

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-522571

(P2018-522571A)

(43) 公表日 平成30年8月16日 (2018. 8. 16)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/62 (2006. 01)	C 1 2 N 15/62 Z	4 B 0 6 3
C 0 7 K 19/00 (2006. 01)	C 0 7 K 19/00 Z N A	4 B 0 6 5
C 0 7 K 16/00 (2006. 01)	C 0 7 K 16/00	4 C 0 7 6
C 0 7 K 14/525 (2006. 01)	C 0 7 K 14/525	4 C 0 8 4
C 0 7 K 14/435 (2006. 01)	C 0 7 K 14/435	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 116 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2018-506513 (P2018-506513)
 (86) (22) 出願日 平成28年8月11日 (2016. 8. 11)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年2月8日 (2018. 2. 8)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2016/069175
 (87) 国際公開番号 W02017/025610
 (87) 国際公開日 平成29年2月16日 (2017. 2. 16)
 (31) 優先権主張番号 62/204, 212
 (32) 優先日 平成27年8月12日 (2015. 8. 12)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/350, 447
 (32) 優先日 平成28年6月15日 (2016. 6. 15)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 506042265
 メディミューン リミテッド
 イギリス国 シービー21 6ジーエイチ
 ケンブリッジシャー, ケンブリッジ, グ
 ランタ パーク, ミルステイン ビルディ
 ング
 (74) 代理人 110002572
 特許業務法人平木国際特許事務所
 (72) 発明者 スチュワート, ロス, アンソニー
 イギリス国 シービー21 6ジーエイチ
 ケンブリッジシャー ケンブリッジ, グ
 ランタ パーク, ミルステイン ビルディ
 ング, メディミューン リミテッド

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 G I T R L 融合タンパク質およびその使用

(57) 【要約】

本開示は、ヒト I g G F c ドメイン、三量体化ドメイン、および G I T R L リガンドの受容体結合ドメインを含む、G I T R L 融合ポリペプチドサブユニットを提供し、ここで、融合ポリペプチドサブユニットは、六量体タンパク質に自己組織化することができる。また、融合ポリペプチドサブユニットおよび六量体タンパク質を調製する方法、ならびに使用方法、例えば、がんの治療方法も提供される。

【選択図】 図 1

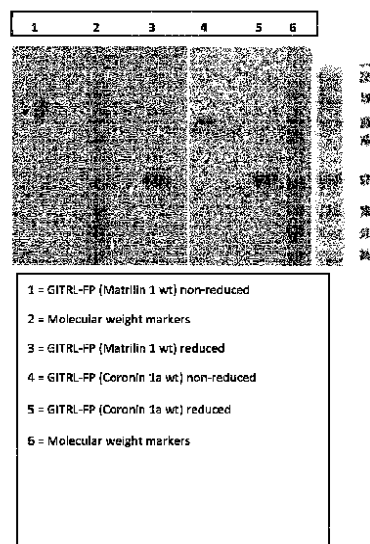


Figure 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

I g G F c ドメイン；機能的多量体化ドメイン；およびグルココルチコイド誘導 T N F 受容体リガンド（G I T R L）の受容体結合ドメインを含む単離された一本鎖ポリペプチドサブユニットであって、三量体または六量体タンパク質に自己組織化し得る、ポリペプチドサブユニット。

【請求項 2】

前記多量体化ドメインが三量体化ドメインである、請求項 1 に記載のポリペプチドサブユニット。

【請求項 3】

アミノ末端からカルボキシ末端にかけて、前記 I g G F c ドメイン、その後に前記多量体化または三量体化ドメイン、その後に前記 G I T R L 受容体結合ドメインを含む、請求項 1 または 2 に記載のポリペプチドサブユニット。

【請求項 4】

前記 I g G F c ドメインのカルボキシ末端が、第 1 のリンカー領域を介して前記多量体化または三量体化ドメインのアミノ末端に融合される、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載のポリペプチドサブユニット。

【請求項 5】

前記多量体化または三量体化ドメインのカルボキシ末端が、第 2 のリンカー領域を介して前記 G I T R L 受容体結合ドメインのアミノ末端に融合される、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載のポリペプチドサブユニット。

【請求項 6】

前記 I g G F c ドメインのカルボキシ末端が、前記多量体化または三量体化ドメインのアミノ末端に直接的に融合される、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載のポリペプチドサブユニット。

【請求項 7】

前記 I g G F c ドメインが、そのアミノ末端に I g G ヒンジ領域を含む、請求項 5 または 6 に記載のポリペプチドサブユニット。

【請求項 8】

前記 I g G ヒンジ領域が、完全な重鎖間ジスルフィド結合形成を与える突然変異を含む、請求項 5 または 6 に記載のポリペプチドサブユニット。

【請求項 9】

前記 I g G ヒンジ領域が、I g G 1 ヒンジ領域、I g G 4 ヒンジ領域、またはその変異体を含む、請求項 7 または 8 に記載のポリペプチドサブユニット。

【請求項 10】

前記 I g G 4 ヒンジ領域が、E U 付番に従う 2 2 8 位にセリンからプロリンへの突然変異（S 2 2 8 P）を有する（I g G 4 P）、請求項 9 に記載のポリペプチドサブユニット。

【請求項 11】

前記 I g G F c ドメインがヒト I g G F c ドメインである、請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載のポリペプチドサブユニット。

【請求項 12】

前記多量体化または三量体化ドメインのカルボキシ末端が、前記 G I T R L 受容体結合ドメインのアミノ末端に直接的に融合される、請求項 1 ～ 4 または 6 ～ 10 のいずれか一項に記載のポリペプチドサブユニット。

【請求項 13】

前記第 1 のリンカー領域、前記第 2 のリンカー領域、または前記第 1 および第 2 のリンカー領域が、存在する場合、（G l y₄）_nモチーフ、（G l y₄ S e r）_nモチーフ（配列番号 19）、S e r（G l y₄ S e r）_nモチーフ（配列番号 22）、G G G G S G G G S G G G G S A L（配列番号 23）、G G G G S G G G G S G G G G S A（配列番

10

20

30

40

50

号 24)、およびそれらの組み合わせ(式中、 n は1、2、3、4、5、6、7、8、9および10からなる群から選択される正の整数である)を含有するリンカー領域からなる群から独立して選択される、請求項5～12のいずれか一項に記載のポリペプチドサブユニット。

【請求項14】

前記第1および第2のリンカー領域が、GGGGSGGGSGGGGS(配列番号25)、およびGGGGSGGGSGGGG(配列番号26)からなる群から独立して選択される、請求項13に記載のポリペプチドサブユニット。

【請求項15】

前記第1のリンカー領域がGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS(配列番号20)であり、かつ前記第2のリンカー領域が(Gly_4)モチーフである、請求項13または14に記載のポリペプチドサブユニット。

10

【請求項16】

前記IgGFcドメインが、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgG4PFcドメイン、またはその変異体を含む、請求項1～15のいずれか一項に記載のポリペプチドサブユニット。

【請求項17】

前記IgGFcドメインが、252Y、254T、256E、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される1つ以上のアミノ酸残基置換を有し、ここで前記残基はEU付番に従って付番される、請求項1～16のいずれか一項に記載のポリペプチドサブユニット。

20

【請求項18】

前記IgGFcドメインがCH2領域を含む、請求項1～17のいずれか一項に記載のポリペプチドサブユニット。

【請求項19】

前記IgGFcドメインがCH3領域をさらに含む、請求項18に記載のポリペプチドサブユニット。

【請求項20】

前記IgGFcドメインが、配列番号21に対して、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項19に記載のポリペプチドサブユニット。

30

【請求項21】

前記IgGFcドメインが配列番号21のアミノ酸配列を含む、請求項19に記載のポリペプチドサブユニット。

【請求項22】

前記三量体化ドメインが、 α -ヘリカルコイルドコイルドメイン、ロイシンジッパードメイン、またはそれらの組み合わせを含む、請求項1～21のいずれか一項に記載のポリペプチドサブユニット。

【請求項23】

前記三量体化ドメインが、マトリリン1、コロニン1a、筋強直性ジストロフィーキナーゼ(DMPK)、ランゲリン、またはそれらの組み合わせから誘導される、請求項22に記載のポリペプチドサブユニット。

40

【請求項24】

前記三量体化ドメインが、マトリリン1またはコロニン1aから誘導される、請求項23に記載のポリペプチドサブユニット。

【請求項25】

前記三量体化ドメインが、コロニン1aから誘導される、請求項24に記載のポリペプチドサブユニット。

【請求項26】

前記三量体化ドメインが、配列番号11に対して少なくとも85%、少なくとも90%

50

、少なくとも９５％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有するコロニン１α三量体化ドメインを含む、請求項２５に記載のポリペプチドサブユニット。

【請求項２７】

前記コロニン１α三量体化ドメインが配列番号１１のアミノ酸配列を含む、請求項２６に記載のポリペプチドサブユニット。

【請求項２８】

前記三量体化ドメインが、配列番号１０のコロニン１α三量体化ドメインを含む、請求項２６に記載のポリペプチドサブユニット。

【請求項２９】

前記コロニン１α三量体化ドメインが、配列番号１１、配列番号１２、配列番号１３、配列番号１４、配列番号１５、配列番号１６、配列番号１７、配列番号１８、またはその任意の組み合わせもしくは変異体のアミノ酸配列を含む、請求項２６に記載のポリペプチドサブユニット。

10

【請求項３０】

前記三量体化ドメインが、配列番号２８に対して、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有するマトリリン１三量体化ドメインを含む、請求項２４に記載のポリペプチドサブユニット。

【請求項３１】

前記三量体化ドメインが、配列番号３０に対して、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有するＤＭＰＫ三量体化ドメインを含む、請求項２３に記載のポリペプチドサブユニット。

20

【請求項３２】

前記三量体化ドメインが、配列番号３２に対して、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有するランゲリン三量体化ドメインを含む、請求項２３に記載のポリペプチドサブユニット。

【請求項３３】

前記三量体化ドメインが、配列番号２８、配列番号２９、配列番号３０、配列番号３１、配列番号３２、または配列番号３３のアミノ酸配列を含む、請求項２３に記載のポリペプチドサブユニット。

30

【請求項３４】

前記ＧＩＴＲＬ受容体結合ドメインが、配列番号３４に対して、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項１～３３のいずれか一項に記載のポリペプチドサブユニット。

【請求項３５】

前記ＧＩＴＲＬ受容体結合ドメインが、配列番号３７に対して、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、もしくは少なくとも９９％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、ここで残基１６１はアスパラギル残基ではない、請求項１～３３のいずれか一項に記載のポリペプチドサブユニット。

40

【請求項３６】

前記ＧＩＴＲＬ受容体結合ドメインが配列番号３５のアミノ酸配列を含む、請求項３５に記載のポリペプチドサブユニット。

【請求項３７】

前記ＧＩＴＲＬ受容体結合ドメインが配列番号３５のアミノ酸配列を含み、ここで残基１６１はアスパルチル残基である、請求項１～３３のいずれか一項に記載のポリペプチドサブユニット。

【請求項３８】

前記ＧＩＴＲＬ受容体結合ドメインが配列番号３６のアミノ酸配列を含む、請求項３７に記載のポリペプチドサブユニット。

50

【請求項 39】

前記 G I T R L 受容体結合ドメインが配列番号 37 のアミノ酸配列を含む、請求項 38 に記載のポリペプチドサブユニット。

【請求項 40】

6つの前記ポリペプチドサブユニットから構築される六量体タンパク質が、ヒト G I T R に特異的に結合し得る、請求項 1～39 のいずれか一項に記載のポリペプチドサブユニット。

【請求項 41】

前記タンパク質がグリコシル化されない、請求項 1～40 のいずれか一項に記載のポリペプチドサブユニット。

【請求項 42】

配列番号 6 に対して、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、もしくは少なくとも 99% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1～41 のいずれか一項に記載のポリペプチドサブユニット。

【請求項 43】

配列番号 6 のアミノ酸配列を含む、請求項 42 に記載のポリペプチドサブユニット。

【請求項 44】

アゴニスト活性を有する、請求項 1～43 のいずれか一項に記載のポリペプチドサブユニット。

【請求項 45】

関連の異種薬剤をさらに含む、請求項 1～44 のいずれか一項に記載のポリペプチドサブユニット。

【請求項 46】

前記異種薬剤が異種ポリペプチドであり、かつ前記ポリペプチドサブユニットとペプチド結合を介して融合される、請求項 45 に記載のポリペプチドサブユニット。

【請求項 47】

前記異種ポリペプチドが前記 I g G - F c ドメインの N 末端に融合されるか、G I T R L の前記受容体結合ドメインの C 末端に融合されるか、前記 I g G - F c ドメインの C 末端および前記三量体化ドメインの N 末端に融合されるか、または G I T R L の前記三量体化ドメインの C 末端および前記受容体結合ドメインの N 末端に融合される、請求項 46 に記載のポリペプチドサブユニット。

【請求項 48】

前記異種薬剤が、前記ポリペプチドサブユニットに化学的に結合される、請求項 45 に記載のポリペプチドサブユニット。

【請求項 49】

前記異種薬剤が、細胞傷害性分子、安定化剤、免疫応答修飾因子、または検出可能な薬剤を含む、請求項 45～48 のいずれか一項に記載のポリペプチドサブユニット。

【請求項 50】

請求項 1～49 のいずれか一項に記載の 3 つのポリペプチドサブユニットを含む三量体タンパク質。

【請求項 51】

請求項 1～49 のいずれか一項に記載の 6 つのポリペプチドサブユニットを含む六量体タンパク質。

【請求項 52】

ヒト、または非ヒト霊長類、任意選択的にはカニクイザル、アカゲザル、またはそれらの任意の組み合わせに由来する C D 4⁺もしくは C D 8⁺ T 細胞、B 細胞、または N K 細胞で発現されるようなグルコシルチコイド誘導 T N F 受容体 (G I T R) に特異的に結合し得、ここで前記 C D 4⁺もしくは C D 8⁺ T 細胞または B 細胞が任意選択的に抗原を経験するか、または前記 N K 細胞が任意選択的に活性化される、請求項 51 に記載の六量体タンパク質。

10

20

30

40

50

【請求項 5 3】

ヒト、または非ヒト霊長類、任意選択的にはカニクイザル、アカゲザル、またはそれらの任意の組み合わせに由来する一次CD4⁺もしくはCD8⁺T細胞で発現されるようなGITRに特異的に結合し得る、請求項52に記載の六量体タンパク質。

【請求項 5 4】

前記CD4⁺もしくはCD8⁺T細胞が抗原を経験する、請求項52または53のいずれか一項に記載の六量体タンパク質。

【請求項 5 5】

ヒトGITRに対する結合親和性が、動力学的排除アッセイによって測定されるとき、約54 nM～約111 nMである、請求項51または54に記載の六量体タンパク質。

10

【請求項 5 6】

前記結合親和性が、動力学的排除アッセイ（KinExA）において測定されるとき、約82 nMである、請求項55に記載の六量体タンパク質。

【請求項 5 7】

GITR陽性免疫細胞からの用量依存性増殖および用量依存性サイトカイン放出を誘導し得る、請求項51～56のいずれか一項に記載の六量体タンパク質。

【請求項 5 8】

前記GITR陽性免疫細胞が、プレートに基づくアッセイにおけるT細胞である、請求項57に記載の六量体タンパク質。

【請求項 5 9】

前記細胞が、CD4⁺、CD8⁺、NK、またはB細胞である、請求項52～58のいずれか一項に記載の六量体タンパク質。

20

【請求項 6 0】

前記GITR陽性免疫細胞、T細胞、CD4⁺、CD8⁺、またはB細胞が抗原を経験し、かつ／またはNK細胞が活性化される、請求項57～59のいずれか一項に記載の六量体タンパク質。

【請求項 6 1】

チミジン取り込みによって測定されるとき、約0.1～約2.7 nMのEC₅₀で、一次抗原を経験したヒトT細胞の増殖を刺激し得る、請求項60に記載の六量体タンパク質。

30

【請求項 6 2】

前記EC₅₀が約0.5 nMである、請求項61に記載の六量体タンパク質。

【請求項 6 3】

前記サイトカインが、IFN γ 、TNF α 、IL-5、IL-10、IL-2、IL-4、IL-13、IL-8、IL-12 p70、IL-1 β 、またはそれらの任意の組み合わせである、請求項57に記載の六量体タンパク質。

【請求項 6 4】

GITR発現細胞における下流シグナル伝達経路を活性化し得、任意選択的には前記下流シグナル伝達経路はNF κ B経路またはMAPK経路である、請求項51～63のいずれか一項に記載の六量体タンパク質。

40

【請求項 6 5】

前記GITR発現細胞がT細胞である、請求項64に記載の六量体タンパク質。

【請求項 6 6】

前記GITR発現T細胞が、前記NF κ Bシグナル伝達経路の刺激に応答してルシフェラーゼを生成する、GITRを発現するJurkat NF κ B-ルシフェラーゼレポーター細胞である、請求項64に記載の六量体タンパク質。

【請求項 6 7】

がん治療を必要とする被験者への有効用量の投与が、前記被験者における腫瘍成長を阻害し得る、請求項51～66のいずれか一項に記載の六量体タンパク質。

【請求項 6 8】

50

前記腫瘍成長阻害が、G I T R陽性免疫細胞、任意選択的にはT細胞またはN K細胞の存在下で達成される、請求項67に記載の六量体タンパク質。

【請求項69】

腫瘍成長が、アイソタイプに合致した対照の投与と比べて、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも100%阻害される、請求項67または68に記載の六量体タンパク質。

【請求項70】

前記ポリペプチドサブユニットが、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4またはI g G 4 P F cドメインを含み、かつG I T Rへの結合を通じてG I T Rを発現するC D 4⁺もしくはC D 8⁺T細胞の増殖およびサイトカイン活性化を誘導し得るが、C D 4⁺もしくはC D 8⁺T細胞に対する補体依存性または抗体依存性細胞傷害性を実質的に誘導しない、請求項51～69のいずれか一項に記載の六量体タンパク質。

10

【請求項71】

前記ポリペプチドサブユニットが、I g G 1 F cドメインを含み、かつ高レベルのG I T Rを発現する細胞に対してF c受容体依存性細胞傷害性を誘導する、請求項51～69のいずれか一項に記載の六量体タンパク質。

【請求項72】

前記ポリペプチドサブユニットが、I g G 2、I g G 3、I g G 4、またはI G 4 P F cドメインを含み、かつG I T Rへの結合を通じてG I T R発現細胞の増殖を誘導し得る、請求項51～69のいずれか一項に記載の六量体タンパク質。

20

【請求項73】

前記F c受容体依存性細胞傷害性が、抗体依存細胞傷害性または抗体依存性食作用である、請求項71に記載の六量体タンパク質。

【請求項74】

高レベルのG I T Rを発現する前記細胞が腫瘍細胞である、請求項71に記載の六量体タンパク質。

【請求項75】

高レベルのG I T Rを発現する前記細胞が、C D 4⁺F O X P 3⁺T細胞または抗原を経験したC D 4⁺F O X P 3⁻T細胞である、請求項71に記載の六量体タンパク質。

30

【請求項76】

対照と比べて、C D 4⁺F O X P 3⁺制御性T細胞の頻度における減少をもたらす、請求項71に記載の六量体タンパク質。

【請求項77】

対照と比べて、腫瘍内部のC D 4⁺F O X P 3⁺制御性T細胞の頻度における減少をもたらす、請求項71に記載の六量体タンパク質。

【請求項78】

請求項51～77のいずれか一項に記載の六量体タンパク質、および担体を含む組成物。

40

【請求項79】

請求項1～49のいずれか一項に記載のポリペプチドサブユニット、または請求項51～78のいずれか一項に記載の六量体タンパク質をコードする核酸を含むポリヌクレオチド。

【請求項80】

前記ポリペプチドサブユニットに作動可能に連結されるシグナルペプチドをコードする核酸配列をさらに含む、請求項79に記載のポリヌクレオチド。

【請求項81】

前記シグナルペプチドをコードする前記核酸が、前記ポリペプチドサブユニットの前記I g G F cドメインのアミノ末端をコードする核酸に作動可能に連結される、請求項8

50

0に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 8 2】

配列番号 5 を含む、請求項 7 9 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 8 3】

請求項 7 9 ～ 8 2 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 8 4】

請求項 7 9 ～ 8 2 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドまたは請求項 8 3 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 8 5】

請求項 1 ～ 4 9 のいずれか一項に記載のポリペプチドサブユニット、または請求項 5 1 ～ 7 7 のいずれか一項に記載の六量体タンパク質を産生する方法であって、請求項 8 4 に記載の宿主細胞を、前記ポリヌクレオチドまたはベクターによってコードされる前記ポリペプチドサブユニットまたは六量体タンパク質が発現される条件下で培養するステップと、前記ポリペプチドサブユニットまたは六量体タンパク質を回収するステップと、を含む、方法。

【請求項 8 6】

抗原を経験した T 細胞および／または NK 細胞の生存または増殖を促進するための方法であって、抗原を経験した T 細胞および／または NK 細胞を、請求項 5 1 ～ 7 7 のいずれか一項に記載の六量体タンパク質または請求項 7 8 に記載の組成物と接触させるステップを含み、ここで前記六量体タンパク質は前記 T 細胞および／または NK 細胞の表面上の G I T R に特異的に結合し得る、方法。

【請求項 8 7】

活性化された G I T R を発現する免疫細胞からのサイトカイン放出を誘導する方法であって、これらの細胞を、請求項 5 1 ～ 7 7 のいずれか一項に記載の六量体タンパク質または請求項 7 8 に記載の組成物と接触させるステップを含み、ここで前記六量体タンパク質はこれらの細胞の表面上の G I T R に特異的に結合し得る、方法。

【請求項 8 8】

前記サイトカインが、I F N γ 、T N F α 、I L - 1 0、G M - C S F、またはそれらの任意の組み合わせである、請求項 8 7 に記載の方法。

【請求項 8 9】

前記 G I T R を発現する免疫細胞が、抗原を経験した C D 4 ⁺ T 細胞、抗原を経験した C D 8 ⁺ T 細胞、活性化 NK 細胞またはそれらの組み合わせである、請求項 8 7 または 8 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9 0】

前記活性化 NK 細胞、抗原を経験した C D 4 ⁺ もしくは抗原を経験した C D 8 ⁺ T 細胞が、ヒト NK 細胞、C D 4 ⁺ もしくは C D 8 ⁺ T 細胞、カニクイザル NK 細胞、C D 4 ⁺ もしくは C D 8 ⁺ T 細胞、アカゲザル NK 細胞、C D 4 ⁺ もしくは C D 8 ⁺ T 細胞、またはそれらの組み合わせである、請求項 8 6 ～ 8 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9 1】

T 細胞または NK 細胞活性化を促進する方法であって、T 細胞または NK 細胞を、請求項 5 1 ～ 7 7 のいずれか一項に記載の六量体タンパク質または請求項 7 8 に記載の組成物と接触させるステップを含み、ここで前記六量体タンパク質は前記 T 細胞または NK 細胞の表面上の G I T R に特異的に結合し得る、方法。

【請求項 9 2】

前記六量体タンパク質を、前記 F c δ メインと F c γ R を発現する細胞との相互作用を通じて架橋するステップをさらに含む、請求項 9 1 に記載の方法。

【請求項 9 3】

F c γ R を発現する前記細胞が、B 細胞、単球、マクロファージ、骨髄もしくは形質細胞様樹状細胞、濾胞樹状細胞、ランゲルハンス細胞、内皮細胞、NK 細胞、好中球、好酸球、血小板、肥満細胞、一次ヒト腫瘍もしくは腫瘍灌流もしくは非灌流リンパ節に由来す

10

20

30

40

50

るCD4⁺細胞、他の二次もしくは三次リンパ様構造に由来するCD4⁺細胞、またはそれらの組み合わせである、請求項92に記載の方法。

【請求項94】

NK細胞またはT細胞活性化が、前記NFκBまたはMAPKシグナル伝達経路の刺激を通じて測定され得る、請求項91～93のいずれか一項に記載の方法。

【請求項95】

前記NKまたはT細胞が、活性化NK細胞、抗原を経験したCD4⁺T細胞、抗原を経験したCD8⁺T細胞、またはそれらの組み合わせである、請求項91～94のいずれか一項に記載の方法。

【請求項96】

前記NK細胞、CD4⁺もしくはCD8⁺T細胞が、一次ヒトNK細胞、CD4⁺もしくはCD8⁺T細胞、カニクイザルNK細胞、CD4⁺もしくはCD8⁺T細胞、アカゲザルNK細胞、CD4⁺もしくはCD8⁺T細胞、またはそれらの組み合わせである、請求項95に記載の方法。

【請求項97】

前記接触させるステップが、前記六量体タンパク質または前記六量体タンパク質を含む組成物を有効量で被験者に投与するステップを含む、請求項86～96のいずれか一項に記載の方法。

【請求項98】

被験者におけるがんを治療する方法であって、請求項51～77のいずれか一項に記載の六量体タンパク質、または請求項78に記載の組成物を有効量で治療を必要とする被験者に投与するステップを含む、方法。

【請求項99】

前記被験者がヒト被験者またはイヌ被験体である、請求項98に記載の方法。

【請求項100】

前記がんが固形腫瘍である、請求項98に記載の方法。

【請求項101】

前記固形腫瘍が、結腸直腸がん、乳がん、肝細胞がん、非小細胞肺がん、小細胞肺がん、中皮腫、頭頸部がん、胃がん、膵がん、黒色腫、ぶどう膜黒色腫、腎臓がん、卵巣がん、子宮頸がん、神経膠芽腫、睾丸がん、甲状腺がん、前立腺がん、および食道がんからなる群から選択されるがんに関連する、請求項100に記載の方法。

【請求項102】

前記がんが血液がんである、請求項98に記載の方法。

【請求項103】

前記血液がんが、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、および慢性骨髄性白血病からなる群から選択される、請求項102に記載の方法。

【請求項104】

前記六量体タンパク質または組成物の投与により、腫瘍成長が阻害され得るか、腫瘍減少が促進され得るか、またはその双方である、請求項98～103のいずれか一項に記載の方法。

【請求項105】

腫瘍成長阻害が、NK細胞またはT細胞の存在下で達成される、請求項98～104のいずれか一項に記載の方法。

【請求項106】

腫瘍成長が、GITRL受容体結合ドメインが欠如したアイソタイプに合致した対照の投与と比べて、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは100%阻害される、請求項104または請求項105に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 107】

前記六量体タンパク質が、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4またはIgG4PFcドメインを含み、かつ抗原を経験したGITR発現免疫細胞の増殖をGITRへの結合を通じて誘導し得るが、前記活性化免疫細胞に対する補体依存性または抗体依存性細胞傷害性を実質的に誘導しない、請求項98～106のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 108】

前記GITR発現免疫細胞が、CD4⁺T細胞、NK細胞、またはCD8⁺T細胞である、請求項107に記載の方法。

【請求項 109】

前記六量体タンパク質が、IgG1 Fcドメインを含み、かつ高レベルのGITRを発現する細胞のNK細胞および／またはマクロファージ媒介性の抗体依存細胞傷害性(ADCC)または抗体依存性細胞食作用を誘導する、請求項98～106のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 110】

高レベルのGITRを発現する前記細胞が腫瘍細胞である、請求項109に記載の方法。

【請求項 111】

高レベルのGITRを発現する前記細胞がCD4⁺FOXP3⁺T細胞である、請求項109に記載の方法。

【請求項 112】

前記六量体タンパク質が、対照と比べて、CD4⁺FOXP3⁺制御性T細胞の頻度における減少をもたらす、請求項111に記載の方法。

20

【請求項 113】

前記六量体タンパク質が、対照と比べて、腫瘍内部のCD4⁺FOXP3⁺制御性T細胞の頻度における減少をもたらす、請求項111に記載の方法。

【請求項 114】

被験者における免疫応答を増強する方法であって、それを必要とする被験者に請求項51～77のいずれか一項に記載の六量体タンパク質、または請求項78に記載の組成物を治療有効量で投与するステップを含む、方法。

【請求項 115】

前記被験者が、ヒト被験者またはイヌ被験体である、請求項114に記載の方法。

30

【請求項 116】

それを必要とする前記被験者ががんを有する、請求項115に記載の方法。

【請求項 117】

前記がんが固形腫瘍である、請求項116に記載の方法。

【請求項 118】

前記被験者が、結腸直腸がん、乳がん、肝細胞がん、非小細胞肺がん(NSCLC)、小細胞肺がん、中皮腫、頭頸部がん、胃がん、膵がん、黒色腫、ぶどう膜黒色腫、腎臓がん、卵巣がん、子宮頸がん、神経膠芽腫、睾丸がん、甲状腺がん、前立腺がん、食道がん、膀胱がん、頭頸部扁平上皮がん(SCCHN)、結腸直腸がん(CRC)、血液がん、またはそれらの組み合わせを有する、請求項114～117のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 119】

前記がんが血液がんである、請求項118に記載の方法。

【請求項 120】

前記血液がんが、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、および慢性骨髄性白血病からなる群から選択される、請求項119に記載の方法。

【請求項 121】

前記六量体タンパク質または組成物の投与により、腫瘍成長が阻害され得るか、腫瘍減

50

少が促進され得るか、またはその双方である、請求項 1 1 4 ~ 1 2 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 2 2】

腫瘍成長阻害が、NK細胞またはT細胞の存在下で達成される、請求項 1 1 4 ~ 1 2 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 2 3】

腫瘍成長が、GITRL受容体結合ドメインが欠如したアイソタイプに合致した対照の投与と比べて、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは100%阻害される、請求項 1 2 1 または 1 2 2 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 1 2 4】

前記六量体タンパク質が、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4またはIgG4PFcドメインを含み、かつ活性化されたGITR発現免疫細胞の増殖をGITRへの結合を通じて誘導し得るが、前記活性化免疫細胞に対する補体依存性または抗体依存性細胞傷害性を実質的に誘導しない、請求項 1 1 4 ~ 1 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 2 5】

前記GITR発現免疫細胞が、CD4⁺T細胞、NK細胞、またはCD8⁺T細胞である、請求項 1 2 4 に記載の方法。

【請求項 1 2 6】

前記六量体タンパク質が、IgG1 Fcドメインを含み、かつ高レベルのGITRを発現する細胞のNK細胞および／またはマクロファージ媒介性の抗体依存細胞傷害性(ADCC)または抗体依存性細胞食作用を誘導する、請求項 1 1 4 ~ 1 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 1 2 7】

高レベルのGITRを発現する前記細胞が腫瘍細胞である、請求項 1 2 6 に記載の方法。

【請求項 1 2 8】

高レベルのGITRを発現する前記細胞がCD4⁺FOXP3⁺T細胞である、請求項 1 2 6 に記載の方法。

30

【請求項 1 2 9】

前記六量体タンパク質が、対照と比べて、CD4⁺FOXP3⁺制御性T細胞の頻度における減少をもたらす、請求項 1 2 6 に記載の方法。

【請求項 1 3 0】

前記六量体タンパク質が、対照と比べて、腫瘍内部のCD4⁺FOXP3⁺制御性T細胞の頻度における減少をもたらす、請求項 1 2 6 に記載の方法。

【請求項 1 3 1】

被験者における固形腫瘍を治療する方法であって、請求項 1 に記載の単離された一本鎖ポリペプチドサブユニットおよびOX40アゴニストを前記被験者に投与するステップを含む、方法。

40

【請求項 1 3 2】

前記OX40アゴニストが、OX40リガンド融合タンパク質または抗OX40抗体の1つ以上である、請求項 1 3 1 に記載の方法。

【請求項 1 3 3】

前記OX40リガンド融合タンパク質がMED16383である、請求項 1 3 2 に記載の方法。

【請求項 1 3 4】

前記抗OX40抗体がMED10562である、請求項 1 3 2 に記載の方法。

【請求項 1 3 5】

被験者におけるがんを治療する方法であって、T細胞プライミング剤と組み合わせて、

50

請求項 51～77 のいずれか一項に記載の六量体タンパク質、または請求項 78 に記載の組成物を有効量で治療を必要とする被験者に投与するステップを含む、方法。

【請求項 136】

前記 T 細胞プライミング剤が、E7 合成ロングペプチド (SLP) に CpG オリゴデオキシヌクレオチドを加えたものである、請求項 136 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

電子的に提出された配列表の参照

本願とともに提出された、ASCII テキストファイル (名称 GITRLF-100P 2__ST25. txt; サイズ: 56, 159 バイト; および作成日: 2016 年 6 月 15 日) にて電子的に提出された配列表の内容は、その全体が参照により本明細書中に援用される。

【背景技術】

【0002】

TNFRSF18、AITR または CD357 としても公知のグルコルチコイド誘導腫瘍壊死因子受容体 (TNFR) 関連タンパク質 (GITR) は、制御性 T 細胞上に発現され、抗原を経験した CD4⁺ ヘルパー細胞および CD8⁺ 細胞傷害性 T 細胞ならびに活性化 NK 細胞上で上方制御される (Stephens et al. J. Immunol. (2004) 173 (8): 5008-5020; Clothier and Watts, Cytokine Growth Factor Rev. (2014))。GITR は、抗原曝露による T 細胞活性化を制御することに関与する受容体およびリガンドの複雑系の一部である。GITR は、緩い三量体型で存在し、GITR をクラスター化し、T 細胞内で強力な細胞シグナル伝達事象をもたらし得る、1 つの公知の内因性リガンド、GITR リガンド (GITRL) を有する (Chattopadhyay et al. (2007) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104 (49): 19452-19457)。GITR と GITRL との相互作用により、正の同時刺激性シグナルが T 細胞へ送達され、抗原曝露によるその増殖および活性化が増強され、メモリー細胞産生が促進され、制御性 T 細胞が再プログラム化されやすくなり、その抑制性機能が低下する (Clothier and Watts, Cytokine Growth Factor Rev. (2014) Jan 4; Schaer et al. Curr Opin Immunol. (2012))。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0003】

本開示は、ポリペプチドサブユニットに関し、各々は、融合ポリペプチドとして、GITR リガンド (GITRL) の受容体結合ドメイン、多量体化ドメイン、例えば三量体化ドメイン、および IgG Fc ドメインを含み、それらは安定な多量体タンパク質、例えば六量体タンパク質を形成する能力がある。がん免疫療法およびウイルス感染の治療にとって有用な組成物および方法が提供される。

【0004】

特定の態様では、IgG Fc ドメイン; 機能的多量体化ドメイン; およびグルコルチコイド誘導 TNF 受容体リガンド (GITRL) の受容体結合ドメインを含む、単離された一本鎖ポリペプチドサブユニットであって、三量体または六量体タンパク質に自己組織化し得る、ポリペプチドサブユニットが提供される。

【0005】

特定の態様では、IgG Fc ドメイン; 機能的多量体化ドメイン; およびグルコルチコイド誘導 TNF 受容体リガンド (GITRL) の受容体結合ドメインを各々含む、3 つの一本鎖ポリペプチドサブユニットを含む三量体タンパク質が提供される。

【0006】

10

20

30

40

50

特定の態様では、I g G F cドメイン；機能的多量体化ドメイン；およびグルコシルチコイド誘導T N F受容体リガンド（G I T R L）の受容体結合ドメインを各々含む、6つの一本鎖ポリペプチドサブユニットを含む六量体タンパク質が提供される。

【0007】

特定の態様では、六量体タンパク質および担体を含む組成物が提供される。

【0008】

特定の態様では、一本鎖ポリペプチドサブユニットまたは六量体タンパク質をコードする核酸を含むポリヌクレオチドが提供される。

【0009】

特定の態様では、一本鎖ポリペプチドサブユニットまたは六量体タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むベクターが提供される。

10

【0010】

特定の態様では、一本鎖ポリペプチドサブユニットまたは六量体タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むか、またはポリヌクレオチドを含むベクターを含む宿主細胞が提供される。

【0011】

特定の態様では、ポリペプチドサブユニットを生成するかまたは六量体タンパク質を生成する方法であって、ポリペプチドサブユニットまたは六量体タンパク質をコードするポリヌクレオチドまたはベクターを、ポリヌクレオチドまたはベクターによってコードされるポリペプチドサブユニットまたは六量体タンパク質が発現されるような条件下で含む宿主細胞を培養するステップと、ポリペプチドサブユニットまたは六量体タンパク質を回収するステップと、を含む、方法が提供される。

20

【0012】

特定の態様では、抗原を経験したT細胞および／または活性化N K細胞の生存または増殖を促進するための方法であって、抗原を経験したT細胞および／または活性化N K細胞を六量体タンパク質または組成物と接触させるステップを含み、ここで六量体タンパク質はT細胞および／またはN K細胞の表面上のG I T Rに特異的に結合し得る、方法が提供される。

【0013】

特定の態様では、活性化されたG I T Rを発現する免疫細胞からのサイトカイン放出を誘導する方法であって、これらの細胞を、六量体タンパク質または組成物と接触させるステップを含み、ここで六量体タンパク質はこれらの細胞の表面上のG I T Rに特異的に結合し得る、方法が提供される。

30

【0014】

特定の態様では、T細胞またはN K細胞活性化を促進する方法であって、T細胞またはN K細胞を、六量体タンパク質または組成物と接触させるステップを含み、ここで六量体タンパク質はT細胞またはN K細胞の表面上のG I T Rに特異的に結合し得る、方法が提供される。

【0015】

特定の態様では、被験者におけるがんを治療する方法であって、六量体タンパク質、または組成物を有効量で治療を必要とする被験者に投与するステップを含む、方法が提供される。

40

【0016】

特定の態様では、被験者における免疫応答を増強する方法であって、それを必要とする被験者に六量体タンパク質、または組成物を治療有効量で投与するステップを含む、方法が提供される。

【0017】

特定の態様では、被験者における固形腫瘍を治療する方法であって、上で開示される単離された一本鎖ポリペプチドサブユニットおよびO X 4 0アゴニストを被験者に投与するステップを含む、方法が提供される。

50

【0018】

別の態様では、被験者における固形腫瘍を治療する方法であって、上で開示される単離された一本鎖ポリペプチドサブユニットおよびT細胞プライミング剤を被験者に投与するステップを含む、方法が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】プロテインGおよびサイズ排除クロマトグラフィーを用いて精製された組換えGITRL融合タンパク質(FP)(マトリリン1 wt)およびGITRL FP(コロニン1a wt)タンパク質のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動分析。

【図2A-B】六量体GITRL FP変異体のGITRを発現するCHO細胞への結合特性を示すグラフ。

【図2C-D】六量体GITRL FP変異体のGITRを発現するCHO細胞への結合特性を示すグラフ。

【図3A-B】三量体GITRLのGITR-Fcへの結合に対する六量体GITRL FP変異体の競合での阻害特性を示すグラフ。

【図3C-D】三量体GITRLのGITR-Fcへの結合に対する六量体GITRL FP変異体の競合での阻害特性を示すグラフ。

【図4A-B】ヒトGITRが遺伝子導入されたNF-κBルシフェラーゼ遺伝子レポーター細胞株を用いてのGITRL FP分子の相対的効力を示すグラフ。

【図4C-D】ヒトGITRが遺伝子導入されたNF-κBルシフェラーゼ遺伝子レポーター細胞株を用いてのGITRL FP分子の相対的効力を示すグラフ。

【図5】(A-D)六量体GITRL FP(GCN4 pII)、GITRL FP(コロニン1a wt)、GITRL FP(ランゲリンwt)およびGITRL FP(ランゲリン変異体)のアンフォールディング転移。

【図6】溶出ピークのモル質量組成。グラフは、溶液中の多量体GITRL FPマトリリン-1タンパク質(点線)が、容易に同定可能でない主要な種とともに、612、312および215 kDaの重量-平均モル質量(左から右へ)を有する3種を形成することを示す。他方、多量体GITRL FP(コロニン1a wt; 破線)および多量体GITRL FP(GCN4 pII; 実線)タンパク質質量の90%超が単一のタンパク質種として溶出する。にもかかわらず、これらのピークは完全に単分散であるわけではなく、これはタンパク質に付着されるグリカンの異質性に起因する可能性が最も高い。

【図7】六量体GITRL FP分子の模式図。

【図8】代表的なGITRL IgG1融合ポリペプチドサブユニットのヌクレオチドおよび翻訳されたタンパク質配列。個別のドメインは、強調され、注釈付けられる。ECD=細胞外ドメイン; GITRL=グルコシルコイド誘導腫瘍壊死因子受容体リガンド; HA=ヘマグルチニン。図8の核酸配列は配列番号7として提供され、コードされる前駆体タンパク質配列は配列番号8として提供される。

【図9】還元されたGITRL IgG1 FPサブユニットにおけるデコンボリュートされたLC-QTOF MSスペクトル。四重極飛行時間型(QTOF)質量分析(LC-QTOF MS)と共役される液体クロマトグラフィーにより測定された、GITRL IgG1 FP単量体サブユニット(配列番号6)の正確な質量は、Fcドメイン内の基準のグリコシル化部位で1鎖あたり1つの二分岐グリカン(主にG0f)の付加を伴う予想されるアミノ酸配列に一致する。

【図10】ユーロピウムクリプテートに複合されたヒトGITR-Fcが、均一時間分解蛍光アッセイにおいてhGITRL-HAに結合する。IgG1アイソタイプ対照抗体の適定では、この結合は阻害されない。配列番号6で示されるアミノ酸配列を有する単量体サブユニットを含む六量体GITRL IgG1 FPは、hGITRとhGITRLとの間の結合を0.562 nMの50%阻害濃度(IC₅₀)で阻害する。実験は2連ウェルで実行された。エラーバーは平均の標準誤差を表す。GITR(L)=グルコシルコイド誘導腫瘍壊死因子受容体(リガンド)。

10

20

30

40

50

【図11】六量体G I T R L F Pは、G I T R受容体の強力なアゴニストである。被験物質が、h G I T RおよびN F κ Bプロモーターに連結されたルシフェラーゼレポーター遺伝子が遺伝子導入されたJ u r k a t細胞に、指定される濃度で溶液へ添加された。発光として測定されたルシフェラーゼ活性が3時間後に判定された。配列番号6で示されるアミノ酸配列を有する単量体サブユニットを含む六量体G I T R L I g G 1 F Pまたは配列番号40で示されるアミノ酸配列を有する単量体サブユニットを含む六量体G I T R L I g G 4 P F Pが、発光における濃度依存的増加をもたらした。この効果に関連する六量体G I T R L I g G 1 F PのE C ₅₀は182 pMであった。この効果に関連する六量体G I T R L I g G 4 P F PのE C ₅₀は289 pMであった。アイソタイプ対照抗体は効果を全く有しなかった。実験は3連ウェルで実行された。エラーバーは平均の標準誤差を表す。 10

【図12】六量体G I T R L F Pは、抗C D 3および抗C D 28に応答して一次ヒトT細胞の増殖を増強する。抗C D 3および抗C D 28に応答した一次ヒトT細胞の増殖は、配列番号6で示されるアミノ酸配列を有する単量体サブユニットを含むプレートに結合した六量体G I T R L I g G 1 F Pまたは配列番号40で示されるアミノ酸配列を有する単量体サブユニットを含む六量体G I T R L I g G 4 P F Pの添加によって増強された。効果は濃度依存的であり、G I T R L I g G 1 F PにおけるE C ₅₀は0.3 nMであり、G I T R L I g G 4 P F PにおけるE C ₅₀は0.5 nMであった。アイソタイプ対照抗体の添加は全く効果を有しなかった。実験は3連ウェルで実行された。エラーバーは平均の標準誤差を表す。 20

【図13】抗C D 3および抗C D 28に応答した一次ヒトT細胞によるI F N - γの放出は、配列番号6で示されるアミノ酸配列を有する単量体サブユニットを含むプレートに結合した六量体G I T R L I g G 1 F Pまたは配列番号40で示されるアミノ酸配列を有する単量体サブユニットを含む六量体G I T R L I g G 4 P F Pの添加によって増強された。効果は濃度依存的であり、G I T R L I g G 1 F PにおけるE C ₅₀は0.6 nMであり、G I T R L I g G 4 P F PにおけるE C ₅₀は0.8 nMであった。アイソタイプ対照抗体の添加は全く効果を有しなかった。実験は3連ウェルで実行された。エラーバーは平均の標準誤差を表す。

【図14】六量体G I T R L I g G 1 F Pは、NK細胞による一次ヒトT細胞のA D C Cを媒介する。抗原を経験した一次ヒトT細胞は、蛍光標識され、一次ヒトNK細胞と1つのT細胞に対する32のNK細胞の比で混合された。被験物質が指定のように添加され、24時間のインキュベーション後、T細胞の%溶解が計算された。配列番号6で示されるアミノ酸配列を有する単量体サブユニットを含む六量体G I T R L F P I g G 1は、溶解の百分率における増加をもたらす。効果は濃度依存的であり、E C ₅₀は239 pMであった。負の対照、配列番号40で示されるアミノ酸配列を有する単量体サブユニットを含む六量体G I T R L I g G 4 P F Pは、T細胞の百分率溶解における増加を全くもたらさなかった。 30

【図15】六量体G I T R L I g G 1 F Pによって媒介されるA D C Cは、増加したC D 8 : C D 4 T細胞比の生成を支持する。抗原を経験した一次ヒトT細胞は、蛍光標識され、一次ヒトNK細胞と1つのT細胞に対する32のNK細胞の比で混合された。被験物質が指定のように添加され、24時間のインキュベーション後、全T細胞集団内に存在するC D 4⁺およびC D 8⁺T細胞の百分率がフローサイトメトリーによって評価された。配列番号6で示されるアミノ酸配列を有する単量体サブユニットを含む六量体G I T R L I g G 1 F Pは、C D 8 : C D 4 T細胞比における濃度依存的変化をもたらす、それはC D 8 T細胞を支持する。 40

【図16】六量体G I T R L I g G 1 F Pは、エフェクターT細胞増殖の制御性T細胞媒介性抑制を克服する。分裂したC D 4⁺C D 25⁻エフェクターT細胞の百分率は、抗C D 3および抗C D 28抗体での5日間の刺激後、フローサイトメトリーによって分析された。分裂細胞の百分率は、増加する数のT - r e gの存在下で減少した。プレートに結合したアイソタイプ対照の添加により、分裂細胞の百分率がさらに減少した。配列番号 50

6で示されるアミノ酸配列を有する単量体サブユニットを含むプレートに結合した六量体 G I T R L I g G 1 F P の指定される濃度での添加により、分裂細胞の百分率が、T - r e g の不在下で認められる百分率までに回復した。エフェクター単独を用いる実験は、単一のウェル内で行われた。すべての他の実験は2連ウェルで実行された。エラーバーは平均の標準誤差を表す。

【図17】m G I T R L F P で治療されたマウスの生存はアイソタイプ依存性である。マウスは、C T 2 6 細胞の皮下移植後の6日目から23日目にかけて毎日、m G I T R L F P m I g G 2 a または m G I T R L I g G 1 F P のいずれも5もしくは10 m g / k g での腹腔内投与によって治療された。生理食塩水は、負の対照として投与された。

