

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7169296号

(P7169296)

(45)発行日 令和4年11月10日(2022.11.10)

(24)登録日 令和4年11月1日(2022.11.1)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C 1 2 N 15/13

C 0 7 K 16/28 (2006.01)

C 0 7 K 16/28

Z N A

C 1 2 N 15/63 (2006.01)

C 1 2 N 15/63

C 1 2 N 1/15 (2006.01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 1/21

請求項の数 15 (全58頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-561375(P2019-561375)

(86)(22)出願日 平成30年1月26日(2018.1.26)

(65)公表番号 特表2020-505075(P2020-505075
A)

(43)公表日 令和2年2月20日(2020.2.20)

(86)国際出願番号 PCT/GB2018/050239

(87)国際公開番号 WO2018/138521

(87)国際公開日 平成30年8月2日(2018.8.2)

審査請求日 令和3年1月25日(2021.1.25)

(31)優先権主張番号 1701351.7

(32)優先日 平成29年1月27日(2017.1.27)

(33)優先権主張国・地域又は機関

英国(GB)

(31)優先権主張番号 1713296.0

(32)優先日 平成29年8月18日(2017.8.18)

最終頁に続く

(73)特許権者 519275799

ウルトラヒューマン ワン リミティド
イギリス国, ケント シーティー 1 3 9
エフエフ, サンドウィッチ, ラムスゲイ
ト ロード, イノベーション ハウス, シ
ーノオー クレストン リープス リミテ
イド ライアビリティ パートナーシップ

(74)代理人 100099759

弁理士 青木 篤

(74)代理人 100123582

弁理士 三橋 真二

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100141977

弁理士 中島 勝

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 結合剤

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) アミノ酸配列 G F S L S T S G Y G V G (配列番号29)(H C D R 1)、L A H I W W D D D K Y Y V D S V K G (配列番号26)(H C D R 2)、T R Q Y F P F A Y (配列番号31)(H C D R 3)、R A S Q S V G S N L A (配列番号32)(L C D R 1)、S A S Y R Y T (配列番号33)(L C D R 2)及び Q Q Y S T D P L T (配列番号34)(L C D R 3) [クローンD __ A 6];又は

(b) アミノ酸配列 G F S L S T F G Y G V G (配列番号35)(H C D R 1)、L A H I W W D D D K Y Y V D S V K G (配列番号26)(H C D R 2)、T R Q Y F P F A Y (配列番号31)(H C D R 3)、R A S Q S V G T N L A (配列番号36)(L C D R 1)、Y A S Y R Y T (配列番号37)(L C D R 2)及び Q Q Y S N D P L T (配列番号38)(L C D R 3) [クローンG __ G 1 0];又は

(c) アミノ酸配列 G F S L S T S G Y G V G (配列番号29)(H C D R 1)、L A H I W W D D D K Y Y V D S V K G (配列番号26)(H C D R 2)、T R L Y F P F A Y (配列番号39)(H C D R 3)、R A S Q N V G S N L A (配列番号40)(L C D R 1)、S A S N R Y S (配列番号41)(L C D R 2)及び Q Q Y S T D P L T (配列番号34)(L C D R 3) [クローンI __ C 2];又は

(d) アミノ酸配列 G F S L S T S G Y G V G (配列番号29)(H C D R 1)、L A H I W W D D D K Y Y V D S V K G (配列番号26)(H C D R 2)、T R Q Y F P F A Y (配列番号31)(H C D R 3)、R A S Q S V G S N L A (配列番号32)(L C D R 1)、S

10

20

A S N R Y T (配列番号 4 4) (L C D R 2) 及び Q Q Y S T D P L T (配列番号 3 4) (L C D R 3) [クローン A 6 . 1];

を含む、ヒトグルココルチコイド誘発 T N F 受容体 (G I T R) 及びカニクイザル G I T R に対して特異的に結合するヒト、ヒト化又はキメラ抗体分子、又はその抗原結合部分。

【請求項 2】

C D R が挿入されている 1 又は 2 以上のヒト可変ドメインフレームワーク足場を含む、請求項 1 に記載の抗体分子又はその抗原結合部分。

【請求項 3】

対応する H C D R 配列が挿入されている I G H V 3 - 7 ヒト生殖系列足場を含む、請求項 1 又は 2 のいずれか 1 項に記載の抗体分子又はその抗原結合部分。

【請求項 4】

対応する L C D R 配列が挿入されている I G K V 3 - 1 1 ヒト生殖系列足場を含む、請求項 1 又は 2 のいずれか 1 項に記載の抗体分子又はその抗原結合部分。

【請求項 5】

免疫学的に不活性な定常領域を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体分子又はその抗原結合部分。

【請求項 6】

F a b フラグメント、F (a b) 2 フラグメント、F v フラグメント、四量体抗体、四価抗体、多重特異性抗体 (例えば、二価抗体)、ドメイン特異的抗体、単一ドメイン抗体、モノクローナル抗体 又は融合タンパク質である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の抗体分子又はその抗原結合部分。

【請求項 7】

治療剤に結合された請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の抗体分子又はその抗原結合部分を含む免疫複合体。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の抗体分子又はその抗原結合部分を含む免疫複合体をコードする核酸分子。

【請求項 9】

請求項 8 に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 10】

請求項 8 に記載の核酸分子又は請求項 9 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の抗体分子又はその抗原結合部分、又は請求項 8 に記載の核酸分子、又は請求項 9 に記載のベクターを含む医薬組成物。

【請求項 12】

医薬として使用される、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の抗体分子又はその抗原結合部分、又は請求項 7 に記載の免疫複合体、又は請求項 8 に記載の核酸分子、又は請求項 9 に記載のベクター、又は請求項 11 に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

癌の治療への使用のための、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の抗体分子又はその抗原結合部分、又は請求項 7 に記載の免疫複合体、又は請求項 8 に記載の核酸分子、又は請求項 9 に記載のベクター、又は請求項 11 に記載の医薬組成物。

【請求項 14】

前記癌が、膵臓癌、メラノーマ、乳癌、肺癌、気管支癌、結腸直腸癌、前立腺癌、胃癌、卵巣癌、膀胱癌、脳又は中枢神経系の癌、末梢神経系癌、食道癌、子宮頸癌、子宮癌又は子宮内膜癌、口腔癌又は咽頭癌、肝臓癌、腎臓癌、精巣癌、胆道癌、小腸又は虫垂癌、唾液腺癌、甲状腺癌、副腎癌、骨肉腫、軟骨肉腫、及び血液組織の癌から成る群から選択される、請求項 13 に記載の抗体分子又はその抗原結合部分、又は免疫複合体、又は核酸分子、又はベクター。

【請求項 15】

10

20

30

40

50

前記抗体、その抗原結合部分、免疫複合体、核酸、ベクター又は医薬組成物が、第2の治療剤、例えば抗癌剤と組合して、別々に、連続して、又は同時に使用するものである、請求項12又は13のいずれか1項に記載の抗体分子又はその抗原結合部分、又は免疫複合体、又は核酸分子、又はベクター。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、グルココルチコイド誘発TNF受容体(GITR)に対して特異的に結合する抗体、及びその医学的用途に関する。

【背景技術】

【0002】

GITR(TNFRSF18とも呼ばれる)は、TNF受容体スーパーファミリーの共刺激メンバーである。GITRの発現は、主にT細胞、NK細胞、B細胞上で、及び程度は低い、他のいくつかの造血細胞型上でも観察されている。GITRは、静止T及びNK細胞において低い発現を示しているが、しかしCD4+Foxp3+制御性T細胞(Treg)においては構成的に高レベルの発現を示す。GITRリガンド又はアゴニスト抗-GITR抗体によるGITRのインビトロ又はインビボ関与は、CD4+及びCD8+T細胞の拡大を引起し、そしてTregによる抑制に対するT細胞の耐性を改善する。

【0003】

前臨床証拠は、GITRシグナル伝達の誘導がエフェクターT細胞(Teffs)の活性化を増強し、そして実験的腫瘍においてTregsの活性を低めることを示唆している。アゴニスト抗-GITR mAbsの投与は、内因性Teff応答の増強、腫瘍微小環境におけるTregsの頻度の低下、及び複数のネズミ腫瘍モデルにおけるその後の腫瘍拒絶につながる。従って、抗-GITR mAbsは、癌及び他の環境において免疫治療剤として作用する可能性を有し、そしてまた、現在確立されている癌免疫療法の有効性を増強する可能性を有する。

【0004】

現在承認されている抗体治療薬の大部分は、免疫化された齧歯類に由来している。それらの抗体のほとんどは、ヒトv-遺伝子フレームワーク配列へのネズミCDRの「移植」を通して、「ヒト化」として知られている工程を経ている(Nelson et al., 2010, Nat Rev Drug Discov 9: 767-774を参照のこと)。この工程はしばしば不正確であり、そして得られる抗体の標的結合親和性の低下につながります。元の抗体の結合親和性に戻すために、マウス残基が、移植されたv-ドメインの可変ドメインフレームワークの重要な位置に通常、導入される(「復帰突然変異(back-mutations)」としても知られている)。

【0005】

CDR移植及び復帰突然変異を介してヒト化された抗体は、完全にネズミv-ドメインを有するそれらの抗体に比較して、診療所におけるより低い免疫応答率を誘導することが示されているが、この基本的な移植方法を用いてヒト化された抗体は、移植されたCDRループにまた収容されている潜在的な物理的不安定性及び免疫原性モチーフのために、依然として、重大な臨床開発リスクを抱えている。タンパク質の免疫原性の動物試験はしばしば、ヒトにおいて免疫応答を予測しないので、治療使用のための抗体工学は、精製されたタンパク質における予測されるヒトT細胞エピトープ含有量、非ヒト生殖系列アミノ酸含有量及び凝集能力の最小化に焦点を当てている。

【0006】

従って、理想的なヒト化アゴニスト抗-GITR抗体は、良く特徴づけられたヒト生殖系列配列のフレームワーク及びCDRの両者に見出されている残基とv-ドメインにおいて可能な限り多くの同一の残基を有するであろう。Townsend et al. (2015; PNAS 112: 15354-15359)は、ラット、ウサギ及びマウス抗体に由来するCDRが好ましいヒトフレームワークに移植され、そして次に、「拡張された二元置換(Augmented Binary Substitution)」と呼ばれるヒト生殖系列アプローチを受ける抗体を生成する方法を記載してい

10

20

30

40

50

る。このアプローチは元の抗体パラトープに基本的可塑性を示したが、非常に正確な抗体 - 抗原共結晶構造データの不在下で、いずれか特定の抗体のCDRループ内のどの残基がヒト生殖系列にどのような組合せで変換されるかを確実に予測することはまだ不可能である。

【0007】

従って、分子の複数の機能特性、この場合、以下の特性が好ましくは、維持されるべきであるので、CDR生殖系列は複雑で多因子の問題である：標的結合特異性、ヒト及び動物試験種（例えば、*Macaca fascicularis*として知られているカニクイザル）の両方からのGITRに対する親和性、v - ドメイン生物物理学的安定性及び/又はIgG発現収量。抗体工学の研究が、主要なCDRにおける単一の残基位置でさえ、それらのすべての望ましい分子特性に劇的な影響を与えることができることを示している。

10

【0008】

国際公開第2006/105021号は、「6C8」と呼ばれるアゴニストマウス抗 - GITR IgG分子及びまた、6C8のヒト化形の調製を記載している。それらの6C8のヒト化形は、従来のヒト化技法を用いて、すなわちKabatで定義されたネズミCDRを、ヒトH及びL鎖フレームワーク配列に、及び対応する位置にある6C8ネズミ残基に戻し突然変異されたヒトフレームワーク残基の一部に移植することにより生成された。潜在的なグリコシル化部位を修飾するために、6C8のKabat定義のネズミCDRの1つに対する1つのアミノ酸修飾のみが、国際公開第2006/105021号に記載されている。上記の理由により、国際公開第2006/105021号に記載される6C8のそのようなヒト化形は理想的ではない。

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明は、多数の最適化された抗 - GITR抗体及びその医学的用途を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明の1つの側面によれば、ヒトGITR及び任意には、またカニクイザルGITRに対して特異的に結合する抗体分子、又はその抗原結合部分が提供され、ここで前記抗体分子又はその抗原結合部分は、以下を有するH鎖可変領域を含み：

30

以下の順序で配列中にアミノ酸を有するHC DR 1：G - F - S、又はS - Lの保存的置換、又はL - S - Tの保存的置換、又はT - S又は任意のアミノ酸（例えば、F） - Gの保存的置換、又はG - Mの保存的置換、又は任意のアミノ酸（例えば、Y、F、L又はW） - G、又はG - Vの保存的置換、又はV - Gの保存的置換、又はGの保存的置換（配列番号1）；

以下の順序で配列中にアミノ酸を有するHC DR 2：L、又はL - Aの保存的置換、又はA - Hの保存的置換、又はH - Iの保存的置換、又はI - W - W - Dの保存的置換、又はD - Dの保存的置換、又はD - Dの保存的置換、又はD - K - Y - Y - Nの保存的置換、又は任意のアミノ酸（例えば、V） - P、又は任意のアミノ酸（例えば、D） - S - L、又はL - K - Sの保存的置換、又は任意のアミノ酸（例えば、G）（配列番号2）；及び

40

以下の順序で配列中にアミノ酸を有するHC DR 3：T、又は任意のアミノ酸（例えば、G、A、N、S又はI） - R、又は任意のアミノ酸（例えば、D、T又はV） - R、又は任意のアミノ酸（例えば、Q、L、M、I又はV） - Y - F、又はF - P - F - A - Yの保存的置換（配列番号3）；

そしてHC DR 1、HC DR 2又はHC DR 3の少なくとも1つは、それぞれ、アミノ酸配列GFSLSTSGMGVG（配列番号4；6C8ネズミHC DR 1）、LAHIWWDDDKYYNP SLKS（配列番号5；6C8ネズミHC DR 2）、LAHIWWDDDKYYQP SLKS（配列番号65；6C8変異体HC DR 2）及びTRRYFPFAY（配列番号6；6C8ネズミHC DR 3）と比較して許容される、少なくとも1つのアミノ酸の差異を有する。

50

【 0 0 1 1 】

本発明の別の側面によれば、抗体分子又はその抗体結合部分は、

以下の順序で配列中にアミノ酸を有する H C D R 1 : F - S - L - S - T - S / F - G - Y - G (配列番号 7) ;

以下の順序で配列中にアミノ酸を有する H C D R 2 : I - W - W - D - D - D - K - Y - Y - V - D - S - V - K - G (配列番号 8) ; 及び

以下の順序で配列中にアミノ酸を有する H C D R 3 : T - R - Q / L / V - Y - F - P - F - A (配列番号 9) 、を有する H 鎖可変領域を含む。

【 0 0 1 2 】

本発明の好ましい側面によれば、抗体分子は、ヒト G I T R 及びまた、カニクイザル G I T R に対して特異的に結合する。

10

【 0 0 1 3 】

抗体分子又は抗原結合部分はさらに、以下を有する L 鎖可変領域を含むことができる：

以下の順序で配列中にアミノ酸を有する L C D R 1 : K、又は K - A の保存的置換、又は A - S - Q - N の保存的置換、又は N - V - G の保存的置換、又は G - T の保存的置換、又は T - N の保存的置換、又は任意のアミノ酸（例えば、Y）- V、又は V - A の保存的置換（配列番号 10）；

以下の順序で配列中にアミノ酸を有する L C D R 2 : S、又は任意のアミノ酸（例えば、Y、E、D、F、L 又は N）- A - S、又は任意のアミノ酸（例えば、Y）- Y、又は任意のアミノ酸（例えば、N）- R - Y、又は任意のアミノ酸（例えば、A 又は D）- S、又は S の保存的置換（配列番号 11）；及び

20

以下の順序で配列中にアミノ酸を有する L C D R 3 : Q - Q、又は G - Y の保存的置換、又は任意のアミノ酸（例えば、R 又は H）- N、又は N - T の保存的置換、又は任意のアミノ酸（例えば、K 又は N）- D、又は任意のアミノ酸（例えば、W、L、S、E、V 又は N）- P - L - T（配列番号 12）；

そして L C D R 1、L C D R 2、又は L C D R 3 の少なくとも 1 つは、それぞれ、アミノ酸配列 K A S Q N V G T N V A（配列番号 13）（6 C 8 ネズミ L C D R 1）、S A S Y R Y S（配列番号 14）（6 C 8 ネズミ L C D R 2）及び Q Q Y N T D P L T（配列番号 15）（6 C 8 ネズミ L C D R 3）と比較して許容される、少なくとも 1 つのアミノ酸の差異を有する。

30

【 0 0 1 4 】

別の側面によれば、本発明の抗体分子又は抗原結合部分は、

以下の順序で配列中にアミノ酸を有する H C D R 1 : A - S - Q - N / S - V - G - T / S - N（配列番号 16）；

以下の順序で配列中にアミノ酸を有する H C D R 2 : S / Y - A - S - Y / N - R - Y - S / T（配列番号 17）；及び

以下の順序で配列中にアミノ酸を有する H C D R 3 : Y - S - T / N - D - P - L（配列番号 18）を有する L 鎖可変領域を含む。

【 0 0 1 5 】

本発明によれば、治療剤に連結された本明細書に定義されるような抗体分子又はその抗原結合部分を含む免疫複合体もまた提供される。

40

【 0 0 1 6 】

別の側面によれば、本発明は、本明細書において定義されるような抗体分子又はその抗原結合部分をコードする核酸分子を提供する。

【 0 0 1 7 】

本発明の核酸分子を含むベクターが、さらに提供される。

【 0 0 1 8 】

本明細書において定義されるような本発明の核酸分子又はベクターを含む宿主細胞もまた提供される。

【 0 0 1 9 】

50

さらなる側面によれば、本発明の宿主細胞を、抗体及び／又はその抗原結合部分の発現及び／又は生成をもたらす条件下で培養し、そして前記宿主細胞又は培養物から抗体及び／又はその抗原結合部分を単離することを含む、抗 - G I T R 抗体及び／又はその抗原結合部分の生成方法が提供される。

【 0 0 2 0 】

本発明の別の側面によれば、本明細書に定義されるような発明の抗体分子又はその抗原結合部分、又は本明細書に定義されるような発明の核酸分子、又は本明細書に定義されるような発明のベクターを含む医薬組成物が提供される。

【 0 0 2 1 】

有効量の本明細書に定義されるような発明の抗体分子又はその抗原結合部分、又は本明細書に定義されるような発明の免疫複合体、又は本明細書に定義されるような発明の核酸分子、又は本明細書に定義されるような発明のベクター、又は本明細書に定義されるような発明の医薬組成物を投与することを含む、対象における免疫応答を増強するための方法がさらに提供される。

10

【 0 0 2 2 】

さらなる側面によれば、有効量の本明細書に定義されるような発明の抗体分子又はその抗原結合部分、又は本明細書に定義されるような発明の免疫複合体、又は本明細書に定義されるような発明の核酸分子、又は本明細書に定義されるような発明のベクター、又は本明細書に定義されるような発明の医薬組成物を投与することを含む、対象における癌の治療又は予防方法が提供される。

20

【 0 0 2 3 】

本発明はまた、癌の治療への使用のための、本明細書に定義されるような発明の抗体分子又はその抗原結合部分、又は本明細書に定義されるような発明の免疫複合体、又は本明細書に定義されるような発明の核酸分子、又は本明細書に定義されるような発明のベクター、又は本明細書に定義されるような発明の医薬組成物を提供する。

【 0 0 2 4 】

別の側面によれば、本発明は、第 2 の治療剤、例えば抗癌剤と組合して、別々に、連続して、又は同時に使用するための、抗体分子、又はその抗原結合部分、又は免疫複合体、又は核酸分子、又は使用のためのベクター、又は本明細書に定義されるような発明の治療方法を提供する。

30

【 0 0 2 5 】

さらなる側面によれば、癌の治療のための薬物の製造のためへの、本明細書に定義されるような発明の抗体分子又はその抗原結合部分、又は本明細書に定義されるような発明の免疫複合体、又は本明細書に定義されるような発明の核酸分子、又は本明細書に定義されるような発明のベクター、又は本明細書に定義されるような発明の医薬組成物の使用が提供される。

【 0 0 2 6 】

本発明はまた、

(1) ヒト化抗 - G I T R 抗体分子又はその抗原結合部分を生成するために、非ヒト源からの抗 - G I T R C D R をヒトドメインフレームワークに移植する工程；

40

(2) C D R において 1 又は 2 以上の変異を含むヒト化抗 - G I T R 抗体分子又はその抗原結合部分のクローンのファージライブラリーを生成する工程；

(3) ヒト G I T R 及びカニクイザル G I T R に結合するためのファージライブラリーをスクリーニングし；

(4) ヒト G I T R 及びカニクイザル G I T R に対する結合特異性を有するクローンを、工程 (3) から選択する工程；及び

(5) 工程 (4) から選択されたクローンから、ヒト G I T R 及びカニクイザル G I T R 又はその抗原結合部分に対して特異的に結合する抗体分子を生成する工程を含む、ヒト G I T R 及びカニクイザル G I T R に対して特異的結合する抗体分子又はその抗原結合部分の生成方法も提供する。

50

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1】図1は、ヒトGITR-FcへのIgG結合についての直接的滴定ELISAを示す。ヒトIgG形式でのキメラ抗-GITR及びヒト生殖系列移植片が、ヒトGITR-Fcタンパク質に対して滴定された($\mu\text{g}/\text{ml}$)。キメラIgG(VH1及びVL3ファミリー)と同等の結合活性を示すクローンをAで示し、そして結合障害のあるそれら(VH2及びVH4ファミリー)をBで示す。各グラフにおいて、X軸は $\mu\text{g}/\text{ml}$ でのIgG濃度を示し、そしてY軸は結合シグナル(OD 450nm)を示す。

【0028】

【図2】図2は、GITR Jurkat細胞レポーターアッセイ(GITRアゴニズム)を示す。ヒトIgG1形式でのヒト生殖系列移植抗体を、Promega GITR+Jurkat細胞レポーターアッセイに適用した。このアッセイは、移植片ファミリーVH1、VH3及びVH4におけるIgGの中で、クローンVH3/VL2がもっとも強力な濃度依存性アゴニスト活性を示したことを示した。移植片のVH2ファミリーは、ELISAによる効果的な標的結合の欠如のために省略された。X軸は ng/ml でのmAbの濃度を示し、そしてY軸は誘導倍率を示す。図においては、「LM」はリガンドマルチマーを示し、そして「C」は対照を示す。

【0029】

【図3A】図3は、ヒト及びカニクイザルGITR-Fcタンパク質に対するライブラリー由来抗-GITR scFvの直接的結合ELISAを示す。AはブランチA periprep ELISA(ヒト-カニクイザル-ヒト-カニクイザル)を示し、BはブランチB periprep ELISA(カニクイザル-ヒト-カニクイザル-ヒト)を示しそしてCはブランチC periprep ELISA(ヒト-ヒト-ヒト-ヒト)を示す。クローンは、3つの別個のファージ選択ブランチ(A、B、C)に由来し、ここでファージ集団は、各ラウンドでビオチン化ヒト(hum)又はカニクイザル(cyno)GITR-Fcタンパク質に基いて選択された。選択の各ラウンドの後、92のライブラリー由来のクローン(黒丸)及び1ラウンド当たり2つの陽性対照(灰色の星)及び2つの陰性対照scFv(灰色の正方形)が、ヒト及びカニクイザルGITR-Fcの両方に対してスクリーニングされた。各ラウンドにおける平均 \pm SD値は、灰色のバーで示されている。各グラフにおいては、X軸は選択ラウンド(「R」)を示し、そして「H」はヒトを示し、そして「C」は、カニクイザルを示し、そしてY軸は結合シグナル(OD 450nm)を示す。

【0030】

【図3B】図3は、ヒト及びカニクイザルGITR-Fcタンパク質に対するライブラリー由来抗-GITR scFvの直接的結合ELISAを示す。AはブランチA periprep ELISA(ヒト-カニクイザル-ヒト-カニクイザル)を示し、BはブランチB periprep ELISA(カニクイザル-ヒト-カニクイザル-ヒト)を示しそしてCはブランチC periprep ELISA(ヒト-ヒト-ヒト-ヒト)を示す。クローンは、3つの別個のファージ選択ブランチ(A、B、C)に由来し、ここでファージ集団は、各ラウンドでビオチン化ヒト(hum)又はカニクイザル(cyno)GITR-Fcタンパク質に基いて選択された。選択の各ラウンドの後、92のライブラリー由来のクローン(黒丸)及び1ラウンド当たり2つの陽性対照(灰色の星)及び2つの陰性対照scFv(灰色の正方形)が、ヒト及びカニクイザルGITR-Fcの両方に対してスクリーニングされた。各ラウンドにおける平均 \pm SD値は、灰色のバーで示されている。各グラフにおいては、X軸は選択ラウンド(「R」)を示し、そして「H」はヒトを示し、そして「C」は、カニクイザルを示し、そしてY軸は結合シグナル(OD 450nm)を示す。

【0031】

【図3C】図3は、ヒト及びカニクイザルGITR-Fcタンパク質に対するライブラリー由来抗-GITR scFvの直接的結合ELISAを示す。AはブランチA periprep ELISA(ヒト-カニクイザル-ヒト-カニクイザル)を示し、BはブランチB periprep ELISA(カニクイザル-ヒト-カニクイザル-ヒト)を示しそしてCはブランチC periprep ELISA(ヒト-ヒト-ヒト-ヒト)を示す。クローンは、3つの別個のファージ選択ブランチ(A、B、C)に由来し、ここでファージ集団は、各ラウンドでビオチン化ヒト(hum)又はカニクイザル(cyno)GITR-Fcタンパク質に基いて選択された。選択の各ラウンドの後、92のライブラリー由来のクローン(黒丸)及び1ラウンド当たり2つの陽性対照(灰色の星)及び2つの陰性対照scFv(灰色の正方形)が、ヒト及びカニクイザルGITR-Fcの両方に対してスクリーニングされた。各ラウンドにおける平均 \pm SD値は、灰色のバーで示されている。各グラフにおいては、X軸は選択ラウンド(「R」)を示し、そして「H」はヒトを示し、そして「C」は、カニクイザルを示し、そしてY軸は結合シグナル(OD 450nm)を示す。

10

20

30

40

50

pre p E L I S A (ヒト - カニクイザル - ヒト - カニクイザル) を示し、B はブランチ B p e r i p r e p E L I S A (カニクイザル - ヒト - カニクイザル - ヒト) を示しそしてC はブランチ C p e r i p r e p E L I S A (ヒト - ヒト - ヒト - ヒト) を示す。クローンは、3つの別個のファージ選択ブランチ (A、B、C) に由来し、ここでファージ集団は、各ラウンドでビオチン化ヒト (h u m) 又はカニクイザル (c y n o) G I T R - F c タンパク質に基いて選択された。選択の各ラウンドの後、92のライブラリー由来のクローン (黒丸) 及び1ラウンド当たり2つの陽性対照 (灰色の星) 及び2つの陰性対照 s c F v (灰色の正方形) が、ヒト及びカニクイザル G I T R - F c の両方に対してスクリーニングされた。各ラウンドにおける平均 \pm S D 値は、灰色のバーで示されている。各グラフにおいては、X 軸は選択ラウンド (「 R 」) を示し、そして「 H 」はヒトを示し、そして「 C 」は、カニクイザルを示し、そしてY 軸は結合シグナル (O D 450 n m) を示す。

10

【 0 0 3 2 】

【図 4 A】図 4 は、ヒト及びカニクイザル G I T R - F c タンパク質に対する選択された抗 - G I T R s c F v についての直接的結合 E L I S A の線形回帰相関分析を示す。ラウンド (R) 2、3 及び 4 の後、ヒト (X 軸) 及びカニクイザル (Y 軸) の両方に対する単一クローンについての結合シグナル (C D 450 n m) を示す。3つの個別のファージ選択ブランチ (A、B、C) からの結合値をブロックする。ライブラリー由来の抗 - G I T R クローンは、黒丸で表され、そして各分析についての相関傾向線が示されている。ブランチ C 値は、ヒト G I T R タンパク質のみに基く選択がより偏った集団をもたらし、より多くのクローンがカニクイザルではなく、ヒトに対する反応性を示すことを示唆する。

