

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2015-232005

(P2015-232005A)

(43) 公開日 平成27年12月24日(2015.12.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28 Z N A	4 C 0 8 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	4 H 0 4 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 U	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 T	
審査請求 有 請求項の数 1 O L (全 69 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2015-142065 (P2015-142065)	(71) 出願人	513035922
(22) 出願日	平成27年7月16日 (2015.7.16)		ジーアイティーアール, インク.
(62) 分割の表示	特願2012-256659 (P2012-256659) の分割		G I T R, I n c.
原出願日	平成18年3月27日 (2006.3.27)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O
(31) 優先権主張番号	60/665, 322		2 1 4 1 ケンブリッジ スイート B 1
(32) 優先日	平成17年3月25日 (2005.3.25)		-1 ソーンダイク ストリート 47
(33) 優先権主張国	米国 (US)		47 Thorndike Street,
(31) 優先権主張番号	60/687, 265		Suite B1-1, Cambri
(32) 優先日	平成17年6月3日 (2005.6.3)		dge, MA O2141 (US)
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100136630
			弁理士 水野 祐啓
		(72) 発明者	スミス, エル., メアリー
			アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O
			2 0 2 6 デッドヘム バイオレット ア
			ベニュー 70
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 G I T R 結合分子およびその使用

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 T 細胞および樹状細胞上で G I T R、例えば、ヒト G I T R (h G I T R) に特異的に結合する結合分子の提供。

【解決手段】 刺激剤、例えば、C D 3 の存在下で、h G I T R に高いアフィニティーで結合することを特徴とし、アゴニスト的であり、T r e g 細胞による T e f f 細胞の抑制を取り消す G I T R 結合分子。種々のアスペクトは、結合分子、及びその医薬組成物、並びにそのような結合分子を作製するための核酸、組換え発現ベクターおよび宿主細胞。結合分子を用いて、インビトロ又はインビボでヒト G I T R を検出し、またはヒト G I T R 活性を調節する方法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号：1のアミノ酸残基20～138、または配列番号：66のアミノ酸残基20～138を含む、GITR結合分子。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本願は、2005年3月25日に出願された、「GITR結合分子およびその使用」という発明の名称の米国仮特許出願第60/665322号、および2005年6月3日に出願された、「GITR結合分子およびその使用」という発明の名称の米国仮特許出願第60/687265号の優先権を主張する。それぞれの内容を本明細書において引用によって援用する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

腫瘍壊死因子およびTNFレセプター（TNFR）スーパーファミリーのメンバーは、細胞増殖、分化および生存といった、多様な生物学的機能を調節する。全身性グルココルチコイドホルモンデキサメサゾンによって誘発されるT細胞mRNAを同定するためにディファレンシャルディスプレイを用いて、Nocentini et al.（（1997）Proc. Natl. Acad. Sci., USA 94:6216-62211997）は、TNFRファミリーの新規のメンバーをコードするマウスcDNAを同定した。対応する遺伝子は、glucocorticoid -induced TNFR（グルココルチコイド誘発性TNFR）ファミリー関連遺伝子を表して、GITR（TNFRSF18としても知られている）と名づけられた。他のTNFRと同様に、予測されるGITRタンパク質は、システインリッチの繰り返し部分を細胞外ドメインに含有する。さらに、GITRの細胞内ドメインは、マウスおよびヒトTNFR、4-1BBおよびCD27のそれと有意なホモロジーを共有している。Nocentini et al.（（1997）Proc. Natl. Acad. Sci., USA 94:6216-62211997）は、GITR遺伝子がデキサメサゾンおよび他の細胞活性化刺激によって、T細胞中において誘発されることを証明した。GITR発現は、抗CD3抗体を用いた処置によって誘発されるアポトーシス（但し、他のアポトーシス物質によるものではない）からT細胞を保護している。

【0003】

Shimizu et al.（（2002）Nat Immunol 3:135-42）は、GITRが、主にCD4+CD25+調節T細胞上で発現することを発見した。しかしながら、GITRはまた、従来のCD4+およびCD8+T細胞上でも発現した。その発現は、活性化後に急速に高められる。インビトロの研究によって、GITRは、これらの細胞によって媒介される末梢耐性（peripheral tolerance）において重要な役割を果たし、CD4+CD25+調節T細胞の抑制機能を取り消す（Shimizu et al.（2002）Nat Immunol 3:135-42; McHugh et al.（2002）Immunity 16:311-23）。

【0004】

GITRを介してのシグナリング調整に有用な物質の開発は、非常に有益なことである。

【0005】

発明の概要

本発明は、T細胞や樹状細胞などの細胞上で、GITR、例えば、ヒトGITR（hGITR）に特異的に結合する結合分子を提供する。本発明の結合分子は、hGITRに高アフィニティーで結合し、刺激剤、例えば、CD3の存在下でアゴニストとなり、Tエフェクター（Teff）細胞のT調節（Treg）細胞による抑制を取り消すことを特徴とする。

10

20

30

40

50

【0006】

本発明のある局面は、配列番号：1のアミノ酸配列を含み、任意にリーダー配列を含む結合分子に関する。

【0007】

別の局面においては、本発明は、配列番号：66のアミノ酸配列を含み、任意にリーダー配列を含む結合分子に関する。

【0008】

別の局面においては、本発明は、配列番号：2のアミノ酸配列を含み、任意にリーダー配列を含む結合分子に関する。

【0009】

本発明の別の局面は、配列番号：58のアミノ酸配列を含み、任意にリーダー配列を含む結合分子に関する。

【0010】

本発明のある局面は、配列番号：59のアミノ酸配列を含み、任意にリーダー配列を含む結合分子に関する。

【0011】

別の局面においては、本発明は、配列番号：60のアミノ酸配列を含み、任意にリーダー配列を含む結合分子に関する。

【0012】

ある局面において、本発明は、配列番号：61のアミノ酸配列を含み、任意にリーダー配列を含む結合分子に関する。

【0013】

別の局面においては、本発明は、配列番号：62のアミノ酸配列を含み、任意にリーダー配列を含む結合分子に関する。

【0014】

本発明のある局面は、配列番号：63のアミノ酸配列を含み、任意にリーダー配列を含む結合分子に関する。

【0015】

本発明のさらに別の局面は、配列番号：3、配列番号：4または配列番号：19および配列番号：5からなる群から選択される、少なくとも1つの相補性決定領域（CDR）アミノ酸配列を含む結合分子に関する。ある態様において、結合分子は、配列番号：3、配列番号：4または配列番号：19および配列番号：5からなる群から選択される、少なくとも2つの相補性決定領域（CDR）アミノ酸配列を含む。別の態様において、結合分子は、配列番号：3、配列番号：4または配列番号：19および配列番号：5からなる群から選択される、少なくとも3つの相補性決定領域（CDR）アミノ酸配列を含む。

【0016】

本発明の別の局面は、配列番号：6、配列番号：7、および配列番号：8からなる群から選択される、少なくとも1つの相補性決定領域（CDR）アミノ酸配列を含む結合分子に関する。ある態様において、結合分子は、配列番号：6、配列番号：7、および配列番号：8からなる群から選択される、少なくとも2つの相補性決定領域（CDR）アミノ酸配列を含む。別の態様において、結合分子は、配列番号：6、配列番号：7、および配列番号：8からなる群から選択される、少なくとも3つの相補性決定領域（CDR）アミノ酸配列を含む。

【0017】

本発明の別の局面は、配列番号：3、4、5、6、7、および8に示されるCDRを含む結合分子に関する。別の局面においては、本発明は、配列番号：3、19、5、6、7、および8に示されるCDRを含む結合分子に関する。

【0018】

本発明のある局面は、配列番号：1のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含み、さらに配列番号：2のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む結合分子に関する。本発明の別の

10

20

30

40

50

局面は、配列番号：66のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含み、さらに配列番号：2のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む結合分子に関する。さらに複数の態様において、結合分子は、ヒト重鎖および軽鎖フレームワーク領域または実質的にヒト重鎖および軽鎖フレームワーク領域を含む。別の態様において、1以上のヒトフレームワークアミノ酸残基を対応するネズミアミノ酸残基に突然変異させる。別の態様において、定常領域は、IgG2b重鎖定常領域を含む。別の態様において、該定常領域は、ヒト、例えば、ヒトIgG1の重鎖定常領域を含む。別の態様において、結合分子を、エフェクター機能および/またはグリコシル化を減少させるように改変される。ある態様において、該結合分子は、ヒトGITRと結合する。

【0019】

10

ある態様において、結合分子は、アポトーシスを誘発しない。別の態様において、該結合分子は、1次混合リンパ球反応をブロックしない。さらに別の態様において、該結合分子は、T調節細胞によるTエフェクター細胞の抑制を取り消す。ある態様において、該結合分子は、エフェクターT細胞の増殖を調整する。ある態様において、該結合分子はネズミである。別の態様において、該結合分子は、ネズミIgG2b重鎖を含む。ある態様において、該結合分子はヒト化抗体である。さらに別の態様において、該結合分子は、キメラ抗体である。さらに別の態様において、該結合分子は、ヒトGITRの活性を調整する。別の態様において、該結合分子は、T細胞中のI- κ Bの分解を減衰させる。

【0020】

20

本発明の別の局面は、T細胞やヒト樹状細胞上のGITRに結合する結合分子を特徴とし、 1×10^{-9} 以下の結合定数(Kd)を有する。ある態様において、該結合分子は、T調節細胞によるTエフェクター細胞の抑制を取り消す。別の態様において、該結合分子は、ヒト化抗体である。

【0021】

本発明の別の局面は、本発明の結合分子および薬学的に許容される担体を含む組成物に関する。ある態様において、該組成物はさらに、被験体における癌を治療するための少なくとも1つのさらなる治療薬を含む。ある態様において、該組成物はさらに、被験体におけるウイルス性感染症を治療するための少なくとも1つのさらなる治療薬を含む。別の態様において、該組成物はさらに、被験体における癌を治療するための少なくとも1つの腫瘍抗原を含む。さらに別の局面において、該組成物はさらに、病原性物質からの少なくとも1つの抗原を含む。

30

【0022】

本発明のある局面は、T調節細胞によるTエフェクター細胞の抑制を取り消す方法の特徴とする。該方法は、ヒト免疫細胞を本発明の結合分子と接触させて、T調節細胞によるTエフェクター細胞の抑制を取り消す。

【0023】

本発明の別の局面は、エフェクターT細胞中でT細胞レセプター誘発性シグナリングを調整する方法に関する。該方法においては、エフェクターT細胞中でT細胞レセプター誘発性シグナリングを調整するように細胞を本発明の結合分子と接触させる。ある態様において、該方法は、I- κ Bの分解を調整する。ある態様において、T細胞は、Th1細胞である。別の態様において、T細胞は、CD4+細胞である。さらに別の態様において、T細胞は、CD8+細胞である。

40

【0024】

本発明のさらに別の局面は、被験体における免疫応答を高める方法に関する。該方法は、被験体における免疫応答を高められるように細胞を本発明の結合分子と接触させることを含む。

【0025】

本発明の別の局面は、被験体における癌を治療する方法に関する。該方法は、被験体において癌が治療されるように、細胞を本発明の結合分子と接触させることを含む。ある態様において、癌のタイプは、膵臓癌、メラノーマ、乳癌、肺癌、気管支癌、結直腸癌、前

50

立腺癌、胃癌、卵巣癌、膀胱癌、脳または中枢神経系癌、末梢神経系の癌、食道癌、子宮頸癌、子宮癌または子宮体癌、口腔または咽頭の癌、肝臓癌、腎臓癌、睾丸の癌、胆道癌、小腸または虫垂の癌、唾液腺の癌、甲状腺癌、副腎癌、骨肉腫、軟骨肉腫および血液学的組織の癌からなる群から選択される。

【0026】

本発明の別の局面は、被験体において病原性物質によって引き起こされる感染症を治療する方法に関する。該方法は、細胞を請求項1に記載の結合分子と接触させて被験体において病原性物質によって引き起こされる感染症を治療する。ある態様において、該病原性物質は、例えば、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、インフルエンザ、水痘、アデノウイルス、単純疱疹ウイルス1（HSV-I）、単純疱疹ウイルス2（HSV-II）、牛痘、ライノウイルス、エコーウイルス、ロタウイルス、呼吸系発疹ウイルス、パピローマウイルス、パポバウイルス、サイトメガロウイルス、エキノウイルス（echinovirus）、アルボウイルス、ハンタウイルス、コクサッキーウイルス、おたふくかぜウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、ポリオウイルス、ヒト免疫不全症ウイルスタイプI（HIV-I）およびヒト免疫不全症ウイルスタイプII（HIV-II）、あらゆるピコルナウイルス、エンテロウイルス、カリチウイルス、あらゆるノーウォーク群のウイルス、トガウイルス、例えば、アルファウイルス、フラビウイルス、コロナウイルス、狂犬病ウイルス、マールブルグウイルス、エボラウイルス、パラインフルエンザウイルス、オルソミクソウイルス、ブニavirus、アレナウイルス、レオウイルス、ロタウイルス、オルビウイルス、ヒトT細胞白血病ウイルスタイプI、ヒトT細胞白血病ウイルスタイプII、サルスの免疫不全症ウイルス、レンチウイルス、ポリオーマウイルス、パルボウイルス、エプスタイン・バーウイルス、ヒトヘルペスウイルス6、サルヘルペスウイルス1（Bウイルス）、ならびにポックスウイルスからなる群から選択されるウイルスである。ある態様において、該方法は、慢性のウイルス性感染症の治療に用いられる。

【0027】

別の態様において、該病原性物質は、例えば、ナイセリア種、連鎖球菌種、S. ミュータンズ（*S. mutans*）、ヘモフィルス種、モラクセラ種、ボルデテラ種、マイコバクテリウム種、レジオネラ種、エシェリキア種、ビブリオ種、エルシニア種、カンピロバクター種、サルモネラ種、リステリア種、ヘリコバクター種、シュードモナス種、ブドウ球菌種、腸球菌種、クロストリジウム種、バシラス種、コリネバクテリウム種、ボレリア種、エーリキア（*Ehrlichia*）種、リケッチア種、クラミジア種、レプトスピラ種、トレポネーマ種からなる群から選択される細菌である。

【0028】

本発明の別の局面は、GITR機能を調整する方法に関する。該方法は、ヒトGITRを本発明の結合分子と、免疫促進性の物質の存在下で接触させて、GITR機能を調整する。

【0029】

本発明のある局面は、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：19、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7および配列番号：8からなる群から選択される、少なくとも1つのCDRアミノ酸配列を含む結合分子に関する。ある態様において、該結合分子はさらに、被験体における癌を治療するための少なくとも1つのさらなる治療薬を含む。別の態様において、該結合分子は、少なくとも1つの、6C8結合分子由来のCDRを含む。別の態様において、該結合分子は、少なくとも2つの、6C8結合分子由来のCDRを含む。別の態様において、該結合分子は、少なくとも3つの、6C8結合分子由来のCDRを含む。別の態様において、該結合分子は、少なくとも4つの、6C8結合分子由来のCDRを含む。別の態様において、該結合分子は、少なくとも5つの、6C8結合分子由来のCDRを含む。別の態様において、該結合分子は、少なくとも6つの、6C8結合分子由来のCDRを含む。

【0030】

本発明の別の局面は、配列番号：3、4または19、5、6、7、および8に示される

C D Rを含む結合分子に関する。

【0031】

本発明のさらに別の局面は、配列番号：1のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含み、さらに配列番号：2のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む結合分子に関する。ある態様において、該結合分子は、ヒト重鎖および軽鎖フレームワーク領域または実質的にヒト重鎖および軽鎖フレームワーク領域を含む。別の態様において、本発明の結合分子は、1以上のヒトフレームワークアミノ酸残基が、対応するネズミアミノ酸残基に逆突然変異しているヒトフレームワーク領域を含む。別の態様において、本発明の結合分子は、イムノグロブリン分子の定常領域、例えば、I g G 2 b重鎖定常領域を含む。さらに別の態様において、該結合分子は、ヒトG I T R (h G I T R) と結合する。ある態様において、該結合分子は、アポトーシスを誘発しない。別の態様において、該結合分子は、1次混合リンパ球反応をブロックしない。さらに別の態様において、該結合分子は、T調節細胞によるTエフェクター細胞の抑制を取り消す。ある態様において、該結合分子は、エフェクターT細胞の増殖を高める。別の態様において、該結合分子は、ヒトG I T Rの活性を中和する。さらに別の態様において、該結合分子は、ヒトG I T Rの活性を調整する。別の態様において、該結合分子は、T細胞中のI - κ Bの分解を減衰させる。

10

【0032】

ある局面において、本発明は、T細胞やヒト樹状細胞上のG I T Rに結合する結合分子を特徴とし、 1×10^{-9} 以下の結合定数(K d)を有する。ある態様において、該結合分子は、T調節細胞の抑制を取り消す。別の態様において、該結合分子は、ネズミであるか、またなネズミC D Rを含む。さらに別の態様において、該結合分子は、I g G 2 b重鎖を含む。ある態様において、該結合分子は、ヒト化抗体である。さらに別の態様において、該結合分子は、キメラ抗体である。

20

【0033】

本発明の別の局面は、本発明の結合分子および薬学的に許容される担体を含む組成物に関する。ある態様において、該組成物はさらに、被験体における癌を治療するための少なくとも1つのさらなる治療薬を含んでいる。

【0034】

本発明のある局面は、T調節細胞によるTエフェクター細胞の抑制を取り消す方法に関する。該方法は、ヒト免疫細胞を本発明の結合分子と接触させて、T調節細胞によるTエフェクター細胞の抑制を取り消す。

30

【0035】

本発明の別の局面は、エフェクターT細胞中でT細胞レセプター誘発性シグナリングを調整する方法に関する。該方法においては、エフェクターT細胞中でT細胞レセプター誘発性シグナリングを調整するように細胞を本発明の結合分子と接触させる。ある態様において、該方法は、I - κ Bの分解を調整する。ある態様において、T細胞は、T h 1細胞である。

【0036】

本発明のさらに別の局面は、被験体における免疫応答を高める方法に関する。該方法は、被験体における免疫応答を高められるように細胞を本発明の結合分子と接触させることを含む。

40

【0037】

本発明の別の局面は、被験体における癌を治療する方法に関する。該方法は、被験体において癌が治療されるように、細胞を本発明の結合分子と接触させることを含む。ある態様において、癌のタイプは、膵臓癌、メラノーマ、乳癌、肺癌、気管支癌、結直腸癌、前立腺癌、胃癌、卵巣癌、膀胱癌、脳または中枢神経系癌、末梢神経系の癌、食道癌、子宮頸癌、子宮癌または子宮体癌、口腔または咽頭の癌、肝臓癌、腎臓癌、睾丸の癌、胆道癌、小腸または虫垂の癌、唾液腺の癌、甲状腺癌、副腎癌、骨肉腫、軟骨肉腫および血液学的組織の癌からなる群から選択される。

【0038】

50

本発明の別の局面は、G I T R機能を調整する方法に関する。該方法は、ヒトG I T Rを本発明の結合分子と、免疫促進性の物質の存在下で接触させて、G I T R機能を調整する。

【0039】

本発明のある局面は、配列番号：9のヌクレオチド配列を含み、任意にリーダー配列を含む重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子に関する。本発明のある局面は、配列番号：67のヌクレオチド配列を含み、任意にリーダー配列を含む重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子に関する。

【0040】

本発明の別の局面は、配列番号：10のヌクレオチド配列を含み、任意にリーダー配列を含む軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子に関する。

【0041】

本発明のさらに別の局面は、配列番号：11、配列番号：12または配列番号：65、および配列番号：13からなる群から選択される、少なくとも1つのC D Rをコードするヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子に関する。ある態様において、単離された核酸分子は、6 C 8結合分子に由来する少なくとも2つのC D Rをコードするヌクレオチド配列を含む。別の態様において、単離された核酸分子は、6 C 8結合分子に由来する少なくとも3つのC D Rをコードするヌクレオチド配列を含む。

【0042】

本発明の別の局面は、配列番号：14、配列番号：15、および配列番号：16からなる群から選択される、少なくとも1つのC D Rをコードするヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子に関する。ある態様において、単離された核酸分子は、6 C 8結合分子に由来する少なくとも2つのC D Rをコードするヌクレオチド配列を含む。別の態様において、単離された核酸分子は、6 C 8結合分子に由来する少なくとも3つのC D Rをコードするヌクレオチド配列を含む。

【0043】

本発明のある局面は、配列番号：11～16および配列番号：65に示されたヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子に関する。

【0044】

本発明のある局面は、本発明の核酸分子を含む組換え発現ベクターに関する。ある態様において、本発明の結合分子をコードするヌクレオチド配列をもつ核酸分子を含む組換え発現ベクターに関する。別の態様において、本発明は、本発明の組換え発現ベクターが導入された宿主細胞に関する。別の局面においては、本発明は、ヒトG I T Rと結合する結合分子を作製する方法に関する。該方法は、ヒトG I T Rと結合する結合分子が細胞によって作製されるまで、本発明の宿主細胞を培養培地にて培養することを含む。

【発明を実施するための最良の形態】

【0045】

本発明は、T細胞および樹状細胞でG I T R、例えば、ヒトG I T R (h G I T R) に特異的に結合する結合分子を提供する。本発明の結合分子は、高アフィニティーで、刺激剤、例えば、C D 3の存在下でh G I T Rに結合することの特徴とし、それらは、アゴニスト作用をし、T調節 (T r e g) 細胞によるTエフェクター (T e f f) 細胞の抑制を取り消す。本発明の様々な局面は、結合分子、および医薬組成物、ならびにそのような結合分子をコードする核酸、そのような結合分子を作製するための組換え発現ベクターおよび宿主細胞に関する。インビトロ またはインビボのいずれにおいても、ヒトG I T Rを検出するための、または、ヒトG I T R活性を調整するための本発明の結合分子は、本発明に包含される。

【0046】

本発明をより容易に理解するために、いくつかの用語をまず定義しておく。

【0047】

I. 定義

本明細書において用いられている用語「グルココルチコイド誘発TNFレセプター」（「GITR」と略される）は、TNFレセプタースーパーファミリー18（TNFRSF18）としても知られており、腫瘍壊死因子／神経成長因子レセプターファミリーのメンバーである。それは、細胞外ドメインにある3つのシステイン・シュードリピートを特徴とする241アミノ酸タイプI膜貫通タンパク質であり、T細胞レセプター誘発アポトーシスを特異的に保護するが、Fasトリガー、デキサメサゾン処置、またはUV照射を含む他のアポトーシスシグナルから細胞を保護しない（Nocentini, G, et al. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 94:6216-622）。ヒトGITR（hGITR）の核酸配列を配列番号：17に示し、アミノ酸配列を配列番号：18に示す。

10

【0048】

本明細書において用いられている用語「結合分子」は、GITRに特異的に結合する少なくとも1つの抗原結合部位を含有する分子を言う。「特異的に結合する」という語によって、本質的に、該結合分子が非GITR分子に結合するバックグラウンドを示す。しかしながら、GITRに結合する単離された結合分子も、他の種からのGITR分子に対する交差反応性も有している。

【0049】

本発明の結合分子は、あらゆるアイソタイプ（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、およびIgY）、クラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2）イムノグロブリン重鎖またはイムノグロブリン分子のサブクラスを含んでもよい。結合分子は、重鎖および軽鎖の双方を含んでもよい。本明細書に記載されているように、用語「結合分子」は、それらが、所望の活性、例えば、GITRに対する結合性を示す限り、抗体（全長抗体を含む）、モノクローナル抗体（全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、多選択性抗体（例えば、二重特異性抗体）、ヒト抗体、ヒト化抗体またはキメラ抗体、および抗体フラグメント、例えば、Fabフラグメント、F(ab')フラグメント、Fab発現ライブラリーによって生成されるフラグメント、例えば、scFv分子、上記のあらゆるエピトープ結合フラグメントおよび工学処理された形態の抗体を含む。

20

【0050】

「抗原」は、結合分子が特異的に結合する部分（例えば、タンパク様の実体またはペプチド）である。

30

【0051】

用語「エピトープ」または「抗原決定基」は、結合分子が特異的に結合する抗原上の部位を言う。エピトープは、タンパク質の3次折り畳みによって並置された、近接するアミノ酸もしくは近接していないアミノ酸より作製することができる。近接するアミノ酸から作製されるエピトープは、典型的に、変性溶媒に曝露されたとき保持される。一方、3次折り畳みによって作製されたエピトープは、典型的に、変性溶媒を用いた処理によって失われる。エピトープは典型的に、少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14または15アミノ酸を独自の空間的高次構造中に含む。エピトープの空間的高次構造を決定する方法としては、例えば、X線結晶学および2次元核磁気共鳴が上げられる。例えば、Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)を参照されたい。

40

【0052】

同じエピトープを認識する結合分子は、他の抗体と標的抗原との結合をブロックするための、ある抗体の能力を示す簡単なイムノアッセイ、すなわち、競合的結合アッセイによって同定することができる。競合的結合は、試験される結合分子が、参照結合分子がGITRなどの共通の抗原に特異的に結合するアッセイによって測定することができる。例えば、固相直接もしくは間接ラジオイムノアッセイ（RIA）；固相直接もしくは間接酵素免疫測定法（EIA）サンドイッチ競合アッセイなど（Stahli et al., Methods in Enzymology 9:242 (1983) 参照）；固相直接ビオチン-アビジンEIA（Kirkland et al., J. Im

50

munol. 137:3614 (1986)) ; 固相直接標識アッセイ、固相直接標識サンドイッチアッセイ (HarlowとLane、Antibody: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1988)) ; I-125標識を用いた固相直接標識 R I A (Morel et al., Mol. Immunol. 25 (1) : 7 (1988) 参照) ; 固相直接ビオチン-アビジン E I A (Cheung et al., Virology 176: 546 (1990)) ; および直接標識 R I A (Moldenhauer et al., Scand. J. Immunol. 32: 77 (1990)) など、多くのタイプの競合的結合アッセイが知られている。典型的に、そのようなアッセイは、固体表面に結合した精製された抗原またはこれらのいずれか、非標識試験結合分子および標識参照結合分子を保有する細胞を使用する。競合的阻害は、試験結合分子の存在下で固体表面もしくは細胞に結合する標識の量を測定することによって測定される。通常、試験結合分子は、過剰に存在する。通常、競合結合分子が過剰に存在する場合、それは、参照結合分子の共通抗原に対する特異的結合を、少なくとも 50 ~ 55 %、55 ~ 60 %、60 ~ 65 %、65 ~ 70 %、70 ~ 75 %、またはそれ以上阻害するであろう。

10

【0053】

エピトープは、免疫学的細胞、例えば、B細胞および/またはT細胞によっても認識される。エピトープの細胞認識は、³H-チミジン組み込みによって測定されるように、抗原サイトカイン分泌、抗体分泌、または抗原依存性殺傷 (細胞傷害性Tリンパ球アッセイ) による依存性増殖を測定するインビトロアッセイによって測定することができる。

【0054】

本明細書で用いられている用語「モノクローナル結合分子」は、ほぼ均質な結合分子の集団から取得される結合分子を言う。モノクローナル結合分子は、高い特異性を有し、単一の抗原部位に対する指向性を示す。また、典型的に異なる決定因子 (エピトープ) を指向する異なる結合分子を含むポリクローナル結合分子調製物とは対照的に、各モノクローナル結合分子は、抗原上の単一の決定因子を指向する。「モノクローナル」が改良されているほど、ほぼ均質な結合分子の集団から取得されるという結合分子の性質を示し、そして、特別の方法で結合分子を作製することを必要として構築されるものではない。例えば、本発明において用いられるモノクローナル結合分子は、Kohler, et al., Nature 256:495 (1975) に最初に記載されたハイブリドーマ法で作製してもよいし、組換えDNA法 (例えば、米国特許第 4, 816, 567 号参照) を用いて作製してもよい。「モノクローナル結合分子」はまた、例えば、Clackson, et al., Nature 352:624-628 (1991) および Marks et al., J. Mol Biol. 222:581-597 (1991) に記載の技法を用いて、ファージ抗体ライブラリーから単離してもよい。

20

30

【0055】

用語「キメラ結合分子」は、異なる種に由来するアミノ酸配列を含む結合分子を言う。キメラ結合分子は、例えば、異なる種に属する結合分子遺伝子セグメントから遺伝子工学による方法によって構築することができる。

【0056】

本明細書におけるモノクローナル結合分子は、重鎖および/または軽鎖の一部が特定の種に由来する、または特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する結合分子、ならびに、例えば、ヒトGITR (hGITR) に対する結合性といった、所望の生物学的活性を示す限り、そのような結合分子のフラグメントと同一である、またはその種における対応する配列に相同する「キメラ」結合分子を特異的に含む (米国特許第. 4,816,567 ; および Morrison, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)) 。

40

【0057】

軽鎖および重鎖の双方とも、構造的および機能的ホモロジーに分けられる。用語「定常」および「可変」は、機能的に用いられている。この点に関して、軽鎖 (VL) および重鎖 (VH) 部分の双方の可変ドメインが抗原認識および特異性を決定することを理解できる。逆に、軽鎖 (CL) および重鎖 (CH1、CH2もしくはCH3) 部分の双方の定常ドメインは、分泌、経胎盤性の動き、Fcレセプター結合、補体結合といった重要な生物学的特性を付与する。従来、定常領域ドメインには、抗体の抗原結合部位またはアミノ末

