

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7695200号
(P7695200)

(45)発行日 令和7年6月18日(2025.6.18)

(24)登録日 令和7年6月10日(2025.6.10)

(51)国際特許分類		F I		
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28	Z N A
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13	
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19	
請求項の数 43 (全90頁) 最終頁に続く				
(21)出願番号	特願2021-563239(P2021-563239)	(73)特許権者	516261966	
(86)(22)出願日	令和2年4月23日(2020.4.23)		ジョイント・ストック・カンパニー “バ イオキャド”	
(65)公表番号	特表2022-532991(P2022-532991 A)		ロシア国 1 9 8 5 1 5 サンクト・ペテ ルブルク, フン. テル. グ. ポセロク・ ストレルナ, ウーリツァ. ズヴァジ, デ ィリエヴニャ 3 8, ストラニスタ 1, ポニシーニャ 8 9	
(43)公表日	令和4年7月21日(2022.7.21)	(74)代理人	100118902	
(86)国際出願番号	PCT/RU2020/050080		弁理士 山本 修	
(87)国際公開番号	WO2020/218951	(74)代理人	100106208	
(87)国際公開日	令和2年10月29日(2020.10.29)		弁理士 宮前 徹	
審査請求日	令和5年4月24日(2023.4.24)	(74)代理人	100196508	
(31)優先権主張番号	2019112296		弁理士 松尾 淳一	
(32)優先日	平成31年4月23日(2019.4.23)	(74)代理人	100107386	
(33)優先権主張国・地域又は機関	ロシア(RU)			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 G I T R に特異的に結合するモノクローナル抗体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

G I T R に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、

(a) (i)

N Y G M H (配列番号 1) のアミノ酸配列を含む C D R 1 ;

(i i)

V I W F D G S N K F Y T D S V K G (配列番号 2) のアミノ酸配列を含む C D R 2 ; および、

(i i i)

E L G G Y Y Y D S S G F R P Y Y Y G M D V (配列番号 3) のアミノ酸配列を含む C D R 3

を含む重鎖可変ドメイン、ならびに、

(b) (i)

R A S Q S I G S W L A (配列番号 7) のアミノ酸配列を含む C D R 1 ;

(i i)

A A S T L Q R (配列番号 8) のアミノ酸配列を含む C D R 2 ; および、

(i i i)

Q Q S H S H P L T (配列番号 9) のアミノ酸配列を含む C D R 3

を含む軽鎖可変ドメイン、

を含むモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 2】

G I T R に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、

(a) (i)

Y Y W M Y (配列番号 1 2) のアミノ酸配列を含む C D R 1 ;

(i i)

A I S W N G G R T Y Y A E S M K G (配列番号 1 3) のアミノ酸配列を含む C D R 2 ;
および、

(i i i)

N R Y Y S D P N Y G M N L (配列番号 1 4) のアミノ酸配列を含む C D R 3
を含む重鎖可変ドメイン、ならびに、

(b) (i)

T G T S T D I G T Y K Y I S (配列番号 1 7) のアミノ酸配列を含む C D R 1 ;

(i i)

G V S H R P S (配列番号 1 8) のアミノ酸配列を含む C D R 2 ;

および、

(i i i)

S S Y T S S G T V V (配列番号 1 9) のアミノ酸配列を含む C D R 3

を含む軽鎖可変ドメイン、

を含むモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 3】

重鎖可変ドメインが、配列番号 4 のアミノ酸配列に少なくとも 9 0 % 同一なアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 4】

重鎖可変ドメインが、配列番号 1 5 のアミノ酸配列に少なくとも 9 0 % 同一なアミノ酸配列を含む、請求項 2 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 5】

重鎖可変ドメインが、配列番号 4 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 6】

重鎖可変ドメインが、配列番号 1 5 のアミノ酸配列を含む、請求項 2 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 7】

軽鎖可変ドメインが、配列番号 1 0 のアミノ酸配列に少なくとも 9 0 % 同一なアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 8】

軽鎖可変ドメインが、配列番号 2 0 のアミノ酸配列に少なくとも 9 0 % 同一なアミノ酸配列を含む、請求項 2 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 9】

軽鎖可変ドメインが、配列番号 1 0 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 1 0】

軽鎖可変ドメインが、配列番号 2 0 のアミノ酸配列を含む、請求項 2 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 1 1】

－ 重鎖可変ドメインが、配列番号 4 のアミノ酸配列に少なくとも 9 0 % 同一なアミノ酸配列を含み；

－ 軽鎖可変ドメインが、配列番号 1 0 のアミノ酸配列に少なくとも 9 0 % 同一なアミノ酸配列を含む、

10

20

30

40

50

請求項 1 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 1 2】

- － 重鎖可変ドメインが、配列番号 1 5 のアミノ酸配列に少なくとも 9 0 % 同一なアミノ酸配列を含み；
- － 軽鎖可変ドメインが、配列番号 2 0 のアミノ酸配列に少なくとも 9 0 % 同一なアミノ酸配列を含む、

請求項 2 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 1 3】

- － 重鎖可変ドメインが、配列番号 4 のアミノ酸配列を含み；
- － 軽鎖可変ドメインが、配列番号 1 0 のアミノ酸配列を含む、

請求項 1 1 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 1 4】

- － 重鎖可変ドメインが、配列番号 1 5 のアミノ酸配列を含み；
- － 軽鎖可変ドメインが、配列番号 2 0 のアミノ酸配列を含む、

請求項 1 2 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 1 5】

前記 G I T R に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体が、全長 I g G 抗体である、請求項 1 または 2 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 1 6】

全長 I g G 抗体が、ヒト I g G 1、I g G 2、I g G 3、または I g G 4 アイソタイプである、請求項 1 5 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 1 7】

全長 I g G 抗体が、ヒト I g G 1 アイソタイプである、請求項 1 6 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 1 8】

前記 G I T R に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体が、アゴニスト特性、抗体依存性細胞傷害（A D C C）を増加させるが、補体依存性細胞傷害（C D C）を増加させないように、F c 断片において E U 付番における E 3 4 5 R 突然変異を含む、請求項 1 または 2 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 1 9】

- （ i ） 配列番号 5 の配列に少なくとも 9 0 % 同一なアミノ酸配列；または
- （ i i ） 配列番号 6 の配列に少なくとも 9 0 % 同一なアミノ酸配列

を含む重鎖を含む、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 2 0】

- （ i ） 配列番号 5 のアミノ酸配列を含む重鎖；または
- （ i i ） 配列番号 6 のアミノ酸配列を含む重鎖

を含む、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 2 1】

配列番号 1 1 の配列に少なくとも 9 0 % 同一なアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 2 2】

配列番号 1 1 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 2 3】

（ i ）

- － 配列番号 5 の配列に少なくとも 9 0 % 同一なアミノ酸配列を含む重鎖；および
- － 配列番号 1 1 の配列に少なくとも 9 0 % 同一なアミノ酸配列を含む軽鎖；

または

（ i i ）

- － 配列番号 6 の配列に少なくとも 9 0 % 同一なアミノ酸配列を含む重鎖；および

－ 配列番号 11 の配列に少なくとも 90% 同一なアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 24】

－ 配列番号 5 のアミノ酸配列を含む重鎖；および
－ 配列番号 11 のアミノ酸配列を含む軽鎖
を含む、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 25】

－ 配列番号 6 のアミノ酸配列を含む重鎖；および
－ 配列番号 11 のアミノ酸配列を含む軽鎖
を含む、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

10

【請求項 26】

配列番号 16 の配列に少なくとも 90% 同一なアミノ酸配列を含む重鎖を含む、請求項 2 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 27】

配列番号 16 のアミノ酸配列を含む重鎖を含む、請求項 2 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 28】

配列番号 21 の配列に少なくとも 90% 同一なアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、請求項 2 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 29】

配列番号 21 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、請求項 2 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

20

【請求項 30】

－ 配列番号 16 の配列に少なくとも 90% 同一なアミノ酸配列を含む重鎖；および
－ 配列番号 21 の配列に少なくとも 90% 同一なアミノ酸配列を含む軽鎖
を含む、請求項 2 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 31】

－ 配列番号 16 のアミノ酸配列を含む重鎖；および
－ 配列番号 21 のアミノ酸配列を含む軽鎖
を含む、請求項 2 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

30

【請求項 32】

請求項 1 ～ 31 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片をコードする単離された核酸。

【請求項 33】

DNA である、請求項 32 に記載の核酸。

【請求項 34】

請求項 32 または 33 に記載の核酸を含む発現ベクター。

【請求項 35】

請求項 1 ～ 31 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片を得るための宿主細胞を得る方法であって、インビトロにおいて、請求項 34 に記載のベクターで細胞を形質転換することを含む方法。

40

【請求項 36】

請求項 32 または 33 に記載の核酸を含む、請求項 1 ～ 31 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片を得るための宿主細胞。

【請求項 37】

請求項 1 ～ 31 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片を得る方法であって、培養培地中で請求項 36 に記載の宿主細胞を培養するステップを含む方法。

【請求項 38】

前記方法が、それに続く、得られた抗体を単離および精製するステップをさらに含む、請求項 37 に記載の方法。

50

【請求項 39】

治療有効量の請求項 1～31 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片を、1 種または複数の医薬的に許容される賦形剤と組み合わせて含む、医薬組成物。

【請求項 40】

治療有効量の請求項 1～31 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片、および治療有効量の少なくとも 1 種の治療活性を有する抗腫瘍化合物を含み、

前記治療活性を有する抗腫瘍化合物が、化学療法剤、抗体または抗ホルモン剤から選択される、請求項 39 に記載の医薬組成物。

【請求項 41】

治療活性を有する抗腫瘍化合物が、

(i) 以下の群：抗 PD1 抗体、抗 PD-L1 抗体、抗 CTLA4 抗体、抗 4-1BB 抗体、抗 OX40 抗体若しくはそれらの組合せから選択される抗体であるか、または

(ii) 自然または適応免疫の活性化剤の群から選択される、
請求項 40 に記載の医薬組成物。

【請求項 42】

請求項 1～31 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片、および少なくとも 1 種の治療活性を有する抗腫瘍化合物が、逐次的に投与される、
あるいは、

請求項 1～31 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片、および少なくとも 1 種の治療活性を有する抗腫瘍化合物が、同時に投与される、
請求項 40 に記載の医薬組成物。

【請求項 43】

請求項 1～31 のいずれか一項に記載の抗体もしくはその抗原結合断片または請求項 39 または 40 に記載の医薬組成物の、薬物療法剤の製造のための使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生物学、特に、抗体またはその抗原結合断片、さらにそれらの使用に関する。より具体的には、本発明は、GITR に特異的に結合するモノクローナル抗体（グルココルチコイド誘導性 TNFR 関連タンパク質／TNFRSF18／腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー 18）に関する。本発明はまた、前記抗体またはその抗原結合断片をコードする核酸、発現ベクター、前記抗体を調製するための方法、および GITR に関連する疾患または障害の処置における前記抗体の使用にも関する。

【背景技術】

【0002】

TNFRSF18、GITR（グルココルチコイド誘導性 TNFR 関連タンパク質／TNFRSF18／腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー）は、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーに属する受容体である膜タンパク質である。

【0003】

GITR は、216 個のアミノ酸からなり、26 kDa の分子量を有する I 型膜貫通タンパク質である。N 末端の細胞外ドメインは、3 つの TNFR-Cys 反復および N-グリコシル化部位を含む。GITR の 3 つのシステインリッチなドメインおよび細胞質内テールは、4-1BB、OX40 および CD27 と著しい相同性を有する（Nocentini ら（1997）Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 6216～6221）。

【0004】

ヒト GITR は、レスポンダー T 細胞では低いレベルで発現され、CD4+ 細胞では、CD8+ 細胞に比べて発現の増加を呈する。GITR 発現は、T 細胞活性化後数日にわたり著しく上方調節される。GITR は、調節性 T 細胞（Treg）、例えば CD4+CD25+ または CD8+CD25+ 細胞では高いレベルで構成的に発現され、これらの細胞

10

20

30

40

50

が活性化されるとさらに上方調節される (Nocentini および Riccardi (2005) E. J. Immunol. 35:1016)。

【0005】

しかしながら、GITR 発現は、T 細胞のみに限定されない。数々の研究で、GITR は NK 細胞、マクロファージ、B 細胞、樹状細胞、肥満細胞および単球でも発現されることが示された (Nocentini および Riccardi (2005) E. J. Immunol. 35:1016~1022)。

【0006】

GITR は、リンパ節、末梢血液白血球で発現され、それより程度は低い脾臓で発現され、Treg では大量に構成的に発現され、ナイーブ T 細胞およびメモリー細胞では少量で発現される。

【0007】

しかしながら、GITR は、免疫細胞だけでなく腫瘍細胞でも発現される。33 種の腫瘍タイプにおける GITR 発現に関する RNA-Seq データ分析が行われ、それによれば、GITR は、HNSCC (頭頸部扁平上皮癌)、NSCLC (非小細胞肺癌)、乳がん、食道がんおよび膀胱がんで高度に発現されることが解明された。

【0008】

24 種の腫瘍タイプからのサンプルの RNA-Seq 分析は、類似の結果を示した。したがって、GITR は、免疫細胞だけでなく腫瘍細胞の膜でも発現される。腫瘍サンプルにおいて、GITRL-Fc は、T 細胞、CD8 T 細胞、細胞傷害性、Th1 細胞、インターフェロンガンマ、NK 細胞、Teff 細胞、および T 細胞活性化マーカーに関連する遺伝子発現を増加させた。

【0009】

GITR およびそのリガンドの発現は、造血細胞に限定されない。GITR は、ケラチノサイト、破骨細胞前駆体でも発現され、それに対して GITRL は、内皮細胞で発現される。

【0010】

GITRL は、ほとんどの TNF リガンドファミリーメンバーにとって典型的であるように、II 型膜貫通タンパク質である。現在のリサーチから、典型的には、ヒト GITRL は三量体として存在するが、単量体として存在するかまたは他の多量体の形態に集合する場合もあることが示される (Chattopadhyay ら (2007) Proc. Natl. Acad. Sci. 104:19452~19457; Zhou ら (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. 105:635~640)。GITRL の可溶性形態も生産されることを示唆するいくつかの証拠がある (Baltz ら (2008) Blood 112:3735~3743; Mahesh ら (2006) Eur. J. Immunol. 36:2128~2138)。GITRL は、主として、APC として機能し得るマクロファージ、B 細胞、樹状細胞および内皮細胞などの抗原提示細胞 (APC) 上に発現される (Nocentini および Riccardi (2005) E. J. Immunol. 35:1016~1022; Agostini ら (2005) Infect. Immun. 73:7502~7508; および Nocentini ら (2007) E. J. Immunol. 37:11651169)。

【0011】

APC 上の GITRL がレスポンド T 細胞上の GITR に結合すると、GITR シグナル伝達が始まり、それによりレスポンド T 細胞は共刺激され、調節性 T 細胞の抑制性活性は阻害される。GITR シグナル伝達は、CD4+ および CD8+ ナイーブ T 細胞の両方への共活性化シグナルとして機能し、それにより、特に T 細胞受容体 (TCR) 刺激が最適に近い状態になったとき、増殖およびエフェクター機能を誘導または強化する (Schaer ら (2012) Curr. Opin. Immunol. 24:217224)。より具体的には、GITR は、エフェクター T 細胞および調節性 T 細胞への数々の作用を有する可能性があり、このような作用としては、エフェクター T 細胞を共刺激および活

10

20

30

40

50

性化することで、それらが阻害に対してより耐性になるようにすること、調節性T細胞の阻害、エフェクターT細胞の調節性T細胞による抑制への感受性を減少させること、ならびに、循環から調節性T細胞を部分的に喪失させること（Nocentiniら（2007）Eur. J. Immunol. 37: 1165～1169）が挙げられる。

【0012】

GITRの主要な機能、したがって抗GITR抗体の主要な作用は、エフェクターT細胞の増殖および機能化を強化し、Tregsの抑制作用を阻害することである。Teff細胞は、最初のうちはTreg細胞による阻害性腫瘍微小環境および抑制に耐える能力を欠いて生成される。アゴニスト抗GITR抗体、可溶性GITRリガンドまたはDCワクチンを介した、プライミングおよび拡張の二次段階におけるGITRの刺激は、TeffおよびTreg腫瘍応答の両方を、前者を優先してモジュレートし、したがって腫瘍退縮を促進する。したがって、抗GITR抗体は、Teffに、Treg抑制に対する耐性を提供する。

【0013】

集合的に、前述の機能、特に、レスポンダーT細胞の共刺激および調節性T細胞のサブレッサー活性の排除は、GITR活性化が強化された免疫応答をもたらすことを意味する。このような活性化は、感染や腫瘍に対する免疫応答を回復させる可能性を有する。したがって、GITRを活性化することが可能な分子は、強化された免疫応答を開始させることが望ましい場合の条件下で免疫刺激剤として有益であると予想される。

【0014】

抗体は、Tregリンパ球に対するエフェクター、細胞傷害性特性と共に、GITRアゴニストの特性を有していなければならない。

GITRに対する様々な抗体は、当業界において公知である（例えばWO2015187835、WO2015031667、WO2017068186、WO2017096189、WO2017214548から）。

【0015】

現在、23種の抗GITRアゴニスト（抗体／組換えGITRL）が、前臨床および臨床治験中である。2つのみの抗体がフェーズ2臨床治験中であり（TRX518、INCAGN1876）、AMG228、MED1873、MK-4166は、フェーズ1の臨床治験中である。臨床データはほとんど提示されていない。

【0016】

しかしながら、現在のところ世界には、GITRに特異的に結合し、治療的使用のために承認された抗体は存在しない。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0017】

上記のことに関連して、GITRと相互作用し、受容体を活性化し、調節性T細胞のサブレッサー作用を排除し、ADCCエフェクター特性を介して免疫系のT-サブレッサー（調節）成分を阻害する／枯渇させる新規のアゴニスト抗体を作り出すことが重要である。

【課題を解決するための手段】

【0018】

BCD-166は、GITRと相互作用し、受容体を活性化し、調節性T細胞のサブレッサー作用を排除し、ADCCエフェクター特性を介して免疫系のT-サブレッサー（調節）成分を阻害する／喪失させることにより、腫瘍微小環境において、CD8+およびCD4+エフェクター細胞の数を増加させ、免疫系のT-エフェクター成分を活性化するアゴニストモノクローナル抗体である。

【0019】

一側面において、本発明は、GITRに特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、

（a）（i）以下の群：

10

20

30

40

50

NYGMH（配列番号1）またはYYWMY（配列番号12）

から選択されるアミノ酸配列を含むCDR1；

（ii）以下の群：

VIWFDGSNKFYTDSVKG（配列番号2）またはAISWNGGRTYYAESMKG（配列番号13）

から選択されるアミノ酸配列を含むCDR2；

（iii）以下の群：

ELGGYYYS SSGFRPYYYGM DV（配列番号3）またはNRYYS DPNYGMNL（配列番号14）

から選択されるアミノ酸配列を含むCDR3

を含む重鎖可変ドメイン、ならびに、

（b）（i）以下の群：

RASQSIGSWLA（配列番号7）またはTGTSTDIGTYKYIS（配列番号17）

から選択されるアミノ酸配列を含むCDR1；

（ii）以下の群：

AASTLQR（配列番号8）またはGVSHRPS（配列番号18）

から選択されるアミノ酸配列を含むCDR2；

（iii）以下の群：

QQSHSHPLT（配列番号9）またはSSYTSSGTVV（配列番号19）

から選択されるアミノ酸配列を含むCDR3

を含む軽鎖可変ドメイン

を含むモノクローナル抗体またはその抗原結合断片に関する。

【0020】

一部の態様において、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、それぞれ配列番号1、2および3の配列により表されるアミノ酸配列を含むCDR1、2および3を含む重鎖可変ドメインを含む。

【0021】

一部の態様において、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、それぞれ配列番号12、13および14の配列により表されるアミノ酸配列を含むCDR1、2および3を含む重鎖可変ドメインを含む。

【0022】

一部の態様において、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、それぞれ配列番号7、8および9により表されるアミノ酸配列を含むCDR1、2および3を含む軽鎖可変ドメインを含む。

【0023】

一部の態様において、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、それぞれ配列番号17、18および19により表されるアミノ酸配列を含むCDR1、2および3を含む軽鎖可変ドメインを含む。

【0024】

一部の態様において、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、
－ それぞれ配列番号1、2および3の配列により表されるアミノ酸配列を含むCDR1、2および3を含む重鎖可変ドメイン；
－ それぞれ配列番号7、8および9の配列により表されるアミノ酸配列を含むCDR1、2および3を含む軽鎖可変ドメインを含む。

【0025】

一部の態様において、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、
－ それぞれ配列番号12、13および14の配列により表されるアミノ酸配列を含むCDR1、2および3を含む重鎖可変ドメイン；

10

20

30

40

50

－ それぞれ配列番号 17、18 および 19 の配列により表されるアミノ酸配列を含む CDR1、2 および 3 を含む軽鎖可変ドメインを含む。

【0026】

一部の態様において、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 4 のアミノ酸配列に少なくとも 90% 相同なアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む。

一部の態様において、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 4 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む。

【0027】

一部の態様において、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 15 のアミノ酸配列に少なくとも 90% 相同なアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む。

一部の態様において、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 15 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む。

【0028】

一部の態様において、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 10 のアミノ酸配列に少なくとも 90% 相同なアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。

一部の態様において、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 10 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。

【0029】

一部の態様において、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 20 のアミノ酸配列に少なくとも 90% 相同なアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。

一部の態様において、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、配列番号 20 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。

【0030】

一部の態様において、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、
－ 配列番号 4 のアミノ酸配列に少なくとも 90% 相同なアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン；
－ 配列番号 10 のアミノ酸配列に少なくとも 90% 相同なアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。

【0031】

一部の態様において、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、
－ 配列番号 4 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン；
－ 配列番号 10 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。

【0032】

一部の態様において、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、
－ 配列番号 15 のアミノ酸配列に少なくとも 90% 相同なアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン；
－ 配列番号 20 のアミノ酸配列に少なくとも 90% 相同なアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。

【0033】

一部の態様において、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、
－ 配列番号 15 のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン；
－ 配列番号 20 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。

【0034】

一部の態様において、GITR に特異的に結合するモノクローナル抗体は、全長 IgG 抗体である。

10

20

30

40

50

一部の態様において、モノクローナル I g G 抗体は、ヒト I g G 1、I g G 2、I g G 3 または I g G 4 アイソタイプのモノクローナル I g G 抗体である。

【0035】

一部の態様において、モノクローナル I g G 抗体は、ヒト I g G 1 アイソタイプのモノクローナル I g G 抗体である。

一部の態様において、G I T R に特異的に結合するモノクローナル抗体は、アゴニスト特性、抗体依存性細胞傷害 (A D C C) を増加させるが、補体依存性細胞傷害 (C D C) を増加させないように、F c 断片において E 3 4 5 R 突然変異を含む。

【0036】

一部の態様において、モノクローナル抗体は、配列番号 5 の配列に少なくとも 90% 相同なアミノ酸配列を含む重鎖を含む。

10

一部の態様において、モノクローナル抗体は、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。

【0037】

一部の態様において、モノクローナル抗体は、配列番号 6 の配列に少なくとも 90% 相同なアミノ酸配列を含む重鎖を含む。

一部の態様において、モノクローナル抗体は、配列番号 6 のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。

【0038】

一部の態様において、モノクローナル抗体は、配列番号 11 の配列に少なくとも 90% 相同なアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

20

一部の態様において、モノクローナル抗体は、配列番号 11 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【0039】

一部の態様において、モノクローナル抗体は、
- 配列番号 5 の配列に少なくとも 90% 相同なアミノ酸配列を含む重鎖；
- 配列番号 11 の配列に少なくとも 90% 相同なアミノ酸配列を含む軽鎖
を含む。

【0040】

一部の態様において、モノクローナル抗体は、
- 配列番号 5 のアミノ酸配列を含む重鎖；
- 配列番号 11 のアミノ酸配列を含む軽鎖
を含む。

30

【0041】

一部の態様において、モノクローナル抗体は、
- 配列番号 6 の配列に少なくとも 90% 相同なアミノ酸配列を含む重鎖；
- 配列番号 11 の配列に少なくとも 90% 相同なアミノ酸配列を含む軽鎖
を含む。

【0042】

一部の態様において、モノクローナル抗体は、
- 配列番号 6 のアミノ酸配列を含む重鎖；
- 配列番号 11 のアミノ酸配列を含む軽鎖
を含む。

40

【0043】

一部の態様において、モノクローナル抗体は、配列番号 16 の配列に少なくとも 90% 相同なアミノ酸配列を含む重鎖を含む。

一部の態様において、モノクローナル抗体は、配列番号 16 のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。

【0044】

一部の態様において、モノクローナル抗体は、配列番号 21 の配列に少なくとも 90%

50

相同なアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

一部の態様において、モノクローナル抗体は、配列番号 21 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

【0045】

一部の態様において、モノクローナル抗体は、

- － 配列番号 16 の配列に少なくとも 90% 相同なアミノ酸配列を含む重鎖；
- － 配列番号 21 の配列に少なくとも 90% 相同なアミノ酸配列を含む軽鎖

を含む。

【0046】

一部の態様において、モノクローナル抗体は、

- － 配列番号 16 のアミノ酸配列を含む重鎖；
- － 配列番号 21 のアミノ酸配列を含む軽鎖

を含む。

【0047】

一側面において、本発明は、いずれかの前記抗体またはその抗原結合断片をコードする単離された核酸に関する。

一部の態様において、核酸は、DNA である。

【0048】

一側面において、本発明は、上記の核酸を含む発現ベクターに関する。

一側面において、本発明は、前記抗体またはその抗原結合断片を生産するための宿主細胞を得るための方法であって、前記ベクターでの細胞の形質転換を含む方法に関する。

【0049】

一側面において、本発明は、前記核酸を含む前記抗体またはその抗原結合断片を調製するための宿主細胞に関する。

一側面において、本発明は、前記抗体またはその抗原結合断片を得るための方法であって、前記抗体を生産させるのに十分な条件下で、培養培地中で、前記宿主細胞を培養するステップ、必要に応じて、それに続いて得られた抗体を単離および精製するステップを含む方法に関する。

【0050】

一側面において、本発明は、治療有効量の前記抗体またはその抗原結合断片を、1 種または複数の医薬的に許容される賦形剤と組み合わせて含む、GITR によって媒介される疾患または障害を処置するために使用される医薬組成物に関する。

【0051】

一部の態様において、医薬組成物は、子宮頸がん、頭頸部がん、胃がん、乳がん、腎細胞がん、CRC（結腸直腸がん）、（OC）卵巣がん、NSCLC（非小細胞肺癌）を含む群から選択される GITR によって媒介される疾患または障害を処置するために使用されることが意図される。

【0052】

一側面において、本発明は、治療有効量の前記抗体またはその抗原結合断片、および治療有効量の少なくとも 1 種の治療活性を有する抗腫瘍化合物を含む、GITR によって媒介される疾患または障害を処置するための医薬組成物に関する。

【0053】

一部の態様において、医薬組成物は、子宮頸がん、頭頸部がん、胃がん、乳がん、腎細胞がん、CRC（結腸直腸がん）、（OC）卵巣がん、NSCLC（非小細胞肺癌）を含む群から選択される GITR によって媒介される疾患または障害を処置するために使用されることが意図される。

【0054】

一部の態様において、医薬組成物は、化学療法剤、抗体または抗ホルモン剤から選択される治療活性を有する抗腫瘍化合物を含む。

一部の態様において、医薬組成物は、抗 PD1 抗体、抗 PD-L1 抗体、抗 CTLA4

10

20

30

40

50

抗体、抗 4-1BB 抗体、抗 OX40 抗体またはそれらの組合せを含む群から選択される抗体である、治療活性を有する抗腫瘍化合物を含む。

【0055】

一部の態様において、医薬組成物は、小分子である治療活性を有する抗腫瘍化合物を含む。

一部の態様において、医薬組成物は、自然または適応免疫の活性化剤の群から選択される、治療活性を有する抗腫瘍化合物を含む。

【0056】

医薬組成物の一部の態様において、前記抗体および少なくとも 1 種の治療活性を有する抗腫瘍化合物は、逐次的に投与される。

医薬組成物の一部の態様において、前記抗体および少なくとも 1 種の治療活性を有する抗腫瘍化合物は、同時に投与される。

【0057】

一側面において、本発明は、GITR の生物学的活性の阻害が必要な対象において GITR の生物学的活性を阻害するための方法であって、有効量の前記抗体またはその抗原結合断片を投与するステップを含む方法に関する。

【0058】

一側面において、本発明は、GITR によって媒介される疾患または障害を処置するための方法であって、治療有効量の前記抗体もしくはその抗原結合断片または前記医薬組成物を、このような処置が必要な対象に投与するステップを含む方法に関する。

【0059】

一部の態様において、処置するための方法は、子宮頸がん、頭頸部がん、胃がん、乳がん、腎細胞がん、CRC（結腸直腸がん）、（OC）卵巣がん、NSCLC（非小細胞肺癌）を含む群から選択される疾患または障害を含む。

【0060】

一側面において、本発明は、前記抗体もしくはその抗原結合断片または前記医薬組成物の使用であって、GITR によって媒介される疾患または障害のこのような処置が必要な対象における処置のための使用に関する。

【0061】

一部の態様において、使用は、以下の群：子宮頸がん、頭頸部がん、胃がん、乳がん、腎細胞がん、CRC（結腸直腸がん）、（OC）卵巣がん、NSCLC（非小細胞肺癌）から選択される疾患または障害を含む。

【図面の簡単な説明】

【0062】

【図1】タンパク質生産のためのプラスミド pEE-GITR-TEV-Fc ラマの図である。

【図2】タンパク質生産のためのプラスミド pEE-GITR-Fc の図である。

【図3】プラスミド pEE-humGITR-リガンド-フォルドン-EPEA のマップを示す図である。

【図4】SDS-PAGE（4～20%ゲル）を示す図である。 1. Actemra 2. 5mg 2. Fermentas unstained PWマーカー 3. - 4. GITR-TEV-Fc-ラマ+β-ME 10ml 5. アンジオポエチン2-H6F+β-ME 10ml 6. - 7. GITR-TEV-Fc-ラマ-β-ME 10ml 8. アンジオポエチン2-H6F-β-ME 10ml。

【図5】SDSゲル電気泳動を示す図である。 1. Fermentas unstained PWマーカー 2. - 3. 精製前のhGITRリガンド-EPEA培地 5ml 4. 精製後のhGITRリガンド-EPEA培地 5ml 5. hGITRリガンド-EPEA。

【図6】ヒトナীবコンビナトリアルライブラリーの合成のスキームを示す図である。

【図7】Fabファージディスプレイライブラリーをクローニングするために使用された

10

20

30

40

50

ファージミド pH 5 のマップを示す図である。

【図 8】分泌された Fab の生産のための発現プラスミド pLL のマップを示す図である。

【図 9】哺乳類細胞における一過性の抗体生産のための抗体の重鎖をコードする発現ベクター pEE-BCD166-01-001-VH-HC のマップを示す図である。

【図 10】哺乳類細胞における一過性の抗体生産のための抗体の軽鎖をコードする発現ベクター pEE-BCD166-01-001-VK-CK のマップを示す図である。

【図 11】12%ゲル+β-MEにおける SDS-PAGE を示す図である。 1. Actemra 5ml 2. Fermentas unstained PW マーカー 3. 4. 精製前の抗 GITR 抗体ロット番号 1161 培地 5ml 5. 精製後の抗 GITR 抗体ロット番号 1161 培地 5ml 6. 抗 GITR 抗体ロット番号 1161 5ml 7. 抗 GITR 抗体ロット番号 1162 5ml 8. 抗 GITR 抗体ロット番号 1163 5ml 9. 抗 GITR 抗体ロット番号 1164 5ml 10. 抗 GITR 抗体ロット番号 1165 5ml 11. 精製前の抗 GITR 抗体ロット番号 1166 培地 5ml 12. 精製後の抗 GITR 抗体ロット番号 1166 培地 5ml 13. 抗 GITR 抗体ロット番号 1166 5ml 14. 抗 GITR 抗体ロット番号 1167 5ml。

【図 12】12%ゲル+β-MEにおける SDS-PAGE を示す図である。 1. Fermentas unstained PW マーカー 2. 精製前の抗 GITR 抗体ロット番号 1208 培地 10ml 3. 精製後の抗 GITR 抗体ロット番号 1208 培地 10ml 4. 抗 GITR 抗体ロット番号 1208 5ml 5. 抗 GITR 抗体ロット番号 1209 5ml 6. 抗 GITR 抗体ロット番号 1210 5ml 7. 抗 GITR 抗体ロット番号 1211 5ml 8. 抗 GITR 抗体ロット番号 1212 5ml 9. 抗 GITR 抗体ロット番号 1213 5ml 10. 精製前の抗 GITR 抗体ロット番号 1214 培地 10ml 11. 精製後の抗 GITR 抗体ロット番号 1214 培地 10ml 12. 抗 GITR 抗体ロット番号 1214 5ml。

【図 13】レポーター細胞株アッセイにおけるロット 1161 (BCD166-01-01)、1210 BCD166-01-011) および 1213 BCD166-01-014) の抗 GITR モノクローナル抗体の特異的なアゴニスト活性の調査の結果を示すグラフである。

【図 14】ヒト GITR、マウス GITR、およびカニクイザル GITR への BCD166-01-01 抗体の特異的な結合の調査の結果を示すグラフである。

【図 15】ヒト GITR、マウス GITR、およびカニクイザル GITR への BCD166-01-011 抗体の特異的な結合の調査の結果を示すグラフである。

【図 16】ヒト GITR、マウス GITR、およびカニクイザル GITR への BCD166-01-014 抗体の特異的な結合の調査の結果を示すグラフである。

【図 17】問題の BCD166-01-01、BCD166-02-01、BCD166-01-014 の細胞アゴニストアッセイにおける活性化のレベルの結果を示すグラフである。

【図 18】問題の BCD166-02-01、BCD166-01-01、BCD166-01-014、BCD166-02-014 の ADCC アッセイにおける EC50 値の結果を示すグラフである。

