(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2019-525727
(P2019-525727A)
(43)公表日　令和1年9月12日(2019.9.12)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/13	(2006.01)	C12N	15/13	ZNA	4B065
C07K 16/30	(2006.01)	C07K	16/30		4C076
C07K 16/46	(2006.01)	C07K	16/46		4C084
C12N 15/63	(2006.01)	C12N	15/63	Z	4C085
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15		4C086

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 159 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2018-557321 (P2018-557321)
(86)(22)出願日　平成29年5月5日 (2017.5.5)
(85)翻訳文提出日　平成30年12月28日 (2018.12.28)
(86)国際出願番号　PCT/US2017/031442
(87)国際公開番号　WO2017/193096
(87)国際公開日　平成29年11月9日 (2017.11.9)
(31)優先権主張番号　62/332,721
(32)優先日　平成28年5月6日 (2016.5.6)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)
(31)優先権主張番号　62/491,897
(32)優先日　平成29年4月28日 (2017.4.28)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)

(71)出願人　516250498
アッヴィ・ステムセントルクス・エル・エル・シー
アメリカ合衆国、イリノイ・６００６４、ノース・シカゴ、ノース・ワウキガン・ロード・１
(74)代理人　110001173
特許業務法人川口國際特許事務所
(72)発明者　サンダース，ローラ
アメリカ合衆国、カリフォルニア・９４１０７、サン・フランシスコ、キング・ストリート・１７０、ユニット・８０９

最終頁に続く

(54)【発明の名称】新規の抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体及び使用方法

(57)【要約】
新規の抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体及び抗体薬物コンジュゲート並びに抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体及び抗体薬物コンジュゲートを使用してがんを治療する方法が提供される。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＴＮＦＲＳＦ２１を発現する腫瘍開始細胞に結合する、単離された抗体。
【請求項２】
配列番号１を含むヒトＴＮＦＲＳＦ２１に結合する、単離された抗体。
【請求項３】
ＴＮＦＲＳＦ２１に結合し、
配列番号２１の軽鎖可変領域（ＶＬ）及び配列番号２３の重鎖可変領域（ＶＨ）、又は
配列番号２５のＶＬ及び配列番号２７のＶＨ、又は
配列番号２９のＶＬ及び配列番号３１のＶＨ、又は
配列番号３３のＶＬ及び配列番号３５のＶＨ、又は
配列番号３７のＶＬ及び配列番号３９のＶＨ、又は
配列番号４１のＶＬ及び配列番号４３のＶＨ、又は
配列番号４５のＶＬ及び配列番号４７のＶＨ、又は
配列番号４９のＶＬ及び配列番号５１のＶＨ、又は
配列番号５３のＶＬ及び配列番号５５のＶＨ、又は
配列番号５７のＶＬ及び配列番号５９のＶＨ、又は
配列番号６１のＶＬ及び配列番号６３のＶＨ、又は
配列番号６５のＶＬ及び配列番号６７のＶＨ、又は
配列番号６９のＶＬ及び配列番号７１のＶＨ、又は
配列番号７３のＶＬ及び配列番号７５のＶＨ、又は
配列番号７７のＶＬ及び配列番号７９のＶＨ、又は
配列番号８１のＶＬ及び配列番号８３のＶＨ、又は
配列番号８５のＶＬ及び配列番号８７のＶＨ、又は
配列番号８９のＶＬ及び配列番号９１のＶＨ、又は
配列番号９３のＶＬ及び配列番号９５のＶＨ；又は
配列番号９７のＶＬ及び配列番号９９のＶＨ；又は
配列番号１０１のＶＬ及び配列番号１０３のＶＨ；又は
配列番号１０５のＶＬ及び配列番号１０７のＶＨ；又は
配列番号１０９のＶＬ及び配列番号１１１のＶＨ；又は
配列番号１１３のＶＬ及び配列番号１１５のＶＨ；又は
配列番号１１７のＶＬ及び配列番号１１９のＶＨ；又は
配列番号１２１のＶＬ及び配列番号１２３のＶＨ；又は
配列番号１２５のＶＬ及び配列番号１２７のＶＨ；又は
配列番号１２９のＶＬ及び配列番号１３１のＶＨ；又は
配列番号１３３のＶＬ及び配列番号１３５のＶＨ；又は
配列番号１３７のＶＬ及び配列番号１３９のＶＨ；又は
配列番号１４１のＶＬ及び配列番号１４３のＶＨ；又は
配列番号１４５のＶＬ及び配列番号１４７のＶＨ；又は
配列番号１４９のＶＬ及び配列番号１５１のＶＨ；又は
配列番号１５３のＶＬ及び配列番号１５５のＶＨ；又は
配列番号１５７のＶＬ及び配列番号１５９のＶＨ；又は
配列番号１６１のＶＬ及び配列番号１６３のＶＨ；又は
配列番号１６５のＶＬ及び配列番号１６７のＶＨ；又は
配列番号１６９のＶＬ及び配列番号１７１のＶＨ；又は
配列番号１７３のＶＬ及び配列番号１７５のＶＨ；又は
配列番号１７７のＶＬ及び配列番号１７９のＶＨ；又は
配列番号１８１のＶＬ及び配列番号１８３のＶＨ；又は
配列番号１８５のＶＬ及び配列番号１８７のＶＨ；又は
配列番号１８９のＶＬ及び配列番号１９１のＶＨ；又は

配列番号１９３のＶＬ及び配列番号１９５のＶＨ；又は
配列番号１９７のＶＬ及び配列番号１９９のＶＨ；又は
配列番号２０１のＶＬ及び配列番号２０３のＶＨ；又は
配列番号２０５のＶＬ及び配列番号２０７のＶＨ；又は
配列番号２０９のＶＬ及び配列番号２１１のＶＨ；又は
配列番号２１３のＶＬ及び配列番号２１５のＶＨ；又は
配列番号２１７のＶＬ及び配列番号２１９のＶＨ；又は
配列番号２２１のＶＬ及び配列番号２２３のＶＨ；又は
配列番号２２５のＶＬ及び配列番号２２７のＶＨ；又は
配列番号２２９のＶＬ及び配列番号２３１のＶＨ；又は
配列番号２３３のＶＬ及び配列番号２３５のＶＨ；又は
配列番号２３７のＶＬ及び配列番号２３９のＶＨ；又は
配列番号２４１のＶＬ及び配列番号２４３のＶＨ；又は
配列番号２４５のＶＬ及び配列番号２４７のＶＨ；又は
配列番号２４９のＶＬ及び配列番号２５１のＶＨ；又は
配列番号２５３のＶＬ及び配列番号２５５のＶＨ；又は
配列番号２５７のＶＬ及び配列番号２５９のＶＨ；又は
配列番号２６１のＶＬ及び配列番号２６３のＶＨ；又は
配列番号３３のＶＬ及び配列番号２６５のＶＨ；又は
配列番号６５のＶＬ及び配列番号２６７のＶＨ；又は
配列番号２６９のＶＬ及び配列番号１０３のＶＨ；又は
配列番号２７１のＶＬ及び配列番号１７５のＶＨ
を含む抗体を含む、又は結合についてこの抗体と競合する、単離された抗体。

【請求項４】
内在化抗体である、請求項１～３のいずれかに記載の単離された抗体。

【請求項５】
キメラ、ＣＤＲグラフト化、ヒト化若しくはヒト抗体、又はその免疫反応性断片である、請求項１～４のいずれかに記載の単離された抗体。

【請求項６】
配列番号２８１の軽鎖可変領域（ＶＬ）及び配列番号２８３の重鎖可変領域（ＶＨ）、又は配列番号２８５のＶＬ及び配列番号２８７のＶＨ、又は配列番号２８９のＶＬ及び配列番号２９１のＶＨを含む、請求項１～５のいずれかに記載の単離された抗体。

【請求項７】
配列番号３００の軽鎖及び配列番号３０１の重鎖、又は配列番号３０２の軽鎖及び配列番号３０３の重鎖、又は配列番号３０２の軽鎖及び配列番号３１１の重鎖、又は配列番号３０４の軽鎖及び配列番号３０５の重鎖、又は配列番号３０６の軽鎖及び配列番号３０７の重鎖、又は配列番号３０６の軽鎖及び配列番号３０９の重鎖を含む、請求項１～５のいずれかに記載の単離された抗体。

【請求項８】
部位特異的抗体を含む、請求項１～７のいずれかに記載の単離された抗体。

【請求項９】
ペイロードにコンジュゲートされている、請求項１～８のいずれか一項に記載の単離された抗体。

【請求項１０】
請求項１～８のいずれか一項に記載の抗体を含む、医薬組成物。

【請求項１１】
請求項１～８のいずれか一項に記載の抗体の全て又は一部をコードする核酸。

【請求項１２】
請求項１１に記載の核酸を含む、ベクター。

【請求項１３】

請求項１１に記載の核酸又は請求項１２に記載のベクターを含む、宿主細胞。
【請求項１４】
式Ａｂ－［Ｌ－Ｄ］ｎであるＡＤＣ、又は薬学的に許容されるこの塩（式中、
ａ）Ａｂは、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体を含み、
ｂ）Ｌは、任意選択のリンカーを含み、
ｃ）Ｄは、薬物を含み、
ｄ）ｎは、約１～約２０の整数である）。
【請求項１５】
抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体が、キメラ、ＣＤＲグラフト化、ヒト化若しくはヒト抗体、又はその免疫反応性断片を含む、請求項１４に記載のＡＤＣ。
【請求項１６】
Ａｂが、請求項１～８のいずれか一項に記載の抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体である、請求項１４に記載のＡＤＣ。
【請求項１７】
ｎが、約２～約８の整数を含む、請求項１４に記載のＡＤＣ。
【請求項１８】
Ｄが、ドラスタチン、オーリスタチン、メイタンシノイド、ピロロベンゾジアゼピン（ＰＢＤ）、ベンゾジアゼピン誘導体、カリケアマイシン及びアマニチンからなる群から選択される化合物を含む、請求項１４に記載のＡＤＣ。
【請求項１９】
請求項１４～１８のいずれか一項に記載のＡＤＣを含む、医薬組成物。
【請求項２０】
請求項１０に記載の医薬組成物又は請求項１９に記載の医薬組成物を、がんの治療を必要とする対象に投与することを含む、がんを治療する方法。
【請求項２１】
がんが、血液悪性腫瘍を含む、請求項２０に記載の方法。
【請求項２２】
血液悪性腫瘍が、白血病又はリンパ腫を含む、請求項２１に記載の方法。
【請求項２３】
がんが固形腫瘍を含む、請求項２０に記載の方法。
【請求項２４】
がんが、副腎がん、肝臓がん、腎臓がん、膀胱がん、乳がん、胃がん、卵巣がん、子宮頚がん、子宮がん、食道がん、結腸直腸がん、前立腺がん、黒色腫、膵臓がん、肺がん（小細胞と非小細胞の両方）、甲状腺がん及び神経膠芽腫からなる群から選択される、請求項２３に記載の方法。
【請求項２５】
がんが、膀胱がんを含む、請求項２４に記載の方法。
【請求項２６】
がんが、肺腺癌を含む、請求項２４に記載の方法。
【請求項２７】
少なくとも１つの追加の治療成分を対象に投与することをさらに含む、請求項２０に記載の方法。
【請求項２８】
腫瘍細胞集団中の腫瘍開始細胞を減少させる方法であって、腫瘍開始細胞及び腫瘍開始細胞以外の腫瘍細胞を含む腫瘍細胞集団を、請求項１４～１８のいずれ一項に記載のＡＤＣと接触させることを含み、これによって腫瘍開始細胞の頻度を減少させる、方法。
【請求項２９】
接触がインビボで行われる、請求項２８に記載の方法。
【請求項３０】
接触がインビトロで行われる、請求項２８に記載の方法。

【請求項３１】
細胞を請求項１４～１８のいずれか一項に記載のＡＤＣと接触させることを含む、細胞に細胞毒を送達する方法。
【請求項３２】
対象におけるがんを検出、診断又は監視する方法であって、（ａ）腫瘍細胞を請求項１～９のいずれか一項に記載の抗体と接触させる工程、及び（ｂ）腫瘍細胞における抗体を検出する工程を含む、方法。
【請求項３３】
接触が、インビトロで行われる、請求項３２に記載の方法。
【請求項３４】
接触が、インビボで行われる、請求項３２に記載の方法。
【請求項３５】
抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体（Ａｂ）に薬物（Ｄ）をコンジュゲートする工程を含む、請求項１４に記載のＡＤＣを生成する方法。
【請求項３６】
請求項１９に記載の医薬組成物を含有する１つ以上の容器を含む、キット。
【請求項３７】
組成物が、がんを有する対象を処置するためのものであることを示す、１つ以上の容器に付随するラベル又は添付文書をさらに含む、請求項３６に記載のキット。
【請求項３８】
がんを有する対象に対する投与レジメンを示す、１つ以上の容器に付随するラベル又は添付文書をさらに含む、請求項３６に記載のキット。
【請求項３９】
がんが、膵臓がん、膀胱がん又は肺がんである、請求項３６～３８に記載のキット。
【請求項４０】
抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体（Ａｂ）に薬物（Ｄ）をコンジュゲートする工程を含む、請求項１４に記載のＡＤＣを生成する方法。
【請求項４１】
抗体が部位特異的抗体を含む、請求項４０に記載の方法。
【請求項４２】
部位特異的抗体を選択的に還元する工程を含む、請求項４１に記載の方法。
【請求項４３】
薬物（Ｄ）がカリケアマイシンを含む、請求項４０～４２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４４】
薬物（Ｄ）がドラスタチンを含む、請求項４０～４２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４５】
ＡＤＣを凍結乾燥する工程をさらに含む、請求項４０～４４のいずれか一項に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本出願は、それぞれ参照によりその全体が本明細書に組み込まれる２０１６年５月６日に出願された米国仮出願第６２／３３２，７２１号及び２０１７年４月２８日に出願された米国仮出願第６２／４９１，８９７号の利益を主張する。
【０００２】
本出願は、ＥＦＳ－Ｗｅｂを介してＡＳＣＩＩ形式で提出され、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる配列表を含む。前記ＡＳＣＩＩの写しは、２０１７年５月３日に作成され、Ｓ６９６９７＿１４２０ＷＯ＿ＳＣ３９０１ＷＯＯ１＿ＳＴ２５．ｔｘｔと名付けられ、大きさが２８０ＫＢ（２８７，３５６バイト）である。

【０００３】
本出願は、一般に、がん及びがんの再発又は転移の治療、診断又は予防のための、新規の抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体又はその免疫反応性断片、及びそれを含む、抗体薬物コンジュゲートを含めた組成物に関する。本発明の選択された実施形態は、腫瘍形成性細胞の頻度の減少を含むがんの治療のための、このような抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体又は抗体薬物コンジュゲートの使用を提供する。
【背景技術】
【０００４】
幹細胞及び始原細胞の分化及び増殖は、器官形成、細胞修復及び細胞置換の間の組織成長を支援するために協調して働く通常の進行プロセスである。この機構は、生物の必要性に基づいて適切なシグナルのみが生成されることが確実となるように厳しく制御されている。細胞増殖及び分化は、通常、損傷のある若しくは瀕死の細胞の置換のため又は成長のために必要なときにのみ生じる。しかしながら、これらのプロセスの破壊は、様々なシグナル伝達化学物質の過小若しくは過剰な量、微小環境の変化の存在、遺伝子変異又はそれらの組合せなどの多くの要因によって引き起こされ得る。正常な細胞の増殖及び／又は分化の撹乱は、様々な障害、例えばがんのような増殖性疾患を導き得る。
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【０００５】
がんに対する従来の処置療法としては、化学療法、放射線療法及び免疫療法が含まれる。これらの治療は効果を奏しないことも多く、外科的切除は有効な臨床的代替手段を提供しない場合がある。現行の標準治療の限界は、第１選択治療を行った後に再発した患者の場合に特に明白である。このような場合に、不応性腫瘍は、侵襲性で不治であることが多く、頻繁に発生する。多くの腫瘍の全体的な生存率は、長年にわたり大きく変化しておらず、少なくともこの原因の一部は、既存の治療法が、再発、腫瘍の再発及び転移を防ぎそこなっていることによる。したがって、増殖性障害に対するより標的化された効能の高い治療法を開発することが依然として強く必要とされている。本発明は、この必要性に対処する。
【課題を解決するための手段】
【０００６】
（発明の要旨）
広い態様において、本発明は、ヒトＴＮＦＲＳＦ２１決定因子に特異的に結合する、単離抗体及び対応する抗体薬物コンジュゲート（ＡＤＣ）若しくは抗体診断コンジュゲート、又はこれらの組成物を提供する。特定の実施形態において、ＴＮＦＲＳＦ２１決定因子は、腫瘍細胞上に発現するＴＮＦＲＳＦ２１タンパク質であるが、他の実施形態において、ＴＮＦＲＳＦ２１決定因子は、腫瘍開始細胞上に発現する。他の実施形態において、本発明の抗体は、ＴＮＦＲＳＦ２１タンパク質に結合し、ヒトＴＮＦＲＳＦ２１タンパク質（ｈＴＮＦＲＳＦ２１）上のエピトープに結合する抗体との結合について競合する。
【０００７】
選択された実施形態において、本発明は、ヒトＴＮＦＲＳＦ２１（配列番号１）に結合する単離された抗体を含む抗体、若しくは結合についてこの単離された抗体と競合する抗体、又は（１）配列番号２１の軽鎖可変領域（ＶＬ）及び配列番号２３の重鎖可変領域（ＶＨ）；又は（２）配列番号２５のＶＬ及び配列番号２７のＶＨ；又は（３）配列番号２９のＶＬ及び配列番号３１のＶＨ；又は（４）配列番号３３のＶＬ及び配列番号３５のＶＨ；又は（５）配列番号３７のＶＬ及び配列番号３９のＶＨ；又は（６）配列番号４１のＶＬ及び配列番号４３のＶＨ；又は（７）配列番号４５のＶＬ及び配列番号４７のＶＨ；又は（８）配列番号４９のＶＬ及び配列番号５１のＶＨ；又は（９）配列番号５３のＶＬ及び配列番号５５のＶＨ；又は（１０）配列番号５７のＶＬ及び配列番号５９のＶＨ；又は（１１）配列番号６１のＶＬ及び配列番号６３のＶＨ；又は（１２）配列番号６５のＶＬ及び配列番号６７のＶＨ；又は（１３）配列番号６９のＶＬ及び配列番号７１のＶＨ；

又は（１４）配列番号７３のＶＬ及び配列番号７５のＶＨ；又は（１５）配列番号７７のＶＬ及び配列番号７９のＶＨ；又は（１６）配列番号８１のＶＬ及び配列番号８３のＶＨ；又は（１７）配列番号８５のＶＬ及び配列番号８７のＶＨ；又は（１８）配列番号８９のＶＬ及び配列番号９１のＶＨ；又は（１９）配列番号９３のＶＬ及び配列番号９５のＶＨ；又は（２０）配列番号９７のＶＬ及び配列番号９９のＶＨ；又は（２１）配列番号１０１のＶＬ及び配列番号１０３のＶＨ；又は（２２）配列番号１０５のＶＬ及び配列番号１０７のＶＨ；又は（２３）配列番号１０９のＶＬ及び配列番号１１１のＶＨ；又は（２４）配列番号１１３のＶＬ及び配列番号１１５のＶＨ；配列番号１１７のＶＬ及び配列番号１１９のＶＨ；又は（２５）配列番号１２１のＶＬ及び配列番号１２３のＶＨ；又は（２６）配列番号１２５のＶＬ及び配列番号１２７のＶＨ；又は（２７）配列番号１２９のＶＬ及び配列番号１３１のＶＨ；又は（２８）配列番号１３３のＶＬ及び配列番号１３５のＶＨ；又は（２９）配列番号１３７のＶＬ及び配列番号１３９のＶＨ；又は（３０）配列番号１４１のＶＬ及び配列番号１４３のＶＨ；又は（３１）配列番号１４５のＶＬ及び配列番号１４７のＶＨ；又は（３２）配列番号１４９のＶＬ及び配列番号１５１のＶＨ；又は（３３）配列番号１５３のＶＬ及び配列番号１５５のＶＨ；又は（３４）配列番号１５７のＶＬ及び配列番号１５９のＶＨ；又は（３５）配列番号１６１のＶＬ及び配列番号１６３のＶＨ；又は（３６）配列番号１６５のＶＬ及び配列番号１６７のＶＨ；又は（３７）配列番号１６９のＶＬ及び配列番号１７１のＶＨ；又は（３８）配列番号１７３のＶＬ及び配列番号１７５のＶＨ；又は（３９）配列番号１７７のＶＬ及び配列番号１７９のＶＨ；又は（４０）配列番号１８１のＶＬ及び配列番号１８３のＶＨ；又は（４１）配列番号１８５のＶＬ及び配列番号１８７のＶＨ；又は（４２）配列番号１８９のＶＬ及び配列番号１９１のＶＨ；又は（４３）配列番号１９３のＶＬ及び配列番号１９５のＶＨ；又は（４４）配列番号１９７のＶＬ及び配列番号１９９のＶＨ；又は（４５）配列番号２０１のＶＬ及び配列番号２０３のＶＨ；又は（４６）配列番号２０５のＶＬ及び配列番号２０７のＶＨ；又は（４７）配列番号２０９のＶＬ及び配列番号２１１のＶＨ；又は（４８）配列番号２１３のＶＬ及び配列番号２１５のＶＨ；又は（４９）配列番号２１７のＶＬ及び配列番号２１９のＶＨ；又は（５０）配列番号２２１のＶＬ及び配列番号２２３のＶＨ；又は（５１）配列番号２２５のＶＬ及び配列番号２２７のＶＨ；又は（５２）配列番号２２９のＶＬ及び配列番号２３１のＶＨ；又は（５３）配列番号２３３のＶＬ及び配列番号２３５のＶＨ；又は（５４）配列番号２３７のＶＬ及び配列番号２３９のＶＨ；又は（５５）配列番号２４１のＶＬ及び配列番号２４３のＶＨ；又は（５６）配列番号２４５のＶＬ及び配列番号２４７のＶＨ；又は（５７）配列番号２４９のＶＬ及び配列番号２５１のＶＨ；又は（５８）配列番号２５３のＶＬ及び配列番号２５５のＶＨ；又は（５９）配列番号２５７のＶＬ及び配列番号２５９のＶＨ；又は（６０）配列番号２６１のＶＬ及び配列番号２６３のＶＨ；又は（６１）配列番号３３のＶＬ及び配列番号２６５のＶＨ；又は（６２）配列番号６５のＶＬ及び配列番号２６７のＶＨ；又は（６３）配列番号２６９のＶＬ及び配列番号１０３のＶＨ；又は（６４）配列番号２７１のＶＬ及び配列番号１７５のＶＨを含む抗体を含む抗体、若しくは結合についてこれらの抗体と競合する抗体を、含む。

【０００８】

さらなる態様において、本発明は、軽鎖可変領域及び重鎖可変領域を含むＴＮＦＲＳＦ２１に結合する抗体を含み、該軽鎖可変領域は、配列番号２１、配列番号２５、配列番号２９、配列番号３３、配列番号３７、配列番号４１、配列番号４５、配列番号４９、配列番号５３、配列番号５７、配列番号６１、配列番号６５、配列番号６９、配列番号７３、配列番号７７、配列番号８１、配列番号８５、配列番号８９、配列番号９３、配列番号９７、配列番号１０１、配列番号１０５　配列番号１０９、配列番号１１３、配列番号１１７、配列番号１２１、配列番号１２５、配列番号１２９、配列番号１３３、配列番号１３７、配列番号１４１、配列番号１４５、配列番号１４９、配列番号１５３、配列番号１５７、配列番号１６１、配列番号１６５、配列番号１６９、配列番号１７３、配列番号１７７、配列番号１８１、配列番号１８５、配列番号１８９、配列番号１９３、配列番号１９

７、配列番号２０１、配列番号２０５　配列番号２０９、配列番号２１３、配列番号２１７、配列番号２２１、配列番号２２５、配列番号２２９、配列番号２３３、配列番号２３７、配列番号２４１、配列番号２４５、配列番号２４９、配列番号２５３、配列番号２５７、配列番号２６１、配列番号２６９又は配列番号２７１として示される軽鎖可変領域のうちの３つのＣＤＲを有しており、該重鎖可変領域は、配列番号２３、配列番号２７、配列番号３１、配列番号３５、配列番号３９、配列番号４３、配列番号４７、配列番号５１、配列番号５５、配列番号５９及び配列番号６３、配列番号６７、配列番号７１、配列番号７５、配列番号７９、配列番号８３、配列番号８７、配列番号９１、配列番号９５、配列番号９９、配列番号１０３、配列番号１０７、配列番号１１１、配列番号１１５、配列番号１１９、配列番号１２３、配列番号１２７、配列番号１３１、配列番号１３５、配列番号１３９、配列番号１４３、配列番号１４７、配列番号１５１、配列番号１５５、配列番号１５９、配列番号１６３、配列番号１６７、配列番号１７１、配列番号１７５、配列番号１７９、配列番号１８３、配列番号１８７、配列番号１９１、配列番号１９５、配列番号１９９、配列番号２０３、配列番号２０７、配列番号２１１、配列番号２１５、配列番号２１９、配列番号２２３、配列番号２２７、配列番号２３１、配列番号２３５、配列番号２３９、配列番号２４３、配列番号２４７、配列番号２５１、配列番号２５５、配列番号２５９、配列番号２６３、配列番号２６５又は配列番号２６７として示される重鎖可変領域のうちの３つのＣＤＲを有する。

【０００９】

他の態様において、本発明は、（１）配列番号２８１を含むＶＬ及び配列番号２８３を含むＶＨ；（２）配列番号２８５を含むＶＬ及び配列番号２８７を含むＶＨ；（３）配列番号２８９を含むＶＬ及び配列番号２９１を含むＶＨ；又は（４）配列番号２９３を含むＶＬ及び配列番号２９５を含むＶＨを有するヒト化抗体を含む。ある特定の実施形態において、これらのヒト化抗体は、部位特異的抗体を含む。他の実施形態において、このような抗体は、Ｎ２９７Ａ変異（ＭＪ変異）を含む。さらに他の実施形態において、本発明の抗体は、ＭＪ変異を有する部位特異的抗体を含むことがある。

【００１０】

他の選択された実施形態において、本発明は、ｈＳＣ３９．２（配列番号３００及び３０１）、ｈＳＣ３９．４（配列番号３０２及び３０３）、ｈＳＣ３９．４ｓｓ１（配列番号３０２及び３１１）、ｈＳＣ３９．２８（配列番号３０４及び３０５）、ｈＳＣ３９．１２６（配列番号３０６及び３０７）及びｈＳＣ３９．１２６ｓｓ１（配列番号３０６及び３０９）からなる群から選択されるヒト化抗体を含む。

【００１１】

本発明のいくつかの態様において、抗体は、キメラ抗体、ＣＤＲグラフト化抗体、ヒト化抗体若しくはヒト抗体又はそれらの免疫反応性断片を含む。本発明の他の態様において、好ましくは前述の配列の全て又は一部を含めて、抗体は、内在化抗体である。さらに他の実施形態において、抗体は、部位特異的抗体を含む。ある特定の実施形態において、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体は、ＴＮＦＲＳＦ２１リガンドのＴＮＦＲＳＦ２１への結合を阻害する。他の選択された実施形態において、本発明は、前述の抗体のいずれかを含む抗体薬物コンジュゲートを含む。

【００１２】

ある特定の態様において、本発明は、本発明の抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体をコードする核酸、又はその断片を含む。他の実施形態において、本発明は、上記の核酸の１つ以上を含むベクター、又は前記核酸若しくはベクターを含む宿主細胞を含む。

【００１３】

上で言及したように、本発明はさらに、本明細書において開示されている抗体がペイロードにコンジュゲートされている、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体薬物コンジュゲートを提供する。ある特定の態様において、本発明は、ｈＴＮＦＲＳＦ２１を免疫優先的に（ｉｍｍｕｎｏｐｒｅｆｅｒｅｎｔｉａｌｌｙ）会合する、又はｈＴＮＦＲＳＦ２１に結合するＡＤＣを含む。本発明の適合抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体薬物コンジュゲート（ＡＤＣ）は、以下

の式：
Ａｂ－［Ｌ－Ｄ］ｎ、又は薬学的に許容されるその塩（式中、
ａ）　Ａｂは、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体を含み、
ｂ）　Ｌは、任意選択のリンカーを含み、
ｃ）　Ｄは、薬物を含み、
ｄ）　ｎは、約１～約２０の整数である）
を一般に含むことができる。

【００１４】

ある特定の態様において、本発明のＡＤＣは、上記のもののような抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体又はこの免疫反応性断片を含む。他の実施形態において、本発明のＡＤＣは、放射性同位体、カリケアマイシン、ピロロベンゾジアゼピン（ＰＢＤ）、ベンゾジアゼピン誘導体、オーリスタチン、ドラスタチン、デュオカルマイシン、メイタンシノイド、又は本明細書に記載されている追加の治療成分から選択される、細胞毒性化合物を含む。ある特定の好ましい実施形態において、開示されるＡＤＣは、カリケアマイシンを含む。他の選択された実施形態において、ＡＤＣはドラスタチンを含み、さらに別の選択された実施形態において、ＡＤＣは、オーリスタチンを含む。

【００１５】

本明細書において開示されている抗ＴＮＦＲＳＦ２１　ＡＤＣを含む医薬組成物が、さらに提供される。ある特定の実施形態において、本組成物は、主要なＡＤＣ種が、存在する種の約５０％超、約６０％超、約７０％超、約８０％超、約９０％又はさらには約９５％超を構成する、選択される薬物－抗体比（ＤＡＲ）を含む。いくつかの実施形態において、選択されたＤＡＲは２になる一方、他の実施形態において、選択されたＤＡＲは４になり、他の実施形態において、選択されたＤＡＲは６になり、さらに他の実施形態において、選択されたＤＡＲは８になる。

【００１６】

本発明の別の態様は、本明細書に記載されているもののような医薬組成物をがんの治療を必要とする対象に投与することを含む、がんを治療する方法である。ある特定の態様において、がんは、例えば、急性骨髄性白血病又はびまん性大細胞型Ｂ細胞性リンパ腫のような血液悪性腫瘍を含む。別の態様において、対象は、固形腫瘍に罹患している。このような実施形態に関すると、がんは、副腎がん、肝臓がん、黒色腫、腎臓がん、膀胱がん、乳がん、胃がん、卵巣がん、子宮頚がん、子宮がん、食道がん、結腸直腸がん、前立腺がん、膵臓がん、肺がん（小細胞と非小細胞の両方）、甲状腺がん及び神経膠芽腫からなる群から好ましくは選択される。ある特定の実施形態において、対象は、肺がんに罹患しており、選択された実施形態において、肺腺癌に罹患している。ある特定の他の実施形態において、対象は、膵臓がんに罹患している。さらに他の実施形態において、対象は、膀胱がんに罹患している。さらに、選択された実施形態において、上記のがんを処置する方法は、本発明の抗ＴＮＦＲＳＦ２１　ＡＤＣに加えて、少なくとも１つの追加の治療成分を対象に投与することを含む。

【００１７】

さらに別の実施形態において、本発明は、腫瘍細胞集団中の腫瘍開始細胞を減少させる方法であって、腫瘍開始細胞集団を明細書に記載されているＡＤＣと接触させる（例えば、インビトロ又はインビボ）ことを含み、これにより腫瘍開始細胞の頻度を減少させる、方法を含む。

【００１８】

一態様において、本発明は、細胞毒を細胞に送達する方法であって、細胞を上記ＡＤＣのいずれかと接触させることを含む、方法を含む。

【００１９】

他の態様において、本発明は、対象におけるがん（例えば膀胱がん又は肺がん）を検出、診断又は監視する方法であって、腫瘍細胞をＴＮＦＲＳＦ２１検出剤と（例えば、インビトロ又はインビボで）接触させること及び腫瘍細胞と会合したＴＮＦＲＳＦ２１剤を検

出することを含む、方法を含む。選択された実施形態において、検出剤は、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体又はＴＮＦＲＳＦ２１遺伝子型決定因子と関連する核酸プローブを含む。関連実施形態において、診断方法は、免疫組織化学（ＩＨＣ）又はインサイチュハイブリダイゼーション（ＩＳＨ）を含む。他の実施形態において、本方法は、循環腫瘍細胞を抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体と接触させることを含む。当業者は、このようなＴＮＦＲＳＦ２１検出剤は、以下に開示されておりかついくつかの標準インビボ画像化技術（例えば、ＭＲＩ、ＣＡＴスキャン、ＰＥＴスキャンなど）のいずれか１つを使用して検出される、エフェクター、マーカー又はレポーターにより標識されてもよく、又はこれらと会合されてもよいことをさらに理解している。

【００２０】

同様に、本発明は、がんのようなＴＮＦＲＳＦ２１関連障害の診断、監視又は治療に有用であるキット又は装置及び関連する方法も提供する。この目的を達成するために、本発明は、好ましくは、ＴＮＦＲＳＦ２１　ＡＤＣを含むレセプタクルと、ＴＮＦＲＳＦ２１関連障害を治療、監視若しくは診断するために前記ＴＮＦＲＳＦ２１　ＡＤＣを使用するための取扱説明資料とを含む、ＴＮＦＲＳＦ２１関連障害を検出、診断若しくは治療するのに有用な製品、又はこのための投与レジメンを提供する。選択された実施形態において、装置及び関連する方法は、少なくとも１つの循環する腫瘍細胞を接触させることを含む。他の実施形態において、本開示のキットは、キット又は装置がＴＮＦＲＳＦ２１に関連するがんの診断、監視又は治療のために用いられることを示す取扱説明書、ラベル、添付文書、読本などを含むか、又はこのための投与レジメンを提供する。

【００２１】

上記は概要であり、したがって、必要により、単純化、一般化及び詳細の省略を含む。結果として、当業者は、この概要が例示にすぎず、決して限定を意図していないことを理解する。本明細書に記載の方法、組成物及び／又は装置及び／又は他の主題の他の態様、特徴及び利点は、本明細書に記載の教示から明らかになる。この概要は、以下で詳細な説明においてさらに説明される単純化された形態の概念の選択を紹介するために、提供される。

【図面の簡単な説明】

【００２２】

【図１Ａ】ＴＮＦＲＳＦ２１の注釈つきアミノ酸配列（図１Ａ）を、説明目的のために図示されている個々の分子成分を含む略図（図１Ｂ）とともに提示する。

【図１Ｂ】ＴＮＦＲＳＦ２１の注釈つきアミノ酸配列（図１Ａ）を、説明目的のために図示されている個々の分子成分を含む略図（図１Ｂ）とともに提示する。

【図２】Ｉｌｌｕｍｉｎａプラットフォームを使用して、患者に由来する異種移植片（ＰＤＸ）、がん幹細胞（ＣＳＣ）及び非腫瘍形成性（ＮＴＧ）細胞、並びに正常組織に由来するＲＮＡの全トランスクリプトーム配列決定を使用して測定した、ＴＮＦＲＳＦ２１の発現レベルを図示している図である。

【図３Ａ】正常組織及び様々なＰＤＸ腫瘍から単離されたＲＮＡ試料におけるｑＲＴ－ＰＣＲによって測定された、ＴＮＦＲＳＦ２１転写産物の相対発現レベルを図示している図である。

【図３Ｂ】様々な正常組織、並びに様々なＰＤＸ腫瘍から単離されたＣＳＣ及びＮＴＧ細胞から単離された、ＲＮＡ試料におけるｑＲＴ－ＰＣＲによって測定された、ＴＮＦＲＳＦ２１転写産物の相対発現レベルを図示している図である。

【図４】正常組織及び様々なＰＤＸ細胞株に由来するＲＮＡ上でのマイクロアレイハイブリダイゼーションによって測定された、ＴＮＦＲＳＦ２１転写産物発現の正規化済み強度値を示す図である。

【図５】公に入出可能なデータセットである、Ｔｈｅ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｇｅｎｏｍｅ　Ａｔｌａｓ（ＴＣＧＡ）からの正常組織及び原発性腫瘍におけるＴＮＦＲＳＦ２１転写産物の発現レベルを示す図である。

【図６－１】本明細書において示されている通りに生成した、例示的な抗ＴＮＦＲＳＦ２

１抗体の抗体アイソタイプ、ビニング及びラットの交差反応性を表形式で提示した図である。
【図６－２】本明細書において示されている通りに生成した、例示的な抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体の抗体アイソタイプ、ビニング及びラットの交差反応性を表形式で提示した図である。
【図７Ａ－１】例示的なマウス抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体の軽鎖可変領域（配列番号２１～２７１の奇数番号）の連続的アミノ酸配列を示す、注釈つきアミノ酸配列及び核酸配列を提示する図である。
【図７Ａ－２】例示的なマウス抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体の軽鎖可変領域（配列番号２１～２７１の奇数番号）の連続的アミノ酸配列を示す、注釈つきアミノ酸配列及び核酸配列を提示する図である。
【図７Ａ－３】例示的なマウス抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体の軽鎖可変領域（配列番号２１～２７１の奇数番号）の連続的アミノ酸配列を示す、注釈つきアミノ酸配列及び核酸配列を提示する図である。
【図７Ａ－４】例示的なマウス抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体の軽鎖可変領域（配列番号２１～２７１の奇数番号）の連続的アミノ酸配列を示す、注釈つきアミノ酸配列及び核酸配列を提示する図である。
【図７Ａ－５】例示的なマウス抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体の軽鎖可変領域（配列番号２１～２７１の奇数番号）の連続的アミノ酸配列を示す、注釈つきアミノ酸配列及び核酸配列を提示する図である。
【図７Ｂ－１】例示的なマウス抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体の重鎖可変領域（配列番号２１～２７１の奇数番号）の連続的アミノ酸配列を示す、注釈つきアミノ酸配列及び核酸配列を提示する図である。
【図７Ｂ－２】例示的なマウス抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体の重鎖可変領域（配列番号２１～２７１の奇数番号）の連続的アミノ酸配列を示す、注釈つきアミノ酸配列及び核酸配列を提示する図である。
【図７Ｂ－３】例示的なマウス抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体の重鎖可変領域（配列番号２１～２７１の奇数番号）の連続的アミノ酸配列を示す、注釈つきアミノ酸配列及び核酸配列を提示する図である。
【図７Ｂ－４】例示的なマウス抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体の重鎖可変領域（配列番号２１～２７１の奇数番号）の連続的アミノ酸配列を示す、注釈つきアミノ酸配列及び核酸配列を提示する図である。
【図７Ｂ－５】例示的なマウス抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体の重鎖可変領域（配列番号２１～２７１の奇数番号）の連続的アミノ酸配列を示す、注釈つきアミノ酸配列及び核酸配列を提示する図である。
【図７Ｃ－１】上述の軽鎖及び重鎖可変領域（配列番号２０～２７０、偶数番号）をコードする核酸配列を示す、注釈つきアミノ酸配列及び核酸配列を提示する図である。
【図７Ｃ－２】上述の軽鎖及び重鎖可変領域（配列番号２０～２７０、偶数番号）をコードする核酸配列を示す、注釈つきアミノ酸配列及び核酸配列を提示する図である。
【図７Ｃ－３】上述の軽鎖及び重鎖可変領域（配列番号２０～２７０、偶数番号）をコードする核酸配列を示す、注釈つきアミノ酸配列及び核酸配列を提示する図である。
【図７Ｃ－４】上述の軽鎖及び重鎖可変領域（配列番号２０～２７０、偶数番号）をコードする核酸配列を示す、注釈つきアミノ酸配列及び核酸配列を提示する図である。
【図７Ｃ－５】上述の軽鎖及び重鎖可変領域（配列番号２０～２７０、偶数番号）をコードする核酸配列を示す、注釈つきアミノ酸配列及び核酸配列を提示する図である。
【図７Ｃ－６】上述の軽鎖及び重鎖可変領域（配列番号２０～２７０、偶数番号）をコードする核酸配列を示す、注釈つきアミノ酸配列及び核酸配列を提示する図である。
【図７Ｃ－７】上述の軽鎖及び重鎖可変領域（配列番号２０～２７０、偶数番号）をコードする核酸配列を示す、注釈つきアミノ酸配列及び核酸配列を提示する図である。
【図７Ｃ－８】上述の軽鎖及び重鎖可変領域（配列番号２０～２７０、偶数番号）をコー

ドする核酸配列を示す、注釈つきアミノ酸配列及び核酸配列を提示する図である。
【図７Ｃ－９】上述の軽鎖及び重鎖可変領域（配列番号２０～２７０、偶数番号）をコードする核酸配列を示す、注釈つきアミノ酸配列及び核酸配列を提示する図である。
【図７Ｃ－１０】上述の軽鎖及び重鎖可変領域（配列番号２０～２７０、偶数番号）をコードする核酸配列を示す、注釈つきアミノ酸配列及び核酸配列を提示する図である。
【図７Ｃ－１１】上述の軽鎖及び重鎖可変領域（配列番号２０～２７０、偶数番号）をコードする核酸配列を示す、注釈つきアミノ酸配列及び核酸配列を提示する図である。
【図７Ｃ－１２】上述の軽鎖及び重鎖可変領域（配列番号２０～２７０、偶数番号）をコードする核酸配列を示す、注釈つきアミノ酸配列及び核酸配列を提示する図である。
【図７Ｃ－１３】上述の軽鎖及び重鎖可変領域（配列番号２０～２７０、偶数番号）をコードする核酸配列を示す、注釈つきアミノ酸配列及び核酸配列を提示する図である。
【図７Ｃ－１４】上述の軽鎖及び重鎖可変領域（配列番号２０～２７０、偶数番号）をコードする核酸配列を示す、注釈つきアミノ酸配列及び核酸配列を提示する図である。
【図７Ｃ－１５】上述の軽鎖及び重鎖可変領域（配列番号２０～２７０、偶数番号）をコードする核酸配列を示す、注釈つきアミノ酸配列及び核酸配列を提示する図である。
【図７Ｃ－１６】上述の軽鎖及び重鎖可変領域（配列番号２０～２７０、偶数番号）をコードする核酸配列を示す、注釈つきアミノ酸配列及び核酸配列を提示する図である。
【図７Ｃ－１７】上述の軽鎖及び重鎖可変領域（配列番号２０～２７０、偶数番号）をコードする核酸配列を示す、注釈つきアミノ酸配列及び核酸配列を提示する図である。
【図７Ｄ】選択した抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体のヒト化ＶＬ及びＶＨドメインのアミノ酸配列を示す、注釈つきアミノ酸配列及び核酸配列を提示する図である。
【図７Ｅ】選択した抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体のヒト化ＶＬ及びＶＨドメインの核酸配列を示す、注釈つきアミノ酸配列及び核酸配列を提示する図である。
【図７Ｆ－１】完全長重鎖及び軽鎖構築物のアミノ酸配列を示す、注釈つきアミノ酸配列及び核酸配列を提示する図である。
【図７Ｆ－２】完全長重鎖及び軽鎖構築物のアミノ酸配列を示す、注釈つきアミノ酸配列及び核酸配列を提示する図である。
【図７Ｇ】Ｋａｂａｔ、Ｃｈｏｔｈｉａ、ＡＢＭ及びＣｏｎｔａｃｔの方法論を使用して決定した、ＳＣ３９．２マウス抗体の軽鎖及び重鎖可変領域のＣＤＲを示す、注釈つきアミノ酸配列及び核酸配列を提示する図である。
【図７Ｈ】Ｋａｂａｔ、Ｃｈｏｔｈｉａ、ＡＢＭ及びＣｏｎｔａｃｔの方法論を使用して決定した、ＳＣ３９．４マウス抗体の軽鎖及び重鎖可変領域のＣＤＲを示す、注釈つきアミノ酸配列及び核酸配列を提示する図である。
【図７Ｉ】Ｋａｂａｔ、Ｃｈｏｔｈｉａ、ＡＢＭ及びＣｏｎｔａｃｔの方法論を使用して決定した、ＳＣ３９．２８マウス抗体の軽鎖及び重鎖可変領域のＣＤＲを示す、注釈つきアミノ酸配列及び核酸配列を提示する図である。
【図７Ｊ】Ｋａｂａｔ、Ｃｈｏｔｈｉａ、ＡＢＭ及びＣｏｎｔａｃｔの方法論を使用して決定した、ＳＣ３９．１２６マウス抗体の軽鎖及び重鎖可変領域のＣＤＲを示す、注釈つきアミノ酸配列及び核酸配列を提示する図である。
【図８Ａ】ドメインマッピングにより決定した例示的な抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体のエピトープ位を、表形式及びグラフ形式で提示している図である。
【図８Ｂ】ドメイン結合の関数としてプロットした、抗体の細胞殺傷活性を、表形式及びグラフ形式で提示している図である。
【図９】電気化学発光サンドイッチＥＬＩＳＡアッセイを使用して測定した、様々なＰＤＸ細胞株及び正常組織中のヒトＴＮＦＲＳＦ２１の相対タンパク質発現を示す図である。
【図１０Ａ】アイソタイプ対照染色集団（灰色実線）と比較した、膵臓のＣＳＣ小集団（黒色の線）及びＮＴＧ小集団（点線）における、フローサイトメトリにより決定した、ＴＮＦＲＳＦ２１の表面タンパク質発現を示す図である。
【図１０Ｂ】アイソタイプ対照染色集団（灰色実線）と比較した、膀胱ＰＤＸのＣＳＣ小集団（黒色の線）及びＮＴＧ小集団（点線）における、フローサイトメトリにより決定し

た、ＴＮＦＲＳＦ２１の表面タンパク質発現を示す図である。
【図１１Ａ】サポリン毒素の導入により、選択された抗ＴＮＦＲＳＦ２１マウス抗体が、ＴＮＦＲＳＦ２１タンパク質を発現する細胞に内在化してこのような細胞を殺傷する能力を示す図である。
【図１１Ｂ】サポリン毒素の導入により、選択された抗ＴＮＦＲＳＦ２１ヒト化抗体が、ＴＮＦＲＳＦ２１タンパク質を発現する細胞に内在化してこのような細胞を殺傷する能力を示す図である。
【図１２Ａ】開示されたＴＮＦＲＳＦ２１　ＡＤＣが、ＴＮＦＲＳＦ２１発現細胞を、濃度依存的にインビトロで殺傷することを実証する図である。
【図１２Ｂ】開示されたＴＮＦＲＳＦ２１　ＡＤＣが、ＴＮＦＲＳＦ２１発現細胞を、濃度依存的にインビトロで殺傷することを実証する図である。
【図１２Ｃ】開示されたＴＮＦＲＳＦ２１　ＡＤＣが、ＴＮＦＲＳＦ２１発現細胞を、濃度依存的にインビトロで殺傷することを実証する図である。
【図１２Ｄ】開示されたＴＮＦＲＳＦ２１　ＡＤＣが、ＴＮＦＲＳＦ２１発現細胞を、濃度依存的にインビトロで殺傷することを実証する図である。
【図１３Ａ】免疫無防備状態マウスにおいて、例示的なＴＮＦＲＳＦ２１　ＡＤＣが、腫瘍負荷を抑制することを示す図である。
【図１３Ｂ】免疫無防備状態マウスにおいて、例示的なＴＮＦＲＳＦ２１　ＡＤＣが、腫瘍負荷を抑制することを示す図である。
【図１３Ｃ】免疫無防備状態マウスにおいて、例示的なＴＮＦＲＳＦ２１　ＡＤＣが、腫瘍負荷を抑制することを示す図である。
【図１３Ｄ】免疫無防備状態マウスにおいて、例示的なＴＮＦＲＳＦ２１　ＡＤＣが、腫瘍負荷を抑制することを示す図である。
【図１３Ｅ】免疫無防備状態マウスにおいて、例示的なＴＮＦＲＳＦ２１　ＡＤＣが、腫瘍負荷を抑制することを示す図である。
【図１３Ｆ】免疫無防備状態マウスにおいて、例示的なＴＮＦＲＳＦ２１　ＡＤＣが、腫瘍負荷を抑制することを示す図である。
【図１３Ｇ】免疫無防備状態マウスにおいて、例示的なＴＮＦＲＳＦ２１　ＡＤＣが、腫瘍負荷を抑制することを示す図である。
【図１３Ｈ】免疫無防備状態マウスにおいて、例示的なＴＮＦＲＳＦ２１　ＡＤＣが、腫瘍負荷を抑制することを示す図である。
【図１３Ｉ】免疫無防備状態マウスにおいて、例示的なＴＮＦＲＳＦ２１　ＡＤＣが、腫瘍負荷を抑制することを示す図である。
【発明を実施するための形態】
【００２３】
本発明は、多くの様々な形態で具現化され得る。本明細書には、本発明の原理を例示する本発明の非限定的な説明的実施形態が開示されている。本明細書で使用されるいずれの項目の見出しも、構成上の目的だけのものであり、記載されている主題を限定するものと解釈されるべきでない。本開示の目的に関して、全ての特定されている配列受託番号は、別途記載がない限り、ＮＣＢＩ参照配列（ＲｅｆＳｅｑ）データベース及び／又はＮＣＢＩ　ＧｅｎＢａｎｋ（登録商標）アーカイブ配列データベースで見出され得る。
【００２４】
驚くべきことに、ＴＮＦＲＳＦ２１の表現型決定因子が、新形成を含む様々な増殖性障害と臨床的に関連すること、並びにＴＮＦＲＳＦ２１タンパク質及びその変異体又はアイソフォームが、関連する疾患の治療に利用することができる有用な腫瘍マーカーを提供することが、見出された。この点において、本発明は、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体標的化剤と細胞傷害性ペイロードとを含む新規の抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体及び抗体薬物コンジュゲートを提供する。下記でより詳細に議論されかつ添付の実施例において示されるように、本開示の抗ＴＮＦＲＳＦ２１　ＡＤＣは、腫瘍形成性細胞を除去するのにとりわけ有効であり、したがって、特定の増殖性障害又はその進行若しくは再発の治療及び予防に有用であ

る。さらに、本開示のＡＤＣ組成物は操作されて、比較的高いＤＡＲ＝２パーセンテージ及び予期しない安定性を示し得、それにより、同じ成分を含む従来のＡＤＣ組成物と比較した場合に改善された治療指数をもたらし得る。

【００２５】

さらに、細胞表面ＴＮＦＲＳＦ２１タンパク質のようなＴＮＦＲＳＦ２１マーカー又は決定因子が、がん幹細胞（腫瘍永続細胞としても公知）と治療上関連し、これを除去するか又は無症状にするために効果的に利用することができることが見出された。本明細書で開示するような抗ＴＮＦＲＳＦ２１コンジュゲートの使用によるがん幹細胞を選択的に減少させる又は除去する能力は、このような細胞が一般的に多くの従来の治療に抵抗性であることが公知であることから、驚くべきことである。すなわち、伝統的及び最近の標的治療方法の有効性は、これらの多様な治療方法にもかかわらず腫瘍成長を永続させることができる抵抗性がん幹細胞の存在及び／又は発生によってしばしば制限される。さらに、がん幹細胞と会合している決定因子は、低いか若しくは一貫性のない発現、腫瘍形成性細胞と会合した状態に留まれないこと又は細胞表面上に存在できないことのために、しばしば不十分な治療標的である。従来技術の教示と極めて対照的に、本明細書に開示されたＡＤＣ及び方法は、この固有の抵抗性を効果的に克服し、このようながん幹細胞の分化を特異的に除去するか、枯渇させるか、沈黙させるか又は促進することにより、潜在する腫瘍成長を持続させるか又は再誘発するがん幹細胞の能力を無効にする。

【００２６】

したがって、本明細書において開示されているもののようなＴＮＦＲＳＦ２１コンジュゲートは、選択された増殖性（例えば、新生物）障害又はその進行若しくは再発の治療及び／又は予防に有利に使用され得ることを、特に、留意すべきである。本発明の好ましい実施形態は、とりわけ特定のドメイン、領域若しくはエピトープに関して、又はがん幹細胞及び本開示の抗体薬物コンジュゲートとのそれらの相互作用に関連して下記に詳細に議論されるが、当業者が、本発明の範囲がこのような例示的実施形態によって限定されないことを理解することが、理解される。むしろ、本発明の最も広範囲の実施形態及び添付の特許請求の範囲は、いかなる特定の作用機序又は特に標的とされる腫瘍、細胞若しくは分子成分にかかわらず、本開示の抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体及びコンジュゲート、並びに新生物障害又は細胞増殖性障害を含めた様々なＴＮＦＲＳＦ２１関連障害若しくはＴＮＦＲＳＦ２１媒介障害の治療及び／又は予防におけるこれらの使用を、広く及び明示的に対象としている。

【００２７】

Ｉ．　ＴＮＦＲＳＦ２１生理学

腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー２１（ＴＮＦＲＳＦ２１；デス受容体６、ＤＲ６、ＣＤ３５８、ＢＭ－１０８及びＵＮＱ４３７／ＰＲＯ８６８としても知られている）は、細胞－表面１回通過タイプＩ膜貫通タンパク質である。ＴＮＦＲＳＦ２１タンパク質の代表的なオルソログには、以下に限定されないが、ヒト（ＮＰ＿００５５２６７；図１Ａ、配列番号１）、チンパンジー（ＸＰ＿００１１４５６４５）、アカゲザル（ＸＰ＿００１１０３７８２）、ラット（ＮＰ＿００１１０１６７７）及びマウス（ＮＰ＿８４８７０４）が含まれる。ヒトにおいて、ＴＮＦＲＳＦ２１遺伝子は、染色体位置６ｐ２１．１における、約７８．４ｋＢｐにわたる６のエクソンからなる。ヒトＴＮＦＲＳＦ２１遺伝子座の転写により、６５５個のアミノ酸のプレタンパク質（ＮＰ＿０５５２６７）をコードする、３．６５ｋＢｐのプロセシングされた転写産物（ＮＭ＿０１４４５２）がもたらされる。プレタンパク質のプロセシングは、分泌シグナルペプチドを含む最初の４１のアミノ酸の除去を含むことが予測され、このタンパク質は、Ｎ－及びＯ－グリコシル化の付加、並びに膜近位システインにおけるＳ－パルミトイル化によって広範に後転写的に修飾されている。構造的に、このタンパク質は、この細胞外ドメイン（ＥＣＤ）において、４つのＴＮＦＲ－Ｃｙｓドメインを含有しており、これらのドメインの存在により、ＴＮＦ受容体のスーパーファミリーメンバーとしてのタンパク質を特徴付けられる。ＴＮＦＲ－Ｃｙｓドメインは、鎖間ジスルフィド結合の連結に関与する６つのシステインを

含む、約４０アミノ残基からなる。ＴＮＦＲＳＦ２１はまた、他のデスドメイン含有タンパク質とホモ二量化又はヘテロ二量化を通常、促進する、細胞質デスドメインを含有する（図１Ｂ）。図１Ａにおいて、リーダー配列に下線が引かれており、細胞外ドメインは大文字であり、膜貫通ドメインは太字であり、細胞内ドメインは小文字である。

【００２８】

ＴＮＦＲＳＦ２１は、この正確なリガンドが未知であるので、オーファン受容体として分類されているが、ニューロン密度をモジュレートする進化過程において、ベーターアミロイド前駆体タンパク質（ＡＰＰ）に結合することが報告されている（Ｎｉｋｏａｅｖら、２００９年；ＰＭＩＤ：１９２２５５１９；Ｏｌｓｅｎら、２０１４年；ＰＭＩＤ：２４８０６６７０）。デスドメインを含有するタンパク質は、アポトーシスシグナル伝達経路の卓越したメンバーであり、ＴＮＦＲＳＦ２１は、様々なアポトーシスシグナル伝達経路に関与するアダプタータンパク質である、ＴＲＡＤＤと会合して、ＮＦカッパＢ及びＪＮＫ経路のどちらも活性化することが示されている。しかし、哺乳動物細胞におけるＴＮＦＲＳＦ２１の過剰発現は、アポトーシスを一様に引き起こさないが、むしろ細胞のタイプに応じて様々となるように思われる（Ｎｉｋｏａｅｖら、２００９年；ＰＭＩＤ：１９２２５５１９；Ｐａｎら、１９９８年；ＰＭＩＤ：９７１４５４１）。最近の研究により、ＴＮＦＲＳＦ２１は、より従来的なアポトーシス経路よりも、Ｂａｘによりアポトーシスが媒介される可能性が示唆された（Ｚｅｎｇら、２０１０年；ＰＭＩＤ：２２７６１４２０）。むしろ逆説的に言えば、ＴＮＦＲＳＦ２１転写産物は、多数のがん細胞株、並びに末期前立腺がん及び乳がん患者から生検に採取したがんにおいて増大するが、これらの株及び腫瘍はまた、同様に抗アポトーシスタンパク質を上方調節することを示し得ることが仮定されている（Ｂｅｎｓｃｈｏｐら、２００９年；ＰＭＩＤ：１９７６００７５）。

【００２９】

ＴＮＦＲＳＦ２１はまた、炎症及び免疫調節過程にリンクしている。ノックアウトマウスは、生存可能で繁殖力があり、ＴＮＦＲＳＦ２１は、発達に必要ではないことが実証されている。これらのマウスは、ＣＤ４＋Ｔ細胞増殖及びＴｈ２サイトカイン産生の増強、並びにＢ細胞増殖、生存及び体液性応答の増強を示す。さらに、それ自体が腫瘍において過剰発現することが多いＭＭＰ－１４は、腫瘍細胞の表面からＴＮＦＲＳＦ２１を開裂させることが知られており、その結果生じるＥＣＤは、未熟及び成熟中の樹状細胞をモジュレートして、死を誘発する又はこの表面の表現型を改変し、腫瘍が免疫監視から逃れる潜在的機構があることが示唆される。

【００３０】

がんの発生及び進行における、ＴＮＦＲＳＦ２１シグナル伝達経路の詳細、このリガンド及びこの正確な役割は未だ十分に解明されていないが、がん細胞、及び本明細書において開示されている通り、がん幹細胞は、このタンパク質を過剰発現することは明白である。したがって、ＴＮＦＲＳＦ２１を標的化する抗体－薬物コンジュゲートの使用は、がん患者における腫瘍を処置する有効な治療戦略となり得る。

【００３１】

ＩＩ．がん幹細胞

現在のモデルによれば、腫瘍は、非腫瘍形成性細胞及び腫瘍形成性細胞を含む。非腫瘍形成性細胞は、自己再生能力を有さず、免疫無防備状態マウスに過剰な細胞数で移植された場合でも腫瘍を再現的に形成することができない。本明細書において「腫瘍開始細胞」（ＴＩＣ）とも称される腫瘍形成性細胞は、通常、０．０１～１０％の腫瘍の細胞集団率を構成し、腫瘍を形成する能力を有する。造血性悪性腫瘍の場合、ＴＩＣは、特に、急性骨髄性悪性腫瘍（ＡＭＬ）において、$1:10^{4}$～$1:10^{7}$と非常に稀な範囲となり得、又は例えば、Ｂ細胞系列のリンパ腫において、非常に豊富となり得る。腫瘍形成性細胞は、交換可能にがん幹細胞（ＣＳＣ）とも呼ばれる腫瘍永続化細胞（ＴＰＣ）と、腫瘍始原細胞（ＴＰｒｏｇ）との両方を包含している。

【００３２】

正常組織の細胞ヒエラルキーを支持する正常幹細胞と同様に、ＣＳＣは、多系列分化の

能力を維持しながら、無限に自己複製することができる。これに関して、ＣＳＣは、腫瘍形成性後代と非腫瘍形成性後代の両方を生成することができ、連続的単離と少数の単離されたＣＳＣの免疫無防備状態マウスへの移植とによって実証されるように、親腫瘍の異種性細胞組成物を完全に再現することができる。これらの「種細胞」が除去された腫瘍でない限り、腫瘍が転位するか又は再発して疾患の再発及び最終的な進行をもたらす可能性がはるかにずっと高いことを示す証拠がある。

【００３３】

ＴＰｒｏｇは、ＣＳＣと同様に、一次移植片における腫瘍成長を促進する能力を有する。しかしながら、ＣＳＣと異なり、ＴＰｒｏｇは、親腫瘍の細胞異種性を再現することができず、後続の移植片において腫瘍形成性を再開するには効率性が低い。なぜなら、ＴＰｒｏｇは、少数の高精製ＴＰｒｏｇの免疫無防備状態マウスへの連続移植により実証されるように、通常、限定された数の細胞分裂しかできないからである。ＴＰｒｏｇはさらに、初期ＴＰｒｏｇと後期ＴＰｒｏｇとに分けることができ、これらは、表現型（例えば、細胞表面マーカー）及び腫瘍細胞構造を再現する能力の差異によって区別され得る。いずれもＣＳＣと同程度に腫瘍を再現することはできないが、初期ＴＰｒｏｇの方が、後期ＴＰｒｏｇよりも、親腫瘍の特徴を再現する能力が高い。前述の区別にかかわらず、一部のＴＰｒｏｇ集団は稀に、ＣＳＣに通常属する性質である自己再生能力を獲得し、それ自体がＣＳＣになることができる。

【００３４】

ＣＳＣは、（ｉ）ＴＰｒｏｇ（初期及び後期ＴＰｒｏｇの両方）並びに（ｉｉ）最終分化腫瘍細胞及び腫瘍浸潤性細胞（例えば、ＣＳＣに由来し、通常、腫瘍バルクを含むことがある、線維芽細胞／間質、内皮及び造血性細胞のような非腫瘍形成性細胞）よりも、高い腫瘍形成性を示し、多くの場合、比較的より静止している。従来の治療及びレジメンが、大部分は、腫瘍を減量させ、急速に増殖する細胞を攻撃するように設計されていることを考慮すると、ＣＳＣは、したがって、より急速に増殖するＴＰｒｏｇ及び他のバルクな腫瘍細胞集団、例えば非腫瘍形成性細胞よりも、従来の治療及びレジメンに対して耐性が強い。ＣＳＣを従来の治療に対して相対的に化学療法耐性にし得る他の特徴は、多剤耐性トランスポーターの発現増加、ＤＮＡ修復メカニズム及び抗アポトーシス遺伝子発現の向上である。このようなＣＳＣの特性は、進行した病期の新生物を有する患者に持続的な応答をもたらすための標準治療レジメンの失敗を示唆している。なぜなら、標準的化学療法では、継続的な腫瘍成長及び再発を実際に促進しているＣＳＣが、有効に標的とされていないためである。

【００３５】

驚くべきことに、ＴＮＦＲＳＦ２１発現が、様々な腫瘍形成性細胞小集団を本明細書に記載される治療に対して感受性にする形でこれらの細胞小集団と関連していることが分かった。本発明は、特に腫瘍形成性細胞を標的化するために有用であり、腫瘍形成性細胞を、鎮静するか、敏感にするか、中和するか、頻度を減少させるか、ブロックするか、破棄するか、それに干渉するか、減少させるか、妨害するか、抑制するか、制御するか、枯渇させるか、和らげるか、媒介するか、縮小させるか、再プログラムするか、消去するか、殺傷するか又は他の方法で阻害する（集約して、「阻害する」）ために使用することができ、したがって増殖性障害（例えば、がん）の治療、管理及び／又は予防を容易にする抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体を提供する。有利には、本発明の抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体は、対象に投与した際に、ＴＮＦＲＳＦ２１の決定因子の型（例えば、表現型又は遺伝子型）にかかわらず、腫瘍形成性細胞の頻度又は腫瘍形成性を好ましくは減少させるように選択されてもよい。腫瘍形成性細胞の頻度の減少は、（ｉ）腫瘍形成性細胞の阻害若しくは根絶、（ｉｉ）腫瘍形成性細胞の成長、拡大若しくは再発の制御、（ｉｉｉ）腫瘍形成性細胞の開始、伝播、維持又は増殖の中断又は（ｉｖ）これら以外の腫瘍形成性細胞の生存、再生及び／若しくは転移を妨げることの結果として生じ得る。いくつかの実施形態において、腫瘍形成性細胞の阻害は、１つ以上の生理学的経路の変化の結果として生じ得る。経路の変化は、腫瘍形成性細胞の阻害又は除去、腫瘍形成性細胞の能力の改変（例えば、分化若

しくはニッチ破壊の誘導による）又は腫瘍環境若しくは他の細胞に影響を及ぼす腫瘍形成性細胞の能力に対する他の方法による干渉のうち、いずれによるものであっても、腫瘍形成性、腫瘍の維持及び／又は転移並びに再発の阻害により、より有効にＴＮＦＲＳＦ２１関連障害を治療することを可能にする。本開示の抗体の同じ特徴は、標準治療レジメンに耐性又は不応性であることが立証された再発性腫瘍の治療で、抗体を特に有効にすることが、さらに理解される。

【００３６】

腫瘍形成性細胞の頻度の減少を評価するために使用され得る方法としては、限定されないが、細胞数測定又は免疫組織化学的分析、好ましくはインビトロ又はインビボ限界希釈分析（Ｄｙｌｌａら、２００８、ＰＭＩＤ：ＰＭＣ２４１３４０２及びＨｏｅｙら、２００９、ＰＭＩＤ：１９６６４９９１）が挙げられる。

【００３７】

インビトロ限界希釈分析は、断片化又は非断片化腫瘍細胞（例えば、それぞれ処理又は未処理細胞）を固体培地で培養してコロニーを形成させ、成長したコロニーをカウントし、特徴付けることにより行ってもよい。又は腫瘍細胞を、液体培地を含有するウェルを有するプレート上に段階希釈し、各ウェルを、接種後、好ましくは接種から１０日より後の任意の時点において、コロニー形成について陽性であるか陰性であるかでスコア化してもよい。

【００３８】

インビボ限界希釈分析は、未処理対照又は選択した治療剤に曝露した腫瘍のいずれかからの腫瘍細胞を、免疫無防備状態マウスに段階希釈で移植し、この後、各マウスの腫瘍形成について陽性であるか陰性であるかをスコア化することによって実施される。スコア化は、移植した腫瘍が検出可能となった後の任意の時点で行ってよいが、好ましくは移植から６０日以上経過した後で行う。腫瘍形成性細胞の頻度を決定するための限界希釈実験の結果の解析は、好ましくは、ポアソン分布統計を使用して又は腫瘍がインビボで生成されるか否かの能力のような予め定義された確定事象の頻度を評価することにより（Ｆａｚｅｋａｓら、１９８２、ＰＭＩＤ：７０４０５４８）、行われる。

【００３９】

フローサイトメトリ及び免疫組織化学も、腫瘍形成性細胞の頻度を決定するために使用され得る。両方の技術が、腫瘍形成性細胞を濃縮することが知られている、当該技術分野で認識されている細胞表面タンパク質又はマーカーに結合する１つ以上の抗体又は試薬を利用する（ＷＯ２０１２／０３１２８０参照）。当該技術分野で公知であるように、フローサイトメトリ（例えば、蛍光活性化細胞選別（ＦＡＣＳ））は、腫瘍形成性細胞を含む様々な細胞集団を特徴付け、単離、精製、濃縮又は分類するためにも使用され得る。フローサイトメトリは、細胞の混合集団が懸濁されている流体の流れを、秒あたり最大何千もの粒子の物理的及び／又は化学的特徴を測定できる電子的検出装置を通して通過させることによって、腫瘍形成性細胞のレベルを測定する。免疫組織化学は、腫瘍形成性細胞マーカーに結合する標識化抗体又は試薬で組織試料を染色することにより、インサイチュ（例えば、組織切片内）で腫瘍形成性細胞の視覚化を可能にするという点で、さらなる情報を提供する。

【００４０】

したがって、本発明の抗体は、例えば、フローサイトメトリ、磁気活性化細胞選別（ＭＡＣＳ）、レーザー媒介の薄片化又はＦＡＣＳなどの方法による、腫瘍形成性細胞の同定、特徴付け、監視、単離、薄片化又は集団若しくは小集団の富化に有用であり得る。ＦＡＣＳは、特異的な細胞表面マーカーに基づいて９９．５％を超える純度で細胞小集団を単離するために使用される、信頼性のある方法である。ＣＳＣを含む腫瘍形成性細胞の特徴付け及び操作のための他の適合技術は、例えば、Ｕ．Ｓ．Ｐ．Ｎ．１２／６８６，３５９、１２／６６９，１３６及び１２／７５７，６４９において見ることができる。

【００４１】

下記に列挙するのは、ＣＳＣ集団に関連し、ＣＳＣを単離又は特徴付けるために使用さ

れてきたマーカーである：ＡＢＣＡ１、ＡＢＣＡ３、ＡＢＣＢ５、ＡＢＣＧ２、ＡＤＡＭ９、ＡＤＣＹ９、ＡＤＯＲＡ２Ａ、ＡＬＤＨ、ＡＦＰ、ＡＸＩＮ１、Ｂ７Ｈ３、ＢＣＬ９、Ｂｍｉ－１、ＢＭＰ－４、Ｃ２０ｏｒｆ５２、Ｃ４．４Ａ、カルボキシペプチダーゼＭ、ＣＡＶ１、ＣＡＶ２、ＣＤ１０５、ＣＤ１１７、ＣＤ１２３、ＣＤ１３３、ＣＤ１４、ＣＤ１６、ＣＤ１６６、ＣＤ１６ａ、ＣＤ１６ｂ、ＣＤ２、ＣＤ２０、ＣＤ２４、ＣＤ２９、ＣＤ３、ＣＤ３１、ＣＤ３２４、ＣＤ３２５、ＣＤ３３、ＣＤ３４、ＣＤ３８、ＣＤ４４、ＣＤ４５、ＣＤ４６、ＣＤ４９ｂ、ＣＤ４９ｆ、ＣＤ５６、ＣＤ６４、ＣＤ７４、ＣＤ９、ＣＤ９０、ＣＤ９６、ＣＥＡＣＡＭ６、ＣＥＬＳＲ１、ＣＥＬＣ１２Ａ、ＣＰＤ、ＣＲＩＭ１、ＣＸ３ＣＬ１、ＣＸＣＲ４、ＤＡＦ、デコリン、ｅａｓｙｈ１、ｅａｓｙｈ２、ＥＤＧ３、ＥＧＦＲ、ＥＮＰＰ１、ＥＰＣＡＭ、ＥＰＨＡ１、ＥＰＨＡ２、ＦＬＪ１００５２、ＦＬＶＣＲ、ＦＺＤ１、ＦＺＤ１０、ＦＺＤ２、ＦＺＤ３、ＦＺＤ４、ＦＺＤ６、ＦＺＤ７、ＦＺＤ８、ＦＺＤ９、ＧＤ２、ＧＪＡ１、ＧＬＩ１、ＧＬＩ２、ＧＰＮＭＢ、ＧＰＲ５４、ＧＰＲＣ５Ｂ、ＨＡＶＣＲ２、ＩＬ１Ｒ１、ＩＬ１ＲＡＰ、ＪＡＭ３、Ｌｇｒ５、Ｌｇｒ６、ＬＲＰ３、ＬＹ６Ｅ、ＭＣＰ、ｍｆ２、ｍｌｌｔ３、ＭＰＺＬ１、ＭＵＣ１、ＭＵＣ１６、ＭＹＣ、Ｎ３３、ＮＡＮＯＧ、ＮＢ８４、ＮＥＳ、ＮＩＤ２、ＮＭＡ、ＮＰＣ１、ＯＳＭ、ＯＣＴ４、ＯＰＮ３、ＰＣＤＨ７、ＰＣＤＨＡ１０、ＰＣＤＨＢ２、ＰＰＡＰ２Ｃ、ＰＴＰＮ３、ＰＴＳ、ＲＡＲＲＥＳ１、ＳＥＭＡ４Ｂ、ＳＬＣ１９Ａ２、ＳＬＣ１Ａ１、ＳＬＣ３９Ａ１、ＳＬＣ４Ａ１１、ＳＬＣ６Ａ１４、ＳＬＣ７Ａ８、ＳＭＡＲＣＡ３、ＳＭＡＲＣＤ３、ＳＭＡＲＣＥ１、ＳＭＡＲＣＡ５、ＳＯＸ１、ＳＴＡＴ３、ＳＴＥＡＰ、ＴＣＦ４、ＴＥＭ８、ＴＧＦＢＲ３、ＴＭＥＰＡＩ、ＴＭＰＲＳＳ４、ＴＦＲＣ、ＴＲＫＡ、ＷＮＴ１０Ｂ、ＷＮＴ１６、ＷＮＴ２、ＷＮＴ２Ｂ、ＷＮＴ３、ＷＮＴ５Ａ、ＹＹ１及びＣＴＮＮＢ１。例えば、Ｓｃｈｕｌｅｎｂｕｒｇら、２０１０、ＰＭＩＤ：２０１８５３２９、Ｕ．Ｓ．Ｐ．Ｎ．７，６３２，６７８並びにＵ．Ｓ．Ｐ．Ｎ．２００７／０２９２４１４、２００８／０１７５８７０、２０１０／０２７５２８０、２０１０／０１６２４１６及び２０１１／００２０２２１参照。

【００４２】

同様に、特定の腫瘍型のＣＳＣに関連する細胞表面表現型の非限定的な例としては、ＣＤ４４^{hi}ＣＤ２４^{low}、ＡＬＤＨ$^{+}$、ＣＤ１３３$^{+}$、ＣＤ１２３$^{+}$、ＣＤ３４$^{+}$ＣＤ３８$^{-}$、ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{-}$、ＣＤ４６^{hi}ＣＤ３２４$^{+}$ＣＤ６６ｃ$^{-}$、ＣＤ１３３$^{+}$ＣＤ３４$^{+}$ＣＤ１０$^{-}$ＣＤ１９$^{-}$、ＣＤ１３８$^{-}$ＣＤ３４$^{-}$ＣＤ１９$^{+}$、ＣＤ１３３$^{+}$ＲＣ２$^{+}$、ＣＤ４４$^{+}$$\alpha_2\beta_1^{hi}$ＣＤ１３３$^{+}$、ＣＤ４４$^{+}$ＣＤ２４$^{+}$ＥＳＡ$^{+}$、ＣＤ２７１$^{+}$、ＡＢＣＢ５$^{+}$並びに当該技術分野で公知の他のＣＳＣ表面表現型が挙げられる。例えば、Ｓｃｈｕｌｅｎｂｕｒｇら、２０１０、前掲、Ｖｉｓｖａｄｅｒら、２００８、ＰＭＩＤ：１８７８４６５８及びＵ．Ｓ．Ｐ．Ｎ．２００８／０１３８３１３参照。本発明に関して特に関心がもたれるのは、固形腫瘍におけるＣＤ４６^{hi}ＣＤ３２４$^{+}$表現型、及び白血病におけるＣＤ３４$^{+}$ＣＤ３８$^{-}$を含むＣＳＣ調製物である。

【００４３】

「正」、「低」及び「負」の発現レベルがマーカー又はマーカー表現型に適用されるとき、以下のように定義される。負（つまり、「－」）の発現を有する細胞は、本明細書において、蛍光チャネル中のアイソタイプ対照抗体を、別の蛍光チャネルの目的の他のタンパク質を標識する完全抗体染色カクテルの存在下で観察した発現の９５パーセンタイル以下で発現する細胞として定義される。当業者は、この負の事象を定義するための手法が、「１を引いた蛍光（ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ　ｍｉｎｕｓ　ｏｎｅ）」又は「ＦＭＯ」染色として参照されることを認識する。上記で述べたＦＭＯ染色手法を用いてアイソタイプ対照抗体で観察された発現の９５パーセンタイルを上回る発現を有する細胞は、「正」（つまり「＋」）と定義される。本明細書で定義するとき、様々な細胞集団が広範に「正」と定義される。抗原の平均発現観測値が、上記のようにアイソタイプ対照抗体でＦＭＯ染色を用いて決定された９５パーセンタイルを上回る場合、細胞は正として定義される。正の細胞は、平均発現観測値がＦＭＯ染色によって決定された９５パーセンタイルを上回るが、９５パーセンタイルの１標準偏差以内である場合、「低発現」（つまり、「ｌｏ」

）の細胞と称され得る。代替的に、正の細胞は、平均発現観測値がＦＭＯ染色によって決定された９５パーセンタイルを上回り、９５パーセンタイルを上回る１標準偏差より大きい場合、「高発現」（つまり、「ｈｉ」）の細胞と称され得る。他の実施形態において、９９パーセンタイルは、好ましくは、負と正のＦＭＯ染色の間の分界点として使用することができ、いくつかの実施形態において、パーセンタイルは９９％より大きくなり得る。

【００４４】

ＣＤ４６^{hi}ＣＤ３２４$^{+}$又はＣＤ３４$^{+}$ＣＤ３８$^{-}$マーカー表現型及びすぐ上に例示された表現型は、標準的フローサイトメトリ解析並びにさらなる解析のためにＴＩＣ及び／又はＴＰＣ細胞又は細胞集団を、特徴付け、単離、精製又は濃縮する細胞選別技術と組み合わせて使用され得る。

【００４５】

したがって、腫瘍形成性細胞の頻度を減少させる本発明の抗体の能力は、上記に記載の技術及びマーカーを使用して決定され得る。いくつかの場合には、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体は、腫瘍形成性細胞の頻度を１０％、１５％、２０％、２５％、３０％又はさらには３５％減少させ得る。他の実施形態において、腫瘍形成性細胞の頻度の減少は、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％又は６５％程度であり得る。ある特定の実施形態において、本開示の化合物は、腫瘍形成性細胞の頻度を７０％、７５％、８０％、８５％、９０％又はさらには９５％減少させ得る。腫瘍形成性細胞の頻度の何らかの減少は、腫瘍形成能、残留性、再発性及び新生物の攻撃性の対応する減少をもたらし得ることが理解される。

【００４６】

ＩＩＩ．抗体

Ａ．抗体の構造

抗体並びにそのバリアント及び誘導体は、承認されている命名法及び番号付けシステムを含め、例えば、Ａｂｂａｓら（２０１０）、Ｃｅｌｌｕｌａｒ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ（第６版）、Ｗ．Ｂ．Ｓａｕｎｄｅｒｓ Ｃｏｍｐａｎｙ；又はＭｕｒｐｈｅｙら（２０１１）、Ｊａｎｅｗａｙ’ｓ Ｉｍｍｕｎｏｂｉｏｌｏｇｙ（第８版）、Ｇａｒｌａｎｄ Ｓｃｉｅｎｃｅに詳細に記載されている。

【００４７】

「抗体」又は「無傷な（ｉｎｔａｃｔ）抗体」は、通常、ジスルフィド共有結合及び非共有結合性相互作用により一緒に保持された２つの重鎖（Ｈ）ポリペプチド鎖と２つの軽鎖（Ｌ）ポリペプチド鎖とを含むＹ字型４量体タンパク質を指す。各軽鎖は、１つの可変ドメイン（ＶＬ）と１つの定常ドメイン（$Ｃ_{Ｌ}$）とで構成される。各重鎖は、１つの可変ドメイン（ＶＨ）と、ＩｇＧ、ＩｇＡ及びＩｇＤ抗体の場合にＣＨ１、ＣＨ２及びＣＨ３と称される３つのドメインを含む（ＩｇＭ及びＩｇＥは第４のドメインＣＨ４を含む）定常領域とを含む。ＩｇＧ、ＩｇＡ及びＩｇＤクラスにおいて、ＣＨ１及びＣＨ２ドメインは、可変長のプロリン及びシステインリッチセグメントであるフレキシブルなヒンジ領域（様々なＩｇＧサブクラスにおいて約１０から約６０のアミノ酸）によって分離されている。軽鎖及び重鎖の両方の可変ドメインは、約１２以上のアミノ酸の「Ｊ」領域によって定常ドメインに連結されており、重鎖は、約１０の付加的アミノ酸の「Ｄ」領域も有する。抗体の各クラスは、対のシステイン残基によって形成される鎖間及び鎖内のジスルフィド結合をさらに含む。

【００４８】

本明細書で使用される場合、用語「抗体」は、ポリクローナル抗体、マルチクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化及び霊長類化抗体、ＣＤＲグラフト化抗体、ヒト抗体（組換え産生ヒト抗体を含む）、組換え産生抗体、細胞内抗体、多重特異的抗体、二重特異的抗体、一価抗体、多価抗体、抗イディオタイプ抗体、合成抗体、例えば、これらのムテイン及びバリアント、免疫特異的抗体断片、例えば、Ｆｄ、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）$_{2}$、Ｆ（ａｂ’）断片、単鎖断片（例えば、ＳｃＦｖ及びＳｃＦｖＦｃ）並びにＦｃ融合及び他の修飾を含むそれらの誘導体、並びに決定因子との優先的会合又は結合を示す限り、あらゆる他の免疫反応分子を含む。さらに、文脈上の制約によって他に指示さ

れない限り、用語はさらに全ての抗体のクラス（つまり、ＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧ及びＩｇＭ）並びに全てのサブクラス（つまり、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ１及びＩｇＡ２）を含む。様々な抗体のクラスに対応する重鎖定常領域は、通常、対応するギリシャ語の小文字α、δ、ε、γ及びμでそれぞれ示される。いずれかの脊椎動物種からの抗体の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づき、カッパ（κ）及びラムダ（λ）と呼ばれる２つの明確に異なる種類の１つに割り当てることができる。

【００４９】

抗体の可変ドメインは、抗体毎にアミノ酸組成にかなりの違いを示し、主に抗原認識及び結合の役割を担っている。各軽鎖／重鎖対の可変領域は抗体結合部位を形成しており、したがって無傷なＩｇＧ抗体は２つの結合部位を有する（すなわち、これは２価である）。ＶＨ及びＶＬドメインは、非常に可変性のある３つの領域を含み、これらの領域は超可変領域、又はより一般的には相補性決定領域（ＣＤＲ）と称され、フレームワーク領域（ＦＲ）として知られる４つの可変性の少ない領域によって囲まれ分離されている。ＶＨ及びＶＬ領域間の非共有結合性の会合は、抗体の２つの抗原結合部位の１つを含有するＦｖ断片（「可変部断片」を表す）を形成している。

【００５０】

本明細書で使用される場合、アミノ酸の各ドメイン、フレームワーク領域及びＣＤＲに対する割り付けは、他に記載がない限り、Ｋａｂａｔら（１９９１）Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｔｅｒｅｓｔ（第５版）、米国保健福祉省、ＰＨＳ、ＮＩＨ、ＮＩＨ公開番号９１－３２４２；Ｃｈｏｔｈｉａら、１９８７、ＰＭＩＤ：３６８１９８１；Ｃｈｏｔｈｉａら、１９８９、ＰＭＩＤ：２６８７６９８；ＭａｃＣａｌｌｕｍら、１９９６、ＰＭＩＤ：８８７６６５０；又はＤｕｂｅｌ編（２００７）Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ、第３版、Ｗｉｌｙ－ＶＣＨ Ｖｅｒｌａｇ ＧｍｂＨ ａｎｄ Ｃｏ又はＡｂＭ（Ｏｘｆｏｒｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ／ＭＳＩ Ｐｈａｒｍａｃｏｐｉａ）によって提供されるスキームの１つに従い得る。当該技術分野で周知のように、可変領域残基の番号付けは、典型的にはＣｈｏｔｈｉａ又はＫａｂａｔに示されている通りである。Ａｂｙｓｉｓウエブサイトデータベース（下記）から取得されるＫａｂａｔ、Ｃｈｏｔｈｉａ、ＭａｃＣａｌｌｕｍ（Ｃｏｎｔａｃｔとしても知られる）及びＡｂＭによって定義される、ＣＤＲを含むアミノ酸残基を下の表１に示す。ＭａｃＣａｌｌｕｍは、Ｃｈｏｔｈｉａ番号付けシステムを用いていることに注意されたい。

【００５１】

【表１】

表１

	Kabat	Chothia	MacCallum	AbM
VH CDR1	31-35	26-32	30-35	26-35
VH CDR2	50-65	52-56	47-58	50-58
VH CDR3	95-102	95-102	93-101	95-102
VL CDR1	24-34	24-34	30-36	24-34
VL CDR2	50-56	50-56	46-55	50-56
VL CDR3	89-97	89-97	89-96	89-97

【００５２】

抗体配列における可変領域及びＣＤＲは、当該技術分野で展開されている一般的法則（

上記に示したもの、例えば、Ｋａｂａｔ番号付けシステム）に従って、又は既知の可変領域のデータベースに対して配列を整列させることにより同定され得る。これらの領域を同定するための方法は、Ｋｏｎｔｅｒｍａｎｎ ａｎｄ Ｄｕｂｅｌ編、Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ、Ｓｐｒｉｎｇｅｒ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、ＮＹ、２００１及びＤｉｎａｒｅｌｌｏら、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ Ｉｎｃ.、Ｈｏｂｏｋｅｎ、ＮＪ、２０００に記載されている。抗体配列の例示的なデータベースは、ｗｗｗ.ｂｉｏｉｎｆ.ｏｒｇ.ｕｋ／ａｂｓの「Ａｂｙｓｉｓ」ウェブサイト（英国、ロンドン、ロンドン大学の生化学・分子生物学（Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ&Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ）部門のＡ．Ｃ．Ｍａｒｔｉｎによって保持）及びｗｗｗ．ｖｂａｓｅ２．ｏｒｇのＶＢＡＳＥ２ウェブサイト（Ｒｅｔｔｅｒら、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ.、３３（データベース号）：Ｄ６７１～Ｄ６７４（２００５）に記載されている）に記載されている又はこれらを通じてアクセスされ得る。

【００５３】

好ましくは、配列は、Ｋａｂａｔ、ＩＭＧＴ及びタンパク質データバンク（ＰＤＢ）からの配列データを、ＰＤＢからの構造データと統合したＡｂｙｓｉｓデータベースを使用して解析される。Ｄｒ．Ａｎｄｒｅｗ Ｃ．Ｒ．Ｍａｒｔｉｎ’ｓ ｂｏｏｋ ｃｈａｐｔｅｒ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ ａｎｄ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ ｏｆ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｖａｒｉａｂｌｅ Ｄｏｍａｉｎｓ．Ｉｎ：Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ Ｌａｂ Ｍａｎｕａｌ（編集：Ｄｕｅｂｅｌ，Ｓ．ａｎｄ Ｋｏｎｔｅｒｍａｎｎ，Ｒ．、Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ、Ｈｅｉｄｅｌｂｅｒｇ、ＩＳＢＮ－１３：９７８－３５４０４１３５４７、ウェブサイトのｂｉｏｉｎｆｏｒｇ.ｕｋ／ａｂｓでも利用可能）参照。Ａｂｙｓｉｓデータベースウェブサイトは、本明細書の教示に従って使用され得る、ＣＤＲを同定するために展開された一般的な規則をさらに含む。ここに添付されている図７Ｇ～７Ｊは、ＳＣ３９．２、ＳＣ３９．４、ＳＣ３９．２８及びＳＣ３９．１２６抗体の場合の例示的な重鎖及び軽鎖可変領域（ＶＨ及びＶＬ）の注釈における、このような解析の結果を示している。他に示さない限り、本明細書に示す全てのＣＤＲは、Ｋａｂａｔらに従ってＡｂｙｓｉｓデータベースウェブサイトにより導き出されたものである。

【００５４】

本発明で議論される重鎖定常領域アミノ酸位置について、番号付けは、Ｅｕインデックスに従う。このインデックスは、最初にＥｄｅｌｍａｎら、１９６９、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ６３（１）：７８～８５において記載された。この文献は骨髄腫タンパク質Ｅｕのアミノ酸配列を記載しており、この配列は最初に配列決定されたヒトＩｇＧ１と報告されている。ＥｄｅｌｍａｎのＥｕインデックスは、Ｋａｂａｔら、１９９１（前掲）にも示されている。したがって、重鎖の文脈における用語「Ｋａｂａｔに記載のＥｕインデックス」又は「ＫａｂａｔのＥｕインデックス」又は「Ｅｕインデックス」又は「Ｅｕ番号付け」は、Ｋａｂａｔら、１９９１（前掲）に示されたＥｄｅｌｍａｎらのヒトＩｇＧ１ Ｅｕ抗体に基づく残基番号付けシステムを指す。軽鎖定常領域アミノ酸配列で使用される番号付けシステムは、同様に、Ｋａｂａｔら（前掲）に示されている。本発明に適合する例示的なカッパ（配列番号５）及びラムダ（配列番号８）軽鎖定常領域アミノ酸配列を直下に示す：

【００５５】

【化１】

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST
YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC（配列番号5）

【００５６】

【化２】

QPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKY
AASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS（配列番号８）

【００５７】

同様に、本発明に適合する例示的なＩｇＧ１重鎖定常領域アミノ酸配列を直下に示す：

【００５８】

【化３】

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPG（配列番号２）

【００５９】

当業者は、野生型（例えば、配列番号２、５又は８を参照）の、又は不対システイン（例えば、配列番号３、４、６、７、９又は１０を参照）を与えるように本明細書において開示されている通りに操作されている、このような重鎖及び軽鎖定常領域配列が、本開示の重鎖及び軽鎖可変領域と、標準的な分子生物学技術を使用して作動可能に会合させられて、本発明のＴＮＦＲＳＦ２１抗体薬物コンジュゲートに組み込まれ得る完全長抗体を提供することができることを、理解する。本発明の選択された抗体を含む、完全長重鎖及び軽鎖の配列（ｈＳＣ３９．２、ｈＳＣ３９．４、ｈＳＣ３９．４ｓｓ１、ｈＳＣ３９．２８、ｈＳＣ３９．１２６及びｈＳＣ３９．１２６ｓｓ１）は、ここに添付されている図７Ｆに示されている。

【００６０】

当業者は、免疫グロブリン分子中に、２種のタイプのジスルフィド架橋又は結合：鎖間及び鎖内ジスルフィド結合が存在することを認識している。当該技術分野で周知のように、鎖間ジスルフィド結合の位置及び数は、免疫グロブリンのクラス及び種類によって変化する。本発明は、抗体の任意のクラス又は特定のサブクラスに限定されるものではないが、ＩｇＧ１免疫グロブリンが、例示のために、本開示を通して使用される。野生型ＩｇＧ１分子には、１２の鎖内ジスルフィド結合（それぞれ重鎖に４つとそれぞれ軽鎖に２つ）と、４つの鎖間ジスルフィド結合がある。鎖内ジスルフィド結合は、一般にやや保護されており、鎖間結合よりも相対的に還元されにくい。逆に、鎖間ジスルフィド結合は、免疫グロブリンの表面に位置しており、溶媒に接触可能で、通常は比較的還元されやすい。２つの鎖間ジスルフィド結合は、重鎖間に存在し、さらにそれぞれの重鎖からそれぞれの軽鎖に存在するジスルフィド結合が存在する。鎖間ジスルフィド結合は、鎖の会合に必須ではないことが実証されている。ＩｇＧ１ヒンジ領域は、重鎖に鎖間ジスルフィド結合を形成するシステインを含有しており、これらのシステインが、構造的な支えとともにＦａｂの動きを容易にする柔軟性をもたらす。重／重ＩｇＧ１鎖間ジスルフィド結合は、残基Ｃ２２６及びＣ２２９（Ｅｕ番号付け）に位置し、一方でＩｇＧ１の軽鎖及び重鎖間（重／軽）のＩｇＧ１鎖間ジスルフィド結合は、カッパ又はラムダ軽鎖のＣ２１４と、重鎖の上流ヒンジ領域のＣ２２０との間に形成される。