50

端から離れるにつれて大きな番号をつけている。N末端は可変領域であり、C末端は定常領域である。CH3およびCLドメインは、実際に重鎖および軽鎖のカルボキシ末端をそれぞれ含む。

【0058】

結合分子と関連づけて用いられる場合の「可変領域」は、抗原結合を分子上に付与し、かつ、定常領域ではない結合分子のアミノ末端部分を言う。この用語は、全可変領域の結合機能のいくつか、または全てを維持する、それらの機能的フラグメントを含む。

【0059】

本明細書において用いられる「超可変領域」は、配列において超可変である、および/または、画定されたループを構造的に形成する結合分子可変ドメインの領域を言う。超可変領域は、「相補性決定領域」もしくは「CDR」に由来するアミノ酸残基を含む。

10

【0060】

本明細書において用いられている用語「CDR」もしくは「相補性決定領域」は、重鎖および軽鎖ポリペプチド両方の可変領域内に見出される、近接していない抗原組換え部位を意味する。これらの特定の領域については、Kabat, et al., J. Biol. Chem. 252, 6609-6616 (1977) およびKabat, et al., Sequences of protein of immunological interest. (1991)、ならびにChothia, et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) およびMacCallum, et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996) に記載されている。そこでは、それぞれ比較すると、アミノ酸残基のオーバーラッピングまたはサブセットを含んでいる。それにもかかわらず、いずれの定義の提供も、結合分子のCDRまたは移植された結合分子またはそれらの異型も本明細書において定義され、用いられている用語の範囲に包含される。

20

【0061】

本明細書において用いられている用語「フレームワーク領域」もしくは「FR」は、CDRによって分離されたフレームワークの各ドメインを意味する。したがって、可変領域フレームワークは、約100~120長のアミノ酸であるが、CDRの外部のアミノ酸のみを意味する。

【0062】

非ヒト（例えば、ネズミ）結合分子の「ヒト化」形態は、非ヒト結合分子に由来する最小配列を含有するキメラ抗体である。大部分、ヒト化結合分子は、超可変領域からの残基が所望の特異性、アフィニティー、容量を有するマウス、ラット、ウサギもしくは非ヒト霊長類などの非ヒト種（ドナー結合分子）の超可変領域からの残基によって置換されたヒト結合分子（アクセプター/レシピエント結合分子）である。いくつかの例において、ヒト結合分子のFvフレームワーク領域（FR）残基は、対応する非ヒト残基に変更、例えば、置き換わっている、置換されている、もしくは突然変異している。また、ヒト化結合分子は、レシピエント結合分子もしくはドナー結合分子に見出される残基を含んでもよい。これらの異型は通常、結合分子性能をさらに精製するために用いられる。通常、ヒト化結合分子は、非ヒト結合分子に対応する超可変ループの全て、またはほぼ全て、およびFR領域の全て、またはほぼ全てがヒト結合分子配列である、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインのほぼ全てを含むであろう。ヒト化結合分子はまた、任意に、結合分子定常領域（Fc）の少なくとも一部、典型的にはヒト結合分子の一部を含むであろう。さらなる詳細については、Jones, et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann, et al., Nature 332:323-329 (1988); およびPresta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992) を参照されたい。

30

40

【0063】

好ましくは、本発明のヒト化結合分子は、配列番号：3（GFSLSTSGMGVG（HC CDR1））、配列番号：4（HIWWDDDKYYNPSLKS（HC CDR2 N））、配列番号：5（TRRYFPFAY（HC CDR3））、配列番号：6（KASQNVGTNVA（LC CDR1））、配列番号：7（SASYRYS（LC CDR2））、配列番号：8（QQYNTDPLT（LC CDR3））および配列番号：19

50

(H I W W D D D K Y Y Q P S L K S (H C C D R 2 Q)) からなる群から選択される、少なくとも1つのCDRを含む。

【0064】

本明細書において用いられている用語「工学処理された」または「組換え」結合分子は、組み換え手段によって調製、発現、創出もしくは単離された結合分子、例えば、宿主細胞にトランスフェクトされた組換え発現ベクターを用いて発現させた結合分子、組み換え、コンビナトリアル結合分子ライブラリーから単離された結合分子、ヒトイムノグロブリン遺伝子に導入されている動物（例えば、マウス）から単離された結合分子（例えば、Taylor, L.D., et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295）、または他のDNA配列にヒト結合分子をスプライシングすることを含む他のあらゆる手段によって調製、発現、創出もしくは単離された結合分子を含む。しかしながら、特定の態様においては、そのような組換えヒト結合分子は、インビトロで突然変異誘発を起こし（または、ヒトIg配列を形質導入した動物を用いる。インビボ体細胞突然変異誘発）、組換え結合分子のVHおよびVL領域は、ヒト生殖細胞系列VHおよびVL配列に由来し、それに関連するが、ヒト結合分子生殖細胞系列レパートリーにインビボで天然には存在しないかもしれない配列である。

【0065】

本明細書において用いられている用語「単離された結合分子」は、異なる抗原特異性を有する他の結合分子を実質的に含まない結合分子を言う（例えば、GITRに実質的に結合する単離された結合分子は、GITR以外の抗原に特異的に結合する結合分子を実質的に含まない）。さらに単離された結合分子は、他の細胞材料および/または化学物質を実質的に含まないこともある。「単離された」結合分子は、その天然の環境の成分から単離され、分離され、および/または回収されたものである。天然の環境の不純物成分は、例えば、該結合分子の診断的もしくは治療的使用に干渉しない物質を含み、また、酵素、ホルモンおよび他のタンパク様の溶質もしくは非タンパク様の溶質を含んでもよい。好ましい態様において、結合分子は、（1）Lowry法による測定によって結合分子の95重量%を超え、最も好ましくは9重量%を超えるように、（2）N末端または内部のアミノ酸配列の少なくとも15の残基を取得するのに十分な程度に、スピニングカップ配列決定装置を用いて、または（3）クーマシーブルーを用いて好ましくは銀染色によって、還元もしくは非還元条件の下でのSDS-PAGEによって均質性にするように、精製する。結合分子の天然の環境の少なくとも1つの成分は存在しないので、単離された結合分子は、in situ で組換え細胞内に結合分子を含む。しかしながら、通常、単離された結合分子は、少なくとも1つの精製ステップによって調製されるであろう。

【0066】

本明細書において用いられている用語「結合定数」「(kd)」は、「アフィニティー定数」とも言われ、2つの分子種間の可逆的な結合の範囲の測定値、実際の結合アフィニティーならびに見かけの結合アフィニティーを含む。実際の結合アフィニティーは、 $M^{-1} S^{-1}$ におけるKassocと S^{-1} におけるKdissocの比率を計算することによって測定することができ、単位は「 M^{-1} 」である。したがって、結合アフィニティーの授与または最適化は、これらの成分のいずれか、または両方を変更して、所望のレベルの結合アフィニティーを達成することを含む。見かけのアフィニティーは、例えば、相互作用の結合活性を含むことができる。例えば、2価の異価同義可変領域の結合フラグメントは、その結合価によって結合アフィニティーを改変もしくは最適化することができる。結合アフィニティーは、BIAコアシステムを用いて、表面プラスモン共鳴の測定によって測定することができる。

【0067】

本明細書において用いられている用語「核酸分子」は、DNA分子およびRNA分子を含む。核酸分子は、一本鎖または二本鎖であるが、好ましくは二本鎖DNAである。

【0068】

GITRに結合する結合タンパク質をコードする核酸に関して本明細書で用いられてい

10

20

30

40

50

る「単離された核酸分子」という用語は、結合分子をコードするヌクレオチド配列が、ヒトゲノムDNAにおいて他の配列が核酸に天然に隣接しているかもしれないヌクレオチド配列を含まない核酸分子を言う。これらの配列は、タンパク質の安定性にとって重要な任意に5'もしくは3'ヌクレオチド配列を含む。

【0069】

本明細書において用いられる用語「ベクター」は、それが結合した他の核酸を輸送することのできる核酸分子をいう。ベクターの1つのタイプは、「プラスミド」であり、これは、環状二本鎖DNAのループであって、その中に追加のDNAセグメントをライゲーションできる。別のタイプのベクターは、ウイルスベクターであり、追加のDNAセグメントをウイルスゲノム中にライゲーションできる。ある種のベクターは、それらが導入された宿主細胞中で自律的に複製することができる（例えば、細菌性の複製オリジンを有する細菌性ベクターおよびエピソード性哺乳動物用ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソード性哺乳動物用ベクター）は、宿主細胞への導入に際して宿主細胞のゲノム中にインテグレートされ、それにより、宿主ゲノムと共に複製される。さらに、ある種のベクターは、それらが機能的に結合した遺伝子の発現を指図することができる。かかるベクターは、ここでは、「組換え発現ベクター」（または単に「発現ベクター」と言う。一般に、組換えDNA技術において有用な発現ベクターは、しばしば、プラスミド形態である。本明細書においては、「プラスミド」と「ベクター」は、プラスミドが最も普通に用いられる型のベクターであることから、互換可能に用いている。しかしながら、本発明は、かかる他の型の発現ベクター、例えば、同等の機能を果たすウイルスベクター（例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス）を包含することを意図している。

【0070】

本明細書において用いられる用語「組換え宿主細胞」（または単に「宿主細胞」）は、組換え発現ベクターが導入された細胞を意味することが意図される。このような用語は、特定の被検細胞のみならず、そのような細胞の子孫を意味することも意図されている。突然変異や環境の影響によって後の世代において特定の異型が生じるかも知れず、そのような子孫は、実際、親細胞と同一ではないかもしれないが、それでもなお本明細書において用いられる用語「宿主細胞」の範囲に含むものとする。

【0071】

本明細書において用いられている用語「T細胞」（すなわち、Tリンパ球）は、T細胞系列内の全ての細胞を含み、哺乳動物（例えば、ヒト）由来の胸腺リンパ球、未成熟T細胞、成熟T細胞などを含む。好ましくは、T細胞は、CD4とCD8のいずれかを発現するが双方を発現しない成熟T細胞である。本明細書に記載の種々のT細胞集団は、それらのサイトカインプロファイルおよびそれらの機能に基づいて定義され、当業者には公知である。

【0072】

本明細書において用いられる用語「樹状細胞」は、未処置のT細胞を活性化し、B細胞の成長および分化を刺激することができるプロフェッショナルな抗原提示細胞（APC）を言う。

【0073】

本明細書において用いられる用語「未処置のT細胞」は、同族の抗原に曝露されていないT細胞を含み、それゆえに活性化された、またはメモリー細胞ではない。未処置のT細胞は、繰り返し構造ではなく、未処置のヒトT細胞は、CD45RA+である。未処置のT細胞が抗原を認識し、限定されないが、抗原の量、投与経路や投与時間といった、さらなる信号を受信すれば、それらは、T細胞の種々のサブセット、例えば、エフェクターT細胞に増殖し、分化するかもしれない。

【0074】

本明細書において用いられている用語「エフェクター細胞」または「Teff細胞」は、抗原を除去する働きをする（例えば、他の細胞の活性化を改変するサイトカインを作製

することによって、または細胞傷害性活性によって) T細胞を含む。用語「エフェクター T細胞」は、Tヘルパー細胞(例えば、Th1およびTh2細胞)ならびに細胞傷害性 T細胞を含む。Th1細胞は、遅延型の超過敏反応およびマクロファージ活性化を媒介し、Th2は、B細胞を助けるために設けられており、アレルギー反応において重要である(MosmannとCoffman, 1989, Annu. Rev. Immunol. 7, 145-173; PaulとSeder, 1994, Cell 76, 241-251; ArthurとMason, 1986, J. Exp. Med. 163, 774-786; Paliard, et al., 1988, J. Immunol. 141, 849-855; Finkelman, et al., 1988, J. Immunol. 141, 2335-2341)。

【0075】

本明細書で用いられている用語「Tヘルパータイプ1反応」(Th1反応)は、IFN- γ 、IL-2、TNFおよびリンフォトキシン(LT)、ならびに、Th2よりむしろTh1によって優先的にもしくは排他的に作製される他のサイトカインから選択される1以上の生成物によって特徴付けられる。本明細書で用いられている用語「Tヘルパータイプ2反応」(Th2反応)は、IL-4、IL-5、IL-6およびIL-10から選択され、Th2細胞によって設けられる効率的なB細胞「ヘルプ」(例えば、増強されたIgG1および/またはIgE産生)に関連する1以上のサイトカインの生成物によって特徴付けられるCD4+T細胞による反応を言う。

【0076】

本明細書で用いられている用語「制御T細胞」または「Treg細胞」は、IL-2、IL-4、IL-5およびIL-12を低レベルで産生するT細胞を含む。エフェクター T細胞より低レベルにもかかわらず、制御T細胞は、TNF α 、TGF β 、IFN- γ 、およびIL-10を産生する。TGF β は、制御T細胞によって作製される主なサイトカインであり、該サイトカインは、Th2細胞によって産生されるものの以下のレベル、例えば、Th1またはTh2細胞未満の大きさのレベルで産生される。制御T細胞は、CD4+CD25+集団の細胞において見出すことができる(例えば、WaldmannとCobbold, 2001, Immunity. 14:399参照)。制御T細胞は、Th1、Th2または、活性化シグナル(例えば、抗原および抗原提示細胞、または、MHCのコンテキストにおいて抗原を模倣するシグナルを持つ、例えば、抗CD3抗体、プラス抗CD28抗体)を有する培養中で刺激された未処置のT細胞の増殖およびサイトカイン産生を活発に抑制する。

【0077】

本明細書で用いられている用語「耐性」は、活性化レセプター培養刺激に対する屈折性を含む。そのような屈折性は通常、抗原特異性であり、耐性抗原に対する曝露を停止した後も持続する。例えば、耐性は、サイトカイン産生の欠如によって特徴付けられる(例えば、IL-2)。または、混合リンパ球培養アッセイを用いて評価することができる。耐性は、抗原自体または外来性抗原に対して起こる。

【0078】

「混合リンパ球培養」(「MLC」)は、2つの異なる個体からのリンパ球を一緒に培養するある種のリンパ球増殖試験であり、増殖応答(「混合リンパ球反応」)が、³H標識チミジン取り込みによって測定される。

【0079】

本明細書で用いられている用語「アポトーシス」は、プログラムされた細胞死(PCD)とも呼ばれ、限定されないが、核ヘテロクロマチンの濃縮、細胞収縮、細胞質内濃縮、アポトーシスの後期の段階においては、異なるフラグメント中に細胞へのエンドヌクレアーゼ媒介DNAの分裂などの特徴によって特徴付けられる細胞の死を意味する。アポトーシスが怒った細胞のDNAを電気泳動的に分析した後、異なるDNAフラグメントの特徴的な「ラダー」が顕在化する。

【0080】

「処置」は、治療的処置および予防的または防止的対策の双方を言う。処置の必要なものとしては、既に障害を持つもの、ならびにまだ障害を持たないものが含まれる。

【0081】

「障害」は、本発明の結合分子による処置から恩恵を受けるあらゆる状態を言う。これには、高すぎる、もしくは低すぎる免疫応答に関連する、慢性および急性の障害もしくは疾患もしくは病理学的症状が含まれる。

【0082】

以下のサブセクションにおいて、本発明の種々の局面について、さらに詳細に記載する。

【0083】

II. GITR 結合分子

本発明は、単離されたGITR結合分子を提供する。本発明の結合分子の例としては、6C8抗体および2F8抗体がある。6C8抗体は、T細胞および樹状細胞、例えば、ヒトT細胞および樹状細胞上で、GITRに高アフィニティーで結合する抗GITR抗体である。好ましくは、そのような結合分子は、T調節細胞によるTエフェクター細胞の抑制を取り消し、そして、部分的に活性化されたT細胞に対してインビトロで刺激剤、例えば、CD3の存在下で、アゴニスト性を示す。

【0084】

ある態様において、本発明の結合分子のVHドメインは、配列番号：1に記載のアミノ酸配列（6C8のVHドメイン“N”、リーダーを含む）を含む。本明細書に記載の結合分子の配列のいくつかは、リーダー配列を含むにもかかわらず、本発明の結合分子はまた、任意に、リーダー配列を排除することが理解できるであろう。例えば、ある態様において、本発明の結合分子は、配列番号：1に記載の成熟タンパク質のアミノ酸（例えば、配列番号：1のアミノ酸20～138）を含む。

【0085】

ある態様において、本発明の結合分子のVHドメインは、配列番号：66に記載のアミノ酸配列を含む（6C8VHドメイン“Q”、リーダーを含む）。

【0086】

ある態様において、本発明の結合分子のVLドメインは、配列番号：2に記載のアミノ酸配列を含む（6C8VLドメイン、リーダーを含む）。

【0087】

ある態様において、本発明の結合分子のVHドメインは、配列番号：66のアミノ酸残基20～138を含む（6C8VHドメイン“N”、リーダーを含まない）。

【0088】

ある態様において、本発明の結合分子のVHドメインは、配列番号：66のアミノ酸残基20～138を含む（6C8VHドメイン“Q”、リーダーを含まない）。

【0089】

ある態様において、本発明の結合分子のVLドメインは、配列番号：2のアミノ酸残基21～127を含む（6C8VLドメイン、リーダーを含まない）。

【0090】

本発明のある態様において、VL鎖は、リーダー配列および／またはシグナル配列を含む。すなわち、配列番号：2（配列番号：59）のアミノ酸残基1～120を含む。ある態様において、VH鎖は、リーダー配列および／またはシグナル配列を含む。すなわち、配列番号：1（配列番号：64）のアミノ酸残基1～19を含む。

【0091】

ある態様において、本発明の結合分子は、配列番号：3（6C8、VH CDR1）に記載のCDRを含むVHドメインを含む。

【0092】

ある態様において、本発明の結合分子は、配列番号：4（6C8、VH CDR2－“N”）に記載のCDRを含むVHドメインを含む。

【0093】

ある態様において、本発明の結合分子は、配列番号：5（6C8、VH CDR3”）に記載のCDRを含むVHドメインを含む。

【0094】

ある態様において、本発明の結合分子は、配列番号：19（6C8、VH CDR2 – 交互の“Q”）に記載のCDRを含むVHドメインを含む。

【0095】

ある態様において、本発明の結合分子は、配列番号：6（6C8、VL CDR1）に記載のCDRを含むVLドメインを含む。

【0096】

ある態様において、本発明の結合分子は、配列番号：7（6C8、VL CDR2）に記載のCDRを含むVLドメインを含む。

【0097】

ある態様において、本発明の結合分子は、配列番号：8（6C8、VL CDR3）に記載のCDRを含むVLドメインを含む。

【0098】

本発明は、上記アミノ酸配列をコードする核酸分子にも関する。

【0099】

ある態様において、本発明の結合分子のVHドメインは、配列番号：9に記載のヌクレオチド配列を含む（6C8 VHドメイン、“N”、リーダーを含む）。

【0100】

ある態様において、本発明の結合分子のVHドメインは、配列番号：65に記載のヌクレオチド配列を含む（6C8 VHドメイン、“Q”、リーダーを含む）。

【0101】

ある態様において、本発明の結合分子のVHドメインは、配列番号：9に記載のヌクレオチド58－414を含む（6C8 VHドメイン、“N”、リーダーを含まない）。

【0102】

ある態様において、本発明の結合分子のVHドメインは、配列番号：65に記載のヌクレオチド58－414を含む（6C8 VHドメイン、“Q”、リーダーを含まない）。

【0103】

ある態様において、本発明の結合分子のVLドメインは、配列番号：10に記載のヌクレオチド配列を含む（6C8 VLドメイン、リーダーを含む）。

【0104】

ある態様において、本発明の結合分子のVLドメインは、配列番号：10に記載のヌクレオチド61－381を含む（6C8 VLドメイン、リーダーを含まない）。

【0105】

ある態様において、本発明の結合分子は、その核酸配列が配列番号：11に記載されているCDRを含むVHドメインを含む（6C8 VH CDR1）。

【0106】

ある態様において、本発明の結合分子は、その核酸配列が配列番号：12に記載されているCDRを含むVHドメインを含む（6C8 VH CDR2 – “ATT”）。

【0107】

ある態様において、本発明の結合分子は、その核酸配列が配列番号：13に記載されているCDRを含むVHドメインを含む（6C8 VH CDR3）。

【0108】

ある態様において、本発明の結合分子は、その核酸配列が配列番号：65に記載されているCDRを含むVHドメインを含む（6C8 VH CDR2 – “CAA”）。

【0109】

ある態様において、本発明の結合分子は、その核酸配列が配列番号：14に記載されているCDRを含むVLドメインを含む（6C8 VL CDR1）。

【0110】

ある態様において、本発明の結合分子は、その核酸配列が配列番号：15に記載されているCDRを含むVLドメインを含む（6C8 VL CDR2）。

10

20

30

40

50

【0111】

ある態様において、本発明の結合分子は、その核酸配列が配列番号：16に記載されているCDRを含むVLドメインを含む（6C8 VL CDR3）。

【0112】

ある態様において、本発明の結合分子のCLドメインは、配列番号：20に記載されているアミノ酸配列を含む（ネズミIgG2a軽鎖定常領域）。

【0113】

ある態様において、本発明の結合分子のCHドメインは、配列番号：21に記載されているアミノ酸配列を含む（ネズミIgG2a軽鎖定常領域）。

【0114】

ある態様において、本発明の結合分子は、配列番号：22に記載されているアミノ酸配列を含む（キメラ6C8VL／ヒトCL IgG1）。

【0115】

ある態様において、本発明の結合分子は、配列番号：23に記載されているアミノ酸配列を含む（キメラGly－6C8VH／ヒトCH IgG1）。

【0116】

ある態様において、本発明の結合分子は、配列番号：24に記載されているアミノ酸配列を含む（キメラAgly－6C8VH／ヒトCH IgG1）。

【0117】

ある態様において、本発明の結合分子は、配列番号：44に記載されているアミノ酸配列を含む（ヒト化6C8 VL）。

【0118】

ある態様において、本発明の結合分子は、配列番号：53に記載されているアミノ酸配列を含む（ヒト化6C8 VH“N”）。

【0119】

ある態様において、本発明の結合分子は、配列番号：54に記載されているアミノ酸配列を含む（ヒト化6C8 VH“Q”）。

【0120】

ある態様において、本発明の結合分子のCLドメインは、配列番号：55に記載されているアミノ酸配列を含む（ヒトIgG1 Gly重鎖定常領域）。

【0121】

ある態様において、本発明の結合分子のCHドメインは、配列番号：56に記載されているアミノ酸配列を含む（ヒトIgG1 Agly重鎖定常領域）。

【0122】

ある態様において、本発明の結合分子のCLドメインは、配列番号：57に記載されているアミノ酸配列を含む（ヒトIgG1 IgG1軽鎖定常領域）。

【0123】

ある態様において、本発明の結合分子は、配列番号：58に記載されているアミノ酸配列を含む（完全ヒト化6C8軽（Light））。

【0124】

ある態様において、本発明の結合分子は、配列番号：60に記載されているアミノ酸配列を含む（完全ヒト化6C8重（Heavy）－HuN6C8－Gly）。

【0125】

ある態様において、本発明の結合分子は、配列番号：61に記載されているアミノ酸配列を含む（完全ヒト化6C8重（Heavy）－HuN6C8－Agly）。

【0126】

ある態様において、本発明の結合分子は、配列番号：62に記載されているアミノ酸配列を含む（完全ヒト化6C8重（Heavy）－HuQ6C8－Gly）。

【0127】

ある態様において、本発明の結合分子は、配列番号：63に記載されているアミノ酸配

10

20

30

40

50

列を含む（完全ヒト化 6 C 8 重（Heavy）－H u Q 6 C 8－A g l y）。

【0128】

ある態様において、本発明の結合分子は、図 18 A～18 D に示すように、V L 配列および V H 配列を有している。6 C 8 V H 領域のアミノ酸配列も配列番号：1 に示されている；6 C 8 V L 領域のアミノ酸配列は配列番号：2 に示されている。別の態様において、本発明の結合分子は、配列番号：20 に記載の L C 配列および H C を有している。

A D A A P T V S I F P P S S E Q L T S G G A S V V C F L N N F Y P K D I N V K W
K I D G S E R Q N G V L N S W T D Q D S K D S T Y S M S S T L T L T K D E Y E R
H N S Y T C E A T H K T S T S P I V K S F N R N E（配列番号：20）；

A K T T P P S V Y P L A P G C G D T T G S S V T L G C L V K G Y F P E S V T V T
W N S G S L S S S V H T F P A L L Q S G L Y T M S S S V T V P S S T W P S Q T V
T C S V A H P A S S T T V D K K L E P S G P I S T I N P C P P C K E C K C P A P
N L E G G P S V F I F P P N I K D V L M I S L T P K V T C V V V D V S E D D P D
V Q I S W F V N N V E V H T A Q T Q T H R E D Y N S T I R V V S T L P I Q H Q D
W M S G K E F K C K V N N K D L P S P I E R T I S K I K G L V R A Q V Y I L P P
P A E Q L S R K D V S L T C L V V G F N P G D I S V E W T S N G H T E E N Y K D
T A P V L D S D G S Y F I Y S K L N M K T S K W E K T D S F S C N V R H E G L K
N Y Y L K K T I S R S P G K（配列番号：20）。

10

【0129】

本発明のある態様において、V L 鎖は、リーダー配列および/またはシグナル配列、例えば、配列番号：2 のアミノ酸残基 1－20 を含む。ある態様において、V H 鎖は、リーダー配列および/またはシグナル配列、例えば、配列番号：1 のアミノ酸残基 1－19 を含む。別の態様において、本発明の結合分子は、リーダー配列および/またはシグナル配列を含まない。

20

【0130】

ある局面において、本発明は、6 C 8 結合分子、および 6 C 8 と均等の特性、例えば、G I T R に対する高アフィニティー結合性や、T r e g 細胞による T e f f 細胞抑制の阻止といった他の結合分子に関する。さらに、本発明の結合分子は、アポトーシスを誘発しないし、混合リンパ球反応を阻害しない。したがって本発明の均等の結合分子は、G I T R アゴニストである。すなわち、それらは、G I T R を介してシグナリングを誘発する。G I T R は、T N F R スーパーファミリーのメンバーである。T N F R ファミリーのメンバーは、生存細胞および N F－κ B を介するシグナリングによるアポトーシスに関与するので、ある態様において、本発明の結合分子は、I－κ B の分解を減衰する。

30

【0131】

ある態様において、本発明は、配列番号：2 に記載のアミノ酸配列と任意にリーダー配列を含む軽鎖可変領域（V L）、ならびに配列番号：1 に記載のアミノ酸配列と任意にリーダー配列を含む重鎖可変領域（V H）を有する単離された h G I T R 結合分子を提供する。いくつかの態様において、結合分子は、重鎖定常領域、例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A、I g E、I g M もしくは I g D 定常領域を含む。また、結合分子は、軽鎖定常領域、カッパ軽鎖定常領域もしくはラムダ軽鎖定常領域のいずれかを含む。好ましくは、結合分子は、カッパ軽鎖定常領域を含む。ある態様において、本発明の結合分子は、配列番号：20 に記載の軽鎖定常領域を含む。ある態様において、本発明の結合分子は、配列番号：21 に記載の重鎖定常領域を含む。ある態様において、本発明の結合分子は、配列番号：55 に記載の重鎖定常領域を含む。ある態様において、本発明の結合分子は、配列番号：56 に記載の重鎖定常領域を含む。ある態様において、本発明の結合分子は、配列番号：57 に記載の重鎖定常領域を含む。

40

【0132】

別の態様において、本発明は、6 C 8 関連 V L C D R ドメインを有する結合分子、例えば、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8 からなる群から選択される少なくとも 1 つの C D R ドメインをもつ軽鎖可変領域（V L）を有する結合分子を提供する。別の態

50

様において、軽鎖可変領域（V L）は、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む少なくとも2つのCDRドメインを有する。さらに別の態様において、軽鎖可変領域（V L）は、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8からなるアミノ酸配列を含むCDRドメインを有する。

【0133】

さらに別の態様において、本発明は、6 C 8 関連V H C D Rドメインを有する結合分子、例えば、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、および配列番号：19からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDRドメインをもつ軽鎖可変領域（V H）を有する結合分子を提供する。別の態様において、重鎖可変領域（V H）は、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、および配列番号：19からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むCDRドメインを少なくとも2つ有する。さらに別の態様において、重鎖可変領域（V H）は、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5、および配列番号：19からなるアミノ酸配列を含むCDRドメインを有する。

【0134】

別の態様において、本発明の結合分子は、ネズミ抗ヒトG I T R結合分子、例えば、6 C 8 結合分子に由来する少なくとも1つのCDRを含む。本明細書において用いられているところの「～に由来する」という語は、示されたタンパク質がそのポリペプチドの起源であることを意味する。ある態様において、特定の開始ポリペプチドに由来する、ポリペプチドまたはアミノ酸配列は、CDR配列、もしくははそれに関連する配列である。別の態様において、特定の開始ポリペプチドに由来する、ポリペプチドまたはアミノ酸配列は、F R配列、もしくははそれに関連する配列である。ある態様において、特定の開始ポリペプチドに由来する、アミノ酸配列は、近接していない。

【0135】

例えば、ある態様において、1、2、3、4、5、または6のCDRは、ネズミ6 C 8 抗体に由来する。ある態様において、本発明の結合分子は、ネズミ6 C 8 抗体の少なくとも1つの重鎖または軽鎖CDRを含む。別の態様において、本発明の結合分子は、ネズミ6 C 8 抗体からの少なくとも2つのCDRを含む。別の態様において、本発明の結合分子は、ネズミ6 C 8 抗体からの少なくとも3つのCDRを含む。別の態様において、別の態様において、本発明の結合分子は、ネズミ6 C 8 抗体からの少なくとも5つのCDRを含む。別の態様において、本発明の結合分子は、ネズミ6 C 8 抗体からの少なくとも6つのCDRを含む。

【0136】

本発明の結合分子は、それらが由来する6 C 8 分子からのアミノ酸配列において変化するように、改変してもよいことも当業者は理解するであろう。例えば、保存的置換もしくは「非必須」アミノ酸残基における変化へと導かれるヌクレオチドまたはアミノ酸置換を行ってもよい（例えば、CDRおよび／またはフレームワーク残基）、また、G I T R、例えば、ヒトG I T Rに対する結合を維持してもよい。

【0137】

ある態様において、少なくとも1つのCDR（または少なくとも1つのCDR、結合分子中に存在する複数の6 C 8 C D RからのCDR）を改変して、天然に存在する6 C 8 結合分子のCDRからの配列を変化させつつ、6 C 8 に対する結合性を維持してもよい。例えば、ある態様において、6 C 8 抗体からの1以上のCDRを改変して、潜在的なグリコシル化部位を除去してもよい。例えば、アミノ酸配列A s n - X - (S e r / T h r) は、結合分子の作製に影響を及ぼしうるグリコシル化部位の推定上のコンセンサス配列であり、6 C 8 重鎖のCDR 2は、配列A s n - P r o - S e rを有し、第2のバージョンの重鎖は、配列番号：53のアミノ酸残基62において、アスパラギン（A s n）に代えてグルタミン（G l n）を用いる保存的置換を行うように調製した。

【0138】

ある態様において、本発明の結合分子は、6 C 8 抗体のそれと本質的に同一のポリペプチドもしくはアミノ酸配列、またはそれらの部分を含む。該部分は、少なくとも3-5ア

ミノ酸、少なくとも5-10アミノ酸、少なくとも10-20アミノ酸、少なくとも20-30アミノ酸、または少なくとも30-50アミノ酸からなる。または、それは、当業者にとって、開始配列に由来するものとして同定可能である。

【0139】

別の態様において、特定の開始ポリペプチドまたはアミノ酸配列に由来する該ポリペプチドまたはアミノ酸配列は、約80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%のアミノ酸配列同一性を有するか、当業者にとって、開始配列に由来するものとして同定可能であるアミノ酸配列を有する。

【0140】

ポリペプチドの天然でない異型例をコードする単離された核酸分子は、1以上のヌクレオチド置換、追加、または欠失を結合分子のヌクレオチド配列に導入することによって、1以上のアミノ酸の置換、追加、または欠失をコードされたタンパク質に導入する。部位指向性突然変異誘発およびPCR媒介性突然変異誘発などの標準的な技法によって突然変異を導入してもよい。ある態様において、1以上の非必須アミノ酸残基において、保存的アミノ酸置換を行う。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が類似の側鎖を持つアミノ酸残基と置き換わっているものである。類似の側鎖を持つアミノ酸残基は、当該技術分野において、定義されている。そしてそれには、塩基性側鎖（例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非電荷極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、ベータ分枝側鎖（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）、および芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）が含まれる。したがって、結合分子ポリペプチド中の非必須アミノ酸残基は、同じ側鎖ファミリーからの別のアミノ酸残基と置換されてもよい。別の態様において、アミノ酸のストリングを構造的に類似するストリングであって、側鎖ファミリーメンバーのオーダーおよび/または組成物において異なるストリング置き換えることができる。

【0141】

別法として、別の態様において、突然変異を全てもしくは一部の結合分子コード配列にランダムに導入してもよい。

【0142】

本発明の好ましい結合分子は、ヒトアミノ酸配列に由来するフレームワークおよび定常領域アミノ酸配列を含む。しかしながら、結合分子は、別の哺乳動物種に由来するフレームワークおよび/または定常領域配列を含むことができる。例えば、霊長類フレームワーク領域（例えば、非ヒト霊長類）を、重鎖部および/またはヒンジ部を対象とする結合分子に導入してもよい。ある態様において、1以上のネズミアミノ酸が、結合しているポリペプチドのフレームワーク領域に存在しているかもしれない。例えば、ヒトもしくは非ヒト霊長類フレームワークアミノ酸配列は、1以上のアミノ酸置換、および/または、対応するネズミアミノ酸残基が存在する逆突然変異を含んでもよい。本発明の好ましい結合分子は、開始6C8ネズミ抗体より免疫原性が低い。

【0143】

本発明はまた、GITRに特異的な、キメラおよび/またはヒト化結合分子（例えば、キメラおよび/またはヒト化イムノグロブリン）を特徴とする。キメラおよび/またはヒト化結合分子は、キメラまたはヒト化結合分子を構築するための開始物質を提供するマウスまたは他の非ヒト結合分子と同じ、もしくは類似の結合特異性およびアフィニティを有する。

【0144】

キメラ結合分子は、その軽鎖および重鎖遺伝子が、異なる種に属するイムノグロブリン遺伝子セグメントから、典型的には遺伝子工学的に構築されているものである。例えば、

マウスモノクローナル結合分子からの遺伝子の可変（V）セグメントを、ヒト定常（C）セグメントに結合してもよい。例えば、I g G 1またはI g G 4。ヒトアイソタイプI g G 1が好ましい。キメラ結合分子の例は、したがって、マウス結合分子からのVまたは抗原結合ドメイン、ならびにヒト結合分子からのCまたはエフェクタードメインからなるハイブリッドタンパク質である。

【0145】

ある態様において、本発明は、6 C 8 結合分子のヒト化可変領域、およびそのようなヒト化可変領域を含むポリペプチドに関する。ある態様において、本発明の結合分子は、少なくとも1つのヒト化6 C 8 結合分子可変領域、例えば、軽鎖もしくは重鎖可変領域を含む。

10

【0146】

用語「ヒト化結合分子」は、ヒト結合分子鎖に由来する可変領域フレームワーク残基を含む少なくとも1つの鎖を含む結合分子（アクセプターイムノグロブリンもしくは結合分子と言う）、マウス結合分子に由来する少なくとも1つの相補性決定領域（ドナーイムノグロブリンもしくは結合分子と言う）を意味する。ヒト化結合分子は、組換えDNA技法を用いて作製することができる。それは、以下の文献において記載されている。例えば、Hwang, W.Y.K., et al. (2005) Methods 36:35; Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1989), 86:10029-10033; Jones et al., Nature, (1986), 321:522-25; Ri echmann et al., Nature, (1988), 332:323-27; Verhoeven et al., Science, (1988), 239:1534-36; Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (1989), 86:3833-37; 米国特許第5, 225, 539号; 5, 530, 101号; 5, 585, 089号; 5, 693, 761号; 5, 693, 762号; 6, 180, 370号; Selick et al., P C T国際公開公報WO90/07861号、およびWinter, 米国特許第5, 225, 539号を参照されたい（それらの全てを全ての目的のために、引用によって援用する）。定常領域は、もし存在すれば、ヒトイムノグロブリンに由来することが好ましい。

20

【0147】

ヒト化のために好ましい非ヒトドナー結合分子を選択すれば、例えば、発現したヒト抗体遺伝子の配列データベースから、いくつかのヒト結合分子の生殖細胞系列I g配列もしくはコンセンサス配列から、適切なヒトアクセプター結合分子を取得することができる。

【0148】

ある態様において、C D Rホモロジーベースの方法を用いてヒト化を行う（例えば、Hwang, W.Y.K., et al. (2005) Methods 36:35、その内容を本明細書に引用によって援用する）。この方法は通常、類似構造のマウスおよびヒトフレームワークよりむしろ類似構造のマウスおよびヒトC D Rに基づいて、マウスC D Rをヒト可変ドメインフレームワークへ置換することを含む。マウスC D RとヒトC D Rの類似性は、通常、マウス結合分子と同じ正準C D R構造の条件をもつ、同じ鎖タイプ（軽鎖または重鎖）のヒト遺伝子を同定し、C D Rペプチド骨格の3次元高次構造を維持することによって決定される。第2に、マウスと候補ヒトC D Rの間の残基-残基ホモロジーに対するマッチング正準構造をもつ、それぞれの候補可変遺伝子を評価する。最後に、ヒト化結合分子、マウスC D Rにまだ同一性を示さない選択されたヒト候補C D RのC D R残基をマウス配列に変換する。ある態様において、ヒトフレームワークの突然変異をヒト化結合分子に導入する。

30

40

【0149】

ある態様において、ヒト生殖細胞系列配列を、G I T R結合分子C D Rに対するC D Rホモロジーについて評価する。例えば、ネズミ6 C 8抗体と、I M G Tデータベース中に2-1-1正準構造をもつ全生殖細胞系列軽鎖カッパ鎖V遺伝子を6 C 8抗体配列と比較した。全3-1生殖細胞系列重鎖V遺伝子を6 C 8アミノ酸配列と比較するとき、同じことを重鎖についても行った。したがって、ある態様において、本発明の結合分子は、2-1-1正準構造をもつヒトカッパ鎖V領域フレームワークを含む。別の態様において、本発明の結合分子は、3-1正準構造を持つヒト重鎖V領域フレームワークを含む。

【0150】

50

以下の潜在的ヒト軽鎖生殖細胞系列配列を同定した。それを本発明の結合分子に組み込んでもよい。

【0151】

IMGT受入番号IGKV3-15の遺伝子は、M23090である。そのアミノ酸配列は、

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSSLQSEDFAVYYCQQYNNWP（配列番号：25）である。

【0152】

IMGT受入番号IGKV3D-11の遺伝子は、X17264である。そのアミノ酸配列は、

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQGVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAATGIPARFSGSGPGTDFTLTISSLLEPEDFAVYYCQQQRSNWH（配列番号：26）である。

【0153】

IGKV3-11遺伝子には2つの対立遺伝子がある。IGKV3-11遺伝子の対立遺伝子*01のIMGT受入番号はX01668である。そのアミノ酸配列は、

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLLEPEDFAVYYCQQQRSNWP（配列番号：27）である。

【0154】

IGKV3-11遺伝子の対立遺伝子*02のIMGT受入番号はK02768である。そのアミノ酸配列は、

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAATGIPARFSGSGSGGRDFTLTISSLLEPEDFAVYYCQQQRSNWP（配列番号：28）である。

【0155】

IGKV1D-43遺伝子のIMGT受入番号は、X72817である。そのアミノ酸配列は、

AIRMTQSPFSLASVGDRTVITCWAASQGISSYLAWYQQKPAKAPKLLFIYYASSLQSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQQYYSTP（配列番号：29）である。

【0156】

IGKV1-39遺伝子には2つの対立遺伝子がある。IGKV1-39遺伝子の対立遺伝子*01のIMGT受入番号はX59315である。そのアミノ酸配列は、

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQQSYSTP（配列番号：30）である。

【0157】

IGKV1-39遺伝子の対立遺伝子*02のIMGT受入番号はX59318である。そのアミノ酸配列は、

DIQMTQSPSFLSASVGDRTVITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQCGYSTP（配列番号：31）である。

【0158】

IGKV1-33遺伝子のIMGT受入番号は、M64856である。そのアミノ酸配列は、

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLEETGVPSRFSGSGSGTDFTFITISSLQPEDIATYYCQQYDNL P（配列番号：32）である。

10

20

30

40

50

【0159】

I G K V 1 - 2 7 遺伝子の I M G T 受入番号は、X 6 3 3 9 8 である。そのアミノ酸配列は、

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S N Y L A W Y Q Q K P
G K V P K L L I Y A A S T L Q S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
E D V A T Y Y C Q K Y N S A P (配列番号：33) である。

【0160】

I G K V 1 - 1 7 遺伝子には2つの対立遺伝子がある。I G K V 1 - 1 7 遺伝子の対立遺伝子*01の I M G T 受入番号はX 7 2 8 0 8 である。そのアミノ酸配列は、

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I R N D L G W Y Q Q K
P G K A P K R L I Y A A S S L Q S G V P S R F S G S G S G T E F T L T I S S L Q
P E D F A T Y Y C L Q H N S Y P (配列番号：34) である。

10

【0161】

I G K V 1 - 1 7 遺伝子の対立遺伝子*02の I M G T 受入番号はD 8 8 2 5 5 である。そのアミノ酸配列は、

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I R N D L G W Y Q Q K P
G K A P K R L I Y A A S S L Q S G V P S R F S G S G S G T E F T L T I S N L Q P
E D F A T Y Y C L Q H N S Y P (配列番号：35) である。

【0162】

I G K V 1 D - 1 6 遺伝子には2つの対立遺伝子がある。I G K V 1 D - 1 6 遺伝子の対立遺伝子*01の I M G T 受入番号はK 0 1 3 2 3 である。そのアミノ酸配列は、

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S W L A W Y Q Q K P
E K A P K S L I Y A A S S L Q S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
E D F A T Y Y C Q Q Y N S Y P (配列番号：36) である。

20

【0163】

I G K V 1 D - 1 6 遺伝子には2つの対立遺伝子がある。I G K V 1 D - 1 6 遺伝子の対立遺伝子*02の I M G T 受入番号はJ 0 0 2 4 4 である。そのアミノ酸配列は、

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A R Q G I S S W L A W Y Q Q K P
E K A P K S L I Y A A S S L Q S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
E D F A T Y Y C Q Q Y N S Y P (配列番号：37) である。

30

【0164】

I G K V 1 - 1 6 遺伝子の I M G T 受入番号は、J 0 0 2 4 8 である。そのアミノ酸配列は、

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S N Y L A W F Q Q K P
G K A P K S L I Y A A S S L Q S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
E D F A T Y Y C Q Q Y N S Y P (配列番号：38) である。

【0165】

I G K V 1 - 1 2 遺伝子には2つの対立遺伝子がある。I G K V 1 - 1 2 遺伝子の対立遺伝子*01の I M G T 受入番号はV 0 1 5 7 7 である。そのアミノ酸配列は、

D I Q M T Q S P S S V S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S W L A W Y Q Q K P
G K A P K L L I Y A A S S L Q S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
E D F A T Y Y C Q Q A N S F P (配列番号：39) である。

40

【0166】

I G K V 1 - 1 2 遺伝子の対立遺伝子*02の I M G T 受入番号はV 0 1 5 7 6 である。そのアミノ酸配列は、

D I Q M T Q S P S S V S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S W L A W Y Q Q K P
G K A P K L L I Y A A S S L Q S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
E D F A T Y Y C Q Q A N S F P (配列番号：40) である。

【0167】

I G K V 1 - 9 遺伝子の I M G T 受入番号は、Z 0 0 0 1 3 である。そのアミノ酸配列

50

は、

D I Q L T Q S P S F L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S Y L A W Y Q Q K P
G K A P K L L I Y A A S T L Q S G V P S R F S G S G S G T E F T L T I S S L Q P
E D F A T Y Y C Q Q L N S Y P (配列番号：41)である。

【0168】

I G K V 1-6 遺伝子の I M G T 受入番号は、M 6 4 8 5 8 である。そのアミノ酸配列は、

A I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I R N D L G W Y Q Q K
P G K A P K L L I Y A A S S L Q S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q
P E D F A T Y Y C L Q D Y N Y P (配列番号：42)である。

【0169】

I G K V 1-5 遺伝子には3つの対立遺伝子がある。I G K V 1-5 遺伝子の対立遺伝子*01の I M G T 受入番号は Z 0 0 0 0 1 である。そのアミノ酸配列は、

D I Q M T Q S P S T L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I S S W L A W Y Q Q K P
G K A P K L L I Y D A S S L E S G V P S R F S G S G S G T E F T L T I S S L Q P
D D F A T Y Y C Q Q Y N S Y S (配列番号：43)である。

【0170】

下記の潜在的ヒト重鎖生殖細胞系列配列を同定した。それは、本発明の結合分子に組み込んでもよい。

【0171】

I G H V 2-5 遺伝子には10個の対立遺伝子がある。I G H V 2-5 遺伝子の対立遺伝子*01の I M G T 受入番号は X 6 2 1 1 1 である。そのアミノ酸配列は、

Q I T L K E S G P T L V K P T Q T L T L T C T F S G F S L S T S G V G V G W I R
Q P P G K A L E W L A L I Y W N D D K R Y S P S L K S R L T I T K D T S K N Q V
V L T M T N M D P V D T A T Y Y (配列番号：45)である。

【0172】

I G H V 2-26 遺伝子の I M G T 受入番号は、M 9 9 6 4 8 である。そのアミノ酸配列は、

Q V T L K E S G P V L V K P T E T L T L T C T V S G F S L S N A R M G V S W I
R Q P P G K A L E W L A H I F S N D E K S Y S T S L K S R L T I S K D T S K S Q
V V L T M T N M D P V D T A T Y Y C A R I (配列番号：46)である。

【0173】

I G H V 2-70 遺伝子には13個の対立遺伝子がある。I G H V 2-70 遺伝子の対立遺伝子*01の I M G T 受入番号は L 2 1 9 6 9 である。そのアミノ酸配列は、

Q V T L R E S G P A L V K P T Q T L T L T C T F S G F S L S T S G M C V S W I R
Q P P G K A L E W L A L I D W D D D K Y Y S T S L K T R L T I S K D T S K N Q V
V L T M T N M D P V D T A T Y Y C A R I (配列番号：47)である。

【0174】

I G H V 4-30-2 遺伝子には4つの対立遺伝子がある。I G H V 4-30-2 遺伝子の対立遺伝子*01の I M G T 受入番号は L 1 0 0 8 9 である。そのアミノ酸配列は、

Q L Q L Q E S G S G L V K P S Q T L S L T C A V S G G S I S S G G Y S W S W I R
Q P P G K G L E W I G Y I Y H S G S T Y Y N P S L K S R V T I S V D R S K N Q F
S L K L S S V T A A D T A V Y Y C A R (配列番号：48)である。

【0175】

I G H V 4-30-4 遺伝子には6個の対立遺伝子がある。I G H V 4-30-4 遺伝子の対立遺伝子*01の I M G T 受入番号は Z 1 4 2 3 である。そのアミノ酸配列は、

Q V Q L Q E S G P G L V K P S Q T L S L T C T V S G G S I S S G D Y Y W S W I R
Q P P G K G L E W I G Y I Y Y S G S T Y Y N P S L K S R V T I S V D T S K N Q F
S L K L S S V T A A D T A V Y Y C A R (配列番号：49)である。

【0176】

10

20

30

40

50

I G H V 4 - 3 1 遺伝子には 10 個の対立遺伝子がある。I G H V 4 - 3 1 遺伝子の対立遺伝子*01 の I M G T 受入番号は L 1 0 0 9 8 である。そのアミノ酸配列は、
Q V Q L Q E S G P G L V K P S Q T L S L T C T V S G G S I S S G G Y Y W S W I R
Q H P G K G L E W I G Y I Y Y S G S T Y Y N P S L K S L V T I S V D T S K N Q F
S L K L S S V T A A D T A V Y Y C A R (配列番号: 50) である。

【0177】

I G H V 4 - 3 9 遺伝子には 6 個の対立遺伝子がある。I G H V 4 - 3 9 遺伝子の対立遺伝子*01 の I M G T 受入番号は L 1 0 0 9 4 である。そのアミノ酸配列は、
Q L Q L Q E S G P G L V K P S E T L S L T C T V S G G S I S S S S Y Y W G W I R
Q P P G K G L E W I G S I Y Y S G S T Y Y N P S L K S R V T I S V D T S K N Q F
S L K L S S V T A A D T A V Y Y C A R (配列番号: 51) である。

【0178】

I G H V 4 - 6 1 遺伝子には 8 個の対立遺伝子がある。I G H V 4 - 6 1 遺伝子の対立遺伝子*01 の I M G T 受入番号は M 2 9 8 1 1 である。そのアミノ酸配列は、
Q V Q L Q E S G P G L V K P S E T L S L T C T V S G G S V S S G S Y Y W S W I R
Q P P G K G L E W I G Y I Y Y S G S T N Y N P S L K S R V T I S V D T S K N Q F
S L K L S S V T A A D T A V Y Y C A R (配列番号: 52) である。

【0179】

これらの各生殖細胞系列配列を用いて、1 以上の 6 C 8 C D R を用いて、フレームワーク領域してもよい。

【0180】

本明細書において用いられている「正準構造」は、それによって結合分子が抗原と接触する、異なる C D R によって作製される保護された超可変ループ高次構造である。正準構造クラスの新しい結合分子への割り当ては、公に利用可能なソフトウェアを用いて達成される。

【0181】

別の態様において、マウス C D R のヒト可変ドメインフレームワークへの置換は、マウス可変ドメインフレームワークの正しい空間配置方向の維持に基づいて、C D R が由来する、マウス可変ドメインフレームワークと同じ高次構造を維持するであろうヒト可変ドメインフレームワークを同定することによって行われる。ある態様において、これは、そのフレームワーク配列がネズミ可変フレームワークドメインに対して高い配列同一性を示すヒト結合分子からのヒト可変ドメインを取得することによって達成される。Kettleborough et al., Protein Engineering 4:773 (1991); Kolbinger et al., Protein Engineering 6:971 (1993) および Carter et al., P C T 国際公開 W O 9 2 / 2 2 6 5 3 号を参照されたい。

【0182】

好ましくは、ヒトアクセプター結合分子は、正準を維持し、ドナー結合分子の残基と相互作用する。さらに、ヒトアクセプター結合分子は、好ましくは、C D R ループの長さにおいてほぼ類似性を有している。Kettleborough et al., Protein Engineering 4:773 (1991); Kolbinger et al., Protein Engineering 6:971 (1993) and Carter et al., P C T 国際公開 W O 9 2 / 2 2 6 5 3 を参照されたい。

【0183】

別の態様において、適切なヒトアクセプター配列は、6 C 8 結合分子のフレームワーク領域へのホモロジーに基づいて選択してもよい。例えば、6 C 8 結合分子のアミノ酸配列は、他の公知の結合分子のアミノ酸配列と、例えば、F R 領域と 6 C 8 アミノ酸配列の可変領域配列と、公知の結合分子の公に利用可能なデータベースとを比較することによって、そして、可変領域もしくは F R 領域のアミノ酸と最も高いパーセント同一性、すなわち、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%の同一性を持つアミノ酸を選択することによって、比較することができる。ある態様において、配列番号: 67

に記載のフレームワーク配列を使用してもよい。

(Q V T L K E S G P G I L Q P S Q T L S L T C S F S G F S L S T S G M G V G W I R Q P S G K G L E W L A H I W W D D D K Y N P S L K S R L T I S K D T S S N Q V F L K I T S V D T R D T A T Y Y C A R T R R Y F P F A Y W G E G T S V T V T S (配列番号：67；フレームワーク残基を太字で示している)。別の態様において、配列番号：68に記載のフレームワーク配列は、

(Q V T L R E S G P A L V K P T Q T L T L T C T F S G F S L S T S G M G V G W I R Q P P G K A L E W L A H I W W D D D K Y N P S L K S R L T I S K D T S K N Q V V L T M T N M D P V D T A T Y Y C A R T R R Y F P F A Y W G Q G T L V T V S S (配列番号：68；フレームワーク残基を太字で示している))。 10

【0184】

ネズミドナーイムノグロブリンとヒトアクセプターイムノグロブリンの相補性決定領域を同定した後、次なるステップは、もしあれば、これらの成分からの残基を置換して、得られたヒト化結合分子の特性を最適化することである。一般に、ヒトアミノ酸残基のネズミとの置換は最低限にすべきである。なぜなら、ネズミ残基の導入によって、ヒトにおけるヒト抗マウス抗体(HAMA)反応を誘発する結合分子のリスクが上昇するからである。免疫応答を決定するための、当業で認識されている方法を行って、特定の患者もしくは治験中のHAMA反応をモニターすることができる。ヒト化結合分子を投与された患者に、前記治療の開始時、および治療期間中ずっと、免疫原性を付与することができる。例えば、当業者に公知の方法を用いて、患者から取得した血清サンプル中で、表面プラスモン共鳴技術(BIACORE)および/または固相ELISA分析によって、抗体をヒト化治療試薬に対する抗体を検出することによって、HAMA反応を測定する。 20

【0185】

必要であれば、ヒトフレームワーク領域中の1以上の残基を、ネズミ抗体中の対応する位置にある残基に変更または置換し、ヒト化抗体の該抗原に対する結合アフィニティを保存することができる。この変更は、ときに「逆突然変異」と言われることがある。CDR高次構造および/または抗原に対する結合におよぼす影響に基づいて、逆突然変異のためのヒト可変領域フレームワーク残基からの特定のアミノ酸を選択する。ネズミCDR領域をヒト可変フレームワーク領域に置くことによって、高次構造的抑制をすることができる。それによって、特定のアミノ酸残基を置換して補正しない限り、結合アフィニティの損失がきたされる。 30

【0186】

ある態様において、逆突然変異のためのアミノ酸残基の選択は、部分的には、当業で認識されている技法を用いたコンピューターモデリングによって測定することができる。一般に、分子モデルは、イムノグロブリン鎖もしくはそのドメインのための解決された構造から開始して作製される。モデルとすべき鎖を比較して、解決されている3次元構造の鎖もしくはドメインを用いてアミノ酸配列類似性を調べ、最も類似性の高い鎖もしくはドメインを、分子モデル構築の開始点として選択する。少なくとも50%の配列同一性を持つ鎖もしくはドメインをモデリングのために選択する。好ましくは、少なくとも60%、70%、80%、90%の配列同一性を持つものをモデリングのために選択する。解決している開始構造を改変し、イムノグロブリン鎖中の実際のアミノ酸またはモデル化されたドメインとの間の相違を開始構造中に許容する。次いで改変された構造をイムノグロブリン複合体に回収する。最後に、エネルギー最小化によって、および全ての原子が互いに適切な距離をおいて存在することを確認することによって、モデルを精製する。結合長、角度は許容限界中にある。 40

【0187】

置換のためのアミノ酸残基の選択は、部分的には、特定の位置のアミノ酸の特徴を調べることによって、または、特定のアミノ酸の置換もしくは突然変異誘発の経験的観察によって、決定することができる。例えば、アミノ酸が、ネズミ可変領域フレームワーク残基と選択されたヒト可変領域フレームワーク残基の間で相違するとき、ヒトフレームワーク 50

アミノ酸は、それが、合理的に以下の(1)～(4)が期待されるとき、マウス結合分子からの等しいフレームワークアミノ酸と置換してもよい。(1)非共有結合的に抗原と直接的に結合する、(2)CDR領域に近接する、(3)そうでなければ、CDR領域と相互作用する(例えば、コンピューターモデリングによって測定したとき、CDR領域の約3～6オングストローム内存在する)、または、(4)VL-VH干渉に関与する。

【0188】

「非共有結合的に抗原と直接的に結合する」残基には、確立された化学的な力、例えば、水素結合、ファン・デル・ワールス力、疎水性の相互作用などによって、抗原上で直接的にアミノ酸と相互作用する可能性の高い、フレームワーク領域内の位置のアミノ酸が含まれる。

【0189】

「CDR領域に近接する」残基としては、ヒト化イムノグロブリン鎖の一次配列中の1以上のCDR非常に隣接した位置、例えば、Kabatによって定義されるCDR、またはChothia (See e.g., Chothia and Lesk JMB 196:901 (1987))によって定義されるCDRに非常に隣接した位置におけるアミノ酸残基が挙げられる。これらのアミノ酸は、CDR中のアミノ酸と特に相互作用しやすく、アクセプターから選択される場合、ドナーCDRをゆがめ、アフィニティーを減少させるかもしれない。さらに、隣接したアミノ酸は、抗原と直接的に相互作用するかもしれない(Amit et al., Science, 233:747 (1986)、本明細書においては引用によって援用する)。また、これらのアミノ酸をドナーから選択することは、もともとの結合分子におけるアフィニティーを提供する抗原接触を維持するために望ましい。

【0190】

「そうでなければ、CDR領域と相互作用する」残基としては、CDR領域に影響をおよぼすのに十分な空間配置となるようにした二次構造分析によって決定されるものが含まれる。ある態様において、「そうでなければ、CDR領域と相互作用する」残基は、ドナーイムノグロブリン(例えば、コンピューター生成モデル)の3次元モデルを分析することによって同定することができる。典型的にはオリジナルのドナー結合分子である3次元モデルは、CDR領域外部のアミノ酸がCDRに近接し、水素結合、ファン・デル・ワールス力、疎水性の相互作用などによって、CDR中のアミノ酸と相互作用する可能性が高いことを示している。アミノ酸の位置としては、アクセプターイムノグロブリンアミノ酸よりも、ドナーイムノグロブリンアミノ酸が選択されるかもしれない。この範囲のアミノ酸は通常、CDR内のいくつかの原子について、約3オングストローム内の側鎖原子を持つことになり、上記したもののような化学的な力によって、CDR原子と相互作用する原子を含有しなければならない。

【0191】

水素結合を形成する原子の場合、この3オングストロームは、それらの核間で測定する。しかし、結合を形成しない元素の場合、この3オングストロームは、それらのファン・デル・ワールス表面間で測定する。したがって、後者の場合、核は、相互作用が可能であると考えられる原子について、約6オングストローム以内でなければならない(3オングストロームプラスファン・デル・ワールスの合計)。多くの場合、核は、4もしくは5乃至6オングストローム離れている。アミノ酸がCDRと相互作用するか否かを測定する際、重鎖CDRの最後の8アミノ酸をCDRの一部と考えることが好ましい。なぜなら、構造の観点から、これらの8アミノ酸は、フレームワークとして振舞うからである。

