

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-531067  
(P2023-531067A)

(43)公表日 令和5年7月20日(2023.7.20)

| (51)国際特許分類                         |   | 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 1 2 N                            | 15/62 (2006.01)   | C 1 2 N | 15/62  | Z 4 B 0 6 5     |
| C 1 2 N                            | 15/63 (2006.01)   | C 1 2 N | 15/63  | Z 4 C 0 8 5     |
| C 0 7 K                            | 16/46 (2006.01)   | C 0 7 K | 16/46  | 4 H 0 4 5       |
| C 0 7 K                            | 16/28 (2006.01)   | C 0 7 K | 16/28  |                 |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全114頁) 最終頁に続く |   |         |  |                 |
| (21)出願番号                           | 特願2022-580049(P2022-580049)   | (71)出願人 | 514099673  |                 |
| (86)(22)出願日                        | 令和3年6月23日(2021.6.23)  |         | エフ・ホフマン・ラ・ロシュ・アクチュエ<br>ンゲゼルシャフト                                    |                 |
| (85)翻訳文提出日                         | 令和5年2月15日(2023.2.15)  |         | スイス国 シーエイチ - 4 0 7 0 パーゼ<br>ル グレンツァッハーシュトラッセ 1 2 4                 |                 |
| (86)国際出願番号                         | PCT/EP2021/067244   | (74)代理人 | 110002077  |                 |
| (87)国際公開番号                         | WO2021/260064   |         | 園田・小林弁理士法人   |                 |
| (87)国際公開日                          | 令和3年12月30日(2021.12.30)  | (72)発明者 | ブルエンカー, ベーター   |                 |
| (31)優先権主張番号                        | 20182307.7  |         | スイス国 8 9 5 2 シュリーレン, ヴ<br>ァーギシュトラッセ 1 0, シーノオー<br>ロッシュ グリクアート アーゲー |                 |
| (32)優先日                            | 令和2年6月25日(2020.6.25)  | (72)発明者 | ガイガー, マルティナ  |                 |
| (33)優先権主張国・地域又は機関                  | 欧州特許庁(EP)   |         | スイス国 8 9 5 2 シュリーレン, ヴ<br>ァーギシュトラッセ 1 0, シーノオー<br>ロッシュ グリクアート アーゲー |                 |
| (81)指定国・地域                         | AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA<br>,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(<br>AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,A<br>T,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR<br>,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,<br>最終頁に続く |         | 最終頁に続く   |                 |

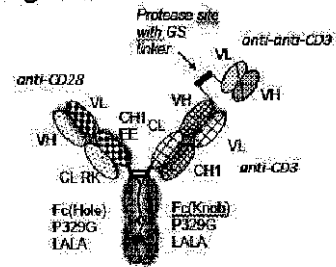
(54)【発明の名称】 抗CD3 / 抗CD28二重特異性抗原結合分子

(57)【要約】

本発明は、抗CD3 / 抗CD28二重特異性抗原結合分子及びそのマスクされたプロテアーゼ活性化形態、それらの産生のための方法、これらの分子を含有する医薬組成物、並びに疾患、特にがんの治療における免疫調節剤及び / 又は共刺激剤としてのそれらの使用に関する。

【選択図】 図1E

Fig. 1E



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

C D 2 8 への一価結合を特徴とする二重特異性アゴニスト C D 2 8 抗原結合分子であって、

( a ) C D 2 8 への特異的結合が可能な第 1 の抗原結合ドメインと、

( b ) C D 3 への特異的結合が可能な第 2 の抗原結合ドメインと、

( c ) F c 受容体に対する抗原結合分子の結合親和性及び / 又はエフェクター機能を低下させる 1 つ以上のアミノ酸置換を含む安定な会合が可能な第 1 のサブユニット及び第 2 のサブユニットで構成される F c ドメインと

を含み、

C D 3 への特異的結合が可能な前記第 2 の抗原結合ドメインが、

( i ) 配列番号 2 の重鎖相補性決定領域 C D R - H 1、配列番号 3 の C D R - H 2、及び配列番号 4 の C D R - H 3 を含む重鎖可変領域 ( V<sub>H</sub> C D 3 ) と、配列番号 5 の軽鎖相補性決定領域 C D R - L 1、配列番号 6 の C D R - L 2、及び配列番号 7 の C D R - L 3 を含む軽鎖可変領域 ( V<sub>L</sub> C D 3 ) と、又は

( i i ) 配列番号 1 0 の重鎖相補性決定領域 C D R - H 1、配列番号 1 1 の C D R - H 2、及び配列番号 1 2 の C D R - H 3 を含む重鎖可変領域 ( V<sub>H</sub> C D 3 ) と、配列番号 1 3 の軽鎖相補性決定領域 C D R - L 1、配列番号 1 4 の C D R - L 2、及び配列番号 1 5 の C D R - L 3 を含む軽鎖可変領域 ( V<sub>L</sub> C D 3 ) と

を含む、二重特異性アゴニスト C D 2 8 抗原結合分子。

10

20

## 【請求項 2】

F c ドメインがヒト I g G 1 サブクラスのものであり、アミノ酸変異 L 2 3 4 A、L 2 3 5 A 及び P 3 2 9 G ( ナンバリングは K a b a t E U インデックスに従う ) を含む、請求項 1 に記載の二重特異性アゴニスト C D 2 8 抗原結合分子。

## 【請求項 3】

C D 2 8 への特異的結合が可能な第 1 の抗原結合ドメインが、

( i ) 配列番号 2 6 の重鎖相補性決定領域 C D R - H 1、配列番号 2 7 の C D R - H 2、及び配列番号 2 8 の C D R - H 3 を含む重鎖可変領域 ( V<sub>H</sub> C D 2 8 ) と、配列番号 2 9 の軽鎖相補性決定領域 C D R - L 1、配列番号 3 0 の C D R - L 2、及び配列番号 3 1 の C D R - L 3 を含む軽鎖可変領域 ( V<sub>L</sub> C D 2 8 ) と、又は

( i i ) 配列番号 1 8 の C D R - H 1、配列番号 1 9 の C D R - H 2、及び配列番号 2 0 の C D R - H 3 を含む重鎖可変領域 ( V<sub>H</sub> C D 2 8 ) と、配列番号 2 1 の C D R - L 1、配列番号 2 2 の C D R - L 2、及び配列番号 2 3 の C D R - L 3 を含む軽鎖可変領域 ( V<sub>L</sub> C D 2 8 ) と

を含む、請求項 1 又は 2 に記載の二重特異性アゴニスト C D 2 8 抗原結合分子。

30

## 【請求項 4】

C D 2 8 への特異的結合が可能な第 1 の抗原結合ドメインが、配列番号 2 4 のアミノ酸配列と少なくとも約 9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 ( V<sub>H</sub> C D 2 8 ) と、配列番号 2 5 のアミノ酸配列と少なくとも約 9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、又は 1 0 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 ( V<sub>L</sub> C D 2 8 ) とを含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の二重特異性アゴニスト C D 2 8 抗原結合分子。

40

## 【請求項 5】

C D 2 8 に特異的に結合可能な第 1 の抗原結合ドメインが、配列番号 3 2、配列番号 3 3、配列番号 3 4、配列番号 3 5、配列番号 3 6、配列番号 3 7、配列番号 3 8、配列番号 3 9、配列番号 4 0 及び配列番号 4 1 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 ( V<sub>H</sub> C D 2 8 ) と、配列番号 2 5、配列番号 4 2、配列番号 4 3、配列番号 4 4、配列番号 4 5、配列番号 4 6、配列番号 4 7、配列番号 4 8、配列番号 4 9、配列番号 5 0、及び配列番号 5 1 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 ( V<sub>L</sub> C D 2 8 ) とを含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の二重特異性アゴニスト

50

C D 2 8 抗原結合分子。

【請求項 6】

C D 2 8 への特異的結合が可能な第 1 の抗原結合ドメインが、

( a ) 配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 ( V<sub>H</sub> C D 2 8 ) 及び配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 ( V<sub>L</sub> C D 2 8 )、又は

( b ) 配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 ( V<sub>H</sub> C D 2 8 ) 及び配列番号 2 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 ( V<sub>L</sub> C D 2 8 )、又は

( c ) 配列番号 4 1 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 ( V<sub>H</sub> C D 2 8 ) 及び配列番号 5 1 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 ( V<sub>L</sub> C D 2 8 )、又は

( d ) 配列番号 3 6 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 ( V<sub>H</sub> C D 2 8 ) 及び配列番号 4 3 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 ( V<sub>L</sub> C D 2 8 )、又は

( e ) 配列番号 3 6 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 ( V<sub>H</sub> C D 2 8 ) 及び配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 ( V<sub>L</sub> C D 2 8 )、又は

( f ) 配列番号 3 6 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 ( V<sub>H</sub> C D 2 8 ) 及び配列番号 4 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 ( V<sub>L</sub> C D 2 8 )、又は

( g ) 配列番号 3 6 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 ( V<sub>H</sub> C D 2 8 ) 及び配列番号 2 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 ( V<sub>L</sub> C D 2 8 )、又は

( h ) 配列番号 3 3 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 ( V<sub>H</sub> C D 2 8 ) 及び配列番号 2 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 ( V<sub>L</sub> C D 2 8 )、又は

( i ) 配列番号 3 2 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 ( V<sub>H</sub> C D 2 8 ) 及び配列番号 4 3 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 ( V<sub>L</sub> C D 2 8 )、又は

( j ) 配列番号 3 2 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 ( V<sub>H</sub> C D 2 8 ) 及び配列番号 4 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 ( V<sub>L</sub> C D 2 8 )、又は

( k ) 配列番号 3 2 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 ( V<sub>H</sub> C D 2 8 ) 及び配列番号 2 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 ( V<sub>L</sub> C D 2 8 )

を含む、請求項 1 ~ 3 又は 5 のいずれか一項に記載の二重特異性アゴニスト C D 2 8 抗原結合分子。

【請求項 7】

C D 2 8 への特異的結合が可能な第 1 の抗原結合ドメインが、 ( i ) 配列番号 5 2 の重鎖相補性決定領域 C D R - H 1、配列番号 5 3 の C D R - H 2、及び配列番号 5 4 の C D R - H 3 を含む重鎖可変領域 ( V<sub>H</sub> C D 2 8 ) と、配列番号 5 5 の軽鎖相補性決定領域 C D R - L 1、配列番号 5 6 の C D R - L 2、及び配列番号 5 7 の C D R - L 3 を含む軽鎖可変領域 ( V<sub>L</sub> C D 2 8 ) とを含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の二重特異性アゴニスト C D 2 8 抗原結合分子。

【請求項 8】

C D 2 8 への特異的結合が可能な第 1 の抗原結合ドメインが、配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 ( V<sub>H</sub> C D 2 8 ) の C D R 及び配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 ( V<sub>L</sub> C D 2 8 ) の C D R を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の二重特異性アゴニスト C D 2 8 抗原結合分子。

【請求項 9】

C D 3 への特異的結合が可能な抗原結合ドメインが、配列番号 1 6 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 ( V<sub>H</sub> C D 3 ) の C D R 及び配列番号 1 7 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 ( V<sub>L</sub> C D 3 ) の C D R を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の二重特異性アゴニスト C D 2 8 抗原結合分子。

【請求項 10】

C D 3 への特異的結合が可能な抗原結合ドメインが、配列番号 1 6 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 ( V<sub>H</sub> C D 3 ) 及び配列番号 1 7 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 ( V<sub>L</sub> C D 3 ) を含む、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の二重特異性アゴニスト C D 2 8 抗原結合分子。

【請求項 11】

10

20

30

40

50

C D 3 への特異的結合が可能な抗原結合ドメインが、配列番号 8 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 ( V<sub>H</sub> C D 3 ) の C D R 及び配列番号 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 ( V<sub>L</sub> C D 3 ) の C D R を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の二重特異性アゴニスト C D 2 8 抗原結合分子。

【請求項 1 2】

C D 3 への特異的結合が可能な抗原結合ドメインが、配列番号 8 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 ( V<sub>H</sub> C D 3 ) 及び配列番号 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 ( V<sub>L</sub> C D 3 ) を含む、請求項 1 ~ 8、又は 1 1 のいずれか一項に記載の二重特異性アゴニスト C D 2 8 抗原結合分子。

【請求項 1 3】

C D 2 8 への特異的結合が可能な第 1 の抗原結合ドメイン及び / 又は C D 3 への特異的結合が可能な第 2 の抗原結合ドメインが F a b 分子である、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の二重特異性アゴニスト C D 2 8 抗原結合分子。

【請求項 1 4】

C D 2 8 への特異的結合が可能な第 1 の抗原結合ドメインが、F a b 軽鎖及び F a b 重鎖の可変ドメイン V<sub>L</sub> 及び V<sub>H</sub>、又は定常ドメイン C<sub>L</sub> 及び C<sub>H</sub> 1、特に可変ドメイン V<sub>L</sub> 及び V<sub>H</sub> が互いに置き換えられている F a b 分子である、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の二重特異性アゴニスト C D 2 8 抗原結合分子。

【請求項 1 5】

C D 3 への特異的結合が可能な第 2 の抗原結合ドメインが従来の F a b 分子である、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の二重特異性アゴニスト C D 2 8 抗原結合分子。

【請求項 1 6】

C D 3 への特異的結合が可能な抗原結合ドメインが、F a b 軽鎖及び F a b 重鎖の可変ドメイン V<sub>L</sub> 及び V<sub>H</sub>、又は定常ドメイン C<sub>L</sub> 及び C<sub>H</sub> 1、特に定常ドメイン C<sub>L</sub> 及び C<sub>H</sub> 1 が互いに置き換えられている F a b 分子である、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の二重特異性アゴニスト C D 2 8 抗原結合分子。

【請求項 1 7】

C D 2 8 への特異的結合が可能な第 1 の抗原結合ドメインが従来の F a b 分子である、請求項 1 ~ 1 3 又は 1 6 のいずれか一項に記載の二重特異性アゴニスト C D 2 8 抗原結合分子。

【請求項 1 8】

従来の F a b 分子が、定常ドメイン C<sub>L</sub> において、位置 1 2 3 (ナンバリングは K a b a t E U インデックスに従う) のアミノ酸がリジン ( K )、アルギニン ( R ) 又はヒスチジン ( H ) から選択されるアミノ酸によって置換され、かつ、位置 1 2 4 (ナンバリングは K a b a t E U インデックスに従う) のアミノ酸がリジン ( K )、アルギニン ( R ) 又はヒスチジン ( H ) によって独立して置換され、かつ、定常ドメイン C<sub>H</sub> 1 において、位置 1 4 7 (ナンバリングは K a b a t E U インデックスに従う) のアミノ酸がグルタミン酸 ( E ) 又はアスパラギン酸 ( D ) によって独立して置換され、かつ、位置 2 1 3 (ナンバリングは K a b a t E U インデックスに従う) のアミノ酸がグルタミン酸 ( E ) 又はアスパラギン酸 ( D ) (ナンバリングは K a b a t E U インデックスに従う) によって独立して置換される F a b 分子である、請求項 1 5 又は 1 7 に記載の二重特異性アゴニスト C D 2 8 抗原結合分子。

【請求項 1 9】

F c ドメインが、F c ドメインの第 1 のサブユニット及び第 2 のサブユニットの会合を促進する改変を含む、請求項 1 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の二重特異性アゴニスト C D 2 8 抗原結合分子。

【請求項 2 0】

F c ドメインの第 1 のサブユニットが、アミノ酸置換 S 3 5 4 C 及び T 3 6 6 W ( E U ナンバリング ) を含み、F c ドメインの第 2 のサブユニットが、アミノ酸置換 Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S 及び Y 4 0 7 V (ナンバリングは K a b a t E U インデックスに従う) を

10

20

30

40

50

含む、請求項 1 ~ 19 のいずれか一項に記載の二重特異性アゴニスト CD 28 抗原結合分子。

【請求項 21】

(d) プロテアーゼ切断可能リンカーを介して二重特異性アゴニスト CD 28 抗原結合分子に共有結合したマスキング部分であって、CD 3 への特異的結合が可能な第 2 の抗原結合ドメインのイデオタイプに結合することができ、それにより、CD 3 への特異的結合が可能な抗原結合ドメインを可逆的に隠す、マスキング部分を更に含む、請求項 1 ~ 20 のいずれか一項に記載の二重特異性アゴニスト CD 28 抗原結合分子。

【請求項 22】

マスキング部分が、CD 3 への特異的結合が可能な第 2 の抗原結合ドメインの重鎖可変領域 (V<sub>H</sub>CD3) に共有結合している、請求項 22 に記載の二重特異性アゴニスト CD 28 抗原結合分子。

【請求項 23】

マスキング部分が scFv である、請求項 21 又は 22 に記載の二重特異性アゴニスト CD 28 抗原結合分子。

【請求項 24】

マスキング部分が、

(i) DYSMN (配列番号 123) の CDR - H1 アミノ酸配列、WINTETGEPRYTDDFKG (配列番号 124)、WINTETGEPRYTDDFTG (配列番号 130)、及び WINTETGEPRYTQGFKG (配列番号 131) からなる群から選択される CDR H2 アミノ酸配列、及び EGDYDVFY (配列番号 125) の CDR H3 アミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V<sub>H</sub>) と、RASKSVSTSSYSYMH (配列番号 126) 及び KSSKSVSTSSYSYMH (配列番号 129) からなる群から選択される軽鎖相補性決定領域 CDR - L1 アミノ酸配列、YVSYLES (配列番号 127) の CDR - L2 アミノ酸配列、及び QHSREFPYT (配列番号 128) 及び QSREFPYT (配列番号 132) からなる群より選択される CDR - L3 アミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V<sub>L</sub>) と、又は

(ii) DYSMN (配列番号 123) の CDR - H1 アミノ酸配列、WINTETGEPRYTDDFKG (配列番号 124) の CDR - H2 アミノ酸配列、及び EGDYDVFY (配列番号 125) の CDR - H3 アミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V<sub>H</sub>) と、RASKSVSTSSYSYMH (配列番号 126) の CDR - L1 アミノ酸配列、YVSYLES (配列番号 127) の CDR - L2 アミノ酸配列、及び QHSREFPYT (配列番号 128) の CDR - L3 アミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V<sub>L</sub>) と、又は

(iii) SYGVS (配列番号 123) の CDR - H1 アミノ酸配列、I IWGDGSTNYHSALIS (配列番号 124) の CDR - H2 アミノ酸配列、及び GITTVVDDY Y Y Y AMDY (配列番号 125) の CDR - H3 アミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V<sub>H</sub>) と、KSSKSVSTSSYSYMH (配列番号 129) の CDR - L1 アミノ酸配列、AATFLAD (配列番号 127) の CDR - L2 アミノ酸配列、及び QHY Y STPYT (配列番号 128) の CDR - L3 アミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V<sub>L</sub>) と、又は

(iv) SYGVS (配列番号 123) の CDR - H1 アミノ酸配列、WINTETGEPRYTDDFTG (配列番号 130) の CDR - H2 アミノ酸配列、及び GITTVVDDY Y Y Y AMDY (配列番号 125) の CDR - H3 アミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V<sub>H</sub>) と、KSSKSVSTSSYSYMH (配列番号 129) の CDR - L1 アミノ酸配列、AATFLAD (配列番号 127) の CDR - L2 アミノ酸配列、及び QHY Y STPYT (配列番号 128) の CDR - L3 アミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V<sub>L</sub>) と、又は

(v) SYGVS (配列番号 123) の CDR - H1 アミノ酸配列、WINTETGEPRYTQGFKG (配列番号 131) の CDR - H2 アミノ酸配列、及び GITTVVDDY Y Y Y AMDY (配列番号 125) の CDR - H3 アミノ酸配列を含む重鎖可変領

10

20

30

40

50

域 (V<sub>H</sub>) と、KSSKSVSTSSYSYMH (配列番号 129) の CDR-L1 アミノ酸配列、AATFLAD (配列番号 127) の CDR-L2 アミノ酸配列、及び QHYYSTPYT (配列番号 128) の CDR-L3 アミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V<sub>L</sub>) とを含む、請求項 21 ~ 23 のいずれか一項に記載の二重特異性アゴニスト CD28 抗原結合分子。

【請求項 25】

マスキング部分が、SYGVS (配列番号 115) の CDR-H1 アミノ酸配列、IIIWGDGSTNYHSALIS (配列番号 116) の CDR-H2 アミノ酸配列、及び GITTVDYDYAMDY (配列番号 117) の CDR-H3 アミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V<sub>H</sub>) と、RASENIDSYLA (配列番号 118) の CDR-L1 アミノ酸配列、AATFLAD (配列番号 119) の CDR-L2 アミノ酸配列、及び QHYYSTPYT (配列番号 120) の CDR-L3 アミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V<sub>L</sub>) とを含む、請求項 21 ~ 23 のいずれか一項に記載の二重特異性アゴニスト CD28 抗原結合分子。

10

【請求項 26】

プロテアーゼ切断可能リンカーが少なくとも 1 つのプロテアーゼ認識配列を含む、請求項 21 ~ 25 のいずれか一項に記載の二重特異性アゴニスト CD28 抗原結合分子。

【請求項 27】

プロテアーゼ認識配列が：

20

(a) RQARVVNG (配列番号 148)；

(b) VHMPPLGFLGPRSRGSFP (配列番号 149)；

(c) RQARVVNGXXXXXXXXVPLSLYSYG (配列番号 150)、式中、X は任意のアミノ酸である；

(d) RQARVVNGVPLSLYSYG (配列番号 151)；

(e) PLGLWSQ (配列番号 152)；

(f) VHMPPLGFLGPRQARVVNG (配列番号 153)；

(g) FVGGTG (配列番号 154)；

(h) KKAAPVNG (配列番号 155)；

(i) PMAKKVNG (配列番号 156)；

30

(j) QARAKVNG (配列番号 157)；

(k) VHMPPLGFLGP (配列番号 158)；

(l) QARAK (配列番号 159)；

(m) VHMPPLGFLGPPMAKK (配列番号 160)；

(n) KKAAP (配列番号 161)；及び

(o) PMAKK (配列番号 162)

からなる群から選択される、請求項 21 ~ 26 のいずれか一項に記載の二重特異性 CD28 抗原結合分子。

【請求項 28】

プロテアーゼ切断可能リンカーがプロテアーゼ認識配列 RQARVVNG (配列番号 148) を含む、請求項 26 又は 27 に記載の二重特異性アゴニスト CD28 抗原結合分子。

40

【請求項 29】

プロテアーゼ切断可能リンカーがプロテアーゼ認識配列 PMAKK (配列番号 162) を含む、請求項 26 又は 27 に記載の二重特異性アゴニスト CD28 抗原結合分子。

【請求項 30】

請求項 1 ~ 29 のいずれか一項に記載の二重特異性アゴニスト CD28 抗原結合分子をコードする、1 つ以上の単離ポリヌクレオチド。

【請求項 31】

請求項 30 に記載の 1 つ以上のポリヌクレオチドを含む、1 つ以上のベクター、特に発

50

現ベクター。

【請求項 3 2】

請求項 3 0 に記載の 1 つ以上のポリヌクレオチド又は請求項 3 1 に記載の 1 つ以上のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 3 3】

二重特異性アゴニスト CD 2 8 抗原結合分子を産生する方法であって、a) 請求項 2 6 に記載の宿主細胞を、二重特異性アゴニスト CD 2 8 抗原結合分子の発現に適した条件下で培養する工程、及び b) 任意に、二重特異性アゴニスト CD 2 8 抗原結合分子を回収する工程を含む、方法。

【請求項 3 4】

請求項 3 3 に記載の方法によって産生される、二重特異性アゴニスト CD 2 8 抗原結合分子。

【請求項 3 5】

請求項 1 ~ 2 9 のいずれか一項に記載の二重特異性アゴニスト CD 2 8 抗原結合分子と、少なくとも 1 種の薬学的に許容可能な賦形剤とを含む、医薬組成物。

【請求項 3 6】

医薬として使用するための、請求項 1 ~ 2 9 のいずれか一項に記載の二重特異性アゴニスト CD 2 8 抗原結合分子、又は請求項 3 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 7】

(a) T 細胞活性化又は (b) T 細胞エフェクター機能の増強における使用のための、請求項 1 ~ 2 9 のいずれか一項に記載の二重特異性アゴニスト CD 2 8 抗原結合分子、又は請求項 3 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 8】

疾患の治療における使用のための、請求項 1 ~ 2 9 のいずれか一項に記載の二重特異性アゴニスト CD 2 8 抗原結合分子、又は請求項 3 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 9】

疾患ががんである、請求項 3 8 に記載の使用のための二重特異性アゴニスト CD 2 8 抗原結合分子、又は医薬組成物。

【請求項 4 0】

使用が、化学療法剤、放射線療法及び / 又はがん免疫療法における使用のための他の薬剤と組み合わせて投与するためのものである、がんの治療における使用のための、請求項 1 ~ 2 9 のいずれか一項に記載の二重特異性アゴニスト CD 2 8 抗原結合分子、又は請求項 3 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 4 1】

疾患の治療、特にがんの治療のための医薬の製造における、請求項 1 ~ 2 9 のいずれか一項に記載の二重特異性アゴニスト CD 2 8 抗原結合分子、又は請求項 3 5 に記載の医薬組成物の使用。

【請求項 4 2】

個体において、疾患、特にがんを治療する方法であって、治療有効量の、請求項 1 ~ 2 9 のいずれか一項に記載の二重特異性アゴニスト CD 2 8 抗原結合分子を含む組成物を前記個体に投与することを含む、方法。

【請求項 4 3】

化学療法剤、放射線療法及び / 又はがん免疫療法に使用するための他の薬剤と組み合わせて投与することを更に含む、請求項 4 2 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

発明の分野

本発明は、抗 CD 3 / 抗 CD 2 8 二重特異性抗原結合分子及びそのプロテアーゼ活性化形態、それらの産生のための方法、これらの分子を含有する医薬組成物、並びに疾患、特

10

20

30

40

50

にがんの治療における免疫調節剤及び／又は共刺激剤としてのそれらの使用に関する。

【背景技術】

【0002】

背景

がん免疫療法は、黒色腫、非小細胞肺癌及び腎細胞癌腫等のがん型において劇的で持続的な応答をもたらすことができる、ますます有効な治療選択肢になりつつある。これは主に、抗PD-1（例えば、Merckのキイトルーダ；BMSのオプジーボ）、抗CTLA-4（例えば、BMSのヤーボイ）及び抗PD-L1（例えば、Rocheのテセントリク）を含むいくつかの免疫チェックポイント遮断の成功によって推進される。これらの薬剤は、多くのがん型の標準治療として、又は併用療法の骨格として役立つ可能性が高いが、患者のごく一部（25%未満）がかかると療法から利益を得るにすぎない。さらに、様々ながん（前立腺がん、結腸直腸がん、膵臓がん、肉腫、非トリプルネガティブ乳がん等）は、これらの免疫調節物質に対する免疫選択（primary resistance）を示す。いくつかの報告は、既存の抗腫瘍T細胞がないことが一部の患者の応答がないこと又は不十分であることに寄与することを示している。要約すると、既存の免疫療法の印象的な抗がん効果にもかかわらず、大きながん患者集団に対処すること、並びに新規な腫瘍特異的T細胞応答を誘導及び増強することを目的とする治療法を開発することに対する明確な医学的必要性が存在する。

【0003】

CD28は、重要なシグナル伝達モチーフを含む単一の膜貫通ドメイン及び細胞質ドメインに結合したペア型Vセット免疫グロブリンスーパーファミリー（IgSF: paired V-set immunoglobulin superfamily）ドメインを特徴とする共刺激分子のサブファミリーの確立メンバーである（Carreno and Collins, 2002）。サブファミリーの他のメンバーとしては、ICOS、CTLA-4、PD1、PD1H、TIGIT及びBTLA（Chen and Flies, 2013）が挙げられる。CD28発現はT細胞に限定され、PD-1又はCTLA-4を発現するものを含む、全てのナイーブ及び抗原経験サブセットの大部分で一般的である。CD28及びCTLA-4は高度に相同であり、樹状細胞、B細胞、マクロファージ及び腫瘍細胞上に発現される同じB7分子CD80及びCD86への結合について競合する（Linsley et al., 1990）。リガンドのB7ファミリーに対するCTLA-4のより高い親和性は、CTLA-4がリガンド結合についてCD28を打ち負かすこと、及びエフェクターT細胞応答を抑制することを可能にする（Engelhardt et al., 2006）。対照的に、PD-1は、CD28の細胞質ドメインを部分的に脱リン酸化することによってCD28シグナル伝達を阻害することが示された（Hui et al., 2017）。プロフェッショナル抗原提示細胞の表面上のCD80又はCD86によるCD28のライゲーションは、ナイーブT細胞の機能的デノボプライミング、その後のクローン増殖、サイトカイン産生、標的細胞溶解、及び長期記憶の形成に厳密に必要とされる。CD28リガンドの結合はまた、OX-40、ICOS、及び4-1BB等の誘導性共刺激受容体の発現を促進する（Acuto and Michel, 2003で概説）。CD28のライゲーション時に、ジスルフィド結合ホモ二量体、膜近位YMNモチーフ及び遠位PYAPモチーフは、いくつかのキナーゼ及びアダプタータンパク質と複合体を形成することが示されている（Boomer and Green, 2010）。これらのモチーフは、NFAT、AP-1及びNF- $\kappa$ Bファミリー転写因子のCD28依存的活性化によって媒介されるIL2転写の誘導に重要である（Fraser et al., 1991）（June et al., 1987）（Thompson et al., 1989）。しかしながら、リン酸化及びユビキチン化のための更なる十分に特徴付けられていない部位が、CD28の細胞質ドメイン内に見られる。（Essensten et al., 2016）によって概説されるように、CD28によって開始される経路は、従来のT細胞の増殖及びエフェクター機能の促進において重要な役割を有する。CD28ライゲーションはまた、制御性T細胞の抗炎症機能を促進す



る。CD28は、T細胞受容体からのシグナルを部分的に増強することによってT細胞を共刺激するが、固有のシグナル伝達事象を媒介することも示された(Acuto and Michel, 2003; Boomer and Green, 2010; June et al., 1987)。CD28によって特異的に引き起こされるシグナルは、下流タンパク質のリン酸化及び他の翻訳後修飾(例えば、PI3K媒介性リン酸化)、転写変化(例えば、Bcl-xL発現)、エピジェネティック変化(例えばIL-2プロモーター)、細胞骨格リモデリング(例えば、微小管形成中心の配向)及び解糖速度の変化(例えば、解糖流量)を含む、T細胞機能の多くの重要な側面を制御する。CD28欠損マウスは、感染性病原体、同種移植片抗原、移植片対宿主病、接触過敏症及び喘息に対する応答が低下している(Acuto and Michel, 2003)。CD28媒介性共刺激の欠如は、*in vitro*及び*in vivo*でのT細胞増殖の減少、胚中心形成及び免疫グロブリンアイソタイプクラスの切り替えの重度の障害、Tヘルパー(Th)細胞分化の減少並びにTh2型サイトカインの発現をもたらす。CD4依存性細胞傷害性CD8+T細胞応答も影響を受ける。重要なことに、CD28欠損ナイーブT細胞は、特に低い抗原濃度で増殖応答の低下を示した。T細胞上でCD28を連結させることが抗腫瘍能を有するという考えが、文献により相次いで支持されている。最近の証拠は、PD-L1/PD-1及びCTLA-4チェックポイント阻害剤の抗がん効果がCD28に依存することを実証している(Kamphorst et al., 2017; Tai et al., 2007)。CTLA-4及びPD-1遮断の治療効果を調査する臨床研究は、進行した黒色腫及び他のがんを有する患者において非常に有望な結果を示している。さらに、細胞内TCRシグナル伝達ドメイン(CD3z)及び細胞内共刺激ドメイン(CD28及び/又は4-1BBドメイン)に融合した細胞外抗原認識ドメインを含む人工キメラT細胞受容体を発現する遺伝子操作されたT細胞の注入は、B細胞がん及び他のがんにおける高い応答率及び応答の持続性を示した。

10

20

30

40

50

#### 【0004】

CD28アゴニスト抗体を、(i)CD28スーパーアゴニスト抗体及び(ii)CD28の従来のアゴニスト抗体の2つのカテゴリーに分けることができる。通常、ナイーブT細胞の活性化には、T細胞抗原受容体(TCR、シグナル1)の連結とCD28による共刺激シグナル伝達(シグナル2)の両方が必要である。CD28スーパーアゴニスト(CD28SA)は、明白なT細胞受容体関与なしにT細胞を自律的に活性化することができるCD28特異的モノクローナル抗体である(Huenig, 2012)。齧歯類では、CD28SAは、従来に制御性T細胞を活性化する。CD28SA抗体は、自己免疫、炎症及び移植の複数のモデルにおいて治療有効である。しかしながら、ヒトCD28SA抗体TGN1412の第I相研究は、2006年に生命を脅かすサイトカインストームをもたらした。追跡調査は、ヒトT細胞及び前臨床動物モデルのT細胞のCD28応答性の違いによる投薬過誤によって毒性が引き起こされたことを示唆している。TGN1412は現在、RA患者及び転移性又は切除不能な進行性固形悪性腫瘍を有する患者における非盲検多施設用量漸増試験で再評価されている。CD28の従来のアゴニスト抗体、例えばクローン9.3は、CD28天然リガンドを模倣し、T細胞受容体シグナルの存在下でのみT細胞活性化を増強することができる(シグナル1)。公開された見識は、抗体の結合エピトープが、アゴニスト抗体がスーパーアゴニストであるか従来のアゴニストであるかに大きな影響を及ぼすことを示している(Beyersdorf et al., 2005)。スーパーアゴニストTGN1412はCD28の側方モチーフに結合するが、従来のアゴニスト分子9.3はリガンド結合エピトープの近くに結合する。異なる結合エピトープの結果として、スーパーアゴニスト抗体及び従来のアゴニスト抗体は、T細胞の表面上にCD28分子の線形複合体を形成する能力が異なる。正確には、TGN1412はCD28の線形アレイを効率的に形成することができ、これはおそらくT細胞活性化の閾値を超えるのに十分な凝集したシグナル伝達成分をもたらす。一方、従来のアゴニスト9.3は、構造が直鎖状ではない複合体をもたらす。9.3クローンに基づく従来のアゴニスト結合因子を変換する試みは、メラノーマ関連プロテオグリカン及びCD28に対する組

換え二重特異性一本鎖抗体を使用して以前に発表されている (O t z e t a l . , 2009)。報告された二重特異性一本鎖抗体は、多量体コンストラクトを形成する二重特異性一本鎖抗体の固有の傾向に基づいて、従来のCD28アゴニスト結合因子9.3の使用にもかかわらず、「超アゴニスト」活性を発揮することが報告された。

【0005】

CD3 (分化抗原群3) は、4つのサブユニット、CD3鎖、CD3鎖、及び2つのCD3鎖からなるタンパク質複合体である。CD3は、T細胞受容体及び鎖と会合し、Tリンパ球において活性化シグナルを生成する。CD3は、薬剤標的として広範に調査されてきた。CD3を標的とするモノクローナル抗体は、I型糖尿病等の自己免疫疾患又は移植拒絶反応の治療における免疫抑制治療として使用されてきた。CD3抗体ムロモナブ-CD3 (OKT3) は、1985年にヒトでの臨床使用がこれまで認可された最初のモノクローナル抗体であった。

10

【0006】

CD3抗体のより最新の適用は、一方でCD3に結合し、他方で腫瘍細胞抗原に結合する二重特異性抗体の形態のものである。かかる抗体がその標的の両方に同時に結合することで、標的細胞とT細胞との間の一時的相互作用を強め、任意の細胞傷害性T細胞の活性化及びそれに続く標的細胞の溶解を引き起こす。治療目的のために、抗体が実現すべき重要な要件は、in vitro (薬剤の保管のため) 及びin vivo (患者への投与後) の両方で十分に安定であることである。アスパラギン脱アミド化のような改変は、組換え抗体について一般的な分解であり、in vitro安定性及びin vivo生物学的機能の両方に影響する恐れがある。抗体、特にT細胞を活性化するための二重特異性抗体の驚異的な治療可能性を考慮すると、最適化された特性を有する増強されたCD3抗体が必要とされている。

20

【発明の概要】

【0007】

概要

本発明は、多量体の形成を必要とすることなく腫瘍依存性T細胞活性化及び腫瘍細胞殺傷を達成する抗CD3/抗CD28二重特異性抗原結合分子及びそのマスクされたプロテアーゼ活性化形態を記載する。本発明の二重特異性CD28抗原結合分子は、CD28への一価結合を特徴とし、マスクされ得るCD3への特異的結合が可能な第2の抗原結合ドメインを含む。具体的には、本発明は、プロテアーゼによって切断されるまでCD3抗原結合ドメインをマスクする抗イディオタイプ結合部分を有する抗CD3/抗CD28二重特異性抗原結合分子に関する。これにより、CD3抗原結合ドメインは、腫瘍、例えば腫瘍浸潤T細胞等の標的組織に近接するまで、アクセス不能又は「マスク」され得る。更に、抗CD3/抗CD28二重特異性抗原結合分子は、Fc受容体に対する抗原結合分子の結合親和性及び/又はエフェクター機能を低下させる1つ以上のアミノ酸置換を含む安定な会合が可能な第1のサブユニット及び第2のサブユニットで構成されるFcドメインを持つ。これにより、Fc受容体媒介性架橋が抑止され、CD3への特異的結合が可能な第2の抗原結合ドメインの結合による架橋によって腫瘍特異的活性化が達成される。

30

【0008】

したがって、本発明は、CD28への一価結合を特徴とする二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子であって、

40

(a) CD28への特異的結合が可能な第1の抗原結合ドメインと、

(b) CD3への特異的結合が可能な第2の抗原結合ドメインと、

(c) Fc受容体に対する抗原結合分子の結合親和性及び/又はエフェクター機能を低下させる1つ以上のアミノ酸置換を含む安定な会合が可能な第1のサブユニット及び第2のサブユニットで構成されるFcドメインと

を含み、  
CD3への特異的結合が可能な第2の抗原結合ドメインが、

(i) 配列番号2の重鎖相補性決定領域CDR-H1、配列番号3のCDR-H2、及

50

び配列番号4のCDR-H3を含む重鎖可変領域(V<sub>H</sub>CD3)と、配列番号5の軽鎖相補性決定領域CDR-L1、配列番号6のCDR-L2、及び配列番号7のCDR-L3を含む軽鎖可変領域(V<sub>L</sub>CD3)と、又は

(ii)配列番号10の重鎖相補性決定領域CDR-H1、配列番号11のCDR-H2、及び配列番号12のCDR-H3を含む重鎖可変領域(V<sub>H</sub>CD3)と、配列番号13の軽鎖相補性決定領域CDR-L1、配列番号14のCDR-L2、及び配列番号15のCDR-L3を含む軽鎖可変領域(V<sub>L</sub>CD3)とを含む、二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子を提供する。

【0009】

一態様では、FcドメインがIgG、特にIgG1 Fcドメイン又はIgG4 Fcドメインである、以下に定義する二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子が提供される。特定の一態様では、安定な会合が可能な第1のサブユニット及び第2のサブユニットから構成されるFcドメインはIgG1 Fcドメインである。一態様では、Fcドメインは、アミノ酸置換L234A及びL235A(Kabat EUインデックスによるナンバリング)を含む。一態様では、FcドメインはヒトIgG1サブクラスのFcドメインであり、アミノ酸変異L234A、L235A及びP329G(Kabat EUインデックスによるナンバリング)を含む。

10

【0010】

一態様では、本明細書において前に定義したような二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子が提供され、CD28への特異的結合が可能な第1の抗原結合ドメインは、

20

(i)配列番号26の重鎖相補性決定領域CDR-H1、配列番号27のCDR-H2、及び配列番号28のCDR-H3を含む重鎖可変領域(V<sub>H</sub>CD28)と、配列番号29の軽鎖相補性決定領域CDR-L1、配列番号30のCDR-L2、及び配列番号31のCDR-L3を含む軽鎖可変領域(V<sub>L</sub>CD28)と、又は

(ii)配列番号18のCDR-H1、配列番号19のCDR-H2、及び配列番号20のCDR-H3を含む重鎖可変領域(V<sub>H</sub>CD28)と、配列番号21のCDR-L1、配列番号22のCDR-L2、及び配列番号23のCDR-L3を含む軽鎖可変領域(V<sub>L</sub>CD28)とを含む。

【0011】

一態様では、二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子のCD28への特異的結合が可能な抗原結合ドメインは、配列番号26のCDR-H1、配列番号27のCDR-H2及び配列番号28のCDR-H3を含む重鎖可変領域(V<sub>H</sub>CD28)と、配列番号29のCDR-L1、配列番号30のCDR-L2及び配列番号31のCDR-L3を含む軽鎖可変領域(V<sub>L</sub>CD28)とを含む。

30

【0012】

別の態様では、二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子のCD28への特異的結合が可能な抗原結合ドメインは、配列番号18のCDR-H1、配列番号19のCDR-H2及び配列番号20のCDR-H3を含む重鎖可変領域(V<sub>H</sub>CD28)と、配列番号21のCDR-L1、配列番号22のCDR-L2及び配列番号23のCDR-L3を含む軽鎖可変領域(V<sub>L</sub>CD28)とを含む。

40

【0013】

更には、CD28への特異的結合が可能な第1の抗原結合ドメインが、配列番号24のアミノ酸配列と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(V<sub>H</sub>CD28)と、配列番号25のアミノ酸配列と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(V<sub>L</sub>CD28)とを含む、本明細書において前に定義したような二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子が提供される。

【0014】

更なる態様では、CD28への特異的結合が可能な第1の抗原結合ドメインが、配列番

50

号 3 2、配列番号 3 3、配列番号 3 4、配列番号 3 5、配列番号 3 6、配列番号 3 7、配列番号 3 8、配列番号 3 9、配列番号 4 0 及び配列番号 4 1 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V<sub>H</sub>CD28) と、配列番号 2 5、配列番号 4 2、配列番号 4 3、配列番号 4 4、配列番号 4 5、配列番号 4 6、配列番号 4 7、配列番号 4 8、配列番号 4 9、配列番号 5 0 及び配列番号 5 1 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V<sub>L</sub>CD28) とを含む、二重特異性アゴニスト CD28 抗原結合分子が提供される。

【0015】

別の態様では、二重特異性アゴニスト CD28 抗原結合分子が提供され、CD28 への特異的結合が可能な第 1 の抗原結合ドメインは、

10

(a) 配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V<sub>H</sub>CD28) 及び配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V<sub>L</sub>CD28)、又は

(b) 配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V<sub>H</sub>CD28) 及び配列番号 2 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V<sub>L</sub>CD28)、又は

(c) 配列番号 4 1 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V<sub>H</sub>CD28) 及び配列番号 5 1 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V<sub>L</sub>CD28)、又は

(d) 配列番号 3 6 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V<sub>H</sub>CD28) 及び配列番号 4 3 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V<sub>L</sub>CD28)、又は

(e) 配列番号 3 6 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V<sub>H</sub>CD28) 及び配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V<sub>L</sub>CD28)、又は

20

(f) 配列番号 3 6 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V<sub>H</sub>CD28) 及び配列番号 4 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V<sub>L</sub>CD28)、又は

(g) 配列番号 3 6 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V<sub>H</sub>CD28) 及び配列番号 2 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V<sub>L</sub>CD28)、又は

(h) 配列番号 3 3 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V<sub>H</sub>CD28) 及び配列番号 2 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V<sub>L</sub>CD28)、又は

(i) 配列番号 3 2 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V<sub>H</sub>CD28) 及び配列番号 4 3 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V<sub>L</sub>CD28)、又は

(j) 配列番号 3 2 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V<sub>H</sub>CD28) 及び配列番号 4 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V<sub>L</sub>CD28)、又は

30

(k) 配列番号 3 2 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V<sub>H</sub>CD28) 及び配列番号 2 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V<sub>L</sub>CD28)

を含む。

【0016】

特定の一態様では、二重特異性アゴニスト CD28 抗原結合分子が提供され、CD28 への特異的結合が可能な第 1 の抗原結合ドメインは、

(i) 配列番号 5 2 の重鎖相補性決定領域 CDR-H1、配列番号 5 3 の CDR-H2、及び配列番号 5 4 の CDR-H3 を含む重鎖可変領域 (V<sub>H</sub>CD28) と、配列番号 5 5 の軽鎖相補性決定領域 CDR-L1、配列番号 5 6 の CDR-L2、及び配列番号 5 7 の CDR-L3 を含む軽鎖可変領域 (V<sub>L</sub>CD28) とを含む。一態様では、CD28 への特異的結合が可能な第 1 の抗原結合ドメインは、配列番号 3 7 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V<sub>H</sub>CD28) の CDR と、配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V<sub>L</sub>CD28) の CDR とを含む。

40

【0017】

別の特定の態様では、CD28 への特異的結合が可能な抗原結合ドメインが、配列番号 3 6 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V<sub>H</sub>CD28) と、配列番号 4 3 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V<sub>L</sub>CD28) とを含む、二重特異性アゴニスト CD28 抗原結合分子が提供される。更なる態様では、CD28 への特異的結合が可能な抗原結合ドメインが、配列番号 3 2 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V<sub>H</sub>CD28) と、配列番号 2 5 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V<sub>L</sub>CD28) とを含む、二重特異性アゴニスト

50

CD28 抗原結合分子が提供される。

【0018】

一態様では、CD3 への特異的結合が可能な抗原結合ドメインが、配列番号2の重鎖相補性決定領域CDR-H1、配列番号3のCDR-H2、及び配列番号4のCDR-H3を含む重鎖可変領域(V<sub>H</sub>CD3)と、配列番号5の軽鎖相補性決定領域CDR-L1、配列番号6のCDR-L2、及び配列番号7のCDR-L3を含む軽鎖可変領域(V<sub>L</sub>CD3)とを含む、二重特異性アゴニストCD28 抗原結合分子が提供される。一態様では、CD3 への特異的結合が可能な抗原結合ドメインは、配列番号8のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(V<sub>H</sub>CD3)のCDRと、配列番号9のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(V<sub>L</sub>CD3)のCDRとを含む。特定の一態様では、CD3 への特異的結合が可能な抗原結合ドメインは、配列番号8のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(V<sub>H</sub>CD3)と、配列番号9のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(V<sub>L</sub>CD3)とを含む。

10

【0019】

別の態様では、CD3 への特異的結合が可能な抗原結合ドメインが、配列番号10の重鎖相補性決定領域CDR-H1、配列番号11のCDR-H2、及び配列番号12のCDR-H3を含む重鎖可変領域(V<sub>H</sub>CD3)と、配列番号13の軽鎖相補性決定領域CDR-L1、配列番号14のCDR-L2、及び配列番号15のCDR-L3を含む軽鎖可変領域(V<sub>L</sub>CD3)とを含む、本明細書に記載される二重特異性アゴニストCD28 抗原結合分子が提供される。一態様では、CD3 への特異的結合が可能な抗原結合ドメインは、配列番号16のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(V<sub>H</sub>CD3)のCDRと、配列番号17のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(V<sub>L</sub>CD3)のCDRとを含む。特定の一態様では、CD3 への特異的結合が可能な抗原結合ドメインは、配列番号16のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(V<sub>H</sub>CD3)と、配列番号17のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(V<sub>L</sub>CD3)とを含む。

20

【0020】

更なる態様では、CD28 への特異的結合が可能な第1の抗原結合ドメイン及び/又はCD3 への特異的結合が可能な第2の抗原結合ドメインがFab断片又はクロスFab断片である、本明細書において前に定義したような二重特異性アゴニストCD28 抗原結合分子が提供される。一態様では、(a)CD28 への特異的結合が可能なFab断片と、(b)CD3 への特異的結合が可能なクロスFab断片と、(c)Fc受容体に対する抗原結合分子の結合親和性及び/又はエフェクター機能を低下させる1つ以上のアミノ酸置換を含む安定な会合が可能な第1及び第2のサブユニットで構成されるFcドメインとを含む、本明細書に記載の二重特異性アゴニスト性CD28 抗原結合分子が提供される。別の態様では、(a)CD28 への特異的結合が可能なクロスFab断片と、(b)CD3 への特異的結合が可能なFab断片と、(c)Fc受容体に対する抗原結合分子の結合親和性及び/又はエフェクター機能を低下させる1つ以上のアミノ酸置換を含む安定な会合が可能な第1及び第2のサブユニットで構成されるFcドメインとを含む、本明細書に記載の二重特異性アゴニスト性CD28 抗原結合分子が提供される。

30

【0021】

一態様では、CD28 への特異的結合が可能な第1の抗原結合ドメインは、Fab軽鎖及びFab重鎖の可変ドメインV<sub>L</sub>及びV<sub>H</sub>、又は定常ドメインC<sub>L</sub>及びC<sub>H</sub>1、特に可変ドメインV<sub>L</sub>及びV<sub>H</sub>が互いに置き換えられているFab断片である。一態様では、CD3 への特異的結合が可能な第2の抗原結合ドメインは従来のFab断片である。一態様では、CD3 への特異的結合が可能な第2の抗原結合ドメインは、定常ドメインC<sub>L</sub>において、位置123(ナンバリングはKabata EUインデックスに従う)のアミノ酸がリジン(K)、アルギニン(R)又はヒスチジン(H)から選択されるアミノ酸によって置換され、かつ、位置124(ナンバリングはKabata EUインデックスに従う)のアミノ酸がリジン(K)、アルギニン(R)又はヒスチジン(H)によって独立して置換され、かつ、定常ドメインC<sub>H</sub>1において、位置147(ナンバリングはKabata EUインデックスに従う)のアミノ酸がグルタミン酸(E)又はアスパラギン酸(D)によ