10

【図18】m G I T R L F P は、T細胞の増殖の増加をもたらす。K i 6 7 の発現は、単回用量として0.2 m g / k g もしくは1 m g / k g のいずれかの m G I T R L F P を用いる治療後の7日目、脾臓T細胞内でフローサイトメトリーによって測定された。丸を伴う黒色ライン=C D 8 T細胞；四角を伴う暗灰色ライン=C D 4 ⁺ F O X P 3 ⁻；三角を伴う明灰色ライン=C D 4 ⁺ F O X P 3 ⁺細胞。有意性は、スチューデントt検定（* p < 0.05；** p < 0.01，*** p < 0.001，**** p < 0.0001）を用いて計算された。

【図19】m G I T R L F P は、T細胞上での活性化マーカー I C O S の発現の増加をもたらす。I C O S の発現は、単回用量として0.2 m g / k g もしくは1 m g / k g の m G I T R L F P を用いる治療後の7日目、脾臓T細胞内でフローサイトメトリーによって測定された。丸を伴う暗灰色ライン=C D 8 T細胞；四角を伴う黒色ライン=C D 4 ⁺ F O X P 3。有意性は、スチューデントt検定（* p < 0.05；** p < 0.01，*** p < 0.001，**** p < 0.0001）を用いて計算された。m G I T R L F P を用いる治療は、腫瘍内部でのC D 4 ⁺ F O X P 3 ⁺制御性T細胞およびC D 4 ⁺ F O X P 3 ⁻ヘルパー細胞の頻度における減少をもたらしたが、C D 8 ⁺細胞傷害性T細胞の頻度を変化させなかった。結果全体は、腫瘍微小環境内部でのC D 8 : C D 4 比の増加であった。

20

【図20】m G I T R L F P は、腫瘍内部でのC D 8 : C D 4 比の増加をもたらす。C D 8 T細胞（丸を伴う黒色ライン）；C D 4 ⁺ F O X P 3 ⁻細胞（四角を伴う暗灰色ライン）；C D 4 ⁺ F O X P 3 ⁺細胞（三角を伴う明灰色ライン）の頻度は、単回用量として0.2 m g / k g もしくは1 m g / k g のいずれかの m G I T R L F P を用いる治療後の7日目、腫瘍内部でフローサイトメトリーによって測定された。有意性は、スチューデントt検定（* p < 0.05；** p < 0.01，*** p < 0.001，**** p < 0.0001）を用いて計算された。

30

【図21】六量体 h G I T R L I g G 1 F P がヒトおよびカニクイザル G I T R - F c に結合することを示す E L I S A データ。配列番号6で示されるアミノ酸配列を有する単量体サブユニットを含むビオチン化六量体 h G I T R L I g G 1 F P の組換えヒトおよびカニクイザル (c y n o) G I T R への結合。C D 1 3 7 - F c は、アッセイにおけるバックグラウンドシグナルを決定するための負の対照として用いられた。実験は3連ウェルで実行された。エラーバーは標準偏差を表す。C D 1 3 7 = 表面抗原分類 1 3 7 (T N F R S F 9)；C D 1 3 7 - F c = h I g G 1 の F c ドメインに連結された表面抗原分類 1 3 7 細胞外ドメイン；C y n o = カニクイザル；E L I S A = 酵素結合免疫吸着測定；G I T R - F c = h I g G 1 の F c ドメインに連結されたグルコシルチコイド誘導腫瘍壊死因子受容体細胞外ドメイン；O D 4 5 0 n M = 4 5 0 n M の波長での光学密度読み取り値。

40

【図22】六量体 h G I T R L I g G 1 F P で治療されるカニクイザルにおける % K I 6 7 陽性T細胞亜集団の測定。カニクイザルは、% K I 6 7 陽性T細胞亜集団のベースラインレベルについて20日間監視され、0日目に媒体対照（丸）、1 m g / k g の h G I T R L I g G 1 F P （三角）、または10 m g / k g の h G I T R L I g G 1 F P （四角）のいずれかで治療され、次に1、3、5、9、11、15、18、22、お

50

よび29日目に%KI67陽性T細胞亜集団について監視された。

【図23】(A-B)三量体hGITRLのhGITR-Fcへの結合に対するhGITRL-FPタンパク質の競合についての阻害特性およびIC₅₀値。hGITRL-FP wt、N92DおよびN104D(A)ならびにhGITRL-FP、N161D(B)。

【図24】hGITRL-FPタンパク質のhGITR-Fcへの結合における結合特性およびK_d値。

【図25A】ヒトGITR遺伝子が導入されたNF-κBルシフェラーゼ遺伝子レポーター細胞株を用いてのGITRL-FP分子の相対的効力およびEC₅₀値を示すグラフ。hGITRL-FP wtおよびN92D(A)；hGITRL-FP wt、N161D、N129AおよびN129A/N161D(B)；N161DおよびN129A/N161D(C)。

10

【図25B-C】ヒトGITR遺伝子が導入されたNF-κBルシフェラーゼ遺伝子レポーター細胞株を用いてのGITRL-FP分子の相対的効力およびEC₅₀値を示すグラフ。hGITRL-FP wtおよびN92D(A)；hGITRL-FP wt、N161D、N129AおよびN129A/N161D(B)；N161DおよびN129A/N161D(C)。

【図26A】チミジン取り込みの読み取りを伴うヒト一次CD3⁺T細胞再刺激アッセイを用いてのGITRL-FP分子の相対的効力を示すグラフ。hGITRL-FP wtおよびN92D(A)；hGITRL-FP wt、N92DおよびN104D(B)；wtおよびN161D(C)。

20

【図26B】チミジン取り込みの読み取りを伴うヒト一次CD3⁺T細胞再刺激アッセイを用いてのGITRL-FP分子の相対的効力を示すグラフ。hGITRL-FP wtおよびN92D(A)；hGITRL-FP wt、N92DおよびN104D(B)；wtおよびN161D(C)。

【図26C】チミジン取り込みの読み取りを伴うヒト一次CD3⁺T細胞再刺激アッセイを用いてのGITRL-FP分子の相対的効力を示すグラフ。hGITRL-FP wtおよびN92D(A)；hGITRL-FP wt、N92DおよびN104D(B)；wtおよびN161D(C)。

【図27】GITRL-FP wtおよびN92D変異体のアンフォールディング転移。

30

【図28】チャイニーズハムスター卵巣細胞内で産生されるhGITRL-FP中に見出される主要なオリゴ糖構造；複合型(A)；高マンノース(B) Man=マンノース；GlcnAc=N-アセチルグルコサミン；Fuc=フコース；Gal=ガラクトース；NANA=N-アセチルノイラミン酸(シアル酸)。

【図29A】GITRL-FPのペプチドマッピング。GITRL-FP wt(Ai)およびGITRL-FP N161D(Aii)における、Fc N-グリコシル化部位を含むトリプシンペプチド7(T7)における抽出されたイオンクロマトグラム。GITRL-FP wt(Aiii)およびGITRL-FP N161D(Aiv)における主要なグリコフォームを示す、T7における組み合わされたデコンボリュートされた質量スペクトル。GITRL-FP wt(Bi)およびGITRL-FP N161D(Bii)における、GITRL-ECN129 N-グリコシル化コンセンサス配列を含むトリプシンペプチド40(T40)における抽出されたイオンクロマトグラム。GITRL-FP wt(Biii)およびGITRL-FP N161D(Biv)における、N129でのN-グリコシル化の不在に合致する質量を示す、T40における組み合わされたデコンボリュートされた質量スペクトル。GITRL-FP wt(Ci)およびGITRL-FP N161D(Cii)におけるトリプシンペプチド42~43(T42~43)および43(T43)の各々における抽出されたイオンクロマトグラム。GITRL-ECN161 N-グリコシル化部位での主要なグリコフォームを示す、GITRL-FP wt(Ciii)におけるT42~43における組み合わされたデコンボリュートされた質量スペクトル。N161D置換およびN-グリコシル化の不在を確

40

50

認する質量を示す、GITRL-FP-N161D (Civ) におけるT43における組み合わされたデコンボリュートされた質量スペクトル。

【図29B】図29Aの続き。

【図29C】図29Aの続き。

【図30】(A-C) マウスGITRLリガンド融合タンパク質の構造およびアゴニストとしての可能性。(A) N末端からC末端にかけて、免疫グロブリンG1 (IgG1) もしくは2a (IgG2a) の結晶性断片 (Fc) 領域、多量体化ドメイン (MD) およびマウスGITRLリガンドの細胞外 (GITRL結合) ドメイン (ECD) からなるマウスGITRL-FPの模式図。(B) 精製されたマウスGITRL-FPのSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法。(C) mGITRL-FP、DTA-1 rIgG2bアイソタイプ対照またはmOX40L-FPによる治療後の、マウスGITR受容体が形質導入されたJurkat細胞株におけるNF-κBに関連する発光。データは、少なくとも2つの独立実験を代表する。

【図31A-C】網羅的なFcγRの会合が抗腫瘍活性を増強するが、GITRの下流でのT細胞増殖の増加を駆動しない。(A) Balb/cマウスにおける腫瘍成長。マウスは、指定のように、生理食塩水対照、mGITRL-FP mIgG1またはmGITRL-FP mIgG2aの腹腔内注射により、1回治療された。退縮数は個別の各グラフで示される。(B) CT26腫瘍保有マウスの治療後4日にわたる脾臓T細胞内でのKi67発現の頻度。(C) 腫瘍内T細胞サブセットの頻度および(D) 指定のように、10mg/kgのmGITRL-FPまたは生理食塩水対照によるCT26腫瘍保有マウスの治療後4日にわたる腫瘍内CD8⁺対CD4⁺FOXP3⁺細胞の比。(B) および(C) においては、二元分散分析による計算によると、**p<0.005, ***p<0.001および****p<0.0001; Cにおける有意性は、CD4⁺FOXP3⁺細胞における変化として黒色であり、CD4⁺FOXP3⁻細胞における変化として灰色である。

【図31D-E】網羅的なFcγRの会合が抗腫瘍活性を増強するが、GITRの下流でのT細胞増殖の増加を駆動しない。(C) 腫瘍内T細胞サブセットの頻度および(D) 指定のように、10mg/kgのmGITRL-FPまたは生理食塩水対照によるCT26腫瘍保有マウスの治療後4日にわたる腫瘍内CD8⁺対CD4⁺FOXP3⁺細胞の比。

(E) 治療後4日にわたる脾臓および腫瘍内T細胞サブセットでのGITR発現の中央値蛍光強度。エラーバーは平均の標準誤差を示す(n=7~10マウス/群)。(D) においては、一元分散分析による計算によると、*P<0.05; (E) においては、シュートメントt検定による計算によると、****p<0.0001。

【図32】(A-B) mGITRL-FP mIgG2aまたはmIgG1による治療後の腫瘍内T-reg 枯渇およびCD4⁺FOXP3⁻:T-reg比。CT26腫瘍保有マウスに、生理食塩水対照、mGITRL-FP mIgG1 (10mg/kg) またはmGITRL-FP mIgG2a (10mg/kg) のいずれかが、CT26移植後の6日目、腹腔内に1回注射された。(A) 治療後4日にわたる腫瘍内のCD4⁺FOXP3⁺T-regの割合を示すフローサイトメトリプロット。CD4⁺FOXP3⁺フローサイトメトリ分析ゲートは、FOXP3蛍光-1つの(FMO) 対照に基づいて位置づけられる。(B) 腫瘍内CD4⁺FOXP3⁻:T-reg比が、指定のように治療後4日目に測定された。統計学的分析が一元分散分析を用いて実施された(****はP値<0.0001を示す)。

【図33A-B】マウスGITRL-FP mIgG2aは、用量およびスケジュールに依存する様式で抗腫瘍活性を媒介する。Balb/cマウスにおける腫瘍成長。マウスは、(A) 指定の用量レベルでのmGITRL-FP mIgG2aの単回用量または(B) 毎日[Q1D]または毎週[Q1W]に投与される0.2mg/kgのmGITRL-FP mIgG2aの複数回用量の腹腔内注射によって治療された。

【図33C】(C) mGITRL-FPの、指定される用量およびスケジュールを用いての投与後の予測される血清濃度。点線は、最大抗腫瘍活性を達成するのに必要とされるm

10

20

30

40

50

G I T R L - F P m I g G 2 a の血液濃度閾値を示す。

【図 3 4】 (A-D) マウス G I T R L - F P m I g G 2 a は、用量およびスケジュールに依存する様式での T 細胞増殖および活性化における P D 変化を媒介する。3 日毎 [Q 3 D] または毎日 [Q 1 D] に 1 回の 0. 2 m g / k g または 1 m g / k g の m I g G 2 a m G I T R L - F P による治療後 7 日にわたる C T 2 6 腫瘍保有マウスの腫瘍流入リンパ節における (A) K i 6 7、(B) I C O S、(C) P D - 1 および (D) O X 4 0 陽性 C D 4 + T 細胞の頻度。エラーバーは 7 ~ 8 マウス / 群からの平均値の標準誤差を示す。一元分散分析による計算によると、* p < 0. 0 5, ** p < 0. 0 1 *** p < 0. 0 0 1, **** p < 0. 0 0 0 1。

【図 3 5】 (A-B) マウス O X 4 0 リガンド融合タンパク質の結合および効力特性。(A) m G I T R L - F P m I g G 1 および m I g G 2 a の各々が、組換えマウス O X 4 0 - F c に対してでなく、組換えマウス G I T R - F c (黒色バー) に特異的に結合することと、m O X 4 0 L - F P m I g G 1 および m I g G 2 a の各々が、組換えマウス G I T R に対してでなく、組換えマウス O X 4 0 (灰色バー) に特異的に結合することを示す結合 E L I S A。m O X 4 0 L - F P Y 1 8 2 A アイソタイプ対照は、組換えマウス O X 4 0 - F c に最小限に結合する。(B) m O X 4 0 L - F P m I g G 1 (黒色丸) または Y 1 8 2 A アイソタイプ対照 (白色丸) の J u r k a t ヒト O X 4 0 N F - κ B レポーター細胞株上のヒト O X 4 0 への結合。レポーターアッセイにおいて、マウス O X 4 0 L - F P m I g G 1 は N F κ B シグナル伝達を誘導したが、これは m O X 4 0 L - F P Y 1 8 2 A アイソタイプ対照においては明白でなかった。

【図 3 6 A】 m G I T R L - F P の抗腫瘍活性は、C T 2 6 モデルにおいて m O X 4 0 L - F P の場合よりも優れる。(A) B a l b / c マウスにおける腫瘍成長。マウスは、5 m g / k g の m I g G 2 a または m I g G 1 の m G I T R L - F P または m O X 4 0 L - F P、5 m g / k g の m I g G 1 融合タンパク質アイソタイプ対照または生理食塩水の腹腔内注射で週 2 回治療された。全退縮の数が個別の各グラフで示される。

【図 3 6 B】 (B) 指定のように治療後 1 0 日目の C T 2 6 腫瘍保有 B a l b / c マウスにおける腫瘍内 C D 4 +、F O X P 3 + T - r e g の頻度。

【図 3 7】 (A-E) m G I T R L - F P m I g G 2 a および m O X 4 0 L - F P m I g G 1 によって媒介される薬力学 (P D) 変化は、差次的であり、組み合わせを通じて増強され得る。2 5 m g / k g の m G I T R L - F P m I g G 2 a、1 5 m g / k g の m O X 4 0 L - F P m I g G 1 または両分子の組み合わせのいずれかによる週 2 回治療後の 1 4 日にわたる C T 2 6 腫瘍保有マウスの脾臓における (A) C D 4 + F O X P 3 - もしくは C D 8 +、K i 6 7 + (B) C D 4 + もしくは C D 8 +、C D 4 4 + C D 6 2 L L o / - エフェクターメモリー、(C) C D 4 + C D 4 4 + C D 6 2 L + セントラルメモリー、(D) C D 4 + もしくは C D 8 +、T - b e t + および (E) C D 4 + E O M E S + T 細胞の頻度。一元分散分析による計算によると、* p < 0. 0 5, ** p < 0. 0 1 *** p < 0. 0 0 1, **** p < 0. 0 0 0 1。

【図 3 8】 (A-B) m G I T R L - F P m I g G 2 a および m O X 4 0 L - F P m I g G 1 の組み合わせが、B 1 6 F 1 0 - L u c 2 および C T 2 6 腫瘍保有マウスにおいて抗腫瘍活性の増強を誘導するように協同する。B 1 6 F 1 0 - L u c 2 および C T 2 6 腫瘍保有マウスにおける腫瘍成長。(A) B 1 6 F 1 0 - L u c 2 腫瘍保有マウスに、生理食塩水、2 週間、隔週での 2 5 m g / k g の m G I T R L - F P m I g G 2 a、3 週間、隔週での 1 5 m g / k g の m O X 4 0 L - F P m I g G 1、または両分子の組み合わせが腹腔内投与され、腫瘍成長が測定された。(B) C T 2 6 腫瘍保有マウスは、非治療であるか、またはアイソタイプ対照、2 用量、週 2 回での 7. 5 m g / k g の m O X 4 0 L - F P m I g G 1、単一準最適用量での 0. 1 m g / k g の m G I T R L - F P m I g G 2 a もしくは両分子の組み合わせの腹腔内注射によって治療された。全退縮の数が個別の各グラフの横に示される。

【図 3 9】 m G I T R L - F P m I g G 2 a および m O X 4 0 L - F P m I g G 1 の組み合わせは、単独療法治療と比べて、B 1 6 F 1 0 - L u c 2 腫瘍を有するマウスの生

存の増加を誘導する。B16F10-Luc2腫瘍保有マウスに、生理食塩水、2週間、隔週での25mg/kgのmGITRL-FP mIgG2a、3週間、隔週での15mg/kgのmOX40L-FP mIgG1、または両分子の組み合わせが腹腔内投与され、生存が測定された。***はP値<0.001を示し、**はP値<0.01を示し、かつ*はP値<0.05を示す場合のログランク検定。

【図40A-B】(A)CT26細胞が 5×10^5 個の細胞/マウスでBalb/Cマウスに皮下移植された。マウスは6日目に腫瘍体積により無作為化され、投与が開始された(群n=マウス10匹)。マウスに、mGITRL-FP IgG2aが(B)単回用量または(C)一日おきに9用量(Q2D×9)のいずれかで腹腔内投与された。それらは、5、1、0.5、0.2、0.1および0.04mg/kgで投与された。示されるデータは、2回の反復実験を代表する。

【図40C-E】マウスに、mGITRL-FP IgG2aが(B)単回用量または(C)一日おきに9用量(Q2D×9)のいずれかで腹腔内投与された。それらは、5、1、0.5、0.2、0.1および0.04mg/kgで投与された。示されるデータは、2回の反復実験を代表する。(D)11日目、マウスは腫瘍サイズに基づいて無作為化され、全く治療されないか、DTA-1(抗GITR mAb)で治療されたか、またはmGITRL-FPで治療された(群n=9)。(E)マウスは、CD8T細胞が8、10、12、14、および16日目に枯渇した。11日目、マウスは腫瘍サイズに基づいて無作為化され、全く治療されないか、DTA-1で治療されたか、またはmGITRL-FP IgG2aで治療された。

【図40F-G】(F)中央値生存。(G)18日目、脾臓および腫瘍におけるCD8T細胞およびTregでのGITR発現を試験するため、CT26腫瘍を有する非治療マウスは屠殺された。

【図41A-C】(A)CT26細胞が 5×10^5 個の細胞/マウスで、Balb/Cマウスに皮下移植された。10日目、マウスは腫瘍体積によって無作為化され、投与が開始された。マウスに、全部で4用量、隔週でmGITRL-FP IgG2aが腹腔内投与された。18日目、(B)Treg、(C)CD8T細胞を試験するため、マウスは屠殺された。

【図41D-H】(D)マウス脾臓および腫瘍は、10μg/mLのAH1ペプチド/タンパク質輸送阻害剤で5時間再刺激され、IFNγおよびTNFαについて染色された。(E)CD8細胞上でのGITR発現。(F)脾臓、リンパ節、および腫瘍におけるTreg上でのGITR発現。(G)CD4T細胞上でのKI-67。(H)CD8T細胞上でのKI-67。

【図42A-B】mGITRL-FPは、抗原特異的T細胞を用量依存的様式で拡大する。(A)単回用量のmGITRL-FP IgG2aで治療されたCT26腫瘍保有マウスは、腫瘍が除去され、85日目[R矢印]に 5×10^5 個のCT26細胞/マウスを再負荷することから保護される。(B)CT26の再負荷後120日目[PD矢印]、マウス脾臓が収集され、単一細胞に処理され、10μg/mLのAH1ペプチド/タンパク質輸送阻害剤で5時間再刺激された。マウスは、AH1特異的T細胞における用量依存的増加を有した。

【図42C】(C)各群からのマウス5匹の代表的プロット。比較のため、ナイーブマウスおよびCT26腫瘍を有する非治療マウス(10日目)が含まれる。

【図43】(A-D)(A)-(B)TC-1細胞が 2×10^4 個の細胞/マウスで、C57BL/6マウスの足蹠に移植された。14日目、マウスは腫瘍体積によって無作為化され、投与が開始された。マウスに、全部で4用量のmGITRL-FP IgG2aが隔週で腹腔内投与された。24日目、(C)Treg上でのGITR発現およびCD8T細胞上でのGITR発現を試験するため、非治療マウスを屠殺した。マウスをE7特異的T細胞について評価し、E7再刺激またはデキストラマーにより何も検出されなかった。

【図44A-C】(A)E7特異的T細胞を作製するため、ナイーブC57BL/6マウスの尾の付け根に、CpG(Addavax)中、10ugのE7 SLPを注射した。

次に、マウスは、3用量、1 mg/kgのmGITRL-FPIgG2aで治療された。マウスは、脾臓の(B)CD4T細胞(C)CD8T細胞(D)E7デキストラマー+T細胞(E)Treg、(F)抗原特異的細胞上のGITRレベルについて評価された。

【図44D-F】マウスは、脾臓の(B)CD4T細胞(C)CD8T細胞(D)E7デキストラマー+T細胞(E)Treg、(F)抗原特異的細胞上のGITRレベルについて評価された。

【図44G-I】(G)TC-1細胞が 2×10^4 個の細胞/マウスで、C57BL/6マウスの足蹠に移植された。14日目、マウスは腫瘍体積によって無作為化され、投与が開始された。C57BL/6マウスの尾の付け根に、CpG(Addavax)中、100 µgのE7SLPが注射された。28日目、マウスは屠殺された。脾臓および腫瘍が、(H)-(I)E7および特異的CD8T細胞(J)-(K)について評価された。

【図44J-K】脾臓および腫瘍が、(H)-(I)E7および特異的CD8T細胞(J)-(K)について評価された。

【図45A-C】(A)TC-1細胞が 2×10^4 個の細胞/マウスで、C57BL/6マウスの足蹠に移植された。14日目、マウスは腫瘍体積によって無作為化され、投与が開始された。(B)ワクチン接種C57BL/6マウスの尾の付け根に、CpG(Addavax)中、3.3 µgのE7SLPが注射された。治療されたマウスに、全部で4用量のGITRL-FPIgG2aが隔週で腹腔内投与された。(C) $P < 0.05$ でのTC-1移植後のマウスの Kaplan-Meier 生存。

【図45D-F】(D)群の中央値生存。(E)薬力学的効果を試験するため、(A)と治療されたマウス群は屠殺され、脾臓および腫瘍が収集された。腫瘍はプールされ、脾臓は個体として残された。(F)腫瘍内のCD45⁺細胞が評価された。

【図45G】(G)マウスの脾臓および腫瘍が、1 µg/mLのE7ペプチド/タンパク質輸送阻害剤で5時間再刺激され、IFN γ およびTNF α について染色され、脾臓および腫瘍のTregが測定された。

【発明を実施するための形態】

【0020】

抗原による予備刺激の間またはその直後でのT細胞、例えばCD4⁺T細胞もしくはCD8⁺T細胞上のGITR受容体の会合の結果、T細胞、例えばCD4⁺T細胞もしくはCD8⁺T細胞の抗原に対する応答が増強する。例えば活性化シグナル(例えば、抗原曝露)による予備刺激の間またはその直後でのNK細胞またはB細胞上のGITR受容体の会合の結果、NK細胞またはB細胞の応答が増強する。本開示との関連では、用語「会合」は、GITR受容体への結合およびGITR受容体によって媒介される少なくとも1つの活性の刺激を指す。例えば、抗原特異性のあるもの、例えば、CD4⁺T細胞もしくはCD8⁺T細胞上のGITR受容体の会合の結果、抗原単独に対する応答と比べて、T細胞増殖が増強され、かつサイトカイン産生が増加する。抗原に対する増強された応答は、GITR受容体会合の不在下よりも実質的に長い期間、維持され得る。したがって、GITR受容体を介する刺激は、非自己、例えば腫瘍抗原またはウイルス抗原のT細胞、NK細胞、またはB細胞認識を追加免疫することにより、抗原特異的免疫応答を増強する。GITRは、特定の慢性ウイルス感染のT細胞媒介性制御に関与している(Pascutti, et al., PLoS Pathog. 2015 Mar 4; 11(3); Clouthier, et al., PLoS Pathog. 2015 Jan 15; 11(1))。

【0021】

GITRアゴニストは、被験者、例えばヒト被験者において、抗原によるT細胞の予備刺激の間またはその直後に被験者に投与されるとき、抗原特異的免疫応答を増強し得る。GITRアゴニストは、GITRリガンド(「GITRL」)、例えば可溶性GITRL融合タンパク質および抗GITR抗体またはその断片を含む。具体例が、GITRLの受容体結合ドメイン、多量体化ドメイン、例えば三量体化ドメイン、例えばコロニン1aから誘導される α ヘリカルコイルドコイルドメイン、およびIgG Fcドメインを含む融

合ポリペプチドサブユニットであり、ここでポリペプチドサブユニットは多量体（例えば三量体または六量体）融合タンパク質に自己組織化する。さらに本明細書に記載されるのは、かかる融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む核酸である。本開示はまた、多量体G I T R L融合タンパク質を用いて被験者における抗原特異的免疫応答を増強するための方法を提供する。G I T R L融合タンパク質に関連して本明細書で開示される組成物および方法は、より一般には、例えば、がんを治療する方法、ウイルス感染を治療する方法、または被験者における免疫応答を増強する方法における、多量体（例えば三量体および六量体）受容体に結合する融合タンパク質の生成および使用に適用され得る。

【0022】

定義

用語「1つの(a)」または「1つの(an)」実体は、その実体の1つまたは複数を指し、例えば、「ポリペプチドサブユニット」は、1つまたは複数のポリペプチドサブユニットを表すと理解される。従って、用語「1つの(a)」(もしくは「1つの(an)」)、「1つまたは複数」および「少なくとも1つ」は、本明細書において互換的に使用することができる。

【0023】

別に定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術および科学用語は、本開示が関連する技術分野の通常の技術者により一般に理解されるのと同じ意味を有する。例えば、the Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; および the Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press は、本開示で使用される多くの用語の一般的辞書を当業者に提供する。

【0024】

単位、接頭辞、および符号は、国際単位系(Système International de Unités)(SI)承認の形態で表記する。数値の範囲は、範囲を定める数もふくむ。別に記載のない限り、アミノ酸配列は、アミノからカルボキシ方向で、左から右に向かって記載する。本明細書に記載する見出しは、本開示の様々な態様または態様の限定ではなく、全体として本明細書の参照により援用され得る。従って、すぐ下に定義する用語は、本明細書への参照により、その全体がより詳細に定義される。

【0025】

本明細書で用いられるとき、語句「抗原を経験した」は、抗原に曝露されている細胞を説明するために用いられ、ここでその抗原への曝露は細胞における応答を誘発している。

【0026】

本明細書において使用される用語「ポリペプチド」は、単数形「ポリペプチド」および複数形「ポリペプチド」を包含するものとし、アミド結合(ペプチド結合としても公知)により直鎖状に結合しているモノマー(アミノ酸)から構成される分子を指す。用語「ポリペプチド」は、2つ以上のアミノ酸の任意の1つまたは複数の鎖を指し、規定の長さの生成物を指さない。したがって、2つ以上のアミノ酸の1つまたは複数の鎖を指すために使用されるペプチド、ジペプチド、トリペプチド、オリゴペプチド、「タンパク質」、「アミノ酸鎖」または任意の他の用語は、「ポリペプチド」の定義内に含まれ、用語「ポリペプチド」は、それらの用語のいずれにも代えて、またはそれらの用語と互換的に使用することができる。用語「ポリペプチド」は、ポリペプチドの発現後修飾、例として、限定されるものではないが、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、公知の保護/遮断基による誘導体化、タンパク質分解開裂、または非標準アミノ酸による修飾の生成物も指すものとする。ポリペプチドは、天然生物学的資源に由来し得、または組換え技術に

10

20

30

40

50

より產生することができるが、指定される核酸配列から必ずしも翻訳されない。これは、任意の様式、例として化学合成により生成することができる。

【0027】

本明細書において使用される「タンパク質」は、単一ポリペプチド、すなわち、上に定義した通りの単一のアミノ酸鎖を指し得るが、例えば、ジスルフィド結合、水素結合、または疎水性相互作用により、結合して、多量体タンパク質を生成する2つ以上のポリペプチドを指す場合もある。本明細書で使用される場合、用語「ポリペプチドサブユニット」は、同一または異なる他のポリペプチドサブユニットと相互作用して、多量体タンパク質、例えば、本明細書に記載する六量体タンパク質を形成することができるアミノ酸からなるポリペプチド鎖を指す。

10

【0028】

本明細書に開示のポリペプチドは、約3アミノ酸以上、5アミノ酸以上、10アミノ酸以上、20アミノ酸以上、25アミノ酸以上、50アミノ酸以上、75アミノ酸以上、100アミノ酸以上、200アミノ酸以上、500アミノ酸以上、1000アミノ酸以上、または2000アミノ酸以上のサイズであり得る。ポリペプチドは、定義された3次元構造を有し得るが、それらは、そのような構造を必ずしも有さない。定義された3次元構造を有するポリペプチドは、フォールドと称され、定義された3次元構造を有さないが、多数の異なる立体構造を採り得るポリペプチドは、アンフォールドと称される。

【0029】

物質、組成物、または実体、またはその任意の文法的変形の「単離された」物質、組成物、実体、および／または任意の組み合わせ、例えば単離された生物学的材料は、その天然環境下でない物質である。特定レベルでの精製が必要とされない。例えば、単離された抗体は、その天然または自然環境下で産生されないかまたは位置しない抗体である。非天然細胞内で生成される材料、例えばハイブリドーマのように、組換え的に生成された生物学的材料は、本明細書で開示される通りに単離されたと考えられる。物質、例えば生物学的材料もまた、それが任意の好適な技法により、分離されている、分画されている、または部分的もしくは実質的に精製されている場合、「単離された」と考えられる。特定の態様では、単離された物質、例えば単離された生物学的材料は、「非天然」であり得る。

20

【0030】

本明細書で用いられるとき、物質、組成物、または実体、またはその任意の文法的変異体の用語「非天然起源の」物質、組成物、実体、および／または任意の組み合わせは、当業者により「天然起源の」として十分に理解されているか、あるいは審査官または米国特許商標局（United States Patent and Trademark Office）などの行政機関、または裁判機関により随時、「天然起源の」とであると判定または解釈され得る、物質、組成物、実体、および／または物質、組成物、もしくは実体の任意の組み合わせの形態を単に除外するのではなく、明示的に除外する条件付き用語である。例えば、用語「非天然起源抗体は、天然に存在する抗体、例えば、通常の抗原刺激環境に曝露されるマウスの免疫系において天然に存在することになる抗体、または行政機関、例えば米国特許商標局（United States Patent and Trademark Office）、もしくは裁判機関、例えば連邦裁判所により、「天然起源の」とであると最終的に判定される抗体を明示的に除外する。

30

40

【0031】

本明細書に開示する他のポリペプチドは、前述のポリペプチドの断片、誘導体、類似体、またはバリエーション、およびこれらの任意の組み合わせである。本明細書に開示するポリペプチドサブユニットまたは多量体タンパク質に関して、用語「断片」、「バリエーション」、「誘導体」および「類似体」は、完全なポリペプチドまたはタンパク質の活性の少なくとも一部を保持するが、構造的に異なる任意のポリペプチドまたはタンパク質を包含し得る。ポリペプチドの断片として、例えば、タンパク質分解断片、ならびに欠失断片が挙げられる。バリエーションとしては、前述した断片、さらには、アミノ酸置換、欠失、または挿入により改変したアミノ酸配列を有するポリペプチドも包含する。バリエーションは、自然に

50

発生したものであってもよいし、または意図的に構築したものでよい。意図的に構築したバリエーションは、当分野で公知の突然変異誘発技術を用いて生成することができる。バリエーションポリペプチドは、保存または非保存アミノ酸置換、欠失もしくは付加を含んでもよい。誘導体は、天然ポリペプチドに見出されない追加的特徴を呈示するように改変されたポリペプチドである。例として、融合タンパク質がある。バリエーションポリペプチドはまた、本明細書において、「ポリペプチド類似体」と呼ぶこともできる。本明細書で使用される「誘導体」は、官能側基の反応により化学的に誘導体化した1つまたは複数のアミノ酸を有する対象のポリペプチドを指す。また、「誘導体」として、20個の標準アミノ酸からなる1つまたは複数の標準もしくは合成アミノ酸誘導体を含むペプチドも含まれる。例えば、4-ヒドロキシプロリンでプロリンを置換することができ；5-ヒドロキシリシンでリシンを置換することができ；3-メチルヒスチジンでヒスチジンを置換することができ；ホモセリンで、セリンを置換することができ；オルニチンでリシンを置換することができる。

10

【0032】

「保存アミノ酸置換」は、1アミノ酸が、類似の側鎖を有する別のアミノ酸により置き換えられたものである。類似の側鎖を有するアミノ酸のファミリーは、当分野において定義されており、これらのファミリーには、塩基性側鎖（例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、ベータ分枝側鎖（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を有するアミノ酸が含まれる。例えば、フェニルアラニンによるチロシンの置換は、保存置換である。タンパク質活性を排除しないヌクレオチドおよびアミノ酸保存置換を同定する方法は、当分野ではよく知られている（例えば、Brummell et al., Biochem. 32:1180-1187 (1993); Kobayashi et al., Protein Eng. 12(10):879-884 (1999); および Burks et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:. 412-417 (1997)）。

20

【0033】

本明細書において使用される場合、用語「抗体」（またはその断片、バリエーション、もしくは誘導体）は、抗原、B細胞により産生される典型的抗体の場合には、重鎖（VH）の可変ドメインおよび軽鎖（VL）の可変ドメインに結合することができる抗体の少なくとも最小部分を指す。脊椎動物系における基本的な抗体構造は、比較的十分に理解されている。例えば、Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988) 参照。

30

【0034】

抗体またはその抗原結合断片、バリエーション、もしくは誘導体として、限定されるものではないが、ポリクローナル、モノクローナル、ヒト、ヒト化、またはキメラ抗体、単鎖抗体、エピトープ結合断片、例えば、Fab、Fab' および F(ab')₂、Fd、Fv、単鎖 Fv (scFv)、単鎖抗体、ジスルフィド結合 Fv (sdFv)、VL もしくは VH ドメインのいずれかを含む断片、および Fab 発現ライブラリーにより産生される断片が挙げられる。scFv 分子は、当分野において公知であり、米国特許第 5,892,019 号明細書に記載されている。本開示により包含される免疫グロブリンまたは抗体分子は、免疫グロブリン分子の任意のタイプ（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、および IgY）、クラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 および IgA2）またはサブクラスのものであってよい。

40

【0035】

用語「ポリヌクレオチド」は、単数形の核酸および複数形の核酸を包含するものとし、

50

単離核酸分子または構築物、例えば、メッセンジャーRNA（mRNA）またはプラスミドDNA（pDNA）を指す。ポリヌクレオチドは、慣用のホスホジエステル結合または非慣用結合（例えば、アミド結合、例えば、ペプチド核酸（PNA）中に見出されるもの）を含み得る。用語「核酸」は、ポリヌクレオチド中に存在する任意の1つまたは複数の核酸セグメント、例えば、DNAまたはRNA断片を指す。「単離」核酸またはポリヌクレオチドは、そのネイティブ環境から取り出された核酸分子、DNAまたはRNAを意図する。例えば、ベクター中に含有されるポリペプチドサブユニットをコードする組換えポリヌクレオチドは、本明細書に開示の単離とみなされる。単離ポリヌクレオチドのさらなる例には、異種宿主細胞中で維持される組換えポリヌクレオチドまたは溶液中の精製された（部分的または実質的に）ポリヌクレオチドが含まれる。単離RNA分子には、ポリヌクレオチドのインビボまたはインビトロRNA転写物が含まれる。単離ポリヌクレオチドまたは核酸には、さらに合成により産生されたそのような分子が含まれる。さらに、ポリヌクレオチドまたは核酸は、調節エレメント、例えばプロモーター、リボソーム結合部位、または転写ターミネーターであり得、またはそれらを含み得る。

【0036】

本明細書において使用される「コード領域」は、アミノ酸に翻訳されるコドンを含む核酸の一部である。「終止コドン」（TAG、TGA、またはTAA）はアミノ酸に翻訳されないが、それは、コード領域の一部とみなすことができるが、任意のフランキング配列、例えば、プロモーター、リボソーム結合部位、転写ターミネーター、イントロンなどはコード領域の一部でない。2つ以上のコード領域が、単一ポリヌクレオチド構築物中、例えば、単一ベクター上に、または別個のポリヌクレオチド構築物中、例えば別個の（異なる）ベクター上に存在し得る。さらに、任意のベクターは、単一コード領域を含有し得、または2つ以上のコード領域を含み得、例えば、単一ベクターは、免疫グロブリン重鎖可変領域および免疫グロブリン軽鎖可変領域を別個にコードし得る。さらに、ベクター、ポリヌクレオチド、または核酸は、ポリペプチドサブユニットまたは本明細書に記載する融合タンパク質をコードする核酸に融合されておりまたは融合されていない異種コード領域をコードし得る。異種コード領域には、限定されるものではないが、特殊化エレメントまたはモチーフ、例えば分泌シグナルペプチドまたは異種機能ドメインが含まれる。

【0037】

ある実施形態において、ポリヌクレオチドまたは核酸はDNAである。DNAの場合、ポリペプチドをコードする核酸を含むポリヌクレオチドは、通常、1つまたは複数のコード領域と作動可能に会合しているプロモーターおよび／または他の転写もしくは翻訳制御エレメントを含み得る。作動可能な会合は、遺伝子産物、例えば、ポリペプチドについてのコード領域が、遺伝子産物の発現を調節配列の影響または制御下に配置するように1つまたは複数の調節配列と会合している場合である。2つのDNA断片（例えば、ポリペプチドコード領域およびそれと会合しているプロモーター）は、プロモーター機能の誘導が所望の遺伝子産物をコードするmRNAの転写をもたらす場合および2つのDNA断片間の結合の性質が遺伝子産物の発現を指向する発現調節配列の能力もDNAテンプレートの転写される能力も妨害しない場合、「作動可能に会合している」または「作動可能に結合している」。したがって、プロモーター領域は、プロモーターがその核酸の転写をもたらし得る場合、ポリペプチドをコードする核酸と作動可能に会合している。プロモーターは、所定の細胞中でのみDNAの実質的な転写を指向する細胞特異的プロモーターであり得る。プロモーターに加え、他の転写制御エレメントは、例えば、エンハンサー、オペレーター、リプレッサー、および転写終結シグナルが細胞特異的転写を指向するためにポリヌクレオチドと作動可能に会合している。好適なプロモーターおよび他の転写制御領域は、本明細書に開示される。

【0038】

種々の転写制御領域は、当業者に公知である。これらには、限定されるものではないが、脊椎動物において機能する転写制御領域、例えば、限定されるものではないが、サイトメガロウイルス（イントロンAと連携する前初期プロモーター）、シミアンウイルス40

10

20

30

40

50

(初期プロモーター)、およびレトロウイルス(例えば、ラウス肉腫ウイルス)からのプロモーターおよびエンハンサーセグメントが含まれる。他の転写制御領域には、脊椎動物遺伝子に由来するもの、例えば、アクチン、熱ショックタンパク質、ウシ成長ホルモンおよびウサギβ-グロビンならびに真核細胞中で遺伝子発現を制御し得る他の配列が含まれる。追加の好適な転写制御領域には、組織特異的プロモーターおよびエンハンサーならびにリンホカイン誘導プロモーター(例えば、インターフェロンまたはインターロイキンにより誘導可能なプロモーター)が含まれる。

【0039】

同様に、種々の翻訳制御エレメントは、当業者に公知である。これらには、限定されるものではないが、リボソーム結合部位、翻訳開始および終結コドン、ならびにピコルナウイルスに由来するエレメント(特に、内部リボソーム進入部位、またはIRES、CITE配列とも称される)が含まれる。

【0040】

他の実施形態において、ポリヌクレオチドは、RNA、例えば、メッセンジャーRNA(mRNA)の形態であり得る。

【0041】

ポリヌクレオチドおよび核酸コード領域は、本明細書に開示のポリヌクレオチド、例えば、本明細書に記載するポリペプチドサブユニットをコードするポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドの分泌を指向する分泌またはシグナルペプチドをコードする追加のコード領域と会合してよい。シグナル仮説によれば、哺乳動物細胞により分泌されるタンパク質は、粗面小胞体を越える成長タンパク質鎖の輸送が開始されると成熟タンパク質から開裂されるシグナルペプチドまたは分泌リーダー配列を有する。当業者は、脊椎動物細胞により分泌されるポリペプチドが一般に、ポリペプチドの分泌または「成熟」形態を産生するために完全または「全長」ポリペプチドから開裂されるポリペプチドのN末端に融合しているシグナルペプチドを有することに精通している。ある実施形態において、ネイティブシグナルペプチド、例えば、免疫グロブリン重鎖または軽鎖シグナルペプチド、または作動可能に会合しているポリペプチドの分泌を指向する能力を保持するその配列の機能的誘導体を使用される。あるいは、異種哺乳動物シグナルペプチド、またはその機能的誘導体を使用することができる。例えば、野生型リーダー配列を、インフルエンザAヘマグルチニン、ヒト組織プラスミノゲン活性化因子(TPA)またはマウスβ-グルクロニダーゼのリーダー配列により置換することができる。

【0042】

「ベクター」は、核酸分子であり、宿主細胞に導入されると、形質転換宿主細胞が生成される。ベクターは、これが宿主細胞で複製することを可能にする核酸配列、例えば、複製起点を含み得る。ベクターはさらに、1つまたは複数の選択マーカ遺伝子および当分野で公知の他の遺伝エレメントを含んでもよい。

【0043】

「形質転換」細胞、または「宿主」細胞は、分子生物学技術によって核酸分子が導入された細胞である。本明細書で用いられるように、形質転換という用語は、核酸分子をこうした細胞に導入することができるあらゆる技術、ウイルスベクターを用いたトランスフェクション、プラスミドベクターを用いた形質転換、ならびに電気穿孔、リポフェクション、およびパーティクル・ガン加速によるネイキッドDNAの導入などが挙げられる。形質転換細胞または宿主細胞は、細菌細胞または真核細胞であってよい。

【0044】

「特異的に結合する」とは、一般に、分子、例えば、GITRLまたはその受容体結合断片が、その受容体結合ドメインを介して別の分子、例えば、GITRに結合すること、ならびに、結合が、抗原結合リガンドと受容体との間にある程度の相補性を必要とすることを意味する。この定義によれば、リガンドは、それがその受容体結合ドメインを介して、ランダムは無関連な分子に結合するよりも容易に受容体に結合する場合、その受容体に「特異的に結合する」と言われる。用語「特異性」は、本明細書において、あるリガンド

がある受容体に結合する相対親和性を特定するために使用される。例えば、リガンド「A」は、所与の受容体についてリガンド「B」よりも高い特異性を有するとみなすことができ、またはリガンド「A」は、それが関連受容体「D」について有するよりも高い特異性で受容体「C」に結合すると言うことができる。

【0045】

「受容体結合ドメイン」とは、リガンド、例えば、本明細書に開示するGITRLに含まれる結合ドメインを意味する。

【0046】

リガンド、例えば、本明細書に開示するGITRL融合ポリペプチドサブユニットまたは多量体GITRL融合タンパク質は、 $5 \times 10^{-2} \text{ 秒}^{-1}$ 、 10^{-2} 秒^{-1} 、 $5 \times 10^{-3} \text{ 秒}^{-1}$ または 10^{-3} 秒^{-1} 以下のオフ速度 ($k(\text{off})$) で受容体、例えば、GITRに結合することができる。リガンド、例えば、本明細書に開示するGITRL融合ポリペプチドサブユニットまたは多量体GITRL融合タンパク質は、 $5 \times 10^{-4} \text{ 秒}^{-1}$ 、 10^{-4} 秒^{-1} 、 $5 \times 10^{-5} \text{ 秒}^{-1}$ 、または 10^{-5} 秒^{-1} 、 $5 \times 10^{-6} \text{ 秒}^{-1}$ 、 10^{-6} 秒^{-1} 、 $5 \times 10^{-7} \text{ 秒}^{-1}$ または 10^{-7} 秒^{-1} 以下のオフ速度 ($k(\text{off})$) で受容体、例えば、GITRに結合することができる。

【0047】

用語「阻害する」、「ブロックする」および「抑制する」は、本明細書において互換的に用いられ、完全な活性のブロックを含む、あらゆる統計的に有意な生物活性の減少を指す。例えば、「阻害」は、生物活性の約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%または100%の減少を指し得る。

【0048】

本明細書において使用される用語「親和性」は、リガンドとそのコグネイト受容体との結合の強さの尺度を指す。本明細書において使用される用語「アビディティ」は、リガンドの集団と受容体との複合体の総合安定性、すなわち、リガンドと受容体の組み合わせ、例えば、六量体GITRL-IgG融合タンパク質 (GITRL-FP) と細胞表面GITRの相互作用の機能的組み合わせ強度を指す。アビディティは、集団における個々の受容体結合ドメインと規定の受容体との親和性、ならびにまたリガンドと受容体の価数の両方に関する。

【0049】

リガンド、例えば、本明細書に開示するGITRL融合ポリペプチドサブユニットまたは多量体GITRL融合タンパク質は、リガンドに対するそれらの結合親和性に関して記載または規定することもできる。例えば、リガンドは、 $5 \times 10^{-2} \text{ M}$ 、 10^{-2} M 、 $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ 、 10^{-3} M 、 $5 \times 10^{-4} \text{ M}$ 、 10^{-4} M 、 $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ 、 10^{-5} M 、 $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ 、 10^{-6} M 、 $5 \times 10^{-7} \text{ M}$ 、 10^{-7} M 、 $5 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、 10^{-8} M 、 $5 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、 10^{-9} M 、 $5 \times 10^{-10} \text{ M}$ 、 10^{-10} M 、 $5 \times 10^{-11} \text{ M}$ 、 10^{-11} M 、 $5 \times 10^{-12} \text{ M}$ 、 10^{-12} M 、 $5 \times 10^{-13} \text{ M}$ 、 10^{-13} M 、 $5 \times 10^{-14} \text{ M}$ 、 10^{-14} M 、 $5 \times 10^{-15} \text{ M}$ 、または 10^{-15} M 以下の解離定数または K_D で受容体に結合し得る。

【0050】

リガンド、例えば、本明細書で開示されるようなGITRL融合ポリペプチドサブユニットまたは多量体GITRL融合タンパク質は、受容体、例えばGITRに、 $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 以上、 $5 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 、 $10^4 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ もしくは $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ のオンレート ($k(\text{on})$) で結合し得る。リガンド、例えば、本明細書で開示されるようなGITRL融合ポリペプチドサブユニットまたは多量体GITRL融合タンパク質は、受容体、例えばGITRに、 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 以上、 $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 、 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 、または $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ もしくは $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ のオンレート ($k(\text{on})$) で結合し得る。

【0051】

GITR、または「GITR受容体」は、グルココルチコイド誘導TNF関連タンパク

10

20

30

40

50

質、腫瘍壊死因子リガンドスーパーファミリーメンバー18、TNFSF18、活性化誘導性TNF関連受容体、GITR、CD357、およびRP5-902P8. 2とも様々に称されるタンパク質であり、活性化NK細胞および抗原を経験したT細胞、例えばCD4⁺およびCD8⁺T細胞の表面上、ならびにCD4⁺CD25⁺FOXP3⁺制御性T細胞上に発現される (Tregs; Stephens et al. J. Immunol. (2004) 173 (8): 5008-5020)。GITRは、例えば配列番号47のタンパク質である。グルコシルチコイド誘導TNF関連リガンド、腫瘍壊死因子リガンドスーパーファミリーメンバー18リガンド、TNFSF18リガンド、TL6、活性化誘導性TNF関連リガンド、GITRリガンド、GITRL、およびRP1-15D23とも様々に称される「GITRリガンド」(「GITRL」)は、主に抗原提示細胞上に見出される (APCs; Stephens et al. J. Immunol. (2004) 173 (8): 5008-5020)。GITRLは、細胞の表面上に発現され、細胞内、膜貫通および細胞外受容体結合ドメインを含む。

10

【0052】

本明細書で用いられるとき、用語「GITRL」は、全GITRリガンド、可溶性GITRリガンド、およびGITRリガンドの機能活性部分を指す。また、GITRLの天然対立遺伝子変異体、天然GITRリガンド分子からのアミノ酸配列が変化したGITRリガンド変異体、およびかかる変異体の組み合わせのいずれもがGITRLの定義の中に含まれ、その場合、変異体はGITR受容体に特異的に結合する能力を保持する。アミノ酸残基置換を含むGITRLの特定の変異体は、本明細書で配列番号1の成熟GITRLタンパク質中の残基数によって同定される。例えば、N161Dは、配列番号1の成熟ヒトGITRLの161位のアスパラギル残基とアスパルチル残基との置換、ならびに配列番号6および配列番号8のヒトGITRLの細胞外ドメイン内の対応位置における同じ置換も指す。配列番号1のGITRL配列における様々な置換については、配列番号1のGITRLポリペプチド以外のGITRLポリペプチド中の対応残基の相当する置換もまた、本明細書で提供される。かかる対応残基は、配列番号1配列を置換されるべきGITRL配列と整列することにより容易に同定され得る。例えば、配列番号1への単一アミノ酸のN末端付加を有するGITRLペプチドであれば、配列番号1の161位でのアスパラギル残基の置換に相当することになる162位でのアスパラギル残基の置換を有し得る。

20

【0053】

本明細書で用いられるとき、用語「GITRL融合ポリペプチドサブユニット」または「GITRL FPサブユニット」は、ヒトIgG Fcドメイン；機能的三量体化ドメイン；およびグルコシルチコイド誘導TNF受容体リガンド (GITRL) の受容体結合ドメインを含む一本鎖ポリペプチドサブユニットを指し、ここでポリペプチドサブユニットは、多量体、例えば三量体もしくは六量体タンパク質に自己組織化し得る。用語「多量体GITRL融合タンパク質」または「多量体GITRL FP」は、GITRL融合ポリペプチドサブユニットの自己組織化された多量体 (例えば三量体および六量体を含む) を指す。特定のアイソタイプのIgG FcドメインがGITRL FPサブユニット内で用いられるとき、そのアイソタイプを有するGITRL FPは、「GITRL IgGX FP」(Xは、1、2、2a、3、4、もしくは4Pであり得る)、例えば、GITRL IgG1 FP、GITRL IgG2 FP、GITRL IgG2a FP、GITRL IgG3 FP、GITRL IgG4 FP、およびGITRL IgG4P FPとして記載される。

30

40

【0054】

本明細書で用いられるとき、「OX40ポリペプチド」は、NCBI受入番号NP_003318に対して少なくとも約85%のアミノ酸同一性を有するポリペプチドまたはその断片を意味する。OX40は、抗原活性化された哺乳動物のCD4⁺およびCD8⁺Tリンパ球の表面上に発現される受容体のTNFRスーパーファミリーのメンバーである。例えば、Paterson et al., Mol Immunol 24, 1281-1290 (1987); Mallett et al., EMBO J 9, 1063

50

—1068 (1990) ; および Calderhead et al. , J Immunol 151, 5261-5271 (1993)) を参照のこと。OX40 は、CD134、ACT-4、および ACT35 とも称される。OX40 受容体配列は、当該技術分野で公知であり、例えばジェンバンク受入番号：AAB33944 または CAE11757 で提供される。

【0055】

例示的なヒト OX40 アミノ酸配列が以下に提供される。

【化1】

```
1   mcvgarrlgr gpcaalllllg lglstvtglh cvgdtypsnd rcchecrp gn gmvsrccsrsg
61  ntvcrpcpgp fyndvvsskp ckpctwcnlr sgserkqlct atqdtvcr cr agtqpldsyk
121 pgvdcapcpp ghfspgdnqa ckpwtnctla gkhtlqpasn ssdaicedrd ppatqpqetq
181 gpparpitvq pteawprtsq gpstrpvevp ggravaailg lglvlglgllgp laillalyll
241 rrdqrlppda hkppgggsfr tpiqeeqada hstlaki (配列番号52)
```

10

【0056】

「OX40 リガンド」は、NCBI 受入番号 NP_003317 に対して少なくとも約 85% のアミノ酸同一性を有し、かつ OX40 受容体に特異的に結合するポリペプチドまたはその断片を意味する。例えば、Baum P. R. , et al. EMBO J. 13: 3992-4001 (1994)) を参照のこと。OX40L という用語は、全 OX40 リガンド、可溶性 OX40 リガンド、および第2の部分、例えばタンパク質ドメインに共有結合した OX40 リガンドの機能活性部分を含む融合タンパク質を含む。また、OX40L の定義の中に、天然 OX4L からアミノ酸配列が変化するが、OX40 受容体に特異的に結合する能力を保持する変異体が含まれる。さらに、OX40L の定義の中に、OX40 の生物学的活性を増強する変異体が含まれる。OX40 リガンド配列は、当該技術分野で公知であり、例えばジェンバンク受入番号：NP_003318 で提供される。

20

【0057】

例示的なヒト OX40 リガンドアミノ酸配列が以下に提供される。

【化2】

```
MERVQPLEENVGNAARPRFERNKLLLVASVIQGLGLLLCFTYICLHFSALQVSHRYPRIQSIKVQFTE
YKKEKGFIILTSQKEDEIMKVQNNSVIINCDFYILSLKGYFSQEVNISLHYQKDEEPLFQLKKVRSVN
SLMVASLTYKDKVYLVNVTDTNTSLDDFHVNGGELILIHQNPGEFCVL (配列番号53)
```

30

【0058】

本明細書で用いられるとき、「OX40 アゴニスト」は、OX40 受容体と特異的に相互作用し、OX40 受容体の生物学的活性を増強する OX40 リガンドを意味する。望ましくは、生物学的活性は、少なくとも約 10%、20%、30%、50%、70%、80%、90%、95%、もしくはさらに 100% 増強される。特定の態様では、本明細書で開示されるような OX40 アゴニストは、OX40 結合ポリペプチド、例えば抗 OX40 抗体（例えば OX40 アゴニスト抗体）、OX40 リガンド、またはこれらの分子の断片もしくは誘導体を含む。

40

【0059】

本明細書で用いられるとき、「OX40 抗体」は、OX40 に特異的に結合する抗体を意味する。OX40 抗体は、OX40 およびその抗原結合断片に特異的なモノクローナルおよびポリクローナル抗体を含む。特定の態様では、本明細書に記載されるような抗 OX40 抗体は、モノクローナル抗体（またはその抗原結合断片）、例えば、マウス、ヒト化、もしくは完全ヒトモノクローナル抗体である。1つの特定の実施形態では、OX40 抗体は、OX40 受容体アゴニスト、例えば Weinberg et al. , J Immunol

50

another 29, 575-585 (2006) によって記載されるマウス抗ヒト OX40 モノクローナル抗体 (9B12) である。他の実施形態では、OX40 またはその抗原結合断片に特異的に結合する抗体は、mAb 9B12 と同じ OX40 エピトープに結合する。別の態様では、抗体は MEDI0562 である。例えば、米国特許出願公開第 2016/0137740 号明細書を参照のこと。

【0060】

本明細書で用いられるとき、「OX40 リガンド融合タンパク質 (OX40L FP)」は、OX40 受容体の特異的に結合し、免疫応答を増強するタンパク質を意味する。一実施形態では、OX40 リガンド融合タンパク質の OX40 受容体への結合は、T 細胞認識をブーストすることにより腫瘍抗原特異的免疫応答を増強する。例示的な OX40 リガンド融合タンパク質は、「Trimeric OX40 Immunoglobulin Fusion Protein and Methods of Use」という表題の米国特許 7,959,925 号明細書に記載されている。他の OX40 リガンド融合タンパク質は、例えば米国特許第 6,312,700 号明細書に記載されている。一実施形態では、OX40 リガンド融合タンパク質は、腫瘍特異的 T 細胞免疫を増強する。一実施形態では、OX40 リガンド融合タンパク質は MEDI6383 (配列番号 50) である。例えば、米国特許出願公開第 2016/0024176 号明細書を参照のこと

10

【0061】

「三量体化ドメイン」は、三量体へのポリペプチドの組織化を促進するポリペプチド内のアミノ酸配列である。例えば、三量体化ドメインは、他の (同じまたは異なるアミノ酸配列を有する別のポリペプチドの) 三量体化ドメインとの結合を介して三量体への組織化を促進する。この用語はまた、ペプチドまたはポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを指すためにも用いられる。

20

【0062】

用語「Fc」ドメインは、抗体定常領域の一部を指す。伝統的に、Fc ドメインという用語は、抗体の対合 CH2、CH3 およびヒンジ領域を含む、プロテアーゼ (例えば、パペイン) 切断生成物を指す。本開示に関連して、Fc ドメインまたは Fc という用語は、生成の手段とは関係なく、免疫グロブリンポリペプチドの CH2、CH3 およびヒンジ領域の全部または一部を含む、任意のポリペプチド (またはそのようなポリペプチドをコードする核酸) を指す。

30

【0063】

本明細書で用いられるとき、用語「IgG Fc ドメイン」は、IgG1、IgG2、IgG3、または IgG4 免疫グロブリンの Fc ドメイン、およびかかる Fc ドメインの変異体を指す。IgG4 Fc ドメインの変異体は、限定はされないが、IgG4P Fc ドメインを含む。

【0064】

本明細書において使用される用語「CH2 ドメイン」には、例えば、慣用の番号付与スキームを使用して、抗体の概ねアミノ酸 244 からアミノ酸 360 に及ぶ重鎖分子の Fc ドメインの部分が含まれる (アミノ酸 244 から 360、Kabatt 番号付与系; およびアミノ酸 231 ~ 340、EU 番号付与系)。また、CH3 ドメインが、IgG 分子の CH2 ドメインから C 末端に及んで、約 108 アミノ酸を含むことも十分に立証されている。

40

【0065】

本明細書で用いられるとき、用語「リンカー領域」は、2 つのタンパク質ドメインを融合または連結するために用いられる任意のペプチドを含む。かかるリンカーは、限定はされないが、(Gly₄)_n モチーフ (複数可)、(Gly₄ Ser)_n モチーフ (複数可) (配列番号 19)、および Ser (Gly₄ Ser)_n モチーフ (複数可) (配列番号 22) を含むペプチドを含む。

【0066】

本明細書において使用される用語「IgG ヒンジ領域」には、CH1 ドメインを CH2

50

ドメインに連結させる重鎖 I g G 分子の F c ドメインの部分が含まれる。このヒンジ領域は、約 25 アミノ酸を含み、フレキシブルであり、したがって 2 つの N 末端抗原結合領域が独立して移動することを可能とする。ヒンジ領域は、3 つの区別されるドメイン：上部、中央部、および下部ヒンジドメイン (Roux et al., J. Immunol. 161: 4083 (1998)) に下位分類することができる。

【0067】

本明細書において使用される用語「ジスルフィド結合」には、2 つの硫黄原子間に形成される共有結合が含まれる。アミノ酸システインは、第 2 のチオール基とのジスルフィド結合または架橋を形成し得るチオール基を含む。本明細書に記載するいくつかの態様では、ヒト I g G 4 F c ドメインは、2 つのヒンジ領域の間にジスルフィド結合形成を、具体的には、228 位 (EU 番号付与に従う) でのセリンからプロリンへの突然変異を確実にするように、ヒンジ領域で突然変異させることができる。S228P 突然変異を含むヒト I g G 4 F c ドメインは、本明細書において「I g G 4 F c ドメイン」と呼ばれる。

10

【0068】

本明細書において使用される用語「結合している」、「融合している」または「融合」は、互換的に使用され得る。これらの用語は、あらゆる手段、例として化学コンジュゲーションまたは組換え手段によるさらに 2 つのエLEMENT または構成成分の連結を指す。「インフレーム融合」は、元の ORF の正確な翻訳リーディングフレームを維持する様式で連続するより長い ORF を形成するための 2 つ以上のポリヌクレオチドオープンリーディングフレーム (ORF) の連結を指す。したがって、組換え融合タンパク質は、元の ORF (セグメントが通常、天然では連結されていない) によりコードされるポリペプチドに対応する 2 つ以上のセグメントを含有する単一タンパク質であり、例えば、本明細書に記載する G I T R L 融合ポリペプチドサブユニットである。リーディングフレームはこうして融合セグメント全体にわたり連続的とされるが、セグメントは、例えば、インフレームリンカー配列により物理的または空間的に分離することができる。

20

【0069】

ポリペプチドに関して、「直鎖配列」または「配列」は、配列中で互いに隣接するアミノ酸がポリペプチドの 1 次活性化構造中で連続する、アミノからカルボキシ末端方向におけるポリペプチド中のアミノ酸の順序である。

30

【0070】

本明細書において使用される用語「発現」は、遺伝子が生化学物質、例えば、ポリペプチドを産生するプロセスを指す。このプロセスには、細胞内の遺伝子の機能的存在の任意の顕在化、例として、限定されるものではないが、遺伝子ノックダウンならびに一過的発現および安定的発現の両方が含まれる。それには、限定されるものではないが、遺伝子のメッセンジャー RNA (mRNA) への転写、およびそのような mRNA のポリペプチドへの翻訳が含まれる。最終所望産物が生化学物質である場合、発現には、その生化学物質および任意の前駆体の作出が含まれる。遺伝子の発現は、「遺伝子産物」を産生する。本明細書において使用される遺伝子産物は、遺伝子の転写により産生される核酸、例えば、メッセンジャー RNA、または転写物から翻訳されるポリペプチドのいずれでもよい。本明細書に記載の遺伝子産物には、転写後修飾、例えば、ポリアデニル化を有する核酸、または翻訳後修飾、例えば、メチル化、グリコシル化、脂質の付加、他のタンパク質サブユニットとの会合、タンパク質分解開裂などを有するポリペプチドがさらに含まれる。

40

【0071】

本明細書において使用される用語「治療する」、「治療」または「～の治療」(例えば、「がん患者を治療する」段階において) は、がん治療の文脈において使用される場合、例えば、対象が、より長期の生存率を有するか、またはその不快が軽減される程度までの、疾患病状の強度の低減、疾患の症状の発生の低下を指す。例えば、治療は、療法が、対象に投与されたとき、疾患症状、兆候、または原因を軽減する能力を指す。治療はまた、少なくとも 1 つの臨床症状の緩和もしくは軽減および／または病状の進行の阻害もしくは

50

遅延および／または疾患もしくは疾病の発症の予防もしくは遅延も指す。

【0072】

本明細書で用いられるとき、用語「治療する」、「治療」または「～の治療」は、（例えば「ウイルス感染を治療する」という語句で）ウイルス感染を治療することに関連して用いられるとき、ウイルス感染に伴う病態および／または症状を軽減することを指す。

【0073】

「対象」または「個体」または「動物」または「患者」または「哺乳動物」とは、診断、予後診断、または治療が望まれる任意の対象、特に哺乳動物対象を意味する。哺乳動物対象には、ヒト、家畜動物、農場動物、競技動物、および動物園動物、例えば、ヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、モルモット、ウサギ、ラット、マウス、ウマ、畜牛、クマなどが含まれる。

10

【0074】

用語「医薬組成物」は、活性成分の生物活性を有効にするような形態を採り、しかも、組成物が投与される対象に対して、許容されないほど毒性の追加成分を含有しない製剤を指す。このような組成物は、無菌であってよい。

【0075】

本明細書に開示する抗体の「有効量」は、具体的に記載される目的を実施するのに十分な量である。「有効な量」は、記載される目的に関して、実験により、常用的方法で決定することができる。

【0076】

G I T R L 融合ポリペプチドサブユニット

本開示は、限定はされないが、遺伝子導入された哺乳動物細胞培養液中で発現されるときに改善された収量；G I T R L に対する改善された結合親和性；様々な生物検定における改善された活性および／または精製または部分精製されるときに G I T R L を含有する以前に開示されたポリペプチドと比べて改善された均一性を含み、改善された特性を有する多量体、例えば三量体または六量体タンパク質に組織化し得る G I T R L 融合ポリペプチドサブユニットに関する（例えば、W y z g o l e t a l . , J I m m u n o l 2009 ; 183 : 1851 - 1861 を参照）。本明細書で提供される G I T R L 融合ポリペプチドサブユニットは、I g G F c ドメイン、例えばヒト I g G F c ドメイン、三量体化ドメイン、およびヒト G I T R L の受容体結合ドメインを含み得る。例示的な実施形態は、図 7 に概略的に図示される。典型的には、I g G F c ドメイン、三量体化ドメインおよび G I T R L 受容体結合ドメインは、N 末端から C 末端方向に配列される。例示的な G I T R L I g G 1 融合ポリペプチドサブユニットは、配列番号 6 によって表される。

20

30

【0077】

特定の実施形態では、G I T R L 受容体結合ドメインは、ヒト G I T R L の細胞外ドメインである。1 つのかかるドメインの配列は、配列番号 37 によって表される。

【0078】

特定の態様では、G I T R L 受容体結合ドメインは、G I T R L 変異体細胞外ドメインである。使用可能な G I T R L 変異体細胞外ドメインは、限定はされないが、配列番号 37 の全長にわたり少なくとも 70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、97 %、98 %、99 %、もしくは 100 % の配列同一性を有するポリペプチドを含む。特定の態様では、G I T R L 変異体細胞外ドメインは、配列番号 34 の全長にわたり少なくとも 70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、97 %、98 %、99 %、もしくは 100 % の配列同一性を有するポリペプチドである。特定の態様では、配列番号 1 のアスパラギン 161 に対応する G I T R L 変異体細胞外ドメイン残基は、任意のアミノ酸またはアスパルチル残基と置換される。配列番号 1 のアスパラギン 161 に対応する残基が任意のアミノ酸またはアスパルチル残基と置換される場合の G I T R L 変異体細胞外ドメインは、限定はされないが、配列番号 35、配列番号 36、および配列番号 37 の全長にわたり少なくとも 70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、97 %、98 %、も

40

50

しくは99%の配列同一性を有するポリペプチドを含む。かかる置換は、GITRL変異体細胞外ドメイン内のこの部位のN結合グリコシル化を低減または除去し得る。特定の態様では、配列番号1のアスパラギン106に対応するGITRL変異体細胞外ドメイン残基は、アラニル残基と置換される。特定の状況では、hGITRLのN106A置換の結果、GITRへの結合が増加し、T細胞増殖応答が改善し得る (Chattopadhyay et al. (2007) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104 (49) : 19452-19457)。特定の態様では、Glu52、Phe62、Pro66、Pro67、Met71、Pro77、Val79、Asn92、Ser83、Gly99、Asn104、Pro112、Arg116、Met123、Asn153、Val158、Asn161、Iso167、Iso168、およびこれらの組み合わせに対応するGITRL変異体細胞外ドメイン残基は、非天然アミノ酸残基または対立遺伝子変異体のアミノ酸残基と独立して置換される。GITRL変異体細胞外ドメインの非限定例が、配列番号35で提供される (式中、 $X_1 = \text{Glu}$ または Ala 、 $X_2 = \text{Ser}$ または Phe 、 $X_3 = \text{Thr}$ または Pro 、 $X_4 = \text{Leu}$ または Ser 、 $X_5 = \text{Thr}$ または Met 、 $X_6 = \text{Leu}$ または Pro 、 $X_7 = \text{Met}$ または Val 、 $X_8 = \text{Thr}$ 、 Phe 、または Ser 、 $X_9 = \text{Ser}$ または Gly 、 $X_{10} = \text{Arg}$ または Pro 、 $X_{11} = \text{Trp}$ または Arg 、 $X_{12} = \text{Leu}$ または Met 、 $X_{13} = \text{Ser}$ または Asn 、 $X_{14} = \text{Phe}$ または Val 、 $X_{15} = \text{Asn}$ または Asp 以外の任意のアミノ酸、 $X_{16} = \text{Val}$ または Ile 、 $X_{17} = \text{Leu}$ または Ile であり、かつ $X_1 \sim X_{17}$ は独立して選択され、任意の組み合わせで存在し得る)。

【0079】

GITR受容体に結合するという所望される特性を保持する任意のGITRLポリペプチド配列が、本明細書に記載の融合ポリペプチドおよび方法において好適である。

【0080】

GITRL受容体結合ドメインに隣接するのが三量体化ドメインである。用語「隣接する」は、例えば、リンカー領域もしくは異種薬剤と隣接する、またはリンカー領域もしくは異種薬剤を介して会合することを含む。かかるドメインは、互いに隣接するとき、互いに直接的に融合されるドメインである。三量体化ドメインは、個別のGITRL融合ポリペプチドサブユニットの三量体タンパク質または六量体タンパク質への自己組織化を促進することに役立つ。特定の実施形態では、三量体化ドメインを有するGITRL融合ポリペプチドサブユニットは、六量体GITRL融合タンパク質に自己組織化する。一実施形態では、三量体化ドメインは、コイルドコイルドメイン、例えばロイシンジッパードメインである。例示的な三量体ロイシンジッパードメインは、Harbury et al. (1993) Science 262 : 1401-1407 (その開示内容は、あらゆる目的のために本明細書に組み込む) により記載されている、エンジニアリングされた酵母GCN4pIIバリエーションである。例示的な三量体化ドメインとして、以下のものが挙げられる：TNF受容体結合因子2 (TRAF2) (GENBANK (登録商標) アクセス番号Q12933 [gi : 23503103] ; アミノ酸310~349) ; トランスポンジン (Thrombospondin) 1 (アクセス番号P07996 [gi : 135717] ; アミノ酸291~314) ; マトリリン (Matrilin) -4 (アクセス番号O95460 [gi : 14548117] ; アミノ酸594~618 ; 軟骨基質タンパク質 (マトリリン-1) (アクセス番号NP002370 [gi : 4505111] ; アミノ酸463~496 ; 熱ショック転写因子 (HSF) (アクセス番号AA42211 [gi : 61362386] ; アミノ酸165~191 ; およびクビリン (Cubilin) (アクセス番号NP001072 [gi : 4557503] ; アミノ酸104~138)。

【0081】

特定の態様では、三量体化ドメインは、 α -ヘリカルコイルドコイルドメインを含む。有用な α -ヘリカルコイルドコイルドメインは、限定はされないが、マトリリン1、コロン1a、筋強直性ジストロフィーキナーゼ (DMPK)、ランゲリン、およびそれらの

組み合わせから誘導されるものを含む。かかる誘導体は、限定はされないが、野生型配列を有するコイルドコイルドメイン、ならびにコイルドコイルドメイン野生型配列内に1つ以上のアミノ酸置換を含む変異体を含む。コロニン1 a三量体化ドメインを含むコロニン1 aタンパク質はまた、時として、コロニン様タンパク質A、C l i p i n - A、コロニン様タンパク質p 5 7、トリプトファンアスパラギン酸を含有するコートタンパク質およびH U G O : C O R O 1 Aのいずれかとしても同義的に称される。使用可能な様々なタンパク質から誘導される野生型コイルドコイルドメインの非限定例として、マトリリン1（配列番号28）、D M P K（配列番号30）、ランゲリン（配列番号32）、およびコロニン1 a（配列番号11）が挙げられる。 α -ヘリカルコイルドコイルドメインの変異体は、対立遺伝子変異体、改変変異体、およびそれらの組み合わせを含み得る。 α -ヘリカルコイルドコイルドメインは、典型的には、アラニン、ロイシン、イソロイシン、またはバリン残基を有するリピートの1つ以上における「h」位（「a」位および／または「d」位）の1つ以上で独立して置換され得る7つ組の配列リピート「h p p h c p c」（またはa b c d e f g）中に構築される。かかる「h p p h c p c」の7つ組のリピートでは、hは疎水性残基を表し、cは典型的には荷電残基を表し、またpは極性（ひいては親水性）残基を表す。マトリリン1、コロニン1 a、筋強直性ジストロフィーキナーゼ（D M P K）、およびランゲリンの α -ヘリカルコイルドコイルドメイン変異体が、それら三量体化ドメインの7つ組のリピートの1つ以上における「a」位および／または「d」位の1つ以上がアラニン、ロイシン、イソロイシン、またはバリン残基と置換される場合に提供される。使用可能な α -ヘリカルコイルドコイルドメイン変異体の非限定例として、マトリリン1（配列番号29）、D M P K（配列番号31）、ランゲリン（配列番号32）、およびコロニン1 a（配列番号12～18）が挙げられる。特定の態様では、G I T R L融合ポリペプチドサブユニット内で用いられるマトリリン1三量体化ドメイン変異体は、限定はされないが、配列番号29の全長にわたり少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するポリペプチドを含み得る。特定の態様では、G I T R L融合ポリペプチドサブユニット内で用いられるD M P K三量体化ドメイン変異体は、限定はされないが、配列番号31の全長にわたり少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するポリペプチドを含み得る。特定の態様では、G I T R L融合ポリペプチドサブユニット内で用いられるランゲリン三量体化ドメイン変異体は、限定はされないが、配列番号33の全長にわたり少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するポリペプチドを含み得る。特定の態様では、G I T R L融合ポリペプチドサブユニット内で用いられるコロニン1 a三量体化ドメインは、限定はされないが、配列番号11の全長にわたり少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、もしくは99%の配列同一性を有するポリペプチドを含み得る。特定の態様では、コロニン1 a三量体化ドメイン変異体のコンセンサス配列が、それら三量体化ドメインの7つ組のリピートの1つ以上における「A」位および／または「D」位の1つ以上がG I T R L融合ポリペプチドサブユニット内で使用可能なアラニン、ロイシン、イソロイシン、またはバリン残基と置換される場合に、配列番号10として提供される。G I T R L融合ポリペプチドサブユニット内で使用可能な例示的なコロニン1 a野生型および変異体配列が表Aに提示される。

【0082】

10

20

30

40

【表 1】

表 A:コロニン 1a コイルドコイルドメインおよびその変異体

三量体化ドメイン	配列	配列番号	ProCoil 予測 スコア	予測された オリゴマー 状態
7つ組の配列リピート	hpphpcp-hpphpcp-hpphpcp-hpphpcp-hpph;hは疎水性残基を表し、cは典型的には荷電残基を表し、かつpは極性(ひいては親水性)残基を表す。7つ組リピートの位置は小文字 <i>abcdefg</i> によっても表され得る。	NA		
hCor1a コンセンサス (X= Ala, Leu, Ile, または Val)	XSRXEEEXRKXQATXQELQKRDRLEETVQAK	10		
hCor1a wt	VSRLEEMRKLQATVQELQKRDRLEETVQAK	11	0.101544216	TRIMER
hCor1a 変異体 1	VSRLEEEIRKLQATVQELQKRDRLEETVQAK	12	0.205919088	TRIMER
hCor1a 変異体 2	VSRIEEEIRKLQATVQELQKRDRLEETVQAK	13	0.386363142	TRIMER
hCor1a 変異体 3	ISRIEEIRKLQATVQELQKRDRLEETVQAK	14	0.431631235	TRIMER
hCor1a 変異体 4	ISRIEEIRKIQATVQELQKRDRLEETVQAK	15	0.509021117	TRIMER
hCor1a 変異体 5	ISRIEEIRKIQATVQELQKRDRLEETVQAK	16	0.668080151	TRIMER
		17		
hCor1a 変異体 6	ISRIEEIRKINATVQELQKRDRLEETVQAK		0.785463418	TRIMER
hCor1a 変異体 7	ISRIEEIRKINATIQELQKRDRLEETVQAK	18	0.729421966	TRIMER

【0083】

本明細書で提供される特定の三量体化ドメイン（例えば、コロニン 1 a 三量体化ドメインまたはその変異体）を有する G I T R L 融合ポリペプチドサブユニットは、異なる三量体化ドメインを有する他の G I T R L 融合ポリペプチドサブユニットと比べられる場合に改善された特性を呈し得る。より詳細には、コロニン 1 a 三量体化ドメインまたはその変異体を有する G I T R L 融合ポリペプチドサブユニットは、限定はされないが、形質転換された哺乳動物細胞培養物、例えば CHO 細胞において発現されるときに改善された収量；G I T R に対する改善された結合親和性；様々な生物検定における改善された活性（例えば、NF-κB シグナル伝達経路の活性化）；および／または精製もしくは部分精製されるときに改善された均一性を含む、改善された特性を呈し得る。理論によって制限されることを求めない限り、コロニン 1 a 三量体化ドメインまたはその変異体を有する G I T R L 融合ポリペプチドサブユニットのかかる改善された特性が、G I T R L 融合ポリペプチドサブユニットの作製を促進し得、かつ／または様々な治療用途における多量体 G I T R L 融合タンパク質の有効性を改善し得ると考えられる。

【0084】

G I T R L 受容体結合ドメインおよび三量体化ドメインに加えて、本明細書で提供されるような G I T R L 融合ポリペプチドサブユニットは、免疫グロブリンドメイン、例えば定常領域または「Fc」ドメインを含む。特定の態様では、本開示は、少なくともヒンジ領域を含むヒト IgG1 および IgG4 Fc ドメインの双方を提供する。特定の態様では、ヒト IgG1 または IgG4 Fc ドメインは、CH2 ドメインをさらに含む。特定の態様では、ヒト IgG1 または IgG4 Fc ドメインは、CH3 ドメインをさらに含む。特定の態様では、Fc ドメインは、ヒト IgG1 Fc ドメインまたはその変異体である。ヒト IgG Fc ドメインは、配列番号 21 に対して少なくとも 70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは 100% の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するペプチドを含み得る。使用可能な IgG Fc ドメイン（例えば IgG1 Fc ドメイン）の変異体は、限定はされないが、252Y、254T、256E、およびそれらの組み合わせからなる群から独立して選択される 1 つ以上のアミノ酸残基を有する IgG Fc ドメインを含み、ここでそれら残基は EU 付番に従っ

て付番される。特定の態様では、I g G 4 F c 領域のヒンジ領域は、完全な重鎖間ジスルフィド結合形成をもたらす、(E U 付番に従う) 2 2 8 位でのセリンからプロリンへの突然変異を含み得る。特定の態様では、I g G 4 ヒンジ領域は、配列番号 4 0 のアミノ酸 1 ~ 1 2 を含む。特定の態様では、ヒト I g G 4 F c ドメインは、配列番号 3 8 の S 2 2 8 P 突然変異を有する I g G 4 P - F c ドメインである。

【0085】

3つのG I T R L 受容体結合ドメインを一緒にする三量体化ドメインと組み合わせて、2つのI g G F c ドメイン間のジスルフィド結合形成は、六量体タンパク質の形成をもたらす(図7)。従って、免疫グロブリンドメインは、非対合免疫グロブリンドメイン同士の相互作用を介して、2つの三量体G I T R L 融合タンパク質同士を安定した六量体(6つのG I T R L 融合ポリペプチドサブユニットを含有する多量体である)に組織化することを促進する二量体化ドメインとして役立つ。いくつかの態様では、ヒトI g G 4 F c ドメインは、抗体依存性細胞傷害性(A D C C)または補体依存性細胞傷害性などのエフェクター機能を促進することなく、六量体タンパク質に安定性を賦与する。他の態様では、ヒトI g G 1 F c ドメインは、六量体タンパク質に安定性を提供する一方、抗体依存性細胞傷害性(A D C C)または補体依存性細胞傷害性などのエフェクター機能を促進する。

【0086】

いくつかの態様では、本開示は、自己組織化して、G I T R に特異的に結合することができる六量体タンパク質を形成する単鎖ポリペプチドサブユニットを提供する。例示的なポリペプチドサブユニットは、ヒトI g G F c ドメイン、機能性三量体化ドメイン、およびG I T R L の受容体結合ドメインを含む。具体的な態様では、ポリペプチドサブユニットは、六量体タンパク質に自己組織化することができる。いくつかの態様では、ポリペプチドサブユニットは、以下のように、アミノ末端からカルボキシ末端に向かって配置される: ヒトI g G F c ドメイン、次に三量体化ドメイン、続いてG I T R L 受容体結合ドメイン。3つのドメインは、直接隣接していてもよい。例えば、いくつかの態様では、ヒトI g G F c ドメインのカルボキシ末端は、三量体化ドメインのアミノ末端に直接融合し、且つ、三量体化ドメインのカルボキシ末端は、G I T R L 受容体結合ドメインのアミノ末端に直接融合している。あるいは、2つまたは3つのドメインは、1つまたは複数のリンカー、スペーサ、またはその他の異種ポリペプチドによって隔てることもできる。有用なリンカーとして、限定はされないが、(G l y₄)_nモチーフ、(G l y₄ S e r)_nモチーフ(配列番号19)、S e r (G l y₄ S e r)_nモチーフ(配列番号22)、G G G G S G G G G S G G G G S A L (配列番号23)、またはG G G G S G G G G S G G G G S A (配列番号24)、およびそれらの組み合わせが挙げられる(式中、nは、1、2、3、4、5、6、7、8、9および10からなる群から選択される正の整数である)。

【0087】

いくつかの態様では、本明細書に記載するG I T R L 融合ポリペプチドサブユニットは、ヒトG I T R に特異的に結合することができる。いくつかの態様では、本明細書に記載するG I T R L 融合ポリペプチドサブユニットは、非ヒト霊長類G I T R、例えば、カンクイザルG I T RまたはアカゲザルG I T R に特異的に結合することができる。いくつかの態様では、本明細書に記載するG I T R L 融合ポリペプチドサブユニットは、マウスG I T RまたはラットG I T R に結合しない。

【0088】

本明細書に記載するG I T R L 融合ポリペプチドサブユニットは、1つまたは複数の保存的アミノ酸変化、例えば、最大10の保存的变化(例えば、2つの置換されたアミノ酸、3つの置換されたアミノ酸、4つの置換されたアミノ酸、または5つの置換されたアミノ酸など)を含有し得るが、ただし、これらの変化は、G I T R L 融合ポリペプチドサブユニットまたは多量体G I T R L F P の生化学的機能を変えることなく、ポリペプチドに達成できるものとする。

【0089】

例えば、1つまたは複数の保存的变化は、GITRに結合するその能力を変えることなく、GITRL受容体結合ドメインに実施することができる。同様に、1つまたは複数の保存的变化は、三量体化するその能力を改変することなく、三量体化ドメインに実施することができる。

【0090】

本明細書で提供されるGITRL融合ポリペプチドサブユニットはまた、GITRLのアスパラギン残基161のN結合グリコシル化を遮断または低減する、1つ以上のアミノ酸置換、挿入、または欠失を含み得る。特定の態様では、GITRLのアスパラギン残基161は、グリコシル化を遮断または低減するため、アスパラギン残基以外の任意のアミノ酸と置換される。特定の態様では、GITRLのアスパラギン残基161は、アスパルチル残基と置換され、例えば、配列番号4で示されるようなGITRLのN161D変異体である。特定の態様では、GITRLのアスパラギン残基161のN結合グリコシル化は、GITRL残基161～163のN結合グリコシル化部位配列NNTを、もはや基準のN結合グリコシル化部位配列NX（T、S、またはC）に一致しないように破壊するアミノ酸の置換、挿入、または欠失により遮断または低減される。特定の実施形態では、GITRL融合ポリペプチドサブユニットまたは多量体GITRL融合タンパク質の生化学的機能を改変することなくポリペプチド中に変化を設けることができると仮定すると、GITRLのアスパラギン残基161のN結合グリコシル化を遮断または低減するため、スレオニル残基163とセリニルまたはシステイニル以外のアミノ酸残基との置換を用いることができる。

10

20

【0091】

さらに、ポリペプチドドメインの一部は、その機能の全てを損傷または排除することなく、欠失させることもできる。同様に、以下に記載するように、その機能を損傷または排除することなく、ポリペプチド鎖に挿入または付加を実施することができる。ポリペプチドの1つまたは複数の機能を実質的に損傷することなく実施することができる他の修飾として、例えば、特異アミノ酸を組み込むインビボまたはインビトロ化学および生化学修飾が挙げられる。こうした修飾として、例えば、アセチル化、カルボキシル化、リン酸化、グリコシル化、例えば、放射性核種による標識、ならびに酵素修飾が挙げられ、これらは、当業者には容易に認識されよう。ポリペプチドの様々な標識方法、こうした目的に有用な標識は、当分野においてよく知られており、放射性同位体、例えば、 ^{32}P 、発蛍光団、化学発光剤、酵素、および抗リガンドが挙げられる。

30

【0092】

融合ポリペプチドサブユニットは、異種薬剤、例えば、安定剤、免疫応答改質剤、または検出可能な薬剤をさらに含んでもよい。いくつかの態様では、異種薬剤は、ペプチド結合を介して、ポリペプチドサブユニットに融合した1つまたは複数の追加のポリペプチド配列、例えば、シグナル配列（例えば、分泌シグナル配列）、リンカー配列、アミノ酸タグもしくは標識、または精製を容易にするペプチドもしくはポリペプチド配列を含む。いくつかの態様では、異種ポリペプチドは、IgG-FcドメインのN末端に融合させることができ、異種ポリペプチドは、GITRLの受容体結合ドメインのC末端に融合させることができ、異種ポリペプチドは、IgG-FcドメインのC末端および三量体化ドメインのN末端に融合させることができ、または異種ポリペプチドは、三量体化ドメインのC末端およびGITRLの受容体結合ドメインのN末端に融合させることができる。あるいは、異種ポリペプチドは、ドメインの機能的特徴が維持される限りにおいて、IgG-Fcドメイン、三量体化ドメイン、またはGITRL受容体結合ドメインのいずれかの内部に融合させることもできる。

40

【0093】

いくつかの態様では、異種薬剤は、ポリペプチドサブユニットに化学的にコンジュゲートすることができる。ポリペプチドサブユニットにコンジュゲートすることができる例示的な異種薬剤として、限定されるものではないが、リンカー、薬物、毒素、造影剤、放射

50

性化合物、有機および無機ポリマー、ならびにポリペプチドサブユニット自体によって賦与されない所望の活性を提供し得るいずれか他の組成物が挙げられる。具体的な薬剤として、限定されるものではないが、ポリエチレングリコール（PEG）、細胞傷害性薬剤、放射性核種、造影剤、ビオチンが挙げられる。

【0094】

特定の態様では、GITRL融合ポリペプチドサブユニットならびにそれらのサブユニットを含む任意の三量体または六量体タンパク質は、対照、（例えば、投与決定のための）診断アッセイを開発または実行するための参照標準、または研究ツールとして用いることができる。例えば、本開示は、上記のようなGITRL融合ポリペプチドサブユニットを提供し、ここでGITRL受容体結合ドメインは、配列番号34、35、36、または37のいずれかを含む。特定の態様では、対照、参照標準、またはツールは、配列番号6に対して少なくとも70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、もしくは100%の配列同一性を有するGITRL融合ポリペプチドサブユニットを含み得る。別の例では、本開示は、上記のような多量体タンパク質を形成し得るGITRL融合ポリペプチドサブユニットを提供するが、ここでは、GITRL受容体結合ドメインは、マウスまたはラットGITRL受容体結合ドメインであり、かつFcドメインは、ヒトまたはマウス起源のFcドメインであり、かつ多量体化ドメインは、例えば三量体化ドメイン、例えばコロニン1a三量体化ドメインである。この融合タンパク質は、齧歯類におけるインビボ実験を実行するため、用いることができる。理論によって制限されることを求めないが、マウスにおける異なるIgGアイソタイプによって与えられるIgGFcドメインエフェクター機能は一般に、ヒトにおける同じIgGアイソタイプによって与えられるものと異なる。しかし、特定のマウスIgGアイソタイプがヒトにおける他のIgGアイソタイプに類似または匹敵すると考えられ、例えばマウスIgG2aがヒトIgG1と類似すると考えられ、またマウスIgG1がヒトIgG4に匹敵すると考えられることが以前に示されている。そのようなものとして、所与のマウスIgGFcドメインアイソタイプを有するマウスにおいて得られる結果は、類似または匹敵するヒトIgGアイソタイプを有するヒトにおいて得られる結果を予測するため、用いることができる。

【0095】

多量体GITRL融合タンパク質

上記のようなGITRL融合ポリペプチドサブユニットは、六量体GITRLFPに自己組織化し得る。したがって、本開示は、上記のような6つのポリペプチドサブユニットを含む六量体タンパク質を提供する。実施例に記載の例示的なポリペプチドサブユニットは、本明細書中で「六量体GITRLFP」と称される六量体タンパク質に自己組織化する。六量体GITRLFPに自己組織化するGITRL融合ポリペプチドサブユニットのアミノ酸配列の非限定例が、配列番号6で提供される。にもかかわらず、当業者は、本開示に照らして、極めて多数の他の配列についても本明細書で示される六量体GITRLFPについての判定基準を満たすことを理解するであろう。配列番号6に対して少なくとも70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、もしくは100%の配列同一性を有する6つのGITRL融合ポリペプチドサブユニットを含む六量体GITRLFPもまた、本明細書で提供される。

【0096】

特定の態様では、本明細書で提供される特定のGITRL融合ポリペプチドサブユニットはまた、3つのGITRL融合ポリペプチドサブユニットを含む三量体GITRLFPに自己組織化し得る。これは、例えば、三量体タンパク質を作製するため、二量体化できないFcドメインがGITRLFP中で用いられる場合に生じ得る。二量体化できず、それ故に三量体GITRLFPの作製に適したFcドメインの例として、限定はされないが、単量体IgG1Fc分子（Ying et al. J Biol Chem. Jun 1, 2012; 287(23):19399-19408）および一価IgG4分子（Wilkinson, et al. MAbs. May 1, 2013; 5(3):

406-417) が挙げられる。

【0097】

本明細書で提供されるような多量体GITRL融合タンパク質、例えば六量体GITRL FPは、一次抗原を経験したT細胞上、例えば、ヒト、カニクイザル、アカゲザル、またはそれらの任意の組み合わせに由来する一次抗原を経験したT細胞上で発現されるようなGITRに特異的に結合し得る。

【0098】

本明細書で提供されるような六量体タンパク質、例えば六量体GITRL FPは、組換えGITRに特異的に結合し得る。特定の態様では、本明細書で提供されるような六量体タンパク質、例えば六量体GITRL FPは、約1 nM～約120 nM、例えば約10 nM～約100 nM、例えば約20 nM～約100 nM、例えば約60 nM～約100 nMの結合親和性（すべては動力的排除アッセイによって測定された）で、組換えヒトGITRに結合し得る。例えば、本明細書で提供されるような六量体タンパク質、例えば六量体GITRL FPは、約0.1 nM、約0.5 nM、約1 nM、約2 nM、約3 nM、約4 nM、約5 nM、約6 nM、約7 nM、約8 nM、約9 nM、約10 nM、約20 nM、約30 nM、約40 nM、約50 nM、約60 nM、約70 nM、約80 nM、約90 nM、約100 nM、約120 nM、約250 nMもしくは約500 nMの結合親和性（すべては動力的排除アッセイによって測定された）で組換えヒトGITRに結合し得る。特定の態様では、本明細書で提供されるような六量体タンパク質、例えば六量体GITRL FPは、約0.1 nM、約0.5 nM、約1 nM、約2 nM、約3 nM、約4 nM、約5 nM、約6 nM、約7 nM、約8 nM、約9 nM、約10 nM、約20 nM、約30 nM、約40 nM、約50 nM、約60 nM、もしくは約70 nMのいずれかから約90 nM、約100 nM、約120 nM、約250 nM、もしくは約500 nMのいずれかの結合親和性（すべては動力的排除アッセイによって測定された）で組換えヒトGITRに結合し得る。特定の態様では、本明細書で提供されるような六量体タンパク質、例えば六量体GITRL FPは、約82 nMの結合親和性（動力的排除アッセイによって測定された）で組換えヒトGITRに結合し得る。当業者によって十分に理解されているように、結合親和性は、幾つかの異なる方法および／または機器によって測定され得、また相対的結合親和性は、方法または機器に応じて変動し得る。

【0099】

別の例では、本明細書で提供されるような六量体タンパク質、例えばGITRL FPは、一次抗原を経験したカニクイザルT細胞、例えばCD4⁺もしくはCD8⁺T細胞で発現されるカニクイザルGITRに結合し得る。

【0100】

特定の態様では、本明細書で提供されるような六量体タンパク質、例えばGITRL FPは、プレートに基づくアッセイにおいて、抗原を経験したCD3⁺T細胞の用量依存性増殖を誘導し得る。例えば、本明細書で提供されるような六量体タンパク質、例えばGITRLを用いるインビトロアッセイでは、約0.03 nM～約0.2 nM、例えば約0.16 nMの六量体タンパク質濃度で一次抗原を経験したヒトCD3⁺T細胞において20%の最大増殖応答（EC₂₀）が達成され得、約0.2 nM～約1 nM、例えば約0.4 nMの六量体タンパク質濃度で一次抗原を経験したヒトCD3⁺T細胞において50%の最大増殖応答（EC₅₀）が達成され得、また約0.7 nM～約5 nM、例えば約1.8 nMの六量体タンパク質濃度で一次抗原を経験したヒトCD3⁺T細胞において90%の最大増殖応答（EC₉₀）が達成され得る（すべてはチミジン取り込みによって測定された）。

【0101】

特定の態様では、本明細書で提供されるような六量体タンパク質、例えばGITRL IgG融合タンパク質は、抗原を経験したT細胞、例えば、ヒト一次抗原を経験したCD3⁺T細胞からの用量依存性サイトカイン放出を誘導し得る。特定の態様では、放出されたサイトカインは、IFN γ 、TNF α 、IL-5、IL-10、IL-2、IL-4、

IL-13、IL-8、IL-12 p70、IL-1 β 、またはそれらの任意の組み合わせである。特定の態様では、サイトカインは、IFN γ 、TNF α 、IL-5、IL-10、またはそれらの任意の組み合わせである。同様に、本明細書で提供されるような六量体タンパク質、例えばGITRL-FPは、一次抗原を経験したカニクイザルT細胞および一次抗原を経験したアカゲザルT細胞におけるT細胞増殖およびサイトカイン放出を増強し得る。

【0102】

さらなる態様では、本明細書で提供されるような六量体タンパク質、例えばGITRL-FPは、GITR発現T細胞におけるNF κ B経路を活性化し得る。例えば、本明細書で提供されるような六量体タンパク質、例えばGITRL-FPは、NF κ Bシグナル伝達経路の刺激に応答してルシフェラーゼを生成するGITR発現Jurkat-NF κ B-ルシフェラーゼレポーター細胞におけるNF κ B経路を、六量体GITRL-IgG1-FPに対して約20 pM~約300 pM、例えば約182 pM、また六量体GITRL-IgG4-FPに対して289 pMのEC₅₀で活性化し得る。あるいは、本明細書で提供されるような六量体タンパク質、例えばGITRL-FPは、ヒトGITR、カニクイザルGITRまたはアカゲザルGITRを発現する細胞におけるNF κ B経路を活性化し得る。

【0103】

さらに別の態様では、本明細書で提供されるような六量体タンパク質、例えばGITRL-FPは、がん治療を必要とする被験者に有効用量として投与されるとき、例えば腫瘍成長を緩徐化するか、腫瘍成長を停止させるか、または既存の腫瘍のサイズを低減することにより、がん治療を促進し得る。特定の態様では、がん治療の促進は、T細胞の存在下で達成され得る。特定の態様では、本明細書で提供されるような六量体タンパク質、例えばGITRL-FPは、治療を必要とする被験者に有効用量として投与されるとき、腫瘍成長を、アイソタイプに合致した対照分子の投与と比べて、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも100%減少させ得る。

【0104】

さらに別の態様では、本明細書で提供されるような六量体タンパク質、例えばGITRL-FPは、治療を必要とする被験者、例えばウイルスに感染した被験者に有効用量として投与されるとき、例えば、ウイルス増殖を緩徐化するか、ウイルス増殖を停止させるか、または感染再発もしくは感染再発頻度を減少させることにより、ウイルス感染の治療を促進し得る。かかる被験者は、慢性または潜在性のいずれかのウイルス感染を有し得る。特定の態様では、治療は、潜在性ウイルス感染を有する被験者に対象とし、感染再発または感染再発頻度をプラセボで治療された被験者と比べて低下させる。特定の態様では、ウイルス感染の治療の促進は、T細胞の存在下で達成され得る。特定の態様では、本明細書で提供されるような六量体タンパク質、例えばGITRL-FPは、治療を必要とする被験者に有効用量として投与されるとき、ウイルス負荷を、アイソタイプに合致した対照分子の投与と比べて、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも100%低下させ得る。特定の態様では、本明細書で提供されるような六量体タンパク質、例えばGITRL-FPは、治療を必要とする被験者に有効用量として投与されるとき、ウイルス感染の再発を、アイソタイプに合致した対照分子の投与と比べて、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、もしくは少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%もしくは少なくとも100%低下させ得る。

【0105】

さらなる態様では、本明細書で提供されるような六量体タンパク質、例えばGITRL

I g G 4 融合タンパク質は、抗原を経験した G I T R 発現 T 細胞の増殖を G I T R への結合を通じて誘導し得るが、抗原を経験した T 細胞に対する補体依存性または抗体依存性細胞傷害性を実質的に誘導することはない。さらに、特定の態様では、本明細書で提供されるような六量体タンパク質、例えば多量体 G I T R L I g G 1 融合タンパク質は、抗原を経験した G I T R 発現 T 細胞の増殖を G I T R への結合を通じて誘導し得るが、C 1 q に結合し、抗原を経験した C D 4 + T 細胞、特に F O X P 3 + C D 4 + 制御性 T 細胞の F c 受容体媒介性の抗体依存細胞傷害性または食作用を誘導する。

【0106】

G I T R L I g G 融合ポリペプチドサブユニットをコードするポリヌクレオチド

本開示は、本明細書で提供されるような G I T R L 融合ポリペプチドサブユニットまたは六量体タンパク質、例えば G I T R L F P をコードする核酸を含むポリヌクレオチドをさらに提供する。G I T R L 融合ポリペプチドサブユニットをコードする例示的なポリヌクレオチド配列は、配列番号 5 によって表される。特定の態様では、I g G F c ドメイン、三量体化ドメインおよび G I T R L 受容体結合ドメインをコードする核酸配列は、5' から 3' の方向へ連結され、例えば 5' から 3' の方向へ隣接して連結される。他の態様では、提供されるポリヌクレオチドは、例えば分泌シグナルペプチドまたは膜局在化配列をコードするシグナル配列をさらに含み得る。ありとあらゆる G I T R L 融合ポリペプチドサブユニットまたは多量体、例えばそのサブユニットを含む六量体タンパク質をコードするポリヌクレオチドが、本開示によって提供される。

【0107】

特定の態様では、本開示は、G I T R L 融合ポリペプチドサブユニットをコードする核酸を含むポリヌクレオチドを提供する。特定の態様では、核酸配列は配列番号 5 を含む。

【0108】

本明細書で提供されるような G I T R L 融合ポリペプチドサブユニット、または六量体タンパク質、例えば G I T R L F P をコードするポリヌクレオチドは、本明細書に記載の融合ポリペプチドをコードする、デオキシリボヌクレオチド (DNA、cDNA) またはリボデオキシヌクレオチド (RNA) 配列、またはいずれかのヌクレオチドの修飾形態を含む。同用語は、DNA および / または RNA の一本鎖および二本鎖形態を含む。

【0109】

さらに、1 つまたは少数の欠失、付加および / または置換を含む核酸配列を含むポリヌクレオチドが提供される。こうした変化は、連続的であってもよいし、または核酸内で異なる位置に分布させてもよい。実質的に同一の核酸配列、例えば、1 つ、または 2 つ、または 3 つ、または 4 つ、またはそれ以上のヌクレオチド欠失、付加および / または置換を含有することができる。いくつかの態様では、1 つまたは複数の欠失、付加および / または置換は、ポリヌクレオチド配列によりコードされるリーディングフレームを改変しないため、修飾されている (「突然変異体」) が、実質的に同一のポリペプチドが、核酸の発現時に生成される。

【0110】

アミノ酸 (および / または核酸) 配列同士の類似性は、配列同士の類似性 (あるいは、配列同一性とも呼ばれる) として表現される。配列同一性は、同一性 (または類似性) パーセンテージとして測定されることが多く; パーセンテージが高いほど、2 つの配列の一次活性化構造も類似している。「同一性パーセント (%)」は、本明細書において、配列をアラインメントし、必要であれば、最大配列同一性パーセントを達成するために、候補および / または選択した配列にギャップを導入した後、保存的アミノ酸置換を配列同一性としてみなさずに、選択した配列中のアミノ酸残基と同一である、候補配列中のアミノ酸残基のパーセンテージとして定義される。

【0111】

したがって、本明細書で提供されるような G I T R L 融合ポリペプチドサブユニット、または六量体タンパク質、例えば G I T R L F P をコードする核酸を含むポリヌクレオチドは、配列番号 5 またはそれに対する少なくとも 1 つの部分配列に対して、少なくとも

10

20

30

40

50

約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、もしくは少なくとも96%、多くは少なくとも97%、98%、もしくは99%同一であり得る。相同性パーセント（すなわち、配列類似性）または同一性パーセントの決定を目的とするアラインメントは、例えば、公知または専有のアルゴリズムを用いて、当業者の技能範囲内の様々な方法で達成することができる。例えば、配列類似性は、ペアワイズ・アラインメント法、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN、もしくはALIGN-2、またはMegalign（DNASTAR）、ClustalWもしくはT-Coffeeソフトウェアなどの複数の配列アラインメント法を用いて、決定することができる。当業者は、適切なスコア関数、例えば、ギャップペナルティまたはアラインメントを測定するためのスコアマトリックスを決定することができ、これには、比較する配列の全長にわたって最適なアラインメントクオリティを達成する上で必要なあらゆるアルゴリズムが含まれる。さらに、配列アラインメントは、構造アラインメント法（例えば、二次元もしくは三次元構造情報を用いて、2つ以上の配列をアラインメントする方法）、または配列、構造、および分子系統情報を組み合わせて、候補タンパク質配列を同定し、最適にアラインメントするハイブリッド法を用いて、達成することができる。

10

【0112】

NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., J. Mol. Biol. (1990) 215: 403) は、配列解析プログラムblastp、blastn、blastx、tblastnおよびtblastxに関連して使用するために、国立生物工学情報センター (National Center for Biotechnology Information) (NCBI, Bethesda, MD.) などの複数のソースから、およびインターネットで入手可能である。このプログラムを用いて、配列同一性を決定する方法についての記載は、インターネットのNCBIウェブサイトから入手可能である。

20

【0113】

このように、配列番号5と実質的に同一か、または実質的に類似した核酸配列は、本開示に包含される。配列が、あるヌクレオチドについてヌクレオチド基準により、参照配列（例えば、配列番号4）の少なくともサブ配列と同一であれば、その配列は、配列番号5と実質的に同一である。こうした核酸は、例えば、配列番号4に対して、挿入、欠失、および置換を含み得る。例えば、こうした核酸は、参照核酸配列と、少なくとも約70%、80%、90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一であるか、または参照ポリペプチド配列、例えば、配列番号4と、少なくとも約70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、もしくは99%同一である。

30

【0114】

さらに、GITRL融合ポリペプチドサブユニット、または本明細書に記載する六量体タンパク質、例えば、GITRL FPをコードする核酸を含むポリヌクレオチドは、核酸の発現または複製を促進するポリヌクレオチド配列、例えば、発現調節配列および／またはベクター配列を含んでもよい。同様に、GITRL融合ポリペプチドサブユニット、または本明細書に記載する六量体タンパク質、例えば、GITRL FPをコードする核酸を含むポリヌクレオチドは、コードされたポリペプチドに機能的属性を付与する追加のコード配列を含んでもよい。かかる配列は、限定はされないが、分泌シグナル配列および膜局在化シグナルを含む。GITRL融合ポリペプチドサブユニットをコードする核酸に作動可能に連結されたシグナルペプチドをコードする核酸の非限定例が、配列番号7で提供される。

40

【0115】

GITRL融合ポリペプチドサブユニット、または本明細書に記載する六量体タンパク質、例えば、GITRL FPをコードする核酸を含むポリヌクレオチドは、慣用の技術により、真核細胞発現ベクターなどのベクターに導入することができる。従って、本開示は、本明細書に記載するポリヌクレオチド配列を含むベクターを提供する。発現ベクター

50

は、cDNAの転写を開始および増強すると共に、その適正なスプライシングおよびポリアデニル化を確実にする調節配列を賦与することによって、細胞中のGITRL融合ポリペプチドサブユニット、または本明細書に記載する六量体タンパク質、例えば、GITRL-FPをコードするポリヌクレオチド配列の転写を可能にするように設計される。多数の発現ベクターが当業者には周知であり、市販されているか、または慣用の分子生物学手順に従い個々の成分から組織化することができる。

【0116】

発現制御配列および発現ベクターの選択は、宿主細胞の選択に左右される。多様な発現宿主／ベクター組み合わせを使用することができる。真核生物宿主に有用な発現ベクターとして、例えば、SV40、ウシバピローマウイルス、アデノウイルスおよびサイトメガロウイルスからの発現制御配列を含むベクターが挙げられる。細菌宿主に有用な発現ベクターとしては、周知の細菌プラスミド、例えば、pCR1、pBR322、pMB9およびこれらの誘導体を含む大腸菌（*E. coli*）由来のプラスミド、より広宿主域のプラスミド、例えば、M13および繊維状単鎖DNAファージが挙げられる。

【0117】

GITRL融合ポリペプチドサブユニット、または本明細書に記載する六量体タンパク質、例えば、GITRL-FPの発現に好適な宿主細胞としては、適切なプロモータの制御下にある、原核生物、酵母、昆虫または高等真核生物細胞が挙げられる。原核生物としては、グラム陰性またはグラム陽性生物、例えば、大腸菌（*E. coli*）または桿菌が挙げられる。高等真核生物細胞としては、以下に記載する哺乳動物起源の樹立細胞株が挙げられる。また、無細胞翻訳系を使用してもよい。抗体生成を含むタンパク質生成方法に関するさらなる情報は、例えば、米国特許公開第2008/0187954号明細書、米国特許第6,413,746号明細書および米国特許第6,660,501号明細書、ならびに国際公開第2004/009823号パンフレットに記載されており、これらの各々は、全体として参照により本明細書に組み込む。

【0118】

また、本明細書に記載するポリヌクレオチドまたはベクターを含む宿主細胞も提供される。有利には、ポリペプチドサブユニットまたは本明細書に記載する六量体タンパク質を発現するために、様々な哺乳動物または昆虫細胞培養系を使用することができる。哺乳動物細胞における組換えタンパク質の発現は、こうしたタンパク質が、概して正しく折り畳まれ、適切に修飾され、しかも完全に機能性であることから、実施することができる。好適な哺乳動物宿主細胞株の例として、HEK-293およびHEK-293T、Gluzman（Cell 23:175, 1981）により記載されるサル腎臓細胞のCOS-7株、ならびに例えば、L細胞、C127、3T3、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）、HeLaおよびBHK細胞株などの他の細胞株が挙げられる。哺乳動物発現ベクターは、非転写エレメント、例えば、複製起点、発現させようとする遺伝子に連結した好適なプロモータおよびエンハンサー、ならびに他の5'もしくは3'フランキング非転写配列、および5'もしくは3'フランキング非翻訳配列、例えば、必要なリボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライスドナー、およびアクセプター部位、ならびに転写終結配列を含んでもよい。昆虫細胞における異種タンパク質の生成のためのバキュロウイルス系が、Luckow and Summers, BioTechnology 6:47 (1988)により論じられている。

【0119】

GITRL融合ポリペプチドサブユニット、または本明細書に記載する六量体タンパク質、例えば、GITRL-FPのようなタンパク質の発現および精製は、標準的実験技術を用いて実施することができる。こうした方法の例は、論じられているか、または本明細書で参照される。発現の後、精製されたタンパク質は、例えば、機能分析、抗体生成、および診断学、ならびに後述する予防および治療用途を含む多くの用途を有する。例えば、ポリペプチドサブユニットまたは本明細書に記載する六量体タンパク質を用いて、予防および／または治療投与に好適なワクチン組成物を含む医薬組成物を生成することができる

。

【0120】

形質転換宿主によって産生されたG I T R L融合ポリペプチドサブユニット、または本明細書に記載する六量体タンパク質、例えば、G I T R L F Pのようなタンパク質は、任意の好適な方法に従い精製することができる。こうした標準的方法として、クロマトグラフィー（例えば、イオン交換、アフィニティおよびサイジングカラムクロマトグラフィー）、遠心分離、示差溶解度、またはタンパク質精製のためのいずれか他の標準的技術が挙げられる。適切なアフィニティカラムの通過による容易な精製を可能にするために、ヘキサヒスチジン（配列番号11）、マルトース結合ドメイン、インフルエンザコート配列、およびグルタチオン-S-トランスフェラーゼなどのアフィニティタグをタンパク質に結合することができる。単離したタンパク質は、タンパク質分解、核磁気共鳴およびX線結晶学などの技術を用いて物理的に特性決定することもできる。

10

【0121】

例えば、市販のタンパク質濃縮フィルタ、例えば、Am i c o nまたはM i l l i p o r e P e l l i c o n超濾過ユニットを用いて、培地中に組換えタンパク質を分泌する系からの上清を最初に濃縮することができる。濃縮ステップの後、濃縮物を好適な精製マトリックスに適用することができる。あるいは、アニオン交換樹脂、例えば、ペンダントジエチルアミノエチル（D E A E）基を有するマトリックスまたは基質を使用することができる。マトリックスは、アクリルアミド、アガロース、デキストラン、セルロースまたはタンパク質精製に一般に使用されるその他のタイプであってよい。あるいは、カチオン交換ステップを使用することもできる。好適なカチオン交換体としては、スルホプロピルまたはカルボキシメチル基を含む様々な不溶性マトリックスが挙げられる。最後に、インフルエンザB／ヤマガタ（Y a m a g a t a）ウイルス結合分子をさらに精製するために、疎水性R P-H P L C担体、例えば、ペンダントメチルもしくは他の脂肪族基を有するシリカゲルを使用した1つまたは複数の逆相高性能液体クロマトグラフィー（R P-H P L C）ステップを使用することができる。均質な組換えタンパク質を提供するために、前述した精製ステップの一部または全部を様々な組み合わせで使用することもできる。

20

【0122】

G I T R L融合ポリペプチドサブユニット、または本明細書に記載する六量体タンパク質、例えば、細菌培養で産生されたG I T R Lは、例えば、細胞ペレットからの初回抽出ステップ、続いて、1回または複数回の濃縮ステップ、塩析ステップ、水性イオン交換もしくはサイズ排除クロマトグラフィーステップによって単離することができる。高性能液体クロマトグラフィー（H P L C）は、最終精製ステップのために、使用することができる。組換えタンパク質の発現に使用される微生物細胞は、凍結融解サイクルの繰り返し、超音波処理、機械的破碎、または細胞溶解剤の使用など、任意の慣用の方法により破碎することができる。

30

【0123】

医薬組成物および投与方法

本明細書で提供されるような六量体タンパク質、例えば本明細書で提供されるようなG I T R L F Pを調製し、投与方法は、それを必要とする被験者へは、例えばがん患者における免疫応答を増強する、例えば腫瘍成長を阻害もしくは低減するため、またはウイルス感染を有する患者へは、例えばウイルス負荷を低減するかまたはウイルス感染の再発を低減するため、当業者に周知であるかまたは当業者によって容易に決定され得る。本明細書に記載する六量体タンパク質、例えば、G I T R L F Pの投与経路は、例えば、経口、非経口、吸入または局所であってよい。本明細書で使用される非経口という用語は、例えば、静脈内、動脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、直腸、または腔内投与を含む。これらの投与形態は全て、好適な形態として明らかに考慮されるが、別の投与形態の例として、特に、静脈内もしくは動脈内注射または滴注がある。通常、好適な医薬組成物は、限定されるものではないが、バッファー（例えば、酢酸、リン酸もしくはクエン酸バッファー）、界面活性剤（例えば、ポリソルベート）、安定剤（例えば、ヒトアルブミン）などを

40

50

含み得る。本明細書の教示内容に適合可能な別の方法では、本明細書に記載する六量体タンパク質、例えば、本明細書に記載のGITRL FPは、有害な細胞集団の部位に直接送達され、これによって治療薬に対する患部組織の曝露を増大することができる。

【0124】

本明細書に記載する特定の医薬組成物は、例えば、カプセル、錠剤、水性懸濁液または溶液などの許容される剤形で経口投与することができる。また、特定の医薬組成物は、鼻内エアゾールまたは吸入によって投与することもできる。こうした組成物は、ベンジルアルコールまたはその他の好適な防腐剤、バイオアベイラビリティを高める吸収促進剤、および／またはその他の慣用の可溶化もしくは分散剤を使用して、食塩溶液として調製することができる。

10

【0125】

単一剤形を製造するために担体材料と組み合わせることができる本明細書に記載する六量体タンパク質、例えば、GITRL FPの量は、治療する対象および具体的な投与方法に応じて変動し得る。組成物は、単回用量、複数回用量として、または既定期間にわたる注入で投与することができる。また、最適な所望の応答（例えば、治療または予防応答）をもたらすように、投与レジメンを調節することもできる。

【0126】

「治療に有効な用量もしくは量」または「有効量」とは、治療しようとする疾患または状態を有する患者の治療に関して、投与されると、プラスの治療応答をもたらす本明細書に記載する六量体タンパク質、例えば、GITRL FPの量を意味する。

20

【0127】

キット

本開示は、さらに、本明細書に記載する六量体タンパク質、例えば、GITRL FPを含み、本明細書に記載する方法を実施するために用いることができるキットも提供する。いくつかの態様では、キットは、少なくとも1種の本明細書に記載する精製六量体タンパク質、例えば、GITRL FPを1つまたは複数の容器内に含む。当業者は、本明細書で提供される開示した六量体タンパク質、例えば、GITRL FPが、当分野でよく知られている既定のキットフォーマットの1つに容易に組み込まれ得ることを容易に認識されよう。

【0128】

免疫アッセイ

本明細書に記載する六量体タンパク質、例えば、GITRL FPは、当分野で公知の任意の方法により、特異的および／または選択的結合についてアッセイすることができる。用いることができる免疫アッセイとして、いくつか挙げると、ウェスタンブロット、放射性免疫アッセイ、ELISA（酵素結合イムノソルベントアッセイ）、蛍光フォーカスアッセイ（FFA）、マイクロ中和アッセイ、血球凝集阻害アッセイ（HAI）、「サンドイッチ」免疫アッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降素反応、ゲル拡散沈降反応、免疫核酸アッセイ、凝集アッセイ、補体結合アッセイ、免疫放射定量測定、蛍光免疫アッセイなどの技法を用いる競合または非競合アッセイシステムがあるが、これらに限定されるものではない。こうしたアッセイは、当分野ではよく知られている（例えば、Ausubel et al., eds, (1994) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, Inc., NY) Vol. 1を参照；これは、全体として参照により本明細書に組み込む）。FFA、マイクロ中和アッセイ、およびHAIは、以下の実施例に詳述する。

30

40

【0129】

本明細書に記載する六量体タンパク質の結合特性の決定に好適な方法および試薬は、当分野では公知であり、および／または市販されている。こうした速度論的分析のために設計された装置およびソフトウェアは市販されている（例えば、BIACore（登録商標）、BIAevaluation（登録商標）software, GE Healthcare；KINEXA（登録商標）Software, Sapidyne Instru

50

ments)。

【0130】

免疫増強および治療の方法

抗原活性化の間または後に抗原を経験したT細胞上、例えば抗原を経験したCD4⁺もしくはCD8⁺T細胞上のGITRに会合することによる被験者（例えば哺乳動物被験者、例えばヒト被験者）における抗原特異的免疫応答の増強は、多種多様な方法を用いて達成され得る。選択方法は主に、免疫応答を増強することが所望される場合の抗原のタイプに依存することになり、また利用可能な様々な方法が以下で考察される。いかなる方法が選択されても、本明細書で提供されるような六量体タンパク質、例えばGITRL-FPは、被験者、例えばヒト患者に、被験者のT細胞に提示されるように、抗原によるT細胞の予備刺激の間または直後に投与され得る。OX40六量体タンパク質を用いて被験者、例えばヒト被験者における免疫応答を活性化する例示的な方法は、米国特許出願公開第2016/0024176号明細書（その全体が参照により本明細書中に援用される）中に提示されており、本明細書で提供されるGITRL-FPとの併用に適応され得る。

10

【0131】

特定の態様では、本開示は、抗原を経験したT細胞、例えば抗原を経験したCD4⁺もしくはCD8⁺T細胞の生存または増殖を促進するための方法であって、抗原を経験したT細胞、例えば抗原を経験したCD4⁺もしくはCD8⁺T細胞を、本明細書で提供されるような六量体タンパク質、例えばGITRL-FPと、六量体タンパク質がT細胞、例えば抗原を経験したCD4⁺もしくはCD8⁺T細胞の表面上のGITRに特異的に結合し得る場合の条件下で接触させるステップを含む、方法を提供する。特定の態様では、接触させるステップはインビトロである。特定の態様では、接触させるステップはインビボであり、例えば治療を必要とする被験者への六量体タンパク質の有効用量での投与を介する。特定の態様では、接触させるステップは、T細胞活性化、例えば抗原活性化と同時に進行ことができ、特定の態様では、接触させるステップは、T細胞活性化後に行うことができる。

20

【0132】

さらなる態様では、本開示は、抗原を経験したT細胞、例えば抗原を経験したCD4⁺もしくはCD8⁺T細胞からのサイトカイン放出を増強する方法であって、抗原を経験したT細胞、例えば抗原を経験したCD4⁺もしくはCD8⁺T細胞を本明細書で提供されるような六量体タンパク質、例えばGITRL-FPと接触させるステップを含み、ここで六量体タンパク質は、抗原を経験したT細胞、例えば抗原を経験したCD4⁺もしくはCD8⁺T細胞の表面上のGITRに特異的に結合し得る、方法を提供する。特定の態様では、接触させるステップはインビトロである。特定の態様では、接触させるステップはインビボであり、例えば治療を必要とする被験者への六量体タンパク質の有効用量での投与を介する。特定の態様では、接触させるステップは、T細胞活性化、例えば抗原活性化と同時に進行ことができ、特定の態様では、接触させるステップは、T細胞活性化後に行うことができる。特定の態様では、サイトカインは、IFN γ 、TNF α 、IL-5、IL-10、IL-2、IL-4、IL-13、IL-8、IL-12p70、IL-1 β 、GM-CSF、またはそれらの任意の組み合わせであり得る。特定の態様では、サイトカインは、IFN γ 、TNF α 、IL-5、IL-10、IL-4、IL-13、GM-CSF、またはそれらの任意の組み合わせである。

30

40

【0133】

特定の態様では、抗原を経験したT細胞、例えば抗原を経験したCD4⁺もしくはCD8⁺T細胞は、ヒトCD4⁺もしくはCD8⁺T細胞、カニクイザルCD4⁺もしくはCD8⁺T細胞、アカゲザルCD4⁺もしくはCD8⁺T細胞、またはそれらの組み合わせである。

【0134】

本開示は、T細胞活性化を促進する方法であって、T細胞を本明細書で提供されるような六量体タンパク質、例えばGITRL融合タンパク質と接触させるステップを含み、こ

50

ここで六量体タンパク質はT細胞の表面上のG I T Rに特異的に結合し得る、方法をさらに提供する。特定の態様では、接触させるステップは、抗原、例えば腫瘍抗原の存在下で行われる。特定の態様では、本方法は、G I T R L F PのI g G－F cドメインと、F c γ Rを発現する細胞、例えば、B細胞、単球、マクロファージ、骨髄性もしくは形質細胞様樹状細胞、濾胞樹状細胞、ランゲルハンス細胞、内皮細胞、NK細胞、好中球、好酸球、血小板、肥満細胞、原発性ヒト腫瘍または腫瘍灌流もしくは非灌流リンパ節に由来するC D 4 5 +細胞、他の二次もしくは三次リンパ様構造に由来するC D 4 5 +細胞、またはそれらの組み合わせとの相互作用を介する六量体G I T R L融合タンパク質の架橋をさらに含む。特定の態様では、T細胞活性化は、N F κ Bシグナル伝達経路の刺激として測定され得る。特定の態様では、T細胞活性化を促進するG I T R L F Pは、G I T R L I g G 1 F P、G I T R L I g G 4 F P、またはそれらの変異体である。特定の態様では、接触させるステップはインビトロである。特定の態様では、接触させるステップはインビボであり、例えば治療を必要とする被験者への六量体タンパク質の有効用量での投与を介する。

【0135】

さらに本明細書で提供されるのは、G I T R L F P、およびO X 4 0アゴニスト（例えば、O X 4 0リガンド融合タンパク質またはO X 4 0アゴニスト抗体）の投与を含む、がんを治療するための方法である。G I T R L F PおよびO X 4 0リガンド融合タンパク質の投与の結果、マウス腫瘍モデルにおいて腫瘍体積が減少し、かつ生存が増加する。特定の態様では、固形腫瘍を呈する患者にG I T R L F PおよびO X 4 0リガンド融合タンパク質（例えばM E D I 6 3 8 3）が投与される。

【0136】

G I T R L F PおよびO X 4 0アゴニストを含むがん治療薬による効果的治療は、例えば、原発性腫瘍の部位、または1つ以上の転移のいずれかにおける、がんの進行速度の減少、腫瘍もしくは転移成長の遅延または安定化、腫瘍縮小、および／または腫瘍退縮を含む。一部の態様では、腫瘍成長の低下または遅延は、統計学的に有意であり得る。腫瘍成長における低下は、想定される腫瘍成長、大規模患者集団に基づく想定される腫瘍成長、または対照集団の腫瘍成長に対して、患者の腫瘍のベースラインでの成長と比べることにより、測定され得る。他の実施形態では、本発明の方法は、生存を増加させる。

【0137】

G I T R L F PおよびO X 4 0アゴニストを含むがん治療薬の投与に対する臨床応答は、臨床医に公知の診断技術、例えば限定はされないが、磁気共鳴画像法（M R I）スキャン、X線撮影イメージング、コンピュータ断層撮影（C T）スキャン、フローサイトメトリーまたは蛍光標示式細胞分取器（F A C S）分析、組織学、肉眼所見、および血液化学など、例えば限定はされないが、E L I S A、R I A、およびクロマトグラフィーによって検出可能な変化などを用いて評価され得る。

【0138】

本開示は、被験者におけるがんまたはウイルス感染を治療する方法であって、本明細書で提供されるような六量体タンパク質、例えばG I T R L F P、または六量体タンパク質を含む組成物もしくは製剤を有効量で、治療を必要とする被験者に投与するステップを含む、方法をさらに提供する。特定の態様では、がんは固形腫瘍である。本方法によると、六量体タンパク質または組成物の投与により、腫瘍成長が阻害され得るか；腫瘍減少が促進され得るか、または双方であり得る。特定の態様では、腫瘍成長阻害は、T細胞の存在下で達成される。

【0139】

用語「がん」、「腫瘍」、「がん性」、および「悪性」は、典型的には制御されない細胞成長によって特徴づけられる、哺乳類における生理学的状態を指すかまたは描写する。がんの例として、限定はされないが、腺がん、リンパ腫、芽細胞腫、黒色腫、肉腫、および白血病を含むがんが挙げられる。かかるがんのさらなる特定例として、扁平上皮細胞がん、小細胞肺がん、非小細胞肺がん、胃腸がん、ホジキンおよび非ホジキンリンパ腫、脾

がん、神経膠芽腫、神経膠腫、子宮頸がん、卵巣がん、肝細胞がんおよび肝腫瘍などの肝臓がん、膀胱がん、乳がん（例えばホルモン媒介性乳がんなど、例えば、Innes et al. (2006) Br. J. Cancer 94:1057-1065を参照）、大腸がん、結腸直腸がん、子宮内膜がん、骨髄腫（多発性骨髄腫など）、唾液腺がん、腎細胞がんおよびウィルムス腫瘍などの腎臓がん、基底細胞がん、黒色腫、前立腺がん、外陰がん、甲状腺がん、睾丸がん、食道がん、限定はされないが、急性骨髄性白血病（AML）および多発性骨髄腫（MM）を含む血液がん、限定はされないが、扁平上皮細胞がんを含む様々なタイプの頭頸部がん、および粘液を起源とするがん、例えば、粘液性卵巣がん、胆管がん（肝臓）および腎乳頭がん、が挙げられる。特定の実施形態では、血液がんは、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、急性リンパ芽球性白血病、急性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、および慢性骨髄性白血病からなる群から選択される。

10

【0140】

一部の実施形態は、治療を必要とする被験者におけるがんまたはウイルス感染を予防または治療する方法であって、本明細書で提供されるような六量体タンパク質、例えばGITRL-FP、本明細書に記載のような六量体タンパク質もしくはポリヌクレオチドを含む組成物もしくは製剤、ベクター、または宿主細胞を有効量で被験者に投与するステップを含む、方法を対象とする。

【0141】

治療を必要とする被験者におけるウイルス感染を治療する方法であって、六量体タンパク質または六量体タンパク質を含む組成物を有効量で被験者に投与するステップを含む、方法もまた提供される。特定の実施形態では、ウイルス感染は、慢性もしくは潜在性ウイルス感染であり得る。かかる慢性ウイルス感染は、ビリオン増殖が生じる場合での数週、数か月、または数年のウイルス感染によって特徴づけられるウイルス感染である。かかる潜在性ウイルス感染は、ビリオンが増殖していない期間によって特徴づけられるウイルス感染である。治療を必要とする被験者は、特定の実施形態では、被験者または被験者から得られる試料におけるウイルスの存在について診断するアッセイを実施することによって同定され得る。特定の実施形態では、治療は、ウイルス負荷における減少、ウイルス再活性化における低下、前記感染に伴う症状の寛解、またはそれらの組み合わせを提供し得る。特定の実施形態では、ウイルス負荷における減少、再活性化における低下、または症状における軽減は、プラセボで治療された対照被験者と比較される。上記方法のいずれかの特定の実施形態では、ウイルス感染は、ヒト免疫不全ウイルス（human immunodeficiency virus）（HIV）、B型肝炎ウイルス（hepatitis B virus）、C型肝炎ウイルス（hepatitis C virus）、麻疹、エプスタイン・バーウイルス（Epstein-Barr virus）（EBV）、サイトメガロウイルス（cytomegalovirus）（CMV）、アデノウイルス（adenovirus）（AdV）、ヒトパピローマウイルス（human papillomavirus）（HPV）、単純ヘルペスウイルス（herpes simplex virus）（HSV）、水痘帯状疱疹ウイルス（Varicella-Zoster virus）（VZV）、およびそれらの組み合わせからなる群から選択されるウイルスによる。

20

30

40

【0142】

本開示の組成物は、任意の好適な方法により、例えば、非経口、脳室内、経口、吸入スプレーにより、局所、直腸、鼻腔、パッカル、経膈または植込リザーバーを介して投与することができる。本明細書において使用される用語「非経口」には、皮下、静脈内、筋肉内、関節内、滑液嚢内、胸骨内、鞘内、肝内、病巣内および頭蓋内注射または注入技術が含まれる。

【0143】

本開示はさらに、対象における免疫応答を増強する方法であって、治療が必要な対象に、治療に有効な量の本明細書に記載の六量体タンパク質、例えば、GITRL-FP、ま

50

たは六量体タンパク質を含有する組成物もしくは製剤を投与するステップを含む方法も提供する。

【0144】

治療しようとする対象は、治療を必要とするいずれかの動物、例えば、哺乳動物であってよく、いくつかの態様では、対象は、ヒト対象である。

【0145】

その最も単純な形態では、対象に投与しようとする調製物は、本明細書に記載の六量体タンパク質、例えば、GITRL FPであり、これは、慣用の剤形で、また、好ましくは、本明細書の他所に記載する製剤用賦形剤、担体または希釈剤と組み合わせて、投与される。

10

【0146】

本明細書に記載の六量体タンパク質、例えば、GITRL FPは、本明細書の他所に記載する任意の好適な方法によって、例えば、IV注入を介して投与することができる。いくつかの態様では、本明細書に記載の六量体タンパク質、例えば、GITRL FPは、腫瘍中に、または腫瘍細胞の近傍に導入することができる。

【0147】

あらゆる種類の腫瘍が、このアプローチによる治療を受ける可能性を有し、こうした腫瘍として、限定されるものではないが、乳房、肺、脾臓、卵巣、腎臓、結腸および膀胱のがん腫、ならびに黒色腫、肉腫およびリンパ腫が挙げられる。

【0148】

T細胞プライミング剤

T細胞プライミング剤と組み合わせて、六量体タンパク質または六量体タンパク質を含む組成物を有効量で被験者に投与するステップを含む、治療を必要とする被験者におけるがんを治療する方法もまた提供される。特定の態様では、T細胞プライミング剤は、DNAワクチン+アジュバントである。特定の態様では、この組み合わせは、例えば、E7合成ロングペプチド(SLP)とCpGオリゴデオキシヌクレオチドである。さらなる態様では、T細胞プライミング剤は、エピジェネティック修飾因子、例えば、5-アザ-2'-デオキシシチジンまたはヒストン修飾因子、例えばHDAC阻害剤である。さらなる態様では、T細胞プライミング剤は、ウイルス、例えば、ワクシニア(Vaccinia)、リステリア(Listeria)、またはニューキャッスル病ウイルス(Newcastle disease virus)である。

20

30

【0149】

本開示は、別に記載のない限り、当業者の技能の範囲内の細胞生物学、細胞培養、分子生物学、トランスジェニック生物学、微生物学、組換えDNA、および免疫学の慣用の技術を使用する。こうした技術は、文献に十分に説明されている。例えば、以下の文献を参照されたい：Sambrook et al., ed. (1989) Molecular Cloning A Laboratory Manual (2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press); Sambrook et al., ed. (1992) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (Cold Springs Harbor Laboratory, NY); D. N. Glover ed., (1985) DNA Cloning, Volumes I and II; Gait, ed. (1984) Oligonucleotide Synthesis; Mullis et al. 米国特許第4,683,195号明細書; Hames and Higgins, eds. (1984) Nucleic Acid Hybridization; Hames and Higgins, eds. (1984) Transcription And Translation; Freshney (1987) Culture Of Animal Cells (Alan R. Liss, Inc.); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press) (1986); Perbal (1984) A Practical Guide To Molecular Clonin

40

50

g; the treatise, *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc. N. Y.); Miller and Calos eds. (1987) *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells*, (Cold Spring Harbor Laboratory); Wu et al., eds., *Methods in Enzymology*, Vols. 154 and 155; Mayer and Walker, eds. (1987) *Immunochemical Methods in Cell And Molecular Biology* (Academic Press, London); Weir and Blackwell, eds., (1986) *Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV; Manipulating the Mouse Embryo*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., (1986); ならびに Ausubel et al. (1989) *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, Baltimore, MD.). 10

【0150】

抗体改変の一般原理は、以下: Borrebaeck, ed. (1995) *Antibody Engineering* (2nd ed.; Oxford Univ. Press) に記載されている。タンパク質改変の一般原理は、以下: Rickwood et al., eds. (1995) *Protein Engineering, A Practical Approach* (IRL Press at Oxford Univ. Press, Oxford, Eng.) に記載されている。抗体および抗体-ハプテン結合の一般原理は、以下の文献に記載されている: Nisonoff (1984) *Molecular Immunology* (2nd ed.; Sinauer Associates, Sunderland, Mass.); および Steward (1984) *Antibodies, Their Structure and Function* (Chapman and Hall, New York, N. Y.)。さらに、当分野において公知であり、詳細に記載していない免疫学の標準的方法は、概して、以下の文献に記載のように実施する: *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, New York; Stites et al., eds. (1994) *Basic and Clinical Immunology* (8th ed.; Appleton & Lange, Norwalk, Conn.) ならびに Mishell and Shiigi (eds) (1980) *Select ed Methods in Cellular Immunology* (W. H. Freeman and Co., NY)。 20 30

【0151】

免疫学の一般原理を記載する標準的参照文献には、以下のものが含まれる: *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, New York; Klein (1982) J., *Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination* (John Wiley & Sons, NY); Kennett et al., eds. (1980) *Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyses* (Plenum Press, NY); Campbell (1984) "Monoclonal Antibody Technology" in *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, ed. Burden et al., (Elsevier, Amsterdam); Goldsby et al., eds. (2000) *Kuby Immunology* 4th ed.; H. Freeman & Co.); Roitt et al. (2001) *Immunology* (6th ed.; London: Mosby 40 50

) ; Abbas et al. (2005) Cellular and Molecular Immunology (5th ed. ; Elsevier Health Sciences Division) ; Kontermann and Dubel (2001) Antibody Engineering (Springer Verlag) ; Sambrook and Russell (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press) ; Lewin (2003) Genes VIII (Prentice Hall 2003) ; Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press) ; Dieffenbach and Dveksler (2003) PCR Primer (Cold Spring Harbor Press)。

10

【0152】

上に引用した参照文献の全て、ならびに本明細書で引用する全ての参照文献は、全体として参照により本明細書に組み込むものとする。

【0153】

以下の実施例は、例示として提供されるのであって、限定を意図するものではない。

【実施例】**【0154】**

【表 2】

表 B:用語の略称および定義のリスト

用語の略称	定義
A	アラニン
ADCC	抗体依存細胞傷害性
°C	摂氏度
CDC	補体依存性細胞傷害性
CR	完全寛解
Cyno	カニクイザル
F	フェニルアラニン
FACS	蛍光標示式細胞分取器
FBS	ウシ胎仔血清
LC-QTOF MS	四重極飛行時間型質量分析と共役した液体クロマトグラフィー
M	モル濃度
mAb	モノクローナル抗体
hGITRL	ヒト GITRL
μg	マイクログラム
MFI	平均蛍光強度
min	分
mL	ミリリットル
Multimeric mGITRL FP	多量体マウス GITR リガンドマウス IgG 融合タンパク質
NIP228	4-ヒドロキシ-3-ヨード-5-ニトロフェニル酢酸に対するヒトモノクローナル抗体
NK	ナチュラルキラー
PBS	リン酸緩衝食塩水
pM	ピコモル
RBD	受容体結合ドメイン
Rh	組換えヒト
ROA	投与経路
rpm	回毎分
RT	室温
SC	皮下
SD	標準偏差
TCR	T 細胞受容体
TGI	腫瘍成長阻害
TNFR	腫瘍壊死因子受容体
Treg	T 制御性
V	体積

【0155】

実施例 1 : G I T R L I g G F c 融合タンパク質の改変

多量体ヒト G I T R L - F P 分子を作製するために用いることができる好適なヒト三量体化モチーフの同定

ヒト六量体 G I T R L F P を作製するための努力は、元々、G I T R L 三量体を安定化させ、六量体タンパク質を形成するため、G C N 4 p I I 三量体化モチーフの使用に注目していた。しかし、このモチーフは、酵母タンパク質から誘導され、非ヒトモチーフ

を有するG I T R L F Pのヒトへの投与が免疫原性をもたらすことがある。したがって、ヒトタンパク質から誘導される三量体化モチーフを有する等価なG I T R L F Pを作製することが望ましいと考えられた。三量体コイルドコイルモチーフを形成する51タンパク質に由来するアミノ酸配列は、その三次元結晶構造またはオルソログの場合によって示される通り、Protein Data Bank (PDB; ワールドワイドウェブサイト「www.pdb.org」経由でインターネットによりアクセス可能)を介して同定し、経験による実験的試験におけるG I T R L F P分子への組み込みとして、4つのコイルドコイルモチーフのサブセットを選択した。

【0156】

方法

コロニン1A (PDBコード: 2akf)、マトリリン1 (1aq5)、ランゲリン (3kqg) および筋強直性ジストロフィーキナーゼDMPK (PDBコード: 1wt6) コイルドコイルモチーフの三次元結晶構造を、PyMol Visualization Graphicsソフトウェアを用いて分析した。

【0157】

結果

51の候補配列を同定した三量体コイルドコイルタンパク質配列についてのProtein Data Bank (PDB)の検索後、多量体G I T R L F Pの作製に用いるため、4つの配列を選択した(表1-1)。これら4つの配列は、ヒトタンパク質のコロニン1a、マトリリン1、ランゲリンおよびDMPKに由来するコイルドコイル配列であった。マウスコロニン1a (PDBコード: 2akf)由来のコイルドコイルモチーフの構造は、溶液中で安定な三量体であることが報告されている(Kammerer, R. A. et al. PNAS, vol: 102, p13891-13896 (2005))。ヒトコロニン1aのコイルドコイル配列は、マウスタンパク質に対して高い配列同一性(78.1%の配列同一性)を示すことから、三量体コイルドコイル構造を形成することが予測された。同様に、ニワトリマトリリン1 (PDBコード: 1aq5)由来のコイルドコイルモチーフの構造は、三量体であることが報告されている(Dames, S. A. et al. NAT. STRUCT. BIOL. 5: 687-691 (1998); PDBコード: 1aq5)。ヒトマトリリン1のコイルドコイル配列は、三量体コイルドコイル構造を、ニワトリオルソログに対するその高い配列同一性(60.0%の配列同一性)に基づいて形成することが予測された。ヒトランゲリン (PDBコード: 3kqg) およびヒトDMPK (PDBコード: 1wt6)のコイルドコイル配列もまた、三量体であることが報告されており(Feinberg, H. et al., J. BIOL. CHEM. 285: 13285-13293 (2010))、多量体ヒトG I T R L融合タンパク質の作製に用いるために選択した。

【0158】

G I T R L融合タンパク質において用いられるさらなるコイルドコイル配列を提供するため、ヒトコロニン1A、マトリリン1、ランゲリンおよびDMPKに由来する野生型コイルドコイル配列の変異体を作製した。これらの変異体配列を作製するため、ProCoilアルゴリズムのオンライン実行(ワールドワイドウェブサイト「bioinf.jku.at/software/procoil/」)経由でインターネットによりアクセス可能)を用いた。このアルゴリズムは、所与の配列が二量体および三量体コイルドコイル構造を形成する確率を予測する。上述の野生型コイルドコイル配列の幾つかの変異体が、三量体を形成することについて、野生型配列と比べてより高い確率スコアを有することが予測された。六量体G I T R L F Pの作製に用いるため、三量体であることについて最高の確率を有する変異体配列を選択した。

【0159】

上記の4つすべてのヒトタンパク質に対して選択した変異体コイルドコイル配列を表1-1に示す。

【0160】

10

20

30

40

50

【表 3】

表 1-1:GITRL FP 構築物中の三量体コイルドコイルモチーフとして用いるための配列

三量体化モチーフ	配列および配列番号
GCN4 pII	IKQIEDKIEEILSKIYHIENEIARIKKL (配列番号 27)
マトリリン 1 wt	CACESLVKFQAKVEGLLQALTRKLEAVSKRLAILENTVV (配列番号 28)
マトリリン 1 変異体	CACESLVKFQAKVEGLIQALTRKLEAVSKRIAILENTVV (配列番号 29)
コロニン 1a wt	VSRLEEEMRKLQATVQELQKRLDRLEETVQAK (配列番号 11)
コロニン 1a 変異体	ISRIEEEIRKINATVQELQKRIDRLEETVQAK (配列番号 17)
DMPK wt	EAEAEVTLRELQEALEEEVLTRQSLSREMEAIRTDNQNFASQLREAEARNRDLEAHVRQLQERMELLQAE (配列番号 30)
DMPK 変異体	IAEIEVTIRELQEALEEEVLTRQSLSREIEAIRTDIQNIASQLREIEARIRDLEAHVRQLQERMELLQAE (配列番号 31)
ランゲリン wt	ASALNTKIRALQGSLENMSKLLKRQNDILQVVS (配列番号 32)

10

【0161】

20

三量体化モチーフをランクづけるためのインシリコ分析

より安定な GITRL 三量体、ひいてはより安定な多量体 GITRL FP を生成することになるモチーフのインシリコ予測は、表 1-1 中の配列をそれらのオリゴマー状態を予測するためのアルゴリズム (LOGICOIL) を用いて分析することによって行った。さらに、平行三量体の形成において得られたスコアを、2つのアルゴリズム (MARCOIL および LOGICOIL) の組み合わせを介して、全ヒトプロテオームから同定されたコイルドコイルからのスコアと比べた。

【0162】

方法

ftp サイト「ftp.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/H_sapiens/mRNA__Prot/human.protein.faa.gz」からダウンロードしたヒトプロテオームに対して、ゲノムワイドな予測を実施した。このバージョンは、総数 71861 のタンパク質配列を含む。これらの配列をスキャンし、ワールドワイドウェブサイト「bcf.isb-sib.ch/Delorenzi/Marcoil/Marcoilcode.tar.gz」からダウンロードしたソフトウェア MARCOIL を実行することにより、コイルドコイルモチーフを同定した。コイルドコイル配列のオリゴマー形成状態 (平行もしくは抗平行二量体、三量体または四量体) を予測するため、特定の具体的な閾値 (すなわち、0.01、0.10、0.50、0.90 および 0.99) を通るモチーフのすべてを、ワールドワイドウェブサイト「coiledcoils.chm.bris.ac.uk/LOGICOIL/LOGICOIL_S 40
source.zip」経由でインターネットからダウンロードした LOGICOIL アルゴリズムを用いてさらに分析した。このパッケージを R 言語 (バージョン 3.0.2-2013-09-25) において実行した。MARCOIL からの出力を LOGICOIL によって想定されるファイルフォーマットに変換するため、アドホック perl スクリプトを開発した。lattice パッケージ (バージョン 0.20~23) を用いて、ヒストグラムを R でプロットした。

【0163】

結果

Refseq からのすべてのヒト配列内のコイルドコイルモチーフを (MARCOIL を用いて) 予測した。異なる閾値に対する MARCOIL アルゴリズムによって予測され 50

るコイルドコイルモチーフの数を表 1-2 に示す。次に、0.99 の閾値からのすべてのモチーフのオリゴマー状態を、表 1-2 での 8 つの選択した三量体コイルドコイルドメインとともに、LOGICOIL を用いて予測した。

【0164】

本試験で用いるこれらのスコアの分布およびモチーフのランキングを表 1-3 に示す。

【0165】

【表 4】

表 1-2:異なる閾値に対する MARCOIL アルゴリズムによって予測されるコイルドコイルモチーフの数

閾値	モチーフの数
0.01	168583
0.10	68793
0.50	41762
0.90	34714
0.99	27240

10

【0166】

【表 5】

20

表 1-3:LOGICOIL TRIM スコアを含む、全プロテオームとの関連での 8 つのコイルドコイルモチーフのランキング

プロテオーム ランキング	サブセット ランキング	配列	LOGICOIL TRIM
20	1	GCN4 pII	2.43
201	2	hDMPK-突然変異体	1.74
219	3	hランゲリン-wt	1.71
241	4	hランゲリン-変異体	1.68
427	5	hCor1a-wt	1.58
1065	6	hCor1a-突然変異体	1.44
3620	7	hDMPK-wt	1.18
12473	8	hMatrilin-変異体	0.96
18993	9	hMatrilin-wt	0.81

30

【0167】

異なるヒト三量体化モチーフを有する GITRL-FP 変異体の作製

40

選択した三量体化モチーフの各々における配列は、GCN4-pII 配列に加えて、適切な立体配置で、GITRL-FP の他の要素（すなわち、短い可動性アミノ酸リンカー配列によって分離された、ヒトFcドメインとヒトGITRLの細胞外ドメインとの間にあるもの）をコードするDNAベクターにクローン化した。これらのベクターを、哺乳動物細胞を一過性に遺伝子導入するために用いて、組換え六量体GITRL-FPタンパク質の分泌とその後の精製を可能にした。

【0168】

方法

懸濁CHO細胞に、PEIを用いて、異なる六量体GITRL-FPをコードするDNAベクターを一過性に遺伝子導入し、80%の湿度下、140rpmで振盪しながら37

50

℃で8日間成長させた。分泌タンパク質を含有する条件培地40 mLを、1,600×gでの遠心分離および濾過により細胞および細胞片から分離した。タンパク質をMa b S e l e c t S u r e（商標）樹脂を用いて精製し、そのサイズおよび完全性を還元SDSーポリアクリルアミドゲル電気泳動法により分析した。

【0169】

その後、六量体GITRL FP（コロニン1a wt）および六量体GITRL FP（マトリリン1 wt）に対して、より大規模な発現および2段階精製プロトコルを用いた。ここで、より大きい体積のCHO条件培地（400 mL）にプロテインGクロマトグラフィー、次いでサイズ排除クロマトグラフィーステップ（S200 16/60）を施した。これらの精製タンパク質をSEC-MALLS分析に用いた。

10

【0170】

結果

組換え六量体GITRL FPタンパク質のすべてが類似レベルで発現したが、中でもコロニン1a wtモチーフを有する六量体GITRL FPは、他のタンパク質よりも高収量をもたらすように思われた（表1-4：図1）。

【0171】

【表6】

表 1-4:8つの GITRL FP タンパク質における CHO 細胞内での一過性発現からのタンパク質収量

20

GITRL FP	濃度 (mg/ml)
マトリリン 1 wt	0.51
マトリリン 1 変異体	0.57
コロニン 1a wt	0.9
コロニン 1a 変異体	0.63
DMPK wt	0.66
DMPK 変異体	0.34
ランゲリン wt	0.37
ランゲリン変異体	0.48

30

【0172】

異なるヒト三量体化モチーフを有するGITRL FP変異体の特徴づけ

GITRL FP変異体のGITRLを発現する細胞への結合

六量体GITRL FP分子が細胞表面に発現されるGITRLに結合し得るか否かを判定するため、六量体GITRL FP分子を、GITRLを過剰発現する細胞とともにインキュベートし、それらの結合をそれらのFcドメインを介して検出した。

40

【0173】

方法

固定濃度のDy L i g h t - 6 4 9に複合した抗ヒトIgG抗体緩衝液、その後、セクション1.3中の上記の2倍希釈した精製六量体GITRL FPタンパク質およびアイソタイプ対照抗体（NIP228）を、2連ウェルで384ウェルの黒色壁付きの透明な底板に添加した。GITRLを安定的に発現するCHO細胞をすべてのウェルに添加し、プレートを室温で4時間インキュベートした。CHO-GITRL細胞への結合を、640 nMのレーザーを用いるMirrorball（商標）プレート血球計数器を用いて測定し、蛍光を測定した。

50

【0174】

結果

結果を図2A～Dに提示する。得られた結合特性は、六量体GITRL-FPの濃度がDyLight-649に複合した検出抗体の濃度を超えるときに認められる「フック効果」を示す結果、六量体GITRL-FPの濃度が高まるにつれて結合の低下が検出され、それ故、釣鐘状の結合特性がもたらされる。この現象にもかかわらず、異なる六量体GITRL-FP分子は、酷似した結合特性をもたらす。

【0175】

GITRL-FP変異体と組換え三量体リガンドとのGITRへの結合に対するGITRL競合の競合

10

ヒトGITRLのヒトGITRへの結合に対する六量体GITRL-FP分子の効果を、均一時間分解蛍光（HTRF）アッセイを用いて測定した。

【0176】

方法

六量体GITRL-FP分子を、GITRL-HA（ヘマグルチニンタグ）のGITR-Fcへの結合が測定されるHTRFアッセイで滴定した。ヒトGITR-Fcをユーロピウムクリプテートと複合させ、XL665と複合させた抗HA抗体を用いてGITRL-HAタンパク質を検出した。Prism 5.01ソフトウェア（GraphPad）を用いて分析データを4つのパラメータロジスティック方程式にカーブフィッティングすることにより、 IC_{50} 値を判定した。

20

【0177】

結果

結果を図3A～Dおよび表1-5に提示する。異なる三量体化モチーフを有する六量体GITRL-FP分子はすべて、三量体GITRL-HAのGITR-Fcへの結合への強力な阻害剤である。GITRL-FP（GCN4）よりも8倍低い効力を示すGITRL-FP（ランゲリンwt）を例外として、大部分のGITRL-FP変異体が、類似の阻害特性および IC_{50} 値をもたらした。GITRL-FP（コロニン1a）は、0.61nMで最低の IC_{50} 値を有した。

【0178】

【表 7】

表 1-5:三量体 GITRL の GITR-Fc への結合に対して競合する GITRL FP タンパク質における IC₅₀(nM)値

被験試料	IC ₅₀ (nM)
GITRL FP (GCN4 pII)	1.06
GITRL FP (マトリリン 1 wt)	1.36
GITRL FP (マトリリン 1 変異体)	0.83
GITRL FP (コロニン 1a wt)	0.61
GITRL FP (コロニン 1a 変異体)	1.44
GITRL FP (DMPK wt)	2.73
GITRL FP (DMPK 変異体)	2.43
GITRL FP (ランゲリン wt)	8.05
GITRL FP (ランゲリン変異体)	2.0
NIP228 IgG-TM	阻害なし

10

20

【0179】

レポーターアッセイにおける GITRL FP 変異体の活性

異なる GITRL FP 分子（六量体 GITRL IgG1 FP（配列番号 6）および六量体 GITRL IgG4 FP（配列番号 40）の機能的活性を、GITR を安定的に発現する NF-κB ルシフェラーゼレポーター細胞を用いるアッセイにおいて測定した。GITR のアゴニズムおよびその後の NF-κB 経路の活性化によって駆動される発光を測定した。

30

【0180】

方法

6 ポイントデータ曲線のため、GITRL FP タンパク質を 4 倍に連続希釈し、3 通りに 96 ウェルプレートに添加した。次に、ヒト GITR を遺伝子導入した Jurkat NF-κB ルシフェラーゼレポーター細胞を、アッセイプレートのすべてのウェルに添加し、37℃で 3 時間インキュベートした。Steady-Glo 試薬をアッセイプレートのすべてのウェルに添加することにより、ルシフェラーゼ発現を検出した。プレートを室温で 5 分間インキュベートし、次に発光を測定し、対数（アゴニスト）対応答の GraphPad Prism 5.01（GraphPad）での可変勾配非線形曲線フィットを用いて EC₅₀ 値を生成した。

40

【0181】

結果

結果を図 4A～D および表 1-6 に示す。すべての六量体 GITRL FP タンパク質が NF-κB シグナル伝達を誘導する。タンパク質は、GITRL FP（GCN4）に対して類似の効力特性および EC₅₀ 値を生成した。

【0182】

【表 8】

Table 1-6: ヒト GITR が遺伝子導入された NF- κ B ルシフェラーゼ遺伝子レポーター細胞株を用いる GITRL FP 変異体における EC₅₀(nM)値

	被験試料	EC ₅₀ (nM)
	GITRL FP (GCN4 pII)	1.02
	GITRL FP (マトリリン 1 wt)	1.12
	GITRL FP (マトリリン 1 変異体)	0.90
	GITRL FP (コロニン 1a wt)	0.95
	GITRL FP (コロニン 1a 変異体)	0.74
	GITRL FP (DMPK wt)	1.37
	GITRL FP (DMPK 変異体)	1.39
	GITRL FP (ランゲリン wt)	1.54
	GITRL FP (ランゲリン変異体)	0.75

10

20

【0183】

GITRL FP 変異体の融解温度

GITRL FP タンパク質の融解温度を、放射特性が折り畳まれていないタンパク質の存在下で変化する蛍光色素 (Sypro Orange) を用いて測定した。

【0184】

方法

多量体 GITRL FP 変異体の熱安定性を、融解温度 (T_m) を計算するための Sypro Orange に基づくアッセイを用いて評価した。異なるタンパク質を、96 ウェル PCR プレートに懸濁する前、最初に 2 × PBS で 0.5 mg/mL まで希釈した。Sypro Orange (商標) をプレート上の各ウェルに添加し、次に密封した。プレートを、Chromo4 (商標) 連続蛍光検出器を用いてリアルタイム (商標) PCR 装置上で読み取った。温度は、1 °C ごとの読み取りと 1 秒の保持時間で 20 °C から 90 °C に高めるように設定した。アンフォールディング転移を、蛍光強度および蛍光誘導体を温度の関数としてプロットすることによって判定した。各多量体 GITRL FP タンパク質を二通りに分析した。

30

【0185】

結果

結果を図 5 A ~ D に示す。9 つの多量体 GITRL FP タンパク質の各々における融解温度を下を表 1 - 7 にまとめる。すべての変異体は、他の大部分、すなわち低温 (45 ~ 50 °C) で追加的な転移ピークを呈する (これは一部の構造的不安定性を示唆する) GITRL FP (ランゲリン wt) および GITRL FP (ランゲリン変異体) の双方における 62 ~ 64 °C と比べて 59 °C で単一の転移ピークを呈する GITRL FP (DMPK wt) 以外では、類似の特性を有する。

40

【0186】

【表 9】

表 1-7:9 つの GITRL FP タンパク質における転移温度

被験試料	Tm1 (°C)	Tm2 (°C)
GITRL FP (GCN4 pII)	/	63
GITRL FP (マトリリン 1 wt)	/	62.5
GITRL FP (マトリリン 1 変異体)	/	63
GITRL FP (コロニン 1a wt)	/	63
GITRL FP (コロニン 1a 変異体)	/	63
GITRL FP (DMPK wt)	/	59
GITRL FP (DMPK 変異体)	/	63.5
GITRL FP (ランゲリン wt)	47.5	63
GITRL FP (ランゲリン変異体)	45-50	62

10

20

【0187】

GITRL FP 変異体のインシリコ免疫原性分析

8 つのコイルドコイルドメインおよびそれら周囲の配列の予測される免疫原性を、ProPred アルゴリズムを用いて判定した。

【0188】

方法

ProPred [Singh & Raghava (2001) Bioinformatics 17 (12)] を用いて、8 つの選択したヒト三量体化モチーフ、および酵母 GCN4 pII の Tスコアを評価した。任意のアミノ酸配列の Tスコアにより、アミノ酸配列の全長に対して強力に結合する MHC クラス II エピトープの数が定量される。ProPred が 10,000 の無作為に生成される 9-mer 配列セットを評価することによって得られる 95 パーセント以上のスコアに位置する結合スコアを戻す場合、9-mer の部分配列は強力に結合するエピトープであると考えられる。Tスコアは、8 つの最も一般的なヒト対立遺伝子に対して、モチーフに先行する 2 × [G4S] 配列ならびにモチーフに後続する [G4] 配列および GITRL ドメインの最初の 4 アミノ酸を含む各モチーフにつき計算した。次に、個別の対立遺伝子の Tスコアの合計として、総 Tスコアを形成した。

30

【0189】

結果

各三量体化モチーフおよびその周囲の配列における総 Tスコアを表 1-8 に示す。最大スコアが 8 に等しく、それは配列内のすべての 9-mer が試験対象の 8 つの対立遺伝子すべてに対して強力に結合するエピトープである場合に対応することに注目された。興味深いことに、このグローバル分析によると、DMPK wt を除くほぼすべての候補が GCN4 よりもやや強力な免疫原性特性を有することが予測される。マトリリン wt と変異体の双方は、最高の総 Tスコアを有する。

40

【0190】

【表 10】

表 1-8:8 つのヒト三量体化モチーフおよび GCN4 pII における総 T スコア

#	コイルドコイルモチーフ	T スコア
1	GCN4 pII	0.131579
2	マトリリン 1	0.270833
3	マトリリン 1 変異体	0.270833
4	コロニン 1a wt	0.142857
5	コロニン 1a 変異体	0.166667
6	DMPK wt	0.0875
7	DMPK 変異体	0.175
8	ランゲリン wt	0.209302
9	ランゲリン変異体	0.186047

10

【0191】

G I T R L F P 変異体の S E C - M A L L S 分析

方法

B i o S e p - S e c - S (商標) 4000 (ボイドボリューム、 $V_0 = 5.7 \text{ ml}$) でタンパク質を分析し、 0.5 ml/分 の流速で30分間、すべてのランを実施した。UV 280、屈折率および多角度レーザー光散乱検出器を用いて、溶出を監視した。試料を ($1 \sim 2 \text{ mg/ml}$ で) カラム上に負荷し、次にモル質量および粒子径を計算した。

20

【0192】

結果

多量体 G I T R L F P (マトリリン 1 wt)

マトリリン-1 三量体化モチーフを有する G I T R L F P は、ゲル濾過カラム上に3つの異なるピークを生成したが、ピーク2は、グリコシル化六量体の予想されたモル質量に一致する 312 kDa の重量-平均モル質量を有し、総タンパク質質量の 40.9% を占める一方、ピーク1は、六量体の二量体に対応する重量-平均モル質量 (約 610 kDa) を有し、注射される総質量の 41.3% を占める。ピーク3は、予想される質量 (約 215 kDa) より低い質量を有するならば、それは断片化の結果または六量体からの二量体の欠損のいずれかであり得る。それは総タンパク質質量の 17.7% を占める。したがって、このタンパク質製剤の組成物は異質性であるとともに、支配的なオリゴマー種は単一ではない。

30

【0193】

多量体 G I T R L F P (コロニン 1a wt)

UV 280 のオーバーレイ、屈折率および 900 レーザー散乱トレースの分析によると、このタンパク質の 93.9% が 300 kDa の単分散種として 16.4 分で溶出することが示される。この観測質量は、六量体 G I T R L F P ポリペプチドの予測された質量 (274.95 kDa) に一致する。計算質量と 25 kDa の観測質量との間の差異は、グリコシル化に起因する可能性が最も高い。 14.7 分後の小さいピークは、 690 kDa の重量-平均モル質量を有し、それは六量体の二量体に起因し得る。

40

【0194】

多量体 G I T R L F P (GCN4 pII)

同様に、GCN4 pII 三量体化モチーフを有する G I T R L F P のレーザー散乱および屈折率クロマトグラムの分析によると、このタンパク質の 93.75% が、グリコシル化六量体に一致する、 330 kDa の単分散種として溶出することが示される。 15 分後のピーク溶出物は、総タンパク質のわずか 6.25% を含有し、おそらくは六量体の二量体の存在を反映する約 700 kDa の重量-平均モル質量を有する。

50

【0195】

モル質量対時間特性

図6は、3つの多量体G I T R L F Pタンパク質の各々に対する溶出ピークのモル質量組成を示す。3つすべてのタンパク質においては、約15分の保持時間を伴う初期ピークにわたるモル質量は、特に同一ピークの最初に溶出される分子の質量と終了時に溶出される分子の質量が100kDaより大きく異なるようなG I T R L F P（マトリリン1 wt）の場合、非常に変化しやすい。約17分後の溶出ピークはそれらの分子組成においてあまり異質ではなく、G I T R L F P（コロニン1a wt）における最大モル質量の変動は20kDa未満である。重量平均モル質量におけるその変動は、同一ピーク内で溶出されている糖タンパク質のグリカン含量における差異に起因する可能性が最も高い。

10

【0196】

特性データの概要

多量体G I T R L F P中の様々なコイルドコイル三量体化ドメインの性能を比較する表1-9に示すような収集データの分析において、コロニン1aコイルドコイルドメインは、改善された発現収量をもたらす。しかし、コロニン1aコイルドコイルモチーフおよび三量体コイルドコイルとして分類されるヒト配列からのモチーフの予測スコアの比較によると、コロニン1a wtが5のLOGICOILランキングを有したことが示される。

20

【0197】

【表11】

表 1-9:特性データの概要

三量体化モチーフ	LOGICOIL ランキング	発現収量 (mg/ml)	Tm1 (Sypro Orange)	受容体/ リガンド阻害 IC50 (HTRF)	細胞結合 (Mirrorball)	アゴニズム EC ₅₀ (NFκB レポーター)	インシリコ 免疫原性
GCN4	1		63	1.06	良好	0.89	0.132
マトリリン1 wt	9	0.51	62.5	1.36	良好	0.92	0.271
マトリリン1 変異体	8	0.57	63	0.83	良好	0.89	0.271
コロニン1a wt	5	0.9	63	0.61	良好	0.75	0.143
コロニン1a 変異体	6	0.63	63	1.44	良好	0.71	0.167
DMPK wt	7	0.66	59	2.73	良好	0.96	0.088
DMPK 変異体	2	0.34	63.5	2.43	良好	1.38	0.175
ランゲリン wt	3	0.37	47.5	8.05	良好	1.17	0.209
ランゲリン変異体	4	0.48	45-50	2	良好	0.57	0.186

30

【0198】

実施例2：G I T R L融合タンパク質の作製および特徴づけ、その特徴づけ、およびマウスG I T R L融合タンパク質の特徴づけ

誘導および組成

40

配列番号6のアミノ酸配列を有する単量体サブユニットを含む六量体G I T R L I g G 1融合タンパク質を構築した。配列番号6の各G I T R L I g G 1 F P単量体サブユニットは、3つの異なるドメイン：1) ヒトI g G 1 F cドメイン；2) ヒトコロニン1Aタンパク質から誘導されるαヘリカルコイルドコイル三量体化ドメインおよび3) 唯一の占有されるグリコシル化部位を排除するヒトG I T R L E C Dにおける単一の点突然変異（N161D）を有するヒトG I T R L E C D、を含む。各ドメインは、可動性グリシンおよびセリンリッチもしくはグリシンリッチの例えば（G l y）₄リンカーによって分離される（図8）。各単量体中のヒトG I T R L E C Dドメインは、溶液中に2つのさらなる単量体を伴う弱い非共有結合三量体を形成し、この会合は、ヒトコロニン1A三量体化ドメイン間の相互作用を通じて強化され、安定化された三量体構造をもたら

50

す。各三量体中に存在する I g G 1 F c ドメインの相互作用が、その後の G I T R L 三量体の二量体の形成につながり、最終的な六量体立体構造をもたらす。

【0199】

配列番号8のアミノ酸配列を有する前駆体 G I T R L I g G 1 F P ポリペプチドサブユニットをコードする、配列番号7で示される D N A 分子を、標準の分子生物学技術を用いて、合成し、効率的な一過性組換えタンパク質の発現を可能にする発現ベクターにクローン化した。

【0200】

配列番号6で示される、G I T R L I g G 1 F P ポリペプチドサブユニットのサブユニット単量体のヌクレオチドおよび推定されるアミノ酸配列を図8に示す。

10

【0201】

組換えタンパク質の発現および精製

ウェーブバッグバイオリアクター内、C D - C H O (商標) (L i f e T e c h n o l o g i e s L t d, P a i s l e y, U K) に類似した合成培地中の懸濁液中で成長する C H O 細胞に、異なる六量体 G I T R L F P をコードする D N A ベクターを遺伝子導入した。培養物を、C H O C D - F e e d E f f i c i e n t F e e d A (商標) (L i f e T e c h n o l o g i e s L t d, P a i s l e y, U K) に類似した栄養素フィードを用いて、流加培養として10~12日間維持し、次いでそれらを細胞除去用の濾過を用いて収集した。次に、馴化培地を精製前に冷蔵した。

20

【0202】

タンパク質を、M a b S e l e c t S u r e (商標) 樹脂を用いて条件培地から精製した。溶出されたピークを、ヒドロキシアパタイトタイプ1樹脂上でのさらなる精製前に中和し、濾過した。塩勾配を用いて溶出を行った。プロセス全体を通じて、純度を S E C H P L C によって監視した。

【0203】

G I T R L I g G 1 F P ポリペプチドサブユニットのグリコシル化分析

配列番号6の G I T R L I g G 1 F P ポリペプチドサブユニットのグリコシル化状態を、四重極飛行時間型 (Q T O F) 質量分析 (L C - Q T O F M S) と共役した液体クロマトグラフィー、および質量分析を用いるペプチドマッピングを用いて判定した。結果を図9に示す。

30

【0204】

還元されたポリペプチドサブユニットの L C - Q T O F M S 分析によって得られた、配列番号6の G I T R L I g G 1 F P ポリペプチドサブユニットの正確な質量は、1つの鎖あたり1つの二分岐グリカン (主に G 0 f) の付加により、予想されたアミノ酸配列に一致する。質量特性は、ペプチドマッピングによって確認される通り、配列番号6の G I T R L I g G 1 F P ポリペプチドサブユニットの G I T R L E C D 中の N 1 2 9 (融合タンパク質中の N 3 6 9) での N - グリカンの占有を伴わない F c ドメインのグリコシル化に合致する。これらのデータでは、G I T R L E C D 中の N 1 6 1 D 突然変異 (融合タンパク質中の N 4 0 1) が、脱グリコシル化 G I T R L E C D をもたらすとともに、N - グリコシル化が F c ドメイン内の基準のグリコシル化部位に限って存在することも確認される。

40

【0205】

六量体 G I T R L I g G 1 F P のインビトロ特性

リガンド-受容体結合に対する六量体 G I T R L I g G 1 F P の効果

配列番号6の単量体 G I T R L I g G 1 F P サブユニット配列を有する六量体 G I T R L I g G 1 F P のヒト G I T R L のヒト G I T R への結合に対する効果を、均一時間分解蛍光 (H T R F) アッセイを用いて判定した。G I T R L I g G 1 F P を、G I T R L - H A (ヘマグルチニンタグ) の G I T R - F c への結合が測定される H T R F アッセイで滴定した。ヒト G I T R F c をユーロピウムクリプテートと複合し、X L 6 6 5 と複合した抗 H A 抗体を用いて、G I T R L - H A タンパク質を検出した。P r i

50

sm 6.0xソフトウェア (Graph Pad) を用いて、分析データを4つのパラメータロジスティック方程式にカーブフィッティングすることにより、 IC_{50} 値を判定した。図10に示す代表的な結果は、GITRL-IgG1-FPがGITRL-HAのGITRへの結合を0.562 nMの IC_{50} で阻害することを示す。アイソタイプ対照抗体NIP228では阻害が認められなかった。

【0206】

GITRアゴニズム

この実験の目的は、GITRL融合タンパク質 (FP) がGITR受容体を介してシグナルを送達する能力を判定することであった。

【0207】

方法

六量体GITRL-FPを、hGITRおよび核内因子 κB (NF κB) プロモーターに連結されたルシフェラーゼレポーター遺伝子を遺伝子導入したJurkat細胞に、溶液へ添加した。このアッセイでは、GITR受容体の活性化がNF κB 経路を介したシグナル伝達をもたらす、次いで発光を介して測定可能なルシフェラーゼ活性における増強をもたらす。

【0208】

結果

六量体GITRL-FPのアッセイ系への添加により、発光の増加がもたらされる。観察された効果は濃度依存性があり、 EC_{50} は約180 pMであった。それに対し、アイソタイプ対照抗体の添加は、全く効果を有しなかった。結果を図11に示す。これらのデータは、六量体GITRL-FPがGITR受容体の強力なアゴニストであることを示す。

【0209】

一次T細胞活性化

この実験は、ヒトT細胞の増殖および機能に対する、六量体GITRL-FPによって媒介されるGITRアゴニズムの影響を評価するために実行した。

【0210】

方法

GITR発現を上方制御するため、全ヒトT細胞を健常ヒト血液から単離し、プレートに結合した抗CD3の存在下での4日間の培養により、抗原を経験させた。抗原を経験した細胞を、六量体GITRL-FPの存在下で亜最適濃度の抗CD3および抗CD28で再刺激する前、培地中での単独培養により2日間静止させた。細胞の増殖は、チミジンの細胞への取り込みを18時間かけて定量化することによって評価した。インターフェロン γ (IFN- γ) の放出を、メソスケールディスクバリーを用いて定量化した。

【0211】

結果

抗CD3を抗CD28と一緒に添加した結果、最小レベルの増殖とIFN- γ の最小放出がもたらされた。プレートに結合した六量体GITRL-FPをプレートに結合した抗CD3および抗CD28と一緒に添加した結果、増殖のレベルおよびIFN- γ の放出における濃度依存性増加がもたらされた。代表的なデータを図12および図13に示す。アイソタイプ対照抗体は、増殖またはサイトカインの放出に対する効果を全く有しなかった。

【0212】

ADCC

マウス六量体GITRL-IgG1-FPは、FOXP3陽性制御性T細胞を含む腫瘍内CD4陽性T細胞を枯渇させ、腫瘍内でのCD8⁺T細胞対CD4⁺T細胞の比の増加をもたらすことがインビボで示されている。この実験は、六量体GITRL-FPがADCCを介してヒトT細胞の枯渇を媒介する能力を判定し、生存細胞集団において生じるCD8:CD4比の変化を評価するために実行した。

【0213】

方法

G I T R 発現を上方制御するため、健常ヒト血液から単離した一次ヒト T 細胞は、植物性血球凝集素 (P H A) および I L - 2 で抗原を経験させた。次にそれらを蛍光色素で標識し、指定濃度で、六量体 G I T R L F P との指定される比で、一次 N K 細胞とともに 24 時間インキュベートした。フローサイトメトリーを用いて、アッセイの終了時に存在する生きた T 細胞の百分率を定量化し、これを用いて、非処理ウェルに対する処理ウェルにおける溶解百分率を計算した。C D 4 および C D 8 細胞の割合についても、フローサイトメトリーによって定量化した。

【0214】

結果

N K 細胞は単独で一次 T 細胞の少量の溶解を媒介し、それは I g G 1 F c ドメインを有する配列番号 6 で示される G I T R L 融合ポリペプチドサブユニットを含む六量体 G I T R L F P を濃度依存的様式で添加することにより著しく増強された。N K 細胞上の F c γ 受容体に結合することができない、I g G 4 F c ドメインを有する配列番号 40 の G I T R L 融合ポリペプチドサブユニットを含む六量体 G I T R L F P は、負の対照として用い、測定した溶解レベルに対する効果を全く有しなかった (図 14) 。

【0215】

アッセイの終了時に存在する C D 4 + および C D 8 + T 細胞の百分率のフローサイトメトリー分析によると、六量体 G I T R L F P によって媒介される A D C C が増加した C D 8 : C D 4 T 細胞比の生成を支持することが示された (図 15) 。

【0216】

制御性 T 細胞アッセイ

G I T R は制御性 T 細胞 (T - r e g) 上で増加したレベルで発現され、G I T R を介するシグナル伝達が T - r e g の他の T 細胞を抑制する能力に影響することが示唆されている。この実験は、T - r e g 機能に対する六量体 G I T R L F P の影響を評価するために実行した。

【0217】

方法

C D 4 + C D 2 5 - エフェクター T 細胞および C D 4 + C D 2 5 + T - r e g を健常ヒトドナーの末梢血から単離した。エフェクター T 細胞は、指定される比での抗 C D 3 抗体、抗 C D 2 8 抗体、T - r e g および被験物質の存在下での培養前、C F S E で標識した。増殖するエフェクター T 細胞の百分率をフローサイトメトリーによって分析した。

【0218】

結果

抗 C D 3 および抗 C D 2 8 の添加に応答して、エフェクター T 細胞の増殖が認められた。増加する数の T - r e g の添加により、アッセイ中に分裂したエフェクター T 細胞の百分率における減少がもたらされた。プレートに結合したアイソタイプ対照の添加により、分裂した細胞の百分率がさらに減少した一方、プレートに結合した六量体 G I T R L F P の添加により、T - r e g の不在下で認められる百分率まで分裂した細胞の百分率が回復した。結果を図 16 に示す。

【0219】

この試験では、六量体 G I T R L F P が他の T 細胞に対する制御性 T 細胞媒介性抑制の効果を克服する能力が示される。

【0220】

生物学的／機能的活性についてのインビボ試験

アイソタイプ依存性の抗腫瘍活性

ヒト G I T R L がマウス G I T R と交差反応しないことから、ヒト G I T R L F P はがんの免疫担当マウスモデルにおいて試験することができない。この試験を可能にするため、代理マウスの m G I T R L I g G 1 F P および m G I T R L I g G 2 a F P

10

20

30

40

50

を作製した。この試験は、がんの C T 2 6 モデルにおける m G I T R L F P の抗腫瘍活性を評価し、またこの活性の規模に対する F c アイソタイプの影響を判定するために実行した。

【0221】

方法

B a l b / c マウスに C T 2 6 マウス結腸直腸がん細胞株を移植した。移植後 6 日目、動物に m G I T R L F P を 1 7 日間で 1 回もしくは毎日のいずれかで腹腔内 (i . p .) 注射により投与した。m G I T R L F P の 2 つの異なるバージョン (一方は m I g G 2 a F c ドメインを有し、もう一方は m I g G 1 F c ドメインを有する) について試験した。5 m g / k g および 1 0 m g / k g の 2 つの異なる用量レベルの各 m G I T R L F P を試験した。生理食塩水治療を負の対照として用いた。

10

【0222】

結果

生理食塩水治療群の中央値生存は 2 2 日であり、このグループ内のマウスのいずれも試験終了まで生存しなかった。1 0 m g / k g の m G I T R L F P での治療により、中央値生存が 3 2 日まで延長され、試験終了時に 5 0 % 生存率が得られた。5 m g / k g の m G I T R L F P で治療した群では、試験終了時に 1 0 匹中 9 匹のマウスが生存し、中央値生存時間を全く確定できなかった。5 もしくは 1 0 m g / k g の m G I T R L F P m I g G 1 での治療により、中央値生存が各々、2 8 日および 2 2 . 5 日まで延長され、試験終了まで 1 0 匹中 2 匹のマウスの生存が得られた。結果を図 1 7 に示す。

20

【0223】

この試験は、m G I T R L F P が抗腫瘍活性を媒介する可能性を示し、F P のアイソタイプが観察される抗腫瘍活性のレベルに影響し得ることを示す。

【0224】

薬力学的効果

この試験は、腫瘍保有マウスの脾臓および腫瘍における T 細胞の活性化状態および割合に対する m G I T R L F P の影響を判定するために実行した。

【0225】

方法

7 ~ 9 週齢の C T 2 6 腫瘍保有 B a l b / c 雌マウスを、指定される通りの 0 . 2 m g / k g もしくは 1 m g / k g のいずれかの m G I T R L F P の腹腔内注射により治療した。生理食塩水治療を負の対照として用いた。マウスを治療開始から 7 日後に屠殺し、フローサイトメトリーを用いて、脾臓および腫瘍における細胞の頻度および表現型を評価した。

30

【0226】

結果

m G I T R L F P による治療は、脾臓におけるすべての T 細胞サブセットでの増殖マーカー K i 6 7 の発現における増加をもたらし、これはこれらの細胞の増殖における増加を示唆する。図 1 8 を参照のこと。

【0227】

m G I T R L F P による治療は、脾臓におけるすべての T 細胞サブセットでの活性化マーカー I C O S の発現における増加をもたらし、これはこれらの細胞の活性化における増加を示唆する。図 1 9 を参照のこと。

40

【0228】

m G I T R L F P による治療は、腫瘍内部の C D 4 + F O X P 3 + 制御性 T 細胞および C D 4 + F O X P 3 - ヘルパー細胞の頻度における減少をもたらしたが、C D 8 + 細胞傷害性 T 細胞の頻度を変化させなかった。全体的結果は、腫瘍微小環境内での C D 8 : C D 4 比の増加であった。図 2 0 を参照のこと。

【0229】

方法

50

細胞株および試薬

TC-1 腫瘍株は、ATCC (カタログ番号 CRL 6475, Manassas, VA) から入手し、DMEM+10% FBS+1% ペニシリン/ストレプトマイシン中で維持した。CT26 腫瘍株は、ATCC (Manassas, VA) から入手し、10% ウシ胎仔血清を添加した RPMI 1640 培地中で維持した。DTA-1 およびアイソタイプ抗体は、Bio X Cell (West Lebanon, NH) から購入した。

【0230】

腫瘍モデル

TC-1 実験では、Jackson Labs (Bar Harbor, ME) から入手した雌 C57BL/6 マウス (カタログ番号 000664) マウスを用いた。CT26 実験では、Envigo (Frederick, MD) から入手した雌 Balb/C マウスを用いた。マウスは、腫瘍移植時、6~8 週齢の間であった。すべての動物実験は、動物実験委員会 (Institutional Animal Care and Use Committee) によって確立されたガイドラインに従って実行した。TC-1 腫瘍移植においては、 2×10^4 個の生存可能な TC-1 細胞を左後足蹠に皮下移植した。CT26 腫瘍移植においては、 5×10^5 個の細胞を右側腹部に移植した。腫瘍成長は、ノギス 1 を用いた直接的測定により評価した。双方向的な測定結果を 2~4 日ごとに収集し、腫瘍体積は体積 = (長さ・幅²) / 2 を用いて計算した。腫瘍を 6~14 日間発生させておき、次に腫瘍保有マウスを腫瘍体積により治療群に無作為化した。マウスは、IACUC プロトコルに従い、原発性腫瘍が TC-1 / 足蹠において 1000 mm^3 、CT26 / 側腹部において 2000 mm^3 を超えたとき、安楽死させた。PD 試験においては、マウスを安楽死させ、腫瘍および脾臓を収集し、70 μM のフィルター (Corning, Corning, NY) を通して粉碎し、単一の細胞懸濁液に処理した。

【0231】

機能的 T 細胞応答およびフローサイトメトリー

抗原特異的刺激のため、 $1 \sim 2 \times 10^6$ 個の生細胞に、1 ウェルあたり 1 μg の AH1 ペプチド配列 SP SYVYHQF (配列番号 56) (Anaspec, Fremont, CA) を蒔いた。すべての株における染色の順序は、live/dead blue (Life Tech)、細胞外タンパク質、FOXP3 Fix/Perm キット (Ebioscience)、それに続いて細胞内サイトカインであった。抗体は、GITR (クローン DTA-1) を含んだ。すべての試料は、LSR-II または Fortessa (BD San Jose, CA) のいずれかで走らせた。すべてのデータは、FlowJo (TreeStar, Ashland, OR) を用いて分析した。

【0232】

結果

mGITRL-FP は極めて有効な GITR アゴニストであり、これは CT26 腫瘍の拒絶をもたらす

GITR アゴニズムが Balb/c マウスにおける CT26 腫瘍の退縮および消失を引き起こす上で有効であることが以前に示されている。Balb/c マウスに CT26 腫瘍細胞を移植し、6 日後に腫瘍体積により無作為化し (群 $n=10$)、mGITRL-FP IgG2a (Q2D $\times$ 9) の単回投与または反復投与で治療した。用量範囲は、5 mg/kg 体重から 0.04 mg/kg 体重に減少した。単回投与においては、mGITRL-FP の用量を 1 mg/kg まで減少させることで、30 日目にかけて CT26 マウス腫瘍の 1 つを残して全部が消失した (図 40B)。最低用量として、0.2 mg/kg 群では 3 つの消失、0.1 mg/kg 群では 2 つの消失が得られた。mGITRL-FP のさらなる投与を追加することで有効性が高まり、0.04 mg/kg の最低用量群を除く全部で 100% の排出速度が認められた (図 40C)。最低反復投与群では、4 つの消失が認められた。

【0233】

mGITRL-FP 機能の評価においては、それを公知のモノクローナル GITR アゴ

ニストであるDTA-1と比較した。100ug~500ugの範囲の用量/マウスの使用については以前に記載がなされている。各マウスは約20グラムであると評価されたので、用量は5mg/kg~25mg/kgの範囲であった。Balb/cマウスにCT26腫瘍細胞を移植し、10日後に腫瘍体積により無作為化し(群n=10)、次に1mg/kgのmGITRL-FPIgG2aまたは5mg/kgもしくは25mg/kgのDTA-1のいずれかの単回投与で治療した(図40D)。

【0234】

しかし、DTA-1の用量増加により有効性が高まり、1mg/kgのmGITRL-FPIgG2aは、5mg/kgのDTA-1の場合と同様の有効性および腫瘍成長動態を示した。CD8T細胞が我々の薬剤効果にとって必要であったか否かを判定するため、選択的に枯渇されたCD8T細胞を除く同一群を、モノクローナル枯渇抗体を用いて評価した(図40E)。CD8T細胞の不在下で、DTA-1またはmGITRL-FPIgG2aのいずれかにおけるCT26腫瘍を完全に消失させる能力が有意に低下した。各群からのわずか1~2匹のマウスが腫瘍のない状態で生存した。

【0235】

加えて、CD8T細胞の不在下で、mGITRL-FPIgG2aは、増加する中央値全生存でDTA-1よりも大して有効でなかった(図40F)。いかにmGITRL-FPIgG2aがCD8と相互作用するかを理解するため、個別のリンパ系集団でのGITR発現を評価した。CD4⁺TregはCD8T細胞よりも高レベルのGITRを発現するが、腫瘍内のTregおよびCD8T細胞の双方は、脾臓内のそれら各々の集団よりも高レベルのGITRを発現する(図40G)。

【0236】

mGITRL-FPIgG2aはTregを枯渇させ、腫瘍抗原に特異的なT細胞を増加させる

GITRアゴニストがTregを減少させるとともに、高結合活性のT細胞応答を増強することが以前に示されている。どの薬力学的効果をGITRL-FPIgG2aが媒介する能力があるかを理解するため、CT26モデルを腫瘍退縮中に評価した。CT26を有するBalb/cマウスをmGITRL-FPIgG2aで治療し、投与開始から8日後、脾臓および腫瘍を収集した。試験の2つのアーム、すなわちTGI(腫瘍成長阻害)群(n=5)およびPD(薬力学)群(n=5)を含めた。mGITRL-FPIgG2aで治療した単一マウス以外のすべてのCT26を治療した(図41A)。18日目、PD群を屠殺し、脾臓および腫瘍に存在する免疫細胞の両表現型を評価した。次に、CD8T細胞機能を、CT26免疫優勢エピトープAH1での再刺激によって評価した。mGITRL-FPIgG2aが有意に増加することで、脾臓および腫瘍におけるTregの数が減少した(図41B)。mGITRL-FPIgG2aは、CD8の百分率を変化させなかった一方、AH1に特異的な抗原であるCD8の数を有意に増加させた(図41C~D)。脾臓では、全CD8の5~10%が抗原特異的であり、IFN γ およびTNF α を産生する能力があった。腫瘍では、その数は5~15%であった。これは腫瘍浸潤リンパ球と抹消貯蔵所(peripheral reservoir)の双方の有意な拡大である。mGITRL-FPIgG2aがCD4⁺TregおよびCD8T細胞の双方に結合していたか否かを評価するため、DTA-1抗体を用いることを意図してGITRを染色した(図41E~F)。Tregは、GITR MFI(平均蛍光強度)において75%を超える減少を示した。これと同じ効果がCD8T細胞上で認められ、これはmGITRL-FPIgG2aがDTA-1のCD8T細胞上での結合を改変していることを示した。このデータに基づき、T細胞がKI-67増殖の増加を示すと仮定された。治療後8日目の評価後、CD4およびCD8T細胞の双方は、腫瘍と脾臓の双方において有意により多くのKI-67陽性細胞を示す(図41G~H)。

【0237】

mGITRL-FPIgG2aは抗原特異的なCD8T細胞を用量依存的様式で拡大させる

次に、CT26を治療したマウスが同じ腫瘍の再負荷から保護されるか否かを検討した。これを評価するため、治療したマウスを、単回用量として1.0、0.5、もしくは0.2mg/kgのmGITRL-FPIgG2aで治療した群から再負荷した(図42

A)。85日目での治療したマウスのみを除くすべてのマウスを、初期用量から減少させて再負荷した。CT26を最初に治療したすべてのマウスが腫瘍の再負荷から保護されたが、最低用量群では、小さい腫瘍が測定されたが迅速に排除された。この結果を精査するため、120日目にマウスを屠殺し、脾細胞を採取し、AH1ペプチドに対して再刺激した。AH1に特異的なT細胞の数において用量依存的増加が認められた(図42B~C)。1mg/kgのmGITRL-FP群では、脾臓CD8T細胞の25%がCT26の単一エピトープに特異的である。これらのマウスは、再負荷中に腫瘍サイズにおける増加を全く示さなかった。最低用量0.2mg/kgは、6%の抗原特異的CD8を有し、120日目までに除かれる再負荷時に少し成長しつつある腫瘍を示した。

【0238】

10

六量体GITRL IgG1 FPのヒトGITRに対する結合親和性

組換えヒトGITRに対する配列番号6のGITRL IgG1 FP単量体サブユニットを含む六量体GITRL IgG1 FPの溶液の K_D (解離定数)を、KinExA 3200装置(Sapidyne Instruments, Boise Idaho)を用いる動力学的排除アッセイ(KinExA)を用いて測定した。

【0239】

D-PBS、0.02%のナトリウムおよび1mg mL⁻¹のウシ血清アルブミン緩衝液中、六量体GITRL IgG1 FPの2nM溶液を、組換えヒトGITRで滴定し、25℃で一晩平衡化した。試料を25℃で温度制御されたKinExA 3200装置に移した。平衡化混合物のサンプリングを、最小にアミン-ビオチン化したヒトGITRで滴定された、アズラクトンビーズに結合されたストレプトアビジンを用いて行った。用いた二次検出試薬は、Fc特異的試薬DyLight 650で標識されたプロテインG'(Sigmaから入手可能なプロテインGの断片)であった。データを、KinExA Proソフトウェア(バージョン3.6.8.)を用いて処理し、解釈した。六量体GITRL IgG1 FPのヒトGITRへの結合について、82nMの K_D が得られた。

20

【0240】

KinExAによる組換えカニクイザルGITRへの六量体GITRL IgG1 FPの結合

組換えカニクイザルGITRに対する配列番号6のGITRL IgG1 FP単量体サブユニットを含む六量体GITRL IgG1 FPの溶液の K_D を、ヒトGITRについてのセクション6.1に記載と同様の方法でKinExAを用いて測定した。六量体GITRL IgG1 FPのカニクイザルGITRへの結合における K_D として107nM得られた。