【0192】

CDR内のアミノ酸と相互作用するアミノ酸は、さらに別の方法で同定することができる。各フレームワークアミノ酸の溶媒受容表面積を、(1)未処理の結合分子中、および(2)CDRが除去された結合分子からなるa仮説の分子中、の2つの方法で計算する。これらの2つの数値の有意差が10平方オングストローム以上であることは、フレームワークアミノ酸の溶媒への接近が少なくとも部分的にCDRによってブロックされることを示している。したがって、アミノ酸は、CDRと接触している。アミノ酸の溶媒接触可

10

20

30

40

50

能表面積は、結合分子の3次元モデルに基づいて、当該技術分野において公知のアルゴリズムを使用して計算される（例えば、Connolly, J. Appl. Cryst. 16:548 (1983)、ならびにLee とRichards, J. Mol. Biol. 55:379 (1971)、この両方を本明細書において引用によって援用する）。フレームワークアミノ酸はまた、別のフレームワークアミノ酸の高次構造に影響を及ぼし、ひいてはCDRと接触することによって、間接的にCDRと相互作用する場合もある。

【0193】

フレームワーク中のいくつかの位置におけるアミノ酸は、多くの結合分子でCDRと相互作用することが可能であることが知られている(ChothiaとLesk, 上掲文献、Chothia et al., 上掲文献、およびTramontano et al., J. Mol. Biol. 215:175 (1990)、この全
10
てを本明細書において、引用によって援用する)。明らかに、軽鎖の2、48および71位置および重鎖の26~30、71および94位置のアミノ酸は、多くの結合分子でCDRと相互作用することが可能であることが知られている。軽鎖の35位置のアミノ酸および重鎖の93および103のアミノ酸もCDRと相互作用する可能性が高い。これらすべての、番号付けされた位置において、(アクセプターアミノ酸とドナーアミノ酸が異なる場合)アクセプターアミノ酸よりむしろドナーアミノ酸が、ヒト化イムノグロブリンとして選択されることが好ましい。一方、CDR領域と相互作用する特定の残基、例えば、軽鎖の第1の5アミノ酸は、時として、アクセプターイムノグロブリンから、ヒト化結合分子におけるアフィニティーの損失なしに選択される。

【0194】

「VL-VH干渉に関与する」残基、または「充填残基」としては、例えば、Novotny とHaber (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:4592-66 (1985)) またはChothia et al., 上掲文献の定義によれば、VLとVH間の界面の残基を含む。通常、異常な充填残基は、それらがヒトフレームワークと異なる場合、ヒト化結合分子に位置されるべきである。
20

【0195】

通常、上記評価基準を満たす1以上のアミノ酸が置換される。いくつかの態様において、上記評価基準を満たす全て、もしくは大半のアミノ酸が置換される。場合によっては、特定のアミノ酸が上記評価基準を満たすか否かについて、なんらかの曖昧さがあり、代わりに異型結合分子が作製される。その1つは、他のそれにはない特定の置換をもつ。そのようにして作製された別の異型結合分子は、その所望の活性および選択された好ましい結合分子に関して、本明細書に記載のあらゆるアッセイにおいて試験することができる。
30

【0196】

通常、ヒト化結合分子のCDR領域は、ほぼ同一であり、より一般的には、ドナー結合分子の対応するCDR領域と同一である。いつも好ましいわけではないが、ときに、得られたヒト化結合分子の結合アフィニティーに感知されるほどの影響を及ぼすことなく、CDR残基の1以上の保存的アミノ酸置換を行うことができる。保存的置換とは、GlyとAla; Val、IleとLeu; AspとGlu; AsnとGln; SerとThr; LysとArgおよびPheとTyrなどの組み合わせを意味する。

【0197】

置換のためのさらなる候補は、その位置のヒトイムノグロブリンとしては普通でない、もしくは「珍しい」アクセプターヒトフレームワークアミノ酸である。これらのアミノ酸は、マウスドナー結合分子の同じ位置からのアミノ酸、または、より典型的にはヒトイムノグロブリンの同じ位置からのアミノ酸で置換することができる。例えば、アクセプターイムノグロブリンのヒトフレームワーク領域のアミノ酸がその位置にとって珍しいとき、また、ドナーイムノグロブリンの対応するアミノ酸が、ヒトイムノグロブリン配列のその位置にとって一般的であるとき、あるいは、アクセプターイムノグロブリンのアミノ酸がその位置にとって珍しいとき、また、ドナーイムノグロブリンの対応するアミノ酸が他のヒト配列にとって珍しいとき、置換が望ましいかもしれない。これらの評価基準は、ヒトフレームワークにおいて典型的でないアミノ酸が結合分子構造を確実に分裂させる助けをする。さらに、一般的でないヒトアクセプターアミノ酸とヒト結合分子にとって典型的
40
50

となるドナー結合分子からのアミノ酸とを置換することによって、ヒト化結合分子の免疫原性は小さくなる。

【0198】

本明細書で用いられている用語「めずらしい」は、その位置でのそのアミノ酸の発生が、配列の約20%未満で、より一般的には約10%未満であることを意味する。本明細書で用いられている用語「一般的な」は、そのアミノ酸の発生が、代表的なサンプルにおける配列の約25%を超える、より一般的には約50%を超えることを意味する。例えば、全てのヒト軽鎖および重鎖可変領域配列を、それぞれ、特に相同的であり、いくつかの重要な位置におけるアミノ酸が同じである配列の「サブグループ」に分ける(Kabat et al., 上掲文献)。ヒト配列において、ヒトアクセプター配列のアミノ酸が「珍しい」か「一般的」かを決定する際、同じサブグループにおける人配列のみをアクセプター配列として検討することが好ましいことが多い。

10

【0199】

置換のためのさらなる候補は、別に定義された(Chothia et al., 上掲文献)CDR領域の一部と同定されるであろうアクセプターヒトフレームワークアミノ酸である。置換のためのさらなる候補は、AbMおよび/または接触定義のものでCDR領域の一部と同定されるであろうアクセプターヒトフレームワークアミノ酸である。特に、可変重鎖のCDR1は、残基26-32を含むとされる。

【0200】

置換のためのさらなる候補は、珍しいまたは普通でないドナーフレームワーク残基に対応するアクセプターフレームワーク残基である。珍しいまたは普通でないドナーフレームワーク残基とは、(本明細書に定義されているように)その位置におけるネズミ結合分子にとって珍しいまたは普通でないものを言う。ネズミ結合分子にとって、サブグループは、Kabatにしたがって決定することができる。そして、残基位置は、コンセンサスとは異なるものとして同定される。これらのドナー特異的相違は、活性を高めるネズミ配列における体細胞突然変異を示唆するものであるかもしれない。結合に影響を及ぼすことが予測される普通でない残基が維持される。一方、結合にとって重要でないことが予測される残基を置換することができる。

20

【0201】

置換のためのさらなる候補は、アクセプターフレームワーク領域に発生する非生殖細胞系列の残基である。例えば、アクセプター結合分子鎖(すなわち、重要な配列を共有するヒト結合分子鎖がドナー結合分子鎖と一致する)を、生殖細胞系列結合分子鎖に配列させ(同じく、共有の重要な配列がドナー鎖と一致する)、アクセプター鎖フレームワークと生殖細胞系列鎖フレームワークとの間にマッチングしない残基を生殖細胞系列配列からの対応する残基と置換することができる。

30

【0202】

上記した特異的アミノ酸置換の他に、ヒト化結合分子のフレームワーク領域は、それらが由来するヒト結合分子のフレームワーク領域と一般的にはほぼ同一であり、より一般的には同一である。もちろんフレームワーク領域におけるアミノ酸の多くは、特異性または結合分子のアフィニティーに対してあまり寄与しない、もしくは直接的な寄与をしない。したがって、フレームワーク残基の多くの個別の保存的置換は、得られたヒト化結合分子の特異性またはアフィニティーの感知可能なほどの変化を起こすことなく、耐性がある。したがって、ある態様において、ヒト化結合分子可変フレームワーク領域は、少なくともヒト可変フレームワーク領域配列またはそのような配列のコンセンサスに少なくとも85%の配列同一性を持つ。別の態様において、ヒト化結合分子の可変フレームワーク領域は、ヒト可変フレームワーク領域配列またはそのような配列のコンセンサスに少なくとも90%、好ましくは95%、より好ましくは96%、97%、98%または99%の配列同一性を示す。しかしながら、通常、そのような置換は望ましくない。

40

【0203】

ある態様において、本発明の結合分子はさらに、アミノ酸残基が界面充填残基であると

50

き、少なくとも1つのヒトアミノ酸残基の、対応するマウスアミノ酸残基に対する逆突然変異を含む。「界面充填残基」は、例えば、NovotnyとHaber, Proc. Natl. Acad. Sci. U SA, 82:4592-66 (1985)に定義されているように、V LとV Hの間の界面にそれらの残基を含む。

【0204】

ある態様において、本発明の結合分子はさらに、アミノ酸残基が正準残基であるとき、少なくとも1つのヒトアミノ酸残基の、対応するマウスアミノ酸残基に対する逆突然変異を含む。「正準残基」は、正準もしくは構造的クラス内において、C D R高次構造にとって重要であることが知られている保存されたフレームワーク残基である (Tramontano et al., J. Mol. Biol. 215:175 (1990)、それらの全てを全ての目的のために、引用によって援用する)。正準残基は、軽鎖の2、25、27B、28、29、30、33、48、51、52、64、71、90、94および95、重鎖の24、26、27、29、34、54、55、71および94の残基を含む。さらなる残基 (例えば、C D R構造決定残基) は、Martin とThorton (1996) J. Mol. Biol. 263:800の方法に従って同定することができる。

10

【0205】

ある態様において、本発明の結合分子はさらに、アミノ酸残基がC D Rと相互作用することが可能な位置にある場合、ヒトアミノ酸残基の対応するマウスアミノ酸残基に対する少なくとも1つの逆突然変異を含む。特に、軽鎖の2、48、64および71ならびに重鎖の26～30、71および94の位置のアミノ酸 (番号付けは、Kabatにしたがっている) は、多くの抗体においてC D Rと相互作用できることが知られている。軽鎖の位置35のアミノ酸ならびに重鎖の位置93および103のアミノ酸も同様にC D Rと相互作用する可能性がある。

20

【0206】

CLUSTAL W分析に基づいて、ヒトフレームワークのいくつかのアミノ酸残基を、例えば、6C8軽鎖からの対応するアミノ酸残基を用いて、潜在的な置換のために同定した。これらには、位置1、8、9、10、11、13、15、17、19、20、21、22、43、45、46、58、60、63、70、76、77、78、79、83、85、87、100、および104が含まれる。

【0207】

ある態様において、本発明の結合分子可変軽鎖フレームワークはさらに、ヒトアミノ酸残基のE1D (すなわち、ネズミC D RおよびヒトF R領域を含むC D R移植抗体の位置1のEがDに突然変異することを表す。これは、6C8抗体の対応するアミノ酸残基である)、P8Q、A9K、T10F、L11M、V13T、P15V、E17D、A19V、T20S、L21V、S22T、A43S、R45K、L46A、I58V、A60D、S63T、E70D、S76N、S77N、L78V、Q79H、F83L、V85E、Y87F、G100A、およびV104Lからなる群から選択される対応するマウスアミノ酸残基への少なくとも1つの置換を含む。

30

【0208】

CLUSTAL W分析に基づいて、ヒトフレームワークのいくつかのアミノ酸残基を、例えば、6C8重鎖からの対応するアミノ酸残基を用いて、潜在的な置換のために同定した。これらには、位置5、10、11、12、15、19、23、43、46、68、77、81、83、84、86、87、89、90、および92が含まれる。

40

【0209】

ある態様において、本発明の結合分子可変重鎖フレームワークはさらに、ヒトアミノ酸残基のR5K (すなわち、ネズミC D RおよびヒトF R領域を含むC D R移植抗体の位置5のRがKに突然変異することを表す。これは、6C8抗体の対応するアミノ酸残基である)、A10G、L11I、V12L、T15S、T19S、T23S、P43S、A46G、R68Q、K77R、V81F、T83K、M84I、N86S、M87V、P89T、V90AおよびT92Aからなる群から選択される対応するマウスアミノ酸残基へ

50

の少なくとも1つの置換を含む。

【0210】

ヒト化結合分子は、好ましくは、少なくとも 10^7 、 10^8 、 10^9 または 10^{10} M⁻¹の抗原に対する特異的結合アフィニティを示す。通常、抗原に対するヒト化結合分子の結合アフィニティの上限は、ドナーイムノグロブリンのその3、4または5倍以内である。しばしば、結合アフィニティの下限もまた、ドナーイムノグロブリンのその3、4または5倍以内である。別法として、結合アフィニティを（例えば、ドナーCDRおよびアクセプターFRをもつが、FR置換を持たない結合分子）をもたないヒト化結合分子のそれと比較することができる。そのような例において、最適化された結合分子（置換を有する）は、置換されていない結合分子と比較して、好ましくは、少なくとも2〜3倍大きい、または3〜4倍大きい。比較のために、例えば、BIACORE（すなわち、非標識試薬を用いた表面プラスモン共鳴）または競合的結合アッセイによって、種々の結合分子の活性を決定することができる。

10

【0211】

ヒト化結合分子のCDRおよびフレームワーク成分を概念的に選択すれば、そのような結合分子を作製するための種々の方法が適用可能である。コードの縮重により、種々の核酸配列は、それぞれの結合分子のアミノ酸配列をコードするであろう。所望の核酸配列を、早期に作製された所望のポリヌクレオチドの異型のde novo 固相DNA合成またはPCR突然変異誘発によって作製することができる。

【0212】

オリゴヌクレオチド媒介性の突然変異誘発は、標的ポリペプチドDNAの異型の置換、欠失、挿入を調製するための好ましい方法である。Adelman et al. (DNA 2:183 (1983))を参照されたい。簡単に述べれば、標的ポリペプチドDNAは、所望の突然変異をコードするオリゴヌクレオチドを、一本鎖DNA鋳型にハイブリダイズすることによって改変することができる。ハイブリダイゼーション後、DNAポリメラーゼを用いて、全体的な第2のオリゴヌクレオチドプライマーを組み込み、選択された改変を標的ポリペプチドDNAにコードする鋳型の相補鎖を合成する。

20

【0213】

上掲文献に記載のようにして作製した結合分子の可変セグメント（例えば、キメラ、ヒト化もしくはヒト結合分子の重鎖および軽鎖可変領域）は、典型的には、少なくとも一部のイムノグロブリン定常領域（Fc）に、典型的には、ヒトイムノグロブリンのそれに結合する。ヒト定常領域DNA配列は、公知の方法に従って、種々のヒト細胞、好ましくは不死化B細胞から単離することができる（Kabat et al.、上掲文献、およびLiu et al.、PCT国際公開公報W087/02671号）（それらの全てを全ての目的のために、引用によって援用する）。通常、結合分子は、軽鎖および重鎖定常領域の双方を含有する。重鎖定常領域は、通常CH1、ヒンジ、CH2、CH3およびCH4領域を含む。本明細書に記載の結合分子は、全てのタイプの定常領域を有する抗体（IgM、IgG、IgD、IgAおよびIgE）、ならびにあらゆるアイソタイプ（IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4）を含む。定常領域の選択は、部分的には、または結合分子依存性補体および／または細胞媒介性毒性が望ましいかどうかにしたがって成される。例えば、アイソタイプIgG1およびIgG3は、補体活性を持ち、アイソタイプIgG2およびIgG4はもたない。結合分子（例えば、ヒト化結合分子）が細胞傷害性活性を示すことが望ましいとき、定常ドメインは通常、定常ドメインを固定する補体であり、そのクラスは典型的にはIgG1である。そのような細胞傷害性活性が望ましくない場合、定常ドメインは、例えば、IgG2クラスであるかもしれない。アイソタイプの選択は、抗体の脳への継代培養にも影響を及ぼす。ヒトアイソタイプIgG1が好ましい。軽鎖定常領域は、ラムダもしくはカッパとすることができる。ヒト化結合分子は、1以上のクラスもしくはアイソタイプからの配列を含んでもよい。結合分子は、2つの軽鎖および2つの重鎖を含有する四量体として、分離した重鎖、軽鎖として、Fab、Fab'F(ab')2およびFvとして、もしくは重鎖および軽鎖可変ドメインがスペーサーを介して結合している

30

40

50

一本鎖結合分子として、発現させることができる。

I I I . 結合分子の作製

【0214】

本発明は、G I T R、例えば、ヒト G I T R に特異性を有する結合分子に関する。そのような結合分子は、本発明の種々の治療的組成物の作製に用いることができ、好ましくは、ヒト化もしくはキメラ結合分子（以下に詳細に示す）の作製のための相補性決定領域を提供する。非ヒトモノクローナル結合分子、例えば、ネズミ、モルモット、霊長類、ウサギ、もしくはラットの作製は、例えば、G I T R もしくは G I T R をコードする核酸分子を持つ動物を免疫することによって達成することができる。例えば、6 C 8 結合分子は、ヒト G I T R をコードする遺伝子を発現ベクターに入れ、動物を免疫することによって作製することができる。G I T R もしくは G I T R の免疫原性フラグメントもしくは抗イデオタイプ G I T R の結合分子を含むより長いポリペプチドを用いることもできる（例えば、Harlow & Lane, 上掲文献、全ての目的のために引用によって援用する）。そのようなイムノゲンは、ペプチド合成もしくは組換え発現によって、天然のソースから取得することができる。以下に述べるように、任意に該イムノゲンを、投与、融合、そうでなければ、キャリアタンパク質と複合体形成することができる。任意に該イムノゲンをアジュバントとともに投与することができる。用語「アジュバント」は、抗原と組み合わせて投与されたとき、抗原に対する免疫応答を高めるが、単独で投与されたとき、抗原に対する免疫応答を発生させない化合物を言う。アジュバントは、リンパ球補充、B細胞および／またはT細胞の刺激、ならびにマクロファージの刺激を含めたいくつかのメカニズムによって免疫応答を増強させる。いくつかのタイプのアジュバントは、以下に述べるようにして用いることができる。実験動物を免疫するためには、完全フロイントアジュバントを用い、その後不完全アジュバントを用いることが好ましい。

【0215】

ポリクローナル結合分子を作製するために、典型的にウサギまたはモルモットを使用することができる。ポリクローナル結合分子の調製例、例えば、継代保護は、以下のようにして行うことができる。動物を、100 μ g の G I T R およびアジュバントで免疫し、4～5ヶ月目に安楽死させる。血液を回収し、I g G を他の血液成分から分離する。イムノゲンに特異的な結合分子は、アフィニティークロマトグラフィーによって部分的に精製してもよい。動物1匹あたり平均約0.5～1.0 mg のイムノゲン特異性結合分子を取得し、合計60～120 mg 取得する。

【0216】

モノクローナル結合分子を作製するために、典型的にマウスを使用することができる。フラグメントまたはより長い形態の G I T R をマウスに注射し、ハイブリドーマを調製し、G I T R に特異的に結合する結合分子のためのハイブリドーマをスクリーニングすることによって、フラグメントに対するモノクローナルを作製することができる。任意に、他の非オーバーラップの G R T R のフラグメントに結合させずに、特異的領域もしくは所望の G R T R のフラグメントに結合させるために、結合分子をスクリーニングした。後者スクリーニングは、結合分子の、G I T R ペプチドの欠失突然変異の集合物に対する結合を決定することによって、どの欠失突然変異が結合分子に結合するかを決定することによって、達成することができる。結合は、例えば、ウェスタンブロットまたは E L I S A によって調べることができる。結合分子への特異的結合を示す最小フラグメントが、結合分子のエピトープを定義する。あるいは、エピトープ特異性が、試験結合分子もしくは参照結合分子が G I T R に対する結合に競合する競合アッセイによって決定することができる。もし、試験結合分子もしくは参照結合分子が競合すれば、それらは同じエピトープ（もしくは十分に遠位にあるエピトープ）に結合し、その結果、結合分子の結合どうしが互いに干渉する。そのような結合分子のための好ましいアイソタイプは、マウスアイソタイプ I g G 2 a もしくは他の種の等価アイソタイプである。マウスアイソタイプ I g G 2 a は、ヒトアイソタイプ I g G 1 の等価である。

【0217】

別の態様において、結合分子をコードするDNAは、従来の方法によって容易に単離して配列してもよい（例えば、ネズミ結合分子重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを用いた方法など）。単離され、サブクローニングされたハイブリドーマ細胞は、そのようなDNAの好ましいソースとして働く。単離してすぐ、DNAを発現ベクターに入れ、次いでそれを原核生物もしくは真核生物の宿主細胞、例えば、大腸菌（*E. coli*）細胞、類人猿COS細胞、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）細胞、または、イムノグロブリンを作製しない骨髓腫細胞にトランスフェクトする。より詳細には、単離されたDNA（以下に述べるように合成的でもよい）を用いて、Newman et al., 米国特許第5,658,570号（1995年1月25日出願、本明細書において引用によって援用する）に記載のように、結合分子の製造のための、定常および可変領域配列へクローニングを行う。基本的に、これは、選択された細胞からのRNAの抽出、cDNAの変換、Ig特異性プライマーを用いたPCRによる増幅を必然的に伴う。この目的にとって好適なプライマーについても米国特許第5,658,570号に記載がある。所望の抗体を発現する形質転換するされた細胞を、比較的大量に作製し、臨床および市販用の結合分子を提供することができるかもしれない。

10

【0218】

当業者は、結合分子をコードするDNAまたはそのフラグメント（例えば、抗原結合部位）は、例えば、pdファージもしくはFdファージミド技法を用いた抗体ファージライブラリーに由来するかもしれないことを理解するであろう。その方法の例が、例えば、欧州特許第368684B1号；米国特許第5,969,108号、Hoogenboom, H.R. と Chames. 2000. Immunol. Today 21:371; Nagy et al. 2002. Nat. Med. 8:801; Huie et al. 2001. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:2682; Lui et al. 2002. J. Mol. Biol. 315:1063に記載されている。そのそれぞれを本明細書においては引用によって援用する。いくつかの出版物（例えば、Marks et al. Bio/Technology 10:779-783（1992））は、大きなファージライブラリーを構築するための戦略として、高アフィニティーヒト結合分子の鎖シャフリングによる作製、ならびにコンビナトリアル感染およびインビボ組換えについて記載している。別の態様において、リボソーム性の表示を行って、バクテリオファージを表示プラットフォームに置き換える（例えば、Hanes et al. 2000. Nat. Biotechnol. 18:1287; Wilson et al. 2001. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:3750; or Irving et al. 2001 J. Immunol. Methods 248:31）。さらに別の態様において、細胞表面ライブラリーをスクリーニングして結合分子を得ることができる（Boder et al. 2000. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:10701; Daugherty et al. 2000 J. Immunol. Methods 243:211）。そのような処置は、単離およびそれに続くモノクローナル結合分子のクローニングのための伝統的なハイブリドーマ技法にとって変わるものである。

20

30

【0219】

本発明のさらに別の態様は、ヒトまたは実質的にヒト結合分子を、内因性イムノグロブリンを産生することができないトランスジェニック動物（例えば、マウス）で生成することを含む（例えば、米国特許第6,075,181号、第5,939,598号、第5,591,669号、第5,589,369号を参照されたい。それぞれ本明細書において引用によって援用する）。例えば、キメラおよび生殖細胞系突然変異マウスにおける抗体重鎖結合領域のホモ接合性の欠失の結果、内因性の抗体産生の完全な阻害を引き起こすことが記載されている。ヒトイムノグロブリン遺伝子アレイを、そのような生殖細胞系突然変異マウスへ転移した結果、抗原誘発後すぐに、ヒト結合分子が作製されるであろう。SCIDマウスを用いてヒト結合分子を作製するための別の好ましい手段が、米国特許第5,811,524号に開示されている。それを本発明において引用によって援用する。これらのヒト結合分子に関連する遺伝物質を、本明細書に記載のように単離し、操作してもよいことが理解できるであろう。

40

【0220】

50

組換え結合分子を生成するための、さらに別の非常に効率的な手段が、Newman, Biotechnology, 10: 1455-1460 (1992) に開示されている。具体的には、この技術によって、サル可変ドメインおよびヒト定常配列を含有する霊長類結合分子を作製することができる。この引例の全体を本明細書において引用によって援用する。さらにこの技法は、米国特許第 5, 658, 570 号、第 5, 693, 780 号、第 5, 756, 096 号に開示されている。そのそれぞれを引用によって本明細書に引用する。

【0221】

別の態様において、リンパ球をマイクロマニピュレーションによって選択し、可変遺伝子を単離することができる。例えば、末梢血単核細胞を、免疫した哺乳動物から単離し、で約 7 日間培養することができる。該培養物をスクリーニングして、スクリーニング評価基準を満たす特異的 IgG を選別することができる。細胞は、陽性のウェルから単離することができる。個別の Ig 産生 B 細胞は、FACS によって、または、それらを補体で媒介された溶血プラークアッセイ中で、単離することができる。Ig 産生 B 細胞を、試験管内でマイクロマニピュレーションし、VH および VL 遺伝子は、例えば、RT-PCR を用いて増幅することができる。VH および VL 遺伝子は、抗体発現ベクターにクローニングすることができ、細胞中（例えば、真核生物細胞または原核生物細胞）にトランスフェクトして、発現させることができる。

【0222】

さらに、本発明ポリペプチドを産生させるために有用な遺伝子配列は、いくつかの異なるソースから取得することができる。例えば、上で広範囲において説明したように、種々のヒト抗体遺伝子は、公にアクセス可能な寄託機関の形態のものを利用可能である。抗体および抗体がコードする遺伝子の多くの配列が公開されている。そして好適な抗体遺伝子をこれらの配列から、当業で認識されている技術を用いて化学的に合成することができる。本発明のこの局面に適合するオリゴヌクレオチド合成技術は、当業者に公知であり、いくつかの市販されている自動合成装置を用いて行うことができる。さらに、本明細書において示したいくつかのタイプの重鎖および軽鎖をコードする DNA 配列は、市販の DNA 合成の業者のサービスを介して取得することができる。その後、前記あらゆる方法を用いて取得した遺伝子物質を、改変または合成して、本発明のポリペプチドを取得することができる。

【0223】

別法として、抗体産生細胞系列を選択し、当業者に公知の方法を用いて培養することができる。そのような技法については、種々の実験室マニュアルや主要な出版物に記載がある。この局面において、以下に述べるように本発明において使用するのに適した技法については、Current Protocols in Immunology, Coligan et al., Eds., Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, New York (1991) に記載がある。その内容全体を補足も含めて、本明細書に引用によって援用する。

【0224】

よく知られているように、RNA は、グアニジニウムイソチオシアネート抽出や、遠心分離もしくはクロマトグラフィーによる析出法などの標準的な方法によって、オリジナルのハイブリドーマ細胞または、他の形質転換された細胞から単離することができる。望ましければ、mRNA は、オリゴ dT セルロース上のクロマトグラフィーなどの標準的な方法によって、全 RNA から単離することができる。好適な技術は、当該技術において公知である。

【0225】

ある態様において、結合分子の軽鎖および重鎖をコードする cDNA は、公知の方法にしたがって、逆トランスクリプターゼおよび DNA ポリメラーゼを用いて、同時に、あるいは別個に作製することができる。公開されている重鎖および軽鎖 DNA およびアミノ酸配列に基づいて、コンセンサス定常領域プライマーまたはより特異的なプライマーによって PCR を開始することができる。上記したように、結合分子軽鎖および重鎖をコードする cDNA クローンを単離するために PCR を使用することもできる。この場合、ライブラ

リーを、コンセンサスプライマーまたはより大きなホモログプローブ、例えば、マウス定常領域プローブによってスクリーニングしてもよい。

【0226】

DNA、典型的には、プラスミドDNAは、公知の方法を用いて細胞から単離してもよい。詳細を示した、標準的な公知の方法、例えば、組換えDNA技法に関連する上記引用文献中に示した方法にしたがって、制限マッピングおよび配列決定してもよい。もちろん、DNAは、単離プロセスまたは続く分析中のあらゆるポイントにおいて、本発明にしたがって合成してもよい。

【0227】

ある態様において、本発明の結合分子は、抗原の抗原結合フラグメントを含む、または、それによって構成される。用語「抗原-結合フラグメント」は、抗原に結合する、または、抗原が結合（すなわち、特異的結合）をする、未処理の抗体（すなわち、それらが由来する未処理の抗体）に競合するイムノグロブリンまたは抗体のポリペプチドフラグメントを表す。本明細書において用いられている用語、抗体分子の「フラグメント」は、抗体の抗原-結合フラグメント、例えば、抗体軽鎖（VL）、抗体重鎖（VH）、一本鎖抗体（scFv）、F(ab')₂フラグメント、Fabフラグメント、Fdフラグメント、Fvフラグメント、および単一ドメイン抗体フラグメント（DAb）を意味する。フラグメントは、例えば、未処理もしくは完全な抗体または抗体鎖の化学的もしくは酵素的処理を介して、または組換え手段によって、取得することができる。

