HVEM、TACI、DR4又はFASから選ばれる、請求項4に記載された融合タンパク質。

【請求項 9】

上記の抗原結合モジュールが標的にする抗原は、CD40である、請求項4に記載された融合タンパク質。

【請求項 10】

上記の抗原結合モジュールが標的にする抗原は、PD-1、CTLA-4、VISTA、TIM-3、BTLA或いはLAG-3から選ばれる、請求項4に記載された融合タンパク質。

【請求項 11】

上記の抗原結合モジュールは、リガンドであり、上記のリガンドは、免疫抑制性リガンド分子であり、上記の免疫抑制性リガンド分子は、PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、CD47、VISTA、HVEM又はGAL9から選ばれる、請求項4に記載された融合タンパク質。

【請求項 12】

請求項1～3のいずれか一つに記載された重鎖定常領域を含む抗体。

【請求項 13】

上記の抗体は、アゴニスト抗体である、請求項12に記載された抗体。

【請求項 1 4】

上記の抗体が標的にする抗原は、CD40、DR5、OX40、CD137、CD27、CD30、GITR、HVEM、TACI、DR4又はFASから選ばれる、請求項12に記載された抗体。

【請求項 1 5】

上記の抗体が標的にする抗原はCD40である、請求項12に記載された抗体。

【請求項 1 6】

上記の抗体の軽鎖は、SEQ ID NO:47に示された配列を有し、上記の抗体の重鎖は、SEQ ID NO:27或いはSEQ ID NO:43に示された配列を有する、請求項15に記載された抗体。

【請求項 1 7】

上記の抗体が標的にする抗原は、免疫抑制性受容体分子であり、かつ上記の免疫抑制性受容体分子は、PD-1、CTLA-4、VISTA、TIM-3、BTLA又はLAG-3から選ばれる、請求項12に記載された抗体。

【請求項 1 8】

請求項4～11のいずれか一つに記載された融合タンパク質又は請求項12～17のいずれか一つに記載された抗体をコードする核酸。

【請求項 1 9】

抗がん薬物の調製における、請求項4～9のいずれか一つに記載された融合タンパク質又は請求項12～16のいずれか一つに記載された抗体の使用。

【請求項 2 0】

a) 治療有効量の請求項4～9のいずれか一つに記載された融合タンパク質又は請求項12～16のいずれか一つに記載された抗体；及びb) 薬学的に許容される薬物担体；を含む増殖性疾患を治療する薬物組成物。

