

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-532965
(P2020-532965A)

(43) 公表日 令和2年11月19日(2020.11.19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13 Z N A	4 B 0 6 4
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	4 B 0 6 5
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 C 0 8 4
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	4 C 0 8 5
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 91 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2020-510103 (P2020-510103)
 (86) (22) 出願日 平成30年8月21日 (2018. 8. 21)
 (85) 翻訳文提出日 令和2年3月10日 (2020. 3. 10)
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2018/101501
 (87) 国際公開番号 WO2019/037711
 (87) 国際公開日 平成31年2月28日 (2019. 2. 28)
 (31) 優先権主張番号 PCT/CN2017/098332
 (32) 優先日 平成29年8月21日 (2017. 8. 21)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 中国 (CN)

(71) 出願人 520053809
 アダジーン インコーポレイテッド
 英国領ケイマン諸島 グランド ケイマン
 ケーワイ1-1103, サウス チャ
 ーチ ストリート 103, ハーパー
 プレイス, ビー. オー. ボックス 25
 82
 (74) 代理人 110002077
 園田・小林特許業務法人

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗CD137分子及びその使用

(57) 【要約】

本開示は、ヒトCD137に結合する抗体またはその抗原結合フラグメント、それをコードする核酸、その治療用組成物、ならびにT細胞機能を増強して細胞性免疫応答を上方制御し、腫瘍免疫などのT細胞機能不全障害を治療するため、及びがんを治療するためのそれらの使用を提供する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトCD137の細胞外ドメインに結合する単離された抗体、またはその抗原結合フラグメントであって、配列番号1のアミノ酸残基34～108内の1つ以上のアミノ酸残基に結合する、前記抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項 2】

前記抗体または抗原結合フラグメントが、配列番号1のアミノ酸残基34～93内の1つ以上のアミノ酸残基に結合する、請求項1に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 3】

前記抗体または抗原結合フラグメントが、配列番号1のアミノ酸残基34～36、53～55、及び92～93からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸残基に結合する、請求項1または請求項2に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

10

【請求項 4】

前記抗体または抗原結合フラグメントが、配列番号1の、アミノ酸残基34～36のうちの1つ以上、53～55のうちの1つ以上、及び92～93のうちの1つ以上に結合する、請求項3に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 5】

前記抗体または抗原結合フラグメントが、配列番号1のアミノ酸残基109～112、125、126、135～138、150、及び151からなる群から選択されるアミノ酸残基のうちの1つ以上に結合しない、請求項1～4のいずれか1項に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

20

【請求項 6】

前記抗体または抗原結合フラグメントが、配列番号1のアミノ酸残基109～112、125、126、135～138、150、及び151に結合しない、請求項5に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 7】

前記抗体または抗原結合フラグメントは、カニクイザル、マウス、ラット、及びイヌからなる群から選択される少なくとも1つの非ヒト種由来のCD137ポリペプチドと交差反応性である、請求項1～6のいずれか1項に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 8】

前記抗体または抗原結合フラグメントが、カニクイザルCD137に結合する、請求項7に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

30

【請求項 9】

前記抗体または抗原結合フラグメントが、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域が、配列番号711のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号735のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び配列番号759のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含み、ならびに/または

前記軽鎖可変領域が、配列番号783のアミノ酸配列を含むHVR-L1、配列番号807のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び配列番号831のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む、

40

請求項1～8のいずれか1項に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 10】

前記重鎖可変領域が配列番号41のアミノ酸配列を含み、及び/または前記軽鎖可変領域が配列番号42のアミノ酸配列を含む、請求項9に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 11】

前記抗体が重鎖及び軽鎖を含み、前記重鎖が配列番号617のアミノ酸配列を含み、及び/または前記軽鎖が配列番号618のアミノ酸配列を含む、請求項10に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 12】

50

前記抗体または抗原結合フラグメントが、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、
前記重鎖可変領域が、配列番号 7 1 2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、配列番号 7
3 6 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び配列番号 7 6 0 のアミノ酸配列を含む H V
R - H 3 を含み、ならびに / または

前記軽鎖可変領域が、配列番号 7 8 4 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、配列番号 8
0 8 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び配列番号 8 3 2 のアミノ酸配列を含む H V
R - L 3 を含む、

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 1 3】

前記重鎖可変領域が配列番号 6 1 のアミノ酸配列を含み、及び / または前記軽鎖可変領
域が配列番号 6 2 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 2 に記載の抗体または抗原結合フラグ
メント。

10

【請求項 1 4】

前記抗体が重鎖及び軽鎖を含み、前記重鎖が配列番号 6 1 9 のアミノ酸配列を含み、及
び / または前記軽鎖が配列番号 6 2 0 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 3 に記載の抗体ま
たは抗原結合フラグメント。

【請求項 1 5】

前記抗体または抗原結合フラグメントが、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、
前記重鎖可変領域が、配列番号 7 3 1 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、配列番号 7
5 5 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、及び配列番号 7 7 9 のアミノ酸配列を含む H V
R - H 3 を含み、ならびに / または

20

前記軽鎖可変領域が、配列番号 8 0 3 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、配列番号 8
2 7 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び配列番号 8 5 1 のアミノ酸配列を含む H V
R - L 3 を含む、

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 1 6】

前記重鎖可変領域が配列番号 7 1 のアミノ酸配列を含み、及び / または前記軽鎖可変領
域が配列番号 7 2 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 5 に記載の抗体または抗原結合フラグ
メント。

【請求項 1 7】

前記抗体が重鎖及び軽鎖を含み、前記重鎖が配列番号 6 5 7 のアミノ酸配列を含み、及
び / または前記軽鎖が配列番号 6 5 8 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 6 に記載の抗体ま
たは抗原結合フラグメント。

30

【請求項 1 8】

重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む、ヒト C D 1 3 7 の細胞外ドメインに結合する単
離された抗体またはその抗原結合フラグメントであって、

a) 前記重鎖可変領域が H V R - H 1、H V R - H 2、及び H V R - H 3 を含み、

前記 H V R - H 1 が、以下からなる群から選択される式によるアミノ酸配列を含み：

式 (I) : $X_1 T F X_2 X_3 Y X_4 I H W V$ (配列番号 2)、式中、 X_1 は F もしく
は Y であり、 X_2 は S もしくは T であり、 X_3 は G、N、もしくは S であり、及び X_4 は
、A、G、もしくは W であり；

40

式 (I I) : $Y S I X_1 S G X_2 X_3 W X_4 W I$ (配列番号 3)、式中、 X_1 は S も
しくは T であり、 X_2 は H もしくは Y であり、 X_3 は H もしくは Y であり、及び X_4 は A
、D、G、N、S、もしくは T であり；ならびに

式 (I I I) : $F S L S T X_1 G V X_2 V X_3 W I$ (配列番号 4)、式中、 X_1 は G
もしくは S であり、 X_2 は A もしくは G であり、及び X_3 は A、G、S、もしくは T であ
り；

前記 H V R - H 2 が、以下からなる群から選択される式によるアミノ酸配列を含み：

式 (I V) : $L A L I D W X_1 X_2 D K X_3 Y S X_4 S L K S R L$ (配列番号 5)、
式中、 X_1 は A、D、もしくは Y であり、 X_2 は D もしくは G であり、 X_3 は R、S、も

50

しくはYであり、及びX₄はPもしくはTであり；

式(V)：IGX₁IYHSGX₂TYX₃PSLKS RV(配列番号6)、式中、X₁はDもしくはEであり、X₂はNもしくはSであり、及びX₃はNもしくはSであり；ならびに

式(VI)：VSX₁ISGX₂GX₃X₄TYYADSVKGRF(配列番号7)、式中、X₁はA、G、S、V、もしくはYであり、X₂はA、D、S、もしくはYであり、X₃はD、G、もしくはSであり、X₄はSもしくはTであり；ならびに

前記HVR-H3が、式(VII)によるアミノ酸配列を含み：ARX₁GX₂X₃X₄VX₅GDWFX₆Y(配列番号8)、式中、X₁はEもしくはGであり、X₂はEもしくはSであり、X₃はDもしくはTであり、X₄はA、T、もしくはVであり、X₅はA、I、L、T、もしくはVであり、及びX₆はA、D、もしくはGであり；ならびに/または

b)前記軽鎖可変領域がHVR-L1、HVR-L2、及びHVR-L3を含み、

前記HVR-H3が、式(VIII)によるアミノ酸配列を含み：X₁ASQX₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈(配列番号9)、式中、X₁はQもしくはRであり、X₂はD、G、もしくはSであり、X₃はIもしくはVであり、X₄はG、R、S、もしくはTであり、X₅はP、R、S、もしくはTであり、X₆はA、D、F、S、V、もしくはYであり、X₇はLもしくはVであり、及びX₈はA、G、もしくはNであり；

前記HVR-L2が、式(IX)によるアミノ酸配列を含み：X₁ASX₂X₃X₄X₅GX₆(配列番号10)、式中、X₁はAもしくはDであり、X₂はN、S、もしくはTであり、X₃はLもしくはRであり、X₄はA、E、もしくはQであり、X₅はSもしくはTであり、及びX₆はIもしくはVであり；ならびに

前記HVR-L3が、以下からなる群から選択される式によるアミノ酸配列を含む：

式(X)：YCCQX₁YX₂X₃X₄T(配列番号11)、式中、X₁はA、G、S、もしくはYであり、X₂はQ、S、もしくはYであり、X₃はI、L、T、もしくはYであり、及びX₄はI、S、V、もしくはWであり；ならびに

式(XI)：YCX₁QX₂X₃X₄X₅PX₆T(配列番号12)、式中、X₁はEもしくはQであり、X₂はP、S、もしくはYであり、X₃はD、L、S、T、もしくはYであり、X₄はD、E、H、S、もしくはTであり、X₅はD、L、T、もしくはWであり、及びX₆はL、P、R、もしくはVである、

前記抗体またはその抗原結合フラグメント。

【請求項19】

前記HVR-H1が、配列番号253~312からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、前記HVR-H2が、配列番号313~372からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、前記HVR-H3が、配列番号373~432からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、前記HVR-L1が、配列番号433~492からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、前記HVR-L2が、配列番号493~552からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、及び前記HVR-L3が、配列番号553~612からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項18に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項20】

前記重鎖可変領域が、配列番号13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107、109、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、及び131からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、ならびに/または前記軽鎖可変領域が、配列番号14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82

10

20

30

40

50

、 84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、114、116、118、120、122、124、126、128、130、及び132からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項18または請求項19に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項21】

前記HVR-H1が、以下からなる群から選択される式によるアミノ酸配列を含み：

式(XII)： X_1 TFS X_2 YWIHWV(配列番号853)、式中、 X_1 はFもしくはYであり、及び X_2 はNもしくはSであり；

式(XIII)：YSIX $_1$ SGX $_2$ X $_3$ WX $_4$ WI(配列番号854)、式中、 X_1 はSもしくはTであり、 X_2 はHもしくはYであり、 X_3 はHもしくはYであり、及び X_4 はA、D、G、N、もしくはSであり；ならびに

式(XIV)：FSLSTX $_1$ GVX $_2$ VX $_3$ WI(配列番号855)、式中、 X_1 はGもしくはSであり、 X_2 はAもしくはGであり、及び X_3 はA、G、もしくはSであり；

前記HVR-H2が、以下からなる群から選択される式によるアミノ酸配列を含み：

式(IV)：LALIDWX $_1$ X $_2$ DKX $_3$ YSX $_4$ SLKSR(配列番号5)、式中、 X_1 はA、D、もしくはYであり、 X_2 はDもしくはGであり、 X_3 はR、S、もしくはYであり、及び X_4 はPもしくはTであり；ならびに

式(XV)：VSX $_1$ ISGX $_2$ GX $_3$ X $_4$ TYYADSVKGRF(配列番号856)、式中、 X_1 はG、S、V、もしくはYであり、 X_2 はA、D、S、もしくはYであり、 X_3 はD、G、もしくはSであり、 X_4 はSもしくはTであり；ならびに

前記HVR-H3が、式(VII)によるアミノ酸配列を含み：ARX $_1$ GX $_2$ X $_3$ X $_4$ VX $_5$ GDWFX $_6$ Y(配列番号8)、式中、 X_1 はEもしくはGであり、 X_2 はEもしくはSであり、 X_3 はDもしくはTであり、 X_4 はA、T、もしくはVであり、 X_5 はA、I、L、T、もしくはVであり、及び X_6 はA、D、もしくはGであり；ならびに/または

前記HVR-L1が、式(XVI)によるアミノ酸配列を含み： X_1 ASQX $_2$ X $_3$ X $_4$ X $_5$ X $_6$ X $_7$ X $_8$ (配列番号857)、式中、 X_1 はQもしくはRであり、 X_2 はD、G、もしくはSであり、 X_3 はIもしくはVであり、 X_4 はG、R、S、もしくはTであり、 X_5 はP、R、S、もしくはTであり、 X_6 はA、F、S、V、もしくはYであり、 X_7 はLもしくはVであり、及び X_8 はAもしくはGであり；

前記HVR-L2が、式(XVII)によるアミノ酸配列を含み： X_1 ASX $_2$ X $_3$ X $_4$ X $_5$ GX $_6$ (配列番号858)、式中、 X_1 はAもしくはDであり、 X_2 はNもしくはSであり、 X_3 はLもしくはRであり、 X_4 はA、E、もしくはQであり、 X_5 はSもしくはTであり、及び X_6 はIもしくはVであり；ならびに

前記HVR-L3が、式(XVIII)によるアミノ酸配列を含む：YCCQX $_1$ YX $_2$ X $_3$ WT(配列番号859)、式中、 X_1 はAもしくはGであり、 X_2 はSもしくはYであり、及び X_3 はI、L、もしくはTである、

請求項18に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項22】

前記HVR-H1が、配列番号709～732からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、前記HVR-H2が、配列番号733～756からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、前記HVR-H3が、配列番号757～780からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、前記HVR-L1が、配列番号781～804からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、前記HVR-L2が、配列番号805～828からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、及び前記HVR-L3が、配列番号829～852からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項21に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項23】

前記重鎖可変領域が、配列番号15、17、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、53、61、63、65、67、71、73、75、79、83

、 85、及び87からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、ならびに/または前記軽鎖可変領域が、配列番号16、18、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、54、62、64、66、68、72、74、76、80、84、86、及び88からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項21または請求項22に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項24】

前記抗体が重鎖及び軽鎖を含み、前記重鎖が、配列番号613、615、617、619、621、623、625、627、629、631、633、635、637、639、641、643、645、647、649、651、653、655、657、及び659からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、ならびに/または、前記軽鎖が、配列番号614、616、618、620、622、624、626、628、630、632、634、636、638、640、642、644、646、648、650、652、654、656、658、及び660からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項21～23のいずれか1項に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

10

【請求項25】

前記HVR-H1が配列番号711または731のアミノ酸配列を含み、前記HVR-H2が配列番号735または755のアミノ酸配列を含み、前記HVR-H3が配列番号759または779のアミノ酸配列を含み、前記HVR-L1が配列番号783または803のアミノ酸配列を含み、前記HVR-L2が配列番号807または827のアミノ酸配列を含み、前記HVR-L3は配列番号831または851のアミノ酸配列を含む、請求項21に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

20

【請求項26】

前記重鎖可変領域が配列番号41または71のアミノ酸配列を含み、及び前記軽鎖可変領域が配列番号42または72のアミノ酸配列を含む、請求項25に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項27】

前記抗体が重鎖及び軽鎖を含み、前記重鎖が配列番号617または657のアミノ酸配列を含み、及び前記軽鎖が配列番号618または658のアミノ酸配列を含む、請求項26に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項28】

前記HVR-H1が配列番号712のアミノ酸配列を含み、前記HVR-H2が配列番号736のアミノ酸配列を含み、前記HVR-H3が配列番号760のアミノ酸配列を含み、前記HVR-L1が配列番号784のアミノ酸配列を含み、前記HVR-L2が配列番号808のアミノ酸配列を含み、前記HVR-L3が配列番号832のアミノ酸配列を含む、請求項21に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

30

【請求項29】

前記重鎖可変領域が配列番号61のアミノ酸配列を含み、及び前記軽鎖可変領域が配列番号62のアミノ酸配列を含む、請求項28に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項30】

前記抗体が重鎖及び軽鎖を含み、前記重鎖が配列番号619のアミノ酸配列を含み、及び前記軽鎖が配列番号620のアミノ酸配列を含む、請求項29に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

40

【請求項31】

前記抗体または抗原結合フラグメントが、表面プラズモン共鳴により測定されるとき、100nM以下の K_D でヒトCD137に結合する、請求項1～30のいずれか1項に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項32】

前記抗体または抗原結合フラグメントが、表面プラズモン共鳴により測定されるとき、50nM以下の K_D でヒトCD137に結合する、請求項31に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

50

【請求項 33】

前記抗体または抗原結合フラグメントは、カニクイザル、マウス、ラット、及びイヌからなる群から選択される少なくとも1つの非ヒト種由来のCD137ポリペプチドと交差反応性である、請求項18～32のいずれか1項に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 34】

前記抗体または抗原結合フラグメントが、カニクイザルCD137に結合する、請求項33に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 35】

前記抗体または抗原結合フラグメントと接触すると、ヒト細胞で発現するヒトCD137の活性が低下する、請求項1～34のいずれか1項に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

10

【請求項 36】

前記抗体または抗原結合フラグメントが、*in vitro*でのヒトCD137のヒトCD137Lへの結合を遮断するための約100nM以下の半数阻害濃度(IC₅₀)を有する、請求項1～34のいずれか1項に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 37】

前記抗体または抗原結合フラグメントが、前記抗体または抗原結合フラグメントが約1μM以上の濃度で提供されると、*in vitro*でのヒトCD137のヒトCD137Lへの結合を完全に遮断する、請求項1～34のいずれか1項に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

20

【請求項 38】

前記抗体または抗原結合フラグメントが、CD137を発現する細胞において、CD137Lにより刺激されるCD137シグナル伝達の1つ以上の態様を遮断する、請求項1～34のいずれか1項に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 39】

前記抗体または抗原結合フラグメントと接触すると、ヒト細胞で発現するヒトCD137の活性が上昇する、請求項1～34のいずれか1項に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 40】

CD137を発現する細胞と前記抗体または抗原結合フラグメントとを接触させると、NF-κB依存性転写が増加する、請求項39に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

30

【請求項 41】

前記抗体が、ヒトIgG2Fc領域を含む、請求項1～40のいずれか1項に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 42】

前記抗体が、ヒトIgG4Fc領域を含む、請求項1～41のいずれか1項に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項 43】

前記ヒトIgG4Fc領域がS241P変異を含み、付番がKababatによる、請求項42に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

40

【請求項 44】

前記重鎖可変領域が、配列番号133、135、137、139、141、143、145、147、149、151、153、155、157、159、161、163、165、167、169、171、173、175、177、179、181、183、185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、205、207、209、211、213、215、217、219、221、223、225、227、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、及び251からなる群から選択される配列を含むポリヌクレオチ

50

ドにコードされ、ならびに/または、前記軽鎖可変領域が、配列番号134、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158、160、162、164、166、168、170、172、174、176、178、180、182、184、186、188、190、192、194、196、198、200、202、204、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、226、228、230、232、234、236、238、240、242、244、246、248、250、及び252からなる群から選択される配列を含むポリヌクレオチドにコードされる、請求項18~20のいずれか1項に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項45】

前記重鎖が、配列番号661、663、665、667、669、671、673、675、677、679、681、683、685、687、689、691、693、695、697、699、701、703、705、及び707からなる群から選択される配列を含むポリヌクレオチドにコードされ、ならびに/または、前記軽鎖が、配列番号662、664、666、668、670、672、674、676、678、680、682、684、686、688、690、692、694、696、698、700、702、704、706、及び708からなる群から選択される配列を含むポリヌクレオチドにコードされる、請求項24に記載の抗体または抗原結合フラグメント。

【請求項46】

請求項1~45のいずれか1項に記載の抗体または抗原結合フラグメントをコードするポリヌクレオチド。

【請求項47】

配列番号133~252からなる群から選択される配列を含むポリヌクレオチド。

【請求項48】

請求項46~47のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項49】

前記ベクターが発現ベクターである、請求項48に記載のベクター。

【請求項50】

請求項48または請求項49に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項51】

前記抗体または抗原結合フラグメントを産生するのに適した条件下で請求項50に記載の宿主細胞を培養することを含む、抗体または抗原結合フラグメントを作製する方法。

【請求項52】

前記細胞によって産生された前記抗体または抗原結合フラグメントを回収することをさらに含む、請求項51に記載の方法。

【請求項53】

請求項1~45のいずれか1項に記載の抗体または抗原結合フラグメントと、医薬的に許容される担体と、を含む、医薬組成物。

【請求項54】

それを必要とする対象のがんを治療する方法であって、請求項1~45のいずれか1項に記載の抗体または抗原結合フラグメントの治療有効量を前記対象に投与することを含む、前記方法。

【請求項55】

治療有効量の少なくとも1つの追加の治療薬を前記対象に投与することをさらに含む、請求項54に記載の方法。

【請求項56】

前記少なくとも1つの追加の治療薬が、ウイルス遺伝子治療、免疫チェックポイント阻害薬、標的療法、放射線療法、及び化学療法からなる群から選択される、請求項55に記載の方法。

【請求項57】

10

20

30

40

50

前記少なくとも1つの追加の治療薬が、ボマリスト、レプリミド、レナリドマイド、ボマリドマイド、サリドマイド、DNAアルキル化白金含有誘導体、シスプラチン、5-フルオロウラシル、シクロホスファミド、抗CTLA4抗体、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗CD20抗体、抗CD40抗体、抗DR5抗体、抗CD1d抗体、抗TIM3抗体、抗SLAMF7抗体、抗KIR受容体抗体、抗OX40抗体、抗HER2抗体、抗ErbB-2抗体、抗EGFR抗体、セツキシマブ、リツキシマブ、トラスツズマブ、ペンブロリズマブ、放射線療法、単回放射線照射、分割放射線照射、局所放射線照射、全臓器放射線照射、IL-12、IFN、GM-CSF、キメラ抗原受容体、養子移入されたT細胞、抗がんワクチン、及び腫瘍溶解性ウイルスからなる群から選択される、請求項55または請求項56に記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2017年8月21日に提出された国際特許出願連続番号PCT/CN2017/098332の優先利益を主張し、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

配列表への参照

ASCIIテキストファイルに関する次の提出の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる：配列表のコンピューター可読形式(CRF)(ファイル名：695402000341sequlist.txt、記録日：2018年8月20日、サイズ：542KB)。

20

【0003】

本開示は、ヒトCD137に結合する抗体またはその抗原結合フラグメント、それをコードする核酸、その治療用組成物、及びそれらの抗腫瘍の使用に関する。

【背景技術】

【0004】

CD137(CD137受容体、4-1BB、TNFRSF9などとも呼ばれる)は、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー(TNFRS)の膜貫通タンパク質である。CD137の現在の理解は、その発現は一般に活性化依存であり、活性化NK及びNKT細胞、制御性T細胞、樹状細胞(DC)、刺激性マスト細胞、分化性骨髄細胞、単球、好中球、及び好酸球を含む免疫細胞の広範なサブセットに存在することを示している(Wang, 2009, Immunological Reviews 229:192-215)。CD137の発現はまた、腫瘍血管系(Broll, 2001, Amer. J. Clin. Pathol. 115(4):543-549; Seaman, 2007, Cancer Cell 11:539-554)及び炎症またはアテローム性動脈硬化の内皮の部位(Drenkard, 2007 FASEB J. 21:456-463; Olofsson, 2008, Circulation 117:1292-1301)でも実証されている。CD137を刺激するリガンド、すなわちCD137リガンド(CD137L)は、活性化抗原提示細胞(APC)、骨髄系前駆細胞、及び造血幹細胞に発現している。

30

40

【0005】

ヒトCD137は、255アミノ酸のタンパク質である(GenBank受託番号NM_001561; NP_001552; 配列番号1)。タンパク質は、シグナル配列(アミノ酸残基1~17)、それに続く細胞外ドメイン(169アミノ酸)、膜貫通領域(27アミノ酸)、及び細胞内ドメイン(42アミノ酸)を含む(Cheuk ATC et al. 2004 Cancer Gene Therapy 11:215-226)。受容体は細胞表面に単量体と二量体の形態で発現し、CD137リガンドと三量体化

50

してシグナルを伝達し得る。

【0006】

マウス及びヒトT細胞の多数の研究は、CD137が細胞の増殖の増大、生存、及びサイトカイン産生を促進することを示している(Croft, 2009, Nat Rev Immunol 9:271-285)。いくつかのCD137アゴニストmAbが共刺激分子の発現を増加させ、細胞溶解性Tリンパ球応答を著しく増強し、さまざまなモデルで抗腫瘍効果をもたらすことが研究により示されている。CD137アゴニストmAbは、予防的及び治療的な環境において有効性を実証している。さらに、CD137単独療法及び組み合わせ療法の腫瘍モデルは、永続的な抗腫瘍保護T細胞記憶応答を確立している(Lynch, 2008, Immunol Rev. 22:277-286)。CD137アゴニストはまた、当該技術分野で認められているさまざまな自己免疫モデルで自己免疫反応を抑制することも示されている(Vinay, 2006, J Mol Med 84:726-736)。CD137のこの二面的な活性は、免疫寛容を破る免疫療法アプローチに関連する可能性のある自己免疫副作用を抑えながら、抗腫瘍活性を提供する可能性を提示する。

10

【0007】

ヒトCD137に結合し、CD137を介した応答を増加させ、それによってがん及び自己免疫疾患を含むさまざまな疾患及び状態の治療に有望な治療を提供する抗体に対する必要性は未だ満たされていない。さらに、動物モデル研究を可能にし、同時に治療候補を提供するために、ヒト及び実験動物(マウス、サル、イヌなど)などの異なる種間で交差反応する抗CD137抗体の必要性が存在する。

20

【発明の概要】

【0008】

本開示の目的は、抗体またはその結合フラグメント、またはその誘導体などの、ヒトCD137に結合する単離された結合分子を提供することである。本開示の別の目的は、CD137に結合する結合分子を含む組成物を提供することである。本開示の1つ以上の結合分子を使用することにより、CD137シグナル伝達に関連するまたは媒介される疾患及び/または状態を治療する方法を提供することも本開示の目的である。本開示のこれら及び他の目的は、本明細書でより完全に説明される。

【0009】

したがって、一態様では、本明細書で提供されるのは、ヒトCD137の細胞外ドメインに結合し、以下の機能特性のうち、1つ以上(例えば、2つ以上、3つ以上、4つ以上、5つ以上、6つ以上、7つ以上、8つ以上、9つ以上、または10個全て)を含む、1つ以上の抗体(例えば、単離された抗体)、または1つ以上のその抗原結合フラグメントである:(a)配列番号1のアミノ酸残基34~108内の1つ以上のアミノ酸残基に結合する;(b)配列番号1のアミノ酸残基109~112、125、126、135~138、150及び151内の1つ以上のアミノ酸残基に結合しない;(c)100nM以下の K_D でヒトCD137に結合する;(d)ヒトCD137に対するアゴニスト活性を有する;(e)1000nMまでの濃度で、ヒトOX40、CD40、GITR、及び/またはCD27受容体に結合しない;(f)サル、マウス、ラット、及び/またはイヌのCD137と交差反応性である;(g)ADCC効果を誘発しない;(h)腫瘍細胞増殖を阻害することができる;(i)がんに対する治療効果を有する;及び/または(j)CD137とCD137L間の結合を遮断する。

30

40

【0010】

したがって、一態様では、本明細書で提供されるのは、ヒトCD137の細胞外ドメインに結合する抗体(例えば、単離された抗体)またはその抗原結合フラグメントである。いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、重鎖可変領域はHVR-H1、HVR-H2、及びHVR-H3を含み、HVR-H1は、以下からなる群から選択される式によるアミノ酸配列を含み:式(I): $X_1TFX_2X_3YX_4IHWV$ (配列番号2)、式中、 X_1 はFまたはYであり、 X

50

2 は S または T であり、X 3 は G、N、または S であり、及び X 4 は、A、G、または W であり；式 (I I) : Y S I X₁ S G X₂ X₃ W X₄ W I (配列番号 3)、式中、X 1 は S または T であり、X 2 は H または Y であり、X 3 は H または Y であり、及び X 4 は A、D、G、N、S、または T であり；ならびに式 (I I I) : F S L S T X₁ G V X₂ V X₃ W I (配列番号 4)、式中、X 1 は G または S であり、X 2 は A または G であり、及び X 3 は A、G、S、または T であり；H V R - H 2 は、以下からなる群から選択される式によるアミノ酸配列を含み：式 (I V) : L A L I D W X₁ X₂ D K X₃ Y S X₄ S L K S R L (配列番号 5)、式中、X 1 は A、D、または Y であり、X 2 は D または G であり、X 3 は R、S、または Y であり、及び X 4 は P または T であり；式 (V) : I G X₁ I Y H S G X₂ T Y Y X₃ P S L K S R V (配列番号 6)、式中、X 1 は D または E であり、X 2 は N または S であり、及び X 3 は N または S であり；ならびに式 (V I) : V S X₁ I S G X₂ G X₃ X₄ T Y Y A D S V K G R F (配列番号 7)、式中、X 1 は A、G、S、V、または Y であり、X 2 は A、D、S、または Y であり、X 3 は D、G、または S であり、X 4 は S または T であり；ならびに H V R - H 3 は、式 (V I I) によるアミノ酸配列を含む：A R X₁ G X₂ X₃ X₄ V X₅ G D W F X₆ Y (配列番号 8)、式中、X 1 は E または G であり、X 2 は E または S であり、X 3 は D または T であり、X 4 は A、T、または V であり、X 5 は A、I、L、T、または V であり、及び X 6 は A、D、または G である。

10

【 0 0 1 1 】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む、ヒト C D 1 3 7 の細胞外ドメインに結合する抗体（例えば、単離された抗体）またはその抗原結合フラグメントであり、重鎖可変領域は H V R - H 1、H V R - H 2、及び H V R - H 3 を含み、H V R - H 1 は、以下からなる群から選択される式によるアミノ酸配列を含み：式 (X I I) : X₁ T F S X₂ Y W I H W V (配列番号 8 5 3)、式中、X 1 は F または Y であり、及び X 2 は N または S であり；式 (X I I I) : Y S I X₁ S G X₂ X₃ W X₄ W I (配列番号 8 5 4)、式中、X 1 は S または T であり、X 2 は H または Y であり、X 3 は H または Y であり、及び X 4 は A、D、G、N、または S であり；ならびに式 (X I V) : F S L S T X₁ G V X₂ V X₃ W I (配列番号 8 5 5)、式中、X 1 は G または S であり、X 2 は A または G であり、及び X 3 は A、G、または S であり；H V R - H 2 は、以下からなる群から選択される式によるアミノ酸配列を含み：式 (I V) : L A L I D W X₁ X₂ D K X₃ Y S X₄ S L K S R L (配列番号 5)、式中、X 1 は A、D、または Y であり、X 2 は D または G であり、X 3 は R、S、または Y であり、及び X 4 は P または T であり；ならびに式 (X V) : V S X₁ I S G X₂ G X₃ X₄ T Y Y A D S V K G R F (配列番号 8 5 6)、式中、X 1 は G、S、V、または Y であり、X 2 は A、D、S、または Y であり、X 3 は D、G、または S であり、X 4 は S または T であり；ならびに H V R - H 3 は、式 (V I I) によるアミノ酸配列を含む：A R X₁ G X₂ X₃ X₄ V X₅ G D W F X₆ Y (配列番号 8)、式中、X 1 は E または G であり、X 2 は E または S であり、X 3 は D または T であり、X 4 は A、T、または V であり、X 5 は A、I、L、T、または V であり、及び X 6 は A、D、または G である。

20

30

【 0 0 1 2 】

別の態様では、本明細書で提供されるのは、ヒト C D 1 3 7 の細胞外ドメインに結合する抗体（例えば、単離された抗体）またはその抗原結合フラグメントである。いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、軽鎖可変領域は H V R - L 1、H V R - L 2、及び H V R - L 3 を含み、H V R - L 1 は、式 (V I I I) によるアミノ酸配列を含み：X₁ A S Q X₂ X₃ X₄ X₅ X₆ X₇ X₈ (配列番号 9)、式中、X 1 は Q または R であり、X 2 は D、G、または S であり、X 3 は I または V であり、X 4 は G、R、S、または T であり、X 5 は P、R、S、または T であり、X 6 は A、D、F、S、V、または Y であり、X 7 は L または V であり、及び X 8 は A、G、または N であり；H V R - L 2 は、式 (I X) によるアミノ酸配列を含み：X₁ A S X₂ X₃ X₄ X₅ G X₆ (配列番号 10)、式中、X 1 は A または D であり

40

50

、X 2 は N、S、または T であり、X 3 は L または R であり、X 4 は A、E、または Q であり、X 5 は S または T であり、及び X 6 は I または V であり；ならびに H V R - L 3 は、以下からなる群から選択される式によるアミノ酸配列を含み：式 (X) : Y C Q Q X 1 Y X 2 X 3 X 4 T (配列番号 1 1)、式中、X 1 は A、G、S、または Y であり、X 2 は Q、S、または Y であり、X 3 は I、L、T、または Y であり、及び X 4 は I、S、V、または W であり；ならびに式 (X I) : Y C X 1 Q X 2 X 3 X 4 X 5 P X 6 T (配列番号 1 2)、式中、X 1 は E または Q であり、X 2 は P、S、または Y であり、X 3 は D、L、S、T、または Y であり、X 4 は D、E、H、S、または T であり、X 5 は D、L、T、または W であり、及び X 6 は L、P、R、または V である。

【 0 0 1 3 】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む、ヒト C D 1 3 7 の細胞外ドメインに結合する抗体（例えば、単離された抗体）またはその抗原結合フラグメントであり、軽鎖可変領域は H V R - L 1、H V R - L 2、及び H V R - L 3 を含み、H V R - L 1 は、式 (X V I) によるアミノ酸配列を含み：X 1 A S Q X 2 X 3 X 4 X 5 X 6 X 7 X 8 (配列番号 8 5 7)、式中、X 1 は Q または R であり、X 2 は D、G、または S であり、X 3 は I または V であり、X 4 は G、R、S、または T であり、X 5 は P、R、S、または T であり、X 6 は A、F、S、V、または Y であり、X 7 は L または V であり、及び X 8 は A または G であり；H V R - L 2 は、式 (X V I I) によるアミノ酸配列を含み：X 1 A S X 2 X 3 X 4 X 5 G X 6 (配列番号 8 5 8)、式中、X 1 は A または D であり、X 2 は N または S であり、X 3 は L または R であり、X 4 は A、E、または Q であり、X 5 は S または T であり、及び X 6 は I または V であり；ならびに H V R - L 3 は、式 (X V I I I) によるアミノ酸配列を含み：Y C Q Q X 1 Y X 2 X 3 W T (配列番号 8 5 9)、式中、X 1 は A または G であり、X 2 は S または Y であり、及び X 3 は I、L、または T である。