20

【 0 0 3 3 】

【図 4 B】図 4 は、ヒト及びカニクイザル G I T R - F c タンパク質に対する選択された抗 - G I T R s c F v についての直接的結合 E L I S A の線形回帰相関分析を示す。ラウンド (R) 2、3 及び 4 の後、ヒト (X 軸) 及びカニクイザル (Y 軸) の両方に対する単一クローンについての結合シグナル (C D 450 n m) を示す。3つの個別のファージ選択ブランチ (A、B、C) からの結合値をブロックする。ライブラリー由来の抗 - G I T R クローンは、黒丸で表され、そして各分析についての相関傾向線が示されている。ブランチ C 値は、ヒト G I T R タンパク質のみに基く選択がより偏った集団をもたらし、より多くのクローンがカニクイザルではなく、ヒトに対する反応性を示すことを示唆する。

30

【 0 0 3 4 】

【図 4 C】図 4 は、ヒト及びカニクイザル G I T R - F c タンパク質に対する選択された抗 - G I T R s c F v についての直接的結合 E L I S A の線形回帰相関分析を示す。ラウンド (R) 2、3 及び 4 の後、ヒト (X 軸) 及びカニクイザル (Y 軸) の両方に対する単一クローンについての結合シグナル (C D 450 n m) を示す。3つの個別のファージ選択ブランチ (A、B、C) からの結合値をブロックする。ライブラリー由来の抗 - G I T R クローンは、黒丸で表され、そして各分析についての相関傾向線が示されている。ブランチ C 値は、ヒト G I T R タンパク質のみに基く選択がより偏った集団をもたらし、より多くのクローンがカニクイザルではなく、ヒトに対する反応性を示すことを示唆する。

【 0 0 3 5 】

40

【図 5 A】図 5 は、生殖系列への突然変異に対する C D R 残基耐性の分析を示す。132のユニーク G I T R 結合 s c F v クローンの E L I S A 陽性集団の C D R におけるマウスアミノ酸保持頻度のプロットを、それぞれ、(A) V_L 及び (B) V_H ドメインについて示す。H C D R 3 以外では、ヒト / ネズミ残基の突然変異誘発を標的とした残基のみがプロットされている。各プロットにおいては、Y 軸はネズミ残基の保持率を示し、そして C D R 残基は X 軸に示される。X 軸の括弧内に記載される C D R 残基は、移植のために使用されるヒト生殖系列に見出される残基 (I G K V 3 - 11 及び I G H V 3 - 7) と同一であった。括弧内ではないが、値が 0 で設定されているそれらの残基は、移植工程の間、ヒト生殖系列に変異された。A 及び B の両方において、75% の灰色の破線は、ヒト生殖系列によるネズミ残基置換の耐性のカットオフを表す。

50

【 0 0 3 6 】

【図 5 B】図 5 は、生殖系列への突然変異に対する C D R 残基耐性の分析を示す。1 3 2 のユニーク G I T R 結合 s c F v クローンの E L I S A 陽性集団の C D R におけるマウスアミノ酸保持頻度のプロットを、それぞれ、(A) V_L 及び (B) V_H ドメインについて示す。H C D R 3 以外では、ヒト / ネズミ残基の突然変異誘発を標的とした残基のみがプロットされている。各プロットにおいては、Y 軸はネズミ残基の保持率を示し、そして C D R 残基は X 軸に示される。X 軸の括弧内に記載される C D R 残基は、移植のために使用されるヒト生殖系列に見出される残基 (I G K V 3 - 1 1 及び I G H V 3 - 7) と同一であった。括弧内ではないが、値が 0 で設定されているそれらの残基は、移植工程の間、ヒト生殖系列に変異された。A 及び B の両方において、7 5 % の灰色の破線は、ヒト生殖系列によるネズミ残基置換の耐性のカットオフを表す。

10

【 0 0 3 7 】

【図 6 A】図 6 は、ヒト及びカニクイザル G I T R - F c タンパク質への I g G 結合の直接的滴定 E L I S A を示す。ヒト I g G 1 形式でのキメラ抗 - G I T R (m V H / m V L)、ヒト生殖系列移植片 (V H 1 / V L 1、V H 3 / V L 3) 及びライブラリー由来クローンを、ヒト (A、C) 及びカニクイザル (B、D) G I T R - F c タンパク質に対する直接的結合 E L I S A により滴定した ($\mu\text{g} / \text{ml}$)。ヒト及びカニクイザルの両方に対する V H 1 / V L 1 及び V H 3 / V L 2 I g G と同等の、又はそれら以上に改善された結合活性を示すクローンを、(A) 及び (B) で示している。ヒト G I T R - F c、カニクイザル G I T R - F c 又は両方に対する V H 1 / V L 1 及び V H 3 / V L 2 I g G に劣っている結合活性を示すクローンを、(C) 及び (D) で示している。各グラフにおいて、X 軸は $\mu\text{g} / \text{ml}$ での I g G 濃度を示し、そして Y 軸は結合シグナル (O D 4 5 0 n m) を示す。

20

【 0 0 3 8 】

【図 6 B】図 6 は、ヒト及びカニクイザル G I T R - F c タンパク質への I g G 結合の直接的滴定 E L I S A を示す。ヒト I g G 1 形式でのキメラ抗 - G I T R (m V H / m V L)、ヒト生殖系列移植片 (V H 1 / V L 1、V H 3 / V L 3) 及びライブラリー由来クローンを、ヒト (A、C) 及びカニクイザル (B、D) G I T R - F c タンパク質に対する直接的結合 E L I S A により滴定した ($\mu\text{g} / \text{ml}$)。ヒト及びカニクイザルの両方に対する V H 1 / V L 1 及び V H 3 / V L 2 I g G と同等の、又はそれら以上に改善された結合活性を示すクローンを、(A) 及び (B) で示している。ヒト G I T R - F c、カニクイザル G I T R - F c 又は両方に対する V H 1 / V L 1 及び V H 3 / V L 2 I g G に劣っている結合活性を示すクローンを、(C) 及び (D) で示している。各グラフにおいて、X 軸は $\mu\text{g} / \text{ml}$ での I g G 濃度を示し、そして Y 軸は結合シグナル (O D 4 5 0 n m) を示す。

30

【 0 0 3 9 】

【図 6 C】図 6 は、ヒト及びカニクイザル G I T R - F c タンパク質への I g G 結合の直接的滴定 E L I S A を示す。ヒト I g G 1 形式でのキメラ抗 - G I T R (m V H / m V L)、ヒト生殖系列移植片 (V H 1 / V L 1、V H 3 / V L 3) 及びライブラリー由来クローンを、ヒト (A、C) 及びカニクイザル (B、D) G I T R - F c タンパク質に対する直接的結合 E L I S A により滴定した ($\mu\text{g} / \text{ml}$)。ヒト及びカニクイザルの両方に対する V H 1 / V L 1 及び V H 3 / V L 2 I g G と同等の、又はそれら以上に改善された結合活性を示すクローンを、(A) 及び (B) で示している。ヒト G I T R - F c、カニクイザル G I T R - F c 又は両方に対する V H 1 / V L 1 及び V H 3 / V L 2 I g G に劣っている結合活性を示すクローンを、(C) 及び (D) で示している。各グラフにおいて、X 軸は $\mu\text{g} / \text{ml}$ での I g G 濃度を示し、そして Y 軸は結合シグナル (O D 4 5 0 n m) を示す。

40

【 0 0 4 0 】

【図 6 D】図 6 は、ヒト及びカニクイザル G I T R - F c タンパク質への I g G 結合の直接的滴定 E L I S A を示す。ヒト I g G 1 形式でのキメラ抗 - G I T R (m V H / m V L

50

)、ヒト生殖系列移植片(VH1/VL1、VH3/VL3)及びライブラリー由来クローンを、ヒト(A、C)及びカニクイザル(B、D)GITR-Fcタンパク質に対する直接的結合ELISAにより滴定した($\mu\text{g}/\text{ml}$)。ヒト及びカニクイザルの両方に対するVH1/VL1及びVH3/VL2 IgGと同等の、又はそれら以上に改善された結合活性を示すクローンを、(A)及び(B)で示している。ヒトGITR-Fc、カニクイザルGITR-Fc又は両方に対するVH1/VL1及びVH3/VL2 IgGに劣っている結合活性を示すクローンを、(C)及び(D)で示している。各グラフにおいて、X軸は $\mu\text{g}/\text{ml}$ でのIgG濃度を示し、そしてY軸は結合シグナル(OD 450 nm)を示す。

【0041】

10

【図7】図7は、優先リードについてのGITR Jurkat細胞レポーターアッセイを示す。ヒトIgG1形式でのリードクローン、D-A6(A)、I-C2(B)及びG-G10(C)について細胞表面でのヒトGITRの架橋の重複分析は、すべての3種のクローンが、抗-NA抗体架橋ヒトGITRタンパク質(x-連結[「x-L」]GITRL)と同様の濃度範囲で濃度依存性アゴニスト活性を誘発し、そしてD-A6はリガンド活性の最も近い模様体であることを示した。各グラフにおいて、X軸は ng/ml でのmAb濃度を示し、Y軸は相対光単位(RLU)を示し、そして対照IgG1は「C IgG1」と呼ばれる。

【0042】

20

【図8A】図8は、優先リードクローンについての結合特異性分析を示す。mVH/mVL(A)、VH3/VL2(B)、及びリードエンジニアリングされたG-G10(C)、I-C2(D)及びD-A6(E)についてのオフターゲット相同体結合リスクを、GITR-Fcオソログ、及び13のヒトTNFRSF及び免疫グロブリンスーパーファミリータンパク質のパネル(名X軸上に標識されている)での直接的ELISAにより試験した。ヒト、カニクイザル及びネズミGITR-Fcs(h/c/mGITR-Fc)への結合を、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ のIgG濃度で実施した。すべての他のタンパク質への結合を、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ のIgG濃度で実施した。各プロットにおいて、Y軸は結合シグナル(OD 450 nm)を示す。すべてのIgGについて、hGITR-Fc及びcGITR-Fcのみへの結合が観察された。mGITR-Fc又は任意の相同ヒトタンパク質については、バックグラウンド以上の結合は観察されなかった。

30

【0043】

【図8B】図8は、優先リードクローンについての結合特異性分析を示す。mVH/mVL(A)、VH3/VL2(B)、及びリードエンジニアリングされたG-G10(C)、I-C2(D)及びD-A6(E)についてのオフターゲット相同体結合リスクを、GITR-Fcオソログ、及び13のヒトTNFRSF及び免疫グロブリンスーパーファミリータンパク質のパネル(名X軸上に標識されている)での直接的ELISAにより試験した。ヒト、カニクイザル及びネズミGITR-Fcs(h/c/mGITR-Fc)への結合を、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ のIgG濃度で実施した。すべての他のタンパク質への結合を、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ のIgG濃度で実施した。各プロットにおいて、Y軸は結合シグナル(OD 450 nm)を示す。すべてのIgGについて、hGITR-Fc及びcGITR-Fcのみへの結合が観察された。mGITR-Fc又は任意の相同ヒトタンパク質については、バックグラウンド以上の結合は観察されなかった。

40

【0044】

【図8C】図8は、優先リードクローンについての結合特異性分析を示す。mVH/mVL(A)、VH3/VL2(B)、及びリードエンジニアリングされたG-G10(C)、I-C2(D)及びD-A6(E)についてのオフターゲット相同体結合リスクを、GITR-Fcオソログ、及び13のヒトTNFRSF及び免疫グロブリンスーパーファミリータンパク質のパネル(名X軸上に標識されている)での直接的ELISAにより試験した。ヒト、カニクイザル及びネズミGITR-Fcs(h/c/mGITR-Fc)への結合を、 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ のIgG濃度で実施した。すべての他のタンパク質への結合を

50

、 $10\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ のIgG濃度で実施した。各プロットにおいて、Y軸は結合シグナル(OD450nm)を示す。すべてのIgGについて、hGITR-Fc及びcGITR-Fcのみへの結合が観察された。mGITR-Fc又は任意の相同ヒトタンパク質については、バックグラウンド以上の結合は観察されなかった。

【0045】

【図8D】図8は、優先リードクローンについての結合特異性分析を示す。mVH/mVL(A)、VH3/VL2(B)、及びリードエンジニアリングされたG-G10(C)、I-C2(D)及びD-A6(E)についてのオフターゲット相同体結合リスクを、GITR-Fcオソログ、及び13のヒトTNFRSF及び免疫グロブリンスーパーファミリータンパク質のパネル(名X軸上に標識されている)での直接的ELISAにより試験した。ヒト、カニクイザル及びネズミGITR-Fcs(h/c/mGITR-Fc)への結合を、 $1\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ のIgG濃度で実施した。すべての他のタンパク質への結合を、 $10\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ のIgG濃度で実施した。各プロットにおいて、Y軸は結合シグナル(OD450nm)を示す。すべてのIgGについて、hGITR-Fc及びcGITR-Fcのみへの結合が観察された。mGITR-Fc又は任意の相同ヒトタンパク質については、バックグラウンド以上の結合は観察されなかった。

10

【0046】

【図8E】図8は、優先リードクローンについての結合特異性分析を示す。mVH/mVL(A)、VH3/VL2(B)、及びリードエンジニアリングされたG-G10(C)、I-C2(D)及びD-A6(E)についてのオフターゲット相同体結合リスクを、GITR-Fcオソログ、及び13のヒトTNFRSF及び免疫グロブリンスーパーファミリータンパク質のパネル(名X軸上に標識されている)での直接的ELISAにより試験した。ヒト、カニクイザル及びネズミGITR-Fcs(h/c/mGITR-Fc)への結合を、 $1\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ のIgG濃度で実施した。すべての他のタンパク質への結合を、 $10\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ のIgG濃度で実施した。各プロットにおいて、Y軸は結合シグナル(OD450nm)を示す。すべてのIgGについて、hGITR-Fc及びcGITR-Fcのみへの結合が観察された。mGITR-Fc又は任意の相同ヒトタンパク質については、バックグラウンド以上の結合は観察されなかった。

20

【0047】

【図9】図9は、ヒトGITR-Fcに結合するVH1/VL1 IgGに対するリード及び対照IgGについてのHTRF競争アッセイを示す。VH1/VL1 IgGについてのHTRF結合シグナルが、ライブラリー由来のリードD-A6、I-C2及びG-G10、陰性対照としてのアイソタイプ(I)IgG1、及び陽性対象としての標識されていないVH1/VL1を含む滴定された競合IgGの存在下で試験された。X軸は、 $\mu\text{g}/\text{ml}$ でのIgG1濃度を示し、そしてY軸はHTRF665/615比を示す。すべてのライブラリー由来のIgGは、VH1-VL1結合の濃度依存性低下を示し、このことは、共有エピトープの維持が示唆された。

30

【0048】

【図10】図10は、ヒト及びカニクイザルGITRを安定的にトランスフェクトされたネズミ細胞への結合におけるリード及び対照IgGのフローサイトメトリー試験を示す。リードライブラリー由来の及び対照IgG(「I IgG1」はアイソタイプIgG1を表す)を、(A)ヒト及び(B)カニクイザル トランスフェクトされたネズミ細胞への特異的結合について試験した。濃度依存性結合は、両方の細胞系に対して観察された。ヒトGITR-トランスフェクトされたヒトJurkat細胞に対するGITRアゴニズムアッセイにおけるように、この実験における最大の結合シグナルは、すべてのヒト化及び移植クローンについて、約 $1000\text{ ng}/\text{ml}$ で観察された。無関係なヒト受容体によりトランスフェクトされたネズミ細胞に対して、バックグラウンド以上の結合シグナルは観察されなかった(C)。各グラフにおいて、X軸は ng/ml でのIgG1の濃度を示し、そしてY軸は平均蛍光光度(MFI)を示す。

40

【0049】

50

【図 1 1】図 1 1 は、G I T R J u r k a t 細胞レポーターアッセイにおける D - A 6 及び V H 1 / V L 1 I g G 1 抗体の二重精製されたモノマーバージョンの相対的効力を示す。ヒト I g G 1 形式における P r o A - S E C 精製 D - A 6 及び V H 1 / V L 1 抗体を、P r o m e g a G I T R + J u r k a t 細胞レポーターアッセイに適用した。このアッセイは、クローン D - A 6 が、G I T R シグナル伝達の誘発において V H 1 / V L 1 よりも有意に強力であったことを示した。X 軸は n M での m A b の濃度を示し、そして Y 軸は R L U を示す。

【 0 0 5 0 】

【図 1 2】図 1 2 は、G I T R 発現細胞のフローサイトメトリーにおける膜結合の特異性を示す。A) このアッセイにおいては、C H O - K 1 ヒト G I T R + 細胞への抗体結合の特異性が、過剰な可溶性の精製された組換えヒト G I T R リガンド (G I T R L) タンパク質の存在又は非存在下でのフローサイトメトリー染色により示された。V H 1 / V L 1 及び D - A 6 抗体の両方について、1 . 1 μ g / m l での抗体に対する G I T R + 細胞への結合シグナルは、1 0 μ g / m l の可溶性 G I T R L タンパク質の存在下で 1 0 倍以上低められた。陰性対照抗 - G F P 抗体は、C H O - K 1 G I T R 細胞への測定可能な結合を示さなかった。「N」は、ナイーブ細胞を示し；「A」は活性化された細胞を示す。B) D - A 6 I g G 1 及び V H 1 / V L 1 I g G 1 の両方はまた、細胞が C D 3 / C D 2 8 刺激により活性化された場合、ヒト H u T 7 8 T 細胞系に対して明確な反応性を示したが、しかしナイーブ細胞の場合、そうではなかった。活性化された細胞での G I T R アップレギュレーションが、抗 - ヒト G I T R モノクローナル試薬抗体 1 0 8 - 1 7 を用いての強い陽性染色により確認された。「A b」は 1 . 1 1 μ g / m l での抗体を示し；「A b + G I T R L」は 1 . 1 1 μ g / m l での抗体 + 1 0 μ g / m l での G I T R L を示す。X 軸は抗体を示し、そして Y 軸は生細胞の M F I を示す。各プロットにおいては、Y 軸は生細胞の M F I を示す。

【 0 0 5 1 】

【図 1 3】図 1 3 は、C H O - K 1 ヒト細胞 (グラフ A) 及びカニクイザル G I T R + 細胞 (グラフ B) を用いての J u r k a t 細胞レポーターアッセイでの F c R I I I のシグナル伝達の誘発における D - A 6 V H 1 / V L 1 I g G 1、D - A 6 I g G 1 - N 2 9 7 A 及び V H 1 / V L 1 I g G 1 - N 2 9 7 A (非グリコシル化) 抗体の相対効力を示す。各グラフにおいて、X 軸は n g / m l での抗体濃度を示し、そして Y 軸は R L U を示す。このアッセイは、I g G 1 形式の D - A 6 及び V H 1 / V L 1 抗体が F c R I I I a シグナル伝達 (N K 細胞における A D C C 活性の誘発の代表) を誘発できるが、一方、D - A 6 I g G 1 - N 2 9 7 A も V H 1 / V L 1 I g G 1 - N 2 9 7 A 抗体の何れもシグナル伝達を誘発しなかったことを示した。重要なことには、D - A 6 I g G 1 は、V H 1 / V L 1 I g G 1 よりもシグナル伝達の誘発において有意に強力であった。

【 0 0 5 2 】

【図 1 4】図 1 4 は、開発リスク E L I S A を示す。このアッセイは、I g G 1 及び I g G 1 - N 2 9 7 A 形式での D - A 6 抗体は、負に帯電された生体分子インスリン (グラフ A)、二本鎖 DNA (d s D N A) (グラフ B) 及び一本鎖 DNA (s s D N A) (グラフ C) への結合が陰性であることを示した。各グラフにおいて、X 軸は μ g / m l での I g G 濃度を示し、そして Y 軸は結合シグナル (O D 4 5 0 n m) を示す。それらの分子への強力なオフターゲット結合は、治療用抗体の低い臨床的性能の高リスク指標であることが示された。

【 0 0 5 3 】

【図 1 5 A】図 1 5 は、優先リードについての G I T R J u r k a t 細胞レポーターアッセイを示す。I g G 1 n u l l 及び I g G 1 - N 2 9 7 A 形式でのリードクローン D - A 6 (A)、D - A 6 . 1 (B)、及び I g G 1 形式でのライブラリー由来のリード G - G 1 D (C) 及び I - C 2 (D) についての細胞表面でのヒト G I T R の架橋の重複分析は、全てのクローンが、V H 1 / V L 1 I g G 1 に比較して、より強い濃度依存性アゴニスト活性を誘発したことを示した。C 及び D においては、「I I g G 1」はアイソタイ

ブ Ig G 1 を示す。各グラフにおいて、X 軸は ng/ml の Ig G 濃度を示し、そして Y 軸は RLU を示す。

【0054】

【図15B】図15は、優先リードについての G I T R Jurkat 細胞レポーターアッセイを示す。Ig G 1 null 及び Ig G 1 - N 2 9 7 A 形式でのリードクローン D - A 6 (A)、D - A 6 . 1 (B)、及び Ig G 1 形式でのライブラリー由来のリード G - G 1 D (C) 及び I - C 2 (D) についての細胞表面でのヒト G I T R の架橋の重複分析は、全てのクローンが、V H 1 / V L 1 Ig G 1 に比較して、より強い濃度依存性アゴニスト活性を誘発したことを示した。C 及び D においては、「I Ig G 1」はアイソタイプ Ig G 1 を示す。各グラフにおいて、X 軸は ng/ml の Ig G 濃度を示し、そして Y 軸は RLU を示す。

10

【0055】

【図15C】図15は、優先リードについての G I T R Jurkat 細胞レポーターアッセイを示す。Ig G 1 null 及び Ig G 1 - N 2 9 7 A 形式でのリードクローン D - A 6 (A)、D - A 6 . 1 (B)、及び Ig G 1 形式でのライブラリー由来のリード G - G 1 D (C) 及び I - C 2 (D) についての細胞表面でのヒト G I T R の架橋の重複分析は、全てのクローンが、V H 1 / V L 1 Ig G 1 に比較して、より強い濃度依存性アゴニスト活性を誘発したことを示した。C 及び D においては、「I Ig G 1」はアイソタイプ Ig G 1 を示す。各グラフにおいて、X 軸は ng/ml の Ig G 濃度を示し、そして Y 軸は RLU を示す。

20

【0056】

【図15D】図15は、優先リードについての G I T R Jurkat 細胞レポーターアッセイを示す。Ig G 1 null 及び Ig G 1 - N 2 9 7 A 形式でのリードクローン D - A 6 (A)、D - A 6 . 1 (B)、及び Ig G 1 形式でのライブラリー由来のリード G - G 1 D (C) 及び I - C 2 (D) についての細胞表面でのヒト G I T R の架橋の重複分析は、全てのクローンが、V H 1 / V L 1 Ig G 1 に比較して、より強い濃度依存性アゴニスト活性を誘発したことを示した。C 及び D においては、「I Ig G 1」はアイソタイプ Ig G 1 を示す。各グラフにおいて、X 軸は ng/ml の Ig G 濃度を示し、そして Y 軸は RLU を示す。

【発明を実施するための形態】

30

【0057】

本発明の第1の側面によれば、ヒト G I T R 及び任意には、またカニクイザル G I T R に対して特異的に結合する抗体分子、又はその抗原結合部分が提供され、ここで前記抗体分子又はその抗原結合部分は、以下を有する H C D R 1 を含み：

以下の順序で配列中にアミノ酸を有する H C D R 1 : G - F - S、又は S - L の保存的置換、又は L - S - T の保存的置換、又は T - S 又は任意のアミノ酸（例えば、F）- G の保存的置換、又は G - M の保存的置換、又は任意のアミノ酸（例えば、Y、F、L 又は W）- G、又は G - V の保存的置換、又は V - G の保存的置換、又は G の保存的置換（配列番号1）；

以下の順序で配列中にアミノ酸を有する H C D R 2 : L、又は L - A の保存的置換、又は A - H の保存的置換、又は H - I の保存的置換、又は I - W - W - D の保存的置換、又は D - D の保存的置換、又は D - D の保存的置換、又は D - K - Y - Y - N の保存的置換、又は任意のアミノ酸（例えば、V）- P、又は任意のアミノ酸（例えば、D）- S - L、又は L - K - S の保存的置換、又は任意のアミノ酸（例えば、G）（配列番号2）；及び

40

以下の順序で配列中にアミノ酸を有する H C D R 3 : T、又は任意のアミノ酸（例えば、G、A、N、S 又は I）- R、又は任意のアミノ酸（例えば、D、T 又は V）- R、又は任意のアミノ酸（例えば、Q、L、M、I 又は V）- Y - F、又は F - P - F - A - Y の保存的置換（配列番号3）；

そして H C D R 1、H C D R 2 又は H C D R 3 の少なくとも1つは、それぞれ、アミノ酸配列 G F S L S T S G M G V G（配列番号4；6 C 8 ネズミ H C D R 1）、L A H I W

50

W D D D K Y Y N P S L K S (配列番号 5; 6 C 8 ネズミ H C D R 2)、L A H I W W D D K Y Y Q P S L K S (配列番号 6 5; 6 C 8 変異体 H C D R 2) 及び T R R Y F P F A Y (配列番号 6; 6 C 8 ネズミ H C D R 3)と比較して、上記定義に従って許容される、少なくとも 1 つのアミノ酸の差異、例えば 1、2、3、4、5 又はそれ以上のアミノ酸の差異を有する。

【 0 0 5 8 】

国際公開第 2 0 0 6 / 1 0 5 0 2 1 号に開示されるような 6 C 8 ネズミ抗体由来の H C D R 2 を定義する配列 L A H I W W D D D K Y Y N P S L K S (配列番号 5) は、位置 N に N を有する野生型ネズミ配列を含む。位置 N に Q を有する国際公開第 2 0 0 6 / 1 0 5 0 2 1 号に開示されるその変異形 (L A H I W W D D D K Y Y Q P S L K S ; 配列番号 6 5) は、推定グリコシル化部位を除去すると述べられている。

10

【 0 0 5 9 】

抗体分子又はその抗原結合部分の H C D R 1、H C D R 2 及び H C D R 3 は、それぞれ、アミノ酸配列 G F S L S T S G M G V G (配列番号 4; 6 C 8 ネズミ H C D R 1)、L A H I W W D D D K Y Y N P S L K S (配列番号 5; 6 C 8 ネズミ H C D R 2)、L A H I W W D D D K Y Y Q P S L K S (配列番号 6 5; 6 C 8 変異体 H C D R 2) 及び T R R Y F P F A Y (配列番号 6; 6 C 8 ネズミ H C D R 3)と比較して、上記定義に従って許容される、少なくとも 1 つのアミノ酸の差異、例えば 1、2、3、4、5 又はそれ以上のアミノ酸の差異を有する。

【 0 0 6 0 】

20

本発明の抗体分子又はその抗原結合部分は、さらに、以下を有する L 鎖可変領域を含むことができる：

以下の順序で配列中にアミノ酸を有する L C D R 1 : K、又は K - A の保存的置換、又は A - S - Q - N の保存的置換、又は N - V - G の保存的置換、又は G - T の保存的置換、又は T - N の保存的置換、又は任意のアミノ酸 (例えば、Y) - V、又は V - A の保存的置換 (配列番号 1 0) ;

以下の順序で配列中にアミノ酸を有する L C D R 2 : S、又は任意のアミノ酸 (例えば、Y、E、D、F、L 又は N) - A - S、又は任意のアミノ酸 (例えば、Y) - Y、又は任意のアミノ酸 (例えば、N) - R - Y、又は任意のアミノ酸 (例えば、A 又は D) - S、又は S の保存的置換 (配列番号 1 1) ; 及び

30

以下の順序で配列中にアミノ酸を有する L C D R 3 : Q - Q、又は G - Y の保存的置換、又は任意のアミノ酸 (例えば、R 又は H) - N、又は N - T の保存的置換、又は任意のアミノ酸 (例えば、K 又は N) - D、又は任意のアミノ酸 (例えば、W、L、S、E、V 又は N) - P - L - T (配列番号 1 2) ;