【図 19】問題の BCD166-01-01、BCD166-02-01、BCD166-01-014 の CDC レベルの結果を示すグラフである。

【図 20】陰性対照と比較したレスポナー細胞 (NK) への問題の抗 GITR 候補の作用の結果を示すグラフである。

【図 21】陰性対照と比較したレスポナー細胞 (B) への問題の抗 GITR 候補の作用の結果を示すグラフである。

【図 22】陰性対照と比較したレスポナー細胞 (CD3) への問題の抗 GITR 候補の作用の結果を示すグラフである。

【図 23】陰性対照と比較したレスポナー細胞 (CD8+T 細胞) への問題の抗 GITR 候補の作用の結果を示すグラフである。

【図24】陰性対照と比較したレスポンド細胞（CD4+T細胞）への問題の抗GITR候補の作用の結果を示すグラフである。

【図25】ドナー1細胞材料の問題の抗GITR候補の作用下での抗体依存性nTreg枯渇の分析を示す図である。

【図26】ドナー2細胞材料の問題の抗GITR候補の作用下での抗体依存性nTreg枯渇の分析を示す図である。

【図27】ドナー1およびドナー2細胞材料の問題の抗GITR候補の作用下でのiTregの抗体依存性枯渇の分析を示す図である。

【図28】抗がん作用を刺激する炎症促進性サイトカインIL-2およびIFN-γの分泌のレベルへの抗GITR抗体の作用の分析の結果を示す図である。

【図29】BCD166-02-01候補のガンマ受容体への結合親和性定数に関するデータの表である。

【図30】50℃で72時間のインキュベーション下でのBCD166-02-01の安定性を示すグラフである。

【図31】50℃で72時間のインキュベーション下でのBCD166-01-014の安定性を示すグラフである。

【図32】実験中のグループにおける腫瘍体積の平均値を示す図である。

【図33】33日目における腫瘍増殖阻害の指標を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0063】

定義および一般的な方法

別段の指定がない限り、本明細書において使用される全ての専門用語や科学用語は、当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。

【0064】

さらに、文脈上別段の要求がなされない限り、単数形の用語は複数形を含むものとし、複数形の用語は単数形を含むものとする。典型的には、細胞培養の分類および方法、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学、分析化学、有機合成化学、医化学および製薬化学、加えて、本明細書に記載されるタンパク質および核酸のハイブリダイゼーションおよび化学的性質は周知であり、当業者によって広く使用される。酵素反応および精製方法は、当業界において一般的なように、または本明細書に記載されるように、製造元の指示に従って実行される。

抗体に関連する定義

TNFRSF18、GITR（グルココルチコイド誘導性TNFR関連タンパク質／TNFRSF18／腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー）は、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーに属する受容体である膜タンパク質である。GITRは、216個のアミノ酸からなり、26kDaの分子量を有するI型膜貫通タンパク質である。N末端の細胞外ドメインは、3つのTNFR-Cys反復およびN-グリコシル化部位を含む。GITRの3つのシステインリッチなドメインおよび細胞質内テールは、4-1BB、OX40およびCD27と著しい相同性を有する（Nocentiniら（1997）Proc. Natl. Acad. Sci. 94:6216~6221）。

【0065】

GITR遺伝子の増幅および／またはそのタンパク質の過剰発現が、子宮頸がん、頭頸部がん、胃がん、乳がん、腎細胞がん、CRC（結腸直腸がん）、（OC）卵巣がん、NSCLC（非小細胞肺がん）を含む多くのがん疾患で見出された。

【0066】

用語「結合分子」は、抗体および免疫グロブリンを含む。

用語「抗体」または「免疫グロブリン」（Ig）は、本明細書で使用される場合、抗体全体および任意の抗原結合断片（すなわち、「抗原結合部分」）またはそれらの単一の鎖を含む。用語「抗体」は、ジスルフィド結合、または抗原結合部分によって相互接続した少なくとも2つの重（H）鎖および2つの軽（L）鎖を含む糖タンパク質を指す。各重鎖

10

20

30

40

50

は、重鎖可変領域（本明細書ではVHという略称で言及される）および重鎖定常領域を含む。ギリシャ文字： α 、 δ 、 ϵ 、 γ および μ によって表される5つのタイプの哺乳類Ig重鎖が公知である。存在する重鎖のタイプは、抗体のクラスを定義する；これらの鎖は、それぞれIgA、IgD、IgE、IgG、およびIgM抗体に見出される。別個の重鎖はサイズと組成の点で異なっており、 α および γ は、およそ450アミノ酸を含有するが、 μ および ϵ は、およそ550アミノ酸を有する。各重鎖は、2つの領域、定常領域および可変領域を有する。定常領域は、同じアイソタイプの全ての抗体で同一であるが、異なるアイソタイプの抗体では異なる。重鎖 γ 、 α および δ は、3つの定常ドメインCH1、CH2およびCH3で（一列で）構成される定常領域、ならびにフレキシビリティーを追加するためのヒンジ領域を有する（Woof J.、Burton D.、Nat Rev Immunol 4、2004、cc. 89～99）；重鎖 μ および ϵ は、4つの定常ドメインCH1、CH2、CH3およびCH4で構成される定常領域を有する。哺乳動物において、ラムダ（ λ ）およびカッパ（ κ ）によって表される2つのみのタイプの軽鎖が公知である。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書ではVLという略称で言及される）および軽鎖定常領域からなる。軽鎖のおよその長さは、211～217アミノ酸である。好ましくは、軽鎖は、カッパ（ κ ）軽鎖であり、定常ドメインCLは、好ましくはCカッパ（ κ ）である。

【0067】

本発明による「抗体」は、いずれのクラスに属するもの（例えばIgA、IgD、IgE、IgG、およびIgM、好ましくはIgG）、またはサブクラスに属するもの（例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2、好ましくはIgG1）でもよい。

【0068】

VLおよびVH領域は、フレームワーク領域（FR）と呼ばれるより高度に保存された領域の間に散在する相補性決定領域（CDR）と呼ばれる超可変領域にさらに細かく分類できる。各VHおよびVLは、アミノ末端からカルボキシ末端に以下の順番：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4で配列された3つのCDRおよび4つのFRで構成される。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。抗体の定常領域は、免疫系（例えばエフェクター細胞）の様々な細胞および古典的補体系の第1の成分（C1q）などの宿主組織または因子への免疫グロブリンの結合を媒介することができる。

【0069】

抗体の「抗原結合部分」または「抗原結合断片」（または単に「抗体部分」または「抗体断片」という用語は、本明細書で使用される場合、抗原に特異的に結合する能力を保持する抗体の1つまたは複数の断片を指す。全長抗体の断片が、抗体の抗原に結合する機能を発揮し得ることが示されている。抗体の「抗原結合部分」という用語に含まれる結合断片の例としては、（i）Fab断片、すなわちVL、VH、CLおよびCH1ドメインからなる1価断片；（ii）F(ab')₂断片、すなわちヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結された2つのFab断片を含む2価断片；（iii）VHおよびCH1ドメインからなるFd断片；（iv）抗体の単一のアームのVLおよびVHドメインからなるFv断片；（v）VH/VHHドメインからなるdAb断片（Wardら、（1989）Nature 341：544～546）；および（vi）抽出された相補性決定領域（CDR）が挙げられる。加えて、Fv断片の2つの領域、VLおよびVHは別個の遺伝子によってコードされ、それらは、VL領域とVH領域が対になって1価分子（単鎖Fv（scFv））として公知；例えばBirdら（1988）Science 242：423～426；およびHoustonら（1988）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85：5879～5883を参照）を形成している単一のタンパク質鎖をそれらが受け入れることを可能にする合成リンカーを使用する組換え方法を使用して合体させることができる。このような一本鎖分子も抗体の「抗原結合部分」という用語に含まれるものとする。このような抗体断片は、当業者公知の従来技術を使用して得られ、断片は、

10

20

30

40

50

無傷抗体の場合と同じ方式でスクリーニングされる。

【0070】

好ましくは、本発明の抗原結合部分または抗体全体の抗原結合部分のCDRは、マウス、ラマまたはヒトドナーライブラリーから誘導されるか、または実質的にヒト起源であり、特定のアミノ酸残基が、特異的な抗体の特性、例えばKD、koff、IC50、EC50、ED50を最適化するために、変更されている、例えば異なるアミノ酸残基で置換されている。好ましくは、本発明の抗体のフレームワーク領域は、ヒト起源であるか、または実質的にヒト起源である（少なくとも80、85、90、95、96、97、98または99%がヒト起源）。

【0071】

他の態様において、本発明の抗原結合部分は、これらに限定されないが、マウス、ラマ、ウサギ、ラットまたはハムスターなどの他の非ヒト種由来であってもよい。代替として、抗原結合領域は、ヒト種由来であってもよい。

【0072】

用語「可変」は、抗体間で可変ドメインの特定の部分が配列の点で大きく異なっているという事実を指す。Vドメインは、抗原結合を媒介し、特定の抗体それぞれの、その特定の抗原に対する特異性を決定する。しかしながら、可変性は、可変ドメインの110アミノ酸の範囲にわたり均一に分布しない。その代わりに、V領域は、「高度可変領域」またはCDRと呼ばれる極端な可変性を有するそれより短い領域によって分離した15~30アミノ酸のフレームワーク領域（FR）と呼ばれる不変の断片からなる。天然の重鎖および軽鎖それぞれの各可変ドメインは、4つのFRを含み、これらは主として、ベータシート構造を接続する、一部の 경우에는ベータシート構造の一部を形成するループを形成する3つの高度可変領域によって接続されるベータシート構成をとる。各鎖における高度可変領域は、FRと近接して一緒に保持され、他の鎖からの高度可変領域と共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する。定常ドメインは、抗体の抗原への結合に直接関与しないが、抗体依存性細胞傷害（ADCC）における抗体の参加などの様々なエフェクター機能を呈する。

【0073】

用語「高度可変領域」は、本明細書によれば、抗原結合に関与する抗体のアミノ酸残基を指す。典型的には、高度可変領域は、一般的に、「相補性決定領域」もしくは「CDR」からのアミノ酸残基および／または「高度可変ループ」からのアミノ酸残基を含む。

【0074】

特定の場合において、標的エピトープへの結合親和性を改善するために、1つまたは複数のCDRアミノ酸残基を変更することが望ましい場合もある。これは「親和性成熟」として公知であり、任意選択で、ヒト化と併用して実行してもよく、例えば抗体のヒト化が、結合特異性または親和性の低減を引き起こし、復帰突然変異だけで結合特異性または親和性を十分に改善することができない状況において実行してもよい。様々な親和性成熟方法は当業界において公知であり、例えば、Burksら、Proc Natl Acad Sci USA、94：412~417（1997）によって説明されるインビトロのスクリーニング飽和突然変異誘発方法、およびWuら、Proc Natl Acad Sci USA 95：6037 6042（1998）による段階的なインビトロの親和性成熟方法がある。

【0075】

「フレームワーク領域」（FR）は、CDR残基以外の可変ドメイン残基である。各可変ドメインは、典型的には、FR1、FR2、FR3およびFR4として識別された4つのFRを有する。CDRがKabatに従って定義される場合、軽鎖FR残基は、およそ、残基1~23（LCFR1）、35~49（LCFR2）、57~88（LCFR3）、および98~107（LCFR4）に位置し、重鎖FR残基は、重鎖において、およそ、残基1~30（HCFR1）、36~49（HCFR2）、66~94（HCFR3）、および103~113（HCFR4）に位置する。CDRが高度可変ループからのアミ

10

20

30

40

50

ノ酸残基を含む場合、軽鎖FR残基は、軽鎖において、およそ、残基1～25（LCFR1）、33～49（LCFR2）、53～90（LCFR3）、および97～107（LCFR4）に位置し、重鎖FR残基は、重鎖残基において、およそ、残基1～25（HCFR1）、33～52（HCFR2）、56～95（HCFR3）、および102～113（HCFR4）に位置する。一部の場合において、CDRが、Kabattで定義されるCDRと高度可変ループのCDRの両方からのアミノ酸を含む場合、FR残基は、それに従って調整されると予想される。例えば、CDRH1がアミノ酸H26～H35を含む場合、重鎖FR1残基は1～25位にあり、FR2残基は36～49位にある。

【0076】

免疫グロブリンの断片の結晶化可能な領域（「Fc領域、Fc」）は、細胞表面Fc受容体と相互作用する免疫グロブリン分子の「テール」領域、加えて、補体系の一部のタンパク質である。この特性は、抗体が免疫系を活性化することを可能にする。IgG、IgAおよびIgD抗体アイソタイプにおいて、Fc領域は、それぞれ2つの重鎖の第2および第3の定常ドメインからの2つの同一なタンパク質断片で構成され、IgMおよびIgEアイソタイプにおいて、Fc領域は、各ポリペプチド鎖に3つの重鎖定常ドメイン（CHドメイン2～4）を含有する。

【0077】

標的抗原と「結合する」本発明の抗体は、抗体が診断剤および／または治療剤として使用できる程度に十分な親和性で抗原と結合し、前記抗原を発現するタンパク質または細胞を標的化することが可能であり、他のタンパク質との交差反応がわずかである抗体を指す。分析方法：蛍光活性化セルソーティング（FACS）、ラジオイムノアッセイ（RIA）またはELISAによれば、このような態様において、非標的タンパク質への抗体結合の程度は、特異的な標的タンパク質への抗体結合の10%未満である。抗体の標的分子への結合に関して、特定のポリペプチド標的上の特定のポリペプチドまたはエピトープへの「特異的な結合」、またはそれに「特異的に結合する」またはそれに「特異的である」という用語は、わかる程度に（測定できる程度に）非特異的な相互作用と異なる結合を意味する（例えば、bH1-44またはbH1-81の場合、非特異的な相互作用は、ウシ血清アルブミン、カゼイン、ウシ胎児血清またはニュートラアビジンへの結合である）。

【0078】

特異的な結合は、例えば、対照分子の結合と比較して分子の結合を決定することによって測定することができる。例えば、特異的な結合は、標的に類似した対照分子、例えば、過量の非標識標的との競合によって決定することができる。この場合、特異的な結合は、標識標的のプロープへの結合が、過量の非標識標的によって競合的に阻害される場合に示される。本明細書で使用される場合、特定のポリペプチドまたは特定のポリペプチド標的上のエピトープとの「特異的な結合」またはそれに「特異的に結合する」またはそれに「特異的である」という用語は、標的に対して、少なくとも約200 nM、または少なくとも約150 nM、または少なくとも約100 nM、または少なくとも約60 nM、または少なくとも約50 nM、または少なくとも約40 nM、または少なくとも約30 nM、または少なくとも約20 nM、または少なくとも約10 nM、または少なくとも約8 nM、または少なくとも約6 nM、または少なくとも約4 nM、または少なくとも約2 nM、または少なくとも約1 nMのKd、またはそれより大きいKdを有する分子によって記載することができる。一態様において、用語「特異的な結合」は、分子が、他のいずれのポリペプチドまたはポリペプチドエピトープに実質的に結合することなく特定のポリペプチドまたは特定のポリペプチド上のエピトープに結合する場合の結合を指す。

【0079】

用語「Ka」は、本明細書で使用される場合、特定の抗体－抗原相互作用の会合（オン）速度を指す。

用語「Kd」は、本明細書で使用される場合、特定の抗体－抗原相互作用の解離（オフ）速度を指す。

【0080】

「結合親和性」は、一般的に、分子（例えば抗体）の単一の結合部位とその結合パートナー（例えば抗原）との間の非共有結合の相互作用の総計の強度を指す。別段の指定がない限り、「結合親和性」は、結合対のメンバー（例えば抗体と抗原）間の1：1の相互作用を反映する固有の（特徴的な、真の）結合親和性を指す。その結合パートナーYへの分子Xの親和性は、一般的に解離定数（ K_d ）により表すことができる。好ましい K_d 値は、約200 nM、150 nM、100 nM、60 nM、50 nM、40 nM、30 nM、20 nM、10 nM、8 nM、6 nM、4 nM、2 nM、1 nM、またはそれ未満である。親和性は、本明細書に記載されるものを含む当業界において公知の一般的な方法によって測定することができる。低い親和性の抗体は通常、抗原に結合するのが遅く、容易に解離する傾向があるが、それに対して高い親和性の抗体は通常、抗原への結合がそれより速く、より長く結合した状態のままである傾向がある。結合親和性を測定する様々な方法が当業界において公知であり、そのうちのいずれかを本発明の目的のために使用することができる。

【0081】

一態様において、「 K_d 」または「 K_d 値」は、25℃で、固定化した抗原CM5チップで、約10の反応単位（RU）でBIAcore（商標）-2000またはBIAcore（登録商標）-3000（BIAcore, Inc., Piscataway, N. J.）を使用する表面プラズモン共鳴アッセイを使用することによって測定される。簡単に言えば、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ（CM5、BIAcore Inc.）は、製造元の指示に従って、N-エチル-N'-（3-ジメチルアミノプロピル）-カルボジイミド塩酸塩（EDC）およびN-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）で活性化される。抗原を、10 mMの酢酸ナトリウム、pH 4.8で5 μ g/ml（約0.2 μ M）に希釈し、次いで5 μ l/分の流速で注入して、およそ10の反応単位（RU）のタンパク質のカップリングを達成する。抗原の注入後、1 Mエタノールアミン溶液を注入して、未反応の基をブロックする。反応速度測定のために、0.05% Tween 20（PBST）を含むPBSでのFabの2倍連続希釈物（例えば0.78 nMから500 nM）を、25℃で、およそ25 μ l/分の流速で注入する。オンレート（ k_{on} ）およびオフレート（ k_{off} ）は、簡単な1対1のラングミュア結合モデル（BIAcoreの評価ソフトウェア、バージョン3.2）を使用して、同時に会合および解離センサーグラムを合わせることによって計算される。平衡解離定数（ K_d ）は、 k_{off}/k_{on} の比率として計算される。例えばChen, Y.ら、（1999）J. Mol. Biol. 293：865～881を参照されたい。オンレートが上記の表面プラズモン共鳴アッセイにより $10^6 M^{-1} s^{-1}$ を超える場合、オンレートは、分光計、例えばストップフローを備えた分光光度計（spectrophotometer）（Aviv Instruments）または攪拌キュベットを有する8000シリーズのSLM-Aminco分光光度計（ThermoSpectronic）で測定した場合の、増加する濃度の抗原の存在下における、PBS、pH 7.2中の20 nM抗抗原抗体溶液（Fab形態）の25℃での蛍光発光強度の増加または減少を測定する蛍光性クエンチング技術（励起=295 nm；放出=340 nm、16 nmの帯域通過）を使用することによって決定することができる。

【0082】

用語「 k_{off} 」は、結合分子と抗原との特定の相互作用のオフレート定数を指す。オフレート定数 k_{off} は、バイオレイヤー干渉法を使用して、例えば、Octet（商標）システムを使用して測定することができる。

【0083】

本発明による「オンレート」または「 k_{on} 」はまた、25℃で、固定化した抗原CM5チップで、約10の相対単位（反応単位、RU）でBIAcore（商標）-2000またはBIAcore（登録商標）-3000（BIAcore, Inc., Piscataway, N. J.）を使用する上記の表面プラズモン共鳴アッセイを使用することによって測定することができる。簡単に言えば、カルボキシメチル化デキストランバイオセ

ンサーチップ（CM5、BIAcore Inc.）は、製造元の指示に従って、N-エチル-N'-（3-ジメチルアミノプロピル）-カルボジイミド塩酸塩（EDC）およびN-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）で活性化される。抗原を、10 mMの酢酸ナトリウム、pH 4.8で5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ （約0.2 μM ）に希釈し、次いで5 $\mu\text{L}/\text{分}$ の流速で注入して、およそ10反応単位（RU）のタンパク質のカップリングを達成する。抗原の注入の後、1 Mエタノールアミン溶液を注入して、未反応の基をブロックする。

【0084】

別段の規定がない限り、本発明のポリペプチドに関する「生物学的に活性な」および「生物学的活性」および「生物学的な特徴」という用語は、生体分子に結合する能力を有することを意味する。

【0085】

用語「生体分子」は、核酸、タンパク質、炭水化物、脂質、およびそれらの組合せを指す。一態様において、生体分子は天然に存在する。

抗体断片、例えばFabおよびF(ab')₂断片は、従来の技術、例えば抗体全体のパインまたはペプシン消化を使用して、抗体全体から調製することができる。さらに、抗体、その部分および免疫接着分子は、標準的な組換えDNA技術を使用して、例えば本明細書に記載されるように調製することができる。

【0086】

用語「組換え抗体」は、抗体をコードするヌクレオチド配列を含む細胞または細胞株で発現される抗体を指すことが意図され、この場合、前記ヌクレオチド配列は、天然において細胞と関連していない。

【0087】

用語「バリエーション抗体」は、本明細書で使用される場合、その「親」抗体のアミノ酸配列と、親抗体の配列と比較した1つまたは複数のアミノ酸残基の付加、欠失および／または置換に基づき異なるアミノ酸配列を有する抗体を指すことが意図される。好ましい態様において、バリエーション抗体は、親抗体と比較して、少なくとも1つまたは複数の（例えば1～12、例えば2、3、4、5、6、7、8または9、10、11または12個；一部の態様において、1から約10個の）アミノ酸の付加、欠失、および／または置換を含む。一部の態様において、このような付加、欠失および／または置換は、バリエーション抗体のCDR中でなされる。バリエーション抗体の配列に関する同一性または相同性は、本明細書では、配列をアライメントし、必要に応じて配列同一性の最大パーセントを達成するためにギャップを導入した後の、親抗体の残基と同一なバリエーション抗体配列中のアミノ酸残基のパーセンテージとして定義される。バリエーション抗体は、親抗体が結合するのと同じ抗原に、好ましくはエピトープに結合する能力を保持し、一部の態様において、少なくとも1つの特性または生物学的活性が親抗体のものより優れている。例えば、バリエーション抗体は、親抗体と比較して、例えばより強い結合親和性、より長い半減期、より低いIC₅₀値、または抗原の生物学的活性を阻害する強化された能力を有していてもよい。本明細書において特に興味深いバリエーション抗体は、親抗体と比較して、生物学的活性の少なくとも2倍（好ましくは少なくとも5倍、10倍または20倍）の強化を示すものである。

【0088】

用語「二重特異性抗体」は、単一の生体分子上の2種の別個のエピトープへの特異的な結合が可能な、または2種の別個の生体分子上のエピトープへの特異的な結合が可能な抗原結合ドメインを有する抗体を指す。また二重特異性抗体は、本明細書では「二重特異性」を有する、または「二重特異性」抗体であるとも言及される。

【0089】

用語「キメラ抗体」は、広義には、1つの抗体の1つまたは複数の領域と、1つまたは数々の他の抗体、典型的には、部分的にヒトおよび部分的に非ヒトの抗体、すなわち部分的に非ヒト動物、例えばマウス、ラット、もしくは他のげっ歯類、またはラクダ科動物、例えばラマおよびアルパカ由来の抗体の1つまたは複数の領域とを含む抗体を指すことが意図される。ヒト抗抗体免疫応答、例えば、マウス抗体の場合、ヒトの抗マウス抗体免疫

10

20

30

40

50

応答のリスクを低減するために、一般的に、非ヒト抗体よりもキメラ抗体が好ましい。典型的なキメラ抗体の例は、可変領域配列がマウス配列であり、一方で定常領域配列がヒトであるものである。キメラ抗体の場合、非ヒト部分は、抗体をヒト化するためにさらなる変更に従われていてもよい。

【0090】

用語「ヒト化」は、抗体が、完全にまたは部分的に非ヒト起源を有する、例えば、それぞれ目的の抗原でマウスまたはラマを免疫化することにより得られたマウスまたはラマ抗体であるか、またはこのようなマウスまたはラマの抗体に基づくキメラ抗体である場合、ヒトにおける免疫応答を回避するかまたは最小化するために、特定のアミノ酸、特に重鎖および軽鎖のフレームワーク領域および定常ドメインにおける特定のアミノ酸を置換することが可能であるということを指すことが意図される。抗体の標的抗原との相互作用の特異性は、主として重鎖および軽鎖の6つのCDR領域に配置されたアミノ酸残基に存在する。この理由のために、CDR内のアミノ酸配列は、CDRの外側の配列より、個々の抗体間ではるかに高い可変性を有する。CDR配列はほとんどの抗体-抗原相互作用に関与するため、例えば特異的な抗体からのCDR配列と異なる抗体からのフレームワーク配列とを発現する発現ベクターを構築することによって、特異的な天然に存在する抗体、またはより一般的には、前記アミノ酸配列を有するいずれかの特異的な抗体の特性を模擬する組換え抗体を発現させることが可能である。結果として、非ヒト抗体を「ヒト化」し、多くの場合、最初の抗体の結合特異性および親和性を保つことが可能である。免疫原性を正確に予測する、それによって特定の抗体のヒト抗体応答を正確に予測することは不可能であるが、非ヒト抗体は、典型的には、ヒト抗体より高い免疫原性を有する。キメラ抗体は、外来（例えばげっ歯類またはラクダ科動物）定常領域がヒト起源の配列で置換された場合、一般的に完全に外来起源のものより低い免疫原性を有することが示されており、治療抗体における傾向は、ヒト化抗体または完全にヒトの抗体に向かっている。それゆえに、非ヒト起源のキメラ抗体または他の抗体は、ヒト抗体応答のリスクを低減するためにヒト化されてもよい。

【0091】

キメラ抗体の場合、ヒト化は、典型的には、可変領域配列のフレームワーク領域の改変を含む。相補性決定領域（CDR）の一部であるアミノ酸残基は、ほとんどの場合、ヒト化によって改変されないと予想されるが、一部の 경우에는、CDRの個々のアミノ酸残基を改変するために、例えば、グリコシル化部位、脱アミド部位、アスパラギン酸異性化部位、または望ましくないシステインまたはメチオニン残基を欠失させるために、望ましい場合がある。N結合型グリコシル化は、トリペプチド配列Asn-X-SerまたはAsn-X-Thr（式中、Xは、Proを除くいずれのアミノ酸であってもよい）においてオリゴ糖鎖をアスパラギン残基に取り付けることによって作製される。N-グリコシル化部位の除去は、好ましくは保存的置換の方法によって、AsnまたはSer/Thr残基のいずれかを異なる残基で突然変異させることによって達成することができる。アスパラギンおよびグルタミン残基の脱アミドは、pHのような因子や表面露出に応じて行うことができる。アスパラギン残基は特に、主として配列Asn-Gly中に存在する場合、さらに、より低い程度ではあるが他のジペプチド配列、例えばAsn-Ala中に存在する場合も、脱アミドを受けやすい。CDR配列がこのような脱アミド部位、特にAsn-Glyを含む場合、典型的には関連する残基のうち1つを欠失させるために保存的置換によって、この部位を除去することが望ましい場合がある。

【0092】

抗体配列のヒト化のための多数の方法が当業界において公知である。1つの一般的に使用される方法は、CDRグラフティングである。CDRグラフティングは、KabatによるCDR定義に基づいていてもよいが、最終版（Magdeline-Beuzelinら、Crit Rev. Oncol Hematol. 64:210-225（2007））は、IMGT（登録商標）（international Immunogenetics information system（登録商標）、www.imgt.org

g) の定義は、ヒト化の結果を改善できることを示唆している (Le francら、Dev. Comp Immunol. 27:55~77 (2003) を参照)。一部の場
合において、CDR グラフティングは、CDR グラフティングされた非ヒト抗体の結合特異性
および親和性、したがって生物学的活性を、CDR を得た親抗体と比較して、低減させる
ことができる。復帰突然変異 (これは時に「フレームワーク領域修復」と称される) は、
親抗体の結合特異性および親和性を回復させるために、典型的にはフレームワーク領域中
の、CDR グラフティングされた抗体の選択された位置に導入されてもよい。可能性のある
復帰突然変異のための位置の同定は、文献や抗体データベースで入手可能な情報を使用
して実行することができる。復帰突然変異の候補であるアミノ酸残基は、典型的には抗体
分子の表面に配置されているものであるが、それに対して埋もれている残基または低い程
度の表面露出を有する残基は通常、変更されないと予想される。CDR グラフティングお
よび復帰突然変異に代わるヒト化技術は、リサーフェイシングであり、それにおいて、非
ヒト起源の表面露出していない残基は保持され、それに対して表面残基はヒト残基に変更
される。

【0093】

完全ヒト抗体は、2つの技術：インビトロにおける収集されたファージライブラリーま
たはインビボにおけるヒト化動物 (マウス、ラットなど) の免疫化の使用を使用して生成
することができる。

【0094】

コンビナトリアルファージ抗体ライブラリーの構築は、遺伝子レパートリー源の選択か
ら始まり、それに応じて数々の抗体ライブラリーのタイプをナイーブ、免疫および合成に
区別することができる。ナイーブおよび免疫ライブラリーは、天然に再構成された遺伝子
を使用して構築され、このような遺伝子は、それぞれ健康なドナーまたは特定の抗原で免
疫化されたドナーの可変免疫グロブリンドメインをコードする。この目的のために、抗体
生産リンパ系細胞株からの mRNA が単離される。主に末梢血リンパ球が使用されるが、
一部の場合において、脾細胞 [Sheets MD、Amersdorfer P、Fin
nern R、Sargent P、Lindquist E、Schier Rら、Ef
ficient construction of a large nonimmune
phage antibody library: the production of
high-affinity human single-chain antibodi
es to protein antigens. Proc Natl Acad Sci
USA 1998、95:6157~6162および de Haard HJ、van N
eer N、Reurs A、Hufton SE、Roovers RC、Hender
ikx Pら、A large non-immunized human Fab fra
gment phage library that permits rapid iso
lation and kinetic analysis of high affini
ty antibodies. J Biol Chem 1999、274:18218~
18230.]、扁桃細胞または骨髄リンパ球 [Vaughan TJ、Williams
AJ、Pritchard K、Osbourn JK、Pope AR、Earnsha
w JCら、Human antibodies with sub-nanomolar
affinities isolated from a large non-immu
nized phage display library. Nat Biotechno
l 1996、14:309~314.] も同様に使用されてきた。次いで mRNA に基
づき cDNA が合成され、抗体の可変ドメインをコードする遺伝子の全ての可能性のある
バリエーションの cDNA コピーを生じるオリゴ dT プライマーと統計学的に考案されたヘ
キサヌクレオチドの両方を使用することができる [Ulitin AB、Kapralo
va MV、Laman AG、Shepelyakovskaya AO、Bulgak
ova EB、Fursova KKら、The library of human mi
niantibodies in the phage display format:
Designing and testing DAN: Izd-vo "Nauka"; 20

10

20

30

40

50

05.]。

【0095】

現在cDNAレベルで、増幅した遺伝子の範囲を1つのまたは数々の可変ドメインの遺伝子ファミリーまたは抗体アイソタイプに限定するために、1つまたは数々のプライマーを同時に使用することができる [Marks JD、Hoogenboom HR、Bonert TP、McCafferty J、Griffiths AD、Winter G. Bypassing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. J Mol Biol 1991、222:581~597]。免疫グロブリンをコードする遺伝子の増幅のために使用されるプライマーは、その最も保存的な領域に相補的である。その配列は、KababまたはVBASEデータベースなどのデータベースに系統立てて構成された遺伝子の収集物から選択される。またプライマー設計は、PCR生成物を適切なベクターにクローニングするための内部制限部位も提供する。

【0096】

合成ライブラリーの構築は、天然CDRのランダム配列のセットでの置き換えに基づく。この場合、膨大な抗原-結合部位を生成することが可能である。

ファージディスプレイは、抗体のサーチのための、最も強力な、広く使用されるインビトロの技術の1つである。1985年に、Smithは、外来DNA配列は、繊維状バクテリオファージM13にクローニングできること、およびこのようなクローニングした配列は、ファージ粒子の表面上に融合タンパク質として発現させることができることを見出した (Smith GP: Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. Science 1985、228:1315~1317.)。したがって、目的の融合タンパク質を、他のタンパク質と結合するその能力に基づいて選択することが可能である。この発見をPCR増幅方法と組み合わせることで、免疫グロブリン遺伝子のcDNAレパートリーをクローニングして、標的特異的なモノクローナル抗体を迅速にサーチするのに使用できる可変ドメインを含有する様々なファージライブラリーを作り出すことを可能にした。ファージライブラリーレパートリーは、ライブラリーを作り出すのに血液を使用したあらゆるヒトまたは動物のB細胞抗体のものを反映する。1995年に、2つの論文は、完全ヒト抗体の発現が可能な遺伝子操作されたマウスの生産を説明しており、そのレパートリーは、ハイブリドーマ技術により得られたものに匹敵する (Lonberg N、Taylor LD、Harding FA、Trounstein M、Higgins KM、Schramm SR、Kuo CC、Mashayekh R、Wymore K、McCabe JGら: Antigen-specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications. Nature 1994、368:856~859)。これらの動物において、それ自体の内因性免疫グロブリン重鎖およびk軽鎖遺伝子を計画的に破壊し、続いてヒト重鎖およびk軽鎖遺伝子のセグメントである導入遺伝子を導入した。より多くの様々な抗原に対して高い特異性および高親和性の抗体を生産するために、ヒト遺伝子レパートリーがマウス免疫系によって使用できることが判明した。トランスジェニックマウスが、本質的にマウスおよびヒト成分 (ヒト免疫グロブリン、マウスIgα、Igβ、および他のシグナル伝達分子) のハイブリッドであるB細胞受容体を発現するという事実にもかかわらず、そのB細胞は正常に発達し成熟する。

【0097】

特定の場合において、標的エピトープへの結合親和性を改善するために、1つまたは複数のCDRアミノ酸残基を変更することが望ましい場合もある。これは「親和性成熟」として公知であり、任意選択で、ヒト化と併用して実行してもよく、例えば抗体のヒト化が、結合特異性または親和性の低減を引き起こし、復帰突然変異だけで結合特異性または親和性を十分に改善することができない状況において実行してもよい。様々な親和性成熟方

10

20

30

40

50

法が当業界において公知であり、例えばBurksら、Proc Natl Acad Sci USA、94:412~417(1997)によって説明されるインビトロのスキヤニング飽和突然変異誘発方法、およびWuら、Proc Natl Acad Sci USA 95:6037-6042(1998)による段階的なインビトロの親和性成熟方法がある。

【0098】

用語「モノクローナル抗体」または「mAb」は、細胞の別個のクローン集団によって合成および単離される抗体を指す。クローン集団は、不死化細胞のクローン集団であってもよい。一部の態様において、クローン集団における不死化細胞は、ハイブリッド細胞であり、すなわち典型的には免疫動物からの個々のBリンパ球をリンパ球の腫瘍からの個々の細胞と融合させることによって生産されたハイブリドーマである。ハイブリドーマは、構築された細胞の一種であり、天然に存在しない。

【0099】

「天然抗体」は通常、2つの同一な軽(L)鎖および2つの同一な重(H)鎖で構成される約150000ダルトンのヘテロ四量体の糖タンパク質である。各軽鎖は、1つの共有結合によるジスルフィド結合によって重鎖に連結されているが、ジスルフィド結合の数は、異なる免疫グロブリンアイソタイプの重鎖間で様々である。各重鎖および軽鎖はまた、規則的に間隔をあけた鎖内のジスルフィド架橋も有する。各重鎖は、一方の末端に可変ドメイン(VH)、それに続いて多数の定常ドメインを有する。各軽鎖は、一方の末端に可変ドメイン(VL)を有し、他方の末端に定常ドメインを有する。軽鎖の定常ドメインは、重鎖の第1の定常ドメインと共にアライメントされ、軽鎖可変ドメインは、重鎖の可変ドメインと共にアライメントされる。特定のアミノ酸残基は、軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインとの間の境界を形成すると考えられる。