【００６１】

Ｂ．抗体生成及び産生

本発明の抗体は、当該技術分野で公知の様々な方法を使用して産生され得る。

【００６２】

１．宿主動物におけるポリクローナル抗体の生成

様々な宿主動物におけるポリクローナル抗体の産生は、当該技術分野において周知である（例えば、Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｌａｎｅ（編集）（１９８８）Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、ＣＳＨ Ｐｒｅｓｓ；及びＨａｒｌｏｗｓら（１９８９）Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ、ＮＹ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ参照）。ポリクローナル抗体を生成するために、免疫適格性の動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、非ヒト霊長類など）を、抗原性タンパク質又は抗原性タンパク質を含む細胞若しくは調製物で免疫化する。一定時間後に、ポリクローナル抗体含有血清を、動物を出血させるか又は屠殺することにより取得する。血清は動物から取得した形態で使用されてもよく、又は抗体を部分的若しくは完全に精製して免疫グロブリン分画若しくは単離された抗体調製物を得てもよい。

【００６３】

この点において、本発明の抗体は、免疫適格性の動物における、免疫応答を誘発するいかなるＴＮＦＲＳＦ２１決定因子からも生成することができる。本明細書において使用する場合、「決定因子」又は「標的」は、特定の細胞、細胞集団若しくは組織において又はこれらの上で、同定可能的に会合するか又は特異的に見出される、任意の検出可能な形質、特性、マーカー又は因子を意味する。決定因子又は標的は、形態的性質の場合もあり、機能的性質の場合もあり、又は生化学的性質の場合もあり、表現型であることが好ましい。好ましい実施形態において、決定因子は、特定の細胞型又はある特定の条件下の細胞（例えば、細胞周期の特定の点又は特定の微小環境における細胞の間）によって異なって発現（過剰発現又は過小発現）されるタンパク質である。本発明の目的のために、決定因子は、好ましくは、異常ながん細胞上で異なって発現され、ＴＮＦＲＳＦ２１タンパク質又はそのスプライスバリアント、アイソフォーム、ホモログ若しくはファミリーメンバー、又はこれらの特異的ドメイン、領域若しくはエピトープのいずれかを含み得る。「抗原」、「免疫原性決定因子」、「抗原性決定因子」又は「免疫原」は、免疫適格性の動物に導入された場合に、免疫応答を刺激することができ、そして免疫応答により生じる抗体によって認識される、任意のＴＮＦＲＳＦ２１タンパク質又はこの任意の断片、領域若しくはドメインを意味する。本明細書において検討されるＴＮＦＲＳＦ２１決定因子の存在又は不在は、細胞、細胞小集団又は組織（例えば、腫瘍、腫瘍形成性細胞又はＣＳＣ）を同定するために使用され得る。

【００６４】

任意の形態の抗原又は抗原を含有する細胞若しくは調製物を、ＴＮＦＲＳＦ２１決定因子に特異的な抗体を生成するために使用することができる。言及したように用語「抗原」は、広義で使用され、任意の免疫原性断片又は選択された標的の決定因子、例えば、単一のエピトープ、複数のエピトープ、単一若しくは複数のドメイン又は全細胞外ドメイン（ＥＣＤ）又はタンパク質を含み得る。抗原は、単離された完全長タンパク質、細胞表面タンパク質（例えば、これらの表面上の抗原の少なくとも一部を発現する細胞により免疫化されている）又は可溶性タンパク質（例えば、タンパク質のＥＣＤ部分しか免疫化されていない）又はタンパク質構築物（例えば、Ｆｃ抗原）であってもよい。抗原は、遺伝的に修飾された細胞において産生されてもよい。前述の抗原のいずれかが単独で使用されてもよく、当該技術分野で公知の１つ以上の免疫原性増強アジュバントと組み合わせて使用されてもよい。抗原をコードしているＤＮＡは、ゲノムであっても非ゲノム（例えば、ｃＤＮＡ）であってもよく、免疫原性応答を誘発するのに十分なＥＣＤの少なくとも一部をコードしていてもよい。任意のベクターを使用して、抗原が発現される細胞を形質転換してもよく、例えばベクターとして、これらに限定されないが、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター、プラスミド及びカチオン性脂質などの非ウイルス性ベクターが挙げられる。

【００６５】

２．モノクローナル抗体

選択された実施形態において、本発明では、モノクローナル抗体の使用を検討する。当該技術分野で公知であるように、用語「モノクローナル抗体」又は「ｍＡｂ」は、実質的

に均一な抗体の集団、すなわち、微量に存在し得る可能性のある変異（例えば、天然に生じる変異）を除いて同一である集団を構成する個別の抗体から取得される抗体を指す。

【００６６】

モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ技術、組換え技術、ファージディスプレイ技術、トランスジェニック動物（例えば、ＸｅｎｏＭｏｕｓｅ（登録商標））又はこれらの何らかの組合せを含む、当該技術分野で公知の様々な技術を使用して調製され得る。例えば、モノクローナル抗体は、例えば、Ａｎ，Ｚｈｉｇｉａｎｇ（編集）Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｆｒｏｍ Ｂｅｎｃｈ ｔｏ Ｃｌｉｎｉｃ、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ、第１版 ２００９；Shireら、（編集）Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｔｒｅｎｄｓ ｉｎ Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ ａｎｄ Ｍａｎｕｆａｃｔｕｒｉｎｇ、Ｓｐｒｉｎｇｅｒ Ｓｃｉｅｎｃｅ＋Ｂｕｓｉｎｅｓｓ Ｍｅｄｉａ ＬＬＣ、第１版 ２０１０；Ｈａｒｌｏｗら、Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓ、第２版 １９８８；Ｈａｍｍｅｒｌｉｎｇら、ｉｎ：Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ ａｎｄ Ｔ－Ｃｅｌｌ Ｈｙｂｒｉｄｏｍａｓ ５６３～６８１（Ｅｌｓｅｖｉｅｒ、Ｎ．Ｙ．、１９８１）により詳細に記載されているハイブリドーマ及び生化学的遺伝子操作技術を使用して産生され得る。決定因子に特異的に結合する複数のモノクローナル抗体の産生後、特に有効な抗体を、様々なスクリーニングプロセスを通じて、例えば、決定因子に対するそれらの親和性又は内在化速度に基づいて、選択してもよい。本明細書に記載されるように産生される抗体は「出所（ｓｏｕｒｃｅ）」抗体として使用することができ、さらに、例えば、標的への親和性を改善するため、細胞培養における産生性を向上させるため、インビボでの免疫原性を減少させるため、多重特異的構築物を生成するなどのために修飾してもよい。モノクローナル抗体の産生及びスクリーニングのより詳細な説明は、下記及び添付の実施例に示される。

【００６７】

３．ヒト抗体

別の実施形態において、抗体は、完全ヒト抗体を含み得る。語「ヒト抗体」は、ヒトによって産生される抗体のアミノ配列に対応するアミノ酸配列を有する抗体及び／又は下記に記載のヒト抗体を作製する技術のいずれかを使用して作製された抗体（好ましくはモノクローナル抗体）を指す。

【００６８】

ヒト抗体は、当該技術分野で公知の様々な技術を使用して産生され得る。技術の１つは、（好ましくはヒト）抗体のライブラリがファージ上に合成されている、ファージディスプレイであり、この技術において、ライブラリは、目的の抗原又はこの抗体結合部分を用いてスクリーニングされ、抗原に結合するファージが単離され、これらから免疫反応性断片を得ることができる。このようなライブラリを調製してスクリーニングする方法は、当該技術分野において周知であり、ファージディスプレイライブラリを生成するためのキットは市販されている（例えば、Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ Ｐｈａｇｅ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｓｙｓｔｅｍ、カタログ番号２７－９４００－０１、及びＳｔｒａｔａｇｅｎｅ ＳｕｒｆＺＡＰ（商標）ファージディスプレイキット、カタログ番号２４０６１２）。抗体ディスプレイライブラリの生成及びスクリーニングに使用することができる、他の方法及び試薬もある（例えば、Ｕ．Ｓ．Ｐ．Ｎ．５，２２３，４０９；ＰＣＴ公開番号ＷＯ９２／１８６１９、ＷＯ９１／１７２７１、ＷＯ９２／２０７９１、ＷＯ９２／１５６７９、ＷＯ９３／０１２８８、ＷＯ９２／０１０４７、ＷＯ９２／０９６９０；及びＢａｒｂａｓら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８８巻：７９７８～７９８２頁（１９９１年）を参照）。

【００６９】

一実施形態において、組換えヒト抗体は、上記の通り調製された組換えコンビナトリアル抗体ライブラリをスクリーニングすることにより単離され得る。一実施形態において、

ライブラリは、Ｂ細胞から単離されたｍＲＮＡから調製されたヒトＶＬ及びＶＨ　ｃＤＮＡを使用して生成されたｓｃＦｖファージディスプレイライブラリである。

【００７０】

ナイーブなライブラリ（天然又は合成のいずれか）により産生された抗体は、中程度の親和性（K_aは、約10^6～$10^7 M^{-1}$）を有することができるが、親和性成熟は、当該技術分野において記載されている二次ライブラリから構築及び再選択することにより、インビトロにおいて模倣され得る。例えば、変異は、エラープローンポリメラーゼを使用することにより、インビトロにおいてランダムに導入され得る（ＬｅｕｎｇらのＴｅｃｈｎｉｑｕｅ、１巻：１１～１５頁（１９８９年）に報告されている）。さらに、親和性成熟は、選択された個々のＦｖクローンにおいて、例えば、目的のＣＤＲにかかるランダム配列を有するプライマーを用いるＰＣＲを使用して１種以上のＣＤＲをランダムに変異させることにより、及びより高次の親和性クローンをスクリーニングすることによって、行われ得る。ＷＯ９６０７７５４は、軽鎖遺伝子のライブラリを作成するために、免疫グロブリン軽鎖のＣＤＲに変異誘発を誘導する方法を記載している。別の有効な手法は、未免疫ドナーから得た天然Ｖドメインバリアントのレパートリーによるファージディスプレイによって選択されたＶＨ又はＶＬドメインを組み換えること、及びＭａｒｋｓら、Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．、１０巻：７７９～７８３頁（１９９２年）に記載されている、数回のチェーンリシャッフリング（ｃｈａｉｎ　ｒｅｓｈｕｆｆｌｉｎｇ）においてより高い親和性をスクリーニングすることである。この技術は、約10^{-9}Ｍ以下の解離定数K_D（k_{off}/k_{on}）を有する抗体及び抗体断片の産生を可能にする。

【００７１】

他の実施形態において、同様の手順は、これらの表面に結合ペアを発現する、真核細胞（例えば、酵母）を含むライブラリを使用して用いられ得る。例えば、Ｕ．Ｓ．Ｐ．Ｎ．７，７００，３０２及びＵ．Ｓ．Ｓ．Ｎ．１２／４０４，０５９を参照されたい。一実施形態において、ヒト抗体は、ヒト抗体を発現するファージライブラリから選択される（Ｖａｕｇｈａｎら、Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　１４巻：３０９～３１４頁（１９９６年）：Ｓｈｅｅｔｓら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９５巻：６１５７～６１６２頁（１９９８年））。他の実施形態において、ヒト結合ペアは、酵母のような真核細胞において生成するコンビナトリアル抗体ライブラリから単離され得る。例えば、Ｕ．Ｓ．Ｐ．Ｎ．７，７００，３０２を参照されたい。このような技術により、多数の候補モジュレーターのスクリーニングを有利なことに可能にし、候補配列の比較的簡単な操作を提供する（例えば、親和性成熟又は組換えシャッフリングによる）。

【００７２】

ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン遺伝子座をトランスジェニック動物、例えば、内在性免疫グロブリン遺伝子が部分的又は完全に不活性化され、ヒト免疫グロブリン遺伝子が導入されたマウスに導入することにより作製することもできる。チャレンジすると、ヒト抗体産生が観察される。この産生は、遺伝子再配列、アセンブリ及び抗体レパートリーを含む全ての点において、ヒトで見られるものと緊密に類似している。このアプローチは、例えば、Ｕ．Ｓ．Ｐ．Ｎ．５，５４５，８０７；５，５４５，８０６；５，５６９，８２５；５，６２５，１２６；５，６３３，４２５；５，６６１，０１６並びにＸｅｎｏＭｏｕｓｅ（登録商標）技術に関するＵ．Ｓ．Ｐ．Ｎ．６，０７５，１８１及び６，１５０，５８４；並びにＬｏｎｂｅｒｇ　ａｎｄ　Ｈｕｓｚａｒ、Ｉｎｔｅｒｎ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３：６５－９３（１９９５）に記載されている。代替的には、ヒト抗体は、標的抗原に対して向けられた抗体を産生するヒトＢリンパ球の不死化を介して調製され得る（このようなＢリンパ球は、新生物障害に罹患している個体から回収し得る又はインビトロで免疫化され得る）。例えば、Ｃｏｌｅら、Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ　ａｎｄ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｔｈｅｒａｐｙ、Ａｌａｎ　Ｒ．Ｌｉｓｓ、ｐ．７７（１９８５）；Ｂｏｅｒｎｅｒら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ、１４７（Ｉ）：８６－９５（１９９１）；及びＵ．Ｓ．Ｐ．Ｎ．５，７５０，３７３を参照。

【００７３】
出所が何であろうとも、ヒト抗体配列は、当該技術分野において公知の分子操作技術を使用して作製され、本明細書に記載されている発現システム及び宿主細胞に導入され得ることが理解される。このような非天然に組換えにより産生したヒト抗体（及び、対象組成物）は、本開示の教示と完全に適合し、本発明の範囲内に明示的に保持されている。ある特定の選択態様において、本発明のＴＮＦＲＳＦ２１　ＡＤＣは、細胞結合剤として作用する、組換えにより産生したヒト抗体を含む。
【００７４】
４．誘導された抗体
出所抗体は、上記のように生成され、選択され、単離された後、改善された医薬的特徴を有する抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体となるようにさらに改変されてもよい。好ましくは、出所抗体は、所望の治療学的特性を有する誘導抗体をもたらすように公知の分子操作技術を使用して修飾又は改変されてもよい。
【００７５】
４．１．キメラ及びヒト化抗体
本発明の選択された実施形態は、免疫特異的にＴＮＦＲＳＦ２１に結合するマウスモノクローナル抗体を含み、この抗体は、「出所」抗体と考えることができる。選択された実施形態において、本発明の抗体は、このような「出所」抗体から、出所抗体の定常領域及び／又はエピトープ結合アミノ酸配列の任意選択の修飾を通じて誘導され得る。ある特定の実施形態では、抗体は、出所抗体の選択されたアミノ酸が、欠失、変異、置換、統合又は組合せを通じて変化する場合、出所抗体から「誘導される」。別の実施形態において、「誘導された」抗体は、出所抗体の断片（例えば、１つ以上のＣＤＲ又はドメイン又は全重鎖及び軽鎖可変領域）がアクセプター抗体配列と組み合わされるか又はアクセプター抗体配列に組み込まれて、誘導抗体（例えば、キメラ、ＣＤＲグラフト化又はヒト化抗体）を提供する抗体である。これらの「誘導」抗体は、例えば、決定因子に対する親和性を改善するか、抗体安定性を改善するか、細胞培養物における産生及び収率を改善するか、インビボでの免疫原性を低減するか、毒性を低減するか、活性部分のコンジュゲーションを促進するか、又は多重特異的抗体を作製するなどのために、細胞を産生する抗体に由来する遺伝物質、及び下記に記載されている標準的な分子生物学的技術を使用して産生され得る。このような抗体は、出所抗体から、化学的手段又は翻訳後修飾による成熟分子の修飾（例えば、グリコシル化パターン又はペグ化）を通じて、誘導されてもよい。
【００７６】
一実施形態において、本発明の抗体は、少なくとも２つの異なる抗体の種又はクラス由来の共有結合的に連結されたタンパク質セグメントに由来するキメラ抗体を含み得る。用語「キメラ」抗体は、重鎖及び／又は軽鎖の一部が、特定の種に由来する又は特定の抗体クラス若しくはサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一又は相同であるが、鎖の残りは、別の種に由来する又は別の抗体クラス若しくはサブクラスに属する抗体並びにこのような抗体の断片の対応する配列と同一又は相同である構築物を指す（Ｕ．Ｓ．Ｐ．Ｎ．４，８１６，５６７）。いくつかの好ましい実施形態において、本発明のキメラ抗体は、ヒト軽鎖及び重鎖定常領域に作動可能に連結されている選択されたマウス重鎖及び軽鎖可変領域の全て又はほとんどを含んでもよい。他の選択された実施形態において、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体は、本明細書において開示されているマウス抗体から「誘導」され得、重鎖及び軽鎖可変領域の全体未満を含む。
【００７７】
他の実施形態において、本発明のキメラ抗体は、「ＣＤＲグラフト化」抗体であり、この場合に、ＣＤＲ（Ｋａｂａｔ、Ｃｈｏｔｈｉａ、ＭｃＣａｌｌｕｍなどを使用して定義される）は、特定の種に由来するか又は特定の抗体クラス若しくはサブクラスに属しており、抗体の残りは別の種から大きく誘導されるか又は別の抗体クラス若しくはサブクラスに属している。ヒトで使用するために、１つ以上の選択されたげっ歯類ＣＤＲ（例えば、マウスＣＤＲ）は、ヒトアクセプター抗体にグラフト化され、天然に存在するヒト抗体の

ＣＤＲの１つ以上と置き換えられ得る。これらの構築物は、一般的に、対象による抗体に対する望ましくない免疫応答を低減しながら、十分な強度のヒト抗体機能、例えば、補体依存細胞傷害性（ＣＤＣ）及び抗体依存細胞媒介細胞傷害性（ＡＤＣＣ）をもたらすという利点を有する。一実施形態において、ＣＤＲグラフト化抗体は、ヒトフレームワーク配列に組み込まれたマウスから取得される１つ以上のＣＤＲを含む。

【００７８】

ＣＤＲグラフト化抗体に類似しているのが「ヒト化」抗体である。本明細書で使用するとき、「ヒト化」抗体は、１つ以上の非ヒト抗体（ドナー又は出所抗体）に由来する１つ以上のアミノ酸配列（例えば、ＣＤＲ配列）を含むヒト抗体（アクセプター抗体）である。ある特定の実施形態では、「逆変異」が、ヒト化抗体に導入されていてもよい。この逆変異では、レシピエントのヒト抗体の可変領域の１つ以上のＦＲが、非ヒト種ドナー抗体の対応する残基によって置換されている。このような逆変異は、グラフト化ＣＤＲの適切な三次元立体配置の維持を補助し、それにより親和性及び抗体安定性を改善し得る。様々なドナー種由来の抗体を使用することができ、例えば、限定されないが、マウス、ラット、ウサギ又は非ヒト霊長類が挙げられる。さらに、ヒト化抗体は、例えば、抗体の性能をさらに洗練するために、レシピエント抗体にもドナー抗体にも見出されない新たな残基を含んでもよい。出所抗体由来のマウス成分及びアクセプター抗体由来のヒト成分を含む、本発明に適合するＣＤＲグラフト化及びヒト化抗体は、下記実施例に示すように提示され得る。

【００７９】

当該技術分野で認識されている様々な技術を使用して、どのヒト配列をアクセプター抗体として使用するかを決定し、本発明に従ってヒト化構築物を提供することができる。適合するヒト生殖系列配列の編纂及びそれらのアクセプター配列としての適性を決定するための方法は、例えば、Ｄｕｂｅｌ ａｎｄ Ｒｅｉｃｈｅｒｔ（編）（２０１４）Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ、第2版、Ｗｉｌｅｙ－Ｂｌａｃｋｗｅｌｌ ＧｍｂＨ；Ｔｏｍｌｉｎｓｏｎ、Ｉ．Ａ．ら（１９９２）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２７：７７６～７９８；Ｃｏｏｋ、Ｇ．Ｐ．ら（１９９５）Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｔｏｄａｙ １６：２３７～２４２；Ｃｈｏｔｈｉａ、Ｄ．ら（１９９２）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２７：７９９～８１７；及びＴｏｍｌｉｎｓｏｎら（１９９５）ＥＭＢＯ Ｊ １４：４６２８～４６３８）に開示されている。ヒト免疫グロブリン可変領域配列の網羅的なディレクトリを提供している（Ｔｏｍｌｉｎｓｏｎ，Ｉ．Ａ．ら、ＭＲＣ Ｃｅｎｔｒｅ ｆｏｒ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＵＫにより編集）Ｖ－ＢＡＳＥディレクトリ（ＶＢＡＳＥ２－Ｒｅｔｔｅｒら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｒｅｓ．３３；６７１～６７４、２００５）を使用して適合するアクセプター配列を同定してもよい。さらに、例えばＵ．Ｓ．Ｐ．Ｎ．６，３００，０６４に記載されているコンセンサスヒトフレームワーク配列も適合するアクセプター配列であり得、本教示に従って使用し得る。一般に、ヒトフレームワークアクセプター配列は、マウス由来フレームワーク配列との相同性と、出所抗体及びアクセプター抗体のＣＤＲ古典的構造の解析とに基づいて選択される。次いで、誘導された抗体の重鎖及び軽鎖可変領域の誘導された配列が、当該技術分野で認識されている技術を使用して合成され得る。

【００８０】

例として、ＣＤＲグラフト化及びヒト化抗体並びに関連する方法は、Ｕ．Ｓ．Ｐ．Ｎ．６，１８０，３７０及び５，６９３，７６２に記載されている。さらなる詳細は、例えば、Ｊｏｎｅｓら、１９８６、（ＰＭＩＤ：３７１３８３１）；並びにＵ．Ｓ．Ｐ．Ｎ．６，９８２，３２１及び７，０８７，４０９を参照。

【００８１】

ＣＤＲグラフト化又はヒト化抗体の可変領域のヒトアクセプター可変領域の配列同一性又はホモロジーは、本明細書で議論したように決定されそして本明細書で議論したように測定されるとき、好ましくは少なくとも６０％又は６５％の配列同一性、より好ましくは

少なくとも７０％、７５％、８０％、８５％又は９０％の配列同一性、さらにより好ましくは少なくとも９３％、９５％、９８％又は９９％の配列同一性を共有する。好ましくは、同一でない残基位置は、保存的アミノ酸置換により異なる。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が、類似の化学的特性（例えば、電荷又は疎水性）の側鎖（Ｒ基）を有する別のアミノ酸残基によって置換されている置換である。一般に、保存的アミノ酸置換は、タンパク質の機能特性を実質的に変化させない。２つ以上のアミノ酸配列が保存的置換によって互いに異なる場合、配列同一性パーセント又は類似度を上方調節させて置換の保存的性質を正しくしてもよい。

【００８２】

添付の図７Ａ及び７Ｂに示される注釈の付されたＣＤＲ及びフレームワーク配列は、専売のＡｂｙｓｉｓデータベースを使用して、Ｋａｂａｔらに従って定義されていることが理解される。しかしながら、本明細書で説明され、また図７Ｇ～７Ｊに示されるように、当業者は、Ｃｈｏｔｈｉａら、ＡＢＭ又はＭａｃＣａｌｌｕｍらによって提供される定義に従って、ＣＤＲを、Ｋａｂａｔらと同様に容易に同定し得る。このように、前述のシステムのいずれかに従って誘導された１つ以上のＣＤＲを含む抗ＴＮＦＲＳＦ２１ヒト化抗体は、本発明の範囲内に明確に保持される。

【００８３】

４．２．部位特異的抗体

本発明の抗体は、細胞毒又は他の抗がん剤へのコンジュゲーションを容易にするために（下記でより詳細に議論されるように）操作されてもよい。抗体薬物コンジュゲート（ＡＤＣ）調製にとって、抗体上の細胞毒の位置及び薬物抗体比（ＤＡＲ）の観点から、均質なＡＤＣ分子集団を含むことが有利である。本発明に基づいて、当業者は本明細書に記載されるような部位特異的操作構築物を容易に作製することができる。本明細書で使用するとき、「部位特異的抗体」又は「部位特異的構築物」は、重鎖又は軽鎖のいずれかの少なくとも１つのアミノ酸が、欠失、改変又は（好ましくは別のアミノ酸で）置換されて少なくとも１つの遊離システインを与えている抗体又はその免疫反応性断片を意味する。同様に、「部位特異的コンジュゲート」は、部位特異的抗体と、不対又は遊離システインにコンジュゲートした少なくとも１つの細胞毒又は他の化合物（例えば、レポーター分子）とを含むＡＤＣを意味する。ある特定の実施形態において、不対システイン残基は、不対鎖内システイン残基を含む。他の実施形態において、遊離システイン残基は、不対鎖間システイン残基を含む。さらに他の実施形態において、遊離システインを、抗体のアミノ酸配列内（例えば、ＣＨ３ドメイン内）へと改変させてもよい。いずれにしても、部位特異的抗体は、様々なアイソタイプの抗体、例えば、ＩｇＧ、ＩｇＥ、ＩｇＡ又はＩｇＤであることができ；これらのクラス内で、抗体は、様々なサブクラスの抗体、例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３又はＩｇＧ４であることができる。ＩｇＧ構築物に関して、抗体の軽鎖は、Ｃ２１４がそれぞれ組み込まれたカッパ又はラムダのいずれかのアイソタイプを含んでもよく、選択された実施形態において、Ｃ２１４は、ＩｇＧ１重鎖のＣ２２０残基がないことにより、不対であってもよい。

【００８４】

したがって、本明細書において使用する場合、用語「遊離システイン」又は「不対システイン」は、他に文脈により指示されていない限り、相互に交換可能に使用することができる用語であり、天然に存在しているか又は分子操作技術を使用して選択された残基位置に特別に組み込まれているかにかかわらず、生理学的条件下において天然に存在している（「又は未処理の」）ジスルフィド結合の部分ではない、抗体の任意のシステイン（又はチオール含有）成分（例えば、システイン残基）を意味するものとする。ある特定の選択された実施形態において、遊離システインは、天然の鎖内又は鎖間ジスルフィド架橋パートナーが置換されたか、除去されたか又は他の方法で変化したことにより生理学的条件下で天然に存在しているジスルフィド架橋が破壊され、それによって部位特異的コンジュゲーションに適切な不対システインとなっている、天然のシステインを含み得る。他の好ましい実施形態において、遊離又は不対システインは、抗体の重鎖又は軽鎖アミノ酸配列内

の所定の部位に選択的に配置されているシステイン残基を含む。コンジュゲーションの前に、遊離又は不対システインが、チオール（還元されたシステイン）として、キャッピングされたシステイン（酸化されている）として又は系の酸化状態に依存した同一又は異なる分子上の別のシステイン若しくはチオール基との非天然分子内又は分子間ジスルフィド結合（酸化されている）の一部として、存在してもよいことが認識される。下記でより詳細に説明するように、適切に操作された抗体構築物の穏やかな還元は、部位特異的コンジュゲーションに利用可能なチオールをもたらす。したがって、特に好ましい実施形態において、遊離又は不対システインは（天然に存在するものか又は組み込まれたものかにかかわらず）、選択的還元及びこの後のコンジュゲーションを受けて、均一なＤＡＲ組成物をもたらす。

【００８５】

本開示の改変コンジュゲート調製物により示される好ましい特性は、コンジュゲーションの位置及び組成物の絶対的ＤＡＲ値の観点からコンジュゲーションを詳細に指定し、作製されたコンジュゲートを大きく限定する能力に基づき、少なくとも部分的に、予測されるものであることが理解される。従来の多くのＡＤＣ調製物と異なり、本発明は、ランダムコンジュゲーション部位及び比較的制御されていないＤＡＲ種を生成する抗体の部分的又は完全な還元に完全に依拠する必要はない。むしろ、特定の態様において、本発明は、好ましくは、標的化抗体を改変して天然に存在する（つまり「未処理の（ｎａｔｉｖｅ）」）鎖内又は鎖間ジスルフィド架橋の１つ以上を破壊することにより又は任意の位置にシステイン残基を導入することにより、１つ以上の所定の不対（又は遊離の）システイン部位を用意する。この目的のために、選択された実施形態において、システイン残基は、標準的分子操作技術を使用して、抗体（又はそれらの免疫反応性断片）の重鎖若しくは軽鎖のいずれの場所に組み込まれてもよく又は付加されてもよいことが理解される。他の好ましい実施形態において、天然ジスルフィド結合の破壊は、後にコンジュゲーション部位として使用され得る非天然システインの導入（後に遊離システインを含む）との組合せで行われ得る。

【００８６】

ある特定の実施形態において、操作された抗体は、鎖内又は鎖間システイン残基に少なくとも１つのアミノ酸欠失又は置換を含む。本明細書で使用するとき、「鎖間システイン残基」は、抗体の軽鎖と重鎖との間又は抗体の２つの重鎖間のいずれかの天然のジスルフィド結合に含まれるシステイン残基を意味し、一方で、「鎖内システイン残基」は、同じ重鎖又は軽鎖内の別のシステインと天然に対をなしているシステイン残基である。一実施形態において、鎖間システイン残基の欠失又は置換は、軽鎖と重鎖との間のジスルフィド結合の形成に関与している。別の実施形態において、システイン残基の置換又は欠失は、２つの重鎖間のジスルフィド結合に関与している。典型的な実施形態において、軽鎖が重鎖のＶＨ及びＣＨ１ドメインと対形成しており、１つの重鎖のＣＨ２及びＣＨ３ドメインが相補的重鎖のＣＨ２及びＣＨ３ドメインと対形成している抗体の相補的な構造により、いずれかの軽鎖又は重鎖の単一のシステインの変異又は欠失によって、操作された抗体における２つの不対システイン残基が生じる。

【００８７】

いくつかの実施形態において、鎖間システイン残基は欠失している。他の実施形態において、鎖間システインは、別のアミノ酸（例えば、天然アミノ酸）で置換されている。例えば、アミノ酸置換は、鎖間システインの、中性（例えば、セリン、スレオニン若しくはグリシン）又は親水性（例えば、メチオニン、アラニン、バリン、ロイシン若しくはイソロイシン）残基での置き換えを生じ得る。選択された実施形態において、鎖間システインは、セリンと置き換えられている。

【００８８】

本発明で意図されるいくつかの実施形態において、欠失又は置換システイン残基は、軽鎖（カッパ又はラムダのいずれか）上にあり、したがって重鎖上に遊離システインが残る。他の実施形態において、欠失又は置換システイン残基は重鎖上にあり、軽鎖定常領域上

に遊離のシステインを残す。アセンブリにおける無傷な抗体の軽鎖又は重鎖のいずれかの単一システインの欠失又は置換は、２つの不対システイン残基を有する部位特異的抗体をもたらすことが理解される。

【００８９】

一実施形態において、ＩｇＧ軽鎖（カッパ又はラムダ）の２１４位のシステイン（Ｃ２１４）が欠失又は置換されている。別の実施形態において、ＩｇＧ重鎖の２２０位のシステイン（Ｃ２２０）が欠失又は置換されている。さらなる実施形態において、重鎖の２２６位又は２２９位のシステインが欠失又は置換されている。一実施形態において、重鎖のＣ２２０がセリンに置換されて（Ｃ２２０Ｓ）、軽鎖に好ましい遊離システインをもたらす。別の実施形態において、軽鎖のＣ２１４がセリンに置換されて（Ｃ２１４Ｓ）、重鎖に好ましい遊離システインをもたらす。このような部位特異的構築物は、以下の実施例においてさらに詳細に記載されている。適合する部位特異的構築物の概要を直下の表２に示す。ここで、番号付けは一般的にＫａｂａｔに示されるＥ$_U$インデックスに従い、ＷＴは、「野生型」又は天然の改変のない定常領域配列を表し、デルタ（Δ）はアミノ酸残基の欠失を指す（例えば、Ｃ２１４Δは、２１４位のシステイン残基が欠失していることを示す）。

【００９０】

【表２】

表２

命名	抗体成分	改変	配列番号
ss1	重鎖 軽鎖	C220S WT	配列番号３ 配列番号5,8
ss2	重鎖 軽鎖	C220Δ WT	配列番号４ 配列番号5,8
ss3	重鎖 軽鎖	WT C214Δ	配列番号２ 配列番号7,10
ss4	重鎖 軽鎖	WT C214S	配列番号２ 配列番号6,9

【００９１】

本発明の部位特異的構築物と適合可能な例示的な操作された軽鎖及び重鎖定常領域が直下に示されており、ここで、配列番号３及び４は、それぞれ、Ｃ２２０Ｓ　ＩｇＧ１及びＣ２２０ΔＩｇＧ１重鎖定常領域を含み、配列番号６及び７は、それぞれ、Ｃ２１４Ｓ及びＣ２１４Δカッパ軽鎖定常領域を含み、配列番号９及び１０は、それぞれ、例示的なＣ２１４Ｓ及びＣ２１４Δラムダ軽鎖定常領域を含む。各場合において、改変されたか又は欠失したアミノ酸の部位は（隣接残基と共に）、下線を付されている。

【００９２】

【化４】

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL
SLSPG（配列番号3）

【００９３】

【化５】

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PG（配列番号4）

【００９４】

【化６】

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST
YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGES（配列番号6）

【００９５】

【化７】

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST
YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE（配列番号7）

【００９６】

【化８】

QPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKY
AASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTESS（配列番号9）

【００９７】

【化９】

QPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKY
AASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTES（配列番号10）

【００９８】

上で議論した通り、重鎖及び軽鎖バリアントはそれぞれ、本開示の重鎖及び軽鎖可変領域（又は、ヒト化若しくはＣＤＲグラフト化構築物のような、この誘導体）と作動可能に会合されて、本明細書において開示されている部位特異的抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体をもたらすことができる。このような操作された抗体は、開示されるＡＤＣにおける使用に、特に適合可能である。

【００９９】

システイン残基又は遊離システインを提供するための残基を（天然のジスルフィド結合の破壊とは対照的に）導入又は付加することに関して、抗体又は抗体断片上の適合する位置は、当業者によって容易に判別され得る。したがって、選択された実施形態において、システインは、所望のＤＡＲ、抗体構築物、選択されたペイロード及び抗体標的に応じて、ＣＨ１ドメイン、ＣＨ２ドメイン若しくはＣＨ３ドメイン又はそれらの任意の組合せに導入され得る。他の好ましい実施形態において、システインは、カッパ又はラムダＣＬドメイン内に導入されてもよく、特に好ましい実施形態において、ＣＬドメインのｃ末端領域に導入されてもよい。それぞれの場合において、システインの挿入部位に近位の他のアミノ酸残基を変更、除去又は置換して、分子の安定性、コンジュゲーションの効率性を促進させてもよく又は一度付加されたペイロードに保護的環境を与えてもよい。特定の実施

形態において、置換される残基は、抗体の任意の接触可能部位にある。このような表面残基をシステインで置換することによって、反応性チオール基は、抗体が容易に接触可能な部位に位置づけられ、本明細書でさらに記載されているように選択的に還元され得る。ある特定の実施形態において、置換される残基は、抗体の接触可能部位にある。これらの残基をシステインで置換することによって、反応性チオール基は、抗体が接触可能な部位に位置づけられ、抗体と選択的にコンジュゲートするために使用され得る。ある特定の実施形態において、以下の残基の任意の１つ以上が、システインで置換され得る：軽鎖のＶ２０５（Ｋａｂａｔ番号付け）；重鎖のＡ１１８（Ｅｕ番号付け）；及び重鎖Ｆｃ領域のＳ４００（Ｅｕ番号付け）。さらなる置換位置及び適合する部位特異的抗体の作製方法は、その全体が本明細書に組み込まれるＵ．Ｓ．Ｐ．Ｎ．７，５２１，５４１に記載されている。

【０１００】

本明細書に記載されるような、定義された部位で抗体薬物コンジュゲートを生成するためのストラテジー及び薬物負荷の化学量論は、抗体の保存された定常領域の操作に主に関わるので、全ての抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体に広く適用可能である。抗体の各クラス及びサブクラスのアミノ酸配列及び天然のジスルフィド結合は十分に文献に記載されているので、当業者は、様々な抗体の操作された構築物を、過度の実験を必要とせずに容易に作製することができ、したがってこのような構築物は、本発明の範囲内にあるとして明確に意図されている。

【０１０１】

４．３．定常領域の修飾又は改変された糖鎖結合

本発明の選択された実施形態は、定常領域（つまりＦｃ領域）の置換又は修飾、例えば、限定されないが、アミノ酸残基の置換、変異及び／又は修飾を含んでもよく、この置換又は修飾により、薬物動態の変化、血清半減期の延長、結合親和性の増加、免疫原性の減少、生産増加、ＦｃリガンドのＦｃ受容体（ＦｃＲ）への結合の変化、ＡＤＣＣ又はＣＤＣの増強又は減少、糖鎖結合及び／又はジスルフィド結合の変化並びに結合特異性の変更を含むがこれらに限定されない特徴が、化合物にもたらされる。

【０１０２】

改善されたＦｃエフェクター機能を有する化合物は、例えば、ＦｃドメインとＦｃ受容体との間の相互作用（例えば、ＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩＡ及びＢ、ＦｃγＲＩＩＩ及びＦｃＲｎ）に関与するアミノ酸残基の変化を通じて生成することができ、これにより、血清半減期の延長のような細胞毒性の増加及び／又は薬物動態の変化が導かれ得る（例えば、Ｒａｖｅｔｃｈ ａｎｄ Ｋｉｎｅｔ、Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ ９：４５７～９２（１９９１）；Ｃａｐｅｌら、Ｉｍｍｕｎｏｍｅｔｈｏｄｓ ４：２５～３４（１９９４）；及びｄｅ Ｈａａｓら、Ｊ．Ｌａｂ．Ｃｌｉｎ．Ｍｅｄ．１２６：３３０～４１（１９９５）を参照。

【０１０３】

本発明の実施形態はまた、以下に限定されないが、薬物動態の改変、血清半減期の向上、結合親和性の向上、免疫原性の低下、産生物の増加、Ｆｃ受容体（ＦｃＲ）に結合するＦｃリガンドの改変、ＡＤＣＣ若しくはＣＤＣの増強又は低下、グリコシル化及び／又はジスルフィド結合の改変、並びに結合特異性の修正を含めた特徴を有する化合物をもたらす、非限定的に、アミノ酸残基の置換、変異及び／又は修飾を含めた、定常領域（すなわち、Ｆｃ領域）の置換又は修飾を含むことができる。

【０１０４】

改善されたＦｃエフェクター機能を有する化合物は、例えば、細胞毒性の向上、及び／又は血清半減期の増加のような薬物動態の改変をもたらし得る、Ｆｃドメイン及びＦｃ受容体（例えば、ＦｃγＲＩ、ＦｃγＲＩＩＡ及びＢ、ＦｃγＲＩＩＩ及びＦｃＲｎ）間の相互作用に関与する、アミノ酸残基の変化を通して、生成することができる（例えば、Ｒａｖｅｔｃｈ及びＫｉｎｅｔ、Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ ９巻：４５７～９２頁（１９９１年）；Ｃａｐｅｌら、Ｉｍｍｕｎｏｍｅｔｈｏｄｓ ４巻：２５～３４頁（

１９９４年）；及びｄｅ　Ｈａａｓら、Ｊ．Ｌａｂ．Ｃｌｉｎ．Ｍｅｄ．１２６巻：３３０～４１頁（１９９５年）を参照）。

【０１０５】

ある特定の実施形態において、Ｎ２９７Ａ変異（「ＭＪ変異」と呼ばれる）を含むバリアントが構築されて、開示される抗体の特性を改善することができる。この目的のため、Ｎ２９７Ａ変異（ＥＵ番号付け）をＴＮＦＲＳＦ２１抗体に導入して、Ｆｃ受容体への抗体及びＡＤＣの結合が低下し、このことは、標的外毒性の原因になると考えられる。

【０１０６】

選択された実施形態において、インビボ半減期が延長された抗体は、ＦｃドメインとＦｃＲｎ受容体との間の相互作用に関与することが同定されたアミノ酸残基を修飾（例えば、置換、欠失又は付加）することにより生成することができる（例えば、ＷＯ９７／３４６３１；ＷＯ０４／０２９２０７；Ｕ．Ｓ．Ｐ．Ｎ．６，７３７，０５６及びＵ．Ｓ．Ｐ．Ｎ．２００３／０１９０３１１を参照）。このような実施形態に関して、Ｆｃバリアントは、哺乳動物、好ましくはヒトにおいて、５日より長いか、１０日より長いか、１５日より長いか、好ましくは２０日より長いか、２５日より長いか、３０日より長いか、３５日より長いか、４０日より長いか、４５日より長いか、２カ月より長いか、３カ月より長いか、４カ月より長いか又は５カ月より長い、半減期を与え得る。延長された半減期により血清力価が高くなり、したがって、抗体の投与頻度を減少させそして／又は投与される抗体の濃度を減少させる。インビボにおけるヒトＦｃＲｎへの結合及びヒトＦｃＲｎ高親和性結合ポリペプチドの血清半減期は、例えば、ヒトＦｃＲｎを発現しているトランスジェニックマウス若しくはトランスフェクトされたヒト細胞株又はバリアントＦｃ領域を有するポリペプチドが投与された霊長類でアッセイされ得る。ＷＯ２０００／４２０７２は、ＦｃＲｎへの結合が向上した又は減少した抗体バリアントを記載している。さらに、例えば、Ｓｈｉｅｌｄｓら　Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．９（２）：６５９１～６６０４（２００１）を参照。

【０１０７】

他の実施形態において、Ｆｃ改変により、ＡＤＣＣ又はＣＤＣ活性の増強又は低下が導かれ得る。当該技術分野で既知のように、ＣＤＣは、補体の存在下での標的細胞の溶解を指し、ＡＤＣＣは、細胞毒性の一形態を指し、ある特定の細胞毒性細胞（例えば、ナチュラルキラー細胞、好中球及びマクロファージ）に存在するＦｃＲへ分泌Ｉｇが結合すると、これらの細胞毒性エフェクター細胞が抗原保有標的細胞に特異的に結合可能となり、この後、細胞毒により標的細胞が殺傷される。本発明の文脈において、抗体バリアントは、「改変された」ＦｃＲ結合親和性を有し、親若しくは非修飾抗体又は天然のＦｃＲ配列を含む抗体と比較して、結合が増強又は減少している。低下した結合を示すこのようなバリアントは、明らかな結合をほとんど又は全く有さず、例えば、天然配列と比較してＦｃＲに対する結合は、例えば当該技術分野で周知の技術で決定するとき、０～２０％であり得る。他の実施形態において、バリアントは、天然の免疫グロブリンＦｃドメインと比較して増強された結合を示す。これらの種類のＦｃバリアントは、本開示の抗体の有効な抗新生物特性を増強するために有利に使用し得ることが理解される。さらに他の実施形態において、このような改変は、結合親和性の増加、免疫原性の減少、生産増加、糖鎖結合及び／若しくはジスルフィド結合の変化（例えば、コンジュゲーション部位に対して）、結合特異性の変更、ファゴサイトーシスの増加及び／又は細胞表面受容体（例えば、Ｂ細胞受容体；ＢＣＲ）の下方制御などを導く。

【０１０８】

さらに他の実施形態は、１つ以上の操作されたグリコフォーム、例えば、タンパク質（例えばＦｃドメイン中の）に共有結合されている改変された糖鎖結合パターン又は改変された炭化水素組成を含む部位特異的抗体を含む。例えば、Ｓｈｉｅｌｄｓ、Ｒ．Ｌ．ら（２００２）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２７７：２６７３３～２６７４０を参照。操作されたグリコフォームは、様々な目的、例えば、これらに限定されないが、エフェクター機能の増強又は減少、標的に対する抗体の親和性の増加又は抗体の産生促進のために、有用で

あり得る。ある特定の実施形態において、エフェクター機能の減少が所望される場合、分子を操作してアグリコシル化された形態を発現させ得る。１つ以上の可変領域フレームワーク糖鎖結合部位の消去に至り得る置換、したがってこの部位での糖鎖結合を消去し得る置換は、周知である（例えば、Ｕ．Ｓ．Ｐ．Ｎ．５，７１４，３５０及び６，３５０，８６１参照）。逆に、増強されたエフェクター機能又は改善された結合が、１つ以上のさらなる糖鎖結合部位の操作によって、Ｆｃ含有分子に付与されてもよい。

【０１０９】

他の実施形態としては、改変された糖鎖組成を有するＦｃバリアント、例えば、フコシル残基の量が減少している低フコシル化抗体又は二分化ＧｌｃＮＡｃ構造が増加している抗体が挙げられる。このような改変された糖鎖結合パターンは、抗体のＡＤＣＣ能力を向上させることが実証されている。操作されたグリコフォームは、当業者に公知の任意の方法により、例えば、操作されたか又はバリアントの発現系統を使用し、１つ以上の酵素（例えば、Ｎ－アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼＩＩＩ（ＧｎＴＩＩＩ））の共発現によって様々な生物又は様々な生物由来の細胞株にＦｃ領域を含む分子を発現させることにより、又はＦｃ領域を含む分子を発現させた後、炭水化物を修飾することにより（例えば、ＷＯ２０１２／１１７００２参照）、生成され得る。

【０１１０】

４．４．断片

本発明の実施のためにどの形態の抗体（例えば、キメラ、ヒト化など）を選択したかにかかわらず、免疫反応断片を、それ自体で又は抗体薬物コンジュゲートの一部として、本明細書の教示に従って使用し得ることが理解される。「抗体断片」は、無傷な抗体の少なくとも一部を含む。本明細書で使用するとき、抗体分子の「断片」という用語は、抗体の抗原結合断片を含んでおり、用語「抗原結合断片」は、選択された抗原又はこの免疫原性断片に免疫特異的に結合するか又は反応し、この断片が由来する無傷抗体と特異的な抗原結合について競合する、免疫グロブリン又は抗体のポリペプチド断片を指す。

【０１１１】

例示的な部位特異的断片としては、可変軽鎖断片（ＶＬ）、可変重鎖断片（ＶＨ）、ｓｃＦｖ、Ｆ（ａｂ’）２断片、Ｆａｂ断片、Ｆｄ断片、Ｆｖ断片、単一ドメイン抗体断片、ダイアボディ、線状抗体、一本鎖抗体分子及び抗体断片から形成された多重特異的抗体が挙げられる。さらに、活性部位特異的断片は、抗原／基質又は受容体と相互作用する能力を維持し、無傷抗体と同様の様式でそれらを修飾する（ただしおそらくはやや効率が劣る）、抗体の部分を含む。このような抗体断片は、本明細書に記載されるような１つ以上の遊離システインを含むようにさらに操作されてもよい。

【０１１２】

他の実施形態において、抗体断片は、Ｆｃ領域を含む断片であって、Ｆｃ領域が無傷抗体に存在しているときに通常伴われる少なくとも１つの生物学的機能、例えばＦｃＲｎ結合、抗体半減期調節、ＡＤＣＣ機能及び補体結合を維持している断片である。一実施形態において、抗体断片は、無傷抗体と実質的に同様のインビボ半減期を有する一価抗体である。例えば、このような抗体断片は、断片にインビボ安定性を付与することが可能な少なくとも１つの遊離システインを含むＦｃ配列に連結された抗原結合アームを含んでもよい。

【０１１３】

当業者であれば十分に認識されるように、断片は、分子操作技術により又は無傷の若しくは完全な抗体若しくは抗体鎖の化学的若しくは酵素的処理（例えばパパイン若しくはペプシン）を介するか又は組換え手段により、取得することができる。抗体断片のより詳細な説明は、例えばＦｕｎｄａｍｅｎｔａｌ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ、Ｗ．Ｅ．Ｐａｕｌ編、Ｒａｖｅｎ　Ｐｒｅｓｓ、Ｎ．Ｙ．（１９９９）を参照。

【０１１４】

４．５．多価構築物

他の実施形態において、本発明の抗体及びコンジュゲートは、一価又は多価（例えば、

二価、三価など）であり得る。本明細書で使用するとき、用語「価数」は、抗体に関連した可能な標的結合部位の数を指す。各標的結合部位は、標的分子上の１つの標的分子又は特異的位置若しくは遺伝子座若しくはエピトープに特異的に結合する。抗体が一価であるとき、分子の各結合部位は、単一抗原位置又はエピトープで特異的に結合する。抗体が２つ以上の標的結合部位（多価）を含むとき、各標的結合部位は同じ又は異なる分子に特異的に結合してもよい（例えば、異なるリガンド若しくは異なる抗原又は同じ抗原上の異なるエピトープ若しくは位置に結合してもよい）。例えば、Ｕ．Ｓ．Ｐ．Ｎ．２００９／０１３０１０５を参照。

【０１１５】

一実施形態において、抗体は、二重特異的抗体であり、２つの鎖が、Ｍｉｌｌｓｔｅｉｎら、１９８３、Ｎａｔｕｒｅ、３０５：５３７～５３９及びＷＯ２０１４／１２４３２６に記載されるように、異なる特異性を有している。他の実施形態には、さらなる特異性を有する抗体、例えば三重特異的抗体が含まれる。他のより精巧な適合する多重特異的構築物及びそれらの作製方法は、Ｕ．Ｓ．Ｐ．Ｎ．２００９／０１５５２５５並びにＷＯ９４／０４６９０；Ｓｕｒｅｓｈら、１９８６、Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ、１２１：２１０及びＷＯ９６／２７０１１に記載されている。

【０１１６】

多価抗体は、所望の標的分子の異なるエピトープに免疫特異的に結合してもよく、又は異種性ポリペプチド若しくは固形支持材料のような標的分子と異種性エピトープとの両方に免疫特異的に結合してもよい。選択された実施形態は２つの抗原にのみ結合する（つまり、二重特異的抗体である）ことができるが、さらなる特異性を有する抗体、例えば三重特異的抗体も本発明に包含される。二重特異的抗体には、架橋又は「ヘテロコンジュゲート」抗体も含まれる。例えば、ヘテロコンジュゲートの抗体の１つはアビジンに結合することができ、他方はビオチンに結合することができる。このような抗体は、例えば、不要な細胞に対して免疫系細胞を標的化させるために（Ｕ．Ｓ．Ｐ．Ｎ．４，６７６，９８０）及びＨＩＶ感染の治療のために（ＷＯ９１／００３６０、ＷＯ９２／２００３７３及びＥＰ０３０８９）提唱されてきた。ヘテロコンジュゲート抗体は、任意の都合のよい架橋方法を使用して作製することができる。適切な架橋剤は当該技術分野で周知であり、いくつかの架橋技術と共にＵ．Ｓ．Ｐ．Ｎ．４，６７６，９８０に開示されている。

【０１１７】

５．抗体の組換え産生

抗体及びそれらの断片は、抗体産生細胞及び組換え技術から得られた遺伝子材料を使用して作製又は修飾されてもよい（例えば、Ｄｕｂｅｌ ａｎｄ Ｒｅｉｃｈｅｒｔ（編）（２０１４）Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ、第２版、Ｗｉｌｅｙ－Ｂｌａｃｋｗｅｌｌ ＧｍｂＨ；Ｓａｍｂｒｏｏｋ ａｎｄ Ｒｕｓｓｅｌｌ（編）（２０００）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（第３版）、ＮＹ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ；Ａｕｓｕｂｅｌら（２００２）Ｓｈｏｒｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ：Ａ Ｃｏｍｐｅｎｄｉｕｍ ｏｆ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｒｏｍ Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ｗｉｌｅｙ、Ｊｏｈｎ ＆ Ｓｏｎｓ、Ｉｎｃ．及びＵ．Ｓ．Ｐ．Ｎ．７，７０９，６１１を参照）。

【０１１８】

本発明の別の態様は、本発明の抗体をコードする核酸分子に関する。核酸は、全細胞、細胞溶解物又は部分的に精製された若しくは実質的に純粋な形態で存在し得る。核酸は、他の細胞成分又は他の混入物、例えば、他の細胞核酸若しくはタンパク質から、標準技術、例えば、アルカリ／ＳＤＳ処理、ＣｓＣｌバンド形成、カラムクロマトグラフィー、アガロースゲル電気泳動及び当該技術分野で周知の他のものを使用して分離されるとき、「単離される」又は実質的に純粋にされる。本発明の核酸は、例えば、ＤＮＡ（例えば、ゲノムＤＮＡ、ｃＤＮＡ）、ＲＮＡ及びこの人工バリアント（例えば、ペプチド核酸）であ

り得、一本鎖若しくは二本鎖又はＲＮＡ、ＲＮＡであってもよく、イントロンを含んでも含まなくてもよい。選択された実施形態において、核酸はｃＤＮＡ分子である。

【０１１９】

本発明の核酸は、標準的な分子生物学的技術を使用して取得され得る。ハイブリドーマ（例えば、下記実施例に記載された調製されるハイブリドーマ）により発現される抗体については、抗体の軽鎖及び重鎖をコードしているｃＤＮＡは、標準的ＰＣＲ増幅又はｃＤＮＡクローニング技術によって取得され得る。免疫グロブリン遺伝子ライブラリから（例えば、ファージディスプレイ技術を使用して）取得される抗体については、抗体をコードしている核酸分子が、ライブラリから収集され得る。

【０１２０】

ＶＨ及びＶＬセグメントをコードしているＤＮＡ断片は、標準的組換えＤＮＡ技術によりさらに操作され、例えば、可変領域遺伝子を、完全長抗体鎖遺伝子、Ｆａｂ断片遺伝子又はｓｃＦｖ遺伝子に変換することができる。これらの操作において、ＶＬ又はＶＨをコードしているＤＮＡ断片は、別のタンパク質、例えば、抗体定常領域又はフレキシブルリンカーをコードしている別のＤＮＡ断片に作動可能に連結される。用語「作動可能に連結される」は、この文脈で使用される場合、２つのＤＮＡ断片によってコードされるアミノ酸配列がインフレームのままであるように２つのＤＮＡ断片が連結されていることを意味する。

【０１２１】

ＶＨ領域をコードしている単離されたＤＮＡは、重鎖定常領域（ＩｇＧ１の場合は、ＣＨ１、ＣＨ２及びＣＨ３）をコードする別のＤＮＡ分子にＶＨコードＤＮＡを作動可能に連結することによって、完全長重鎖遺伝子に変換することができる。ヒト重鎖定常領域遺伝子の配列は、当該技術分野で公知であり（例えば、Ｋａｂａｔら、（１９９１）（前掲））、これらの領域を包含するＤＮＡ断片は、標準的ＰＣＲ増幅により取得され得る。重鎖定常領域は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ、ＩｇＥ、ＩｇＭ又はＩｇＤ定常領域であり得るが、最も好ましくはＩｇＧ１又はＩｇＧ４定常領域である。例示的ＩｇＧ１定常領域は、配列番号２に示される。Ｆａｂ断片重鎖遺伝子に関して、ＶＨコードＤＮＡは、重鎖ＣＨ１定常領域のみをコードしている別のＤＮＡ分子に作動可能に連結され得る。

【０１２２】

ＶＬ領域をコードしている単離されたＤＮＡは、軽鎖定常領域ＣＬをコードしている別のＤＮＡ分子にＶＬコードＤＮＡを作動可能に連結することによって、完全長軽鎖遺伝子（並びにＦａｂ軽鎖遺伝子）に変換され得る。ヒト軽鎖定常領域遺伝子の配列は当該技術分野で公知であり（例えば、Ｋａｂａｔら、（１９９１）（前掲））、これらの領域を包含するＤＮＡ断片は、標準的ＰＣＲ増幅によって取得され得る。軽鎖定常領域は、カッパ又はラムダ定常領域であり得るが、最も好ましくはカッパ定常領域である。例示的な適合性カッパ軽鎖定常領域は、配列番号５に示されている一方、例示的な適合性ラムダ軽鎖定常領域は、配列番号８に示されている。

【０１２３】

各場合において、ＶＨ又はＶＬドメインは、これらの各定常領域（ＣＨ又はＣＬ）に作動可能に連結されることができ、この場合、定常領域は、部位特異的定常領域であり、部位特異的抗体をもたらす。選択された実施形態において、得られた部位特異的抗体は、重鎖に２つの不対システイン対を含む一方、他の実施形態において、部位特異的抗体は、ＣＬドメインに２つの不対システインを含む。

【０１２４】

本明細書において、本発明のポリペプチドに対する「配列同一性」、「配列類似性」又は「配列相同性」を示すある特定のポリペプチド（例えば、抗原又は抗体）が検討される。例えば、誘導されたヒト化抗体ＶＨ又はＶＬドメインは、出所（例えば、マウス）又はアクセプター（例えば、ヒト）ＶＨ又はＶＬドメインと配列類似性を示し得る。「相同」ポリペプチドは、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％又は９０％の配列同一性を示

し得る。他の実施形態において、「相同」ポリペプチドは、９３％、９５％又は９８％の配列同一性を示し得る。他の実施形態において、「相同」ポリペプチドは、９３％、９５％又は９８％の配列同一性を示し得る。本明細書で使用するとき、２つのアミノ酸配列間の相同性パーセントは、２つの配列間の同一性パーセントと同等である。２つの配列間の同一性パーセントは、配列によって共有される同一の位置の数の関数であり（つまり、％相同性＝同一位置の数／位置の合計数×１００）、２つの配列の最適な整列のために導入することが必要なギャップの数と各ギャップの長さが考慮に入れられる。配列の比較及び２つの配列間の同一性パーセントの決定は、下記の非限定的実施例に記載されるように、数学的アルゴリズムを使用して達成され得る。

【０１２５】

２つのアミノ酸配列間の同一性パーセントは、ＡＬＩＧＮプログラム（バージョン２．０）に組み込まれているＥ．Ｍｅｙｅｒｓ及びＷ．Ｍｉｌｌｅｒのアルゴリズム（Ｃｏｍｐｕｔ．Ａｐｐｌ．Ｂｉｏｓｃｉ．，４：１１～１７（１９８８））を使用し、ＰＡＭ１２０ウェイト残基テーブル（ｗｅｉｇｈｔ　ｒｅｓｉｄｕｅ　ｔａｂｌｅ）、１２のギャップ・レングス・ペナルティ、４のギャップペナルティを使用して決定され得る。さらに、２つのアミノ酸配列間の同一性パーセントは、ＧＣＧソフトウェアパッケージのＧＡＰプログラム（ｗｗｗ．ｇｃｇ．ｃｏｍで利用可能）に組み込まれているＮｅｅｄｌｅｍａｎ及びＷｕｎｓｃｈのアルゴリズム（Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４８：４４４～４５３（１９７０））を使用し、Ｂｌｏｓｓｕｍ６２マトリックス又はＰＡＭ２５０マトリックス並びに１６、１４、１２、１０、８、６又は４のギャップ・ウェイト及び１、２、３、４、５又は６のレングス・ウェイトを使用して決定され得る。

【０１２６】

追加的に又は代替的に、本発明のタンパク質配列は、公的データベースに対して検索を行い、例えば関連する配列を同定するために、「クエリー配列」として使用されてもよい。このような検索は、Ａｌｔｓｃｈｕｌら、（１９９０）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５：４０３～１０のＸＢＬＡＳＴプログラム（バージョン２．０）を使用して実施され得る。ＢＬＡＳＴタンパク質検索は、本発明の抗体分子に相同なアミノ酸配列を取得するために、ＸＢＬＡＳＴプログラム、スコア＝５０、ワードレングス＝３を用いて実施されてもよい。比較のためのギャップありアラインメントを取得するために、Ｇａｐｐｅｄ　ＢＬＡＳＴが、Ａｌｔｓｃｈｕｌら、（１９９７）Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２５（１７）：３３８９～３４０２に記載されているように利用されてもよい。ＢＬＡＳＴ及びＧａｐｐｅｄ　ＢＬＡＳＴプログラムを使用するときは、対応するプログラム（例えば、ＸＢＬＡＳＴ及びＮＢＬＡＳＴ）のデフォルトパラメータが使用されてもよい。

【０１２７】

同一でない残基の位置は、保存的アミノ酸置換また非保存的アミノ酸置換によって異なり得る。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が、類似の化学的特性（例えば、電荷又は疎水性）の側鎖を有する別のアミノ酸残基によって置換されている置換である。一般に、保存的アミノ酸置換は、タンパク質の機能特性を実質的に変化させない。２つ以上のアミノ酸配列が保存的置換によって互いに異なる場合、置換の保存的性質を訂正するために、配列同一性パーセント又は類似度を上昇させるように調整してもよい。非保存的アミノ酸による置換が存在する場合、実施形態において、配列同一性を示すポリペプチドは、本発明のポリペプチド（例えば、抗体）の所望の機能又は活性を保持する。

【０１２８】

本発明の核酸に対して「配列同一性」、「配列類似性」又は「配列相同性」を示す核酸も、本明細書で検討される。「相同配列」は、少なくとも約６５％、７０％、７５％、８０％、８５％又は９０％の配列同一性を示す核酸分子の配列を意味する。他の実施形態において、核酸の「相同配列」は、参照核酸に対して、９３％、９５％又は９８％の配列同一性を示し得る。

【０１２９】

本発明は、プロモーターに作動可能に連結されていてもよい上記に記載されたこのよう

な核酸（例えば、ＷＯ８６／０５８０７；ＷＯ８９／０１０３６；及びＵ．Ｓ．Ｐ．Ｎ．５，１２２，４６４参照）と、真核生物分泌経路の他の転写調節及びプロセシング制御エレメントとを含むベクターも提供する。本発明は、これらのベクターを包含する宿主細胞及び宿主発現系も提供する。

【０１３０】

本明細書で使用される場合、用語「宿主発現系」は、本発明の核酸、又はポリペプチド及び抗体のいずれかを生成するように操作することができる任意の種類の細胞系を含む。このような宿主発現系としては、これらに限定されないが、組換えバクテリオファージＤＮＡ又はプラスミドＤＮＡで形質転換又はトランスフェクトされた微生物（例えば、Ｅ．コリ（Ｅ．ｃｏｌｉ）又はＢ．サブチリス（Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ））；組換え酵母発現ベクターでトランスフェクトされた酵母（例えば、サッカロマイセス（Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ））又は哺乳動物細胞若しくはウイルス（例えば、アデノウイルス後期プロモーター）のゲノムに由来するプロモーターを含有する組換え発現構築物を包含する哺乳動物細胞（例えば、ＣＯＳ、ＣＨＯ－Ｓ、ＨＥＫ－２９３Ｔ、３Ｔ３細胞）が挙げられる。宿主細胞は、２つの発現ベクター、例えば、重鎖由来ポリペプチドをコードしている第１のベクター及び軽鎖由来ポリペプチドをコードしている第２のベクターで同時トランスフェクトされていてもよい。

【０１３１】

哺乳動物細胞を形質転換する方法は当該技術分野で周知である。例えば、Ｕ．Ｓ．Ｐ．Ｎ．４，３９９，２１６、４，９１２，０４０、４，７４０，４６１及び４，９５９，４５５参照。宿主細胞は、様々な特徴を有する抗原結合分子の産生を可能にするように操作されていてもよい（例えば、修飾グリコフォーム又はＧｎＴＩＩＩ活性を有するタンパク質）。

【０１３２】

組換えタンパク質の長期的な高収率生産のために、安定な発現が好ましい。したがって、選択された抗体を安定に発現する細胞株は、当該技術分野で認識されている標準技術を使用して操作されてもよく、本発明の一部を形成する。ウイルス複製起源を含有する発現ベクターを使用せずに、宿主細胞は、適切な発現制御エレメント（例えば、プロモーター又はエンハンサー配列、転写ターミネータ、ポリアデニル化部位など）及び選択可能マーカーにより制御されたＤＮＡで形質転換されてもよい。当該技術分野で周知の選択系のいずれも使用することができ、例えば、選択された条件下で発現を増強する効率的なアプローチを提供するグルタミン合成酵素遺伝子発現系（ＧＳ系）を使用してもよい。ＧＳ系は、全体的又は部分的に、ＥＰ０２１６８４６、ＥＰ０２５６０５５、ＥＰ０３２３９９７及びＥＰ０３３８８４１並びにＵ．Ｓ．Ｐ．Ｎ．５，５９１，６３９及び５，８７９，９３６に関連して述べられている。安定な細胞株の開発のための別の適合する発現系は、Ｆｒｅｅｄｏｍ（商標）ＣＨＯ－Ｓキット（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）である。

【０１３３】

本発明の抗体が、組換え発現又は任意の他の開示された技術で産生されたら、当該技術分野で公知の方法で精製又は単離されてもよく、これにより抗体は、同定され、それらの天然環境から分離されそして／若しくは回収され、抗体又は関連ＡＤＣの診断的又は治療的用途に干渉する混入物から分離される。単離された抗体には、組換え細胞内のインサイチュの抗体が含まれる。

【０１３４】

これらの単離された調製物は、当該技術分野で認識されている様々な技術、例えば、イオン交換及びサイズ排除クロマトグラフィー、透析、ダイアフィルトレーション及び親和性クロマトグラフィー、特にタンパク質Ａ又はタンパク質Ｇ親和性クロマトグラフィーを使用して精製されてもよい。下記の実施例において、適合する方法をより詳細に説明する。

【０１３５】

６．産生後選択

取得される方法にかかわらず、抗体産生細胞（例えば、ハイブリドーマ、酵母コロニーなど）は、選択され、クローニングされ、そして所望の特徴（例えば、堅固な成長、抗体高産生及び目的の抗原に対する高い親和性などの望ましい抗体特徴）のためにさらにスクリーニングされてもよい。ハイブリドーマは、細胞培養においてインビトロで又は同系遺伝子免疫無防備状態動物において、インビボで拡大増殖させることができる。ハイブリドーマ及び／又はコロニーを選択、クローニング及び拡大増殖する方法は、当業者に周知である。所望の抗体が同定されたら、当該技術分野で認識されている一般的な分子生物学及び生化学的技術を使用して、関連する遺伝子材料を単離、操作及び発現させてもよい。

【０１３６】

ナイーブなライブラリ（天然又は合成のいずれか）で産生された抗体は、中程度の親和性（約10^6から$10^7 M^{-1}$のK_a）を有する抗体であり得る。親和性を増加させるために、親和性成熟が、抗体ライブラリの構築（例えば、エラープローンポリメラーゼを使用したインビトロでのランダム変異の導入による）及び抗原に対して高親和性を有する抗体の第２ライブラリからの再選択（例えば、ファージ又は酵母ディスプレイの使用による）により、インビトロで模倣されてもよい。ＷＯ９６０７７５４は、軽鎖遺伝子のライブラリを作成するために、免疫グロブリン軽鎖のＣＤＲに変異誘発を誘導する方法を記載している。

【０１３７】

様々な技術が、抗体を選択するために使用され得、例えば、これらに限定されないが、ヒトコンビナトリアル抗体又はｓｃＦｖ断片のライブラリがファージ又は酵母で合成されるファージ又は酵母ディスプレイを使用でき、このライブラリを、目的の抗原又はその抗体結合部分でスクリーニングし、この抗原に結合するファージ又は酵母を単離して、これらから抗体又は免疫反応性断片を取得し得る（Ｖａｕｇｈａｎら、１９９６、ＰＭＩＤ：９６３０８９１；Ｓｈｅｅｔｓら、１９９８、ＰＭＩＤ：９６００９３４；Ｂｏｄｅｒら、１９９７、ＰＭＩＤ：９１８１５７８；Ｐｅｐｐｅｒら、２００８、ＰＭＩＤ：１８３３６２０６）。ファージ又は酵母ディスプレイライブラリを生成するためのキットは市販されている。抗体ディスプレイライブラリの生成及びスクリーニングに使用され得る他の方法及び試薬もある（Ｕ．Ｓ．Ｐ．Ｎ．５，２２３，４０９；ＷＯ９２／１８６１９、ＷＯ９１／１７２７１、ＷＯ９２／２０７９１、ＷＯ９２／１５６７９、ＷＯ９３／０１２８８、ＷＯ９２／０１０４７、ＷＯ９２／０９６９０；及びＢａｒｂａｓら、１９９１、ＰＭＩＤ：１８９６４４５参照）。このような技術は、多数の候補抗体のスクリーニングを有利に可能にし、配列の比較的簡単な操作を提供する（例えば、組換えシャッフリングによる）。

【０１３８】

ＩＶ．抗体の特徴

ある特定の実施形態において、抗体産生細胞（例えば、ハイブリドーマ、酵母コロニーなど）は、選択され、クローニングされ、並びに好ましい特性、例えば、堅固な成長、抗体高産生及び下記に詳細に記載されるような望ましい部位特異的抗体特徴のためにさらにスクリーニングされてもよい。他の場合において、抗体の特徴は、動物の接種のために、特定の抗原（例えば、特異的ＴＮＦＲＳＦ２１アイソフォーム）又は標的抗原の免疫応答性断片を選択することによって付与されてもよい。さらに他の実施形態において、選択された抗体は、上記のように操作されて、免疫化学的特徴、例えば親和性又は薬物動態が増強又は洗練されてもよい。

【０１３９】

Ａ．中和抗体

選択された実施形態において、本発明の抗体は、「アンタゴニスト」又は「中和」抗体であってもよい。これは、この抗体が、決定因子と会合することができ、直接的に、又は前記決定因子とリガンド若しくは受容体のような結合パートナーとの会合を阻止することにより、前記決定因子の活性を遮断若しくは阻害することにより、これらがなければ、分

子の相互作用に起因すると思われる生物学的応答を遮ることを意味する。中和抗体又はアンタゴニスト抗体は、過剰の抗体が、例えば、標的分子活性によって、又はインビトロでの競合結合アッセイにおいて測定すると、少なくとも約２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％、９９％又はそれを超えて、決定因子に結合したパートナーの結合量を低下させる場合、このリガンド又は基質への決定因子の結合を実質的に阻害する。改変された活性は、当該技術分野で認識されている技術を直接使用して測定されてもよく、又は下流において改変された活性が有する影響（例えば、腫瘍発生又は細胞生存）によって測定されてもよいことが理解される。

【０１４０】

Ｂ．内在化抗体

ある特定の実施形態において、抗体は、抗体が決定因子と結合し、腫瘍形成性細胞のような選択された標的細胞に内在化される（任意のコンジュゲートされた薬学的に活性な成分を伴う）ような、内在化抗体を含み得る。内在化する抗体分子の数は、抗原発現細胞、特に、抗原発現腫瘍形成性細胞を殺傷するのに十分であり得る。抗体又は一部の場合には抗体薬物コンジュゲートの効力に応じて、単一抗体分子の細胞への取込みが、抗体が結合する標的細胞を殺傷するために十分であり得る。本発明に関連して、発現されたＴＮＦＲＳＦ２１タンパク質の実質的な部分が腫瘍形成性細胞表面に会合して残り、それにより本開示の抗体又はＡＤＣの局在化及び内在化を可能にしているという証拠がある。選択された実施形態において、このような抗体は、内在化に際して細胞を殺傷する１つ以上の薬物と会合されるか又はコンジュゲートされる。いくつかの実施形態において、本発明のＡＤＣは、内在化部位特異的ＡＤＣを含む。

【０１４１】

本明細書で使用されるとき、「内在化する」抗体は、関連する決定因子に結合する際に、標的細胞によって（任意のコンジュゲートされた細胞毒と共に）取り込まれる抗体を指す。このような内在化するＡＤＣの数は、決定因子発現細胞、特に、決定因子発現がん幹細胞を殺傷するのに十分であることが好ましい。細胞毒又はＡＤＣの全体としての効力に応じて、一部の場合には、抗体の数分子の細胞内への取込みが、抗体が結合する標的細胞を殺傷するために十分である。例えば、ＰＢＤ又はカリケアマイシンのようなある特定の薬物は強力であるため、抗体にコンジュゲートされた毒素の数分子の内在化が、腫瘍細胞を殺傷するために十分である。抗体が哺乳類細胞に結合して内在化するかどうかは、以下の実施例で記載されるものを含む、当該技術分野で認識されている様々なアッセイ（例えば、Ｍａｂ－Ｚａｐ及びＦａｂ－Ｚａｐのようなサポリンアッセイ；アドバンストターゲティングシステム）により決定され得る。抗体が細胞に内在化するかどうかを検出する方法は、Ｕ．Ｓ．Ｐ．Ｎ．７，６１９，０６８にも記載されている。

【０１４２】

Ｃ．枯渇抗体

他の実施形態において、本発明の抗体は枯渇抗体である。用語「枯渇」抗体は、好ましくは細胞表面上又は細胞表面近傍で抗原に結合し、（例えば、ＣＤＣ、ＡＤＣＣ又は細胞毒性剤の導入により）細胞の死を誘導するか、促進するか又はもたらす抗体を指す。実施形態において、選択された枯渇抗体は、細胞毒にコンジュゲートされている。

【０１４３】

好ましくは、枯渇抗体は、定義された細胞集団におけるＴＮＦＲＳＦ２１発現細胞の少なくとも２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、９５％、９７％又は９９％を殺傷することができる。用語「見かけのＩＣ５０」とは、本明細書において使用する場合、毒素に連結している一次抗体が、この一次抗体によって認識された抗原を発現する細胞の５０パーセントを殺傷した濃度を指す。毒素は、一次抗体に直接コンジュゲートされてもよく、又は一次抗体を認識する二次抗体若しくは抗体断片を介して一次抗体と会合してもよく、これらの二次抗体又は抗体断片は、毒素に直接コンジュゲートされている。枯渇抗体は、５μＭ未満、１μＭ未満、１００ｎＭ未満、５０ｎＭ未満、３０ｎＭ未満、２０ｎＭ未満、１０ｎＭ未満、５ｎＭ未満、２ｎＭ未満、又は１

ｎＭ未満のＩＣ５０を有するのが好ましい。いくつかの実施形態において、細胞集団は、濃縮されたか、区分されたか、精製されたか又は単離された腫瘍形成性細胞、例えば、がん幹細胞を含み得る。他の実施形態において、細胞集団は、全腫瘍試料又はがん幹細胞を含む異種性腫瘍抽出物を含み得る。標準的な生化学的技術が使用され、腫瘍形成性細胞の枯渇が、本明細書に記載の技術に従って監視及び定量されてもよい。

【０１４４】

Ｄ．結合親和性

本明細書において、特定の決定因子、例えば、ＴＮＦＲＳＦ２１に対して高い結合親和性を有する抗体が開示される。用語「K_D」は、特定の抗体－抗原相互作用の解離定数又は見かけの親和性を指す。本発明の抗体は、解離定数K_D（k_{off}／k_{on}）が≦10^{-7}Ｍであるとき、その標的抗原に免疫特異的に結合することができる。抗体は、K_Dが≦5×10^{-9}Ｍであるとき、高親和性で抗原に特異的に結合し、K_Dが≦5×10^{-10}Ｍであるとき、非常に高い親和性で抗原に特異的に結合する。本発明の一実施形態において、抗体は、≦10^{-9}ＭのK_Dと、約1×10^{-4}／秒のオフ速度（ｏｆｆ－ｒａｔｅ）を有する。本発明の一実施形態において、オフ速度は、＜1×10^{-5}／秒である。本発明の他の実施形態において、抗体は、約10^{-7}Ｍから10^{-10}ＭのK_Dで決定因子に結合し、さらに別の実施形態において、K_D≦2×10^{-10}Ｍで決定因子に結合する。本発明のさらに他の選択された実施形態は、10^{-6}Ｍ未満、5×10^{-6}Ｍ未満、10^{-7}Ｍ未満、5×10^{-7}Ｍ未満、10^{-8}Ｍ未満、5×10^{-8}Ｍ未満、10^{-9}Ｍ未満、5×10^{-9}Ｍ未満、10^{-10}Ｍ未満、5×10^{-10}Ｍ未満、10^{-11}Ｍ未満、5×10^{-11}Ｍ未満、10^{-12}Ｍ未満、5×10^{-12}Ｍ未満、10^{-13}Ｍ未満、5×10^{-13}Ｍ未満、10^{-14}Ｍ未満、5×10^{-14}Ｍ未満、10^{-15}Ｍ未満又は5×10^{-15}Ｍ未満のK_D（k_{off}／k_{on}）を有する抗体を含む。

【０１４５】

ある特定の実施形態において、決定因子、例えば、ＴＮＦＲＳＦ２１に免疫特異的に結合する本発明の抗体は、少なくとも$10^5M^{-1}s^{-1}$、少なくとも$2\times10^5M^{-1}s^{-1}$、少なくとも$5\times10^5M^{-1}s^{-1}$、少なくとも$10^6M^{-1}s^{-1}$、少なくとも$5\times10^6M^{-1}s^{-1}$、少なくとも$10^7M^{-1}s^{-1}$、少なくとも$5\times10^7M^{-1}s^{-1}$又は少なくとも$10^8M^{-1}s^{-1}$の会合速度定数又はk_{on}（又はk_a）速度（抗体＋抗原（Ａｇ）$^{k}{}_{on}$←抗体－Ａｇ）を有し得る。

【０１４６】

別の実施形態において、決定因子、例えば、ＴＮＦＲＳＦ２１に免疫特異的に結合する本発明の抗体は、$10^{-1}s^{-1}$未満、$5\times10^{-1}s^{-1}$未満、$10^{-2}s^{-1}$未満、$5\times10^{-2}s^{-1}$未満、$10^{-3}s^{-1}$未満、$5\times10^{-3}s^{-1}$未満、$10^{-4}s^{-1}$未満、$5\times10^{4}s^{-1}$未満、$10^{-5}s^{-1}$未満、$5\times10^{-5}s^{-1}$未満、$10^{-6}s^{-1}$未満、$5\times10^{-6}s^{-1}$未満、$10^{-7}s^{-1}$未満、$5\times10^{-7}s^{-1}$未満、$10^{-8}s^{-1}$未満、$5\times10^{-8}s^{-1}$未満、$10^{-9}s^{-1}$未満、$5\times10^{-9}s^{-1}$未満又は$10^{-10}s^{-1}$未満の解離速度定数又はk_{off}（又はk_d）速度（抗体＋抗原（Ａｇ）$^{k}{}_{off}$←抗体－Ａｇ）を有し得る。

【０１４７】

結合親和性は、当該技術分野で公知の様々な技術、例えば、表面プラズモン共鳴、バイオレイヤー干渉法、二面偏波式干渉法、静的光散乱法、動的光散乱法、等温滴定型カロリメトリー、ＥＬＩＳＡ、超遠心分析法及びフローサイトメトリを使用して決定され得る。

【０１４８】

Ｅ．ビニング（Ｂｉｎｎｉｎｇ）及びエピトープマッピング

本明細書に開示された抗体は、それらが会合する個別のエピトープの観点で特徴付けることができる。「エピトープ」は、抗体又は免疫反応性断片が特異的に結合する決定因子の部分である。免疫特異的結合は、上記の結合親和性に基づいて又はタンパク質及び／若しくは巨大分子の複雑な混合物における（例えば、競合アッセイにおける）その標的抗原の抗体による優先的な認識により、確認し、定義することができる。「線状エピトープ」

は、抗体の免疫特異的結合を可能にする、抗原における連続的アミノ酸により形成される。線状エピトープに優先的に結合する能力は、一般に、抗原が変性されたときでも維持される。逆に、「立体エピトープ」は、通常、抗原のアミノ酸配列における非連続的アミノ酸であるが、抗原の二次的、三次的又は四次的構造の概念において、単一の抗体に同時に結合されるために十分に近接している非連続的アミノ酸を含む。立体エピトープを有する抗原が変性されたとき、通常、抗体はもはや抗原を認識しない。エピトープ（連続的又は非連続的）は、特有の空間的立体配置に、通常少なくとも３個、より一般的には少なくとも５個又は８～１０個又は１２～２０個のアミノ酸を含む。

【０１４９】

本発明の抗体は、それらが属する群又は「ビン（ｂｉｎ）」の観点で特徴付けることもできる。「ビニング」は、免疫原性決定因子に同時に結合することができない抗体の対を同定し、それによって結合について「競合する」抗体を同定する、競合的抗体結合アッセイの使用を指す。抗体の競合は、試験される抗体又は免疫学的に機能的な断片が、共通の抗原に対する参照抗体の特異的結合を予防又は阻害するアッセイによって決定され得る。そのようなアッセイは、典型的には、固体表面又は細胞、非標識試験抗体及び標識参照抗体に結合した精製抗原（例えば、ＴＮＦＲＳＦ２１又はこのドメイン若しくは断片）の使用が含まれる。競合阻害は、試験抗体の存在下に固体表面又は細胞に結合した標識の量を決定することにより測定される。競合的結合を決定するための方法に関するさらなる詳細は、本明細書に記載の実施例で提供される。通常、競合抗体が過剰に存在するとき、競合抗体は、参照抗体の共通抗原に対する特異的な結合を、少なくとも３０％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％又は７５％阻害する。いくつかの例において、結合は、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％又は９７％以上阻害される。逆に、参照抗体が結合しているとき、参照抗体は、後で添加する試験抗体（つまり、ＴＮＦＲＳＦ２１抗体）の結合を、好ましくは、少なくとも、３０％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％又は７５％阻害する。いくつかの例において、試験抗体の結合は、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％又は９７％以上阻害される。

【０１５０】

一般に、ビニング又は競合結合は、当該技術分野で認識されている様々な技術、例えば、イムノアッセイ、例えば、ウェスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降反応、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体結合アッセイ、免疫放射定量測定アッセイ、蛍光イムノアッセイ及びタンパク質Ａイムノアッセイを使用して決定され得る。このようなイムノアッセイは慣例であり、当該技術分野で周知である（Ａｕｓｕｂｅｌら編（１９９４）Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、１巻、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ＆Ｓｏｎ，Ｉｎｃ.、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ参照）。さらに、交差ブロックアッセイを使用することができる（例えば、ＷＯ２００３／４８７３１；及びＨａｒｌｏｗら（１９８８）Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ、Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ、Ｅｄ Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｄａｖｉｄ Ｌａｎｅ参照）。

【０１５１】

競合的阻害（したがって「ビン」）を決定するために使用される他の技術としては、例えば、ＢＩＡｃｏｒｅ（商標）２０００システム（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を使用した表面プラズモン共鳴；例えば、ＦｏｒｔｅＢｉｏ（登録商標）Ｏｃｔｅｔ ＲＥＤ（ＦｏｒｔｅＢｉｏ）を使用したバイオレイヤー干渉法；又は、例えば、ＦＡＣＳＣａｎｔｏ ＩＩ（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）若しくはマルチプレックスＬＵＭＩＮＥＸ（商標）検出アッセイ（Ｌｕｍｉｎｅｘ）を使用したフローサイトメトリビーズアレイが挙げられる。

【０１５２】

Ｌｕｍｉｎｅｘは、大規模マルチプレックス抗体対合を可能にするビーズベースのイムノアッセイプラットフォームである。アッセイは、抗体の対の標的抗原への同時結合パタ

ーンを比較する。抗体の対の１つ（捕捉ｍＡｂ）がＬｕｍｉｎｅｘビーズに結合し、一方でそれぞれの捕捉ｍＡｂは異なる色のビーズに結合する。他の抗体（検出因子ｍＡｂ）は、蛍光シグナル（例えば、フィコエリトリン（ＰＥ））に結合する。アッセイは、抗原に対する抗体の同時結合（対合）を解析し、同様の対合プロファイルを有する抗体とともに群分けする。検出因子ｍＡｂ及び捕捉ｍＡｂの同様のプロファイルは、２つの抗体が同じか又は密接に関連したエピトープに結合することを示す。一実施形態において、対合プロファイルは、Ｐｅａｒｓｏｎ相関係数を使用して決定され、試験される一連の抗体の任意の特定の抗体に最も密接に相関する抗体を同定することができる。実施形態において、抗体の対のＰｅａｒｓｏｎ相関係数が少なくとも０．９である場合、試験／検出因子ｍＡｂは、参照／捕捉ｍＡｂと同じビンにあると決定される。他の実施形態において、Ｐｅａｒｓｏｎ相関係数は、少なくとも０．８、０．８５、０．８７又は０．８９である。さらなる実施形態において、Ｐｅａｒｓｏｎ相関係数は、少なくとも０．９１、０．９２、０．９３、０．９４、０．９５、０．９６、０．９７、０．９８、０．９９又は１である。Ｌｕｍｉｎｅｘアッセイから得られたデータを解析する他の方法は、Ｕ．Ｓ．Ｐ．Ｎ．８，５６８，９９２に記載されている。同時に１００種類（又はそれ以上）の異なるビーズを解析するＬｕｍｉｎｅｘの能力により、ほぼ無制限の抗原及び／又は抗体表面が用意され、バイオセンサーアッセイ上の抗体エピトーププロファイリングにおいて改善された処理能力及び解像度がもたらされる（Ｍｉｌｌｅｒら、２０１１、ＰＭＩＤ：２１２２３９７０）。

【０１５３】

同様に、表面プラズモン共鳴を含むビニング技術は、本発明に適合する。本明細書で使用されるとき、「表面プラズモン共鳴」は、バイオセンサーマトリックス内のタンパク質濃度の変化を検出することにより、特異的相互作用のリアルタイム解析を可能にする光学的現象を指す。ＢＩＡｃｏｒｅ（商標）２０００システムのような市販の機器を使用して、選択された抗体が、定義された抗原に対する結合に関して互いに競合するか否かを容易に決定することができる。

【０１５４】

他の実施形態において、試験抗体が結合に関して参照抗体と「競合する」かを決定するために使用し得る技術は「バイオレイヤー干渉法」である。この干渉法は、２つの表面、つまりバイオセンサーチップ上に固定化されたタンパク質の層及び内部参照層から反射される白色光の干渉パターンを解析する光学的解析技術である。バイオセンサーチップに結合した分子の数の任意の変化は、リアルタイムで測定され得る干渉パターンのシフトを引き起こす。このようなバイオレイヤー干渉法アッセイは、ＦｏｒｔｅＢｉｏ（登録商標）Ｏｃｔｅｔ　ＲＥＤ機器を使用して以下のように実施され得る。参照抗体（Ａｂ１）を、抗マウス捕捉チップ上に捕捉させ、次いで、高濃度の非結合抗体を使用して、チップをブロックし、ベースラインを収集する。単量体の組換え標的タンパク質を、次いで特異的抗体（Ａｂ１）に捕捉させ、チップを対照と同じ抗体（Ａｂ１）を含むウェル中又は異なる試験抗体（Ａｂ２）を含むウェル中に浸漬させる。結合レベルを対照Ａｂ１と比較して決定して、さらなる結合が生じない場合、Ａｂ１及びＡｂ２は「競合する」抗体と決定される。Ａｂ２でさらなる結合が観察された場合、Ａｂ１及びＡｂ２は互いに競合しないと決定される。このプロセスは、固有のビンを示す９６ウェルのプレート中の抗体の完全な列を使用して、固有の抗体の大きなライブラリをスクリーニングするために拡大され得る。実施形態において、参照抗体が共通の抗原に対する試験抗体の特異的結合を少なくとも４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％又は７５％阻害する場合、試験抗体は参照抗体と競合する。他の実施形態において、結合は、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％又は９７％以上阻害される。

【０１５５】

競合抗体の群を包含するビンが定義されたら、この抗体の群が結合する抗原上の特異的ドメイン又はエピトープを決定するために、さらなる特徴付けを実施してもよい。ドメイン－レベルエピトープマッピングは、Ｃｏｃｈｒａｎら、２００４、ＰＭＩＤ：１５０９

９７６３に記載されているプロトコルを改変して使用することにより実施され得る。ファインエピトープマッピングは、抗体が結合する決定因子のエピトープを含む抗原上の特異的アミノ酸を決定するプロセスである。

【０１５６】

ある特定の実施形態において、ファインエピトープマッピングは、ファージ又は酵母ディスプレイを使用して実施することができる。他の適合エピトープマッピング技術としては、アラニンスキャニング変異体、ペプチドブロット（Ｒｅｉｎｅｋｅ、２００４、ＰＭＩＤ：１４９７０５１３）又はペプチド切断解析が挙げられる。さらに、エピトープ除去、エピトープ抽出及び抗原の化学的修飾のような方法（Ｔｏｍｅｒ、２０００、ＰＭＩＤ：１０７５２６１０）も、タンパク分解酵素のような酵素（例えば、トリプシン、エンドプロテイナーゼＧｌｕ－Ｃ、エンドプロテイナーゼＡｓｐ－Ｎ、キモトリプシンなど）；スクシンイミジルエステル及びそれらの誘導体、一級アミン含有化合物、ヒドラジン及びカルボヒドラジン、遊離アミノ酸のような化学物質を使用して利用することができる。別の実施形態において、抗原構造ベースの抗体プロファイリング（Ａｎｔｉｇｅｎ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ－ｂａｓｅｄ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｐｒｏｆｉｌｉｎｇ、ＡＳＡＰ）としても公知の修飾補助プロファイリング（Ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ Ａｓｓｉｓｔｅｄ Ｐｒｏｆｉｌｉｎｇ）を使用して、化学的又は酵素的に修飾された抗原表面に対する各抗体の結合プロファイルの類似性に従って、同じ抗原に向かう多数のモノクローナル抗体を分類することができる（Ｕ．Ｓ．Ｐ．Ｎ．２００４／０１０１９２０）。

【０１５７】

抗原上の所望のエピトープが決定されたら、このエピトープに対するさらなる抗体を、例えば、本明細書に記載の技術を使用して、選択されたエピトープを含むペプチドで免疫化することにより、生成することができる。

【０１５８】

Ｖ．抗体コンジュゲート

いくつかの実施形態において、本発明の抗体は、薬学的に活性な又は診断的成分とコンジュゲートして、「抗体薬物コンジュゲート」（ＡＤＣ）又は「抗体コンジュゲート」を形成し得る。用語「コンジュゲート」は広義に使用され、会合の方法にかかわらず、任意の薬学的に活性な又は診断的成分と本発明の抗体との共有結合的又は非共有結合的会合を意味する。ある特定の実施形態において、この会合は、抗体のリシン又はシステイン残基を通じて達成される。いくつかの実施形態において、薬学的に活性な又は診断的成分は、１つ以上の部位特異的な遊離システインを介して抗体にコンジュゲートされ得る。開示されるＡＤＣは、治療及び診断目的のために使用され得る。

【０１５９】

本発明のＡＤＣを使用して、所定の弾頭を、標的位置（例えば、腫瘍形成性細胞及び／又はＴＮＦＲＳＦ２１を発現している細胞）に選択的に送達し得ることが理解される。本明細書において示される場合、用語「薬物」又は「弾頭」は、相互に交換可能に使用され得、任意の生物学的活性体（例えば、薬学的活性化合物又は治療成分）、又は対照に導入されると、生理学的作用又はレポーター機能を有する、検出可能な分子若しくは化合物を意味する。誤解を避けると、このような弾頭には、以下に記載されている抗がん剤又は細胞毒が含まれる。「ペイロード」は、ＡＤＣが標的に到達するまで、比較的安定な医薬品複合体を好ましくはもたらす、任意選択のリンカー化合物（例えば、治療用ペイロード）と組み合わせた薬物又は弾頭を含み得る。例として、コンジュゲート上の弾頭又は薬物は、ペプチド、タンパク質、又はインビボで代謝されて活性薬剤となるプロドラッグ、ポリマー、核酸分子、小分子、結合剤、模倣剤、合成薬物、無機分子、有機分子及び放射性同位体を含み得る。ある特定の実施形態において、薬物又は弾頭は、リンカーによって共有結合により、抗体にコンジュゲートされる。他の実施形態（例えば、放射性同位体）において、薬物又は弾頭は、抗体に直接コンジュゲートされるか、又は抗体に組み込まれる。