【 0 0 1 4 】

別の態様では、本明細書で提供されるのは、ヒト C D 1 3 7 の細胞外ドメインに結合する抗体（例えば、単離された抗体）またはその抗原結合フラグメントである。いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、重鎖可変領域は、以下のものである H V R - H 1、H V R - H 2、及び H V R - H 3 を含み：V H 1、V H 2、V H 3、V H 4、V H 5、V H 6、V H 7、V H 8、V H 9、V H 1 0、V H 1 1、V H 1 2、V H 1 3、V H 1 4、V H 1 5、V H 1 6、V H 1 7、V H 1 8、V H 1 9、V H 2 0、V H 2 1、V H 2 2、V H 2 3、V H 2 4、V H 2 5、V H 2 6、V H 2 7、V H 2 8、V H 2 9、V H 3 0、V H 3 1、V H 3 2、V H 3 3、V H 3 4、V H 3 5、V H 3 6、V H 3 7、V H 3 8、V H 3 9、V H 4 0、V H 4 1、V H 4 2、V H 4 3、V H 4 4、V H 4 5、V H 4 6、V H 4 7、V H 4 8、V H 4 9、V H 5 0、V H 5 1、V H 5 2、V H 5 3、V H 5 4、V H 5 5、V H 5 6、V H 5 7、V H 5 8、V H 5 9、もしくは V H 6 0；ならびに / または、軽鎖可変領域は、以下のものである H V R - L 1、H V R - L 2、及び H V R - L 3 を含み：V L 1、V L 2、V H 3、V L 4、V H 5、V L 6、V L 7、V L 8、V L 9、V L 1 0、V L 1 1、V L 1 2、V L 1 3、V L 1 4、V L 1 5、V L 1 6、V L 1 7、V L 1 8、V L 1 9、V L 2 0、V L 2 1、V L 2 2、V L 2 3、V L 2 4、V L 2 5、V L 2 6、V L 2 7、V L 2 8、V L 2 9、V L 3 0、V L 3 1、V L 3 2、V L 3 3、V L 3 4、V L 3 5、V L 3 6、V L 3 7、V L 3 8、V L 3 9、V L 4 0、V L 4 1、V L 4 2、V L 4 3、V L 4 4、V L 4 5、V L 4 6、V L 4 7、V L 4 8、V L 4 9、V L 5 0、V L 5 1、V L 5 2、V L 5 3、V L 5 4、V L 5 5、V L 5 6、V L 5 7、V L 5 8、V L 5 9、もしくは V L 6 0 (表 1 c に示される)。いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域は、以下のものである H V R - H 1、H V R - H 2、H V R - H 3、H V R - L 1、H V R - L 2、及び H V R - L 3 を含み：V H 1 及び V L 1、V H 2 及び V L 2、V H 3 及び V L 3、V H 4 及び V L 4、V H 5 及び V L 5、V H 6 及び V L 6、V H 7 及び V L 7、V H 8 及

10

20

30

40

50

びVL8、VH9及びVL9、VH10及びVL10、VH11及びVL11、VH12
 及びVL12、VH13及びVL13、VH14及びVL14、VH15及びVL15、
 VH16及びVL16、VH17及びVL17、VH18及びVL18、VH19及びV
 L19、VH20及びVL20、VH21及びVL21、VH22及びVL22、VH2
 3及びVL23、VH24及びVL24、VH25及びVL25、VH26及びVL26
 、VH27及びVL27、VH28及びVL28、VH29及びVL29、VH30及び
 VL30、VH31及びVL31、VH32及びVL32、VH33及びVL33、VH
 34及びVL34、VH35及びVL35、VH36及びVL36、VH37及びVL3
 7、VH38及びVL38、VH39及びVL39、VH40及びVL40、VH41及
 びVL41、VH42及びVL42、VH43及びVL43、VH44及びVL44、V
 H45及びVL45、VH46及びVL46、VH47及びVL47、VH48及びVL
 48、VH49及びVL49、VH50及びVL50、VH51及びVL51、VH52
 及びVL52、VH53及びVL53、VH54及びVL54、VH55及びVL55、
 VH56及びVL56、VH57及びVL57、VH58及びVL58、VH59及びV
 L59、またはVH60及びVL60（表1cに示される）。

【0015】

別の態様では、本明細書で提供されるのは、ヒトCD137の細胞外ドメインに結合す
 る抗体（例えば、単離された抗体）またはその抗原結合フラグメントである。いくつかの
 実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含
 み、重鎖可変領域は、以下のものである重鎖可変領域を含み：VH1、VH2、VH3、
 VH4、VH5、VH6、VH7、VH8、VH9、VH10、VH11、VH12、V
 H13、VH14、VH15、VH16、VH17、VH18、VH19、VH20、V
 H21、VH22、VH23、VH24、VH25、VH26、VH27、VH28、V
 H29、VH30、VH31、VH32、VH33、VH34、VH35、VH36、V
 H37、VH38、VH39、VH40、VH41、VH42、VH43、VH44、V
 H45、VH46、VH47、VH48、VH49、VH50、VH51、VH52、V
 H53、VH54、VH55、VH56、VH57、VH58、VH59、もしくはVH
 60；ならびに/または、軽鎖可変領域は、以下のものである軽鎖可変領域を含む：VL
 1、VL2、VL3、VL4、VL5、VL6、VL7、VL8、VL9、VL10、V
 L11、VL12、VL13、VL14、VL15、VL16、VL17、VL18、V
 L19、VL20、VL21、VL22、VL23、VL24、VL25、VL26、V
 L27、VL28、VL29、VL30、VL31、VL32、VL33、VL34、V
 L35、VL36、VL37、VL38、VL39、VL40、VL41、VL42、V
 L43、VL44、VL45、VL46、VL47、VL48、VL49、VL50、V
 L51、VL52、VL53、VL54、VL55、VL56、VL57、VL58、V
 L59、もしくはVL60（表1cに示される）。いくつかの実施形態では、抗体または
 抗原結合フラグメントは、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、重鎖可変領域及び軽鎖
 可変領域は、以下のものである重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む：VH1及びVL1
 、VH2及びVL2、VH3及びVL3、VH4及びVL4、VH5及びVL5、VH6
 及びVL6、VH7及びVL7、VH8及びVL8、VH9及びVL9、VH10及びV
 L10、VH11及びVL11、VH12及びVL12、VH13及びVL13、VH1
 4及びVL14、VH15及びVL15、VH16及びVL16、VH17及びVL17
 、VH18及びVL18、VH19及びVL19、VH20及びVL20、VH21及び
 VL21、VH22及びVL22、VH23及びVL23、VH24及びVL24、VH
 25及びVL25、VH26及びVL26、VH27及びVL27、VH28及びVL2
 8、VH29及びVL29、VH30及びVL30、VH31及びVL31、VH32及
 びVL32、VH33及びVL33、VH34及びVL34、VH35及びVL35、V
 H36及びVL36、VH37及びVL37、VH38及びVL38、VH39及びVL
 39、VH40及びVL40、VH41及びVL41、VH42及びVL42、VH43
 及びVL43、VH44及びVL44、VH45及びVL45、VH46及びVL46、

10

20

30

40

50

VH47及びVL47、VH48及びVL48、VH49及びVL49、VH50及びVL50、VH51及びVL51、VH52及びVL52、VH53及びVL53、VH54及びVL54、VH55及びVL55、VH56及びVL56、VH57及びVL57、VH58及びVL58、VH59及びVL59、またはVH60及びVL60（表1cに示される）。

【0016】

別の態様では、本明細書で提供されるのは、ヒトCD137の細胞外ドメインに結合する抗体（例えば、単離された抗体）またはその抗原結合フラグメントである。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号1のアミノ酸残基34～108内の1つ以上のアミノ酸残基に結合する。いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号1のアミノ酸残基34～93内の1つ以上のアミノ酸残基に結合する。いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号1のアミノ酸残基34～36、53～55、及び92～93からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸残基に結合する。いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号1の、アミノ酸残基34～36のうちの1つ以上、53～55のうちの1つ以上、及び92～93のうちの1つ以上に結合する。いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号1のアミノ酸残基109～112、125、126、135～138、150、及び151からなる群から選択されるアミノ酸残基のうちの1つ以上に結合しない。いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号1のアミノ酸残基109～112、125、126、135～138、150、及び151に結合しない。いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、カニクイザル、マウス、ラット、及び/またはイヌから選択される少なくとも1つの非ヒト種由来のCD137ポリペプチドと交差反応性である。いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、カニクイザルCD137に結合する。

10

20

【0017】

いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、重鎖可変領域は、配列番号711のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号735のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び配列番号759のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含み、ならびに/または軽鎖可変領域は、配列番号783のアミノ酸配列を含むHVR-L1、配列番号807のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び配列番号831のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。いくつかの実施形態では、重鎖可変領域は配列番号41のアミノ酸配列を含み、及び/または軽鎖可変領域は配列番号42のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、抗体は重鎖及び軽鎖を含み、重鎖は配列番号617のアミノ酸配列を含み、及び/または軽鎖は配列番号618のアミノ酸配列を含む。

30

【0018】

いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、重鎖可変領域は、配列番号712のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号736のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び配列番号760のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含み、ならびに/または軽鎖可変領域は、配列番号784のアミノ酸配列を含むHVR-L1、配列番号808のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び配列番号832のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。いくつかの実施形態では、重鎖可変領域は配列番号61のアミノ酸配列を含み、及び/または軽鎖可変領域は配列番号62のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、抗体は重鎖及び軽鎖を含み、重鎖は配列番号619のアミノ酸配列を含み、及び/または軽鎖は配列番号620のアミノ酸配列を含む。

40

【0019】

いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、重鎖可変領域は、配列番号731のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号755のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び配列番号779のアミノ酸配列

50

を含むHVR-H3を含み、ならびに/または軽鎖可変領域は、配列番号803のアミノ酸配列を含むHVR-L1、配列番号827のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び配列番号851のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。いくつかの実施形態では、重鎖可変領域は配列番号71のアミノ酸配列を含み、及び/または軽鎖可変領域は配列番号72のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、抗体は重鎖及び軽鎖を含み、重鎖は配列番号657のアミノ酸配列を含み、及び/または軽鎖は配列番号658のアミノ酸配列を含む。

【0020】

別の態様では、本明細書で提供されるのは、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む、ヒトCD137の細胞外ドメインに結合する抗体（例えば、単離された抗体）であり、重鎖可変領域はHVR-H1、HVR-H2、及びHVR-H3を含み、HVR-H1は、以下からなる群から選択される式によるアミノ酸配列を含み：式(I)、式(II)、及び式(III)；HVR-H2は、以下からなる群から選択される式によるアミノ酸配列を含み：式(IV)、式(V)、及び式(VI)；HVR-H3は式(VII)によるアミノ酸配列を含み；ならびに/または軽鎖可変領域はHVR-L1、HVR-L2、及びHVR-L3を含み、HVR-L1は式(VIII)によるアミノ酸配列を含み；HVR-L2は式(IX)によるアミノ酸配列を含み；HVR-L3は、以下からなる群から選択される式によるアミノ酸配列を含む：式(X)及び式(XI)。いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む、ヒトCD137の細胞外ドメインに結合する抗体（例えば、単離された抗体）であり、重鎖可変領域はHVR-H1、HVR-H2、及びHVR-H3を含み、HVR-H1は、以下からなる群から選択される式によるアミノ酸配列を含み：式(XII)及び式(XVI)；HVR-H2は、以下からなる群から選択される式によるアミノ酸配列を含み：式(IV)及び式(XV)；HVR-H3は式(VII)によるアミノ酸配列を含み；ならびに/または軽鎖可変領域はHVR-L1、HVR-L2、及びHVR-L3を含み、HVR-L1は式(XVI)によるアミノ酸配列を含み；HVR-L2は式(XVII)によるアミノ酸配列を含み；HVR-L3は式(XVIII)によるアミノ酸配列を含む。

【0021】

いくつかの実施形態では、HVR-H1は、配列番号253～312からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、HVR-H2は、配列番号313～372からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、HVR-H3は、配列番号373～432からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、HVR-L1は、配列番号433～492からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、HVR-L2は、配列番号493～552からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、及びHVR-L3は、配列番号553～612からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、重鎖可変領域は、配列番号13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107、109、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、及び131からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、ならびに/または軽鎖可変領域は、配列番号14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、114、116、118、120、122、124、126、128、130、及び132からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0022】

いくつかの実施形態では、HVR-H1は、式(XII)、式(XIII)、及び式(XIV)からなる群から選択される式によるアミノ酸配列を含み；HVR-H21は、式

(I V) または式 (X V) によるアミノ酸配列を含み ; ならびに H V R - H 3 は式 (V I I) によるアミノ酸配列を含み ; ならびに / または、 H V R - L 1 は式 (X V I) によるアミノ酸配列を含み ; H V R - L 2 は式 (X V I I) によるアミノ酸配列を含み ; H V R - L 3 は式 (X V I I I) によるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、 H V R - H 1 は、配列番号 7 0 9 ~ 7 3 2 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、 H V R - H 2 は、配列番号 7 3 3 ~ 7 5 6 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、 H V R - H 3 は、配列番号 7 5 7 ~ 7 8 0 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、 H V R - L 1 は、配列番号 7 8 1 ~ 8 0 4 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、 H V R - L 2 は、配列番号 8 0 5 ~ 8 2 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、及び H V R - L 3 は、配列番号 8 2 9 ~ 8 5 2 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、重鎖可変領域は、配列番号 1 5、1 7、3 1、3 3、3 5、3 7、3 9、4 1、4 3、4 5、4 7、4 9、5 3、6 1、6 3、6 5、6 7、7 1、7 3、7 5、7 9、8 3、8 5、及び 8 7 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、ならびに / または軽鎖可変領域は、配列番号 1 6、1 8、3 2、3 4、3 6、3 8、4 0、4 2、4 4、4 6、4 8、5 0、5 4、6 2、6 4、6 6、6 8、7 2、7 4、7 6、8 0、8 4、8 6、及び 8 8 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、抗体は重鎖及び軽鎖を含み、重鎖は、配列番号 6 1 3、6 1 5、6 1 7、6 1 9、6 2 1、6 2 3、6 2 5、6 2 7、6 2 9、6 3 1、6 3 3、6 3 5、6 3 7、6 3 9、6 4 1、6 4 3、6 4 5、6 4 7、6 4 9、6 5 1、6 5 3、6 5 5、6 5 7、及び 6 5 9 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、ならびに / または、軽鎖は、配列番号 6 1 4、6 1 6、6 1 8、6 2 0、6 2 2、6 2 4、6 2 6、6 2 8、6 3 0、6 3 2、6 3 4、6 3 6、6 3 8、6 4 0、6 4 2、6 4 4、6 4 6、6 4 8、6 5 0、6 5 2、6 5 4、6 5 6、6 5 8、及び 6 6 0 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 3 】

いくつかの実施形態では、 H V R - H 1 は配列番号 7 1 1 または 7 3 1 のアミノ酸配列を含み、 H V R - H 2 は配列番号 7 3 5 または 7 5 5 のアミノ酸配列を含み、 H V R - H 3 は配列番号 7 5 9 または 7 7 9 のアミノ酸配列を含み、 H V R - L 1 は配列番号 7 8 3 または 8 0 3 のアミノ酸配列を含み、 H V R - L 2 は配列番号 8 0 7 または 8 2 7 のアミノ酸配列を含み、 H V R - L 3 は配列番号 8 3 1 または 8 5 1 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、重鎖可変領域は配列番号 4 1 または 7 1 のアミノ酸配列を含み、及び軽鎖可変領域は配列番号 4 2 または 7 2 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、抗体は重鎖及び軽鎖を含み、重鎖は配列番号 6 1 7 または 6 5 7 のアミノ酸配列を含み、及び軽鎖は配列番号 6 1 8 または 6 5 8 のアミノ酸配列を含む。

【 0 0 2 4 】

いくつかの実施形態では、 H V R - H 1 は配列番号 7 1 2 のアミノ酸配列を含み、 H V R - H 2 は配列番号 7 3 6 のアミノ酸配列を含み、 H V R - H 3 は配列番号 7 6 0 のアミノ酸配列を含み、 H V R - L 1 は配列番号 7 8 4 のアミノ酸配列を含み、 H V R - L 2 は配列番号 8 0 8 のアミノ酸配列を含み、 H V R - L 3 は配列番号 8 3 2 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、重鎖可変領域は配列番号 6 1 のアミノ酸配列を含み、及び軽鎖可変領域は配列番号 6 2 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、抗体は重鎖及び軽鎖を含み、重鎖は配列番号 6 1 9 のアミノ酸配列を含み、及び軽鎖は配列番号 6 2 0 のアミノ酸配列を含む。

【 0 0 2 5 】

前述の実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、(例えば、表面プラズモン共鳴により測定されるとき) 1 0 0 n M 以下の K_D でヒト C D 1 3 7 に結合する。いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、(例えば、表面プラズモン共鳴により測定されるとき) 5 0 n M 以下の K_D でヒト C D 1 3 7 に結合する。

【 0 0 2 6 】

前述の実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、カニクイザル（例えば、GenBank 遺伝子 ID 102127961）、マウス（例えば、GenBank 遺伝子 ID 21942）、ラット（例えば、GenBank 遺伝子 ID 500590）、及び/またはイヌ（例えば、GenBank 遺伝子 ID 608274）から選択される少なくとも1つの非ヒト種由来のCD137ポリペプチドと交差反応性である。いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、カニクイザルCD137に結合する。

【0027】

前述の実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントと接触すると、（例えば、ヒト細胞などの細胞で発現するとき）ヒトCD137の活性が低下する。

10

【0028】

前述の実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、*in vitro*でのヒトCD137のヒトCD137Lへの結合を遮断するための約100nM以下の半数阻害濃度（IC₅₀）を有する。いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、抗体または抗原結合フラグメントが約1μM以上の濃度で提供されると、*in vitro*でのヒトCD137のヒトCD137Lへの結合を完全に遮断する。前述の実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントと接触すると、（例えば、ヒト細胞などの細胞で発現するとき）ヒトCD137の活性が上昇する。いくつかの実施形態では、CD137（例えば、ヒト細胞に発現する）を抗体または抗原結合フラグメントと接触させると、NF-κB依存性転写が増加する。上述の実施形態のいくつかのいくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、CD137を発現する細胞において、CD137Lにより刺激されるCD137シグナル伝達の1つ以上の態様、例えばCD137Lに刺激されるNF-κB依存性転写を遮断する。

20

【0029】

前述の実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、抗体はヒトIgG2Fc領域を含む。前述の実施形態のいずれかと組み合わせることができるいくつかの実施形態では、抗体はヒトIgG4Fc領域を含む。いくつかの実施形態では、ヒトIgG4Fc領域はS241P変異を含み、ここで付番はKabataによる。いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントはADCC効果を誘導しない。

30

【0030】

別の態様では、本明細書で提供されるのは、配列番号133、135、137、139、141、143、145、147、149、151、153、155、157、159、161、163、165、167、169、171、173、175、177、179、181、183、185、187、189、191、193、195、197、199、201、203、205、207、209、211、213、215、217、219、221、223、225、227、229、231、233、235、237、239、241、243、245、247、249、及び251から選択される配列を含むポリヌクレオチドにコードされる抗体重鎖可変領域、ならびに/または、配列番号134、136、138、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158、160、162、164、166、168、170、172、174、176、178、180、182、184、186、188、190、192、194、196、198、200、202、204、206、208、210、212、214、216、218、220、222、224、226、228、230、232、234、236、238、240、242、244、246、248、250、及び252から選択される配列を含むポリヌクレオチドにコードされる抗体軽鎖可変領域である。いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、配列番号661、663、665、667、669、671、673、675、677、679、681、683、685、687、

40

50

689、691、693、695、697、699、701、703、705、及び707から選択される配列を含むポリヌクレオチドにコードされる抗体重鎖、ならびに/または、配列番号662、664、666、668、670、672、674、676、678、680、682、684、686、688、690、692、694、696、698、700、702、704、706、及び708から選択される配列を含むポリヌクレオチドにコードされる抗体軽鎖である。

【0031】

いくつかの実施形態では、HVRはKababによる。いくつかの実施形態では、抗体は、配列GFSLSTSGVGVG（配列番号866）を含むHVR-H1、配列LIDWDDDKYYSPLKS（配列番号867）を含むHVR-H2、及び配列GGSDTVLGDFAY（配列番号868）を含むHVR-H3を含む重鎖可変（VH）ドメイン；ならびに/または、配列RASQSVSPYLA（配列番号869）を含むHVR-L1、配列DASLES（配列番号870）を含むHVR-L2、及び配列QQGYSLWT（配列番号871）を含むHVR-L3を含む軽鎖可変（VH）ドメインを含む。

10

【0032】

いくつかの実施形態では、HVRはKababによる。いくつかの実施形態では、抗体は、配列GYSITSGHYWA（配列番号872）を含むHVR-H1、配列SIGSYGSTTYADSVKG（配列番号873）を含むHVR-H2、及び配列GGSDAVLGDFAY（配列番号874）を含むHVR-H3を含む重鎖可変（VH）ドメイン；ならびに/または、配列RASQGISFLA（配列番号875）を含むHVR-L1、配列DASNLET（配列番号876）を含むHVR-L2、及び配列QQGYLWT（配列番号877）を含むHVR-L3を含む軽鎖可変（VH）ドメインを含む。

20

【0033】

いくつかの実施形態では、HVRはKababによる。いくつかの実施形態では、抗体は、配列GFSLSTGGVGVG（配列番号878）を含むHVR-H1、配列LIDWADDKYYSPLKS（配列番号879）を含むHVR-H2、及び配列GGSDTVIGDFAY（配列番号880）を含むHVR-H3を含む重鎖可変（VH）ドメイン；ならびに/または、配列RASQSIGSYLA（配列番号881）を含むHVR-L1、配列DASNLET（配列番号882）を含むHVR-L2、及び配列QQGYLWT（配列番号883）を含むHVR-L3を含む軽鎖可変（VH）ドメインを含む。

30

【0034】

上述の実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、本開示の抗体は多量体抗体（例えば、二重特異性抗体）である。上述の実施形態のいずれかのいくつかの実施形態では、本開示の抗体は、IgM抗体であり、例えば、IgM Fc領域（例えば、ヒトIgM Fc領域）を含む。

【0035】

別の態様では、本明細書で提供されるのは、本明細書に記載の抗体または抗原結合フラグメントのいずれかをコードするポリヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、配列番号133～252から選択される配列を含むポリヌクレオチドである。

40

【0036】

別の態様では、本明細書で提供されるのは、上述のポリヌクレオチドのいずれかを含むベクターである。いくつかの実施形態では、ベクターは発現ベクターである。

【0037】

別の態様において、本明細書で提供されるのは、本書に記載のポリヌクレオチドまたはベクターのいずれかを含む宿主細胞（例えば、細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞、哺乳動物細胞（CHO細胞または293T細胞など）など）である。いくつかの実施形態では、本

50

明細書で提供されるのは、抗体または抗原結合フラグメントを産生するのに適した条件下で宿主細胞を培養することを含む、抗体または抗原結合フラグメントを作製する方法である。いくつかの実施形態では、この方法は、宿主細胞によって産生された抗体または抗原結合フラグメントを回収することをさらに含む。

【0038】

別の態様では、本明細書で提供されるのは、本明細書に記載の抗体または抗原結合フラグメント（またはその誘導体）のいずれかと、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物である。

【0039】

別の態様では、本明細書で提供されるのは、それを必要とする対象において異常な細胞増殖（例えば、がん）を治療する方法であって、治療有効量の明細書に記載の抗体、抗原結合フラグメント、及び/または医薬組成物のいずれかを対象に投与することを含む、方法である。いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるのは、対象において腫瘍細胞転移を低減する方法であって、治療有効量の明細書に記載の抗体、抗原結合フラグメント、及び/または医薬組成物のいずれかを前記対象に投与することを含む、方法である。いくつかの実施形態では、方法は、少なくとも1つ（例えば、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも10個など）の治療的有效量の追加の治療薬を対象に投与することをさらに含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの追加の治療薬は、ウイルス遺伝子治療、免疫チェックポイント阻害薬、標的療法、放射線療法、及び化学療法からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの追加の治療薬は、ポマリド、レプリミド、レナリドマイド、ポマリドマイド、サリドマイド、DNAアルキル化白金含有誘導体、シスプラチン、5-フルオロウラシル、シクロホスファミド、抗CTLA4抗体、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗CD20抗体、抗CD40抗体、抗DR5抗体、抗CD1d抗体、抗TIM3抗体、抗SLAMF7抗体、抗KIR受容体抗体、抗OX40抗体、抗HER2抗体、抗Erbb2抗体、抗EGFR抗体、セツキシマブ、リツキシマブ、トラスツズマブ、ペンブロリズマブ、放射線療法、単回放射線照射、分割放射線照射、局所放射線照射、全臓器放射線照射、IL-12、IFN、GM-CSF、キメラ抗原受容体、養子移入されたT細胞、抗がんワクチン、及び腫瘍溶解性ウイルスからなる群から選択される。本明細書で提供されるのはまた、それを必要とする対象における、異常な細胞増殖（例えば、がん）の治療及び/または腫瘍細胞転移の低減のための、明細書に記載の医薬組成物、抗体、及び/または抗原結合フラグメント（またはその誘導体）のいずれかの使用である。本明細書で提供されるのはまた、それを必要とする対象における、異常な細胞増殖（例えば、がん）の治療及び/または腫瘍細胞転移の低減のための医薬の製造のための、明細書に記載の抗体または抗原結合フラグメント（またはその誘導体）のいずれかの使用である。

【0040】

上述及び本明細書に記載の様々な実施形態の特性の1つ、いくつか、または全てを組み合わせ、本開示の他の実施形態を形成できることを理解されたい。本開示のこれら及び他の態様は、当業者に明らかになるであろう。本開示のこれら及び他の実施形態は、以下の詳細な説明によってさらに説明される。

【図面の簡単な説明】

【0041】

【図1】図1Aは、例示的な重鎖可変領域（VH）（配列番号13）及び例示的な軽鎖可変領域（VL）（配列番号14）のKabattによるCDR定義と比較した超可変領域（HVR）定義を示す。図1Bは、マウスCD137と交差反応性であるFabヒットの選択を示す。

【図2】例示的な抗体の、ヒト、サル、及びマウスのCD137へのELISA結合アッセイを示す。パネルの上部に示されているように、各パネルは異なる抗体に関するものである。

10

20

30

40

50

【図 3 A】例示的な抗体の、ヒト、サル、マウス、及びラットの CD 137 への FACS ベースの結合アッセイを示す。パネルの上部に示されているように、各パネルは異なる抗原に関するものである。

【図 3 B】例示的な抗体と参照抗体における、種の交差反応性の比較を示す。

【図 4 A】活性化されたヒト及びサル T 細胞に結合するがナイーブヒト T 細胞には結合しない例示的な抗体を示す。

【図 4 B】AG 10131 の、活性化されたヒト、サル、マウス、及びラット T 細胞への結合を示す。

【図 5】例示的な抗体の、CD 137 に対する結合特異性を有するが、他の TNFR ファミリーメンバーに対しては結合しないことを示す。

【図 6】図 6 A 及び図 6 B は、例示的な抗体が ELISA (図 6 A) 及びフローサイトメトリーによるアッセイ (図 6 B) の両方によって CD 137 とその同族リガンド CD 137L の結合を遮断することを示す。

【図 7 A】フローサイトメトリーによるエピトープマッピング結果を示す。

【図 7 B】エピトープマッピング実験から同定された CD 137 配列 / 目的領域 (注釈付き) と共に、ヒト (配列番号 1)、カニクイザル (配列番号 860)、及びマウス (配列番号 861) の CD 137 の一部の複数の配列アラインメントを示す。

【図 8】NF B レポーターアッセイにおける例示的な抗体のアゴニスト活性を示す。

【図 9】CD 8 + T 細胞増殖 (上パネル) 及び INF - 分泌 (下パネル) における例示的な抗体のアゴニスト活性を示す。

【図 10】H 2 2 マウス肝癌モデルにおける、例示的な抗体の抗腫瘍効果、及び腫瘍への CD 4 + 及び CD 8 + T 細胞の浸潤を示す。

【図 11】CT 26 マウス結腸癌モデルにおける例示的な抗体の抗腫瘍効果を示す。

【図 12】EMT 6 マウス乳癌モデルにおける例示的な抗体の抗腫瘍効果を示す。

【図 13】同一の腫瘍細胞で再チャレンジした後、例示的な抗体で処理した CT 26 マウスが腫瘍フリーを維持したことを示す。

【図 14】腫瘍を拒絶した再チャレンジマウスの脾細胞による腫瘍細胞の殺傷を示す。

【図 15】AG 10131 が ADC C 効果を示さないことを示す。

【図 16】例示的な抗体が高濃度で凝集の少ないことを示す。

【図 17】加速ストレス条件下での例示的な抗体の安定性を示す。

【図 18】熱安定性を示す。

【図 19】AG 10131 が、通常のマウスで隔週 100 mg / kg (BIW) x 2 まで血液毒性がないことを示す。

【図 20】AG 10131 が、通常のマウスで隔週 100 mg / kg (BIW) x 2 まで組織学的肝臓異常がないことを示す。

【図 21】AG 10131 が、10 mg / kg / 週 x 4 でカニクイザルに血液毒性がないことを示す。

【図 22】AG 10131 が、10 mg / kg / 週 x 4 でサルに肝臓毒性がないことを示す。

【図 23】サルにおける AG 10131 の薬物動態プロファイルを示す。

【図 24】ラットにおける AG 10131 の薬物動態プロファイルを示す。

【図 25】マウスにおける様々な抗体の薬物動態プロファイルを示す。

【図 26】CD 137 システインリッチドメイン (CRD) が示されたヒト CD 137 - CD 137L 複合体の結晶構造を示す。

【図 27】フローサイトメトリーによる、示されたヒト CD 137 CRD への示された抗 CD 137 抗体結合のエピトープマッピングを示す。

【図 28】抗 CD 137 抗体 AG 10131 が CD 137L に刺激される CD 137 シグナル伝達を遮断することを示す。結果は、NF B ルシフェラーゼレポーターを安定的に発現する 293T 細胞にヒト CD 137 を発現する DNA コンストラクトをトランスフェクトし、ヒト B 細胞リンパ腫細胞 Daudi (上段) または Raji (下段) と、示され

10

20

30

40

50

た比率で共培養し、次いで、アイソタイプ対照（左の列）またはリガンド遮断抗CD137抗体（右の列）の連続希釈液（示されたとおり）とともに一晚インキュベートし、その後ルシフェラーゼ活性を測定した、細胞のNF- κ Bルシフェラーゼレポーターアッセイからのものである。

【図29】架橋抗体の存在下または非存在下で、抗CD137抗体AG10131、AC1121、またはAC1097によるヒトCD137媒介NF- κ Bシグナル伝達の活性化を示す。NF- κ Bシグナル伝達活性化（架橋を有するかまたは有さない）に対する各抗体のEC50（nM）が示される。

【図30】AG10131とそのヒトIgG4アイソタイプ対照抗体が、試験した濃度範囲でヒト補体C1q成分に結合する能力を欠いているのに対し、ヒトIgG1アイソタイプ対照抗体はC1qに結合できることを示す。

【図31】様々な腫瘍モデルにおけるAG10131処理による腫瘍浸潤性Tリンパ球の増強を示す。左上：処理後のH22腫瘍におけるマウスCD4⁺（上パネル）及びCD8⁺（下パネル）T細胞の代表的なIHC染色画像。右上：処理後のEMT6腫瘍におけるマウスCD4⁺（上パネル）及びCD8⁺（下パネル）T細胞の代表的なIHC染色画像。下中央：処理後のCT26腫瘍におけるマウスCD4⁺（上パネル）及びCD8⁺（下パネル）T細胞の代表的なIHC染色画像。CD4⁺及びCD8⁺T細胞は、ヘマトキシリンによる核の対比染色の背景で黒く染色された。CD4⁺及びCD8⁺T細胞は黒い矢印で示されている。

【図32】図31に示される実験からの腫瘍浸潤Tリンパ球の数を定量化する。H22、EMT6、及びCT26腫瘍試料の腫瘍におけるCD4⁺（上段）及びCD8⁺T細胞（下段）の%を、ピヒクルとAG10131処理群で比較した。*^{*}, p < 0.01; *^{*}*^{*}, p < 0.001。

【図33】確立されたマウスCT26結腸癌同系モデルにおける、AG10131及び抗PD-1抗体の単独及び組み合わせの抗腫瘍効果を示す。上パネル：各処理群の平均腫瘍増殖のプロット。下パネル：各群の個々の腫瘍増殖のスパイダープロット。

【発明を実施するための形態】

【0042】

A. 定義

本明細書で特に定義されない限り、本開示に関連して使用される科学用語及び技術用語は、当業者によって一般に理解される意味を有するものとする。さらに、文脈で特に必要とされない限り、単数形用語は複数形を含み、複数形用語は単数形を含むものとする。一般に、本明細書に記載の抗体工学、免疫療法、細胞及び組織培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学、ならびにタンパク質及び核酸化学に関連して使用される命名法及び技術は、当該技術分野で周知であり、一般的に使用されるものである。

【0043】

本明細書で使用されるとき、以下の各用語は、このセクションでそれに関連する意味を有する。

【0044】

冠詞「a」及び「an」は、冠詞の文法的な対象の、1又は1を超えるもの（すなわち、少なくとも1）を指す。例として、「要素（an element）」は、1つの要素または1つを超える要素を意味する。

【0045】

「アミノ酸」という用語は、天然に存在するアミノ酸及び合成アミノ酸、ならびに天然に存在するアミノ酸と同様に機能するアミノ酸類似体及びアミノ酸模倣物を指す。天然に存在するアミノ酸は、遺伝暗号によってコードされるアミノ酸、及び後で修飾されるアミノ酸、例えば、ヒドロキシプロリン、ガンマ-カルボキシグルタミン酸、及びO-ホスホセリンである。「アミノ酸類似体」という用語は、天然に存在するアミノ酸と同一の基本化学構造を有するが、C末端カルボキシ基、N末端アミノ基、または側鎖官能基が別の官能基に化学修飾された化合物を指す。「アミノ酸模倣物」という用語は、アミノ酸の一般

10

20

30

40

50

的な化学構造とは異なる構造を有するが、天然に存在するアミノ酸と同様に機能する化合物を指す。

【0046】

「抗体」という用語は、本明細書において最も広い意味で使用され、所望の生物学的活性を示す限り、モノクローナル抗体（完全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、及び抗体フラグメント（例えば、単鎖可変フラグメントまたはs c F v）を具体的に包含する。