【0100】

本明細書において様々な抗体を記載するのに使用される「単離された」という用語は、抗体が発現される細胞または細胞培養物から同定され分離された、および／またはそれから再生成された抗体を指す。その天然環境からの不純物(汚染成分)は、ポリペプチドの診断的または治療的使用に干渉すると予想される物質であり、その例としては、酵素、ホルモン、および他のタンパク質性または非タンパク質性の溶質を挙げることができる。好ましい態様において、抗体は、(1)スピニングカップシークエネーター(エドマン(Edman)シークエネーター)の使用によってN末端または内部アミノ酸配列の少なくとも15残基を得るのに十分な程度に、または(2)クーマシーブリリアントブルー、または好ましくは銀染色を使用する非還元または還元条件下でのSDS-PAGEによって均一な状態まで精製される。単離された抗体は、ポリペプチドの天然環境の少なくとも1つの成分を排除した後の、組換え細胞内の場所に存在する抗体を含む。単離されたポリペプチドは、典型的には少なくとも1つの精製工程によって調製される。

【0101】

「単離された」核酸分子は、同定され、抗体核酸の天然源においてそれが結合している少なくとも1つの核酸分子不純物から分離された核酸分子である。単離された核酸分子は、自然状態でそれが見出される形態または集団とは異なる。したがって、単離された核酸分子は、自然状態で細胞中に存在する核酸分子とは異なる。しかしながら、例えば、核酸分子が、自然状態でそれが細胞中で局在する場所と異なる染色体内の場所に局在している場合、単離された核酸分子は、抗体が通常発現される細胞中に存在する核酸分子を含む。

【0102】

用語「エピトープ」は、本明細書で使用される場合、結合分子(例えば、抗体または関連分子、例えば二重特異性結合分子)に特異的に結合する抗原の部分(決定基)を指すことが意図される。エピトープ決定基は通常、分子の化学的に活性な表面の基、例えばアミノ酸または炭水化物または糖側鎖からなり、典型的には、特異的な3次元構造の特徴、加えて特異的な電荷の特徴を含む。エピトープは、「リニア」または「コンフォメーションル」のいずれであってもよい。リニアエピトープにおいて、タンパク質(例えば抗原)と

相互作用する分子（例えば抗体）との相互作用のポイントの全ては、タンパク質の一次アミノ酸配列に沿って直線的に存在する。コンフォメーションエピトープにおいて、相互作用のポイントは、一次アミノ酸配列において互いに分離しているタンパク質上のアミノ酸残基にわたり存在する。抗原の望ましいエピトープが決定されたら、当業界において周知の技術を使用してそのエピトープに対する抗体を生成することが可能である。加えて、抗体または他の結合分子の生成および特徴付けは、望ましいエピトープに関する情報を明らかにする可能性がある。この情報に基づいて、例えば、抗原への結合に関して互いに競合する結合分子を見出すための競合研究を実行することによって、同じまたは同一なエピトープへの結合に関して抗体を競合的にスクリーニングすることが可能である。

【0103】

用語「ペプチドリンカー」は、本明細書で使用される場合、ドメインを組み合わせる能力を有するあらゆるペプチドを意味することが意図され、その長さは、互いに結合させるドメインに依存し、あらゆるアミノ酸配列を含む。好ましくは、ペプチドリンカーは、5個より多くのアミノ酸の長さを有し、G、A、S、P、E、T、D、Kから選択されるあらゆるアミノ酸のセットからなる。

【0104】

用語「インビトロ」は、人工的な条件下での体外の生物学的な実体、生物学的なプロセス、または生物学的な反応を指す。例えば、インビトロで増殖させた細胞は、体外の環境で、例えば試験管、培養バイアル、またはマイクロタイタープレートで、増殖した細胞として理解されることになる。

【0105】

用語「IC₅₀」（50%阻害濃度）は、本明細書で使用される場合、測定可能な活性または応答、例えば腫瘍細胞などの細胞の成長／増殖が50%阻害される薬物の濃度を指す。IC₅₀値は、カーブフィッティングのための特殊な統計ソフトウェアを使用して、適切な用量－応答曲線を使用して計算することができる。

【0106】

用語GI₅₀（50%増殖阻害）は、腫瘍細胞などの細胞の増殖が50%阻害される薬物の濃度を指す。

用語「ED₅₀」（EC₅₀）（50%有効量／濃度）は、生物学的作用（例えば細胞傷害性を挙げることができる）の50%を生じる薬物の濃度を指す。

【0107】

用語「抗増殖作用」は、がん細胞などの細胞の増殖を停止または阻害することを指すことが意図される。

抗体の「エフェクター機能」という用語は、抗体のFc領域（天然のFc領域の配列またはFc領域のアミノ酸バリエーション）に起因する生物学的活性を指し、このような活性は、抗体アイソタイプに応じて様々である。抗体エフェクター機能の例としては、C1q結合および補体依存性細胞傷害；Fc受容体結合；抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）；貪食；細胞表面受容体（例えばB細胞受容体、BCR）の下方調節、ならびに、B細胞活性化が挙げられる。

【0108】

「抗体依存性細胞傷害」または「ADCC」は、Fc受容体（FcR）を発現する非特異的な細胞傷害性細胞（例えば、ナチュラルキラー（NK）細胞、好中球、およびマクロファージ）が標的細胞上の結合した抗体を認識し、続いて標的細胞の溶解または貪食を引き起こす細胞媒介応答を指す。ADCCを媒介するための主要な細胞であるNK細胞は、FcγRIIのみを発現するが、それに対して単球は、FcγRI、FcγRIIおよびFcγRIIIを発現する。造血細胞におけるFcR発現は、RavetchおよびKinetic、Annu. Rev. Immunol. 9: 457～92（1991）の464頁の表3に要約される。目的の分子のADCC活性を評価するために、インビトロのADCCアッセイ、例えば米国特許第5,500,362号または5,821,337号に記載されるものを実行してもよい。このようなアッセイのための有用なエフェクター細胞と

10

20

30

40

50

しては、末梢血単核細胞（P B M C）およびナチュラルキラー（N K）細胞が挙げられる。代替として、または加えて、目的の分子のA D C C活性は、インビボで、例えば動物モデルで、例えばC l y n e sらP N A S（U S A）95：652～656（1998）で開示されたものなどで評価することができる。

【0109】

「ヒトエフェクター細胞」は、1つまたは複数のF c Rを発現し、エフェクター機能を発揮する白血球である。好ましくは、このような細胞は、少なくともF c γ R I I Iを発現し、A D C Cエフェクター機能を発揮する。A D C Cを媒介するヒト白血球の例としては、末梢血単核細胞（P B M C）、ナチュラルキラー（N K）細胞、単球、細胞傷害性T細胞および好中球が挙げられ、P B M CおよびN K細胞が好ましい。エフェクター細胞は、それらの天然源から、例えば本明細書に記載される血液またはP B M Cから単離することができる。

10

【0110】

用語「F c 受容体」または「F c R」は、抗体のF c領域に結合する受容体を記載するのに使用される。好ましいF c Rは、天然配列のヒトF c Rである。さらに、好ましいF c Rは、I g G抗体（ガンマ受容体）と結合するものであり、その例としては、F c γ R I、F c γ R I I、およびF c γ R I I Iサブクラスを受容体、加えて、これらの受容体の対立遺伝子バリエーションおよびオルタナティブスプライシングされた形態などが挙げられる。F c γ R I I I受容体としては、主としてそれらの細胞質内ドメインにおいて異なる類似のアミノ酸配列を有するF c γ R I I A（「活性化受容体」）およびF c γ R I I B（「阻害受容体」）が挙げられる。活性化受容体であるF c γ R I I Aは、その細胞質内ドメイン中に免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ（I T A M）を含有する。阻害受容体であるF c γ R I I Bは、その細胞質内ドメイン中に免疫受容体チロシンベースの阻害モチーフ（I T I M）を含有する（D a e r o n、A n n u . R e v . I m m u n o l . 15：203～234（1997）における総論を参照）。F c Rは、R a v e t c hおよびK i n e t、A n n u . R e v . I m m u n o l 9：457～92（1991）に総論されている。将来的に同定されるものなどを含む他のF c Rは、本明細書における用語「F c R」に包含される。この用語はまた、母体I g Gの胎児への移動に関する胎児性受容体、F c R nも含む。

20

【0111】

「補体依存性細胞傷害」および「C D C」は、補体の存在下で標的を溶解させる分子の能力を指す。補体活性化経路は、同種抗原と複合体化した分子（例えば抗体）への補体系の第1の成分（C 1 q）の結合から始まる。補体活性化を評価するために、C D Cアッセイ、例えばG a z z a n o - S a n t o r oら、J . I m m u n o l . M e t h o d s 202：163（1996）に記載されたようなアッセイ。

30

【0112】

用語「同一性」または「相同性」は、配列を比較し、全体配列にわたり最大のパーセント同一性を達成するために必要に応じてギャップを導入した後の、候補配列と比較される対応する配列の残基と同一な候補配列中のアミノ酸残基のパーセンテージを意味するとして解釈され、いずれの保存的置換も配列同一性の一部として考慮されない。NまたはC末端の伸長も挿入も、同一性または相同性を低減させるとして解釈されないものとする。アライメントのための方法およびコンピュータプログラムは当業界において周知である。配列同一性は、配列分析ソフトウェア（例えばS e q u e n c e A n a l y s i s S o f t w a r e P a c k a g e、G e n e t i c s C o m p u t e r G r o u p、U n i v e r s i t y o f W i s c o n s i n B i o t e c h n o l o g y C e n t e r、1710 U n i v e r s i t y A v e .、M a d i s o n、W I 53705）を使用して測定することができる。このソフトウェアは、相同性の程度を様々な置換、欠失（排除）、および他の改変に割り当てることによって類似の配列を一致させる。

40

【0113】

用語「相同な」は、抗体のポリペプチド配列に関して、ポリペプチド配列に関して少な

50

くとも70%、好ましくは80%、より好ましくは90%、最も好ましくは95%の配列同一性を呈する抗体として解釈されるものとする。この用語は、核酸配列に関して、核酸配列に関して少なくとも85%、好ましくは90%、より好ましくは95%、最も好ましくは97%の配列同一性を呈するヌクレオチドの配列として解釈されるものとする。

【0114】

本明細書に記載される抗体のアミノ酸配列の改変が提供される。例えば、抗体の結合親和性および／または他の生物学的特性を改善することが望ましい場合がある。抗体のアミノ酸配列バリエーションは、抗体核酸に適切なヌクレオチド変化を導入することによって、またはペプチド合成によって調製される。このような改変としては、例えば、抗体のアミノ酸配列内の残基の欠失および／または挿入および／または置換が挙げられる。欠失、挿入、および置換のあらゆる組合せは、最終的な構築物に到達するようになされ、ただし最終的な構築物は、望ましい特徴を有する。またアミノ酸の変化、例えばグリコシル化部位の数または位置を変化させることは、抗体における翻訳後プロセスも変更することができる。

10

【0115】

アミノ酸置換を使用する抗体のアミノ酸配列の改変のバリエーション。このようなバリエーションは、抗体分子中の少なくとも1つのアミノ酸残基を異なる残基で置換したものである。置換変異誘発のための最も興味深い部位としては、高度可変領域またはCDRが挙げられるが、FRまたはFc変更も予期される。保存的置換は、表Aにおいて「好ましい置換」の下に示す。このような置換が生物学的活性の変更を引き起こす場合、さらなる実質的な変化を作製してもよく、これは、表Aに記載の「例示的な置換」として表され、またはアミノ酸のクラスを記載する場合、以下でより詳細に記載される変更、さらに生成物のスクリーニングを実行してもよい。

20

【0116】

30

40

50

【表 1】

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

【0117】

用語「核酸」、「核酸の配列」、「核酸配列」、「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、「ポリヌクレオチド配列」および「ヌクレオチド配列」は、本明細書において同義的に使用され、ヌクレオチドの正確な配列を意味し、このような配列は、改変された、または改変されておらず、核酸の断片または領域を決定し、非天然ヌクレオチドを含有するか、または含有せず、二本鎖DNAもしくはRNA、一本鎖DNAもしくはRNA、または前記DNAの転写産物のいずれかである。

【0118】

本発明は、その天然の染色体の環境にある、すなわち天然状態のヌクレオチド配列に関連しないこともここに含まれるものとする。本発明の配列は、単離および／または精製されており、すなわちそれらは、例えばコピーによって直接的または間接的にサンプリング

され、それらの環境が少なくとも部分的に改変されている。したがって、本明細書では、例えば宿主細胞の手段によって組換え遺伝学により得られた、または化学合成により得られた単離された核酸も述べられているものとする。

【0119】

ヌクレオチド配列への言及は、別段の規定がない限り、その相補体を包含する。したがって、特定の配列を有する核酸への言及は、その相補配列を有するその相補鎖を包含するものとして理解されるものとする。

【0120】

用語「制御配列」は、特定の宿主生物における作動可能に連結したコード配列の発現に必要なDNA配列を指す。原核生物に好適な制御配列は、例えば、プロモーター、任意選択でオペレーター配列、およびリボソーム結合部位を含む。真核細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナル、およびエンハンサーを利用することが公知である。

【0121】

核酸は、別の核酸配列と機能的な関係になるように配置されている場合、「作動可能に連結」している。例えば、前駆配列または分泌リーダー配列に関するDNAは、それがポリペプチドの分泌に参加する前駆タンパク質として発現される場合、ポリペプチドに関するDNAに作動可能に連結されており；プロモーターまたはエンハンサーは、それが配列の転写に影響を与える場合、コード配列に作動可能に連結されており；リボソーム結合部位は、それが翻訳を容易にするように配置される場合、コード配列に作動可能に連結されている。一般的に、「作動可能に連結した」は、連結されているDNA配列が連続していること、分泌リーダーの場合はリーディング相で連続していることを意味する。しかしながら、エンハンサーは、連続していなくてもよい。

【0122】

用語「ベクター」は、本明細書で使用される場合、それに連結されている別の核酸を輸送することが可能な核酸分子を意味する。一部の態様において、ベクターは、プラスミドであり、すなわち、それに追加のDNAセグメントをライゲートすることができるDNAの環状の二本鎖断片である。一部の態様において、ベクターは、ウイルスゲノムに追加のDNAセグメントをライゲートすることができるウイルスベクターである。一部の態様において、ベクターは、それが導入される宿主細胞における自律複製が可能である（例えば複製およびエピソーム性哺乳類ベクターの細菌起源の部位を有する細菌ベクター）。さらなる態様において、ベクター（例えば非エピソーム性哺乳類ベクター）は、宿主細胞に導入されたら宿主細胞のゲノムに組み込まれていてもよく、それによって宿主遺伝子と共に複製される。さらに、特定のベクターは、それが作動可能に連結する遺伝子の発現を指示することが可能である。このようなベクターは、本明細書では、「組換え発現ベクター」（または単に「発現ベクター」）と称される。

【0123】

用語「組換え宿主細胞」（または単に「宿主細胞」）は、本明細書で使用される場合、組換え発現ベクターが導入されている細胞を指すことが意図される。本発明は、宿主細胞に関し、宿主細胞は、例えば上述される本発明によるベクターを含んでいてもよい。また本発明は、例えば、本発明の結合分子の第1の結合ドメインおよび／または第2の結合ドメインの、重鎖をコードするヌクレオチド配列もしくはその抗原結合部分、軽鎖をコードするヌクレオチド配列もしくはその抗原結合部分、またはその両方を含む宿主細胞にも関する。「組換え宿主細胞」および「宿主細胞」は、特定の対象細胞だけでなくこのような細胞の後代も同様に指すことが意図されることが理解されるものとする。改変は、突然変異または環境の影響のいずれかのために後の世代で起こる可能性があるため、このような後代は、実際に親細胞と同一ではない場合があるが、このような細胞は、それでもなお本明細書で使用される場合、用語「宿主細胞」の範囲内に含まれる。

【0124】

用語「賦形剤」は、本明細書において、本発明の化合物以外の任意の成分を記載するのに使用される。

用語「GITRによって媒介される疾患または障害」は、疾患または障害の原因論、発症、進行、持続性または病理学を含むGITRに直接的または間接的のいずれかで関連するあらゆる疾患または障害を指す。

【0125】

「処置する」、「処置すること」および「処置」は、生物学的な障害および／またはその付随する症状の少なくとも1つを軽減する、または妨げる方法を指す。本明細書で 사용되는場合、疾患、障害または状態を「軽減する」とは、疾患、障害、または状態の症状の重症度および／または出現頻度を低減させることを意味する。さらに、本明細書における「処置」への言及は、治癒的、緩和的および予防的処置への言及を含む。

【0126】

一側面において、処置の対象、または患者は、哺乳動物であり、好ましくはヒト対象である。前記対象は、雄または雌のいずれであってもよいし、あらゆる年齢であってもよい。

【0127】

用語「障害」は、本発明の化合物での処置によって利益を得ると予想されるあらゆる状態を意味する。この用語の定義は、哺乳動物を問題の障害に罹りやすくする病的状態を含む慢性および急性の障害または疾患を含む。

【0128】

用語「がん」および「がんの、がん性の」は、典型的には無秩序な細胞の成長／増殖を特徴とする生理学的状態を指し、または哺乳動物におけるそのような生理学的状態を説明するものである。この定義は、良性および悪性のがん性疾患の両方を包含する。がん性疾患の例としては、これらに限定されないが、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、および白血病が挙げられる。このようながん性疾患のより詳細な例としては、扁平上皮がん、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌および肺扁平上皮癌、腹膜がん、肝細胞がん、消化器がんを含む胃がん、膵臓がん、膠芽腫、神経膠腫、子宮頸がん、卵巣がん、肝臓がん、膀胱がん、乳がん、結腸がん、結腸直腸がん、子宮内膜または子宮癌、唾液腺癌、腎臓または腎臓がん、前立腺がん、外陰がん、甲状腺がん、肝臓癌、肛門癌、陰茎癌、黒色腫、ならびに、様々な頭頸部がんが挙げられる。

【0129】

用語「免疫応答」、「自己免疫応答」および「自己免疫炎症」は、例えば、リンパ球、抗原提示細胞、食細胞、顆粒球、および前記細胞または肝臓細胞によって生産される可溶性巨大分子（浸潤性の病原体、病原体に感染した細胞または組織、がん細胞、または自己免疫または病理学的炎症の場合、ヒト体からの正常細胞または組織の選択的なダメージ、破壊または排除の結果生産された抗体、サイトカインおよび補体など）の作用を指す。

【0130】

「治療有効量」は、処置されている障害の症状の1つまたは複数がある程度緩和すると予想される、投与されている治療剤の量を指すことが意図される。

用語「慢性」の使用は、急性の（一時的な）投与経路とは対照的に、長い期間にわたり初期の治療作用（活性）が維持されるような薬剤の連続する（不断の）使用を指す。

【0131】

「間欠的な」使用は、中断なく一貫して行われない処置を指すが、実際のところ処置は、むしろ断続的である。

本明細書で 사용되는場合、言葉「含む（comprise）」、「有する（have）」、「含む（include）」、または「含む（comprises）」、「含むこと（comprising）」、「有する（has）」、「有すること」、「含むこと（includes）」または「含むこと（including）」などの変化形、およびそれらの全ての文法上の変化形は、述べられた整数または整数の群を包含するが、他のいずれかの整数または整数の群も除外されないことが理解されることとする。

発明の詳細な説明

抗体

本発明は、GITRに特異的に結合するモノクローナル抗体に関する。

10

20

30

40

50

【0132】

一側面において、本発明は、GITRに特異的に結合するモノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、

(a) (i) 以下の群：

NYGMH（配列番号1）またはYYWMY（配列番号12）

から選択されるアミノ酸配列を含むCDR1；

(ii) 以下の群：

VIWFDGSNKFYTD SVKG（配列番号2）またはAISWNGGRYYAE
SMKG（配列番号13）

から選択されるアミノ酸配列を含むCDR2；

(iii) 以下の群：

ELGGYYYS SSGFRPYYY GMDV（配列番号3）またはNRYYS DP NY
GMNL（配列番号14）

から選択されるアミノ酸配列を含むCDR3

を含む重鎖可変ドメイン、ならびに、

(b) (i) 以下の群：

RASQSIGSWLA（配列番号7）またはTGTS TD IGT YKYIS（配列番号
17）

から選択されるアミノ酸配列を含むCDR1；

(ii) 以下の群：

AASTLQR（配列番号8）またはGVSHRPS（配列番号18）

から選択されるアミノ酸配列を含むCDR2；

(iii) 以下の群：

QQSHSHPLT（配列番号9）またはSSYTSS GTV V（配列番号19）

から選択されるアミノ酸配列を含むCDR3

を含む軽鎖可変ドメイン

を含むモノクローナル抗体またはその抗原結合断片に関する。

【0133】

一部の態様において、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、それぞれ配列番号1、2および3の配列により表されるアミノ酸配列を含むCDR1、2および3を含む重鎖可変ドメインを含む。

【0134】

一部の態様において、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、それぞれ配列番号12、13および14の配列により表されるアミノ酸配列を含むCDR1、2および3を含む重鎖可変ドメインを含む。

【0135】

一部の態様において、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、それぞれ配列番号7、8および9により表されるアミノ酸配列を含むCDR1、2および3を含む軽鎖可変ドメインを含む。

【0136】

一部の態様において、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、それぞれ配列番号17、18および19により表されるアミノ酸配列を含むCDR1、2および3を含む軽鎖可変ドメインを含む。

【0137】

一部の態様において、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、

－ それぞれ配列番号1、2および3の配列により表されるアミノ酸配列を含むCDR1、2および3を含む重鎖可変ドメイン；

－ それぞれ配列番号7、8および9の配列により表されるアミノ酸配列を含むCDR1、2および3を含む軽鎖可変ドメイン

を含む。

【0138】

一部の態様において、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、

－ それぞれ配列番号12、13および14の配列により表されるアミノ酸配列を含むCDR1、2および3を含む重鎖可変ドメイン；

－ それぞれ配列番号17、18および19の配列により表されるアミノ酸配列を含むCDR1、2および3を含む軽鎖可変ドメインを含む。

【0139】

一部の態様において、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、アミノ酸配列EVQLVQSGGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWFDGSNKFYTD SVKGRFTISRDN SKDTLSLQMNSLRAEDTAVYYCARELG GYY YDSSGFRPYYYGMDVWGQGTMTVTVSS（配列番号4）に少なくとも90%相同なアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む。

10

【0140】

一部の態様において、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、アミノ酸配列EVQLVQSGGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWFDGSNKFYTD SVKGRFTISRDN SKDTLSLQMNSLRAEDTAVYYCARELG GYY YDSSGFRPYYYGMDVWGQGTMTVTVSS（配列番号4）を含む重鎖可変ドメインを含む。

20

【0141】

一部の態様において、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、アミノ酸配列QVQLVQSGGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSY YWMYWVRQAPGKGLEWVSAISWNGGRTYYAESMKGRFTISRDN AQNTLYLQMNSLKSEDTAVYYCAKNRYYS DP NYGMNLWGKGTTVTVSS（配列番号15）に少なくとも90%相同なアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含む。

【0142】

一部の態様において、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、アミノ酸配列QVQLVQSGGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSY YWMYWVRQAPGKGLEWVSAISWNGGRTYYAESMKGRFTISRDN AQNTLYLQMNSLKSEDTAVYYCAKNRYYS DP NYGMNLWGKGTTVTVSS（配列番号15）を含む重鎖可変ドメインを含む。

30

【0143】

一部の態様において、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、アミノ酸配列DVVMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQSIGSWLAWYQQKPG EAPKLLIYAASTLQRGVPSRFSGGGYGTEFTLTIS SLQPE DFATYFCQQSHSHPLTFGGG TKVEIK（配列番号10）に少なくとも90%相同なアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。

【0144】

一部の態様において、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、アミノ酸配列DVVMTQSPSSVSASVGDRVITICRASQSIGSWLAWYQQKPG EAPKLLIYAASTLQRGVPSRFSGGGYGTEFTLTIS SLQPE DFATYFCQQSHSHPLTFGGG TKVEIK（配列番号10）を含む軽鎖可変ドメインを含む。

40

【0145】

一部の態様において、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、アミノ酸配列QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSTDIGTYKYISWYQQHPGKAPKLLIYGVSHRPSGVSDRFSGSKSDNTASLTISGLQAEDEADYYC SSYTSSGTVVF GG GTKVTVL（配列番号20）に少な

50

くとも90%相同なアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。

【0146】

一部の態様において、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、アミノ酸配列Q S A L T Q P A S V S G S P G Q S I T I S C T G T S T D I G T Y K Y I S W Y Q Q H P G K A P K L I I Y G V S H R P S G V S D R F S G S K S D N T A S L T I S G L Q A E D E A D Y Y C S S Y T S S G T V V F G G G T K V T V L (配列番号20)を含む軽鎖可変ドメインを含む。

【0147】

一部の態様において、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、

－ アミノ酸配列 E V Q L V Q S G G G V V Q P G K S L R L S C A A S G F T F S N Y G M H W V R Q A P G K G L E W V A V I W F D G S N K F Y T D S V K G R F T I S R D N S K D T L S L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R E L G G Y Y Y D S S G F R P Y Y Y G M D V W G Q G T M V T V S S (配列番号4)に少なくとも90%相同なアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン；

－ アミノ酸配列 D V V M T Q S P S S V S A S V G D R V T I T C R A S Q S I G S W L A W Y Q Q K P G E A P K L L I Y A A S T L Q R G V P S R F S G G G Y G T E F T L T I S S L Q P E D F A T Y F C Q Q S H S H P L T F G G G T K V E I K (配列番号10)に少なくとも90%相同なアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。

【0148】

一部の態様において、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、

－ アミノ酸配列 E V Q L V Q S G G G V V Q P G K S L R L S C A A S G F T F S N Y G M H W V R Q A P G K G L E W V A V I W F D G S N K F Y T D S V K G R F T I S R D N S K D T L S L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R E L G G Y Y Y D S S G F R P Y Y Y G M D V W G Q G T M V T V S S (配列番号4)を含む重鎖可変ドメイン；

－ アミノ酸配列 D V V M T Q S P S S V S A S V G D R V T I T C R A S Q S I G S W L A W Y Q Q K P G E A P K L L I Y A A S T L Q R G V P S R F S G G G Y G T E F T L T I S S L Q P E D F A T Y F C Q Q S H S H P L T F G G G T K V E I K (配列番号10)を含む軽鎖可変ドメインを含む。

【0149】

一部の態様において、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、

－ アミノ酸配列 Q V Q L V Q S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S Y Y W M Y W V R Q A P G K G L E W V S A I S W N G G R T Y Y A E S M K G R F T I S R D N A Q N T L Y L Q M N S L K S E D T A V Y Y C A K N R Y Y S D P N Y G M N L W G K G T T V T V S S (配列番号15)のアミノ酸配列に少なくとも90%相同なアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン；

－ アミノ酸配列 Q S A L T Q P A S V S G S P G Q S I T I S C T G T S T D I G T Y K Y I S W Y Q Q H P G K A P K L I I Y G V S H R P S G V S D R F S G S K S D N T A S L T I S G L Q A E D E A D Y Y C S S Y T S S G T V V F G G G T K V T V L (配列番号20)に少なくとも90%相同なアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。

【0150】

一部の態様において、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、

－ アミノ酸配列 Q V Q L V Q S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S Y Y W M Y W V R Q A P G K G L E W V S A I S W N G G R T Y Y A E S M K G R F T I S R D N A Q N T L Y L Q M N S L K S E D T A V Y Y C A K N R Y Y S D P N Y G M N L W G K G T T V T V S S (配列番号15)を含む重鎖可変ドメイン；

－ アミノ酸配列 Q S A L T Q P A S V S G S P G Q S I T I S C T G T S T D I G T Y K Y I S W Y Q Q H P G K A P K L I I Y G V S H R P S G V S D R F S G S K S D N

10

20

30

40

50

T A S L T I S G L Q A E D E A D Y Y C S S Y T S S G T V V F G G G T K V T V L (配列番号 20) を含む軽鎖可変ドメインを含む。

【0151】

一部の態様において、G I T R に特異的なモノクローナル抗体は、全長 I g G 抗体である。

一部の態様において、モノクローナル I g G 抗体は、ヒト I g G 1、I g G 2、I g G 3 または I g G 4 アイソタイプのモノクローナル I g G 抗体である。

【0152】

一部の態様において、モノクローナル I g G 抗体は、ヒト I g G 1 アイソタイプのモノクローナル I g G 抗体である。

一部の態様において、G I T R に特異的なモノクローナル抗体は、アゴニスト特性、抗体依存性細胞傷害 (A D C C) を増加させるが、補体依存性細胞傷害 (C D C) を増加させないように、F c 断片において E 3 4 5 R 突然変異を含む。

【0153】

一部の態様において、モノクローナル抗体は、配列

【0154】

【化1】

EVQLVQSGGGVVPQPKSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWFDDGSNKFYTDVSKGRF
TISRDNKDTLSLQMNLSRAEDTAVYYCARELGYYIDSSGFRPYYYGMDVWGQGTMTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS
SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 5)

【0155】

に少なくとも 90% 相同なアミノ酸配列を含む重鎖を含む。

一部の態様において、モノクローナル抗体は、アミノ酸配列

【0156】

【化2】

EVQLVQSGGGVVPQPKSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWFDDGSNKFYTDVSKGRF
TISRDNKDTLSLQMNLSRAEDTAVYYCARELGYYIDSSGFRPYYYGMDVWGQGTMTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS
SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 5)

【0157】

を含む重鎖を含む。

一部の態様において、モノクローナル抗体は、配列

【0158】

10

20

30

40

50

【化 3】

EVQLVQSGGGVVPKGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWFDDGSNKFYTDSVKGRF
TISRDN SKDTLSLQMNSLRAEDTAVYYCARELGYYDSSGFRPYYYGMDVWGQGTMTVTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS
SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPRRPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
PVLDSDDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 6)

【0159】

10

に少なくとも 90% 相同なアミノ酸配列を含む重鎖を含む。

一部の態様において、モノクローナル抗体は、アミノ酸配列

【0160】

【化 4】

EVQLVQSGGGVVPKGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWFDDGSNKFYTDSVKGRF
TISRDN SKDTLSLQMNSLRAEDTAVYYCARELGYYDSSGFRPYYYGMDVWGQGTMTVTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS
SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPRRPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
PVLDSDDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 6)

20

【0161】

を含む重鎖を含む。

一部の態様において、モノクローナル抗体は、配列 DVVMTQSPSSVSASVG
DRVITITCRASQSIGSWLAWYQQKPGEAPKLLIYAAS TLQR
GVPSRFSGGGYGTEFTLTISSLQPEDFATYFCQQSHSHPL
TFGGGT KVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLL
NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC (配
列番号 11) に少なくとも 90% 相同なアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

30

【0162】

一部の態様において、モノクローナル抗体は、アミノ酸配列 DVVMTQSPSSVS
ASVG DRVITITCRASQSIGSWLAWYQQKPGEAPKLLIYAAS
TLQRGVPSRFSGGGYGTEFTLTISSLQPEDFATYFCQQSH
SHPLTFGGGT KVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASV
VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST
YSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRG
EC (配列番号 11) を含む軽鎖を含む。

【0163】

40

一部の態様において、モノクローナル抗体は、

— 配列

【0164】

50

【化 5】

EVQLVQSGGGVVPKGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWFDDGSNKFYTDVSKGRF
TISRDNKSDTLISLQMNLSRAEDTAVYYCARELGYYDYDSSGFRPYYGMDVWGQGTMTVTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS
SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 5)

【0165】

10

に少なくとも90%相同なアミノ酸配列を含む重鎖；

－ 配列DVVMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQSISGLAW
YQQKPGGEAPKLLIYAASLTQRGVPSRFSGGGYGTEFTLT
ISLQPEDFATYFCQQSHSHPLTFGGGKVEIKRTVAAPSV
FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE
VTHQGLSSSPVTKSFNRGEC (配列番号 11) に少なくとも90%相同なア
ミノ酸配列を含む軽鎖
を含む。

【0166】

20

一部の態様において、GITRに特異的に結合するモノクローナル抗体は、BCD16
6-01-001である。

モノクローナル抗体BCD166-01-001は、

－ アミノ酸配列

【0167】

【化 6】

EVQLVQSGGGVVPKGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWFDDGSNKFYTDVSKGRF
TISRDNKSDTLISLQMNLSRAEDTAVYYCARELGYYDYDSSGFRPYYGMDVWGQGTMTVTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSS
SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 5)

30

【0168】

を含む重鎖；

－ アミノ酸配列DVVMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQSISGLAW
YQQKPGGEAPKLLIYAASLTQRGVPSRFSGGGYGTEFT
LTISLQPEDFATYFCQQSHSHPLTFGGGKVEIKRTVA
APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD
NALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV
YACEVTHQGLSSSPVTKSFNRGEC (配列番号 11) を含む軽鎖
を含む。

40

【0169】

一部の態様において、モノクローナル抗体は、

－ 配列

【0170】

50

【化 7】

EVQLVQSGGGVVPKGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWFDDGSNKFYTDVSKGRF
TISRDNKDTLSLQMNLSRAEDTAVYYCARELGYYDYDSSGFRPYYYGMDVWGQGTMTVTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFPSS
SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPRRPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
PVLDSDDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 6)

【0171】

10

に少なくとも90%相同なアミノ酸配列を含む重鎖；

－ 配列DVVMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQSIGSWLAW
YQQKPGEAPKLLIYAASLTQRGVPSRFSGGGYGTEFTLT
ISLQPEDFATYFCQQSHSHPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSV
FIFFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACE
VTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 11) に少なくとも90%相同なア
ミノ酸配列を含む軽鎖
を含む。

【0172】

20

一部の態様において、GITRに特異的に結合するモノクローナル抗体は、BCD166-02-001である。

BCD166-02-001とBCD166-01-001との間の差は、アゴニスト特性、抗体依存性細胞傷害(ADCC)を増加させるが、補体依存性細胞傷害(CDC)を増加させないようにするための、Fc断片におけるE345R突然変異である。

【0173】

モノクローナル抗体BCD166-02-001は、

－ アミノ酸配列

【0174】

【化 8】

30

EVQLVQSGGGVVPKGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWFDDGSNKFYTDVSKGRF
TISRDNKDTLSLQMNLSRAEDTAVYYCARELGYYDYDSSGFRPYYYGMDVWGQGTMTVTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFPSS
SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTISKAKGQPRRPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
PVLDSDDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 6)

【0175】

を含む重鎖；

40

－ アミノ酸配列DVVMTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQSIGS
WLAWYQQKPGEAPKLLIYAASLTQRGVPSRFSGGGYGTEF
TLTISLQPEDFATYFCQQSHSHPLTFGGGTKVEIKRTVA
APSVFIFFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD
NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKV
YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 11) を含む軽鎖
を含む。

【0176】

一部の態様において、モノクローナル抗体は、配列

【0177】

50

【化 9】

QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYYWMYWVRQAPGKGLEWVSAISWNGGRTYYAESMKGRF
TISRDNQAQNTLYLQMNSLKSEDTAVYYCAKNRYSDPNYGMNLWGKGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPS
SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 16)

【0178】

10

に少なくとも90%相同なアミノ酸配列を含む重鎖を含む。

一部の態様において、モノクローナル抗体は、アミノ酸配列

【0179】

【化10】

QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYYWMYWVRQAPGKGLEWVSAISWNGGRTYYAESMKGRF
TISRDNQAQNTLYLQMNSLKSEDTAVYYCAKNRYSDPNYGMNLWGKGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPS
SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 16)