40

50

って独立して置換され、かつ、位置 2 1 3 (ナンバリングは K a b a t E U インデックスに従う) のアミノ酸がグルタミン酸 ( E ) 又はアスパラギン酸 ( D ) (ナンバリングは K a b a t E U インデックスに従う) によって独立して置換される F a b 分子である。

【 0 0 2 2 】

更なる態様では、 C D 3 への特異的結合が可能な第 2 の抗原結合ドメインが F a b 分子であり、 F a b 軽鎖及び F a b 重鎖の可変ドメイン V L 及び V H、又は定常ドメイン C L 及び C H 1、特に定常ドメイン C L 及び C H 1 が互いに置き換えられている、本明細書に記載の二重特異性アゴニスト性 C D 2 8 抗原結合分子が提供される。一態様では、 C D 2 8 への特異的結合が可能な第 1 の抗原結合ドメインは、従来の F a b 分子である。一態様では、 C D 2 8 への特異的結合が可能な第 1 の抗原結合ドメインは、定常ドメイン C L において、位置 1 2 3 (ナンバリングは K a b a t E U インデックスに従う) のアミノ酸がリジン ( K )、アルギニン ( R ) 又はヒスチジン ( H ) から選択されるアミノ酸によって置換され、かつ、位置 1 2 4 (ナンバリングは K a b a t E U インデックスに従う) のアミノ酸がリジン ( K )、アルギニン ( R ) 又はヒスチジン ( H ) によって独立して置換され、かつ、定常ドメイン C H 1 において、位置 1 4 7 (ナンバリングは K a b a t E U インデックスに従う) のアミノ酸がグルタミン酸 ( E ) 又はアスパラギン酸 ( D ) によって独立して置換され、かつ、位置 2 1 3 (ナンバリングは K a b a t E U インデックスに従う) のアミノ酸がグルタミン酸 ( E ) 又はアスパラギン酸 ( D ) (ナンバリングは K a b a t E U インデックスに従う) によって独立して置換される F a b 分子である。

【 0 0 2 3 】

別の態様では、第 1 及び第 2 の抗原結合ドメインがそれぞれ F a b 分子であり、 F c ドメインが安定な会合が可能な第 1 及び第 2 のサブユニットで構成される、本明細書に開示される二重特異性アゴニスト性 C D 2 8 抗原結合分子が提供され、 ( i ) 第 1 の抗原結合ドメインは F a b 重鎖の C 末端において F c ドメインの第 1 のサブユニットの N 末端に融合され、第 2 の抗原結合ドメインは F a b 重鎖の C 末端において F c ドメインの第 2 のサブユニットの N 末端に融合されるか、又は ( i i ) 第 2 の抗原結合ドメインは F a b 重鎖の C 末端において F c ドメインの第 1 のサブユニットの N 末端に融合され、第 1 の抗原結合ドメインは F a b 重鎖の C 末端において F c ドメインの第 2 のサブユニットの N 末端に融合される。一態様では、 F c ドメインは、 F c ドメインの第 1 のサブユニットと第 2 のサブユニットとの会合を促進する修飾を含む。一態様では、 F c ドメインの第 1 のサブユニットは、アミノ酸置換 S 3 5 4 C 及び T 3 6 6 W ( E U ナンバリング ) を含み、 F c ドメインの第 2 のサブユニットは、アミノ酸置換 Y 3 4 9 C、 T 3 6 6 S 及び Y 4 0 7 V ( K a b a t E U インデックスによるナンバリング ) を含む。

【 0 0 2 4 】

更なる態様では、 C D 2 8 への一価結合を特徴とする二重特異性アゴニスト C D 2 8 抗原結合分子が提供され、

- ( a ) C D 2 8 への特異的結合が可能な第 1 の抗原結合ドメインと、
  - ( b ) C D 3 への特異的結合が可能な第 2 の抗原結合ドメインと、
  - ( c ) F c 受容体に対する抗原結合分子の結合親和性及び / 又はエフェクター機能を低下させる 1 つ以上のアミノ酸置換を含む安定な会合が可能な第 1 のサブユニット及び第 2 のサブユニットで構成される F c ドメインと
- を含み、

C D 3 への特異的結合が可能な当該第 2 の抗原結合ドメインが、

- ( i ) 配列番号 2 の重鎖相補性決定領域 C D R - H 1、配列番号 3 の C D R - H 2、及び配列番号 4 の C D R - H 3 を含む重鎖可変領域 ( V H C D 3 ) と、配列番号 5 の軽鎖相補性決定領域 C D R - L 1、配列番号 6 の C D R - L 2、及び配列番号 7 の C D R - L 3 を含む軽鎖可変領域 ( V L C D 3 ) と、又は

- ( i i ) 配列番号 1 0 の重鎖相補性決定領域 C D R - H 1、配列番号 1 1 の C D R - H 2、及び配列番号 1 2 の C D R - H 3 を含む重鎖可変領域 ( V H C D 3 ) と、配列番号 1 3 の軽鎖相補性決定領域 C D R - L 1、配列番号 1 4 の C D R - L 2、及び配列番号 1 5

10

20

30

40

50

の C D R - L 3 を含む軽鎖可変領域 ( V L C D 3 ) と  
を含み、更に、

( d ) プロテアーゼ切断可能リンカーを介して二重特異性アゴニスト C D 2 8 抗原結合分子に共有結合したマスキング部分であって、C D 3 への特異的結合が可能な第 2 の抗原結合ドメインのイディオタイプに結合することができ、それにより、C D 3 への特異的結合が可能な抗原結合ドメインを可逆的に隠す、マスキング部分を含む。

【 0 0 2 5 】

一態様では、マスキング部分は、C D 3 への特異的結合が可能な第 2 の抗原結合ドメインの重鎖可変領域 ( V H C D 3 ) に、特にペプチドリンカーを介して、より具体的にはプロテアーゼ切断可能リンカーを介して共有結合している。一態様では、マスキング部分は s c F v である。

10

【 0 0 2 6 】

更なる態様では、マスキング部分は、

( i ) D Y S M N ( 配列番号 1 2 3 ) の C D R - H 1 アミノ酸配列、W I N T E T G E P R Y T D D F K G ( 配列番号 1 2 4 )、W I N T E T G E P R Y T D D F T G ( 配列番号 1 3 0 )、及び W I N T E T G E P R Y T Q G F K G ( 配列番号 1 3 1 ) からなる群から選択される C D R H 2 アミノ酸配列、及び E G D Y D V F D Y ( 配列番号 1 2 5 ) の C D R H 3 アミノ酸配列を含む重鎖可変領域 ( V H ) と、R A S K S V S T S S Y S Y M H ( 配列番号 1 2 6 ) 及び K S S K S V S T S S Y S Y M H ( 配列番号 1 2 9 ) からなる群から選択される軽鎖相補性決定領域 C D R - L 1 アミノ酸配列、Y V S Y L E S ( 配列番号 1 2 7 ) の C D R - L 2 アミノ酸配列、及び Q H S R E F P Y T ( 配列番号 1 2 8 ) 及び Q Q S R E F P Y T ( 配列番号 1 3 2 ) からなる群から選択される C D R - L 3 アミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 ( V L ) と、又は

20

( i i ) D Y S M N ( 配列番号 1 2 3 ) の C D R - H 1 アミノ酸配列、W I N T E T G E P R Y T D D F K G ( 配列番号 1 2 4 ) の C D R - H 2 アミノ酸配列、及び E G D Y D V F D Y ( 配列番号 1 2 5 ) の C D R - H 3 アミノ酸配列を含む重鎖可変領域 ( V H ) と、R A S K S V S T S S Y S Y M H ( 配列番号 1 2 6 ) の C D R - L 1 アミノ酸配列、Y V S Y L E S ( 配列番号 1 2 7 ) の C D R - L 2 アミノ酸配列、及び Q H S R E F P Y T ( 配列番号 1 2 8 ) の C D R - L 3 アミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 ( V L ) と、又は

30

( i i i ) S Y G V S ( 配列番号 1 2 3 ) の C D R - H 1 アミノ酸配列、I I W G D G S T N Y H S A L I S ( 配列番号 1 2 4 ) の C D R - H 2 アミノ酸配列、及び G I T T V V D D Y Y A M D Y ( 配列番号 1 2 5 ) の C D R - H 3 アミノ酸配列を含む重鎖可変領域 ( V H ) と、K S S K S V S T S S Y S Y M H ( 配列番号 1 2 9 ) の C D R - L 1 アミノ酸配列、A A T F L A D ( 配列番号 1 2 7 ) の C D R - L 2 アミノ酸配列、及び Q H Y Y S T P Y T ( 配列番号 1 2 8 ) の C D R - L 3 アミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 ( V L ) と、又は

( i v ) S Y G V S ( 配列番号 1 2 3 ) の C D R - H 1 アミノ酸配列、W I N T E T G E P R Y T D D F T G ( 配列番号 1 3 0 ) の C D R - H 2 アミノ酸配列、及び G I T T V V D D Y Y A M D Y ( 配列番号 1 2 5 ) の C D R - H 3 アミノ酸配列を含む重鎖可変領域 ( V H ) と、K S S K S V S T S S Y S Y M H ( 配列番号 1 2 9 ) の C D R - L 1 アミノ酸配列、A A T F L A D ( 配列番号 1 2 7 ) の C D R - L 2 アミノ酸配列、及び Q H Y Y S T P Y T ( 配列番号 1 2 8 ) の C D R - L 3 アミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 ( V L ) と、又は

40

( v ) S Y G V S ( 配列番号 1 2 3 ) の C D R - H 1 アミノ酸配列、W I N T E T G E P R Y T Q G F K G ( 配列番号 1 3 1 ) の C D R - H 2 アミノ酸配列、及び G I T T V V D D Y Y A M D Y ( 配列番号 1 2 5 ) の C D R - H 3 アミノ酸配列を含む重鎖可変領域 ( V H ) と、K S S K S V S T S S Y S Y M H ( 配列番号 1 2 9 ) の C D R - L 1 アミノ酸配列、A A T F L A D ( 配列番号 1 2 7 ) の C D R - L 2 アミノ酸配列、及び Q H Y Y S T P Y T ( 配列番号 1 2 8 ) の C D R - L 3 アミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 ( V L ) とを含む。

50

## 【0027】

特定の一態様では、マスキング部分は、SYGVS（配列番号115）のCDR-H1アミノ酸配列、IIWGDGSTNYHSALIS（配列番号116）のCDR-H2アミノ酸配列、及びGITTVVDDYYAMDY（配列番号117）のCDR-H3アミノ酸配列を含む重鎖可変領域（V<sub>H</sub>）と、RASENIDSYLA（配列番号118）のCDR-L1アミノ酸配列、AATFLAD（配列番号119）のCDR-L2アミノ酸配列、及びQHYYSTPYT（配列番号120）のCDR-L3アミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（V<sub>L</sub>）とを含む。

## 【0028】

別の態様では、プロテアーゼ切断可能リンカーが少なくとも1つのプロテアーゼ認識配列を含む、本明細書中上記に記載されるような二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子が提供される。一態様では、プロテアーゼ認識配列は、

(a) RQARVVNG（配列番号148）；  
 (b) VHMP L G F L G P G R S R G S F P（配列番号149）；  
 (c) RQARVVNGXXXVPLSLYSG（配列番号150）、式中、Xは任意のアミノ酸である；

(d) RQARVVNGVPLSLYSG（配列番号151）；  
 (e) PLGLWSQ（配列番号152）；  
 (f) VHMP L G F L G P R Q A R V V N G（配列番号153）；  
 (g) FVGGTG（配列番号154）；  
 (h) KKAAPVNG（配列番号155）；  
 (i) PMAKKVNG（配列番号156）；  
 (j) QARAKVNG（配列番号157）；  
 (k) VHMP L G F L G P（配列番号158）；  
 (l) QARAK（配列番号159）；  
 (m) VHMP L G F L G P P M A K K（配列番号160）；  
 (n) KKAAP（配列番号161）；及び  
 (o) PMAKK（配列番号162）

からなる群から選択される。

## 【0029】

一態様では、プロテアーゼ切断可能リンカーは、プロテアーゼ認識配列RQARVVNG（配列番号148）を含む。別の態様では、プロテアーゼ切断可能リンカーは、プロテアーゼ認識配列PMAKK（配列番号162）を含む。

## 【0030】

本発明の別の態様によれば、本発明の二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子をコードする1つ以上の単離されたポリヌクレオチドが提供される。本発明は更に、本発明の1つ以上の単離ポリヌクレオチドを含む1つ以上のベクター、特に、1つ以上の発現ベクター、及び本発明の1つ以上の単離ポリヌクレオチド又は1つ以上の発現ベクターを含む宿主細胞を提供する。いくつかの態様では、宿主細胞は真核細胞、特に哺乳動物細胞である。別の態様では、二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子の発現に適した条件下で本発明の宿主細胞を培養すること、を含む、本明細書に記載の二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子の製造方法が提供される。任意に、この方法はまた、二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子を回収することを含む。本発明は、本発明の方法により作製した二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子もまた包含する。

## 【0031】

本発明は更に、本発明の二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子及び少なくとも1つの薬学的に許容可能な賦形剤を含む医薬組成物を提供する。一態様では、医薬組成物は、疾患、特にがんの治療における使用のためのものである。

## 【0032】

二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子又は本発明の医薬組成物を使用する方法も

10

20

30

40

50



本発明に包含される。一態様では、本発明は、医薬として使用するための本発明による二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子又は医薬組成物を提供する。一態様では、(a)細胞活性化の増強又は(b)T細胞エフェクター機能の増強における使用のための、本明細書に記載の二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子が提供される。一態様では、疾患の治療における使用のための本発明による二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子又は医薬組成物が提供される。特定の態様では、疾患はがんである。別の態様では、本発明による二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子又は医薬組成物は、がんの治療における使用のためのものであり、二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子は、化学療法剤、放射線療法及び/又はがん免疫療法における使用のための他の薬剤と組み合わせて投与するためのものである。

10

### 【0033】

疾患を治療するための医薬の製造における本発明による二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子又は医薬組成物の使用、並びに個体における疾患を治療する方法であって、当該個体に、治療有効量の本発明による二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子又は本発明による二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子を薬学的に許容可能な形態で含む組成物を投与することを含む、方法も提供される。特定の態様では、疾患はがんである。一態様では、個体における(a)細胞活性化を増強するか又は(b)T細胞エフェクター機能を増強する方法であって、本発明による二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子又は本発明による二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子を薬学的に許容可能な形態で含む組成物を当該個体に投与することを含む、方法が提供される。別の態様では、疾患を治療するための医薬の製造における本発明による二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子の使用であって、該治療が化学療法剤、放射線療法及び/又はがん免疫療法における使用のための他の薬剤との同時投与を含む、使用が提供される。更なる態様では、個体において疾患を治療する方法であって、治療有効量の本発明の二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子又は本発明の二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子を薬学的に許容可能な形態で含む組成物を当該個体に投与することを含み、化学療法剤、放射線療法及び/又はがん免疫療法における使用のための他の薬剤と同時投与することを含む、方法が提供される。個体における腫瘍細胞の増殖を阻害する方法であって、当該個体に、有効量の、本発明による二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子又は本発明による二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子を薬学的に許容可能な形態で含む組成物を投与して、腫瘍細胞の増殖を阻害すること、を含む、方法も提供される。上の態様のいずれかにおいて、個体は、好ましくは哺乳動物であり、特にヒトである。

20

30

### 【図面の簡単な説明】

#### 【0034】

【図1】図1A~図1Iには、本明細書に記載される分子の概略図が示される。図1Aは、一価huIgG1 PGLALAアイソタイプ(「Fcサイレント」として)のCD28アゴニスト抗体変異体の概略図を示す。図1Bは、1+1フォーマットの二重特異性CD3-CD28抗原結合分子を示し、CD3抗原結合ドメインを含むFab分子では、CH1ドメインとCLドメインが互いに交換され(CH1/CLクロスFab)、CD28抗原結合ドメインを含むFab分子では、CH1ドメインとCLドメインの特定のアミノ酸が交換され(荷電変異体)、軽鎖とのより良好な対合を可能とする。図1Cは、一価huIgG1 PGLALAアイソタイプ(「Fcサイレント」として)のCD28アゴニスト抗体変異体の概略図を示し、図1Dは、一価huIgG1 PGLALAアイソタイプ(「Fcサイレント」として)のCD3抗体を示す。図1Eは、huIgG1 PG-LALAクロスFab分子としての1+1フォーマットの二重特異性CD3-CD28抗原結合分子を示し、CD3(CH2527)Fab断片(ノブ)では、CH1ドメイン及びCKドメインが交換されており、CD3は、抗イディオタイプCD3 scFv 4.24.72及び切断可能リンカー(MK062マトリプターゼ部位)でマスクされている。図1Fは、huIgG1 PG-LALAクロスFab分子としての1+1フォーマットの二重特異性CD3-CD28抗原結合分子を示し、CD3(CH2527

40

50

） F a b 断片（ノブ）において、 C H 1 ドメインと C L ドメインとが互いに交換され（ C L / C H 1 クロス f a b ）、 C D 3 は、抗イディオタイプ C D 3 s c F v 4 . 2 4 . 7 2 及び切断不可能リンカーでマスクされている。図 1 G は、 1 + 1 フォーマットの二重特異性 C D 3 - C D 2 8 抗原結合分子を示し、 C D 2 8 抗原結合ドメインを含む F a b 分子では、 V H ドメインと V L ドメインが互いに交換され（ V H / V L クロス f a b ）、 C D 3 抗原結合ドメインを含む F a b 分子では、 C H 1 ドメインと C L ドメインの特定のアミノ酸が交換され（荷電変異体）、軽鎖とのより良好な対合を可能とする。図 1 H は、 h u I g G 1 P G - L A L A クロス F a b 分子としての 1 + 1 フォーマットの二重特異性 C D 3 - C D 2 8 抗原結合分子を示し、 C D 2 8 F a b 断片（ホール）では、 V H ドメイン及び C L ドメインが交換されており、 C D 3 は、抗イディオタイプ C D 3 s c F v 4 . 7 2 . 2 4 及び切断可能リンカー（ M K 0 6 2 マトリプターゼ部位）でマスクされている。図 1 I は、 h u I g G 1 P G - L A L A クロス F a b 分子としての 1 + 1 フォーマットの二重特異性 C D 3 - C D 2 8 抗原結合分子を示し、 C D 2 8 F a b 断片（ホール）では、 V H ドメイン及び C L ドメインが交換されており、 C D 3 は、抗イディオタイプ C D 3 s c F v 4 . 7 2 . 2 4 及び切断不可能リンカーでマスクされている。

10

【図 2】 C D 2 8 ( S A ) の可変ドメイン及びその変異体のアラインメントを図 2 A ~ 2 D に示す。システイン 5 0 を除去し、得られた抗 C D 2 8 結合因子の親和性を様々な程度に低下させるための C D 2 8 ( S A ) V H ドメイン及びその変異体のアラインメントを図 2 A に示す。注目すべきことに、 V H 変異体 i 及び j では、 C D 2 8 ( S A ) の C D R を I G H V 1 - 2 フレームワークから I G H V 3 - 2 3 フレームワークにグラフトした（図 2 B ）。図 2 C には、得られた抗 C D 2 8 結合因子の親和性を異なる程度に低下させるための C D 2 8 ( S A ) V L ドメイン及びその変異体のアラインメントを示す。変異体 t では、 C D R をトラスツズマブ（ハーセプチン） V L 配列のフレームワーク配列にグラフトした（図 2 D ）。

20

【図 3】図 3 A ~ 3 C では、細胞上のヒト C D 2 8 に対する上清からの単一特異性の一価 I g G フォーマットにおける親和性低下 C D 2 8 アゴニスト抗体変異体の結合を示す。陰性対照（抗 D P 4 7 ）及び元の C D 2 8 抗体 C D 2 8 ( S A ) と比較した、ヒト C D 2 8 を発現する C H O 細胞（ヒト C D 2 8 を安定的に過剰発現するように改変された親細胞株 C H O - k 1 A T C C # C C L - 6 1 ）への結合の蛍光強度中央値をフローサイトメトリーによって評定した。変異体 1 ~ 1 0 の結合曲線を図 3 A に示し、変異体 1 1 ~ 2 2 の結合曲線を図 3 B に示し、変異体 2 3 ~ 3 1 の結合曲線を図 3 C に示す。 S D を伴う技術的複製を示す。

30

【図 4】図 4 A 及び 4 B は、実施例 2 に記載の J u r k a t N F A T 活性化アッセイに関する。図 4 A は、二重特異性 C D 2 8 m A b 9 . 3 - C D 3 I g G によって媒介される J u r k a t N F A T 活性化を示す。 J u r k a t N F A T エフェクター細胞を二重特異性 C D 2 8 ( 9 . 3 ) - C D 3 I g G 又は一価対照 I g G と共にインキュベートした。 O n e G l o 基質の添加後、 5 時間のインキュベーション後に発光を測定した。各点は 3 連（ n = 2 ）の平均値を表す。図 4 B には、二重特異性 C D 2 8 ( S A ) - C D 3 I g G によって媒介される J u r k a t N F A T 活性化を示す。 J u r k a t N F A T エフェクター細胞を二重特異性 C D 2 8 ( S A ) - C D 3 I g G 又は一価対照 I g G と共にインキュベートした。 O n e G l o 基質の添加後、 5 時間のインキュベーション後に発光を測定した。各点は 3 連（ n = 2 ）の平均値を表す。図 4 C は、抗ヒト F c 抗体被覆プレート上の二重特異性 C D 2 8 ( 9 . 3 ) - C D 3 I g G によって媒介される J u r k a t N F A T 活性化を示す。 J u r k a t N F A T エフェクター細胞を二重特異性 C D 2 8 ( 9 . 3 ) - C D 3 I g G 又は一価対照 I g G と共にインキュベートした。 O n e G l o 基質の添加後、 5 時間のインキュベーション後に発光を測定した。各点は 3 連（ n = 2 ）の平均値を表す。図 4 D は、抗ヒト F c 抗体被覆プレート上の二重特異性 C D 2 8 ( S A ) - C D 3 I g G によって媒介される J u r k a t N F A T 活性化を示す。 J u r k a t N F A T エフェクター細胞を二重特異性 C D 2 8 ( S A

40

50

) - C D 3 I g G 又は一価対照 I g G と共にインキュベートした。O n e G l o 基質の添加後、5 時間のインキュベーション後に発光を測定した。各点は3 連 ( n = 2 ) の平均値を表す。図 4 E は、非被覆プレート上の二重特異性 C D 2 8 ( 9 . 3 ) - C D 3 I g G によって媒介される J u r k a t N F A T 活性化を示す。J u r k a t N F A T エフェクター細胞を二重特異性 C D 2 8 ( 9 . 3 ) - C D 3 I g G 又は一価対照 I g G と共にインキュベートした。O n e G l o 基質の添加後、5 時間のインキュベーション後に発光を測定した。各点は3 連 ( n = 2 ) の平均値を表す。図 4 F は、非被覆プレート上の二重特異性 C D 2 8 ( S A ) - C D 3 I g G によって媒介される J u r k a t N F A T 活性化を示す。J u r k a t N F A T エフェクター細胞を二重特異性 C D 2 8 ( S A ) - C D 3 I g G 又は一価対照 I g G と共にインキュベートした。O n e G l o 基質の添加後、5 時間のインキュベーション後に発光を測定した。各点は3 連 ( n = 2 ) の平均値を表す。

10

【図 5】図 5 A ~ 5 D は、4 8 時間のインキュベーション後のヒト P B M C における 1 0 n M の濃度での二重特異性 C D 3 - C D 2 8 I g G 、一価対照 I g G によって媒介される T 細胞活性化を示す ( 実施例 4 を参照されたい ) 。図 5 A には、h u F c コーティングを架橋に使用した場合の二重特異性 C D 3 - C D 2 8 ( 9 . 3 ) I g G について用量依存性 T 細胞活性化 ( I F N ガンマ放出によって測定 ) を示し、一方、図 5 B には、h u F c コーティングなしの用量依存性 T 細胞活性化 ( I F N ガンマ放出によって測定 ) を示す。図 5 C は、h u F c コーティングを架橋に使用した場合の二重特異性 C D 3 - C D 2 8 ( S A ) I g G について用量依存性 T 細胞活性化 ( I F N ガンマ放出によって測定 ) を示し、一方、図 5 D には、h u F c コーティングなしの用量依存性 T 細胞活性化 ( I F N ガンマ放出によって測定 ) を示す。

20

【図 6】図 6 A ~ 6 D は、実験において測定される T 細胞活性化を示し、プロテアーゼ活性化可能なマスクされた C D 3 - C D 2 8 I g G ( 切断可能リンカー又は切断不可能リンカーのいずれかで C D 3 に融合された、抗イデオタイプ C D 3 s c F v でマスクされた P r o - C D 3 ) も試験した。r h マトリプターゼ / S T 1 4 ( R & D S y s t e m s ) による前処理を 3 7 で 2 4 時間行った。図 6 A には、h u F c コーティングを架橋に使用した場合の二重特異性 C D 3 - C D 2 8 ( 9 . 3 ) I g G コンストラクトの用量依存性 T 細胞活性化 ( I F N ガンマ放出によって測定 ) を示し、一方、図 6 B には、h u F c コーティングを用いた用量依存性 T 細胞活性化 ( C D 8 陽性 T 細胞上の C D 6 9 の定量によって測定 ) を示す。図 6 C は、h u F c コーティングのない二重特異性 C D 3 - C D 2 8 ( S A ) I g G についての用量依存的な T 細胞活性化 ( I F N ガンマ放出によって測定される ) を示し、一方、図 6 D には、h u F c コーティングのない用量依存的な T 細胞活性化 ( C D 8 陽性 T 細胞上の C D 6 9 の定量によって測定される ) が示される。

30

【図 7】図 7 A ~ 7 D は、更なる実験において測定される T 細胞活性化を示し、プロテアーゼ活性化可能なマスクされた C D 3 - C D 2 8 ( S A ) I g G ( 切断可能リンカー又は切断不可能リンカーのいずれかで C D 3 に融合された、抗イデオタイプ C D 3 s c F v でマスクされた P r o - C D 3 ) も含まれ、h u F c 被覆対 h u F c 非被覆の影響を更に研究した。図 7 A には、h u F c コーティングを架橋に使用した場合の二重特異性 C D 3 - C D 2 8 ( S A ) I g G コンストラクトの用量依存性 T 細胞活性化 ( I F N ガンマ放出によって測定 ) を示す。図 7 B は、h u F c コーティングを架橋に使用した場合の用量依存性 T 細胞活性化 ( C D 8 陽性 T 細胞上の C D 6 9 の定量によって測定 ) を示す図である。図 7 C は、h u F c コーティングのない二重特異性 C D 3 - C D 2 8 ( S A ) I g G コンストラクトについての用量依存的な T 細胞活性化 ( I F N ガンマ放出によって測定される ) を示す。図 7 D には、h u F c コーティングのない用量依存性 T 細胞活性化 ( C D 8 陽性 T 細胞上の C D 6 9 の定量化によって測定 ) を示す。

40

【図 8】図 8 は、組換えマトリプターゼと共にインキュベートせず、1  $\mu$  l の組換えマトリプターゼ ( r h M a t ) の存在下でプロテアーゼ活性化可能なマスクされた C D 3 - C D 2 8 ( v a r . 8 ) I g G ( マトリプターゼ切断可能リンカーで C D 3 に融合された、抗イデオタイプ C D 3 s c F v でマスクされた P r o - C D 3 ) の動態を示す。

50

【図9】図9A～9Cは、異なる時点でJurkat NFAT IL2活性化（発光読み出し）を測定することによるT細胞活性化を示し、プロテアーゼ活性化可能なマスクされたCD3-CD28（Var.8）IgG（切断可能リンカー又は切断不可能リンカーのいずれかでCD3に融合された、抗イディオタイプCD3 scFvでマスクされたPro-CD3）をマスクされていないCD3-CD28（Var.8）と比較した。2時間後（図9A）、3.40時間後（図9B）及び6時間後（図9C）のマトリプターゼを用いないか又は1 $\mu$ lの組換えマトリプターゼ（rhMat）のインキュベーションによるNFAT IL2活性化を示す。

【発明を実施するための形態】

【0035】

発明の詳細な説明  
定義

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

【0036】

本明細書で使用される場合、「抗原結合分子」という用語は、最も広い意味で、抗原決定基に特異的に結合する分子を指す。抗原結合分子の例は、抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、抗体断片及び足場抗原結合タンパク質である。

【0037】

本明細書で使用される場合、「T細胞上に発現される抗原に結合する抗原結合ドメイン」又は「T細胞上に発現される抗原への特異的結合が可能な部分」という用語は、抗原CD3に特異的に結合するポリペプチド分子を指す。一態様では、抗原結合ドメインは、CD3を介したシグナル伝達を活性化することができる。特定の態様では、抗原結合ドメインは、それが付着している実体（例えば、CD28抗体）をCD3発現細胞、例えば特定のタイプのT細胞に向けることができる。CD3に特異的への特異的結合が可能な抗原結合ドメインは、本明細書で更に定義される抗体及びその断片を含む。さらに、抗原への特異的結合が可能な抗原結合ドメインは、本明細書で更に定義される足場抗原結合タンパク質、例えば、設計された反復タンパク質又は設計された反復ドメインに基づく結合ドメイン（例えば、国際公開第2002/020565号を参照されたい）を含む。

【0038】

抗原結合分子、すなわち抗体又はその断片に関して、「抗原結合ドメイン」という用語は、抗原の一部又は全部に特異的に結合し、抗原の一部又は全部に相補的である領域を含む分子の一部を指す。特異的抗原結合が可能な抗原結合ドメインは例えば、1つ以上の抗体可変ドメイン（抗体可変領域とも呼ばれる）により、提供されることができる。具体的には、特異的抗原結合が可能な抗原結合ドメインは、抗体軽鎖可変領域（VL）と、抗体重鎖可変領域（VH）とを含む。別の態様では、「腫瘍関連抗原への特異的結合が可能な抗原結合ドメイン」は、Fab断片又はクロスFab断片であってもよい。本明細書で使用される場合、抗原結合ドメイン等に関する「第1」、「第2」又は「第3」という用語は、各タイプの部分が2つ以上存在するときに区別の便宜のために使用される。これらの用語の使用は、そのように明示的に示されていない限り、部分の特定の順序又は向きを与えることを意図していない。

【0039】

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

【0040】

本明細書で使用される場合、「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗

10

20

30

40

50

体の集合から得られる抗体を指し、すなわち、集合に含まれる個々の抗体が、同一であり、及び/又は同じエピトープに結合するが、但し、例えば、天然に存在する変異又はモノクローナル抗体製剤の製造中に生じる変異を含む、可能な変異体抗体を除き、かかる変異体は、一般的に、少量存在する。様々な決定基(エピトープ)に対する様々な抗体を通常含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対するものである。

#### 【0041】

本明細書で使用される場合、「単一特異性」抗体という用語は、同じ抗原の同じエピトープにそれぞれ結合する1つ以上の結合部位を有する抗体を意味する。「二重特異性」という用語は、抗原結合分子が、少なくとも2つの別個の抗原決定基に特異的に結合することができることを意味する。典型的には、二重特異性抗原結合分子は、2つの抗原結合部位を含み、それぞれが異なる抗原決定基に対して特異的である。しかしながら、二重特異性抗原結合分子は、更なる抗原決定基に結合する更なる抗原結合部位も含み得る。特定の態様では、二重特異性抗原結合分子は、2つの抗原決定基、特に2つの異なる細胞又は同じ細胞上に発現される2つの抗原決定基に同時に結合することができる。したがって、本発明による「二重特異性」という用語は、三重特異性分子、例えばCD28抗体及び2つの異なる標的細胞抗原に向けられた2つの抗原結合ドメインを含む二重特異性分子も含み得る。

10

#### 【0042】

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

20

#### 【0043】

「完全長抗体」、「インタクトな抗体」及び「全抗体」という用語は、本明細書中で互換的に使用され、天然型抗体構造と実質的に類似の構造を有する抗体を指す。「天然抗体」は、様々な構造を有する天然に存在する免疫グロブリン分子を指す。例えば、天然IgGクラス抗体は、約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質であり、ジスルフィド結合した2つの軽鎖と2つの重鎖で構成される。N末端からC末端まで、それぞれの重鎖は、可変領域(VH)(可変重鎖ドメイン又は重鎖可変ドメインとも呼ばれる)と、その後に3つの定常ドメイン(CH1、CH2及びCH3)(重鎖定常領域とも呼ばれる)を有する。同様に、N末端からC末端まで、それぞれの軽鎖は、可変領域(VL)(可変軽鎖ドメイン又は軽鎖可変ドメインとも呼ばれる)、続いて軽鎖定常ドメイン(CL)(軽鎖定常領域とも呼ばれる)を有する。抗体の重鎖は、(IgA)、(IgD)、(IgE)、(IgG)又は $\mu$ (IgM)と呼ばれる5種類の1つに分けられてもよく、このいくつかは、例えば、1(IgG1)、2(IgG2)、3(IgG3)、4(IgG4)、1(IgA1)及び2(IgA2)等のサブタイプに更に分けられてもよい。抗体の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ( )及びラムダ( )と呼ばれる2つのタイプのいずれかに割り当てることができる。

30

40

#### 【0044】

「抗体断片」は、インタクトな抗体が結合する抗原に結合するインタクトな抗体の一部を含むインタクトな抗体以外の分子を指す。抗体断片の例としては、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab<sub>2</sub>)ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、クロスFab断片；直鎖抗体；一本鎖抗体分子(例えばscFv)；及び単一ドメイン抗体

50

が挙げられるが、これらに限定されない。特定の抗体断片の総説としては、Hudson et al., Nat Med 9, 129-134 (2003) を参照されたい。scFv断片の総説としては、例えば、Plueckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994) を参照されたい。また、国際公開第93/16185号及び米国特許第5,571,894号及び同第5,587,458号を参照されたい。サルベージ受容体結合エピトープ残基を含み、in vivoでの半減期が長くなったFab及びF(ab')<sub>2</sub>断片の説明については、米国特許第5,869,046号を参照されたい。ダイアボディは、二価又は二重特異性であってもよい2つの抗原結合部位を含む抗体断片であり、例えば、EP 404,097号；国際公開第1993/01161号；Hudson et al., Nat Med 9, 129-134 (2003)、及びHollinger et al., Proc Natl Acad Sci USA 90, 6444-6448 (1993) を参照されたい。トリアボディ及びテトラボディも、Hudson et al., Nat Med 9, 129-134 (2003) に説明されている。単ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインの全て又は一部又は軽鎖可変ドメインの全て又は一部を含む抗体断片である。特定の実施形態では、単ドメイン抗体は、ヒト単ドメイン抗体である(Domantis, Inc.、マサチューセッツ州ウォルサム；例えば、米国特許第6,248,516号B1を参照されたい)。抗体断片は、限定されないが、本明細書に記載されるように、インタクトな抗体のタンパク質分解による消化、及び組換え宿主細胞(例えば、大腸菌又はファージ)による産生を含め、種々の技術によって作られてもよい。

#### 【0045】

インタクトな抗体のパパイン消化により、2つの同一の抗原結合断片が得られ、これは、それぞれ重鎖及び軽鎖可変ドメインと、更に、軽鎖の定常ドメイン及び重鎖の第1の定常ドメイン(CH1)を含む「Fab」断片と呼ばれる。したがって、本明細書で使用される場合、「Fab断片」又は「Fab分子」という用語は、軽鎖(CL)の可変軽鎖(VL)ドメイン及び定常ドメインを含む軽鎖断片と、重鎖の可変重鎖(VH)ドメイン及び第1の定常ドメイン(CH1)を含む抗体断片を指す。Fab'断片は、抗体ヒンジ領域由来の1つ以上のシステインを含め、重鎖CH1ドメインのカルボキシ末端での数個の残基の付加によって、Fab断片とは異なる。Fab'-SHは、定常ドメインの1つ以上のシステイン残基が遊離チオール基を持つFab'断片である。ペプシン処理により、2つの抗原結合部位(2つのFab断片)と、Fc領域の一部とを有するF(ab')<sub>2</sub>断片が得られる。「従来のFab断片」は、VL-CL軽鎖及びVH-CH1重鎖で構成される。

#### 【0046】

「cross Fab断片」又は「x Fab断片」又は「クロスオーバーFab断片」という用語は、重鎖及び軽鎖の可変領域又は定常領域のいずれかが交換されたFab断片を指す。クロスオーバーFab分子の2つの可能な鎖組成が可能であり、本発明の二重特異性抗体に含まれる。一方、Fab重鎖及び軽鎖の可変領域は、置き換わっており、すなわち、クロスオーバーFab分子は、軽鎖可変(VL)ドメインと重鎖定常ドメイン(CH1)とで構成されるペプチド鎖と、重鎖可変ドメイン(VH)と軽鎖定常ドメイン(CL)とで構成されるペプチド鎖とを含む。このクロスオーバーFab分子は、cross Fab(VLVH)とも呼ばれる。一方、Fab重鎖及び軽鎖の定常領域が置き換わっている場合、クロスオーバーFab分子は、重鎖可変ドメイン(VH)と軽鎖定常ドメイン(CL)とで構成されるペプチド鎖と、軽鎖可変ドメイン(VL)と重鎖定常ドメイン(CH1)とで構成されるペプチド鎖とを含む。このクロスオーバーFab分子は、cross Fab(CLCH1)とも呼ばれる。

#### 【0047】

「単鎖Fab断片」又は「scFab」は、抗体重鎖可変ドメイン(VH)、抗体定常

ドメイン1 (CH1)、抗体軽鎖可変ドメイン (VL)、抗体軽鎖定常ドメイン (CL) 及びリンカーからなるポリペプチドであり、当該抗体ドメイン及び当該リンカーは、N末端からC末端方向に次の順序：(a) VH - CH1 - リンカー - VL - CL、(b) VL - CL - リンカー - VH - CH1、(c) VH - CL - リンカー - VL - CH1、又は (d) VL - CH1 - リンカー - VH - CLのうちの一つを有し；かつ当該リンカーは、少なくとも30アミノ酸、好ましくは32～50アミノ酸のポリペプチドである。当該単鎖 Fab断片は、CLドメインとCH1ドメインとの間の天然ジスルフィド結合によって安定化されている。さらに、これらの単鎖 Fab分子は、システイン残基の挿入（例えば、Kabataナンバリングによれば、可変重鎖の位置44及び可変軽鎖の位置100）による鎖間ジスルフィド結合の生成によって、更に安定化されるであろう。

10

## 【0048】

「クロスオーバー単鎖 Fab断片」又は「x-scfab」は、抗体重鎖可変ドメイン (VH)、抗体定常ドメイン1 (CH1)、抗体軽鎖可変ドメイン (VL)、抗体軽鎖定常ドメイン (CL) 及びリンカーからなるポリペプチドであり、当該抗体ドメイン及び当該リンカーは、N末端からC末端方向に次の順序：(a) VH - CL - リンカー - VL - CH1及び(b) VL - CH1 - リンカー - VH - CLのうちの一つを有し；VHとVLは一緒になって、ある抗原に特異的に結合する抗原結合部位を形成し、かつ当該リンカーは、少なくとも30アミノ酸のポリペプチドである。これに加え、これらのx-scfab分子は、システイン残基の挿入（例えば、Kabataナンバリングによれば、可変重鎖の位置44及び可変軽鎖の位置100）による鎖間ジスルフィド結合の生成によって、更に安定化されるであろう。

20

## 【0049】

「単鎖可変断片 (scfv)」は、10～約25アミノ酸の短いリンカーペプチドを用いて連結された、抗体の重鎖 (VH) 及び軽鎖 (VL) の可変領域の融合タンパク質である。リンカーは、通常、可撓性のためにグリシンが豊富であり、溶解度のためにセリン又はスレオニンが豊富であり、VHのN末端とVLのC末端とを、又はその逆で接続することができる。このタンパク質は、定常領域が除去され、リンカーが導入されているが、元々の抗体の特異性を保持している。scfv抗体は、例えば、Houston, J. S., Methods in Enzymol. 203 (1991) 46 - 96)に記載されている。これに加え、抗体断片は、VHドメインに特徴的な（すなわち、VLドメインと共に集合させることが可能な）、又はVLドメインに特徴的な（すなわち、機能的抗原結合部位にVHドメインと共に集合させることが可能な）単鎖ポリペプチドを含み、それによって、完全長抗体の抗原結合特性を与える。

30

## 【0050】

「足場抗原結合タンパク質」は、当該技術分野で既知であり、例えば、フィブロネクチン及び設計されたアンキリンリピートタンパク質 (DARPin) は、抗原結合ドメインの代替的な足場として使用されてきた。例えば、Gebauer and Skerra, Engineered protein scaffolds as next-generation antibody therapeutics. Curr Opin Chem Biol 13: 245 - 255 (2009) 及び Stump et al., Darpins: A new generation of protein therapeutics. Drug Discovery Today 13: 695 - 701 (2008) を参照されたい。本発明の一態様では、足場抗原結合タンパク質は、CTLA-4 (エピボディ)、リポカリン (アンチカリン)、プロテインA由来分子、例えば、プロテインAのZ-ドメイン (アフィボディ)、A-ドメイン (アビマー/マキシボディ)、血清トランスフェリン (トランスボディ)；設計されたアンキリンリピートタンパク質 (DARPin)、抗体軽鎖又は重鎖の可変ドメイン (単ドメイン抗体、sdAb)、抗体重鎖の可変ドメイン (ナノボディ、aVH)、VNAR断片、フィブロネクチン (アドネクチン)、C型レクチンドメイン (テトラネクチン)；新規抗原受容体 - ラクタマーゼの可変ドメイン (VNAR断片)、ヒト - クリスタリン又はユビキチン (ア

40

50

フィリン分子) ; ヒトプロテアーゼ阻害剤のクニッツ型ドメイン、ミクロボディ、例えば、ノッチンファミリー由来のタンパク質、ペプチドアプタマー及びフィブロネクチン(アドネクチン)からなる群から選択される。CTLA-4(細胞傷害性Tリンパ球関連抗原4)は、主にCD4<sup>+</sup>T細胞で発現するCD28ファミリー受容体である。その細胞外ドメインは、可変ドメイン様のIg折りたたみを有する。抗体のCDRに対応するループは、異なる結合特性を与えるために、異種配列と置換されてもよい。異なる結合特異性を有するように操作されたCTLA-4分子も、エビボディとして知られている(例えば、米国特許第7166697号B1)。エビボディは、抗体(例えば、ドメイン抗体)の単離された可変領域とほぼ同じ大きさである。更なる詳細については、*Journal of Immunological Methods* 248(1-2)、31-45(2001)を参照されたい。リポカリンは、ステロイド、ビリリン、レチノイド及び脂質等の小さな疎水性分子を運ぶ細胞外タンパク質のファミリーである。リポカリンは、剛性シート二次構造を有し、円錐構造の開放端に多くのループがあり、このループは、異なる標的抗原に結合するように操作することができる。アンチカリンは、160~180アミノ酸の大きさであり、リポカリンから誘導される。更なる詳細については、*Biochim Biophys Acta* 1482:337-350(2000)、米国特許第7250297号B1及び米国特許出願公開第20070224633号を参照されたい。アフィボディは、抗原に結合するように操作することが可能な、スタフィロコッカス・アウレウス(*Staphylococcus aureus*)のプロテインAに由来する足場である。ドメインは、約58アミノ酸の3つの螺旋形の束からなる。ライブラリーは、表面残基のランダム化によって作られている。更なる詳細について、*Protein Eng. Des. Sel.* 2004, 17, 455-462及び欧州特許出願公開第1641818号A1を参照されたい。アビマーは、Aドメイン足場ファミリーに由来する複数ドメインタンパク質である。約35アミノ酸の天然ドメインは、規定のジスルフィド結合した構造に適合する。多様性は、A-ドメインのファミリーによって示される天然の変動のシャッフリングによって作られる。更なる詳細については、*Nature Biotechnology* 23(12)、1556-1561(2005)及び*Expert Opinion on Investigational Drugs* 16(6)、909-917(2007年6月)を参照されたい。トランスフェリンは、モノマー血清輸送糖タンパク質である。トランスフェリンは、許容状態の表面ループへのペプチド配列の挿入によって異なる標的抗原に結合するように操作可能である。操作されたトランスフェリン足場の例としては、トランスボディが挙げられる。更なる詳細については、*J. Biol. Chem* 274、24066-24073(1999)を参照されたい。設計されたアンキリンリピートタンパク質(DARPin)は、細胞骨格の内在性膜タンパク質の接着に介在するタンパク質のファミリーであるアンキリンに由来する。単一のアンキリンリピートは、2つのらせんとターンとからなる33残基のモチーフである。単一のアンキリンリピートは、各反復の第1のらせん及びターンの中の残基をランダム化することによって異なる標的抗原に結合するように操作することができる。その結合界面は、モジュールの数を増やすことによって、増加させることができる(親和性成熟方法)。更なる詳細については、*J. Mol. Biol.* 332、489-503(2003)、*PNAS* 100(4)、1700-1705(2003)及び*J. Mol. Biol.* 369、1015-1028(2007)及び米国特許出願公開第20040132028号A1を参照されたい。一本鎖ドメイン抗体は、一本のモノマー性可変抗体ドメインからなる抗体断片である。第1の単一ドメインは、ラクダ由来の抗体重鎖の可変ドメインに由来した(ナノボディ又はV<sub>H</sub>H断片)。さらに、単一ドメイン抗体という用語は、自律的なヒト重鎖可変ドメイン(aVH)又はサメ由来V<sub>NAR</sub>断片を含む。フィブロネクチンは、抗原に結合するように操作可能な足場である。アドネクチンは、ヒトフィブロネクチンIII型(FN3)の15反復単位の10番目のドメインの天然アミノ酸配列を有する骨格からなる。ベータ-サンドイッチの片方の端にある3つのループを、アドネクチンが目的の治療標的を特異的に認識することができるように操作することができる。更なる詳細に



ついて、Protein Eng. Des. Sel. 18、435-444(2005)、米国特許出願公開第20080139791号、国際公開第2005056764号及び米国特許第6818418B1号を参照されたい。ペプチドアダプターは、定常足場タンパク質、典型的には、活性部位に挿入される拘束された可変ペプチドループを含むチオレドキシン(TrxA)からなるコンビナトリアル認識分子である。更なる詳細については、Expert Opin. Biol. Ther. 5、783-797(2005)を参照されたい。マイクロボディは、3~4のシステイン架橋を含む、25~50アミノ酸長の天然に存在するマイクロタンパク質に由来し、マイクロタンパク質の例としては、KalataBI、コトキシン及びノッチンが挙げられる。マイクロタンパク質は、マイクロタンパク質の全体的な折りたたみに影響を与えることなく、25アミノ酸までを含むように操作することができるループを有する。操作されたノッチドメインの更なる詳細については、国際公開第2008098796号を参照されたい。

#### 【0051】

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

#### 【0052】

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

#### 【0053】

本明細書で使用される場合、「抗原決定基」という用語は、「抗原」及び「エピトープ」と同義であり、抗原結合部分-抗原複合体を形成する、抗原結合部分が結合するポリペプチド高分子上の部位(例えば、アミノ酸の連続伸長部又は異なる領域の非連続アミノ酸から構成される立体配座構造)を指す。有用な抗原決定基は、例えば、腫瘍細胞の表面上に、ウイルス感染した細胞の表面上に、他の疾患細胞の表面上に、免疫細胞の表面上に、血清中で遊離して、及び/又は細胞外マトリックス(ECM)中に認めることができる。特に指定されない限り、本明細書において抗原として有用なタンパク質は、哺乳動物、例えば、霊長類(例えばヒト)及び齧歯類(例えば、マウス及びラット)を含め、任意の脊椎動物源由来の任意の天然形態のタンパク質であってもよい。特定の実施形態では、抗原は、ヒトタンパク質である。本明細書において特定のタンパク質が言及される場合、この用語は「完全長」の未処理のタンパク質と、細胞内でのプロセッシングにより得られる任意の形態のタンパク質とを包含する。この用語はまた、天然に存在するタンパク質変異体、例えば、スプライス変異体又は対立遺伝子変異体を包含する。

#### 【0054】

「特異的結合」とは、結合が抗原について選択的であり、望ましくない又は非特異的な相互作用とは区別可能であることを意味する。抗原結合分子が特定の抗原に結合する能力は、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)又は当該技術分野で知られている他の技術、例えば、表面プラズモン共鳴(SPR)技術(BIACore装置で分析される)(Liljeblad et al., Glyco J 17, 323-329(2000))、及び従来結合アッセイ(Heeley, Endocr Res 28, 217-229(2002))によって測定することができる。一実施形態では、抗原結合分子の無関係なタンパク質への結合の程度は、例えばSPRによって測定した場合、抗原結合分子の抗原への結合の約10%未満である。特定の実施形態では、抗原に結合する分子は、解離定数(Kd)が、1 $\mu$ M、100nM、10nM、1nM、0.1nM、0.01nM又は0.001nM(例えば、10<sup>-8</sup>M以下、例えば、10<sup>-8</sup>M~10

$10^{-13}$  M、例えば、 $10^{-9}$  M ~  $10^{-13}$  M) である。

【0055】

「親和性」又は「結合親和性」は、分子の単一の結合部位（例えば、抗体）と、その結合対（例えば、抗原）との間の非共有結合性相互作用の合計強度を指す。特に指定されない限り、本明細書で使用される場合、「結合親和性」は、結合対（例えば、抗体と抗原）のメンバー間の1:1相互作用を反映する固有の結合親和性を指す。分子Xのその結合対Yに対する親和性は、一般的に、解離定数（ $K_d$ ）によって表すことができ、脱離速度定数と解離速度定数（それぞれ  $k_{off}$  及び  $k_{on}$ ）の比である。したがって、速度定数の比が同じである限り、同等の親和性が異なる速度定数を含み得る。親和性は、本明細書に記載するものを含め、当該技術分野で一般的な方法によって測定することができる。親和性を測定する特定の方法は、表面プラズモン共鳴（SPR）である。