【０１６０】

好ましい実施形態において、開示されるＡＤＣは、結合したペイロード（例えば、薬物

リンカー）を、弾頭の放出及び活性化の前に、比較的非反応性の非毒性状態で標的部位に向かわせる（例えば、オーリスタチン、ドラスタチン、カリケアマイシン、ＰＢＤなど）。弾頭のこの標的化放出は、ペイロードの安定なコンジュゲーション（例えば、抗体上の１つ以上のシステイン又はリシンを介する）及び過剰にコンジュゲートされた毒性ＡＤＣ種を最小にするＡＤＣ調製物の比較的均質な組成物を通じて、好ましくは達成される。本発明のコンジュゲートは、弾頭を大量に放出するように設計された薬物リンカーと結合されて腫瘍部位に送達されると、望ましくない非特異的な毒性を実質的に低減することができる。これにより、腫瘍部位で比較的高レベルの活性な細胞毒が、非標的化細胞及び組織への曝露を最小にしつつ有利に提供され、これにより増強した治療指数が提供される。

【０１６１】

本発明のいくつかの実施形態は、治療成分（例えば、細胞毒）が組み込まれたペイロードを含むが、診断剤及び生体適合性修飾剤が組み込まれた他のペイロードも、開示されるコンジュゲートにより、提供される標的化送達から利益を得る場合があることが理解される。したがって、例示的な治療的ペイロードに関する任意の開示は、文脈による他の指示がない限り、本明細書に述べられている診断剤又は生体適合性修飾剤を含むペイロードにも適用可能である。選択されたペイロードは、共有結合的に又は非共有結合的に抗体に連結することができ、少なくとも部分的にコンジュゲーションを達成するために使用される方法に依存して、様々な化学量論的モル比率を示し得る。

【０１６２】

本発明のコンジュゲートは一般的に、式：

Ａｂ－［Ｌ－Ｄ］ｎ

（式中、

ａ）Ａｂは、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体を含み、

ｂ）Ｌは、任意選択のリンカーを含み、

ｃ）Ｄは、薬物を含み、

ｄ）ｎは、約１から約２０の整数である）

又はその薬学的に許容される塩によって表され得る。

【０１６３】

当業者は、前述の式によるコンジュゲートは、いくつかの異なるリンカー及び薬物を使用して作製することができ、コンジュゲーション方法は、成分の選択により様々であることを理解する。このように、開示される抗体の反応性残基（例えば、システイン又はリシン）と会合する任意の薬物又は薬物リンカー化合物は、本明細書における教示と適合する。同様に、選択される薬物の抗体に対するコンジュゲーション（部位特異的コンジュゲーションを含む）を可能にする任意の反応条件は、本発明の範囲内である。前記にかかわらず、本発明のいくつかの好ましい実施形態は、薬物又は薬物リンカーの遊離システインとの、本明細書に記載の穏やかな還元剤と組み合わせた安定化剤を使用した選択的なコンジュゲーションを含む。このような反応条件は、非特異的コンジュゲーション及び混入物がより少なく、したがって毒性が少ない、より均質な調製物を提供する傾向がある。

【０１６４】

Ａ．　弾頭

１．治療剤

本明細書において議論されている通り、本発明の抗体は、治療成分又は抗がん剤のような薬物を含む、任意の薬学的活性化合物（これらに限定されないが、細胞毒性剤（又は細胞毒）、細胞分裂停止剤、抗血管新生剤、減量剤、化学治療剤、放射性治療剤、標的化抗がん剤、生物学的応答修飾剤、がんワクチン、サイトカイン、ホルモン療法、抗転移剤及び免疫療法剤を含む）と、コンジュゲート、連結、又は融合又は他の方法で会合されてもよい。

【０１６５】

例示的な抗がん剤又は細胞毒（それらのホモログ及び誘導体を含む）としては、１－デヒドロテストステロン、アントラマイシン、アクチノマイシンＤ、ブレオマイシン、カリ

ケアマイシン（ｎ－アセチルカリケアマイシンを含む）、コルヒチン、シクロホスファミド、サイトカラシンＢ、ダクチノマイシン（以前のアクチノマイシン）、ジヒドロキシアントラシン、ジオン、デュオカルマイシン、エメチン、エピルビシン、臭化エチジウム、エトポシド、グルココルチコイド、グラミシジンＤ、リドカイン、ＤＭ－１及びＤＭ－４（免疫原）のようなマイタンシノイド、ベンゾジアゼピン誘導体（免疫原）、ミトラマイシン、マイトマイシン、ミトキサントロン、パクリタキセル、プロカイン、プロプラノロール、ピューロマイシン、テニポシド（ｔｅｎｏｐｏｓｉｄｅ）、テトラカイン並びに上記のいずれかの薬学的に許容される塩若しくは溶媒和物、酸、若しくは誘導体が挙げられる。ある特定の選択された実施形態において、細胞毒は、カリケアマイシン（ｎ－アセチルカリケアマイシンを含む）、ドラスタチン、オーリスタチン又はピロロベンゾジアゼピン（ＰＢＤ）を含む。

【０１６６】

さらなる適合細胞毒は、ドラスタチン及びオーリスタチン類、例えば、モノメチルオーリスタチンＥ（ＭＭＡＥ）及びモノメチルオーリスタチンＦ（ＭＭＡＦ）（Ｓｅａｔｔｌｅ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ）、アマニチン類、例えば、α－アマニチン、β－アマニチン、γ－アマニチン又はε－アマニチン（Ｈｅｉｄｅｌｂｅｒｇ　Ｐｈａｒｍａ）、ＤＮＡ副溝結合剤、例えば、デュオカルマイシン誘導体（Ｓｙｎｔａｒｇａ）、アルキル化剤、例えば、修飾若しくは二量体ピロロベンゾジアゼピン類（ＰＢＤ）、メクロレタミン、チオテパ、クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン（ＢＣＮＵ）、ロムスチン（ＣＣＮＵ）、シクロホスファミド（ｃｙｃｌｏｔｈｏｓｐｈａｍｉｄｅ）、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンＣ及びシスジクロロジアミン白金（ＩＩ）（ＤＤＰ）シスプラチン、スプライシング阻害剤、例えば、メアヤマイシン類似体又は誘導体（例えば、Ｕ．Ｓ．Ｐ．Ｎ．７，８２５，２６７に示されるＦＲ９０１４６４）、チューブリン（ｔｕｂｕｌａｒ）結合剤、例えば、エポチロン類似体及びチューブリシン、パクリタキセル及びＤＮＡ損傷剤、例えば、カリケアマイシン及びエスペラミシン、抗代謝物質、例えば、メトトレキサート、６－メルカプトプリン、６－チオグアニン、シタラビン及び５－フルオロウラシル　デカルバジン、抗有糸分裂剤、例えば、ビンブラスチン及びビンクリスチン及びアントラサイクリン類、例えば、ダウノルビシン（以前のダウノマイシン）及びドキソルビシン並びに上記のいずれかの薬学的に許容される塩又は溶媒和物、酸又は誘導体を含む。

【０１６７】

選択された実施形態において、本発明の抗体は、細胞傷害性Ｔ細胞を動員し、腫瘍形成性細胞に標的化させるために、抗ＣＤ３結合分子と会合され得る（ＢｉＴＥ　ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ；例えば、Ｆｕｈｒｍａｎｎら、（２０１０）Ａｎｎｕａｌ　Ｍｅｅｔｉｎｇ　ｏｆ　ＡＡＣＲ要約番号５６２５を参照）。

【０１６８】

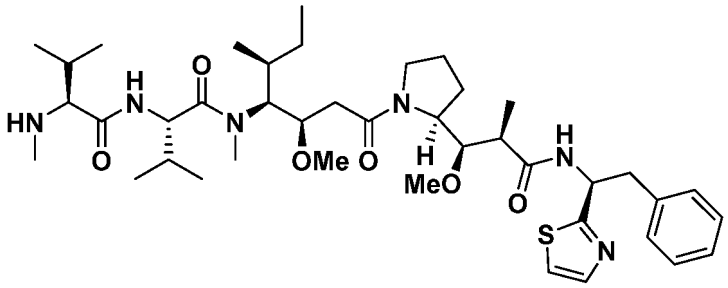
さらなる実施形態において、本発明のＡＤＣは、適切なリンカーを使用してコンジュゲートされる治療用放射性同位体を含む細胞毒を含んでもよい。このような実施形態に適合し得る例示的な放射性同位体としては、これらに限定されないが、ヨウ素（^{131}Ｉ、^{125}Ｉ、^{123}Ｉ、^{121}Ｉ）、炭素（^{14}Ｃ）、銅（^{62}Ｃｕ、^{64}Ｃｕ、^{67}Ｃｕ）、硫黄（^{35}Ｓ）、ラジウム（^{223}Ｒ）、トリチウム（^{3}Ｈ）、インジウム（^{115}Ｉｎ、^{113}Ｉｎ、^{112}Ｉｎ、^{111}Ｉｎ）、ビスマス（^{212}Ｂｉ、^{213}Ｂｉ）、テクネチウム（^{99}Ｔｃ）、タリウム（^{201}Ｔｉ）、ガリウム（^{68}Ｇａ、^{67}Ｇａ）、パラジウム（^{103}Ｐｄ）、モリブデン（^{99}Ｍｏ）、キセノン（^{133}Ｘｅ）、フッ素（^{18}Ｆ）、^{153}Ｓｍ、^{177}Ｌｕ、^{159}Ｇｄ、^{149}Ｐｍ、^{140}Ｌａ、^{175}Ｙｂ、^{166}Ｈｏ、^{90}Ｙ、^{47}Ｓｃ、^{186}Ｒｅ、^{188}Ｒｅ、^{142}Ｐｒ、^{105}Ｒｈ、^{97}Ｒｕ、^{68}Ｇｅ、^{57}Ｃｏ、^{65}Ｚｎ、^{85}Ｓｒ、^{32}Ｐ、^{153}Ｇｄ、^{169}Ｙｂ、^{51}Ｃｒ、^{54}Ｍｎ、^{75}Ｓｅ、^{113}Ｓｎ、^{117}Ｓｎ、^{76}Ｂｒ、^{211}Ａｔ及び^{225}Ａｃが挙げられる。他の放射性核種も診断剤及び治療剤として利用可能であり、特にエネルギー範囲６０から４，０００ｋｅＶのものを利用し得る。

【０１６９】
いくつかの実施形態において、本発明のＡＤＣは、ＰＢＤ及びその薬学的に許容される塩又は溶媒和物、酸又は誘導体を、弾頭として含み得る。ＰＢＤは、ＤＮＡの副溝に共有結合することにより抗腫瘍活性を発揮し、核酸合成を阻害するアルキル化剤である。ＰＢＤは、強力な抗腫瘍特性を有する一方で、最小の骨髄抑制を示すことが示されてきた。本発明に適合するＰＢＤは、いくつかの種類のリンカー（例えば、遊離のスルフヒドリルを有するマレイミド部分を含むペプチジルリンカー）を使用して抗体に連結されてもよく、ある特定の実施形態では二量体の形態である（すなわち、ＰＢＤ二量体）。開示される抗体にコンジュゲートさせ得る適合ＰＢＤ（及び任意選択のリンカー）は、例えば、Ｕ．Ｓ．Ｐ．Ｎ．６，３６２，３３１、７，０４９，３１１、７，１８９，７１０、７，４２９，６５８、７，４０７，９５１、７，７４１，３１９、７，５５７，０９９、８，０３４，８０８、８，１６３，７３６、２０１１／０２５６１５７及びＰＣＴ出願ＷＯ２０１１／１３０６１３、ＷＯ２０１１／１２８６５０、ＷＯ２０１１／１３０６１６、ＷＯ２０１４／０５７０７３及びＷＯ２０１４／０５７０７４に記載されている。

【０１７０】
他の選択された実施形態において、本発明のＡＤＣは、細胞毒性ベンゾジアゼピン誘導体弾頭にコンジュゲートされる。本開示の抗体にコンジュゲートされ得る適合ベンゾジアゼピン誘導体（及び任意選択のリンカー）は、例えば、Ｕ．Ｓ．Ｐ．Ｎ．８，４２６，４０２並びにＰＣＴ出願ＷＯ２０１２／１２８８６８及びＷＯ２０１４／０３１５６６に記載されている。ＰＢＤと同様に、適合ベンゾジアゼピン誘導体は、ＤＮＡの副溝に結合し、核酸合成を阻害すると考えられる。このような化合物は、強力な抗腫瘍特性を有することが報告され、したがって、本発明のＡＤＣに用いるのにとりわけ適している。

【０１７１】
上で示されているように、ある特定の態様において、本発明のＡＤＣは、ドラスタチン弾頭を含む。適合ドラスタチンは、ドラスタチン１０とドラスタチン１５の両方を含み、これらはそれぞれ、モノメチル類似体（例えば、モノメチルドラスチン１０）の形態とすることができる。ドラスタチン１０及びドラスタチン１５は、インド洋のアメフラシである、ドルラベルラ・アウリクラリア（Ｄｏｌｌａｂｅｌｌａ　ａｕｒｉｃｕｌａｒｉａ）から単離された海洋天然産物である。小さな線状ペプチド分子である、ドラスタチン１０及び１５はどちらも、様々な腫瘍に対して活性を示す有望な抗がん薬と考えられている。ドラスタチンは、微小管組立てを干渉する有糸分裂阻害剤であり、これにより、チューブリン凝集体の形成及び有糸分裂の阻害をもたらす。この薬剤はまた、一部のがんにおいて過剰発現する腫瘍性タンパク質である、ｂｃｌ－２を含む機構により、腫瘍細胞アポトーシスも誘発する。適合弾道であるモノメチルドラスタチン１０及びドラスタチン１５の構造は、直下に示されている：

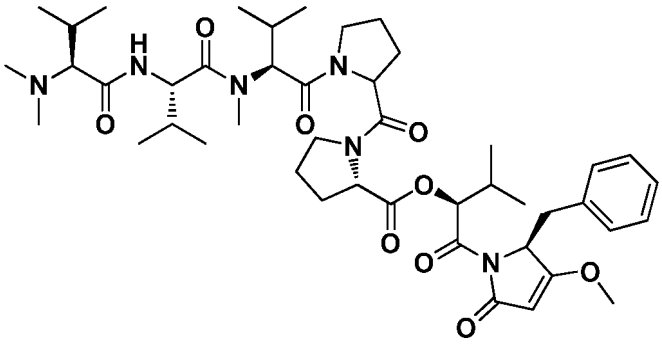
【０１７２】
【化１０】



モノメチルドラスタチン10弾頭（MMD10）：

【０１７３】

【化１１】



ドラスタチン15弾頭（DMD15）：

【０１７４】

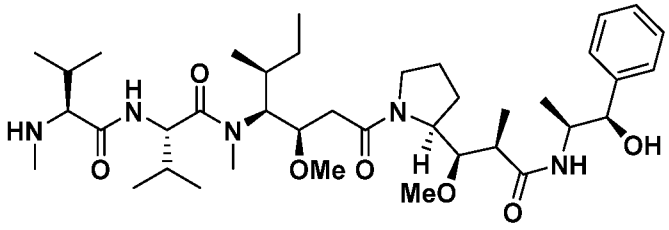
ジメチルドラスタチン弾頭及びモノメチルドラスタチン弾頭のどちらも、開示されるＡＤＣと適合可能であり、本発明の範囲内（例えば、モノメチルドラスタチン１０、モノメチルドラスタチン１５、ジメチルドラスタチン１０及びジメチルドラスタチン１５）にあるものとして明示的に企図されていることが理解される。

【０１７５】

ドラスタチンに加えて、本明細書における教示に適合可能な弾頭は、オーリスタチンを含み得ることがさらに理解される。当該技術分野において周知の通り、ドラスタチンは、構造的に修飾されて、ある特定の場合に、臨床的開発に適した、等しく有効な誘導体である、密接に関連するオーリスタチンをもたらす。これらの合成剤は、α－チューブリン上のビンカアルカロイド結合部位と相互作用して、この重合を遮断し、分裂装置の形成を防止する。特に、適合オーリスタチンは、モノメチルオーリスタチンＥ（ＭＭＡＥ）及びモノメチルオーリスタチンＦ（ＭＭＡＦ）を含み、これらの構造は直下に示されている：

【０１７６】

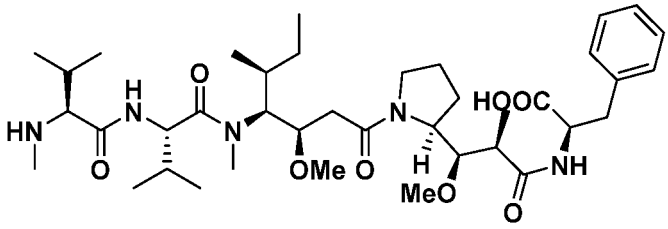
【化１２】



MMAE 弾頭

【０１７７】

【化１３】



MMAF 弾頭

【０１７８】

ドラスタチンに関して、ジメチルオーリスタチン及びモノメチルオーリスタチン弾頭のどちらも、開示されるＡＤＣと適合可能であり、本発明の範囲内（例えば、モノメチルオ

ーリスタチンＥ、モノメチルオーリスタチンＦ、ジメチルオーリスタチンＥ及びジメチルオーリスタチンＦ）にあるものとして明示的に企図されていることが理解される。

【０１７９】

本明細書における教示によれば、上述のドラスタチン弾頭及びオーリスタチン弾頭のそれぞれが、標的細胞による内在化及びリンカーの破壊の際に放出されることが好ましいことが理解される。下記においてさらに詳細に記載されているように、ある特定のリンカーは、リンカーのいかなる部分も保持することなく、活性な弾頭（例えば、ＭＭＤ１０又はＭＭＡＥ）の放出を可能にする自己崩壊部分を組み込むことができる切断可能リンカーを含む。

【０１８０】

他の好ましい実施形態において、弾頭は、カリケアマイシンを含む。すなわち、本発明のＴＮＦＲＳＦ２１　ＡＤＣは、式Ａｂ－［Ｌ－Ｄ］ｎ又は薬学的に許容されるこの塩を含むことができ、Ｄは、カリケアマイシン、又は本明細書において提供される式のいずれかにおけるこの類似体である。当該技術分野において公知の通り、カリケアマイシンは、細菌のカリケアマイシンγ_1^I、カリケアマイシンβ_1^{Br}、カリケアマイシンγ_1^{Br}、カリケアマイシンα_2^I、カリケアマイシンα_3^I、カリケアマイシンβ_1^i及びカリケアマイシンδ_1^iを含めた、マイクロモノスポラ・エキノスポラ（Ｍｉｃｒｏｍｏｎｏｓｐｏｒａ　ｅｃｈｉｎｏｓｐｏｒａ）から誘導される、エンジイン抗腫瘍抗生物質のクラスであり、単離及び同定されている。上述のカリケアマイシン類似体の各々の構造は、当分野において周知であり（例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれている、Ｌｅｅら、Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ａｎｔｉｂｉｏｔｉｃｓ、１９８９年７月を参照）、本明細書において開示されているカリケアマイシン薬物リンカー構築物及び抗体薬物コンジュゲートと適合可能である。

【０１８１】

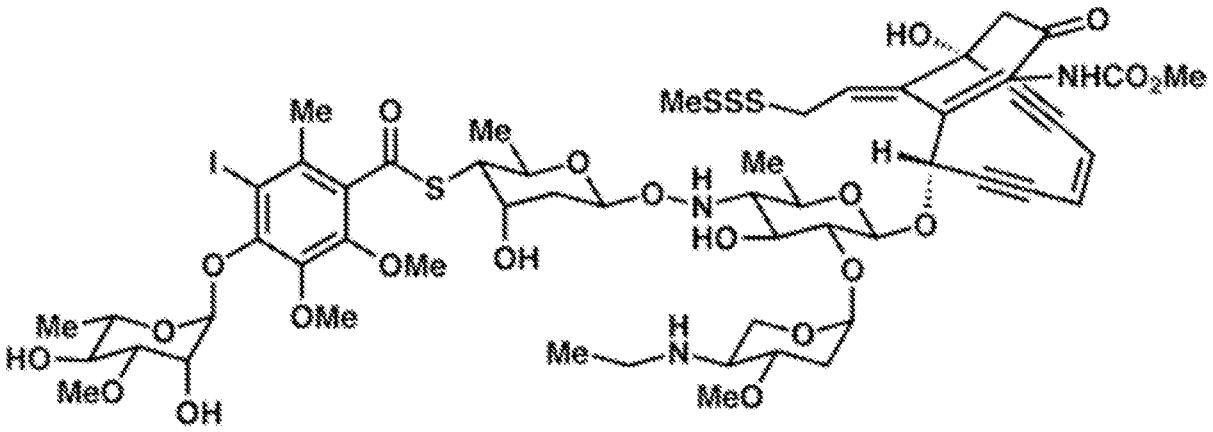
一般に、カリケアマイシンγ^1は、２つの個別の構造領域を含み、各々が、この化合物の生物活性において特異的な役割を果たしている。これらの２つのうちの大きい方が、４つの単糖単位及び１つの六置換ベンゼン環を含む、鎖長の延びた糖残基からなる。これらは、かなり稀な一連のグリコシド連結基、チオエステル連結基及びヒドロキシルアミン連結基により一緒に結合している。第２の構造の領域であるアグリコン（カリケアマイシノンとして知られている）は、架橋１０員環内に歪んだエンジイン単位を収容している、高度に官能化された、小さくまとまった二環式コアを含有する。このアグリコンサブユニットは、アリルトリスルフィドをさらに含み、これは、以下に記載する通り、アクチベーターとして機能し、分子の細胞毒性形態を生成する。

【０１８２】

例として、トリスルフィドカリケアマイシンγ_1^Iの構造が、直下に示されている：

【０１８３】

【化１４】



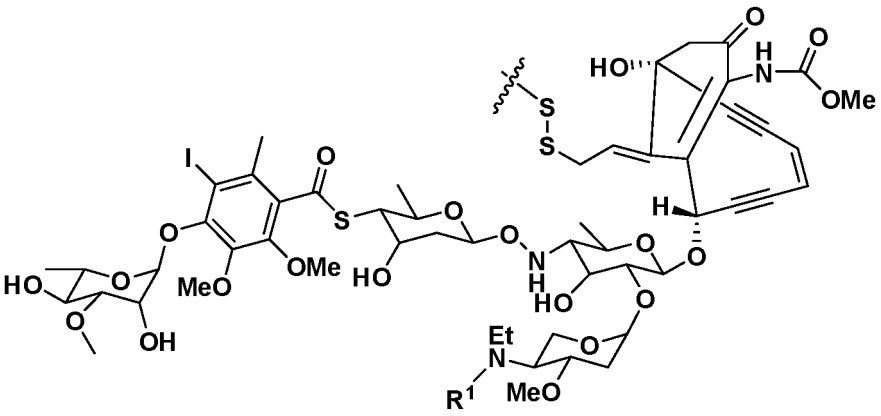
カリケアマイシンγ１

【０１８４】

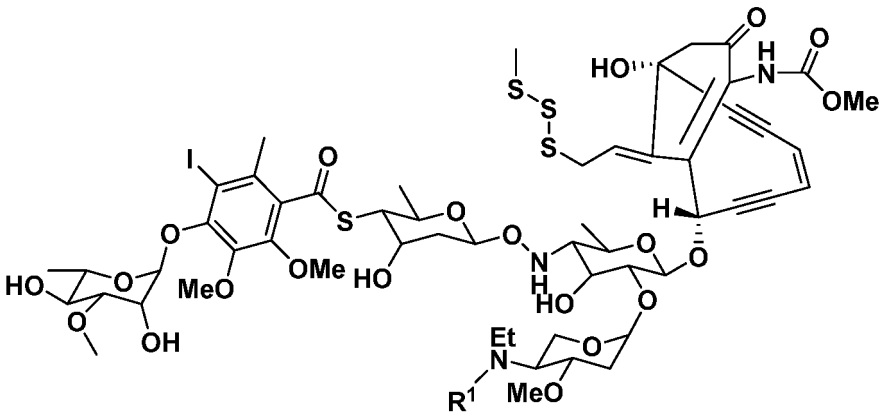
本明細書において使用する場合、用語「カリケアマイシン」は、カリケアマイシンγ_1^I、カリケアマイシンβ_1^{Br}、カリケアマイシンγ_1^{Br}、カリケアマイシンα_2^I、カリケアマイシンα_3^I、カリケアマイシンβ_1^i及びカリケアマイシンδ_1のいずれか１つを、Ｎ－アセチル誘導体、スルフィド類似体及びこれらの類似体と共に、意味するとみなされるものとする。したがって、本明細書において使用する場合、用語「カリケアマイシン」は、天然に見出されるいずれのカリケアマイシン、及び別の分子（例えば、抗体薬物コンジュゲート）及びこの類似体への結合点を有するジスルフィド結合を有するカリケアマイシン分子を包含することが理解される。例として、本明細書において使用される場合、カリケアマイシンγ^Iは、以下の分子：

【０１８５】

【化１５】



及び



（式中、Ｒ^{1}は、以下の通り定義される）を含むものと解釈されることを理解すべきである。

【０１８６】

上述の化合物のいずれも、本明細書における教示と適合し、開示されたカリケアマイシン薬物リンカー構築物及び抗体薬物コンジュゲートを作製するために使用され得ることが理解される。ある特定の実施形態において、開示される抗体薬物コンジュゲートのカリケアマイシン成分は、Ｎ－アセチルカリケアマイシンγ$_{1}^{I}$を含む。

【０１８７】

カリケアマイシンは核酸を標的して、鎖分断を引き起こし、これにより標的細胞を殺傷する。より詳細には、カリケアマイシンは、ＤＮＡの副溝に結合することが見出されており、この場合、カリケアマイシンは、次に、Ｂｅｒｇｍａｎ環化に類似した反応を受けて、ジラジカル種を生成する。この点において、Ｃｒｏｔｈｅｒｓら（１９９９年）により実証されている通り、アリールテトラサッカライドサブユニットは、この標的に薬物を送達する働きをして、二重螺旋ＤＮＡの副溝に強く結合する。求核剤（例えばグルタチオン）が、トリスルフィド基の中央硫黄原子を攻撃すると、これにより、大きな構造的幾何変化がもたらされ、エンジイン１０員環上にかなり大きな歪みをかける。この歪みは、エンジインが芳香族環化反応を受けることにより完全に解かれ、反応性が非常に高い、１，４－ベンゼノイドジラジカルを生成し、最終的に、デオキシリボースＤＮＡ主鎖から水素原子を引き抜くことによりＤＮＡ開裂に至り、これにより鎖分断がもたらされる。本発明のカリケアマイシンジスルフィド類似体構築物において、求核剤は、保護されているジスルフィド結合を開裂して、所望のジラジカルを生成することに留意されたい。

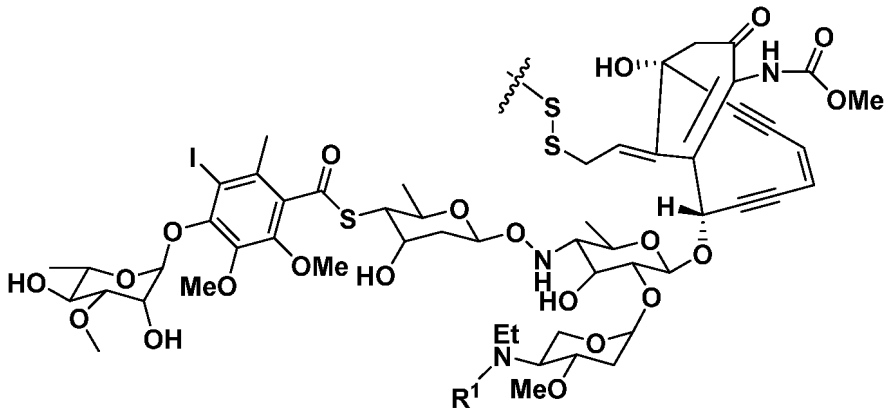
【０１８８】

より詳細には、Ｄは、当該技術分野において公知のカリケアマイシンのクラスの任意のメンバーを明示的に含むことが理解され、この場合、末端の－Ｓ－Ｓ－Ｓ－ＣＨ$_{3}$部分は

、－Ｓ－Ｓ－
【０１８９】
【化１６】

により置き換えられていてもよく、記号
【０１９０】
【化１７】

は、リンカーへの結合点を表す。
【０１９１】
したがって、ある特定の実施形態において、Ｄは、式：
【０１９２】
【化１８】



である。
【０１９３】
Ｒ^{1}は、水素、ハロゲン、置換若しくは非置換アルキル、置換若しくは非置換ヘテロアルキル、置換若しくは非置換シクロアルキル、置換若しくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換若しくは非置換アリール又は置換若しくは非置換ヘテロアリール、－ＣＦ$_{3}$、－ＣＣｌ$_{3}$、－ＣＢｒ$_{3}$、－ＣＩ$_{3}$、－ＣＮ、－Ｃ（Ｏ）Ｒ^{1E}、－ＯＲ^{1A}、－ＮＲ^{1B}Ｒ^{1C}、－Ｃ（Ｏ）ＯＲ^{1A}、－Ｃ（Ｏ）ＮＲ^{1B}Ｒ^{1C}、－ＳＲ^{1D}、－ＳＯ$_{n1}$Ｒ^{1B}又は－ＳＯ$_{v1}$ＮＲ^{1B}Ｒ^{1C}である。ある特定の選択された実施形態において、Ｒ^{1}はＨを含む。別の選択された実施形態において、Ｒ^{1}は、－Ｃ（Ｏ）ＣＨ$_{3}$を含む。
【０１９４】
Ｒ^{1A}、Ｒ^{1B}、Ｒ^{1C}、Ｒ^{1D}及びＲ^{1E}は、独立して、水素、ハロゲン、－ＣＦ$_{3}$、－ＣＣｌ$_{3}$、－ＣＢｒ$_{3}$、－ＣＩ$_{3}$、－ＯＨ、－ＮＨ$_{2}$、－ＣＯＯＨ、－ＣＯＮＨ$_{2}$、－Ｎ（Ｏ）$_{2}$、－ＳＨ、－Ｓ（Ｏ）$_{3}$Ｈ、－Ｓ（Ｏ）$_{4}$Ｈ、－Ｓ（Ｏ）$_{2}$ＮＨ$_{2}$、－ＮＨＮＨ$_{2}$、－ＯＮＨ$_{2}$、－ＮＨＣ（Ｏ）ＮＨＮＨ$_{2}$、－ＮＨＣ（Ｏ）ＮＨ$_{2}$、－ＮＨＳ（Ｏ）$_{2}$Ｈ、－ＮＨＣ（Ｏ）Ｈ、－ＮＨＣ（Ｏ）－ＯＨ、－ＮＨＯＨ、－ＯＣＦ$_{3}$、－ＯＣＣｌ$_{3}$、－ＯＣＢｒ$_{3}$、－ＯＣＩ$_{3}$、－ＯＣＨＦ$_{2}$、－ＯＣＨＣｌ$_{2}$、－ＯＣＨＢｒ$_{2}$、－ＯＣＨＩ$_{2}$、置換若しくは非置換アルキル、置換若しくは非置換ヘテロアルキル、置換若しくは非置換シクロアルキル、置換若しくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換若しくは非置換アリール又は置換若しくは非置換ヘテロアリールである。
【０１９５】
実施形態において、同一窒素原子に結合しているＲ^{1B}及びＲ^{1C}置換基は、任意選択的に、結合して、置換若しくは非置換ヘテロシクロアルキル又は置換若しくは非置換ヘテロアリールを形成してもよい。記号ｎ１は、独立して０～４の整数であり、記号ｖ１は、

独立して１又は２であり、記号
【０１９６】
【化１９】

は、リンカーへの結合点を表す。
【０１９７】
直前の式に関すると、例示されている化合物は、リンカーの残りに共有結合している、ジスルフィド保護基（
【０１９８】
【化２０】

により表される結合点における）に好ましくは結合している、ジスルフィドカリケアマイシン類似体（例えば、Ｎ－アセチルカリケアマイシン類似体）を含むことが理解される。ジスルフィド保護基は、血流中におけるジスルフィド結合の安定性を改善し、開示されたカリケアマイシン－リンカー構築物の効率的な合成を可能にする。標的（例えば、がん細胞）に到達すると、リンカーは、ジスルフィド保護結合を介してリンカー部分に結合しているカリケアマイシンを放出するよう好ましくは切断される。ある特定の実施形態において、リンカーが、ジスルフィド保護基（すなわち、カリケアマイシンから遠位にある）よりも最初に開裂すると、カリケアマイシンに結合しているリンカーの残りは、生理的条件下においてジスルフィド結合が切断される点まで（好ましくは、細胞内において）分解し、次いで活性なカリケアマイシンのジラジカル種の転位及び形成が起こる。細胞ＤＮＡの副溝に結合して、所望の細胞毒性作用を誘発するのが、カリケアマイシン弾頭のこの形態である（その全体が、参照により本明細書に組み込まれている、Ｗａｌｋｅｒら、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　８９巻：４６０８～４６１２頁、５／９２を参照）。
【０１９９】
より詳細には、カリケアマイシンジスルフィド基は、ＡＤＣが標的細胞に到達するまで、安定性（例えば、血漿安定性）をもたらす、置換若しくは非置換二官能性短鎖脂肪族基又はアリール基によって好ましくは保護される（「ジスルフィド保護基」）。この点において、ジスルフィド保護基は、カリケアマイシンジスルフィド基を、任意のリンカー（開裂可能な又は非開裂可能である）の残りに共有結合により連結する。これを行う際、ジスルフィド保護基は、ジスルフィド結合に対してある程度の立体障害をもたらし、これにより、チオール－ジスルフィド交換反応により、開裂に対するこの感受性が低下する。本開示を鑑みると、当業者は、所望の安定性をもたらし、カリケアマイシンＡＤＣの治療指数を最適化する、適合ジスルフィド保護基を容易に選択することができる（Ｋｅｌｌｏｇｇら、Ｂｉｏｃｏｎｊ．Ｃｈｅｍ、２０１１年、２２巻、７１７～７２７頁を参照）。ジスルフィド結合の安定化をもたらすさらなる方法は、参照により本明細書に組み込まれている、ＵＳＰＮ２００１００３６９２６に見出され得る。
【０２００】
前述の細胞毒性剤に加えて、本発明の抗体は、生物学的応答修飾剤にコンジュゲートされてもよい。例えば、いくつかの実施形態において、薬物成分は、所望の生物活性を有するポリペプチドとすることができる。このようなタンパク質としては、例えば、毒素、例えば、アブリン、リシンＡ、オンコナーゼ（Ｏｎｃｏｎａｓｅ）（又は別の細胞傷害性ＲＮアーゼ）、シュードモナス菌体外毒素、コレラ毒素、ジフテリア毒素；アポトーシス剤、例えば、腫瘍壊死因子、例えば、ＴＮＦα又はＴＮＦβ、α－インターフェロン、β－インターフェロン、神経成長因子、血小板由来成長因子、組織プラスミノーゲン活性化因子、ＡＩＭ　Ｉ（ＷＯ９７／３３８９９）、ＡＩＭ　ＩＩ（ＷＯ９７／３４９１１）、Ｆａｓリガンド（Ｔａｋａｈａｓｈｉら、１９９４、ＰＭＩＤ：７８２６９４７）及びＶＥＧＩ（ＷＯ９９／２３１０５）、血栓性物質（ｔｈｒｏｍｂｏｔｉｃ　ａｇｅｎｔ）、抗

血管新生剤、例えば、アンジオスタチン又はエンドスタチン、リンホカイン、例えば、インターロイキン－１（ＩＬ－１）、インターロイキン－２（ＩＬ－２）、インターロイキン－６（ＩＬ－６）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）及び顆粒球コロニー刺激因子（Ｇ－ＣＳＦ）又は成長因子、例えば、成長ホルモン（ＧＨ）が挙げられ得る。

【０２０１】

２．診断剤又は検出剤

他の実施形態において、本発明の抗体又はその断片若しくは誘導体は、例えば、生物学的分子（例えば、ペプチド又はヌクレオチド）、小分子、フルオロフォア又は放射性同位体であり得る診断剤若しくは検出剤、マーカー又はレポーターにコンジュゲートされる。標識化抗体は、過剰増殖障害の発生若しくは進行を監視するのに、又は開示する抗体（すなわち診断治療薬）を含む特定の治療の有効性を決定するための若しくは治療の今後の方針を決定するための臨床的試験手法の一部として、有用であり得る。このようなマーカー又はレポーターは、抗体分析（例えば、エピトープ結合又は抗体ビニング）に使用するための選択された抗体を精製するために、腫瘍形成性細胞を分離若しくは単離するために又は前臨床的手法若しくは毒性研究においても、有用であり得る。

【０２０２】

このような診断、解析及び／又は検出は、抗体を検出可能な物質、例えば、これらに限定されないが、様々な酵素、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、β－ガラクトシダーゼ又はアセチルコリンエステラーゼ；補欠分子族、例えば、これらに限定されないがストレプトアビジン／ビオチン及びアビジン／ビオチン；蛍光材料、例えば、これらに限定されないが、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート（ｉｓｏｔｈｉｏｃｙｎａｔｅ）、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミン　フルオレセイン、ダンシルクロリド又はフィコエリトリン；発光材料、例えば、これらに限定されないが、ルミノール；生物発光材料、例えば、これらに限定されないが、ルシフェラーゼ、ルシフェリン及びエクオリン；放射活性材料、例えば、これらに限定されないが、ヨウ素（^{131}Ｉ、^{125}Ｉ、^{123}Ｉ、^{121}Ｉ）、炭素（^{14}Ｃ）、硫黄（^{35}Ｓ）、トリチウム（^{3}Ｈ）、インジウム（^{115}Ｉｎ、^{113}Ｉｎ、^{112}Ｉｎ、^{111}Ｉｎ）、及びテクネチウム（^{99}Ｔｃ）、タリウム（^{201}Ｔｉ）、ガリウム（^{68}Ｇａ、^{67}Ｇａ）、パラジウム（^{103}Ｐｄ）、モリブデン（^{99}Ｍｏ）、キセノン（^{133}Ｘｅ）、フッ素（^{18}Ｆ）、^{153}Ｓｍ、^{177}Ｌｕ、^{159}Ｇｄ、^{149}Ｐｍ、^{140}Ｌａ、^{175}Ｙｂ、^{166}Ｈｏ、^{90}Ｙ、^{47}Ｓｃ、^{186}Ｒｅ、^{188}Ｒｅ、^{142}Ｐｒ、^{105}Ｒｈ、^{97}Ｒｕ、^{68}Ｇｅ、^{57}Ｃｏ、^{65}Ｚｎ、^{85}Ｓｒ、^{32}Ｐ、^{89}Ｚｒ、^{153}Ｇｄ、^{169}Ｙｂ、^{51}Ｃｒ、^{54}Ｍｎ、^{75}Ｓｅ、^{113}Ｓｎ及び^{117}Ｔｉｎ；様々なポジトロン放出トモグラフィを使用したポジトロン放出金属、非放射活性常磁性金属イオン及び特定の放射性同位体に放射標識又はコンジュゲートした分子にカップリングすることによって行われ得る。このような実施形態において、適切な検出方法は、当該技術分野で周知であり、多数の市販供給源から容易に利用可能である。

【０２０３】

他の実施形態において、抗体又はその断片は、マーカー配列又は化合物、例えば、ペプチド又はフルオロフォアに融合又はコンジュゲートされて、精製又は診断又は分析的手法、例えば、免疫組織化学、バイオレイヤー干渉法、表面プラズモン共鳴、フローサイトメトリ、競合的ＥＬＩＳＡ、ＦＡＣなどを容易にすることができる。いくつかの実施形態において、マーカーは、ヒスチジンタグ、例えば、多くの市販品の中でもとりわけｐＱＥベクター（Ｑｉａｇｅｎ）によって提供されるヒスチジンタグを含む。精製のために有用な他のペプチドタグとしては、これらに限定されないが、インフルエンザヘマグルチニンタンパク質に由来するエピトープに対応するヘマグルチニン「ＨＡ」タグ（Ｗｉｌｓｏｎら、１９８４、Ｃｅｌｌ　３７：７６７）及び「フラッグ」タグ（Ｕ．Ｓ．Ｐ．Ｎ．４，７０３，００４）が挙げられる。

【０２０４】

３．生体適合性修飾因子

選択された実施形態において、本発明の抗体は、所望の通りに特徴を調整、変化、改善又は緩和するために使用され得る生体適合性修飾因子とコンジュゲートしてもよい。例えば、インビボ半減期が増加した抗体又は融合構築物は、比較的分子量の大きいポリマー分子、例えば、市販のポリエチレングリコール（ＰＥＧ）又は同様の生体適合性ポリマーを結合することによって生成されてもよい。当業者は、ＰＥＧが、多くの様々な分子量及び分子構造で取得され得、これらを選択して抗体に特定の特性を付与することができる（例えば半減期を調節し得る）ことを理解する。ＰＥＧは、ＰＥＧの前記抗体若しくは抗体断片のＮ若しくはＣ末端へのコンジュゲーションを通じて又はリシン残基上に存在するεアミノ基を介して、多機能リンカーあり又はなしで、抗体又は抗体断片又は誘導体に結合し得る。生物学的活性の損失を最小にする線状又は分岐ポリマー誘導体が使用され得る。コンジュゲーションの度合いは、ＰＥＧ分子の抗体分子への最適なコンジュゲーションを確実にするために、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ及び質量分析により密接に監視され得る。未反応のＰＥＧは、抗体－ＰＥＧコンジュゲートから、例えば、サイズ排除又はイオン交換クロマトグラフィーにより分離され得る。同様の方法において、開示される抗体は、抗体若しくは抗体断片をインビボでより安定にするために又はインビボでより長い半減期を有するためにアルブミンにコンジュゲートされ得る。この技術は、当該技術分野で周知である。例えば、ＷＯ９３／１５１９９、ＷＯ９３／１５２００及びＷＯ０１／７７１３７；及びＥＰ０４１３，６２２を参照。他の生体適合性コンジュゲートは当業者にとって明らかであり、本明細書に記載の教示に従って容易に同定され得る。

【０２０５】

Ｂ．リンカー化合物及び薬物リンカー

上で示されているように、本発明に適合するペイロードは、１つ以上の弾頭、及び任意選択的に、弾頭を抗体標的剤と会合させるリンカーを含む。多数のリンカー化合物が、関連する弾頭に本発明の抗体をコンジュゲートするために使用され得る。リンカーは、抗体上の反応性残基（好ましくはシステイン又はリシン）と選択された薬物化合物とを共有結合することが必要とされるにすぎない。したがって、選択された抗体残基と反応し、本発明の比較的安定なコンジュゲート（部位特異的又はそれ以外のコンジュゲート）を提供するために使用され得る任意のリンカーは、本明細書の教示に適合する。

【０２０６】

適合リンカーは、求核性である還元されたシステイン及びリシンに有利に結合し得る。還元されたシステイン及びリシンに関与するコンジュゲーション反応としては、これらに限定されないが、チオール－マレイミド、チオールハロゲノ（アシルハライド）、チオール－エン、チオール－イン、チオール－ビニルスルホン、チオール－ビスルホン、チオール－チオスルホネート、チオール－ピリジルジスルフィド及びチオールパラフルオロ反応が挙げられる。本明細書でさらに議論されるように、チオール－マレイミド生体コンジュゲーションは、この速い反応速度と穏やかなコンジュゲーション条件により、最も広く使用されているアプローチの１つである。このアプローチの１つの問題点は、レトロミカエル反応の可能性、及び抗体から血漿中の他のタンパク質、例えば、ヒト血清アルブミンへの、マレイミド連結ペイロードの損失又は移行である。しかしながら、いくつかの実施形態において、コンジュゲートを安定化し、この望ましくない移行を減少させるために、本明細書で下記の実施例に示される選択的還元及び部位特異的抗体の使用が使用され得る。チオール－アシルハライド反応は、レトロミカエル反応が起こり得ない生体コンジュゲートを提供し、それゆえさらに安定である。しかしながら、チオール－ハライド反応は、一般にマレイミドに基づくコンジュゲーションと比較して反応速度が遅いことから効率的でなく、所望しない薬物抗体比をもたらす。チオール－ピリジルジスルフィド反応は、よく使用される別の生体コンジュゲーション経路である。ピリジルジスルフィドは、遊離チオールとの速い交換が進行し、それにより混成のジスルフィド及びピリジン－２－チオンの放出がもたらされる。混成のジスルフィドは還元的な細胞環境で切断され、ペイロードが放出され得る。生体コンジュゲーションにおいてさらに注目を集める他のアプローチは、

チオール－ビニルスルホン及びチオールビスルホン反応であり、これらのそれぞれが本明細書の教示に適合し、明確に本発明の範囲内に含まれる。

【０２０７】

選択された実施形態において、適合リンカーは、細胞外環境においてＡＤＣに安定性を付与し、ＡＤＣ分子の凝集を予防し、ＡＤＣの水性媒体及び単量体状態における自由な可溶性を保持する。細胞への移動又は送達の前に、ＡＤＣは、好ましくは安定であり、無傷のままであり、つまり、抗体は薬物部分に連結したままである。リンカーは、標的細胞外で安定であるが、細胞内でいくぶん効果的な速度で切断又は分解されるように設計され得る。したがって、効果的なリンカーは、：（ｉ）抗体の特異的結合特性を維持し、（ｉｉ）コンジュゲート又は薬物部分の細胞内送達を可能にし、（ｉｉｉ）コンジュゲートがその標的部位に送達又は輸送されるまで、安定及び無傷のままである、すなわち切断も分解もされない；かつ（ｉｖ）薬物部分の細胞傷害性、細胞殺傷効果又は細胞分裂停止効果（いくつかの場合には任意のバイスタンダー効果を含む）を維持する。ＡＤＣの安定性は、標準的な解析技術、例えば、ＨＰＬＣ／ＵＰＬＣ、質量分析、ＨＰＬＣ並びに分離／解析技術ＬＣ／ＭＳ及びＬＣ／ＭＳ／ＭＳによって測定され得る。前述のように、抗体及び薬物部分の共有結合は、リンカーに、２つの反応性官能基、すなわち反応性という意味において２価を有することを要求する。ＭＭＡＥ及び抗体のような、２つ以上の機能的又は生物学的に活性な部分を結合するために有用な二価のリンカー試薬は公知であり、本明細書における教示と適合するそれらの結果として生じるコンジュゲートを得るための方法が記載されている。

【０２０８】

本発明に適合するリンカーは、広義において、切断可能リンカー及び非切断可能リンカーとして分類され得る。切断可能リンカーは、酸不安定性リンカー（例えば、オキシム及びヒドロゾン）プロテアーゼ切断可能リンカー及びジスルフィドリンカーを含み得、標的細胞に内在化され、細胞内のエンドソーマル－リソソーマル経路において切断される。細胞毒の放出及び活性化は、酸不安定性化学的連結、例えば、ヒドラゾン又はオキシムの切断を容易にするエンドソーム／リソソーム酸性区画に依存する。リソソーマル特異的なプロテアーゼ切断部位がリンカー内へと操作される場合、細胞毒がそれらの細胞内標的の近傍で放出される。代替的に、混合ジスルフィドを含有するリンカーは、細胞傷害性ペイロードが、血流中の酸素リッチ環境ではなく細胞の還元環境内で選択的に切断されるときに細胞内に放出されるアプローチを提供する。対照的に、アミド連結ポリエチレングリコール又はアルキルスペーサーを含有する適合性非切断可能リンカーは、標的細胞内でＡＤＣがリソソーマル分解される間に毒性ペイロードを解放する。いくつかの観点で、リンカーの選択は、コンジュゲートで使用される特定の薬物、特定の指標及び抗体標的に依存する。

【０２０９】

したがって、本発明のある特定の実施形態は、細胞内環境（例えば、リソソーム又はエンドソーム又はカベオラ内）に存在する切断剤により切断可能であるリンカーを含む。リンカーは、例えば、細胞内ペプチダーゼ又はプロテアーゼ酵素、例えば、これらに限定されないが、リソソーマル又はエンドソーマルプロテアーゼによって切断されるペプチジルリンカーであり得る。いくつかの実施形態において、ペプチジルリンカーは、少なくとも２アミノ酸長又は少なくとも３アミノ酸長である。切断剤は、カテプシンＢ及びＤ並びにプラスミンを含むことができ、これらのそれぞれは、ジペプチド薬物誘導体を加水分解して標的細胞内に活性な薬物を放出することが知られている。カテプシン－Ｂは、がん性組織で高発現することが見出されているので、チオール－依存性プロテアーゼカテプシン－Ｂによって切断可能な例示的なペプチジルリンカーは、Ｐｈｅ－Ｌｅｕを含むペプチドである。このようなリンカーの他の例は、例えば、Ｕ．Ｓ．Ｐ．Ｎ．６，２１４，３４５に記載されている。特定の実施形態において、細胞内プロテアーゼにより切断可能なペプチジルリンカーは、Ｖａｌ－Ｃｉｔリンカー、Ｖａｌ－Ａｌａリンカー又はＰｈｅ－Ｌｙｓリンカーである。治療剤の細胞内タンパク分解性放出を利用する１つの利点は、この薬剤

はコンジュゲートされると通常減弱化される薬剤であり、かつこのコンジュゲートの血清安定性が比較的高いことである。

【０２１０】

他の実施形態において、切断可能なリンカーは、ｐＨ感受性である。通常、ｐＨ感受性リンカーは、酸性条件下で加水分解性である。例えば、リソソーム中で加水分解性である酸不安定性リンカー（例えば、ヒドラゾン、オキシム、セミカルバゾン、チオセミカルバゾン、ｃｉｓ－アコニットアミド、オルトエステル、アセタール、ケタールなど）を使用することができる（例えば、Ｕ．Ｓ．Ｐ．Ｎ．５，１２２，３６８；５，８２４，８０５；５，６２２，９２９を参照）。このようなリンカーは、中性ｐＨ条件、例えば、血液のｐＨ条件下で比較的安定であるが、ほぼリソソームのｐＨであるｐＨ５．５又は５．０未満で不安定（例えば、切断可能）である。

【０２１１】

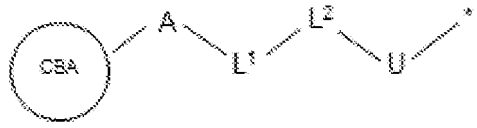
さらに他の実施形態において、リンカーは、還元条件下で切断可能である（例えば、ジスルフィドリンカー）。様々なジスルフィドリンカーが当該技術分野で公知であり、例えば、ＳＡＴＡ（Ｎ－スクシンイミジル－Ｓ－アセチルチオアセテート）、ＳＰＤＰ（Ｎ－スクシンイミジル－３－（２－ピリジルジチオ）プロピオネート）、ＳＰＤＢ（Ｎ－スクシンイミジル－３－（２－ピリジルジチオ）ブチレート）及びＳＭＰＴ（Ｎ－スクシンイミジル－オキシカルボニル－α－メチル－α－（２－ピリジル－ジチオ）トルエン）を使用して形成可能なものが挙げられる。さらに他の特定の実施形態において、リンカーは、マロネートリンカー（Ｊｏｈｎｓｏｎら、１９９５、Ａｎｔｉｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．１５：１３８７－９３）、マレイミドベンゾイルリンカー（Ｌａｕら、１９９５、Ｂｉｏｏｒｇ－Ｍｅｄ－Ｃｈｅｍ．３（１０）：１２９９－１３０４）又は３’－Ｎ－アミドアナログ（Ｌａｕら、１９９５、Ｂｉｏｏｒｇ－Ｍｅｄ－Ｃｈｅｍ．３（１０）：１３０５－１２）である。

【０２１２】

本発明のある特定の態様において、選択されたリンカーは、式

【０２１３】

【化２１】



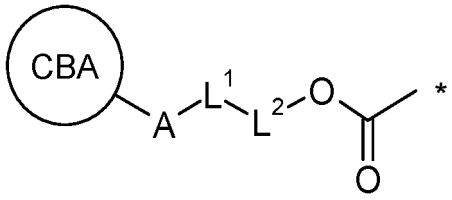
（式中、アスタリスクは薬物への結合点を示し、ＣＢＡ（ｃｅｌｌ ｂｉｎｄｉｎｇ ａｇｅｎｔ、つまり細胞結合剤）は、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体を含み、L^1は、リンカー単位及び任意選択的に切断可能リンカー単位を含み、Ａは、L^1を抗体上の反応性残基に連結する（任意選択的にスペーサーを含む）連結基であり、L^2は、好ましくは共有結合であり、Ｕは、存在していてもしていなくてもよく、腫瘍部位における弾頭からのリンカーの完全な分離を促進する自己崩壊性単位の全て又は一部を含み得る）の化合物を含む。

【０２１４】

いくつかの実施形態（Ｕ．Ｓ．Ｐ．Ｎ．２０１１／０２５６１５７に示される形態など）において、適合リンカーは、

【０２１５】

【化２２】



（式中、アスタリスクは薬物への結合点を示し、ＣＢＡ（ｃｅｌｌ　ｂｉｎｄｉｎｇ　ａｇｅｎｔ、つまり細胞結合剤）は、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体を含み、Ｌ^{1}は、リンカー及び任意選択的に切断可能リンカーを含み、Ａは、Ｌ^{1}を抗体上の反応性残基に連結する（任意選択的にスペーサーを含む）連結基であり、Ｌ^{2}は、共有結合である又は－ＯＣ（＝Ｏ）－と一緒になって自己崩壊部分を形成する）を含み得る。

【０２１６】

Ｌ^{1}及びＬ^{2}の性質は、存在する場合、広く変動し得ることが理解される。これらの基は、これらの切断特徴に基づき選択され、コンジュゲートが送達される部位の条件によって指示され得る。酵素の作用により切断されるリンカーが好ましいが、ｐＨの変化（例えば、酸若しくは塩基不安定性）、温度の変化又は放射線照射（例えば、感光性）によって切断可能なリンカーも使用され得る。還元又は酸化条件下で切断可能であるリンカーも本発明で使用され得る。

【０２１７】

ある特定の実施形態において、Ｌ^{1}は、アミノ酸の連続配列を含んでもよい。アミノ酸配列は酵素切断の標的基質となり得、それにより薬物を放出し得る。

【０２１８】

一実施形態において、Ｌ^{1}は、酵素の作用により切断可能である。一実施形態において、酵素は、エステラーゼ又はペプチダーゼである。

【０２１９】

別の実施形態において、Ｌ^{1}は、カテプシン不安定性リンカーである。

【０２２０】

一実施形態において、Ｌ^{1}は、ジペプチドを含む。ジペプチドは、－ＮＨ－Ｘ$_{1}$－Ｘ$_{2}$－ＣＯ－として表される場合があり、ここで－ＮＨ－及び－ＣＯ－は、それぞれアミノ酸基Ｘ$_{1}$及びＸ$_{2}$のＮ末端及びＣ末端を表す。ジペプチドのアミノ酸は、天然アミノ酸の任意の組合せであり得る。リンカーがカテプシン不安定性リンカーである場合、ジペプチドは、カテプシン媒介切断の作用部位となり得る。

【０２２１】

さらに、カルボキシル又はアミノ側鎖官能基を有するアミノ酸基、例えば、それぞれＧｌｕ及びＬｙｓに対して、ＣＯ及びＮＨが、この側鎖官能基であり得る。

【０２２２】

一実施形態において、ジペプチド、－ＮＨ－Ｘ$_{1}$－Ｘ$_{2}$－ＣＯ－における基－Ｘ$_{1}$－Ｘ$_{2}$－は、－Ｐｈｅ－Ｌｙｓ－、－Ｖａｌ－Ａｌａ－、－Ｖａｌ－Ｌｙｓ－、－Ａｌａ－Ｌｙｓ－、－Ｖａｌ－Ｃｉｔ－、－Ｐｈｅ－Ｃｉｔ－、－Ｌｅｕ－Ｃｉｔ－、－Ｉｌｅ－Ｃｉｔ－、－Ｐｈｅ－Ａｒｇ－及び－Ｔｒｐ－Ｃｉｔ－から選択され、ここでＣｉｔはシトルリンである。

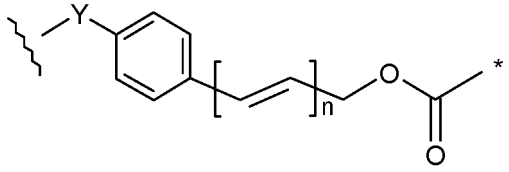
【０２２３】

好ましくは、ジペプチド、－ＮＨ－Ｘ$_{1}$－Ｘ$_{2}$－ＣＯ－における基－Ｘ$_{1}$－Ｘ$_{2}$－は、－Ｐｈｅ－Ｌｙｓ－、－Ｖａｌ－Ａｌａ－、－Ｖａｌ－Ｌｙｓ－、－Ａｌａ－Ｌｙｓ－及び－Ｖａｌ－Ｃｉｔ－から選択される。

【０２２４】

最も好ましくは、ジペプチド、－ＮＨ－Ｘ$_{1}$－Ｘ$_{2}$－ＣＯ－における基－Ｘ$_{1}$－Ｘ$_{2}$－は、－Ｐｈｅ－Ｌｙｓ－又は－Ｖａｌ－Ａｌａ－又はＶａｌ－Ｃｉｔである。特定の選択

された実施形態において、ジペプチドは、－Ｖａｌ－Ａｌａ－を含む。
【０２２５】
一実施形態において、Ｌ^{2}は、共有結合の形態で存在する。
【０２２６】
一実施形態において、Ｌ^{2}は存在し、－Ｃ（＝Ｏ）Ｏ－と一緒になって自己崩壊性リンカーを形成する。
【０２２７】
一実施形態において、Ｌ^{2}は、酵素活性の基質であり、これにより弾頭の放出を可能にする。
【０２２８】
一実施形態において、Ｌ^{1}が酵素の作用により切断可能であり、Ｌ^{2}が存在する場合、酵素は、Ｌ^{1}とＬ^{2}との間の結合を切断する。
【０２２９】
Ｌ^{1}及びＬ^{2}は、存在する場合、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）Ｏ－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－ＯＣ（＝Ｏ）－、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｏ－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）Ｏ－、－ＯＣ（＝Ｏ）ＮＨ－及び－ＮＨＣ（＝Ｏ）ＮＨ－から選択される結合によって連結されていてもよい。
【０２３０】
Ｌ^{2}に連結されているＬ^{1}のアミノ基は、アミノ酸のＮ末端であり得、又はアミノ酸側鎖、例えば、リシンアミノ酸側鎖のアミノ基に由来し得る。
【０２３１】
Ｌ^{2}に連結されているＬ^{1}のカルボキシル基は、アミノ酸のＣ末端であり得、又はアミノ酸側鎖、例えば、グルタミン酸アミノ酸側鎖のカルボキシル基に由来し得る。
【０２３２】
Ｌ^{2}に連結されているＬ^{1}のヒドロキシル基は、アミノ酸側鎖、例えば、セリンアミノ酸側鎖のヒドロキシル基に由来し得る。
【０２３３】
用語「アミノ酸側鎖」は、（ｉ）天然に存在するアミノ酸、例えば、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン及びバリン；（ｉｉ）マイナーなアミノ酸、例えば、オルニチン及びシトルリン；（ｉｉｉ）非天然アミノ酸、ベーターアミノ酸、合成類似体及び天然に存在するアミノ酸の誘導体；並びに（ｉｖ）全てのエナンチオマー、ジアステレオマー、異性体的に濃縮された形態、同位体で標識された形態（例えば、^{2}Ｈ、^{3}Ｈ、^{14}Ｃ、^{15}Ｎ）、保護された形態及びそれらのラセミ体混合物で見出されるそれらの基を含む。
【０２３４】
一実施形態において、－Ｃ（＝Ｏ）Ｏ－及びＬ^{2}は、一緒になって基：
【０２３５】
【化２３】



（式中、アスタリスクは、薬物又は細胞毒性剤の位置に対する結合点を示し、波線は、リンカーＬ^{1}への結合点を示し、Ｙは、－Ｎ（Ｈ）－、－Ｏ－、－Ｃ（＝Ｏ）Ｎ（Ｈ）－又は－Ｃ（＝Ｏ）Ｏ－であり、ｎは０から３である）を形成する。フェニレン環は、１、２

又は３つの置換基で置換されていてもよい。一実施形態において、フェニレン基は、ハロ、ＮＯ$_2$、アルキル又はヒドロキシアルキルで置換されていてもよい。

【０２３６】

一実施形態において、Ｙは、ＮＨである。

【０２３７】

一実施形態において、ｎは０又は１である。好ましくは、ｎは０である。

【０２３８】

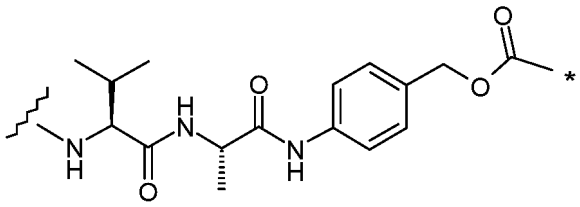
ＹがＮＨであり、ｎが０である場合、自己崩壊性リンカーは、ｐ－アミノベンジルカルボニルリンカー（ＰＡＢＣ）と称され得る。

【０２３９】

他の実施形態において、リンカーは、自己崩壊性リンカー及びジペプチドを含み、一緒になって、基－ＮＨ－Ｖａｌ－Ｃｉｔ－ＣＯ－ＮＨ－ＰＡＢＣ－を形成してもよい。他の選択された実施形態において、リンカーは、下記に示すＮＨ－Ｖａｌ－Ａｌａ－ＣＯ－ＮＨ－ＰＡＢＣ基を含んでもよい：

【０２４０】

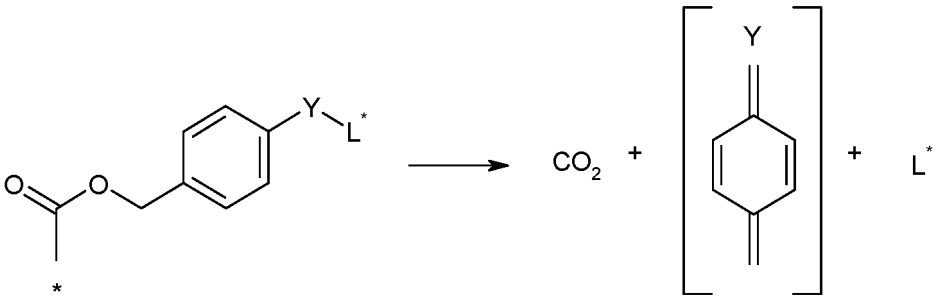
【化２４】



（式中、アスタリスクは、選択された細胞毒性部分に対する結合点を示し、波線は、抗体にコンジュゲートされ得るリンカーの残余部分（例えば、スペーサー－抗体結合セグメント）への結合点を示す）。ジペプチドの酵素切断に際し、自己崩壊性リンカーは遠位部位が活性化されるとき、以下に示す流れに沿って進み、保護された化合物（つまり、細胞毒）の完全な放出を可能にする：

【０２４１】

【化２５】



（式中、アスタリスクは、選択された細胞毒性部分への結合点を示し、Ｌ˙は、切断されるペプチジル単位を含むリンカーの残余部分の活性化形態である）。弾頭の明確な放出は、所望の毒性活性の維持を確実にする。

【０２４２】

一実施形態において、Ａは、共有結合である。したがって、Ｌ^{1}と抗体とは直接的に連結される。例えば、Ｌ^{1}が、連続するアミノ酸配列を含む場合、配列のＮ末端は、抗体残基に直接連結し得る。

【０２４３】

別の実施形態において、Ａは、スペーサー基である。したがって、Ｌ^{1}と抗体は、間接

的に連結する。

【０２４４】

ある特定の実施形態において、L^1及びＡは、－Ｃ（＝Ｏ）ＮＨ－、－Ｃ（＝Ｏ）Ｏ－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）－、－ＯＣ（＝Ｏ）－、－ＯＣ（＝Ｏ）Ｏ－、－ＮＨＣ（＝Ｏ）Ｏ－、－ＯＣ（＝Ｏ）ＮＨ－及び－ＮＨＣ（＝Ｏ）ＮＨ－から選択される結合によって連結され得る。

【０２４５】

下記にさらに詳細に述べられるように、本発明の薬物リンカーは、好ましくは、システイン、例えば、遊離システイン上の反応性チオール求核基に連結する。この目的に関して、抗体のシステインは、様々な還元剤、例えば、ＤＴＴ又はＴＣＥＰ又は本明細書に記載の穏やかな還元剤での処理によってリンカー試薬とコンジュゲートするために反応し得る。他の実施形態において、本発明の薬物リンカーは、好ましくはリシンに連結される。

【０２４６】

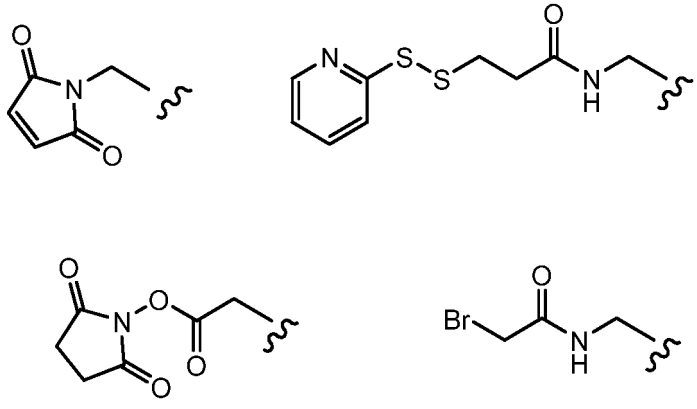
好ましくは、リンカーは、抗体上の求核性官能基と反応する求電子性官能基を含む。抗体上の求核性基としては、これらに限定されないが：（ｉ）Ｎ末端アミン基、（ｉｉ）側鎖アミン基、例えば、リシン、（ｉｉｉ）側鎖チオール基、例えば、システイン及び（ｉｖ）抗体がグリコシル化されている場合の糖のヒドロキシル又はアミノ基が挙げられる。アミン、チオール及びヒドロキシル基は、求核性であり、リンカー部分及びリンカー試薬上の求電子性基と反応して共有結合を形成することができる。リンカー試薬としては、（ｉ）マレイミド基、（ｉｉ）活性化ジスルフィド、（ｉｉｉ）活性エステル、例えば、ＮＨＳ（Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド）エステル、ＨＯＢｔ（Ｎ－ヒドロキシベンゾトリアゾール）エステル、ハロホルメート及び酸ハロゲン化物；（ｉｖ）アルキル及びベンジルハロゲン化物、例えば、ハロアセトアミド；及び（ｖ）アルデヒド、ケトン、及びカルボキシル基が挙げられる。

【０２４７】

本発明と適合する例示的な官能基を、すぐ下に示す：

【０２４８】

【化２６】

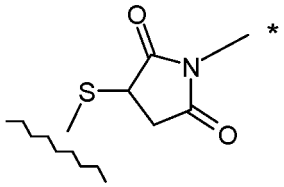


【０２４９】

いくつかの実施形態において、システイン（部位特異的抗体の遊離システインを含む）と薬物－リンカー部分との間の結合は、リンカーに存在しているチオール残基及び末端マレイミド基を通じたものである。このような実施形態において、抗体と薬物－リンカーとの連結は、

【０２５０】

【化２７】



（式中、アスタリスクは、薬物－リンカーの残余部分との結合点を示し、波線は、抗体の残余部分との結合点を示す）であってもよい。このような実施形態において、Ｓ原子は、好ましくは、部位特異的遊離システインに由来し得る。

【０２５１】

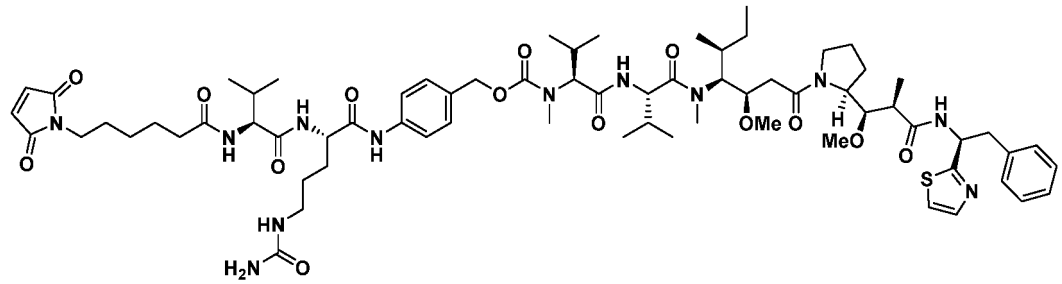
他の適合可能なリンカーに関して、結合部分は、抗体上の活性化残基と反応し得る末端ブロモアセトアミド又はヨードアセトアミドを含んで、所望のコンジュゲートをもたらすことができる。いずれにしても、当業者は、本開示の薬物－リンカー化合物のそれぞれと、適合する抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体（部位特異的抗体を含む）とを、本開示に鑑みて、容易にコンジュゲートすることができる。

【０２５２】

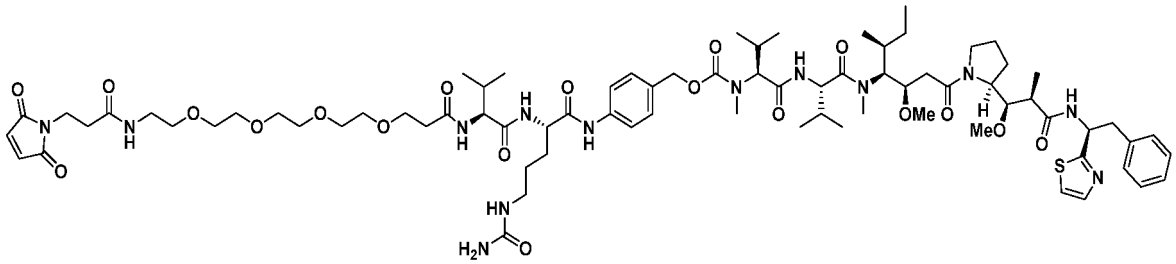
本開示によれば、本発明は、適合する抗体薬物コンジュゲートを作製する方法であって、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体を下記からなる群から選択される薬物－リンカー化合物（すなわち、開示される式Ａｂ－［Ｌ－Ｄ］ｎ中の［Ｌ－Ｄ］）にコンジュゲートすることを含む方法を提供する：

【０２５３】

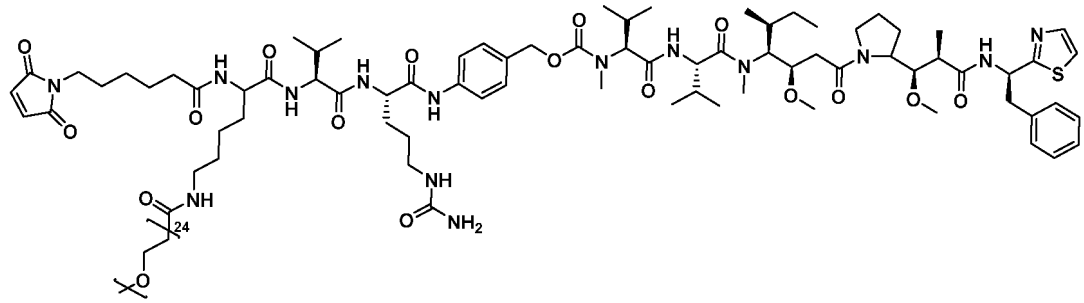
【化２８】



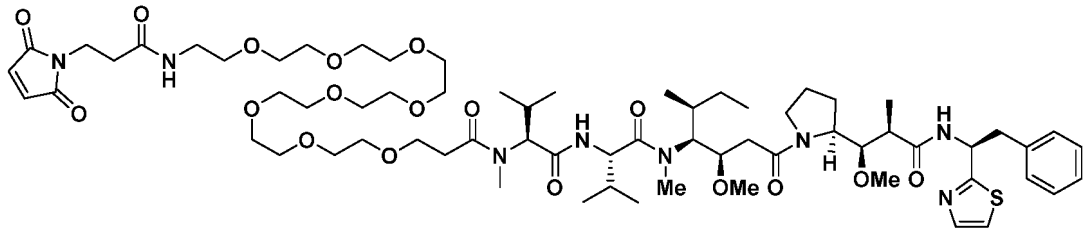
DL1 (MMD10),



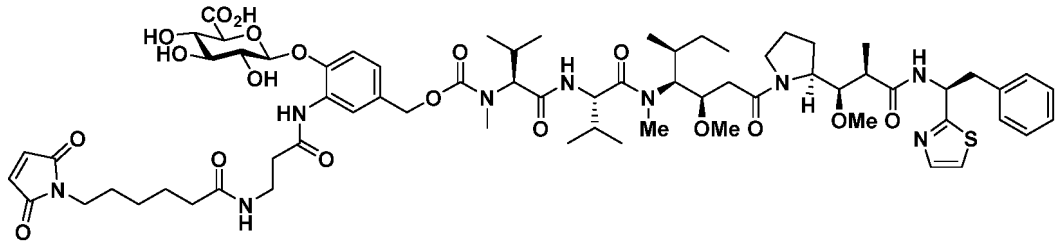
DL2 (MMD10),



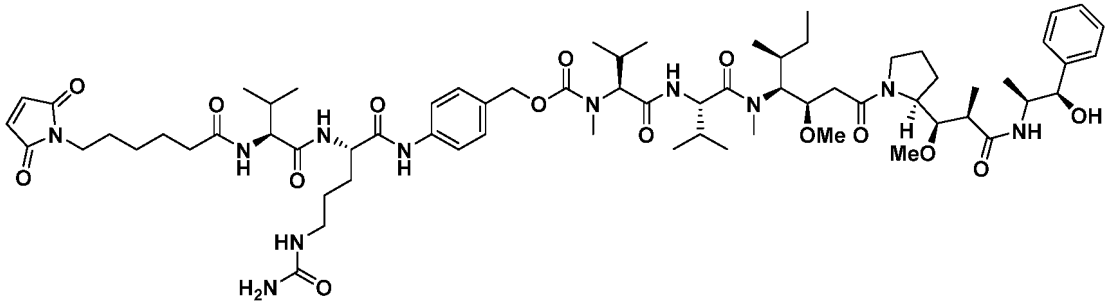
DL3 (MMD10),



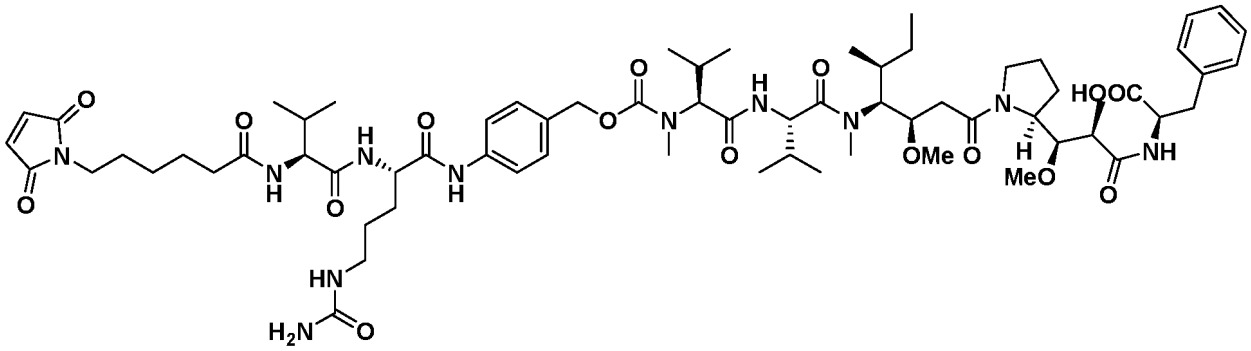
DL4 (MMD10),



DL5 (MMD10),

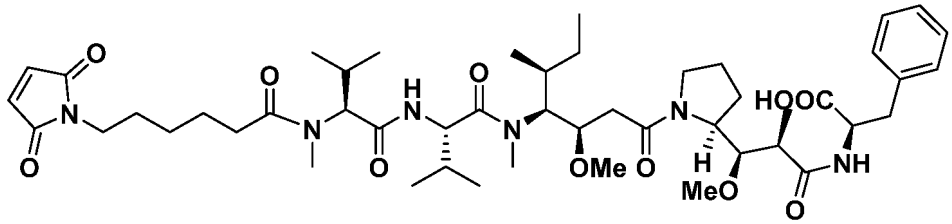


DL6 (MMAE),



DL7 (MMAF),

及び



DL8 (MMAF).

【０２５４】

本出願の目的に関し、ＤＬは、「薬物－リンカー」（又は、式Ａｂ－［Ｌ－Ｄ］ｎ中の「リンカー－薬物」）の略称として使用され、上記に示す薬物リンカー１～８（つまり、ＤＬ１、ＤＬ２、ＤＬ３、ＤＬ４、ＤＬ５、ＤＬ６、ＤＬ７及びＤＬ８）を含む。ＤＬ１～ＤＬ５は、リンカーからの開裂時に、放出される同一弾頭（ＭＭＤ１０）を含むことに留意されたい。同一のパターンが、ＤＬ７及びＤＬ８にも該当し、ＭＭＡＦが、それぞれの場合において放出される。

【０２５５】

末端マレイミド部分が付されたリンカーは、当該技術分野において認識されている技術を使用して、選択されたＴＮＦＲＳＦ２１抗体の遊離スルフヒドリルにコンジュゲートされてもよいことが理解される。前述の化合物の合成経路は、当該技術分野において周知であるが、このような薬物リンカーの組合せをコンジュゲートする具体的な方法は、以下の実施例に示されている。

【０２５６】

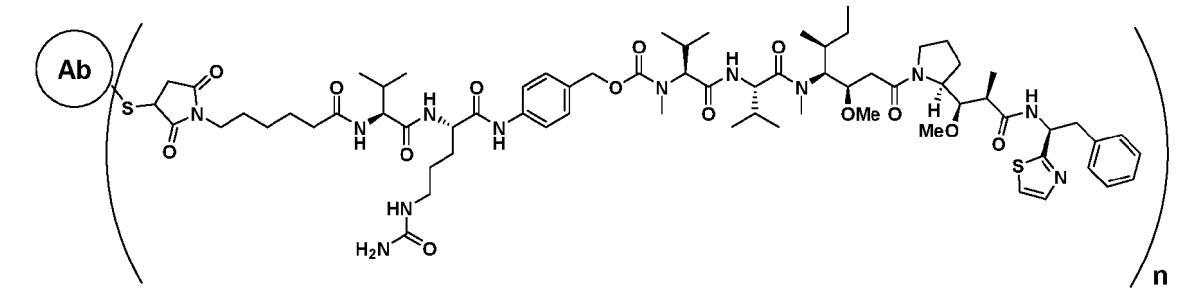
こうして、選択された態様において、本発明は、直下のＡＤＣ１～８に実質的に示されている式Ａｂ－［Ｌ－Ｄ］ｎであるＴＮＦＲＳＦ２１イムノコンジュゲートをもたらす、開示されたＤＬ部分（ＤＬ１～ＤＬ８）にコンジュゲートされているＴＮＦＲＳＦ２１抗体に関する。

【０２５７】

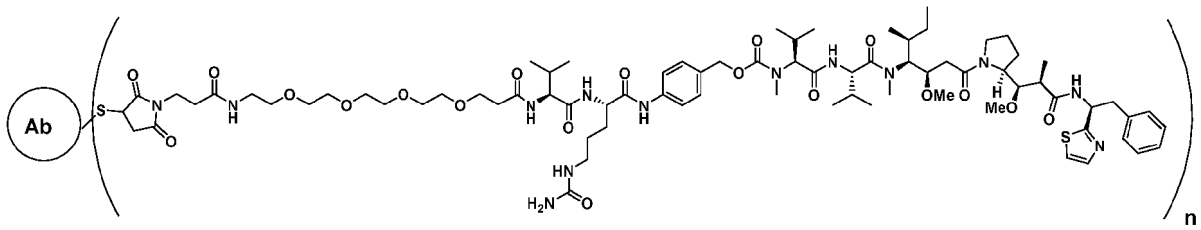
したがって、ある特定の態様において、本発明は、以下からなる群から選択される構造を含む、式Ａｂ－［Ｌ－Ｄ］ｎのＡＤＣを対象としている：

【０２５８】

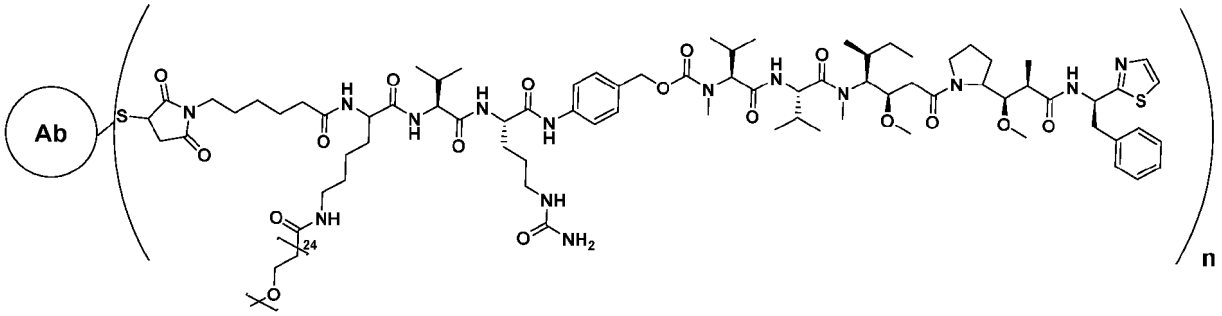
【化２９】



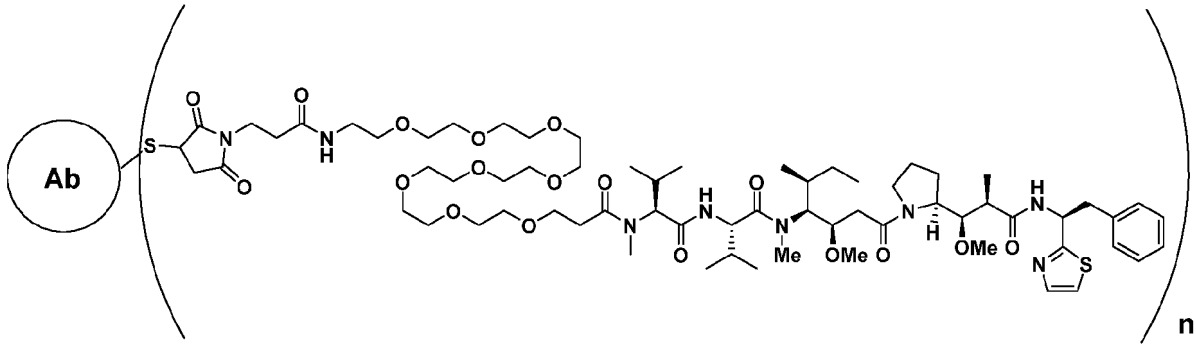
ADC1 (MMD10),

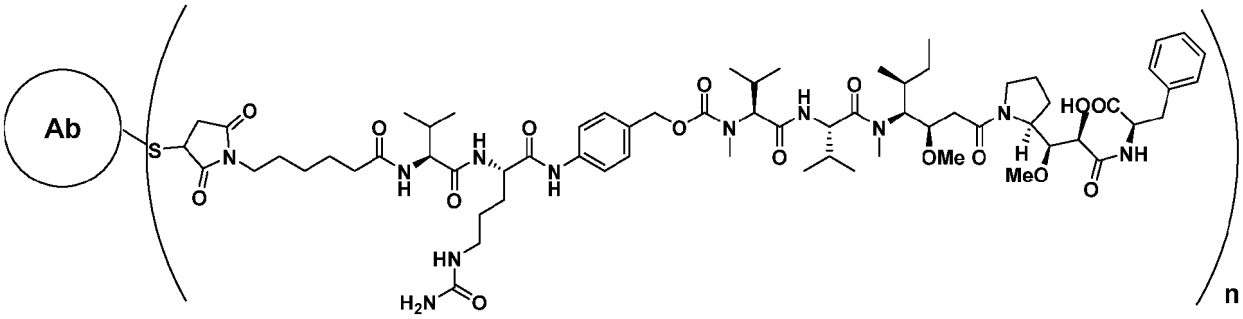


ADC2 (MMD10),



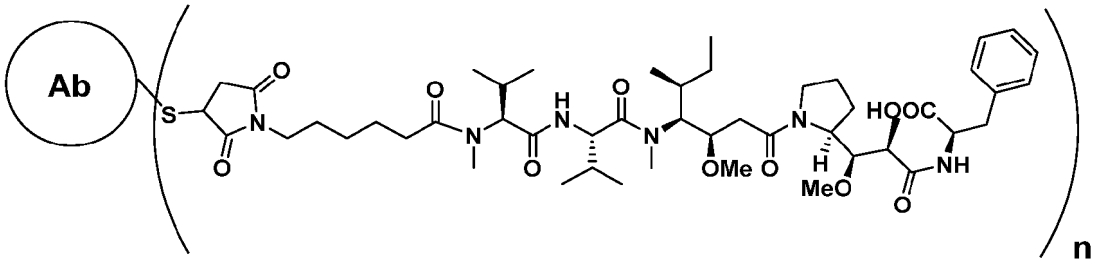
ADC3 (MMD10),


Ab
S
N
O
O
O



ADC7 (MMAF),

及び



ADC8 (MMAF),

式中、Ａｂは、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体又はこの免疫反応性断片を含み、ｎは、約１～約２０の整数である。好ましい実施形態において、ｎは、１～８の整数を含み、ある特定の実施形態において、ｎは、２又は４を含む。

【０２５９】

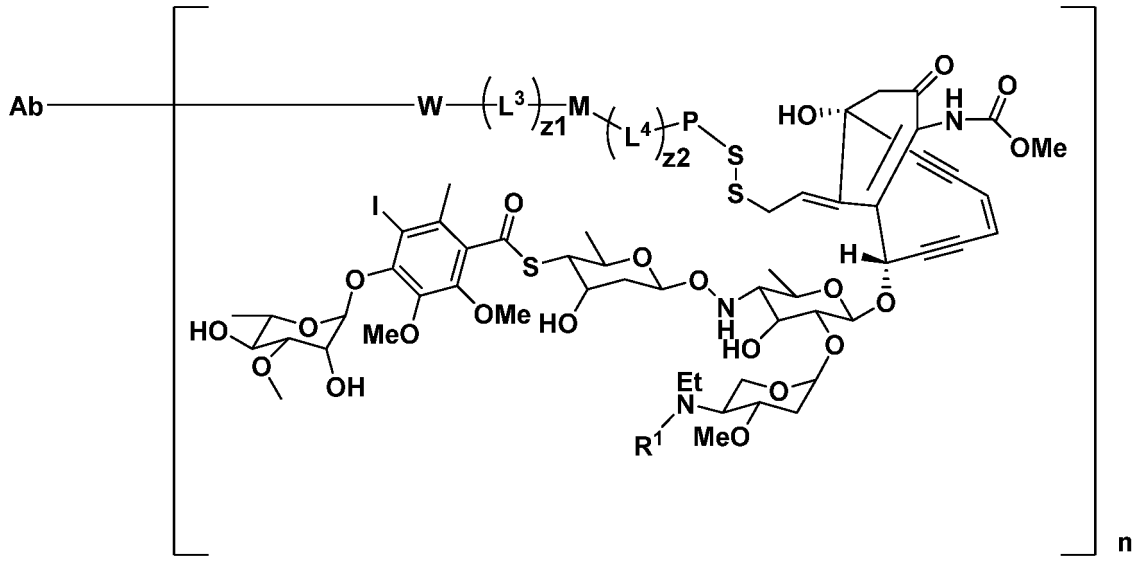
当業者は、上述のＡＤＣ構造が式Ａｂ－［Ｌ－Ｄ］ｎにより定義されること、及びこの中に図示されている１つより多い薬物リンカー分子がＴＮＦＲＳＦ２１抗体に共有結合によりコンジュゲートされ得ること（例えば、ｎは約１～約２０の整数とすることができる）を理解している。より詳細に、下記にさらに詳細に議論するように、１つより多いペイロードが各抗体にコンジュゲートされ得ること、及び上の概略図はそのように解釈されなければならないことが、理解される。例として、上で説明されるＡＤＣは、１、２、３、４、５、６、７若しくは８又はそれ超のペイロードにコンジュゲートされているＴＮＦＲＳＦ２１抗体を含むことができ、このようなＡＤＣの組成物は、薬物ローディングされた化学種からなる混合物を一般に含む。

【０２６０】

他の態様において、本発明のＡＤＣは、カリケアマイシンを含む。この点において、以下の式：

【０２６１】

【化３０】



（式中、Ａｂは、ＴＮＦＲＳＦ２１抗体であり、ｚ１、ｚ２、Ｌ^{3}、Ｌ^{4}、Ｗ、Ｍ、Ｐ、Ｒ１及びｎは、本明細書において示されている通り定義される）を有する化合物（例えば、式Ａｂ－［Ｌ－Ｄ］ｎの抗体薬物コンジュゲート）が提供される。選択された実施形態において、Ａｂは、キメラ抗体、ＣＤＲ移植抗体、ヒト化抗体若しくはヒト抗体、又はこれらの免疫反応性断片である。

【０２６２】

存在する場合、Ｌ^{3}は、共有結合、－Ｏ－、－Ｓ－、－ＮＲ^{3Ｂ}－、－Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－Ｓ（Ｏ）－、－Ｓ（Ｏ）$_{2}$、－Ｃ（Ｏ）ＮＲ^{3Ｂ}－、－ＮＲ^{3Ｂ}Ｃ（Ｏ）－、－ＮＲ^{3Ｂ}Ｃ（Ｏ）ＮＨ－、－ＮＨＣ（Ｏ）ＮＲ^{3Ｂ}－、置換若しくは非置換アルキレン又は置換若しくは非置換ヘテロアルキレンである。

【０２６３】

存在する場合、Ｌ^{4}は、共有結合、－Ｏ－、－Ｓ－、－ＮＲ^{4Ｂ}－、－Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－Ｓ（Ｏ）－、－Ｓ（Ｏ）$_{2}$－、－Ｃ（Ｏ）ＮＲ^{4Ｂ}－、－ＮＲ^{4Ｂ}Ｃ（Ｏ）－、－ＮＲ^{4Ｂ}Ｃ（Ｏ）ＮＨ－、－ＮＨＣ（Ｏ）ＮＲ^{4Ｂ}－、置換若しくは非置換アルキレン又は置換若しくは非置換ヘテロアルキレンである。

【０２６４】

Ｒ^{1}は、水素、ハロゲン、置換若しくは非置換アルキル、置換若しくは非置換ヘテロアルキル、置換若しくは非置換シクロアルキル、置換若しくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換若しくは非置換アリール又は置換若しくは非置換ヘテロアリール、－ＣＦ$_{3}$、－ＣＣｌ$_{3}$、－ＣＢｒ$_{3}$、－ＣＩ$_{3}$、－ＣＮ、－Ｃ（Ｏ）Ｒ^{1Ｅ}、－ＯＲ^{1Ａ}、－ＮＲ^{1Ｂ}Ｒ^{1Ｃ}、－Ｃ（Ｏ）ＯＲ^{1Ａ}、－Ｃ（Ｏ）ＮＲ^{1Ｂ}Ｒ^{1Ｃ}、－ＳＲ^{1Ｄ}、－ＳＯ$_{n1}$Ｒ^{1Ｂ}又は－ＳＯ$_{v1}$ＮＲ^{1Ｂ}Ｒ^{1Ｃ}である。ある特定の選択された実施形態において、Ｒ^{1}はＨを含む。別の選択された実施形態において、Ｒ^{1}は、－Ｃ（Ｏ）ＣＨ$_{3}$を含む。