20

【0180】

を含む重鎖を含む。

一部の態様において、モノクローナル抗体は、配列Q S A L T Q P A S V S G S P G Q
S I T I S C T G T S T D I G T Y K Y I S W Y Q Q H P G K A P K L I I Y G V S H R
P S G V S D R F S G S K S D N T A S L T I S G L Q A E D E A D Y Y C S S Y T S S
G T V V F G G G T K V T V L G Q P K A A P S V T L F P P S S E E L Q A N K A T L
V C L I S D F Y P G A V T V A W K A D S S P V K A G V E T T T P S K Q S N N K Y
A A S S Y L S L T P E Q W K S H R S Y S C Q V T H E G S T V E K T V A P T E C S
(配列番号 21) に少なくとも90%相同なアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

30

【0181】

一部の態様において、モノクローナル抗体は、アミノ酸配列Q S A L T Q P A S V S G
S P G Q S I T I S C T G T S T D I G T Y K Y I S W Y Q Q H P G K A P K L I I Y G
V S H R P S G V S D R F S G S K S D N T A S L T I S G L Q A E D E A D Y Y C S S
Y T S S G T V V F G G G T K V T V L G Q P K A A P S V T L F P P S S E E L Q A N
K A T L V C L I S D F Y P G A V T V A W K A D S S P V K A G V E T T T P S K Q S
N N K Y A A S S Y L S L T P E Q W K S H R S Y S C Q V T H E G S T V E K T V A P
T E C S (配列番号 21) を含む軽鎖を含む。

【0182】

40

一部の態様において、モノクローナル抗体は、

— 配列

【0183】

【化 1 1】

QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYYWYWVRQAPGKGLEWVSAISWNGGRITYYAESMKGRF
TISRDNANQNTLYIQMNSLKSEDTAVYYCAKNRYSDPNYGMNLWGKGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPS
SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 16)

【0 1 8 4】

10

に少なくとも 90% 相同なアミノ酸配列を含む重鎖；

－ 配列 Q S A L T Q P A S V S G S P G Q S I T I S C T G T S T D I G T Y K Y I
S W Y Q Q H P G K A P K L I I Y G V S H R P S G V S D R F S G S K S D N T A S L
T I S G L Q A E D E A D Y Y C S S Y T S S G T V V F G G G T K V T V L G Q P K A
A P S V T L F P P S S E E L Q A N K A T L V C L I S D F Y P G A V T V A W K A D
S S P V K A G V E T T T P S K Q S N N K Y A A S S Y L S L T P E Q W K S H R S Y
S C Q V T H E G S T V E K T V A P T E C S (配列番号 21) に少なくとも 90% 相同
なアミノ酸配列を含む軽鎖
を含む。

【0 1 8 5】

20

一部の態様において、G I T R に特異的に結合するモノクローナル抗体は、B C D 1 6
6 - 0 1 - 0 1 4 である。

モノクローナル抗体 B C D 1 6 6 - 0 1 - 0 1 4 は、

－ アミノ酸配列

【0 1 8 6】

【化 1 2】

QVQLVQSGGGIVQPGGSLRLSCAASGFTFSYYWYWVRQAPGKGLEWVSAISWNGGRITYYAESMKGRF
TISRDNANQNTLYIQMNSLKSEDTAVYYCAKNRYSDPNYGMNLWGKGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPS
SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDS
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS
FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 16)

30

【0 1 8 7】

を含む重鎖を含む。

－ アミノ酸配列 Q S A L T Q P A S V S G S P G Q S I T I S C T G T S T D I G T
Y K Y I S W Y Q Q H P G K A P K L I I Y G V S H R P S G V S D R F S G S K S D N
T A S L T I S G L Q A E D E A D Y Y C S S Y T S S G T V V F G G G T K V T V L G
Q P K A A P S V T L F P P S S E E L Q A N K A T L V C L I S D F Y P G A V T V A
W K A D S S P V K A G V E T T T P S K Q S N N K Y A A S S Y L S L T P E Q W K S
H R S Y S C Q V T H E G S T V E K T V A P T E C S (配列番号 21) を含む軽鎖。

40

核酸分子

また本発明は、本明細書に記載されるような、任意選択でそれに接続される任意のペプ
チドリンカー配列を含む核酸分子、特に、本発明による G I T R に特異的に結合するモノ
クローナル抗体をコードする配列にも関する。

【0 1 8 8】

ヌクレオチド配列への言及は、別段の規定がない限り、その相補体を包含する。したが
って、特定の配列を有する核酸への言及は、その相補配列を有するその相補鎖を包含する
ものとして理解されるものとする。用語「ポリヌクレオチド」は、本明細書で使用する

50

場合、長さが少なくとも10塩基のヌクレオチド、もしくはリボヌクレオチド、もしくはデオキシリボヌクレオチドのいずれか、またはいずれかのタイプのヌクレオチドの改変された形態のポリマー形態を意味する。この用語は、一本鎖および二本鎖の形態を含む。

【0189】

一側面において、本発明は、配列番号1～21から選択されるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子に関する。核酸分子はまた、前記ヌクレオチド配列のあらゆる組合せを含んでいてもよい。

【0190】

一側面において、本発明は、GITRに特異的に結合し、

(a) (i) 以下の群：

NYGMH（配列番号1）またはYYWMY（配列番号12）

から選択されるアミノ酸配列を含むCDR1；

(ii) 以下の群：

VIWFDGSNKFYTD SVKG（配列番号2）またはAISWNGGRTYYAE
SMKG（配列番号13）

から選択されるアミノ酸配列を含むCDR2；

(iii) 以下の群：

ELGGYYDSSGFRPYYYGMDV（配列番号3）またはNRYYS DPNY
GMNL（配列番号14）

から選択されるアミノ酸配列を含むCDR3

を含む重鎖可変ドメイン、ならに、

(b) (i) 以下の群：

RASQSIGSWLA（配列番号7）またはTGTSTDIGTYKYIS（配列番号
17）

から選択されるアミノ酸配列を含むCDR1；

(ii) 以下の群：

AASTLQR（配列番号8）またはGVSHRPS（配列番号18）

から選択されるアミノ酸配列を含むCDR2；

(iii) 以下の群：

QQSHSHPLT（配列番号9）またはSSYTSSGTVV（配列番号19）

から選択されるアミノ酸配列を含むCDR3

を含む軽鎖可変ドメイン

を含むモノクローナル抗体またはその抗原結合断片をコードするヌクレオチド配列を含む核酸に関する。

【0191】

一部の態様において、核酸分子は、それぞれ配列番号1、2および3の配列により表されるアミノ酸配列を含むCDR1、2、および3を含む重鎖可変ドメインを含むモノクローナル抗体またはその抗原結合断片をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0192】

一部の態様において、核酸分子は、それぞれ配列番号12、13および14の配列により表されるアミノ酸配列を含むCDR1、2、および3を含む重鎖可変ドメインを含むモノクローナル抗体またはその抗原結合断片をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0193】

一部の態様において、核酸分子は、それぞれ配列番号7、8および9の配列により表されるアミノ酸配列を含むCDR1、2、および3を含む軽鎖可変ドメインを含むモノクローナル抗体またはその抗原結合断片をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0194】

一部の態様において、核酸分子は、それぞれ配列番号17、18および19の配列により表されるアミノ酸配列を含むCDR1、2、および3を含む軽鎖可変ドメインを含むモノクローナル抗体またはその抗原結合断片をコードするヌクレオチド配列を含む。

10

20

30

40

50

【0195】

一部の態様において、核酸分子は、

－ それぞれ配列番号1、2および3の配列により表されるアミノ酸配列を含むCDR1、2および3を含む重鎖可変ドメイン；

－ それぞれ配列番号7、8および9の配列により表されるアミノ酸配列を含むCDR1、2および3を含む軽鎖可変ドメイン

を含むモノクローナル抗体またはその抗原結合断片をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0196】

一部の態様において、核酸分子は、

－ それぞれ配列番号12、13および14の配列により表されるアミノ酸配列を含むCDR1、2および3を含む重鎖可変ドメイン；

－ それぞれ配列番号17、18および19の配列により表されるアミノ酸配列を含むCDR1、2および3を含む軽鎖可変ドメイン

を含むモノクローナル抗体またはその抗原結合断片をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0197】

一部の態様において、核酸分子は、配列番号4のアミノ酸配列に少なくとも90%相同なアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含むモノクローナル抗体またはその抗原結合断片をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0198】

一部の態様において、核酸分子は、配列番号4のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含むモノクローナル抗体またはその抗原結合断片をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0199】

一部の態様において、核酸分子は、配列番号15のアミノ酸配列に少なくとも90%相同なアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含むモノクローナル抗体またはその抗原結合断片をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0200】

一部の態様において、核酸分子は、配列番号15のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含むモノクローナル抗体またはその抗原結合断片をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0201】

一部の態様において、核酸分子は、配列番号10のアミノ酸配列に少なくとも90%相同なアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含むモノクローナル抗体またはその抗原結合断片をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0202】

一部の態様において、核酸分子は、配列番号10のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含むモノクローナル抗体またはその抗原結合断片をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0203】

一部の態様において、核酸分子は、配列番号20のアミノ酸配列に少なくとも90%相同なアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含むモノクローナル抗体またはその抗原結合断片をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0204】

一部の態様において、核酸分子は、配列番号20のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含むモノクローナル抗体またはその抗原結合断片をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0205】

一部の態様において、核酸分子は、

－ 配列番号4のアミノ酸配列に少なくとも90%相同なアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン；

－ 配列番号10のアミノ酸配列に少なくとも90%相同なアミノ酸配列を含む軽鎖可

10

20

30

40

50

変ドメイン

を含むモノクローナル抗体またはその抗原結合断片をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0206】

一部の態様において、核酸分子は、

- － 配列番号4のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン；
- － 配列番号10のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン

を含むモノクローナル抗体またはその抗原結合断片をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0207】

一部の態様において、核酸分子は、

－ 配列番号15のアミノ酸配列に少なくとも90%相同なアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン；

－ 配列番号20のアミノ酸配列に少なくとも90%相同なアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン

を含むモノクローナル抗体またはその抗原結合断片をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0208】

一部の態様において、核酸分子は、

- － 配列番号15のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン；
- － 配列番号20のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン

を含むモノクローナル抗体またはその抗原結合断片をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0209】

一部の態様において、核酸分子は、全長IgG抗体であるGITRに特異的に結合するモノクローナル抗体をコードするヌクレオチド配列を含む。

一部の態様において、核酸分子は、ヒトIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4アイソタイプのモノクローナルIgG抗体をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0210】

一部の態様において、核酸分子は、ヒトIgG1アイソタイプのモノクローナルIgG抗体をコードするヌクレオチド配列を含む。

一部の態様において、核酸分子は、アゴニスト特性、抗体依存性細胞傷害(ADCC)を増加させるが、補体依存性細胞傷害(CDC)を増加させないように、Fc断片においてE345R突然変異を含むGITRに特異的に結合するモノクローナル抗体をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0211】

一部の態様において、核酸分子は、配列番号5の配列に少なくとも90%相同なアミノ酸配列を含む重鎖を含むモノクローナル抗体をコードするヌクレオチド配列を含む。

一部の態様において、核酸分子は、配列番号5のアミノ酸配列を含む重鎖を含むモノクローナル抗体をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0212】

一部の態様において、核酸分子は、配列番号6の配列に少なくとも90%相同なアミノ酸配列を含む重鎖を含むモノクローナル抗体をコードするヌクレオチド配列を含む。

一部の態様において、核酸分子は、配列番号6のアミノ酸配列を含む重鎖を含むモノクローナル抗体をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0213】

一部の態様において、核酸分子は、配列番号11の配列に少なくとも90%相同なアミノ酸配列を含む軽鎖を含むモノクローナル抗体をコードするヌクレオチド配列を含む。

一部の態様において、核酸分子は、配列番号11のアミノ酸配列を含む軽鎖を含むモノクローナル抗体をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0214】

一部の態様において、核酸分子は、

- － 配列番号5の配列に少なくとも90%相同なアミノ酸配列を含む重鎖；
- － 配列番号11の配列に少なくとも90%相同なアミノ酸配列を含む軽鎖

10

20

30

40

50

を含むモノクローナル抗体をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0215】

一部の態様において、核酸分子は、

- － 配列番号5のアミノ酸配列を含む重鎖；
- － 配列番号11のアミノ酸配列を含む軽鎖

を含むモノクローナル抗体をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0216】

一部の態様において、核酸分子は、

- － 配列番号6の配列に少なくとも90%相同なアミノ酸配列を含む重鎖；
- － 配列番号11の配列に少なくとも90%相同なアミノ酸配列を含む軽鎖

を含むモノクローナル抗体をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0217】

一部の態様において、核酸分子は、

- － 配列番号6のアミノ酸配列を含む重鎖；
- － 配列番号11のアミノ酸配列を含む軽鎖

を含むモノクローナル抗体をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0218】

一部の態様において、核酸分子は、配列番号16の配列に少なくとも90%相同なアミノ酸配列を含む重鎖を含むモノクローナル抗体をコードするヌクレオチド配列を含む。

一部の態様において、核酸分子は、配列番号16のアミノ酸配列を含む重鎖を含むモノクローナル抗体をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0219】

一部の態様において、核酸分子は、配列番号21の配列に少なくとも90%相同なアミノ酸配列を含む軽鎖を含むモノクローナル抗体をコードするヌクレオチド配列を含む。

一部の態様において、核酸分子は、配列番号21のアミノ酸配列を含む軽鎖を含むモノクローナル抗体をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0220】

一部の態様において、核酸分子は、

- － 配列番号16の配列に少なくとも90%相同なアミノ酸配列を含む重鎖；
- － 配列番号21の配列に少なくとも90%相同なアミノ酸配列を含む軽鎖

を含むモノクローナル抗体をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0221】

一部の態様において、核酸分子は、

- － 配列番号16のアミノ酸配列を含む重鎖；
- － 配列番号21のアミノ酸配列を含む軽鎖

を含むモノクローナル抗体をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0222】

一部の態様において、核酸は、DNAである。

上記態様のいずれかにおいて、核酸分子は、単離されていてもよい。

本発明の核酸分子は、GITRに特異的に結合するモノクローナル抗体を生産する任意の源から単離されていてもよい。特定の態様において、本発明の核酸分子は、単離されたものではなく、合成されたものでもよい。

【0223】

本発明の一態様において、VH（配列番号4または配列番号15）またはVL（配列番号10または配列番号20）ドメインをコードする核酸分子は、すでにそれぞれ重鎖定常（CH）または軽鎖定常（CL）ドメインをコードする発現ベクターへの挿入によって、VHセグメントがベクター内のCHセグメントに作動可能に連結され、および／またはVLセグメントがベクター内のCLセグメントに作動可能に連結されるように全長にわたり抗体遺伝子に形質転換される。本発明の別の態様において、VHおよび／またはVLドメインをコードする核酸分子は、標準的な分子生物学的な技術を使用してVHおよび／また

はV Lドメインをコードする核酸分子をC Hおよび／またはC Lドメインをコードする核酸分子に連結、例えばライゲートすることによって、抗体の全長にわたり遺伝子に形質転換される。次いで重鎖および／または軽鎖の全長をコードする核酸分子は、それが導入された細胞から発現させることができる。

【0224】

核酸分子は、大量の組換えG I T Rに特異的に結合するモノクローナル抗体を発現させるのに使用することができる。

ベクター

別の側面において、本発明は、本明細書に記載されるヌクレオチド配列のいずれかの発現に好適なベクターに関する。

【0225】

本発明は、本明細書に記載されるG I T Rに特異的に結合するモノクローナル抗体またはその部分（例えば第1の結合ドメインの重鎖配列、ならびに／または、第2の結合ドメインの重鎖および／もしくは軽鎖配列）のアミノ酸配列のいずれかをコードする核酸分子を含むベクターに関する。本発明はさらに、融合タンパク質、改変された抗体、抗体断片をコードする核酸分子を含むベクターに関する。

【0226】

一部の態様において、本発明によるG I T Rに特異的に結合するモノクローナル抗体は、上述したように得られた第1または第2の結合ドメインの配列を部分的または完全にコードするDNA（例えば軽鎖および重鎖配列であって、結合ドメインが軽鎖および重鎖配列を含むもの）を、遺伝子が必要な発現制御配列、例えば転写および翻訳制御配列に作動可能に連結されるように、発現ベクターに挿入することによって発現される。発現ベクターとしては、プラスミド、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス（AAV）、植物ウイルス、例えばカリフラワーモザイクウイルス、タバコモザイクウイルス、コスミド、YAC、EBV由来エピソームなどが挙げられる。DNA分子は、ベクター内の転写および翻訳制御配列が、それらの意図されたDNAの転写および翻訳を調節する機能を発揮するように、ベクターにライゲートすることができる。発現ベクターおよび発現制御配列は、使用される発現宿主細胞に適合するように選択することができる。第1および第2の結合ドメインの配列を部分的または完全にコードするDNA分子（例えば、重鎖および軽鎖配列であって、結合ドメインが重鎖および軽鎖配列を含むもの）を、個々のベクターに導入することができる。一態様において、前記DNA分子のあらゆる組合せが、同じ発現ベクターに導入される。DNA分子は、標準的な方法（例えば抗体遺伝子断片およびベクターへの相補的制限部位のライゲーション、または制限部位が存在しない場合、平滑末端ライゲーション）によって発現ベクターに導入することができる。

【0227】

好適なベクターは、上述したようにいずれのV HまたはV L配列も、容易に挿入および発現できるように操作する適切な制限部位と共に機能的に完全なヒトC HまたはC L免疫グロブリン配列をコードするものである。このようなベクターにおける遺伝子のH CおよびL Cコード部分は、イントロン配列を含有していてもよく、その結果として、対応するmRNAを安定化することによって全体的な抗体タンパク質収量の強化がもたらされる。イントロン配列は、RNAスプライシングがどこで起こるかを決定するスプライスドナーおよびスプライスアクセプター部位を端部に有する。イントロン配列の位置は、抗体鎖の可変または定常領域のどちらかにあってもよいし、または複数のイントロンが使用される場合、可変および定常領域の両方にあってもよい。ポリアデニル化および転写終結は、コード領域下流の天然染色体部位で起こる可能性がある。組換え発現ベクターはまた、宿主細胞からの抗体鎖の分泌を容易にするシグナルペプチドをコードしていてもよい。抗体鎖遺伝子は、シグナルペプチドがフレーム内で免疫グロブリン鎖のアミノ末端に連結されるように、ベクターにクローニングすることができる。シグナルペプチドは、免疫グロブリンシグナルペプチドまたは異種シグナルペプチド（すなわち、非免疫グロブリンタンパク質由来のシグナルペプチド）であってもよい。

10

20

30

40

50

【0228】

抗体鎖遺伝子に加えて、本発明の組換えベクター発現は、宿主細胞において抗体鎖遺伝子の発現を制御する調節配列を有していてもよい。発現ベクターの設計は、調節配列の選択を含めて、形質転換しようとする宿主細胞の選択、望ましいタンパク質の発現のレベルなどのような因子に依存する可能性があることが、当業者によって理解されているであろう。哺乳動物において発現宿主細胞のための好ましい制御配列としては、哺乳類細胞において高レベルのタンパク質発現を確実にするウイルスエレメント、例えばレトロウイルスLTR由来のプロモーターおよび／またはエンハンサー、サイトメガロウイルス（CMV）由来のプロモーターおよび／またはエンハンサー（例えばCMVプロモーター／エンハンサー）、シミアンウイルス40（SV40）由来のプロモーターおよび／またはエンハンサー（例えばSV40プロモーター／エンハンサー）、アデノウイルス由来のプロモーターおよび／またはエンハンサー（例えば主要後期プロモーターアデノウイルス（AdMLP））、ポリオーマウイルスおよび強い哺乳類のプロモーター、例えば天然の免疫グロブリンプロモーターまたはアクチンプロモーターが挙げられる。ウイルス制御エレメントおよびそれらの配列のさらなる説明については、例えば米国特許第5,168,062号、4,510,245号および4,968,615号を参照されたい。植物において結合分子、例えば抗体を発現するための方法は、プロモーターおよびベクター、加えて植物の形質転換の説明を含めて、当業界において公知である。例えば米国特許第6,517,529号を参照されたい。ポリペプチドを細菌細胞または真菌細胞、例えば酵母細胞において発現するための方法も当業界において周知である。

【0229】

抗体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、追加の配列、例えば宿主細胞におけるベクターの複製を調節する配列（例えば複製起源）および選択可能マーカー遺伝子を有していてもよい。選択可能マーカー遺伝子は、ベクターが導入されている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、4,634,665号および5,179,017号を参照）。例えば、典型的には、選択可能マーカー遺伝子は、ベクターが導入されている宿主細胞に、医薬的な物質、例えばG418、ハイグロマイシンまたはメトトレキセートへの抵抗を付与する。例えば、選択可能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（メトトレキセート選択／増幅の間にdhfr宿主細胞での使用のため）、neo遺伝子（G418選択のため）、およびグルタメートシンセターゼ遺伝子が挙げられる。

【0230】

用語「発現制御配列」は、本明細書で使用される場合、それらがライゲートされているコード配列の発現およびプロセッシングを実行するのに必要なポリヌクレオチド配列を指すことが意図される。発現制御配列としては、適切な転写開始、終結、プロモーターおよびエンハンサー配列；効率的なRNAプロセッシングシグナル、例えばスプライシングおよびポリアデニル化シグナル；細胞質内のmRNAを安定化させる配列；翻訳効率を強化する配列（すなわち、コザックコンセンサス配列）；タンパク質の安定性を強化する配列；および望ましい場合、タンパク質分泌を強化する配列が挙げられる。このような制御配列の性質は宿主生物に応じて異なり、原核生物において、このような制御配列は、一般的に、リボソーム結合部位のプロモーター、および転写終結配列を含み；真核生物において、典型的には、このような制御配列は、プロモーターおよび転写終結配列を含む。用語「制御配列」は、その存在が発現およびプロセッシングに必須である少なくとも全ての成分を含むことが意図され、その存在が有利である追加の成分、例えば、リーダー配列および融合パートナー配列を含んでいてもよい。

宿主細胞

本発明のさらなる側面は、本発明によるGITRに特異的に結合するモノクローナル抗体を得るための方法に関する。本発明の1つの態様は、本明細書において定義されるGITRに特異的に結合するモノクローナル抗体を得るための方法であって、GITRに特異的に結合するモノクローナル抗体を発現することが可能な組換え宿主細胞の生産、GIT

Rに特異的に結合するモノクローナル抗体の発現／生産に好適な条件下での前記宿主細胞の培養、および得られたGITRに特異的に結合するモノクローナル抗体の単離を含む方法に関する。このような組換え宿主細胞におけるこのような発現によって生産されたGITRに特異的に結合するモノクローナル抗体は、本明細書では、「組換えGITRに特異的に結合するモノクローナル抗体」と称される。本発明はまた、このような宿主細胞からの細胞の後代、および同じように生産されたGITRに特異的に結合するモノクローナル抗体にも関する。

【0231】

本発明によるGITRに特異的に結合するモノクローナル抗体をコードする核酸分子およびこれらの核酸分子を含むベクターは、好適な哺乳類またはその細胞、植物またはその細胞、細菌または酵母宿主細胞のトランスフェクションに使用することができる。宿主細胞にポリヌクレオチドを導入するために、形質転換は、あらゆる公知の技術によってなされ得る。哺乳類細胞への異種ポリヌクレオチドの導入ための方法は当業界において周知であり、デキストラン媒介トランスフェクション、カチオン性ポリマー-核酸複合体トランスフェクション、リン酸カルシウム沈殿、ポリブレン媒介トランスフェクション、プロトプラスト融合、リポソームへのポリヌクレオチドの封入、および核へのDNAの直接のマイクロインジェクションが挙げられる。加えて、核酸分子は、ウイルスベクターによって哺乳類細胞に導入されてもよい。細胞をトランスフェクトするための方法は当業界において周知である。例えば米国特許第4,399,216号、4,912,040号、4,740,461号および4,959,455号を参照されたい。植物細胞を形質転換するための方法は当業界において周知であり、例えばアグロバクテリウム媒介形質転換、遺伝子銃形質転換、直接注射、エレクトロポレーションおよびウイルス形質転換が挙げられる。細菌および酵母細胞を形質転換する方法も当業界において周知である。

【0232】

形質転換の宿主として使用される哺乳類細胞株は当業界において周知であり、その例としては、利用可能な複数の不死化細胞株が挙げられる。これらの例としては、例えばチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、NS0細胞、SP2細胞、HEK-293T細胞、FreeStyle 293細胞(Invitrogen)、NIH-3T3細胞、HeLa細胞、ベビーハムスター腎臓(BHK)細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞(COS)、ヒト肝細胞癌細胞(例えばHep G2)、A549細胞、および多数の他の細胞株が挙げられる。細胞株は、どの細胞株が高い発現レベルを有し、生産されるタンパク質の必要な特徴をもたらすかを決定することによって選択される。使用可能な他の細胞株は、昆虫細胞株、例えばSf9またはSf21細胞である。GITRに特異的に結合するモノクローナル抗体をコードする組換え発現ベクターが哺乳類宿主細胞に導入される場合、抗体は、宿主細胞における抗体の発現、またはより好ましくは宿主細胞を増殖させる培養培地への抗体の分泌を可能にするのに十分な期間、宿主細胞を培養することによって生産される。GITRに特異的に結合するモノクローナル抗体は、標準的なタンパク質精製技術を使用して培養培地から再構成することができる。植物宿主細胞としては、例えばタバコ属、シロイヌナズナ属、ウキクサ、トウモロコシ、コムギ、ジャガイモなどが挙げられる。細菌の宿主細胞としては、大腸菌属(*Escherichia*)およびストレプトマイセス属(*Streptomyces*)の種が挙げられる。酵母宿主細胞としては、シゾサッカロマイセス・ポンベ(*Schizosaccharomyces pombe*)、サッカロマイセス・セレビジエ(*Saccharomyces cerevisiae*)およびピチア・パストリス(*Pichia pastoris*)が挙げられる。

【0233】

さらに、生産細胞株からの本発明によるGITRに特異的に結合するモノクローナル抗体の生産レベルは、多数の公知の技術を使用して強化することができる。例えば、グルタミン合成酵素遺伝子発現系(GS系)が、特定の条件下での発現を強化するための一般的なアプローチである。GS系は、EP0216846号、0256055号、0323997号および0338841号に関連して全体的または部分的に論じられている。

【0234】

様々な細胞株またはトランスジェニック動物のGITRに特異的に結合するモノクローナル抗体は、互いに比較して異なるグリコシル化プロファイルを有することが考えられる。しかしながら、本明細書に記載される核酸分子によってコードされる、または本明細書で提供されるアミノ酸配列を含むGITRに特異的に結合するモノクローナル抗体は、結合分子のグリコシル化に関係なく、さらに一般的には、翻訳後修飾の存在または非存在に関係なく、本発明の一部である。

抗体の調製

本発明はまた、GITRに特異的に結合するモノクローナル抗体およびその抗原結合断片を得るための方法およびプロセスにも関する。

モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は、最初にKohlerら、Nature 256、1975、495頁によって説明されたハイブリドーマ方法を使用して調製してもよいし、または組換えDNA方法(US4816567)を使用して調製してもよい。

【0235】

ハイブリドーマ方法において、マウス、または他の適切な宿主動物、例えばハムスターは、上記の方法に従って免疫化されて、免疫化のために使用されるタンパク質に特異的に結合すると予想される抗体を生産するかまたは生産することが可能なリンパ球を生じさせる。別の態様によれば、リンパ球は、インビトロでの免疫化の結果として得ることができる。免疫化の後、リンパ球を、好適な融合剤、例えばポリエチレングリコールを使用して骨髓腫細胞株と融合させて、ハイブリドーマ細胞を生産する。

【0236】

上記の方式で得られたハイブリドーマ細胞は、好適な培養培地、好ましくは、融合していない親の骨髓腫細胞の増殖または生存を阻害する1種または複数の物質を含有する培地中で培養してもよい。例えば、親の骨髓腫細胞が酵素ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRTまたはHPRRT)を欠如している場合、ハイブリドーマのための培養培地は、典型的には、ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジン(HAT培地)、すなわちHGPRT欠乏細胞の増殖を妨げる物質を含むと予想される。

【0237】

骨髓腫細胞融合のための成分として使用される好ましい細胞は、効率的に融合させ、選択された抗体生産細胞による安定な高いレベルの抗体生産を支え、融合していない親細胞が選択される培地に感受性であるものである。好ましい骨髓腫細胞株は、マウス骨髓腫株、例えば、Salk Institute Cell Distribution Center、San Diego、California、USAより入手可能なMOPC-21およびMPC-11マウス腫瘍、ならびにAmerican Type Culture Collection、Rockville、Maryland、USAより入手可能なSP-2またはX63-Ag8-653細胞由来のものである。またヒト骨髓腫およびマウス-ヒト異種骨髓腫細胞株もモノクローナル抗体の生産に関して記載されている(Kozbor, J. Immunol.、133、1984、3001頁)。

【0238】

好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって生産されたモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降によって、またはインビトロの結合アッセイ、例えばラジオイムノアッセイ(RIA)もしくは酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)によって決定される。

【0239】

モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、Munsonら、Anal. Biochem.、107:220(1980)に記載されるスキャッチャード分析によって決定することができる。

【0240】

望ましい特異性、親和性、および／または活性の抗体を生産するハイブリドーマ細胞が同定されたら、クローンを限界希釈法によってサブクローニングし、標準的な方法によ

10

20

30

40

50

て増殖させることができる。この目的のために好適な培養培地としては、例えば、D-MEMまたはRPMI-1640培地が挙げられる。加えて、ハイブリドーマ細胞は、例えばマウスに細胞を腹膜内(i.p.)注射することによる、動物における腹水腫瘍として、インビボで増殖させることができる。

【0241】

サブクローンによって分泌されたモノクローナル抗体は、従来の抗体精製技術、例えば、アフィニティークロマトグラフィー（例えばプロテインAまたはプロテインG-セファロースを使用して）またはイオン交換クロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析などによって培養培地、腹水、または血清から分離することができる。

【0242】

モノクローナル抗体をコードするDNAは、従来の手順を使用して（例えば、マウス抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子への特異的な結合が可能なオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって）容易に単離およびシーケンシングされる。ハイブリドーマ細胞は、このようなDNAの好ましい源として役立つ。単離されたら、DNAは、発現ベクターに配置することができ、これを次いでトランスフェクトされなければ抗体タンパク質を生産しない宿主細胞、例えば大腸菌(E.coli)細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、または骨髓腫細胞にトランスフェクトして、組換え宿主細胞におけるモノクローナル抗体の合成を達成する。

【0243】

本発明のさらなる態様において、モノクローナル抗体または抗体断片は、McCaffertyら、Nature、348:552~554(1990)に記載される技術を使用して生成された抗体ファージライブラリーから単離されていてもよい。Clacksonら、Nature、352:624~628(1991)およびMarksら、J.Mol.Biol.、222:581~597(1991)は、それぞれファージライブラリーを使用したマウスおよびヒト抗体の単離を記載している。それに続く刊行物は、チェーンシャッフリングによる高親和性(nMの範囲)ヒト抗体の生産(Marksら、Bio/Technology、10:779~783(1992)、加えて、非常に大きいファージライブラリーを構築するための戦略としてコンビナトリアル感染およびインビボの組換え(Waterhouseら、Nucl.Acids.Res.21:2265~2266(1993)を記載している。したがって、これらの技術は、モノクローナル抗体の単離のための従来のモノクローナル抗体ハイブリドーマ技術の実用的な代替法である。

【0244】

抗体をコードするDNAは、例えば、キメラまたは融合抗体ポリペプチドを生産するように、例えば重鎖および軽鎖(CHおよびCL)定常領域配列を相同なマウス配列で置換することによって(US4816567およびMorrisonら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA:81:6851(1984)、または免疫グロブリンコード配列を非免疫グロブリンポリペプチド(異種ポリペプチド)のコード配列の全部または一部と共有結合で融合させることによってそれらを生産するように改変することができる。非免疫グロブリンポリペプチド配列は、抗体の定常領域と置換されていてもよいし、またはそれらは、抗原への特異性を有する1つの抗原-結合部位と、異なる抗原への特異性を有する別の抗原-結合部位とを含むキメラ2価抗体が作り出されるように、抗体の抗原結合中心の可変ドメインと置換されていてもよい。

ファージディスプレイライブラリーに基づくヒト抗体および手法

現在、免疫化の後、内因性免疫グロブリン生産を起さずにヒト抗体の全範囲を生産することが可能なトランスジェニック動物(例えばマウス)を生産することが可能である。例えば、キメラおよび生殖系列突然変異マウスにおける抗体重鎖連結領域(JH)遺伝子のホモ接合体欠失が、内因性抗体生産の完全な阻害をもたらすことが記載されている。ヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子アレイの、このような生殖系列突然変異マウスへの移動は、抗原攻撃の後にヒト抗体の生産をもたらす(US5545806、5569825、

10

20

30

40

50

5 5 9 1 6 6 9 (全て GenPharm) ; 5 5 4 5 8 0 7 ; および WO 9 7 / 1 7 8 5 2)。

【0245】

代替として、ファージディスプレイ技術 (McCaffertyら、Nature、348:552~553 (1990)) を使用して、インビトロで免疫化されたドナーの体由来の免疫グロブリン可変 (V) 領域遺伝子レパートリーからヒト抗体および抗体断片を得ることができる。この技術によれば、抗体 V 領域遺伝子は、フレーム内で繊維状バクテリオファージ、例えば M13 または fd のメジャーまたはマイナーコートタンパク質遺伝子のいずれかと共にクローニングされ、ファージ粒子の表面上に機能的な抗体断片として提示される。繊維状粒子はファージゲノムの一本鎖 DNA コピーを含有するため、抗体の機能特性に基づく選択はまた、前記特性を呈する抗体をコードする遺伝子の選択ももたらす。したがって、ファージは、B 細胞特性の一部を模擬する。ファージディスプレイは、様々な様式で実行することができる。V 遺伝子セグメントの数々の源がファージディスプレイに使用することができる。Clacksonら、Nature、352:624~628 (1991) は、免疫化されたマウスの脾臓由来の V 遺伝子の小さいランダムコンビナトリアルライブラリーから抗オキサゾロン抗体の様々なアレイを単離した。免疫されていないヒトドナーからの V 遺伝子のレパートリーを構築することができ、抗原 (自己抗原を含む) の多様なアレイに対する抗体は、Marksら、J. Mol. Biol. 222:581~597 (1991) によって記載された技術に本質的にしたがって単離することができる。

【0246】

上述したように、ヒト抗体はまた、インビトロの活性化 B 細胞によって生成することもできる (US 5 5 6 7 6 1 0 および 5 2 2 9 2 7 5 を参照)。