【0047】

「抗体」という用語は、当該技術分野で認識されている用語であり、2つの同一の重（H）鎖及び2つの同一の軽（L）鎖からなる基本的な4ポリペプチド鎖構造を有する抗原結合タンパク質（すなわち免疫グロブリン）を指し得る。各々のL鎖は、1つの共有ジスルフィド結合によってH鎖に連結され、一方で2つのH鎖は、H鎖のアイソタイプに応じて1つ以上のジスルフィド結合によって互いに連結される。各重鎖は、N末端に、可変領域（本明細書ではV_Hと略す）とそれに続く定常領域を有する。重鎖定常領域は3つのドメイン、C_{H1}、C_{H2}、及びC_{H3}からなる。各軽鎖は、N末端に可変領域（本明細書ではV_Lと略す）とそれに続く他端の定常領域を有する。軽鎖定常領域は、1つのドメイン、C_Lからなる。V_Lは、V_Hと並列し、C_Lは、重鎖の第1定常ドメイン（C_{H1}）と並列する。V_HとV_Lの対形成は、共に単一の抗原結合部位を形成する。IgM抗体は、「J鎖と呼ばれるさらなるポリペプチドを伴って5つの基本的なヘテロ四量体単位からなり、したがって、10の抗原結合部位を含むが、一方で分泌されたIgA抗体は、重合してJ鎖と共に2～5個の基本的な4本鎖単位からなる多価集合体を形成することができる。

10

20

【0048】

V_H及びV_L領域は、構造解析及び配列解析に基づいて、超可変領域（HVR）と呼ばれる超可変の領域にさらに細分化できる。HVRには、フレームワーク領域（FW）と呼ばれる、より保存された領域が散在している。比較のために、Yvonne Chen等によるKabata CDR定義（Selection and Analysis of an Optimized Anti-VEGF Antibody: Crystal Structure of an Affinity-matured Fab in Complex with Antigen, J. Mol. Biol. (1999) 293, 865-881）を以下に列挙する（図1aも参照）。各々のV_H及びV_Lは、アミノ末端からカルボキシ末端に向けて以下の順番：FW1、HVR1、FW2、HVR2、FW3、HVR3、FW4で配置された、3つのHVR及び4つのFWからなる。本開示を通じて、重鎖の3つのHVRは、HVR__H1、HVR__H2、及びHVR__H3と呼ばれる。同様に、軽鎖の3つのHVRは、HVR__L1、HVR__L2、及びHVR__L3と呼ばれる。

30

【0049】

重鎖及び軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。抗体の定常領域は、免疫系の様々な細胞（例えば、エフェクター細胞）及び古典的補体系の第1成分（C1q）を含む宿主の組織または因子に対する免疫グロブリンの結合を媒介することができる。軽鎖及び重鎖内では、可変領域と定常領域は約12個以上のアミノ酸の「J」領域で結合され、重鎖は約10個以上のアミノ酸の「D」領域も含む。概して、Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed., Raven Press, N.Y. (1989))を参照されたい。

40

【0050】

いずれかの脊椎動物由来のL鎖は、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ及びラムダと呼ばれる2つの明確に異なるタイプのうちの一方に割り当てることができる。それらの重鎖の定常ドメイン（CH）のアミノ酸配列に応じて、抗体は異なるクラスまたはアイソタイプに割り当てることができる。5つのクラスの抗体が存在する：IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgM、それぞれ（アルファ）、（デルタ）、

50

(イブシロン)、(ガンマ)、及び μ (ミュー)と呼ばれる重鎖を有する。抗体のIgGクラスは、ガンマ重鎖Y1~Y4によって、それぞれ4つのサブクラスIgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4にさらに分類できる。

【0051】

抗体の「抗体誘導体」または「誘導体」という用語は、抗体が結合するのと同じの抗原(例えば、CD137)に結合することができ、追加の分子エンティティに連結された抗体のアミノ酸配列を含む分子を指す。抗体誘導体に含まれる抗体のアミノ酸配列は、抗体の、完全長重鎖、完全長軽鎖、完全長重鎖の任意の部分もしくは複数部分、完全長軽鎖の任意の部分もしくは複数部分、抗体の任意の他のフラグメント(複数可)、または完全抗体であり得る。追加の分子エンティティは、化学分子または生物学的分子であり得る。追加の分子エンティティの例には、化学基、アミノ酸、ペプチド、タンパク質(酵素、抗体など)、及び化合物が含まれる。追加の分子エンティティは、検出剤、標識、マーカー、医薬品、または治療薬としての使用など、任意の有用性を有し得る。抗体のアミノ酸配列は、化学的カップリング、遺伝的融合、非共有結合、またはその他の方法により、追加の分子エンティティに結合または連結してもよい。「抗体誘導体」という用語はまた、キメラ抗体、ヒト化抗体、ならびに保存アミノ酸の置換、付加、及び挿入など、CD137抗体のアミノ酸配列の修飾に由来する分子を含む。

10

【0052】

抗体の「抗原結合フラグメント」または「抗原結合部分」という用語は、抗体が結合する抗原(例えば、CD137)に結合する能力を保持する抗体の1つ以上の部分を指す。抗体の「抗原結合フラグメント」の例には、(i) V_L 、 V_H 、 C_L 、及び C_{H1} ドメインからなる一価フラグメントであるFabフラグメント；(ii) ヒンジ領域でジスルフィド架橋により連結された2つのFabフラグメントを含む二価フラグメントであるF(ab')₂フラグメント；(iii) V_H 及び C_{H1} ドメインからなるFdフラグメント；(iv) 抗体の単一アームの V_L 及び V_H ドメインからなるFvフラグメント、(v) V_H ドメインからなるdAbフラグメント(Ward et al., Nature 341:544-546 (1989))；(vi) 単離された相補性決定領域(CDR)が含まれる。

20

【0053】

「結合分子」という用語は、(1)抗体、(2)抗体の抗原結合フラグメント、及び(3)抗体の誘導体を包含し、それぞれ本明細書で定義されるとおりである。

30

【0054】

「CD137に結合すること」、「CD137に結合する」、「CD137へと結合すること」、または「CD137へと結合する」という用語は、本明細書で定義される結合分子の、実施例4に記載されているようなピアコアアッセイなどのin vitroアッセイにおける、100nM以下の親和性(K_D)でのヒトCD137への結合を指す。

【0055】

「CD137」及び「CD137受容体」という用語は、本願において交換可能に使用され、ヒトCD137受容体、ならびにその変異体、アイソフォーム、及び種相同体を含む。したがって、本明細書で定義及び開示される結合分子は、ヒト以外の種由来のCD137にも結合し得る。他の場合、結合分子はヒトCD137に完全に特異的であり得、種または他の種類の交差反応性を示さないものであり得る。

40

【0056】

「CD137抗体」という用語は、本明細書で定義されるように、ヒトCD137受容体に結合することができる抗体を指す。

【0057】

「キメラ抗体」という用語は、ヒト抗体に由来する可変領域及びマウス免疫グロブリン定常領域を有するものなど、異なる動物種に由来するアミノ酸配列を含む抗体を指す。

【0058】

「結合について競合する」という用語は、それらの結合標的への結合における2つの抗

50

体の相互作用を指す。一次抗体とその同族エピトープとの結合が、二次抗体の非存在下の一次抗体の結合と比較して二次抗体の存在下で検出可能に減少する場合、一次抗体は結合について二次抗体と競合する。代替的に、二次抗体のそのエピトープへの結合もまた、一次抗体の存在下で検出可能に減少する場合は、必ずしもそうであることはないが、そうである可能性がある。すなわち、一次抗体のそれぞれのエピトープへの結合を二次抗体が阻害することなく、一次抗体は、二次抗体のそのエピトープへの結合を阻害することができる。しかしながら、各抗体が、他の抗体とその同族のエピトープとの結合を検出可能に阻害する場合、同程度、それ以上、またはそれ以下の範囲で、抗体はそれぞれのエピトープ（複数可）の結合について互いに「交差競合」と言われる。

【0059】

「エピトープ」という用語は、抗体（またはその抗原結合フラグメント）が結合する抗原の一部を指す。エピトープは、タンパク質の三次フォールディングによって並置された連続アミノ酸または非連続アミノ酸の両方から形成し得る。連続アミノ酸から形成されたエピトープは、典型的には、変性溶媒への暴露時に保持されるが、三次フォールディングによって形成されたエピトープは、典型的には、変性溶媒による処理で失われる。エピトープは、特有の空間的コンフォメーションでさまざまな数のアミノ酸を含むことができる。エピトープの空間的コンフォメーションを決定する方法には、例えば、X線結晶学、2次元核磁気共鳴、質量分析と組み合わせた重水素水素交換、または部位特異的変異導入、または抗原とその結合抗体及びその変異体との複合体構造の計算モデリングと組み合わせて使用される全ての方法が含まれる。例えば、Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)を参照されたい。抗原の所望のエピトープが決定されると、例えば、本明細書に記載の技術を使用して、そのエピトープに対する抗体を生成することができる。抗体の生成と特性解析により、所望のエピトープに関する情報を解明できる。この情報から、同一のエピトープへの結合について競合的に抗体をスクリーニングすることができる。これを達成するためのアプローチは、相互競合研究を実施して、互いに競合的に結合する抗体、すなわち、抗原への結合について競合する抗体を見つけることである。相互競合に基づいて抗体を「ピニング」するためのハイスループットプロセスは、PCT公開番号WO03/48731に記載されている。

【0060】

「生殖系列」という用語は、生殖細胞を介して親から子孫に渡されるときに抗体遺伝子及び遺伝子セグメントのヌクレオチド配列を指す。生殖系列配列は、B細胞成熟過程での組換え及び高頻度変異事象により変化した成熟B細胞の抗体をコードするヌクレオチド配列とは区別される。

【0061】

「グリコシル化部位」という用語は、真核細胞により糖残基の付加位置として認識されるアミノ酸残基を指す。オリゴ糖などの炭水化物が付加するアミノ酸は、典型的には、アスパラギン（N結合）、セリン（O結合）、及びトレオニン（O結合）残基である。特定の付加部位は、典型的には、本明細書で「グリコシル化部位配列」と呼ばれるアミノ酸配列によって示される。N-結合型グリコシル化のグリコシル化部位配列は次のとおりである：-Asn-X-Ser-または-Asn-X-Thr-、式中、Xは、プロリン以外の標準的なアミノ酸のいずれでもよい。「N結合」及び「O結合」という用語は、糖分子とアミノ酸残基の間の付加部位として機能する化学基を指す。N結合型糖はアミノ基を介して付加し、O結合糖は、ヒドロキシル基を介して付加する。「グリカン占有」という用語は、グリコシル化部位に連結された（すなわち、グリカン部位が占有されている）糖部分の存在を指す。ポリペプチド上に少なくとも2つの潜在的なグリコシル化部位がある場合、なし（0-グリカン部位占有）、1つ（1-グリカン部位占有）、または両方（2-グリカン部位占有）のいずれかの部位が、糖部分によって占有され得る。

【0062】

10

20

30

40

50

「宿主細胞」という用語は、目的のタンパク質、タンパク質フラグメント、またはペプチドを生成するように遺伝子操作できる細胞系を指す。宿主細胞には、非限定的に、例えばCHO、BHK、NSO、SP2/0、YB2/0などのげっ歯類（ラット、マウス、モルモット、もしくはハムスター）、またはヒト組織もしくはハイブリドーマ細胞に由来する哺乳動物培養細胞、酵母細胞、昆虫細胞、及びトランスジェニック動物または培養組織内に含まれる細胞などの培養細胞が含まれる。この用語は、特定の対象細胞だけでなく、そのような細胞の子孫も包含する。変異や環境の影響により、特定の修飾が後続の世代で発生する可能性があるため、このような子孫は親細胞と同一ではないかもしれないが、なおも「宿主細胞」という用語の範囲内に含まれる。

【0063】

「ヒト抗体」という用語は、軽鎖及び重鎖のアミノ酸配列全体がヒト免疫グロブリン遺伝子に由来する抗体を指す。マウス、マウス細胞、またはマウス細胞由来のハイブリドーマで産生される場合、ヒト抗体はマウス糖鎖を含み得る。ヒト抗体は、当該技術分野で公知の様々な方法で調製され得る。

【0064】

「ヒト化抗体」という用語は、ヒト抗体配列に由来するアミノ酸残基を含むキメラ抗体を指す。ヒト化抗体は、非ヒト動物または合成抗体由来のCDRまたはHVRの一部または全てを含むことができ、抗体のフレームワーク及び定常領域は、ヒト抗体配列に由来するアミノ酸残基を含む。

【0065】

「例示的抗体」という用語は、本開示に記載され、表1a及び1bに列挙されたものとして指定された抗体のいずれか1つを指す。これらの抗体は、どのクラスのものでもよい（例えば、IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgM）。したがって、上述で特定された各抗体は、 V_L 及び V_H 領域に対して同一のアミノ酸配列を有する5つのクラス全ての抗体を包含する。さらに、IgGクラスの抗体は、任意のサブクラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4）のものであり得る。したがって、上述で特定されたIgGサブクラスの各抗体は、 V_L 及び V_H 領域に対して同一のアミノ酸配列を有する4つのサブクラス全ての抗体を包含する。5つのクラス及び4つのIgGサブクラスのヒト抗体の重鎖定常領域のアミノ酸配列は、当該技術分野で公知である。表1bに示される例示的な抗体のそれぞれのIgG4サブクラスの全長重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列は、本開示で提供される。

【0066】

「単離された抗体」または「単離された結合分子」という用語は、本明細書で定義されるような抗体または結合分子を指し、(1)天然状態においてそれと付随する天然で関連付けられた成分と関連付けられていない；(2)同一種に由来する他のタンパク質を含まない；(3)異なる種の細胞によって発現される；または(4)天然に存在しない。単離された抗体の例には、CD137を使用してアフィニティ精製されたCD137抗体、*in vitro*でハイブリドーマまたは他の細胞株によって生成されたCD137抗体、及びトランスジェニック動物に由来するCD137抗体が含まれる。

【0067】

「単離された核酸」という用語は、核酸の天然源に存在する他の核酸分子から分離された、ゲノム、cDNA、もしくは合成起源、またはそれらの組み合わせの核酸分子を指す。例えば、ゲノムDNAに関して、「単離された」という用語には、ゲノムDNAが天然で関連している染色体から分離された核酸分子が含まれる。好ましくは、「単離された」核酸は、天然で核酸に隣接する配列（すなわち、目的の核酸の5'及び3'末端に位置する配列）を含まない。

【0068】

「 k_a 」という用語は、特定の抗体-抗原相互作用の会合速度定数を指し、「 k_d 」という用語は、特定の抗体-抗原相互作用の解離速度定数を指す。

【0069】

10

20

30

40

50

「 K_D 」という用語は、特定の抗体 - 抗原相互作用の平衡解離定数を指す。これは、 k_d の k_a に対する比（すなわち k_d / k_a ）から得られ、モル濃度（ M ）で表される。 K_D は、結合パートナーに結合する抗体の親和性の尺度として使用される。 K_D が小さければ小さいほど、抗体はより強く結合するか、または抗体と抗原の間の親和性が高くなる。例えば、ナノモル濃度（ nM ）の解離定数を持つ抗体は、マイクロモル濃度（ μM ）の解離定数を持つ抗体よりも特定の抗原により強く結合する。抗体の K_D は、当該技術分野で十分に確立された方法を使用して決定することができる。抗体の K_D を決定する1つの方法は、典型的には、*Biacore*（登録商標）システムなどのバイオセンサーシステムを使用して、表面プラズモン共鳴を使用することによる。*BIACORE*（商標）システム（*BIACORE*アッセイ）を使用するアッセイ手順は、本開示の実施例セクションに記載されている。

10

【0070】

「哺乳動物」という用語は、哺乳綱の任意の動物種を指す。哺乳動物の例には以下が含まれる：ラット、マウス、サル、及びモルモットなどの実験動物；ネコ、イヌ、ウサギ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、及びブタなどの家畜；ならびにライオン、トラ、ゾウなどの飼育下の野生動物。

【0071】

哺乳動物の特定の疾患状態に関して「予防する」または「予防すること」という用語は、疾患の発症を予防または遅延させること、またはその臨床的または無症状症状の発現を予防することを指す。

20

【0072】

本明細書で使用される時、2つのポリペプチド配列間の「配列同一性」は、配列間で同一であるアミノ酸のパーセンテージを示す。ポリペプチドのアミノ酸配列同一性は、*Bestfit*、*FASTA*、または*BLAST*などの公知のコンピュータプログラムを使用して従来どおりに決定できる（例えば、*Pearson, Methods Enzymol.* 183:63-98 (1990); *Pearson, Methods Mol. Biol.* 132:185-219 (2000); *Altschul et al., J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990); *Altschul et al., Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402 (1997)を参照されたい）。*Bestfit*または他の配列アライメントプログラムを使用して、特定の配列が、例えば参照アミノ酸配列と95%同一であるかどうかを決定するとき、パラメーターは、同一のパーセンテージが参照アミノ酸配列の全長にわたって計算され、参照配列内のアミノ酸残基の総数の最大5%の相同性のギャップが許容されるように設定される。ポリペプチド間の同一性のパーセンテージを決定するこの前述の方法は、本明細書に開示される全てのタンパク質、フラグメント、または変異体に適用可能である。

30

【0073】

本明細書で定義される時、結合分子（例えば、抗体）とその結合パートナー（例えば、抗原）との相互作用に関して、「特異的に結合する」または「~へと特異的に結合する」という用語は、所定の条件下で、動物種からの目的の抗原と、異なる動物種からの抗原オーソログとを識別する結合分子の能力を指す。*CD137*結合分子は、*in vitro*アッセイで決定されるとき、ラットまたはマウスの*CD137*に結合する*EC50*の50%未満の*EC50*でヒト*CD137*に結合する場合、ヒト*CD137*に特異的に結合すると言われる。抗体の結合特異性は、当該技術分野で公知の方法を使用して決定できる。そのような方法の例には、*PHA*刺激一次細胞を使用する*FACS*、ウエスタンブロット、*ELISA*、*RIA*、*ECL*、*IRMA*試験、及びペプチドスキャンが含まれる。

40

【0074】

本明細書で定義される時、結合分子（例えば、抗体）とその結合パートナー（例えば、抗原）との相互作用に関して、「選択的に結合する」または「~へと選択的に結合する」という用語は、所定の条件下で、動物種からの目的の抗原（ヒト*CD137*など）と、

50

同一の動物種からの異なる抗原（ヒトCD40など）とを識別する結合分子の能力を指す。CD137結合分子は、*in vitro*アッセイで決定されるとき、ヒトCD40またはヒトCD134に結合するEC50の10%未満のEC50でヒトCD137に結合する場合、ヒトCD137に選択的に結合すると言われる。

【0075】

哺乳動物の特定の疾患状態に関して「治療する」、「治療すること」、または「治療」という用語は、疾患状態を有する哺乳動物に望ましいまたは有益な効果を引き起こすことを指す。望ましいまたは有益な効果には、疾患の1つ以上の症状の頻度または重症度の低下（すなわち、腫瘍増殖及び/もしくは転移、または免疫細胞の数及び/もしくは活性などによって媒介される他の効果）、あるいは疾患、状態、または障害のさらなる進行の停止または阻害が含まれ得る。哺乳動物におけるがん治療の文脈において、望ましいまたは有益な効果には、がん細胞のさらなる増殖または拡散の阻害、がん細胞の死滅、がんの再発の阻害、がんに関連する疼痛の軽減、または哺乳動物の生存率の改善が含まれ得る。効果は主観的または客観的のいずれかであり得る。例えば、哺乳動物がヒトである場合、ヒトは、活力またはバイタリティーの改善、または疼痛の減少を、治療の改善または応答の自覚症状として指摘する場合がある。代替的に、臨床医は、身体検査、検査値、腫瘍マーカー、またはX線所見に基づいて、腫瘍サイズまたは腫瘍量の減少を指摘する場合がある。臨床医が治療に対する応答について観察する可能性のあるいくつかの臨床検査の兆候には、白血球数、赤血球数、血小板数、赤血球沈降速度、及びさまざまな酵素レベルなどの検査の正常化が含まれる。さらに、臨床医は、検出可能な腫瘍マーカーの減少を観察する

10

20

【0076】

「ベクター」という用語は、外来核酸分子を輸送することができる核酸分子を指す。外来核酸分子は、連結または組換えなどの組換え技術によりベクター核酸分子に連結されている。これにより、宿主細胞または生物において外来核酸分子を増殖、選択、さらに操作または発現させることができる。ベクターは、プラスミド、ファージ、トランスポゾン、コスミド、染色体、ウイルス、またはビリオンであり得る。ベクターの1つの種類は、宿主細胞への導入の際、宿主細胞のゲノムに組み込まれ、それによって、宿主ゲノムと共に複製される（例えば、非エピソーム哺乳類ベクター）。ベクターの別の種類は、それが導入された宿主細胞において自律的複製が可能である（例えば、細菌の複製起点を有する細菌ベクター及びエピソーム哺乳動物ベクター）。それらが作動可能に連結されている発現可能な外来核酸の発現を誘導することができる別の特定のタイプのベクターは、一般に「発現ベクター」と呼ばれる。発現ベクターは一般に、発現可能な外来核酸の発現を駆動する制御配列を有する。「転写ベクター」として知られるより単純なベクターは、転写のみが可能で、翻訳はできない：それらは、標的細胞で複製できるが、発現しない。「ベクター」という用語は、その機能に関係なく、全てのタイプのベクターを包含する。それらが作動可能に連結されている発現可能な核酸の発現を誘導することができるベクターは、一般に「発現ベクター」と呼ばれる。

30

【0077】

本開示の方法及び技術は、一般に、当該技術分野で周知の方法に従って実施され、特に明記しない限り、本明細書を通して引用及び議論される様々な一般的及びより具体的な参考文献に記載される。そのような参考文献は、例えば、Sambrook and Russell, *Molecular Cloning, A Laboratory Approach*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001), Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (2002)、及び Harlow and Lane *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press,

40

50

Cold Spring Harbor, N.Y. (1990)を含む。酵素反応及び精製技術は、当該技術分野で一般的に達成されるように、または本明細書に記載されるように、製造業者の仕様に従って実施される。本明細書に記載される分析化学、合成有機化学、及び医薬化学及び薬学化学に関連して使用される命名法、ならびに実験室手順及び技術は、当該技術分野で周知であり一般的に使用されるものである。標準的な手法は、化学合成、化学分析、医薬品の調製、製剤化、送達、及び患者の治療に使用される。

【0078】

本明細書で使用されるとき、20個の従来のアミノ酸及びそれらの略語は標準的な使用方法に従う。Immunology - A Synthesis (2nd Edition, E. S. Golub and D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991))を参照されたい。

10

【0079】

B. ヒトCD137に結合する結合分子

本開示は、CD137抗体、CD137抗体の抗原結合フラグメント、及びCD137抗体の誘導体を含む、ヒトCD137へと結合する単離された結合分子を提供する。いくつかの実施形態では、結合分子は、エピトープ結合に関連して記載された抗体、及びHV R、可変領域(VL、VH)、及びIgG(例えば、IgG4)軽鎖及び重鎖に関連して記載された抗体のうちの任意のものである。いくつかの実施形態では、本開示は、ヒトCD137に結合し、以下の機能的特性のうちの少なくとも1つ(例えば、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7、8、または9つ全て)を有する結合分子に関する：(a)500nM以下のKDでヒトCD137へと結合する；(b)ヒトCD137に対するアゴニスト活性を有する；(c)1000nMまでの濃度で、ヒトOX40、CD40、GITR、及び/またはCD27受容体に結合しない；(d)サル、マウス、ラット、またはイヌのCD137と交差反応性である；(e)ADCC効果を誘導しない；(f)腫瘍細胞の増殖を阻害できる；(g)がんに対する治療効果を有する；(h)CD137とCD137Lの間の結合を遮断する；ならびに(i)CD137を発現する細胞において、CD137Lによって刺激されるCD137シグナル伝達(例えば、CD137Lに刺激されるNF- κ B依存性転写)を遮断する。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される抗体はまた、CD137とそのリガンドCD137Lとの間の結合を遮断、例えば完全に遮断することができる。また、本明細書で提供されるのは、本明細書に記載の抗体または抗原結合フラグメントの1つ以上とヒトCD137への結合について交差競合する1つ以上の抗CD137抗体または抗原結合フラグメントである。

20

30

【0080】

いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合フラグメントは、配列番号1のアミノ酸残基34~108内の1つ以上のアミノ酸残基に結合する。いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号1のアミノ酸残基34~93内の1つ以上のアミノ酸残基に結合する。いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号1のアミノ酸残基34~36、53~55、及び92~93からなる群から選択される1つ以上のアミノ酸残基に結合する。いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号1の、アミノ酸残基34~36のうちの1つ以上、53~55のうちの1つ以上、及び92~93のうちの1つ以上に結合する。いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号1のアミノ酸残基109~112、125、126、135~138、150、及び151からなる群から選択されるアミノ酸残基のうちの1つ以上に結合しない。いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、配列番号1のアミノ酸残基109~112、125、126、135~138、150、及び151に結合しない。標的抗原に結合する抗体または抗原結合フラグメントの能力を測定する方法は、例えば、表面プラズモン共鳴、ELISA、等温滴定熱量測定、フィルター結合アッセイ、EMSAなどを含む、当該技術分野に公知の任

40

50

意の方法を使用して実施してもよい。いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントの標的抗原へと結合する能力は、表面プラズモン共鳴によって測定される（例えば、以下の実施例 1 を参照されたい）。

【0081】

いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、約 500 nM 以下の KD（例えば、約 500 nM 以下、約 400 nM 以下、約 300 nM 以下、約 200 nM 以下、約 150 nM 以下、約 100 nM 以下、約 90 nM 以下、約 80 nM 以下、約 75 nM 以下、約 70 nM 以下、約 60 nM 以下、約 50 nM 以下、約 40 nM 以下、約 30 nM 以下、約 25 nM 以下、約 20 nM 以下、約 10 nM 以下、約 1 nM 以下、約 0.1 nM 以下など）で、ヒト CD137 へと結合する。いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、約 100 nM 以下の KD で、ヒト CD137 へと結合する。いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、約 50 nM 以下の KD で、ヒト CD137 へと結合する。抗体または抗原結合フラグメントの KD を測定する方法は、例えば、表面プラズモン共鳴、ELISA、等温滴定熱量測定、フィルター結合アッセイ、EMSA などを含む、当該技術分野に公知の任意の方法を使用して実施してもよい。いくつかの実施形態では、KD は表面プラズモン共鳴によって測定される（例えば、以下の実施例 1 を参照されたい）。

10

【0082】

抗 CD137 抗体は、アゴニストになるために架橋する必要がある。例えば、Fc ガンマ受容体を介して *in vivo* で架橋が達成されるが、典型的には、*in vitro* での細胞ベースの実験ではポリクローナル抗 Fc 抗体が使用される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗体または抗原結合フラグメントは、ヒト CD137 に対してアゴニスト活性を有する。いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、ヒト CD137 を発現する細胞（例えば、ヒト細胞）が、抗体または抗原結合フラグメントと接触するとき、ヒト CD137 の 1 つ以上（例えば、1 つ以上、2 つ以上、3 つ以上など）の活性を誘発する。様々な CD137 活性が当該技術分野で公知であり、非限定的に、NF- κ B 依存性転写の誘導、T 細胞増殖の誘導、T 細胞生存の延長、活性化 T 細胞の共刺激、サイトカイン分泌（IL-2 など）の誘導、及び単球活性化の誘導を含み得る。いくつかの実施形態では、1 つ以上の CD137 活性はそのリガンドへの CD137 結合ではない。CD137 活性（例えば、NF- κ B 依存性転写及び/または T 細胞増殖などの誘導）を測定する方法は、当該技術分野に公知であり、例えば以下の実施例 8 及び 9 に記載の方法によるものを含む。いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、ヒト CD137 を発現する細胞（例えば、ヒト細胞）で NF- κ B 依存性転写を増加させる。いくつかの実施形態では、NF- κ B 依存性転写は、抗体または抗原結合フラグメントと接触する CD137 を発現する細胞（例えば、ヒト細胞）において、抗体または抗原結合フラグメントと接触していない対応する細胞（例えば、抗体と接触していない、またはアイソタイプ対照抗体と接触する対応する細胞）と比較して、約 10% 以上、約 20% 以上、約 30% 以上、約 40% 以上、約 50% 以上、約 60% 以上、約 70% 以上、約 80% 以上、約 90% 以上、または約 99% 以上増加する。いくつかの実施形態では、NF- κ B 依存性転写は、抗体または抗原結合フラグメントと接触する CD137 を発現する細胞（例えば、ヒト細胞）において、抗体または抗原結合フラグメントと接触していない対応する細胞（例えば、抗体と接触していない、またはアイソタイプ対照抗体と接触する対応する細胞）と比較して、約 2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍、100 倍、1000 倍、またはそれ以上増加する。

20

30

40

【0083】

いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、サル（例えば、カニクイザル）、マウス、ラット、及び/またはイヌ CD137 と交差反応性である。いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、サル CD137 と交差反応性である。いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、マウス CD137 と交差反応性である。いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、ラッ

50

トCD137と交差反応性である。いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、イヌCD137と交差反応性である。いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、サルとマウスのCD137；サルとラットのCD137；サルとイヌのCD137；マウスとラットのCD137；マウスとイヌのCD137；ラットとイヌのCD137；サルとマウスとラットのCD137；サルとマウスとイヌのCD137；サルとラットとイヌのCD137；マウスとラットとイヌのCD137；またはサルとマウスとラットとイヌのCD137と交差反応性である。いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、約100nM（例えば、約1nM、約10nM、約25nM、約50nM、約75nM、約100nM）で交差反応性である。非限定的に、表面プラズモン共鳴、ELISA、等温滴定量測定、フィルター結合アッセイ、EMSAなどを含む、抗体の交差反応性を測定する方法は、当該技術分野に公知である。いくつかの実施形態では、交差反応性はELISAによって測定される（例えば、以下の実施例2を参照されたい）。

10

【0084】

いくつかの実施形態では、抗体はADCC効果を誘発しない。非限定的に、以下の実施例11に記載される方法を含む、ADCC効果を測定する方法（例えば、*in vivo*方法）は、当該技術分野に公知である。いくつかの実施形態では、抗体は、対照と比較して、約10%を超えるADCC効果を誘導しない（約10%を超える、約5%を超える、約1%を超える、約0.1%を超える、約0.01%を超える、ADCCを誘導しない）。

20

【0085】

いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、腫瘍細胞の増殖（*growth*）/増殖（*proliferation*）を阻害することができる。いくつかの実施形態では、腫瘍細胞の増殖（*growth*）/増殖（*proliferation*）は、抗体または抗原結合フラグメントと接触するとき、抗体または抗原結合フラグメントと接触していない対応する腫瘍細胞と比較して、少なくとも約5%（例えば、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、または少なくとも約99%）、阻害される。いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、抗体または抗原結合フラグメントが対象に投与されると、対象の腫瘍体積を低減することができる。いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、対象における初期の腫瘍体積（例えば、抗体または抗原結合フラグメントの投与前）と比較して、少なくとも約5%（例えば、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、または少なくとも約99%）、低減する。腫瘍細胞の増殖（*growth*）/増殖（*proliferation*）、腫瘍体積、及び/または腫瘍阻害をモニタリングする方法は、例えば、以下の実施例10に記載の方法によるものを含んで、当該技術分野で公知である。

30

【0086】

いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、がんに対して治療効果を有する。いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、がんの1つ以上の徴候または症状を軽減する。いくつかの実施形態では、がん罹患している対象は、抗体または抗原結合フラグメントを投与すると部分的または完全に寛解する。

40

【0087】

別の態様では、本開示は、ヒトCD137への結合についてAG10058、AG10059、及び/またはAG10131などの本開示の例示的な抗体のいずれかと競合または交差競合する単離された抗体を提供する。特定の実施形態では、本開示は、本開示の例示的な抗体のいずれかとヒトCD137上の同一のエピトープへの結合について競合または交差競合する単離された抗体を提供する。別の抗体との結合について競合または交差競

50

合する抗体の能力は、B I A c o r e 分析、E L I S A アッセイ、またはフローサイトメトリーなどの当技術分野で公知の標準的な結合アッセイを使用して決定することができる。例えば、本開示の例示的な抗体が飽和条件下でヒトCD137へと結合することを可能にし、次いでCD137へと結合する試験抗体の能力を測定することができる。試験抗体が例示的な抗体と同時にCD137へと結合できる場合、試験抗体は例示的な抗体とは異なるエピトープへと結合する。しかしながら、試験抗体がCD137へと同時に結合できない場合、試験抗体は同一のエピトープ、重複するエピトープ、または例示的な抗体が結合するエピトープにごく近接したエピトープへと結合する。この実験は、E L I S A、R I A、F A C S、または表面プラズモン共鳴などのさまざまな方法を使用して実施できます。

10

【0088】

いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、CD137とそのリガンド（例えば、ヒトCD137とヒトCD137L）間の結合を遮断する。いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、*in vitro*でCD137とそのリガンド間の結合を遮断する。いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、CD137のそのリガンドの結合の遮断について、約500 nM以下（例えば、約500 nM以下、約400 nM以下、約300 nM以下、約200 nM以下、約100 nM以下、約50 nM以下、約25 nM以下、約10 nM以下、約1 nM以下など）の半数阻害濃度（IC50）を有する。いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、CD137のそのリガンドの結合を遮断について、約100 nM以下の半数阻害濃度（IC50）を有する。いくつかの実施形態では、抗体または抗原結合フラグメントは、約100 nM以上（例えば、約100 nM以上、約500 nM以上、約1 μM以上、約10 μM以上など）の濃度で提供されるとき、ヒトCD137のそのリガンドへの結合を完全に遮断する。本明細書で使用するとき、「完全に遮断すること」または「完全に遮断する」という用語は、抗体または抗原結合フラグメントの、第1タンパク質と第2タンパク質の間の結合を少なくとも約80%（例えば、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約99%など）、低減する能力を指す。抗体または抗原結合フラグメントが第1タンパク質（例えばCD137）及び第2タンパク質（例えばCD137L）の結合を遮断する能力を測定する方法は、B I A c o r e 分析、E L I S A アッセイ、及びフローサイトメトリーを非限定的に含み、当該技術分野において公知である（例えば、以下の実施例6を参照されたい）。

20

30

【0089】

B - 1 . C D 1 3 7 抗体

いくつかの態様では、本開示は、配列番号1のアミノ酸残基34～108または34～93内のエピトープでヒトCD137に結合する単離された抗体を提供する。いくつかの実施形態では、抗体は、表面プラズモン共鳴により測定されるとき、50 nM以下の K_D でヒトCD137に結合する。ある特定の実施形態では、抗体は、カニクイザル、マウス、ラット、及びイヌからなるリストから選択される少なくとも1つの非ヒト種と交差反応性であり得る。