そして L C D R 1、L C D R 2、又は L C D R 3 の少なくとも 1 つは、それぞれ、アミノ酸配列 K A S Q N V G T N V A (配列番号 1 3) (6 C 8 ネズミ L C D R 1)、S A S Y R Y S (配列番号 1 4) (6 C 8 ネズミ L C D R 2) 及び Q Q Y N T D P L T (配列番号 1 5) (6 C 8 ネズミ L C D R 3)と比較して、上記定義に従って許容される、少なくとも 1 つのアミノ酸の差異、例えば 1、2、3、4、5 又はそれ以上のアミノ酸の差異を有する。

【 0 0 6 1 】

40

抗体分子又はその抗原結合部分の L C D R 1、L C D R 2、又は L C D R 3 は、それぞれ、アミノ酸配列 K A S Q N V G T N V A (配列番号 1 3 ; 6 C 8 ネズミ L C D R 1)、S A S Y R Y S (配列番号 1 4 ; 6 C 8 ネズミ L C D R 2) 及び Q Q Y N T D P L T (配列番号 1 5 ; 6 C 8 ネズミ L C D R 3)と比較して、上記定義に従って許容される、少なくとも 1 つのアミノ酸の差異、例えば 1、2、3、4、5 又はそれ以上のアミノ酸の差異を有する。

【 0 0 6 2 】

本明細書に述べられるように、本発明者は、国際公開第 2 0 0 6 / 1 0 5 0 2 1 号に開示されるネズミ抗 - G I T R 抗体 6 C 8 由来の C D R 配列を用いて多くの最適化された抗 - G I T R 抗体分子の生成に最初に成功した。本発明の好ましい抗体分子は、(動物試験

50

種における研究を促進するために) ヒト G I T R 及びカニクイザル G I T R の両方に対して結合特異性を有するよう選択されている。本明細書に記載の最適化された抗体分子のさらなる精製により、G I T R のカニクイザルオーソログへの改善された結合、ヒト G I T R シグナル伝達のアゴニスト作用の改善された効力、インビボでの A D C C 応答を促進するための F c R I I I a 受容体の改善された関与、良好な可変ドメインの安定性、高い発現収率、及び/又は低められた免疫原性が提供される。

【 0 0 6 3 】

本発明の好ましい最適化された抗 - G I T R 抗体分子は、対応するネズミ C D R 又は他の(例えば、フレームワーク)アミノ酸位置で最大数のヒト生殖系列置換を必ずしも有さない。下記試験セッションで詳しく説明するように、「最大ヒト化」抗体分子は抗 - G I T R 結合特性及び/又は他の所望の特徴に関して、必ずしも「最大最適化」する必要はないことが見出された。

10

【 0 0 6 4 】

本発明は、本明細書に定義されるような抗体分子又はその抗原結合部分のアミノ酸配列に対する修飾を包含する。例えば、本発明は、機能的に同等な可変領域、及びそれらの特性に有意に影響しない C D R、並びに増強された又は低められた活性及び/又は親和性も有する変異体を含む抗体分子及びその対応する抗原結合部分を含む。例えば、アミノ酸配列は、G I T R に対する所望の結合親和性を有する抗体を得るために突然変異誘発され得る。1つの残基から100又はそれ以上の残基を含むポリペプチド間での長さの範囲のアミノ及び/又はカルボキシル末端融合を含む挿入、及び単一又は複数のアミノ酸残基の配列内挿入が想定される。末端挿入の例は、N末端メチオニル残基を有する抗体分子、又はエピトープ標識に融合される抗体分子を含む。抗体分子の他の挿入変異体は、血液循環における抗体の半減期を高める酵素又はポリペプチドの抗体のN-又はC-末端への融合を含む。

20

【 0 0 6 5 】

本発明の抗体分子又はその抗原結合部分は、グリコシル化された及び非グリコシル化されたポリペプチド、及び他の翻訳後修飾、例えば異なる糖でのグリコシル化、アセチル化及びリン酸化を有するポリペプチドを含むことができる。本発明の抗体分子又はその抗原結合部分は、例えば1又は2以上のアミノ酸残基を付加し、除去し、又は置換し、グリコシル化部位を形成するか、又は除去することにより、そのような翻訳後修飾を変更するよう突然変異誘発され得る。

30

【 0 0 6 6 】

本発明の抗体分子又はその抗原結合部分は、例えば抗原における潜在的なタンパク質分解部位を除去するために、例えばアミノ酸置換により修飾され得る。

【 0 0 6 7 】

抗体分子又はその抗原結合部位においては、

H C D R 1 は、アミノ酸配列 G - F - S / T - L / F - S - T / A - S / F - G / S - M / Y / F / L / W - G / A - V / M - G / S (配列番号 19) を有することができ；

H C D R 2 は、アミノ酸配列 L / V - A / S - H / N - I / V - W - W - D / E - D / S - D / E - K - Y - Y - N / V - P / D - S - L / V - K - S / G (配列番号 20) を有することができ；そして

40

H C D R 3 は、アミノ酸配列 T / G / A / N / S / I - R / D / T / V - R / Q / L / M / I / V - Y - F / Y - P - F - A - Y (配列番号 21) を有することができる。

【 0 0 6 8 】

例えば、H C D R 1 は、アミノ酸配列 G - F - S / T - L / F - S - T / A - S / F - G / S - M / Y / F / L / W - G / A - V / M - G / S (配列番号 19) を有することができ；

H C D R 2 は、アミノ酸配列 L / V - A / S - H / N - I / V - W - W - D / E - D / S - D / E - K - Y - Y - V - D - S - V - K - G (配列番号 30) を有することができ；そして

H C D R 3 は、アミノ酸配列 T / G / A / N / S / I - R / D / T / V - R / Q / L / M / I / V - Y - F / Y - P - F - A - Y (配列番号 21) を有することができる。

50

【 0 0 6 9 】

抗体分子又はその抗原結合部分においては、

L C D R 1 は、アミノ酸配列 K / R - A / T - S - Q - N / D / S - V - G / S - T / S / N - N / Y - V / L - A (配列番号 2 2) を有することができ：

L C D R 2 は、アミノ酸配列 S / Y / E / D / F / L / N - A - S / Y - Y / N - R - Y / A / D - S / T (配列番号 2 3) を有することができ：そして

L C D R 3 は、アミノ酸配列 Q - Q / H - Y / R / H - N / S / R - T / K / N - D / W / L / S / E / V / N - P - L - T (配列番号 2 4) を有することができる。

【 0 0 7 0 】

例えば、L C D R 1 は、アミノ酸配列 R - A / T - S - Q - N / D / S - V - G / S - T / S / N - N / Y - V / L - A (配列番号 1 7 4) を有することができ：

L C D R 2 は、アミノ酸配列 S / Y / E / D / F / L / N - A - S / Y - Y / N - R - Y / A / D - S / T (配列番号 2 3) を有することができ：そして

L C D R 3 は、アミノ酸配列 Q - Q / H - Y / R / H - N / S / R - T / K / N - D / W / L / S / E / V / N - P - L - T (配列番号 2 4) を有することができる。

【 0 0 7 1 】

本発明の別の側面によれば、

以下の順序で配列中にアミノ酸を有する H C D R 1 : F - S - L - S - T - S / F - G - Y - G (配列番号 7) ；

以下の順序で配列中にアミノ酸を有する H C D R 2 : I - W - W - D - D - D - K - Y - Y - V - D - S - V - K - G (配列番号 8) ；及び

以下の順序で配列中にアミノ酸を有する H C D R 3 : T - R - Q / L / V - Y - F - P - F - A (配列番号 9) 、を有する H 鎖可変領域を含む、ヒトグルココルチコイド誘発 T N F 受容体 (G I T R) 及びカニクイザル G I T R に対して特異的に結合するヒト、ヒト化又はキメラ抗体分子、又はその抗原結合部分が提供される。

【 0 0 7 2 】

上記 C D R 配列は、表 1 に示されるように、「統一された」定義よりむしろ、より短い「A H o」定義を用いて定義される。A H o 定義は、構造生物学に基かれており、そして全ての免疫グロブリン v - ドメインについての命名法を統一することを目的とする。

【 0 0 7 3 】

A h o C D R 定義を用いて上記に定義されたような抗体分子又はその抗原結合部分は、以下のような統一された定義を用いて定義され得る：

H C D R 1 が以下の順序で配列中にアミノ酸を含み：G - F - S - L - S - T - S / F - G - Y - G - V - G (配列番号 2 5) ；

H C D R 2 が以下の順序で配列中にアミノ酸を含み：L - A - H - I - W - W - D - D - D - K - Y - Y - V - D - S - V - K - G (配列番号 2 6) ；そして

H C D R 3 が以下の順序で配列中にアミノ酸を含む：T - R - Q / L / V - Y - F - P - F - A - Y (配列番号 2 7) 。

【 0 0 7 4 】

本発明のこの側面によれば、抗体分子又はその抗原結合部分は、以下を有する L 鎖可変領域を含むことができる：

以下の順序で配列中にアミノ酸を有する H C D R 1 : A - S - Q - N / S - V - G - T / S - N (配列番号 1 6) ；

以下の順序で配列中にアミノ酸を有する H C D R 2 : S / Y - A - S - Y / N - R - Y - S / T (配列番号 1 7) ；及び

以下の順序で配列中にアミノ酸を有する H C D R 3 : Y - S - T / N - D - P - L (配列番号 1 8) 。

【 0 0 7 5 】

再び、上記 C D R 配列は、A H o 定義を用いて定義される。他方では、統一された定義を用いて、抗体分子又はその抗原結合部分は、以下である L 鎖可変領域を含むことができ

10

20

30

40

50

る：

H C D R 1 が以下の順序で配列中にアミノ酸を含み：R - A - S - Q - N / S - V - G - T / S - N - L - A (配列番号 2 8)；

H C D R 2 が以下の順序で配列中にアミノ酸を含み：S / Y - A - S - Y / N - R - Y - S / T (配列番号 1 7)；そして

H C D R 3 が以下の順序で配列中にアミノ酸を含む：Q - Q - Y - S - T / N - D - P - L - T (配列番号 1 7 3)。

【 0 0 7 6 】

本発明のこの側面の特定の実施形態は、以下を含む抗体分子又は抗原結合部分を含む。：

(a) アミノ酸配列 G F S L S T S G Y G V G (配列番号 2 9) (H C D R 1)、L A H I W W D D D K Y Y V D S V K G (配列番号 2 6) (H C D R 2)、T R Q Y F P F A Y (配列番号 3 1) (H C D R 3)、R A S Q S V G S N L A (配列番号 3 2) (L C D R 1)、S A S Y R Y T (配列番号 3 3) (L C D R 2) 及び Q Q Y S T D P L T (配列番号 3 4) (L C D R 3) [クローン D __ A 6]；又は

(b) アミノ酸配列 G F S L S T F G Y G V G (配列番号 3 5) (H C D R 1)、L A H I W W D D D K Y Y V D S V K G (配列番号 2 6) (H C D R 2)、T R Q Y F P F A Y (配列番号 3 1) (H C D R 3)、R A S Q S V G T N L A (配列番号 3 6) (L C D R 1)、Y A S Y R Y T (配列番号 3 7) (L C D R 2) 及び Q Q Y S N D P L T (配列番号 3 8) (L C D R 3) [クローン G __ G 1 0]；又は

(c) アミノ酸配列 G F S L S T S G Y G V G (配列番号 2 9) (H C D R 1)、L A H I W W D D D K Y Y V D S V K G (配列番号 2 6) (H C D R 2)、T R L Y F P F A Y (配列番号 3 9) (H C D R 3)、R A S Q N V G S N L A (配列番号 4 0) (L C D R 1)、S A S N R Y S (配列番号 4 1) (L C D R 2) 及び Q Q Y S T D P L T (配列番号 3 4) (L C D R 3) [クローン I __ C 2]；又は

(d) アミノ酸配列 G F S L S T S G Y G V G (配列番号 2 9) (H C D R 1)、L A H I W W D D D K Y Y V D S V K G (配列番号 2 6) (H C D R 2)、T R V Y F P F A Y (配列番号 4 2) (H C D R 3)、R A S Q N V G T N L A (配列番号 4 3) (L C D R 1)、S A S Y R Y T (配列番号 3 3) (L C D R 2) 及び Q Q Y S T D P L T (配列番号 3 4) (L C D R 3) [クローン H __ B 3]；又は

(e) アミノ酸配列 G F S L S T S G Y G V G (配列番号 2 9) (H C D R 1)、L A H I W W D D D K Y Y V D S V K G (配列番号 2 6) (H C D R 2)、T R Q Y F P F A Y (配列番号 3 1) (H C D R 3)、R A S Q S V G S N L A (配列番号 3 2) (L C D R 1)、S A S N R Y T (配列番号 4 4) (L C D R 2) 及び Q Q Y S T D P L T (配列番号 3 4) (L C D R 3) [クローン A 6 . 1]。

【 0 0 7 7 】

上記で定義されたようなクローン D __ A 6 の C D R 配列を含む抗体分子又はその抗原結合部分は、本発明の特定の特異的实施形態である。

【 0 0 7 8 】

本発明の抗体分子又はその抗原結合部分は、国際公開第 2 0 0 6 / 1 0 5 0 2 1 号において「H u N 6 C 8 - A g l y」として標識されたヒト化ネズミ抗 - G I T R I g G 抗体と比較して、改善された G I T R 活性化を有することができる。

【 0 0 7 9 】

既知の抗体 H u N 6 C 8 - A g l y は、leap Therapeutics, Inc. により現在開発されている抗体「T R X - 5 1 8」(又は「T R X 5 1 8」)と同義であると理解されている。H u N 6 C 8 - A g l y / T R X - 5 1 8 抗体は、国際公開第 2 0 0 6 / 1 0 5 0 2 1 号に定義されるような「配列番号 5 3」(及び下記表 2 における「G I T R - V H 1」配列に応答する)、及び国際公開第 2 0 0 6 / 1 0 5 0 2 1 号に定義されるような「配列番号 4 4」(及び下記表 2 における G I T R - V L 1 配列に対応する)を含む。H u N 6 C 8 - A g l y / T R X - 5 1 8 L 鎖の完全配列は、国際公開第 2 0 0 6 / 1 0 5 0 2 1 号の「配列番号 5 8」により定義され、そして H u N 6 C 8 - A g l y / T R X - 5 1 8 H 鎖の完

10

20

30

40

50

全配列は、国際公開第 2 0 0 6 / 1 0 5 0 2 1 号の「配列番号 6 1」により定義される。

【 0 0 8 0 】

本明細書において使用されるような改善された G I T R 活性化は、例えば、以下の実施例 1 に記載されるように、Promega G I T R Bioassay Kit (CS184006)において最大のシグナル (R L U 値又は活性化倍数) を示すとして定義され得、すなわち抗体 T R X - 5 1 8 について観察される倍率よりも少なくとも 1 . 5 倍高い。

【 0 0 8 1 】

本発明の抗体分子又はその抗原結合部分は、抗体 T R X - 5 1 8 と比較して、改善されたイン・シリコ免疫原性を有することができる。

【 0 0 8 2 】

イン・シリコ免疫原性は、例えば、下記実施例 1 に記載されるように、Lonza Epibase ISシステム (バージョン 3) を用いて決定され得る。

【 0 0 8 3 】

本発明の抗体分子又はその抗原結合部分は、Lonza Epibase ISシステム (バージョン 3) により決定されるように、1 6 0 0 以下、例えば 1 5 0 0 以下、1 1 0 0 以下、又は特に 9 0 0 以下のイン・シリコ免疫原性総 D R B 1 スコアを有することができる。

【 0 0 8 4 】

本発明の抗体分子又はその抗原結合部分は、抗体 T R X - 5 1 8 と比較して、カニクイザル G I T R に対して改善された親和性を有することができる。親和性は、以下の実施例 1 に記載されるように S P R 分析を用いて決定され得る。

【 0 0 8 5 】

本発明の他の特定の実施形態によれば、抗体分子又はその抗原結合部分は、以下を含むことができる：

(a) アミノ酸配列 G F S L S T S G M G M S (配列番号 6 1) (H C D R 1)、L A H I W W D D D K Y Y V D S V K G (配列番号 2 6) (H C D R 2)、N R R Y F P F A Y (配列番号 4 5) (H C D R 3)、R A S Q N V G S N L A (配列番号 4 0) (L C D R 1)、S A S Y R A T (配列番号 4 6) (L C D R 2) 及び Q Q Y S N D P L T (配列番号 3 8) (L C D R 3) [クローン C _ B 1 0]; 又は

(b) アミノ酸配列 G F S L S T S G Y G V S (配列番号 4 7) (H C D R 1)、L A H V W W D D E K Y Y V D S V K G (配列番号 4 8) (H C D R 2)、N R R Y F P F A Y (配列番号 4 5) (H C D R 3)、R A S Q S V G T N V A (配列番号 4 9) (L C D R 1)、S A S Y R A T (配列番号 4 6) (L C D R 2) 及び Q Q Y N N W P L T (配列番号 5 0) (L C D R 3) [クローン C _ D 5]; 又は

(c) アミノ酸配列 G F S F S T S G Y G V S (配列番号 5 1) (H C D R 1)、L A H I W W D D E K Y Y V D S V K G (配列番号 5 2) (H C D R 2)、N R R Y F P F A Y (配列番号 4 5) (H C D R 3)、R A S Q N V G T N L A (配列番号 4 3) (L C D R 1)、S A S Y R A S (配列番号 5 3) (L C D R 2) 及び Q Q Y S T D P L T (配列番号 3 4) (L C D R 3) [クローン C _ F 2]; 又は

(d) アミノ酸配列 G F S L S T S G M G V S (配列番号 5 4) (H C D R 1)、V A H I W W D D E K Y Y V D S V K G (配列番号 5 5) (H C D R 2)、N R R Y F P F A Y (配列番号 4 5) (H C D R 3)、R A S Q S V G S N L A (配列番号 3 2) (L C D R 1)、S A S Y R A T (配列番号 4 6) (L C D R 2) 及び Q Q Y S T D P L T (配列番号 3 4) (L C D R 3) [クローン F _ B 1 1]; 又は

(e) アミノ酸配列 G F S F S T S G M G V S (配列番号 5 6) (H C D R 1)、V A H I W W D D E K Y Y V D S V K G (配列番号 5 5) (H C D R 2)、N R R Y F P F A Y (配列番号 4 5) (H C D R 3)、R A S Q S V G S N V A (配列番号 5 7) (L C D R 1)、S A S N R Y T (配列番号 4 4) (L C D R 2) 及び Q Q Y S T D P L T (配列番号 3 4) (L C D R 3) [クローン F _ B 9]; 又は

(f) アミノ酸配列 G F S L S T S G M G M G (配列番号 5 8) (H C D R 1)、L A H I W W D D D K Y Y V D S V K G (配列番号 2 6) (H C D R 2)、S R R Y F P F A Y (

10

20

30

40

50

配列番号 59) (HCDR3)、RASQNVGSNLA (配列番号 40) (LCDR1)、SASYRYT (配列番号 33) (LCDR2) 及び QQYSTDPLT (配列番号 34) (LCDR3) [クローン H__A3]; 又は

(g) アミノ酸配列 GFSLSTSSYGVS (配列番号 60) (HCDR1)、VAHIWWDDDEKYYVDSVKG (配列番号 55) (HCDR2)、TRL YFPFAY (配列番号 39) (HCDR3)、RASQSVGTNLA (配列番号 36) (LCDR1)、SASYRYT (配列番号 33) (LCDR2) 及び QQYSNDPLT (配列番号: 38) (LCDR3) [クローン J__C5]; 又は

(h) アミノ酸配列 GFSLSTSGMGMS (配列番号 61) (HCDR1)、LAHIWWDDDEKYYVDSVKG (配列番号 52) (HCDR2)、NRRYFPFAY (配列番号 45) (HCDR3)、RASQSVGTNVA (配列番号 49) (LCDR1)、SASYRAS (配列番号 53) (LCDR2) 及び QQYSTDPLT (配列番号 34) (LCDR3) [クローン K__A12]; 又は

(i) アミノ酸配列 GFSLSTSGYGMS (配列番号 62) (HCDR1)、VAHIWWDDDEKYYVDSVKG (配列番号 55) (HCDR2)、TRQYFPFAY (配列番号 31) (HCDR3)、RASQSVGSNLA (配列番号 32) (LCDR1)、SASYRAT (配列番号 46) (LCDR2) 及び QQYSTDPLT (配列番号 34) (LCDR3) [クローン MH]; 又は

(j) アミノ酸配列 GFSLSTSGMGMS (配列番号 61) (HCDR1)、VAHIWWDDDEKYYVDSVKG (配列番号 55) (HCDR2)、TRQYFPFAY (配列番号 31) (HCDR3)、RASQSVGSNLA (配列番号 32) (LCDR1)、SASYRAT (配列番号 46) (LCDR2) 及び QQYSTDPLT (配列番号 34) (LCDR3) [クローン MH - 1]; 又は

(k) アミノ酸配列 GFSLSTSGYGVS (配列番号 47) (HCDR1)、VAHIWWDDDEKYYVDSVKG (配列番号 55) (HCDR2)、TRQYFPFAY (配列番号 31) (HCDR3)、RASQSVGSNLA (配列番号 32) (LCDR1)、SASYRAT (配列番号 46) (LCDR2) 及び QQYSTDPLT (配列番号 34) (LCDR3) [クローン MH - 2]; 又は

(l) アミノ酸配列 GFSLSTSGYGMS (配列番号 62) (HCDR1)、VAHIWWDDDEKYYVDSVKG (配列番号 55) (HCDR2)、TRQYFPFAY (配列番号 31) (HCDR3)、RASQNVGSNLA (配列番号 40) (LCDR1)、SASYRAT (配列番号 46) (LCDR2) 及び QQYSTDPLT (配列番号 34) (LCDR3) [クローン MH - 3]; 又は

(m) アミノ酸配列 GFSLSTSGYGMS (配列番号 62) (HCDR1)、VAHIWWDDDEKYYVDSVKG (配列番号 55) (HCDR2)、TRQYFPFAY (配列番号 31) (HCDR3)、RASQSVGSNVA (配列番号 57) (LCDR1)、SASYRAT (配列番号 46) (LCDR2) 及び QQYSTDPLT (配列番号 34) (LCDR3) [クローン MH - 4]; 又は

(n) アミノ酸配列 GFSLSTSGYGMS (配列番号 62) (HCDR1)、VAHIWWDDDEKYYVDSVKG (配列番号 55) (HCDR2)、TRQYFPFAY (配列番号 31) (HCDR3)、RASQSVGSNLA (配列番号 32) (LCDR1)、SASYRYT (配列番号 33) (LCDR2) 及び QQYSTDPLT (配列番号 34) (LCDR3) [クローン MH - 5]; 又は

(o) アミノ酸配列 GFSLSTSGYGVG (配列番号 29) (HCDR1)、LAHIWWDDDDKYYVDSVKG (配列番号 26) (HCDR2)、TRQYFPFAY (配列番号 31) (HCDR3)、RASQSVGSNLA (配列番号 32) (LCDR1)、SASNRYT (配列番号 44) (LCDR2) 及び QQYSTNPLT (配列番号 63) (LCDR3) [クローン A6 . 2]; 又は

(p) アミノ酸配列 GFSLSTSGYGVS (配列番号 47) (HCDR1)、LAHIWWDDDDKYYVDSVKG (配列番号 26) (HCDR2)、TRQYFPFAY (配

10

20

30

40

50

列番号 31) (HCDR3)、RASQSVGSNLA (配列番号 32) (LCDR1)、SASNRYT (配列番号 44) (LCDR2) 及び QQYSTDP LT (配列番号 34) (LCDR3) [クローン A6.3]; 又は

(q) アミノ酸配列 GFSLS TSGY GMS (配列番号 62) (HCDR1)、LAHIWWDDDKYYVDSVKG (配列番号 26) (HCDR2)、TRQYFPFAY (配列番号 31) (HCDR3)、RASQSVGSNLA (配列番号 32) (LCDR1)、SASNRYT (配列番号 44) (LCDR2) 及び QQYSTDP LT (配列番号 34) (LCDR3) [クローン A6.4]; 又は

(r) アミノ酸配列 GFSLS TSGY GMG (配列番号 64) (HCDR1)、LAHIWWDDDKYYVDSVKG (配列番号 26) (HCDR2)、TRQYFPFAY (配列番号 31) (HCDR3)、RASQSVGSNLA (配列番号 32) (LCDR1)、SASNRYT (配列番号 44) (LCDR2) 及び QQYSTDP LT (配列番号 34) (LCDR3) [クローン A6.5]。

【0086】

本発明の他の特定の実施形態によれば、抗体分子又はその抗原結合部分は、以下の表3及び4において特定されるさらなる個々のクローンについて列挙されるHCDR1 - 3及びLCDR1 - 3配列を含むことができる。

【0087】

特定のクローンがそれらの名称に下線を含む場合、その下線は同じクロンのハイフンに置き換えられる。例えば、名称「D__A6」及び「D - A6」は同じクローンを言及し、そしてそれらの名称は本明細書においては、交換可能的に使用される。

【0088】

本明細書において定義されるような抗体分子又はその抗原結合部分は、翻訳後修飾 (PTM) 部位、例えばグリコシル化部位 (N結合された又はO - 結合された)、脱アミノ化部位、リン酸化部位又は異性化/断片化部位を除去する、1又は2以上の置換、欠失及び/又は挿入を含むことができる。

【0089】

350種類以上のPTMが知られている。PTMの主要形は、リン酸化、グリコシル化 (N及びO結合)、スモイル化、パルミトイル化、アセチル化、硫酸化、ミリストイル化、プレニル化及びメチル化 (K及びR残基の) を含む。特定のPTMを担当する推定アミノ酸部位を同定する統計学的方法は、当業界において良く知られている (Zhou et al., 2016, Nature Protocols 1: 1318-1321を参照のこと)。例えば、置換、欠失及び/又は挿入によるそのような部位の除去、及び次に、(a) 結合活性及び/又は(b) PTMの欠失についての任意の試験 (実験的に及び/又は理論的に) が企画される。

【0090】

例えば、6C8ネズミLCDR1 (本明細書に定義されるような、すなわちアミノ酸配列KASQNVGTNVA (配列番号13)) は、残基8 (T) で推定O - 結合グリコシル化部位を有することが同定されている。例えば、保存的置換 (例えば、S、A又はNへの) によるこの部位の除去が想定される (例えば、クローンD__A6、及び表3及び4における他のクローンにおけるように)。

【0091】

同様に、6C8ネズミLCDR3 (本明細書において定義されるような、すなわちアミノ酸配列QQYNTDPLT (配列番号15)) は、残基4 (N) で推定脱アミド化部位を有することが同定されている。例えば、保存的置換 (例えば、S、H、D、T、K、G、E、Q又はRへの) によるこの部位の除去が推定される (例えば、クローンD__A6、及び表3及び4における他のクローンにおけるように)。

【0092】

また、例として、6C8マウスHCDR1 (本明細書で定義されるように、すなわちアミノ酸配列GFSLS TSGMGV G (配列番号4)) は、残基9 (M) に推定酸化部位を有することが同定されている。(Y、F、L、又はWなどの) 任意のアミノ酸への置換

10

20

30

40

50

などによるこの部位の除去が想定されています（例えば、クローン D __ A 6 及び表 3 及び 4 の他のクローンにおけるように）。

【 0 0 9 3 】

抗体分子又はその抗原結合部分は、ヒト、ヒト化又はキメラであり得る。

【 0 0 9 4 】

抗体分子又はその抗原結合部分は、C D R が挿入されている 1 又は 2 以上のヒト可変ドメインフレームワーク足場を含むことができる。

【 0 0 9 5 】

抗体分子又はその抗原結合部分は、対応する H C D R 配列が挿入されている I G H V 3 - 7 ヒト生殖系列足場を含むことができる。

10

【 0 0 9 6 】

抗体分子又はその抗原結合部分は、対応する L C D R 配列が挿入されている I G K V 3 - 1 1 ヒト生殖系列足場を含むことができる。

【 0 0 9 7 】

抗体分子又はその抗原結合部分は、免疫学的に不活性な定常領域を含むことができる。

【 0 0 9 8 】

抗体分子又はその抗原結合部分は、F a b フラグメント、F (a b) 2 フラグメント、F v フラグメント、四量体抗体、四価抗体、多重特異性抗体（例えば二価抗体）、ドメイン特異的抗体、単ドメイン抗体、モノクローナル抗体又は融合タンパク質であり得る。抗体分子及びそれらの構築及び使用方法は、例えば Holliger & Hudson (2005, Nature Biotechnol. 23(9): 1126-1136) に記載されている。

20

【 0 0 9 9 】

本発明の別の側面によれば、治療剤に結合される、本明細書において定義されるような本発明の抗体分子又はその抗原結合部分を含む免疫複合体が提供される。

【 0 1 0 0 】

適切な治療剤の例は細胞毒素、放射性同位元素、化学療法剤、免疫調節剤、抗血管新生剤、抗増殖剤、プロアポトーシス剤、及び細胞増殖抑制及び細胞溶解酵素（例えば、RNA ses）を含む。さらなる治療剤は、治療用核酸、例えば免疫調節薬、抗血管新生薬、抗増殖薬、又はアポトーシス促進薬をコードする遺伝子を含む。それらの薬物記載は、相互的に排他的ではなく、そして従って、治療剤は、1 又は 2 以上の上記用語を用いて説明され得る。

30

【 0 1 0 1 】

免疫複合体への使用のための適切な治療剤の例は、タキサン、メイタンシン、CC-1065 及びデュオカルマイシン、カリケアマイシン及び他のエンジン、及びオーリスタチンを含む。他の例は、葉酸拮抗薬、ピンカアルカロイド、及びアントラサイクリンを含む。植物毒素、他の生物活性タンパク質、酵素（すなわち、A D E P T）、放射性同位体、光増感剤がまた、免疫複合体に使用され得る。さらに、複合体は、リボソーム又はポリマーのような細胞毒性剤として二次担体を用いて製造され得る。適切な細胞毒素は、細胞の機能を阻害するか又は防止し、そして / 又は細胞の破壊をもたらす剤を含む。代表的な細胞毒素は、抗生物質、チューブリン重合インヒビター、DNA に結合し、そして破壊するアルキル化剤、及びタンパク質合成、又はタンパク質キナーゼ、ホスファターゼ、トポイソメラーゼ、酵素及びサイクリンなどの必須細胞タンパク質の機能を破壊する剤を含む。

40

【 0 1 0 2 】

代表的な細胞毒素は以下を含むが、但しそれらだけには限定されない：ドキソルビシン、ダウノルビシン、イダルビシン、アクリルビシン、ゾルビシン、ミトキサントロン、エピルビシン、カルビシン、ノガラマイシン、メノガリル、ピタルビシン、パルルビシン、シタラビン、ゲムシタビン、トリフルリジン、アンシタビン、エノシタビン、アザシチジン、ドキシフルヒジン、ペントスタチン、プロクスフジン、カペシタビン、クラドピン、デシタビン、フロクスヒジン、フルダラビン、グゲロチン、ピューロマイシン、テガフル、チアゾフーン、アダマイシン、シスプラチン、カルボプラチン、シクロホスファミド

50

、ダカルバジン、ビンブラスチン、ピンクリスチン、ミトキサントロン、ブレオマイシン、メクロレタミン、プレドニゾン、プロカルバジン、メトトレキサート、フルオロウラシル、エトポシド、タキソール、タキソール類似体、プラチン、例えばシスプラチン及びカルボプラチン、マイトマイシン、チオテパ、タキサン、ピンクリスチン、ダウノルビシン、エピルビシン、アクチノマイシン、オートラマイシン、アザセリン、ブレオマイシン、タモキシフェン、イダルビシン、ドラスタチン/オーリスタチン、ヘミアステリン、エスペラマイシン、及びメイタンシノイド。

【0103】

適切な免疫調節剤は、腫瘍に対するホルモン作用をブロックする抗ホルモン剤、及びサイトカイン産生を抑制し、自己抗原発現をダウンレギュレートするか、又はMHC抗原をマスクする免疫抑制剤を含む。

10

【0104】

本明細書に記載されるような本発明の抗体分子又はその抗原結合部分をコードする核酸分子がまた提供される。

【0105】

本明細書に記載されるような本発明の核酸分子を含むベクターがさらに提供される。

【0106】

本明細書に記載されるような本発明の核酸分子又はベクターを含む宿主細胞がまた提供される。

【0107】

さらなる側面によれば、抗体及び/又はその抗原結合部分の発現及び/又は生成をもたらす条件下で、本発明の宿主細胞を培養し、そして前記宿主細胞又は培養物から抗体及び/又はその抗原結合部分を単離する、抗-GITR抗体及び/又はその抗原結合部分の生成方法が提供される。

20

【0108】

本発明の別の側面によれば、本明細書に記載されるような本発明の抗体分子又はその抗原結合部分、又は本明細書に記載されるような本発明の核酸分子、又は本明細書に記載されるような本発明のベクターを含む医薬組成物が提供される。

【0109】

さらに、有効量の本明細書に記載されるような本発明の抗体分子又はその抗原結合部分、又は本明細書に記載されるような本発明の免疫複合体、又は本明細書に記載されるような本発明の核酸分子、又は本明細書に記載されるような本発明のベクター、又は本明細書に記載されるような本発明の医薬組成物を投与することを含む、対象における免疫応答を増強するための方法が提供される。

30

【0110】

さらなる側面によれば、有効量の本明細書に記載されるような本発明の抗体分子又はその抗原結合部分、又は本明細書に記載されるような本発明の免疫複合体、又は本明細書に記載されるような本発明の核酸分子、又は本明細書に記載されるような本発明のベクター、又は本明細書に記載されるような本発明の医薬組成物を投与することを含む、対象における癌の治療又は予防方法が提供される。

40

【0111】

癌は例えば、膵臓癌、メラノーマ、乳癌、肺癌、気管支癌、結腸直腸癌、前立腺癌、胃癌、卵巣癌、膀胱癌、脳又は中枢神経系の癌、末梢神経系癌、食道癌、子宮頸癌、子宮癌又は子宮内膜癌、口腔癌又は咽頭癌、肝臓癌、腎臓癌、精巣癌、胆道癌、小腸又は虫垂癌、唾液腺癌、甲状腺癌、副腎癌、骨肉腫、軟骨肉腫、及び血液組織の癌から成る群から選択され得る。

【0112】

本発明はまた、癌の治療への使用のための、本明細書に記載されるような本発明の抗体分子又はその抗原結合部分、又は本明細書に記載されるような本発明の免疫複合体、又は本明細書に記載されるような本発明の核酸分子、又は本明細書に記載されるような本発明

50

のベクター、又は本明細書に記載されるような本発明の医薬組成物も提供する。

【0113】

別の側面によれば、本発明は、抗体、その抗原結合部分、免疫複合体、核酸、ベクター又は医薬組成物が、第2の治療剤、例えば抗癌剤と組合して、別々に、連続して、又は同時に使用するためのものである、本明細書に記載されるような本発明の使用のための抗体分子又はその抗原結合部分、又は免疫複合体、又は核酸分子、又はベクター、又は本明細書に記載されるような本発明の治療方法を提供する。

【0114】

さらなる側面によれば、癌の治療のための薬物の製造のためへの、本明細書に記載されるような本発明の抗体分子又はその抗原結合部分、又は、本明細書に記載されるような本発明の免疫複合体、又は、本明細書に記載されるような本発明の核酸分子、又は、本明細書に記載されるような本発明のベクター、又は、本明細書に記載されるような本発明の医薬組成物の使用が提供される。

10

【0115】

本発明の医薬組成物は、医薬的に許容できる賦形剤を含むことができる。医薬的に許容できる賦形剤は、二次反応を引起さず、そして例えば抗-GITR抗体分子の投与の促進、その寿命の延長及び/又は体内でのその有効性の上昇、又は溶液へのその溶解度の上昇を可能にする医薬組成物中に入る化合物又は化合物の組合せであり得る。それらの医薬的に許容できるピークルは、周知であり、そして抗-GITR抗体分子の投与形式の機能として当業者により適合されるであろう。

20

【0116】

いくつかの実施形態によれば、抗-GITR抗体分子は、投与の前、再構成のために凍結乾燥形で提供され得る。例えば、凍結乾燥された抗体分子は、個体への投与の前、滅菌水において再構成され、そして生理食塩水と共に混合され得る。

【0117】

抗-GITR抗体分子は通常、抗体分子の他に少なくとも1つの成分を含む医薬組成物の形で投与されるであろう。従って、医薬組成物は、抗-GITR抗体分子の他に、医薬的に許容できる賦形剤、担体、緩衝剤、安定剤又は当業者に良く知られている他の材料を含むことができる。そのような材料は、非毒性であるべきであり、そして抗-GITR抗体分子の効力を妨げるべきではない。担体又は他の材料の正確な性質は、以下に論じられるように、ポーラス、注入、注射又は他の適切な経路によってであり得る投与経路に依存するであろう。

30

【0118】

非経口投与、例えば注射による皮下又は静脈内投与に関しては、抗-GITR抗体分子を含む医薬組成物は、発熱物質を含まず；そして適切なpH、等張性及び安定性を有する非経口的に許容できる水溶液の形であり得る。当業者は、例えば等張性ピークル、例えば塩化ナトリウム注射液、リンゲル注射液、乳酸加リンゲル注射液を用いて適切な溶液を調製することができる。必要に応じて、緩衝液、例えばリン酸、クエン酸及び他の有機酸を含む、保存剤、安定剤、緩衝剤、酸化防止剤及び/又は他の添加剤；酸化防止剤、例えばアスコルビン酸及びメチオニン；保存剤（例えば、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム；塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチルまたはベンジルアルコール；アルキルパラベン、例えばメチルまたはプロピルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3'-ペンタノール；及びm-クレゾール）；低分子量ポリペプチド；タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチン、免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えばポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、又はリジン；単糖類、二糖類、及びグルコース、マンノース又はデキストリンを含む他の炭水化物；キレート剤、例えばEDTA；糖、例えばスクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトール；塩形成対イオン、例えばナトリウム；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）；及び/又は非イオン性界面活性剤、例えばTWEEN（登録商標）、PLURONICS（

40

50

登録商標)又はポリエチレングリコール(P E G)が使用され得る。

【0119】

抗-G I T R抗体分子を含む医薬組成物は、単独で又は他の治療と組合して、治療される状態に依存して、同時に又は連続的に投与され得る。

【0120】

本明細書に記載されるような抗-G I T R抗体分子は、予防的又は防止的治療(例えば、個体に発生する状態のリスクを低めるために個体における状態の発症前の治療;又は発症後のその重症度の低下)を含む、ヒト又は動物の治療方法に使用され得る。治療方法は、抗-G I T R抗体分子を、その必要な個体に投与することを含むことができる。

【0121】

投与は通常、「治療的有效量」であり、これは患者に利点を示すのに十分である。そのような利点は、少なくとも1つの症状の少なくとも改善であり得る。実際の投与量、及び投与の速度及び時間経過は、治療される対象の性質及び重症度、治療される特定の哺乳類、個々の患者の臨床状態、障害の原因、組成物の送達部位、投与方法、投与スケジュール及び開業医に知られている他の要因に依存するであろう。治療の処方、例えば投与量などの決定は、一般開業医及び他の医師の責任の範囲内であり、そして症状の重症度及び/又は治療される疾患の進行に依存する。抗体分子の適切な用量は、当業界における周知である(Ledermann J.A. et al., 1991, Int. J. Cancer 47: 659-664; Bagshawe K.D. et al., 1991, Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals 4: 915-922)。特定の投与量は、本明細書に示されており、又はPhysician's Desk Reference (2003)に記載されており、投与される医薬の種類に応じて使用されてもよい。抗体分子の治療的有效量又は適切な用量は、動物モデルにおけるそのインビトロ活性及びインビボ活性を比較することにより決定され得る。マウス及び他の試験動物の有効用量をヒトに外挿する方法は知られている。正確な用量は、抗体が予防用か又は治療用か、治療される領域のサイズ及び位置、抗体の正確な性質(例えば、全抗体、断片)、及び抗体に結合される検出可能な標識又は他の分子の性質を含む多くの要因に依存するであろう。

【0122】

典型的な抗体用量は、全身投与の場合、100 µg ~ 1 g、及び局所投与の場合、1 µg ~ 1 mgの範囲であろう。最初のより高い負荷用量、続いて1又は2回以上のより低い用量が投与され得る。典型的には、抗体は全抗体、例えばIg G 1又はIg G 4アイソタイプであろう。これは、成人患者の1回の治療のための用量であり、小児及び乳児では、比例して調整され、そしてまたは、分子量に応じて他の抗体形式でも調整され得る。治療は医師の裁量で、毎月、毎週2回、毎週又は毎月の間隔で反復され得る。個体の治療スケジュールは、抗体組成物の薬物動態学的及び薬力学的特性、投与経路及び治療される状態の性質に依存することができる。

【0123】

治療は定期的であってもよく、投与間の期間は、約2週間以上、例えば約3週間以上、約4週間以上、約1ヶ月以上、約5週間以上、又は約6週間以上であってもよい。例えば、治療は、2~4週間ごと、又は4~8週間ごとであり得る。治療は、手術の前及び/又は後に行われ得、そして/又は外科的治療又は侵襲的手順の解剖学的部位に直接投与又は適用され得る。適切な製剤及び投与経路は上記に記載されている。

【0124】

いくつかの実施形態によれば、本明細書に記載されるような抗-G I T R抗体分子は、皮下注射として投与され得る。皮下注射は、例えば長期の予防/治療のために、自動注射器を用いて投与され得る。

【0125】

いくつかの好ましい実施形態によれば、抗-G I T R抗体分子の治療効果は、投与量に依存して、いくつかの半減期にわたって持続することができる。例えば、抗-G I T R抗体分子の1回の用量の治療効果は、個体において、1ヶ月以上、2ヶ月以上、3ヶ月以上、4ヶ月以上、5ヶ月以上、又は6ヶ月以上、持続することができる。

10

20

30

40

50

【 0 1 2 6 】

本発明はまた、

(1) ヒト化抗 - G I T R 抗体分子又はその抗原結合部分を生成するために、非ヒト源からの抗 - G I T R C D R をヒト V ドメインフレームワークに移植する工程；

(2) C D R において 1 又は 2 以上の変異を含むヒト化抗 - G I T R 抗体分子又はその抗原結合部分のクローンのファージライブラリーを生成する工程；

(3) ヒト G I T R 及びカニクイザル G I T R に結合するためのファージライブラリーをスクリーニングし；

(4) ヒト G I T R 及びカニクイザル G I T R に対する結合特異性を有するクローンを、工程 (3) から選択する工程；及び

(5) 工程 (4) から選択されたクローンから、ヒト G I T R 及びカニクイザル G I T R 又はその抗原結合部分に対して特異的に結合する抗体分子を生成する工程を含む、ヒト G I T R 及びカニクイザル G I T R に対して特異的に結合する抗体分子又はその抗原結合部分の生成方法も提供する。

【 0 1 2 7 】

上記方法に適用できる改良点は、以下の実施例 1 に記載される。

【 0 1 2 8 】

本明細書において使用される場合、用語「グルココルチコイド誘発性 T N F 受容体」及び「G I T R」は、グルココルチコイド誘発性 T N F 受容体、及び G I T R の生物学的活性の少なくとも一部を保持するその変異体を言及する。本明細書において使用される場合、G I T R は、ヒト、ラット、マウス及びニワトリを含む、すべての哺乳類種の生来の配列 G R I R を含む。用語「G I T R」は、ヒト G I T R の変異体、アイソフォーム及び種相同体を含むために使用される。本発明の抗体は、ヒト以外の種由来の G I T R、特にカニクイザル (*Macaca fascicularis*) 由来の G I T R と交差反応することができる。特定の実施形態によれば、抗体は、ヒト G I T R に対して完全に特異的であってもよく、そして非ヒト交差反応性を示さなくてもよい。

【 0 1 2 9 】

本明細書において使用される場合、本発明の抗体に関して使用される「アンタゴニスト」又は「抗 - G I T R アンタゴニスト抗体」(互換的に、「抗 - G I T R 抗体」と呼ばれる) は、G I T R に結合することができ、そして G I T R シグナル伝達により介在される G I T R 生物学的活性及び / 又は下流経路を阻害する抗体を言及する。抗 - G I T R アンタゴニスト抗体は、受容体結合及び / 又は G I T R に対する細胞応答の誘発などの G I T R シグナル伝達により介在される下流経路を含む、G I T R 生物学的活性をブロックし、拮抗し、抑制するか又は低める (有意に含む) ことができる抗体を包含する。本発明の目的のためには、用語「抗 - G I T R アンタゴニスト抗体」とは、すべての用語、タイトル及び機能的状態及び特徴を包含し、それにより、G I T R 自体、及び G I T R 生物学的活性 (T e f f の活性化を促進し、そして T r e g の活性を低めるその能力を含むが、但しそれらだけには限定されない)、又は活性又は生物学的活性の結果が、実質的に無効化され、低められるか、又は有意な程度に中和されることが明確に理解されるであろう。

【 0 1 3 0 】

G I T R は、それが他の受容体に結合するよりも、より大きな親和性、結合力、より容易に及び / 又はより長い期間、結合する場合、G I T R と、「特異的に相互作用し」、「優先的に結合し」、「結合し」又は「相互作用する」。

【 0 1 3 1 】

「抗体分子」は、免疫グロブリン分子の可変領域に位置する少なくとも 1 つの抗原認識部位を通して、標的、例えば炭水化物、ポリヌクレオチド、脂質、ポリペプチド等に対して特異的に結合できる免疫グロブリン分子である。本明細書において使用される場合、用語「抗体分子」とは、損なわれていないポリクローナル又はモノクローナル抗体のみならず、また任意の抗原結合フラグメント (例えば、「抗原結合部分」又はその一本鎖、抗体を含む融合タンパク質、及び s c F v、一本鎖ドメイン抗体 (例えば、サメ及びラクダ抗体

10

20

30

40

50

)、マキシボディ、ミニボディ、イントラボディ、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、 v -NAR及びbis-scFv(但し、それらだけには限定されない)を含む抗原認識部位を含む免疫グロブリン分子の任意の他の修飾されたコンフィギュレーションも含む。

【0132】

「抗体分子」は、IgG、IgA又はIgM(又はそのサブクラス)などの任意のクラスの抗体を含み、そしてその抗体は、任意の特定のクラスのものである必要はない。H鎖の定常領域の抗体アミノ酸配列に依存して、免疫グロブリンは異なったクラスに割り当てられ得る。免疫グロブリンには、IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMの5つの主要クラスがあり、そしてそれらのいくつかはさらに、サブクラス(アイソタイプ)、例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及びIgA2に分割され得る。異なるクラスの免疫グロブリンに対応するH鎖定常領域は、それぞれアルファ、デルタ、イプシロン、ガンマ、及びミューと呼ばれる。免疫グロブリンの異なるクラスのサブユニット構造及び三次元配置は良く知られている。

10

【0133】

本明細書において使用される場合、用語「抗原結合部分」とは、GITRに対して特異的に結合する能力を保持する損なわれていない抗体の1又は2以上のフラグメントを言及する。抗体分子の抗原結合機能は、損なわれていない抗体のフラグメントにより実施され得る。用語「抗体分子の「抗原結合部分」内に含まれる結合フラグメントの例は、Fab; Fab'; F(ab')₂; VH及びCH1ドメインから成るFdフラグメント; 20 抗体の単一アームのVL及びVHドメインから成るFvフラグメント; 単一ドメイン抗体(dAb)フラグメント; 及び単離された相補性決定領域(CDR)を含む。

20

【0134】

用語「Fc領域」は、免疫グロブリンH鎖のC末端領域を定義するために使用される。「Fc領域」は、生来の配列Fc領域又は変異体Fc領域であり得る。免疫グロブリンH鎖のFc領域の境界は異なるかも知れないが、通常、ヒトIgGH鎖Fc領域は、Cys226位置のアミノ酸残基から、又はPro230からそのカルボキシル末端まで伸びると定義されている。Fc領域における残基の番号付けは、KabataにおけるようなEUIンデックスの番号である。免疫グロブリンのFc領域は一般的に、2つの定常ドメインCH2及びCH3を含む。当業界において知られているように、Fc領域は、ダイマー又はモノマー形で存在し得る。

30

【0135】

抗体の「可変領域」とは、単独で又は組合せて、抗体L鎖の可変領域又は抗体H鎖の可変領域を言及する。当業界において知られているように、H鎖及びL鎖の可変領域は、それぞれ、超可変領域としても知られている3つの相補性決定領域(CDR)により結合される4つのフレームワーク領域(FR)から成り、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する。例えば抗体をヒト化又は最適化する際、CDRに隣接するFRを選択する場合、同じ標準クラスのCDR配列を含む抗体からのFRが好ましい。それにもかかわらず、そのようなFRは、例えば、必要に応じて長さを増加するか又は短縮することを含む、突然変異又は欠失により修飾され得る。

40

【0136】

本出願で使用される「統一された」CDR定義は、免疫グロブリンレパートリー分析、及び抗体の単離及び抗原との共結晶の構造分析の組合せに基かれる、現場で創造された多くの異なる、しばしば矛盾するスキームに使用されるドメインを組合す(Swindells et al., 2016, abYsis: Integrated Antibody Sequence and Structure-Management, Analysis, and Prediction. J Mol Biol. [PMID: 27561707; Epub 22 August 2016])による再考を参照のこと)。本明細書において使用されるCDR定義(「統一された」定義又は「私たちのもの」として言及される場合、そのようなすべての以前の洞察の教訓を組み込み、そして潜在的に標的結合相補性を仲介する完全な残基の景観をサンプリングするために必要とされるすべての適切なループ位置を含む。

50

【 0 1 3 7 】

表 1 は、同じ C D R を定義するための周知の代替システムと比較して、「統一された」定義に従って本明細書に定義される 6 C 8 ネズミ抗 - G I T R 抗体 C D R のアミノ酸配列を示す。本発明のその抗原結合部分の抗体分子は、表 1 に示される C D R 定義のいずれかを用いて定義され得る。

【 0 1 3 8 】

参照のために、C 6 8 ネズミ抗 - C I T R 抗体 H 鎖及び L 鎖可変領域についての完全な古典的な K a b a t 番号付け（国際公開第 2 0 1 6 / 1 0 5 0 2 1 号に開示されるような）は、以下の通りである。

可変 H 鎖：

10

【 0 1 3 9 】

H1 Q, H2 V, H3 T, H4 L, H5 K, H6 E, H7 S, H8 G, H9 P, H10 G, H11 I, H12 L, H13 K, H14 P, H15 S, H16 Q, H17 T, H18 L, H19 S, H20 L, H21 T, H22 C, H23 S, H24 F, H25 S, H26 G, H27 F, H28 S, H29 L, H30 S, H31 T, H32 S, H33 G, H34 M, H35 G, H35A V, H35B G, H36 W, H37 I, H38 R, H39 Q, H40 P, H41 S, H42 G, H43 K, H44 G, H45 L, H46 E, H47 W, H48 L, H49 A, H50 H, H51 I, H52 W, H53 W, H54 D, H55 D, H56 D, H57 K, H58 Y, H59 Y, H60 N, H61 P, H62 S, H63 L, H64 K, H65 S, H66 Q, H67 L, H68 T, H69 I, H70 S, H71 K, H72 D, H73 T, H74 S, H75 R, H76 N, H77 Q, H78 V, H79 F, H80 L, H81 K, H82 I, H82A T, H82B S, H82C V, H83 D, H84 T, H85 A, H86 D, H87A, H88 A, H89 T, H90 Y, H91 Y, H92 C, H93 A, H94 R, H95 T, H96 R, H97 R, H98 Y, H99 F, H100 P, H100A F, H101 A, H102 Y, H103 W, H104 G, H105 Q, H106 G, H107 T, H108 L, H109 V, H110 T, H111 V, H112 S, H113 S, H114 -。

20

【 0 1 4 0 】

可変 L 鎖：

L1 D, L2 I, L3 V, L4 M, L5 T, L6 Q, L7 S, L8 Q, L9 K, L10 F, L11 M, L12 S, L13 T, L14 S, L15 V, L16 G, L17 D, L18 R, L19 V, L20 S, L21 V, L22 T, L23 C, L24 K, L25 A, L26 S, L27 Q, L28 N, L29 V, L30 G, L31 T, L32 N, L33 V, L34 A, L35 W, L36 Y, L37 Q, L38 Q, L39 K, L40 P, L41 G, L42 Q, L43 S, L44 P, L45 K, L46 A, L47 L, L48 I, L49 Y, L50 S, L51 A, L52 S, L53 Y, L54 R, L55 Y, L56 S, L57 G, L58 V, L59 P, L60 D, L61 R, L62 F, L63 T, L64 G, L65 S, L66 G, L67 S, L68 G, L69 T, L70 D, L71 F, L72 T, L73 L, L74 T, L75 I, L76 N, L77 N, L78 V, L79 H, L80 S, L81 E, L82 D, L83 L, L84 A, L85 E, L86 Y, L87 F, L88 C, L89 Q, L90 Q, L91 Y, L92 N, L93 T, L94 D, L95 P, L96 L, L97 T, L98 F, L99 G, L100 A, L101 G, L102 T, L103 K, L104 L, L105 E, L106 I, L107 K。

30

【 0 1 4 1 】

本明細書において使用される場合、用語「保存的置換」とは、機能的活性を著しく有害に変化させない別のアミノ酸によるアミノ酸の置換を言及する。「保存的置換」の好ましい例は、次の B L O S U M 6 2 置換マトリックスにおいて値 0 を有する別のアミノ酸による 1 つのアミノ酸の置換である（Henikoff & Henikoff, 1992, PNAS 89: 10915-10919を参照のこと）：

40

	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
A	4	-1	-2	-2	0	-1	-1	0	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	1	0	-3	-2	0
R	-1	5	0	-2	-3	1	0	-2	0	-3	-2	2	-1	-3	-2	-1	-1	-3	-2	-3
N	-2	0	6	1	-3	0	0	0	1	-3	-3	0	-2	-3	-2	1	0	-4	-2	-3
D	-2	-2	1	6	-3	0	2	-1	-1	-3	-4	-1	-3	-3	-1	0	-1	-4	-3	-3
C	0	-3	-3	-3	9	-3	-4	-3	-3	-1	-1	-3	-1	-2	-3	-1	-1	-2	-2	-1
Q	-1	1	0	0	-3	5	2	-2	0	-3	-2	1	0	-3	-1	0	-1	-2	-1	-2
E	-1	0	0	2	-4	2	5	-2	0	-3	-3	1	-2	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2
G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	6	-2	-4	-4	-2	-3	-3	-2	0	-2	-2	-3	-3

50

H -2 0 1 -1 -3 0 0 -2 8 -3 -3 -1 -2 -1 -2 -1 -2 -2 2 -3
 I -1 -3 -3 -3 -1 -3 -3 -4 -3 4 2 -3 1 0 -3 -2 -1 -3 -1 3
 L -1 -2 -3 -4 -1 -2 -3 -4 -3 2 4 -2 2 0 -3 -2 -1 -2 -1 1
 K -1 2 0 -1 -3 1 1 -2 -1 -3 -2 5 -1 -3 -1 0 -1 -3 -2 -2
 M -1 -1 -2 -3 -1 0 -2 -3 -2 1 2 -1 5 0 -2 -1 -1 -1 -1 1
 F -2 -3 -3 -3 -2 -3 -3 -3 -1 0 0 -3 0 6 -4 -2 -2 1 3 -1
 P -1 -2 -2 -1 -3 -1 -1 -2 -2 -3 -3 -1 -2 -4 7 -1 -1 -4 -3 -2
 S 1 -1 1 0 -1 0 0 0 -1 -2 -2 0 -1 -2 -1 4 1 -3 -2 -2
 T 0 -1 0 -1 -1 -1 -1 -2 -2 -1 -1 -1 -1 -2 -1 1 5 -2 -2 0
 W -3 -3 -4 -4 -2 -2 -3 -2 -2 -3 -2 -3 -1 1 -4 -3 -2 11 2 -3
 Y -2 -2 -2 -3 -2 -1 -2 -3 2 -1 -1 -2 -1 3 -3 -2 -2 2 7 -1
 V 0 -3 -3 -3 -1 -2 -2 -3 -3 3 1 -2 1 -1 -2 -2 0 -3 -1 4

【 0 1 4 2 】

用語「モノクローナル抗体」(M a b)とは、例えば真核生物、原核生物又はファージクローンを含む単一のコピー又はクローンに由来する抗体又はその抗原結合部分を言及し、そしてそれが生成される方法ではない。好ましくは、本発明のモノクローナル抗体は、均質又は実質的に均質な集団に存在する。

【 0 1 4 3 】

「ヒト化」抗体分子とは、非ヒト免疫グロブリン由来の最小配列を含む、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖又はそのフラグメント(例えば、F v、F a b、F a b'、F (a b') 2又は抗体の他の抗原結合配列)である、非ヒト(例えば、ネズミ)抗体分子、又はその抗原結合部分の形を言及する。ヒト化抗体は、受容体のC D Rからの残基が、非ヒト種(ドナー抗体)、例えば所望の特異性、親和性及び能力を有するマウス、ラット又はウサギのC D Rからの残基により置換されているヒト免疫グロブリン(受容体抗体)であり得る。

【 0 1 4 4 】

「ヒト抗体又は完全ヒト抗体」とは、ヒト抗体遺伝子を担持するトランスジェニックマウス又はヒト細胞に由来する抗体分子又はその抗原結合部分を言及する。

【 0 1 4 5 】

用語「キメラ抗体」とは、可変領域配列が1つの種に由来し、そして定常領域配列が別の種に由来する抗体分子又はその抗原結合部分、及び可変領域配列がマウス抗体に由来し、そして定常領域配列がヒト抗体の由来する抗体分子を指すことを意図している。

【 0 1 4 6 】

「抗体-薬物複合体」及び「免疫複合体」とは、G I T Rに結合し、そして細胞毒性剤、細胞増殖抑制剤及び/又は治療剤である抗体誘導体を含む、抗体分子又はその抗原結合部分を言及する。

【 0 1 4 7 】

本発明の抗体分子又はその抗原結合部分は、当業界において周知の技法、例えば組換え技法、ファージディスプレイ技法、合成技法、又はそのような技法又は当業界において容易に知られている他の技法の組合せを用いて生成され得る。

【 0 1 4 8 】

用語「エピトープ」とは、1又は2以上の抗体分子の抗原結合領域で、抗体分子又はその抗原結合部分により認識され、そして結合されることができ分子の部分の部分を言及する。エピトープは、一次、二次又は三次タンパク質構成の定義された領域から成り、そして抗体の抗原結合領域、又はその抗原結合部分により認識される標的の二次構造単位又は構造ドメインの組合せを含む。同様に、エピトープは、アミノ酸又は糖側鎖などの分子の定義された化学的活性な表面グループから成り、そして特定の三次元構造特性及び特定の電荷特性を有する。用語「抗原性エピトープ」とは、本明細書において使用される場合、抗体分子が、当業界において周知の任意の方法により、例えば従来のイムノアッセイ、抗体競争結合アッセイ、又はx線結晶構造解析又は関連する構造決定方法(例えば、N M R)に

10

20

30

40

50

より決定されるように特異的に結合できる、ポリペプチドの一部として定義される。

【0149】

用語「結合親和性」又は「 K_D 」とは、特定の抗原 - 抗体相互作用の解離速度を言及する。 K_D は、解離速度（「オフレート（ K_{off} ）」とも呼ばれる）の、結合速度又は「オンレート（ K_{on} ）」に対する比である。従って、 K_D は、 K_{off} / K_{on} に等しく、そしてモル濃度（ M ）として表される。 K_D が小さいほど、結合の親和性は強くなる。従って、 $1 \mu M$ の K_D は、 $1 nM$ の K_D に比較して、弱い結合親和性を示す。抗体の K_D 値は、当業界において十分に確立された方法を用いて決定され得る。抗体の K_D を決定するための1つの方法は、通常、バイオセンサーシステム、例えばBiacore（登録商標）システムを用いて、表面プラズモン共鳴（SPR）を使用することによってである。

10

【0150】

用語「効力」とは、生物学的活性の測定値であり、そして TC_{50} 、又は本明細書に記載されるようなGITR活性アッセイにおいて測定される活性の50%を阻害する抗体、又は抗原GITRに対する抗体薬物複合体の有効濃度として指定され得る。

【0151】

本明細書において使用される場合、「有効量」又は「治療的有效量」の用語とは、所望の治療結果を達成するのに必要な量（投与量で、及び期間、及び投与手段のための）を言及する。有効量は、対象に治療的利益を与えるのに必要である活性剤の少なくとも最小量であるが、しかし毒性量よりも少ない量である。

【0152】

20

本発明の抗体分子の生物活性に関して本明細書において使用される場合、用語「阻害する」又は「中和する」とは、例えば抗体分子の生物学的活性又はGITRへの抗体分子の結合相互作用を含む（但し、それらだけには限定されない）、阻害されているものの進行又は重症度を、抗体が実質的に拮抗、禁止、予防、抑制、減速、破壊、排除、停止、減少又は逆転する能力を意味する。

【0153】

「宿主細胞」は、ポリヌクレオチド挿入体の組込みのためのベクターのための受容体であり得るか、又は受容体であった個々の細胞又は細胞培養物を含む。宿主細胞は、単一の宿主細胞の子孫を含み、そして子孫は、自然、偶発的又は意図的な突然変異のために、元の親細胞と必ずしも完全に同一である必要はない（形態又はゲノムDNA相補体において）。宿主細胞は、本発明のポリヌクレオチドによりインピボトランスフェクトされた細胞を含む。

30

【0154】

本明細書において使用される場合、「ベクター」とは、宿主細胞において、目的の1又は2以上の遺伝子又は配列を送達し、そして好ましくは発現できるコンストラクトを意味する。ベクターの例は以下を含むが、但しそれらだけには限定されない：ウィルスベクター、裸のDNA又はRNA発現ベクター、プラスミド、コスミド又はファージベクター、カチオン性凝縮剤に関連するDNA又はRNA発現ベクター、リボソームにカプセル化されたDNA又はRNA発現ベクター、及び一定の真核細胞、例えばプロデューサー細胞。

【0155】

40

用語「治療する」とは、本明細書において使用される場合、特にことわらない限り、そのような用語が適用される障害又は状態、又はそのような障害又は状態の1又は2以上の症状の進行を逆転し、緩和し、阻害し、進行を遅延し、開始を遅延し、又は予防することを意味する。用語「治療」とは、本明細書において使用される場合、特にことわらない限り、上記で定義されるような治療の行為を言及する。用語「治療する」はまた、対照のアジュバント治療も含まれる。疑念を避けるために、本明細書における「治療」への言及は、治療的、緩和的及び予防的治療への言及も含む。疑念を避けるために、本明細書における「治療」への言及はまた、治療的、緩和的及び予防的治療への言及も含む。

【0156】

本明細書において、実施形態が、「含む」という文言で記載される場合は常に、「から

50

成る」及び／又は「から本質的に成る」という用語で記載される類似の実施形態もまた提供されることが理解される。

【0157】

本発明の側面又は実施形態がマーカッシュグループ又は代替の他のグループに関して記載される場合、本発明は、全体として列挙される全グループのみならず、またグループの各メンバーを個々に、及び主にグループのすべての可能なサブグループも、グループメンバーの1又は2以上の不在の主グループもまた包含する。本発明はまた、請求された発明におけるグループメンバーのいずれか1又は2以上の明示的な除外も想定している。

【0158】

特にことわらない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語及び科学用語は、本発明が局する技術分野の当業者により一般的に理解されるのと同じ意味を有する。矛盾する場合、定義を含む明細書が支配するであろう。本明細書及び特許請求の範囲を通して、用語「含む (comprise)」、又は変形、例えば「含む (comprises)」又は「含む comprising」とは、言及される整数又は整数のグループの包含を意味するが、しかしいずれか他の整数又は整数のグループの除外を意味するものではないことが理解されるであろう。特に必要とされない限り、単数形の使用とは、複数形が含まれ、複数形の使用には、単数形が含まれる。用語「例えば (e.g.)」又は「例えば (for example)」に続く任意の例は、網羅的又は限定的であることを意味するものではない。

【0159】

本発明の実施は、特にことわらない限り、分子生物学 (組換え技法を含む)、微生物学、細胞生物学、生化学及び免疫学の従来技法を使用し、これは当業者の範囲内である。

【0160】

本発明の特定の非限定的な実施形態が、添付の図面を参照して説明されるであろう。

【実施例】

【0161】

実施例1．最適化された抗 - G I T R 治療抗体の生成
前書き

この実施例においては、アゴニスト、最適化された抗 - G I T R 抗体のパネルの生成に成功した。それらの抗 - G I T R 抗体は十分に発現し、生物物理学的に安定し、高い溶解性であり、そして好ましいヒト生殖系列との最大の同一性を有する。

【0162】

材料及び方法

I g G クローニング、一過性発現、精製

抗体 v - ドメインコードの DNA 配列を、別々のプラスミドベクターの別々の I g G H 鎖及び L 鎖発現カセット中に、制限連結クローニングを介してクローニングした。製造業者のプロトコルに従って、エンドトキシンを含まない I g G 発現プラスミド調製物によるトランスフェクションの後、I g G を H E K - 2 3 e x p i 細胞において一時的に発現した。I g G を、シングル - ステッププロトコルを用いて以下のようにして精製した：ならし培地を、P B S (p H 7 . 4) で前もって平衡化された、1 m l の P r o A セファロースカラム上に負荷した (ニート)。カラムを 5 カラム容量の P B S (p H 7 . 4) により洗浄した後、タンパク質を、1 0 0 m M のグリシン (p H 2 . 7) により溶出し、そして 3 0 K D a のカットオフ透析膜を用いて、P B S (p H 7 . 4) 下で透析した。

【0163】

I g G 滴定結合 E L I S A

Greiner Bio-One High bind ELISA プレート を被覆するために、標的タンパク質を、炭酸緩衝液で 1 μ g / m l に希釈し、そしてウェル当たり 1 0 0 μ l で、4 ° C で 1 6 時間添加した。被覆されたプレートを、P B S (p H 7 . 4) により 3 度、洗浄し、P B S 中、1 % B S A (3 8 0 μ l / ウェル) により、R T で 1 時間ブロックし、次に、P B S - T w e e n 2 0 (P B S T) により 3 度、洗浄した。次に、G I T R 抗体 (1 0 0 μ l / ウェル ; P B S T で希釈された) を添加し、そして次に、R T で 1 時間インキュベートし

た。次に、プレートにP B S Tにより3度、洗浄し、そしてヤギ抗 - ヒトカップバ鎖 - H R P (1 0 0 μ l / ウェル) をR Tで1時間、添加した。次に、プレートにP B S Tにより3度、P B Sにより2度、洗浄し、次にウェル当たり1 0 0 μ lのT M Bを添加した。反応を、1 0 0 μ lの2 MのH₂ S O₄をウェル当たり添加することにより、停止し、そしてO Dを4 5 0 n mでプレートリーダー上で読み取った。負に帯電された生体分子表面のE L I S AによるI g G結合分析を、前に記載されたようにして実施した (Mouquet et al., 2010, Nature 467: 591-595を参照のこと)。

【 0 1 6 4 】

G I T R細胞に基く分析

P r o m e g aからのG I T R B i o a s s a yキット (C S 1 8 4 0 0 6) を用いて、G I T Rを架橋し、そして受容体を刺激するそれらの能力について抗 - G I T R I g Gを分析した。このアッセイは、「G l o R e s p o n s e」N F k B - l u c 2 / G I T R J u r k a t細胞に基かれる。アッセイを、製造業者の説明書に従って、陽性対照としてH A標識されたヒトG I T Rタンパク質及び抗 - H A標識抗体を用いて実施した。無関係な受容体に対する特異性を有するヒトI g G 1を、アイソタイプ陰性対照として使用した。

10

【 0 1 6 5 】

P r o m e g aからのA D C C B i o a s s a yキット (G 7 0 1 5) を用いて、ヒト又はカニクイザルG I T R発現C H O - K 1細胞を結合した後、A D C Cを誘発するそれらの能力について抗 - G I T R I g Gを分析した。このアッセイは、F c R I I I a受容体、V 1 5 8 (高親和性) 変異体、及びホタルルシフェラーゼの発現を駆動するN F A T応答要素を安定して発現する操作されたJ u r k a tエフェクター細胞に基かれる。このアッセイを、製造業者の説明に従って、I g G 1及び非グリコシル化I g G 1の両方の形の抗 - G I T R抗体を用いて実施した。

20

【 0 1 6 6 】

G - V L 1 - V H 3ライブラリーの生成及び選択

G - V L 2 - V H 3 s c F vレパートリーを、大量オリゴ合成及びP C Rによりアセンブリした。次に、増幅制限 - 連結により、ファージミドベクターにクローニングし、E . コリT G - 1細胞を形質転換し、特徴付けし、そしてファージレパートリーを、実質的に前に詳細に記載されたようにしてレスキューした (Finlay et al., 2011, Methods Mol Biol 681: 383-401)。

30

【 0 1 6 7 】

ファージ選択を、G I T R - F cタンパク質 (ヒト又はカニクイザル) によりストレプトアビジン磁気マイクロビーズを被覆し、ビーズをP C Rにより3度、洗浄し、そしてP B S (p H 7 . 4) + 5 % スキムミルクタンパク質 (M P R S) に再懸濁することにより実施した。それらのビーズを、選択のラウンド1で2 0 0 n Mの標的タンパク質で被覆し、次に、続くラウンドで、1 0 0、5 0及び1 0 n Mで被覆した。

【 0 1 6 8 】

H T R F結合競争アッセイ

競争H T R Fアッセイを、移植された及びライブラリー由来のクローンによりV H 1 / V L 1 I g Gに対するエピトープ競争を試験するために確立した。精製されたV H 1 / V L 1 I g Gを、製造業者の説明書に従って、標識キット (C i s B i o) を用いてテルビウムにより標識した。最終反応混合物は、1 \times アッセイ緩衝液 [5 0 m Mのリン酸ナトリウム、p H 7 . 5、4 0 0 m Mのフッ化カリウム及び0 . 1 % B S A (w / v)] 中、2 0 μ lの総反応体積で、ピオチン化されたヒトG I T R - F c、S A - X L 6 6 5 (C i s b i o)、テルビウム標識された親X T - M 4、及び上記のようにして調製された目的の競争I g Gを含んだ。試薬を、3 8 4ウェルの低容量ブラックプレート (N u n c) 中に、Mini Trak Liquid Handling Platform (Perkin-Elmer) で連続的に添加した。反応は室温で1時間、進行し、そして続いて、プレートを、3 4 0 n mでの励起読み取り、及び6 1 5 n m (V H 1 - V L 1 - クリプレートからの入力ドナー蛍光を測定する) 及び6 6 5 n m

40

50

(S A X L 6 6 5 からの出入受容体蛍光を測定する) での 2 回の発光読み取りを、プレートリーダー上で読み取った。読み取りは、6 6 5 n m / 6 1 5 n m 比として表された。

【 0 1 6 9 】

結合特異性の分析

抗 - G I T R 抗体を、E L I S A により多反応性について試験した。精製された組換え標的及び非標的抗原を、炭酸緩衝液中、1 0 0 n g / ウェルで 9 6 ウェル N u n c M a x i s o r p プレートにおいて、4 で一晩被覆した。次に、プレートを、P B S により 3 度、洗浄し、P B S 中、1 % B S A によりロックし、次に、P B S - T w e e n 2 0 により 3 度、洗浄した。次に、一次抗体の希釈系列を適用し、プレートを P B S 0 - T w e e n 2 0 により 3 度、洗浄し、続いて 1 : 4 , 0 0 0 のヤギ抗 - ヒトカップ鎖 - H R P : 二

10

【 0 1 7 0 】

抗 - G I T R 抗体を、フローサイトメトリーにより結合特異性についても試験した。H u T 7 8 細胞を、抗 - C D 3 / 抗 C D 2 8 ビーズと共に 3 日間、インキュベートすることにより活性化した。ナイーブ細胞を、培地のみににおいてインキュベートした。インキュベーションの最後で、細胞を収穫し、そしてビーズを、磁石を用いて、活性化された細胞から除去した。細胞を、生存性色素と共にインキュベートし、そして次に、抗 - G I T R 抗体により 4 染色した。市販の抗 - ヒト G I T R モノクローナル抗体 1 0 8 - 1 7 (P E により直接標識された ; BioLegend Inc. から入手された、カタログ番号 3 7 1 2 0 2) もまた、陽性対照として含まれた。V H 1 / V L 1 及び D - A 6 I g G タンパク質の結合を、P E 標識されたヤギ抗 - ヒト I g G との続くインキュベーションにより検出した。細胞を、4 % P F A により固定し、続いて P B S において 4 で一晩、貯蔵した。次の日、D i v a ソフトウェアを実行する B D F o r t e s s a フローサイトメトリーを用いて、細胞を分析した。分析は、F l o w J o ソフトウェアを用いて実施された。単一細胞が、生存性色素を用いて散乱細胞及び生細胞によりゲート制御された。単一生細胞の P E チャネルにおけるメジアン蛍光強度 (M F I) を決定し、そしてプロットした。各染色条件は、二重反復して実施された。

20

30

【 0 1 7 1 】

抗 - G I T R F a b フラグメントの B i a c o r e 親和性分析

I g G 1 及び G I T R - F c タンパク質の両方は多量体であるので、表面プラズモン共鳴 (S P R) を介しての正確な 1 : 1 結合親和性測定を達成することは挑戦的である。この問題を最小限にするためには、GingisKHANキット (Genovis) を用いて、V H 1 / V L 1 及び D - A 6 I g G 1 タンパク質の両方から単量体 F a b フラグメント (「 F a b 」) を調製した。次に、B i a c o r e 分析への使用のために、F a b を、H B E - E P 緩衝液に緩衝液交換した。

【 0 1 7 2 】

親和性の推定のために、抗 - ヒト I g G F c 抗体を、B i a c o r e C M 5 チップの 3 つのフローセル (F c 1 ~ F c 3) 上に p H 5 でアミン結合した。チップに固定された抗 - F c 抗体のレベルは約 5 5 0 R U であった。次に、8 0 ~ 1 0 0 R U を補足するために、ヒト及びカニクイザル G I T R - F c 及び無関係な受容体 - F c タンパク質を、抗 - F c 抗体上に補足した (ほぼ / 完全に飽和するまで抗体表面上に注入することにより) 。次に、F a b モノマーを、チップ上に補足された F c タンパク質上に、3 7 で 5 0 μ / 分の流速で 1 2 0 秒間注入し、続いて B i a c o r e ランニング緩衝液 (H B S - E P) をチップ上に 5 0 μ l / 分で 2 4 0 秒間流した。チップを、1 0 m M のグリシン (p H 2) の 2 回の 1 5 秒注入を用いて、サイクル間で再生した。試験される F a b サンプルの濃度は、4 0 0 、2 0 0 、1 0 0 、5 0 、2 5 、1 2 . 5 、及び 6 . 2 5 n M であった。B i a c o r e ランニング緩衝液対照 (O n M) がまた、対照として含まれた。

40

50

【 0 1 7 3 】

結果及び議論

好ましいヒト生殖系列 v - 遺伝子への $C D R$ 移植

アゴニスト性ネズミ抗 - $G I T R$ $I g G$ 6 C 8 ($m V H / m V L$; 国際公開第 2 0 0 6 / 1 0 5 0 2 1 号及び表 2 を参照のこと) の $C D R$ を、最初に、 $C D R$ 移植を用いて、ヒト生殖系列免疫グロブリン v - ドメインフレームワーク配列足場に導入した。最適な薬物のような特性を有する最終リード治療 $I g G$ 化合物に向けての我々の工学的努力を偏らせるために、我々は、親抗体の $C D R$ を、高い安定性を有することが知られており、そして発現されたヒト抗体レパートリーにおいて高い頻度で使用される「好ましい」生殖系列足場に移植することを選択する。

10

【 0 1 7 4 】

参照分子として、我々はまた、最も近い生殖系列フレームワーク ($h V H 1 / V L 1$) に $C D R$ を移植した。それらの足場及び移植された $C D R$ 定義は、表 2 に概説されている。ネズミ抗 - $G I T R$ 抗体の H 鎖及び L 鎖配列もまた、表 2 に示されている。この $C D R$ 移植方法は良く知られているが、ヒト v - ドメイン配列の所定の組が非ヒト $C D R$ 移植のための適切な受容体フレームワークとして作用するかどうかを予測することは依然として問題である。不適切なフレームワークの使用は、標的結合機能の喪失、タンパク質安定性の問題、又はさらに最終的 $I g G$ の発現障害を導く可能性がある。この研究において、この方法は、親抗体が、ヒト抗体レパートリーにおいて低頻度で使用される標準的 $H C D R$ 構造 ($H 1 - 1 5 - 1$) を使用している事実によりさらに複雑にされている。この観察は、抗体が「最も近い生殖系列」配列 (最も近いアミノ酸相同性を有するそれらのヒト生殖系列) にヒト化されるべきであるが、しかし最も近い H 鎖生殖系列 ($I G H V 2 - 7 0$) は機能的に発現されたヒト抗体レパートリーにはまれにしか使用されず、得られた抗体を、好ましくない薬理学的及び製造上の品質のリスクにさらす仮定に当業者を導く可能性がある。

20

【 0 1 7 5 】

7 種の v - ドメイン移植片 ($4 V H$ 、 $3 V L$) を、表 1 に概説されるような $C D R$ 定義を用いて、イン・シリコで企画した。移植された及び $m V H / m V L$ v - ドメインの v - ドメイン遺伝子配列を、二本鎖 $D N A$ カセットとして合成し、そして全長ヒト $I g G 1$ 抗体の発現のために企画されたプラスミドにクローニングした。それらのプラスミドを用いて、 $H E K - 2 9 3$ 細胞の一過性トランスフェクションを行い、そして発現された $I g G$ を、プロテイン A カラムにより精製した。機能について $C D R$ - 移植された v - ドメインのすべての可能な組合せを試験するために、すべての 4 つのヒト化 H 鎖を 3 つのヒト化 L 鎖のそれぞれと共発現し、12 の $I g G$ を 4 つのファミリー ($V H - 1 - 4$) にグループ化した。

30

【 0 1 7 6 】

精製された $I g G 1$ タンパク質における $G I T R$ 結合機能の保持は、ヒト $G I T R - F c$ に対する直接的結合 $E L I S A$ における滴定により最初に試験された。それらの実験は、 $V H 2$ 及び $V H 4$ ファミリーについての $m V H / m V L$ $I g G$ ($E C_{50} = 0.004 \mu g / m l$) と比較して、標的結合の障害をし、そしてすべての結合機能は $V H 2$ ファミリーにおいては、本質的に除去されている (図 1 B)。この発見は、親抗体の $C D R$ が、機能が保持されていた場合、任意のランダムに選択されたヒト v - ドメインフレームワークに単純に移植できなかったことを実証した。重要なことには、 $V H 2$ $I g G$ ファミリーにおける結合機能の 100 倍以上の損失は、 $H C D R 1$ が移植のために使用されるフレームワーク ($I G H V 3 - 7$) に見出されるヒト生殖細胞系列 $H C D R 1$ の生来の配列と一致するよう事前に完全に生殖細胞系列化できなかったことをさらに示した。 $m V H / m V L$ $I g G 1$ と同等、又はそれ以上に改善された結合機能が、 $V H 1$ 及び $V H 3$ ファミリー及び $V H 3$ ファミリーにおける抗体に観察された (図 1 A)。

40

【 0 1 7 7 】

$E L I S A$ 結合データに基づいて、 $m V H / m V L$ 、 $V H 1$ 、 $V H 3$ 及び $V H 4$ ファミリ

50

ー I g G を、細胞ベースの組換え受容体レポーターアッセイにおいて G I T R の濃度依存性アゴニスト活性化について試験した。このアッセイは、V H 3 / V L 2 の組合せが最も強い濃度依存性受容体活性化を与えることを実証した（図 2）。従って、この移植片は、C D R 突然変異誘発及び改善されたクローンの選択のための鋳型として進められた。

【 0 1 7 8 】

ライブラリー生成及びスクリーニング

v - ドメイン配列 V L 2 及び V L 3 を、V L - V H s c F v 形式に組合し、そして突然変異誘発ライブラリーカセットを、大量オリゴ合成及びアセンブリーにより生成した。最終 s c F v ライブラリー（G - V L 2 - V H 3 と命名される）を、ファージディスプレイベクターに連結し、そしてエレクトロポレーションにより E . コリを形質転換し、 3×10^8 個の独立したクローンを生成した。ライブラリービルドの品質を、100,000 以上のクローンのデプシーケンスにより検証した。この配列決定データは、各分散位置でネズミ又はヒト生殖細胞系列残基のいずれかをコードする位置が 50 % の頻度で効果的にサンプリングされたことを示した。ライブラリーを、ヘルパーファージ M 13 を用いてレスキューし、そしてビオチン化されたヒト及びカニクイザル G I T R - F c タンパク質に基く選択を実施した。

【 0 1 7 9 】

選択後スクローニング（図 3 A、B、C）及び D N A 配列決定は、C D R 内に有意に高められたヒト含有物を有する、132 のユニーク、ヒト及びカニクイザル G I T R 結合 s c F v クローンの存在を明らかにしたが、フレームワーク配列は完全に生殖系列のままであった。それらの 132 のクローンのうち、74 のクローンは、すべての C D R に生殖細胞内突然変異を有することが見出された（表 3）。リードクローンが、ヒト及びカニクイザル G I T R - F c の両方への結合について、C D R 生殖細胞系列のレベル対 E L I S A シグナルのレベルに基いてランク付けされた（図 4）。次に、このランキングからの上位 11 のクローンの V - ドメインを、下記のようにさらに試験するために I g G 発現ベクター中にサブクローニングした（表 4 を参照のこと）。

【 0 1 8 0 】

生殖系列内突然変異がライブラリー選択に直接的に由来するリードクローンの全ての C D R に観察されたが、配列分析により、最大のヒト化を有するよう、さらなるクローンの企画を可能にする可能性が残っている。従って、ヒト及びカニクイザルタンパク質に対する結合シグナルを有する 132 の配列固有のヒットを用いて、この機能的に特徴付けられた集団の C D R 中のネズミアミノ酸についての保持頻度（R F）を分析した。位置的なアミノ酸 R F を、V L 及び V H ドメインに見出される割合として表した（図 5 A 及び B）。75 % 以下の R F を有するネズミ残基は、一連の組合せ企画において、標的結合パラトープに必須ではなく、生殖細胞内に露出されやすい位置として見なされた。

【 0 1 8 1 】

75 % 以上の R F を有するネズミ残基のみを含む企画を、「M H」（M H = 最大にヒト化された）と指定した。このクローン、及びネズミ残基を C D R 中に戻された 5 つのさらなるデザイナークローン（M H - 1 ~ M H - 5；表 4 を参照のこと）を、上記に概説される 11 のライブラリー由来のクローンのように、遺伝子合成により生成し、そして生成のためにヒト I g G 1 発現ベクターにクローン化した。全ての 17 の I g G を、H E K - 293 細胞の一過性トランスフェクションから容易に発現し、そして精製した。単一のプロテイン A カラム精製工程の後、分析 H P L C サイズ排除クロマトグラフィーは、すべてのリードが 97.65 ~ 99.75 % の範囲のモノマー I g G を有することを示した。

【 0 1 8 2 】

リード I g G の親和性、安定性及び特異性の特性

次に、上記の 17 の精製された I g G を、直接的滴定 E L I S A 形式でヒト及びカニクイザル G I T R - F c への結合について試験した。驚くべきことには、この分析は、多くの（14 / 17）のクローンが V H 1 / V L 1 及び V H 3 / H L 2 I g G（デザイナークローン M H、M H L - 4 を含む）に匹敵するヒト G I T R に対する結合親和性を保持して

いるのに対して、3つのクローン(D-A6、I-C2及びG-G10)のみがカニクイザルGITR-Fcと同等か又はそれ以上の結合を維持したことを実証した(図6)。GITRアゴニズムレポーターアッセイにおいては、D-A6、I-C2及びG-G10のすべてはまた、抗体架橋ヒトGITRと同じ濃度範囲でヒトGITRの濃度依存性受容体活性化を示した(図7A-C)。すべてのIgG及びGITRLの最大シグナルは、1000~2000 ng/mlで観察された。

【0183】

リードクローンが突然変異及び再選択工程の間、標的特異性の損失に悩まされていないことを確認するために、D-A6、I-C2、G-G10、mVH/mVL及びVH3/VL2クローンを、ネズミGITR-Fc及びヒトTNFRSFメンバー及び一般的免疫グロブリンスーパーファミリーメンバーを含み、14の精製されたタンパク質のパネルへの結合について試験した(図8A-E)。すべての5つのIgGは、1 µg/mlでGITR-Fc(ヒトOD450nm>3.0、カニクイザル>1.0)への結合シグナルを示し、そして任意の他のタンパク質に対しては、検出できる結合(OD450nm<0.1)を示さなかった。

【0184】

VH1/VL1ヒトIgG移植片とのエピトープ競争のHTRF分析

ライブラリー由来のクローンと、VH1/VL1 IgGの変更されていない、最も近い生殖系列移植CDRとの競争を調べるために、均一時間分解蛍光(HTRF)アッセイを確立した。このアッセイは、液相結合においてテルビウム標識VH1/VL1 IgG、ビオチン化hGITR-Fc及びストレプトアビジン-XL665を組込んだ。次に、非標識IgG VH1/VL1(陽性対照)、アイソタイプ対照、及びリードIgG D-A6、G-G10及びI-C2を、広い濃度範囲(0.003~100 µg/ml)で添加した。IgGs VH1/VL1、D-A6、G-G10及びI-C2はすべて、結合シグナルの濃度依存性減少を示し、このことは、それらがGITRへのVH1/VL1 IgGの結合をブロックすることを示唆する(図9)。重要なことには、クローンD-A6は、直線相で非標識VH1/VL1 IgGの阻害曲線と完全に重複する阻害曲線を示し、このことは、mVH/mVLに比較して、12のCDR突然変異(ヒト生殖系列に対する)を有するにもかかわらず、クローンD-A6における親和性及びエピトープ特異性の両方の完全な維持を示唆している。

【0185】

D-A6 IgG1対VH1/VL1 IgG1のGITRアルゴリズムの効力のインビトロ分析

フローサイトメトリー、エピトープ競争及び受容体アゴニズムデータに基づいて、IgG D-A6を、さらなるインビトロ分析のために優先順位付けした。IgG、例えば二量体の活性凝集体を、通常、IgG1発現及び精製手順の間、生成した。それらの凝集体は、受容体アゴニズムアッセイにおいて偽陽性又は誇張されたシグナルを創造することができる。正確な比較がD-A6とVH1/VL1 IgGとの間で行われたことを確認するために、それらをそれぞれ2回精製した：最初に、プロテインAカラム結合、及び次に、サイズ排除クロマトグラフィーにより、ヒトIgG1の予想される分子(約150 kDa)よりも大きな任意のタンパク質種を除去した。次に、完全に精製されたIgG1タンパク質を、細胞ベースのレポーターアッセイにおいて、GITRの濃度依存性アゴニスト活性化について試験した。このアッセイは、予想外に、D-A6 IgG1がVH1/VL1 IgGよりも有意に強い濃度依存性受容体活性化を示すことを実証した(図11)。このアッセイにおいては、両方の抗体の重複分析を用いる場合、D-A6クローンは以下のことを示した：1. VH1/VL1のRLU値が11664であるのに対して、D-A6の最大RLU値は21876である高い合計効力を有し；2. VH1/VL1に比較して、0.1~133 nMで試験されたD-A6 IgG1のすべての濃度で高いシグナルであった。

【0186】

細胞膜でのリード I g G 結合特異性のフローサイトメトリー分析

細胞表面での G I T R への濃度依存性結合を、フローサイトメトリーを用いて分析した。I g G の何れもマウス G I T R - F c に結合することが観察されなかったので、独自のネズミ芽細胞腫及び C H O - K 1 細胞を、ヒト又はカニクイザル G I T R 完全長 c D N A により安定してトランスフェクトした。次に、I g G s m V H / m V L 、 V H 1 / V L 1 、 V H 3 / V L 2 、 D - A 6 、 G - G 1 0 、 I - C 2 及びアイソタイプ対照 I g G 1 を、ヒト、カニクイザル又は陰性対照（無関係なヒト受容体により安定してトランスフェクトされた）ネズミ芽細胞種細胞への結合について、10,000 ~ 13.7 ng/ml の濃度範囲にわたって試験した（図 10）。アイソタイプ対照以外のすべての I g G は、ヒト及びカニクイザル G I T R + 細胞に対する濃度依存性結合を示し、各場合、最大 M F I は約 1111 ng/ml であった。いずれの濃度でも、負の対照細胞系への測定できる結合は、任意の I g G に関して観察されなかった。

【0187】

リード I g G の G I T R + ヒト細胞への結合を調べるために、H u T 7 8 細胞を、抗 - C D 3 / 抗 - C D 2 8 ビーズと共に3日間のインキュベーションにより活性化した。t - 細胞の活性化は、G I T R 発現のアプレギュレーションに関連する。ナイーブ細胞を、培地のみにおいてインキュベートした。次に、I g G V H 1 / V L 1 、 D - A 6 及び抗 - G I T R 市販対照抗体「108-17」を、活性化された及びナイーブ細胞への結合について10 µg/ml で試験した。すべての3種の抗体は、活性化された細胞への強い結合を示したが、ナイーブ細胞への識別可能な結合は示さなかった（図 12 A）。次に、同様に、活性化された H u T 7 8 細胞を、I g G 1 s V H 1 / V L 1 、 D - A 6 及び負の対照、ヒト I g G 1 抗 - G F P 市販抗体「A b D 1 8 7 0 5 _ h I g G 1」により1.1 µg/ml で染色した。それぞれの場合、染色は、10 µg/ml のヒト G I T R リガンドタンパク質の存在又は非存在下で実施された。抗 - G F P 対照は、何れの分析でも活性化された細胞への結合を示さず、ところが、I g G V H 1 / V L 1 及び D - A 6 の両方は、過剰の G I T R タンパク質の非存在下で結合を示した（図 12 B）。このアッセイは、クローン D - A 6 が活性化されたヒト T 細胞上の G I T R を特異的に結合し、そしてその結合部位が G I T R の天然の結合パートナーである G I T R L の結合部位と重複することを示した。

【0188】

I g G 1 及び I g G 1 - N 2 9 7 A 抗体による濃度依存性 F c R I I I a 関与のインビトロ分析

T R X - 5 1 8 としても知られているモノクローナル 6 C 8 のヒト化形は、非グリコシル化ヒト I g G 1 である。正規の n - 結合されたグルコシル化の除去は、変異 N 2 9 7 A のヒト I g G 1 F c C H 2 領域への付加により達成される。この非グリコシル化 F c 領域は、抗体結合細胞に対する N K 細胞による A D C C の駆動に関連する、非常に重要な F c R I I I a 受容体を含む、すべてのヒト F c 受容体への結合に対してヌルにされる。高レベルの G I T R を発現することが知られている免疫抑制性腫瘍浸潤 T r e g 細胞の枯渇を可能にする可能性があるので、抗 - G I T R アゴニスト抗体における A D C C 活性の存在は非常に有益である可能性がある。

【0189】

A D C C を駆動する V H 1 / V L 1 (v - ドメインは T R X - 5 1 8 とアミノ酸配列において同一である) 及び D - A 6 v - ドメインの能力を試験するために、両抗体をヒト I g G 1 及び I g G 1 - N 2 9 7 A 形式で発現した。それらの抗体は、上記のように p r o A - S E C 精製され、そして次に、P r o m e g a A D C C アッセイに使用され、そして C H O - K 1 標的細胞はヒト又はカニクイザル G I T R のいずれかを標的細胞集団として安定して発現する。ヒト（図 13 A）及びカニクイザル（図 13 B）C H O - K 1 細胞の両方で、V H 1 / V L 1 及び D - A 6 I g G 1 抗体の両方は、用量依存性 F c R I I I a 活性化を示したが、I g G 1 - N 2 9 7 A 抗体のいずれも、使用される任意の濃度でシグナル伝達を誘導しなかった。重要なことには、D - A 6 I g G 1 は、V H 1 / V L 1

I g G 1 よりも有意により強力 (2 倍以上) であった (図 1 3 A、1 3 8)。ヒト G I T R 細胞上で観察された E C 5 0 値は、D - A 6 I g G 1 で 1 5 . 4 n M - 対 - V H 1 / V L 1 I g G 1 で 3 5 . 6 n M であった。カニクイザル G I T R 細胞で、観察された E C 5 0 値は、D - A 6 I g G 1 で 5 7 . 9 n M - 対 - V H 1 / V L 1 I g G 1 で 1 6 0、0 n M であった。

【 0 1 9 0 】

「開発可能性」E L I S A アッセイにおけるリード I g G D A 6 分析

いくつかの指標の生物学的基質への治療使用のために意図されたい g G の結合は、不良な生物学的利用能及び短いインピボ半減期のために、患者における不調なパフォーマンスの高いリスクのインジケーターであることは当業界において知られている。3つのそのような生物学的基質は、インスリン、d s D N A 及び s s D N A である。従って、それらの3つの基質を用いて、E L I S A プレートが被覆し、最適化されたリード D - A 6 の I g G 1 及び I g G 1 - N 2 9 7 A バージョンの結合を試験した。それらのヒト I g G ベースの抗体の結合シグナルを、臨床試験においてそれらの進行を停止された、多反応性及び不良なパフォーマンスを有することが見出されている「陽性対照」ヒト I g G 抗体 (B o c c o z i u m a b 及び B r i a k i n u m a b ヒト I g G 1 類似体) と比較した。陰性対照ヒト I g G 1 抗体に関しては、I g G 1 U s t e k i n u m e b 類似体が、それは B r i a k i n u m a b と同じ治療標的と反応するが、しかし長い p K を有するので、使用され、そして治療製品として都合良く承認された。図 1 4 に示される E L I S A 分析においては、陽性対照抗体は3つのすべての基質に対して予想される強い反応性を示したが、陰性対照は低い反応性を示した。重要なことには、D - A 6 I g G 1 及び I g G 1 - N 2 9 7 A タンパク質の両方は、すべての3つの基質に対して陰性対照以下の結合を示した。この発見は、最適化されたクローン D - A 6 における非常に特異的な標的駆動結合の維持を強調した。

【 0 1 9 1 】

リード v - ドメインのイン・シリコ免疫原性の分析

最近の米国 F D A ガイダンスは、治療開発を意図した全ての抗体についての t - 細胞エピトープリスクのイン・シリコ免疫原性評価を推薦している (U S F D A [2 0 1 4] G u i d a n c e f o r I n d u s t r y - I m m u n o g e n i c i t y A s s e s s m e n t f o r T h e r a p e u t i c P r o t e i n P r o d u c t s を参照のこと)。ヒト t - 細胞エピトープ含有物についての抗 - G I T R 抗体を試験するために、I g G s m V H / m V L、V H 3 / V L 2、D - A 6、G - G 1 0 及び I - C 2 の v - ドメイン配列を、世界人口統計に基づく D R B 1 スコアについて L o n z a E p i b a s e I S (登録商標) システム (バージョン 3) に提出した (表 5)。この分析においては、ヒト t - 細胞免疫原性リスクが、両 v - ドメインを通しての合計スコアで与えられる。開始ネズミクローン m V H / m V L は、1 6 8 0 . 4 のスコアを受け取り、これは、治療薬としての使用が現在承認されているキメラ抗体についての予測される免疫原性範囲の下限である (1 5 0 0 ~ 2 4 0 0 以上)。移植されたクローン V H 3 / V L 2 (フレームワークに復帰突然変異を有さない直接生殖系列移植片) は、治療薬として現在承認されているヒト化抗体についての予測される免疫原性範囲の下限 (1 0 0 0 ~ 1 6 0 0) で、9 9 4 . 0 の低められたスコアを示した。リードクローン D - A 6 及び G - G 1 0 は、それぞれ 9 3 2 . 5 及び 8 4 2 . 8 のスコアを受け取った。それらのスコアは、治療薬としての使用のために現在承認されている完全ヒト抗体についての予測される免疫原性範囲に含まれる (2 5 0 ~ 1 2 0 0)。

【 0 1 9 2 】

クローン D - A 6 (完全な機能を保持する) 及び M H (カニクイザル G I T R 結合及びヒト G I T R アゴニズムが除去されている) の配列の比較は、わずか 5 つのアミノ酸差異を示した。免疫原性及び機能に対するそれらの突然変異の影響を試験するために、5 つのさらなるデザイナー変異体 (A 6 . 1 ~ A 6 . 5、C D R 配列については表 4 を参照のこと) がまた、E p i b a s e 分析のために提供された (表 5)。この評価は、それらの変異体についての合計 D R B 1 スコアは、さらに、D - A 6 の予測される免疫原性を、クローン A 6 . 4 で 8 4 5 . 9 の低さまで低めることができたことを示した。しかしながら、

E L I S A 結合分析が A 6 . 1 ~ A 6 . 5 の I g G 1 タンパク質に対して行われた場合、すべてのクローンはヒト G I T R への結合を保持したが、しかし A 6 . 1 のみが V H 1 / V L 1 及び D - A 6 に匹敵するカニクイザル G I T R への結合を保持した。カニクイザル G I T R 結合は、クローン A 6 . 2 ~ A 6 . 5 の全てで大幅に低められた。

【 0 1 9 3 】

抗 - G I T R F a b フラグメント対 h G I T R - F c 及び c G I T R - F c についての S P R 親和性分析

G I T R アゴニズム及び A D C C 分析は全て、リードクローン D - A 6 が V H 1 / V L 1 よりも有意に改善されていることを示したので、我々は、B i a c o r e 上でそれらの2つの抗体についての親和性値を分析した。モノマー F a b フラグメントを生成し、そしてヒト及びカニクイザル G I T R - F c 被覆されたバイオセンサーチップ上での移動相に流し、1 : 1 の結合値を導いた。このデータは、V H 1 / V L 1 及び D - A 6 F a b についての K_D 値が、ヒト G I T R 上でほぼ同一であったことを示したが、しかし E L I S A データと一致して、D - A 6 F a b はカニクイザル G I T R に対して約 4 倍の改善された親和性を示した (表 6)。すべての分析の C h i 2 値は 0 . 1 5 未満であり、このことは、データが 1 : 1 L a n g m u i r 動力学モデルに正確に適に合することを示唆する。

【 0 1 9 4 】

さらなるリード I g G 対 V H 1 / V L 1 についての G I T R アゴニズムの効力のインビトロ分析

I g G D - A 6 は、I g G 形式で受容体アゴニズムの改善された効力を示したので、一連のさらなるリードを、追加の G I T R アゴニズム分析のために優先した。このアッセイは、I g G n u l l 及び I g G 1 - N 2 9 7 A 形式での D - A 6 クローン (図 1 5 A)、I g G 1 形式での D - A 6 . 1 クローン (図 1 5 B) 及びライブラリー由来のリード G - G 1 0 (図 1 5 C) 及び I - C 2 (図 1 5 D) すべて、V H 1 / V L 1 I g G よりも有意に強い濃度依存性受容体活性化を示すことを実証した。このアッセイにおいては、すべての抗体の重複分析を用いて、I g G クローンは、以下を示した：1 . それらの最大 R L U 値におけるより高い合計効力；2 . I - C 2 を除き、V H 1 / V L 1 に比較して、試験された I g G のすべての濃度でのより高いシグナル。アイソタイプヒト I g G 1 もまた、含まれており (図 1 5 C、1 5 D)、これは受容体を刺激する能力を示さなかった。

【 0 1 9 5 】

好ましいまたは例示的な実施形態を参照して本発明を説明したが、当業者は、本発明の精神および範囲から逸脱することなく同じものに対する様々な修飾及び変形を達成でき、そしてそのような修飾が明らかに本明細書で考慮されることを認識するであろう。本明細書に開示され、添付の特許請求の範囲に記載されている特定の実施形態に関する限定は意図されておらず、また推測されるべきではない。

【 0 1 9 6 】

本明細書に引用されるすべての文書は、参照によりその全体が組込まれる。

【 0 1 9 7 】

下記表 1 - 4 のそれぞれにおいては、配列番号は各配列の下に括弧内に示されている。

【 0 1 9 8 】

表 1 . 代替の定義と比較して、本明細書において定義されたような (「統一された」スキーム) ネズミ抗 - G I T R C D R のアミノ酸配列。

10

20

30

40

50

【表 1】

スキーム	<u>HCDR1</u>	<u>HCDR2</u>	<u>HCDR3</u>	<u>LCDR1</u>	<u>LCDR2</u>	<u>LCDR3</u>
統一された	GFSLSTSGMGV (4)	LAHIWDDDKYYNP (5)	TRRYFFAY (6)	KASQNVGTNVA (13)	SASYRYS (14)	QQYNTDPLT (15)
Kabat	TSGMGV (66)	HIWDDDKYYNP (67)	TRRYFFAY (6)	KASQNVGTNVA (13)	SASYRYS (14)	QQYNTDPLT (15)
Chotia	GFSLSTSGM (68)	WWDDK (69)	ARTRRYFFAY (70)	KASQNVGTNVA (13)	SASYRYS (14)	QQYNTDPLT (15)
IMGT	GFSLSTSGM (71)	IWDDDK (72)	ARTRRYFFAY (70)	QNVGTN (73)	SAS (14)	QQYNTDPLT (15)
AHo	FSLSTSGM (74)	IWDDDKYYNP (75)	TRRYFFAY (76)	ASQNVGTN (77)	SASYRYS (14)	YNTDPL (78)
AbM	GFSLSTSGMGV (4)	HIWDDDKYY (79)	TRRYFFAY (6)	KASQNVGTNVA (13)	SASYRYS (14)	QQYNTDPLT (15)
接触	STSGMGV (80)	LAHIWDDDKYY (81)	ARTRRYFFAY (82)	GTNVAVY (83)	LLIYSASYRY (84)	QQYNTDPL (85)

【0199】

表2. 6C8ネズミ抗-GITR v-ドメイン(GITR-mVH/mVL)及びヒト生殖系列CDR移植片(GITR-VH1-4/VL1-3)のアミノ酸配列。

10

20

30

40

50

【表 2】

V ドメイン	ヒト生殖 系列 (1)	アミノ酸配列 (3)
G1TR-mVH	n/a	QVTLKESGPGILKPSQTLSTLTCFSGFSLSTSGMGVGVIRQPSGKGLEWL AH IHWDDDKYNNPSLKSQLTISKDTSRNQVFLKITSVDTADAAT YYCARTRRYFFPAYWGQGLTVTSS (配列番号 86)
G1TR-VH1	IGHV2-70	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVGVIRQPPGKALEWL AH IHWDDDKYNNPSLKSRLTISKDTSKNQVVLTMNMDPVDAT YYCARTRRYFFPAYWGQGLTVTSS (配列番号 87)
G1TR-VH2	IGHV3-7- XH (2)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS- SYN MSIVRQAPGKGLEWL AH IHWDDDKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVY YYCARTRRYFFPAYWGQGLTVTSS (配列番号 88)
G1TR-VH3	IGHV3-7	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSLSTSGMGVGVIRQAPGKGLEWL AH IHWDDDKYYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCARTRRYFFPAYWGQGLTVTSS (配列番号 89)
G1TR-VH4	IGHV5-51	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGFSLSTSGMGVGVIRQMPGKGLEWL AH IHWDDDKYYSPFQGVTSADKSI STAY LQWSSLKASDTAM YYCARTRRYFFPAYWGQGLTVTSS (配列番号 90)
G1TR-mVL	n/a	DIVMTQSQKFMTSVGDRVSVTCASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKAL IYS ASYRYSGVPRFTGSGSGTDFTLTINNVSIEDLA EYFC QQYNTD PLTFGGGTKLEIK (配列番号 91)
G1TR-VL1	IGKV3-15	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCASQNVGTNVAWYQQKPGQAPRL IYS ASYRYSGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVY YCC QYNTD PLTFGGGTKVEIK (配列番号 92)
G1TR-VL2	IGKV3-11	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQNVGTNVAWYQQKPGQAPRL IYS ASYRYSGIPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDFAVY YCC QYNTD PLTFGGGTKVEIK (配列番号 93)
G1TR-VL3	IGKV1-39	DIVMTQSPSSLSASVGRVITCRASQNVGTNVAWYQQKPGKAPKLL IYS ASYRYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVY YCC QYNTD PLTFGGGTKVEIK (配列番号 94)

- (1) IMGT システムに基づく移植と使用されるヒト生殖系列の定義。
 (2) この CDR における配列タッシュは、配列のアラインメントに基づいて、サンプリングされた残基の間隔を示すために追加される。
 (3) CDR 残基は太字で下線が引かれている。上記のように、この原稿で使用されるいくつかの CDR 定義は、従来の Kabat 定義と比較して拡張された定義である。

【0200】

表 3. 74 のユニーク抗 - G1TR v - ドメインの CDR のアミノ酸配列、及び CDR におけるヒト生殖系列に対する % 配列同一性 (% ID)。

10

20

30

40

50

【表 3 - 1】

クローン 名称	HCDR3	HCDR1	HCDR2	LCDR3	LCDR1	LCDR2	% ID
D_A6	TRQYFPAY (31)	GFSLSTSGYGVG (29)	LAHIWDDDKYYVDSVKG (26)	QQYSTDPLT (34)	RASQSVGSNLA (32)	SASYRYT (33)	65%
G_G10	TRQYFPAY (31)	GFSLSTFGYGVG (35)	LAHIWDDDKYYVDSVKG (26)	QQYSNDPLT (38)	RASQSVGTNLA (36)	YASYRYT (37)	63%
I_C2	TRLYPFAY (39)	GFSLSTSGYGVG (29)	LAHIWDDDKYYVDSVKG (26)	QQYSTDPLT (34)	RASQNVGSNLA (40)	SASNRYS (41)	63%
C_A9	TRMYFPAY (95)	GFTFSTSSYGMS (96)	LANIWWDDKYYVDSVKG (97)	QQYNNPLT (98)	RASQSVGSYLA (99)	EASYRAS (100)	75%
D_F8	TRIYPFAY (101)	GFSLSTSSYGVS (60)	VANIWWDDKYYVDSVKG (102)	QQYSNDPLT (38)	RASQSVGTYYA (103)	DASNRYT (104)	74%
H_G1	GRRYFPAY (112)	GFSTSTSGYGMG (105)	LANIWWDDKYYVDSVKG (106)	QQYSNWPLT (107)	RASQNVGSNLA (40)	SASYRAT (46)	72%
H_B5	ARRYFPAY (108)	GFSTSTSGYGMG (105)	LANIWWDDKYYVDSVKG (106)	QQYNTWPLT (109)	RASQSVGSYLA (99)	SASYRAT (46)	72%
D_B1	TRIYPFAY (101)	GFSLSTSSMGMS (110)	LANIWWDDKYYVDSVKG (97)	QQYSTDPLT (34)	RASQNVGSYYA (111)	SASNRYT (44)	71%
K_D10	GRRYFPAY (112)	GFTFSTSGYGMG (113)	VANIWWDDKYYVDSVKG (102)	QQYSTWPLT (114)	RASQSVGTNLA (36)	SASYRAS (53)	71%
E_D5	ARRYFPAY (108)	GFTLSTSGYGVG (115)	LANIWWDDKYYVDSVKG (116)	QQYSNWPLT (107)	RASQNVGTYLA (117)	SASNRAT (118)	71%
H_B2	TRQYFPAY (31)	GFSLSTSGMGMG (58)	LANIWWDDKYYVDSVKG (97)	QQYNTWPLT (109)	RASQDVGTYLA (119)	SASNRAT (118)	69%
H_D11	ARRYFPAY (108)	GFTLSASGYGMG (120)	VANIWWDDKYYVDSVKG (121)	QQYSTWPLT (114)	RASQNVGSYLA (122)	SASYRAS (53)	69%
G_G3	TRMYFPAY (95)	GFSLSTSSYGVS (60)	LANIWWDDKYYVDSVKG (97)	QQYNNPLT (98)	RASQNVGTYYA (123)	DASNRYS (124)	69%
J_C5	TRLYPFAY (39)	GFSLSTSSYGVS (60)	VAHIWWDDKYYVDSVKG (55)	QQYSNDPLT (38)	RASQSVGTNLA (36)	SASYRYT (33)	69%
G_E9	TDRYFPAY (125)	GFTFSTSGWAWG (126)	LAHIWDDDKYYVDSVKG (26)	QQRNNDPLT (127)	RASQSVGTYYA (103)	DASNRAT (128)	69%
E_G6	NRRYFPAY (45)	GFTLSTSGYGMS (129)	LAHIWDDDKYYVDSVKG (26)	QQYSNDPLT (38)	RASQSVGSNVA (57)	SASYRAT (46)	69%
A_F2	GRRYFPAY (112)	GFSLSTSGYGMG (64)	LANIWWDDKYYVDSVKG (116)	QQYSTWPLT (114)	RASQNVGSNLA (40)	SASNRAS (130)	69%
E_E2	ARRYFPAY (108)	GFSLSTSGYGMG (64)	LANIWWDDKYYVDSVKG (106)	QQYSTWPLT (114)	RASQSVGTNLA (36)	SASNRAS (130)	69%
E_C12	IRRYFPAY (131)	GFTLSTSGYGMS (129)	LAHIWWDDKYYVDSVKG (132)	QQYSNDPLT (38)	RASQSVGSNLA (32)	SASNRAS (130)	69%
F_B11	NRRYFPAY (45)	GFSLSTSGMGVS (54)	VAHIWWDDKYYVDSVKG (55)	QQYSTDPLT (34)	RASQSVGSNLA (32)	SASYRAT (46)	68%
C_B10	NRRYFPAY (45)	GFSLSTSGMGMS (61)	LAHIWWDDKYYVDSVKG (26)	QQYSNDPLT (38)	RASQNVGSNLA (40)	SASYRAT (46)	68%
G_A6	TRMYFPAY (95)	GFSLSTFSYGVS (133)	LAHIWWDDKYYVDSVKG (132)	QQYSNDPLT (38)	RASQNVGTYLA (117)	DASYRYT (134)	68%

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

クローン 名称	HCDR3	HCDR1	HCDR2	LCDR3	LCDR1	LCDR2	% ID
C_B12	NRRYFPFAY (45)	GFTFSTSGMGVS (135)	VAHIWWDDKYYVDSVKG (55)	QQYSTDPLT (34)	RASQSVGSNVA (57)	SASNRYT (44)	68%
E_A1	NRRYFPFAY (45)	GFTLSTSGMGMS (136)	LAHIWWDDKYYVDSVKG (26)	QQYSNDPLT (38)	RASQSVGSNLA (32)	SASYRAS (53)	68%
F_F2	NRRYFPFAY (45)	GFSLSTSGMGMS (61)	VAHIWWDDKYYVDSVKG (55)	QHYSTDPLT (137)	RASQSVGSNLA (32)	SASNRAS (130)	68%
H_G4	NRRYFPFAY (45)	GFTFSTSGMGMS (138)	VAHIWWDDKYYVDSVKG (55)	QQYSTDPLT (34)	RASQNVGSNVA (139)	SASYRAT (46)	68%
E_E4	NRRYFPFAY (45)	GFSLSTSGMGMS (61)	LSHIWWDDKYYVDSVKG (140)	QQYSTDPLT (34)	RASQSVGSNLA (32)	SASNRAS (130)	68%
F_B9	NRRYFPFAY (45)	GFSFSTSGMGVS (56)	VAHIWWDDKYYVDSVKG (55)	QQYSTDPLT (34)	RASQSVGSNVA (57)	SASNRYT (44)	68%
H_G5	ARRYFPFAY (108)	GFSLSTSGYGMS (62)	LAHIWWDDKYYVDSVKG (52)	QQYSTDPLT (34)	RASQNVGTNLA (43)	SASYRAT (46)	68%
H_C8	ARRYFPFAY (108)	GFSLSTSGYGMS (62)	VAHIWWDDKYYVDSVKG (141)	QQYSTDPLT (34)	RASQNVGSNLA (40)	SASNRAS (130)	68%
C_F2	NRRYFPFAY (45)	GFSFSTSGYGVS (51)	LAHIWWDDKYYVDSVKG (52)	QQYSTDPLT (34)	RASQNVGTNLA (43)	SASYRAS (53)	66%
D_E3	TTRYFPFAY (142)	GFSLSTSGYGVG (29)	LAHIWWDDKYYVDSVKG (52)	QQYNDPLT (98)	RASQNVGSYLA (122)	SASYRAS (53)	66%
E_C4	NRRYFPFAY (45)	GFSLSTSGMGMS (61)	VAHIWWDDKYYVDSVKG (141)	QQYSNDPLT (38)	RASQNVGSNVA (139)	SASYRAT (46)	66%
E_B10	NRRYFPFAY (45)	GFSLSTSGYGVS (47)	LAHIWWDDKYYVDSVKG (52)	QQYSTDPLT (34)	RASQSVGTNLA (36)	SASYRAS (53)	66%
D_G11	HRIYFPFAY (143)	GFSLSTSSMGMG (144)	VAHIWWDDKYYVDSVKG (55)	QQYSTDPLT (34)	RASQSVGTYYA (103)	DASNRYT (124)	66%
E_G11	NRRYFPFAY (45)	GFSLSTSGMGVS (54)	LAHIWWDDKYYVDSVKG (52)	QQYSNDPLT (38)	RASQNVGTNVA (145)	SASNRAT (118)	66%
H_C5	NRRYFPFAY (45)	GFSLSTSGMGMS (61)	VAHIWWDDKYYVDSVKG (55)	QQYSTDPLT (34)	RASQSVGTNVA (49)	NASNRAS (146)	66%
K_D6	NRRYFPFAY (45)	GFSLSTSGMGMS (61)	LAHIWWDDKYYVDSVKG (26)	QQYSNDPLT (38)	RASQSVGSNVA (57)	SASYRAS (53)	66%
E_F10	GRRYFPFAY (112)	GFSLSTSGYGVG (29)	VANIWWDDKYYVDSVKG (121)	QQYNTWPLT (109)	RASQNVGSYLA (122)	SAYYRAT (147)	66%
E_G3	ARRYFPFAY (108)	GFSLSTSGYGVG (29)	LANIWWDDKYYVDSVKG (106)	QQYSTWPLT (114)	RASQNVGTYYA (117)	SASYRAS (53)	66%
C_D5	NRRYFPFAY (45)	GFSLSTSGYGVS (47)	LAHVWWDDKYYVDSVKG (48)	QQYNNWPLT (50)	RASQSVGTNVA (49)	SASYRAT (46)	65%
F_H9	TTRYFPFAY (142)	GFSLSTSGMGMG (58)	VAHIWWDDKYYVDSVKG (141)	QQYSTLPLT (148)	RASQNVGSNLA (40)	SASYRAT (46)	65%
E_D9	NRRYFPFAY (45)	GFSLSTSGYGMS (62)	LAHIWWDDKYYVDSVKG (26)	QQYSTDPLT (34)	RASQNVGTNLA (43)	SASYRAS (53)	65%
D_A9	SRLYFPFAY (149)	GFTLSTSGMGVS (150)	VAHIWWDDKYYVDSVKG (55)	QQHNDPLT (151)	RASQNVGTYYA (123)	FASNRYT (152)	65%

10

20

30

40

50

【表 3 - 3】

クローン7 名称	HCDR3	HCDR1	HCDR2	LCDR3	LCDR1	LCDR2	% ID
C_C11	NRRYFPFAY (45)	GFTFSTSGMGVS (135)	LAHIWDDDKYYVDSVKG (26)	QQYSTDPLT (34)	RASQNVGSNVA (139)	DASNRYS (124)	65%
E_F4	NRRYFPFAY (45)	GFTLSTSGYGVS (153)	VAHIWDDDKYYVDSVKG (141)	QQYSTDPLT (34)	RASQNVGSNLA (40)	SASYRAS (53)	65%
F_F1	NRRYFPFAY (45)	GFTFSTSGMGVS (135)	LAHIWDDDKYYVDSVKG (26)	QQYNNPLT (98)	RASQNVGSNLA (40)	SASNRYS (41)	65%
C_C10	ARRYFPFAY (108)	GFSLSTSGMGVS (54)	LAHIWDDDKYYVDSVKG (52)	QQYSTDPLT (34)	RASQNVGTNLA (43)	SASYRAT (46)	65%
J_G8	TRQYFPFAY (31)	GFSLSTSGMGVS (54)	VAHIWDDDKYYVDSVKG (141)	QQYSNDPLT (38)	RASQSVGSNVA (57)	SASYRYT (33)	65%
E_G12	TRLYFPFAY (39)	GFSLSTSGMGMG (58)	LAHIWDDDKYYVDSVKG (26)	QQYNNPLT (98)	RASQNVGSYLA (122)	SASYRYT (33)	65%
I_B7	NRRYFPFAY (45)	GFSLSTSGYGVS (47)	VAHVWDDDKYYVDSVKG (154)	QQYSNWPLT (107)	RASQSVGTNVA (49)	SASYRDT (155)	65%
H_A7	NRRYFPFAY (45)	GFSLSTSGYGMS (62)	LAHIWDDDKYYVDSVKG (26)	QQYSNDPLT (38)	RASQNVGTNVA (145)	SASYRAS (53)	65%
K_A12	NRRYFPFAY (45)	GFSLSTSGMGMS (61)	LAHIWDDDKYYVDSVKG (52)	QQYSTDPLT (34)	RASQSVGTNVA (49)	SASYRAS (53)	65%
H_E11	NRRYFPFAY (45)	GFSLSTSGFGMS (156)	LAHIWDDDKYYVDSVKG (52)	QQYSTDPLT (34)	RASQSVGTNVA (49)	SASYRAS (53)	65%
D_A4	NRRYFPFAY (45)	GFSLSTSGMGMS (61)	LAHIWDDDKYYVDSVKG (52)	QQYSTDPLT (34)	RASQNVGTNVA (145)	SASYRAS (53)	63%
D_A11	NRRYFPFAY (45)	GFTLSTSGMGMS (136)	VAHIWDDDKYYVDSVKG (55)	QQYSTDPLT (34)	RASQNVGTNVA (145)	SASYRAS (53)	63%
E_D10	TVRYFPFAY (157)	GFSLSTSGYGVG (29)	LAHIWDDDKYYVDSVKG (26)	QQYSTDPLT (34)	RASQSVGSNVA (57)	SASNRYS (41)	63%
E_G8	TRRYFPFAY (158)	GFSLSTSGYGVG (29)	VAHIWDDDKYYVDSVKG (141)	QQYSTSPLT (159)	RASQSVGTYVA (103)	SASYRAS (53)	63%
C_D10	NRRYFPFAY (45)	GFSLSTSGMGMS (61)	LAHIWDDDKYYVDSVKG (26)	QQYSTDPLT (34)	RASQNVGTNVA (145)	DASYRYT (134)	63%
J_G6	TRQYFPFAY (31)	GFSLSTSGYGVG (29)	VAHIWDDDKYYVDSVKG (141)	QQYSTDPLT (34)	RASQSVGSNVA (57)	SASYRYT (33)	63%
D_B7	TRQYFPFAY (31)	GFSLSTSGYGMG (64)	LAHIWDDDKYYVDSVKG (26)	QQYSNDPLT (38)	RASQNVGTNVA (145)	SASYRAS (53)	63%
K_E12	SRRYFPFAY (59)	GFTLSTSGMGMS (136)	VAHIWDDDKYYVDSVKG (141)	QQYSTDPLT (34)	RASQNVGSNVA (139)	SASYRAS (53)	63%
H_A3	SRRYFPFAY (59)	GFSLSTSGMGMG (58)	LAHIWDDDKYYVDSVKG (26)	QQYSTDPLT (34)	RASQNVGSNLA (40)	SASYRYT (33)	63%
G_C11	NRRYFPFAY (45)	GFSLSTSGYGVS (47)	VAHIWDDDKYYVDSVKG (55)	QQYNNWPLT (50)	RASQSVGTNVA (49)	SASYRAS (53)	63%
I_E12	NRRYFPFAY (45)	GFSLSTSGFGVS (160)	LAHIWDDDKYYVDSVKG (52)	QQYNNWPLT (50)	RASQSVGTNVA (49)	SASYRAT (46)	63%
J_G10	NRLYFPFAY (161)	GFSLSTSSLGMS (162)	VAHIWDDDKYYVDSVKG (141)	QQYSTDPLT (34)	RASQNVGTNVA (145)	DASYRYT (134)	63%

10

20

30

40

50

【表 3 - 4】

クローン7 名称	HCDR3	HCDR1	HCDR2	LCDR3	LCDR1	LCDR2	% ID
H_B3	TRVYFPFAY (42)	GFSLSTSGYGVG (29)	LAHIWDDDKYYYVDSVKG (26)	QQYSTDPLT (34)	RASQNVGTNLA (43)	SASYRYT (33)	62%
E_G7	TRQYFPFAY (31)	GFTLSTSGMGVG (163)	VAHIWDDDEKYYYVDSVKG (55)	QQYSTDPLT (34)	RASQNVSTNVA (164)	SASYRYT (33)	62%
E_F6	TRIYFPFAY (101)	GFSLSTSGYGVG (29)	LAHIWDDDEKYYYVDSVKG (52)	QQYNNVPLT (165)	RASQNVGTNVA (145)	SASNRYS (41)	62%
K_G9	SRRYFPFAY (59)	GFSLSTSGMGVS (54)	VAHIWDEDEKYYYVDSVKG (166)	QQYSTDPLT (34)	RASQNVGNVA (167)	SASNRAS (130)	62%
J_G6	NRRYFPFAY (45)	GFSLSTSGYGVG (47)	VAHVWDDDEKYYYVDSVKG (154)	QQYSTEPLT (168)	RASQSVGTNVA (49)	SASYRAS (53)	62%
F_D2	TRL YFPFAY (39)	GFTLSTSGMGVG (163)	LAHIWDDDKYYYVDSVKG (26)	QQYRTDPLT (169)	RASQNVGTNLA (43)	DASYRYT (134)	60%
F_A8	SRRYFPFAY (59)	GFSLSTSGMGMG (58)	LAHIWDDDKYYYVDSVKG (26)	QQYSTDPLT (34)	RASQNVGTNVA (145)	SASNRYS (41)	60%
D_A10	SRL YFPFAY (149)	GFTLSTSGMGVS (150)	VAHIWDDDEKYYYVDSVKG (55)	QQHNKDPLT (170)	RTSQNVGTYYA (171)	LASNRVT (172)	58%

【 0 2 0 1 】

表 4 . 2 2 のユニークライブラリー由来及びデザイナー抗 - G I T R I g G の C D R のアミノ酸配列。

10

20

30

40

50

【表 4 - 1】

クローン名称	HCDR3	HCDR1	HCDR2	LCDR3	LCDR1	LCDR2
C_B10	NRRYFPFAY (45)	GFSLSTSGMGMS (61)	LAHIWDDDKYYVDSVKG (26)	QQYSTDPPLT (38)	RASQNVGSNLA (40)	SASYRAT (46)
C_D5	NRRYFPFAY (45)	GFSLSTSGYGVGS (47)	LAHVWDDDKYYVDSVKG (48)	QQYNNIPLT (50)	RASQSVGTNVA (49)	SASYRAT (46)
C_F2	NRRYFPFAY (45)	GFSTSTSGYGVGS (51)	LAHIWDDDKYYVDSVKG (52)	QQYSTDPPLT (34)	RASQNVGTNLA (43)	SASYRAS (53)
D_A6	TRQYFPFAY (31)	GFSLSTSGYGVG (29)	LAHIWDDDKYYVDSVKG (26)	QQYSTDPPLT (34)	RASQSVGSNLA (32)	SASYRYT (33)
F_B11	NRRYFPFAY (45)	GFSLSTSGMGVS (54)	VAHIWDDDKYYVDSVKG (55)	QQYSTDPPLT (34)	RASQSVGSNLA (32)	SASYRAT (46)
F_B9	NRRYFPFAY (45)	GFSTSTSGMGVS (56)	VAHIWDDDKYYVDSVKG (55)	QQYSTDPPLT (34)	RASQSVGSNVA (57)	SASNRYT (44)
G_G10	TRQYFPFAY (31)	GFSLSTFGYGVG (35)	LAHIWDDDKYYVDSVKG (26)	QQYSTDPPLT (38)	RASQSVGTNLA (36)	YASYRYT (37)
H_A3	SRRYFPFAY (59)	GFSLSTSGMGMG (58)	LAHIWDDDKYYVDSVKG (26)	QQYSTDPPLT (34)	RASQNVGSNLA (40)	SASYRYT (33)
I_C2	TRLYFPFAY (39)	GFSLSTSGYGVG (29)	LAHIWDDDKYYVDSVKG (26)	QQYSTDPPLT (34)	RASQNVGSNLA (40)	SASNRYS (41)
J_C5	TRLYFPFAY (39)	GFSLSTSSYGVGS (60)	VAHIWDDDKYYVDSVKG (55)	QQYSTDPPLT (38)	RASQSVGTNLA (36)	SASYRYT (33)
K_A12	NRRYFPFAY (45)	GFSLSTSGMGMS (61)	LAHIWDDDKYYVDSVKG (52)	QQYSTDPPLT (34)	RASQSVGTNVA (49)	SASYRAS (53)
MH	TRQYFPFAY (31)	GFSLSTSGYGVGS (62)	VAHIWDDDKYYVDSVKG (55)	QQYSTDPPLT (34)	RASQSVGSNLA (32)	SASYRAT (46)
MH-1	TRQYFPFAY (31)	GFSLSTSGMGMS (61)	VAHIWDDDKYYVDSVKG (55)	QQYSTDPPLT (34)	RASQSVGSNLA (32)	SASYRAT (46)
MH-2	TRQYFPFAY (31)	GFSLSTSGYGVGS (47)	VAHIWDDDKYYVDSVKG (55)	QQYSTDPPLT (34)	RASQSVGSNLA (32)	SASYRAT (46)

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

クローン名称	HCDR3	HCDR1	HCDR2	LCDR3	LCDR1	LCDR2
MH-3	TRQYFPAY (31)	GFSLSTSGYGMS (62)	VAHIWDDDEKYYVDSVKG (55)	QQYSTDPLT (34)	RASQSVGSNLA (40)	SASVRYT (46)
MH-4	TRQYFPAY (31)	GFSLSTSGYGMS (62)	VAHIWDDDEKYYVDSVKG (55)	QQYSTDPLT (34)	RASQSVGSNVA (57)	SASVRYT (46)
MH-5	TRQYFPAY (31)	GFSLSTSGYGMS (62)	VAHIWDDDEKYYVDSVKG (55)	QQYSTDPLT (34)	RASQSVGSNLA (32)	SASVRYT (33)
A6.1	TRQYFPAY (31)	GFSLSTSGYGVG (29)	LAHIWDDDDKYYVDSVKG (26)	QQYSTDPLT (34)	RASQSVGSNLA (32)	SASNRYT (44)
A6.2	TRQYFPAY (31)	GFSLSTSGYGVG (29)	LAHIWDDDDKYYVDSVKG (26)	QQYSTNPLT (63)	RASQSVGSNLA (32)	SASNRYT (44)
A6.3	TRQYFPAY (31)	GFSLSTSGYGVG (47)	LAHIWDDDDKYYVDSVKG (26)	QQYSTDPLT (34)	RASQSVGSNLA (32)	SASNRYT (44)
A6.4	TRQYFPAY (31)	GFSLSTSGYGMS (62)	LAHIWDDDDKYYVDSVKG (26)	QQYSTDPLT (34)	RASQSVGSNLA (32)	SASNRYT (44)
A6.5	TRQYFPAY (31)	GFSLSTSGYGMG (64)	LAHIWDDDDKYYVDSVKG (26)	QQYSTDPLT (34)	RASQSVGSNLA (32)	SASNRYT (44)

【 0 2 0 2 】

表 5 . リード抗 - G I T R I g G C D R についての E p i b a s e D R B 1 スコア。

10

20

30

40

50

【表 5】

クローン名称	総 DRB1	VL	VH
mVH/mVL	1680.4	720.4	960
G-VH3/VL2	994	426.3	567.7
I-C2	1022.7	412.1	610.6
G-G10	842.8	442.4	400.4
D-A6	932.5	499.7	432.8
A6.1	888.7	455.9	432.8
A6.2	888.7	455.9	432.8
A6.3	895.4	455.9	439.5
A6.4	845.9	455.9	390
A6.5	900.3	455.9	444.4

10

【0203】

表6. 抗-GITR Fab対hGITR及びcGITRについてSPR由来の親和性値。

【表 6】

20

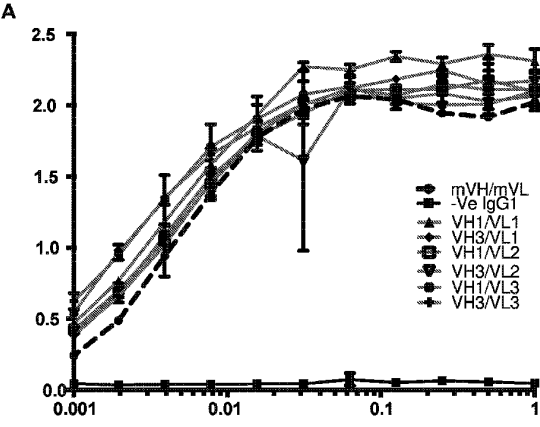
Fab名称 (標的)	K_{on} $M^{-1} S^{-1}$	K_{off} S^{-1}	K_D M	χ^2
VH1/VL1 (hGITR)	4.5×10^4	5.1×10^{-3}	1.1×10^{-7}	0.0568
VH1/VL1 (cGITR)	2.2×10^4	6.1×10^{-3}	2.7×10^{-7}	0.0747
D-A6 (hGITR)	9.2×10^4	1.1×10^{-3}	1.2×10^{-7}	0.0574
D-A6 (cGITR)	3.7×10^4	2.1×10^{-3}	5.7×10^{-7}	0.140

30

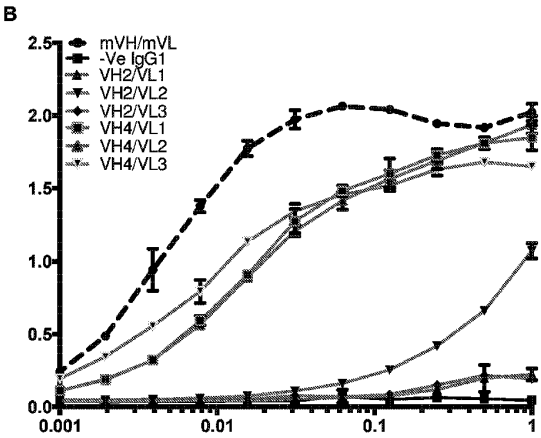
40

50

【 図面 】
【 図 1 A 】

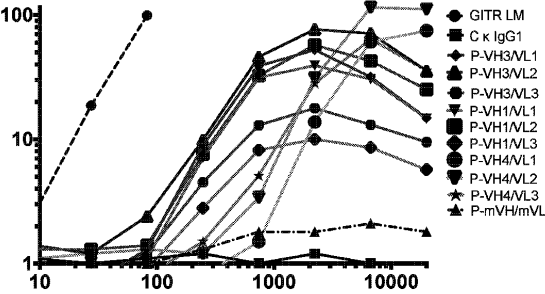


【 図 1 B 】

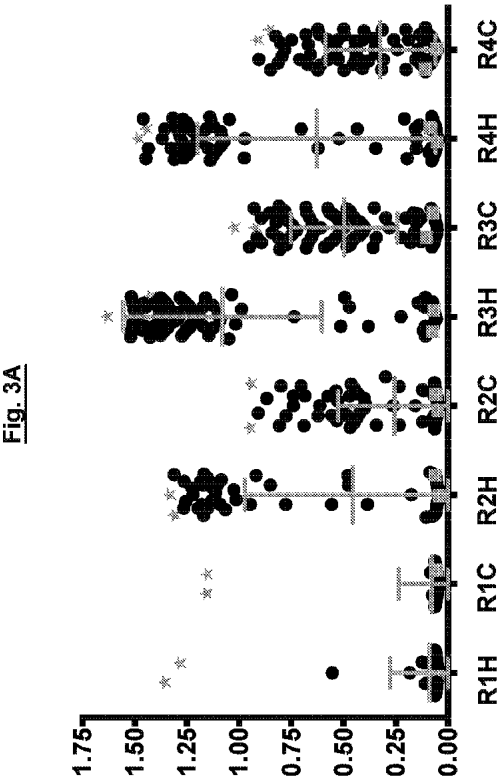


【 図 2 】

Fig. 2



【 図 3 A 】



10

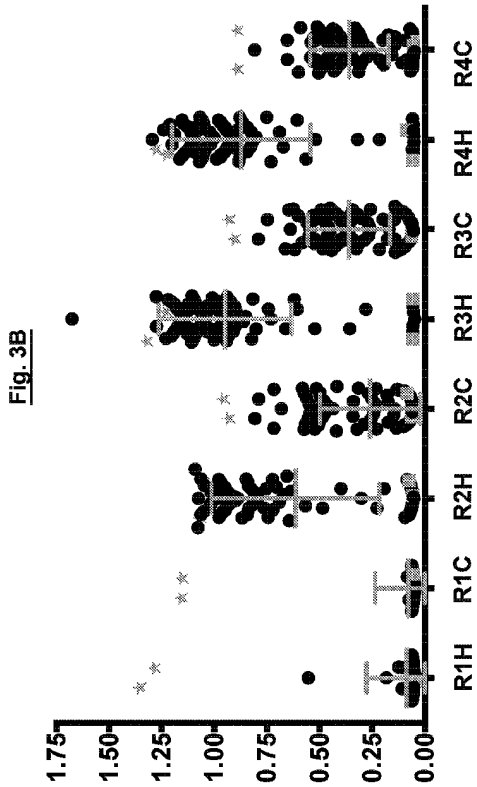
20

30

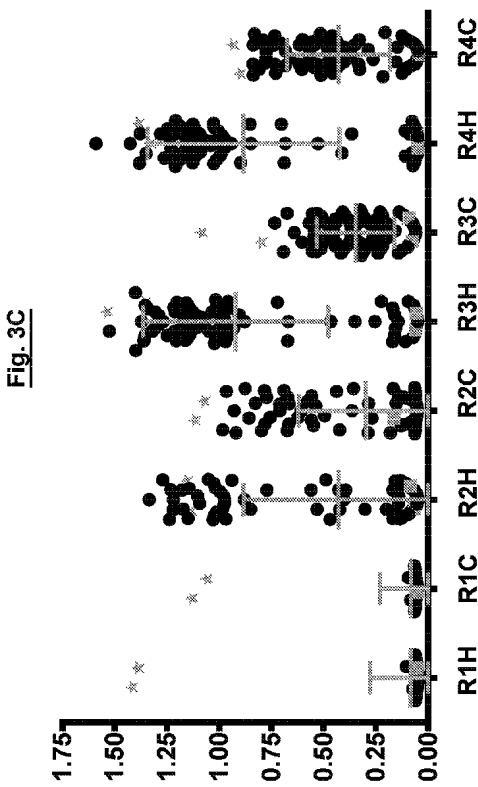
40

50

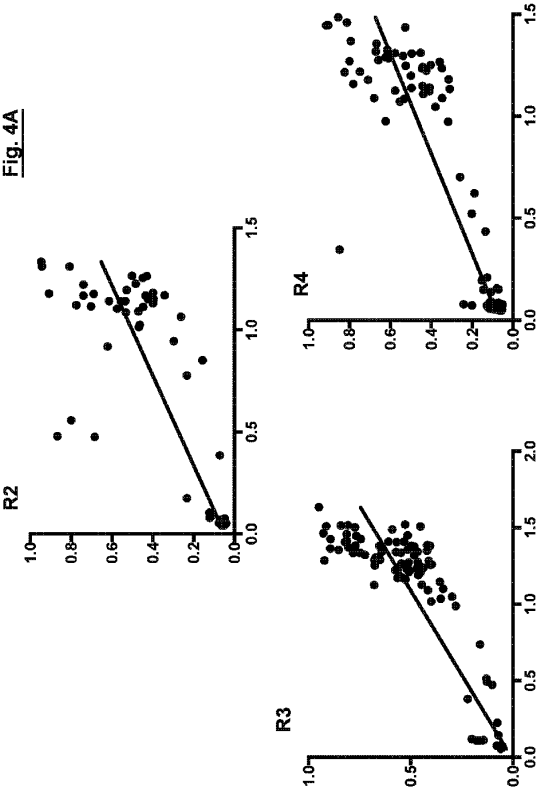
【 図 3 B 】



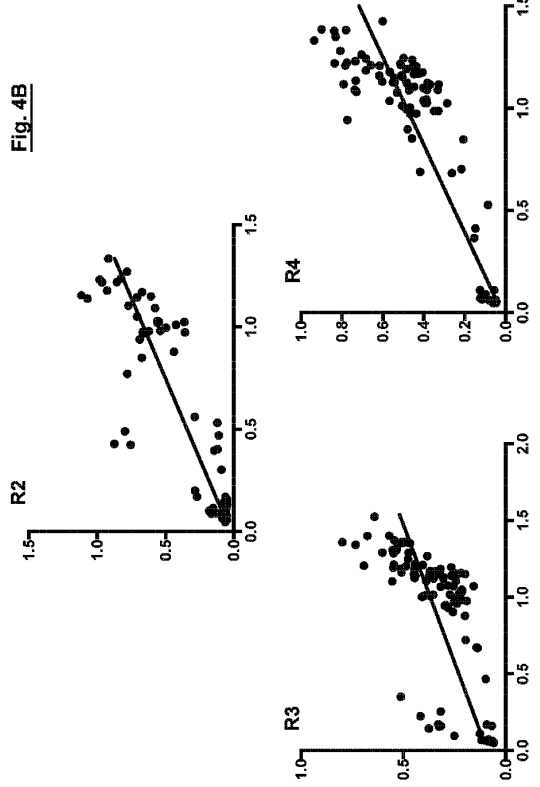
【 図 3 C 】



【 図 4 A 】



【 図 4 B 】



10

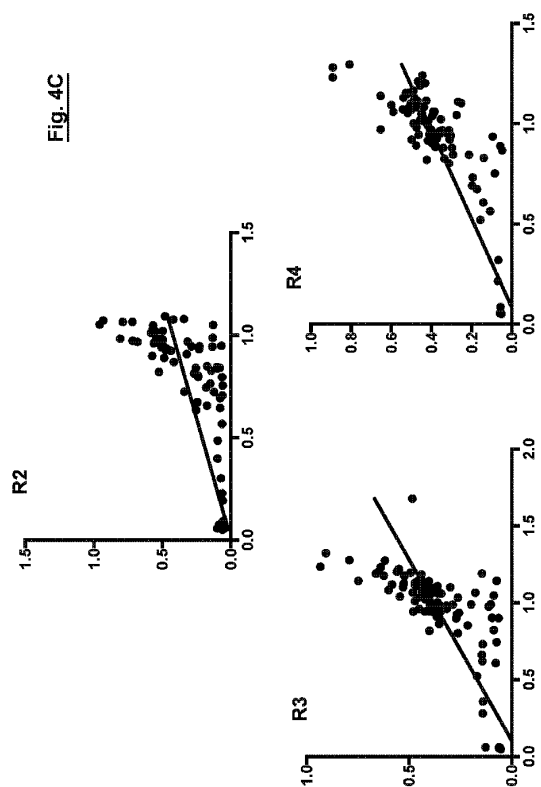
20

30

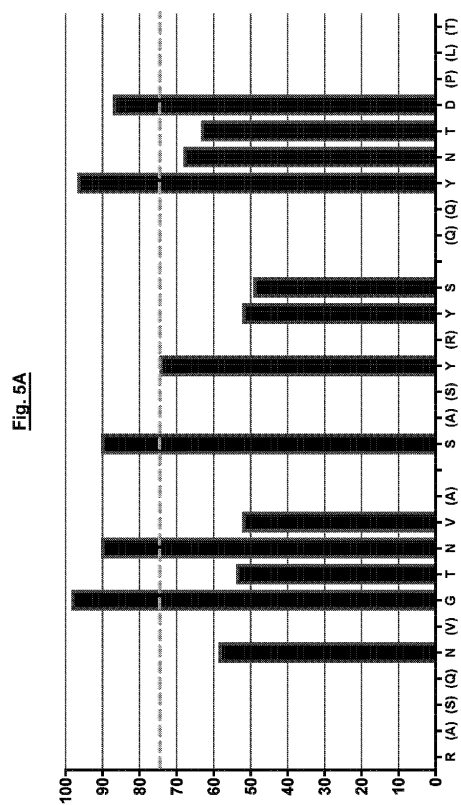
40

50

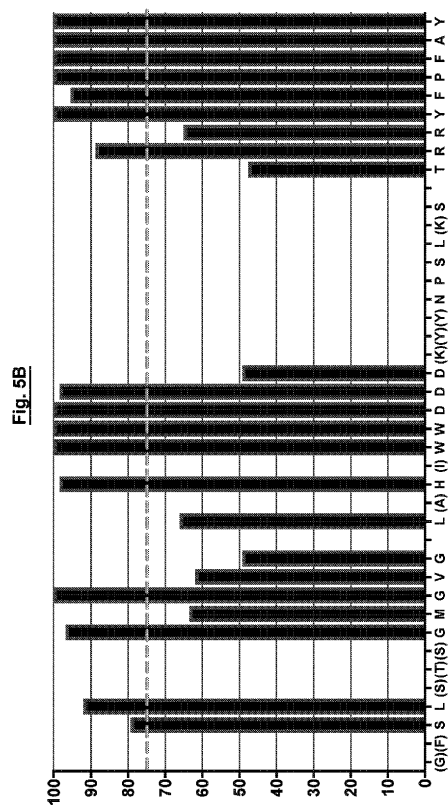
【 図 4 C 】



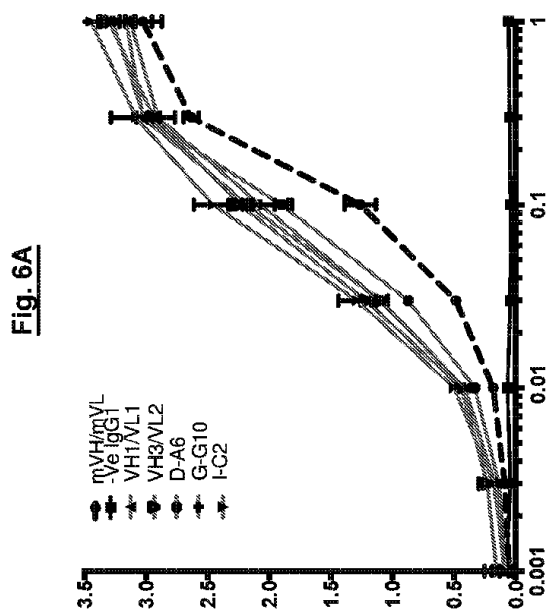
【 図 5 A 】



【 図 5 B 】



【 図 6 A 】



10

20

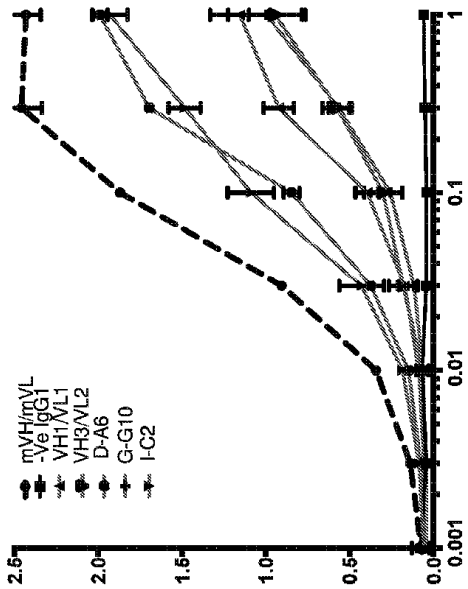
30

40

50

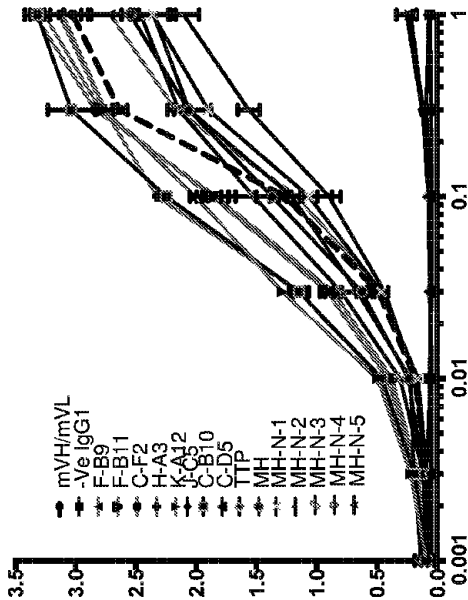
【 図 6 B 】

Fig. 6B



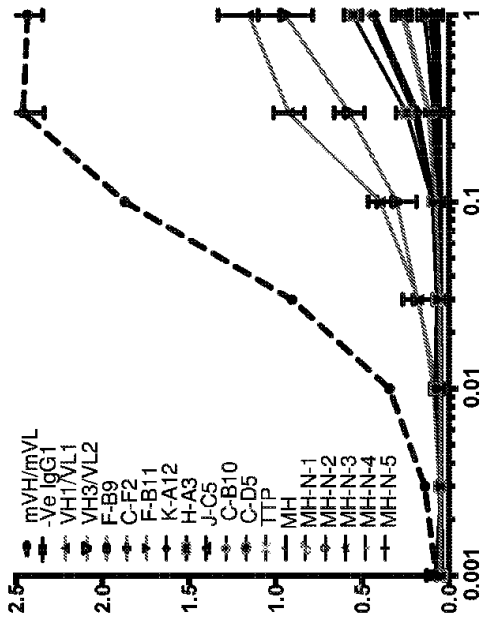
【 図 6 C 】

Fig. 6C



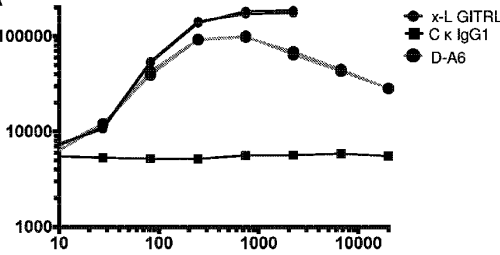
【 図 6 D 】

Fig. 6D



【 図 7 A 】

A



10

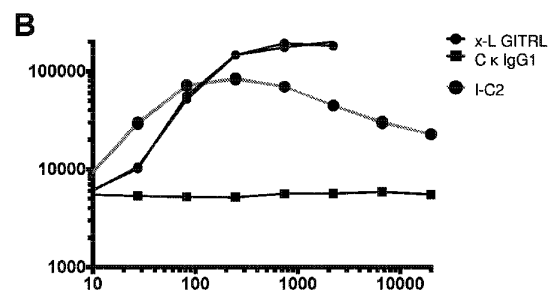
20

30

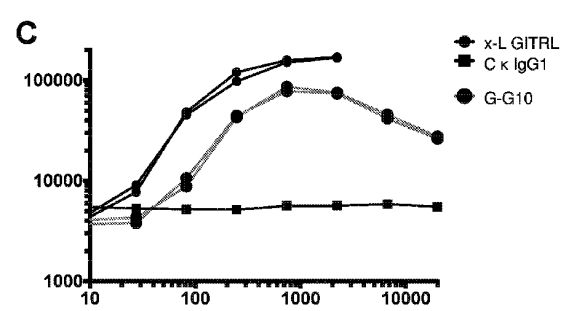
40

50

【 図 7 B 】

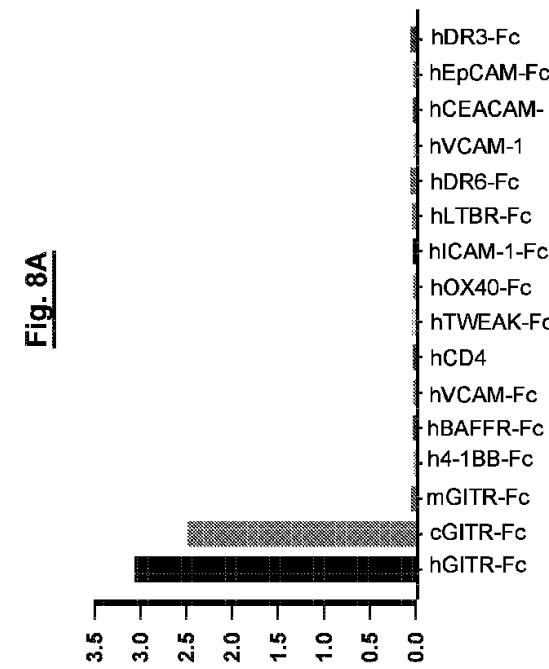


【 図 7 C 】

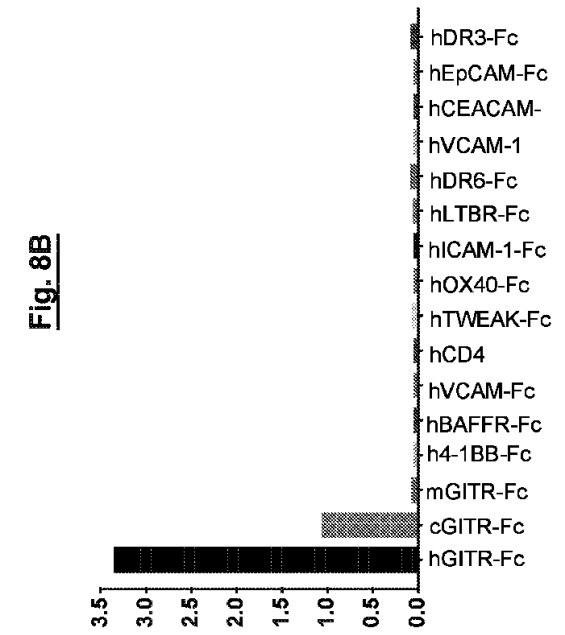


10

【 図 8 A 】



【 図 8 B 】



20

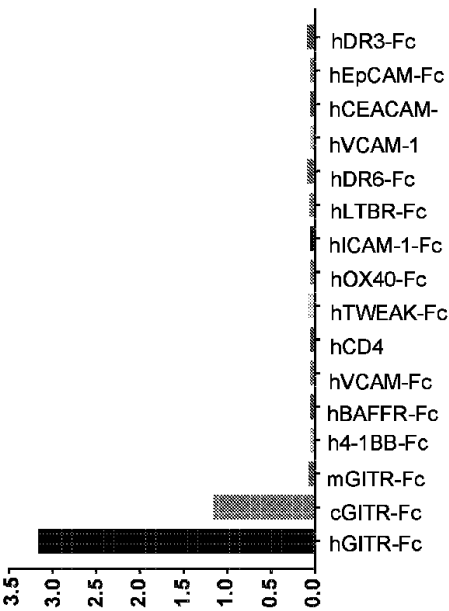
30

40

50

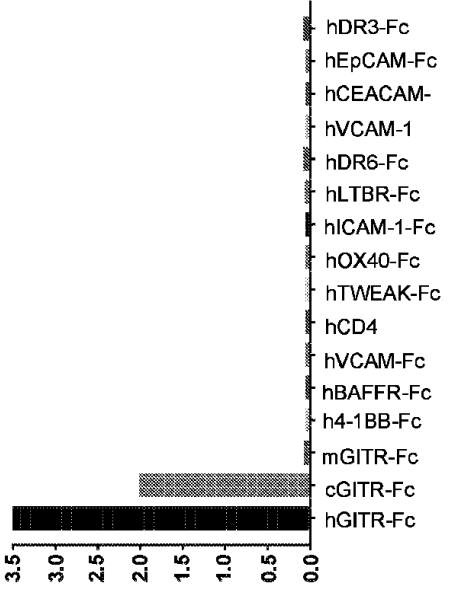
【 8 C 】

Fig. 8C



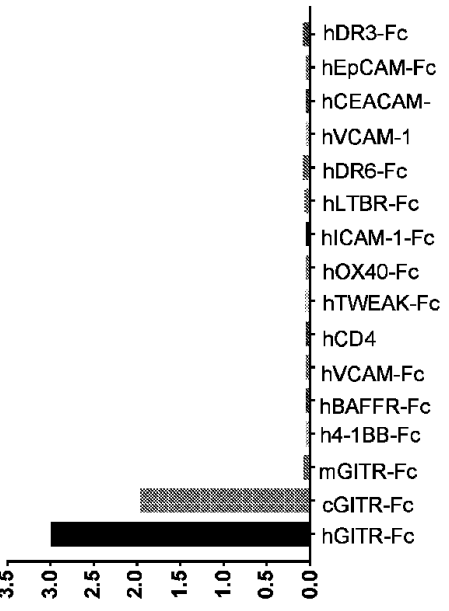
【 8 D 】

Fig. 8D



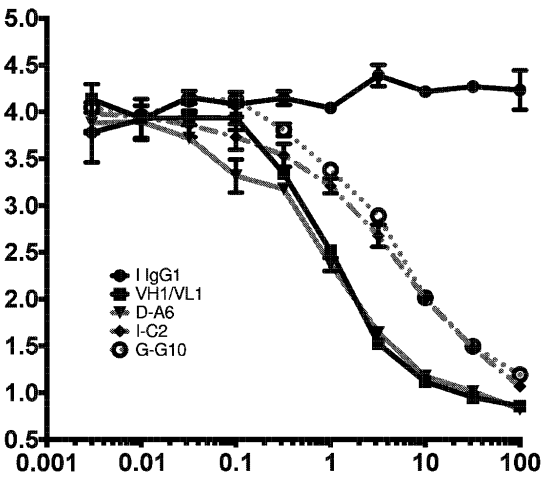
【 8 E 】

Fig. 8E



【 9 】

Fig. 9



10

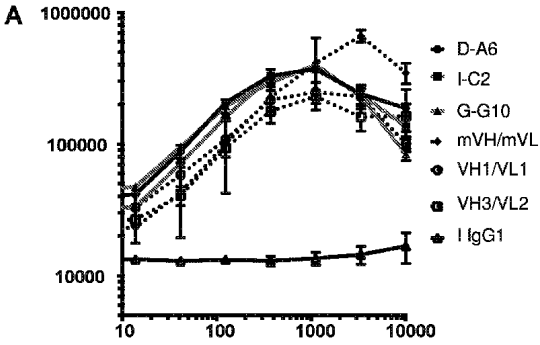
20

30

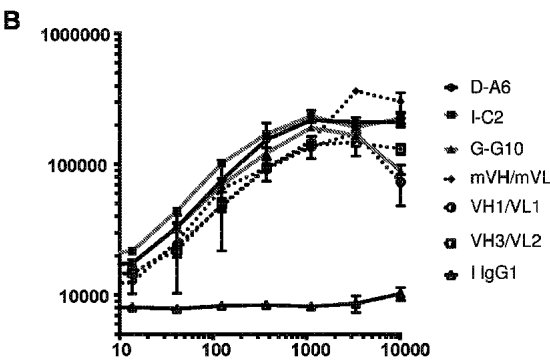
40

50

【図 10 A】

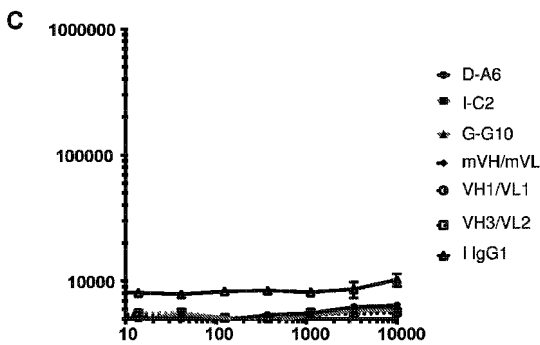


【図 10 B】

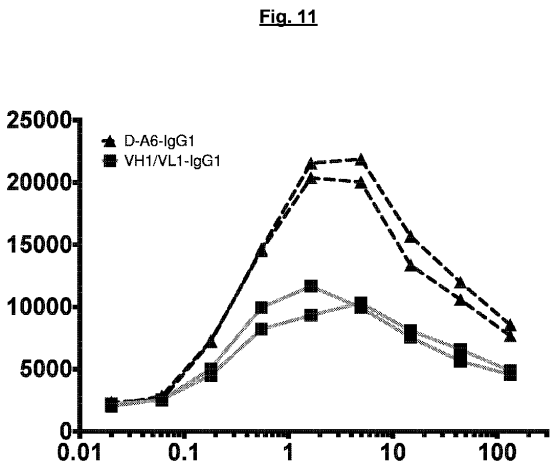


10

【図 10 C】



【図 11】



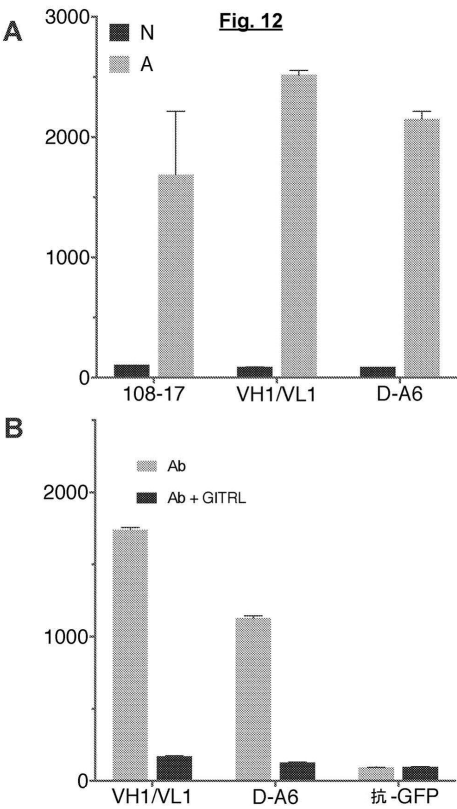
20

30

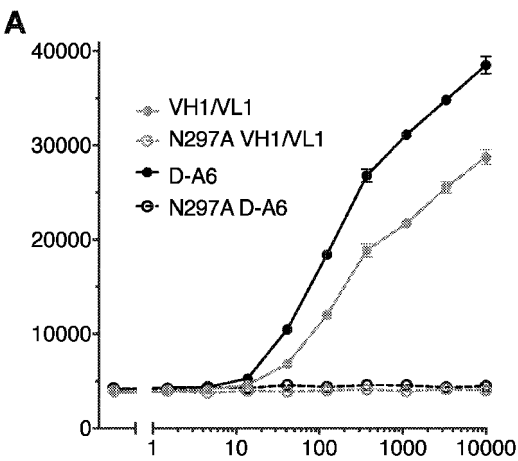
40

50

【 図 1 2 】



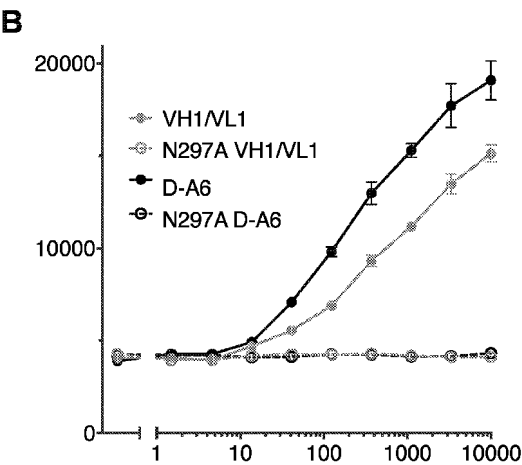
【 図 1 3 A 】



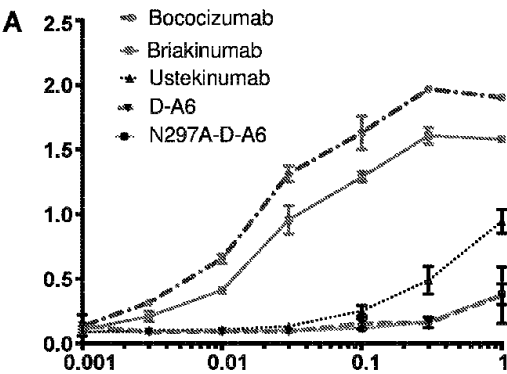
10

20

【 図 1 3 B 】



【 図 1 4 A 】

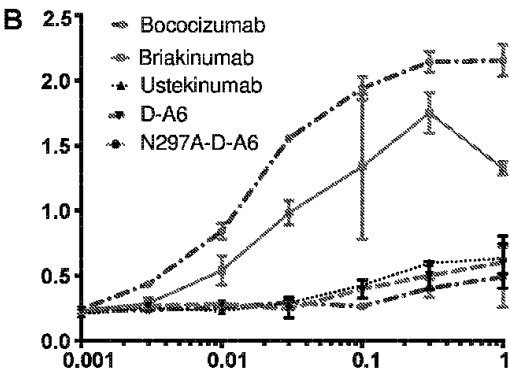


30

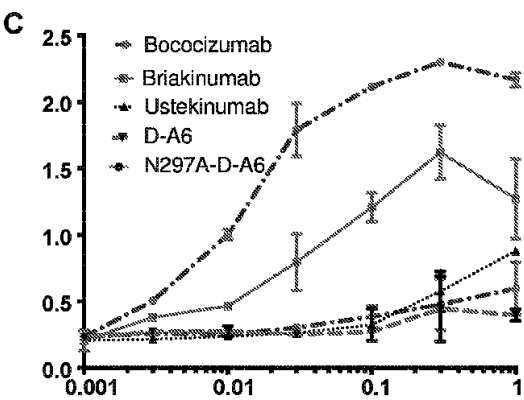
40

50

【 図 1 4 B 】

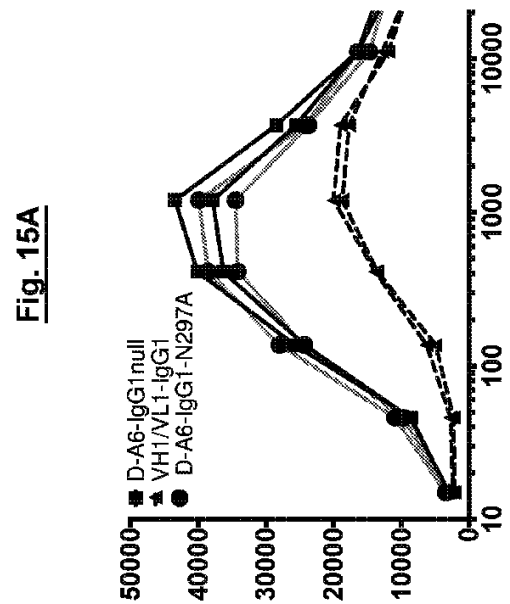


【 図 1 4 C 】

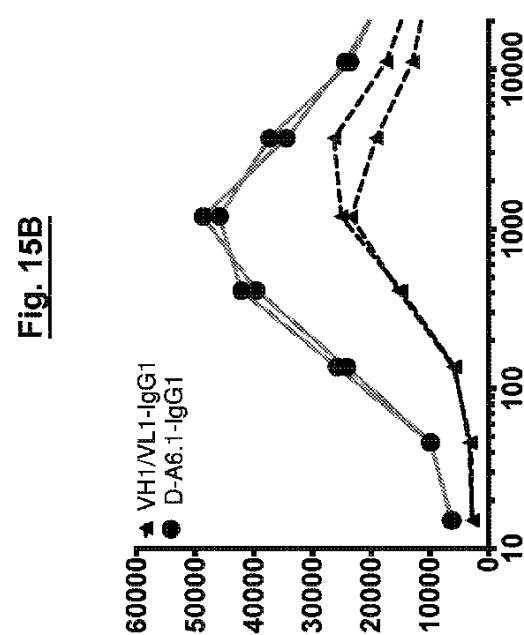


10

【 図 1 5 A 】



【 図 1 5 B 】



20

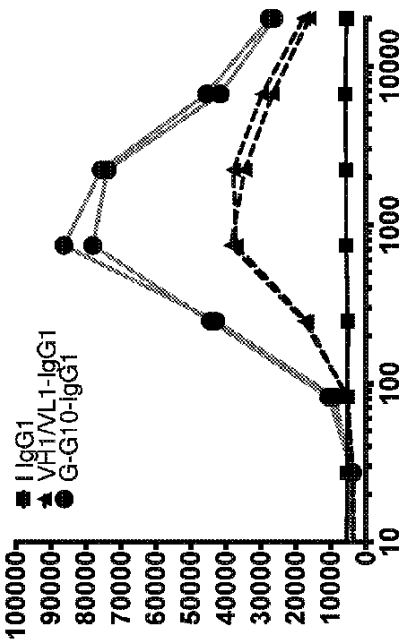
30

40

50

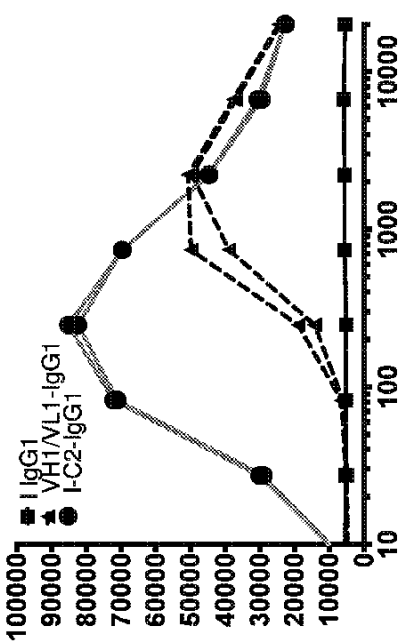
【 図 1 5 C 】

Fig. 15C



【 図 1 5 D 】

Fig. 15D



【 配列表 】

0007169296000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 K	31/7088 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	U
A 6 1 K	47/68 (2017.01)	A 6 1 K	31/7088	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 K	47/68	
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 6 1 P	1/18 (2006.01)	A 6 1 P	37/04	
A 6 1 P	17/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	15/00 (2006.01)	A 6 1 P	1/18	
A 6 1 P	11/00 (2006.01)	A 6 1 P	17/00	
A 6 1 P	1/00 (2006.01)	A 6 1 P	15/00	
A 6 1 P	1/04 (2006.01)	A 6 1 P	11/00	
A 6 1 P	1/02 (2006.01)	A 6 1 P	1/00	
A 6 1 P	13/08 (2006.01)	A 6 1 P	1/04	
A 6 1 P	13/10 (2006.01)	A 6 1 P	1/02	
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P	13/08	
A 6 1 P	25/02 (2006.01)	A 6 1 P	13/10	
A 6 1 P	1/16 (2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	13/12 (2006.01)	A 6 1 P	25/02	
A 6 1 P	5/14 (2006.01)	A 6 1 P	1/16	
A 6 1 P	19/08 (2006.01)	A 6 1 P	13/12	
A 6 1 P	21/00 (2006.01)	A 6 1 P	5/14	
A 6 1 P	7/00 (2006.01)	A 6 1 P	19/08	
		A 6 1 P	21/00	
		A 6 1 P	7/00	

(33)優先権主張国・地域又は機関

英国(GB)

(74)代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(74)代理人 100182730

弁理士 大島 浩明

(72)発明者 ウィリアム ジェイムズ ジョナサン フィンリー

イギリス国, ケント シーティー 13 9エフエフ, サンドウィッチ, ラムスゲイト ロード, イノベーション ハウス, シー/オー クレストン リーズ リミティド ライアビリティ パートナーシップ

審査官 野村 英雄

(56)参考文献 特表 2016 - 530278 (JP, A)

国際公開第 2016 / 057841 (WO, A1)

国際公開第 2015 / 187835 (WO, A2)

国際公開第 2015 / 184099 (WO, A1)

特表 2013 - 503632 (JP, A)

特表 2008 - 533993 (JP, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 15 / 00 - 15 / 90

C 0 7 K 1 / 00 - 19 / 00

JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)

CAplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)

UniProt / GeneSeq

PubMed