10

【0056】

本明細書で使用される場合、「T細胞抗原」は、Tリンパ球、特に細胞傷害性Tリンパ球の表面に提示される抗原決定基を指す。

【0057】

本明細書で使用される場合、「T細胞活性化治療剤」は、対象にT細胞活性化を誘導することができる治療剤、特に対象にT細胞活性化を誘導するために設計された治療剤を指す。T細胞活性化治療剤の例としては、CD3等の活性化T細胞抗原、及びCD28等の別の抗原に特異的に結合する二重特異性抗体が挙げられる。

【0058】

本明細書で使用される場合、「活性化T細胞抗原」は、Tリンパ球、特に細胞傷害性Tリンパ球によって発現される抗原決定基を指し、抗原結合分子との相互作用時にT細胞活性化を誘導又は増強することができる。具体的には、抗原結合分子のT細胞活性化抗原との相互作用は、T細胞受容体複合体のシグナル伝達のカスケードをトリガーすることによりT細胞活性化を誘導することができる。例示的な活性化T細胞抗原はCD3である。

20

【0059】

特に指定されない限り、「CD3」という用語は、霊長類（例えばヒト）、非ヒト霊長類（例えばカニクイザル）及び齧歯類（例えばマウス及びラット）等の哺乳動物を含む任意の脊椎動物源に由来する任意の天然CD3を指す。この用語は「完全長」の未処理のCD3と、細胞内でのプロセッシングにより得られる任意の形態のCD3とを包含する。この用語は、CD3の天然に存在する変異体、例えば、スプライス変異体又は対立遺伝子変異体も包含する。一実施形態では、CD3は、ヒトCD3、特にヒトCD3のイプシロンサブユニット（CD3 $\epsilon$ ）である。ヒトCD3 $\epsilon$ のアミノ酸配列は、UniProt ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)) 受託番号 P07766 (バージョン144)、又はNCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)) RefSeq NP\_000724.1 に示されている。配列番号70も参照されたい。カニクイザル [*Macaca fascicularis*] CD3 $\epsilon$ のアミノ酸配列は、NCBI GenBank 番号 BAB71849.1 に示されている。配列番号71も参照されたい。

30

【0060】

「CD28」（分化クラスター28、Tp44）は、特に指定されない限り、霊長類（例えばヒト）、非ヒト霊長類（例えばカニクイザル）及び齧歯（例えば、マウス及びラット）等の哺乳動物を含む任意の脊椎動物供給源由来の任意のCD28タンパク質を指す。CD28はT細胞上で発現され、T細胞の活性化及び生存に必要な共刺激シグナルを提供する。T細胞受容体（TCR）に加えてCD28によるT細胞刺激は、様々なインターロイキンの産生のための強力なシグナルを提供することができる。CD28は、CD80（B7.1）及びCD86（B7.2）タンパク質の受容体であり、ナイーブT細胞上に構成的に発現される唯一のB7受容体である。ヒトCD28のアミノ酸配列は、UniProt ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org)) 受託番号 P10747 (配列番号1) に示されている。

40

【0061】

50

「アゴニスト抗体」とは、所与の受容体に対するアゴニスト機能を備える抗体を指す。一般に、アゴニストリガンド（因子）が受容体に結合すると、受容体タンパク質の三次構造が変化し、受容体が活性化される（受容体が膜タンパク質である場合、細胞増殖シグナル等が、通常、形質導入される（transduced））。受容体が二量体形成型である場合、アゴニスト抗体は受容体を適切な距離及び角度で二量体化することができ、したがってリガンドと同様に作用する。適切な抗受容体抗体は、リガンドによって行われる受容体の二量体化を模倣することができ、したがって、アゴニスト抗体になり得る。

【0062】

「CD28アゴニスト抗原結合分子」又は「CD28従来のアゴニスト抗原結合分子」は、T細胞受容体シグナル（「シグナル2」）の存在下でT細胞活性化を増強する役割においてCD28天然リガンド（CD80又はCD86）を模倣する抗原結合分子である。T細胞は、完全に活性化されるために2つのシグナルを必要とする。生理学的条件下では、「シグナル1」は、T細胞受容体（TCR）分子と抗原提示細胞（APC）上のペプチド/主要組織適合遺伝子複合体（MHC）複合体との相互作用から生じ、「シグナル2」は共刺激受容体、例えばCD28の連結によって提供される。CD28アゴニスト抗原結合分子は、T細胞を共刺激することができる（シグナル2）。それはまた、TCR複合体に対する特異性を有する分子と組み合わせてT細胞増殖及びサイトカイン分泌を誘導することができるが、CD28アゴニスト抗原結合分子は、TCRの更なる刺激なしにT細胞を完全に活性化することができない。しかしながら、CD28特異的抗原結合分子のサブクラス、いわゆるCD28スーパーアゴニスト抗原結合分子が存在する。「CD28スーパーアゴニスト抗原結合分子」は、TCRを更に刺激することなくT細胞を完全に活性化することができるCD28抗原結合分子である。CD28スーパーアゴニスト抗原結合分子は、事前のT細胞活性化なしにT細胞増殖及びサイトカイン分泌を誘導することができる（シグナル1）。

【0063】

本明細書で使用される場合、「イディオタイプ特異的ポリペプチド」は、抗原結合ドメイン、例えばCD3に特異的な抗原結合ドメインのイディオタイプを認識するポリペプチドを指す。イディオタイプ特異的ポリペプチドは、抗原結合ドメインの可変領域への特異的結合が可能であり、それによって抗原結合ドメインのその同族抗原への特異的結合を低減又は防止することができる。抗原結合ドメインを含む分子と会合すると、イディオタイプ特異的ポリペプチドは分子のマスキング部分として機能することができる。本明細書で具体的に開示されるのは、抗CD3結合分子のイディオタイプに特異的な抗イディオタイプ抗体又は抗イディオタイプ結合抗体断片である。

【0064】

本明細書で使用される場合、「プロテアーゼ」又は「タンパク質分解酵素」は、認識部位でリンカーを切断し、標的細胞によって発現される任意のタンパク質分解酵素を指す。かかるプロテアーゼは、標的細胞によって分泌されるか、又は例えば標的細胞表面上で標的細胞と会合したままであり得る。プロテアーゼの例としては、メタロプロテイナーゼ、例えばマトリックスメタロプロテイナーゼ1-28、並びにディスインテグリン及びメタロプロテイナーゼ（ADAM）2、7~12、15、17~23、28~30及び33、セリンプロテアーゼ、例えばウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子及びマトリプターゼ、システインプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ、並びにカテプシンファミリーのメンバーが挙げられるが、これらに限定されない。特定の例は、配列番号164のアミノ酸配列を含むヒトマトリプターゼである。

【0065】

二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子に関して本明細書で使用される場合、「プロテアーゼ活性化可能」は、CD3に結合する二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子の能力を低減又は抑止するマスキング部分により、T細胞を活性化する能力が低減又は抑止された二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子を指す。タンパク質分解的切断によって、例えば、マスキング部分を二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子に接続す

10

20

30

40

50

るリンカーのタンパク質分解的切断によってマスキング部分が解離すると、CD3への結合が回復し、それによってT細胞活性化二重特異性分子が活性化される。

【0066】

本明細書で使用される場合、「可逆的に隠す」とは、例えば抗原結合ドメイン又はイディオタイプ特異的ポリペプチドの抗原、例えばCD3への結合を防止するための、抗原結合ドメイン又は分子へのマスキング部分又はイディオタイプ特異的ポリペプチドの結合を指す。この隠すこと (concealing) は、イディオタイプ特異的ポリペプチドが、例えばプロテアーゼ切断によって抗原結合ドメイン又は分子から放出され、それによって抗原結合ドメイン又は分子を解放してその抗原に結合させることができるという点で可逆的である。

【0067】

「可変ドメイン」又は「可変領域」という用語は、抗原に対する抗原結合分子の結合に関与する抗体重鎖又は軽鎖のドメインを指す。天然の抗体の重鎖及び軽鎖の可変ドメイン (それぞれVH及びVL) は、概して、類似の構造を有しており、各ドメインは、4つの保存されたフレームワーク領域 (FR) と、3つの超可変領域 (HVR) とを含む。例えば、Kindt et al., Kuby Immunology, 6th, W. H. Freeman and Co., page 91 (2007) を参照されたい。単一のVH又はVLドメインは、抗原結合特異性を付与するために十分であり得る。

【0068】

本明細書で使用される場合、「超可変領域」又は「HVR」という用語は、配列内で超可変可能であり、抗原結合特異性を決定する、抗原結合可変ドメインの領域、例えば「相補性決定領域」 (CDR) のそれぞれを意味する。一般的に、抗原結合ドメインは、6個のCDRを含み、VHに3個 (CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3)、VLに3個 (CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3) 含む。本明細書における例示的なCDRとしては、

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

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

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

【0069】

特に指定されない限り、CDRは、上記Kabat et al. に従い決定される。当業者は、CDRの表記は、上記Chothia、上記MacCallum、又は、任意の他の、科学的に受け入れられた命名法に従い決定することができることを理解するであろう。Kabat et al. はまた、任意の抗体に適用可能な可変領域配列のナンバリングシステムも定義した。当業者は、任意の可変領域配列に対し、配列自体を超える実験データに頼ることなく、「Kabatナンバリング」のこのシステムを明確に割り当てることができる。本明細書で使用される場合、「Kabatナンバリング」は、Kabat et al., U. S. Dept. of Health and Human Services, 'Sequence of Proteins of Immunological Interest' (1983) に記載されるナンバリングシステムを指す。特

10

20

30

40

50

に明記されない限り、抗体可変領域中の特定のアミノ酸残基の位置のナンバリングに関する言及は、K a b a tナンバリングシステムに従う。

【0070】

本明細書で使用される場合、抗原結合分子（例えば、抗体）に関連して「親和性成熟」という用語は、参照抗原結合分子に由来し、例えば突然変異により、参照抗体と同じ抗原に、好ましくは同じエピトープに結合し、抗原に対して、参照抗原結合分子よりも高い親和性を有する抗原結合分子を指す。親和性成熟は、一般に、抗原結合分子の1つ以上のCDR中の1つ以上のアミノ酸残基の修飾を含む。典型的には、親和性成熟抗原結合分子は、最初の参照抗原結合分子と同じエピトープに結合する。

【0071】

「フレームワーク」又は「FR」は、超可変領域（HVR）残基以外の可変ドメイン残基を指す。可変ドメインのFRは、一般的に、FR1、FR2、FR3及びFR4の4つのFRドメインからなる。したがって、HVR及びFR配列は、一般的に、VH（又はVL）中において以下の配列で現れる：FR1 - H1（L1） - FR2 - H2（L2） - FR3 - H3（L3） - FR4。

【0072】

本明細書の目的のための「アクセプターヒトフレームワーク」は、以下に定義される、ヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワークに由来する、軽鎖可変ドメイン（VL）フレームワーク又は重鎖可変ドメイン（VH）フレームワークのアミノ酸配列を含むフレームワークである。ヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワーク「由来の」アクセプターヒトフレームワークは、その同じアミノ酸配列を含んでいてもよく、又はアミノ酸配列の変更を含んでいてもよい。いくつかの実施形態では、アミノ酸変化の数は、10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下、又は2以下である。いくつかの実施形態では、VLアクセプターヒトフレームワークは、VLヒト免疫グロブリンフレームワーク配列又はヒトコンセンサスフレームワーク配列に対して、配列が同一である。

【0073】

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

【0074】

抗体の「クラス」は、その重鎖が保有する定常ドメイン又は定常領域の種類を指す。抗体の5つの主要なクラス、即ち、IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgMであり、これらのうちのいくつかは、サブクラス（アイソタイプ）、例えば、IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub>、IgA<sub>1</sub>、及びIgA<sub>2</sub>に更に分けることができる。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、 $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$ 、及び $\alpha$ と呼ばれる。

【0075】

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

【0076】

「ヒト」抗体は、ヒト又はヒト細胞によって産生されるか、又はヒト抗体のレパートリー又は他のヒト抗体コード配列を利用する非ヒト源から誘導される抗体のアミノ酸配列に

10

20

30

40

50

対応するアミノ酸配列を有するものである。このヒト抗体の定義は、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を特異的に除外する。

【0077】

「CH1ドメイン」という用語は、おおよそEU位置118からEU位置215まで延びる抗体重鎖ポリペプチドの部分を表す(KabatによるEUナンバリングシステム)。一態様では、CH1ドメインは、ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSQV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVD KKV(配列番号165)のアミノ酸配列を有する。通常、EPKSC(配列番号168)のアミノ酸配列を有するセグメントは、続いてCH1ドメインをヒンジ領域に連結する。

10

【0078】

「ヒンジ領域」という用語は、野生型抗体重鎖においてCH1ドメインとCH2ドメインとを結合する抗体重鎖ポリペプチドの一部(例えば、KabatのEUナンバリングシステムにより、約216の位置から約230の位置まで、又は約226の位置から約230の位置まで)を表す。他のIgGサブクラスのヒンジ領域は、IgG1サブクラス配列のヒンジ領域システイン残基と整列させることによって決定することができる。ヒンジ領域は、通常、同一のアミノ酸配列を有する2つのポリペプチドからなる二量体分子である。ヒンジ領域は、一般に、25個までのアミノ酸残基を含み、柔軟であり、関連する標的結合部位が独立して動くことを可能にする。ヒンジ領域は、上部、中央、及び下部ヒンジドメイン(例えば、Roux, et al., J. Immunol. 161(1998)4083を参照されたい)の3つのドメインに細分することができる。

20

【0079】

一態様では、ヒンジ領域は、アミノ酸配列DKTHTCPXCP(配列番号169)を有し、XはS又はPのいずれかである。一態様では、ヒンジ領域は、アミノ酸配列HTCPXCP(配列番号170)を有し、XはS又はPのいずれかである。一態様では、ヒンジ領域はアミノ酸配列CPXCP(配列番号171)を有し、XはS又はPのいずれかである。

【0080】

「Fcドメイン」又は「Fc領域」との用語は、本明細書において、定常領域の少なくとも一部を含む抗体重鎖のC末端領域を定義するために使用される。この用語は、天然配列Fc領域と変異体Fc領域を含む。IgG Fc領域は、IgG CH2及びIgG CH3ドメインを含む。

30

【0081】

ヒトIgG Fc領域の「CH2ドメイン」は、通常、約EU位置231のアミノ酸残基から約EU位置340のアミノ酸残基(KabatによるEUナンバリングシステム)まで延在する。一態様では、CH2ドメインは、APELLGGPSV FLFPKPK KDT LMISRTPEVT CVWDVSHEDP EVKFNWYVDG VEV HNAKTKP REEQESTYRW SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISSKAK(配列番号166)のアミノ酸配列を有する。CH2ドメインは、別のドメインと密接に対合されないという点で特有である。むしろ、インタクトネイティブFc領域の2つのCH2ドメインの間には、2つのN-linked分岐炭水化物鎖が介在している。炭水化物がドメイン-ドメイン対合の代替を提供し、CH2ドメインを安定させるのに役立ち得ることが推測されている。Burton, Mol. Immunol. 22(1985)161-206。一実施形態では、炭水化物鎖は、CH2ドメインに付着している。本明細書のCH2ドメインは、天然配列CH2ドメイン又は変異体CH2ドメインであり得る。

40

【0082】

「CH3ドメイン」は、Fc領域中のCH2ドメインのC末端側の残基のストレッチを含み、おおよそEU位置341からEU位置446まで延びる抗体重鎖ポリペプチドの部分

50

を表す (KabatによるEUナンバリングシステム)。一態様では、CH<sub>3</sub>ドメインは、GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (配列番号167) のアミノ酸配列を有する。本発明のCH<sub>3</sub>領域は、天然配列CH<sub>3</sub>ドメイン又は変異体CH<sub>3</sub>ドメインであってもよい (例えば、その1つの鎖に導入された「隆起」(「ノブ」) を有し、その他の鎖に導入された対応する「空洞」(「ホール」) を有するCH<sub>3</sub>ドメイン; 本明細書に参考として明確に組み込まれる米国特許第5,821,333号を参照されたい)。このような変異体CH<sub>3</sub>ドメインは、本明細書に記載の2つの非同抗体重鎖のヘテロ二量体化を促進するために使用することができる。一実施形態では、ヒトIgG重鎖Fc領域は、Cys226から、又はPro230から、重鎖のカルボキシル末端までに及ぶ。しかしながら、Fc領域のC末端のリジン(Lys447)は、存在する場合もあれば、しない場合もある。本明細書で特に明記しない限り、Fc領域又は定常領域のアミノ酸残基のナンバリングは、Kabat等のSequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991に記載されているように、EUインデックスとも呼ばれるEUナンバリングシステムに従う。

10

#### 【0083】

「ノブ・イントゥ・ホール(knob-into-hole)」技術は、例えば、米国特許第5,731,168号明細書、米国特許第7,695,936号明細書、Ridgway et al., Prot Eng 9, 617-621 (1996) 及びCarter, J Immunol Meth 248, 7-15 (2001) に記載されている。通常、この方法は、隆起がそれに対応する空洞内に位置できるように、第1のポリペプチドの接触面に隆起(「ノブ」)を、及び第2のポリペプチドの接触面に対応する空洞を、それぞれ導入することにより、ヘテロ二量体形成を促進し、かつホモ二量体形成を妨害することを含む。隆起は、第1のポリペプチドの接触面からの小さなアミノ酸側鎖をそれより大きな側鎖(例えばチロシン又はトリプトファン)で置き換えることにより構築される。隆起と同じ又は同様のサイズの相補的空洞は、大きなアミノ酸側鎖をそれよりも小さなもの(例えばアラニン又はスレオニン)で置き換えることにより、第2のポリペプチドの接触面に作り出される。隆起と空洞は、ポリペプチドをコードする核酸を、例えば部位特異的突然変異誘発により、又はペプチド合成により変化させることによって作り出すことができる。特定の実施形態では、ノブ修飾は、Fcドメインの2つのサブユニットのうちの一つにアミノ酸置換T366Wを含み、ホール修飾は、Fcドメインの2つのサブユニットのうち他方の一つにアミノ酸置換T366S、L368A及びY407Vを含む。更なる具体的な実施形態では、ノブ修飾を含むFcドメインのサブユニットは、アミノ酸置換S354Cを更に含み、ホール修飾を含むFcドメインのサブユニットは、アミノ酸置換Y349Cを更に含む。これら2つのシステイン残基の導入によって、Fc領域の2つのサブユニット間にジスルフィド架橋が生成し、それにより、ダイマーを更に安定化する(Carter, J Immunol Methods 248, 7-15 (2001))。

20

30

40

#### 【0084】

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

50

)。

【0085】

「野生型Fcドメイン」という用語は、自然界で見出されるFcドメインのアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を意味する。野生型ヒトFcドメインとしては、天然ヒトIgG1 Fc領域（非A及びAアロタイプ）、天然ヒトIgG2 Fc領域、天然ヒトIgG3 Fc領域及び天然ヒトIgG4 Fc領域、並びにその天然変異体が挙げられる。野生型Fc領域は、配列番号172（IgG1、白人型アロタイプ）、配列番号173（IgG1、アフロアメリカン型アロタイプ）、配列番号174（IgG2）、配列番号175（IgG3）及び配列番号176（IgG4）に示される。

【0086】

「変異体（ヒト）Fcドメイン」という用語は、少なくとも1つの「アミノ酸変異」によって「野生型」（ヒト）Fcドメインアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を示す。一態様では、変異体Fc領域は、天然Fc領域と比較して少なくとも1つのアミノ酸変異、例えば約1～約10個のアミノ酸変異、一態様では天然Fc領域中に約1～約5個のアミノ酸変異を有する。一態様では、（変異体）Fc領域は、野生型Fc領域と少なくとも約95%の相同性を有する。

【0087】

「エフェクター機能」という用語は、抗体のFc領域に帰属可能な生物活性を指し、抗体アイソタイプによって変わる。抗体エフェクター機能の例としては、C1q結合及び補体依存性細胞傷害（CDC）、Fc受容体結合、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）、抗体依存性細胞貪食（ADCP）、サイトカイン分泌、抗原提示細胞による免疫複合体媒介抗原取り込み、細胞表面受容体（例えば、B細胞受容体）の下方制御；及びB細胞の活性化が挙げられる。

【0088】

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

【0089】

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

【0090】

- FcRI（CD64）は、単量体IgGに高い親和性で結合し、マクロファージ、単球、好中球、及び好酸球にて発現する。アミノ酸残基E233～G236、P238、D265、N297、A327、及びP329（KabataのEUインデックスに従ったナンバリング）の少なくとも1つにおける、Fc領域内での修飾によって、FcRIへの結合が低下する。IgG1及びIgG4に置換された、位置233～236におけるI

10

20

30

40

50



g G 2 残基は、F c R I への結合を  $10^3$  倍低下させ、抗体により感作される赤血球に対するヒト単核細胞応答を取り除いた (Armour, K. L., et al., Eur. J. Immunol. 29 (1999) 2613 - 2624)。

【0091】

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

10

【0092】

- F c R I I I (C D 1 6) は I g G に、中程度 ~ 低度の親和性で結合し、2つの種類として存在する。F c R I I I A は、NK細胞、マクロファージ、好酸球、並びにいくつかの単球及びT細胞上に見られ、ADCCを媒介する。F c R I I I B は好中球上に高度に発現される。F c R I I I A に対する結合の低下は、例えば、少なくとも、アミノ酸残基 E 2 3 3 ~ G 2 3 6、P 2 3 8、D 2 6 5、N 2 9 7、A 3 2 7、P 3 2 9、D 2 7 0、Q 2 9 5、A 3 2 7、S 2 3 9、E 2 6 9、E 2 9 3、Y 2 9 6、V 3 0 3、A 3 2 7、K 3 3 8、及び D 3 7 6 (KabataのEUIンデックスに従ったナンバリング) の1つにおいて変異を有する I g G F c 領域を含む抗体に対して発見されている。

20

【0093】

F c 受容体に対する、ヒト I g G 1 上での結合部位のマッピング、上述した変異部位、並びに F c R I 及び F c R I I A への結合を測定する方法は、Shields, R. L., et al. J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591 - 6604 に記載されている。

30

【0094】

「ADCC」又は「抗体依存性細胞傷害性」という用語は、免疫エフェクター細胞による抗体被覆標的細胞の溶解をもたらす免疫機構である。標的細胞は、F c 領域を含む抗体又はその誘導体が、一般的に F c 領域に対して N 末端であるタンパク質部分を介して、特異的に結合する細胞である。本明細書で使用される場合、「減少した ADCC」という用語は、上記で定義された ADCC の機構による、標的細胞を取り囲む培地中の所与の濃度の抗体で所与の時間に溶解される標的細胞の数の減少、及び / 又は ADCC の機構による、所与の時間に所与の数の標的細胞の溶解を達成するために必要な、標的細胞を取り囲む培地中の抗体の濃度の増加のいずれかとして定義される。ADCC の減少は、同じ標準的な産生、精製、製剤化及び保存の方法 (当業者に知られている) を使用して、同じ種類の宿主細胞によって産生される同じ抗体によって媒介されるが、操作されていない ADCC と比較している。例えば、その F c ドメインに、ADCC を低下させるアミノ酸置換を含む抗体によって媒介される ADCC の低下は、F c ドメイン中にこのアミノ酸置換を含まない同じ抗体によって媒介される ADCC に対するものである。ADCC を測定するのに適したアッセイは、当該技術分野で周知である (例えば、PCT 国際公開第 2006 / 082515 号又は同第 2012 / 130831 号を参照されたい)。例えば、ADCC を媒介する初期工程を誘発する抗体の能力は、F c R I 及び / 若しくは F c R I I A 又

40

50

は（本質的にFc RIIIAを発現する）NK細胞を組み換えにより発現する細胞といった、Fc受容体を発現する細胞への、抗体の結合を測定することにより調査される。特に、NK細胞上でのFc Rへの結合が測定される。

【0095】

「活性化Fc受容体」は、抗体のFc領域による結合に続いて、受容体保有細胞を刺激してエフェクター機能を実行するシグナル伝達事象を誘発するFc受容体である。活性化Fc受容体としては、FcRIIIa（CD16a）、FcRI（CD64）、FcRIIIa（CD32）及びFcRI（CD89）が挙げられる。特定の活性化Fc受容体は、ヒトFcRIIIaである（配列番号177、UniProt受託番号P08637、バージョン141）。

10

【0096】

「エクトドメイン」は、細胞外空間（すなわち、標的細胞の外側の空間）に伸長する膜タンパク質のドメインである。エクトドメインは、通常、シグナル伝達をもたらす表面との接触を開始するタンパク質の部分である。

【0097】

「ペプチドリンカー」という用語は、1つ以上のアミノ酸、典型的には、約2～20のアミノ酸を含むペプチドを指す。ペプチドリンカーは、当該技術分野で公知であるか、又は本明細書に記載される。好適な、非免疫原性リンカーペプチドは例えば、(G4S)<sub>n</sub>、(SG4)<sub>n</sub>又はG4(SG4)<sub>n</sub>ペプチドリンカーであり、式中、「n」は一般に、1～5、典型的には2～4、特に2の数字であり、すなわち、ペプチドは、GGGGS（配列番号178）、GGGGSGGGGS（配列番号179）、SGGGGS（配列番号180）及びGGGGSGGGGS（配列番号183）からなる群から選択されるが、配列GSPGSSSSGS（配列番号182）、(G4S)<sub>3</sub>（配列番号183）、(G4S)<sub>4</sub>（配列番号184）、GSGSGSGS（配列番号185）、GSGSGNGS（配列番号186）、GSGSGSGS（配列番号187）、GSGSGS（配列番号188）、GSGS（配列番号189）、GSGNGSGS（配列番号190）、GGNGSGSG（配列番号191）及びGGNGSG（配列番号192）もまた含む。特に興味深いペプチドリンカーは、(G4S)（配列番号178）、(G4S)<sub>2</sub>又はGGGGSGGGGS（配列番号179）、(G4S)<sub>3</sub>（配列番号183）及び(G4S)<sub>4</sub>（配列番号184）である。ペプチドリンカーの特定の群は、本明細書に記載のプロテアーゼ切断可能リンカーである。

20

30

【0098】

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

40

【0099】

「融合した」又は「接続した」とは、構成要素（例えば、上記TNFリガンドファミリーメンバーのポリペプチド及びエクトドメイン）がペプチド結合によって直接又は1つ以上のペプチドリンカーを介して連結されていることを意味する。

【0100】

参照ポリペプチド（タンパク質）配列に対する「アミノ酸配列同一性パーセント（％）」は、これらの配列を整列させ、最大の配列同一性パーセントを達成するために必要に応じてギャップを導入し、配列同一性の一部としていかなる保存的置換も考慮しない場合の、該参照ポリペプチド配列中のアミノ酸残基と同一である、候補配列中のアミノ酸残基の

50

割合と定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを決定するためのアラインメントは、例えば、公的に入手可能なBLAST、BLAST-2、ALIGN等のコンピュータソフトウェアを使用して、当該技術分野の技術の範囲内にある種々の様式で達成され得る。SAWI又はMegalign(DNASTAR)ソフトウェアを用いて達成することができる。当業者であれば、比較される配列の全長にわたって最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、配列のアラインメントのための適切なパラメータを決定することができる。しかしながら、本明細書での目的のために、アミノ酸配列同一性%値は、配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を用いて生成している。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムは、Genentech, Inc.が作成したものであり、ソースコードは、使用者用書類と共に、米国著作権局、Washington D.C.、20559に提出され、米国著作権登録番号TXU510087として登録されている。ALIGN-2プログラムは、Genentech, Inc. (South San Francisco, California)から公的に入手可能であり、又はそのソースコードからコンパイルし得る。ALIGN-2プログラムは、デジタルUNIX V4.0Dを含め、UNIXオペレーティングシステムで使用するためにコンパイルされるべきである。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定されており、変わらない。ALIGN-2がアミノ酸配列比較に用いられる状況では、所与のアミノ酸配列Bへの、アミノ酸配列Bとの、又はアミノ酸配列Bに対する、所与のアミノ酸配列Aのアミノ酸配列同一性% (或いは、所与のアミノ酸配列Bへの、アミノ酸配列Bとの、又はアミノ酸配列Bに対する、特定のアミノ酸配列同一性%を有する又は含む、所与のアミノ酸配列Aとして記述され得る)は、以下のように計算される：分数X/Yの100倍(Xは、配列アラインメントプログラムALIGN-2により、AとBのそのプログラムのアラインメントにおいて同一性マッチとしてスコアリングされたアミノ酸残基の数であり、Yは、Bのアミノ酸残基の合計数である)。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さとは異なる場合、AのBに対する%アミノ酸配列同一性は、BのAに対する%アミノ酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。特に明記しない限り、本明細書で使用される場合、全ての%アミノ酸配列同一性値は、ALIGN-2コンピュータプログラムを使用して、直前の段落で説明したように得られる。

10

20

#### 【0101】

特定の実施形態では、本明細書で提供する、CD28抗原結合分子のアミノ酸配列変異体が想到される。例えば、CD28抗原結合分子の結合親和性、及び/又は他の生物学的性質を改善するのが望ましい場合がある。CD28抗原結合分子のアミノ酸配列変異体は、分子をコードするヌクレオチド配列に適切な修飾を導入することによって、又はペプチド合成によって調製され得る。かかる改変としては、例えば、抗体のアミノ酸配列内の残基からの欠失、及び/又は抗体のアミノ酸配列内の残基への挿入、及び/又は抗体のアミノ酸配列内の残基の置換が挙げられる。最終コンストラクトが所望の特性、例えば、抗原結合を有していることを条件として、欠失、挿入、及び置換の任意の組み合わせを、最終コンストラクトに到達させるために作ることができる。置換変異誘発の対象となる部位には、HVR及びフレームワーク(FR)が含まれる。保存的置換は、「好ましい置換」の見出しで表Bに与えられており、アミノ酸側鎖クラス(1)~(6)を参照しつつ、以下に更に記載される。アミノ酸置換は、目的の分子に導入することができ、その産物は、所望の活性、例えば、抗原結合の保持/改善、免疫原性の低下、又はADCC若しくはCDCの改善についてスクリーニングされる。

30

40

## 【表 A】

表 A

| 元残基     | 例示置換                            | 好ましい置換 |
|---------|---------------------------------|--------|
| Ala (A) | Val; Leu; Ile                   | Val    |
| Arg (R) | Lys; Gln; Asn                   | Lys    |
| Asn (N) | Gln; His; Asp; Lys; Arg         | Gln    |
| Asp (D) | Glu; Asn                        | Glu    |
| Cys (C) | Ser; Ala                        | Ser    |
| Gln (Q) | Asn; Glu                        | Asn    |
| Glu (E) | Asp; Gln                        | Asp    |
| Gly (G) | Ala                             | Ala    |
| His (H) | Asn; Gln; Lys; Arg              | Arg    |
| Ile (I) | Leu; Val; Met; Ala; Phe; ノルロイシン | Leu    |
| Leu (L) | ノルロイシン; Ile; Val; Met; Ala; Phe | Ile    |
| Lys (K) | Arg; Gln; Asn                   | Arg    |
| Met (M) | Leu; Phe; Ile                   | Leu    |
| Phe (F) | Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr    | Tyr    |
| Pro (P) | Ala                             | Ala    |
| Ser (S) | Thr                             | Thr    |
| Thr (T) | Val; Ser                        | Ser    |
| Trp (W) | Tyr; Phe                        | Tyr    |
| Tyr (Y) | Trp; Phe; Thr; Ser              | Phe    |
| Val (V) | Ile; Leu; Met; Phe; Ala; ノルロイシン | Leu    |

10

20

30

## 【0102】

アミノ酸は共通の側鎖特性に従ってグループ化することができる。

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

40

## 【0103】

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

## 【0104】

「アミノ酸配列変異体」という用語は、親抗原結合分子（例えば、ヒト化抗体又はヒト抗体）の1つ以上の超可変領域残基中にアミノ酸置換が存在する実質的な変異体を含む。一般的に、更なる試験のために選択され、得られた1つ以上の変異体は、親抗原結合分子と比較して、特定の生物学的特性の修飾（例えば、改善）（例えば、親和性の増加、免疫原性の低下）を有し、及び/又は親抗原結合分子の特定の生物学的特性を実質的に保持し

50

ているであろう。例示的な置換変異体は、親和性成熟した抗体であり、例えば、本明細書に記載されるようなファージディスプレイに基づく親和性成熟技法を使用して、簡便に生成され得る。簡潔には、1つ以上のHVR残基は、突然変異しており、ファージディスプレイされ、特定の生体活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングされた変異体抗原結合分子である。特定の実施形態では、置換、挿入又は欠失は、このような変更が、抗原結合分子が抗原に結合する能力を実質的に減らさない限り、1つ以上のHVR内で起こってもよい。例えば、結合親和性を実質的に低下させない保存的改変（例えば、本明細書に提供される保存的置換）が、HVR中で行われてよい。突然変異誘発を標的とし得る抗体の残基又は領域の同定のための有用な方法は、Cunningham and Wells (1989) Science, 244: 1081 - 1085 によって記載されるように、「アラニンスキャンニング突然変異誘発」と呼ばれる。この方法では、抗体と抗原との相互作用が影響を受けるかどうかを決定するために、残基又は標的残基群（例えば、帯電した残基、例えば、Arg、Asp、His、Lys及びGlu）が同定され、中性又は負に帯電したアミノ酸（例えば、アラニン又はポリアラニン）によって置き換えられる。更なる置換が、最初の置換に対する機能的感受性を示すアミノ酸の位置に導入され得る。これに代えて、又はこれに加えて、抗体と抗原との間の接触点を同定するための、抗原-抗原結合分子複合体の結晶構造。このような接触残基及び隣接残基は、置換の候補として標的にしても排除してもよい。変異体を、所望の特性を有するか否かを判定するためにスクリーニングしてもよい。

10

## 【0105】

20

アミノ酸配列挿入には、長さが1残基から100個以上の残基を含むポリペプチドに及ぶアミノ末端融合及び/又はカルボキシル末端融合、並びに単一又は複数のアミノ酸残基の配列内挿入が含まれる。挿入の例としては、CD28抗原結合分子の血清半減期を増加させる、N又はC末端の、ポリペプチドへの融合を伴うCD28抗原結合分子が挙げられる。

## 【0106】

特定の実施形態では、本明細書で提供するCD28抗原結合分子が改変され、抗体がグリコシル化される程度が増加又は低下される。該分子のグリコシル化変異体は、簡便には、1つ以上のグリコシル化部位が生成又は除去されるようにアミノ酸配列を変更することにより得ることができる。アゴニスト性ICOS結合分子がFcドメインを含む場合、Fcドメインに付着した炭水化物を改変することができる。哺乳動物細胞によって産生された天然抗体は、典型的には、N結合によってFc領域のCH2ドメインのAsn297に一般に付着される分岐状の二分岐オリゴ糖を含む。例えば、Wright et al. TIBTECH 15: 26 - 32 (1997) を参照されたい。オリゴ糖には、様々な炭水化物、例えば、マンノース、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、ガラクトース、及びシアル酸、並びに二分岐オリゴ糖構造の「幹」のGlcNAcに付着したフコースが含まれ得る。いくつかの実施形態では、アゴニスト性ICOS結合分子中のオリゴ糖の改変は、特定の改良された特性を有する変異体を作製するために行われてもよい。一態様では、Fc領域に（直接的又は間接的に）接続するフコースを欠いた炭水化物構造を有するアゴニスト性ICOS結合分子の変異体が提供される。このようなフコシル化変異体は、改善されたADCC機能を有していてもよく、例えば、米国特許出願公開第2003/0157108号 (Presta, L.) 又は米国特許出願公開第2004/0093621号 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd) を参照されたい。本発明のCD28抗原結合分子の更なる変異体は、二分されたオリゴ糖を有するもの、例えば、Fc領域に接続した二分岐オリゴ糖がGlcNAcによって二分されているものを含む。このような変異体は、フコシル化の低下及び/又はADCC機能の向上を有していてもよく、例えば、国際公開第2003/011878号 (Jean-Mairet et al.)、米国特許第6,602,684号 (Umana et al.) 及び米国特許出願公開第2005/0123546号 (Umana et al) を参照されたい。Fc領域に付着したオリゴ糖中に少なくとも1つのガラクトース残基を有する変異体も

30

40

50

提供される。このような抗体変異体は、改良されたCD4機能をもつ場合があり、例えば、国際公開第1997/30087号(Patel et al.)、国際公開第1998/58964号(Raju, S.)及び国際公開第1999/22764号(Raju, S.)に記載される。

#### 【0107】

一定の実施形態では、本発明のCD28抗原結合分子のシステイン操作変異体、例えば、分子の1つ以上の残基がシステイン残基で置換された「チオMAb」を作製することが望ましい場合がある。特定の実施形態では、置換された残基は、分子の接近可能な部位で生じる。これらの残基をシステインで置換することによって、反応性チオール基が抗体の接近可能な部位に配置され、その反応性チオール基を用いて抗体を他の部分、例えば薬物部分又はリンカー-薬物部分にコンジュゲートさせて、イムノコンジュゲートを作製することができる。特定の実施形態では、以下の残基のうちのいずれか1つ以上がシステインで置換されていてもよい。軽鎖のV205(Kabatナンバリング)、重鎖のA118(EUナンバリング)、及び重鎖Fc領域のS400(EUナンバリング)。システイン操作された抗原結合分子は、例えば、米国特許第7,521,541号に記載されるように作製されてもよい。

#### 【0108】

特定の態様では、本明細書中に提供されるCD28抗原結合分子は、当該分野で公知であり、容易に入手可能である更なる非タンパク質性部分を含むように更に改変され得る。抗体の誘導体化に適した部位としては、水溶性ポリマーが挙げられるが、これらに限定されるものではない。水溶性ポリマーの非限定的な例としては、限定されないが、ポリエチレングリコール(PEG)、エチレングリコール/プロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ-1,3-ジオキソラン、ポリ-1,3,6-トリオキサン、エチレン/無水マレイン酸コポリマー、ポリアミノ酸(ホモポリマー又はランダムコポリマーのいずれか)、及びデキストラン又はポリ(n-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール(例えば、グリセロール)、ポリビニルアルコール、及びこれらの混合物が挙げられる。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは、水中でのその安定性のため、製造時に有利であり得る。ポリマーは、任意の分子量であってもよく、分岐していても、分岐していなくてもよい。抗体に付着するポリマーの数は変化し得て、1つを超えるポリマーが付着する場合、ポリマーは、同じ分子であってもよく、又は異なる分子であってもよい。一般的に、誘導体化に使用されるポリマーの数及び/又は種類は、改善されるべき抗体の特定の特性又は機能、その抗体誘導体が限定条件の下での治療に使用されるかどうかを含めた(但しこれらに限定されない)考慮事項に基づいて決定することができる。別の態様では、放射線への曝露によって選択的に加熱され得る抗体及び非タンパク質性部分のコンジュゲートが提供される。一実施形態では、非タンパク質性部分は、カーボンナノチューブである(Kam, N.W. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102(2005)11600-11605)。放射線は、任意の波長であってもよく、限定されないが、通常、細胞に有害ではないが、非タンパク質性部分を、抗体-非タンパク質性部分に近位の細胞が死滅する温度まで加熱する波長を含む。別の態様では、本明細書で提供するCD28抗原結合分子のイムノコンジュゲートを得ることができる。「イムノコンジュゲート」は、限定されないが、細胞傷害性薬剤を含む、1つ以上の異種分子にコンジュゲートされている抗体である。

#### 【0109】

「ポリヌクレオチド」という用語は、単離された核酸分子又はコンストラクト、例えば、メッセンジャーRNA(mRNA)、ウイルス由来のRNA、又はプラスミドDNA(pDNA)を指す。ポリヌクレオチドは、従来のホスホジエステル結合又は従来の結合以外の結合(例えば、アミド結合、例えば、ペプチド核酸(PNA)中に見出されるもの)を含んでいてもよい。「核酸分子」という用語は、任意の1つ以上の核酸セグメント、例

10

20

30

40

50

例えば、ポリヌクレオチド中に存在するDNA又はRNA断片を指す。各ヌクレオチドは、塩基で構成され、具体的には、プリン塩基又はピリミジン塩基（すなわち、シトシン（C）、グアニン（G）、アデニン（A）、チミン（T）又はウラシル（U））、糖（すなわち、デオキシリボース又はリボース）、及びリン酸基で構成される。多くは、核酸分子は、塩基配列によって記述され、当該塩基は、核酸分子の一次構造（線形構造）を表す。塩基の配列は、典型的には、5'から3'へと表される。本明細書において、核酸分子という用語は、デオキシリボ核酸（DNA）、例えば、相補性DNA（cDNA）及びゲノムDNA、リボ核酸（RNA）、特に、メッセンジャーRNA（mRNA）、DNA又はRNAの合形成態、及びこれらの分子の2つ以上を含む混合ポリマーを包含する。核酸分子は、線形又は環状であってもよい。これに加え、核酸分子という用語は、センス鎖及びアンチセンス鎖、並びに一本鎖形態及び二本鎖形態の両方を含む。さらに、本明細書で記載される核酸分子は、天然に存在するヌクレオチド又は天然に存在しないヌクレオチドを含むことができる。誘導体化された糖又はホスフェート骨格結合又は化学修飾された残基を含む、天然に存在しないヌクレオチドの例として、修飾されたヌクレオチド塩基が挙げられる。核酸分子は、例えば、宿主又は患者において、*in vitro*及び/又は*in vivo*で本発明の抗体の直接的な発現のためのベクターとして適したDNA分子及びRNA分子も包含する。かかるDNA（例えば、cDNA）又はRNA（例えば、mRNA）ベクターは、修飾されていなくてもよく、又は修飾されていてもよい。例えば、mRNAは、RNAベクターの安定性及び/又はコードされた分子の発現を増強するために化学修飾することができる、その結果、mRNAを対象に注射して、*in vivo*で抗体を生成することができる（例えば、Stadler et al. (2017) Nature Medicine 23: 815 - 817、又はEP 2 101 823号B1を参照されたい）。

#### 【0110】

「単離された」核酸分子又はポリヌクレオチドとは、その天然環境から取り出された核酸分子、DNA、又はRNAを意図している。例えば、ベクターにおいて含有されるポリペプチドをコードする組換えポリヌクレオチドは、本発明の目的のために単離されていると考えられる。単離されたポリヌクレオチドの更なる例には、異種宿主細胞内に維持されている組換えポリヌクレオチド、又は溶液中の（部分的に又は実質的に）精製されたポリヌクレオチドが挙げられる。単離されたポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチド分子を通常含む細胞に含まれるポリヌクレオチド分子を含むが、そのポリヌクレオチド分子は、染色体外に、又は天然の染色体上の位置とは異なる染色体位置に存在している。単離されたRNA分子は、*in vivo*又は*in vitro*での本発明のRNA転写物、及びポジティブ及びネガティブの鎖形態、二本鎖形態を含む。さらに、本発明の単離されたポリヌクレオチド又は核酸には、合成により生成されたこのような分子が含まれる。加えて、ポリヌクレオチド又は核酸は、プロモーター、リボソーム結合部位、又は転写ターミネーター等の調節エレメントであってもよく、又は調節エレメントを含んでいてもよい。

#### 【0111】

本発明の参照ヌクレオチド配列と少なくとも、例えば95%「同一の」ヌクレオチド配列を有する核酸又はポリヌクレオチドとは、このポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が、参照ヌクレオチド配列の100ヌクレオチドあたり5個までの点突然変異を含んでいてもよいことを除けば、参照配列と同一であることを意図している。言い換えると、参照ヌクレオチド配列と少なくとも95%同一のヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを得るために、参照配列内のヌクレオチドの5%までが、欠失していてもよく、若しくは別のヌクレオチドで置換されていてもよく、又は参照配列内の全ヌクレオチドの5%までが、参照配列内へと挿入されていてもよい。参照配列のこのような変更は、参照ヌクレオチド配列の5'若しくは3'末端位置で、又はこれら末端位置の間どの位置で起こってもよく、参照配列中の残基間に個々に散在してもよいし、又は参照配列内に1つ以上の連続した群として散在してもよい。実際の様式として、任意の特定のポリヌクレオチド配列が、本発明のヌクレオチド配列と少なくとも80%、85%、90%、95%、96%、97

%、98%又は99%同一であるかどうかは、既知のコンピュータプログラム、例えば、ポリペプチドについて上に記載したもの（例えば、ALIGN-2）を用いて、従来通りに決定することができる。

【0112】

「発現カセット」という用語は、標的細胞内の特定の核酸の転写を可能にする一連の特定の核酸要素を用いて、組換え又は合成により生成されたポリヌクレオチドを指す。組換え発現カセットは、プラスミド、染色体、ミトコンドリアDNA、プラスチドDNA、ウイルス又は核酸断片に組み込むことができる。典型的には、発現ベクターの組換え発現カセット部分は、配列の中でも特に、転写される核酸配列とプロモーターとを含む。特定の実施形態では、本発明の発現カセットは、本発明の二重特異性抗原結合分子をコードするポリヌクレオチド配列又はその断片を含む。

10

【0113】

「ベクター」又は「発現ベクター」という用語は、「発現コンストラクト」と同義であり、標的細胞内においてそれが作動可能に結合する特定の遺伝子の発現を導入及び誘導するために使用されるDNA分子を指す。この用語は、自己複製する核酸構造としてのベクター、及びベクターが導入された宿主細胞のゲノム内へと組み込まれたベクターを含む。本発明の発現ベクターは、発現カセットを含む。発現ベクターによって、安定したmRNAの多量の転写が可能となる。発現ベクターが標的細胞内部に入ると、遺伝子によってコードされるリボ核酸分子又はタンパク質が、細胞転写及び/又は翻訳機構によって生成される。一実施形態では、本発明の発現ベクターは、本発明の二重特異性抗体をコードするポリヌクレオチド配列又はその断片を含む発現カセットを含む。

20

【0114】

「宿主細胞」、「宿主細胞株」及び「宿主細胞培養物」という用語は、互換的に使用され、外因性の核酸が導入されている細胞を指し、かかる細胞の子孫も含む。宿主細胞には、「形質転換体」及び「形質転換細胞」が含まれ、これらには、初代形質転換細胞及び、継代の数に関係なく、それに由来する子孫が含まれる。子孫は、核酸含量が親細胞と完全に同じでなくてもよく、変異を含んでもよい。本明細書には、最初に形質転換された細胞でスクリーニング又は選択されたものと同じ機能又は生物活性を有する突然変異子孫が含まれる。宿主細胞は、本発明の二重特異性抗原結合分子を生成するのに使用できる任意の種類 of 細胞系である。宿主細胞としては、培養細胞、例えば、哺乳動物培養細胞、例えば、ほんの数例を挙げると、CHO細胞、BHK細胞、NS0細胞、SP2/0細胞、YO骨髓腫細胞、P3X63マウス骨髓腫細胞、PER細胞、PER.C6細胞又はハイブリドーマ細胞、酵母細胞、昆虫細胞及び植物細胞が挙げられるが、トランスジェニック動物、トランスジェニック植物又は培養植物若しくは動物組織に含まれる細胞も挙げられる。

30

【0115】

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

【0116】

薬剤、例えば医薬組成物の「治療有効量」とは、所望の治療的又は予防的結果を得るのに必要な用量及び期間での有効な量を指す。薬剤の治療有効量は、疾患の有害作用を、例えば排除し、低下させ、遅延させ、最小化し、又は防止する。

40

【0117】

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

【0118】

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

50



## 【 0 1 1 9 】

「薬学的に許容可能な賦形剤」は、医薬組成物中の活性成分以外の成分で、対象に対して非毒性である成分を指す。薬学的に許容可能な賦形剤としては、限定されないが、バッファー、安定剤又は防腐剤が挙げられる。

## 【 0 1 2 0 】

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

## 【 0 1 2 1 】

本明細書で使用される場合、「治療 ( treatment )」(及び「治療する ( treat )」又は「治療すること ( treating )」等、その文法的変形)は、治療されている個体の自然経過を変えようと試みる臨床的介入を指し、予防のために行うことも、臨床病理の過程において行うこともできる。治療の望ましい効果には、限定されないが、疾患の発症又は再発を予防すること、症状の緩和、疾患の直接的又は間接的な病理学的帰結の縮小、転移を予防すること、疾患の進行の速度を遅らせること、疾患の状態の改善又は緩和、及び寛解又は予後の改善が含まれる。いくつかの実施形態では、本発明の分子は、疾患の発症を遅延させるか又は疾患の進行を遅くするために使用される。

10

## 【 0 1 2 2 】

本明細書で述べる「併用治療」又は「同時投与」という用語は、併用投与(2つ以上の治療剤が同じ又は別個の製剤に含まれる場合)及び別個の投与を包含し、その場合、本明細書で報告する抗体の投与は、1つ以上の追加の治療剤、好ましくは1つ以上の抗体の投与の前、同時に及び/又は後に起こり得る。

20

## 【 0 1 2 3 】

「がん」という用語は、制御されていない細胞成長/増殖を典型的に特徴とする哺乳動物における生理学的状態を指すか、又は説明する。そのため、本明細書で使用される場合、がんという用語は、癌腫、リンパ腫(例えば、ホジキンリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫)、芽細胞腫、肉腫、及び白血病等の増殖性疾患を指す。特に、がんという用語は、リンパ球性白血病、肺がん、非小細胞肺 ( NSCL ) がん、肺細気管支肺胞がん、骨がん、膵臓がん、皮膚がん、頭部若しくは頸部のがん、皮膚若しくは眼内の黒色腫、子宮がん、卵巣がん、直腸がん、肛門領域のがん、胃がん ( stomach cancer )、胃がん ( gastric cancer )、結腸がん、乳がん、子宮がん、卵管の癌腫、子宮内膜の癌腫、子宮頸部の癌腫、膣の癌腫、外陰の癌腫、ホジキン病、食道のがん、小腸のがん、内分泌系のがん、甲状腺のがん、副甲状腺のがん、副腎のがん、軟組織の肉腫、尿道のがん、陰茎のがん、前立腺がん、膀胱のがん、腎臓又は尿管のがん、腎細胞癌腫、腎盂の癌腫、中皮腫、肝細胞がん、胆道がん、中枢神経系 ( CNS ) の新生物、脊髄軸腫瘍、脳幹グリオーマ、多形膠芽細胞腫、星細胞種、神経鞘腫、上衣腫、髄芽腫、髄膜腫、扁平上皮癌腫、下垂体腺腫、及びユーイング肉腫(上述のがんのいずれかの難治性態様を含む)、又は上述のがんの1つ以上の組み合わせを含む。一態様では、がんは固形腫瘍である。別の態様では、がんは血液がん、特に白血病、最もくわしくは急性リンパ芽球性白血病 ( ALL ) 又は急性骨髄性白血病 ( AML ) である。

30

40

## 【 0 1 2 4 】

本発明の二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子

本発明は、製造可能性、安定性、結合親和性、生物活性、標的化効率、減少した毒性、患者に与えることができる拡大した投与量範囲、及びそれによりおそらく増強した有効性等の、特に有利な特性を有する新規の二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子を提供する。新規の二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子は、Fc受容体に対する抗原結合分子の結合親和性及び/又はエフェクター機能 ( Fcサイレント ) を低下させ、したがってFc受容体を介した非特異的架橋が回避される、1つ以上のアミノ酸置換を含む安定な会合が可能な第1のサブユニット及び第2のサブユニットで構成されるFcドメインを含む。代わりに、それらは、腫瘍部位で架橋を引き起こすCD3への特異的結合が可能な

50

少なくとも1つの抗原結合ドメインを含む。したがって、腫瘍特異的T細胞活性化が達成される。特定の一態様では、マスクされたCD3抗原結合ドメインを有する二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子が提供される。プロテアーゼ部位を含有するリンカーによってCD3バインダーのHCにN末端で連結された抗イデオタイプCD3 scFvでCD3バインダーをマスクすることは、潜在的な毒性を低減することを目的とする。プロテアーゼは、腫瘍微小環境において活性であり、リンカー中のプロテアーゼ部位の切断を引き起こし、それによってCD3結合を回復する。したがって、CD3結合は、腫瘍細胞の存在下では可能であるが、健康な組織では可能ではない。

【0125】

CD28への一価結合を有する二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子であって、  
 (a) CD28への特異的結合が可能な第1の抗原結合ドメインと、  
 (b) CD3への特異的結合が可能な第2の抗原結合ドメインと、  
 (c) Fc受容体に対する抗原結合分子の結合親和性及び/又はエフェクター機能を低下させる1つ以上のアミノ酸置換を含む安定な会合が可能な第1のサブユニット及び第2のサブユニットで構成されるFcドメインと  
 を含み、

CD3への特異的結合が可能な当該第2の抗原結合ドメインが、  
 (i) 配列番号2の重鎖相補性決定領域CDR-H1、配列番号3のCDR-H2、及び配列番号4のCDR-H3を含む重鎖可変領域(V<sub>H</sub>CD3)と、配列番号5の軽鎖相補性決定領域CDR-L1、配列番号6のCDR-L2、及び配列番号7のCDR-L3を含む軽鎖可変領域(V<sub>L</sub>CD3)と、又は  
 (ii) 配列番号10の重鎖相補性決定領域CDR-H1、配列番号11のCDR-H2、及び配列番号12のCDR-H3を含む重鎖可変領域(V<sub>H</sub>CD3)と、配列番号13の軽鎖相補性決定領域CDR-L1、配列番号14のCDR-L2、及び配列番号15のCDR-L3を含む軽鎖可変領域(V<sub>L</sub>CD3)と  
 を含む。

【0126】

一態様では、FcドメインがIgG、特にIgG1 Fcドメイン又はIgG4 Fcドメインである、本明細書において前に定義したような二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子が提供される。特定の一態様では、安定な会合が可能な第1のサブユニット及び第2のサブユニットから構成されるFcドメインはIgG1 Fcドメインである。Fcドメインは、Fc受容体に対する抗原結合分子の結合親和性を低下させる、及び/又はエフェクター機能を低下させる若しくは消失させる1つ以上のアミノ酸置換を含む。一態様では、Fcドメインは、アミノ酸置換L234A及びL235A(Kabat EUインデックスによるナンバリング)を含む。一態様では、FcドメインはヒトIgG1サブクラスのFcドメインであり、アミノ酸変異L234A、L235A及びP329G(Kabat EUインデックスによるナンバリング)を含む。一態様では、安定な会合が可能な第1及び第2のサブユニットで構成されるFcドメインを含み、第1のサブユニットが配列番号96(FcホールPGLALA)のアミノ酸配列を含み、第2へのサブユニットが配列番号95(FcノブPGLALA)のアミノ酸配列を含む、二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子が提供される。

【0127】

一態様では、本明細書において前に定義したような二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子が提供され、CD28への特異的結合が可能な第1の抗原結合ドメインは、  
 (i) 配列番号26の重鎖相補性決定領域CDR-H1、配列番号27のCDR-H2、及び配列番号28のCDR-H3を含む重鎖可変領域(V<sub>H</sub>CD28)と、配列番号29の軽鎖相補性決定領域CDR-L1、配列番号30のCDR-L2、及び配列番号31のCDR-L3を含む軽鎖可変領域(V<sub>L</sub>CD28)と、又は  
 (ii) 配列番号18のCDR-H1、配列番号19のCDR-H2、及び配列番号20のCDR-H3を含む重鎖可変領域(V<sub>H</sub>CD28)と、配列番号21のCDR-L1

、配列番号 22 の C D R - L 2、及び配列番号 23 の C D R - L 3 を含む軽鎖可変領域 ( V L C D 2 8 ) とを含む。

【 0 1 2 8 】

一態様では、二重特異性アゴニスト C D 2 8 抗原結合分子の C D 2 8 への特異的結合が可能な抗原結合ドメインは、配列番号 26 の C D R - H 1、配列番号 27 の C D R - H 2 及び配列番号 28 の C D R - H 3 を含む重鎖可変領域 ( V H C D 2 8 ) と、配列番号 29 の C D R - L 1、配列番号 30 の C D R - L 2 及び配列番号 31 の C D R - L 3 を含む軽鎖可変領域 ( V L C D 2 8 ) とを含む。

【 0 1 2 9 】

別の態様では、二重特異性アゴニスト C D 2 8 抗原結合分子の C D 2 8 への特異的結合が可能な抗原結合ドメインは、配列番号 18 の C D R - H 1、配列番号 19 の C D R - H 2 及び配列番号 20 の C D R - H 3 を含む重鎖可変領域 ( V H C D 2 8 ) と、配列番号 21 の C D R - L 1、配列番号 22 の C D R - L 2 及び配列番号 23 の C D R - L 3 を含む軽鎖可変領域 ( V L C D 2 8 ) とを含む。

【 0 1 3 0 】

更には、C D 2 8 への特異的結合が可能な抗原結合ドメインが、配列番号 24 のアミノ酸配列と少なくとも約 95%、96%、97%、98%、99% 又は 100% 同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 ( V H C D 2 8 ) と、配列番号 25 のアミノ酸配列と少なくとも約 95%、96%、97%、98%、99% 又は 100% 同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 ( V L C D 2 8 ) とを含む、本明細書において前に定義したような二重特異性アゴニスト C D 2 8 抗原結合分子が提供される。一態様では、C D 2 8 への特異的結合が可能な第 1 の抗原結合ドメインが、配列番号 32、配列番号 33、配列番号 34、配列番号 35、配列番号 36、配列番号 37、配列番号 38、配列番号 39、配列番号 40 及び配列番号 41 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 ( V H C D 2 8 ) と、配列番号 25、配列番号 42、配列番号 43、配列番号 44、配列番号 45、配列番号 46、配列番号 47、配列番号 48、配列番号 49、配列番号 50、及び配列番号 51 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 ( V L C D 2 8 ) とを含む。

【 0 1 3 1 】

別の態様では、二重特異性アゴニスト C D 2 8 抗原結合分子が提供され、C D 2 8 への特異的結合が可能な第 1 の抗原結合ドメインは、

( a ) 配列番号 37 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 ( V H C D 2 8 ) 及び配列番号 44 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 ( V L C D 2 8 )、又は

( b ) 配列番号 37 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 ( V H C D 2 8 ) 及び配列番号 25 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 ( V L C D 2 8 )、又は

( c ) 配列番号 41 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 ( V H C D 2 8 ) 及び配列番号 51 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 ( V L C D 2 8 )、又は

( d ) 配列番号 36 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 ( V H C D 2 8 ) 及び配列番号 43 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 ( V L C D 2 8 )、又は

( e ) 配列番号 36 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 ( V H C D 2 8 ) 及び配列番号 44 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 ( V L C D 2 8 )、又は

( f ) 配列番号 36 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 ( V H C D 2 8 ) 及び配列番号 49 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 ( V L C D 2 8 )、又は

( g ) 配列番号 36 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 ( V H C D 2 8 ) 及び配列番号 25 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 ( V L C D 2 8 )、又は

( h ) 配列番号 33 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 ( V H C D 2 8 ) 及び配列番号 25 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 ( V L C D 2 8 )、又は

( i ) 配列番号 32 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 ( V H C D 2 8 ) 及び配列番号 43 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 ( V L C D 2 8 )、又は

10

20

30

40

50

(j) 配列番号 32 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V<sub>H</sub>CD28) 及び配列番号 49 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V<sub>L</sub>CD28)、又は

(k) 配列番号 32 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V<sub>H</sub>CD28) 及び配列番号 25 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V<sub>L</sub>CD28) を含む。

【0132】

一態様では、CD28 への特異的結合が可能な第 1 の抗原結合ドメインが、配列番号 37 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V<sub>H</sub>CD28) の CDR と、配列番号 44 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V<sub>L</sub>CD28) の CDR とを含む、二重特異性 CD28 抗原結合分子が提供される。別の態様では、二重特異性アゴニスト CD28 抗原結合分子の CD28 への特異的結合が可能な第 1 の抗原結合ドメインは、配列番号 52 の CDR - H1、配列番号 53 の CDR - H2 及び配列番号 54 の CDR - H3 を含む重鎖可変領域 (V<sub>H</sub>CD28) と、配列番号 55 の CDR - L1、配列番号 56 の CDR - L2 及び配列番号 57 の CDR - L3 を含む軽鎖可変領域 (V<sub>L</sub>CD28) とを含む。

10

【0133】

別の態様では、CD28 への特異的結合が可能な抗原結合ドメインが、配列番号 36 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V<sub>H</sub>CD28) の CDR と、配列番号 43 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V<sub>L</sub>CD28) の CDR とを含む、二重特異性 CD28 抗原結合分子が提供される。別の態様では、二重特異性アゴニスト CD28 抗原結合分子の CD28 への特異的結合が可能な抗原結合ドメインは、配列番号 58 の CDR - H1、配列番号 59 の CDR - H2 及び配列番号 60 の CDR - H3 を含む重鎖可変領域 (V<sub>H</sub>CD28) と、配列番号 61 の CDR - L1、配列番号 62 の CDR - L2 及び配列番号 63 の CDR - L3 を含む軽鎖可変領域 (V<sub>L</sub>CD28) とを含む。

20

【0134】

別の態様では、CD28 への特異的結合が可能な抗原結合ドメインが、配列番号 32 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V<sub>H</sub>CD28) の CDR と、配列番号 25 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V<sub>L</sub>CD28) の CDR とを含む、二重特異性 CD28 抗原結合分子が提供される。別の態様では、二重特異性アゴニスト CD28 抗原結合分子の CD28 への特異的結合が可能な抗原結合ドメインは、配列番号 64 の CDR - H1、配列番号 65 の CDR - H2 及び配列番号 66 の CDR - H3 を含む重鎖可変領域 (V<sub>H</sub>CD28) と、配列番号 67 の CDR - L1、配列番号 68 の CDR - L2 及び配列番号 69 の CDR - L3 を含む軽鎖可変領域 (V<sub>L</sub>CD28) とを含む。

30

【0135】

一態様では、CD28 への特異的結合が可能な抗原結合ドメインが、配列番号 24 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V<sub>H</sub>CD28) 及び配列番号 25 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V<sub>L</sub>CD28) を含む抗原結合ドメインと比較して、低いアフィニティーで CD28 に結合する、二重特異性アゴニスト CD28 抗原結合分子が提供される。親和性は、CD28 を発現する CHO 細胞への結合としてフローサイトメトリーによって測定される。一態様では、CD28 への特異的結合が可能な抗原結合ドメインは、配列番号 24 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V<sub>H</sub>CD28) と配列番号 25 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V<sub>L</sub>CD28) とを含む抗原結合ドメインと比較して、低下したアフィニティーで CD28 に結合し、配列番号 37 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V<sub>H</sub>CD28) の CDR - H1、CDR - H2 及び CDR - H3 と、配列番号 44 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V<sub>L</sub>CD28) の CDR - L1、CDR - L2 及び CDR - L3 とを含む。一態様では、配列番号 24 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V<sub>H</sub>CD28) と、配列番号 25 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V<sub>L</sub>CD28) とを含む抗原結合ドメインと比較して、低い親和性で CD28 への特異的結合が可能な抗原結合ドメインは、配列番号 37 のアミノ酸配列と少なくとも約 95%、96%、97%、98%、99% 又は 100% 同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V<sub>H</sub>CD28) と、配列番号 44 のアミノ酸配列と少なくとも約 95%、96%、97%、98%、99% 又は 1

40

50

00%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（V<sub>L</sub>CD28）とを含む。

【0136】

特定の一態様では、CD28への特異的結合が可能な抗原結合ドメインが、配列番号37のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（V<sub>H</sub>CD28）と、配列番号44のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（V<sub>L</sub>CD28）とを含む、二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子が提供される。

【0137】

別の特定の一態様では、CD28への特異的結合が可能な抗原結合ドメインが、配列番号36のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（V<sub>H</sub>CD28）と、配列番号43のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（V<sub>L</sub>CD28）とを含む、二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子が提供される。

10

【0138】

更なる態様では、CD28への特異的結合が可能な抗原結合ドメインが、配列番号32のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（V<sub>H</sub>CD28）と、配列番号25のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（V<sub>L</sub>CD28）とを含む、二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子が提供される。

【0139】

CD3標的化二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子

腫瘍関連抗原への特異的結合が可能な抗原結合ドメインが、CD3への特異的結合が可能な抗原結合ドメインである、二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子が本明細書において提供される。

20

【0140】

一態様では、CD3への特異的結合が可能な抗原結合ドメインが、配列番号2のアミノ酸配列を含むCDR-H1、配列番号3のアミノ酸配列を含むCDR-H2、及び配列番号4のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む重鎖可変領域（V<sub>H</sub>CD3）と、配列番号5のアミノ酸配列を含むCDR-L1、配列番号6のアミノ酸配列を含むCDR-L2、及び配列番号7のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含む軽鎖可変領域（V<sub>L</sub>CD3）とを含む、本明細書に記載の二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子が提供される。一態様では、CD3への特異的結合が可能な抗原結合ドメインは、配列番号8のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（V<sub>H</sub>CD3）のCDRと、配列番号9のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（V<sub>L</sub>CD3）のCDRとを含む。一態様では、CD28への特異的結合が可能な抗原結合ドメインが、配列番号8のアミノ酸配列と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（V<sub>H</sub>CD3）と、配列番号9のアミノ酸配列と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（V<sub>L</sub>CD3）とを含む、二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子が提供される。特に、CD3への特異的結合が可能な抗原結合ドメインは、配列番号8のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（V<sub>H</sub>CD3）と、配列番号9のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（V<sub>L</sub>CD3）とを含む。

30

【0141】

別の態様では、CD3への特異的結合が可能な抗原結合ドメインが、配列番号10のアミノ酸配列を含むCDR-H1、配列番号11のアミノ酸配列を含むCDR-H2、及び配列番号12のアミノ酸配列を含むCDR-H3を含む重鎖可変領域（V<sub>H</sub>CD3）と、配列番号13のアミノ酸配列を含むCDR-L1、配列番号14のアミノ酸配列を含むCDR-L2、及び配列番号15のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含む軽鎖可変領域（V<sub>L</sub>CD3）とを含む、本明細書に記載の二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子が提供される。一態様では、CD3への特異的結合が可能な抗原結合ドメインは、配列番号16のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（V<sub>H</sub>CD3）のCDRと、配列番号17のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（V<sub>L</sub>CD3）のCDRとを含む。一態様では、CD3への特異的結合が可能な抗原結合ドメインが、配列番号16のアミノ酸配列と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖

40

50

可変領域（V<sub>H</sub>CD3）と、配列番号17のアミノ酸配列と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%、又は100%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（V<sub>L</sub>CD3）とを含む、二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子が提供される。特に、CD3への特異的結合が可能な抗原結合ドメインは、配列番号16のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域（V<sub>H</sub>CD3）と、配列番号17のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域（V<sub>L</sub>CD3）とを含む。

【0142】

CD28への結合については一価であり、CD3への結合については一価である二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子（1+1フォーマット）

一態様では、CD28への特異的結合が可能な第1の抗原結合ドメイン及び/又はCD3への特異的結合が可能な第2の抗原結合ドメインがFab断片である、二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子が提供される。特定の一態様では、CD28への特異的結合が可能な第1の抗原結合ドメインとCD3への特異的結合が可能な第2の抗原結合ドメインの両方がFab断片である。

10

【0143】

一態様では、(a)CD28への特異的結合が可能なクロスFab断片と、(b)CD3への特異的結合が可能な従来のFab断片と、(c)Fc受容体に対する抗原結合分子の結合親和性及び/又はエフェクター機能を低下させる1つ以上のアミノ酸置換を含む安定な会合が可能な第1及び第2のサブユニットで構成されるFcドメインとを含む、本明細書に記載の二重特異性アゴニスト性CD28抗原結合分子が提供される。別の態様では、(a)CD28への特異的結合が可能な従来のFab断片と、(b)CD3への特異的結合が可能なクロスFab断片と、(c)Fc受容体に対する抗原結合分子の結合親和性及び/又はエフェクター機能を低下させる1つ以上のアミノ酸置換を含む安定な会合が可能な第1及び第2のサブユニットで構成されるFcドメインとを含む、本明細書に記載の二重特異性アゴニスト性CD28抗原結合分子が提供される。

20

【0144】

一態様では、CD28への特異的結合が可能な第1の抗原結合ドメインが、Fab軽鎖及びFab重鎖の可変ドメインV<sub>L</sub>及びV<sub>H</sub>、又は定常ドメインC<sub>L</sub>及びC<sub>H</sub>1、特に可変ドメインV<sub>L</sub>及びV<sub>H</sub>が互いに置き換えられたFab断片（クロスFab断片）である、本明細書に記載の二重特異性アゴニスト性CD28抗原結合分子が提供される。一態様では、CD28への特異的結合が可能な第1の抗原結合ドメインは、Fab軽鎖及びFab重鎖の可変ドメインV<sub>L</sub>及びV<sub>H</sub>又は定常ドメインC<sub>L</sub>及びC<sub>H</sub>1、特に可変ドメインV<sub>L</sub>及びV<sub>H</sub>が互いに置き換えられているFab断片であり、CD3への特異的結合が可能な第2の抗原結合ドメインは従来のFab断片である。一態様では、CD3への特異的結合が可能な第2の抗原結合ドメインは、定常ドメインC<sub>L</sub>において、位置123（ナンバリングはKabat EUインデックスに従う）のアミノ酸がリジン（K）、アルギニン（R）又はヒスチジン（H）から選択されるアミノ酸によって置換され、かつ、位置124（ナンバリングはKabat EUインデックスに従う）のアミノ酸がリジン（K）、アルギニン（R）又はヒスチジン（H）によって独立して置換され、かつ、定常ドメインC<sub>H</sub>1において、位置147（ナンバリングはKabat EUインデックスに従う）のアミノ酸がグルタミン酸（E）又はアスパラギン酸（D）によって独立して置換され、かつ、位置213（ナンバリングはKabat EUインデックスに従う）のアミノ酸がグルタミン酸（E）又はアスパラギン酸（D）（ナンバリングはKabat EUインデックスに従う）によって独立して置換されるFab断片である。

30

40

【0145】

特定の一態様では、配列番号102のアミノ酸配列を含む第1の軽鎖と、配列番号101のアミノ酸配列を含む第1の重鎖と、配列番号103のアミノ酸配列を含む第2の重鎖と、配列番号104のアミノ酸配列を含む第2の軽鎖とを含む、二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子（分子10）が提供される。

【0146】

50

一態様では、C D 3 への特異的結合が可能な第 2 の抗原結合ドメインが F a b 断片であり、F a b 軽鎖及び F a b 重鎖の可変ドメイン V L 及び V H、又は定常ドメイン C L 及び C H 1、特に可変ドメイン C L 及び C H 1 が互いに置き換えられている（クロス F a b 断片）、本明細書に記載の二重特異性アゴニスト性 C D 2 8 抗原結合分子が提供される。一態様では、C D 3 への特異的結合が可能な第 2 の抗原結合ドメインは、F a b 軽鎖及び F a b 重鎖の可変ドメイン V L 及び V H、又は定常ドメイン C L 及び C H 1、特に可変ドメイン C L 及び C H 1 が互いに置き換えられた F a b 断片であり、C D 2 8 への特異的結合が可能な第 1 の抗原結合ドメインは従来の F a b 断片である。一態様では、C D 2 8 への特異的結合が可能な抗原結合ドメインは、定常ドメイン C L において、位置 1 2 3（ナンバリングは K a b a t E U インデックスに従う）のアミノ酸がリジン（K）、アルギニン（R）又はヒスチジン（H）から選択されるアミノ酸によって置換され、かつ、位置 1 2 4（ナンバリングは K a b a t E U インデックスに従う）のアミノ酸がリジン（K）、アルギニン（R）又はヒスチジン（H）によって独立して置換され、かつ、定常ドメイン C H 1 において、位置 1 4 7（ナンバリングは K a b a t E U インデックスに従う）のアミノ酸がグルタミン酸（E）又はアスパラギン酸（D）によって独立して置換され、かつ、位置 2 1 3（ナンバリングは K a b a t E U インデックスに従う）のアミノ酸がグルタミン酸（E）又はアスパラギン酸（D）（ナンバリングは K a b a t E U インデックスに従う）によって独立して置換される F a b 断片である。

10

## 【0147】

特定の一態様では、配列番号 9 0 のアミノ酸配列を含む第 1 の軽鎖と、配列番号 8 9 のアミノ酸配列を含む第 1 の重鎖と、配列番号 9 1 のアミノ酸配列を含む第 2 の重鎖と、配列番号 9 2 のアミノ酸配列を含む第 2 の軽鎖とを含む、二重特異性アゴニスト C D 2 8 抗原結合分子（分子 1）が提供される。

20

## 【0148】

特定の一態様では、配列番号 9 0 のアミノ酸配列を含む第 1 の軽鎖と、配列番号 8 9 のアミノ酸配列を含む第 1 の重鎖と、配列番号 9 3 のアミノ酸配列を含む第 2 の重鎖と、配列番号 9 4 のアミノ酸配列を含む第 2 の軽鎖とを含む、二重特異性アゴニスト C D 2 8 抗原結合分子（分子 2）が提供される。

## 【0149】

別の態様では、配列番号 1 0 2 のアミノ酸配列を含む第 1 の軽鎖と、配列番号 1 0 1 のアミノ酸配列を含む第 1 の重鎖と、配列番号 1 0 3 のアミノ酸配列を含む第 2 の重鎖と、配列番号 1 0 4 のアミノ酸配列を含む第 2 の軽鎖とを含む、二重特異性アゴニスト C D 2 8 抗原結合分子（分子 1 0）が提供される。

30

## 【0150】

F c 受容体結合及び / 又はエフェクター機能を低下させる F c ドメイン修飾

本発明の二重特異性アゴニスト C D 2 8 抗原結合分子の F c ドメインは、免疫グロブリン分子の重鎖ドメインを含む一对のポリペプチド鎖からなる。例えば、免疫グロブリン G（I g G）分子の F c ドメインは、二量体であり、それぞれのサブユニットは、C H 2 及び C H 3 I g G 重鎖定常ドメインを含む。F c ドメインの 2 つのサブユニットは、互いに安定な会合が可能である。F c ドメインは、本発明の抗原結合分子に、標的組織への良好な蓄積に寄与する長い血清半減期、望ましい組織 - 血液分布比を含め、望ましい薬物動態特性を与える。一方では、好ましい抗原を含む細胞ではなく、F c 受容体を発現する細胞に対する本発明の二重特異性抗体の望ましくない標的化を引き起こす場合がある。

40

## 【0151】

したがって、二重特異性アゴニスト C D 2 8 抗原結合分子の F c ドメインは、ネイティブ I g G 1 F c ドメインと比較して、F c 受容体に対する結合アフィニティーの低下及び / 又はエフェクター機能の低下を示す。一態様では、F c は F c 受容体に実質的に結合せず、及び / 又はエフェクター機能を誘導しない。特定の一態様では、F c 受容体は、F c 受容体である。一態様では、F c 受容体は、ヒト F c 受容体である。具体的な態様では、F c 受容体は、活性化ヒト F c 受容体であり、より具体的には、ヒト F c R I I I a

50

、 F c R I 又は F c R I I a であり、最も具体的には、ヒト F c R I I I a である。一態様では、 F c ドメインはエフェクター機能を誘導しない。エフェクター機能の低下としては、限定されないが、以下のうちの 1 つ以上が挙げられる：補体依存性細胞障害 ( C D C ) の低下、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 ( A D C C ) の低下、抗体依存性細胞貪食 ( A D C P ) の低下、サイトカイン分泌の低下、抗原提示細胞による免疫複合体媒介性抗原取り込みの低下、 N K 細胞への結合の低下、マクロファージへの結合の低下、単球への結合の低下、多形核細胞への結合の低下、アポトーシスを誘導する直接シグナル伝達の低下、樹状細胞の成熟の低下、又は減少した T 細胞プライミング。

#### 【 0 1 5 2 】

特定の態様では、 1 つ以上のアミノ酸改変は、本明細書で提供される抗体の F c 領域に導入されてもよく、それにより、 F c 領域変異体を作成する。 F c 領域変異体は、 1 つ以上のアミノ酸位置にアミノ酸改変 (例えば置換) を含むヒト F c 領域配列 (例えばヒト I g G 1、 I g G 2、 I g G 3 又は I g G 4 F c 領域) を含み得る。

#### 【 0 1 5 3 】

特定の態様では、本発明は、 F c 領域が、 F c 受容体に対する、特に F c 受容体への結合を減少させる 1 つ以上のアミノ酸置換を含む、抗原結合分子を提供する。一態様では、本発明は、 F c 領域が 1 つ以上のアミノ酸置換を含み、かつ抗体によって誘導される A D C C が、野生型ヒト I g G 1 F c 領域を含む抗体によって誘導される A D C C の 0 ~ 2 0 % に減少する、抗体を提供する。

#### 【 0 1 5 4 】

一態様では、本発明の抗原結合分子の F c ドメインは、 F c 受容体に対する F c ドメインの結合親和性及び / 又はエフェクター機能を下げる 1 つ以上のアミノ酸変異を含む。典型的には、 F c ドメインの 2 つのサブユニットそれぞれに、同じ 1 つ以上のアミノ酸変異が存在する。特に、 F c ドメインは、 E 2 3 3、 L 2 3 4、 L 2 3 5、 N 2 9 7、 P 3 3 1 及び P 3 2 9 の位置 ( E U ナンバリング) にアミノ酸置換を含む。特に、 F c ドメインは、 I g G 重鎖の 2 3 4 及び 2 3 5 ( E U ナンバリング) 及び / 又は 3 2 9 ( E U ナンバリング) の位置にアミノ酸置換を含む。より詳しくは、 I g G 重鎖中にアミノ酸置換 L 2 3 4 A、 L 2 3 5 A 及び P 3 2 9 G (「 P 3 2 9 G L A L A」、 E U ナンバリング) を有する F c ドメインを含む、本発明による抗原結合分子が提供される。アミノ酸置換 L 2 3 4 A 及び L 2 3 5 A は、いわゆる L A L A 変異を指す。アミノ酸置換の「 P 3 2 9 G L A L A」の組み合わせは、ヒト I g G 1 F c ドメインの F c 受容体結合をほぼ完全に消失させ、かかる変異体 F c ドメインを調製する方法及び F c 受容体結合又はエフェクター機能等のその特性を決定する方法も記載している国際特許出願国際公開第 2 0 1 2 / 1 3 0 8 3 1 ( A 1 ) 号に記載される。

#### 【 0 1 5 5 】

F c 受容体結合及び / 又はエフェクター機能が低下した F c ドメインには、 F c ドメイン残基 2 3 8、 2 6 5、 2 6 9、 2 7 0、 2 9 7、 3 2 7 及び 3 2 9 のうちの 1 つ以上が置換されたものも含まれる (米国特許第 6, 7 3 7, 0 5 6 号)。かかる F c 変異体には、アミノ酸位置 2 6 5、 2 6 9、 2 7 0、 2 9 7 及び 3 2 7 のうちの 2 つ以上に置換を有する F c 変異体が挙げられ、残基 2 6 5 及び 2 9 7 がアラニンに置換されている、いわゆる「 D A N A」 F c 変異体が含まれる (米国特許第 7, 3 3 2, 5 8 1 号)。

#### 【 0 1 5 6 】

別の態様では、 F c ドメインは、 I g G 4 F c ドメインである。 I g G 4 抗体は、 I g G 1 抗体と比較して、 F c 受容体に対する結合親和性の低下と、エフェクター機能の低下を示す。より具体的な態様では、 F c ドメインは、位置 S 2 2 8 ( K a b a t ナンバリング) にアミノ酸置換、特にアミノ酸置換 S 2 2 8 P を含む I g G 4 F c ドメインである。より具体的な態様では、 F c ドメインは、アミノ酸置換 L 2 3 5 E 及び S 2 2 8 P 及び P 3 2 9 G ( E U ナンバリング) を含む、 I g G 4 F c ドメインである。かかる I g G 4 F c ドメイン変異体及びそれらの F c 受容体結合特性は、国際公開第 2 0 1 2 / 1 3 0 8 3 1 号にも記載されている。

10

20

30

40

50



## 【0157】

変異体Fcドメインは、当該技術分野で周知の遺伝的方法又は化学的方法を用いて、アミノ酸の欠失、置換、挿入又は修飾によって調製することができる。遺伝的方法は、コードDNA配列の部位特異的突然変異誘発、PCR、遺伝子合成等を含んでいてもよい。正しいヌクレオチド変化は、例えば、スクリーニングによって確認することができる。

## 【0158】

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

10

## 【0159】

Fcドメイン、又はFcドメインを含む本発明の抗原結合分子のエフェクター機能は、当該技術分野で既知の方法によって測定することができる。ADCCを測定するのに適したアッセイを本明細書に記載する。目的の分子のADCC活性を評定するための*in vitro*アッセイの他の例は、米国特許第5,500,362号、Hellstrom et al. Proc Natl Acad Sci USA 83,7059-7063(1986)及びHellstrom et al., Proc Natl Acad Sci USA 82,1499-1502(1985)、米国特許第5,821,337号、Bruggemann et al., J Exp Med 166,1351-1361(1987)に記載される。或いは、非放射性アッセイ方法を使用してもよい(例えば、フローサイトメトリー(Cell Technology, Inc. マウンテンビュー、カリフォルニア州)のためのACTI(商標)非放射性細胞傷害性アッセイ、及びCytotox 96(登録商標)非放射性細胞傷害性アッセイ(Promega、ウィスコンシン州マディソン))。かかるアッセイに有用なエフェクター細胞としては、末梢血単核細胞(PBMC)及びナチュラルキラー(NK)細胞が挙げられる。或いは、又は加えて、対象となる分子のADCC活性は、*in vivo*で、Clynes et al., Proc Natl Acad Sci USA 95,652-656(1998)等が開示されるもの等の動物モデルにおいて評定されてもよい。

20

30

## 【0160】

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

40

## 【0161】

特定の一態様では、ネイティブIgG1 Fcドメインと比較して、Fc受容体に対する結合親和性の低下及び/又はエフェクター機能の低下を示すFcドメインは、アミノ酸置換L234A、L235A及び任意にP329Gを含むヒトIgG1 Fcドメイン、又はアミノ酸置換S228P、L235E及び任意にP329Gを含むヒトIgG4 Fcドメインである(Kabat EUインデックスによるナンバリング)。より詳しくは、それは、アミノ酸置換L234A、L235A及びP329G(ナンバリングはKabat EUインデックスに従う)を含むヒトIgG1 Fcドメインである。

50

## 【 0 1 6 2 】

ヘテロ二量体化を促進する F c ドメイン修飾

本発明の二重特異性アゴニスト C D 2 8 抗原結合分子は、F c ドメインの 2 つのサブユニットの片方又はもう一方に融合した異なる抗原結合部位を含み、そのため、F c ドメインの 2 つのサブユニットは、2 つの非同ポリペプチド鎖に含まれていてもよい。これらのポリペプチドの組換え同時発現及びその後の二量化によって、2 つのポリペプチドのいくつかの可能な組み合わせが生じる。組換え産生における本発明の二重特異性抗原結合分子の収率及び純度を高めるために、本発明の二重特異性抗原結合分子の F c ドメインに、所望なポリペプチドの会合を促進する改変を導入することが有利である。

## 【 0 1 6 3 】

したがって、特定の態様では、本発明は、( a ) C D 2 8 への特異的結合が可能な 1 つの抗原結合ドメインと、( b ) C D 3 への特異的結合が可能な少なくとも 1 つの抗原結合ドメインと、( c ) F c 受容体に対する抗原結合分子の結合親和性及び/又はエフェクター機能を低下させる 1 つ以上のアミノ酸置換を含む安定な会合が可能な第 1 のサブユニット及び第 2 のサブユニットから構成される F c ドメインとを含み、F c ドメインは、F c ドメインの第 1 のサブユニット及び第 2 のサブユニットの会合を促進させる改変を含む、C D 2 8 への一価結合を有する二重特異性アゴニスト C D 2 8 抗原結合分子に関する。ヒト I g G F c ドメインの 2 つのサブユニット間の最も長いタンパク質 - タンパク質相互作用の部位は、F c ドメインの C H 3 ドメイン内にある。したがって、一態様では、当該修飾は、F c ドメインの C H 3 ドメインの中にある。

## 【 0 1 6 4 】

具体的な態様では、当該改変は、いわゆる「ホールにノブを入れる」改変であり、F c ドメインの 2 つのサブユニットの 1 つに「ノブ」改変と、F c ドメインの 2 つのサブユニットの他の 1 つに「ホール」改変とを含む。したがって、本発明は、( a ) C D 2 8 への特異的結合が可能な 1 つの抗原結合ドメインと、( b ) 腫瘍関連抗原への特異的結合が可能な少なくとも 1 つの抗原結合ドメインと、( c ) F c 受容体に対する抗原結合分子の結合親和性及び/又はエフェクター機能を低下させる 1 つ以上のアミノ酸置換を含む安定な会合が可能な第 1 のサブユニット及び第 2 のサブユニットで構成される F c ドメインとを含み、ノブからホールへする方法に従って F c ドメインの第 1 のサブユニットがノブを含み、F c ドメインの第 2 のサブユニットがホールを含む、C D 2 8 への一価結合を有する二重特異性アゴニスト C D 2 8 抗原結合分子に関する。特定の態様では、F c ドメインの第 1 のサブユニットは、アミノ酸置換 S 3 5 4 C 及び T 3 6 6 W ( E U ナンバリング ) を含み、F c ドメインの第 2 のサブユニットは、アミノ酸置換 Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S 及び Y 4 0 7 V を含む ( K a b a t E U インデックスによるナンバリング ) 。

## 【 0 1 6 5 】

ノブ・イントゥ・ホール技術は、例えば、米国特許第 5, 7 3 1, 1 6 8 号、米国特許第 7, 6 9 5, 9 3 6 号、Ridgway et al., Prot Eng 9, 6 1 7 - 6 2 1 ( 1 9 9 6 ) 及び Carter, J Immunol Meth 2 4 8, 7 - 1 5 ( 2 0 0 1 ) に記載される。通常、この方法は、隆起がそれに対応する空洞内に位置できるように、第 1 のポリペプチドの接触面に隆起 ( 「ノブ」 ) を、及び第 2 のポリペプチドの接触面に対応する空洞を、それぞれ導入することにより、ヘテロ二量体形成を促進し、かつホモ二量体形成を妨害することを含む。隆起は、第 1 のポリペプチドの接触面からの小さなアミノ酸側鎖をそれより大きな側鎖 ( 例えばチロシン又はトリプトファン ) で置き換えることにより構築される。隆起と同じ又は同様のサイズの相補的空洞は、大きなアミノ酸側鎖をそれよりも小さなもの ( 例えばアラニン又はスレオニン ) で置き換えることにより、第 2 のポリペプチドの接触面に作り出される。

## 【 0 1 6 6 】

したがって、一態様では、本発明の二重特異性抗原結合分子の F c ドメインの第 1 のサブユニットの C H 3 ドメインにおいて、アミノ酸残基は、より大きな側鎖容積を有するアミノ酸残基と置き換わり、それによって、第 2 のサブユニットの C H 3 ドメイン内の空洞

10

20

30

40

50

内で位置換え可能な第1のサブユニットのCH3ドメイン内に隆起を生成し、Fcドメインの第2のサブユニットのCH3ドメインにおいて、アミノ酸残基は、より小さな側鎖容積を有するアミノ酸残基と置き換わり、それによって、第2のサブユニットのCH3ドメイン内に空洞を生成し、その中で、第1のサブユニットのCH3ドメイン内の隆起が位置換え可能である。隆起と空洞は、ポリペプチドをコードする核酸を、例えば部位特異的突然変異誘発により、又はペプチド合成により変化させることによって作り出すことができる。具体的な態様では、Fcドメインの第1のサブユニットのCH3ドメインにおいて、位置366のスレオニン残基がトリプトファン残基と置き換わっており(T366W)、Fcドメインの第2のサブユニット(のCH3ドメイン)において、位置407のチロシン残基がバリン残基と置き換わっている(Y407V)。一態様では、Fcドメインの第2のサブユニットにおいて、更に、位置366のトレオニン残基が、セリン残基と置き換わっており(T366S)、位置368のロイシン残基が、アラニン残基と置き換わっている(L368A)。

10

#### 【0167】

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

20

#### 【0168】

代替的な態様では、Fcドメインの第1のサブユニット及び第2のサブユニットの会合を促進する修飾は、例えば、PCT出願国際公開第2009/089004号に記載されるように、静電ステアリング効果を媒介する修飾を含む。一般的に、この方法は、2つのFcドメインサブユニットの接触面に、ホモ二量体生成が静電的に望ましくないが、ヘテロ二量化が静電的に望ましいように、荷電アミノ酸残基による1つ以上のアミノ酸残基の置き換えを含む。

30

#### 【0169】

本明細書に報告される二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子の重鎖のC末端は、アミノ酸残基PGKで終わる完全なC末端であり得る。重鎖のC末端は、C末端アミノ酸残基のうちの1つ又は2つが除去された、短くなったC末端であってもよい。好ましい一態様では、重鎖のC末端は、Pで終わる短くなったC末端である。好ましい一態様では、重鎖のC末端は、PGで終わる短くなったC末端である。本明細書に報告される全ての態様のうちの1つの態様では、本明細書に明記されるC末端のCH3ドメインを含む重鎖を含むCD28抗原結合分子は、C末端グリシン-リシンジペプチドを含む(G446及びK447、Kabat EUインデックスによるナンバリング)。本明細書に報告される全ての態様のうちの1つの態様では、本明細書に明記されるC末端のCH3ドメインを含む重鎖を含むCD28抗原結合分子は、C末端グリシン残基を含む(G446、Kabat EUインデックスによるナンバリング)。

40

#### 【0170】

##### Fabドメイン内の改変

一態様では、本発明は、(a)CD28への特異的結合が可能な第1の抗原結合ドメインと、(b)CD3への特異的結合が可能な第2の抗原結合ドメインと、(c)Fc受容体に対する抗原結合分子の結合親和性及び/又はエフェクター機能を低下させる1つ以上のアミノ酸置換を含む安定な会合が可能な第1及び第2のサブユニットで構成されるFcドメインとを含む、CD28への一価結合を特徴とする二重特異性アゴニスト性CD28

50

抗原結合分子であって、CD3への特異的結合が可能な第2の抗原結合ドメインがFab断片であり、Fab断片において、可変ドメインVH及びVL、又は定常ドメインCH1及びCLのいずれかがCrossma b技術に従って交換される、二重特異性アゴニスト性CD28抗原結合分子に関する。

【0171】

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

10

【0172】

一態様では、本発明は、(a)CD28への特異的結合が可能な第1の抗原結合ドメインと、(b)CD3への特異的結合が可能な第2の抗原結合ドメインと、(c)Fc受容体に対する抗原結合分子の結合親和性及び/又はエフェクター機能を低下させる1つ以上のアミノ酸置換を含む安定な会合が可能な第1及び第2のサブユニットで構成されるFcドメインを含む、CD28への一価結合を特徴とする二重特異性アゴニスト性CD28抗原結合分子であって、CD28への特異的結合が可能なFab断片において、可変ドメインVL及びVHが、VHドメインが軽鎖の一部であり、VLドメインが重鎖の一部であるように互いに置き換えられている、二重特異性アゴニスト性CD28抗原結合分子に関する。

20

【0173】

別の態様では、正しい対合を更に改善するために、(a)CD28への特異的結合が可能な第1の抗原結合ドメインと、(b)CD3への特異的結合が可能な第1の抗原結合ドメインと、(c)Fc受容体に対する抗原結合分子の結合親和性及び/又はエフェクター機能を低下させる1つ以上のアミノ酸置換を含む安定な会合が可能な第1のサブユニット及び第2のサブユニットで構成されるFcドメインを含み、CD28への一価結合を特徴とする二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子は、種々の荷電アミノ酸置換(いわゆる「荷電残基」)を含むことができる。これらの修飾は、交差しているか、又は交差していないCH1ドメイン及びCLドメインに導入される。特定の態様では、本発明は、CLドメインの1つにおいて、位置123(EUナンバリング)のアミノ酸がアルギニン(R)で置換されており、位置124(EUナンバリング)のアミノ酸がリジン(K)で置換されており、CH1ドメインの1つにおいて、位置147(EUナンバリング)、及び位置213(EUナンバリング)のアミノ酸がグルタミン酸(E)で置換されている、二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子に関する。特定の態様では、CD28への特異的結合が可能なFab断片のCLドメインでは、123位のアミノ酸(EUナンバリング)がアルギニン(R)で置換されており、124位のアミノ酸(EUナンバリング)がリジン(K)で置換されており、CD28への特異的結合が可能なFab断片のCH1ドメインでは、147位のアミノ酸(EUナンバリング)及び213位のアミノ酸(EUナンバリング)がグルタミン酸(E)によって置換されている。

30

40

【0174】

プロテアーゼ活性化可能な二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子

別の態様では、CD28への一価結合を特徴とする二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子が提供され、

(a)CD28への特異的結合が可能な第1の抗原結合ドメインと、

(b)CD3への特異的結合が可能な第2の抗原結合ドメインと、

(c)Fc受容体に対する抗原結合分子の結合親和性及び/又はエフェクター機能を低下させる1つ以上のアミノ酸置換を含む安定な会合が可能な第1のサブユニット及び第2のサブユニットで構成されるFcドメインと

を含み、

50

C D 3 への特異的結合が可能な当該第 2 の抗原結合ドメインが、

( i ) 配列番号 2 の重鎖相補性決定領域 C D R - H 1、配列番号 3 の C D R - H 2、及び配列番号 4 の C D R - H 3 を含む重鎖可変領域 ( V<sub>H</sub> C D 3 ) と、配列番号 5 の軽鎖相補性決定領域 C D R - L 1、配列番号 6 の C D R - L 2、及び配列番号 7 の C D R - L 3 を含む軽鎖可変領域 ( V<sub>L</sub> C D 3 ) と、又は

( i i ) 配列番号 1 0 の重鎖相補性決定領域 C D R - H 1、配列番号 1 1 の C D R - H 2、及び配列番号 1 2 の C D R - H 3 を含む重鎖可変領域 ( V<sub>H</sub> C D 3 ) と、配列番号 1 3 の軽鎖相補性決定領域 C D R - L 1、配列番号 1 4 の C D R - L 2、及び配列番号 1 5 の C D R - L 3 を含む軽鎖可変領域 ( V<sub>L</sub> C D 3 ) と

を含み、

10

さらに、

( d ) プロテアーゼ切断可能リンカーを介して二重特異性アゴニスト C D 2 8 抗原結合分子に共有結合したマスキング部分であって、C D 3 への特異的結合が可能な第 2 の抗原結合ドメインのイディオタイプに結合することができ、それにより、C D 3 への特異的結合が可能な抗原結合ドメインを可逆的に隠す、マスキング部分を含む。

#### 【 0 1 7 5 】

一態様では、マスキング部分は、C D 3 への特異的結合が可能な抗原結合ドメインのイディオタイプに結合することができ、それによって抗原結合ドメインを可逆的に隠す。一態様では、プロテアーゼ活性化可能二重特異性アゴニスト性 C D 2 8 抗原結合分子のマスキング部分は、第 1 の抗原結合部分に共有結合している。一態様では、マスキング部分は、第 1 の抗原結合部分の重鎖可変領域に共有結合している。一態様では、マスキング部分は、第 1 の抗原結合部分の軽鎖可変領域に共有結合している。この共有結合は、イディオタイプ第 1 の抗原結合部位へのマスキング部分の、好ましくは非共有結合性である特異的結合とは別である。第 1 の抗原結合部分のイディオタイプはその可変領域を含む。一態様では、マスキング部分は、第 1 の抗原結合ドメインが C D 3 に結合したときに C D 3 と接触するアミノ酸残基に結合する。好ましい態様では、マスキング部分は第 1 の抗原結合ドメインの同族抗原又はその断片ではない、すなわちマスキング部分は C D 3 又はその断片ではない。一態様では、マスキング部分は抗イディオタイプ抗体又はその断片である。一態様では、マスキング部分は抗イディオタイプの s c F v である。抗イディオタイプ s c F v である例示的なマスキング部分、及びかかるマスキング部分を含むプロテアーゼ活性化可能 C D 2 8 抗原結合分子は、実施例に詳細に記載されている。

20

30

#### 【 0 1 7 6 】

プロテアーゼ活性化可能二重特異性アゴニスト C D 2 8 抗原結合分子の成分は、様々な構成で互いに融合することができる。特定の態様では、プロテアーゼ活性化可能 T 細胞活性化二重特異性分子は、安定な会合が可能な第 1 及び第 2 のサブユニットで構成される F c ドメインを含む。いくつかの態様では、それぞれ、第 1 の抗原結合ドメインは、F a b 重鎖の C 末端において、F c ドメインの第 1 又は第 2 のサブユニットの N 末端に融合され、第 2 の抗原結合ドメインは、F a b 重鎖の C 末端において、F c ドメインの他方のサブユニットの N 末端に融合される。抗原結合部分は、F c ドメインに直接的に又は 1 つ以上のアミノ酸、典型的には約 2 ~ 2 0 個のアミノ酸を含むペプチドリンカーを介して融合していてもよい。ペプチドリンカーは、当該技術分野に知られており、本明細書に説明されている。適切な非免疫原性ペプチドリンカーには、例えば、( G<sub>4</sub> S )<sub>n</sub>、( S G<sub>4</sub> )<sub>n</sub>、( G<sub>4</sub> S )<sub>n</sub> 又は G<sub>4</sub> ( S G<sub>4</sub> )<sub>n</sub> ペプチドリンカーが挙げられる。「n」は、一般に、1 ~ 1 0 の間、典型的には 2 ~ 4 の間の数である。第 1 の抗原結合部分及び第 2 の抗原結合部分の F a b 重鎖を連結するのに適した例示的なペプチドリンカーは、E P K S C ( D ) - ( G<sub>4</sub> S )<sub>2</sub> ( 配列番号 1 9 3 及び 1 9 4 ) である。加えて、リンカーは、免疫グロブリンヒンジ領域 ( の一部 ) を含んでいてもよい。特に、抗原結合部分が F c ドメインサブユニットの N 末端に融合する場合、免疫グロブリンヒンジ領域又はその一部を介して、更なるペプチドリンカーを伴って又は伴うことなく融合していてもよい。

40

#### 【 0 1 7 7 】

50

マスキング部分

本発明の二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子は、少なくとも1つのマスキング部分を含み得る。結合部分を、結合部分によって認識される抗原の断片でキャッピングすることによって、抗体の結合をマスクすることが試みられてきた（例えば、国際公開第2013128194号）。この手法にはいくつかの制限がある。例えば、抗原を使用すると、結合部分の親和性を低下させる柔軟性が低くなる。これは、親和性が、抗原マスクによって確実にマスクされるのに十分に高くなければならないからである。また、解離した抗原は、*in vivo*でその1つ以上の同族受容体に結合して相互作用し、かかる受容体を発現する細胞に望ましくないシグナルを引き起こす可能性がある。対照的に、本明細書中に記載されるアプローチは、抗イディオタイプ抗体又はその断片をマスクとして使用する。有効なマスキング部分を設計するための2つの相対する考慮事項は、1.マスキングの有効性及び2.マスキングの可逆性である。親和性が低すぎる場合、マスキングは非効率的である。しかしながら、親和性が高すぎる場合、マスキングプロセスは容易に可逆的ではない可能性がある。高親和性抗イディオタイプマスク又は低親和性抗イディオタイプマスクがより良好に機能するかどうかは予測できなかった。本明細書に記載されるように、より高い親和性のマスキング部分は、抗原結合側をマスキングする際に全体的により良好に機能し、同時に、分子の活性化のために効果的に除去することができた。一態様では、抗イディオタイプマスクは1~8 nMの $K_D$ を有する。一態様では、抗イディオタイプマスクは、37°Cで2 nMの $K_D$ を有する。具体的な一実施形態では、マスキング部分は、CD3、例えばヒトCD3に結合することができる第1の抗原結合部分のイディオタイプを認識する。具体的な一実施形態では、マスキング部分は、標的細胞抗原に結合することができる第2の抗原結合部分のイディオタイプを認識する。

10

20

【0178】

一態様では、マスキング部分はCD3抗原結合ドメインをマスクし、

(i) DYSMN (配列番号123)のCDR-H1アミノ酸配列、WINTETGEPRYTDDFKG (配列番号124)、WINTETGEPRYTDDFTG (配列番号130)、及びWINTETGEPRYTQGFKG (配列番号131)からなる群から選択されるCDR-H2アミノ酸配列、及びEGDYDVFDY (配列番号125)のCDR-H3アミノ酸配列を含む重鎖可変領域( $V_H$ )と、RASKSVSTSSYSYMH (配列番号126)及びKSSKSVSTSSYSYMH (配列番号129)からなる群から選択される軽鎖相補性決定領域CDR-L1アミノ酸配列、YVSYLES (配列番号127)のCDR-L2アミノ酸配列、及びQHSREFPYT (配列番号128)及びQQSREFPYT (配列番号132)からなる群から選択されるCDR-L3アミノ酸配列を含む軽鎖可変領域( $V_L$ )と、又は

30

(ii) DYSMN (配列番号123)のCDR-H1アミノ酸配列、WINTETGEPRYTDDFKG (配列番号124)のCDR-H2アミノ酸配列、及びEGDYDVFDY (配列番号125)のCDR-H3アミノ酸配列を含む重鎖可変領域( $V_H$ )と、RASKSVSTSSYSYMH (配列番号126)のCDR-L1アミノ酸配列、YVSYLES (配列番号127)のCDR-L2アミノ酸配列、及びQHSREFPYT (配列番号128)のCDR-L3アミノ酸配列を含む軽鎖可変領域( $V_L$ )と、又は

40

(iii) SYGVS (配列番号123)のCDR-H1アミノ酸配列、IIWGDGSTNYHSALIS (配列番号124)のCDR-H2アミノ酸配列、及びGITTVVDDYYAMDY (配列番号125)のCDR-H3アミノ酸配列を含む重鎖可変領域( $V_H$ )と、KSSKSVSTSSYSYMH (配列番号129)のCDR-L1アミノ酸配列、AATFLAD (配列番号127)のCDR-L2アミノ酸配列、及びQHYSSTPYT (配列番号128)のCDR-L3アミノ酸配列を含む軽鎖可変領域( $V_L$ )と、又は

(iv) SYGVS (配列番号123)のCDR-H1アミノ酸配列、WINTETGEPRYTDDFTG (配列番号130)のCDR-H2アミノ酸配列、及びGITTVVDDYYAMDY (配列番号125)のCDR-H3アミノ酸配列を含む重鎖可変領域

50

(V<sub>H</sub>)と、KSSKSVSTSSYSYMH (配列番号129)のCDR-L1アミノ酸配列、AATFLAD (配列番号127)のCDR-L2アミノ酸配列、及びQHYYSTPYT (配列番号128)のCDR-L3アミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(V<sub>L</sub>)と、又は

(v)SYGVS (配列番号123)のCDR-H1アミノ酸配列、WINTETGEP RYTQGFKG (配列番号131)のCDR-H2アミノ酸配列、及びGITTVVDDYYAMDY (配列番号125)のCDR-H3アミノ酸配列を含む重鎖可変領域(V<sub>H</sub>)と、KSSKSVSTSSYSYMH (配列番号129)のCDR-L1アミノ酸配列、AATFLAD (配列番号127)のCDR-L2アミノ酸配列、及びQHYYSTPYT (配列番号128)のCDR-L3アミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(V<sub>L</sub>)とを含む。

【0179】

一態様では、マスキング部分はCD3抗原結合ドメインをマスクし、配列番号133と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一である重鎖可変領域配列と、配列番号134と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一である軽鎖可変領域配列と、又は機能を保持するそれらの変異体とを含む。一態様では、マスキング部分は、配列番号135と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一である重鎖可変領域配列と、配列番号136と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一である軽鎖可変領域配列とを含む。一態様では、マスキング部分は、配列番号135と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一である重鎖可変領域配列と、配列番号137と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一である軽鎖可変領域配列とを含む。一態様では、マスキング部分は、配列番号138と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一である重鎖可変領域配列と、配列番号137と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一である軽鎖可変領域配列とを含む。一態様では、マスキング部分は、配列番号139と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一である重鎖可変領域配列と、配列番号140と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一である軽鎖可変領域配列とを含む。別の態様では、マスキング部分は、配列番号141と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一である重鎖可変領域配列と、配列番号142と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一である軽鎖可変領域配列とを含む。

【0180】

一態様では、マスキング部分はCD3結合ドメインをマスクし、配列番号143のアミノ酸配列を含む。別の態様では、マスキング部分は、配列番号144のアミノ酸配列を含む。更に別の態様では、マスキング部分は、配列番号145のアミノ酸配列を含む。更なる一態様では、マスキング部分は、配列番号146のアミノ酸配列を含む。

【0181】

別の態様では、マスキング部分は、CD3抗原結合ドメインをマスクし、SYGVS (配列番号115)のCDR-H1アミノ酸配列、IIWGDGSTNYHSALIS (配列番号116)のCDR-H2アミノ酸配列、及びGITTVVDDYYAMDY (配列番号117)のCDR-H3アミノ酸配列を含む重鎖可変領域(V<sub>H</sub>)と、RASENIDSYLA (配列番号118)のCDR-L1アミノ酸配列、AATFLAD (配列番号119)のCDR-L2アミノ酸配列、及びQHYYSTPYT (配列番号120)のCDR-L3アミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(V<sub>L</sub>)とを含む。

【0182】

一態様では、マスキング部分はCD3抗原結合ドメインをマスクし、配列番号121と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一である重鎖可変領域配列と、配列番号122と少なくとも約95%、96%、97%、98%、99%又は100%同一である軽鎖可変領域配列と、又は機能を保持するそれらの変異体とを含む

。一態様では、マスキング部分はC D 3抗原結合ドメインをマスクし、配列番号1 2 1の重鎖可変領域配列と、配列番号1 2 2の軽鎖可変領域配列とを含む。一態様では、マスキング部分は、配列番号1 4 7のアミノ酸配列を含む。

【0 1 8 3】

特定の一態様では、マスキング部分はヒト化されている。一態様では、分子の抗C D 3抗原結合ドメインを可逆的に隠すためのイディオタイプ特異的ポリペプチドがヒト化されている。免疫グロブリンをヒト化する方法は、当該技術分野で周知であり、本明細書に記載される。

【0 1 8 4】

一態様では、マスキング部分はC D 3抗原結合ドメインをマスクし、配列番号1 3 3と少なくとも約9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %又は1 0 0 %同一である重鎖可変領域配列と、配列番号1 3 4と少なくとも約9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %又は1 0 0 %同一である軽鎖可変領域配列と、又は機能を保持するそれらの変異体とを含む。一態様では、マスキング部分はC D 3抗原結合ドメインをマスクし、配列番号1 3 3のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域配列と、配列番号1 3 4のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域配列と、又は機能性を保持するその変異体とを含む。一態様では、マスキング部分は、配列番号2 1 2のアミノ酸配列を含む。

10

【0 1 8 5】

特定の一態様では、マスキング部分はヒト化されている。一態様では、分子の抗C D 3抗原結合ドメインを可逆的に隠すためのイディオタイプ特異的ポリペプチドがヒト化されている。免疫グロブリンをヒト化する方法は、当該技術分野で周知であり、本明細書に記載される。

20

【0 1 8 6】

リンカー

一態様では、プロテアーゼ切断可能リンカーを介して二重特異性アゴニストC D 2 8抗原結合分子に共有結合したマスキング部分を含む二重特異性アゴニストC D 2 8抗原結合分子であって、該マスキング部分が、C D 3への特異的結合能を有する第2の抗原結合ドメインのイディオタイプに結合することができ、それにより、C D 3への特異的結合が可能な抗原結合ドメインを可逆的に隠す、二重特異性アゴニストC D 2 8抗原結合分子が提供される。一態様では、マスキング部分は、C D 3への特異的結合が可能な第2の抗原結合ドメインの重鎖可変領域(V<sub>H</sub>C D 3)に共有結合している。一態様では、マスキング部分は抗イディオタイプs c F vである。

30

【0 1 8 7】

一特定態様では、プロテアーゼ活性化可能二重特異性アゴニストC D 2 8抗原結合分子は、配列番号1 9 5、1 9 6、1 9 7、1 9 8、1 9 9、2 0 0、2 0 1、2 0 2、2 0 3、2 0 4、2 0 5、2 0 6、2 0 7、2 0 8、2 0 9、2 1 0又は2 1 1と少なくとも約9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %又は1 0 0 %同一であるポリペプチド配列を含むプロテアーゼ認識部位を有するリンカーを含む。一態様では、プロテアーゼ認識部位は、配列番号1 4 8、1 4 9、1 5 0、1 5 1、1 5 2、1 5 3、1 5 4、1 5 5、1 5 6、1 5 7、1 5 8、1 5 9、1 6 0、1 6 1又は1 6 2のポリペプチド配列を含む。好ましい実施形態では、プロテアーゼ認識部位は、配列番号1 6 2のポリペプチド配列を含む。

40

【0 1 8 8】

一態様では、プロテアーゼ切断可能リンカーを切断することができるプロテアーゼは、メタロプロテイナーゼ、例えばマトリックスメタロプロテイナーゼ(M M P) 1 ~ 2 8、ディスインテグリン及びメタロプロテイナーゼ(A D A M) 2、7 ~ 1 2、1 5、1 7 ~ 2 3、2 8 ~ 3 0及び3 3、セリンプロテアーゼ、例えばウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子及びマトリプターゼ、システインプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ、並びにカテプシンプロテアーゼからなる群から選択される。特定の一態様では、プロテアーゼはM M P 9又はM M P 2である。更に好ましい態様では、免疫グロブリンは、ヒ

50



ト免疫グロブリンである。MT-SP1、ST14 (Suppression of tumorigenicity protein 14) 又はTADG-15 (tumor-associated differentially expressed gene 15 protein) と呼ばれるマトリプターゼは、ほとんどのヒト上皮で発現されるトリプシン様セリンプロテアーゼであり、配列番号164 (UniProt Q9Y5Y6) のアミノ酸配列を含む。一態様では、プロテアーゼ切断可能リンカーは、プロテアーゼ認識配列RQARVVNG (配列番号148) を含む。別の態様では、プロテアーゼ切断可能リンカーは、プロテアーゼ認識配列PMAKK (配列番号162) を含む。

【0189】

特定の一態様では、配列番号102のアミノ酸配列を含む第1の軽鎖と、配列番号101のアミノ酸配列を含む第1の重鎖と、配列番号106のアミノ酸配列を含む第2の重鎖と、配列番号104のアミノ酸配列を含む第2の軽鎖とを含む、二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子(分子11)が提供される。

【0190】

別の一態様では、配列番号90のアミノ酸配列を含む第1の軽鎖と、配列番号98のアミノ酸配列を含む第1の重鎖と、配列番号97のアミノ酸配列を含む第2の重鎖と、配列番号92のアミノ酸配列を含む第2の軽鎖とを含む、二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子(分子6)が提供される。

【0191】

別の一態様では、配列番号90のアミノ酸配列を含む第1の軽鎖と、配列番号98のアミノ酸配列を含む第1の重鎖と、配列番号99のアミノ酸配列を含む第2の重鎖と、配列番号94のアミノ酸配列を含む第2の軽鎖とを含む、二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子(分子7)が提供される。

【0192】

別の態様では、切断不可能リンカーを介して二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子に共有結合したマスキング部分を含む二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子であって、該マスキング部分が、CD3への特異的結合能を有する第2の抗原結合ドメインのイディオタイプに結合することができ、それにより、CD3への特異的結合が可能な抗原結合ドメインを可逆的に隠す、二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子が提供される。一態様では、マスキング部分は、CD3への特異的結合が可能な第2の抗原結合ドメインの重鎖可変領域(V<sub>H</sub>CD3)に共有結合している。一態様では、マスキング部分は抗イディオタイプscFvである。一態様では、切断不可能リンカーは、配列番号163のアミノ酸配列を有する。

【0193】

ポリヌクレオチド

本発明は更に、本明細書に記載した二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子、又はその断片をコードする単離ポリヌクレオチドを提供する。本発明の二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子をコードする1つ以上の単離ポリヌクレオチドは、完全な抗原結合分子をコードする単一のポリヌクレオチドとして発現されてもよく、又は同時発現される複数の(例えば、2つ以上の)ポリヌクレオチドとして発現されてもよい。一緒に発現するポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドは、例えば、ジスルフィド結合又は他の手段を介して会合し、機能的な抗原結合分子を形成してもよい。例えば、免疫グロブリンの軽鎖部分は、免疫グロブリンの重鎖部分とは別のポリヌクレオチドによってコードされ得る。共発現すると、重鎖ポリペプチドは軽鎖ポリペプチドと会合して免疫グロブリンを形成する。いくつかの態様では、単離されたポリヌクレオチドは、本明細書中に記載される本発明による二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子全体をコードする。他の態様では、単離されたポリヌクレオチドは、本明細書中に記載される本発明による二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子に含まれるポリペプチドをコードする。特定の態様では、ポリヌクレオチド又は核酸は、DNAである。他の態様では、本発明のポリヌクレオチドはRNAであり、例えば、メッセンジャーRNA(mRNA)の形態である。本

10

20

30

40

50

発明のRNAは、一本鎖又は二本鎖であってもよい。

【0194】

組換え方法

本発明の二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子は、例えば、固体ペプチド合成（例えば、Merrifield固相合成）又は組換え産生によって得ることができる。組換え産生のために、例えば上記のような二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子又はそのポリペプチド断片をコードする1つ以上のポリヌクレオチドを単離し、宿主細胞における更なるクローニング及び/又は発現のために1つ以上のベクターに挿入する。このようなポリヌクレオチドは、一般的な手順を使用して容易に単離され、配列決定され得る。本発明の一態様では、本発明のポリヌクレオチドの1つ以上を含むベクター、好ましくは発現ベクターを提供する。当業者に周知の方法を使用し、適切な転写/翻訳制御シグナルと共に、抗体（断片）のコード配列を含む発現ベクターを構築することができる。これらの方法としては、*in vitro*組換えDNA技術、合成技術及び*in vivo*組換え/遺伝子組換えが挙げられる。例えば、Maniatis et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1989); 及び Ausubel et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989)に記載される技術を参照されたい。発現ベクターは、プラスミド、ウイルスの一部であってもよく、又は核酸断片であってもよい。発現ベクターは、抗体又はそのポリペプチド断片（即ちコード領域）をコードするポリヌクレオチドが、プロモーター、及び/又は他の転写若しくは翻訳調節要素と作動可能に会合してクローニングされる発現カセットを含む。本明細書で使用される場合、「コード領域」は、アミノ酸に翻訳されるコドンからなる核酸の一部である。「終止コドン」（TAG、TGA又はTAA）はアミノ酸に翻訳されないが、（存在する場合には）コード領域の一部と考えられる。但し、例えばプロモーター、リボソーム結合部位、転写ターミネーター、イントロン、5'及び3'非翻訳領域等の任意の隣接配列はコード領域の一部ではない。2つ以上のコード領域が、単一のポリヌクレオチドコンストラクト中に、例えば単一のベクター上に存在していてもよく、又は別個のポリヌクレオチドコンストラクト中に、例えば別個の（異なる）ベクター上に存在していてもよい。さらに、任意のベクターは、単一のコード領域を含んでいてもよいし、2つ以上のコード領域を含んでいてもよく、例えば本発明のベクターは、タンパク質分解性切断によって翻訳後又は翻訳と同時に最終タンパク質に分離される1つ以上のポリペプチドをコードしてもよい。さらに、本発明のベクター、ポリヌクレオチド、又は核酸は、本発明の抗体、若しくはそのポリペプチド断片をコードするポリヌクレオチド、又はその変異体若しくは誘導体に融合している、又は非融合であるいずれかの、異種コード領域をコードすることができる。異種コード領域には、限定されないが、例えば分泌シグナルペプチド又は異種性機能ドメイン等の特殊なエレメント又はモチーフが含まれる。作動可能な結合とは、ポリペプチド等の遺伝子産物のコード領域が、遺伝子産物の発現を制御配列の影響下又は制御下に置くように、1つ以上の制御配列と結合している場合である。2つのDNA断片（ポリペプチドコード領域とそれに結合するプロモーター等）は、プロモーター機能の誘導が、所望の遺伝子産物をコードするmRNAの転写をもたらす場合、及び2つのDNA断片間の連結の性質が、遺伝子産物の発現を指示する発現制御配列の能力を妨げないか又は転写されるDNAテンプレートの能力を妨げない場合、「作動可能に結合している」。したがって、プロモーター領域は、プロモーターがその核酸の転写をもたらすことができる場合に、ポリペプチドをコードする核酸に作動可能に結合されているといえる。プロモーターは、所定の細胞においてのみDNAの実質的な転写を指示する、細胞特異的プロモーターであってもよい。プロモーター以外に、他の転写調節エレメント、例えばエンハンサー、オペレーター、リプレッサー及び転写終結シグナルが、細胞特異的転写を指示するポリヌクレオチドと作動可能に結合することができる。

10

20

30

40

50

【 0 1 9 5 】

適切なプロモーター及び他の転写調節領域は本明細書に開示されている。様々な転写調節領域が当業者に知られている。これらには、限定されないが、脊椎動物細胞において機能する転写調節領域、例えば、限定されないが、サイトメガロウイルス由来のプロモーター及びエンハンサーセグメント（例えば、最初期プロモーターとイントロンA）、シミアンウイルス40（例えば最初期プロモーター）、及びレトロウイルス（例えばラウス肉腫ウイルス等）が挙げられる。他の転写調節領域としては、脊椎動物遺伝子から誘導されるもの、例えば、アクチン、ヒートショックタンパク質、ウシ成長ホルモン及びウサギa-グロビン、及び真核細胞において遺伝子発現を制御することが可能な他の配列が挙げられる。更なる適切な転写調節領域としては、組織特異的なプロモーター及びエンハンサー、及び誘発性プロモーター（例えばプロモーター誘発性テトラサイクリン）が挙げられる。同様に、様々な翻訳調節エレメントが当業者に知られている。これらには、限定されないが、リボソーム結合部位、翻訳開始及び終止コドン、並びにウイルス系由来のエレメント（特に、配列内リボソーム進入部位、すなわちIRES、CITE配列とも呼ばれる）が挙げられる）が挙げられる。また、発現カセットは、例えば複製起点及び/又はレトロウイルスの長い末端反復配列（LTR）若しくはアデノ随伴ウイルス（AAV）の逆位末端配列（ITR）等の染色体組み込みエレメントといった他の特徴を含んでいてもよい。

10

【 0 1 9 6 】

本発明のポリヌクレオチド及び核酸コード領域は、本発明のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの分泌を指示する分泌又はシグナルペプチドをコードする更なるコード領域と結合させることができる。例えば、抗体又はそのポリペプチド断片の分泌が所望される場合、シグナル配列をコードするDNAを、本発明の抗体又はそのポリペプチド断片の核酸の上流に配置することができる。シグナル仮説によると、哺乳類細胞によって分泌されるタンパク質は、成長中のタンパク質鎖の粗面小胞体を横切る排出輸送が開始されると成熟タンパク質から切断されるシグナルペプチド又は分泌リーダー配列を有する。当業者は、脊椎動物細胞によって分泌されるポリペプチドが一般に、ポリペプチドのN末端に融合したシグナルペプチドを有し、それが翻訳されたポリペプチドから切断されて分泌又は「成熟」型のポリペプチドを産生することを知っている。特定の実施形態では、天然のシグナルペプチド（例えば免疫グロブリン重鎖若しくは軽鎖シグナルペプチド）、又はその配列と作動可能に結合している、ポリペプチドの分泌を指示する能力を保持するその配列の機能的誘導体を使用される。或いは、異種哺乳動物シグナルペプチド又はその機能的誘導体を使用され得る。例えば、野生型リーダー配列は、ヒト組織プラスミノゲン活性化因子（TPA）又はマウス - グルクロニダーゼのリーダー配列で置換されてもよい。

20

30

【 0 1 9 7 】

後の精製（例えばヒスチジンタグ）を容易にするために、又は二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子の標識化を補助するために使用され得る短いタンパク質配列をコードするDNAは、本発明の抗体又はそのポリペプチド断片をコードするポリヌクレオチドの内部又は末端に含まれ得る。

【 0 1 9 8 】

本発明の更なる態様では、本発明の1つ以上のポリヌクレオチドを含む宿主細胞を提供する。特定の実施形態では、本発明の1つ以上のベクターを含む宿主細胞が提供される。ポリヌクレオチド及びベクターは、それぞれポリヌクレオチド及びベクターに関連して本明細書に記載する特徴のいずれかを単独で、又は組み合わせて組み込んでもよい。一態様では、宿主細胞は、本発明の本発明の抗体（の一部）をコードするポリヌクレオチドを含むベクターを含む（例えば、これにより形質転換されている、又はこれがトランスフェクションされている）。本明細書で使用される場合、「宿主細胞」という用語は、本発明の融合タンパク質又はその断片を生成するように操作することが可能な任意の種類細胞系を指す。抗原結合分子を複製し、発現を補助するのに適した宿主細胞は、当該技術分野で周知である。かかる細胞は、適切な場合、特定の発現ベクターを用いてトランスフェクト

40

50

されるか、又は形質導入されてもよく、大規模発酵機に接種するために大量のベクターを含む細胞を成長させ、臨床用途に十分な量の抗原結合分子を得ることができる。適切な宿主細胞としては、原核微生物（例えば大腸菌）又は種々の真核生物細胞、例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）、昆虫細胞等が挙げられる。例えば、ポリペプチドは、特にグリコシル化が必要とされない場合には、細菌内で産生されてもよい。発現後、ポリペプチドは、適切な画分中の細菌細胞ペーストから単離されてもよく、更に精製されてもよい。原核生物に加え、真核生物の微生物、例えば、糸状菌又は酵母は、ポリペプチドをコードするベクターに適切なクローニング又は発現の宿主であり、グリコシル化経路が「ヒト化」された真菌株及び酵母株を含み、部分的又は完全にヒトグリコシル化パターンを有するポリペプチドを産生する。Gerngross, Nat Biotech 22, 1409-1414 (2004) 及び Li et al., Nat Biotech 24, 210-215 (2006) を参照されたい。

10

#### 【0199】

（グリコシル化）ポリペプチドの発現に適した宿主細胞は、多細胞生物（無脊椎動物と脊椎動物）からも得られる。無脊椎動物細胞の例としては、植物細胞及び昆虫細胞が挙げられる。多くのバキュロウイルス株が同定されており、特に、*Spodoptera frugiperda* 細胞のトランスフェクションのために、これを昆虫細胞と組み合わせて使用してもよい。植物細胞培養物も、宿主として利用することができる。例えば、米国特許第5,959,177号、同第6,040,498号、同第6,420,548号、同第7,125,978号、及び同第6,417,429号（トランスジェニック植物で抗体を産生するためのPLANTIBODIES（商標）技術を記載している）を参照されたい。脊椎動物細胞も、宿主として使用され得る。例えば、懸濁液中で増殖するように適合されている哺乳動物細胞株は有用であり得る。有用な哺乳動物宿主細胞株の他の例は、SV40（COS-7）によって形質転換されたサル腎臓CV1株；ヒト胎児性腎臓（例えば、Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)）に記載される293又は293T細胞；ベビーハムスター腎臓細胞（baby hamster kidney cell: BHK）；マウスセルトリ細胞（例えば、Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)）に記載されるTM4細胞；サル腎臓細胞（CV1）；アフリカミドリザル腎臓細胞（VERO-76）；ヒト子宮頸癌腫細胞（HELA）；イヌ腎臓細胞（MDCK）；バッファローラット肝臓細胞（BRL 3A）；ヒト肺細胞（W138）；ヒト肝臓細胞（Hep G2）；マウス乳がん細胞（MMT 060562）；例えばMather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)）に記載されるTRI細胞；MRC 5細胞；並びにFS4細胞である。他の有用な哺乳動物宿主細胞株としては、dhfr-CHO細胞を含む、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞（Urlaub et al., Proc Natl Acad Sci USA 77, 4216 (1980)）、骨髄腫細胞株、例えば、YO、NS0、P3X63及びSp2/0が挙げられる。タンパク質産生に適した特定の哺乳動物宿主細胞の総説としては、例えば、Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003) を参照されたい。宿主細胞としては、培養細胞、例えば、ほんの数例を挙げると、哺乳動物培養細胞、酵母細胞、昆虫細胞、細菌細胞及び植物細胞が挙げられるが、トランスジェニック動物、トランスジェニック植物又は培養植物又は動物組織に含まれる細胞も挙げられる。一実施形態では、宿主細胞は、真核細胞であり、好ましくは、哺乳動物細胞、例えば、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、ヒト胚腎臓（HEK）細胞又はリンパ球細胞（例えば、YO、NS0、Sp20細胞）である。これらの系において外来遺伝子を発現させる標準的な技術は、当該技術分野で公知である。免疫グロブリンの重鎖又は軽鎖を含むポリペプチドを発現する細胞は、発現された生成物が重鎖及び軽鎖の両方を有する免疫グロブリンであるように、免疫グロブリン鎖の他方も発現するように操作することができる。

20

30

40

50

## 【0200】

一態様では、本発明の抗体又はそのポリペプチド断片の発現に適した条件下で、本明細書で提供される本発明の抗体又はそのポリペプチド断片をコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞を培養すること、及び本発明の抗体又はそのポリペプチド断片を宿主細胞（又は宿主細胞培養培地）から回収すること、を含む、本発明の二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子又はそのポリペプチド断片を産生する方法が提供される。

## 【0201】

特定の態様では、抗原結合分子の一部を形成するCD3（例えば、Fab断片）への特異的結合が可能な抗原結合ドメインは、少なくとも抗原への結合が可能な免疫グロブリン可変領域を含む。可変領域は、天然又は非天然に存在する抗体及びその断片の一部を形成し得、それらに由来し得る。ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体を産生する方法は、当該技術分野で周知である（例えば、Harlow and Lane, 'Antibodies, a laboratory manual', Cold Spring Harbor Laboratory, 1988を参照されたい）。天然に存在しない抗体は、固相ペプチド合成を用いて構築することができ、組換えによって産生することができ（例えば、米国特許第4,186,567号に記載されるように）、又は例えば、可変重鎖及び可変軽鎖を含むコンビナトリアルライブラリをスクリーニングすることによって得ることができる（例えば、McCaffertyに対する米国特許第5,969,108号を参照されたい）。

## 【0202】

任意の動物種の免疫グロブリンを本発明で使用することができる。本発明において有用な非限定的な免疫グロブリンは、マウス、霊長類、又はヒト起源のものであり得る。融合タンパク質がヒトへの使用を意図したものである場合、免疫グロブリンの定常領域がヒト由来であるキメラ形態の免疫グロブリンを使用してもよい。免疫グロブリンのヒト化形態又は完全なヒト形態は、当該技術分野で周知の方法に従って調製することもできる（例えば、Winterに対する米国特許第5,565,332号を参照されたい）。ヒト化は、限定されないが、(a)重要なフレームワーク残基（例えば、良好な抗原結合親和性又は抗体機能を維持するのに重要なもの）を保持しつつ、又は保持せずに、非ヒト（例えば、ドナー抗体）のCDRをヒト（例えば、レシピエント抗体）のフレームワーク領域及び定常領域上に移植すること、(b)非ヒト特異性決定領域（SDR又はa-CDR；抗体-抗原相互作用にとって重要な残基）のみをヒトフレームワーク及び定常領域上に移植すること、又は(c)非ヒト可変ドメイン全体を移植するが、表面残基の置き換えによってヒト様切片で「クローキング」することを含め、種々の方法によって達成されてもよい。ヒト化抗体及びそれらの作製方法は、例えば、Almagro and Franssón, Front Biosci 13, 1619-1633 (2008)に概説されており、例えば、Riechmann et al., Nature 332, 323-329 (1988); Queen et al., Proc Natl Acad Sci USA 86, 10029-10033 (1989); 米国特許第5,821,337号、同第7,527,791号、同第6,982,321号及び同第7,087,409号; Jones et al., Nature 321, 522-525 (1986); Morrison et al., Proc Natl Acad Sci 81, 6851-6855 (1984); Morrison and Oi, Adv Immunol 44, 65-92 (1988); Verhoeyen et al., Science 239, 1534-1536 (1988); Padlan, Molec Immun 31(3), 169-217 (1994); Kashmiri et al., Methods 36, 25-34 (2005) (SDR (a-CDR) グラフト化を記載); Padlan, Mol Immunol 28, 489-498 (1991) (「リサーフェシング (resurfacing)」を記載); Dall'Acqua et al., Methods 36, 43-60 (2005) (「FRシャッフリング」を記載); 並びに Osbourn et al., Methods 36, 61-68 (2005) 及

10

20

30

40

50

び Klimka et al., Br J Cancer 83, 252 - 260 (2000) (FRシャッフリングに対する「ガイド選択」アプローチを記載)に更に記載されている。本発明による特定の免疫グロブリンは、ヒト免疫グロブリンである。ヒト抗体及びヒト可変領域は、当該技術分野で公知の様々な技術を用いて作製することができる。ヒト抗体は、一般的に、van Dijk and van de Winkel, Curr Opin Pharmacol 5, 368 - 74 (2001)及びLonberg, Curr Opin Immunol 20, 450 - 459 (2008)に記載される。ヒト可変領域は、ハイブリドーマ法によって作製されたヒトモノクローナル抗体の一部を形成し得て、そのヒトモノクローナル抗体に由来し得る(例えば、Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51 - 63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)を参照されたい)。ヒト抗体及びヒト可変領域はまた、抗原チャレンジに応答して、インタクトなヒト抗体又はヒト可変領域を有するインタクトな抗体を産生するように改変されたトランスジェニック動物に免疫原を投与することによって調製することができる(例えば、Lonberg, Nat Biotech 23, 1117 - 1125 (2005)を参照されたい)。ヒト抗体及びヒト可変領域はまた、ヒト由来ファージディスプレイライブラリー(例えば、Hoogenboom et al. in Methods in Molecular Biology 178, 1 - 37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001);及びMcCafferty et al., Nature 348, 552 - 554; Clackson et al., Nature 352, 624 - 628 (1991)を参照されたい)から選択されるFvクローン可変領域配列を単離することによって作製され得る。ファージは、典型的には、抗体断片を単鎖Fv(scFv)断片又はFab断片のいずれかとしてディスプレイする。

### 【0203】

特定の態様では、二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子に含まれる抗原結合ドメインは、例えば、PCT出願国際公開第2012/020006号(親和性成熟に関する実施例を参照されたい)又は米国特許第2004/0132066号に開示される方法に従って、結合親和性が増強されるように操作される。本発明の抗原結合分子が特定の抗原決定基に結合する能力は、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)又は当業者には知られている他の技術、例えば、表面プラズモン共鳴技術(Liljebblad et al., Glyco J 17, 323 - 329 (2000))、及び従来 of 結合アッセイ(Heeley, Endocr Res 28, 217 - 229 (2002))のいずれかによって測定することができる。競合アッセイを使用して、特定の抗原への結合について参照抗体と競合する抗原結合分子を同定することができる。特定の実施形態では、かかる競合抗原結合分子は、参照抗原結合分子によって結合される同じエピトープ(例えば、線状エピトープ又は立体配座エピトープ)に結合する。抗原結合分子が結合するエピトープをマッピングするための詳細な例示の方法が、Morris (1996) ' ' Epitope Mapping Protocols, ' ' in Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ)に提供されている。例示的な競合アッセイでは、固定化された抗原を、抗原に結合する第1の標識抗原結合分子と、抗原への結合について第1の抗原結合分子と競合するその能力について試験されている第2の非標識抗原結合分子とを含む溶液中でインキュベートする。第2の抗原結合分子は、ハイブリドーマ上清中に存在していてもよい。対照として、固定化された抗原を、第1の標識抗原結合分子を含むが第2の非標識抗原結合分子を含まない溶液中でインキュベートする。第1の抗体の抗原への結合を許容する条件下でインキュベートした後、過剰な未結合抗体が除去され、固定化された抗原に結合した標識の量が測定される。固定化抗原に結合した標識の量が、対照試料と比較して試験試料中で実質的に減少している場合、それは、第2の抗原結合分子が、抗原への結合について第1の抗原結合分子と競合していることを示している。Harlow and Lane (1988

) Antibodies: A Laboratory Manual ch. 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) を参照されたい。

#### 【0204】

本明細書に記載のとおり調製される本発明の二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子は、高速液体クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、親和性クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー等の、当該技術分野にて周知の技術により精製することができる。特定のタンパク質を精製するために使用される実際の条件は、一部には正味荷電、疎水性、親水性等の因子に依存し、当業者に明瞭であろう。親和性クロマトグラフィー精製のために、抗原結合分子が結合する抗体、リガンド、受容体、又は抗原を使用することができる。例えば、本発明の抗原結合分子を親和性クロマトグラフィー精製するために、プロテインA又はプロテインGを含むマトリックスを使用することができる。連続的なプロテインA又はG親和性クロマトグラフィー及びサイズ排除クロマトグラフィーが、基本的に実施例に記載されるように、抗原結合分子を単離するために使用され得る。CD28抗原結合分子又はその断片の純度は、ゲル電気泳動、高圧液体クロマトグラフィー等を含む、多種多様の周知の分析技術のいずれかにより測定することができる。例えば、実施例にて記載のとおり発現するCD28抗原結合分子は、還元型、及び非還元型SDS-PAGEにより示されるように、インタクトであり、適切にアSEMBLしたことが示された。

10

#### 【0205】

##### アッセイ

本明細書提供される二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子の物理的/化学的性質、及び/又は生物活性を、当該技術分野において公知の様々なアッセイにより識別、スクリーニング、又は特性決定することができる。

20

#### 【0206】

##### 1. 親和性アッセイ

対応する標的に対する本明細書で提供される抗原結合分子の親和性は、Proteon機器(Bio-rad)等の標準的な機器、及び組換え発現によって得られ得るもの等の受容体又は標的タンパク質を使用して、表面プラズモン共鳴(SPR)によって実施例に記載の方法に従って決定することができる。二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子のその抗原に対する親和性は、Proteon機器(Bio-rad)等の標準的な機器を使用して、表面プラズモン共鳴(SPR)によって決定することもでき、受容体又は標的タンパク質等は組換え発現によって得ることができる。一態様によれば、 $K_D$ は、Proteon(登録商標)機(Bio-Rad)を用い、25で表面プラズモン共鳴によって測定される。

30

#### 【0207】

一態様では、CD3に対する結合活性は、以下のようにSPRによって決定される。泳動緩衝液及び希釈緩衝液としてHBS-P+(10mM HEPES、150mM NaCl pH7.4、0.05%界面活性剤P20)を用いて、Biacore T200装置(GE Healthcare)で25でSPRを行う。ビオチン化ヒトCD3 / (ノブ・イントゥ・ホール修飾を有するヒトFcドメイン及びC末端Aviタグに融合されたCD3デルタ及びCD3イプシロン外部ドメインのヘテロ二量体; 配列番号41及び42を参照されたい)、並びにビオチン化抗huIgG(Capture Select, Thermo Scientific, #7103262100)を、Series S Sensor Chip SA(GE Healthcare, #29104992)に固定化し、少なくとも1000共鳴単位(RU)の表面密度を得る。2µg/mlの濃度の抗CD3抗体を5µl/分の流速で30秒間注入し、解離を120秒間監視する。10mMグリシンpH1.5を60秒間注入することによって表面を再生する。バルク屈折率差は、ブランク注入を差し引くことによって、及びブランク対照フローセルから得られた応答を差し引くことによって補正される。評価のため、注入終了5秒後の結合応

40

50

答をとる。結合シグナルを正規化するために、CD3結合は、抗huIgG応答（固定化された抗huIgG抗体上での抗CD3抗体の捕捉の際に得られるシグナル（RU））によって分けられる。特定の治療の後の抗体のCD3に対する結合活性であって、異なる治療の後の抗体のCD3に対する結合活性に対して相対的なものは、異なる治療の後の対応する抗体の試料の結合活性に対して、特定の治療の後の抗体のサンプルの結合活性を基準とすることにより計算される。

#### 【0208】

##### 2. 結合アッセイ及びその他のアッセイ

本明細書において提供する二重特異性抗原結合分子の、対応する受容体を発現する細胞への結合は、例えばフローサイトメトリー（FACS）により、特定の受容体又は標的抗原を発現する細胞株を使用して評価することができる。一態様では、ヒトCD28（ヒトCD28を安定的に過剰発現するように改変された親細胞株CHO-k1 ATCC#CCL-61）を発現するCHO細胞を結合アッセイに使用する。

10

#### 【0209】

##### 3. 活性アッセイ

一態様では、生物活性を有するCD28抗原結合分子を特定するためのアッセイが提供される。生物活性には、例えばT細胞の増殖の誘導、T細胞内のシグナル伝達の誘導、T細胞内の活性化マーカーの発現の誘導、T細胞によるサイトカイン分泌の誘導、腫瘍細胞等の標的細胞の溶解の誘導、並びに腫瘍退縮及び/又は生存の向上の誘導が含まれる。特に、T細胞活性化及びサイトカイン分泌は、実施例2~4に記載されるような方法又は腫瘍細胞殺傷によって測定される。例えば、Jurkat NFATレポーター細胞アッセイを使用して、T細胞活性化を測定する。in vivo及び/又はin vitroでかかる生物活性を有する抗原結合分子も提供される。

20

#### 【0210】

##### 医薬組成物、製剤、及び投与経路

更なる態様では、本発明は、例えば、以下の治療方法のいずれかにおける使用のための、本明細書で提供される二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子のいずれかを含む医薬組成物を提供する。一実施形態では、医薬組成物は、本明細書で提供される二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子、及び少なくとも1種の薬学的に許容可能な賦形剤を含む。別の態様では、医薬組成物は、本明細書で提供される二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子のいずれかと、例えば後述する少なくとも1種の追加の治療剤とを含む。

30

#### 【0211】

本発明の医薬組成物は、薬学的に許容可能な賦形剤に溶解又は分散した、治療有効量の1つ以上の二重特異性抗原結合分子を含む。「薬学的又は薬理的に許容可能な」という語句は、用いられる用量及び濃度でレシピエントに対して一般に無毒である、すなわち、例えばヒト等の動物に必要なに応じて投与されたとき、副作用、アレルギー又は他の有害な反応を生じない分子実体及び組成物を指す。少なくとも1種の二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子、及び任意に追加の有効成分を含有する医薬組成物の調製は、参照により本明細書に組み込まれているRemington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990により例示されているように、本開示の見地から当業者に既知であろう。特に、組成物は、凍結乾燥された製剤又は水溶液である。本明細書で使用される場合、「薬学的に許容可能な賦形剤」としては、当業者には知られているだろうが、任意及び全ての溶媒、バッファー、分散媒体、コーティング、界面活性剤、酸化防止剤、防腐剤（例えば、抗菌剤、抗真菌剤）、等張性剤、塩類、安定化剤及びこれらの組合せが挙げられる。

40

#### 【0212】

非経口組成物としては、注射、例えば皮下、皮内、病巣内、静脈内、動脈内、筋肉内、髄腔内、又は腹腔内注射により投与されるように設計されているものが挙げられる。注射のために、本発明のTNFファミリーリガンド三量体含有抗原結合分子は、水溶液中で配合されてもよく、好ましくは、生理学的に適合する緩衝液、例えば、Hanks溶液、R

50



inger 溶液又は生理食塩水緩衝液中で配合されてもよい。該溶液は、懸濁剤、安定剤、及び/又は分散剤等の調剤剤を含有することができる。或いは、二重特異性アゴニスト CD28 抗原結合分子は使用前に、好適なビヒクル、例えば発熱性物質除去水と共に構成するための、粉末形態であることができる。滅菌注射可能溶液は、必要な場合には以下に列挙する種々の他の成分と共に、本発明の融合タンパク質を必要な量で、適切な溶媒に組み込むことによって調製される。滅菌性は、例えば、滅菌ろ過膜を通したる過によって容易に達成され得る。一般的に、分散物は、種々の滅菌した有効成分を、塩基性分散媒体及び/又は他の成分を含む滅菌ビヒクルに組み込むことによって調製される。滅菌注射可能溶液、懸濁液又は乳濁液を調製するための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、既に滅菌濾過した液体媒体から有効成分と任意の更なる所望な成分の粉末が得られる減圧乾燥又は凍結乾燥技術である。液体媒体は、必要な場合には適切に緩衝されているべきであり、注射する前に、十分な食塩水又はグルコースで液体希釈剤をまず等張性にする。該組成物は、製造及び貯蔵条件下で安定でなければならず、細菌及び真菌といった微生物の汚染作用から保護されなければならない。エンドトキシンの汚染は、安全なレベルで、例えば、 $0.5 \text{ ng/mg}$  タンパク質未満で最小限に維持されるべきであることが理解される。薬学的に許容可能な適切な賦形剤には、限定されないが、リン酸塩、クエン酸塩及び他の有機酸等のバッファー；アスコルビン酸及びメチオニンを含む抗酸化剤；防腐剤（例えばオクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；ヘキサメトニウムクロリド；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、フェノール、ブチル又はベンジルアルコール；アルキルパラベン類、例えばメチル又はプロピルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及び m-クレゾール）；低分子量（約 10 残基未満）のポリペプチド；タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチン又は免疫グロブリン；親水性ポリマー類、例えばポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン又はリジン；単糖類、二糖類、及びグルコース、マンノース又はデキストリンを含む他の炭水化物；キレート剤、例えば EDTA；糖、例えばスクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトール；塩形成対イオン、例えばナトリウム；金属錯体（例えば Zn-タンパク質錯体）；及び/又はポリエチレングリコール（PEG）等の非イオン性界面活性剤が挙げられる。水性注射懸濁液は、懸濁液の粘度を上げる化合物（例えば、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、ソルビトール、デキストラン等）を含んでいてもよい。任意に、該懸濁液は、適切な安定剤、又は化合物の溶解度を上昇させて高濃度溶液の調製を可能にする薬剤も含有することができる。さらに、活性化合物の懸濁液は、適切な油注射懸濁液として調製されてもよい。適切な親油性溶媒又はビヒクルには、ゴマ油等の脂肪油、又はオレイン酸エチル（ethyl oleate）若しくはトリグリセリド等の合成脂肪酸エステル、又はリポソームが挙げられる。

### 【0213】

有効成分は、例えば、コアセルベーション技術によって、又は界面重合によって調製されたマイクロカプセル中に封入されてもよく（例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロース又はゼラチンマイクロカプセル及びポリ（メチルメタクリレート）マイクロカプセル）、コロイド状薬物送達システム（例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル）又はマクロエマルジョンに封入されてもよい。かかる技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences (18th Ed. Mack Printing Company, 1990) に開示されている。徐放性製剤が調製されてもよい。徐放性製剤の適切な例としては、ポリペプチドを含有する固体疎水性ポリマーの半透過性マトリックスが挙げられ、このマトリックスは、例えば、フィルム又はマイクロカプセル等の成型物品の形態である。特定の実施形態では、注射可能組成物の持続性吸収は、吸収を遅らせる薬剤（例えば、モノステアリン酸アルミニウム、ゼラチン、又はこれらの組み合わせ）の組成物での使用によってもたらされてもよい。本発明の例示的な薬学的に許容可能な賦形剤は、更に、間質性薬物分散剤、例えば、可溶性中性活性ヒアルロニダーゼ糖タンパク質（SHASEGP

)、例えば、ヒト可溶性PH-20ヒアルロニダーゼ糖タンパク質、例えば、rHuPH20 (HYLENEX (登録商標)、Baxter International, Inc.) を含む。特定の例示的なSHASEGP及び使用方法は、rHuPH20を含め、米国特許出願公開第2005/0260186号及び同第2006/0104968号に記載される。一態様では、SHASEGPを、1つ以上の更なるグリコサミノグリカナーゼ(例えば、コンドロイチナーゼ)と組み合わせる。例示的な凍結乾燥した抗体製剤は、米国特許第6,267,958号に記載される。水性抗体製剤としては、米国特許第6,171,586号及び国際公開第2006/044908号に記載されるものが挙げられ、後者の製剤は、酢酸ヒスチジンバッファーを含む。上述した組成物に加えて、二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子をデポー調製物として製剤化することも可能である。このような長く作用する製剤は、埋め込みによって(例えば、皮下又は筋肉内)、又は筋肉内注射によって投与されてもよい。したがって、例えば、二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子は、適切なポリマー又は疎水性材料(例えば、許容可能な油中のエマルションとして)又はイオン交換樹脂を用いて、又はやや難溶性の誘導體として、例えば、やや難溶性の塩として配合されてもよい。

10

#### 【0214】

本発明の二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子を含む医薬組成物は、従来の混合、溶解、乳化、カプセル化、封入、又は凍結乾燥プロセスにより製造することができる。医薬組成物は、1つ以上の生理的に許容される担体、希釈剤、賦形剤、又はタンパク質の薬学的に使用可能な調製物への加工を容易にする補助剤を使用して、従来の方法で製剤化

適切な製剤は、選択する投与経路によって変わる。本発明の二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子は、遊離酸又は塩基、中性又は塩形態で、組成物に配合されることが

できる。薬学的に許容可能な塩は、遊離の酸又は塩基の生物活性を実質的に保持する塩である。薬学的に許容可能な塩としては、酸付加塩、例えば、タンパク質性組成物の遊離アミノ基と形成される酸付加塩、又は塩酸又はリン酸等の無機酸と形成されるか、又は酢酸、シュウ酸、酒石酸又はマンデル酸等の有機酸と形成されるものが挙げられる。また、遊離カルボキシル基と形成される塩は、例えばナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム若しくは水酸化第二鉄等の無機塩基；又はイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン若しくはプロカイン等の有機塩基に由来し得る。医薬塩は、対応する遊離塩基形態よりも、水性及び他のプロトン性溶媒に溶けやすい傾向がある。本発明の組成

物は、治療される特定の徴候に必要な1種類より多い有効成分も含んでいてもよく、好ましくは、互いに有害な影響を与えない相補的な活性を有するものを含んでいてもよい。かかる有効成分は、意図される目的に有効な量で組み合わせ好適に存在する。in vivo投与に使用される製剤は、一般に、滅菌のものである。滅菌性は、例えば、滅菌ろ過膜を通したる過によって容易に達成され得る。

20

30

#### 【0215】

##### 治療方法及び組成物

本明細書において提供する二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子のいずれかを、単独で又は組み合わせて、治療方法にて使用することができる。

#### 【0216】

一態様では、医薬として使用するための二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子が提供される。更なる態様では、がんの治療における使用のための二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子が提供される。特定の態様では、治療の方法における使用のための二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子が提供される。特定の態様では、本明細書では、がんを有する個体を治療する方法における使用のための二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子であって、方法が、有効量のスーパーアゴニストCD28抗原結合分子を個体に投与することを含む、二重特異性CD28抗原結合分子が提供される。かかる一実施形態では、本方法は、有効量の少なくとも1つの追加の治療剤を個体に投与することを含む。

40

#### 【0217】

50

一態様では、二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子は、がん細胞の増殖の阻害における使用のためのものである。したがって、特定の態様では、二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子は、がんの治療における使用のためのものである。かかるがんとしては、例えば、乳がん、肺がん、皮膚がん、血液がん、扁平上皮癌腫、骨がん、腎臓がん、頭頸部がん、胃がん(stomach cancer)、前立腺がん、卵巣がん、結腸直腸がん、結腸がん、子宮頸がん、食道がん、気管がん、胃がん(gastric cancer)、膀胱がん、子宮がん、直腸がん、若しくは小腸のがん、膵臓がん、若しくは他の上皮がん、又はそれらに関連する転移が挙げられる。

【0218】

特定の態様では、治療の方法における使用のための二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子が提供される。特定の態様では、本明細書では、がんを有する個体を治療する方法における使用のための二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子であって、方法が、有効量のスーパーアゴニストCD28抗原結合分子を個体に投与することを含む、二重特異性CD28抗原結合分子が提供される。別の態様では、有効量の二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子を個体に投与することを含む、CD3発現がん、特に上皮がん若しくは扁平上皮がん、又は乳がん、肺がん、胃がん(stomach cancer)、前立腺がん、卵巣がん、結腸直腸がん、結腸がん、食道がん、気管がん、胃がん(gastric cancer)、膀胱がん、子宮がん、直腸がん、膵臓がん、若しくは小腸がんから選択されるがんを有する個体を治療する方法における使用のための二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子が提供される。かかる一実施形態では、本方法は、有効量の少なくとも1つの追加の治療剤を個体に投与することを更に含む。