【０２６５】

Ｐは、共有結合である、又は－Ｏ－、－Ｓ－、－ＮＲ^{2Ｂ}－、－Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－Ｓ（Ｏ）－、－Ｓ（Ｏ）$_{2}$－、－Ｃ（Ｏ）ＮＲ^{2Ｂ}－、－ＮＲ^{2Ｂ}Ｃ（Ｏ）－、－ＮＲ^{2Ｂ}Ｃ（Ｏ）ＮＨ－、－ＮＨＣ（Ｏ）ＮＲ^{2Ｂ}－、置換若しくは非置換二官能性脂肪族又はアリール基、置換若しくは非置換アルキレン、置換若しくは非置換ヘテロアルキレン、置換若しくは非置換シクロアルキレン、置換若しくは非置換ヘテロシクロアルキレン、置換若しくは非置換アリーレン、又は置換若しくは非置換ヘテロアリーレンである。

【０２６６】

ある特定の実施形態において、ジスルフィド保護基Ｐは、環式若しくは非環式の、直鎖又は分岐鎖のＣ$_{1}$～Ｃ$_{12}$飽和又は不飽和脂肪族部分を含む。ある特定の好ましい実施形態において、脂肪族部分は置換されていてもよい。他の好ましい実施形態において、脂肪族部分は、非置換であってもよい。さらに他のジスルフィド保護基の実施形態は、ジスルフィド部分に近位の炭素に結合している１つ又は２つのメチル基を有する、脂肪族部分を含む。さらに他の実施形態において、脂肪族部分は、ジスルフィド部分に近位の炭素に結合している単一メチル基を含む。他の好ましい実施形態は、近位の炭素から離れている、１つ以上のメチル基、１個、２個又は３個の炭素を有する、脂肪族部分を含む。個々のこのような構築物によって付与される安定性は、当該技術分野で認識されている技術を使用して容易に測定され得る。個々の例において、選択されたジスルフィド保護基は、ジスルフィド結合の安定性を向上させて、カリケアマイシンＡＤＣのインビボの半減期を延長するよう作用する。

【０２６７】

Ｍは、共有結合である、又は－Ｏ－、－Ｓ－、－ＮＲ^{5B}－、－Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－Ｓ（Ｏ）－、－Ｓ（Ｏ）$_{2}$－、－Ｃ（Ｏ）ＮＲ^{5B}－、－ＮＲ^{5B}Ｃ（Ｏ）－、－ＮＲ^{5B}Ｃ（Ｏ）ＮＨ－、－ＮＨＣ（Ｏ）ＮＲ^{5B}－、－［ＮＲ^{5B}Ｃ（Ｒ^{5E}）（Ｒ^{5F}）Ｃ（Ｏ）］$_{n2}$－、置換若しくは非置換アルキレン、置換若しくは非置換ヘテロアルキレン、置換若しくは非置換シクロアルキレン、置換若しくは非置換ヘテロシクロアルキレン、置換若しくは非置換アリーレン、置換若しくは非置換ヘテロアリーレン、又はＭ^{1A}－Ｍ^{1B}－Ｍ^{1C}である。

【０２６８】

Ｗは、共有結合である、又は－Ｏ－、－Ｓ－、－ＮＲ^{6B}－、－Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－Ｓ（Ｏ）－、－Ｓ（Ｏ）$_{2}$－、－Ｃ（Ｏ）ＮＲ^{6B}－、－ＮＲ^{6B}Ｃ（Ｏ）－、－ＮＲ^{6B}Ｃ（Ｏ）ＮＨ－、－ＮＨＣ（Ｏ）ＮＲ^{6B}－、置換若しくは非置換アルキレン、置換若しくは非置換ヘテロアルキレン、置換若しくは非置換シクロアルキレン、置換若しくは非置換ヘテロシクロアルキレン、置換若しくは非置換アリーレン、置換若しくは非置換ヘテロアリーレン、又はＷ^{1A}－Ｗ^{1B}－Ｗ^{1C}である。

【０２６９】

Ｍ^{1A}は、Ｌ^{3}に好ましくは結合している。Ｍ^{1C}は、Ｌ^{4}に好ましくは結合している。

【０２７０】

Ｍ^{1A}は、共有結合、－Ｏ－、－Ｓ－、－ＮＲ^{5AB}－、－Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－Ｓ（Ｏ）－、－Ｓ（Ｏ）$_{2}$－、－Ｃ（Ｏ）ＮＲ^{5AB}－、－ＮＲ^{5AB}Ｃ（Ｏ）－、－ＮＲ^{5AB}Ｃ（Ｏ）ＮＨ－、－ＮＨＣ（Ｏ）ＮＲ^{5AB}－、－［ＮＲ^{5AB}ＣＲ^{5AE}Ｒ^{5AF}Ｃ（Ｏ）］$_{n3}$－、置換若しくは非置換アルキレン、置換若しくは非置換ヘテロアルキレン、置換若しくは非置換シクロアルキレン、置換若しくは非置換ヘテロシクロアルキレン、置換若しくは非置換アリーレン又は置換若しくは非置換ヘテロアリーレンである。

【０２７１】

Ｍ^{1B}は、共有結合、－Ｏ－、－Ｓ－、－ＮＲ^{5BB}－、－Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－Ｓ（Ｏ）－、－Ｓ（Ｏ）$_{2}$－、－Ｃ（Ｏ）ＮＲ^{5BB}－、－ＮＲ^{5BB}Ｃ（Ｏ）－、－ＮＲ^{5BB}Ｃ（Ｏ）ＮＨ－、－ＮＨＣ（Ｏ）ＮＲ^{5BB}－、－［ＮＲ^{5BB}Ｃ（Ｒ^{5BE}）（Ｒ^{5BF}）Ｃ（Ｏ）］$_{n4}$－、置換若しくは非置換アルキレン、置換若しくは非置換ヘテロアルキレン、置換若しくは非置換シクロアルキレン、置換若しくは非置換ヘテロシクロアルキレン、置換若しくは非置換アリーレン又は置換若しくは非置換ヘテロアリーレンである。

【０２７２】

Ｍ^{1C}は、共有結合、－Ｏ－、－Ｓ－、－ＮＲ^{5CB}－、－Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－Ｓ（Ｏ）－、－Ｓ（Ｏ）$_{2}$－、－Ｃ（Ｏ）ＮＲ^{5CB}－、－ＮＲ^{5CB}Ｃ（Ｏ）－、－ＮＲ^{5CB}Ｃ（Ｏ）ＮＨ－、－ＮＨＣ（Ｏ）ＮＲ^{5CB}－、－［ＮＲ^{5CB}ＣＲ^{5C}

$^{E}R^{5CF}C(O)]_{n5}$－、置換若しくは非置換アルキレン、置換若しくは非置換ヘテロアルキレン、置換若しくは非置換シクロアルキレン、置換若しくは非置換ヘテロシクロアルキレン、置換若しくは非置換アリーレン又は置換若しくは非置換ヘテロアリーレンである。

【０２７３】

W^{1A}は、Ａｂに好ましくは結合している。W^{1C}は、L^{3}に好ましくは結合している。

【０２７４】

W^{1A}は、共有結合、－Ｏ－、－Ｓ－、$-NR^{6BA}-$、－Ｃ（Ｏ）－、Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－Ｓ（Ｏ）－、$-S(O)_2-$、$-C(O)NR^{6BA}-$、$-NR^{6BA}C(O)-$、$-NR^{6BA}C(O)NH-$、$-NHC(O)NR^{6BA}-$、置換若しくは非置換アルキレン、置換若しくは非置換ヘテロアルキレン、置換若しくは非置換シクロアルキレン、置換若しくは非置換ヘテロシクロアルキレン、置換若しくは非置換アリーレン又は置換若しくは非置換ヘテロアリーレンである。

【０２７５】

W^{1B}は、共有結合、－Ｏ－、－Ｓ－、$-NR^{6BB}-$、－Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－Ｓ（Ｏ）－、$-S(O)_2-$、$-C(O)NR^{6BB}-$、$-NR^{6BB}C(O)-$、$-NR^{6BB}C(O)NH-$、$-NHC(O)NR^{6BB}-$、置換若しくは非置換アルキレン、置換若しくは非置換ヘテロアルキレン、置換若しくは非置換シクロアルキレン、置換若しくは非置換ヘテロシクロアルキレン、置換若しくは非置換アリーレン又は置換若しくは非置換ヘテロアリーレンである。

【０２７６】

W^{1C}は、共有結合、－Ｏ－、－Ｓ－、$-NR^{6BC}-$、－Ｃ（Ｏ）－、－Ｃ（Ｏ）Ｏ－、－Ｓ（Ｏ）－、$-S(O)_2-$、$-C(O)NR^{6BC}-$、$-NR^{6BC}C(O)-$、$-NR^{6BC}C(O)NH-$、$-NHC(O)NR^{6BC}-$、置換若しくは非置換アルキレン、置換若しくは非置換ヘテロアルキレン、置換若しくは非置換シクロアルキレン、置換若しくは非置換ヘテロシクロアルキレン、置換若しくは非置換アリーレン又は置換若しくは非置換ヘテロアリーレンである。

【０２７７】

R^{1A}、R^{1B}、R^{1C}、R^{1D}、R^{1E}、R^{2B}、R^{3B}、R^{4B}、R^{5B}、R^{5E}、R^{5F}、R^{5AB}、R^{5AE}、R^{5AF}、R^{5BB}、R^{5BE}、R^{5BF}、R^{5CB}、R^{5CE}、R^{5CF}、R^{6B}、R^{6BA}、R^{6BB}及びR^{6BC}は、独立して、水素、ハロゲン、$-CF_3$、$-CCl_3$、$-CBr_3$、$-CI_3$、－ＯＨ、$-NH_2$、－ＣＯＯＨ、$-CONH_2$、$-N(O)_2$、－ＳＨ、$-S(O)_3H$、$-S(O)_4H$、$-S(O)_2NH_2$、$-NHNH_2$、$-ONH_2$、$-NHC(O)NHNH_2$、$-NHC(O)NH_2$、$-NHS(O)_2H$、$-NHC(O)H$、$-NHC(O)-OH$、－ＮＨＯＨ、$-OCF_3$、$-OCCl_3$、$-OCBr_3$、$-OCI_3$、$-OCHF_2$、$-OCHCl_2$、$-OCHBr_2$、$-OCHI_2$、置換若しくは非置換アルキル、置換若しくは非置換ヘテロアルキル、置換若しくは非置換シクロアルキル、置換若しくは非置換ヘテロシクロアルキル、置換若しくは非置換アリール、又は置換若しくは非置換ヘテロアリールである。

【０２７８】

ある特定の実施形態において、同一窒素原子に結合しているR^{1B}及びR^{1C}置換基は、任意選択的に結合して、置換若しくは非置換ヘテロシクロアルキル、又は置換若しくは非置換ヘテロアリールを形成してもよい。

【０２７９】

ｚ１及びｚ２は、０であってもよく、又は１～１０の整数を独立して含んでもよく、ｎは、１～２０の整数を含む。ある特定の選択された実施形態において、ｎは、１～８の整数を含み、他の好ましい実施形態において、ｎは、２又は４を含む。

【０２８０】

ペプチジルの開裂可能な部分を含む適合カリケアマイシンリンカー構築物の特に好まし

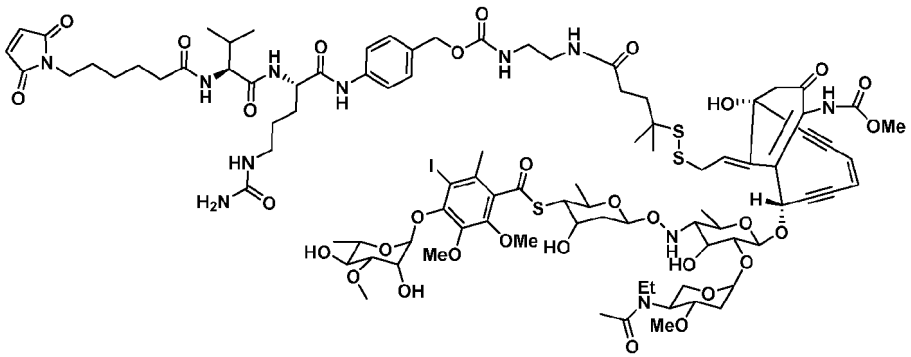
い実施形態が、直下に示されている。これらの構築物は、このような合成に関連する通り、本明細書において明示的に組み込まれている、ＰＣＴ／ＵＳ２０１６／０２８５３０に実質的に示されている通りに作製され得ることが理解される。さらに、本開示を鑑みると、当業者は、類似の合成スキームを使用する、さらなるペプチジルリンカーカリケアマイシン構築物を容易に作製することができる。

【０２８１】

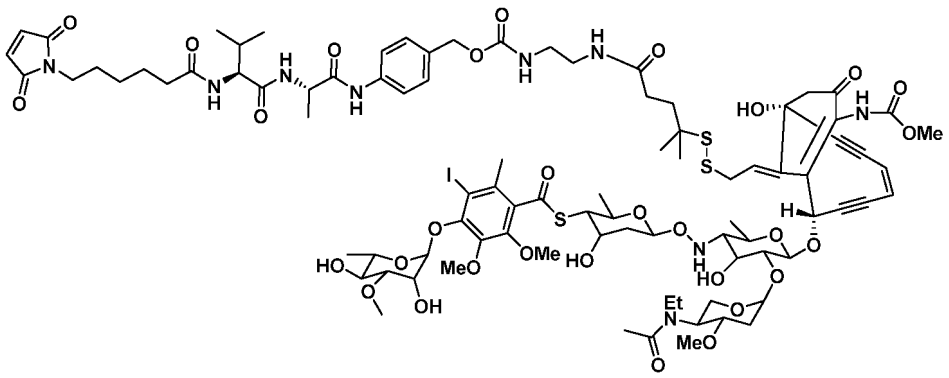
したがって、本開示によれば、本発明は、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体を、

【０２８２】

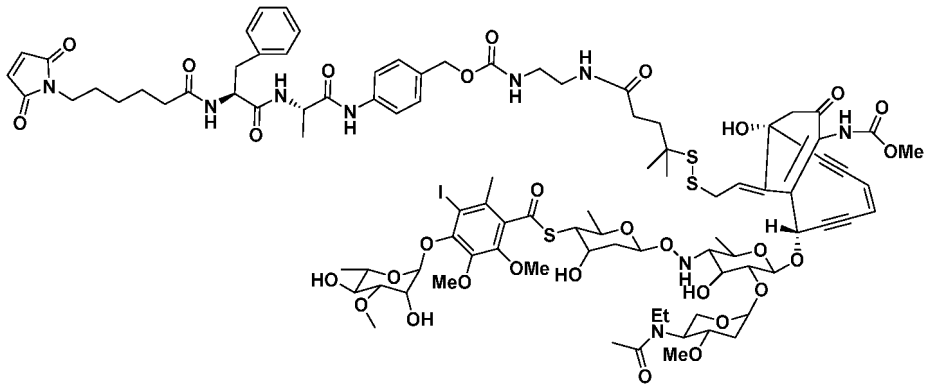
【化３１】



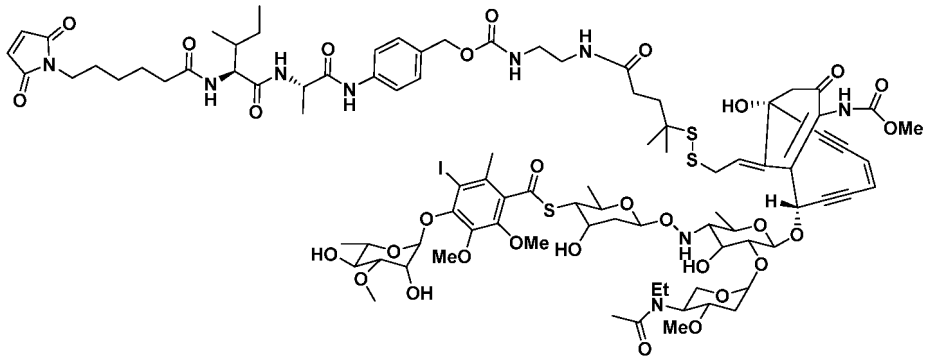
DL9 (Val-Cit),



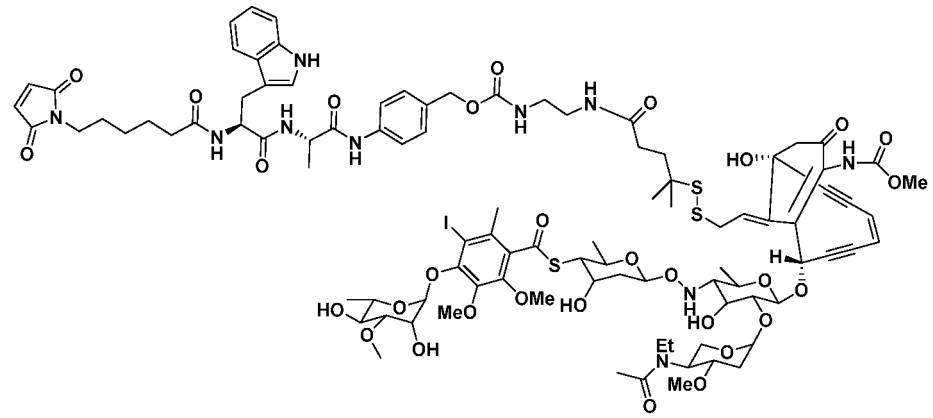
DL10 (Val-Ala),



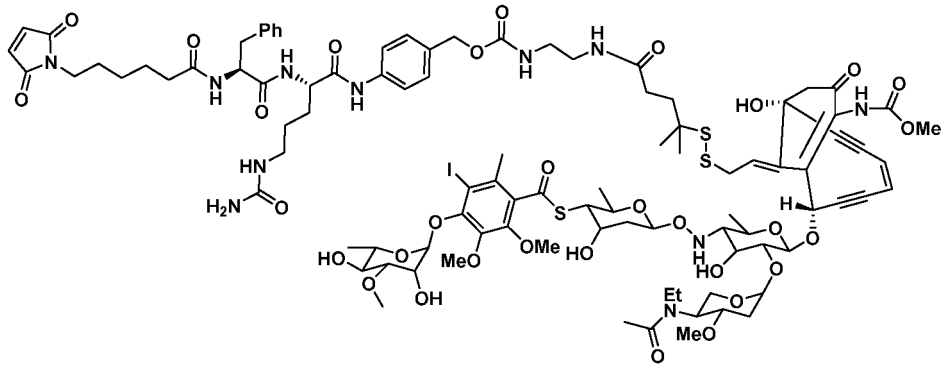
DL11 (Phe-Ala),



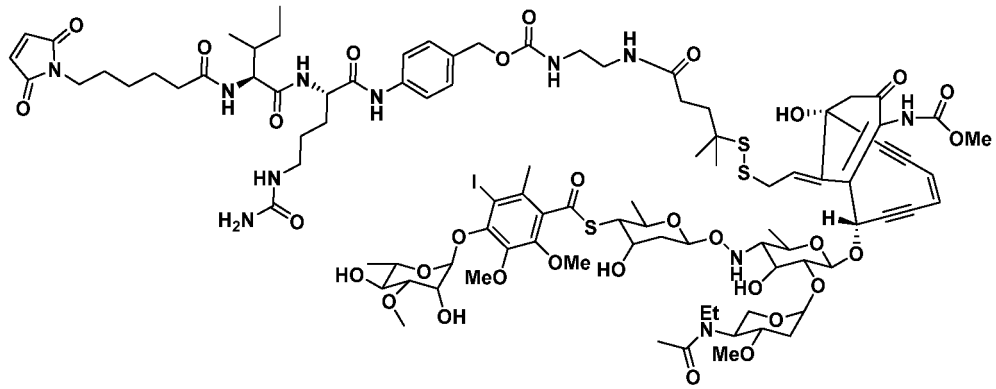
DL12 (Ile-Ala),



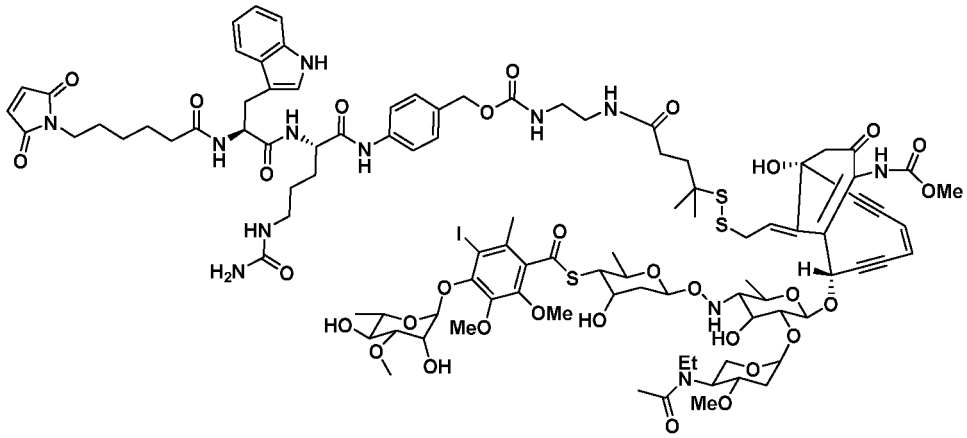
DL13 (Trp-Ala),



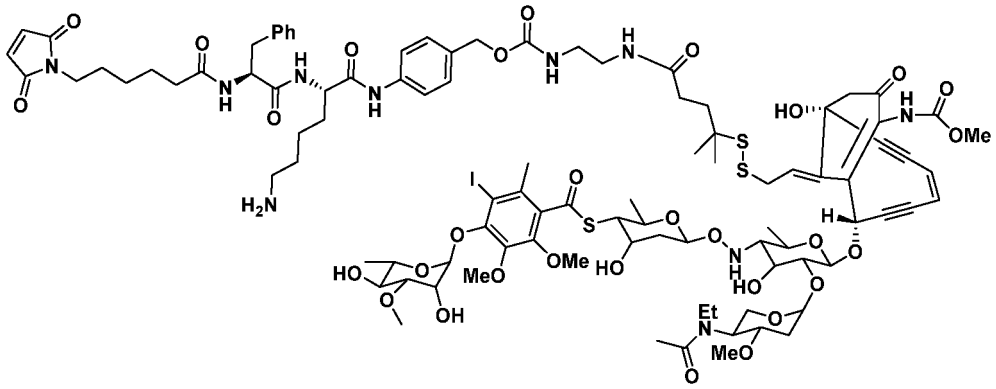
DL14 (Phe-Cit),



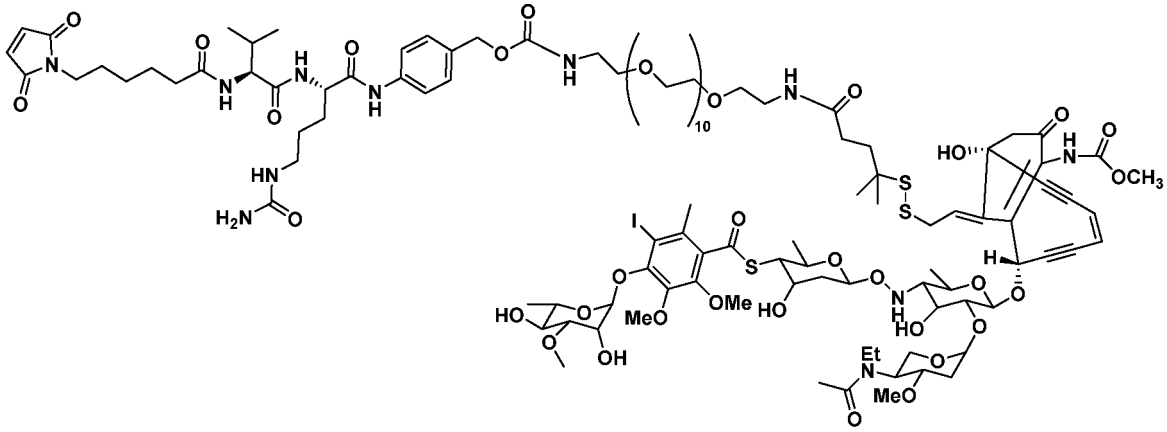
DL15 (Ile-Cit),



DL16 (Trp-Cit),



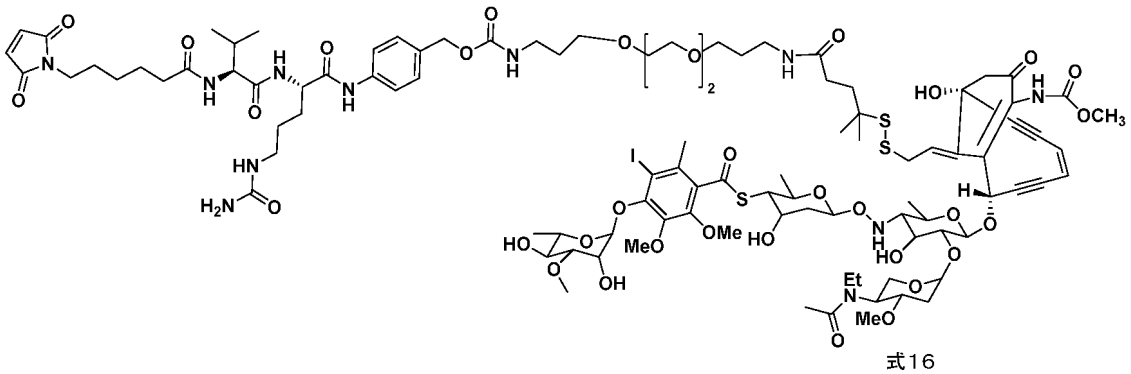
DL17 (Phe-Lys),



式17 ，

DL18 (Val-Cit – 10 Peg),

及び



式16

DL19 (Val-Cit – 2 Peg).

からなる群から選択される、薬物－リンカー化合物（すなわち、開示されている式Ａｂ－［Ｌ－Ｄ］ｎ中の［Ｌ－Ｄ］）をコンジュゲートすることを含む、適合抗体薬物コンジュゲートを作製する方法を提供する。

【０２８３】

末端マレイミド部分が付されたリンカーは、当該技術分野において認識されている技術を使用して、選択されたＴＮＦＲＳＦ２１抗体の遊離スルフヒドリルにコンジュゲートされてもよいことが理解される。前述の化合物の合成経路は、当該技術分野において周知であるが、このような薬物リンカーの組合せをコンジュゲートする具体的な方法は、以下の実施例に示されている。

【０２８４】

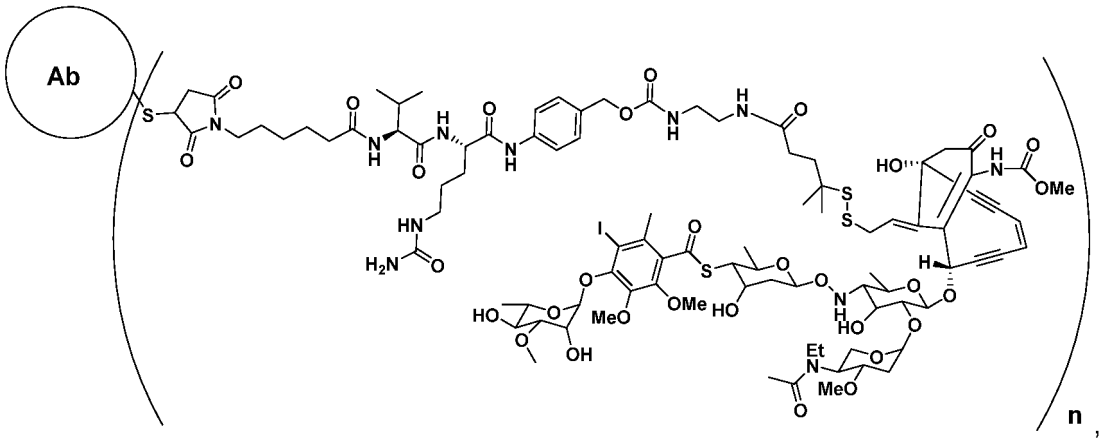
こうして、選択された態様において、本発明は、直下のＡＤＣ９～１９に実質的に示されている式Ａｂ－［Ｌ－Ｄ］ｎであるＴＮＦＲＳＦ２１イムノコンジュゲートをもたらす、開示されたＤＬ部分（ＤＬ９～ＤＬ１９）にコンジュゲートされているＴＮＦＲＳＦ２１抗体に関する。

【０２８５】

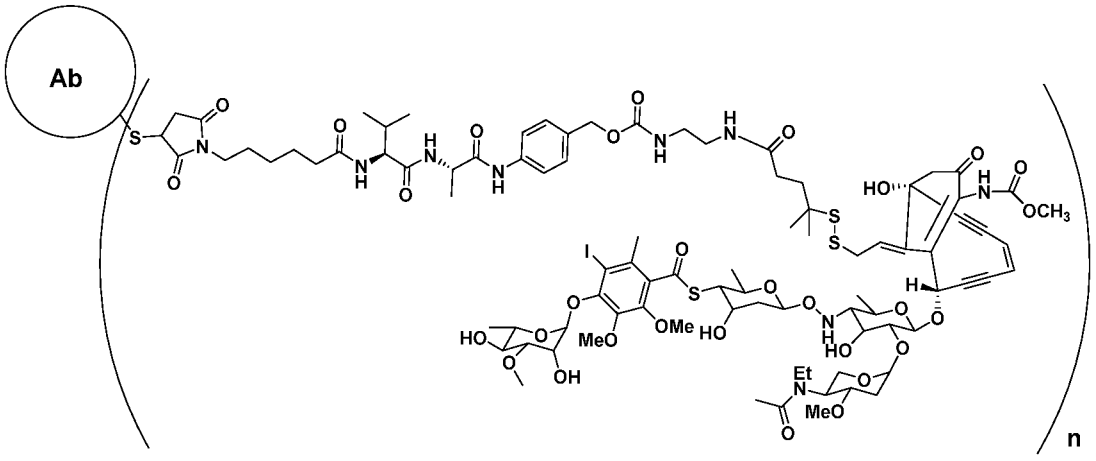
この点において、本発明のある特定の態様は、以下からなる群から選択される構造を含む、式Ａｂ－［Ｌ－Ｄ］ｎのＡＤＣを対象としている：

【０２８６】

【化３２】

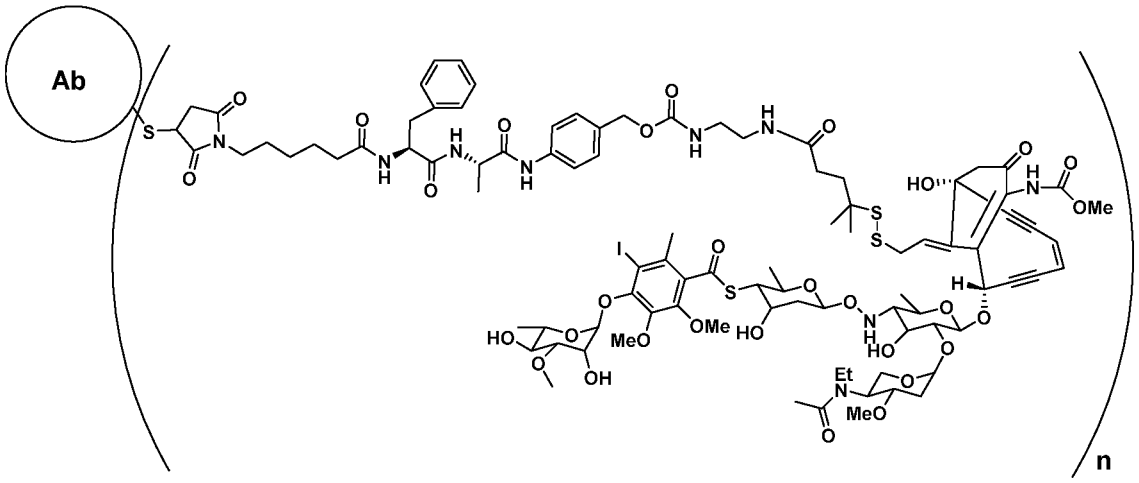


ADC9 (Val-Cit),



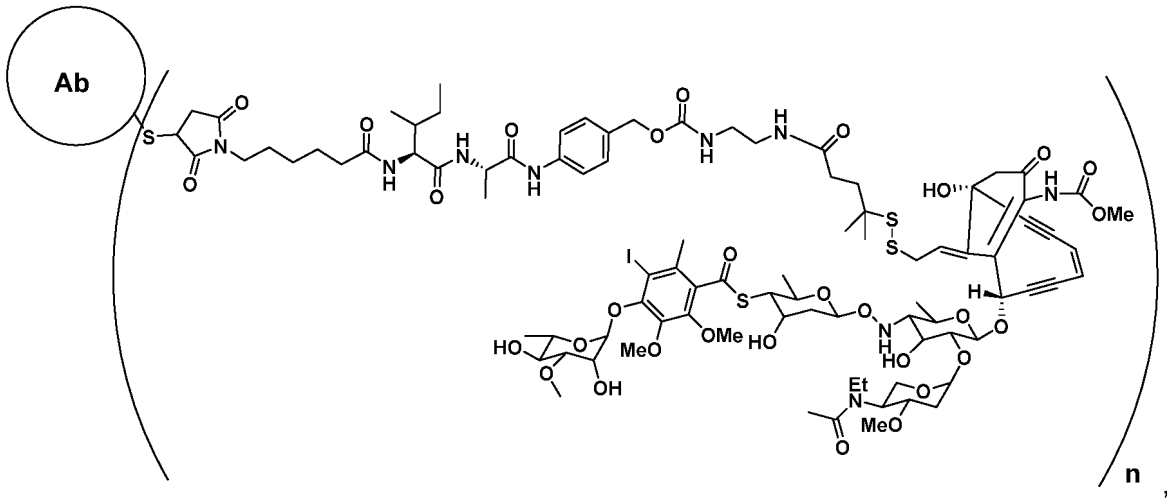
,

ADC10 (Val-Ala),



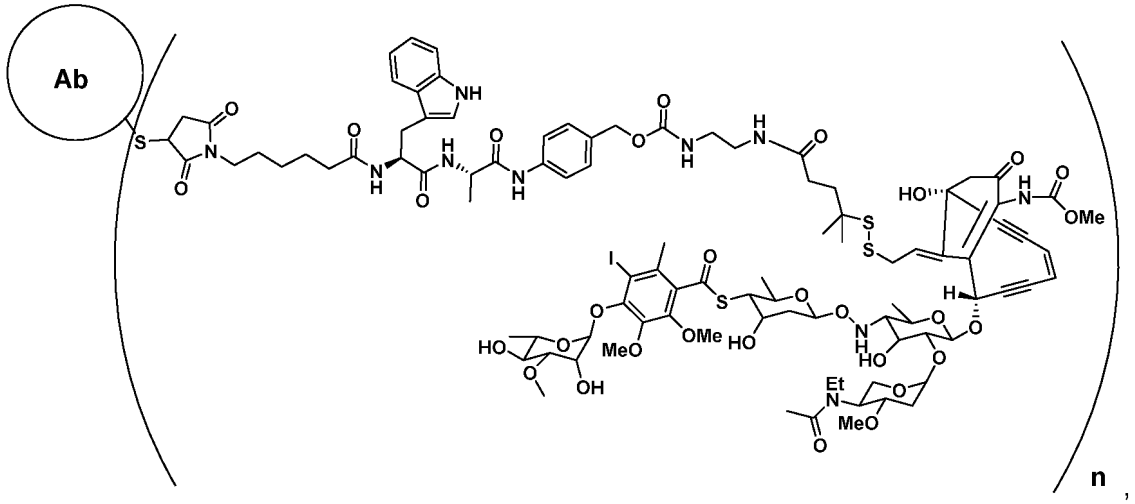
,

ADC11 (Phe-Ala),



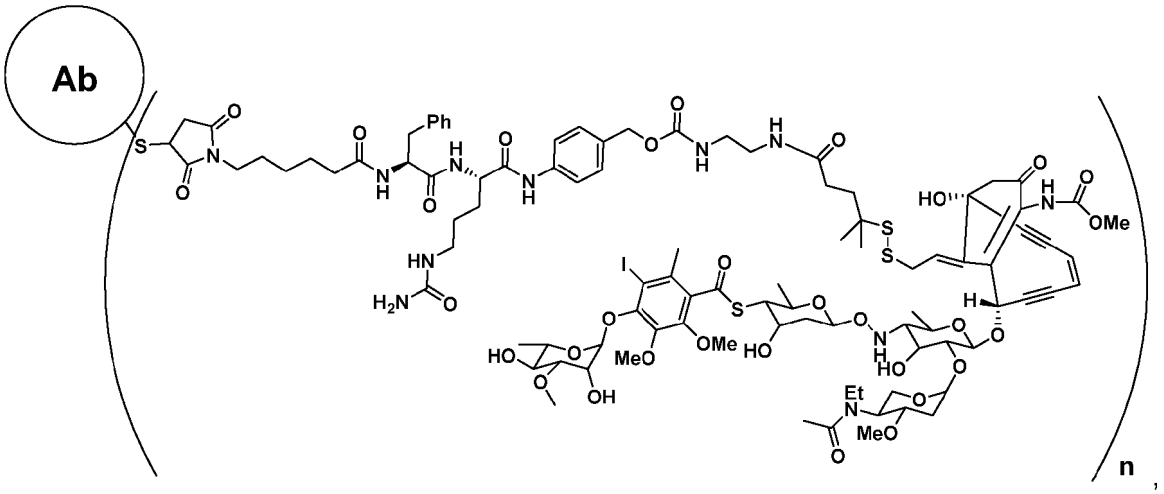
,

ADC12 (Ile-Ala),

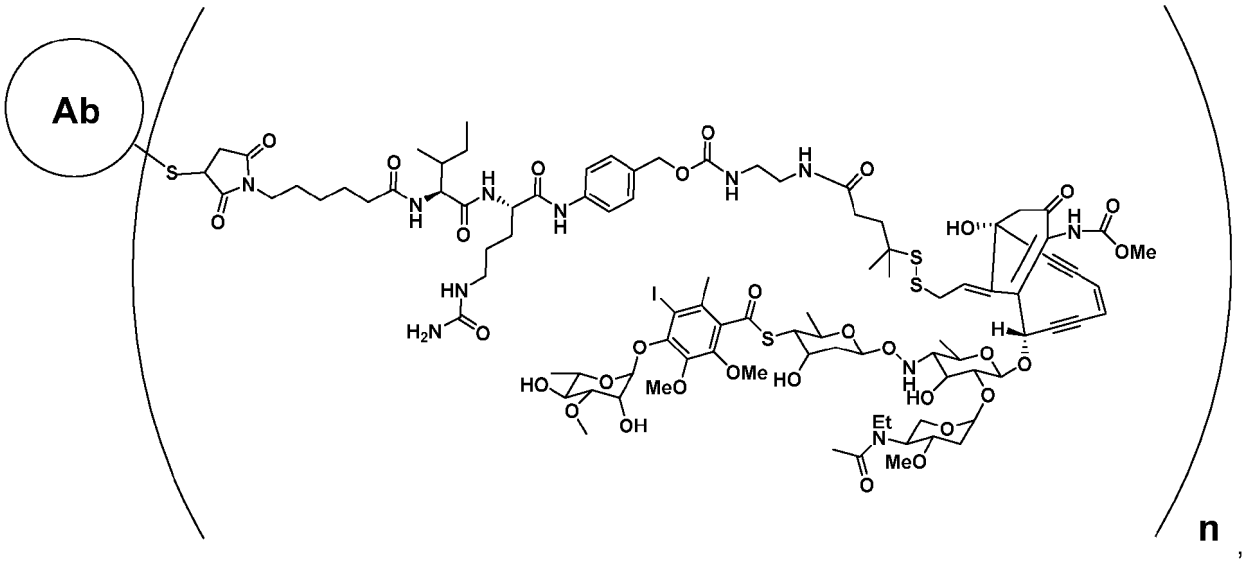


,

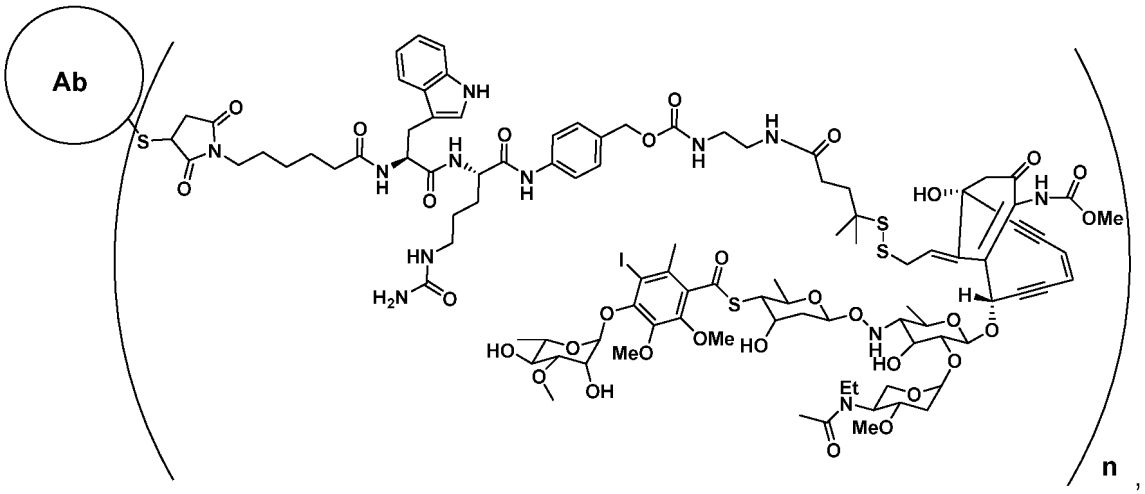
ADC13 (Trp-Ala),



ADC14 (Phe-Cit),

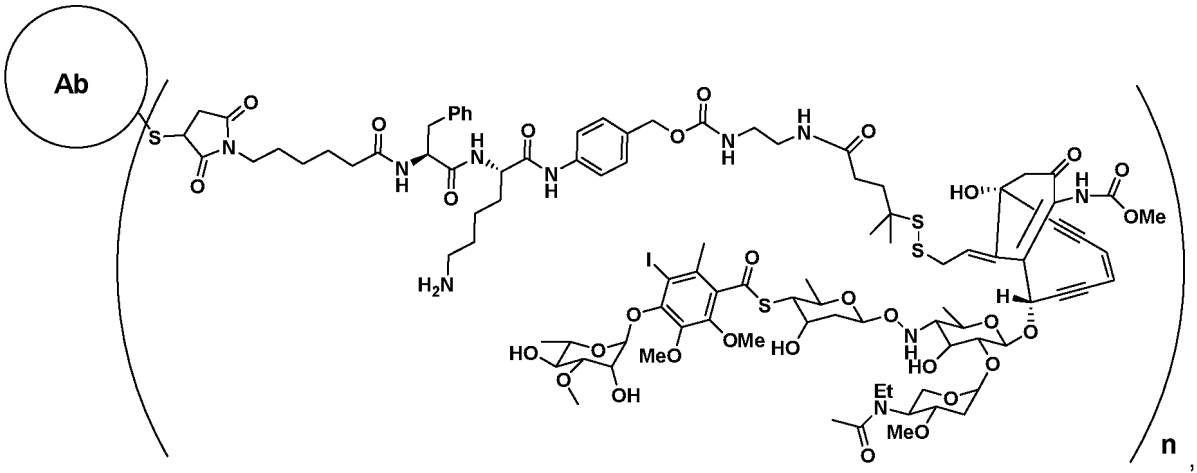


ADC15 (Ile-Cit),



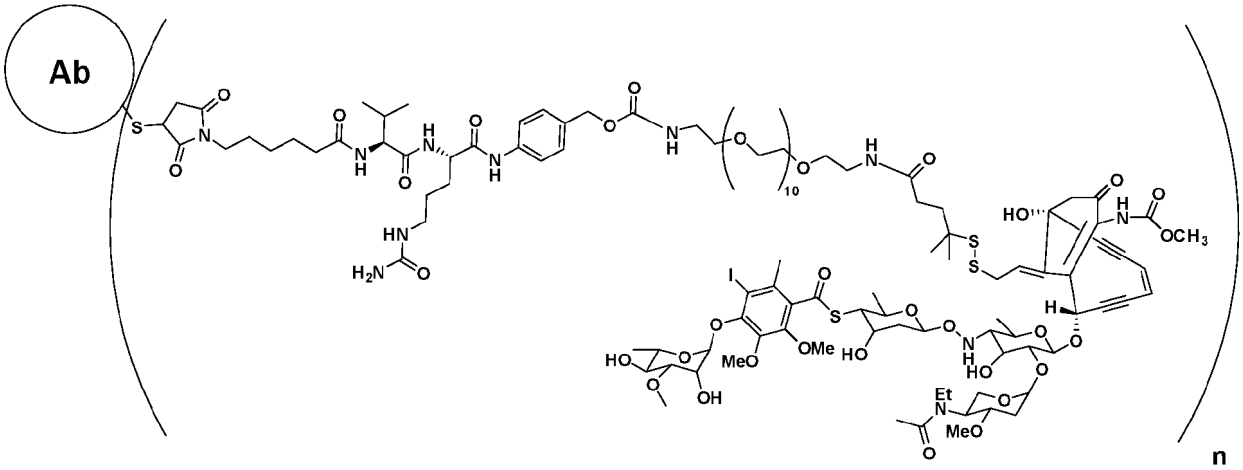
,

ADC16 (Trp-Cit),



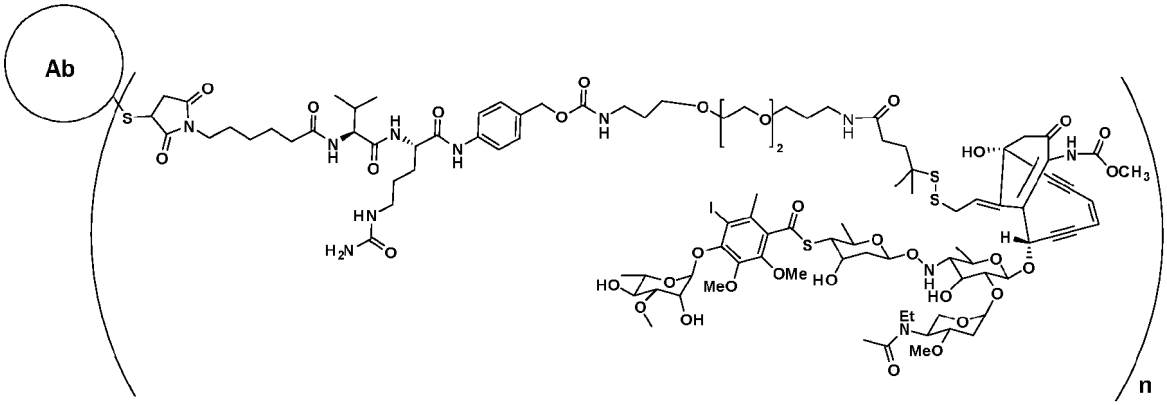
,

ADC17 (Phe-Lys),



ADC18 (Val-Cit – 10 Peg),

及び



ADC19 (Val-Cit – 2 Peg).

（式中、Ａｂは、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体又はこの免疫反応性断片を含み、ｎは、約１～２０の整数である）。好ましい実施形態において、ｎは、１～８の整数を含み、ある特定の実施形態において、ｎは、２又は４を含む。

【０２８７】

Ｃ．コンジュゲーション

いくつかの周知の反応を使用して、薬物部分及び／又はリンカーを選択された抗体に結合させ得ることが理解される。例えば、システインのスルフヒドリル基を活用する様々な反応が、所望の部分をコンジュゲートするために利用されてもよい。いくつかの実施形態は、下記に詳細に述べられた１つ以上の遊離システインを含む抗体のコンジュゲーションを含む。他の実施形態において、本発明のＡＤＣは、選択された抗体に存在するリシン残基の溶媒露出されたアミノ基への薬物のコンジュゲーションを通じて生成され得る。さらに他の実施形態は、Ｎ末端スレオニン及びセリン残基の活性化を含み、この活性化が利用されて、本開示のペイロードが抗体に連結され得る。選択されるコンジュゲーション方法は、好ましくは、抗体に結合する薬物の数を最適化し、比較的高い治療指数を得るためにあつらえられる。

【０２８８】

治療化合物をシステイン残基にコンジュゲートさせるための様々な方法は、当該技術分野において公知であり、当業者に明らかである。塩基性条件下で、システイン残基を脱プロトン化すると、マレイミド及びヨードアセトアミドなどのソフトな求電子剤と反応し得るチオレート求核剤が生成される。一般にこのようなコンジュゲーションのための試薬は、システインチオールと直接反応してコンジュゲート化タンパク質を形成してもよく又はリンカー－薬物と直接反応してリンカー－薬物中間体を形成してもよい。リンカーの場合、有機化学反応、条件及び試薬を用いる複数の経路が当業者に公知であり、例えば、（１）本発明のタンパク質のシステイン基をリンカー試薬と反応させて、共有結合を介してタンパク質－リンカー中間体を形成し、次いで、活性化化合物と反応させる経路；及び（２）化合物の求核性基をリンカー試薬と反応させて、共有結合を介した薬物－リンカー中間体を形成し、次いで本発明のタンパク質のシステイン基と反応させる経路がある。前述の記載から当業者に明らかなように、二官能性（又は二価）リンカーが本発明において有用である。例えば、二官能性リンカーは、システイン残基と共有結合するためのチオール修飾基、及び化合物と共有又は非共有結合するための少なくとも１つの結合部分（例えば、第２チオール修飾部分）を含み得る。

【０２８９】

コンジュゲーションの前に、抗体を、例えば、ジチオスレイトール（ＤＴＴ）又は（トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）を用いた処理により、リンカー試薬とのコンジュゲーションに対して反応性にしてもよい。他の実施形態において、抗体にさらなる求核性基を、リシンと試薬との反応により導入してもよく、試薬としては、これらに限定されないが、アミンをチオールに変換する２－イミノチオラン（Ｔｒａｕｔ試薬）、ＳＡＴＡ、ＳＡＴＰ又はＳＡＴ（ＰＥＧ）４が挙げられる。

【０２９０】

このようなコンジュゲーションに関して、システインチオール又はリシンアミノ基は求核性であり、リンカー試薬又は化合物－リンカー中間体又は薬物、例えば、（ｉ）活性エステル、例えば、ＮＨＳエステル、ＨＯＢｔエステル、ハロホルメート及び酸ハロゲン化物；（ｉｉ）アルキル及びベンジルハロゲン化物、例えば、ハロアセトアミド；（ｉｉｉ）アルデヒド、ケトン、カルボキシル及びマレイミド基；並びに（ｉｖ）ジスルフィド、例えば、ピリジルジスルフィド、の求電子性基と、スルフィド交換を介して反応して共有結合を形成することができる。化合物又はリンカー上の求核性基としては、これらに限定されないが、リンカー部分又はリンカー試薬の求電子性基と反応して共有結合を形成することができるアミン、チオール、ヒドロキシル、ヒドラジド、オキシム、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボキシレート及びアリールヒドラジド基が挙げられる。

【０２９１】

コンジュゲーション試薬としては、マレイミド、ハロアセチル、ヨードアセトアミドスクシンイミジルエステル、イソチオシアネート、スルホニルクロリド、２，６－ジクロロトリアジニル、ペンタフルオロフェニルエステル及びホスホラミダイトが、一般に挙げられるが、他の官能基も使用され得る。ある特定の実施形態において、方法は、例えば、マレイミド類、ヨードアセトアミド類又はハロアセチル／アルキルハライド、アジリジン、アクリロイル誘導体を使用して、システインのチオールと反応させて、化合物と反応するチオエーテルを製造することを含む。遊離チオールと活性化されたピリジルジスルフィドとのジスルフィド交換は、コンジュゲートの製造（例えば、５－チオ－２－ニトロ安息香酸（ＴＮＢ）の使用）のためにも有用である。好ましくは、マレイミドが使用される。

【０２９２】

上述のように、リシンは、本明細書に示されるコンジュゲーションを達成する反応性残基としても使用することができる。求核性リシン残基は、一般に、アミン反応性スクシンイミジルエステルを通して標的化される。最適な数の脱プロトン化リシン残基を得るために、水溶液のｐＨは、リシンアンモニウム基のｐＫａである約１０．５より低くすべきであり、したがって、反応の典型的なｐＨは約８及び９である。カップリング反応のための

一般的試薬は、リシンアシル化機構を介して求核性リシンと反応するＮＨＳ－エステルである。同様の反応を行う他の適合試薬は、イソシアネート及びイソチオシアネートを含むが、本明細書の教示と共に使用してＡＤＣを提供することもできる。リシンが活性化されたら、前述の連結基の多くが、弾頭を抗体に共有結合させるために使用され得る。

【０２９３】

化合物をスレオニン又はセリン残基（好ましくはＮ末端残基）にコンジュゲートさせるための方法も当該技術分野で公知である。例えば、カルボニル前駆体を、セリン又はスレオニンの１，２－アミノアルコールから誘導し、過ヨウ素酸酸化により選択的にかつ迅速にアルデヒド形態に変換させることができる方法が記載されている。アルデヒドを、本発明のタンパク質に結合する化合物におけるシステインの１，２－アミノチオールと反応させることにより、安定なチアゾリジン生成物が形成される。この方法は、Ｎ末端セリン又はスレオニン残基でタンパク質を標識するために特に有用である。

【０２９４】

いくつかの実施形態において、反応性チオール基が、選択された抗体（又はその断片）に、１、２、３、４又はより多くの遊離システイン残基を導入することにより（例えば、１つ以上の遊離非天然システインアミノ酸残基を含む抗体を調製することにより）、導入され得る。少なくとも部分的には、本明細書に示す改変された遊離システイン部位及び／又は新規コンジュゲーション手法が提供されるため、このような部位特異的抗体又は改変抗体により、コンジュゲート調製物が、向上した安定性及び実質的な均一性を示すことが可能になる。鎖内又は鎖間抗体ジスルフィド結合のそれぞれを完全又は部分的に還元してコンジュゲーション部位を提供する従来のコンジュゲーション方法（本発明に完全に適合する）と異なり、本発明はある特定の調製された遊離システイン部位の選択的還元及びそれに対する薬物リンカーの結合をさらに提供する。

【０２９５】

これに関して、部位の改変及び選択的還元により特異的に促進されたコンジュゲーションにより、所望の位置での部位特異的コンジュゲーションの割合が高くなるのを可能にすることが理解される。重大なことに、これらのコンジュゲーション部位の一部、例えば、軽鎖定常領域の末端領域に存在するコンジュゲーション部位は、他の遊離システインと交差反応しやすいために、一般に有効にコンジュゲートすることが困難である。しかしながら、得られた遊離システインの分子的操作及び選択的還元により、望ましくない高ＤＡＲ混入物及び非特異的毒性を大きく減少させる効率的なコンジュゲーション率が得られ得る。より一般的には、選択的還元を含む改変された構築物及び本開示の新規コンジュゲーション方法は、改善された薬物動態及び／又は薬力学並びに潜在的な改善された治療指数を有するＡＤＣ調製物を提供する。

【０２９６】

ある特定の実施形態において、部位特異的構築物は、遊離システインを提示しており、還元されると、上記で開示するようなリンカー部分の求電子性基と反応して共有結合を形成することができる求核性チオール基を含む。上記のように、本発明の抗体は、還元可能な不対の鎖間若しくは鎖内システイン又は導入された非天然システイン、つまりこのような求核性基を提供するシステインを有してもよい。したがって、ある特定の実施形態において、還元された遊離システインの遊離スルフヒドリル基と、開示される薬物リンカーの末端マレイミド又はハロアセトアミド基との反応により、所望のコンジュゲーションが提供される。このような場合に、抗体の遊離システインは、還元剤、例えば、ジチオスレイトール（ＤＴＴ）又は（トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン（ＴＣＥＰ）での処理により、リンカー試薬とのコンジュゲーションに反応性にされてもよい。したがって、各遊離システインは、理論的には、反応性チオール求核剤を提供する。このような試薬は、本発明に特に適合するが、部位特異的抗体のコンジュゲーションは、当業者に一般に公知の様々な反応、条件及び試薬を使用して行われ得ることが理解される。

【０２９７】

さらに、操作された抗体の遊離システインは、選択的に還元されて、部位特異的コンジ

ュゲーションの向上及び望ましくない潜在的な毒性混入物の減少をもたらし得ることが見出された。より詳細には、アルギニンなどの「安定化剤」は、タンパク質中の分子内又は分子間相互作用を調節することが見出され、選択された還元剤（好ましくは比較的穏やか）と組み合わせて使用され、遊離システインを選択的に還元し、本明細書に示される部位特異的コンジュゲーションを容易にし得る。本明細書で使用される場合、用語「選択的還元」又は「選択的に還元される」は、相互に交換可能に使用され得、改変抗体に存在する天然ジスルフィド結合を実質的に破壊することのない遊離システインの還元を意味する。選択された実施形態において、この選択的な還元は、ある特定の還元剤又はある特定の還元剤濃度の使用により行われ得る。他の実施形態において、改変構築物の選択的還元は、還元剤（穏やかな還元剤を含む）と組み合わせた安定化剤の使用を含む。用語「選択的コンジュゲーション」は、本明細書に記載の細胞毒の存在下で選択的に還元されている、操作された抗体のコンジュゲーションを意味することが理解される。この点に関して、選択された還元剤と組み合わせたこのような安定化剤（例えば、アルギニン）の使用は、抗体重鎖及び軽鎖のコンジュゲーションの程度並びに調製物のＤＡＲ分布により決定される部位特異的コンジュゲーションの効率を顕著に改善し得る。適合する抗体構築物並びに選択的コンジュゲーション技術及び試薬は、本明細書に詳細に組み込むＷＯ２０１５／０３１６９８においてこのような方法及び構築物に関して詳細に開示されている。

【０２９８】

特定の理論に制限されることは望まないが、このような安定化剤は、所望のコンジュゲーション部位で静電気的微小環境を調節及び／又は立体配座変化を調節するように作用し得、それにより比較的穏やかな還元剤（無傷の天然のジスルフィド結合を実質的に還元しない）に、所望の遊離システイン部位でのコンジュゲーションを促進させる。このような物質（例えば、ある特定のアミノ酸）は、塩橋を形成（水素結合及び静電相互作用を介して）することが知られており、好ましい立体配座変化を生じさせ得、そして／又は好ましくないタンパク質－タンパク質相互作用を減少させる安定化効果を付与するようにタンパク質－タンパク質相互作用を調節し得る。さらに、このような物質は、還元後の望ましくない分子内（及び分子間）システイン－システイン結合の形成を阻害するように作用し得、したがって、改変された部位特異的システインが（好ましくはリンカーを介して）薬物に結合する所望のコンジュゲーション反応が促進される。選択的還元条件は、無傷の天然のジスルフィド結合を顕著に還元しないので、後のコンジュゲーション反応は自然に、遊離システイン上の比較的反応性の少ないチオール（例えば、好ましくは抗体あたり２つの遊離チオール）に向かう。先に言及したように、このような技術は、本開示に従って作製されるコンジュゲート調製物における非特異的コンジュゲーション及び対応する望ましくないＤＡＲ種のレベルを相当に減少させるために使用され得る。

【０２９９】

選択された実施形態において、本発明に適合する安定化剤は、一般的に、塩基性ｐＫａを有する少なくとも１つの成分を有する化合物を含む。ある特定の実施形態において、この成分は、一級アミンを含むが、他の実施形態において、アミン部分は、二級アミンを含む。さらに他の実施形態において、アミン部分は、三級アミン又はグアニジニウム基を含む。他の選択された実施形態において、アミン部分は、アミノ酸を含み、他の適合する実施形態において、アミン部分は、アミノ酸側鎖を含む。さらに他の実施形態において、アミン部分は、タンパク質性アミノ酸を含む。さらに他の実施形態において、アミン部分は、非タンパク質性アミノ酸を含む。いくつかの実施形態において、適合する安定化剤は、アルギニン、リシン、プロリン及びシステインを含み得る。ある特定の好ましい実施形態において、安定化剤は、アルギニンを含む。さらに適合安定化剤は、グアニジン及び塩基性ｐＫａを有する窒素含有複素環を含み得る。

【０３００】

ある特定の実施形態において、適合安定化剤は、約７．５より大きいｐＫａを有する少なくとも１つのアミン部分を有する化合物を含む。他の実施形態において、対象アミン部分は、約８．０より大きいｐＫａを有し、さらに他の実施形態において、アミン部分は、

約８．５より大きいｐＫａを有し、さらに他の実施形態において、安定化剤は、約９．０より大きいｐＫａを有するアミン部分を含む。他の実施形態は、アミン部分が約９．５より大きいｐＫａを有する安定化剤を含み、一方で、ある特定の他の実施形態は、約１０．０より大きいｐＫａを有する少なくとも１つのアミン部分を示す安定化剤を含む。さらに他の実施形態において、安定化剤は、約１０．５より大きいｐＫａを有するアミン部分を有する化合物を含み、他の実施形態において、安定化剤は、約１１．０より大きいｐＫａを有するアミン部分を有する化合物を含み、さらに他の実施形態において、安定化剤は、約１１．５より大きいｐＫａを有するアミン部分を含む。さらに他の実施形態において、安定化剤は、約１２．０より大きいｐＫａを有するアミン部分を有する化合物を含み、さらに他の実施形態において、安定化剤は、約１２．５より大きいｐＫａを有するアミン部分を含む。当業者は、関連するｐＫａが、標準的技術を使用して容易に計算又は決定され得、安定化剤としての選択された化合物の使用の適応性を決定するために使用され得ることを理解する。

【０３０１】

開示される安定化剤は、ある特定の還元剤と組み合わされるときに、遊離の部位特異的システインに対するコンジュゲーションの標的化において特に有効であることが示される。本発明の目的に関して、適合する還元剤は、改変抗体の天然ジスルフィド結合を顕著に破壊することなく、コンジュゲーションについて部位特異的な還元された遊離のシステインを生じさせる、任意の化合物を含み得る。好ましくは、このような選択された安定化剤と還元剤との組合せによりもたらされる条件下において、活性化薬物リンカーは、所望の遊離の部位特異的システイン部位に結合するよう大きく制限されることになる。比較的低濃度で使用され、穏やかな条件を与える比較的穏やかな還元剤又は還元剤が、特に好ましい。本明細書で使用される場合、用語「穏やかな還元剤」又は「穏やかな還元条件」は、改変抗体に存在する天然ジスルフィド結合を実質的に破壊することなく、遊離システイン部位でチオールを提供する還元剤により（任意選択的に安定化剤の存在下で）もたらされる任意の物質又は条件を意味することが支持される。つまり、穏やかな還元剤又は条件（好ましくは安定化剤との組合せ）は、タンパク質の天然ジスルフィド結合を顕著に破壊することなく、遊離システインを効果的に還元する（チオールを提供する）ことができる。所望の還元条件は、選択的コンジュゲーションのための適切な環境を確立するいくつかのスルフヒドリル系化合物により提供され得る。実施形態において、穏やかな還元剤は、１つ以上の遊離チオールを有する化合物を含み得、いくつかの実施形態において、穏やかな還元剤は、単一の遊離チオールを有する化合物を含む。本発明の選択的還元技術に適合する還元剤の非限定的な例としては、グルタチオン、ｎ－アセチルシステイン、システイン、２－アミノエタン－１－チオール及び２－ヒドロキシエタン－１－チオールが挙げられる。

【０３０２】

上記に示される選択的還元プロセスは、遊離のシステインに対する標的化コンジュゲーションで特に効果的であることが理解される。この点に関して、部位特異的抗体における、所望の標的部位に対するコンジュゲーションの程度（ここでは「コンジュゲーション効率」として定義する）は、当該技術分野で受け入れられている様々な技術により決定され得る。抗体に対する薬物の部位特異的コンジュゲーション効率は、全ての他のコンジュゲーション部位に対する標的コンジュゲーション部位（例えば、各軽鎖のｃ末端の遊離システイン）のコンジュゲーションのパーセンテージを評価することによって決定され得る。ある特定の実施形態において、本明細書における方法は、遊離システインを含む抗体に薬物を効率的にコンジュゲートすることを提供する。いくつかの実施形態において、コンジュゲーション効率は、全ての他のコンジュゲーション部位に対する標的コンジュゲーションのパーセンテージにより測定して、少なくとも５％、少なくとも１０％、少なくとも１５％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、

少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９８％又はそれ以上である。
【０３０３】
コンジュゲーション可能な改変抗体は、抗体が産生又は保存されるときに、阻止又はキャップされるスルフヒドリル基を含む遊離システイン残基を含有し得ることが、さらに理解される。このようなキャップとしては、小分子、タンパク質、ペプチド、イオン及びスルフヒドリル基と相互作用し、コンジュゲート形成を予防又は阻害する他の物質が挙げられる。いくつかの場合において、コンジュゲートしていない改変抗体は、同じ又は異なる抗体上の他の遊離システインに結合する遊離システインを含んでもよい。本明細書で述べられているように、このような交差反応性は、作製手順の間に様々な混入物を導き得る。いくつかの実施形態において、改変抗体は、コンジュゲーション反応の前にキャップをはずすことを必要とし得る。特定の実施形態において、本明細書の抗体は、キャップされておらず、コンジュゲーション可能な遊離スルフヒドリル基を提示する。特定の実施形態において、本明細書の抗体は、天然に存在するジスルフィド結合を破壊せず、再配列もしない、キャップ除去反応にかけられる。ほとんどの場合において、キャップ除去反応は通常の還元反応（還元又は選択的還元）中に生じることが理解される。
【０３０４】
Ｄ．ＤＡＲ分布及び精製
選択された実施形態において、本発明に適合するコンジュゲーション及び精製方法は、狭いＤＡＲ分布を含む比較的均質なＡＤＣ調製物を生成する能力を有利にもたらす。この点に関して、本開示の構築物（例えば、部位特異的構築物）及び／又は選択的コンジュゲーションは、薬物と改変抗体との間の化学量論比の観点及び毒素の位置に関して、試料内のＡＤＣ種に均質性を提供する。上記で簡単に述べたように、用語「薬物対抗体比」すなわち「ＤＡＲ」は、ＡＤＣ調製物内の抗体に対する薬物のモル比を指す。ある特定の実施形態において、コンジュゲート調製物は、そのＤＡＲ分布に関して実質的に均質であり得、このことは、ＡＤＣ調製物内で、ローディングの部位（すなわち、遊離システイン上）に関しても均一である特定の薬物ローディング（例えば、２又は４の薬物ローディング）を有する部位特異的ＡＤＣが主要な種であることを意味する。本発明の他のある特定の実施形態において、部位特異的抗体及び／又は選択的還元並びにコンジュゲーションの使用を通じて所望の均質性を達成することができる。他の実施形態において、所望の均質性は、選択的還元と組み合わせた部位特異的構築物の使用を通じて達成し得る。さらに他の実施形態において、適合する調製物は、所望の均質性を得るために分析的又は分取クロマトグラフィー技術を使用して精製され得る。これらの実施形態のそれぞれにおいて、ＡＤＣ試料の均質性は、当該技術分野で公知の様々な技術、例えば、これらに限定されないが、質量分析、ＨＰＬＣ（例えば、サイズ排除ＨＰＬＣ、ＲＰ－ＨＰＬＣ、ＨＩＣ－ＨＰＬＣなど）又はキャピラリー電気泳動を使用して解析され得る。
【０３０５】
ＡＤＣ調製物の精製に関して、所望の純度を得るために、標準的医薬調製方法が使用され得ることが理解される。本明細書において述べられているように、液体クロマトグラフィー方法、例えば、逆相（ＲＰ）及び疎水性相互作用クロマトグラフィー（ＨＩＣ）は、薬物負荷値により混合物中の化合物を分離することができる。一部の場合に、イオン交換（ＩＥＣ）又は混合モードクロマトグラフィー（ＭＭＣ）を使用して、特異的薬物負荷を有する種を単離してもよい。
【０３０６】
いずれにしても本開示のＡＤＣ及びその調製物は、抗体の立体構造に依存して、そしてコンジュゲーションを達成するために使用される方法に少なくとも部分的に依存して、様々な化学量論モル比の薬物部分及び抗体成分を含むことができる。ある特定の実施形態において、ＡＤＣあたりの薬物負荷は、１から２０の弾頭を含み得る（すなわち、ｎは１～２０である）。他の選択された実施形態は、１から１５の弾頭の薬物負荷を有するＡＤＣを含む。さらに他の実施形態において、ＡＤＣは、１から１２の弾頭、又はより好ましくは１から１０の弾頭を含み得る。いくつかの実施形態において、ＡＤＣは、１から８の弾

頭を含む。

【０３０７】

理論的薬物負荷は比較的高くてもよいが、遊離システイン交差反応性及び弾頭疎水性などの実際上の限定により、このようなＤＡＲを含む均質な調製物の生成は、凝集物及び他の混入物により限定される傾向がある。つまり、高い薬物負荷、例えば、＞８又は１０の薬物負荷は、ペイロードによって、ある特定の抗体薬物コンジュゲートの、凝集、不溶性、毒性又は細胞透過性の消失を引き起こし得る。このような懸念の観点から、本発明により提供される薬物負荷は、好ましくは、コンジュゲートあたり１から８個の薬物の範囲であり、すなわち各抗体に１、２、３、４、５、６、７又は８個の薬物が共有結合している（例えば、ＩｇＧ１の場合には、他の抗体が、ジスルフィド結合の数に応じて異なる負荷性を有し得る）。好ましくは、本発明の組成物のＤＡＲは、およそ２、４又は６であり、いくつかの実施形態において、ＤＡＲはおよそ２である。

【０３０８】

本発明により提供される比較的高いレベルの均質性にかかわらず、本開示の組成物は、ある範囲の（ＩｇＧ１の場合は１から８の範囲の）薬物化合物を有するコンジュゲートの混合物を実際に含む。このように、開示されるＡＤＣ組成物は、コンジュゲートの混合物を含み、ここで構成要素の抗体のほとんどは、１つ以上の薬物部分に共有結合的に連結されており、（改変された構築物及び選択的還元によりもたらされる相対的なコンジュゲート特異性にもかかわらず、）薬物部分は様々なチオール基により抗体に結合されていてもよい。つまり、以下のコンジュゲーション、本発明の組成物は、様々な濃度の異なる薬物負荷（例えば、ＩｇＧ１抗体あたり１から８の薬物）を有するＡＤＣの混合物を含む（遊離システインの交差反応性によって主に引き起こされるある特定の反応混入物を含む）。しかしながら選択的還元及び作製後の精製を使用して、コンジュゲート組成物は、単一の主要な所望のＡＤＣ種（例えば、２の薬物負荷を有する）を大量に含み、他のＡＤＣ種（例えば、１、４、６などの薬物負荷を有する）は比較的低レベルとなる点に導かれ得る。平均ＤＡＲ値は、組成物全体に対する薬物負荷（すなわち、全てのＡＤＣ種をまとめたもの）の加重平均を表す。用いられる定量法の固有の不確定性と商業的状況において非優勢ＡＤＣ種を完全に除去することの困難性とにより、許容可能なＤＡＲ値又は特異度、平均値、範囲又は分布として表されることが多い（すなわち、平均ＤＡＲが２＋／－０．５）。好ましくは、範囲内（すなわち、１．５から２．５）に測定された平均ＤＡＲを含む組成物が、医薬的状況において使用される。

【０３０９】

したがって、いくつかの実施形態において、本発明は、１、２、３、４、５、６、７又は８でそれぞれ＋／－０．５の平均ＤＡＲを有する組成物を含む。他の実施形態において、本発明は、２、４、６又は８＋／－０．５の平均ＤＡＲを含む。最終的に、選択された実施形態において、本発明は、２＋／－０．５又は４＋／－０．５の平均ＤＡＲを含む。この範囲又は偏差は、いくつかの実施形態において、０．４未満であり得ることが理解される。したがって、他の実施形態において、組成物は、１、２、３、４、５、６、７若しくは８でそれぞれ＋／－０．３の平均ＤＡＲ、２、４、６若しくは８＋／－０．３の平均ＤＡＲ、さらにより好ましくは２若しくは４＋／－０．３の平均ＤＡＲ、又はさらには２＋／－０．３の平均ＤＡＲを含む。他の実施形態において、ＩｇＧ１コンジュゲート組成物は、好ましくは、平均ＤＡＲが１、２、３、４、５、６、７又は８でそれぞれ＋／－０．４で、非優勢ＡＤＣ種が比較的低いレベル（すなわち、３０％未満）である組成物を含む。他の実施形態において、ＡＤＣ組成物は、２、４、６又は８でそれぞれ＋／－０．４の平均ＤＡＲを含み、非優勢ＡＤＣ種を比較的低レベル（＜３０％）で含む。いくつかの実施形態において、ＡＤＣ組成物は、２＋／－０．４の平均ＤＡＲを含み、非優勢ＡＤＣ種を比較的低いレベル（＜３０％）で含む。さらに他の実施形態において、優勢ＡＤＣ種（例えば、薬物ローディングが２又は薬物ローディングが４）は、組成物中に存在する他の全てのＤＡＲ種に対して測定すると、５０％超の濃度、５５％超の濃度、６０％超の濃度、６５％超の濃度、７０％超の濃度、７５％超の濃度、８０％超の濃度、８５％超の濃

度、９０％超の濃度、９３％超の濃度、９５％超の濃度又はさらに９７％超の濃度で存在する。

【０３１０】

以下の実施例において詳述されているように、コンジュゲーション反応由来のＡＤＣの調製物における抗体あたりの薬物の分布は、ＵＶ－Ｖｉｓ分光光度法、逆相ＨＰＬＣ、ＨＩＣ、質量分析法、ＥＬＩＳＡ及び電気泳動法のような従来手段により特徴付けられ得る。抗体あたりの薬物の観点でＡＤＣの定量的分布も、決定され得る。ＡＤＣの特定の調製物における抗体あたりの薬物の平均値は、ＥＬＩＳＡによって決定され得る。しかし、抗体価あたりの薬物分布は、抗体－抗原結合、及びＥＬＩＳＡの検出限界によって認識されない。同様に、抗体－薬物コンジュゲートの検出向けのＥＬＩＳＡアッセイは、薬物部分が抗体の（抗体の重鎖若しくは軽鎖断片、又は特定のアミノ酸残基などの）どこに結合しているかを決定しない。

【０３１１】

ＶＩ．診断及びスクリーニング

Ａ．診断

本発明は、増殖性障害を検出、診断又は監視するためのインビトロ及びインビボの方法並びに患者からの細胞をスクリーニングして、腫瘍形成性細胞を含む腫瘍細胞を同定するための方法を提供する。このような方法は、がんを有する個体を治療のために特定すること又はがんの進行を監視する方法であって、患者又は患者から得られた試料を、ＴＮＦＲＳＦ２１決定因子を特異的に認識し、会合することができる検出剤（例えば、抗体又は核酸プローブ）と、（インビボ又はインビトロのいずれかで）接触させること及び試料における検出剤の存在若しくは不在又は会合のレベルを検出することを含む、方法を含む。選択された実施形態において、検出剤は、本明細書に記載の検出可能な標識又はレポーター分子と会合した抗体を含む。特定の他の実施形態において、ＴＮＦＲＳＦ２１抗体は、投与され、二次標識抗体（例えば、抗マウス抗体）を用いて検出される。さらに他の実施形態（例えば、インサイチュハイブリダイゼーション又はＩＳＨ）において、ゲノムＴＮＦＲＳＦ２１決定因子と反応する核酸プローブは、増殖性障害の検出、診断又は監視に使用される。

【０３１２】

より一般的に、ＴＮＦＲＳＦ２１決定因子の存在及び／又はレベルは、タンパク質又は核酸解析のために当業者に利用可能ないくつかの任意の技術、例えば、直接的物理学的測定（例えば、質量分析）、結合アッセイ（例えば、イムノアッセイ、凝集アッセイ及びイムノクロマトグラフィーアッセイ）、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ、ＲＴ－ＰＣＲ；ＲＴ－ｑＰＣＲ）技術、分岐オリゴヌクレオチド技術、ノザンブロット技術、オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション技術並びにインサイチュハイブリダイゼーション技術を使用して測定されてもよい。方法には、化学反応、例えば、光学的吸光度の変化、蛍光の変化、化学発光若しくは電気化学発光の生成、反射率、屈折率若しくは光散乱の変化、検出可能標識の蓄積若しくは表面からの放出、酸化若しくは還元若しくは酸化還元種、電流若しくは電位、磁場の変化などから生じるシグナルの測定を含んでもよい。適切な検出技術は、光発光（例えば、蛍光、時間分解蛍光、エバネッセント波蛍光、アップコンバート性リン、多光子蛍光の測定を介する）、化学発光、電気化学発光、光散乱、光吸収、放射能、磁場、酵素活性（例えば、光吸収若しくは蛍光の変化を生じさせる又は化学発光の放射を生じさせる酵素反応を通じた酵素活性の測定による）を介した標識の測定を通じて、標識された結合試薬の参加を測定することにより、結合事象を検出してもよい。代替的に、標識の使用を必要としない検出技術、例えば、質量（例えば、表面弾性波測定）、屈折率（例えば、表面プラズモン共鳴測定）又は分析物の固有の発光の測定に基づく技術を使用してもよい。

【０３１３】

いくつかの実施形態において、検出剤と試料中の特定の細胞又は細胞成分との会合は、試料が腫瘍形成性細胞を含む可能性があることを示しており、したがって、がんを有する

個体を本明細書に記載の抗体又はＡＤＣを用いて効果的に治療し得ることを示している。
【０３１４】
ある特定の好ましい実施形態において、アッセイには、免疫組織化学（ＩＨＣ）アッセイ若しくはこの変形（例えば、蛍光、色素生産性、標準ＡＢＣ、標準ＬＳＡＢなど）、免疫細胞化学若しくはこの変形（例えば、直接、間接、蛍光、色素生産性など）又はインサイチュハイブリダイゼーション（ＩＳＨ）若しくはこの変形（例えば、色素生産性インサイチュハイブリダイゼーション（ＣＩＳＨ）若しくは蛍光インサイチュハイブリダイゼーション（ＤＮＡ－ＦＩＳＨ又はＲＮＡ－ＦＩＳＨ］））が含まれてもよい。
【０３１５】
この点に関して、本発明のある特定の態様は、免疫組織化学（ＩＨＣ）のための標識されたＴＮＦＲＳＦ２１の使用を含む。より詳細には、ＴＮＦＲＳＦ２１　ＩＨＣは、様々な増殖性障害の診断を補助するため及びＴＮＦＲＳＦ２１抗体療法を含む治療に対する潜在的な応答を監視するための診断ツールとして使用され得る。ある特定の実施形態において、ＴＮＦＲＳＦ２１は、１つ以上のレポーター分子にコンジュゲートされている。他の実施形態において、ＴＮＦＲＳＦ２１抗体は、標識されておらず、１つ以上のレポーター分子に会合している個別の薬剤（例えば、抗マウス抗体）を用いて検出される。本明細書で議論するように及び下記実施例において示されるように、適合する診断アッセイは、化学的に固定された組織（これらに限定されないが、ホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド（ｇｌｕｔｅｒａｌｄｅｈｙｄｅ）、四酸化オスミウム、重クロム酸カリウム、酢酸、アルコール、亜鉛塩、塩化第二水銀、四酸化クロム及びピクリン酸が挙げられる）並びに包埋された組織（これらに限定されないが、グリコールメタクリレート、パラフィン及び樹脂が挙げられる）、又は凍結を介して保存された組織に対して、実施され得る。このようなアッセイは、治療の決定に対する道筋を立て、投与レジメン及びタイミングを決定するために使用され得る。
【０３１６】
他の特に適合する本発明の態様は、ＴＮＦＲＳＦ２１決定因子を検出又は監視するためのインサイチュハイブリダイゼーションの使用を含む。インサイチュハイブリダイゼーション技術又はＩＳＨは、当業者にとって周知である。簡潔には、細胞を固定し、特定のヌクレオチド配列を含有する検出可能なプローブを固定した細胞に加える。細胞が相補的ヌクレオチド配列を含有する場合には、検出され得るプローブは、それらの配列にハイブリダイズする。本明細書に示す配列情報を使用して、遺伝子型ＴＮＦＲＳＦ２１決定因子を発現する細胞を特定するようにプローブを設計することができる。プローブは、好ましくは、そのような決定因子に対応するヌクレオチド配列にハイブリダイズする。ハイブリダイゼーション条件は、不完全な相補的ハイブリダイゼーションによるバックグラウンドシグナルを最小化するように慣用的に最適化することができるが、好ましくは、プローブは、選択されたＴＮＦＲＳＦ２１決定因子に完全に相補的であることが好ましい。選択された実施形態において、プローブは、プローブに付された蛍光色素で標識されており、つまり標準的蛍光方法により容易に検出可能である。
【０３１７】
インビボの診断治療又は診断に適合するアッセイには、当業者に公知の磁気共鳴画像、コンピュータ断層撮影（例えば、ＣＡＴスキャン）、陽電子放射断層撮影（例えば、ＰＥＴスキャン）、Ｘ線撮影、超音波のような当該技術分野で認識されている画像化又は監視技術を含めてもよい。
【０３１８】
ある特定の実施形態において、本発明の抗体は、患者試料（例えば、血漿又は血液）中の特定の決定因子（例えば、ＴＮＦＲＳＦ２１タンパク質）のレベルを検出及び定量するために使用することができ、同様に、関連する決定因子が関与する増殖性障害を検出、診断又は監視するために使用することができる。例えば、血液及び骨髄試料は、フローサイトメトリと組み合わせて使用されて、ＴＮＦＲＳＦ２１発現（又は、別の共発現マーカー）を検出及び測定することができ、疾患の進行及び／又は治療への応答を監視することが

できる。関連する実施形態において、本発明の抗体は、循環腫瘍細胞をインビボ又はインビトロのいずれかで検出、監視及び／又は定量するために使用され得る（ＷＯ２０１２／０１２８８０１）。さらに他の実施形態において、循環腫瘍細胞は、腫瘍形成性細胞を含み得る。

【０３１９】

本発明のある特定の実施形態において、対象又は対象由来の試料における腫瘍形成性細胞は、治療又はレジメンのベースラインが確立される前に、本開示の抗体を使用して評価又は特徴付けされ得る。他の例において、腫瘍形成性細胞は、治療された対象に由来する試料から評価され得る。

【０３２０】

別の実施形態において、本発明は、がんの進行及び／又は病因をインビボで分析する方法を提供する。別の実施形態において、がんの進行及び／又は病因のインビボでの解析は、腫瘍の進行の程度を決定することを含む。別の実施形態において、解析は、腫瘍の同定を含む。別の実施形態において、腫瘍の進行の解析が、原発性腫瘍に対して行われる。別の実施形態において、解析は、当業者にとって公知のように、がんの種類に応じて経時的に行われる。別の実施形態において、原発性腫瘍の転移性細胞に起因する二次性腫瘍の解析が、さらにインビボで行われる。別の実施形態において、二次性腫瘍の大きさと形状が解析される。いくつかの実施形態において、さらにエクスビボの解析が行われる。

【０３２１】

別の実施形態において、本発明は、がんの進行及び／又は病因をインビボで解析する方法であって、細胞の転移を決定すること又は循環腫瘍細胞のレベルを検出すること及び定量することを含む方法を提供する。さらに別の実施形態において、細胞転移の解析は原発性腫瘍から不連続の部位において、細胞の進行性成長を測定することを含む。いくつかの実施形態において、手法は、血管、リンパ、体腔内又はそれらの組合せを通じて分散する腫瘍細胞を監視するために行うことができる。別の実施形態において、細胞転移解析は、細胞遊走、播種、血管外漏出、増殖又はそれらの組合せの結果として行われる。

【０３２２】

ある特定の例において、対象又は対象由来の試料における腫瘍形成性細胞は、治療の前にベースラインを確立するために、本開示の抗体を使用して評価又は特徴付けてもよい。他の例において、試料は、治療された対象に由来する。いくつかの例において、試料は、対象が治療を開始又は終了してから少なくとも約１、２、４、６、７、８、１０、１２、１４、１５、１６、１８、２０、３０、６０、９０日、６カ月、９カ月、１２カ月又は＞１２カ月後の対象から得られる。ある特定の実施例において、腫瘍形成性細胞は、一定数の投与の後（例えば、治療の２、５、１０、２０、３０回以上の投与の後）に、評価又は特徴付けされる。他の例において、腫瘍形成性細胞は、１回以上の治療を受けてから１週、２週、１カ月、２カ月、１年、２年、３年、４年以上後に、特徴付け又は評価される。

【０３２３】

Ｂ．スクリーニング

ある特定の実施形態において、本発明の抗体は、決定因子との相互作用により腫瘍細胞の機能又は活性を変化させる化合物又は作用因子（例えば、抗体又はＡＤＣ）を同定するために、試料のスクリーニングに使用することができる。一実施形態において、腫瘍細胞は、抗体又はＡＤＣと接触され、この抗体又はＡＤＣは、ある特定の標的（例えばＴＮＦＲＳＦ２１）を発現する細胞について腫瘍をスクリーニングするために使用され、このような細胞を、例えば限定されないが、診断目的などの目的のために同定すること、このような細胞を監視して治療の有効性を決定すること又はこのような標的発現細胞のための細胞集団を濃縮することができる。

【０３２４】

さらに別の実施形態において、方法は、腫瘍細胞を試験薬剤又は化合物に直接的又は間接的に接触させることと、試験薬剤又は化合物が、決定因子会合腫瘍細胞の活性又は機能を調節するかどうか、例えば、細胞の形態又は生存性の変化、マーカーの発現、分化又は

脱分化、細胞の呼吸作用、ミトコンドリア活性、膜完全性、成熟性、増殖性、生存性、アポトーシス又は細胞死を調節するかどうかを決定することとを含む。直接的相互作用の一例は物理的相互作用であり、一方で、間接的相互作用としては、例えば、参照実体（例えば、細胞又は細胞培養物）に順に作用する中間的分子に対する組成物の作用が挙げられる。

【０３２５】

スクリーニング方法は、ハイスループットスクリーニングを含み、この方法は、例えば、培養皿、チューブ、フラスコ、ローラーボトル又はプレート上において、任意選択的に所定の位置に配置されたか又は置かれた、細胞のアレイ（例えば、マイクロアレイ）を含み得る。ハイスループットのロボット又は手作業による方法は、化学的相互作用を調べ、短期間に多くの遺伝子の発現レベルを決定することができる。分子シグナルを利用する、例えば、フルオロフォア又はマイクロアレイを介する技術（Ｍｏｃｅｌｌｉｎ ａｎｄ Ｒｏｓｓｉ、２００７、ＰＭＩＤ：１７２６５７１３）が開発され、さらに情報を非常に迅速に処理する解析（例えば、Ｐｉｎｈａｓｏｖら、２００４、ＰＭＩＤ：１５０３２６６０参照）が自動化されてきた。スクリーニングされ得るライブラリは、例えば、小分子ライブラリ、ファージディスプレイライブラリ、全ヒト抗体酵母ディスプレイライブラリ（Ａｄｉｍａｂ）、ｓｉＲＮＡライブラリ及びアデノウイルストランスフェクションベクターを含む。

【０３２６】

ＶＩＩ．医薬調製物及び治療的使用

Ａ．製剤及び投与経路

本発明の抗体又はＡＤＣは、当該技術分野で認識されている技術を使用して様々な方法で製剤化され得る。いくつかの実施形態において、本発明の治療組成物は、そのまま又は最小量の付加的成分と共に投与することができ、他方で任意選択的に適切な薬学的に許容される担体を含有するように製剤化してもよい。本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」は、当該技術分野で周知であり、医薬調製物で使用するために商業的供給源から入手可能である、賦形剤、ビヒクル、アジュバント及び希釈剤を含む（例えば、Ｇｅｎｎａｒｏ（２００３）Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ ｗｉｔｈ Ｆａｃｔｓ ａｎｄ Ｃｏｍｐａｒｉｓｏｎｓ：Ｄｒｕｇｆａｃｔｓ Ｐｌｕ、第２０版、Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ；Ａｎｓｅｌら（２００４）Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｄｏｓａｇｅ Ｆｏｒｍｓ ａｎｄ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｓｙｓｔｅｍｓ、第７版、Ｌｉｐｐｅｎｃｏｔｔ Ｗｉｌｌｉａｍｓ ａｎｄ Ｗｉｌｋｉｎｓ；Ｋｉｂｂｅら（２０００）Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｅｘｃｉｐｉｅｎｔｓ、第３版、Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｐｒｅｓｓを参照）。

【０３２７】

適切な薬学的に許容される担体は、比較的不活性であり、かつ抗体又はＡＤＣの投与を容易にすることができる物質又は活性化合物を加工して作用部位に送達するために薬学的に最適化された調製物にすることを補助し得る物質を、含む。

【０３２８】

このような薬学的に許容される担体は、製剤の形態、一貫性、粘度、ｐＨ、張度、安定性、浸透圧、薬物動態、タンパク質凝集又は溶解度を変えることができる薬剤を含み、緩衝剤、湿潤剤、乳化剤、希釈剤、カプセル剤及び皮膚浸透促進剤を含む。担体のある特定の非限定的例は、生理食塩水、緩衝生理食塩水、デキストロース、アルギニン、ショ糖、水、グリセロール、エタノール、ソルビトール、デキストラン、カルボキシメチルセルロースナトリウム及びこれらの組合せを含む。全身投与のための抗体は、経腸的、非経口的又は局所的投与のために製剤化され得る。実際、３種類の製剤全てが、活性成分の全身投与を達成するために同時に使用され得る。非経口的及び経口的薬物送達のための賦形剤及び製剤は、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ（２０００）第２０版、Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇに示さ

れている。

【０３２９】

経腸投与のために適切な製剤は、硬ゼラチン又は軟ゼラチンカプセル剤、丸剤、錠剤、例えば、被覆錠剤、エリキシル剤、懸濁剤、シロップ又は吸入剤及びこれらの制御放出形態を含む。

【０３３０】

非経口投与（例えば、注射による）に適切な製剤としては、活性成分が、溶解、懸濁化又は他の方法で（例えば、リポソーム又は他の微小粒子系で）提供される水性又は非水性の、等張性発熱物質不含滅菌液（例えば、溶液、懸濁液）が挙げられる。このような液体は、他の薬学的に許容される抗体、例えば、抗酸化剤、緩衝剤、保存剤、安定化剤、静菌剤、懸濁化剤、増粘剤及び製剤を、対象とするレシピエントの血液（又は他の関連する体液）と等張にする溶質をさらに含んでもよい。賦形剤の例としては、例えば、水、アルコール、ポリオール、グリセロール、植物油などが挙げられる。このような製剤に使用するための適切な等張の薬学的に許容される担体の例は、塩化ナトリウム注射剤、リンゲル液又は乳酸リンゲル注射剤を含む。

【０３３１】

特に好ましい実施形態において、本発明の製剤化された組成物は、凍結乾燥して、投与前に再構成することができる粉末形態の抗体又はＡＤＣを提供することができる。注射用溶液の調製のための滅菌粉末は、有効成分を任意選択の共可溶化生体適合性成分と共に含む粉末を生成するために、本開示の抗体又はＡＤＣを含む溶液を凍結乾燥することによって得ることができる。一般的に、分散体又は溶液は、塩基性分散媒又は溶媒（例えば、希釈剤）及び任意選択的に他の生体適合性成分を含む滅菌媒体に、活性化合物を混入することによって調製される。適合する希釈剤は、薬学的に許容されるもの（ヒトへの投与のために安全で、非毒性である）であり、凍結乾燥後に再構成される製剤のような、液体製剤の調製に有用である。例示的希釈剤は、滅菌水、注射用静菌水（ＢＷＦＩ）、ｐＨ緩衝溶液（例えば、リン酸緩衝生理食塩水）、滅菌生理食塩液、リンゲル液又はデキストロース溶液を含む。代替的な実施形態において、希釈剤は、塩及び／又は緩衝剤の水溶液を含み得る。