30

【0241】

ELISAによる組換えカニクイザルGITRへの六量体GITRL IgG1 FPの結合

配列番号6のGITRL IgG1 FP単量体サブユニットを含む六量体GITRL IgG1 FPのカニクイザルGITRに対する交差反応性を、ELISAを用いて測定した。六量体GITRL IgG1 FPをビオチン化し、固定化されたカニクイザルGITR-Fへの結合を、ストレプトアビジン-HRPおよびTMB基質を用いて検出した。図21は、六量体GITRL IgG1 FPのカニクイザルGITRへの結合がヒトGITRに酷似し、かつ負の対照CD137-Fcタンパク質に対する結合が全く認められないことを示す。

40

【0242】

実施例3：カニクイザルにおける静脈内GITRL IgG1 FP治療のインビボ薬学的効果

カニクイザルにおける六量体GITRL IgG1融合タンパク質(FP)の薬力学的パラメータを決定するため、配列番号6のGITRL IgG1 FP単量体サブユニットを含む六量体GITRL IgG1 FPを、雄カニクイザルの群(5/群)に静脈内

50

(I V) ボーラス注射によって投与した。

【0243】

方法

1日目、3日目および5日目、動物の別々の群に、1もしくは10mg/kgの六量体GITRL IgG1 FPを注射した。対照動物は、溶媒(20mMリン酸ナトリウム、230mMスクロース、0.02%P80、pH7.5)を受けた。薬力学的エンドポイントの測定のため、前投与期間中と1、3、5、9、11、15、18、22、および29日目に、血液試料を採取した。

【0244】

標準のフローサイトメトリー法を用いて、全血由来のKi67陽性T細胞集団を測定した。

10

【0245】

結果

細胞増殖を示す、%Ki67陽性T細胞亜集団、例えば(CD3⁺CD4⁺CD95^{hi}ighCD28⁺/dim/-全メモリーCD4⁺およびCD3⁺CD8⁺CD95^{hi}ighCD28⁺/dim/-全メモリーCD8⁺T細胞)における増加が認められた(図22)。この観察によると、11日目もしくは15日目の投与期間に最大に達し、次に試験終了に向けて減少した。

【0246】

実施例4:GITRL FP内部のアミノ酸の突然変異およびそれらの受容体結合、アゴニスト活性および熱安定性に対する影響

20

GITRL受容体結合ドメイン内に突然変異を有するhGITRL FP変異体の作製

hGITRL FP変異体を作製し、GITRLに対して結合し、刺激するその能力について試験した。場合によっては、その熱安定性についても評価した。

【0247】

方法

遺伝子合成および標準のDNAクローニング技術を用いて、GITRL FP変異体をコードするDNAベクターを作製した。懸濁CHO細胞に、異なる六量体hGITRL融合タンパク質をコードするDNAベクターを、PEIを用いて一過性に遺伝子導入し、80%の湿度下、140rpmで振盪しながら37℃で8日間成長させた。分泌タンパク質を含有する40mLの条件培地を、1,600×gでの遠心分離および濾過により、細胞および細胞片から分離した。Mab Select Sure(商標)樹脂を用いてタンパク質を精製し、そのサイズおよび完全性を還元SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によって分析した。

30

【0248】

GITRLへの結合に対するGITRL FP変異体と組換え三量体リガンドとの競合

ヒトGITRLのヒトGITRLへの結合に対するGITRL FP分子の効果を、均一時間分解蛍光(HTRF)アッセイを用いて判定した。

【0249】

方法

40

GITRL FP分子を、GITRL-HA(ヘマグルチニンタグ)のGITRL-Fcへの結合が測定されるHTRFアッセイで滴定した。ヒトGITRL-Fcはユーロピウムクリプテートと複合させ、XL665と複合した抗HA抗体を用いて、GITRL-HAタンパク質を検出した。Prism5.01ソフトウェア(GraphPad)を用いて分析データを4つのパラメータロジスティック方程式にカーブフィッティングすることにより、IC₅₀値を判定した。

【0250】

結果

突然変異した六量体GITRL FP分子(hGITRL-FP wt、N92D、N104DおよびN161D)はすべて、三量体GITRL-HAのGITRL-Fcへの結

50

合の強力な阻害剤であり、類似の阻害特性および IC_{50} 値をもたらした（図 23A、B）。

【0251】

G I T R L F P 変異体の組換え G I T R - F c への結合

異なる h G I T R L F P 分子の機能的活性を、h G I T R を安定的に発現する N F κ B ルシフェラーゼレポーター細胞を用いるアッセイにて測定した。h G I T R のアゴニズムとその後の N F κ B 経路の活性化によって駆動される発光を測定した。

【0252】

方法

h G I T R L F P 分子を、h G I T R L F P の h G I T R - F c への結合が測定される H T R F アッセイで滴定した。ヒト h G I T R F c はユーロピウムクリプテートと複合させ、X L 6 6 5 と複合した抗 F L A G 抗体を用いて、h G I T R L F P タンパク質を検出した。P r i s m 5 . 0 1 ソフトウェア (G r a p h P a d) を用いて分析データを 1 つの部位の飽和結合方程式にカーブフィッティングすることにより、 K_D 値を判定した。

【0253】

結果

h G I T R L F P w t および h G I T R L F P N 1 6 1 D における結合特性は酷似していた一方（各々、 1.225 nM および 1.079 nM の K_D ）、N 1 2 9 A 突然変異 h G I T R L F P は、h G I T R F c に対する結合低下を示した（ $K_D = 3.774 \text{ nM}$ ）。N 1 2 9 A 突然変異を N 1 6 1 D 突然変異と組み合わせるとき、h G I T R L F P 分子の結合能力はさらなる負の影響を受けた（ $K_D = 11.85 \text{ nM}$ ）（図 24 を参照）。

【0254】

レポーターアッセイにおける G I T R L F P 変異体の活性

異なる h G I T R L - F P 分子の機能的活性を、h G I T R を安定的に発現する N F κ B ルシフェラーゼレポーター細胞を用いるアッセイにて測定した。h G I T R のアゴニズムとその後の N F κ B 経路の活性化によって駆動される発光を測定した。

【0255】

方法

6 ポイントデータ曲線のため、h G I T R L F P タンパク質を 4 倍に連続希釈し、3 通りに 9 6 ウェルプレートに添加した。次に、ヒト G I T R を遺伝子導入した J u r k a t N F - κ B ルシフェラーゼレポーター細胞を、アッセイプレートのすべてのウェルに添加し、 37°C で 3 時間インキュベートした。S t e a d y - G l o 試薬をアッセイプレートのすべてのウェルに添加することにより、ルシフェラーゼ発現を検出した。プレートを室温で 5 分間インキュベートし、次に発光を測定し、対数（アゴニスト）対応答の G r a p h P a d （商標）P r i s m 5 . 0 1 (G r a p h P a d S o f t w a r e , I n c . L a J o l l a , C A U S A) での可変勾配非線形曲線フィットを用いて EC_{50} 値を生成した。

【0256】

結果

すべての G I T R L F P タンパク質が N F - κ B シグナル伝達を誘導する。N 9 2 D および N 1 6 1 D 突然変異体 h G I T R L F P タンパク質は、G I T R L F P (w t) と類似の効力特性および EC_{50} 値をもたらした。N 1 2 9 A および N 1 2 9 A / N 1 6 1 D 突然変異は、このアッセイにおける h G I T R L F P の G I T R を刺激する能力に負の影響を与えた（図 25A ~ C）。

【0257】

T 細胞再刺激アッセイにおける G I T R L F P 変異体の活性

異なる h G I T R L F P 分子の機能的活性を、一次ヒト T 細胞およびチミジン取り込みの読み出しを用いる同時刺激アッセイにて測定した。

【0258】

方法

ヒト末梢血単核球（PBMC）由来のCD3⁺T細胞を、マウス抗ヒトCD3抗体でコーティングしたTC処理プレート内でのインキュベーションを介して37℃で4日間刺激した。次に、それらを遠心分離によってペレット化し、アッセイ培地に再懸濁し、TC処理プレートに添加し、37℃で2日間インキュベートした（静止期）。hGITRL FP分子を、10ポイントにわたりアッセイ培地で2倍に連続希釈し、マウス抗ヒトCD3で予備コーティングしたTC処理プレートに3通りに添加した。2時間後、アッセイプレートを洗浄し、以前に調製したCD3⁺T細胞を各ウェルに添加し、37℃で4日間インキュベートした。4日後、アッセイ培地中のトリチウム標識チミジンを各ウェルに添加し、プレートを37℃でさらに18時間インキュベートした。インキュベーション後、チミジンの取り込みを、Topcount（商標）を用いて測定した。

10

【0259】

結果

試験したすべてのhGITRL FP突然変異体は、2つの独立実験において低下した活性を有するN92Dを例外として、hGITRL FP wtに等価な活性を示した（図26A～C）。

【0260】

GITRL FP変異体の融解温度

GITRL FP wtおよびN92Dタンパク質の融解温度を蛍光色素（Sypro（商標）Orange）を用いて測定したが、その放射特性は折り畳まれていないタンパク質の存在下で変化する。

20

【0261】

方法

GITRL FP wtおよびN92D GITRL FP変異体の熱安定性を、融解温度（T_m）を計算するためのSypro Orangeに基づくアッセイを用いて評価した。タンパク質を、96ウェルPCRプレートに懸濁する前、最初に2×PBSで0.5mg/mLまで希釈した。Sypro（商標）Orangeをプレート上の各ウェルに添加し、次に密封した。プレートを、Chromo4（商標）連続蛍光検出器を用いてリアルタイムPCR装置上で読み取った。温度は、1℃ごとの読み取りと1秒の保持時間で20℃から90℃に高めるように設定した。アンフォールディング転移を、蛍光強度および蛍光誘導体を温度の関数としてプロットすることによって判定した。各GITRL FPタンパク質を二通りに分析した。

30

【0262】

結果

2つのGITRL FPタンパク質における融解温度を下の表4-1にまとめる。両変異体は67℃で転移ピークを有するが、hGITRL FPN92Dは、低温（54℃）で追加的な幅広い転移ピークを呈し、これは構造的不安定性を示唆する（図27）。

【0263】

【表12】

40

表 4-1:2 つの GITRL FP タンパク質における転移温度

	被験試料	T _m 1 (°C)	T _m 2 (°C)
	GITRL FP wt	/	67
	GITRL FP N92D	54	67

【0264】

50

データの概要および結論

N104D G I T R L F Pタンパク質は、G I T R / G I T R L競合結合アッセイおよび一次T細胞再刺激アッセイにおいて野生型h G I T R L F P対応物に等価な活性を示したが、これはN104がh G I T R L F Pの活性における主要な役割を果たさないことを示唆する。A s pに対するA s n 1 6 1の突然変異は、N結合グリコシル化部位の除去を表し（実施例4におけるデータを参照）、この突然変異体（h G I T R L F P N 1 6 1 D）はすべてのアッセイ（G I T R / G I T R L競合結合、直接結合、レポーターおよび一次T細胞再刺激アッセイ）において活性を保持したが、これはA s n 1 6 1、およびこの部位のグリカンがG I T Rの結合およびアゴニズムなどの重要な機能に関与しないことを示唆する。

10

【0265】

N129A突然変異体は、レポーターアッセイにおいてh G I T Rへの結合低下および活性低下を示したが、これはそれがh G I T Rへの結合とその後のh G I T Rのアゴニズムにおける役割を果たすことを示唆する。興味深いことに、この突然変異をN161D突然変異（単独で活性に影響しない）と組み合わせたとき、G I T Rの結合およびアゴニズムはさらに低下した。

【0266】

N92D突然変異は、レポーターアッセイにて試験した時、h G I T R L F Pの活性に影響するようには思われなかったが、h G I T R L F P N 9 2 Dの活性低下が一次T細胞再刺激アッセイにおいて認められた。N92D突然変異体の熱安定性を検討した時、h G I T R L F Pと比べてより低い追加的な非常に幅広い融解温度転移ピークが認められ、これは（37℃を含む）より低温での一部の構造的不安定性を示唆する。一次T細胞アッセイのより長い時間経過（4日）に起因して、h G I T R L F P N 9 2 D分子が不安定化し、かつ折り畳まれず、このアッセイではレポーターアッセイ（3時間）と比べて活性の低下をもたらすことが予想され得る。したがって、A s n 9 2のA s pへの突然変異は、構造的安定性の観点で好ましくないように思われる。

20

【0267】

実施例5：グリコシル化されるh G I T R L F P内部のアミノ酸残基の同定

G I T R結合ドメイン内部に2つの有望なN-グリコシル化コンセンサス部位（N161およびN129）が存在する。これらの部位、ならびにF cドメイン内部の基準のN-グリコシル化部位（I g Gとの関連でのN297；成熟h G I T R L F P配列内のN78）でのグリカンの存在および構造を質量分析によって測定した。

30

【0268】

方法

組換えタンパク質の発現および精製

組換えh G I T R L F P w tおよびN161Dタンパク質を、親和性クロマトグラフィーとその後のサイズ排除クロマトグラフィーを用いて、関連タンパク質をコードするベクターを一過性に遺伝子導入したCHO細胞の条件培地から精製した。

【0269】

トリプシンペプチドマッピング

h G I T R L F P w tおよびh G I T R L F P N 1 6 1 Dの試料を変性させ、還元し、還元したシステインをアルキル化した。次に、試料をトリプシンで消化した。37℃で4時間後、消化物を酸の添加によりクエンチした。ペプチドをU P L C上で逆相によって分離し、U V検出器および質量分析計を用いて測定した。得られたトリプシンペプチド配列を表5-1に提示する。

40

【0270】

結果：

【0271】

【表 1 3】

表 5-1

ID	配列	試料
T7	EEQY <u>N</u> STYR (配列番号 43)	hGITRL FP wt & hGITRL FP N161D
T40	DMIQTLT <u>N</u> K (配列番号 44)	hGITRL FP wt & hGITRL FP N161D
T42-43	IQNVGGTYELHVGDTIDLIFNSEHQVLK <u>NN</u> TYWGIILLANPQFIS (配列番号 45)	hGITRL FP wt
T43'	<u>D</u> NTYWGIILLANPQFIS (配列番号 46)	hGITRL FP N161D

N=アスパラギン部分 N-グリコシル化コンセンサス 配列D=hGITRL FP N161D における N161D 置換

10

【0 2 7 2】

20

様々な h G I T R L F P 中に見出されるオリゴ糖構造のタイプの模式図を図 2 8 に提示する。質量分析データを図 2 9 A、B、および C に提示する。

【0 2 7 3】

結論

G I T R L および F c ドメインにおける N-グリコシル化部位の占有、ならびに各部位での主要なオリゴ糖の構造を判定するため、ペプチドマッピング分析を用いた。h G I T R L F P w t および h G I T R L F P N 1 6 1 D タンパク質の双方では、基準の F c N-グリコシル化部位 (N 7 8) がグリコシル化され、主要な炭水化物構造が C H O 細胞内で発現される I g G F c 領域に典型的な中性の二分岐複合型オリゴ糖であった。G I T R L R B D 内部の N 1 2 9 の N-グリコシル化コンセンサス部位は、h G I T R L F P w t または h G I T R L F P N 1 6 1 D のいずれかにおける任意のオリゴ糖構造で占有されなかった。G I T R L R B D 内部の N 1 6 1 の N-グリコシル化コンセンサス部位は h G I T R L F P w t 中で占有され、主要な炭水化物構造は中性の帯電した二分岐複合型オリゴ糖であることが見出された。h G I T R L F P N 1 6 1 D タンパク質では、ペプチドマッピングにより、G I T R L R B D から N 1 6 1 N-グリコシル化コンセンサス部位を除去する、N 1 6 1 D アミノ酸置換が確認された。予想通り、N-グリコシル化が D 1 6 1 で全く検出されなかった。

30

【0 2 7 4】

実施例 6：マウスモデルおよび O X 4 0 組み合わせ試験

G I T R の標的化をより理解するため、マウス G I T R L - F P の活性および薬力学的効果を、アゴニストのマウス O X 4 0 L F P を標的化する O X 4 0 の場合と比較した。

40

【0 2 7 5】

材料および方法

N F - κ B レポーターアッセイ

J u r k a t m G I T R またはヒト O X 4 0 N F κ B 細胞を、指定の通り、5 0 , 0 0 0 個の細胞 (J u k a t m G I T R) または 2 0 0 , 0 0 0 個の細胞 (J u r k a t ヒト O X 4 0) で、抗 G I T R 抗体 D T A - 1 (B i o l e g e n d) 、N I P r I g G 2 b アイソタイプ対照、m G I T R L - F P m I g G 2 a またはプレートに固定化された m O X 4 0 L - F P m I g G 1 もしくはアイソタイプ対照 (タンパク質の O X 4 0 を介するシグナル伝達を不能にする (Y 1 8 2 A) 位での単一アミノ酸突然変異を含む

50

）と一緒に、96ウェルプレート内、37℃、5%CO₂および85%の湿度下で培養した。mOX40L-FP mIgG1を有するアッセイにおいて、ルシフェリン基質を含有する定常Glo（登録商標）試薬（Promega）を5時間後または16時間後にプレートに添加し、プレートをプレートシェーカー上、暗所で30分間インキュベートした。Envisionプレートリーダー（Perkin Elmer）を用いて、アッセイシグナルを検出した。

【0276】

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法

5μgのタンパク質を、負荷緩衝液および還元剤と混合し、80℃で10分間変性させ、タンパク質分子量マーカー（Rainbow Marker、GE Healthcare）と一緒に、4～20%トリス-グリシンSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動ゲル（Thermo Fisher）上に負荷した。タンパク質を200Vで45分間電気泳動し、Instant Blueタンパク質染色（Sigma）を用いて染色した。

【0277】

マウスおよび腫瘍モデル

8～10週齢BALB/cまたはC57BL/6雌マウスをCharles River UK Ltd. またはHarlan Laboratories Inc. から入手した。PBS中CT26またはB16F10-Luc2細胞の5×10⁶個の細胞/mLまたは5×10⁴個の細胞/mLの細胞密度での懸濁液100μLを、各動物の右側腹部に皮下注射した。B16F10-Luc2細胞株にルシフェラーゼレポーターをCAGプロモーターの制御下で組み込み、細胞を50%PBSおよび50%成長因子（還元）およびフェノールレッドフリーマトリゲル（Corning）に移植した。測定可能な腫瘍を腫瘍体積に基づいて無作為化した。各腫瘍の長さ（mm）および幅（mm）を電子ノギスで週3回測定した。腫瘍の体積（mm³）を、式（長さ[mm]×幅[mm]²）/2に基づいて計算した。腫瘍成長応答を、試験終了時に体積が200mm³未満であるように測定可能な腫瘍が存在しないかまたは持続的な腫瘍成長阻害が認められる場合の応答として分類した。各スパイダープロット上に示される退縮の数は、移植された腫瘍の総数に対する割合である。同系腫瘍の移植後6日目、またはそれらが200mm³の体積に達した時、マウスにmGITRL-FPまたはmOX40L-FPのいずれかを腹腔内投与した。B16F10-Luc2保有マウスにおける25mg/kgのmGITRL-FPの投与に限り、4用量に対して耐性を示した。

【0278】

フローサイトメトリー

腫瘍、脾臓または腫瘍流入リンパ節を切断し、氷上のRPMI-1640培地中に置いた。組織を、各々を40もしくは100μmのナイロンセルストレーナー（Falcon）を通過させることにより脱凝集させ、細胞を遠心分離によってペレット化し、赤血球溶解緩衝液（Sigma）に再懸濁した。室温で2分間のインキュベーション後、細胞を洗浄し、フローサイトメトリー緩衝液（Ebioscience）に再懸濁した。腫瘍組織試料を、穏やかなMACSディソシエーターおよび腫瘍解離キット（Miltenyi Biotec）を用いて製造業者の使用説明書に従って処理した。

【0279】

試料を、生存度を意図して、live dead fixable blue（Life Technologies）を用いて製造業者の使用説明書に従って染色し、次に蛍光色素結合抗体で染色する前に抗CD16/32（ebioscience）でブロッキングした。CD4（Rm4.5）、FOXP3（FJK-16S）、Ki67（SolA15）、ICOS（7E.17G9）、Eomes（Dan11mag）、T-bet（Apr-46）およびGITR（DTA-1）をebioscienceから購入した。CD45（30-F11）、CD44（IM7）、CD62L（MEL-14）、PD-1（29F.1A12）、およびOX40（OX86）をBiolegendから購入した。CD8（53-6.7）をBD Pharmingenから購入した。細胞内抗原

の染色においては、FOXP3染色キット (ebioscience) を製造業者の使用説明書に従って用いた。Fortessa (Becton Dickinson) を用いての試料の取得前に、試料を3.7%ホルマリンに固定した。データをFlowJoソフトウェア (Ashland, OR) を用いて分析した。

【0280】

薬物動態モデリング

Balb/cマウスに、5もしくは15mg/kgのmGITRL-FP mIgG2aを1回投与した。1群あたりマウス3匹を治療から5分後、0.5、1、2、6、24、72、144、および240時間後に屠殺した。血清試料を収集し、存在する循環mGITRL-FP mIgG2aのレベルを、捕獲と検出の双方として抗マウスGITRL mAb (R&D Systems) を用いてのサンドイッチELISAで評価した。

10

【0281】

2回投与群から得られる薬物動態 (PK) データをプールし、同時に集団手法を用いてモデル化した。集団分析は、薬物統計学的ソフトウェアパッケージNONMEM (バージョン7.2, ICON Development Solutions, Ellicott City, Maryland) を用いて実施した。相互作用オプションを伴うFOCE法を用いた。マウスGITRL-FP mIgG2a PKは、2区画モデルにより適切に特徴づけた。

【0282】

細胞株

20

HEK293T-17細胞 (ATCC, CRL-11268) を、DMEM (Invitrogen) + 10% v/v 熱不活化ウシ胎仔血清 (HI FBS, HyClone) および1×非必須アミノ酸 (NEAA, Invitrogen) で維持した。Jurkat細胞 (ATCC, TIB-152) を、RPMI1640 (Invitrogen) + 10% v/v HI FBSで維持した。Jurkat mGITR NFκB細胞を、10% HI FBS、5 μg/mLのブラストサイジン (Invitrogen) および5 μg/mLのピューロマイシン (Invitrogen) を添加したRPMI1640で維持した。

【0283】

細胞株の作製

30

Jurkat mGITR NFκB細胞株を、第3世代レンチウイルス系 (Systems Biosciences) を用いるレンチウイルス形質導入によって作製した。マウスGITR遺伝子 (NM_009400.2) をCAGプロモーターの制御下でのピューロマイシン耐性遺伝子を有する発現プラスミドにクローン化した。NFκBレポーター発現プラスミドを、ブラストサイジン耐性遺伝子と一緒に、最小プロモーター下でのホタルルシフェラーゼレポーター (luc2, Promega) の上流でNFκB応答要素の5つのコピーを発現するように設計した。各発現プラスミドを、パッケージングプラスミド (Systems Biosciences) と一緒に、リポフェクタミン2000 (Invitrogen) を用いてHEK293T-17に同時導入した。ウイルス粒子を含有する上清を、遺伝子導入の48時間後に収集し、Jurkat細胞を形質導入するために用いた。ウイルス形質導入したJurkat細胞を、形質導入の48時間後から、選択抗生物質として5 μg/mLのブラストサイジンおよび5 μg/mLのピューロマイシンを添加した培地で培養した。JurkatヒトOX40 NFκB細胞株を、ヒトOX40を構成的に発現するように設計したレンチウイルスベクターを形質導入したことを除き、同様の手順を用いて作製した。マウスOX40LはヒトOX40に結合し、それ故、マウスOX40L融合タンパク質の活性を評価するため、ヒトOX40を発現するNFκBルシフェラーゼレポーターJurkat細胞株を用いることができる。

40

【0284】

ELISA

組換えマウスGITR-FcおよびOX40-Fc (R&D Systems) 糖タン

50

パク質を、PBS中 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ で96ウェルプレート（Greiner）上に一晚コーティングした。プレートをPBST（PBS+0.01%ツイーン20）で洗浄し、室温、1%（w/v）BSAを含有するPBSで1時間ブロッキングし、PBSTで再び洗浄した。アッセイ緩衝液〔PBS+1%ウシ血清アルブミン（BSA）〕で希釈した $1\mu\text{g}/\text{mL}$ のマウスGITRLまたはOX40L FPをウェルに $25\mu\text{L}$ 添加し、プレートを室温で2時間インキュベートした。3回洗浄後、アッセイ緩衝液で希釈した $1\mu\text{g}/\text{mL}$ の西洋わさびペルオキシダーゼに結合した抗マウスFc抗体（Sigma）を各ウェルに $25\mu\text{L}$ 添加し、プレートを1時間インキュベートした。インキュベーション後、プレートをPBSTで3回洗浄し、テトラメチルベンジジン基質溶液（KPL）を各ウェルに $25\mu\text{L}$ 添加し、プレートを5分間インキュベートした。インキュベーション後、0.5 Mの硫酸停止溶液をすべてのウェルに $15\mu\text{L}$ 添加した。450nmでの光学密度を、EnVisionプレートリーダー（PerkinElmer）を用いて測定した。

【0285】

統計学

すべての統計学的分析は、Prism Statistical Softwareバージョン6を用いて実施した。

【0286】

結果

mGITRL-FPのインビトロ効力

インビボでの免疫細胞活性化および抗腫瘍活性に対するGITR受容体シグナル伝達の効果を検討するため、四量体mGITRL-FPを作製した。mGITRL-FPは、エフェクター細胞上のGITR受容体およびFcγRへの貪欲な結合を誘導するように設計した。その分子は、N末端からC末端にかけて、免疫グロブリンG（IgG）の結晶性断片（Fc）領域、イソロイシンジッパードメイン（ILZ）およびマウスGITRリガンドの細胞外（GITR結合）ドメイン（ECD）からなるものであった（図30A）。変性した精製mGITRL-FPをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によって可視化した時（図30B）、それは高度な均一性および予想される分子量48kDaよりもやや高い分子量を示し、それはおそらくはFcおよびmGITRLドメインのグリコシル化に起因する。mGITRL-FP mIgG2aおよび抗GITR抗体（DTA-1）の双方は、GITR依存性NFκBレポーター遺伝子細胞アッセイにおいてNFκBシグナル伝達を誘導することができた一方、マウスOX40L FP mIgG1（mOX40L-FP mIgG1）、およびアイソタイプ対照では任意の検出可能なシグナルが欠如していた（図30C）。重要なことには、四量体mGITRL-FPは、このアッセイにおけるGITRアゴニズムに関連して0.05nMのEC₅₀を示し、それは2.31nMのEC₅₀を示したDTA-1よりも約50倍強力であった。

【0287】

mIgG2a Fcで改変されたmGITRL-FPの抗腫瘍活性

以前の試験では、FcγRを活性化することがDTA-1抗体の抗腫瘍活性にとって必要であり、かつこの抗体の抗腫瘍活性が、それがmIgG2a Fcを有するとき、rIgG2b FcまたはN297A突然変異体Fc（FcγRへの結合が欠如する）と比べて増強されることが示されている。mGITRL-FPの抗腫瘍活性に対するFcアイソタイプの影響を判定するため、CT26腫瘍保有マウスを、mIgG2aまたはmIgG1 Fcアイソタイプを有するmGITRL-FPで治療した。5もしくは10mg/kgのいずれかのアイソタイプでのマウスの治療により、腫瘍体積の減少によって明らかに、生理食塩水で治療した対照と比べて著明な抗腫瘍活性が得られた（図31A）。しかし、抗腫瘍活性全体は、mGITRL-FP mIgG2aによる治療後、mGITRL-FP mIgG1の場合（7/20が全退縮、図31A）に対して増強した（11/20が全退縮）。

【0288】

Fc変異体の活性におけるこの差異がT細胞活性化とその後のGITRアゴニズム下流

での事象を媒介するその能力における差異に起因したか否かを判定するため、脾臓T細胞集団の増殖を、 $CD4^{+}FOX P3^{-}$ （エフェクターT細胞）、 $CD8^{+}$ （エフェクターT細胞）および $CD4^{+}FOX P3^{+}$ （T-r e g）細胞でのK i 6 7発現のフローサイトメトリー分析を用いて評価した。m G I T R L - F Pの両方のアイソタイプは、3つすべての脾臓T細胞サブセットの増殖において、生理食塩水対照と比べるとときに同等の有意な増加を引き起こした（図3 1 B）。脾臓T-r e g細胞集団は、治療後にK i 6 7の最高の発現を呈し（m G I T R L - F P m I g G 2 a治療後に $53.95\% \pm 0.75$ 、m G I T R L - F P m I g G 1治療後に $58.43\% \pm 1.26$ ）、それに $CD4^{+}FOX P3^{-}$ （m G I T R L - F P m I g G 1で $9.52\% \pm 0.58$ 、m G I T R L - F P m I g G 1で $10.89\% \pm 0.56$ ）および $CD8^{+}$ T細胞（m G I T R L - F P m I g G 2 aで $7.60\% \pm 0.27$ 、m G I T R L - F P m I g G 1で 7.79 ± 0.43 ）が続いた。このデータは、脾臓T細胞活性化単独がm G I T R L - F Pのm I g G 1およびm I g G 2 a F cアイソタイプの間で抗腫瘍免疫において認められた差異を説明することができないことを示唆した。

【0289】

次に、T細胞集団内での腫瘍内変化が、m G I T R L - F Pのm I g G 2 a変異体対m I g G 1変異体で認められる抗腫瘍活性の増強を説明し得るか否かについて検討した。m G I T R L - F P m I g G 2 aによるマウスの治療が、 $p < 0.0001$ の有意値で、腫瘍内T-r e gの頻度における生理食塩水治療動物での $13.31\% \pm 1.06$ から $3.60\% \pm 0.79$ への有意な減少（図3 1 Cおよび図3 2）と、それに続く対照治療動物と比べての $CD8:T-r e g$ （図3 1 D）比および $CD4:T-r e g$ （図3 2 B）比における増加を誘導した。それに対し、腫瘍内T-r e gにおける減少は、m G I T R L - F Pのm I g G 1 F c変異体において明白でなかった（ $12.95\% \pm 1.34$ ）。また、m G I T R L - F P m I g G 2 aでの治療後、腫瘍内 $CD4^{+}FOX P3^{-}$ T細胞の割合における対照動物（ $13.01\% \pm 1.12$ ）と比べての有意な減少（ $8.64\% \pm 1.21$ ）についての証拠があったが、これはT-r e gについて認められた場合の程度には至らなかった。m G I T R L - F P m I g G 2 aによるT-r e gの優先的枯渇は、腫瘍内T-r e gに対するG I T Rの高発現（図3 1 E）およびC T 2 6腫瘍の腫瘍微小環境下での活性化F c γ Rの高発現に起因し得る可能性が高く、また抗体依存性細胞傷害（A D C C）または抗体依存性細胞食作用（A D C P）によるクリアランスを示唆する。まとめると、これらのデータは、m G I T R L - F P治療後の最適な抗腫瘍活性において、腫瘍内T-r e gにおける減少と同時に生じる末梢 $CD4^{+}$ および $CD8^{+}$ T細胞の増殖が要求されることを示唆する。

【0290】

m G I T R L - F P m I g G 2 aに媒介される抗腫瘍活性

m G I T R L - F P m I g G 2 aがm G I T R L - F P m I g G 1と比べて抗腫瘍活性の増強を誘導したことから、血液中のm G I T R L - F P m I g G 2 aの曝露レベルおよび曝露時間がC T 2 6腫瘍保有マウスにおける抗腫瘍応答にいかに関連するかを次に特徴づけた。第1に、1単回用量の生理食塩水対照または 0.2 、 1 、もしくは 5 m g / k gのm G I T R L - F P m I g G 2 aでマウスを治療することによる、腫瘍成長に対する用量レベル増加の効果を測定した。 0.2 m g / k gのm G I T R L - F P m I g G 2 aによる治療の結果、わずか $1/10$ の完全退縮がもたらされたが、用量が 0.2 m g / k gから 1 m g / k gもしくは 5 m g / k gに上昇した（各々、 $6/10$ および $9/10$ の退縮をもたらした）時、抗腫瘍免疫における用量依存的増加における証拠が存在した（図3 3 A）。さらに、抗腫瘍活性はまた、 0.2 m g / k g投与の頻度を毎日1回（Q 1 D）または毎週1回（Q 1 W）に増加させることにより改善することができた（図3 3 B）。これらの結果は、Q 1 Dスケジュールを用いるときに限って到達される、完全腫瘍退縮および最小残留腫瘍体積によって規定されるような最適な抗腫瘍活性を誘導するのに必要とされるm G I T R L - F P m I g G 2 aの要求される曝露レベルが存在することを示した。この閾値を判定するため、m G I T R L - F P m I g G 2 aの濃度を、

2つの代替的な用量レベルのmG I T R L－F Pで治療したマウスの血液中で測定し、次にこれらの結果をP Kモデルに組み込んだ。このモデルに基づき、Q 1 Dスケジュールによって持続される、また最適な抗腫瘍活性を維持するために必要と考えられるmG I T R L－F P m I g G 2 aの血液濃度は1 μ g / m L以上であると計算された（図 3 3 C）。

【 0 2 9 1 】

次に、mG I T R L－F P m I g G 2 a治療後、抗腫瘍活性のP Dバイオマーカーを検討した。K i 6 7の発現を用いて増殖を評価した一方、I C O S、P D－1およびO X 4 0（すべては活性化後にT細胞上に発現されることが知られている）についても分析した。mG I T R L－F P m I g G 2 aの曝露を、用量レベルを増加させるかまたは投与頻度を増加させるかのいずれかによって増加させることにより、K i 6 7、I C O S、P D－1およびO X 4 0を発現する末梢C D 4⁺T細胞の頻度がさらに大幅に漸増した（図 3 4 A～D）。

【 0 2 9 2 】

mG I T R L－F PおよびmO X 4 0 L－F P抗腫瘍活性の比較分析

O X 4 0 標的化に対して、G I T Rの関連機構を理解するため、mG I T R L－F Pの抗腫瘍活性を、類似のタンパク質構造を含み、G I T R受容体と交差反応せず、O X 4 0レポーター細胞アッセイにおいてN F κ B発現を誘導することができるmO X 4 0 L－F Pと直接的に比較した（図 3 5 AおよびB）。

【 0 2 9 3 】

C T 2 6 腫瘍保有マウスを、m I g G 1またはm I g G 2 a F cアイソタイプのいずれかの5 m g / k gのmG I T R L－F PまたはmO X 4 0 L－F Pで週2回治療し、腫瘍成長を測定した。mG I T R L－F Pで認められるように、mO X 4 0 L－F Pで認められる抗腫瘍活性は、m I g G 2 aアイソタイプでの治療後（9 / 1 0の退縮）、m I g G 1での治療後（1 / 1 0の退縮；図 3 6 A）よりも高まった。しかし、mG I T R L－F P m I g G 1での治療（6 / 1 0の退縮）は、mO X 4 0 L－F P m I g G 1での治療後に認められる場合と比べて増強された抗腫瘍活性を誘導し、m I g G 2 aアイソタイプ（1 0 / 1 0）では、mO X 4 0 L－F P m I g G 2 aと比べてわずかに良好であった（図 3 6 A）。腫瘍内T－r e gにおける類似の枯渇が、mG I T R L－F PおよびmO X 4 0 L－F P（m I g G 2 a F cアイソタイプを有する）の双方での治療後に認められたが、これはいずれの分子のm I g G 1 F cアイソタイプにおいて明白でなかった（図 5 B）。このデータは、m I g G 2 aアイソタイプが、C T 2 6 腫瘍保有マウスにおいてG I T RおよびO X 4 0アゴニストの双方の抗腫瘍活性を誘導することにおいて、m I g G 1よりも優れることを示す。

【 0 2 9 4 】

mG I T R L－F P m I g G 2 aおよびmO X 4 0 L－F P m I g G 1の組み合わせ試験

mG I T R L－F P m I g G 2 aでの治療後におけるC D 4⁺T細胞上のO X 4 0受容体の上方制御を仮定し（図 3 4 D）、T細胞活性化を最大化する可能性についてさらに検討した。mG I T R L－F P m I g G 2 aおよびmO X 4 0 L－F P m I g G 1を用いて、G I T RおよびO X 4 0経路を標的化する薬剤を組み合わせることの潜在的な利点を評価した。

【 0 2 9 5 】

mG I T R L－F P m I g G 2 aおよびmO X 4 0 L－F P m I g G 1の組み合わせによる隔週治療の結果、脾臓C D 4⁺（2 9 . 1 6 % $\pm$ 1 . 5 1）およびC D 8⁺（2 4 . 4 % $\pm$ 0 . 8 7）T細胞におけるK i 6 7の発現が、生理食塩水対照（7 . 8 2 % $\pm$ 0 . 3 0および9 . 2 2 % $\pm$ 0 . 3 1）またはいずれかの単独療法での治療（mG I T R L－F Pで治療されたC D 4およびC D 8 T細胞において1 4 . 2 % $\pm$ 0 . 4 5および1 5 . 5 2 % $\pm$ 0 . 6 6、またmO X 4 0 L－F Pで治療されたC D 4およびC D 8 T細胞において1 7 . 0 2 % $\pm$ 0 . 4 9および1 6 . 2 2 % $\pm$ 1 . 2 2；図 3 7 A）と比べて有

意に増加したが、これは両分子を組み合わせた相加的效果を示す。脾臓CD4⁺およびCD8⁺T細胞集団のさらなる分析によると、組み合わせ治療により、CD44⁺およびCD62^{lo}と定義されるCD4⁺およびCD8⁺エフェクターメモリー区画の双方の頻度（図37B）、ならびにCD44⁺およびCD62⁺と定義されるCD4⁺セントラルメモリー集団の頻度（図37C）が、単独療法治療の場合を超える程度に増加した。IFN γ の産生における冗長性およびCD8⁺T細胞における細胞傷害性を示しており、ひいてはTh1分化における役割を有する転写因子T-bet（図37D）およびEomes（図37E）のCD4⁺およびCD8⁺T細胞上での発現もまた、組み合わせ治療中、いずれの単独療法の場合よりも大幅に増加した。GITRおよびOX40経路間の機構的差異は、mOX40L-FP mIgG1で治療される動物におけるCD4⁺T細胞上でのT-betおよびEomesの発現が、mGITRL-FP mIgG2aで治療した動物と比べると有意に高いことであった。

10

【0296】

これらの知見に基づき、腫瘍成長に対してmGITRL-FP mIgG2aをmOX40L-FP mIgG1と組み合わせる効果を判定した。次に、mOX40L-FP mIgG1によるマウスの治療が、単回の亜最適用量のmGITRL-FP mIgG2aと組み合わせることにより、さらに改善され得るか否かを検討した。mOX40L-FP mIgG1単独療法治療により5/10の退縮が誘導され、mGITRL-FP mIgG2a単独療法治療により3/10の退縮が誘導されたが、mGITRL-FP mIgG2aとmOX40L-FP mIgG1の双方を組み合わせた結果、8/10の退縮を示す抗腫瘍活性の増強がもたらされた（図38A）。

20

【0297】

高用量のmGITRL-FP mIgG2aでの単独療法治療により、CT26モデルにおけるマウスの大部分で完全腫瘍退縮が誘導されたと仮定し、mOX40L-FP mIgG1およびmGITRL-FP mIgG2aの高用量での組み合わせを、B16F10-Luc2モデルでの利益増加について検討した。いずれの単独療法での投与によっても、このモデルにおける腫瘍退縮が全く誘導されなかったが、両分子を組み合わせた結果、単独療法治療と比べて、改善された抗腫瘍活性；腫瘍成長における遅延および生存の増加がもたらされた（図38Bおよび図39）。

30

【0298】

実施例7：mGITRL-FPと組み合わせたT細胞プライミング剤

材料および方法

細胞株および試薬

TC-1腫瘍株は、ATCC（カタログ番号CRL6475, Manassas, VA）から入手し、DMEM+10%FBS+1%ペニシリン/ストレプトマイシンで維持した。CT26腫瘍株は、ATCC（Manassas, VA）から入手し、10%ウシ胎仔血清を添加したRPMI1640培地で維持した。DTA-1およびアイソタイプ抗体は、Bio X Cell（West Lebanon, NH）から購入した。

【0299】

E7 SLPおよびワクチン接種

40

45-merのHPV16-E7配列SSEEEDEIDGPAGQAE PDRAHY NIVTFCKCDSTLR LCVQSTHVD（配列番号57）からなるE7合成ロングペプチド（SLP）を、New England Peptide（Gardner, MA）から合成した。E7 SLPを10 μ gもしくは3.3 μ gで投与し、全体積50 μ Lで、Addavax（Life Technologies, Carlsbad, CA）およびPBS中、20 μ gのCpG ODN2395（TriLink, San Diego, CA）を用いて製剤化した。ワクチン接種を、尾の付け根の背側表面皮下に施した。

【0300】

腫瘍モデル

50

TC-1実験では、Jackson Labs (Bar Harbor, ME) から入手した雌C57BL/6マウス (カタログ番号000664) のマウスを用いた。CT26実験では、Envigo (Frederick, MD) から入手した雌Balb/Cマウスを用いた。マウスは、腫瘍移植の時点で6~8週齢の間であった。すべての動物実験は、動物実験委員会 (Institutional Animal Care and Use Committee) によって確立されたガイドラインに従って実行した。TC-1腫瘍移植においては、 2×10^4 個の生存可能TC-1細胞を左後足蹠に皮下移植した。CT26腫瘍移植においては、 5×10^5 個の細胞を右側腹部に移植した。腫瘍成長は、ノギス1を用いる直接的測定により評価した。双方向的な測定結果を2~4日ごとに収集し、腫瘍体積は体積 = (長さ・幅²) / 2を用いて計算した。腫瘍を6~14日間発生させておき、次に腫瘍保有マウスを腫瘍体積により治療群に無作為化した。マウスは、IACUCプロトコルに従い、原発性腫瘍がTC-1/足蹠において 1000mm^3 、CT26/側腹部において 2000mm^3 を超えたとき、安楽死させた。PD試験においては、マウスを安楽死させ、腫瘍および脾臓を収集し、70uMのフィルター (Corning (商標)、Corning, NY) を通して粉碎し、単一の細胞懸濁液に処理した。

10

【0301】

機能的T細胞応答およびフローサイトメトリー

抗原特異的刺激のため、 $1 \sim 2 \times 10^6$ 個の生細胞に、1ウェルあたり1ugのAH1ペプチド配列SPSYVYHQF (配列番号56) (Anaspec, Fremont, CA) または10ugのE7ペプチド配列RAHYNI VTF (配列番号58) (Anaspec) およびタンパク質輸送阻害剤 (Ebioscience, Santa Clara, CA) を蒔いた。5時間後、細胞を染色した。すべての染色における染色の順序は、live/dead blue (Life Tech)、細胞外タンパク質、FOXP3 Fix/Permキット (Ebioscience)、それに続いて細胞内サイトカインであった。抗体は、CD45 (クローン30-F11)、CD4 (クローンRM4-5) CD8 (クローン53-6.7)、GITR (クローンDTA-1)、IFN γ (クローンXMG1.2)、TNF α (クローンMP6-XT22)、FOXP3 (クローンFJK-16s)、KI-67 (クローンSolA15) を含んだ。RAHYNI VTFを負荷したH2-D_b E7デキストラマーをImmudex (Fairfax, VA) から購入し、我々は染色についてのそのプロトコルに従った。すべての試料は、LSR-I IまたはFortessa (BD San Jose, CA) のいずれかで走らせた。すべてのデータは、FlowJo (Treestar, Ashland, OR) を用いて分析した。

20

30

【0302】

mGITRL-FPは抗原特異的な細胞を必要とする

CT26は、高い腫瘍内CD45レベルおよび基礎CTLレベルを有する高免疫原性腫瘍モデルである。CT26は、低レベルのAH1特異的T細胞を自己刺激することが示されている。mGITRL-FPが抗原特異的応答の新規な生成をもたらし得るか否かを評価するため、E6/E7形質転換TC-1腫瘍モデルを用いた。このモデルは、公知のCD8T細胞エピトープを有し、そのE7特異的免疫応答は、E7を有する腫瘍からの保護をもたらし得る。TC-1腫瘍細胞をC57/b6マウスの足蹠に移植した。マウスは、14日目に測定し、腫瘍サイズに基づいて無作為化し、1mg/kg、5mg/kg、および20mg/kgのmGITRL-FP IgG2aで治療した (図43A)。腫瘍成長の遅延または阻害が任意の試験用量で認められた (図43B)。24日目、非治療および1mg/kg治療マウスのサブセットを屠殺し、脾臓および腫瘍を収集した。T細胞集団およびE7抗原特異的応答を評価した。CD4およびCD8T細胞上に認められたGITRLレベルは、腫瘍内で有意に高めであった (図43C)。E7予備刺激を伴わない場合、mGITRL-FPは、TC-1腫瘍成長を遅延させるかまたは抗腫瘍免疫応答を生成することができなかった。

40

【0303】

50

mG I T R L - F P は予備刺激された抗原特異的 C D 8 T 細胞を拡大する

D N A ワクチンの接種は、T C - 1 腫瘍モデルの腫瘍成長の阻止および阻害をもたらす E 7 特異的応答の生成において有効であることが示されている。この試験では、mG I T R L - F P が抗腫瘍応答を駆動するのに予備刺激された抗原特異的 T 細胞を必要とし得ることが仮定された。この応答を生成するため、ナイーブ C 5 7 / b 6 マウスの尾の付け根に、C p G (a d d a v a x) を有する E 7 合成ロングペプチド (S L P) を 1 0 u g でワクチン接種した。この期間中、マウスを 3 用量の mG I T R L - F P I g G 2 a で治療した。7 日後、脾細胞を採取し、T 細胞の E 7 デキストラマーとの抗原特異性について評価した (図 4 4 A) 。 C D 4 および C D 8 の百分率における差は認められなかったが、mG I T R L - F P で治療した時、抗原特異的細胞における大幅な増加が認められた (図 4 4 B ~ D) 。加えて、ワクチン接種マウス単独に対する G I T R レベルを評価し、抗原特異的 D e x + 細胞は、D e x - C D 8 T 細胞よりも高い G I T R M F I を有した (図 4 4 E ~ F) 。 G I T R レベルが腫瘍微小環境下で最高であるように思われたことから、この差が腫瘍を有するマウスにおいてさらに高めであることが仮定された。C 5 7 / b 6 マウスに、T C - 1 腫瘍を移植し、E 7 S L P / C p G (A d d a v a x) をワクチン接種した (図 4 4 G) 。抗原特異的 E 7 細胞の予備刺激が、双方の脾臓および腫瘍におけるデキストラマーによる測定として認められた (図 4 4 H ~ I) 。デキストラマーで陽性染色した細胞もまた、脾臓および腫瘍の双方における G I T R について高めであった (図 4 4 J ~ K) 。 E 7 S L P は、腫瘍の存在の有無にかかわらず、E 7 特異的応答を高度に予備刺激することができ、予備刺激した抗原特異的細胞は、他の C D 8 T 細胞よりも高レベルの G I T R を発現した。