40

【0090】

一態様では、本開示は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む単離された抗体を提供し、a) 重鎖可変領域はHVR-H1、HVR-H2、及びHVR-H3を含み、HVR-H1は、以下からなる群から選択される式によるアミノ酸配列を含み：式(I)：X1TFX2X3YX4IHWV（配列番号2）、式中、X1はFもしくはYであり、X2はSもしくはTであり、X3はG、N、もしくはSであり、及びX4は、A、G、もしくはWであり；式(II)：YSIX1SGX2X3WX4WI（配列番号3）、式中、X1はSもしくはTであり、X2はHもしくはYであり、X3はHもしくはYであり、及びX4はA、D、G、N、S、もしくはTであり；ならびに式(III)：FSLSTX1GVX2VX3WI（配列番号4）、式中、X1はGもしくはSであり、X2はAもしくはGであり、及びX3はA、G、S、もしくはTであり；HVR-H2は、以下からなる群か

50

ら選択される式によるアミノ酸配列を含み：式（IV）：L A L I D W X₁ X₂ D K X₃ Y S X₄ S L K S R L（配列番号5）、式中、X₁はA、D、もしくはYであり、X₂はDもしくはGであり、X₃はR、S、もしくはYであり、及びX₄はPもしくはTであり；式（V）：I G X₁ I Y H S G X₂ T Y Y X₃ P S L K S R V（配列番号6）、式中、X₁はDもしくはEであり、X₂はNもしくはSであり、及びX₃はNもしくはSであり；ならびに式（VI）：V S X₁ I S G X₂ G X₃ X₄ T Y Y A D S V K G R F（配列番号7）、式中、X₁はA、G、S、V、もしくはYであり、X₂はA、D、S、もしくはYであり、X₃はD、G、もしくはSであり、X₄はSもしくはTであり；ならびにH V R - H 3は、式（VII）によるアミノ酸配列を含む：A R X₁ G X₂ X₃ X₄ V X₅ G D W F X₆ Y（配列番号8）、式中、X₁はEもしくはGであり、X₂はEもしくはSであり、X₃はDもしくはTであり、X₄はA、T、もしくはVであり、X₅はA、I、L、T、もしくはVであり、及びX₆はA、D、もしくはGであり；ならびに/またはb）軽鎖可変領域は、H V R - L 1、H V R - L 2、及びH V R - L 3を含み、H V R - L 1は式（VIII）によるアミノ酸配列を含み：X₁ A S Q X₂ X₃ X₄ X₅ X₆ X₇ X₈（配列番号9）、式中、X₁はQもしくはRであり、X₂はD、G、もしくはSであり、X₃はIもしくはVであり、X₄はG、R、S、もしくはTであり、X₅はP、R、S、もしくはTであり、X₆はA、D、F、S、V、もしくはYであり、X₇はLもしくはVであり、及びX₈はA、G、もしくはNであり；H V R - L 2は、式（IX）によるアミノ酸配列を含み：X₁ A S X₂ X₃ X₄ X₅ G X₆（配列番号10）、式中、X₁はAもしくはDであり、X₂はN、S、もしくはTであり、X₃はLもしくはRであり、X₄はA、E、もしくはQであり、X₅はSもしくはTであり、及びX₆はIもしくはVであり；ならびにH V R - L 3は、以下からなる群から選択される式によるアミノ酸配列を含み：式（X）：Y C Q Q X₁ Y X₂ X₃ X₄ T（配列番号11）、式中、X₁はA、G、S、もしくはYであり、X₂はQ、S、もしくはYであり、X₃はI、L、T、もしくはYであり、及びX₄はI、S、V、もしくはWであり；ならびに式（XI）：Y C X₁ Q X₂ X₃ X₄ X₅ P X₆ T（配列番号12）、式中、X₁はEもしくはQであり、X₂はP、S、もしくはYであり、X₃はD、L、S、T、もしくはYであり、X₄はD、E、H、S、もしくはTであり、X₅はD、L、T、もしくはWであり、及びX₆はL、P、R、もしくはVである。

10

20

30

40

50

【0091】

いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号253～312からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するH V R - H 1、配列番号313～372からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するH V R - H 2、配列番号373～432からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するH V R - H 3、配列番号433～492からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するH V R - L 1、配列番号493～552からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するH V R - L 2、及び配列番号553～612からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するH V R - L 3を含み得る。

【0092】

ある特定の実施形態では、抗体は、それぞれ配列番号133～252からなる群から選択されるDNA配列によってコードされることが好ましい配列番号13 - 132からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するV L及び/またはV Hを含み得る。

【0093】

いくつかの実施形態では、抗体は、配列番号709～732からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するH V R - H 1、配列番号733～756からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するH V R - H 2、配列番号757～780からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するH V R - H 3、配列番号781～804からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するH V R - L 1、配列番号805～828からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するH V R - L 2、及び配列番号829～852からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するH V R - L 3を含み得る。

【0094】

ある特定の実施形態では、抗体は、それぞれ配列番号661~708からなる群から選択されるDNA配列によってコードされることが好ましい配列番号613-660からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する軽鎖及び/または重鎖(例えば、IgG4などのIgGのもの)を含み得る。

【0095】

いくつかの実施形態では、HVRはKababによる。いくつかの実施形態では、抗体は、配列GFSLSTSGVGVG(配列番号866)を含むHVR-H1、配列LIDWDDDKYYSPSLKS(配列番号867)を含むHVR-H2、及び配列GGSDTVLGDFWFA(配列番号868)を含むHVR-H3を含む重鎖可変(VH)ドメイン;ならびに/または、配列RASQSVSPYLA(配列番号869)を含むHVR-L1、配列DASSLES(配列番号870)を含むHVR-L2、及び配列QQGYSLWT(配列番号871)を含むHVR-L3を含む軽鎖可変(VH)ドメインを含む。

10

【0096】

いくつかの実施形態では、HVRはKababによる。いくつかの実施形態では、抗体は、配列GYSITSGHYWA(配列番号872)を含むHVR-H1、配列SISGYGSTTYADSVKG(配列番号873)を含むHVR-H2、及び配列GGSDAVLGDFWFA(配列番号874)を含むHVR-H3を含む重鎖可変(VH)ドメイン;ならびに/または、配列RASQGISFLA(配列番号875)を含むHVR-L1、配列DASNLET(配列番号876)を含むHVR-L2、及び配列QQGYLWT(配列番号877)を含むHVR-L3を含む軽鎖可変(VH)ドメインを含む。

20

【0097】

いくつかの実施形態では、HVRはKababによる。いくつかの実施形態では、抗体は、配列GFSLSTGGVGVG(配列番号878)を含むHVR-H1、配列LIDWADDKYYSPSLKS(配列番号879)を含むHVR-H2、及び配列GGSDTVIGDFWFA(配列番号880)を含むHVR-H3を含む重鎖可変(VH)ドメイン;ならびに/または、配列RASQSISYLA(配列番号881)を含むHVR-L1、配列DASNLET(配列番号882)を含むHVR-L2、及び配列QQGYLWT(配列番号883)を含むHVR-L3を含む軽鎖可変(VH)ドメインを含む。

30

【0098】

本明細書に記載のCD137抗体は、IgG、IgM、IgE、IgA、またはIgDなどの任意のクラスのものであり得る。CD137抗体は、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4サブクラスなどのIgGクラスのものであることが好ましい。CD137抗体は、当該技術分野で公知の方法を使用して、1つのクラスまたはサブクラスから別のクラスまたはサブクラスに変換され得る。所望のクラスまたはサブクラスで抗体を産生するための例示的な方法は、CD137抗体の重鎖をコードする核酸及びCD137抗体の軽鎖をコードする核酸を単離するステップと、V_H領域をコードする配列を単離するステップと、V_H配列を所望のクラスまたはサブクラスの重鎖定常領域をコードする配列に連結するステップと、細胞内で軽鎖遺伝子及び重鎖コンストラクトを発現させるステップと、CD137抗体を収集するステップとを含む。

40

【0099】

さらに、本開示により提供される抗体はモノクローナルまたはポリクローナルであり得るが、好ましくはモノクローナルである。

【0100】

本開示により提供される特定の単離された抗体の例には、表1a及び1bに列挙されるものが含まれる。これらの抗体の重鎖可変領域、IgG2及びIgG4サブクラスの全長重鎖、軽鎖可変領域、及び全長軽鎖のヌクレオチド及びアミノ酸配列もまた、以下に提供される。

50

【0101】

本開示の抗体は、従来のモノクローナル抗体方法論、例えば、標準体細胞ハイブリダイゼーション技術（例えば、Kohler and Milstein, Nature 256:495 (1975)を参照されたい、Bリンパ球のウイルスまたは腫瘍遺伝子による形質転換、または本明細書で以下に詳細に記載される組換え抗体技術などを含む、当該技術分野で公知の技術によって産生できる。

【0102】

ハイブリドーマ産生は非常によく確立された手順である。ハイブリドーマを調製するための一般的な動物システムは、マウスシステムである。免疫化プロトコール及び融合のための免疫脾細胞の単離のための技術は、当該技術分野で公知である。融合パートナー（例えば、マウス骨髄腫細胞）及び融合手順も公知である。本開示により提供されるヒトCD137抗体を作製するために使用され得る1つの周知の方法は、XenoMouse（商標）動物システムの使用を含む。XenoMouse（商標）マウスは、ヒト免疫グロブリン重鎖及び軽鎖遺伝子座の大きなフラグメントを含み、マウス抗体の産生が欠失する、遺伝子操作されたマウス系統である。例えば、Green et al., Nature Genetics 7:13-21 (1994)及びWO2003/040170を参照されたい。動物はCD137抗原で免疫される。CD137抗原は、単離及び/または精製されたCD137、好ましくはCD137である。それは、CD137の細胞外ドメインなどのCD137のフラグメント、特に配列番号1のアミノ酸残基34~108または34~93を含むCD137細胞外ドメインフラグメントであってもよい。動物の免疫化は、当該技術分野で公知の任意の方法により実施され得る。例えば、Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1990を参照されたい。マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシ、及びウマなどの非ヒト動物を免疫化する方法は、当該技術分野で周知である。例えば、前出のHarlow and Lane、及び米国特許第5,994,619号を参照されたい。CD137抗原は、免疫応答を刺激するためにアジュバントとともに投与してもよい。例示的なアジュバントには、完全または不完全フロイントアジュバント、RIBI（ムラミルジペプチド）、またはISCOM（免疫刺激複合体）が含まれる。CD137抗原で動物を免疫化した後、免疫動物から単離された細胞から抗体産生不死化細胞株を調製する。免疫後、動物を屠殺し、リンパ節及び/または脾臓B細胞を不死化する。細胞を不死化する方法には、非限定的に、それらに癌遺伝子を導入すること、それらに腫瘍ウイルスを感染させること、不死化細胞を選択する条件下でそれらを培養すること、それらを発がん性または変異化合物に供すること、不死化細胞、例えば骨髄腫細胞と融合すること、及び腫瘍抑制遺伝子を不活性化することが含まれる。例えば、前出のHarlow and Laneを参照されたい。骨髄腫細胞との融合が使用される場合、骨髄腫細胞は免疫グロブリンポリペプチドを分泌しないことが好ましい（非分泌細胞株）。不死化細胞は、CD137、その一部、またはCD137を発現する細胞を使用してスクリーニングされる。CD137抗体産生細胞、例えばハイブリドーマは、以下でさらに議論されるように、強力な増殖、高い抗体産生、及び望ましい抗体特性を含む望ましい特性について選択され、クローン化され、さらにスクリーニングされる。ハイブリドーマは、同系動物、免疫系を欠く動物、例えばヌードマウス内で*in vivo*で、または*in vitro*での細胞培養で増殖させることができる。ハイブリドーマを選択、クローニング、及び増殖する方法は、当業者に周知である。

【0103】

本開示の抗体は、ファージディスプレイ法または酵母ディスプレイ法を使用して調製することもできる。ヒト抗体を単離するためのそのようなディスプレイ方法は、Achim Knappik, et al., "Fully Synthetic Human Combinatorial Antibody Libraries (HuCAL) Based on Modular Consensus Frameworks

and CDRs Randomized with Trinucleotides. J. Mol. Biol. (2000) 296, 57-86; 及び Michael J. Feldhaus, et al, "Flow-cytometric isolation of human antibodies from a non-immune Saccharomyces cerevisiae surface display library" Nat Biotechnol (2003) 21:163-170 などのように、当該技術分野で確立されている。

【0104】

B-2. 抗原結合フラグメント

他のいくつかの態様では、本開示は、本開示により提供される CD137 抗体のいずれかの抗原結合フラグメントを提供する。

10

【0105】

抗原結合フラグメントは、抗体の任意の配列を含んでもよい。いくつかの実施形態では、抗原結合フラグメントは以下のアミノ酸配列を含む：(1) CD137 抗体の軽鎖；(2) CD137 抗体の重鎖；(3) CD137 抗体の軽鎖由来の変領域；(4) CD137 抗体の重鎖由来の変領域；(5) CD137 抗体の1つ以上の HVR (2、3、4、5、または6つの HVR)；または(6) CD137 抗体の軽鎖由来の3つの HVR と重鎖由来の3つの HVR。

【0106】

いくつかの特定の実施形態では、本開示は、表1a及び1bに列挙されたものから選択される抗体の抗原結合フラグメントを提供する。

20

【0107】

他の特定の実施形態では、CD137 抗体の抗原結合フラグメントには、(i) V_L 、 V_H 、 C_L 、及び C_H1 ドメインからなる一価フラグメントである Fab フラグメント；(ii) ヒンジ領域でジスルフィド架橋により連結された2つの Fab フラグメントを含む二価フラグメントである $F(ab')_2$ フラグメント；(iii) V_H 及び C_H1 ドメインからなる Fd フラグメント；(iv) 抗体の単一アームの V_L 及び V_H ドメインからなる Fv フラグメント、(v) V_H ドメインからなる dAb フラグメント (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546)；(vi) 単離された相補性決定領域 (CDR)；ならびに (vii) 抗体の V_H 領域に連結された抗体の V_L 領域を含むポリペプチドである単鎖抗体 (scFv)、が含まれる。Bird et al., (1988) Science 242:423-426、及び Huston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883。

30

【0108】

いくつかの特定の実施形態では、抗原結合フラグメントは、表1aに列挙されたものから選択される Fab フラグメントである。

【0109】

B-3. 抗体誘導体

いくつかのさらなる態様では、本開示は、本開示により提供される CD137 抗体のいずれかの誘導体を提供する。

40

【0110】

一態様では、抗体誘導体は、本開示の例示的な抗体(「親抗体」)のアミノ酸配列の修飾に、親抗体のアミノ酸配列の全体的な分子構造を保存しながら、由来する。フレームワーク領域、HVR領域、または定常領域など、親抗体鎖の任意の領域のアミノ酸配列を修飾してもよい。修飾の種類には、親抗体の1つ以上のアミノ酸の置換、挿入、欠失、またはそれらの組み合わせが含まれる。

【0111】

いくつかの実施形態では、抗体誘導体は、配列番号13~132に記述されるアミノ酸配列に対して、少なくとも65%、少なくとも75%、少なくとも85%、少なくとも9

50

0%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である、V_LまたはV_H領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体誘導体は、配列番号253~312に記述されるアミノ酸配列に対して、少なくとも65%、少なくとも75%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である、HVR__H1アミノ酸配列領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体誘導体は、配列番号313~372に記述されるアミノ酸配列に対して、少なくとも65%、少なくとも75%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である、HVR__H2アミノ酸配列領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体誘導体は、配列番号373~432に記述されるアミノ酸配列に対して、少なくとも65%、少なくとも75%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である、HVR__H3アミノ酸配列領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体誘導体は、配列番号433~492に見出すことができる、表1aに示される全てのFabヒットのHVR__L1アミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、抗体誘導体は、配列番号493~552に見出すことができる、表1aに示される全てのFabヒットのHVR__L2アミノ酸配列を含む。

10

【0112】

いくつかの実施形態では、抗体誘導体は、配列番号553~612に見出すことができる、表1aに示される全てのFabヒットのHVR__L3アミノ酸配列を含む。いくつかの特定の実施形態では、誘導体は、配列番号13~132、及び253~612のいずれかに記述されているアミノ酸配列に対して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、もしくは15個の保存的もしくは非保存的置換、及び/または1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15個の付加及び/または欠失を含む。

20

【0113】

いくつかの実施形態では、抗体誘導体は、配列番号613~660に記述されるアミノ酸配列に対して、少なくとも65%、少なくとも75%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である、軽鎖または重鎖を含む。

30

【0114】

いくつかの実施形態では、抗体誘導体は、配列番号709~732に記述されるアミノ酸配列に対して、少なくとも65%、少なくとも75%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である、HVR__H1アミノ酸配列領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体誘導体は、配列番号733~756に記述されるアミノ酸配列に対して、少なくとも65%、少なくとも75%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である、HVR__H2アミノ酸配列領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体誘導体は、配列番号758~780に記述されるアミノ酸配列に対して、少なくとも65%、少なくとも75%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である、HVR__H3アミノ酸配列領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体誘導体は、配列番号781~804に記述されるアミノ酸配列に対して、少なくとも65%、少なくとも75%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である、HVR__L1アミノ酸配列領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体誘導体は、配列番号805~828に記述されるアミノ酸配列に対して、少なくとも65%、少なくとも75%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少な

40

50

くとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である、HVR__L2アミノ酸配列領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体誘導体は、配列番号829~852に記述されるアミノ酸配列に対して、少なくとも65%、少なくとも75%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%同一である、HVR__L3アミノ酸配列領域を含む。いくつかの特定の実施形態では、誘導体は、配列番号613~660、及び709~852のいずれかに記述されているアミノ酸配列に対して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、もしくは15個の保存的もしくは非保存的置換、及び/または、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15個の付加及び/または欠失を含む。

10

【0115】

アミノ酸置換には、保存的置換と非保存的置換の両方が包含される。「保存的アミノ酸置換」という用語は、2つのアミノ酸が、関係する残基の極性、電荷、溶解性、疎水性、親水性、及び/または両親媒性などの特定の物理化学的特性において類似性を有する場合には、1つのアミノ酸を別のアミノ酸で置き換えることを意味する。例えば、置換は典型的には、以下の群の各々内でなされる：(a)アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニンなどの非極性(疎水性)アミノ酸；(b)グリシン、セリン、トレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、及びグルタミンなどの極性中性アミノ酸；(c)アルギニン、リジン、及びヒスチジンなどの正荷電(塩基性)アミノ酸；(d)アスパラギン酸とグルタミン酸などの負荷電(酸性)アミノ酸。

20

【0116】

修飾は、HVR、フレームワーク領域、または定常領域を含む、抗体のアミノ酸配列の任意の位置で実施してもよい。一実施形態では、本開示は、本開示の例示的な抗体のV_H及びV_L HVR配列を含むが、例示的な抗体のものとは異なるフレームワーク配列を含む抗体誘導体を提供する。そのようなフレームワーク配列は、生殖細胞系抗体遺伝子配列を含む公的なDNAデータベースまたは公開された参考文献から入手できる。例えば、ヒト重鎖及び軽鎖可変領域遺伝子の生殖細胞系DNA配列は、Genbankデータベースまたは「VBase」ヒト生殖細胞系配列データベースに見出すことができる(Kabat, E. A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 (1991); Tomlinson, I. M., et al., J. Mol. Biol. 227:776-798 (1992);及びCox, J. P. L. et al., Eur. J. Immunol. 24:827-836 (1994))。抗体誘導体の構築に使用できるフレームワーク配列には、本開示の例示的な抗体によって使用されるフレームワーク配列と構造的に類似するもの、例えば本開示の例示的な抗体によって使用される、V_H3-23フレームワーク配列及び/またはV_L3もしくは1-13フレームワーク配列に類似するものが含まれる。例えば、例示的な抗体のHVR__H1、HVR__H2、及びHVR__H3配列、ならびにHVR__L1、HVR__L2、及びHVR__L3配列は、フレームワーク配列が由来する生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子に見られるものと同じの配列を有するフレームワーク領域に移植することができ、または、HVR配列は、生殖系列配列と比較して1つ以上の変異を含むフレームワーク領域に移植できる。

30

40

【0117】

特定の実施形態では、抗体誘導体は、本開示の例示的な抗体のアミノ酸配列を含むキメラ抗体である。一例において、1つ以上の例示的なヒト抗体由来の1つ以上のHVRは、マウスまたはラットなどの非ヒト動物由来の抗体からのHVRと組み合わせられる。別の例において、キメラ抗体の全てのHVRは、1つ以上の例示的な抗体に由来する。いくつか

50

の特定の実施形態では、キメラ抗体は、例示的な抗体の重鎖可変領域または軽鎖可変領域由来の1、2、または3つのHVRを含む。キメラ抗体は、当該技術分野で公知の従来の方法を使用して生成され得る。

【0118】

別の種類の修飾は、 V_H 及び/または V_L 鎖のHVR領域内のアミノ酸残基を変異させることである。部位特異的変異導入またはPCR媒介変異導入を実施して変異(複数可)を導入し、抗体結合または他の目的の機能特性に対する効果を、当該技術分野で公知の *in vitro* または *in vivo* アッセイで評価できる。典型的には、保守的な置換が導入される。変異は、アミノ酸の付加及び/または欠失であり得る。さらに、典型的には、HVR領域内の1、2、3、4、または5残基以下が変更される。いくつかの実施形態では、抗体誘導体は、重鎖HVR及び/または軽鎖HVRに1、2、3、または4個のアミノ酸置換を含む。別の実施形態では、アミノ酸置換は、抗体中の1つ以上のシステインを、非限定的にアラニンまたはセリンなどの別の残基に変更することである。システインは、標準的または非標準的なシステインであり得る。一実施形態では、抗体誘導体は、例示的な抗体のアミノ酸配列と比較して、重鎖HVR領域に1、2、3、または4個の保守的アミノ酸置換を有する。

10

【0119】

修飾は、 V_H 及び/または V_L 領域内のフレームワーク残基でもなし得る。典型的には、そのようなフレームワーク変異体は、抗体の免疫原性を低下させるために作製される。1つのアプローチは、1つ以上のフレームワーク残基を対応する生殖系列配列に「逆変異」させることである。体細胞変異を受けた抗体は、抗体が由来する生殖系列配列とは異なるフレームワーク残基を含み得る。そのような残基は、抗体のフレームワーク配列を、抗体が由来する生殖系列配列と比較することにより同定できる。フレームワーク領域配列をそれらの生殖系列構成に戻すために、体細胞変異は、例えば、部位特異的変異導入またはPCR媒介変異導入により生殖系列配列に「逆変異」することができる。

20

【0120】

さらに、典型的には血清半減期、補体結合、Fc受容体結合、及び/または抗原依存性細胞傷害性のような抗体の1つ以上の機能的特性を変更するために、例示的な抗体のFc領域内で修飾を行ってもよい。一例では、CH1のヒンジ領域は、ヒンジ領域のシステイン残基の数が変化するように、例えば増加または減少するように修飾される。このアプローチについては、米国特許第5,677,425号にさらに記載されている。CH1のヒンジ領域のシステイン残基の数は、例えば、軽鎖及び重鎖のアセンブリを促進するために、または抗体の安定性を増加または減少させるために変更される。別の場合には、抗体の生物学的半減期を減少させるために、抗体のFcヒンジ領域が変異される。

30

【0121】

さらに、本開示の抗体は、当該技術分野で公知の日常的な実験に従って、潜在的なグリコシル化部位またはパターンを変更するために修飾され得る。別の態様では、本開示は、可変領域のグリコシル化のパターンを変化させる軽鎖または重鎖の可変領域に少なくとも1つの変異を含む本開示のCD137抗体の誘導体を提供する。そのような抗体誘導体は、抗原に結合について、増加した親和性及び/または修飾された特異性を有し得る。変異により、V領域に新規のグリコシル化部位が追加されたり、1つ以上のV領域のグリコシル化部位(複数可)の位置が変更されたり、既存のV領域のグリコシル化部位が削除されたりする。一実施形態では、本開示は、重鎖可変領域のアスパラギンに潜在的なN結合型グリコシル化部位を有するCD137抗体の誘導体を提供し、1つの重鎖可変領域の潜在的なN結合型グリコシル化部位が除去される。別の実施形態では、本開示は、重鎖可変領域のアスパラギンに潜在的なN結合型グリコシル化部位を有するCD137抗体の誘導体を提供し、両方の重鎖可変領域の潜在的なN結合型グリコシル化部位が除去される。抗体のグリコシル化パターンを変更する方法は、当該技術分野で知られており、例えば、米国特許第6,933,368号に記載されているものであり、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

40

50

【0122】

別の態様では、本開示は、追加の分子エンティティに連結された、本明細書に記載のCD137抗体またはその抗原結合フラグメントを含む抗体誘導体を提供する。追加の分子エンティティの例には、医薬品、ペプチドまたはタンパク質、検出剤または標識、及び抗体が含まれる。

【0123】

いくつかの実施形態では、抗体誘導体は、医薬品に連結された本開示の抗体を含む。医薬品の例には、細胞毒性薬または他のがん治療薬、及び放射性同位体が含まれる。細胞毒性薬の具体例には、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、エチジウムプロマイド、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、及びピューロマイシン、ならびにそれらの類似体または同族体が含まれる。治療薬にはまた、例えば、代謝拮抗薬（例えば、メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルデカルバジン）、アルキル化剤（例えば、メクロレタミン、チオエパクロラムブシル、メルファラン、カルムスチン(BSNU)、及びロムスチン(CCNU)、シクロトスファミド、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、及び*cis*-ジクロロジアミン白金(II)(DDP)シスプラチン)、アントラサイクリン（例えば、ダウノルピシン(従前のダウノマイシン)及びドキシソルピシン)、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン(従前はアクチノマイシン)、プレオマイシン、ミトラマイシン、及びアントラマイシン(AMC)）、ならびに有糸分裂阻害剤（例えば、ピンクリスチン及びピンブラスチン）が含まれる。診断的または治療的に使用するために抗体に結合させることができる放射性同位体の例には、ヨウ素¹³¹、インジウム¹¹¹、イットリウム⁹⁰、及びルテチウム¹⁷⁷が含まれるが、これらに限定されない。様々なリンカー技術を使用するなどの抗体を医薬品に連結する方法は、当該技術分野で公知である。リンカーの種類例には、ヒドラゾン、チオエーテル、エステル、ジスルフィド、及びペプチド含有リンカーが含まれる。治療薬を抗体に連結する方法の詳細については、Saito et al., Adv. Drug Deliv. Rev. 55:199-215 (2003); Trail, et al., Cancer Immunol. Immunother. 52:328-337 (2003); Payne, Cancer Cell 3:207-212 (2003); Allen, Nat. Rev. Cancer 2:750-763 (2002); Pastan, I. and Kreitman, Curr. Opin. Investig. Drugs 3:1089-1091 (2002); Senter, P. D. and Springer, C. J. (2001) Adv. Drug Deliv. Rev. 53:247-264も参照されたい。

【0124】

特定の実施形態において、抗体誘導体はCD137抗体多量体であり、これは抗体二量体、三量体、または単量体抗体の高次多量体などのCD137抗体の多量体形態である。抗体多量体内の個々のモノマーは同一でも異なっていてもよい。さらに、多量体内の個々の抗体は、同一または異なる結合特異性を有してもよい。抗体の多量体化は、抗体の自然な凝集により達成され得る。例えば、精製された抗体調製物（例えば、精製されたIgG4分子）の一部は、抗体ホモ二量体及びその他の高次抗体多量体を含むタンパク質凝集体を自発的に形成する。代替的に、抗体ホモ二量体は、架橋剤の使用など、当該技術分野で公知の化学結合技術によって形成されてもよい。適切な架橋剤には、適切なスペーサーで分離された2つの明確な反応基を有するヘテロ二官能性(m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、スクシンイミジル4-(マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート、及びN-スクシンイミジルS-アセチルチオ-酢酸

10

20

30

40

50

塩など)、またはホモ二官能性(スベリン酸ジスクシンイミジルなど)であるものが含まれる。そのようなリンカーは、例えば、Pierce Chemical Company, Rockford, ILから市販されている。抗体はまた、当該技術分野で公知の組換えDNA技術によって多量体化するように作製され得る。

【0125】

いくつかの実施形態では、本開示の抗体は多量体抗体(例えば、二重特異性抗体)である。いくつかの実施形態では、本開示の抗体は、IgM抗体であり、例えば、IgM Fc領域(例えば、ヒトIgM Fc領域)を含む。

【0126】

本開示により提供される他の抗体誘導体の例には、単鎖抗体、ダイアボディ、ドメイン抗体、ナノボディ、及びユニボディが含まれる。「単鎖抗体」(scFv)は、V_Hドメインに連結されたV_Lドメインを含む単一のポリペプチド鎖からなり、V_LドメインとV_Hドメインが対になって一価分子を形成する。単鎖抗体は、当該技術分野で公知の方法に従って調製され得る(例えば、Bird et al., (1988) Science 242:423-426及びHouston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883を参照されたい。。「ダイアボディ」は2本の鎖からなり、各鎖は短いペプチドリinkerによって接続された同一のポリペプチド鎖上の軽鎖可変領域に接続された重鎖可変領域を含み、同一の鎖上の2つの領域は互いに対にならないが、他の鎖に相補的なドメインを持ち、二重特異性分子を形成する。ダイアボディを調製する方法は、当該技術分野で公知である(例えば、Holliger P. et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448、及びPoljak R. J. et al., (1994) Structure 2:1121-1123を参照されたい)。ドメイン抗体(dAbs)は抗体の小さな機能的結合単位であり、抗体の重鎖または軽鎖のいずれかの可変領域に対応する。ドメイン抗体は、細菌、酵母、哺乳動物の細胞系で良好に発現する。ドメイン抗体及びその産生方法のさらなる詳細は、当該技術分野で公知である(例えば、米国特許第6,291,158号;米国特許第6,582,915号;米国特許第6,593,081号;米国特許第6,172,197号;米国特許第6,696,245号;欧州特許第0368684号、及び欧州特許第0616640号;WO05/035572、WO04/101790、WO04/081026、WO04/058821、WO04/003019、ならびにWO03/002609を参照されたい)。ナノボディは、抗体の重鎖に由来する。ナノボディは、典型的には、単一の可変ドメインと2つの定常ドメイン(CH2及びCH3)を含み、元の抗体の抗原結合能を保持する。ナノボディは、当該技術分野で公知の方法により調製され得る(例えば、米国特許第6,765,087号、米国特許第6,838,254号、WO06/079372を参照されたい)。ユニボディは、IgG4抗体の1つの軽鎖と1つの重鎖からなる。ユニボディは、IgG4抗体のヒンジ領域の除去により作製することができる。ユニボディ及びそれらを調製する方法のさらなる詳細は、WO2007/059782に見出すことができる。

【0127】

C. 核酸、ベクター、宿主細胞、及びCD137抗体を産生する組換え方法

本開示の別の態様は、本開示により提供される結合分子のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子を提供する。ヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列は、HVR、1、2、または3つのHVRを含む配列、重鎖の可変領域、軽鎖の可変領域などの抗体の任意の部分であってもよく、または全長の重鎖もしくは全長の軽鎖であってもよい。本開示の核酸は、例えば、DNAまたはRNAであり得、イントロン配列を含んでも含まなくてもよい。典型的には、核酸はcDNA分子である。

【0128】

いくつかの実施形態では、本開示は、以下からなる群から選択されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含むかまたはそれからなる単離された核酸分子を提供する：

(1) 例示的な抗体のHVR__H3もしくはHVR__L3のアミノ酸配列；(2) 例示的な抗体の重鎖の可変領域もしくは軽鎖の可変領域；または(3) 例示的な抗体の全長重鎖もしくは全長軽鎖。

【0129】

他の実施形態では、核酸分子は、配列番号13~132、253~612、613~660、及び709~852のいずれか1つに記述されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含むかまたはそれからなる。

【0130】

さらに他の実施形態では、核酸分子は、配列番号133~252及び661~708からなる群から選択されるヌクレオチド配列を含むか、またはそれからなる。

10

【0131】

本開示の核酸は、任意の適切な分子生物学技術を使用して得ることができる。ハイブリドーマによって発現される抗体の場合、ハイブリドーマによって作製される抗体の軽鎖及び重鎖をコードするcDNAは、PCR増幅またはcDNAクローニング技術によって取得することができる。免疫グロブリン遺伝子ライブラリーから得られる抗体の場合(例えば、ファージディスプレイ技術を使用して)、抗体をコードする核酸をライブラリーから回収することができる。

【0132】

V_H領域をコードする単離されたDNAは、V_HをコードするDNAを、重鎖定常領域(CH1、CH2、及びCH3)をコードする別のDNA分子に作動可能に連結することによって、完全長重鎖遺伝子に変換され得る。ヒト重鎖定常領域遺伝子の配列は、当該技術分野で公知であり(例えば、Kabata et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242を参照されたい)、これらの領域を包含するDNAフラグメントは、標準的なPCR増幅によって取得され得る。重鎖定常領域はIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM、またはIgD定常領域であり得るが、最も好ましくはADCC効果のないIgG4またはIgG2定常領域である。IgG4定常領域配列は、異なる個体間で生じることが知られている様々な対立遺伝子またはアロタイプのいずれかであり得る。これらのアロタイプは、IgG4定常領域に天然に存在するアミノ酸置換を表す。Fabフラグメント重鎖遺伝子の場合、V_HをコードするDNAは、重鎖CH1定常領域のみをコードする別のDNA分子に作動可能に連結され得る。

20

30

【0133】

V_L領域をコードする単離されたDNAは、V_LをコードするDNAを、軽鎖定常領域、CLをコードする別のDNA分子に作動可能に連結することによって、完全長軽鎖遺伝子に変換され得る。ヒト軽鎖定常領域遺伝子の配列は、当該技術分野で公知であり(例えば、Kabata et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242を参照されたい)、これらの領域を包含するDNAフラグメントは、標準的なPCR増幅によって取得され得る。軽鎖定常領域は、カッパまたはラムダ定常領域であり得る。

40

【0134】

scFv遺伝子を作成するには、V_H及びV_LをコードするDNAフラグメントを、V_H及びV_L配列がV_LとV_H領域が柔軟なリンカーで結合された連続した単鎖タンパク質として発現できるように、例えばアミノ酸配列(Gly₄-Ser)₃をコードする柔軟なリンカーをコードする別のフラグメントに作動可能に連結される(例えば、Bird et al., Science 242:423-426 (1988); Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:

50

5879-5883 (1988); 及び McCafferty et al., Nature 348:552-554 (1990)を参照されたい)。

【0135】

本開示はさらに、本開示により提供される核酸分子を含むベクターを提供する。核酸分子は、軽鎖もしくは重鎖の一部(CDRもしくはHVRなど)、全長軽鎖もしくは重鎖、重鎖もしくは軽鎖の一部もしくは全長を含むポリペプチド、または抗体誘導体もしくは抗原結合フラグメントのアミノ酸配列をコードしてもよい。いくつかの実施形態では、ベクターは、抗体またはその抗原結合フラグメントなどの結合分子の発現に有用な発現ベクターである。いくつかの実施形態では、ベクターが提供され、第1ベクターは本明細書に記載の重鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド配列を含み、第2ベクターは本明細書に記載の軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチド配列を含む。いくつかの実施形態では、単一ベクターが、本明細書に記載の重鎖可変領域及び本明細書に記載の軽鎖可変領域をコードするポリヌクレオチドを含む。

10

【0136】

本開示の結合分子を発現するために、部分的または完全長の軽鎖及び重鎖をコードするDNAを発現ベクターに挿入し、DNA分子が転写及び翻訳制御配列に作動可能に連結されるようにする。この文脈において、「作動可能に連結される」という用語は、ベクター内の転写及び翻訳制御配列がDNA分子の転写及び翻訳を調節するそれらの意図された機能を果たすように抗体遺伝子がベクターに連結されることを意味する。発現ベクター及び発現制御配列は、使用される発現宿主細胞と適合するように選択される。抗体の軽鎖遺伝子と抗体の重鎖遺伝子は、別々のベクターに挿入することができ、より典型的には、両方の遺伝子を同一の発現ベクターに挿入する。抗体遺伝子は、任意の適切な方法(例えば、抗体遺伝子フラグメント及びベクター上の相補的な制限部位のライゲーション、または相同組換えベースのDNAライゲーション)によって発現ベクターに挿入される。本明細書に記載の抗体の軽鎖及び重鎖可変領域は、所望のアイソタイプ及びサブクラスの重鎖定常及び軽鎖定常領域をすでにコードしている発現ベクターに挿入し、V_Hセグメントがベクター内のC_Hセグメント(複数可)に作動可能に連結され、V_Lセグメントがベクター内のC_Lセグメントに作動可能に連結されるようにすることにより、任意の抗体アイソタイプ及びサブクラスの全長抗体遺伝子を作成するために使用できる。さらに、または代替的に、組換え発現ベクターは、宿主細胞からの抗体鎖の分泌を促進するシグナルペプチドをコードすることができる。シグナルペプチドが抗体鎖遺伝子のアミノ末端にインフレームで連結されるように、抗体鎖遺伝子をベクターにクローニングすることができる。シグナルペプチドは、免疫グロブリンシグナルペプチドまたは異種シグナルペプチド(すなわち、非免疫グロブリンタンパク質由来のシグナルペプチド)であり得る。

20

30

【0137】

抗体鎖遺伝子に加えて、本開示の発現ベクターは、典型的には、宿主細胞における抗体鎖遺伝子の発現を制御する制御配列を担持する。「制御配列」という用語は、抗体鎖遺伝子の転写または翻訳を制御するプロモーター、エンハンサー及び他の発現制御エレメント(例えば、ポリアデニル化シグナル)を含むことを意図している。そのような制御配列は、例えば、Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990))に記載されている。制御配列の選択を含む発現ベクターの設計は、形質転換される宿主細胞の選択、所望のタンパク質の発現レベル等の要素に依存し得ることは、当業者によって理解されるであろう。哺乳類宿主細胞発現の制御配列の例には、サイトメガロウイルス(CMV)、シミアンウイルス40(SV40)、アデノウイルス(例えば、アデノウイルス主要後期プロモーター(AdMLP)及びポリオーマ由来のプロモーター及び/またはエンハンサーなどの、哺乳動物細胞における高レベルのタンパク質発現を誘導するウイルスのエレメントを含む。代替的に、ユビキチンプロモーターまたは-グロビンプロモーターなどの非ウイルス性制御配列を使用してもよい。さらに、調節エレメントは、SV40初期プロモーターと

40

50

ヒトT細胞白血病ウイルス1型の長い末端反復由来の配列を含むSRプロモーターシステムなど、異なる源由来の配列からなる (Takebe, Y. et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8:466-472)。

【0138】

抗体鎖遺伝子及び制御配列に加えて、発現ベクターは、宿主細胞内のベクターの複製を調節する配列 (例えば、複製起点) 及び選択可能なマーカー遺伝子などの追加の配列を担持してもよい。選択可能なマーカー遺伝子は、ベクターが導入された宿主細胞の選択を容易にする (例えば、全て Axel et al. による、米国特許第4,399,216号、米国特許第4,634,665号、及び米国特許第5,179,017号を参照されたい)。例えば、典型的には、選択可能なマーカー遺伝子は、ベクターが導入された宿主細胞に、G418、ハイグロマイシン、またはメトトレキサートなどの薬物に対する耐性を付与する。選択可能なマーカー遺伝子には、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) 遺伝子 (メトトレキサート選択/増幅を伴う dhfr 宿主細胞で使用するため) 及び neo 遺伝子 (G418 選択のため) が含まれる。

10

【0139】

軽鎖及び重鎖の発現のために、重鎖及び軽鎖をコードする発現ベクター (複数可) は、任意の適切な技術によって宿主細胞にトランスフェクトされる。「トランスフェクション」という用語の様々な形態は、外因性DNAを原核生物または真核生物の宿主細胞に導入するために一般的に使用される多種多様な技術、例えばエレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、DEAE-デキストラントランスフェクションなどを包含することを意図している。原核生物または真核生物宿主細胞のいずれかで本開示の抗体を発現させることは可能であるが、真核生物細胞、及び典型的には哺乳動物宿主細胞における抗体の発現が最も典型的である。

20

【0140】

本開示はさらに、本開示により提供される核酸分子を含む宿主細胞を提供する。宿主細胞は、発現ベクターが利用可能な事実上、いずれの細胞であってもよい。それは、例えば、哺乳動物細胞などの高等真核宿主細胞、酵母細胞などの低等真核宿主細胞であってもよく、細菌細胞などの原核細胞であってもよい。組換え核酸コンストラクトの宿主細胞への導入は、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE、デキストラン媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、またはファージ感染により達成され得る。

30

【0141】

形質転換に適した原核生物宿主には、E. coli、Bacillus subtilis、Salmonella typhimurium、ならびにシュドモナス属、ストレプトミセス属、及びブドウ球菌属内の様々な種が含まれる。

【0142】

本開示の結合分子を発現するための哺乳動物宿主細胞には、例えば、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞 (例えば、Kaufman and Sharp, J. Mol. Biol. 159:601-621 (1982) に記載されるように、DHFRと共に使用される、Urlaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220 (1980) に記載される、dhfr-CHO細胞を含む)、NS0骨髄腫細胞、COS細胞及びSp2細胞が含まれる。特に、NS0骨髄腫またはCHO細胞で使用するための別の発現系は、WO87/04462、WO89/01036、及びEP338,841に開示されているGS (グルタミンシンターゼ) 遺伝子発現系である。抗体遺伝子をコードする発現ベクターが哺乳類の宿主細胞に導入されると、抗体は、宿主細胞での抗体の発現またはそれらが増殖する培地への抗体の分泌を可能にするのに十分な期間、宿主細胞を培養することにより産生される。抗体は、適切なタンパク質精製方法を使用して培地から回収できる。

40

【0143】

D. 組成物

他の態様では、本開示は、本開示により提供される結合分子を含む組成物を提供する。

50

一の態様では、組成物は、結合分子と薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物である。組成物は、当該技術分野において公知の慣用的な方法によって調製できる。

【0144】

いくつかの実施形態では、本開示は、本開示により提供される抗体またはその抗原結合フラグメントと、薬学的に許容される担体とを含む組成物を提供し、前記抗体は、本明細書に開示されるHVRアミノ酸配列を含む可変ドメインを含み、前記組成物は、約11%、10%、8%、5%、3%、または2%以下の前記抗体、または抗原結合部分を含み、それは前記組成物中に存在する抗体またはその抗原結合部分の総量と比較して、前記アミノ酸配列のアスパラギンでグリコシル化されている。別の実施形態において、組成物は、少なくとも約2%の前記抗体または抗原結合部分を含み、それは、前記組成物中に存在する抗体またはその抗原結合部分の総量と比較して、前記アミノ酸配列のアスパラギンでグリコシル化されている。

10

【0145】

「薬学的に許容される担体」という用語は、結合分子の送達のための製剤での使用に適した任意の不活性物質を指す。担体は、付着防止剤、結合剤、コーティング剤、崩壊剤、充填剤または希釈剤、保存剤（抗酸化剤、抗菌剤、または抗真菌剤など）、甘味料、吸収遅延剤、湿潤剤、乳化剤、緩衝液などであってよい。適切な薬学的に許容される担体の例には、水、エタノール、ポリオール（グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、デキストロース、植物油（オリーブ油など）、生理食塩水、緩衝液、緩衝生理食塩水、砂糖、多価アルコール、ソルビトール、塩化ナトリウムなどの等張剤が含まれる。

20

【0146】

組成物は、液体、半固体、及び固体の剤形などの任意の適切な形態であってもよい。液体剤形の例には、溶液（例えば、注射可能及び注入可能な溶液）、マイクロエマルジョン、リポソーム、分散液、または懸濁液が含まれる。固体剤形の例には、錠剤、丸剤、カプセル剤、マイクロカプセル剤、及び散剤が含まれる。結合分子を送達するのに適した組成物の特定の形態は、注射または注入用の溶液、懸濁液、または分散液などの滅菌液である。滅菌溶液は、適切な担体に必要量の抗体を混合してから、滅菌精密濾過を行うことにより調製できる。一般的に、分散液は、基本的な分散媒と他の担体を含む滅菌ビヒクルに抗体を混合することにより調製される。滅菌液体の調製のための滅菌粉末の場合、調製方法には、真空乾燥及び凍結乾燥（凍結乾燥）が含まれ、以前に滅菌濾過されたその溶液から活性成分と任意の追加の所望の成分との粉末が得られる。組成物の様々な剤形は、当該技術分野において公知の慣用的な技術によって調製できる。

30

【0147】

組成物に含まれる結合分子の相対量は、使用される特定の結合分子及び担体、剤形、ならびに所望の放出及び薬力学的特性などの多くの要因に応じて変動するであろう。単一剤形中の結合分子の量は一般に、治療効果を生じる量であろうが、より少ない量であってもよい。一般に、この量は、剤形の総重量に対して約0.01パーセント～約99パーセント、約0.1パーセント～約70パーセント、または約1パーセント～約30パーセントの範囲であろう。

40

【0148】

結合分子に加えて、1つ以上の追加の治療薬が組成物に含まれていてもよい。追加の治療薬の例は、本明細書で以下に記載されている。組成物に含まれるべき追加の治療薬の適切な量は、当業者によって容易に選択することができ、使用される特定の薬剤及び担体、剤形、及び所望の放出及び薬力学的特性などの多くの要因に応じて変動するであろう。単一剤形中の追加の治療薬の量は一般に、治療効果を生じる薬剤の量であろうが、同様に、より少ない量であってもよい。

【0149】

E. 結合分子及び医薬組成物の使用

本開示により提供される結合分子及び医薬組成物は、免疫応答の調節、がんの治療、他

50

のがん治療の効力の増強、ワクチンの効力の増強、または自己免疫疾患の治療など、治療、診断、または他の目的に有用である。したがって、他の態様では、本開示は、結合分子または医薬組成物を使用する方法を提供する。一態様では、本開示は、本開示により提供される治療有効量の結合分子を、治療を必要とする哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物の障害を治療する方法を提供する。結合分子はCD137アゴニストまたはアンタゴニストであり得る。いくつかの実施形態では、結合分子はCD137アゴニストである。いくつかの実施形態では、哺乳動物はヒトである。

【0150】

いくつかの実施形態では、障害はがんである。悪性または良性、原発性または続発性にかかわらず、CD137が関係しているさまざまながんは、本開示で提供される方法で治療または予防することができる。そのようながんの例には、気管支癌（例えば、扁平上皮癌、小細胞癌、大細胞癌、及び腺癌）、肺胞細胞癌、気管支腺腫、軟骨腫過誤腫（非がん性）、肉腫（がん性）などの肺癌；粘液腫、線維腫、横紋筋腫などの心臓癌；骨軟骨腫、軟骨腫、軟骨芽細胞腫、軟骨粘液線維腫、類骨骨腫、巨細胞腫、軟骨肉腫、多発性骨髄腫、骨肉腫、線維肉腫、悪性線維性組織球腫、ユーイング腫瘍（ユーイング肉腫）、及び細網肉腫などの骨癌；神経膠腫（例えば、多形性膠芽腫）、悪性星状細胞腫、星状細胞腫、乏突起神経膠腫、髄芽腫、脊索腫、神経鞘腫、上衣腫、髄膜腫、下垂体腺腫、松果体腫、骨腫、血管芽腫、頭蓋咽頭腫、脊索腫、胚細胞腫、奇形腫、類皮嚢胞、及び血管腫などの脳癌；平滑筋腫、類表皮癌、腺癌、平滑筋肉腫、胃腺癌、腸脂肪腫、腸神経線維腫、腸線維腫、大腸ポリープ、結腸直腸癌などの消化器系のがん；肝細胞腺腫、血管腫、肝細胞癌、線維層癌、胆管癌、肝芽腫、血管肉腫などの肝臓癌；腎腺癌、腎細胞癌、副腎腫、腎盂の移行上皮癌などの腎癌；膀胱癌；急性リンパ性（リンパ芽球性）白血病、急性骨髄性（骨髄球性、骨髄性、骨髄芽球性、骨髄単球性）白血病、慢性リンパ球性白血病（例えば、セザリー症候群及び有毛細胞白血病）、慢性骨髄性（骨髄性、骨髄性、顆粒球性）白血病、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、B細胞リンパ腫、菌状息肉腫、及び骨髄増殖性疾患（真性赤血球増加症、骨髄線維症、血小板血症、慢性骨髄性白血病などの骨髄増殖性疾患を含む）などの血液癌；基底細胞癌、扁平上皮癌、黒色腫、カボジ肉腫、パジェット病などの皮膚癌；頭頸部癌；網膜芽細胞腫や眼内黒色腫などの眼関連のがん；良性前立腺過形成、前立腺癌、及び精巣癌（例えば、セミノーマ、奇形腫、胚性癌、絨毛癌）などの男性生殖器系のがん；乳癌；子宮癌（子宮内膜癌）、子宮頸癌（子宮頸癌）、卵巣の癌（卵巣癌）、外陰癌、陰癌、卵管癌、及び胞状奇胎などの女性生殖器系のがん；甲状腺癌（乳頭癌、濾胞癌、未分化癌、または髄様癌を含む）；褐色細胞腫（副腎）；副甲状腺の非癌性増殖；膵臓癌；白血病、骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、及びホジキンリンパ腫などの血液癌、が含まれる。

【0151】

他のいくつかの実施形態では、障害は自己免疫疾患である。結合分子で治療できる自己免疫疾患の例には、自己免疫性脳脊髄炎、エリテマトーデス、及び関節リウマチが含まれる。結合分子は、炎症（アレルギー性喘息など）及び慢性移植片対宿主病の治療にも使用できる。

【0152】

別の態様では、本開示は、本開示により提供される治療有効量の結合分子を哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物の免疫応答を増強する方法を提供する。いくつかの実施形態では、結合分子はCD137抗体またはその抗原結合フラグメントであり、哺乳動物はヒトである。さらなる態様において、結合分子はCD137アゴニスト抗体またはその抗原結合フラグメントである。「免疫応答を増強すること」という用語またはその文法的変化とは、哺乳類の免疫系の応答を刺激、誘発、増加、改善、または増強することを意味する。免疫応答は、細胞性応答（すなわち、細胞傷害性Tリンパ球媒介などの細胞媒介性）または体液性応答（すなわち、抗体媒介性応答）であってよく、一次または二次免疫応答であってよい。免疫応答の増強の例には、CD4+ヘルパーT細胞活性の増加及び細胞溶解性T細胞の生成が含まれる。免疫応答の増強は、細胞傷害性Tリンパ球アッセイ、サ

10

20

30

40

50

イトカインの放出（例えば、IL-2産生）、腫瘍の退縮、担腫瘍動物の生存、抗体産生、免疫細胞増殖、細胞表面マーカーの発現、細胞傷害性を含むがこれらに限定されない、当業者に公知の多くの *in vitro* または *in vivo* 測定を使用して評価することができまる。典型的には、本開示の方法は、未治療の哺乳動物または特許請求の範囲の方法を使用して治療されていない哺乳動物による免疫応答と比較したときの、哺乳動物による免疫応答を増強する。一実施形態では、結合分子は、微生物病原体（ウイルスなど）に対するヒトの免疫応答を増強するために使用される。別の実施形態では、結合分子は、ワクチンに対するヒトの免疫応答を増強するために使用される。結合分子はCD137アゴニストまたはアンタゴニストであり得る。いくつかの実施形態では、結合分子はCD137アゴニストである。一実施形態では、この方法は、細胞性免疫応答、特に細胞傷害性T細胞応答を増強する。別の実施形態では、細胞性免疫応答はTヘルパー細胞応答である。さらに別の実施形態では、免疫応答はサイトカイン産生、特にIL-2産生である。結合分子は、微生物病原体（ウイルスなど）、またはワクチンに対するヒトの免疫応答を増強するために使用され得る。結合分子はCD137アゴニストまたはアンタゴニストであり得る。いくつかの実施形態では、結合分子はCD137アゴニストである。

10

20

30

40

50

【0153】

治療方法の実施において、結合分子は、単独療法として単独で投与されても、1つ以上の追加の治療薬または療法と組み合わせ投与されてもよい。したがって、別の態様では、本開示は、別個の、逐次的な、または同時投与のための1つ以上の追加の療法または治療薬と組み合わせた結合分子を含む組み合わせ療法を提供する。「追加の療法」という用語は、本開示により提供される結合分子を治療薬として使用しない療法を指す。「追加の治療薬」という用語は、本開示により提供される結合分子以外の任意の治療薬を指す。特定の一態様では、本開示は、本開示により提供される治療有効量の結合分子を1つ以上の追加の治療薬と組み合わせ哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物のがんを治療するための組み合わせ療法を提供する。さらなる実施形態では、哺乳動物はヒトである。

【0154】

多種多様ながん治療薬を、本開示により提供される結合分子と組み合わせ使用することができる。当業者は、本開示の方法及び結合分子と組み合わせ使用することができ、本明細書に記述の療法の形態に限定されない、他のがん療法の存在及び開発を認識することができるであろう。がんを治療するための組み合わせ療法で使用できる追加の治療薬のカテゴリーの例には、(1)化学療法薬、(2)免疫療法薬、及び(3)ホルモン療法薬が含まれる。

【0155】

「化学療法剤」という用語は、がん細胞の死を引き起こすか、がん細胞の増殖、分裂、修復、及び/または機能を妨げる可能性のある化学物質または生物学的物質を指す。化学療法剤の例には、WO2006/129163及びUS20060153808に開示されているものが含まれ、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。特定の化学療法薬の例として、以下が挙げられる：(1)クロラムブシル（ロイケラン）、ムシクロホスファミド（シトキサン）、イホスファミド（IFEX）、塩酸メクロレタミン（ムスタルゲン）、チオテパ（チオプレックス）、ストレプトゾトシン（ザノサル）、カルムスチン（BICNU、グリアデルウェーハ）、ロムスチン（CEENU）、及びダカルバジン（DTIC-DOME）などのアルキル化剤；(2)ドキシルピシン（アドリアマイシン）、エピルピシン（ELLENCÉ、PHARMORUBICIN）、ダウノルピシン（セルピジン、ダウノキサム）、ネモルピシン、イダルピシン（IDAMYCIN PFS、ZAVEDOS）、ミトキサントロン（DHAD、NOVANTRONE）、ダクチノマイシン（アクチノマイシンD、コスメゲン）、プリカマイシン（ミトラシン）、マイトマイシン（ムタマイシン）、及びプレオマイシン（プレノキサム）などの細胞毒性抗生物質、酒石酸ピノレルピン（ナベルピン）、ビンブラスチン（VELBAN）、ビンクリスチン（オンコピン）、及びピンデシン（ELDISINE）を含む、アルカロイドまたは植物ピンカアルカロイド；(3)カペシタピン（ゼローダ）、シタラピン（CYT

OSAR-U)、フルダラビン(フルダラ)、ゲムシタピン(ジェムザール)、ヒドロキシ尿素(HYDRA)、メトトレキサート(FOLEX、MEXATE、TREXALL)、ネララビン(アラノン)、トリメトレキサート(NEUTREXIN)、及びペメトレキセド(アリムタ)などの代謝拮抗剤；(4)5-フルオロウラシル(5-FU)；カベシタピン(ゼローダ)、ラルチトレキセド(TOMUDEX)、テガフルウラシル(UFTORAL)、及びゲムシタピン(ジェムザール)などのピリミジン拮抗薬；(5)ドセタキセル(タキソテル)、パクリタキセル(タキソール)などのタキサン；(6)シスプラチン(プラチノール)やカルボプラチン(パラプラチン)、オキサリプラチン(エロキサチン)などのプラチナ製剤；(7)イリノテカン(CAMPTOSAR)、トポテカン(ハイカムチン)、エトポシド(ETOPOPHOS、VEPESSID、TOPOSAR)、テニポシド(VUMON)などのトポイソメラーゼ阻害剤；(8)エトポシド(ETOPOPHOS、VEPESSID、TOPOSAR)などのエピポドフィロトキシン(ポドフィロトキシン誘導体)；(9)ロイコボリン(ウェルコボリン)などの葉酸誘導体；(10)カルムスチン(BiCNU)、ロムスチン(CeeNU)などのニトロソ尿素；(11)ゲフィチニブ(イレッサ)、エルロチニブ(タルセバ)、ボルテゾミブ(ベルケイド)、メシル酸イマチニブ(グリーベック)、ジェネフィチニブ、ラパチニブ、ソラフェニブ、サリドマイド、スニチニブ(サテン)、アキシチニブ、リツキシマブ(リツキサン、マブセラ)、トラスツズマブ(ハーセプチン)、セツキシマブ(エルビタックス)、ベバシズマブ(アバスチン)、ラニビズマブ(ルセンティス)、Lym-1(オンコリム)、WO2002/053596に開示されているインスリン様成長因子-1受容体(IGF-1R)に対する抗体などの、上皮成長因子受容体(EGFR)、血管内皮成長因子(VEGF)、インスリン受容体、インスリン様成長因子受容体(IGFR)、肝細胞成長因子受容体(HGFR)、及び血小板由来成長因子受容体(PDGFR)を含む受容体チロシンキナーゼの阻害剤；(12)ベバシズマブ(アバスチン)、スラミン(GERMANIN)、アンジオスタチン、SU5416、サリドマイド、及びマトリックスメタロプロテイナーゼ阻害剤(パチマスタットやマリマスタットなど)などの血管新生阻害剤、及びWO2002055106に開示されているもの；ならびに(13)ボルテゾミブ(ベルケイド)などのプロテアソーム阻害剤。

【0156】

「免疫療法剤」という用語は、哺乳動物の免疫応答を増強することができる化学物質または生物学的物質を指す。免疫療法剤の例として以下が挙げられる：無菌化ウシ型結核菌(BCG)；インターフェロンなどのサイトカイン；MyVaxパーソナライズ免疫療法、OnyVax-P、オンコファージ、GRNVAC1、Favld、プロベンジ、GVAX、Lovaxin C、BioVaxID、GMXX、NeuVaxなどのワクチン；ならびにアレムツズマブ(キャンパス)、ベバシズマブ(アバスチン)、セツキシマブ(アービタックス)、ゲムツズマブオゾガミシン(マイロターグ)、イブリットマブチウキセタン(ゼパリン)、パニツムマブ(ベクチビックス)、リツキシマブ(リツキサン、マブセラ)、トラスツズマブ(ハーセプチン)、トシツモマブ(ベキサール)、イピリムマブ(ヤーボイ)、トレメリムマブ、CAT-3888、OX40受容体に対するアゴニスト抗体(WO2009/079335に開示されているものなど)、CD40受容体に対するアゴニスト抗体(WO2003/040170に開示されているものなど)、及びTLR-9アゴニスト(WO2003/015711、WO2004/016805、及びWO2009/022215に開示されているものなど)などの抗体。

【0157】

「ホルモン治療薬」という用語は、ホルモンの産生を阻害または排除するか、がん性細胞の増殖及び/または生存に対するホルモンの効果を阻害または相殺する化学物質または生物学的物質を指す。本明細書の方法に適したそのような薬剤の例には、US20070117809に開示されているものが含まれる。特定のホルモン治療薬の例には、タモキシフェン(ノルパデックス)、トレミフェン(フェアストン)、フルベストラント(フェソロデックス)、アナストロゾール(アリミデックス)、エキセメスタン(アロマシン)

、レトロゾール（フェマーラ）、酢酸メガエストロール（MEGACE）、ゴセリン（ゾラデックス）、及びリュープロリド（ループロン）が含まれる。本開示の結合分子は、（１）卵巣、睾丸、副腎、及び下垂体などのホルモンの産生に關与する臓器または腺の全てまたは一部を除去する外科的方法、ならびに（２）患者の臓器または腺が、標的ホルモンの産生を阻害または排除するのに十分な量の放射線にさらされる放射線治療などの非薬物ホルモン療法と組み合わせて使用することもできる。

【0158】

がんを治療するための組み合わせ療法には、結合分子と腫瘍を切除する手術の組み合わせも包含される。結合分子は、手術の前、その最中、またはその後に哺乳動物に投与することができる。

10

【0159】

がんを治療するための組み合わせ療法にはまた、結合分子と、電離（電磁）放射線療法（例えば、X線またはガンマ線）及び粒子線療法（例えば、高線形エネルギー放射線）などの放射線療法と組み合わせも包含される。放射線源は、哺乳動物の外部または内部にあり得る。結合分子は、放射線療法の前、その最中、またはその後に哺乳動物に投与することができる。

【0160】

本開示により提供される結合分子及び組成物は、投与の任意の適切な経腸経路または非経口経路を介して投与することができる。投与の「経腸経路」という用語は、胃腸管の任意の部分を経た投与を指す。経腸経路の例には、経口、粘膜、頬側、直腸の経路、または胃内経路が含まれる。投与の「非経口経路」は、経腸経路以外の投与経路を指す。非経口投与経路の例には、静脈内、筋肉内、皮内、腹腔内、腫瘍内、膀胱内、動脈内、髄腔内、嚢内、眼窩内、心臓内、経気管、関節内、嚢下、くも膜下、脊髄内、硬膜外及び胸骨内、皮下、または局所の投与が含まれる。本開示の抗体及び組成物は、経口摂取、経鼻胃管、胃瘻管、注射、注入、埋め込み可能な注入ポンプ、及び浸透圧ポンプなどによる任意の適切な方法を使用して投与することができる。適切な投与経路及び投与方法は、使用される特定の抗体、所望の吸収速度、使用される特定の製剤または剤形、治療される障害の種類または重症度、特定の作用部位、及び患者の状態などの多くの要因に応じて異なり得、当業者によって容易に選択され得る。

20

【0161】

結合分子の「治療有効量」という用語は、意図された治療目的に有効な量を指す。例えば、免疫応答を増強するという文脈において、「治療有効量」とは、哺乳動物の免疫系の任意の応答を刺激、誘発、増加、改善、または増強するのに有効な任意の量である。疾患を治療する文脈において、「治療有効量」は、治療される哺乳動物に任意の望ましいまたは有益な効果を引き起こすのに十分な任意の量である。具体的には、がんの治療において、望ましいまたは有益な効果の例には、がん細胞のさらなる増殖または拡散の阻害、がん細胞の死滅、がんの再発の阻害、がんに関連する疼痛の軽減、または哺乳動物の生存率の改善が含まれる。CD137抗体の治療有効量は、通常、哺乳動物の体重に基づいて約0.001～約500mg/kg、より一般的には約0.01～約100mg/kgの範囲である。例えば、その量は、哺乳動物の体重に基づいて約0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kg、5mg/kg、10mg/kg、50mg/kg、または100mg/kgであり得る。いくつかの実施形態では、CD137抗体の治療有効量は、哺乳動物の体重に基づいて約0.01～30mg/kgの範囲である。他のいくつかの実施形態では、CD137抗体の治療有効量は、哺乳動物の体重に基づいて約0.05～15mg/kgの範囲である。投与される正確な用量レベルは、治療される障害の種類及び重症度、使用される特定の結合分子、投与経路、投与時間、治療期間、使用される特定の追加の療法、治療中の患者の年齢、性別、体重、状態、全体的な健康状態、及び過去の病歴の多くの要因、ならびに医学分野で周知の同様の要因に応じて、当業者によって容易に決定され得る。

30

40

【0162】

50

結合分子または組成物は通常複数回投与される。単回投与の間隔は、例えば、毎週、毎月、3ヶ月ごと、または毎年であり得る。例示的な治療計画は、週に1回、2週間に1回、3週間に1回、4週間に1回、月に1回、3か月に1回、または3～6か月に1回の投与を伴う。CD137抗体の典型的な投与計画には、静脈内投与による1mg/kg体重または3mg/kg体重が含まれ、以下の投与スケジュールのうちの一つを使用する。(i) 6回の投与を4週間ごと、その後は3か月ごと；(ii) 3週間ごと；(iii) 3mg/kg体重を1回、その後3週間ごとに1mg/kg体重。

【0163】

本開示は、以下の実施例を参照することにより、より完全に理解されるであろう。しかしながら、実施例は、本開示の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。本明細書に記載される実施例及び実施形態は例示のみを目的とするものであり、それを考慮した様々な修正または変更が当業者に示唆され、それらは本出願及び添付の特許請求の範囲の趣旨及び範囲内に含まれることは理解されよう。本開示を通して引用された全ての図及び全ての参考文献、特許、及び公開された特許出願の内容は、参照によりその全体が本明細書に明示的に組み込まれる。

10

【実施例】

【0164】

実施例1

ヒトCD137に特異的に結合する一次Fabの生成

独自のファージミドライブラリー（参照により本明細書に組み込まれる、代理人整理番号69540-2000140として本明細書と同時に出願された、“Dynamic Human Antibody Light Chain Libraries”と題する、PCT国際出願を参照されたい；参照により本明細書に組み込まれる、代理人整理番号69540-2000240として本明細書と同時に出願された、“Dynamic Human Heavy Chain Antibody Libraries”と題する、PCT国際出願もまた参照されたい）を利用して、ヒトCD137抗原に対してパンニングされた。合計3回または4回のパンニングが実施された。パンニングの最終ラウンドの後、シングルコロニー上清ELISAを実施して、ヒトCD137を特異的に認識する一次ヒットを特定した。一次ヒットは、ELISAシグナルがバックグラウンドの少なくとも2倍であるものとして定義された。それらを配列決定し、固有のクローンを発現させ、ForteBio及びBiacoreによる親和性測定のために精製した。リストは、ELISA陽性ヒットと固有の配列の両方が含まれるFabで124に絞り込まれた。K_D 応答シグナルR > 0.1、R² > 0.9、及びアフィニティK_D < 100 nMの基準に従って、リストはさらに60ヒットに絞り込まれた（表1a）。次いで、それらのうちの24個を詳細な生物物理学的及び機能的特性評価のためにIgGに変換した（表1b）。

20

30

【0165】

固有のヒットに対応するFabをE. coliで発現させ、精製した。ヒトCD137に対するそれらの親和性は、ForteBio Octet RED96 Systemによって測定された。簡潔に述べると、AHCセンサー（抗ヒトIgG Fc Capture Dip及びRead Biosensor）を使用してCD137-hisFc融合タンパク質（Sino Biological # Cat 10041-H03H）を捕捉し、動態緩衝液（10 mM HEPES、150 mM NaCl、3 mM EDTA、0.005 % v/v Surfactant P20、pH 7.4）で5～10 μg/mlに希釈された精製されたFabを含むウェルに浸漬した。取得したForteBioデータをデータ取得ソフトウェア7.1で処理し、動態データを1:1 Langmuir結合モデルに適合させた。親和性及び動態パラメーター（バックグラウンドを差し引いたもの）を表1aに列挙する。それらの対応するIgGのヒトCD137に対する親和性をBiacoreで測定し、表1bに示す。

40

表1a 選択されたFabのヒトCD137及び対応するアミノ酸配列に対する親和性（配

50

列番号)

ヒットID	KD(nM)	kon(1/Ms)	koff(1/s)	配列番号 (上段VH; 下段VL)
3760	1.26E-08	3.52E+05	4.44E-03	13
				14
4072	6.95E-09	1.54E+05	1.07E-03	15
				16
4074	1.95E-08	4.80E+04	9.37E-04	17
				18
4076	7.44E-09	6.38E+04	4.75E-04	19
				20
4079	3.15E-08	6.93E+04	2.19E-03	21
				22
4134	1.30E-08	5.93E+04	7.69E-04	23
				24
4137	<1.0E-12	8.56E+04	<1.0E-07	25
				26
4139	1.65E-09	4.96E+04	8.17E-05	27
				28
4140	<1.0E-12	2.57E+04	<1.0E-07	29
				30
4217	9.67E-08	5.64E+05	5.45E-02	31
				32
5299	1.37E-08	5.55E+05	7.60E-03	33
				34
5300	1.53E-08	5.96E+05	9.10E-03	35
				36
5302	1.21E-09	3.54E+05	4.26E-04	37
				38
5303	5.12E-09	9.95E+05	5.09E-03	39
				40
5310	5.72E-09	8.13E+05	4.65E-03	41
				42
5314	8.39E-09	2.10E+05	1.77E-03	43
				44
5316	1.14E-08	140600	0.001605	45
				46
5318	1.90E-08	1.41E+05	2.69E-03	47
				48
5323	1.04E-08	7.82E+05	8.12E-03	49
				50

10

20

30

40

50

ヒットID	KD(nM)	kon(1/Ms)	koff(1/s)	配列番号 (上段VH; 下段VL)
5341	2.93E-08	6.42E+04	1.88E-03	51
				52
5342	3.89E-08	1.57E+05	6.12E-03	53
				54
5346	1.61E-08	6.05E+05	9.77E-03	55
				56
5348	1.02E-08	1.31E+06	1.33E-02	57
				58
5349	6.20E-09	1.62E+05	1.01E-03	59
				60
5351	7.29E-09	4.66E+05	3.40E-03	61
				62
5353	1.61E-08	3.70E+05	5.97E-03	63
				64
5359	7.10E-10	4.64E+05	3.30E-04	65
				66
5360	2.41E-08	1.20E+05	2.89E-03	67
				68
5363	9.87E-09	8.37E+04	8.26E-04	69
				70
5365	2.56E-09	7.01E+05	1.79E-03	71
				72
5367	1.49E-08	4.07E+05	6.08E-03	73
				74
5370	1.91E-09	5.24E+05	1.00E-03	75
				76
5371	3.97E-09	1.21E+06	4.79E-03	77
				78
5404	3.30E-09	3.95E+05	1.30E-03	79
				80
5407	1.76E-09	2.48E+05	4.37E-04	81
				82
5408	2.36E-08	3.18E+05	7.50E-03	83
				84
5409	1.70E-08	2.51E+05	4.27E-03	85
				86
5413	9.93E-10	5.55E+05	5.51E-04	87
				88

10

20

30

40

ヒットID	KD(nM)	kon(1/Ms)	koff(1/s)	配列番号(上段VH; 下段VL)
5417	4.04E-08	5.72E+04	2.31E-03	89
				90
7077	1.88E-08	4.98E+05	9.34E-03	91
				92
7078	2.52E-08	3.45E+05	8.70E-03	93
				94
7079	2.99E-08	1.00E+05	3.00E-03	95
				96
7080	2.44E-08	3.06E+05	7.46E-03	97
				98
7081	4.31E-08	2.87E+05	1.23E-02	99
				100
7087	6.96E-08	1.23E+05	8.55E-03	101
				102
7088	4.36E-08	2.55E+05	1.11E-02	103
				104
7090	5.55E-08	3.12E+05	1.73E-02	105
				106
7092	4.57E-08	4.31E+05	1.97E-02	107
				108
7097	2.43E-08	5.42E+05	1.32E-02	109
				110
7100	3.50E-08	4.62E+05	1.62E-02	111
				112
7105	3.33E-08	3.30E+05	1.10E-02	113
				114
7109	3.20E-08	1.73E+05	5.55E-03	115
				116
7120	3.45E-08	2.64E+05	9.11E-03	117
				118
7128	3.97E-08	3.09E+05	1.23E-02	119
				120
7131	3.04E-08	2.66E+05	8.10E-03	121
				122
7133	4.03E-08	1.01E+05	4.05E-03	123
				124
7135	3.17E-08	1.02E+05	3.22E-03	125
				126

10

20

30

40

ヒットID	KD(nM)	kon(1/Ms)	koff(1/s)	配列番号 (上段VH; 下段VL)
7159	3.79E-08	1.06E+05	4.03E-03	127
				128
7163	1.26E-08	2.99E+05	3.78E-03	129
				130
7166	1.24E-08	3.45E+05	4.29E-03	131
				132

10

【0166】

配列番号13～132のアミノ酸配列をコードする対応するDNA配列は、それぞれ配列番号133～252に見出すことができる。表1aに示される全てのFabヒットのHVR__H1アミノ酸配列は、それぞれ配列番号253～312に見出すことができる。表1aに示される全てのFabヒットのHVR__H2アミノ酸配列は、それぞれ配列番号313～372に見出すことができる。表1aに示される全てのFabヒットのHVR__H3アミノ酸配列は、それぞれ配列番号373～432に見出すことができる。表1aに示される全てのFabヒットのHVR__L1アミノ酸配列は、それぞれ配列番号433～492に見出すことができる。表1aに示される全てのFabヒットのHVR__L2アミノ酸配列は、それぞれ配列番号493～552に見出すことができる。表1aに示される全てのFabヒットのHVR__L3アミノ酸配列は、それぞれ配列番号553～612に見出すことができる(表1cも参照されたい)。

20

表1b ヒトCD137に対するFabと対応するIgGの親和性

ヒット ID	Fab			IgG ID	IgG			IgG配列番号 (上段重鎖; 下段軽鎖)
	K (M)	D k a (1 /M s)	kd(1/s)		KD(M)	Ka(1/Ms)	kd(1/s)	
4072	7.0E-09	1.5E+05	1.1E-03	AG10054	1.3E-08	1.4E+05	1.9E-03	613
								614
5303	5.1E-09	1.0E+06	5.1E-03	AG10057	7.9E-09	7.7E+05	6.1E-03	615
								616
5310	5.7E-09	8.1E+05	4.7E-03	AG10058	5.9E-09	4.1E+05	2.4E-03	617
								618
5351	7.3E-09	4.7E+05	3.4E-03	AG10059	3.8E-08	1.6E+05	6.3E-03	619
								620
5359	7.1E-10	4.6E+05	3.3E-04	AG10060	1.1E-09	2.2E+05	2.5E-04	621
								622
5370	1.9E-09	5.2E+05	1.0E-03	AG10061	3.6E-09	2.2E+05	7.8E-04	623
								624
5404	3.3E-09	4.0E+05	1.3E-03	AG10062	5.9E-09	1.6E+05	9.4E-04	625
								626
5413	9.9E-10	5.6E+05	5.5E-04	AG10063	9.9E-10	3.9E+05	3.9E-04	627
								628
4074	2.0E-08	4.8E+04	9.4E-04	AG10079	1.4E-09	1.9E+05	2.7E-04	629
								630
4217	9.7E-08	5.6E+05	5.5E-02	AG10080	1.0E-08	1.2E+06	1.2E-02	631
								632
5299	1.4E-08	5.6E+05	7.6E-03	AG10081	6.9E-09	2.4E+05	1.7E-03	633
								634
5300	1.5E-08	6.0E+05	9.1E-03	AG10082	1.3E-08	5.6E+05	7.2E-03	635
								636
5323	1.0E-08	7.8E+05	8.1E-03	AG10083	1.2E-08	5.7E+05	6.9E-03	637
								638
5360	2.4E-08	1.2E+05	2.9E-03	AG10084	4.3E-08	6.6E+04	2.8E-03	639
								640
5367	1.5E-08	4.1E+05	6.1E-03	AG10085	5.4E-08	1.5E+05	7.9E-03	641
								642
5409	1.7E-08	2.5E+05	4.3E-03	AG10086	4.6E-08	1.0E+05	4.5E-03	643
								644
5302	1.2E-09	3.5E+05	4.3E-04	AG10124	6.0E-09	5.0E+05	3.0E-03	645
								646
5314	8.4E-09	2.1E+05	1.8E-03	AG10125	1.5E-08	1.1E+05	1.7E-03	647
								648

10

20

30

40

5316	1.1E-08	1.4E+05	1.6E-03	AG10126	1.4E-08	5.4E+09	7.3E+01	649
								650
5318	1.9E-08	1.4E+05	2.7E-03	AG10127	9.6E-09	3.0E+05	2.9E-03	651
								652
5342	3.9E-08	1.6E+05	6.1E-03	AG10128	3.0E-09	1.2E+05	3.7E-04	653
								654
5353	1.6E-08	3.7E+05	6.0E-03	AG10129	1.9E-08	3.1E+05	6.0E-03	655
								656
5365	2.6E-09	7.0E+05	1.8E-03	AG10131	3.7E-09	5.1E+05	1.9E-03	657
								658
5408	2.4E-08	3.2E+05	7.5E-03	AG10132	6.9E-08	2.0E+05	1.4E-02	659
								660

10

【 0 1 6 7 】

配列番号 613 ~ 660 のアミノ酸配列をコードする対応する DNA 配列は、それぞれ配列番号 661 ~ 708 に見出すことができる。表 1 b に示される全ての I g G 配列の H V R __ H 1 アミノ酸配列は、それぞれ配列番号 709 ~ 732 に見出すことができる。表 1 b に示される全ての I g G 配列の H V R __ H 2 アミノ酸配列は、それぞれ配列番号 733 ~ 756 に見出すことができる。表 1 b に示される全ての I g G 配列の H V R __ H 3 アミノ酸配列は、それぞれ配列番号 757 ~ 780 に見出すことができる。表 1 b に示される全ての I g G 配列の H V R __ L 1 アミノ酸配列は、それぞれ配列番号 781 ~ 804 に見出すことができる。表 1 b に示される全ての I g G 配列の H V R __ L 2 アミノ酸配列は、それぞれ配列番号 805 ~ 828 に見出すことができる。表 1 b に示される全ての I g G 配列の H V R __ L 3 アミノ酸配列は、それぞれ配列番号 829 ~ 852 に見出すことができる。

20

表 1 c : F a b の C D R 配列

ヒットID	VH/VL	HVR-H1 配列番号	HVR-H2 配列番号	HVR-H3 配列番号	HVR-L1 配列番号	HVR-L2 配列番号	HVR-L31 配列番号
3760	VH1/VL1	253	313	373	433	493	553
4072	VH2/VL2	254	314	374	434	494	554
7074	VH3/VL3	255	315	375	435	495	555
4076	VH4/VL4	256	316	376	436	496	556
4079	VH5/VL5	257	317	377	437	497	557
4134	VH6/VL6	258	318	378	438	498	558
4137	VH7/VL7	259	319	379	439	499	559
4139	VH8/VL8	260	320	380	440	500	560
4140	VH9/VL9	261	321	381	441	501	561
4217	VH10/VL10	262	322	382	442	502	562
5299	VH11/VL11	263	323	383	443	503	563
5300	VH12/VL12	264	324	384	444	504	564
5302	VH13/VL13	265	325	385	445	505	565
5303	VH14/VL14	266	326	386	446	506	566
5310	VH15/VL15	267	327	387	447	507	567
5314	VH16/VL16	268	328	388	448	508	568
5316	VH17/VL17	269	329	389	449	509	569
5318	VH18/VL18	270	330	390	450	510	570
5323	VH19/VL19	271	331	391	451	511	571
5341	VH20/VL20	272	332	392	452	512	572
5342	VH21/VL21	273	333	393	453	513	573
5346	VH22/VL22	274	334	394	454	514	574
5348	VH23/VL23	275	335	395	455	515	575
5349	VH24/VL24	276	336	396	456	516	576
5351	VH25/VL25	277	337	397	457	517	577
5353	VH26/VL26	278	338	398	458	518	578
5359	VH27/VL27	279	339	399	459	519	579
5360	VH28/VL28	280	340	400	460	520	580
5363	VH29/VL29	281	341	401	461	521	581
5365	VH30/VL30	282	342	402	462	522	582
5367	VH31/VL31	283	343	403	463	523	583
5370	VH32/VL32	284	344	404	464	524	584
5371	VH33/VL33	285	345	405	465	525	585
5404	VH34/VL34	286	346	406	466	526	586
5407	VH35/VL35	287	347	407	467	527	587
5408	VH36/VL36	288	348	408	468	528	588

10

20

30

40

5409	VH37/VL37	289	349	409	469	529	589
5413	VH38/VL38	290	350	410	470	530	590
5417	VH39/VL39	291	351	411	471	531	591
7077	VH40/VL40	292	352	412	472	532	592
7078	VH41/VL41	293	353	413	473	533	593
7079	VH42/VL42	294	354	414	474	534	594
7080	VH43/VL43	295	355	415	475	535	595
7081	VH44/VL44	296	356	416	476	536	596
7087	VH45/VL45	297	357	417	477	537	597
7088	VH46/VL46	298	358	418	478	538	598
7090	VH47/VL47	299	359	419	479	539	599
7092	VH48/VL48	300	360	420	480	540	600
7097	VH49/VL49	301	361	421	481	541	601
7100	VH50/VL50	302	362	422	482	542	602
7105	VH51/VL51	303	363	423	483	543	603
7109	VH52/VL52	304	364	424	484	544	604
7120	VH53/VL53	305	365	425	485	545	605
7128	VH54/VL54	306	366	426	486	546	606
7131	VH55/VL55	307	367	427	487	547	607
7133	VH56/VL56	308	368	428	488	548	608
7135	VH57/VL57	309	369	429	489	549	609
7159	VH58/VL58	310	370	430	490	550	610
7163	VH59/VL59	311	371	431	491	551	611
7166	VH60/VL60	312	372	432	492	552	612

10

20

30

【 0 1 6 8 】

実施例 2

マウスCD137と交差反応性であるFabヒットの選択

Fabヒットの種交差反応性は、ELISAを使用して決定された。簡潔に述べると、200 μ Lの5 μ g/mLの抗ヒトIgG(Fab特異的)(Sigma #I5260)を、Maxisorpプレート(Thermo Scientific 446469)に4で一晚コーティングした。ブロッキング後、100 μ LのFab5310(5 μ g/mL)、5351(2.8 μ g/mL)及び5365(5 μ g/mL)を添加し、1時間インキュベートした。3回洗浄した後、ヒトFCフラグメントと融合したヒトまたはマウスCD137抗原の連続希釈液を添加し、1時間インキュベートした。洗浄後、HRP標識ヤギ抗ヒトFCをPBSで1:2000に希釈し、各ウェルに添加して1時間インキュベーションした。プレートを3回洗浄し、TMB基質とともに室温で20分間インキュベートした。反応停止後、450nmの吸光度を測定した。結果は図1bに示し、下パネルは、Fab5310及び5365がヒトとマウスの両方のCD137に結合するのに対し、Fab5351はヒトCD137に結合するが、マウスCD137には結合しないことを示す。

40

【 0 1 6 9 】

実施例 3

IgG変換と発現：AG10058、AG10059、及びAG10131

50

F a b 5 3 1 0、5 3 5 1、及び5 3 6 5の重鎖及び軽鎖は、哺乳類発現ベクター p C D N A 3 . 3 (T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c) の S 2 4 1 P 変異を含む I g G 4 アイソタイプ中に個別にクローン化された。2つの参照抗体の重鎖及び軽鎖も、p C D N A 3 . 3 の I g G 4 及び I g G 2 アイソタイプ中にそれぞれクローニングされた。

【 0 1 7 0 】

参照抗体 A C 1 0 9 7 で使用される重鎖可変領域は、配列 E V Q L V Q S G A E V K K P G E S L R I S C K G S G Y S F S T Y W I S W V R Q M P G K G L E W M G K I Y P G D S Y T N Y S P S F Q G Q V T I S A D K S I S T A Y L Q W S S L K A S D T A M Y Y C A R G Y G I F D Y W G Q G T L V T V S S (配列番号 8 6 2) を含み、参照抗体 A C 1 0 9 7 で使用される軽鎖可変領域は、配列 S Y E L T Q P P S V S V S P G Q T A S I T C S G D N I G D Q Y A H W Y Q Q K P G Q S P V L V I Y Q D K N R P S G I P E R F S G S N S G N T A T L T I S G T Q A M D E A D Y Y C A T Y T G F G S L A V F G G G T K L T V L (配列番号 8 6 3) を含んだ。参照抗体 A C 1 1 2 1 で使用される重鎖可変領域は、配列 Q V Q L Q Q W G A G L L K P S E T L S L T C A V Y G G S F S G Y Y W S W I R Q S P E K G L E W I G E I N H G G Y V T Y N P S L E S R V T I S V D T S K N Q F S L K L S S V T A A D T A V Y Y C A R D Y G P G N Y D W Y F D L W G R G T L V T V S S (配列番号 8 6 4) を含み、参照抗体 A C 1 1 2 1 で使用される軽鎖可変領域は、配列 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 Q S V S S Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R A T 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 Y C Q Q R S N W P P A L T F G G G T K V E I K (配列番号 8 6 5) を含んだ。本明細書で使用される I g G を表 2 に示す。

表 2 : I g G のリスト

IgG	Fab	アイソタイプ	説明
AC1097	参考1	IgG2	参照Ab
AC1121	参照2	IgG4 (S241P)	参照Ab
AG10058	5310	IgG4 (S241P)	Adagene mAb
AG10059	5351	IgG4 (S241P)	Adagene mAb
AG10131	5365	IgG4 (S241P)	Adagene mAb
AG10154		IgG4 (S241P)	アイソタイプ対照

【 0 1 7 1 】

製造者の取扱説明書に従って、プラスミドの対を H E K 2 9 3 F 細胞に一過性にトランスフェクトした。上清を回収し、遠心分離及び濾過により清澄化し、I g G を標準的なプロテイン A アフィニティークロマトグラフィーで精製した (M a b S e l e c t S u R e , G E H e a l t h c a r e) 。タンパク質を溶出及び中和し、緩衝液を P B 緩衝液 (2 0 m M リン酸ナトリウム、1 5 0 m M N a C l、p H 7 . 0) に交換した。タンパク質濃度は UV 分光光度法によって決定され、I g G 純度は S D S - P A G E または S E C - H P L C によって変性、還元、及び非還元条件下で分析された。

【 0 1 7 2 】

実施例 4

ヒト、サル、マウスの C D 1 3 7 への結合親和性

I g G のヒト、サル、及びマウスの C D 1 3 7 に対する結合親和性は、B I A c o r e、E L I S A、及びフローサイトメトリーによって測定された。結果を表 3 に要約した。

表 3 抗体のヒト、サル、マウスの C D 1 3 7 への結合親和性

KD (nM)	Biacore			ELISA			HEK293F細胞表面		
	ヒト	カニクイザル	マウス	ヒト	カニクイザル	マウス	ヒト	カニクイザル	マウス
AG10131	3.7	12.5	64.5	0.2	0.3	23.9	1.3	1.2	49.4
AG10058	5.9	9.3	15.2	0.2	0.3	0.3	1.8	2	10.1
AG10059	24.2	23.1	NC	0.8	0.4	NC	5	2.6	NC
AC1097	20.9	37.6	NC	0.2	0.4	NC	1.9	2.9	NC
AC1121	9.6	NC	NC	0.2		NC	3.3	NC	NC

NC：交差反応性ではない

【0173】

4 a . SPRによる結合親和性と動力学的測定

製造者のガイドラインに従って、Biacore (商標) T200機器 (Biacore AB, Uppsala, Sweden) を使用した表面プラズモン共鳴 (SPR) 分析により、ヒト、サル、及びマウスCD137タンパク質に対する抗体の結合親和性と动力学を調べた。Human Antibody Captureキット (GE BR-1008-39) の抗ヒトIgG (Fc) 抗体は、Amine Couplingキット (GE Biacore #BR-1000-50) の取扱説明書に従って、そのアミン基をセンサーチップのカルボキシル化表面にカップリングすることにより、CM5チップに固定した。固定化された抗ヒトIgG (Fc) 抗体を使用して、AG10058、AG10059、AG10131、AC1121、及びAC1097を捕捉した。最終的に、6の濃度 (3.13、6.25、12.5、25、50、100) (nM) (ランニング緩衝液で希釈) のヒトCD137-His6 (Sino Biological #10041-H08H) を流速30 μ l/minで300秒間注入し、解離時間は300秒であった。使用したランニング緩衝液は、1x HBS-EP (10mM HEPES、150mM NaCl、3mM EDTA、0.005% v/v Surfactant P20、25 でpH 7.4) であった。「バックグラウンド」減算のために、固定化されたタンパク質を含まないブランクフローセルを使用して、それぞれの場合に対応する対照を実施した。製造者のガイドラインに従って、Biacore T200評価ソフトウェア (Biacore AB, Uppsala, Sweden) を使用して、1:1 Langmuir結合モデルに結合及び解離曲線を適合させた。表3に示すように、全ての抗体はヒトCD137に結合する。AG10058及びAG10059は、両方の参照抗体よりも高い親和性を示す。AC1121参照mAbを除き、全ての抗体はサルCD137に結合する。AG10058及びAG10131のみがマウス及びラットのCD137に結合する。AG10058は、AG10131 (64.5 nM) よりも高い親和性 (15.2 nM) を有する。

【0174】

4 b . ELISAアッセイを使用する可溶性CD137への結合親和性の測定

ヒトFCフラグメントと融合したヒト、サル、またはマウスのCD137の連続希釈液を調製し、37 で1時間ELISAプレートをコーティングするために使用した。ブロッキング後、100 μ l IgG (5 μ g/mL) を添加し、37 で1時間インキュベートした。プレートを3回洗浄した後、HRPコンジュゲートタンパク質L (1:2000希釈) とともに37 で1時間インキュベートした。プレートを再度3回洗浄し、TMB基質とともに室温で20分間インキュベートした。反応停止後、450 nmの吸光度を測定した。データは、非線形フィッティングを備えたGraphpad Prism 6によって分析された。図2に示すように、全ての抗体は、同様のnM未満の親和性でヒトCD137 (FC融合タンパク質) に結合する。AC1121参照mAbを除き、全ての

10

20

30

40

50

抗体は同様の nM 未満の親和性でサル CD 137 に結合する。Biacore の結果と一致して、AG 10058 と AG 10131 のみがマウス CD 137 に結合する。AG 10058 は、AG 10131 (23.9 nM) よりも高い親和性 (0.3 nM) を有する。
【0175】

4c. フローサイトメトリーによる細胞表面で過剰発現した CD 137 への結合親和性の測定

抗体の親和性は、HEK 293F 細胞の表面に一過性に発現するヒト、サル、及びマウスの CD 137 に対しても評価された。簡潔に述べると、HEK 293F 細胞に、バイシストロン IRES ベクターから完全長のヒト、サル、またはマウスの CD 137 を発現するプラスミドをトランスフェクトし、EGFP を使用してトランスフェクトした細胞を特定した。48 時間後、トランスフェクトされた細胞を回収し、冷 FACS 緩衝液 (1% BSA を補充した PBS) で 1 回洗浄した。次いで、細胞を様々な IgG (それぞれ 100 nM) と共に氷上で 1 時間インキュベートし、事前に冷却した FACS 緩衝液で 2 回洗浄し、AlexaFluor (登録商標) 647 コンジュゲートマウス抗ヒト FC 抗体と共に氷上で 30 分間インキュベートした。フローサイトメトリー (Beckman (登録商標) CytoFlex) による分析の前に、細胞を 1 回洗浄した。図 3a に示すように、全ての抗体は細胞表面に発現したヒト CD 137 に低い nM 親和性で結合する。AG 10058、AG 10059、及び AG 10131 は、両方の参照抗体よりわずかに優れている。AC 1121 参照 mAb を除き、全ての抗体は低 nM 親和性でサル CD 137 に結合し、AG 10058、AG 10059、及び AG 10131 は、AC 1097 参照抗体よりもわずかに優れている。Biacore 及び ELISA の結果と一致して、AG 10058 と AG 10131 のみがマウス及びラットの CD 137 に結合する。AG 10058 は、マウス CD 137 に対して AG 10131 よりも高い親和性を有する。さらに、AG 10058 及び AG 10131 (それぞれ 100 nM) は、HEK 293F 細胞表面で過剰発現したラット及びイヌの CD 137 にも結合する (図 3b)。

【0176】

4d. 活性化されたヒト、サル、マウス、及びラットの T 細胞への IgG の結合。

例示的な抗体の種交差反応性は、ヒト、サル、マウス、及びラットの PMA 及びイオノマイシン刺激 PBMC または T 細胞を使用してさらに確認された。ヒト及びカニクイザルの PBMC は、Ficoll 密度勾配遠心分離によって単離された。簡潔に述べると、健康なドナーまたはカニクイザル由来の新規に採取した全血を等量の PBS で希釈し、Histopaque 1077 (50 ml の遠心管中に 14 ml) の頂部に慎重にロードした。プレーキをオフにして、室温で 30 分間、1,200 x g で遠心分離する。遠心分離後、単核細胞を含む不透明な界面の 0.5 cm 以内まで上層を注意深くピペットで吸引する。上層を破棄する。不透明な界面 (約 3 ~ 5 ml) を、清潔な 50 ml コニカル遠心管にピペットで慎重に移す。20 ml の PBS で細胞を洗浄し、400 x g で 5 分間遠心分離して細胞を収集し、細胞を 20 ml の PBS に再懸濁する。血球計算盤で細胞を計数し、400 x g で 5 分間遠心分離して細胞を再度収集する。マウスまたはラットの脾細胞は、50 ml のコニカルチューブに取り付けられた 45 µm のセルストレーナーに脾臓を通し、単一細胞懸濁液を取得し、PBS でストレーナーを通して細胞を洗浄することによって単離された。1600 rpm で 5 分間遠心分離し、上清を破棄する。2 ml の赤血球溶解液に細胞ペレットを 2 分間再懸濁する。10 倍量を超える PBS を添加し、1600 rpm で 5 分間遠心して細胞を収集する。上清を破棄し、脾細胞を RPMI 1640 / 10% FBS に再懸濁する。Pan-T 細胞は、それぞれヒト、サル、マウス、及びラットに特異的な市販キット (Stemcell Technologies) の磁気ビーズによるネガティブ選択により、PBMC (ヒト/サル) または脾細胞 (マウス/ラット) から濃縮された。ヒト/サル PBMC、またはマウス/ラット脾細胞の活性化は、細胞を 50 ng/ml PMA 及び 1 µM イオノマイシンと共に、37 °C、5% CO₂ で一晩インキュベートすることにより実施した。

【0177】

活性化された細胞（約 2×10^5 細胞/チューブ）を事前に冷却した染色緩衝液（2% FBSを補充したPBS）で洗浄し、氷上で1時間、100 nMの試験抗体と共にインキュベートした。次いで、細胞を1 mLの染色緩衝液を使用して2回洗浄し、AlexaFluor（登録商標）647コンジュゲートマウス抗ヒトFC抗体と種特異的T細胞マーカー抗体を含む100 μ Lの染色緩衝液に再懸濁した。以下のようなT細胞マーカー抗体が使用された：CD3、CD4、またはCD8。暗所で30分間インキュベートした後、細胞を染色緩衝液で2回洗浄した。最終的に、細胞を300 μ Lの染色緩衝液に再懸濁し、Beckman CytoFlexで分析した。データ分析は、Flowjo 10ソフトウェアを使用して実施された。図4aに示すように、試験した全ての抗体は、活性化したヒトとサルの両方のT細胞に結合するが、ナイーブヒトT細胞には結合しない。AG10131の活性化したマウス及びラットのT細胞への結合能力をさらに評価した（図4b）。AG10131は、活性化されたマウスとラットの両方のT細胞に結合する。

10

【0178】

要約すると、AG10058及びAG10131抗体は、ヒト及びサルのCD137に対してより高い親和性を示す。それらは、AG10131についてヒト、カニクイザル、マウス、ラット、及びイヌを含む広範な種交差反応性を示すが、AG10058について、ヒト、カニクイザル、マウス、及びイヌを含み、マウス同系モデルにおける*in vivo*での有効性の迅速な評価を可能にする。

【0179】

実施例5

20

CD137に対する抗体の結合選択性

CD137に対する抗体の選択性は、TNFRスーパーファミリーのメンバーへの結合能力のフローサイトメトリー分析を使用して評価された。CD137、OX40、CD40、GITR、及びCD27を含むTNFRSF受容体は、HEK293F細胞の表面上で一過性に過剰発現していた。トランスフェクトした細胞を事前に冷却した染色緩衝液（2% FBSを補充したPBS）で洗浄し、次いで氷上で1時間、100 nMの試験抗体と共にインキュベートした。細胞を染色緩衝液で2回洗浄し、AlexaFluor（登録商標）647コンジュゲートマウス抗ヒトFC抗体を添加し、氷上で30分間インキュベートした。試料は、フローサイトメトリーによる分析の前に染色緩衝液で1回洗浄された。図5に示すように、AG10058、AG10059、及びAG10131は、CD137に特異的に結合するが、任意の他の試験されたファミリーメンバーまたは空のベクターをトランスフェクトした親細胞には結合しない。

30

【0180】

実施例6

ELISA及びフローサイトメトリーを使用したリガンド競合

ELISAとフローサイトメトリーアッセイの両方により、その同族リガンドCD137LへのCD137の結合を遮断する能力について抗体を試験した。図6a及び6bに示すように、試験した全ての抗体はCD137とCD137Lの結合を遮断する。

【0181】

6a. ELISAによるリガンド競合結合

40

組換えヒトCD137（ヒトFc及びHisタグと融合）をPBSで1 μ g/mLに希釈し、Maxisorpプレートに4で一晚コーティングした。プレートを、37で1時間、3%脱脂乳を補充したPBSでブロッキングした。洗浄後、50 μ Lのビオチン化CD137L（4 μ g/mL）とさまざまな濃度の試験抗体（500 μ g/mL ~ 2 μ g/mLの範囲の8つの1:2連続希釈液）の合計量100 μ Lの混合物をそれぞれのウェルに添加し、37で1時間インキュベートした。プレートを3回洗浄し、100 μ LのHRPコンジュゲートニュートラアビジン（1:1000）を各ウェルに添加し、37で1時間インキュベートした。プレートを前述のように洗浄し、50 μ LのTMB基質溶液を添加し、室温で20分間インキュベートした後、50 μ LのH₂SO₄で反応を停止した。図6aに示すように、全ての試験抗体AG10058、AG10059、及びA

50

G10131は、CD137のCD137Lへの結合を遮断する。AG10131は、約 μM の範囲で最も強いまたは完全な遮断能力を示し、 $> \mu\text{M}$ で顕著な遮断を示すAG10058、 μM 範囲で効果的に遮断するAG10059がそれに続く。これらのデータは、試験された条件下で、使用された試薬によって、幅広い種の交差反応性抗体AG10131及びAG10058が、CD137とそのリガンドCD137Lの間の相互作用の非常に効果的な阻害剤であるのに対し、AG10059がCD137及びそのリガンドCD137Lの間の相互作用の適度に効果的な遮断のみを示すことを示唆する。ヒトとサル両方のCD137と交差反応性である参照抗体AC1097、ヒトCD137とのみ反応するAC1121は、ほとんど遮断を示さないことに留意されたい。

【0182】

6b. フローサイトメトリーによるリガンド競合結合

全長ヒトCD137をコードするプラスミドは、HEK293F細胞で一時的に発現した。細胞を染色緩衝液(1%BSAを補充したPBS)で洗浄し、100nMの試験抗体を含む染色緩衝液に再懸濁した。氷上で30分間インキュベートした後、33nMのビオチン化CD137Lを各ウェルに添加し、氷上でさらに1時間インキュベートした。細胞を染色緩衝液で2回洗浄し、Alexa fluor 647コンジュゲートストレプトアビジンを含む50 μL の染色緩衝液を添加し、氷上で30分間インキュベートした。細胞を1回洗浄し、CytoFluorフローサイトメトリーで分析した。図6bに示すように、試験した3つの抗体は全て、CD137とCD137Lの結合を濃度依存的に遮断できる。AG10131は最も強力な遮断能力を示し、顕著な遮断を有するAG10058、効果の低い遮断を有するAG10059が後に続く。これらのデータは、幅広い種の交差反応性抗体AG10131及びAG10058が、CD137とそのリガンドCD137Lの間の相互作用の遮断において非常に効果的であるのに対し、AG10059がCD137及びそのリガンドCD137Lの間の相互作用の部分的な遮断を示すことを示唆する。対照的に、ヒトとサル両方のCD137と交差反応するAC1097参照抗体は、部分的な遮断のみを示すが、ヒトCD137とのみ反応するAC1121参照抗体は、遮断を示さない。

【0183】

実施例7

エピトープマッピング

試験した抗体の結合領域をアミノ酸残基レベルで決定するために、ヒトCD137の細胞外ドメインで一連の変異(表5)を作製した。これらのCD137変異プラスミドを使用して、HEK293F細胞をトランスフェクトした。ヒトCD137変異体への抗体の結合は、実施例5で以前に記載されるように、フローサイトメトリー分析により評価され、図7Aに示した。結果は、表5に要約するが、これらの抗体は、興味深い区別でヒト、サル、マウス、及びラットCD137との交差反応性ととも、Adageneライブラリーに由来するヒットからの洗練されたエピトープを示す。AG10131は4種全てに結合し、一方でAG10058は3種全てのCD137に結合するが、ラットCD137には結合しない。AG10058、AG10059、及びAG10131は、GFT34AAA、FSS53AAA、及びFH92AA変異への結合能力を失い、それらの結合エピトープがこれらの領域内、例えば、配列番号1のアミノ酸残基34~93または34~108(図7Bも参照されたい)にあることを示す。AG10058とAG10131は同一または非常に類似したエピトープに結合し得、AG10059はAG10058及びAG10131とは異なるエピトープに結合し得る。

【0184】

変異体コンストラクトは、AC1121及びAC1097による参照抗体からAG10058、AG10059、及びAG10131によるエピトープを区別することを意味した。3つの抗体AG10058、AG10059、及びAG10131は全て、AC1121及びAC1097とは非常に異なるエピトープを標的とすることは明らかである。AG10058、AG10059、及びAG10131は、変異体Hu__FH92AA及び

10

20

30

40

50

Hu__FSS53AAA及び場合によってはHu__GTF34AAAによって定義される領域でAC1121と異なるが、AG10058、AG10059、及びAG10131は、Hu__FH92AAならびにマウス、ラット、及びイヌのCD137などの他の種とのそれらの交差反応性は異なるが、サルとのそれらの種交差反応性を除いて、使用されるほとんどの変異体によって定義される領域でAC1097と異なる。いくつかの実施形態では、AG10058、AG10059、及びAG10131または本明細書に開示される他の抗体は、配列番号1のアミノ酸残基115~156内に位置するエピトープに結合しない。図7A及び表5にも示されるように、ヒトCD137リガンドの野生型対変異体ヒトCD137への結合が、これらの抗体がその受容体へのCD137リガンド結合を遮断するという観察と共に、試験された抗体の結合パターンとよく一致する。

10

表5 エピトープマッピング

変異	AG10058	AG10059	AG10131	AC1121	AC1097	HuCD137L
Hu_WT	+	+	+	+	+	+
Cyno_WT	+	+	+	-	+	
Mouse_WT	+	-	+	-	-	
Rat_WT	-	-	+	-	-	
Hu_GTF34AAA	-	-	-	-/+	+	-
Hu_FSS53AAA	-	-	-	+	+	-
Hu_FH92AA	-	-	-	+	-	-
Hu_GQ109AA	+	+	+	+	-	+
Hu_EL111AA	+	+	+	+	-	+
Hu_F125A	+	+	+	+	-	+
Hu_FN125AA	+	+	+	+	-	+
Hu_PW135AA	+	+	+	+	-	+
Hu_TN137AA	+	+	+	+	-	+
Hu_GT150AA	+	+	+	+	-	+

20

30

【0185】

実施例8

NF Bルシフェラーゼレポーターアッセイにおける抗体のアゴニスト活性

抗体のアゴニスト活性はNF Bレポーターアッセイを使用して評価された。293T細胞に、NF Bルシフェラーゼレポータープラスミドとともに、ヒト、サル、またはマウスCD137を発現するプラスミドをトランスフェクトした。4時間後、50µLの細胞を 0.4×10^6 /mLの密度で96ウェルプレートの各アッセイウェルに播種した。試験抗体及び3:1の比率の架橋抗体(Fab'ヤギ抗ヒトIgG FC)を含む総容量50µLの抗体混合物を添加し、18時間インキュベートした。培地を除去した後、50µLのPassive Lysis Buffer(Promega E1980)を添加し、37°Cで30分間インキュベートした。20µLの溶解物を白いプレートに移し、ルシフェラーゼ基質を添加した。ホタルとウミシイタケの発光シグナルを測定し、それらの比率をGraphPad Prism 6.0ソフトウェアによるデータ分析に使用した。図8に示すように、アイソタイプ対照抗体と比較して、ヒト及びサルのCD137が発現するとき、全ての試験抗体がNF Bレポーター遺伝子の発現を活性化する。マウスCD137が発現すると、AG10059ではなくAG10058及びAG10131がNF Bレポーター遺伝子の発現を活性化する。これは、AG10058とAG10131がマウスCD137に結合するのに対し、AG10059は結合しないという以前の観察と一致する。

40

50

【0186】

実施例9

T細胞活性化アッセイにおける抗体のアゴニスト活性

抗体のアゴニスト活性は、T細胞活性化アッセイにおいてさらに確認された。96ウェル細胞培養プレートを、1×PBS中の、50μLの抗CD3抗体(2μg/mL)単独で、または50μLの試験抗体(60μg/mL、20μg/mL、6μg/mL、2μg/mL、0μg/mL)と共に、4で一晚コーティングした。CD8+T細胞は、製造元の取扱説明書に従うプロトコルを使用して単離された。細胞は、10%FBSを補充したRPMI1640培地で1×10⁷細胞/mLの密度で調製した。200μLの細胞を各アッセイウェルに播種し、37、5%CO₂インキュベーターで4日間インキュベートした。増殖について細胞を毎日、顕微鏡下でチェックした。96時間のインキュベーション後、100μLの上清をIFN- 検出用の新しい96ウェルプレートに移した。T細胞増殖は、Cell Titer Glowキット(Promega)を使用してアッセイした。図9に示すように、アイソタイプ対照抗体と比較して、試験した全ての抗体は、用量依存的にCD8+T細胞増殖とIFN- 分泌の両方を誘発した。

10

【0187】

実施例10

マウス同系モデルにおける抗腫瘍活性

マウスCD137との種交差反応性により、迅速な*in vivo*機能評価が可能になる。AG10058及びAG10131は、複数のマウス同系モデルで試験されている。BALB/cマウス(群あたりn=8)に2×10⁶のH22肝癌細胞(Xiao et al, Soluble PD-1 facilitates 4-1BBL-triggered antitumor immunity against murine H22 hepatocarcinoma *in vivo*. Clin Cancer Res. 2007;13(6):1823-30.)、5×10⁵のCT26結腸癌細胞、または5×10⁵のEMT6乳癌細胞を皮下移植した。腫瘍が確立された(>50mm³)とき、腹腔内注射によるアイソタイプ対照抗体、AG10058、またはAG10131による処理が3週間まで週に2回、開始された。腫瘍増殖を週に2回モニターし、経時的に平均腫瘍体積±s.e.m.として報告した。図10~13に示すように、アイソタイプ対照抗体と比較して、AG10058とAG10131は両方とも、これらの異なる同系マウス腫瘍モデルで強力な*in vivo*抗腫瘍活性を示した。

20

30

【0188】

10a. CD137アゴニスト抗体は、H22マウス肝癌モデルで抗腫瘍効果を示す

最初に、AG10058またはAG10131を50mg/kgの用量で3週間にわたって週2回投与した。両方の分子はほぼ100%TGI(腫瘍増殖阻害)を示した(図10、パネルa)。CD4及びCD8マーカーの免疫組織化学染色により、AG10131はH22腫瘍(Xiao et al, Soluble PD-1 facilitates 4-1BBL-triggered antitumor immunity against murine H22 hepatocarcinoma *in vivo*. Clin Cancer Res. 2007;13(6):1823-30.)微小環境におけるCD4+及びCD8+T細胞の浸潤を有意に増加させることが示された(図10、パネルb)。さらに3mg/kgまでの用量漸減でも、約100%TGIが示され、両方の分子が強力な抗腫瘍活性を有することが示唆された(図10、パネルc及びd)。AG10131の1mg/kg及び0.1mg/kgまでのさらなる用量漸減でも、0.1mg/kg及び1mg/kgで50%を超えるTGIが示された(図10、パネルe)。

40

【0189】

10b. CD137アゴニスト抗体は、CT26マウス結腸癌モデルで抗腫瘍効果を示す

図10に示すように、CT26マウス結腸癌モデル(Martinez-Forero

50

et al., T cell costimulation with anti-CD137 monoclonal antibodies is mediated by K63-polyubiquitin-dependent signals from endosomes. *J Immunol.* 2013; 190(12): 6694-706)でAG10058とAG10131の両方が50mg/kgの用量でほぼ100%のTGI(腫瘍増殖阻害)を示した(図11、パネルa)。AG10131のさらなる用量滴定(図11、パネルb)は、5mg/kg及び1mg/kgの用量でほぼ100%のTGIを示した。0.1mg/kgの用量で、約40%のTGIが達成され、用量依存性の抗腫瘍活性が示された。

【0190】

10

10c. EMT6乳癌モデル

抗腫瘍活性は、EMT6マウス乳癌同系モデルでさらに評価される(Shi and Siemann, Augmented antitumor effects of radiation therapy by 4-1BB antibody (BMS-469492) treatment. *Anticancer Res.* 2006; 26: 3445-53)(図12)。AG10058とAG10131は両方とも、約100%の腫瘍増殖阻害を示した。

【0191】

10d. CD137アゴニスト抗体処理に完全に応答したマウスは、新しい腫瘍細胞による再チャレンジ後も腫瘍フリーの状態を維持する。

20

CT26腫瘍モデルにおいてAG10058またはAG10131により3週間処理した後、完全な腫瘍退縮を伴うマウスは、処理なしでさらに1ヶ月間維持された。次いで、完全奏功を維持したマウスは、62日目に反対側腹部に 5×10^5 のCT26腫瘍細胞を皮下に再チャレンジし、腫瘍増殖についてモニターした。同数のCT26腫瘍細胞を接種したナイーブマウスで同時に再チャレンジ対照群を設定した。図13に示すように、AG10131での処理(1及び5mg/kgで、それぞれ図13の上パネル及び下パネルを参照されたい)は、CT26腫瘍モデルで強力な抗腫瘍活性を示し、AG10131(1mg/kg群)では5/8、AG10131(5mg/kg群)では6/8が、CT26腫瘍細胞に再チャレンジする前に60日間にわたって完全奏功を示した。さらに、これらのマウスは、同一の腫瘍細胞で再チャレンジした後も腫瘍フリーのままであり、特定の抗腫瘍記憶がこれらのマウスで発達したことを示唆している。

30

【0192】

この仮説を証明するために、脾臓細胞をこれらの腫瘍拒絶再チャレンジマウスと対照マウスから収集し、マイトマイシンCで増殖阻害されたCT26腫瘍細胞と*in vitro*で7日間共培養して、腫瘍特異的メモリーT細胞を増幅した。次いで、これらの脾細胞を回収し、異なるE/T比で4時間蛍光標識生CT26腫瘍細胞と混合し、生/死染色及びFACS分析により腫瘍細胞の殺傷を検出した。図14に示すように、AG10058とAG10131の両方で事前に処理した、腫瘍拒絶再チャレンジマウス由来の脾細胞で、腫瘍細胞の殺傷の顕著な増加が観察された。

【0193】

40

実施例11

AG10131-IgG4はADCC効果を誘発しない

ヒトCD8⁺T細胞は、EasySepヒトCD8⁺T細胞濃縮キット(StemCell Technologies)によって健康なドナーの末梢血から単離され、PMA(50ng/ml)+イオノマイシン(1uM)で18時間、*in vitro*で刺激された。次いで、これらの活性化CD8⁺T細胞をCalcein-AMで標識し、標的細胞として機能させた。異なる健康なドナーからのNK細胞を、ヒトNK分離キット(StemCell Technologies)で分離し、エフェクター細胞として機能させた。抗体依存性細胞障害性(ADCC)アッセイでは、連続希釈抗体の非存在下及び存在下で、エフェクター(NK)及び標的(活性化CD8⁺T)細胞を5:1の比率で96ウ

50

エルプレートにおいて培養条件下で4時間混合した。次いで、各ウェルから上清を収集し、プレートリーダーSpectraMax i3x (Ex 488 nm、Em 520 nm)で蛍光シグナルを検出した。アイソタイプhIgG4 mAbを陰性対照として使用し、ヒト化OKT3 (Novoproteinの抗CD3 hIgG1)を陽性対照として使用した。次いで、次の式を使用して溶解%を計算した。溶解% = [(実験的放出) - 平均(標的 + NK)] / [平均(標的 最大) - 平均(標的 単独)] × 100% (図15)。

【0194】

実施例12

抗体の開発プロファイル

開発可能性評価のために、精製されたAG10058、AG10059、AG10131、及びAC1097をPB緩衝液(20 mM PB、150 mM NaCl、pH 7.0)に交換した。濾過、濃縮、加速ストレス試験を含む全ての実験は、PB緩衝液で実施された。全てのSEC-HPLC分析では、TSKgelカラム(Tosoh Bioscience G3000SWx1)を使用した。

【0195】

12a. 溶解性

3つの抗体は全て、明白な沈殿なしにPB緩衝液で100 mg/mlよりも高く濃縮できる(表6)。次いで、抗体をPB緩衝液で20 mg/mlに調整した。次に、高分子量(HMW)凝集体の検出のために、試料(各10 µg)をSEC-HPLCで分析した。クロマトグラム(図16)に示されているように、全ての試験抗体について、高濃度(20 mg/ml)でHMW凝集体の増加は観察されなかった。

表6 抗体の溶解性

試料	濃度/(mg/mL)	凝集(HMW %)
AG10058	108	1.0
AG10059	134	1.4
AG10131	110	2.0

【0196】

12b. 加速ストレス条件下での抗体の安定性

抗体の安定性も加速ストレス条件下で調べ、結果を表7にまとめる。凍結(-80)及び解凍(室温)の6サイクル後、全ての抗体は安定したままである(図17)。50で7日後、HMW凝集体またはLMWフラグメントの変化はほとんどなかった(図17)。長期の経時変化実験(40で28日間まで)では、全ての抗体が安定したままであり、HMW凝集体またはLMWフラグメントの顕著な増加はなかった(図17)。

表7 加速条件下でのHMWの変化

	AG10058	AG10059	AG10131
凍結-解凍6回	4.6%	1.2%	0.4%
50°C 7日	0.7%	1.2%	0%
40°C 28日	0.9%	0%	0%

【0197】

さらに、示差走査熱量測定(DSC)で測定される熱安定性は、AG10131とAG10058の両方が少なくとも約59まで安定していることを示している。転移中点Tm(ほぼ全てのタンパク質ドメインの変性転移が起こる特徴的な温度)を、以下の図18及び表8に示す。

表8 DSCによる熱安定性

	Tm onset (°C)	Tm1 (°C)	Tm2 (°C)
AG10058	61.5	67.3	76.9
AG10131	59.3	67.6	81.5

【0198】

さらに、遠心分離後のAG10131及びAG10058の最高達成濃度は、それぞれ180mg/mL超及び220mg/mL超であった。

【0199】

実施例13

関連種の安全性プロファイル：マウスとカニクイザル

13a. 正常なC57BL/6マウスにおけるAG10131の反復投与毒性試験。

AG10131の反復投与毒性試験は、正常なC57BL/6マウスにおいて実施された。ビヒクル、AG10131(100mg/kg)を、1日目、4日目、8日目、及び11日目にi.p.投与した(10mL/kg)。5匹のメスマウス(7~8週齢)が各群に含まれていた。マウスに異常な行動や症状がないかどうかを毎日モニターし、食物摂取量と体重を毎日測定した。14日目に、死後検査及びその他の分析のために動物を安楽死させた。各動物から血液を採取し、群ごとに2つの血液試料を血液学に(RBC、血小板、WBC、WBC百分率検査)、群内の他の3つの血液試料を血液生化学に(AL、AST、ALB、GLB、A/G、TBIL、ALP、GGT、及びLDH)分析に使用した。各マウスから以下の臓器を収集し、FFPEに保存した：心臓、肺、胸腺、肝臓、脾臓、及び腎臓。肝臓組織のFFPEブロックを調製し、切片化し、組織病理学分析のためにH&E染色した。

10

20

【0200】

全研究の生存期間中、異常な行動の観察または予定外の動物の死亡はなかった。ビヒクル処理と比較して、AG10131は食物摂取量と体重に影響しなかった。死後検査では、両方のAG10131を使用した処理群のマウスに明らかな病変も示されなかった。血液学分析では、AG10131で処理したマウスで試験した血液生化学パラメーターに関して、顕著な変化はまったく示されなかった(図19)。これら全てのマウスの肝臓の病理組織切片に明らかな異常はまったく見つからなかった(図20)。全体として、AG10131はこの研究で十分に認容され、マウスでは顕著な毒性は観察されなかった。

30

40

【0201】

13b. カニクイザルにおけるAG10131の反復投与研究

AG10131の反復投与研究は、正常なカニクイザルにおいて実施された。ヒトIgG4アイソタイプ対照(10mg/kg)、AG10131(0.5及び10mg/kg)を、0日、7日、14日、及び22日にi.v.投与した(1mL/kg)。1匹のオスと1匹のメスのカニクイザル(3~5歳)が各群に含まれていた。動物に異常な行動や臨床徴候がないかどうかを毎日モニターし、食物摂取量を毎日測定した。体重は、投与前の(-15)日目、(-5)日目、ならびに投与後の6日目、13日目、18日目、及び26日目に測定された。血液学及び血液化学パラメーターは投与前の(-12)日目、(-5)日目、ならびに投与後の7日目、14日目、19日目、及び27日目(10mg/kg群のみ)に測定され、尿検査は投与前の(-12)日目、(-5)日目、及び投与後の6日目、13日目、18日目に実施された。10mg/kg群の動物は、27日目に死後検査及びその他の分析のために安楽死させた。主要な臓器を解剖し、秤量した。FFPE肝臓組織ブロックを調製し、切片化し、組織病理学分析のためにH&E染色した。

【0202】

全研究の生存期間中、全ての群において異常な行動の観察または予定外の動物の死亡はなかった。ビヒクル処理と比較して、10mg/kgでのAG10131処理は食物摂取量と体重に影響しなかった。注射部位の反応も含めて、臨床徴候は認められなかった。死後検査では、10mg/kgのAG10131で処理したカニクイザルで検査した全ての

50

臓器に明らかな病変や体重異常はまったく見られなかった。血液学、血液化学、尿パラメーターも全ての治療群で正常範囲内である(図21)。肝臓の組織病理学分析では、10 mg/kgでのAG10131の反復投与後、リンパ球浸潤を含む明らかな異常はまったく示されなかった(図22)。全体として、AG10131はカニクイザルで10 mg/kgまでの週用量で十分に認容され、明らかな毒性は検出されなかった。

【0203】

実施例14

カニクイザルにおけるAG10131の薬物動態

14a. カニクイザルにおけるAG10131の薬物動態

AG10131の薬物動態研究は、ナীবなカニクイザルにおいて実施された。AG10131の3つの用量レベル(10 mg/kg、30 mg/kg、100 mg/kg)は、サル3つの群に静脈内ボラス投与された。各群には、3匹のオスと3匹のメスが含まれる。血清試料は投与前、投与後0.083、0.25、0.5、1、2、6、12、24、36、48、72、96、120、144、168、240、336、408、504、672、及び840時間で収集された。AG10131の血清濃度はELISAによって決定された。

10

【0204】

AG10131は、16匹中12匹の動物、すなわち低及び中用量群の全動物及び高用量群の6匹中2匹で14日目(336時間)に急速に除去された。21日目に、高用量群からさらに2匹の動物が急速なクリアランスを示した。これら14匹の動物の血清濃度は低いか、定量限界を下回っている。これは、これらの動物での抗薬物抗体生成の観察と一致している。高用量群の薬物動態に影響を与えない可能性のある2匹の動物のデータを適合させて、薬物動態パラメーターを予測した(図23)。AG10131の半減期は7.3~8.8日の範囲である。

20

【0205】

14b. ラット内でのAG10131の薬物動態

AG10131の薬物動態研究は、ナীবなSDラットにおいて実施された。AG10131の3つの用量レベル(10 mg/kg、30 mg/kg、100 mg/kg)は、動物の3つの群に静脈内ボラス投与された。各群には、15匹のオスと15匹のメスが含まれる。血清試料は、3匹の動物から、投与前、投与後0.083、0.25、0.5、1、2、6、12、24、36、48、72、96、120、144、168、240、336、408、504、672、及び840時間の各時点で収集された。AG10131の血清濃度はELISAによって決定され、データはPhoenix Professional V6.3によって分析された。

30

【0206】

結果：低、中、高用量のPKパラメーターは類似する(図24)。AG10131のクリアランス率は約0.004 ml/kg/分である。AG10131の半減期は11.5~14.6日の範囲である。

【0207】

14c. マウス内でのAG10131の薬物動態

AG10131の薬物動態研究は、約8週齢のBALB/cマウスで実施された。投与群あたり3匹のメスBALB/cマウスに、尾静脈からAG10131を含む試験抗体を1 mg/kgで静脈内注射した。投与後1時間、8時間、48時間、168時間、及び336時間に血液試料(試料あたり約100 uL)を収集した。ブランクの対照血液は、抗体投与なしの3匹のナীবメスマウスから収集された。AG10131を含む各試験抗体の血清濃度をELISAで決定し、抗ヒトIgG(Fc特異的)抗体を捕捉に、HRP標識抗ヒトIgG(Fab特異的)抗体を検出に使用した。

40

【0208】

アイソタイプ対照(AG10154)、2つのベンチマーク抗体(AC1020及びAC1021)、3つのAdagene抗体(AG10131、AG10058、及びAG

50

10059)を含む全ての試験抗体は、マウスで同等の薬物動態を示す(図25)。

【0209】

実施例15

さらなるエピトープマッピング

Adagene及び他の参照抗体によって本明細書に示される抗体の結合エピトープを決定するために、ドメイン、モチーフ、及び残基の3つのレベルの解像度でエピトープを分析する体系的なアプローチを採用した。4つのCRDモチーフを含むCD137の細胞外ドメインと、ヒト、サル、マウス、及びラットのCD137などの4つの異なる種のCD137を使用した(表9)。一連のヒトCD137 CRDモチーフ(システインリッチドメイン)及び1、2、及び3ユニットのヒトCRDモチーフを含むそれらのコンストラクト(表9)が示された。低コピー数のCEN/ARSベースのベクターを使用して、酵母*S. cerevisiae*の誘導性GAL1-10プロモーターの制御下でヒトCD137 CRDを発現させた(Boder and Wittrop (1997) *Nat Biotechnol* 15(6):553-7)。ヒトCD137 CRDへの抗体の結合は、実施例5で以前に記載されるように、フローサイトメトリー分析及び他の技術により評価され、図27に示した。

10

【0210】

結果を表9に要約するが、これらの抗体はCD137標的のみに選択的に結合するが、表に列挙されている非CD137標的はいずれも結合せず、これらの抗体によるヒト、サル、マウス、及びラット種由来のCD137との種特異的な交差反応性は顕著であり、Adagene Dynamic Precision Librariesからスクリーニングされた多様なヒットによる洗練されたエピトープカバレッジを強調している。例えば、AG10131は、ヒト、サル、マウス、ラット、及びイヌ(図示せず)のCD137へと結合し; AG10058は、ヒト、サル、マウスのCD137には結合するが、ラットCD137には結合せず; 一方で、AG10059は、ヒトとサルの両方のCD137に結合する。対照的に、トランスジェニックマウス由来の参照抗体AC1121は、ヒトCD137にのみ結合し、一方で、モルフォシスファージライブラリによる別の参照抗体は、ヒトとサルの両方のCD137に結合する。比較のために、ヒトリガンドCD137LはマウスCD137ではなくヒトCD137受容体とのみ相互作用し、マウスCD137LはヒトCD137ではなくマウスCD137とのみ相互作用することに留意されたい(表9を参照されたい)。

20

30

表9

	AG10058	AG10059	AG10131	AC1121	AC1097	ヒト CD137L	マウス CD137L
Human WT	+	+	+	+	+	+	-
Mouse_WT	+	-	+	-	-	-	+
Cyno_WT	+	+	+	-	+		NA
Rat_WT	-	-	+	-	-		NA

40

【0211】

表9に要約されるように、ヒトCD137標的に対するこれらの抗体の結合モチーフをさらに分析するために、Adageneにより識別された結合部位、他の参照抗体は、解剖されたCD137 CRDモチーフ及びそれらの組み合わせとのCD137リガンド結合と比較して、十分に分離されて、注記されている: AG10058、AG10059、及びAG10131抗体、ならびにヒトCD137リガンドは、ヒトCD137の単一のCRDまたは2つのCRDユニット(CRD2-CRD3)には結合しない。AG10058、AG10059、及びAG10131抗体は、ヒトCD137リガンドと同様に、ヒトCD137の3つのCRDユニット(CRD1-CRD2-CRD3)に結合できる

50

。参照抗体 AC1121 は、ヒト CD137 の 3 つの CRD ユニット (CRD1 - CRD2 - CRD3) にも結合できるが、それは、ヒト CD137 の特定の 2 つの CRD ユニット (CRD1 - CRD2) である。比較すると、ヒト CD137 の 3 つの CRD ユニット (CRD1 - CRD2 - CRD3) は、AG10058、AG10059、AG10131 抗体、及びヒト CD137 リガンドによる結合に必要である。参照抗体 AC1097 は、ヒト CD137 の 3 つの CRD ユニット (CRD2 - CRD3 - CRD4) を含む 2 つの CRD ユニット (CRD3 - CRD4) に結合できる。これらは、Adagene の AG10058、AG10059、AG10131 抗体が、ヒト CD137 リガンドと同様に、ヒト CD137 の 3 つの CRD ユニット (CRD1 - CRD2 - CRD3) でカバーされるエピトープに結合することを示すが、これらは、ヒト CD137 の 2 つのユニット (CRD1 - CRD2) に結合する参照抗体 AC1121、及びヒト CD137 の 2 つの CRD ユニット (CRD3 - CRD4) に結合する参照抗体 AC1097 とは非常に異なる。結論として、Adagene の抗体による CD137 の結合エピトープは、ヒト CD137 L リガンドによる CD137 エピトープと、重複していないとしても非常に類似して必要とされる、特定の使用される CRD 及びその CRD ユニットの数の点での相違によって示されるように、2 つの参照抗体 (CRD1 - CRD2 との AC1121、CRD3 - CRD4 との AC1097) によるエピトープとは異なり、CD137 - CD137 L 間のエピトープは、図 26 に示されるように、最近報告された結晶構造複合体により確認されている (Gilbreth, R.N., Oganessian, V.Y., Amdouni, H., Novarra, S., Grinberg, L., Barnes, A., Baca, M. (2018) J. Biol. Chem. 293:9880-9891)。

表 9 B .

	AG10058	AG10059	AG10131	AC1121	AC1097	ヒト CD137L	マウス CD137L
Hu_CRD1	-	-	-	-	-	-	-
Hu_CRD2	-	-	-	-	-	-	-
Hu_CRD3	-	-	-	-	-	-	-
Hu_CRD4	-	-	-	-	-	-	-
Hu_CRD1-CRD2	-	-	-	+	-	-	-
Hu_CRD2-CRD3	-	-	-	-	-	-	-
Hu_CRD1-CRD2- CRD3	+	+	+	+	-	+	-
Hu_CRD3-CRD4	-	-	-	-	+	-	-
Hu_CRD2-CRD3- CRD4	-	-	-	-	+	-	-

【0212】

Adagene 及び参照の抗体の結合エピトープをアミノ酸残基レベルで決定するために、ヒト CD137 の細胞外ドメインで一連の変異 (表 5) を作製した。これらの CD137 変異プラスミドを使用して、HEK293F 細胞をトランスフェクトした。ヒト CD137 変異体への抗体の結合は、実施例 5 で以前に記載されるように、フローサイトメトリー分析により評価され、図 7 A に示した。結果は、表 5 に要約するが、これらの抗体は、興味深い区別でヒト、サル、マウス、及びラット CD137 との交差反応性ととも、Adagene ライブラリーに由来するヒットからの洗練されたエピトープを示す。AG10131 はヒト、サル、マウス、及びラットの CD137 に結合するが、一方で AG1

0058はヒト、サル、及びマウスのCD137に結合するが、ラットのCD137には結合しない。AG10058、AG10059、及びAG10131による結合エピトープは、CD137のCRD1 - CRD2 - CRD3ユニットにマッピングされ、それらは、GFT34AAA、FSS53AAA、及びFH92AA変異への結合能力を失い、それらの結合エピトープがこれらの領域内、例えば、配列番号1のアミノ酸残基34~93または34~108(図7Bも参照されたい)にあることを示す。AG10058とAG10131は同一または非常に類似したエピトープに結合し得、AG10059はAG10058及びAG10131とは異なるエピトープに結合し得る。T35A、F36A、F53A、R66A、F72A、N83A、及びF92Aなどの単一の変異体は、そのリガンドによるCD137との結合を維持しているR66Aを除くCD137Lによる結合とともに、Adagene抗体AG10058、AG10059、及びAG10131によるヒトCD137との結合の喪失を示す。しかしながら、単一の変異体P32A及びP49Aは、CDL137LとCD137の間の結合を喪失するが、抗体とCD137の間の相互作用へのその影響は変化する。F125Aは、AC1097がCD137にもはや結合しなくなったことを示すが、ヒトCD137Lを含む他の抗体による結合には影響がない。結論として、CD137全体の変異体による全体的な結合パターンは、Adagene抗体とその参照抗体が結合部位の点で区別されているという明確なメッセージを示す。変異体コンストラクトは、AC1121及びAC1097による参照抗体からAG10058、AG10059、及びAG10131によるエピトープを区別することを意味した。3つの抗体AG10058、AG10059、及びAG10131は全て、AC1121及びAC1097とは非常に異なるエピトープを標的とする。AG10058、AG10059、及びAG10131は、変異体Hu__FH92AA及びHu__FSS53AAA及び場合によってはHu__GTF34AAAによって定義される領域でAC1121と異なるが、AG10058、AG10059、及びAG10131は、Hu__FH92AAならびにマウス、ラット、及びイヌのCD137などの他の種とのそれらの交差反応性は異なるが、サルとのそれらの種交差反応性を除いて、使用されるほとんどの変異体によって定義される領域でAC1097と異なる。いくつかの実施形態では、AG10058、AG10059、及びAG10131または本明細書に開示される他の抗体は、配列番号1のアミノ酸残基115~156内に位置するエピトープに結合しない。図7A及び表5にも示されるように、ヒトCD137リガンドの野生型対変異体ヒトCD137への結合が、これらの抗体がその受容体へのCD137リガンド結合を遮断するという観察と共に、試験された抗体の結合パターンとよく一致する。

10

20

30

	AG10058	AG10059	AG10131	AC1121	AC1097	ヒト CD137L	マウス CD137L
Human_WT	+	+	+	+	+	+	-
Mouse_WT	+	-	+	-	-	-	+
Cyno_WT	+	+	+	-	+		NA
Rat_WT	-	-	+	-	-		NA
Hu_N30A	+	+	+	+	+	+	-
Hu_P32A	+	+	+	-	+	-	-
Hu_GTF34AAA	-	-	-	-/+	+	-	-
Hu_T35A	-	-	-	-	+	-	-
Hu_F36A	-	-	-	-	+	-	-
Hu_P49A	+	-	+	+	+	-	-
Hu_P50A	+	+	+	+	+	+	-
Hu_F53A	-	-	-	-	+	-	-
Hu_FSS53AAA	-	-	-	+	+	-	-
Hu_Q59A	+	+	+	+	+	+	-
Hu_I64A	+	+	+	+	+	+	-
Hu_R66A	-	-	-	+	+	+	-
Hu_F72A	-	-	-	+	+	-	-
Hu_N83A	-	-	-	+	+	-	-
Hu_F92A	-	-	-	+	+	-	-
Hu_L95A	+	+	+	+	+	+	-
Hu_FH92AA	-	-	-	+	-	-	-
Hu_GQ109AA	+	+	+	+	-	+	-
Hu_EL111AA	+	+	+	+	-	+	-
Hu_F125A	+	+	+	+	-	+	-
Hu_FN125AA	+	+	+	+	-	+	-
Hu_PW135AA	+	+	+	+	-	+	-
Hu_TN137AA	+	+	+	+	-	+	-
Hu_GT150AA	+	+	+	+	-	+	-
	AG10058	AG10059	AG10131	AC1121	AC1097	ヒト CD137L	マウス CD137L
Hu_CRD1	-	-	-	-	-	-	-
Hu_CRD2	-	-	-	-	-	-	-
Hu_CRD3	-	-	-	-	-	-	-
Hu_CRD4	-	-	-	-	-	-	-

10

20

30

40

Hu_CRD1-CRD2	-	-	-	+	-	-	-
Hu_CRD2-CRD3	-	-	-	-	-	-	-
Hu_CRD1-CRD2-CRD3	+	+	+	+	-	+	-
Hu_CRD3-CRD4	-	-	-	-	+	-	-
Hu_CRD2-CRD3-CRD4	-	-	-	-	+	-	-

10

【0213】

実施例16

ネイティブCD137Lシグナル伝達はAG10131によって遮断される

ELISAによる*in vitro*結合アッセイは、AG10131が組換えCD137とそのリガンドとの相互作用を遮断できることを実証した。AG10131のこのリガンド遮断活性をさらに機能的に検証するために、細胞NF κ Bルシフェラーゼレポーターアッセイを実施した。簡潔に述べると、NF κ Bルシフェラーゼレポーターを安定して発現する293T細胞に、ヒトCD137を発現するDNAコンストラクトをトランスフェクトし、細胞を異なる比率でヒトB細胞リンパ腫細胞DaudiまたはRajiと共培養した。細胞混合物を、アイソタイプ対照またはリガンド遮断抗CD137抗体の連続希釈液とともに一晩インキュベートし、製造者の取扱説明書に従ってPromegaルシフェラーゼアッセイキットを使用してルシフェラーゼ活性を測定した。相対ルシフェラーゼ単位(RLU)は、抗体処理のない293T細胞で発現したルシフェラーゼのレベルに対して計算された。

20

【0214】

図28に示すように、Daudi(上段)とRaji(下段)の両方の細胞は、293T細胞でNF κ Bルシフェラーゼレポーターを活性化する機能的なCD137リガンドを発現した。アイソタイプ対照抗体(左列)と比較して、AG10131を共培養システムに添加(右列)すると、両方の細胞タイプによって刺激されたNF κ Bシグナル伝達が大いに阻害され、AG10131抗体が、DaudiとRajiのBリンパ腫細胞の両方で発現するCD137リガンドから刺激されるCD137シグナル伝達を機能的に遮断できたことを示唆する。

30

【0215】

実施例17

NF κ Bレポーターアッセイにおける抗CD137抗体架橋

機能的な細胞NF κ Bレポーターアッセイを使用して、3つの抗CD137抗体(AG10131、AC1121、及びAC1097)を試験した。図29に示すように、架橋したとき、3つの抗CD137抗体は全て、同等のレベルで用量依存的にヒトCD137受容体シグナル伝達を刺激することができた。抗体誘導NF κ Bシグナル伝達活性化応答のEC50は、3つの抗CD137抗体全てについて同様の範囲であった。しかしながら、AC1121はAG10131及びAC1097とは異なる特有のプロパティを示した。AC1121は架橋の非存在下でヒトCD137受容体シグナル伝達を顕著に活性化できたが、AG10131及びAC1097は活性化できなかった。CD137受容体シグナル伝達の刺激における架橋を伴うかまたは伴わないAC1121のEC50は、同様のレベルであることが判明した。

40

【0216】

実施例18

AG10131はCDCを誘発しない

AG10131のCDC活性は、ELISAによるAG10131とヒト補体の精製C1q成分との直接結合により判定された。図30に示すように、AG10131とそのヒ

50

トIgG4アイソタイプ対照抗体は、試験した濃度範囲でヒト補体C1q成分に結合する能力を欠いているのに対し、ヒトIgG1アイソタイプ対照抗体はC1qに結合できる。この結果は、AG10131も補体依存性細胞毒性を誘導する可能性が低く、IgG4アイソタイプフレームワークと一致していることを示唆している。

【0217】

実施例19

抗CD137抗体AG10131は、腫瘍浸潤性Tリンパ球を増強する

実施例10に示す同系マウスH22肝癌、EMT6乳癌、及びCT26結腸癌モデルにおける*in vivo*抗腫瘍効果試験は、AG10131処理が腫瘍増殖を強く阻害することを実証した。AG10131はT細胞を活性化するアゴニスト抗体であるため、AG10131処理は腫瘍浸潤T細胞を腫瘍微小環境に入るよう刺激し、それにより*in vivo*で抗腫瘍効果を媒介すると予想される。腫瘍浸潤リンパ球に対するAG10131処理の効果を評価するために、マウスH22、EMT6、及びCT26がんモデルにおけるAG10131の*in vivo*抗腫瘍効果試験の腫瘍を試験終了時に収集した。

10

【0218】

図31は、H22腫瘍（左上）、EMT6腫瘍（右上）、及びCT26腫瘍（中央下）のマウスCD4+及びCD8+T細胞の代表的なIHC染色画像を示す。図32に示すように、ビヒクル対照で処理されたH22、EMT6、及びCT26腫瘍には、Tリンパ球（CD4+またはCD8+T細胞のいずれか）はほとんど存在しなかったが、AG10131処理はCD4+及びCD8+T細胞の腫瘍への浸潤を顕著に刺激した（図31において黒い矢印で示される）。これらのデータは、T細胞の増殖、活性化、及び腫瘍微小環境への浸潤を刺激して抗腫瘍効果を媒介することによる、AG10131の免疫アゴニストとしての機能と一致している。

20

【0219】

実施例20

CT26結腸癌モデルにおける、抗CD137抗体AG10131と抗PD1抗体を組み合わせることによる抗腫瘍効果の向上

次に、抗CD137抗体AG10131と抗PD1抗体を組み合わせた効果を、CT26結腸癌モデルで試験した。腫瘍発生のために、各々のメスBALB/cマウスの右下腹部領域にCT26腫瘍細胞（ 3×10^5 ）を皮下接種した。平均腫瘍体積が 98 mm^3 に達したとき、10匹のマウスを各実験群に割り当てた。これらの群には、ビヒクル（PBS）、5もしくは 10 mg/kg のAG10131、 10 mg/kg の抗PD-1、または5もしくは 10 mg/kg のAG10131と 10 mg/kg の抗PD-1のmAbの組み合わせが、3週間、週2回の*ip*注射によって投与された。腫瘍体積を測定し、腫瘍が 2000 mm^3 の終点体積に達したとき、または最終日（42日目）のいずれか早いほうに達したときに各マウスを安楽死させた。