抗体断片

特定の環境では、抗体全体よりも抗体断片を使用することが望ましい。小さいサイズの断片は、その急速なクリアランスに寄与し、高密度の腫瘍へのより優れた浸透に寄与する場合もある。

【0247】

抗体断片の生産のための様々な技術が開発されてきた。従来、これらの断片は、無傷抗体のタンパク質分解消化を介して得ていた。しかしながら、これらの断片は現在、組換え宿主細胞によって直接得ることができる。Fab、Fv および ScFv 抗体断片は、大腸菌から発現させ分泌させることができ、したがってこれらの断片の大量生産を容易にすることができる。抗体断片は、上述した抗体ファージライブラリーから単離してもよい。別の態様によれば、Fab'-SH 断片を大腸菌から直接単離し、化学的にカップリングして、F(ab')₂ 断片を形成することができる (Carterら、Bio/Technology 10:163~167 (1992))。別のアプローチによれば、F(ab')₂ 断片は、組換え宿主細胞培養物から直接単離してもよい。エピトープに結合する受容体残基を保持した、インビボにおける半減期が増加した Fab および F(ab')₂ が、US 5 8 6 9 0 4 6 に記載されている。抗体断片の生産のための他の技術は、当業者には明らかであろう。本発明の他の態様において、最適な抗体は、単鎖 Fv 断片 (scFv) である (WO 9 3 / 1 6 1 8 5 ; US 5 5 7 1 8 9 4 および US 5 5 8 7 4 5 8 を参照)。Fv および scFv は、定常領域が欠失した無傷の結合部位を有する唯一の種である ; 結果としてそれらは、インビボでの使用中における非特異的結合の低減に好適である。scFv 融合タンパク質を構築して、scFv の N または C 末端のいずれかにおけるエフェクタータンパク質の融合をもたらすことができる。抗体断片はまた、例えば U. S. 5 6 4 1 8 7 0 に記載されたように、「線状抗体」であってもよい。このような線状抗体断片は、単一特異性のまたは二重特異性であってもよい。

医薬組成物

別の側面において、本発明は、活性成分として (または唯一の活性成分として) GITR に特異的に結合するモノクローナル抗体を含む医薬組成物を提供する。

【0248】

医薬組成物は、少なくとも1つのGITRに特異的に結合するモノクローナル抗体、ならびに、医薬的に許容される、および薬理学的に適合可能な賦形剤からなる群から選択される成分の少なくとも1つを含んでいてもよい。

【0249】

医薬組成物は、少なくとも1つのGITRに特異的に結合するモノクローナル抗体、および対応する表面受容体の1つまたは複数を標的化する1つまたは複数の追加の結合分子（例えば抗体）を含んでいてもよい。本発明の一部の態様において、組成物は、GITRに関連する可能性がある障害を改善する、防止する、または処置することが意図される。

【0250】

「医薬組成物」は、本発明によるGITRに特異的に結合するモノクローナル抗体、ならびに、医薬的に許容される、および薬理学的に適合可能な賦形剤、例えば増量剤、溶媒、希釈剤、担体、助剤、分配剤、送達剤、保存剤、安定剤、乳化剤、懸濁化剤、増粘剤、長期送達制御剤（*prolonged delivery controller*）からなる群から選択される成分の少なくとも1つを含む組成物を意味し、それらの選択および比率は、投与のタイプおよび経路ならびに投薬量に依存する。本発明の医薬組成物およびその調製方法は、当業者にとって確実に明らかであろう。医薬組成物は、好ましくはGMP（*Good Manufacturing Practice*；医薬品の製造管理および品質管理に関する基準）の要件に従って製造されるべきである。組成物は、緩衝組成物、等張化剤、安定剤および可溶化剤を含んでいてもよい。組成物の長期作用は、医薬品有効成分の吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンによって達成してもよい。好適な担体、溶媒、希釈剤および送達剤の例としては、水、エタノール、多価アルコールおよびそれらの混合物、油、ならびに注射のための有機エステルが挙げられる。

【0251】

「医薬（薬物）」は、ヒトおよび動物における生理学的機能の回復、改善または改変、ならびに疾患の処置および防止、診断、麻酔、避妊、美容などを意図した、錠剤、カプセル剤、散剤、凍結乾燥剤、注射剤、点滴剤、軟膏剤の形態、ならびに他のすぐに使用できる形態での、化合物、または医薬組成物としての化合物の混合物である。当業界において容認されるペプチド、タンパク質または抗体を投与するためのあらゆる方法が、本発明によるGITRに特異的に結合するモノクローナル抗体のために好適に採用することができる。

【0252】

用語「医薬的に許容される」は、哺乳動物、好ましくはヒトにおける投与に好適な1つまたは複数の適合性の液体または固体成分を指す。

用語「賦形剤」は、本明細書において、本発明の上記の成分以外の任意の成分を記載するのに使用される。これらは、薬物製品に必要な物理化学的な特性を付与するために医薬品製造で使用する無機または有機の性質を有する物質である。

【0253】

用語「緩衝液」、「緩衝組成物」、「緩衝剤」は、その酸-塩基共役成分の作用によってpHの変化に耐えることを可能にし、CD20に特異的に結合するモノクローナル抗体の薬物がpHの変化に耐えるようにする溶液を指す。一般的に、医薬組成物は、好ましくは、4.0から8.0の範囲のpHを有する。使用される緩衝液の例としては、これらに限定されないが、酢酸緩衝溶液、リン酸緩衝溶液、クエン酸緩衝溶液、ヒスチジン緩衝溶液、コハク酸緩衝溶液などの緩衝溶液が挙げられる。

【0254】

用語「等張化剤」、「浸透圧調節物質」または「浸透圧剤」は、本明細書で 사용되는場合、液体の抗体製剤の浸透圧を増加させることができる賦形剤を指す。「等張な」薬物は、ヒト血液の浸透圧と同等な浸透圧を有する薬物である。等張な薬物は、典型的には、約250から350mOsm/kgの浸透圧を有する。使用される等張剤としては、これ

10

20

30

40

50

らに限定されないが、ポリオール、糖およびスクロース、アミノ酸、金属塩、例えば、塩化ナトリウムなどが挙げられる。

【0255】

「安定剤」は、活性薬剤の物理的および／または化学的安定性をもたらす賦形剤または2種またはそれより多くの賦形剤の混合物を指す。安定剤としては、アミノ酸、例えば、これらに限定されないが、アルギニン、ヒスチジン、グリシン、リシン、グルタミン、プロリン；界面活性剤、例えば、これらに限定されないが、ポリソルベート20（商標名：Tween 20）、ポリソルベート80（商標名：Tween 80）、ポリエチレンーポリプロピレングリコールおよびそれらのコポリマー（商標名：Poloxamer、Pluronic、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）；抗酸化剤、例えば、これらに限定されないが、メチオニン、アセチルシステイン、アスコルビン酸、モノチオグリセロール、亜硫酸塩など；キレート剤、例えば、これらに限定されないが、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、ジエチレントリアミンペンタ酢酸（DTPA）、クエン酸ナトリウムなどが挙げられる。

10

【0256】

医薬組成物は、特定の貯蔵寿命の間に、貯蔵温度での、例えば2～8℃の貯蔵温度で、活性薬剤がその物理的安定性および／または化学的安定性および／または生物学的活性を保持する場合、「安定」である。好ましくは、活性薬剤は、物理的および化学的安定性の両方、加えて生物学的活性を保持する。貯蔵期間は、加速または自然老化条件における安定性試験の結果に基づいて調整される。

20

【0257】

本発明の医薬組成物は、すぐに使える製剤の形態で、単一の単位用量または複数の単一の単位用量の形態で、製造する、パッケージ化する、または広く販売することができる。用語「単一の単位用量」は、本明細書で使用される場合、予め決定された量の活性成分を含有する、別々の量の医薬組成物を指す。活性成分の量は、典型的には、対象に投与しようとする活性成分の用量に等しいか、またはこのような用量の便利な分けられた量、例えばこのような用量の半分または3分の1に等しい。

【0258】

本発明による医薬組成物は、典型的には、皮膚または粘膜バリアを破ること、注射、輸注および埋め込みを利用して消化管をバイパスすることによるヒト体への投与を意図した滅菌製剤として、非経口投与に好適である。例えば、非経口投与としては、とりわけ、皮下、腹膜内、筋肉内、胸骨内、静脈内、動脈内、髄腔内、心室内、尿道内、頭蓋内、滑液包内、経皮の注射または輸注；および腎臓透析の輸注技術が挙げられる。また腫瘍内送達、例えば腫瘍内注射も採用することができる。また局所灌流も提供される。本発明の好ましい態様は、静脈内および皮下の経路を含む。当業界において容認されるペプチドまたはタンパク質を投与するためのあらゆる方法が、本発明によるGITRに特異的に結合するモノクローナル抗体のために好適に採用することができる。

30

【0259】

注射製剤は、これらに限定されないが、単位剤形で、例えばアンプル、バイアル、プラスチック容器、プレフィルドシリンジ、自己注射デバイスの形態で、調製する、パッケージ化する、または販売することができる。非経口投与のための製剤としては、とりわけ、懸濁剤、液剤、油性または水性基剤中の乳剤、ペーストなどが挙げられる。

40

【0260】

別の態様において、本発明は、投与の前に好適な基剤（例えば滅菌ピロジェンフリー水）を用いて再構成させるための乾燥した（すなわち粉末または顆粒状の）形態で提供される医薬組成物を含む非経口投与のための組成物を提供する。このような製剤は、例えば、当業界においてフリーズドライとして公知の凍結乾燥プロセスによって調製してもよく、このようなプロセスは、生成物を凍結させること、続いて凍結した材料から溶媒を除去することを含む。

【0261】

50

本発明によるG I T Rに特異的に結合するモノクローナル抗体はまた、単独で、好適な医薬的に許容される賦形剤との混合物としてのいずれかで、好適な噴射剤を使用するかまたは使用しない、加圧エアロゾル容器、ポンプ、スプレー、アトマイザー、またはネブライザーなどの吸入器から、または点鼻剤、またはスプレーとして、鼻腔内に、または吸入によって投与してもよい。

【0262】

非経口投与のための剤形は、即時放出または放出調節となるように製剤化されてもよい。放出調節剤としては、遅延、持続、パルス、制御、標的化およびプログラム化された放出が挙げられる。

本発明によるG I T Rに特異的に結合するモノクローナル抗体の治療的使用

一側面において、本発明によるG I T Rに特異的に結合するモノクローナル抗体は、G I T R活性と関連する（それによって媒介される）障害の処置において有用である。

【0263】

一側面において、処置の対象、または患者は、哺乳動物、好ましくはヒト対象である。前記対象は、雄または雌のいずれであってもよいし、あらゆる年齢であってもよい。

一部の態様において、前記G I T Rに特異的に結合するモノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、G I T Rによって媒介される疾患または障害を処置するために使用され、その場合、疾患または障害は、子宮頸がん、頭頸部がん、胃がん、乳がん、腎細胞がん、CRC（結腸直腸がん）、（OC）卵巣がん、NSCLC（非小細胞肺がん）を含む群から選択される。

【0264】

腫瘍（例えば、がん）の場合、治療有効量の抗体またはその断片（例えば、G I T Rに特異的に結合する抗体またはその断片）は、がん細胞の数を低減する；初期の腫瘍サイズを低減する；がん細胞の末梢器官への浸潤を阻害する（すなわちある程度遅くする、好ましくは停止する）；腫瘍転移を抑える（すなわちある程度遅くする、好ましくは停止する）；腫瘍増殖をある程度阻害する；および／または障害に関連する症状の1つまたは複数にある程度緩和することができる。抗体またはその断片は、ある程度、現存するがん細胞の増殖を防止する、および／またはそれを致死させることができ、これは、細胞増殖抑制性であってもよいし、および／または細胞傷害性であってもよい。がん療法の場合、インビボの効能は、例えば、生存、腫瘍進行までの期間（TTP）、処置に対する腫瘍奏効率（RR）、応答の持続時間および／または生活の質を評価することによって測定することができる。

【0265】

本明細書で使用される場合、用語「共投与」、「共投与された」および「～と組み合わせる」は、G I T Rに特異的に結合するモノクローナル抗体と1種または複数の異なる治療剤に対して言及される場合、以下を意味することが意図される、それらを指す、またはそれらを含む：

1）処置が必要な患者への、このような本発明によるG I T Rに特異的に結合するモノクローナル抗体および治療剤の組合せの同時投与であり、このような成分と一緒に単一の剤形に製剤化される場合、それは前記患者に前記成分を実質的に同じときに放出し、

2）処置が必要な患者への、このような本発明によるG I T Rに特異的に結合するモノクローナル抗体および治療剤の組合せの同時投与であり、このような成分が互いに離れて別々の剤形に製剤化される場合、それは実質的に同じときに前記患者によって摂取され、その後すぐに前記成分は、実質的に同じときに前記患者に放出され、

3）処置が必要な患者への、このような本発明によるG I T Rに特異的に結合するモノクローナル抗体および治療剤の組合せの逐次的な投与であり、このような成分が互いに離れて別々の剤形に製剤化される場合、それは各投与間に有意な時間間隔をあけて連続する時間に前記患者によって摂取され、その後すぐに前記成分は、実質的に異なるときに前記患者に放出され；

4）処置が必要な患者への、このような本発明によるG I T Rに特異的に結合するモノ

クローナル抗体および治療剤の組合せの逐次的な投与であり、このような成分と一緒に単一の剤形に製剤化される場合、それは前記成分を制御された方法で放出し、その後すぐにそれは、同時に、連続的に、または同じおよび／または異なるときに連带的に前記患者に放出され、この場合、各部分は、同一または異なる経路のどちらで投与されてもよい。

【0266】

本発明によるGITRに特異的に結合するモノクローナル抗体は、さらなる治療的処置を伴わずに、すなわち独立した療法として投与することができる。さらに、本発明によるGITRに特異的に結合するモノクローナル抗体による処置は、少なくとも1つの追加の治療的処置を含んでいてもよい（併用療法）。本発明の一部の態様において、CD20に特異的に結合するモノクローナル抗体は、連带的に投与されてもよいし、またはがんの処置のための別の薬物療法／調製物と共に製剤化されてもよい。

10

【0267】

用語「細胞傷害性物質」は、本明細書で使用される場合、細胞の機能を阻害もしくは防止する、および／または細胞の破壊を引き起こす物質を指す。この用語は、放射性同位体（例えば At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} および Lu の放射性同位体）、化学療法剤、および毒素、例えば、小分子毒素、または細菌、真菌、植物もしくは動物起源の酵素的に活性な毒素を含み、さらにそれらの断片および／またはバリエーションも含むことが意図される。

【0268】

「化学療法剤」は、悪性腫瘍を処置するのに使用される化合物である。化学療法剤の例としては、アルキル化剤、例えばチオテパおよびシクロホスファミド（cyclophosphamide）（CYTOXAN（登録商標））；スルホン酸アルキル、例えばブスルファン、インプロスルファンおよびピボスルファン；アジリジン、例えばベンゾドール、カルボコン、メツレドール、およびウレドール（uredopa）；エチレンイミンおよびメチラメラミン（methyldiamine）、例えばアルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド（triethylenethiophosphoramide）、トリエチレンチオホスホラミドおよびトリメチロキサミンなど；アセトゲニン（例えばブラタシンおよびブラタシノン）；デルター9-テトラヒドロカンナビノール（ドロナビノールであるMARINOL（登録商標））；ベターラパコン；ラパコール；コルヒチン；ベツリン酸；カンプトテシン（例えば合成アナログトポテカン（HYCAMTIN（登録商標））、CPT-11（イリノテカン、CAMPTOSAR（登録商標））、アセチルカンプトテシン、スコボレチン、および9-アミノカンプトテシンなど）；ブリオスタチン；カリストアチン；CC-1065（例えばそのアドゼレシン、カルゼレシンおよびビゼレシン合成アナログなど）；ポドフィロトキシン；ポドフィリン酸；テニポシド；クリプトフィシン（例えばクリプトフィシン1およびクリプトフィシン8）；ドラスタチン；デュオカルマイシン（例えば合成アナログであるKW-2189およびCB1-TM1など）；エリテロピン；パンクラチスタチン；サルコジクチン；スポンギスタチン；ナイトロジェンマスタード、例えばクロラムブシル、クロルナファジン、クロロホスファミド（chlorophosphamide）、エストラムスチン、イフォスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベムビシン（novembichin）、フェネステリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタード；ニトロソウレア（nitrosourea）、例えばカルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、およびラニムスチン（ranimustine）；抗生物質、例えばエンジイン抗生物質（例えばカリケアマイシン、例えばカリケアマイシガンマIIおよびカリケアマイシンオメガII（例えばAgnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33:183~186（1994）を参照）；ダイネマイシン（dynemicin）、例えばダイネマイシンAなど；エスペラミシン；加えて、ネオカルチノスタチン発色団および関連する色素タンパク質であるエンジイン抗生物質発色団）、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、アントラマイシン（anthramycin）、アザセリン、ブレオマイシン、カクチ

20

30

40

50

ノマイシン、カルビシン (carabycin)、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン、6-ジアゾ-5-オキソ-1-ノルロイシン、ドキシソルビシン (例えば ADRIAMYCIN (登録商標))、モルホリノドキシソルビシン、シアノモルホリノドキシソルビシン、2-ピロリノドキシソルビシン、ドキシソルビシン HCL リポソーム注射剤 (DOXOL (登録商標))、リポソームドキシソルビシン TLC D-99 (MYOCET (登録商標))、ペグ化リポソームドキシソルビシン (CAELYX (登録商標))、およびデオキシドキシソルビシンなど)、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン、マイトマイシン、例えばマイトマイシン C、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポルフィロマイシン (potfiromycin)、ピューロマイシン、クエラマイシン (quelamycin)、ロドルビシン (rodorubicin)、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルビシン; 代謝拮抗物質、例えばメトトレキセート、ゲムシタビン (GEMZAR (登録商標))、テガフル (UFTORAL (登録商標))、カペシタビン (XELODA (登録商標))、エボチロン、および 5-フルオロウラシル (5-FU); 葉酸アナログ、例えばデノプテリン、メトトレキセート、プテロプテリン、トリメトトレキセート; プリンアナログ、例えばフルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン (thiamiprine)、チオグアニン; ピリミジンアナログ、例えばアンシタビン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスウリジン; 副腎皮質抑制薬 (anti-adrenal)、例えばアミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン; 葉酸補充剤、例えばホリニン酸 (frolinic acid); アセグラトン; アルドホスファミドグリコシド; アミノレブリン酸; エニルウラシル; アムサクリン; ベストラブシル; ビサントレン; エダトレキセート (edatraxate); デフォファミン (defofamine); デメコルシン; ジアジクオン; エフロルニチン (elfornithine); 酢酸エリブチニウム; エトグルシド; 硝酸ガリウム; ヒドロキシ尿素; レンチナン; ロニダミン (lonidainine); メイタンシノイド、例えばメイタンシンおよびアンサミトシン; ミトグアゾン; ミトキサントロン; モピダモール (mopidanmol); ニトラクリン (nitraerine); ペントスタチン; フェナメット; ピラルビシン; ロソキサントロン; 2-エチルヒドラジド; プロカルバジン; PSK (登録商標) 多糖複合体 (JHS 天然産物、Eugene, OR); ラゾキサン; リゾキシン; シゾフィラン; スピロゲルマニウム; テヌアゾン酸; トリアジクオン; 2, 2', 2''-トリクロロトリエチルアミン; トリコテセン (例えば T-2 毒素、ベラクリン (verracurin) A、ロリジン A および アングイジン); ウレタン; ダカルバジン; マンノムスチン; ミトブロニトール; ミトラクトール; ピボプロマン; ガシトシン (gacytosine); アラビノシド (「Ara-C」); チオテパ; タキソイド、例えばパクリタキセル (TAXOL (登録商標))、パクリタキセルのアルブミンで操作されたナノ粒子製剤 (ABRAXANETM)、およびドセタキセル (TAXOTERE (登録商標)); クロラムブシル; 6-チオグアニン; メルカプトプリン; メトトレキセート; 白金剤、例えばシスプラチン、オキサリプラチン、およびカルボプラチン; チューブリン重合の微小管形成を防止するビンカ、例えばビンブラスチン (VELBAN (登録商標))、ピンクリスチン (ONCOVIN (登録商標))、ビンデシン (ELDISINE (登録商標))、FILDESIN (登録商標)、およびビノレルビン (NAVELBINE (登録商標)) など; エトポシド (VP16); イフォスファミド; ミトキサントロン; ロイコボリン; ノバントロン; エダトレキセート; ダウノマイシン; アミノプテリン; イバンドロネート; トポイソメラーゼ阻害剤 RFS 2000; ジフルオロメチルオルニチン (difluorometlhylornithine) (DMFO); レチノイド、例えばレチノイン酸、例えばベキサロテン (TARGRETIN (登録商標)) など; ビスホスホネート、例えばクロドロネート (例えば、BONEFOS (登録商標) または OSTAC (登録商標))、エチドロネート (DIDROCAL (登録商標))、NE-58095、ゾレドロン酸/ゾレドロン酸

10

20

30

40

50

塩（ZOMETA（登録商標））、アレンドロネート（FOSAMAJX（登録商標））、パミドロネート（AREDIA（登録商標））、チルドロネート（SKELID（登録商標））、またはリセドロネート（ACTONEL（登録商標））；トロキサシタビン（1, 3-ジオキサランヌクレオシドシトシンアナログ）；アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に、例えばPKC-アルファ、Raf、H-Ras、および上皮増殖因子受容体（EGF-R）などの異常な細胞増殖に関与するシグナル伝達経路における遺伝子の発現を阻害するもの；ワクチン、例えばセラトープ（THERATOPE）（登録商標）ワクチンおよび遺伝子療法ワクチン、例えば、ALLOVECTIN（登録商標）ワクチン、LEUVECTIN（登録商標）ワクチン、およびVAXID（登録商標）ワクチン；トポイソメラーゼⅠ阻害剤（例えばLURTOTECAN（登録商標））；rmRH（例えばABARELIX（登録商標））；BAY439006（ソラフェニブ；Bayer）；SU-11248（Pfizer）；ペリフォシン、COX-2阻害剤（例えばセレコキシブまたはエトリコキシブ）、プロテオソーム阻害剤（例えばPS341）；ボルテゾミブ（VELCADE（登録商標））；CCI-779；チピファルニブ（RL 1577）；またはアフエニブ（afenib）、ABT510；Bcl-2阻害剤、例えばオブリマーセンナトリウム（GENA SENSE（登録商標））；ピクサントロン；EGFR阻害剤（以下の定義を参照）；チロシンキナーゼ阻害剤（以下の定義を参照）；ならびに上記のいずれかの医薬的に許容される塩、酸または誘導体；加えて、上記のものの2種またはそれより多くの組合せ、例えばシクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、およびブレドニゾロンを組み合わせた療法の略語であるCHOP、ならびに5-FU およびロイコボリン（leucovorin）と組み合わされたオキサリプラチン（ELOXATINTM）を用いた処置レジメンの略語であるFOLFOXが挙げられる。

【0269】

この定義には、腫瘍へのホルモン作用を調節または阻害するように作用する抗ホルモン剤、例えば混成のアゴニスト／アンタゴニストプロファイルを有する抗エストロゲン剤、例えば、タモキシフェン（NOLVADEX（登録商標））、4-ヒドロキシタモキシフェン、トレミフェン（FARESTON（登録商標））、イドキシフェン、ドロロキシフェン、ラロキシフェン（EVTSTA（登録商標））、トリオキシフェン、ケオキシフェン、および選択的エストロゲン受容体モジュレーター（SERM）、例えばSERM3など；アゴニスト特性を有さない純粋な抗エストロゲン剤、例えばフルベストラント（FASLODEX（登録商標））、およびEM800（このような薬剤は、エストロゲン受容体（ER）二量体化をブロックする、DNA結合を阻害する、ERのターンオーバーを増加させる、および／またはERレベルを抑制することができる）；アロマターゼ阻害剤、例えば、ステロイド性アロマターゼ阻害剤、例えばフォルメスタンおよびエキセメスタン（AROMASIN（登録商標））、および非ステロイド性アロマターゼ阻害剤、例えばアナストラゾール（AREVIIDEX（登録商標））、レトロゾール（FEMARA（登録商標））およびアミノグルテチミドなど、および他のアロマターゼ阻害剤、例えば、ボロゾール（RIVISOR（登録商標））、酢酸メゲストロール（MEGASE（登録商標））、ファドロゾール、イミダゾールなど；黄体形成ホルモン放出ホルモンアゴニスト、例えば、ロイプロリド（LUPRON（登録商標））およびELIGARD（登録商標））、ゴセレリン、ブセレリン、およびトリプトレリン（tripterelin）など；性ステロイド、例えば、プロゲステロン、例えば酢酸メゲストロールおよび酢酸メドロキシプロゲステロン、エストロゲン、例えばジエチルスチルベストロールおよびプレマリン、ならびにアンドロゲン／レチノイド、例えばフルオキシメステロン、全てのtransレチノイン酸およびフェンレチニドなど；オナプリストン；抗プロゲステロン剤；エストロゲン受容体ダウンレギュレーター（ERD）；抗アンドロゲン剤、例えばフルタミド、ニルタミドおよびビカルタミド；テストラクトン；ならびに上記のいずれかの医薬的に許容される塩、酸または誘導体；加えて、上記のものの2種またはそれより多くの組合せも含まれる。

【0270】

10

20

30

40

50

本発明によるG I T Rに特異的に結合する抗体と組み合わせて使用できる他の治療剤は、増殖因子機能の阻害剤であってもよく、例えば、このような阻害剤としては、増殖因子抗体および増殖因子受容体抗体（例えば、抗e r b B 2抗体トラスツズマブ〔ハーセプチン〕、抗E G F R抗体パニツムマブ、抗e r b B 1抗体セツキシマブ〔アービタックス、C 2 2 5〕およびS t e r nら、C r i t i c a l r e v i e w s i n o n c o l o g y / h a e m a t o l o g y、2 0 0 5、第5 4巻、1 1～2 9頁によって開示されたあらゆる増殖因子または増殖因子受容体抗体）；血管新生阻害剤、例えば、血管内皮増殖因子の作用を阻害するもの〔例えば、抗血管内皮細胞増殖因子抗体であるベバシズマブ（アバスタ）〕、抗血管内皮増殖因子受容体抗体、例えば抗K D R抗体および抗f l t 1抗体；アンチセンス療法剤、例えば上記で列挙した標的に対して向けられたもの、例えばI S I S 2 5 0 3、抗r a sアンチセンスまたはG 3 1 3 9（G e n a s e n s e）、抗b c l 2アンチセンス；遺伝子療法アプローチ、例えば、異常な遺伝子、例えば異常なp 5 3または異常なB R C A 1もしくはB R C A 2を置き換えるためのアプローチ、G D E P T（遺伝子指向性酵素プロドラッグ療法）、シトシンデアミナーゼ、チミジンキナーゼまたは細菌ニトロレダクターゼ酵素を使用するものなどのアプローチ、および化学療法または放射線療法に対する患者の耐性を増加させるためのアプローチ、例えば多剤耐性遺伝子療法など；免疫療法アプローチ、例えば、C D 5 2に向けられたモノクローナル抗体であるアレムツズマブ（c a m p a t h - 1 H）での処置、またはC D 2 2に向けられた抗体での処置など、患者の腫瘍細胞の免疫原性を増加させるためのエクスピボおよびインピボのアプローチ、サイトカイン、例えばインターロイキン2、インターロイキン4または顆粒球マクロファージコロニー刺激因子でのトランスフェクション、T細胞アネルギーを減少させるためのアプローチ、例えば、C T L A - 4機能を阻害するモノクローナル抗体での処置、トランスフェクトされた免疫細胞、例えばサイトカインでトランスフェクトされた樹状細胞を使用するアプローチ、サイトカインでトランスフェクトされた腫瘍細胞株を使用するアプローチ、および抗イディオタイプ抗体を使用するアプローチ、非特異的に活性化されたかまたはエクスピボで目的の特異的な抗原に標的化されたT細胞を使用する養子T細胞移入；タンパク質分解の阻害剤、例えばプロテアソーム阻害剤、例えばベルケード（ボルテゾミブ）；バイオ療法による治療アプローチ、例えば、ペプチドまたはタンパク質（例えば抗体または可溶性の外部受容体ドメイン構造）を使用するものであって、受容体リガンドを封鎖するか、受容体に結合するリガンドをブロックするか、または受容体シグナル伝達を減少させるか（例えば、受容体分解の強化または発現レベルの低下によって）のいずれかであるアプローチが挙げられる。

【0 2 7 1】

本発明によるG I T Rに特異的に結合する抗体と組み合わせて使用できる他の治療剤は、抗P D 1抗体、抗P D - L 1抗体、抗C T L A 4抗体、抗4 - 1 B B抗体、抗O X 4 0抗体またはそれらの組合せを含む群から選択される抗体であってもよい。

【0 2 7 2】

本発明によるG I T Rに特異的に結合する抗体と組み合わせて使用できる他の治療剤は、自然または適応免疫の活性化剤の群から選択される治療活性を有する抗腫瘍化合物であってもよい。

【0 2 7 3】

本発明によるG I T Rに特異的に結合するモノクローナル抗体は、上述した処置の方法において使用でき、上述した処置において使用でき、および／または上述した処置のための薬物療法剤の製造において使用できることが意図される。

用量および投与経路

本発明によるG I T Rに特異的に結合するモノクローナル抗体は、問題の状態の処置において効果的な量で、すなわち、望ましい結果を達成するのに必要な用量および期間で投与されると予想される。治療有効量は、処置されている特定の状態、年齢、性別および患者の体重などの要因、さらに、G I T Rに特異的に結合するモノクローナル抗体が、独立した処置として投与されているのか、または1つまたは複数の追加の薬物または処置と組

み合わせて投与されているのかによって変更してもよい。

【0274】

投薬レジメンは、最適な応答が提供されるように調整してもよい。例えば、単回のボーラスが投与されてもよいし、数回に分けた用量が長期にわたり投与されてもよいし、または用量は、治療状況の緊急性に応じて比例的に低減または増加させてもよい。投与のしやすさ、および投薬量の均一性のために、非経口組成物を単位剤形で製剤化することが特に有利である。単位剤形は、本明細書で使用される場合、処置しようとする患者／対象のための一体的な投薬として適した物理的に別々の単位を指すことが意図され、各単位は、望ましい医薬用担体と併用して望ましい治療作用を生じるように計算された予め決定された量の活性な化合物を含有する。本発明の単位剤形に関する詳細は、典型的には、(a) 化学療法剤の固有な特徴および達成しようとする特定の治療または予防作用、ならびに (b) このような対象における感受性の処置のための活性な化合物を調剤する分野において固有の制限によって決定され、それらに直接的に依存する。

10

【0275】

したがって、当業者は、本明細書で提供される開示に基づいて、用量および投薬レジメンは、治療分野において周知の方法に従って調整されることを認識しているであろう。すなわち、最大許容量は容易に確立でき、患者に検出可能な治療作用をもたらす有効量も決定することができ、同様に、患者に検出可能な治療作用をもたらすための、各薬剤の投与の一時的な要件も決定し得る。したがって、本明細書では特定の用量および投与レジメンが例示されるが、これらの例は、本発明の態様の実施において患者に提供できる用量および投与レジメンを全く限定しない。

20

【0276】

投薬量の値は、軽減しようとする状態のタイプおよび重症度に応じて様々であってもよく、単回または複数回用量を含んでいてもよいことに留意されたい。さらに、いずれの特定の対象にとっても、具体的な投薬レジメンは、個々の必要性および組成物の投与を投与または管理する医療専門家の判断に従って経時的に調整されるべきであること、さらに、本明細書に記載の投薬量範囲は、単なる例示であり、特許請求された組成物の範囲または実施を限定することは意図されないことが理解されるであろう。さらに、本発明の組成物を用いる投薬レジメンは、疾患のタイプ、患者の年齢、体重、性別、医学的状态、状態の重症度、投与経路、および採用されるGITRに特異的に結合する特定のモノクローナル抗体などの様々な要因に基づいていてもよい。したがって、投薬レジメンは広く変更が可能であるが、標準的な方法を使用して慣例的に決定することができる。例えば、用量は、薬物動態学的または薬力学的なパラメーターに基づいて調整してもよく、このようなパラメーターとしては、毒作用などの臨床的な作用および／または実験値を挙げることができる。したがって、本発明は、当業者によって決定される患者内の用量漸増を包含する。適切な投薬量およびレジメンを決定するための方法は当業界において周知であり、本明細書で開示された概念が提供されれば当業者によって理解されるであろう。

30

【0277】

好適な投与方法の例は、上記に提供される。

本発明によるGITRに特異的に結合するモノクローナル抗体の好適な用量は、0.1～200 mg/kg、好ましくは0.1～100 mg/kg、例えば約0.5～50 mg/kgなど、例えば約1～20 mg/kgの範囲であると予想され则认为られる。GITRに特異的に結合するモノクローナル抗体は、例えば、少なくとも0.25 mg/kg、例えば、少なくとも0.5 mg/kg、例えば少なくとも1 mg/kgなど、例えば、少なくとも1.5 mg/kg、例えば、少なくとも2 mg/kg、例えば、少なくとも3 mg/kg、例えば少なくとも4 mg/kgなど、例えば、少なくとも5 mg/kg；例えば、50 mg/kgの最大値まで、例えば30 mg/kgなどの最大値まで、例えば、20 mg/kgの最大値まで、例えば15 mg/kgなどの最大値までの用量で投与されてもよい。投与は、典型的には、適切な時間間隔で、例えば週1回、2週毎に1回、3週毎に1回、または4週毎に1回、場合によって用量を必要に応じて増加または低減させる

40

50

ことができる担当医によって適切とみなされる程度の長さにわたり、繰り返されると予想される。

診断的使用および組成物

本発明によるG I T Rに特異的に結合するモノクローナル抗体はまた、診断プロセス（例えばインビトロ、エクスピボでの）においても使用される。例えば、本発明によるG I T Rに特異的に結合する本モノクローナル抗体は、患者から得られた試料（例えば組織試料または体液の試料、例えば炎症の滲出物、血液、血清、腸液、唾液または尿）中のG I T Rを検出する、またはそのレベルを測定するのに使用することができる。検出および測定のための好適な方法としては、イムノアッセイ、例えばフローサイトメトリー、酵素結合免疫吸着測定法（E L I S A）、化学発光アッセイ、ラジオイムノアッセイ、および免疫組織学が挙げられる。本発明はさらに、本明細書に記載されるG I T Rに特異的に結合するモノクローナル抗体を含むキット、例えば診断キットを含む。

【実施例】

【0278】

以下の実施例は、本発明のよりよい理解のために提供される。これらの実施例は単に例示のためであり、どのような形でも本発明の範囲の限定として解釈されないものとする。

本明細書で引用された全ての公報、特許、および特許出願は参照により本明細書に組み入れられる。理解を明確にするために前述の発明を例示と実施例によって一部詳細に説明したが、添付の態様の本質および範囲から逸脱することなくそれらにある程度の変更および改変をなし得ることが、本発明の教示に照らして当業者には容易に明らかであろう。