【０３３２】

特定の好ましい実施形態において、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体又はＡＤＣは、薬学的に許容される糖と組み合わせて凍結乾燥される。「薬学的に許容される糖」は、目的のタンパク質と組み合わせた場合、保存時のタンパク質の化学的及び／又は物理的不安定性を著しく予防する又は減少させる分子である。製剤が凍結乾燥され、次いで再構成されることが意図される場合。本明細書で使用される場合、薬学的に許容される糖は、「乾燥保護剤（ｌｙｏｐｒｏｔｅｃｔａｎｔ）」と称すこともできる。例示的糖及びそれらの対応する糖アルコールは、グルタミン酸一ナトリウム又はヒスチジンのようなアミノ酸；ベタインのようなメチルアミン；硫酸マグネシウムのようなリオトロピック塩；三価又はより高い分子量の糖アルコール、例えば、グリセリン、デキストラン、エリスリトール、グリセロール、アラビトール、キシリトール、ソルビトール及びマンニトールのようなポリオール；プロピレングリコール；ポリエチレングリコール；ＰＬＵＲＯＮＩＣＳ（登録商標）；並びにそれらの組合せを含む。さらなる例示的乾燥保護剤は、グリセリン及びゼラチン並びに糖メリビオース、メレジトース、ラフィノース、マンノトリオース及びスタキオースを含む。還元糖の例は、グルコース、マルトース、ラクトース、マルツロース、イソマルツロース及びラクツロースを含む。非還元糖の例は、糖アルコール及び他の直鎖ポリアルコールから選択されるポリヒドロキシ化合物の非還元グリコシドを含む。好ましい糖アルコールは、モノグリコシド、とりわけ、ラクトース、マルトース、ラクツロース及びマルツロースのような二糖の還元により得られる化合物である。グリコシド側基は、グルコシド側基又はガラクトシド側基であり得る。糖アルコールのさらなる例は、グルシトール、マルチトール、ラクチトール及びイソマルツロースである。好ましい薬学的に許容される糖は、非還元糖トレハロース又はショ糖である。薬学的に許容される糖は、タンパク質が保

存中の物理的及び化学的安定性及び完全性を（例えば、再構成及び保存後まで）本質的に保持することを意味する「保護量（ｐｒｏｔｅｃｔｉｎｇ　ａｍｏｕｎｔ）」で、（例えば、凍結乾燥前に）製剤に添加される。

【０３３３】

当業者は、適合可能な乾燥保護剤（ｌｙｐｒｏｔｅｃａｔａｎｔ）を、約１ｍＭ～約１０００ｍＭ、約２５ｍＭ～約７５０ｍＭ、約５０ｍＭ～約５００ｍＭ、約１００ｍＭ～約３００ｍＭ、約１２５ｍＭ～約２５０ｍＭ、約１５０ｍＭ～約２００ｍＭ又は約１６５ｍＭ～約１８５ｍＭの範囲の濃度で、液状製剤又は凍結乾燥製剤に加えてもよいことを理解している。ある特定の実施形態において、乾燥保護剤は、約１０ｍＭ、約２５ｍＭ、約５０ｍＭ、約７５ｍＭ、約１００ｍＭ、約１２５ｍＭ、約１３０ｍＭ、約１４０ｍＭ、約１５０ｍＭ、約１６０ｍＭ、約１６５ｍＭ、約１７０ｍＭ、約１７５ｍＭ、約１８０ｍＭ、約１８５ｍＭ、約１９０ｍＭ、約２００ｍＭ、約２２５ｍＭ、約２５０ｍＭ、約３００ｍＭ、約４００ｍＭ、約５００ｍＭ、約６００ｍＭ、約７００ｍＭ、約８００ｍＭ、約９００ｍＭ又は約１０００ｍＭの濃度をもたらすよう添加され得る。ある特定の好ましい実施形態において、乾燥保護剤は、薬学的に許容される糖を含んでもよい。特に好ましい態様において、薬学的に許容される糖は、トレハロース又はスクロースを含む。

【０３３４】

別の選択された実施形態において、本発明の液状製剤及び凍結乾燥製剤は、アミノ酸又は薬学的に許容されるこの塩を含めた、ある種の化合物を含んで、安定化剤又は緩衝化剤として作用することができる。このような化合物は、約１ｍＭ～約１００ｍＭ、約５ｍＭ～約７５ｍＭ、約５ｍＭ～約５０ｍＭ、約１０ｍＭ～約３０ｍＭ又は約１５ｍＭ～約２５ｍＭの範囲の濃度で添加することができる。ある特定の実施形態において、緩衝化剤は、約１ｍＭ、約５ｍＭ、約１０ｍＭ、約１５ｍＭ、約２０ｍＭ、約２５ｍＭ、約３０ｍＭ、約３５ｍＭ、約４０ｍＭ、約５０ｍＭ、約６０ｍＭ、約７０ｍＭ、約８０ｍＭ、約９０ｍＭ又は約１００ｍＭの濃度をもたらすよう添加され得る。別の選択された実施形態において、緩衝化剤は、約５ｍＭ、約１０ｍＭ、約１５ｍＭ、約２０ｍＭ、約２５ｍＭ、約３０ｍＭ、約３５ｍＭ、約４０ｍＭ、約５０ｍＭ、約６０ｍＭ、約７０ｍＭ、約８０ｍＭ、約９０ｍＭ又は約１００ｍＭの濃度をもたらすよう添加され得る。ある特定の好ましい実施形態において、緩衝化剤は、ヒスチジン塩酸塩を含む。

【０３３５】

さらに他の選択された実施形態において、本発明の液状製剤及び凍結乾燥製剤は、安定化剤として、ポリソルベート２０、ポリソルベート４０、ポリソルベート６０又はポリソルベート８０のような非イオン性界面活性剤を含んでもよい。このような化合物は、約０．１ｍｇ／ｍｌ～約２．０ｍｇ／ｍｌ、約０．１ｍｇ／ｍｌ～約１．０ｍｇ／ｍｌ、約０．２ｍｇ／ｍｌ～約０．８ｍｇ／ｍｌ、約０．２ｍｇ／ｍｌ～約０．６ｍｇ／ｍｌ又は約０．３ｍｇ／ｍｌ～約０．５ｍｇ／ｍｌの範囲の濃度で添加され得る。ある特定の実施形態において、界面活性剤は、約０．１ｍｇ／ｍｌ、約０．２ｍｇ／ｍｌ、約０．３ｍｇ／ｍｌ、約０．４ｍｇ／ｍｌ、約０．５ｍｇ／ｍｌ、約０．６ｍｇ／ｍｌ、約０．７ｍｇ／ｍｌ、約０．８ｍｇ／ｍｌ、約０．９ｍｇ／ｍｌ又は約１．０ｍｇ／ｍｌの濃度をもたらすよう添加され得る。別の選択された実施形態において、界面活性剤は、約１．１ｍｇ／ｍｌ、約１．２ｍｇ／ｍｌ、約１．３ｍｇ／ｍｌ、約１．４ｍｇ／ｍｌ、約１．５ｍｇ／ｍｌ、約１．６ｍｇ／ｍｌ、約１．７ｍｇ／ｍｌ、約１．８ｍｇ／ｍｌ、約１．９ｍｇ／ｍｌ又は約２．０ｍｇ／ｍｌの濃度をもたらすよう添加され得る。ある特定の好ましい実施形態において、界面活性剤は、ポリソルベート２０又はポリソルベート４０を含む。

【０３３６】

非経口投与（例えば、静脈内注射）向けの開示される抗体又はＡＤＣの適合性製剤は、約１０／ｍＬμｇ～約１００ｍｇ／ｍＬの濃度のＡＤＣ又は抗体を含むことができる。ある特定の選択された実施形態において、抗体又はＡＤＣの濃度は、２０μｇ／ｍＬ、４０μｇ／ｍＬ、６０μｇ／ｍＬ、８０μｇ／ｍＬ、１００μｇ／ｍＬ、２００μｇ／ｍＬ、３００μｇ／ｍＬ、４００μｇ／ｍＬ、５００μｇ／ｍＬ、６００μｇ／ｍＬ、７００μ

ｇ／ｍＬ、８００μｇ／ｍＬ、９００μｇ／ｍＬ又は１ｍｇ／ｍＬを構成する。他の実施形態において、ＡＤＣ濃度は、２ｍｇ／ｍＬ、３ｍｇ／ｍＬ、４ｍｇ／ｍＬ、５ｍｇ／ｍＬ、６ｍｇ／ｍＬ、８ｍｇ／ｍＬ、１０ｍｇ／ｍＬ、１２ｍｇ／ｍＬ、１４ｍｇ／ｍＬ、１６ｍｇ／ｍＬ、１８ｍｇ／ｍＬ、２０ｍｇ／ｍＬ、２５ｍｇ／ｍＬ、３０ｍｇ／ｍＬ、３５ｍｇ／ｍＬ、４０ｍｇ／ｍＬ、４５ｍｇ／ｍＬ、５０ｍｇ／ｍＬ、６０ｍｇ／ｍＬ、７０ｍｇ／ｍＬ、８０ｍｇ／ｍＬ、９０ｍｇ／ｍＬ又は１００ｍｇ／ｍＬを構成する。

【０３３７】

凍結乾燥粉末から再構成したか否かにかかわらず、液体ＴＮＦＲＳＦ２１　ＡＤＣ製剤（例えば、直上に示した）は、投与前にさらに希釈する（好ましくは水性担体中）ことができる。例えば、前述の液体製剤は、投与のための所望の用量レベルを達成するために、０．９％塩化ナトリウム注射剤、ＵＳＰ又は同等物（必要な変更を加えた）を含む注入バッグ中にさらに希釈することができる。特定の態様において、十分に希釈されたＴＮＦＲＳＦ２１　ＡＤＣ溶液は、ＩＶ装置を用いて静脈内注入により投与される。好ましくは、投与されるＴＮＦＲＳＦ２１　ＡＤＣ薬物溶液（静脈内（ＩＶ）注入又は注射にかかわらず）は、透明、無色及び可視粒子状物質不含有である。

【０３３８】

本発明の化合物及び組成物は、インビボで、それを必要とする対象に、様々な経路、例えば、これらに限定されないが、経口、静脈内、動脈内、皮下、非経口的、鼻腔内、筋肉内、心臓内、脳室内、気管内、バッカル、直腸、腹腔内、皮内、局所、経皮及びくも膜下内、又はそれ以外に移植若しくは吸入により投与され得る。本組成物は、固体、半固体、液体又は気体形態の調製物に製剤化することができ、例えば、これらに限定されないが、錠剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、軟膏、溶液、坐剤、浣腸剤、注射剤、吸入剤及びエアロゾルが挙げられる。適切な製剤及び投与経路は、意図する適用及び治療レジメンにより選択され得る。

Ｂ．投与量及び投与レジメン

特定の投与レジメン、すなわち、用量、タイミング及び反復は、特定の個体並びに実験的検討事項、例えば、薬物動態（例えば、半減期、クリアランス速度など）に依存する。投与の頻度の決定は、当業者、例えば、担当医により、状態及び治療される状態の重症度、治療される対象の年齢及び全体的健康状態などの検討事項に基づいて行われ得る。投与の頻度は、選択した組成物の効能及び投与レジメンの評価に基づいて治療の過程を通じて調整され得る。このような評価は、特異的な疾患、障害若しくは状態のマーカーの評価に基づいて行われ得る。個体ががんを有する実施形態において、評価は、触診又は視覚的観察を介した腫瘍サイズの直接的測定、Ｘ線又は他の画像化技術による腫瘍サイズの間接的測定、直接的な腫瘍生検によって評価される改善及び腫瘍試料の顕微鏡検査、間接的な腫瘍マーカー（例えば、前立腺がんに対するＰＳＡ）又は本明細書に記載の方法により特定された抗原、増殖性又は腫瘍形成性細胞の数の減少、このような新生細胞の減少の維持、新生細胞の増殖の減少又は転移の発生の遅延の測定を含む。

【０３３９】

本発明のＴＮＦＲＳＦ２１抗体又はＡＤＣは、様々な範囲で投与され得る。これらの範囲としては、用量あたり約５μｇ／ｋｇ体重から約１００ｍｇ／ｋｇ体重、用量あたり約５０μｇ／ｋｇ体重から約５ｍｇ／ｋｇ体重、用量あたり約１００μｇ／ｋｇ体重から約１０ｍｇ／ｋｇ体重が挙げられる。他の範囲としては、用量あたり約１００μｇ／ｋｇ体重から約２０ｍｇ／ｋｇ体重及び用量あたり約０．５ｍｇ／ｋｇ体重から約２０ｍｇ／ｋｇ体重が挙げられる。特定の実施形態において、投与量は、少なくとも約１００μｇ／ｋｇ体重、少なくとも約２５０μｇ／ｋｇ体重、少なくとも約７５０μｇ／ｋｇ体重、少なくとも約３ｍｇ／ｋｇ体重、少なくとも約５ｍｇ／ｋｇ体重、少なくとも約１０ｍｇ／ｋｇ体重である。

【０３４０】

選択された実施形態において、ＴＮＦＲＳＦ２１抗体又はＡＤＣは、用量あたりおよそ１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０又は１００μｇ／ｋｇ体重で（

好ましくは静脈内に）投与される。他の実施形態は、用量あたり約２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００、１０００、１１００、１２００、１３００、１４００、１５００、１６００、１７００、１８００、１９００又は２０００μｇ／ｋｇ体重での抗体又はＡＤＣの投与を含む。他の実施形態において、本開示のコンジュゲートは、２．５、３、３．５、４、４．５、５、５．５、６、６．５、７、７．５、８、９又は１０ｍｇ／ｋｇで投与される。さらに他の実施形態において、コンジュゲートは、用量あたり１２、１４、１６、１８又は２０ｍｇ／ｋｇ体重で投与され得る。さらに他の実施形態において、コンジュゲートは、用量あたり２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、９０又は１００ｍｇ／ｋｇ体重で投与され得る。本明細書の教示を用い、当業者は、前臨床動物研究、臨床観察並びに標準的な医学及び生化学的技術及び測定に基づいて、様々なＴＮＦＲＳＦ２１抗体又はＡＤＣのための適切な投与量を容易に決定することができる。

【０３４１】

他の投与レジメンは、Ｕ．Ｓ．Ｐ．Ｎ．７，７４４，８７７に開示されているような体表面積（ＢＳＡ）計算に基づき、予測され得る。周知のように、ＢＳＡは、患者の身長及び体重を使用して計算され、彼又は彼女の身体の表面積によって表される対象の大きさの尺度を提供する。ある特定の実施形態において、コンジュゲートは、１ｍｇ／ｍ^{2}から８００ｍｇ／ｍ^2、５０ｍｇ／ｍ^{2}から５００ｍｇ／ｍ^{2}の投与量及び１００ｍｇ／ｍ^2、１５０ｍｇ／ｍ^2、２００ｍｇ／ｍ^2、２５０ｍｇ／ｍ^2、３００ｍｇ／ｍ^2、３５０ｍｇ／ｍ^2、４００ｍｇ／ｍ^{2}又は４５０ｍｇ／ｍ^{2}の投与量で投与され得る。当該技術分野で認識されておりかつ経験的な技術が、適切な投与量を決定するために使用され得ることも理解される。

【０３４２】

抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体又はＡＤＣは、特別なスケジュールで投与されてもよい。一般に、ＴＮＦＲＳＦ２１コンジュゲートの有効量は、対象に１回以上投与される。より詳細には、ＡＤＣの有効量は、対象に、１カ月に１回、１カ月に１回を超えて又は１カ月に１回未満投与される。ある特定の実施形態において、ＴＮＦＲＳＦ２１抗体又はＡＤＣの有効量は、複数回、例えば少なくとも１カ月、少なくとも６カ月、少なくとも１年、少なくとも２年又は数年間投与され得る。さらに他の実施形態において、数日（２、３、４、５、６若しくは７日）、数週間（１、２、３、４、５、６、７若しくは８週間）又は数カ月間（１、２、３、４、５、６、７若しくは８カ月間）またさらには１若しくは数年間が、本開示の抗体又はＡＤＣの投与の間に経過し得る。

【０３４３】

いくつかの実施形態において、コンジュゲート抗体を含む治療の過程は、数週間又は数カ月の期間にわたり、選択された薬物製品を複数回投与することを含む。より詳細には、本発明の抗体又はＡＤＣは、１日毎に１回、２日毎に１回、４日毎に１回、１週間毎に１回、１０日毎に１回、２週間毎に１回、３週間毎に１回、１カ月毎に１回、６週間毎に１回、２カ月毎に１回、１０週間毎に１回又は３カ月毎に１回投与され得る。これに関して、患者の応答及び診療に基づき、投与量を変化させてもよく、投与間隔を調整してもよいことが理解される。本発明には、不連続投与又は数回の部分投与に分割された１日用量も包含される。本発明の組成物及び抗がん剤は、交互に、隔日又は隔週で投与されてもよく又は一連の抗体治療を行った後に１つ以上の抗がん剤治療による処置を行ってもよい。いずれにしても、当業者であれば理解するように、化学療法剤の適切な用量は、一般に、化学療法剤が単独で又は他の化学療法剤との併用で投与される臨床治療において既に採用されている用量程度である。

【０３４４】

別の実施形態において、本発明のＴＮＦＲＳＦ２１抗体又はＡＤＣは、疾患の初期症状後の腫瘍再発の確率を減少又は無くすための維持療法に使用されてもよい。好ましくは、障害は、治療されたことがあり、最初の腫瘍塊は除去、減少又は他の方法で緩和されており、患者は無症状である又は寛解状態にある。このような場合、標準的診断手法を使用し

て疾患の徴候がほとんど又は全くない場合でも、対象は、薬学的に有効な量の本開示の抗体が１回以上投与されてもよい。

【０３４５】

別の好ましい実施形態において、本発明のモジュレーターは、予防的に又は減量手法後の腫瘍転移の可能性を予防又は減少させるためのアジュバント療法として使用され得る。本開示で使用するとき、「減量手法」は、腫瘍塊を減少させるか又は腫瘍負荷若しくは腫瘍増殖を緩和させる任意の手法、技術又は方法を意味する。例示的減量手法としては、限定されないが、外科手術、放射線治療（つまり、ビーム照射）、化学療法、免疫療法又はアブレーションが挙げられる。本開示に鑑みて当業者により容易に決定される適切な時間に、本開示のＡＤＣは、臨床的、診断的又は治療診断的手法により示唆されるように腫瘍転移を低減させるために投与されてもよい。

【０３４６】

本発明のさらに他の実施形態は、本開示の抗体又はＡＤＣを、無症状であるがんを発症するリスクのある対象に投与することを含む。つまり、本発明の抗体又はＡＤＣは、真に予防的な意味において使用することができ、検査若しくは試験を受けて１つ以上の認められた危険因子（例えば、ゲノム指標、家族歴、インビボ又はインビトロ試験結果など）を有するが新生物を発症していない患者に投与されてもよい。

【０３４７】

投与量及びレジメンも、本開示の組成物を個体に１回以上投与して実験的に決定され得る。例えば、個体に、本明細書に記載されるように製造された治療組成物を漸増する投与量で与えてもよい。選択された実施形態において、投与量は、実験的に決定されたか又は観察された副作用又は毒性にそれぞれ基づいて、徐々に増加又は減少又は減弱化されてもよい。選択された組成物の有効性を評価するために、特定の疾患、障害又は状態のマーカーを前述のように伴ってもよい。がんに関して、これらには、触診又は視覚的観察を介した腫瘍サイズの直接的測定、Ｘ線又は他の画像化技術による腫瘍サイズの間接的測定、直接的な腫瘍生検によって評価される改善及び腫瘍試料の顕微鏡検査；間接的な腫瘍マーカー（例えば、前立腺がんに対するＰＳＡ）又は本明細書に記載の方法により特定された腫瘍形成性抗原、疼痛又は麻痺の減少、会話、視力、呼吸若しくは他の腫瘍に関連する障害の改善、食欲の増加又は容認された試験若しくは生存の延長によって測定される生活の質の向上の測定が挙げられる。当業者は、投与量が、個体、新生物状態の種類、新生物状態の病期、新生物状態の個体の他の位置への転移並びに過去及び現在に使用している治療に依存して変わることを認識する。

【０３４８】

Ｃ．併用療法

併用療法は、望まない新生物細胞増殖を減少させるか若しくは抑制するため、がんの発生を減少させるため、がんの再発を低減させるか若しくは予防するため、又はがんの広がり若しくは転移を低減させるか若しくは予防するために、とりわけ有用であり得る。このような場合、本発明のモジュレーターは、本発明のモジュレーターがなければ出現しそして腫瘍塊を存続させるであろうＣＳＣを除去することにより、感作剤又は化学感作剤として機能し、これにより、現在の標準治療である減量剤又は抗がん剤のより有効な使用を可能にする。すなわち、本開示の抗体又はＡＤＣは、特定の実施形態において、別の投与された治療剤の作用機序を増強させる効果の増強（例えば、事実上相加又は相乗的）をもたらし得る。本発明の文脈において、「併用療法」は、広く解釈するものとし、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体又はＡＤＣ並びに細胞毒性剤、細胞分裂停止剤、抗血管新生剤、減量剤、化学療法剤、放射線療法及び放射線治療剤、標的化抗がん剤（モノクローナル抗体及び小分子体の両方を含む）、ＢＲＭ、治療抗体、がんワクチン、サイトカイン、ホルモン療法、放射線治療及び抗転移剤並びに特異的及び非特異的アプローチを含む免疫療法剤を含むが、これらに限定されない、１つ以上の抗がん剤の投与を単に意味する。

【０３４９】

併用の結果が、各治療（例えば、抗体及び抗がん剤）が別個に行われる場合に認められ

る効果の相加的なものであるという要求は存在しない。少なくとも相加効果が一般的に望ましいが、単独療法の１つを上回る抗腫瘍効果の増大は有益である。さらに、本発明は、相乗効果を示すことを併用治療に要求しない。しかし、当業者は、好ましい実施形態を含む特定の選択された組合せにより、相乗効果が認められる可能性があることを理解する。

【０３５０】

したがって、特定の態様において、併用療法は、がんの治療において、（ｉ）抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体若しくはＡＤＣの単独使用、（ｉｉ）治療成分の単独使用又は（ｉｉｉ）抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体もＡＤＣも含まない別の治療成分と組み合わせた治療成分の使用を、上回る治療的相乗効果を有するか又は測定可能な治療効果を改善する。用語「治療的相乗作用」は、本明細書で使用される場合、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体又はＡＤＣと１つ以上の治療成分との組合せの相加的効果よりも大きい治療効果を有する、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体又はＡＤＣと１つ以上の治療成分との組合せを意味する。

【０３５１】

本開示の組合せの所望の転帰は、対照又はベースラインの測定に対する比較によって定量される。本明細書で使用される場合、相対的な用語、例えば、「改善する」、「増加する」又は「減少させる」は、対照、例えば、本明細書に記載の治療の開始前の同じ個体の測定値又は本明細書に記載の抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体もＡＤＣも不在であるが、標準治療処置などの他の治療成分の存在下における対照個体（若しくは複数の対照個体）の測定値に対する値を示す。代表的な対照個体は、治療されている個体と同じ形態のがんに罹患しており、治療されている個体とほぼ同じ年齢の個体である（治療される個体及び対照個体の疾患の病期が同等であることを確実にするため）。

【０３５２】

治療に応答した変化又は改善は、一般的に、統計学的に有意である。本明細書で使用される場合、用語「有意性」又は「有意」は、２つ以上の実体の間に非ランダムな関係がある確率についての統計学的解析に関する。関係が「有意」であるか又は「有意性」を有するかどうかを決定するために「ｐ値」が計算され得る。ユーザー定義のカットオフ点を下回るｐ値は、有意とみなされる。０．１以下、０．０５未満、０．０１未満、０．００５未満又は０．００１未満のｐ値は、有意とみなされ得る。

【０３５３】

相乗的治療効果は、単一の治療成分若しくは抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体又はＡＤＣにより誘発される治療効果よりも又は所与の組合せの抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体又はＡＤＣ若しくは単一治療成分により誘発される治療効果の合計よりも少なくとも約２倍大きい又は少なくとも約５倍大きい又は少なくとも約１０倍大きい又は少なくとも約２０倍大きい又は少なくとも約５０倍大きい又は少なくとも約１００倍大きい効果であり得る。また相乗的治療効果は、単一の治療成分若しくは抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体又はＡＤＣにより誘発される治療効果又は所与の組合せの抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体又はＡＤＣ若しくは単一治療成分により誘発される治療効果の合計と比較して、少なくとも１０％又は少なくとも２０％又は少なくとも３０％又は少なくとも４０％又は少なくとも５０％又は少なくとも６０％又は少なくとも７０％又は少なくとも８０％又は少なくとも９０％又は少なくとも１００％以上の治療効果の増加として観察され得る。相乗的効果は、組合せで使用したときに、治療剤の投与量の減少を可能にする効果でもある。

【０３５４】

併用療法の実施において、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体又はＡＤＣ及び治療成分は、単一の組成物又は同じ若しくは異なる投与経路を使用する２つ以上の別個の組成物において、対象に同時に投与することができる。代替的に、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体又はＡＤＣでの治療は、例えば、数分から数週間の間隔で、治療成分による治療に先行又は追随してもよい。一実施形態において、治療成分と、抗体又はＡＤＣとの両方が互いに約５分から約２週間以内に投与される。さらに他の実施形態において、数日（２、３、４、５、６若しくは７）、数週間（１、２、３、４、５、６、７若しくは８）又は数カ月間（１、２、３、４、５、６、７若しくは８）が、抗体の投与と治療成分の投与との間に経過してもよい。

【０３５５】
併用療法は、状態が治療されるまで、緩和されるまで、又は治癒されるまで、様々なスケジュールで、例えば、１日に１回、２回若しくは３回、２日毎に１回、３日毎に１回、１週間毎に１回、２週間毎に１回、１カ月毎に１回、２カ月毎に１回、３カ月毎に１回、６カ月毎に１回、投与されてもよく、又は連続的に投与されてもよい。抗体及び治療成分は、１日おきに若しくは１週間おきに投与されてもよく、又は一連の抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体若しくはＡＤＣ治療を行い、後に追加の治療成分で１回以上治療してもよい。一実施形態において、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体又はＡＤＣは、１つ以上の治療成分と組み合わせて短期治療サイクルで投与される。他の実施形態において、組合せ治療は、長期治療サイクルで投与される。併用療法は、任意の経路によって投与することができる。

【０３５６】
選択された実施形態において、本発明の化合物及び組成物は、ＰＤ－１阻害剤又はＰＤ－Ｌ１阻害剤のようなチェックポイント阻害剤と組み合わせて使用されてもよい。ＰＤ－１は、このリガンドＰＤ－Ｌ１と共に、抗腫瘍Ｔリンパ球応答の負の調節因子である。一実施形態において、併用療法は、抗ＰＤ－１抗体（例えば、ペムブロリズマブ、ニボルマブ、ピジリズマブ）、及び任意選択的に１種以上の他の治療成分と一緒にした、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体又はＡＤＣの投与を含むことができる。別の実施形態において、併用療法は、抗ＰＤ－Ｌ１抗体（例えば、アベルマブ、アテゾリズマブ、デュルバルマブ）、及び任意選択的に１種以上の他の治療成分と一緒にした、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体抗又はＡＤＣの投与を含むことができる。さらに別の実施形態において、併用療法は、チェックポイント阻害剤及び／又は標的化ＢＲＡＦ併用療法（例えば、ベムラフェニブ又はダブラフィニブ）による処置後に進行が続く患者に投与される抗ＰＤ－１抗体又は抗ＰＤ－Ｌ１と共に抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体又はＡＤＣの投与を含むことができる。

【０３５７】
いくつかの実施形態において、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体又はＡＤＣは、様々な第一選択がん治療と組み合わせて使用されてもよい。したがって、選択された実施形態において、併用療法は、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体又はＡＤＣ、並びにイホスファミド、マイトマイシンＣ、ビンデシン、ビンブラスチン、エトポシド、イリノテカン（ｉｒｏｎｉｔｅｃａｎ）、ゲムシタビン、タキサン、ビノレルビン、メトトレキセート及びペメトレキセドのような細胞毒性剤、並びに任意選択的に１つ以上の他の治療成分の使用を含む。ある特定の新生物の症例（例えば、ＡＭＬ又は多発性骨髄腫のような血液学的症例）において、開示されるＡＤＣは、シタラビン（ＡｒａＣ）、及びアントラサイクリン（ａｎｔｈｒａｃｙｃｌｉｎｅ）（アクラルビシン、アムサクリン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、イダルビシン（ｉｄａｒｕｂｉｘｃｉｎ）など）、又はミトキサントロン、フルダラビン；ヒドロキシ尿素、クロファラビン、クロレタジンのような細胞毒性剤と組み合わせて使用されてもよい。他の実施形態において、本発明のＡＤＣは、アザシチジン又はデシタビン、ＦＬＴ３選択的チロシンキナーゼ阻害剤（例えば、ミドスタウリン、レスタウルチニブ及びスニチニブ）、全てがトランスのレチノイン酸（ＡＴＲＡ）及び三酸化ひ素のような脱メチル化剤であるＧ－ＣＳＦ又はＧＭ－ＣＳＦプライミングと組み合わせて、投与されてもよい（最後の２つの組合せは、急性前骨髄球性白血病（ＡＰＬ）に特に有効となり得る）。

【０３５８】
別の実施形態において、併用療法は、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体又はＡＤＣ及び白金系薬剤（例えば、カルボプラチン又はシスプラチン）及び任意選択的に１つ以上の他の治療成分（例えば、ビノレルビン；ゲムシタビン；例えばドセタキセル若しくはパクリタキセルのようなタキサン；イリノテカン；又はペメトレキセド）の使用を含む。

【０３５９】
ある特定の実施形態において、例えば、ＢＲ－ＥＲＰＲ、ＢＲ－ＥＲ又はＢＲ－ＰＲがんの処置において、併用療法は、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体又はＡＤＣ、及び「ホルモン療法」として記載されている１種以上の治療成分の使用を含む。「ホルモン療法」とは、本

明細書において使用する場合、例えば、タモキシフェン；性腺刺激ホルモン又は黄体形成放出ホルモン（ＧｎＲＨ又はＬＨＲＨ）；エベロリムス及びエキセメスタン；トレミフェン；又はアロマターゼ阻害剤（例えば、アナストロゾール、レトロゾール、エキセメスタン又はフルベストラント）を指す。

【０３６０】

別の実施形態において、例えば、ＢＲ－ＨＥＲ２の処置において、併用療法は、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体又はＡＤＣ、及びトラスツズマブ又はアド－トラスツズマブエムタンシン（Ｋａｄｃｙｌａ）、及び任意選択的に１種以上の他の治療成分（例えば、ペルツズマブ及び／又はドセタキセル）の使用を含む。

【０３６１】

一部の実施形態において、例えば、転移性乳がんの処置において、併用療法は、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体又はＡＤＣ、及びタキサン（例えば、ドセタキセル又はパクリタキセル）、及び任意選択的な追加の治療成分、例えば、アントラサイクリン（例えば、ドキソルビシン又はエピルビシン）、及び／又はエリブリンの使用を含む。

【０３６２】

別の実施形態において、例えば、転移性若しくは再現性乳がん、又はＢＲＣＡ変異体乳がんの処置において、併用療法は、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体又はＡＤＣ、及びメゲストロール、及び任意選択的な追加の治療成分の使用を含む。

【０３６３】

さらなる実施形態において、例えば、ＢＲ－ＴＮＢＣの処置において、併用療法は、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体又はＡＤＣ、及びポリＡＤＰリボースポリメラーゼ（ＰＡＲＰ）阻害剤（例えば、ＢＭＮ－６７３、オラパリブ、ルカパリブ及びベリパリブ）、及び任意選択的な追加の治療成分の使用を含む。

【０３６４】

別の実施形態において、併用療法は、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体又はＡＤＣ、及びＰＡＲＰ阻害剤及び任意選択的に１種以上の他の治療成分の使用を含む。

【０３６５】

別の実施形態において、例えば乳がんの治療において、併用療法は、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体又はＡＤＣ並びにシクロホスファミド並びに任意選択的に１つ以上の他の治療成分（例えば、ドキソルビシン、タキサン、エピルビシン、５－ＦＵ及び／又はメトトレキサート）の使用を含む。

【０３６６】

別の実施形態において、ＥＧＦＲ陽性ＮＳＣＬＣの治療のための併用療法は、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体又はＡＤＣ並びにアファチニブ並びに任意選択的に１つ以上の他の治療成分（例えば、エルロチニブ及び／又はベバシズマブ）の使用を含む。

【０３６７】

別の実施形態において、ＥＧＦＲ陽性ＮＳＣＬＣの治療のための併用療法は、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体又はＡＤＣ及びエルロチニブ及び任意選択的に１つ以上の他の治療成分（例えば、ベバシズマブ）の使用を含む。

【０３６８】

別の実施形態において、ＡＬＫ陽性ＮＳＣＬＣの治療のための併用療法は、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体又はＡＤＣ及びセリチニブ（Ｚｙｋａｄｉａ）及び任意選択的に１つ以上の他の治療成分の使用を含む。

【０３６９】

別の実施形態において、ＡＬＫ陽性ＮＳＣＬＣの治療のための併用療法は、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体又はＡＤＣ及びクリゾチニブ（Ｘａｌｃｏｒｉ）及び任意選択的に１つ以上の他の治療成分の使用を含む。

【０３７０】

別の実施形態において、併用療法は、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体又はＡＤＣ並びにベバシズマブ並びに任意選択的に１つ以上の他の治療成分（例えば、ゲムシタビン若しくは、ド

セタキセル若しくはパクリタキセルのようなタキサン；及び／又は白金アナログ）の使用を含む。

【０３７１】

別の実施形態において、併用療法は、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体又はＡＤＣ、並びにベバシズマブ及び任意選択的にシクロホスファミドの使用を含む。

【０３７２】

特定の実施形態において、白金製剤耐性腫瘍の治療のための併用療法は、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体又はＡＤＣ並びにドキソルビシン及び／又はエトポシド及び／又はゲムシタビン及び／又はビノレルビン及び／又はイホスファミド及び／又はロイコボリン変調（ｌｅｕｃｏｖｏｒｉｎ－ｍｏｄｕｌａｔｅｄ）５－フルオロウラシル（ｆｌｕｏｒｏｕｃｉｌ）及び／又はベバシズマブ及び／又はタモキシフェン並びに任意選択的に１つ以上の他の治療成分の使用を含む。

【０３７３】

選択された実施形態において、開示される抗体及びＡＤＣは、ある特定のステロイドと組み合わせて使用され、潜在的に処置の過程を一層効果的にして、炎症、吐き気及び過敏性のような副作用を低減することができる。本発明のＡＤＣと組み合わせて使用され得る例示的なステロイドには、以下に限定されないが、ヒドロコルチゾン、デキサタサゾン、メチルプレドニゾロン及びプレドニゾロンが含まれる。特に好ましい態様において、ステロイドは、デキサタサゾンを含む。

【０３７４】

いくつかの実施形態において、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体又はＡＤＣは、黒色腫の様々な第一選択治療との組合せで使用されてもよい。一実施形態において、併用療法は、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体又はＡＤＣ及びダカルバジン及び任意選択的に１つ以上の他の治療成分の使用を含む。さらなる実施形態において、併用療法は、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体又はＡＤＣ及びテモゾロミド（ｔｅｍｏｚｏｌａｍｉｄｅ）及び任意選択的に１つ以上の他の治療成分の使用を含む。別の実施形態において、併用療法は、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体又はＡＤＣ及び白金系治療成分（例えば、カルボプラチン又はシスプラチン）及び任意選択的に１つ以上の他の治療成分の使用を含む。いくつかの実施形態において、併用療法は、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体又はＡＤＣ及びビンカアルカロイド治療成分（例えば、ビンブラスチン、ビノレルビン、ビンクリスチン又はビンデシン）及び任意選択的に１つ以上の他の治療成分の使用を含む。一実施形態において、併用療法は、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体又はＡＤＣ及びインターロイキン２及び任意選択的に１つ以上の他の治療成分の使用を含む。別の実施形態において、併用療法は、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体又はＡＤＣ及びインターフェロンα及び任意選択的に１つ以上の他の治療成分の使用を含む。

【０３７５】

他の実施形態において、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体又はＡＤＣは、黒色腫のアジュバント治療及び／又は外科的手法（例えば、腫瘍切除）との組合せで使用されてもよい。一実施形態において、併用療法は、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体又はＡＤＣ及びインターフェロンα及び任意選択的に１つ以上の他の治療成分の使用を含む。

【０３７６】

本発明は、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体又はＡＤＣと放射線療法との組合せも提供する。用語「放射線療法」は、本明細書で使用される場合、腫瘍細胞内で局所的にＤＮＡ損傷を誘導する任意の機構、例えば、ガンマ線照射、Ｘ線、ＵＶ照射、マイクロ波、電子放出などを意味する。腫瘍細胞への放射性同位体の方向付けられた送達を使用する併用療法も検討され、本明細書に開示の抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体と組み合わせて、又は抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体のコンジュゲートとして、使用され得る。典型的には、放射線療法は、約１から約２週間の期間にわたりパルスで投与される。任意選択的に、放射線療法は、単独用量として又は複数回の連続用量として投与されてもよい。

【０３７７】

他の実施形態において、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体又はＡＤＣは、以下に記載されている

１種以上の化学治療剤と組み合わせて使用されてもよい。
Ｄ．抗がん剤
用語「抗がん剤」は、本明細書で使用される場合、「治療成分」の１つのサブセット、つまり、「薬学的に活性な成分」として記載される薬剤のサブセットである。より詳細には、「抗がん剤」は、細胞増殖性障害、例えば、がんを治療するために使用することができる任意の薬剤（又はその薬学的に許容される塩）を意味し、これらに限定されないが、細胞毒性剤、細胞分裂停止剤、抗血管新生剤、減量剤、化学療法剤、放射線治療剤、標的化抗がん剤、生物学的応答修飾剤、治療抗体、がんワクチン、サイトカイン、ホルモン療法、抗転移剤及び免疫療法剤が挙げられる。抗がん剤の前述の分類は、互いに排他的なものではなく、選択された薬剤は、１つ以上のカテゴリーに分類され得ることに注意されたい。例えば、ある適合する抗がん剤は、細胞毒性剤でありかつ化学療法剤であると分類することができる。したがって、前述の用語のそれぞれは、本開示を考慮し、次に医療分野におけるそれらの使用に応じて解釈すべきである。
【０３７８】
好ましい実施形態において、抗がん剤は、がん性細胞又はがん性になる可能性があるか若しくは腫瘍形成性後代（例えば、腫瘍形成性細胞）を発生する可能性がある細胞を、抑制するか若しくは除去する化学剤、又は抑制する若しくは除去するように設計されている化学剤（例えば、化学療法剤）を含み得る。これに関して、選択された化学剤（細胞周期依存性薬剤）は、しばしば細胞の成長又は分裂に必要な細胞内プロセスを対象とし、したがって、一般的に急速に成長しそして分裂するがん性細胞対して、特に有効である。例えば、ビンクリスチンは、微小管を解重合し、したがって、急速に分裂しつつある細胞が有糸分裂に入ることを阻害する。他の場合において、選択された化学剤は、細胞のライフサイクルのあらゆる点における細胞生存を妨げる細胞周期非依存性薬剤であり、指向性療法（例えば、ＡＤＣ）に有効であり得る。例として、特定のピロロベンゾジアゼピンは、細胞ＤＮＡの副溝に結合し、核への送達により転写を阻害する。併用療法又はＡＤＣ成分の選択に関して、当業者は、本開示を考慮して適合する細胞周期依存性薬剤及び細胞周期非依存性薬剤を容易に同定できることが理解される。
【０３７９】
いずれにしてもまた上記で言及したように、選択された抗がん剤は、本明細書で開示した抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体及びＡＤＣに加えて互いに組み合わせて（例えば、ＣＨＯＰ療法）投与することができることが理解される。さらに、選択された実施形態において、このような抗がん剤は、コンジュゲートを含むことができ、投与前に抗体と会合していてもよいことがさらに理解される。特定の実施形態において、本開示の抗がん剤は、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体と連結されて、本明細書に開示のＡＤＣを提供する。
【０３８０】
本明細書で使用される場合、用語「細胞毒性剤」（又は細胞毒）は、一般的に、細胞の機能を減少若しくは阻害しそして／又は腫瘍細胞の破壊を引き起こすという点で、細胞に毒性がある物質を意味する。特定の実施形態において、物質は、（天然源から精製された若しくは合成により調製された、）生存生物に由来する天然に存在する分子又はその類似体である。細胞毒性剤の例としては、これらに限定されないが、小分子毒素又は酵素的に活性な細菌毒素（例えば、カリケアマイシン、ジフテリア（Ｄｉｐｔｈｅｒｉａ）毒素、シュードモナス（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）菌体内毒素及び菌体外毒素、ブドウ球菌（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃａｌ）エンテロトキシンＡ）、菌類（例えば、αサルシン、レストリクトシン）、植物（例えば、アブリン、リシン、モルデクシン、ビスクミン、ヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、サポリン、ゲロニン、モモルジン（ｍｏｍｏｒｉｄｉｎ）、トリコサンチン、オオムギ毒素、アレウリテス・フォルジ（Ａｌｅｕｒｉｔｅｓ ｆｏｒｄｉｉ）タンパク質、ジランチン（ｄｉａｎｔｈｉｎ）タンパク質、フィトラッカ・メリカナ（Ｐｈｙｔｏｌａｃｃａ ｍｅｒｉｃａｎａ）タンパク質［ＰＡＰＩ、ＰＡＰＩＩ及びＰＡＰ－Ｓ］、モモルディカ・カランティア（Ｍｏｍｏｒｄｉｃａ ｃｈａｒａｎｔｉａ）阻害剤、クルシン、クロチン、サポナリア・オフィキナリス（Ｓａｐｏｎａｒｉａ

ｏｆｆｉｃｉｎａｌｉｓ）阻害剤、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、ネオマイシン及びトリコテセン）又は動物（例えば、細胞傷害性ＲＮアーゼ、例えば、細胞外膵ＲＮアーゼ；ＤＮアーゼＩ、これらの断片及び／又はバリアントを含む）が挙げられる。放射性同位体、メイタンシノイド、オーリスタチン、ドラスタチン、デュオカルマイトマイシン、アマニチン及びピロロベンゾジアゼピンを含むさらなる適合する細胞毒性剤を本明細書に示す。

【０３８１】

より一般に本発明の抗体と組み合わせて（又はコンジュゲートして）使用され得る細胞毒性剤又は抗がん剤の例は、限定されないが、アルキル化剤、アルキルスルホネート、アナストロゾール、アマニチン、アジリジン、エチレンイミン及びメチルメラミン、アセトゲニン、カンプトテシン、ＢＥＺ－２３５、ボルテゾミブ、ブリオスタチン、カリスタチン（ｃａｌｌｙｓｔａｔｉｎ）、ＣＣ－１０６５、セリチニブ、クリゾチニブ、クリプトフィシン、ドラスタチン、デュオカルマイシン、エリュテロビン、エルロチニブ、パンクラチスタチン、サルコジクチイン、スポンジスタチン、ナイトロジェンマスタード、抗生物質、エンジイン　ダイネマイシン、ビスホスホネート、エスペラミシン、色素タンパク質のエンジイン抗生物質発色団、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、アントラマイシン（ａｕｔｈｒａｍｙｃｉｎ）、アザセリン、ブレオマイシン、アクチノマイシン（ａｃｔｉｎｏｍｙｃｉｎ）、カンフォスファミド、カルビシン（ｃａｒａｂｉｃｉｎ）、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、シクロホスファミド（ｃｙｃｌｏｓｐｈｏｓｐｈａｍｉｄｅ）、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、トルビシン、６－ジアゾ－５－オキソ－Ｌ－ノルロイシン，ドキソルビシン、エピルビシン、エソルビシン、エキセメスタン、フルオロウラシル、フルベストラント、ゲフィチニブ、イダルビシン、ラパチニブ、レトロゾール、ロナファーニブ、マルセロマイシン、酢酸メゲストロール、マイトマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリゴマイシン（ｏｌｉｖｏｍｙｃｉｎ）、パゾパニブ、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン（ｐｏｔｆｉｒｏｍｙｃｉｎ）、ピューロマイシン、クエラマイシン、ラパマイン、ロドルビシン、ゾラフェニブ、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、タモキシフェン、クエン酸タモキシフェン、テモゾロミド、テパディナ（ｔｅｐｏｄｉｎａ）、チピファルニブ、ツベルシジン、ウベニメクス、バンデタニブ、ボロゾール、ＸＬ－１４７、ジノスタチン、ゾルビシン；抗代謝物質、葉酸アナログ、プリンアナログ、アンドロゲン、抗副腎物質、フォリン酸（ｆｒｏｌｉｎｉｃ　ａｃｉｄ）のような葉酸補充薬、アセグラトン、アルドホスファミドグリコシド、アミノレブリン酸、エニルウラシル、アムサクリン、ベストラブシル、ビサントレン、エダトレキサート、デフォファミン（ｄｅｆｏｆａｍｉｎｅ）、デメコルチン、ジアジクオン、エフロルニチン（ｅｌｆｏｒｎｉｔｈｉｎｅ）、酢酸エリプチニウム、エポチロン、エトグルシド、硝酸ガリウム、ヒドロキシ尿素、レンチナン、ロニダミン（ｌｏｎｉｄａｉｎｉｎｅ）、マイタンシノイド、ミトグアゾン、ミトキサントロン、モピダモール（ｍｏｐｉｄａｎｍｏｌ）、ニトラエリン（ｎｉｔｒａｅｒｉｎｅ）、ペントスタチン、フェナメット、ピラルビシン、ロソキサントロン、ポドフィリン酸、２－エチルヒドラジド、プロカルバジン、多糖錯体、ラゾキサン；リゾキシン；ＳＦ－１１２６、シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジクオン；２，２’，２”－トリクロロエチルアミン；トリコテシン類（Ｔ－２毒素、ベラキュリン（ｖｅｒｒａｃｕｒｉｎ）Ａ、ロリジンＡ及びアングイジン）；ウレタン；ビンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトブロニトール；ミトラクトール；ピポブロマン；ガシトシン（ｇａｃｙｔｏｓｉｎｅ）；アラビノシド；シクロホスファミド；チオテパ；タキソイド、クロラムブシル（ｃｈｌｏｒａｎｂｕｃｉｌ）；ゲムシタビン；６－チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキサート；白金アナログ、ビンブラスチン；白金；エトポシド；イホスファミド；ミトキサントロン；ビンクリスチン；ビノレルビン；ノバントロン；テニポシド；エダトレキサート；ダウノマイシン；アミノプテリン；ゼローダ；イバンドロネート；イリノテカン、トポイソメラーゼ阻害剤ＲＦＳ２０００；ジフルオロメチルオルニチン（ｄｉｆｌｕｏｒｏｍｅｔｌｈｙｌｏｒｎｉｔｈｉｎｅ）；レチノイド；カペシタビン；コンブ

レタスタチン；ロイコボリン；オキサリプラチン；ＸＬ５１８、細胞増殖を減少させるＰＫＣ－α、Ｒａｆ、Ｈ－Ｒａｓ、ＥＧＦＲ及びＶＥＧＦ－Ａ阻害並びに上記のいずれかの医薬的に許容される塩又は溶媒和物、酸若しくは誘導体を含む。腫瘍に対するホルモンの作用を調節する又は阻害するように作用する抗ホルモン剤、例えば、抗エストロゲン剤及び選択的エストロゲン受容体抗体、副腎におけるエストロゲンの生成を調節する酵素であるアロマターゼを阻害するアロマターゼ阻害剤並びに抗アンドロゲン剤並びにトロキサシタビン（１，３－ジオキソランヌクレオシドシトシンアナログ）、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ＶＥＧＦ発現阻害剤及びＨＥＲ２発現阻害剤などのリボザイム、ワクチン、ＰＲＯＬＥＵＫＩＮ（登録商標）ｒＩＬ－２、ＬＵＲＴＯＴＥＣＡＮ（登録商標）トポイソメラーゼ１阻害剤、ＡＢＡＲＥＬＩＸ（登録商標）ｒｍＲＨ、ビノレルビン及びエスペラミシン並びに上記のうちのいずれかの薬学的に許容される塩又は溶媒和物、酸又は誘導体なども本定義に含まれる。

【０３８２】

適合する細胞毒性剤又は抗がん剤は、商業的又は臨床的に利用可能な化合物、例えば、エルロチニブ（ＴＡＲＣＥＶＡ（登録商標）、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ／ＯＳＩ Ｐｈａｒｍ.）、ドセタキセル（ＴＡＸＯＴＥＲＥ（登録商標）、Ｓａｎｏｆｉ－Ａｖｅｎｔｉｓ）、５－ＦＵ（フルオロウラシル、５－フルオロウラシル、ＣＡＳ番号５１－２１－８）、ゲムシタビン（ＧＥＭＺＡＲ（登録商標）、Ｌｉｌｌｙ）、ＰＤ－０３２５９０１（ＣＡＳ番号３９１２１０－１０－９、Ｐｆｉｚｅｒ）、シスプラチン（ｃｉｓ－ジアミン、ジクロロ白金（ＩＩ）、ＣＡＳ番号１５６６３－２７－１）、カルボプラチン（ＣＡＳ番号４１５７５－９４－４）、パクリタキセル（ＴＡＸＯＬ（登録商標）、Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ Ｓｑｕｉｂｂ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ、Ｐｒｉｎｃｅｔｏｎ、Ｎ．Ｊ．）、トラスツズマブ（ＨＥＲＣＥＰＴＩＮ（登録商標）、Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）、テモゾロミド（４－メチル－５－オキソ－２，３，４，６，８－ペンタアザビシクロ［４．３．０］ノナ－２，７，９－トリエン－９－カルボキサミド、ＣＡＳ番号８５６２２－９３－１、ＴＥＭＯＤＡＲ（登録商標）、ＴＥＭＯＤＡＬ（登録商標）、Ｓｃｈｅｒｉｎｇ Ｐｌｏｕｇｈ）、タモキシフェン（（Ｚ）－２－［４－（１，２－ジフェニルブタ－１－エニル）フェノキシ］－Ｎ，Ｎ－ジメチルエタンアミン、ＮＯＬＶＡＤＥＸ（登録商標）、ＩＳＴＵＢＡＬ（登録商標）、ＶＡＬＯＤＥＸ（登録商標））及びドキソルビシン（ＡＤＲＩＡＭＹＣＩＮ（登録商標））を含む。さらなる商業的又は臨床的に利用可能な抗がん剤は、オキサリプラチン（ＥＬＯＸＡＴＩＮ（登録商標）、Ｓａｎｏｆｉ）、ボルテゾミブ（ＶＥＬＣＡＤＥ（登録商標）、Ｍｉｌｌｅｎｎｉｕｍ Ｐｈａｒｍ.）、スーテント（ＳＵＮＩＴＩＮＩＢ（登録商標）、ＳＵ１１２４８、Ｐｆｉｚｅｒ）、レトロゾール（ＦＥＭＡＲＡ（登録商標）、Ｎｏｖａｒｔｉｓ）、メシル酸イマチニブ（ＧＬＥＥＶＥＣ（登録商標）、Ｎｏｖａｒｔｉｓ）、ＸＬ－５１８（Ｍｅｋ阻害剤、Ｅｘｅｌｉｘｉｓ、ＷＯ２００７／０４４５１５）、ＡＲＲＹ－８８６（Ｍｅｋ阻害剤、ＡＺＤ６２４４、Ａｒｒａｙ ＢｉｏＰｈａｒｍａ、Ａｓｔｒａ Ｚｅｎｅｃａ）、ＳＦ－１１２６（ＰＩ３Ｋ阻害剤、Ｓｅｍａｆｏｒｅ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ）、ＢＥＺ－２３５（ＰＩ３Ｋ阻害剤、Ｎｏｖａｒｔｉｓ）、ＸＬ－１４７（ＰＩ３Ｋ阻害剤、Ｅｘｅｌｉｘｉｓ）、ＰＴＫ７８７／ＺＫ ２２２５８４（Ｎｏｖａｒｔｉｓ）、フルベストラント（ＦＡＳＬＯＤＥＸ（登録商標）、ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａ）、リューコボリン（フォリン酸）、ラパマイシン（シロリムス、ＲＡＰＡＭＵＮＥ（登録商標）、Ｗｙｅｔｈ）、ラパチニブ（ＴＹＫＥＲＢ（登録商標）、ＧＳＫ５７２０１６、Ｇｌａｘｏ Ｓｍｉｔｈ Ｋｌｉｎｅ）、ロナファーニブ（ＳＡＲＡＳＡＲ（商標）、ＳＣＨ ６６３３６、Ｓｃｈｅｒｉｎｇ Ｐｌｏｕｇｈ）、ソラフェニブ（ＮＥＸＡＶＡＲ（登録商標）、ＢＡＹ４３－９００６、Ｂａｙｅｒ Ｌａｂｓ）、ゲフィチニブ（ＩＲＥＳＳＡ（登録商標）、ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａ）、イリノテカン（ＣＡＭＰＴＯＳＡＲ（登録商標）、ＣＰＴ－１１、Ｐｆｉｚｅｒ）、ティピファニブ（ＺＡＲＮＥＳＴＲＡ（商標）、Ｊｏｈｎｓｏｎ＆Ｊｏｈｎｓｏｎ）、ＡＢＲＡＸＡＮＥ（商標）（Ｃｒｅｍｏｐｈｏｒ－ｆｒｅｅ）、パクリタキセルのアルブミン改変ナノ粒子製剤（Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｐａｒｔ

ｎｅｒｓ、Ｓｃｈａｕｍｂｅｒｇ、Ｉｌ）、バンデタニブ（ｒＩＮＮ、ＺＤ６４７４、ＺＡＣＴＩＭＡ（登録商標）、ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａ）、クロラムブシル、ＡＧ１４７８、ＡＧ１５７１（ＳＵ　５２７１；Ｓｕｇｅｎ）、テムシロリムス（ＴＯＲＩＳＥＬ（登録商標）、Ｗｙｅｔｈ）、パゾパニブ（ＧｌａｘｏＳｍｉｔｈＫｌｉｎｅ）、カンフォスファミド（ＴＥＬＣＹＴＡ（登録商標）、Ｔｅｌｉｋ）、チオテパ及びシクロホスファミド（ＣＹＴＯＸＡＮ（登録商標）、ＮＥＯＳＡＲ（登録商標））、ビノレルビン（ＮＡＶＥＬＢＩＮＥ（登録商標））、カペシタビン（ＸＥＬＯＤＡ（登録商標）、Ｒｏｃｈｅ）、タモキシフェン（例えば、ＮＯＬＶＡＤＥＸ（登録商標）、クエン酸タモキシフェン、ＦＡＲＥＳＴＯＮ（登録商標）（クエン酸トレミフェン（ｔｏｒｅｍｉｆｉｎｅ））、ＭＥＧＡＳＥ（登録商標）（酢酸メゲストロール）、ＡＲＯＭＡＳＩＮ（登録商標）（エキセメスタン；Ｐｆｉｚｅｒ）、フォルメスタン（ｆｏｒｍｅｓｔａｎｉｅ）、ファドロゾール、ＲＩＶＩＳＯＲ（登録商標）（ボロゾール）、ＦＥＭＡＲＡ（登録商標）（レトロゾール；Ｎｏｖａｒｔｉｓ）及びＡＲＩＭＩＤＥＸ（登録商標）（アナストロゾール；ＡｓｔｒａＺｅｎｅｃａ）を含み得る。

【０３８３】

用語「薬学的に許容される塩」又は「塩」は、分子又は巨大分子の有機又は無機塩を意味する。酸付加塩は、アミノ基と共に形成され得る。例示的な塩としては、これらに限定されないが、硫酸塩、クエン酸塩、酢酸塩、シュウ酸塩、塩化物、臭化物、ヨウ化物、硝酸塩、硫酸水素塩、リン酸塩、酸性リン酸塩、イソニコチン酸塩、乳酸塩、サリチル酸塩、酸性クエン酸塩、酒石酸塩、オレイン酸塩、タンニン酸塩、パントテン酸塩、酸性酒石酸塩、アスコルビン酸塩、コハク酸塩、マレイン酸塩、ゲンチジン酸塩、フマル酸塩、グルコン酸塩、グルクロン酸塩、サッカリン酸塩、ギ酸塩、安息香酸塩、グルタミン酸塩、メタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、ｐ－トルエンスルホン酸塩及びパモ酸塩（すなわち、１，１’メチレンビス－（２－ヒドロキシ３－ナフトエート））が挙げられる。薬学的に許容される塩は、例えば、酢酸イオン、コハク酸イオン又は他の対イオンなどの別の分子が包含されたものを含み得る。対イオンは、親化合物の電荷を安定化させる任意の有機又は無機部分であり得る。さらに、薬学的に許容される塩は、その構造内に２つ以上の荷電原子を有し得る。複数の荷電原子が薬学的に許容される塩の一部である場合、この塩は複数の対イオンを有し得る。したがって、薬学的に許容される塩は、１つ以上の荷電原子及び／又は１つ以上の対イオンを有し得る。

【０３８４】

同様に「薬学的に許容される溶媒和物」又は「溶媒和物」は、１つ以上の溶媒分子と分子又は巨大分子との会合物を指す。薬学的に許容される溶媒和物を形成する溶媒の例としては、これらに限定されないが、水、イソプロパノール、エタノール、メタノール、ＤＭＳＯ、酢酸エチル、酢酸及びエタノールアミンが挙げられる。

【０３８５】

他の実施形態において、本発明の抗体又はＡＤＣは、現在臨床試験にある又は市販のいくつかの抗体（又は免疫療法剤）のいずれか１つと組み合わせて使用し得る。本開示の抗体は、アバゴボマブ、アデカツムマブ、アフツズマブ、アレムツズマブ、アルツモマブ、アマツキシマブ、アナツモマブ、アルシツモマブ、アテゾリズマブ、アベルマブ、バビツキシマブ、ベクツモマブ、ベバシズマブ、ビバツズマブ、ブリナツモマブ、ブレンツキシマブ、カンツズマブ、カツマキソマブ、セツキシマブ、シタツズマブ、シクスツムマブ、クリバツズマブ、コナツムマブ、ダセツズマブ、ダロツズマブ、ダラツムマブ、デツモマブ、ドロジツマブ、デュリゴツマブ、ドゥルバルマブ、デュシギツマブ、エクロメキシマブ、エロツズマブ、エンシツキシマブ、エルツマキソマブ、エタラシズマブ、ファルレツズマブ、フィクラツズマブ、フィギツムマブ、フランボツマブ、フツキシマブ、ガニツマブ、ゲムツズマブ、ギレンツキシマブ、グレムバツムマブ、イブリツモマブ、イゴボマブ、イムガツズマブ、インダツキシマブ、イノツズマブ、インテツムマブ、イピリムマブ、イラツムマブ、ラベツズマブ、ラムブロリズマブ、レクサツムマブ、リンツズマブ、ロルボツズマブ、ルカツムマブ、マパツムマブ、マツズマブ、ミラツズマブ、ミンレツモマブ

、ミツモマブ、モキセツモマブ、ナルナツマブ、ナプツモマブ、ネシツムマブ、ニモツズマブ、ニボルマブ、ノフェツモマブ（ｎｏｆｅｔｕｍｏｍａｂｎ）、オビヌツズマブ、オカラツズマブ、オファツムマブ、オララツマブ、オラパリブ、オナルツズマブ、オポルツズマブ、オレゴボマブ、パニツムマブ、パーサツズマブ、パトリツマブ、ペンブロリズマブ、ペムツモマブ、パーツズマブ、ピジリズマブ、ピンツモマブ、プリツムマブ、ラコツモマブ、ラドレツマブ、ラムシルマブ、リロツムマブ、リツキシマブ、ロバツムマブ、サツモマブ、セルメチニブ、シブロツズマブ、シルツキシマブ、シムツズマブ、ソリトマブ、タカツズマブ、タプリツモマブ、テナツモマブ、テプロツムマブ、チガツズマブ、トシツモマブ、トラスツズマブ、ツコツズマブ、ウブリツキシマブ、ベルツズマブ、ボルセツズマブ、ボツムマブ、ザルツムマブ、ＣＣ４９、３Ｆ８、ＭＥＤＩ０６８０、ＭＤＸ－１１０５及びこれらの組合せからなる群から選択される抗体と組み合わせて使用され得る。

【０３８６】

他の実施形態は、がん治療のために承認された抗体、例えば、これらに限定されないが、リツキシマブ、ゲムツズマブ　オゾガマイシン、アレムツズマブ、イブリツモマブ　チウキセタン、トシツモマブ、ベバシズマブ、セツキシマブ、パニツムマブ（ｐａｔｉｔｕｍｕｍａｂ）、オファツムマブ、イピリムマブ及びブレンツキシマブベドチンの使用を含む。当業者は、本明細書の教示に適合するさらなる抗がん剤を容易に特定することができる。

【０３８７】

Ｅ．放射線療法

本発明は、抗体又はＡＤＣと、放射線療法（つまり、腫瘍細胞内で局所的にＤＮＡ損傷を誘導する任意の機構、例えば、ガンマ線照射、Ｘ線、ＵＶ照射、マイクロ波、電子放出など）との組合せも提供する。腫瘍細胞への放射性同位体の方向付けられた送達を使用する併用療法も検討され、本開示の抗体又はＡＤＣは、標的抗がん剤又は他の標的化手段と結び付けて使用することができる。典型的には、放射線療法は、約１～約２週間の期間にわたりパルスで投与される。放射線療法は、頭頚部がんを有する対象に約６～７週間投与されてもよい。任意選択的に、放射線療法は、単回用量として又は複数回の連続用量として投与されてもよい。

【０３８８】

ＶＩＩＩ．適応症

本発明は、本発明の抗体及びＡＤＣの、様々な障害、例えば、増殖性障害、新生物、炎症性、血管新生及び免疫学的障害並びに毒素によって引き起こされる障害の診断、診断治療、治療及び／又は予防のための使用を提供する。特定の実施形態において、治療される疾患は、固形腫瘍を含む新生物状態を含む。他の実施形態において、治療される疾患は、血液悪性疾患を含む。特定の実施形態において、本発明の抗体又はＡＤＣは、ＴＮＦＲＳＦ２１決定因子を発現する腫瘍又は腫瘍形成性細胞を治療するために使用される。好ましくは、治療される「対象」又は「患者」はヒトであるが、本明細書で使用するとき、それらの用語は、あらゆる哺乳動物種を含むものとして表される。

【０３８９】

本発明の化合物及び組成物は、疾患の様々な病期にあり、治療サイクルにおける種々の点にある対象を治療するために用いることができることが理解される。したがって、特定の実施形態において、本発明の抗体及びＡＤＣは、フロントライン治療として使用され、がん性状態に関して以前に治療されたことがない対象に投与される。他の実施形態において、本発明の抗体及びＡＤＣは、セカンドライン患者及びサードライン患者（すなわち、同じ状態について以前にそれぞれ１及び２回治療を受けた対象）を治療するために用いられる。さらに他の実施形態は、本開示のＴＮＦＲＳＦ２１　ＡＤＣにより又は異なる治療剤により３回以上同じ又は関連する状態について治療されたフォースライン患者又はこれより高次の患者（例えば、胃がん又は結腸直腸がん患者）の治療を含む。他の実施形態において、本発明の化合物及び組成物は、以前に（本発明の抗体又はＡＤＣを用いて又は他の抗がん剤を用いて）治療され、再発した対象又は以前の治療に対して不応性と判断され

た対象を治療するために使用される。選択された実施形態において、本発明の化合物及び組成物は、再発性腫瘍を有する対象を治療するために使用され得る。

【０３９０】

ある特定の態様において、増殖性障害は、以下に限定されないが、副腎、肝臓、腎臓、膀胱、乳房、胃、卵巣、子宮頚部、子宮、食道、結腸直腸、前立腺、膵臓、肺（小細胞及び非小細胞の両方）、甲状腺、癌、肉腫、神経膠芽腫及び様々な頭頚部の腫瘍を含めた、固形腫瘍を含む。他の好ましい実施形態において、開示されるＡＤＣは、膵臓がん、選択された態様において、肺腺癌の処置に特に有効である。ある特定の実施形態において、肺がんは、アントラサイクリン及び／又はタキサン（例えば、ドセタキセル、パクリタキセル、ラロタキセル又はカバジタキセル）に対して、不応性、再発性又は耐性がある。本発明のさらに他の態様において、開示される抗体及びＡＤＣは、甲状腺髄様がん、大細胞神経内分泌癌（ＬＣＮＥＣ）、神経膠芽腫、前立腺神経内分泌がん（ＮＥＰＣ）、悪性度の高い膵消化管神経内分泌（ＧＥＰ）及び悪性黒色腫の処置に使用され得る。さらに他の好ましい実施形態において、開示されるＡＤＣは、膀胱がんを処置するために使用されてもよい。

【０３９１】

膵臓がんに関すると、明細書において開示されている組成物は、膵腺房細胞癌、十二指腸膵臓癌（ｄｕｏｄｅｎａｌ　ｐａｎｃｒｅａｔｉｃ　ｃａｒｃｉｎｏｍａ）、粘液性膵臓腺癌、神経内分泌膵臓がん、膵臓腺癌、外分泌型膵臓腺癌、膵管腺癌及び十二指腸乳頭部膵臓腺癌（ａｍｐｕｌｌａｒｙ　ｐａｎｃｒｅａｔｉｃ　ａｄｅｎｏｃａｒｃｉｎｏｍａ）を処置するために使用されてもよい。

【０３９２】

より一般に本発明に従った例示的新生物状態の治療対象は、良性又は悪性の、固形腫瘍又は血液悪性疾患であり得、限定されないが、以下の群から選択され得る；副腎腫瘍、ＡＩＤＳ－関連がん、胞巣状軟部肉腫、星細胞系腫瘍、自律神経節腫瘍、膀胱がん（扁平上皮がん及び移行上皮がん）、胞胚腔障害、骨がん（アダマンチノーマ、動脈瘤様骨のう腫（ａｎｅｕｒｉｓｍａｌ　ｂｏｎｅ　ｃｙｓｔ）、骨軟骨腫、骨肉腫）、脳及び脊髄がん、転移性脳腫瘍、乳がん、頸動脈球腫瘍、子宮頚部がん、軟骨肉腫、脊索腫、嫌色素性腎細胞癌、腎明細胞癌、結腸がん、結腸直腸がん、深在性良性線維性組織球腫、線維形成性小円形細胞腫瘍、上衣腫、上皮障害、ユーイング腫瘍、骨格性粘液様軟骨肉腫、骨性線維形成不全症（ｆｉｂｒｏｇｅｎｅｓｉｓ　ｉｍｐｅｒｆｅｃｔａ　ｏｓｓｉｕｍ）、線維性骨異形成症、胆嚢及び胆管がん、胃がん、胃腸、妊娠性絨毛性疾患、胚細胞腫瘍、腺障害、頭頚部がん、視床下部、腸がん、島細胞腫瘍、カポジ肉腫、腎臓がん（腎芽腫、乳頭状腎細胞がん）、白血病、脂肪腫／良性脂肪腫様腫瘍、脂肪肉腫／悪性脂肪腫様腫瘍、肝臓がん（肝芽腫、肝細胞がん）、リンパ腫、肺がん（小細胞がん、腺がん、扁平上皮がん、大細胞がんなど）、マクロファージ障害（ｍａｃｒｏｐｈａｇａｌ　ｄｉｓｏｒｄｅｒ）、髄芽腫、黒色腫、髄膜腫、甲状腺髄様がん、多発性内分泌腺腫瘍症、多発性骨髄腫、骨髄異形成症候群、神経芽細胞腫、神経内分泌腫瘍、卵巣がん、膵臓がん、甲状腺乳頭がん、副甲状腺腫瘍、小児科がん、末梢神経鞘腫瘍、褐色細胞腫、下垂体膿瘍腫瘍、前立腺がん、後ブドウ膜黒色腫、希少血液障害（ｒａｒｅ　ｈｅｍａｔｏｌｏｇｉｃ　ｄｉｓｏｒｄｅｒ）、腎性転移性がん、ラブドイド腫瘍、横紋筋肉腫、肉腫、皮膚がん、軟組織肉腫、扁平上皮がん、胃がん、間質性障害、滑膜肉腫、精巣がん、胸腺癌、胸腺腫、甲状腺転移性がん及び子宮がん（子宮頚部癌、子宮内膜癌及び平滑筋腫）。ある特定の実施形態において、本発明の化合物及び組成物は、フロントライン治療として使用され、がん性状態に関して以前に治療されたことがない対象に投与される。他の実施形態において、本発明の化合物及び組成物は、以前に（本発明の抗体若しくはＡＤＣを用いて、又は他の抗がん剤を用いて）治療され、再発した対象、又は以前の治療に対して不応性と判断された対象を治療するために使用される。選択された実施形態において、本発明の化合物及び組成物は、再発性腫瘍を有する対象を治療するために使用され得る。

【０３９３】

ある特定の実施形態において、本発明の化合物及び組成物は、フロントライン治療として使用され、がん性状態に関して以前に処置されたことがない対象に投与される。他の実施形態において、本発明の化合物及び組成物は、以前に（本発明の抗体若しくはＡＤＣを用いて、又は他の抗がん剤を用いて）処置され、再発した対象、又は以前の処置に対して不応性と判断された対象を処置するために使用される。選択された実施形態において、本発明の化合物及び組成物は、再発性腫瘍を有する対象を処置するために使用され得る。

【０３９４】

血液悪性腫瘍に関すると、本発明の化合物及び方法は、急性骨髄性白血病（ＡＭＬ、ＦＡＢ命名体系に基づいた様々なサブタイプのものが認識されている（Ｍ０－Ｍ７）、ＷＨＯ分類、分子マーカー／変異、核型、形態学及び他の特徴のもの）、系列急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）、慢性骨髄性白血病（ＣＭＬ）、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）、有毛細胞白血病（ＨＣＬ）、慢性骨髄単球性白血病（ＣＭＭＬ）、若年性骨髄単球性白血病（ＪＭＭＬ）及び大顆粒リンパ球性白血病（ＬＧＬ）、及びＢ細胞リンパ腫（ホジキンリンパ腫（従来的なホジキンリンパ腫及び結節性リンパ球優位型ホジキンリンパ腫）を含む）、非ホジキンリンパ腫（びまん性大細胞型Ｂ細胞性リンパ腫（ＤＬＢＣＬ）、濾胞性リンパ腫（ＦＬ）、低悪性度リンパ腫／ＮＨＬ濾胞性細胞リンパ腫（ＦＣＣ）、小リンパ球性リンパ腫（ＳＬＬ）、粘膜関連リンパ組織（ＭＡＬＴ）リンパ腫、マントル細胞リンパ腫（ＭＣＬ）、及びバーキットリンパ腫（ＢＬ）を含む）；中悪性度リンパ腫／濾胞性ＮＨＬ、中悪性度びまん性ＮＨＬ、高悪性度免疫芽球性ＮＨＬ、高悪性度リンパ芽球性ＮＨＬ、高悪性度小型非切れ込み核細胞性リンパ腫ＮＨＬ、かさばり病変ＮＨＬ、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、リンパ形質細胞性リンパ腫（ＬＰＬ）、ＡＩＤＳ関連性リンパ腫、単球様Ｂ細胞リンパ腫、血管性免疫芽球性リンパ腺症、びまん性小型切れ込み細胞、大細胞型免疫芽球性リンパ芽球種、小型、非切れ込み型、バーキット及び非バーキット、濾胞性大細胞優性；濾胞性小切れ込み型細胞優性；及び濾胞性混合小切れ込み型及び大細胞リンパ腫を含めた、様々な白血病の処置に特に有効となり得ることがさらに理解される。Ｇａｉｄｏｎｏら、「Ｌｙｍｐｈｏｍａｓ」、ＩＮ　ＣＡＮＣＥＲ：ＰＲＩＮＣＩＰＬＥＳ＆ＰＲＡＣＴＩＣＥ　ＯＦ　ＯＮＣＯＬＯＧＹ、２巻：２１３１～２１４５頁（ＤｅＶｉｔａら（編）、第５版、１９９７年）を参照。これらのリンパ腫は、分類体系の変更により、様々な名称を有することが多く、異なる名称に分類されているリンパ腫を有する患者もまた、本発明の組合せ治療レジメンから利益を得ることができることは、当業者に明白となるはずである。

【０３９５】

ある特定の選択された態様において、開示されるＡＤＣは、腸タイプ、びまん性タイプ、胃の噴門、胃の間質タイプ、カルチノイド、及び印環細胞胃腺癌を含めた、胃がんの処置においてとりわけ有効である。一実施形態において、胃がんは、放射線、５－フルオロウラシル、白金をベースとする薬剤（例えば、カルボプラチン、シスプラチン、オキサリプラチン）又はこれらの組合せに対して、不応性である、再発性である、又は耐性である。選択された実施形態において、抗体及びＡＤＣは、非転移性又は転移性胃がんを示す患者に投与され得る。他の実施形態において、開示されるコンジュゲート抗体は、不応性患者（すなわち、初期治療の全工程中又は直後に疾患を再発する患者）、感受性のある患者（すなわち、再発が一次治療から２～３カ月後より長い患者）；又は放射線、５－フルオロウラシル及び／若しくは白金をベースとする薬剤（例えば、カルボプラチン、シスプラチン、オキサリプラチン）に耐性を示す患者に投与される。各場合において、適合ＡＤＣは、選択された投与レジメン及び臨床診断に応じて、他の抗がん剤と組み合わせて使用され得ることが理解される。

【０３９６】

他の選択された態様において、開示されるＡＤＣは、腺癌、膠様腺癌、腸管カルチノイド、腸間質、平滑筋肉腫、扁平上皮癌、神経内分泌癌、並びに小腸、結腸及び直腸の印環細胞癌を含めた、結腸直腸がんの処置にとりわけ効果的である。一実施形態において、結腸直腸がんは、放射線、５－フルオロウラシル、白金をベースとする薬剤（例えば、カル

ボプラチン、シスプラチン、オキサリプラチン）、ＶＥＧＦ－Ａ標的剤、ＶＥＧＦ受容体標的剤、ＥＧＦＲ標的剤又はこれらの組合せに対して、不応性である、再発性である、又は耐性である。選択された実施形態において、抗体及びＡＤＣは、非転移性又は転移性結腸直腸がんを示す患者に投与され得る。他の実施形態において、開示されるコンジュゲート抗体は、不応性患者（すなわち、初期治療の全工程中又は直後に疾患を再発する患者）、感受性のある患者（すなわち、再発が一次治療から２～３カ月後より長い患者）；又は放射線、５－フルオロウラシル、白金をベースとする薬剤（例えば、カルボプラチン、シスプラチン、オキサリプラチン）、ＶＥＧＦ－Ａ標的剤、ＶＥＧＦ受容体標的剤及び／若しくはＥＧＦＲ標的剤に耐性を示す患者に投与される。各場合において、適合ＡＤＣは、選択された投与レジメン及び臨床診断に応じて、他の抗がん剤と組み合わせて使用され得ることが理解される。

【０３９７】

ある特定の好ましい実施形態において、本発明のＴＮＦＲＳＦ２１　ＡＤＣは、肺腺癌、膵臓がん又は膀胱がんに罹患している、フロントライン患者に投与され得る。他の実施形態において、本発明のＴＮＦＲＳＦ２１　ＡＤＣは、同じ障害に罹患している、セカンドライン患者に投与されてもよい。さらに他の実施形態において、本発明のＴＮＦＲＳＦ２１　ＡＤＣは、肺腺癌、膵臓がん又は膀胱がんを有する、サードライン患者に投与されてもよい。

【０３９８】

さらに他の選択された態様において、開示されるＡＤＣは、肺腺癌、小肺がん（ＳＣＬＣ）及び非小細胞肺がん（ＮＳＣＬＣ）（例えば、扁平上皮細胞非小細胞肺がん又は扁平上皮細胞小細胞肺がん）を含めた、肺がんを処置するのにとりわけ有効である。一実施形態において、肺がんは、白金をベースとする薬剤（例えば、カルボプラチン、シスプラチン、オキサリプラチン）及び／又はタキサン（例えば、ドセタキセル、パクリタキセル、ラロタキセル又はカバジタキセル）に対して、不応性、再発性又は耐性がある。別の実施形態において、処置される対象は、大細胞神経内分泌癌（ＬＣＮＥＣ）に罹患している。

【０３９９】

示されているように、開示される抗体及びＡＤＣは、以下のサブタイプ：小細胞肺がん及び非小細胞肺がん（例えば、扁平上皮細胞非小細胞肺がん又は扁平上皮細胞小細胞肺がん）を含めた、肺がんの処置にとりわけ有効である。他の実施形態において、開示組成物は、肺腺癌を処置するために使用されてもよい。選択された実施形態において、抗体及びＡＤＣは、限定された病期の疾患又は広範囲の病期の疾患を示す患者に投与され得る。他の実施形態において、開示されるコンジュゲート抗体は、不応性患者（すなわち、初期治療の全工程中又は直後に疾患を再発する患者）、感受性のある患者（すなわち、再発が一次治療から２～３カ月後より長い患者）；又は白金をベースとする薬剤（例えば、カルボプラチン、シスプラチン、オキサリプラチン）及び／若しくはタキサン（例えば、ドセタキセル、パクリタキセル、ラロタキセル又はカバジタキセル）に耐性を示す患者に投与される。特定の好ましい実施形態において、本発明のＴＮＦＲＳＦ２１　ＡＤＣは、フロントライン患者に投与され得る。他の実施形態において、本発明のＴＮＦＲＳＦ２１　ＡＤＣは、セカンドライン患者に投与され得る。さらに他の実施形態において、本発明のＴＮＦＲＳＦ２１　ＡＤＣは、サードライン患者に投与され得る。

【０４００】

特に好ましい実施形態において、開示されるＡＤＣは、小細胞肺がんを処置するために使用されてもよい。このような実施形態に関して、コンジュゲートされたモジュレーターは、限定された病期の疾患を示す患者に投与され得る。他の実施形態において、開示されたＡＤＣは、広範囲の病期の疾患を示す患者に投与される。他の好ましい実施形態において、開示されたＡＤＣは、不応性患者（すなわち、初期治療の過程中又はこの完了の直後に再発した患者）又は再発小細胞肺がん患者に投与される。さらに他の実施形態は、感受性のある患者（すなわち、再発が一次治療の後の２～３カ月より長い患者）への開示されたＡＤＣの投与を含む。各場合において、適合ＡＤＣは、選択された投与レジメン及び臨

床診断に応じて、他の抗がん剤と組み合わせて使用され得ることが理解される。

ＩＸ．製品

本発明は、１つ以上の容器又はレセプタクルを含む医薬パック又はキットを含み、ここで、容器は、１用量以上の本発明の抗体又はＡＤＣを含み得る。このようなキット又はパックは、本質的に診断用又は治療用である。特定の実施形態において、パック又はキットは、１つ以上の追加の薬剤及び任意選択的に１つ以上の抗がん剤を含む又は含まない、例えば、本発明の抗体又はＡＤＣを含む組成物の所定の量を意味する、単位用量を含む。特定の他の実施形態において、パック又はキットは、がん性細胞の検出、定量化及び／又は視覚化のための結合レポーター分子及び任意選択的に１つ以上の追加の薬剤を含むか又は含まない、検出可能な量の抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体又はＡＤＣを含む。

【０４０１】

いずれにしても本発明のキットは、一般的に、薬学的に許容される製剤を含む適切な容器又はレセプタクル内に、本発明の抗体又はＡＤＣを含み、任意選択的に、同じ又は異なる容器に１つ以上の抗がん剤を含む。キットは、診断又は併用療法用のいずれかのために、他の薬学的に許容される製剤又は装置を含んでもよい。診断装置又は機器の例としては、細胞又は増殖性障害に伴うマーカーの検出、監視、定量化又はプロファイルに使用し得るものを含む（このようなマーカーの完全な列挙について、上記参照）。いくつかの実施形態において、装置は、インビボ又はインビトロのいずれかで、循環する腫瘍細胞を検出、監視、及び／又は定量化するために使用することができる（例えば、ＷＯ２０１２／０１２８８０１を参照）。さらに他の実施形態において、循環する腫瘍細胞は、腫瘍形成性細胞を含んでもよい。本発明で検討されるキットは、本発明の抗体又はＡＤＣを抗がん剤又は診断剤と組み合わせるための適切な試薬を含んでもよい（例えば、Ｕ．Ｓ．Ｐ．Ｎ．７，４２２，７３９参照）。

【０４０２】

キットの成分が１つ以上の液体溶液で提供される場合、液体溶液は非水性であり得るが、典型的には水溶液が好ましく、滅菌水溶液が特に好ましい。キット内の製剤は、乾燥粉末として、又は適切な液体の添加により再構成され得る凍結乾燥形態で提供されてもよい。再構成に使用される液体は、別個の容器に含有され得る。このような液体は、滅菌の薬学的に許容されるバッファー又は他の希釈剤、例えば、注射用静菌水、リン酸緩衝食塩水、リンゲル液又はデキストロース溶液を含み得る。キットが、本発明の抗体又はＡＤＣをさらなる治療薬又は薬剤との組合せで含む場合、溶液はモル当量の組合せで、又は一方の成分を他方より過剰にして予め混合されていてもよい。代替的に、本発明の抗体又はＡＤＣ及びいずれかの任意選択の抗がん剤又は他の薬剤（例えば、ステロイド）は、患者への投与前は別個の容器内で別個に維持されていてもよい。

【０４０３】

ある特定の好ましい実施形態において、本発明の組成物を含む前述のキットは、キットの内容物ががんの治療、予防及び／又は診断のために使用され得ることを示すラベル、マーカー、添付文書、バーコード及び／又は読本を含む。他の好ましい実施形態において、キットは、キットの内容物が、がんを患う対象を治療するためのある特定の投与レジメン又は投与量レジメンに従って投与され得ることを示す、ラベル、マーカー、添付文書、バーコード及び／又は読本を含むことができる。特に好ましい態様において、ラベル、マーカー、添付文書、バーコード及び／又は読本は、キットの内容物が、血液悪性腫瘍（例えば、ＡＭＬ）の治療、予防及び／若しくは診断のために用いられ得ること、又はこの治療の投与量若しくは投与レジメンを提示することを表示する。他の特に好ましい態様において、ラベル、マーカー、添付文書、バーコード及び／又は読本は、キットの内容物が、肺がん（例えば、腺癌）の治療、予防及び／若しくは診断、又はこの治療のための投与レジメンのために用いられ得ることを表示する。

【０４０４】

適切な容器又はレセプタクルとしては、例えば、ボトル、バイアル、シリンジ、注入バッグ（ＩＶバッグ）などが含まれる。容器は、様々な材料、例えば、ガラス又は薬学的に

適合するプラスチックなどで形成することができる。特定の実施形態において、レセプタクルは、滅菌アクセスポートを含んでもよい。例えば、容器は、皮下注射針によって穴を開けることができるストッパーを有する静脈内溶液バッグ又はバイアルであってもよい。

【０４０５】

いくつかの実施形態において、キットは、抗体及びいずれかの任意選択の成分を患者に投与するための手段、例えば、製剤を対象に注射若しくは導入する又は身体の疾患領域に適用することができる、１つ以上の針又はシリンジ（充填済又は空）、点眼器、ピペット又は他の同様の装置を含んでもよい。本発明のキットは、典型的に、バイアル又はそれと同様のもの、及び市販のために厳重に密封された状態の他の要素、例えば、所望のバイアル及び他の装置を配置及び保持できる中空プラスチック容器を含有するための手段も含む。

【０４０６】

Ｘ．その他

本明細書において別段に定義されない限り、本発明に関連して使用される科学的用語及び技術的用語は、当業者に一般に理解される意味を有する。さらに、文脈によって別途要求されない限り、単数形は複数形を含み、複数形の用語は単数形を含む。さらに、本明細書及び添付の特許請求の範囲において提供される範囲は、両方の終点及び終点の間の全ての点を含む。したがって、２．０から３．０の範囲は、２．０、３．０及び２．０と３．０との間の全ての点を含む。

【０４０７】

一般的に、本明細書に記載の細胞及び組織培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学及び化学に関する技術は、当該技術分野において周知であり、一般に使用されているものである。本明細書で使用される命名法は、このような技術に関連して、当該技術分野でも一般に使用されている。他に指示されていない限り、本発明の方法及び技術は、一般的に、当該技術分野で周知の及び本明細書を通じて引用されている様々な参照文献に記載された通常の方法に従って実施される。

【０４０８】

ＸＩ．参照文献

本明細書で引用されている全ての特許、特許出願及び出版物並びに電子工学的に利用可能な資料（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ及びＲｅｆＳｅｑにおけるヌクレオチド配列提出物、並びに例えば、ＳｗｉｓｓＰｒｏｔ、ＰＩＲ、ＰＲＦ、ＰＢＤにおけるアミノ酸配列提出物並びにＧｅｎＢａｎｋ及びＲｅｆＳｅｑにおける注釈の付されたコード領域からの翻訳物を含む）の完全な開示は、「参照により組み込まれる」という文言が特定の参照文献に関連して使用されているか否かにかかわらず、参照により組み込まれる。前述の詳細な説明及び以下の実施例は、理解を明確にするためにのみ提供される。それによって不必要に限定されないことが理解されるものとする。本発明は、示され、記載されている正確な詳細に限定されない。当業者にとって明らかな変形は、特許請求の範囲によって定義された本発明に含まれる。本明細書で使用されるあらゆる標題は組織化を目的とするものにすぎず、記載の主題を限定するものとして解釈されるべきでない。

【実施例】

【０４０９】

上記で全体的に説明した本発明は、以下の実施例を参照することにより、さらに容易に理解される。以下の実施例は、例証として提供され、本発明を限定することを意図していない。実施例は、以下の実験が、実施される全て又は唯一の実験であることを表すことを意図していない。別途指示しない限り、部は重量部であり、分子量は重量平均分子量であり、温度は摂氏温度であり、圧力は大気圧又は大気圧近傍である。

配列表のまとめ

表３は、本明細書に含まれているアミノ酸配列及び核酸配列のまとめを示している。

【０４１０】

【表３】

表3

配列番号	説明
1	TNFRSF21のアミノ酸配列
2	IgG1重鎖定常領域タンパク質
3	C220S IgG1重鎖定常領域タンパク質(heavy constant region protein)
4	C220Δ IgG1重鎖定常領域タンパク質(heavy constant region protein)
5	カッパ軽鎖定常領域タンパク質
6	C214S カッパ軽鎖定常領域タンパク質
7	C214Δ カッパ軽鎖定常領域タンパク質
8	ラムダ軽鎖定常領域タンパク質
9	C214S ラムダ軽鎖定常領域タンパク質
10	C214Δ ラムダ軽鎖定常領域タンパク質
11-19	保存されている
20	SC39.1 VL DNA
21	SC39.1 VLタンパク質
22	SC39.1 VH DNA
23	SC39.1 VHタンパク質
24-263	配列番号20～23と同じ順序の追加のマウスクローン
264	SC39.27 VH DNA
265	SC39.27 VHタンパク質
266	SC39.28 VH DNA
267	SC39.28 VHタンパク質
268	SC39.153 VL DNA
269	SC39.153 VLタンパク質
270	SC39.161 VL DNA
271	SC39.161 VLタンパク質
272 - 279	保存されている
280	hSC39.2 VL DNA

281	hSC39.2 VLタンパク質
282	hSC39.2 VH DNA
283	hSC39.2 VHタンパク質
284-295	配列番号280～283と同じ順序の追加のヒト化構築物
296-299	保存されている
300	hSC39.2軽鎖タンパク質
301	hSC39.2重鎖タンパク質
302	hSC39.4軽鎖タンパク質
303	hSC39.4重鎖タンパク質
304	hSC39.28軽鎖タンパク質
305	hSC39.28重鎖タンパク質
306	hSC39.126軽鎖タンパク質
307	hSC39.126重鎖タンパク質
308	保存されている
309	hSC39.126ss1重鎖タンパク質
310	保存されている
311	hSC39.4ss1重鎖タンパク質

【０４１１】

腫瘍細胞株のまとめ

ＰＤＸ腫瘍細胞のタイプは、特定の腫瘍細胞株を表す略称とそれに続く番号で示されている。試験した試料の継代数は、試料の命名に付属したｐ０～ｐ＃で表され、ここでｐ０は患者腫瘍から直接取得された非継代の試料を示し、ｐ＃は試験前のマウスから腫瘍が継代された回数を示す。本明細書で使用される場合、腫瘍のタイプ及びサブタイプの略称が以下の通り表４に示される：

【０４１２】

【表４】

表4

腫瘍タイプ	略称	腫瘍サブタイプ	略称
急性骨髄性白血病	AML		
膀胱	BL		
乳房	BR		
		基底様	BR-Basal-Like
		エストロゲン受容体ポジティブ及び/又は黄体ホルモン受容体ポジティブ	BR-ERPR
		ERBB2/Neuポジティブ	BR- ERBB2/Neu
		HER2ポジティブ	BR-HER2
		トリプルネガティブ	TNBC
		ルミナルA	BR-LumA
		ルミナルB	BR-LumB
		トリプルネガティブのクローディンサブタイプ	TNBC-CL
		低クローディン	BR-CLDN-Low
		正常様	BR-NL
子宮頸	CER		
結腸直腸	CR		
		直腸腺癌	RE-Ad
子宮内膜	EM		
食道	ES		
胃	GA		
		びまん性腺癌	GA-Ad-Dif/Muc
		腸腺癌	GA-Ad-Int
		間質腫瘍	GA-GIST
神経膠芽腫	GB		
頭頸部	HN		
腎臓	KDY		
		腎明細胞癌	KDY-CC
		乳頭状腎細胞癌	KDY-PAP
		移行上皮癌又は尿路上皮癌	KDY-URO
		未知	KDY-UNK
肝臓	LIV		
		肝細胞癌	LIV-HCC
		胆管細胞癌	LIV-CHOL
リンパ腫	LYM		
	DLBC	びまん性大細胞型B細胞	
肺	LU		
		腺癌	LU-Ad
		カルチノイド	LU-CAR

		大細胞神経内分泌	LU-LCC
		非小細胞	NSCLC
		扁平上皮細胞	LU-SCC
		小細胞	SCLC
		紡錘細胞	LU-SPC
多発性骨髄腫	MM		
卵巣	OV		
		明細胞	OV-CC
		類内膜	OV-END
		混合サブタイプ	OV-MIX
		悪性混合ミュラー	OV-MMMT
		粘液性	OV-MUC
		神経内分泌	OV-NET
		漿液性乳頭状	OV-PS
		漿液性	OV-S
		小細胞	OV-SC
		移行上皮癌	OV-TCC
膵臓	PA		
		腺房細胞癌	PA-ACC
		十二指腸腫	PA-DC
		粘液性腺癌	PA-MAD
		神経内分泌	PA-NET
		腺癌	PA-PAC
		腺癌外分泌型	PA-PACe
		導管腺癌	PA-PDAC
		乳頭部癌	PA-AAC
前立腺	PR		
皮膚	SK		
		黒色腫	MEL
		扁平上皮癌	SK-SCC
		ブドウ膜黒色腫	UVM
睾丸	TES		
甲状腺	THY		
		甲状腺髄様癌	MTC