【0228】

ある態様において、本発明の結合分子は、工学的処理が施された、または改変された抗体である。工学的に処理された形態の抗体の例としては、例えば、ミニボディー（ミニボディー（Minibodies））、ジアボディー（diabodies）、CH3分子に融合されたジアボディー（diabodies）、四価の抗体、イントラジアボディー（intradiabodies）（例えば、Jendreyko et al., 2003, J. Biol. Chem., 278:47813）、二重特異性抗体、融合タンパク質（例えば、抗体サイトカイン融合タンパク質）、または二重特異性抗体が挙げられる。他のイムノグロブリン（Ig）および特定の変形例を、例えば、米国特許第4,745,055号；欧州特許第256,654号；Faulkner et al., Nature 298:286（1982）；欧州特許第120,694号；欧州特許第125,023号；Morrison, J. Immunol. 123:793（1979）；Kohler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197（1980）；Raso et al., Cancer Res. 41:2073（1981）；Morrison et al., Ann. Rev. Immunol. 2:239（1984）；Morrison, Science 229:1202（1985）；Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851（1984）；欧州特許第255,694号；欧州特許第266,663号；ならびにPCT国際公開公報WO 88/03559に記載されている。再配列されたイムノグロブリン鎖も公知である。例えば、米国特許第4,444,878；PCT国際公開公報WO 88/03565；および欧州特許第68,763号および、そこに引用されている引例を参照されたい。

【0229】

ある態様において、本発明の改変された抗体は、ミニボディーである。ミニボディーは、それぞれScFv分子（1以上の抗原結合部位を含む単一ポリペプチド、例えば、柔軟なリンカーによってVHドメインとVLドメインが結合したVLドメインが結合ペプチドを介してCH3ドメインに融合している）をもつ2つのポリペプチド鎖からなる二量体分子である。

【0230】

ScFv分子は、VH-リンカー-VL配向定位、またはVL-リンカー-VH配向定位中に構築することができる。

【0231】

抗原結合部位を構成するVLドメインとVHドメインとを結合する柔軟なヒンジは、約10乃至約50のアミノ酸残基から構成されることが好ましい。この目的のための結合ペプチドの例としては、（Gly4Ser）₃（配列番号：17）（Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879）がある。他の結合ペプチドは、当該技術分野

において公知である。

【0232】

一本鎖抗体を作製する方法は、当該技術分野において公知である。例えば、Ho et al. 1989. Gene 77:51; Bird et al. 1988 Science 242:423; Pantoliano et al. 1991. Biochemistry 30:10117; Milenic et al. 1991. Cancer Research 51:6363; Takkinen et al. 1991. Protein Engineering 4:837を参照されたい。

【0233】

ミニボディーは、S c F v成分および結合ペプチドーC H 3成分を当該技術において記載されている方法を用いて構築することによって、作製することができる（例えば、米国特許第5, 837, 821号またはP C T国際公開公報W O 94 / 09817 A 1）。これらの成分は、分離したプラスミドから制限フラグメントとして単離し、ライゲーションし、適切なベクターに再度クローニングすることができる。適切なアセンブリーは、制限消化およびD N A配列分析によって確認することができる。

10

【0234】

ジアボディーは、s c F v分子に類似しているが、通常、Vドメイン間を結合し、同じポリペプチド鎖上のV LドメインおよびV Hドメインが相互作用しないようにする、短い（10未満、好ましくは1～5）のアミノ酸残基リンカーを有する。かわりに、一方のポリペプチド鎖のV LドメインおよびV Hドメインは、第2のポリペプチド鎖上のV HドメインおよびV Lドメイン（それぞれ）と相互作用する（P C T国際公開公報W O 02 / 02781）。ある態様において、本発明の結合分子は、少なくとも1つの重鎖部分に融合したジアボディーである。別の好ましい態様において、本発明の結合分子は、C H 3ドメインに融合したジアボディーである。

20

【0235】

他の形態の改変された抗体も、本発明の範囲に包含される（例えば、P C T国際公開公報W O 02 / 02781 A 1 ; 5, 959, 083 ; 6, 476, 198 B 1 ; 米国特許第2002 / 0103345 A 1号 ; P C T国際公開公報00 / 06605 ; Byrn et al. 1990. Nature. 344:667-70; ChamowとAshkenazi. 1996. Trends Biotechnol. 14:52）。

【0236】

ある態様において、本発明の結合分子は、イムノグロブリン定常領域を含む。定常領域がいくつかのエフェクター機能を媒介することは、当該技術分野において公知である。例えば、補体のC 1成分の結合分子への結合が補体系を活性化する。補体の活性化は、オプソニン処理、細胞病原体の溶解において重要である。補体の活性化はまた、炎症性の反応を刺激する。また、それは、自己免疫過敏症にも関与するかもしれない。さらに別の結合分子は、F c領域を介して細胞に結合する。結合分子F c領域上のF cレセプター部位は、細胞上のF cレセプター（F c R）に結合する。異なるクラスの結合分子に特異的ないくつかのF cレセプター、例えば、I g G（ガンマレセプター）、I g E（イプシロンレセプター）、I g A（アルファレセプター）およびI g M（ミューレセプター）が存在する。結合分子のF cレセプターへの細胞表面上での結合によって、結合分子をコーティングした粒子の貪食および破壊、免疫複合体の分解、結合分子をコーティングした標的細胞のキラー細胞による溶解（抗体依存性細胞媒介性細胞傷害性、もしくはA D C Cと呼ばれる）、炎症性の仲介物質の放出、経胎盤伝達およびイムノグロブリン産生のコントロールといった、いくつかの重要かつ多様な生物学的反応を引き起こす。

30

40

【0237】

ある態様において、エフェクター機能は、標的細胞を枯渇させることができないと考えられているI g G 4結合分子の定常領域を使用することによって、または、F c変形例を作製することによって、削除もしくは減少させることができる。エフェクター機能にとって重要なF c領域内の残基は、公知の技術（例えば、米国特許第5, 585, 097号）によって突然変異させることができる。例えば、定常領域ドメインの欠失もしくは不活化（点突然変異または別の手段による）は、循環する改変された結合分子のF cレセプター

50

結合を減少させ、それによって腫瘍の局在化を増加させる。その他の場合においては、それは、本発明と一致する定常領域改変によって、補体結合を和らげ、それによって、複合化したサイトトキシンの血清半減期および非特異的結合を減少させる。定常領域の他の変形例は、抗原特異性または結合分子の柔軟性の増加によって、局在化を増強させるジスルフィド結合または、オリゴ糖部分改変をするために用いることができる。より一般的には、当業者は、本明細書に記載のように改変された結合分子は、容易に理解することができるかもしれない、もしくはできないかもしれない、いくつかのサブセットの効果を発揮しうることを理解するであろう。しかしながら、得られた生理学のプロファイル、バイオアベイラビリティおよび他の生化学的作用（例えば、腫瘍の局在化、生体内分布および血清半減期）を容易に、免疫学的方法によって、過度な実験をすることなく、測定および定量化することができる。

10

【0238】

ある態様において、本発明の結合分子は、別の機能的分子に誘導体化または結合することができる（例えば、別のペプチドもしくはタンパク質）。したがって、本発明の結合分子は、誘導体化された、そうでなければ改変された形態の、本明細書に記載の抗GITR結合分子（イムノアドヘシン分子）を含む。例えば、本発明の結合分子は、機能的に、異常の他の分子部分、例えば、結合分子と他の分子（例えば、ストレプトアビジンコア領域もしくはポリヒスチジンタグ）の結合を媒介することができる、他の結合分子（例えば、二重特異性抗体もしくはジアボディー）、または、検出可能な作用物質、細胞傷害性物質、薬学的物質、および/または、タンパク質もしくはペプチドに結合（化学的結合、遺伝的融合、非共有結合もしくはその他）することができる。

20

【0239】

誘導体化された結合分子の1つのタイプは、2以上の結合分子（例えば、二重特異性抗体を作製するための同一タイプ、もしくは異なるタイプ）を架橋することによって作製することができる好適なクロスリンカーとしては、適切なスペーサー（例えば、*m*-マレイミドベンゾイル-*N*-ヒドロキシスクシンイミド）によって分離された2つのはっきりした反応グループをもつヘテロ二機能性、またはホモ二機能性（例えば、ジスクシンイミジルスベリン酸塩）をもつものが挙げられる。そのようなリンカーは、Pierce Chemical Company, Rockford, ILから入手可能である。

【0240】

それによって本発明の結合分子が誘導体化されうる有用な検出可能な物質は、蛍光化合物を含む。検出可能な蛍光物質の例としては、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、5-ジメチルアミン-1-ナフタレンスルホニルクロリド、フィコエリトリンなどが挙げられる。結合分子はまた、アルカリ性ホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼなどの検出可能な酵素によって誘導体化されうる。結合分子が、検出可能な酵素によって誘導体化される場合、それは、検出可能な反応産物を作製するために酵素を使用するさらなる試薬を添加することによって検出される。例えば、検出可能な物質、西洋ワサビペルオキシダーゼが存在する場合、過酸化水素およびジアミノベンジジンの添加によって、検出可能な着色された反応物が導かれる。結合分子はまた、ビオチンによって誘導体化することもでき、アビジンもしくはアビジン結合の間接的な測定によって測定することもできる。

30

40

IV. 結合分子の発現

【0241】

本発明の結合分子は、イムノグロブリン軽鎖および重鎖遺伝子の宿主細胞中での組換え発現によって調製することができる。結合分子を組換え的に発現させるために、宿主細胞を、結合分子のイムノグロブリン軽鎖および重鎖をコードして、軽鎖および重鎖を宿主細胞中で発現させるDNAフラグメントをもつ1以上の組換え発現ベクターでトランスフェクトする。好ましくは、宿主細胞を培養している培地であって、そこから結合分子を除去することができる培地中に分泌させる。標準的な組換えDNA方法を用いて、抗体重鎖および軽鎖遺伝子を取得し、これらの遺伝子を組換え発現ベクターに組み込み、該ベクター

50

を宿主細胞中に導入する。Sambrook, Fritsch and Maniatis (eds), Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989), Ausubel, F.M. et al. (eds.) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates, (1989) and in 米国特許第. 4,816,397 by Boss, et al.に記載されているように行う。

【0242】

本発明の結合分子を発現させるために、部分的もしくは全長軽鎖および重鎖をコードするDNAを発現ベクターに挿入して、その遺伝子が転写および翻訳調節配列に作用可能に連結するようにしてもよい。この文脈において、「作用可能に連結する」とは、結合分子遺伝子がベクターにライゲーションして、ベクター内の転写および翻訳調節配列が、結合分子遺伝子の転写および翻訳を調節するという、それらの意図された機能を発揮するようにすることを意味する。ある態様において、発現ベクターおよび発現調節配列は、用いられる発現宿主細胞と両立するように選択される。結合分子軽鎖遺伝子および結合分子重鎖遺伝子を、分離したベクターに挿入する。または、典型的には双方の遺伝子を同じ発現ベクターに挿入する。結合分子遺伝子を標準的な方法（例えば、結合分子遺伝子フラグメントおよびベクター上の相補的な制限部位のライゲーション、または、もし制限部位が存在しなければ、平滑末端ライゲーション）によって発現ベクターに挿入してもよい。結合分子の軽鎖または重鎖配列の挿入前に、発現ベクターは、結合分子定常領域配列を有してもよい。例えば、VHおよびVL配列を全長結合分子遺伝子に変換する1つのアプローチは、それらを、重鎖定常領域および軽鎖定常領域を既にコードしている発現ベクターにそれぞれ挿入して、VHセグメントをベクター内のCHセグメントに作用可能に連結し、VLセグメントをベクター内のCLセグメントに作用可能に連結することである。さらに、または別法として、組換え発現ベクターは、結合分子鎖の宿主細胞からの分泌を容易にするシグナルペプチドをコードすることができる。結合分子鎖遺伝子を該ベクターにクローニングし、シグナルペプチドがインフレームで結合分子鎖遺伝子のアミノ末端に結合するようにしてもよい。シグナルペプチドは、イムノグロブリンシグナルペプチドであってもよいし、または、異種のシグナルペプチド（すなわち、非イムノグロブリンタンパク質からのシグナルペプチド）であってもよい。

【0243】

結合分子鎖遺伝子に加えて、本発明の組換え発現ベクターは、宿主細胞中の結合分子鎖の発現を調節する調節配列を保有する。用語「調節配列」は、結合分子鎖遺伝子の転写または翻訳を調節するプロモーター、エンハンサーおよび他の発現調節エレメント（例えば、ポリアデニル化シグナル）を含む。そのような調節配列は、例えば、Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)に記載されている。当業者は、調節配列の選択を含めた発現ベクターのデザインが、形質転換されるべき宿主細胞、所望のタンパク質の発現レベルなどの因子によって決定されることを理解するであろう。哺乳動物宿主細胞の発現のための好ましい調節配列としては、哺乳動物細胞において高いレベルのタンパク質発現を導くウイルスエレメント、例えば、サイトメガロウイルス(CMV)（例えば、CMVプロモーター/エンハンサー）、サルウイルス40(SV40)（例えば、SV40プロモーター/エンハンサー）、アデノウイルス（例えば、アデノウイルスメジャーレートプロモーター(AdMLP)）、およびポリオーマ由来のプロモーターおよび/またはエンハンサーが挙げられる。ウイルス調節エレメントについてのさらなる詳細、およびその配列については、例えば、米国特許第5,168,062号(Stinskiによる)、米国特許第4,510,245号(Bell et al.による)および米国特許第4,968,615号(Schaffner, et al.による)を参照されたい。

【0244】

結合分子鎖遺伝子および調節配列に加えて、本発明の組換え発現ベクターは、さらなる配列、例えば、宿主細胞（例えば、複製のオリジン）および選択可能なマーカー遺伝子中のベクターの複製を調節する配列を保有してもよい。該選択可能なマーカー遺伝子は、ベ

クターが導入された宿主細胞の選択を容易にする（例えば、米国特許第4,399,216号、第4,634,665号および第5,179,017（全てAxel et al.）を参照されたい）。例えば、典型的に、該選択可能なマーカー遺伝子は、G418、ハイグロマイシンもしくはメトトレキサートなどの薬剤に対する耐性をベクターが導入された宿主細胞に付与する。好ましい選択可能なマーカー遺伝子としては、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（DHFR）遺伝子（dhfr^r宿主細胞に用いられる。メトトレキサート選択／増幅をもつ）や、ネオ遺伝子（G418選択）などがある。

【0245】

軽鎖および重鎖を発現させるために、結合分子重鎖および軽鎖をコードする発現ベクターを標準的な方法によって宿主細胞にトランスフェクトする。種々の形態の用語「トランスフェクション」は、外因性DNAを原核生物もしくは真核生物宿主細胞に導入する際に一般的に使用される広範囲の技法、例えば、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、DEAE-デキストラントランスフェクションなどを包含することが意図されている。本発明の結合分子を、原核生物または真核生物宿主細胞のいずれかにおいて発現させることができ、結合分子の真核生物細胞での発現、最も好ましくは哺乳動物宿主細胞での発現が最も好ましい。なぜなら、そのような真核生物細胞、特に哺乳動物細胞は、原核生物細胞よりも集合しやすく、適切に折り曲げられた、免疫学的に活性のある結合分子に分泌する可能性があるからである。

【0246】

一般的に、発現ベクターは、選択マーカー（例えば、アンピシリン耐性、ハイグロマイシン耐性、テトラサイクリン耐性、もしくはネオマイシン耐性）を含有して、所望のDNA配列を用いて形質転換した細胞を検出すること可能とする（例えば、Itakura et al., 米国特許第4,704,362号）。

【0247】

大腸菌（*E. coli*）は、本発明のポリヌクレオチド（例えば、DNA配列）をクローニングするために特に有用な1つの原核生物宿主である。使用するのに好適な他の微生物宿主としては、バシラス・サチリスなどの桿菌類、および他のエンテロバクテリアセエ、例えば、サルモネラ、セラチア、および種々のシュードモナス種が挙げられる。これらの原核生物宿主中に、発現ベクターを作製することもできる。それは、典型的には、宿主細胞（例えば、複製のオリジン）と適合性のある発現制御配列を含む。さらに、ラクトースプロモーター系、トリプトファン（trp）プロモーター系、ベクターラクタマーゼプロモーター系、またはファージラムダからのプロモーター系などの、あらゆる数の種々の公知のプロモーターが存在するであろう。該プロモーターは典型的に、オペレーター配列を任意に用いて発現を制御する。そしてそれは、転写および翻訳を開始し、完成させるためのリボソーム結合部位配列などを有する。

【0248】

酵母菌などの他の微生物も発現にとって有用である。サッカロミセスは、必要であれば、発現制御配列（例えば、プロモーター）、複製のオリジン、終止配列などをもつ好適なベクターをもつ好ましい酵母菌宿主である。典型的なプロモーターとしては、3-ホスホグリセリン酸キナーゼおよび他の糖分解酵素が挙げられる。誘導性の酵母菌プロモーターは、とりわけ、アルコールデヒドロゲナーゼからのプロモーター、イソチトクロームC、およびマルトースおよびガラクトースの利用に関与する酵素を含む。

【0249】

微生物の他に、哺乳動物組織細胞の培養もまた、本発明のポリペプチド（例えば、結合分子をコードするポリヌクレオチド）を発現および産生させるために使用してもよい。Winnacker, From Genes to Clones, VCH Publishers, N.Y., N.Y. (1987)を参照されたい。真核生物細胞が実際には好ましい。なぜなら、異種のタンパク質（例えば、未処理の結合分子）を分泌することが可能な、多くの好適な宿主細胞系列が当該技術分野において開発されており、CHO細胞系列、種々のCos細胞系列、HeLa細胞、骨髄腫細胞系列、または形質転換されたB細胞もしくはハイブリドーマなどがあるからである。好ましく

は、該細胞は、非ヒト細胞である。これらの細胞のための発現ベクターは、複製のオリジン、プロモーターおよびエンハンサーなどの発現制御配列、および、リボソーム結合部位、RNAスプライシング部位、ポリアデニル化部位、および転写終始配列といった必要なプロセッシング情報部位を含むことができる (Queen et al., Immunol. Rev. 89:49 (1986))。好ましい発現制御配列は、イムノグロブリン遺伝子、SV40、アデノウイルス、ウシパピローマウイルス、サイトメガロウイルスなどに由来するプロモーターである。Co et al., J. Immunol. 148:1149 (1992) を参照されたい。

【0250】

あるいは、結合分子コード配列は、トランスジェニック動物のゲノムに導入し、次いでトランスジェニック動物の乳において発現させるためのトランスジーンに組み込むことができる (例えば、Deboer et al., 米国特許第 5, 741, 957 号; Rosen, 米国特許第 5, 304, 489 号、および Meade et al., 米国特許第 5, 849, 992 号)。好適なトランスジーンは、乳腺特異的遺伝子、例えば、カゼインまたはベータラクログロブリンからのプロモーターやエンハンサーとの作用可能な連結におけるリガンドおよび/または重鎖のためのコード配列を含む。

【0251】

本発明の組換え結合分子を発現させるための好ましい哺乳動物宿主細胞としては、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO 細胞) (Urlaub と Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220 に記載されている dhfr-CHO 細胞を含む。R.J. Kaufman and P.A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621 に記載されているように DHFR 選択可能マーカーとともに用いられる)、NSO 骨髓腫細胞、COS 細胞および SP2 細胞が挙げられる。結合分子遺伝子をコードする組換え発現ベクターを哺乳動物宿主細胞に導入したとき、宿主細胞中の結合分子の発現、より好ましくは、宿主細胞が成長する培養培地への結合分子の分泌を可能にするのに十分な時間の間、宿主細胞を培養することによって、結合分子を作製する。結合分子は、標準的な精製方法を用いて培養培地から回収することができる。

【0252】

当該ポリヌクレオチド配列 (例えば、結合分子重鎖および軽鎖コード配列および発現制御配列) を含有するベクターを、細胞宿主のタイプにしたがって、公知の方法で宿主細胞に移入する。例えば、原核生物細胞には、通常塩酸カルシウムトランスフェクションが用いられ、一方、他の細胞宿主には、リン酸カルシウム処理、エレクトロポレーション、リポフェンブフェン、微粒子銃またはウイルスベクターのトランスフェクションを使用することができる (一般的に、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, 2nd ed., 1989 参照) (その全体を全ての目的のために引用によって援用する)。哺乳動物細胞を形質転換するために用いられる他の方法としては、ポリブレン、プロトプラスト融合、リボソーム、エレクトロポレーションおよびマイクロインジェクション (一般的に、Sambrook et al., 上掲文献参照)。トランスジェニック動物を作製するために、トランスジーンを受精卵にマイクロインジェクションすることができる。または、胚性幹細胞のゲノムに組み込み、そのような細胞の核を摘出された卵子に移植することができる。

【0253】

重鎖および軽鎖を別個の発現ベクターにクローニングし、該ベクターをコトランスフェクトし、発現させ、未反応のイムノグロブリンを回収する。一旦、発現すれば、全結合分子、それらの二量体、個別の軽鎖および重鎖、もしくは本発明の他のイムノグロブリン形態を、硫酸アンモニウム沈殿法、アフィニティーカラム、カラムクロマトグラフィー、HPLC 精製、ゲル電気泳動法などを含む当該技術分野における標準的な処置にしたがって精製する (一般的に、Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, N.Y., (1982))。少なくとも約 90~95% の相同性を示す、本質的に純粋な結合分子が好ましい。医薬品として使用するためには、相同性が 98~99% の相同性が最も好ましい。

【0254】

宿主細胞を用いて、F a bフラグメントまたはs c F v分子などといった未反応の結合分子部分を作製することもできる。上記処置に対する変形も本発明に包含されることが理解されよう。例えば、本発明の結合分子の軽鎖または重鎖（両方ではない）をコードするDNAを有する宿主細胞をトランスフェクトすることが望ましいかもしれない。組換えDNA技術を用いて、一部もしくは全ての、GITRに結合するために必要な軽鎖および重鎖のいずれかもしくは双方をコードするDNAを除去することもできる。そのような切断されたDNA分子から発現された分子も、本発明の結合分子の範囲に含まれる。さらに、二官能性結合分子を作製してもよい。そこでは、1つの重鎖および1つの軽鎖が本発明の結合分子となり、他の重鎖および軽鎖が本発明の結合分子を第2の結合分子に標準的な架橋方法によって架橋されることによって、GITR以外の抗原に特異性をもつ。

10

【0255】

上述に鑑み、本発明の別の局面は、本発明の結合分子の組換え発現に用いることができる核酸、ベクター、および宿主細胞組成物に関する。6C8軽鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を図18および配列番号10に示す。VLのCDR1ドメインは、配列番号：10（配列番号：14）のヌクレオチド130～162を含み、CDR2ドメインは、配列番号：10（配列番号：15）のヌクレオチド208～228を含み、CDR3ドメインは、配列番号：10（配列番号：16）のヌクレオチド325～351を含む。6C8重鎖可変領域をコードするヌクレオチド配列を図18および配列番号9に示す。VHのCDR1ドメインは、配列番号：9（配列番号：11）のヌクレオチド133～168を含み、CDR2ドメインは、配列番号：9（配列番号：12）のヌクレオチド211～258を含み、CDR3ドメインは、配列番号：9（配列番号：13）のヌクレオチド355～381を含む。ある態様において、VHのCDR2をコードするヌクレオチド配列は、配列番号：12を含む。別の態様において、VHのCDR2をコードするヌクレオチド配列は、配列番号：65（C A C A T T T G G T G G G A T G A T G A T A A G T A C T A T C A A C C A T C C C T G A A G A G C）を含む。6C8関連結合分子をコードするヌクレオチド配列は、ゲノムコードや標準的な分子生物学的手法を用いて、6C8VLおよびVHをコードするヌクレオチド配列から導出され得ることを当業者は理解するであろう。

20

【0256】

ある態様において、本発明は、6C8CDRを含む、例えば、配列番号：3、配列番号：4、配列番号19、配列番号：5、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、ポリペプチド配列をコードする単離された核酸分子を提供する。

30

【0257】

さらに別の態様において、本発明は、配列番号：2のアミノ酸配列からなる結合分子軽鎖可変領域をコードする単離された核酸分子を提供する。もっとも、遺伝子コードの縮重によって、他の核酸分子が配列番号：2のアミノ酸配列をコードしうることを当業者は理解するであろう。核酸分子は、VLのみ、またはVLに作用可能に連結した結合分子軽鎖定常領域をコードすることができる。ある態様において、この核酸分子は、組換え発現ベクター中に存在する。

40

【0258】

さらに別の態様において、本発明は、配列番号：1のアミノ酸配列からなる結合分子重鎖可変領域をコードする単離された核酸分子を提供する。もっとも、遺伝子コードの縮重によって、他の核酸分子が配列番号：1のアミノ酸配列をコードしうることを当業者は理解するであろう。別の態様において、本発明は、配列番号：66のアミノ酸配列からなる結合分子重鎖可変領域をコードする単離された核酸分子を提供する。もっとも、遺伝子コードの縮重によって、他の核酸分子が配列番号：66のアミノ酸配列をコードしうることを当業者は理解するであろう。核酸分子は、VHのみ、またはVHに作用可能に連結した結合分子軽鎖定常領域をコードすることもできる。例えば、該核酸分子は、IgG1もしくはIgG2定常領域を含むことができる。ある態様において、この核酸分子は、組換え

50

発現ベクター中に存在する。

【0259】

本発明はまた、結合分子重鎖および/または結合分子軽鎖をコードする、組換え発現ベクターを提供する。例えば、ある態様において、本発明は、組換え発現ベクターを提供する。それは、以下をコードする。

a) 配列番号2のアミノ酸配列を含む可変領域を有する結合分子軽鎖；および

b) 配列番号1のアミノ酸配列を含む可変領域を有する結合分子重鎖。

【0260】

別の態様において、本発明は、組換え発現ベクターを提供する。それは、以下をコードする。

a) 配列番号2のアミノ酸配列を含む可変領域を有する結合分子軽鎖；および

b) 配列番号66のアミノ酸配列を含む可変領域を有する結合分子重鎖。

【0261】

本発明は、本発明の1以上の組換え発現ベクターが導入された宿主細胞を提供する。このましくは、該宿主細胞は、哺乳動物宿主細胞である。

【0262】

さらに、本発明は、本発明の宿主細胞を好適な培養培地において、本発明の組換え結合分子が合成されるまで培養することによって、本発明の組換え結合分子を合成する方法を提供する。該方法はさらに当該培養培地から組換え結合分子を単離することを含む。

【0263】

V. 本発明の結合分子の使用

G I T Rに対して結合する能力があれば、本発明の結合分子は、G I T R（例えば、血清もしくは血漿などの生物学的サンプル中）を、従来のイムノアッセイ、例えば、酵素結合抗体免疫アッセイ（E L I S A）、ラジオイムノアッセイ（R I A）もしくは組織免疫組織化学的手法を用いて検出するために用いることができる。本発明は、生物学的サンプル中のh G I T Rを検出するための方法であって、生物学的サンプルを本発明の結合分子に接触させ、およびh G I T Rに結合した結合分子または未結合の結合分子のいずれかを検出し、それによって、生物学的サンプル中のh G I T Rを検出することを含む方法を提供する。該方法は、インビトロまたはインビボのいずれで行うこともできる。該結合分子は、検出可能な物質を用いて、直接的または間接的に標識し、結合した結合分子または未結合の結合分子の検出を容易にすることができる。好適な検出可能な物質としては、種々の酵素、補欠分子団、蛍光物質、発光性物質、および放射性物質が挙げられる。好適な酵素の例には、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、β-ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが含まれる。好適な補欠分子団の例には、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが含まれ、好適な蛍光物質の例には、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリドもしくはフィコエリトリンが含まれ、発光性物質の例にはルミノールが含まれる；好適な放射性物質の例には、¹²⁵I、¹³¹I、³⁵Sもしくは³Hが含まれる。

【0264】

結合分子の標識に替えて、h G I T Rは、検出可能な物質や未標識抗h G I T R結合分子で標識されたG I T R標準を用いた競合イムノアッセイによって生物学的液体中でアッセイすることができる。このアッセイにおいて、生物学的サンプル、標識されたG I T R標準、および抗h G I T R結合分子を組み合わせ、未標識の結合分子に結合した標識されたG I T R標準の量を測定する。生物学的サンプル中のh G I T Rの量は、抗h G I T R結合分子に結合した標識されたG I T R標準の量に反比例する。

【0265】

本発明の抗G I T R結合分子はまた、ヒト以外の種のサンプル中のG I T R、特に、霊長類（例えば、チンパンジー、ヒヒ、マーモセット、カニクイザルおよびアカゲザル）からのG I T Rを検出するために用いることもできる。

10

20

30

40

50

【0266】

別の態様において、本発明は、T調節細胞によるTエフェクター細胞の抑制を取り消す方法を提供する。T調節細胞によるTエフェクター細胞の抑制の取り消しは、例えば、結合分子が、T調節細胞の存在下で、T細胞のエフェクター機能、例えば、サイトカイン産生（例えば、IL-2産生）もしくは細胞増殖（例えば、Tヘルパー細胞増殖）を高める能力を測定することによって、例えば、³H-チミジン組み込みを測定することによって、またはFACS分析によって調べることができる。例えば、Tエフェクター細胞の反応または活性は、T調節細胞の存在下では低い、たとえ、T調節細胞が存在しても、GITR結合分子を添加すれば増加する。すなわち、GITR結合分子は、T調節細胞によるTエフェクター細胞の抑制を取り消す。

10

【0267】

本発明の結合分子はまた、細胞中のI-κBの分解を減衰するために用いてもよい。細胞中のI-κBの減衰された分解は、例えば、ウエスタンブロッティングによって、そして抗GITR結合分子で細胞を処理した後にI-κBの量を定量することによって調べることができる。

【0268】

数多くの疾患または病理的状態が、Tエフェクター細胞の活性を高めること、および/またはT調節細胞の活性を下方調整することによって、例えば、T調節細胞によるTエフェクター細胞の抑制を取り消すことによって恩恵を受けるであろう。例えば、免疫エフェクター細胞は、しばしば癌細胞に効率的に反応できない。したがって、エフェクターT細胞または抗体反応を高めることが好ましい場合、本発明の方法を用いてそのような疾患に罹患した被験体を治療することができる。ある態様において、そのような方法では、患者に対して本発明の結合分子を投与して、その結果、T調節細胞によるTエフェクター細胞の抑制を取り消し、それによって免疫応答を高めている。好ましくは、該被験体は、ヒト被験体である。あるいは、該被験体は、本発明の結合分子がクロス反応するGITRを発現する哺乳動物であることができる。さらに、該被験体は、GITRが導入された哺乳動物である（例えば、GITRの投与による、もしくは、GITRトランスジーンが発現による）。本発明の結合分子は、治療または予防的目的のためにヒト被験体に投与することができる。例えば、該被験体は、疾患または状態に罹患していると診断されている被験体であってもよいし、またはその疾患にかかりやすい、それに対する感受性が高い被験体であってもよい。さらに、本発明の結合分子は、獣医学目的のために結合分子が架橋反応するGITR分子を発現する非ヒト哺乳動物（例えば、霊長類）または、ヒト疾患の動物モデルに投与してもよい。後者に関しては、そのような動物モデルは、本発明の結合分子の治療的および/または予防的有効性を評価する（例えば、投与量および/または投与時間を調べる）ために有用である。

20

30

【0269】

本発明の結合分子の使用例を以下においてさらに説明する。

【0270】

免疫促進性組成物

添付の実施例に記載しているように、本発明の結合分子は、免疫促進性組成物（またはワクチン）として、例えば、抗原と組み合わせて使用して、対象となる抗原（例えば、被験体におけるタンパク質抗原）に対する免疫応答を促進させるために使用することができる。すなわち、本発明の結合分子は、免疫応答を高めるためのアジュバントとして機能することができる。例えば、対象となる抗原に対する抗体または細胞免疫応答を刺激するために（例えば、ワクチン接種の目的）、本発明の抗原および結合分子を併用して投与する（例えば、同じもしくは別個の組成物で同時に併用投与する、または連続的に併用投与する）ことができ、その結果、免疫応答が上昇する。対象となる抗原および結合分子はいっしょに、単一の医薬組成物として製剤することもできるし、または別個の組成物として製剤することもできる。ある態様において、対象となる抗原および結合分子を被験体に同時に投与する。別法として、いくつかの状況においては、まず抗原を投与し、その後結合分

40

50

子を投与する、またはその逆が望ましいかもしれない（例えば、反応を引き起こすためにまず抗原のみを投与し、その後結合分子を癌毒もしくは抗原の追加免疫とともに、投与することが好ましいかもしれない）。好ましい態様において、本発明の G I T R 結合分子を、抗原によるプライミングと同時に、すなわち、最初の抗原投与と同時に、例えば、-3、-2、-1、0、+1、+2、+3 日目に投与する。本発明の G I T R 結合分子の特に好ましい投与日は、抗原投与の前日である。

【0271】

対象となる抗原としては、例えば、被験体を攻撃感染から保護する、抗原がそこから誘発される、もしくは被験体にとって有益な方法で腫瘍成長および転移に影響を与えることが可能な感染性因子によって保護することを提供する抗原が挙げられる。対象となる抗原の例としては、感染物質、癌細胞に由来するものなどがある。そこでは、抗原に向けられた直接的な免疫応答は、その物質によって引き起こされた疾患を予防または治療するために働く。そのような抗原は、限定されないが、ウイルス、細菌、真菌、もしくは寄生タンパク質、糖タンパク質、リポタンパク質、糖脂質などを含む。対象となる抗原はまた、腫瘍を持つリスクがある、または腫瘍があると診断された被験体にとって利益をもたらし、また、例えば、腫瘍細胞のレベルが向上したときに排他的に発現される腫瘍関連抗原を含む。該被験体は、好ましくは哺乳動物であり、最も好ましくはヒトである。

【0272】

本明細書において用いられている用語「病原体」または「病原性物質」は、正常な宿主（例えば、動物（例えば、哺乳動物、好ましくは霊長類、例えば、ヒト））に感染し得る、もしくは寄生し得る微生物を含む。本明細書において用いられているように、この用語は、日和見的物質、例えば、異常な宿主、例えば、治療の結果、正常叢が取ってかわった宿主、または免疫無防備状態の宿主に感染し得る、もしくは寄生し得る微生物を含む。本明細書において用いられているように、この語はまた、その複製が被験体において望ましくない微生物または微生物によって作成された毒性分子（例えば、トキシン）を含む。

【0273】

非限定的なウイルス抗原の例としては、限定されないが、インフルエンザウイルスの核タンパク質（NP）および HIV の Gag タンパク質が含まれる。他の異種抗原としては、限定されないが、HIV Env タンパク質もしくはその成分部分 gp120 および gp41、HIV Nef タンパク質、および HIV Pol タンパク質、逆トランスクリプターゼ およびプロテアーゼが挙げられる。さらに、エボラウイルス（EBOV）抗原などの他のウイルス抗原（例えば、EBOV NP もしくは糖タンパク質（GP）、全長または分子のムチン領域において欠失している GP（Yang Z-Y, et al. (2000) Nat Med 6:886-9, 2000）、小痘抗原、A、B もしくは C 型肝炎ウイルス、タイプ 2 もしくは 14 などのヒトライノウイルス、単純ヘルペスウイルス、ポリオウイルスタイプ 2 もしくは 3、手足口病ウイルス（FMDV）、狂犬病ウイルス、ロタウイルス、インフルエンザウイルス、コクサッキーウイルス、ヒトパピローマウイルス（HPV）、例えば、タイプ 16 パピローマウイルス、その E7 タンパク質および E7 タンパク質もしくはそのエピトープを含有するフラグメント；およびサル免疫不全症ウイルス（SIV）を用いることができる。真菌抗原、細菌抗原および腫瘍抗原が開示されている組成物および方法に関連して用いることができるように、対象となる抗原はウイルスオリジンの抗原に限られない。寄生虫抗原、例えば、マラリア抗原が含まれる。細菌抗原の限定されない例としては、ボルデテラペルツシス（例えば、P69 タンパク質および糸状菌ヘムアグルチニン（FHA）抗原）、ビブリオコレラ、炭疽菌、および大腸菌熱易動性トキシン B サブユニット（LT-B）、大腸菌、大腸菌 K88 抗原および毒素原性大腸菌抗原などの大腸菌抗原がある。他の抗原の例としては、マンソン住血吸虫 P28 グルタチオン S-トランスフェラーゼ抗原（P28 抗原）および吸虫、マイコプラズマ、回虫、条虫類、クラミジアートラコマチスおよびマラリア原虫、例えば、マラリア原虫属もしくはバベシア属の寄生虫、例えば、熱帯熱マラリア、ならびにおよび上記抗原からの免疫原性エピトープをコードするペ

10

20

30

40

50

ブチドの抗原が含まれる。

【0274】

本発明のワクチンを投与することによって治療される、または予防されるかもしれない感染、疾患または障害としては、宿主免疫応答が感染、疾患または障害を予防するように機能する、あらゆる感染、疾患または障害が含まれる。本発明の免疫促進性の組成物を投与することによって治療される、または予防されるかもしれない感染、疾患または障害としては、限定されないが、真菌、寄生虫、ウイルスもしくは細菌によって引き起こされる、もしくはそれに関連するあらゆる感染、疾患または障害、バイオテロリズム、リステリア症、エボラウイルス、SARS、小痘、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、E型肝炎、ヒトライノウイルスによって引き起こされる疾患および障害、HIV（例えば、HIV-1およびHIV-2）、ならびにエイズ、ヘルペス、ポリオ、手足口病、狂犬病、ロタウイルス、インフルエンザ、コクサッキーウイルス、ヒトパピローマウイルス、SIV、マラリア、癌、例えば、腫瘍、ヒトヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス（特に、ヒト）、エプスタイン・バーウイルス、水痘-帯状疱疹ウイルス、B型肝炎、A型肝炎、C型肝炎などの肝炎ウイルス、パラミキソウイルス：呼吸系発疹ウイルス、パラインフルエンザウイルス、麻疹ウイルス、おたふくかぜウイルス、ヒトパピローマウイルス（例えば、HPV6、11、16、18など）、フラビウイルス群（例えば、黄熱病ウイルス、デング熱ウイルス、ダニ媒介脳炎ウイルス、日本脳炎ウイルス）、またはインフルエンザウイルス、例えば、インフルエンザA（例えば、サブタイプ、赤血球凝集素（H）およびノイラミニダーゼ（N））、インフルエンザB、およびインフルエンザCによって引き起こされる、もしくはそれに関連する疾患または障害、ならびにグラム陽性菌およびグラム陽性菌を含む細菌性微生物による感染による疾患または障害に用いられる種々の物質によって引き起こされる、もしくはそれに関連するあらゆる感染、疾患または障害、が含まれる。例としては、限定されないが、N. ゴノレエおよびN. メニンジティディスを含むナイセリア種；肺炎連鎖球菌、S. ピオゲネス、S. アガラクティエ、S. ミュータンスを含む連鎖球菌；H. インフルエンザタイプB、タイプに分けられないH、インフルエンザ、H. デュクレイ（ducreyi）を含むヘモフィルス種；ブランハメラカタラーリスとしても知られるM. カタラーリスを含むモラクセラ種；B. ペルツシス、B. パラペルツシスおよびB. ブロンキセプチカを含むボルデテラ種；M. ツベルクローシス、M. ボビス、M. レプレ、M. アビウム、パラ結核菌、M. スメグマチスを含むマイコバクテリウム種；L. ニューモフィラを含むレジオネラ種；エンテロトキシン産生大腸菌、腸管出血性大腸菌、腸管病原性大腸菌を含むエシェリキア種；V. コレラを含むビブリオ種；ソネ赤痢菌、志賀赤痢菌、フレクスナー赤痢菌を含む赤痢菌種；Y. エンテロコリチカ、Y. ペスティス、Y. シュードツベルクローシスを含むエルシニア種；C. ジェジュニおよびC. コリを含むカンピロバクター種；S. チフィ、S. パラチフィ、S. コレレスイス、S. エンテリティディスを含むサルモネラ種；L. モノサイトゲネスを含むリステリア種；H. ピロリを含むヘリコバクター種；P. アエルギノーズを含むシュードモナス種；S. アウレウス、S. エピデルミディスを含むブドウ球菌種；E. フェカーリス、E. フェシウムを含む腸球菌種；C. テタニ、C. ボツリナム、C. ディフィシレを含むクロストリジウム種；炭疽菌を含むバチルス種；C. ジフセリエを含むコリネバクテリウム種；B. ブルグドルフェリ、B. ガリニ、B. アフゼリ、B. アンデルソニ（andersonii）、B. ヘルムシーを含むボレリア種；E. エキ（equi）およびヒト顆粒球性エールリッチオシス（Ehrlichiosis）の物質を含むエールリッチア種；R. リケッチイを含むリケッチア種；C. トラコマチス、C. ニューモニエ、C. シッタシを含むクラミジア種；L. インタロガンスを含むレプトスピラ；T. パリダム、T. デンティコラ、T. ビオディセンテリエを含むトレポネーマ種、が含まれる。好ましい細菌としては、限定されないが、リステリア、マイコバクテリア、マイコバクテリア（例えば、結核菌）、炭疽菌、サルモネラ菌およびリステリアモノサイトジーン、百日咳菌、ビブリオコレラ、吸虫類、マイコプラズマ、回虫、条虫、トラコーマ病原体、およびマラリア寄生虫が挙げられる。

【0275】

10

20

30

40

50

本明細書において用いられている用語「細菌感染」は、種々による感染が含まれる（注：原文どおり）。別の態様において、T細胞を患者から除去し、インビトロで抗GITR結合分子、任意に活性化シグナル（例えば、抗原プラスAPCもしくはポリクローナル抗体）と接触させることができ、患者に再度導入することができる。

【0276】

制御T細胞は、自己免疫疾患および癌に対する免疫応答を抑制することによって免疫学的自己耐性において重要な役割を果たす。したがって、ある態様において、T調節細胞によるTエフェクター細胞の抑制を取り消すことは、癌における免疫応答を高める上で有益であるだろう。したがって、本発明の結合分子は、悪性腫瘍の治療に使用し、腫瘍の成長や転位を阻止することができる。該結合分子は、全身に投与することもできるし、または腫瘍部位に局所的に投与することもできる。

10

【0277】

ある態様において、GITR機能の調節は、腫瘍免疫化を誘発する際に、すなわち、新生物疾患または癌を持つ被験者の治療に有用であるかもしれない。ある態様において、本発明の結合分子は、腫瘍のサイズを減少させ、腫瘍の成長を阻止し、および/または腫瘍を保有する被験体の生存時間を長引かせる。GITR結合分子を、腫瘍細胞（例えば、サルコーマ、メラノーマ、リンパ腫、白血病、神経芽細胞腫、カルシノーマ）を持つ患者に投与し、被験体における腫瘍特異性耐性を克服することができる。

【0278】

本明細書において用いられているように「腫瘍関連抗原」という用語は、ホスト生物において腫瘍の成長もしくは転移に影響を及ぼす抗原を意味する。腫瘍関連抗原は、腫瘍細胞によって発現される抗原であってもよいし、非腫瘍細胞によって発現する抗原であってもよい。しかし、発現する際、腫瘍細胞の成長または転移を促進するものである。腫瘍抗原のタイプおよび腫瘍関連抗原は、あらゆる公知の、もしくはこれまで知られていなかった腫瘍抗原を含み、限定されないが、白血病中およびHPV E6のbcra抗原、子宮頸癌に関連する発癌性ウイルスのE7抗原、メラノーマ中のもしくは、それに関連するMAGE1抗原およびM2-E抗原、ならびに乳癌中の、もしくはそれに関連するMVC-1抗原およびHER-2抗原がある。

20

【0279】

本明細書において用いられている用語「新生物性疾患」は、悪性腫瘍の成長または、良性の過剰増殖および過形成性細胞を特徴とする疾患状態によって特徴付けられる。用語「新形成」の共通の医学的意味は、正常の成長コントロールを失った結果生じる「新しい細胞の成長」である。例えば、新生物性細胞成長である。

30

【0280】

本明細書において用いられている用語「過剰増殖」、「過形成性」、「悪性の」および「新生物性」は、互換可能に用いられ、急速な増殖もしくは新組織形成を特徴とする異常な状態または条件の細胞を意味する。この用語は、組織病理学的タイプまたは侵襲性の程度に関わらず、全てのタイプの過剰増殖成長、過形成性成長、癌性成長、または発癌性プロセス、転移性もしくは悪性に形質転換された細胞、組織、もしくは臓器を意味する。「過形成」は、異常に高速に成長する細胞を意味する。しかしながら、本明細書において用いられているように、用語、新形成および過形成は、本明細書において明らかであるように、互換可能に用いることができ、一般的に異常な細胞成速度での細胞発現を意味する。新形成および過形成は、良性、準悪性、もしくは悪性の「腫瘍」を含む。

40

【0281】

「新形成」、「過形成」および「腫瘍」は、一般に「癌」を意味し、制御不能な、異常な細胞成長を特徴とする100を超える疾患の一般名称である。癌の例としては、限定されないが、乳癌、大腸癌、非小細胞肺癌、頭部および頸部の癌、結腸直腸癌、肺癌、前立腺癌、卵巣癌、腎臓癌、メラノーマ、および胃腸癌（例えば、膵臓癌および胃癌）、ならびに骨原性サルコーマが挙げられる。

【0282】

50

ある態様において、癌は、膵臓癌、メラノーマ、乳癌、肺癌、気管支癌、結直腸癌、前立腺癌、胃癌、卵巣癌、膀胱癌、脳または中枢神経系癌、末梢神経系の癌、食道癌、子宮頸癌、子宮癌または子宮体癌、口腔または咽頭の癌、肝臓癌、腎臓癌、睾丸の癌、胆道癌、小腸または虫垂の癌、唾液腺の癌、甲状腺癌、副腎癌、骨肉腫、軟骨肉腫、血液学的組織の癌からなる群から選択される。

【0283】

したがって、本発明は、被験体、好ましくはヒト、または他の動物において、そのような被験体や動物に有効量の本発明の結合分子を投与することによって、新生物性疾患もしくは癌を治療する方法にも関する。当業者は、ルーチンの実験によって、新生物性疾患もしくは癌を治療する目的でどの有効量のポリペプチドを投与するかを決定することができる。例えば、本発明の結合分子の治療的有效量は、被験体の疾患状態（例えば、ステージ I 対ステージ IV）、年齢、性別、医学的合併症（例えば、免疫抑制条件や疾患）および体重や、その被験体において所望の応答を惹起する上での結合分子の能力に応じて変わるであろう。投薬計画を、最適な治療的および／または予防的応答が得られるように調節することができる。例えば、複数回に分けた用量を毎日投与することも、あるいは、治療状況の緊急性が指示されている場合には、用量を比例的に減少させることもできる。しかしながら、一般的に、有効な投与量は、体重 1 キログラムあたり、1 日約 0.05～100 ミリグラム、および、より好ましくは、体重 1 キログラムあたり、1 日約 0.5～10 ミリグラムである。

【0284】

免疫応答を高める方法

当該結合分子は、免疫応答を高める方法にも使用することができる。免疫応答のアップレギュレーションは、存在する免疫応答を高める、もしくは最初の免疫応答を惹起するのいずれの形態であってもよい。例えば、GITR の調節によって免疫応答を高めることは、ウイルス性感染症の場合に有用であるかもしれない。抗 GITR 結合分子は、免疫応答を高めるように作用するので、それらは、より急速もしくはより徹底的な病原性物質（例えば、細菌およびウイルス）の排除が有益な場合に、治療的に有用である。したがって、本発明の抗 GITR 結合分子は、単独または抗原もしくは免疫促進性の物質との組み合わせのいずれかにおいて、治療的に用いて、感染症や悪性腫瘍などの疾患や状態（例えば、上記参照）をもつ被験体を治療することができる。

【0285】

抗 GITR 結合分子は、種所の病原体において予防的に用いることもできる。病原体、例えば、ウイルスに対する免疫は、GITR 結合分子（上記のように）とともにウイルス性タンパク質を接種することによって誘発され得る。あるいは、病原性抗原および GITR 結合分子の双方のための遺伝子をコードする発現ベクター、例えば、ウイルスタンパク質をコードする核酸および GITR 結合分子をコードする核酸を発現するように工学処理されたワクシニアウイルス発現ベクターを用いてワクチン接種することができる。ワクチンが有用な病原体としては、例えば、B 型肝炎、C 型肝炎、エプスタイン・バーウイルス、サイトメガロウイルス、HIV-1、HIV-2、インフルエンザ、結核、マラリアおよび住血吸虫症が挙げられる。

【0286】

本発明はさらに、本発明の結合分子を動物、好ましくは哺乳動物、特に好ましくはヒト患者に投与して、開示された疾患、障害もしくは状態の 1 以上を治療、検出および／または予防することを含む、結合分子をベースとした治療を目的とする。本発明の治療的化合物としては、限定されないが、本発明の結合分子（本明細書に記載されているように、そのアナログおよび誘導体を含む）および本明細書に記載されているように抗イディオタイプ結合分子が含まれる。本発明の結合分子は、限定されないが、本明細書に記載のいずれか 1 以上の疾患、障害もしくは状態（例えば、本発明の結合分子は、当該技術分野において公知であるように、または本明細書に記載しているように、薬学的に許容される組成物の形態で提供することができる）を含む GITR の異常な活性に関連する疾患、障害もし

くは状態を治療、診断、阻害、もしくは予防するために使用することができる。

【0287】

本発明の結合分子は、結合分子と相互作用して、例えば、これらは結合分エフェクター細胞の数もしくは活性を増加させる働きをする、他のモノクローナルもしくはキメラ結合分子と組み合わせ、または、リンフォカインもしくは造血成長因子（例えば、IL-2、IL-3およびIL-7）と組み合わせ好都合に使用することができる。

【0288】

本発明の結合分子は、単独または他のタイプの治療、例えば、放射線療法、化学療法、ホルモン療法、免疫療法、および抗腫瘍薬、抗生物質、病原性物質に対する直接的な治療（例えば、免疫療法またはウイルス病原体もしくは細菌性抗原に対して有効な化学療法）および免疫促進性の物質と組み合わせ投与することができる。本発明の結合分子は、免疫応答を高めることが望ましい抗原、例えば、ワクチンもしくは病原性物質からの抗原（または弱毒化ウイルスもしくは細菌）もしくは上記のような狩猟からの抗原と組み合わせ投与することもできる。ある態様において、本発明の結合分子は、単独または併用療法で感染症に罹患した被験体に投与される。別の態様において、本発明の結合分子は、単独または併用療法で慢性のウイルス性感染症に罹患した被験体に投与される。さらに別の態様において、本発明の結合分子は、単独または併用療法で癌に罹患した被験体に投与される。

【0289】

通常、患者と同じ種に由来する結合分子を調製する。したがって、別の好ましい態様において、ヒト結合分子、誘導體、アナログ、もしくは核酸を治療または予防の目的のために、ヒト患者に投与する。

【0290】

VI. 医薬組成物

本発明の結合分子は、被験体へ好適に投与される医薬組成物に組み込む。典型的に、医薬組成物は、本発明の結合分子 および薬学的に許容される担体を含む。本明細書において用いられている用語「薬学的に許容される担体」には、薬学的投与に適合する、溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗カビ剤、等張剤および吸収遅延剤等が含まれる。薬学的に活性な物質のためのこのような媒質および薬剤の使用は、当業で公知である。従来の媒質または薬剤が当該活性化合物に対して不適合でない限り、治療用組成物中へのその使用は考慮される。補助的な活性化合物も本組成物中に取り入れることができる。

【0291】

本発明の医薬組成物は、それに意図された投与経路と適合性があるように調合される。投与経路の例には、非経口、例えば、静脈内、皮内、皮下、経口（例えば吸入）、経皮（局所）、経粘膜、および直腸投与がある。非経口、皮内、または皮下投与に用いられる溶液または懸濁液には、以下の成分を含めることができる：無菌の希釈剤、例えば注射用の水、生理食塩水、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたは他の合成溶媒；抗菌剤、例えばベンジルアルコールまたはメチルパラベン；抗酸化剤、例えばアスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウム；キレート剤、例えばエチレンジアミン四酢酸；緩衝剤、例えば酢酸、クエン酸またはリン酸並びに塩化ナトリウムまたはデキストロースなど、張性の調節用の薬剤。pHは、塩酸または水酸化ナトリウムなどの酸または塩基で調節することができる。非経口用製剤は、ガラス製またはプラスチック製のアンプル、使い捨て用シリンジまたはマルチプルバイアルに封入することができる。

【0292】

注射による使用に適した医薬組成物には、無菌の水溶液（水溶性の場合）または分散液、および、無菌の注射用溶液または分散液の即時調製用の無菌粉末、がある。静脈内投与の場合、適した担体には、生理食塩水、静菌水、Cremophor EL（登録商標）（BASF, Parsippany, NJ）またはリン酸緩衝生理食塩水（PBS）、がある。いずれの場合も、当該組成物は無菌でなくてはならず、注射筒への注入が容易な程度に流動性でなくてはならない。

それは製造および保管条件下で安定でなくてはならず、細菌および真菌などの微生物の汚染作用から保護されていなければならない。当該担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えばグリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）、およびこれらの適した混合物を含有する溶媒または分散媒であってよい。適正な流動性は、例えばレシチンなどのコーティングを用いたり、分散液の場合には必要な粒子サイズを維持したり、界面活性剤を用いるなどして、維持することができる。微生物の活動を防止するには、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサル等の多様な抗菌剤および抗カビ剤により、達成することができる。多くの場合、例えば糖類、マンニトールなどのポリアルコール、ソルビトール、および塩化ナトリウムなどの等張剤を組成物中に含めることが好ましい。注射用組成物の吸収を長引かせるには、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンなど、吸収を遅らせる薬剤を組成物中に含めることで、可能である。

10

【0293】

無菌の注射用溶液は、必要量の活性化合物を適した溶媒に、必要に応じて上に列挙した成分の1つまたは組み合わせと一緒に加えた後、滅菌濾過を行うことにより、調製できる。分散液は一般的には、塩基性の分散媒と、上に列挙したものの中で必要な他の成分とを含有する無菌の賦形剤に当該活性化合物を加えることで、調製されている。無菌の注射用溶液の調製用の無菌粉末の場合、好ましい調製法は真空乾燥および凍結乾燥であり、その結果、活性成分および付加的な所望の成分の粉末が、予め殺菌濾過されたその溶液から生じる。

20

【0294】

経口用組成物は一般に、不活性の希釈剤および食用の担体を含む。これらをゼラチン・カプセルに封入することも、または圧縮して錠剤にすることもできる。経口による治療的投与の場合、活性化合物を医薬品添加物と一緒に取り入れ、錠剤、トローチ、またはカプセルの形で用いることができる。経口用組成物は、さらに、口内洗浄剤として用いる流動性の担体を用いて調製することができ、この場合、この流動性の担体中の化合物は経口利用され、さっと口に入れて喀出されるか、または飲み込まれる。薬学的に適合性ある結合剤、および／または、アジュバント物質を、組成物の一部として含めることができる。錠剤、丸剤、カプセル、トローチ等は以下の成分、または同様の性質の化合物のいずれかを含有することができる：微結晶セルロース、トラガカントゴムまたはゼラチンなどの結合剤；でんぷんまたはラクトースなどの医薬品添加物、アルギン酸、プリモゲル（Primogel）、またはコーンスターチなどの崩壊剤；ステアリン酸マグネシウムまたはステロテス（Sterotes）などの潤滑剤；コロイド状二酸化珪素などのグリダント（glidant）；ショ糖またはサッカリンなどの甘味料；または、ペパーミント、サリチル酸メチル、またはオレンジ着香料などの着香料。

30

【0295】

吸入による投与の場合、当該化合物を、二酸化炭素などのガスなど、適した推進剤を含有する加圧された容器またはディスペンサや、またはネブライザからのエロゾル・スプレーの形で送達する。

【0296】

全身投与はまた、経粘膜または経皮手段によってもよい。経粘膜または経皮投与の場合、透過させようとする障壁に適した浸透剤を製剤中に用いる。このような浸透剤は一般に当業で公知であるが、その中には、例えば、経粘膜投与用の場合、界面活性剤、胆汁酸塩、およびフシジン酸誘導体、がある。経粘膜投与は、鼻孔用スプレーまたは座薬の使用を通じて行うことができる。経皮投与の場合、当該活性化合物を、当業で一般的に知られているように、軟膏、軟膏剤、ゲル、またはクリームに調合する。

40

【0297】

本化合物を、座薬（例えばココアバターおよび他のグリセリドなどの従来の座薬用基剤を用いる）の形で調製することも、または、直腸送達用の停留浣腸剤の形で調製することもできる。

50

【0298】

ある態様において、本発明の結合分子を、インプラントおよびマイクロ封入送達系を含め、徐放性製剤など、身体から当該化合物が急速に失われないように保護するであろう担体と一緒に調製する。エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸など、生分解性で生体適合性あるポリマーを用いることができる。このような製剤の調製方法は、当業者には明白なはずである。当該材料は、Alza CorporationおよびNova Pharmaceuticals, Inc.社から市販のものも得ることができる。リポソーム性懸濁液は、薬学的に許容される担体として用いることもできる。これらは、例えば米国特許第4,522,811号で記載されているように、当業者に公知の方法に従って調製することができる。

10

【0299】

投与の容易さおよび投薬量の均一性のためには、経口または非経口用組成物を単位剤形で調合することが特に有利である。ここで用いる単位剤形とは、治療しようとする被験体にとって単位となる投薬量に適した、物理的に別個の単位を言う。各単位は、必要な医薬品担体との関連から所望の治療効果を生ずるよう計算された所定量の活性化合物を含有する。本発明の単位剤形の詳細は、活性化合物の固有の特徴、および、達成しようとする特定の治療効果、およびこのような活性化合物を、個体の治療に向けて配合する技術に内在する限界、によって決定され、またこれらに直接依存する。

【0300】

このような化合物の毒性および治療上の有効性は、例えばLD50（集団の50%にとって致命的な用量）およびED50（集団の50%において治療上有効な用量）を決定するためなど、細胞培養または実験動物での標準的薬学的手法により、判定することができる。毒性効果および治療効果の間の用量比が治療指数であり、それを比LD50/ED50で表すことができる。大きな治療指数を示す化合物が好ましい。毒性の副作用を示す化合物を用いることも可能であるが、非感染細胞への潜在的損傷を最小限にし、ひいては副作用を減らすために、罹患組織の部位をこのような化合物が標的とする送達系をデザインするように注意せねばならない。

20

【0301】

細胞培養アッセイおよび動物研究から得られたデータを、ヒトでの使用に向けた一定の範囲の投薬量を処方する上で用いることができる。このような化合物の投薬量は、好ましくは、毒性が少ないか、または全くない、ED50を含むような範囲内であることが好ましい。投薬量は、用いる剤形および利用する投与経路に応じて、この範囲内で様々であってよい。本発明の方法で用いられるいずれの化合物についても、治療上の有効量は、細胞培養アッセイからまず、推定することができる。用量を動物モデルで調合して、細胞培養で判定されたIC50（即ち、症状の半分から最大の障害を達成する検査化合物の濃度）を含むような循環血漿濃度範囲を達成することができる。このような情報は、ヒトで有用な用量をより精確に決定するために用いることができる。血漿中のレベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィーにより、測定することができる。

30

【0302】

本医薬組成物を、投与に関する指示と一緒に容器、バック、またはディスペンサ内に含めることができる。

40

【0303】

VII. 本発明の結合分子の投与

本発明の結合分子は、インビボまたはインビトロでの医薬投与に適した生物学的に適合性ある形で被験体に投与される。「生物学的に適合性ある形」とは、毒性の効果が、当該作用薬の治療効果よりも小さいような作用薬の形を意味する。

【0304】

ある態様において、当該組成物を被験体に投与する。本発明の治療用組成物の治療的有效量の投与とは、所望の結果を達成するために必要な投薬量および期間で有効である量と、定義される。例えば、結合分子の治療的有效量は、個体の疾患状態、年齢、性別、およ

50

び体重や、その個体において所望の応答を惹起する上での結合分子の能力といった要因に応じて変わるであろう。投薬計画を、最適な治療上の応答が得られるように調節することができる。例えば、複数回に分けた用量を毎日投与することもできるし、あるいは、治療状況の緊急性が指示されている場合には、用量を比例的に減少させることもできる。

【0305】

本発明の医薬組成物は、「治療的有效量の」または「予防的に有効な量の」本発明の結合分子を含んでもよい。「治療的有效量の」とは、所望の結果を達成するために必要な投薬量および期間で有効である量と、定義される。例えば、結合分子の治療的有效量は、個体の疾患状態、年齢、性別、および体重や、その個体において所望の応答を惹起する上での結合分子の能力といった要因に応じて変わるであろう。治療的有效量はまた、治療的有益効果が、結合分子のあらゆる毒性作用もしくは有害作用よりも大きい場合の量である。

「予防的に有効な量」とは、所望の予防的結果を達成するために必要な投薬量および期間で有効である量と、定義される。典型的に、予防的投与量は、疾患が発症する前、または疾患の早期の段階で被験体に対して用いられるので、該予防的に有効な量は、治療的に有効な量よりも少ないものとなるであろう。

【0306】

投薬計画を、最適な所望の応答（たとえば、治療的または予防的応答）が得られるように調節することができる。例えば、単回ボラス投与を行ってもよいし、複数回に分けた用量を、時間をかけて投与してもよい。あるいは、治療状況の緊急性が指示されている場合には、用量を比例的に減少させることもできる。投与の容易さ、および投与量の均一性を得るためには、非経口組成物を用量単位剤形で製剤することが特に有利である。ここで用いる単位剤形とは、治療しようとする哺乳動物被験体にとって単位となる投薬量に適した、物理的に別個の単位を言う。各単位は、必要な医薬品担体との関連から所望の治療効果を生ずるよう計算された所定量の活性化化合物を含有する。本発明の単位剤形の詳細は、（a）活性化化合物の固有の特徴、および、達成しようとする特定の治療もしくは予防的効果、および（b）このような活性化化合物を、個体の感受性の治療に向けて配合する技術に内在する限界、によって決定され、またこれらに直接依存する。

【0307】

本発明の結合分子の治療的もしくは予防的有效な量の限定されない例の範囲は、例えば、約0.1～25 mg/kg、約1.0～10 mg/kg、約0.5～2.5 mg/kg、約5～25 mg/kg、約1～400 mg/kgである。なお、用量の値は、改善しようとする病状のタイプおよび重篤度によって変化する。さらに、あらゆる特定の被験体について、具体的な用量を、個体の必要性、および当該組成物の投与および投与の監督を行う当業者の専門的判断に基づいて、時間をかけて調整すべきであること、また、ここに示した投与量の範囲は、単なる例に過ぎず、請求の範囲で述べた組成物の範囲またはプラクティスを限定することを意図するものではないことが理解されるであろう。本発明の結合分子の治療的もしくは予防的有效な量の、さらなる限定されない例の範囲は、被験体の体重あたり、約0.0001～100 mg/kg、および約0.01～5 mg/kg（例えば、0.02 mg/kg、0.25 mg/kg、0.5 mg/kg、0.75 mg/kg、1 mg/kg、2 mg/kgなど）である。例えば、投与量は、1 mg/kg体重もしくは10 mg/kg体重、または1～10 mg/kgの範囲とすることができる。好ましくは、少なくとも1 mg/kgである。上記範囲の投与量中間値も本発明の範囲内であることが意図される。

【0308】

被験体にそのような用量で、毎日、1日おき、週1回、または経験的分析によって決定された他のあらゆるスケジュールにしたがって、投与することができる。治療は、複数の投与を長期間、例えば、少なくとも6ヶ月にわたって行うことを必要とする。さらに別の例の治療計画は、2週間に1回、または3～6ヶ月に1回投与することを必要とする。投与の例としては、連続して毎日、1～10 mg/kgまたは15 mg/kg、隔日に30 mg/kgまたは週1回60 mg/kgの投与が挙げられる。

【0309】

本発明の結合分子は、多数回投与することができる。単回投与間の間隔は、例えば、毎日、週1回、月1回、または年1回、がある。間隔は、患者における結合分子の血液濃度を測定することによって指示されるように不規則とすることもできる。

【0310】

本発明の結合分子は、任意に、治療を必要とする障害または状態を治療するのに有効な量（例えば、予防的もしくは治療的）の他の物質と組み合わせて投与することができる。好ましい追加的物質は、当業で認識されており、特定の障害のために標準的に投与される。

【0311】

該結合分子は、注射（皮下、静脈内等）、経口投与、吸入、経皮投与、または直腸投与などの便利な方法で投与することができる。投与経路に応じ、当該化合物を失活させかねない酵素、酸および他の天然条件の作用から当該化合物を保護する物質で被覆することができる。例えば、非経口投与以外により本作用薬を投与するには、本作用薬を、その失活から保護する物質で被覆または同時投与することが好ましいであろう。

【0312】

本発明の結合分子を、当業で公知の種々の方法で投与することができ、多くの治療的投与について、好ましい投与経路／投与形態は、静脈注射または注入である。当業者が理解しているように、該投与経路／投与形態は、所望の結果によって変わるであろう。いくつかの態様においては、活性化合物は、当該化合物が急速に放出するのを防ぐであろう担体とともに調製されるかもしれない。例えば、徐放性製剤である。これには、インプラント、経皮パッチ、およびマイクロ封入送達系がある。エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸など、生分解性で生体適合性あるポリマーを用いることができる。このような製剤の調製方法は、多く特許となっており、当業者に全般に公知である。例えば、Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978を参照されたい。

【0313】

いくつかの態様において、本発明の結合分子は、例えば、不活性の希釈剤および食用の担体とともに、経口投与される。該化合物（および必要であれば、他の成分）は、ゼラチン硬カプセルもしくは軟カプセルに封入することも、または圧縮して錠剤にすることもできる。または被験者の食事に直接と組み込むこともできる。経口による治療的投与の場合、該化合物を添加物と一緒に取り入れ、摂取可能な錠剤、バッカル錠、トローチ、カプセル、エリキシル剤、懸濁液、シロップ、ウエハース、などの形で用いることができる。非経口投与以外で本発明の化合物を投与するためには、該化合物をコーティングすること、または該化合物とその不活化を防ぐための物質とを同時投与することが必要かもしれない。

【0314】

結合分子を、酵素阻害剤と一緒に投与することも、あるいはリボソームなどの適した担体に入れて投与することもできる。薬学的に許容される希釈剤には、生理食塩水および水性の緩衝剤水溶液がある。アジュバントはその最も広い意味で用いられており、その中には、インターフェロンなど、いずれかの免疫刺激性化合物が含まれる。ここで考慮されるアジュバントには、レゾルシノール、ポリオキシエチレンオレイルエーテルおよびn-ヘキサデシルポリエチレンエーテルなどの非イオン性界面活性剤が含まれる。酵素阻害剤には、膵臓トリプシン阻害剤、ジイソプロピルフルオロホスフェート（DEEP）およびトラジロールがある。リボソームには、水中油中水乳濁液や、従来のリボソームがある（Sterna et al. (1984) J. Neuroimmunol. 7:27）。

【0315】

該活性化合物を非経口投与しても、または腹腔内投与してもよい。分散液は、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、およびこれらの混合物中や、油中に調製することもで

10

20

30

40

50

きる。通常の保管および使用条件下では、これらの製剤に、微生物の成長を防ぐ保存剤を含めてもよい。

【0316】

活性化化合物が上述したように適宜保護されていれば、本作用薬を、例えば不活性の希釈剤または同和可能な食用の担体と一緒に経口投与することができる。

【0317】

補助活性化化合物を組成物に組み込むこともできる。いくつかの対応において、本発明の結合分子は、1以上の追加治療薬と同時に製剤されおよび/または同時に投与される。例えば、本発明の抗GITR結合分子は、他の標的と結合する1以上のさらに別の抗体、例えば、他のサイトカインと結合する抗体、または、細胞表面分子と結合する抗体と同時に製剤されおよび/または同時に投与される。そのような併用療法は、投与された治療薬の投与量を有利に減少させるかもしれない、可能な毒性または種々の単独治療との合併症を避ける。

【0318】

本発明はさらに、診断薬もしくは治療薬と組み合わせた結合分子を包含する。結合分子は、例えば、所与の治療計画の有効性を決定するための臨床試験処置の一環として、例えば、腫瘍の発症もしくは進行を診断的にモニターするために使用することができる。検出は、抗体を検出可能な物質と結合することによって容易に行うことができる。検出可能な物質の例には、種々の酵素、補欠分子団、蛍光物質、発光性物質、生物発光物質、放射性物質、種々のポジトロン放出断層撮影を利用したポジトロン放出金属、および非放射性常磁性金属イオンが挙げられる。該検出可能な物質は、結合分子に直接的結合もしくは接合してもよいし、中間物質（例えば、当業で公知のリンカーなど）を介して間接的に結合もしくは接合してもよい。例えば、本発明において診断に使用するための結合分子に接合され得る金属イオンについては、米国特許第4,741,900号を参照されたい。好適な酵素の例には、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが含まれる。好適な補欠分子団の例には、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが含まれ、好適な蛍光物質の例には、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリドもしくはフィコエリトリンが含まれ、発光性物質の例にはルミノールが含まれ、好適な生物発光物質の例には、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、アエクオリンが含まれ、好適な放射性物質の例には、 I^{125} 、 I^{131} 、 I^{111} 、 In^{99Tc} が含まれる。

【0319】

さらに、結合分子は、サイトトキシン、例えば、細胞静止もしくは細胞破壊性の物質、治療薬、放射性金属イオン、例えば、アルファエミッター（例えば、 ^{213}Bi ）、生物学的トキシン、プロドラッグ、ペプチド、タンパク質、酵素、ウイルス、脂質、生物反応変性剤、医薬物質、免疫学的に活性のあるリガンド（例えば、リンフォカインもしくは他の抗体）、などの治療的部分に接合してもよい。別の態様において、本発明の結合分子は、腫瘍の血管新生を減少させる分子に接合することができる。他の態様においては、開示された組成物は、薬物もしくはプロドラッグに結合した本発明の結合分子を含んでもよい。本発明のさらに別の態様は、特異的な生物毒素もしくはそれらの細胞傷害性フラグメント、例えば、リシン、シュードモナスエキソトキシンもしくはジフテリアトキシンに接合した本発明の結合分子の使用を含む。使用すべき結合分子のいずれが接合されており、接合されていないかの選択は、癌の種類、調整治療の使用（例えば、化学療法もしくは体外放射線療法）および患者の状態によって変わる。当業者は、ここに記載の教示に鑑み、そのような選択を容易に行うことができると理解されよう。

【0320】

サイトトキシンまたは細胞傷害性物質は、細胞にとって有害なあらゆる物質を含む。例としては、パクリタキセル、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コ

ルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン (dihydroxy anthracin dione)、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシン D、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド類、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびピューロマイシン、ならびにそのアナログもしくはホモログがある。治療薬としては、限定されないが、アンチメタボライト (例えば、メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルデカルバジン (fluorouracil decarbazine)、アルキル化剤 (例えば、クロルエタミン、チオテパクロランブシル (thioepa chlorambucil)、メルファラン、カルスチン (carnustine) (BSNU) およびロムスチン (CCNU)、シクロトスファミド (cyclophosphamide)、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシン C、およびシス-ジクロロジアンミン白金 (II) (DDP) シスプラチン)、アントラサイクリン (例えば、ダウノルビシン (旧称：ダウノマイシン) およびドキソルビシン)、抗生物質 (たとえば、ダクチノマイシン (旧称：アクチノマイシン)、ブレオマイシン、ミトラマイシンおよびアントラマイシン (AMC))、ならびに抗分裂剤 (例えば、ビンクリスチンおよびビンブラスチン) が挙げられる。

10

【0321】

本発明をさらに以下の実施例で説明することとするが、以下の実施例を限定的なものとして捉えられてはならない。本出願全体を通じて引用された全参考文献、特許および公開済み特許出願の内容や、図面および添付物を、引用をもってここに援用することとする。

【0322】

20

実施例

いくつかの実施例において、以下の材料と方法を用いる。

【0323】

方法：T細胞系列の培養

分化細胞系列を、ヒト臍帯血または末梢血 CD4 + CD45RA + 未処置の T 細胞から、フローサイトメトリーおよび磁気ビーズ分離法を含む種々の方法により調製された細胞から作製した。開始集団の純度は > 95% だった。次に細胞を、10% FCS および 1% ヒト AB 血清と、サイトカインおよび抗サイトカイン中和化抗体との規定された混合液を含む CD3 および CD28 抗体の RPMI 1640 溶液で刺激して、分化細胞種を作製した。Th1 細胞を IL12 (62 U/ml) および抗 IL4 (0.2 ug/ml) との培養で産生させ；Th2 細胞を、IL4 (145 U/ml) および抗 IL12 (10 ug/ml) および抗 IFNγ (10 ug/ml) 中での培養で産生させ；そして制御性 T 細胞を TGFβ (32 U/ml)、IL9 (42 U/ml)、抗 IL4 (10 ug/ml) および抗 IL12 (10 ug/ml) および抗 IFNγ (10 ug/ml) 中での培養で産生させた。(注：抗 IL12 はすべての実験で用いられたわけではない)。培養物すべてに、IL2 (65 U/ml) および IL15 (4500 U/ml) を添加した。細胞を、細胞分裂で可能な場合に、より大型の培養皿に分け取った。

30

【0324】

実施例 1：6C8 の単離および精製

6C8 抗体は、IgG2b カップである。この抗体を精製することによって、二重の重鎖の存在が明らかになった (図 1)。これは、グリコシル化または他の Ab の混在のいずれかによるものであろう。立体排除クロマトグラフィーによって、1つのピークの存在が示された。

40

【0325】

6C8 抗体は、以下のようにして精製した。

1) 20 ml のプロテイン G (Protein G, Pharmacia HR 10/30) を 5 CV の dPBS で洗浄した。

2) 1 L (ラン 1) または 2 L (ラン 2) の hGITR (6C8) 上清を入れた。

3) 10 CV の dPBS で洗浄した。

4) 100 mM クエン酸塩、pH 2.8 を直接 1 M トリス (20-25%、v:v) に

50

溶出させた。

5) 100 mM クエン酸塩、pH 2.8、0.3 M の NaCl で除去した。

【0326】

実施例 2： 6C8 の特徴づけ

6C8 抗体は、GITR-L-M トランスフェクトされた細胞および活性化された PBL (図 4) に結合する (図 3)。および活性化されたリンパ球上のビオチン標識された抗 GITR の飽和曲線は、良好な相対的アフィニティーを示唆している (図 5)。

【0327】

6C8 抗体は、準最適抗 CD3 によって活性化された T リンパ球状で共刺激性を示す (図 6)。この抗体は、CD28 と同じレベルに対しては共刺激性を示さないが、市販の抗 GITR (R&D) に匹敵するものである。

10

【0328】

6C8 抗体は、活性化されたリンパ球上ではアポトーシスを誘発しない (図 7)。リンパ球は、抗体を添加する前、PHA で 3 日間活性化した。YTH655 (活性化されたリンパ球上ではアポトーシスを誘発することが知られている抗ヒト CD2) と比較して、6C8 は、活性化された T リンパ球のアポトーシスを増加させない。

【0329】

6C8 抗体は、一次混合リンパ球反応 (MLR) をブロックしない (図 8)。TRX1 (抗ヒト CD4) を、MLR の陽性対照として用いた。

【0330】

実施例 3： 6C8 抗体は T 調節細胞によって誘発された T エフェクター細胞の抑制を取り消す

6C8 抗体は、T 調節細胞によって誘発された抑制をブロックすることができる (図 9)。CD4+/CD25+ 細胞を CD4+/CD25- 細胞に、種々の比率で添加した。該細胞をプレートに結合した抗 CD3 および抗 CD28 で刺激した。1:1 の比率で、CD4+/CD25+ 細胞は CD4+/CD25- 細胞の増殖を取り消すことができる。6C8 の培養物への添加によって、容量依存的に抑制をブロックすることができた。

20

【0331】

T 細胞を抗 CD3 のみで刺激したとき (抗 CD28 を混合しない)、CD4+/CD25+ 細胞を CD4+/CD25- 細胞に添加したとき、抑制は認められなかった。こうした条件下では、実際、抗 GITR 抗体細胞はわずかに共刺激性であった (図 10)。

30

【0332】

実施例 4： 6C8 抗体の NF-κB を介してのシグナリングの調整

I-κB リン酸化 (図 12 および 14) およびそれに続く分解 (図 11 および 13) の双方によって評価されるように、T 細胞の CD3 または CD3 と CD28 を介しての活性化の結果、I-κB シグナリング経路の活性化が起こる。

【0333】

図 11 に示されているように、部分活性化の条件下では、I-κB の時間依存性分解によって評価されるように、抗 GITR は、I-κB シグナリングに対して有意な効果を示す。GITR 結合分子の存在下で、分解は、分析の全てのポイントにおいて有意に減衰する。上記の変化は、I-κB のリン酸化の減少とうまく対応している (図 12)。

40

【0334】

TH2 と Treg 対 TH1 について、反応の大きさは益々大きくなる。さらに、GITR の発現は、並行実験において、TH2 および Treg 細胞と比較して、TH1 細胞上でより高いことがわかる (MCF (中間チャネル蛍光光度) による評価による)。CD3 および CD28 の架橋を介して完全に活性化される T 細胞は、それらの抗 GITR に対する反応性を緩めるが、TNF-α を介しての I-κb の活性化を完全に維持している。

【0335】

実施例 5： 6C8 抗体による免疫応答の増強

B16 メラノーマ腫瘍モデルは、癌細胞における T 調節細胞の役割を研究するために用

50

いられてきた攻撃的なメラノーマモデルである。枯渇作用をする抗CD25抗体もしくは抗CTLA-4を用いてマウスを治療することで、有望な結果がこのモデルにおいて認められる。双方のケースにおいて、治療は、腫瘍の開始および腫瘍サイズを遅らせることができる。GITRは、CD25+細胞において発現し、T調節細胞の抑制を止めることに関与するかもしれない。B16腫瘍を持つマウスを抗GITR結合分子で治療して、腫瘍の開始または腫瘍細胞に影響を及ぼすかどうかを測定した。マウスに腫瘍を注入した1日後に、抗GITR結合分子を用いた治療を行ったところ、腫瘍の発生およびサイズが遅延した(図17)。さらに、実験終了時、腫瘍がなかったGITR治療群にはまだマウスが存在していた。

【0336】

0日目、全ての動物に、それらの右側のフラスコに入っている 10^4 のB16メラノーマ細胞を注入した。1日目、GITR群に、2ミリグラム、1ミリグラム、0.5ミリグラム、または0.2ミリグラムの抗GITR結合分子を与えた。開始16日目に、計測可能な腫瘍が認められた。

【0337】

実施例6： 抗GITRおよび抗原の同時送達によるアジュバント効果

抗mGITR抗体が卵白アルブミン(Ova)もしくは赤血球凝集素(HA)に対する体液反応のアジュバントをさらに調べた。1日前、0日目、1日目に、マウスを抗体なし、YAML(アイソタイプ対照)、または2F8(ラット抗mGITR)を用いて、0.4mg/日で治療した。結合分子の作用機序におけるFcレセプターの関与の重要性を評価するために、さらに別の群の動物を6mg/日の2F8F(ab')₂を用いて、1日前、0日目、1日目に治療した。この投与量は、抗体全体と比較して短い半減期のF(ab')₂に基づいて選択された。マウスを0日目に、Ova(100μg)またはHA(10μg)で免疫した。Ova治療マウスに対して、100μgのOvaを14日目に攻撃感染し、21日目および28日目に採血してELISAアッセイのための血清サンプルを取得した。HA治療マウスにもを14日目に攻撃感染し、21日目および28日目に採血した。

【0338】

2F8および2F8F(ab')₂の血清濃度をモニターして、結合分子のファーマコキナエティクスプロファイルを評価した。1日目、2F8または2F8F(ab')₂フラグメントを用いて治療したマウスの結合分子の血清濃度が比較可能であった。2F8で治療したマウス中で9日目まで結合分子を検出した。一方、2F8F(ab')₂フラグメントで治療したマウスで、15倍の高さの用量であったにもかかわらず、検出可能な結合分子が観察されたのは、3日目までであった。

【0339】

HAを用いた研究において、21日目と28日目のそれぞれにおいて、2F8で治療したマウスは、抗体を用いずに治療したマウスと比較して、抗HA抗体が4倍、5倍増加していた。また、YAML治療マウスと比較して、抗HA抗体が18倍、20倍増加していたことが示された(図19)。アジュバントとして抗mGITR抗体を用いて観察した抗HA力価は、HAが不完全フロイントアジュバント(IFA)とともに投与された場合に観察された力価に匹敵するものであった。これは、抗mGITR抗体を用いて観察した反応が、免疫学的研究においてしばしば使用される最も強力なアジュバントの1つに匹敵することを示唆するものである。

【0340】

Ovaを用いた研究において、21日目と28日目のそれぞれにおいて、2F8で治療したマウスは、抗体を用いずに治療したマウスと比較して、抗Ova抗体が13倍、6倍増加していた。また、YAML治療マウスと比較して、抗Ova抗体が17倍、8倍増加していた(図20)。2F8抗体がOvaにおよぼす作用は、HAにおいて観察されたものに匹敵するものであった。2F8F(ab')₂で治療したマウスは、抗体を用いずに治療したマウスと比較して、抗Ova抗体が4倍、3倍増加していた。また、YAML治

10

20

30

40

50

療マウスと比較して、抗Ova抗体が6倍、5倍増加していた(図20)。2F8治療マウスと比較した場合、F(ab')₂の用量と全抗体と比較した異なるファーマコキカインティックプロファイルから、抗Ova反応の減少を説明できるかもしれない。

【0341】

あわせて、これらのデータは、2F8抗体が、抗原に対する体液反応におよぼす作用が主に抗体のF(ab')₂部分に抗体に起因し、Fcレセプターのかかわりが抗mGITR抗体のアジュバント作用に必要とされないかもしれないということを示す。

【0342】

実施例7：キメラ抗GITR結合分子の調製

6C8可変軽鎖領域を、従来の生物学的技法を用いて、ヒト軽鎖定常領域に移植した。IgG1軽鎖定常領域を用いた。完全キメラ軽鎖GITR結合分子のアミノ酸配列を以下に示す：

DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKALITYSASYRYS GVPDRFTGSGSGTDFTLTITNNVHSEDLAEYFCQQYNTDPLTFGAGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(配列番号：22)。

【0343】

6C8可変重鎖領域を、従来の生物学的技法を用いて、ヒト重鎖定常領域に移植した。IgG1重鎖定常領域を用いた。完全キメラ軽鎖GITR結合分子のアミノ酸配列を以下に示す(「Gly」とも称する)：

QVTLKESGPGILKPSQTLSTLTC SFSGFSLSLSTSGMGVGVWIRQPSGKGLEWLAHIWWDDDKYYNP SLKSQLTISKDTSRNQVFLKITSVDTADAATYYCARTRRYFPFA YWGQGTLVTVSSASTKGPSTVFPLAPSSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSTVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLSPGK(配列番号：23)。

【0344】

アミノ酸配列NX(S/T)は、結合分子の作製に影響を及ぼし得るグリコシル化部位のための推定上のコンセンサス配列であり、6C8重鎖のIgG1定常領域は、配列NSTを有するので、重鎖定常領域の第2のバージョンは、配列番号：23のアミノ酸残基299(上記太字および下線部分)において、グルタミンをアスパラギンに保存的に置換して調製された。したがって、第2のヒト定常領域は、6C8重鎖可変領域に移植される。完全キメラ重鎖GITR結合分子のアミノ酸配列(「Agly」とも称される)を以下に示す。

QVTLKESGPGILKPSQTLSTLTC SFSGFSLSLSTSGMGVGVWIRQPSGKGLEWLAHIWWDDDKYYNP SLKSQLTISKDTSRNQVFLKITSVDTADAATYYCARTRRYFPFA YWGQGTLVTVSSASTKGPSTVFPLAPSSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSTVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY ASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY

YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL
DSDGSAFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK (配列番号：24)。

【0345】

実施例8： 6C8抗GITR結合分子のヒト化形態の調製

Hwang et al. (2005) Methods (36) 35-42に記載されているCDRホモロジーベースのストラテジーを用いて6C8をヒト化した。重鎖および軽鎖アミノ酸配列を、公開されている利用可能なデータベースを用いてブラストした。その結果によれば、6C8は、3-1重鎖正準構造および2-1-1軽鎖正準構造を持つことが示された。これにより、IMGTデータベース中の2-1-1正準構造を持つ全ての生殖細胞系列κ鎖V遺伝子を6C8抗体配列と比較した。同じことを重鎖についても行い、そこでは、全ての3-1生殖細胞系列重鎖V遺伝子を6C8アミノ酸配列と比較した。CDR配列のみを比較し、フレームワークは、CDRにおいてどの生殖細胞系列配列が最も多くのマッチングを示すかに基づいて選択した(下のアライメントを参照されたい)。

【0346】

軽鎖として、3-15*01配列は、14のマッチングをCDRに有するものを選択した。CDR3は、ロイシンとトレオニンで終わっている。Jk4J遺伝子セグメント配列を用いた。

【0347】

2-1-1正準構造を持つ軽鎖V遺伝子

【表1】

【表1】

IMGT

Gene Name	CDR 1	CDR 2	CDR 3	IDs
IGKV1-5	RASQSISSWLA.....	DASSLES.....	QQYNSYS..	11
IGKV1-6	RASQGIRNDLG.....	AASSLSQ.....	LQDYNYP..	9
IGKV1-9	RASQGISSYLA.....	AASTLQS.....	QQLNSYP..	11
IGKV1-12	RASQGISSWLA.....	AASSLQS.....	QQANSFP..	11
IGKV1-16	RASQGISSWLA.....	AASSLQS.....	QQYNSYP..	12
IGKV1D-16	RARQGISSWLA.....	AASSLQS.....	QQYNSYP..	11
IGKV1-17	RASQGIRNDLG.....	AASSLQS.....	LQHNSYP..	9
IGKV1-27	RASQGISNYLA.....	AASTLQS.....	QKYNSAP..	11
IGKV1-33	QASQDISNYLN.....	DASNLET.....	QQYDNL..	9
IGKV1-39	RASQSISSYLN.....	AASSLQS.....	QQSYSTP..	9
IGKV1D-43	WASQGISSYLA.....	YASSLQS.....	QQYYSTP..	11
IGKV3-11	RASQSVSSYLA.....	DASNRAT.....	QQRSNWP..	11
IGKV3D-11	RASQGVSSYLA.....	DASNRAT.....	QQRSNWH..	10
IGKV3-15	RASQSVSSNLA.....	GASTRAT.....	QQYNNWP..	14
6C8	KASQNVGTNVA.....	SASYRYS.....	QQYNTDP	

【0348】

IMGTデータベース中の2-1-1正準構造を持つ全ての生殖細胞系列軽鎖カッパ鎖V遺伝子を6C8抗体配列と比較した。同じことを重鎖についても行い、そこでは、全ての3-1生殖細胞系列重鎖V遺伝子を6C8アミノ酸配列と比較した。

【0349】

この方法を用いて、軽鎖の1つのバージョンを作製した。

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCKASQNVGTNVAWYQQKPGQAPRLLIYSASYRYSGLPARFSGSGSGTEFTLTITSSLSQSEDFAVYYCQQYNTDPLTFFGGGTKVEIK（配列番号：44）（CDRをイタリック体で示している）。

10

【0350】

重鎖として、配列2-05*01は、17のマッチングを有していた。しかしながら、CDR3の周りの配列は、6C8（YYCAR対YYCAHR）とは異なっていた。CDR3は、最も重要なCDRを認識するために示していたので、この領域をできるだけ完全に一致させた状態で維持することが重要である。配列2-70*01は、CDRに16のマッチングを有しており、CDR3の直前の配列は、6C8'sと完全に一致していたので2-70*01を選択した。

【0351】

重鎖のJ遺伝子セグメントとして、最も高いマッチングを示していたJH4を選択した。その後アミノ酸配列を逆翻訳し、所望のヌクレオチド配列に対応するプライマーをIDT（Coralville, IA）から取得した。

20

【0352】

3-1正準構造重鎖V遺伝子

【表2】

【表2】

IMGT

Gene Name	CDR 1	CDR 2	IDs
IGHV2-5	TSGVGVG.....	LIYWNDDKRYSPSLKS	17
IGHV2-26	NARMGVS.....	HIFSNDEKSYSTSLKS	12
IGHV2-70	TSGMCVS.....	LIDWDDDKYYSTSLKT	16
IGHV4-30-2	SGGYSWS.....	YIYHSGSTYYNPSLKS	10
IGHV4-30-4	SGDYYS.....	YIYYSGSTYYNPSLKS	9
IGHV4-31	SGGYYS.....	YIYYSGSTYYNPSLKS	9

30

IGHV4-39 SSSYYWG..... SIYYSGSTYYNPSLKS 10
 IGHV4-61 SGSYYWS..... YIYYSGSTYYNPSLKS 8

6C8 TSGMGVG..... HIWDDDKYYNPSLKS

40

【0353】

この方法を用いて、重鎖の1つのバージョンを作製した。

QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGVGWIR

50

【 0 3 5 4 】

Q V T L R E S G P A L V K P T Q T L T L T C T F S G F S L S T S G M G V G W I R
Q P P G K A L E W L A H I W W D D D K Y Y Q P S L K S R L T I S K D T S K N Q V
V L T M T N M D P V D T A T Y Y C A R T R R Y F P F A Y W G Q G T L V T V S S (配列番号: 54) (「Q」とも称する)。

6C8 軽鎖可変領域および 3-15*01 生殖細胞系列の軽鎖配列の CLUSTAL W (1.82) マルチプル配列アライメント (ギャップペナルティー 10 をもつ Blosom スコアリングマトリックスを用いる) も行った。その結果を下に示す。

【表 3】

```

6C8          DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKALIYASASYRYSQVDP
3-15*01      EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPA
:*****      :* * * * *:::***** *:::*****::: * * * * *

```

```
6C8          RFTGSGSGTDFTLTINNVHSEDLAEYFCQQYNTDPLTFGAGTKLEIK
3-15*01      RFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNWNP-----
***.*****.*****.***.***.* *.*****.*
```

ヒト化6C8軽鎖の6C8フレームワーク残基に対応するアミノ酸残基を用いた潜在的置換を行うために、CLUSTAL W分析に基づいて、ヒトフレームワーク中のいくつかのアミノ酸残基を同定した。具体的には、位置1のE、位置8のP、位置9のA、位置10のT、位置11のL、位置13のV、位置15のP、位置17のE、位置19のA、位置20のT、位置21のL、位置22のS、位置43のA、位置45のR、位置46のL、位置58のI、位置60のA、位置63のS、位置70のE、位置76のS、位置77のS、位置78のL、位置79のQ、位置83のF、位置86のV、位置87のY、位置100のG、および位置104のV。

同様に、6 C 8 重鎖可変領域および2-70*01アミノ酸配列を持つ生殖細胞系重鎖タンパク質のCLUSTAL W (1.82) マルチプル配列アライメント (ギャップペナルティー10をもつBlosumスコアリングマトリックスを用いる) も行った。その結果を下に示す。

【 0 3 5 9 】

【表 4】

【表 4】

6C8	QVTLKESGPGILKPSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVWIRQPSGKGLEWLAHIWDDDKY
2-70*01	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMCVSWIRQPPGKALEWLALIDWDDDKY
	****:****.:**:*:*:*:*:*:*:*:*:* * .*****.*.****** * *****
6C8	YNPSLKSQLTISKDTSRNQVFLKITSVDTADAATYYCARTTRYFPFAYWGQGLVTVSS
2-70*01	YSTSLKTRLTISKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARI-----
	*..***.:*****:*:*.*.:*.:*..*:*****

10

【0360】

ヒト化6C8重鎖の6C8フレームワーク残基に対応するアミノ酸残基を用いた潜在的置換を行うために、CLUSTAL W分析に基づいて、ヒトフレームワーク中のいくつかのアミノ酸残基を同定した。具体的には、位置5のR、位置10のA、位置11のL、位置12のV、位置15のT、位置19のT、位置23のT、位置43のP、位置46のA、位置68のR、位置77のK、位置81のV、位置83のT、位置84のM、位置86のN、位置87のM、位置89のP、位置90のV、および／または位置92のT。.

20

【0361】

4つのヒト化全長6C8結合分子を、以下のヒト化重鎖および軽鎖の組み合わせを用いて作製した。

【0362】

全長バージョン1 (HuN6C8-Gly)-ヒト化(Hu)6C8軽鎖(L)/ヒト化重鎖、CDR2にNをもち(「N」)、Nをもつ定常領域を含む(「Gly」)。

全長バージョン2 (HuN6C8-Agly)-ヒト化(Hu)6C8軽鎖(L)/ヒト化重鎖、CDR2にNをもち(「N」)、Aをもつ定常領域を含む(「Agly」)。

全長バージョン3 (HuN6C8-Gly)-ヒト化(Hu)6C8軽鎖(L)/ヒト化重鎖、CDR2にQをもち(「Q」)、Nをもつ定常領域を含む(「Gly」)。

30

全長バージョン4 (HuN6C8-Agly)-ヒト化(Hu)6C8軽鎖(L)/ヒト化重鎖、CDR2にNをもち(「N」)、Aをもつ定常領域を含む(「Agly」)。

【0363】

全長結合分子を作製するために用いられたグリコシル化されたIgG1重鎖定常領域のアミノ酸配列を以下に示す。

A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T
Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G
P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W
Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K
E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E
L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V
L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T
Q K S L S L S P G K (配列番号: 55)。

40

【0364】

全長結合分子を作製するために用いられたグリコシル化されたIgG1重鎖定常領域のアミノ酸配列を以下に示す。

A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T
Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G

50

P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W
Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y A S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K
E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E
L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V
L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T
Q K S L S L S P G K (配列番号: 56)。

【0365】

全長結合分子を作製するために用いられたグリコシル化された I g G 1 軽鎖定常領域の
アミノ酸配列を以下に示す。

R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q
W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E
K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C (配列番号: 57)。

【0366】

ヒト化 6 C 8 軽鎖の完全なアミノ酸配列を以下に示す。

E I V M T Q S P A T L S V S P G E R A T L S C K A S Q N V G T N V A W Y Q Q K P
G Q A P R L L I Y S A S Y R Y S G I P A R F S G S G S G T E F T L T I S S L Q S
E D F A V Y Y C Q Q Y N T D P L T F G G G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P
S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q
E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G
L S S P V T K S F N R G E C (配列番号: 58)。

【0367】

ヒト化 6 C 8 重鎖バージョン、Hu N 6 C 8 - A g l y、Hu Q 6 C 8 - G l y および
Hu Q 6 C 8 - A g l y の完全アミノ酸配列を以下に示す。

【0368】

Hu N 6 C 8 - G l y

Q V T L R E S G P A L V K P T Q T L T L T C T F S G F S L S T S G M G V G W I R
Q P P G K A L E W L A H I W W D D D K Y Y N P S L K S R L T I S K D T S K N Q V
V L T M T N M D P V D T A T Y Y C A R T R R Y F P F A Y W G Q G T L V T V S S A
S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W
N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y
I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P
S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y
V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E
Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L
T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L
D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q
K S L S L S P G K (配列番号: 60)；

【0369】

Hu N 6 C 8 - A g l y

Q V T L R E S G P A L V K P T Q T L T L T C T F S G F S L S T S G M G V G W I R
Q P P G K A L E W L A H I W W D D D K Y Y N P S L K S R L T I S K D T S K N Q V
V L T M T N M D P V D T A T Y Y C A R T R R Y F P F A Y W G Q G T L V T V S S A
S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W
N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y
I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P
S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y
V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y A S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E
Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L
T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L
D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q

K S L S L S P G K (配列番号: 61);

【0370】

HuQ6C8-Gly

Q V T L R E S G P A L V K P T Q T L T L T C T F S G F S L S T S G M G V G W I R
Q P P G K A L E W L A H I W W D D D K Y Y Q P S L K S R L T I S K D T S K N Q V
V L T M T N M D P V D T A T Y Y C A R T R R Y F P F A Y W G Q G T L V T V S S A
S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W
N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y
I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P
S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y
V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E
Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L
T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L
D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q
K S L S L S P G K (配列番号: 62)

10

【0371】

HuQ6C8-Agly

Q V T L R E S G P A L V K P T Q T L T L T C T F S G F S L S T S G M G V G W I R
Q P P G K A L E W L A H I W W D D D K Y Y Q P S L K S R L T I S K D T S K N Q V
V L T M T N M D P V D T A T Y Y C A R T R R Y F P F A Y W G Q G T L V T V S S A
S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W
N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y
I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P
S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y
V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y A S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E
Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L
T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L
D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q
K S L S L S P G K (配列番号: 63)。

20

【0372】

リーダー配列MDRLTF S F L L L I V P A Y V L S (配列番号: 64)を任意に含んでもよい。

30

【0373】

均等物

当業者は、ルーチンの実験以上のことをすることなく、本明細書に記載した本発明の具体的な実施形態に対する多くの均等物を認識、または確認することができるであろう。そのような均等物は、添付の請求項に包含されることが意図されている。

【図面の簡単な説明】

【0374】

【図1】図1は、精製されたマウスGITR結合分子およびヒトGITR結合分子のSDS-PAGEプロットを示す図である。各ウェルに12マイクログラムのタンパク質を入れた。

40

【図2】図2は、精製されたヒトGITR結合分子の立体排除クロマトグラフィー (SE-HPLC) を示す図である。50マイクログラムのタンパク質をSE-HPLCカラムに流速0.6ml/minで注入した。SE-HPLCによる結合分子の精製によって、モノマーが99.8%、凝集物が0.2%である結合分子の集団を産出した。

【図3】図3は、GITR発現ハイブリドーマ細胞からの50μlの上清液で染色したGITR遺伝子によってトランスフェクトされたL-M (マウス線維芽細胞) 細胞のFACS分析を示す図である。GITR結合分子は、GITRトランスフェクト細胞を染色したが、トランスフェクトされていないL-M細胞を染色しなかった。

50

【図4】G I T Rが活性化されたリンパ球上で主に発現することを証明するF A C S分析を示す図である。6 C 8結合分子は、C D 4 +、C D 8 +、C D 2 5 +リンパ球を染色しているが、C D 1 0 3 +細胞は非常に弱くしか染色していない。

【図5】図5は、C D 3活性化リンパ球上のビオチン標識された6 C 8の結合の飽和曲線を示す図である。

【図6】図6は、準最適O K T 3（抗C D 3；0. 0 1 μ g / m l）で刺激され、抗C D 2 8または抗G I T Rでインキュベートされた6 C 8結合分子がTリンパ球に対して共刺激性であることを示すグラフである。アイソタイプ対照（I g G 2 b）も用いた。

【図7】図7 Aおよび7 Bは、6 C 8結合分子がアポトーシスを誘発しないことを証明するグラフである。リンパ球を、1 0 μ g / m lのY T H 6 5 5（活性化されたリンパ球上でアポトーシスを誘発することが知られている抗C D 2抗体、Friend, P., et al. (1987) Transplant. Proc. 19:4317）、6 C 8またはアイソタイプ対照（I g G 2 b）を添加する3日前にP H Aで活性化した。アポトーシスは、細胞生存度数（A）およびアネキシンV染色（B）によって、フローサイトメトリーによるアポトーシス測定によって測定することができる。

【図8】図8は、6 C 8結合分子が、最初の混合リンパ球反応（M L R）をブロックしないことを証明するグラフである。同種ドナーからのリンパ球をT R X 1（抗ヒトC D 4）、6 C 8またはM O P C（T R X 1のアイソタイプ対照）の存在下で、種々の濃度で混合した。該細胞を3日間インキュベートし、細胞を回収し、計測する1 8時間前に³ H-チミンでパルスした。

【図9】図9は、6 C 8結合分子がT r e g細胞によって誘発されるTエフェクターの抑制を阻害することを証明するグラフである。C D 4 + / C D 2 5 +細胞をC D 4 + / C D 2 5 -細胞に、様々な比率で添加した。該細胞をプレート結合抗C D 3および抗C D 2 8で刺激した。1 : 1の比率で、C D 4 + / C D 2 5 -細胞の増殖の阻害が認められた。異なる2つの希釈率で6 C 8を添加することによって、C D 4 + / C D 2 5 + T調節細胞によって誘発されたC D 4 + Tエフェクター細胞の抑制を阻害することができた。

【図10】図10は、T細胞が、抗C D 2 8に不存在下で抗C D 3によって刺激されるときでさえ、6 C 8結合分子が共刺激性を証明するグラフである。C D 4 + / C D 2 5 -細胞を用いて、異なる細胞比率でC D 4 + / C D 2 5 +細胞をインキュベートした。プレート結合抗C D 3のみで該細胞を刺激した。6 C 8を該細胞に添加したところ、これらの条件は共刺激性であった。

【図11】図11は、C D 3で活性化されたT細胞におけるI - κ B分解に及ぼす抗G I T Rの効果を証明する図である。

【図12】図12は、C D 3で活性化されたT細胞におけるI - κ Bリン酸化に及ぼす抗G I T Rの効果を証明する図である。

【図13】図13は、C D 3 + C D 2 8で活性化されたT細胞におけるI - κ B分解に及ぼす抗G I T Rの効果を証明する図である。

【図14】図14は、C D 3 + C D 2 8で活性化されたT細胞におけるI - κ Bリン酸化に及ぼす抗G I T Rの効果を証明するグラフである。

【図15】6 C 8およびR&D Systems（Minneapolis, MN）抗体が独自のエピトープを認識することを証明するグラフである。競合アッセイをO K T 3およびC o n A活性化リンパ球上で行った。1 μ g / m lの6 C 8を種々の量の競合R&D Systems抗体（G I T R / T N F R S F 1 8モノクローナル抗体）とともに用いた。抗体濃度が最大のとき、いくらかの競合が認められたが、これは、立体障害による可能性が高い。

【図16】図16は、6 C 8抗G I T R抗体対R&D Systems G I T R抗体のカイネティック分析を示す図である。

【図17】図17は、G I T R抗体（2 F 8ラット抗マウスG I T R結合分子）で処置した後、マイトマイシンCで処理されたB 1 6細胞を注入されたマウスの生存率パーセントを示す図である。

【図18】図18 A ~ 1 8 Dは、6 C 8の結合分子可変重鎖（V H D）の核酸およびアミ

10

20

30

40

50

ノ酸配列を示す図（それぞれAおよびB）および可変軽鎖（V K A）の核酸およびアミノ酸配列を示す図である（それぞれDおよびD）。リーダー配列を太字で示し、フレームワーク配列に下線を施し、C D R配列は斜体で示した。

【図19】図19Aおよび19Bは、2F8と2F8、F（a b'）2フラグメントが、H Aに対する体液反応を高めることを示すグラフである。

【図20】図20Aおよび20Bは、2F8と2F8、F（a b'）2フラグメントが、O v aに対する体液反応を高めることを示すグラフである。

【図1】

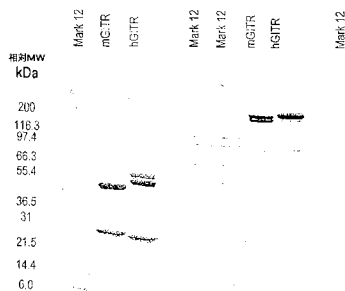


Fig. 1

【図2】

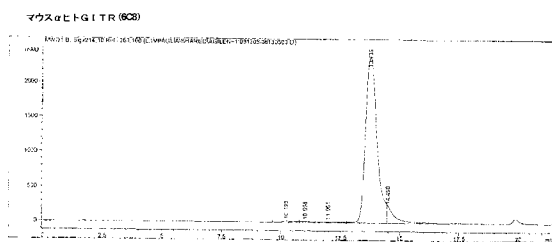


Fig. 2

【図3】

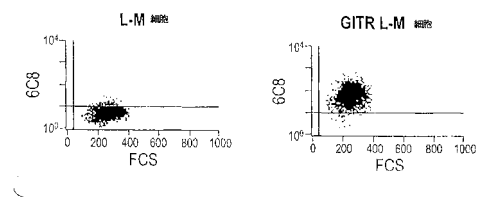


Fig. 3

【図4】

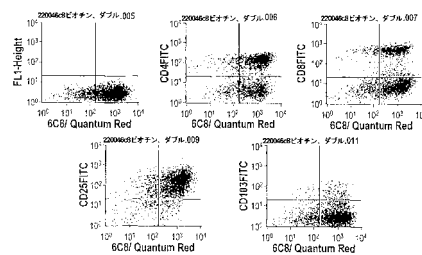


Fig. 4

【図 5】

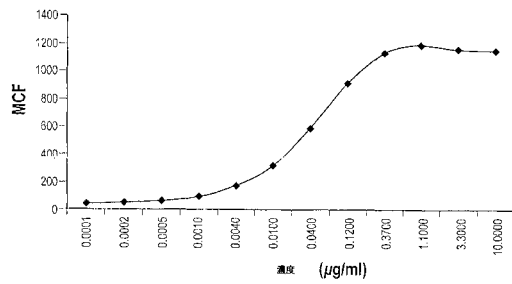


Fig. 5

【図 6】

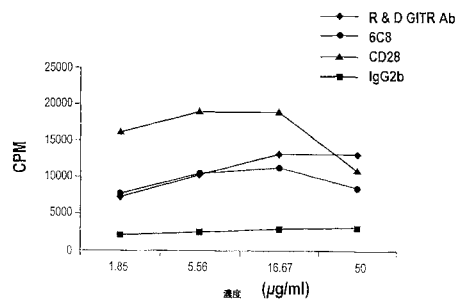


Fig. 6

【図 8】

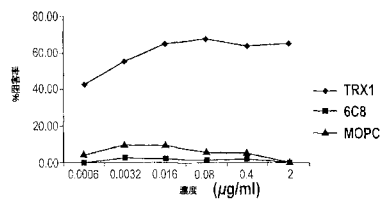


Fig. 8

【図 9】

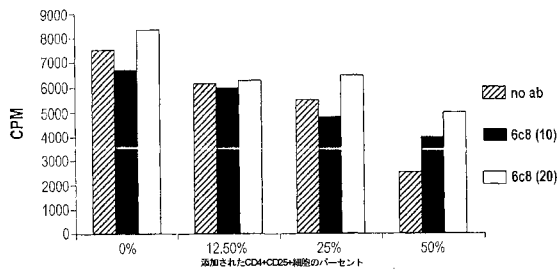


Fig. 9

【図 7】

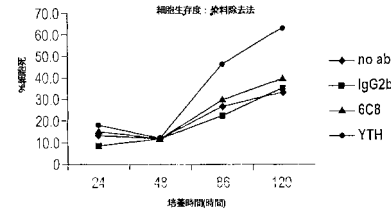


Fig. 7A

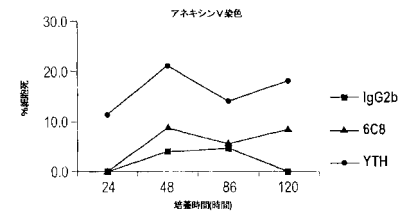


Fig. 7B

【図 10】

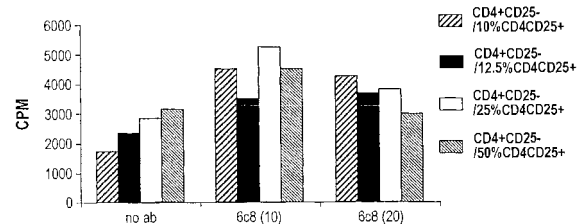


Fig. 10

【図 11】

抗GITRが $\text{I} - \alpha$ B分解 (β アクチンに正規化) に及ぼす効果: CD3で活性化

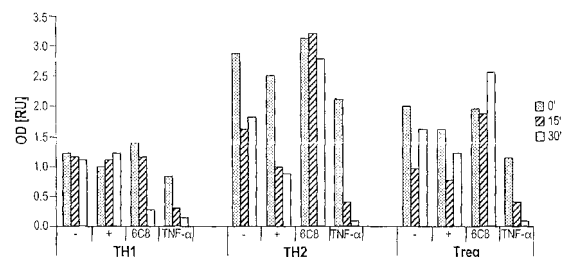


Fig. 11

【図 1 2】

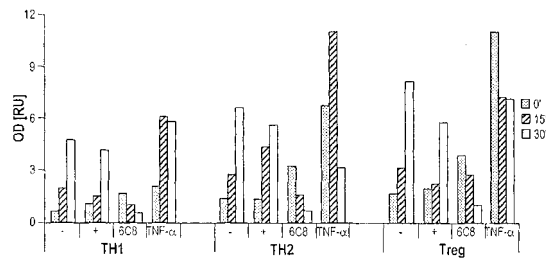
抗GITRがI- κ Bリン酸化（I- κ Bと β アクチンの合計に正規化）に及ぼす効果：CD3で活性化

Fig. 12

【図 1 4】

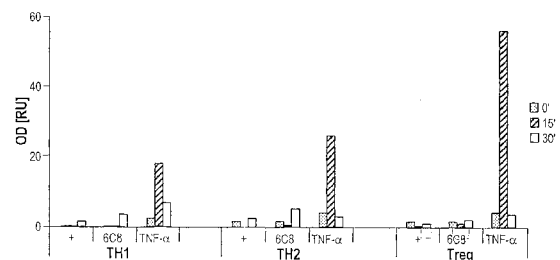
抗GITRがI- κ Bリン酸化（I- κ Bと β アクチンの合計に正規化）に及ぼす効果：CD3およびCD28で活性化

Fig. 14

【図 1 3】

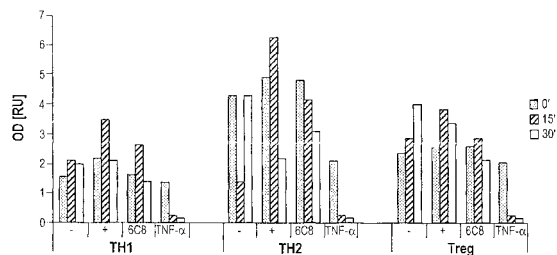
抗GITRがI- κ B分解（ β アクチンに正規化）に及ぼす効果：CD3およびCD28で活性化

Fig. 13

【図 1 5】

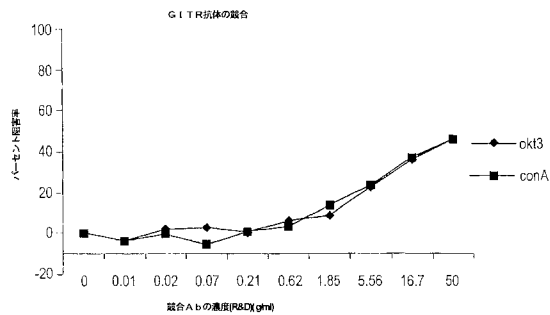


Fig. 15

【図 1 6】

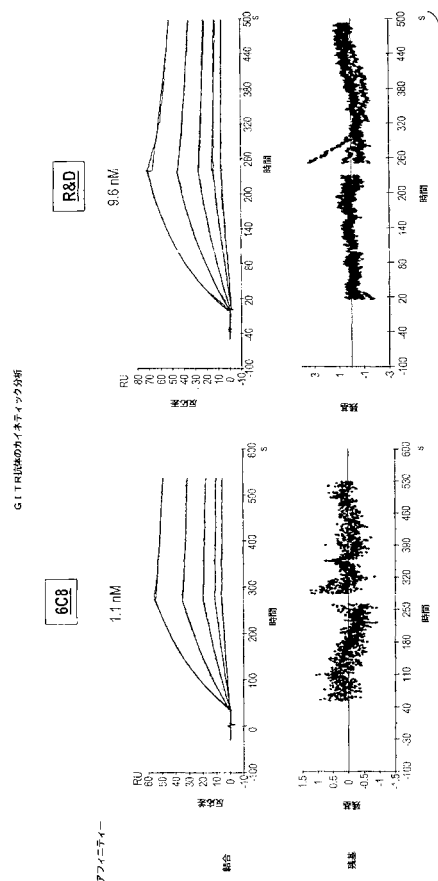


Fig. 16

【図 17】

抗体を用いてマイトマイシンC処理されたB16細胞のパーセント生存率

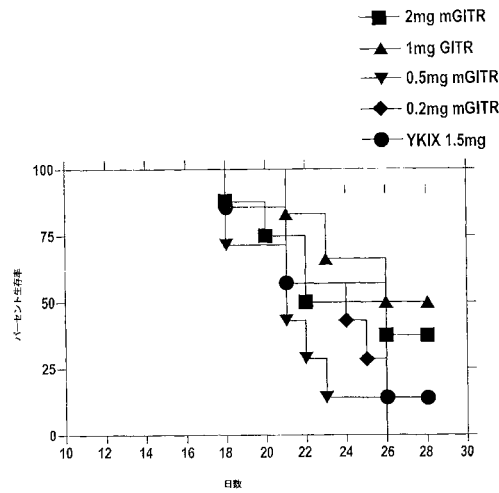


Fig. 17

【図 18】

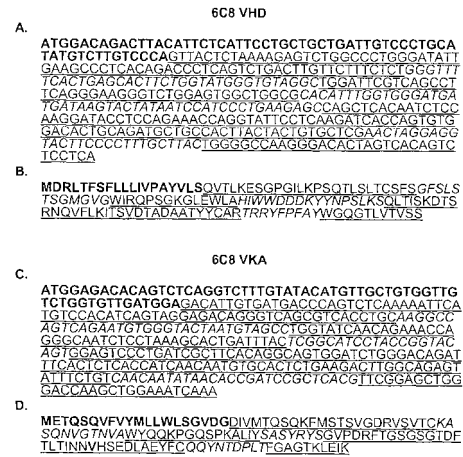


Fig. 18

【図 19】

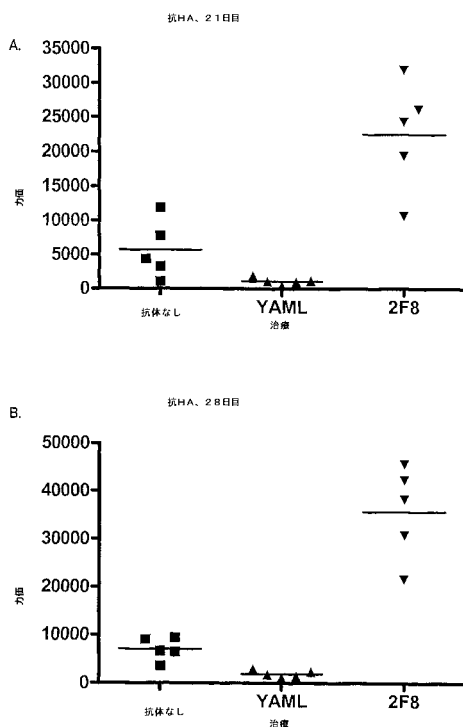


Fig. 19

【図 20】

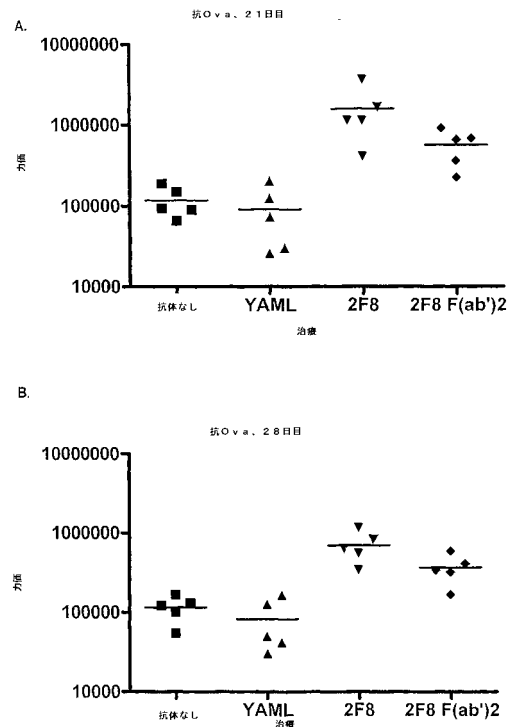


Fig. 20

【配列表】

2015232005000001.app

フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I テーマコード (参考)
A 6 1 P 35/02 (2006.01) A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 31/12
A 6 1 P 31/04
A 6 1 P 35/02
- (72)発明者 スジマンスカ, グラジーナ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 0 2 6 デッドヘム プレストン ストリート 4 7
- (72)発明者 ポナス, ポール
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 1 1 4 サンフランシスコ クリッパー ストリート
6 9 8
- (72)発明者 ローゼンツウィッグ, マイケル
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 1 6 ボストン アpartment 2 フェイター
ル ストリート 2 0
- (72)発明者 ポンテ, ホセ, エフ.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 1 2 7 サウス ボストン セイワード プレイス
5 # 2
- F ターム(参考) 4C085 AA13 AA14 BB01 BB17 EE01
4H045 AA11 BA10 BA40 CA40 DA75 EA20 GA26