材料および一般的な方法

ヒト免疫グロブリン軽鎖および重鎖のヌクレオチド配列に関する一般的な情報は、K a b a t, E. A. ら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、Public Health Service、National Institutes of Health、Bethesda、MD（1991）に示されている。抗体鎖のアミノ酸は、E Uの番号付け（E d e l m a n, G. M. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. Natl. Acad. Sci. USA 63（1969）78～85；K a b a t, E. A. ら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、Public Health Service、National Institute s of Health、Bethesda、MD（1991）に従って番号付けされる。

組換えDNA技術

標準的な方法を使用して、S a m b r o o k, J. ら、Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、New York、1989に記載されたようにDNAを操作した。分子生物学的な試薬を製造元のプロトコールに従って使用した。

遺伝子合成

化学合成によって作製されたオリゴヌクレオチドから望ましい遺伝子セグメントを調製した。特異的な制限部位を端部に有する長さ300～4000kbの遺伝子セグメントを、P C R増幅を含むオリゴヌクレオチドのアニーリングおよびライゲーションによって組み立て、その後示された制限部位を介してクローニングした。サブクローニングした遺伝子断片のDNA配列をDNAシーケンシングによって確認した。

DNA配列決定

DNA配列を、サンガーシーケンシングによって決定した。

DNAおよびタンパク質の配列分析および配列データの管理

I n f o m a xのV e c t o r N T 1 A d v a n c e s u i t eバージョン8.0を、配列の作成、マッピング、分析、アノテーションおよびイラストレーションのために使用した。

発現ベクター

記載された抗体および抗原の発現のために、原核細胞（*E. coli*）での発現、真核細胞での（例えばCHO細胞での）一過性発現を意図した発現プラスミドのバリエーションを適用した。ベクターは、抗体発現カセットの他に、大腸菌での前記プラスミドの複製を可能にする複製起点、大腸菌において様々な抗生物質に対する（例えばアンピシリンやカナマイシンに対する）耐性を付与する遺伝子を含んでいた。

【0279】

以下で説明される記載された抗体鎖を含む融合遺伝子を、PCRおよび／または遺伝子合成によって生成し、一致する核酸セグメントの接続による公知の組換え方法および技術を用いて、例えば対応するベクターにおける固有な制限部位を使用して組み立てた。サブクローニングした核酸配列をDNAシーケンシングによって検証した。一過性トランスフェクションのために、より多くの量のプラスミドを、形質転換した大腸菌培養物からのプラスミド調製によって調製した。

【0280】

実施例1

哺乳類細胞の懸濁培養における組換え抗原および抗体の生産

ヒトGITRの細胞外部分の配列およびオーソログに基づき組換え抗原を調製するために、本発明者らは、ヒトGITR (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q9Y5U5>)、アカゲザル (*Macaca mulatta*) のmc yGITR (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q1PBC4>) およびハツカネズミのmusGITR (<https://www.uniprot.org/uniprot/O35714>) の抗原細胞外ドメインを含む多数の構築物を生成した。遺伝子配列を、プラスミドベクターRDC0359から全長ヒトGITR抗原をコードするマトリックス (https://www.rndsystems.com/products/human-gitrt-nfrsf18-np_004186-versac-lone-cdna_rdc0359) からPCRによって合成し、GITRオーソログ遺伝子のための合成オリゴヌクレオチドから組み立てた。GITR遺伝子配列を、Fc IgG1ラマ (*Lama glama*) タグを有する哺乳類細胞におけるタンパク質生産のためのプラスミド (図1) のSalI/NotI制限部位にクローニングした。さらに、抗原配列は、TEVプロテアーゼのプロテアーゼ不安定性部位によってFcから分離される；さらにこの部位を使用して、TEVプロテアーゼでの処置によってFc断片を切断し、抗原のタグ無しバージョンも得た。さらにこの配列を、タンパク質のC末端にFLAG-EPEA-タグ (C-タグ、GE Healthcare) を含有するプラスミド (図2) にもSalI/NotI制限部位でクローニングした。さらに、組換えヒトGITR-リガンド (GITRL) (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q9UNG2>) を、GITRLのC末端にホモ三量体フォールド [1] ドメインおよびEPEA-タグを含有するプラスミド (図3) に同様にしてクローニングした。必要な量のプラスミドを大腸菌細胞で生産し、Maxiprep Qia genキットを使用して精製した。

【0281】

抗体および抗原を、公開されたプロトコールに従ってチャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO-K1) から得られた確立された細胞株で生成した [Biotechnol Bioeng. 2005年9月20日; 91 (6): 670~677、Liao Meta l.、2004; Biotechnol Lett. 2006年6月; 28 (11): 843~848; Biotechnol Bioeng. 2003年11月5日; 84 (3): 332~342]。EBNA1 (エプスタイン-バーウイルス核抗原1) タンパク質遺伝子を構成的に発現する細胞を使用した。懸濁培養を、オービタルシェーカー上のフラスコ中で、Life Technologies社からの無血清培地を使用して、製造元のガイドラインに従って実行した。一過性発現のために、 2×10^6 /mlの濃度での細胞を、直鎖状ポリエチレンイミン (PEI MAX、Polysciences) によってトランスフェクトした。DNA/PEI比率は1:3~1:10であった。トランスフ

10

20

30

40

50

エクシオン後の5～7日に、細胞培養物を2000gで20分遠心分離し、0.22μmフィルターに通過させてろ過した。標的タンパク質を親和性HPLCによって培養液から単離した。

【0282】

タンパク質のC末端にEPEA-タグ（グルタミン酸-プロリン-グルタミン酸-アラニン）を含む組換えGITRおよびGITRLタンパク質を単離し、Capture Select C-タグ親和性マトリックス吸着剤を使用して培養液から精製した。培養液を、5mlのC-タグ吸着剤を予め充填したクロマトグラフカラムに通過させ、次いでカラムを25mlのPBSで洗浄して、非特異的に結合する成分を除去した。結合した抗原を、20mMのトリス、2MのMgCl₂ pH7.0～7.4を使用する穏やかな条件下で溶出させた。次いでタンパク質を、半透性の透析膜を使用してPBS（pH7.4）に対して透析し、ろ過し（0.22μm）、チューブに移し、-70℃で貯蔵した。

10

【0283】

組換えGITR-TEV-Fc抗原を単離し、親和性HPLCのためのプロテインAカラムで培養液から精製した。清澄化した培養液を、リン酸緩衝食塩水（PBS、pH7.4）で平衡化した5mlのHiTrap rProteinAセファロースFFカラム（GE Healthcare）に通過させた。次いでカラムを5カラム体積のPBSで洗浄して、非特異的に結合する成分を除去した。結合した抗原を、0.1Mのグリシン緩衝液（pH3）を使用して溶出させた。主要なタンパク質溶出ピークを収集し、1Mのトリス緩衝液（pH8）で中性pHにした。全ての段階を110cm/時間の流速で実行した。次いでタンパク質を、SnakeSkin Dialysis Tubing技術を使用してPBS（pH7.4）に対して透析し、ろ過し（0.22μm）、チューブに移し、-70℃で貯蔵した。

20

【0284】

全ての組換えIgG抗体を、抗原に関する前述の手順に従って1mlのHiTrap rProteinA FFカラム（GE Healthcare）で精製した。得られたタンパク質溶液の純度を、SDSゲル電気泳動によって評価した（図4および5に例を示す）。

【0285】

実施例2

ナイーブヒト抗体Fab-ライブラリーMeganLib（商標）の構築

RNeasyミニキット（QIAGEN）を示唆されたプロトコールに従って使用して、千人より多くの個々のヒトドナーからの血液試料からのBリンパ球の全RNAを単離した。RNA濃度アッセイを、Nanovueキット（GE Healthcare）を使用して実行し、単離されたRNAの品質を、1.5%アガロースゲル電気泳動によって試験した。

30

【0286】

逆転写反応を、MMLV RTキット（Evrogen）を推奨されたプロトコールに従って使用して、MMuLV逆転写酵素およびプライマーとしてランダム六量体オリゴヌクレオチドを使用して実行した。

40

【0287】

逆転写産物を、2段階のポリメラーゼ連鎖反応におけるマトリックスとして使用して、制限部位を端部に有する可変ドメイン遺伝子を得て、反応を、オリゴヌクレオチドキットを、[J Biol Chem. 1999 Jun 25; 274(26):18218～30] によるプロトコールに従って使用して実行した。

【0288】

得られたDNA調製物VL-CK-VH（図6）をNheI/Eco91I制限エンドヌクレアーゼで処理し、元のファージミドpH5にライゲートした（図7）。ライゲーション生成物を、プロトコール[Methods Enzymol. 2000; 328:333～63.]に従って調製されたSS320株エレクトロコンピテント細胞に形質転換

50

した。コンビナトリアルファージFabディスプレイライブラリーMeganLib（商標）のレパートリーは、 10^{11} 個の形質転換体であった。Fabライブラリーファージ生成物を、初期に説明された手順に従って調製した[J Mol Biol. 1991年12月5日; 222(3): 581~97]。

【0289】

実施例3

ハイブリッドラマーヒト抗体（CHARM）の免疫Fabライブラリーの構築

組換えGITR抗原で免疫化されたラマの個々の血液試料からのBリンパ球の全RNAは、最大の特有な血清力価を呈し、これを、RNeasyミニキットを示唆されたプロトコール（QIAGEN）に従って使用して単離した。RNA濃度アッセイを、Nanovueキット（GE Healthcare）を使用して実行し、単離されたRNAの品質を、1.5%アガロースゲル電気泳動によって試験した。

【0290】

逆転写反応を、MMLV RTキット（Evrogen）を推奨されたプロトコールに従って使用して、MMuLV逆転写酵素およびプライマーとしてランダム六量体オリゴヌクレオチドを使用して実行した。

【0291】

逆転写産物を、2段階のポリメラーゼ連鎖反応におけるマトリックスとして使用して、制限部位を端部に有する可変ドメイン遺伝子を得て、反応を、オリゴヌクレオチドキットを、[J Biol Chem. 1999 Jun 25; 274(26): 18218~30] によるプロトコールに従って使用して実行した。

【0292】

得られたDNA調製物VL-CK-VH（図6）をNheI/Eco91I制限エンドヌクレアーゼで処理し、元のファージミドpH5にライゲートした（図7）。ライゲーション生成物を、プロトコール[Methods Enzymol. 2000; 328: 333~63.]に従って調製されたSS320株エレクトロコンピテント細胞に形質転換した。コンビナトリアルファージFabディスプレイライブラリーMeganLib（商標）のレパートリーは、 10^{11} 個の形質転換体であった。Fabライブラリーファージ生成物を、初期に説明された手順に従って調製した[J Mol Biol. 1991年12月5日; 222(3): 581~97]。表1は、免疫ライブラリー生成物の要約の表を示す。

【0293】

10

20

30

40

50

【表 2】

表 1.

項目 番号	コード	名称	ライブラリー バリエーション/起源の種	レポートリ ー、CFU	濃度、単位/ml
1	Lib1- 60	BCD166_ ILKalifVHH.bph	GITR プロジェクトの 下でのカリフラマ (Kalif llama) 免疫 モノドメインライブラ リー(プラスミド pSCK)	5x10E ⁸	2x10E ¹³
2	Lib1- 61	BCD166_ ILBlackVHH.bph	GITR プロジェクトの 下でのブラックラマ (Black llama) 免疫 モノドメインライブラ リー(プラスミド pSCK)	5x10E ⁸	2x10E ¹³
3	Lib1- 62	BCD166_Ch_ L_VH_ILBlack.bph	GITR プロジェクトの 下でのブラックラマλ -Fab Charm Lib(プ ラスミド pH6)	5x10E ⁷	4x10E ¹³
4	Lib1- 63	BCD166_Ch_ K_VH_ILBlack.bph	GITR プロジェクトの 下でのブラックラマκ -Fab Charm Lib(プ ラスミド pH6)	5x10E ⁷	4x10E ¹³
5	Lib1- 64	BCD166_Ch_ L_VH_ILKalif.bph	GITR プロジェクトの 下でのカリフラマλ- Fab Charm Lib(プ ラスミド pH6)	5x10E ⁷	3x10E ¹³
6	Lib1- 65	BCD166_Ch_ K_VH_I LKalif.bph	GITR プロジェクトの 下でのカリフラマκ- Fab Charm Lib(プ ラスミド pH6)	5x10E ⁷	4.7x10E ¹³

【0294】

実施例 4

ファージ抗体 Fab-ライブラリーの選択

特異的な抗 GITR ヒトファージ Fab 抗体を、コンビナトリアルファージ Fab ディスプレイライブラリー Megan Lib (商標) ならびに実施例 2 および 3 に記載される免疫 CHARM ライブラリーから得た。選択を、ファージディスプレイによって組換えヒト GITR 抗原で実行した [Nat Biotechnol. 1996 年 3 月; 14 (3): 309~14; J Mol Biol. 1991 年 12 月 5 日; 222 (3): 581~97]。

【0295】

免疫ファージライブラリーの選択を、EIA/RIA Tube High Binding 5ml イムノチューブで実行した。抗原 (0.5ml、2μg/ml) を、炭酸緩衝液 (0.1M の NaHCO₃、pH 9.5) 中で +4℃ で一晩吸着させた。次いでチューブを PBST (10mM のリン酸緩衝食塩水 pH 7.3~7.5、137mM の NaCl および 2.7mM の KCl、0.1% ポリソルベート 20) で洗浄し、ブロッキングのために総体積 (5ml) の PBST 中の 0.5% 粉乳を添加した。ブロッキングをラウン

ドごとに交換した；例えば、第1のラウンドでP B S T中の0.5%乳汁を使用した場合、第2のラウンドではP B S T中の1% B S Aを使用した。チューブを、振盪機で、室温で1時間インキュベートした。チューブをP B S Tで洗浄し、そこに2 ml / チューブのブロッキング緩衝液およびファージライブラリーをファージ粒子約 2×10^{12} 個 / ml の濃度まで添加した。本発明者らは、ファージと共にそれを室温で1~2時間インキュベートした。さらなるラウンドにおいて、本発明者らは、前のラウンドからの4 ml のファージ上清を使用し、これを遠心分離機で17,000 g で10~15分、事前に清澄にした。チューブをP B S Tで20回洗浄した。0.5 ml の0.1 M グリシン緩衝液 pH 2.2 を用いてチューブの表面からファージを溶出させ：チューブにグリシン緩衝液を添加し、溶液を室温で15分軽く攪拌した。次いでファージ溶液を、中和のための100 μ l の1 M の T r i s H C l pH 8.0 を含む清潔な非吸着性 (n o n - s o r b i n g) チューブに移した。細胞が感染するまでチューブを氷中で維持した。

【0296】

選択の後、宿主として大腸菌 T G 1 株を使用して M 1 3 バクテリオファージを培養する。増幅は、宿主株培養物をファージで感染させ、続いて12~15時間増殖させることによって行われる。

【0297】

選択の後、0.5~1 ml のファージを細胞培養物 (O D ₆₀₀ = 0.3~0.4) と混合し、37℃で1.5時間インキュベートした。次いで細胞を3,000~4,000 rpm で10~15分遠沈させ、1 ml の培地に再懸濁し、選択のための抗生物質 (アンピシリン) を含有するペトリ皿上にプレーティングした。コロニーをサーモスタットで30℃で増殖させた。12~15時間後、本発明者らはコロニーの数を計算し、5~10 ml の L B 培地で培養皿から細胞を洗い落とした。100 μ l の細胞懸濁液を20 ml の抗生物質培地 (アンピシリン) に添加した。本発明者らは、37℃によって密度を O D ₆₀₀ = 0.35~0.5 に増加させた。K 0 7 ファージヘルパーを1 μ l / 10 ml 培養物 (粒子 10^{10} 個 / ml) で添加し、振盪しないで37℃で1.5時間インキュベートした。次いで細胞培養に、単回用量のアンピシリン (100 μ g / ml) および2倍用量のカナマイシン (40 μ g / ml) および2倍用量の I P T G (0.2 mM) を含む等しい体積の培地を添加した。細胞培養物を振盪機にローディングし、ファージを30℃で4~5時間培養した。細胞培養物を17,000 g で25~30分遠心分離し、上清をチューブに収集した。次いで得られた上清を次のラウンドの選択に使用するか、またはさらなる貯蔵のためにファージを沈殿によって単離した。

【0298】

ファージを以下の方法によって単離した：20%のポリエチレングリコールおよび2.5 M の塩化ナトリウムを含む溶液の体積の1/6を、上清に添加し、強く攪拌した。溶液を氷中で少なくとも3時間インキュベートした。次いで溶液を8,000 g で10分間遠心分離し、得られたファージを含む沈殿を1 ml の T B S 緩衝液 (トリスホウ酸緩衝液) で希釈した。

【0299】

2~3ラウンド後、バクテリオファージを単離し、本発明者らは、ポリクローナルファージのヒト G I T R、および非特異的な抗原への特異的な結合を分析した。

実施例 5

選択の第2および第3のラウンドからのポリクローナルファージの分析

標的抗原に対する2つのナイーブ M e g a n L i b ライブラリーおよび6つの免疫ライブラリーの選択の3ラウンドの後、本発明者らは、E L I S A を使用して、第2および第3のラウンドからのポリクローナルファージの特異的および非特異的な結合を調査した。

【0300】

標的 G I T R 抗原を、炭酸緩衝液 (0.1 M の N a H C O ₃、pH 9.5) 中で E L I S A プレートのプラスチック表面上に一晩吸着させて、特異的に結合するファージ (2 μ g / ml)、または G C S F、h I L 6 R - F c、インターフェロンアルファ-2 b、リ

10

20

30

40

50

ツキシマブ ($2 \mu\text{g}/\text{mL}$) の存在を分析して、非特異的に結合するファージを分析した。次いでプレートを P B S T (10 mM のリン酸緩衝食塩水、 $\text{pH } 7.3 \sim 7.5$ 、 137 mM の NaCl および 2.7 mM の KCl 、 0.1% のポリソルベート 20) で洗浄し、次いでブロッキングのために $300 \mu\text{L}/\text{ウェル}$ の P B S T 中の 0.5% 粉乳を添加した。プレートを、振盪機で、室温で 1 時間インキュベートした。プレートを P B S T で洗浄し、ブロッキング緩衝液で $1:2$ から $1:256$ に希釈した選択の第 2 および第 3 のラウンドからの $50 \mu\text{L}/\text{ウェル}$ のファージ溶液をプレートに添加した。プレートを、振盪機で、室温で 1 時間インキュベートした。プレートを P B S T で洗浄し、ブロッキング緩衝液中の抗 M13 ホースラディッシュペルオキシダーゼコンジュゲート抗体でコーティングした。1 時間のインキュベーション後、プレートを洗浄し、酢酸緩衝液 $\text{pH } 5.0$ 中の $50 \mu\text{L}/\text{ウェル}$ の反応基質 ($\text{H}_2\text{O}_2 - 0.02\%$ および TMB) を添加した。プレートを、暗所で、室温で、陰性対照においてわずかなバックグラウンドが出現するまで (ただし 20 分以下) インキュベートした。 $25 \mu\text{L}/\text{ウェル}$ の $10\% \text{H}_2\text{SO}_4$ を添加することによって反応をクエンチし、ウェルの OD を 450 nm で測定した。

【0301】

アッセイから、標的抗原に対する選択の第 3 のラウンド後の、1 つのヒトナイブ Fab ライブラリーおよび 6 つの免疫 Fab CHARM ライブラリーの特異的な (バックグラウンドシグナルの 5 倍) 結合、ならびに有意な非特異的結合の非存在 (バックグラウンドシグナルの 2 倍未満) が明らかになった。

【0302】

これらのライブラリーからの抗体の可変ドメイン遺伝子を発現ベクター pLL-Fab (図 8) に再クローニングして、大腸菌細胞中で Fab の分泌可能な可溶性形態を生産した。

【0303】

実施例 6

ヒト GITR と特異的に結合する Fab のスクリーニング

ELISA を使用して、実施例 5 に従って大腸菌中で生産されたモノクローンから培地に分泌されたヒト GITR と特異的に結合する Fab を検出した。公開された配列を有する Fab、Fab-gitr3215 (特許出願) を、陽性対照として使用した。特異的な結合アッセイのために、ELISA ウェルプレート (medium binding、Greiner bio one) を、 $50 \mu\text{L}/\text{ウェル}$ の GITR ($1 \times$ 炭酸緩衝液中の $0.2 \mu\text{g}/\text{mL}$) でコーティングし、シールし、 4°C で一晩インキュベートした。全てのさらなる段階を、標準的な ELISA プロトコールに従って、Genetix Qpix 2xt (Molecular Devices) および Tecan Freedom VO200 (Tecan) などのロボット利用のシステムに基づく高性能自動化プラットフォームを使用して実行した。ブロッキング緩衝液 BB ($200 \mu\text{L}$ の PBS 中の 0.5% 無脂肪乳) を添加することによって、非特異的な結合をブロックした。プレートを振盪機で室温で 1 時間インキュベートした。PBS-Tween で洗浄した後、各細胞を、等しい体積の BB と混合された $50 \mu\text{L}$ の試験 Fab を含有する細胞上清でコーティングした。プレートを振盪機で室温で 1 時間インキュベートした；さらに、各プレートのウェルを PBS-Tween 緩衝液で 3 回洗浄した。洗浄した後、各ウェルを、PBS-Tween 中の抗ヒト Fab HRP コンジュゲート二次抗体 (Pierce-Thermo Scientific) ($1:5000$) でコーティングした ($50 \mu\text{L}/\text{ウェル}$)。プレートを回転振盪機で振盪し (室温で 50 分)、次いで上述したように PBS-Tween 緩衝液で 3 回洗浄した。TMB ($50 \mu\text{L}/\text{ウェル}$) を飽和するまで (平均 3~5 分) 添加することによって比色シグナルを展開した；さらなる発色を、停止溶液 ($30 \mu\text{L}/\text{ウェル}$ 、 10% 硫酸) を添加することによってブロックした。色シグナルを、適切な Tecan-Sunrise プレートリーダー (Tecan) を使用して 450 nm で測定した。抗体結合レベルは、色シグナルの生産に比例していた。色シグナルがバックグラウンドシグナルの 5 倍を超え、対照抗体 Fab-gitr3215 の色シグナルに匹敵していた

クローンをELISAによって調査して、非特異的な結合を検出した。

【0304】

実施例7

選択されたFab-他の抗原の相互作用の非特異的結合アッセイ

またELISAを採用して、問題のFab断片の他の抗原への非特異的な結合もアッセイした。研究を上述したように実行したが、IL6R-Fc、INF α 2b、PCSK9-VG-FE、PD-1-Fc (1 $\times$ 炭酸緩衝液中の2.5 μ g/ml)を、固定抗原として使用した。GITR-TEV-Fc (1 $\times$ 炭酸緩衝液中の0.2 μ g/ml)を、特異的結合の対照として使用した。全てのさらなる段階を、Genetix Qpix2xt (Molecular Devices) およびTecan Freedom EVO200 (Tecan)などのロボット利用のシステムに基づく高性能自動化プラットフォームを使用する標準的なELISAプロトコールに従って実行した。非特異的な結合の色シグナルがバックグラウンドシグナルを超えず、特異的な結合の色シグナルと比較して5分の1の値を有していたクローンを陽性とみなし、それらの遺伝子を、抗体可変ドメイン遺伝子配列の決定および一意性の決定のためにシーケンシングした。シーケンシングの結果として、本発明者らは、全長IgG1抗体様式への変換のために30種の固有な配列を選択した。

【0305】

実施例8

哺乳類細胞の懸濁培養における組換え抗体の生産

実施例7からの抗体可変ドメイン遺伝子を、標準的な方法に従ってクローニングした。この目的を達成するために、本発明者らは、抗体重鎖および軽鎖可変ドメイン遺伝子を含むPCR産物を生成した。重鎖可変ドメインを、ベクターpEE-Hc IgG1のSalI/NheI制限部位にクローニングした。その概略マップは図9に示される。軽鎖可変ドメインをベクターpEE-CKのSalI/BsiWI制限部位にライゲートした。その概略マップは図10に示される。

【0306】

抗体を、公開されたプロトコールに従ってチャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO-K1)から得られた確立された細胞株で生成した[Biotechnol Bioeng. 2005年9月20日; 91(6): 670~677, Liao Metal.、2004; Biotechnol Lett. 2006年6月; 28(11): 843~848; Biotechnol Bioeng. 2003年11月5日; 84(3): 332~342]。EBNA1(エプスタイン-バーウイルス核抗原1)タンパク質遺伝子を構成的に発現する細胞を使用した。

【0307】

CHO-K1-S細胞株の細胞を使用して、一過性発現系で抗体を生成した。バッフル付きフラスコ(125、250、500、1000および3000ml)中で、4mMのグルタミン、0.05mg/mlのゲンタマイシンおよび10 μ g/mlのシプロフロキサシンが補充されたCHO-S-SFM IIおよびFreeStyle CHO(1:1)培地の混合物中で、オービタルシェーカー-インキュベーターで、+37 $^{\circ}$ C、5%CO₂で、フラスコサイズに応じて110または150rpmで、細胞を培養した。細胞を、週3回、細胞0.2 $\times$ 10⁶個/mlのプレーティング密度で二次培養した。

【0308】

トランスフェクションのために、トランスフェクションの前日に細胞0.8 $\times$ 10⁶個/mlの密度で細胞を植え付け、1日後に細胞2 $\times$ 10⁶個/mlの密度での細胞培養を使用してトランスフェクションを実行した。2mMのグルタミンおよび0.05mg/mlのゲンタマイシンが補充されたRPMI-1640培地を使用して、トランスフェクション混合物を調製した。ベクターを0.75 μ g/mlで別々に培地に希釈し、トランスフェクション試薬であるポリエチレンジアミン(PEI)を重量により7:1のPEI:DNAで別々に希釈した。ベクターおよびPEIの希釈物を混合し、室温で10分インキ

ュベートし、次いでこのトランスフェクション混合物を細胞に導入し、細胞を標準条件下で培養した。

【0309】

トランスフェクション後の次の日に、 0.05 mg/ml のゲンタマイシンおよび $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ のシプロフロキサシン、 1 mM のバルプロ酸ナトリウムならびに 10% の供給F12.7が補充されたCHO-S-SFM IIおよびFreeStyle CHO (1:1)培地の混合物を細胞に添加し、オービタルシェーカーインキュベーター中で、 $+34^{\circ}\text{C}$ 、 $5\%\text{ CO}_2$ で、フラスコサイズに応じて 110 または 150 rpm で細胞を培養した。トランスフェクション後の3~4日目に、 10% の供給F12.7を細胞に添加した。

10

【0310】

トランスフェクション後の7日目に、細胞流体試料を選択して、Protein-A Biosenseチップで生産されているタンパク質の濃度を、OctetRed 96をForteBioのプロトコールに従って使用して測定した(表2)。組換え抗体を単離し、プロテインA親和性HPLCカラムを使用して培養液から精製した。清澄化した培養液を、リン酸緩衝食塩水(PBS、 $\text{pH}7.4$)で平衡化した 1 ml のHiTrap rProteinA FFカラム(GE Healthcare)に通過させた。次いでカラムを、5カラム体積のPBSで洗浄して、全ての非特異的に結合する成分を除去した。結合した抗体を、 0.1 M のグリシン緩衝液($\text{pH}3$)を使用して溶出させた。主要なタンパク質溶出ピークを収集し、 1 M のトリス緩衝液($\text{pH}8$)で中性 pH にした。全ての段階を 110 cm/時間 の流速で実行した。次いでタンパク質を、SnakeSkin Dialysis Tubing技術によってPBS($\text{pH}7.4$)に対して透析し、ろ過し($0.22\text{ }\mu\text{m}$)、チューブに移し、 -70°C で貯蔵した。

20

【0311】

得られたタンパク質溶液の純度を、SDSゲル電気泳動によって評価した(図11および12)。全ての抗体は、細胞アッセイで物理化学的な特性および活性を調査するのに必要な純度レベルに適合する。

【0312】

30

40

50

【表 3】

表 2.

ロット番号	タンパク質名称	OCTETRED96 によって測定した抗体の濃度 (mg/l)
1161	BCD166-NHVKITSe13-5-H3-25	147.0
1162	BCD166-NHVKSe13-1-C1-9	127.9
1163	BCD166-NHVKSe13-1-A1-1	119.5
1164	BCD166-SPF2Se13-4-F1-38	148.0
1165	BCD166-SPF2Se13-4-G8-43	188.0
1208	BCD166-01_VH_ChLVHILBSe12_MP1_A9_3-HC (DEL)_VL_ChLVHILBSe12_MP1_A9_3-CL	145.4
1209	BCD166-01_VH_ChLVHILBSe12_MP1_B11_20-HC (DEL)_VL_ChLVHILBSe12_MP1_B11_20-CL	163.0
1210	BCD166-01_VH_ChLVHILBSe12_MP1_F10_16-HC (DEL)_VL_ChLVHILBSe12_MP1_F10_16-CL	52.0
1211	BCD166-01_VH_ChKVHILKSe13_MP2_B9_57-HC (DEL)_VK_ChKVHILKSe13_MP2_B9_57-CK	125.2
1212	BCD166-01_VH_ChKVHILKSe13_MP2_D2_5-HC (DEL)_VL_ChKVHILKSe13_MP2_D2_5-CL	136.0
1213	BCD166-01_VH_ChLVHILKSe12_MP2_G15-HC (DEL)_VL_ChLVHILKSe12_MP2_G1_5-CL	109.0
1214	BCD166-01_VH_ChKVHILKSe13_MP2_H8_55-HC (DEL)_VK_ChKVHILKSe13_MP2_H8_55-CK	187.4

【0313】

実施例 9

抗GITR IgG1抗体-ヒトGITR相互作用の反応速度論アッセイ

抗GITR抗体-ヒト／アカゲザル (rhesus macaque) ／カニクイザル GITR相互作用の結合親和性定数を、OctetRed 96を製造元 (ForteBio) のプロトコールに従って使用して決定した。25 µg/mlの抗原を、抗GITR抗体の第2世代のアミン反応性センサー (AR2G) の表面上に非特異的に固定させた (ForteBio、AR2Gセンサーの調製および固定に関する製造元の説明書に従って標準的なプロトコールを使用して)。抗体を所定濃度で添加した。アッセイを、使用緩衝液として0.1% Tween-20および0.1% BSAを含むPBSを使用して30℃で実行した。

【0314】

参照シグナルを引いた後に得られたセンソグラム (sensogram) を、Octetデータ分析ソフトウェア (バージョン8.0) を標準的手順に従って使用して、1:1の相互作用モデルを使用して分析した。表3に得られた親和性定数を示す。全ての試験した抗体は、ヒトGITRに対して高親和性および特異性を示す。

【0315】

10

20

30

40

50

【表 4】

表 3. 抗 GITR 抗体-ヒト GITR 相互作用の親和性定数。

番号	名称	ロット番号	KD (M)
1	BCD166-NHVKITSe13-5-H3-25	1161	6.38E^{-11}
2	BCD166-NHVKSe13-1-C1-9	1162	6.81E^{-10}
3	BCD166-NHVKSe13-1-A1-1	1163	1.96E^{-10}
4	BCD166-SPF2Se13-4-F1-38	1164	5.76E^{-10}
5	BCD166-SPF2Se13-4-G8-43	1165	3.30E^{-11}
7	BCD166-01_VH_ChLVHILBSe12_MP1_A9_3-HC (DEL)_VL_ChLVHILBSe12_MP1_A9_3-CL	1208	7.37E^{-11}
8	BCD166-01_VH_ChLVHILBSe12_MP1_B11_20-HC (DEL)_VL_ChLVHILBSe12_MP1_B11_20-CL	1209	6.54E^{-10}
9	BCD166-01_VH_ChLVHILBSe12_MP1_F10_16-HC (DEL)_VL_ChLVHILBSe12_MP1_F10_16-CL	1210	1.84E^{-11}
10	BCD166-01_VH_ChKVHILKSe13_MP2_B9_57-HC (DEL)_VK_ChKVHILKSe13_MP2_B9_57-CK	1211	3.13E^{-10}
11	BCD166-01_VH_ChKVHILKSe13_MP2_D2_5-HC (DEL)_VL_ChKVHILKSe13_MP2_D2_5-CL	1212	$<1.0\text{E}^{-12}$
12	BCD166-01_VH_ChLVHILKSe12_MP2_G1_5-HC (DEL)_VL_ChLVHILKSe12_MP2_G1_5-CL	1213	8.50E^{-09}
13	BCD166-01_VH_ChKVHILKSe13_MP2_H8_55-HC (DEL)_VK_ChKVHILKSe13_MP2_H8_55-CK	1214	1.98E^{-10}

【0316】

実施例 10

抗 GITR 特異的なアゴニスト活性の決定

アッセイのために、本発明者らは、表面上に GITR を安定して発現し、NFκB プロモーターの制御下でホタルルシフェラーゼをコードする遺伝子を含有する、HEK-293 細胞株に基づき生成された HEK293-GITR-NFκB-Luc 細胞株を使用した。

【0317】

アッセイを 96-ウェル培養プレートで実行した。各ウェル中の懸濁液は、HEK293-GITR-NFκB-Luc 細胞および試験抗体をグラフに示した通りの濃度で含有していた。全ての懸濁液成分を栄養細胞培養培地中で調製した。全ての成分を添加した後、プレートを 37℃、5% CO₂ でインキュベートし、次いで発光アッセイキットおよびプレートリーダーを使用して、ウェル中のルシフェラーゼ強度を測定した。

【0318】

抗 GITR モノクローナル抗体の特異的な活性の調査から、ロット 1161、1210 および 1213 の抗体は、機能的に活性であり、対照抗体である抗 GITR 3215 抗体および GITRL の両方のアゴニスト活性と同等の、上側のプラトーを有する著しいアゴニスト活性を呈することが解明された（図 13）。これらの抗体を表 4 に従って再び名付けた。

【0319】

10

20

30

40

50

【表 5】

表 4.