【０４１３】

［実施例１］

ＴＮＦＲＳＦ２１発現の特定

全トランスクリプトーム配列決定の使用

固形腫瘍ががん患者に存在するときの、固形腫瘍の細胞異種性を特徴付けて、臨床的関連性のある治療標的を特定するために、当該技術分野で認識されている技術を使用して、大規模なＰＤＸ腫瘍バンクを開発し、維持した。多数の個別の腫瘍細胞株を含む、ＰＤＸ腫瘍バンクを、元々、様々な固形悪性腫瘍に罹患しているがん患者から得られた腫瘍細胞の複数回の継代により、免疫無防備状態マウスにおいて増殖させた。継代の少ないＰＤＸ腫瘍は、この天然環境における腫瘍を代表しており、腫瘍成長を推進する根本的な機構及び現在の治療法に対する耐性への臨床的に関連する洞察を提供する。

【０４１４】

先に言及したように、腫瘍細胞は、２つのタイプ：非腫瘍形成性細胞（ＮＴＧ）及び腫瘍開始細胞（ＴＩＣ）の細胞小集団に広く分割され得る。ＴＩＣは、ＴＮＦＲＳＦ２１免疫無防備状態マウスに移植すると、腫瘍を形成する能力を有する。がん幹細胞（ＣＳＣ）

は、ＴＩＣのサブセットあり、多系列分化の能力を維持しながら、不確定に自己複製することができる。ＮＴＧは、インビボにおいていくらか成長する能力を有しているが、移植されると、元の腫瘍の異種性を再現する腫瘍を形成しない。

【０４１５】

全トランスクリプトーム解析を行うため、ＰＤＸ腫瘍を、これらが８００～２，０００mm^3に達した後、マウスから切除した。切除したＰＤＸ腫瘍を切り離して、当該技術分野で認識されている酵素消化技術を使用し、単一細胞懸濁液に入れた（例えば、Ｕ．Ｓ．Ｐ．Ｎ．２００７／０２９２４１４を参照）。死滅細胞を検出するための４’，６－ジアミジノ－２－フェニルインドール（ＤＡＰＩ）、マウス細胞を特定するための抗マウスＣＤ４５及びＨ－２Ｋ^{d}抗体、及びヒト細胞を特定するための抗ヒトＥＰＣＡＭ抗体と共に、切り離したバルク腫瘍細胞をインキュベートした。一部の場合、マウス細胞の含有率が＞５％の場合、バルク腫瘍試料は、ビオチン化抗マウスＣＤ４５、及びＨ－２Ｋ^{d}抗体、及びストレプトアビジンコーティングした鉄系ビーズを使用して、マウス細胞を磁気により枯渇させた。マウス細胞を枯渇させた後、解離した細胞は、蛍光的にコンジュゲートした抗ヒトＣＤ４６及び／又はＣＤ３２４抗体と共にインキュベートして、ＣＤ４６^{hi}ＣＤ３２４$^+$　ＣＳＣ又はＣＤ４６^{lo}／$^-$ＣＤ３２４$^-$ＮＴＧ細胞を特定し、次に、ＦＡＣＳＡｒｉａ細胞ソーター（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用して選別した（Ｕ．Ｓ．Ｐ．Ｎ　２０１３／０２６０３８５、２０１３／００６１３４０及び２０１３／００６１３４２を参照）。

【０４１６】

１％　２－メルカプトエタノールを補足したＲＬＴｐｌｕｓ　ＲＮＡ溶解バッファー（Ｑｉａｇｅｎ）中で細胞を溶解することにより、選別した腫瘍細胞からＲＮＡを抽出し、この溶解物を－８０℃において凍結し、次に、ＲＮｅａｓｙ単離キット（Ｑｉａｇｅｎ）を使用してＲＮＡを抽出するため、溶解物を解凍した。ＲＮＡは、Ｎａｎｏｄｒｏｐ分光光度計（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）及び／又はＢｉｏａｎａｌｙｚｅｒ２１００（Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用して定量した。正常組織のＲＮＡは、様々な供給元（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、Ａｇｉｌｅｎｔ、ＳｃｉｅｎＣｅｌｌ、ＢｉｏＣｈａｉｎ及びＣｌｏｎｔｅｃｈ）から購入した。得られた全ＲＮＡ調製物は、遺伝配列決定及び遺伝子発現解析によって評価した。

【０４１７】

高品質ＲＮＡの全トランスクリプトーム配列決定は、２つの異なるシステムを使用して行った。より具体的に、Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ＨｉＳｅｑ２０００又は２５００次世代配列決定システム（Ｉｌｌｕｍｉｎａ，Ｉｎｃ．）を使用して、試料を解析した。

【０４１８】

Ｉｌｌｕｍｉｎａ全トランスクリプトーム解析は、上記の通りに単離された、ＣＳＣ腫瘍集団から抽出された、５ｎｇの全ｍＲＮＡを使用して生成したｃＤＮＡを用いて行った。ライブラリは、ＴｒｕＳｅｑ　ＲＮＡ試料調製キットｖ２（Ｉｌｌｕｍｉｎａ）を使用して作成した。得られたｃＤＮＡライブラリは断片化して、バーコードを付加した。Ｉｌｌｕｍｉｎａプラットフォームからの配列決定データは、遺伝子のエクソン領域へとマッピングされたＦＰＭ（１００万あたりの断片数）又はＦＰＫＭ（１００万あたりのキロ塩基あたりの断片数）計量を使用して、断片発現値として、名目上、表されており、基礎的遺伝子発現解析を、ＦＰＭ＿Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔ又はＦＰＫＭ＿Ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔとして正規化し、計数することを可能にするものである。

【０４１９】

ＴＮＦＲＳＦ２１　ｍＲＮＡの発現は、ＮＴＧ集団と比べて、ＢＬ（ＢＬ２５、ＢＬ３８）、ＬＵ－Ａｄ（ＬＵ１２３、ＬＵ１３４、ＬＵ１３５、ＬＵ２４４）、ＬＵ－ＳＣＣ（ＬＵ１３９）及びＰＡ（ＰＡ２０、ＰＡ２６、ＰＡ４０、ＰＡ４９、ＰＡ４、ＰＡ５４、ＰＡ５５及びＰＡ８９）のＣＳＣ腫瘍細胞小集団において向上した。ＴＮＦＲＳＦ２１　ｍＲＮＡ発現は、以下の臓器：結腸、食道、心臓、腎臓、肝臓、肺、膵臓、皮膚、脾臓、胃及び気管において、関連正常組織に比べると、ＣＳＣが一層高かった（図２）。

【０４２０】
ＢＬ、ＬＵ－Ａｄ、ＬＵ－ＳＣＣ及びＰＡ腫瘍における、向上したＴＮＦＲＳＦ２１ｍＲＮＡ発現の特定により、ＴＮＦＲＳＦ２１は、潜在的な診断標的及び／又は免疫療法標的として、さらなる評価に値することが示された。さらに、ＬＵ－Ａｄ、ＬＵ－ＳＣＣ及びＰＡ腫瘍において、ＮＴＧと比べて、ＣＳＣにおけるＴＮＦＲＳＦ２１の発現が向上していることは、ＴＮＦＲＳＦ２１が、これらの腫瘍タイプにおいて、腫瘍形成性細胞の良好なマーカーとなることを示している。
【０４２１】
［実施例２］
ｑＲＴ－ＰＣＲを使用する腫瘍中のＴＮＦＲＳＦ２１　ｍＲＮＡの発現
腫瘍細胞におけるＴＮＦＲＳＦ２１　ＲＮＡ発現を確認するため、業界の標準プロトコルに従い、Ｆｌｕｉｄｉｇｍ　ＢｉｏＭａｒｋ（商標）ＨＤシステムを使用して、様々なＰＤＸ細胞株に対してｑＲＴ－ＰＣＲを行った。ＲＮＡは、実施例１に記載されている通り、バルクＰＤＸ腫瘍細胞又は選別したＣＳＣ及びＮＴＧ小集団から抽出した。１．０ｎｇのＲＮＡを、製造業者の指示に従い、Ｈｉｇｈ　Ｃａｐａｃｉｔｙ　ｃＤＮＡ　Ａｒｃｈｉｖｅキット（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用して、ｃＤＮＡに変換した。次に、ＴＮＦＲＳＦ２１プローブ特異的Ｔａｑｍａｎアッセイを使用して予め増幅したｃＤＮＡ材料を、後続のｑＲＴ－ＰＣＲ実験に使用した。
【０４２２】
正常組織（ＮｏｒｍＴｏｘ又はＮｏｒｍ）中のＴＮＦＲＳＦ２１発現を、ＡＭＬ、ＢＬ、ＢＲ、ＣＲ、ＧＡ、ＬＵ、ＯＶ及びＰＡ　ＰＤＸ細胞株における発現と比較した（図３Ａ、各点は、個々の組織又はＰＤＸ細胞株それぞれの平均相対発現を表しており、水平線は、各表示の幾何平均を表している）。ＴＮＦＲＳＦ２１の高い発現は、一部のＡＭＬ、ＢＬ、ＢＲ基底様、ＢＲ－ＬｕｍＢ、ＣＲ、ＧＡ、ＬＵ－Ａｄ、ＬＵ－ＳＣＣ、ＯＶ及びＰＡ－ＰＡＣ／ＰＤＡＣ　ＰＤＸ腫瘍、並びに正常膀胱、後根神経節、腎臓、胃、気管及び血管平滑筋細胞において観察された。「ＮｏｒｍＴｏｘ」は、以下：副腎、動脈、結腸、後根神経節、食道、心臓、腎臓、肝臓、肺、膵臓、筋骨格、皮膚、小腸、脾臓、胃、胸腺、気管、静脈及び血管平滑筋細胞のような様々な正常組織の試料を表している。「Ｎｏｒｍ」と表される、別の組の正常組織は、ＡＤＣ型薬物に関する毒性のリスクが低いと推定される、以下の正常組織：Ｂ細胞、膀胱、乳房、子宮頚部、単球、正常骨髄、好中球、ＮＫ細胞、卵巣、末梢血単核球細胞（ＰＢＭＣ）、唾液腺、Ｔ細胞、胸腺及び甲状腺の試料を表す。
【０４２３】
バルク腫瘍発現の上記の試験に加えて、本発明者らは、様々なＰＤＸに由来する、ＣＳＣ及びＮＴＧ集団に対するｑＲＴ－ＰＣＲによって高いＣＳＣ発現があることを確認した。ＴＮＦＲＳＦ２１　ｍＲＮＡの発現は、ＮＴＧ集団と比べて、ＬＵ－Ａｄ（ＬＵ１３４、ＬＵ１７６）、ＬＵ－ＳＣＣ（ＬＵ７６、ＬＵ１２８）及びＰＡ（ＰＡ４、ＰＡ２０、ＰＡ７６及びＰＡ９４ＭＥＴ）のＣＳＣ腫瘍細胞小集団において向上した（図３Ｂ）。ＴＮＦＲＳＦ２１　ｍＲＮＡ発現はまた、それぞれ、対応する正常組織、肺及び膵臓と比べて、ＣＳＣがより高かった。
【０４２４】
これらのデータは、ＴＮＦＲＳＦ２１は、いくつかの腫瘍において発現し、これらの症例における、抗体をベースとする治療の開発に対する良好な標的となり得ることを実証している。正常組織と比較したＰＤＸにおける総合的な発現レベルは狭い枠であることを示しているが、ＴＮＦＲＳＦ２１は、多数の試験腫瘍において、ＮＴＧ集団に比べるとＣＳＣ集団においてより高いレベルに特異的に発現し、これにより、本発明者らが、正常組織に対して標的化することを望む腫瘍集団の発現の差異が高まる。
【０４２５】
［実施例３］
マイクロアレイ解析を使用する、腫瘍におけるＴＮＦＲＳＦ２１　ｍＲＮＡの発現の決定

様々な腫瘍細胞株におけるＴＮＦＲＳＦ２１の発現レベルを決定するマイクロアレイ実験を行い、データを以下の通り解析した。様々ながんタイプを含むＰＤＸ細胞株に由来する、実施例１に実質的に記載したように全腫瘍の総ＲＮＡを１～２μｇ抽出した。さらに、正常組織（例えば、結腸、心臓、腎臓、肝臓、肺、卵巣、膵臓、皮膚、脾臓、ＰＢＭＣ及び胃）の試料からＲＮＡを抽出した。ヒトゲノムにおいて、２７，９５８の遺伝子及び７，４１９のｌｎｃＲＮＡに対して設計された、５０，５９９の生物学的プローブを含むＡｇｉｌｅｎｔ　ＳｕｒｅＰｒｉｎｔ　ＧＥヒト８ｘ６０　ｖ２マイクロアレイプラットフォームを使用して、ＲＮＡ試料を解析した。標準的な業界の慣習を使用して、強度値を正規化して変換し、各試料に関する遺伝子発現を定量した。各試料におけるＴＮＦＲＳＦ２１発現の正規化後の強度が、図４にプロットされており、各腫瘍タイプについて誘導された幾何平均値は、水平の棒により示されている。

【０４２６】

図４を精査することにより、ＴＮＦＲＳＦ２１　ｍＲＮＡ発現は、正常組織に比べて、ＢＬ、ＢＲ、ＣＲ、ＧＡ、ＬＩＶ、ＬＵ－Ａｄ、ＬＵ－ＳＣＣ、ＯＶ、ＰＡ－ＰＡＣ／ＰＤＡＣ、ＰＲ、及びＳＫ－ＭＥＬのサブセットにおいて向上した。正常組織における最高の発現は、脾臓、乳房及び腎臓において観察された。試験した正常組織には、乳房、結腸、心臓、腎臓、肝臓、肺、卵巣、膵臓、ＰＢＭＣ、皮膚、脾臓及び胃が含まれる。

【０４２７】

ＢＬ、ＢＲ、ＣＲ、ＧＡ、ＬＵ－Ａｄ、ＬＵ－ＳＣＣ及びＰＡ－ＰＡＣ／ＰＤＡＣにおけるＴＮＦＲＳＦ２１発現が向上したことが観察されたことにより、実施例１及び２の結果が確認され、ＴＮＦＲＳＦ２１発現レベルと腫瘍細胞との間に観察された関係がさらに示唆される。

【０４２８】

［実施例４］

Ｔｈｅ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｇｅｎｏｍｅ　Ａｔｌａｓを使用する、腫瘍におけるＴＮＦＲＳＦ２１発現

様々な腫瘍におけるｈＴＮＦＲＳＦ２１　ｍＲＮＡの過剰発現を、Ｔｈｅ　Ｃａｎｃｅｒ　Ｇｅｎｏｍｅ　Ａｔｌａｓ（ＴＣＧＡ）として知られている原発性腫瘍及び正常試料の、公に入手可能な多量のデータセットを使用して確認した。ＩｌｌｕｍｉｎａＨｉＳｅｑ＿ＲＮＡＳｅｑＶ２プラットフォームからのｈＴＮＦＲＳＦ２１発現データを、ＴＣＧＡデータポータル（ｈｔｔｐｓ：／／ｔｃｇａ－ｄａｔａ．ｎｃｉ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｔｃｇａ／ｔｃｇａＤｏｗｎｌｏａｄ．ｊｓｐ）からダウンロードして解読し、各遺伝子の個々のエクソンからの読取り値を統合し、マップされたリード数１００万あたりのエクソンのキロベースあたりのリード数（ｒｅａｄ　ｐｅｒ　ｋｉｌｏｂａｓｅ　ｏｆ　ｅｘｏｎ　ｐｅｒ　ｍｉｌｌｉｏｎ　ｍａｐｐｅｄ　ｒｅａｄｓ）（ＲＰＫＭ）の単一の値を生成した。

【０４２９】

図５は、いくつかのＬＵ－Ａｄ、ＬＵ－ＳＣＣ、ＢＬ、及びＰＡ腫瘍において、正常組織と比べて、ＴＮＦＲＳＦ２１発現が向上していることを示している。これらのデータにより、ＴＮＦＲＳＦ２１　ｍＲＮＡのレベル向上が、様々な腫瘍タイプにおいて見出され得ることがさらに確認され、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体及びＡＤＣは、これらの過剰発現する腫瘍に対する有用な治療薬となり得ることを示している。

【０４３０】

［実施例５］

組換えＴＮＦＲＳＦ２１タンパク質のクローニング及び発現並びに細胞表面ＴＮＦＲＳＦ２１タンパク質を過剰発現する細胞株の操作

ヒトＴＮＦＲＳＦ２１（ｈＴＮＦＲＳＦ２１）

ｈＴＮＦＲＳＦ２１タンパク質に関係する本発明において必要な分子及び細胞材料を全て生成するため、市販のヒトＴＮＦＲＳＦ２１　ｃＤＮＡクローンを、Ｏｒｉｇｅｎｅ（ＳＣ１１４９６７、受託番号ＮＭ＿０１４４５２に対応する）から購入した。ＳＣ１１４

９６７　ｃＤＮＡクローンを、成熟ｈＴＮＦＲＦ２１タンパク質又はこの断片を発現する構築物の全ての後続の操作のために使用した。

【０４３１】

ｈＴＮＦＲＳＦ２１タンパク質への免疫反応性又は免疫特異的モジュレーターを生成するため、ｈＴＮＦＲＳＦ２１タンパク質の細胞外ドメイン（ＥＣＤ）が、９－ヒスチジンタグ又はヒトＩｇＧ２　Ｆｃタグの一方とインフレームで融合した、キメラ融合遺伝子を生成した。これは、標準分子技術を使用して、以下の通り行った：ｈＴＮＦＲＳＦ２１（残基Ｑ４２～Ｈ３４９）のＥＣＤをコードするＤＮＡ断片を、ＳＣ１１４９６７ｃＤＮＡクローンからＰＣＲ増幅し、ＣＭＶ駆動発現ベクターに、インフレームで、ＩｇＫシグナルペプチド配列の下流に、及び９－ヒスチジンタグ又はヒトＩｇＧ２　Ｆｃ　ｃＤＮＡのどちらかの上流にサブクローニングした。

【０４３２】

ＣＭＶ駆動ｈＴＮＦＲＳＦ２１発現ベクターにより、ＨＥＫ－２９３Ｔ及び／又はＣＨＯ－Ｓ細胞において、高いレベルの一過性発現が可能になる。ＨＥＫ２９３Ｔ細胞の懸濁液若しくは接着培養物、又は懸濁液ＣＨＯ－Ｓ細胞に、トランスフェクト試薬として、ポリエチレンイミンポリマーを使用して、ｈＴＮＦＲＳＦ２１　ＥＣＤ－Ｈｉｓ又はｈＴＮＦＲＳＦ２１　ＥＣＤ－Ｆｃタンパク質のいずれかをコードする発現構築物をトランスフェクトした。トランスフェクトして３～５日後に、ＡＫＴＡ　ｅｘｐｌｏｒｅｒ、及びそれぞれ、ニッケル－ＥＤＴＡ（Ｑｉａｇｅｎ）又はＭａｂＳｅｌｅｃｔ　ＳｕＲｅ（商標）プロテインＡ（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）カラムのどちらか一方を使用して、ｈＴＮＦＲＳＦ２１－ＥＣＤ－Ｈｉｓ又はｈＴＮＦＲＳＦ２１－ＥＣＤ－Ｆｃタンパク質を、清澄化した細胞－上清から精製した。

【０４３３】

ラットＴＮＦＲＳＦ２１（ｒＴＮＦＲＳＦ２１）

９－ヒスチジンタグ又はヒトＩｇＧ２　Ｆｃタグのどちらかをインフレームで融合したｒＴＮＦＲＳＦ２１のＥＣＤをコードする構築物を組み立てるために、ＮＣＢＩ受託番号ＮＭ＿００１１０８２０７に含まれている配列に相当するｃＤＮＡクローンを、Ｏｒｉｇｅｎｅ（ＲＲ２０４３１７）から購入した。標準分子技術を使用して、成熟ＥＣＤをコードするＰＣＲ断片（残基Ｑ４２～Ｈ３４９）を、ＲＲ２０４３１７テンプレートから増幅し、ＣＭＶ駆動発現ベクターに、インフレームで、ＩｇＫシグナルペプチド配列の下流に、及び９－ヒスチジンタグ又はヒトＩｇＧ２　Ｆｃ　ｃＤＮＡのどちらかの上流にクローニングした。組換えタンパク質は、上記のｈＴＮＦＲＳＦ２１タンパク質に記載した通り生成した。

【０４３４】

細胞株の操作

ｈＴＮＦＲＳＦ２１を過剰発現する操作した細胞株は、レンチウイルスベクターを使用して構築し、当該技術分野で認識されている技術を使用して、ＨＥＫ－２９３Ｔ細胞株を形質導入した。まず、標準的な分子クローニング技術を使用して、ＩｇＫシグナルペプチドをコードするヌクレオチド配列、次いで、ｐＣＤＨ－ＥＦ１－ＭＣＳ－Ｔ２Ａ－ＧＦＰ（Ｓｙｓｔｅｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）の多重クローニング部位の上流にＤＤＤＫエピトープタグを導入し、ベクターｐＣＥＭＴを作製した。ｐＣＥＭＴにおけるＴ２Ａ配列は、ペプチド結合の縮合部のリボソームスキッピングを促進し、２つの独立したタンパク質：Ｔ２Ａペプチドの下流においてコードされるＧＦＰマーカータンパク質の共発現を伴う、Ｔ２Ａペプチドの上流においてコードされる、ＤＤＤＫタグ付き細胞表面タンパク質の高レベル発現をもたらす。ｐＣＥＭＴを使用して、以下の通り、様々なＴＮＦＲＳＦ２１ベクターを作製した：成熟ｈＴＮＦＲＳＦ２１タンパク質（残基Ｑ４２～Ｌ６５５）をコードするＤＮＡ断片を、テンプレートとしてＳＣ１１４９６７　ｃＤＮＡクローンを使用して、ＰＣＲ増幅により産生し、得られたＰＣＲ産物を、ｐＣＥＭＴにおいて、ＩｇＫシグナルペプチド－ＤＤＤＫエピトープタグの下流にインフレームでサブクローニングした。これにより、ｐＬ１２０－ｈＴＮＦＲＳＦ２１レンチウイルスベクターが産生した。

当業者に周知の標準レンチウイルス形質導入技術を使用し、このレンチウイルスベクターを使用して、ｈＴＮＦＲＳＦ２１タンパク質を過剰発現する安定なＨＥＫ－２９３Ｔをベースとする細胞株を作製し、次いで、高発現性ＨＥＫ－２９３ＴサブクローンのＴＮＦＲＳＦ２１－正細胞選択及び蛍光活性化細胞選別（ＦＡＣＳ）を行った（例えば、ＧＦＰ及びＦＬＡＧエピトープに対して強力にポジティブとなる細胞）。

【０４３５】

［実施例６］

ＴＮＦＲＳＦ２１抗体の生成

抗ＴＮＦＲＳＦ２１マウス抗体を、以下の通り２つの免疫付与キャンペーンで生成した。株Ｂａｌｂ／ｃ、ＣＤ－１及びＦＶＢに由来するマウスに、等量の体積のＴｉｔｅｒＭａｘ（登録商標）アジュバントを用いて乳化した１０μｇのｈＴＮＦＲＳＦ２１－Ｆｃ又はｈＴＮＦＲＳＦ２１－Ｈｉｓタンパク質を接種した。最初の接種に続いて、このマウスに、等量の体積のミョウバンアジュバント及びＣｐＧを用いて乳化した、５μｇのｈＴＮＦＲＳＦ２１タンパク質を４週間、毎週２回注射した。

【０４３６】

マウスを屠殺し、流入リンパ節（膝窩、鼠径及び内側腸骨）を解離し、抗体産生細胞源として使用した。Ｂ細胞の単一細胞懸濁液（１２２．５ｘ１０^{6}個の細胞）を生成し、エレクトロセルフュージョンにより、モデルＢＴＸ　Ｈｙｂｒｉｍｍｕｎｅシステム（ＢＴＸ　Ｈａｒｖａｒｄ　Ａｐｐａｒａｔｕｓ）を使用して、非分泌Ｓｐ２／０－Ａｇ１４骨髄腫細胞（ＡＴＣＣ＃ＣＲＬ－１５８１）と、１：１の比で融合した。細胞を、アザセリン、１５％の胎性クローンＩ血清（Ｔｈｅｒｍｏ＃ＳＨ３００８０－０３）、１０％のＢＭ順化培地（Ｒｏｃｈｅ＃１０６６３５７３００１）、１ｍＭの非必須アミノ酸（Ｃｏｒｎｉｎｇ＃２５－０２５－ＣＩ）、１ｍＭのＨＥＰＥＳ（Ｃｏｒｎｉｎｇ＃２５－０６０－ＣＩ）、１００ＩＵのペニシリン－ストレプトマイシン（Ｃｏｒｎｉｎｇ＃３０－００２－ＣＩ）及び１００ＩＵのＬ－グルタミン（Ｃｏｒｎｉｎｇ＃２５－００５－ＣＩ）を補足したＤＭＥＭ培地からなるハイブリドーマ選択培地に再懸濁し、１００ｍＬの選択培地を含有する３つのＴ２２５フラスコ中で培養した。フラスコを、７％CO_2及び９５％空気を含有する加湿３７℃インキュベータにおいて、６日間、置いた。

【０４３７】

融合後の６日目に、ハイブリドーマライブラリ細胞を一時的に冷凍した。この細胞は、ハイブリドーマ選択培地中で解凍し、３７℃の加湿インキュベータ中、１日間、休ませた。細胞をフラスコから選別し、９０μＬの補足したハイブリドーマ選択培地（上記）中の、ウェルあたり細胞１個で、１２Ｆａｌｃｏｎ３８４ウェルプレートに蒔いた（ＢＤ　ＦＡＣＳＡｒｉａ　Ｉ細胞ソーターを使用）。未使用ハイブリドーマライブラリ細胞の残りを、今後のライブラリ試験及びスクリーニングのために、液体窒素中で凍結した。

【０４３８】

ハイブリドーマは、１０日間、培養し、上清を、フローサイトメトリ及びＥＬＩＳＡを使用して、ｒＴＮＦＲＳＦ２１と交差反応する、ｈＴＮＦＲＳＦ２１及び抗体に特異的な抗体についてスクリーニングした。ハイブリドーマ上清に関するフローサイトメトリを以下の通り行った。ｈＴＮＦＲＳＦ２１を形質導入したＨＥＫ－２９３Ｔ細胞を、２５μＬのハイブリドーマ上清と共に、３０分間、インキュベートした。細胞を、ＰＢＳ／２％ＦＣＳで洗浄し、次いで試料あたり２５μＬの、ＰＢＳ／２％　ＦＣＳで１：３００に希釈したＦｃ断片二次特異的、ＤｙｅＬｉｇｈｔ６４９標識化ヤギ－抗マウスＩｇＧと１５分間インキュベートした。細胞をＰＢＳ／２％ＦＣＳで２回洗浄し、ＤＡＰＩのＰＢＳ／２％ＦＣＳ中で再懸濁し、アイソタイプ対照抗体で染色した細胞の蛍光を超える蛍光についてフローサイトメトリにより分析した。

【０４３９】

ＥＬＩＳＡアッセイを使用して、ｈＴＮＦＲＳＦ２１に及びｒＴＮＦＲＳＦ２１に結合した抗体のハイブリドーマ上清をスクリーニングした。ＥＬＩＳＡは、以下の通りに実施した：ＰＢＳバッファー中、０．５μｇ／ｍＬの精製したｒＴＮＦＲＳＦ２１－Ｈｉｓ、

及びｈＴＮＦＲＳＦ２１－Ｆｃ又はｈＴＮＦＲＳＦ２１－Ｈｉｓによりプレートを被覆し、４℃において一晩、インキュベートした。次に、プレートをＰＢＳＴにより洗浄し、５％ＦＢＳを含むＰＢＳにより３７℃において３０分間、ブロッキングした。このブロッキング溶液を除去し、１５μｌのＰＢＳＴをウェルに加えた。ハイブリドーマ上清２５μｌを加えて、室温で1時間、インキュベートした。ＰＢＳＴにより洗浄した後、ＰＢＳＡ中、１：１０，０００に希釈した、ＨＲＰ標識ヤギ抗マウスＩｇＧ　３０μＬ／ウェルを室温で３０分間、加えた。このプレートを洗浄して、２５μＬ／ウェルのＴＭＢ基質溶液（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を室温で約5分間、添加することにより発色させた。等量体積の０．２Ｍ　H_2SO_4を加えて、基質発色を停止させた。次に、この試料をＯＤ４５０において分光光度計により分析した。バックグラウンドより３倍大きなＯＤ４５０を有する試料は、交差反応性であるとみなした。

【０４４０】

ｈＴＮＦＲＳＦ２１－Ｈｉｓの免疫付与キャンペーンにより、ｈＴＮＦＲＳＦ２１を発現するＨＥＫ－２９３Ｔ細胞の表面に結合した１５０を超えるマウス抗体が生じた。

【０４４１】

［実施例７］

ＴＮＦＲＳＦ２１抗体の特徴

様々な方法を使用して、アイソタイプ、ＴＮＦＲＳＦ２１に対する親和性、ｒＴＮＦＲＳＦ２１に対する交差反応性、結合速度、及び個々の抗体により占有される固有のエピトープビンの確立に関して、実施例６において生成した抗ＴＮＦＲＳＦ２１マウス抗体を特徴付けた。図６は、いくつかの例示的なマウス抗体に関する、上述の特徴をまとめた表を示している。図６において、ブランク細胞又は「Ｎ／Ｄ」は、この場合にデータが生成しなかったことを示している。

【０４４２】

いくつかの代表的な抗体のアイソタイプは、製造業者のプロトコルに従い、Ｍｉｌｌｉｐｌｅｘマウス免疫グロブリンアイソタイピングキット（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）を使用して決定した。例示的なＴＮＦＲＳＦ２１特異的抗体の結果が、「アイソタイプ」と印が付けられている列に示されている。

【０４４３】

ｈＴＮＦＲＳＦ２１－Ｈｉｓ及びｒＴＮＦＲＳＦ２１－Ｈｉｓに対する抗体の親和性は、以下の通り、ＦｏｒｔｅＢｉｏ　ＲＥＤを用いて生成した速度曲線から定量的に決定した。抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体は、3分間の接触時間及び１０００ｒｐｍの流速により、抗マウスＦｃ捕捉バイオセンサーに固定化した。ベースラインからの捕捉した抗体負荷は、０．３～１単位で一定とした。抗体捕捉及び５０秒のベースライン後に、バイオセンサーをｈＴＮＦＲＳＦ２１－Ｈｉｓ又はｒＴＮＦＲＳＦ２１－Ｈｉｓの３００ｎＭ溶液に、４分間の会合期の間、次いで、１０００ｒｐｍの振とう速度で４分間の解離期の間、浸漬した。各サイクル後、１０ｍＭのグリシン（ｐＨ１．７）に浸漬することにより、バイオセンサーを再生成した。これらのデータは、特異的抗体応答から、対照のマウスＩｇＧ表面応答を差し引くことにより処理し、データを、会合期及び解離期に切り出した。会合曲線及び解離曲線を使用して、選択した抗体（データ示さず）の親和性を定量的に評価した。ｒＴＮＦＲＳＦ２１タンパク質への高い親和性で交差反応する抗体を特定した（図６）。ｒＴＮＦＲＳＦ２１タンパク質への交差反応性を、インビトロでの殺傷アッセイ（データ示さず）により確認した。

【０４４４】

ｈＴＮＦＲＳＦ２１、ｃＴＮＦＲＳＦ２１（Ｓｉｎｏ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌから購入；カタログ番号１０１７５－Ｈ０８Ｈ）又はｒＴＮＦＲＳＦ２１タンパク質に対する選択抗体の親和性を、ＢＩＡｃｏｒｅ２０００機器（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を使用する表面プラズモン共鳴を使用して定量した。抗マウス抗体捕捉キットを使用して、ＣＭ５バイオセンサーチップにマウス抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体を固定した。各抗原注射サイクルの前に、０．１～２μｇ／ｍＬの濃度のマウス抗体を、２分間の接触時間及び５μＬ／分

の流速で表面に捕捉した。ベースラインからの捕捉した抗体負荷は、８０～１２０応答単位で一定とした。抗体捕捉及び１分間のベースライン後、実施例５において生成したｈＴＮＦＲＳＦ２１－Ｈｉｓ抗原モノマーを、４分間の会合期の間、次いで、５μＬ／分の流速で４分間の解離期の間、様々な濃度で表面に流した。抗ヒト抗体捕捉キットを使用した点を除いて、ヒト化抗体（実施例１０を参照）の結合親和性を測定するため、同様のプロトコルを使用した。これらのデータは、特異的抗体の表面応答から、対照の非結合抗体の表面応答を差し引くことにより処理し、データを、会合期及び解離期に切り出した。得られた応答曲線を使用して、１：１ラングミュア結合モデルにあてはめ、ＢｉａＥｖａｌｕａｔｉｏｎソフトウェア３．１（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）を使用して、算出したk_{on}及びk_{off}速度定数を使用して、見かけ親和性を生成した。抗体は、ナノモル濃度の範囲（データを示さず）において、ｈＴＮＦＲＳＦ２１、ｃＴＮＦＲＳＦ２１及びｒＴＮＦＲＳＦ２１に対して親和性があることを示した。

【０４４５】

抗体は、マルチプレックス競合イムノアッセイ（Ｌｕｍｉｎｅｘ）を使用して、ビンに群分けした。１０μｇ／ｍＬの濃度の個々の固有の抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体（捕捉ｍＡｂ）１００μｌを、抗マウスカッパ抗体（Ｍｉｌｌｅｒら、２０１１年、ＰＭＩＤ：２１２２３９７０）にコンジュゲートした磁気ビーズ（Ｌｕｍｉｎｅｘ）と共に１時間、インキュベートした。捕捉ｍＡｂ／コンジュゲートビーズ複合体をＰＢＳＴＡバッファー（０．０５％Ｔｗｅｅｎ２０を含むＰＢＳ中の１％ＢＳＡ）により洗浄し、次に、プールした。残りの洗浄用バッファーを除去した後、上記のビーズを２μｇ／ｍＬのｈＴＮＦＲＳＦ２１－Ｈｉｓタンパク質と共に１時間、インキュベートし、ＰＢＳＴＡにおいて洗浄して、次に再懸濁させた。プールしたビーズ混合物を９６ウェルプレートに分布させて、各ウェルは、固有の抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体（検出ｍＡｂ）を含んでおり、これを振とうしながら、１時間、インキュベートした。洗浄工程後、ＰＥにコンジュゲートした抗マウスカッパ抗体（上において使用したものと同一）を、５μｇ／ｍｌの濃度でウェルに加え、１時間、インキュベートした。ビーズを再度、洗浄し、ＰＢＳＴＡ中で再懸濁した。平均蛍光強度（ＭＦＩ）値をＬｕｍｉｎｅｘ　ＭＡＧＰＩＸ機器により測定した。抗体対合を、抗体の対のピアソン相関係数から算出した、距離行列の樹状図として視覚化した。ビニングは、抗体の対のＭＦＩ値の樹状図及び解析に基づいて決定した。図６により、スクリーニングした抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体は、ｈＴＮＦＲＳＦ２１タンパク質上の少なくとも４つの固有のビン（Ａ～Ｄ）に群分けすることができることが示される。低い結合親和性を有しており、この低い結合親和性のために、特異的なビンを決定することができない抗体は、ビンＸにあると表示する。ブランクのビン又はＮ／Ｄは、関連抗体に関するビニング実験を行わなかったことを意味する。

【０４４６】

［実施例８］

ＴＮＦＲＳＦ２１抗体の配列決定

実施例６において生成した抗ＴＮＦＲＳＦ２１マウス抗体は、以下に記載されている通りに配列決定した。全ＲＮＡは、製造業者の指示に従い、ＲＮｅａｓｙ　Ｍｉｎｉｐｒｅｐキット（Ｑｉａｇｅｎ）を使用して、選択されたハイブリドーマ細胞から精製した。試料あたり10^4～10^5個の間の細胞を使用した。単離されたＲＮＡ試料は、使用するまで－８０℃において保存した。

【０４４７】

各ハイブリドーマのＩｇ重鎖の可変領域を、完全マウスＶＨレパートリーを標的とするように設計した８６のマウス特異的リーダー配列プライマーを含む２つの５’プライマーミックスと、全てのマウスＩｇアイソタイプに特異的な３’マウスＣγプライマーとを組み合わせて使用して増幅させた。同様に、Ｖκマウスファミリーのそれぞれを増幅するように設計した６４の５’Ｖκリーダー配列を含む２つのプライマーミックスを、マウスカッパ定常領域に特異的な単一リバースプライマーと組み合わせて使用し、カッパ軽鎖を増幅させ配列決定した。ＶＨ及びＶＬ転写産物は、１００ｎｇの全ＲＮＡから、Ｑｉａｇｅ

ｎ　Ｏｎｅ工程ＲＴ－ＰＣＲキットを以下のように使用して増幅した。全部で４つのＲＴ－ＰＣＲ反応を各ハイブリドーマについて実施し、２つはＶκ軽鎖について、２つはＶＨ重鎖に対して行った。ＰＣＲ反応混合物は、１．５μＬのＲＮＡ、０．４μＬの１００μＭの重鎖又はカッパ軽鎖いずれかのプライマー（Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓによりカスタム合成）、５μＬの５×ＲＴ－ＰＣＲバッファー、１μＬのｄＮＴＰ並びに逆転写酵素及びＤＮＡポリメラーゼを含有する０．６μＬの酵素ミックスを含んでいた。サーマルサイクラープログラムは、５０℃で６０分、９５℃で１５分、続いて３５サイクル×（９４．５℃で３０秒、５７℃で３０秒、７２℃で１分間）のＲＴ工程であった。次いで最終インキュベーションを７２℃で１０分間実施した。

【０４４８】

抽出されたＰＣＲ産物を、可変領域の増幅について上述したものと同じ特異的可変領域プライマーを使用して配列決定した。ＰＣＲ産物を、ＰＣＲ精製及び配列決定サービスのための外部配列決定提供業者（ＭＣＬＡＢ）へと送付した。ヌクレオチド配列を、ＩＭＧＴ配列解析ツール（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｉｍｇｔ．ｏｒｇ／ＩＭＧＴｍｅｄｉｃａｌ／ｓｅｑｕｅｎｃｅ＿ａｎａｌｙｓｉｓ．ｈｔｍｌ）を使用して分析し、最も高い配列相同性を有する生殖細胞系Ｖ、Ｄ及びＪ遺伝子メンバーを特定した。誘導した配列は、専売抗体配列データベースを使用してＶＨ及びＶＬ遺伝子をマウス生殖系列データベースにアラインメントすることにより、ＩｇのＶ－及びＪ－領域の既知の生殖系列ＤＮＡ配列と比較した。

【０４４９】

図７Ａは、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体からの多数の新規なマウス軽鎖可変領域の連続するアミノ酸配列を図示している一方、図７Ｂは、同じ抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体からの新規なマウス重鎖可変領域の連続するアミノ酸配列を図示している。マウス軽鎖及び重鎖可変領域アミノ酸配列が一緒に、配列番号２１～２７１（奇数）に示されている。

【０４５０】

より詳細には、図７Ａ及び７Ｂは、（１）配列番号２１の軽鎖可変領域（ＶＬ）及び配列番号２３の重鎖可変領域（ＶＨ）；又は（２）配列番号２５のＶＬ及び配列番号２７のＶＨ；又は（３）配列番号２９のＶＬ及び配列番号３１のＶＨ；又は（４）配列番号３３のＶＬ及び配列番号３５のＶＨ；又は（５）配列番号３７のＶＬ及び配列番号３９のＶＨ；又は（６）配列番号４１のＶＬ及び配列番号４３のＶＨ；又は（７）配列番号４５のＶＬ及び配列番号４７のＶＨ；又は（８）配列番号４９のＶＬ及び配列番号５１のＶＨ；又は（９）配列番号５３のＶＬ及び配列番号５５のＶＨ；又は（１０）配列番号５７のＶＬ及び配列番号５９のＶＨ；又は（１１）配列番号６１のＶＬ及び配列番号６３のＶＨ；又は（１２）配列番号６５のＶＬ及び配列番号６７のＶＨ；又は（１３）配列番号６９のＶＬ及び配列番号７１のＶＨ；又は（１４）配列番号７３のＶＬ及び配列番号７５のＶＨ；又は（１５）配列番号７７のＶＬ及び配列番号７９のＶＨ；又は（１６）配列番号８１のＶＬ及び配列番号８３のＶＨ；又は（１７）配列番号８５のＶＬ及び配列番号８７のＶＨ；又は（１８）配列番号８９のＶＬ及び配列番号９１のＶＨ；又は（１９）配列番号９３のＶＬ及び配列番号９５のＶＨ；又は（２０）配列番号９７のＶＬ及び配列番号９９のＶＨ；又は（２１）配列番号１０１のＶＬ及び配列番号１０３のＶＨ；又は（２２）配列番号１０５のＶＬ及び配列番号１０７のＶＨ；又は（２３）配列番号１０９のＶＬ及び配列番号１１１のＶＨ；又は（２４）配列番号１１３のＶＬ及び配列番号１１５のＶＨ；配列番号１１７のＶＬ及び配列番号１１９のＶＨ；又は（２５）配列番号１２１のＶＬ及び配列番号１２３のＶＨ；又は（２６）配列番号１２５のＶＬ及び配列番号１２７のＶＨ；又は（２７）配列番号１２９のＶＬ及び配列番号１３１のＶＨ；又は（２８）配列番号１３３のＶＬ及び配列番号１３５のＶＨ；又は（２９）配列番号１３７のＶＬ及び配列番号１３９のＶＨ；又は（３０）配列番号１４１のＶＬ及び配列番号１４３のＶＨ；又は（３１）配列番号１４５のＶＬ及び配列番号１４７のＶＨ；又は（３２）配列番号１４９のＶＬ及び配列番号１５１のＶＨ；又は（３３）配列番号１５３のＶＬ及び配列番号１５５のＶＨ；又は（３４）配列番号１５７のＶＬ及び配列番号１５９のＶＨ；又は（３５）配列番

号１６１のＶＬ及び配列番号１６３のＶＨ；又は（３６）配列番号１６５のＶＬ及び配列番号１６７のＶＨ；又は（３７）配列番号１６９のＶＬ及び配列番号１７１のＶＨ；又は（３８）配列番号１７３のＶＬ及び配列番号１７５のＶＨ；又は（３９）配列番号１７７のＶＬ及び配列番号１７９のＶＨ；又は（４０）配列番号１８１のＶＬ及び配列番号１８３のＶＨ；又は（４１）配列番号１８５のＶＬ及び配列番号１８７のＶＨ；又は（４２）配列番号１８９のＶＬ及び配列番号１９１のＶＨ；又は（４３）配列番号１９３のＶＬ及び配列番号１９５のＶＨ；又は（４４）配列番号１９７のＶＬ及び配列番号１９９のＶＨ；又は（４５）配列番号２０１のＶＬ及び配列番号２０３のＶＨ；又は（４６）配列番号２０５のＶＬ及び配列番号２０７のＶＨ；又は（４７）配列番号２０９のＶＬ及び配列番号２１１のＶＨ；又は（４８）配列番号２１３のＶＬ及び配列番号２１５のＶＨ；又は（４９）配列番号２１７のＶＬ及び配列番号２１９のＶＨ；又は（５０）配列番号２２１のＶＬ及び配列番号２２３のＶＨ；又は（５１）配列番号２２５のＶＬ及び配列番号２２７のＶＨ；又は（５２）配列番号２２９のＶＬ及び配列番号２３１のＶＨ；又は（５３）配列番号２３３のＶＬ及び配列番号２３５のＶＨ；又は（５４）配列番号２３７のＶＬ及び配列番号２３９のＶＨ；又は（５５）配列番号２４１のＶＬ及び配列番号２４３のＶＨ；又は（５６）配列番号２４５のＶＬ及び配列番号２４７のＶＨ；又は（５７）配列番号２４９のＶＬ及び配列番号２５１のＶＨ；又は（５８）配列番号２５３のＶＬ及び配列番号２５５のＶＨ；又は（５９）配列番号２５７のＶＬ及び配列番号２５９のＶＨ；又は（６０）配列番号２６１のＶＬ及び配列番号２６３のＶＨ；又は（６１）配列番号３３のＶＬ及び配列番号２６５のＶＨ；又は（６２）配列番号６５のＶＬ及び配列番号２６７のＶＨ；又は（６３）配列番号２６９のＶＬ及び配列番号１０３のＶＨ；又は（６４）配列番号２７１のＶＬ及び配列番号１７５のＶＨを含めた、マウス抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体の注釈つき配列を提示している。

【０４５１】

開示される抗体（又は、これらを産生するクローン）を、それぞれの表示（例えば、ＳＣ３９．１、ＳＣ３９．２など）及び可変領域核酸又はアミノ酸の配列番号（図７Ａ～７Ｃを参照）と一緒にまとめたものが、直下の表５に示されている。

【０４５２】

【表５】

表5

クローン	VL 配列番号 NA / AA	VH 配列番号 NA / AA
SC39.1	20 / 21	22 / 23
SC39.2	24 / 25	26 / 27
SC39.3	28 / 29	30 / 31
SC39.4	32 / 33	34 / 35
SC39.5	36 / 37	38 / 39
SC39.6	40 / 41	42 / 43
SC39.7	44 / 45	46 / 47
SC39.8	48 / 49	50 / 51
SC39.11	52 / 53	54 / 55
SC39.12	56 / 57	58 / 59
SC39.18	60 / 61	62 / 63
SC39.24	64 / 65	66 / 67
SC39.26	68 / 69	70 / 71
SC39.33	72 / 73	74 / 75
SC39.37	76 / 77	78 / 79
SC39.39	80 / 81	82 / 83
SC39.101	84 / 85	86 / 87
SC39.102	88 / 89	90 / 91
SC39.103	92 / 93	94 / 95
SC39.104	96 / 97	98 / 99
SC39.105	100 / 101	102 / 103
SC39.108	104 / 105	106 / 107
SC39.109	108 / 109	110 / 111
SC39.110	112 / 113	114 / 115
SC39.112	116 / 117	118 / 119
SC39.117	120 / 121	122 / 123
SC39.120	124 / 125	126 / 127
SC39.121	128 / 129	130 / 131
SC39.122	132 / 133	134 / 135
SC39.123	136 / 137	138 / 139
SC39.124	140 / 141	142 / 143
SC39.125	144 / 145	146 / 147
SC39.127	148 / 149	150 / 151
SC39.129	152 / 153	154 / 155
SC39.144	156 / 157	158 / 159

SC39.149	160 / 161	162 / 163
SC39.151	164 / 165	166 / 167
SC39.152	168 / 169	170 / 171
SC39.154	172 / 173	174 / 175
SC39.156	176 / 177	178 / 179
SC39.157	180 / 181	182 / 183
SC39.158	184 / 185	186 / 187
SC39.160	188 / 189	190 / 191
SC39.162	192 / 193	194 / 195
SC39.163	196 / 197	198 / 199
SC39.169	200 / 201	202 / 203
SC39.170	204 / 205	206 / 207
SC39.172	208 / 209	210 / 211
SC39.175	212 / 213	214 / 215
SC39.177	216 / 217	218 / 219
SC39.180	220 / 221	222 / 223
SC39.181	224 / 225	226 / 227
SC39.182	228 / 229	230 / 231
SC39.186	232 / 233	234 / 235
SC39.188	236 / 237	238 / 239
SC39.189	240 / 241	242 / 243
SC39.192	244 / 245	246 / 247
SC39.196	248 / 249	250 / 251
SC39.126	252 / 253	254 / 255
SC39.136	256 / 257	258 / 259
SC39.148	260 / 261	262 / 263
SC39.27	32 / 33	264 / 265
SC39.28	64 / 65	266 / 267
SC39.153	268 / 269	102 / 103
SC39.161	270 / 271	174 / 175

【０４５３】

図７Ａ及び図７Ｂにおいて、ＶＬ及びＶＨアミノ酸配列に注釈をつけて、Ｋａｂａｔらに準拠して定義される、フレームワーク領域（すなわち、ＦＲ１～ＦＲ４）及び相補性決定領域（すなわち、図７Ａ中のＣＤＲＬ１～ＣＤＲＬ３又は図７Ｂ中のＣＤＲＨ１～ＣＤＲＨ３）を同定する。可変領域配列は、Ａｂｙｓｉｓデータベースの専売のバージョンを使用して解析し、ＣＤＲ及びＦＲの表示を得た。ＣＤＲは、Ｋａｂａｔらに従い定義されるが、当業者は、ＣＤＲ及びＦＲの表示はまた、Ｃｈｏｔｈｉａ、ＭｃＣａｌｌｕｍ、又は他の任意の許容された命名法システムに従って定義され得ることを理解する。さらに、図７Ｃは、図７Ａ及び７Ｂに示されているアミノ酸配列をコードする核酸配列（配列番号２０～２７０、偶数）を提示している。

【０４５４】

図７Ａ及び７Ｂ、並びに表５において分かる通り、特定のマウス抗体のそれぞれに対する重鎖及び軽鎖可変領域アミノ酸配列の配列番号は、一般に、連続する奇数である。したがって、モノクローナル抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体ＳＣ３９．１は、軽鎖及び重鎖可変領域についてそれぞれ、アミノ酸配列番号２１及び２３を含む。ＳＣ３９．２は、配列番号２

５及び２７を含む。ＳＣ３９．３は配列番号２９及び３１を含むなどである。図７Ａ及び７Ｂに示されている連続番号付けスキームに対する例外は、固有の重鎖と共に抗体ＳＣ３９．４に見出されているものと同じ軽鎖可変領域を含む、ＳＣ３９．２７（配列番号３３及び２６５）、固有の重鎖と共に抗体ＳＣ３９．２４に見出されているものと同じ軽鎖可変領域を含む、ＳＣ３９．２８（配列番号６５及び２６７）、固有の軽鎖と共に抗体ＳＣ３９．１０５に見出されているものと同じ重鎖可変領域を含む、ＳＣ３９．１５３（配列番号２６９及び１０３）、及び固有の軽鎖と共に抗体ＳＣ３９．１５４に見出されているものと同じ重鎖可変領域を含む、ＳＣ３９．１６１（配列番号２７１及び１７５）である。いずれの事象においても、マウス抗体アミノ酸配列（図７Ｃに示されている）をコードする対応するアミノ酸配列は、対応するアミノ酸の配列番号の直前の配列番号を有する。したがって、例えば、ＳＣ３９．１抗体のＶＬ及びＶＨの核酸配列の配列番号は、それぞれ配列番号２０及び２２となる。

【０４５５】

図７Ａ～７Ｃ中の注釈つき配列に加えて、図７Ｇ～７Ｊはそれぞれ、Ｋａｂａｔ、Ｃｈｏｔｈｉａ、ＡＢＭ及びＣｏｎｔａｃｔの方法論を使用して決定した、ＳＣ３９．２、ＳＣ３９．４、ＳＣ３９．２８及びＳＣ３９．１２６の軽鎖及び重鎖可変領域のＣＤＲ表示を提示している。図７Ｇ～７Ｊに図示されているＣＤＲ配列を、上で議論されているＡｂｙｓｉｓデータベースの専売バージョンを使用して誘導した。後の実施例に示されている通り、当業者は、開示したマウスＣＤＲは、本発明に従って、ヒトフレームワーク配列にグラフト化されて、ＣＤＲグラフト化抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体又はヒト化抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体を与えることができることを理解する。さらに、本開示を鑑みると、本明細書の教示に従って、作製及び配列決定された任意の抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体のＣＤＲを容易に決定して、この誘導されたＣＤＲ配列を、本発明のＣＤＲグラフト化抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体又はヒト化抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体を得るために使用することができると思われる。これは、図７Ａ～７Ｂに示されている重鎖及び軽鎖可変領域配列を有する抗体に特に当てはまる。

【０４５６】

［実施例９］

ＴＮＦＲＳＦ２１抗体のドメイン－レベルエピトープマッピング

開示される抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体によって結合されているエピトープを特徴付けるため、ドメイン－レベルエピトープマッピングを、酵母により表示されたドメインを使用するＦＡＣＳに基づく方法を使用して行った（一般に、Ｃｏｃｈｒａｎら、２００４年、ＰＭＩＤ：１５０９９７６３を参照）。

【０４５７】

ｈＴＮＦＲＳＦ２１において見出されたドメインの概略図は図１Ｂ中にある。アミノ酸４２～８９を含むｃｙｓ繰り返し１（Ｄ１）、アミノ酸９０～１３２を含むｃｙｓ繰り返し２（Ｄ２）、アミノ酸１３３～１６８を含むｃｙｓ繰り返し３（Ｄ３）、アミノ酸１６９～２１１を含むｃｙｓ繰り返し４（Ｄ４）、アミノ酸２１２～３４９を含む細胞外ドメイン（Ｄ５）の残り、並びにＤ１、Ｄ２、Ｄ３、Ｄ４及びＤ５の組合せとなるｈＴＮＦＲＳＦ２１を発現させるために、酵母ディスプレイプラスミド構築物を生成した。これらのドメインの番号付けには、ｈＴＮＦＲＳＦ２１のシグナルペプチド配列である、アミノ酸１～４１を含む（図１Ａ中に下線が引かれている）。ドメイン情報に関して、一般に、ＵｎｉＰｒｏｔＫＢ／Ｓｗｉｓｓ－Ｐｒｏｔデータベースエントリー０７５５０９を参照されたい。

【０４５８】

酵母ディスプレイプラスミドを酵母に形質転換し、次に、Ｃｏｃｈｒａｎらに記載されている通り、この酵母を成長させて誘起した。特定の構築物への結合を試験するため、所望の構築物を発現する２００，０００個の誘起酵母細胞を、１ｍｇ／ｍＬのＢＳＡ（ＰＢＳＡ）を含むＰＢＳ中で２回洗浄し、マウス又はヒト化のどちらかの精製抗体１００ｎｇ／ｍＬ及び１０μｇ／ｍＬで、ニワトリ抗ｃ－Ｍｙｃ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉ

ｅｓ）と共に、ＰＢＳＡ５０μＬ中でインキュベートした。氷上で９０分間、細胞をインキュベートし、次に、ＰＢＳＡ中、２回洗浄した。次に、Ａｌｅｘａ４８８をコンジュゲートした抗ニワトリ抗体、及びＡｌｅｘａ６４７をコンジュゲートしたヤギ抗マウス抗体又はヤギ抗ヒト抗体（どちらもＬｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）のどちらか一方と共に、それぞれ０．３μｇ／ｍＬで、ＰＢＳＡ５０μＬ中で細胞をインキュベートした。氷上の２０分間のインキュベート後、細胞をＰＢＳＡにより２回洗浄し、ＦＡＣＳＣａｎｔｏ　ＩＩ（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）で解析した。

【０４５９】

図８Ａは、ドメイン－レベルエピトープマッピング実験の結果をまとめたものである。エピトープマッピングデータは、抗原全体を良好に網羅していることを示しており、複数の抗体が、各ドメインに結合している。

【０４６０】

抗体が細胞殺傷を媒介する能力にエピトープの位置が役割を果たすかどうかを判定するため、ヒトｈＴＮＦＲＳＦ２１を発現する２９３個の細胞に関して、図１１Ａ（以下の実施例１３に示されている通りに決定した）に示されている殺傷データをドメインによりプロットし、図８Ｂに示している。図８Ｂを精査すると、ドメイン１～３にマッピングされたこれらの抗体は、以下に示されている通り、サポリンと組み合わせて使用すると、より高い細胞殺傷活性を示すことが示される。これらのデータは、ドメイン１～３に会合したエピトープに結合した抗体は、本明細書において開示されている抗体薬物コンジュゲートの成分として使用すると、特に有効となり得ることを示している。

【０４６１】

［実施例１０］

キメラ及びヒト化抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体の生成

キメラ抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体を、当該技術分野で認識されている技術を用いて以下のように生成した。

【０４６２】

実施例１に記載されている方法を実質的に使用して、全ＲＮＡを抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体生成ハイブリドーマから抽出し、ＲＮＡをＰＣＲ増幅した。マウス抗体のＶＨ鎖及びＶＬ鎖のＶ、Ｄ及びＪ遺伝子セグメントに関するデータを、本発明の抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体の核酸配列（図７Ｃ）から得た。抗体のＶＨ鎖及びＶＬ鎖のフレームワーク配列に特異的なプライマーセットを、次の制限部位を使用して設計した：ＶＨ断片に対してＡｇｅＩ及びＸｈｏＩ並びにＶＬ断片に対してＸｍａＩ及びＤｒａＩＩＩ。ＰＣＲ産物を、Ｑｉａｑｕｉｃｋ　ＰＣＲ精製キット（Ｑｉａｇｅｎ）により精製し、次いでＶＨ断片に対して制限酵素ＡｇｅＩ及びＸｈｏＩ並びにＶＬ断片に対してＸｍａＩ及びＤｒａＩＩＩを用いて消化した。ＶＨ及びＶＬ消化ＰＣＲ産物を精製し、ＩｇＨ又はＩｇκ発現ベクターにそれぞれライゲーションした。ライゲーション反応を、全体積１０μＬの２００ＵのＴ４－ＤＮＡリガーゼ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ）、７．５μＬの消化及び精製した遺伝子特異的ＰＣＲ産物並びに２５ｎｇの直線化ベクターＤＮＡ中で実施した。コンピテントのＥ．コリ（Ｅ．ｃｏｌｉ）ＤＨ１０Ｂ菌（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を、４２℃の熱ショックを介して、３μＬのライゲーション産物を用いて形質転換し、濃度１００μｇ／ｍＬでアンピシリンプレートの上に蒔いた。増幅ライゲーション産物の精製及び消化後、ＶＨ断片を、ＨｕＩｇＧ１（ｐＥＥ６．４ＨｕＩｇＧ１）を含むｐＥＥ６．４発現ベクター（Ｌｏｎｚａ）のＡｇｅＩ－ＸｈｏＩ制限部位にクローニングし、ＶＬ断片を、ヒトカッパ軽鎖定常領域（ｐＥＥ１２．４Ｈｕ－カッパ）を含むｐＥＥ１２．４発現ベクター（Ｌｏｎｚａ）のＸｍａＩ－ＤｒａＩＩＩ制限部位にクローニングした。

【０４６３】

トランスフェクト試薬としてポリエチレンイミン（ＰＥＩ）を使用し、ＣＨＯ－Ｓ細胞をｐＥＥ６．４ＨｕＩｇＧ１及びｐＥＥ１２．４Ｈｕ－カッパ発現ベクターと同時トランスフェクトすることにより、マウスＶＨ及びＶＬ領域、並びにヒト定常領域を含むキメラ

抗体を発現させた。上清を、トランスフェクションから３から６日後に採取した。組換えキメラ抗体を含有する培養上清を、８００×ｇで１０分間遠心分離することにより細胞デブリから清澄化し、４℃で保存した。組換えキメラ抗体を、タンパク質Ａビーズにより精製した。

【０４６４】

さらに、専売の分析プログラム（Ａｂｙｓｉｓ　Ｄａｔａｂａｓｅ、ＵＣＬ　Ｂｕｓｉｎｅｓｓ）及び以下の標準分子操作技術の手助けを受けて、選択したマウス抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体（ＳＣ３９．２、ＳＣ３９．４及びＳＣ３９．２８、ＳＣ３９．１２６）をヒト化した。可変領域のヒトフレームワーク領域を、ヒト生殖系列抗体配列のフレームワーク配列及びＣＤＲ古典的構造と、関連マウス抗体のフレームワーク配列及びＣＤＲとの間の最も高い相同性に基づき選択／設計した。解析のために、アミノ酸のＣＤＲドメインのそれぞれに対する帰属をＫａｂａｔらの番号付けに従って行った。可変領域が選択されたら、それらを合成遺伝子セグメントから生成した（Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）。ヒト化抗体をクローニングし、キメラ抗体について上述した分子的方法を使用して発現させた。

【０４６５】

図７Ｄ及び７Ｅにおいて示されているように、ヒト化抗体ｈＳＣ３９．２（配列番号２８１及び２８３、ａａ及び配列番号２８０及び２８２、ｎａ）、ｈＳＣ３９．４（配列番号２８５及び２８７、ａａ及び配列番号２８４及び２８６、ｎａ）、ｈＳＣ３９．２８（配列番号２８９及び２９１、ａａ及び配列番号２８８及び２９０、ｎａ）及びｈＳＣ３９．１２６（配列番号２９３及び２９５、ａａ及び配列番号２９２及び２９４、ｎａ）のＶＬ及びＶＨ配列は、それぞれ、対応するマウス抗体ＳＣ３９．２（ａａ配列番号２５及び２７）、ＳＣ３９．４（ａａ配列番号３３及び３５）、ＳＣ３９．２８（ａａ配列番号６５及び２６７）及びＳＣ３９．１２６（ａａ配列番号２５３及び２５５）のＶＬ及びＶＨ配列から誘導した。

【０４６６】

以下の表６は、ヒト化抗体の好都合な結合特性を維持するため、ＳＣ３９．２の重鎖可変領域における位置４７及び９３（ｈＳＣ３９．４）、９４（ｈＳＣ３９．２）、並びに４８（ｈＳＣ３９．１２６）において、並びにＳＣ３９．２の軽鎖可変領域の位置４６及び４８において、フレームワークが変化したことを示している。

【０４６７】

【表６】

表6

mAb	アイソタイプ	ヒトVH	ヒトJH	VH FW 変化	VH CDR 変化	ヒトVK	ヒトJK	VK FW 変化	VK CDR 変化
hSC39.2	IgG1/k	IGHV1-3*01	JH1	R94N	なし	IGKV1-27*01	JK2	L46A I48L	なし
hSC39.4	IgG1/k	IGHV3-48*01	JH1	A93V W47L	なし	IGKV4-1*01	JK2	なし	なし
hSC39.4ss1	IgG1 C220S/k	IGHV3-48*01	JH1	A93V W47L	なし	IGKV4-1*01	JK2	なし	なし
hSC39.28	IgG1/k	IGHV3-21*01	JH1	なし	なし	IGKV4-1*01	JK4	なし	なし
hSC39.126	IgG1/k	IGHV5-51*01	JH6	M48I	なし	IGKV1-39*01	JK2	なし	なし
hSC39.126ss1	IgG1 C220S/k	IGHV5-51*01	JH6	M48I	なし	IGKV1-39*01	JK2	なし	なし

【０４６８】
ヒト化ＶＨ及びＶＬアミノ酸並びに核酸配列（図７Ｄ及び図７Ｅ）に加えて、図７Ｆは、表６に示されている例示的なヒト化抗体構築物の完全長重鎖及び軽鎖アミノ酸配列を提示している。図７Ｆにおいて、ＶＨ及びＶＬ領域は、部位特異的Ｃ２２０Ｓ変異と共に下線が引かれている。さらに、ヒト化構築物のそれぞれに会合した核酸及びアミノ酸配列のまとめが、直下の表７に示されている。ｈＳＣ３９．４及びｈＳＣ３９．１２６構築物は、同一のＶＬ及びＶＨ領域、並びに同一の軽鎖を使用するが、重鎖の１つが、部位特異的コンジュゲーションのために遊離システインをもたらす変異（Ｃ２２０Ｓ）を取り込んでいる点において異なる重鎖を使用していることに留意されたい。

【０４６９】
【表７】

表7

クローン	VL 配列番号 NA / AA	VH 配列番号 NA / AA	完全長 配列番号 LC / HC
hSC39.2	280 / 281	282 / 283	300 / 301
hSC39.4	284 / 285	286 / 287	302 / 303
hSC39.4ss1	284 / 285	286 / 287	302 / 311
hSC39.28	288 / 289	290 / 291	304 / 305
hSC39.126	292 / 293	294 / 295	306 / 307
hSC39.126ss1	292 / 293	294 / 295	306 / 309

【０４７０】
この実施例に示されている例示的なヒト化抗体は、臨床的に適合可能な抗体が、本明細書において開示されている通りに生成されて、誘導され得ることを実証している。本発明のある特定の態様において、このような抗体がＴＮＦＲＳＦ２１　ＡＤＣに組み込まれて、好都合な治療指数を含む組成物を実現することができる。

【０４７１】
［実施例１１］
ＭＳＤによる腫瘍中のＴＮＦＲＳＦ２１タンパク質発現の検出
実施例１～３に記載されている様々な腫瘍と会合するＴＮＦＲＳＦ２１　ｍＲＮＡの転写産物レベルが向上したことを考慮して、ＴＮＦＲＳＦ２１タンパク質発現もまた、ＰＤＸ腫瘍において向上するかどうかを試験する検討を行った。ＴＮＦＲＳＦ２１タンパク質発現を検出して定量するため、ＭＳＤディスカバリープラットフォーム（Ｍｅｓｏ　Ｓｃａｌｅ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ）を使用する、エレクトロルミネッセンスＴＮＦＲＳＦ２１サンドイッチＥＬＩＳＡアッセイを開発した。

【０４７２】
ＰＤＸ腫瘍をマウスから切除し、ドライアイス／エタノール上で急速冷凍した。解凍した腫瘍片にタンパク質抽出用バッファー（Ｂｉｏｃｈａｉｎ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ）を加えて、ＴｉｓｓｕｅＬｙｓｅｒ　ｓｙｓｔｅｍ（Ｑｉａｇｅｎ）を使用して微粉砕した。溶解物を遠心分離（２０，０００ｇ、２０分間、４℃）により清澄化し、各溶解物中の全タンパク質濃度を、ビシンコニン酸を使用して定量した。次に、このタンパク質溶解物を５ｍｇ／ｍＬに正規化し、使用するまで－８０℃において保管した。正常組織は、市販供給元から購入した。

【０４７３】
溶解試料に由来するＴＮＦＲＳＦ２１タンパク質濃度は、（実施例５からの）精製済み組換えｈＴＮＦＲＳＦ２１－Ｈｉｓタンパク質を使用して生成した標準タンパク質濃度曲線からの値を内挿することにより決定した。ＴＮＦＲＳＦ２１タンパク質標準曲線及びタンパク質定量アッセイを、以下のように行った。

【０４７４】
ＰＢＳ中、２μｇ／ｍＬの捕捉抗体ＳＣ３９．４７を１５μＬを用いて、ＭＳＤ標準プレートを４℃で一晩、被覆した。プレートをＰＢＳＴ中で洗浄し、震とうしながら、３５μＬのＭＳＤ３％ブロッカーＡ溶液中で、１時間、ブロックした。プレートを、ＰＢＳＴ中で再び洗浄した。１０％タンパク質抽出用バッファーを含有する、ＭＳＤ　１％ブロッカーＡ中の１０×希釈溶解物（又は、段階的に希釈した組換えＴＮＦＲＳＦ２１標準品）１０μＬもウェルに加え、震とうしながら、２時間、インキュベートした。プレートを、ＰＢＳＴ中で再び洗浄した。次に、製造業者のプロトコルに従って、ＭＳＤ（登録商標）ＳＵＬＦ０－ＴＡＧ　ＮＨＳエステルを使用して、抗ＴＮＦＲＳＦ２１検出抗体（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ；ＡＦ１４４）にスルホタグ付けした。ＭＳＤ　ＳＵＬＦＯ－ＴＡＧ　ＮＨＳ－エステルは、反応性アミンである、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステルであり、これは、温和な塩基性条件下、タンパク質の一級アミン基に容易に結合して、安定なアミド結合を形成する。洗浄済みプレートに、タグ付けした検出抗体１０μＬを、震とうしながら、ＭＳＤ　１％ブロッカーＡ中、０．５μｇ／ｍＬで、室温で、１時間、加えた。プレートを、ＰＢＳＴ中で洗浄した。界面活性剤を含むＭＳＤ読取り用バッファーＴを水に１Ｘまで希釈し、３５μＬを各ウェルに加えた。標準曲線からの内挿により、ＰＤＸ試料中のＴＮＦＲＳＦ２１濃度を導く、統合ソフトウェア解析プログラムを使用して、プレートをＭＳＤ　Ｓｅｃｔｏｒ　Ｉｍａｇｅｒ２４００で読み取った。次に、値を全タンパク質濃度により除算し、全溶解タンパク質１ミリグラムあたりのＴＮＦＲＳＦ２１のナノグラム数を得た。得られた濃度は図９に示されており、各点は、単一ＰＤＸ腫瘍株に由来するＴＮＦＲＳＦ２１タンパク質濃度を表している。各点は、単一ＰＤＸ株に由来しているが、大部分の場合、複数の生物学的試料を同一ＰＤＸ株から試験して、値を平均し、データ点を得た。

【０４７５】
図９は、乳房、結腸、胃、肺、卵巣及び膵臓の腫瘍試料の代表的な試料が、高いＴＮＦＲＳＦ２１タンパク質発現を示すことを示している。試験した正常組織としては、副腎、動脈、結腸、食道、胆嚢、心臓、腎臓、肝臓、肺、末梢神経及び座骨神経、膵臓、筋骨格、皮膚、小腸、脾臓、胃、気管、赤血球及び白血球及び血小板、膀胱、脳、乳房、眼、リンパ節、卵巣、下垂体、前立腺及び脊髄が挙げられる。ヒトにおける潜在的な毒性の懸念を示すため、以下の組織：気管、胃、脾臓、小腸、皮膚、筋骨格、赤血球／白血球、血小板、膵臓、神経、肺、肝臓、腎臓、心臓、胆嚢、食道、結腸、動脈及び副腎を「ＮｏｒｍＴｏｘ」としてグラフ表示した。正常組織におけるＴＮＦＲＳＦ２１の発現は、ＮｏｒｍＴｏｘ組織中よりも、大抵、高かった。上に示されているＴＮＦＲＳＦ２１発現に関する、ｍＲＮＡ発現データと合わせたこれらのデータは、ＴＮＦＲＳＦ２１決定因子が、治療的介入にとって魅力的な標的をもたらすという主張を強力に強めるものである。

【０４７６】
［実施例１２］
フローサイトメトリによる腫瘍中のＴＮＦＲＳＦ２１タンパク質発現の検出
ＰＤＸ腫瘍細胞に発現したＴＮＦＲＳＦ２１に結合する本発明の抗体の能力は、以下の通り評価した。

【０４７７】
ＰＤＸ腫瘍を採取し、当該技術分野で認識されている酵素組織消化技術を使用して切除し、ＰＤＸ腫瘍細胞の単一細胞懸濁液を得た（例えば、Ｕ．Ｓ．Ｐ．Ｎ．２００７／０２９２４１４を参照）。ＰＤＸ腫瘍単一細胞懸濁液を、抗マウスＣＤ４５及びＨ－２Ｋ^{d}抗体と共にインキュベートしてマウス細胞を特定し、抗ヒトＥＰＣＡＭ抗体と共にインキュベートしてヒト細胞を特定した。さらに、腫瘍細胞を抗ヒトＣＤ４６　ＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ－６４７及びＣＤ３２４　ＰｅｒＣＰ　Ｃｙ５．５と共にインキュベートしてＣＳＣを特定した（Ｕ．Ｓ．Ｐ．Ｎ．２０１３／０２６０３８５、２０１３／００６１３４０及び２０１３／００６１３４２を参照）。最後に、ＰＤＸ腫瘍細胞を抗ＴＮＦＲＳＦ２１ビオチン化クローンＳＣ３９．２３と共にインキュベートし、ＰＤＸ小集団におけるＴＮＦ

ＲＳＦ２１の細胞表面発現を決定した。単離した細胞を、一次抗体又はアイソタイプが一致する対照抗体と共に３０分間、インキュベートし、ＰＢＳ／２％ＦＣＳ中で２回洗浄した。この細胞を、試料あたり５０μＬの、ＰＢＳ／２％ＦＣＳ中に１：２００に希釈したフィコエリスリン標識ストレプトアジピン二次抗体と共に１５分間、インキュベートし、１ｍＬのＰＢＳ／２％　ＦＣＳにより２回洗浄し、生存細胞と死滅細胞とを区別するため、４’，６－ジアミジノ－２－フェニルインドール（ｐｈｅｎｙｌｉｎｄｏｌｅａｎｔｉ）（ＤＡＰＩ）を含むＰＢＳ／２％　ＦＣＳ中で再懸濁した。次に、ＢＤ　ＦＡＣＳ　Ｃａｎｔｏ　ＩＩフローサイトメータを使用するフローサイトメトリにより、ＰＤＸ腫瘍細胞に結合した抗体を解析した。

【０４７８】

図１０Ａは、ＰＡ　ＰＤＸが、生存ヒトＣＳＣ小集団にＴＮＦＲＳＦ２１タンパク質の発現を有した一方（黒色実線；ＰＡ２０、ＰＡ５５、ＰＡ６０及びＰＡ６６）、ＮＴＧ細胞（ＣＤ３２４又はＣＤ４６を発現しない）（破線）は、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体との場合ほど、有意な染色がないことを実証していることを示している。蛍光マイナスワン（ＦＭＯ）及びアイソタイプ対照抗体を使用して、染色特異性（灰色）を確認した。ＣＳＣ細胞及びＮＴＧ細胞の表面上で観察された抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体の染色差をまとめている表が図１０Ａに示されており、発現は、それぞれの腫瘍細胞小集団に対する、表示されている抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体とアイソタイプ対照との間の幾何平均蛍光強度（ΔＭＦＩ）の変化として算出されている。このデータにより、腫瘍形成性細胞に対してＴＮＦＲＳＦ２１の発現が向上していること、及び本発明の抗体がこのような細胞に選択的に結合する能力があることがさらに確認された。

【０４７９】

より詳細には、実施例１及び２（図２及び３Ｂ）は、ＴＮＦＲＳＦ２１　ｍＲＮＡ発現が、ＬＵ－Ａｄ、ＬＵ－ＳＣＣ及びＰＡ　ＰＤＸ腫瘍株から単離されたＮＴＧ細胞と比べて、ＣＳＣにおいて向上したことを示している。ＬＵ１３４、ＰＡ２０及びＰＡ４を両方のアッセイで試験し、これらは、両プラットフォームにわたり、ＮＴＧ小集団よりもＣＳＣ小集団において、ＴＮＦＲＳＦ２１のｍＲＮＡ発現が一層高いことを示している。同様に、この実施例においてフローサイトメトリにより決定された通り、ＴＮＦＲＳＦ２１タンパク質発現もまた、ＰＡ　ＰＤＸ腫瘍のＣＳＣ小集団において向上していることが分かった。この点に関すると、図１０Ａの結果（ＰＡ２０、ＰＡ５５、ＰＡ６０及びＰＡ６６において向上）は、全トランスクリプトーム解析（ＰＡ２０、ＰＡ５５）及びｑＲＴ－ＰＣＲ（ＰＡ２０）により分かる通り、ＣＳＣにおいてｍＲＮＡ発現の向上と相関関係がある。

【０４８０】

大部分のＰＡ　ＰＤＸにおける機能的なＣＳＣ小集団は、＜１：１００細胞である一方、ＣＳＣ小集団を含む細胞集団の表現型細胞表面マーカーは、ＰＡ　ＰＤＸ腫瘍の１～９４％の範囲となる。ＴＮＦＲＳＦ２１は、バルク腫瘍のわずかな部分であるＣＳＣ小集団において向上することが多いので、正常組織と比較した全ＰＤＸ腫瘍の発現と比較すると、ＣＳＣ集団と正常組織との間の発現には、一層大きな発現の差異が存在する。これは、腫瘍におけるＣＳＣと正常組織との間の発現に、ＴＮＦＲＳＦ２１の一層大きな発現の差異をもたらし、このことは、ＣＳＣ小集団においてＴＮＦＲＳＦ２１の発現を伴う腫瘍の処置に、抗ＴＮＦＲＳＦ２１モジュレーターの有益な使用の方向性を示すものである。

【０４８１】

前の実施例に示されているＲＮＡデータに基づくと、膀胱（ＢＬ）のＰＤＸ腫瘍試料を実質的に上で示した通りに調製した。より詳細には、ＰＤＸ腫瘍単一細胞懸濁液を、抗マウスＣＤ４５及びＨ－２Ｋ^{d}抗体と共にインキュベートしてマウス細胞を特定し、抗ヒトＥＰＣＡＭ抗体と共にインキュベートしてヒト細胞を特定した。さらに、腫瘍細胞を抗ヒトＣＤ１１１　ＡＦ６４７及び抗ヒトＣＤ３２４　ＰｅｒＣＰ　Ｃｙ５．５ＣＳＣと共にインキュベートした。最後に、ＰＤＸ腫瘍細胞を抗ＴＮＦＲＳＦ２１　ＰＥをコンジュゲートしたＳＣ３９．１０７と共にインキュベートし、ＰＤＸ小集団におけるＴＮＦＲＳＦ

２１の細胞表面発現を決定した。単離した細胞を、一次抗体と共に又はアイソタイプが一致する対照抗体と共に３０分間、インキュベートし、ＰＢＳ／２％　ＦＣＳ中、２回洗浄した。この細胞を１ｍＬのＰＢＳ／２％ＦＣＳにより２回洗浄し、４’，６－ジアミジノ－２－フェニルインドール（ＤＡＰＩ）を含むＰＢＳ／２％　ＦＣＳ中で再懸濁して、生存細胞と死滅細胞とを区別した。次に、ＢＤ　ＦＡＣＳ　Ｃａｎｔｏ　ＩＩフローサイトメータを使用するフローサイトメトリにより、ＰＤＸ腫瘍細胞に結合した抗体を解析した。

【０４８２】

図１０Ｂは、ＢＬＣＡ　ＰＤＸが、生存ヒトＣＳＣ小集団にＴＮＦＲＳＦ２１タンパク質の発現を有した一方（黒色実線；ＢＬ３８）、ＮＴＧ細胞（破線）は、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体との場合ほど、有意な染色がないことを実証したことを示している。蛍光マイナスワン（ＦＭＯ）及びアイソタイプ対照抗体を使用して、染色特異性（灰色）を確認した。ＣＳＣ細胞及びＮＴＧ細胞の表面上で観察された抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体の染色差をまとめた表が図１０Ｂに示されており、発現は、それぞれの腫瘍細胞小集団に対する、表示されている抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体とアイソタイプ対照との間の幾何平均蛍光強度（ΔＭＦＩ）の変化として算出されている。

【０４８３】

このデータにより、腫瘍形成性細胞に対してＴＮＦＲＳＦ２１の発現が向上していること、及び本発明の抗体がこのような細胞に選択的に結合する能力があることがさらに確認される。

【０４８４】

［実施例１３］

抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体は、インビトロにおいて細胞毒性剤の送達を促進する

本発明の抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体が、生存腫瘍細胞への細胞毒性剤の送達を媒介するために内在化することができるかどうかを判定するため、選択した抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体及びサポリンに連結している二次抗マウス抗体ＦＡＢ断片を使用して、インビトロでの細胞殺傷アッセイを行った。サポリンは、リボソームを非活性化する植物毒であり、これによって、タンパク質合成が阻害され、細胞が死に至る。サポリンはリボソーム上で作用するので、サポリンは、細胞内部でしか毒性ではないが、サポリン自体は内在化することはできない。したがって、この実施例において証拠付けされたサポリン媒介性細胞毒性は、細胞表面の標的タンパク質に結合すると、開示される抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体が内在化する能力があることを示すものである。

【０４８５】

ｈＴＮＦＲＳＦ２１を過剰発現するＨＥＫ２９３Ｔ細胞の単一細胞懸濁液を、ＢＤ組織培養プレート（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）に、ウェルあたり５００個の細胞で蒔いた。１日後、マウス抗体を試験するため、２ｎＭに固定した濃度の抗マウスＩｇＧ　ＦＡＢ－サポリン構築物（Ａｄｖａｎｃｅｄ　Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）と、又はヒト化抗体を試験するため、２ｎＭの抗ヒトＩｇＧ　ＦＡＢ－サポリン構築物と一緒にした培養物に、様々な濃度の精製済み抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体を加えた。９６時間、インキュベートした後、製造業者の指示により、ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ（登録商標）（Ｐｒｏｍｅｇａ）を使用して、生存細胞を数えた。二次ＦＡＢ－サポリンコンジュゲートとのみインキュベートした細胞を含有する培養物を使用して、未処置の蛍光計数物を１００％参照値として設定し、全ての他の計数物を参照値の割合として算出した。

【０４８６】

１０ｐＭの濃度において、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体の大きなサブセットは、ＨＥＫ－２９３Ｔ細胞を過剰発現するｈＴＮＦＲＳＦ２１を効果的に殺傷した（図１１Ａ）一方、同じ濃度のマウスＩｇＧ１アイソタイプ対照抗体（ｍｕＩｇＧ１）は、殺傷しなかった。さらに、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体による、標的タンパク質を発現しない野生型ＨＥＫ－２９３Ｔ細胞の処理は、いかなる細胞死ももたらすことはなく、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体は、ＴＮＦＲＳＦ２１タンパク質に特異的に結合していることを示している（データ示さず）

。

【０４８７】

キメラ及びヒト化抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体を濃度依存的に使用して、上記の実験を繰り返した。この点において、図１１Ｂは、抗ＴＮＦＲＳＦ２１ヒト化抗体（ｈＳＣ３９．２、ｈＳＣ３９．４、ｈＳＣ３９．２８及びｈＳＣ３９．１２６）は、ＴＮＦＲＳＦ２１を過剰発現するＨＥＫ－２９３Ｔ細胞を効果的に殺傷することを示している。ヒト化抗体は、これに由来するキメラ抗体に対して同等の効力があることを示すことに留意すべきである。上記の結果は、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体（ヒト化抗体を含む）は内在化して、細胞傷害性ペイロードを送達する能力があることを実証しており、これにより、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体は、ＡＤＣの標的部分として効果的に使用され得ることを実証している。

【０４８８】

［実施例１４］

部位特異的ＴＮＦＲＳＦ２１抗体の生成

天然のヒト化ＩｇＧ１に加えて、不対システインをもたらすように変異されている天然の軽鎖（ＬＣ）定常領域及び重鎖（ＨＣ）定常領域を含む、抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体（ｈＳＣ３９．２、ｈＳＣ３９．４、ｈＳＣ３９．２８、及びｈＳＣ３９．１２６）を操作したヒトＩｇＧ１／カッパ抗ＴＮＦＲＳＦ２１部位特異的抗体も構築した。この点において、ＨＣの上部ヒンジ領域中のシステイン２２０（Ｃ２２０）を、セリン（Ｃ２２０Ｓ）により置換して、ｈＳＣ３９．４ｓｓ１及びｈＳＣ３９．１２６ｓｓ１を得た。組立て時に、ＨＣ及びＬＣは、治療剤にコンジュゲートするのに好適な、軽鎖定常領域のｃ末端に２つの遊離システインを含む抗体を形成する。記載しない限り、定常領域残基の全ての番号付けは、Ｋａｂａｔらに示されるＥＵ番号付けスキームに従っている。

【０４８９】

天然のヒト化ＩｇＧ１抗体及び部位特異的構築物を生成するため、ＨＣ定常領域（例えば、配列番号２）又はこのＣ２２０Ｓ変異（例えば、配列番号３）を含有する発現ベクターに、ＶＨ核酸をクローニングした。天然のｈＳＣ３９．４　ＨＣ（図７Ｆ、配列番号３０３）、ｈＳＣ３９．４の変異体Ｃ２２０Ｓ　ＨＣ（図７Ｆ、配列番号３１１）をコードする得られたベクターに、野生型ＩｇＧ１カッパＬＣ（配列番号５）と作動可能に結合する選択されたＶＬ（ｈＳＣ３９．４）をコードするベクターを、ＣＨＯ－Ｓ細胞中で同時トランスフェクトして、ｈＳＣ３９．４　ＬＣ（配列番号３０２）を得て、哺乳動物の一過性発現システムを使用して発現させた。Ｃ２２０Ｓ変異体ＨＣを含む、得られた抗ＴＮＦＲＳＦ２１部位特異的抗体は、ｈＳＣ３９．４ｓｓ１と呼ばれる一方、天然型はｈＳＣ３９．４と呼ばれる。この点に関すると、完全長ｈＳＣ３９．４部位特異的抗体の重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列が図７Ｆ（天然ヒト化抗体ｈＳＣ３９．４と共に）に示されており、ｈＳＣ３９．４ｓｓ１は、それぞれ、配列番号３０２及び３１１のＬＣ及びＨＣを含み、ｈＳＣ３９．４は、それぞれ、配列番号３０２及び３０３のＬＣ及びＨＣを含む。さらに、適切な配列を使用して、実質的に同じ工程を使用して表７に示されている、ｈＳＣ３９．１２６類似体を得た。一式の分子の両方に関して、重鎖の可変領域及び部位特異的変異の位置を、適宜、図７Ｆに下線を引いている。

【０４９０】

改変抗ＴＮＦＲＳＦ２１部位特異的抗体をＳＤＳ－ＰＡＧＥにより特徴付け、正確な変異体が生成されていることを確認した。ＳＤＳ－ＰＡＧＥは、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓからのプレキャスト１０％Ｔｒｉｓ－Ｇｌｙｃｉｎｅミニゲル上で、還元剤、例えば、ＤＴＴ（ジチオスレイトール）の存在及び不在下で実施した。電気泳動後、ゲルをクーマシーコロイド溶液で染色した（データ示さず）。還元条件下、遊離ＬＣ及び遊離ＨＣに対応する２つのバンドを観察した。このパターンは、還元条件のＩｇＧ分子に典型的である。非還元条件下、バンドパターンは、ＨＣとＬＣとの間のジスルフィド結合の不在を示す天然ＩｇＧ分子とは異なる。ＨＣ－ＨＣダイマーに対応する約９８ｋＤのバンドが観察された。さらに、遊離ＬＣに対応するかすかなバンドと、ＬＣ－ＬＣダイマーに対応する約４８ｋＤの顕著なバンドが観察された。若干量のＬＣ－ＬＣ種の形成は、各ＬＣ

上のＣ末端における遊離システインにより予測される。
【０４９１】
［実施例１５］
抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体薬物コンジュゲートの調製
抗ＴＮＦＲＳＦ２１　ＡＤＣは、さらなるインビトロ及びインビボ試験を行うために、本明細書による教示に従って調製した。
【０４９２】
この点において、実施例１０及び１４からの選択されたヒト化抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体（天然及び部位特異的）を、遊離スルフヒドリル基を有する末端マレイミド部分を介して、様々な細胞毒（オーリスタチン、ドラスタチン及びカリケアマイシン）にコンジュゲートし、例示的な抗体薬物コンジュゲート（ＡＤＣ）を作製した。
【０４９３】
天然の抗体、抗ＴＮＦＲＳＦ２１　ＡＤＣを、以下のように調製した。抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体のシステイン結合を、抗体１ｍｏｌあたりトリス（２－カルボキシエチル）－ホスフィン（ＴＣＥＰ）の所定のモル数の添加により、５ｍＭのＥＤＴＡを含むリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）中、室温で９０分間、部分的に還元した。次いで、得られた部分還元調製物を、室温において最低３０分間、マレイミドリンカーを介して選択したサイトトキシンにコンジュゲートした（サイトトキシンの構造は、本明細書の上記に提示されている）。次いで、水中で調製した１０ｍＭの原液を使用して、リンカー薬物と比較して過剰のＮ－アセチルシステイン（ＮＡＣ）を添加することにより、反応物をクエンチした。最低２０分間クエンチした後、０．５Ｍの酢酸の添加によりｐＨを６．０に調整した。ＡＤＣの調製は、３０ｋＤａ膜を使用するダイアフィルトレーションによりダイアフィルトレーションバッファーにバッファー交換した。次いで、ダイアフィルトレーションした抗ＴＮＦＲＳＦ２１　ＡＤＣを、ショ糖及びポリソルベート２０を用いて製剤化し、目的の最終濃度にした。得られた抗ＴＮＦＲＳＦ２１　ＡＤＣは、タンパク質濃度（ＵＶ測定により）、凝集（ＳＥＣ）、薬物対抗体比（ＤＡＲ）（逆相ＨＰＬＣ（ＲＰ－ＨＰＬＣ）により）及び活性（インビトロ細胞毒性）について分析した。
【０４９４】
部位特異的ヒト化抗ＴＮＦＲＳＦ２１　ＡＤＣ（例えば、ｈＳＣ３９．４ｓｓ１及びｈＳＣ３９．１２６ｓｓ１）を、改変された部分還元プロセスを使用してコンジュゲートした。所望の生成物は、各ＬＣ定常領域上の不対システイン（Ｃ２１４）に最大限にコンジュゲートし、２より大きい薬物ローディングを有するＡＤＣを最小化する一方で、２の薬物ローディングを有するＡＤＣを最大化する、ＡＤＣである。コンジュゲーションの特異性をさらに改善するため、安定化剤（例えば、Ｌ－アルギニン）及び穏やかな還元剤（例えば、グルタチオン）を含むプロセスを使用して抗体を選択的に還元し、この後、リンカー薬物を用いてコンジュゲーションを行い、次いで、ダイアフィルトレーション及び製剤化工程を行った。
【０４９５】
より具体的には、各抗体の調製は、所定濃度の還元済みグルタチオン（ＧＳＨ）を含む、ｐＨ８．０の１Ｍ　Ｌ－アルギニン／５ｍＭ　ＥＤＴＡを含有するバッファー中、室温で最低２時間、部分的に還元した。次いで、全ての調製物を、３０ｋＤａ膜（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ　Ａｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ）を用いて２０ｍＭのＴｒｉｓ／３．２ｍＭのＥＤＴＡ、ｐＨ７．０のバッファーへとバッファー交換し、還元バッファーを除去した。次いで、得られた部分的還元調製物を、室温において最低３０分間、マレイミドリンカーを介してＰＢＤ３にコンジュゲートした。次いで、水中で調製した１０ｍＭの原液を使用して、リンカー薬物と比較して過剰のＮＡＣを添加することにより、反応物をクエンチした。最低２０分間クエンチした後、０．５Ｍの酢酸の添加によりｐＨを６．０に調整した。ＡＤＣの調製物は、３０ｋＤａ膜を使用するダイアフィルトレーションによりダイアフィルトレーションバッファーにバッファー交換した。次いで、ダイアフィルトレーションした抗ＴＮＦＲＳＦ２１　ＡＤＣを、ショ糖及びポリソルベート２０を用いて製剤化し、目的

の最終濃度にした。

【０４９６】

得られた抗ＴＮＦＲＳＦ２１　ＡＤＣは、タンパク質濃度（ＵＶ測定により）、凝集（ＳＥＣ）、薬物対抗体比（ＤＡＲ）（逆相ＨＰＬＣ（ＲＰ－ＨＰＬＣ）により）及び活性（インビトロ細胞毒性）について分析した。次いでこれらは全て、凍結して、使用するまで保管した。

【０４９７】

［実施例１６］

ＴＮＦＲＳＦ２１抗体薬物コンジュゲートは、細胞毒性剤の送達をインビトロで促進する

細胞毒性剤を生存腫瘍細胞に送達するのを媒介するために、本発明の抗ＴＮＦＲＳＦ２１　ＡＤＣが内在化することができるかどうかを判定するため、抗ＴＮＦＲＳＦ２１　ＡＤＣ　ｈＳＣ３９．２　ＭＭＡＥ、ｈＳＣ３９．４　ＭＭＡＥ、ｈＳＣ３９．４ｓｓ１　ＭＭＡＥ、ｈＳＣ３９．２８　ＭＭＡＥ、ｈＳＣ３９．１２６　ＭＭＡＥ、ｈＳＣ３９．１３６　ＭＭＡＥ、ｈＳＣ３９．４　Ｄｏｌａ、ｈＳＣ３９．４ｓｓ１　Ｄｏｌａ及びｈＳＣ３９．４ｓｓ１　Ｃａｌｉｃｈｅ（４種の異なるカリケアマイシン薬物リンカー）を使用して、インビトロでの細胞殺傷アッセイを行い、各々が、上の実施例１５に実質的に記載されている通りに生成した。

【０４９８】

ヒトＴＮＦＲＳＦ２１を過剰発現するＨＥＫ２９３Ｔ細胞又はナイーブなＨＥＫ２９３Ｔ細胞の単一細胞懸濁液を、ＢＤ組織培養プレート（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）に、ウェルあたり５００個の細胞で蒔いた。１日後、様々な濃度の精製したＡＤＣ、又はＭＭＡＥ、ドラスタチン１０、Ｎ－アセチルカリケアマイシン又はアセチル化カリケアマイシンにコンジュゲートしたヒトＩｇＧ１対照抗体を上記の培養物に加えた。細胞を、３７Ｃ／５％　ＣＯ２において、９６時間、インキュベートした。インキュベート後、製造業者の指示により、ＣｅｌｌＴｉｔｅｒ－Ｇｌｏ（登録商標）（Ｐｒｏｍｅｇａ）を使用して生存細胞を数えた。未処置細胞を含有する培養物を使用して、未処理の蛍光計数物を１００％参照値として設定し、全ての他の計数物を参照値の割合として算出した。図１２Ａ～１２Ｄは、細胞が、ヒトＩｇＧ１対照抗体と比較して、抗ＴＮＦＲＳＦ２１　ＡＤＣに対してかなり感受性が高かったことを示している。部位特異的構築物対従来的にコンジュゲートしたＡＤＣに着目したにも関わらず、このことがあてはまり（図１２Ａ）、この場合、ＴＮＦＲＳＦ２１　ＭＭＡＥ　ＡＤＣの両方のタイプが、ＩｇＧ対照ＡＤＣよりもかなり毒性が高かった。同様に、図１２Ｂは、様々な例示的なＴＮＦＲＳＦ２１抗体が、本発明のＭＭＡＥ　ＡＤＣに取り込まれた場合、ＴＮＦＲＳＦ２１＋細胞の殺傷に有効であったことを示している。図１２Ｃは、開示されたＴＮＦＲＳＦ２１　ＡＤＣ（この場合、ドラスタチン細胞毒性剤を取り込んでいる）は、ＴＮＦＲＳＦ２１＋細胞をいかに効率よく、選択的に排除することができるかをさらに実証している。最後に、図１２Ｄは、本発明のさらなる他の実施形態（この場合、４種の異なるカリケアマイシンペイロード（ＡＤＣ９及びＡＤＣ１８のアセチル化並びに非アセチル化バリアント）を取り込んでいる）を使用して、ＴＮＦＲＳＦ２１により操作された細胞を効果的に排除することができることを例示している。さらに、各場合において、ＴＮＦＲＳＦ２１　ＡＤＣは、ＴＮＦＲＳＦ２１を過剰発現しなかったナイーブなＨＥＫ２９３Ｔ細胞にほとんど効果がなく、これにより、様々な適合細胞毒性剤を取り込ませているにもかかわらず、ＡＤＣは、選択的に標的細胞を殺傷することができる能力があることを繰り返し実証される。

【０４９９】

上述の結果は、抗ＴＮＦＲＳＦ２１　ＡＤＣは、内在化及びＴＮＦＲＳＦ２１を発現する細胞に選択した細胞傷害性ペイロード（カリケアマイシン、ＭＭＡＥ及びドラスタチン）の送達を特異的に媒介する能力があることを明確に実証している。

【０５００】

［実施例１７］

抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体薬物コンジュゲートは腫瘍成長をインビボで抑制する

例えば、上の実施例１５において記載されている通りに生成した抗ＴＮＦＲＳＦ２１ＡＤＣを、以下に実質的に記載されている通り、当該技術分野で認識されている技術を使用して試験し、免疫不全マウスにおけるヒト肺、膵臓及び膀胱の腫瘍成長を抑制する能力があることを実証する。

【０５０１】

当該技術分野で認識されている技術を使用して、ＴＮＦＲＳＦ２１を発現したＰＤＸ腫瘍株（ＬＵ２５３、ＬＵ２０６、ＬＵ１３９、ＰＡ２０、ＢＬ６５及びＢＬ３８）、及びＴＮＦＲＳＦ２１を発現しなかった対照腫瘍株を、雌のＮＯＤ／ＳＣＩＤマウスの脇腹の皮下において成長させた。腫瘍体積及びマウス重量を１週あたり１回又は２回監視した。腫瘍体積が１５０～２５０ｍｍ^{3}に到達すると、マウスを無作為に処置群に割り当てて、ドラスタチン１０、ＭＭＡＥ又はカリケアマイシンペイロードを含む、ｈＳＣ３９．４ｓｓ１及びｈＳＣ３９．１２６ｓｓ１　ＡＤＣの単回用量分を静脈内注射した（図１３Ａ～１３Ｉ）。処置後、腫瘍が８００ｍｍ^{3}を超える、又はマウスが健康を害するまで、腫瘍体積及びマウス重量を監視した。

【０５０２】

図１３Ａ～１３Ｉに示されている通り、開示したＴＮＦＲＳＦ２１　ＡＤＣは、ＴＮＦＲＳＦ２１発現を示す肺、膵臓又は膀胱腫瘍を有するマウスにおいて、腫瘍成長を実質的に阻害又は抑制する。この点において、マウスをヒト化部位特異的ＴＮＦＲＳＦ２１のドラスタチンＡＤＣにより処置すると、肺、膵臓及び膀胱腫瘍を有するマウスにおいて、６０～１００＋日間の程度で続く、腫瘍収縮をもたらした（図１３Ａ～１３Ｆ）。図１３Ｇ～１３Ｈにおいて分かる通り、ヒト化部位特異的ＴＮＦＲＳＦ２１　ＭＭＡＥ　ＡＤＣを使用すると、類似の結果が得られた。より詳細には、投与されたＡＤＣは、長期間、及びＬＵ２５３において、膵臓及び肺の腫瘍の成長を抑制し、用量依存性を示し、この場合、１０ｍｇ／ｋｇが３ｍｇ／ｋｇよりも有効な抑制となることを実証した。最後に、図１３Ｉにおいて分かる通り、この実施例（ｈＳＣ３９．４ｓｓ１）において使用した同一の抗体の１つを含むが、カリケアマイシンペイロードを取り込ませたＡＤＣは、８ｍｇ／ｋｇの程度の用量において、膵臓腫瘍を効果的に抑制することを示した。前の実施例と同様に、様々な細胞結合剤及び３種の多様な細胞傷害性ペイロード（様々な作用機序を有する）を含む、ＴＮＦＲＳＦ２１　ＡＤＣによる腫瘍成長を抑制する能力は、本開示による、本発明の幅広い適用性を実証するものである。

【０５０３】

図１３Ａ～１３Ｉに示されているデータを、図１２Ａ～１２Ｄに提示されているデータと一緒にしてまとめると、開示されたＴＮＦＲＳＦ２１　ＡＤＣは、肺、膀胱及び膵臓がんを含めた、様々な新生物状態を処置するために使用され得る、実現可能な臨床的候補であるという、強力な証拠をもたらす。

【０５０４】

［実施例１８］

抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体－薬物コンジュゲートによる腫瘍開始細胞頻度の低下

上の実施例１１及び１２に実証されている通り、ＴＮＦＲＳＦ２１発現は、腫瘍形成性に関連している。したがって、抗ＴＮＦＲＳＦ２１　ＡＤＣによる処理が、薬物耐性であること、並びに腫瘍再発及び転移を刺激することが知られている腫瘍開始細胞（ＴＩＣ）の頻度を低減することを実証するため、インビボでの、限界希釈アッセイ（ＬＤＡ）を、例えば、以下に実質的に記載されているように行う。

【０５０５】

免疫不全マウスにおいて、ＰＤＸ腫瘍（例えば、結腸直腸又は胃）を皮下で成長させる。腫瘍体積が、平均で１５０ｍｍ^3～２５０ｍｍ^{3}のサイズとなると、マウスを無作為に２つの群に分ける。群の１つは、ネガティブ対照として薬物にコンジュゲートしたヒトＩｇＧ１を腹腔内に注射し、もう一方の群は、抗ＴＮＦＲＳＦ２１　ＡＤＣ（例えば、上の実施例において調製した通り）を腹腔内注射する。投与して１週間後、各群からの２匹の

代表的なマウスを安楽死させて、これらの腫瘍を採取し、単一細胞懸濁液に分散させる。次に、各処置群からの腫瘍細胞を収穫してプールし、実施例１に既に記載した通り、分類する。これらの細胞を、ＦＩＴＣをコンジュゲートした抗マウスＨ２ｋＤ及び抗マウスＣＤ４５抗体により標識してマウス細胞を検出し、ＥｐＣＡＭにより標識してヒト細胞を検出し、ＤＡＰＩにより標識して死滅細胞を検出する。次に、得られた懸濁液をＢＤ　ＦＡＣＳ　Ｃａｎｔｏ　ＩＩフローサイトメータを使用してＦＡＣＳにより選別し、生存ヒト腫瘍細胞を単離して採集する。

【０５０６】

マウスの４つのコホートに、抗ＴＮＦＲＳＦ２１　ＡＤＣにより処理した腫瘍に由来する、１２５０、３７５、１１５又は３５の選別した生存ヒト細胞のいずれかを注射する。ネガティブ対照として、マウスの４つのコホートに、対照ＩｇＧ１　ＡＤＣにより処理した腫瘍に由来する、１０００、３００、１００又は３０の選別した生存ヒト細胞のいずれかを移植する。レシピエントマウスにおける腫瘍を毎週、測定し、腫瘍が１５００mm^3に到達する前に、個々のマウスを安楽死させる。レシピエントマウスは、ポジティブ又はネガティブ腫瘍成長を有するとして、点数化する。ポジティブ腫瘍成長は、１００mm^3を超過する腫瘍の成長として定義する。

【０５０７】

ポアソン分布統計学（Ｌ－Ｃａｌｃソフトウェア、Ｓｔｅｍｃｅｌｌ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）を使用して、各集団におけるＴＩＣの頻度を算出する。

【０５０８】

当業者はさらに、本発明が、本趣旨又は中心的な特性から逸脱することなく、他の特定の態様に具現化され得ることを理解している。本発明の上述の記載がこの例示的な実施形態しか開示していないという点において、他の変形が本発明の範囲内であることが企図されることが理解される。したがって、本発明は、本明細書において詳細に記載されている特定の実施形態に限定されない。むしろ、参照は、本発明の範囲及び内容の指標として添付の特許請求の範囲に対してなされるべきである。

【図１Ａ】

ヒトTNFRSF21アミノ酸配列

mgtspssstalascsriarratatmiagslllgflsttt**AQPEQKASNLIGTY**
RHVDRATGQVLTCDKCPAGTYVSEHCTNTSLRVCSSCPVGTFTRHENGIEKCHD
CSQPCPWPMIEKLPCAALTDRECTCPPGMFQSNATCAPHTVCPVGWGVRKKGTE
TEDVRCKQCARGTFSDVPSSVMKCKAYTDCLSQNLVVIKPGTKETDNVCGTLPS
FSSSTSPSPGTAIFPRPEHMETHEVPSSTYVPKGMNSTESNSSASVRPKVLSSI
QEGTVPDNTSSARGKEDVNKTLPNLQVVNHQQGPHHRHILKLLPSMEATGGEKS
STPIKGPKRGHPRQNLHKHFDINEHLPWMIVLFLLLVLVIVVCSIrkssrtlk
kgprqdpsaivekaglkksmtptqnrekwiyycnghgidilklvaaqvgsqwkd
iyqflcnaserevaafsngytadherayaalqhwtirgpeaslaqlisalrqhr
rndvvekirglmedttqletdklalpmspsplspspipspnaklensalltvep
spqdknkgfffvdesepllrcdstssgssalsrngsfitkekkdtvlrqvrldpc
dlqpifddmlhflnpeelrvieeipqaedkldrlfeiigvksqeasqtlldsvy
shlpdll 配列番号1

FIG. 1A

【図１Ｂ】

TNFRSF21タンパク質ドメインの模式図

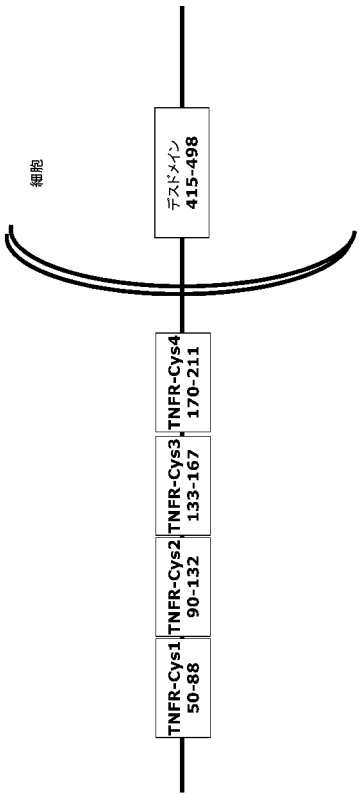


FIG. 1B

【図２】

illumina全トランスクリプトーム配列決定により決定したTNFRSF21 mRNA発現

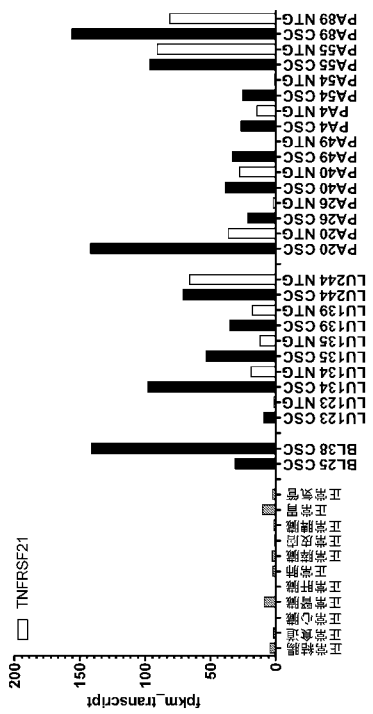


FIG. 2

【図３Ａ】

qRT－PCRを使用して決定したPDX腫瘍細胞におけるTNFRSF21 mRNA発現

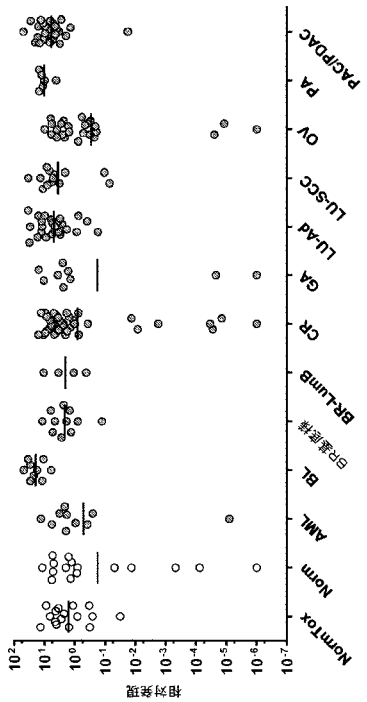


FIG. 3A

【図３Ｂ】

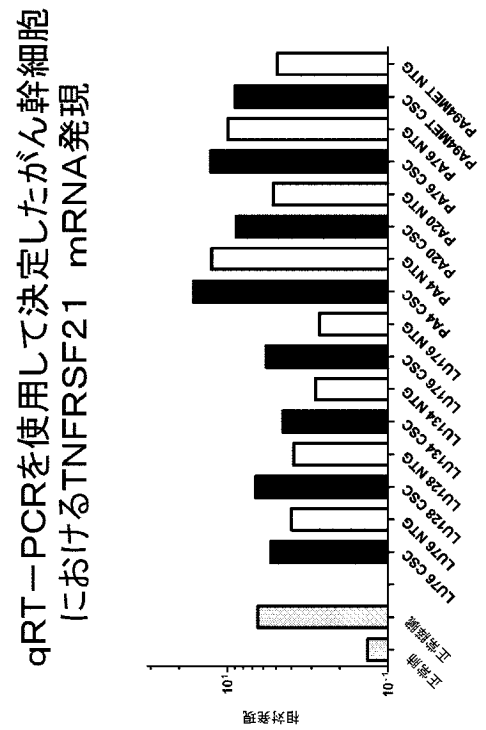


FIG. 3B

【図４】

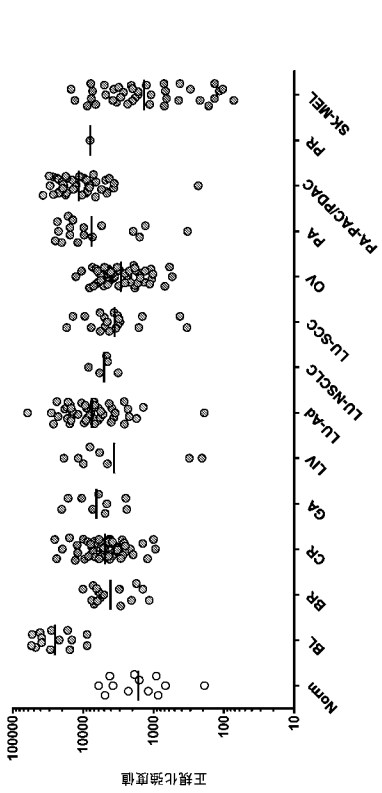


FIG. 4

【図５】

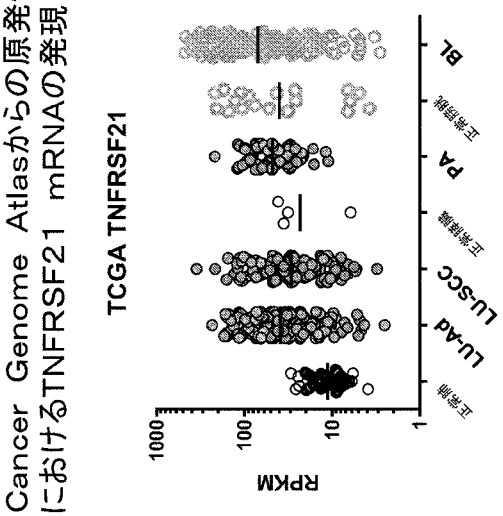


FIG. 5

【図６－１】

抗TNFRSF21抗体の特徴付け

抗体	アイソタイプ	ビン	ラット結合	抗体	アイソタイプ	ビン	ラット結合
SC39.1	IgG1	ND	-	SC39.29	IgG1	ND	-	SC39.57	IgG1	ND	-
SC39.2	IgG1	B	-	SC39.30	IgG1	ND	-	SC39.58	IgG1	ND	-
SC39.3	IgG1	ND	+	SC39.31	IgG1	ND	-	SC39.59	IgG1	ND	-
SC39.4	IgG1	A/D	+	SC39.32	IgG1	ND	-	SC39.60	IgG1	ND	-
SC39.5	IgG1	ND	-	SC39.33	IgG2b	ND	-	SC39.101	IgG1	C	-
SC39.6	IgG1	ND	-	SC39.34	IgG1	ND	-	SC39.102	IgG2b	B	-
SC39.7	IgG1	ND	-	SC39.35	IgG1	ND	-	SC39.103	IgG1	C	-
SC39.8	IgG1	ND	-	SC39.36	IgG1	ND	-	SC39.104	IgG2a	C	-
SC39.9	IgG1	ND	-	SC39.37	IgG1	ND	-	SC39.105	IgG2a	D	-
SC39.10	IgG1	ND	-	SC39.38	IgG1	ND	-	SC39.106	IgG1	X	-
SC39.11	IgG1	ND	-	SC39.39	IgG1	B	-	SC39.107	IgG1	X	-
SC39.12	IgG1	ND	-	SC39.40	IgG1	ND	-	SC39.108	ND	X	-
SC39.13	IgG1	ND	-	SC39.41	IgG1	ND	-	SC39.109	IgG2a	B	-
SC39.14	IgG1	ND	-	SC39.42	IgG1	ND	-	SC39.110	IgG2a	D	+
SC39.15	IgG1	ND	-	SC39.43	IgG1	ND	-	SC39.111	ND	B	-
SC39.16	IgG1	ND	-	SC39.44	IgG1	ND	-	SC39.112	IgG1	A	-
SC39.17	IgG1	ND	-	SC39.45	IgG1	ND	-	SC39.113	ND	C/D	-
SC39.18	IgG1	ND	-	SC39.46	IgG1	ND	-	SC39.114	IgG2a	B	-
SC39.19	IgG1	ND	-	SC39.47	IgG1	ND	-	SC39.115	IgG1	C/D	-
SC39.20	IgG1	ND	-	SC39.48	IgG1	ND	-	SC39.116	IgG1	X	-
SC39.21	IgG1	ND	-	SC39.49	IgG1	ND	-	SC39.117	IgG1	D	-
SC39.22	IgG1	ND	-	SC39.50	IgG1	ND	-	SC39.118	IgG2a	D	+
SC39.23	IgG1	ND	-	SC39.51	IgG1	ND	-	SC39.119	IgG2a	D	-
SC39.24	IgG2b	ND	-	SC39.52	IgG1	ND	-	SC39.120	ND	X	-
SC39.25	IgG1	ND	-	SC39.53	IgG1	ND	-	SC39.121	IgG2b	B	-
SC39.26	IgG1	ND	-	SC39.54	IgG1	ND	-	SC39.122	IgG1	A	-
SC39.27	IgG1	ND	-	SC39.55	IgG1	ND	-	SC39.123	IgG1	C	-
SC39.28	IgG1	D/C	-	SC39.56	IgG1	ND	-	SC39.124	IgG2b	B	-

FIG. 6

【図７Ａ－２】

抗TNFRSF21マウス抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列

名称	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	配列番号
SC39.26	DIQMTQSPASLSVSMGDTVTITC	RASENIYTNLA	WYQQKQGKSPRLLVY	GVTNLAD	GVPSRFSGSGSGTQVSLQINSLQSEDFGSYYC	QHFWGTPYT	FGGGTKLEIK	69
SC39.27	DIQMNQSPSSLSASLGDTITITC	HASQNINVWLS	WYQQKPGNIPKLLIY	KASNLHT	GVPSRFSGSGSGTGFTLTISSLQPEDIATYYC	QQGQSYPLT	FGGGTKLEIK	33
SC39.28	DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSC	KSSQSLLYSSNQKNYLA	WYQQKPGQSPKLLIY	WASTRKS	GVPDHFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYYC	QQYYSYPYT	FGGGTKLEIK	65
SC39.33	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISC	RTSQDISNYLN	WYQQRPDGTVNLLIY	YTSRLHS	GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFC	LQGDTLRT	FGGGTKLEIK	73
SC39.37	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTISC	SASSSVSYMY	WYQQKPGSSPKPWIY	RTSNLAS	GVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYC	QQYHSYQYT	FGGGTKLEIK	77
SC39.39	DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTC	RASQEISGFLS	WLQQKPDGTIKRLIY	AASTLDS	GVPKRFSGSRSGSDYSLTISSLESEDFADYYC	LQYASFPYT	FGGGTKVEIK	81
SC39.101	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISC	RSSQSIVHSNRYTYLE	WYLQKPGQSLKLLIY	GVSNRFS	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDMGVYYC	FQGTHVPYT	FGGGTKLEIK	85
SC39.102	DVVMTQTPLTLSVTIGQPASISC	KSSQSLLYTNGKTYLN	WLLLRPGQSPKRLIY	LVSKLDS	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC	LQNTHFPPT	FGGGTKLEIK	89
SC39.103	NIVMTQTPKFLPVTAEDRVTITC	KASQSVNNEVT	WYQQKPGQSPKLLIY	YASNRYT	GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQVEDLAVYFC	QQHNSSPLT	FGAGTKLELK	93
SC39.104	DVQITQSPSYLAASPGETITINC	RASKSINKYLA	WYQEKPGKTNKLLIY	FGSTLQS	GIPSRFSGSGSGTDFSLTISSLEPEDFAVYHC	QQHNEYPLT	FGAGTKLELK	97
SC39.105	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISC	RASQDISNYLH	WYQQKPDGTVKLLIY	FTSRLHS	GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEHEDIATYFC	QQGSTLPFT	FGSGTKLEIK	101
SC39.108	DVVMTQTPLTLSVTIGQPASISC	KSSQSLLDSDGKTYLN	WLLQRPGESPKLLIY	LVSKLDS	GVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC	LQTTHFPLT	FGAGTKLELK	105
SC39.109	DIQMTQSPASQSASLGESVTITC	LASQTIGTWLA	WYQQKPGKSPQLLIY	AATSLAD	GVPSRFSGSGSGTEFSFKISSLQAEDFVSYYC	QQLYSPPRT	FGGGTKLEIK	109

FIG. 7A（ 続き ）

【図７Ａ－３】

抗TNFRSF21マウス抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列

名称	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	配列番号
SC39.110	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISC	RASQDISNYLH	WYQQKPDGTVKLLIF	FTSRLHS	GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFC	QQGSTLPFT	FGSGTKLEIK	113
SC39.112	DILMTQSPSSMSVSLGDTVNITC	HASQGISSNIG	WLQQKPGKSFKGLIY	HATKLED	GVPSRFSGSGSGADHSLTISRLESEDFADYYC	VQYGQFPFT	FGSGTKLEIK	117
SC39.117	DIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSC	RASQSISNYLH	WYQQKSHESPRLLIK	YASQSIS	GIPSRFSGSGSGSDFTLSINSVEPEDVGVYYC	QNGHSFPVT	FGAGTKLELK	121
SC39.120	DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSC	KSSQSLLNSSNQKNYLA	WYQQKPGQSPKLLVY	FASTRES	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYC	QQHYSTPWT	FGGGTKLEIK	125
SC39.121	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISC	RSSQSLVHSNGNTYLH	WYLQKPGQSPKLLIY	KVSNRFS	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFC	SQSSHVPYT	FGGGTKLEIK	129
SC39.122	DILMTQSPSSMSVSLGDTVSITC	HASQGISSNIG	WLQQKPGKSFKGLIY	HGTKLED	GVPSRFSGSGSGADFSLTISSLESEDFADYYC	VQYAHFPFT	FGAGTKLELK	133
SC39.123	DVQITQSPSYLAASPGETITINC	RASKSISNYLA	WYQEKPGKTNKLLIY	SGSTLQS	GIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAMYYC	QQHHEYPLT	FGAGTKLELK	137
SC39.124	DVVMTQTPLTLSVTIGQPASISC	KSSQSLLYTNGKTYLN	WLLQRPGQSPKRLIY	LVSKLDS	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC	LQNTHFPPT	FGGGTKLEIK	141
SC39.125	DIQMTQSPASLSASVGETVTMTC	RASENIYSDLA	WYQQKQGKSPQLLVY	AATNLAD	GVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYYC	QHFYGTPFT	FGGGTKLEIK	145
SC39.127	DIVITQDELSNPVTSGESVSISC	RSSKSLLYKDGKTYLN	WFLQRPGQSPQLLVY	WMSTRAS	GVSDRFGGSGSGTDFALEISRVKAEDVGVYYC	QQVLEYPLT	FGVGTKLELK	149
SC39.129	DILMTQSPSSMSVSLGDTVSITC	HAGQGINSNIG	WLQQKPGKSFKGLIY	HGTTLED	GVPSRFSGSGSGADYSLTISSLESEDFADYYC	VQYAQFPFT	FGSGTKLEIK	153
SC39.144	DVQIIQSPSYLAASPGETITIYC	RASKSISNYLA	WYQEKPGKTNQLLIY	SGSTLQS	GIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAMYFC	QQHYEYPLT	FGVGTKLELK	157
SC39.149	QVVLTQSPALMSASPGEKVTMTC	SASSSVSYMY	WYQQKPGSSPKPWIY	RTSNLAS	GVPARFSGSGSGTSYSLTVSSVEAEDAATYYC	QQYNNYPPIT	FGTGTKLALK	161

FIG. 7A（ 続き ）

【図６－２】

抗TNFRSF21抗体の特徴付け

抗体	アイソタイプ	ビン	ラット結合
SC39.125	IgG1	C/D	+
SC39.126	IgG2a	A/D	+
SC39.127	IgG1	X	-
SC39.128	ND	C/D	-
SC39.129	IgG1	A	-
SC39.130	IgG2a	B	-
SC39.131	IgG1	A	-
SC39.132	IgG1	B	-
SC39.133	IgG1	C/D	-
SC39.134	ND	X	-
SC39.135	ND	X	-
SC39.136	IgG2a	D	+
SC39.137	IgG1	X	-
SC39.138	IgG2a	B	-
SC39.139	IgG2b	B	-
SC39.140	IgG1	B	-
SC39.141	ND	B	-
SC39.142	IgG2b	X	-
SC39.143	ND	X	-
SC39.144	IgG2b	X	-
SC39.145	IgG2a	X	+
SC39.146	IgG1	X	-
SC39.147	IgG2b	C/D	-
SC39.148	IgG2a	C/D	+
SC39.149	IgG1	X	-
SC39.150	IgG1	C/D	-
SC39.151	IgG2b	A/D	-
SC39.152	IgG2b	B	-
SC39.153	IgG2a	A/D	-
SC39.154	ND	A/D	-
SC39.155	IgG2a	B	+
SC39.156	IgG1	B/D	-
SC39.157	IgG2b	B	-
SC39.158	IgG1	B	+
SC39.159	ND	X	-
SC39.160	IgG1	A/D	-
SC39.161	IgG2a	A/D	+
SC39.162	IgG2a	A/D	-
SC39.163	IgG2b	B/D	-
SC39.164	IgG2a	A/D	+
SC39.165	IgG2b	A/D	-
SC39.166	ND	A/D	-
SC39.167	ND	B	-
SC39.168	IgG2a	A/D	+
SC39.169	IgG2b	B/D	-
SC39.170	IgG2b	C	-
SC39.171	IgG2a	A/D	+
SC39.172	IgG2b	D	-
SC39.173	ND	A/D	-
SC39.174	IgG2a	A/D	+
SC39.175	IgG1	X	-
SC39.176	IgG1	A/D	-
SC39.177	IgG1	B	-
SC39.178	IgG1	B/D	-
SC39.179	IgG1	B	-
SC39.180	ND	B	+
SC39.181	IgG1	C	-
SC39.182	IgG1	A/D	+
SC39.183	IgG2a	A/D	+
SC39.184	IgG1	B	-
SC39.185	IgG1	C	-
SC39.186	IgG1	A/D	-
SC39.187	IgG1	D	-
SC39.188	IgG1	B	-
SC39.189	IgG1	A/D	-
SC39.190	IgG1	C	-
SC39.191	IgG1	A/D	-
SC39.192	IgG1	A/D	-
SC39.193	IgG1	X	-
SC39.194	IgG1	B	-
SC39.195	IgG1	A/D	-
SC39.196	IgG2a	B	-

FIG. 6（ 続き ）

【図７Ａ－１】

抗TNFRSF21マウス抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列

名称	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	配列番号
SC39.1	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISC	RSSQSLVHSNGNTYLH	WYLQKPGQSPKLLIY	KVSNRFS	GVPDRFSGSGSGTDFTLKITRVEAEDLGVYFC	SQSTHVPYT	FGGGTKLEIK	21
SC39.2	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVNVTC	KASQNVGTSVA	WYQQKPGQSPKALLY	SASYRFS	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFC	QQYNSYPLT	FGAGTKLELK	25
SC39.3	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISC	RSSQSLVHSNGNTYLH	WYLQKPGQSPKLLIC	KVSNRFS	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFC	SQSTVVAYT	FGGGTKLEIK	29
SC39.4	DIQMNQSPSSLSASLGDTITITC	HASQNINVWLS	WYQQKPGNIPKLLIY	KASNLHT	GVPSRFSGSGSGTGFTLTISSLQPEDIATYYC	QQGQSYPLT	FGGGTKLEIK	33
SC39.5	DIQMNQSPSSLSASLGDTITITC	HASQNINVWLS	WYQQKPGNIPKLLIY	KASNLHT	GVPSRFSGSGSGTGFTLTISSLQPEDIATYYC	QQGQSYPLT	FGGGTELEIK	37
SC39.6	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISC	RSSQSLVHSNGNTYLH	WYLQKPGQSPKLLIY	KVSNRFS	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFC	SQSTYVACT	FGGGTKLEIK	41
SC39.7	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISC	RSSQSLVHSNGNTYLH	WYLQKPGQSPKLLIY	KVSNRFS	GVPDRFSGSGSGTDFTLNISRVEAEDLGVYFC	SQSTHVPYT	FGGGTKLEIK	45
SC39.8	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC	KASQTVNSNVA	WYQQKPGQSPKALIY	SASYRFS	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFC	QQYNSYPLT	FGTGTKLELK	49
SC39.11	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC	KASQNVDTNVA	WYQQKPGQSPKALIY	SASYRFS	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSDDLAEYFC	QQYNSYPLT	FGAGTKLELK	53
SC39.12	DIQMNQSPSSLSASLGDTITITC	HASQNINVWLS	WYQQKPGNIPKLLIY	KASNLHT	GVPSRFSGSGSGTGFTLTISSLQPEDIATYYC	QQGQSYPLT	FGGGTKLEIR	57
SC39.18	DIQMTQSPASLSVSVGETVTITC	RASNNIYNNLA	WYQQKQGKSPQLLVY	GVTNLAD	GVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDFGSYYC	QHFWGTPYT	FGGGTKLEIK	61
SC39.24	DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSC	KSSQSLLYSSNQKNYLA	WYQQKPGQSPKLLIY	WASTRKS	GVPDHFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYYC	QQYYSYPYT	FGGGTKLEIK	65

FIG. 7A

【図７Ａ－４】

抗TNFRSF21マウス抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列

名称	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	配列番号
SC39.151	DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTLSC	KSSQSLLYSSNQKNYLA	WYQQKPGQSPKLLIY	WASTRES	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYYC	QQYYSYPLT	FGAGTKLELK	165
SC39.152	DIQMTQSPSSLSASLGERISLTC	RASQDISNYLN	WFQQKPDGTFKRLIY	ATSSLDS	GVPKRFSGSRSGSDYSLTISSLESEDFADYYC	LQYASYPLT	FGAGTKLERK	169
SC39.153	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISC	RASQDIRNYLN	WYQQKPDGTVKLLIY	YTSRLHS	GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFC	QQGSTLPFT	FGSGTKLEIK	269
SC39.154	DIQMTQITSSLSVSLGDRVTISC	RASQDISNYLH	WYQLKPDGTVKLLIY	FTSRLHS	GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIASYFC	QQGSSLPFT	FGSGTKLEIK	173
SC39.156	SIVMTQTPKFLPVTAEDRVTITC	KASQSVSNEVV	WYQQKPGQSPKLLIY	YASNRYT	GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQVEDLAVYFC	QQHSSSPLT	FGAGTKLELK	177
SC39.157	DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSC	KSSQSLLNSSNHKTYLA	WYQQKPGQSPKLLVY	FTSTRES	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAADLAVYYC	QQHYSTPWT	FGGGTKLEIK	181
SC39.158	DVVLTQTPLSLPVNIGDQVTISC	KSTKSLLTSDGFTYLD	WYLQKPGQSPQLLIY	LVSNRFS	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGIYSC	FQSNSLPFT	FGSGTKLEIK	185
SC39.160	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSITC	KASQNVRTAVA	WYQQKPGQSPKALIS	LASNRHT	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAAYFC	LQHWNYPYT	FGGGTKLEIK	189
SC39.161	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISC	RASQDISNYLH	WYQLKPDGTVKLLIY	FTSRLHS	GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIASYFC	QQGSSLPFT	FGSGTKLEIK	271
SC39.162	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISC	RASQDISNYLH	WYQQKPDGTVKLLIY	YTSRLHS	GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDFATYFC	QQGSTLPFT	FGSGTKLEIK	193
SC39.163	SIVMTQTPKFLPIKAGDRVIITC	KASQSVSNEVV	WFQQKPGQSPKLLIY	YASNRYI	GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQVEDLAVYFC	QQHSSSPLT	FGAGTKLELK	197
SC39.169	SIVMTQTPKFLPVKAEDRVIITC	KASQSVSNEVV	WFQQKPGQSPKLLIY	YASNRYT	GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQVEDLAVYFC	QQHNSSPLT	FGAGTKLELK	201
SC39.170	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTC	KASQNVGTNVA	WYQQKPGQSPKALIY	SASYRFS	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFC	QQYNSYPFT	FGSGTKLEIK	205

FIG. 7A（ 続き ）

【図７Ａ－５】

抗TNFRSF21マウス抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列

名称	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	配列番号
SC39.172	DVQITQSPSYLAASPGETITIYC	RASKSISNYLA	WYQEKPGKTNQLLIY	SGSTLQS	GIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAMYYC	QQHYEYPLT	FGVGTKLELK	209
SC39.175	DIVITQDELSNPVTSGESVSISC	RSSKSLLYKDGKTYLN	WFLQRPGQSPQLLVY	WMSDRES	GVSDRFSGSGSGTDFTLEISRVKAEDVGVYYC	QQVLEYPLT	FGAGTKLELK	213
SC39.177	DVVLTQTPLSLPVSLGDQASISC	RSSQSIVHSNGNTYLY	WYLQKPGQSPKLLIY	RVSNRFS	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDMGVYYC	FQGTHVPHT	FGGGTKLEIK	217
SC39.180	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISC	RSSQSIVHSNRYTYLE	WYLQKPGQSLKLLIY	GVSNRFS	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDMGVYYC	FQGTHVPFT	FGGGTKLEIK	221
SC39.181	DILMTQSPSSMSVSLGDTVSITC	HASQGISSNIG	WLQQKPGKSFKGLIY	HATKLED	GVPLRFSGSGSGADHSLTISRLESEDFADYYC	VQYGQFPFT	FGSGTKLEIK	225
SC39.182	DIQMTQSPSSLSASLGERISLTC	RASQDISNYLI	WFQQKPDGTFKRLIY	ATSSLDS	GVPKRFSGSRSGSDYSLTISSLESEDFADYYC	LQYASYPWT	FGGGTKLEIK	229
SC39.186	ENVLTQSPAIMAASLGQKVTMTC	SASSSVSSSSLH	WYQQKSGASPKPLIH	GTSNLAS	GVPTRFSGSGSGTSYSLTITSVEAEDDATYYC	QQWSGYPYT	FGGGTKLEIK	233
SC39.188	SIVMTQTPKFLPVTAEDRVTITC	KASQSVSSEVA	WYQQKPGQSPKLLIY	YASNRYT	GVPDRFTGSGSGTDFTFTITSVQVEDLAVYFC	QQHYSSPYT	FGGGTKLEIK	237
SC39.189	DIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSC	RASQSISNSLH	WYQQKSHESPRLLIK	YASQSIS	GIPSRFSGSGSGSDFTLSINSVEPEDVGVYYC	QNGHSFPVT	FGAGTKLELK	241
SC39.192	QIVLSQSPAALSASPGEKVTMTC	RATSSVSYMH	WYQQRAGSSPKPWIY	ATSNLAS	GVPDRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYC	QQWSSNPWT	FGGGTKLEIK	245
SC39.196	DIQMTQSPASLSASVGETVTITC	RASENIYSYLA	WFQQKQGKSPQLLVY	NAKTLAE	GVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLQPEDFGSYYC	QHHYGTPLT	FGAGTKLELK	249
SC39.126	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISC	RASQDISNYLH	WYQQKPDGTVKLLIY	YTSRLHS	GVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFC	QQGRTLPFT	FGSGTKLEIK	253
SC39.136	DIQMTQSPSSLSASLGERISLTC	RASQDISNHLT	WFQQKPDGTFRRLIY	ATSTLDS	GVPKRFSGSRSGSDYSLTISRLESEDFADYYC	LQYASYPWT	FGGGTKLEIK	257
SC39.148	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTITC	RASQDISNSLN	WYQQKPDGTVKLLIY	YTSRLHS	GVPPRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIGTYFC	QQGFTLPWT	FGGGTKLEIK	261

FIG. 7A（ 続き ）

【図７Ｂ－１】

抗TNFRSF21マウス抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列

名称	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	配列番号
SC39.1	QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLS	TSDMGVD	WIRQPSGKGLEWLA	HIWWDDVKRYHPALKS	RLTISKDSSSSQVFLKIASVDTADTATYYCAR	GDGFAY	WGQGTLVTVSA	23
SC39.2	QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFT	SYWMN	WVKQRPGQGLEWIG	MIDPSDSETHVNQNFKD	KATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAN	YGSSWFAY	WGQGTLVTVSA	27
SC39.3	QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLT	SYGVS	WVRQPPGKGLEWLG	VIWGDGSTNYHSALIS	RLSISKDTSKSQVFLKLNSLQTDDTATYYCAK	PGRYAAMDF	WGQGTSVTVSS	31
SC39.4	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFS	NYGMS	WVRQTPDKRLELVA	IINSHGGSTYYPDSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMSSLKSEDTAMYYCVR	DLLWLRYYTMDY	WGQGTSVTVSS	35
SC39.5	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFS	NYGMS	WVRQTPDKRLELVA	IINSHGGSTYYPDSVMG	RFTISRDNANNTLHLQMSSLKSEDTAMYYCTR	DLLWLRYYTMDY	WGQGTSVAVSS	39
SC39.6	QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLT	SYGVS	WVRQPPGKGLEWLG	VIWGDGSTDYHSALIS	RLSISKDTSKSQVFLKLNSLQTDDTATYYCAK	PGRYAAMDF	WGQGTSVTVSS	43
SC39.7	QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLS	TSDMGVD	WIRQPSGKGLEWLA	HIWNDDVKHYNPALKS	RLTISKDTSSSQVFLKIASVDTADTATYYCAR	GDGFAY	WGQGTLVTVSA	47
SC39.8	QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFT	TYWMN	WVKERPGQGLEWIG	MIDPSDSETHYNQMFKD	RATLTVDKSSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAN	YGGSWFVY	WGQGTLVTVSA	51
SC39.11	QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKGSGYTFT	SYWMN	WVKQRPGQGLEWIG	MIDPSDSETHYNQMFKD	KATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAN	YGSSWFVY	WGQGTLVTVSA	55
SC39.12	EVRLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFS	NYGMS	WVRQTPDKRLELVA	IINSNGGSTYNPDSVKG	RFTISRDNAKNILYLQMSSLKSEDTAMYYCTR	DLLWLRYYVMDY	WGQGTSVTVSS	59
SC39.18	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFT	DYSMH	WVKQAPGKGLKWMG	WINTETGEPTYADDFKG	RIAFSLEVSATTAYLQINNLKNEDTATYFCAR	WLLPVY	WGQGTTLTVSS	63
SC39.24	EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCVVSGFTFS	AYAMS	WVRQTPEKRLEWVT	SISSGGSFVYLDSVKG	RFTISRDNARNILYLQMSSLRSEDTAMYYCAR	GDYGSSYGAMDY	WGQGTSVTVSS	67

FIG. 7B

【図７Ｂ－２】

抗TNFRSF21マウス抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列

名称	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	配列番号
SC39.26	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFT	DYSMH	WVKQAPGKGLKWMG	WINTETGEPTYADDFKG	RFAFSLETSASTAYLQINNLKNEDTATYFCAR	WLLPVY	WGQGTALTVSS	71
SC39.27	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFS	SYGMS	WVRQTPDTRLELVA	TINSAGGSTYYPDSVKG	RFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCAR	NLLWLRYYVMDY	WGQGTSVTVSS	265
SC39.28	EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFS	AYAMS	WVRQTPEKRLEWVA	SISSGGSIYYLDSVKG	RFTISRDNARNILYLQMSSLRSEDTAMYYCAR	GDYGSSYGAMDY	WGQGTSVTVSS	267
SC39.33	QVQLQQPGPELVKPGASVKLSCKASGYTFT	NYYIY	WVKQRPGQGLEWIG	GINPSNGSPNFNEKFRS	KATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAIYYCTR	LGYYYAMDY	WGQGTSVTVSS	75
SC39.37	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFT	EYTMH	WVKQSHGKSLEWIG	GINPNNIVTSYNQKFEG	KATLTVDKSSNTAYMELRSLTSADSAVYYCAR	YWDVLGFDV	WGQGTSLTVSS	79
SC39.39	EVQMQQSGAELVRSGASVKLSCTASDFNIK	DYYMH	WVKQRPEQGLEWIG	WIDPENGDTEYAPKFQG	KATMTADTSSNTAYLHLSSLTSEDTAVYFCNT	GGPDY	WGQGTTLTVSS	83
SC39.101	EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFT	GYTMN	WVKQSHGKNLEWIG	LINPYNGATNYNQKFKG	KATLTVDKSSSTACMELLSLTSEDSAVYYCTR	IRDFYYYGMDY	WGQGTSVTVSS	87
SC39.102	QVQLQQPGTELVKPGASVKLSCKASGYTFT	NYWMH	WVMQRPGQGLEWIG	NINPSDGGSNYNEKFEN	KATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTI	YNGSGPFAF	WGQGTLVTVSA	91
SC39.103	QMQLQQSGPQVVRPGASVKISCKTSGYSFT	SYWMH	WVKQRPGQGLEWIG	MIDPSDSETRLNQKFKD	KATLTEDKSSTTAYMQLTSPTSEDSAVYYCVR	RGLGRVFDV	WGAGTTVTVSS	95
SC39.104	QVQLMESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLT	NYGVD	WVRQPPGKGLEWLG	VIWGGGSTNYNSALMS	RLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAMYYCAK	RYDYQGWFAY	WGQGTLVTVSA	99
SC39.105	QVQLQQSGPELVRPGASVKISCKAPGYTFT	SHWMQ	WVRQRPGQGLEWIG	EIFPGSGSTYYNEKFKG	KATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAR	DYRYGDAYYAMDY	WGQGTSVTVSS	103
SC39.108	PVLVKPGPSVKISCKASGFTFT	DYYMH	WVKQSHGQSLEWIG	LVVPYNGEFSYSQKFKG	KATLTVDTSSSTAYMELNSLTSEDSAVYYCAR	GPVYSNYHYAMDY	WGQGTSVTVSS	107
SC39.109	QVQLQQPGSVLVRPGASVKLSCKASGYTFT	RYWMY	WVKQRPGQGLEWIG	EIHPNSGITNYNEKFKG	KATLTVDTSSSTAYVDLSSLTSEDSAVYYCAS	GGYLAY	WGQGTLVTVSA	111

FIG. 7B（ 続き ）

【図７Ｂ－５】

抗TNFRSF21マウス抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列

名称	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	配列番号
SC39.172	QVQLKASGPGLVAPSQSLSITCTVSGFPLT	SYGVD	WVRQPPGKALEWLG	VIWGGGSTNYNSALMS	RLNISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAMYYCAK	RGGYYGWFAY	WGQGTLVTVSA	211
SC39.175	EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIK	DDYMH	WVKQRPEQGLEWIG	RIHPANGNTKYAPKFQD	RATITADTSSNTAVLQLSSLTSEDTAVYYCAR	SAMDY	WGQGTSVTVSS	215
SC39.177	QVSLRESGPGILQSSQTLSLTCSFSGFSLS	TSGMGVS	WIRQPSGKGLEWLA	LIYWDDDKRYNPSLKS	RLTISKDTSRNQVFLKITSVDTADTATYYCAR	TYSHWFAY	WGQGTLVTVSA	219
SC39.180	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFT	NYGMN	WVKQAPGKGLKWMG	WINTNTGEPTYADDFKG	RFAFSLETSARTAYLQISNLKNEDMATYFCAR	EGDDNYLAWLAY	WGQGTLVTVSA	223
SC39.181	QVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFT	NYYIY	WVKQRPGQGLEWIG	EIYPSNGDTNFNEKFKT	KATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTR	GILY	WGQGTLVTVSA	227
SC39.182	QVQLKESGPVLVAPSQSLSITCTVSGFSLT	SYDIH	WVRQPPGKGLEWLG	VIWAGGDTNYSSALMS	RLSISKDNSKNQVFLKMNSLQTDDTAMYYCAI	LSLTRIVV	WGQGTLVTVSA	231
SC39.186	EVQFQQSGTVLARPGASVKMSCKASGYSFT	SYWMH	WIKQRPGQGLEWIG	AIYAGNSDTGYNQKFEG	KAKLTAVTSATTAYMELSSLTNEDSAVYYCTR	DYYYGGFDY	WGQGTTLTVSS	235
SC39.188	QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCKASGNAFT	KYLIE	WVKQRPGQGLEWIG	LINPGNGGTNYNEKFKG	KATLTADKSSSTAYIQLSSLTSDDSAIYFCAR	RGLGPWFAY	WGQGTLVTVSA	239
SC39.189	QVQLQQSGPELVKPGALVMISCKASGYTFT	SYDIN	WVKQRPGQGLEWIG	WIYPGDGSTKYNEKFKG	KATLTADKSSSTAYMHLSSLTSENSAVYFCTS	NYFAH	WGQGTLVTVSA	243
SC39.192	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFT	DYYMT	WVRQPPGKALEWLG	FIKNKPHGYTTEYSASVKG	RFTISRDNSQSILYLQMNTLRAEDSATYYCAR	VPNVYYVMDQ	WGQGTSVTVSS	247
SC39.196	DVQLQESGPGLVKPSQSLSVTCTVTDYSIT	SGYYWN	WIRQFPRNKLEWMG	YIHNSGSTNYNPSLKS	RISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCAW	GDYLAWFAY	WGQGTLVTVSA	251
SC39.126	QVQLQQSGPELVRPGASVKISCKAPGYTFT	SHWMQ	WVRQRPGQGLEWIG	EIFPGSGSTYYNERFKG	KATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAR	DYRYGDAYYAMDY	WGQGTSVTVSS	255
SC39.136	QVQLKESGPVLVAPSQSLSITCTVSGFSLT	SYDVH	WVRQPPGKGLEWLG	VIWAGGSTNCNSALMS	RLSISKDNSKSQVFLKMSSLQTDDTAMYYCAI	LSLSRIVV	WGQGTLVSVSA	259
SC39.148	QVQLQQPGAELVKPGASVKVSCKASGYTFT	SYWMH	WVRQRPGQGLEWIG	RIHPSDTNTNYNQKFKG	KATLTVDKSSSTAYMHLSSLTSEDSAVYYCAI	DYLFAY	WGQGTLVTVSA	263

FIG. 7B（ 続き ）

【図７Ｂ－３】

抗TNFRSF21マウス抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列

名称	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	配列番号
SC39.110	QVQLQQSGPELVRPGASVKISCKAPGYTFT	SHWMQ	WVRQRPGQGLEWIG	EIFPGSGSTYYNEKFKD	KATLTVDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAR	DYRYGDAYYAMDY	WGQGTSVTVSS	115
SC39.112	QVQLQQSGAGLVKPGASVKLSCKASGYTFT	NYVIY	WVKQRPGQGLEWIG	EIYPSNGDTNFNEKFKT	KATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTR	GILY	WGQGTLVTVSA	119
SC39.117	QVQLQQSGPELVKPGALVMISCKASGYTFT	SYDIN	WVKQRPGQGLEWIG	WIYPGDGSTKYNEKFKG	KATLTADKSSSTAYMHLSSLTSENSAVYFCTS	NYFAY	WGQGTLVTVSA	123
SC39.120	DVKLVESGEGLVKPGGSLKLSCAASGFTFS	TYAMS	WVRQTPEKRLEWVA	YISSGGDYIYYADTVKG	RFTISRDNAMNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCTR	EGAYYYALDY	WGQGTSVTVSS	127
SC39.121	QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLS	TSDMGVG	WIRQPAGKGLEWLA	DIWWDDVKRYNPALKS	RLTISKDTSSSQVFLKIASVDTADTATYYCAR	GDGFAY	WGQGTLVTVSA	131
SC39.122	QIQLQQSGPELVRPGTSVKISCKASGYTFT	GYVIN	WMKQRPGQGLEWIG	WIYPGDGNTKYNEKFKG	MATLTIDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAIYFCAR	GILR	LGQGTLVTVSA	135
SC39.123	QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLT	SYGVD	WVRQPPGKGLEWLG	VIWGGGSTIYNSALMS	RLSISKDNSKSQVFLQVNSLQTDDTAMYYCAK	RGGYNGWFAY	WGQGTLITVSA	139
SC39.124	QVQLQQSGTELVKPGASVKLSCKASGYTLT	SYWMH	WVKQRPGQGLEWIG	NINPNNGDTNYNEKFKR	KATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAI	YNGSGPFAY	WGQGTLVTVSS	143
SC39.125	EVRLQQSGPELVRPGASVKISCETSGYTFT	ECNMH	WVRQSHGKSLEWIG	GINPNNGVTSYNQKFKG	KATLTLDKSSSTACMELRSLTSEDSAVYYCAR	RGLYKFDKNFDY	WGQGTTLTVSS	147
SC39.127	EVQLQQSGAEFVRPGASVKLSCTASGFNIK	DDYMH	WVKQRPEQGLEWIG	RIDLANGNVKYAPKFQD	KATITADTSSNTAFLQLSSLTSEDTAVYYCLR	SAMDY	WGQGTSVTVSS	151
SC39.129	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFT	DYYLN	WVKQSHGKSLEWIG	DIYPNNGESSYNQKFKA	KATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCAR	GISAAY	WGQGTLVTVSA	155
SC39.144	QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFPLT	SYGVD	WVRQPPGKGLEWLG	VIWGGGSTTYNSALMS	RLNISKDNSKSQVFLKLNSLQTDDTAMYYCAK	RGGYNGWFAY	WGQGTLVTVSA	159
SC39.149	EVQLQQSGPILVKPGPSVKISCEASGFTFT	DYFIH	WVKQSHGKSLEWIG	LVYPYNGGTRYNQKFKD	KATLTIDTSSSTAYMELNSLTSEDSAVYYCAR	EISYWYFDV	WGAGTTVTVSS	163

FIG. 7B（ 続き ）

【図７Ｃ－１】

抗TNFRSF21マウス抗体の可変領域のヌクレオチド配列

名称	鎖	核酸配列	配列番号
SC39.1	軽鎖	GATGT^G^GATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCT^G^ACACAGTAATGGAAACACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAG^GGA^CAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCACCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAGTACGCATGTTCCGTACACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA	20
SC39.1	重鎖	CAGGT^ACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGGATATTGCAGCCCTCCCAGACCCTCAGTCTGACTTGTTCTTTCTCTGGGTT^TCACTGAGCACTTCTGATATGGGTGTAGACTGGATTCGTCAGCCATCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGCTGGCACACATTTGGTGGGATGATGTCAAGCGCTATCACCCAGCCCTGAAGAGCCGAC^GAC^A^C^CCAAGGATTCCTCCAGCAGCCAGGTATTCCTCAAGATCGCCAG^GTGGACACTGCAGATACTGCCACATACTACTGTGCAAGGGGGACGGCTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGG^CAC^GTCTCTGCA	22
SC39.2	軽鎖	GACAT^G^GATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAACGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTAGGTACTAGTGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCAATC^CCTAAAGCACTGCTTTACTCGGCATCCTACCGGTTCAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGA^TT^CACTCTCACCATCAGCAATGTGCAGTCTGAAGACTTGGCAGAC^A^TTCTGTCAGCAATATAACAGCTATCCGCTCACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA	24
SC39.2	重鎖	CAGGTCCAACTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACC^TCACCAGCTACTGGATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAATGGATTGGTATGATTGATCCTTCAGACAGTGAAACTCACTACAATCAAATGTTCAAGGACAAGGCCACA^TGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGTAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAACTACGGTAGTAGCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGAC^C^GGTCACTGTCTCTGCA	26
SC39.3	軽鎖	GATGT^G^GATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCT^G^ACACAGTAATGGAAACACCTATTTACATTGGTACTTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTGCAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAG^GGA^CAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTTTGCTCTCAAAGTACATATGTTGCGTACACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA	28
SC39.3	重鎖	CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCATCACATGCACTGTCTCAGGGTTCTCA^TAACCAGCTATGGTGTAAGCTGGGTTCGCCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGGTGACGGGAGCACAAATTATCATTCAGCTCTCATATCCAGACTGAGCA^CAGCAAGGATACGTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAACTGAACAGTC^GCAAACTGATGACACAGCCACGTACTACTGTGCCAAACCGGGGAGGTACGCCGCTATGGACTTTTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA	30
SC39.4	軽鎖	GACATCCAGATGAACCAGTCTCCATCCAGTCTGTCTGCATCCCTTGGAGAACACAATTACCATCACTTGCCATGCCAGTCAGAACAT^AATGTTTGGTTAAGCTGGTACCAGCAGAAACCAGGAAATAT^CCTAAACTATTGATCTATAAGGCTTCCAATTTGCACACAGGCGTCCCATCAAGGTTTAGTGGCAGTGGATCTGGAACAGG^TT^CACATTAACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGACATTGCCACT^ACTACTGTCAACAGGGTCAAAGTTATCCTCTGACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA	32
SC39.4	重鎖	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACT^TCAGTAACTATGGCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCTGACAAGAGGCTGGAGTTGGTCGCAATAATTAATAGTCATGGCGGTAGCACCTATTATCCAGACAGTGTGAAGGGCCGA^TCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACTCCCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAAGTCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGTAAGAGATCTACTATGGTTACGTTACTATACTATGGACTAC^GGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA	34

FIG. 7C

【図７Ｃ－４】

抗TNFRSF21マウス抗体の可変領域のヌクレオチド配列

名称	鎖	核酸配列	配列番号
SC39.26	軽鎖	GACATCCAGATGACTCAGTC^CCAGCCTCCCTATCTGTTTCTATGGGAGACACTGTCACCATCACATGTCGAGCAAGTGAGAATA^^TTACACTAAT^^TAGCATGGTA^CAGCAGAAACAGGGAAA ATCTCCCTCGGCTCCTGGTCTATGGTGTAACAAACTTAGCAGA^GGTG^GCCATCAAGG^^TCAGTGGCAG^GGATCAGGCACACAG^ATTCCCTCCAGATCAACAGCC^GCAGTCTGAAGATTTTG GGAGTTATTACTGTCAACAT^^TTTGGGGTACTCCATCACACGT^^CGGAGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA	68
SC39.26	重鎖	CAGATCCAG^TGGTGCAGTC^GGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGA^CTCCTGCAAGGCTTCTGGTTATACCT^^CACAGACTAT^^CAATGCACTGGGTGAAGCAGGCTCCAGG AAAGGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGATAAACACTGAGACTGG^GAGCCAACATATGCAGATGAC^^TTCAAGGGACGGTTTGCCTTC^CTTTGGAAACCT^CTGCCAGCACTGCCTATTTGCAGATCA ACAACCTCAAAAATGAGGACACGGC^ACATATTTCTGTGCTAGATGG^^TACTACCGGTCTACTGGGGCACAAGGCACCGCTCTCACAGTCTCCTCA	70
SC39.27	軽鎖	GACATCCAGATGAACCAGTC^CCATCCAGTCTGTCTGCATCCCTTGGAGACACAATTACCATCACTTGCCATGCCAGTCAGAACA^^TAATGTTTGG^TAAGCTGGTACCAGCAGAAACCAGGAAA TATTCCTAAACTATTGATCTATAAGGCTTCCAATTTGCACACAGGCG^CCCATCAAGG^^TTAGTGGCAG^GGATCTGGAACAGGT^^TCACATTAACCATCAGCAGCC^GCAGCCTGAAGACATTG CCAACTTACTACTGTCAACAGGGTCAAAGTTATCCTCTGACGT^^CGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA	32
SC39.27	重鎖	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTC^GGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAAAC^CTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTT^^CAGTAGCTATGGCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCAGA CACGAGAACTGGAATTGGTCGCAACCATTAATAGTGCTGGTGG^AGCACCTATTATCCAGACAGTGTGAAGGGCCGATTCACCATC^CCAGAGACAA^GCCAAGAACACCCTGTACCTGCAAATGA GCAGTCTGAAGTCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGAAATCTACTATGGTTACGTTACTATG^TATGGACTACTGGGG^CAAGGAACCTCAGTCACCGTC^CCTCA	264
SC39.28	軽鎖	GACATTGTGATGTCACAGTC^CCATCCTCCCTAGCTGTGTCAGTTGGAGAGAAGGTTACTATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGCC^TTTATATAGTAGCAATCAAAAGAACTACTTGGCCTGGTA CCAGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCTAAACTGCTGATTTACTGGGCATCCACTAGGAAA^CTGGGGTCC^GATCACTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTG TGAAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTA^TACTGTCAGCAATATTATAGC^ATCCTTACACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA	64
SC39.28	重鎖	GAAGTGAAGCTGGTGGAGTC^GGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAAC^CTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTT^CAGTGCCTATGCCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCAGA GAAGAGGCTGGAGTGGGTCGCATCCATTAGTAGTGGTGGTAG^ATTTATTATCTAGACAGTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGATAATGCCAGGAACATCC^GTACCTGCAAATGAGCA GTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAGAGGCGAC^ACGGTAGTAGCTACGGTGCTA^GGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAG^CACCGTCTCC^CA	266
SC39.33	軽鎖	GATATCCAGATGACACAGAC^ACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAGGACAAGTCAGCAGACA^TAGTAATTAT^^TAAACTGGTA^CAGCAGAGACCAGATGG AACTGTTAACCTCCTGATCTACTACACATCAAGATTACACTCAGGAG^CCCATCAAGG^TCAGTGGCAG^GGGTCTGGAACAGAT^ATTCTCTCACCATTAGCAACC^GGAGCAAGAAGATATTG CCACGTACT^^TTGCCTACAGGGTGA^ACGCTTCGGACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA	72
SC39.33	重鎖	CAGGTCCAA^TGCAGCAGCC^GGGGCTGAACTGGTGAAGCCTGGGGC^TCAGTGAAGT^GTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCT^CACCAACTAC^ATATATACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGG ACAAGGCCT^GAGTGGATTGGGGGATTAATCCTAGCAATGG^AGTCCTAACTTCAATGAGAAGTTCAGGAGCAAGGCACACTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTATATGCAACTCA GCAGCCTGACATCTGAGGAC^CTGCGATCTATTACTGTACAAGACTGGGTTATTACTA^GCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCG^CTCCTCA	74

FIG. 7C（ 続き ）

【図７Ｃ－２】

抗TNFRSF21マウス抗体の可変領域のヌクレオチド配列

名称	鎖	核酸配列	配列番号
SC39.5	軽鎖	GACATCCAGATGAACCAGTCTCCATCCAGTCTGTCTGCATCCCTTGGAGACACAATTACCATCACTTGCCATGCCAGTCAGAACATTAATGTTTGGTTAAGCTGGTACCAGCAGAAACCAGGAAA TAT^CCTAAACTATTGA^CTATAAGGCTTCCAACTTACACACAGGCGTCCCATCAAGG^^TTAG^GGCAGTGGATCTGGGACAGGTTTCACATTAACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGACA^TG CCACTTACTACTGTCAACAGGGTCAAAGTTATCCTCTGACGTTCGGTGGAGGCACCGAGCTGGAAATCAAA	36
SC39.5	重鎖	GAGGTGCAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAAAC^CTCC^GTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAACTATGGCATGTC^TGGGTTCGCCAGACTCCAGA CAAGAGGCTGGAGTTGG^CGCAATCA^^TAATAGTCATGGTGGTAGTACC^ATTATCCAGACAG^GTGATGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAATAACACCCTGCACCTGCAAA^GA GCAGTCTGAAGTCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTACAAGAGATCTACTATGGTTACGTTACTA^ACTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTC^CCTCA	38
SC39.6	軽鎖	GATGTTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATC^CTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTGTACACAGTAATGGAAACACC^ATTTACATTGGTACTT GCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGC^CCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGA^TTCACACTCAAGA^CAGCAGAG^GG AGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTT^GCTCTCAAAGTACATATGTTGCGTGCACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAA^AAAA	40
SC39.6	重鎖	CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACC^GGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCA^CACA^GCACTGTCTCAGGGTTC^CATTAACCAGCTATGGTGTAAGCTGGGTTCGCCAGCCTCCAGG AAAGGGTCTGGAGTGGC^GGGCGTAA^ATGGGGTGACGGGAGCACAGAT^ATCATTCAGCTCTCATA^CCAGACTGAGCATCAGCAAGGA^ACGTCCAAGAGCCAAGT^^TTCT^AAAACTGAACA GTC^GCAAACTGATGACACAGCCACG^ACTACTGTGCCAAACCGGGGAGGTACGCCGC^ATGGACTT^TGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA	42
SC39.7	軽鎖	GATGTTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATC^CTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTGTACACAGTAATGGAAACACC^ATTTACATTGGTACCT GCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGC^CCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGA^TTCACACTCAATA^CAGCAGAG^GG AGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTT^GCTCTCAAAGTACATATGTTGCGTGCACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAA^AAAA	44
SC39.7	重鎖	CAGGTTACTCTGAAAGAGTCTGGCCC^GGGATATTGCAGCCCTCCCAGACCCTCAGTC^GACT^GTTCTTTCTCTGGGTTT^CACTGAGCACTTCTGATATGGG^GTAGACTGGATTCGTCAGCC ATCAGGGAAGGGTCTGGAATGGCTGGCACACATTTGGTGGGATGATGTCAAGCACTATAACCCAGCCCTGAAGAGCCGACTGACTATCTCCAAGGATACCTCCAGCAGCCAGG^ATTCCTCAAGA TCGCCAGTGTGGACACTGCAGATACTGCCACATACTACTG^GCAAGGGGGGCAGCTGCTT^GCTTACTGGGGCCAAGGGACTC^GGTCACTG^CTCTGCA	46
SC39.8	軽鎖	GACATTGTGATGACCCAGTCTCAMMMATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGACTGTGAAT^CTAATGATAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCA ATC^CCTAAGCACTGA^TTACTCGGCATCCTACCGGTTCAGTGGAGTCCCTGATCGC^TCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCAC^CTCACCATCAGCAATGTGCAGTCTGAAGACT^GG CAGAGTATTTCTGTCAGCAATATAACAGCTATCCGCTCACGTTCGGTAC^GGGACCAAGCTGGAGCTGAAA	48
SC39.8	重鎖	CAGGTCCAACTGCAGCAGCCTGGGGC^GAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGC^GTCC^GCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCACCTACTGGATGAAACTGGGTGAAGGAGAGGCC^GG ACAAGGCCTTGAATGGA^TGGTATGA^TGATCCTTCAGACAGTGAAACAT^CACTACAATCAAATGTT^CAAGGACAGGGCCACATTGACTGTAGACAAATCCTCCACCACAGCCTACATGCAGC^CA GCAGCCTGACATCTGAGGAC^CTGCGGTCTATTACTGTGCAAACTACGG^GGTAGCTGGTTTG^TTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA	50

FIG. 7C（ 続き ）

【図７Ｃ－５】

抗TNFRSF21マウス抗体の可変領域のヌクレオチド配列

名称	鎖	核酸配列	配列番号
SC39.37	軽鎖	CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATATCCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGTACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCTC CCCAAACCCTGGATTTATGCACA^CCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCA CTTATTACTGCCAGCAGTATCATAG^TACCAGTATACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA	76
SC39.37	重鎖	GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGAT^^TCCTGCAAGACTTCTGGATACACATTCACTGAGTACACCATGCATTGGGTGAAGCAGAGCCATGG AAAGAGCCTTGAGTGGATTAATCCTAACAATATTGTTACTAGTTACAACCAGAAGTTCGAGGGCAAGGCCACATTGACTGTGGACAAG^CCTCCAACACAGCCTACA^GGAGCTCC GCAGCC^GACATCTGCGGATTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGATACTGGGACGTCCTAGGGTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCTCTCTCACAGTCTCCTCA	78
SC39.39	軽鎖	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTTATCTGCCTCTCTGGGAGAAAGAGTCAG^GTCACTTGTCGGGCAAGTCAGGAATTAGTGGTTTCT^AAGCTGGCTTCAGCAGAAACCAGATGG AACTAT^AAACGCCTGATCTACGCCGCATCCACTTTAGATTCTGGTGTCCCAAAAAGGT^CAGTGGCAGTAGGTCTGGGTCAGATTATTCTCTCACCATCAGCAGCCTTGAGTC^GAAGATTTTG CAGACTATTACTGTCTACAGTATGC^AGTTTTCCGTACACGTTCGGAGGGGGGACCAAGGTGGAAATAAAA	80
SC39.39	重鎖	GAGGTTCAGATGCAGCAGTCTGGGGCAGAACTTGTGAGGTCAGGGGCCTCAGTCAAGTTGTCCTGCACAGCTTCTGACTTCAACATTAAAGACTACTATATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGA ACAGGGCCTGGAGTGGATTGGATGGATTGATCCTGAGAATGGTGATACTGAATATGCCCGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTATGACTGCAGACACA^CCTCCAACACAGCCTACC^GCACCTCA GCAGCC^GACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTTCTGTAATACGGGGGGCCCTGACTAC^GGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA	82
SC39.101	軽鎖	GATGTTGTGATGACCCAAACTCCAC^CTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTACACAGTAACAGATACACCTATTTAGAATGGTACCT GCAGAAACCAGGCCAGTCGCTAAAGCTCCTGATATATGGGGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGG AGGCTGAGGATATGGGAGTTTATT^ACTGCTTTCAAGGTACACATGTTCCGTACACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA	84
SC39.101	重鎖	GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGAGCTTCAATGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCACTGGCTACACCATGAACTGGGTGAAGCAGAGCCATGG AAAGAACCTTGAGTGGATTGGAC^TATTAATCCTTACAATGGTGCTACTAACTACAACCAGAAATTCAAGGGCAAGGCCACATTAACTGTAGACAAG^CATCCAGCACAGCCTGCA^GGAGCTCC TCAGTC^GACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTACAAGAATCCGGGACTCTCTAT^ACTATGGTAGTGGCAACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA	86
SC39.102	軽鎖	GATGTTGTGATGACCCAAACTCCAC^CACTTTGTCGGTTACCATTGGACAACCAGCTTCCATCTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTATATACTAATGGAAAAACCTATTTGAA^TGGTTATT ACTGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAACGCCTAATCTATCTGGTGTCTAAATTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAAATCAGCAGAGTGG AGGCTGAGGATTTGGGAGTTTAT^ACTGCTTGCAGAATACACATTTTCCTCCGACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA	88
SC39.102	重鎖	CAGGTCCAACTGCAGCAGCCTGGGACTGAACTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAACTACTGGATGCACTGGGTGATGCAGAGGCCTGG ACAAGGCCTTGAGTGGATAGGAAATATTAATCCTAGCGATGGTGGTTCTAACTACAATGAGAAGTTCGAGAACAAGGCCACACTGACTGTAGACAAA^CCTCCAGCACAGCCTACA^GCAGCTCA GCAGCC^GACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTATTGTACAATCTACAACGGTAGTGGCCCGTTTGCTTTCTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGT^TCTGCA	90

FIG. 7C（ 続き ）

【図７Ｃ－３】

抗TNFRSF21マウス抗体の可変領域のヌクレオチド配列

名称	鎖	核酸配列	配列番号
SC39.11	軽鎖	GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGATACTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCA ATCTCCTAAAGCACTGATTTACTCGGCATCCTACCGGTTCAGTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAATGTGCAGTCTGATGACTTGG CAGAATATTTCTGTCAGCAATATAACAGCTATCCGCTCACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA	52
SC39.11	重鎖	CAGGTCCAACTGCAGCAGCCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTGTCCTGCAAGGGTTCAGGCTACACCTTCACCAGCTACTGGATGAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGG ACAAGGCCTTGAATGGATTGGAGTATTAATCCTAACAATAGTGGTTACTAGTTACAACCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCA GCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAACTACGGTAGTAGTTGGTTTGTTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA	54
SC39.12	軽鎖	GACATCCAGATGAACCAGTCTCCATCCAGTCTGTCTGCATCCCTTGGAGACACAATTACCATCACTTGCCATGCCAGTCAGAACATTAATGTTTGGTTAAGCTGGTACCAGCAGAAACCAGGAAA TATTCCTAAACTATTGATCTATAAGGCTTCCAACTTGCACACAGGCGTCCCATCAAGGTTTAGTGGAAGTGGATCTGGAACAGGTTTCACATTAACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGACATTG CCACTTACTACTGTCAACAGGGTCAAAGTTATCCTCTGACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAGA	56
SC39.12	重鎖	GAGGTGCGTCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAACTATGGCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCAGA CAAGAGGCTGGAGTTGGTCGCAATTATTAATAGTAATGGTGGTAGCACCTATAATCCAGACAGTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACATCCTGTACCTGCAAATGA GCAGTCTGAAGTCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTACAAGAGATCTACTATGGTTACGTTATTATGTTATGGACTATTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA	58
SC39.18	軽鎖	GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGTATCTGTGGGAGAAACTGTCACCATCACATGTCGAGCAAGTAATAATATTTACAATAATTTAGCATGGTATCAGCAGAAACAGGGAAA ATCTCCTCAGCTCCTGGTCTATGGTGTAACAAACTTAGCAGATGGTGTGCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACACAGTATTCCCTCAAGATCAACAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTG GGAGTTATTACTGTCAACATTTTGGGGTACTCCATCACACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA	60
SC39.18	重鎖	CAGATCCAGTTGGTGCAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCAGGAGAGACAGTCAAGATCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTATACCTTCACAGACTATTCAATGCACTGGGTGAAGCAGGCTCCAGG AAAGGGTTTAAGTGGATGGGCTGGATAAACACTGAGACTGGTGAGCCAACATATGCAGATGACTTCAAGGGACGGATTGCCTTCTCTTTGGAAGTCTCTGCCACTACACTGCCTATCTGCAGATCA ACAACCTCAAAAATGAGGACACGGCAACATATTTCTGTGCTAGATGGTTACTTCCGTACACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA	62
SC39.24	軽鎖	GACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTAGCTGTGTCAGTTGGAGAGAAGGTTACTATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGCCTTTTATATAGTAGCAATCAAAAGAACTACTTGGCCTGGTA CCAGCAGAAACCAGGCAGTCTCCTAAACTGCTGATTTACTGGGCATCCACTAGGAAATCTGGGGTCCCTGATCACTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTG TGAAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATTATAGCTATCCTTACACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA	64
SC39.24	重鎖	GAAGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGTAGTCTCTGGATTCACTTTCAGTGCCTATGCCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCAGA GAAGAGGCTGGAGTGGGTCACATCCATTAGTAGTGGTTTTATTATCTAGACAGTGTCAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGATAATGCCAAGAACACCCTGTACCTGCAAATGAGCA GTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTCAAGAGCGACTACGGTAGTAGCTACGGTGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA	66

FIG. 7C（ 続き ）

(142) JP 2019-525727 A 2019.9.12

【図７Ｃ－６】

抗TNFRSF21マウス抗体の可変領域のヌクレオチド配列

名称	鎖	核酸配列	配列番号
SC39.103	軽鎖	AATATTGTGATGACCCAGACTCCCAAATTCCTGCCTGTAACAGCAGAAGACAGGG^TACCATAACG^GCAAGGCCAG^CAGAGTGTGAATAATGAAGTAACT^TGGTACCAACAAAAGCCAGGGCA GTCTCCTAAAC^GCTGATATAT^ATGCATCCAA^CGCTACACTGGAGTCCCTGATCGCTT^CACTGGCAGTGGATCTGGCACGGATTTCACTTTCACCATCAGCAGTGTGCAGGTTGAAGACCTGG CAGTTTATTTC^GTCAGCAGCA^AATAGCTCTCCGCTCACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGC^GAAA	92
SC39.103	重鎖	CAAATGCAACTGCAGCAGTCTGGGCCTCAGGTGGTTAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGACTTCTGG^TACTCATTCACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGG ACAAGGTCTTGAGTGGATTGGCATGATTGATCC^TCCGATAGTGAAACTAGGTTAAATCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTGAAGACAAATCCTCCACCACAGCCTACATGC CCAGCCCGACA^CTGAGGACTC^GCGGTCTATTATTGTGTAAGAAGGGGACTGGGACGGTACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA	94
SC39.104	軽鎖	GATGTCCAGATAACCCAGTCTCCATCTTATCTTGCTGCATCTCC^GGAGAAACCA^TACTATTAAT^GCAGGGCAAG^AAGAGCATTAACAAATATTTAGCCTGGTATCAAGAGAAACCTGGGAA AACTAACAAGC^TCTTATCTAC^TTGGATCCACCTTGCAAATCTGAGGTTCCAGTGGCAGTGGATCTGGTACAGATTTTCTCTCACCATCAGTAGCCTGGAGCCTGAAGAT^TTG CAGTGTATCAC^GTCAACAGCA^AATGAATACCCGCTCACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGC^GAAA	96
SC39.104	重鎖	CAGGTGCAGCTGATGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCATCACTTGCACTGTCTCTGGGTTTTCATTAACCAACTATGGTGTTGACTGGGT^CGCCAGCCTCCAGG AAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTTATATGGGG^GGTGGAAGCACAAATTATAAT^CAGCTCTCATGTCCAGACTGAGCATCAGCAAAGACAACTCCAAGAGCCAAGTTT^CTTAAAAATGAACA GTCTGCAAACTGATGACACAGCCATGTACTACTGTGCTCGAAAGGTAGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA	98
SC39.105	軽鎖	GATATCCAGATGACACAGACTACATCCTCCCTG^CTGCCTCTCTGGGAGACAGAG^CACCATCAGT^GCAGGGCCAG^CAGGACATTAGCAATTATTTACACTGGTATCAGCAGAAACCAGATGG AACTGTTAAAC^CCTGATCTAC^TCACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGATTATTCTCTCACCAT^AGCAACCTGGAACAGGAAGATATTG CCACTTACTTT^GCCAACAGGG^AGTACGCTTCCATTCACGTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAA^AAAA	100
SC39.105	重鎖	CAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTCCTGGCTATACCTTCACCAGCCACTGGATGCAGTGGGTAAGACAGAGGCCTGG ACAGGGCCTGAGTGGATTGGAGAGATTTTCC^GGAAGTGGTAGTACTTATTATAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGTAGACACATCCTCCAGTACAGCCTACATGCAGCTCA GCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGACTATTTCTGTGCAAGAGGGATTTTACGGTTGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA	102
SC39.108	軽鎖	GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTG^CGGTTACCAT^GGACAACCAGCTTCCATCTCT^GCAAGTCAAG^CAGAGCCTCTTAGATAGTGATGGAAAAACCTA^TTAAATTGGT^ATT ACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTAATCTATCTGGTGTCTAAACTGGAC^CTGGAGTCCC^GACAGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGA^TTCACACTGAAAATCAGCAGAGTGG AGGCTGAGGATTGGGAGTTTATTACTGCTTGCAGAATACACATTTTCCTCCGACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA	104
SC39.108	重鎖	CCTGTGCTGGTGAAGCCGGGGCCTTCAGTGAAGATATCCTGTAAGGCTTCTGGAT^CACATTCACTGACTACTACATGCACTGGGTGAAGCAGAGCCATGGACAGAGCCT^GAGTGGATTGGACT ^GTTTATCCTTACAATGGTGAA^TTAGTTACAG^CAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTAGACACATCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTAAACAGCCTGACTTCTGAGGAC^CTG CGGTCTATTAT^GTGCAAGGGGCCCTACTATAGTAACTACCAC^ATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA	106

FIG. 7C（ 続き ）

【図７Ｃ－７】

抗TNFRSF21マウス抗体の可変領域のヌクレオチド配列

名称	鎖	核酸配列	配列番号
SC39.109	軽鎖	GACA^TCAGATGACCCAGTC^CCTGCCTCCCAGTCTGCATCTCTGGGAGAAAGTG^CACCATCACATGCCTGGCAAGTCAGACCATTGGTACATGGTTAGCATGGTA^CAGCAGAAACCAGGGAA ATC^CCTCAGCTCCTGATT^AGCTGCAACCAGCTTGGCAGATGGGGCTCCCATCAAGGTTCAGTGGTAGTGGA^CTGGCACAGAATTTTC^^^TCAAGATCAGCAGCC^ACAGGCTGAAGATTTTG TAAG^TATTACTGTCAACAAC^TTACAGTCCTCCTCGGAGTTCGGTGGTGGCACCAAGCTGGAAATCAAA	108
SC39.109	重鎖	CAGG^GCAACTGCAGCAGCC^GGGTCTGTGCTGGTGAGGCCTGGAGCTTCAGTGAAGCTGTCCTGCAAGGC^^CTGGCTACACATTCACCAGGTACTGGATGTACTGGG^GAAGCAGAGGCCTGG ACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGAAGATTCATCCTAA^AGTGGTATTACTAACTACAATGAGAAGTTCAAGGCGAAGGCCACACTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCAC^GCCTACGTGGATCTCA GCAGCCTGACATCTGAAGAC^CTGCGGTCTATTACTG^GCAAGCGGGGGGTATC^^GCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTC^GCA	110
SC39.110	軽鎖	GA^A^CCAGATGACACAGAC^ACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAG^CACCATCAGTTGCAGGGCCAGTCAGGACATTAGCAATTATTTACACTGGTA^CAGCAGAAACCAGATGG AAC^GTTAAACTCCTGATC^^CTTCACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGG^CTGGGACAGATTATTC^CTCACCATTAGCAACC^GGAACAAGAAGATATTG CCAC^TACTTTTGCCAACAGGGTAGTACGCTTCCAT^CACGTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAA	112
SC39.110	重鎖	CAGG^TCAGCTGCAGCAGTC^GGACCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGC^CCTGGCTATACCTTCACCAGCCACTGGATGCAGTGGG^AAGACAGAGGCCTGG ACAGGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTTTCCTGGAAGTGGTAGTACTTATTA^AATGAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACACTGACTGTAGACACATCCTCCAGTACAGCCTACATGCAGCTCA GCAGCCTGACATCTGAGGAC^CTGCGGTCTATTTCTG^GCAAGAGGACTATAGGTACGGCGACGCCTACTATGC^ATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCG^CTCCTCA	114
SC39.112	軽鎖	GACA^CCTGATGACCCAATC^CCATCCTCCATGTCTG^ATCTCTGGGAGACACAG^CAACATCACTTGCCA^GCAAGTCAGGGCATTAGCAGTAATATAGGGTGGTTGCAGCAGAAACCAGGGAA ATCA^TTAAGGGCCTGATC^A^CATGCAACCAAGTTGGAAGATGGAGTTCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGA^CTGGAGCAGATCATTC^CTCACCATCAGCAGAC^GGAATCTGAAGATTTTG CAGACTATTACTGTGTACAA^ATGGTCAGTTTCCAT^CACGTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAA	116
SC39.112	重鎖	CAGG^CCAACTGCAGCAATC^GGGGCTGGACTGGTGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGTTGTCCTGCAAGGC^^CTGGCTACACCTTCACCAACTACTATATATACTGGG^GAAGCAGAGGCCTGG ACAAGGCCTTGAGTGGATTGGGGAGATTTATCCTAGCAATGGTGATACTAACTTCAATGAGAAGTTCAAGACCAAGGCCACACTGACTGTAGACAATCCTCCAGCACAGCATACATGCAACTCA GCAGCCTGACATCTGAGGAC^CTGCGGTCTATTACTG^ACAAGAGGGATTCTTTACTGGGGCCAAGGGACTC^GGTCACTGTCTCTGCA	118
SC39.117	軽鎖	GACA^TGTGATGACTCAGTC^CCAGCCACCCTGTCTG^GACTCCAGGAGATAGAG^CTCTCTTTCCTGCAGGGCCAGCCAGAGTATTAGCAACTACTTACACTGGTA^CAACAAAAATCACATGA GTC^CCAAGGCTTCTCATCAAATATGCTTCCCAATCCA^CTCTGGGATCCCCTCCAGGTTCAGTGGCAGTGGA^CAGGGTCAGATTTCAC^CTCAGTATCAACAGTG^GGAACCTGAAGATGTTG GAG^GTATTACTGTCAAAA^GGTCACAGCTTTCCGG^CACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGC^GAAA	120
SC39.117	重鎖	CAGG^TCAGCTGCAGCAGTC^GGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTTAGTGA^GATATCCTGCAAGGC^^CTGGTTACACCTTCACAAGCTACGATATAAACTGGG^GAAGCAGAGGCCTGG ACAGGGACTTGAGTGGATTGGATGGATTTATCCTGGAGATGGTAGTACTAAGTACAATGAGAAATTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCACCTCA GCAGCCTGACTTCTGAGAAC^CTGCAGTCTATTTCTG^ACAAGTAACTACTTTGC^^TACTGGGGCCAGGGGAC^CTGGTCACTGTCTCTGCA	122

FIG. 7C（ 続き ）

【図７Ｃ－８】

抗TNFRSF21マウス抗体の可変領域のヌクレオチド配列

名称	鎖	核酸配列	配列番号
SC39.120	軽鎖	GACATTGTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGGCTATG^CAGTAGGACAGAAGGTCAC^ATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGCCTTT^AAATAGTAGCAATCAAAAGAACTATTTGGCCTGGTA CCAGCAGAAACCAGGACAG^CTCCTAAACTTCTGGTATACTTTGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCAC^CTTACCATCAGCAGTG TGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAACATTATAGCACTCCGTGGACG^TCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA	124
SC39.120	重鎖	GACGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGAAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTACCTATGCCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCAGA GAAGAGGCTGGAGTGGGTCGCATACATTAGTAGTGGTGG^GATTACATCTACTATGCAGACACTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCATGAACACCCTGTACCTGCAAATGA GCAGTCTGAAGTCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTACAAGAGAGGGGGCCTACTAC^ATGCTCTGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA	126
SC39.121	軽鎖	GATGTTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTG^ACACAGTAATGGAAACACC^ATTTACATTGGTACCT GCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGA^CAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGG AGGCTGAGGATCTGGGAGT^TATTTCTGCTCTCAAAGTTCACATGTTCCGTACACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA	128
SC39.121	重鎖	CAGGTTACTCTGAAAGAGTCTGGCCCTGGGATATTGCAGCCCTCCCAGACCCTCAGTCTGACTTGTTCTTTCTCTGGGTTTTCACTGAGCACTTCTGATATGGGTGTAGGCTGGATTCGTCAGCC AGCAGGGAAGGGTCTGGAG^GGCTGGCAGACATTTGGTGGGATGATGTCAAGCGCTATAACCCAGCCCTGAAGAGCCGACTGACTATC^CCAAGGATACCTCCAGCAG^CAGGTATTCCTCAAGA TCGCCAGTGTGGACACTGCAGATACTGCCACACTACTGTGCTCGAGGGGACGGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCAC^GTCTCTGCA	130
SC39.122	軽鎖	GACATCCTGATGACCCAATCTCCATCCTCCATGTCTGTA^CTCTGGGAGACACAGTCAGCATCACTTGCCATGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTAATATAGGGTGGTTGCAGCAGAAACCAGGGAA ATCATTTAAGGGCCTGATC^ATCATGGAACCAAGTTGGAAGATGGAGTTCCATCAAGGT^CAGTGGCAGTGGATCTGGAGCAGATTTT^CTCTCACCATCAGCAGCCTGGAAGTCTGAAGATTTTCG CAGACTATTACTGTGTACAGTATGCTCATTTTCCGTTCACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA	132
SC39.122	重鎖	CAGATCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAACTGGTGAGGCCTGGGACTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACTGGCTACTATATAAACTGGATGAAGCAAAGGCCTGG ACAGGGACTTGAGTGGATTGGATGGATTTATCCTGGAGACGGTAATACTAAGTATAATGAGAAGTTTAAGGGCATGGCCACATTGACTATAGACACATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCA GCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGACTCTATTTCTGTGCAAGAGGGATTTTACGGTTGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA	134
SC39.123	軽鎖	GATGTCCAGATAACCCAGTCTCCATCTTATCTTGCTGCA^CTCCTGGAGAAACCATTAC^ATTAATTGCAGGGCAAGTAAGAGCATTAGCAATTATTTAGCCTGGTATCAAGAGAAACCTGGGAA AACTAATAAACTTCTTATC^ACTCTGGGTCCACTTTGCAATCTGGAATTCCATCAAGGT^CAGTGGCAGTGGATCTGGTACAGATTTCACTCTCACCATCAGTAGCCTGGAGCCTGAGGATTTTG CAATGTATTACTGTCAACAGCATCATGAATACCCGCTCACATTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA	136
SC39.123	重鎖	CAGGTGCAACTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCATCACTTGCACTGTCTCTGGGTTTTCATTAACCAGCTATGGTGTAGACTGGGTTCGCCAGCCTCCAGG AAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGTAATATGGGGTGGTGGAAGCACAATTTATAATTCAGCTCTCATGTCCAGACTGAGCATCAGTAAAGACAACTCCAAGAGCCAAGTTTCTTTACAAGTGAACA GTCTGCAAACTGATGACACAGCCATGTACTACTGTGCCAAGCGAGGTGGTTACAACGGC^GGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGATCACTGTCTCTGCA	138

FIG. 7C（ 続き ）

【図７Ｃ－９】

抗TNFRSF21マウス抗体の可変領域のヌクレオチド配列

名称	鎖	核酸配列	配列番号
SC39.124	軽鎖	GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTG^CGGTTACCATTGGACAACCAGCTTCCATCTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTA^ATACTAATGGAAAAACCTATTTGAATTGGTTATT ACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAACGCCTAATCTATCTGGTGTCTAAATTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCAGGGACAGATTTCACACTGAAAATCAGCAGAGTGG AGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTACTGCTTGCAGAATACACATTTTCCTCCGACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA	140
SC39.124	重鎖	CAGGTCCAACTGCAGCAGTCTGGGACTGAACTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAG^GAAGCTGTCCTGCAAGGC^TCTGGCTACACCCTCACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGG ACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAAATATTAATCC^AACAATGGTGATACTAAC^ACAATGAGAAGTTCAAGCGCAAGGCCACACTGACTGTAGACAAACCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCA GCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTATTGTGCGATCTACAACGG^AGTGGCCCGTTTGCTTAC^GGGGCCAAGGGACTCTGG^CACTGTCTCTTCA	142
SC39.125	軽鎖	GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTA^CTGCATCTGTGGGAGAAACTGTCACCATGACATGTCGAGCAAGTGAGAATATTTACAGTGATTTAGCATGGTATCAGCAGAAACAGGGAAA ATCTCCTCAGCTCCTGGTCTATGCTGCAACAAACTTAGCAGATGGTGTGCCA^CAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACACAGTTTTC^CTGAAGATCAACAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTG GGAGTTATTACTGTCAACATTTTTATGGTACTCCGTTCACGTTCGGAGGGAGGGACCAAACTGGAAATCAAA	144
SC39.125	重鎖	GAGGTCCGGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAG^GAAGATATCCTGCGAGAC^TCTGGATACACATTCACTGAATGCAACATGCACTGGGTGAGGCAGAGCCGTGG ATCGAGCCTTGAGTGGATTGGAGGTATTAATCC^AACAATGGTGTTACTTCC^ACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTTAGACAAGTCCTCCAGCACAGCCTGCATGGAGCTCC GCAGCCTGACATCTGAGGATCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAAAGGGGACTCTATAAATTCGACAAGAAC^TTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA	146
SC39.127	軽鎖	GATATTGTGATAACCCAGGATGAACTCTCCAATCCTGTCACTTCTGGAGAATCAGTTTCTATCTCCTGCAGGTCTAGTAAGAGTCTCCTA^ATAAGGATGGAAAGACATACTTGAATTGGTTTCT GCAGAGGCCAGGACAGTCTCCTCAACTCCTGGTCTATTGGATGTCCACCCGTGCATCAGGAGTCTCAGACCGGTTTGGTGGCAGTGGGTCGGGGACAGATTTCGCACTGGAAATCAGTAGAGTGA AGGCTGAGGATGTGGGTGTGTATTACTGTCAACAAGTTTTAGAATATCCTCTCACGTTCGGTGTGTTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA	148
SC39.127	重鎖	GAGGTTCAACTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGTTTGTGAGGCCAGGGGCCTCAG^CAAGTTGTCCTGCACAGC^TCTGGCTTTAACATTAAAGACGACTATATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGA ACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAGAATTGATCT^GCGAATGGTAATGTTAAA^ATGCCCCGAAGTTCCAGGACAAGGCCACTATAACTGCAGACACATCCTCCAACACAGCCTTCCTGCAGCTCA GCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCGTCTATTACTGTCTTAGATCCGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA	150
SC39.129	軽鎖	GACATCCTGATGACCCAATCTCCATCCTCCATG^CTGTATCTCTGGGAGACACAGTCAGCATCACTTGCC^GCAGGTCAGGGCATTAACAGTAATATAGGGTGGTTGCAGCAGAAACCAGGGAA ATCATTTAAGGGCCTGATCTATCATGGAACCAACTTGGAAGATGGAGTTCCA^CAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGAGCAGATTATTC^CTCACCATCAGCAGCCTGGAATCTGAAGATTTTG CAGACTATTACTGTGTACAGTATGCTCAGTTTCCATTCACGTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAA	152
SC39.129	重鎖	GAGGTCCAGCTGCAACAATCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAG^GAAGATATCCTGTAAGGC^TCTGGATATACATTCACTGACTACTACTTGAACTGGGTGAAGCAGAGCCATGG AAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAGATATTTATCC^AACAATGGTGAAAGTAGC^ACAACCAGAAATTCAAGGCCAAGGCCACATTGACTGTAGACAAGTCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCC GCAGCCTAACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGGAATCTCGGCCGGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA	154

FIG. 7C（ 続き ）

【図７Ｃ－１０】

抗TNFRSF21マウス抗体の可変領域のヌクレオチド配列

名称	鎖	核酸配列	配列番号
SC39.144	軽鎖	GATGTCCAGATAATTCAGTCTCCATCTTATCTTGCTGCATCTCC~GGAGAAACCA~TACTATTTATTGCAGGGCAAGTAAGAGCATTAGCAACTATTTAGCCTGGTATCAAGAGAAACCTGGGAAAACTAA~CAGCTTCTTA~CTACTCTGGA~CCAC~TTGCAATCTGGAATTCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGTACAGATTTCACTCTCACCA~CAGTAGCCTGGAGCC~GAAGATTTTGCAATGTATTTCTGTCAACAACATTATGAATACCCGCTCACGTTCGGTGTTGGGACCAAGC~GGAGCTGAAA	156
SC39.144	重鎖	CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCATCACTTGCACTGTCTCTGGGTTTCCATTAACCAGTTATGG~GTAGACTGGGTTCGCCAGCCTCCAGGAAAGGG~CTGGAGTGGCC~GGGAGTGATA~GGGGAGGTGGAAGCACTACTTATAAT~CAGC~CTCATGTCCAGACTGAACATCAGCAAAGACAACTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAACTGAACAG~CTGCAAACTGATGACACAGCCATGTACTACTGTGCCAAACGAGGTGGTTATATAACGGCTGGTTTGCTTAC~GGGGCCAAGGACTC~GGTCACTGTC~CTGCA	158
SC39.149	軽鎖	CAAGTTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAC~CATG~CTGCATCTCCAGGGGAGAAGG~CACCATGACCTGCAG~GCCTCCTCAAGTGTAAGTTACATGTACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCTCACCAAACCCTGGATTTATCGCACATCCAACCTGGCTTCTGGAG~CCCTGCTCGC~TCAG~GGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTC~CTCACAGTCAGCAGCGTGGAAGGCCGAAGATGCTGCCAC~TATTACTGCCAGCAA~ACAATAATTACCCACCCATCACGTTCGGTACTGGGACCAAGC~GGCGCTGAAA	160
SC39.149	重鎖	GAGGTCCAGCTGCAACAAGTCTGGACCTGACCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGACTTCTGGATACACATTCACTGAATACACCATGCACTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAAGAGCCTTGAATGGA~TGGACTTGTT~ATCC~TACAATGGTGGTACTAGGTACAACCAGAAATTCAAGGACAAGGCCACATTGAC~ATAGACACTTCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTAAACAGCC~GACTTCTGAGGATCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGGGGGAACAAATGGTAACCACTATGG~ATGGAGAACTGGGGTCAAGGAACCTCAG~CACCGTCTCCTCA	162
SC39.151	軽鎖	GACATTGTGATGTCACAGTCTCCATCCTCCCTAGCTGTGTCAGT~GGAGAGAAGG~TACTCTGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGCCTT~TATATAGTAGCAATCAAAAAAACTAC~TGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAA~TGCTGATTTACTGGGCTTCCACTAGGGAATC~GGGGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAG~GGATCTGGGACAGAT~TCACTCTCACCATCAGCAGTGTGAAGGCTGAAGCTGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATTATAGCTATCCTCTCACGT~CGGTGCTGGGACCAAGC~GGAGCGGAAA	164
SC39.151	重鎖	CAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGATGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGCTT~CCTGCAAGGC~ACTGGCTACACATTCACTGGCTACTGGATAGAGTGGGTAAAGCAGAGGCCTGGACATGGCCTTGAGTGGA~TGGAGAGATT~TACC~GGAAGTTATAGTACTAACTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAGGGCCACATTCAC~GCAGATACATCCTCCAACACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCC~GACAACTGAAGACTCTGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATTATAGCTATCCTCTCACGT~CGGTGCTGGGACCAAGC~GGAGCGGAAA	166
SC39.152	軽鎖	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCTTA~CTGCCTCTCTGGGAGAAAGAA~CAGTCTCACTTGCCGGGCAAGTCAGGATATTAGTAATTACTTAAACTGGTTTCAGCAGAAACCTGATGGAACTTT~AAACGCCTGA~CTATGCCACA~CCAG~TTAGATTCTGGTGTCCCCAAAAGGTTCAGTGGCAGTAGGTCTGGGTCAGATTA~TCTCTCACCA~CAGCAGCCTTGAGTC~GAAGATTTTGCAGACTATTACTGTCTACAATATGCTAG~TATCCGCTCACGTTCGGTGCTGGGACCAAGC~GGAGCGGAAA	168
SC39.152	重鎖	GAGGTTCACCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGCTTGTGAGGCCAGGGGCCTCAGTCAAGTTG~CCTGCACAGC~TCTGGCTTCAACATTAAAGACTACTA~ATGTATTGGGTGAAACAGAGGCCTGAACAGGCCTGGAGTGGA~CGGAAGGATTGATCC~GAGGATGGTGATACTGAATATGCCCCGAAGTTCCGGGCAGGCCACTATGAC~GCAGACACATCCTCCAACACAGCCTACCTGCAGCTCAGCGCC~GACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTACTGTACTTCCCTTATTACTACGGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAG~CTCCTCA	170

FIG. 7C（ 続き ）

【図７Ｃ－１１】

抗TNFRSF21マウス抗体の可変領域のヌクレオチド配列

名称	鎖	核酸配列	配列番号
SC39.153	軽鎖	GATATCCAGATGACACAGACTACATCC~CCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAGGGCCAGTCAGGACATTAGCAATTA~TTAACTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAACTGTTAAACTCCTGATCTATTACACATCAGAGGTTCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAATTATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAACAAGAAGATATTGCCACTTAC~TTTGCCAACAGGGTAGTAGTCTTCCATTCACGTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAA	268
SC39.153	重鎖	CAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTCCTGGCTATACCTTCACCAGCCACTGGATGCAGTGGGTAAGACAGAGGCCTGGACAGGGCC~TGAGTGGATTGGAGAGAT~TTTCCTGGAAGTGGTAGTACTTATTATAA~GAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGTAGACACATCCTCCAGTAAAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTACATGCAGCTCAGCGCC~GACATCTGAAGGACTCTGCGGC~CTATTTCTGTGCAAGAGACTATAGGTACGGCGACGCCTACTATGCACTGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA	102
SC39.154	軽鎖	GATATCCAGATGACACAGATTACATCC~CCCTGTCTGTCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAGGGCCAGTCAGGACATTAGCAATTA~TTACACTGGTATCAGCTGAAACCAGATGGAACTGTTAAACTCCTGATCTACTTCACATCAAGGATTCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAATTATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAACAAGAAGATATTGCCACTTAC~TTTGCCAACAGGGTAGTAGTCTTCCATTCACGTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAA	172
SC39.154	重鎖	CAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTCCTGGCTATACCTTCACCAGCCACTGGATGCAGTGGGTAAGACAGAGGCCTGGACAGGGCC~TGAGTGGATTGGAGAGAT~TTTCCTGGAAGTGGTAGTACTTATTATAA~GAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGTAGACACATCCTCCAGTAAAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTACATGCAGCTCAGCGCC~GACATCTGAAGGACTCTGCGGC~CTATTTCTGTGCAAGAGACTATAGGTACGGCGACGCCTACTATGCACTGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA	174
SC39.156	軽鎖	AGTATTGTGATGACCCAGACTCCCAAA~TCCTGCCTGTAACAGCAGAAGACAGGGTTACCATAACCTGCAAGGCCAGTCAGAGTGTGAGTAATGAAGTAGTTTGGTACCAACAGAAGCCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGATATACTATGCATCCAACTGGACTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAATGTGCAGTCTGAAGACTTGGCAGAGTATTTCTGTCAGCAGATAATAACAGCTATCCGCTCACGTTCGGTGCTGGGACCAAGC~GGAGCGGAAA	176
SC39.156	重鎖	CAGGTCCAACTGCAGCAGTCTGGGCTGAGCTGGTAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGCTTTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTTACCACTACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGTC~TGAGTGGATTGGCATGAT~GATCCTTCCGATAGTGAAACTAGGTTAAA~CAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTGTAGACACATCCTCCAGCACAGCCTACATGCACCTCAGCAGCCTACATGCACCTCA	178
SC39.157	軽鎖	GACATTGTGATGACCCAGTCTCCATCC~CCCTGGCTATGTCAGTAGGACAGAAGGTCACTATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGCCTTTAAATAG~AGCAATCATAAGACCTAT~TGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGTCTCCTAAACTTCTGGTATACTTTACA~CCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGC~TCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTTACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGCAGACCTGGAAATTATTACTGTCAACAACATTATAGCACTCCGTGGACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA	180
SC39.157	重鎖	GACGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGAAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTCGTTA~GCCATGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCAGAGAAGAGGC~GGAGTGGTCGCATACAT~AGTAGTGGTGGTGATTACATCTACTATACAGACACTGTGAAGGGCCGA~TCACCATCTCCAGAGACAATGCCAGGAACACCCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAAGTCTGAGGACACAGCCA~GTATTACTGTACAAGAGAGGGGGCCTACTACTATGCTTTGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCG	182

FIG. 7C（ 続き ）

【図７Ｃ－１２】

抗TNFRSF21マウス抗体の可変領域のヌクレオチド配列

名称	鎖	核酸配列	配列番号
SC39.158	軽鎖	GATGTTGTTC~GACCCAAACTCCACTCTCTCTGCCTGTTAATATTGGAGA~CAAGTCACTATCTCTTGCAAGTCTACTAAGAGTCTTCTGACTAGTGATGGATTCACT~ATTTGGACTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTAATATATTTGGTTTCTAATCGATTTTCTGGAGTTCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCAGGAACAGA~TTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGA~TTGGGAATTTATTCTTGC~TCCAGAGTAACTCTCTTCCA~TCACGTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAA	184
SC39.158	重鎖	AGGTCCAAAC~GCAGCAGTCTGGAGCTGAACTGGTAAGGCCTGGGACTTCAGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACGCCTTCACGAATTACTTCATAGAGTGGGTAAAACAGAGGCCTGGACAGGGCCTTGAGTGGATTGGAGTGATTAATCCTGGAAGTGGTGGTACTCACTATAATGAGAAGTTCAAGGACAAGGCAATACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCAC~GCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGATGACTCTGCGGTCTATTTCTGTACAAGACCCAAC~ATGGTCTGGACTACTGGGG~CAAGGAACCTCGGTCACCGTCTCCTCA	186
SC39.160	軽鎖	GACATTGTGA~GACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCATCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTTCGTACTGCTGTCGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGACAG~CTCCTAAAGCACTGATTTGCTTGGCATCCAACCGGCACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCAT~AGCAATGTGCAATCTGAAGACCTGGCAGCTTATTTCTGTCTGCAACATTGGAATTATCCTTACAGTTCGGAGGGGGGACCAAGC~GGAAATAAA	188
SC39.160	重鎖	GAGGTCCAGC~GCAACAGTCTGGACCTGACCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGACTTCTGGATACACATTCACTGAATACACCATGCACTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAGAAGAGCCTTGAGCGGGTTGGAGGTGTTCATCCTAACAATGGTGTTACTACCTACAACCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTGTAGACAAGTCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCCGCAGTCTGACATCTGAGGATTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGGGGGAACAAATGGTAACCACTATGG~ATGGAGAACTGGGGTCAAGGAACCTCAG~CACCGTCTCCTCA	190
SC39.161	軽鎖	GATATCCAGA~GACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAGGCCAGTCAGGACATTAGCAATTATTTACACTGGTATCAGCTGAAACCAGATGGAACTGTTAAACTCCTGATCTACTTCACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGATTATTCTCTCACCAT~AGCAACCTGGAACAGGAAGATATTGCCTCTTACTT~TGCCAACAGGGTAGTAGTCTTCCATTCACGTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAA	270
SC39.161	重鎖	CAGGTTCAGC~GCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTCCTGGCTATACCTTCACCAGCCACTGGATGCAGTGGGTAAGACAGAGGCCTGGACAGGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTTTTCCTGGAAGTGGTAGTACTTATTATAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTTTAGACACATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAGACTATAGGTACGGCGACGCCTACTA~GCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCG~CTCCTCA	174
SC39.162	軽鎖	GATATCCAGA~GACACAGACTACATCCTCCCTGTCTGCCTCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAGGGCCAGTCAGGACATTAGCAATTATTTACACTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAACTGTTAAACTCCTGATCTACTACACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCCGTCAAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGATTATTCTCTCACCAT~AGCAACCTGGAAACAAGAAGATTTTGCCACTTACTT~TGCCAACAGGGTAGTAGCCTTCCATTCACGTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAA	192
SC39.162	重鎖	CAGGTTCAGC~GCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGGATATCCTGCAAGGCTCCTGGCTATACCTTCACCAGCCACTGGATGCAGTGGGTAAGACAGAGGCCTGGACAGGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTTTTCCTGGAAGTGGTAGTTCTTATTATAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTTTAGACACATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAGACTATAGGTACGGCGACGCCTACTA~GCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCG~CTCCTCA	194

FIG. 7C（ 続き ）

【図７Ｃ－１３】

抗TNFRSF21マウス抗体の可変領域のヌクレオチド配列

名称	鎖	核酸配列	配列番号
SC39.163	軽鎖	AGTATTGTGATGACCCAGACTCCCAAAT~TCTGCCTATAAAAGCAGGAGACAGGG~TATCATAACCTGCAAGGCCAGTCAGAGTGTGAGTAATGAAGTAGTCTGGTTCCAACAGAAGCCAGGGCAG~CCCCTAAACTGCTGATATACTA~GCA~CCAATCGCTATATTGGAG~CCC~GATCGCTTCACTGGCAGTGGATCTGGCACGGATTTCACTTTCACCATCAGCAGTGTGCAGGTTGAAGACCTGGCAGTTTACTTCTGTCAGCAGCATTCCAG~TCTCCGCTCACGTTCGGTGCTGGGACCAAGC~GGAACTGAAA	196
SC39.163	重鎖	CAGGTGCAACTGCAGCAGTCTGGGCCTCAGCTGGTTAGGCCTGGGGC~TCAGTGAAGATATCCTGCAAGGTTTC~GGTTACTCATTCACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGTCTTGAGTGGATTGGCATGATTGATCCTTCCGATAGTGAAAGTAGGTTAAATCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTGTAGACAAATCCTCCGGCACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTACATGCAACTCA	198
SC39.169	軽鎖	AGTATTGTGATGACCCAGACTCCCAAAT~CCTGCCTGTAAAAGCAGAAGACAGGG~TATCATAACCTGCAAGGCCAGTCAGAGTGTGAGTAATGAAGTAGTCTGGTTCCAACAGAAGCCAGGGCAG~CCCCTAAACTGCTGATATACTA~GCA~CCAATCGCTACACTGGAG~CCC~GATCGCTTCACTGGCAGTGGATCTGGCACGGATTTCACTTTCACCATCAGCAGTGTGCAGGTTGAAGACCTGGCAGTTTACTTCTGTCAGCAGCATAATAGCTCTCCGCTCACGTTCGGTGCTGGGACCAAGC~GGAGCTGAAA	200
SC39.169	重鎖	CAGGTGCAACTGCAACAGTCTGGGCCTCAGCTGGTTAGGCCTGGGGC~TCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTTC~GGTTACTCATTCACCAGCTACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGTCTTGAGTGGATTGGCATGATTGATCCTTCCGATAGTGAAAGTTAGATTAAATCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTGTGGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCA	202
SC39.170	軽鎖	GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAAT~CATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGG~CAGCGTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTAATGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGCA~CTCCTAAAGCACTGATTTACTCGGCA~CCTACCGGTTCACTGGCGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAATGTGCAGTCTGAAGACTTGGCAGAGTATTTCTGTCAGCAATATAACAGCTATCCGTTCACGTTCGGC~CGGGGACAAAGTTGGAAATAAA	204
SC39.170	重鎖	CAGGTCCAACTGCAGCAGCCTGGG~CTG~GCTGGTGAGGCCTGGAGC~TCAGTGAAGCTGTCCTGCAAGGCTTC~GGCTACACATTCACCAGCTACTGGATGAACTGGGTGAAACAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATT~ATCCTAATAGTGGTAGAACAAACTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGTAGACACATCCTCCAGCACAGCCTACATGGATCTCAGCAGCCTACATGGATCTCA	206
SC39.172	軽鎖	GATGTCCAGATAACCAGTCTCCA~CTTATCTTGCTGCATCTCCTGGAGAAACCA~TACTATTTATTGCAGGGCAAGTAAGAGCATTAGCAACTATTTAGCCTGGTATCAAGAGAAACCTGGAAAACTAATCAGCTTCTTATCTACTC~GGA~CCACTTTGCAATCTGGAA~TCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGTACAGATTTCACTCTCACCATCAGTAGCCTGGAGCCTGAAGATTTTGCAATGTATTACTGTCAACAACATTATGAATACCCGCTCACGTTCGGTGTTGGGACCAAACTGGAGCTGAAA	208
SC39.172	重鎖	CAGGTGCAGCTGAAGGCGTCAGGACCTGGCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCATCACTTGCACTGTCTC~GGGTTTCCATTAACCAGTTATGGTGTAGACTGGGTTCGCCAGCCTCCAGGAAAGGC~TCTGGAGTGGCTGGGAGTAATA~GGGGAGGTGGAAGCACAAATTA~AAT~CAGCTCTCATGTCCAGAC~GAACATCAGCAAAGACAATTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAG~CTGCAAACTGATGACACAGCCA~GTACTACTGTGCCAAACGAGGTGGTTACTACGGCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTCA	210

FIG. 7C（ 続き ）

【図７Ｃ－１６】

抗TNFRSF21マウス抗体の可変領域のヌクレオチド配列

名称	鎖	核酸配列	配列番号
SC39.189	軽鎖	GACATTGTGATGACTCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGACTCCAGGAGATAGAGTCTCTCTTTCCTGCAGGGCCAGCCAGAGTATTAGCAACTCCTTACACTGGTATCAACAAAAATCACATGAGTCTCCAAGGCTTCTCATCAAATATGCTTCCCAATCCATCTCTGGGATCCCCTCCAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGTCAGATTTCACTCTCAGTATCAACAGTGTGGAACCTGAAGATGTTGGAGTGTATTACTGTCAAAATGGTCACAGCTTTCCGGTCACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA	240
SC39.189	重鎖	CAGGTTCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTTAGTGATGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACACCTTCACAAGCTACGATATAAACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGACTTGAGTGGATTGGATGGATTATCCTGGAGATGGTAGTACTAAGTACAATGAGAAATTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCACCTCAGCAGCCTGACTTCTGAGAACTCTGCAGTCTATTTCTGTACAAGTAACTACTTTGCTCACTGGGGCCAGGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA	242
SC39.192	軽鎖	CAAATTGTTCTCTCCCAGTCTCCAGCAGCCCTGTCTGCATCTCCAGGGGAAAAGGTCACAATGACTTGCAGGGCCACCTCAAGTGTAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAGGCAGGATCCTCCCCCAAACCCTGGATTTATGCCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGATCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCATACTCTCTCACAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCTTGGACGTTCGGTGGAGGCACCAAACTGGAAATCAAA	244
SC39.192	重鎖	GAGGTGAAACTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTTCTCTGAGACTCTCCTGTGCAACTTCTGGGTTCACCTTCACTGATTACTACATGACCTGGGTCCGCCAGCCTCCAGGAAAGGCACTTGAGTGGTTGGGTTTTATTAAAAACAAACCTCATGGTTACACACAACAGAATACAGTGCATCTGTGAAGGGTCGGTTCACCATCTCCAGAGATAATTCCCAAAGCATCCTCTATCTTCAAATGAACAACCTGAGAGCTGAGGACAGTGCCACTTATTACTGTGCAAGAGTCCCTAACGTTTACTATGTTATGGACCAGTGGGGTCAAGGAACCTCTGTCACCGTCTCCTCA	246
SC39.196	軽鎖	GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGCATCTGTGGGAGAAACTGTCACCATCACATGTCGAGCAAGTGAAAATATTTACAGTTATTTAGCATGGTTTCAGCAGAAACAGGGAAAATCTCCTCAGCTCCTGGTCTATAATGCAAAAACCTTAGCAGAAGGTGTGCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACACAGTTTTCTCTGAAGATCAACAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGGGAGTTATTACTGTCAACATCATTATGGTACTCCGCTCACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA	248
SC39.196	重鎖	GATGTGCAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTGAAACCTTCTCAGTCTCTGTCCGTCACCTGCACTGTCACTGACTACTCCATCACCAGTGGTTATTACTGGAACTGGATCCGGCAGTTTCCAAGAAACAAACTGGAGTGGATGGGCTACATACACAACAGTGGTAGCACTAACTACAACCCATCTCTCAAAAGTCGAATCTCTATCACTCGAGACACATCCAAGAACCAGTTCTTCCTGCAGTTGAATTCTGTGACTACTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCGTGGGGTGACTACTTAGCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA	250

FIG. 7C（ 続き ）

【図７Ｃ－１４】

抗TNFRSF21マウス抗体の可変領域のヌクレオチド配列

名称	鎖	核酸配列	配列番号
SC39.175	軽鎖	GATATTGTGA^AACCCAGGATGAACTCTCCAATCCTGTCACTTCTGGAGAA^CAGTTTCTATCTCCTGCAGG^CTAGTAAGAGTCTCCTATA^AAGGATGGGAAGACATAC^^GAATTGGTTTCTGCAGAGGCCAGGACAGTCTCCTCAGCTCCTGGTCTATTGGATGTCCGACCG^GAATCAGGAGTCTCAGACCGGTTTAGTGGCAGTGGGTCGGGGACAGATTTCACACTGGAAA^CAGTAGAGTGAAGGCTGAAGA^GTGGGTGTGTATTACTGTCAGCAAGTTTAGAGTATCCTC^CACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA	212
SC39.175	重鎖	GAGGTTCAGC^GCAGCAGTCTGGGGCTGAAC^^TGTGAGGCCAGGGGCCTCAG^CAAGTTGTCCTGCACAGCT^CTGGCTTTAACATTAAAGAACGACTATATGCACTGGGTGAAACAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGACGGATTCATCCTGCGAATGGTAATACTAAA^ATGCCCCGAAGTTCCAGGACAGGGCCACTATAACTGCAGACACATCCTCCAACACAGCC^ACCTGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTA^TACTGTGCTAGATCCGCTA^GGACTACTGGGGTCAAGGCACCTCAGTCACCGTCTCCTCA	214
SC39.177	軽鎖	GATGTTGTGC^GACCCAAACTCCACTCTCCC^GCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGA^CTAGTCAGAGCATTGTACACAGTAATGGAAACACCTAT^^^ATATTGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAGGGTTTCCAACCGA^TTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGA^CAGCAGAGTGGAGGCTGAGGA^ATGGGAGTTTATTACTGCTT^CAAGGTACACATGTTCCTCACACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAA	216
SC39.177	重鎖	CAGGTTAGTC^GAGAGAGTCTGGCCCTGGGA^ATTGCAGTCCTCCCAGACCC^CAGTCTGACTTGTTCTTTC^CCGGGTTCTCACTGAGCAC^^CTGGAATGGGTGTGAGC^GGATTCGTCAGCCTTCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGCACTCATTTACTGGGATGATGACAAGCGCTATAATCCATCCCTTAAGAGCCGGCTCACAATCTCCAAGGATACCTCCAGAAACCAGG^ATTCCTCAAGATCACCAGTGTGGACACTGCAGATACTGCCACATACTACTGTGCTCGAACCTACTCTCACTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA	218
SC39.180	軽鎖	GATGTTGTGA^GACCCAAACTCCACTCTCCC^GCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGA^CTAGTCAGAGCATTGTACACAGTAATAGATACACCTAT^^^AGAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCGCTAAAGCTCCTGATATATGGGGTTTCCAACCGA^TTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGA^CAGCAGAGTGGAGGCTGAGGA^ATGGGAGTTTATTACTGCTT^CAAGGTACACATGTTCCGT^CACGTTCGGAGGGGGGCAACCAAGCTGGAAATAAA	220
SC39.180	重鎖	CAGATCCAGT^GGTGCAGTCTGGACCTGAGC^GAAGAAGCCTGGAGAGACAG^CAAGATCTCCTGCAAGGCT^CTGGGTATACCTTCACAAAC^ATGGAATGAACTGGGTGAAGCAGGCTCCAGGAAAGGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGATAAACACCAACACTGGAGAGCCAACA^ATGCTGATGACTTCAAGGGACGGTTTGCCTTCTCTTTGGAAACCTCTGCCAGAACTGCC^ATTTGCAGATCAGCAACCTCAAAAATGAGGACATGGCTACTTA^TTCTGTGCAAGAGAGGGGGA^GATAACTACCTGGCCTGGC^TGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA	222
SC39.181	軽鎖	GACATCCTGA^GACCCAATCTCCATCCTCCA^GTCTGTATCTCTGGGAGACACAGTCAGCATCACTTGCCATGCAAGTCAGGGCATTAGCAG^AATATAGGGTGGTTGCAGCAGAAACCAGGGAAATCATTTAAGGGCCTGATCTATCATG^CAACCAAGTTGGAAGATGGAGTTCCA^TAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGAGCAGATCATTCTC^CACCATCAGCAGACTGGAA^CTGAAGATTTTGCAGACTATTACTGTGTACAGTATTGGTAGATTGCCATTCACGTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAA	224
SC39.181	重鎖	CAGGTCCAAC^GCAGCAATCTGGGGCTGAAC^GGTGAAGCCTGGGGCCTCAG^GAAGTTGTCCTGCAAGGCT^CTGGCTACACCTTCACCAAC^ACTATATATACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTTATCCTAGCAATGGTGATACTAAC^TCAATGAGAAGTTCAAGACCAAGGCCACACTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCA^ACATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTA^TACTGTACAAGAGGGGATTC^^TACTGGGGCCAAGGGACTC^GGTCACTGTCTCTGCA	226

FIG. 7C（ 続き ）

【図７Ｃ－１７】

抗TNFRSF21マウス抗体の可変領域のヌクレオチド配列

名称	鎖	核酸配列	配列番号
SC39.126	軽鎖	GA^ATCCAGATGACACAGAC^ACATCCTCCCTGTCTGCC^CTCTGGGGGACAGAGTCACCATCAGTTGCAGGGCCAG^CAGGACATTAGCAATTA^^TACACTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAACTGTTAAACTCCTGATC^ACTACACATCAGATTACACTCAGGAGTCCCATCAAGG^^TCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGATTATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAACAAGAAGATATTGCCACTTACTTTGCCAACAGGGTAGAACGCTTCCATTCACGTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATTAAA	252
SC39.126	重鎖	CAGGTTCAGCTGCAGCAGTC^GGACCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGA^ATCCTGCAAGGCTCCTGGC^ATACCTTCACCAGCCAC^GGATGCAGTGGGTAAGACAGAGGCCTGGACAGGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTTTTCCTGGAAG^GGTAGTACTTATTATAA^GAGAGGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGTAGACACATCCTCCAGCACAGCCTACA^GCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGAC^CTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAGACTATAGGTACGGCGACGCCTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA	254
SC39.136	軽鎖	GACATCCAGATGACCCAGTC^CCATCCTCCTTATCTGCC^CTCTGGGAGAAAGAATCAGTCTCACTTGCCGGGCAAG^CAGGATATTAGTAATCAC^^TAACATGGTTTCAGCAGAAACCAGATGGAACTTTTAGACGCCTGATC^A^GCCACATCCACTTTAGA^TCTGGTGTCCCCAAAAGG^TCAGTGGCAGTAGGTCCGGGTCAGATTATTCTCTCACCATCAGCAGACTTGAGTC^GAAGATTTTGCAGACTATTACTGTCTACAG^ATGCTAGTTATCCGTGGACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA	256
SC39.136	重鎖	CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGTCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCA^CACTTGCACTGTCTCTGGG^TTTCATTAACCAGCTATGATGTACACTGGGTTCGCCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGGTAATATGGGCTGGTGGAAGCACAAATTGTAATTCAGCTCTCATGTCCAGACTGAGCATCAGCAAGGACAACTCCAAGAAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAAGCAG^CTGCAAACTGATGACACAGCCATGTACTACTGTGCCATTCTAAGCCTCACGAGAATTGTTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA	258
SC39.148	軽鎖	GA^ATCCAGATGACACAGAC^ACATCCTCCCTGTCTGCC^CTCTGGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCAGGGCCAG^CAGGACATTAGCAATTCT^^TAAACTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAACTGTTAAACTCCTGATC^ACTACACATCAAGATTACACTCAGGAGTCCCACCAAGG^TCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGATTATTCTCTCACCATTAGCAACCTGGAGCAAGAAGATATTGGCACTTACTTTTGCCAACAGGGTAGAACGCTTCCATTCACGTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATCAAA	260
SC39.148	重鎖	CAGGTCCAACTACAGCAGCC^GGGGCTGAACTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGG^GTCCTGCAAGGCTTCTGGC^ACACCTTCACCAGTTAT^GGATGCACTGGGTGAGGCAGAGGCCTGGCCAAGGCCTTGAGTGGATTGGAAGGATTCATCCCTTCTGA^ACTAATACTAACTACAA^CAAAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACA^GCACCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGAC^CTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAGGGGACTGGGACCTTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTC^GGTCACTGTCTCTGCA	262

FIG. 7C（ 続き ）

【図７Ｃ－１５】

抗TNFRSF21マウス抗体の可変領域のヌクレオチド配列

名称	鎖	核酸配列	配列番号
SC39.182	軽鎖	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCTTATCTGCCTCTCTGGGAGAAAGAATCAGTCTCACTTGCCGGGCAAGTCAGGATATTAGTAATTACTTAATCTGGTTTCAGCAGAAACCAGATGGAACTTTTAAACGCCTGATCTATGCCACATCCAGTTTAGATTCTGGTGTCCCCAAAAGGTTCAGTGGCAGTAGGTCTGGGTCAGATTATTCTCTCACCATCAGCAGCCTTGAGTCTGAAGATTTTGCAGACTATTACTGTCTACAATATGCTAGCTATCCGTGGACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA	228
SC39.182	重鎖	CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGTCCTGGTGGCGCCCTCACAGAGCCTGTCCATCACTTGCACTGTCTCTGGGTTTTCATTAACCAGCTATGATATACACTGGGTTCGCCAGCCTCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGGAGGTAATATGGGCTGGTGGAAGCACAAATTATAGTTCAGCTCTCATGTCCAGACTGAGCATCAGCAAAGACAACTCCAAGAAGCCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTGCAAACTGATGACACAGCCATGTACTACTGTGCCATTCTAAGCCTCACGAGAATTGTTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA	230
SC39.186	軽鎖	GAAAATGTGCTCACCCAGTCTCCAGCAATAATGGCTGCCTCTCTGGGCCAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTCCAGTTCCTTGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCGCTTCCCCCAAACCTTGATTCATGGGACATCCAACTGGCTTCTGGAGTCCCAACTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCACCAGCGTGGAGGCTGAAGATGATGCAACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTTACCATACACGTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA	232
SC39.186	重鎖	GAGGTTCAGTTCCAGCAGTCTGGGACTGTGCTGGCAAGGCCTGGGGCTTCCGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACAGCTTTACCAGCTACTGGATGCACTGGATAAAACAGAGGCCTGGACAGGGTCTAGAATGGATTGGTGCTATTTATGCTGGAAATAGTGATACCGGTTACAACCAGAAGTTCGAGGGCAAGGCCAAACTGACTGCTGTCACATCCGCCACCACTGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTACAAGACAGAACTCCCACGACGCCTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA	234
SC39.188	軽鎖	AGTATTGTGATGACCCAGACTCCCAAATTCCTGCCTGTAACAGCAGAAGACAGGGTTACCATAACCTGCAAGGCCAGTCAGAGTGTGAGTAGTGAAGTAGCTTGGTACCAACAGAAGCCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGATATACTATGCATCCAATCGCTACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACTGGCAGTGGATCTGGCACGGATTTCACTTTCACCATCACCAGTGTGCAGGTTGAAGACCTGGCAGTTTATTTCTGTCAGCAGCATTATAGCTCTCCGTACACGTTCGGAGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA	236
SC39.188	重鎖	CAGGTCCAGTTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGTAAGGCCTGGGACTTCAGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCTGGAAACGCCTTCACTAAGTACTTGATAGAGTGGGTAAAGCAGAGGCCTGGACAGGGCCTTGAGTGGATTGGGCTGATTAATCCTGGAAATGGTGGAACTAATTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCAACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACTGCCTACATACAACTCAGCAGCCTGACATCTGATGACTCTGCGATCTATTTCTGTGCAAGAAGGGGACTGGGACCTTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA	238

FIG. 7C（ 続き ）

【図７Ｆ－１】

抗TNFRSF21ヒト化の完全長アミノ酸配列

名称	鎖	完全配列	配列番号
hSC39.2	軽鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNVG~SVAWYQQKPGKVPKALLYSASYRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQQYNSYPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	300
hSC39.2	重鎖	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQRLEWMGMIDPSDSE~HYNQMFKDRVTITRDTSASTAYMELSSLRSED~AVYYCANYGSSWFAYWGQGTLVTVSSAS~KGPSVFPLAPSSKSTSGG~AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG~QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	301
hSC39.4	軽鎖	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCHASQNINVWLSWYQQKPGQPPKLLIYKASNLHTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQGQSYPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	302
hSC39.4	重鎖	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQAPGKGLELVSIINSHGGS~YYPDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAED~AVYYCVRDLLWLRYYTMDYWGQGTLV~VSSASTKGPSVFPLAPSSKS~SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK~HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	303
hSC39.28	軽鎖	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRKSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSYPYTFGGGTKVEJKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	304
hSC39.28	重鎖	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSAYAMSWVRQAPGKGLEWVSSISSGGSIYYLDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGDYGSSYGAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK~HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD~LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT~PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	305

FIG. 7F

【図７Ｄ】

抗TNFRSF21ヒト化抗体の軽鎖可変領域アミノ酸配列

名称	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	配列番号
hSC39.2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	KASQNVGTSVA	WYQQKPGKVPKALLY	SASYRFS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYC	QQYNSYPLT	FGQGTKLEIK	281
hSC39.4	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC	HASQNINVWLS	WYQQKPGQPPKLLIY	KASNLHT	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC	QQGQSYPLT	FGQGTKLEIK	285
hSC39.28	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC	KSSQSLLYSSNQKNYLA	WYQQKPGQPPKLLIY	WASTRKS	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYC	QQYYSYPYT	FGGGTKVEIK	289
hSC39.126	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RASQDISNYLH	WYQQKPGKAPKLLIY	YTSRLHS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	QQGRTLPFT	YGQGTKLEIK	293

FIG. 7D

抗TNFRSF21ヒト化抗体の重鎖可変領域アミノ酸配列

名称	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4	配列番号
hSC39.2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT	SYWMN	WVRQAPGQRLEWMG	MIDPSDSETHYNQMFKD	RVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAN	YGSSWFAY	WGQGTLVTVSS	283
hSC39.4	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	NYGMS	WVRQAPGKGLELVS	IINSHGGSTYYPDSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVR	DLLWLRYYTMDY	WGQGTLVTVSS	287
hSC39.28	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS	AYAMS	WVRQAPGKGLEWVS	SISSGGSIYYLDSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	GDYGSSYGAMDY	WGQGTTVTVSS	291
hSC39.126	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT	SYWMQ	WVRQMPGKGLEWIG	EIFPGSGSTYYNERFKG	QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTANYYCAR	DYRYGDAYYAMDY	WGQGTTVTVSS	295

FIG. 7E

【図７Ｆ－２】

抗TNFRSF21ヒト化の完全長アミノ酸配列

名称	鎖	完全配列	配列番号
hSC39.126	軽鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLHWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA~YYCQQGRTLPFTYGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	306
hSC39.126	重鎖	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSHWMQWVRQMPGKGLEWIGEIFPGSGS~YYNERFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTANYYCARDYRYGDAYYAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK~HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	307
hSC39.126ss1	軽鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLHWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA~YYCQQGRTLPFTYGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	308
hSC39.126ss1	重鎖	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSHWMQWVRQMPGKGLEWIGEIFPGSGS~YYNERFKGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTANYYCARDYRYGDAYYAMDYWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDK~HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA?IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	309
hSC39.4ss1	軽鎖	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCHASQNINVWLSWYQQKPGQPPKLLIYKASNLHTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQGQSYPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	310
hSC39.4ss1	重鎖	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQAPGKGLELVSIINSHGGS~YYPDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRDLLWLRYYTMDYWGQGTLVTVSSAST~KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV~VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR~PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	311

FIG. 7F（ 続き ）

【図７Ｅ】

抗TNFRSF21ヒト化抗体の可変領域ヌクレオチド配列

名称	鎖	核酸配列	配列番号
hSC39.2	軽鎖	GATA~ACAGATGACCCAGAGTCCTTCTAGCC~GAGTGCCAGCGTGGGTGACCGAGTAACAATCACCTGCAAGGCCAGCCAGAA~G~GGGCACCTCTGTCGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGGAAAAGTCCCTAAGGCACTGCTATATAG~GCCAGCTATCGGTTTTCAGGCG~TCCAAGTAGATTCTCAGGTTCCGGCTCTGGCACTGACTTCACCCTGACCATCAGTAGTCTGCAGCCTGAGGACGTGGCAACCTATTATTGTCAGCAGTACAATCTTCCTACCCTCTGACCT~CGGGCAGGGCACTAAGCTCGAAATTAAG	280
hSC39.2	重鎖	CAGG~TCAACTGGTGCAGTCAGGTGCAGAGG~GAAGAAACCAGGAGCTTCTG~GAAAG~CTCATGCAAAGCTTCAGGCTACAC~T~CACCTCATATTGGATGAA~TGGGTACGCCAGGCCCCAGGCCAGCGGCTGGAATGGATGGGGATGA~CGACCCTTCCGATAGCGAAACCCA~TATAATCAGATGTTTAAGGATAGAGTCACCATTACCCGGATACCTCAGCTAGCACCGCATATATGGAGCTGTCT~CTCTGAGGTCTGAGGA~ACCGCTG~CTATTACTGTGCTAAT~A~GGGAGCTCATGGTTCGCATATTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACTGTATCCAGT	282
hSC39.4	軽鎖	GACA~TGT~ATGACTCAATCCCCAGACTC~C~CGCAG~CAGTTTGGGAGAGCGCGCCACCATAAACTGCCACGCCAGTCAGAACA~CAATGTGTGGCTGTCATGGTATCAACAAAAACCTGGTCAGCCACCCAAATTGCTTATCTATAAAGCC~CTAATCTCCACACTGGAG~CCC~GATAGATTCTCCGGGTCGGGGAGTGGGACTGACTTCACCTTGACTAT~TCTAGCCTGCAGGCAGAAGATGT~GCTGTATATTACTGCCAGCAGGGCCAGTCTTACCCATTGACAT~TGG~CAAGGGACCAAGTTGGAAATTAAG	284
hSC39.4	重鎖	GAGG~GCAGCTCGTAGAATCCGGAGGCGGAC~TGTGCAACCAGGCGGAAGTT~GCGAC~CTCCTGTGCTGCCAGTGGCTTTACAT~TAGTAACTACGGTATGAGCTGGGTGAGACAAGCACCAGGAAAGGGACTGGAGCTGGTGTCTAT~A~CAACAGCCACGGTGGATCTACT~A~TACCCAGACTCAGTCAAGGGTAGA~TCACCATATCACGGGACAATGCAAAAAACTCACTGTATTTGCAAATGAATAGCCTGAGGGCCGAGGA~ACCGCAG~GTATTACTGCGTCAGAGACC~GCTGTGGCTGAGATACTATACCATGGATTACTGGGGCACAGGGTACCC~GGTGACCGTGAGCAGC	286
hSC39.28	軽鎖	GATA~TGTCATGACACAGAGCCCTGATTCAC~TGCAG~TAGCCTGGGCGAAAGAGCCACCATCAACTGTAAATCATCTCAG~C~C~GCTTTACTCATCTAATCAGAAGAATTACTTGGCTTGGTACCAGCAAAGCCTGGACAGCCCTCCCAAACTTC~GATCTACTGGGCTAGTACACGGAAAAGCGGAGTGCCTGATCGG~TCTCTGGATCTGGAAGCGGCACAGAC~TCACTCTGACTATTAGTAGCCTCCAGGCCGAGGACGTCGC~G~T~ATTACTGCCAGCAATATTAC~CCTACCCCTATACTTTGGGGGAGGGACCAAGGTGGAAATCAAG	288
hSC39.28	重鎖	GAGG~GCAGCTTGTGGAATCTGGTGGTGGAC~GGTAAAGCCCGGCGGATCCC~GCGAC~GAGCTGTGCAGCCTCCGGCTTTACCT~TTCTGCCTATGCTATGAGCTGGGTTCGGCAAGCCCCAAGGTAAAGCCTCGAATGGGTATCAAGCA~A~CAAGTGGCGGAAGTAGCATTTAC~ACC~GGATTCCGTTAAGGGCCGTTTTACCA~CAGTCGCGACAATGCTAAGAAC~CTCTGTACCTCCAGA~GAACTCACTCCGCGCAGAAGACAC~GCAGTGTATTACTGCGCCAGGGGAGA~TACGGATCTAGTTATGGCGCTATGGA~TACTGGGGACAGGGCACCACCG~GACTGTGAGCAGC	290
hSC39.126	軽鎖	GACA~ACAGATGACTCAGAGCCCTTCTTCAC~G~CAGCTTCCGTGGGAGAACCGCGTAACTATAACCTGTCGGGCCAGTCAAGACA~TAGTAACTATCTCCACTGGTATCAACAAAAGCCGGTAAAGC~CCAAAACTCCTTATATACTACACCAGCCGCCTTCACTCTGGTG~ACCATCTCGTTTCTCAGGAAGTGGAAGCGGAACTGACTTTACACTCACAATATCAAGCCTGCAGCCAGAAGAT~TCGCTACATATTACTGTCAACAGGGTCGTACCCTTCCTTTTACCTACGGCCAGGGTACAAAACTGGAGATAAAG	292
hSC39.126	重鎖	GAGG~ACAACTGGTTCAATCTGGTGCTGAAG~TAAGAAGCCAGGGGASAGTC~CAAGA~AAGTTGCAAGGGCAGTGGCTATAGCT~TACATCACACTGGATGCAGTGGGTAAGACAAATGCCTGGGAAGGGC~TGGAGTGGATCGGCGAGA~C~TCCCAGGATCAGGCAGTACT~ACTATAATGAACGGTTCAAGGGCCAAGTCACTATTAGCGCTGATAAGTC~A~CAGTACCGCCTATCTGCAG~GGAGTAGCTTGAAAGCCTCAGACACAGCCA~GTACTACTGCGCTAGGGA~TATAGATATGGAGATGCTTATTATGCAA~GGATTACTGGGGGCAAGGGACAACCGTCACAGTCAGTAGC	294

FIG. 7E

【図７Ｇ】

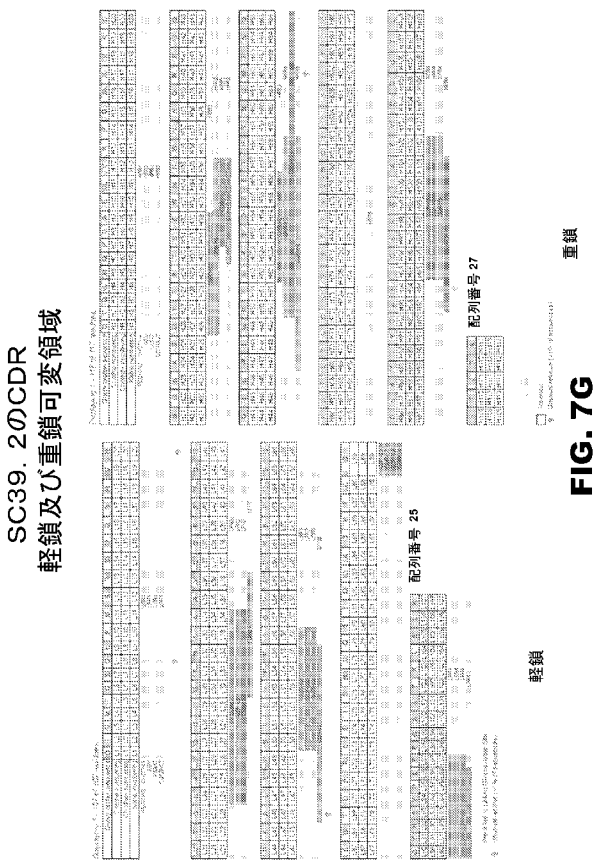


FIG. 7G

【図７Ｈ】

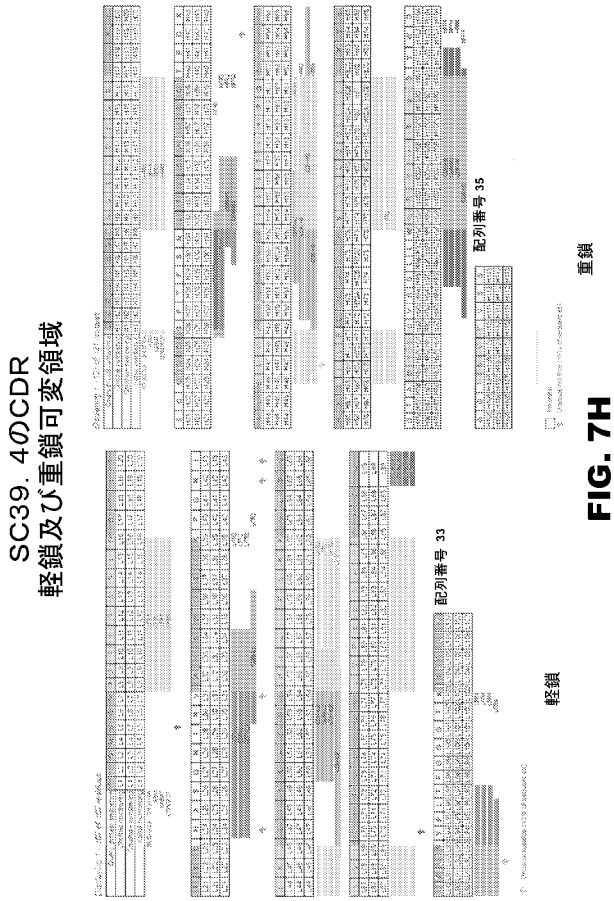


FIG. 7H

【図７Ｉ】

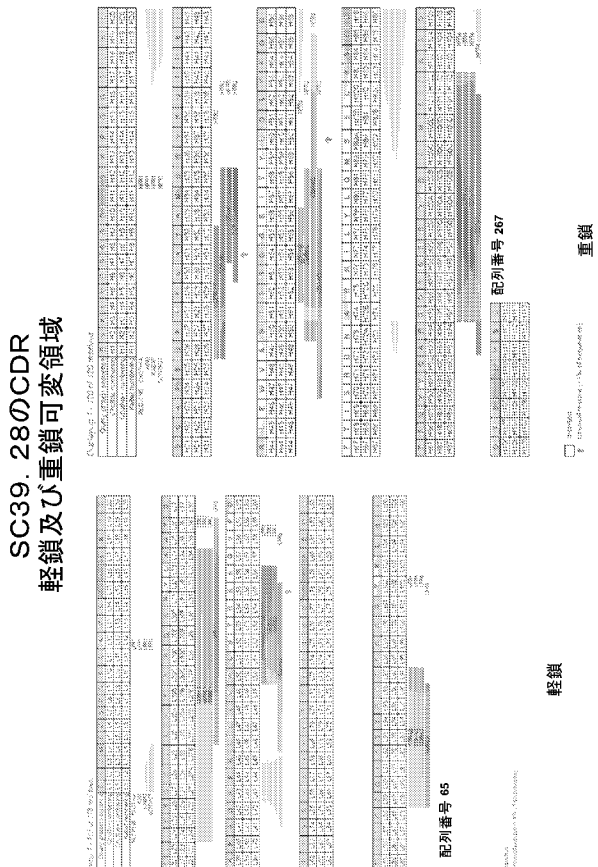


FIG. 7I

【図７Ｊ】

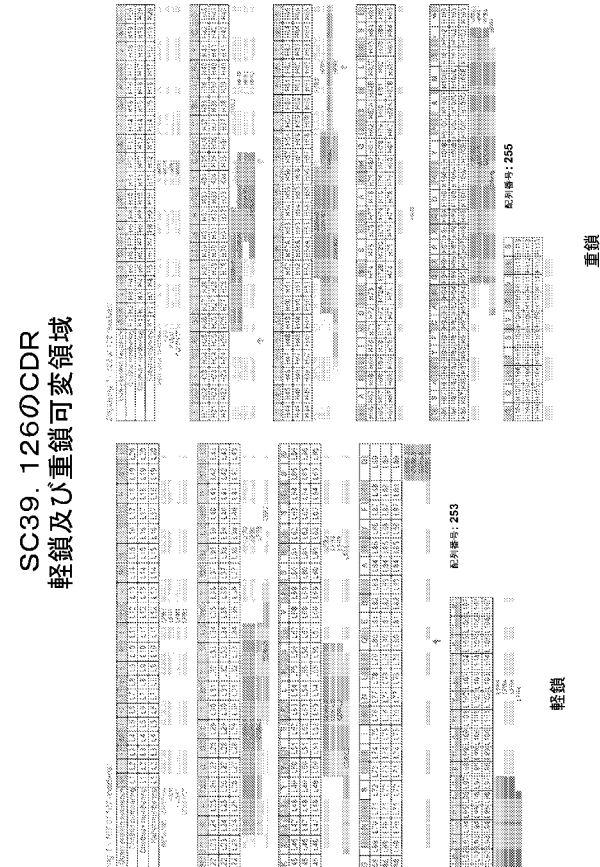


FIG. 7J

【図８Ａ】

例示的なTNFRSF21抗体のドメインマッピング

D1 (aa 42-89)	D2 (aa 90-132)	D4 (aa 169-211)	D5 (aa 212-349)	D1-D4 (aa 42-211)	D1-D3 (aa 42-168)	D2-D3 (aa 90-168)	D3-D4 (aa 133-211)
SC39.4	SC39.104	SC39.111	SC39.102	SC39.150	SC39.28	SC39.151	SC39.2
SC39.105	SC39.123	SC39.120	SC39.121		SC39.101	SC39.163	SC39.39
SC39.110	SC39.144	SC39.130	SC39.124		SC39.103	SC39.173	SC39.106
SC39.118	SC39.172	SC39.141	SC39.133		SC39.113		SC39.114
SC39.119	SC39.187	SC39.167	SC39.135		SC39.115		SC39.132
SC39.122			SC39.139		SC39.117		SC39.138
SC39.128			SC39.140		SC39.125		SC39.152
SC39.129			SC39.146		SC39.134		
SC39.126			SC39.155		SC39.147		
SC39.136			SC39.158		SC39.148		
SC39.153			SC39.159		SC39.165		
SC39.154			SC39.193		SC39.169		
SC39.161					SC39.174		
SC39.162					SC39.176		
SC39.164					SC39.186		
SC39.168					SC39.195		
SC39.170							
SC39.171							
SC39.182							
SC39.183							
SC39.185							

FIG. 8A

【図８Ｂ】

抗TNFRSF21の殺傷とドメイン結合との間の相関関係

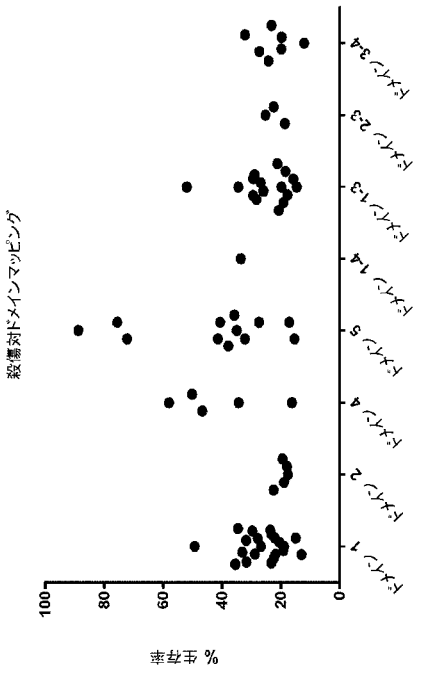


FIG. 8B

【図９】

PDX腫瘍細胞株におけるTNFRSF21タンパク質発現

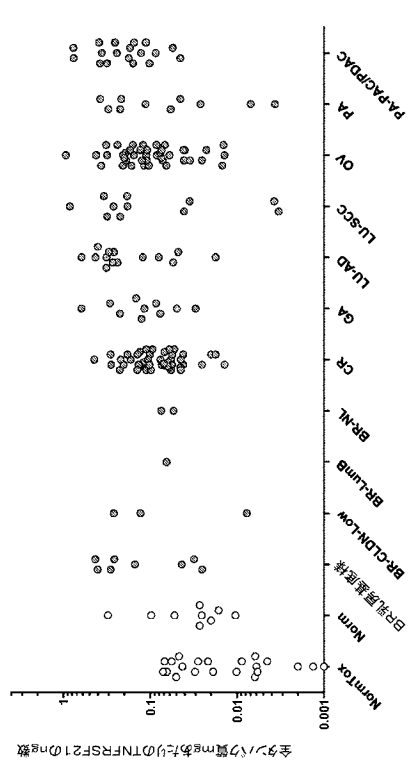
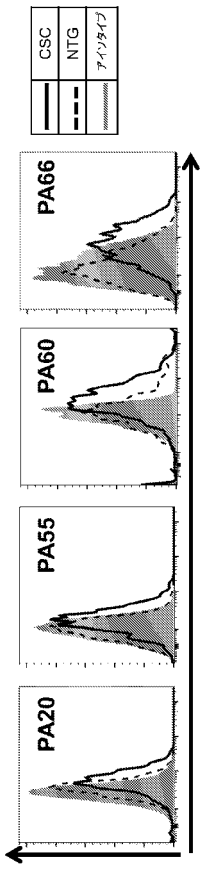


FIG. 9

【図１０Ａ】

抗TNFRSF21抗体は、膵臓のPDX腫瘍細胞上のTNFRSF21タンパク質の表面発現を検出する



PDX 株	ΔMFI NTG	ΔMFI CSC
PA20	31	84
PA55	3	790
PA60	38	148
PA66	83	532

FIG. 10A

【図１０Ｂ】

抗TNFRSF21抗体は、膀胱のPDX腫瘍細胞上のTNFRSF21タンパク質の表面発現を検出する

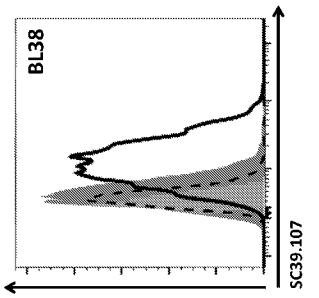


FIG. 10B

【図１１Ａ】

抗TNFRSF21マウス抗体はTNFRSF21タンパク質を発現する細胞を殺傷する

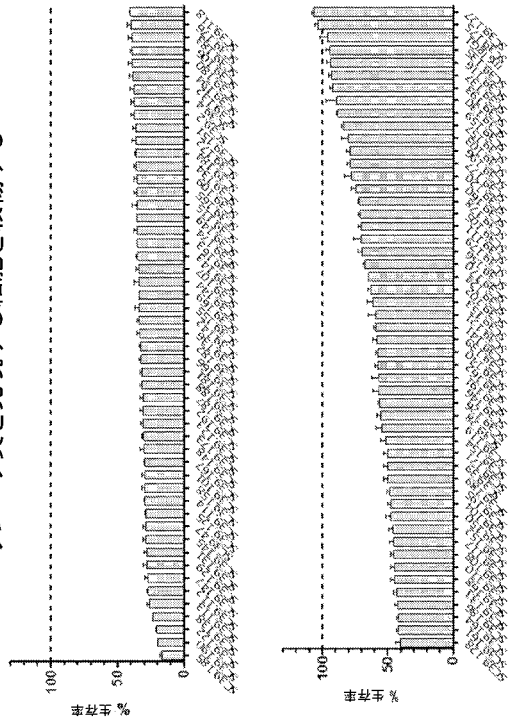


FIG. 11A

【図１１Ｂ】

抗TNFRSF21ヒト化抗体はTNFRSF21を発現する細胞を濃度依存的に殺傷する

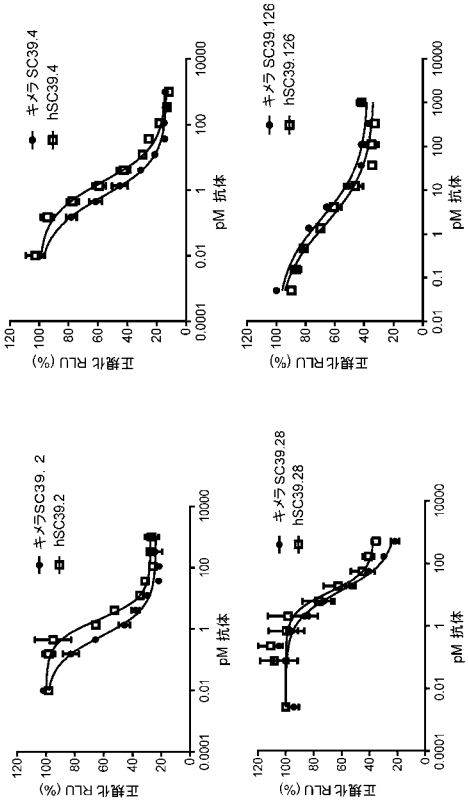


FIG. 11B

【図１２Ａ】

抗TNFRSF21 MMAE ADCはTNFRSF21を発現する細胞を濃度依存的に殺傷する

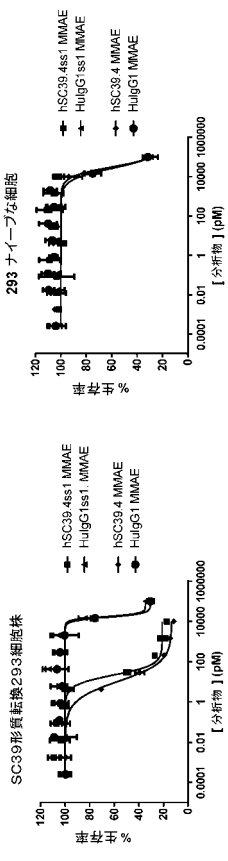


FIG. 12A

【図１２Ｂ】

抗TNFRSF21 MMAE ADCはTNFRSF21
を発現する細胞を濃度依存的に殺傷する

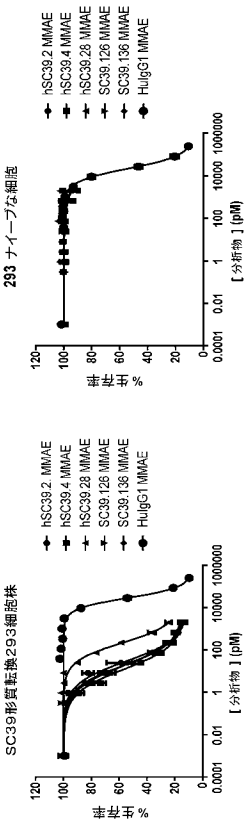


FIG. 12B

【図１２Ｃ】

抗TNFRSF21ドラスタチンADCはTNFRSF21
を発現する細胞を濃度依存的に殺傷する

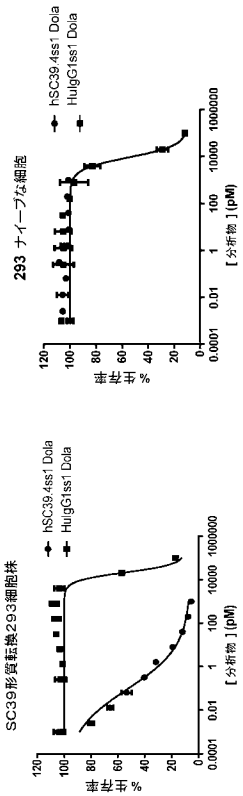


FIG. 12C

【図１２Ｄ】

抗TNFRSF21カリケアマイシンADCはTNFRSF21
を発現する細胞を濃度依存的に殺傷する

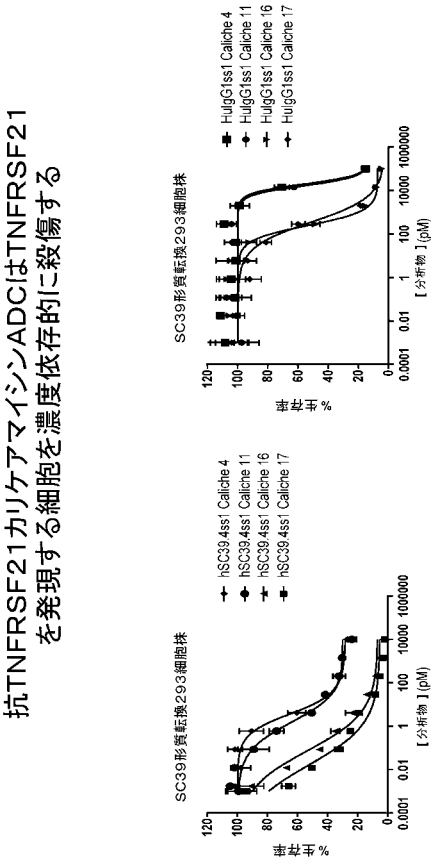


FIG. 12D

【図１３Ａ】

ヒト化TNFRSF21 ADCモジュレーターはインビボで
PDX腫瘍細胞の成長を抑制する

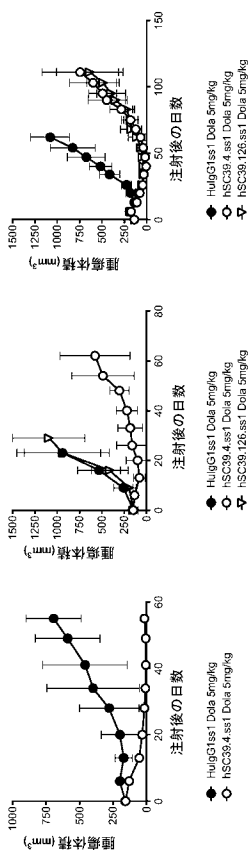


FIG. 13A FIG. 13B FIG. 13C

【図１３Ｂ】

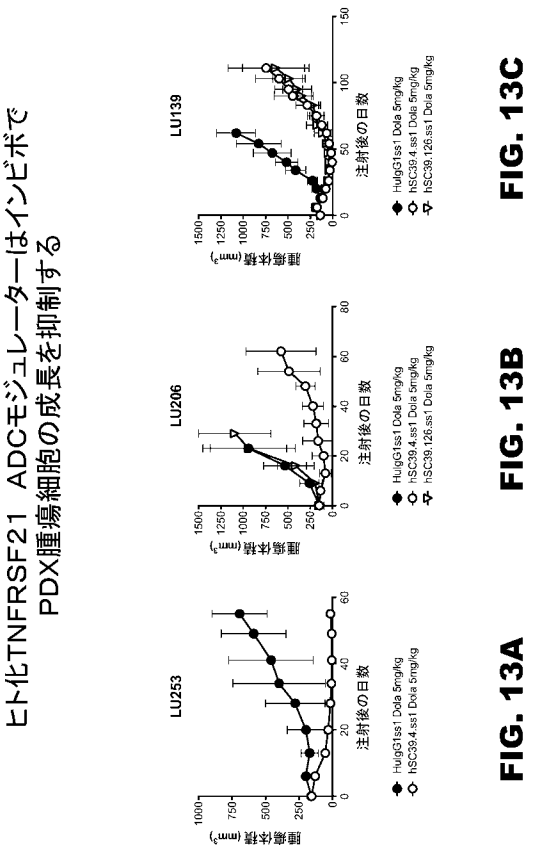


FIG. 13A FIG. 13B FIG. 13C

【図１３Ｃ】

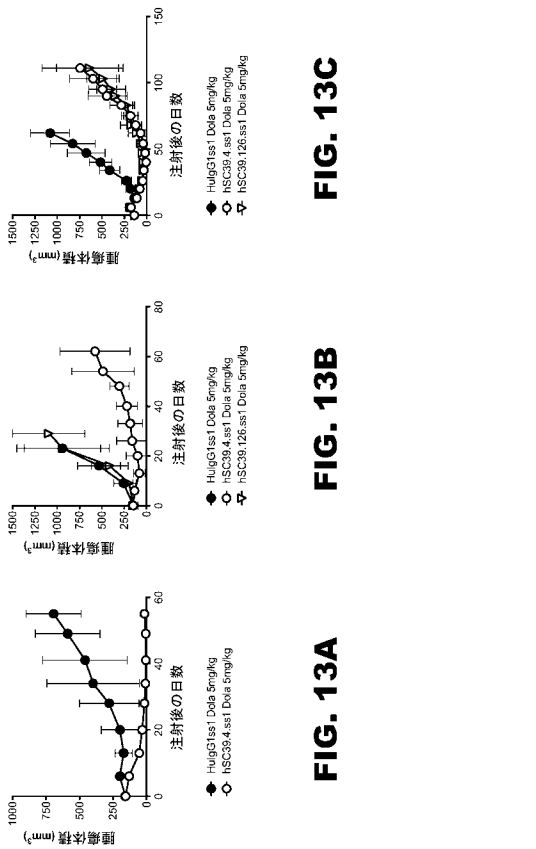


FIG. 13A FIG. 13B FIG. 13C

【図１３Ｄ】

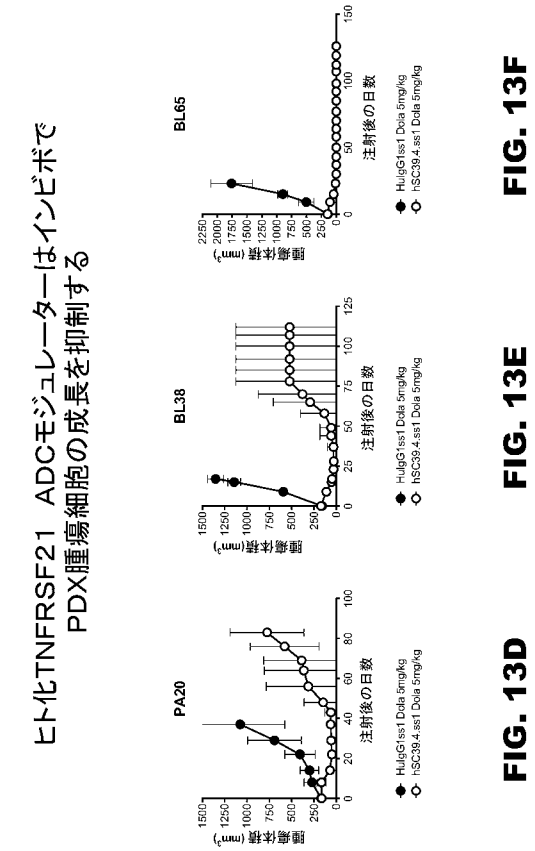


FIG. 13D FIG. 13E FIG. 13F

【図１３Ｅ】

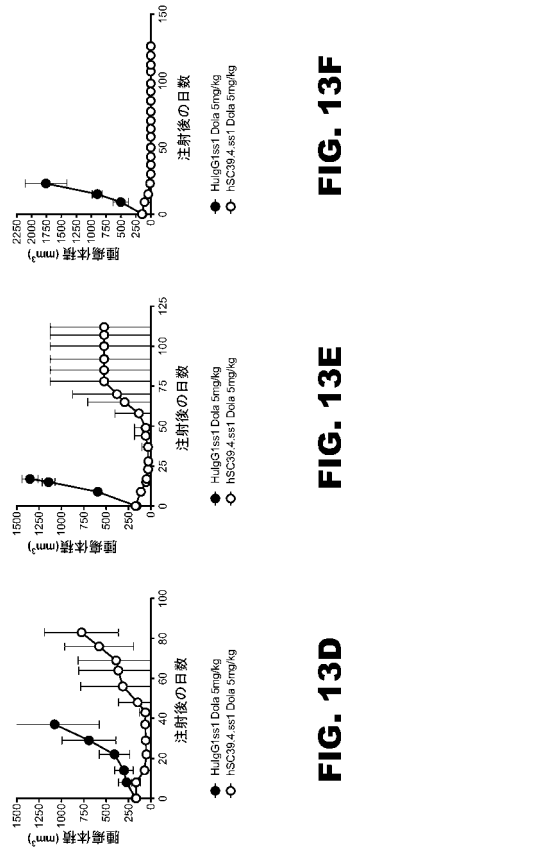


FIG. 13D FIG. 13E FIG. 13F

【図１３Ｆ】

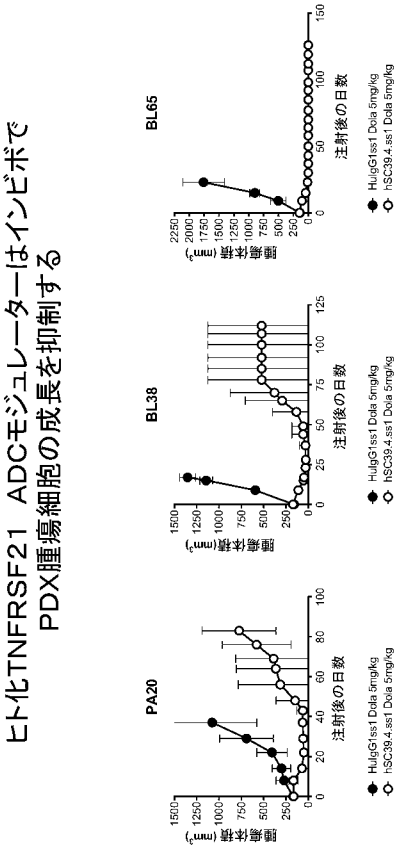


FIG. 13D FIG. 13E FIG. 13F

【図１３Ｇ】

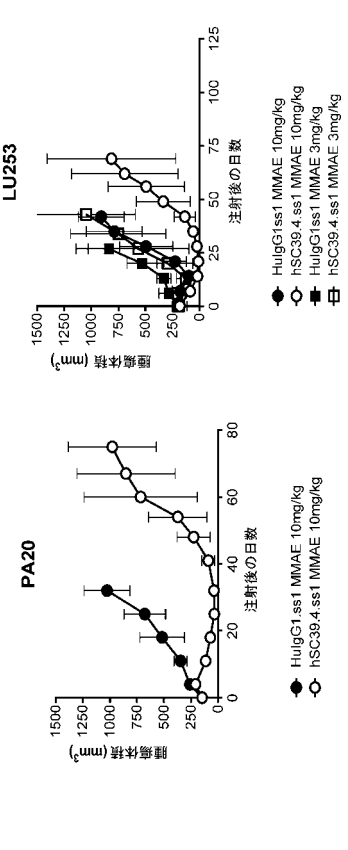


FIG. 13G FIG. 13H

【図１３Ｈ】

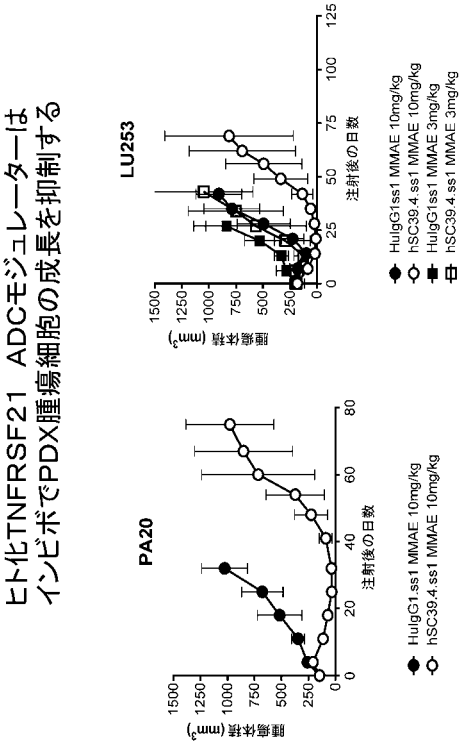


FIG. 13G FIG. 13H

【図１３Ｉ】

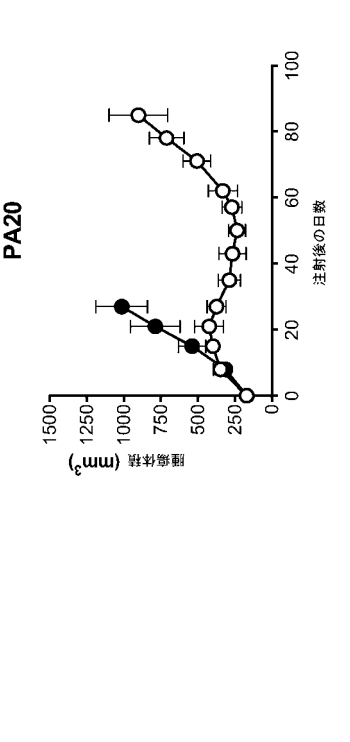


FIG. 13I

【配列表】
2019525727000001.app

【国際調査報告】

PCT/US2017/031442 27.09.2017

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US17/31442

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC - C07K 16/18, 16/28, 16/30; C12N 15/13; C12P 21/08; A61K 39/395 (2017.01)
CPC - C07K 16/18, 16/28, 16/2878, 16/30; A61K 39/395, 39/39533, 39/39558

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
See Search History document

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X -- Y	US 2008/0064049 A1 (CLARKE et al.) 13 March 2008; paragraphs [0067], [0153], [0242], [0255], [0286]-[0289]	1, 4/1, 14-15, 35, 40-41 ---------- 4/2, 17-18, 42, 43/40-42, 44/40-42
X -- Y -- A	US 2010/0203044 A1 (NIKOLAEV et al.) 12 August 2010; paragraphs [0021], [0109]; SEQ ID NO: 1	2 -- 4/2 -- 3, 4/3
Y	US 2012/0128663 A1 (LAZAR) 24 May 2012; paragraphs [0101]-[0103], [0106], [0115], [0122], [0153]	17-18, 43/40-42, 44/40-42
Y	WO 2015/123265 A1 (SEATTLE GENETICS, INC.) 20 August, 2015; paragraphs [0002]-[0004], [0014]	42, 43/42, 44/42
A	US 2006/0233788 A1 (HEIMAN et al.) 19 October, 2006; paragraphs [0019], [0029]; SEQ ID NO: 3	3, 4/3
A	US 2007/0264260 A1 (TUSCANO et al.) 15 November, 2007; paragraphs [0013], [0017], [0019]; SEQ ID NO: 29	3, 4/3
A	US 2013/0058947 A1 (STULL et al.) 7 March, 2013; paragraph [0011]; SEQ ID NO: 41	3, 4/3

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

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
18 September 2017 (18.09.2017)	27 SEP 2017
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US17/31442

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. ☒ forming part of the international application as filed:

      ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

      ☐ on paper or in the form of an image file.

   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).

      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US17/31442

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 5-13, 16, 19-34, 36-39, 45
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

-***-Continued Within the Next Supplemental Box-***-

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1, 2, 3 (in-part), 4 (in-part), 14, 15, 17, 18, 35 and 40-44

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/US17/31442

-***-Continued from Box No. III Observations where unity of invention is lacking-***-

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Groups I+, Claims 1-4, 14, 15, 17, 18, 35, 40-44 and SEQ ID NOs: 21 and 23 are directed toward an isolated antibody that binds to human TNFRSF21, comprising SEQ ID NO: 1, on tumor initiating cells expressing TNFRSF21; an antibody-drug conjugate comprising the antibody; and method of producing the conjugate.

The antibody, conjugate and method will be searched to the extent they comprise a light chain variable region encompassing SEQ ID NO: 21 (first exemplary VL) and a heavy chain variable region encompassing SEQ ID NO: 23 (first exemplary VH). Applicant is invited to elect additional antibody(ies), with specified pair(s) of VL and VH sequence(s), with specified SEQ ID NO: for each, to be searched. Additional antibody VL and VH sequence(s) will be searched upon the payment of additional fees. It is believed that claims 1, 2, 3 (in-part), 4 (in-part), 14, 15, 17, 18, 35 and 40-44 encompass this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they encompass SEQ ID NO: 21 (VL) and SEQ ID NO: 23 (VH). Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined. An exemplary election would be an antibody comprising a VL encompassing SEQ ID NO: 25 (first exemplary elected VL sequence) and a VH encompassing SEQ ID NO: 27 (first exemplary VH sequence).

No technical features are shared between the antibody VL and/or VH sequences of Groups I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Groups I+ share the technical features including: an isolated antibody that binds to human TNFRSF21, comprising SEQ ID NO: 1, on tumor initiating cells expressing TNFRSF21, wherein the antibody comprises or competes for binding with an antibody comprising: a light chain variable region (VL) and a heavy chain variable region; an ADC of the formula Ab-[L-D]n or a pharmaceutically acceptable salt thereof wherein: a) Ab comprises an anti-TNFRSF21 antibody; b) L comprises an optional linker; c) D comprises a drug; and d) n is an integer from about 1 to about 20; and a method of producing an ADC, comprising the step of conjugating an anti-TNFRSF21 antibody (Ab) with a drug (D).

However, these shared technical features are previously disclosed by US 2010/0203044 A1 to Nikolaev et al. (hereinafter 'Nikolaev') in view of WO 2015/138698 A1 to Temple University-of the Commonwealth System of Higher Education (hereinafter 'Temple').

Nikolaev discloses an isolated antibody that binds to human TNFRSF21 (an isolated antibody that binds to human DR6 (TNFRSF21); paragraphs [0011], [0027]), comprising SEQ ID NO: 1 (comprising SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 1); paragraph [0027], wherein SEQ ID NO: 1 is 100% identical to Applicants' SEQ ID NO: 1), wherein the antibody comprises or competes for binding with an antibody comprising: a light chain variable region (VL) (wherein the antibody comprises or competes for binding with an antibody comprising: a light chain variable region (VL); paragraph [0021]) and a heavy chain variable region (and a heavy chain variable region; paragraph [0021]); an ADC of the formula Ab-[L-D]n (an immunoconjugate comprising an antibody conjugated to a cytotoxic agent (an ADC of the formula Ab-[L-D]n); paragraph [0091]) wherein: a) Ab comprises an anti-TNFRSF21 antibody (wherein: a) Ab comprises an anti-DR6 (TNFRSF21) antibody; paragraph [0011]); c) D comprises a drug; and d) n is an integer from about 1 to about 20 (conjugated to a cytotoxic agent (c) D comprises a drug; and d) n is an integer from about 1 to about 20); paragraph [0091]); and a method of producing an ADC, comprising the step of conjugating an anti-TNFRSF21 antibody (Ab) with a drug (D) (generating an immunoconjugate by conjugating or fusing the anti-DR6 antibody to a cytotoxic agent (a method of producing an ADC, comprising the step of conjugating an anti-TNFRSF21 antibody (Ab) with a drug (D)); paragraphs [0011], [0091]).

Nikolaev does not disclose: on tumor initiating cells expressing TNFRSF21.

Temple discloses a method for inducing differentiation of tumor-initiating cells comprising administering a DR-6 antibody to tumor-derived stem cells (a method for inducing differentiation of tumor-derived stem cells (tumor-initiating cells) comprising administering a DR-6 antibody (agonist) to tumor-derived stem cells; page 3, lines 15-16; page 29, lines 7-12)

It would have been obvious to a person of ordinary skill in the art at the time of the invention was made to have modified the disclosure of Nikolaev to have used the antibodies disclosed by Nikolaev to bind a TNFRSF21 (DR6) molecule on cancer-initiating cells, such as cancer stem cells, as disclosed by Temple, in order to enable the detection of the receptor protein on the cells as a part of detection and/or treatment or prevention of cancer.

Since none of the special technical features of the Groups I+ inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by a combination of the Nikolaev and Temple references, unity of invention is lacking.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI				テーマコード（参考）
C12N	*1/19*	*(2006.01)*	C12N	1/19			4H045
C12N	*1/21*	*(2006.01)*	C12N	1/21			
C12N	*5/10*	*(2006.01)*	C12N	5/10			
C07K	*19/00*	*(2006.01)*	C07K	19/00			
C12N	*5/095*	*(2010.01)*	C12N	5/095			
C07K	*5/103*	*(2006.01)*	C07K	5/103			
A61K	*47/68*	*(2017.01)*	A61K	47/68			
A61P	*35/00*	*(2006.01)*	A61P	35/00			
A61P	*35/02*	*(2006.01)*	A61P	35/02			
A61P	*13/10*	*(2006.01)*	A61P	13/10			
A61P	*11/00*	*(2006.01)*	A61P	11/00			
A61P	*43/00*	*(2006.01)*	A61P	43/00	121		
A61P	*1/18*	*(2006.01)*	A61P	1/18			
A61K	*31/537*	*(2006.01)*	A61K	31/537			
A61K	*38/07*	*(2006.01)*	A61K	38/07			
A61K	*38/08*	*(2019.01)*	A61K	38/08			
A61K	*31/5517*	*(2006.01)*	A61K	31/5517			
A61K	*31/7036*	*(2006.01)*	A61K	31/7036			
A61K	*38/12*	*(2006.01)*	A61K	38/12			
A61K	*39/395*	*(2006.01)*	A61K	39/395		N	
G01N	*33/53*	*(2006.01)*	A61K	39/395		L	
G01N	*33/574*	*(2006.01)*	G01N	33/53		D	
C07K	*7/06*	*(2006.01)*	G01N	33/574		A	
			C07K	7/06			

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

（特許庁注：以下のものは登録商標）
1．TWEEN
2．Ｃｒｅｍｏｐｈｏｒ

(72)発明者　ロッカム，ディープティ
アメリカ合衆国、カリフォルニア・９４０８７、サニーベール、サージェント・ドライブ・１２２１
(72)発明者　リウ，デイビッド
アメリカ合衆国、カリフォルニア・９４１１２、サン・フランシスコ、サンタ・ローザ・アベニュー・３００、アパートメント・１
(72)発明者　ブーンタンラート，マンディ
アメリカ合衆国、カリフォルニア・９４１１７、サン・フランシスコ、ヘイズ・ストリート・９８４
(72)発明者　バンコービッチ，アレクサンダー・ジョン

アメリカ合衆国、カリフォルニア・９４１０７、サン・フランシスコ、テネシー・ストリート・６３５、ナンバー・２０４
(72)発明者 ビショップ，エバン
アメリカ合衆国、カリフォルニア・９５１２５、サン・ノゼ、ノールウッド・アベニュー・１６３２
(72)発明者 オージェイ，モネット
アメリカ合衆国、カリフォルニア・９４１１０、サン・フランシスコ、ポトレロ・アベニュー・８４０
(72)発明者 ホワン，ジャオ
アメリカ合衆国、カリフォルニア・９４０１０、バーリンゲーム、パーク・ロード・１１７、アパートメント・１０１

Ｆターム(参考) 4B065 AA93X AB01 AC12 AC14 AC20 BA01 BB13 BB19 BC12 CA25
CA44
4C076 AA11 AA22 AA36 AA53 BB01 BB11 CC27 EE59 GG06
4C084 AA01 AA02 AA03 BA16 BA23 BA25 BA32 BA42 MA17 MA23
MA35 MA37 MA52 MA55 MA66 NA14 ZA592 ZA662 ZA812 ZB262
ZB272 ZC751
4C085 AA13 AA14 AA21 AA25 AA26 BB11 CC21 EE01 GG01 GG08
4C086 AA01 AA02 CB11 CB22 EA08 MA17 MA23 MA35 MA37 MA52
MA55 MA66 NA14 ZA59 ZA66 ZA81 ZB26 ZB27 ZC75
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA13 BA40 BA51 BA72 CA40 CA50
DA76 DA83 EA28 FA50 FA74

专利名称(译)	新型抗TNFRSF21抗体及其使用方法		
公开(公告)号	JP2019525727A	公开(公告)日	2019-09-12
申请号	JP2018557321	申请日	2017-05-05
[标]申请(专利权)人(译)	史坦森特瑞斯公司		
申请(专利权)人(译)	亚瑟维·系统烯菊花型·爱蜜·爱蜜·海洋		
[标]发明人	サンダースローラ ロッカムディープティ リウデイビッド ブーンタンラートマンディ オージェイモネット		
发明人	サンダース,ローラ ロッカム,ディープティ リウ,デイビッド ブーンタンラート,マンディ バンコービッチ,アレクサンダー·ジョン ビショップ,エバン オージェイ,モネット ホワン,ジャオ		
IPC分类号	C12N15/13 C07K16/30 C07K16/46 C12N15/63 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K19/00 C12N5/095 C07K5/103 A61K47/68 A61P35/00 A61P35/02 A61P13/10 A61P11/00 A61P43/00 A61P1/18 A61K31/537 A61K38/07 A61K38/08 A61K31/5517 A61K31/7036 A61K38/12 A61K39/395 G01N33/53 G01N33/574 C07K7/06		
CPC分类号	A61K31/351 A61K31/427 A61K47/6803 A61K47/6849 A61K2039/505 A61P35/04 C07K16/2878 C07K2317/24 C07K2317/33 C07K2317/77 G01N33/57484 G01N2333/7151		
FI分类号	C12N15/13.ZNA C07K16/30 C07K16/46 C12N15/63.Z C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K19/00 C12N5/095 C07K5/103 A61K47/68 A61P35/00 A61P35/02 A61P13/10 A61P11/00 A61P43/00.121 A61P1/18 A61K31/537 A61K38/07 A61K38/08 A61K31/5517 A61K31/7036 A61K38/12 A61K39/395.N A61K39/395.L G01N33/53.D G01N33/574.A C07K7/06		
F-TERM分类号	4B065/AA93X 4B065/AB01 4B065/AC12 4B065/AC14 4B065/AC20 4B065/BA01 4B065/BB13 4B065/BB19 4B065/BC12 4B065/CA25 4B065/CA44 4C076/AA11 4C076/AA22 4C076/AA36 4C076/AA53 4C076/BB01 4C076/BB11 4C076/CC27 4C076/EE59 4C076/GG06 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/BA16 4C084/BA23 4C084/BA25 4C084/BA32 4C084/BA42 4C084/MA17 4C084/MA23 4C084/MA35 4C084/MA37 4C084/MA52 4C084/MA55 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA592 4C084/ZA662 4C084/ZA812 4C084/ZB262 4C084/ZB272 4C084/ZC751 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA21 4C085/AA25 4C085/AA26 4C085/BB11 4C085/CC21 4C085/EE01 4C085/GG01 4C085/GG08 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/CB11 4C086/CB22 4C086/EA08 4C086/MA17 4C086/MA23 4C086/MA35 4C086/MA37 4C086/MA52 4C086/MA55 4C086/MA66 4C086/NA14 4C086/ZA59 4C086/ZA66 4C086/ZA81 4C086/ZB26 4C086/ZB27 4C086/ZC75 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA13 4H045/BA40 4H045/BA51 4H045/BA72 4H045/CA40 4H045/CA50 4H045/DA76 4H045/DA83 4H045/EA28 4H045/FA50 4H045/FA74		
优先权	62/332721 2016-05-06 US 62/491897 2017-04-28 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了新颖的抗TNFRSF21抗体和抗体药物结合物以及使用抗TNFRSF21抗体和抗体药物结合物治疗癌症的方法。

(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2019-525727
(P2019-525727A)
(43)公表日　令和1年9月12日(2019.9.12)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/13	(2006.01)	C12N	15/13	ZNA	4B065
C07K 16/30	(2006.01)	C07K	16/30		4C076
C07K 16/46	(2006.01)	C07K	16/46		4C084
C12N 15/63	(2006.01)	C12N	15/63	Z	4C085
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15		4C086

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 159 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2018-557321 (P2018-557321)
(86)(22)出願日　平成29年5月5日 (2017.5.5)
(85)翻訳文提出日　平成30年12月28日 (2018.12.28)
(86)国際出願番号　PCT/US2017/031442
(87)国際公開番号　WO2017/193096
(87)国際公開日　平成29年11月9日 (2017.11.9)
(31)優先権主張番号　62/332,721
(32)優先日　平成28年5月6日 (2016.5.6)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)
(31)優先権主張番号　62/491,897
(32)優先日　平成29年4月28日 (2017.4.28)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)

(71)出願人　516250498
アッヴィ・ステムセントルクス・エル・エル・シー
アメリカ合衆国、イリノイ・６００６４、ノース・シカゴ、ノース・ワウキガン・ロード・１
(74)代理人　110001173
特許業務法人川口國際特許事務所
(72)発明者　サンダース，ローラ
アメリカ合衆国、カリフォルニア・９４１０７、サン・フランシスコ、キング・ストリート・１７０、ユニット・８０９

最終頁に続く

(54)【発明の名称】新規の抗ＴＮＦＲＳＦ２１抗体及び使用方法