【請求項 2 1】

請求項9に記載された融合タンパク質又は請求項15又は16に記載された抗体を有するワクチンアジュバンド。

【請求項 2 2】

a) 治療有効量の請求項9に記載された融合タンパク質又は請求項15～16のいずれか一つに記載された抗体；及びb) ワクチン；を含むワクチン組成物。

【請求項 2 3】

腫瘍の予防及び／又は治療において使用される請求項22に記載されたワクチン組成物。

【請求項 2 4】

炎症及び／又は自己免疫症状を軽減する薬物の調製における、請求項10又は11に記載された融合タンパク質又は請求項17に記載された抗体の使用。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2017/087620
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 16/00 (2006.01) i; C07K 16/46 (2006.01) i; C07K 16/28 (2006.01) i; A61K 39/395 (2006.01) i; A61K 39/39 (2006.01) i; A61P 35/00 (2006.01) i; A61P 37/04 (2006.01) i; G01N 33/68 (2006.01) i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K; A61K; A61P; G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS; CPRSABS; CJFD; DWPI; SIPOABS; CNTXT; EPTXT; USTXT; WOTXT; GENBANK; EMBL-EBI; CNKI; GOOGLE; PubMed; ISI Web of Knowledge: SHANGHAI JIAO TONG UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE; LI, Fubin; LIU, Xiaobo; SHI, Huan; ZHANG, Huihui; ZHANG, Yan; exciting antibody, constant region of heavy chain, CH1 structure domain, hinge region, CH2 structure domain, CH3 structure domain, human IgG1, human IgG2, mutant, Fc γ IIB, affinity, Fc, fusion protein, nanobody, ligand, immune co-stimulatory molecule, immune inhibitory acceptor molecule, G237D, P238D, H268D, P271G, A330R, S267E, L328F, hIgG?, adnectin, affilin, CD40, DR5, OX40, CD+, PD-1, PD-L?, CTLA-4, VISTA, TIM-3, BTLA, LAG-3, SEQ ID NOs: 9-14		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	DAHAN, R. et al., "Therapeutic Activity of Agonistic, Human Anti-CD40 Monoclonal Antibodies Requires Selective Fcg γ R Engagement", CANCER CELL, vol. 29, 13 June 2016 (13.06.2016), pages 820-831	1, 3-4, 7-9, 12-17, 21-22, 25
Y	MIMOTO, F. et al., "Engineered Antibody Fc Variant with Selectively Enhanced Fc γ RIIb Binding over both Fc γ RIIa (R131) and Fc γ RIIa (H131)", PROTEIN ENGINEERING, DESIGN & SELECTION, vol. 26, no. 10, 05 June 2013 (05.06.2013), pages 589-598	1-26
Y	MIMOTO, F. et al., "Chain A, Crystal Structure of Lib Selective Fc Variant, Fc (v12), in Complex with Fcgriib", GENPEPT, 26 November 2014 (26.11.2014), PDB: 3WJL_A	1-26
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 19 July 2017 (19.07.2017)	Date of mailing of the international search report 02 August 2017 (02.08.2017)	
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer CHEN, Ying Telephone No.: (86-10) 62413889	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2017/087620
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	STROHL, W.R., "Optimization of Fc-Mediated Effector Functions of Monoclonal Antibodies", CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY, vol. 20, 04 November 2009 (04.11.2009), pages 685-691	1-26
Y	WO 2015070972 A1 (ATLAB PHARMA), 21 May 2015 (21.05.2015), claims 1, 6, 12, 25 and 26	1-26
A	WO 2015184099 A1 (4-ANTIBODY AG et al.), 03 December 2015 (03.12.2015), the whole document	1-26
A	CN 104955844 A (REGENERON PHARMACEUTICALS INC.), 30 September 2015 (30.09.2015)	1-26
A	CN 104736706 A (CHUGAI PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 24 June 2015 (24.06.2015), the whole document	1-26
A	CN 104918957 A (APEXIGEN INC.), 16 September 2015 (16.09.2015), the whole document	1-26
A	CN 101014619 A (XENCOR, INC.), 08 August 2007 (08.08.2007), the whole document	1-26
A	CN 104244980 A (CHUGAI PHARMACEUTICAL CO., LTD.), 24 December 2014 (24.12.2014), the whole document	1-26
A	CN 103260640 A (JANSSEN BIOTECH, INC.), 21 August 2013 (21.08.2013), the whole document	1-26
A	CHU, S.Y. et al., "Inhibition of B Cell Receptor-Mediated Activation of Primary Human B Cells by Coengagement of CD19 and Fc γ RIb with Fc-Engineered Antibodies", MOLECULAR IMMUNOLOGY, vol. 45, 08 August 2008 (08.08.2008), pages 3926-3933	1-26

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/CN2017/087620
Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)	
<p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <p>1. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 25 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: [1] claim 25 relates to a method for treating diseases, which does not comply with the requirements of PCT Rule 39.1(iv). This report is carried out based on the modified solution of the pharmaceutical use.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2017/087620