【0219】

更なる態様では、本明細書において、医薬の製造又は調製における、本明細書中に記載される二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子の使用のために提供される。一実施形態では、医薬は、がんの治療のためのものである。更なる態様では、医薬は、がんを治療する方法であって、がんを有する個体に有効量の医薬を投与することを含む、方法における使用のためのものである。かかる一態様では、該方法は、有効量の少なくとも1つの更なる治療剤、例えば、以下に記載されるものを個体に投与することを更に含む。別の態様では、医薬は、がんの治療のためのものである。更なる態様では、医薬は、がんを治療する方法であって、がんを有する個体に有効量の医薬を投与することを含む、方法における使用のためのものである。更なる態様では、がんを治療するための方法が本明細書で提供される。一態様では、本方法は、がんを有する個体に有効量の二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子を投与する工程を含む。かかる一態様では、本方法は、以下に記載されるように、有効量の少なくとも1つの追加の治療剤を個体へ投与することを更に含む。上記の態様のいずれかによる「個体」は、ヒトであってもよい。

【0220】

更なる態様では、例えば上記の治療方法のいずれかにおける使用のための、本明細書に掲載する二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子のいずれかを含む医薬製剤を本明細書において提供する。一態様では、医薬製剤は、本明細書に提供される二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子のいずれか、及び薬学的に許容可能な担体を含む。別の態様では、医薬製剤は、本明細書に記載される二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子のいずれか、及び少なくとも1つの追加の治療剤を含む。

【0221】

本明細書に記載の二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子は、単独で、又は他の薬剤と組み合わせて治療に使用することができる。例えば、本明細書中に記載されるような二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子は、少なくとも1つの更なる治療剤と同時投与され得る。したがって、がん免疫療法における使用のための本明細書に記載の二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子が提供される。特定の実施形態では、がん免疫療法の方法における使用のための二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子が提供される。上記の態様のいずれかによる「個体」は、好ましくはヒトである。

## 【 0 2 2 2 】

上述のかかる併用療法は、併用投与（同じ又は別個の製剤中に2つ以上の治療剤が含まれる）及び別個の投与を包含し、別個の投与の場合、本明細書に報告される抗体の投与は、追加の1つ以上の治療剤の投与前、投与と同時に、及び/又は投与後に行われ得る。一態様では、二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子の投与、及び追加の治療剤の投与は互いに、約1ヶ月以内、又は約1、2、若しくは3週間以内、又は約1、2、3、4、5、若しくは6日以内に生じる。

## 【 0 2 2 3 】

本明細書に報告される抗原結合分子（及び任意の追加の治療剤）は、非経口、肺内、及び鼻腔内、並びに局所治療のために所望される場合、病変内投与を含む、任意の好適な手段によって投与することができる。非経口輸液には、筋肉内投与、静脈内投与、動脈内投与、腹腔内投与、又は皮下投与が含まれる。投薬は、その投与が短期か又は長期かに部分的に依存して、任意の適切な経路、例えば、静脈内又は皮下注射等の注射により行うことができる。本明細書では、単回投与又は様々な時点にわたる複数回投与、ポース投与、パルス注入を含むがこれらに限定されない様々な投与スケジュールが想定される。

## 【 0 2 2 4 】

本明細書に記載の二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子は、良好な医療行為と一致した様式で、製剤化され、投薬され、投与され得る。この文脈で考慮すべき要因としては、治療される特定の障害、治療される特定の哺乳動物、個々の患者の臨床的状況、障害の原因、薬剤の送達部位、投与方法、投与スケジュール、及び医療従事者に公知である他の要因が挙げられる。二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子は、必ずしもではないが、任意に、問題の障害を予防又は治療するために同時に使用する1つ以上の作用物質と共に、製剤化される。有効量のかかる他の作用物質は、製剤中に存在する抗体の量、障害又は治療の種類、及び上述の他の要因に依存する。これらは、一般に、本明細書に記載のものと同じ投薬量及び投与経路によって、又は本明細書に記載の投薬量の約1～99%、又は適切であると経験的/臨床的に判断される任意の投薬量及び任意の経路で使用される。

## 【 0 2 2 5 】

疾患の予防又は治療のために、本明細書に記載される二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子の適切な投薬量は（単独で又は1つ以上の他の追加の治療剤と組み合わせて使用されるとき）、治療置対象の疾患の種類、抗体の種類、疾患の重症度及び経過、抗体が予防目的又は治療目的で投与されるかどうか、以前の治療法、患者の病歴、抗体への反応、並びに主治医の裁量によって決定されることになる。二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子は、一度に、又は一連の治療にまたがり、患者に好適に投与される。疾患の種類及び重症度に応じ、例えば、1回以上の個別投与、又は連続点滴にかかわらず、約1 µg/kg～15 mg/kg（例えば0.5 mg/kg～10 mg/kg）の二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子が、患者への投与への最初の候補投与量となり得る。典型的な1日投薬量は、上述の因子に依存して、約1 µg/kg～100 mg/kgの範囲であってもよい。数日以上にわたる反復投与に関しては、病状に応じて、治療は一般に疾患症状の望まれる抑制が起こるまで継続されるものとする。抗体の1つの例示的な投薬量は、約0.05 mg/kg～約10 mg/kgの範囲である。したがって、約0.5 mg/kg、2.0 mg/kg、4.0 mg/kg、又は10 mg/kg（又はこれらの任意の組合せ）のうちの一つ以上の用量が、患者に投与され得る。このような用量は、断続的に、例えば毎週又は3週間毎（例えば、患者が約2～約20回、又は例えば約6回の用量の抗体を受容するように）投与されてもよい。初回の高負荷用量の後、それより少ない用量を1つ以上投与してもよい。しかしながら、他の投薬レジメンが有用であってもよい。この療法の進行は、従来の技術及びアッセイによって容易に監視される。

## 【 0 2 2 6 】

他の薬剤及び治療

前述のように、本発明の二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子は、1つ以上の他

10

20

30

40

50

の薬剤と組み合わせて投与され得る。例えば、本発明の抗原結合分子は、少なくとも1つの追加の治療剤と共投与されてもよい。「治療剤」という用語は、このような治療が必要な個体において、症状又は疾患を治療するために投与することが可能な任意の薬剤を包含する。このような追加の治療剤は、治療される特定の徴候に適した任意の有効成分を含んでいてもよく、好ましくは、互いに有害な影響を与えない相補的な活性を有するものを含んでいてもよい。特定の実施形態では、更なる治療剤は、別の抗がん剤、例えば、微小管破壊剤、代謝拮抗剤、トポイソメラーゼ阻害剤、DNAインターカレーター、アルキル化剤、ホルモン治療、キナーゼ阻害剤、受容体アンタゴニスト、腫瘍細胞アポトーシスの活性化剤、又は抗血管形成剤である。特定の態様では、更なる治療剤は、免疫調節剤、細胞増殖抑制剤、細胞接着の阻害剤、細胞毒性剤若しくは細胞増殖抑制、細胞アポトーシスの活性化剤、又はアポトーシス誘発因子に対する細胞の感度を高める薬剤である。

10

## 【0227】

したがって、がんの治療における使用のための本発明の二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子又はそれらを含む医薬組成物が提供され、二重特異性抗原結合分子は、がん免疫療法に使用するための化学療法剤、放射線及び/又は他の薬剤と組み合わせて投与される。

## 【0228】

このような他の薬剤は、適切には、意図する目的にとって有効な量で組み合わせた状態で存在する。有効量のかかる他の薬剤は、使用される融合タンパク質の量、障害又は治療の種類、上述の他の因子に依存する。本発明の二重特異性抗原結合分子又は抗体は通常、本明細書に記載される同一用量及び投与経路、若しくは本明細書に記載される1~99%の用量、又は実験的/臨床的に適切と測定される任意の用量及び任意の経路で使用される。上記のかかる併用療法は、併用投与(2つ以上の治療剤が同じ又は別個の組成物に含まれる場合)、及び別個の投与を含み、その場合、本発明の二重特異性抗原結合分子又は抗体の投与は、追加の治療剤及び/又はアジュバントの投与前、同時、及び/又は後に、起こり得る。

20

## 【0229】

更なる態様では、がんの治療における使用のための上述した本明細書中に記載の二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子であって、別の免疫調節剤と組み合わせて投与される二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子が提供される。「免疫調節剤」という用語は、免疫系に影響を与えるモノクローナル抗体を含む任意の物質を指す。本発明の分子は、免疫調節剤と見なすことができる。免疫調節剤は、がんの治療のための抗腫瘍剤として使用することができる。一態様では、免疫調節剤としては、抗CTLA4抗体(例えば、イピリムマブ)、抗PD1抗体(例えば、ニボルマブ又はペンブロリズマブ)、PD-L1抗体(例えば、アテゾリズマブ、アベルマブ又はデュルバルマブ)、OX40アゴニスト(特にOX-40抗体)、4-1BBアゴニスト(4-1BBL又は4-1BB抗体)及びGITRアゴニスト(例えばGITR抗体)が挙げられるが、これらに限定されない。上述のこのような併用療法は、組み合わせた投与(2つ以上の治療剤が、同じ又は別個の組成物に含まれる)、及び別個の投与を包含し、この場合、二重特異性抗原結合分子の投与は、更なる治療剤及び/又はアジュバントの投与前、投与と同時に及び/又は投与後に

30

40

## 【0230】

上述のかかる併用療法は、併用投与(同じ又は別個の製剤中に2つ以上の治療剤が含まれる)及び別個の投与を包含し、別個の投与の場合、治療剤の投与は、追加の1つ以上の薬剤の投与前、投与と同時に、及び/又は投与後に行うことができる。一実施形態では、治療剤の投与及び追加の治療剤の投与は、互いの約1ヶ月以内、又は約1、2、若しくは3週間以内、又は約1、2、3、4、5、若しくは6日以内に行われる。

## 【0231】

製造品

本発明の別の態様では、上述した障害の治療、予防及び/又は診断に有用な物質を含有

50

する製造品が提供される。製造品は、容器と、容器に貼られているか又は付随しているラベル又は添付文書とを備える。適切な容器としては、例としてボトル、バイアル、シリンジ、I V 輸液バッグ等が挙げられる。容器は、ガラス又はプラスチック等の様々な材料から形成され得る。容器は、状態の治療、予防、及び/又は診断に有効な、単独の又はその他の組成物と併用される化合物を収容し、無菌のアクセスポートを有することができる（例えば、容器は皮下注射針により穿孔可能なストッパーを有する静脈内溶液のバッグ又はバイアルであってよい）。組成物中の少なくとも1種の活性剤は、本発明の二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子である。ラベル又は添付文書は、組成物が、選択される状態を治療するために使用されることを示す。さらに、製造物品は、(a)製造物品中に含有され、本発明の二重特異性アゴニストCD28抗原結合分子を含む組成物を含む第1の容器、及び、(b)製造物品中に含有され、更なる細胞傷害性の又は別の治療剤を含む組成物を含む第2の容器を含んでよい。本発明のこの実施形態における製造品は、組成物が特定の状態を治療するために使用できることを示す添付文書を更に備えてもよい。代替的に又は追加的に、製造品は、薬学的に許容されるバッファー（例えば注射用静菌水（BWF I）、リン酸緩衝生理食塩水、リンゲル液、及びデキストロース溶液）を収容する第2（又は第3）の容器を更に備えてもよい。これは、他のバッファー、希釈剤、フィルタ、針及びシリンジを含め、商業的及びユーザーの観点から望ましい他の材料を更に備えてもよい。

10

20

30

40

50

## 【表 B】

表 B (配列) :

| 配列番号 | 名称  | 配列  |
|------|---|---|
| 1    | h u C D 2 8<br>UniProt番号P10747、<br>バージョン1 | MLRLLLALNL FPSIQVTGNK ILVKQSPMLV<br>AYDNAVNLSK KYSYNLFSRE FRASLHKGLD<br>SAVEVCVVYG NYSQQLVVYS KTGFNCDGKL<br>GNESVTFYLO NLYVNQTDIY FCKIEVMYPP<br>PYLDNEKSNG TIIHVKGKHL CPSPLFPGPS<br>KPFWVLVVVG GVLACYSLLV TVAFIIFWVR<br>SKRSRLHSD YMNMTFRRPG PTRKHYQPYA<br>PPRDFAAAYS |
| 2    | CD3 (CH2527) CDR-H1                       | TYAMN   |
| 3    | CD3 (CH2527) CDR-H2                       | RIRSKYNNYATYYADSVKG   |
| 4    | CD3 (CH2527) CDR-H3                       | HGNFGNSYVSWFAY  |
| 5    | CD3 (CH2527) CDR-L1                       | GSSTGAVTTSNYAN  |
| 6    | CD3 (CH2527) CDR-L2                       | GTNKRAP   |
| 7    | CD3 (CH2527) CDR-L3                       | ALWYSNLWV   |
| 8    | 重鎖可変ドメインVH、CD3<br>(CH2527)                | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVR<br>QAPGKGLEWVSRIIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDD<br>SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAY<br>WGQGTTLVTVSS   |
| 9    | 軽鎖可変ドメインVL、CD3<br>(CH2527)                | QAVVTQEPSTLVSPGGTVTTLTCSSTGAVTTSNYANWV<br>QEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALT<br>LSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGKTLTVL  |
| 10   | CD3 (P035.093) CDR-H1                     | SYAMN   |
| 11   | CD3 (P035.093) CDR-H2                     | RIRSKYNNYATYYADSVKG   |
| 12   | CD3 (P035.093) CDR-H3                     | ASNFPASYVSFYAY  |
| 13   | CD3 (P035.093) CDR-L1                     | GSSTGAVTTSNYAN  |
| 14   | CD3 (P035.093) CDR-L2                     | GTNKRAP   |
| 15   | CD3 (P035.093) CDR-L3                     | ALWYSNLWV   |
| 16   | 重鎖可変ドメインVH、CD3<br>(P035.093)              | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVR<br>QAPGKGLEWVSRIIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDD<br>SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRASNFPASYVSFYAY<br>WGQGTTLVTVSS   |
| 17   | 軽鎖可変ドメインVL、CD3<br>(P035.093)              | QAVVTQEPSTLVSPGGTVTTLTCSSTGAVTTSNYANWV<br>QEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALT<br>LSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGKTLTVL  |
| 18   | CD28(SA) CDR-H1                           | SYIHH   |
| 19   | CD28(SA) CDR-H2                           | CIYPGNVNTNYNEKFKD   |
| 20   | CD28(SA) CDR-H3                           | SHYGLDWNFDV   |
| 21   | CD28(SA) CDR-L1                           | HASQNIYVWLN   |
| 22   | CD28(SA) CDR-L2                           | KASNLHT   |
| 23   | CD28(SA) CDR-L3                           | QQGQTYPYT   |
| 24   | CD28(SA) VH                               | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYIHWVR<br>QAPGQGLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTSI<br>STAYMELSRSDDTAVYFCTRSYGLDWNFDVWGQGT   |

10

20

30

40

50

| 配列番号 | 名称                 | 配列   |
|------|--------------------|--|
|      |                    | TVT <sup>2</sup> VSS   |
| 25   | CD28(SA) VL        | DIQMTQSPSSLSASV <sup>2</sup> DRVTIT <sup>2</sup> CHASQNIYVWLNWYQQ<br>KPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDF <sup>2</sup> TLTIS<br>SLQPEDFATYYCQQGQTYPYTFGGG <sup>2</sup> TKVEIK   |
| 26   | CD28 CDR-H1 コンセンサス | SY <sup>2</sup> YIH  |
| 27   | CD28 CDR-H2 コンセンサス | S <sup>2</sup> IY <sup>2</sup> PX <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> TNYNEKFKD、式中、<br>X <sub>1</sub> はG又はRであり、<br>X <sub>2</sub> はN又はDであり、<br>X <sub>3</sub> はV又はGであり<br>X <sub>4</sub> はN又はQ又はAである。                |
| 28   | CD28 CDR-H3 コンセンサス | SHYGX <sub>5</sub> DX <sub>6</sub> NFDV、式中<br>X <sub>5</sub> はL又はAであり、<br>X <sub>6</sub> はW又はH又はY又はFである。   |
| 29   | CD28 CDR-L1 コンセンサス | X <sub>7</sub> ASQX <sub>8</sub> IX <sub>9</sub> X <sub>10</sub> X <sub>11</sub> LN、式中<br>X <sub>7</sub> はH又はRであり、<br>X <sub>8</sub> はN又はGであり、<br>X <sub>9</sub> はY又はSであり、<br>X <sub>10</sub> はV又はNであり、<br>X <sub>11</sub> はW又はH又はF又はYである。 |
| 30   | CD28 CDR-L2 コンセンサス | X <sub>12</sub> X <sub>13</sub> SX <sub>14</sub> LX <sub>15</sub> X <sub>16</sub> 、式中<br>X <sub>12</sub> はK又はYであり、<br>X <sub>13</sub> はA又はTであり、<br>X <sub>14</sub> はN又はSであり、<br>X <sub>15</sub> はH又はYであり、<br>X <sub>16</sub> はT又はSである。     |
| 31   | CD28 CDR-L3 コンセンサス | QQX <sub>17</sub> QTYPYT、式中<br>X <sub>17</sub> はG又はAである。   |
| 32   | CD28 VH変異体 a       | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV <sup>2</sup> SCKASGYTFTSY <sup>2</sup> YIHWVRQAPG<br>QGLEWIGSIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDT <sup>2</sup> SISTAYMELS<br>RLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGT <sup>2</sup> TVT <sup>2</sup> VSS                                     |
| 33   | CD28 VH変異体 b       | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV <sup>2</sup> SCKASGYTFTSY <sup>2</sup> YIHWVRQAPG<br>QGLEWIGSIYPGNVQNTNYNEKFKDRATLTVDT <sup>2</sup> SISTAYMELS<br>RLRSDDTAVYFCTRSHYGLDHNFDVWGQGT <sup>2</sup> TVT <sup>2</sup> VSS                                    |
| 34   | CD28 VH変異体 c       | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV <sup>2</sup> SCKASGYTFTSY <sup>2</sup> YIHWVRQAPG<br>QGLEWIGSIYPGNVQNTNYNEKFKDRATLTVDT <sup>2</sup> SISTAYMELS<br>RLRSDDTAVYFCTRSHYGADHNFDVWGQGT <sup>2</sup> TVT <sup>2</sup> VSS                                    |
| 35   | CD28 VH変異体 d       | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV <sup>2</sup> SCKASGYTFTSY <sup>2</sup> YIHWVRQAPG<br>QGLEWIGSIYPRDQNTNYNEKFKDRATLTVDT <sup>2</sup> SISTAYMELS<br>RLRSDDTAVYFCTRSHYGLDYNFDVWGQGT <sup>2</sup> TVT <sup>2</sup> VSS                                     |
| 36   | CD28 VH変異体 e       | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV <sup>2</sup> SCKASGYTFTSY <sup>2</sup> YIHWVRQAPG<br>QGLEWIGSIYPGNVQNTNYNEKFKDRATLTVDT <sup>2</sup> SISTAYMELS<br>RLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGT <sup>2</sup> TVT <sup>2</sup> VSS                                    |
| 37   | CD28 VH変異体 f       | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV <sup>2</sup> SCKASGYTFTSY <sup>2</sup> YIHWVRQAPG<br>QGLEWIGSIYPGNVQNTNYNEKFKDRATLTVDT <sup>2</sup> SISTAYMELS<br>RLRSDDTAVYFCTRSHYGLDHNFDVWGQGT <sup>2</sup> TVT <sup>2</sup> VSS                                    |
| 38   | CD28 VH変異体 g       | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV <sup>2</sup> SCKASGYTFTSY <sup>2</sup> YIHWVRQAPG<br>QGLEWIGSIYPRNVQNTNYNEKFKDRATLTVDT <sup>2</sup> SISTAYMELS<br>RLRSDDTAVYFCTRSHYGLDHNFDVWGQGT <sup>2</sup> TVT <sup>2</sup> VSS                                    |
| 39   | CD28 VH変異体 h       | QVQLVQSGAEVKKPGASVKV <sup>2</sup> SCKASGYTFTSY <sup>2</sup> YIHWVRQAPG<br>QGLEWIGSIYPRDVQNTNYNEKFKDRATLTVDT <sup>2</sup> SISTAYMELS<br>RLRSDDTAVYFCTRSHYGLDHNFDVWGQGT <sup>2</sup> TVT <sup>2</sup> VSS                                    |
| 40   | CD28 VH変異体 i       | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS <sup>2</sup> CAASGFTFTSY <sup>2</sup> YIHWVRQAPG<br>KGLEWVASIYPGNVNTRYADSVKGRFT <sup>2</sup> ISADTSKNTAYLQMN<br>SLRAEDTAVYYCTRSHYGLDWNFDVWGQGT <sup>2</sup> TVT <sup>2</sup> VSS                                     |
| 41   | CD28 VH変異体 j       | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS <sup>2</sup> CAASGFTFTSY <sup>2</sup> YIHWVRQAPG<br>KGLEWVASIYPGNVATRYADSVKGRFT <sup>2</sup> ISADTSKNTAYLQMN<br>SLRAEDTAVYYCTRSHYGLDWNFDVWGQGT <sup>2</sup> TVT <sup>2</sup> VSS                                     |
| 42   | CD28 VL変異体 k       | DIQMTQSPSSLSASV <sup>2</sup> DRVTIT <sup>2</sup> CHASQNIYVHLNWYQQKPGK<br>APKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDF <sup>2</sup> TLTIS <sup>2</sup> SLQPEDFA<br>TYYCQQAQTYPYTFGGG <sup>2</sup> TKVEIK   |

10

20

30

40

50



| 配列番号 | 名称                            | 配列   |
|------|-------------------------------|--|
| 43   | CD28VL変異体 l                   | DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCHASQNIYVFLNHWYQQKPGK<br>APKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA<br>TYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIK  |
| 44   | CD28VL変異体 m                   | DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCHASQNIYVFLNHWYQQKPGK<br>APKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA<br>TYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIK  |
| 45   | CD28VL変異体 n                   | DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCHASQGISNYLNHWYQQKPGK<br>APKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA<br>TYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIK  |
| 46   | CD28VL変異体 o                   | DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCHASQNIYVFLNHWYQQKPGK<br>APKLLIYYSLSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA<br>TYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIK  |
| 47   | CD28VL変異体 p                   | DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCHASQGISNYLNHWYQQKPGK<br>APKLLIYYSLSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA<br>TYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIK  |
| 48   | CD28VL変異体 q                   | DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCHASQGISNHLNHWYQQKPGK<br>APKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA<br>TYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIK  |
| 49   | CD28VL変異体 r                   | DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCHASQGIYVFLNHWYQQKPGK<br>APKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA<br>TYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIK  |
| 50   | CD28VL変異体 s                   | DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCHASQGISVYLNHWYQQKPGK<br>APKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFA<br>TYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIK  |
| 51   | CD28VL変異体 t                   | DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQNIYVFLNHWYQQKPGK<br>APKLLIYKASNLHYSVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFA<br>TYCQQGQTYPYTFGGGTKLEIK  |
| 52   | CD28 (変異体8) CDR-H1            | SYIHH  |
| 53   | CD28 (変異体8) CDR-H2            | SIYPGNVQNTNYNEKFKD   |
| 54   | CD28 (変異体8) CDR-H3            | SHYGLDWNFDV  |
| 55   | CD28 (変異体8) CDR-L1            | HASQNIYVFLN  |
| 56   | CD28 (変異体8) CDR-L2            | KASNLHT  |
| 57   | CD28 (変異体8) CDR-L3            | QQGQTYPYT  |
| 58   | CD28 (変異体15) CDR-H1           | SYIHH  |
| 59   | CD28 (変異体15) CDR-H2           | SIYPGNVQNTNYNEKFKD   |
| 60   | CD28 (変異体15) CDR-H3           | SHYGLDWNFDV  |
| 61   | CD28 (変異体15) CDR-L1           | HASQNIYVFLN  |
| 62   | CD28 (変異体15) CDR-L2           | KASNLHT  |
| 63   | CD28 (変異体15) CDR-L3           | QQGQTYPYT  |
| 64   | CD28 (変異体29) CDR-H1           | SYIHH  |
| 65   | CD28 (変異体29) CDR-H2           | SIYPGNVNTNYNEKFKD  |
| 66   | CD28 (変異体29) CDR-H3           | SHYGLDWNFDV  |
| 67   | CD28 (変異体29) CDR-L1           | HASQNIYVFLN  |
| 68   | CD28 (変異体29) CDR-L2           | KASNLHT  |
| 69   | CD28 (変異体29) CDR-L3           | QQGQTYPYT  |
| 70   | ヒトCD3ε<br>Uniprot番号P07766     | MQSGTHWRVVLGLCLLSVGVWQDGNEEMGGITQT<br>PYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGG<br>DEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYVVCYPRG<br>SKPEDANFYLYLRARVCENCMEMDVMSVATIVIV<br>DICITGGLLLLVIYYSKNRKAKAKPVTRGAGAGG<br>RQRGQNKERPPVNPDPYEPYRKGQRDLYSGLNQRRI |
| 71   | カニクイザルCD3ε<br>Uniprot番号Q95L15 | MQSGTRWRVVLGLCLLSIGVWQDGNEEMGSITQT<br>PYQVSI SGTTVILTCSQHLGSEAQWQHNGKKNED<br>SGDRLFLPEFSEMEQSGYVVCYPRGSNPEDASHH  |

10

20

30

40

50

| 配列番号 | 名称                                      | 配列   |
|------|---|--|
|      |   | LYLKARVCENCMEMDMVAVATIVIVDICTITLGLL<br>LLVYYWSKNRKAkakPVTRGAGAGGRQRGQNKER<br>PPFPVNPDEYEPiRKGQQDLYSGLNQRRI   |
| 72   | VH (CD28 SA) CH1<br>(EE) -FcノブPGLALA    | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYIHWVR<br>QAPGGGLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTSI<br>STAYMELSRRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWQGT<br>TVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDY<br>FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT<br>VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHT<br>CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVV<br>VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR<br>VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKA<br>KGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI<br>AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS<br>RWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSP |
| 73   | VH (CD28 変異体 g) CH1<br>(EE) -FcノブPGLALA | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYIHWVR<br>QAPGGGLEWIGSIYPRNVQTNYNEKFKDRATLTVDTSI<br>STAYMELSRRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDHNFDVWQGT<br>TVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDY<br>FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT<br>VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHT<br>CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVV<br>VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR<br>VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKA<br>KGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI<br>AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS<br>RWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSP |
| 74   | VH (CD28 変異体 f) CH1<br>(EE) -FcノブPGLALA | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYIHWVR<br>QAPGGGLEWIGSIYPGNVQTNYNEKFKDRATLTVDTSI<br>STAYMELSRRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDFNFDVWQGT<br>TVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDY<br>FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT<br>VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHT<br>CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVV<br>VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR<br>VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKA<br>KGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI<br>AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS<br>RWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSP |
| 75   | VH (CD28 変異体 j) CH1<br>(EE) -FcノブPGLALA | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYIHWVR<br>QAPGKLEWVASIYPGNVATRYADSVKGRFTISADTSK<br>NTAYLQMNLSRAEDTAVYYCTRSHYGLDWNFDVWQGT<br>TVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDY<br>FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT<br>VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHT<br>CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVV<br>VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR<br>VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKA<br>KGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI<br>AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS<br>RWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSP  |
| 76   | VH (CD28 変異体 e) CH1<br>(EE) -FcノブPGLALA | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYIHWVR<br>QAPGGGLEWIGSIYPGNVQTNYNEKFKDRATLTVDTSI<br>STAYMELSRRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWQGT<br>TVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDY<br>FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT<br>VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHT<br>CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVV   |

10

20

30

40

50

| 配列番号 | 名称                                    | 配列  |
|------|---------------------------------------|---|
|      |                                       | VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR<br>VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKA<br>KGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI<br>AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS<br>RWQQGNVFSQVMHEALHNNHYTQKSLSLSP   |
| 77   | VH (CD28変異体b) CH1<br>(EE) -FcノブPGLALA | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYIHWVR<br>QAPGGLEWIGSIYPGNVQTNVNEKFKDRATLTVDTSI<br>STAYMELSRRLSDDTAVYFCTRSHYGLDHNFDVWGQGT<br>TVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDY<br>FPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT<br>VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHT<br>CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVV<br>VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR<br>VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKA<br>KGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI<br>AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS<br>RWQQGNVFSQVMHEALHNNHYTQKSLSLSP   |
| 78   | VH (CD28変異体a) CH1<br>(EE) -FcノブPGLALA | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTSYIHWVR<br>QAPGGLEWIGSIYPGNVNTNNEKFKDRATLTVDTSI<br>STAYMELSRRLSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGT<br>TVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDY<br>FPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT<br>VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHT<br>CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVV<br>VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR<br>VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKA<br>KGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI<br>AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS<br>RWQQGNVFSQVMHEALHNNHYTQKSLSLSP    |
| 79   | VH (CD28変異体i) CH1<br>(EE) -FcノブPGLALA | EVQLVDSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYIHWVR<br>QAPGGLEWVASIYPGNVNTRYADSVKGRFTISADTSK<br>NTAYLQMNLSLRAEDTAVYYCTRSHYGLDWNFDVWGQGT<br>TVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDY<br>FPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT<br>VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHT<br>CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVV<br>VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR<br>VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKA<br>KGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI<br>AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS<br>RWQQGNVFSQVMHEALHNNHYTQKSLSLSP |
| 80   | VL-CD28 (SA) -CL<br>「RK」              | DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCHASQNIYVWLNWYQQ<br>KPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS<br>SLQPEDFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIKRTVAAPS<br>VFI FPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPRKAVQWKVDN<br>ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHK<br>VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC   |
| 81   | VL (CD28変異体k) -CL<br>(RK)             | DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCHASQNIYVHLNHWYQQ<br>KPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS<br>SLQPEDFATYYCQQAQTYPYTFGGGTKVEIKRTVAAPS<br>VFI FPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPRKAVQWKVDN<br>ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHK<br>VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC  |
| 82   | VL (CD28変異体l) -CL<br>(RK)             | DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCHASQNIYVFLNHWYQQ<br>KPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS<br>SLQPEDFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIKRTVAAPS<br>VFI FPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPRKAVQWKVDN<br>ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHK  |

10

20

30

40

50

| 配列番号 | 名称   | 配列  |
|------|--|---|
|      |  | VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC  |
| 83   | VL (CD28 変異体 m) - CL (RK)                    | DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCHASQNIYVYLNWYQQ<br>KPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS<br>SLQPEDFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIKRTVAAPS<br>VFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPRKAVQWKVDN<br>ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHK<br>VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC  |
| 84   | VL (CD28 変異体 r) - CL (RK)                    | DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCHASQGIYVYLNWYQQ<br>KPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS<br>SLQPEDFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIKRTVAAPS<br>VFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPRKAVQWKVDN<br>ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHK<br>VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC  |
| 85   | VL (CD28 変異体 s) - CL (RK)                    | DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCHASQGISVYLNWYQQ<br>KPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS<br>SLQPEDFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIKRTVAAPS<br>VFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPRKAVQWKVDN<br>ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHK<br>VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC  |
| 86   | VL (CD28 変異体 t) - CL (RK)                    | DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQNIYVWLNWYQQ<br>KPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS<br>SLQPEDFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIKRTVAAPS<br>VFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPRKAVQWKVDN<br>ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHK<br>VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC  |
| 87   | Fc ホール PGLALA, HYRF                          | DKTHTCPPEAAGGFSVFLFPPKPKDTLMSRTPE<br>VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY<br>NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEK<br>TISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLTCAVKGF<br>YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKL<br>TVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNRFQKSLSLSP  |
| 88   | Avi タグ                                       | GLNDI FEAQKIEWHE  |
| 89   | CD3 (CH2527) VH-CL hu IgG1 Fc ノブ PGLALA      | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSTYAMNWVR<br>QAPGKLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDD<br>SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAY<br>WGQGLTVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC<br>LLNNFYPRKAVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC<br>DKTHTCPPEAAGGFSVFLFPPKPKDTLMSRTPE<br>VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY<br>NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEK<br>TISKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP |
| 90   | CD3(CH2527) VL-CH1                           | QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWV<br>QEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALT<br>LSGAQPEDEAEYYCALWYNSLWVFGGGTKLTVLSSAST<br>KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW<br>NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQ<br>TYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSC  |
| 91   | CD28 (9.3) VH-CH1 (EE) hu IgG1 Fc ホール PGLALA | EVKLLQSGPGLVTPSQSLITCTVSGFSLSDYGVHWVR<br>QSPGQLEWLVGIWAGGTNYNSALMSRKSISKDNSKS<br>QVFLKMSLQADDTAVYYCARDKGYSSYYSDYWGQGT<br>SVTVSSASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDY<br>FPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT<br>VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHT<br>CPPCPPEAAGGFSVFLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVV  |

10

20

30

40

50

| 配列番号 | 名称  | 配列  |
|------|---|---|
|      |   | VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKA<br>KGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDI<br>AVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSEFLVSKLTVDKS<br>RWQQGNVVFSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSP   |
| 92   | CD 28 (9. 3) VL-Cカップ<br>(RK)  | DIELTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVEYYVTSLMQ<br>WYQQKPGQPPKLLIFAAASNVEGVPARFSGSGGTNFS<br>LNHHPVDEDDVAMYFCQQSRKVPYTFGGGKLEIKRTV<br>AAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW<br>KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADY<br>EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC   |
| 93   | CD 28 (SA) VH-CH1<br>(EE) hu IgG1 Fcホール<br>PGLALA                                   | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTTSYYIHVWR<br>QAPGGGLEWIGCIYPGNVNTNINEKFKDRATLTVDTSI<br>STAYMELSRRLSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWQGT<br>TVTVSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDY<br>FPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYLSVSVT<br>VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHT<br>CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCV<br>VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR<br>VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKA<br>KGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDI<br>AVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSEFLVSKLTVDKS<br>RWQQGNVVFSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSP |
| 94   | CD 28 (SA) VL-Cカップ<br>(RK)  | DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCHASQNIYVWLNWYQQ<br>KPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFLTIIS<br>SLQPEDFATYYCQQGQTYPYTFGGGKVEIKRTVAAPS<br>VFI FPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN<br>ALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADY EKHK<br>VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC  |
| 95   | FcノブPGLALA  | DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPE<br>VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY<br>NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EK<br>TISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGF<br>YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSEFLYSKL<br>TVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSP  |
| 96   | FcホールPGLALA   | DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPE<br>VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY<br>NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPI EK<br>TISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGF<br>YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSEFLVSKL<br>TVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSP  |
| 97   | CD 28 (9. 3) VH-CH1<br>(EE) hu IgG1 Fcホール<br>PGLALA                                 | EVKLLQSGPGLVTPSQSLITCTVSGFSLSDYGVHWVR<br>QSPGGGLEWLVGIWAGGNTNYSALMSRKSISKDNSKS<br>QVFLKMNSLQADDTAVYYCARDKGYSYYSMDYWGQGT<br>SVTVSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDY<br>FPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYLSVSVT<br>VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHT<br>CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCV<br>VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR<br>VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKA<br>KGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDI<br>AVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSEFLVSKLTVDKS<br>RWQQGNVVFSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSP  |
| 98   | ScFv (4. 24. 72) VH-<br>(G4S) 4-VL-マトリプターゼ<br>リンカー CD3 VH-CL h<br>u IgG1 FcノブPGLALA | QVQLKESGPGLVAPSQSLITCTVSGFSLTSYGVSWVR<br>QPPGKCLEWLGIIWGDGSTNYHSALISRLSISKDNSKS<br>QVFLKLSLQDDTAVYYCAKGIITTVDDYYAMDYWGQ<br>GTSVTVSSGGGGSGGGGGSGGGGGSGGGSDIQMTQSPAS<br>LSASVGETVITCRASENIDSYLAWYQQKQKSPQLLV  |

10

20

30

40

50

| 配列番号 | 名称   | 配列   |
|------|--|--|
|      |  | YAATFLADDVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDVARY<br>YCQHYSTPYTFGCGTKLEIKGGGGSGGGSRQARVVN<br>GGGGGSGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSC<br>AASGFTFSTYAMNWRQAPGKGLEWVSRIIRSKYNNYAT<br>YYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC<br>VRHGNGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSSASVAAPSVFIF<br>PPSDEQLKSGTASVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQS<br>GNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEKHKVYAC<br>EVTHQGLSSPVTKSFNRGECDKTHTCPPCPAPEAAGGP<br>SVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN<br>WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL<br>NGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLF<br>PCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN<br>YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM<br>HEALTHHNYTQKSLSLSP   |
| 99   | CD28 (SA) VH-CH1<br>(EE) hu IgG1 Fc ホール<br>PGLALA                                | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCSKASGYTFSTSYIHWVR<br>QAPGGGLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTISI<br>STAYMELSRRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFDVWGQGT<br>TVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDY<br>FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT<br>VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHT<br>CPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVV<br>VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR<br>VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKA<br>KGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDI<br>AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKS<br>RWQQGNVFCFSVMHEALTHHNRFTQKSLSLSP  |
| 100  | ScFv (4.24.72) VH-<br>(G4S) 4-VL-切断不可能リン<br>カー CD3 VH-CL hu<br>IgG1 Fc ノブ PGLALA | QVQLKESGPGLVAPSSLSITCTVSGFSLTSYGVSWVR<br>QPPGKCLEWLGITWGDGSTNYHSALISRLSISKDNSKS<br>QVFLKLNLSLQDDTATYYCAKGITTVVDDYYAMDYWGQ<br>GTSVTVSSGGGGSGGGSGGGGGGGGGDIQMTQSPAS<br>LSASVGETVITTCRASENIDSYLAWYQQKQKSPQLLV<br>YAATFLADDVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDVARY<br>YCQHYSTPYTFGCGTKLEIKGGGGSGGGSGGGGGGG<br>GGGGGSGGGSGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSC<br>AASGFTFSTYAMNWRQAPGKGLEWVSRIIRSKYNNYAT<br>YYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC<br>VRHGNGNSYVSWFAYWGQGLTVTVSSASVAAPSVFIF<br>PPSDEQLKSGTASVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQS<br>GNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEKHKVYAC<br>EVTHQGLSSPVTKSFNRGECDKTHTCPPCPAPEAAGGP<br>SVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN<br>WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL<br>NGKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLF<br>PCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN<br>YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM<br>HEALTHHNYTQKSLSLSP |
| 101  | CD28 (SA_変異体8) VL-C<br>H hu IgG1 Fc ホール PG<br>LALA                               | DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCHASQNIYVYLNWYQQ<br>KPGKAPKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS<br>SLQPEDFATYYCQQGQTYPYTFGGGTKVEIKSSASTKG<br>PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS<br>GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTY<br>ICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG<br>GPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK<br>FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD<br>WLNKEYKCKVSNKALGAPIEKTI SKAKGQPREPQVCT<br>LPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPE<br>NNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFS   |

10

20

30

40

| 配列番号 | 名称   | 配列   |
|------|--|--|
|      |  | VMHEALHNHYTQKSLSLSP  |
| 102  | CD28 (SA__変異体8) VH-C L   | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYFTFSYYIHVVR<br>QAPGGGLEWIGSIYPGNVQNTYNEKFKDRATLTVDTSI<br>STAYMELSRRLSDDTAVYFCTRSHYGLDFNFDVWGQGT<br>TVTIVSASVAAPSVFIFFPSDEQLKSGTASVVCLLNNF<br>YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSS<br>TLTSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC  |
| 103  | CD3 (P035.093) VH-C H1 (EE) FcノブPGLALA   | EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWVR<br>QAPGKGLEWVSRI RSKYNNYATYYADSVKGRFTISRDD<br>SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRASNFASVYSYFAY<br>WGQGLTVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGC<br>LVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL<br>SSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSC<br>DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPE<br>VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY<br>NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEK<br>TISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGF<br>YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL<br>TVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP   |
| 104  | CD3 (P035.093) VL-C カップ  | QAVVTQEP SLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTTSNYANWV<br>QEKPGQAFRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLGGAALT<br>LSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGKTLTVLQPKA<br>APSVTLFPPSSKKLQANKATLVCLISDFYPGAATVAWK<br>ADSSPVKAGVETTPSKQSNKYAASSYLSLTP EQWKS<br>HRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS  |
| 105  | ScFv (4.24.72) VH-(G4S) <sub>4</sub> -VL切断不可能リンカー-CD3 (P035.093) VH-CH1 hu IgG1 FcノブPGLALA | QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTVTDYSMNWVK<br>QAPGKCLKWGWINTETGEPRYTD DFKGRFAFSLETS<br>STAYLQINNLKNEDSATYFCAREGDYDVFYWGHTTL<br>KVSSGGGGGGGGGGGGGGGGSDIVLTQSPASLAVS<br>LGQRATISCRASKSVSTSSYSYMHWYQQKPGQPPKLLI<br>KYVSYLESQVPA RFSGSGSGTDFTLNIHPVEEDAATY<br>YCQHSREFFPYTFGCCTKLEIKGGGGGGGGGGGGGG<br>GGGGGGGGGGGGGGSEVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSC<br>AASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSRI RSKYNNYAT<br>YYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC<br>VRASNFASVYSYFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFP<br>LAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSG<br>VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH<br>KPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFL<br>FPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD<br>GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKALGAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPCRD<br>ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT<br>PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEAL<br>HNHYTQKSLSLSP |
| 106  | ScFv (4.24.72) VH-(G4S) <sub>4</sub> -VL-PMACK-CD3 (P035.093) VH-CH1 hu IgG1 FcノブPGLALA    | QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTVTDYSMNWVK<br>QAPGKCLKWGWINTETGEPRYTD DFKGRFAFSLETS<br>STAYLQINNLKNEDSATYFCAREGDYDVFYWGHTTL<br>KVSSGGGGGGGGGGGGGGGGSDIVLTQSPASLAVS<br>LGQRATISCRASKSVSTSSYSYMHWYQQKPGQPPKLLI<br>KYVSYLESQVPA RFSGSGSGTDFTLNIHPVEEDAATY<br>YCQHSREFFPYTFGCCTKLEIKGGGGGGGGGGGGGG<br>GGGGGGGGGGGGGGSEVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSC<br>AASGFTFSSYAMNWVRQAPGKGLEWVSRI RSKYNNYAT<br>YYADSVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC<br>VRASNFASVYSYFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFP<br>LAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSG<br>VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH  |

10

20

30

40

50

| 配列番号 | 名称   | 配列   |
|------|--|--|
|      |  | KPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFL<br>FPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD<br>GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE<br>YKCKVSNKALGAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPCRD<br>ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT<br>PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEAL<br>HNHYTQKSLSLSP |
| 107  | CD28(mAb 9.3) CDR-H1                                 | DYGVH  |
| 108  | CD28(mAb 9.3) CDR-H2                                 | VIWAGGGTNYNSALMS   |
| 109  | CD28(mAb 9.3) CDR-H3                                 | DKGYSYYYSMDY   |
| 110  | CD28(mAb 9.3) CDR-L1                                 | RASESVEYYVTSLMQ  |
| 111  | CD28(mAb 9.3) CDR-L2                                 | AASNVES  |
| 112  | CD28(mAb 9.3) CDR-L3                                 | QQRKVPYPT  |
| 113  | CD28(mAb 9.3) VH                                     | EVKLLQSGPGLVTPSQSLSITCTVSGFSLSDYGVHWVR<br>QSPGQGLEWLGVIWAGGGTNYNSALMSRKSISKDNSKS<br>QVFLKMNLSLQADDTAVYYCARDKGYYSYYSMDYWGQGT<br>SVTVSS  |
| 114  | CD28(mAb 9.3) VL                                     | DIELTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVEYYVTSLMQ<br>WYQQKPGQPPKLLI FAASNVESGVPARFSGSGGTNFS<br>LNHPVDEDDVAMYFCQQSRKVPYPTFGGGTKLEIK  |
| 115  | CDR-H1 (ID_4.32.63)                                  | SYGVS  |
| 116  | CDR-H2 (ID_4.32.63)                                  | I IWGDGSTNYHSALIS  |
| 117  | CDR-H3 (ID_4.32.63)                                  | GITTVDDYYAMDY  |
| 118  | CDR-L1 (ID_4.32.63)                                  | RASENIDSYLA  |
| 119  | CDR-L2 (ID_4.32.63)                                  | AATFLAD  |
| 120  | CDR-L3 (ID_4.32.63)                                  | QHYYSTPYT  |
| 121  | VH (ID_4.32.63)                                      | QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTSYGVSWVR<br>QPPGKCLEWLGIIWGDGSTNYHSALISRLSISKDNSKS<br>QVFLKLNLSLQDDTATYYCAKGITTVDDYYAMDYWGQ<br>GTSVTVSS  |
| 122  | VL (ID_4.32.63)                                      | DIQMTQSPASLSASVGETVTTITCRASENIDSYLAWYQQ<br>KQGKSPQLLVYAATFLADDVPSRFSGSGGTQYSLKIN<br>SLQSEDEVARYYCOHYYSTPYTFGCGTKLEIK   |
| 123  | CDR-H1 (ID_4.24.72, H1L1,<br>H1L2, H2L2, H3L2, H3L3) | DYSMN  |
| 124  | CDR-H2 (ID_4.24.72, H1L1,<br>H1L2)                   | WINTETGEPRYTDDFKG  |
| 125  | CDR-H3 (ID_4.24.72, H1L1,<br>H1L2, H2L2, H3L2, H3L3) | EGDYDVFDY  |
| 126  | CDR-L1 (ID_4.24.72, H1L1)                            | RASKSVSTSSYSYMH  |
| 127  | CDR-L2 (ID_4.24.72, H1L1,<br>H1L2, H2L2, H3L2, H3L3) | YVSYLES  |
| 128  | CDR-L3 (ID_4.24.72, H1L1,<br>H1L2, H2L2, H3L2)       | QHSREFFPYT   |
| 129  | CDR-L1 (H1L2, H2L2,<br>H3L3)                         | KSSKSVSTSSYSYMH  |
| 130  | CDR-H2 (H2L2)  | WINTETGEPRYTDDFTG  |
| 131  | CDR-H2 (H3L2)  | WINTETGEPRYTQGFKG  |
| 132  | CDR-L3 (H3L3)  | QQSREFFPYT   |
| 133  | ID_4.24.72 VH  | QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTVDYSMNWVK<br>QAPGKCLKWGWINTETGEPRYTDDFKGRFAFSLETS  |

10

20

30

40

50



| 配列番号 | 名称            | 配列   |
|------|---------------|--|
|      |               | STAYLQINNLLKNEDSATYFCAREGDYDVFYDYGWGHGTTLKVSS  |
| 134  | ID_4.24.72 VL | DIVLVTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSSYSYMH<br>WYQQKPGQPPKLLIKYVSYLESVGPDRFSGSGSGTDFT<br>LNHPVEEEDAATYYCQHSREFPYTFGCGTKLEIK  |
| 135  | H1L1, H1L2 VH | QVQLVQSGSELKPKGASVKVSCASGYTVDYSMNWVR<br>QAPGGQLEWMGWINTETGEPRYTDDFKGRFVFLDTSV<br>STAYLQISSLKAEDTAVYYCAREGDYDVFYDYGWQGTTLV<br>TVSS  |
| 136  | H1L1 VL       | DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSSYSYMH<br>WYQQKPGQPPKLLIKYVSYLESVGPDRFSGSGSGTDFT<br>LTISLQAEDVAVYYCQHSREFPYTFGCGTKLEIK   |
| 137  | H1L2, H2L2 VL | DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSKSVSTSSYSYMH<br>WYQQKPGQPPKLLIKYVSYLESVGPDRFSGSGSGTDFT<br>LTISLQAEDVAVYYCQHSREFPYTFGCGTKLEIK   |
| 138  | H2L2 VH       | QVQLVQSGSELKPKGASVKVSCASGYTVDYSMNWVR<br>QAPGGQLEWMGWINTETGEPRYTDDFKGRFVFLDTSV<br>STAYLQISSLKAEDTAVYYCAREGDYDVFYDYGWQGTTLV<br>TVSS  |
| 139  | H3L3 VH       | QVQLVQSGSELKPKGASVKVSCASGYTVDYSMNWVR<br>QAPGGQLEWMGWINTETGEPRYTQGFGRFVFLDTSV<br>STAYLQISSLKAEDTAVYYCAREGDYDVFYDYGWQGTTLV<br>TVSS   |
| 140  | H3L3 VL       | DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSSYSYMH<br>WYQQKPGQPPKLLIKYVSYLESVGPDRFSGSGSGTDFT<br>LTISLQAEDVAVYYCQHSREFPYTFGCGTKLEIK   |
| 141  | H7L5 VH       | QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTVDYSMNWVR<br>QAPGGQLEWMGWINTETGEPRYTDDFKGRVTMTRDTSI<br>STAYMELSRRLSDDTAVYYCAREGDYDVFYDYGWQGTTLV<br>TVSS   |
| 142  | H7L5 VL       | DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASKSVSTSSYSYMH<br>WYQQKPGQPPKLLIYYVSYLESVGPDRFSGSGSGTDFT<br>LTISLQAEDVAVYYCQHSREFPYTFGCGTKLEIK   |
| 143  | H1L1 scFv     | QVQLVQSGSELKPKGASVKVSCASGYTVDYSMNWVR<br>QAPGQCLEWMGWINTETGEPRYTDDFKGRFVFLDTSV<br>STAYLQISSLKAEDTAVYYCAREGDYDVFYDYGWQGTTLV<br>TVSSGGGGGGGGGGGGGGGGSDIVMTQSPDSLAVS<br>LGERATINCRASKSVSTSSYSYMHWYQQKPGQPPKLLI<br>KYVSYLESVGPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVY<br>YCQHSREFPYTFGCGTKLEIK |
| 144  | H1L2 scFv     | QVQLVQSGSELKPKGASVKVSCASGYTVDYSMNWVR<br>QAPGQCLEWMGWINTETGEPRYTDDFKGRFVFLDTSV<br>STAYLQISSLKAEDTAVYYCAREGDYDVFYDYGWQGTTLV<br>TVSSGGGGGGGGGGGGGGGGSDIVMTQSPDSLAVS<br>LGERATINCKSSKSVSTSSYSYMHWYQQKPGQPPKLLI<br>KYVSYLESVGPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVY<br>YCQHSREFPYTFGCGTKLEIK |
| 145  | H2L2 scFv     | QVQLVQSGSELKPKGASVKVSCASGYTVDYSMNWVR<br>QAPGQCLEWMGWINTETGEPRYTDDFKGRFVFLDTSV<br>STAYLQISSLKAEDTAVYYCAREGDYDVFYDYGWQGTTLV<br>TVSSGGGGGGGGGGGGGGGGSDIVMTQSPDSLAVS<br>LGERATINCKSSKSVSTSSYSYMHWYQQKPGQPPKLLI<br>KYVSYLESVGPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVY<br>YCQHSREFPYTFGCGTKLEIK |
| 146  | H3L2 scFv     | QVQLVQSGSELKPKGASVKVSCASGYTVDYSMNWVR<br>QAPGQCLEWMGWINTETGEPRYTQGFGRFVFLDTSV<br>STAYLQISSLKAEDTAVYYCAREGDYDVFYDYGWQGTTLV<br>TVSSGGGGGGGGGGGGGGGGSDIVMTQSPDSLAVS  |

10

20

30

40

50

| 配列番号 | 名称                          | 配列  |
|------|-----------------------------|---|
|      |                             | LGERATINCKSSKSVSTSSYSYMHWYQQKPGQPPKLLI<br>KYVSYLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVY<br>YCQHSREFPYTFGCCTKLEIK   |
| 147  | 4.32.63 scFv                | QVQLKESGPGLVAPSQSLITCTVSGFSLTSYGVSWVR<br>QPPGKCLEWLGIIWGDGSTNYHSALISRLSISKDNSK<br>QVFLKLNLSLQTDATATYCAKGIITVVDYYAMDYWGQ<br>GTSVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPAS<br>LSASVGETVTITCRASENIDSYLAWYQQKQKSPQLLV<br>YAATFLADDVPSRFSGSGSGTQYSLKINLSQSEDVARY<br>YCQHYYSTPYTFGCCTKLEIK  |
| 148  | プロテアーゼ認識部位 1                | RQARVNG   |
| 149  | プロテアーゼ認識部位 2                | VHMPGLGLGPRSRGSEFP  |
| 150  | プロテアーゼ認識部位 3                | RQARVNGXXXXXVPLSLYSG  |
| 151  | プロテアーゼ認識部位 4                | RQARVNGVPLSLYSG   |
| 152  | プロテアーゼ認識部位 5                | PLGLWSQ   |
| 153  | プロテアーゼ認識部位 6                | VHMPGLGLGPRQARVNG   |
| 154  | プロテアーゼ認識部位 7                | FVGGTG  |
| 155  | プロテアーゼ認識部位 8                | KKAAPVNG  |
| 156  | プロテアーゼ認識部位 9                | PMAKKNG   |
| 157  | プロテアーゼ認識部位 10               | QARAKVNG  |
| 158  | プロテアーゼ認識部位 11               | VHMPGLGLGP  |
| 159  | プロテアーゼ認識部位 12               | QARAK   |
| 160  | プロテアーゼ認識部位 13               | VHMPGLGLGPPMAKK   |
| 161  | プロテアーゼ認識部位 14               | KKAAP   |
| 162  | プロテアーゼ認識部位 15               | PMAKK   |
| 163  | 切断不可能リンカー                   | GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG   |
| 164  | ヒトマトリブターゼ<br>UniProt Q9Y5Y6 | MGSDRARKGGGGPKDFGAGLKYNRHEKVNGLLEEVF<br>LPVNNVKKVEKHGPGRWVLAALVIGLLLVLLGIGFLV<br>WHLQYRDVRVQKVFNGYMRITNENFVDAYENSSTEFV<br>SLASKVKDALKLLYSGVPLFGPYHKESAVTAFSEGSVI<br>AAYWSEFSIPQHLVEEAERVMAEERVVMLPPRARSLKS<br>FVVTSVVAFPTDSKTQRTQDNCSFGLHARGVELMRF<br>TTPGFPDSPAHAARCQWALRGDADSVLSLTFRSFDLA<br>SCDERGSDLVTYNTLSPEMPHALVQLCGTYPPSYNLT<br>FHSSQNVLLITLITNTERRHPGFEATFFQLPRMSSCGG<br>RLRKAQGTFNFPYPGHYPNIDCTWNI EVPNNQHVKV<br>RFKFFYLLEPGVPAGTCKPDYVEINGEKYCGERSQFVV<br>TSNSNKITVRFHSDQSYTDTGFLAEYLSYDSSDPCPGQ<br>FTCRTGRCIRKELRCDGWADCTDHSDELNCS CDAGHQF<br>TCKNKFCCKPLFWVCDVNDGCDNSDEQGCSCPAQTFRC<br>SNGKCLSKSQCNKDDCGDGSDEASC PKVNVVTCRKH<br>TYRCLNGLCLSKGNPECDGKEDCS DGSDEKDCDCGLRS<br>FTRQARVVGTTDADEGEWPWQVSLHALGQGHICGASLI<br>SPNWLVSAAHCYIDDRGFRYS DPTQWTAFLGLHDQSQR<br>SAPGVQERRLKRIISHPFNDFTFDYDIALLELEKPAE<br>YSSMVRPICLPDASHVFPAGKAIWVTGWGHTQYGGTGA<br>LILQKEIRVINQTTCCENLLPQQITPRMCMVGLSGGV<br>DSCQGDSSGGLSSVEADGRI FQAGVVSWDGCAQRNKP<br>GVYTRLP LFRDWIKENTGV |
| 165  | IgG CH1ドメイン                 | ASTKGPVVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT<br>VSWNSGALTSVHTFPAPVLQSSGLYSLSVVTVPSSSL<br>GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV   |
| 166  | IgG CH2ドメイン                 | APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWDVSH<br>DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQESTYRWSVLTVL   |

10

20

30

40

50

| 配列番号 | 名称                              | 配列  |    |
|------|---------------------------------|---|----|
|      |                                 | HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAK  |    |
| 167  | I g G CH3ドメイン                   | GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA<br>VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR<br>WQOQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPG  |    |
| 168  | CH1コネクタ                         | EPKSC   |    |
| 169  | ヒンジフル                           | XがS又はPであるDKTHTCPXCP   |    |
| 170  | ヒンジ中央                           | XがS又はPであるHTCPXCP  |    |
| 171  | ヒンジショート                         | XがS又はPであるCPXCP  |    |
| 172  | I g G 1、白人型アロタイプ                | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT<br>VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL<br>GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPA<br>PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSH<br>DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT<br>VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPRE<br>PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES<br>NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOQGN<br>VFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK   | 10 |
| 173  | I g G 1、アフロアメリカン型アロタイプ          | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT<br>VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL<br>GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPA<br>PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSH<br>DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT<br>VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPRE<br>PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES<br>NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOQGN<br>VFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK   | 20 |
| 174  | IgG2                            | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT<br>VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSENF<br>GTQTYTCNVNHHKPSNTKVDKTKVERKCCVECPAPPV<br>AGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEV<br>QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS VLT VVHQ<br>DWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTI SKTKGQPREPQVY<br>TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISEWESNGQP<br>ENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOQGNVFSC<br>SVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK  |    |
| 175  | IgG3                            | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT<br>VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL<br>GTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTP LGDTTHTCPRC<br>PEPKSCTPPPCPRCPEPKSCTPPPCPRCPEPKSCT<br>PPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVT<br>CVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS<br>TFRVVS VLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI<br>SKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFY<br>PSDIAVEWESSGQPENNYNTTPMLDSDGSFFLYSKLTV<br>DKSRWQOQGNIFSCSVMHEALHNRF TQKLSLSLSPGK | 30 |
| 176  | IgG4                            | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT<br>VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL<br>GTKTYTCNVNHHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEF<br>LGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPE<br>VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH<br>QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQV<br>YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ<br>PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS<br>CSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK   |    |
| 177  | ヒトFcγRIIIa<br>UniProt受託番号P08637 | MWQLLLPTALLLVLSAGMRTEDLPKAVVFLEPQW<br>YRVLEKDSVTLKCGAYS PEDNSTQWFHNE SLIS<br>SQASSYFIDAATVDDSGEYRCQTNLSTLSDFVQL   | 40 |

| 配列番号 | 名称                                     | 配列   |
|------|--|--|
|      |  | EVHIGWLLLQAPRWVFKEEDPIHLRCHSWKNTAL<br>HKVTYLQNGKGRKYFHHNSDFYIPKATLKDSGSY<br>FCRGLFGSKNVSSETVNITITQGLAVSTISSFFP<br>PGYQVSFCLVMVLLFAVDVTGLYFSVKTNIRSSTR<br>DWKDHKFKWRKDPQDK  |
| 178  | ペプチドリンカー (G 4 S)                       | GGGGS  |
| 179  | ペプチドリンカー (G 4 S) 2                     | GGGSGGGGS  |
| 180  | ペプチドリンカー (S G 4) 2                     | SGGGSGGGG  |
| 181  | ペプチドリンカー-G 4 (S G 4) 2                 | GGGSGGGSGGGG   |
| 182  | ペプチドリンカー                               | GSPGSSSSGS   |
| 183  | (G 4 S) 3 ペプチドリンカー                     | GGGSGGGSGGGG   |
| 184  | (G 4 S) 4 ペプチドリンカー                     | GGGSGGGSGGGSGGGG   |
| 185  | ペプチドリンカー                               | GSGSGSGS   |
| 186  | ペプチドリンカー                               | GSGSGNGS   |
| 187  | ペプチドリンカー                               | GSGSGSG  |
| 188  | ペプチドリンカー                               | GSGSG  |
| 189  | ペプチドリンカー                               | GSG  |
| 190  | ペプチドリンカー                               | GSGNGSG  |
| 191  | ペプチドリンカー                               | GNGSGSG  |
| 192  | ペプチドリンカー                               | GNGSG  |
| 193  | ペプチドリンカー                               | EPKSCGGGSGGGGS   |
| 194  | ペプチドリンカー                               | EPKSCDGGGSGGGGS  |
| 195  | マトリプターゼリンカー                            | SGGSGGGGSPMAKKGGGSGGGSGGGSGGGSGGS  |
| 196  | リンカー 2                                 | GGGGSVHMLGFLGPRQARVNVGGGSGGGGS   |
| 197  | リンカー 3                                 | GGGSGGGGSRQARVNVGGGSGGGSGGGSGGGGS  |
| 198  | MMP プロテアーゼリンカー                         | GGGSGGGGSGPLGLWSQGGGSGGGSGGGSGGGSGG  |
| 199  | 複合型MMP 9 MK 0 6 2、C D 3<br>に対する 3 3 AA | GGGGSVHMLGFLGPRQARVNVGGGSGGGGS   |
| 200  | カテプシン S/B                              | GGGSGGGGSGGGGSGVGGTGGGSGGGSGGS   |
| 201  | KKAAPVNG                               | GGGSGGGGSKKAAPVNVGGGSGGGSGGGGS   |
| 202  | PMAKKVNG                               | GGGSGGGGSPMAKKVNVGGGSGGGSGGGGS   |
| 203  | QARAKVNG                               | GGGSGGGGQARAKVNVGGGSGGGSGGGGS  |
| 204  | MMP9                                   | GGGSGGGGSVHMLGFLGPGGGSGGGSGGS  |
| 205  | QARAK                                  | GGGSGGGGQARAKGGGSGGGSGGGSGGS   |
| 206  | MMP9-PMAKK                             | GGGGSVHMLGFLGPPMAKKGGGSGGGSGGS   |
| 207  | KKAAP                                  | GGGSGGGGSKKAAPGGGSGGGSGGGSGGS  |
| 208  | PMAKK                                  | GGGSGGGGSPMAKKGGGSGGGSGGGSGGS  |
| 209  | N F 9 / M a t 5 複合型リンカー                | GGGGSVHMLGFLGPRSRGSPGGGGS  |
| 210  | 複合型MK 0 6 2 MMP 9                      | GGGSGGGGSRQARVNVGGGSGVPLSLYSGGGSGGS<br>GGS   |
| 211  | 複合型MK 0 6 2 -MMP 9                     | GGGSGGGGSRQARVNVGPLSLYSGGGSGGGGS   |
| 212  | 4.24.72 scFv                           | QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTVDYSMNWVK<br>QAPGKCLKMGMWINTETGEPRTDDFKGRFAFSLETS<br>ASTAYLQINNLKNEDSATYFCAREGDYDVFYDWHGHTTL<br>KVS<br>SGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDIVLTQSPASLAVS<br>LGQRATISCRASKSVSTSSYSYMHWYQQKPGQPPKLLI<br>KYVSYLESQV<br>PARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATY<br>YQHSREFPYTFGCGTKLEIK |

10

20

30

40

## 【 0 2 3 2 】

ヒト免疫グロブリンの軽鎖及び重鎖のヌクレオチド配列に関連する一般的な情報は、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) に与えられる。抗体鎖のアミノ酸は、上に定義したようなKabat (Kabat, E. A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Instit

50

utes of Health, Bethesda, MD (1991))によるナンバリングシステムに従ってナンバリングされ、参照される。

【実施例】

【0233】

以下は、本発明の方法及び組成物の実施例である。上記の一般的な説明を前提として、他の様々な実施形態を実施できることが理解される。

【0234】

組換えDNA技術

標準的な方法を使用して、Sambrook et al., Molecular Cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989に記載されるように、DNAを操作した。分子生物学的試薬を製造者の指示書に従って使用した。ヒト免疫グロブリンの軽鎖及び重鎖のヌクレオチド配列に関する一般的な情報は、以下に与えられる: Kabat, E. A. et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Ed., NIH Publication No 91-3242。

10

【0235】

DNA配列決定

DNA配列は、二本鎖配列決定によって決定した。

20

【0236】

遺伝子合成

必要な場合、望ましい遺伝子セグメントは、適切なテンプレートを使用してPCRにより生成したか、又はGeneart AG (レーゲンスブルク、ドイツ)又はGenscript (ニュージャージー州、米国)で合成オリゴヌクレオチドとPCR産物から自動遺伝子合成によって合成した。単一の制限エンドヌクレアーゼ開裂部位に隣接する遺伝子セグメントを、標準的なクローニング/配列決定ベクター内へとクローニングした。プラスミドDNAを形質転換細菌から精製し、濃度をUV分光法によって測定した。サブクローニングした遺伝子断片のDNA配列を、DNA配列決定によって確認した。遺伝子セグメントは、それぞれの発現ベクター内へのサブクローニングを可能にする適切な制限部位を用いて設計した。全てのコンストラクトは、真核細胞における分泌のためのタンパク質を標的とするリーダーペプチドをコードする、5'末端DNA配列を含むように設計された。

30

【0237】

細胞培養技術

Current Protocols in Cell Biology (2000)、Bonifacino, J. S., Dasso, M., Harford, J. B., Lippincott-Schwartz, J. 及び Yamada, K. M. (編集)、John Wiley & Sons, Inc.に記載されているように、標準的な細胞培養技術を使用した。

40

【0238】

タンパク質精製

標準的なプロトコルを参照して、フィルタにかけた細胞培養上清からタンパク質を精製した。簡潔に述べると、抗体を、Protein A Sepharoseカラム(GE Healthcare)に適用し、PBSで洗浄した。抗体の溶出はpH 2.8で達成され、その直後に試料を中和した。凝集したタンパク質を、サイズ排除クロマトグラフィー(Superdex 200, GE Healthcare)によって、PBS中、又は20mMヒスチジン、150mM NaCl (pH 6.0)中、単量体抗体から分離させた。単量体抗体画分をプールし、(必要な場合)例えばMILLIPORE Amicon Ultra (30 MWCO)遠心濃縮機を使用して濃縮し、-20 又は -80

50

で凍結保存した。これらの試料の一部が、例えばSDS-PAGE、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)又は質量分析によるその後のタンパク質解析及び分析的特徴付けのために提供された。

【0239】

SDS-PAGE

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

10

【0240】

分析用サイズ排除クロマトグラフィー

抗体の凝集及びオリゴマー状態を決定するためのサイズ排除クロマトグラフィー(SEC)は、HPLCクロマトグラフィーによって行った。簡潔に述べると、プロテインA精製抗体を、Agilent HPLC 1100システムの300mM NaCl、50mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(pH 7.5)におけるTosoh TSKgel G3000SWカラムに、又はDionex HPLC-Systemの2xPBSにおけるSuperdex 200カラム(GE Healthcare)に適用した。溶離したタンパク質をUV吸光度及びピーク面積の積分によって定量した。BioRad Gel Filtration Standard 151-1901を標準とした。

20

【0241】

質量分析法

この章は、その正しいアセンブリに重点をおいて、VH/VL置き換え(VH/VL CrossMab)を有する多重特異性抗体の特性決定を記載する。予想される一次構造を、脱グリコシル化したインタクトなCrossMabs及び脱グリコシル化した/消化したプラスミン、又は脱グリコシル化した/制限されたLysC消化したCrossMabのエレクトロスプレーイオン化質量分析法(ESI-MS)によって分析した。

【0242】

VH/VL CrossMabsを、リン酸バッファー又はTrisバッファー中、タンパク質濃度1mg/mlで、37°Cで17時間までの時間、N-グリコシダーゼFを用いて脱グリコシル化した。プラスミン又は制限されたLysC(Roche)消化を、100µgの脱グリコシル化したVH/VL CrossMabを用い、Trisバッファー(pH8)中、それぞれ、室温で120時間、また、37°Cで40分間行った。質量分析の前に、サンプルを、Sephadex G25カラム(GE Healthcare)でのHPLCによって脱塩した。合計質量は、TriVersa NanoMate source(Advion)が取り付けられたmaxis 4G UHR-QTOF MSシステム(Bruker Daltonik)でのESI-MSによって決定された。

30

【0243】

表面プラズモン共鳴(SPR)(Biacore)を用い、それぞれの抗原に対する多重特異性抗体の結合及び結合親和性の決定。

40

それぞれの抗原に対する、生成した抗体の結合は、Biacore装置(GE Healthcare Biosciences AB、ウプサラ、スウェーデン)を用い、表面プラズモン共鳴によって観察された。簡潔には、親和性測定のために、ヤギ抗ヒトIgG、JIR 109-005-098抗体を、それぞれの抗原に対する抗体の提示のためにアミンカップリングを介してCM5チップ上に固定化する。結合を、HBS緩衝液(HBS-P(10mM HEPES、150mM NaCl、0.005% Tween 20、pH7.4)、25°C(又は代替的に37°C)中で測定する。抗原(R&D Systems又は社内精製)を溶液中に様々な濃度で添加した。80秒~3分の抗原注入により会合を測定し、チップ表面をHBS緩衝液で3~10分間洗浄して解離を測定し、1:

50

1 ラングミュア結合モデルを用いてKD値を推定した。システム固有のベースラインドリフトの補正及びノイズシグナル低減のために、サンプル曲線から陰性対照データ（例えば、緩衝曲線）を差し引く。それぞれのBiacore Evaluation Softwareを、センサーグラムの分析及び親和性データの計算に使用する。

#### 【0244】

##### 実施例1

CD28及びCD3を標的とする二重特異性抗原結合分子の作製

##### 1.1 抗CD28抗体の作製

抗原のクローニング：

ヒトCD28 (UniProt: P10747)の細胞外ドメイン(成熟タンパク質のアミノ酸1~134)をコードするDNA断片を、溶解性タグ及び精製タグとしてはたらくhum IgG1 Fc断片をコードする断片の下流にある2つの異なる哺乳動物のレシピエントベクターにインフレームで挿入した。発現ベクターの1つはFc領域に「ホール」変異を含み、もう1つは「ノブ」変異、並びにBir Aビオチンリガーゼとの同時発現中に特異的ビオチン化を可能にするC末端aviタグ(GLNDIFEAQKIEWHE、配列番号88)を含んでいた。また、両Fc断片はPG-LALA突然変異を含んでいた。Fcノブ鎖のC末端に一価ビオチン化aviタグを有する二量体CD28-Fcコンストラクトを得るために、両方のベクターをBir Aビオチンリガーゼをコードするプラスミドと組み合わせて同時トランスフェクトした。

10

#### 【0245】

ホットスポットを欠き、親和性が低下したCD28(SA)変異体の作製及び特性評価  
配列番号24のアミノ酸配列を含むVH及び配列番号25のアミノ酸配列を含むVLを有するCD28スーパーアゴニスト抗体(SA)は、国際公開第2006/050949号に記載されている。

20

#### 【0246】

不對システイン残基、トリプトファン残基、脱アミド部位の除去及び親和性低下CD28(SA)変異体の生成

本発明者らの詳細な結合因子の特性評価の一部として、CD28(SA)可変ドメイン配列の計算分析を行った。この分析により、VHのCDR2領域の不對システイン(50位、Kabataナンバリング)、VHのCDR3のトリプトファン残基(100a位、Kabataナンバリング)及びVLのCDR1(32位、Kabataナンバリング)、並びにVHのCDR2の潜在的なアスパラギン脱アミド部位(56位、Kabataナンバリング)が明らかになった。トリプトワンの酸化はかなり遅いプロセスであり、還元化合物を添加することによって防止することができるが、抗体可変ドメイン中の不對システインの存在は重要となり得る。遊離システインは反応性であり、他のタンパク質又は細胞若しくは培地の成分の他の不對システインと安定な結合を形成することができる。結果として、これは、潜在的に免疫原性であり、したがって患者にリスクをもたらす得る未知の修飾を有する不均一で不安定な生成物をもたらす可能性がある。さらに、アスパラギンの脱アミド化並びに結果として生じるイソアスパラギン酸及びスクシンイミドの形成は、in vitro安定性及びin vivo生物学的機能の両方に影響を及ぼし得る。親マウス結合因子5.11Aの結晶構造分析により、C50はヒトCD28への結合に関与せず、したがってCD28に対する親和性に影響を与えることなくセリン等の類似のアミノ酸で置換できることが明らかになった。しかしながら、50位のトリプトファン残基及びアスパラギンの両方は、結合界面に近いか又はそれに関与し、したがって、類似のアミノ酸による置換は、結合親和性の低下をもたらす得る。この実施例では、本発明者らは、以下の理由のために、ヒトCD28に対するCD28(SA)の親和性を低下させることを特に目的とした：CD28(SA)の親和性は1~2nMの範囲内であり、結合半減期は約32分である。この強い親和性は、患者に静脈内注射した場合、血液及びリンパ組織等の大量のCD28発現細胞を含有する組織においてシンク効果(sink effect)をもたらす得る。結果として、標的化成分を介した化合物の部位特異的標的化が低下し得、

30

40

50

コンストラクトの有効性が低下し得る。かかる効果を最小限に抑えるために、いくつかのVH及びVL変異体を生成して、親和性を種々の程度に低下させた(図2A及び2C)。潜在的な安定性ホットスポットを表す前述の位置に加えて、ヒトCD28への結合に直接的又は間接的に関与する更なる残基は、元のマウス生殖系列アミノ酸又は類似のアミノ酸のいずれかによって置き換えられた。さらに、CD28(SA)VL及びVHの両方のCDRも、トラスツズマブのそれぞれのフレームワーク配列にグラフトした(図2B及び2D)。次いで、VH及びVL変異体のいくつかの組み合わせを一価の1アーム抗CD28 IgG様コンストラクトとして発現させ、結合をSPRによって特性評価した。

#### 【0247】

SPRによる還元型1アーム抗CD28変異体の解離速度定数( $k_{off}$ )の分析

10

第1の工程で抗CD28結合因子変異体を特徴付けるために、全ての結合因子を一価の1アームIgG様コンストラクトとして発現させた(図1A)。このフォーマットを、1:1モデルにおいてCD28への結合を特性評価するために選択した。HEK細胞へのトランスフェクションの5日後、上清を回収し、発現したコンストラクトの力価を決定した。

#### 【0248】

抗CD28結合因子変異体の解離速度を、ニュートラアビジン捕捉によってNLCチップ上に固定化されたビオチン化huCD28-Fc抗原を用いて25でProteOn XPR36機器(Biorad)を使用して表面プラズモン共鳴(SPR)によって測定した。組換え抗原(リガンド)の固定化のため、huCD28-FcをPBST(10mMリン酸塩、150mM塩化ナトリウム pH 7.4、0.005% Tween 20からなるTween 20を含むリン酸緩衝生理食塩水)で100~500nMの範囲の濃度に希釈し、次いで、様々な接触時間で25 $\mu$ l/分で注射した。これにより、垂直方向で1000~3000応答単位(RU)の固定化レベルが得られた。

20

#### 【0249】

ワンショット反応速度測定では、注入方向を水平方向に変更した。産生された上清の力価に基づいて、一価の1アームIgGをPBSTで希釈して、100nM~6.25nMの範囲の2倍希釈系列を得た。注入は、120秒の結合時間及び300秒の解離時間で、別々のチャンネル1~5に沿って50 $\mu$ l/分で同時に行った。参照用の「インライン」ブランクを提供するために、6つ目のチャンネルに沿って緩衝液(PBST)を注入した。結合相互作用は、精製及び生化学的特性評価をせずに上清からの一価の1アームIgGを用いて測定したため、タンパク質:タンパク質相互作用のオフレートのみを更なる結論に使用した。解離センサーグラムを適合させることによって、ProteOn Manager v3.1ソフトウェアの単純な1対1ラングミュア結合モデルを使用して、解離速度を計算した。全てのクローンの解離速度定数( $k_{off}$ )値を表1に要約する。産生された変異体の比較により、 $k_{off}$ 値が親配列と比較して最大30倍減少することが明らかになった。

30

40

50



## 【表 1】

表 1：解離速度定数 ( $k_{off}$ ) 値を有する発現された全ての一価抗 CD 28 変異体の概要

| 結合因子変異体                       | ID       | 配列番号 | 配列番号 | 配列番号 | $k_{off}$<br>( $10^{-4}/M$ ) |
|-------------------------------|----------|------|------|------|------------------------------|
| CD28 (SA) __変異体__1<br>(親CD28) | P1AE4441 | 72   | 80   | 87   | 3.0                          |
| CD28 (SA) __変異体__2            | P1AE3058 | 73   | 81   | 87   | N/A                          |
| CD28 (SA) __変異体__3            | P1AE3059 | 73   | 82   | 87   | N/A                          |
| CD28 (SA) __変異体__4            | P1AE3060 | 73   | 83   | 87   | N/A                          |
| CD28 (SA) __変異体__5            | P1AE3061 | 73   | 80   | 87   | N/A                          |
| CD28 (SA) __変異体__6            | P1AE3062 | 74   | 81   | 87   | N/A                          |
| CD28 (SA) __変異体__7            | P1AE3063 | 74   | 82   | 87   | 100                          |
| CD28 (SA) __変異体__8            | P1AE3064 | 74   | 83   | 87   | 68                           |
| CD28 (SA) __変異体__9            | P1AE3065 | 74   | 84   | 87   | 78                           |
| CD28 (SA) __変異体__10           | P1AE3066 | 74   | 85   | 87   | N/A                          |
| CD28 (SA) __変異体__11           | P1AE3067 | 74   | 80   | 87   | 37                           |
| CD28 (SA) __変異体__12           | P1AE3068 | 75   | 86   | 87   | 2.4                          |
| CD28 (SA) __変異体__13           | P1AE3069 | 75   | 80   | 87   | 1.9                          |
| CD28 (SA) __変異体__14           | P1AE3070 | 76   | 81   | 87   | 100                          |
| CD28 (SA) __変異体__15           | P1AE3071 | 76   | 82   | 87   | 24                           |
| CD28 (SA) __変異体__16           | P1AE3072 | 76   | 83   | 87   | 10                           |
| CD28 (SA) __変異体__17           | P1AE3073 | 76   | 84   | 87   | 14                           |
| CD28 (SA) __変異体__18           | P1AE3074 | 76   | 85   | 87   | 82                           |
| CD28 (SA) __変異体__19           | P1AE3075 | 76   | 80   | 87   | 2.9                          |
| CD28 (SA) __変異体__20           | P1AE3076 | 77   | 81   | 87   | N/A                          |
| CD28 (SA) __変異体__21           | P1AE3077 | 77   | 82   | 87   | N/A                          |
| CD28 (SA) __変異体__22           | P1AE3078 | 77   | 83   | 87   | 61                           |
| CD28 (SA) __変異体__23           | P1AE3079 | 77   | 80   | 87   | 43                           |
| CD28 (SA) __変異体__24           | P1AE3080 | 78   | 81   | 87   | 80                           |
| CD28 (SA) __変異体__25           | P1AE3081 | 78   | 82   | 87   | 3.51                         |
| CD28 (SA) __変異体__26           | P1AE3082 | 78   | 83   | 87   | 9.7                          |
| CD28 (SA) __変異体__27           | P1AE3083 | 78   | 84   | 87   | 14                           |
| CD28 (SA) __変異体__28           | P1AE3084 | 78   | 85   | 87   | 69                           |
| CD28 (SA) __変異体__29           | P1AE3085 | 78   | 80   | 87   | 2.5                          |
| CD28 (SA) __変異体__30           | P1AE3086 | 79   | 86   | 87   | 3.22                         |
| CD28 (SA) __変異体__31           | P1AE3087 | 79   | 80   | 87   | 2.5                          |

10

20

30

40

## 【0250】

ヒトCD28への結合を、ヒトCD28を発現するCHO細胞(ヒトCD28を安定的に過剰発現するように改変された親細胞株CHO-k1 ATCC#CCL-61)を用いて試験した。結合を評定するために、細胞を回収し、計数し、生存率についてチェックし、FACS緩衝液(eBioscience、カタログ番号00-4222-26)に $2.5 \times 10^5 / ml$ で再懸濁した。 $5 \times 10^4$ 個の細胞を、漸増濃度のCD28結合因子(1pM~100nM)と共に4で2時間、丸底96ウェルプレートにおいてインキュベートした。次いで、細胞を冷FACS緩衝液で3回洗浄し、PEコンジュゲート化ヤギ抗ヒトPE(Jackson ImmunoResearch、カタログ番号109-

50

116-098)と共に4で更に60分間インキュベートし、冷FACS緩衝液で1回洗浄し、遠心分離し、100ulのFACS緩衝液に再懸濁した。コンストラクトと細胞との間の非特異的結合相互作用をモニターするために、抗DP47 IgGを陰性対照として含めた。結合を、FACS Fortessa (BD、ソフトウェアFACS Diva)を用いたフローサイトメトリーによって評定した。GraphPad Prism 6を用いて結合曲線を得た。図3A~図3Cから分かるように、一価の1アームIgG様CD28変異体コンストラクトは、結合の違いを示した。

#### 【0251】

1.2 CD3及びCD28を標的とする二重特異性抗原結合分子の調製

CD3及びCD28を標的とする二重特異性抗原結合分子のクローニング

発現プラスミドの作製のために、それぞれの可変ドメインの配列を使用し、それぞれのレシピエント哺乳動物発現ベクターに予め挿入されたそれぞれの定常領域とインフレームでサブクローニングした。Fcドメインにおいて、国際特許出願国際公開第2012/130831に記載の方法に従い、Pro329Gly、Leu234Ala、及びLeu235Ala変異(PG-LALA)を、ヒトIgG1重鎖の定常領域に導入して、Fc受容体への結合をなくした。二重特異性抗体の作製のために、Fc断片は、重鎖の誤対合を回避するための「ノブ」変異(S354C/T366W変異、ナンバリングはKabata EUインデックスに従う)又は「ホール」変異(Kabata EUインデックスによるY349C/T366S/L368A/Y407V突然変異)のいずれかを含有した。二重特異性抗原結合分子における軽鎖の誤対合を回避するために、VH/VL又はCH1/Cカップドメインの交換を1つの結合部分に導入した(クロスFab技術)。国際特許出願の国際公開第2015/150447号に記載されるように、別の結合部分において、電荷をCH1ドメイン及びCカップドメインに導入した。

#### 【0252】

以下の分子をクローニングし、その概略図を図1B~1Iに示す：

分子1：CD28(9.3)-CD3(CH2527)1+1フォーマット、CD3(CH2527)Fab断片(ノブ)におけるVH/VL交換及び配列番号89及び91の重鎖アミノ酸配列と、配列番号90及び92の軽鎖アミノ酸配列(P1AD8935)とを含むCD28(9.3)Fab断片(ホール)における荷電修飾を有する二重特異性huIgG1 PG-LALA クロスFab分子(図1B)。

分子2：CD28(SA)-CD3(CH2527)1+1フォーマット、配列番号89及び93の重鎖アミノ酸配列と、配列番号90及び94の軽鎖アミノ酸配列(P1AD8942)とを含む、CD3(CH2527)Fab断片(ノブ)におけるVH/VL交換、及びCD28(SA)Fab断片(ホール)における荷電修飾を有する二重特異性huIgG1 PG-LALA クロスFab分子(図1B)。

分子3：CD28(9.3)単一特異性huIgG1 PG-LALA、一価抗CD28(9.3)huIgG1 PG-LALAコンストラクトであって、CD28重鎖は、Fc(ノブ)断片と組み合わせて「ホール」Fc鎖として発現される(図1C)。分子は、配列番号91、92及び95(P1AD8938)のアミノ酸配列を含む。

分子4：CD28(SA)単一特異性huIgG1 PG-LALA、一価抗CD28(SA)huIgG1 PG-LALAコンストラクトであって、CD28重鎖は、Fc(ノブ)断片と組み合わせて「ホール」Fc鎖として発現される(図1C)。分子は、配列番号93、94及び95(P1AD8944)のアミノ酸配列を含む。

分子5：CD3(CH2527)単一特異的huIgG1 PG-LALA、一価抗CD3(CH2527)huIgG1 PG-LALAコンストラクトであって、CD3重鎖は、Fc(ホール)断片と組み合わせて「ノブ」Fc鎖として発現される(図1D)。分子は、配列番号89、90及び96(P1AD8939)のアミノ酸配列を含む。

分子6：CD3(CH2527)Fab断片(ノブ)におけるVH/VL交換及びCD28(9.3)Fab断片(ホール)における荷電修飾を有する、マスクされたCD28(9.3)-CD3(CH2527)1+1フォーマット、二重特異性huIgG1 P

10

20

30

40

50

G - L A L A クロス F a b 分子であって、C D 3 が、抗イデオタイプ C D 3 s c F v 4 . 2 4 . 7 2 及び切断可能リンカー（マスクされた 4 . 2 4 . 7 2 \_ R Q A R V V N G 部位、M K 0 6 2 マトリプターゼ部位）によりマスクされる、分子（図 1 E）。分子は、配列番号 9 8 及び 9 7 の重鎖アミノ酸配列と、配列番号 9 0 及び 9 2 の軽鎖アミノ酸配列（P 1 A D 8 9 8 7）とを含む。

分子 7：C D 3（C H 2 5 2 7）F a b 断片（ノブ）における V H / V L 交換及び C D 2 8（S A）F a b 断片（ホール）における荷電修飾を伴う、マスクされた C D 2 8（S A）- C D 3（C H 2 5 2 7）1 + 1 フォーマット、二重特異性 h u I g G 1 P G - L A L A クロス F a b 分子であって、C D 3 が、抗イデオタイプ C D 3 s c F v 4 . 2 4 . 7 2 及び切断可能リンカー（マスクされた 4 . 2 4 . 7 2 \_ R Q A R V V N G 部位、M K 0 6 2 マトリプターゼ部位）によりマスクされる、分子（図 1 E）。分子は、配列番号 9 8 及び 9 9 の重鎖アミノ酸配列と、配列番号 9 0 及び 9 4 の軽鎖アミノ酸配列（P 1 A D 8 9 9 0）とを含む。

分子 8：C D 3（C H 2 5 2 7）F a b 断片（ノブ）における V H / V L 交換及び C D 2 8（9 . 3）F a b 断片（ホール）における荷電修飾を有する、マスクされた C D 2 8（9 . 3）- C D 3（C H 2 5 2 7）1 + 1 フォーマット、二重特異性 h u I g G 1 P G - L A L A クロス F a b 分子であって、C D 3 が、抗イデオタイプ C D 3 s c F v 4 . 3 2 . 6 3 及び切断不可能リンカー（マスクされた 4 . 2 4 . 7 2 \_ 切断不可能）によりマスクされる、分子（図 1 F）。分子は、配列番号 1 0 0 及び 9 7 の重鎖アミノ酸配列と、配列番号 9 0 及び 9 2 の軽鎖アミノ酸配列（P 1 A D 8 9 8 8）とを含む。

分子 9：C D 3（C H 2 5 2 7）F a b 断片（ノブ）における V H / V L 交換及び C D 2 8（S A）F a b 断片（ホール）における荷電修飾を有する、マスクされた C D 2 8（S A）- C D 3（C H 2 5 2 7）1 + 1 フォーマット、二重特異性 h u I g G 1 P G - L A L A クロス F a b 分子であって、C D 3 が、抗イデオタイプ C D 3 s c F v 4 . 3 2 . 7 2 及び切断不可能リンカー（マスクされた 4 . 2 4 . 7 2 \_ 切断不可能）によりマスクされる、分子（図 1 F）。分子は、配列番号 1 0 0 及び 9 9 の重鎖アミノ酸配列と、配列番号 9 0 及び 9 4 の軽鎖アミノ酸配列（P 1 A D 8 9 8 9）とを含む。

分子 1 0：C D 2 8（S A \_\_ 変異体 8）- C D 3（P 0 3 5 . 0 9 3）1 + 1、配列番号 1 0 1 及び 1 0 3 の重鎖アミノ酸配列と、配列番号 1 0 2 及び 1 0 4 の軽鎖アミノ酸配列（P 1 A F 7 2 8 9）とを含む、C D 2 8（S A \_\_ 変異体 8）F a b 断片（ホール）における V H / V L 交換、及び C D 3（P 0 3 5 . 0 9 3）F a b 断片（ノブ）における荷電修飾を有する、二重特異性 h u I g G 1 P G - L A L A クロス F a b 分子（図 1 G）。

分子 1 1：C D 2 8（S A \_\_ 変異体 8）F a b 断片（ホール）における V H / V L 交換及び C D 3（P 0 3 5 . 0 9 3）F a b 断片（ノブ）における荷電修飾を有する、マスクされた C D 2 8（S A \_\_ 変異体 8）- C D 3（P 0 3 5 . 0 9 3）1 + 1、二重特異性 h u I g G 1 P G - L A L A クロス F a b 分子であって、C D 3 は、抗イデオタイプ C D 3 s c F v 4 . 2 4 . 7 2 及び切断可能リンカー（P M A K K 部位）でマスクされている（図 1 H）。分子は、配列番号 1 0 1 及び 1 0 6 の重鎖アミノ酸配列と、配列番号 1 0 2 及び 1 0 4 の軽鎖アミノ酸配列（P 1 A F 7 2 9 1）とを含む。

分子 1 2：C D 2 8（S A \_\_ 変異体 8）F a b 断片（ホール）における V H / V L 交換及び C D 3（P 0 3 5 . 0 9 3）F a b 断片（ノブ）における荷電修飾を有する、マスクされた C D 2 8（S A \_\_ 変異体 8）- C D 3（P 0 3 5 . 0 9 3）1 + 1、二重特異性 h u I g G 1 P G - L A L A クロス F a b 分子であって、C D 3 は、抗イデオタイプ C D 3 s c F v 4 . 3 2 . 7 2 及び切断不可能リンカーでマスクされている（図 1 I）。分子は、配列番号 1 0 1 及び 1 0 5 の重鎖アミノ酸配列と、配列番号 1 0 2 及び 1 0 4 の軽鎖アミノ酸配列（P 1 A F 7 2 9 0）とを含む。

### 【 0 2 5 3 】

1 . 2 C D 2 8 及び C D 3 を標的とする二重特異性抗原結合分子の産生

抗イデオタイプ（I D）バインダー配列を、ハイブリドーマ細胞の R N A から R A C

10

20

30

40

50

E-PCR (cDNA末端の迅速増幅)によって得た。マウスの免疫化によってハイブリドーマ細胞を得た。クローニングに必要な制限部位を含む単鎖Fv (ScFv)配列の合成を、Invitrogenで注文した。抗ID一本鎖Fv DNA配列を、それぞれのレシピエント哺乳動物発現ベクターに予め挿入されたCD3 VH鎖とインフレームでサブクローニングした。タンパク質発現はMP5Vプロモーターによって駆動され、合成ポリAシグナル配列がCDSの3'末端に存在する。さらに、各ベクターは、EBV OriP配列を含む。

#### 【0254】

懸濁状態で増殖するHEK293 Expi293 TMF (Thermo Fisher)細胞を、Expifectamine Reagentを使用して哺乳動物発現ベクターと同時にトランスフェクトすることによって、分子を産生した。1:1:1:1の比(「重鎖ホール、重鎖ノブ、軽鎖荷電、軽鎖交差」)で細胞に対応する発現ベクターをトランスフェクトした。

#### 【0255】

トランスフェクションのため、HEK293 Expi293 TMF細胞を、トランスフェクションする前にExpi293発現培地(Thermo Fisher)中で培養した。トランスフェクションの日に、プラスミドDNA(1µg/mLの総トランスフェクション量、4種のプラスミド1:1:1:1)をOpti-MEM(全トランスフェクション体積の5%)と混合した。Expifectamine Reagent(Ratio Reagent-OptiMEM 8:150)をOpti-MEM(全トランスフェクション体積の5%)と混合し、室温で5分間インキュベートする。DNAと試薬を1:1の比で混合し、室温で30分間インキュベートする。細胞(5mLの総トランスフェクション体積に対して、 $2.5 \cdot 10^6$ 細胞/mLが必要である)をExpi培地で希釈し、DNA-試薬複合体に添加する。細胞を複合体と共に37、5%CO<sub>2</sub>で16~18時間インキュベートする。次いで、細胞にトランスフェクションエンハンサー1(総トランスフェクション体積の0.5%)及びトランスフェクションエンハンサー2(総トランスフェクション体積の5%)を供給する。

#### 【0256】

6~7日後、210×gで20~30分間の遠心分離(Sigma 8K遠心分離機)による精製のために上清を回収した。溶液を滅菌濾過(0.22µmフィルタ)し、0.01%w/vの最終濃度のアジ化ナトリウムを添加した。溶液を精製するまで4に保った。

#### 【0257】

1.3 CD28及びCD3を標的とする二重特異性抗原結合分子の精製

分泌されたタンパク質を、ProteinAアフィニティークロマトグラフィーを使用するアフィニティークロマトグラフィー、続いて1~2回のサイズ排除クロマトグラフィー工程によって細胞培養上清から精製した。

#### 【0258】

アフィニティークロマトグラフィーのため、25mLの20mMリン酸ナトリウム、20mMクエン酸ナトリウム、0.5M塩化ナトリウムpH7.5で平衡化したHiTrap Protein A FFカラム(CV=5mL, GE Healthcare)に上清をロードした。未結合タンパク質を、少なくとも10カラム体積の20mMリン酸ナトリウム、20mMクエン酸ナトリウム、pH7.5で洗浄することによって除去し、標的タンパク質を20カラム体積(0%~100%の勾配)の20mMクエン酸ナトリウム、100mM塩化ナトリウム、100mMグリシンpH3で溶出した。1/10の2M Tris pH10.5を添加することによってタンパク質溶液を中和した。標的タンパク質をAmicon(登録商標)Ultra-15 Ultracel 30K(Merck Millipore Ltd.)で最大4mLの体積まで濃縮した後、20mMヒスチジン、140mM塩化ナトリウム、pH6.0で平衡化したHiLoad Superdex 200カラム(GE Healthcare)にロードした。

## 【0259】

サイズ排除クロマトグラフィー後の分析のため、単一画分中の分子の純度及び分子量を、還元剤の非存在下でのSDS-PAGE及びクーマシー（Instant Blue（商標）、Expedeon）による染色によって分析した。NuPAGE（登録商標）Pre-Castゲルシステム（4～12%ビス-トリス、Invitrogen又は3～8%トリス-アセタテート、Invitrogen）を製造元の説明書に従って使用した。精製タンパク質試料のタンパク質濃度を、アミノ酸配列に基づいて計算されたモル吸光係数で割った280nmでの光学密度（OD）を測定することによって決定した。

## 【0260】

最終精製ステップ後の分子の純度と分子量を、還元剤の存在下と非存在下でCE-SDS分析によって分析した。Caliper LabChip GXIIシステム（Caliper Lifescience）が、製造元の指示に従って使用された。分子の凝集体内容を、25mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、125mM NaCl、200mM L-アルギニンモノヒドロクロリド、0.02%（w/v）NaN<sub>3</sub>、pH6.7泳動緩衝液中でTSKgel G3000 SW XL分析サイズ排除カラム（Tosoh）を使用して25で分析した。

## 【0261】

全ての分子の最終的な品質は良好であり、95%以上の（84%の分子9を除く）モノマー含有量であった。特定の分子の精製パラメータの概要を表2に示す。

## 【表2】

表2：二重特異性CD28抗原結合分子の産生及び精製の概要

| 分子 | 収率<br>[mg/l] | 分析SEC<br>(HMW/モノマー/LMW)<br>[%] | CE-SDSで<br>測定した純度<br>[%] |
|----|--------------|--------------------------------|--------------------------|
| 1  | 36.3         | 0/73.96/24.4                   | 75.55                    |
| 2  | 29.93        | 1.44/97.5/1.05                 | 78.1                     |
| 3  | 10.15        | 1.4/98.6/0                     | 97.7                     |
| 4  | 38.5         | 0.2/99.3/0.5                   | 99.6                     |
| 5  | 103.2        | 0/99.11/0.89                   | 94.36                    |
| 6  | 0.65         | 2/98/0                         | 100                      |
| 7  | 4.94         | 5/95/0                         | 100                      |
| 8  | 1.296        | 3.4/96.6/0                     | 100                      |
| 9  | 3            | 14.5/83.5/1.7                  | 71.2                     |
| 10 | 39.15        | 0/91.9/8.1                     | 98.04                    |
| 11 | 2.55         | 0/92.7/7.3                     | 95.73                    |
| 12 | 1.54         | 0.9/90.1/9                     | 100                      |

## 【0262】

## 実施例2

Jurkat NFATレポーター細胞を使用したT細胞活性化アッセイ

Jurkat-NFATレポーターアッセイを使用して、二重特異性CD28-CD3 IgGによって媒介されるT細胞活性化を定量した。

## 【0263】

Jurkat-NFATレポーター細胞株（Promega）は、ヒトCD3を発現

する、NFATプロモーターを有するヒト急性リンパ性白血病レポーター細胞株である。T細胞二重特異性分子がCD28及びCD3に結合(架橋)する場合、ルシフェラーゼ発現を測定することができる。発光を、One-Glo基質(Promega)の添加後に測定する。

#### 【0264】

Jurkat-NFATレポーター細胞を回収し、VCellを使用して生存度を評価した。細胞を350×gで5分間遠心分離した後、Jurkat培地(Jurkat培地:RPMI 1640、2g/lグルコース、2g/l NaHCO<sub>3</sub>、10%FCS、25mM HEPES、2mM L-グルタミン、1×NEAA、1×ピルビン酸ナトリウム)に再懸濁した。50μl/ウェル(25,000細胞/ウェル)を96ウェル白色平底プレート(Greiner、非被覆)に添加した。抗体をJurkat培地で希釈し、50μl/ウェルをJurkat細胞に添加した。プレートを加湿インキュベータ内で37で5時間インキュベートした後、発光読み出しのために取り出した。

10

#### 【0265】

アッセイを行うおよそ5時間前に、調製したONE-Glo溶液の適量の凍結アリコート室温で解凍した。アッセイプレートも室温に適合させるために、ONE-Gloを添加する15分前にインキュベーターから取り出した。30μl/ウェルのONE-Glo溶液を加え、上下に数回ピペティングすることによってウェルを再懸濁した。プレートを暗所で室温にて約10分間インキュベートし、発光(5秒)を測定した。

#### 【0266】

図4A及び4Bに示されるように、CD3及びCD28の両方を含む二重特異性抗原結合分子については用量依存的なJurkat-NFAT活性化を検出することができたが、一価対照についてはJurkat-NFAT活性化は検出されなかった(すなわち、T細胞活性化のためには架橋が必要である)。

20

#### 【0267】

##### 実施例3

Jurkat-NFATレポーター細胞及び抗ヒトFc被覆プレートを使用するT細胞活性化アッセイ

96ウェル白色平底プレート(Greiner)を、0.025μl/ウェルPBS中の8μg/ml抗ヒトFcAb(BioLegend)で4にて20時間被覆した。DPBSを吸引によって除去した。

30

#### 【0268】

全ての抗体をJurkat培地で希釈した。非被覆プレートについては50μl/ウェルを添加し、被覆プレートについては25μl/ウェルを添加した。4で30分間のインキュベーションDPBSを吸引によって除去した。

#### 【0269】

Jurkat-NFATレポーター細胞を回収し、VCellを使用して生存度を評価した。細胞を350×gで5分間遠心分離した後、Jurkat培地に再懸濁した。50μl/ウェル(25,000細胞/ウェル)を96ウェル白色平底プレート(Greiner)に添加した。プレートを加湿インキュベータ内で37で5時間インキュベートした後、発光読み出しのために取り出した。