番号	古い名称	ロット 番号	新しい名称
1	BCD166-NHVKITSel3-5-H3-25	1161	BCD166-01-01
3	BCD166-01_VH_ChLVHILBSe12_MP1_F10_16-HC(DEL)_VL_ChLVHILBSe12_MP1_F10_16-CL	1210	BCD166-01-011
2	BCD16601_VH_ChLVHILKSe12_MP2_G1_5-HC(DEL)_VL_ChLVHILKSe12_MP2_G1_5-CL	1213	BCD166-01-014

10

【0320】

実施例 11

異なる生物からの抗GITR抗体とGITRとの相互作用の酵素結合免疫検査法

ELISAを使用して、異なる生物からのGITR-Fcに対する抗体の相対的な親和性を測定した。結合アッセイのために、ELISAプレートのウェル（Greiner bio oneからのmedium binding）を、50μlのヒト／カニクイザル／マウスGITR-Fc（1×炭酸緩衝液中の0.5μg/ml）でコーティングし、シールし、4℃で一晩インキュベートした。全てのさらなる工程を、実施例6に記載される標準的なELISAプロトコールに従って実行した。抗GITR抗体BCD166-01-01は、ヒトおよびカニクイザルGITRに特異的に結合し、マウスGITRに結合しなかった（図14）。抗体BCD166-01-011は、ヒトGITRに特異的に結合したが、カニクイザルおよびマウスGITRへの結合を呈さなかった（図15）。抗体BCD166-01-014は、ヒトGITRに特異的に結合したが、カニクイザルGITRへの結合はそれより一層弱く、マウスGITRへの結合は全く観察されなかった（図16）。それゆえに、候補BCD166-01-011を、サルGITRへの明らかな特異性の欠如のためにさらなる研究から除外した。さらなる開発のために、候補BCD166-01-01およびBCD166-01-014を最終的に選んだ。

20

30

【0321】

実施例 12

抗GITR IgG1抗体－アカゲザルGITR／マカカ・シノモルグス（macaca cynomolgus）GITR相互作用の反応速度論アッセイ

抗GITR抗体およびアカゲザル／カニクイザルGITRの結合親和性定数を、OctetRed 96を製造元の（ForteBio）プロトコールに従って使用して得た。25μg/mlの抗原を、抗GITR抗体の第2世代のアミン反応性センサー（AR2G）の表面上に非特異的に固定した（ForteBio、AR2Gセンサーの調製および固定に関する製造元の説明書に従って標準的なプロトコールを使用して）。抗体を所定濃度で添加した。アッセイを、使用緩衝液として0.1%Tween-20および0.1%BSAを含むPBSを使用して30℃で実行した。

40

【0322】

参照シグナルを引いた後に得られたセンソグラムを、Octetデータ分析ソフトウェア（バージョン8.0）を標準的手順に従って使用して、1:1の相互作用モデルを使用して分析した。表5および6に得られた親和性定数を示す。全ての試験した抗体は、サルGITRに対して高親和性および特異性を呈し、したがってこの関連するインビボの動物モデルへのさらなるリサーチのための基準が得られる。

【0323】

50

【表 6】

表 5. 抗 GITR 抗体-アカゲザル GITR 相互作用の親和性定数。

	抗 GITR 抗体の名称	ロット番号	KD (M)
1	BCD166-01-01	1285	9.34E^{-11}
2	BCD166-01-014	1284	1.92E^{-10}

【0324】

10

【表 7】

表 6. 抗 GITR 抗体-マカカ・シノモルグス GITR 相互作用の親和性定数。

	抗 GITR 抗体の名称	ロット番号	KD (M)
1	BCD166-01-01	1285	5.42E^{-10}
2	BCD166-01-014	1284	5.53E^{-08}

【0325】

20

実施例 13

野生型および強化されたアゴニスト活性を有する突然変異体候補の抗 GITR 特異的なアゴニスト活性の決定のためのインビトロの細胞アッセイ。

【0326】

ヒト誘導体である抗 GITR 抗体 BCD166-01-01 のアゴニスト活性の可能性のある強化に関して、さらに、WO2005047327、WO2006104989 (A2)、WO2007005612 (A2) および Science. 2014 年 3 月 14 日; 343 (6176): 1260~3 における抗体のオリゴマー化をもたらすこのような置換の研究に基づいて、E345R 突然変異を選択し、抗体の IgG1 の Fc 領域に導入した。このような突然変異は、抗原への結合後に細胞表面上での抗体のオリゴマー化をもたらし、ADCC、ADCP、CDC などの様々なエフェクター機能、加えて薬物動態 (PK) を強化することができることが示されている。目的は、CDC ではなくアゴニスト能力、ADCC が強化された抗体を得ることであった。変異誘発を、標準的な遺伝子工学プロトコールに従って実行し、実施例 8 に従って組換え抗体を合成した。抗体を名付けたが、これは、本明細書では BCD166-02-01 と称される。また 2 つの親抗体 BCD166-01-01、BCD166-01-014 もアッセイした。

30

【0327】

実施例 10 のものと同じ様式でアッセイを実行した。

図 17 に示される結果は、試験 BCD166-02-01 の細胞アゴニストアッセイにおいて、E345R 突然変異が導入された前駆体 BCD166-01-01 と比較して活性化レベルが 5 倍増加したことを示し、これは、標的細胞上での抗 GITR 抗体 BCD166-02-01 の抗原依存性のオリゴマー化に起因する。さらに、活性化の、上側のプラトーのレベルが自然に増加しただけでなく、EC50 値も上昇の方向で 20 倍より多く増加した。

40

【0328】

実施例 14

抗 GITR 抗体の抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (ADCC) のためのインビトロの細胞アッセイ

アッセイにおいて、本発明者らは、候補 BCD166-02-01 の ADCC 活性を研究した。また 2 つの抗体 BCD166-01-01、BCD166-01-014 もアッ

50

セイした。さらに、候補BCD166-01-01から類推して、E345R突然変異を候補BCD166-01-014に導入して（これをBCD166-02-014と称した）、野生型のものと比べてADCC活性を増加させた。

【0329】

アッセイにおいて、本発明者らは、表面上でCD16を安定して発現し、NFATプロモーターの制御下にホタルルシフェラーゼをコードする遺伝子を含む、Jurkat細胞株に基づき作製されたJurkat-NFAT-Luc-CD16細胞株；および表面上でGITRを安定して発現する、HeK-293細胞株に基づいて作製されたHEK-293-GITR細胞株を使用した。

【0330】

アッセイを96-ウェル培養プレートで実行した。各ウェル中の懸濁液は、Jurkat-NFAT-Luc-CD16エフェクター細胞およびHeK-293-GITR標的細胞、加えて試験抗体をグラフに示した通りの濃度で含有していた。全ての懸濁液成分を栄養細胞培養培地中で調製した。全ての成分を添加した後、プレートを37℃、5%CO₂でインキュベートし、次いでルシフェラーゼアッセイキットおよびプレートリーダーを使用して、本発明者らは、ウェル中の発光強度を測定した。

【0331】

図18に示される結果は、E345R突然変異が導入された前駆体BCD166-01-01のEC50値と比較して、試験BCD166-02-01のADCCアッセイにおけるEC50値の40倍の増加を示し、これは、標的細胞での抗GITR抗体BCD166-02-01の抗原依存性のオリゴマー化に起因する。またEC50値の5倍の増加は、E345R突然変異が導入された前駆体BCD166-01-14のEC50値と比較して、試験BCD166-02-14のADCCアッセイにおいて確実に検出される。集計データから明らかに、高度に活性なGITRアゴニストの生産に必要な異なるエフェクター特徴へのIgG1抗体のFc部分におけるE345R置換の著しい正の作用が示される。

【0332】

実施例15

抗GITR抗体の補体依存性細胞傷害（CDC）のためのインビトロの細胞アッセイ

アッセイにおいて、本発明者らは、抗体BCD166-01-01、BCD166-01-014、BCD166-02-01および対照抗GITR-3215抗体を研究した。

【0333】

アッセイを96-ウェル培養プレートで実行した。各ウェル中の懸濁液は、HEK-293-GITR細胞、加えて示された濃度での試験抗体およびヒト血清補体を含んでいた。記載された懸濁液を含有するプレートを、37℃で4時間、5%CO₂でインキュベートした。さらに、アラマーブルー溶液を各ウェルに添加し、次いでプレートを、37℃、5%CO₂でインキュベートした。さらに、プレートリーダーを使用して、ウェルにおける蛍光強度を測定した（544nmの励起波長、590nmの発光波長）。

【0334】

図19に示される結果は、わずかなCDC活性、すなわち、抗体BCD166-01-01、BCD166-02-01および対照抗GITR-3215抗体に関してヒトでの使用が予期される治療用量を推測するための限界濃度である1μg/mlの濃度に対して10%以下のCDC活性を示す。候補BCD166-01-14の場合、1μg/mlの濃度におけるCDC活性は約30%の溶解であることから、場合によりインビボではそれほどでもないが明らかな作用を示す。集計データから明らかに、抗GITR IgG1抗体候補のFc部分におけるE345R置換の有意ではない作用が示される。

【0335】

実施例16

抗GITR候補のインビトロの細胞の細胞傷害性アッセイ

アッセイを実行して、レスポンド細胞の異なる集団の数における変化への試験抗GI

10

20

30

40

50

T R 候補の負または正の作用を評価した。アッセイにおいて、本発明者らは、抗体 B C D 1 6 6 - 0 1 - 0 1、B C D 1 6 6 - 0 1 - 0 1 4、B C D 1 6 6 - 0 2 - 0 1 および対照抗 C D 2 0 抗体（リツキシマブ）を研究した。

【0336】

P B M C を、健康なドナーからの全血から、フィコール密度勾配遠心分離によって単離した。アッセイを 9 6 - ウェル培養プレートで実行した。各ウェル中の懸濁液は、P B M C およびグラフに示した通り 2 5、1 および 0 μ g / m l の濃度の抗体を含有していた。P B M C および抗体を混合した後、プレートを、3 7 ° C で 1 6 時間、5 % C O 2 でインキュベートした。次いで、懸濁液中の P B M C の C D 5 6 +、C D 1 9 +、C D 3 +、C D 4 + および C D 8 + 部分集団の比率を、対応する C D に対する蛍光標識された抗体での懸濁液の直接の染色およびそれに続くフローサイトフルオロメーターを使用した細胞分析によって測定した。C D 5 6 +、C D 1 9 +、C D 3 + 細胞については、グラフは、試験懸濁液の全ての細胞に対するそれらの比率を示し、それに対して C D 4 +、C D 8 + については、グラフは、C D 3 + 細胞に対するそれらの比率を示す。

【0337】

図 2 0 ~ 2 4 に示される結果は、試験抗 G I T R 候補の、大きくはない負の作用、すなわち陰性対照と比較したレスポナー細胞の数における 1 0 % 以下の低減を示す。N K 細胞集団の場合、本発明者らは、用量に応じて細胞数において約 3 0 ~ 7 0 % の増加を観察した。しかしながら、対照抗 C D 2 0 抗体も N K 細胞のパーセンテージにおける増加を示したが、C D 2 0 + B 細胞集団の実質的に天然の完全な枯渇も示した。したがって、全ての問題の候補は、ヒト血液細胞に対する非特異的なインビトロの細胞傷害性を呈さない。

【0338】

実施例 1 7

ヒト n T r e g 細胞集団の抗体依存性枯渇に関するインビトロの細胞アッセイ

G I T R + n T r e g 細胞集団の A D C C 依存性枯渇は、抗 G I T R 抗体の治療的な抗腫瘍形成性作用のための主要な予期されるメカニズムの 1 つであると予期される。アッセイにおいて、本発明者らは、抗体 B C D 1 6 6 - 0 1 - 0 1、B C D 1 6 6 - 0 1 - 0 1 4、B C D 1 6 6 - 0 2 - 0 1 および対照抗 C T L A 4 抗体（イピリムマブ）を研究した。

【0339】

末梢血単核細胞（P B M C）を、フィコール密度勾配遠心分離によって健康なドナーからの全血から単離した。「C D 4 + C D 2 5 + 調節性 T 細胞単離キット、ヒト（C D 4 + C D 2 5 + R e g u l a t o r y T C e l l I s o l a t i o n K i t, h u m a n）」（M i l t e n y i B i o t e c, G e r m a n y）を使用して、P B M C を n T r e g について濃縮した。得られた細胞を、抗 C D 3 および抗 C D 2 8 抗体が固定された磁気ビーズを使用して活性化した。

【0340】

N K 細胞を、「N K 細胞単離キット、ヒト（N K C e l l I s o l a t i o n K i t, h u m a n）」（M i l t e n y i B i o t e c, G e r m a n y）を使用して P B M C から単離した。

【0341】

抗体溶液、N K 細胞懸濁液および n T r e g 懸濁液を培養プレートに添加した。プレートを、3 7 ° C、5 % C O 2 で 1 6 時間インキュベートした。

細胞懸濁液の試料を、C D 3、C D 4、C D 2 5、F o x P 3 に対する蛍光標識された抗体（B i o l e g e n d, U S A）を使用して染色した。染色された細胞懸濁液の試料をフローサイトフルオロメトリーによって分析した。

【0342】

ドナー 1 細胞材料に関する図 2 5 およびドナー 2 に関する図 2 6 に示される試験抗体の作用下での抗体依存性 n T r e g 枯渇に関する分析の結果から、細胞集団における著しい 7 0 ~ 1 0 0 % の減少、すなわち、特にドナー 2 材料の場合、試験抗 G I T R 候補の活性の枯渇が示される。さらに、対照抗 C T L A 4 抗体であるイピリムマブとの比較分析から

、抗GITR抗体、特に最終的な候補BCD166-02-01は、より大きい活性を呈することが示される。

【0343】

実施例18

ヒトiTreg細胞集団の抗体依存性枯渇に関するインビトロの細胞アッセイ

GITR+iTreg細胞集団のADCC依存性枯渇は、抗GITR抗体の治療的な抗腫瘍形成性の作用のための主要な予期されるメカニズムの1つであると予期される。アッセイにおいて、本発明者らは、抗体BCD166-01-01、BCD166-01-014、BCD166-02-01を研究した。

【0344】

PBMCを、フィコール密度勾配遠心分離によって健康なドナーからの全血から単離した。単球を、培養プラスチックに結合する細胞の集団としてPBMCから単離した。樹状細胞を得るために、単球を、1000ユニット/mlのGM-CSF (PeproTech、USA) および500ユニット/mlのIL-4 (Thermo Scientific、USA) の存在下で、37℃、5%CO₂で120時間インキュベートした。LPS溶液 (Sigma、USA) を0.5 μg/mlの濃度まで培養培地に添加し、細胞を、37℃、5%CO₂で48時間インキュベートした。

【0345】

抗体希釈溶液、樹状細胞懸濁液およびPBMCを培養プレートに添加した。プレートを、37℃、5%CO₂で120時間インキュベートした。

細胞懸濁液の試料を、CD3、CD4、CD25、FoxP3に対する蛍光標識された抗体 (BioLegend、USA) を使用して染色した。染色された細胞懸濁液の試料をフローサイトフルオロメトリーによって分析した。抗GITR抗体BCD166-01-01、BCD166-01-14およびBCD166-02-01は、インビトロでiTreg枯渇を誘導する。

【0346】

ドナー1/ドナー2細胞材料に関する図27に示される試験抗体の作用下での抗体依存性iTreg枯渇に関するアッセイの結果は、特にドナー1材料について、試験抗GITR候補の著しい2~5倍の枯渇活性を示す。最終候補BCD166-02-01は、十分なiTreg枯渇活性を示す。

【0347】

実施例19

ヒト細胞集団における抗GITR抗体の作用下での炎症促進性サイトカインIL-2およびIFN-γの分泌に関するインビトロの細胞アッセイ

PBMCを、フィコール密度勾配遠心分離によって健康なドナーからの全血から単離した。

【0348】

抗CD3および抗GITR抗体を96-ウェルプレートのウェルに固定した。この目的を達成するために、グラフに示した通りの濃度の抗GITR抗体BCD166-02-01および最適下限の濃度の抗CD3抗体を含有する100 μl/ウェルのDPBS溶液を、対応するプレートのウェルに添加し、プレートを室温で16時間インキュベートした。

【0349】

ウェルに抗CD3および抗GITR抗体を前もって固定した96-ウェルプレートを使用してアッセイを実行した。各ウェル中の懸濁液は、40,000個のPBMCおよび最適下限の濃度の抗CD28抗体を含有していた。全ての懸濁液成分を10%FBSを含有するRPMI-1640培地中で調製した。細胞懸濁液を添加した後、プレートを、37℃、5%CO₂で6日間インキュベートした。インキュベーションの4日目に、培養液のアリコートウェルから収集した。次いで、IL-2およびIFN-γの濃度を、ELISAを使用して、インキュベーションの4および6日目の培養液で測定した。

【0350】

抗がん作用に寄与する炎症促進性サイトカインIL-2およびIFN- γ の分泌レベルへの抗GITR抗体の作用の分析から、培養液中のこれらの物質の濃度における著しい増加が示された（図28に結果を示す）。したがって、候補BCD166-02-01は、サイトカイン分泌活性化において高い活性を呈し、これは、著しい抗腫瘍形成性作用を示す可能性がある。

【0351】

実施例20

抗体BCD166-02-01-ヒトFcRn、FcγRIIIa158V、FcγRIIIa158F、FcγRIIIa131H、FcγRIIIa131R、FcγRIIbおよびFcγRIa受容体の相互作用の結合分析

抗体BCD166-02-01-ヒトFcRn、FcγRIIIa158V、FcγRIIIa158F、FcγRIIIa131H、FcγRIIIa131R、FcγRIIbおよびFcγRIaの相互作用の結合親和性定数を、OctetRed 96（ForteBio）を使用して決定した。ビオチン化した受容体を、ストレプトアビジンセンサー（SA）の表面上に固定した。本発明者らは、30℃での使用緩衝液（0.1%Tween-20および0.1%BSAを含有するPBS：FcRn受容体の場合、本発明者らはpH6の緩衝液を使用し、他の受容体の場合、本発明者らはpH7.4の緩衝液を使用した）中の受容体と抗体との会合および解離を実行し、分析した。得られたセンソグラムを、1:1または2:1モデルに従って分析し、親和性定数を、Octetデータ分析ソフトウェア8.0のユーザーガイド、著作権2011年（C）を使用して計算した。

【0352】

図29に、BCD166-02-01-ヒトFcRn、FcγRIIIa158V、FcγRIIIa158F、FcγRIIIa131H、FcγRIIIa131R、FcγRIIbおよびFcγRIaの相互作用に関する親和性アッセイの結果を示す。これらは、IgG1アイソタイプ抗体に関して文献データおよび本発明者らの社内で繰り返して測定されたデータと比較して複数倍の値を実証し、したがって、溶液からこれらの受容体上に吸着したモノマー抗体の反応速度に対して、Fc断片におけるE345R突然変異の顕著であるが定性的ではない作用を示す。

【0353】

実施例21

動的光散乱法を使用したタンパク質凝集点によるコロイドおよび熱安定性の決定

動的光散乱法により研究中の試料の凝集温度を決定するために、DynaPro（登録商標）プレートリーダーII（Wyatt Technology社）を使用して、40から85℃に段階的に加熱して、温度に対する培地における粒度の依存性を得た。表7に結果を示す。

【0354】

【表8】

試験試料		凝集点
BCD166-02-01	20 mM 酢酸塩, pH=5.0	73.9°C ±0.1°C
	20 mM His, pH=5.5	73.9°C ±0.1°C

表7. BCD166-02-01 の凝集点

10

20

30

40

50

【0355】

分子BCD166-02-01は高い熱コロイド安定性を有すると結論付けることができる（20mMの酢酸塩、pH=5.0および20mMのHis、pH=5.5緩衝溶液における凝集点は、 $>65^{\circ}$ である）。

【0356】

BCD166-01-014について類似のデータを得た。

実施例22

50℃の熱ストレス下での熱安定性の決定

試験試料をサーモスタットで調節されたエアバスに入れ、72時間にわたりサーモスタットで50℃に調節した。加熱後、無傷の試料およびストレスを受けた試料を、UV検出器を備えたサイズ排除HPLC（SEC HPLC）によって、さらにキャピラリー等電点分画法によって分析した。クロマトグラフィーを、東ソー株式会社のTSK-Gel G3000SWXLカラム上のAgilent 1100HPLCシステムで実行し、検出を220nmの波長で実行した。電荷の不均質性を、Labchip GX II、Caliperを使用したキャピラリー等電点分画法の技術によって決定した。使用溶液およびチップの調製を、HT Protein Charge Variant Labeling KitおよびProtein Charge Variant Buffer Kit、PerkinElmerを使用する標準的な方法に従って行った。

【0357】

50℃のインキュベーション下でのBCD-166安定性（BCD166-02-01およびBCD166-01-014について）に関して得られたデータは表8に示され；図30（BCD166-02-01について）および31（BCD166-01-014について）は、50℃で72時間のインキュベーション下での組み合わされたクロマトグラムを示す。

【0358】

全体的な結論：試料は高いコロイドおよび熱安定性を有する。

【0359】

【表9】

緩衝溶液	試験試料ごとの条件	SEC			アイソフォームのプロファイル		
		集合体含量、%	単量体含量、%	断片含量、%	アルカリ性画分、%	塩基性画分、%	酸画分、%
20 mM 酢酸塩, pH=5.0	無傷	0.396	98.332	1.272	4.57	64.43	31.00
	50℃で72時間	0.432	98.664	0.905	4.01	58.90	37.09
	Δ*	0.036	0.332	-0.367	-0.56	-5.53	6.09
20 mM His, pH=5.5	無傷	0.416	99.110	0.474	4.48	66.93	28.59
	50℃で72時間	0.393	99.198	0.410	4.39	60.93	34.69
	Δ*	-0.023	0.088	-0.064	-0.09	-6.00	6.10

* Δは、ストレスを受けた試料の純度と無傷の試料（入力対照）の純度との差(%)である。

表8. BCD-166に関するサイズ排除HPLCおよび電気泳動による単量体含量の依存性。

【0360】

実施例23

皮下異種移植片モデルを使用したBCD-166生成物の抗腫瘍活性の評価

皮下腫瘍異種移植片モデルを使用して、BCD-166生成物の抗腫瘍活性を評価した。この目的を達成するために、Matrigel（登録商標）と混合した 3×10^6 個のA2058細胞株細胞をヒト化huNOG-EXLマウスの皮下に移植した。細胞植え付

け後の7日目に、動物を表9で示されるようにグループ分けした。

【0361】

【表10】

表9. BCD-166 生成物の抗腫瘍活性の研究における動物のグループ

グループ	動物の数	用量
BCD-166-01-01	10	20 mg/kg
BCD-166-02-01	10	20 mg/kg
BCD-166-01-014	9	20 mg/kg
陰性対照	10	-

10

【0362】

動物をグループ分けした後の1、5、8、12日目に、生成物を20mg/kgの用量で腹腔内投与した。陰性対照グループにはヒスチジン緩衝液を投与した。実験にわたりマウスの体重および腫瘍の長さ寸法を測定した。式 $V = L \times W \times H \times \pi / 6$ を使用して腫瘍体積を計算した。試験生成物の効能を、以下の式を使用して陰性対照グループ（ V_c ）および生成物のグループ（ V_t ）における平均腫瘍体積を考慮に入れて計算された腫瘍増殖阻害の指標（TGI）によって評価した：

20

【0363】

【数1】

$$TGI(\%) = \frac{V_c - V_t}{V_c} * 100$$

【0364】

30

実験から、BCD-166-01-014およびBCD-166-02-01生成物の高い抗腫瘍活性が解明されたが、それに対してBCD-166-01-01生成物は、有意な抗腫瘍活性を全く示さなかった。図32および33に結果を示す。

非限定的に、本発明は以下の態様を含む。

【態様1】

GITRに特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、

(a) (i) 以下の群：

NYGMH（配列番号1）またはYYWMY（配列番号12）

から選択されるアミノ酸配列を含むCDR1；

40

(ii) 以下の群：

VIWFDGSNKFYTD SVKG（配列番号2）またはAISWNGGRTYYAE SMKG（配列番号13）

から選択されるアミノ酸配列を含むCDR2；

(iii) 以下の群：

ELGGYYYS SSGFRPYYYGMDV（配列番号3）またはNRYYS DPNY GMNL（配列番号14）

から選択されるアミノ酸配列を含むCDR3

を含む重鎖可変ドメイン、ならびに、

(b) (i) 以下の群：

50

R A S Q S I G S W L A (配列番号 7) または T G T S T D I G T Y K Y I S (配列番号 17)

から選択されるアミノ酸配列を含む C D R 1 ;

(i i) 以下の群 :

A A S T L Q R (配列番号 8) または G V S H R P S (配列番号 18)

から選択されるアミノ酸配列を含む C D R 2 ;

(i i i) 以下の群 :

Q Q S H S H P L T (配列番号 9) または S S Y T S S G T V V (配列番号 19)

から選択されるアミノ酸配列を含む C D R 3

を含む軽鎖可変ドメイン

を含むモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

[態様 2]

重鎖可変ドメインが、

(i) それぞれ配列番号 1、配列番号 2 および配列番号 3 の配列により表される C D R 1、C D R 2 および C D R 3 のアミノ酸配列、

(i i) それぞれ配列番号 12、配列番号 13 および配列番号 14 の配列により表される C D R 1、C D R 2 および C D R 3 アミノ酸配列

を含む、態様 1 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

[態様 3]

軽鎖可変ドメインが、

(i) それぞれ配列番号 7、配列番号 8 および配列番号 9 の配列により表されるアミノ酸配列を含む C D R 1、C D R 2 および C D R 3、

(i i) それぞれ配列番号 17、配列番号 18 および配列番号 19 の配列により表されるアミノ酸配列を含む C D R 1、C D R 2 および C D R 3

を含む、

態様 1 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

[態様 4]

— 重鎖可変ドメインが、

それぞれ配列番号 1、配列番号 2 および配列番号 3 の配列により表されるアミノ酸配列を含む C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含む ;

— 軽鎖可変ドメインが、それぞれ配列番号 7、配列番号 8 および配列番号 9 の配列により表されるアミノ酸配列を含む C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含む、

態様 1 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

[態様 5]

— 重鎖可変ドメインが、それぞれ配列番号 12、配列番号 13 および配列番号 14 の配列により表されるアミノ酸配列を含む C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含む ;

— 軽鎖可変ドメインが、それぞれ配列番号 17、配列番号 18 および配列番号 19 の配列により表されるアミノ酸配列を含む C D R 1、C D R 2 および C D R 3 を含む、

態様 1 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

[態様 6]

重鎖可変ドメインが、

(i) 配列番号 4 のアミノ酸配列に少なくとも 90 % 相同なアミノ酸配列 ; または

(i i) 配列番号 15 のアミノ酸配列に少なくとも 90 % 相同なアミノ酸配列

を含む、

態様 1 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

[態様 7]

(i) 重鎖可変ドメインが、配列番号 4 のアミノ酸配列を含むか、または

(i i) 重鎖可変ドメインが、配列番号 15 のアミノ酸配列を含む、

態様 1 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

[態様 8]

10

20

30

40

50

軽鎖可変ドメインが、

(i) 配列番号 10 のアミノ酸配列に少なくとも 90% 相同なアミノ酸配列；または

(ii) 配列番号 20 のアミノ酸配列に少なくとも 90% 相同なアミノ酸配列

を含む、

態様 1 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

[態様 9]

(i) 軽鎖可変ドメインが、配列番号 10 のアミノ酸配列を含むか；または

(ii) 軽鎖可変ドメインが、配列番号 20 のアミノ酸配列を含む、

態様 1 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

[態様 10]

(i)

－ 重鎖可変ドメインが、配列番号 4 のアミノ酸配列に少なくとも 90% 相同なアミノ酸配列を含み；

－ 軽鎖可変ドメインが、配列番号 10 のアミノ酸配列に少なくとも 90% 相同なアミノ酸配列を含むか；または

(ii)

－ 重鎖可変ドメインが、配列番号 15 のアミノ酸配列に少なくとも 90% 相同なアミノ酸配列を含み；

－ 軽鎖可変ドメインが、配列番号 20 のアミノ酸配列に少なくとも 90% 相同なアミノ酸配列を含む、

態様 1 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

[態様 11]

－ 重鎖可変ドメインが、配列番号 4 のアミノ酸配列を含み；

－ 軽鎖可変ドメインが、配列番号 10 のアミノ酸配列を含む、

態様 10 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

[態様 12]

－ 重鎖可変ドメインが、配列番号 15 のアミノ酸配列を含み；

－ 軽鎖可変ドメインが、配列番号 20 のアミノ酸配列を含む、

態様 10 に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

[態様 13]

G I T R に特異的に結合する抗体が、全長 I g G 抗体である、態様 1 に記載のモノクローナル抗体。

[態様 14]

全長 I g G 抗体が、ヒト I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4 アイソタイプに関する、態様 13 に記載のモノクローナル抗体。

[態様 15]

全長 I g G 抗体が、ヒト I g G 1 アイソタイプに関する、態様 14 に記載のモノクローナル抗体。

[態様 16]

G I T R に特異的に結合する抗体が、アゴニスト特性、抗体依存性細胞傷害 (A D C C) を増加させるが、補体依存性細胞傷害 (C D C) を増加させないように、F c 断片において E 3 4 5 R 突然変異を含む、態様 1 に記載のモノクローナル抗体。

[態様 17]

(i) 配列番号 5 の配列に少なくとも 90% 相同なアミノ酸配列；または

(ii) 配列番号 6 の配列に少なくとも 90% 相同なアミノ酸配列

を含む重鎖を含む、態様 1 に記載のモノクローナル抗体。

[態様 18]

(i) 配列番号 5 のアミノ酸配列を含む重鎖；または

(ii) 配列番号 6 のアミノ酸配列を含む重鎖

を含む、態様 1 に記載のモノクローナル抗体。

10

20

30

40

50

[態様 19]

配列番号 11 の配列に少なくとも 90% 相同なアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、態様 1 に記載のモノクローナル抗体。

[態様 20]

配列番号 11 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、態様 1 に記載のモノクローナル抗体。

[態様 21]

(i)

- ー 配列番号 5 の配列に少なくとも 90% 相同なアミノ酸配列を含む重鎖；
- ー 配列番号 11 の配列に少なくとも 90% 相同なアミノ酸配列を含む軽鎖；または

(ii)

- ー 配列番号 6 の配列に少なくとも 90% 相同なアミノ酸配列を含む重鎖；
- ー 配列番号 11 の配列に少なくとも 90% 相同なアミノ酸配列を含む軽鎖

を含む、態様 1 に記載のモノクローナル抗体。

[態様 22]

- ー 配列番号 5 のアミノ酸配列を含む重鎖；
- ー 配列番号 11 のアミノ酸配列を含む軽鎖

を含む、態様 1 に記載のモノクローナル抗体。

[態様 23]

- ー 配列番号 6 のアミノ酸配列を含む重鎖；
- ー 配列番号 11 のアミノ酸配列を含む軽鎖

を含む、態様 1 に記載のモノクローナル抗体。

[態様 24]

配列番号 16 の配列に少なくとも 90% 相同なアミノ酸配列を含む重鎖を含む、態様 1 に記載のモノクローナル抗体。

[態様 25]

配列番号 16 のアミノ酸配列を含む重鎖を含む、態様 1 に記載のモノクローナル抗体。

[態様 26]

配列番号 21 の配列に少なくとも 90% 相同なアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、態様 1 に記載のモノクローナル抗体。

[態様 27]

配列番号 21 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、態様 1 に記載のモノクローナル抗体。

[態様 28]

- ー 配列番号 16 の配列に少なくとも 90% 相同なアミノ酸配列を含む重鎖；
- ー 配列番号 21 の配列に少なくとも 90% 相同なアミノ酸配列を含む軽鎖

を含む、態様 1 に記載のモノクローナル抗体。

[態様 29]

- ー 配列番号 16 のアミノ酸配列を含む重鎖；
- ー 配列番号 21 のアミノ酸配列を含む軽鎖

を含む、態様 1 に記載のモノクローナル抗体。

[態様 30]

態様 1～29 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片をコードする単離された核酸。

[態様 31]

DNA である、態様 30 に記載の核酸。

[態様 32]

態様 30 または 31 に記載の核酸を含む発現ベクター。

[態様 33]

態様 1～29 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片を得るための宿主細胞を得る方法であって、態様 32 に記載のベクターで細胞を形質転換することを含む方法。

[態様 34]

態様 30 または 31 に記載の核酸を含む、態様 1 ～ 29 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片を得るための宿主細胞。

[態様 35]

態様 1 ～ 29 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片を得る方法であって、前記抗体を得るのに十分な条件下で、培養培地中で態様 34 に記載の宿主細胞を培養するステップ、必要に応じて、それに続いて得られた抗体を単離および精製するステップを含む方法。

[態様 36]

治療有効量の態様 1 ～ 29 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片を、1 種または複数の医薬的に許容される賦形剤と組み合わせて含む、GITR によって媒介される疾患または障害を処置するための医薬組成物。

10

[態様 37]

以下の群：子宮頸がん、頭頸部がん、胃がん、乳がん、腎細胞がん、CRC（結腸直腸がん）、（OC）卵巣がん、NSCLC（非小細胞肺癌）から選択される GITR によって媒介される疾患または障害を処置することが意図された、態様 36 に記載の医薬組成物。

[態様 38]

治療有効量の態様 1 ～ 29 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片、および治療有効量の少なくとも 1 種の治療活性を有する抗腫瘍化合物を含む、GITR によって媒介される疾患または障害を処置するための医薬組成物。

20

[態様 39]

以下の群：子宮頸がん、頭頸部がん、胃がん、乳がん、腎細胞がん、CRC（結腸直腸がん）、（OC）卵巣がん、NSCLC（非小細胞肺癌）から選択される GITR によって媒介される疾患または障害を処置することが意図された、態様 38 に記載の医薬組成物。

[態様 40]

治療活性を有する抗腫瘍化合物が、化学療法剤、抗体または抗ホルモン剤から選択される、態様 38 に記載の医薬組成物。

[態様 41]

治療活性を有する抗腫瘍化合物が、

30

（i）以下の群：抗 PD1 抗体、抗 PD-L1 抗体、抗 CTLA4 抗体、抗 4-1BB 抗体、抗 OX40 抗体若しくはそれらの組合せから選択される抗体であるか、または

（ii）小分子であるか、または

（iii）自然または適応免疫の活性化剤の群から選択される、態様 40 に記載の医薬組成物。

[態様 42]

態様 29 に記載の抗体および少なくとも 1 種の治療活性を有する抗腫瘍化合物が、逐次的に投与される、態様 41 に記載の医薬組成物。

[態様 43]

態様 1 ～ 29 のいずれか一項に記載の抗体および少なくとも 1 種の治療活性を有する抗腫瘍化合物が、同時に投与される、態様 41 に記載の医薬組成物。

40

[態様 44]

GITR の生物学的活性の阻害が必要な対象において GITR の生物学的活性を阻害するための方法であって、有効量の態様 1 ～ 29 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片の投与を含む方法。

[態様 45]

GITR によって媒介される疾患または障害を処置するための方法であって、このような処置が必要な対象における、治療有効量の、態様 1 ～ 29 のいずれか一項に記載の抗体もしくはその抗原結合断片または態様 36 または 38 に記載の医薬組成物の投与を含む方法。

50

[態様 4 6]

疾患または障害が、以下の群：子宮頸がん、頭頸部がん、胃がん、乳がん、腎細胞がん、CRC（結腸直腸がん）、（OC）卵巣がん、NSCLC（非小細胞肺がん）から選択される、態様 4 5 に記載の疾患または障害を処置するための方法。

[態様 4 7]