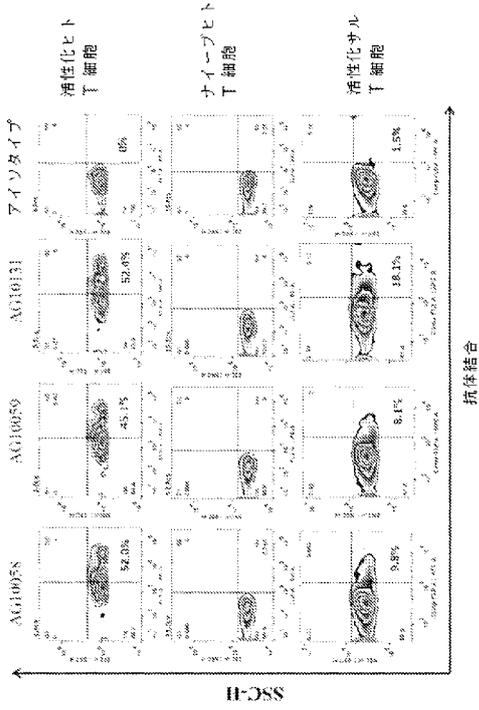
30

【0220】

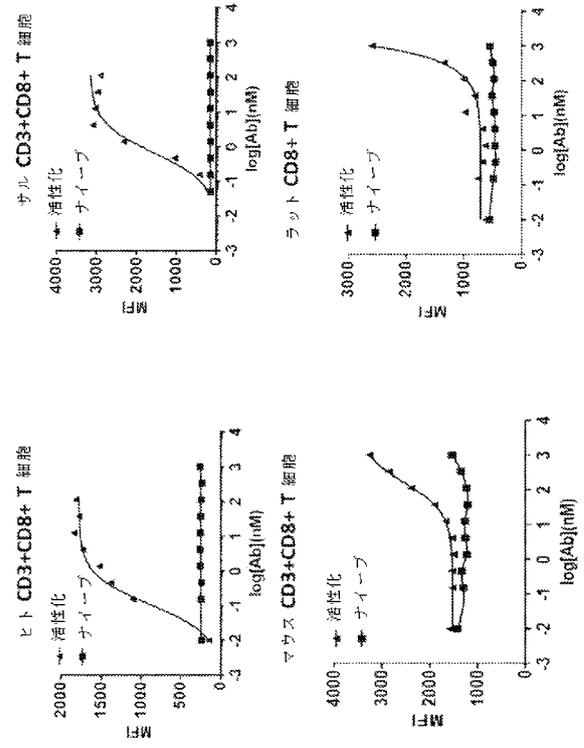
図33に示すように、AG10131（ 5 mg/kg または 20 mg/kg ）と抗PD1（ 10 mg/kg ）の両方が腫瘍の進行を遅らせたが、AG10131は腫瘍の進行をさらに数日遅らせ、まれに腫瘍の縮小をもたらした。しかしながら、AG10131または抗PD1のいずれかで処理されたほぼ全てのマウスは、最終的に腫瘍進行により死亡した。重要なことに、AG10131（ 5 mg/kg または 20 mg/kg ）を抗PD1（ 10 mg/kg ）と組み合わせると、ほとんどのマウスは本質的に腫瘍が治癒し、AG10131（ 5 mg/kg ）と抗PD1（ 10 mg/kg ）またはAG10131（ 20 mg/kg ）と抗PD1（ 10 mg/kg ）の組み合わせで、それぞれわずか2（10のうち）または1（10のうち）が、腫瘍抑制を回避した。これらの結果は、AG10131と抗PD1の強力な相乗効果を実証し、AG10131と抗PD1の組み合わせが抗PD1抵抗性腫瘍に有効である可能性を示唆している。

40

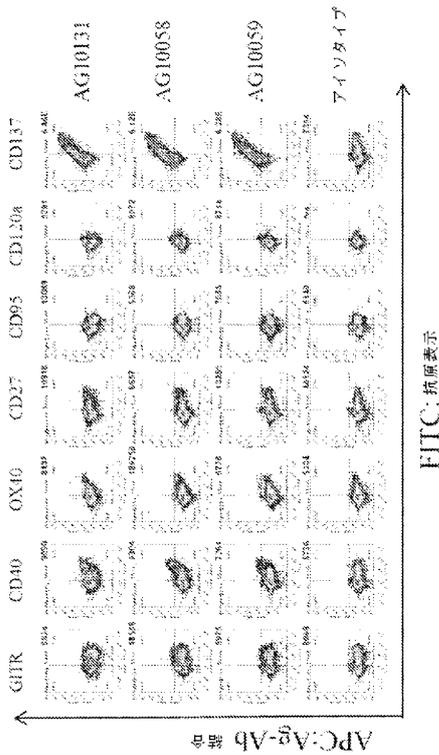
【図 4 A】



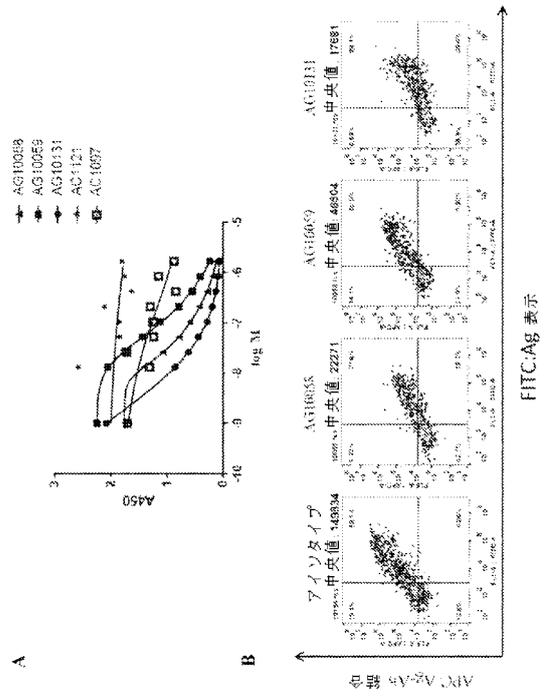
【図 4 B】



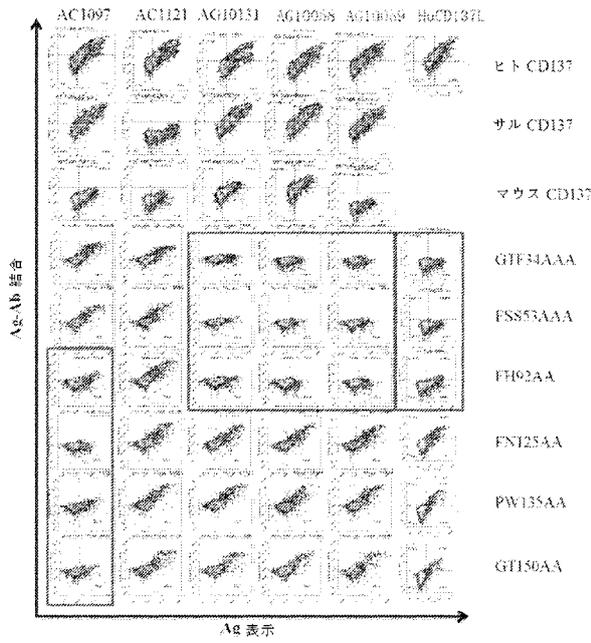
【図 5】



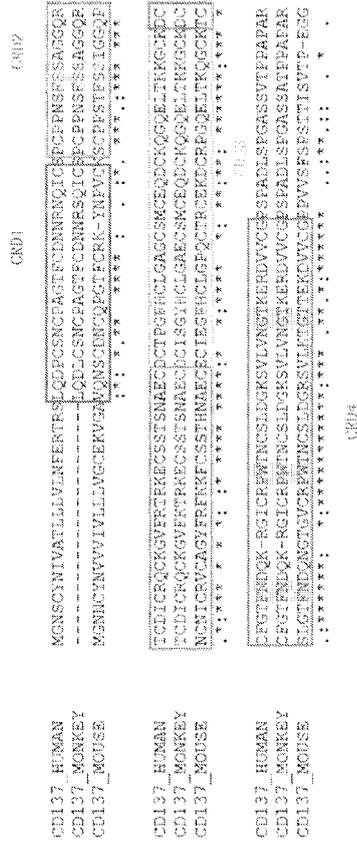
【図 6】



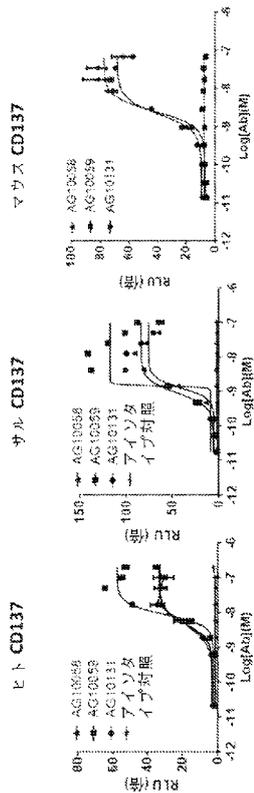
【 図 7 A 】



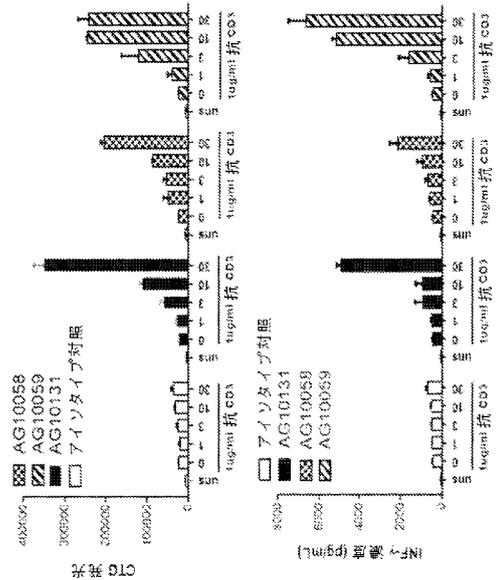
【 図 7 B 】



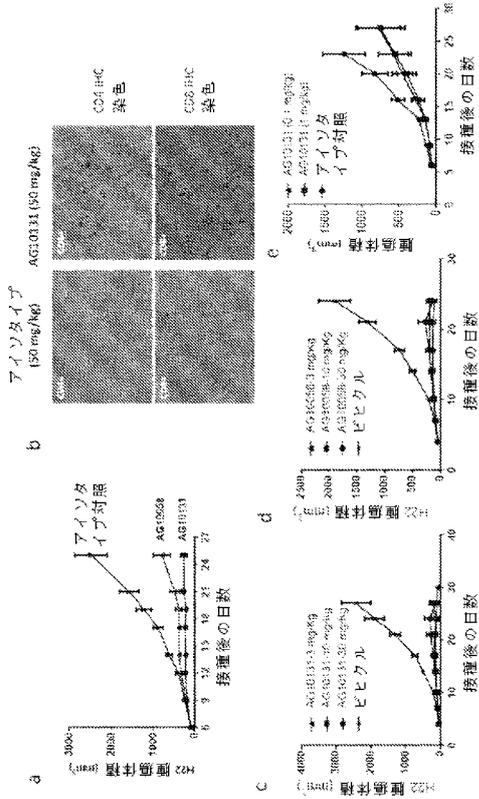
【 図 8 】



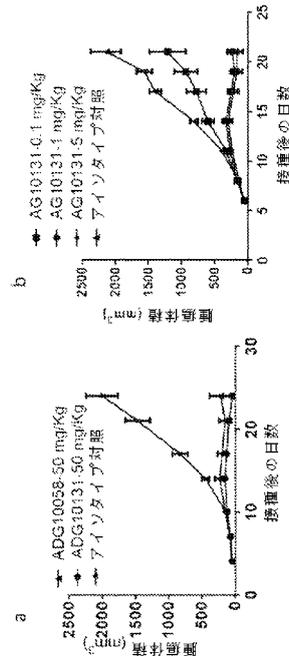
【 図 9 】



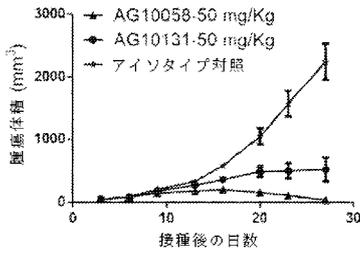
【図 1 0】



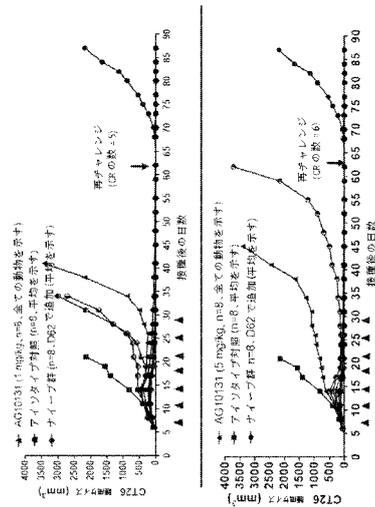
【図 1 1】



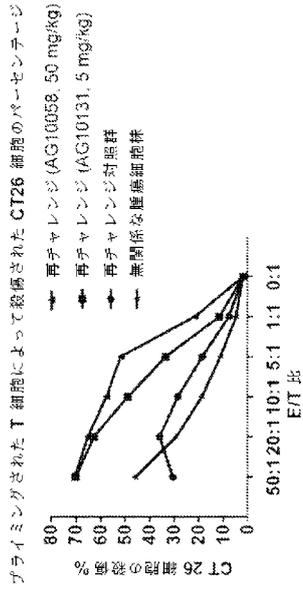
【図 1 2】



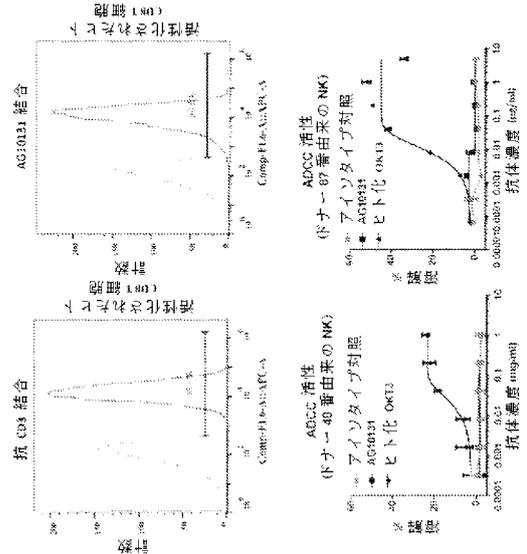
【図 1 3】



【 図 1 4 】



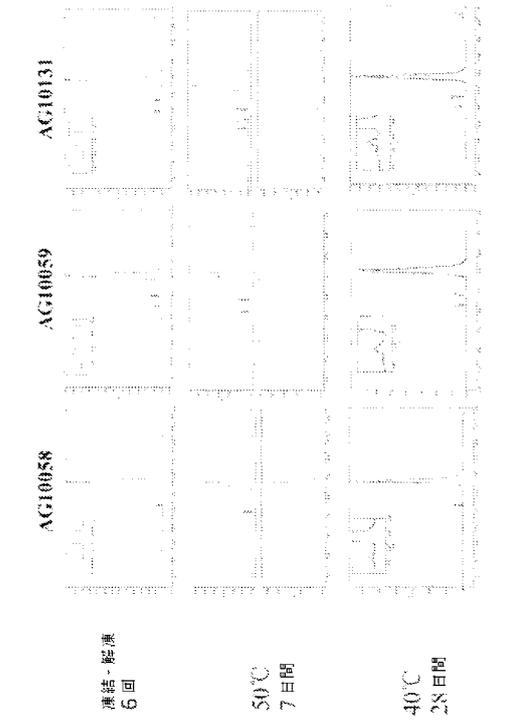
【 図 1 5 】



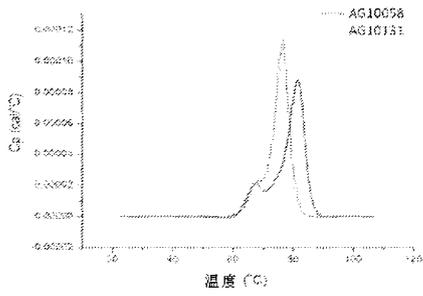
【 図 1 6 】

AG10058	AG10059	AG10131
1 mg/mL	1 mg/mL	1 mg/mL
108 mg/mL	134 mg/mL	110 mg/mL

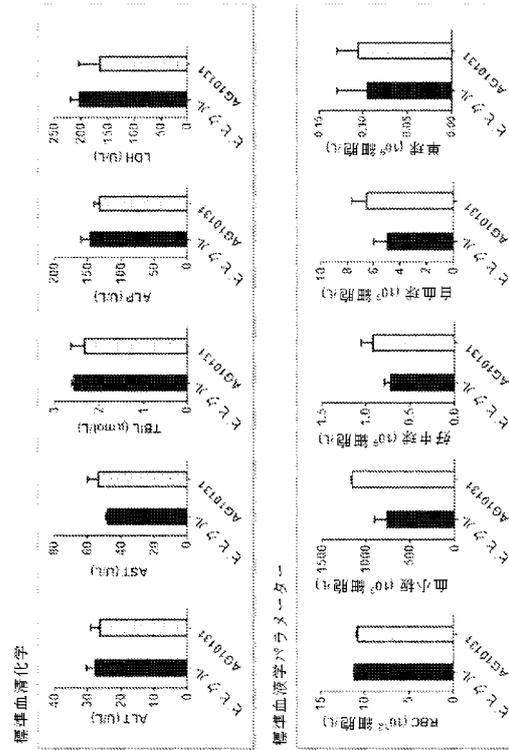
【 図 1 7 】



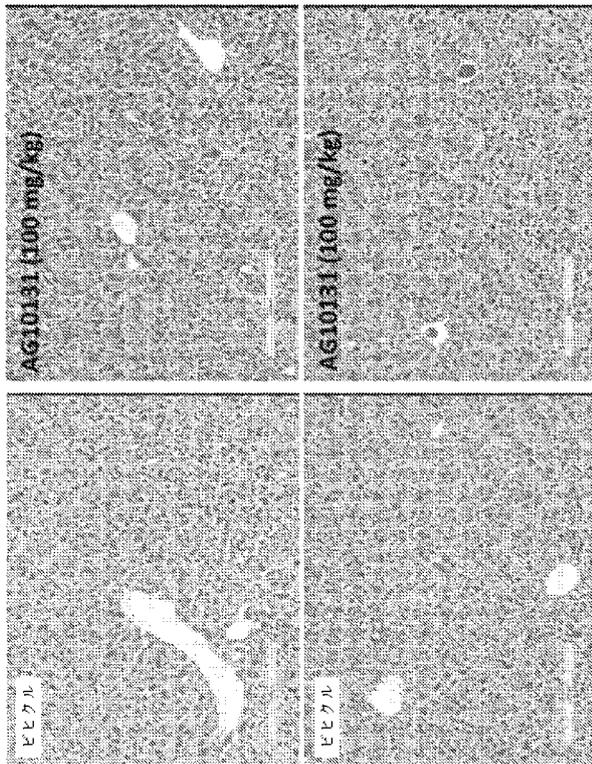
【 図 1 8 】



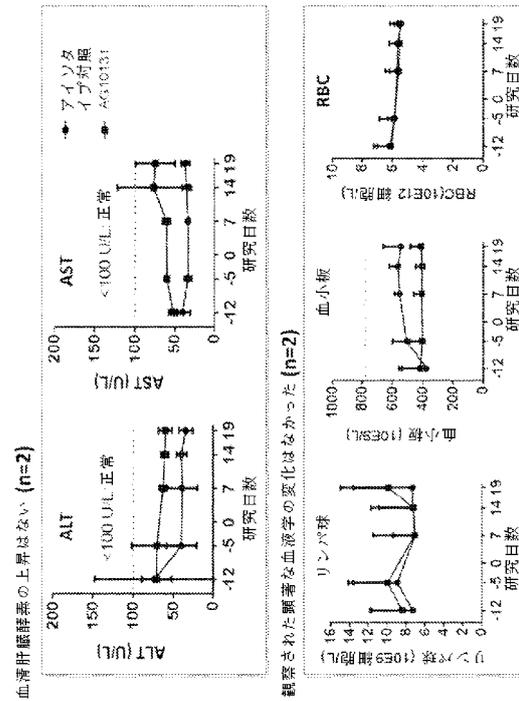
【 図 1 9 】



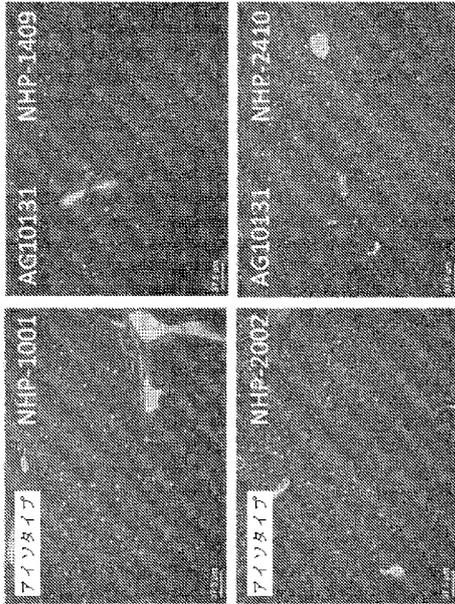
【 図 2 0 】



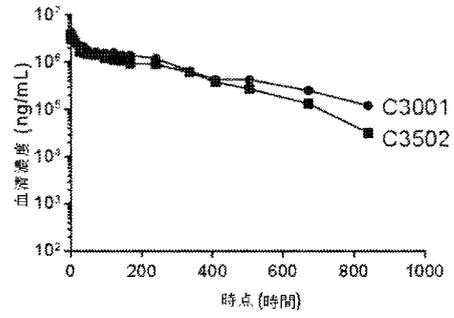
【 図 2 1 】



【 図 2 2 】



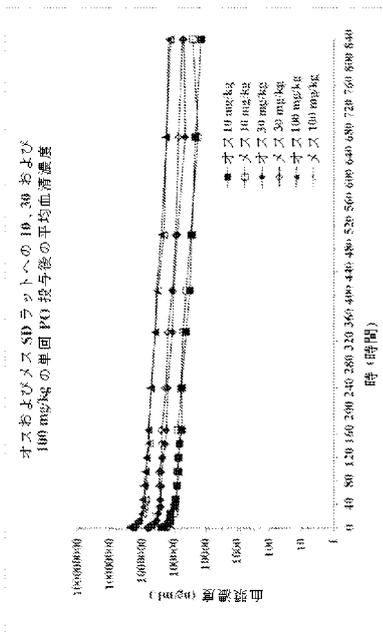
【 図 2 3 】



用量レベル (mg/kg)	T _{1/2}	C _{max}	AUC _{0-∞}
	(日数)	(µg/mL)	(日数 * µg/mL)
C3001(100)	7.3	4410	27099
C3502(100)	8.6	3770	22639

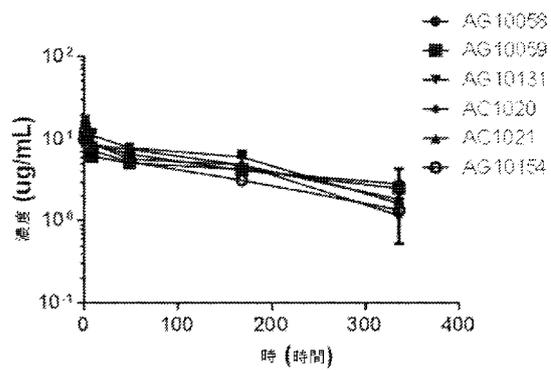
注：血清濃度に影響しない可能性のある動物のすべての実際のデータを使用した2コンパートメント分析

【 図 2 4 】

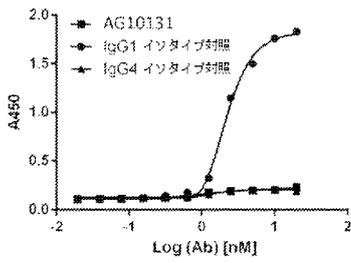


種別	PKパラメーター		
	10 mg/kg	30 mg/kg	100 mg/kg
オス	24.810	24.810	24.810
メス	24.810	24.810	24.810
T _{1/2} (計算のための時間範囲)	45.816	24.810	24.810
C _{max} (ng/mL)	248000	194100	618000
T _{1/2} (h)	831	353	287
SD (h)	0.102	0.109	0.111
CV (%)	0.0079	0.0029	0.0055
CV (%)	840	840	840
AUC _{0-∞} (ng·h/mL)	53700000	48400000	99500000
CV (%)	41.70000	51.25000	13.90000

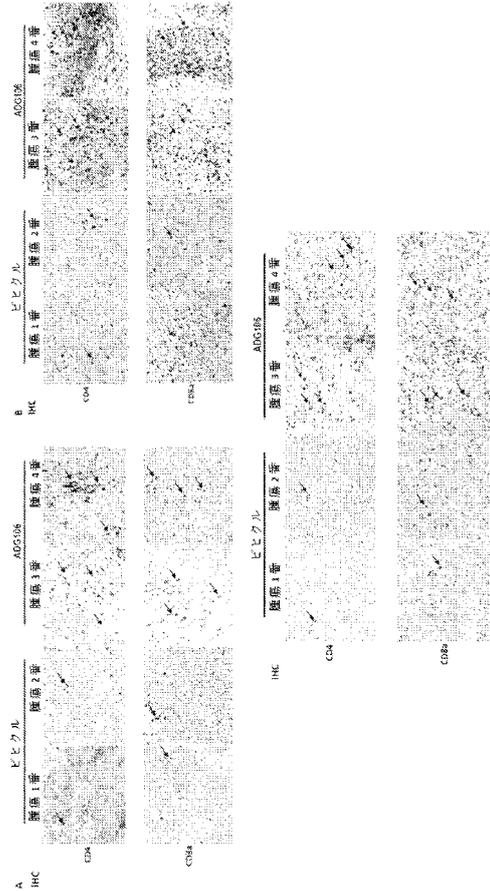
【 図 2 5 】



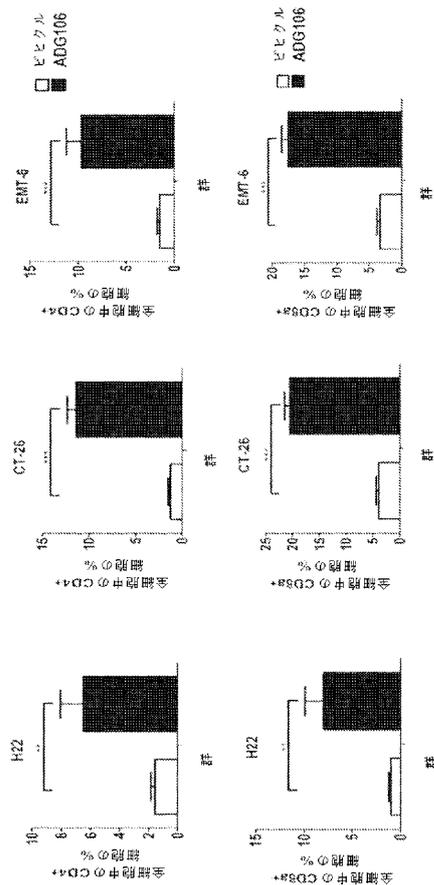
【 図 3 0 】



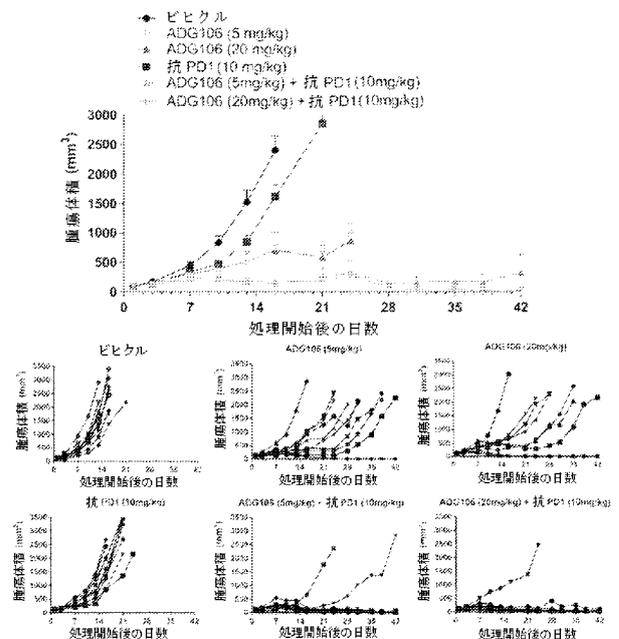
【 図 3 1 】



【 図 3 2 】



【 図 3 3 】



【配列表】

2020532965000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2018/101501
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K 16/28(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K 16/-		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS, VEN, CNTXT, EPTXT, USTXT, WOXT, CJFD, CNKI, WANFANG DATA, BAIDU, GOOGLE SCHOLAR, PUBMED, ISI Web of Knowledge, PATENTICS, NCBI GenBank, EBI-EMBL, DUXIU:SEQ ID Nos: 1-883; CD137, CD137L, CD137 receptor, 4-1BB, TNFRSF9, antibody+, antigen-binding fragment, extracellular domain, variable region, HVR, CDR, CANCER, carcinoma, tumor, immune+, pharmaceutical composition.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 1867585 A (BRISTOL-MYERS SQUIBB CO) 22 November 2006 (2006-11-22) claims 1-10, example 1	1-57
Y	CHEUK, A.T. et al. "Role of 4-1BB:4-1BB ligand in cancer immunotherapy" <i>CANCER GENE THERAPY</i> , Vol. 11, 12 December 2003 (2003-12-12), page 215, right column, paragraph 2	1-57
Y	WO 0029445 A1 (LG CHEMICAL LTD.) 25 May 2000 (2000-05-25) pages 10-27, Examples 1-11	1-57
Y	YI, L. et al. "Location of extracellular cysteine-rich domains of 4-1BB binding to murine 4-1BB ligand and analysis of its possible structure" <i>CHIN. J. MICROBIOL. IMMUNOL.</i> , Vol. 29, No. 4, 30 April 2009 (2009-04-30), pages 343-344	1-57
A	PETERS, S.J. et al. "Engineering an Improved IgG4 Molecule with Reduced Disulfide Bond Heterogeneity and Increased Fab Domain Thermal Stability" <i>THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY</i> , Vol. 287, No. 29, 13 July 2012 (2012-07-13), pages 24525-24533	41-43
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 05 November 2018	Date of mailing of the international search report 14 November 2018	
Name and mailing address of the ISA/CN STATE INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE OF THE P.R.CHINA 6, Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing 100088 China	Authorized officer SHEN, Jingjing	
Facsimile No. (86-10)62019451	Telephone No. 86-(10)-53961944	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/101501

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TIAN, X.S. et al. "In-depth analysis of subclass-specific conformational preferences of IgG antibodies" <i>IUCRI</i> , Vol. 2, 31 December 2015 (2015-12-31), pages 9-18	41-43
A	LI, J.T. "Expression of human CD137 and CD28 proteins and preparation of their specific monoclonal antibodies" <i>CHINESE MASTER'S THESES FULL-TEXT DATABASE MEDICINE AND HEALTH SCIENCES</i> , No. 2, 15 February 2014 (2014-02-15), page E059-133	1-57

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/101501

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/101501

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 54-57
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
 - [1] The subject matter of claims 54-57 relates to a method of treatment of the human by therapy and therefore does not warrant a search according to the criteria set out in Rule 39.1(iv). However, the search has been carried out and based on the use of the anti-CD137 antibodies of treating a cancer in a subject in need for the manufacturing of a medicament reagent.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2018/101501

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	1867585	A	22 November 2006	TW	200517124	A	01 June 2005
				AR	046094	A1	23 November 2005
				ZA	200602834	B	25 July 2007
				ZA	200602834	A	25 July 2007
				PE	09622005	A1	17 November 2005
				CN	1867585	B	09 February 2011
				TW	I332844	B	11 November 2010
WO	0029445	A1	25 May 2000	CA	2351170	A1	25 May 2000
				AU	1186900	A	05 June 2000
				PE	13162000	A1	19 January 2001
				US	6458934	B1	01 October 2002
				EP	1131357	A1	12 September 2001
				AU	757760	B2	06 March 2003
				AR	021296	A1	03 July 2002
				CN	1187374	C	02 February 2005
				KR	20000034847	A	26 June 2000
				JP	2002531383	A	24 September 2002
				KR	20010101022	A	14 November 2001
				CO	5160384	A1	30 May 2002
				CN	1357009	A	03 July 2002
				TW	I230163	B	01 April 2005

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
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	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	

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

(72) 発明者 ルオ, ピーター ペイチャー
 中華人民共和国 2 1 5 1 2 3 チャンスー, スーチョウ インダストリアル パーク, シン
 フー ストリート 2 1 8, ビルディング シー 1 4, 4 階, シー/オー アダジーン イ
 ンコーポレイテッド

(72) 発明者 トゥー, ファンヨン
 中華人民共和国 2 1 5 1 2 3 チャンスー, スーチョウ インダストリアル パーク, シン
 フー ストリート 2 1 8, ビルディング シー 1 4, 4 階, シー/オー アダジーン イ
 ンコーポレイテッド

(72) 発明者 リュウ, ギジョン
 中華人民共和国 2 1 5 1 2 3 チャンスー, スーチョウ インダストリアル パーク, シン
 フー ストリート 2 1 8, ビルディング シー 1 4, 4 階, シー/オー アダジーン イ
 ンコーポレイテッド

(72) 発明者 リー, ヤン
 中華人民共和国 2 1 5 1 2 3 チャンスー, スーチョウ インダストリアル パーク, シン
 フー ストリート 2 1 8, ビルディング シー 1 4, 4 階, シー/オー アダジーン イ
 ンコーポレイテッド

(72) 発明者 チェン, ユン
 中華人民共和国 2 1 5 1 2 3 チャンスー, スーチョウ インダストリアル パーク, シン
 フー ストリート 2 1 8, ビルディング シー 1 4, 4 階, シー/オー アダジーン イ
 ンコーポレイテッド

(72) 発明者 シェ, シャオホン
 中華人民共和国 2 1 5 1 2 3 チャンスー, スーチョウ インダストリアル パーク, シン
 フー ストリート 2 1 8, ビルディング シー 1 4, 4 階, シー/オー アダジーン イ
 ンコーポレイテッド

(72) 発明者 チュン, ピーター
 中華人民共和国 2 1 5 1 2 3 チャンスー, スーチョウ インダストリアル パーク, シン
 フー ストリート 2 1 8, ビルディング シー 1 4, 4 階, シー/オー アダジーン イ
 ンコーポレイテッド

F ターム(参考) 4B064 AG27 CA19 CC24 CE12 DA05
 4B065 AA92Y AA93X AA94Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA44
 4C084 AA19 NA05 ZB092 ZB262 ZC412

4C085 AA14 AA16 CC23 DD62 EE01 EE03
4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 CA40 DA76 EA28 FA74 GA26