40

#### 【0270】

アッセイを行うおよそ5時間前に、調製したONE-Glo溶液の適量の凍結アリコートを室温で解凍した。アッセイプレートも室温に適合させるために、ONE-Gloを添加する15分前にインキュベーターから取り出した。30μl/ウェルのONE-Glo溶液を加え、上下に数回ピペティングすることによってウェルを再懸濁した。プレートを暗所で室温にて約10分間インキュベートし、発光(5秒)を測定した。

#### 【0271】

結果を、それぞれ図4C及び図4D(抗ヒトFc被覆プレートを含む)並びに図4E及び図4F(非被覆プレート)に示す。CD3及びCD28の両方を含む二重特異性抗原結

50

合分子については用量依存的な Jurkat NFAT 活性化を検出することができたが、一価対照については Jurkat NFAT 活性化は検出されなかった (T 細胞活性化のためには架橋が必要である)。IgG (二重特異性 CD28 - CD3 抗体及び二価 CD3 IgG) に対する Jurkat NFAT 活性化は、抗ヒト Fc 被覆プレートでより高かった (< 10 倍)。

#### 【0272】

##### 実施例 4

##### ヒト PBMC を使用する T 細胞活性化アッセイ

96 ウェル平底プレート (TPP) を、0.025 µl / ウェル PBS 中の 8 µg / ml 抗ヒト Fc Ab (BioLegend) で 4 にて 20 時間被覆した。DPBS を吸引によって除去した。全ての抗体をアッセイ培地 (2% FCS 及び 1 × GlutaMAX で完了した高度 RPMI 1640 培地 (12633012、Fisher Scientific)) で希釈した。非被覆プレートについては 50 µl / ウェルを添加し、被覆プレートについては 25 µl / ウェルを添加した。4 で 30 分間のインキュベーション DPBS を吸引によって除去した。

10

#### 【0273】

ヒト PBMC をエフェクター細胞として使用し、分子とのインキュベーションの 48 時間で細胞殺傷を検出した。ヒト末梢血単核細胞 (PBMC) を、健康なヒトドナーから得られたバフィーコートから単離した。濃縮リンパ球調製物 (バフィーコート) のため、Histopaque - 1077 密度調製物を使用した。血液 / バフィーコートを滅菌 PBS で 1 : 1 に希釈し、Histopaque 勾配 (Sigma、#H8889) 上に重層した。遠心分離 (450 × g、30 分、ブレーキ無し、室温) 後、PBMC 含有界面相より上方の血漿を廃棄し、PBMC を新しい falcon チューブに移し、続いて PBS 50 ml で満たした。混合物を遠心分離し (400 × g、10 分、室温)、上清を廃棄し、PBMC ペレットを赤血球溶解用の 2 ml の ACK 緩衝液に再懸濁した。37 で約 2 ~ 3 分間インキュベートした後、チューブを滅菌 PBS で 50 ml まで充填し、350 × g で 10 分間遠心分離した。この洗浄工程を 1 回繰り返した後、2% FCS 及び 1 × GlutaMax を含有する RPMI 1640 培地に PBMC を再懸濁した。PBMC を、液体窒素に移す前に、冷却セルボックス内で -80 で一晩凍結した。アッセイ開始の 24 時間前に、PBMC を解凍し、加湿インキュベータ内で 37、5% CO<sub>2</sub> のアッセイ培地 (密度 2 mio / ml) に保った。

20

30

#### 【0274】

T 細胞活性化を、CD4 陽性及び CD8 陽性 T 細胞上の CD25 及び CD69 の定量化、並びにインターフェロンガンマ放出 (ELISA) の定量化によって、37、5% CO<sub>2</sub> での 48 時間のインキュベーション後に評定した。

#### 【0275】

T 細胞活性化のために使用される材料：CD4 陽性及び CD8 陽性 T 細胞上の CD25 及び CD69 の定量化

FACS バッファー (1 × PBS 0.1% BSA)

4% PFA ホルマリン溶液 (Sigma) HT 501320 - 9 51

40

Brilliant Violet 421 TM 抗ヒト CD4 (BioLegend、317434)

Brilliant Violet 421 TM 抗ヒト CD25 (BioLegend、356114)

APC 抗ヒト CD8 (BioLegend、344722)

PE 抗ヒト CD8 (BioLegend、344706)

FITC 抗ヒト CD4 (BioLegend、357406)

PE - 抗ヒト CD69 (BioLegend、310906)

使用される補正対照：PBMC のみ

未染色

50

B v 4 2 1 C D 4  
 A P C C D 8  
 F I T C C D 4  
 P E C D 8

染色：

A P C C D 8 R 1  
 F I T C C D 4 B 1  
 P E C D 6 9 B 2  
 B V 4 2 1 C D 2 5 V 1

【0276】

10

F A C S 染色及び固定：

プレートを350×gで5分間遠心分離し、プレートを反転させることによって上清を除去した。150μlの冷FACS緩衝液を添加し、プレートを再び350×gで4分間遠心分離した。細胞をボルテックスによって再懸濁した後、25μl/ウェル(各フルオロフォアに対して0.8μl/ウェルのAbを含むFACS緩衝液)を添加し、プレートを4で60分間インキュベートした。細胞を2回洗浄した後(150μlの冷FACS緩衝液)、細胞を100μlの2%PFA(ホルマリン溶液)/ウェルに再懸濁して細胞を固定した。

【0277】

インターフェロンガンマ放出(ELISA)

20

使用材料：

ヒトIFN-ガンマ DuoSet ELISA、15プレート(R&D Systems)

Immunoplates Maxisorp F Boden 400ml Maxisorp(10547781、Fisher Scientific)

TMB高感度基質溶液(BioLegend)

Pierce(商標)TMB基質キット(34021、Thermo Fisher)

停止溶液：硫酸溶液、1M(35276、Fluka)

試薬希釈液：PBS中0.01%、0.05%Tween-20

30

洗浄緩衝液：PBS水中0.05%Tween-20。

ブロック緩衝液：PBS中1%BSA

Tween-20、10%溶液(Roche)

【0278】

捕捉抗体を500μlのPBS中で再構成した。240μg/バイアル、したがって480μg/ml。最終濃度は4μg/mlでなければならないため、PBSで1:120希釈する(30ml PBS中300ul)。

【0279】

捕捉抗体によるコーティング：

100μl/ウェルを、透明なMicrotest(商標)96ウェルELISAプレート(BD Falcon)に播種し、密封し、室温で一晩インキュベートした。プレートを裏返し、Wash Bufferで洗浄し、このプロセスを2回繰り返して合計3回洗浄した。各ウェルを洗浄緩衝液(PBS中0.05%Tween-20)(400μL)で満たすことによって洗浄する。各工程で液体を完全に除去することは、良好な性能のために不可欠である。最後の洗浄後、プレートを吸引することによって、又はプレートを反転させて清潔なペーパータオルに吸い取ることによって、残っている洗浄緩衝液を除去する。ブロッキングは、300μLのブロックバッファー(PBS中1%BSA)を各ウェルに添加することによって行った。室温で最低1時間インキュベートする。洗浄工程を3回繰り返した。

40

【0280】

50



標準：32.5 ngを0.5 ml 試薬希釈液（PBS中0.01%、0.05% Tween-20）中で再構成した。65 ng/mlに希釈し、標準希釈液を調製した。ウェルあたり100 µLの標準を添加した。プレートを接着性ストリップで覆い、室温で2時間インキュベートした。洗浄工程を3回繰り返した。試薬希釈液で希釈した100 µLの検出抗体（12 µg/ml 200 ng/ml 1:60希釈）を各ウェルに添加した。接着性ストリップで覆い、室温で2時間インキュベートする。洗浄工程を3回繰り返した。ストレプトアビジン-HRPの作業希釈液（1:40）100 µLを各ウェルに添加した。プレートを覆い、暗所において室温で20分間インキュベートする。洗浄工程を3回繰り返した。各ウェルに100 µLの基質溶液（TMB高感度基質溶液、BioLegend）溶液。暗所で室温でインキュベートする。溶液が暗青色変わったらすぐに、50 µl/ウェルの停止溶液を添加した（黄色に変わる）。450 nmに設定したマイクロプレートリーダーを使用して、各ウェルの光学濃度を直ちに決定する。波長補正が利用可能であれば、540 nm又は570 nmに設定する。波長補正が利用できない場合、450 nmでの読み取り値から540 nm又は570 nmでの読み取り値を減算する。この減算は、プレート内の光学的欠陥を補正する。補正なしで450 nmで直接行われた読み取りは、より高く、より正確ではない可能性がある。

10

## 【0281】

架橋のためのhuFcコーティングの使用：用量依存性T細胞活性化（インターフェロンガンマ放出によって測定）を、二重特異性CD3-CD28（9.3）IgG、並びにCD3 IgG（二価）及び一価CD3 IgGについて検出することができたが、一価CD28 mAb9.3 IgGについてはT細胞活性化を検出することができなかった（図5A）。コーティング（架橋）なしでは、CD3 IgG（二価）は用量依存的なT細胞活性化（インターフェロンガンマ放出によって測定）を約0.13 nMのEC<sub>50</sub>で誘導するが、CD3 IgGによって誘導されるT細胞活性化は低下する（EC<sub>50</sub>約12 nM）。一価CD3又は一価CD28（9.3）IgGのコーティングなしでは、T細胞活性化を検出することはできなかった（図5B）。

20

## 【0282】

架橋のためのhuFcコーティングの使用：用量依存性T細胞活性化（インターフェロンガンマ放出によって測定）を、二重特異性CD3-CD28（SA）IgG、並びにCD3 IgG（二価）及び一価CD3 IgGについて検出することができたが、一価CD28（SA）IgGについてはT細胞活性化を検出することができなかった（図5C）。コーティング（架橋）なしでは、CD3 IgG（二価）は非常に弱い用量依存性T細胞活性化（インターフェロン放出によって測定）を誘導し、EC<sub>50</sub>は約9 nMである。二重特異性CD3-CD28（SA）については、二重特異性IgG IFN 放出は100 nMでしか検出することができなかった。一価CD3又は一価CD28（SA）IgGのコーティングなしでは、T細胞活性化を検出することはできなかった（図5D）。

30

## 【0283】

架橋のためのhuFcコーティングの使用：用量依存性T細胞活性化（インターフェロンガンマ放出によって測定）を、二重特異性CD3-CD28（9.3）IgG及びCD3 IgG（二価）について検出することができた。一価CD3 IgG、並びに切断型二重特異性CD28 mAb9.3-CD3 IgGは用量依存的なT細胞活性化を誘導するが、マスクされたCD3-CD28（9.3）IgG（切断不可能）については低下したT細胞活性化を検出することができ、一価CD28（9.3）IgGについてはT細胞活性化を検出することができなかった（図6A）。

40

## 【0284】

架橋のためのhuFcコーティングの使用：用量依存性T細胞活性化（CD8陽性T細胞上のCD69の定量化によって測定）を、二重特異性CD3-CD28（9.3）IgG及びCD3 IgG（二価）について検出することができた。一価CD3 IgG、並びに切断型二重特異性CD3-CD28（9.3）IgGも用量依存的なT細胞活性化を誘導するが、マスクされたCD3-CD28（9.3）IgG（切断不可能）については

50

低下したT細胞活性化を検出することができ、一価CD28(9.3)IgGについてはT細胞活性化を検出することができなかった(図6B)。

【0285】

コーティングなし：用量依存性T細胞活性化(インターフェロンガンマ放出によって測定)を、二重特異性CD3-CD28(9.3)IgG及びCD3 IgG(二価)について検出することができた(二重特異性よりも約5倍低いEC50)。マスクされたCD3-CD28(9.3)(切断不可能)IgG、一価CD3 IgG並びに一価CD28(9.3)IgGは、本明細書で使用される最高濃度の一価CD3 IgGを除いて、T細胞活性化を誘導しない。切断型CD3-CD28(9.3)IgGは、マスクのない二重特異性CD3-CD28(9.3)IgG及び強いベル型と比較して、より高いEC50でT細胞活性化を誘導する(図6C)。

10

【0286】

コーティングなし：用量依存性T細胞活性化(CD8陽性T細胞上のCD69の定量化によって測定)を、二重特異性CD3-CD28(9.3)IgG及びCD3 IgG(二価)について検出することができた。切断型CD3-CD28(9.3)IgGは、マスクなしの二重特異性に匹敵したが、一価CD3 IgG、一価CD28(9.3)IgG及びマスクされたCD3-CD28(9.3)IgG(切断不可能リンカー)についてはT細胞活性化を観察することができなかった(図6D)。

【0287】

架橋のためのhuFcコーティングの使用：用量依存性T細胞活性化(インターフェロンガンマ放出によって測定)を、二重特異性CD3-CD28(SA)IgG及びCD3 IgG(二価)について検出することができた。一価CD3 IgG、並びに切断型二重特異性CD3-CD28(SA)IgGも用量依存的なT細胞活性化を誘導するが、マスクされたCD3-CD28(SA)IgG(切断不可能)については低下したT細胞活性化を検出することができ、一価CD28(SA)についてはT細胞活性化を検出することができなかった(図7A)。

20

【0288】

架橋のためのhuFcコーティングの使用：用量依存性T細胞活性化(CD8陽性T細胞上のCD69の定量化によって測定)を、二重特異性CD3-CD28(SA)IgG及びCD3 IgG(二価)について検出することができた。一価CD3 IgG、並びに切断型二重特異性CD3-CD28(SA)IgGも用量依存的なT細胞活性化を誘導するが、マスクされたCD3-CD28(SA)IgG(切断不可能)については低下したT細胞活性化(マスクなしの二重特異性CD3-CD28(SA)IgGよりもおよそ240倍高いEC50)を検出することができ、一価CD28(SA)IgGについてはT細胞活性化を検出することができなかった(図7B)。

30

【0289】

コーティングなし：用量依存性T細胞活性化(インターフェロンガンマ放出によって測定)を、二重特異性CD3-CD28(SA)IgG及びCD3 IgG(二価)について検出することができた(二重特異性よりも約30倍低いEC50)。マスクされたCD3-CD28(SA)(切断不可能)、一価CD3 IgG並びに一価CD28(SA)IgGは、本明細書で使用される最高濃度の一価CD3 IgGを除いて、T細胞活性化を誘導しない。切断型CD3-CD28(SA)IgGは、T細胞活性化を誘導しない(図7C)。

40

【0290】

コーティングなし：用量依存性T細胞活性化(CD8陽性T細胞上のCD69の定量化によって測定)を、二重特異性CD3-CD28(SA)IgG及びCD3 IgG(二価)について検出することができた。切断型CD3-CD28(SA)IgGも用量依存的なT細胞活性化を誘導したが、効力はマスクしていない二重特異性CD3-CD28(SA)と比較して低かった。マスクされたCD3-CD28(SA)(切断不可能)については、T細胞活性化を認めることができなかった。一価CD3 IgG及び一価CD2

50

8 ( S A ) は、本明細書で使用される最高濃度 ( 図 7 D ) で T 細胞活性化を誘導した。

【 0 2 9 1 】

実施例 5

Jurkat IL2 レポーター細胞アッセイで測定される T 細胞活性化

マスクされた CD3 - CD28 二重特異性抗体によって媒介される T 細胞活性化も、Jurkat IL2 レポーター細胞アッセイを使用して測定した。Jurkat IL2 レポーター細胞上の CD3 (シグナル 1) 及び CD28 (シグナル 2) の同時結合は、Jurkat IL2 レポーター細胞の下流活性化をもたらす。IL2 - Jurkat レポーター細胞の活性化は IL2 の産生をもたらし、これが Jurkat IL2 レポーター細胞における IL2 調節ホタルルシフェラーゼの発現の引き金となる。後者は、One-Glo 基質 (Promega) を添加により定量される。決定された発光の量は、CD3 及び CD28 媒介 Jurkat 活性化の直接的な尺度である。

【 0 2 9 2 】

Jurkat IL-2 レポーター細胞 (Promega、カタログ番号 J1651) はエフェクター細胞としてはたらく。Jurkat T 細胞株は、IL2 プロモーターを有するヒト急性リンパ性白血病レポーター細胞株であり、ヒト CD3 単独、更にはヒト CD28 の更なる活性化を介して活性化されるとルシフェラーゼ発現をもたらす。細胞を、RPMI 1640 (2 g / l グルコース、2 g / l NaHCO<sub>3</sub> を含んだ)、と 10% FCS、25 mM HEPES、1 x GlutaMAX、1 x NEAA MEM、1 x ピルビン酸ナトリウムの懸濁液中で、0.1 ~ 0.5 Mio 細胞 / ml で増殖させた。最終濃度であるハイグロマイシン B 1 ml あたり 200 µg を、細胞を継代するときにはいつでも添加した。

【 0 2 9 3 】

アッセイのために、懸濁液中の Jurkat IL2 レポーター細胞を計数し、ViCell を用いて生存率を評定した。遠心分離 (310 x g、3 分) 後、培地を吸引し、細胞を新しい Jurkat 培地 (Jurkat 培地: RPMI 1640、2 g / l グルコース、2 g / l NaHCO<sub>3</sub>、10% FCS、25 mM HEPES、2 mM L-グルタミン、1 x NEAA、1 x ピルビン酸ナトリウム) 中に再懸濁した。

【 0 2 9 4 】

Jurkat - NFAT レポーター細胞を回収し、ViCell を使用して生存度を評定した。細胞を 350 x g で 5 分間遠心分離した後、Jurkat 培地 (Jurkat 培地: RPMI 1640、2 g / l グルコース、2 g / l NaHCO<sub>3</sub>、10% FCS、25 mM HEPES、2 mM L-グルタミン、1 x NEAA、1 x ピルビン酸ナトリウム) に再懸濁した。30 µl / ウェル (30.000 細胞 / ウェル) を 384 ウェル白色透明底プレート (Corning) に添加し、GloSensor cAMP 試薬 (Promega) を添加した。抗体を Jurkat 培地で希釈し (1 : 5 の希釈列を調製した)、必要量 (抗体あたり 200 nM) を安全なロックエписに添加し、1 µl の Rh-マトリプターゼ (His タグ付きで誘導された大腸菌 (E. coli)、Enzo) あり、又は無しで 37 °C で 2 時間インキュベートした。次いで、各希釈物を 4 倍濃縮し、ウェルあたり 10 µl の各濃縮抗体希釈物をアッセイプレートに添加した。アッセイプレートを数秒間遠心分離して、全ての液体がプレートの底部にあることを確認し、次いで、培地液体で覆い、加湿 CO<sub>2</sub> 中、37 °C で一定時間 (例えば、4 時間及び 6 時間) インキュベートした後、発光の読み出しのために取り出した。Tecan Spark 10 M を使用して、発光 (ウェルあたり 0.5 秒) を直接測定した。

【 0 2 9 5 】

図 8 に示されるように、マスクされた CD28 (SA\_\_variant 8) - CD3 (P035.093) 1 + 1 抗原結合分子について、Jurkat NFAT IL2 活性化は、Rh-マトリプターゼが添加されたとき、2 ~ 6 時間のインキュベーション時間後に検出することができたが、マトリプターゼの非存在下では Jurkat IL2 活性化は検出されなかった。図 9 A ~ 9 C では、様々な CD28 - CD3 二重特異性抗体につ

いての Jurkat NFAT IL2 活性化が、異なる時点、すなわち 2 時間 ( 図 9 A )、3 時間 40 分 ( 図 9 B ) 及び 6 時間で示される ( 図 9 C )。

【 0 2 9 6 】

二重特異性 CD28 - CD3 IgG は、用量依存的な Jurkat NFAT IL2 活性化を誘導する。組換えヒトマトリプターゼと 37 で 2 時間インキュベートしても、CD28 - CD3 IgG の効力は低下しない。マトリプターゼインキュベーションの有無にかかわらず、CD28 - CD3 IgG の Jurkat NFAT IL2 活性化は同等である。切断不可能リンカーを含有するマスクされた CD28 - Pro - CD3 IgG は、200 nM の最高濃度を除いて Jurkat NFAT IL2 活性化を誘導しない。活性化は、マスクされていない分子と比較して有意に少ない。マトリプターゼインキュベーションの有無にかかわらず、CD28 - pro - CD3 IgG の Jurkat NFAT IL2 活性化は同じである。マトリプターゼ切断可能リンカー ( PMAKK ) を含有するマスクされた CD28 - Pro - CD3 IgG は、用量依存的な Jurkat NFAT IL2 活性化を誘導する。効力は、CD28 - CD3 IgG と比較して EC<sub>50</sub> に関してわずかに低い。マトリプターゼが存在しなければ、マトリプターゼ切断可能リンカー ( PMAKK ) を含有するマスク CD28 - Pro - CD3 IgG は、切断可能リンカーを含有するマスク CD28 - Pro - CD3 IgG に匹敵する。

10

【 0 2 9 7 】

参考文献：

Acuto, O., and Michel, F. (2003). CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nat Rev Immunol* 3, 939 - 951. 20

Atamaniuk, J., Gleiss A., Porpazcy E., Kainz B., Grunt T.W., Raderer M., Hilgarth B., Drach J., Ludwig H., Gisslinger H., Jaeger U., Gaiger A. (2012). Overexpression of G protein-coupled receptor 5D in the bone marrow is associated with poor prognosis in patients with multiple myeloma. *Eur J Clin Invest*. 42 (9), 953 - 60. 30

Bahlis N.J., King A.M., Kolonias D. Carlsson L.M., Liu H.Y., Hussein M.A., Terebelo H.R., Byrne G.E. Jr, Levine B.L., Boise L.H., Lee K.P. (2007). CD28-mediated regulation of multiple myeloma cell proliferation and survival. *Blood* 109 (11), 5002 - 5010.

Boomer, J.S., and Green, J.M. (2010). An enigmatic tail of CD28 signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a002436. 40

Carreno, B.M., and Collins, M. (2002). The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu Rev Immunol* 20, 29 - 53.

Chen, L., and Flies, D.B. (2013). Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol* 13, 227 - 242.

Engelhardt, J.J., Sullivan, T.J., and Allison, J.P. (2006). CTLA-4 overexpression inhi 50

bits T cell responses through a CD28 - B7 - dependent mechanism. *J Immunol* 177, 1052 - 1061.

Esensten, J. H., Helou, Y. A., Chopra, G., Weiss, A., and Bluestone, J. A. (2016). CD28 Costimulation: From Mechanism to Therapy. *Immunity* 44, 973 - 988.

Fraser, J. D., Irving, B. A., Crabtree, G. R., and Weiss, A. (1991). Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28. *Science* 251, 313 - 316. 10

Gao Y., Wang X., Yan H., Zeng J., Ma S., Niu Y., Zhou G., Jiang Y., Chen Y. (2016). Comparative Transcriptome Analysis of Fetal Skin Reveals Key Genes Related to Hair Follicle Morphogenesis in Cashmere Goats. *PLoS One* 11(3), e0151118.

Hui, E., Cheung, J., Zhu, J., Su, X., Taylor, M. J., Wallweber, H. A., Sasmal, D. K., Huang, J., Kim, J. M., Mellman, I., and Vale, R. D. (2017). T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition. *Science* 355, 1428 - 1433. 20

Hunig, T. (2012). The storm has cleared: lessons from the CD28 superagonist TGN1412 trial. *Nat Rev Immunol* 12, 317 - 318.

June, C. H., Ledbetter, J. A., Gillespie, M. M., Lindsten, T., and Thompson, C. B. (1987). T-cell proliferation involving the CD28 pathway is associated with cyclosporine-resistant interleukin 2 gene expression. *Mol Cell Biol* 7, 4472 - 4481. 30

Kamphorst, A. O., Wieland, A., Nasti, T., Yang, S., Zhang, R., Barber, D. L., Konieczny, B. T., Daugherty, C. Z., Koenig, L., Yu, K., et al. (2017). Rescue of exhausted CD8 T cells by PD-1-targeted therapies is CD28-dependent. *Science* 355, 1423 - 1427.

Lavin, Y., Kobayashi, S., Leader, A., Amir, E. D., Elefant, N., Bigenwald, C., Remark, R., Sweeney, R., Becker, C. D., Levine, J. H., et al. (2017). Innate Immune Landscape in Early Lung Adenocarcinoma by Paired Single-Cell Analyses. *Cell* 169, 750 - 765 e717. 40

Linsley, P. S., Clark, E. A., and Ledbetter, J. A. (1990). T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 5031 - 5035. 50

Murray M. E., Gavile C. M., Nair J. R., Koorella C., Carlson L. M., Buac D., Utley A., Chesni M., Bergsagel P. L., Boise L. H., Lee K. P. (2014). CD28-mediated pro-survival signaling induces chemotherapeutic resistance in multiple myeloma. *Blood* 123(24), 3770-3779.

Roemer, P. S., Berr, S., Avota, E., Na, S. Y., Battaglia, M., ten Berge, I., Einsele, H., and Hunig, T. (2011). Preculture of PBMCs at high cell density increases sensitivity of T-cell responses, revealing cytokine release by CD28 superagonist TGN1412. *Blood* 118, 6772-6782. 10

Tai, X., Van Laethem, F., Sharpe, A. H., and Singer, A. (2007). Induction of autoimmune disease in CTLA-4-/- mice depends on a specific CD28 motif that is required for in vivo costimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 13756-13761. 20

Thompson, C. B., Lindsten, T., Ledbetter, J. A., Kunkel, S. L., Young, H. A., Emerson, S. G., Leiden, J. M., and June, C. H. (1989). CD28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell-derived lymphokines/cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 1333-1337.

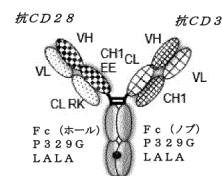
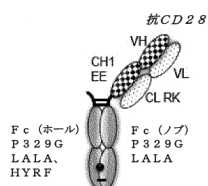
Tirosh, I., Izar, B., Prakadan, S. M., Wadsworth, M. H., 2nd, Treacy, D., Trombetta, J. J., Roem, A., Rodman, C., Lian, C., Murphy, G., et al. (2016). Dissecting the multicellular ecosystem of metastatic melanoma by single-cell RNA-seq. *Science* 352, 189-196. 30

Zheng, C., Zheng, L., Yoo, J. K., Guo, H., Zhang, Y., Guo, X., Kang, B., Hu, R., Huang, J. Y., Zhang, Q., et al. (2017). Landscape of Infiltrating T Cells in Liver Cancer Revealed by Single-Cell Sequencing. *Cell* 169, 1342-1356 e1316. 40

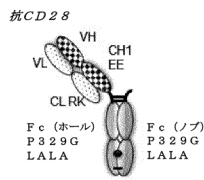
【図面】

【図1A】

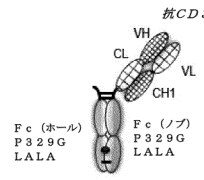
【図1B】



【図 1 C】

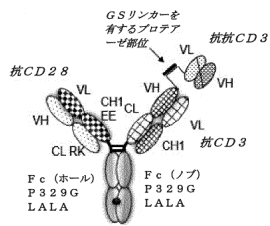


【図 1 D】

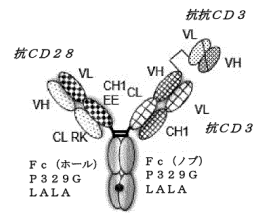


10

【図 1 E】

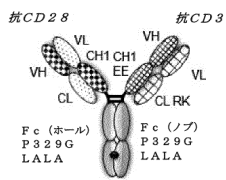


【図 1 F】

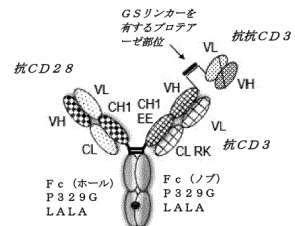


20

【図 1 G】



【図 1 H】

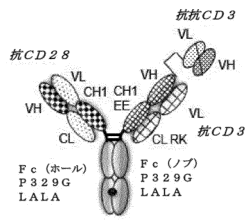


30

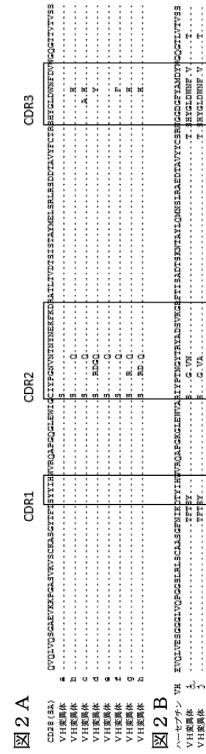
40

50

【 図 1 I 】



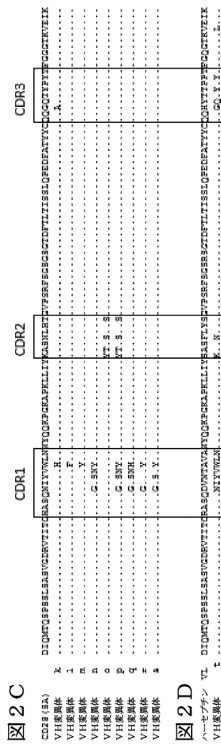
【 図 2 - 1 】



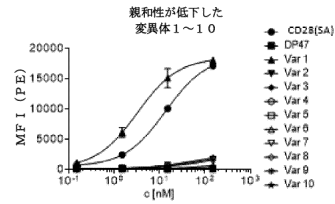
10

20

【 図 2 - 2 】



【 図 3 A 】



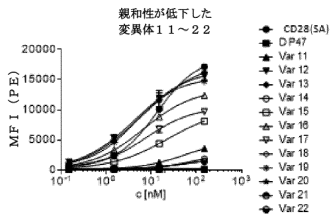
30

40

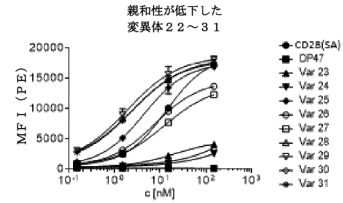
50



【 図 3 B 】

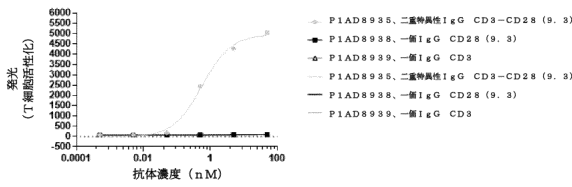


【 図 3 C 】

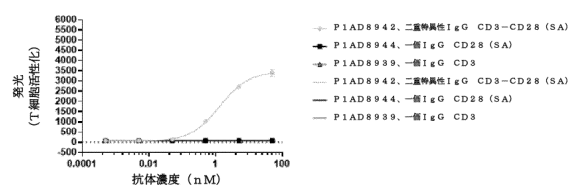


10

【 図 4 A 】

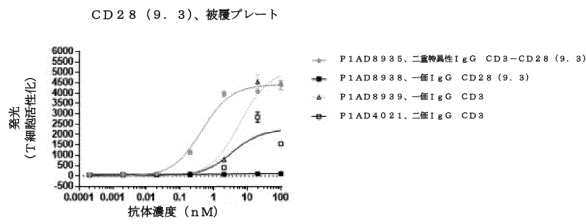


【 図 4 B 】

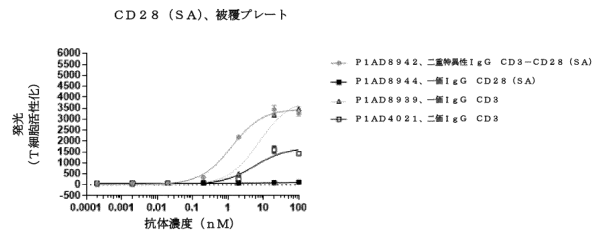


20

【 図 4 C 】



【 図 4 D 】

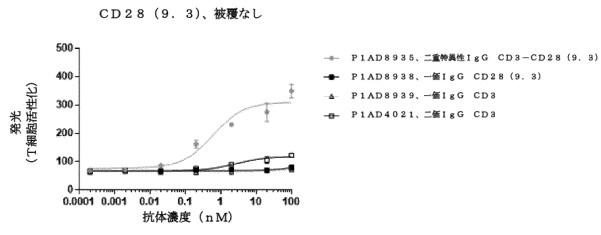


30

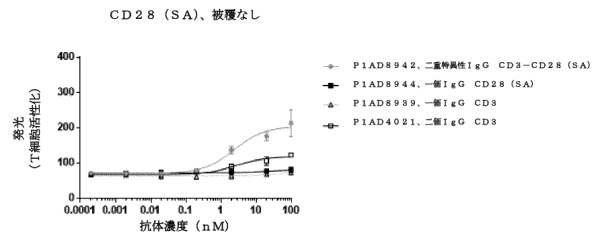
40

50

【 図 4 E 】

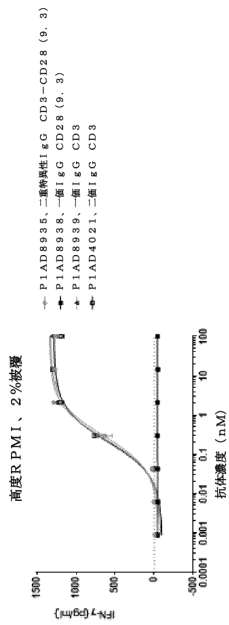


【 図 4 F 】

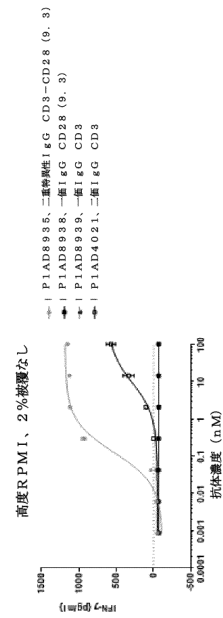


10

【 図 5 A 】



【 図 5 B 】



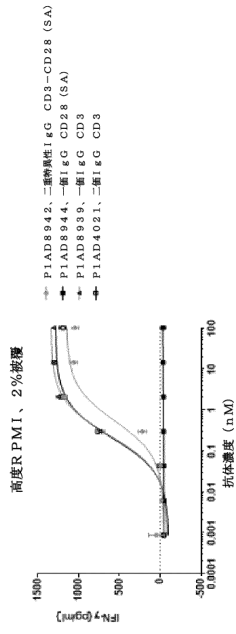
20

30

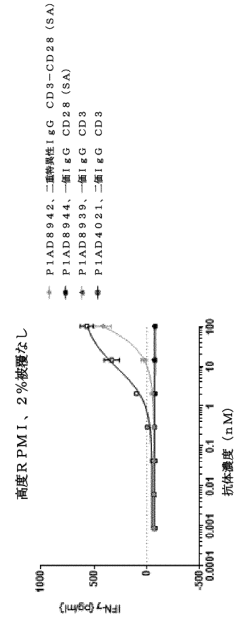
40

50

【 図 5 C 】



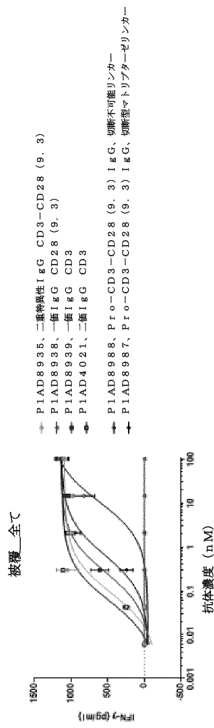
【 図 5 D 】



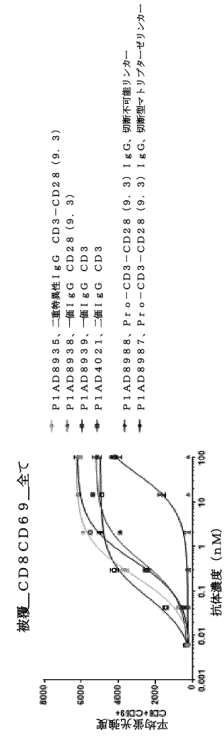
10

20

【 図 6 A 】



【 図 6 B 】

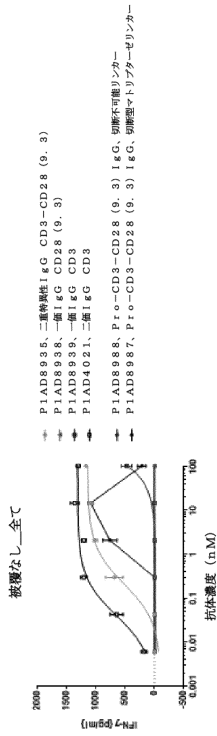


30

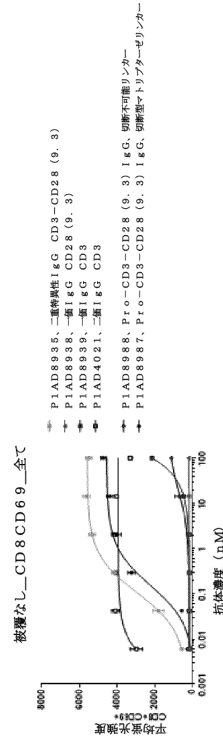
40

50

【 図 6 C 】



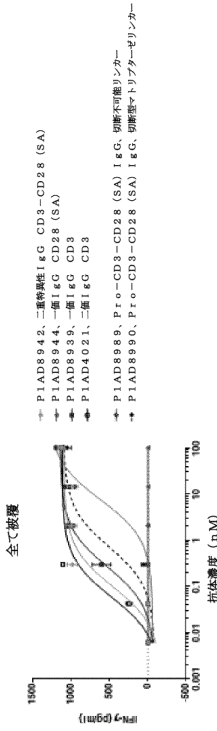
【 図 6 D 】



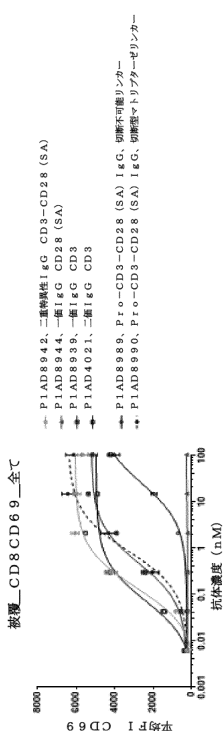
10

20

【 図 7 A 】



【 図 7 B 】

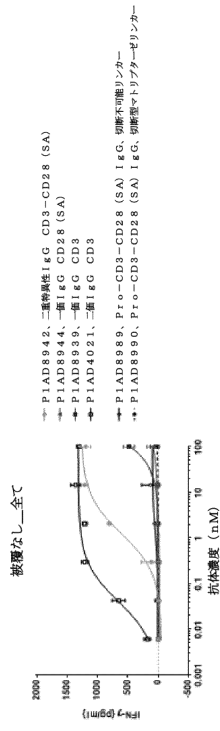


30

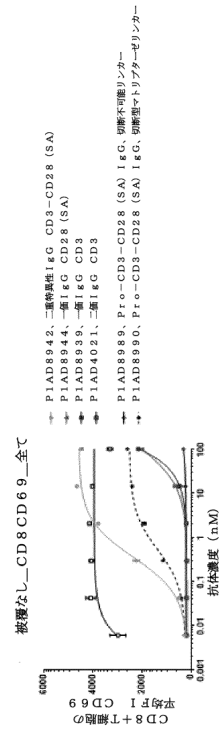
40

50

【 図 7 C 】



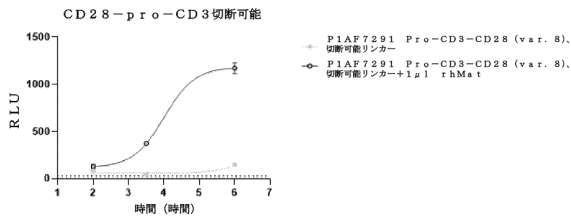
【 図 7 D 】



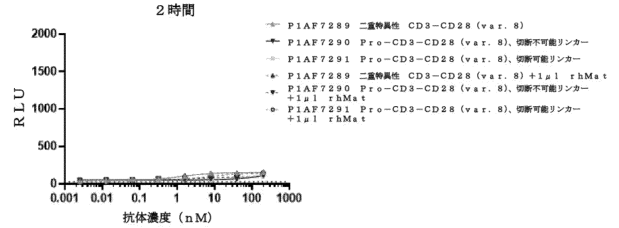
10

20

【 図 8 】



【 図 9 A 】

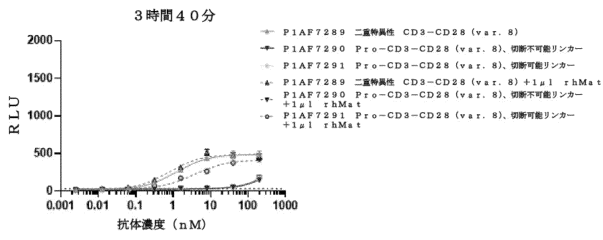


30

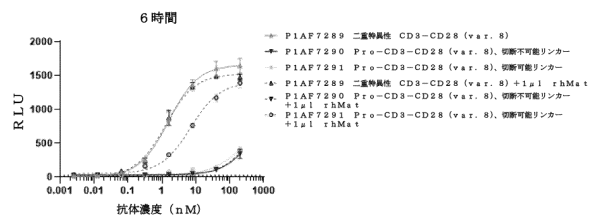
40

50

【 図 9 B 】



【 図 9 C 】



10

【 配列表 】

2023531067000001.app

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2021/067244

| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>INV. C07K16/28 A61P35/00<br>ADD.   |  |  |
|--|--|--|
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC  |  |  |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>C07K A61P  |  |  |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  |  |  |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)<br>EPO-Internal, WPI Data   |  |  |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>  |  |  |
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No.  |
| X  | WO 2020/027330 A1 (CHUGAI PHARMACEUTICAL CO LTD [JP]) 6 February 2020 (2020-02-06) Figs.4, 33-36 (legend), Ex. 23, [0175]<br>-----                           | 1-43   |
| X  | CN 108 264 560 A (SHANGHAI XINBAINUO BIOTECHNOLOGY CO LTD) 10 July 2018 (2018-07-10) Throughout, e.g. Summary of the Invention, Figures 1-4, claims<br>----- | 1-43   |
| X  | EP 3 575 319 A1 (SHANGHAI SINOBIO BIOTECH CO LTD [CN]) 4 December 2019 (2019-12-04) [0270]-[0274]<br>-----<br>-/--   | 1-43   |
| <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<br>*E* earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>*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)<br>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>*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<br>*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<br>*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<br>*&* document member of the same patent family |
| Date of the actual completion of the international search<br>10 September 2021   |  | Date of mailing of the international search report<br>22/09/2021   |
| Name and mailing address of the ISA/<br>European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040,<br>Fax: (+31-70) 340-3016   |  | Authorized officer<br>Wimmer, Georg  |

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

10

20

30

40

4

50

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

|   |
|---|
| International application No<br>PCT/EP2021/067244 |
|---|

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |  |                       |
|--|--|-----------------------|
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
| X  | X.-B. WANG: "A New Recombinant Single Chain Trispecific Antibody Recruits T Lymphocytes to Kill CEA (Carcinoma Embryonic Antigen) Positive Tumor Cells In Vitro Efficiently",<br>JOURNAL OF BIOCHEMISTRY,<br>vol. 135, no. 4, 1 April 2004 (2004-04-01)<br>, pages 555-565, XP055132180,<br>ISSN: 0021-924X, DOI: 10.1093/jb/mvh065<br>abstract, Fig. 1D | 1-43                  |
| A  | -----<br>TRICKETT A ET AL: "T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads",<br>JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER<br>SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, NL,<br>vol. 275, no. 1-2,<br>1 April 2003 (2003-04-01), pages 251-255,<br>XP004416755,<br>ISSN: 0022-1759, DOI:<br>10.1016/S0022-1759(03)00010-3<br>the whole document      | 1-43                  |
| A  | -----<br>ISAACS ET AL: "T cell immunomodulation-the Holy Grail of therapeutic tolerance",<br>CURRENT OPINION IN PHARMACOLOGY, ELSEVIER<br>SCIENCE PUBLISHERS, NL,<br>vol. 7, no. 4, 1 August 2007 (2007-08-01),<br>pages 418-425, XP027017007,<br>ISSN: 1471-4892<br>[retrieved on 2007-08-25]<br>the whole document                                     | 1-43                  |
| A  | -----<br>LU YUN-CHI ET AL: "Specific activation of pro-Infliximab enhances selectivity and safety of rheumatoid arthritis therapy",<br>PLOS BIOLOGY,<br>vol. 17, no. 6, 13 June 2019 (2019-06-13),<br>page e3000286, XP55839639,<br>United States<br>ISSN: 1544-9173, DOI:<br>10.1371/journal.pbio.3000286<br>the whole document                         | 22-25                 |
| A  | -----<br>WO 2016/020309 A1 (HOFFMANN LA ROCHE [CH];<br>HOFFMANN LA ROCHE [US])<br>11 February 2016 (2016-02-11)<br>Summary of the invention,<br>SEQ ID NOs. 3, 7   | 1-43                  |

4

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

page 2 of 2

50



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2021/067244

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|------------------|
| WO 2020027330 A1                       | 06-02-2020       | AU 2019315226 A1        | 18-03-2021       |
|  |                  | BR 112021001693 A2      | 04-05-2021       |
|  |                  | CA 3106829 A1           | 06-02-2020       |
|  |                  | CN 113286824 A          | 20-08-2021       |
|  |                  | EP 3831854 A1           | 09-06-2021       |
|  |                  | JP WO2020027330 A1      | 19-08-2021       |
|  |                  | KR 20210040989 A        | 14-04-2021       |
|  |                  | SG 112021011520 A       | 30-03-2021       |
|  |                  | WO 2020027330 A1        | 06-02-2020       |
| -----                                  |                  |                         |                  |
| CN 108264560 A                         | 10-07-2018       | NONE                    |                  |
| -----                                  |                  |                         |                  |
| EP 3575319 A1                          | 04-12-2019       | EP 3575319 A1           | 04-12-2019       |
|  |                  | WO 2018120842 A1        | 05-07-2018       |
| -----                                  |                  |                         |                  |
| WO 2016020309 A1                       | 11-02-2016       | AU 2015299163 A1        | 08-12-2016       |
|  |                  | AU 2019250201 A1        | 07-11-2019       |
|  |                  | BR 112016030462 A2      | 16-01-2018       |
|  |                  | CA 2951599 A1           | 11-02-2016       |
|  |                  | CL 2017000278 A1        | 03-11-2017       |
|  |                  | CN 106661120 A          | 10-05-2017       |
|  |                  | CR 20170032 A           | 04-04-2017       |
|  |                  | DK 3177643 T3           | 15-07-2019       |
|  |                  | EP 3177643 A1           | 14-06-2017       |
|  |                  | EP 3608337 A1           | 12-02-2020       |
|  |                  | ES 2734178 T3           | 04-12-2019       |
|  |                  | HR P20191174 T1         | 04-10-2019       |
|  |                  | HU E044814 T2           | 28-11-2019       |
|  |                  | IL 249120 A             | 30-04-2020       |
|  |                  | JP 6464255 B2           | 06-02-2019       |
|  |                  | JP 2017525690 A         | 07-09-2017       |
|  |                  | KR 20170020723 A        | 23-02-2017       |
|  |                  | KR 20190077125 A        | 02-07-2019       |
|  |                  | LT 3177643 T            | 12-08-2019       |
|  |                  | MA 50584 A              | 16-09-2020       |
|  |                  | NZ 727600 A             | 30-10-2020       |
|  |                  | PE 20170263 A1          | 30-03-2017       |
|  |                  | PH 12016502505 A1       | 10-04-2017       |
|  |                  | PL 3177643 T3           | 30-09-2019       |
|  |                  | PT 3177643 T            | 05-07-2019       |
|  |                  | SG 10201803384T A       | 28-06-2018       |
|  |                  | SG 11201700879W A       | 30-03-2017       |
| SI 3177643 T1                          | 30-08-2019       |                         |                  |
| TW 201619196 A                         | 01-06-2016       |                         |                  |
| UA 124254 C2                           | 18-08-2021       |                         |                  |
| US 2016075785 A1                       | 17-03-2016       |                         |                  |
| US 2018222980 A1                       | 09-08-2018       |                         |                  |
| US 2018222981 A1                       | 09-08-2018       |                         |                  |
| US 2020231673 A1                       | 23-07-2020       |                         |                  |
| WO 2016020309 A1                       | 11-02-2016       |                         |                  |
| ZA 201608205 B                         | 27-05-2020       |                         |                  |

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

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

| (51)国際特許分類               | F I            | テーマコード (参考) |
|--------------------------|----------------|-------------|
| C 1 2 P 21/08 (2006.01)  | C 1 2 P 21/08  |             |
| 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 P 37/04 (2006.01)  | A 6 1 P 37/04  |             |

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,N  
E,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,  
CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,K  
E,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,N  
G,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,  
TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

## 1. T W E E N

- (72)発明者 ホーファー, トーマス  
スイス国 8 9 5 2 シュリーレン, ヴァーギシュトラーセ 1 0, シーノオー ロッシュ グリク  
アート アーゲー
- (72)発明者 クライン, クリステリアン  
スイス国 8 9 5 2 シュリーレン, ヴァーギシュトラーセ 1 0, シーノオー ロッシュ グリク  
アート アーゲー
- (72)発明者 ウマーニャ, パブロ  
スイス国 8 9 5 2 シュリーレン, ヴァーギシュトラーセ 1 0, シーノオー ロッシュ グリク  
アート アーゲー

F ターム (参考) 4B064 AG27 CA19 CC24 CE06 CE07 CE12 DA05  
4B065 AA01X AA57X AA72X AA90X AB01 BA02 CA25 CA44  
4C085 AA13 AA14 BB11 CC02 DD62 EE01 GG01  
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 DA76 EA20 EA28 FA72 FA74  
GA10 GA22 GA26