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date	
WO 2015070972 A1	21 May 2015	EP 3068798 A1 CA 2963178 A1 JP 2016537975 A CN 106414494 A US 2016280765 A1 AU 2015266958 A1 PH 12016502345 A1 EP 3148579 A1 TW 201607958 A US 2015368349 A1 KR 20170020819 A SG 11201609721 W A IL 249092 D0 CA 2949998 A1 EA 201591407 A1 AR 095115 A1 TW 201514206 A KR 20150110571 A US 2014243504 A1 US 9359437 B2 JP 2016507525 A HK 1217955 A1 CA 2899457 A1 IL 239688 A WO 2014121087 A1 SG 11201505072 R A AU 2014212148 A1 EP 2951207 A1 MX 2015009502 A IL 239688 D0 US 2016347839 A1 EP 2889377 A4 MX 2015002368 A CA 2882272 A1 JP WO2014030728 A1 US 2015299296 A1 SG 11201500873 X A RU 2015110250 A KR 20150045443 A WO 2014030728 A1 EP 2889377 A1 AU 2013306700 A1 TW 201420604 A HK 1208490 A1 US 9676861 B2 KR 20150079787 A AU 2013337903 A1 EP 2914627 A1 HK 1213581 A1	21 September 2016 21 May 2015 08 December 2016 15 February 2017 29 September 2016 08 December 2016 13 February 2017 05 April 2017 01 March 2016 24 December 2015 24 February 2017 29 December 2016 31 January 2017 03 December 2015 30 December 2015 30 September 2015 16 April 2015 02 October 2015 28 August 2014 07 June 2016 10 March 2016 27 January 2017 07 August 2014 31 August 2015 07 August 2014 30 July 2015 20 August 2015 09 December 2015 04 March 2016 31 August 2015 01 December 2016 03 August 2016 03 June 2015 27 February 2014 08 August 2016 22 October 2015 29 April 2015 20 October 2016 28 April 2015 27 February 2014 01 July 2015 12 February 2015 01 June 2014 04 March 2016 13 June 2017 08 July 2015 07 May 2015 09 September 2015 08 July 2016	
WO 2015184099 A1	03 December 2015			
CN 104955844 A	30 September 2015			
CN 104736706 A	24 June 2015			
CN 104918957 A	16 September 2015			

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2017/087620

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 101014619 A	08 August 2007	US 2014120103 A1 JP 2015533853 A CA 2888763 A1 WO 2014070934 A1 KR 20070029190 A IL 179048 D0 JP 5301611 B2 JP 2008505174 A WO 2006019447 A1 EP 1919950 A1 AU 2005272993 A1 ES 2530340 T3 CN 101014619 B EP 2471813 B1 DK 2471813 T3 KR 100863776 B1 EP 2940043 A1 SI 2471813 T1 JP 2011188869 A CN 103172731 A CA 2565961 A1 CN 103351434 B AU 2005272993 B2 CN 103351434 A CN 101987870 B EP 2471813 A1 BR PI0510674 A CN 101987870 A EP 2818183 A1 CA 2865158 A1 HK 1201476 A1 JP WO2013125667 A1 US 2016046693 A1 AU 2013223087 A1 RU 2014138499 A KR 20140130707 A WO 2013125667 A1 EP 2818183 A4 TW 201343673 A SG 11201405137 Q A JP 6138108 B2 MX 2014010140 A DK 2654780 T3 EA 201390958 A1 JP 6012624 B2 JP 2014504301 A EC SP13012712 A MX 2013007291 A US 2013011386 A1 US 2015139984 A1	01 May 2014 26 November 2015 08 May 2014 08 May 2014 13 March 2007 08 March 2007 25 September 2013 21 February 2008 23 February 2006 14 May 2008 23 February 2006 02 March 2015 03 November 2010 31 December 2014 02 March 2015 16 October 2008 04 November 2015 31 March 2015 29 September 2011 26 June 2013 23 February 2006 30 September 2015 11 February 2010 16 October 2013 03 July 2013 04 July 2012 26 December 2007 23 March 2011 31 December 2014 29 August 2013 04 September 2015 30 July 2015 18 February 2016 18 September 2014 20 April 2016 11 November 2014 29 August 2013 04 November 2015 01 November 2013 30 December 2014 31 May 2017 12 September 2014 10 April 2017 29 November 2013 25 October 2016 20 February 2014 30 August 2013 13 September 2013 10 January 2013 21 May 2015
CN 104244980 A	24 December 2014		
CN 103260640 A	21 August 2013		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2017/087620

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
		AU 2011349719 B2	15 September 2016
		CR 20130292 A	03 October 2013
		NZ 612379 A	31 October 2014
		HR P20170595 T1	16 June 2017
		EP 2654780 B1	01 February 2017
		ZA 201305538 B	28 January 2015
		SG 191233 A1	31 July 2013
		KR 20140003485 A	09 January 2014
		US 8871204 B2	28 October 2014
		CO 6741179 A2	30 August 2013
		LT 2654780 T	27 March 2017
		EP 2654780 A4	18 March 2015
		GT 201300167 A	26 September 2014
		BR 112013018317 A2	21 March 2017
		US 9611328 B2	04 April 2017
		WO 2012087746 A1	28 June 2012
		CN 103260640 B	02 December 2015
		EP 2654780 A1	30 October 2013
		CA 2822366 A1	28 June 2012
		AU 2011349719 A1	04 July 2013

国际检索报告	国际申请号 PCT/CN2017/087620												
A. 主题的分类 C07K 16/00(2006.01)i; C07K 16/46(2006.01)i; C07K 16/28(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61K 39/39(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 37/04(2006.01)i; G01N 33/68(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类													
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C07K; A61K; A61P; G01N 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献													
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS; CPRSABS; CJFD; DWPI; SIPOABS; CNTXT; EPTXT; USTXT; WOTXT; GENBANK; EMBL-EBI; CNKI; GOOGLE; PubMed; ISI Web of Knowledge: 上海交通大学医学院, 李福彬, 刘小波, 石欢, 张慧慧, 张燕, 激动型抗体, 重链恒定区, CH1结构域, 绞链区, CH2结构域, CH3结构域, 人IgG1, 人IgG2, 突变, Fcγ IIB, 亲和力, Fc, 融合蛋白, 纳米抗体, 配体, 免疫共刺激分子, 免疫抑制性受体分子, G237D, P238D, H268D, P271G, A330R, S267E, L328F, hIgG?, adnectin, affilin, CD40, DR5, OX40, CD+, PD-1, PD-L?, CTLA-4, VISTA, TIM-3, BTLA, LAG-3, SEQ ID NOs:9-14													
C. 相关文件 <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">类型*</th> <th style="width: 80%;">引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th style="width: 10%;">相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>PX</td> <td>DAHAN, R. 等. "Therapeutic Activity of Agonistic, Human Anti-CD40 Monoclonal Antibodies Requires Selective Fcγ R Engagement" Cancer Cell, 第29卷, 2016年 6月 13日 (2016-06-13), 第820-831页</td> <td>1, 3-4, 7-9, 12-17, 21-22, 25</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>MIMOTO, F. 等. "Engineered antibody Fc variant with selectively enhanced Fcγ RIIb binding over both Fcγ RIIa(R131) and Fcγ RIIa(H131)" Protein Engineering, Design & Selection, 第26卷, 第10期, 2013年 6月 5日 (2013-06-05), 第589-598页</td> <td>1-26</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>MIMOTO, F. 等. "Chain A, Crystal Structure Of Iib Selective Fc Variant, Fc(v12), In Complex With Fcgriib" GenPept, 2014年 11月 26日 (2014-11-26), PDB:3WJL_A</td> <td>1-26</td> </tr> </tbody> </table>		类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	PX	DAHAN, R. 等. "Therapeutic Activity of Agonistic, Human Anti-CD40 Monoclonal Antibodies Requires Selective Fcγ R Engagement" Cancer Cell, 第29卷, 2016年 6月 13日 (2016-06-13), 第820-831页	1, 3-4, 7-9, 12-17, 21-22, 25	Y	MIMOTO, F. 等. "Engineered antibody Fc variant with selectively enhanced Fcγ RIIb binding over both Fcγ RIIa(R131) and Fcγ RIIa(H131)" Protein Engineering, Design & Selection, 第26卷, 第10期, 2013年 6月 5日 (2013-06-05), 第589-598页	1-26	Y	MIMOTO, F. 等. "Chain A, Crystal Structure Of Iib Selective Fc Variant, Fc(v12), In Complex With Fcgriib" GenPept, 2014年 11月 26日 (2014-11-26), PDB:3WJL_A	1-26
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求											
PX	DAHAN, R. 等. "Therapeutic Activity of Agonistic, Human Anti-CD40 Monoclonal Antibodies Requires Selective Fcγ R Engagement" Cancer Cell, 第29卷, 2016年 6月 13日 (2016-06-13), 第820-831页	1, 3-4, 7-9, 12-17, 21-22, 25											
Y	MIMOTO, F. 等. "Engineered antibody Fc variant with selectively enhanced Fcγ RIIb binding over both Fcγ RIIa(R131) and Fcγ RIIa(H131)" Protein Engineering, Design & Selection, 第26卷, 第10期, 2013年 6月 5日 (2013-06-05), 第589-598页	1-26											
Y	MIMOTO, F. 等. "Chain A, Crystal Structure Of Iib Selective Fc Variant, Fc(v12), In Complex With Fcgriib" GenPept, 2014年 11月 26日 (2014-11-26), PDB:3WJL_A	1-26											
<input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。													
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件													
国际检索实际完成的日期 2017年 7月 19日													
国际检索报告邮寄日期 2017年 8月 2日													
ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451													
受权官员 陈莹 电话号码 (86-10)62413889													

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2017/087620
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	STROHL, W.R. "Optimization of Fc-mediated effector functions of monoclonal antibodies" Current Opinion in Biotechnology, 第20卷, 2009年 11月 4日 (2009 - 11 - 04), 第685-691页	1-26
Y	WO 2015070972 A1 (ATLAB PHARMA) 2015年 5月 21日 (2015 - 05 - 21) 权利要求1, 6, 12, 25, 26	1-26
A	WO 2015184099 A1 (4-ANTIBODY AG等) 2015年 12月 3日 (2015 - 12 - 03) 全文	1-26
A	CN 104955844 A (瑞泽恩制药公司) 2015年 9月 30日 (2015 - 09 - 30)	1-26
A	CN 104736706 A (中外制药株式会社) 2015年 6月 24日 (2015 - 06 - 24) 全文	1-26
A	CN 104918957 A (埃派斯进有限公司) 2015年 9月 16日 (2015 - 09 - 16) 全文	1-26
A	CN 101014619 A (赞科股份有限公司) 2007年 8月 8日 (2007 - 08 - 08) 全文	1-26
A	CN 104244980 A (中外制药株式会社) 2014年 12月 24日 (2014 - 12 - 24) 全文	1-26
A	CN 103260640 A (詹森生物科技公司) 2013年 8月 21日 (2013 - 08 - 21)	1-26
A	CHU, S.Y. 等, "Inhibition of B cell receptor-mediated activation of primary human B cells by coengagement of CD19 and FcγRIIb with Fc-engineered anti-bodies" Molecular Immunology, 第45卷, 2008年 8月 8日 (2008 - 08 - 08), 第3926-3933页	1-26

表 PCT/ISA/210 (第2页) (2009年7月)

国际检索报告	国际申请号 PCT/CN2017/087620
<p>第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)</p> <p>根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：</p> <p>1. <input checked="" type="checkbox"/> 权利要求： 25 因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即： [1] 权利要求25涉及疾病的治疗方法，不符合PCT细则39.1(iv)的规定，本报告基于其修改为制药用途的方案而进行的检索。</p> <p>2. <input type="checkbox"/> 权利要求： 因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：</p> <p>3. <input type="checkbox"/> 权利要求： 因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。</p>	

国际检索报告 关于同族专利的信息				国际申请号 PCT/CN2017/087620		
检索报告引用的专利文件		公布日 (年/月/日)	同族专利		公布日 (年/月/日)	
WO	2015070972	A1	2015年 5月 21日	EP	3068798	A1
				CA	2963178	A1
				JP	2016537975	A
				CN	106414494	A
				US	2016280765	A1
WO	2015184099	A1	2015年 12月 3日	AU	2015266958	A1
				PH	12016502345	A1
				EP	3148579	A1
				TW	201607958	A
				US	2015368349	A1
				KR	20170020819	A
				SG	11201609721W	A
				IL	249092	D0
				CA	2949998	A1
CN	104955844	A	2015年 9月 30日	EA	201591407	A1
				AR	095115	A1
				TW	201514206	A
				KR	20150110571	A
				US	2014243504	A1
				US	9359437	B2
				JP	2016507525	A
				HK	1217955	A1
				CA	2899457	A1
				IL	239688	A
				WO	2014121087	A1
				SG	11201505072R	A
				AU	2014212148	A1
				EP	2951207	A1
CN	104736706	A	2015年 6月 24日	MX	2015009502	A
				IL	239688	D0
				US	2016347839	A1
				EP	2889377	A4
				MX	2015002368	A
				CA	2882272	A1
				JP	W02014030728	A1
				US	2015299296	A1
				SG	11201500873X	A
CN	104918957	A	2015年 9月 16日	RU	2015110250	A
				KR	20150045443	A
				WO	2014030728	A1
				EP	2889377	A1
				AU	2013306700	A1
				TW	201420604	A
				HK	1208490	A1
						2016年 3月 4日
						2016年 8月 3日
CN	104918957	A	2015年 9月 16日	US	9676861	B2
				KR	20150079787	A
				AU	2013337903	A1
				EP	2914627	A1
				HK	1213581	A1

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

国际检索报告 关于同族专利的信息				国际申请号 PCT/CN2017/087620			
检索报告引用的专利文件		公布日 (年/月/日)	同族专利		公布日 (年/月/日)		
			US	2014120103	A1	2014年 5月 1日	
			JP	2015533853	A	2015年 11月 26日	
			CA	2888763	A1	2014年 5月 8日	
			WO	2014070934	A1	2014年 6月 8日	
CN	101014619	A	2007年 8月 8日	KR	20070029190	A	2007年 3月 13日
				IL	179048	D0	2007年 3月 8日
				JP	5301611	B2	2013年 9月 25日
				JP	2008505174	A	2008年 2月 21日
				WO	2006019447	A1	2006年 2月 23日
				EP	1919950	A1	2008年 5月 14日
				AU	2005272993	A1	2006年 2月 23日
				ES	2530340	T3	2015年 3月 2日
				CN	101014619	B	2010年 11月 3日
				EP	2471813	B1	2014年 12月 31日
				DK	2471813	T3	2015年 3月 2日
				KR	100863776	B1	2008年 10月 16日
				EP	2940043	A1	2015年 11月 4日
				SI	2471813	T1	2015年 3月 31日
				JP	2011188869	A	2011年 9月 29日
				CN	103172731	A	2013年 6月 26日
				CA	2565961	A1	2006年 2月 23日
				CN	103351434	B	2015年 9月 30日
				AU	2005272993	B2	2010年 2月 11日
				CN	103351434	A	2013年 10月 16日
				CN	101987870	B	2013年 7月 3日
				EP	2471813	A1	2012年 7月 4日
				BR	PI0510674	A	2007年 12月 26日
				CN	101987870	A	2011年 3月 23日
				CN	104244980	A	2014年 12月 24日
				EP	2818183	A1	2014年 12月 31日
				CA	2865158	A1	2013年 8月 29日
				HK	1201476	A1	2015年 9月 4日
				JP	W02013125667	A1	2015年 7月 30日
				US	2016046693	A1	2016年 2月 18日
				AU	2013223087	A1	2014年 9月 18日
				RU	2014138499	A	2016年 4月 20日
				KR	20140130707	A	2014年 11月 11日
				WO	2013125667	A1	2013年 8月 29日
				EP	2818183	A4	2015年 11月 4日
				TW	201343673	A	2013年 11月 1日
				SG	11201405137Q	A	2014年 12月 30日
				JP	6138108	B2	2017年 5月 31日
				MX	2014010140	A	2014年 9月 12日
				CN	103260640	A	2013年 8月 21日
				DK	2654780	T3	2017年 4月 10日
				EA	201390958	A1	2013年 11月 29日
				JP	6012624	B2	2016年 10月 25日
				JP	2014504301	A	2014年 2月 20日
				EC	SP13012712	A	2013年 8月 30日
				MX	2013007291	A	2013年 9月 13日
				US	2013011386	A1	2013年 1月 10日
				US	2015139984	A1	2015年 5月 21日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

国际检索报告 关于同族专利的信息		国际申请号 PCT/CN2017/087620	
检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
		AU 2011349719 B2	2016年 9月 15日
		CR 20130292 A	2013年 10月 3日
		NZ 612379 A	2014年 10月 31日
		HR P20170595 T1	2017年 6月 16日
		EP 2654780 B1	2017年 2月 1日
		ZA 201305538 B	2015年 1月 28日
		SG 191233 A1	2013年 7月 31日
		KR 20140003485 A	2014年 1月 9日
		US 8871204 B2	2014年 10月 28日
		CO 6741179 A2	2013年 8月 30日
		LT 2654780 T	2017年 3月 27日
		EP 2654780 A4	2015年 3月 18日
		GT 201300167 A	2014年 9月 26日
		BR 112013018317 A2	2017年 3月 21日
		US 9611328 B2	2017年 4月 4日
		WO 2012087746 A1	2012年 6月 28日
		CN 103260640 B	2015年 12月 2日
		EP 2654780 A1	2013年 10月 30日
		CA 2822366 A1	2012年 6月 28日
		AU 2011349719 A1	2013年 7月 4日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/00	(2006.01) A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 43/00	(2006.01) A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 P 37/04	(2006.01) A 6 1 P 37/04	
A 6 1 P 37/06	(2006.01) A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 29/00	(2006.01) A 6 1 P 29/00	
A 6 1 K 47/68	(2017.01) A 6 1 K 47/68	
A 6 1 K 47/62	(2017.01) A 6 1 K 47/62	
A 6 1 K 39/44	(2006.01) A 6 1 K 39/44	
A 6 1 K 39/395	(2006.01) A 6 1 K 39/395	E
A 6 1 K 39/00	(2006.01) A 6 1 K 39/395	T
A 6 1 K 39/39	(2006.01) A 6 1 K 39/395	D
C 1 2 P 21/08	(2006.01) A 6 1 K 39/395	N
		U
	A 6 1 K 39/00	H
	A 6 1 K 39/39	
	C 1 2 P 21/08	

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,D0,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,Th,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

(72)発明者 リュウ シャオボー

中華人民共和国 2 0 0 0 2 5 シャンハイ フアンパー ディストリクト サウス チョンチン
ロード 280

(72)発明者 ジャン イエン

中華人民共和国 2 0 0 0 2 5 シャンハイ フアンパー ディストリクト サウス チョンチン
ロード 280

(72)発明者 ジャオ インジエ

中華人民共和国 2 0 0 0 2 5 シャンハイ フアンパー ディストリクト サウス チョンチン
ロード 280

(72)発明者 シー フアン

中華人民共和国 2 0 0 0 2 5 シャンハイ フアンパー ディストリクト サウス チョンチン
ロード 280

(72)発明者 ジャン フイファイ

中華人民共和国 2 0 0 0 2 5 シャンハイ フアンパー ディストリクト サウス チョンチン
ロード 280

F ターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 DA01

4C076 AA95 BB13 BB14 BB15 CC04 CC06 CC07 CC26 CC27 CC41

EE41 EE59

4C085 AA03 AA13 AA14 AA15 AA16 AA38 BA01 BB01 BB11 BB17

BB22 BB36 CC31 DD62 EE01 EE06 FF13 GG01 GG02 GG03
GG04 GG10
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 DA76 EA28 FA74