【 0 3 0 4 】

mG I T R L - F P は、E 7 S L P により予備刺激された抗原特異的細胞を拡大し、T C - 1 腫瘍に対する防御免疫応答を生成し得る

mG I T R L - F P が T C - 1 腫瘍細胞に対する E 7 特異的応答を拡大できたか否かを評価するため、1 4 日目、T C - 1 腫瘍細胞を足蹠に移植し、マウスを腫瘍体積により無作為化した。尾の付け根に 4 用量での mG I T R L - F P I g G 2 a とともに C p G (A d d a v a x) を加えた単回用量の E 7 S L P の投与がワクチン接種日に開始した (図 4 5 A) 。試験に、T G I (腫瘍成長阻害) 群 (n = 1 0) および P D (薬力学) 群 (n = 5) の 2 つのアームを含めた。対照マウスの腫瘍は迅速に成長し、すべてのマウスが死亡し、中央値生存は 2 7 日であった。E 7 S L P 単独は、T C - 1 腫瘍を有するマウスに生存上の利点を提供し、8 5 日目に 1 0 匹中 1 匹のマウスが生存し、腫瘍を含まず、中央値生存は 4 6 . 5 日であった (図 4 5 B) 。E 7 S L P + mG I T R L - F P は、腫瘍成長を有意に遅延させ、8 5 日目に 3 / 1 0 のマウスが腫瘍を含まず、5 / 1 0 が生存し、中央値生存は 8 0 . 5 日であった (図 4 5 C ~ D) 。ワクチン接種単独は、腫瘍進行に遅延をもたらしたが、mG I T R L - F P を最上部に添加することで進行がさらに遅延した。これは腫瘍特異的 C D 8 の選択拡大が理由で生じると仮定された。2 1 日目、P D マウス群を屠殺し、薬力学分析用に脾臓および腫瘍を採取した。足蹠からの腫瘍を、採取した組織量に応じてプールした (図 4 5 E) 。単独または mG I T R L - F P との組み合わせでのワクチン接種の結果、腫瘍内に C D 4 5 + 細胞が有意に増加した (図 4 5 F) 。抗原特異的機能を評価するため、腫瘍または脾臓の単一の細胞懸濁液を 1 u g / m L の E 7 ペプチドで再刺激した。ワクチン接種は抗原特異的細胞における基礎増加をもたらし、mG I T R L - F P の添加により、これが脾臓および腫瘍の双方においてより高レベルにさらにブーストされた (図 4 5 G) 。mG I T R L - F P は、E 7 S L P ワクチンの存在時、脾臓における T r e g を枯渇させないように思われ、腫瘍における T r e g に限って枯渇させることができた (図 4 5 G) 。

【 0 3 0 5 】

実施例 8 : ヌクレオチドおよびタンパク質配列

本願で開示されるヌクレオチドおよびタンパク質配列の注釈付きバージョンを表 6 - 1 に提示する。

【 0 3 0 6 】

【 表 1 4 】

表 6-1

配列番号.	説明	配列
1	全長 WT GITRL のアミノ 酸配列	MCLSHLENMPLSHSRTQGAQRSSWKLWLFCSIVMLLFLCSFS WLIFIFLQLETAKEPCMAKFGPLPSKWQMASSEPPCVNKVSD WKLEILQNGLYLIYGQVAPNANYNDVAPFEVRLYKNKDMIQT LTNKSQIQNVGGTYELHVGDTIDLIFNSEHQVLKNNTYWGII LANPQFIS
2	全長 GITRL 変 異体のアミノ酸 配列	MCLSHLENMPLSHSRTQGAQRSSWKLWLFCSIX ₁ X ₂ LLFLCSFS WLIFIFLQLX ₃ TAKEPCMAKX ₄ GPLX ₅ X ₆ KWQX ₇ ASSEPX ₈ CX ₉ N KVX ₁₀ DWKLEILQNGLYLIYX ₁₁ QVAPNANYNDVAX ₁₂ FEVX ₁₃ L YKNKDX ₁₄ IQTLTNKSQIQNVGGTYELHVGDTIDLIFX ₁₅ SEHQX 16LKX ₁₇ NTYWGIX ₁₈ X ₁₉ LLANPQFIS X ₁ = Gly または Val, X ₂ = Thr, Met,または Val; X ₃ = Glu または Ala, X ₄ = Ser または Phe, X ₅ =Thr または Pro, X ₆ =Leu または Ser, X ₇ =Thr または Met, X ₈ = Leu または Pro, X ₉ = Met または Val, X ₁₀ = Thr, Phe,または Ser, X ₁₁ = Ser または Gly, X ₁₂ = Arg または Pro, X ₁₃ = Trp または Arg, X ₁₄ = Leu または Met, X ₁₅ = Ser または Asn, X ₁₆ =Phe または Val, X ₁₇ = Asn 以外の任意のアミノ酸, X ₁₈ = Val または Ile, および X ₁₉ =Leu または Ile
3	全長 GITRL N161X 変異体 のアミノ酸配列	MCLSHLENMPLSHSRTQGAQRSSWKLWLFCSIVMLLFLCSFS WLIFIFLQLETAKEPCMAKFGPLPSKWQMASSEPPCVNKVSD WKLEILQNGLYLIYGQVAPNANYNDVAPFEVRLYKNKDMIQT LTNKSQIQNVGGTYELHVGDTIDLIFNSEHQVLKXNTYWGII LANPQFIS X は Asn 以外の任意のアミノ酸である
4	全長 GITRL N161D 変異体 のアミノ酸配列	MCLSHLENMPLSHSRTQGAQRSSWKLWLFCSIVMLLFLCSFS WLIFIFLQLETAKEPCMAKFGPLPSKWQMASSEPPCVNKVSD WKLEILQNGLYLIYGQVAPNANYNDVAPFEVRLYKNKDMIQT LTNKSQIQNVGGTYELHVGDTIDLIFNSEHQVLKDNTYWGII LANPQFIS

10

20

30

【 0 3 0 7 】

【表 1 5】

5	成熟 GITRL IgG1 FP サブユニットをコードする核酸配列(シグナルペプチドをコードする領域を含まない)	CTGGACAAGACCCATACCTGTCCTCCATGCCCTGCCCCCGA ACTGCTGGGAGGCCCTTCTGTGTTCCCTGTTCCCCCAAAGC CCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACC TGC GTGGTGGTGGATGTGTCCACGAGGACCCTGAAGTGA AGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGC CAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTAC CGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCT GAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCC CTGCCTGCCCCCATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGG GCCAGCCCCGGGAACCCCAGGTGTACACACTGCCCCCTAGC CGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTC TCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGG GAGTCCAACGGCCAGCCTGAGAACAACTACAAGACCACCC CCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCTGTACTCCA AGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGT GTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACT ACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCCTGGAAAAGGCGG CGGAGGATCTGGCGGAGGCGGTTCTGGTGGTGGCGGATCT GGGGGCGGAGGTAGCGGAGGTGGTGGCTCTGTGTCTCGGC TGGAAGAGGAAATGCGGAAGCTGCAGGCCACCGTGCAGGA ACTGCAGAAGCGGCTGGACAGACTGGAAGAGACAGTGCAG GCTAAGGGCGGTGGCGGACAGCTCGAGACAGCCAAAGAAC CCTGCATGGCCAAGTTCGGCCCCCTGCCTTCCAAGTGGCAG ATGGCCTCTTCCGAGCCCCCCTGCGTGAACAAAGTGTCCGA CTGGAAGCTGGAAATCCTGCAGAACGGCCTGTACCTGATCT ACGGCCAGGTGGCCCCCAACGCCAACTACAACGATGTGGC CCCCTTCGAAGTGC GGCTGTACAAGAACAAGGACATGATC CAGACCCTGACCAACAAGAGCAAGATCCAGAACGTGGGCG GCACCTACGAGCTGCACGTGGGCGATACCATCGACCTGATC TTCAACTCCGAGCACCAGGTGCTGAAGGACAACACCTACTG GGGCATCATCCTGCTGGCCAACCCCCAGTTCATCTCC
6	成熟 GITRL IgG1 FP サブユニットのアミノ酸配列(リンカー1およびリンカー2は下線部)	LDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSEFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK <u>GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG</u> <u>S</u> VSRL ~~EE~~ EMRKLQATVQELQKRLDRLEETVQAK <u>GGGG</u> QLET AKEPCMAKFGPLPSKWQMASSEPPCVNKVSDWKLEILQNGL YLIYGQVAPNANYNDVAPFEVRLYKNKDMIQTLTNKSKIQNV GGTYELHVGDITDLIFNSEHQVLK <u>D</u> NTYWGIILLANPQFIS

10

20

30

【表 1 6】

7	前駆体 GITRL IgG1 FP サブユニットをコードする核酸(シグナルペプチドをコードする領域を含む)	ATGGCCATCATCTACCTGATCCTGCTGTTACACGCCGTGCG GGGCCTGGACAAGACCCATACCTGTCCTCCATGCCCTGCCC CCGAAGTCTGGGAGGCCCTTCTGTGTTCCCTGTTCCCCCA AAGCCCAAGGACACCCCTGATGATCTCCCGGACCCCGAAG TGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCACGAGGACCCTGAA GTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACA ACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTACAACCTCCAC CTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATT GGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAA GGCCCTGCCTGCCCCATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCA AGGGCCAGCCCCGGGAACCCAGGTGTACACACTGCCCCC TAGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACC TGTCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGA ATGGGAGTCCAACGGCCAGCCTGAGAACAACACTACAAGACC ACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCTTCTGTAC TCCAAGCTGACAGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCA ACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAAC CACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCCTGGAAGAGG CGGCGGAGGATCTGGCGGAGGCGGTTCTGGTGGTGGCGGA TCTGGGGGCGGAGGTAGCGGAGGTGGTGGCTCTGTGTCTCG GCTGGAAGAGGAAATGCGGAAGCTGCAGGCCACCGTGCAG GAACTGCAGAAGCGGCTGGACAGACTGGAAGAGACAGTGC AGGCTAAGGGCGGTGGCGGACAGCTCGAGACAGCCAAAGA ACCCTGCATGGCCAAGTTCGGCCCCCTGCCTTCCAAGTGGC AGATGGCCTCTTCCGAGCCCCCTGCGTGAACAAAGTGTCC GACTGGAAGCTGGAAATCCTGCAGAACGGCCTGTACCTGA TCTACGGCCAGGTGGCCCCCAACGCCAACTACAACGATGTG GCCCCCTTCGAAGTGCGGCTGTACAAGAACAAGGACATGA TCCAGACCCTGACCAACAAGAGCAAGATCCAGAACGTGGG CGGCACCTACGAGCTGCACGTGGGCGATACCATCGACCTG ATCTTCAACTCCGAGCACCAGGTGCTGAAGGACAACACCTA CTGGGGGCATCATCCTGCTGGCCAACCCCCAGTTCATCTCC
8	前駆体 GITRL IgG1 FP サブユニットのアミノ酸配列(シグナルペプチドをコードする領域を含む; リンカー1 およびリンカー2 は下線部)	MAIIYLILLFTAVRGLDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFLLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGSGGGGSG <u>GGGSGGGSGGGGS</u> VSRL EEEMRKLQATVQELQKRLDRLEE TVQAKGGGGQLETAKEPCMAKFGPLPSKWQMASSEPPCVNK VSDWKLEILQNGLYLIYGQVAPNANYNDVAPFEVRLYKNKD MIQTLTNKSKIQNVGGTYELHVGDTIDLIFNSEHQVLKDNTY WGIILLANPQFIS

【表 17】

9	ヒトコロンin 1a (hCor1a)のアミノ酸配列	MSRQVVRSSKFRHVFGQPAKADQCYEDVRVSQTTWDSGFC AVNPKFVALICEASGGGAFLVLPLGKTGRVDKNAPTVCGHTA PVLDAWCPHNDNVIASGSEDCTVMVWEIPDGGLMLPLREPV VTLEGHTKRVGIVAWHTTAQNVLLSAGCDNVIMVWDVGTG AAMLTGPEVHPDTIYSVDWSRDGGICTSCRDKRVRIIEPRK GTVVAEKDRPHEGTRPVRAVVFVSEGKILTTGFSRMSERQVAL WDTKHLEEPLSLQELDTSSGVLLPFFDPDTNIVYLCGKGDSSIR YFEITSEAPFLHYLSMFSSKESQRGMGYMPKRGLEVNKCEIAR FYKLHERRCEPIAMTVPRKSDLFQEDLYPPTAGPDPALTAEEW LGGRDAGPLLISLKDGYVPPKSREL RVNRGLDTGRRRAAPEAS GTPSSDAVSRLEEEEMRKLQATVQELQKRLDRLEETVQAK
10	hCor1a 三量体 化ドメインコンセン サスの アミノ酸配列	XSRXEEEXRKXQATXQELQKRDRLEETVQAK X= Ala, Leu, Ile,または Val
11	hCor1a wt 三量 体化ドメインの アミノ酸配列	VSRLEEEEMRKLQATVQELQKRLDRLEETVQAK
12	hCor1a 変異体 1 三量体化 ドメインの アミノ酸配列	VSRLEEEIRKLQATVQELQKRLDRLEETVQAK
13	hCor1a 変異体 2 三量体化 ドメインの アミノ酸配列	VSRIEEEIRKLQATVQELQKRLDRLEETVQAK
14	hCor1a 変異体 3 三量体化 ドメインの アミノ酸配列	ISRIEEEIRKLQATVQELQKRLDRLEETVQAK
15	hCor1a 変異体 4 三量体化 ドメインの アミノ酸配列	ISRIEEEIRKIQATVQELQKRLDRLEETVQAK
16	hCor1a 変異体 5 三量体化 ドメインの アミノ酸配列	ISRIEEEIRKIQATVQELQKRIDRLEETVQAK
17	hCor1a 変異体 6 三量体化 ドメインの アミノ酸配列	ISRIEEEIRKINATVQELQKRIDRLEETVQAK

10

20

30

40

【表 1 8】

18	hCor1a 変異体 7 三量体化 ドメインの アミノ酸配列	ISRIEEEIRKINATIQELQKRIDRLEETVQAK
19	Gly(4)Ser モチ ーフ(n=1)の アミノ酸配列	GGGGS
20	リンカー1 の アミノ酸配列	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
21	配列番号 6 の GITRL IgG1 FP 中で用いられ る IgG1 Fc 領域 のアミノ酸配列	LDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGSEFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
22	Ser(Gly ₄ Ser)n モチーフ(n=1)の アミノ酸配列	SGGGGS
23	リンカー領域の アミノ酸配列	GGGGSGGGGSGGGGSAL
24	リンカー領域の アミノ酸配列	GGGGSGGGGSGGGGSA
25	Gly(4)Ser モチ ーフ(n=3)の アミノ酸配列	GGGGSGGGGSGGGGS
26	リンカー領域の アミノ酸配列	GGGGSGGGGSGGGG
27	酵母 GCN4 pII のアミノ酸配列	IKQIEDKIEEILSKIYHIENEIARIKKL
28	マトリリン 1 wt 三量体化ドメイン のアミノ酸配列	CACESLVKFQAKVEGLLQALTRKLEAVSKRLAILENTVV

10

20

30

【 0 3 1 1 】

【表 1 9】

29	マトリリン 1 変異体三量体化 ドメインの アミノ酸配列	CACESLVKFQAKVEGLIQALTRKLEAVSKRIAILENTVV
30	DMPK wt 三量 体化ドメインの アミノ酸配列	EAEAEVTLRELQEALIEEVLTQRSLREMEAIRTDNQNFASQL REAEARNRDLEAHVRQLQERMELLQAE
31	DMPK 変異体 三量体化ドメイン のアミノ酸配列	IAEIEVTIRELQEALIEEVLTQRSLREIEAIRTDIQNIASQLREIE ARIRDLEAHVRQLQERMELLQAE
32	ランゲリン wt 三 量体化ドメインの アミノ酸配列	ASALNTKIRALQGSLENMSKLLKRQNDILQVVS
33	ランゲリン変異体 三量体化ドメイン のアミノ酸配列	ISALNTKIRAIQGSLENMSKLIKQNDIIQVVS
34	成熟 WT GITRL 細胞外 ドメインの アミノ酸配列	QLETAKEPCMAKFGPLPSKWQMASSEPPCVNKVSDWKLEILQ NGLYLIYGQVAPNANYNDVAPFEVRLYKNKDMIQTLTNKSKI QNVGGTYELHVGDTIDLIFNSEHQVLKNNTYWGIILLANPQFIS
35	成熟 GITRL 変 異体細胞外ドメ インのアミノ酸 配列	QLX ₁ TAKEPCMAKX ₂ GPLX ₃ X ₄ KWQX ₅ ASSEPX ₆ CX ₇ NKVX ₈ DW KLEILQNGLYLIYX ₉ QVAPNANYNDVAX ₁₀ FEVX ₁₁ LYKNKDX ₁₂ I QTLTNKSKIQNVGGTYELHVGDTIDLIFX ₁₃ SEHQX ₁₄ LKX ₁₅ NTY WGX ₁₆ X ₁₇ LLANPQFIS X ₁ = Glu または Ala, X ₂ = Ser または Phe, X ₃ =Thr または Pro , X ₄ =Leu ま たは Ser , X ₅ =Thr または Met, X ₆ = Leu または Pro, X ₇ = Met または Val, X ₈ = Thr, Phe,または Ser , X ₉ = Ser または Gly, X ₁₀ = Arg または Pro, X ₁₁ = Trp または Arg, X ₁₂ = Leu または Met, X ₁₃ = Ser または Asn, X ₁₄ =Phe または Val, X ₁₅ = Asn 以外の任意のアミノ酸 , X ₁₆ = Val または Ile , および X ₁₇ =Leu または Ile
36	成熟 GITRL N161X 変異体 細胞外ドメインの アミノ酸配列	QLETAKEPCMAKFGPLPSKWQMASSEPPCVNKVSDWKLEILQ NGLYLIYGQVAPNANYNDVAPFEVRLYKNKDMIQTLTNKSKI QNVGGTYELHVGDTIDLIFNSEHQVLKXNTYWGIILLANPQFIS X は Asn 以外の任意のアミノ酸である

10

20

30

【表 2 0】

37	成熟 GITRL N161D 変異体 細胞外ドメインの アミノ酸配列	QLETAKEPCMAKFGPLPSKWQMASSEPPCVNKVSDWKLEILQ NGLYLIYGQVAPNANYNDVAPFEVRLYKNKDMIQTLTNKSKI QNVGGTYELHVGDITDLIFNSEHQVLKDNTYWGIILLANPQFIS
38	GITRL IgG4P FP 中で用いられ る IgG1 Fc 領域 のアミノ酸配 (S228P 突然変 異は下線部)	ESKYGPPCP <u>P</u> CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSEFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLGLGK
39	成熟 GITRL IgG4P FP サブ ユニットをコード する核酸 (シグナ ルペプチドをコー ドする領域を含ま ない)	GAGTCTAAGTACGGCCCTCCTTGTCCTCCTTGCCCTGCCCCCT GAGTTTCTGGGCGGACCTTCCGTGTTCTCTGTTCCCCCAAA GCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTG ACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCAGGAAGATCCCGAGGT GCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAAC GCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTTCAACTCCACCT ACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGG CTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGG GCCTGCCCTCCAGCATCGAAAAGACCATCTCCAAGGCCAA GGGCCAGCCCCGGGAACCCAGGTGTACACACTGCCTCCA AGCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCT GTCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAA TGGGAGTCCAACGGCCAGCCTGAGAACAACACTACAAGACCA CCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTGTACT CCCGCCTGACCGTGACCAAGTCCAGATGGCAGGAAGGCAA CGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACC ACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGTCTCTGGGCAAGGGC GGCGGAGGATCTGGCGGAGGCGGTTCTGGTGGTGGTGGAT CTGGTGGCGGAGGAAGTGGGGGAGGGGGATCTGTGTCTCG GCTGGAAGAGGAAATGCGGAAGCTGCAGGCCACCGTGCAG GAACTGCAGAAGCGGCTGGACAGACTGGAAGAGACAGTGC AGGCTAAGGGCGGTGGCGGACAGCTCGAGACAGCCAAAGA ACCCTGCATGGCCAAGTTCGGCCCCCTGCCTTCCAAGTGGC AGATGGCCTCTTCCGAGCCCCCTGCGTGAACAAAGTGTCC GACTGGAAGCTGGAAATCCTGCAGAACGGCCTGTACCTGA TCTACGGCCAGGTGGCCCCCAACGCCAACTACAACGATGTG GCCCCCTTCGAAGTGCGGCTGTACAAGAACAAGGACATGA TCCAGACCCTGACCAACAAGAGCAAGATCCAGAACGTGGG CGGCACCTACGAGCTGCACGTGGGCGATACCATCGACCTG ATCTTCAACTCCGAGCACCAGGTGCTGAAGGACAACACCTA CTGGGGCATCATCCTGCTGGCCAACCCCCAGTTCATCTCC

10

20

30

【表 2 1】

40	成熟 GITRL IgG4P FP サブ ユニットのアミノ 酸配列	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLGLKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SVSRLEEEMRKLQATVQELQKRLDRLEETVQAKGGGGQLET AKEPCMAKFGPLPSKWQMASSEPPCVNKVSDWKLEILQNGL YLIYGQVAPNANYNDVAPFEVRLYKNKMDMIQTLTNKSKIQNV GGTYELHVGDITDLIFNSEHQVLKDNTYWGHILLANPQFIS
41	前駆体 GITRL IgG4P FP サブ ユニットをコード する核酸(シグナ ルペプチドをコー ドする領域を含 む)	ATGGCCATCATCTACCTGATCCTGCTGTTACCGCCCGTGCG GGGCGAGTCTAAGTACGGCCCTCCTTGTCCTCCTTGCCCTG CCCCTGAGTTTCTGGGCGGACCTTCCGTGTTCTGTTCCCCC CAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGA AGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCCAGGAAGATCCCC AGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCA CAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAACAGTTCAACTCC ACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGA TTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAAC AAGGGCCTGCCCTCCAGCATCGAAAAGACCATCTCCAAGG CCAAGGGCCAGCCCCGGGAACCCCAGGTGTACACACTGCC TCCAAGCCAGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTG ACCTGTCTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGT GGAATGGGAGTCCAACGGCCAGCCTGAGAACAATAACAAG ACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTG TACTCCCGCCTGACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAGGAAG GCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCAC AACCCTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGTCTCTGGGCAA GGGCGGCGGAGGATCTGGCGGAGGCGGTTCTGGTGGTGGT GGATCTGGTGGCGGAGGAAGTGGGGGAGGGGGATCTGTGT CTCGGCTGGAAGAGGAAATGCGGAAGCTGCAGGCCACCGT GCAGGAAGTGCAGAAGCGGCTGGACAGACTGGAAGAGACA GTGCAGGCTAAGGGCGGTGGCGGACAGCTCGAGACAGCCA AAGAACCCTGCATGGCCAAGTTCGGCCCCCTGCCTTCCAAG TGGCAGATGGCCTCTTCCGAGCCCCCTGCGTGAACAAAGT GTCCGACTGGAAGCTGGAAATCCTGCAGAACGGCCTGTAC CTGATCTACGGCCAGGTGGCCCCCAACGCCAACTACAACG ATGTGGCCCCCTTCGAAGTGCGGCTGTACAAGAACAAGGA CATGATCCAGACCCTGACCAACAAGAGCAAGATCCAGAAC GTGGGCGGCACCTACGAGCTGCACGTGGGCGATACCATCG ACCTGATCTTCAACTCCGAGCACCAGGTGCTGAAGGACAAC ACCTACTGGGGCATCATCCTGCTGGCCAACCCCCAGTTCAT CTCC

10

20

30

40

【表 2 2】

42	前駆体 GITRL IgG4P FP サブユニ ットのアミノ酸配列 (シグナルペプチドを コードする領域を有 する)	MAIIYLILLFTAVRGESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSS IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSR WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKGGGGSGGGGS GGGGSGGGSGGGGSVSRLEEEMRKLQATVQELQKRLDRLE ETVQAKGGGGQLETAKEPCMAKFGPLPSKWQMASSEPPCVN KVSDWKLEILQNGLYLIYGQVAPNANYNDVAPFEVRLYKNK DMIQTLTNKSKIQNVGGTYELHVGDTIDLIFNSEHQVLKDN TYWGIILLANPQFIS
43	hGITRL-FP wt & hGITRL-FP N161D ポリペプチ ドサブユニットの トリプシン断片	EEQY <u>N</u> STYR
44	hGITRL-FP wt & hGITRL-FP N161D ポリペプチ ドサブユニットの トリプシン断片	DMIQTLT <u>N</u> K
45	hGITRL-FP wt ポ リペプチドサブユ ニットのトリプシン断片	IQNVGGTYELHVGDTIDLIFNSEHQVLK <u>N</u> NTYWGIILLANPQFI S
46	hGITRL-FP N161D ポリペプチ ドサブユニットの トリプシン断片	<u>D</u> NTYWGIILLANPQFIS
47	hGITR (ヒト GITR)	MAQHGAAMGAFRALCGLALLCALSLGQRPTGGPGCGPGRLLL GTGTDARCCRVHTTRCCRDYPGEECCSEWDCMCVQPEFHC GDPCCCTTCRHHPCPPGQGVQSQGFSGFQCIDCASGTFSGGHE GHCKPWTDCQFGFLTVPFGNKTHNAVCPVGSPPAEPLGWLT VLLAVAACVLLLTSAQLGLHIWQLRSQCMWPRETQLLLEVP PSTEDARSCQFPEEERGERSAEEKGRLGDLWV
48	mGITRL-FP	MAIIYLILLFTAVRGIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVL MISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVNNVEVHTAQTQTHRE DYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTIS KPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYV EWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVER NSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGKGGGGSGGGSGGGGS GGGGSGGGSIKQIEDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLGGGGIESC MVKFELSSSKWHMTSPKPHCVNTTSDGKLKILQSGTYLIYGQ VIPVDKKYIKDNAPFVVQIYKKNDVLQTLMNDFQILPIGGVYE LHAGDNIYLFNSKDHIQKTNTYWGIIIMPDLPFIS

10

20

30

40

【表 2 3】

49	mOX40L-FP	VPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVTCVVV DISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTPREEQFNSTFRSVSELPI MHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTI PPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKN TQPIMDTDGSYFVYSKLVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNH HTEKSLSHSPGKRLDQDKIEALS NKVQQQLERSIGLKDLAMADL EQKVSELEVSTSSPAKDPPIQRLRGAVTRCEDGQLFISSYKNEY QTMEVQNNNSVVIKCDGLYIIYLKGSFFQEVKIDLHFREDHNPIS IPMLNDGRRIVFTVVASLAFKDKVYLTVNAPDTLCEHLQINDG ELIVVQLTPGYCAPEGSYHSTVNQVPL	10
50	MEDI6383	LATDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGKELLGGGSIKQIEDKIEEILSKIYHIEN EIARIKKLIGERGHGGGNSQVSHRYPRFQSIKVFQTEYKKEK GFILTSQKEDEIMKVQNNNSVIINCDGFYLI SLKGYFSQEVNISLH YQKDEEPLFQLKKVRSVNSLMVASLTYKDKVYLVNVTDTNTSL DDFHVNGGELILIHQNPGEFCVL	20
51	MEDI0562 VH	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCAVYGGSFSSGYWNWIRKHPG KLEYYIGYISYNGITYHNPSLKSRTINRDTSKNQYSLQLNSVTP EDTAVYYCARYKYDYDGGHAMDYWGQGTLTVTSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	30
52	MEDI0562 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLNWYQQKPGKA PKLLIYYTSKLHSGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYY CQQGSALPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	40
53	ヒト OX40	MCVGARRLGR GPCAALLLG LGLSTVTGLH CVGDTYPSND RCHECRPGN GMVSRCSRSQNTVCRPCGPG FYNDVVSSKP CKPCTWCNLR SGSERKQLCTATQDTVCR CR AGTQPLDSYK PGVDCAPCPP GHFSPGDNQA CKPWTNCTLA GKHTLQPASN SSDAICEDRD PPATQPQETQGPPARPITVQ PTEAWPRTSQ GPSTRPVEVP GGRAVAAILG LGLVLGLLGP LAILLALYLL RRDQRLPPDA HKPPGGGSFR TPIQEEQADA HSTLAKI	

【表 2 4】

54	ヒト OX40 リガンド	MERVQPLEENVGNAARPRFERNKLLLVASVIQGLGLLLCFTYI CLHFSALQVSHRYPRIQSIKVQFTEYKKEKGFILTSQKEDEIMK VQNNSVIINCDFYILSLKGYFSQEVNLSLHYQKDEEPLFQLKK VRSVNSLMVASLTYKDKVYLNVTDDNTSLDDFHVNGGELILI HQNPGEFCVL
55	mOX40L-FP Y182A	VPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVTCTVVV DISKDDPEVQFSWFVDDDEVHTAQTPREEQFNSTFRSVSELP MHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTI PPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKN TQPIMDTDGSYFVYSKLVNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNH HTEKSLSHSPGKRLDQDKIEALSNNVQQLERSIGLKDLAMADL EQKVSELEVSTSSPAKDPPIQRLRGAVTRCEDGQLFISSYKNEY QTMEVQNNSVVIKCDGLYIIYLKGSFFQEVKIDLHFREDHNPIS IPMLNDGRRIVFTVVASLAFKDKVYLTVNAPDTLCEHLQINDG ELIVVQLTPGACAPEGSYHSTVNQVPL
56	AH1 ペプチド	SPSYVYHQF
57	E7 合成ロング ペプチド (SLP)	SSEEEDEIDGPAGQAEPDRAHYNIVTFCKCDSTLRLCVQSTH VD
58	E7 ペプチド	RAHYNIVTF

10

20

【0 3 1 7】

本開示の幅および範囲は、上記の例示的な実施形態のいずれかによって制限されるべきではなく、あくまで以下の特許請求の範囲およびその均等物に従って定義されるべきである。

【図 1】

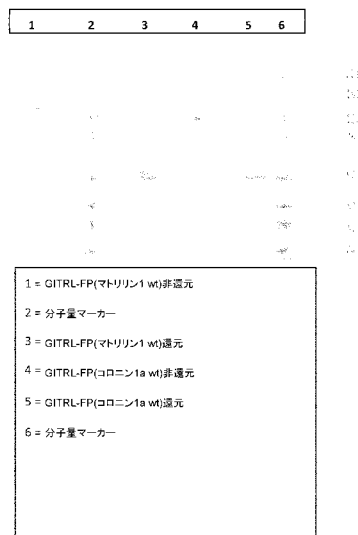


図1

【図 2 A - B】

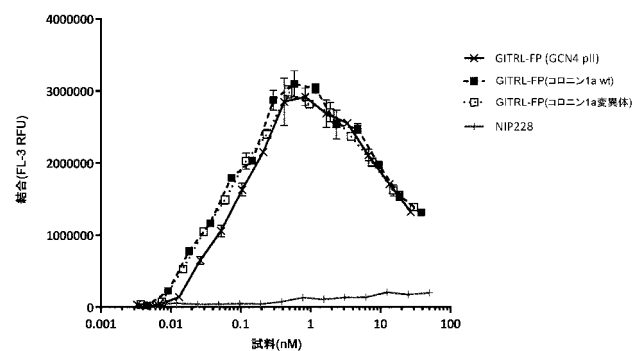


図2A

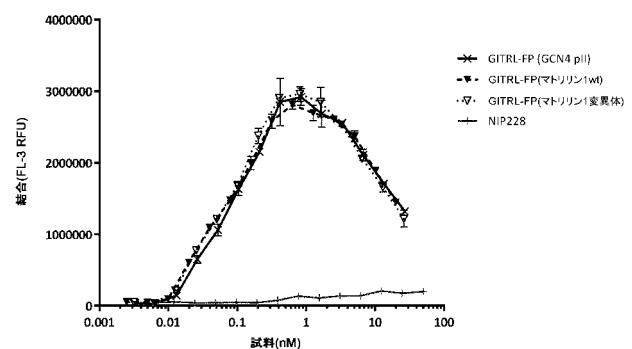


図2B

【図 2 C - D】

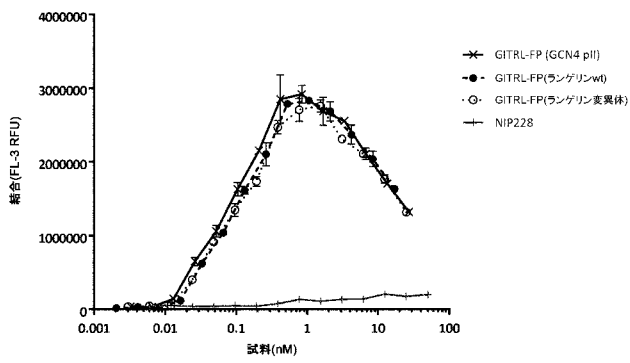


図 2C

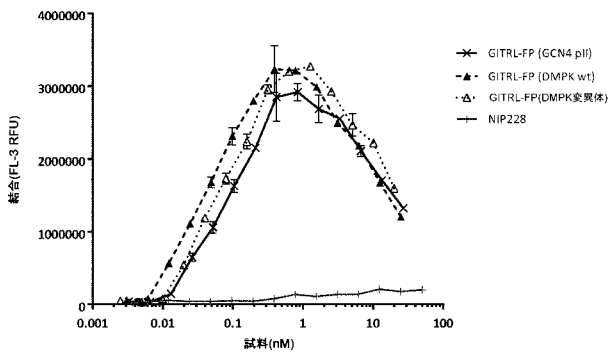


図 2D

【図 3 A - B】

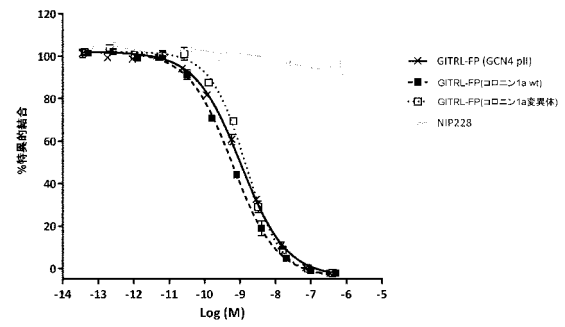


図 3A

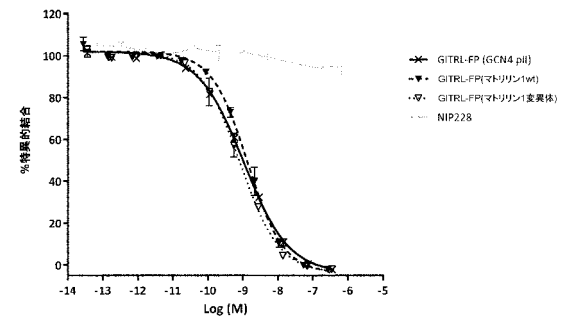


図 3B

【図 3 C - D】

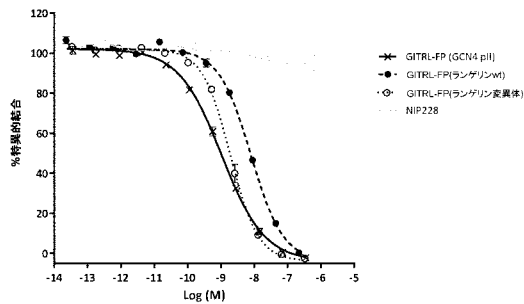


図 3C

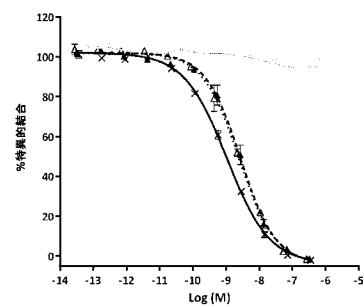


図 3D

【図 4 A - B】

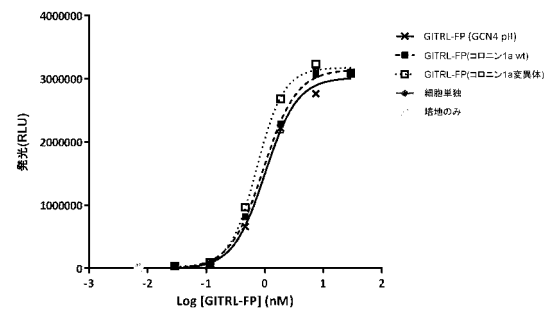


図 4A

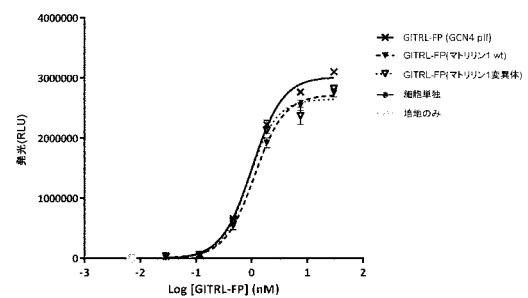


図 4B

【図 4 C - D】

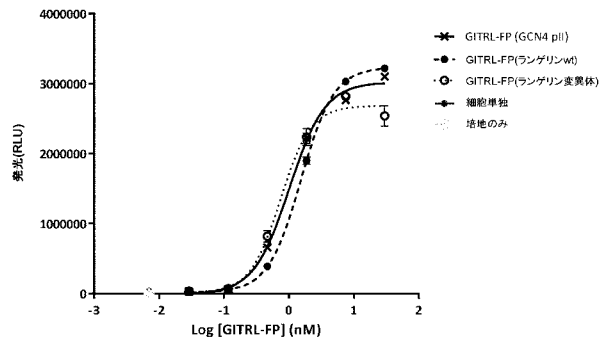


図 4C

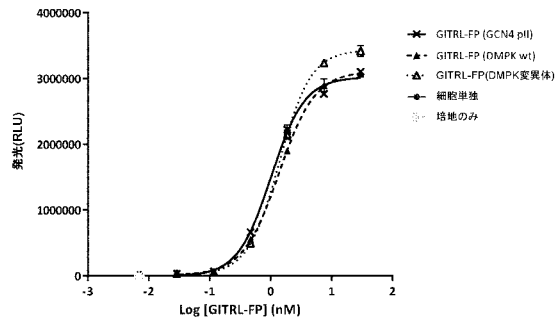


図 4D

【図 5】

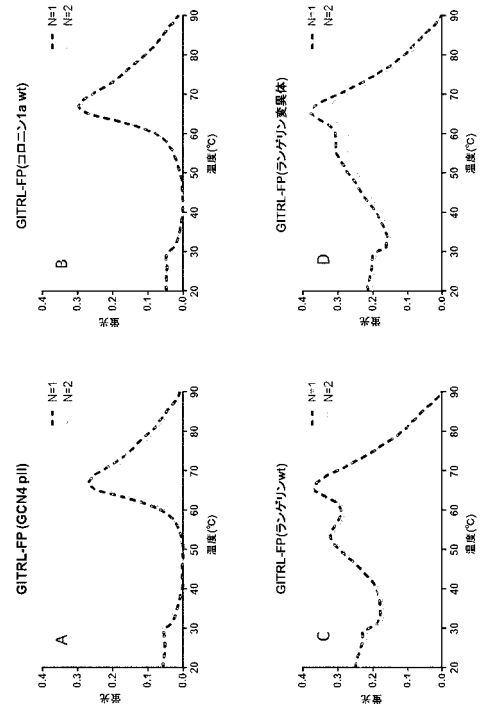


図 5A-D

【図 6】

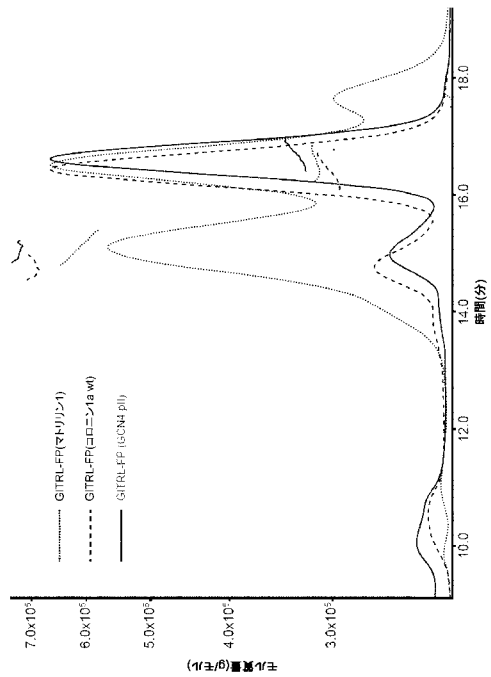


図 6

【図 7】

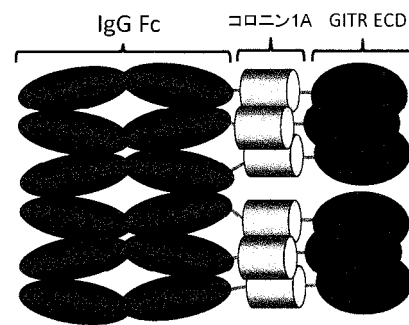


図 7

【図 1 2】

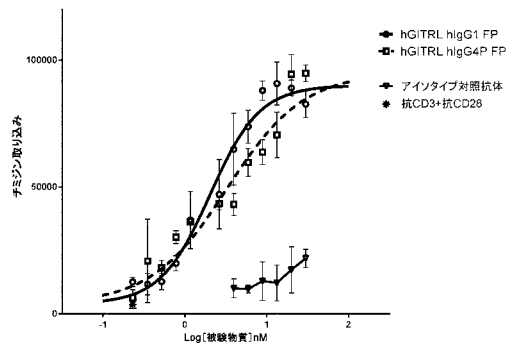


図 12

【図 1 3】

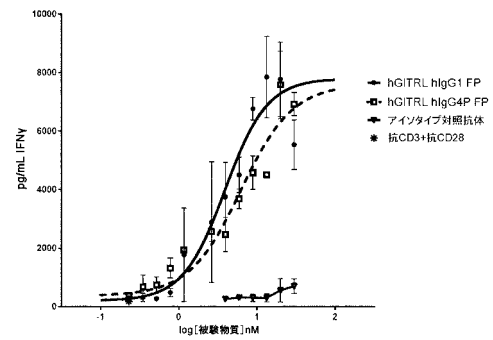


図 13

【図 1 4】

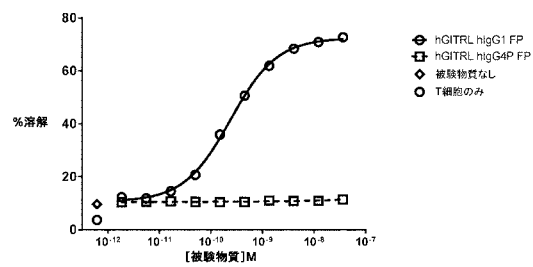


図 14

【図 1 5】

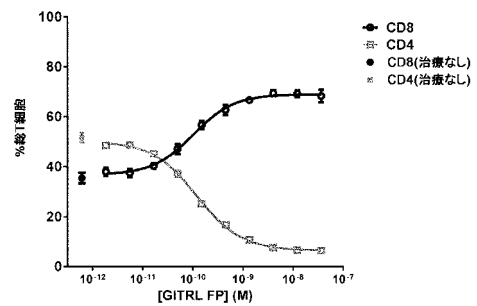


図 15

【図 16】

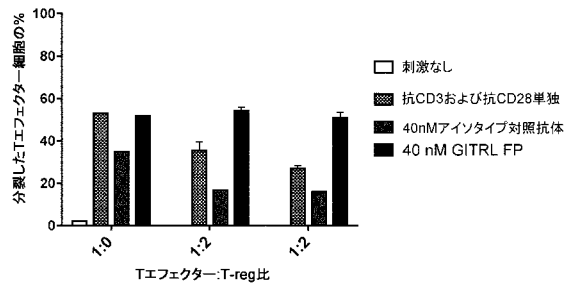


図16

【図 17】

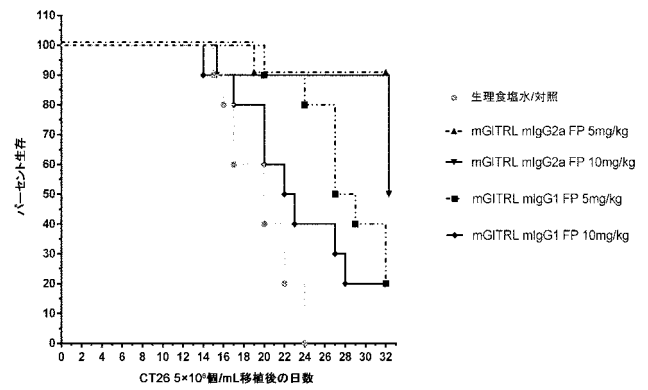


図17

【図 18】

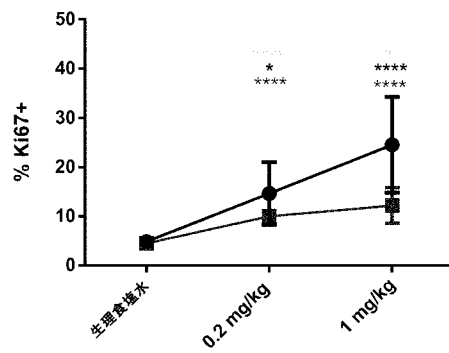


図18

【図 19】

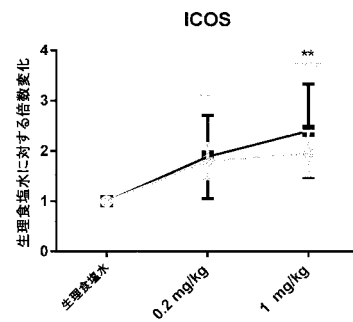


図19

【図 20】

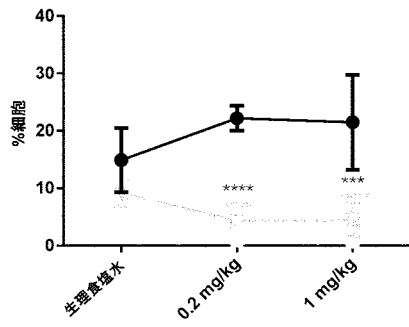


図 20

【図 21】

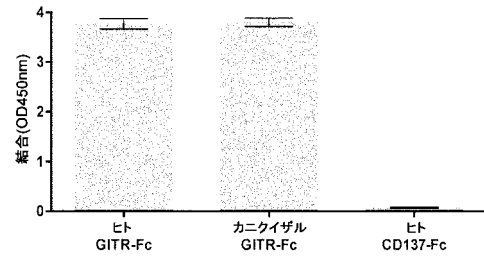


図 21

【図 22】

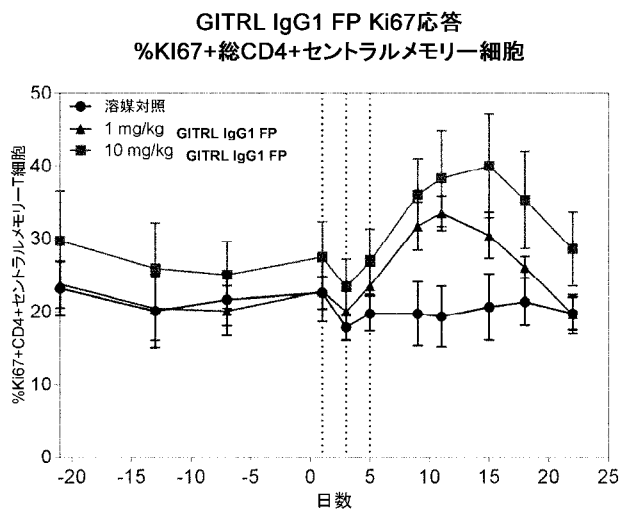


図 22

【図 23】

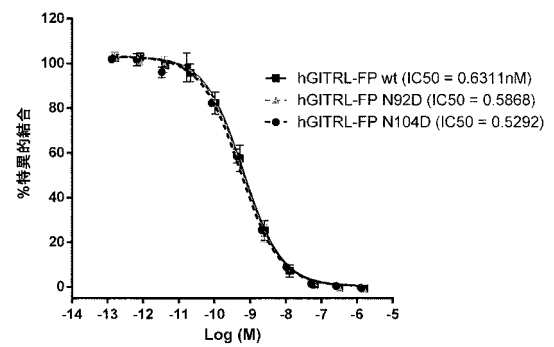


図 23A

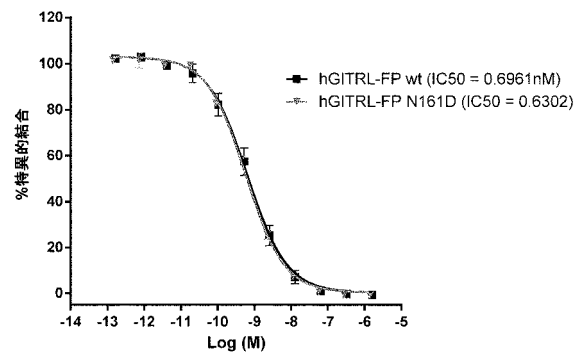


図 23B

【図 2 4】

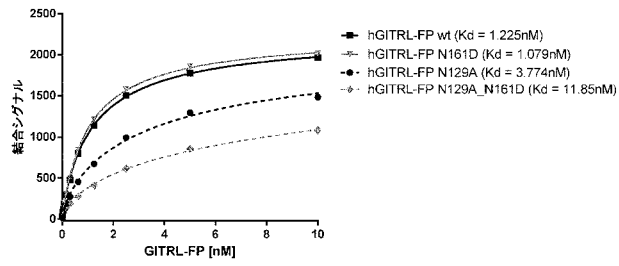


図 24

【図 2 5 A】

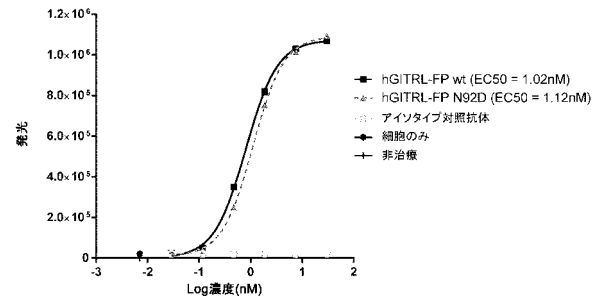


図 25A

【図 2 5 B - C】

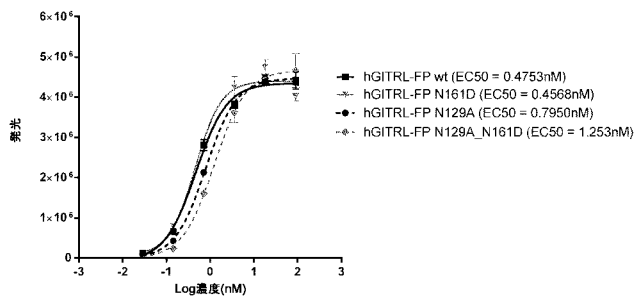


図 25B

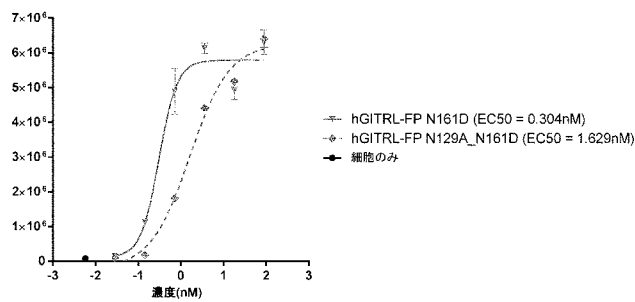


図 25C

【図 2 6 A】

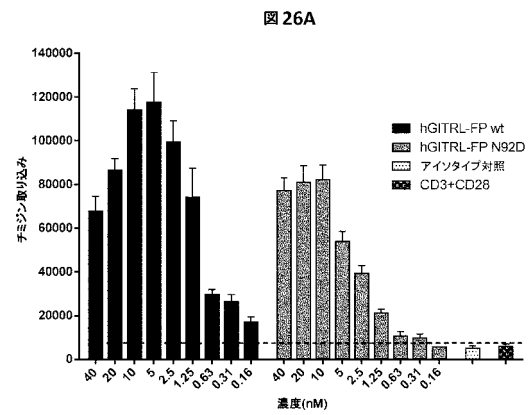


図 26A

【図 26 B】

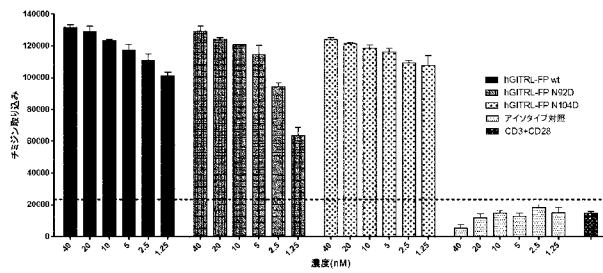


図 26B

【図 26 C】

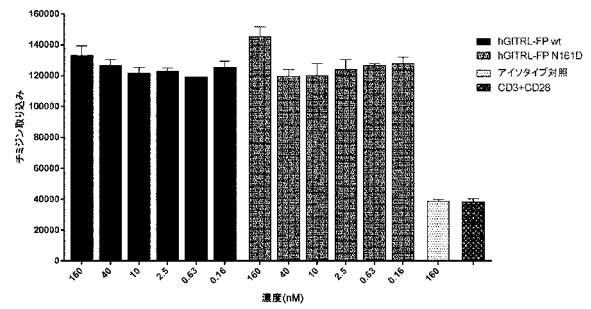


図 26C

【図 27】

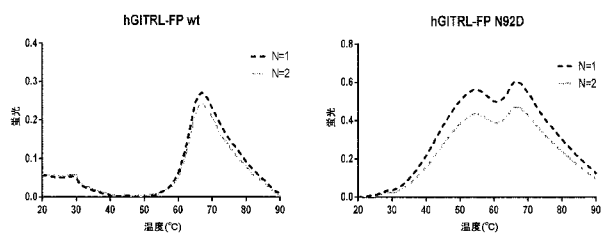


図 27

【図 28】

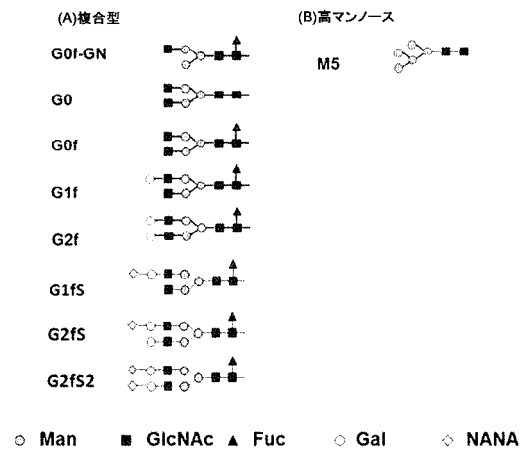


図 28

【図 29 A】

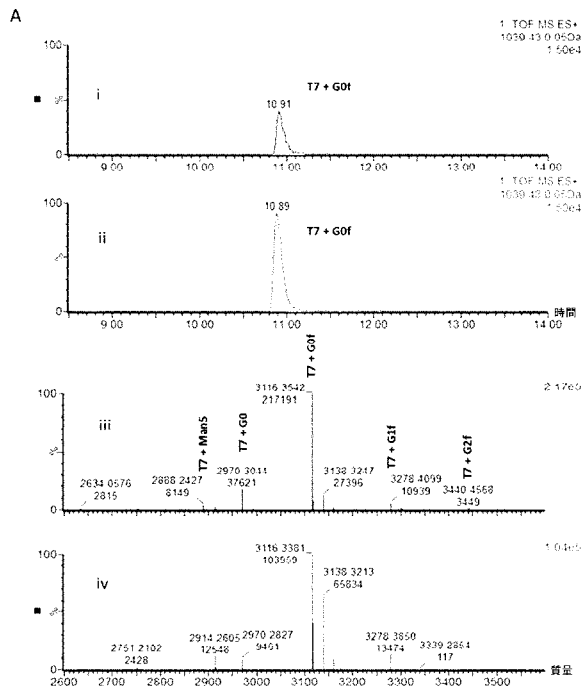


図 29A

【図 29 B】

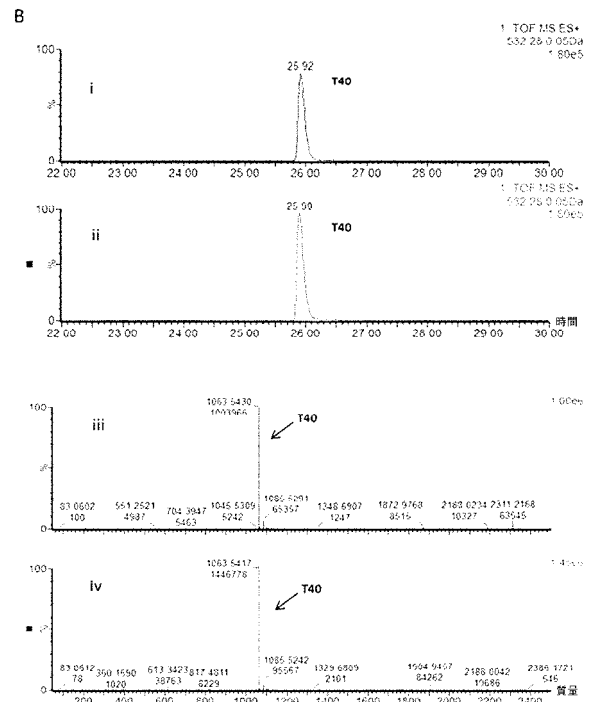


図 29B

【図 29 C】

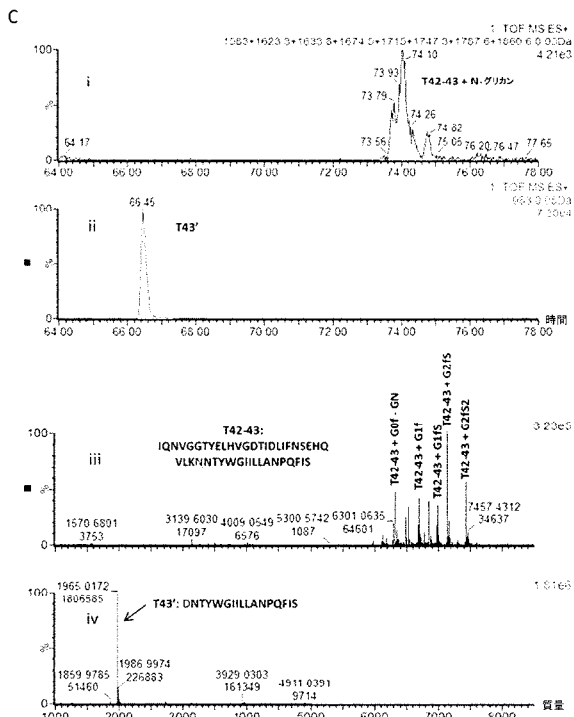


図 29C

【図 30】

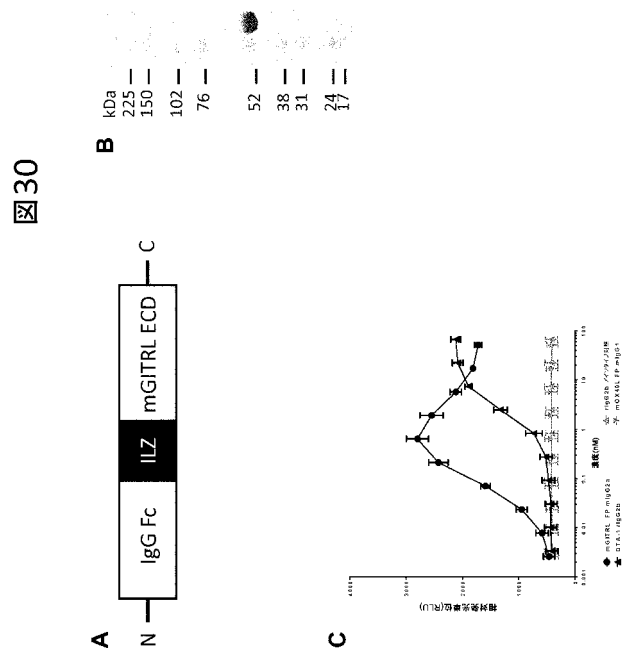
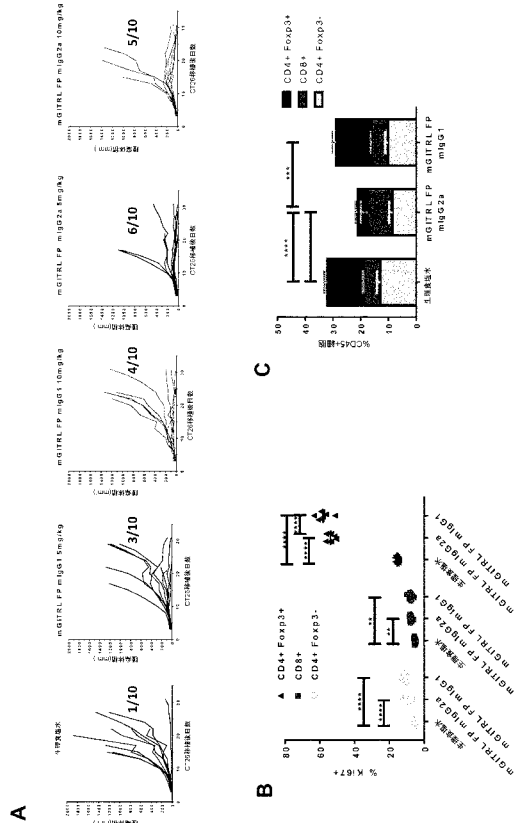


図 30

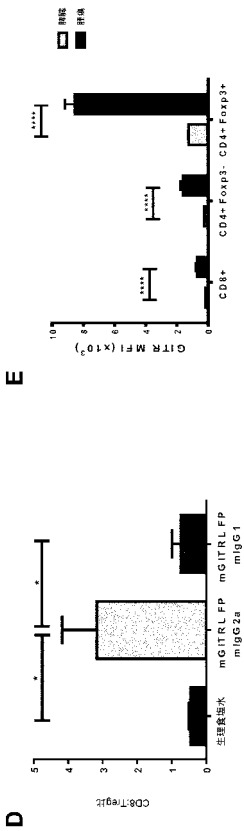
【図 3 1 A - C】

図 31



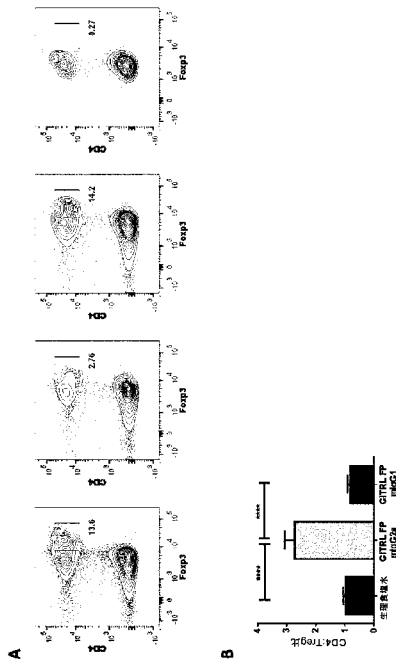
【図 3 1 D - E】

図 31 続き



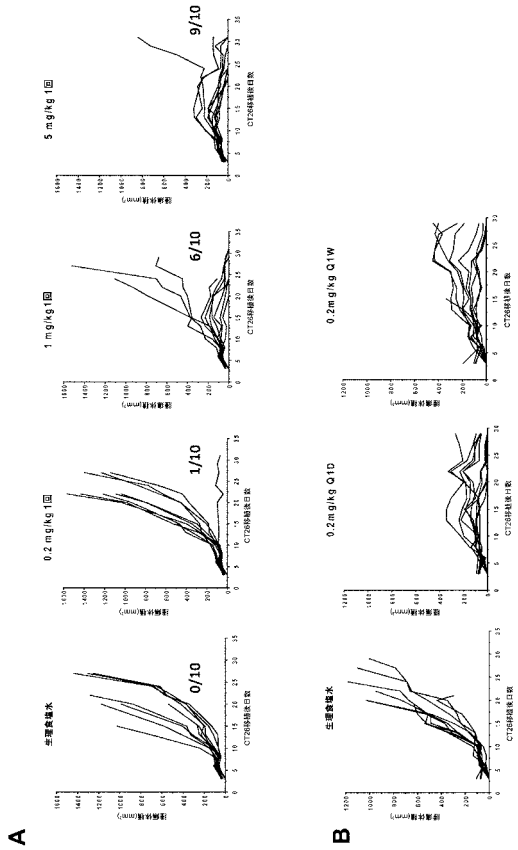
【図 3 2】

図 32

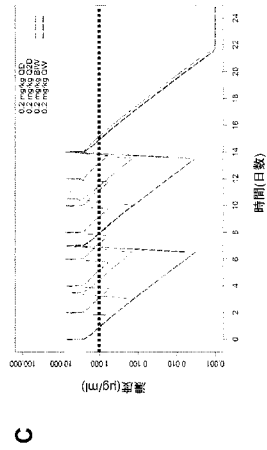
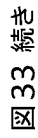


【図 3 3 A - B】

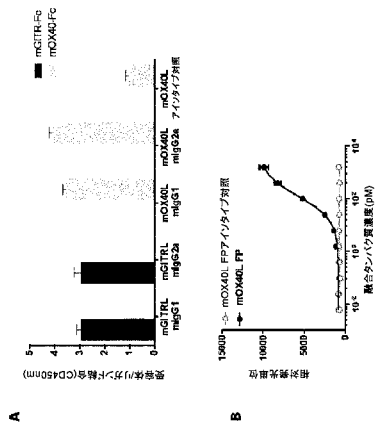
図 33



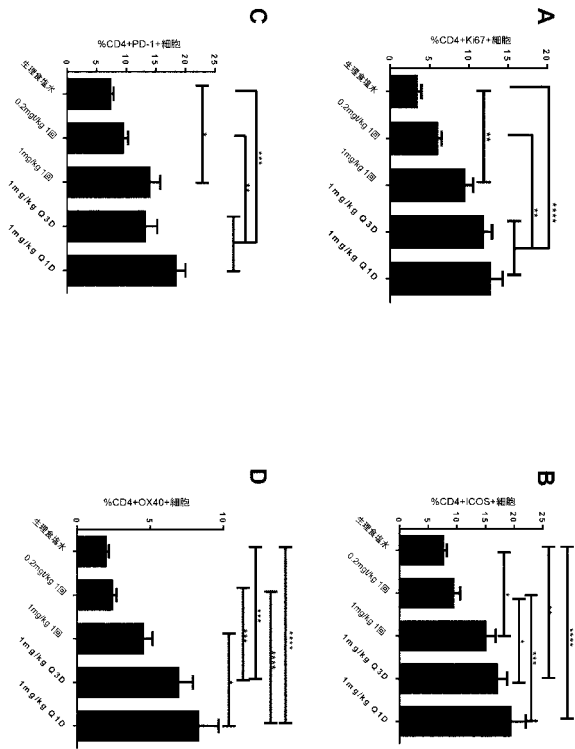
【图 3 3 C】



【图 3 5】

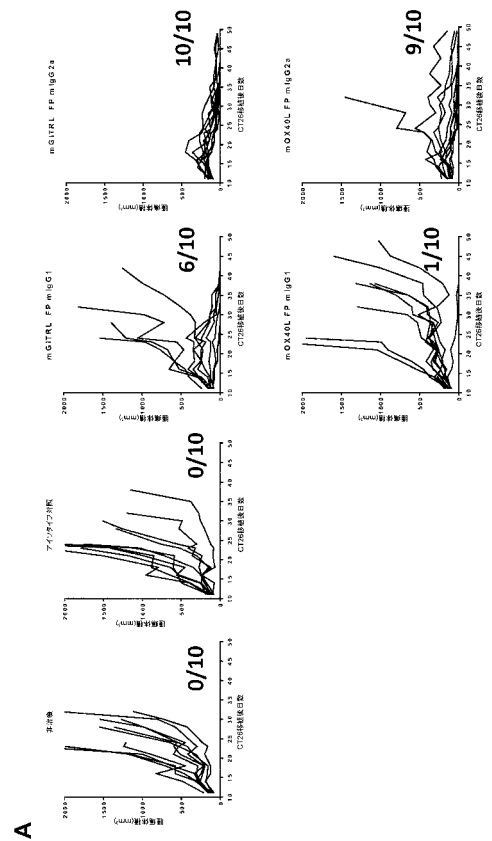


【図 3 4】



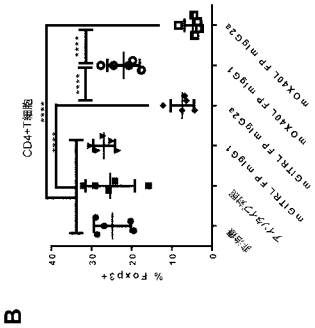
34 ㊦

【図 3 6 A】



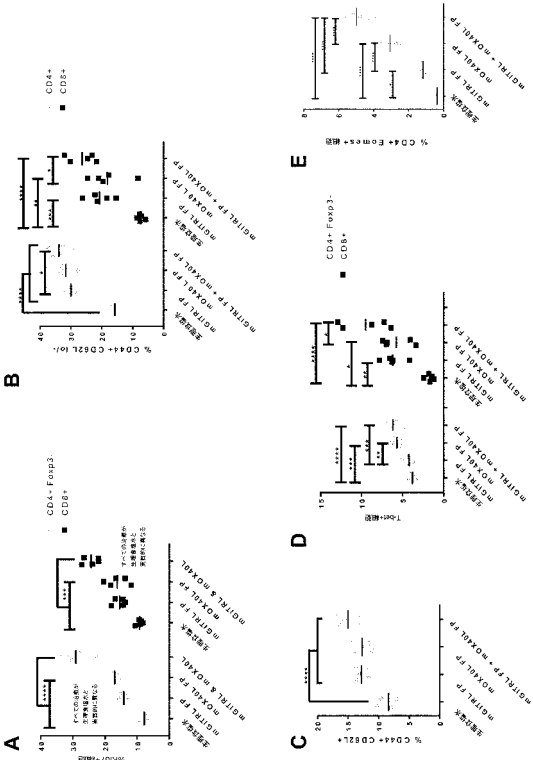
【図 36 B】

図36 続き



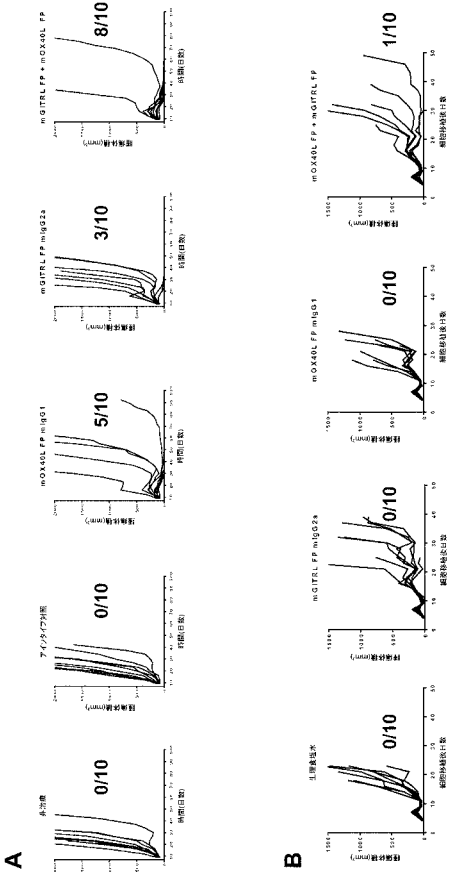
【図 37】

図 37



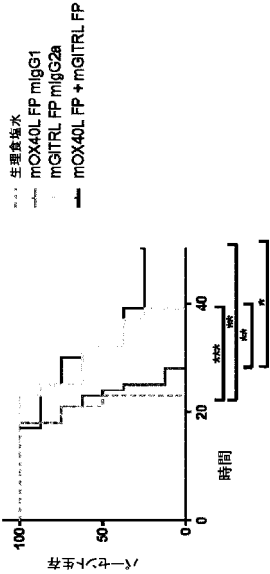
【図 38】

図 38

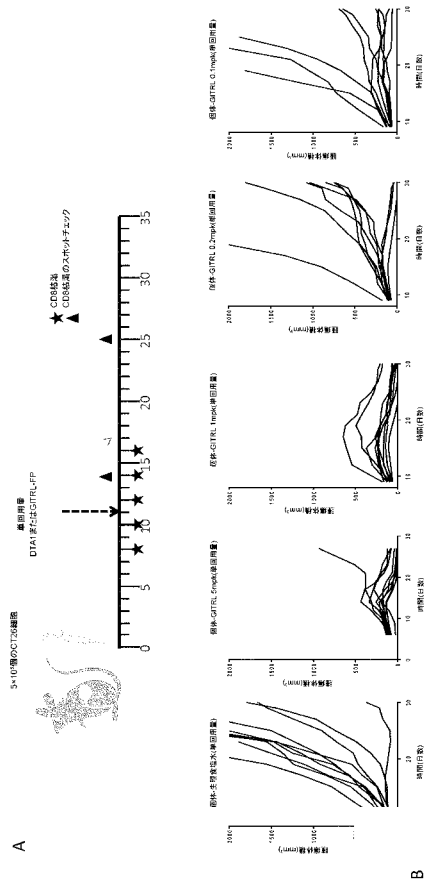


【図 39】

図 39



【图 4 0 A - B】



☒ 40

【図 4 0 C - E】

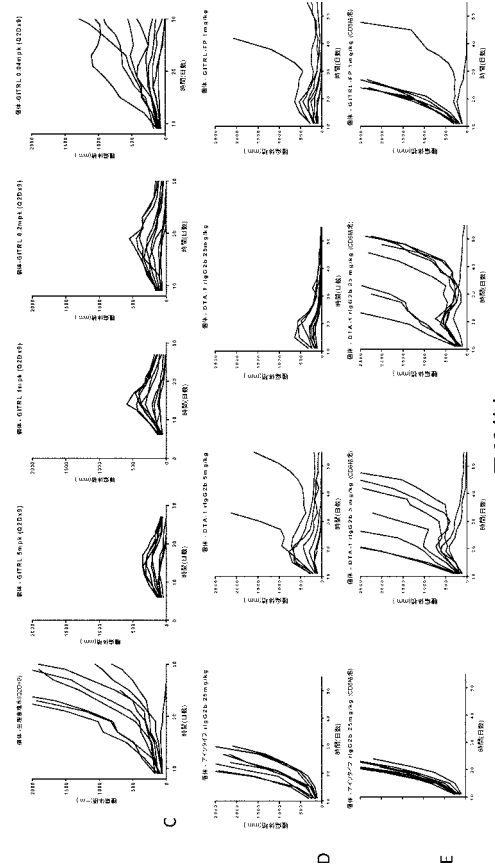


図40 続き

【図 40 F - G】

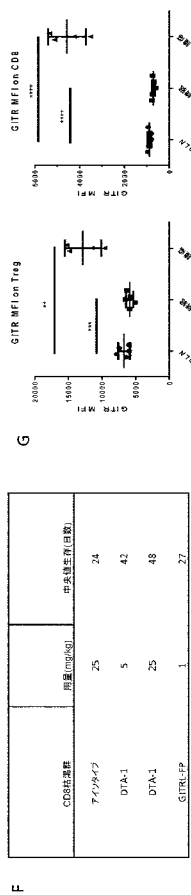


図40 続き

【図 4 1 A - C】

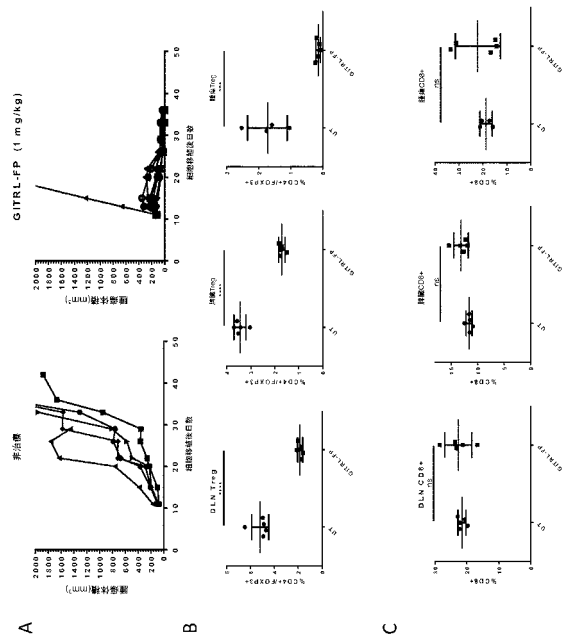


图 41

【図 4 1 D－H】

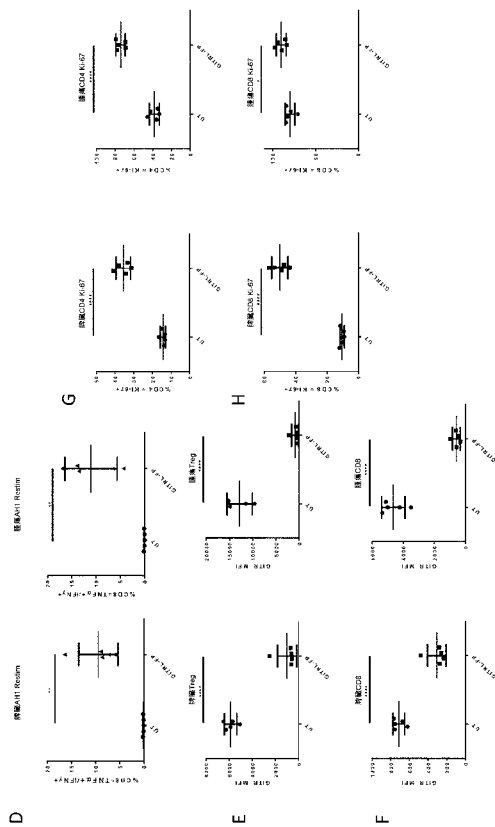


図 41 続き

【図 4 2 A－B】

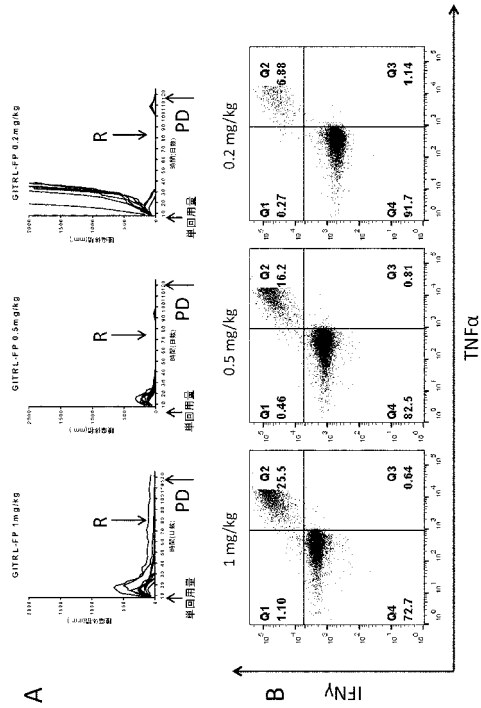
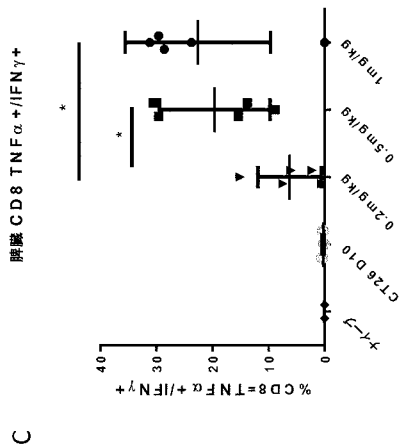


図 42

【図 4 2 C】



【図 4 3】

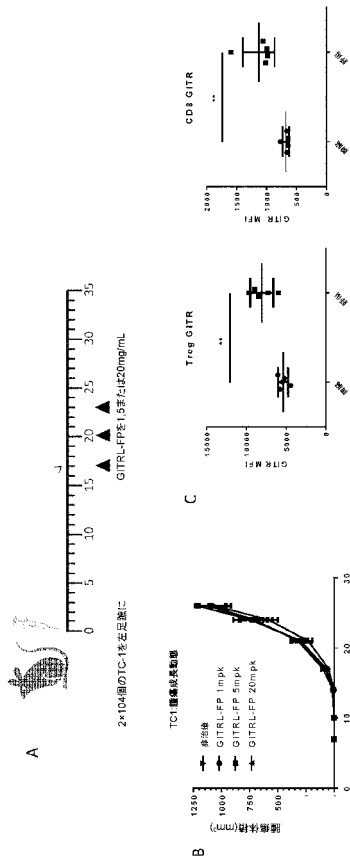
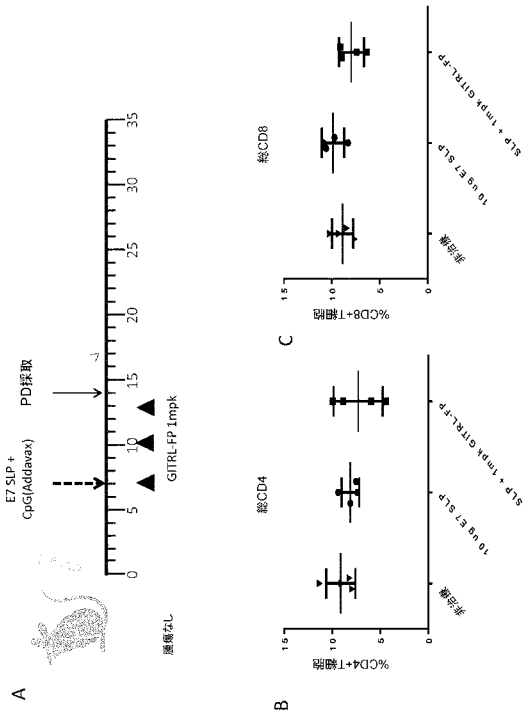


図 43

【図 4 4 A - C】



【図 4 4 D - F】

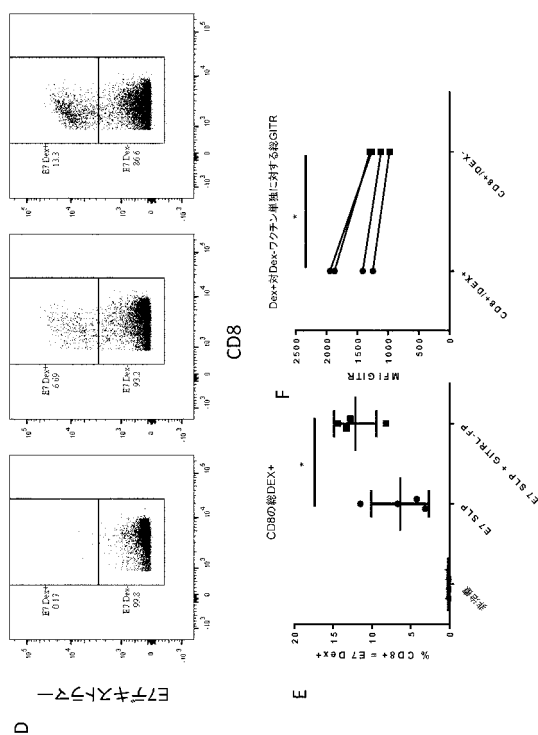


図 44 続き

【図 4 4 G - I】

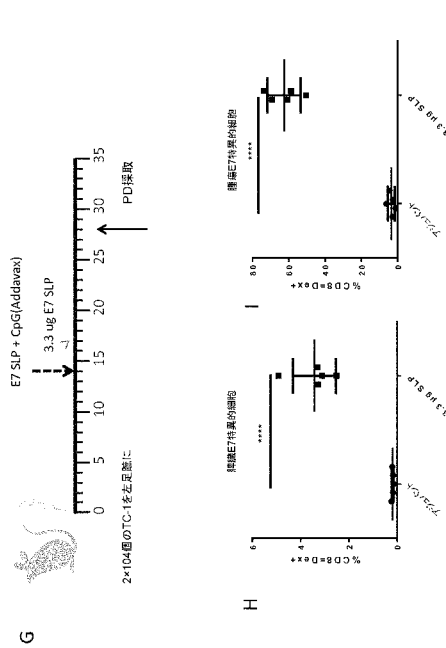


図 44 続き

【図 4 4 J - K】

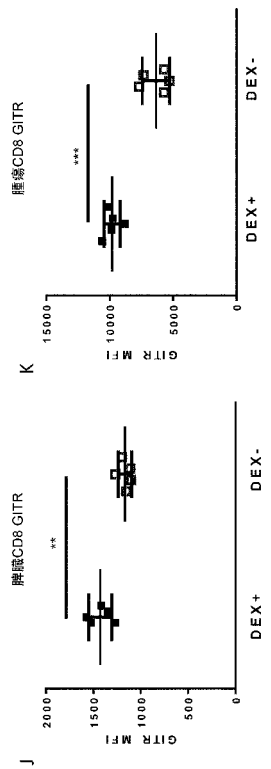
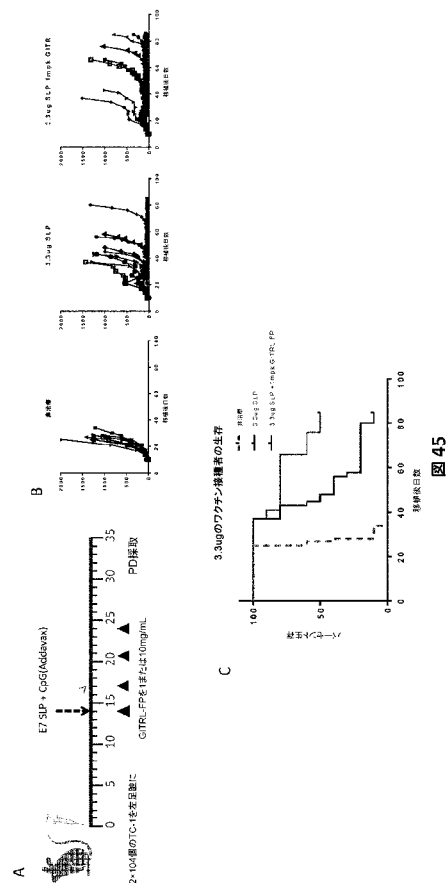


図 44 続き

【図 4 5 A - C】



【図 4 5 D - F】

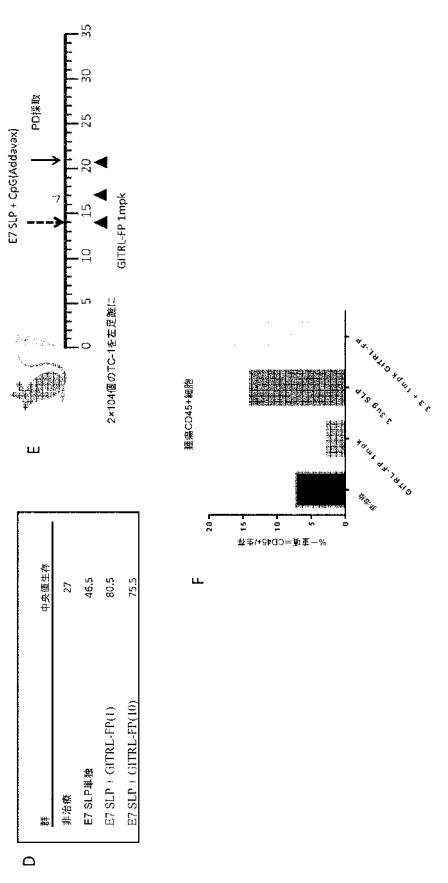


図45 続き

【図 4 5 G】

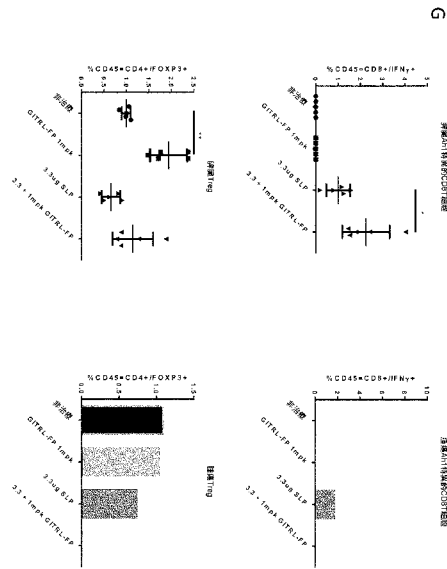


図45 続き

【配列表】

2018522571000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/EP2016/069175
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/705 A61K38/00 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, FSTA, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	A. WYZGOL ET AL: "Trimer Stabilization, Oligomerization, and Antibody-Mediated Cell Surface Immobilization Improve the Activity of Soluble Trimers of CD27L, CD40L, 41BBL, and Glucocorticoid-Induced TNF Receptor Ligand", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 183, no. 3, 1 August 2009 (2009-08-01), pages 1851-1861, XP055015511, ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/jimmunol.0802597	1-85
Y	the whole document page 1859, column 1, paragraph 2 ----- -/--	86-136
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
16 November 2016	30/11/2016	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-9016	Authorized officer Voigt-Ritzer, Heike	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2016/069175

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GIUSEPPE NOCENTINI ET AL: "Pharmacological modulation of GITRL/GITR system: therapeutic perspectives", BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY, vol. 165, no. 7, 9 March 2012 (2012-03-09) , pages 2089-2099, XP055150987, ISSN: 0007-1188, DOI: 10.1111/j.1476-5381.2011.01753.x	86-130, 135,136
A	the whole document	1-85, 131-134
Y	----- WO 2015/116178 A1 (UNIV JEFFERSON [US]; UNIV PENNSYLVANIA [US]) 6 August 2015 (2015-08-06)	131-134
A	page 62 - page 68 abstract	1-130, 135
A	----- WO 2009/009116 A2 (TOLERX INC [US]; ROSENZWEIG MICHAEL [US]; PONATH PAUL [US]; PONTE JOSE) 15 January 2009 (2009-01-15) examples 1-7 page 6, paragraph 2 page 1, paragraph 3 -----	1-135

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2016/069175

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☐ forming part of the international application as filed:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2016/069175

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2015116178	A1	06-08-2015	NONE
WO 2009009116	A2	15-01-2009	
		AU 2008275589	A1 15-01-2009
		CA 2693677	A1 15-01-2009
		CN 101801413	A 11-08-2010
		DK 2175884	T3 26-09-2016
		EP 2175884	A2 21-04-2010
		JP 5932217	B2 08-06-2016
		JP 2010533184	A 21-10-2010
		JP 2014169327	A 18-09-2014
		US 2009136494	A1 28-05-2009
		US 2014220002	A1 07-08-2014
		US 2016324963	A1 10-11-2016
		WO 2009009116	A2 15-01-2009

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z 4 H 0 4 5
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 38/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
A 6 1 K 47/62 (2017.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 47/62	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
C 1 2 N 15/85 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	A 6 1 K 39/395	N
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	Y
C 1 2 Q 1/6897 (2018.01)	C 1 2 N 15/85	Z
C 1 2 Q 1/66 (2006.01)	C 1 2 N 15/113	Z
	C 1 2 Q 1/02	
	C 1 2 Q 1/6897	Z
	C 1 2 Q 1/66	

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

- (72)発明者 ティーグ, ナタリー, ジョー
イギリス国 シービー 2 1 6 ジーエイチ ケンブリッジシャー ケンブリッジ, グランタ パーク, ミルスティン ビルディング, メディミューン リミテッド
- (72)発明者 ヤング, レスリー, リン
イギリス国 シービー 2 1 6 ジーエイチ ケンブリッジシャー ケンブリッジ, グランタ パーク, ミルスティン ビルディング, メディミューン リミテッド
- (72)発明者 ヒガジ, ダニエル, ラムゼイ
イギリス国 シービー 2 1 6 ジーエイチ ケンブリッジシャー ケンブリッジ, グランタ パーク, ミルスティン ビルディング, メディミューン リミテッド
- (72)発明者 バンバー, リサ
イギリス国 シービー 2 1 6 ジーエイチ ケンブリッジシャー ケンブリッジ, グランタ パーク, ミルスティン ビルディング, メディミューン リミテッド
- (72)発明者 スリダラン, スダルサン
イギリス国 シービー 2 1 6 ジーエイチ ケンブリッジシャー ケンブリッジ, グランタ パーク, ミルスティン ビルディング, メディミューン リミテッド
- (72)発明者 リーランド, レベッカ

イギリス国 シービー 2 1 6 ジーエイチ ケンブリッジシャー ケンブリッジ, グランタ パーク, ミルステイン ビルディング, メディミューン リミテッド

(72)発明者 ダラム, ニコラス, メイソン

アメリカ合衆国 2 0 8 7 8 メリーランド州, ゲイサースバーグ, ワシ メディミューン ウェイ, メディミューン, エルエルシー

F ターム(参考) 4B063 QA01 QQ08 QQ22 QQ79 QR02 QR33 QR59 QR80 QS05 QS28

QX02

4B065 AA01X AA57X AA72X AA88X AA90X AA90Y AB01 AB04 AC14 BA02

CA24 CA44

4C076 CC41 EE41 EE59 FF70

4C084 AA02 AA19 BA01 CA53 NA14 ZB09 ZB21 ZB26 ZB27 ZC41

ZC75

4C085 AA15 AA25 BB01 BB11 DD62 EE01

4H045 AA10 BA41 BA72 CA40 DA14 EA20 FA74