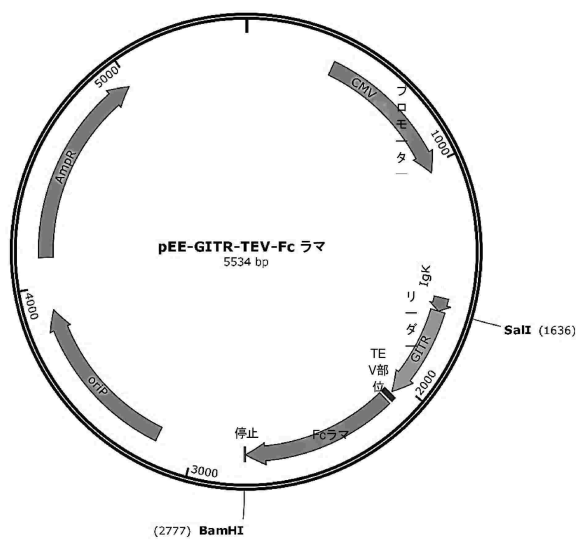
態様 1 ～ 2 9 のいずれか一項に記載の抗体もしくはその抗原結合断片または態様 3 6 または 3 8 に記載の医薬組成物の使用であって、GITR によって媒介される疾患または障害のこのような処置が必要な対象における処置のための使用。

[態様 4 8]

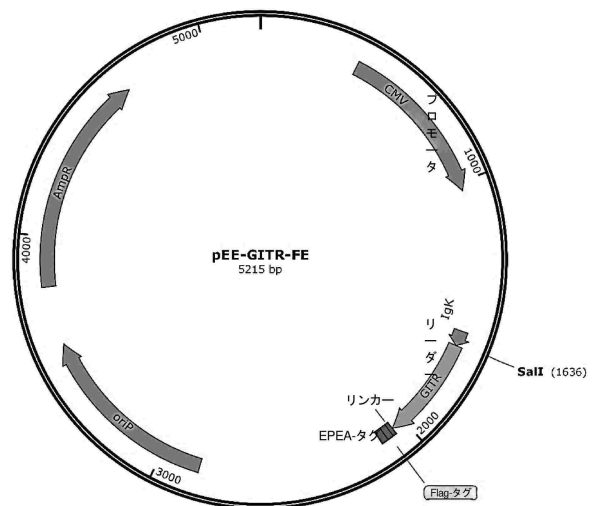
疾患または障害が、子宮頸がん、頭頸部がん、胃がん、乳がん、腎細胞がん、CRC（結腸直腸がん）、（OC）卵巣がん、NSCLC（非小細胞肺がん）を含む群から選択される、態様 4 7 に記載の使用。

【図面】

【図 1】



【図 2】



10

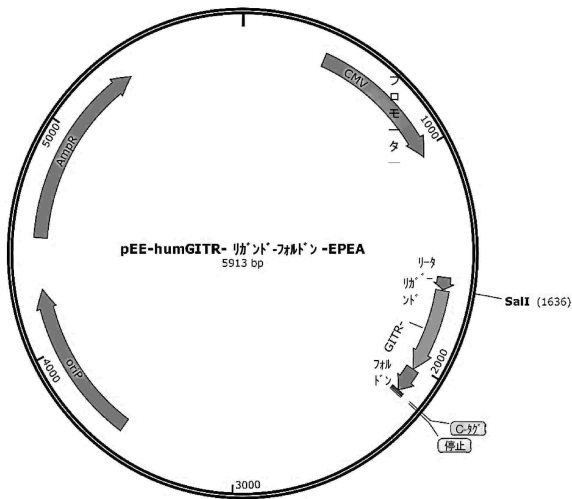
20

30

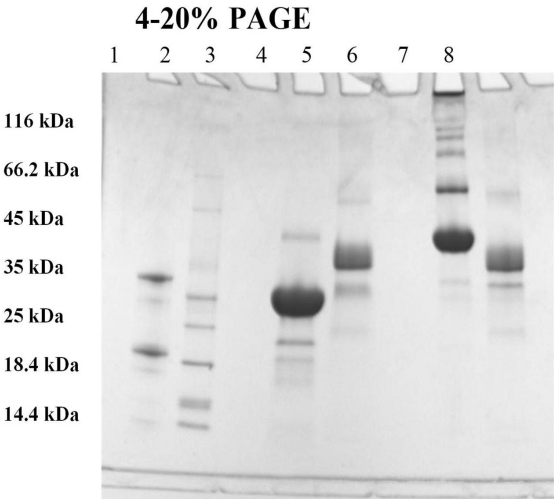
40

50

【図 3】

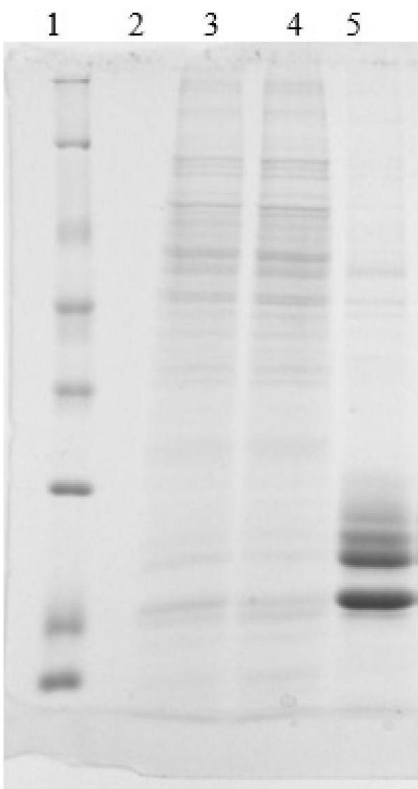


【図 4】

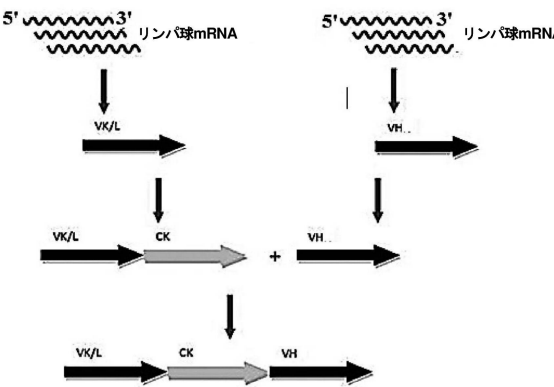


10

【図 5】



【図 6】



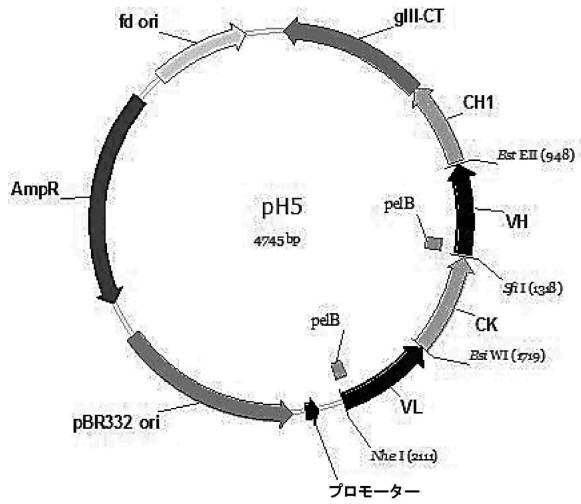
20

30

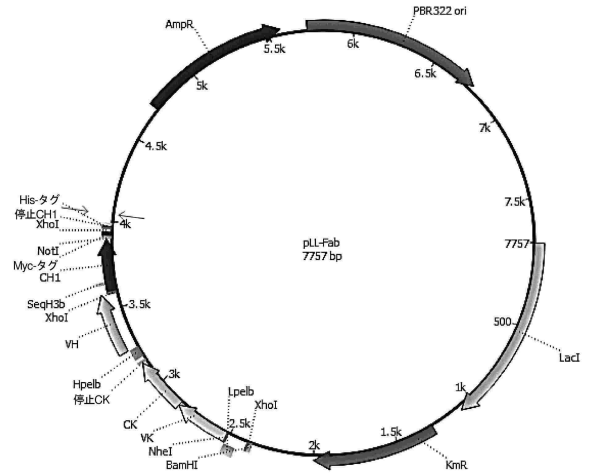
40

50

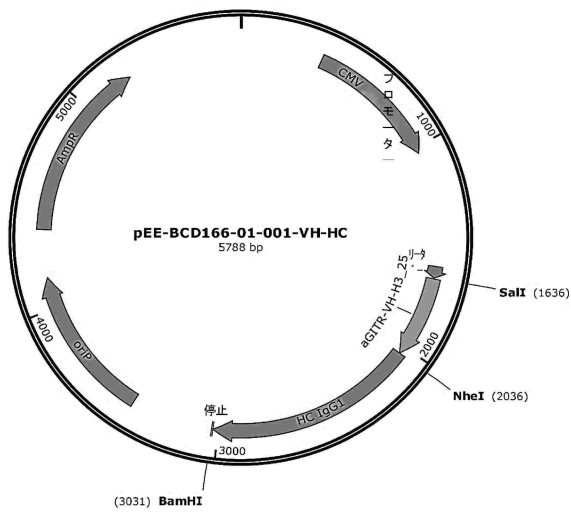
【圖 7】



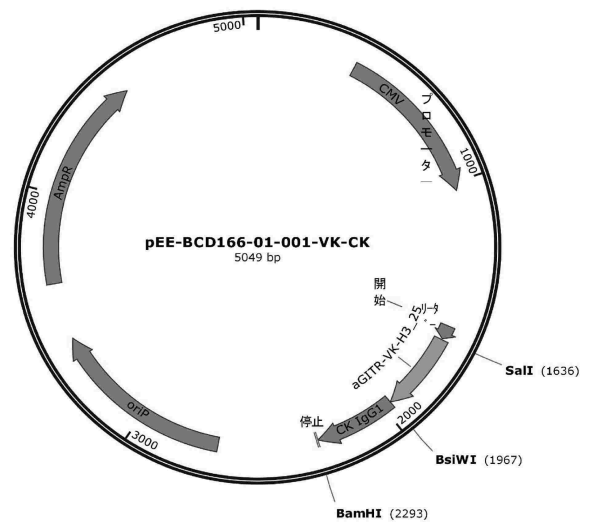
【図 8】



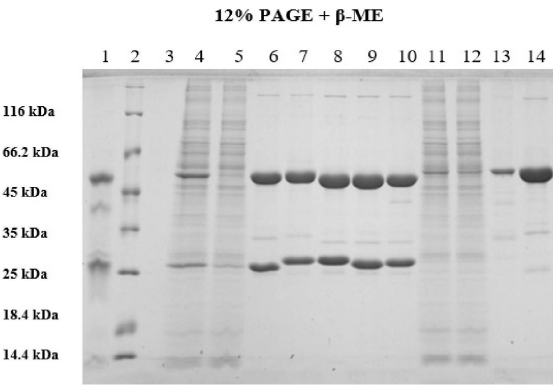
【図 9】



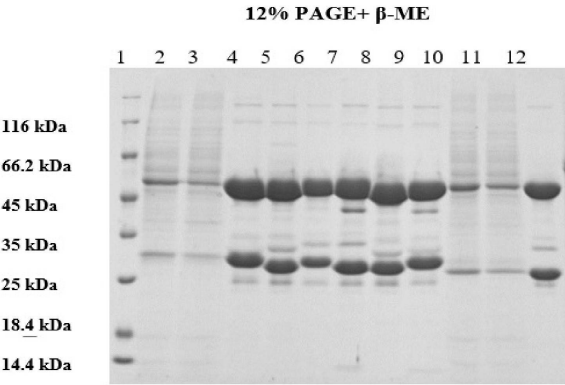
【図 10】



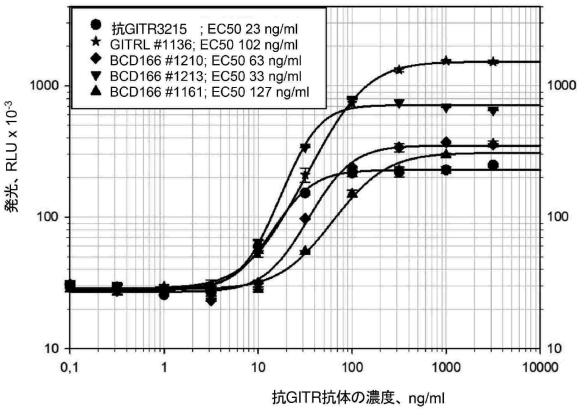
【図 1 1】



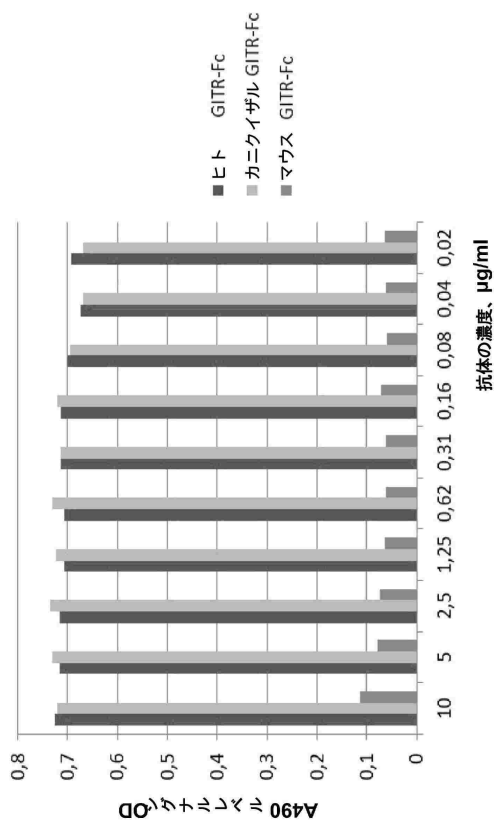
【図 1 2】



【図 1 3】



【図 1 4】



10

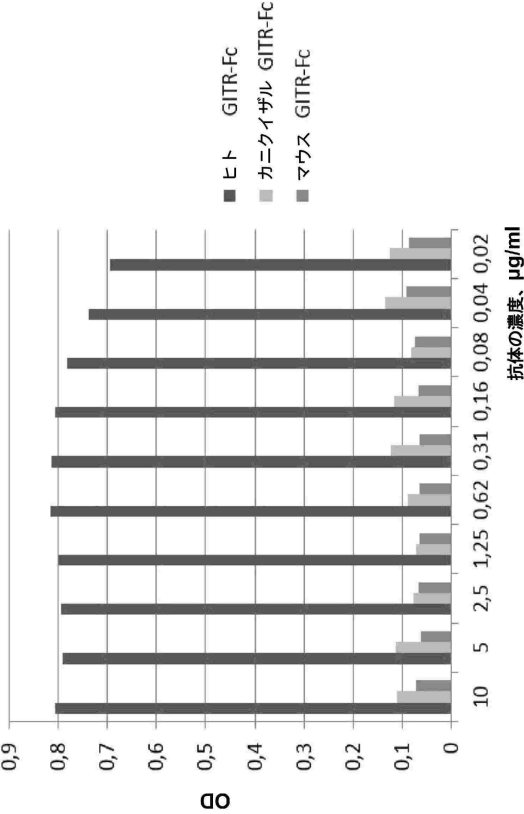
20

30

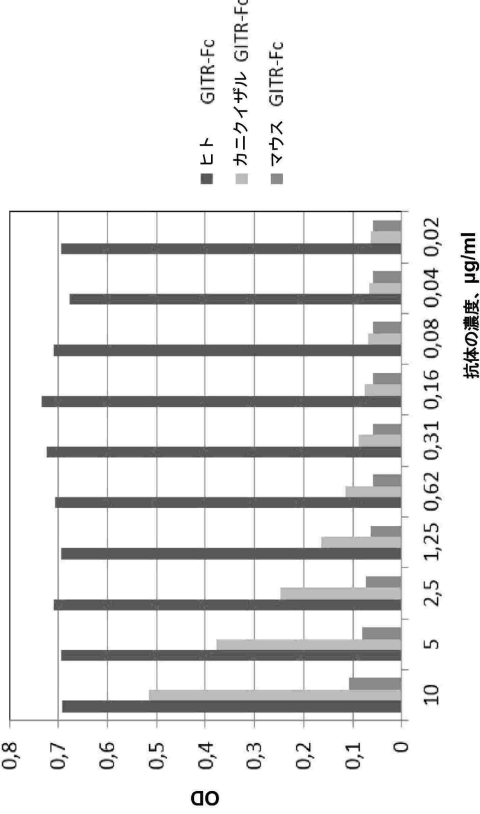
40

50

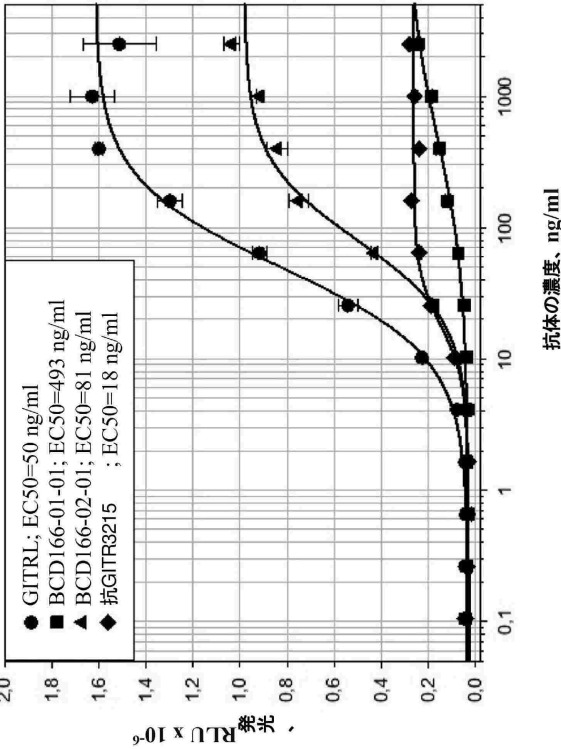
【図 15】



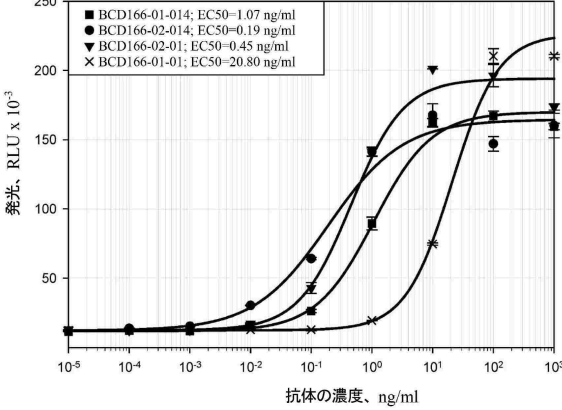
【図 16】



【図 17】



【図 18】



10

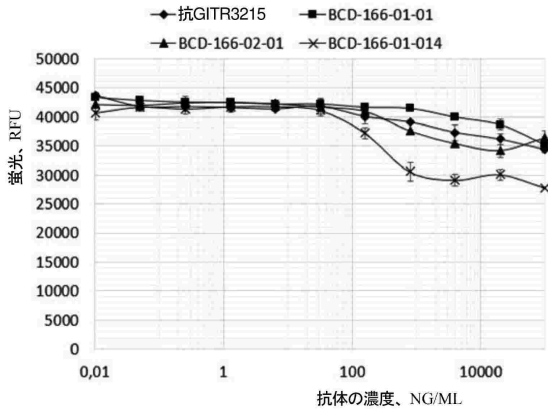
20

30

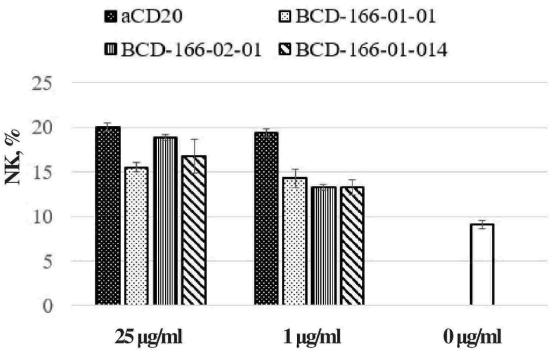
40

50

【図 19】

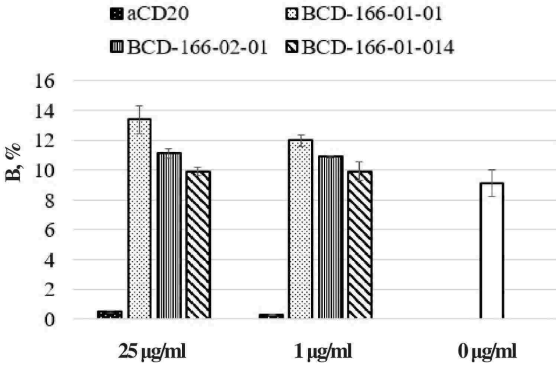


【図 20】

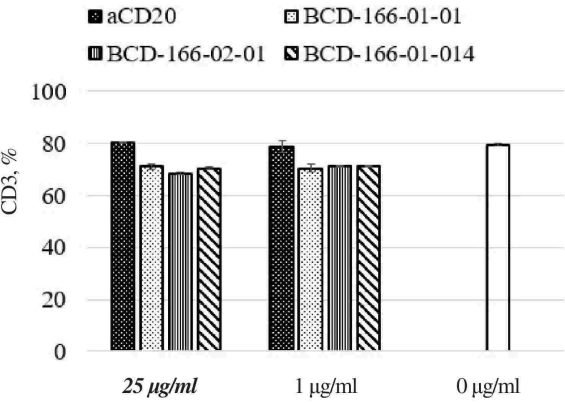


10

【図 21】



【図 22】



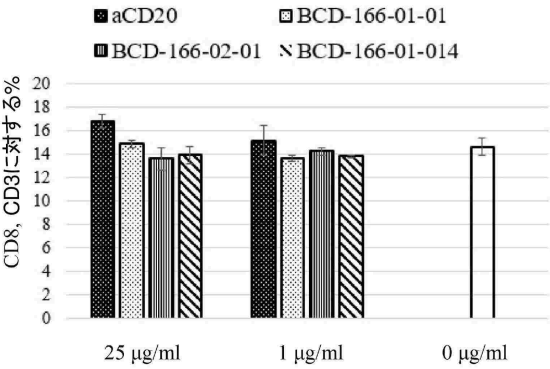
20

30

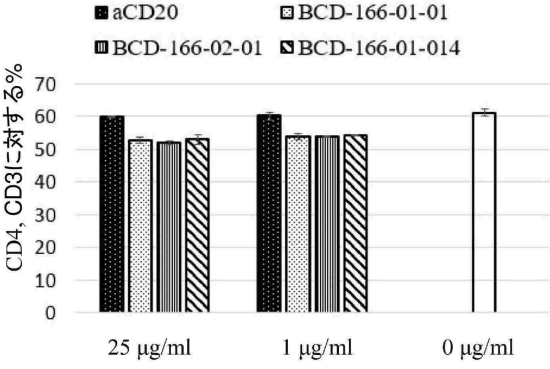
40

50

【図 2 3】

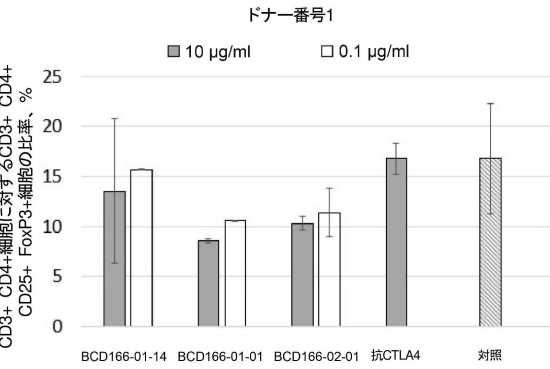


【図 2 4】

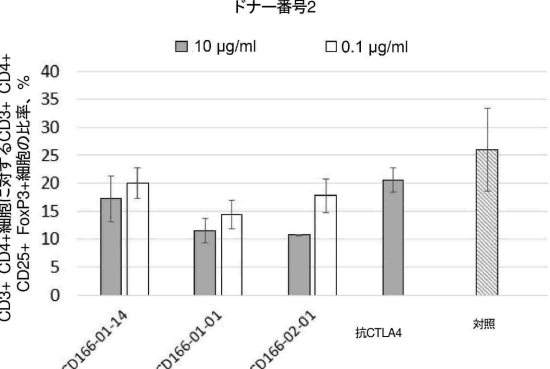


10

【図 2 5】



【図 2 6】



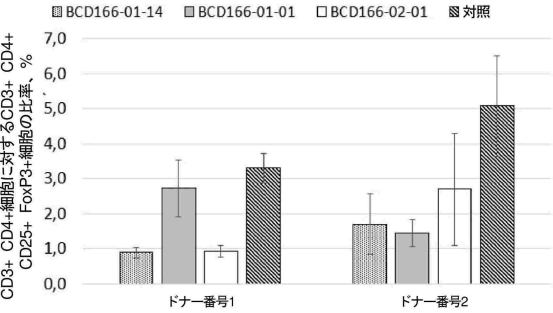
20

30

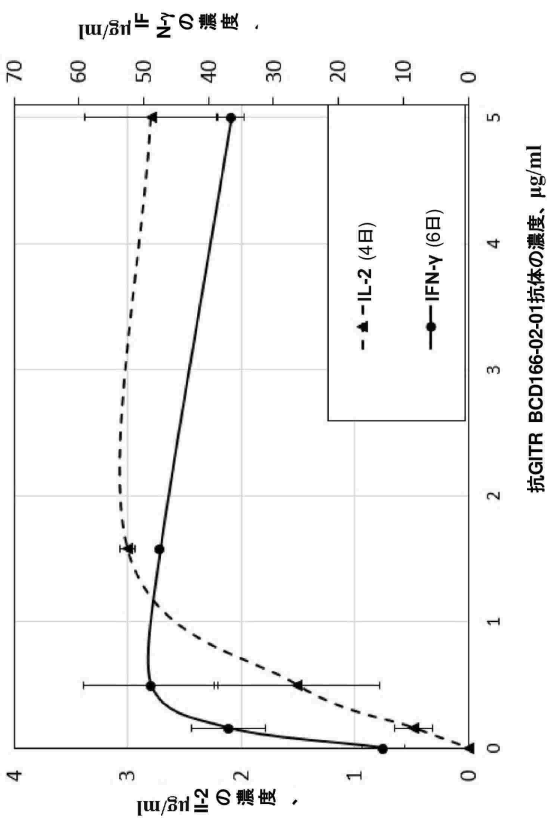
40

50

【図 2 7】



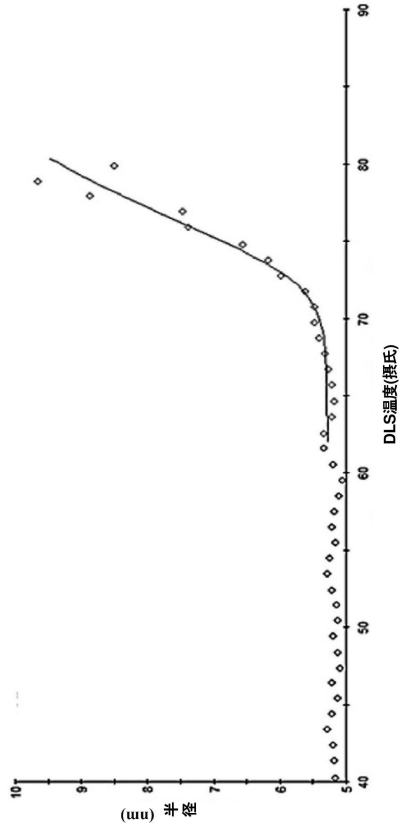
【図 2 8】



【図 2 9】

	BCD166-02-01
FcRn, KD, M	2.7 E-08
Fc γ RIa, KD, M	7.23E-10
Fc γ RIIa-131H, KD, M	7.22E-08
Fc γ RIIa-131R, KD, M	4.02E-08
Fc γ RIIb, KD, M	5.57E-07
Fc γ RIIIa-158F, KD, M	1.42E-06
Fc γ RIIIa-158V, KD, M	1.18E-07

【図 3 0】



10

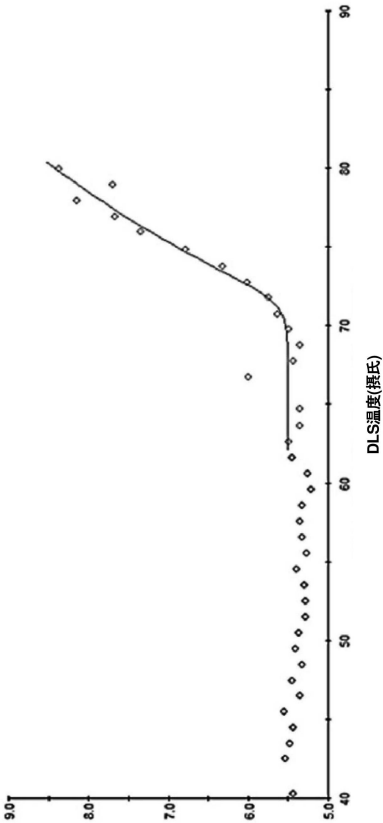
20

30

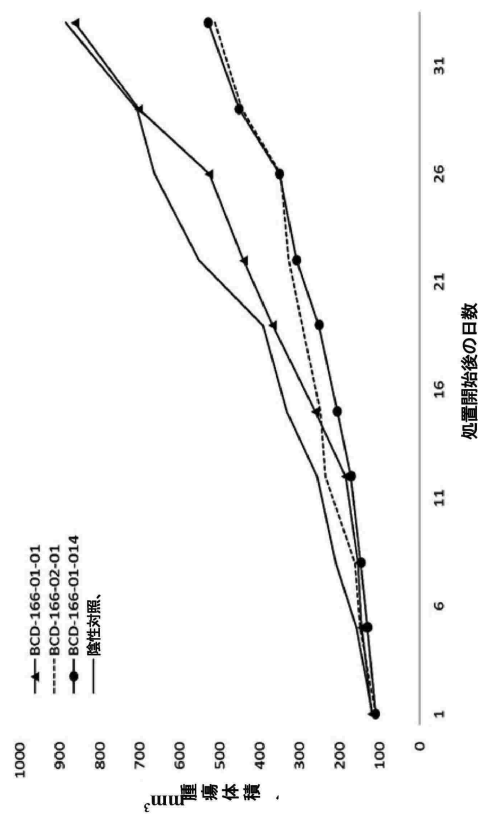
40

50

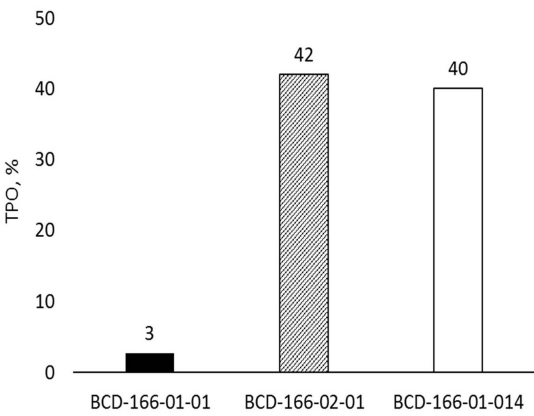
【図 3 1】



【図 3 2】



【図 3 3】



【配列表】

0007695200000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	U
		A 6 1 K	39/395	T
		A 6 1 K	39/395	G
		A 6 1 K	39/395	E
		A 6 1 K	45/00	

弁理士 泉谷 玲子

- (72)発明者 ウリティン, アンドレイ・ボリソビッチ
ロシア国 1 4 2 2 9 0 オーブラスチ・モスコフスカヤ, プシノ, マイクロディストリクト “エイビー”, ドム 2 8, クバルチーラ 1 1
- (72)発明者 コズロフ, オレスヤ・ニコラエフナ
ロシア国 1 9 6 6 4 3 サンクトペテルブルク, ポス・ポントンニ, レニングラードスカヤ・オブラスチ, ウーリッツァ・ユズナヤ, ドム 1 3, クバルチーラ 7 5
- (72)発明者 ゴルディエフ, アレクサンドル・アンドレービッチ
ロシア国 4 2 6 0 1 1 ゴロド・イジェフスク, ウーリッツァ・プシュキンスカヤ, ドム 2 8 6, クバルチーラ 4 9
- (72)発明者 ブルニシェフ, クセニア・ミハイロフナ
ロシア国 1 1 5 3 0 4 ゴロド・モスクワ, ウーリッツァ・カンテミロフスカヤ, ドム 5, コルプ 3, クバルチーラ 6 2 5
- (72)発明者 イシュチノフ, アナスタシア・ニコラエフナ
ロシア国 1 4 2 3 0 0 ゴロド・チェクホフ, モスコフスカヤ・オーブラスチ, ウーリッツァ・ベセンニャヤ, ドム 3 1, クバルチーラ 5 4
- (72)発明者 ソゾノフ, アレクサンドラ・アレクサンドロフナ
ロシア国 1 6 4 5 0 0 ゴロド・セベロドビンスク, アルクハングルスカヤ・オブラスチ, ピーアール・ケイティー・モルスコジ, ドム 2, クバルチーラ 5 1
- (72)発明者 アゲエフ, セルゲイ・アンドレービッチ
ロシア国 1 4 2 3 0 1 ゴロド・チェーホフ, モスコフスカヤ・オーブラスチ, ウーリッツァ・ゼムスカヤ, ドム 8, クバルチーラ 7 5
- (72)発明者 ドローニン, アレクサンドル・ニコラエビッチ
ロシア国 1 0 5 4 2 5 モスクワ, ウーリッツァ・7-アヤ パルコバヤ, ドム 3 1, コルプ 4, クバルチーラ 2 0
- (72)発明者 ツィムピロフ, ウラジーミル・セルゲービッチ
ロシア国 6 7 3 2 2 2 エス. ザクルタ, キロクスkey アールーエヌ, ザバイカルスキー・ケイアール, ウーリッツァ・ソルネチナヤ, ドム 1 2
- (72)発明者 ミトロシン, イワン・ウラディミロビッチ
ロシア国 4 2 6 0 5 0 ゴロド・イジェフスク, レス・ウドムルトスカヤ, ウーリッツァ・ドゼルジンスコゴ, ドム 4, クバルチーラ 2 6
- (72)発明者 ソロフエフ, バレリイ・ウラディミロビッチ
ロシア国 1 4 2 2 9 0 ゴロド・プシノ, モスコフスカヤ・オーブラスチ, マイクラジョン・デイー, ドム 2 4, クバルチーラ 9 1
- (72)発明者 ウスティウゴフ, イアコフ・イウレビッチ
ロシア国 6 1 8 4 2 6 ゴロド・ベレズニキ, クル・ペルムスキー, ウーリッツァ・ユビレイナヤ, ドム 1 1 8, クバルチーラ 1 4
- (72)発明者 イワノフ, ロマン・アレクセービッチ

ロシア国 125167 ゴロド・モスクワ, ウーリッツァ・プラネトナヤ, 29, コルプ 2, ク
バルチーラ 176

(72)発明者 モロゾフ, ドミトリー・バレンチノビッチ

ロシア国 190000 サンクトペテルブルク, アドミラルテイスキー アールーエヌ, ウーリッ
ツァ・ポクタムツカヤ, ドム 20, クバルチーラ 3

審査官 山内 達人

(56)参考文献 特表2017-523771 (JP, A)

国際公開第2018/005950 (WO, A1)

国際公開第2018/145075 (WO, A1)

国際公開第2018/031400 (WO, A1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12N

C07K

A61P

A61K

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (ST
N)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq