

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7221379号
(P7221379)

(45)発行日 令和5年2月13日(2023.2.13)

(24)登録日 令和5年2月3日(2023.2.3)

| | | |
|-------------------------|---------------|-------|
| (51)国際特許分類 | F I | |
| C 0 7 K 16/46 (2006.01) | C 0 7 K 16/46 | Z N A |
| C 0 7 K 16/28 (2006.01) | C 0 7 K 16/28 | |
| C 0 7 K 16/18 (2006.01) | C 0 7 K 16/18 | |
| C 1 2 N 15/62 (2006.01) | C 1 2 N 15/62 | Z |
| C 1 2 N 15/13 (2006.01) | C 1 2 N 15/13 | |
| 請求項の数 38 (全150頁) 最終頁に続く | | |

| | | | |
|-------------------|----------------------------------|----------|--|
| (21)出願番号 | 特願2021-517673(P2021-517673) | (73)特許権者 | 514099673 エフ・ホフマン・ラ・ロシュ・アクチュ ンゲゼルシャフト スイス国 シーエイチ - 4 0 7 0 パーゼ ル グレンツァッハーシュトラッセ 1 2 4 110002077 |
| (86)(22)出願日 | 令和1年9月30日(2019.9.30) | (74)代理人 | 園田・小林弁理士法人 |
| (65)公表番号 | 特表2022-511382(P2022-511382 A) | (72)発明者 | ブルエンカー, ベーター スイス国 8 9 5 2 シュリーレン, ヴ ァーギシュトラッセ 1 0, シーノオー ロッシュ グリクアート アーゲー |
| (43)公表日 | 令和4年1月31日(2022.1.31) | (72)発明者 | デュール, ハーラルト ドイツ国 8 2 3 7 7 ベンツベルク, ノンネンヴァルト 2, シーノオー ロ ッシュ ダイアグノスティック ゲーエムベ 最終頁に続く |
| (86)国際出願番号 | PCT/EP2019/076375 | | |
| (87)国際公開番号 | WO2020/070041 | | |
| (87)国際公開日 | 令和2年4月9日(2020.4.9) | | |
| 審査請求日 | 令和3年5月27日(2021.5.27) | | |
| (31)優先権主張番号 | 18197866.9 | | |
| (32)優先日 | 平成30年10月1日(2018.10.1) | | |
| (33)優先権主張国・地域又は機関 | 欧州特許庁(EP) | | |

(54)【発明の名称】 抗F A Pクローン2 1 2を含む二重特異性抗原結合分子

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) C D 4 0 に特異的に結合可能な少なくとも1つの抗原結合ドメインと、
(b) (i) 配列番号3のアミノ酸配列からなるC D R - H 1、(i i) 配列番号4、
配列番号1 1及び配列番号1 2からなる群から選択されるアミノ酸配列からなるC D R -
H 2、及び(i i i) 配列番号5のアミノ酸配列からなるC D R - H 3を含む重鎖可変領
域(V_HF A P)、並びに(i v) 配列番号6、配列番号1 3及び配列番号1 4からなる
群から選択されるアミノ酸配列からなるC D R - L 1、(v) 配列番号7のアミノ酸配列
からなるC D R - L 2、及び(v i) 配列番号8のアミノ酸配列からなるC D R - L 3を
含む軽鎖可変領域(V_LF A P)を含む線維芽細胞活性化タンパク質(F A P)に特異的
に結合可能な少なくとも1つの抗原結合ドメインと、を含む、二重特異性抗原結合分子。

【請求項 2】

(c) ノブ・イントゥ・ホール技術に基づく改変、又は静電操縦効果に介在する改変に
より会合が可能な第1のサブユニット及び第2のサブユニットから構成されるF c領域を
さらに含む、請求項1に記載の二重特異性抗原結合分子。

【請求項 3】

F A Pに特異的に結合可能な前記抗原結合ドメインが、配列番号9のアミノ酸配列と少
なくとも9 0%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(V_HF A P)、及び配列番
号1 0のアミノ酸配列と少なくとも9 0%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域
(V_LF A P)を含む、請求項1又は2に記載の二重特異性抗原結合分子。

【請求項 4】

F A P に特異的に結合可能な前記抗原結合ドメインが、
配列番号 1 5、配列番号 1 6、配列番号 1 7、配列番号 1 8、配列番号 1 9 及び配列番号 2 0 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V_HF A P) と、
配列番号 2 1、配列番号 2 2、配列番号 2 3、配列番号 2 4、配列番号 2 5 及び配列番号 2 6 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V_LF A P) と、を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

【請求項 5】

F A P に特異的に結合可能な前記抗原結合ドメインが、
(a) 配列番号 1 5 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V_HF A P)、及び配列番号 2 1 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V_LF A P)、
(b) 配列番号 1 6 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V_HF A P)、及び配列番号 2 1 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V_LF A P)、
(c) 配列番号 1 6 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V_HF A P)、及び配列番号 2 2 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V_LF A P)、又は
(d) 配列番号 1 9 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V_HF A P)、及び配列番号 2 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V_LF A P) を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

【請求項 6】

C D 4 0 に特異的に結合可能な前記抗原結合ドメインが、(i) 配列番号 2 7 のアミノ酸配列を含む C D R - H 1、(i i) 配列番号 2 8 のアミノ酸配列を含む C D R - H 2、及び (i i i) 配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含む C D R - H 3 を含む重鎖可変領域 (V_HC D 4 0) と、(i v) 配列番号 3 0 のアミノ酸配列を含む C D R - L 1、(v) 配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2、及び (v i) 配列番号 3 2 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3 を含む軽鎖可変領域 (V_LC D 4 0) と、を含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

【請求項 7】

C D 4 0 に特異的に結合可能な前記抗原結合ドメインが、
(i) 配列番号 3 7、配列番号 3 8、配列番号 3 9 及び配列番号 4 0 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V_HC D 4 0) と、
(i i) 配列番号 4 1、配列番号 4 2、配列番号 4 3、及び配列番号 4 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V_LC D 4 0) と、を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

【請求項 8】

C D 4 0 に特異的に結合可能な前記抗原結合ドメインが、
(i) 配列番号 4 5、配列番号 4 6、配列番号 4 7、配列番号 4 8、配列番号 4 9 及び配列番号 5 0 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V_HC D 4 0) と、
(i i) 配列番号 5 1、配列番号 5 2、配列番号 5 3、及び配列番号 5 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V_LC D 4 0) と、を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

【請求項 9】

C D 4 0 に特異的に結合可能な前記抗原結合ドメインが、
(a) 配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む V_H、及び配列番号 4 1 のアミノ酸配列を含む V_L、又は
(b) 配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む V_H、及び配列番号 4 2 のアミノ酸配列を含む V_L、又は
(c) 配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む V_H、及び配列番号 4 3 のアミノ酸配列を含む V_L、又は
(d) 配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む V_H、及び配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含む

10

20

30

40

50

む V L、又は

(e) 配列番号 3 8 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 4 1 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(f) 配列番号 3 8 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 4 2 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(g) 配列番号 3 8 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 4 3 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(h) 配列番号 3 8 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(i) 配列番号 3 9 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 4 1 のアミノ酸配列を含む V L、又は

10

(j) 配列番号 3 9 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 4 2 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(k) 配列番号 3 9 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 4 3 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(l) 配列番号 3 9 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(m) 配列番号 4 0 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 4 1 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(n) 配列番号 4 0 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 4 2 のアミノ酸配列を含む V L、又は

20

(o) 配列番号 4 0 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 4 3 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(p) 配列番号 4 0 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含む V L を含む、請求項 1 ~ 5 又は 7 のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

【請求項 1 0】

C D 4 0 に特異的に結合可能な前記抗原結合ドメインが、配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 4 1 のアミノ酸配列を含む V L を含む、請求項 1 ~ 5 又は 7 又は 9 のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

【請求項 1 1】

30

C D 4 0 に特異的に結合可能な前記抗原結合ドメインが、

(a) 配列番号 4 5 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 5 1 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(b) 配列番号 4 6 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 5 1 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(c) 配列番号 4 7 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 5 1 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(d) 配列番号 4 8 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 5 1 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(e) 配列番号 4 5 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 5 2 のアミノ酸配列を含む V L、又は

40

(f) 配列番号 4 6 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 5 2 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(g) 配列番号 4 7 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 5 2 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(h) 配列番号 4 8 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 5 2 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(i) 配列番号 4 9 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 5 3 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(j) 配列番号 5 0 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 5 3 のアミノ酸配列を含む

50

む V L、又は

(k) 配列番号 4 9 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 5 4 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(l) 配列番号 5 0 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 5 4 のアミノ酸配列を含む V L を含む、請求項 1 ~ 5 又は 8 のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

【請求項 1 2】

C D 4 0 に特異的に結合可能な前記抗原結合ドメインが、配列番号 4 5 のアミノ酸配列を含む V H 及び配列番号 5 1 のアミノ酸配列を含む V L を含むか、又は C D 4 0 に特異的に結合可能な前記抗原結合ドメインが、配列番号 4 8 のアミノ酸配列を含む V H 及び配列番号 5 1 のアミノ酸配列を含む V L を含む、請求項 1 ~ 5 又は 8 又は 1 1 のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

10

【請求項 1 3】

(i) 配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V_H C D 4 0) 及び配列番号 4 1 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V_L C D 4 0) を含む、C D 4 0 に特異的に結合可能な少なくとも 1 つの抗原結合ドメインと、

(i i) 配列番号 1 5 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V_H F A P) 及び配列番号 2 1 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V_L F A P) を含む、F A P に特異的に結合可能な少なくとも 1 つの抗原結合ドメインと、を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

【請求項 1 4】

前記 F c 領域が、I g G であり、かつ前記 F c 領域が、F c 受容体及び / 又はエフェクター機能に対する抗体の結合親和性を低下させる 1 つ以上のアミノ酸置換を含む、請求項 2 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

20

【請求項 1 5】

I g G が、I g G 1 F c 領域又は I g G 4 F c 領域である、請求項 1 4 に記載の二重特異性抗原結合分子。

【請求項 1 6】

前記 F c 領域が、アミノ酸変異 L 2 3 4 A、L 2 3 5 A 及び P 3 2 9 G (K a b a t E U インデックスによる番号付け) を有するヒト I g G 1 サブクラスの F c 領域である、請求項 2 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

30

【請求項 1 7】

前記二重特異性抗原結合分子が、

(a) F c 領域に連結した C D 4 0 に特異的に結合可能な少なくとも 2 つの F a b フラグメントと、

(b) 前記 F c 領域の C 末端に連結した F A P に特異的に結合可能な 1 つの抗原結合ドメインと、を含む、請求項 1 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

【請求項 1 8】

前記二重特異性抗原結合分子が、

(a) F c 領域に融合した C D 4 0 に特異的に結合可能な少なくとも 2 つの F a b フラグメントと、

(b) 前記 F c 領域の C 末端に融合した F A P に特異的に結合可能なクロス F a b フラグメントと、を含む、請求項 1 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

40

【請求項 1 9】

F A P に特異的に結合可能な前記クロス F a b フラグメントの V H - C カッパ鎖が前記 F c 領域の前記 C 末端に融合した、請求項 1 8 に記載の二重特異性抗原結合分子。

【請求項 2 0】

(a) C D 4 0 に特異的に結合可能な 2 つの F a b フラグメント、及び F c 領域を含む抗体の 2 つの軽鎖及び 2 つの重鎖と、

(b) V L - C H 1 鎖が (a) の 2 つの重鎖の 1 つの C 末端に融合する、F A P に特異的に結合可能なクロス F a b フラグメントと、を含む、請求項 1 ~ 1 8 のいずれか一項に

50

記載の二重特異性抗原結合分子。

【請求項 2 1】

(a) 各々が配列番号 6 2 のアミノ酸配列を含む 2 つの軽鎖、配列番号 6 1 のアミノ酸配列を含む 1 つの軽鎖、配列番号 6 3 のアミノ酸配列を含む第 1 の重鎖、及び配列番号 6 4 のアミノ酸配列を含む第 2 の重鎖、又は

(b) 各々が配列番号 6 6 のアミノ酸配列を含む 2 つの軽鎖、配列番号 6 5 のアミノ酸配列を含む 1 つの軽鎖、配列番号 6 7 のアミノ酸配列を含む第 1 の重鎖、及び配列番号 6 8 のアミノ酸配列を含む第 2 の重鎖、を含む、請求項 1 に記載の二重特異性抗原結合分子。

【請求項 2 2】

各々が配列番号 6 2 のアミノ酸配列を含む 2 つの軽鎖、配列番号 6 1 のアミノ酸配列を含む 1 つの軽鎖、配列番号 6 3 のアミノ酸配列を含む第 1 の重鎖、及び配列番号 6 4 のアミノ酸配列を含む第 2 の重鎖、を含む、請求項 1 に記載の二重特異性抗原結合分子。

10

【請求項 2 3】

前記二重特異性抗原結合分子が、CD 4 0 に特異的に結合可能な 4 つの Fab フラグメントを含む、請求項 1 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

【請求項 2 4】

FAP に特異的に結合する抗体であって、(i) 配列番号 3 のアミノ酸配列からなる CDR - H 1、(i i) 配列番号 4、配列番号 1 1 及び配列番号 1 2 からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる CDR - H 2、及び(i i i) 配列番号 5 のアミノ酸配列からなる CDR - H 3 を含む重鎖可変領域(V_HFAP)と、(i v) 配列番号 6、配列番号 1 3 及び配列番号 1 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる CDR - L 1、(v) 配列番号 7 のアミノ酸配列からなる CDR - L 2、及び(v i) 配列番号 8 のアミノ酸配列からなる CDR - L 3 を含む軽鎖可変領域(V_LFAP)と、を含む、抗体。

20

【請求項 2 5】

前記抗体が、

(a) 配列番号 1 5 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(V_HFAP)、及び配列番号 2 1 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(V_LFAP)、

(b) 配列番号 1 6 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(V_HFAP)、及び配列番号 2 1 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(V_LFAP)、

(c) 配列番号 1 6 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(V_HFAP)、及び配列番号 2 2 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(V_LFAP)、又は

(d) 配列番号 1 9 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(V_HFAP)、及び配列番号 2 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(V_LFAP)を含む、請求項 2 4 に記載の抗体。

30

【請求項 2 6】

請求項 1 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子、又は請求項 2 4 若しくは 2 5 に記載の抗体をコードする、単離核酸。

【請求項 2 7】

請求項 2 6 に記載の単離核酸を含む、発現ベクター。

【請求項 2 8】

請求項 2 6 に記載の単離核酸、又は請求項 2 7 に記載の発現ベクターを含む、宿主細胞。

40

【請求項 2 9】

前記二重特異性抗原結合分子の発現に適した条件下で請求項 2 8 に記載の宿主細胞を培養すること、及び前記二重特異性抗原結合分子を単離することを含む、二重特異性抗原結合分子を製造する方法。

【請求項 3 0】

請求項 1 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子又は請求項 2 4 若しくは 2 5 に記載の抗体と、薬学的に許容され得る担体とを含む、医薬組成物。

【請求項 3 1】

追加の治療薬剤をさらに含む、請求項 3 0 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 2】

50

医薬として使用するための、請求項 1 ~ 2.3 のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子、又は、請求項 3.0 に記載の医薬組成物。

【請求項 3.3】

- (i) C D 4 0 発現抗原提示細胞 (A P C) による免疫刺激の誘導において、
- (i i) 腫瘍特異的 T 細胞応答の刺激において、
- (i i i) 腫瘍細胞のアポトーシスを引き起こすことにおいて、
- (i v) 癌の処置において、
- (v) 癌の進行を遅らせることにおいて、
- (v i) 癌を患う患者の生存を延長することにおいて、
- (v i i) 感染症の処置において、

使用するための、請求項 1 ~ 2.3 のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子又は請求項 3.0 に記載の医薬組成物。

【請求項 3.4】

癌の処置に使用するための、請求項 1 ~ 2.3 のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子又は請求項 3.0 に記載の医薬組成物。

【請求項 3.5】

前記二重特異性抗原結合分子又は前記医薬組成物が、癌免疫療法で使用するための化学療法剤、放射線及び / 又は他の薬剤と組み合わせた投与のためのものである、癌の処置に使用するための、請求項 1 ~ 2.3 のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子、又は請求項 3.0 に記載の医薬組成物。

【請求項 3.6】

前記二重特異性抗原結合分子が、 P D - L 1 / P D - 1 相互作用を遮断する薬剤と組み合わせた投与のためのものである、癌の処置に使用するための、請求項 1 ~ 2.3 のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子又は請求項 3.0 に記載の医薬組成物。

【請求項 3.7】

癌の処置のための医薬の製造における、請求項 1 ~ 2.3 のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子又は請求項 3.0 に記載の医薬組成物の使用。

【請求項 3.8】

請求項 1 ~ 2.3 のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子又は請求項 3.0 に記載の医薬組成物を含む、癌を有する個体を処置するための医薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、線維芽細胞活性化タンパク質 (F A P) に特異的に結合可能な少なくとも 1 つの抗原結合ドメイン、 C D 4 0 に特異的に結合可能な少なくとも 1 つの抗原結合ドメイン、及び安定した会合が可能な第 1 及び第 2 のサブユニットから構成される F c ドメインを含む、新しい二重特異性抗原結合分子に関する。本発明は更に、新しい抗 F A P クローン 2 1 2 に関する。本発明の更なる態様は、これらの分子を製造する方法及びこれらの分子を使用する方法である。

【背景技術】

【0002】

強力な適応免疫応答の生成中には、複数の分子信号が必要である。シグナル 1 は、 T 細胞抗原受容体 (T C R) が、抗原提示細胞 (A P C) の表面に提示された同族の抗原に結合することに関与する。シグナル 2 は、共刺激受容体と T 細胞と A P C の間のそれぞれのリガンドとの結合で構成されている。最もよく研究され、最も重要な共刺激エフェクターの 1 つは、腫瘍壊死因子受容体 (T N F R) ファミリーメンバー C D 4 0 及びそのリガンド C D 4 0 L である (E l g u e t a R . e t a l . , I m m u n o l R e v . 2 0 0 9 ; 2 2 9 (1) : 1 5 2 - 7 2) 。 C D 4 0 を含む T N F R ファミリーのいくつかのメンバーは、最初の T 細胞活性化後に機能して A P C 及び T 細胞応答を維持し、そのために免疫系の組織化及び機能において極めて重要な役割を果たす (W a t t s T . H . (

10

20

30

40

50

2005) *Annu. Rev. Immunol.* 23, 23-68)。異なる共刺激 TNFRファミリーメンバーの組み合わせにより、APC及びT細胞の活性化と生存の連続的かつ一過性の調節が可能になり、APC及びT細胞機能の厳密な制御を維持しながら免疫応答が増加する。疾患症状に応じて、共刺激性 TNFRファミリーメンバーを介した刺激は、疾患を悪化又は改善する可能性がある。TNFRファミリー共刺激因子の活性化又は遮断は、癌、疾患、移植、及び自己免疫を含む複数の分野でのいくつかの治療への応用の可能性を示す。

【0003】

いくつかの共刺激分子の中で、TNFRファミリーメンバーCD40は、成熟、生存、抗原提示、サイトカイン産生、及びAPCの共刺激分子の発現を誘導することにより免疫応答を誘発する重要な役割を果たし、炎症性サイトカインによる抗原特異的T細胞応答とNK細胞活性化を促進する。CD40は、感染症、腫瘍、自己抗原に対する免疫応答を調節し、その発現は、血小板だけでなく、B細胞、樹状細胞(DC)、単球、マクロファージなどのAPC、筋線維芽細胞、線維芽細胞、上皮細胞、及び内皮細胞などの非造血起源の細胞の表面で実証されている(Elgueta R. et al., *Immunol Rev.* 2009; 229(1): 152-72)。CD40リガンドCD40Lは、活性化CD4⁺ヘルパーT細胞、血小板、単球細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、及び好塩基球に発現する(Carbone E. et al., *J Exp Med.* 1997; 185(12): 2053-2060又はElgueta R. et al., *Immunol Rev.* 2009; 229(1): 152-72)。CD40及びCD40Lの発現は、さまざまな免疫刺激シグナルに応答して強くアップレギュレートされ、APCとCD4⁺T細胞間のCD40-CD40L相互作用は、APC活性化及び抗原特異的CD8⁺T細胞応答の増加に寄与する(Bevan M.J., *Nat Rev Immunol.* 2014; 4(8): 595-602)。同様の免疫刺激の結果は、CD40アゴニスト抗体を使用することによって観察された(Vonderheide R.H. and Glennie M.J., *Clin Cancer Res.* 2013; 19(5): 1035-43)。

【0004】

天然リガンドCD40L、II型膜貫通タンパク質又はアゴニスト抗体によるI型膜貫通受容体CD40の関与は、CD40クラスター化を促進し、細胞質受容体ドメインへのアダプタータンパク質の動員を誘導する。TNF受容体関連因子(TRAF)として知られるこれらのアダプタータンパク質の動員は、マイトジェン活性化プロテインキナーゼ(MAPK)、ホスホイノシチド3-キナーゼ(PI3K)、及びカノニカル及び非カノニカル核因子B(NF- κ B)シグナル伝達経路の相乗的活性化につながる(Elgueta R. et al., *Immunol Rev.* 2009; 229(1): 152-72)。次に、これによりAPCの成熟と活性化が起こり、抗原特異的T細胞応答が最大化される。最近の研究では、抗腫瘍免疫を利用する際のアゴニストCD40抗体の2つの異なる作用機序が示されている。適応免疫系の活性化を介した媒介腫瘍細胞殺傷によるその間接的な作用機序に加えて、アゴニストCD40抗体は、CD40発現固形腫瘍細胞のアポトーシスを誘導することにより直接腫瘍細胞死滅を誘導することができる(Eliopoulos A.G. et al., *Mol Cell Biol.* 2000; 20(15): 5503-15)。CD40抗体を介した腫瘍細胞の直接死滅は、抗CD40抗体を介したCD40関与によって同時に活性化されるAPCによって処理及び提示できる腫瘍抗原の供給源を提供し、腫瘍抗原特異的T細胞を、内因性ワクチン接種として知られている仮定されたメカニズムを誘導することができる。CD40関与が効率的な抗がん免疫応答につながることを考えると、アゴニストCD40抗体は、単剤として、又は化学療法と組み合わせ、さまざまな前臨床腫瘍モデルで順調に使用されている(Vonderheide R.H. and Glennie M.J., *Clin Cancer Res.* 2013; 19(5): 1035-43)。

【0005】

10

20

30

40

50

現在までに、6つのCD40 mAbが臨床試験で調査中である。Chi Lob 7 / 4 (CD40 agonistic IgG1 chimeric mAb; Cancer Research UK; Chowdhury F. et al., Cancer Immunol Res. 2013; 2: 229 - 40)、ADC1013 (完全ヒト、CD40アゴニストIgG1抗体; Alligator Bioscience and Johnson & Johnson; Mangsbo SM. et al., Clin Cancer Res. 2015 Mar 1; 21(5): 1115 - 26)、APX-005 (完全ヒト化、CD40アゴニストIgG1 mAb; Apexigen; Bjorck P. et al. J Immunother Cancer. 2015; 3(Suppl 2): P198)、SEA-CD40 (CD40アゴニストIgG1キメラmAb; Seattle Genetics; Gardai SJ. et al. AACR 106th Annual Meeting 2015; April 18 - 22, abstract 2472)、及びRO7009789 (完全ヒト、CD40スーパーアゴニストIgG2 mAb)は、臨床第I相試験で調査され、ダセツズマブ (CD40部分アゴニストIgG1キメラmAb; Seattle Genetics; Khubchandani S. et al., Curr Opin Investig Drugs. 2009; 10, 579 - 87)は、臨床第II相研究で調査されている。これらの研究の対象となる患者は、固形腫瘍、古典的ホジキンリンパ腫 (HL)、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫 (DLBCL)、又は無痛性リンパ腫 (濾胞性リンパ腫を含む)を有する。補体媒介性細胞傷害 (CMC) 又は抗体依存性細胞傷害 (ADCC) を介したCD40⁺腫瘍細胞のFc依存性細胞傷害から、抗腫瘍T細胞応答を誘導するAPC活性化、及び腫瘍と腫瘍ストロマを枯渇させるマクロファージ活性化に至るまでの多様な活性が、これらのCD40アゴニスト抗体について示されている。これまでのところ、この観察された不均一性についての決定的な説明はない。しかし、最近の研究では、この作用機序の多様性は、少なくとも部分的には、エピトープ特異性、アイソタイプ、又はFc:FcR相互作用における抗CD40抗体の違いによって説明できることが示されている。例えば、インビボでのCD40アゴニスト抗体は、TNFRスーパーファミリーの他のアポトーシス誘導又は免疫調節剤メンバーに特異的なアゴニスト抗体について記載されているように、標的細胞上のそのFabフラグメントによって結合されたCD40を、標的細胞以外の細胞上のそのFcフラグメントによって結合されたFc受容体に架橋することを必要とするようである。(Dahan R., Cancer Cell. 2016 Jun 13; 29(6): 820 - 31; Li F. and Ravetch J. V. Science, 2011; 333, 1030 - 1034; Teng M. W. et al., J. Immunol. 2009; 183, 1911 - 1920)。提案されたメカニズムには、標的細胞上のCD40膜貫通分子のFc受容体を介したクラスター化と、それに続く強力なインビボでの有効性を達成するためのCD40シグナル伝達の強化が含まれる。

【0006】

アゴニストCD40抗体の臨床開発は、有望な初期結果を提供している。最初の臨床試験で、CP-870, 893は進行がん患者に臨床有効性を示した。進行がんの29人の患者のうち4人は、CP-870, 893の単回静脈内注入を受けた後に部分的な反応を示した (Vonderheide RH., J Clin Oncol. 2007 Mar 1; 25(7): 876 - 83)。1年半にわたってCP-870, 893の9回のその後の投与で処置されたこれらの4人の患者のうちの1人は5年以上の間、完全寛解を維持した。但し、CP-870, 893の最も一般的な副作用は、サイトカイン放出症候群と血栓塞栓性イベントであるため、140人を超える患者を対象とした第1相臨床試験のデータを組み合わせた投与スケジュールと投与経路では、限られた臨床有効性しか示されておらず、抗体の局所投与が提案された (Vonderheide RH, Glennie M, Clin Cancer Res. 2013, 19(5), 1035 - 1043)。単剤反応の欠如は、部分的には、広範なCD40発現によって引き起こされる標的上/腫瘍外への深刻な影響が原因で発生し、その結果、用量制限毒性 (サイトカイン放出症候群な

10

20

30

40

50

ど)が生じる。CD40が腫瘍特異的標的によって架橋されたときにAPCを特異的に活性化するアゴニストCD40抗体の開発は、副作用を減らし、用量制限を減らし、効率的で長期的な抗癌免疫を生み出す可能性のある新しい治療オプションを提供する。

【0007】

入手可能な前臨床及び臨床データは、癌に対する効果的な内因性免疫応答を誘導及び増強することができるCD40の効果的なアゴニストに対する高い臨床的必要性があることを明確に示している。しかし、効果が単一のタイプの細胞に限定されたり、単一のメカニズムを介して作用したりすることはほとんどなく、また細胞間及び細胞内のシグナル伝達メカニズムを解明するために設計された研究により、複雑さのレベルが高まっていることが明らかになった。既知のCD40抗体は、サイトカイン放出症候群や血小板/内皮細胞の活性化などの用量制限毒性のため、比較的低用量でしか投与できず、標的APCの経路の活性化が不十分で治療指数が狭くなる。したがって、好ましくは単一のタイプの細胞に作用する「標的化された」アゴニストが必要である。

10

【0008】

本発明は、CD40及び線維芽細胞活性化タンパク質(FAP)に特異的に結合可能なことができ、したがってFAPに結合することができる部分をCD40にアゴニスト結合することができる部分と組み合わせる新しい二重特異性抗原結合分子に関し、CD40を介したAPCの活性化は、腫瘍間質細胞に発現するFAPを介した架橋によって提供され、また二次リンパ組織に中間的に発現するFAPを介して提供される可能性もある。CD40及びCTLA-4やPD-1などの活性化T細胞上の免疫チェックポイント受容体に特異的に結合可能な二重特異性抗原結合分子とは対照的に、FAPなどの腫瘍標的を標的とすることで、主に腫瘍間質及び線維芽細胞が他の組織と比較して増加したレベルのFAPを発現する腫瘍排出リンパ節において、CD40を介したAPC活性化が可能になる。したがって、本発明の抗原結合分子は、CD40受容体を効果的に誘発するだけでなく、FcR架橋の必要性を克服し、それによって副作用を低減しながら、所望の部位で非常に選択的に誘発することができる。新しい二重特異性抗原結合分子は、FcドメインのC末端に融合したときにその優れた結合特性を失わない新しいFAP抗原結合ドメインを含むことによって更に特徴付けられる。

20

【発明の概要】

【0009】

本発明は、共刺激性TNF受容体ファミリーメンバーCD40に特異的に結合可能な少なくとも1つの抗原結合ドメインと、新しいマウス抗ヒトFAPクローン212及びそのヒト化変異体を含む線維芽細胞活性化タンパク質(FAP)を標的とする少なくとも1つの抗原結合ドメインとを組み合わせる二重特異性抗原結合分子に関する。これらの二重特異性抗原結合分子は、FAPに高い親和性で結合可能なため、FAPが発現する腫瘍関連部位で共刺激CD40受容体を活性化することが好ましいため、有利である。

30

【0010】

一つの態様において、本発明は、

(a) CD40に特異的に結合可能な少なくとも1つの抗原結合ドメインと、

(b) (i) 配列番号3のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii) 配列番号4、配列番号11及び配列番号12からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-H2、及び(iii) 配列番号5のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む重鎖可変領域(V_HFAP)、並びに(iv) 配列番号6、配列番号13及び配列番号14からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-L1、(v) 配列番号7のアミノ酸配列を含むCDR-L2、及び(vi) 配列番号8のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含む軽鎖可変領域(V_LFAP)を含む線維芽細胞活性化タンパク質(FAP)に特異的に結合可能な少なくとも1つの抗原結合ドメインと、を含む、二重特異性抗原結合分子を提供する。

40

【0011】

特定の態様において、二重特異性抗原結合分子は、(a) CD40に特異的に結合可能

50

少なくとも1つの抗原結合ドメインと、(b)(i)配列番号3のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii)配列番号4、配列番号11及び配列番号12からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-H2、及び(iii)配列番号5のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む重鎖可変領域(V_HFAP)、並びに、(iv)配列番号6、配列番号13及び配列番号14からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-L1、(v)配列番号7のアミノ酸配列を含むCDR-L2、及び(vi)配列番号8のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含む軽鎖可変領域(V_LFAP)を含むFAPに特異的に結合可能な少なくとも1つの抗原結合ドメインと、(c)安定した会合が可能な第1及び第2のサブユニットから構成されるFcドメインと、を含む。より具体的には、安定した会合が可能な第1及び第2のサブユニットから構成されるFcドメインは、エフェクター機能を低下させる突然変異を含む。

10

【0012】

一つの態様において、FAPに特異的に結合可能な少なくとも1つの抗原結合ドメインが、(i)配列番号3のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii)配列番号4からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-H2、及び(iii)配列番号5のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む重鎖可変領域(V_HFAP)、並びに、(iv)配列番号6からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-L1、(v)配列番号7のアミノ酸配列を含むCDR-L2、及び(vi)配列番号8のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含む軽鎖可変領域(V_LFAP)を含む。一つの態様において、FAPに特異的に結合可能な抗原結合ドメインは、配列番号9のアミノ酸配列に少なくとも約90%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(V_HFAP)、及び、配列番号10のアミノ酸配列に少なくとも約90%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(V_LFAP)を含む。特定の態様において、FAPに特異的に結合可能な抗原結合ドメインは、配列番号9のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(V_HFAP)、及び配列番号10のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(V_LFAP)を含む。

20

【0013】

別の態様において、FAPに特異的に結合可能な抗原結合ドメインが、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19及び配列番号20からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(V_HFAP)と、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25及び配列番号26からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(V_LFAP)と、を含む。より具体的には、FAPに特異的に結合可能な抗原結合ドメインは、(a)配列番号15のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(V_HFAP)及び配列番号21のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(V_LFAP)、又は、(b)配列番号16のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(V_HFAP)及び配列番号21のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(V_LFAP)、又は、(c)配列番号16のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(V_HFAP)及び配列番号22のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(V_LFAP)、又は、(d)配列番号19のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(V_HFAP)及び配列番号25のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(V_LFAP)を含む。より具体的には、FAPに特異的に結合可能な抗原結合ドメインは、(a)配列番号15のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(V_HFAP)、及び配列番号21のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(V_LFAP)を含む。

30

40

【0014】

一つの態様において、CD40に特異的に結合可能な抗原結合ドメインは、配列番号1のアミノ酸配列を含む、又はそれからなる、ポリペプチドに結合する。

【0015】

更なる態様において、提供されるのは、少なくとも1つのCD40に特異的に結合可能な抗原結合ドメインが、(i)配列番号27のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii)配列番号28のアミノ酸配列を含むCDR-H2、及び(iii)配列番号29のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む重鎖可変領域(V_HCD40)、並びに、(iv)配列番号30のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(v)配列番号31のアミノ酸配列を含

50

む C D R - L 2、及び (v i) 配列番号 3 2 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3 を含む軽鎖可変領域 (V_L C D 4 0) を含む、二重特異性抗原結合分子である。

【 0 0 1 6 】

一つの態様において、提供されるのは、本明細書で以前に定義された二重特異性抗原結合分子であって、C D 4 0 に特異的に結合可能な少なくとも一つの抗原結合ドメインが、

(i) 配列番号 3 7、配列番号 3 8、配列番号 3 9 及び配列番号 4 0 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V_H C D 4 0) と、

(i i) 配列番号 4 1、配列番号 4 2、配列番号 4 3、及び配列番号 4 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V_L C D 4 0) と、を含む、本明細書で以前に定義された二重特異性抗原結合分子である。

10

【 0 0 1 7 】

別の態様において、提供されるのは、二重特異性抗原結合分子であって、C D 4 0 に特異的に結合可能な少なくとも一つの抗原結合ドメインが、(i) 配列番号 4 5、配列番号 4 6、配列番号 4 7、配列番号 4 8、配列番号 4 9 及び配列番号 5 0 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V_H C D 4 0) と、

(i i) 配列番号 5 1、配列番号 5 2、配列番号 5 3、及び配列番号 5 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V_L C D 4 0) と、を含む、前に本明細書で定義された二重特異性抗原結合分子である。

【 0 0 1 8 】

更に、提供されるのは、本明細書で以前に定義された二重特異性抗原結合分子であって、C D 4 0 に特異的に結合可能な少なくとも一つの抗原結合ドメインが、

20

(a) 配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む V_H、及び配列番号 4 1 のアミノ酸配列を含む V_L、又は

(b) 配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む V_H、及び配列番号 4 2 のアミノ酸配列を含む V_L、又は

(c) 配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む V_H、及び配列番号 4 3 のアミノ酸配列を含む V_L、又は

(d) 配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む V_H、及び配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含む V_L、又は

(e) 配列番号 3 8 のアミノ酸配列を含む V_H、及び配列番号 4 1 のアミノ酸配列を含む V_L、又は

30

(f) 配列番号 3 8 のアミノ酸配列を含む V_H、及び配列番号 4 2 のアミノ酸配列を含む V_L、又は

(g) 配列番号 3 8 のアミノ酸配列を含む V_H、及び配列番号 4 3 のアミノ酸配列を含む V_L、又は

(h) 配列番号 3 8 のアミノ酸配列を含む V_H、及び配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含む V_L、又は

(i) 配列番号 3 9 のアミノ酸配列を含む V_H、及び配列番号 4 1 のアミノ酸配列を含む V_L、又は

(j) 配列番号 3 9 のアミノ酸配列を含む V_H、及び配列番号 4 2 のアミノ酸配列を含む V_L、又は

40

(k) 配列番号 3 9 のアミノ酸配列を含む V_H、及び配列番号 4 3 のアミノ酸配列を含む V_L、又は

(l) 配列番号 3 9 のアミノ酸配列を含む V_H、及び配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含む V_L、又は

(m) 配列番号 4 0 のアミノ酸配列を含む V_H、及び配列番号 4 1 のアミノ酸配列を含む V_L、又は

(n) 配列番号 4 0 のアミノ酸配列を含む V_H、及び配列番号 4 2 のアミノ酸配列を含む V_L、又は

(o) 配列番号 4 0 のアミノ酸配列を含む V_H、及び配列番号 4 3 のアミノ酸配列を含む V_L、又は

50

む V L、又は

(p) 配列番号 4 0 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含む V L を含む、本明細書で以前に定義された二重特異性抗原結合分子である。

【 0 0 1 9 】

特定の態様において、二重特異性抗原結合分子が提供され、C D 4 0 に特異的に結合可能な少なくとも 1 つの抗原結合ドメインが、配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む V H と、配列番号 4 1 のアミノ酸配列を含む V L とを含む。

【 0 0 2 0 】

更なる態様において、提供されるのは、二重特異性抗原結合分子であって、C D 4 0 に特異的に結合可能な少なくとも 1 つの抗原結合ドメインが、

(a) 配列番号 4 5 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 5 1 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(b) 配列番号 4 6 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 5 1 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(c) 配列番号 4 7 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 5 1 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(d) 配列番号 4 8 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 5 1 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(e) 配列番号 4 5 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 5 2 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(f) 配列番号 4 6 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 5 2 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(g) 配列番号 4 7 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 5 2 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(h) 配列番号 4 8 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 5 2 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(i) 配列番号 4 9 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 5 3 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(j) 配列番号 5 0 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 5 3 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(k) 配列番号 4 9 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 5 4 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(l) 配列番号 5 0 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 5 4 のアミノ酸配列を含む V L を含む、二重特異性抗原結合分子である。

【 0 0 2 1 】

更なる具体的な態様において、二重特異性抗原結合分子が提供され、少なくとも 1 つの C D 4 0 に特異的に結合可能な抗原結合ドメインが、配列番号 4 5 のアミノ酸配列を含む V H 及び配列番号 5 1 のアミノ酸配列を含む V L を含む、又は C D 4 0 に特異的に結合可能な抗原結合ドメインが、配列番号 4 8 のアミノ酸配列を含む V H 及び配列番号 5 1 のアミノ酸配列を含む V L を含む。

【 0 0 2 2 】

より具体的には、提供されるのは、二重特異性抗原結合分子であり、

(i) 配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V_H C D 4 0) 及び配列番号 4 1 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V_L C D 4 0) を含む、C D 4 0 に特異的に結合可能な少なくとも 1 つの抗原結合ドメインと、

(i i) 配列番号 1 5 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V_H F A P) 及び配列番号 2 1 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V_L F A P) を含む、F A P に特異的に結合可能な少なくとも 1 つの抗原結合ドメインと、を含む。

【 0 0 2 3 】

一つの態様において、二重特異性抗原結合分子は、ヒト化抗体又はキメラ抗体である。

10

20

30

40

50

更なる態様において、二重特異性抗原結合分子は、I g G F c領域、特にI g G 1 F c領域又はI g G 4 F c領域を含む。具体的には、F c領域は、F c受容体及び/又はエフェクター機能に対する抗体の結合親和性を低下させる1つ以上のアミノ酸置換を含む。特定の態様において、提供されるのは、二重特異性抗原結合分子であって、F c領域が、アミノ酸変異L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、及びP 3 2 9 G (K a b a t E Uインデックスによる番号付け)を有するヒトI g G 1サブクラスのF c領域である、二重特異性抗原結合分子である。

【0024】

別の態様において、提供されるのは、二重特異性抗原結合分子であって、F c領域の第1のサブユニットが、ノブを含み、F c領域の第2のサブユニットが、ノブからホールへ
10
の方法によるホールを含む、二重特異性抗原結合分子である。具体的には、提供されるのは、二重特異性抗原結合分子であって、(i) F c領域の第1のサブユニットが、アミノ酸置換S 3 5 4 C及びT 3 6 6 W (K a b a t E Uインデックスによる番号付け)を含み、F c領域の第2のサブユニットが、アミノ酸置換Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S及びY 4 0 7 V (K a b a t E Uインデックスによる番号付け)を含み、又は(ii) F c領域の第1のサブユニットが、アミノ酸置換K 3 9 2 D及びK 4 0 9 D (K a b a t E Uインデックスによる番号付け)を含み、及びF c領域の第2のサブユニットが、アミノ酸置換E 3 5 6 K及びD 3 9 9 K (K a b a t E Uインデックスによる番号付け)を含む、二重特異性抗原結合分子である。より具体的には、提供されるのは、二重特異性抗原結合分子であって、F c領域の第1のサブユニットが、アミノ酸置換S 3 5 4 C及びT 3 6 6 W
20
(K a b a t E Uインデックスによる番号付け)を含み、F cドメインの第2のサブユニットが、アミノ酸置換Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S及びY 4 0 7 V (K a b a t E Uインデックスによる番号付け)を含む、二重特異性抗原結合分子である。

【0025】

更なる態様において、提供されるのは、二重特異性抗原結合分子であって、二重特異性抗原結合分子は、

(a) F c領域に連結したC D 4 0に特異的に結合可能な少なくとも2つのF a bフラグメントと、

(b) F c領域のC末端に連結したF A Pに特異的に結合可能な1つの抗原結合ドメインと、を含む、二重特異性抗原結合分子である。
30

【0026】

したがって、提供されるのは、C D 4 0に対する二価の結合及びF A Pに対する一価の結合を提供する二重特異性抗原結合分子である。

【0027】

別の態様において、提供されるのは、二重特異性抗原結合分子であって、二重特異性抗原結合分子は、

(a) F c領域に融合したC D 4 0に特異的に結合可能な少なくとも2つのF a bフラグメントと、

(b) F c領域のC末端に融合したF A Pに特異的に結合可能な1つの抗原結合ドメインと、を含む、二重特異性抗原結合分子である。
40

【0028】

特定の態様において、F c領域のC末端に連結したF A Pに特異的に結合可能な抗原結合ドメインは、クロスF a bフラグメントである。したがって、提供されるのは、二重特異性抗原結合分子であって、二重特異性抗原結合分子は、

(a) F c領域に融合したC D 4 0に特異的に結合可能な少なくとも2つのF a bフラグメントと、

(b) F c領域のC末端に融合したF A Pに特異的に結合可能なクロスF a bフラグメントと、を含む、二重特異性抗原結合分子である。

【0029】

更なる態様において、二重特異性抗原結合分子は、C D 4 0に特異的に結合可能な4つ
50

の F a b フラグメントを含む。したがって、提供されるのは、C D 4 0 に対する四価の結合及び F A P に対する一価の結合を提供する二重特異性抗原結合分子である。

【 0 0 3 0 】

したがって、一つの態様において、提供されるのは、二重特異性抗原結合分子であって、
(a) C D 4 0 に特異的に結合可能な 2 つの F a b フラグメントと F c 領域を含む抗体の 2 つの軽鎖と 2 つの重鎖と、

(b) F A P に特異的に結合可能な抗原結合ドメインの V H 及び V L であって、V H は (a) の 2 つの重鎖の 1 つの C 末端に融合し、V L は (a) の 2 つの重鎖のもう一方の C 末端に融合する、V H 及び V L と、を含む、二重特異性抗原結合分子である。

【 0 0 3 1 】

別の態様において、提供されるのは、二重特異性抗原結合分子であって、

(a) C D 4 0 に特異的に結合可能な 2 つの F a b フラグメントと F c 領域を含む抗体の 2 つの軽鎖と 2 つの重鎖と、

(b) F A P に特異的に結合可能なクロス F a b フラグメントであって、V H - C カップ鎖は (a) の 2 つの重鎖の 1 つの C 末端に融合した、クロス F a b フラグメントと、を含む、二重特異性抗原結合分子である。

【 0 0 3 2 】

更に別の態様において、提供されるのは、二重特異性抗原結合分子であって、

(a) C D 4 0 に特異的に結合可能な 2 つの F a b フラグメントと F c 領域を含む抗体の 2 つの軽鎖と 2 つの重鎖と、

(b) F A P に特異的に結合可能なクロス F a b フラグメントであって、V L - C H 1 鎖が、(a) の 2 つの重鎖の 1 つの C 末端に融合した、クロス F a b フラグメントと、を含む、二重特異性抗原結合分子である。

【 0 0 3 3 】

更に、提供されるのは、二重特異性抗原結合分子であって、

(a) C D 4 0 に特異的に結合可能な 2 つの F a b フラグメントと F c 領域を含む抗体の 2 つの軽鎖と 2 つの重鎖と、

(b) F A P に特異的に結合可能な 2 つの F a b フラグメントであって、1 つの F a b フラグメントが、(a) の 2 つの重鎖の 1 つの C 末端に連結し、もう 1 つの F a b フラグメントが、(a) の 2 つの重鎖のもう一方の C 末端に連結した、F a b フラグメントと、を含む、二重特異性抗原結合分子である。

【 0 0 3 4 】

別の態様において、提供されるのは、二重特異性抗原結合分子であって、二重特異性抗原結合分子は、

(a) 2 つの重鎖であって、各重鎖が、C D 4 0 に特異的に結合可能な F a b フラグメントの V H 及び C H 1 ドメイン、及び F c 領域サブユニットを含む、2 つの重鎖と、

(b) 2 つの軽鎖であって、各軽鎖が、C D 4 0 に特異的に結合可能な F a b フラグメントの V L 及び C L ドメインを含む、2 つの軽鎖と、

(c) F A P に特異的に結合可能な 1 つの F a b フラグメントであって、F a b フラグメントが、(a) の 2 つの重鎖の 1 つの C 末端に連結した、F a b フラグメントと、を含む、二重特異性抗原結合分子である。

【 0 0 3 5 】

別の態様において、F A P に特異的に結合可能な F a b フラグメントは、V L - C H 1 鎖及び V H - C カップ鎖を含み、V H - C カップ鎖又は V L - C H 1 鎖が、(a) の 2 つの重鎖のうちの 1 つの C 末端に連結したクロス F a b フラグメントである。

【 0 0 3 6 】

一つの態様において、提供されるのは、二重特異性抗原結合分子であって、二重特異性抗原結合分子が、C D 4 0 に特異的に結合可能な 4 つの F a b フラグメントを含む、二重特異性抗原結合分子である。特定の態様において、提供されるのは、本明細書で以前に定義された二重特異性抗原結合分子であって、(a) の 2 つの重鎖のそれぞれが、互いに、

10

20

30

40

50

必要に応じてペプチドリンカーによって、連結したCD40に特異的に結合可能なFabフラグメントの2つのVH-CH1鎖を含む、二重特異性抗原結合分子である。

【0037】

したがって、一つの態様において、本発明は、

(a) 2つの重鎖であって、各重鎖は、CD40に特異的に結合可能なFabフラグメントの2つのVH-CH1鎖を含み、これらは、必要に応じてペプチドリンカー、及びFc領域サブユニットによって互いに連結されている、2つの重鎖と、

(b) 4つの軽鎖であって、各軽鎖が、CD40に特異的に結合可能なFabフラグメントのVL及びCカッパドメインを含む、4つの軽鎖と、

(c) VL-CH1鎖及びVH-Cカッパ鎖を含むFAPに特異的に結合可能なクロスFabフラグメントであって、VH-Cカッパ鎖又はVL-CH1鎖が、(a)の2つの重鎖のうちの1つのC末端に、必要に応じてペプチドリンカーによって連結した、クロスFabフラグメントと、を含む、二重特異性抗原結合分子を提供する。

10

【0038】

別の態様において、提供されるのは、二重特異性抗原結合分子であって、

(a) 2つの重鎖であって、各重鎖は、CD40に特異的に結合可能なFabフラグメントの2つのVH-CH1鎖を含み、これらは、必要に応じてペプチドリンカー、及びFc領域サブユニットによって互いに連結されている、2つの重鎖と、

(b) 4つの軽鎖であって、各軽鎖が、CD40に特異的に結合可能なFabフラグメントのVL及びCLドメインを含む、4つの軽鎖と、

(c) FAPに特異的に結合可能なクロスFabフラグメントであって、上記クロスFabフラグメントのVH-CL鎖が、(a)の2つの重鎖の1つのC末端に連結した、クロスFabフラグメントと、を含む、二重特異性抗原結合分子である。

20

【0039】

更に別の態様において、提供されるのは、二重特異性抗原結合分子であって、

(a) 2つの重鎖であって、各重鎖は、CD40に特異的に結合可能なFabフラグメントの2つのVH-CH1鎖を含み、これらは、必要に応じてペプチドリンカー、及びFc領域サブユニットによって互いに連結されている、2つの重鎖と、

(b) 4つの軽鎖であって、各軽鎖が、CD40に特異的に結合可能なFabフラグメントのVL及びCLドメインを含む、4つの軽鎖と、

(c) FAPに特異的に結合可能なクロスFabフラグメントであって、上記クロスFabフラグメントのVL-CH1鎖が、(a)の2つの重鎖の1つのC末端に連結した、クロスFabフラグメントと、を含む、二重特異性抗原結合分子である。

30

【0040】

別の態様において、提供されるのは、FAPに特異的に結合する抗体であって、(i) 配列番号3のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii) 配列番号4、配列番号11及び配列番号12からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-H2、及び(iii) 配列番号5のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む重鎖可変領域(VHFAP)、並びに、(iv) 配列番号6、配列番号13及び配列番号14からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-L1、(v) 配列番号7のアミノ酸配列を含むCDR-L2、及び(vi) 配列番号8のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含む軽鎖可変領域(VLFAP)を含む、抗体である。ある特定の態様において、提供されるのは、FAPに特異的に結合する抗体であって、(i) 配列番号3のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii) 配列番号4からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-H2、及び(iii) 配列番号5のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む重鎖可変領域(VHFAP)、並びに、(iv) 配列番号6からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-L1、(v) 配列番号7のアミノ酸配列を含むCDR-L2、及び(vi) 配列番号8のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含む軽鎖可変領域(VLFAP)を含む、抗体である。

40

【0041】

更なる態様において、提供されるのは、(a) 配列番号15のアミノ酸配列を含む重鎖

50

可変領域（ $V_H F A P$ ）及び配列番号 21 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（ $V_L F A P$ ）、又は、（b）配列番号 16 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ $V_H F A P$ ）及び配列番号 21 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（ $V_L F A P$ ）、又は、（c）配列番号 16 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ $V_H F A P$ ）及び配列番号 22 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（ $V_L F A P$ ）、又は、（d）配列番号 19 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（ $V_H F A P$ ）及び配列番号 25 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（ $V_L F A P$ ）を含む、抗体である。

【0042】

本発明の別の態様に従うと、本明細書にて上述した二重特異性抗原結合分子をコードする単離核酸が提供される。また、本明細書で上述したように、抗体をコードする単離核酸も提供される。本発明は更に、ベクター、特に、本発明の単離核酸と、単離核酸又は本発明のベクターを含む宿主細胞とを含む発現ベクターを提供する。いくつかの態様では、宿主細胞は真核細胞、特に哺乳動物細胞である。別の態様において、提供されるのは、本明細書で上述の二重特異性抗原結合分子又は抗体を産生する方法であって、二重特異性抗原結合分子又は抗体の発現に適した条件下で上記のように宿主細胞を培養すること、及び二重特異性抗原結合分子又は抗体を単離することを含む、二重特異性抗原結合分子又は抗体を製造する方法である。本発明はまた、 $C D 4 0$ 及び $F A P$ に特異的に結合する二重特異性抗原結合分子、又は本発明の方法によって製造された $F A P$ に特異的に結合する抗体を包含する。

【0043】

本発明は更に、本明細書で上述した二重特異性抗原結合分子又は本明細書で上述した抗体及び薬学的に許容され得る担体を含む医薬組成物を提供する。一つの態様において、医薬組成物は、追加の治療薬剤を含む。

【0044】

医薬として使用するための、本明細書で上述した二重特異性抗原結合分子又は抗体、並びに、二重特異性抗原結合分子を含む医薬組成物もまた、本発明に包含されている。

【0045】

一つの態様において、提供されるのは、本明細書にて上述した二重特異性抗原結合分子、又は、本発明の医薬組成物であり、

- (i) $C D 4 0$ 発現抗原提示細胞（ $A P C$ ）による免疫刺激の誘導において、
- (ii) 腫瘍特異的 T 細胞応答の刺激において、
- (iii) 腫瘍細胞のアポトーシスを引き起こすことにおいて、
- (iv) 癌の処置において、
- (v) 癌の進行を遅らせることにおいて、
- (vi) 癌を患う患者の生存を延長することにおいて、
- (vii) 感染症の処置において、

使用するための、二重特異性抗原結合分子、又は、医薬組成物である。

【0046】

一つの態様において、癌の処置で使用するための、本明細書にて上述した二重特異性抗原結合分子、又は本発明の医薬組成物を提供する。別の態様においては、本発明は、化学療法剤、放射線及び/又は癌免疫療法で使用する他の剤と組み合わせて投与される、癌の処置で使用するための、本明細書にて上述した二重特異性抗原結合分子を提供する。一つの態様において、本明細書に記載の二重特異性抗原結合分子は、癌の処置に使用するためのものであり、二重特異性抗原結合分子は、 $P D - L 1 / P D - 1$ 相互作用を遮断する薬剤と組み合わせて投与するためのものである。別の態様において、提供されるのは、細胞傷害性 T 細胞活性をアップレギュレート又は延長する際に使用するための、本明細書で上述したような二重特異性抗原結合分子又は本発明の医薬組成物である。更なる態様において、提供されるのは、癌の処置に使用するための、本明細書で上述したような抗体である。

【0047】

更なる態様において、本発明は、個体における腫瘍細胞の増殖の阻害方法であって、当

該個体に有効量の、本明細書にて上述した二重特異性抗原結合分子、又は本発明の医薬組成物を投与して、当該腫瘍細胞の増殖を阻害することを含む、方法を提供する。別の態様において、本発明は、本明細書で上述した有効量の二重特異性抗原結合分子又は本発明の医薬組成物を個体に投与することを含む、個体の癌を処置又は遅延させる方法を提供する。

【0048】

疾患の処置を必要とする個体での、疾患の処置のための医薬を作製するための、具体的には、癌の処置のための医薬の製造のための、本明細書にて上述した二重特異性抗原結合分子の使用、及び、個体における疾患の処置方法であって、個体に、治療有効量の、本発明の二重特異性抗原結合分子を薬学的に許容され得る形態で含む組成物を投与することを含む、方法もまた提供する。特定の態様において、疾患は、癌である。上記態様のいずれかにおいて、個体は哺乳類、特にヒトである。

10

【図面の簡単な説明】

【0049】

【図1A-F】ヒトCD40及びFAPに特異的に結合する二重特異性抗原結合分子の概略図を示す。図1Aは、クロスオーバーFabフラグメントとして1つのFAP(212)結合部分と組み合わせられた2つのCD40結合部分からなる2+1フォーマットの二重特異性FAP-CD40抗体の概略図を示し、VL-CH1鎖は、Fcノブ鎖のC末端(CD40では二価、FAPでは一価)で融合される。図1Bは、クロスオーバーFabフラグメントとして1つのFAP(4B9)結合部分と組み合わせられた2つのCD40結合部分からなる2+1フォーマットの二重特異性FAP-CD40抗体の概略図を示し、VH-Cカッパ鎖は、Fcノブ鎖のC末端(CD40では二価、FAPでは一価)で融合される。図1Cは、クロスオーバーFabフラグメントとして1つのFAP(28H1)結合部分と組み合わせられた2つのCD40結合部分からなる2+1フォーマットの二重特異性FAP-CD40抗体の概略図を示し、VL-CH1鎖は、Fcノブ鎖のC末端(CD40では二価、FAPでは一価)で融合される。図1Dは、クロスオーバーFabフラグメントとして1つのFAP(212)結合部分と組み合わせられた4つのCD40結合部分からなる4+1フォーマットの二重特異性FAP-CD40抗体の概略図を示し、VL-CH1鎖は、Fcノブ鎖のC末端(CD40では四価、FAPでは一価)で融合される。図1Eは、クロスオーバーFabフラグメントとして1つのFAP(4B9)結合部分と組み合わせられた4つのCD40結合部分からなる4+1フォーマットの二重特異性FAP-CD40抗体の概略図を示し、VH-Cカッパ鎖は、Fcノブ鎖のC末端(CD40では四価、FAPでは一価)で融合される。図1Fは、クロスオーバーFabフラグメントとして1つのFAP(28H1)結合部分と組み合わせられた4つのCD40結合部分からなる4+1フォーマットの二重特異性FAP-CD40抗体の概略図を示し、VL-CH1鎖は、Fcノブ鎖のC末端(CD40では四価、FAPでは一価)で融合される。黒い点は、ノブ・イントゥ・ホール(knob-into-hole)突然変異を表している。あるいは、全ての分子において、クロスFabのVH-Cカッパ鎖は、Fcノブ鎖のC末端で融合され得る。

20

30

【図2A-2B】FAPクローン4B9及び28H1と競合してトランスフェクトされたHEK細胞上で発現されたヒトFAPへの免疫由来FAPクローンの細胞結合を示す。図2Aは、試験した全てのハイブリドーマ由来のマウスクローン(209、210、211、212、213、214、215、216、217及び218という名前)が抗FAP抗体4B9との結合について競合しなかったことを示す。図2Bは、同じクローンが抗FAP抗体28H1との結合について競合しなかったことを示す。MFIは、フローサイトメトリーによって測定した。x軸は、FAP抗体の濃度を示す。

40

【図3A-3B】抗FAPクローンがC末端でFcドメインに融合したときに、抗FAPクローンの結合特性が失われないかどうかを判断するために作製された抗体コンストラクトの概略図を示す。図3Aは、VHドメインがFcノブ鎖のC末端に融合され、VLドメインがFcホール鎖のC末端に融合されている、Fcノブ鎖及びFcホール鎖を含むコンストラクトを示す(C末端VH/VL融合)。図3Bは、Fcノブ鎖及びFcホール鎖を

50

含むコンストラクトを示し、F a b全体がそのV HドメインとF cノブ鎖のC末端に融合されている（C末端F a b融合）。は、図3 Cは、B i a c o r e T 2 0 0機器（実施例1 . 9を参照）で表面プラズモン共鳴（S P R）ベースのアッセイを使用して実行されたエピトープマッピングのセットアップを示す。

【図4】F A P（2 1 2）、F A P（4 B 9）又はF A P（2 8 H 1）を標的とした一価フォーマットのヒト四価又は二価抗C D 4 0抗体のヒトF A P陽性N I H / 3 T 3細胞への結合を示す。トランスジェニック改変マウス胚性線維芽細胞N I H / 3 T 3 - h F A P細胞株は、高レベルのヒト線維芽細胞活性化タンパク質（h u F A P）を発現する。F A P結合部分を有する図示された全ての抗C D 4 0抗原結合分子は、N I H / 3 T 3 - h F A P細胞に効率的に結合するが、N I H / 3 T 3 - h F A P細胞への結合強度（E C₅₀値及びシグナル強度）が異なる。C末端F A P（2 1 2）又はF A P（4 B 9）結合ドメインを有するF A P - C D 4 0コンストラクトは、C末端F A P（2 8 H 1）結合ドメインを有するF A P - C D 4 0コンストラクトよりも強く結合する。二次検出抗体として使用されるフィコエリトリン（P E）標識抗ヒトI g G F c - 特異的ヤギI g G F（a b'）2フラグメントの蛍光強度（M F I）の中央値としての結合が示されている。M F Iは、フローサイトメトリーで測定し、ベースラインはブランクコントロールのM F Iを差し引くことで補正した。x軸は、抗体コンストラクトの濃度を示す。

10

【図5】F A P（2 1 2）又はF A P（4 B 9）を標的とした一価フォーマットのヒト四価又は二価抗C D 4 0抗体の、ヒトC D 4 0の表面発現レベルが高い初代ヒトB細胞への結合を示す。描かれている全てのコンストラクトはC D 4 0に結合するが、C D 4 0陽性B細胞への結合強度（E C₅₀値及びシグナル強度）が異なる。二価の抗C D 4 0抗体は、F A P結合部分に関係なく、四価の抗C D 4 0抗体と比較して、より高いE C₅₀レベルを示し、より高い結合プラトーに達する。細胞表面タンパク質への抗C D 4 0抗体の結合は、F A C S分析を使用して、フィコエリトリン（P E）に結合した抗ヒトI g G F c - 特異的ヤギI g G F（a b'）2フラグメントで検出された。M F Iは、フローサイトメトリーで測定し、ベースラインはブランクコントロールのM F Iを差し引くことで補正した。x軸は、抗体コンストラクトの濃度を示す。

20

【図6 A - 6 B】2日間のインキュベーション後のF A Pコーティング（図6 A）又は非コーティングD y n a b e a d s（登録商標）（図6 B）の存在下での一価F A P（2 1 2）、F A P（4 B 9）又はF A P（2 8 H 1）標的ヒト抗C D 4 0コンストラクトによるヒトD a u d i細胞のインビトロ活性化を示す。F A Pでコーティングされたビーズでは、F A Pに対して一価の二重特異性抗体が全て、B細胞活性化マーカーの発現C D 7 0の増加を誘導した。F A P（2 1 2）又はF A P（4 B 9）結合ドメインを有する2 + 1フォーマットの二重特異性F A P - C D 4 0抗体によるB細胞活性化マーカーのアップレギュレーションは、2 + 1フォーマットの二重特異性F A P - C D 4 0抗体、F A P（2 8 H 1）結合ドメインを含むフォーマット、F A P（2 1 2）、F A P（4 B 9）又はF A P（2 8 H 1）結合ドメインを含む4 + 1フォーマットの二重特異性F A P - C D 4 0抗体、又はF A P非依存性陽性コントロール抗体によって誘導されるアップレギュレーションと比較して高かった。F A P（非コーティングビーズ）の非存在下では、C D 4 0に対して二価の描かれたF A P標的の二重特異性抗体ではC D 7 0の増加は観察されなかったが、四価のC D 4 0結合分子はC D 7 0のアップレギュレーションを誘導したが、F A Pの存在下よりも程度は小さかった。示された滴定抗体との2日間のインキュベーション後のC D 7 0陽性の重要なD a u d i細胞のパーセンテージを示す。x軸は、抗体コンストラクトの濃度を示す。

30

40

【図7 A - 7 B】2日間のインキュベーション後のF A Pコーティング（図7 A）又は非コーティングD y n a b e a d s（登録商標）（図7 B）の存在下での一価F A P（2 1 2）、F A P（4 B 9）又はF A P（2 8 H 1）標的ヒト抗C D 4 0コンストラクトによるB細胞のインビトロ活性化を示す。F A Pでコーティングされたビーズでは、F A Pに対して一価の二重特異性抗体が全て、B細胞活性化マーカーの発現C D 8 6の増加を誘導した。架橋抗C D 4 0抗体（P 1 A D 4 4 7 0）によって誘導されるC D 8 6のF A P非

50

依存性アップレギュレーションと比較して、FAP依存性二重特異性抗原結合分子によって誘導されるCD86アップレギュレーションは、類似していたかわずかに低かった。より低い抗体濃度では、FAP(212)又はFAP(4B9)結合ドメインを有する2+1フォーマットの二重特異性FAP-CD40抗体によるB細胞活性化マーカーのアップレギュレーションは、2+1フォーマットの二重特異性FAP-CD40抗体、FAP(28H1)結合ドメインを含むフォーマット、FAP(212)、FAP(4B9)又はFAP(28H1)結合ドメインを含む4+1フォーマットの二重特異性FAP-CD40抗体、又はFAP非依存性陽性コントロール抗体によって誘導されるアップレギュレーションと比較して低かった。FAP(非コーティングピース)がない場合、二重特異性抗原結合分子ではCD86発現の増加は観察されなかったが、陽性コントロール抗体はCD86のアップレギュレーションを誘導した。示された滴定抗体との2日間のインキュベーション後のCD86陽性の重要なB細胞のパーセンテージを示す。x軸は、抗体コンストラクトの濃度を示す。

10

【図8A-8B】FAPの存在下(図8A)又は非存在下(図8B)で、FAP標的抗CD40結合分子によって活性化されたOVAパルスDCのT細胞プライミングを示す。huCD40トランスジェニックマウスから単離され、DEC205-OVAコンジュゲートで処置され、FAP依存性二重特異性抗CD40抗体及びFAPコーティングピースで刺激されたDCは、抗原特異的T細胞の強力な増殖を誘導した。対照的に、FAP(非コーティングピース)がない場合、FAP標的抗CD40抗体で刺激されたDCによってT細胞の増殖は誘導されなかった。2つ又は4つのCD40及び1つのFAP(212)又はFAP(4B9)結合部分を有するヒト二重特異性抗原結合分子で刺激されたDCによって誘導されたT細胞増殖は同等だった。DEC205-OVAコンジュゲートの代わりに大量のSINFELKでパルスされたDCは、強力なT細胞増殖を誘導した。示されているのは、OVAの存在下で示された滴定抗体とプレインキュベートされたhuCD40tgDCと共培養された増殖中(CFSE低)の重要なCFSE標識マウスCD3⁺CD8⁺OT-1 T細胞のパーセンテージである(図8A及び8B)。x軸は、抗体コンストラクトの濃度を示す。

20

【図9】実施例5.3に記載されているように、2細胞株架橋アッセイにおける二重特異性FAP×CD40抗体の同時結合の効果を示す。示されているのは、異なるフォーマットの二重特異性抗体の濃度に対する光学密度(OD)である。

30

【図10】CD40受容体(FAPとは独立)を活性化するさまざまなフォーマットのFAP×CD40抗体の可能性を示す。レポーター細胞株アッセイでは、シグナル伝達により、分泌された胚性アルカリホスファターゼ(SEAP)のNF- κ B-依存性産生が誘導され、SEAPの活性が測定される。n=6及び3×STDEVの光学密度(OD)の平均が、分子に対してプロットされる。

【図11】皮下MC38-FAP腫瘍モデルにおける非標的抗CD40抗体と比較した、FAP標的抗CD40結合分子の安全性、薬物動態、及び薬力学的プロファイルを評価するためのインビボマウス研究の研究デザインを示す。

【図12】示された単一又は組み合わせの抗体療法で処置されたマウスの1回目及び2回目の(再チャレンジ)MC38-FAP腫瘍細胞注射時の腫瘍増殖を示す。矢印は、治療の注射と再チャレンジの日を示す。y軸は腫瘍体積をmm³で表し、x軸は最初のMC38-FAP腫瘍細胞注射の日数を表す。フォーマット及び抗PD-L1抗体の同時注射とは無関係に、FAP-CD40抗体処置時のMC38-FAP腫瘍の完全な腫瘍退縮が観察された。対照的に、抗PD-L1抗体のみ、抗CD40抗体のみ、又は抗CD40と抗PD-L1抗体の組み合わせで処置したマウスでは、腫瘍増殖はビヒクルコントロールで処置したマウスと同等だった。更に、再チャレンジすると、以前にFAP-CD40抗体で処置した群ではMC38-FAP腫瘍は成長しなかったが、ナイーブマウスでは腫瘍の100%が成長した。

40

【図13A】28日目(治療後6日)の全ての処置群を比較した統計表である。

【図13B】31日目(治療後9日目)以降の全ての処置を比較した統計表である。

50

【図14】FAP発現マウス結腸腺癌腫瘍細胞株を注射したマウスにおける4+1及び2+1 FAP標的抗CD40結合分子と非標的親抗CD40抗体の薬物動態プロファイルを示す(MC38-FAP)。y軸は、血清中の用量正規化濃度を表し、x軸は、抗体注射時の時間を表す。最高のクリアランス率は、非標的抗CD40抗体で観察された。4+1フォーマットのFAP標的抗CD40結合分子のクリアランス速度は、非標的抗CD40分子と比較して低く、最低のクリアランス速度は、2+1フォーマットのFAP標的抗CD40結合分子で観察された。

【図15-16-17】流入領域リンパ節(LN、図15A、図16A、及び図17A)、非流入領域リンパ節(図15B、図16B、及び図17B)、FAP発現マウス結腸腺癌腫瘍細胞株(MC38-FAP)を注射した及び非標的抗CD40(P1AE2301)、抗CD40-FAP 4+1(P1AE2024)、抗CD40-FAP 2+1(P1AE2302)、又はビヒクルのみのいずれかで処置した、マウスの脾臓(図15C、図16C及び図17C)及び腫瘍(図15D、図16D及び図17D)におけるDC、T細胞、及びB細胞の活性化を示す。治療注射の4日後の腫瘍におけるDC及びT細胞の活性化(図15D及び図16D)は、ビヒクルで処置した動物と比較して、抗CD40-FAP 2+1(P1AE2302)で処置した動物で有意に増加した。他の全ての分析された組織(排出LN、非排出LN及び脾臓)において、非標的抗CD40、抗CD40-FAP 4+1及び抗CD40-FAP 2+1は、ビヒクル群と比較して有意なDC及びT細胞の活性化を誘導した。対照的に、非標的抗CD40のみが、ビヒクルコントロール群と比較して、分析された全ての組織において有意なB細胞活性化を媒介した(図17A-図17D、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、**** $p < 0.0001$ 、対になっていない、両側のスチューデントの検定)。

【図18】FAP発現マウス結腸腺癌腫瘍細胞株(MC38-FAP)を注射し、非標的抗CD40(P1AE2301)、抗CD40-FAP 4+1(P1AE2024)、抗CD40-FAP 2+1(P1AE2302)又はビヒクルのいずれかで処置したマウスの、抗PD-L1抗体(P1AE0099)の同時注射の有無での体重を示す。y軸は、処置前の体重のパーセントで体重を示し、x軸は、治療注射後の日数を示す。非標的抗CD40抗体を単独で、又は抗PD-L1と組み合わせて処置したマウスでのみ、明らかな体重減少が観察された。

【発明を実施するための形態】

【0050】

定義

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

【0051】

本明細書で使用される場合、「抗原結合分子」との用語は、最も広い意味で、抗原決定基に特異的に結合する分子を指す。抗原結合分子の例は、抗体、抗体フラグメント及び足場抗原結合タンパク質である。

【0052】

本明細書で使用する場合、用語「標的細胞抗原に特異的に結合可能な抗原結合ドメイン」、又は「標的細胞抗原に特異的に結合可能な部分」とは、抗原に特異的に結合するポリペプチド分子を意味する。一つの態様において、抗原結合ドメインは、その標的細胞抗原を介してシグナル伝達を活性化することが可能である。特定の態様において、抗原結合ドメインは、標的部位、例えば、特定の種類の腫瘍細胞、又は抗原決定基を有する腫瘍間質に結合する構成要素(例えばCD40アゴニスト)を指令することができる。標的細胞抗原に特異的に結合可能な抗原結合ドメインは、本明細書で更に定義される抗体及びそのフラグメントを含む。更に、標的細胞抗原に特異的に結合可能な抗原結合ドメインは、本明細書で更に定義されるスキャフォールド抗原結合タンパク質、例えば、設計された反復タ

10

20

30

40

50

ンパク質又は設計された反復ドメインに基づく結合ドメイン（例えば、国際公開第 2 0 0 2 / 0 2 0 5 6 5 号を参照のこと）を含む。

【 0 0 5 3 】

抗体又はそのフラグメントに関連して、用語「標的細胞抗原に特異的に結合可能な抗原結合ドメイン」とは、抗原の一部又は全てに特異的に結合し、かつ相補性である領域を含む分子の一部を意味する。特異的抗原結合が可能な抗原結合ドメインは例えば、1つ以上の抗体可変ドメイン（抗体可変領域とも呼ばれる）により、提供されることができる。具体的には、特異的抗原結合が可能な抗原結合ドメインは、抗体軽鎖可変領域（V L）、及び抗体重鎖可変領域（V H）を含む。別の態様において、「標的細胞抗原に特異的に結合可能な抗原結合ドメイン」は、F a bフラグメント又はクロスF a bフラグメントでもあり得る。

10

【 0 0 5 4 】

本明細書の「抗体」との用語は、最も広い意味で使用され、種々の抗体構造を包含し、限定されないが、所望の抗原結合活性を示す限り、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、単一特異性抗体及び多特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、及び抗体フラグメントを含む。

【 0 0 5 5 】

用語「モノクローナル抗体」とは、本明細書で使用される場合、実質的に均一な抗体の集合から得られる抗体を指す。すなわち、集合に含まれる個々の抗体が、同一であり、及び/又は同じエピトープに結合するが、但し、例えば、天然に存在する突然変異又はモノクローナル抗体製剤の製造中に生じる変異を含む、可能な変異体抗体は除く。このような変異体は、一般的に、少量存在する。典型的には異なる決定基（エピトープ）に対して指向する異なる抗体を含むポリクローナル抗体製剤とは対照的に、モノクローナル抗体製剤のそれぞれのモノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対して指向する。

20

【 0 0 5 6 】

「単一特異性」抗体との用語は、本明細書で使用される場合、同じ抗原の同じエピトープにそれぞれ結合する1つ以上の結合部位を有する抗体を示す。「二重特異性」との用語は、抗原結合分子が、少なくとも2つの別個の抗原決定基に特異的に結合することができることを意味する。典型的には、二重特異性抗原結合分子は、2つの抗原結合部位を含み、それぞれが異なる抗原決定基に対して特異的である。特定の実施形態では、二重特異性抗原結合分子は、2つの抗原決定基（特に、2つの別個の細胞で発現する2つの抗原決定基）に同時に結合することができる。本明細書に記載の二重特異性抗原結合分子はまた、多特異性抗体の一部を形成することができる。

30

【 0 0 5 7 】

本出願の中で用いられる用語「-価」とは、1つの異なる抗原決定基に対して特異的である抗原結合分子内で、1つの異なる抗原決定基に対して特異的な結合部位が特定の数、存在することを意味する。そのため、用語「二価」、「四価」、及び「六価」とは、抗原結合分子においてそれぞれ、特定の抗原決定基に対して特異的な、2つの結合部位、4つの結合部位、及び6つの結合部位が存在することを意味する。本発明の具体的な態様において、本発明に従った二重特異性抗原結合分子は、特定の抗原決定基に対して一価であることができ、このことは、これらが、上記抗原決定基に対して1つのみの結合部位を有することを意味する。又は、これらは特定の抗原決定基に対して二価若しくは四価であることができ、このことは、これらが、上記抗原決定基に対してそれぞれ、2つの結合部位、若しくは4つの結合部位を有することを意味する。

40

【 0 0 5 8 】

「全長抗体」、「インタクト抗体」及び「全抗体」との用語は、ネイティブ抗体構造に実質的に類似した構造を有する抗体を指すために、本明細書で相互に置き換え可能に用いられる。「ネイティブ抗体」は、さまざまな構造を有する天然に存在する免疫グロブリン分子を指す。例えば、ネイティブI g Gクラス抗体は、約150,000ダルトンのヘテロテトラマー糖タンパク質であり、ジスルフィド結合した2つの軽鎖と2つの重鎖から構

50

成される。N末端からC末端まで、それぞれの重鎖は、可変ドメイン(VH)(可変重鎖ドメイン又は重鎖可変ドメインとも呼ばれる)と、その後3つの定常ドメイン(CH1、CH2及びCH3)(重鎖定常領域とも呼ばれる)を有する。同様に、N末端からC末端まで、それぞれの軽鎖は、可変ドメイン(VL)(可変軽鎖ドメイン又は軽鎖可変ドメインとも呼ばれる)と、その後軽鎖定常ドメイン(CL)(軽鎖定常領域とも呼ばれる)を有する。抗体の重鎖は、(IgA)、(IgD)、(IgE)、(IgG)又は μ (IgM)と呼ばれる5種類の1つに分けられてもよく、このいくつかは、例えば、1(IgG1)、2(IgG2)、3(IgG3)、4(IgG4)、1(IgA1)及び2(IgA2)などのサブタイプに更に分けられてもよい。抗体の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づき、カッパ()及びラムダ()と呼ばれる2種類の1つに分けられてもよい。

10

【0059】

「抗体フラグメント」は、インタクト抗体が結合する抗原に結合するインタクト抗体の一部を含むインタクト抗体以外の分子を指す。抗体フラグメントの例としては、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab)₂ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、クロスFabフラグメント；直鎖抗体；一本鎖抗体分子(例えばscFv)；及び単ドメイン抗体が挙げられるが、これらに限定されない。ある特定の抗体フラグメントの総説としては、Hudson et al., Nat Med 9, 129-134 (2003)を参照されたい。scFvフラグメントの総説としては、例えば、Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)を参照。また、国際公開第93/16185号及び米国特許第5,571,894号及び第5,587,458号を参照。サルベージ受容体結合エピトープ残基を含み、インビボでの半減期が長くなったFab及びF(ab')₂フラグメントの説明については、米国特許第5,869,046号を参照。ダイアボディは、二価又は二重特異性であってもよい2つの抗原結合ドメインを含む抗体フラグメントであり、例えば、EP 404,097号；国際公開第1993/01161号；Hudson et al., Nat Med 9, 129-134 (2003)、及びHollinger et al., Proc Natl Acad Sci USA 90, 6444-6448 (1993)を参照。トリアボディ及びテトラボディも、Hudson et al., Nat Med 9, 129-134 (2003)に説明されている。シングルドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインの全て又は一部又は軽鎖可変ドメインの全て又は一部を含む抗体フラグメントである。特定の実施形態では、シングルドメイン抗体は、ヒトシングルドメイン抗体である(Domantis, Inc., Waltham, MA。例えば、米国特許第6,248,516 B1号を参照)。抗体フラグメントは、限定されないが、本明細書に記載されるように、インタクト抗体のタンパク質分解による消化、及び組換え宿主細胞(例えば、大腸菌又はファージ)による産生を含め、種々の技術によって作られてもよい。

20

30

【0060】

インタクト抗体のパパイン消化により、2つの同一の抗原結合フラグメントが得られ、これは、それぞれ重鎖及び軽鎖可変ドメインと、更に、軽鎖の定常ドメイン及び重鎖の第1の定常ドメイン(CH1)を含む「Fab」フラグメントと呼ばれる。したがって、本明細書で使用される場合、「Fabフラグメント」との用語は、軽鎖(CL)のVLドメイン及び定常ドメインを含む軽鎖フラグメントと、重鎖のVHドメイン及び第1の定常ドメイン(CH1)を含む抗体フラグメントを指す。Fab'フラグメントは、抗体ヒンジ領域由来の1つ以上のシステインを含め、重鎖CH1ドメインのカルボキシ末端での数個の残基の付加によって、Fabフラグメントとは異なる。Fab'-SHは、定常ドメインのシステイン残基が有機チオール基を有するFab'フラグメントである。ペプシン処理により、2つの抗原結合部位(2つのFabフラグメント)と、Fc領域の一部とを含む、F(ab')₂フラグメントが得られる。本発明に従うと、用語「Fabフラグメント」は、

40

50

以下で定義する「クロスF a bフラグメント」又は「クロスオーバーF a bフラグメント」もまた含む。

【0061】

「クロスF a bフラグメント」又は「x F a bフラグメント」又は「クロスオーバーF a bフラグメント」との用語は、重鎖及び軽鎖の可変領域又は定常領域のいずれかが交換されたF a bフラグメントを指す。クロスオーバーF a b分子の2つの可能な鎖組成が可能であり、本発明の二重特異性抗体に含まれる。一方、F a b重鎖及び軽鎖の可変領域は、置き換わっており、すなわち、クロスオーバーF a b分子は、軽鎖可変領域(V L)と重鎖定常領域(C H 1)とで構成されるペプチド鎖と、重鎖可変領域(V H)と軽鎖定常領域(C L)とで構成されるペプチド鎖とを含む。このクロスオーバーF a b分子は、クロスF a b (V L V H)とも呼ばれる。一方、F a b重鎖及び軽鎖の定常領域が置き換わっている場合、クロスオーバーF a b分子は、重鎖可変領域(V H)と軽鎖定常領域(C L)とで構成されるペプチド鎖と、軽鎖可変領域(V L)と重鎖定常領域(C H 1)とで構成されるペプチド鎖とを含む。このクロスオーバーF a b分子は、クロスF a b (C L C H 1)とも呼ばれる。

10

【0062】

「一本鎖F a bフラグメント」又は「s c F a b」は、抗体重鎖可変ドメイン(V H)、抗体定常ドメイン1(C H 1)、抗体軽鎖可変ドメイン(V L)、抗体軽鎖定常ドメイン(C L)及びリンカーからなるポリペプチドであり、上記抗体ドメイン及び上記リンカーは、N末端からC末端へ方向で、以下の順序の1つを有する：(a) V H - C H 1 - リンカー - V L - C L、(b) V L - C L - リンカー - V H - C H 1、(c) V H - C L - リンカー - V L - C H 1、又は(d) V L - C H 1 - リンカー - V H - C L。また、上記リンカーは、少なくとも30アミノ酸、好ましくは32~50アミノ酸のポリペプチドである。上記一本鎖F a bフラグメントは、C LドメインとC H 1ドメインとの間の天然ジスルフィド結合によって安定化される。更に、これらの一本鎖F a b分子は、システイン残基の挿入(例えば、K a b a t番号付けによれば、可変重鎖の44位及び可変軽鎖の100位)による鎖間ジスルフィド結合の生成によって、更に安定化されるだろう。

20

【0063】

「クロスオーバー一本鎖F a bフラグメント」又は「x - s c F a b」は、抗体重鎖可変ドメイン(V H)、抗体定常ドメイン1(C H 1)、抗体軽鎖可変ドメイン(V L)、抗体軽鎖定常ドメイン(C L)及びリンカーからなるポリペプチドであり、上記抗体ドメイン及び上記リンカーは、N末端からC末端へ方向で、以下の順序の1つを有する。(a) V H - C L - リンカー - V L - C H 1及び(b) V L - C H 1 - リンカー - V H - C L。V HとV Lは一緒になって、ある抗原に特異的に結合する抗原結合部位を形成し、また上記リンカーは、少なくとも30アミノ酸のポリペプチドである。更に、これらのx - s c F a b分子は、システイン残基の挿入(例えば、K a b a t番号付けによれば、可変重鎖の44位及び可変軽鎖の100位)による鎖間ジスルフィド結合の生成によって、更に安定化されるだろう。

30

【0064】

「一本鎖可変フラグメント(s c F v)」は、10~約25アミノ酸の短いリンカーペプチドを用いて連結された、抗体の重鎖(V H)及び軽鎖(V L)の可変領域の融合タンパク質である。リンカーは、通常、可撓性のためにグリシンが豊富であり、溶解度のためにセリン又はトレオニンが豊富であり、V HのN末端とV LのC末端とを、又はその逆で接続することができる。このタンパク質は、定常領域が除去され、リンカーが導入されているが、元々の抗体の特異性を保持している。s c F v抗体は、例えば、H o u s t o n , J . S . , M e t h o d s i n E n z y m o l . 2 0 3 (1 9 9 1) 4 6 - 9 6)に記載されている。これに加え、抗体フラグメントは、V Hドメインに特徴的な(すなわち、V Lドメインと共に集合させることが可能な)、又はV Lドメインに特徴的な(すなわち、機能的抗原結合部位にV Hドメインと共に集合させることが可能な)一本鎖ポリペプチドを含み、それによって、全長抗体の抗原結合特性を与える。

40

50

【 0 0 6 5 】

「足場抗原結合タンパク質」は、当該技術分野で既知であり、例えば、フィブロネクチン及び設計されたアンキリンリピートタンパク質 (DARPin) は、抗原結合ドメインの代替的な足場として使用されてきた。例えば、Gebauer and Skerra, Engineered protein scaffolds as next-generation antibody therapeutics. *Curr Opin Chem Biol* 13: 245 - 255 (2009) 及び Stump et al., Darpins: A new generation of protein therapeutics. *Drug Discovery Today* 13: 695 - 701 (2008) を参照。本発明の一つの態様において、スキヤフォールド抗原結合タンパク質は、CTLA-4 (エビボディ)、リポカリン (アンチカリン)、プロテインA由来分子、例えば、プロテインAのZ-ドメイン (アフィボディ)、A-ドメイン (アビマー/マキシボディ)、血清トランスフェリン (トランスボディ); 設計されたアンキリンリピートタンパク質 (DARPin)、抗体軽鎖又は重鎖の可変ドメイン (単ドメイン抗体、sdAb)、抗体重鎖の可変ドメイン (ナノボディ、aVH)、V_{NAR}フラグメント、フィブロネクチン (アドネクチン)、C型レクチンドメイン (テトラネクチン); 新規抗原受容体 - ラクタマーゼの可変ドメイン (V_{NAR}フラグメント)、ヒト - クリスタリン又はユビキチン (アフィリン分子); ヒトプロテアーゼ阻害剤のクニッツ型ドメイン、マイクロボディ、例えば、ノッチンファミリー由来のタンパク質、ペプチドアプタマー及びフィブロネクチン (アドネクチン) からなる群から選択される。CTLA-4 (細胞毒性Tリンパ球関連抗原4) は、主にCD4⁺T細胞で発現するCD28ファミリー受容体である。その細胞外ドメインは、可変ドメイン様のIg折りたたみを有する。抗体のCDRに対応するループは、異なる結合特性を与えるために、異種配列と置換されてもよい。異なる結合特異性を有するように操作されたCTLA-4分子も、エビボディとして知られている (例えば、米国特許第7166697B1号)。エビボディは、抗体 (例えば、ドメイン抗体) の単離された可変領域とほぼ同じ大きさである。更なる詳細については、*Journal of Immunological Methods* 248 (1-2)、31-45 (2001) を参照。リポカリンは、ステロイド、ビリル、レチノイド及び脂質などの小さな疎水性分子を運ぶ細胞外タンパク質のファミリーである。リポカリンは、剛性シート二次構造を有し、円錐構造の開放端に多くのループがあり、このループは、異なる標的抗原に結合するように操作することができる。アンチカリンは、160~180アミノ酸の大きさであり、リポカリンから誘導される。更なる詳細については、*Biochim Biophys Acta* 1482: 337-350 (2000)、米国特許第7250297B1号及び米国特許出願公開第20070224633号を参照。アフィボディは、抗原に結合するように操作することが可能な、*Staphylococcus aureus* のプロテインAに由来する足場である。ドメインは、約58アミノ酸の3つのラセン形の束からなる。ライブラリーは、表面残基のランダム化によって作られている。更なる詳細については、*Protein Eng. Des. Sel.* 2004, 17, 455-462 及び EP 1641818A1号を参照。アビマーは、Aドメイン足場ファミリーに由来する複数ドメインタンパク質である。約35アミノ酸のネイティブドメインは、規定のジスルフィド結合した構造に適合する。多様性は、A-ドメインのファミリーによって示される天然の変動のシャッフリングによって作られる。更なる詳細については、*Nature Biotechnology* 23 (12)、1556-1561 (2005) 及び *Expert Opinion on Investigational Drugs* 16 (6)、909-917 (2007年6月) を参照。トランスフェリンは、単量体血清輸送糖タンパク質である。トランスフェリンは、許容状態の表面ループへのペプチド配列の挿入によって異なる標的抗原に結合するように操作可能である。操作されたトランスフェリン足場の例としては、トランスボディが挙げられる。更なる詳細については、*J. Biol. Chem* 274、24066-24073 (1999) を参照。設計されたアンキリンリピートタンパク質 (DARPin) は、細胞骨格の内蔵性膜タンパク

10

20

30

40

50

質の接着に介在するタンパク質のファミリーであるアンキリンに由来する。単一のアンキリンリピートは、2つの *らせん* と *ターン* とからなる33残基のモチーフである。単一のアンキリンリピートは、各反復の第1の *らせん* 及び *ターン* の中の残基をランダム化することによって異なる標的抗原に結合するように操作することができる。その結合界面は、モジュールの数を増やすことによって、増加させることができる(親和性成熟方法)。更なる詳細については、*J. Mol. Biol.* 332, 489-503 (2003)、*PNAS* 100(4)、1700-1705 (2003) 及び *J. Mol. Biol.* 369, 1015-1028 (2007) 及び米国特許出願公開第20040132028A1号を参照。一本鎖ドメイン抗体は、一本の単量体可変抗体ドメインからなる抗体フラグメントである。第1の単ドメインは、ラクダ由来の抗体重鎖の可変ドメインに由来した(ナノボディ又はV_HHフラグメント)。更に、単ドメイン抗体との用語は、自律的なヒト重鎖可変ドメイン(aVH)又はサメ由来V_{NAR}フラグメントを含む。フィブロネクチンは、抗原に結合するように操作可能な足場である。アドネクチンは、ヒトフィブロネクチンIII型(FN3)の15反復単位の10番目のドメインの天然アミノ酸配列を有する骨格からなる。サンドイッチの片方の端にある3つのループを、アドネクチンが目的の治療標的を特異的に認識することができるように操作することができる。更なる詳細については、*Protein Eng. Des. Sel.* 18, 435-444 (2005)、米国特許出願公開第20080139791号、国際公開第2005056764号及び米国特許第6818418B1号を参照。ペプチドアプタマーは、定常足場タンパク質、典型的には、活性部位に挿入される拘束された可変ペプチドループを含むチオレドキシン(TrxA)からなるコンビナトリアル認識分子である。更なる詳細について、*Expert Opin. Biol. Ther.* 5, 783-797 (2005)を参照。ミクロボディは、3~4のシステイン架橋を含む、25~50アミノ酸長の天然に存在するミクロタンパク質に由来し、ミクロタンパク質の例としては、KalataBI、コトキシ及びノッチンが挙げられる。ミクロタンパク質は、ミクロタンパク質の全体的な折りたたみに影響を与えることなく、25アミノ酸までを含むように操作することができるループを有する。操作されたノッチンドメインの更なる詳細については、国際公開第2008098796号を参照。

【0066】

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

【0067】

用語「抗原結合ドメイン」又は「抗原結合部位」とは、抗原の一部又は全てに特異的に結合し、かつ相補性である領域を含む抗原結合分子の一部を意味する。抗原が大きい場合、抗原結合分子は、抗原の特定の部分のみに結合してもよく、この部分は、エピトープと呼ばれる。抗原結合ドメインは、例えば、1つ以上の可変ドメイン(可変領域とも呼ばれる)によって与えられてもよい。特に、抗原結合ドメインは、抗体軽鎖可変領域(VL)と、抗体重鎖可変領域(VH)とを含む。

【0068】

本明細書で使用される場合、「抗原決定基」との用語は、「抗原」及び「エピトープ」と同義であり、抗原結合部分-抗原複合体を形成する、抗原結合部分が結合するポリペプチド高分子上の部位(例えば、アミノ酸の連続伸長部又は異なる領域の非連続アミノ酸から構成される配座構成)を指す。有用な抗原決定基は、例えば、腫瘍細胞の表面上に、ウイルス感染した細胞の表面上に、他の疾患細胞の表面上に、免疫細胞の表面上に、血清中で遊離して、及び/又は細胞外マトリックス(ECM)内に認めることができる。本発明

10

20

30

40

50

の抗原として有用なタンパク質は、哺乳動物、例えば、霊長類（例えばヒト）及びげっ歯類（例えば、マウス及びラット）を含め、任意の脊椎動物源由来の任意のネイティブ形態のタンパク質であってもよい。特定の実施形態では、抗原は、ヒトタンパク質である。本発明の特定のタンパク質について言及される場合、この用語は、「全長」の未処理のタンパク質、及び細胞の処理から得られるタンパク質の任意の形態を包含する。この用語は、タンパク質の天然に存在する変異体、例えば、スプライス変異体又は対立遺伝子変異体も包含する。

【0069】

「特異的に結合する」とは、その結合が抗原選択性であり、望ましくない相互作用又は非特異的な相互作用とは判別できることを意味する。抗原結合分子が特定の抗原に結合する能力は、酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）又は当該技術分野で知られた他の技術、例えば、表面プラズモン共鳴（SPR）技術（BIAcore装置で分析される）（Liljeblad et al., Glyco J 17, 323-329 (2000)）、及び従来結合アッセイ（Heeley, Endocr Res 28, 217-229 (2002)）によって測定することができる。一実施形態では、無関係なタンパク質に対する抗原結合分子の結合度は、例えばSPRによって測定される抗原に対する抗原結合分子の結合の約10%未満である。特定の実施形態では、抗原に結合する分子は、解離定数（Kd）が、 $1\ \mu\text{M}$ 、 $100\ \text{nM}$ 、 $10\ \text{nM}$ 、 $1\ \text{nM}$ 、 $0.1\ \text{nM}$ 、 $0.01\ \text{nM}$ 又は $0.001\ \text{nM}$ （例えば、 $10^{-8}\ \text{M}$ 以下、例えば、 $10^{-8}\ \text{M} \sim 10^{-13}\ \text{M}$ ）である。

【0070】

「親和性」又は「結合親和性」は、分子の単一の結合部位（例えば、抗体）と、その結合対（例えば、抗原）との間の非共有結合性相互作用の合計強度を指す。特に示されない限り、本明細書で使用される場合、「結合親和性」は、結合対（例えば、抗体と抗原）のメンバー間の1:1相互作用を反映する特異的結合親和性を指す。分子Xのその結合対Yに対する親和性は、一般的に、解離定数（Kd）によって表すことができ、脱離速度定数と会合速度定数（それぞれkoff及びkon）の比である。したがって、速度定数の比率が同じままである限り、等価の親和性は、異なる速度定数を含むことができる。親和性は、本明細書に記載するものを含め、当該技術分野で一般的な方法によって測定することができる。親和性を測定する特定の方法は、表面プラズモン共鳴（SPR）である。

【0071】

「親和性成熟した」抗体は、1つ以上の超可変領域（HVR）に1つ以上の変更を有する抗体を指し、これに対して、親抗体は、そのような変更を有しておらず、そのような変更によって、抗原に対する抗体の親和性が向上する。

【0072】

「標的細胞抗原」とは、本明細書で使用する場合、標的細胞、具体的には、癌細胞又は腫瘍間質細胞等の腫瘍内の標的細胞の表面に提示された抗原決定基を意味する。したがって、標的細胞抗原は腫瘍関連抗原である。具体的には、腫瘍標的細胞抗原は、線維芽細胞活性化タンパク質（FAP）である。

【0073】

プロリルエンドペプチダーゼFAP又はセプラーゼ（EC 3.4.21）としても知られている、用語「線維芽細胞活性化タンパク質（FAP）」とは、特に断りのない限り、霊長類（例えばヒト）、非ヒト霊長類（例えばカニクイザル）、並びに齧歯類（例えばマウス及びラット）などの哺乳類を含む、任意の脊椎動物源に由来する、任意の天然FAPを意味する。この用語は、「全長」のプロセッシングされていないFAP、及び細胞におけるプロセッシングから生じるFAPの任意の形態を包含する。この用語は、FAPの天然に存在する変異体、例えば、スプライス変異体又は対立遺伝子変異体も包含する。一実施形態では、本発明の抗原結合分子は、ヒト、マウス、及び/又はカニクイザルFAPに特異的に結合可能である。ヒトFAPのアミノ酸配列は、UniProt（www.uniprot.org）寄託番号Q12884（バージョン149、配列番号2）、又はNC

10

20

30

40

50

BI (www.ncbi.nlm.nih.gov/) RefSeq NP_004451.2にて示されている。ヒトFAPの細胞外ドメイン(ECD)は、アミノ酸位置26から760まで伸びている。Hisタグ化したヒトFAP ECDのアミノ酸配列は、配列番号78に示されている。マウスFAPのアミノ酸配列は、UniProt寄託番号P97321(バージョン126、配列番号79)、又はNCBI RefSeq NP_032012.1に示されている。マウスFAPの細胞外ドメイン(ECD)は、アミノ酸位置26から761まで伸びている。配列番号80は、Hisタグ化されたマウスFAP ECDのアミノ酸配列を示す。配列番号81は、Hisタグ化されたカニクイザルFAP ECDのアミノ酸配列を示す。好ましくは、抗本発明のFAP結合分子はFAPの細胞外ドメインに結合する。

10

【0074】

「可変領域」又は「可変ドメイン」との用語は、抗原に対する抗原結合分子の結合に関与する抗体重鎖又は軽鎖のドメインを指す。天然の抗体の重鎖及び軽鎖の可変ドメイン(それぞれVH及びVL)は、概して、類似の構造を有しており、各ドメインは、4つの保存されたフレームワーク領域(FR)と、3つの超可変領域(HVR)とを含む。例えば、Kindt et al., Kuby Immunology, 6th Ed. W.H. Freeman and Co., 91ページ(2007)を参照。抗原結合特異性を与えるために、単一のVH又はVLドメインで十分な場合がある。

【0075】

本明細書で使用する場合、用語「超可変領域」又は「HVR」とは、配列内で超可変可能であり、抗原結合特異性を決定する、抗体可変ドメインの領域、例えば「相補性決定領域」(CDR)のそれぞれを意味する。

20

【0076】

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

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

30

(b) アミノ酸残基24-34(L1)、50-56(L2)、89-97(L3)、31-35b(H1)、50-65(H2)及び95-102(H3)に存在するCDR(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD(1991)); 並びに

(c) アミノ酸残基27c-36(L1)、46-55(L2)、89-96(L3)、30-35b(H1)、47-58(H2)及び93-101(H3)で生じる抗原接触(MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745(1996))が挙げられる。

40

【0077】

特に指示がない限り、CDRは、上記Kabatraに従い決定される。当業者は、CDRの表記は、上記Chothia、上記MacCallum、又は、任意の他の、科学的に認可された命名システムに従い決定することができることを理解するであろう。

【0078】

「フレームワーク」又は「FR」は、相補性決定領域(CDR)以外の可変ドメイン残基を指す。可変ドメインのFRは、概して、FR1、FR2、FR3及びFR4の4つのFRドメインからなる。したがって、CDR及びFR配列は、一般に、VH(又はVL)において次の配列: FR1-CDR-H1(CDR-L1)-FR2-CDR-H2(CDR-L2)-FR3-CDR-H3(CDR-L3)-FR4。

50

【0079】

「キメラ」抗体との用語は、重鎖及び／又は軽鎖の一部が、特定の供給源又は種に由来する抗体を指し、一方、重鎖及び／又は軽鎖の残りは、異なる供給源又は種に由来する。

【0080】

抗体の「クラス」は、その重鎖が保有する定常ドメイン又は定常領域の種類を指す。抗体の5種類の主要なクラスがあり、すなわち、IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgMであり、これらのうちのいくつかは、サブクラス(アイソタイプ)、例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、及びIgA₂に更に分けることができる。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、
、及びμと呼ばれる。

10

【0081】

「ヒト化」抗体は、非ヒトHVR由来のアミノ酸残基と、ヒトFR由来のアミノ酸残基とを含むキメラ抗体を指す。ある特定の実施形態では、ヒト化抗体は、少なくとも1つの、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含むものであり、それにおいて、HVR(例えば、CDR)の全て又は実質的に全てが非ヒト抗体のものに相当し、FRの全て又は実質的に全てがヒト抗体のものに相当する。ヒト化抗体は、必要に応じて、ヒト抗体に由来する抗体定常領域の少なくとも一部を含んでいてもよい。ある抗体、例えば、非ヒト抗体の「ヒト化形態」は、ヒト化を受けた抗体を指す。本発明に包含される「ヒト化抗体」の他の形態は、特に、C1q結合及び／又はFc受容体(FcR)結合という観点で、本発明に係る特性を作り出すために、定常領域が、元々の抗体の定常領域から更に修飾されるか、又は変更されているものである。

20

【0082】

「Fcドメイン」又は「Fc領域」との用語は、本明細書において、定常領域の少なくとも一部を含む抗体重鎖のC末端領域を定義するために使用される。本用語は、天然配列Fc領域と変異体Fc領域とを含む。IgG Fc領域は、IgG CH₂ドメインと、IgG CH₃ドメインとを含む。ヒトIgG Fc領域の「CH₂ドメイン」は、通常、おおよその231位のアミノ酸残基から、おおよその340位のアミノ酸残基まで延びている。一実施形態では、炭水化物鎖は、CH₂ドメインに接続している。本発明のCH₂ドメインは、ネイティブ配列CH₂ドメイン又は変異体CH₂ドメインであってもよい。「CH₃ドメイン」は、Fc領域中のCH₂ドメインに対してC末端に残基の伸長部を含む(すなわち、IgGのおおよその341位のアミノ酸残基から、おおよその447位のアミノ酸残基まで)。本発明のCH₃領域は、ネイティブ配列CH₃ドメイン又は変異体CH₃ドメインであってもよい(例えば、その1つの鎖に導入された「突起部」(「ノブ」)を有し、その他の鎖に対応する導入された「空洞」(「ホール」)を有するCH₃ドメイン、本明細書に参考として明確に組み込まれる米国特許第5,821,333号を参照)。そのような変異体CH₃ドメインを使用して、本明細書に記載される2つの同一ではない抗体重鎖のヘテロ二量体化を促進してもよい。一実施形態では、ヒトIgG重鎖Fc領域は、Cys226から、又はPro230から、重鎖のカルボキシル末端までに及ぶ。しかしながら、Fc領域のC末端リジン(Lys447)は、存在していてもよく、又は存在していなくてもよい。本明細書で特に明記されない限り、Fc領域又は定常領域におけるアミノ酸残基の番号付けは、Kabate et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991に記載されるEU番号付けシステム(EUインデックスとも呼ばれる)に従う。

30

40

【0083】

「ノブ・イントゥ・ホール」技術は、例えば、米国特許第5,731,168号明細書、米国特許第7,695,936号明細書、Ridgway et al., Prot Eng 9, 617-621(1996)及びCarter, J Immunol Meth 248, 7-15(2001)に記載されている。一般的に、この方法は、第1のポリペ

50

プチドの界面にある突起（「ノブ」）と、第2のポリペプチドの界面にある空洞（「ホール」）とを導入することを含み、その結果、突起が、ヘテロ二量体形成を促進し、ホモ二量体形成を妨害するように空洞内に位置することができる。突起は、第1のポリペプチドの界面からの小さなアミノ酸側鎖を、より大きな側鎖（例えば、チロシン又はトリプトファン）と交換することによって構築される。突起と同一又は同様の大きさの相補性空洞が、大きなアミノ酸側鎖を、より小さなアミノ酸側鎖（例えば、アラニン又はトレオニン）と置き換えることによって、第2のポリペプチドの界面に作られる。突起及び空洞は、ポリペプチドをコードする核酸を変えることによって、例えば、部位特異的変異導入法によって、又はペプチド合成によって作り出すことができる。具体的な実施形態では、ノブ修飾は、Fcドメインの2つのサブユニットのうち1つにアミノ酸置換T366Wを含み、ホール修飾は、Fcドメインの2つのサブユニットのうち他方の1つにアミノ酸置換T366S、L368A及びY407Vを含む。更に具体的な実施形態では、ノブ修飾を含むFcドメインのサブユニットは、更に、アミノ酸置換S354Cを含み、ホール修飾を含むFcドメインのサブユニットは、更に、アミノ酸置換Y349Cを含む。これら2つのシステイン残基の導入によって、Fc領域の2つのサブユニット間にジスルフィド架橋が生成し、それにより、二量体を更に安定化する（Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001)）。

10

【0084】

「免疫グロブリンのFc領域に等価な領域」は、天然に存在する免疫グロブリンのFc領域の対立遺伝子変異体及び置換、付加又は欠失を生じるが、エフェクター機能（例えば、抗体依存性細胞毒性）に介在する免疫グロブリンの能力を実質的に低下させない変更を有する変異体を含むことが意図される。例えば、1種以上のアミノ酸は、生体機能を実質的に失うことなく、免疫グロブリンのFc領域のN末端又はC末端から欠失されていてもよい。そのような変異体は、活性に対して最小限の影響を有するように、当該技術分野で知られた一般的な規則に従って選択することができる（例えば、Bowie, J. U. et al., Science 247: 1306-10 (1990)を参照）。

20

【0085】

「エフェクター機能」との用語は、抗体のFc領域に帰属可能な生体活性を指し、抗体アイソタイプによって変わる。抗体エフェクター機能の例としては、以下のものが挙げられる。C1q結合及び補体依存性細胞障害(CDC)、Fc受容体結合、抗体依存性細胞媒介障害(ADCC)、抗体依存性細胞食作用(ADCP)、サイトカイン分泌、抗原提示細胞による免疫複合体媒介性抗原取り込み、細胞表面受容体（例えば、B細胞受容体）のダウンレギュレーション、及びB細胞活性化。

30

【0086】

Fc受容体結合依存性エフェクター機能は、抗体のFc領域と、造血細胞における専用の細胞表面受容体である、Fc受容体(FcR)との相互作用により媒介されることができる。Fc受容体は免疫グロブリンスーパーファミリーに属し、免疫複合体のファゴサイトーシスによる、抗体で覆われた病原体の除去、並びに、抗体依存性細胞傷害(ADCC)による、赤血球、及び対応する抗体で覆われた他の細胞標的（例えば腫瘍細胞）の溶解の両方を媒介することが示されている（例えば、Van de Winkel, J. G. and Anderson, C. L., J. Leukoc. Biol. 49 (1991) 511-524を参照のこと）。FcRは、免疫グロブリンアイソタイプに対するその特異性により定義される：IgG抗体に対するFc受容体は、FcRと呼ばれる。Fc受容体結合は、例えばRavetch, J. V. and Kinet, J. P., Annu. Rev. Immunol. 9 (1991) 457-492; Capel, P. J., et al., Immunomethods 4 (1994) 25-34; de Haas, M., et al., J. Lab. Clin. Med. 126 (1995) 330-341; and Gessner, J. E., et al., Ann. Hematol. 76 (1998) 231-248に記載されている。

40

【0087】

50

I g G 抗体 (F c R) の F c 領域に対する受容体の架橋は、ファゴサイトーシス、抗体依存性細胞傷害、及び炎症性メディエータの放出、並びに、免疫複合体のクリアランス及び抗体産生の制御を含む、多種多様のエフェクター機能を誘発する。ヒトにおいて、3クラスの F c R が特性決定されており、これらは以下のとおりである。

【 0 0 8 8 】

- F c R I (C D 6 4) は、単量体 I g G に高い親和性で結合し、マクロファージ、単球、好中球、及び好酸球にて発現する。アミノ酸残基 E 2 3 3 ~ G 2 3 6、P 2 3 8、D 2 6 5、N 2 9 7、A 3 2 7、及び P 3 2 9 (K a b a t の E U インデックスに従った番号付け) の少なくとも1つにおける、F c 領域内での修飾によって、F c R I への結合が低下する。I g G 1 及び I g G 4 に置換された、位置 2 3 3 ~ 2 3 6 における I g G 2 残基は、F c R I への結合を 1 0 3 倍低下させ、抗体により感作される赤血球に対するヒト単核細胞応答を取り除いた (A r m o u r , K . L . , e t a l . , E u r . J . I m m u n o l . 2 9 (1 9 9 9) 2 6 1 3 - 2 6 2 4) 。

10

【 0 0 8 9 】

- F c R I I (C D 3 2) は、複合体化 I g G に中程度から低度の親和性で結合し、幅広く発現する。受容体は、2つのサブタイプ：F c R I I A 及び F c R I I B に分けることができる。F c R I I A は主に、殺傷に關与する多くの細胞 (例えばマクロファージ、単球、好中球) にて発見され、殺傷プロセスを活性化可能であるようである。F c R I I B は、阻害プロセスで役割を果たすようであり、B細胞、マクロファージ、並びに肥満細胞及び好酸球で発見されている。B細胞上では、F c R I I B は、免疫グロブリン産生、及び、例えば I g E クラスへのアイソタイプ切り替えを更に抑制する機能を有するようである。マクロファージ上では、F c R I I B は、F c R I I A によって媒介されるように、ファゴサイトーシスを阻害する役割を果たす。好酸球及び肥満細胞上において、B形態は、I g E の、その個別の受容体への結合による、これらの細胞の活性化の抑制を補助し得る。F c R I I A に対する結合の低下は、例えば、少なくとも、アミノ酸残基 E 2 3 3 ~ G 2 3 6、P 2 3 8、D 2 6 5、N 2 9 7、A 3 2 7、P 3 2 9、D 2 7 0、Q 2 9 5、A 3 2 7、R 2 9 2、及び K 4 1 4 (K a b a t の E U インデックスに従った番号付け) の1つにおいて突然変異を有する I g G F c 領域を含む抗体に対して発見されている。

20

【 0 0 9 0 】

- F c R I I I (C D 1 6) は I g G に、中程度 ~ 低度の親和性で結合し、2つの種類として存在する。F c R I I I A は N K 細胞、マクロファージ、好酸球、並びにいくつかの単球及び T 細胞上で発見されており、A D C C を媒介する。F c R I I I B は、好中球上で非常に発現する。F c R I I I A に対する結合の低下は、例えば、少なくとも、アミノ酸残基 E 2 3 3 ~ G 2 3 6、P 2 3 8、D 2 6 5、N 2 9 7、A 3 2 7、P 3 2 9、D 2 7 0、Q 2 9 5、A 3 2 7、S 2 3 9、E 2 6 9、E 2 9 3、Y 2 9 6、V 3 0 3、A 3 2 7、K 3 3 8、及び D 3 7 6 (K a b a t の E U インデックスに従った番号付け) の1つにおいて突然変異を有する I g G F c 領域を含む抗体に対して発見されている。

30

【 0 0 9 1 】

F c 受容体に対する、ヒト I g G 1 上での結合部位のマッピング、上述した突然変異部位、並びに F c R I 及び F c R I I A への結合を測定する方法は、S h i e l d s , R . L . , e t a l . J . B i o l . C h e m . 2 7 6 (2 0 0 1) 6 5 9 1 - 6 6 0 4 に記載されている。

40

【 0 0 9 2 】

用語「A D C C」又は「抗体依存性細胞傷害」とは、F c 受容体結合により媒介される機能であり、エフェクター細胞の存在下における、本明細書で報告される抗体による、標的細胞の溶解を意味する。A D C C を媒介する初期工程を誘発する抗体の能力は、F c R I 及び / 若しくは F c R I I A 又は (本質的に F c R I I I A を発現する) N K 細胞を組み換えにより発現する細胞といった、F c 受容体を発現する細胞への、抗体の結

50

合を測定することにより調査される。具体的には、NK細胞上でのFcRへの結合が測定される。

【0093】

「活性化Fc受容体」は、抗体のFc領域による結合の後に、エフェクター機能を発揮するために受容体を含む細胞を刺激するシグナル伝達事象を誘発するFc受容体である。活性化Fc受容体として、FcRIIIa(CD16a)、FcRI(CD64)、FcRIIa(CD32)及びFcRI(CD89)が挙げられる。特定の活性化Fc受容体は、ヒトFcRIIIaである(UniProt寄託番号P08637, version 141を参照)。

【0094】

本明細書で使用される「CD40」という用語は、別途示されない限り、霊長類(例えば、ヒト)及び齧歯類(例えば、マウス及びラット)等の哺乳動物を含む任意の脊椎動物源由来の任意の天然CD40を指す。この用語は、「全長」のプロセシングされていないCD40、及び細胞におけるプロセシングから生じるCD40の任意の形態を包含する。この用語は、CD40の天然に存在する変異体、例えば、スプライス変異体又は対立遺伝子変異体も包含する。例示的なヒトCD40のアミノ酸配列は、配列番号1(UniProt P25942、バージョン200)に示され、例示的なマウスCD40のアミノ酸配列は、配列番号146(UniProt P27512、バージョン160)に示される。CD40抗原は、腫瘍壊死因子受容体(TNF-R)ファミリーに属する50kDaの細胞表面糖タンパク質である(Stamenkovic et al. (1989), EMBO J. 8: 1403-10)。CD40は、Bリンパ球、樹状細胞、単球、マクロファージ、胸腺上皮、内皮細胞、線維芽細胞、平滑筋細胞などを含む、多くの正常細胞及び腫瘍細胞タイプで発現している。CD40は、全てのBリンパ腫及び全ての固形腫瘍の70%で発現し、IFN- γ やGM-CSFなどの成熟シグナルによって抗原提示細胞(APC)でアップレギュレートされる。CD40の活性化はまた、単球の機能的樹状細胞(DC)への分化を誘導し、APC-CD40誘導サイトカインを介してNK細胞の細胞溶解活性を増強する。したがって、CD40は、APCの成熟、ヘルパーサイトカインの分泌、共刺激分子のアップレギュレーション、及びエフェクター機能の増強を誘導することにより、免疫応答の開始と増強に重要な役割を果たす。

【0095】

本明細書で使用される「CD40アゴニスト」という用語は、CD40/CD40L相互作用をアゴニストする任意の部分を含む。この文脈で使用されるCD40は、好ましくはヒトCD40を指し、したがって、CD40アゴニストは好ましくはヒトCD40のアゴニストである。通常、この部分はアゴニストCD40抗体又は抗体フラグメントになる。

【0096】

用語「抗CD40抗体」「抗CD40」、「CD40抗体」及び「CD40に特異的に結合する抗体」とは、抗体がCD40の標的化において診断及び/又は治療薬剤として有用であるような充分な親和性を有して、CD40に結合可能である抗体を指す。一つの態様において、抗CD40抗体が無関係の、非CD40タンパク質に結合する程度は、例えばラジオイムノアッセイ(RIA)又はフローサイトメトリー(FACS)により測定すると、CD40に対する抗体の結合の約10%未満である。特定の実施形態において、CD40に結合する抗体は、 $1\mu\text{M}$ 、 100nM 、 10nM 、 1nM 、 0.1nM 、 0.01nM 、又は 0.001nM (例えば 10^{-6}M 以下、例えば $10^{-6.8}\sim 10^{-1.3}\text{M}$ 、例えば $10^{-8}\text{M}\sim 10^{-10}\text{M}$)の解離定数(K_D)を有する。

【0097】

「ペプチドリンカー」との用語は、1種以上のアミノ酸、典型的には、約2~20のアミノ酸を含むペプチドを指す。ペプチドリンカーは、当該技術分野で知られているか、又は本明細書に記載される。好適な、非免疫原性リンカーペプチドは例えば、 $(G_4S)_n$ 、 $(SG_4)_n$ 、又は $G_4(SG_4)_n$ ペプチドリンカーであり、式中、「n」は一般に、1~10、典型的には2~4、特に2の数字である。即ち、ペプチドは、GGGS(配

10

20

30

40

50

列番号 82)、GGGGSGGGGS(配列番号 83)、SGGGGS GGGG(配列番号 84)、及びGGGGSGGGGS GGGG(配列番号 85)からなる群から選択されるが、配列GSPGSSSSGS(配列番号 86)、(G4S)₃(配列番号 87)、(G4S)₄(配列番号 88)、GSGSGSGS(配列番号 89)、GSGSGNGS(配列番号 90)、GGS GSGSG(配列番号 91)、GGS GSG(配列番号 92)、GGS G(配列番号 93)、GGS GNGSG(配列番号 94)、GGNGSGSG(配列番号 95)、及びGGNGSG(配列番号 96)もまた含む。特に興味深いペプチドリンカーは、(G4S)(配列番号 82)、(G4S)₂又はGGGGSGGGGS(配列番号 83)、(G4S)₃(配列番号 87)及び(G4S)₄(配列番号 88)である。

【0098】

「アミノ酸」との用語は、本明細書中で使用される場合、アラニン(三文字コード: ala、一文字コード)A)、アルギニン(arg、R)、アスパラギン(asn、N)、アスパラギン酸(asp、D)、システイン(cys、C)、グルタミン(gln、Q)、グルタミン酸(glu、E)、グリシン(gly、G)、ヒスチジン(his、H)、イソロイシン(ile、I)、ロイシン(leu、L)、リシン(lys、K)、メチオニン(met、M)、フェニルアラニン(phe、F)、プロリン(pro、P)、セリン(ser、S)、トレオニン(thr、T)、トリプトファン(trp、W)、チロシン(tyr、Y)及びバリン(val、V)を含む天然に存在するカルボキシ - アミノ酸の一群を示す。

【0099】

「融合した」、又は「連結した」とは、構成成分(例えば、抗体の重鎖及びFabフラグメント)が直接、又は1つ以上のペプチドリンカーを介してのいずれかで、ペプチド結合により結合されていることを意味する。

【0100】

参照ポリペプチド配列に関する「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」は、最大パーセントの配列同一性を達成するために配列をアラインメントし、必要に応じてギャップを導入した後、保存的置換を配列同一性の一部として考慮しないで、参照ポリペプチド配列のアミノ酸残基と同一である候補配列のアミノ酸残基の割合として定義される。アミノ酸配列同一性率を決定するためのアラインメントは、当該技術分野の技術の範囲内にある種々の様式で、例えば、公的に入手可能なコンピュータソフトウェア、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN、SAWI又はMegalign(DNASTAR)ソフトウェアを用いて達成することができる。当業者は、比較される配列の全長にわたって最大整列度を達成するのに必要とされる任意のアルゴリズムを含め、配列を整列させるのに適切なパラメータを決定することができる。しかしながら、本明細書では目的のために、アミノ酸配列同一%値は、配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を用いて生じる。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムは、Genentech, Inc.によって作成されており、ソースコードは、U.S. Copyright Office (Washington D.C., 20559)のユーザドキュメンテーションにファイルされており、U.S. Copyright Registration No. TXU 510087の下に登録されている。ALIGN-2プログラムは、Genentech, Inc. (South San Francisco, California)から公的に入手可能であり、又はそのソースコードからコンパイルされてもよい。ALIGN-2プログラムは、デジタルUNIX V4.0Dを含め、UNIXオペレーティングシステムで使用するためにコンパイルされるべきである。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定されており、かつ変わらない。ALIGN-2がアミノ酸配列比較に採用されている状況においては、(あるいは所与のアミノ酸配列Bに対する、配列Bとの、又は配列Bに対向するある特定のアミノ酸配列同一%を有するか又は含む所与のアミノ酸配列Aとして購入することができる)所与のアミノ酸配列Aの、所与のアミノ酸配列Bに対する、配列Bとの、又は配列Bに対向するアミノ酸配列同一%は、次のように計算される。

10

20

30

40

50

【 0 1 0 1 】

分数 X / Y の 1 0 0 倍

式中、 X は、 A 及び B のこのプログラムのアラインメントにおいて、配列アラインメントプログラム `ALIGN - 2` によって同一性マッチとしてスコアリングされたアミノ酸残基の数であり、 Y は、 B におけるアミノ酸残基の合計数である。アミノ酸配列 A の長さが、アミノ酸配列 B の長さとは等しくない場合、 B に対する A のアミノ酸配列同一性%は、 A に対する B のアミノ酸配列同一性%に等しくないことが理解されるだろう。他の意味であると具体的に述べられていない限り、本明細書で使用されるアミノ酸配列同一性%の値は全て、`ALIGN - 2` コンピュータプログラムを用いる直前の段落に記載されるように得られる。

10

【 0 1 0 2 】

特定の実施形態において、本明細書において提供する、二重特異性抗原結合分子のアミノ酸配列変異体が想到される。例えば、`TNF` リガンド三量体含有抗原結合分子の結合親和性、及び/又は他の生物学的性質を改善するのが望ましい場合がある。適切な改変を、分子をコードするヌクレオチド配列に導入することにより、又はペプチド合成により、`TNF` リガンド三量体含有抗原結合分子のアミノ酸配列変異体を調製することができる。そのような修飾は、例えば、抗体のアミノ酸配列内の残基の欠失、及び/又は挿入、及び/又は置換を含む。欠失、挿入及び置換の任意の組合せは、最終コンストラクトが、所望の特徴（例えば、抗原結合）を有する限り、最終コンストラクトに到達するように行うことができる。置換による突然変異生成のための目的部位として、`HVR` 及びフレームワーク（`FR`）が挙げられる。保存的置換は、「好ましい置換」の見出しで表 B に与えられており、アミノ酸側鎖クラス（1）～（6）を参照しつつ、以下に更に記載される。アミノ酸置換は、目的の分子及び所望の活性（例えば、抗原結合の保持/向上、免疫原性の低下、又は `ADCC` 又は `CDC` の向上）についてスクリーニングされた産物に導入されていてもよい。

20

30

40

50

【表 A】

| 元の残基 | 例示的置換 | 好ましい置換 |
|--------------|--|--------|
| A l a (A) | V a l ; L e u ; I l e | V a l |
| A r g (R) | L y s ; G l n ; A s n | L y s |
| A s n (N) | G l n ; H i s ; A s p , L y s ; A r g | G l n |
| A s p (D) | G l u ; A s n | G l u |
| C y s (C) | S e r ; A l a | S e r |
| G l n (Q) | A s n ; G l u | A s n |
| G l u (E) | A s p ; G l n | A s p |
| G l y (G) | A l a | A l a |
| H i s (H) | A s n ; G l n ; L y s ; A r g | A r g |
| I l e (I) | L e u ; V a l ; M e t ; A l a ; P h e ; ノルロイ シン | L e u |
| L e u (L) | ノルロイシン ; I l e ; V a l ; M e t ; A l a ; P h e | I l e |
| L y s (K) | A r g ; G l n ; A s n | A r g |
| M e t (M) | L e u ; P h e ; I l e | L e u |
| P h e (F) | T r p ; L e u ; V a l ; I l e ; A l a ; T y r | T y r |
| P r o (P) | A l a | A l a |
| S e r (S) | T h r | T h r |
| T h r (T) | V a l ; S e r | S e r |
| T r p (W) | T y r ; P h e | T y r |
| T y r (Y) | T r p ; P h e ; T h r ; S e r | P h e |
| V a l (V) | I l e ; L e u ; M e t ; P h e ; A l a ; ノルロイ シン | L e u |

【0103】

アミノ酸は、共通の側鎖特性に従って群分けされてもよい。

- (1) 疎水性：ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- (2) 中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；
- (3) 酸性：Asp、Glu；
- (4) 塩基性：His、Lys、Arg；
- (5) 鎖の配向に影響を与える残基：Gly、Pro；
- (6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe。

【0104】

10

20

30

40

50

非保存的置換は、これらのクラスの1つのメンバーを別のクラスと交換することを伴うだろう。

【0105】

「アミノ酸配列変異体」との用語は、親抗原結合分子（例えば、ヒト化抗体又はヒト抗体）の1つ以上の超可変領域残基中にアミノ酸置換が存在する実質的な変異体を含む。一般的に、更なる研究のために選択され、得られた変異体は、親抗原結合分子と比較して、特定の生物学的特性の修飾（例えば、改良）（例えば、親和性の増加、免疫原性の低下）を有し、及び/又は親抗原結合分子の特定の生物学的特性を実質的に保持しているだろう。例示的な置換変異体は、親和性成熟した抗体であり、例えば、本明細書に記載されるようなファージディスプレイに基づく親和性成熟技術を用い、簡便に生成されてもよい。簡単に言うと、1つ以上のHVR残基は、変異しており、ファージディスプレイされ、特定の生体活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングされた変異体抗原結合分子である。特定の実施形態では、置換、挿入又は欠失は、そのような変更が、抗原結合分子が抗原に結合する能力を実質的に減らさない限り、1つ以上のHVR内で起こってもよい。例えば、結合親和性を実質的に低下させない保存的変更（例えば、本明細書に提供される保存的置換）が、HVR中に作られてもよい。変異を標的とし得る抗体の残基又は領域の同定のための有用な方法は、Cunningham and Wells (1989) Science, 244: 1081-1085によって記載されるように、「アラニンスクランニング突然変異生成」と呼ばれる。この方法では、抗体と抗原との相互作用が影響を受けるかどうかを決定するために、残基又は標的残基群（例えば、荷電残基、例えば、Arg、Asp、His、Lys及びGlu）が同定され、中性又は負に荷電したアミノ酸（例えば、アラニン又はポリアラニン）によって置き換えられる。更なる置換が、初期置換に対する機能的感受性を示すアミノ酸位置に導入されてもよい。これに代えて、又は更に、抗体と抗原との間の接触点を同定するための、抗原-抗原結合分子複合体の結晶構造。そのような接触残基及び隣接残基は、置換の候補として標的とされるか、又は除去されてもよい。変異体は、所望の特性を有するか否かを判定するためにスクリーニングされてもよい。

【0106】

アミノ酸配列挿入として、1個の残基から100個以上の残基を含むポリペプチドまでの長さ範囲のアミノ末端及び/又はカルボキシル末端の融合、並びに1個又は複数のアミノ酸残基の配列内挿入が挙げられる。末端挿入の例としては、N末端メチオニル残基を有する、本発明の二重特異性抗原結合分子が挙げられる。分子の他の挿入変異体としては、二重特異性抗原結合分子の血清半減期を増加させる、N又はC末端の、ポリペプチドへの融合が挙げられる。

【0107】

特定の実施形態において、本明細書において提供する二重特異性抗原結合分子が改変され、抗体がグリコシル化される程度が増加又は低下される。1つ以上のグリコシル化部位が作製される、又は取り除かれるように、アミノ酸配列を改変することにより、分子のグリコシル化変異体を便利に入手することができる。TNFリガンド三量体含有抗原結合分子がFc領域を含む場合において、Fc領域に付着した炭水化物を改変することができる。哺乳動物細胞によって産生される天然抗体は、典型的には、一般にN結合によってFc領域のCH2ドメインのAsn297に結合される分岐状の二分岐オリゴ糖を含む。例えば、Wrightら、「TIBTECH」、第15巻、第26~32頁（1997年）を参照されたい。オリゴ糖には、さまざまな炭水化物、例えば、マンノース、N-アセチルグルコサミン（GlcNAc）、ガラクトース、及びシアル酸、並びに二分岐型オリゴ糖構造の「幹」のGlcNAcに結合したフコースが含まれ得る。いくつかの実施形態では、特定の改善された性質を有する変異体を作製するために、TNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子内でオリゴ糖の修飾を行うことができる。一つの態様において、Fc領域に（直接又は間接的に）結合したフコースを欠く炭水化物構造を有する、本発明の二重特異性抗原結合分子又は抗体の変異体が提供される。このようなフコシル化変異体は

10

20

30

40

50

、改良されたADC機能をも有していてもよい。例えば、米国特許出願公開第2003/0157108号(Presta, L.)又は米国特許出願公開第2004/0093621号(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)を参照。別の態様において、バイセクトオリゴ糖を含む、例えば、Fc領域に結合した二分枝オリゴ糖がGlcNAcにより二分割されている、本発明の二重特異性抗原結合分子又は抗体の変異体が提供される。このような変異体は、フコシル化の低下及び/又はADC機能の向上をも有していてもよく、例えば、国際公開第2003/011878号(Jean-Mairet et al.)、米国特許第6,602,684号(Umana et al.)及び米国特許出願公開第2005/0123546号(Umana et al)を参照のこと。Fc領域に接続したオリゴ糖中に少なくとも1つのガラクトース残基をも有する変異体も提供される。このような抗体変異体は、改良されたCDC機能をも有する場合があります、例えば、国際公開第1997/30087号(Patel et al.)、国際公開第1998/58964号(Raju, S.)及び国際公開第1999/22764号(Raju, S.)に記載される。

【0108】

特定の態様において、本発明の二重特異性抗原結合分子のシステイン操作された変異体、例えば、分子の1つ以上の残基がシステイン残基で置換されている「thioMAb」を作製することが望ましい場合がある。具体的な態様において、置換された残基は、分子の利用しやすい部位で生じる。これらの残基をシステインと置換することによって、反応性チオール基は、抗体の接近可能な部位に位置しており、これを使用し、抗体を他の部分(例えば、薬物部分又はリンカー-薬物部分)に対して抱合させ、免疫抱合体を作製してもよい。特定の態様において、任意の1つ以上の以下の残基をシステインで置換してよい：軽鎖のV205(Kabat番号付け)、重鎖のA118(EU番号付け)、及び重鎖Fc領域のS400(EU番号付け)。システイン操作された抗原結合分子は、例えば、米国特許第7,521,541号に記載されるように作製されてもよい。

【0109】

「核酸」又は「ポリヌクレオチド」との用語は、ヌクレオチドのポリマーを含む任意の化合物及び/又は物質を含む。各ヌクレオチドは、塩基で構成され、具体的には、プリン塩基又はピリミジン塩基(すなわち、シトシン(C)、グアニン(G)、アデニン(A)、チミン(T)又はウラシル(U))、糖(すなわち、デオキシリボース又はリボース)、及びホスフェート基で構成される。多くは、核酸分子は、塩基配列によって記述され、ここで、上記塩基は、核酸分子の一次構造(線形構造)を表す。塩基の配列は、典型的には、5'から3'へと表される。ここで、核酸分子との用語は、デオキシリボ核酸(DNA)、例えば、相補性DNA(cDNA)及びゲノムDNA、リボ核酸(RNA)、特に、メッセンジャーRNA(mRNA)、DNA又はRNAの合形成態、及びこれらの分子の2つ以上を含む混合ポリマーを包含する。核酸分子は、線形又は環状であってもよい。これに加え、核酸分子との用語は、センス鎖及びアンチセンス鎖、及び一本鎖形態及び二本鎖形態の両方を含む。更に、本明細書に記載される核酸分子は、天然に存在するヌクレオチド又は天然に存在しないヌクレオチドを含んでいてもよい。誘導体化された糖又はホスフェート骨格結合又は化学修飾された残基を含む、天然に存在しないヌクレオチドの例として、修飾されたヌクレオチド塩基が挙げられる。核酸分子は、例えば、宿主又は患者において、インビトロ及び/又はインビボで本発明の抗体の直接的な発現のためのベクターとして適したDNA分子及びRNA分子も包含する。このようなDNA(例えば、cDNA)又はRNA(例えば、mRNA)ベクターは、改変されていなくてもよく、又は改変されていてもよい。例えば、mRNAは、インビボで抗体を産生するために対象にmRNAを注入することができるように、RNAベクターの安定性及び/又はコードされた分子の発現を高めるように化学修飾されてもよい。(例えば、Stadler et al, Nature Medicine 2017、2017年6月12日にオンラインで公開、doi:10.1038/nm.4356又はEP 2 101 823 B1号を参照。)

【0110】

「単離」核酸とは、核酸分子が自然環境の構成要素から分離されたものを指す。単離核酸は、元々その核酸分子を含む細胞に含まれているが、その核酸分子が、染色体外に存在するか、又はその天然の染色体位置とは異なる染色体位置に存在する核酸分子を含む。

【 0 1 1 1 】

「二重特異性抗原結合分子又は抗体をコードする単離核酸」とは、単一ベクター又は個別のベクター内の核酸分子を含む、二重特異性抗原結合分子又は抗体の重鎖及び軽鎖（又はそのフラグメント）をコードする1つ以上の核酸分子を指し、そのような核酸分子は、宿主細胞内の1つ以上の場所に存在する。

【 0 1 1 2 】

本発明の参照ヌクレオチド配列に対して少なくとも、例えば95%「同一の」ヌクレオチド配列を有する核酸又はポリヌクレオチドとは、このポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が、ポリヌクレオチド配列が、参照ヌクレオチド配列の100ヌクレオチドあたり5個までの点突然変異を含んでいてもよいことを除けば、参照配列に対して同一であることを意図している。言い換えると、参照ヌクレオチド配列に対して少なくとも95%同一のヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを得るために、参照配列内のヌクレオチドの5%までが、欠失していてもよく、若しくは別のヌクレオチドで置換されていてもよく、又は参照配列内の全ヌクレオチドの5%までが、参照配列内へと挿入されていてもよい。参照配列のこれらの変更は、参照ヌクレオチド配列の5'末端位置若しくは3'末端位置で、又は、それらの末端位置の間の、参照配列内の残基間で個々の若しくは参照配列内での1つ以上の連続した基においてかのいずれかに点在しているどこかで起こってもよい。実際の様式として、任意の特定のポリヌクレオチド配列が、本発明のヌクレオチド配列に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%同一であるかどうかは、既知のコンピュータプログラム、例えば、ポリペプチドについて上に記載したもの（例えば、ALIGN-2）を用いて、従来通りに決定することができる。

【 0 1 1 3 】

「発現カセット」との用語は、組換えによって、又は合成によって作られるポリヌクレオチドを指し、標的細胞内の特定の核酸の転写が可能な特定の一連の核酸要素を含む。組換え発現カセットは、プラスミド、染色体、ミトコンドリアDNA、プラスチドDNA、ウイルス、又は核酸フラグメントへと組み込むことができる。典型的には、発現ベクターの組換え発現カセット部分は、配列の中でも特に、転写される核酸配列と、プロモーターとを含む。特定の実施形態では、本発明の発現カセットは、本発明の二重特異性抗原結合分子をコードするポリヌクレオチド配列又はそのフラグメントを含む。

【 0 1 1 4 】

用語「ベクター」又は「発現ベクター」は「発現コンストラクト」と同義であり、標的細胞中で作用可能に会合した特異的遺伝子の発現を導入及び誘導するのに使用されるDNA分子を意味する。本用語は、自己複製する核酸構造としてのベクター、及びベクターが導入された宿主細胞のゲノム内へと組み込まれたベクターを含む。本発明の発現ベクターは、発現カセットを含む。発現ベクターによって、安定したmRNAの多量の転写が可能となる。いったん発現ベクターが標的細胞内に入ると、リボ核酸分子又は遺伝子によってコードされたタンパク質は、細胞の転写機構及び/又は翻訳機構によって産生される。一実施形態では、本発明の発現ベクターは、本発明の二重特異性抗原結合分子をコードするポリヌクレオチド配列又はそのフラグメントを含む発現カセットを含む。

【 0 1 1 5 】

用語「宿主細胞」、「宿主細胞株」、及び「宿主細胞培養」は同じ意味で用いられ、外因性核酸が導入された細胞を意味し、そのような細胞の後代を含む。宿主細胞は、「形質転換体」及び「形質転換された細胞」を含み、これらは、継代数に関わらず、初代の形質転換された細胞、及び初代の形質転換された細胞から誘導された子孫を含む。後代は、核酸含有量が親細胞と完全に同一でなくてもよいが、突然変異を含有していてもよい。元々の形質転換された細胞についてスクリーニングされるか又は選択されるのと同じ機能又は生物活性を有する突然変異体の後代は、本発明に含まれる。宿主細胞は、本発明の二重特

10

20

30

40

50

異性抗原結合分子を生成するために使用可能な任意の種類細胞系である。宿主細胞としては、培養細胞、例えば、哺乳動物培養細胞、例えば、ほんの数例を挙げると、CHO細胞、BHK細胞、NS0細胞、SP2/0細胞、YO骨髓腫細胞、P3X63マウス骨髓腫細胞、PER細胞、PER.C6細胞又はハイブリドーマ細胞、酵母細胞、昆虫細胞及び植物細胞が挙げられるが、トランスジェニック動物、トランスジェニック植物又は培養植物又は動物組織に含まれる細胞も含まれる。

【0116】

ある薬剤の「有効量」は、その薬剤が投与される細胞又は組織において、ある生理学的変化を引き起こすのに必要な量を指す。

【0117】

ある薬剤（例えば、医薬組成物）の「治療有効量」は、所望の治療結果又は予防結果を達成するのに有効な量、必要な投薬量及び必要な期間を指す。治療有効量の作用剤は、例えば、疾患の副作用を除去し、低下させ、遅延させ、最小限にし、又は予防する。

【0118】

「個体」又は「対象」は、哺乳動物である。哺乳動物としては、限定されないが、家畜動物（例えば、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ及びウマ）、霊長類（例えば、ヒト及びサルなどの非ヒト霊長類）、ウサギ、げっ歯類（例えば、マウス及びラット）が挙げられる。特に、個体又は対象は、ヒトである。

【0119】

「医薬組成物」又は「医薬製剤」という用語は、調製物の中に含有される活性成分の生物活性が有効になるような形態であり、医薬組成物が投与されるであろう対象にとって許容できないほど有毒である追加の成分を何ら含有しない、調製物を指す。

【0120】

「薬学的に許容され得る担体」は、有効成分以外の医薬組成物又は製剤中の成分であって、対象にとって非毒性である成分を指す。薬学的に許容され得る担体としては、緩衝剤、賦形剤、安定剤、又は防腐剤が挙げられるが、これらに限定されない。

【0121】

「パッケージ添付文書」との用語は、治療製品の市販パッケージに通常含まれる指示を指すために用いられ、そのような治療製品に関する適応症、使用、投薬量、投与、併用療法、禁忌及び/又は警告に関する情報を含む。

【0122】

本明細書で使用される場合、「処置」（及びその文法的な変形語、例えば、「処置する」又は「処置すること」）は、処置される個体において本来の経過を変える試みにおける臨床的介入を指し、予防のために、又は臨床病理の経過の間に行うことができる。処置の所望の効果としては、疾患の発症又は再発を予防すること、症状の軽減、疾患の任意の直接的又は間接的な病理学的結果の減弱、転移を予防すること、疾患進行率を低下させること、病状の寛解又は緩和、及び回復又は改良された予後が挙げられる。いくつかの実施形態では、本発明の分子を使用して、疾患の発生を遅らせるか、又は疾患の進行を遅らせる。

【0123】

「癌」との用語は、本明細書で使用される場合、増殖性疾患、例えば、リンパ腫、リンパ性白血病、肺癌、非小細胞肺（NSCL）癌、肺胞細胞性肺癌、骨腫瘍、膵臓癌、皮膚癌、頭部又は頸部の癌、皮膚又は眼内黒色腫、子宮癌、卵巣癌、直腸癌、肛門領域の癌、胃癌、消化器癌、結腸癌、乳癌、子宮癌、卵管癌腫、子宮内膜癌腫、頸部の癌腫、膣の癌腫、陰門の癌腫、ホジキン病、食道の癌、小腸癌、内分泌系の癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、副腎癌、軟組織の肉腫尿道の癌、陰茎癌、前立腺癌、膀胱癌、腎臓又は尿管の癌、腎細胞癌腫、腎盂癌腫、中皮腫、肝細胞癌、胆管癌、中枢神経系（CNS）の新生物、脊髄軸腫瘍、脳幹神経膠腫、多形性膠芽腫、星状細胞腫、神経鞘腫、上衣腫、髓芽腫、髄膜腫、扁平上皮癌腫、下垂体腺腫及びユーイング肉腫（上述のいずれかの癌の難治性態様を含む）、又は上述の癌の1つ以上の組合せを指す。

【0124】

10

20

30

40

50

「化学療法剤」とは、癌の処置において有用な化学物質を指す。一つの態様において、化学療法剤は代謝拮抗剤である。一つの態様において、代謝拮抗剤は、アミノプテリン、メトトレキセド、ペメトトレキセド、ラルチトレキセド、クラドリピン、クロファラピン、フルダラピン、メルカプトプリン、ペントスタチン、チオグアニン、カペシタピン、シタラピン、フルオロウラシル、フロクスウリジン、及びゲムシタピンからなる群から選択される。一つの特定の態様において、代謝拮抗剤は、カペシタピン又はゲムシタピンである。別の態様において、代謝拮抗剤は、パクリタキセルである。一つの態様において、化学療法剤は、微小管形成に影響を与える薬剤である。一つの態様において、微小管形成に影響を与える薬剤は、パクリタキセル、ドセタキセル、ピンクリスチン、ピンプラスチン、ピンデシン、ピノレルピン、タキソテール、エトポシド、及びテニポシドからなる群から選択される。別の態様において、化学療法剤は、シクロホスファミドなどのアルキル化剤である。一つの態様において、化学療法剤は、トポイソメラーゼ II 阻害剤などの細胞毒性抗生物質である。一つの態様において、トポイソメラーゼ II 阻害剤は、ドキシソルピシンである。

10

【0125】

本発明の二重特異性抗体

本発明は、新しい抗FAP抗体(クローン212)を含む新規の二重特異性抗原結合分子を提供する。この新しい抗FAP抗体を含む二重特異性抗原結合分子は、生産性、安定性、結合親和性、生物活性、標的化効率、内在化の低下、優れた薬物動態(PK)特性、毒性の低下、患者に与えられ得る投与量範囲の拡大、それによっておそらく増強された有効性など、特に有利な特性を備えている。

20

【0126】

例示的な二重特異性抗原結合分子

一つの態様において、本発明は、CD40への標的化されたアゴニスト結合を特徴とする二重特異性抗原結合分子を提供する。特に、二重特異性抗原結合分子は、FAPを標的とするCD40アゴニストである。別の特定の態様において、本発明の二重特異性抗原結合分子は、エフェクター機能を低下させる突然変異を含む安定した会合が可能な第1及び第2のサブユニットから構成されるFc領域を含む。エフェクター機能を低下又は無効にする突然変異を含むFc領域の使用は、Fc受容体を介した架橋による非特異的アゴニズムを防ぎ、CD40⁺細胞のADCCを防ぐ。本明細書に記載の二重特異性抗原結合分子は、典型的には癌細胞又は腫瘍間質である標的細胞で免疫応答を選択的に誘導するという点で、CD40に特異的に結合可能な従来抗体に勝る利点を有する。

30

【0127】

したがって、二重特異性抗原結合分子は、CD40へのFAP標的アゴニスト結合によって特徴付けられる。FAP発現細胞の存在下で、二重特異性抗原結合分子は、抗原提示細胞(APC)を活性化し、ヒトB細胞(実施例5.1.2)、ヒトDauidi細胞(実施例5.1.1)及びヒト単球由来樹状細胞(moDC)を活性化することができる。

【0128】

したがって、一つの態様において、提供されるのは、二重特異性抗原結合分子であって、

(a) CD40に特異的に結合可能な少なくとも1つの抗原結合ドメインと、

(b) (i) 配列番号3のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii) 配列番号4、配列番号11及び配列番号12からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-H2、及び(iii) 配列番号5のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む重鎖可変領域(V_HFAP)、並びに(iv) 配列番号6、配列番号13及び配列番号14からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-L1、(v) 配列番号7のアミノ酸配列を含むCDR-L2、及び(vi) 配列番号8のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含む軽鎖可変領域(V_LFAP)を含む線維芽細胞活性化タンパク質(FAP)に特異的に結合可能な少なくとも1つの抗原結合ドメインと、を含む、二重特異性抗原結合分子を提供する。

40

【0129】

特定の態様において、提供されるのは、二重特異性抗原結合分子であって、a) CD4

50

0 に特異的に結合可能な少なくとも1つの抗原結合ドメインと、(b)(i)配列番号3のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii)配列番号4からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-H2、及び(iii)配列番号5のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む重鎖可変領域(V_HFAP)、並びに、(iv)配列番号6からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-L1、(v)配列番号7のアミノ酸配列を含むCDR-L2、及び(vi)配列番号8のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含む軽鎖可変領域(V_LFAP)を含む線維芽細胞活性化タンパク質(FAP)に特異的に結合可能な少なくとも1つの抗原結合ドメインと、を含む、二重特異性抗原結合分子である。

【0130】

一つの態様において、提供されるのは、二重特異性抗原結合分子であって、FAPに特異的に結合可能な抗原結合ドメインが、配列番号9のアミノ酸配列と少なくとも約90%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(V_HFAP)、及び配列番号10のアミノ酸配列と少なくとも約90%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(V_LFAP)を含む、二重特異性抗原結合分子である。

10

【0131】

別の態様において、提供されるのは、二重特異性抗原結合分子であって、FAPに特異的に結合可能な抗原結合ドメインが、

配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19及び配列番号20からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(V_HFAP)と、

配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25及び配列番号26からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(V_LFAP)と、を含む、二重特異性抗原結合分子である。

20

【0132】

一つの態様において、二重特異性抗原結合分子が、

(a)配列番号15のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(V_HFAP)、及び配列番号21のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(V_LFAP)、

(b)配列番号16のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(V_HFAP)、及び配列番号21のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(V_LFAP)、

(c)配列番号16のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(V_HFAP)、及び配列番号22のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(V_LFAP)、又は

(d)配列番号19のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(V_HFAP)、及び配列番号25のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(V_LFAP)を含む。

30

【0133】

特定の態様において、二重特異性抗原結合分子は、配列番号15のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(V_HFAP)、及び配列番号21のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(V_LFAP)を含む。

【0134】

別の態様において、提供されるのは、CD40に特異的に結合可能な抗原結合ドメインが、(i)配列番号27のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii)配列番号28のアミノ酸配列を含むCDR-H2、及び(iii)配列番号29のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む重鎖可変領域(V_HCD40)、並びに、(iv)配列番号30のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(v)配列番号31のアミノ酸配列を含むCDR-L2、及び(vi)配列番号32のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含む軽鎖可変領域(V_LCD40)を含む、二重特異性抗原結合分子である。

40

【0135】

更なる態様において、提供されるのは、二重特異性抗原結合分子であって、CD40に特異的に結合可能な抗原結合ドメインが、

(i)配列番号37、配列番号38、配列番号39及び配列番号40からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(V_HCD40)と、

(ii)配列番号41、配列番号42、配列番号43、及び配列番号44からなる群か

50

ら選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V_LCD40) と、を含む、二重特異性抗原結合分子である。

【0136】

一つの態様において、提供されるのは、二重特異性抗原結合分子であって、CD40に特異的に結合可能な抗原結合ドメインが、

(a) 配列番号37のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号41のアミノ酸配列を含むV_L、又は

(b) 配列番号37のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号42のアミノ酸配列を含むV_L、又は

(c) 配列番号37のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号43のアミノ酸配列を含むV_L、又は

10

(d) 配列番号37のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号44のアミノ酸配列を含むV_L、又は

(e) 配列番号38のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号41のアミノ酸配列を含むV_L、又は

(f) 配列番号38のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号42のアミノ酸配列を含むV_L、又は

(g) 配列番号38のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号43のアミノ酸配列を含むV_L、又は

(h) 配列番号38のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号44のアミノ酸配列を含むV_L、又は

20

(i) 配列番号39のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号41のアミノ酸配列を含むV_L、又は

(j) 配列番号39のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号42のアミノ酸配列を含むV_L、又は

(k) 配列番号39のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号43のアミノ酸配列を含むV_L、又は

(l) 配列番号39のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号44のアミノ酸配列を含むV_L、又は

(m) 配列番号40のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号41のアミノ酸配列を含むV_L、又は

30

(n) 配列番号40のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号42のアミノ酸配列を含むV_L、又は

(o) 配列番号40のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号43のアミノ酸配列を含むV_L、又は

(p) 配列番号40のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号44のアミノ酸配列を含むV_Lを含む、本明細書で以前に定義された二重特異性抗原結合分子である。

【0137】

特定の態様において、二重特異性抗原結合分子が、CD40に特異的に結合可能な抗原結合ドメインが、配列番号37のアミノ酸配列を含むV_H、及び配列番号41のアミノ酸配列を含むV_Lを含む。

40

【0138】

更なる態様において、提供されるのは、二重特異性抗原結合分子であって、CD40に特異的に結合可能な抗原結合ドメインが、

(i) 配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号49及び配列番号50からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V_HCD40) と、

(ii) 配列番号51、配列番号52、配列番号53、及び配列番号54からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V_LCD40) と、を含む、前に本明細書で定義された二重特異性抗原結合分子である。

50

【 0 1 3 9 】

一つの態様において、提供されるのは、二重特異性抗原結合分子であって、C D 4 0 に特異的に結合可能な抗原結合ドメインが、

(a) 配列番号 4 5 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 5 1 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(b) 配列番号 4 6 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 5 1 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(c) 配列番号 4 7 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 5 1 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(d) 配列番号 4 8 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 5 1 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(e) 配列番号 4 5 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 5 2 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(f) 配列番号 4 6 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 5 2 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(g) 配列番号 4 7 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 5 2 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(h) 配列番号 4 8 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 5 2 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(i) 配列番号 4 9 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 5 3 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(j) 配列番号 5 0 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 5 3 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(k) 配列番号 4 9 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 5 4 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(l) 配列番号 5 0 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 5 4 のアミノ酸配列を含む V L を含む、二重特異性抗原結合分子である。

【 0 1 4 0 】

特定の態様において、提供されるのは、二重特異性抗原結合分子であって、(i) 少なくとも 1 つの C D 4 0 に特異的に結合可能な抗原結合ドメインであり、配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V_H C D 4 0) 及び配列番号 4 1 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V_L C D 4 0) を含む抗原結合ドメインと、(i i) F A P に特異的に結合可能な少なくとも 1 つの抗原結合ドメインであり、配列番号 1 5 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V_H F A P) 及び配列番号 2 1 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V_L F A P) を含む抗原結合ドメインと、を含む、二重特異性抗原結合分子である。

【 0 1 4 1 】

C D 4 0 及び F A P に結合する二重特異性抗原結合分子

別の態様において、提供されるのは、二重特異性抗原結合分子であって、

(i) C D 4 0 に特異的に結合可能な少なくとも 1 つの抗原結合ドメインであり、配列番号 3 7、配列番号 3 8、配列番号 3 9 及び配列番号 4 0 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V_H C D 4 0)、及び配列番号 4 1、配列番号 4 2、配列番号 4 3、及び配列番号 4 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V_L C D 4 0) を含む、抗原結合ドメインと、

(i i) F A P に特異的に結合可能な少なくとも 1 つの抗原結合ドメインであり、配列番号 1 5、配列番号 1 6、配列番号 1 7、配列番号 1 8、配列番号 1 9 及び配列番号 2 0 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V_H F A P)、及び配列番号 1 9 及び配列番号 2 0、並びに配列番号 2 1、配列番号 2 2、配列番号 2 3、配列番号 2 4、配列番号 2 5 及び配列番号 2 6 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V_L F A P) を含む抗原結合ドメインと、を含む、二重特異性抗原結合分子である。

10

20

30

40

50

【 0 1 4 2 】

更なる態様において、提供されるのは、二重特異性抗原結合分子であって、

(i) C D 4 0 に特異的に結合可能な少なくとも1つの抗原結合ドメインであり、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号49及び配列番号50からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(V_H C D 4 0)、及び配列番号51、配列番号52、配列番号53、及び配列番号54からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(V_L C D 4 0)を含む抗原結合ドメインと、

(i i) F A P に特異的に結合可能な少なくとも1つの抗原結合ドメインであり、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19及び配列番号20からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(V_H F A P)、及び配列番号19及び配列番号20、並びに配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25及び配列番号26からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(V_L F A P)を含む抗原結合ドメインと、を含む、二重特異性抗原結合分子である。

10

【 0 1 4 3 】

特定の態様において、提供されるのは、二重特異性抗原結合分子であって、

(i) C D 4 0 に特異的に結合可能な少なくとも1つの抗原結合ドメインであり、配列番号37のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(V_H C D 4 0)及び配列番号41のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(V_L C D 4 0)を含む抗原結合ドメインと、

(i i) F A P に特異的に結合可能な少なくとも1つの抗原結合ドメインであり、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19及び配列番号20からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(V_H F A P)、及び配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25及び配列番号26からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(V_L F A P)を含む抗原結合ドメインと、を含む、二重特異性抗原結合分子である。

20

【 0 1 4 4 】

別の態様において、提供されるのは、二重特異性抗原結合分子であって、

(i) C D 4 0 に特異的に結合可能な少なくとも1つの抗原結合ドメインであり、配列番号45及び配列番号48のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(V_H C D 4 0)及び配列番号51のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(V_L C D 4 0)を含む抗原結合ドメインと、

(i i) F A P に特異的に結合可能な少なくとも1つの抗原結合ドメインであり、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19及び配列番号20からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(V_H F A P)、及び配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25及び配列番号26からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(V_L F A P)を含む抗原結合ドメインと、を含む、二重特異性抗原結合分子である。

30

【 0 1 4 5 】

更なる態様において、提供されるのは、二重特異性抗原結合分子であって、

(i) C D 4 0 に特異的に結合可能な抗原結合ドメインが、配列番号37、配列番号38、配列番号39及び配列番号40からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(V_H C D 4 0)、及び配列番号41、配列番号42、配列番号43、及び配列番号44からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(V_L C D 4 0)を含み、

(i i) F A P に特異的に結合可能な抗原結合ドメインが、配列番号15アミノ酸配列を含む重鎖可変領域V_H、及び配列番号21のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、二重特異性抗原結合分子である。

40

【 0 1 4 6 】

更に、提供されるのは、二重特異性抗原結合分子であって、

(i) C D 4 0 に特異的に結合可能な抗原結合ドメインが、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号49及び配列番号50からなる群から選択さ

50

れるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V_HCD40)、及び配列番号51、配列番号52、配列番号53、及び配列番号54からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V_LCD40) を含み、

(ii) FAPに特異的に結合可能な抗原結合ドメインが、配列番号15アミノ酸配列を含む重鎖可変領域V_H、及び配列番号21のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、二重特異性抗原結合分子である。

【0147】

特定の態様において、提供されるのは、二重特異性抗原結合分子であって、(i)少なくとも1つのCD40に特異的に結合可能な抗原結合ドメインであり、配列番号37のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V_HCD40) 及び配列番号41のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V_LCD40) を含む抗原結合ドメインと、(ii) FAPに特異的に結合可能な少なくとも1つの抗原結合ドメインであり、配列番号15のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V_HFAP) 及び配列番号21のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V_LFAP) を含む抗原結合ドメインと、を含む、二重特異性抗原結合分子である。

10

【0148】

二重特異性の二価抗原結合分子 (1 + 1フォーマット)

一つの態様において、本発明は、

(a) CD40に特異的に結合可能な1つの抗原結合ドメインと、

(b) (i) 配列番号3のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii) 配列番号4、配列番号11及び配列番号12からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-H2、及び(iii) 配列番号5のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む重鎖可変領域 (V_HFAP)、並びに(iv) 配列番号6、配列番号13及び配列番号14からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-L1、(v) 配列番号7のアミノ酸配列を含むCDR-L2、及び(vi) 配列番号8のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含む軽鎖可変領域 (V_LFAP) を含む線維芽細胞活性化タンパク質 (FAP) に特異的に結合可能な1つの抗原結合ドメインと、

20

(c) 安定した会合が可能な第1及び第2のサブユニットから構成されるFcドメインと、を含む、二重特異性抗原結合分子に関する。

【0149】

1つの特定の態様において、提供されるのは、二重特異性抗原結合分子であって、上記分子が、(a) CD40に特異的に結合可能な第1のFabフラグメントと、(b) (i) 配列番号3のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii) 配列番号4、配列番号11及び配列番号12からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-H2、及び(iii) 配列番号5のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む重鎖可変領域 (V_HFAP)、並びに、(iv) 配列番号6、配列番号13及び配列番号14からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-L1、(v) 配列番号7のアミノ酸配列を含むCDR-L2、及び(vi) 配列番号8のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含む軽鎖可変領域 (V_LFAP) を含む、FAPに特異的に結合可能な第2のFabフラグメントと、(c) 安定した会合が可能な第1及び第2のサブユニットから構成されるFcドメインと、を含む分子である、二重特異性抗原結合分子である。

30

40

【0150】

1つの特定の態様において、本発明は、(a) 配列番号63のアミノ酸配列を含む第1の重鎖、配列番号98のアミノ酸配列を含む第2の重鎖、配列番号61のアミノ酸配列を含む第1の軽鎖、配列番号62のアミノ酸配列を含む第2の軽鎖を含む、二重特異性抗原結合分子を提供する。

【0151】

CD40に結合するために二価であり、標的細胞抗原に結合するために一価である二重特異性抗原結合分子 (2 + 1フォーマット)

別の態様において、本発明は、

(a) CD40に特異的に結合可能な2つの抗原結合ドメインと、

50

(b) F A P に特異的に結合可能な 1 つの抗原結合ドメインであって、(i) 配列番号 3 のアミノ酸配列を含む C D R - H 1、(i i) 配列番号 4、配列番号 1 1 及び配列番号 1 2 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む C D R - H 2、及び(i i i) 配列番号 5 のアミノ酸配列を含む C D R - H 3 を含む重鎖可変領域(V_HF A P)、並びに、(i v) 配列番号 6、配列番号 1 3 及び配列番号 1 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む C D R - L 1、(v) 配列番号 7 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2、及び(v i) 配列番号 8 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3 を含む軽鎖可変領域(V_LF A P) を含む 1 つの抗原結合ドメインと、

(c) 安定した会合が可能な第 1 及び第 2 のサブユニットから構成される F c ドメインと、を含む、二重特異性抗原結合分子を提供する。

10

【 0 1 5 2 】

したがって、提供されるのは二重特異性抗原結合分子であり、二重特異性抗原結合分子は、C D 4 0 に二価で結合し、F A P に一価で結合する。

【 0 1 5 3 】

一つの態様において、二重特異性抗原結合分子が、

(a) C D 4 0 及び F c ドメインに特異的に結合可能な 2 つの F a b フラグメントを含む抗体の 2 つの軽鎖と 2 つの重鎖と、

(b) 標的細胞抗原に特異的に結合可能な V_H 及び V_L ドメインであって、V_H ドメイン及び V_L ドメインが、それぞれ、ペプチドリンカーを介して 2 つの重鎖の C 末端の 1 つに連結されている、V_H 及び V_L ドメインと、を含む。

20

【 0 1 5 4 】

更なる態様において、提供されるのは、二重特異性抗原結合分子であって、

(a) 2 つの重鎖であって、各重鎖が、C D 4 0 に特異的に結合可能な F a b フラグメントの V_H 及び C H 1 ドメイン、及び F c 領域サブユニットを含む、2 つの重鎖と、

(b) 2 つの軽鎖であって、各軽鎖が、C D 4 0 に特異的に結合可能な F a b フラグメントの V_L 及び C L ドメインを含む、2 つの軽鎖と、

(c) F A P に特異的に結合可能なクロス F a b フラグメントであって、V_L - C H 1 鎖及び V_H - C L 鎖を含み、V_H - C L 鎖が、(a) の 2 つの重鎖のうちの 1 つの C 末端に連結したクロス F a b フラグメントと、を含む、二重特異性抗原結合分子を提供する。

【 0 1 5 5 】

一つの態様において、V_H - C L (V_H - C カップ) 鎖は、F c ノブ重鎖の C 末端に連結している。

30

【 0 1 5 6 】

別の態様において、提供されるのは、二重特異性抗原結合分子であって、

(a) 2 つの重鎖であって、各重鎖が、C D 4 0 に特異的に結合可能な F a b フラグメントの V_H 及び C H 1 ドメイン、及び F c 領域サブユニットを含む、2 つの重鎖と、

(b) 2 つの軽鎖であって、各軽鎖が、C D 4 0 に特異的に結合可能な F a b フラグメントの V_L 及び C L ドメインを含む、2 つの軽鎖と、

(c) F A P に特異的に結合可能なクロス F a b フラグメントであって、V_L - C H 1 鎖及び V_H - C L 鎖を含み、V_L - C H 1 鎖が、(a) の 2 つの重鎖のうちの 1 つの C 末端に連結したクロス F a b フラグメントと、を含む、二重特異性抗原結合分子である。

40

【 0 1 5 7 】

一つの態様において、V_L - C H 1 鎖は、F c ノブ重鎖の C 末端に連結している。

一つの態様において、本発明は、

(a) それぞれが配列番号 6 2 のアミノ酸配列を含む 2 つの軽鎖、配列番号 6 1 のアミノ酸配列を含む 1 つの軽鎖、配列番号 6 3 のアミノ酸配列を含む第 1 の重鎖、及び配列番号 6 4 のアミノ酸配列を含む第 2 の重鎖、又は

(b) それぞれが配列番号 6 6 のアミノ酸配列を含む 2 つの軽鎖、配列番号 6 5 のアミノ酸配列を含む 1 つの軽鎖、配列番号 6 7 のアミノ酸配列を含む第 1 の重鎖、及び配列番号 6 8 のアミノ酸配列を含む第 2 の重鎖を含む、二重特異性抗原結合分子を提供する。

50

【0158】

一つの態様において、本発明は、

(a) それぞれが配列番号62のアミノ酸配列を含む2つの軽鎖、配列番号61のアミノ酸配列を含む1つの軽鎖、配列番号63のアミノ酸配列を含む第1の重鎖と、配列番号64のアミノ酸配列を含む第2の重鎖と、を含む、二重特異性抗原結合分子を提供する。

【0159】

ヘッドトゥータールフォーマットの二重特異性抗原結合分子(2+1)

別の態様において、提供されるのは、二重特異性抗原結合分子であって、

(a) CD40に特異的に結合可能なFabフラグメントのVH及びCH1ドメイン、及びFc領域サブユニットを含む、重鎖と、

(b) CD40に特異的に結合可能なFabフラグメントのVH及びCH1ドメイン、並びにFAP及びFc領域サブユニットに特異的に結合可能なFabフラグメントのVL及びCH1ドメインを含む、重鎖と、

(c) 各軽鎖が、CD40に特異的に結合可能なFabフラグメントのVL及びCLドメインを含む、2つの軽鎖と、

(d) FAPに特異的に結合可能なFabフラグメントのVH及びCLドメインを含む軽鎖と、を含む、二重特異性抗原結合分子である。

【0160】

CD40に結合するために二価であり、標的細胞抗原に結合するために二価である二重特異性抗原結合分子(2+2フォーマット)

別の態様において、本発明は、

(a) CD40に特異的に結合可能な2つの抗原結合ドメインと、

(b) FAPに特異的に結合可能な2つの抗原結合ドメインであって、(i)配列番号3のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii)配列番号4、配列番号11及び配列番号12からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-H2、及び(iii)配列番号5のアミノ酸配列を含むCDR-H3、並びに、(iv)配列番号6、配列番号13及び配列番号14からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-L1、(v)配列番号7のアミノ酸配列を含むCDR-L2、及び(vi)配列番号8のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含む軽鎖可変領域(VL FAP)を含む2つの抗原結合ドメインと、

(c) 安定した会合が可能な第1及び第2のサブユニットから構成されるFcドメインと、を含む、二重特異性抗原結合分子を提供する。

【0161】

したがって、提供されるのは二重特異性抗原結合分子であり、二重特異性抗原結合分子は、CD40に二価で結合し、FAPに二価で結合する。

【0162】

一つの態様において、提供されるのは、二重特異性抗原結合分子であって、二重特異性抗原結合分子は、

(a) 2つの重鎖であって、各重鎖が、CD40に特異的に結合可能なFabフラグメントのVH及びCH1ドメイン、及びFc領域サブユニットを含む、2つの重鎖と、

(b) 2つの軽鎖であって、各軽鎖が、CD40に特異的に結合可能なFabフラグメントのVL及びCLドメインを含む、2つの軽鎖と、

(c) FAPに特異的に結合可能な2つのFabフラグメントであって、1つのFabフラグメントが、(a)の2つの重鎖の1つのC末端に連結し、もう1つのFabフラグメントが、(a)の2つの重鎖のもう一方のC末端に連結している、Fabフラグメントと、を含む、二重特異性抗原結合分子である。

【0163】

CD40に結合するために四価であり、標的細胞抗原に結合するために一価である二重特異性抗原結合分子(4+1フォーマット)

別の態様において、本発明は、

(a) CD40に特異的に結合可能な4つの抗原結合ドメインと、

10

20

30

40

50

(b) F A P に特異的に結合可能な 1 つの抗原結合ドメインであって、(i) 配列番号 3 のアミノ酸配列を含む C D R - H 1、(ii) 配列番号 4、配列番号 1 1 及び配列番号 1 2 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む C D R - H 2、及び(iii) 配列番号 5 のアミノ酸配列を含む C D R - H 3、並びに、(iv) 配列番号 6、配列番号 1 3 及び配列番号 1 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む C D R - L 1、(v) 配列番号 7 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2、及び(vi) 配列番号 8 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3 を含む軽鎖可変領域 (V_L F A P) を含む 2 つの抗原結合ドメインと、

(c) 安定した会合が可能な第 1 及び第 2 のサブユニットから構成される F c ドメインと、を含む、二重特異性抗原結合分子を提供する。

【0164】

したがって、提供されるのは二重特異性抗原結合分子であり、二重特異性抗原結合分子は、C D 4 0 に四価で結合し、F A P に一価で結合する。

【0165】

一つの態様において、提供されるのは、二重特異性抗原結合分子であって、C D 4 0 に特異的に結合可能な 4 つの抗原結合ドメインが F a b フラグメントであり、それらの各 2 つが、必要に応じてペプチドリンカーを介して重鎖で互いに融合される二重特異性抗原結合分子である。特定の態様において、ペプチドリンカーは配列番号 8 3 のアミノ酸配列を含む。より具体的には、抗原結合分子は、それぞれ V H C H 1 - ペプチドリンカー - V H C H 1 フラグメントを含む 2 つの重鎖を含む。特定の態様において、ペプチドリンカーは配列番号 8 3 のアミノ酸配列を有する。

【0166】

特定の態様において、二重特異性抗原結合分子が、

(a) 4 つの軽鎖であって、各軽鎖が、C D 4 0 に特異的に結合可能な F a b フラグメントの V L 及び C L ドメインを含む、4 つの軽鎖と、

(b) 2 つの重鎖であって、各重鎖が、C D 4 0 に特異的に結合可能な第 2 の F a b フラグメントの V H 及び C H 1 ドメインに融合した C D 4 0 に特異的に結合できる F a b フラグメントの V H 及び C H 1 ドメイン、及び F c 領域サブユニットを含む重鎖と、

(c) F A P に特異的に結合可能なクロス F a b フラグメントであって、V H ドメインが、ペプチドリンカーを介して重鎖の 1 つの C 末端に連結している、クロス F a b フラグメントと、を含む。

【0167】

別の態様において、二重特異性抗原結合分子が、

(a) 4 つの軽鎖であって、各軽鎖が、C D 4 0 に特異的に結合可能な F a b フラグメントの V L 及び C L ドメインを含む、4 つの軽鎖と、

(b) 2 つの重鎖であって、各重鎖が、C D 4 0 に特異的に結合可能な第 2 の F a b フラグメントの V H 及び C H 1 ドメインに融合した C D 4 0 に特異的に結合できる F a b フラグメントの V H 及び C H 1 ドメイン、及び F c 領域サブユニットを含む重鎖と、

(c) F A P に特異的に結合可能なクロス F a b フラグメントであって、V L ドメインが、ペプチドリンカーを介して重鎖の 1 つの C 末端に連結している、クロス F a b フラグメントと、を含む。

【0168】

特定の態様において、ペプチドリンカーは、配列番号 8 2、配列番号 8 3、配列番号 8 7 及び配列番号 8 8 から選択されるアミノ酸配列を含む。より具体的には、ペプチドリンカーは、配列番号 8 3 を含む。

【0169】

特定の態様において、本発明は、

(a) それぞれが配列番号 6 2 のアミノ酸配列を含む 4 つの軽鎖、配列番号 6 1 のアミノ酸配列を含む 1 つの軽鎖、配列番号 6 9 のアミノ酸配列を含む第 1 の重鎖、及び配列番号 7 0 のアミノ酸配列を含む第 2 の重鎖を含む、二重特異性抗原結合分子を提供する。

【0170】

10

20

30

40

50

CD40に結合するための四価であり、標的細胞抗原に結合するために二価である二重特異性抗原結合分子(4+2フォーマット)

別の態様において、本発明は、

(a) CD40に特異的に結合可能な4つの抗原結合ドメインと、

(b) FAPに特異的に結合可能な2つの抗原結合ドメインであって、

(i) 配列番号3のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii) 配列番号4、配列番号11及び配列番号12からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-H2、及び(iii) 配列番号5のアミノ酸配列を含むCDR-H3、並びに、(iv) 配列番号6、配列番号13及び配列番号14からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-L1、(v) 配列番号7のアミノ酸配列を含むCDR-L2、及び(vi) 配列番号8のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含む軽鎖可変領域(V_LFAP)を含む2つの抗原結合ドメインと、

(c) 安定した会合が可能な第1及び第2のサブユニットから構成されるFcドメインと、を含む、二重特異性抗原結合分子を提供する。

【0171】

したがって、提供されるのは二重特異性抗原結合分子であり、二重特異性抗原結合分子は、CD40に四価で結合し、FAPに二価で結合する。

【0172】

一つの態様において、提供されるのは、二重特異性抗原結合分子であって、CD40に特異的に結合可能な4つの抗原結合ドメインがFabフラグメントであり、それらの各2つが、必要に応じてペプチドリンカーを介して、互いに融合される二重特異性抗原結合分子である。特定の態様において、ペプチドリンカーは配列番号83のアミノ酸配列を含む。より具体的には、抗原結合分子は、それぞれVHCH1-ペプチドリンカー-VHCH1フラグメントを含む2つの重鎖を含む。特定の態様において、ペプチドリンカーは配列番号83のアミノ酸配列を有する。

【0173】

別の態様において、二重特異性抗原結合分子が提供され、標的細胞抗原に特異的に結合可能な抗原結合ドメインが、Fabフラグメントであり、第1のFabフラグメントが、ペプチドリンカーを介して第1のサブユニットのC末端に連結し、第2のFabフラグメントが、Fcドメインの第2のサブユニットのC末端に連結している。一つの態様において、標的細胞抗原に特異的に結合可能な2つのFabフラグメントは、それぞれがVL-CH1鎖及びVH-CL鎖を含み、VL-CH1鎖が、2つの重鎖のうちの1つのC末端に連結したクロスオーバーFabフラグメントである。

【0174】

Fc受容体結合及び/又はエフェクター機能を下げるFcドメイン改変

本発明の二重特異性抗原結合分子は、安定した会合が可能な、第1及び第2のサブユニットで構成されるFcドメインを更に含む。

【0175】

特定の態様において、1つ以上のアミノ酸改変は、本明細書で提示される抗体のFc領域に導入されてもよく、それにより、Fc領域変異体を作製する。Fc領域変異体は、1つ以上のアミノ酸位置にアミノ酸修飾(例えば、置換)を含むヒトFc領域配列(例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、又はIgG4 Fc領域)を含み得る。

【0176】

Fcドメインは、本発明の二重特異性抗体に、標的組織への良好な蓄積に寄与する長い血清半減期、望ましい組織-血液分布比を含め、望ましい薬物動態特性を与える。しかし、同時に、好ましい抗原を含む細胞ではなく、Fc受容体を発現する細胞に対する本発明の二重特異性抗体の望ましくない標的化を引き起こす場合がある。したがって、具体的な実施形態では、本発明の二重特異性抗体のFcドメインは、ネイティブIgG Fcドメイン、特に、IgG1 Fcドメイン又はIgG4 ドメインと比較して、Fc受容体に対する結合親和性の低下及び/又はエフェクター機能の低下を示す。より具体的には、Fc

10

20

30

40

50

ドメインはI g G 1 F cドメインである。

【 0 1 7 7 】

1つのこのような態様において、F cドメイン（又は上記F cドメインを含む本発明の二重特異性抗原結合分子）は、ネイティブI g G 1 F cドメイン（又はネイティブI g G 1 F cドメインを含む本発明の二重特異性抗原結合分子）と比較して、F c受容体に対する結合親和性の50%未満、好ましくは20%未満、より好ましくは10%未満、最も好ましくは5%未満の結合親和性を示し、及び/又はネイティブI g G 1 F cドメイン（又はネイティブI g G 1 F cドメインを含む本発明の二重特異性抗原結合分子）と比較して、50%未満、好ましくは20%未満、より好ましくは10%未満、最も好ましくは5%未満のエフェクター機能を示す。一つの態様において、F cドメイン（又は上記F cドメインを含む本発明の二重特異性抗原結合分子）は、F c受容体に実質的に結合せず、及び/又はエフェクター機能を誘発しない。特定の態様において、F c受容体は、F c受容体である。一つの態様において、F c受容体は、ヒトF c受容体である。一つの態様において、F c受容体は、活性化F c受容体である。具体的な態様において、F c受容体は、活性化ヒトF c受容体であり、より特定のには、ヒトF c R I I I a、F c R I又はF c R I I aであり、最も特定のには、ヒトF c R I I I aである。一つの態様において、F c受容体は、阻害性F c受容体である。具体的な態様では、F c受容体は、阻害性ヒトF c受容体、より特定のには、ヒトF c R I I Bである。一つの態様において、エフェクター機能は、1つ以上のC D C、A D C C、A D C P及びサイトカイン分泌である。特定の態様において、エフェクター機能は、A D C Cである。一つの態様において、F cドメインのドメインは、ネイティブI g G 1 F cドメインと比較して、新生児F c受容体（F c R n）に対して実質的に同様の結合親和性を示す。F c R nに対する実質的に同様の結合は、F cドメイン（又は上記F cドメインを含む本発明の二重特異性抗原結合分子）が、ネイティブI g G 1 F cドメイン（又はネイティブI g G 1 F cドメインを含む本発明の二重特異性抗原結合分子）と比較して、F c R nに対して約70%より大きく、特に約80%より大きく、より具体的には約90%より大きい結合親和性を示す場合に達成される。

【 0 1 7 8 】

特定の態様において、F cドメインは、操作されていないF cドメインと比較して、F c受容体に対する結合親和性が低下し、及び/又はエフェクター機能が低下するように操作される。特定の態様において、本発明の二重特異性抗原結合分子のF cドメインは、F c受容体に対するF cドメインの結合親和性及び/又はエフェクター機能を下げる1つ以上のアミノ酸変異を含む。典型的には、F cドメインの2つのサブユニットそれぞれに、同じ1つ以上のアミノ酸変異が存在する。一つの態様において、アミノ酸変異は、F c受容体に対するF cドメインの結合親和性を下げる。別の態様において、アミノ酸変異は、F c受容体に対するF cドメインの結合親和性を、少なくとも2分の1、少なくとも5分の1、又は少なくとも10分の1に下げる。一つの態様において、操作されたF cドメインを含む本発明の二重特異性抗原結合分子は、操作されていないF cドメインを含む本発明の二重特異性抗体と比較して、F c受容体に対する結合親和性の20%未満、特に10%未満、より具体的には5%未満を示す。特定の態様において、F c受容体は、F c受容体である。別の態様において、F c受容体は、ヒトF c受容体である。一つの態様において、F c受容体は、阻害性F c受容体である。具体的な態様において、F c受容体は、阻害性ヒトF c受容体、より特定のには、ヒトF c R I I Bである。いくつかの態様において、F c受容体は、活性化F c受容体である。具体的な態様において、F c受容体は、活性化ヒトF c受容体であり、より特定のには、ヒトF c R I I I a、F c R I又はF c R I I aであり、最も特定のには、ヒトF c R I I I aである。好ましくは、これらそれぞれの受容体に対する結合が低下する。いくつかの態様において、相補性構成要素に対する結合親和性（特定のにはC 1 qに対する結合親和性）も低下する。一つの態様において、新生児F c受容体（F c R n）に対する結合親和性は、低下しない。F c R nに対する実質的に同様の結合（すなわち、上記受容体に対するF cドメインの結合

10

20

30

40

50

親和性の保護)は、Fcドメイン(又は上記Fcドメインを含む本発明の二重特異性抗原結合分子)が、FcRnに対するFcドメインの操作されていない形態(又はFcのこの操作されていない形態を含む本発明の二重特異性抗原結合分子)の結合親和性の約70%を超える結合親和性を示す場合に達成される。Fcドメイン、又は上記Fcドメインを含む本発明の二重特異性抗原結合分子は、このような親和性の約80%より大きく、更に約90%より大きい親和性を示してもよい。特定の実施形態では、本発明の二重特異性抗原結合分子のFcドメインは、操作されていないFcドメインと比較して、エフェクター機能が低下するように操作される。エフェクター機能の低下としては、限定されないが、以下のうちの1つ以上が挙げられる:補体依存性細胞傷害(CDC)の低下、抗体依存性細胞傷害(ADCC)の低下、抗体依存性細胞傷害(ADCP)の低下、サイトカイン分泌の低下、抗原提示細胞による免疫複合体を介した抗原取り込みの低下、NK細胞への結合の低下、マクロファージへの結合の低下、単球への結合の低下、多形核細胞への結合の低下、アポトーシスを誘導する直接シグナル伝達の低下、樹状細胞の成熟の低下、又は減少したT細胞プライミング。

10

【0179】

エフェクター機能が低下した抗体としては、Fc領域の残基238、265、269、270、297、327及び329の1つ以上の置換を有するものが挙げられる(米国特許第6,737,056号)。このようなFc変異体としては、アミノ酸位置265、269、270、297及び327のうち2つ以上での置換を有するFc変異体が挙げられ、残基265及び297がアラニンに置換されている、いわゆる「DANA」Fc変異体を含む(米国特許第7,332,581号)。FcRに対する結合が向上又は減少した特定の抗体変異体が記載される。(例えば、米国特許第6,737,056号、国際公開第2004/056312号及びShields, R. L. et al., J. Biol. Chem. 276(2001)6591-6604。)

20

【0180】

本発明の一つの態様において、Fcドメインは、E233、L234、L235、N297、P331及びP329の位置にアミノ酸置換を含む。いくつかの態様において、Fcドメインは、アミノ酸置換L234A及びL235A(「LALA」)を含む。1つのこのような実施形態では、Fcドメインは、IgG1 Fcドメイン、特にヒトIgG1 Fcドメインである。一つの態様において、Fcドメインは、位置P329にアミノ酸置換を含む。より具体的な態様において、アミノ酸置換は、P329A又はP329G、特にP329Gである。一実施形態では、Fcドメインは、位置P329にアミノ酸置換を含み、E233P、L234A、L235A、L235E、N297A、N297D又はP331Sからなる群から選択される更なるアミノ酸置換を含む。より特定のな実施形態では、Fcドメインは、アミノ酸変異L234A、L235A及びP329Gを含む(「P329G LALA」)。アミノ酸置換の「P329G LALA」の組み合わせは、PCT特許出願国際公開第2012/130831A1号に記載されるように、ヒトIgG1 FcドメインのFc受容体の結合をほとんど完全になくす。文書はまた、このような変異体Fcドメインを調製する方法及びFc受容体の結合又はエフェクター機能などの特性を決定する方法も記載する。このような抗体は、突然変異L234A及びL235A、又は突然変異L234A、L235A及びP329Gを有するIgG1である(EU index of Kabat et al, Kabat et al., Sequence of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991による番号付け)。

30

40

【0181】

一つの態様において、Fcドメインは、IgG4 Fcドメインである。より具体的な実施形態では、Fcドメインは、位置S228にアミノ酸置換、特にアミノ酸置換S228Pを含むIgG4 Fcドメインである(Kabat番号付け)。より具体的な実施形態では、Fcドメインは、アミノ酸置換L235E及びS228P及びP329Gを含む

50

、IgG4 Fcドメインである。このアミノ酸置換は、インビボでのIgG4抗体のFabアーム交換を減らす(Stubenrauch et al., Drug Metabolism and Disposition 38, 84-91 (2010)を参照)。

【0182】

半減期が長くなり、新生児Fc受容体に対する結合が向上した抗体は、胎児に対する成熟IgGの移動を担い(Guyer, R. L. et al., J. Immunol. 117 (1976) 587-593及びKim, J. K. et al., J. Immunol. 24 (1994) 2429-2434)、米国特許出願公開第2005/0014934号に記載されている。これらの抗体は、FcRnへのFc領域の結合を向上する1つ以上の置換基を有するFc領域を含む。かかるFc変異体は、1つ以上のFc領域残基：238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424又は434のうち1つ以上における置換、例えばFc領域残基434の置換を伴うものを含む(米国特許第7,371,826号)。Fc領域変異体の他の例に関して、Duncan, A. R. 及びWinter, G., Nature 322 (1988) 738-740;米国特許第5,648,260号;米国特許第5,624,821号;及び国際公開第94/29351号も参照。

【0183】

Fc受容体に対する結合は、例えば、ELISAによって、又はBIAcore装置(GE Healthcare)などの標準的な装置と組換え発現によって得られ得るFc受容体を用いた表面プラズモン共鳴(SPR)によって、容易に決定することができる。適切なこのような結合アッセイを本明細書に記載する。又は、Fc受容体に対するFcドメイン又はFcドメインを含む細胞活性化二重特異性抗原結合分子の結合親和性は、特定のFc受容体を発現することが知られている細胞株(例えば、FcγRIIIa受容体を発現するヒトNK細胞)を用いて評価されてもよい。Fcドメイン、又はFcドメインを含む本発明の二重特異性抗原結合分子のエフェクター機能は、当該技術分野において既知の方法により測定することができる。ADCCを測定するのに適したアッセイを本明細書に記載する。目的の分子のADCC活性を評価するためのインビトロアッセイの他の例は、米国特許第5,500,362号、Hellstrom et al., Proc Natl Acad Sci USA 83, 7059-7063 (1986)及びHellstrom et al., Proc Natl Acad Sci USA 82, 1499-1502 (1985)、米国特許第5,821,337号、Bruggemann et al., J Exp Med 166, 1351-1361 (1987)に記載される。あるいは、非放射性アッセイ方法を使用してもよい(例えば、フローサイトメトリー(Cell Technology, Inc. Mountain View, CA)のためのACTI(商標)非放射性細胞毒性アッセイ、及びCytotoxic 96(登録商標)非放射性細胞毒性アッセイ(Promega, Madison, WI))。かかるアッセイに有用なエフェクター細胞としては、末梢血単核球(peripheral blood mononuclear cell: PBMC)及びナチュラルキラー(Natural Killer: NK)細胞が挙げられる。これに代えて、又は更に、目的の分子のADCC活性は、インビボで、例えば、Clynes et al., Proc Natl Acad Sci USA 95, 652-656 (1998)に開示されるような動物モデルにおいて評価されてもよい。

【0184】

以下の章は、Fc受容体結合及び/又はエフェクター機能を低下させるFcドメイン改変を含む、本発明の二重特異性抗原結合分子の好ましい態様を記載する。一つの態様において、本発明は、二重特異性抗原結合分子(a)CD40に特異的に結合可能な少なくとも1つの抗原結合ドメイン、(b)標的細胞抗原に特異的に結合可能な少なくとも1つの抗原結合ドメイン、(c)安定した会合が可能な、第1及び第2のサブユニットで構成されるFcドメインであって、Fcドメインが、Fc受容体、特にFc受容体に対する抗

10

20

30

40

50

体の結合親和性を低下させる1つ以上のアミノ酸置換を含む、Fcドメイン、に関する。別の態様において、本発明は、(a) CD40に特異的に結合可能な少なくとも1つの抗原結合ドメイン、(b) 標的細胞抗原に特異的に結合可能な少なくとも1つの抗原結合ドメイン、及び(c) 安定した会合が可能な、第1及び第2のサブユニットで構成されるFcドメインを含み、Fcドメインが、エフェクター機能を低下させる1つ以上のアミノ酸置換を含む、二重特異性抗原結合分子に関する。特定の態様において、Fcドメインは、アミノ酸変異L234A、L235A及びP329G(Kabat EUインデックスによる番号付け)を有する、ヒトIgG1サブクラスのFcドメインである。

【0185】

ヘテロ二量体化を促進するFcドメイン改変

10

本発明の二重特異性抗原結合分子は、Fcドメインの2つのサブユニットの片方又はもう一方に融合した異なる抗原結合部位を含み、そのため、Fcドメインの2つのサブユニットは、2つの非同ポリペプチド鎖に含まれていてもよい。これらのポリペプチドの組換え同時発現及びその後の二量化によって、2つのポリペプチドのいくつかの可能な組み合わせが生じる。組換え産生における本発明の二重特異性抗原結合分子の収率及び純度を高めるために、本発明の二重特異性抗原結合分子のFcドメインに、所望なポリペプチドの会合を促進する改変を導入することが有利である。

【0186】

したがって、具体的な態様において、本発明は、(a) CD40に特異的に結合可能な少なくとも1つの抗原結合ドメイン、(b) FAPに特異的に結合可能な少なくとも1つの抗原結合ドメイン、及び(c) 安定した会合が可能な、第1及び第2のサブユニットで構成されるFcドメインを含み、Fcドメインが、Fcドメインの第1及び第2のサブユニットの会合を促進する修飾を含む、二重特異性抗原結合分子に関する。ヒトIgG Fcドメインの2つのサブユニット間の最も長いタンパク質-タンパク質相互作用の部位は、FcドメインのCH3ドメイン内にある。したがって、一つの態様において、上記改変は、FcドメインのCH3ドメインの中にある。

20

【0187】

具体的な態様において、上記改変は、いわゆる「ノブ・イントゥ・ホール」改変であり、Fcドメインの2つのサブユニットの1つに「ノブ」改変と、Fcドメインの2つのサブユニットの他の1つに「ホール」改変とを含む。したがって、本発明は、(a) CD40に特異的に結合可能な少なくとも1つの抗原結合ドメインと、(b) 標的細胞抗原に特異的に結合可能な少なくとも1つの抗原結合ドメインと、(c) 安定した会合が可能な第1及び第2のサブユニットから構成されるFcドメインであって、Fcドメインの第1のサブユニットはノブを含み、Fcドメインの第2のサブユニットは、ノブから穴への方法によるホールを含む、Fcドメインと、を含む、二重特異性抗原結合分子に関する。特定の態様において、Fcドメインの第1のサブユニットは、アミノ酸置換S354C及びT366W(EU番号付け)を含み、Fcドメインの第2のサブユニットは、アミノ酸置換Y349C、T366S及びY407Vを含む(Kabat EUインデックスによる番号付け)。

30

【0188】

ノブ・イントゥ・ホール技術は、例えば、米国特許第5,731,168号、米国特許第7,695,936号、Ridgway et al., Prot Eng 9, 617-621(1996)及びCarter, J Immunol Meth 248, 7-15(2001)に記載される。一般的に、この方法は、第1のポリペプチドの界面にある突起(「ノブ」)と、第2のポリペプチドの界面にある空洞(「ホール」)とを導入することを含み、その結果、突起が、ヘテロ二量体形成を促進し、ホモ二量体形成を妨害するように空洞内に位置することができる。突起は、第1のポリペプチドの界面からの小さなアミノ酸側鎖を、より大きな側鎖(例えば、チロシン又はトリプトファン)と交換することによって構築される。突起と同一又は同様の大きさの相補性空洞が、大きなアミノ酸側鎖を、より小さなアミノ酸側鎖(例えば、アラニン又はトレオニン)と置き換えることに

40

50

よって、第2のポリペプチドの界面に作られる。

【0189】

したがって、一つの態様において、本発明の二重特異性抗原結合分子のFcドメインの第1のサブユニットのCH3ドメインにおいて、アミノ酸残基は、より大きな側鎖容積を有するアミノ酸残基と置き換わり、それによって、第2のサブユニットのCH3ドメイン内の空洞内で位置換え可能な第1のサブユニットのCH3ドメイン内に突起を生成し、Fcドメインの第2のサブユニットのCH3ドメインにおいて、アミノ酸残基は、より小さな側鎖容積を有するアミノ酸残基と置き換わり、それによって、第2のサブユニットのCH3ドメイン内に空洞を生成し、その中で、第1のサブユニットのCH3ドメイン内の突起が位置換え可能である。突起及び空洞は、ポリペプチドをコードする核酸を変えること
10
によって、例えば、部位特異的変異導入法によって、又はペプチド合成によって作り出すことができる。具体的な態様において、Fcドメインの第1のサブユニットのCH3ドメインにおいて、位置366のトレオニン残基が、トリプトファン残基と置き換わっており（T366W）、Fcドメインの第2のサブユニット（のCH3ドメイン）において、位置407のチロシン残基は、バリン残基と置き換わっている（Y407V）。一つの態様において、Fcドメインの第2のサブユニットにおいて、更に、位置366のトレオニン残基が、セリン残基と置き換わっており（T366S）、位置368のロイシン残基が、アラニン残基と置き換わっている（L368A）。

【0190】

なお更なる態様において、Fcドメインの第1のサブユニットにおいて、更に、位置354のセリン残基が、システイン残基と置き換わっており（S354C）、Fcドメインの第2のサブユニットにおいて、更に、位置349のチロシン残基が、システイン残基と置き換わっている（Y349C）。これら2つのシステイン残基の導入によって、Fcドメインの2つのサブユニット間にジスルフィド架橋が生成し、二量体を更に安定化する（Carter（2001）, *J Immunol Methods* 248, 7-15）。特定の態様において、Fcドメインの第1のサブユニットは、アミノ酸置換S354C及びT366W（EU番号付け）を含み、Fcドメインの第2のサブユニットは、アミノ酸置換Y349C、T366S及びY407Vを含む（Kabata EUインデックスによる番号付け）。
20

【0191】

代替的な態様において、Fcドメインの第1及び第2のサブユニットの会合を促進する改変は、例えば、PCT出願国際公開第2009/089004号に記載されるように、静電操縦効果に介在する改変を含む。一般的に、この方法は、2つのFcドメインサブユニットの界面に、ホモ二量体生成が静電的に望ましくないが、ヘテロ二量化が静電的に望ましいように、帯電したアミノ酸残基による1つ以上のアミノ酸残基の置き換えを含む。
30

【0192】

本明細書に報告されるような二重特異性抗体の重鎖のC末端は、アミノ酸残基PGKで終わる完全なC末端であってもよい。重鎖のC末端は、C末端アミノ酸残基のうち1つ又は2つが除去された、短くなったC末端であってもよい。好ましい一つの態様において、重鎖のC末端は、PGで終わる短くなったC末端である。一つの態様において、本明細書に報告される全ての態様のうちの1つの態様において、本明細書に明記されるC末端のCH3ドメインを含む重鎖を含む二重特異性抗体は、C末端グリシン-リシンジペプチドを含む（G446及びK447、Kabata EUインデックスによる番号付け）。本明細書に報告される全ての態様のうちの1つの態様において、本明細書に明記されるC末端のCH3ドメインを含む重鎖を含む二重特異性抗体は、C末端グリシン残基を含む（G446、Kabata EUインデックスによる番号付け）。
40

【0193】

Fabドメイン内の改変

一つの態様において、本発明は、(a)CD40に特異的に結合可能な第1のFabフラグメントと、(b)FAPに特異的に結合可能な第2のFabフラグメントと、(c)
50

安定した会合が可能な第1及び第2のサブユニットで構成されたFcドメインとを含み、Fabフラグメントの1つにおいて、可変ドメインVH及びVL又は定常ドメインCH1及びCLのいずれかが交換される、二重特異性抗原結合分子に関する。二重特異性抗体は、Crossmab技術に従って調製される。

【0194】

1つの結合アームにドメインの置き換え/交換を有する多特異性抗体(CrossmabVH-VL又はCrossmabCH-CL)は、国際公開第2009/080252号及びSchaefer, W. et al, PNAS, 108(2011)11187-1191に記載される。これらの多特異性抗体は、明確に、第1の抗原に対する軽鎖と、第2の抗原に対する誤った重鎖のミスマッチにより生じる副産物を減らす(このようなドメインの置き換えがない手法と比較した場合)。

10

【0195】

一つの態様において、本発明は、(a)CD40に特異的に結合可能な第1のFabフラグメントと、(b)FAPに特異的に結合可能な第2のFabフラグメントと、(c)安定した会合が可能な第1及び第2のサブユニットで構成されるFcドメインとを含み、Fabフラグメントの1つにおいて、定常ドメインCL及びCH1が、CH1ドメインが軽鎖の一部であり、CLドメインが重鎖の一部であるように、互いに置き換えられている、二重特異性抗原結合分子に関する。より具体的には、標的細胞抗原に特異的に結合可能な第2のFabフラグメントにおいて、定常ドメインCL及びCH1が、CH1ドメインが軽鎖の一部であり、CLドメインが、重鎖の一部であるように、互いに置き換えられる。

20

【0196】

特定の態様において、本発明は、(a)CD40に特異的に結合可能な第1のFabフラグメント、(b)FAPに特異的に結合可能な第2のFabフラグメントであって、定常ドメインCL及びCH1が、CH1ドメインが軽鎖の一部であり、CLドメインが重鎖の一部であるように、互いに置き換えられている、第2のFabフラグメント、を含む、二重特異性抗原結合分子に関する。このような分子は、CD40とFAPの両方に一価で結合する。

【0197】

別の態様において、本発明は、(a)CD40及びFcドメインに特異的に結合可能な2つのFabフラグメントを含む抗体の2つの軽鎖及び2つの重鎖、及び(b)FAPに特異的に結合可能な2つの追加のFabフラグメントであって、上記追加のFabフラグメントはそれぞれ、ペプチドリinkerを介して(a)の重鎖のC末端に連結している、Fabフラグメントを含む、二重特異性抗原結合分子に関する。特定の態様において、追加のFabフラグメントが、Fabフラグメントであって、可変ドメインVL及びVHは、VHドメインが軽鎖の一部であり、VLドメインが重鎖の一部であるように互いに置き換わっている。

30

【0198】

したがって、特定の態様において、本発明は、(a)CD40及びFcドメインに特異的に結合できる2つのFabフラグメントを含む抗体の2つの軽鎖及び2つの重鎖と、(b)FAPに特異的に結合できる2つの追加のFabフラグメントであって、標的細胞抗原に特異的に結合可能な2つの追加の上記Fabフラグメントは、可変ドメインVL及びVHが互いに置換され、VL-CH鎖がそれぞれペプチドリinkerを介して(a)の重鎖のC末端に連結しているクロスオーバーFabフラグメントである、Fabフラグメントと、を含む、二重特異性抗原結合分子を含む。

40

【0199】

別の態様において、そして正しい対形成を更に改善するために、(a)CD40に特異的に結合可能な第1のFabフラグメントと、(b)FAPに特異的に結合可能な第2のFabフラグメントと、(c)安定した会合が可能な第1及び第2のサブユニットで構成されるFcドメインとを含む二重特異性抗原結合分子が、異なる荷電アミノ酸置換(いわゆる「荷電残基」)を含み得る。これらの改変は、クロスしているか、又はクロスしてい

50

ないCH1ドメイン及びCLドメインに導入される。特定の態様において、本発明は、CLドメインの1つにおいて、位置123（EU番号付け）のアミノ酸がアルギニン（R）で置換されており、位置124（EU番号付け）のアミノ酸がリジン（K）で置換されており、CH1ドメインの1つにおいて、位置147（EU番号付け）、及び/又は位置213（EU番号付け）のアミノ酸がグルタミン酸（E）で置換されている、二重特異性抗原結合分子に関する。

【0200】

本発明の例示的な抗体

一つの態様において、本発明は、FAPに特異的に結合する新しい抗体及び抗体フラグメントを提供する。これらの抗体は、既知のFAP抗体4B）又は28H1とは異なるエピトープに結合するため、他のFAP標的分子と組み合わせ使用され得る二重特異性抗原結合分子への組み込みに特に適している。新しい抗体は、大量かつ高力価で生産可能であり、優れたPK特性を有すると考えられる高い熱安定性（凝集温度 T_{agg} で測定）を示し、Biacoreアッセイで測定した場合にヒトFAPに高い親和性で結合することを更に特徴としている。

10

【0201】

一つの態様において、提供されるのは、FAP（クローン212）に特異的に結合する抗体であって、(i)配列番号3のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii)配列番号4、配列番号11及び配列番号12からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-H2、及び(iii)配列番号5のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む重鎖可変領域(V_{HFAP})、並びに、(iv)配列番号6、配列番号13及び配列番号14からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-L1、(v)配列番号7のアミノ酸配列を含むCDR-L2、及び(vi)配列番号8のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含む軽鎖可変領域(V_{LFAP})を含む、抗体である。

20

【0202】

一つの態様において、提供されるのは、FAPに特異的に結合するヒト化抗体であって、(i)配列番号3のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii)配列番号4、配列番号11及び配列番号12からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-H2、及び(iii)配列番号5のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む重鎖可変領域(V_{HFAP})、並びに、(iv)配列番号6、配列番号13及び配列番号14からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-L1、(v)配列番号7のアミノ酸配列を含むCDR-L2、及び(vi)配列番号8のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含む軽鎖可変領域(V_{LFAP})を含む、ヒト化抗体である。

30

【0203】

別の態様において、提供されるのは、FAPに特異的に結合する抗体と結合について競合する抗体であって、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19及び配列番号20からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むいずれかの重鎖可変領域(V_{HFAP})、並びに配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25及び配列番号26からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、いずれかの軽鎖可変領域(V_{LFAP})のいずれかを含む、抗体である。

40

【0204】

一つの態様において、提供されるのは、FAPに特異的に結合する抗体と結合について競合する抗体であって、上記抗体は、配列番号15のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 V_H 及び配列番号21のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 V_L を含む、抗体である。

【0205】

更なる態様において、提供されるのは、FAPに特異的に結合する抗体であって、

(a)配列番号15のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(V_{HFAP})、及び配列番号21のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(V_{LFAP})、

(b)配列番号16のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(V_{HFAP})、及び配列番号21のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(V_{LFAP})、

50

(c) 配列番号16のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(V_HFAP)、及び配列番号22のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(V_LFAP)、又は

(d) 配列番号19のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(V_HFAP)、及び配列番号25のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(V_LFAP)を含む、抗体である。

【0206】

更なる態様において、提供されるのは、FAPに特異的に結合可能な抗体であって、配列番号15のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(V_HFAP)及び配列番号21のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(V_LFAP)を含む、抗体である。

【0207】

ポリヌクレオチド

本発明は更に、本明細書に記載の二重特異性抗原結合分子又はそのフラグメントをコードする単離核酸、又は本明細書に記載の抗体をコードする単離核酸を提供する。

【0208】

本発明の二重特異性抗原結合分子をコードする単離ポリヌクレオチドは、完全な抗原結合分子をコードする単一のポリヌクレオチドとして発現されてもよく、又は同時発現される複数の(例えば、2つ以上の)ポリヌクレオチドとして発現されてもよい。一緒に発現するポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドは、例えば、ジスルフィド結合又は他の手段を介して会合し、機能的な抗原結合分子を形成してもよい。例えば、免疫グロブリンの軽鎖部分は、免疫グロブリンの重鎖部分由来の別個のポリヌクレオチドによってコードされてもよい。同時発現する場合、重鎖ポリペプチドは、軽鎖ポリペプチドと会合し、免疫グロブリンを形成する。

【0209】

いくつかの態様において、単離ポリヌクレオチドは、本明細書に記載する本発明に係る二重特異性分子に含まれるポリペプチドをコードする。

【0210】

一つの態様において、本発明は、(a)CD40に特異的に結合可能な少なくとも1つの抗原結合ドメインと、(b)(i)配列番号3のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii)配列番号4、配列番号11及び配列番号12からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-H2、及び(iii)配列番号5のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む重鎖可変領域(V_HFAP)、並びに、(iv)配列番号6、配列番号13及び配列番号14からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDR-L1、(v)配列番号7のアミノ酸配列を含むCDR-L2、及び(vi)配列番号8のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含む軽鎖可変領域(V_LFAP)を含むFAPに特異的に結合可能な少なくとも1つの抗原結合ドメインと、(c)安定した会合が可能な第1及び第2のサブユニットから構成されるFcドメインと、を含む、二重特異性抗原結合分子をコードする、単離ポリヌクレオチドに関する。

【0211】

特定の実施形態では、ポリヌクレオチド又は核酸は、DNAである。他の実施形態では、本発明のポリヌクレオチドは、RNAであり、例えば、メッセンジャーRNA(mRNA)の形態である。本発明のRNAは、一本鎖又は二本鎖であってもよい。

【0212】

組換え方法

本発明の二重特異性抗原結合分子は例えば、組換え産生により入手することができる。組換え産生のために、二重特異性抗原結合分子又はそのポリペプチドフラグメントをコードする1種以上のポリヌクレオチドを提供する。二重特異性抗原結合分子をコードする1種以上のポリヌクレオチドを単離して、宿主細胞で更にクローニング及び/又は発現するために、1種以上のベクターに挿入する。このようなポリヌクレオチドは、従来の手順を用い、容易に単離され、配列決定されてもよい。本発明の一つの態様において、本発明の1種以上のポリヌクレオチドを含む、ベクター、好ましくは発現ベクターを提供する。当業者に周知の方法を用いて、適切な転写/翻訳制御シグナルに従い、二重特異性抗原結合

10

20

30

40

50

分子（フラグメント）のコード配列を含有する発現ベクターを構築することができる。これらの方法としては、インビトロ組換えDNA技術、合成技術及びインビボ組換え/遺伝子組換えが挙げられる。例えば、Maniatis et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989); 及び Ausubel et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989) に記載されている手法を参照。発現ベクターは、プラスミド、ウイルスの一部であってもよく、又は核酸フラグメントであってもよい。発現ベクターは、二重特異性抗原結合分子又はそのポリペプチドフラグメント（即ちコード領域）をコードするポリヌクレオチドが、プロモーター、及び/又は他の転写若しくは翻訳調節要素と作動可能に会合してクロニングされる発現カセットを含む。本明細書で使用される場合、「コード領域」は、アミノ酸に翻訳されるコドンからなる核酸の一部である。「停止コドン」（TAG、TGA 又は TAA）は、アミノ酸に翻訳されないが、コード領域の一部であると考えられてもよいが、存在する場合、任意のランキング配列、例えば、プロモーター、リボソーム結合部位、転写ターミネーター、イントロン、5' 及び 3' 未翻訳領域などは、コード領域の一部ではない。2つ以上のコード領域が、単一のポリヌクレオチドコンストラクト中に例えば、単一のベクター上に存在していてもよく、又は別個のポリヌクレオチドコンストラクト中に例えば別個の（異なる）ベクター上に存在していてもよい。更に、任意のベクターは、単一のコード領域を含んでいてもよく、又は2つ以上のコード領域を含んでいてもよく、例えば本発明のベクターは、1種以上のポリペプチドをコードしてもよく、翻訳後又は翻訳と同時に、タンパク質分解による開裂によって、最終的なタンパク質へと分離される。更に、本発明のベクター、ポリヌクレオチド、又は核酸は、本発明の二重特異性抗原結合分子、若しくはそのポリペプチドフラグメントをコードするポリヌクレオチド、又はその変異体若しくは誘導体に融合している、又は非融合であるいずれかの、異種コード領域をコードすることができる。異種コード領域としては、限定されないが、特殊な要素又はモチーフ、例えば、分泌シグナルペプチド又は異種機能性ドメインが挙げられる。作動可能な会合は、ある遺伝子産物（例えばポリペプチド）のコード領域が、制御配列の影響下又は制御下で、遺伝子産物の発現を行うような様式で、1つ以上の制御配列と会合する。2つのDNAフラグメント（例えば、ポリペプチドコード領域及びこれに関連するプロモーター）は、プロモーター機能の導入によって、所望の遺伝子産物をコードするmRNAの転写が起こる場合、2つのDNAフラグメント間の結合の性質が、遺伝子産物の発現を試行する発現制御配列の能力を妨害しないか、又はDNAテンプレートを転写する能力を妨害しない場合、「作動可能に会合する」。したがって、プロモーター領域は、プロモーターが核酸の転写を行うことが可能な場合、ポリペプチドをコードする核酸と作動可能に会合していてもよい。プロモーターは、所定の細胞内でのDNAの実質的な転写のみに指向する細胞特異的なプロモーターであってもよい。プロモーター以外の他の転写制御要素、例えば、エンハンサー、オペレーター、転写停止シグナルは、細胞特異的な転写に指向するために、ポリヌクレオチドに作動可能に会合してもよい。

【0213】

適切なプロモーター及び他の転写制御領域は、本明細書に開示される。種々の転写制御領域が当業者に知られている。これらとしては、限定されないが、脊椎動物細胞内で機能する転写制御領域、例えば、限定されないが、サイトメガロウイルス由来のプロモーター及びエンハンサーセグメント（例えば最初期プロモーター、イントロン-Aと組み合わせる）、シミアンウイルス40（例えば初期プロモーター）及びレトロウイルス（例えばラウス肉腫ウイルス）が挙げられる。他の転写制御領域としては、脊椎動物遺伝子から誘導されるもの、例えば、アクチン、ヒートショックタンパク質、ウシ成長ホルモン及びウサギα-グロビン、及び真核細胞において遺伝子発現を制御することが可能な他の配列が挙げられる。追加の適切な転写制御領域としては、組織特異的なプロモーター及びエンハン

10

20

30

40

50

サー、及び誘発性プロモーター（例えばプロモーター誘発性テトラサイクリン）が挙げられる。同様に、種々の翻訳制御要素は、当業者に知られている。これらとしては、限定されないが、リボソーム結合部位、翻訳開始及び停止コドン、ウイルス系から誘導される要素（特に、内部リボソーム侵入部位、すなわちIRES、CITE配列とも呼ばれる）が挙げられる。発現カセットは、例えば、複製の起源及びノ又は染色体組み込み要素、例えば、レトロウイルスの長い末端反復（LTR）、又はアデノ随伴ウイルス（AAV）末端逆位配列（ITR）などの他の特徴も含んでいてもよい。

【0214】

本発明のポリヌクレオチド及び核酸コード領域は、分泌又はシグナルペプチドをコードする追加のコード領域と会合してもよく、本発明のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの分泌を指向する。例えば、二重特異性抗原結合分子又はそのポリペプチドフラグメントの分泌が所望される場合、シグナル配列をコードするDNAを、本発明の二重特異性抗原結合分子、又はそのポリペプチドフラグメントをコードする核酸の上流に配置することができる。シグナル仮説によれば、哺乳動物細胞によって分泌されるタンパク質は、シグナルペプチド又は分泌リーダー配列を有しており、これらは、粗い小胞体を通して成長したタンパク質鎖が外に出始めると、成熟タンパク質から切断される。当業者は、脊椎動物細胞によって分泌されるポリペプチドが、一般的に、ポリペプチドのN末端に融合するシグナルペプチドを有しており、ポリペプチドの分泌した形態又は「成熟」形態を生成するために、翻訳されたポリペプチドから切断されることを知っている。特定の実施形態では、ネイティブシグナルペプチド、例えば免疫グロブリン重鎖又は軽鎖シグナルペプチドが使用されるか、又は作動可能に会合するポリペプチドの分裂を指向する能力を保持する配列の機能性誘導体を使用される。又は、異種哺乳動物シグナルペプチド、又はその機能性誘導体を使用してもよい。例えば、野生型リーダー配列は、ヒト組織プラスミノゲンアクティベーター（TPA）又はマウス - グルクロニダーゼのリーダー配列で置換されてもよい。

【0215】

後での精製（例えばヒスチジンタグ）を容易にする、又は、融合タンパク質の標識を補助するために使用可能な、短いタンパク質配列をコードするDNAを、本発明の二重特異性抗原結合分子、又はそのポリペプチドフラグメントをコードするポリヌクレオチドの中に、又はその末端に含めることができる。

【0216】

本発明の更なる態様において、本発明の1種以上のポリヌクレオチドを含む宿主細胞を提供する。特定の態様において、本発明の1種以上のベクターを含む宿主細胞を提供する。ポリヌクレオチド及びベクターは、それぞれポリヌクレオチド及びベクターに関連して本明細書に記載する特徴のいずれかを単独で、又は組み合わせて組み込んでもよい。一つの態様において、宿主細胞は、本発明の本発明の二重特異性抗原結合分子（の一部）をコードするポリヌクレオチドを含むベクターを含む（例えば、これにより形質転換されている、又はこれがトランスフェクションされている）。本明細書で使用される場合、「宿主細胞」との用語は、本発明の融合タンパク質又はそのフラグメントを生成するように操作することが可能な任意の種類 of 細胞系を指す。抗原結合分子を複製し、発現を補助するのに適した宿主細胞は、当該技術分野で周知である。このような細胞は、適切な場合、特定の発現ベクターを用いてトランスフェクトされるか、又は形質導入されてもよく、大規模発酵機に接種するために大量のベクターを含む細胞を成長させ、臨床用途に十分な量の抗原結合分子を得ることができる。適切な宿主細胞としては、原核微生物（例えば大腸菌）又は種々の真核生物細胞、例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）、昆虫細胞などが挙げられる。例えば、ポリペプチドは、特にグリコシル化が必要とされない場合には、細菌内で産生されてもよい。発現後、ポリペプチドは、適切なフラクション中の細菌細胞ペーストから単離されてもよく、更に精製されてもよい。原核生物に加え、真核生物の微生物、例えば、糸状菌又は酵母は、ポリペプチドをコードするベクターに適切なクローニング又は発現の宿主であり、グリコシル化経路が「ヒト化」された真菌株及び酵母

10

20

30

40

50

株を含み、部分的又は完全にヒトグリコシル化パターンを有するポリペプチドを産生する。Gerngross, Nat Biotech 22, 1409-1414 (2004) 及び Li et al., Nat Biotech 24, 210-215 (2006) を参照。

【0217】

(グリコシル化)ポリペプチドの発現に適した宿主細胞も、多細胞生物(無脊椎動物及び脊椎動物)から誘導される。無脊椎動物細胞の例としては、植物細胞及び昆虫細胞が挙げられる。昆虫細胞と併せて(特に *Spodoptera frugiperda* 細胞のトランスフェクションに)使用することができる、多数のバキュロウイルス株が特定されている。植物細胞培養物も、宿主として利用することができる。例えば、米国特許第5,959,177号、同第6,040,498号、同第6,420,548号、同第7,125,978号、及び同第6,417,429号(トランスジェニック植物で抗体を産生するための PLANTIBODIES (商標) 技術を記載している)を参照されたい。脊椎動物細胞も、宿主として使用されてもよい。例えば、懸濁物中で成長するように適合した哺乳動物細胞株が有用な場合がある。有用な哺乳動物宿主細胞株の他の例は、SV40 (COS-7) によって形質転換されたサル腎臓 CV1 株、ヒト胚腎臓株(例えば、Graham et al., J Gen Virol 36, 59 (1977) に記載されるような 293 細胞又は 293T 細胞)、ベビーハムスター腎臓細胞 (BHK)、マウスセルトリ細胞(例えば、Mather, Biol Reprod 23, 243-251 (1980) に記載されるような TM4 細胞)、サル腎臓細胞 (CV1)、アフリカミドリサル腎臓細胞 (VERO-76)、ヒト頸部癌腫細胞 (HELA)、イヌ腎臓細胞 (MDC K)、パッファローラット肝臓細胞 (BRL 3A)、ヒト肺細胞 (W138)、ヒト肝臓細胞 (Hep G2)、マウス乳房腫瘍細胞 (MMT 060562)、TRI 細胞(例えば、Acad Sci 383, 44-68 (1982) に記載されるもの)、MRC 5 細胞、及び FS4 細胞である。他の有用な哺乳動物宿主細胞株としては、dhfr-CHO 細胞を含む、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞 (Urlaub et al., Proc Natl Acad Sci USA 77, 4216 (1980))、骨髓腫細胞株、例えば、Y0、NS0、P3X63 及び Sp2/0 が挙げられる。タンパク質産生に適した特定の哺乳動物宿主細胞の総説としては、例えば、Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003) を参照。宿主細胞としては、培養細胞、例えば、ほんの数例を挙げると、哺乳動物培養細胞、酵母細胞、昆虫細胞、細菌細胞及び植物細胞が挙げられるが、トランスジェニック動物、トランスジェニック植物又は培養植物又は動物組織に含まれる細胞も含まれる。一実施形態では、宿主細胞は、真核細胞であり、好ましくは、哺乳動物細胞、例えば、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、ヒト胚腎臓 (HEK) 細胞又はリンパ球細胞(例えば、Y0、NS0、Sp20 細胞)である。これらの系において外来遺伝子を発現させる標準的な技術は、当該技術分野で既知である。免疫グロブリンの重鎖又は軽鎖のいずれかを含むポリペプチドを発現する細胞を組み換えて、他方の免疫グロブリン鎖を発現して、発現した生成物が、重鎖及び軽鎖の両方を有する免疫グロブリンとなるようにすることができる。

【0218】

一つの態様において、本発明の二重特異性抗原結合分子、又はそのポリペプチドフラグメントを製造する方法であって、本発明の二重特異性抗原結合分子、又はそのポリペプチドフラグメントを発現するのに好適な条件下にて、本明細書において提供するように、本発明の二重特異性抗原結合分子、又はそのポリペプチドフラグメントをコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞を培養することと、本発明の二重特異性抗原結合分子、又はそのポリペプチドフラグメントを、宿主細胞(又は宿主細胞培養培地)から回収することとを含む、方法を提供する。

【0219】

10

20

30

40

50

本明細書に記載のとおり調製される本発明の二重特異的分子は、高速液体クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、親和性クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィーなどの、当該技術分野にて周知の技術により精製することができる。特定のタンパク質を精製するために使用される実際の条件は、一部には、正味の電荷、疎水性、親水性などの因子に依存し、当業者には明らかである。親和性クロマトグラフィー精製のために、二重特異性抗原結合分子が結合する抗体、リガンド、受容体、又は抗原を使用することができる。例えば、本発明の融合タンパク質を親和性クロマトグラフィー精製するために、プロテインA又はプロテインGを含むマトリックスを使用することができる。連続したプロテインA又はGの親和性クロマトグラフィー及びサイズ排除クロマトグラフィーを用いて、実施例にて本質的に記載しているように、抗原結合分子を単離することができる。二重特異性抗原結合分子又はそのフラグメントの純度は、ゲル電気泳動、高圧液体クロマトグラフィーなどを含む、多種多様の周知の分析技術のいずれかにより測定することができる。例えば、実施例にて記載のとおりに発現する二重特異性抗原結合分子は、還元型、及び非還元型SDS-PAGEにより示されるように、インタクトであり、適切にアSEMBLしたことが示された。

10

【0220】

アッセイ

本明細書において提供する二重特異性抗原結合分子は、それらの結合特性及び/又は生物活性について、当該技術分野において公知のさまざまなアッセイによって特性決定することができる。特に、それらは、実施例でより詳細に記載されているアッセイによって特徴付けられる。

20

【0221】

1. 結合アッセイ

本明細書で提供される二重特異性抗原結合分子の対応する標的発現細胞への結合は、例えば、ヒト線維芽細胞活性化タンパク質(FAP)及びフローサイトメトリー(FACS)分析を発現するマウス線維芽細胞株を使用することによって評価することができる。本明細書で提供される二重特異性抗原結合分子のCD40への結合は、実施例4.2に記載されているように初代B細胞を使用することによって決定し得る。

【0222】

2. 活性アッセイ

30

【0223】

本発明の二重特異性抗原結合分子は、生物学的活性について試験される。生物学的活性には、二重特異性抗原結合分子の有効性及び特異性が含まれ得る。有効性及び特異性は、標的抗原の結合時にCD40受容体を介したアゴニストシグナル伝達を示すアッセイによって示される。更に、インビトロでT細胞プライミングアッセイは、二重特異性抗原結合分子とインキュベートされてきた樹状細胞(DC)を使用して実施される。

【0224】

F. 医薬組成物、製剤及び投与経路

更なる態様において、本発明は、例えば、以下の治療方法のいずれかで使用するための、本明細書において提供する二重特異性抗原結合分子のいずれかを含む医薬組成物を提供する。一実施形態では、医薬組成物は、本明細書に提示されるいずれかの二重特異性抗原結合分子及び少なくとも1種の薬学的に許容され得る賦形剤を含む。別の実施形態では、医薬組成物は、本明細書において提供する二重特異性抗原結合分子のいずれか、及び、例えば後述する少なくとも1種の追加の治療薬剤を含む。

40

【0225】

本発明の医薬組成物は、薬学的に許容され得る担体に溶解又は分散した、治療有効量の1種以上の二重特異性抗原結合分子を含む。「薬学的又は薬理的に許容され得る」との句は、一般的に、使用する投薬量及び濃度でレシピエントに非毒性であり、すなわち、適切な場合、動物(例えばヒト)に投与したときに、有害なアレルギー反応又は他の不都合な反応を引き起こさない分子部分及び組成物を指す。本発明に従った少なくとも1種の二

50

重特異性抗原結合分子、及び必要に応じて追加の有効成分を含有する医薬組成物の調製は、参照により本明細書に組み込まれている Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990 により例示されているように、本開示の見地から当業者に既知であろう。特に、組成物は、凍結乾燥された製剤又は水溶液である。本明細書で使用される場合、「薬学的に許容され得る賦形剤」としては、当業者には知られているだろうが、任意及び全ての溶媒、バッファー、分散媒体、コーティング、界面活性剤、酸化防止剤、防腐剤（例えば、抗菌剤、抗真菌剤）、等張性剤、塩類、安定化剤及びこれらの組み合わせが挙げられる。

【0226】

非経口組成物としては、注射による（例えば、皮下、皮内、病変内、静脈内、動脈内、筋肉内、髄腔内又は腹腔内注射による）投与のために設計されたものが挙げられる。注射のために、本発明の二重特異性抗原結合分子は、水溶液中で配合されてもよく、好ましくは、生理学的に適合するバッファー、例えば、Hanks 溶液、Ringer 溶液又は生理食塩水バッファー中で配合されてもよい。溶液は、配合剤、例えば、懸濁剤、安定化剤及び分散剤を含有していてもよい。あるいは、二重特異性抗原結合分子は使用前に、好適なビヒクル、例えば発熱性物質除去水と共に構成するための、粉末形態であることができる。滅菌注射可能溶液は、必要な場合には以下に列挙する種々の他の成分と共に、本発明の抗原結合分子を必要な量で、適切な溶媒に組み込むことによって調製される。滅菌性は、例えば、滅菌ろ過膜を通したる過によって容易に達成され得る。一般的に、分散物は、種々の滅菌した有効成分を、塩基性分散媒体及び/又は他の成分を含む滅菌ビヒクルに組み込むことによって調製される。滅菌注射可能溶液、懸濁物又は乳化物を調製するための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、既に滅菌フィルターにかけた液体媒体から有効成分と任意の追加の所望の成分の粉末が得られる減圧乾燥又は凍結乾燥技術である。液体媒体は、必要な場合には適切に緩衝化されているべきであり、注射する前に、十分な食塩水又はグルコースで液体希釈剤をまず等張性にする。組成物は、製造条件及び保存条件下で安定でなければならず、細菌及び真菌などの微生物の混入作用から保護されなければならない。内毒素の混入は、安全なレベルで、例えば、 0.5 ng/mg のタンパク質未満で最小限に維持されるべきであることが理解される。適切な薬学的に許容され得る賦形剤としては、限定されないが、バッファー、例えば、ホスフェート、シトレート及び他の有機酸；アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤；防腐剤（例えば、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；ヘキサメトニウムクロリド；ベンザルコニウムクロリド；ベンゼトニウムクロリド；フェノール、ブチル又はベンジルアルコール；アルキルパラベン、例えば、メチルパラベン又はプロピルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及び m-クレゾール）；低分子量（約 10 残基未満の）ポリペプチド；タンパク質、例えば、血清アルブミン、ゼラチン又は免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン又はリシン；単糖類、二糖類及び他の炭水化物、グルコース、マンノース又はデキストリンを含む；キレート化剤、例えば、EDTA；糖類、例えば、ショ糖、マンニトール、トレハロース又はソルビトール；塩を形成する対イオン、例えば、ナトリウム；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）；及び/又は非イオン性界面活性剤、例えば、ポリエチレングリコール（PEG）が挙げられる。水性注射懸濁物は、懸濁物の粘度を上げる化合物（例えば、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、ソルビトール、デキストランなど）を含んでいてもよい。必要に応じて、懸濁物は、適切な安定化剤、又は高度に濃縮した溶液の調製を可能にするために、化合物の溶解度を高める薬剤も含んでいてもよい。更に、活性化合物の懸濁物は、適切な油注射懸濁物として調製されてもよい。適切な親油性溶媒又はビヒクルとしては、脂肪族油（例えば、ゴマ油）、又は合成脂肪酸エステル（例えば、エチルクリート（ethyl c1e a t）又はトリグリセリド）又はリポソームが挙げられる。

【0227】

10

20

30

40

50

活性成分はまた、例えば、コアセルベーション技術によって、又は界面重合によって調製されたマイクロカプセル、例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロース若しくはゼラチンマイクロカプセル及びポリ-(メチルメタクリレート)マイクロカプセルにより、コロイド薬物送達系(例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロ乳濁液、ナノ粒子、及びナノカプセル)内、又はマクロ乳濁液中にも取り込まれ得る。このような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences (18th Ed. Mack Printing Company, 1990)に開示されている。徐放性調製物を調製してもよい。徐放性製剤の適切な例としては、ポリペプチドを含有する固体疎水性ポリマーの半透過性マトリックスが挙げられ、このマトリックスは、例えば、フィルム又はマイクロカプセルなどの成型物品の形態である。具体的な実施形態では、注射可能組成物の持続性吸収は、吸収を遅らせる薬剤(例えば、モノステアリン酸アルミニウム、ゼラチン、又はこれらの組み合わせ)の組成物での使用によってもたらされてもよい。

10

【0228】

本発明の例示的な薬学的に許容され得る賦形剤は、更に、間質性薬物分散剤、例えば、可溶性中性活性ヒアルロニダーゼ糖タンパク質(sHASEGP)、例えば、ヒト可溶性PH-20ヒアルロニダーゼ糖タンパク質、例えば、rHuPH20(HYLENEX(登録商標)、Baxter International, Inc.)を含む。特定の例示的なsHASEGP及び使用方法は、rHuPH20を含め、米国特許出願公開第2005/0260186号及び第2006/0104968号に記載される。一つの態様において、sHASEGPを、1種以上の追加のグリコサミノグリカナーゼ(例えば、コンドロイチナーゼ)と合わせる。

20

【0229】

例示的な凍結乾燥抗体製剤は、米国特許第6,267,958号に記載されている。水性抗体製剤としては、米国特許第6,171,586号及び国際公開第2006/044908号に記載されるものが挙げられ、後者の製剤は、酢酸ヒスチジン緩衝液を含む。

【0230】

上述した組成物に加えて、抗原結合分子をデポー調製物として製剤化することも可能である。このような長く作用する製剤は、移植によって(例えば、皮下又は筋肉内)、又は筋肉内注射によって投与されてもよい。それゆえに、例えば融合タンパク質は、好適なポリマー若しくは疎水性材料(例えば、許容され得るオイルの乳剤エマルジョンとして)又はイオン交換樹脂と共に、又は例えば、低溶解性の塩等の難溶性誘導体として製剤化してよい。

30

【0231】

本発明の二重特異性抗原結合分子を含む医薬組成物は、従来の混合、溶解、乳化、カプセル化、封入、又は凍結乾燥プロセスにより製造することができる。医薬組成物は、1種以上の生理学的に許容され得る担体、希釈剤、賦形剤又はタンパク質を医薬として使用可能な製剤へと加工するのを容易にする補助剤を用い、従来の様式で配合されてもよい。適切な製剤は、選択する投与経路によって変わる。

【0232】

二重特異性抗原結合分子は、遊離酸又は塩基、中性又は塩形態で、組成物に配合されることができる。薬学的に許容され得る塩は、遊離酸又は遊離塩基の生体活性を実質的に保持する塩である。薬学的に許容され得る塩としては、酸付加塩、例えば、タンパク質性組成物の遊離アミノ基と形成される酸付加塩、又は塩酸又はリン酸などの無機酸と形成されるか、又は酢酸、シュウ酸、酒石酸又はマンデル酸などの有機酸と形成されるものが挙げられる。遊離カルボキシル基と形成される塩も、例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウムの水酸化物又は水酸化第二鉄などの無機塩基から誘導されてもよく、又はイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン又はプロカインなどの有機塩基から誘導されてもよい。医薬塩は、対応する遊離塩基形態よりも、水及び他のプロトン性溶媒に溶けやすい傾向がある。

40

50

【 0 2 3 3 】

本発明の組成物は、処置される特定の徴候に必要な1種類より多い有効成分も含んでいてもよく、好ましくは、互いに有害な影響を与えない相補的な活性を有するものを含んでいてもよい。かかる活性成分は、意図される目的に有効な量で組み合わせ好適に存在する。

【 0 2 3 4 】

インピボ投与に使用される製剤は、一般に、滅菌のものである。滅菌性は、例えば、滅菌ろ過膜を通したる過によって容易に達成され得る。

【 0 2 3 5 】

G. 治療方法及び組成物

本明細書において提供する二重特異性抗原結合分子のいずれかを、治療方法にて使用することができる。治療方法で使用するために、本発明の二重特異性抗原結合分子を、良好な医事に一致する様式で製剤化、用量化、及び投与することができる。この観点で考慮する因子としては、処置されている具体的な障害、処置されている具体的な哺乳動物、個々の患者の臨床症状、障害の原因、薬剤の送達部位、投与方法、投与のスケジュール及び医学実務家には既知の他の因子が挙げられる。

【 0 2 3 6 】

一つの態様において、医薬として使用するための、本発明の二重特異性抗原結合分子を提供する。

【 0 2 3 7 】

更なる態様において、(i) CD40 + 抗原提示細胞 (APC) による免疫刺激の誘導において、(ii) 腫瘍特異的 T 細胞応答の刺激において、(iii) 腫瘍細胞のアポトーシスを引き起こすことにおいて、細胞は、(iv) 癌の処置において、(v) 癌の進行を遅らせることにおいて、(vi) 癌を患う患者の生存を延長することにおいて、(vii) 感染症の処置において、使用するための本発明の二重特異性抗原結合分子が提供される。特定の態様において、疾患の処置で使用するための、特に、癌の処置で使用するための、本発明の二重特異性抗原結合分子を提供する。

【 0 2 3 8 】

特定の態様において、処置方法で使用するための、本発明の二重特異性抗原結合分子を提供する。一つの態様において、本発明は、疾患の処置を必要とする個体における、疾患の処置で使用するための、本明細書に記載した二重特異性抗原結合分子を提供する。特定の態様において、本発明は、疾患を有する個体の処置方法であって、治療有効量の二重特異性抗原結合分子を個体に投与することを含む方法で使用するための二重特異性抗原結合分子を提供する。特定の態様において、処置される疾患は癌である。処置が必要な対象、患者又は個体は、典型的には、哺乳動物であり、より特定のには、ヒトである。

【 0 2 3 9 】

一つの態様において、提供されるのは、(i) CD40 + 抗原提示細胞 (APC) による免疫刺激を誘導する、(ii) 腫瘍特異的 T 細胞応答を刺激する、(iii) 腫瘍細胞のアポトーシスを引き起こす、(iv) 癌を処置するための方法が提供される、(v) 癌の進行を遅らせる、(vi) 癌を患う患者の生存を延長する、又は (vii) 感染症の処置のための方法であって、この方法は、治療有効量の本発明の二重特異性抗原結合分子を、それを必要とする個体に投与することを含む、方法である。

【 0 2 4 0 】

更なる態様において、本発明は、疾患の処置を必要とする個体における、疾患の処置のための医薬の製造又は調製における、本発明の二重特異性抗原結合分子の使用を提供する。一つの態様において、医薬は、疾患を有する個体に、治療有効量の医薬を投与することを含む疾患の処置方法で使用するためのものである。特定の態様において、処置される疾患は、増殖性障害、特に癌である。癌の例としては、膀胱癌、脳腫瘍、頭頸部癌、膵臓癌、肺癌、乳癌、卵巣癌、子宮癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、食道癌、結腸癌、結腸直腸癌、肛門癌、胃癌、前立腺癌、血液がん、皮膚癌、扁平細胞癌腫、骨がん及び腎臓癌が挙げら

10

20

30

40

50

れるが、これらに限定されない。癌の他の例としては、癌、リンパ腫（例えばホジキン及び非ホジキンリンパ腫）、芽腫、肉腫、及び白血病が挙げられる。本発明の二重特異性抗原結合分子又は抗体を使用して処置可能な、その他の細胞増殖性障害としては、腹部、骨、乳房、消化系、肝臓、膵臓、腹膜、内分泌腺（副腎、副甲状腺、脳下垂体、睾丸、卵巣、胸腺、甲状腺）、眼、頭頸部、神経系（中枢及び末梢）、リンパ系、骨盤、皮膚、軟組織、脾臓、胸部領域及び泌尿生殖器系に位置する新生物が挙げられるが、これらに限定されない。前癌症状又は病変及び癌転移も含まれる。特定の実施形態では、癌は、腎細胞癌、皮膚癌、肺癌、結腸直腸癌、乳癌、脳腫瘍、頭頸部癌からなる群から選択される。多くの場合において、本発明の二重特異性抗原結合分子又は抗体は治癒をもたらし得ないが、効果をもたらし得ることを当業者は速やかに理解する。いくつかの態様において、いくらかの効果を有する生理学的変化もまた、治療上有益であるとみなされる。したがって、いくつかの態様において、生理学的変化をもたらす本発明の二重特異性抗原結合分子又は抗体量を、「有効量」、又は「治療有効量」とみなす。

10

【0241】

疾患の予防又は処置に関して、（単独で、又は、1種以上の他の追加の治療薬剤と組み合わせる場合の）本発明の二重特異性抗原結合分子の適切な用量は、処置される疾患のタイプ、疾患の重症度及び経過、本発明の二重特異性抗原結合分子が予防又は治療目的で投与されるかどうか、以前又は同時の治療的介入、患者の病歴及び二重特異性抗原結合分子に対する応答、並びに主治医の裁量に依存するであろう。投与の責任を担う医師は、いずれにしても、組成物中の有効成分の濃度、個々の対象に適切な投薬量を決定する。単回又はさまざまな時点にわたる複数回投与、ボラス投与、及びパルス注入を含むが、これらに限定されないさまざまな投薬スケジュールが、本明細書では企図される。

20

【0242】

本発明の二重特異性抗原結合分子は患者に1回、又は連続処置にわたって好適に投与される。疾患の種類及び重症度に応じ、例えば、1回又は複数回の個別投与、又は連続点滴に関わらず、約 $1 \mu\text{g} / \text{kg} \sim 15 \text{mg} / \text{kg}$ （例えば $0.1 \text{mg} / \text{kg} \sim 10 \text{mg} / \text{kg}$ ）の二重特異性抗原結合分子が、患者への投与への最初の候補投与量となることができる。1つの典型的な日用量は、上で言及した因子に応じて、約 $1 \mu\text{g} / \text{kg} \sim 100 \text{mg} / \text{kg}$ 以上の範囲であってもよい。数日間又はそれ以上にわたる反復投与において、状態に応じ、処置は通常、疾患症状の所望の抑制が生じるまで続けられる。本発明の二重特異性抗原結合分子の1つの例示的な用量は、約 $0.005 \text{mg} / \text{kg} \sim 10 \text{mg} / \text{kg}$ の範囲である。他の例では、投薬量はまた、投与あたり、約 $1 \mu\text{g} / \text{kg}$ 体重、約 $5 \mu\text{g} / \text{kg}$ 体重、約 $10 \mu\text{g} / \text{kg}$ 体重、約 $50 \mu\text{g} / \text{kg}$ 体重、約 $100 \mu\text{g} / \text{kg}$ 体重、約 $200 \mu\text{g} / \text{kg}$ 体重、約 $350 \mu\text{g} / \text{kg}$ 体重、約 $500 \mu\text{g} / \text{kg}$ 体重、約 $1 \text{mg} / \text{kg}$ 体重、約 $5 \text{mg} / \text{kg}$ 体重、約 $10 \text{mg} / \text{kg}$ 体重、約 $50 \text{mg} / \text{kg}$ 体重、約 $100 \text{mg} / \text{kg}$ 体重、約 $200 \text{mg} / \text{kg}$ 体重、約 $350 \text{mg} / \text{kg}$ 体重、約 $500 \text{mg} / \text{kg}$ 体重から約 $1000 \text{mg} / \text{kg}$ 体重まで、又はもっと多く、又はその間の誘導可能な任意の範囲を含んでいてもよい。本明細書に列挙される数から誘導可能な範囲の例では、約 $0.1 \text{mg} / \text{kg} / \text{体重} \sim 20 \text{mg} / \text{kg} / \text{体重}$ 、約 $5 \mu\text{g} / \text{kg} / \text{体重} \sim 1 \text{mg} / \text{kg} / \text{体重}$ などが、上述の数に基づいて投与されてもよい。したがって、約 $0.5 \text{mg} / \text{kg}$ 、 $2.0 \text{mg} / \text{kg}$ 、 $5.0 \text{mg} / \text{kg}$ 、又は $10 \text{mg} / \text{kg}$ （又はこれらの任意の組合せ）のうちの1つ以上の用量が、患者に投与され得る。このような投薬量を、断続的に、例えば、毎週、又は3週間毎に投与してもよい（例えば、患者は、約2～約20回、又は例えば約6回の融合タンパク質の投薬を受ける）。特定の態様において、二重特異性抗原結合分子は3週間毎に投与される。最初の多めの投与量、それに続く1回又は複数回の量の少ない用量を投与してよい。しかしながら、他の投薬レジメンが有用であってもよい。この療法の進行は、従来技術及びアッセイによって容易に監視される。

30

40

【0243】

本発明の二重特異性抗原結合分子は一般に、意図する目的を達成するのに有効な量で使用される。疾患症状を処置又は予防するのに使用するため、本発明の二重特異性抗原結合

50

分子、又はその医薬組成物は、治療有効量で投与される、又は適用される。治療有効量の決定は、特に、本明細書に与えられる詳細な開示の観点で、十分に当業者の能力の範囲内である。全身投与の場合、治療有効投薬量は、インビトロアッセイ、例えば、細胞培養アッセイから最初に概算することができる。次いで、細胞培養物で決定されるような IC_{50} を含む血中濃度範囲を達成するために、用量を動物モデルで配合してもよい。このような情報を使用し、ヒトにおける有用な用量を更に正確に決定することができる。初期投薬量も、インビボデータから、例えば、動物モデルから、当該技術分野で周知の技術を用いて概算することができる。当業者は、動物データに基づき、ヒトへの投与を容易に最適化することができる。

【0244】

投与量及び感覚を個別に調節して、治療効果を維持するのに十分な、本発明の二重特異性抗原結合分子の血漿濃度を提供することができる。注射による投与に有用な患者投薬量は、約 $0.1 \sim 50 \text{ mg/kg/day}$ 、典型的には約 $0.1 \sim 1 \text{ mg/kg/day}$ の範囲である。治療に有効な血漿濃度は、各日に複数回投薬量を投与することによって達成されてもよい。血漿中の量は、例えば、HPLCによって測定されてもよい。局所投与又は選択的な取り込みの場合、本発明の二重特異性抗原結合分子又は抗体の効果的な局所濃度は、血漿濃度のとは関係し得ない。当業者は、過度な実験を行うことなく、治療に有効な局所投薬量を最適化することができる。

【0245】

本明細書に記載される、本発明の二重特異性抗原結合分子の治療に有効な用量は一般に、実質的な毒性を引き起こすことなく治療効果を提供する。融合タンパク質の毒性及び治療有効性は、細胞培養物又は実験動物における標準的な医薬手順によって決定することができる。細胞培養アッセイ及び動物実験を使用し、 LD_{50} (集団の50%が致死に至る用量) 及び ED_{50} (集団の50%が治療に有効である用量) を決定することができる。毒性と治療効果との間の投薬比は、治療指数であり、比 LD_{50}/ED_{50} として表すことができる。大きな治療指数を示す二重特異性抗原結合分子が好ましい。一つの態様において、本発明の二重特異性抗原結合分子又は抗体は、高い治療指数を示す。細胞培養アッセイ及び動物実験から得られるデータを、ヒトでの使用に適した投薬範囲を配合する際に使用することができる。投薬量は、好ましくは、毒性がほとんどないか、全くない状態で、 ED_{50} を含む血中濃度の範囲内にある。投薬量は、例えば、使用される投薬量、利用される投与経路、対象の症状などの種々の因子に依存して、この範囲内で変動してもよい。実際の製剤、投与経路及び負う薬量は、患者の症状という観点で個々の医師によって選択されてもよい (例えば、その全体が本明細書に参考として組み込まれる、Finglet al., 1975, The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ch. 1, p. 1を参照)。

【0246】

本発明の融合タンパク質で処置される患者の主治医は、毒性、臓器不全などに起因して、どのように、いつ投与を中止するか、中断するか、又は調整するかを知っている。逆に、主治医は、臨床応答が十分ではない場合 (毒性を生じずに)、処置をもっと高レベルにするように調整することも知っている。目的の障害の管理において投与される投薬量の大きさは、処置される症状の重篤度、投与経路などに伴って変動する。症状の重篤度は、例えば、部分的には、標準的な診断評価方法によって評価されてもよい。更に、投薬量と、おそらく投薬頻度は、個々の患者の年齢、体重及び応答によっても変わる。

【0247】

他の薬剤及び処置

本発明の二重特異性抗原結合分子は、1種以上の他の薬剤と組み合わせて投与され得る。例えば、本発明の本発明の二重特異性抗原結合分子又は抗体は、少なくとも1種の追加の治療薬剤と同時に投与することができる。「治療薬剤」との用語は、このような処置が必要な個体において、症状又は疾患を処置するために投与することが可能な任意の薬剤を包含する。このような更なる治療薬剤は、処置される特定の徴候に適した任意の有効成分

10

20

30

40

50

を含んでいてもよく、好ましくは、互いに有害な影響を与えない相補的な活性を有するものを含んでいてもよい。特定の実施形態において、更なる治療薬剤は、別の抗癌剤、例えば、微小管破壊剤、代謝拮抗剤、トポイソメラーゼ阻害剤、DNAインターカレーター、アルキル化剤、ホルモン治療、キナーゼ阻害剤、受容体アンタゴニスト、腫瘍細胞アポトーシスの活性化剤、又は抗血管形成剤である。特定の態様において、更なる治療薬剤は、免疫調節剤、細胞増殖抑制剤、細胞接着の阻害剤、細胞毒性剤若しくは細胞増殖抑制、細胞アポトーシスの活性化剤、又はアポトーシス誘発因子に対する細胞の感度を高める薬剤である。

【0248】

したがって、提供されるのは、癌の処置に使用するための本発明の二重特異性抗原結合分子又はそれらを含む医薬組成物であり、二重特異性抗原結合分子が、癌免疫療法に使用するための化学療法剤、放射線及び/又は他の薬剤と組み合わせて投与される、二重特異性抗原結合分子である。

10

【0249】

このような他の薬剤は、適切には、意図する目的にとって有効な量で組み合わせた状態で存在する。有効量のこのような他の薬剤は、使用される融合タンパク質の量、障害又は処置の種類、上述の他の因子に依存する。本発明の二重特異性抗原結合分子又は抗体は通常、本明細書に記載される同一用量及び投与経路、若しくは本明細書で記載される1~99%の用量、又は実験的/臨床的に適切と測定される任意の用量及び任意の経路で使用される。

20

【0250】

上記のそのような併用療法は、併用投与(2つ以上の治療薬剤が同じ又は別個の組成物に含まれる場合)、及び別個の投与を含み、その場合、本発明の二重特異性抗原結合分子又は抗体の投与は、追加の治療薬及び/又はアジュバントの投与の前、同時、及び/又は後に、起こり得る。

【0251】

更なる態様において、提供されるのは、癌の処置に使用するための、本明細書で上述した二重特異性抗原結合分子であり、二重特異性抗原結合分子は、別の免疫調節剤と組み合わせて投与される。

【0252】

「免疫調節剤」という用語は、免疫系に影響を与えるモノクローナル抗体を含む任意の物質を指す。本発明の分子は、免疫調節剤と見なすことができる。免疫調節剤は、癌の処置のための抗腫瘍剤として使用することができる。一つの態様において、免疫調節剤には、抗CTLA4抗体(例えば、イピリムマブ)、抗PD1抗体(例えば、ニボルマブ又はペンブロリズマブ)、PD-L1抗体(例えば、アテゾリズマブ、アベルマブ又はデュルバルマブ)、OX-40抗体、4-1BB抗体及びGITR抗体が挙げられる。更なる態様において、提供されるのは、癌の処置に使用するための、本明細書で上述した二重特異性抗原結合分子であり、二重特異性抗原結合分子は、PD-L1/PD-1相互作用を遮断する薬剤と組み合わせて投与される。一つの態様において、PD-L1/PD-1相互作用を遮断する薬剤は、抗PD-L1抗体又は抗PD1抗体である。より具体的には、PD-L1/PD-1相互作用を遮断する薬剤は、抗PD-L1抗体、特にアテゾリズマブ、デュルバルマブ、ペンブロリズマブ及びニボルマブからなる群から選択される抗PD-L1抗体である。1つの特定の態様では、PD-L1/PD-1相互作用を遮断する薬剤はアテゾリズマブ(MPDL3280A、RG7446)である。別の態様において、PD-L1/PD-1相互作用を遮断する薬剤は、配列番号107の重鎖可変ドメインVH(PDL-1)及び配列番号108の軽鎖可変ドメインVL(PDL-1)を含む抗PD-L1抗体である。別の態様において、PD-L1/PD-1相互作用を遮断する薬剤は、配列番号109の重鎖可変ドメインVH(PDL-1)及び配列番号110の軽鎖可変ドメインVL(PDL-1)を含む抗PD-L1抗体である。別の態様において、PD-L1/PD-1相互作用を遮断する薬剤は、抗PD1抗体、具体的にはペンブロリズマブ

30

40

50

又はニボルマブから選択される抗PD1抗体である。このような他の薬剤は、適切には、意図する目的にとって有効な量で組み合わせた状態で存在する。有効量のこのような他の薬剤は、使用される二重特異性抗原結合分子の量、障害又は処置の種類、上述の他の因子に依存する。本明細書で上述したような二重特異性抗原結合分子体は、通常、本明細書に記載される同一用量及び投与経路、若しくは本明細書で記載される1～99%の用量、又は実験的/臨床的に適切と測定される任意の用量及び任意の経路で使用される。

【0253】

上述のこのような併用療法は、組み合わせた投与(2つ以上の治療薬剤が、同じ又は別個の組成物に含まれる)、及び別個の投与を包含し、この場合、二重特異性抗原結合分子の投与は、更なる治療薬剤及び/又はアジュバントの投与前、投与と同時に及び/又は投与後に行われてもよい。

10

【0254】

製造物品

本発明の別の態様において、上述の障害の処置、予防、及び/又は診断に有用な材料を含有する製造物品が提供される。製造物品は、容器と、容器に挿入されるか、又は容器に付随するラベル若しくはパッケージ添付文書とを備えている。適切な容器としては、例えば、瓶、バイアル、シリンジ、静注溶液袋などが挙げられる。容器は、ガラス又はプラスチックなどの種々の材料から作られてもよい。容器は、組成物をそれ自身で、又は症状を処置し、予防し、及び/又は診断するのに有効な別の組成物と組み合わせて保持しており、滅菌アクセス口を有していてもよい(例えば、容器は、皮下注射針によって穿孔可能なストッパーを有する静脈用溶液袋又はバイアルであってもよい)。組成物中の少なくとも1種の活性剤は、本発明の二重特異性抗原結合分子である。

20

【0255】

ラベル又は添付文書は、組成物が、選択される症状を処置するために使用されることを示す。更に、製造物品は、(a)製造物品中に含有され、本発明の二重特異性抗原結合分子を含む組成物を含む第1の容器、及び、(b)製造物品中に含有され、更なる細胞毒性又は別の治療薬剤を含む組成物を含む第2の容器を含んでよい。本発明のこの実施形態における製造品は、組成物が特定の症状を処置するために使用され得ることを示す添付文書を更に含み得る。

【0256】

あるいは、又は加えて、製造物品は、薬学的に許容され得る緩衝液、例えば、注射用静菌水(BWFI)、リン酸緩衝化生理食塩水、リンゲル溶液及びデキストロス溶液を含む第2の(又は第3の)容器を更に備えていてもよい。他の緩衝液、希釈剤、フィルター、ニードル、及びシリンジを含め、商業的及びユーザの観点から望ましい他の材料を更に含んでいてもよい。

30

40

50

【表 B】

(配列) :

| 配列番号 | 名称 | 配列 |
|------|-------------|---|
| 1 | h u C D 4 0 | U n i P r o t 番号 P 2 5 9 4 2、バージョン 2 0 0 M V R L P L Q C V L W G C L L T A V H P E P P T A C R E K Q Y L I N S Q C C S L C Q P G Q K L V S D C T E F T E T E C L P C G E S E F L D T W N R E T H C H Q H K Y C D P N L G L R V Q Q K G T S E T D T I C T C E E G W H C T S E A C E S C V L H R S C S P G F G V K Q I A T G V S D T I C E P C P V G F F S N V S S A F E K C H P W T S C E T K D L V V Q Q A G T N K T D V V C G P Q D R L R A L V V I P I I F G I L F A I L L V L V F I K K V A K K P T N K A P H P K Q E P Q E I N F P D D L P G S N T A A P V Q E T L H G C Q P V T Q E D G K E S R I S V Q E R Q |
| 2 | h u F A P | U n i P r o t 番号 Q 1 2 8 8 4、バージョン 1 6 8 M K T W V K I V F G V A T S A V L A L L V M C I V L R P S R V H N S E E N T M R A L T L K D I L N G T F S Y K T F F P N W I S G Q E Y L H Q S A D N N I V L Y N I E T G Q S Y T I L S N R T M K S V N A S N Y G L S P D R Q F V Y L E S D Y S K L W R Y S Y T A T Y Y I Y D L S N G E F V R G N E L P R P I Q Y L C W S P V G S K L A Y V Y Q N N I Y L K Q R P G D P P F Q I T F N G R E N K I F N G I P D W V Y E E E M L A T K Y A L W W S P N G K F L A Y A E F N D T D I P V I A Y S Y Y G D E Q Y P R T I N I P Y P K A G A K N P V V R I F I I D T T Y P A Y V G P Q E V P V P A M I A S S D Y Y F S W L T W V T D E R V C L Q W L K R V Q N V S V L S I C D F R E D W Q T W D C P K T Q E H I E E S R T G W A G G F F V S T P V F S Y D A I S Y Y K I F S D K D G Y K H I H Y I K D T V E N A I Q I |

10

20

30

40

50

| 配列番号 | 名称 | 配列 |
|------|------------------|---|
| | | T S G K W E A I N I F R V T Q D S L F Y S S N E F E E Y P G R R N I Y R I S I G S Y P P S K K C V T C H L R K E R C Q Y Y T A S F S D Y A K Y Y A L V C Y G P G I P I S T L H D G R T D Q E I K I L E E N K E L E N A L K N I Q L P K E E I K K L E V D E I T L W Y K M I L P P Q F D R S K K Y P L L I Q V Y G G P C S Q S V R S V F A V N W I S Y L A S K E G M V I A L V D G R G T A F Q G D K L L Y A V Y R K L G V Y E V E D Q I T A V R K F I E M G F I D E K R I A I W G W S Y G G Y V S S L A L A S G T G L F K C G I A V A P V S S W E Y Y A S V Y T E R F M G L P T K D D N L E H Y K N S T V M A R A E Y F R N V D Y L L I H G T A D D N V H F Q N S A Q I A K A L V N A Q V D F Q A M W Y S D Q N H G L S G L S T N H L Y T H M T H F L K Q C F S L S D |
| 3 | FAP (212) CDR-H1 | DYNMD |
| 4 | FAP (212) CDR-H2 | DIYPNTGGTIYNQKFKG |
| 5 | AP (212) CDR-H3 | FRGIHYAMDY |
| 6 | FAP (212) CDR-L1 | RASESVDNYGLSFIN |
| 7 | FAP (212) CDR-L2 | GTSNRGS |
| 8 | FAP (212) CDR-L3 | QQSNEVPYT |
| 9 | FAP (212) VH | EVLLQQSGPELVKPGASVKIAC KASGYTLTDYNMDWVRQSHGKS LEWIGDIYPNTGGTIYNQKFKG KATLTIDKSSSTAYMDLRSLTS EDTAVYYCTRFRGIHYAMDYWG QGTSVTVSS |
| 10 | FAP (212) VL | DIVLTQSPVSLAVSLGQRATIS CRASESVDNYGLSFINWVQQKP GQPPKLLIYGTSNRGSGVPARF SSGSGGTDNFLNIHPMEEDDTA MYFCQQSNEVPYTFGGGTNLEIK |
| 11 | FAP (VH1G3a) | DIYPNTGGTIYAQKFKG |

10

20

30

40

50

| 配列番号 | 名称 | 配列 |
|------|------------------------|--|
| | CDR-H2 | |
| 12 | FAP (VH2G3a) CDR-H2 | DIYPNTGGTIYADSVKG |
| 13 | FAP (VL1G3a) CDR-L1 | RASESVDNYGLSFLA |
| 14 | FAP (VL2G3a) CDR-L1 | RASESIDNYGLSFLN |
| 15 | FAP (VH1G1a) | 表10を参照 |
| 16 | FAP (VH1G2a) | 表10を参照 |
| 17 | FAP (VH1G3a) | 表10を参照 |
| 18 | FAP (VH2G1a) | 表10を参照 |
| 19 | FAP (VH2G2a) | 表10を参照 |
| 20 | FAP (VH2G3a) | 表10を参照 |
| 21 | FAP (VL1G1a) | 表10を参照 |
| 22 | FAP (VL1G2a) | 表10を参照 |
| 23 | FAP (VL1G3a) | 表10を参照 |
| 24 | FAP (VL2G1a) | 表10を参照 |
| 25 | FAP (VL2G2a) | 表10を参照 |
| 26 | FAP (VL2G3a) | 表10を参照 |
| 27 | h u CD40 CDR -H1 | GY Y I H |
| 28 | h u CD40 CDR -H2 | R V I P N A G G T S Y N Q K F K G |
| 29 | h u CD40 CDR -H3 | E G I Y W |
| 30 | h u CD40 CDR -L1 | R S S Q S L V H S N G N T F L H |
| 31 | h u CD40 CDR -L2 | T V S N R F S |
| 32 | h u CD40 CDR -L3 | S Q T T H V P W T |
| 33 | h u CD40 VH | E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G Y S F T G Y Y I H W V R Q A P G K G L E W V A R V I P N A G G T S Y N Q K F K G R F T L S V D N S K N T A Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R E G I Y W W G Q G T L V T V S S |
| 34 | h u CD40 VL | D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R S S Q S L V H S N G N T F L H W Y Q Q K P G K A P K L L I Y T V S N R F S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y F C S Q T T H V P W T F G Q G T K V E I K |
| 35 | CD40 (S2C6) V H | E V Q L Q Q S G P D L V K P G A S V K I S C K A S G Y S F T G Y Y I H W V K Q S H G K S L E W I G R V I P N N G G T S Y N Q K F K G K A I L T V D K S S S T A Y M E L R S L T S E D S A V Y Y C A R E G I Y W W G H G T T L |

10

20

30

40

50

| 配列番号 | 名称 | 配列 |
|------|--|--|
| | | T V S S |
| 36 | CD40 (S2C6) VL | D V V V T Q T P L S L P V S L G A Q A S I S C R S S Q S L V H S N G N T F L H W Y L Q K P G Q S P K L L I Y T V S N R F S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D L G V Y F C S Q T T H V P W T F G G G T K L E I Q |
| 37 | VH1a (CD40) | 表17を参照 |
| 38 | VH1b (CD40) | 表17を参照 |
| 39 | VH1c (CD40) | 表17を参照 |
| 40 | VH1d (CD40) | 表17を参照 |
| 41 | VL1a (CD40) | 表17を参照 |
| 42 | VL1b (CD40) | 表17を参照 |
| 43 | VL1c (CD40) | 表17を参照 |
| 44 | VL1d (CD40) | 表17を参照 |
| 45 | VH2a (CD40) | 表18を参照 |
| 46 | VH2b (CD40) | 表18を参照 |
| 47 | VH2c (CD40) | 表18を参照 |
| 48 | VH2d (CD40) | 表18を参照 |
| 49 | VH2ab (CD40) | 表18を参照 |
| 50 | VH2ac (CD40) | 表18を参照 |
| 51 | VL2a (CD40) | 表18を参照 |
| 52 | VL2b (CD40) | 表18を参照 |
| 53 | VL2ab (CD40) | 表18を参照 |
| 54 | VL2ac (CD40) | 表18を参照 |
| 55 | P1AE0400重鎖 | 表20を参照 |
| 56 | P1AE0400軽鎖 | 表20を参照 |
| 57 | P1AE0403重鎖 | 表20を参照 |
| 58 | P1AE0403軽鎖 | 表20を参照 |
| 59 | P1AE0817重鎖 | 表20を参照 |
| 60 | P1AE0817軽鎖 | 表20を参照 |
| 61 | (P1AE1689) 軽鎖クロスVH-C kappa | 表24を参照 |
| 62 | VL1a (CD40) 軽鎖 (荷電) | 表24を参照 |
| 63 | VH1a (CD40) (VHCH1 荷電) Fc ノブ_PGLALA_ (P1AE1689) (VL-CH1) | 表24を参照 |
| 64 | VH1a (CD40) (VHCH1 荷電) Fc ホール_PGLALA | 表24を参照 |
| 65 | (P1AE1689) 軽鎖クロスVL-CH1 | 表24を参照 |
| 66 | VL1a (CD40) 軽鎖 | 表24を参照 |

10

20

30

40

50

| 配列番号 | 名称 | 配列 |
|------|---|-------------------------|
| 67 | VH1a (CD40) (VHCH1)Fcノブ _PGLALA_(P1 AE1689)(VH- Cカップ) | 表24を参照 |
| 68 | VH1a (CD40) (VHCH1)Fcホー ル_PGLALA | 表24を参照 |
| 69 | VH1a (CD40) (VHCH1荷電_VH 1a (CD40)(VH CH1荷電)-Fcノブ _PGLALA_(P1 AE1689)(VL- CH1) | 表24を参照 |
| 70 | VH1a (CD40) (VHCH1荷電)_V H1a (CD40)(V HCH1荷電)-Fcホ ール_PGLALA | 表24を参照 |
| 71 | 4B9軽鎖クロスVL- CH1 | 表24を参照 |
| 72 | VH1a (CD40) (VHCH1)Fcノブ _PGLALA_4B9 (VH-Cカップ) | 表24を参照 |
| 73 | VH1a (CD40) (VHCH1)_VH1 a (CD40)(VHC H1)-Fcノブ_PG LALA_(4B9) (VH-Cカップ) | 表24を参照 |
| 74 | VH1a (CD40) (VHCH1)_VH1 a (CD40)(VHC H1)-Fcホール_PG LALA | 表24を参照 |
| 75 | 28H1軽鎖クロスVH -Cカップ | 表24を参照 |
| 76 | VH1a (CD40) (VHCH1荷電)Fc ノブ_PGLALA_2 8H1(VL-CH1) | 表24を参照 |
| 77 | VH1a (CD40) (VHCH1荷電)_V H1a (CD40)(V HCH1荷電)Fcノブ _PGLALA_28H 1(VL-CH1) | 表24を参照 |
| 78 | hu FAP外部ドメイ | RPSRVHNSEENTMRALTLKDI L |

10

20

30

40

50

| 配列番号 | 名称 | 配列 |
|------|---|---|
| | ン+poly-lys-タグ+his ₆ -タグ | NGTFSYKTFFPNWI SGQEYLHQ SADNNIVLYNIETGQSYTILSN RTMKSVNASNYGLSPDRQFVYL ESDYSKLRYSYTATYYIYDLS NGEFVRGNE LPRPIQYLCWSPV GSKLAYVYQNNIYLKQRPGDPP FQITFNGRENKIFNGIPDWVYE EEMLATKYALWWS PNGKFLAYA EFNDTDIPVIAYSYYGDEQYPR TINIPYPKAGAKNPVVRIFIID TTYPAYVGPQEVPPAMIASSD YYFSWLTWVTDERVCLQWLKRV QNVSVLSICDFREDWQ TWDCPK TQEHIEESRTGWAGGFFVSTPV FSYDAISYYKIFSDKDGYKHIH YIKDTVENAIQITSGKWEAINI FRVTQDSL FYS SNEFEEY PGRR NIYRISIGSYPPSKKCVTCHLR KERCCYYTASFSDYAKYYALVC YGPGIPISTLHDGRTDQEI KIL EENKELENALKNIQLPKEEIKK LEVDEITLWYKMILPPQFDRSK KYPLLIQVYGGPCSQSVRSVFA VNWISYLASKEGMVIALVDGRG TAFQGDKLLYAVYRKLGVYEVE DQITAVRKF IEMGF IDEKRIAI WGWSYGGYVSS LALASGTGLFK CGIAVAPVSSWEYYASVYTERF MGLPTKDDNLEHYKNSTVMARA EYFRNVLDYLLIHGTADDNVHFQ NSAQIAKALVNAQVDFQAMWYS DQNHGLSGLSTNHLYTHMTHFL KQCFSLSDGKKKKKKGHHHHH |
| 79 | マウスFAP | UniProt 寄託番号 P97321 |
| 80 | マウスFAP外部ドメイン+poly-lys-タグ+his ₆ -タグ | RPSRVYKPEGNTKRALTLKDIL NGTFSYKTYFPNWI SEQEYLHQ SEDDNIVFYNIETRESYIILSN STMKSVNATDYGLSPDRQFVYL ESDYSKLRYSYTATYYIYDLQ NGEFVRGYELPRPIQYLCWSPV GSKLAYVYQNNIYLKQRPGDPP FQITYTGRENRI FNGIPDWVYE EEMLATKYALWWS PDGKFLAYV EFNDSDIPIIAYSYYG DGQYPR TINIPYPKAGAKNPVVRVFIID TTYPHHVGPMEVPPPEMIASSD YYFSWLTWVSSERVCLQWLKRV QNVSVLSICDFREDWHAWCEPK NQEHVEESRTGWAGGFFVSTPA FSQDATSYKIFSDKDGYKHIH |

10

20

30

40

| 配列番号 | 名称 | 配列 |
|------|---|---|
| | | Y I K D T V E N A I Q I T S G K W E A I Y I F R V T Q D S L F Y S S N E F E G Y P G R R N I Y R I S I G N S P P S K K C V T C H L R K E R C Q Y Y T A S F S Y K A K Y Y A L V C Y G P G L P I S T L H D G R T D Q E I Q V L E E N K E L E N S L R N I Q L P K V E I K K L K D G G L T F W Y K M I L P P Q F D R S K K Y P L L I Q V Y G G P C S Q S V K S V F A V N W I T Y L A S K E G I V I A L V D G R G T A F Q G D K F L H A V Y R K L G V Y E V E D Q L T A V R K F I E M G F I D E E R I A I W G W S Y G G Y V S S L A L A S G T G L F K C G I A V A P V S S W E Y Y A S I Y S E R F M G L P T K D D N L E H Y K N S T V M A R A E Y F R N V D Y L L I H G T A D D N V H F Q N S A Q I A K A L V N A Q V D F Q A M W Y S D Q N H G I L S G R S Q N H L Y T H M T H F L K Q C F S L S D G K K K K K K G H H H H H H |
| 81 | カニクイザルFAP外部 ドメイン+poly-1 ys-タグ+his6- タグ | R P P R V H N S E E N T M R A L T L K D I L N G T F S Y K T F F P N W I S G Q E Y L H Q S A D N N I V L Y N I E T G Q S Y T I L S N R T M K S V N A S N Y G L S P D R Q F V Y L E S D Y S K L W R Y S Y T A T Y Y I Y D L S N G E F V R G N E L P R P I Q Y L C W S P V G S K L A Y V Y Q N N I Y L K Q R P G D P P F Q I T F N G R E N K I F N G I P D W V Y E E E M L A T K Y A L W W S P N G K F L A Y A E F N D T D I P V I A Y S Y Y G D E Q Y P R T I N I P Y P K A G A K N P F V R I F I I D T T Y P A Y V G P Q E V P V P A M I A S S D Y Y F S W L T W V T D E R V C L Q W L K R V Q N V S V L S I C D F R E D W Q T W D C P K T Q E H I E E S R T G W A G G F F V S T P V F S Y D A I S Y Y K I F S D K D G Y K H I H Y I K D T V E N A I Q I T S G K W E A I N I F R V T Q D S L F Y S S N E F E D Y P G R R N I Y R I S I G S Y P P S K K C V T C H L R K E R C Q Y Y T A S F S D Y A K Y Y A L V C Y G P G I P I S T L H D G R T D Q E I K I L E E N K E L E N A L K N I Q L P K E E I K K L E V D E I T L W Y K M I L P P Q F D R S K K Y P L L I Q V Y G G P C S Q S V R S V F A V N W I S Y L A S K E G M V I A L V D G R G T A F Q G D K L L Y A V Y R K L G V Y E V E D Q I T A V R K F I E M G F I D E K R I A I W G W S Y G G Y V S S L A L A S G T G L F K C G I A V A P V S S W E Y Y A S V Y T E R F M G L P T K D D N L E H Y K N S T V M A R A E Y F R N V D Y L L I H G T A D D N V H F Q |

10

20

30

40

| 配列番号 | 名称 | 配列 |
|-------|--|--|
| | | NSAQIAKALVNAQVDFQAMWYS DQNHGLSGLSTNHLYTHMTHFL KQCFSLSDGKKKKKKGHHHHH |
| 8 2 | ペプチドリンカー (G 4 S) | GGGGS |
| 8 3 | ペプチドリンカー (G 4 S) ₂ | GGGGS GGGGS |
| 8 4 | ペプチドリンカー (SG 4) ₂ | SGGGGS GGGG |
| 8 5 | ペプチドリンカー G 4 (SG 4) ₂ | GGGGS GGGGS GGGG |
| 8 6 | ペプチドリンカー | GSPGSSSSGS |
| 8 7 | (G 4 S) ₃ ペプチドリンカー | GGGGS GGGGS GGGGS ₃ |
| 8 8 | (G 4 S) ₄ ペプチドリンカー | GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS |
| 8 9 | ペプチドリンカー | GSGSGSGS |
| 9 0 | ペプチドリンカー | GSGSGNGS |
| 9 1 | ペプチドリンカー | GGSGSGSG |
| 9 2 | ペプチドリンカー | GGSGSG |
| 9 3 | ペプチドリンカー | GGSG |
| 9 4 | ペプチドリンカー | GGSGNGSG |
| 9 5 | ペプチドリンカー | GGNGSGSG |
| 9 6 | ペプチドリンカー | GGNGSG |
| 9 7 | F c ノブ鎖 | DKTHTC P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P C R D E L T K N Q V S L W C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K |
| 9 8 | F c ホール鎖 | DKTHTC P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V C T L P P S R D E L T K N Q V S L S C A V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L V S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K |
| 9 9 | アクセプターフレームワーク IGHJ 6 * 0 1 / 0 2 (106 ページ) | YYYYYGMDVWGQGTTVTVSS |
| 1 0 0 | アクセプターフレームワ | LTFGGGTKVEIK |

10

20

30

40

50

| 配列番号 | 名称 | 配列 |
|-------|--|--|
| | ーク I G K J 4 * 0 1 / 0 2 (1 0 6 ページ) | |
| 1 0 1 | クセプターフレームワーク 1 I G H J 6 * 0 1 / 0 2 (1 1 0 ページ) | Y Y Y Y Y G M D V W G Q G T T V T V S S |
| 1 0 2 | クセプターフレームワーク 1 I G K J 4 * 0 1 / 0 2 (1 1 0 ページ) | L T F G G G T K V E I K |
| 1 0 3 | クセプターフレームワーク 2 I G H J 6 * 0 1 / 0 2 (1 1 1 ページ) | Y Y Y Y Y G M D V W G Q G T T V T V S S |
| 1 0 4 | クセプターフレームワーク 2 I G K J 4 * 0 1 / 0 2 (1 1 1 ページ) | L T F G G G T K V E I K |
| 1 0 5 | h u C D 4 0 軽鎖 (荷電) | 表 2 4 を参照 |
| 1 0 6 | h u C D 4 0 (V H C H 1 荷電) F c P G L A L A F A P (V L - C H 1) | 表 2 4 を参照 |
| 1 0 7 | V H (P D - L 1) | E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S D S W I H W V R Q A P G K G L E W V A W I S P Y G G S T Y Y A D S V K G R F T I S A D T S K N T A Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R R H W P G G F D Y W G Q G T L V T V S S |
| 1 0 8 | V L (P D - L 1) | D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V S T A V A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y L Y H P A T F G Q G T K V E I K |
| 1 0 9 | V H (P D - L 1) | E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S R Y W M S W V R Q A P G K G L E W V A N I K Q D G S E K Y Y V D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R E G G W F G E L A F D Y W G Q G T L V T V S S |
| 1 1 0 | V L (P D - L 1) | E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T L S C R A S Q R V S S S Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S S R A T G I P D R F S G S G S G T D F T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q Q Y G S L P W T F G Q G T K V E I K |

10

20

30

40

【 0 2 5 7 】

以下の番号付けされた項は、本発明の態様を記載する。

【 0 2 5 8 】

1. 二重特異性抗原結合分子であって、

(a) C D 4 0 に特異的に結合可能な少なくとも1つの抗原結合ドメインと、

(b) (i) 配列番号3のアミノ酸配列を含む C D R - H 1、(i i) 配列番号4、配列番号11及び配列番号12からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む C D R - H 2、及び(i i i) 配列番号5のアミノ酸配列を含む C D R - H 3を含む重鎖可変領域(V_HFAP)、並びに(i v) 配列番号6、配列番号13及び配列番号14からなる群から

50

選択されるアミノ酸配列を含む C D R - L 1、(v) 配列番号 7 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2、及び (v i) 配列番号 8 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3 を含む軽鎖可変領域 (V_LF A P) を含む線維芽細胞活性化タンパク質 (F A P) に特異的に結合可能な少なくとも 1 つの抗原結合ドメインと、を含む、二重特異性抗原結合分子。

【 0 2 5 9 】

2 . 項 1 に記載の二重特異性抗原結合分子であって、

(c) 安定した会合が可能な第 1 及び第 2 のサブユニットから構成される F c 領域をさらに含む、二重特異性抗原結合分子。

【 0 2 6 0 】

3 . F A P に特異的に結合可能な上記抗原結合ドメインが、配列番号 9 のアミノ酸配列と少なくとも約 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V_HF A P)、及び配列番号 1 0 のアミノ酸配列と少なくとも約 9 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V_LF A P) を含む、項 1 又は 2 に記載の二重特異性抗原結合分子。

10

【 0 2 6 1 】

4 . 上記 F A P に特異的に結合可能な抗原結合ドメインが、

配列番号 1 5、配列番号 1 6、配列番号 1 7、配列番号 1 8、配列番号 1 9 及び配列番号 2 0 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V_HF A P) と、

配列番号 2 1、配列番号 2 2、配列番号 2 3、配列番号 2 4、配列番号 2 5 及び配列番号 2 6 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V_LF A P) と、を含む、項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

20

【 0 2 6 2 】

5 . 上記 F A P に特異的に結合可能な抗原結合ドメインが、

(a) 配列番号 1 5 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V_HF A P)、及び配列番号 2 1 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V_LF A P)、

(b) 配列番号 1 6 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V_HF A P)、及び配列番号 2 1 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V_LF A P)、又は

(c) 配列番号 1 6 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V_HF A P)、及び配列番号 2 2 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V_LF A P)、又は

(d) 配列番号 1 9 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V_HF A P)、及び配列番号 2 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V_LF A P) を含む、項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

30

【 0 2 6 3 】

6 . C D 4 0 に特異的に結合可能な抗原結合ドメインが、(i) 配列番号 2 7 のアミノ酸配列を含む C D R - H 1、(i i) 配列番号 2 8 のアミノ酸配列を含む C D R - H 2、及び (i i i) 配列番号 2 9 のアミノ酸配列を含む C D R - H 3 を含む重鎖可変領域 (V_HC D 4 0) と、(i v) 配列番号 3 0 のアミノ酸配列を含む C D R - L 1、(v) 配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2、及び (v i) 配列番号 3 2 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3 を含む軽鎖可変領域 (V_LC D 4 0) と、を含む、項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

【 0 2 6 4 】

7 . C D 4 0 に特異的に結合可能な前記抗原結合ドメインが、

(i) 配列番号 3 7、配列番号 3 8、配列番号 3 9 及び配列番号 4 0 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V_HC D 4 0) と、

(i i) 配列番号 4 1、配列番号 4 2、配列番号 4 3、及び配列番号 4 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V_LC D 4 0) と、を含む、項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

40

【 0 2 6 5 】

8 . C D 4 0 に特異的に結合可能な上記抗原結合ドメインが、

(i) 配列番号 4 5、配列番号 4 6、配列番号 4 7、配列番号 4 8、配列番号 4 9 及び配列番号 5 0 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V_HC D 4 0

50

)と、

(i i) 配列番号 5 1、配列番号 5 2、配列番号 5 3、及び配列番号 5 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V_L C D 4 0) と、を含む、項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

【 0 2 6 6 】

9 . C D 4 0 に特異的に結合可能な上記抗原結合ドメインが、

(a) 配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 4 1 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(b) 配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 4 2 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(c) 配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 4 3 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(d) 配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(e) 配列番号 3 8 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 4 1 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(f) 配列番号 3 8 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 4 2 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(g) 配列番号 3 8 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 4 3 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(h) 配列番号 3 8 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(i) 配列番号 3 9 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 4 1 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(j) 配列番号 3 9 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 4 2 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(k) 配列番号 3 9 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 4 3 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(l) 配列番号 3 9 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(m) 配列番号 4 0 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 4 1 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(n) 配列番号 4 0 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 4 2 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(o) 配列番号 4 0 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 4 3 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(p) 配列番号 4 0 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含む V L を含む、項 1 ~ 5 又は 7 のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

【 0 2 6 7 】

1 0 . C D 4 0 に特異的に結合可能な前記抗原結合ドメインが、配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 4 1 のアミノ酸配列を含む V L を含む、項 1 ~ 5 又は 7 又は 9 のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

【 0 2 6 8 】

1 1 . C D 4 0 に特異的に結合可能な上記抗原結合ドメインが、

(a) 配列番号 4 5 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 5 1 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(b) 配列番号 4 6 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 5 1 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(c) 配列番号 4 7 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 5 1 のアミノ酸配列を含む V L、又は

10

20

30

40

50

(d) 配列番号 4 8 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 5 1 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(e) 配列番号 4 5 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 5 2 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(f) 配列番号 4 6 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 5 2 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(g) 配列番号 4 7 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 5 2 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(h) 配列番号 4 8 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 5 2 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(i) 配列番号 4 9 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 5 3 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(j) 配列番号 5 0 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 5 3 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(k) 配列番号 4 9 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 5 4 のアミノ酸配列を含む V L、又は

(l) 配列番号 5 0 のアミノ酸配列を含む V H、及び配列番号 5 4 のアミノ酸配列を含む V L を含む、項 1 ~ 5 又は 8 のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

【 0 2 6 9 】

1 2 . C D 4 0 に特異的に結合可能な前記抗原結合ドメインが、配列番号 4 5 のアミノ酸配列を含む V H 及び配列番号 5 1 のアミノ酸配列を含む V L を含む、又は C D 4 0 に特異的に結合可能な前記抗原結合ドメインが、配列番号 4 8 のアミノ酸配列を含む V H 及び配列番号 5 1 のアミノ酸配列を含む V L を含む、項 1 ~ 5 又は 8 又は 1 1 のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

【 0 2 7 0 】

1 3 . 項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子であって、

(i) 配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V H C D 4 0) 及び配列番号 4 1 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V L C D 4 0) を含む、C D 4 0 に特異的に結合可能な少なくとも 1 つの抗原結合ドメインと、

(i i) 配列番号 1 5 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V H F A P) 及び配列番号 2 1 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V L F A P) を含む、F A P に特異的に結合可能な少なくとも 1 つの抗原結合ドメインと、を含む、項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

【 0 2 7 1 】

1 4 . 上記 F c 領域が、I g G、特に I g G 1 F c 領域又は I g G 4 F c 領域であり、かつ上記 F c 領域が、F c 受容体及び / 又はエフェクター機能に対する抗体の結合親和性を低下させる 1 つ以上のアミノ酸置換を含む、項 2 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

【 0 2 7 2 】

1 5 . 上記 F c 領域が、アミノ酸変異 L 2 3 4 A、L 2 3 5 A 及び P 3 2 9 G (K a b a t E U インデックスによる番号付け) を有するヒト I g G 1 サブクラスの F c 領域である、項 2 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

【 0 2 7 3 】

1 6 . 上記二重特異性抗原結合分子が、

(a) F c 領域に連結した C D 4 0 に特異的に結合可能な少なくとも 2 つの F a b フラグメントと、

(b) F c 領域の C 末端に連結した F A P に特異的に結合可能な 1 つの抗原結合ドメインと、を含む項 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

【 0 2 7 4 】

1 7 . 上記二重特異性抗原結合分子が、

10

20

30

40

50

(a) F c 領域に融合した C D 4 0 に特異的に結合可能な少なくとも 2 つの F a b フラグメントと、

(b) F c 領域の C 末端に融合した F A P に特異的に結合可能なクロス F a b フラグメントと、を含む項 1 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

【 0 2 7 5 】

1 8 . F A P に特異的に結合可能な前記クロス F a b フラグメントの V H - C カップ鎖が F c 領域の C 末端に融合した、項 1 7 に記載の二重特異性抗原結合分子。

【 0 2 7 6 】

1 9 . 上記二重特異性抗原結合分子が、C D 4 0 に特異的に結合可能な 4 つの F a b フラグメントを含む、項 1 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

10

【 0 2 7 7 】

2 0 . F A P に特異的に結合する抗体であって、(i) 配列番号 3 のアミノ酸配列を含む C D R - H 1、(i i) 配列番号 4、配列番号 1 1 及び配列番号 1 2 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む C D R - H 2、及び(i i i) 配列番号 5 のアミノ酸配列を含む C D R - H 3 を含む重鎖可変領域(V H F A P)と、(i v) 配列番号 6、配列番号 1 3 及び配列番号 1 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む C D R - L 1、(v) 配列番号 7 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2、及び(v i) 配列番号 8 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3 を含む軽鎖可変領域(V L F A P)と、を含む、抗体。

【 0 2 7 8 】

2 1 . 上記抗体が、

20

(a) 配列番号 1 5 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(V H F A P)、及び配列番号 2 1 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(V L F A P)、

(b) 配列番号 1 6 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(V H F A P)、及び配列番号 2 1 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(V L F A P)、又は

(c) 配列番号 1 6 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(V H F A P)、及び配列番号 2 2 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(V L F A P)、又は

(d) 配列番号 1 9 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(V H F A P)、及び配列番号 2 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(V L F A P)を含む、項 2 0 に記載の抗体。

【 0 2 7 9 】

2 2 . 項 1 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子、又は項 2 0 若しくは 2 1 に記載の抗体をコードする、単離核酸。

30

【 0 2 8 0 】

2 3 . 項 2 2 に記載の単離核酸を含む、発現ベクター。

【 0 2 8 1 】

2 4 . 項 2 2 に記載の単離核酸、又は項 2 3 に記載の発現ベクターを含む、宿主細胞。

【 0 2 8 2 】

2 5 . 上記二重特異性抗原結合分子の発現に適した条件下で項 2 4 に記載の宿主細胞を培養すること、及び前記二重特異性抗原結合分子を単離することを含む、二重特異性抗原結合分子を製造する方法。

【 0 2 8 3 】

40

2 6 . 項 1 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子又は項 2 0 又は 2 1 に記載の抗体と、薬学的に許容され得る担体とを含む、医薬組成物。

【 0 2 8 4 】

2 5 . 追加の治療薬剤をさらに含む、項 2 4 に記載の医薬組成物。

【 0 2 8 5 】

2 6 . 医薬として使用するための、項 1 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子、又は、項 2 4 に記載の医薬組成物。

【 0 2 8 6 】

2 7 .

(i) C D 4 0 発現抗原提示細胞(A P C)による免疫刺激の誘導において、

50

(i i) 腫瘍特異的 T 細胞応答の刺激において、
 (i i i) 腫瘍細胞のアポトーシスを引き起こすことにおいて、
 (i v) 癌の処置において、
 (v) 癌の進行を遅らせることにおいて、
 (v i) 癌を患う患者の生存を延長することにおいて、
 (v i i) 感染症の処置において、使用するための、項 1 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子又は項 2 4 に記載の医薬組成物。

【 0 2 8 7 】

2 8 . 癌の処置に使用するための、項 1 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子、又は項 2 4 に記載の医薬組成物。

10

【 0 2 8 8 】

2 9 . 癌の処置に使用するための医薬の製造における、項 1 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子、又は項 2 4 に記載の医薬組成物の使用。

【 0 2 8 9 】

3 0 . 癌を有する個体を処置する方法であって、個体に、有効量の項 1 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子又は項 2 4 に記載の医薬組成物を投与することを含む、方法。

【 0 2 9 0 】

3 1 . 上記二重特異性抗原結合分子又は医薬組成物が、癌免疫療法で使用するために化学療法剤、放射線及び / 又は他の薬剤と組み合わせた投与のためのものである、癌の処置に使用するための項 1 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子又は項 2 4 に記載の医薬組成物。

20

【実施例】

【 0 2 9 1 】

以下は、本発明の方法及び組成物の例である。先に提供した一般的な説明を考慮すると、種々の他の実施形態が実施されてもよいことは理解される。

【 0 2 9 2 】

組換え DNA 技術

標準的な方法を使用して、Sambrook et al., Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989 において説明されるように、DNA を操作した。分子生物学的試薬は、製造元の説明書によって使用した。ヒト免疫グロブリンの軽鎖及び重鎖のヌクレオチド配列に関する一般的な情報は、以下に与えられる: Kabat, E. A. et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Ed., NIH Publication No 91 - 3242 に示されている。

30

【 0 2 9 3 】

DNA 配列決定

DNA 配列は、二本鎖配列決定によって決定した。

40

【 0 2 9 4 】

遺伝子合成

所望の遺伝子セグメントは、適切なテンプレートを使用した PCR によって生成されたか、又は Geneart AG (Regensburg, ドイツ) によって、合成オリゴヌクレオチド及び PCR 産物から自動遺伝子合成によって合成した。正確な遺伝子配列が利用できない場合においては、最も近い相同体の配列に基づきオリゴヌクレオチドプライマーを設計し、適切な組織に由来する RNA から、RT-PCR により遺伝子を単離した。単一の制限エンドヌクレアーゼ開裂部位に隣接する遺伝子セグメントを、標準的なクローニング / 配列決定ベクター内へとクローニングした。プラスミド DNA を形質転換細菌から精製し、濃度を UV 分光法によって測定した。サブクローニングした遺伝子フラグメ

50

ントのDNA配列は、DNA配列決定によって確認した。遺伝子セグメントは、それぞれの発現ベクター内へのサブクローニングを可能にする適切な制限部位を用いて設計した。全てのコンストラクトは、真核細胞における分泌のためのタンパク質を標的とするリーダー配列についてコードする5'末端DNA配列を用いて設計した。

【0295】

タンパク質精製

タンパク質は、標準プロトコルに言及される、フィルタにかけた細胞培養物上清から精製した。簡潔に述べると、抗体を、Protein A Sepharoseカラム(GE Healthcare)に適用し、PBSで洗浄した。抗体の溶離は、pH2.8で達成され、その後、試料を即時中和した。凝集したタンパク質は、PBS中での、又は20mMヒスチジン、150mM NaCl(pH6.0)中でのサイズ排除クロマトグラフィー(Superdex 200, GE Healthcare)によって、単量体抗体から分離した。単量体抗体フラクションをプールし、例えば、MILLIPORE Amicon Ultra(30 MWCO)遠心分離濃縮器を用いて濃縮し(必要な場合)、凍結させ、-20又は-80で保存した。サンプルの一部を、例えば、SDS-PAGE、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)又は質量分析法によるその後のタンパク質分析及び分析による特性決定のために提供した。

10

【0296】

SDS-PAGE

NuPAGE(登録商標)Pre-Castゲルシステム(Invitrogen)を、製造元の説明書により使用した。特に、10%又は4~12%のNuPAGE(登録商標)Novex(登録商標)Bis-TRIS Pre-Castゲル(pH6.4)、及びNuPAGE(登録商標)MES(還元型ゲル、NuPAGE(登録商標)酸化防止剤ランニングバッファー助剤を添加)又はMOPS(非還元型ゲル)ランニングバッファーを使用した。

20

【0297】

CE-SDS

二重特異性抗体とコントロール抗体の純度、抗体の完全性、分子量を、マイクロ流体LabChipテクノロジー(Caliper Life Science, USA)を使用したCE-SDSで分析した。HT Protein Express試薬キットを製造元の指示に従って使用してCE-SDS分析用に5µlのタンパク質溶液を調製し、HT Protein Expressチップを使用してLabChip GXIIシステムで分析した。LabChip GXソフトウェアバージョン3.0.618.0を使用してデータを分析した。

30

【0298】

分析用サイズ排除クロマトグラフィー

抗体の凝集及びオリゴマー状態を決定するためのサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)は、HPLCクロマトグラフィーによって行った。簡潔に述べると、プロテインA精製抗体を、Agilent HPLC 1100システムの300mM NaCl、50mM KH₂PO₄/K₂HPO₄(pH7.5)におけるTosoh TSK gel G3000SWカラムに、又はDionex HPLC-Systemの2xPBSにおけるSuperdex 200カラム(GE Healthcare)に適用した。溶離したタンパク質をUV吸光度及びピーク面積の積分によって定量した。BioRad Gel Filtration Standard 151-1901を標準物質として供した。

40

【0299】

質量分析法

この章は、その正しいアセンブリに重点をおいて、VH/VL又はCH/CL交換(CrossMab)を有する多特異性抗体の特性決定を記載する。予想される一次構造を、脱グリコシル化したインタクトなCrossMab及び脱グリコシル化した/FabALACTICA、又は脱グリコシル化した/GingisKHAN消化したCrossMa

50

bのエレクトロスプレーイオン化質量分析法 (ESI-MS) によって分析した。

【0300】

Cross Mabを、リン酸緩衝液又はTris緩衝液中、タンパク質濃度1mg/mLで、37°Cで17時間までの時間、N-グリコシダーゼFを用いて脱グリコシル化した。FabALACTICA又はGingis KHAN (Genovis AB; スウェーデン) 消化は、100 µgの脱グリコシル化Cross Mabsを使用してベンダーから提供されたバッファーで行った。質量分析の前に、サンプルを、Sephadex G25カラム (GE Healthcare) でのHPLCによって脱塩した。合計質量は、TriVersa NanoMate source (Advion) が取り付けられたmaXis 4G UHR-QTOF MSシステム (Bruker Daltonik) でのESI-MSによって決定された。

10

【0301】

実施例1

線維芽細胞活性化タンパク質 (FAP) に対する新しい抗体の生成

1.1 マウスの免疫付与

Balb/c及びNMRIマウスを免疫に使用した。動物は、付録A「動物の収容と世話に関するガイドライン」に従ってAAALACi認定の動物施設に収容された。全ての動物予防接種プロトコルと実験は、オーバーバイエルン政府 (許可番号55.2-1-54-2531-19-10) によって承認され、ドイツの動物福祉法と欧州議会及び理事会の指令2010/63に従って実施された。6~8週齢のBalb/c及びNMRIマウス (n=5) は、HisTag (配列番号78) に共有結合したヒト線維芽細胞活性化タンパク質アルファ (アミノ酸27-759; アクセション番号NP_004451) の組換え産生細胞外ドメインで4ラウンドの免疫を受けた。各免疫化の前に、マウスを酸素とイソフルランの混合ガスで麻酔した。最初の免疫では、PBS、pH7.4に溶解した30 µgのタンパク質を等量のCFA (BD Difco、#263810) と混合し、腹腔内 (i.p.) 投与した。アビスコアジュバントに乳化した別の10 µgのタンパク質を6週目に皮下 (s.c.) 投与した。アジュバントなしの5 µgタンパク質の3回目の用量を10週目に腹腔内投与した。最後に、ハイブリドーマ技術を使用して抗体開発のための脾細胞を調製する3日前に、マウスを50 µgのタンパク質で静脈内 (i.v.) 追加免疫に供した。血清は、ELISAによって抗原特異的総IgG抗体産生について試験された。最終免疫の3日後、マウスを安楽死させ、脾臓を無菌的に単離し、ハイブリドーマ生成のために準備した。マウスリンパ球を単離し、PEGベースの標準プロトコルを使用してマウス骨髓腫細胞株と融合させてハイブリドーマを生成した。得られたハイブリドーマ細胞を平底96ウェルマイクロ力価プレートに約10⁴でプレティングし、続いて選択培地で約2週間インキュベートし、抗原特異的抗体の産生についてスクリーニングした。広範なハイブリドーマの増殖が起こると、抗体分泌ハイブリドーマが再播種される。ハイブリドーマ上清を、ELISAによって組換えヒト線維芽細胞活性化タンパク質アルファ (huFAP) への特異的結合についてスクリーニングし、続いて、Biacore測定を使用して組換えhuFAPへの動的結合パラメータを評価した。

20

30

【0302】

ハイブリドーマの培養：生成されたmuMabハイブリドーマは、2mM L-グルタミン (GIBCO - カタログ番号35050-038)、1mM Na-ピルビン酸 (GIBCO - カタログ番号11360-039)、1xNEAA (GIBCO - カタログ番号11140-035)、10%FCS (PAA - カタログ番号A15-649)、1xPen Strep (Roche - カタログ番号1074440)、1xNutridoma CS (Roche - カタログ番号1363743)、50 µMメルカプトエタノール (GIBCO - カタログ番号31350-010) 及び50U/ml IL-6マウス (Roche - カタログ番号1444581) を添加したRPMI 1640 (PAN - カタログ番号 (カタログ番号) PO4-17500) で、37°C及び5%CO₂で、培養した。

40

50

【0303】

1.2 FAPクローン4B9及び28H1への抗huFAP抗体の競合的細胞結合

得られたクローンを、FAPクローン4B9と比較してそれらの結合挙動について試験した。FAPバインダー4B9及び28H1の生成及び調製は、国際公開第2012/020006A2号に記載されており、参照により本明細書に組み込まれる。マウスFAPクローンが異なるエピトープをクローン4B9及び28H1として認識するかどうかを決定するために、トランスフェクトされたHEK細胞で発現されたヒトFAPに結合する競合を実施した。

【0304】

簡単に説明すると、標的細胞をCell Dissociation bufferで回収し、FACS Buffer (PBS + 2% FCS + 5mM EDTA + 0.25% ナトリウム酸) で洗浄し、96-Uボトムプレートに播種した (1×10^5 個の細胞/ウェル)。非標識一次抗ヒトFAP抗体 (μ IgG1) を細胞に添加し (最終濃度 $60 \mu\text{g}/\text{ml} \sim 0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$; 1:3 希釈)、Alexa Fluor 647 標識抗FAP抗体4B9又は28H1 (最終濃度 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$) を添加する前に4で20分間インキュベートした。4で30分間インキュベートした後、細胞を洗浄、固定し、Miltenyi MACSQuantを使用してAF647標識クローン4B9及び28H1の蛍光シグナル強度を測定した。

10

【0305】

図2A及び図2Bに見られるように、抗FAP抗体4B9又は28H1との結合をめぐる競合しなかった10個のハイブリドーマ由来のマウス抗体 (クローン209、210、211、212、213、214、215、216、217及び218と名付けられた) が同定された。

20

【0306】

1.3 抗huFAPマウス抗体の標的結合特異性

線維芽細胞活性化タンパク質 (FAP、FAP-、セプラゼ) は、プロリルオリゴペプチダーゼファミリーに属するII型膜貫通型セリンプロテアーゼである。このファミリーは、プロリン残基の後に優先的にペプチドを切断するセリンプロテアーゼを含む。ヒトプロテオームで発現されるこのファミリーの他の重要なメンバーは、プロリルオリゴペプチダーゼ (PREP) 及びジペプチジルペプチダーゼ (DPP) である。DPP-IVは、FAPの最も近い相合体である。FAPとは対照的に、DPP-IVは普遍的に発現し、T細胞共刺激、ケモカイン生物学、糖代謝、腫瘍形成などのさまざまな生物学的プロセスで役割を果たすため、所望の抗ヒトFAP抗体はヒトDPP-IVに結合しないはずである。

30

【0307】

ヒトFAP及びヒトDPP-IVへの結合は、ヒトFAP又はヒトDPP-IVをトランスフェクトしたHEK細胞を使用したフローサイトメトリーによって決定された。簡単に説明すると、標的細胞をCell Dissociation bufferで回収し、FACS Buffer (PBS + 2% FCS + 5mM EDTA + 0.25% ナトリウム酸) で洗浄し、96-Uボトムプレートに播種した (1×10^5 個の細胞/ウェル)。標識されていない一次抗体を細胞に添加し (最終濃度 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$)、4で30分間インキュベートした。洗浄後、細胞をやぎ抗マウスIgG-PEF (ab')₂ (Serotec) とともに、暗所で4で30分間インキュベートした。その後、細胞を洗浄し、固定し、BD FACS Canto (商標) IIを使用して測定した。ヒトDPP-IVへの非特異的結合は、10個のハイブリドーマ由来の抗ヒトFAP抗体のいずれについても検出されなかった。

40

【0308】

1.4 huIgG1__LALA__PGフォーマットでの抗huFAP抗体の生成

新しい抗huFAP抗体のDNA配列は、標準的な配列決定法で決定された。VH及びVLドメインに基づいて、新しい抗FAP抗体は、国際公開第2012/130831A

50

1号に記載されている方法に従って、Fc受容体への結合を無効にするエフェクターサイレントFc (P329G; L234、L235A)を備えたhuIgG1抗体として発現された。詳細には、抗体は、異なるペプチド鎖をコードする発現ベクターを用いて、懸濁液中で増殖させたHEK293-F細胞の一過性トランスフェクションによって発現された。HEK293-F細胞(Invitrogen、USA)へのトランスフェクションは、抗体ベクターのMaxiprep(Qiagen、ドイツ)調製物、F17ベースの培地(Invitrogen、USA)、PEIpro(Polyscience Europe GmbH)、及び無血清FreeStyle 293発現培地(Invitrogen)での初期細胞密度が100~200万生細胞/mlを使用して、細胞供給業者の指示に従って実施した。振とうフラスコ又は攪拌発酵槽で7日間培養した後、14000gで30分間遠心分離して細胞培養上清を回収し、0.22µmフィルターにかけた。

10

【0309】

抗体は、MabSelectSure-Sepharose(商標)(GE Healthcare、スウェーデン)クロマトグラフィーを使用した親和性クロマトグラフィーによって細胞培養上清から精製された。簡単に説明すると、滅菌フィルターにかけた細胞培養上清を、PBSバッファー(10mM Na₂HPO₄、1mM KH₂PO₄、137mM NaCl及び2.7mM KCl、pH7.4)で平衡化したMabSelectSure樹脂で捕捉し、平衡化バッファーで洗浄し、25mMクエン酸塩、pH3.0で溶出した。1M Tris pH9.0で中和した後、20mM ヒスチジン、140mM NaCl、pH6.0でサイズ排除クロマトグラフィー(Superdex 200、GE Healthcare)を使用して、凝集タンパク質を単量体抗体種から分離した。単量体タンパク質画分をプールし、必要に応じて、例えば、MILLIPORE Amicon Ultra(30KD MWCO)遠心分離濃縮器を用いて濃縮し、-80℃で保存した。サンプルの一定分量は、CE-SDS、サイズ排除クロマトグラフィー、質量分析、及びエンドトキシン測定によるその後の分析特性評価に使用された。

20

【0310】

1.5 抗huFAP抗体の細胞間結合

抗FAP抗体とヒトIgG1 P329G LALA FcのヒトFAPへの結合は、ヒトFAPをトランスフェクトしたHEK細胞を使用したフローサイトメトリーによって決定した。簡単に説明すると、標的細胞をCell Dissociation bufferで回収し、FACS Buffer(PBS+2%FCS+5mM EDTA+0.25%ナトリウム酸)で洗浄し、96-Uボトムプレートに播種した(1×10⁵個の細胞/ウェル)。標識されていない一次抗体を細胞に添加し(最終濃度10µg/ml~0.64ng/ml; 1:5希釈)、4℃で30分間インキュベートした。洗浄後、細胞をPE結合AffiPure F(ab)₂フラグメントヤギ抗ヒトIgG、Fc特異的(Jackson Immunoresearch)とともに、暗所で4℃で30分間インキュベートした。その後、細胞を洗浄し、固定し、BD FACS LSR Fortessa(商標)を使用して測定した。

30

【0311】

全ての抗FAP抗体は、以前に見られたように、ヒトFAPへの同様の結合を示した。選択したバインダーのEC₅₀値を以下の表1に示す。

40

【表 1】

h u F A P 発現細胞への抗 F A P 抗体の細胞間結合

| サンプル ID | クローン | EC ₅₀ [μ g/ml] の F A P トランスフェクト H E K 細胞への細胞結合 |
|-----------------|-------|--|
| | 4 B 9 | 0. 0 8 9 |
| P 1 A D 9 4 2 7 | 2 0 9 | 0. 1 4 5 |
| P 1 A D 9 4 3 6 | 2 1 0 | 0. 1 2 5 |
| P 1 A D 9 4 3 7 | 2 1 1 | 0. 1 9 8 |
| P 1 A D 9 4 3 8 | 2 1 2 | 0. 1 1 8 |
| P 1 A D 9 4 4 0 | 2 1 4 | 0. 0 8 6 |

10

【 0 3 1 2 】

1. 6 抗 h u F A P 抗体の細胞内在化

F A P バインダーの内在化は、ヒト F A P をトランスフェクトした H E K 細胞を標的として使用して決定された。簡単に説明すると、標的細胞を細胞解離バッファーで回収し、冷 F A C S バッファー (P B S + 2 % F C S + 5 m M E D T A + 0 . 2 5 % ナトリウム酸) で洗浄し、冷 F A C S バッファーに $1 . 5 \times 1 0 ^ 6$ 個の細胞 / m l で再懸濁した。細胞を 1 5 m l チューブに分配した (各チューブは 2 m l に $3 \times 1 0 ^ 6$ 個の細胞を含む) 。 2 m l の抗ヒト F A P 抗体溶液を細胞に添加し (最終濃度 $2 0 \mu$ g / m l) 、 4 で 4 5 分間インキュベートした。その後、細胞を洗浄し、冷 F A C S バッファーに再懸濁し、時点「 0 」の細胞を直ちに 9 6 - U ボトムプレートに播種し ($1 . 5 \times 1 0 ^ 5$ 個の細胞 / ウェル) 、 4 で維持したが、他の全ての細胞は、遠心分離し、 1 0 % F C S 及び 1 % G l u t a m a x ($1 . 5 \times 1 0 ^ 6$ 個の細胞 / m l) を含み、加湿インキュベーター (5 % C O ₂) で 3 7 にシフトした温 R P M I 1 6 4 0 培地中に、再懸濁した。示された各時点の後、 1 0 0 μ l / チューブの細胞懸濁液をプレートに移し、すぐに冷 F A C S バッファーで冷却し、全ての時点が収集されるまで冷蔵庫に保存した。全ての時点を収集した後、細胞を冷 F A C S バッファーで洗浄し、 P E 標識二次抗体とともに 4 で 3 0 分間インキュベートした。その後、細胞を洗浄、固定し、 B D F A C S C a n t o (商標) I I を使用して測定した。

20

30

【 0 3 1 3 】

標識された二次抗体によって引き起こされるシグナルは、時間の経過とともにほぼ一定のままだった。つまり、時間の経過とともに抗体の喪失は観察されず、テストされた抗 h u F A P 抗体はいずれも内在化されなかった。

【 0 3 1 4 】

1. 7 抗 h u F A P 抗体の結合速度論

ヒト F A P 結合動態を評価するために、ビオチン化ヒト F A P をシリーズ S B i a c o r e C A P t u r e チップ (G E H e a l t h c a r e 2 8 - 9 2 0 2 - 3 4) に製造元の指示に従って固定化し、表面密度を約 2 0 共鳴単位 (R U) にした。ランニング及び希釈バッファーとして、H B S - P + (1 0 m M H E P E S 、 1 5 0 m M N a C l p H 7 . 4 、 0 . 0 5 % 界面活性剤 P 2 0) を使用した。一連の抗 h u F A P F a b の希釈液 (3 . 7 ~ 3 0 0 n M 、 1 : 3 希釈) をそれぞれ 1 2 0 秒間連続して注入し、 3 0 μ l / m i n の流速で 1 8 0 0 秒間解離をモニターした (シングルサイクル動態) 。 6 M グアニジン - H C l 、 0 . 2 5 M N a O H を 1 2 0 秒間注入することにより、表面を再生成した。バルク屈折率の差は、ブランク注入を差し引くことによって、及び捕捉されたヒト F A P なしで制御フローセルから得られた応答を差し引くことで補正した。カーブフィッティングは、 B i a c o r e 評価ソフトウェア内の 1 : 1 ラングミュア結合モデルを使用して実行された。親和性データを以下の表 2 に示す。

40

50

【表 2】

B i a c o r e によって測定されたヒト F A P に対する抗 F A P F a b の親和性

| サンプル ID | クローン | k_a (1/Ms) | k_d (1/s) | KD |
|-----------------------------|----------------|-------------------|-------------------|-----------|
| | 4 B 9 __ F a b | 1. 8 2 E + 0 6 | 7. 8 0 E - 0 4 | 4 3 0 p M |
| P 1 A D 9 4 2 7 __ F a b | 2 0 9 | 3. 5 0 E + 0 6 | 1. 7 7 E - 0 3 | 5 1 0 p M |
| P 1 A D 9 4 3 6 __ F a b | 2 1 0 | 1. 8 7 E + 0 6 | < E - 0 6 | < 1 0 p M |
| P 1 A D 9 4 3 7 __ F a b | 2 1 1 | 8. 1 3 E + 0 5 | 4. 6 1 E - 0 5 | 6 0 p M |
| P 1 A D 9 4 3 8 __ F a b | 2 1 2 | 1. 0 6 E + 0 6 | < E - 0 6 | < 1 0 p M |
| P 1 A D 9 4 4 0 __ F a b | 2 1 4 | 1. 9 9 E + 0 6 | < E - 0 6 | < 1 0 p M |

10

【 0 3 1 5 】

1. 8 抗 h u F A P クローンのフォーマット依存結合

抗 F A P クローンが、 F c ドメインに C 末端で融合したときに結合特性が失われないかどうかを判断するために、 V H ドメインが C 末端に融合した F c ノブ鎖と F c ホール鎖を含むコンストラクト F c ノブ鎖の末端及び V L ドメインが、 F c ホール鎖の C 末端に融合され (図 3 A、 C 末端 V H / V L 融合)、 F c ノブ鎖及び F c ホール鎖を含むコンストラクトが、 F a b 全体が V H ドメインと F c ノブ鎖の C 末端に融合している (図 3 B、 C 末端 F a b 融合)。 F c ノブ鎖は配列番号 9 7 のアミノ酸配列を有し、 F c ホール鎖は配列番号 9 8 のアミノ酸配列を有する。

20

【 0 3 1 6 】

抗体と比較した、 ビオチン化組換えヒト F A P 及び ビオチン化組換え カニクイザル F A P に対するコンストラクトの親和性を以下の表 3 に示す。

【表 3】

B i a c o r e によって測定されたヒト F A P 及び カニクイザル F A P への親和性

| クローン | ヒト F A P への親和性 KD [nM] | | | カニクイザル F A P への親和性 KD [nM] | | |
|-------|---------------------------|----------------------|-------------------------|-------------------------------|----------------------|-------------------------|
| | 遊離の F a b | C 末端 F a b 融 合 | C 末端 V H / V L 融合 | I g G | C 末端 F a b 融 合 | C 末端 V H / V L 融合 |
| 2 0 9 | 0. 3 1 | 1. 5 2 | 4 2. 4 0 | 0. 3 3 | 1. 6 0 | 5 0. 0 0 |
| 2 1 0 | 0. 0 7 | 0. 1 7 | 3. 9 5 | 0. 1 2 | 0. 2 0 | 3. 4 4 |
| 2 1 1 | 0. 2 8 | 1. 2 0 | 1 0. 9 0 | 0. 3 2 | 1. 3 0 | 1 1. 4 0 |
| 2 1 2 | 0. 1 2 | 0. 6 2 | 5. 7 2 | 0. 1 4 | 0. 6 4 | 6. 1 9 |
| 2 1 4 | 0. 0 6 | 0. 1 9 | 2. 4 9 | 0. 0 9 | 0. 2 1 | 2. 7 7 |

30

40

【 0 3 1 7 】

コンストラクトの F A P トランスフェクト H E K 細胞への細胞間結合もまた、本明細書で以前に記載されたように決定されている。 E C 5 0 値を表 4 に示す。全ての抗 F A P 抗体の C 末端融合コンストラクトはヒト及びカニクイザル F A P に結合可能だったが、 F a b 全体が V H ドメインと F c ノブ鎖の C 末端に融合しているコンストラクトは、 V H ドメインが、 F c ノブ鎖の C 末端に融合し、 V L ドメインは F c ホール鎖の C 末端に融合しているものよりも、優れていた。

50

【表 4】

h u F A P 発現細胞への細胞間結合

| クロー ン | ヒトFAPへの細胞間結合 E C ₅₀ [μg/ml] | | | カニクイザルFAPへの細胞間結 合 E C ₅₀ [μg/ml] | | |
|----------|---|--------------------|---------------------|---|--------------------|---------------------|
| | I g G | C末端 F a b融 合 | C末端 V H/V L融合 | I g G | C末端 F a b融 合 | C末端 V H/V L融合 |
| 209 | 0, 15 | 1. 2 | 5. 7 | 0. 4 | 1. 1 | 7. 9 |
| 210 | 0, 13 | 1. 8 | 9. 0 | 0. 4 | 1. 3 | 7. 1 |
| 211 | 0, 20 | 3. 7 | 9. 3 | 0. 3 | 2. 9 | 6. 7 |
| 212 | 0, 12 | 2. 8 | 8. 8 | 0. 3 | 2. 3 | 11. 1 |
| 214 | 0, 09 | 1. 7 | 9. 4 | 0. 3 | 1. 3 | 3. 6 |

10

【0318】

1. 9 Biacoreによって決定された抗ヒトFAPクローンの競合的結合

エピトープマッピングを、Biacore T200 機器で表面プラズモン共鳴 (SPR) に基づくアッセイを用いて行った。FAP 抗原は固定化された抗His抗体によって捕捉された。最初のステップでは、FAP バインダーが飽和するまで注入された。続いて、第2のFAP バインダーが注入された。アッセイの設計を図3Cに模式的に示す。二次抗体の添加後の結合シグナルの増加は、一次抗体とは異なるエピトープへの結合を示す。追加の結合は、一次抗体と二次抗体が同じエピトープ領域を認識することを示していない。

20

【0319】

20 μg/ml の濃度の抗His抗体 (GE Healthcare Kit 28-9950-56) は、CM5 センサーチップ (GE Healthcare BR-1005-30) の表面へのアミンカップリング (GE Healthcare Kit BR-1000-50) によって固定化された。注入時間は10 μl/min の流量で600秒で、2つのフローセルで12000 応答ユニット (RU) が得られ、1つはリファレンスとして使用し、もう1つはアクティブフローセルとして使用した。ランニングバッファはHBS-N (GE Healthcare BR-1006-70) だった。測定には、PBS-P+ (GE Healthcare 28-9950-84) をランニング及び希釈バッファとして使用した。フローセル温度は25 °C、サンプルコンパートメントは12 °C に設定した。流量は、ラン全体で10 μl/min に設定した。

30

【0320】

His タグ付きFAP 抗原は、20 μg/ml の濃度で180秒間アクティブフローセルに捕捉された。一次抗体と二次抗体 (FAP バインダー) を、両方のフローセルに10 μg/ml の濃度でそれぞれ120秒間連続して注入した。各サイクルの後、表面を10 mM グリシン pH 1.5 で60秒間再生成した (GE Healthcare BR-1003-54)。

【0321】

結果を、以下の表5に示す。

40

【表 5】

4 B 9 への抗 F A P 抗体の競合的結合

| | 4 B 9 | 2 0 9 | 2 1 0 | 2 1 1 | 2 1 2 | 2 1 4 |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 4 B 9 | 競合的結合 | 同時結合 | 同時結合 | 同時結合 | 同時結合 | 同時結合 |
| 2 0 9 | 同時結合 | 競合的結合 | 同時結合 | 同時結合 | 同時結合 | 同時結合 |
| 2 1 0 | 同時結合 | 同時結合 | 競合的結合 | 競合的結合 | 競合的結合 | 競合的結合 |
| 2 1 1 | 同時結合 | 同時結合 | 競合的結合 | 競合的結合 | 競合的結合 | 競合的結合 |
| 2 1 2 | 同時結合 | 同時結合 | 競合的結合 | 競合的結合 | 競合的結合 | 競合的結合 |
| 2 1 4 | 同時結合 | 同時結合 | 競合的結合 | 競合的結合 | 競合的結合 | 競合的結合 |

10

【 0 3 2 2】

したがって、3つのエピトープピンが同定された。要求に応じて、どの抗 F A P 抗体も抗体 4 B 9 (エピトープピン 1) との結合をめぐって競合しなかった。抗体 2 1 0、2 1 1、2 1 2、及び 2 1 4 は、結合について互いに競合し、従って 1 つの群を形成する (エピトープピン 3) が、抗体 2 0 9 は、他の抗体との結合について競合しなかった (エピトープピン 2)。

20

【 0 3 2 3】

1. 9 抗 F A P 抗体の熱安定性評価

試料を、20 mM ヒスチジン/ヒスチジクロリド、140 mM NaCl 中、pH 6.0 で 1 mg/mL の濃度にて調製し、0.4 μm フィルタープレートで遠心分離して光学 384 ウェルプレートに移し、パラフィンオイルで覆った。流体力学的半径は、サンプルを 25 ~ 80 まで 0.05 / 分の速度で加熱しながら、DynaPro プレートリーダー (ワイアット) で動的散乱法によって繰り返し測定される。あるいは、サンプルを 10 μL のマイクロキュベットアレイに移し、静的散乱データと 266 nm レーザーで励起したときの蛍光データを、それらが 25 ~ 90 まで 0.1 / 分の速度で加熱されている間、Optim 1000 装置 (Avacta Inc.) で記録した。凝集開始温度 (T_{agg}) は、流体力学的半径 (DLS) 又は散乱光強度 (Optim 1000) が増加し始める温度として定義される。融点は、蛍光強度対波長を示すグラフの変曲点として定義される。選択した抗 F A P 抗体の凝集開始温度を表 6 に示す。

30

【表 6】

抗 F A P 抗体の凝集開始温度

| | 4 B 9 | 2 0 9 | 2 1 0 | 2 1 2 | 2 1 4 |
|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| T _{agg} (°C) | 60 | 66 | 61 | 67 | 61 |

40

【 0 3 2 4】

抗 F A P クローン 2 1 2 は、抗体 4 B 9 と同等の高い親和性でヒト F A P に結合し、開発に有利な特性を示したため、ヒト化のために選択された。その配列のコンピュータ分析は、1つの予測される分解ホットスポット (位置 401 の Trp) のみを示した。マウスクローン 2 1 2 の配列を表 7 に示す。

50

【表 7】

マウス抗FAPクローン212の可変ドメインのアミノ酸配列

| 種 | 配列 | 配列番号 |
|--------------|--|------|
| FAP (212) VH | EVLLQQSGPELVKPGASVKIACK ASGYTLT <u>LDYNMD</u> WVRQSHGKSL WIGDIYPNTGGTIYNQKFKGKAT LTIKSSSTAYMDLRSLSLTS EDTAVYYCTR <u>FRGIHYAMDY</u> WGQGT SVTVSS | 9 |
| FAP (212) VL | DIVLTQSPVSLAVSLGQRATISC <u>RASESVDNYGLSF</u> INWVQKPGQ PPKLLIY <u>GTSNRGSG</u> VPARFSGS GSGTDFSLNIHPMEEDDTAMYFC QQSNEVPYTFGGGTNLEIK | 10 |

10

【0325】

1.10 抗FAPクローン212のヒト化

1.10.1 方法論

適切なヒトアクセプターフレームワークは、ヒトV及びJ領域配列のBLASTpデータベースにマウス入力配列（可変部分に植え付けられた）を照会することによって特定された。ヒトアクセプターフレームワークを選択するための選択基準は、配列相同性、同じ又は類似のCDR長、及びヒト生殖系列の推定頻度だったが、VH-VLドメインインターフェースでの特定のアミノ酸の保存でもあった。生殖系列の同定ステップに続いて、マウス入力配列のCDRをヒトアクセプターフレームワーク領域に移植した。これらの最初のCDR移植片と親抗体の間の各アミノ酸の違いは、それぞれの可変領域の構造的完全性への影響の可能性について評価され、親配列に対する「逆突然変異」が適切と思われる場合はいつでも導入された。構造評価は、Biovia Discovery Studio Environment、バージョン17R2を使用して実装した、社内で抗体構造相同性モデリングプロトコルにより作製し、親抗体とヒト化変異体の両方のFv領域相同性モデルに基づいた。いくつかのヒト化変異体には、「順突然変異」、すなわち、親バインダーの所与のCDR位置で発生する元のアミノ酸をヒト受容体生殖系列の同等の位置で見られるアミノ酸に変更するアミノ酸交換が含まれていた。目的は、免疫原性のリスクを更に低減するために、（フレームワーク領域を超えて）ヒト化変異体の全体的な人間性を高めることである。

20

30

【0326】

社内で開発されたコンピュータツールを使用して、対になったVH及びVLヒト化変異体のVH-VLドメイン配向を予測した（国際公開第2016/062734号を参照）。結果を親バインダーの予測されたVH-VLドメイン配向と比較して、元の抗体に形状が近いフレームワークの組み合わせを選択した。理論的根拠は、バインディングプロパティに悪影響を与える可能性がある2つのドメインのペアリングに破壊的な変化をもたらす可能性のあるVH-VLインターフェース領域でのアミノ酸交換の可能性を検出することである。

40

【0327】

1.10.2 アクセプターフレームワークの選択及びその適合
次のアクセプターフレームワークを選択した。

50

【表 8】

アクセプターフレームワーク

| | マウスV領域生殖系列 | グラフト変異体 | ヒトアクセプターV領域生殖系列の選択 | 移植後のヒトV領域生殖系列との同一性 (BLASTp): |
|---------------------|-----------------------|---------|-----------------------|------------------------------|
| F A P (2 1 2) V H | I G H V 1 - 1 8 * 0 1 | V H 1 | I G H V 1 - 4 6 * 0 1 | 8 7 . 8 % |
| | | V H 2 | I G H V 3 - 2 3 * 0 3 | 8 2 . 7 % |
| F A P (2 1 2) V L | I G K V 3 - 2 * 0 1 | V L 1 | I G K V 3 - 1 1 * 0 1 | 8 5 . 1 % |
| | | V L 2 | I G K V 1 - 3 9 * 0 1 | 8 2 . 8 % |

10

【0328】

ポストCDR3フレームワーク領域は、ヒトIGHJ生殖系列IGHJ6*01/02 (YYYYYGMDVWVGQGTTVTVSS)及びヒトIGKJ生殖系列IGKJ4*01/02 (LTFGGGTKVEIK)から適合された。アクセプターフレームワークに関連する部分は太字で示されている。

20

【0329】

構造上の考慮事項に基づいて、ヒトアクセプターフレームワークから親バインダーのアミノ酸への逆突然変異が、H43 (Q>K)、H44 (G>S)、H48 (M>I)、H71 (R>I)、H73 (T>K)、H93 (A>T) [VH1]、H49 (S>G)、H71 (R>I)、H73 (N>K)、H78 (L>A)、H93 (A>T)、H94 (K>R) [VH2]、L36 (Y>F)、L43 (A>P)、L87 (Y>F) [VL1]及びL36 (Y>F)、L42 (K>Q)、L43 (A>P)、L85 (T>M)、L87 (Y>F) [VL2]の位置に導入された。

【0330】

更に、位置H60 (N>A)、H64 (K>Q) [VH1]、H60 (N>A)、H61 (Q>D)、H62 (K>S)、H63 (F>V) [VH2]、L33 (I>L)、L34 (N>A) [VL1]及びL27b (V>I)、L33 (I>L) [VL2]は、順突然変異の有望な候補として同定された。全ての位置は、Kabat EUの番号付けスキームで与えられる。

30

40

50

【表 9】

変異体のリスト

| 変異体名 | 逆／順突然変異 | ヒトV領域生殖系列 (BLASTp) との同一性 |
|------------|---|--------------------------|
| VH1G1 a | bM48I、bR71I、bA93T | 84.7% |
| VH1G2 a | bQ43K、bG44S、bM48I、bR71I、bT73K、bA93T | 81.6% |
| VH1G3 a | bM48I、fN60A、fK64Q、bR71I、bA93T | 86.7% |
| VH2G1 a | bS49G、bA93T、bK94R | 79.6% |
| VH2G2 a | bS49G、bR71I、bN73K、bL78A、bA93T、bK94R | 76.5% |
| VH2G3 a | bS49G、fN60A、fQ61D、fK62S、fF63V、bA93T、bK94R | 83.7% |
| VL1G1 a | bY36F、bY87F | 83% |
| VL1G2 a | bY36F、bA43P、bY87F | 81.9% |
| VL1G3 a | fI33L、fN34A、bY36F、bY87F | 85.1% |
| VL2G1 a | bY36F、bY87F | 80.8% |
| VL2G2 a | bY36F、bK42Q、bA43P、bT85M、bY87F | 77.8% |
| VL2G3 a | fV27bI、fI33L、bY36F、bY87F | 82.8% |

10

20

【0331】

注：逆突然変異の前にはbが付いており、順突然変異にはfが付いている。例えば、bM48Iは、48位 (Kabatt) のメチオニンからイソロイシンへの逆突然変異 (ヒト生殖系列アミノ酸から親抗体アミノ酸) を指す。

【0332】

アクセプターフレームワークに基づいて得られたヒト化FAP抗体のVH及びVLドメインは、以下の表10に見出すことができる。

30

40

50

【表 10】

ヒト化FAP抗体のVH及びVLドメインのアミノ酸配列

| 種 | 配列 | 配列番号 |
|--------|--|------|
| VH1G1a | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTLT <u>TDYNMDWVRQAPGQGLEWIGDIY</u> <u>PNTGGTIYNQKFKGRVTMTIDTSTST</u> VYME LSSLRSEDTAVYYCTR <u>FRG IHY</u> AMDYWGQGT TVT VSS | 15 |
| VH1G2a | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTLT <u>TDYNMDWVRQAPGKSLWIGDIY</u> <u>PNTGGTIYNQKFKGRVTMTIDKSTST</u> VYME LSSLRSEDTAVYYCTR <u>FRG IHY</u> AMDYWGQGT TVT VSS | 16 |
| VH1G3a | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YTLT <u>TDYNMDWVRQAPGQGLEWIGDIY</u> <u>PNTGGTIYAQKFKGRVTMTIDTSTST</u> VYME LSSLRSEDTAVYYCTR <u>FRG IHY</u> AMDYWGQGT TVT VSS | 17 |
| VH2G1a | EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASG YTLT <u>TDYNMDWVRQAPGKGLEWVGDYIY</u> <u>PNTGGTIYNQKFKGRFTISRDNSKNT</u> LYLQ MNSLRAEDTAVYYCTR <u>FRG IHY</u> AMDYWGQGT TVT VSS | 18 |
| VH2G2a | EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASG YTLT <u>TDYNMDWVRQAPGKGLEWVGDYIY</u> <u>PNTGGTIYNQKFKGRFTISIDKSKNT</u> AYLQ MNSLRAEDTAVYYCTR <u>FRG IHY</u> AMDYWGQGT TVT VSS | 19 |
| VH2G3a | EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASG YTLT <u>TDYNMDWVRQAPGKGLEWVGDYIY</u> <u>PNTGGTIYADSVKGRFTISRDNSKNT</u> LYLQ MNSLRAEDTAVYYCTR <u>FRG IHY</u> AMDYWGQGT TVT VSS | 20 |
| VL1G1a | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS <u>ESVDNYGLSFINWFQQKPGQAPRLLI</u> <u>YGTSNRGSGIPARFSGSGSGTDFTLT</u> ISSLEPEDFAVYFC <u>QQSNEVPYTFGG</u> GTKVEIK | 21 |
| VL1G2a | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS <u>ESVDNYGLSFINWFQQKPGQPRLLI</u> <u>YGTSNRGSGIPARFSGSGSGTDFTLT</u> ISSLEPEDFAVYFC <u>QQSNEVPYTFGG</u> GTKVEIK | 22 |
| VL1G3a | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS <u>ESVDNYGLSFLAWFQQKPGQAPRLLI</u> <u>YGTSNRGSGIPARFSGSGSGTDFTLT</u> ISSLEPEDFAVYFC <u>QQSNEVPYTFGG</u> GTKVEIK | 23 |
| VL2G1a | DIQMTQSPSSLSASV GDRVTITCRAS <u>ESVDNYGLSFINWFQQKPGKAPKLLI</u> <u>YGTSNRGSGVPSRFSGSGSGTDFTLT</u> ISSLQPEDFATYFC <u>QQSNEVPYTFGG</u> | 24 |

10

20

30

40

50

| | | |
|-------------|---|-----|
| | G T K V E I K | |
| V L 2 G 2 a | <u>D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S</u> <u>E S V D N Y G L S F I N W F Q Q K P G Q P P K L L I</u> <u>Y G T S N R G S G V P S R F S G S G S G T D F T L T</u> I S S L Q P E D F A M Y F C <u>Q Q S N E V P Y T F G G</u> G T K V E I K | 2 5 |
| V L 2 G 3 a | <u>D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S</u> <u>E S I D N Y G L S F L N W F Q Q K P G K A P K L L I</u> <u>Y G T S N R G S G V P S R F S G S G S G T D F T L T</u> I S S L Q P E D F A T Y F C <u>Q Q S N E V P Y T F G G</u> G T K V E I K | 2 6 |

10

【 0 3 3 3 】

1 . 1 0 . 3 新しいヒト化抗 F A P F a b

V H 及び V L の新しいヒト化変異体に基づいて、新しい抗 F A P F a b が発現された。

【表 1 1】

F a b として表される V H / V L の組み合わせの命名法

| | V L 1 G 1 a | V L 1 G 2 a | V L 1 G 3 a | V L 2 G 1 a | V L 2 G 2 a | V L 2 G 3 a |
|----------------|--------------------|--------------------|----------------|----------------|--------------------|----------------|
| V H 1 G 1 a | P 1 A E 1 6 8 9 | | | | | |
| V H 1 G 2 a | P 1 A E 1 6 9 0 | P 1 A E 1 6 9 3 | | | | |
| V H 1 G 3 a | | | | | | |
| V H 2 G 1 a | | | | | | |
| V H 2 G 2 a | | | | | P 1 A E 1 7 0 2 | |
| V H 2 G 3 a | | | | | | |

20

30

【 0 3 3 4 】

クローン 2 1 2 に基づく新しいヒト化抗 F A P 変異体の親和性を、抗 F A P 抗体 4 B 9 と比較して分析した。更に、ヒト化変異体のヒト性を計算し、その凝集開始温度を測定した。

40

50

【表 1 2】

B i a c o r e によって測定されたクローン 2 1 2 のヒト化変異体の親和性

| サンプル I D | k_a (1/Ms) | k_d (1/s) | KD (pM) | $T_{1/2}$ (分) | h u V 生殖系列 への同一 性 | T_{agg} [°C] |
|---------------------------|-------------------|-------------------|------------|------------------|----------------------------|-------------------|
| P 1 A E 1 6 8 9__F a b | 4. 4 3 E + 0 5 | 4. 2 1 E - 0 5 | 9 5 | 2 7 4 | 8 3 / 8 4, 7 | 7 2, 7 |
| P 1 A E 1 6 9 0__F a b | 5. 5 1 E + 0 5 | 6. 3 0 E - 0 5 | 1 1 4 | 1 8 3 | 8 3 / 8 1, 7 | 7 5, 4 |
| P 1 A E 1 6 9 3__F a b | 5. 3 0 E + 0 5 | 7. 1 8 E - 0 5 | 1 3 5 | 1 6 1 | 8 1, 9 / 8 1, 7 | 7 5, 4 |
| P 1 A E 1 7 0 2__F a b | 5. 0 2 E + 0 5 | 1. 0 7 E - 0 4 | 2 1 3 | 1 0 8 | 7 7, 8 / 7 6, 5 | 7 1, 6 |
| 4 B 9__F a b | 7. 4 7 E + 0 5 | 2. 0 8 E - 0 4 | 2 7 9 | 5 5 | | 6 0 |

10

【 0 3 3 5】

1 . 11 F c R n /ヘパリン結合とコンピュータ電荷分布

P B S、p H 7 . 4 における抗体 4 B 9 及び P 1 A E 1 6 8 9 の電荷分布は、コンピュータモデルで計算された。モデルによると、4 B 9 には大きな陽性パッチがあり、ヘパリン結合の増加と相関することがある。一方、P 1 A E 1 6 8 9 は、ヘパリンの相互作用が弱いことを示す可能性のある大きな負電荷パッチを示す。

20

【 0 3 3 6】

これらの予測は、F c R n 親和性カラム及び p H 勾配、並びにヘパリン親和性カラム及び p H 勾配を使用した両方の抗体のクロマトグラフィーによって確認された。国際公開第 2 0 1 5 / 1 4 0 1 2 6 号は、F c R n 親和性クロマトグラフィーカラムで決定された保持時間に基づいて抗体のインビボ半減期を予測する方法を開示しているが、ヘパリン結合は細胞表面構造との非特異的相互作用と相関している。

30

【 0 3 3 7】

実施例 2

抗 C D 4 0 抗体 S 2 C 6 のヒト化変異体の生成と産生

2 . 1 抗 C D 4 0 抗体 S 2 C 6 のヒト化変異体の生成

2 . 2 . 1 方法論

【 0 3 3 8】

抗 C D 4 0 バインダー S 2 C 6 のヒト化中の適切なヒトアクセプターフレームワークの同定のために、2 つの方法論の組み合わせが使用された。一方では、高い配列相同性を備えたアクセプターフレームワークを検索し、このフレームワークに C D R を移植し、どの逆突然変異を想定できるかを評価することにより、古典的なアプローチが採用された。より明示的には、親抗体に対する、識別したフレームワークの各アミノ酸の違いの、バインダーに対する構造的完全性の影響を判断し、適切な場合はいつでも、親配列に対する逆突然変異を導入した。構造評価は、親抗体、及び、B i o v i a D i s c o v e r y S t u d i o E n v i r o n m e n t , バージョン 4 . 5 を使用して実装した、社内で抗体構造相同性モデリングツールにより作製したそのヒト化版の両方の F v 領域相同性モデルに基いた。

40

【 0 3 3 9】

他方、社内で開発されたコンピュータツールを使用して、ヒト化バージョンの V H 及び V L ドメインの互いに対する方向を予測した（参照により本明細書に組み込まれる国際公開第 2 0 1 6 0 6 2 7 3 4 号を参照）。結果を親バインダーの予測された V H - V L ドメ

50

イン配向と比較して、開始抗体に形状に近いフレームワークの組み合わせを選択した。理論的根拠は、2つのドメインのペアリングに破壊的な変化をもたらす可能性のあるVH-VLインターフェース領域でのアミノ酸交換の可能性を検出することである。

【0340】

2.2.2 アクセプターフレームワークの選択及びその適合

以下の表16及び表18に記載されているように、2つの異なるアクセプターフレームワークが選択された。

【表13】

アクセプターフレームワーク1「IGHV1-IGKV2D」

| | マウスV領域生殖系列 | ヒトアクセプターV領域生殖系列の選択 | 移植後のヒトV領域生殖系列との同一性 (BLASTp): |
|------------|--------------|--------------------|------------------------------|
| S2C6 VH | IGHV1-26*01 | IGHV1-2*05 | 91.8% |
| S2C6 VL | IGKV1-110*01 | IGKV2D-29*02 | 88.0% |

10

【0341】

ポストCDR3フレームワーク領域は、ヒトIGHJ生殖系列IGHJ6*01/02 (YYYYYGMDVWGQGTTVTVSS)及びヒトIGKJ生殖系列IGKJ4*01/02 (LTFGGGTKVEIK)から適合された。アクセプターフレームワークに関連する部分は太字で示されている。

20

【0342】

構造上の考慮事項に基づいて、ヒトアクセプターフレームワークから親バインダーのアミノ酸への逆突然変異が、VH領域の位置H43 (Q>K)、H44 (G>S)、H69 (M>L)、H71 (R>V)、H73 (T>K)、H88 (V>A)及びH105 (Q>H)、VL領域の位置L2 (I>V)、L4 (M>V)、L87 (Y>F)及びL104 (V>L)に導入された。1つの変異体では、この位置でわずかに親水性の高い残基の効果を研究するために、突然変異T70S (VH)が含まれていた。

30

【0343】

全ての変異体には、推定される開発可能性のホットスポット (アスパラギンの脱アミド化) に対処するためのN54A突然変異 (VH)が含まれている。全ての位置は、Kabat EUの番号付けスキームで与えられる。

【0344】

次の表14に、ヒト化変異体のVH-VLペアリングマトリックスを示す。

40

50

| | | V L 1 a | V L 1 b | V L 1 c | V L 1 d |
|---------|---|-----------|-----------------------|-----------------------------------|---|
| | | b Y 8 7 F | b M 4 V、 b Y 8 7 F | b I 2 V、 b M 4 V、 b Y 8 3 F | b I 2 V、 b M 4 V、 b Y 7 8 3 F、 b V 1 0 4 L |
| V H 1 a | b G 4 4 S、b M 6 9 L、b R 7 1 V、b T 7 3 K、b V 8 8 A | x | x | x | x |
| V H 1 b | b Q 4 3 K、b G 4 4 S、b M 6 9 L、b R 7 1 V、b T 7 3 K、b V 8 8 A | x | x | x | x |
| V H 1 c | b G 4 4 S、b M 6 9 L、b R 7 1 V、b T 7 3 K、b V 8 8 A、b Q 1 0 5 H | x | x | x | x |
| V H 1 d | b G 4 4 S、b M 6 9 L、b R 7 1 V、b T 7 3 K、b V 8 8 A、x T 7 0 S | x | x | x | x |

10

20

突然変異 N 5 4 A は、全ての V H 変異体に適用され、明示的には言及されていない。接頭辞 b が付いたものが、逆突然変異、接頭辞 f が付いたものが、順突然変異、及び接頭辞 x が付いたものが、その他の突然変異

【表 1 5】

アクセプターフレームワーク 2 「I G H V 3 - I G K V 1」

| | マウス V 領域生殖系列 | ヒトアクセプター V 領域生殖系列の選択 | 移植後のヒト V 領域生殖系列との同一性 (BLAST p) : |
|----------------|----------------------------|--------------------------|----------------------------------|
| S 2 C 6 V H | I G H V 1 - 2 6 * 0 1 | I G H V 3 - 2 3 * 0 2 | 7 9 . 6 % |
| S 2 C 6 V L | I G K V 1 - 1 1 0 * 0 1 | I G K V 1 - 3 9 * 0 1 | 7 9 . 0 % |

30

【0 3 4 5】

ポスト C D R 3 フレームワーク領域は、ヒト I G H J 生殖系列 I G H J 6 * 0 1 / 0 2 (Y Y Y Y Y G M D V W G Q G T T V T V S S) 及びヒト I G K J 生殖系列 I G K J 4 * 0 1 / 0 2 (L T F G G G T K V E I K) から適合された。アクセプターフレームワークに関連する部分は太字で示されている。

【0 3 4 6】

構造上の考慮事項に基づいて、ヒトアクセプターフレームワークから親バインダーのアミノ酸への逆突然変異が、V H 領域の位置 H 4 4 (G > S)、H 4 9 (S > G)、H 7 1 (R > V)、H 7 8 (L > A)、H 9 4 (K > R) 及び H 1 0 5 (Q > H)、並びに V L 領域の位置 L 4 2 (K > Q)、L 4 3 (A > S) 及び L 8 7 (Y > F) に導入された。更に、C D R - H 2 の 4 つの位置、すなわち、H 6 0 (N > G)、H 6 1 (Q > D)、H 6 2 (K > S) 及び H 6 3 (F > V) は、全体的な人間の特性を高めるための、親バインダーからヒトアクセプター生殖系列へのアミノ酸交換などの順突然変異の有望な候補として特定された。

40

【0 3 4 7】

全ての変異体には、推定される開発可能性のホットスポット (アスパラギンの脱アミド

50

化) に対処するための N 5 4 A 突然変異 (V H) が含まれている。全ての位置は、 K a b a t E U の番号付けスキームで与えられる。

【 0 3 4 8 】

次の表 1 6 に、ヒト化変異体の V H - V L ペアリングマトリックスを示す。

| | | V L 2 a | V L 2 b |
|---------|---|-----------|---------------------------------------|
| | | b Y 8 7 F | K 4 2 Q 、 b A 4 3 S 、 b Y 8 7 F |
| V H 2 a | b S 4 9 G 、 b R 7 1 V 、 b L 7 8 A 、 b K 9 4 R | x | x |
| V H 2 b | b G 4 4 S 、 b S 4 9 G 、 b R 7 1 V 、 b L 7 8 A 、 b K 9 4 R | x | x |
| V H 2 c | b S 4 9 G 、 b R 7 1 V 、 b L 7 8 A 、 b K 9 4 R 、 b Q 1 0 5 H | x | x |
| V H 2 d | b S 4 9 G 、 f N 6 0 G 、 f Q 6 1 D 、 f K 6 2 S 、 f F 6 3 V 、 b R 7 1 V 、 b L 7 8 A 、 b K 9 4 R | x | x |

10

20

接頭辞 b が付いたものが、逆突然変異、接頭辞 f が付いたものが、順突然変異

【 0 3 4 9 】

2 . 2 . 3 得られるヒト化 C D 4 0 抗体の V H 及び V L ドメイン

アクセプターフレームワーク 1 に基づくヒト化 C D 4 0 抗体の結果の V H 及び V L ドメインは、以下の表 1 7 に見出すことができ、アクセプターフレームワーク 2 に基づくヒト化 C D 4 0 抗体の結果の V H 及び V L ドメインを以下の表 1 8 に示す。

30

40

50

【表 17】

アクセプターフレームワーク 1 に基づくヒト化 CD40 抗体の VH 及び VL ドメインのアミノ酸配列

| 種 | 配列 | 配列番号 |
|-------|---|------|
| VH1 a | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYS FTGYYIHWVRQAPGQSLEWMGRVIPNAG GTSYNQKFKGRVTLTVDKSISTAYMELS RLRSDDTAVYYCARE <u>EGIYW</u> WGQGT T V T V SS | 37 |
| VH1 b | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYS FTGYYIHWVRQAPGKSLLEWMGRVIPNAG GTSYNQKFKGRVTLTVDKSISTAYMELS RLRSDDTAVYYCARE <u>EGIYW</u> WGQGT T V T V SS | 38 |
| VH1 c | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYS FTGYYIHWVRQAPGQSLEWMGRVIPNAG GTSYNQKFKGRVTLTVDKSISTAYMELS RLRSDDTAVYYCARE <u>EGIYW</u> WGHG T T V T V SS | 39 |
| VH1 d | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYS FTGYYIHWVRQAPGQSLEWMGRVIPNAG GTSYNQKFKGRVTLTVDKSISTAYMELS RLRSDDTAVYYCARE <u>EGIYW</u> WGQGT T V T V SS | 40 |
| VL1 a | DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQS LVHSNGNTFLHWYLQKPGQSPQLLIYTV SNRFSGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVE AEDVGVYFC <u>SQTTHVPWT</u> FGGGTKVEIK | 41 |
| VL1 b | DIVVTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQS LVHSNGNTFLHWYLQKPGQSPQLLIYTV SNRFSGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVE AEDVGVYFC <u>SQTTHVPWT</u> FGGGTKVEIK | 42 |
| VL1 c | DVVVTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQS LVHSNGNTFLHWYLQKPGQSPQLLIYTV SNRFSGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVE AEDVGVYFC <u>SQTTHVPWT</u> FGGGTKVEIK | 43 |
| VL1 d | DVVVTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQS LVHSNGNTFLHWYLQKPGQSPQLLIYTV SNRFSGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVE AEDVGVYFC <u>SQTTHVPWT</u> FGGGTKLEIK | 44 |

10

20

30

40

50

【表 18】

アクセプターフレームワーク 2 に基づくヒト化 CD40 抗体の VH 及び VL ドメインのアミノ酸配列

| 種 | 配列 | 配列番号 |
|----------|--|------|
| VH 2 a | EVQLLES GGG L V Q P G G S L R L S C A A S G Y S F T <u>G Y Y I H W V R Q A P G K G L E W V G R V I P N A G</u> <u>G T S Y N Q K F K G R F T I S V D N S K N T A Y L Q M N</u> S L R A E D T A V Y Y C A R E <u>E G I Y W W G Q G T T V T V</u> S S | 45 |
| VH 2 b | EVQLLES GGG L V Q P G G S L R L S C A A S G Y S F T <u>G Y Y I H W V R Q A P G K S L E W V G R V I P N A G</u> <u>G T S Y N Q K F K G R F T I S V D N S K N T A Y L Q M N</u> S L R A E D T A V Y Y C A R E <u>E G I Y W W G Q G T T V T V</u> S S | 46 |
| VH 2 c | EVQLLES GGG L V Q P G G S L R L S C A A S G Y S F T <u>G Y Y I H W V R Q A P G K G L E W V G R V I P N A G</u> <u>G T S Y N Q K F K G R F T I S V D N S K N T A Y L Q M N</u> S L R A E D T A V Y Y C A R E <u>E G I Y W W G H G T T V T V</u> S S | 47 |
| VH 2 d | EVQLLES GGG L V Q P G G S L R L S C A A S G Y S F T <u>G Y Y I H W V R Q A P G K G L E W V G R V I P N A G</u> <u>G T S Y G D S V K G R F T I S V D N S K N T A Y L Q M N</u> S L R A E D T A V Y Y C A R E <u>E G I Y W W G Q G T T V T V</u> S S | 48 |
| VH 2 a b | EVQLLES GGG L V Q P G G S L R L S C A A S G Y S F T <u>G Y Y M H W V R Q A P G K G L E W V G R V I P N A G</u> <u>G T S Y N Q K F K G R F T I S V D N S K N T A Y L Q M N</u> S L R A E D T A V Y Y C A R E <u>E G I Y W W G Q G T T V T V</u> S S | 49 |
| VH 2 a c | EVQLLES GGG L V Q P G G S L R L S C A A S G Y S F T <u>G Y Y I H W V R Q A P G K G L E W V G R V I P N A G</u> <u>G T S Y N Q K V K G R F T I S V D N S K N T A Y L Q M N</u> S L R A E D T A V Y Y C A R E <u>E G I Y W W G Q G T T V T V</u> S S | 50 |
| VL 2 a | D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C <u>R S S Q S</u> <u>L V H S N G N T F L H W Y Q Q K P G K A P K L L I Y T V</u> <u>S N R F S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q</u> P E D F A T Y F C S <u>Q T T H V P W T F G G G T K V E I K</u> | 51 |
| VL 2 b | I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C <u>R S S Q S L</u> <u>V H S N G N T F L H W Y Q Q K P G Q S P K L L I Y T V S</u> <u>N R F S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P</u> E D F A T Y F C S <u>Q T T H V P W T F G G G T K V E I K</u> | 52 |
| VL 2 a b | D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C <u>R A S Q S</u> <u>L V H S N G N T F L H W Y Q Q K P G K A P K L L I Y T V</u> <u>S N R F S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q</u> P E D F A T Y F C S <u>Q T T H V P W T F G G G T K V E I K</u> | 53 |
| VL 2 a c | D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C <u>R S S Q S</u> <u>I V H S N G N T F L H W Y Q Q K P G K A P K L L I Y T V</u> <u>S N R F S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q</u> P E D F A T Y F C S <u>Q T T H V P W T F G G G T K V E I K</u> | 54 |

10

20

30

40

【0350】

2.2.4 hu IgG1__LALA__PGフォーマットの新しいヒト化 CD40 抗体
VH 及び VL の新しいヒト化変異体に基づいて、新しい CD40 抗体は、国際公開第 2012/130831A1 号に記載されている方法に従って、Fc 受容体への結合を無効にするエフェクターサイレント Fc (P329G; L234、L235A) を備えた hu IgG1 抗体として発現された。

【表 19】

h u I g G 1 _ L A L A _ P G 抗体として発現した V H / V L の組み合わせに関する命名法

| | V L 1 a | V L 1 b | V L 1 c | V L 1 d | V L 2 a | V L 2 b | V L 2 a b | V L 2 a c |
|-----------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| V H 1 a | P 1 A E 0 8 1 7 | P 1 A E 1 0 0 1 | P 1 A E 0 9 9 3 | P 1 A E 0 9 9 6 | | | | |
| V H 1 b | P 1 A E 1 0 0 2 | P 1 A E 1 0 0 3 | P 1 A E 1 0 0 4 | P 1 A E 1 0 0 5 | | | | |
| V H 1 c | P 1 A E 0 9 9 7 | P 1 A E 1 0 0 6 | P 1 A E 0 8 1 8 | P 1 A E 0 9 9 8 | | | | |
| V H 1 d | P 1 A E 0 9 9 9 | P 1 A E 1 0 0 7 | P 1 A E 1 0 0 0 | P 1 A E 0 8 1 9 | | | | |
| V H 2 a | | | | | P 1 A E 0 4 0 0 | P 1 A E 0 4 0 4 | | |
| V H 2 b | | | | | P 1 A E 0 4 0 1 | P 1 A E 0 4 0 5 | | |
| V H 2 c | | | | | P 1 A E 0 4 0 2 | P 1 A E 0 4 0 6 | | |
| V H 2 d | | | | | P 1 A E 0 4 0 3 | P 1 A E 0 4 0 7 | | |
| V H 2 a b | | | | | | | P 1 A E 1 1 2 5 | P 1 A E 1 1 2 6 |
| V H 2 a c | | | | | | | P 1 A E 1 1 3 4 | P 1 A E 1 1 3 5 |

10

【 0 3 5 1 】

ヒト I g G 1 _ L A L A P G 抗体としてのヒト化 C D 4 0 抗体の例示的な完全長配列は、表 2 0 に見出すことができる。

20

30

40

50

【表 20】

ヒト化CD40 I g G 1 _ L A L A P G 抗体のアミノ酸配列

| 抗体 | 配列 | 配列番号 |
|----------------|---|------|
| P1AE040 0重鎖 | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GYSFTGYYIHWVRQAPGKGLEWVGR VIPNAGGTSYNQKFKGRFTISVDNS KNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAREG IYWWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL GAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG | 55 |
| P1AE040 0軽鎖 | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRS SQSLVHSNGNTFLHWYQQKPKGKAPK LLIYTVSNRFSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSSLQPEDFATYFCSQTTHVP WTFGGGTKEVEIKRTVAAPSVEFI FPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC | 56 |
| P1AE040 3重鎖 | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GYSFTGYYIHWVRQAPGKGLEWVGR VIPNAGGTSYGDVSKGRFTISVDNS KNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAREG IYWWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL GAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPG | 60 |
| P1AE040 3軽鎖 | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRS SQSLVHSNGNTFLHWYQQKPKGKAPK LLIYTVSNRFSGVPSRFSGSGSGTD FTLTISSSLQPEDFATYFCSQTTHVP WTFGGGTKEVEIKRTVAAPSVEFI FPP | 61 |

10

20

30

40

50

| | | |
|----------------|--|----|
| | SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC | |
| P1AE081 7重鎖 | VQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASG YSFTGYYIHWVRQAPGQSLEWMGRV IPNAGGTSYNQKFKGRVTLTVDKSI STAYMELSRRLRSDDTAVYYCAREGI YWWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPPLA PSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKEVEPKSCDKTHTCPPC PAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALG APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPG | 62 |
| P1AE081 7軽鎖 | DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRS SQSLVHSNGNTFLHWYLLQKPGQSPQ LLIYTVSNRFSGVPDRFSGSGSGTD FTLKISRVEAEDVGVYFCSQTTHVP WTFGGGTKVEIKRTVAAPSVEIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC | 63 |

10

20

【0352】

2.2.5 huIgG1__LALA__PGフォーマットでの新しいヒト化CD40抗体の産生

抗体は、異なるペプチド鎖をコードする発現ベクターを用いて、懸濁液中で増殖させたHEK293-F細胞の一過性トランスフェクションによって発現された。HEK293-F細胞(Invitrogen、USA)へのトランスフェクションは、抗体ベクターのMaxiprep(Qiagen、ドイツ)調製物、F17ベースの培地(Invitrogen、USA)、PEIpro(Polyscience Europe GmbH)、及び無血清FreeStyle 293発現培地(Invitrogen)での初期細胞密度が100~200万生細胞/mlを使用して、細胞供給業者の指示に従って実施した。振とうフラスコ又は攪拌発酵槽で7日間培養した後、14000gで30分間遠心分離して細胞培養上清を回収し、0.22µmフィルターにかけた。

30

40

【0353】

抗体は、MabSelectSure-Sepharose(商標)(GE Healthcare、スウェーデン)クロマトグラフィーを使用した親和性クロマトグラフィーによって細胞培養上清から精製された。簡単に説明すると、滅菌フィルターにかけた細胞培養上清を、PBSバッファー(10mM Na₂HPO₄、1mM KH₂PO₄、137mM NaCl及び2.7mM KCl、pH7.4)で平衡化したMabSelectSure樹脂で捕捉し、平衡化バッファーで洗浄し、25mMクエン酸塩、pH3.0、続いて1M Tris pH9.0で中和することにより、溶出した。ProteinA精製後に受け取った製品の品質に応じて、ブチルセファロース4FF(GE Health

50

care、スウェーデン)樹脂を使用した疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)精製ステップが含まれていた。HIC精製の前に、タンパク質をHIC平衡バッファーに対して透析した。HIC精製は、平衡化/洗浄バッファーとして40mM酢酸塩、1.5M硫酸アンモニウム、pH5.5、溶出バッファーとして40mM酢酸塩 pH5.5を使用して行い、直線勾配を適用して精製した。続いて、凝集したタンパク質は、20mMヒスチジン、140mM NaCl、pH6.0でのサイズ排除クロマトグラフィー(Superdex 200、GE Healthcare)によって、単量体抗体種から分離した。単量体タンパク質画分をプールし、必要に応じて、例えば、MILLIPORE Amicon Ultra (30KD MWCO)遠心分離濃縮器を用いて濃縮し、-80

で保存した。サンプルの一定分量は、CE-SDS、サイズ排除クロマトグラフィー、質量分析、及びエンドトキシン測定によるその後の分析特性評価に使用された。

10

【0354】

さまざまなヒト化CD40抗体の産生収量を、MabSelect Sure-Sepharose(商標)クロマトグラフィーを使用した分取親和性クロマトグラフィー後の収量から計算された力価として表21に示す。

【0355】

最終精製ステップ後の分子の純度と分子量は、還元剤の存在下と非存在下でCE-SDS分析によって分析された。Caliper LabChip GXIIシステム(Caliper Lifescience)が、製造元の指示に従って使用された。

【0356】

分子の凝集体含有量は、25mM リン酸カリウム、125mM 塩化ナトリウム、200mM L-アルギニン塩酸塩、0.02%(w/v)NaN₃、25でのpH6.7ランニングバッファーで、TSKgel G3000 SW XL分析サイズ排除カラム(東ソー)を使用して分析した。

20

【0357】

全ての抗体を直接比較するために、静的光散乱(SLS)と、加えられた温度ストレスにตอบสนองした固有のタンパク質蛍光を測定することにより、熱安定性をモニターした。タンパク質濃度が1mg/mlのフィルターにかけたタンパク質サンプル30μgを、Optim 2機器(Avacta Analytical Ltd)に2回ずつ適用した。温度は0.1/分で25~85に上昇し、半径と総散乱強度が収集された。固有のタンパク質蛍光を測定するために、サンプルを266nmで励起し、275nm~460nmでの発光を収集した。全ての抗体について、凝集温度(Tagg)は64~69の間であり、以下の表21又は表22に示されている。

30

【0358】

異なるフレームワークを用いたヒト化CD40抗体の産生収率を以下の表21又は表22に提供する。

40

50

【表 2 1】

アクセプターフレームワーク 2 に基づくヒト化 CD 4 0 抗体の産生力価、ヒト性及び集温度

| 抗体 | VH-VL | 力価 [μ g / ml] | ヒト性 (VH / VL (%)) | T _{agg} |
|--------------------|----------------------|--------------------|-------------------|------------------|
| P 1 A D 4 4 7 0 | コントロール | 1 4 0 | 7 7 . 6 / 7 8 | 6 8 |
| P 1 A E 0 4 0 0 | V L 2 a / V H 2 a | 2 1 9 | 7 7 . 6 / 7 8 | 6 9 |
| P 1 A E 0 4 0 1 | V L 2 a / V H 2 b | 1 6 2 | 7 6 . 5 / 7 8 | 6 9 |
| P 1 A E 0 4 0 2 | V L 2 a / V H 2 c | 1 9 6 | 7 7 . 6 / 7 8 | 6 9 |
| P 1 A E 0 4 0 3 | V L 2 a / V H 2 d | 1 3 7 | 8 0 . 6 / 7 8 | 6 7 |
| P 1 A E 0 4 0 4 | V L 2 b / V H 2 a | 1 6 5 | 7 7 . 6 / 7 6 | 6 9 |
| P 1 A E 0 4 0 5 | V L 2 b / V H 2 b | 1 2 8 | 7 6 . 5 / 7 6 | 6 9 |
| P 1 A E 0 4 0 6 | V L 2 b / V H 2 c | 1 5 4 | 7 7 . 6 / 7 6 | 6 9 |
| P 1 A E 0 4 0 7 | V L 2 b / V H 2 d | 1 0 2 | 8 0 . 6 / 7 6 | 6 7 |

10

20

30

40

50

【表 2 2】

アクセプターフレームワーク 1 に基づくヒト化 CD 4 0 抗体の産生力価、ヒト性及び集温度

| 抗体 | VH/VL | 力価 [μ g/ml] | ヒト性 (VH/VL (%)) | T _{agg} |
|----------|-----------|------------------|-----------------|------------------|
| P1AE0816 | コントロール | 8.5 | 84.7/84 | 64 |
| P1AE0817 | VH1a/VL1a | 62 | 86.7/87 | 67 |
| P1AE0818 | H1c/VL1c | 47 | 86.7/85 | 66 |
| P1AE0819 | VH1d/VL1d | 90 | 85.7/85 | 67 |
| P1AE0993 | VH1a/VL1c | 34 | 86.7/85 | 67 |
| P1AE0996 | VH1a/VL1d | 16 | 86.7/85 | 67 |
| P1AE0997 | VH1c/VL1a | 44 | 86.7/87 | 66 |
| P1AE0998 | VH1c/VL1d | 24 | 86.7/85 | 66 |
| P1AE0999 | H1d/VL1a | 34 | 85.7/87 | 67 |
| P1AE1000 | VH1d/VL1c | 16 | 85.7/85 | 66 |
| P1AE1001 | VH1a/VL1b | 34 | 86.7/86 | 65 |
| P1AE1002 | VH1b/VL1a | 46 | 85.7/87 | 67 |
| P1AE1003 | VH1b/VL1b | 49 | 85.7/86 | 66 |
| P1AE1004 | VH1b/VL1c | 60 | 85.7/85 | 67 |
| P1AE1005 | VH1b/VL1d | 7 | 85.7/85 | 65 |
| P1AE1006 | VH1c/VL1b | 24 | 86.7/86 | 65 |
| P1AE1007 | VH1d/VL1b | 34 | 85.7/86 | 67 |

10

20

30

【0359】

2.2.6 組換えヒト及びカニクイザル CD 4 0 細胞外ドメインタンパク質の生成

以下のコンストラクトがクローン化され、HEK 293 細胞での一過性発現によって発現された。

1) C 末端 His - AviTag (商標) タグ (配列番号 266) を有するヒト CD 4 0 細胞外ドメイン (配列番号 1 のアミノ酸 21 - 193、NCBI アクセション番号 NP_001241)

2) C 末端 His - AviTag (商標) タグ (配列番号 267) を有するカニクイザル (macaca fascicularis) CD 4 0 細胞外ドメイン (アミノ酸 21 - 193、カニクイザル CD 4 0 細胞外ドメイン配列は Roche cynomolgus cDNA データベース、未発表データから取得)

40

【0360】

結合分析用の CD 4 0 細胞外ドメイン抗原は、遺伝子合成 (Eurofins Gen

50

omics GmbHサービス、ドイツ)によって生成され、標準のクローニング手順を使用して、独自の制限部位を介してRocheの社内発現ベクターにクローニングされた。全てのコンストラクトのクローニングは、シーケンシングによって検証された。全ての抗原は、CMVプロモーターの制御下で発現された。CD40細胞外ドメインコンストラクトを一過性に発現させるために、懸濁液に適応したHEK293-F細胞(Life Technologies、USA)にそれぞれのプラスミドをトランスフェクトした。一般に、約 2×10^6 個の細胞/mlの1LのHEK293-F細胞に、PEIプロトランスフェクション試薬(PolySciences Europe GmbH、ドイツ)によって複合体を形成した合計500 μ gのプラスミドDNAを製造元の指示に従ってトランスフェクトした。トランスフェクション後、HEK293-F細胞を6日間インキュベートした。続いて、細胞を遠心分離によって収集し、タンパク質を含む上清を、0.22 μ mの真空濾過システム(Millipore)を使用してフィルターにかけた。His-AviTag(商標)タグ付きタンパク質は、完全なHis-Tag樹脂(Roche Diagnostics)を使用したIMAC親和性クロマトグラフィーによって精製された。50mM Na_2PO_4 、300mM NaCl 、pH8.0で洗浄した後、His-AviTag(商標)融合タンパク質を、pH7.0の500mMイミダゾールを添加した洗浄バッファーを使用して溶出した。凝集タンパク質は、20mM Tris、150mM NaCl 、pH7.4でのサイズ排除クロマトグラフィー(Superdex 75、GE Healthcare)によって単量体融合タンパク質から分離された。単量体タンパク質画分をプールし、必要に応じて、例えば、MILLIPORE Amicon Ultra(10KD MWCO)遠心分離濃縮器を用いて濃縮し、-80 で保存した。試料の一定分量を、例えば、CE-SDS、サイズ排除クロマトグラフィー又は質量分析法によるその後のタンパク質分析及び分析による特性決定のために使用した。

【0361】

CD40細胞外ドメインのビオチン化:

C末端AviTag(商標)を含むヒト又はカニクイザルCD40細胞外ドメインコンストラクトの酵素部位特異的ビオチン化は、製造元の指示に従ってBirAビオチン-タンパク質リガーゼキット(Avidity LLC、USA)を使用して実行された。簡単に説明すると、1/10容量のBiomixA(10X濃度:0.5M ビシンバッファー、pH8.3)及びBiomixB(10X濃度:100mM ATP、100mM MgOAc 、500 μ M d-ビオチン)をAviTag(商標)含有タンパク質に添加し、続いて10nmolタンパク質あたり2.5 μ gのBirAリガーゼを添加した。反応混合物を30 で1時間インキュベートし、Superdex75プレップグレードのプレバックHiLoadカラム(GE Healthcare、スウェーデン)でサイズ排除クロマトグラフィーにより精製した。

【0362】

2.2.7 ヒト/カニクイザルCD40結合表面プラズモン共鳴分光法アッセイ

キャプチャシステムの約12000共鳴ユニット(RU)(10 μ g/mlヤギ抗ヒトF(ab)₂;注文コード:28958325;GE Healthcare Biosciences AB、スウェーデン)を、GE Healthcareが提供するアミンカップリングキットを使用して、CM5チップ(GE Healthcare BR-1005-30)にpH5.0でカップリングした。サンプル及びシステムバッファーは、PBS-T(0.05% Tween 20を含む10mMのリン酸緩衝生理食塩水)pH7.4だった。フローセルを25 に設定し、サンプルブロックを12 に設定し、ランニングバッファーで2回プライミングした。抗体は、50nMの溶液を5 μ l/minの流量で30秒間注入することによって捕捉された。会合は、ヒトCD40細胞外ドメイン又はカニクイザルCD40細胞外ドメインを、溶液中のさまざまな濃度で、1:3希釈の300nMから開始して30 μ l/minの流量で300秒間注入することによって測定した。解離段階は最大1200秒間監視され、サンプル溶液からランニングバッファーに切り替えることで誘発された。グリシン pH2.1溶液で30 μ l/minの流速で60

秒間洗淨することにより、表面を再生成した。ヤギの抗ヒトF (a b ')₂表面から得られた応答を差し引くことにより、バルク屈折率の差を補正した。ブランク注入も差し引いた(二重参照)。見かけのK_D及びその他の速度論的パラメータの計算には、Langmuir 1:1モデルを使用した。見かけのK_dは、Biacore(商標)B4000評価ソフトウェア(バージョン1.1)を使用して計算された。

【0363】

2.2.8 CD40特異的ヒト化抗体の特性評価のための細胞間結合アッセイ

CD40陽性細胞(Raji細胞)をトリプシンを使用して培養ボトルから切り離し、Casyセルカウンターを使用してカウントした。4でペレット化した後、細胞をFACSバッファー(PBS中2.5%FCS)に再懸濁し、2.0E+06細胞/mLに調整し、96ウェルPPV底プレート(25µL/ウェル=5.0E+04ゼレン/ウェル)に分注した。

10

【0364】

CD40特異的抗体はFACSバッファーで20µg/mLに調整され、最終濃度は10µg/mLになった。20µlを25µlの細胞懸濁液に加え、4で1時間インキュベートした。次に、細胞をFACSバッファーで2回洗淨した。洗淨後、細胞を二次抗体を含む50µLのFACSバッファー(<huIgG>-Alexa488、c=10µg/mL)に再懸濁し、4で1時間インキュベートした。次に、細胞をFACSバッファーで2回洗淨し、FACS Canto(BD、Pharmingen)を使用して測定するために、70µl/ウェルのFACSバッファーに再懸濁した。

20

【0365】

表23に、ヒト化CD40抗体(Biacoreで測定)の親和性とCD40発現細胞(Raji細胞)への細胞結合を示す。

30

40

50

【表 2 3】

C D 4 0 発現細胞に対するヒト化 C D 4 0 抗体の親和性と細胞間結合

| ID | VH/VL | 親和性 [nM] | Ka (1/Ms) | Kd (1/s) | EC ₅₀ [μ g/ml] 細胞結合 (Raji) |
|----------|-----------|-------------|-----------|----------|---|
| P1AD4470 | コントロール | 4.6 | 1.69E+06 | 7.81E-03 | 0.09 |
| P1AE0400 | VL2a/VH2a | 4.2 | 1.68E+06 | 6.99E-03 | 0.12 |
| P1AE0401 | VL2a/VH2b | 4.6 | 1.69E+06 | 7.87E-03 | 0.13 |
| P1AE0402 | VL2a/VH2c | 4.2 | 1.67E+06 | 7.09E-03 | 0.13 |
| P1AE0403 | VL2a/VH2d | 2.9 | 1.40E+06 | 4.07E-02 | 0.12 |
| P1AE0404 | VL2b/VH2a | 4.2 | 1.63E+06 | 6.93E-03 | 0.11 |
| P1AE0405 | VL2b/VH2b | 5.1 | 1.61E+06 | 8.14E-03 | 0.09 |
| P1AE0406 | VL2b/VH2c | 4.2 | 1.67E+06 | 7.09E-03 | 0.09 |
| P1AE0407 | VL2b/VH2d | 3.0 | 1.19E+06 | 3.55E-02 | 0.12 |
| P1AE0816 | コントロール | 8.7 | 2.53E+06 | 2.19E-02 | 0.09 |
| P1AE0817 | VH1a/VL1a | 2.5 | 2.40E+06 | 5.93E-03 | 0.09 |
| P1AE0818 | VH1c/VL1c | 3.2 | 2.63E+06 | 8.47E-03 | 0.14 |
| P1AE0819 | VH1d/VL1d | 3.4 | 2.59E+06 | 8.77E-03 | 0.11 |
| P1AE0993 | VH1a/VL1c | 3.4 | 2.68E+06 | 8.98E-03 | 0.13 |
| P1AE0996 | VH1a/VL1d | 3.5 | 2.59E+06 | 9.08E-03 | 0.12 |
| P1AE0997 | VH1c/VL1a | 2.3 | 2.59E+06 | 6.03E-03 | 0.12 |
| P1AE0998 | VH1c/VL1d | 3.3 | 2.70E+06 | 8.96E-03 | 0.12 |
| P1AE0999 | VH1d/VL1a | 2.4 | 2.45E+06 | 5.92E-03 | 0.15 |
| P1AE1000 | VH1d/VL1c | 3.2 | 2.68E+06 | 8.62E-03 | 0.14 |
| P1AE1001 | VH1a/VL1b | 2.7 | 2.56E+06 | 6.81E-03 | 0.08 |
| P1AE1002 | VH1b/VL1a | 2.2 | 2.54E+06 | 5.57E-03 | 0.13 |
| P1AE1003 | VH1b/VL1b | 2.5 | 2.46E+06 | 6.06E-03 | 0.13 |
| P1AE1004 | VH1b/VL1c | 3 | 2.63E+06 | 7.95E-03 | 0.14 |
| P1AE1005 | VH1b/VL1d | 3.2 | 2.58E+06 | 8.16E-03 | 0.11 |
| P1AE1006 | VH1c/VL1b | 2.6 | 2.53E+06 | 6.51E-03 | 0.14 |
| P1AE1007 | VH1d/VL1b | 2.7 | 2.50E+06 | 6.62E-03 | 0.12 |

10

20

30

40

【0366】

2.2.9 UHR-ESI-QTOF質量分析による抗体の特性評価

サンプルは、Sephadex G25 5x250mmカラム (Amersham Biosciences、フライブルク、ドイツ) で、40%アセトニトリルと2%ギ酸 (v/v) を使用したHPLCで脱塩した。合計質量は、Triversa NanoMate source (Advion、Ithaca、NY) が装備されたmaxis 4G UHR-QTOF MSシステム (Bruker Daltonik、ブレーメン、ドイツ) でのESI-MSによって測定した。データ収集は900-4000m/z (ISCID: 0.0eV) で行われた。社内で開発されたソフトウェアツールを使用して、生の質量スペクトルを評価し、個々の相対モル質量に変換した。

50

【0367】

2.2.10 抗体の熱安定性評価

試料を、20 mM ヒスチジン/ヒスチジנקロリド、140 mM NaCl中、pH 6.0で1 mg/mLの濃度にて調製し、0.4 μmフィルタプレートで遠心分離して光学384ウェルプレートに移し、パラフィンオイルで覆った。流体力学的半径は、サンプルを25 から80 まで0.05 /分の速度で加熱しながら、DynaProプレートリーダー（ワイアット）で動的光散乱法によって繰り返し測定される。あるいは、サンプルを10 μLのマイクロキュベットアレイに移し、静的光散乱データと266 nmレーザーで励起したときの蛍光データを、それらが25 ~ 90 まで0.1 /分の速度で加熱されている間、Optim1000装置（Avacta Inc.）で記録した。凝集開始温度は、流体力学的半径（DLS）又は散乱光強度（Optim1000）が増加し始める温度として定義される。融点は、蛍光強度対波長を示すグラフの変曲点として定義される。

10

【0368】

実施例3

新しい抗FAPクローン212及びそのヒト化変異体を用いた二重特異性コンストラクトの生成及び産生

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

【0369】

二重特異性CD40-FAP抗体は、FcのC末端にある1つのFAP結合部分と組み合わされた2つのCD40結合部分からなる2+1フォーマット（図1A~図1C）又はFcのC末端にある1つのFAP結合部分と組み合わされた4つのCD40結合部分からなる4+1フォーマットで調製した（図1D~図1F）。二重特異性CD40-FAP抗体には新しい抗FAPクローン212（図1A及び図1D）が含まれていたが、比較のために、FAPクローン4B9（図1B及び図1E）及び28H1（図1C及び図1F）と対応する分子を調製した。FAP結合剤28H1及び4B9の生成及び調製は、参照により本明細書に組み込まれる国際公開第2012/020006A2号に記載されている。4+1及び2+1分子を生成するために、ノブ・イントゥ・ホール技術を使用してヘテロ二量体化を実現した。S354C/T366W突然変異は第1の重鎖HC1（Fcノブ重鎖）に導入され、Y349C/T366S/L368A/Y407V突然変異は第2の重鎖HC2（Fcホール重鎖）に導入された。二重特異性フォーマットとは無関係に、全ての場合において、エフェクターサイレントFc（P329G；L234、234A）を使用して、国際公開第2012/130831A1号に記載されている方法に従ってFc受容体への結合を無効にした。二重特異性分子の配列を表24に示す。

20

30

【0370】

全ての遺伝子は、CMVプロモーターエンハンサーフラグメントと組み合わされたMP5VコアプロモーターからなるキメラMP5Vプロモーターの制御下で一過性に発現される。発現カセットには、cDNAの3'末端に合成ポリAシグナルも含まれている。発現ベクターには、宿主細胞を含むEBNA（エプスタイン・バーウイルス由来核抗原）におけるエピソーム複製のためのoriP領域も含まれている。

40

【表 2 4】

二重特異性抗原結合分子のアミノ酸配列

| コンストラクト | 配列 | 配列番号 |
|--|---|------|
| <u>P1AE2423</u> CD40 (P1AE0817) xFAP (P1AE1689) (2+1) C末端クロスFab融合 | | |
| (P1AE1689) 軽鎖クロスVH-Cカップ | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKA SGYTLTDYNDWVRRQAPGQGLEWIGDIYPNTGGTIYNQKFKGRVTMTIDTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYCTRFRGIHYAMDYWGQGTITVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | 61 |
| VL1a (CD40) 軽鎖 (荷電) | DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSQSLVHSNGNTFLHWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSTQTHVPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC | 62 |
| VH1a (CD40) (VHCH1荷電) Fcノブ__PGLALA__ (P1AE1689) (VL-CH1) | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTFTGYYIHWVRRQAPGQSLEWIMGRVIPNAGGTSYNQKFKGRVTLTVDKSISTAYMELSR LRSDDTAVYYCAREGIYWWGQGTITVTVSSASTKGFVSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVE DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDNYGLSFINWFQ QKPGQAPRLLIYGTSNRRGSGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYFCQQSNEVPYTFGGGTKVEIKSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS | 63 |

10

20

30

40

50

| コンストラクト | 配列 | 配列番号 |
|--|---|------|
| | GVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSC | |
| VH1a (CD40) (VHCH1 荷電) Fc ホール_PGLALA | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKA SGYSFTGYYIHWVRQAPGQSLEWM GRVIPNAGGTSYNQKFKGRVTLTV DKSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYC AREGIYWWGQGTTVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVE DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKS CDKTHTCP PCAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKA KGQPREPQVCTLP SRDELTKNQV SLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLT VDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNNH YTQKSLSLSPG | 64 |
| <u>P1AE2734</u> CD40 (P1AE0817) x FAP (P1AE1689) (2+1) 異なるC 末端クロスFab融合 | | |
| (P1AE1689) 軽鎖クロスVL-CH1 | EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCR ASESVDNYGLSF INWFQQKPGQAP RLLIYGTSNRGSGIPARFSGSGSG TDFTLTISSELEPEDFAVYFCQQSN EVPYTFGGGTKVEIKSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSC | 65 |
| VL1a (CD40) 軽鎖 | DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCR SSQSLVHSNGNTFLHWY LQKPGQS PQLLIYTVSNRFSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYFCST THVPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSV FI FPPSDEQLKSGTASVVC LLNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC | 66 |
| VH1a (CD40) (VHCH1) Fc ノブ_PGLALA (P1AE1689) (VH-C カップ) | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKA SGYSFTGYYIHWVRQAPGQSLEWM GRVIPNAGGTSYNQKFKGRVTLTV DKSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYC AREGIYWWGQGTTVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK | 67 |

10

20

30

40

50

| コンストラクト | 配列 | 配列番号 |
|---|---|------|
| | DYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKA KGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQV SLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLT VDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNNH YTQKSLSLSPGGGGSGGGSGGGG GSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCKASGYTLTDYNMDWVRQAP GQGLEWIGDIYPNTGGTIYNQKFK GRVTMTIDTSTSTVYME LSSLRSE DTA VYYCTRFRGIHYAMDYWGQGT TVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVC LLNFPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDY SLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC | |
| VH1a (CD40) (VHCH1) Fc ホール_PGLALA | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKA SGYSFTGYYIHWVRQAPGQSLEWM GRVIPNAGGTSYNQKFKGRVTLTV DKSI STAYMELSR LRSDDTA VYYC AREGIYWWGQGT TVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKA KGQPREPQVCTLP PSRDELTKNQV SLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLT VDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNNH YTQKSLSLSPG | 68 |
| <u>P1AE2424</u> CD40 (P1AE0817) x FAP (P1AE1689) (4+1) C末端クロスFab融合 | | |
| (P1AE1689) 軽鎖クロスVH-Cカップ | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKA SGYTLTDYNMDWVRQAPGQGLEWIG DDIYPNTGGTIYNQKFKGRVTMTI DTSTSTVYME LSSLRSEDTAVYYC TRFRGIHYAMDYWGQGT TVTVSSA | 61 |

10

20

30

40

50

| コンストラクト | 配列 | 配列 番号 |
|--|---|----------|
| | SVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDYSLSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC | |
| V L 1 a (C D 4 0) 軽鎖 (荷電) | DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCR SSQSLVHSNGNTFLHWYLQKPGQS PQLLIYTVSNRFSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQT THVPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSV FIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDYSLSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSSPVTKSFNR GEC | 6 2 |
| V H 1 a (C D 4 0) (VHCH1 荷電 _ V H 1 a (C D 4 0) (VHCH1 荷 電) - F c ノブ _ P G L A L A _ (P 1 A E 1 6 8 9) (V L - C H 1) | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKA SGYSFTGYYIHWVRQAPGQSLEWM GRVIPNAGGTSYNQKFKGRVTLTV DKSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYC AREGIYWWGQGT T V T V S S A S T K G P SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVE DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKS CDGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVK KPGASVKVSCKASGYSFTGYYIHW VRQAPGQSLEWMGRVIPNAGGTSY NQKFKGRVTLTVDKSISTAYMELS RLRSDDTAVYYCAREGIYWWGQGT T V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T SGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LGAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTL PPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLT QSPATLSLSPGERATLSCRASESV DNYGLSFINWFQQKPGQAPRLLIY GTSNRGSGIPARFSGSGSGTDFTL TISSLEPEDFAVYFCQQSNEVPYT FGGGTKVEIKSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP | 6 9 |

10

20

30

40

50

| コンストラクト | 配列 | 配列番号 |
|---|---|------|
| | VTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN VNHKPSNTKVDKKVEPKSC | |
| VH1a (CD40) (VHCH1荷電) _VH1a (CD40) (VHCH1荷電) -Fcホール _PGLALA | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKA SGYSFTGYIHWVRQAPGQSLEWM GRVIPNAGGTSYNQKFKGRVTLTV DKSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYC AREGIYWVGQGTTVTSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVE DYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKS CDGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVK KPGASVKVSCKASGYSFTGYIHW VRQAPGQSLEWMGRVIPNAGGTSY NQKFKGRVTLTVDKSISTAYMELS RLRSDDTAVYYCAREGIYWVGQGT TVTSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWN SGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSL SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LGAPIEKTIISKAKGQPREPQVCTL PPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG | 70 |
| <u>P1AE2487</u> CD40 (P1AE0817) xFAP (4B9) (2+1) C末端クロスFab融合 | | |
| 4B9軽鎖クロスV L-CH1 | EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCR ASQSVTSSYLAWYQQKPGQAPRLL INVGSRRTATGIPDRFSGSGSGTDF TLTISRLEPEDFAVYYCQQGIMLP PTFGQGTKVEIKSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC | 71 |
| VL1a (CD40) 軽鎖 | DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCR SSQSLVHSNGNTFLHWYLLKPGQS PQLLIYTVSNRFSGVDPDRFSGSGS GTDFTLKRVEAEDVGVYFCSQT THVPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSV FI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV | 66 |

10

20

30

40

50

| コンストラクト | 配列 | 配列番号 |
|--|--|------|
| | TEQDSKDSTYSLSSTLTLISKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC | |
| VH1a (CD40) (VHCH1) Fc ノブ_PGLAL A_4B9 (VH-C カップ) | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKA SGYSFTGYIHWVRQAPGQSLLEWM GRVIPNAGGTSYNQKFKGRVTLTV DKSISTAYMELSRRLSDDTAVYYC AREGIYWWGQGTTVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKA KGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQV SLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNNH YTQKSLSLSPGGGGSGGGGSGGGG GSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGS LRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAP GKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVK GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKGFVGGFNYWGQGTLV TVSSASVAAPS VFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS LSSTLTLISKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC | 72 |
| VH1a (CD40) (VHCH1) Fc ホール_PGLALA | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKA SGYSFTGYIHWVRQAPGQSLLEWM GRVIPNAGGTSYNQKFKGRVTLTV DKSISTAYMELSRRLSDDTAVYYC AREGIYWWGQGTTVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKA KGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQV SLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNNH | 68 |

10

20

30

40

50

| コンストラクト | 配列 | 配列 番号 |
|---|---|----------|
| | Y T Q K S L S L S P G | |
| <u>P 1 A E 2 8 9 5</u> | | |
| C D 4 0 (P 1 A E 0 8 1 7) x F A P (4 B 9) (4 + 1) C 末 端 ク ロ ス F a b 融 合 | | |
| 4 B 9 軽 鎖 ク ロ ス V L - C H 1 | E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V T S S Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I N V G S R R A T G I P D R F S G S G S G T D F T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q Q G I M L P P T F G Q G T K V E I K S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C | 7 1 |
| V L 1 a (C D 4 0) 軽 鎖 | D I V M T Q T P L S L S V T P G Q P A S I S C R S S Q S L V H S N G N T F L H W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y T V S N R F S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G V Y F C S Q T T H V P W T F G G G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C | 6 6 |
| V H 1 a (C D 4 0) (V H C H 1) _ V H 1 a (C D 4 0) (V H C H 1) - F c ノ ブ _ P G L A L A _ (4 B 9) (V H - C カ ッ パ) | Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y S F T G Y Y I H W V R Q A P G Q S L E W M G R V I P N A G G T S Y N Q K F K G R V T L T V D K S I S T A Y M E L S R L R S D D T A V Y Y C A R E G I Y W W G Q G T T V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D G G G S G G G S Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y S F T G Y Y I H W V R Q A P G Q S L E W M G R V I P N A G G T S Y N Q K F K G R V T L T V D K S I S T A Y M E L S R L R S D D T A V Y Y C A R E G I Y W W G Q G T T V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E A A G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L G A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P C R D E L T K N Q V S L W C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F | 7 3 |

10

20

30

40

50

| コンストラクト | 配列 | 配列番号 |
|--|--|------|
| | SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLL ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF SSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIIG SGASTYYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGF GGFNYWGQGT LVTVSSASVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSYSLSSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC | 10 |
| VH1a (CD40) (VHCH1) — VH1a (CD40) (VHCH1) — Fc ホール_PGL ALA | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKA SGYSFTGYYIHWVRQAPGQSLEWM GRVIPNAGGTSYNQKFKGRVTLTV DKSI STAYMELSR LRSDDTAVYYC AREGIYWWGQGT TTVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKS CDGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVK KPGASVKVSCKASGYSFTGYYIHW VRQAPGQSLEWMGRVIPNAGGTSY NQKFKGRVTLTVDKSI STAYMELS RLRSDDTAVYYCAREGIYWWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKEPKSCDKTHTCP CPA PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTL PPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG | 74 |
| <u>P1AE2302</u> CD40 (P1AE0817) xFAP (28H1) (2+1) C末端クロスF a b 融合 | | |
| 28H1 軽鎖クロス VH-Cカップ | EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTTFSSHAMSWVRQAPGKGLEWV SAIWASGEQYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA KGWLG NFDYWGQGT LVTVSSASVA APSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS | 75 |

10

20

30

40

50

| コンストラクト | 配列 | 配列番号 |
|--|---|------|
| | QESVTEQDSKDYSLSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC | |
| VL1a (CD40) 軽鎖 (荷電) | DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCR SSQSLVHSNGNTFLHWYLQKPGQS PQLLIYTVSNRFSGVPDRFSGSGS GTDFTLKI SRVEAEDVGVYFCSQT THVPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSV FIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDYSLSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC | 62 |
| VH1a (CD40) (VHCH1 荷電) _VH1a (CD40) (VHCH1 荷電) Fcノブ_PGLALA_28H1 (VL-CH1) | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKA SGYSFTGYYIHWVRQAPGQSLEWM GRVIPNAGGTSYNQKFKGRVTLTV DKSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYC AREGIYWWGQGTTVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVE DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPPEVTCVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKA KGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQV SLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNNH YTQKLSLSLSPGGGGGGSGGGGGSGGG GSGGGGSEIVLTQSPGTLSSLSPGE RATLSCRASQSVRSYLAWYQQKP GQAPRLLIIGASTRATGIPDRFSG SGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQGQVIPPFTFGQGTKEIKSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVE PKSC | 76 |
| VH1a (CD40) (VHCH1 荷電) Fcホール_PGLALA | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKA SGYSFTGYYIHWVRQAPGQSLEWM GRVIPNAGGTSYNQKFKGRVTLTV DKSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYC AREGIYWWGQGTTVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVE DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGT | 64 |

10

20

30

40

50

| コンストラクト | 配列 | 配列番号 |
|---|---|------|
| | QTYICNVNHNKPSNTKVDEKVEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKA KGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQV SLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLT VDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNNH YTQKSLSLSPG | |
| <u>P1AE2024</u> CD40 (P1AE0817) x FAP (28H1) (4+1) C末端クロスF a b 融合 | | |
| 28H1 軽鎖クロス VH-Cカップ | EVQLLES GGG LVQP GGS LRLSCAA SGFTFSSHAMSWVRQAPGKGLEWV SAIWASGEQYYADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA KGWLG NFDYWGQGT LVTVSSASVA APSVFI FPPSDEQLKSGTASVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDYSLSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC | 75 |
| VL1a (CD40) 軽鎖 (荷電) | DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCR SSQSLVHSNGNTFLHWYLQKPGQS PQLLIYTVSNRFSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQT THVPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSV FIFPPSDRKLKSGTASVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDYSLSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC | 62 |
| VH1a (CD40) (VHCH1 荷電) _ VH1a (CD40) (VHC H1 荷電) _ VH1 a (CD40) (VH CH1 荷電) Fcノ ブ _ PGLALA _ 28H1 (VL-C H1) | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKA SGYSFTGYYIHWVRQAPGQSLEWM GRVIPNAGGTSYNQKFKGRVTLTV DKSI STAYMELSR LRSDDTAVYYC AREGIYWWGQGT TTVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVE DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSVTVTPSSSLGT QTYICNVNHNKPSNTKVDEKVEPKS CDGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVK KPGASVKVSCKASGYSFTGYYIHW VRQAPGQSLEWMGRVIPNAGGTSY NQKFKGRVTLTVDKSI STAYMELS RLRSDDTAVYYCAREGIYWWGQGT TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWN | 77 |

10

20

30

40

50

| コンストラクト | 配列 | 配列番号 |
|--|--|------|
| | SGALTS G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D E K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E A A G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L G A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P C R D E L T K N Q V S L W C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G G G G G S G G G S G G G S G G G G S E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S R S Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I I G A S T R A T G I P D R F S G S G S G T D F T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q Q G Q V I P P T F G Q G T K V E I K S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C | 10 |
| V H 1 a (C D 4 0) (V H C H 1 荷 電) _ V H 1 a (C D 4 0) (V H C H 1 荷 電) - F c ホール _ P G L A L A | Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y S F T G Y Y I H W V R Q A P G Q S L E W M G R V I P N A G G T S Y N Q K F K G R V T L T V D K S I S T A Y M E L S R L R S D D T A V Y Y C A R E G I Y W W G Q G T T V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V E D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D E K V E P K S C D G G G G S G G G G S Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y S F T G Y Y I H W V R Q A P G Q S L E W M G R V I P N A G G T S Y N Q K F K G R V T L T V D K S I S T A Y M E L S R L R S D D T A V Y Y C A R E G I Y W W G Q G T T V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V E D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D E K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E A A G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L G A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V C T L P P S R D E L T K N Q V S L S C A V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L V S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G | 70 |
| | | 20 |
| | | 30 |
| | | 40 |

| コンストラクト | 配列 | 配列 番号 |
|---|---|----------|
| <u>P1AF0873</u> CD40 (P1AE0817) x FAP (P1AE1689) (1+1) C末端ク ロスFab融合 | | |
| (P1AE1689) 軽鎖クロスVH-Cカッパ | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKA SGYTLTDYNMDWVRQAPGQGLEWI GDIYPNTGGTIYNQKFKGRVTMTI DTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYC TRFRGIHYAMDYWGQGTTVTVSSA SVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDYSLSTLT LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC | 61 |
| VL1a (CD40) 軽鎖 (荷電) | DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCR SSQSLVHSNGNTFLHWY LQKPGQS PQLLIYTVSNRFSGVPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQT THVPWTFGGG TKVEIKRTVAAPSV FIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDYSLSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNR GEC | 62 |
| VH1a (CD40) (VHCH1 荷 電) Fcノブ__PG LALA__ (P1A E1689) (VL- CH1) | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKA SGYSFTGYYIHWVRQAPGQSLEWM GRV I P N A G G T S Y N Q K F K G R V T L T V D K S I S T A Y M E L S R L R S D D T A V Y Y C A R E G I Y W W G Q G T T V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V E D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D E K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E A A G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L G A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P C R D E L T K N Q V S L W C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S E S V D N Y G L S F I N W F Q Q K P G Q A P R L L I Y G T S N R G S G I P A R F S G S G S G T D F T L T I S S L E P E D F A V Y F C Q Q S N E V P Y T F G G G T K V E I K S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P | 63 |

10

20

30

40

50

| コンストラクト | 配列 | 配列番号 |
|--|--|------|
| | SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSC | |
| Fc-ホール | DKTHTCPCPCAPEAAGGPSVFLFP PKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAK GQPREPQVCTLPSPSRDELTKNQVS LSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHY TQKSLSLSPG | 98 |
| <u>P1AA9663</u> | | |
| CD40 (huCD40) xFAP (28H1) (2+2) C末端クロスFab融合 | | |
| 28H1軽鎖クロス VH-Cカップ | EVQLLES GGG L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S H A M S W V R Q A P G K G L E W V S A I W A S G E Q Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K G W L G N F D Y W G Q G T L V T V S S A S V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C | 75 |
| CD40軽鎖 (荷電) | DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCR SSQSLVHSNGNTFLHWYQQKPKGKA PKLLIYTVSNRFSGVPSRFSGSGS GTDFTLTITSSLQPEDFATYFCSQT THVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSV FI F P P S D R K L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C | 105 |
| CD40 (VHCH1荷電) Fc PG LALA FAP (VL-CH1) | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGYSFTGYYIHWRQAPGKGLEWV ARV I P N A G G T S Y N Q K F K G R F T L S V D N S K N T A Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R E G I Y W W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V E D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D E K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E A A G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L G A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V | 106 |

10

20

30

40

50

| コンストラクト | 配列 | 配列番号 |
|---------|--|------|
| | S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S R S Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I I G A S T R A T G I P D R F S G S G S G T D F T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q Q G Q V I P P T F G Q G T K V E I K S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C | |

10

【0371】

3.2 FAP及びCD40を標的とする二重特異性抗原結合分子の産生

線維芽細胞活性化タンパク質 (FAP) と CD40 を標的とする二重特異性抗原結合分子は、4つの異なるペプチド鎖をコードする発現ベクターを用いて懸濁液中で増殖させた HEK細胞の一過性トランスフェクションによって発現された。HEK293-F細胞 (Invitrogen) へのトランスフェクションは、抗体ベクターの Maxiprep (Qiagen) 調製物、F17の培地 (Invitrogen, USA)、Peipr o (Polyscience Europe GmbH)、及び無血清 FreeStyle 293発現培地 (Invitrogen) での初期細胞密度が100~200万生細胞/mlを使用して、細胞供給業者の指示に従って実施した。振とうフラスコ又は攪拌発酵槽で7日間培養した後、14000gで30分間遠心分離して細胞培養上清を回収し、0.22µmフィルターにかけた。

20

【0372】

二重特異性抗体は、MabSelectSure-Sepharose (商標) (GE Healthcare、スウェーデン) クロマトグラフィーを使用したプロテインA親和性クロマトグラフィーによって細胞培養上清から精製された。簡単に説明すると、滅菌フィルターにかけた細胞培養上清を、PBSバッファー (10mM Na₂HPO₄、1mM KH₂PO₄、137mM NaCl及び2.7mM KCl、pH7.4) で平衡化した MabSelect Sure樹脂で捕捉し、平衡化バッファーで洗浄し、25mMクエン酸塩、pH3.0で溶出した。1M Tris pH9.0で中和した後、20mMヒスチジン、140mM NaCl、pH6.0でサイズ排除クロマトグラフィー (Superdex 200、GE Healthcare) を使用して、凝集タンパク質を単量体抗体種から分離した。単量体タンパク質画分をプールし、必要に応じて、例えば、MILLIPORE Amicon Ultra (30KD MWCO) 遠心分離濃縮器を用いて濃縮し、-80℃で保存した。サンプルの一定分量は、CE-SDS、サイズ排除クロマトグラフィー、質量分析、及びエンドトキシン測定によるその後の分析特性評価に使用された。

30

40

50

【表 2 5】

二重特異性CD40-FAP抗原結合分子の産生収量

| サンプル | Prot A後の収率 ミリグラムでの 0.9Lの一過性 HEK発現から | Prot A後のSECによる%単量体 | Prot A後のCE-SDSによる%生産物ピーク | HIC調製及びSEC調製後の収率 [mg/L] | HIC調製及びSEC調製後のSECによる%単量体 | HIC調製及びSEC調製後の生産物ピーク |
|--------------|--|--------------------|--------------------------|----------------------------|--------------------------|----------------------|
| P1AE 2423 | 16.5 | 92 | >95 | 11.25 | >95 | >95 |
| P1AE 2424 | 10.4 | 93 | >95 | 6.4 | >95 | >95 |
| P1AE 2734 | 25 | 89 | 18 | | | |
| P1AE 2487 | 14 | 93 | 82 | 4.8 | >95 | >95 |
| P1AE 2895 | 14.4 | 94 | 91 | 4.1 | >95 | >95 |
| P1AE 2302 | | | | 12 | | |
| P1AE 2024 | | | | 6.6 | | |

10

20

【0373】

P1AE2734は、クロスFabのVH-Cカッパ鎖がFcドメイン重鎖の1つのC末端に融合している二重特異性抗体である。この二重特異性抗体は、クロスFabのVL-CH1鎖がFcドメイン重鎖の1つのC末端に融合している二重特異性抗体P1AE2423よりも、製造及び精製がはるかに困難だった。更なる精製ステップを適用する必要があり、つまり、イオン交換クロマトグラフィーと追加のCE-SDSにより、1mgの物質が得られた。

30

【0374】

3.3 二重特異性抗huFAP抗体の結合速度論

二重特異性FAP標的抗体のヒトFAP結合速度式を評価するために、結合動態を実施例1.7に記載されているように測定したが、リガンドとしてHISタグ付きヒトFAP外部ドメインを使用した。クロスFabの異なる融合を伴う二重特異性2+1 CD40 x FAP抗体の親和性データを以下の表25Aに示す。

【表 2 5 A】

SPRで測定したヒトFAPに対する2+1 CD40 x FAP二重特異性抗体親和性

| サンプルID | k_a (1/Ms) | k_d (1/s) | KD [nM] |
|----------------------------|-------------------|-------------------|-----------------------|
| P1AE2423 Fcに融合したVL-CH1 | 3.4×10^5 | 3.2×10^5 | 9.4×10^{-11} |
| P1AE2734 Fcに融合したVH-Cカッパ | 2.5×10^5 | 5.2×10^5 | 2.1×10^{-10} |

40

【0375】

C末端Fab融合としての二重特異性抗体のFAP結合親和性は、2つのクロス変異体間で同様の範囲にある(SPRで測定)。

50

【0376】

実施例4

CD40及びFAPを標的とする二重特異性コンストラクトの特性評価

4.1 ヒトFAP発現マウス線維芽細胞への結合

【0377】

細胞表面FAPへの結合は、NIH/3T3-hFAPクローン19を発現するヒト線維芽細胞活性化タンパク質(huFAP)を使用してテストされた。NIH/3T3-huFAPクローン19は、マウス胚性線維芽細胞NIH/3T3細胞株(ATCC CRL-1658)に発現ベクターpETR4921をトランスフェクトして、1.5 µg/mLのピューロマイシン選択huFAPで発現させることにより生成された。

10

【0378】

NIH/3T3-huFAP細胞は、10%ウシ胎児血清(FBS)(Life Technologies、カタログ番号16140、ロット番号1797306A)を添加した1xダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)(Gibco、カタログ番号42430-025)で培養した。1.5 µg/mLピューロマイシン(Gibco、カタログ番号A11138-03)を、FAP発現細胞を選択するために培地に添加した。NIH/3T3-huFAP細胞は、酵素を含まないCell Dissociation Buffer(Gibco、カタログ番号13151014)を使用して培養フラスコから取り出した。0.3 x 10⁵個のNIH/3T3-hFAPクローン19細胞を、10%FBSを含む200 µLの1xDMEMで、丸底96ウェルプレート(Greiner Bio-one、cellstar、カタログ番号650185)の各ウェルに添加した。プレートを1700 rpmで5分間遠心分離し、上清をはじき飛ばした。細胞を200 µLの4⁺冷FACSバッファー(eBioscience、カタログ番号00-4222-26)で1回洗浄した。全てのサンプルを、二重特異性抗原結合分子(一次抗体)又はアイソタイプコントロール抗体DP47を指定範囲の濃度(2回)で含む4⁺の冷FACSバッファー50 µL/ウェルに再懸濁し、4⁺で120分間インキュベートした。その後、細胞を200 µLの4⁺の冷FACSバッファーで3回洗浄した。細胞は、R-フィコエリトリン(PE)結合AffiniPure F(ab')₂フラグメントヤギ抗ヒトIgG、Fcフラグメント特異的(Jackson ImmunoResearch、カタログ番号109-116-098)二次抗体を含む25 µL/ウェルの4⁺の冷二次抗体溶液(二次抗体の1:50希釈)で更に染色され、暗所で4⁺で60分間インキュベートした。細胞を200 µLのFACSバッファーで洗浄し、0.2 µg/mLのDAPI(Roche、カタログ番号10236276001)を含む85 µL/ウェルのFACSバッファーに再懸濁し、5レーザーLSR-Fortessa(BD Bioscience with DIVAソフトウェア)を使用して同日に取得した。FlowJoバージョン10ソフトウェア(FlowJo LLC)を使用してデータ分析を実行した。

20

30

【0379】

図4に示すように、FAPに対して一価の二重特異性抗体は、ヒトFAP発現標的細胞に結合する。したがって、FAP標的抗CD40抗原結合分子は、直接的な腫瘍標的特性を示す。C末端FAP(212(P1AE1689))又はFAP(4B9)結合ドメインを有するFAPコンストラクトは、C末端FAP(28H1)結合ドメインを有するFAPコンストラクトよりも強く結合し、これは、FAP(28H1)バインダーと比較して、FAP(212)のFAP(4B9)バインダーのヒトFAPに対する結合親和性が高いことで説明される。最強のFAP結合は、FAP(4B9)結合部分(P1AE2487)を有する2+1コンストラクトで観察された。アイソタイプコントロール抗体DP47(ヒト生殖系列コントロール)のNIH/3T3-hFAP細胞への結合は検出されなかった。異なる二重特異性抗体について測定されたEC₅₀値を以下の表26に示す。

40

【表 2 6】

異なる二重特異性抗体フォーマットでの 2 1 2 (P 1 A E 1 6 8 9)、4 B 9 及び 2 H 1 のヒト F A P 結合特性

| 分子 | | EC ₅₀ [nM] |
|--------------------|--|--------------------------|
| P 1 A E 2 4 2 3 | CD 4 0 x F A P (2 1 2) 2 + 1 クロス F a b | 5 . 1 9 |
| P 1 A E 2 4 8 7 | CD 4 0 x F A P (4 B 9) 2 + 1 クロス F a b | 3 . 7 0 |
| P 1 A E 2 3 0 2 | CD 4 0 x F A P (2 8 H 1) 2 + 1 クロス F a b | 2 0 . 0 1 |
| P 1 A E 2 4 2 4 | CD 4 0 x F A P (2 1 2) 4 + 1 クロス F a b | 7 . 5 2 |
| P 1 A E 2 8 9 5 | CD 4 0 x F A P (4 B 9) 4 + 1 クロス F a b | 5 . 2 7 |
| P 1 A E 2 0 2 4 | CD 4 0 x F A P (2 8 H 1) 4 + 1 クロス F a b | 3 8 . 6 7 |

10

【 0 3 8 0】

4 . 2 ヒト C D 4 0 発現初代 B 細胞への結合

細胞表面 C D 4 0 への結合は、末梢血単核細胞 (P B M C) から分離されたヒト初代 B 細胞を使用してテストされた。P B M C を分離するために、Stiftung Zürcher Blutspendedienst SRK からバフィーコートを購入した。5 0 mL のバフィーコートを同量の P B S (g i b c o 、カタログ番号 1 0 0 1 0 0 2 3) で希釈した。5 0 mL ポリプロピレン遠心チューブ (T P P 、カタログ番号 9 1 0 5 0) には 1 5 mL の Lymphoprep (商標) (S T E M C E L L T e c h n o l o g i e s 、カタログ番号 0 7 8 5 1) が付属し、チューブあたり 2 5 mL のバフィーコート / P B S 溶液を Lymphoprep (商標) の上に注意深く重ねた。チューブを 2 0 0 0 rpm で 2 4 分間、室温で低加速で破損することなく遠心分離した。その後、P B M C を界面から収集し、P B S で 3 回洗浄し、1 0 mL の P B S に再懸濁し、Beckman Coulter セルカウンター Ac · T (商標) 5 d i f f O V (Beckman Coulter 、カタログ番号 6 6 0 5 5 8 0) を使用して細胞の種類と数を分析した。P B M C から B 細胞を分離する前に、C D 1 4 マイクロビーズ (M i l t e n y i 、カタログ番号 1 3 0 - 0 5 0 - 2 0 1) で C D 1 4 陽性細胞を磁気標識し、続いて a u t o M A C S (登録商標) P r o セパレーター (M i l t e n y i 、カタログ番号 1 3 0 - 0 9 2 - 5 4 5) で分離することにより、C D 1 4 陽性画分を除去した。C D 1 4 陰性画分は、M i l t e n y i B 細胞分離キット I I (カタログ番号 1 3 0 - 0 9 1 - 1 5 1) 及び a u t o M A C S (登録商標) 分離を用いて、その後の B 細胞分離に使用された。0 . 3 x 1 0 ⁵ 個の B 細胞を、1 0 % (v / v) F B S 、1 % (v / v) ペニシリンストレプトマイシン (g i b c o 、カタログ番号 1 5 0 7 0 - 0 6 3) 、1 % (v / v) L - グルタミン (g i b c o 、カタログ番号 2 5 0 3 0 - 0 2 4) 、1 % (v / v) ピルビン酸ナトリウム (g i b c o 、カタログ番号 1 1 3 6 0 - 0 3 9) 、1 % (v / v) M E M 非必須アミノ酸 (g i b c o 、カタログ番号 1 1 1 4 0 - 0 3 5) 及び 5 0 μ M -メルカプトエタノール (g i b c o 、カタログ番号 3 1 3 5 0 - 0 1 0) を含む Roswell Park Memorial Institute 培地 (R P M I) 1 6 4 0 (g i b c o 、カタログ番号 3 1 8 7 0 - 0 2 5) からなる 2 0 0 μ l の R 1 0 培地中に、丸底 9 6 ウェルプレート (g r e i n e r b i o - o n e 、 c e l l s t a r 、カタログ番号 6 5 0 1 8 5) の各ウェルに添加した。プレートを 1 7 0 0 rpm で 5 分間遠心分離し、上清をはじき飛ばした。細胞を 2 0 0 μ L の 4 冷 F A C S バッファー (e B i o s c i e n c e 、カタログ番号 0 0 - 4 2 2 2 - 2 6) で 1 回洗浄した。全てのサンプルを、二重特異性抗原結合分子 (一次抗体) 又はアイソタイプコントロール抗体 D P 4 7 を指定範囲の濃

20

30

40

50

度（2回）で含む4の冷FACSバッファ-50μL/ウェルに再懸濁し、4で120分間インキュベートした。その後、細胞を200μLの4の冷FACSバッファ-で3回洗浄した。細胞は、R-フィコエリトリン（PE）結合AffiniPure F（ab'）2フラグメントヤギ抗ヒトIgG、Fcフラグメント特異的（Jackson ImmunoResearch、カタログ番号109-116-098）二次抗体を含む25μL/ウェルの4の冷二次抗体溶液（二次抗体の1：50希釈）で更に染色され、暗所で4で60分間インキュベートした。細胞を200μLのFACSバッファ-で洗浄し、0.2μg/mLのDAPI（Roche、カタログ番号10236276001）を含む85μL/ウェルのFACSバッファ-に再懸濁し、5レーザーLSR-Foressa（BD Bioscience with DIVAソフトウェア）を使用して同日に取得した。FlowJoバージョン10ソフトウェア（FlowJo LLC）を使用してデータ分析を実行した。

10

【0381】

図5に示すように、描かれている全てのクローンはCD40に結合するが、CD40陽性B細胞への結合強度（EC₅₀値及びシグナル強度）が異なる。それらのFAP結合部分に関係なく、二価抗CD40抗体は、抗体あたりのより多くの占有CD40結合部位及び二価CD40フォーマットと比較した四価の結合力の獲得によって説明される四価抗CD40抗体と比較して、より高いEC₅₀レベルを示し、より高い結合プラトーに達する。陰性コントロール抗体のB細胞への結合は検出されなかった。異なる二重特異性抗体について測定されたEC₅₀値を以下の表27に示す。

20

【表27】

異なる二重特異性抗体フォーマットでのCD40抗体のヒトCD40結合特性

| 分子 | | EC ₅₀ [nM] |
|--------------|----------------------------|--------------------------|
| P1AD447 0 | CD40 IgG1 | 0.33 3 |
| P1AE242 3 | CD40 x FAP (212) 2+1クロスFab | 0.09 5 |
| P1AE248 7 | CD40 x FAP (4B9) 2+1クロスFab | 0.08 6 |
| P1AE242 4 | CD40 x FAP (212) 4+1クロスFab | 0.03 6 |
| P1AE289 5 | CD40 x FAP (4B9) 4+1クロスFab | 0.04 9 |

30

【0382】

実施例5

FAP標的抗ヒトCD40結合分子の機能特性

5.1 FAP標的抗ヒトCD40結合分子によるヒトB細胞のCD40を介した活性化
CD40のライゲーションは、B細胞及び樹状細胞（DC）の成熟と活性化を誘導し、これらの細胞タイプの生存を促進する。CD40シグナル伝達により、B細胞及びDCの表面でのサイトカイン産生及び共刺激分子発現が増加する（S. Quezada et al., Annu Rev Immunol. 2004, 22, 307-328; S. Danese et al., Gut. 2004, 53, 1035-1043; G. Bishop et al., Adv Exp Med Biol. 2007, 597, 131-151）。

40

【0383】

異なるFAP依存性抗CD40抗体のアゴニスト特性及びFAP特異性をテストするために、ヒトパフィーコートから得られたDaudi細胞又は初代B細胞を、FAPコーティングビーズの存在下でFAP依存性アゴニスト抗ヒトCD40抗体とインキュベートし、B細胞の活性化をFACSで測定した。

【0384】

50

5.1.1. 抗原源としてFAPコーティングされたDynabeads（登録商標）を使用した、FAP標的抗ヒトCD40結合分子によるヒトDaudi細胞の活性化

ヒトCD40（ATCC CCL-213）の発現レベルが高いヒトBリンパ芽球細胞株である 1×10^5 個のDaudi細胞を、96ウェル平底プレートのウェルあたり10%胎児ウシ血清（FBS）（Life Technologies、カタログ番号16140、ロット番号1797306A）を添加した100 μ lの1xダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）（gibco、カタログ番号42430-025）に添加した。ストレプトアビジンDynabeads（登録商標）（ThermoFisher Scientific、カタログ番号：11205D）は、ビオチン化ヒトFAP（社内で生産）で、製造元の指示に従って、コーティングされ（ 6.5×10^4 ビーズの結合容量：0.01 μ gのタンパク質）、10%FBSを含む50 μ lの1xDMEMで2：1のビーズ対細胞比でDaudi細胞に添加した。コントロールとして、非コーティングビーズをDaudi細胞に加えた。FAP標的抗ヒトCD40抗体を、10%FBS培地を含む50 μ lの1xDMEMで、6.7nMから0.003nMの範囲の濃度でDaudi細胞に添加した（3x希釈系列）。陽性コントロールとして、FAP非依存性アゴニスト抗ヒトCD40抗体SGN-40（IgG1、INN：ダセツズマブ）を使用した。抗体はCD40に対して二価である。SGN-40抗体は生物活性のためにFc受容体の架橋を必要とすることが文献に記載されているため（C. Law et al., Cancer Res 2005, 65, 8331-8338）、抗体をDaudi細胞に添加する前に、架橋ヤギ抗ヒトIgG Fc フラグメント特異的F(ab')₂フラグメント（Jackson ImmunoResearch、カタログ番号109-006-008）とともに30分間インキュベートした。48時間後、細胞を96ウェル丸底プレートに移し、PBSで1回洗浄し、PBS中でマウスIgGアイソタイプコントロール（ThermoFisher Scientific、カタログ番号10400C）をブロックする3 μ g/mLのFc受容体50 μ lとインキュベートした。4で15分間インキュベートした後、細胞をPBSで洗浄し、PBS中の蛍光標識抗体の混合物50 μ lを細胞に添加した。以下の蛍光標識抗体を使用した：抗ヒトCD83 BV421（Biolegend、クローンHB15e、カタログ番号305324）、抗ヒトCD80 BV605（BD Biosciences、クローンL307.4、カタログ番号563315）、抗HLA-ABC FITC（BD Biosciences、クローンG46-2.6、カタログ番号555552）、抗ヒトCD14 PerCP-Cy5.5（Biolegend、クローンHCD14、カタログ番号325622）、抗ヒトCD3 PerCP-Cy5.5（Biolegend、クローンUCHT1、カタログ番号300430）、抗ヒトCD70 PE（Biolegend、クローン113-16、カタログ番号355104）、抗ヒトCD86 PE-CF594（BD Biosciences、クローンFUN-1、カタログ番号562390）、抗HLA-DR APC（BD Biosciences、クローンG46-6、カタログ番号559866）及び抗ヒトCD19 APC-H7（BD Biosciences、クローンSJ25C1、カタログ番号560177）。生細胞と死細胞を区別するために、生存率色素Zombie Aqua（商標）（Biolegend、カタログ番号423102）を抗体混合物に添加した。4で30分間インキュベートした後、細胞をPBSで2回洗浄し、200 μ lのPBSに再懸濁した。細胞は、5レーザーLSR-Fortessa（BD Bioscience with DIVAソフトウェア）を使用して同日に分析した。FlowJo バージョン10ソフトウェア（FlowJo LLC）を使用してデータ分析を実行した。CD14及びCD3が陰性で、CD19が陽性の生（アクア陰性）細胞を、CD70、CD80、CD83、及びCD86の発現について分析した。

【0385】

アゴニスト抗CD40抗体との2日間のインキュベーション後に分析されたDaudi細胞は、描写された全ての抗体のCD70発現の増加を示した（図6A及び図6Bを参照）。この活性化マーカーのアプレギュレーションは、異なるFAP標的抗体の場合はF

10

20

30

40

50

A Pに依存していた。より低い抗体濃度では、これらのF A P依存性抗体によって誘導される発現の増加は、架橋C D 4 0抗体（P 1 A D 4 4 7 0）によって誘導される増加と比較して高かった。更に、F A P（2 1 2）又はF A P（4 B 9）結合ドメインを有する2 + 1フォーマットの二重特異性F A P - C D 4 0抗体によるC D 7 0のアプレギュレーションは、2 + 1フォーマットの二重特異性F A P - C D 4 0抗体、F A P（2 8 H 1）結合ドメインを含むフォーマット、F A P（2 1 2）、F A P（4 B 9）又はF A P（2 8 H 1）結合ドメインを含む4 + 1フォーマットの二重特異性F A P - C D 4 0抗体、又はF A P非依存性陽性コントロール抗体によって誘導されるアプレギュレーションと比較して高かった。F A P（非コーティングビーズ）の非存在下では、C D 4 0に対して二価の描写された二重特異性抗体ではC D 7 0の増加は観察されなかったが、四価のC D 4 0結合分子はC D 7 0のアプレギュレーションを誘導したが、F A Pの存在下よりも程度は低く、D a u d i細胞における四価C D 4 0バインダーの低い検出可能なF A P非依存性C D 4 0活性化を示す。

10

【0386】

5.1.2 抗原源としてF A PコーティングされたD y n a b e a d s（登録商標）を使用した、F A P標的抗ヒトC D 4 0結合分子によるヒトB細胞の活性化

実施例4.2に記載されているようにB細胞をバフィーコートから単離し、100µlのR10培地中の 1×10^5 個のB細胞を96ウェル平底プレートのウェルごとに添加した。ストレプトアビジンD y n a b e a d s（登録商標）（ThermoFisher Scientific、カタログ番号：11205D）は、ビオチン化ヒトF A P（社内で生産）で、製造元の指示に従って、コーティングされ（ 6.5×10^4 ビーズの結合容量：0.01µgのタンパク質）、50µlのR10培地で2：1のビーズ対細胞比でB細胞に添加した。コントロールとして、非コーティングビーズをB細胞に添加した。F A P標的抗ヒトC D 4 0抗体又は陽性コントロール抗体（実施例5.1.1に記載）を50µlのR10培地でB細胞に添加した。2日後、実施例5.1.1で指定された染色及び分析手順に従って、B細胞をF A C Sによって分析した。

20

【0387】

アゴニスト抗C D 4 0抗体との2日間のインキュベーション後に分析されたB細胞は、描写された全ての抗体のC D 8 6発現の増加を示した（図7A及び図7Bを参照）。C D 8 6のアプレギュレーションは、異なるF A P標的抗体の場合、F A Pに依存し、これらのF A P依存性抗体によって誘導される発現の増加は、架橋抗C D 4 0抗体P 1 A D 4 4 7 0によって誘導される増加と同等又はわずかに低かった。1つのF A P（2 1 2）結合ドメインを有するF A Pに対して一価の二重特異性抗体は、1つのF A P（4 B 9）結合部分を有する分子と同様の活性化マーカー発現の増加を誘導した。より低い抗体濃度では、F A P結合部分に関係なく、4 + 1フォーマットは、F A P（2 1 2）又はF A P（4 B 9）結合部分を有する2 + 1フォーマットと比較してより高いB細胞活性化を誘導した。

30

【0388】

5.2 F A P標的抗C D 4 0結合分子によるD CのC D 4 0を介した活性化及びそれに続くT細胞のプライミング

40

F A P依存性抗ヒトC D 4 0抗体によって活性化されたD CがT細胞を効率的にプライミングする能力を実証するために、インビトロT細胞プライミングアッセイを確立した。これらのアッセイでは、ヒトC D 4 0受容体を発現するトランスジェニックマウス（h u C D 4 0 t gマウス；類似のヒト及びマウスC D 4 0受容体発現パターンを有するマウス；C 5 7 B L / 6バックグラウンド；T a c o n i cによって生成）の脾臓からD Cを単離し、S I I N F E K Lペプチド又はオバルブミン（O V A；D E C - 2 0 5受容体を介した抗原取り込み）のいずれかでパルスし、また異なるアゴニスト抗ヒトC D 4 0抗体とインキュベートした。F A Pは、二重特異性抗原結合分子のF A P依存性を示すために、F A PコーティングされたD y n a b e a d s（登録商標）を用いて提供された。24時間後、C D 8陽性T細胞が、O T 1マウスの脾臓から分離された（これらのマウスのC D

50

8陽性T細胞は全て、H2-KbのコンテキストでS I I N F E K Lを認識するトランスジェニックTCRを有する；C57BL/6-Tg(TcraTcrb)1100Mjb/Cr1、Charles River)、カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル(CFSE)で標識され、パルスDCに添加された。実験の4日目に、T細胞増殖をFACSによって分析した。

【0389】

5.2.1 FAP標的抗CD40結合分子によって活性化されたOVAパルスDCを用いたT細胞プライミング

DCはhuCD40tgマウスの脾臓から分離された。脾臓DCを分離するために、huCD40tgマウスの脾臓を、カルシウム²⁺(gibco、カタログ番号14025-05)、Hank平衡塩類溶液(HBSS)2.25mL、コラゲナーゼDの10mg/mL溶液(最終濃度1mg/mL)(Sigma-Aldrich、カタログ番号11088866001)250μL及び10mg/mL DNase溶液(最終濃度0.05mg/mL)(Sigma-Aldrich、D5025-150KU、ロット番号SLBR0535V)12.5μLを含む6ウェルプレートの1つのウェルに入れた。脾臓は、21G針(ブラウン、カタログ番号4657527)を備えた3mLシリンジ(BD、カタログ番号309658)を使用して膨らませ、その後、はさみを使用して細かく裂いた。37°Cで25分間インキュベートした後、50μLの0.5Mエチレンジアミン四酢酸(EDTA)(Applichem、カタログ番号A4892.1000)を添加し、37°Cで5分間の2回目のインキュベーションステップを行った。脾臓細胞と脾臓組織の薄片を含む溶液を、40μmフィルター(Corning、カタログ番号352340)でフィルターにかけて50mLポリプロピレン遠心チューブに入れた。残りの脾臓組織片は、3mLシリンジプラグの端でフィルターを通して粉碎された。次のステップでは、50mLチューブを1500rpmで5分間、室温で遠心分離し、上清を廃棄し、1mLの1x細胞溶解バッファー(蒸留水で1:10に希釈)(BD、カタログ番号555899)を、赤血球を溶解するために脾細胞に加えた。室温で4分間インキュベートした後、R10を20mL添加し、続いて室温で5分間1500rpmで遠心分離した。上清を除去し、脾細胞を30mLのR10に再懸濁し、自動EVEセルカウンター(VWR、カタログ番号734-2675)を使用して細胞数と生存率を測定した。マウスCD11c UltraPureマイクロビーズ(Miltenyi、カタログ番号130-108-338)を製造元の指示に従って使用し、autoMACS(登録商標)分離によってDCを分離した。続いて、 0.25×10^5 のDCを96ウェル平底プレートのウェルあたり50μLのR10に播種した。

【0390】

次に、DCに1ng/mL S I I N F E K L(卵アルブミン残基257-264、Eurogentec、カタログ番号AS-60193-5、ロットNo.1360618)でパルスした。これは、陽性コントロールとして、又は抗原としてOVAタンパク質をロードした、DCによる取り込み及び処理を必要としない。Toll様受容体(TLR)刺激に依存しない方法でOVAの取り込みを促進するために(追加のTLR刺激は、DCの全体的な活性化を高め、アゴニスト抗CD40抗体による刺激によるさまざまな活性化状態の検出を不可能にする可能性があります)OVA抗原送達試薬(Miltenyi、カタログ番号130-094-663)をビオチン化抗マウスDEC205抗体(Miltenyi、クローンNLDC-145、カタログ番号130-101-854)と組み合わせて、製造元のプロトコルに従って使用した。簡単に説明すると、DCは、CD8陽性クロス提示DCで高度に発現するDEC205受容体に結合するビオチン化抗体とともにインキュベートされた(M.Lahoud et al., Int Immunol. 2000, 12(5), 731-735)。その後、FITC及びOVAに結合した抗ビオチン抗体であるOVA送達試薬を細胞に添加し、DEC205受容体を介したOVAの取り込みをもたらした。陰性コントロールを提供するために、DCはOVAを添加せずに抗DEC205抗体でのみ標識された。更に、例5.1.1で説明したように、ヒトFAP

10

20

30

40

50

コーティング又は非コーティングの Dynabeads (登録商標) を 50 μ L の R10 で 2 : 1 のビーズ対細胞比で DC に添加した。次のステップでは、さまざまなアゴニスト抗 CD40 抗体を 50 μ L の R10 に、6.7 nM から 0.01 nM の範囲の濃度で添加した (10 倍希釈系列)。この実験設定では、1 つの FAP (212) 又は FAP (4B9) FAP 結合部位を含む二重特異性 2 + 1 及び 4 + 1 抗ヒト CD40 抗体を、架橋 SGN-40 抗体と比較した。

【0391】

翌日、OT1 マウスから脾臓 CD8 陽性細胞が分離された。そのために、OT1 マウスの脾臓を 40 μ m のフィルターに通し、3 mL のシリンジプラグの端を 50 mL のチューブに差し込んだ。フィルターを R10 で洗浄し、脾細胞を 1500 rpm で 5 分間室温で遠心分離した。1 mL の 1x 細胞溶解バッファー (蒸留水で 1 : 10 に希釈) を細胞に添加し、室温で 4 分間インキュベートした後、R10 を 20 mL 添加した。チューブを 1500 rpm で 5 分間、室温で遠心分離し、上清を捨てた。脾細胞を 30 mL の R10 に再懸濁し、自動 EVE セルカウンターを使用して細胞数と生存率を測定した。CD8 陽性細胞は、マウス CD8a⁺T 細胞分離キット (Miltenyi、カタログ番号 130-104-075) を使用し、製造元の指示に従って autoMACS (登録商標) 分離を使用して、陰性セレクトションプロセスで分離した。次に、分離後に陰性画分に見られた CD8 陽性細胞を、予熱した PBS で洗浄し、EVE セルカウンターでカウントし、細胞数を予熱した PBS で 2×10^7 細胞/mL に調整した。10 mM CFSE 溶液 (Cell Trace (商標) CFSE Cell Proliferation Kit、ThermoFisher、カタログ番号 C34554) を予熱した PBS で 5000 倍に希釈し、PBS に 1 : 1 の比率で再懸濁した細胞に添加した (CFSE 最終濃度 1 μ M)。短いボルテックスの後、細胞を室温で 5 分間インキュベートした。細胞に 40 mL の予熱した R10 培地を加えることにより、標識反応を停止した。PBS で 2 回洗浄した後、CD8 陽性細胞を R10 に再懸濁し、 0.5×10^5 個の細胞を 100 μ l の R10 でパルス DC に添加した。実験の 4 日目に、T 細胞増殖をフローサイトメトリーによって分析した。したがって、細胞を 96 ウェル平底プレートから 96 ウェル丸底プレートに移し、PBS で 1 回洗浄し、PBS 中のマウス IgG アイソタイプコントロールをブロックする 3 μ g/mL の Fc 受容体 50 μ l とインキュベートした。4 で 15 分間インキュベートした後、細胞を PBS で洗浄し、PBS 中の蛍光標識抗体の混合物 50 μ l を細胞に添加した。以下の抗体を使用した：抗マウス CD4 BV421 (Biolegend、クローン GK1.5、カタログ番号 100438)、抗マウス CD86 BV785 (Biolegend、クローン GL-1、カタログ番号 105043)、抗 I-A/I-E PerCp-Cy5.5 (Biolegend、クローン M5/114.15.2、カタログ番号 107626)、抗マウス CD70 PE (eBioscience、クローン FR70、カタログ番号 12-0701-82)、抗マウス CD3 PE-CF594 (BD Biosciences、クローン 145-2C11、カタログ番号 562286)、抗マウス CD25 PE-Cy7 (eBioscience、クローン PC61.5、カタログ番号 25-0251-82)、抗マウス CD11c APC (BD Biosciences、クローン HL3、カタログ番号 561119)、抗マウス CD44 Alexa Fluor 700 (BD Biosciences、クローン IM7、カタログ番号 560567) 及び抗マウス CD8 APC-Cy7 (Biolegend、クローン 53-6.7、カタログ番号 100714)。生細胞と死細胞を区別するために、生存率色素 Zombie Aqua (商標) を抗体混合物に添加した。細胞を 50 μ l の染色抗体ミックスとともに 4 で 30 分間インキュベートした。その後、細胞を PBS で 2 回洗浄し、200 μ l の PBS に再懸濁し、5 レーザー LSR-Fortessa を使用して分析した。FlowJo バージョン 10 ソフトウェアを使用してデータ分析を実行した。生存可能な CD3 及び CD8 陽性細胞を CFSE シグナル並びに CD25 及び CD44 発現について分析した。

【0392】

10

20

30

40

50

図8A及び図8Bは、OVA送達試薬とインキュベートし、ヒトCD40及びFAPを標的とする二重特異性抗原結合分子で刺激したDCが、CD8陽性OT1 T細胞の増殖を高度に増強することを示す。これらの効果はFAP依存性であった。描写されたFAP依存性抗体によって誘導されたT細胞増殖の増加は、架橋CD40抗体(P1AD4470)によって誘導された増加と比較してわずかに低かった。1つのFAP(212)又はFAP(4B9)結合部分を有する2+1又は4+1二重特異性抗CD40抗体で刺激されたDCによって誘発された増殖のレベルは同等だった。

【0393】

5.3 FAP結合及びCD40シグナル伝達のための2つの細胞株ブリッジングアッセイ

10

二重特異性抗体の作用機序は、2つの細胞株ブリッジングアッセイに反映されている。抗体は、FAP発現細胞株のFAPとレポーター遺伝子細胞株のCD40受容体に結合する。CD40受容体のクラスター化の場合、シグナル伝達により、分泌された胚性アルカリホスファターゼのNF- κ B依存性産生が誘導される。

【0394】

簡単に言うと：レポーター細胞株HEK-Blue(商標)CD40L(InvivoGen、ヒトCD40受容体及びNF κ B誘導性分泌型胚性アルカリホスファターゼ(SEAP)をコードするプラスミドでトランスフェクトされた)をAccutase(Life Technologies)で分離し、 6.8×10^6 個の細胞を滅菌50mL遠心チューブ(Greiner)に移し、使用するまでローラーミキサー(Heidolph)に置いた。

20

【0395】

表面にFAPを発現するネイティブ標的細胞(WM-266-4、ATCC)をすぐに使用できる凍結細胞として使用した。各バイアルには、 2×10^7 個の細胞/2mL DMEM、10%FBS、及び5%DMSOが含まれていた。細胞の維持培養は、高グルコース及びHEPES(Life Technologies)を含むDMEMで行う必要がある。標的細胞は、37 $^{\circ}$ Cの予熱した水浴で2分間解凍した。2mLの細胞懸濁液を、30mLのDMEM、10%FBS(Life Technologies)を含む50mLの遠心チューブに直ちに移した。 13.6×10^6 個の細胞の一定分量を50mLの遠心チューブに移し、使用するまでローラーミキサーに置いた。細胞の解凍は、抗体希釈系列の調製後に行われた。

30

【0396】

HEK-Blue(商標)検出培地(InvivoGen)を細胞懸濁液及び抗体希釈液の調製に使用した。3つのポーチを150mLの蒸留水(Life Technologies)に溶解し、0.22 μ mのメンブラン(Millipore)でフィルターにかけて滅菌ガラス瓶(Schott)に入れた。150 μ Lのゲンタマイシン(50mg/mL、Life Technologies)を追加した。

【0397】

抗体希釈液は、HEK-Blue(商標)検出培地で2倍に濃縮した。連続希釈系列(1:4)の8つの濃度により、最終アッセイ濃度は518pM~0.0316pMになった。各抗体濃度100 μ Lを透明な96ウェルマイクロ力価組織培養プレート(Greiner)に移した。分子あたり3枚のプレート上の複製を評価した。

40

【0398】

両方の細胞株(レポーター及び標的細胞株)を、室温で180 \times gで4分間遠心分離した。上清を除去し、各細胞株を17mLのHEK-Blue(商標)検出培地に再懸濁した。両方の細胞株を組み合わせることにより、最終的に混合物には1mLあたり 2×10^5 個のHEK-Blue(商標)CD40L細胞と1mLあたり 4×10^5 個のWM-266-4細胞が含まれていた。100 μ Lの細胞混合物をアッセイプレートの各ウェルに添加した。最後に、20,000個のHEK-Blue(商標)CD40L細胞と40,000個のWM-266-4細胞が各ウェルに存在した。プレートを室温で15分間プレ

50

インキュベートして細胞の分布と定着を可能にし、次に37℃及び5%CO₂(セルインキュベーター)で20時間インキュベートした。SEAPの活性は、650nmのHEK-Blue(商標)検出培地(Victor X4、Perkin Elmer)で測定した。光学密度(OD)を抗体の濃度に対してプロットした(図9を参照)。EC₅₀値を、以下の表28に示す。

【表28】

2つの細胞株ブリッジングアッセイで測定されたEC₅₀値

| 分子 | | EC ₅₀ (pM) |
|--------------|-----------------------------|--------------------------|
| P1AE242 3 | CD40 x FAP (212) 2+1クロスFab | 3.2 |
| P1AF087 3 | CD40 x FAP (212) 1+1クロスFab | 26.5 |
| P1AA966 3 | CD40 x FAP (28H1) 2+2クロスFab | 13.2 |
| P1AE230 2 | CD40 x FAP (28H1) 2+1クロスFab | 2.5 |

10

【0399】

EC₅₀値は、2つのCD40結合FabフラグメントとFAP結合クロスFabフラグメントを含む2+1分子P1AE2423とP1AE2302で非常に似ている。EC₅₀は、1+1クロスFabコンストラクトP1AF0873及び2+2コンストラクトP1AA9663で有意に高くなっている。更に、1+1コンストラクトP1AF0873は、有意に目立たない高い漸近線を示し、有効性が低いことを意味する。

20

【0400】

5.4 FAPに依存しないCD40特異的アッセイ

FAPを介したクラスター化なしのCD40経路の潜在的な活性化を評価した。CD40受容体の活性化の場合、シグナル伝達により、分泌された胚性アルカリホスファターゼのNF- κ B依存性産生が誘導される。

【0401】

簡単に説明すると、レポーター細胞株HEK-Blue(商標)CD40L(InvivoGen、ヒトCD40受容体及びNF- κ B誘導性分泌型胚性アルカリホスファターゼ(SEAP)をコードするプラスミドでトランスフェクトされた)をAccutase(Life Technologies)で分離し、 3.4×10^6 個の細胞を滅菌50mL遠心チューブ(Greiner)に移し、使用するまでローラーミキサー(Heidolph)に置いた。HEK-Blue(商標)検出培地(InvivoGen)は、「FAP結合とCD40シグナル伝達のための2つの細胞株ブリッジングアッセイ」から使用された。抗体希釈液をHEK-Blue(商標)検出培地で2倍に濃縮した。最終アッセイ濃度は518pMだった。「FAP結合及びCD40シグナル伝達のための2つの細胞株ブリッジングアッセイ」の3つの独立した希釈シリーズのうち、100 μ Lの最高抗体濃度を2回ずつ透明な96ウェルマイクロ力価組織培養プレート(Greiner)に移した。これにより、1つのプレートで分子あたり6つの値が評価された。

30

40

【0402】

レポーター細胞株を180xg、室温で4分間遠心分離した。上清を除去し、細胞を17mLのHEK-Blue(商標)検出培地に再懸濁した。20,000個のHEK-Blue(商標)CD40L細胞を含む100 μ Lがウェルに存在した。プレートを室温で15分間プレインキュベートして細胞の分布と定着を可能にし、次に37℃及び5%CO₂(セルインキュベーター)で20時間インキュベートした。SEAPの活性は、650nmのHEK-Blue(商標)検出培地(Victor X4、Perkin Elmer)で測定した。n=6及び3xSTDEVの光学密度(OD)の平均を、分子に対してプロットした(図10を参照)。

50

【0403】

FAP依存性アッセイで使用された最高濃度は、CD40特異的レポーター細胞を分子とインキュベートするために使用された。FAP結合を介したクラスター化がなければ、CD40受容体の活性化とそれに続くシグナル伝達は非常に低かった。P1AF0873(1+1クロスマブ)及びP1AA9663(2+2クロスマブ)の方が、2+1分子P1AE2423及びP1AE2302(エラーバーの重複)よりも更に低かった。

【0404】

実施例6

PD-L1と組み合わせたFAP標的抗ヒトCD40結合分子の抗腫瘍有効性の評価
免疫担当マウスのFAP発現腫瘍細胞に対するアゴニスト抗FAP x CD40抗体の効果を決定するために、インビボ研究が設計された(図11)。特に、マウスFAPに結合する28H1 FAP結合ドメインを有する4+1フォーマットの二重特異性FAP-CD40抗体と、28H1 FAP結合ドメインと独立したFAP-CD40コントロール抗体を有する2+1フォーマットの二重特異性FAP-CD40抗体の違いを、aPD-L1処理の有無に関わらず、評価した。

10

【0405】

合計97+9(再チャレンジ実験に必要)huCD40 tg HO雌マウス、実験開始時6~9週齢(Charles Rivers、フランスから購入)、もともとはタコニックから入手したもので、特定病原体除去条件下で、コミットされたガイドライン(GV-Solas; Felasa; TierschG)に従って、毎日12時間の明期/12時間の暗期のサイクルで維持された。実験的研究プロトコルは、地方自治体(ZH225-17)によってレビューされ、承認された。到着した後、動物を、新しい環境に慣れさせ、観察するために1週間維持した。その後、マウスの背中の中右側にトランスポンダーを皮下移植して識別し、回復のために更に1週間維持した。連続的な健康モニタリングは、定期的に行われた。動物は、臨床症状及び有害作用の検出のために毎日管理された。

20

【0406】

MC38-muFAP invipa細胞(CRC)は、Roche Glycart AGで実施された生体内継代から得られ、増殖後にGlycart内部細胞バンクに沈着した。MC38-muFAP invipa細胞は、10%FCS(PAALaboratories、オーストリア)、1mMピルビン酸、1xNEAA、及び6µg/mlピューロマイシンを含むDMEMで培養した。5%CO₂で、水飽和した雰囲気中、37°Cで細胞を培養した。細胞は、10のインビトロ継代及び94.5%の生存率で注入された。

30

【0407】

腫瘍細胞接種のために、マウスを麻酔し、50%RPMI+50%マトリゲル培地中の2x10⁶個のMC38-muFAP単一細胞懸濁液を含む100µlの溶液を含む29G針(BD)を左脇腹に皮下注射した。同じ腫瘍細胞株での再チャレンジのために、45匹のマウスを最初の治療の93日後に同じ手順に従って右側腹部に注射した。

【0408】

腫瘍の平均が200mm³に達した22日目に、マウスは、それぞれが同様の平均腫瘍サイズを有する9匹のマウスからなる8つの異なる群にランダム化された。(表29)。ランダム化後、研究群(表31)に従って、マウスに異なる化合物(表30)を含む29G針を腹腔内注射した。1回目の治療の7日後と14日後に、群B、F、G及びHに2回目と3回目の抗PD-L1腹腔内注射を行った。

40

【0409】

ランダム化と治療注射の後、腫瘍サイズを週に3回キャリパー測定で追跡した。動物の福祉の遵守を確実にするために、毎日のモニタリングが行われた。ライセンス基準(ZH225-17)の中で、潰瘍性腫瘍、腫瘍体積が3000mm³を超える腫瘍、又は元の体重の20%を超える体重減少(0日目)のマウスの場合、マウスを犠牲にした。終了が必要な場合、マウスをイソフルランで麻酔し、機械的な頸椎脱臼を行った。

50

【表 2 9】

2 2 日目の腫瘍体積に応じた動物のランダム化

| | 腫瘍体積 (m m ³) | | | | | | | |
|-----|--------------------------|--------|--------|-------|-----------|-----------|--------|---------|
| | 平均 | 中央値 | 標準偏差 | SEM | IQR (25%) | IQR (75%) | N (動物) | N (測定値) |
| TG1 | 205.87 | 183.09 | 117.82 | 39.27 | 83.77 | 118.89 | 9 | 9 |
| TG2 | 212.06 | 166.15 | 129.07 | 43.02 | 61.73 | 134.20 | 9 | 9 |
| TG3 | 203.06 | 195.36 | 109.90 | 36.63 | 86.46 | 71.22 | 9 | 9 |
| TG4 | 207.98 | 197.16 | 120.68 | 40.23 | 80.87 | 98.34 | 9 | 9 |
| TG5 | 222.03 | 193.11 | 160.66 | 53.55 | 84.25 | 69.29 | 9 | 9 |
| TG6 | 206.73 | 181.89 | 119.04 | 39.68 | 69.52 | 117.74 | 9 | 9 |
| TG7 | 207.83 | 195.20 | 132.17 | 44.06 | 84.94 | 62.45 | 9 | 9 |
| TG8 | 201.83 | 190.58 | 114.43 | 38.14 | 73.22 | 76.46 | 9 | 9 |
| 除外 | | | | | | | 25 | |

10

20

30

40

50

【表 3 0】

使用した抗原結合分子

| 種 | 分子名 | 物質識別子 |
|-----|--|----------|
| マウス | PD-L1 6E11 mIgG2a PG LALA | P1AE0099 |
| ヒト | FAP-CD40 4+1 : 4+1_hu IgG1_PGLALA_C-term_x Fab_P1AE0817_28H1 | P1AE2024 |
| ヒト | FAP-CD40 2+1 : 2+1_hu IgG1_PGLALA_C-term_xF ab_P1AE0817_28H1 | P1AE2302 |
| ヒト | CD40 : muIgG1_wt_SGN40 | P1AE2301 |

10

【表 3 1】

処置のための研究群

| 群 | 最初の治療 22日目 | 2回目の治療 29日目 | 3回目の治療 36日目 |
|---|--------------------------|----------------|----------------|
| A | ビヒクル | ビヒクル | ビヒクル |
| B | PD-L1 | PD-L1 | PD-L1 |
| C | FAP-CD40 2+1 | | |
| D | FAP-CD40 4+1 | | |
| E | huCD40 muIgG1 | | |
| F | PD-L1 + FAP-CD40 2+1 | PD-L1 | PD-L1 |
| G | PD-L1 + FAP-CD40 4+1 | PD-L1 | PD-L1 |
| H | PD-L1 + huCD40 muIgG1 | PD-L1 | PD-L1 |

20

【0410】

除外された動物から、12匹の動物を選択し、群A、C、D、及びEの治療法（治療ごとに3匹）で処置し、最初の治療注射の4日目に免疫薬物力学的効果を分析するスカウトとして犠牲にした。

30

【0411】

6.1 FAP標的抗CD40結合分子は、完全な腫瘍寛解と効率的な抗腫瘍免疫記憶応答を誘導する

キャリパー測定により、腫瘍サイズを週に3回モニターした。JMP12ソフトウェアは、腫瘍増殖データの統計分析に使用された。多重比較のグループ平均の有意差をテストするために、Tukey-Kramer法を使用した標準分散分析（ANOVA）を適用した。Tukey-Kramerは、平均間の全てのペアワイズ差の検定を行う。サンプルサイズが同じである場合、これは正確なアルファレベルのテストである。

【0412】

最初の治療の93日後、完全な腫瘍退縮を示したマウスに、この腫瘍細胞株に対する免疫細胞記憶の形成を決定するために、MC38-FAP腫瘍細胞を反対側の側面に皮下注射した。コントロールとして、9匹のナイーブC57b1/6-huCD40 tgマウスに同じMC38-FAP腫瘍細胞を注射し、獣医免許に従って週に2~3回キャリパー測定を行った。

40

【0413】

図12に示すように、両方のFAP-CD40二重特異性分子（2+1及び4+1）は、PD-L1処置の有無に関わらず完全な腫瘍寛解を誘導した。非標的CD40、PD-L1、又はその両方を組み合わせて処置したマウスでは、ビヒクル群と比較して腫瘍増殖は遅延しなかった。その上、再チャレンジすると、以前にFAP-CD40抗体で処置し

50

た群ではMC38-FAP腫瘍は成長しなかったが、ナイーブマウスでは腫瘍の100%が成長した。これらの結果は、非標的CD40療法とは対照的に、標的CD40療法の強力なMC38-FAP抗腫瘍有効性及び腫瘍増殖の退縮を示す。抗FAP-CD40抗体で処置された全てのマウスは100%の腫瘍寛解を示したので、これらのマウスには明らかな抗PD-L1アドオン効果はなかった。更に、腫瘍増殖阻害に関して、2+1フォーマットと4-1フォーマットの間の実証された違いはなかった。再チャレンジデータは、FAP-CD40抗体で処置された全てのマウスにおけるMC38-FAP腫瘍細胞に対する効率的な免疫記憶応答の形成を示す。

【0414】

統計分析は、2+1 FAP-CD40抗体処置群では28日目（治療後6日）から（10 図13A、28日目の全ての群を比較する統計分析）、4+1 FAP-CD40抗体処置群では31日目（治療後9日）から（図13B、31日目の全ての群を比較する統計分析）、ビヒクルと比較してデータが有意に異なり始めることを示した。

【0415】

6.2 4+1 FAP標的抗CD40結合分子は、2+1 FAP標的抗CD40結合分子と比較して高い血清クリアランスを示す。

【0416】

腹腔内注射時の薬物の薬物動態プロファイルを追跡するために、群あたり3~4匹のマウスから血液を採取した。血清サンプルは、血中抗CD40レベルを分析するための最初の抗体療法6時間後、24時間後、48時間後、72時間後、96時間後、8日後、及び15日後に収集された。時点ごとに最大100 μ lの血液が収集された。マウスの体温は、血管の良好な拡張を確実にするために、39 $^{\circ}$ Cに温められた箱によってわずかに上昇された。尾静脈の穿刺は22G針で行った。血液を1.1mlのZ-Gelマイクロチューブ(SARSTEDT)に収集し、遠心分離後に上清を収集して血清を抽出した。サンプルは-20 $^{\circ}$ Cで保存され、後でキャリブレーション用のそれぞれの抗体を使用して抗CD40レベルについて分析された。20

【0417】

血清中の抗CD40濃度は、プロトコル(Roche-Glycart、スイス)に従って、抗CD40 hu IgGの定量化のためにCD40/Fcキメラ(R&D、1493-CD-050) ELISAを使用してテストされた。試薬はタンパク質を捕捉する：ヒトIgG-Fcビオチン(Abcam、ab98561)及びCD40/Fcキメラ(R&D、1493-CD-050)、検出抗体：抗マウスIgG(HRP)(Abcam、ab97040)又は抗huCH1-DIG(Roche-Penzberg、ドイツ)及びanti-DIG-POD(Roche、11633716001)を使用した。血清サンプルは、注射された投与量(mg/kg)及び抗CD40注射後の収集時間(6時間、24時間、48時間、96時間)に応じて段階希釈で分析された。405nmの測定波長と490nmの参照波長(SpectraMax i3マイクロプレートリーダー、Molecular Devices)を使用して吸収を測定した。30

【0418】

PK分析では、Phoenix 64、WinNonlin 6.4ソフトウェアを使用して、曲線下面積とCmaxを計算した。薬物動態は96時間までしかモニターされなかったため、クリアランスや半減期などのPKパラメータは示されていない。40

【0419】

図14及び表3.2に示すように、2+1フォーマットと比較して4+1フォーマットの方が高いクリアランスが観察された。この高いクリアランスは、二価のCD40バインダー(2+1フォーマット)よりも四価のCD40バインダー(4+1フォーマット)の方が顕著であるCD40固有のTarget-Mediated-Drug-Disposition(TMDD)によって説明できる。

【0420】

また、非標的CD40は、両方のFAP-CD40分子と比較して高いクリアランスを50

示した。このクリアランスはT M D D仮説では説明できないが、C D 4 0療法での抗薬物抗体(A D A)の形成が原因であり得る。

【表32】

P Kパラメータ

| | 用量 (mg / k g) | Cmax (ng / mL) | AUClast (日 * ng / mL) |
|----------------------------|---------------------|-------------------|--------------------------|
| F A P - C D 4 0 2 + 1 | 1 3 | 7 8 9 1 4 | 2 2 9 8 0 8 |
| F A P - C D 4 0 4 + 1 | 2 0 | 1 6 8 6 6 7 | 3 3 4 1 4 3 |
| h u C D 4 0 m u I g G 1 | 1 0 | 1 0 9 7 6 2 | 1 9 3 0 7 9 |

10

【0421】

6.3 処置後96時間のF A P標的抗C D 4 0結合分子によるD C、B細胞及びT細胞のC D 4 0媒介活性化

最初の治療の96時間後、群あたり3匹のマウスを犠牲にし、フローサイトメトリー分析のために次の臓器をP B S中に収集した：腫瘍、脾臓、鼠径部排出リンパ節、鼠径部、軸性及び上腕の非排出リンパ節。

【0422】

フローサイトメーター分析のために、収集された全ての臓器の単細胞懸濁液を、実施例5.2.1に記載されているように調製し、蛍光標識抗体で染色した。この目的のために、調製した単細胞懸濁液を96ウェル平底プレートに移し、P B Sで洗浄し、3µg / mlのF c受容体ブロッキングマウスI g Gアイソタイプコントロール(ThermoFisher Scientific、カタログ番号10400C)50µlとP B S中でインキュベートした。4で15分間インキュベートした後、細胞をP B Sで洗浄し、P B S中の蛍光標識抗体の混合物50µlを細胞に添加した。以下の抗体を使用した：抗マウスC D 3 Pacific Blue(商標)(BD Bioscience、クローン500A2、カタログ番号558214)、抗マウスC D 8 6 BV605(Biolegend、クローンG L - 1、カタログ番号105037)、C D 4 5 Alexa Fluor 700(eBioscience、クローン30-F11、カタログ番号56-0451-82)、抗マウスC D 1 9 BUV395(BD Biosciences、クローン1D3、カタログ番号563557)、抗マウスC D 1 1 c BV785(Biolegend、クローンN418、カタログ番号117336)、抗マウスB220 APC-Cy7(Biolegend、クローンRA3-6B2、カタログ番号103224)、抗マウスC D 6 9 BUV737(BD Biosciences、クローンH1.2F3、カタログ番号612793)、抗I - A / I - E PerCp - Cy5.5(Biolegend、クローンM5/114.15.2、カタログ番号107626)。生細胞と死細胞を区別するために、生存率色素Zombie Aqua(商標)又はFixable blue(両方ともLife Technologies)を抗体混合物に添加した。細胞を細胞外染色抗体溶液とともに4で30分間インキュベートした。その後、細胞をP B Sで2回洗浄し、透過処理し、Foxp3 / 転写因子を含む抗マウスKi - 6 7 PE - Cy7(eBioscience、クローンSolA15、カタログ番号25-5698-82)を使用して、染色バッファーセット(eBioscience、カタログ番号00-5523-00)を用いて、製造元のプロトコルに従って、Ki - 6 7の細胞内染色を行った。細胞を200µlのP B Sに再懸濁し、5レーザーLSR - Fortessaを使用して同じ日に分析した。FlowJoバージョン10ソフトウェアを使用してデータ分析を実行した。生存可能なC D 4 5 +、C D 3 +及びC D 8 + T細胞をKi - 6 7発現について分析した。生存樹状細胞(C D 4 5 +、M H C I I +、C D 1 1 c +)をD C活性化マーカーC D 8 6の発現について分析し、生存B細胞(C D 4 5 +、C D 1 9 +、B 2 2 0 +)をB細胞活性化マーカーC D 6 9の発現について分析した。

20

30

40

50

【0423】

図15に示すように、FAP標的抗CD40抗体フォーマット(2+1及び4+1)は両方とも、腫瘍排出リンパ節、非排出リンパ節、及び脾臓で、処置の4日後に非標的抗CD40抗体よりも程度は低い、DC活性化(CD86発現)の有意な増加を誘導した。対照的に、2+1フォーマットのFAP標的抗CD40抗体のみが、ビヒクル群と比較して腫瘍において有意なDC活性化を誘導した。図16に示すように、T細胞の活性化(Ki-67発現)についても同じパターンが観察された。ビヒクル群と比較して、分析された全ての組織サンプルにおける有意なB細胞活性化(CD69発現)は、非標的抗CD40抗体で処置されたマウスでのみ観察された(図17)。

【0424】

6.4 FAP標的抗CD40結合分子は、マウスの非標的CD40抗体と比較して副作用が少ない

6.4.1 FAP標的抗CD40抗体で処置されたマウスは、非標的抗CD40抗体で処置されたマウスとは対照的に体重減少を示さない

【0425】

治療注射後、各マウスの体重を15日間毎日測定した。元の体重の20%を超える体重減少(0日目)のマウスを犠牲にした(ここでは、マウスを犠牲にする必要はなかった)。

【0426】

図18に示すように、非標的抗CD40抗体で処置したマウスは、抗体注射時に明らかな体重減少を示し、抗CD40と抗PD-L1抗体を併用注射した場合、この体重減少はより長く続いた。4+1又は2+1 FAP-CD40単剤、PD-L1単剤を注射した群、及びFAP-CD40(4+1又は2+1)+PD-L1の組み合わせた群では体重減少は観察されなかった。この結果は、非標的抗CD40抗体と比較して、FAP標的抗CD40結合分子の安全なプロファイルを示す。

【0427】

6.4.1 FAP標的抗CD40抗体で処置したマウスは、非標的抗CD40抗体で処置したマウスと比較して、抗PD-L1を介した有害事象が少ないことを示す。

【0428】

抗PD-L1抗体の3回目の注射でいくつかの有害事象が観察された。マウスを犠牲にする必要はなかったが、症状は、治療注射後5分以内にマウスの活動が低下し、背中が反り返り、毛皮がだらしないと説明した。表33は、3回目の治療でこれらの症状を示したマウスの割合を示す。

【表33】

3回目の抗PD-L1療法で有害事象を示した動物のパーセンテージ

| 群 | 3回目の抗PD-L1療法で有害事象を示したマウスの% | 回復時間(分) |
|--------------------|----------------------------|---------|
| PD-L1 | 33% | 30-40 |
| FAP-CD40 2+1+PD-L1 | 44% | 10-20 |
| FAP-CD40 4+1+PD-L1 | 55% | 10-20 |
| CD40+PD-L1 | 100% | 30-40 |

【0429】

結果は、PD-L1+CD40の併用群で有害事象が明らかに増加したのに対し、抗PD-L1+FAP-CD40群(4+1及び2+1)で観察された有害事象の割合は、抗PD-L1単剤処置群と比較して、わずかに増加しただけであることを示す。

【 0 4 3 0 】

観察された有害事象は、抗 P D - L 1 に対する A D A 形成による強力な免疫反応（サイトカインストーム）の結果である可能性がある。これは、非標的抗 C D 4 0 抗体の存在下で更に増加する。この観察結果は、両方の分子を抗 P D - L 1 抗体療法と組み合わせた場合、非標的抗 C D 4 0 抗体と比較して標的 F A P - C D 4 0 分子の安全性プロファイルが優れていることを示す。

【 0 4 3 1 】

要約すると、4 + 1 及び 2 + 1 フォーマットの C D 4 0 の F A P 依存性活性化を伴う F A P 標的抗 C D 4 0 分子は、非標的抗 C D 4 0 親抗体と比較して、全身毒性が低下した、腫瘍を有するマウスにおいて強力な抗腫瘍免疫応答を誘導する。

10

20

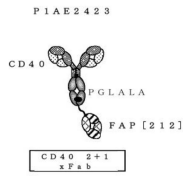
30

40

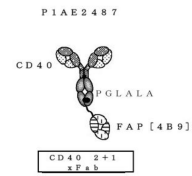
50

【図面】

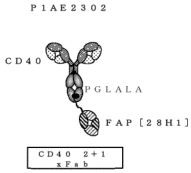
【図 1 A】



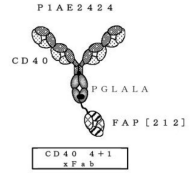
【図 1 B】



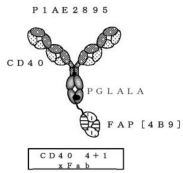
【図 1 C】



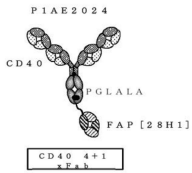
【図 1 D】



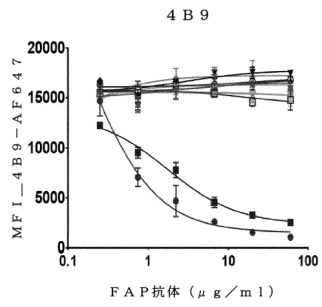
【図 1 E】



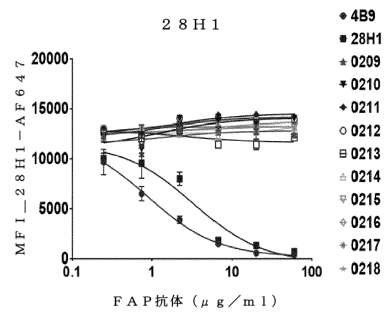
【図 1 F】



【図 2 A】



【図 2 B】



10

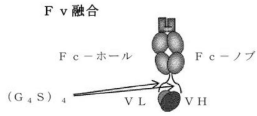
20

30

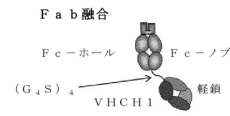
40

50

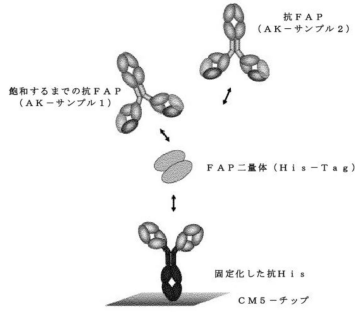
【図 3 A】



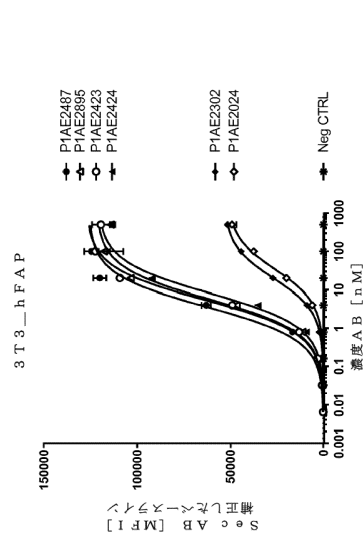
【図 3 B】



【図 3 C】



【図 4】

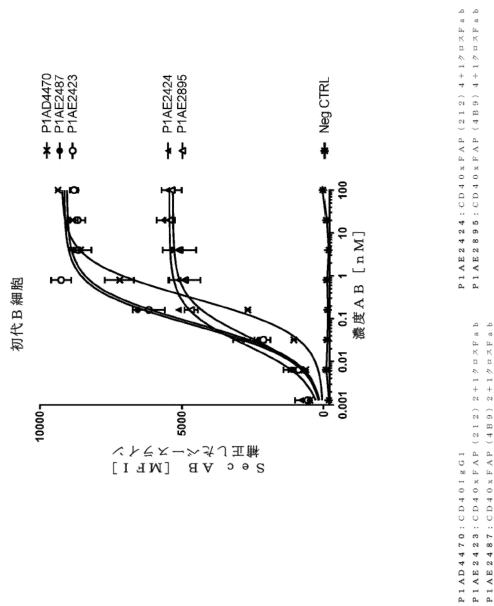


P1AE2423:CD40xFAP (212), 2+1P2XFab
 P1AE2487:CD40xFAP (489), 2+1P2XFab
 P1AE2302:CD40xFAP (28H1), 2+1P2XFab
 P1AE2424:CD40xFAP (212), 4+1P2XFab
 P1AE2895:CD40xFAP (489), 4+1P2XFab
 P1AE2024:CD40xFAP (28H1), 4+1P2XFab

10

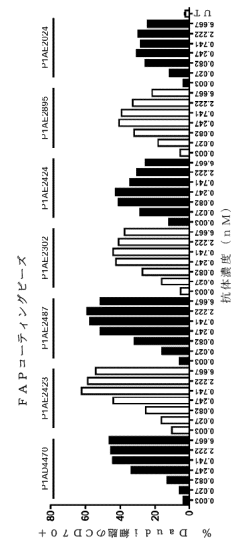
20

【図 5】



P1AD4470:CD40L1G1
 P1AE2423:CD40xFAP (212), 2+1P2XFab
 P1AE2487:CD40xFAP (489), 2+1P2XFab
 P1AE2424:CD40xFAP (212), 4+1P2XFab
 P1AE2895:CD40xFAP (489), 4+1P2XFab

【図 6 A】

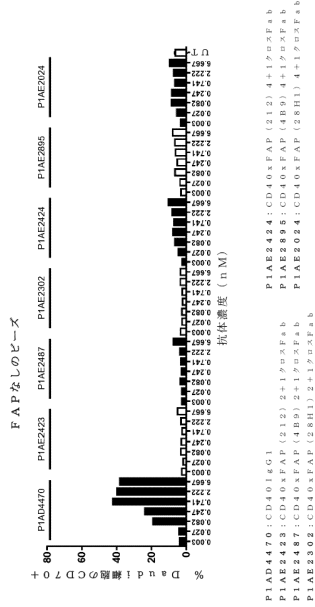


30

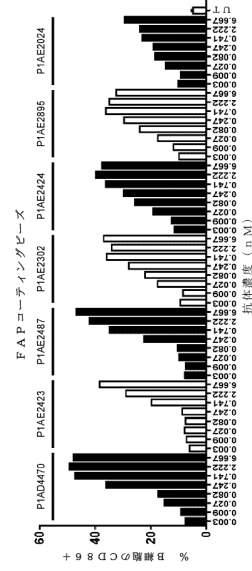
40

50

【 図 6 B 】

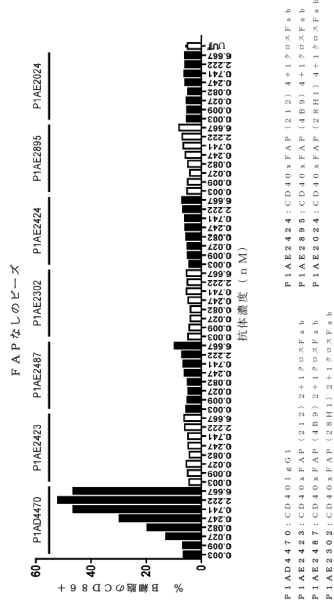


【 図 7 A 】

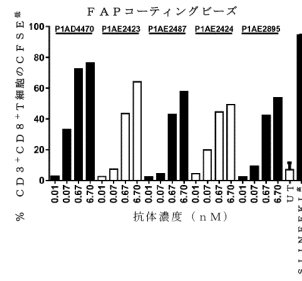


10

【 図 7 B 】



【 図 8 A 】



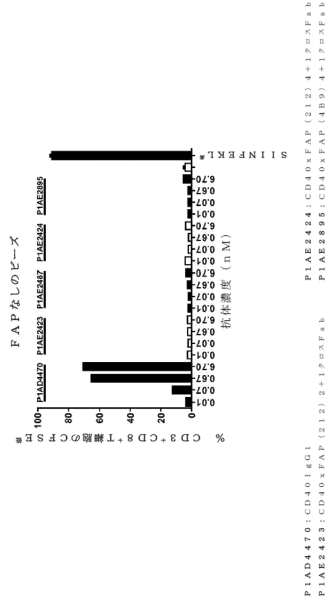
20

30

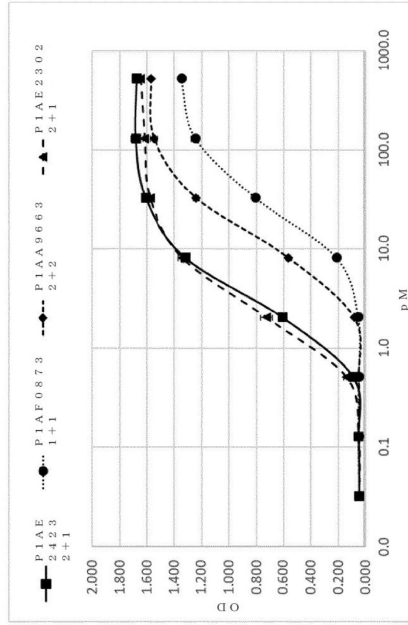
40

50

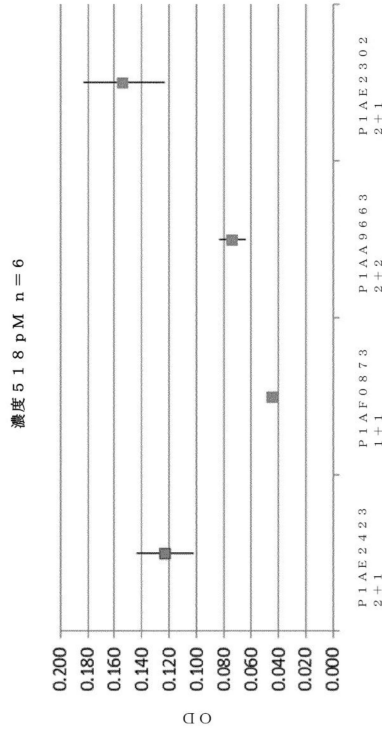
【 8 B 】



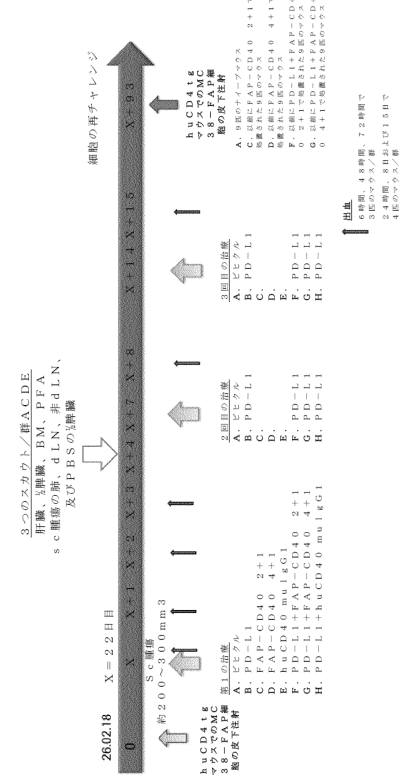
【 9 】



【 10 】



【 11 】



10

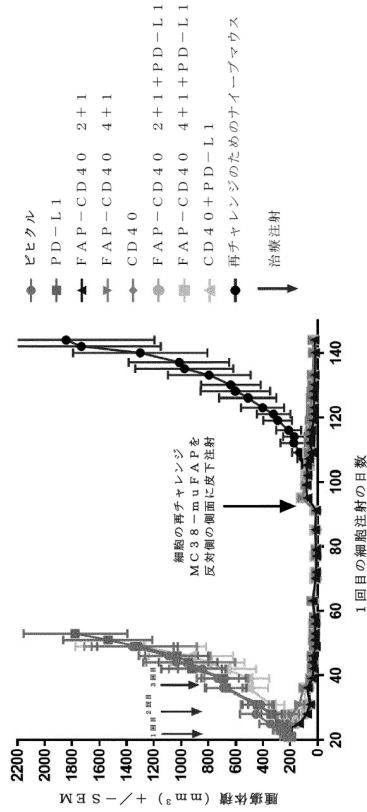
20

30

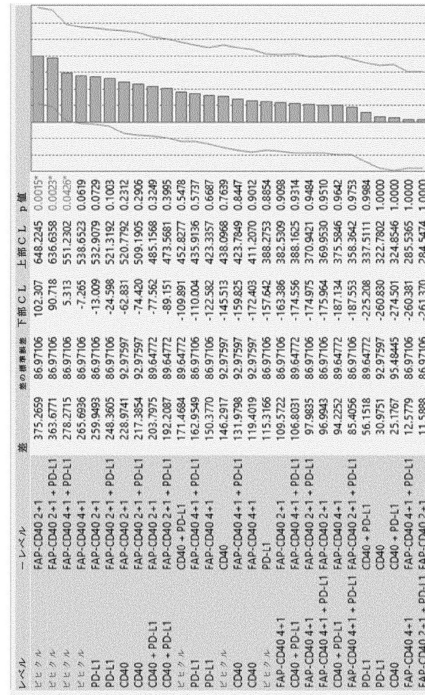
40

50

【図 1 2】



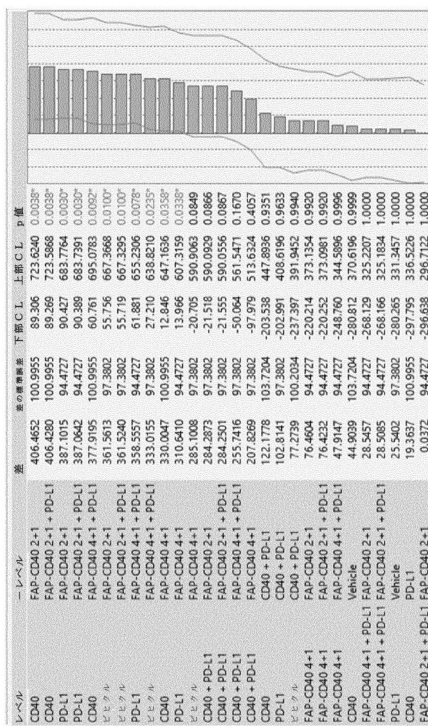
【図 1 3 A】



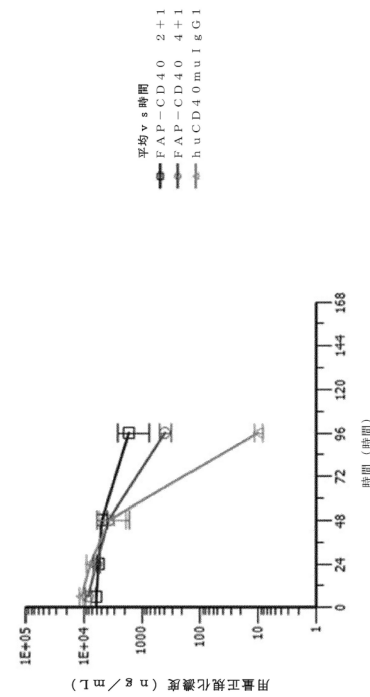
10

20

【図 1 3 B】



【図 1 4】



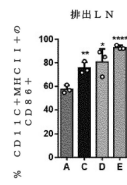
30

40

50

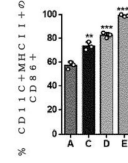
【図 15 A】

樹状細胞の活性化 (d 4)



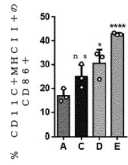
【図 15 B】

非排出LN



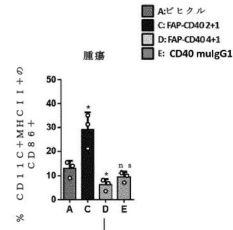
【図 15 C】

脾臓



【図 15 D】

腫瘍

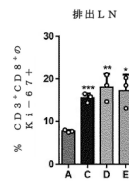


4 + 1 抗体で処置されたマウスの腫瘍は小さすぎて、信頼できる結果を得ることができなかった。

10

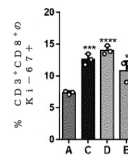
【図 16 A】

CD8 T細胞の活性化 (d 4)



【図 16 B】

非排出LN




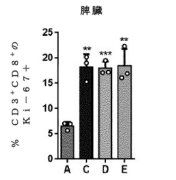
20


30

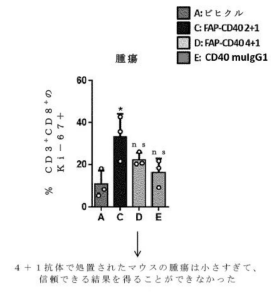
40

50


【 16C】



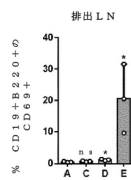
【 16D】




10

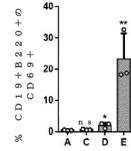
【 17A】

B細胞の活性化 (d4)




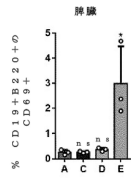
【 17B】


非脾臓 L N

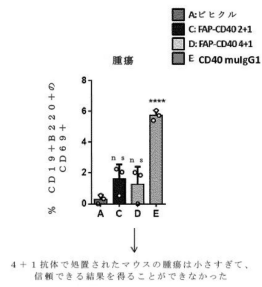


20

【 17C】



【 17D】

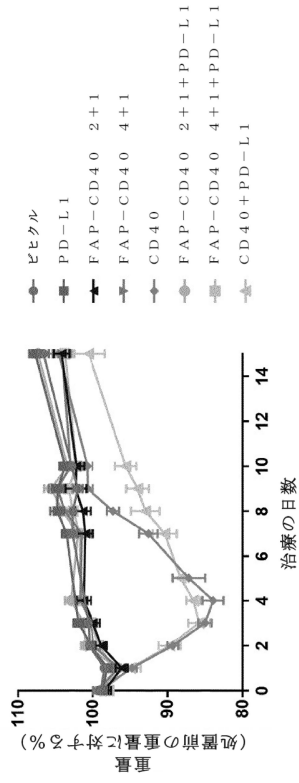


30

40

50

【 図 18 】



10

20

【 配列表 】

[0007221379000001.app](#)

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

| | F I | | |
|--------------------------|---------|--------|---|
| C 1 2 N 15/63 (2006.01) | C 1 2 N | 15/63 | Z |
| C 1 2 N 1/15 (2006.01) | C 1 2 N | 1/15 | |
| C 1 2 N 1/19 (2006.01) | C 1 2 N | 1/19 | |
| C 1 2 N 1/21 (2006.01) | C 1 2 N | 1/21 | |
| C 1 2 N 5/10 (2006.01) | C 1 2 N | 5/10 | |
| C 1 2 P 21/08 (2006.01) | C 1 2 P | 21/08 | |
| A 6 1 P 35/00 (2006.01) | A 6 1 P | 35/00 | |
| A 6 1 P 37/04 (2006.01) | A 6 1 P | 37/04 | |
| A 6 1 K 39/395 (2006.01) | A 6 1 K | 39/395 | N |
| | A 6 1 K | 39/395 | T |

ーハー

- (72)発明者 クライン, クリスティアン
スイス国 8 9 5 2 シュリーレン, ヴァーギシュトラーセ 1 8, シー/オー ロッシュ グリク
アート アーゲー
- (72)発明者 ウマーニャ, パブロ
スイス国 8 9 5 2 シュリーレン, ヴァーギシュトラーセ 1 0, シー/オー ロッシュ グリク
アート アーゲー
- (72)発明者 ブジョツェク, アレクサンダー
ドイツ国 8 2 3 7 7 ペンツベルク, ノンネンヴァルト 2, シー/オー ロッシュ ダイアグノス
ティック ゲーエムベーハー
- (72)発明者 ジェロンカ, イェルク
スイス国 8 9 5 2 シュリーレン, ヴァーギシュトラーセ 1 0, シー/オー ロッシュ グリク
アート アーゲー
- (72)発明者 トランプフェラー, クリスティーン
スイス国 8 9 5 2 シュリーレン, ヴァーギシュトラーセ 1 0, シー/オー ロッシュ グリク
アート アーゲー
- (72)発明者 ラップ, モーリッツ
スイス国 8 9 5 2 シュリーレン, ヴァーギシュトラーセ 1 0, シー/オー ロッシュ グリク
アート アーゲー
- (72)発明者 ルクレック, マリン
スイス国 8 9 5 2 シュリーレン, ヴァーギシュトラーセ 1 0, シー/オー ロッシュ グリク
アート アーゲー

審査官 北村 悠美子

(56)参考文献

- 特表 2 0 1 3 - 5 4 2 7 1 4 (J P , A)
 特表 2 0 1 4 - 5 1 9 8 0 7 (J P , A)
 特表 2 0 0 9 - 5 2 2 3 2 9 (J P , A)
 特表 2 0 2 2 - 5 1 1 3 9 6 (J P , A)
 特表 2 0 2 0 - 5 1 5 2 7 6 (J P , A)
 Journal of Immunology , 2009年 , Vol.183, pp.1851-1861

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B名)

- C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
 C 0 7 K 1 6 / 0 0 - 1 9 / 0 0
 C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)