(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2016-530278
(P2016-530278A)
(43)公表日　平成28年9月29日(2016.9.29)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C07K 16/28	(2006.01)	C07K	16/28	ZNA	4B064
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A	4B065
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15		4C084
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19		4C085
C12N 1/21	(2006.01)	C12N	1/21		4H045

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 113 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2016-537860 (P2016-537860)
(86)(22)出願日　平成26年8月28日 (2014.8.28)
(85)翻訳文提出日　平成28年4月22日 (2016.4.22)
(86)国際出願番号　PCT/US2014/053246
(87)国際公開番号　WO2015/031667
(87)国際公開日　平成27年3月5日 (2015.3.5)
(31)優先権主張番号　61/872,125
(32)優先日　平成25年8月30日 (2013.8.30)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　62/031,036
(32)優先日　平成26年7月30日 (2014.7.30)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　500049716
アムジエン・インコーポレーテツド
アメリカ合衆国　シーエー　９１３２０，サウザンド　オークス，ワン　アムジエン　センター　ドライブ
(74)代理人　110001173
特許業務法人川口國際特許事務所
(72)発明者　ビアーズ，コートニー
アメリカ合衆国、ワシントン・９８１０７、シアトル、ノースウェスト・シックスティセカンド・ストリート・９３２
(72)発明者　オニール，ジェイソン・シー
アメリカ合衆国、ワシントン・９８０３６、ブライヤー、サーティーエイス・プレイス・ウェスト・２３３０４

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＧＩＴＲ抗原結合タンパク質

(57)【要約】
ＧＩＴＲを活性化する抗原結合タンパク質が提供される。抗原結合タンパク質をコードする核酸、並びにかかる核酸を含むベクター及び細胞も提供される。抗原結合タンパク質は、ＧＩＴＲシグナル伝達を刺激し、それによって対象における免疫反応を誘発するまたは向上させることが有用である治療方法において価値を有する。従って、抗原結合タンパク質は、種々のがん及び感染症の治療を始めとする様々な免疫療法の治療において有用性を有する。

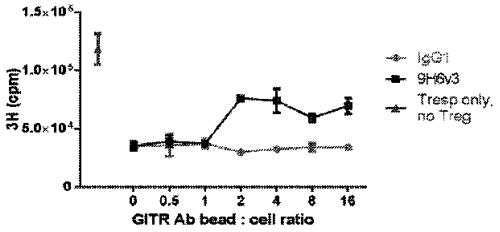


FIG. 2

【特許請求の範囲】
【請求項１】
抗原結合タンパク質であって、
ａ）それぞれ重鎖可変ドメイン（ＶＨ）及び軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）のＣＤＲＨ３及びＣＤＲＬ３であって、ＶＨ及びＶＬが、表１に示される抗原結合タンパク質Ａｂ１からＡｂ５９のいずれか１種より選択される同一の抗原結合タンパク質の一部である、ＣＤＲＨ３及びＣＤＲＬ３、
ｂ）ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２及びＣＤＲＨ３を含む変異ＶＨであって、ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２及びＣＤＲＨ３の１または複数が、Ａｂ１からＡｂ５９の群より選択されるいずれかの単一の抗原結合タンパク質のＶＨの、対応するＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２及びＣＤＲＨ３と比較して配列が異なり、但し、前記変異ＶＨのＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２及びＣＤＲＨ３の、前記ＶＨ配列の対応するＣＤＲと比較した場合の前記配列の違いは、全体の合計で１、２、３、４または５を超えないアミノ酸であるとの条件である、変異ＶＨ、
ｃ）ＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２及びＣＤＲＬ３を含む変異ＶＬであって、ＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２及びＣＤＲＬ３の１または複数が、Ａｂ１からＡｂ５９の群より選択されるいずれかの単一の抗原結合タンパク質のＶＬの、対応するＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２及びＣＤＲＬ３と比較して配列が異なり、但し、前記変異ＶＬのＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２及びＣＤＲＬ３の、前記ＶＬ配列の対応するＣＤＲと比較した場合の前記配列の違いは、全体の合計で１、２、３、４または５を超えないアミノ酸であるとの条件である、変異ＶＬ、
ｄ）ｂ）の変異ＶＨ及びｃ）の変異ＶＬであって、それぞれ、変異ＶＨ及び変異ＶＬが表１に指定される同一の抗原結合タンパク質のＶＨ及びＶＬの変異体であるとの条件の、ｂ）の変異ＶＨ及びｃ）の変異ＶＬ、
ｅ）ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２及びＣＤＲＨ３を含むＶＨであって、
ＣＤＲＨ１が配列X_1ＹＧＭX_2（配列番号４３６）を含み、Ｘ１はＳまたはＮであり、Ｘ２はＨまたはＹであり、
ＣＤＲＨ２が配列ＶＩＷＹX_1ＧＳＮＫＹＹＡＤＳＶX_2Ｇ（配列番号４３７）を含み、Ｘ１はＥ、Ｖ、Ａ、Ｐであり、Ｘ２はＫまたはＲであり、
ＣＤＲＨ３が配列ＧＧX_1Ｌ$X_2$$X_3$$X_4$ＹＹ$X_5$ＧＭＤＶ（配列番号４３８）を含み、Ｘ１はＱ、Ｌ、Ｅ、またはＲであり、Ｘ２はＧ、Ｒ、またはＳであり、Ｘ３はＫ、Ｙ、Ｌ、Ｆ、またはＲであり、Ｘ４はＹまたはＤであり、Ｘ５はＹまたはＳである、
ＶＨ、
ｆ）ＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２及びＣＤＲＬ３を含むＶＬであって、
ＣＤＲＬ１が配列ＲＡＳＱX_1ＩＲＮＤＬＧ（配列番号４３９）を含み、Ｘ１はＧまたはＶであり、
ＣＤＲＬ２が配列$X_1$$X_2$ＳＸ$_3$ＬＱＳ（配列番号４４０）を含み、Ｘ１はＡまたはＤであり、Ｘ２はＡまたはＴであり、Ｘ３はＳまたはＴであり、
ＣＤＲＬ３が配列X_1Ｑ$X_2$$X_3$$X_4$ＹＰ$X_5$Ｔ（配列番号４４１）を含み、Ｘ１はＬまたはＱであり、Ｘ２はＨまたはＬであり、Ｘ３はＮまたはＨであり、Ｘ４はＳ、ＮまたはＴであり、Ｘ５はＷ、ＬまたはＩである、
ＶＬ、
ｇ）ｅ）のＶＨ及びｆ）のＶＬ、
ｈ）それぞれ、表１に指定されるＡｂ１からＡｂ５９の抗原結合タンパク質の同一のＶＨ由来の、ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２及びＣＤＲＨ３、
ｉ）それぞれ、表１に指定されるＡｂ１からＡｂ５９の抗原結合タンパク質の同一のＶＬ由来の、ＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２及びＣＤＲＬ３、
ｊ）前記ＶＨ及び前記ＶＬが同一の抗原結合タンパク質由来である、ｈ）のＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２及びＣＤＲＨ３並びにｉ）のＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２及びＣＤＲＨ３、
ｋ）アミノ酸配列が、表１に指定される抗原結合タンパク質Ａｂ１からＡｂ５９のいずれか１種のＶＨの配列と、少なくも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％または９９％同一であるＶＨ、

ｌ）アミノ酸配列が、表１に指定される抗原結合タンパク質Ａｂ１からＡｂ５９のいずれか１種のＶＬの配列と、少なくも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％または９９％同一であるＶＬ、
ｍ）ｋ）のＶＨ及びｌ）のＶＬであって、ＶＨ及びＶＬが表１に指定される同一の抗原結合タンパク質由来である、ｋ）のＶＨ及びｌ）のＶＬ、
ｎ）表１に指定される抗原結合タンパク質Ａｂ１からＡｂ５９のいずれか１種のＶＨのアミノ酸配列を含むＶＨ、
ｏ）表１に指定される抗原結合タンパク質Ａｂ１からＡｂ５９のいずれか１種のＶＬのアミノ酸配列を含むＶＬ、
ｐ）ｎ）のＶＨ及びｏ）のＶＬであって、ＶＨ及びＶＬが表１に指定される同一の抗原結合タンパク質由来の、ｎ）のＶＨ及びｏ）のＶＬ、
ｑ）アミノ酸配列が、表１に指定される抗原結合タンパク質Ａｂ１からＡｂ５９のいずれか１種の完全長重鎖（ＨＣ）の配列と、少なくも９０％、９５％、９７％または９９％同一である完全長重鎖、
ｒ)アミノ酸配列が、表１に指定される抗原結合タンパク質Ａｂ１からＡｂ５９のいずれか１種の完全長軽鎖（ＬＣ）の配列と、少なくも９０％、９５％、９７％または９９％同一である完全長軽鎖、
ｓ）表１に指定される同一の抗原結合タンパク質由来である、ｑ）の完全長重鎖及びｒ）の完全長軽鎖、
ｔ）表１に指定される抗原結合タンパク質Ａｂ１からＡｂ５９のいずれか１種の完全長重鎖のアミノ酸配列を含む完全長重鎖、
ｕ）表１に指定される抗原結合タンパク質Ａｂ１からＡｂ５９のいずれか１種の完全長軽鎖のアミノ酸配列を含む完全長軽鎖、または
ｖ）表１に指定される同一の抗原結合タンパク質由来である、ｔ）の完全長重鎖及びｕ）の完全長軽鎖
を含む、抗原結合タンパク質。

【請求項２】
ＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２、ＣＤＲＬ３、ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２及びＣＤＲＨ３を含む請求項１に記載の抗原結合タンパク質であって、ＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２、ＣＤＲＬ３、ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２及びＣＤＲＨ３の１または複数の配列が、Ａｂ１からＡｂ５９の群より選択されるいずれかの単一の抗体の対応するＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２、ＣＤＲＬ３、ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２及びＣＤＲＨ３と比較して異なり、但し、前記ＣＤＲの前記配列の違いは、全体の合計で１、２、３、４または５を超えないアミノ酸であるとの条件である、抗原結合タンパク質。

【請求項３】
ＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２、ＣＤＲＬ３、ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２及びＣＤＲＨ３を含む請求項１または２に記載の抗原結合タンパク質であって、
ａ）ＣＤＲＬ１が配列番号５を含み、ＣＤＲＬ２が配列番号１１を含み、ＣＤＲＬ３が配列番号１９を含み、ＣＤＲＨ１が配列番号３１を含み、ＣＤＲＨ２が配列番号３６を含み、ＣＤＲＨ３が配列番号４７を含む、
ｂ）ＣＤＲＬ１が配列番号５を含み、ＣＤＲＬ２が配列番号１２を含み、ＣＤＲＬ３が配列番号１８を含み、ＣＤＲＨ１が配列番号３１を含み、ＣＤＲＨ２が配列番号４０を含み、ＣＤＲＨ３が配列番号５２を含む、
ｃ）ＣＤＲＬ１が配列番号１０を含み、ＣＤＲＬ２が配列番号１７を含み、ＣＤＲＬ３が配列番号２８を含み、ＣＤＲＨ１が配列番号３５を含み、ＣＤＲＨ２が配列番号４５を含み、ＣＤＲＨ３が配列番号６２を含む、
ｄ）ＣＤＲＬ１が配列番号５を含み、ＣＤＲＬ２が配列番号１２を含み、ＣＤＲＬ３が配列番号２９を含み、ＣＤＲＨ１が配列番号３１を含み、ＣＤＲＨ２が配列番号３７を含み、ＣＤＲＨ３が配列番号５８を含む、
ｅ）ＣＤＲＬ１が配列番号５を含み、ＣＤＲＬ２が配列番号１４を含み、ＣＤＲＬ３が

配列番号３０を含み、ＣＤＲＨ１が配列番号３を含み、ＣＤＲＨ２が配列番号３６を含み、ＣＤＲＨ３が配列番号６３を含む、
ｆ）ＣＤＲＬ１が配列番号１０を含み、ＣＤＲＬ２が配列番号１７を含み、ＣＤＲＬ３が配列番号２８を含み、ＣＤＲＨ１が配列番号３５を含み、ＣＤＲＨ２が配列番号４５を含み、ＣＤＲＨ３が配列番号７６を含む、
ｇ）ＣＤＲＬ１が配列番号５を含み、ＣＤＲＬ２が配列番号１２を含み、ＣＤＲＬ３が配列番号２９を含み、ＣＤＲＨ１が配列番号３１を含み、ＣＤＲＨ２が配列番号３７を含み、ＣＤＲＨ３が配列番号５８を含む、
ｈ）ＣＤＲＬ１が配列番号５を含み、ＣＤＲＬ２が配列番号１４を含み、ＣＤＲＬ３が配列番号３０を含み、ＣＤＲＨ１が配列番号３１を含み、ＣＤＲＨ２が配列番号７１を含み、ＣＤＲＨ３が配列番号６３を含む、または
ｉ）ＣＤＲＬ１が配列番号５を含み、ＣＤＲＬ２が配列番号１１を含み、ＣＤＲＬ３が配列番号１９を含み、ＣＤＲＨ１が配列番号３１を含み、ＣＤＲＨ２が配列番号７１を含み、ＣＤＲＨ３が配列番号４７を含む、
ｊ）ＣＤＲＬ１が配列番号５を含み、ＣＤＲＬ２が配列番号１２を含み、ＣＤＲＬ３が配列番号１８を含み、ＣＤＲＨ１が配列番号３１を含み、ＣＤＲＨ２が配列番号７３を含み、ＣＤＲＨ３が配列番号５２を含む、
抗原結合タンパク質。

【請求項４】

ＶＬ及びＶＨを含む請求項１から３のいずれか１項に記載の抗原結合タンパク質であって、
ａ）ＶＬのアミノ酸配列が、配列番号１１９と、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％または９９％同一であり、ＶＨのアミノ酸配列が、配列番号１３８と、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％または９９％同一である、
ｂ）ＶＬのアミノ酸配列が、配列番号１２４と、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％または９９％同一であり、ＶＨのアミノ酸配列が、配列番号１４３と、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％または９９％同一である、
ｃ）ＶＬのアミノ酸配列が、配列番号１３４と、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％または９９％同一であり、ＶＨのアミノ酸配列が、配列番号１５３と、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％または９９％同一である、
ｄ）ＶＬのアミノ酸配列が、配列番号１３５と、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％または９９％同一であり、ＶＨのアミノ酸配列が、配列番号１５４と、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％または９９％同一である、
ｅ）ＶＬのアミノ酸配列が、配列番号１３６と、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％または９９％同一であり、ＶＨのアミノ酸配列が、配列番号１５５と、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％または９９％同一である、
ｆ）ＶＬのアミノ酸配列が、配列番号２４２と、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％または９９％同一であり、ＶＨのアミノ酸配列が、配列番号２８２と、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％または９９％同一である、
ｇ）ＶＬのアミノ酸配列が、配列番号２５５と、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％または９９％同一であり、ＶＨのアミノ酸配列が、配列番号２９５と、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％または９９％同一である、
ｈ）ＶＬのアミノ酸配列が、配列番号２６２と、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％または９９％同一であり、ＶＨのアミノ酸配列が、配列番号３０２と、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％または９９％同一である、
ｉ）ＶＬのアミノ酸配列が、配列番号２６７と、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％または９９％同一であり、ＶＨのアミノ酸配列が、配列番号３０７と、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％または９９％同一である、
ｊ）ＶＬのアミノ酸配列が、配列番号２７２と、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％または９９％同一であり、ＶＨのアミノ酸配列が、配列番号３１２と、少

なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％または９９％同一である、
抗原結合タンパク質。
【請求項５】
ＶＬ及びＶＨを含む請求項１から４のいずれか１項に記載の抗原結合タンパク質であって、
ａ）ＶＬが配列番号１１９を含み、ＶＨが配列番号１３８を含む、
ｂ）ＶＬが配列番号１２４を含み、ＶＨが配列番号１４３を含む、
ｃ）ＶＬが配列番号１３４を含み、ＶＨが配列番号１５３を含む、
ｄ）ＶＬが配列番号１３５を含み、ＶＨが配列番号１５４を含む、
ｅ）ＶＬが配列番号１３６を含み、ＶＨが配列番号１５５を含む、
ｆ）ＶＬが配列番号２４２を含み、ＶＨが配列番号２８２を含む、
ｇ）ＶＬが配列番号２５５を含み、ＶＨが配列番号２９５を含む、
ｈ）ＶＬが配列番号２６２を含み、ＶＨが配列番号３０２を含む、
ｉ）ＶＬが配列番号２６７を含み、ＶＨが配列番号３０７を含む、
ｊ）ＶＬが配列番号２７２を含み、ＶＨが配列番号３１２を含む、
抗原結合タンパク質。
【請求項６】
ＬＣ及びＨＣを含む請求項１から５のいずれか１項に記載の抗原結合タンパク質であって、
ａ）ＬＣのアミノ酸配列が、配列番号３１７と、少なくとも９０％、９５％、９７％または９９％同一であり、ＨＣのアミノ酸配列が、配列番号３３６と、少なくとも９０％、９５％、９７％または９９％同一である、
ｂ）ＬＣのアミノ酸配列が、配列番号３２２と、少なくとも９０％、９５％、９７％または９９％同一であり、ＨＣのアミノ酸配列が、配列番号３４１と、少なくとも９０％、９５％、９７％または９９％同一である、
ｃ）ＬＣのアミノ酸配列が、配列番号３３２と、少なくとも９０％、９５％、９７％または９９％同一であり、ＨＣのアミノ酸配列が、配列番号３５１と、少なくとも９０％、９５％、９７％または９９％同一である、
ｄ）ＬＣのアミノ酸配列が、配列番号３３３と、少なくとも９０％、９５％、９７％または９９％同一であり、ＨＣのアミノ酸配列が、配列番号３５２と、少なくとも９０％、９５％、９７％または９９％同一である、
ｅ）ＬＣのアミノ酸配列が、配列番号３３４と、少なくとも９０％、９５％、９７％または９９％同一であり、ＨＣのアミノ酸配列が、配列番号３５３と、少なくとも９０％、９５％、９７％または９９％同一である、
ｆ）ＬＣのアミノ酸配列が、配列番号３６０と、少なくとも９０％、９５％、９７％または９９％同一であり、ＨＣのアミノ酸配列が、配列番号４００と、少なくとも９０％、９５％、９７％または９９％同一である、
ｇ）ＬＣのアミノ酸配列が、配列番号３７３と、少なくとも９０％、９５％、９７％または９９％同一であり、ＨＣのアミノ酸配列が、配列番号４１３と、少なくとも９０％、９５％、９７％または９９％同一である、
ｈ）ＬＣのアミノ酸配列が、配列番号３８０と、少なくとも９０％、９５％、９７％または９９％同一であり、ＨＣのアミノ酸配列が、配列番号４２０と、少なくとも９０％、９５％、９７％または９９％同一である、
ｉ）ＬＣのアミノ酸配列が、配列番号３８５と、少なくとも９０％、９５％、９７％または９９％同一であり、ＨＣのアミノ酸配列が、配列番号４２５と、少なくとも９０％、９５％、９７％または９９％同一である、
ｊ）ＬＣのアミノ酸配列が、配列番号３９０と、少なくとも９０％、９５％、９７％または９９％同一であり、ＨＣのアミノ酸配列が、配列番号４３０と、少なくとも９０％、９５％、９７％または９９％同一である、
抗原結合タンパク質。

【請求項７】
ＬＣ及びＨＣを含む請求項１から６のいずれか１項に記載の抗原結合タンパク質であって、
ａ）ＬＣが配列番号３１７を含み、ＨＣが配列番号３３６を含む、
ｂ）ＬＣが配列番号３２２を含み、ＨＣが配列番号３４１を含む、
ｃ）ＬＣが配列番号３３２を含み、ＨＣが配列番号３５１を含む、
ｄ）ＬＣが配列番号３３３を含み、ＨＣが配列番号３５２を含む、
ｅ）ＬＣが配列番号３３４を含み、ＨＣが配列番号３５３を含む、
ｆ）ＬＣが配列番号３６０を含み、ＨＣが配列番号４００を含む、
ｇ）ＬＣが配列番号３７３を含み、ＨＣが配列番号４１３を含む、
ｈ）ＬＣが配列番号３８０を含み、ＨＣが配列番号４２０を含む、
ｉ）ＬＣが配列番号３８５を含み、ＨＣが配列番号４２５を含む、
ｊ）ＬＣが配列番号３９０を含み、ＨＣが配列番号４３０を含む、
抗原結合タンパク質。
【請求項８】
ヒトＧＩＴＲとの結合に関して、基準となる抗原結合タンパク質と競合する抗原結合タンパク質であって、前記基準となる抗原結合タンパク質が請求項５に記載の抗原結合タンパク質である、抗原結合タンパク質。
【請求項９】
ヒトＧＩＴＲとの結合に関して、抗原結合タンパク質と基準となる抗体とが交差競合する、請求項８に記載の抗原結合タンパク質。
【請求項１０】
ａ）モノクローナル抗体である、
ｂ）ヒト抗体、ヒト化抗体、またはキメラ抗体である、
ｃ）多重特異性抗体である、
ｄ）ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４型である、
ｅ）抗原結合抗体フラグメントである、
ｆ）Ｆａｂフラグメント、Ｆａｂ’フラグメント、Ｆ（ａｂ’）２フラグメント、またはＦｖフラグメントである、
ｇ）二特異性抗体、一本鎖抗体、ドメイン抗体、またはナノボディーである、
ｈ）標識されている
の１または複数の特性を有する、請求項１から９のいずれか１項に記載の抗原結合タンパク質。
【請求項１１】
完全ヒト抗体である、請求項１から１０のいずれか１項に記載の抗原結合タンパク質。
【請求項１２】
ヒトＧＩＴＲの活性を刺激する、請求項１から１１のいずれか１項に記載の抗原結合タンパク質。
【請求項１３】
ａ）ＧＩＴＲとの結合に関して、ＧＩＴＲＬと交差競合する、
ｂ）ヒトＣＤ４細胞中へ内部移行可能である、
ｃ）制御性Ｔ細胞の抑制を阻害する、
ｄ）制御性Ｔ細胞の循環を低下させる、
ｅ）エフェクタＴ細胞を活性化する、
ｆ）ヒト血清中で、少なくとも６日、７日、９日または１２日の半減期を有する
の１または複数の活性を有する、請求項１から１２のいずれか１項に記載の抗原結合タンパク質。
【請求項１４】
完全ヒトＩｇＧ１抗体である、請求項１から１３のいずれか１項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項１５】
Ｆｃγ受容体（ＦｃγＲ）と結合する能力を有する、請求項１から１４のいずれか１項に記載の抗原結合タンパク質。
【請求項１６】
抗原結合タンパク質のクラスタが形成されるように、Ｆｃγ受容体（ＦｃγＲ）と結合する能力を有する、請求項１から１５のいずれか１項に記載の抗原結合タンパク質。
【請求項１７】
ヒトＧＩＴＲと結合する、請求項１から１６のいずれか１項に記載の抗原結合タンパク質。
【請求項１８】
ａ）１０ｎＭ以下のＫＤで、配列番号１のヒトＧＩＴＲポリペプチドと結合する、
ｂ）５００ｎＭ以下のＫＤで、配列番号２のカニクイザルＧＩＴＲポリペプチドと結合する
の１または複数の特性を有する、請求項１から１７のいずれか１項に記載の抗原結合タンパク質。
【請求項１９】
ヒトＧＩＴＲを刺激する、ＩｇＧ１型の完全ヒトモノクローナル抗体である、請求項１から１８のいずれか１項に記載の抗原結合タンパク質。
【請求項２０】
１０ｎＭ以下のK_Dで、配列番号１のヒトＧＩＴＲと結合し、５００ｎＭ以下のK_Dで、配列番号２のカニクイザルＧＩＴＲと結合する、請求項１から１９のいずれか１項に記載の抗原結合タンパク質。
【請求項２１】
ａ）請求項１から２０のいずれか１項に記載の抗原結合タンパク質のＶＬ、ＶＨ若しくはそれらの両方、または
ｂ）請求項１から２０のいずれか１項に記載の抗原結合タンパク質のＬＣ若しくはＨＣまたはそれらの両方
をコードする核酸。
【請求項２２】
ａ）ＶＬ核酸及びＶＨ核酸がそれぞれ、表４に指定されるＡｂ１からＡｂ５９の群より選択されるいずれかの単一の抗体に対して示されるＶＬヌクレオチド配列及びＶＨヌクレオチド配列を含み、
ｂ）ＬＣ核酸またはＨＣ核酸がそれぞれ、表４に指定されるＡｂ１からＡｂ５９の群より選択されるいずれかの単一の抗体に対して示されるＬＣヌクレオチド配列及びＨＣヌクレオチド配列を含む
請求項２１に記載の核酸。
【請求項２３】
請求項２１または２２に記載の核酸を含むベクター。
【請求項２４】
請求項２１若しくは２２に記載の核酸または請求項２３に記載のベクターを含む細胞。
【請求項２５】
請求項１から２０のいずれか１項に記載の抗原結合タンパク質の製造方法であって、前記抗原結合タンパク質の発現を可能にする条件下で請求項２４に記載の細胞を培養すること、及び、任意選択で、培養物から抗原結合タンパク質を単離することを含む、製造方法。
【請求項２６】
少なくとも１種の請求項１から２０のいずれか１項に記載の抗原結合タンパク質及び薬学的に許容される担体または希釈剤を含む医薬組成物。
【請求項２７】
免疫賦活剤、抗血管新生剤、及び化学療法剤からなる群より選択される付加的な活性成

分を更に含む、請求項２６に記載の医薬組成物。
【請求項２８】
治療に用いるための、請求項１から２０のいずれか１項に記載の抗原結合タンパク質または請求項２６若しくは２７に記載の医薬組成物。
【請求項２９】
対象における免疫反応の誘発または向上方法に用いるための、請求項１から２０のいずれか１項に記載の抗原結合タンパク質、または請求項２６若しくは２７に記載の医薬組成物であって、前記方法が、前記抗原結合タンパク質を前記対象に投与することを含む、抗原結合タンパク質または医薬組成物。
【請求項３０】
対象における免疫反応の誘発または向上方法であって、前記免疫反応を誘発するまたは向上させるために有効な量で、請求項１から２０のいずれか１項に記載の抗原結合タンパク質または請求項２６若しくは２７に記載の医薬組成物を対象に投与することを含む、方法。
【請求項３１】
免疫反応が腫瘍抗原に向けて生起される、請求項３０に記載の方法。
【請求項３２】
免疫反応が感染因子に向けて生起される、請求項３０に記載の方法。
【請求項３３】
対象において、
ａ）エフェクタＴ細胞の活性の制御性Ｔ細胞による抑制を低減すること、
ｂ）循環制御性Ｔ細胞のレベルを低下させること、
ｃ）エフェクタＴ細胞の活性化、
ｄ）エフェクタＴ細胞増殖を誘発するまたは向上させること、
ｅ）腫瘍の成長を阻害すること、及び
ｆ）腫瘍退縮を誘発すること
の１または複数を達成するために十分な量で、抗原結合タンパク質が投与される、請求項３０から３２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３４】
がんを有する対象におけるがんの治療方法であって、有効量の請求項１から２０のいずれか１項に記載の抗原結合タンパク質または請求項２６若しくは２７に記載の医薬組成物を前記対象に投与することを含む、治療方法。
【請求項３５】
がんが固形がんである、請求項３４の治療方法。
【請求項３６】
がんが血液がんである、請求項３４の治療方法。
【請求項３７】
がんが、黒色腫、肺がん、頭頚部がん、腎細胞がん、または結腸直腸がんである、請求項３４の治療方法。
【請求項３８】
がんが、非小細胞性肺がん、頭頚部扁平上皮がんまたは膀胱がんである、請求項３４の治療方法。
【請求項３９】
がんを有する対象における転移の阻害方法であって、有効量の請求項１から２０のいずれか１項に記載の抗原結合タンパク質または請求項２６若しくは２７に記載の医薬組成物を前記対象に投与することを含む、治療方法。
【請求項４０】
ａ）化学療法を施すこと、
ｂ）放射線療法を施すこと、及び／または
ｃ）１種または複数種の付加的な治療薬を投与すること

の１または複数を更に含む、請求項３０から３９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項４１】
付加的な治療薬が免疫賦活剤である、請求項４０に記載の方法。
【請求項４２】
免疫賦活剤が、Ｔ－ＶＥＣ、ＰＤ１アンタゴニスト、ＰＤＬ１アンタゴニスト、ＣＴＬＡ－４アンタゴニスト及びＢｉＴＥからなる群より選択される、請求項４１に記載の方法。
【請求項４３】
抗原結合タンパク質の前に、それと同時にまたはその後に、化学療法、放射線療法が施され、または治療薬が投与される、請求項４０に記載の方法。
【請求項４４】
感染症を有する対象の治療方法であって、請求項１から２０のいずれか１項に記載の抗原結合タンパク質、または請求項２６若しくは２７に記載の医薬組成物を、前記感染症を治療するために有効な量で投与することを含む、治療方法。
【発明の詳細な説明】
【背景技術】
【０００１】
グルココルチコイド誘導性ＴＮＦＲ関連遺伝子（ＧＩＴＲ：ＴＮＦＲＳＦ１８）は、活性化誘発性ＴＮＦＲ科メンバー（ＡＩＴＲ）と称されることもある、ＴＮＦ受容体スーパーファミリー（ＴＮＦＲＳＦ）に属する受容体である。ＧＩＴＲはその同族リガンドであるＧＩＴＲリガンド（ＣＩＴＲＬ、ＴＮＦＳＦ１８）により活性化される。ＧＩＴＲは、システインに富む細胞外ドメインを含むＩ型膜貫通タンパク質であり、該細胞外ドメインはＴＮＦＲ科メンバーの特徴である。例えば、ＧＩＴＲの細胞質ドメインは、４－１ＢＢ及びＣＤ２７などの、特定の他のＴＮＦＲ科メンバーと近接した相同性を共有する（Ｎｏｃｅｎｔｉｎｉら（１９９７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．９４：６２１６～６２２１）。
【０００２】
ヒトＧＩＴＲは、休止期のレスポンダＴ細胞において低レベルで発現し、ＣＤ４＋細胞はＣＤ８＋細胞に比較して大きな発現を示す。ＧＩＴＲの発現は、Ｔ細胞の活性化後数日間顕著に上方制御される。ＧＩＴＲは、ＣＤ４＋ＣＤ２５＋細胞またはＣＤ８＋ＣＤ２５＋細胞などの制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）において高いレベルで構成的に発現し、これらの細胞が活性化されると更に上方制御される（Ｎｏｃｅｎｔｉｎｉ及びＲｉｃｃａｒｄｉ（２００５）Ｅ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．３５：１０１６～１０２２）。但し、ＧＩＴＲの発現はＴ細胞のみに限定されるものではない。報告によれば、ＧＩＴＲは、ＮＫ細胞、マクロファージ、Ｂ細胞、樹状細胞、肥満細胞及び単球上で発現することも示されている（Ｎｏｃｅｎｔｉｎｉ及びＲｉｃｃａｒｄｉ（２００５）Ｅ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．３５：１０１６～１０２２）。
【０００３】
ＧＩＴＲＬは、殆どのＴＮＦリガンド科メンバーに関して典型的である通り、ＩＩ型膜貫通タンパク質である。現在の研究では、ヒトＧＩＴＲＬは、単量体として存在する、または他の多量体の形態に会合する場合もあるが、一般的には三量体として存在することが示されている（Ｃｈａｔｔｏｐａｄｈｙａｙら（２００７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．１０４：１９４５２～１９４５７、Ｚｈｏｕら（２００８）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．１０５：６３５～６４０）。可溶性の形態のＧＩＴＲＬも産生されていることを示唆する一部の証左がある（Ｂａｌｔｚら（２００８）Ｂｌｏｏｄ １１２：３７３５～３７４３、Ｍａｈｅｓｈら（２００６）Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．３６：２１２８～２１３８)。ＧＩＴＲＬは主として、マクロファージ、Ｂ細胞、樹状細胞及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）として機能することができる内皮細胞を始めとするＡＰＣ上で発現する（Ｎｏｃｅｎｔｉｎｉ及びＲｉｃｃａｒｄｉ（２００５）Ｅ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．３５：１０１６～１０２２、Ａｇｏｓｔｉｎｉら（２００５）Ｉｎｆｅｃｔ．Ｉ

ｍｍｕｎ．７３：７５０２～７５０８、並びにＮｏｃｅｎｔｉｎｉら（２００７）Ｅ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．３７：１１６５～１１６９）。

【０００４】

ＡＰＣ上のＧＩＴＲＬがレスポンダＴ細胞上のＧＩＴＲに結合することが、ＧＩＴＲシグナル伝達をトリガーし、該シグナル伝達がレスポンダＴ細胞を同時刺激し、Ｔｒｅｇ細胞の抑制作用を阻害する。ＧＩＴＲシグナル伝達は、ＣＤ４＋ナイーブＴ細胞及びＣＤ８＋ナイーブＴ細胞の両者に対して同時活性化するシグナルとして機能し、それによって、特にＴ細胞受容体（ＴＣＲ）刺激が不十分である場合に、増殖及びエフェクタ機能を誘発するまたは向上させる（Ｓｃｈａｅｒら（２０１２）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２４：２１７～２２４）。より詳細には、ＧＩＴＲは、エフェクタＴ細胞が阻害に対してより耐性となるような、エフェクタＴ細胞の同時刺激及び活性化、制御性Ｔ細胞の阻害、制御性Ｔ細胞による抑制に対するエフェクタＴ細胞の感受性の低減、並びに循環における制御性Ｔ細胞の一部の除去を始めとする、エフェクタＴ細胞及び制御性Ｔ細胞に対するいくつかの効果を奏することができる（Ｎｏｃｅｎｔｉｎｉら（２００７）Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．３７：１１６５～１１６９）。

【０００５】

まとめると、上述の活性、特にレスポンダＴ細胞の同時刺激及び制御性Ｔ細胞の抑制因子活性の抑止は、ＧＩＴＲの活性化が免疫反応の向上に繋がることを意味する。かかる活性化は、感染症及び腫瘍に対する免疫反応を回復する可能性を有する。従って、ＧＩＴＲを活性化する能力を有する分子は、免疫反応の向上をトリガーすることが望ましい状況において、免疫賦活剤としての価値があることとなる。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００６】

【非特許文献１】Ｎｏｃｅｎｔｉｎｉら（１９９７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．９４：６２１６～６２２１
【非特許文献２】Ｎｏｃｅｎｔｉｎｉ及びＲｉｃｃａｒｄｉ（２００５）Ｅ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．３５：１０１６～１０２２
【非特許文献３】Ｃｈａｔｔｏｐａｄｈｙａｙら（２００７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．１０４：１９４５２～１９４５７
【非特許文献４】Ｚｈｏｕら（２００８）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．１０５：６３５～６４０
【非特許文献５】Ｂａｌｔｚら（２００８）Ｂｌｏｏｄ　１１２：３７３５～３７４３
【非特許文献６】Ｍａｈｅｓｈら（２００６）Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．３６：２１２８～２１３８
【非特許文献７】Ａｇｏｓｔｉｎｉら（２００５）Ｉｎｆｅｃｔ．Ｉｍｍｕｎ．７３：７５０２～７５０８
【非特許文献８】Ｎｏｃｅｎｔｉｎｉら（２００７）Ｅ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．３７：１１６５～１１６９
【非特許文献９】Ｓｃｈａｅｒら（２０１２）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２４：２１７～２２４

【発明の概要】

【０００７】

本明細書には、ヒトＧＩＴＲなどのＧＩＴＲに結合する抗原結合タンパク質が記載される。この抗原結合タンパク質は抗体またはそのフラグメントであってもよく、または、１若しくは複数の相補性決定領域が埋め込まれた若しくは挿入された他のタイプの分子スカフォールド、但し、当該分子はヒトＧＩＴＲなどのＧＩＴＲに結合する能力を有するとの条件である、であってもよい。抗原結合タンパク質はＧＩＴＲのアゴニストであり、従って、ＧＩＴＲシグナル伝達を誘発するまたは向上させることができる。ＧＩＴＲが、免疫反応を刺激することにおいて役割を果たすとの前提で、抗原結合タンパク質は、免疫反応

を高めることが望ましい様々なＧＩＴＲ関連疾患または障害の治療において有用性を有する。例えば、抗原結合タンパク質は、種々のがんまたは感染症の治療などの、様々な免疫療法用途において用いることができる。

【０００８】

第１の実施形態において、

ａ）それぞれ重鎖可変ドメイン（ＶＨ）及び軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）のＣＤＲＨ３及びＣＤＲＬ３であって、ＶＨ及びＶＬが、抗原結合タンパク質Ａｂ１からＡｂ５９のいずれか１種より選択される同一の抗原結合タンパク質の一部であるＣＤＲＨ３及びＣＤＲＬ３、

ｂ）ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２及びＣＤＲＨ３を含む変異ＶＨであって、ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２及びＣＤＲＨ３の１または複数が、Ａｂ１からＡｂ５９の群より選択されるいずれかの単一の抗原結合タンパク質のＶＨの、対応するＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２及びＣＤＲＨ３と比較して配列が異なり、但し、変異ＶＨのＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２及びＣＤＲＨ３の、ＶＨ配列の対応するＣＤＲと比較した場合の配列の違いは、全体の合計で１、２、３、４または５を超えないアミノ酸であるとの条件である、変異ＶＨ、

ｃ）ＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２及びＣＤＲＬ３を含む変異ＶＬであって、ＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２及びＣＤＲＬ３の１または複数が、Ａｂ１からＡｂ５９の群より選択されるいずれかの単一の抗原結合タンパク質のＶＬの、対応するＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２及びＣＤＲＬ３と比較して配列が異なり、但し、変異ＶＬのＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２及びＣＤＲＬ３の、ＶＬ配列の対応するＣＤＲと比較した場合の配列の違いは、全体の合計で１、２、３、４または５を超えないアミノ酸であるとの条件である、変異ＶＬ、

ｄ）ｂ）の変異ＶＨ及びｃ）の変異であって、それぞれ変異ＶＨ及び変異ＶＬのが、同一の抗原結合タンパク質のＶＨ及びＶＬの変異体であるとの条件の、ｂ）の変異ＶＨ及びｃ）の変異ＶＬ、

ｅ）ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２及びＣＤＲＨ３を含むＶＨであって、

ＣＤＲＨ１が配列X_1ＹＧＭX_2（配列番号４３６）を含み、Ｘ１はＳまたはＮであり、Ｘ２はＨまたはＹであり、

ＣＤＲＨ２が配列ＶＩＷＹX_1ＧＳＮＫＹＹＡＤＳＶX_2Ｇ（配列番号４３７）を含み、Ｘ１はＥ、Ｖ、Ａ、Ｐであり、Ｘ２はＫまたはＲであり、

ＣＤＲＨ３が配列ＧＧX_1Ｌ$X_2$$X_3$$X_4$ＹＹ$X_5$ＧＭＤＶ（配列番号４３８）を含み、Ｘ１はＱ、Ｌ、Ｅ、またはＲであり、Ｘ２はＧ、Ｒ、またはＳであり、Ｘ３はＫ、Ｙ、Ｌ、Ｆ、またはＲであり、Ｘ４はＹまたはＤであり、Ｘ５はＹまたはＳである、

ＶＨ、

ｆ）ＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２及びＣＤＲＬ３を含むＶＬであって、

ＣＤＲＬ１が配列ＲＡＳＱX_1ＹＩＲＮＤＬＧ（配列番号４３９）を含み、Ｘ１はＧまたはＶであり、

ＣＤＲＬ２が配列$X_1$$X_2$Ｓ$X_3$ＬＱＳ（配列番号４４０）を含み、Ｘ１はＡまたはＤであり、Ｘ２はＡまたはＴであり、Ｘ３はＳまたはＴであり、

ＣＤＲＬ３が配列X_1Ｑ$X_2$$X_3$$X_4$ＹＰ$X_5$Ｔ（配列番号４４１）を含み、Ｘ１はＬまたはＱであり、Ｘ２はＨまたはＬであり、Ｘ３はＮまたはＨであり、Ｘ４はＳ、ＮまたはＴであり、Ｘ５はＷ、ＬまたはＩである、

ＶＬ、

ｇ）ｅ）のＶＨ及びｆ）のＶＬ、

ｈ）それぞれ、Ａｂ１からＡｂ５９の抗原結合タンパク質の同一のＶＨ由来の、ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２及びＣＤＲＨ３、

ｉ）それぞれ、Ａｂ１からＡｂ５９の抗原結合タンパク質の同一のＶＬ由来の、ＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２及びＣＤＲＬ３、

ｊ）ＶＨ及びＶＬが同一の抗原結合タンパク質由来である、ｈ）のＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２及びＣＤＲＨ３並びにｉ）のＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２及びＣＤＲＨ３、

ｋ）アミノ酸配列が、抗原結合タンパク質Ａｂ１からＡｂ５９のいずれか１種のＶＨの

配列と、少なくも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％または９９％同一であるＶＨ、
ｌ）アミノ酸配列が、抗原結合タンパク質Ａｂ１からＡｂ５９のいずれか１種のＶＬの配列と、少なくも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％または９９％同一であるＶＬ、
ｍ）ｋ）のＶＨ及びｌ）のＶＬであって、ＶＨ及びＶＬが同一の抗原結合タンパク質由来である、ｋ）のＶＨ及びｌ）のＶＬ、
ｎ）抗原結合タンパク質Ａｂ１からＡｂ５９のいずれか１種のＶＨのアミノ酸配列を含むＶＨ、
ｏ）抗原結合タンパク質Ａｂ１からＡｂ５９のいずれか１種のＶＬのアミノ酸配列を含むＶＬ、
ｐ）ｎ）のＶＨ及びｏ）のＶＬであって、ＶＨ及びＶＬが同一の抗原結合タンパク質由来の、ｎ）のＶＨ及びｏ）のＶＬ、
ｑ）アミノ酸配列が、抗原結合タンパク質Ａｂ１からＡｂ５９のいずれか１種の完全長重鎖（ＨＣ）の配列と、少なくも９０％、９５％、９７％または９９％同一である完全長重鎖、
r)アミノ酸配列が、抗原結合タンパク質Ａｂ１からＡｂ５９のいずれか１種の完全長軽鎖（ＬＣ）の配列と、少なくも９０％、９５％、９７％または９９％同一である完全長軽鎖、
ｓ）同一の抗原結合タンパク質由来である、ｑ）の完全長重鎖及びｒ）の完全長軽鎖、
ｔ）抗原結合タンパク質Ａｂ１からＡｂ５９のいずれか１種の完全長重鎖のアミノ酸配列を含む完全長重鎖、
ｕ）抗原結合タンパク質Ａｂ１からＡｂ５９のいずれか１種の完全長軽鎖のアミノ酸配列を含む完全長軽鎖、または
ｖ）同一の抗原結合タンパク質由来である、ｔ）の完全長重鎖及びｕ）の完全長軽鎖
を含む抗原結合タンパク質が提供される。

【０００９】

第２の実施形態において、抗原結合タンパク質は、ＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２、ＣＤＲＬ３、ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２及びＣＤＲＨ３を含み、ここで、ＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２、ＣＤＲＬ３、ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２及びＣＤＲＨ３の１または複数の配列は、Ａｂ１からＡｂ５９の群より選択されるいずれかの単一の抗体の対応するＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２、ＣＤＲＬ３、ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２及びＣＤＲＨ３と比較して異なり、但し、ＣＤＲの配列の違いは、全体の合計で１、２、３、４または５を超えないアミノ酸であるとの条件である。

【００１０】

第３の実施形態において、抗原結合タンパク質は、ＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２、ＣＤＲＬ３、ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２及びＣＤＲＨ３を含み、ここで、
ａ）ＣＤＲＬ１は配列番号５を含み、ＣＤＲＬ２は配列番号１１を含み、ＣＤＲＬ３は配列番号１９を含み、ＣＤＲＨ１は配列番号３１を含み、ＣＤＲＨ２は配列番号３６を含み、ＣＤＲＨ３は配列番号４７を含むか、
ｂ）ＣＤＲＬ１は配列番号５を含み、ＣＤＲＬ２は配列番号１２を含み、ＣＤＲＬ３は配列番号１８を含み、ＣＤＲＨ１は配列番号３１を含み、ＣＤＲＨ２は配列番号４０を含み、ＣＤＲＨ３は配列番号５２を含むか、
ｃ）ＣＤＲＬ１は配列番号１０を含み、ＣＤＲＬ２は配列番号１７を含み、ＣＤＲＬ３は配列番号２８を含み、ＣＤＲＨ１は配列番号３５を含み、ＣＤＲＨ２は配列番号４５を含み、ＣＤＲＨ３は配列番号６２を含むか、
ｄ）ＣＤＲＬ１は配列番号５を含み、ＣＤＲＬ２は配列番号１２を含み、ＣＤＲＬ３は配列番号２９を含み、ＣＤＲＨ１は配列番号３１を含み、ＣＤＲＨ２は配列番号３７を含み、ＣＤＲＨ３は配列番号５８を含むか、
ｅ）ＣＤＲＬ１は配列番号５を含み、ＣＤＲＬ２は配列番号１４を含み、ＣＤＲＬ３は

配列番号３０を含み、ＣＤＲＨ１は配列番号３を含み、ＣＤＲＨ２は配列番号３６を含み、ＣＤＲＨ３は配列番号６３を含むか、

ｆ）ＣＤＲＬ１は配列番号１０を含み、ＣＤＲＬ２は配列番号１７を含み、ＣＤＲＬ３は配列番号２８を含み、ＣＤＲＨ１は配列番号３５を含み、ＣＤＲＨ２は配列番号４５を含み、ＣＤＲＨ３は配列番号７６を含むか、

ｇ）ＣＤＲＬ１は配列番号５を含み、ＣＤＲＬ２は配列番号１２を含み、ＣＤＲＬ３は配列番号２９を含み、ＣＤＲＨ１は配列番号３１を含み、ＣＤＲＨ２は配列番号３７を含み、ＣＤＲＨ３は配列番号５８を含むか、

ｈ）ＣＤＲＬ１は配列番号５を含み、ＣＤＲＬ２は配列番号１４を含み、ＣＤＲＬ３は配列番号３０を含み、ＣＤＲＨ１は配列番号３１を含み、ＣＤＲＨ２は配列番号７１を含み、ＣＤＲＨ３は配列番号６３を含むか、

ｉ）ＣＤＲＬ１は配列番号５を含み、ＣＤＲＬ２は配列番号１１を含み、ＣＤＲＬ３は配列番号１９を含み、ＣＤＲＨ１は配列番号３１を含み、ＣＤＲＨ２は配列番号７１を含み、ＣＤＲＨ３は配列番号４７を含むか、または

ｊ）ＣＤＲＬ１は配列番号５を含み、ＣＤＲＬ２は配列番号１２を含み、ＣＤＲＬ３は配列番号１８を含み、ＣＤＲＨ１は配列番号３１を含み、ＣＤＲＨ２は配列番号７３を含み、ＣＤＲＨ３は配列番号５２を含む。

【００１１】

第４の実施形態において、抗原結合タンパク質は、ＶＬ及びＶＨを含み、ここで、

ａ）ＶＬのアミノ酸配列は、配列番号１１９と、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％または９９％同一であり、ＶＨのアミノ酸配列は、配列番号１３８と、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％または９９％同一であるか、

ｂ）ＶＬのアミノ酸配列は、配列番号１２４と、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％または９９％同一であり、ＶＨのアミノ酸配列は、配列番号１４３と、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％または９９％同一であるか、

ｃ）ＶＬのアミノ酸配列は、配列番号１３４と、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％または９９％同一であり、ＶＨのアミノ酸配列は、配列番号１５３と、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％または９９％同一であるか、

ｄ）ＶＬのアミノ酸配列は、配列番号１３５と、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％または９９％同一であり、ＶＨのアミノ酸配列は、配列番号１５４と、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％または９９％同一であるか、

ｅ）ＶＬのアミノ酸配列は、配列番号１３６と、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％または９９％同一であり、ＶＨのアミノ酸配列は、配列番号１５５と、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％または９９％同一であるか、

ｆ）ＶＬのアミノ酸配列は、配列番号２４２と、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％または９９％同一であり、ＶＨのアミノ酸配列は、配列番号２８２と、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％または９９％同一であるか、

ｇ）ＶＬのアミノ酸配列は、配列番号２５５と、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％または９９％同一であり、ＶＨのアミノ酸配列は、配列番号２９５と、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％または９９％同一であるか、

ｈ）ＶＬのアミノ酸配列は、配列番号２６２と、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％または９９％同一であり、ＶＨのアミノ酸配列は、配列番号３０２と、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％または９９％同一であるか、

ｉ）ＶＬのアミノ酸配列は、配列番号２６７と、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％または９９％同一であり、ＶＨのアミノ酸配列は、配列番号３０７と、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％または９９％同一であるか、あるいは

ｊ）ＶＬのアミノ酸配列は、配列番号２７２と、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％または９９％同一であり、ＶＨのアミノ酸配列は、配列番号３１２と、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％または９９％同一である。

【００１２】

第５の実施形態において、抗原結合タンパク質は、ＶＬ及びＶＨを含み、ここで、
ａ）ＶＬは配列番号１１９を含み、ＶＨは配列番号１３８を含む、
ｂ）ＶＬは配列番号１２４を含み、ＶＨは配列番号１４３を含む、
ｃ）ＶＬは配列番号１３４を含み、ＶＨは配列番号１５３を含む、
ｄ）ＶＬは配列番号１３５を含み、ＶＨは配列番号１５４を含む、
ｅ）ＶＬは配列番号１３６を含み、ＶＨは配列番号１５５を含む、
ｆ）ＶＬは配列番号２４２を含み、ＶＨは配列番号２８２を含む、
ｇ）ＶＬは配列番号２５５を含み、ＶＨは配列番号２９５を含む、
ｈ）ＶＬは配列番号２６２を含み、ＶＨは配列番号３０２を含む、
ｉ）ＶＬは配列番号２６７を含み、ＶＨは配列番号３０７を含む、
ｊ）ＶＬは配列番号２７２を含み、ＶＨは配列番号３１２を含む。

【００１３】

第６の実施形態において、抗原結合タンパク質は、ＬＣ及びＨＣを含み、ここで、
ａ）ＬＣのアミノ酸配列は、配列番号３１７と、少なくとも９０％、９５％、９７％または９９％同一であり、ＨＣのアミノ酸配列は、配列番号３３６と、少なくとも９０％、９５％、９７％または９９％同一である、
ｂ）ＬＣのアミノ酸配列は、配列番号３２２と、少なくとも９０％、９５％、９７％または９９％同一であり、ＨＣのアミノ酸配列は、配列番号３４１と、少なくとも９０％、９５％、９７％または９９％同一である、
ｃ）ＬＣのアミノ酸配列は、配列番号３３２と、少なくとも９０％、９５％、９７％または９９％同一であり、ＨＣのアミノ酸配列は、配列番号３５１と、少なくとも９０％、９５％、９７％または９９％同一である、
ｄ）ＬＣのアミノ酸配列は、配列番号３３３と、少なくとも９０％、９５％、９７％または９９％同一であり、ＨＣのアミノ酸配列は、配列番号３５２と、少なくとも９０％、９５％、９７％または９９％同一である、
ｅ）ＬＣのアミノ酸配列は、配列番号３３４と、少なくとも９０％、９５％、９７％または９９％同一であり、ＨＣのアミノ酸配列は、配列番号３５３と、少なくとも９０％、９５％、９７％または９９％同一である、
ｆ）ＬＣのアミノ酸配列は、配列番号３６０と、少なくとも９０％、９５％、９７％または９９％同一であり、ＨＣのアミノ酸配列は、配列番号４００と、少なくとも９０％、９５％、９７％または９９％同一である、
ｇ）ＬＣのアミノ酸配列は、配列番号３７３と、少なくとも９０％、９５％、９７％または９９％同一であり、ＨＣのアミノ酸配列は、配列番号４１３と、少なくとも９０％、９５％、９７％または９９％同一である、
ｈ）ＬＣのアミノ酸配列は、配列番号３８０と、少なくとも９０％、９５％、９７％または９９％同一であり、ＨＣのアミノ酸配列は、配列番号４２０と、少なくとも９０％、９５％、９７％または９９％同一である、
ｉ）ＬＣのアミノ酸配列は、配列番号３８５と、少なくとも９０％、９５％、９７％または９９％同一であり、ＨＣのアミノ酸配列は、配列番号４２５と、少なくとも９０％、９５％、９７％または９９％同一である、
ｊ）ＬＣのアミノ酸配列は、配列番号３９０と、少なくとも９０％、９５％、９７％または９９％同一であり、ＨＣのアミノ酸配列は、配列番号４３０と、少なくとも９０％、９５％、９７％または９９％同一である。

【００１４】

第７の実施形態において、抗原結合タンパク質は、ＬＣ及びＨＣを含み、ここで、
ａ）ＬＣは配列番号３１７を含み、ＨＣは配列番号３３６を含む、
ｂ）ＬＣは配列番号３２２を含み、ＨＣは配列番号３４１を含む、
ｃ）ＬＣは配列番号３３２を含み、ＨＣは配列番号３５１を含む、
ｄ）ＬＣは配列番号３３３を含み、ＨＣは配列番号３５２を含む、
ｅ）ＬＣは配列番号３３４を含み、ＨＣは配列番号３５３を含む、

ｆ）ＬＣは配列番号３６０を含み、ＨＣは配列番号４００を含む、
ｇ）ＬＣは配列番号３７３を含み、ＨＣは配列番号４１３を含む、
ｈ）ＬＣは配列番号３８０を含み、ＨＣは配列番号４２０を含む、
ｉ）ＬＣは配列番号３８５を含み、ＨＣは配列番号４２５を含む、
ｊ）ＬＣは配列番号３９０を含み、ＨＣは配列番号４３０を含む。

【００１５】

第８の実施形態において、抗原結合タンパク質は、ヒトＧＩＴＲとの結合に関して、基準となる抗原結合タンパク質と競合し、ここで、基準となる抗原結合タンパク質は第５の実施形態に関して記載の抗原結合タンパク質である。

【００１６】

第９の実施形態において、第８の実施形態の抗原結合タンパク質と基準となる抗体とは、ヒトＧＩＴＲとの結合に関して交差競合する。

【００１７】

第１０の実施形態において、実施形態１～９のいずれか１の抗原結合タンパク質は、
ａ）モノクローナル抗体である、
ｂ）ヒト抗体、ヒト化抗体、またはキメラ抗体である、
ｃ）多重特異性抗体である、
ｄ）ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４型である、
ｅ）抗原結合抗体フラグメントである、
ｆ）Ｆａｂフラグメント、Ｆａｂ’フラグメント、Ｆ（ａｂ’）２フラグメント、またはＦｖフラグメントである、
ｇ）二特異性抗体、一本鎖抗体、ドメイン抗体、またはナノボディーである、
ｈ）標識されている
の１または複数の特性を有する。

【００１８】

第１１の実施形態において、実施形態１～１０のいずれか１の抗原結合タンパク質は、完全ヒト抗体である。

【００１９】

第１２の実施形態において、実施形態１～１１のいずれか１の抗原結合タンパク質は、ヒトＧＩＴＲの活性を刺激する。

【００２０】

第１３の実施形態において、実施形態１～１２いずれか１の抗原結合タンパク質は、
ａ）ＧＩＴＲとの結合に関して、ＧＩＴＲＬと交差競合する、
ｂ）ヒトＣＤ４細胞中へ内部移行可能である、
ｃ）制御性Ｔ細胞の抑制を阻害する、
ｄ）制御性Ｔ細胞の循環を低下させる、
ｅ）エフェクタＴ細胞を活性化する、
ｆ）ヒト血清中で、少なくとも６日、７日、９日または１２日の半減期を有する
の１または複数の活性を有する。

【００２１】

第１４の実施形態において、実施形態１～１３いずれか１の抗原結合タンパク質は、完全ヒトＩｇＧ１抗体である。

【００２２】

第１５の実施形態において、実施形態１～１４いずれか１の抗原結合タンパク質は、Ｆｃγ受容体（ＦｃγＲ）と結合する能力を有する。

【００２３】

第１６の実施形態において、実施形態１～１５いずれか１の抗原結合タンパク質は、抗原結合タンパク質のクラスタが形成されるように、Ｆｃγ受容体（ＦｃγＲ）と結合する能力を有する。

【００２４】

第１７の実施形態において、実施形態１～１６いずれか１の抗原結合タンパク質は、ヒトＧＩＴＲ（例えば、配列番号１）と結合する。

【００２５】

第１８の実施形態において、実施形態１～１７いずれか１の抗原結合タンパク質は、

ａ）１０ｎＭ以下のＫＤで、配列番号１のヒトＧＩＴＲポリペプチドと結合する、

ｂ）５００ｎＭ以下のＫＤで、配列番号２のカニクイザルＧＩＴＲポリペプチドと結合する

の１または複数の特性を有する。

【００２６】

第１９の実施形態において、実施形態１～１８いずれか１の抗原結合タンパク質は、ヒトＧＩＴＲを刺激する、ＩｇＧ１型の完全ヒトモノクローナル抗体である。

【００２７】

第２０の実施形態において、実施形態１～１９いずれか１の抗原結合タンパク質は、１０ｎＭ以下のK_Dで、配列番号１のヒトＧＩＴＲと結合し、５００ｎＭ以下のＫＤで、配列番号２のカニクイザルＧＩＴＲと結合する。

【００２８】

第２１の実施形態において、実施形態１～２０いずれか１の抗原結合タンパク質はグリコシル化されている。

【００２９】

第２２の実施形態において、

ａ）実施形態１～２０のいずれか１の抗原結合タンパク質のＶＬ、ＶＨ若しくはそれらの両方、または

ｂ）実施形態１～２０のいずれか１の抗原結合タンパク質のＬＣ若しくＨＣまたはそれらの両方

をコードする核酸が提供される。

【００３０】

第２３の実施形態において、核酸は、

ａ）Ａｂ１からＡｂ５９の群より選択されるいずれかの単一の抗体に対して示されるＶＬヌクレオチド配列及び／またはＶＨヌクレオチド配列、

ｂ）Ａｂ１からＡｂ５９の群より選択されるいずれかの単一の抗体に対して示されるＬＣヌクレオチド配列及び／またはＨＣヌクレオチド配列

を含む。

【００３１】

第２４の実施形態において、実施形態２２または２３の核酸を含むベクターが提供される。

【００３２】

第２５の実施形態において、実施形態２２若しくは２３の核酸または実施形態２４のベクターを含む細胞が提供される。

【００３３】

第２６の実施形態において、実施形態１～２１のいずれか１の抗原結合タンパク質の製造方法であって、抗原結合タンパク質の発現を可能にする条件下で実施形態２５の細胞を培養すること、及び、任意選択で、抗原結合タンパク質を培養物より単離することを含む製造方法が提供される。

【００３４】

第２７の実施形態において、少なくとも１種の実施形態１～２１のいずれか１の抗原結合タンパク質及び薬学的に許容される担体または希釈剤を含む医薬組成物が提供される。

【００３５】

第２８の実施形態において、実施形態２７の医薬組成物は、免疫賦活剤、抗血管新生剤、及び化学療法剤からなる群より選択される付加的な活性成分を更に含む。

【００３６】

第２９の実施形態において、実施形態１～２１のいずれか１の抗原結合タンパク質または実施形態２７若しくは２８の医薬組成物は、治療に用いるためのものである。

【００３７】

第３０の実施形態において、実施形態１～２１のいずれか１の抗原結合タンパク質、または実施形態２７若しくは２８の医薬組成物は、対象における免疫反応の誘発または向上方法であって、抗原結合タンパク質を対象に投与することを含む方法に用いるためのものである。

【００３８】

第３１の実施形態において、対象における免疫反応の誘発または向上方法であって、免疫反応を誘発するまたは向上させるために有効な量で、実施形態１～２１のいずれか１の抗原結合タンパク質または実施形態２７若しくは２８の医薬組成物を対象に投与することを含む、方法が提供される。

【００３９】

第３２の実施形態において、実施形態３１の方法は、腫瘍抗原に向けた免疫反応を生起させることを含む。

【００４０】

第３３の実施形態において、実施形態３１の方法は、感染因子に向けた免疫反応を生起させることを含む。

【００４１】

第３４の実施形態において、実施形態３１～３３のいずれか１の方法は、対象において、

ａ）エフェクタＴ細胞の活性の制御性Ｔ細胞による抑制を低減すること、

ｂ）循環制御性Ｔ細胞のレベルを低下させること、

ｃ）エフェクタＴ細胞の活性化、

ｄ）エフェクタＴ細胞増殖を誘発するまたは向上させること、

ｅ）腫瘍の成長を阻害すること、及び

ｆ）腫瘍退縮を誘発すること

の１または複数を達成するために十分な量で、抗原結合タンパク質を投与することを含む。

【００４２】

第３５の実施形態において、がんを有する対象におけるがんの治療方法であって、有効量の実施形態１～２１のいずれか１の抗原結合タンパク質または実施形態２７若しくは２８に記載の医薬組成物を対象に投与することを含む、治療方法が提供される。

【００４３】

第３６の実施形態において、実施形態３５の治療方法は、固形がんを治療するためのものである。

【００４４】

第３７の実施形態において、実施形態３５の治療方法は、血液がんを治療するためのものである。

【００４５】

第３８の実施形態において、実施形態３５の治療方法は、メラノーマ、肺がん、頭頸部がん、腎細胞がん、または結腸直腸がんを治療するためのものである。

【００４６】

第３９の実施形態において、がんを有する対象における転移の阻害方法が提供され、該方法は、有効量の実施形態１～２１のいずれか１の抗原結合タンパク質または実施形態２７若しくは２８の医薬組成物を対象に投与することを含む。

【００４７】

第４０の実施形態において、実施形態３１～３９のいずれか１の方法は、

ａ）化学療法を施すこと、

ｂ）放射線療法を施すこと、

ｃ）１種または複数種の付加的な治療薬を投与すること
の１または複数を更に含む。
【００４８】
第４１の実施形態において、方法は実施形態４０に関して記載された通りであり、付加的な治療薬は免疫賦活剤である。
【００４９】
第４２の実施形態において、方法は実施形態４１に関して記載された通りであり、免疫賦活剤は、Ｔ－ＶＥＣ、ＰＤ１アンタゴニスト、ＰＤＬ１アンタゴニスト、ＣＴＬＡ－４アンタゴニスト及びＢｉＴＥからなる群より選択される。
【００５０】
第４３の実施形態において、方法は実施形態４０に関して記載された通りであり、抗原結合タンパク質の前に、それと同時にまたはその後に、化学療法、放射線療法が施され、または治療薬が投与される。
【００５１】
第４４の実施形態において、感染症を有する対象の治療方法であって、実施形態１～２１のいずれか１の抗原結合タンパク質、または実施形態２７若しくは２８の医薬組成物を、感染症を治療するために有効な量で投与することを含む、治療方法が提供される。
【図面の簡単な説明】
【００５２】
【図１Ａ】全体で、本明細書において提供されるものなどのＧＩＴＲ抗体が、２種の別個のＴ細胞亜集団、すなわち、ＣＤ４＋ＣＤ２５＋Ｔ細胞及びＣＤ８＋ＣＤ２５＋Ｔ細胞との結合に関して、ヒトＧＩＴＲＬと交差競合することを示す結合プロットである。特に、図１Ａ及び１Ｂにまとめた結果は、本明細書において提供されるものなどのＧＩＴＲ抗体が、ＧＩＴＲＬのこれらの２種のＴ細胞亜集団との結合を遮断することを示す。この部分の実験においては、然るべく活性化したＴ細胞集団を、種々のモル濃度のＧＩＴＲ抗体（９Ｈ６、５Ｈ７、４１Ｇ５）と共に１０分間インキュベートし、その後、４ｍＭのＨｉｓタグ付きヒトＧＩＴＲＬを添加し、この混合物を更に４℃で３０分間インキュベートした。次いで細胞を洗浄し、続いて結合したＧＩＴＲＬを検知するための蛍光タグ付き抗Ｈｉｓ抗体と共にインキュベートした。フローサイトメトリーにより、結合したＧＩＴＲＬのＭＦＩ（平均蛍光強度）を測定した。図１Ａ及び１Ｂは、２種の別個の細胞集団に関する、ＧＩＴＲ抗体：ＧＩＴＲＬモル濃度比の関数としてのＭＦＩのプロットである。図１Ｃ及び１Ｄは、逆実験の結果を示すプロットであり、ＧＩＴＲＬが抗ＧＩＴＲ抗体の２種のＴ細胞亜集団との結合を遮断することができることを示す。これらの試験においては、最初に種々の濃度の、ＧＩＴＲ抗体ではなくＧＩＴＲＬを、然るべく活性化したＴ細胞集団と共にインキュベートした。続いてＧＩＴＲ抗体（４ｍＭの９Ｈ６、５Ｈ７、４１Ｇ５）を添加し、得られた混合物を４Ｃで３０分間インキュベートした。蛍光標識抗ヒトＦｃと共にインキュベートすることによって、結合したＧＩＴＲ抗体を検知した。結合はフローサイトメトリー分析によって測定した。図１Ｃ及び１Ｄは、２種の別個の細胞集団に関する、ＧＩＴＲＬ：ＧＩＴＲ抗体モル濃度比の関数としてのＭＦＩのプロットである。
【図１Ｂ】全体で、本明細書において提供されるものなどのＧＩＴＲ抗体が、２種の別個のＴ細胞亜集団、すなわち、ＣＤ４＋ＣＤ２５＋Ｔ細胞及びＣＤ８＋ＣＤ２５＋Ｔ細胞との結合に関して、ヒトＧＩＴＲＬと交差競合することを示す結合プロットである。特に、図１Ａ及び１Ｂにまとめた結果は、本明細書において提供されるものなどのＧＩＴＲ抗体が、ＧＩＴＲＬのこれらの２種のＴ細胞亜集団との結合を遮断することを示す。この部分の実験においては、然るべく活性化したＴ細胞集団を、種々のモル濃度のＧＩＴＲ抗体（９Ｈ６、５Ｈ７、４１Ｇ５）と共に１０分間インキュベートし、その後、４ｍＭのＨｉｓタグ付きヒトＧＩＴＲＬを添加し、この混合物を更に４℃で３０分間インキュベートした。次いで細胞を洗浄し、続いて結合したＧＩＴＲＬを検知するための蛍光タグ付き抗Ｈｉｓ抗体と共にインキュベートした。フローサイトメトリーにより、結合したＧＩＴＲＬのＭＦＩ（平均蛍光強度）を測定した。図１Ａ及び１Ｂは、２種の別個の細胞集団に関する

、ＧＩＴＲ抗体：ＧＩＴＲＬモル濃度比の関数としてのＭＦＩのプロットである。図１Ｃ及び１Ｄは、逆実験の結果を示すプロットであり、ＧＩＴＲＬが抗ＧＩＴＲ抗体の２種のＴ細胞亜集団との結合を遮断することができることを示す。これらの試験においては、最初に種々の濃度の、ＧＩＴＲ抗体ではなくＧＩＴＲＬを、然るべく活性化したＴ細胞集団と共にインキュベートした。続いてＧＩＴＲ抗体（４ｍＭの９Ｈ６、５Ｈ７、４１Ｇ５）を添加し、得られた混合物を４Ｃで３０分間インキュベートした。蛍光標識抗ヒトＦｃと共にインキュベートすることによって、結合したＧＩＴＲ抗体を検知した。結合はフローサイトメトリー分析によって測定した。図１Ｃ及び１Ｄは、２種の別個の細胞集団に関する、ＧＩＴＲＬ：ＧＩＴＲ抗体モル濃度比の関数としてのＭＦＩのプロットである。

【図１Ｃ】全体で、本明細書において提供されるものなどのＧＩＴＲ抗体が、２種の別個のＴ細胞亜集団、すなわち、ＣＤ４＋ＣＤ２５＋Ｔ細胞及びＣＤ８＋ＣＤ２５＋Ｔ細胞との結合に関して、ヒトＧＩＴＲＬと交差競合することを示す結合プロットである。特に、図１Ａ及び１Ｂにまとめた結果は、本明細書において提供されるものなどのＧＩＴＲ抗体が、ＧＩＴＲＬのこれらの２種のＴ細胞亜集団との結合を遮断することを示す。この部分の実験においては、然るべく活性化したＴ細胞集団を、種々のモル濃度のＧＩＴＲ抗体（９Ｈ６、５Ｈ７、４１Ｇ５）と共に１０分間インキュベートし、その後、４ｍＭのＨｉｓタグ付きヒトＧＩＴＲＬを添加し、この混合物を更に４℃で３０分間インキュベートした。次いで細胞を洗浄し、続いて結合したＧＩＴＲＬを検知するための蛍光タグ付き抗Ｈｉｓ抗体と共にインキュベートした。フローサイトメトリーにより、結合したＧＩＴＲＬのＭＦＩ（平均蛍光強度）を測定した。図１Ａ及び１Ｂは、２種の別個の細胞集団に関する、ＧＩＴＲ抗体：ＧＩＴＲＬモル濃度比の関数としてのＭＦＩのプロットである。図１Ｃ及び１Ｄは、逆実験の結果を示すプロットであり、ＧＩＴＲＬが抗ＧＩＴＲ抗体の２種のＴ細胞亜集団との結合を遮断することができることを示す。これらの試験においては、最初に種々の濃度の、ＧＩＴＲ抗体ではなくＧＩＴＲＬを、然るべく活性化したＴ細胞集団と共にインキュベートした。続いてＧＩＴＲ抗体（４ｍＭの９Ｈ６、５Ｈ７、４１Ｇ５）を添加し、得られた混合物を４Ｃで３０分間インキュベートした。蛍光標識抗ヒトＦｃと共にインキュベートすることによって、結合したＧＩＴＲ抗体を検知した。結合はフローサイトメトリー分析によって測定した。図１Ｃ及び１Ｄは、２種の別個の細胞集団に関する、ＧＩＴＲＬ：ＧＩＴＲ抗体モル濃度比の関数としてのＭＦＩのプロットである。

【図１Ｄ】全体で、本明細書において提供されるものなどのＧＩＴＲ抗体が、２種の別個のＴ細胞亜集団、すなわち、ＣＤ４＋ＣＤ２５＋Ｔ細胞及びＣＤ８＋ＣＤ２５＋Ｔ細胞との結合に関して、ヒトＧＩＴＲＬと交差競合することを示す結合プロットである。特に、図１Ａ及び１Ｂにまとめた結果は、本明細書において提供されるものなどのＧＩＴＲ抗体が、ＧＩＴＲＬのこれらの２種のＴ細胞亜集団との結合を遮断することを示す。この部分の実験においては、然るべく活性化したＴ細胞集団を、種々のモル濃度のＧＩＴＲ抗体（９Ｈ６、５Ｈ７、４１Ｇ５）と共に１０分間インキュベートし、その後、４ｍＭのＨｉｓタグ付きヒトＧＩＴＲＬを添加し、この混合物を更に４℃で３０分間インキュベートした。次いで細胞を洗浄し、続いて結合したＧＩＴＲＬを検知するための蛍光タグ付き抗Ｈｉｓ抗体と共にインキュベートした。フローサイトメトリーにより、結合したＧＩＴＲＬのＭＦＩ（平均蛍光強度）を測定した。図１Ａ及び１Ｂは、２種の別個の細胞集団に関する、ＧＩＴＲ抗体：ＧＩＴＲＬモル濃度比の関数としてのＭＦＩのプロットである。図１Ｃ及び１Ｄは、逆実験の結果を示すプロットであり、ＧＩＴＲＬが抗ＧＩＴＲ抗体の２種のＴ細胞亜集団との結合を遮断することができることを示す。これらの試験においては、最初に種々の濃度の、ＧＩＴＲ抗体ではなくＧＩＴＲＬを、然るべく活性化したＴ細胞集団と共にインキュベートした。続いてＧＩＴＲ抗体（４ｍＭの９Ｈ６、５Ｈ７、４１Ｇ５）を添加し、得られた混合物を４Ｃで３０分間インキュベートした。蛍光標識抗ヒトＦｃと共にインキュベートすることによって、結合したＧＩＴＲ抗体を検知した。結合はフローサイトメトリー分析によって測定した。図１Ｃ及び１Ｄは、２種の別個の細胞集団に関する、ＧＩＴＲＬ：ＧＩＴＲ抗体モル濃度比の関数としてのＭＦＩのプロットである。

【図２】本明細書に記載のものなどのＧＩＴＲ抗体が、制御性Ｔ細胞（Ｔｒｅｇ）による

エフェクタＴ細胞の抑制を低減できることを図解するグラフである。この実験においては、Ｔｒｅｇ細胞及びＴレスポンダを、等しい数のＴ細胞活性化ビーズと共に、及び種々の濃度の、代表的なＧＩＴＲ抗体で被覆したビーズと共に、５日間インキュベートした。培養の最後の１６時間の間に細胞を１μＣｉの３Ｈでパルスし、細胞を採取し、カウントを測定した。このプロットは、ＧＩＴＲ抗体被覆ビーズ：細胞比の関数としてのカウント数である。

【図３】本明細書に開示のもの（９Ｈ６ｖ３、５Ｈ７ｖ２、４１Ｇ５ｖ２）などの数種のＧＩＴＲ抗体が、ヒト化ＮＳＧマウスモデル（非担腫瘍）における循環制御性Ｔ細胞の数の減少を生じさせることを測定した実験の結果の概要を示す図である。この実験においては、ＮＳＧマウスにＣＤ３４＋胎性肝細胞を移植することによって、該マウスにヒトＣＤ４＋及びＣＤ８＋エフェクタＴ細胞並びに制御性Ｔ細胞の産生を誘発させた。２５ｍｇ／ｋｇのＧＩＴＲ抗体の単回腹腔内投与量をマウスに注射し、制御性Ｔ細胞マーカーＦｏｘＰ３を発現する循環ヒトＣＤ４＋Ｔ細胞のパーセンテージをフローサイトメトリーによって測定した。

【図４Ａ】２種の別個の形態のＦｃγ受容体（ＦｃγＲ）が、本明細書において提供されるものなどのＧＩＴＲ抗体のクラスタ形成を生じさせることができることを示すグラフである。図４Ａの結果は、増殖アッセイにおいて、ＦｃγＲＩＩａが、代表的なＧＩＴＲ抗体（５Ｈ７、９Ｈ６、７Ａ１０及び４１Ｇ５）をクラスタ形成させて、一次ヒトＴ細胞を活性化させることができることを示す。図４Ｂは、ＦｃγＲＩＩＩａが同様なクラスタ化活性を有することを示す。各実験において、種々の濃度のＧＩＴＲ抗体またはヒトＩｇＧ１アイソタイプコントロールを、Ｆｃγ受容体の１種を発現するように遺伝子操作した、一次ヒトＣＤ４＋Ｔ細胞及び２９３Ｔ細胞の共培養に添加した。少数のＣＤ３被覆したビーズを添加して、最適未満のＴＣＲ刺激を与えた。細胞を９６時間インキュベートし、培養の最後の１８時間の間に１μＣｉの３Ｈでパルスし、抗体によって誘発される細胞増殖の量を測定した。これらのグラフは、抗体濃度の関数としての３Ｈのカウントのプロットであり、１種３ウェルの平均値±標準偏差を表わし、５のヒトドナー由来の５つの実験を代表したものである。

【図４Ｂ】２種の別個の形態のＦｃγ受容体（ＦｃγＲ）が、本明細書において提供されるものなどのＧＩＴＲ抗体のクラスタ形成を生じさせることができることを示すグラフである。図４Ａの結果は、増殖アッセイにおいて、ＦｃγＲＩＩａが、代表的なＧＩＴＲ抗体（５Ｈ７、９Ｈ６、７Ａ１０及び４１Ｇ５）をクラスタ形成させて、一次ヒトＴ細胞を活性化させることができることを示す。図４Ｂは、ＦｃγＲＩＩＩａが同様なクラスタ化活性を有することを示す。各実験において、種々の濃度のＧＩＴＲ抗体またはヒトＩｇＧ１アイソタイプコントロールを、Ｆｃγ受容体の１種を発現するように遺伝子操作した、一次ヒトＣＤ４＋Ｔ細胞及び２９３Ｔ細胞の共培養に添加した。少数のＣＤ３被覆したビーズを添加して、最適未満のＴＣＲ刺激を与えた。細胞を９６時間インキュベートし、培養の最後の１８時間の間に１μＣｉの３Ｈでパルスし、抗体によって誘発される細胞増殖の量を測定した。これらのグラフは、抗体濃度の関数としての３Ｈのカウントのプロットであり、１種３ウェルの平均値±標準偏差を表わし、５のヒトドナー由来の５つの実験を代表したものである。

【図５Ａ】本明細書に開示のものなどの特定のＧＩＴＲ抗体が、４種の別個のヒトＴ細胞亜集団に、差示的に結合することを実証する実験の結果の概要を示す図である。特に、これらの結果は、本明細書に記載の３種の抗体（５Ｈ７、９Ｈ６及び４１Ｇ５）が、１）ＣＤ４＋ＣＤ２５＋Ｔ細胞と結合する一方でＣＤ４＋ＣＤ２５－Ｔ細胞とは結合しないこと（図５Ａ及び５Ｂ）、及び２）ＣＤ８＋ＣＤ２５＋Ｔ細胞と結合する一方でＣＤ８＋ＣＤ２５－Ｔ細胞とは結合しないこと（図５Ｃ及び５Ｄ）を示す。これらの結果は、別な公知のＧＩＴＲ抗体に対して得られた結果と対照をなし、該別なＧＩＴＲ抗体は、１）同様にＣＤ４＋ＣＤ２５＋Ｔ細胞と結合する一方でＣＤ４＋ＣＤ２５－Ｔ細胞とは結合しないが、２）５Ｈ７、９Ｈ６及び４１Ｇ５とは異なって、ＣＤ８＋ＣＤ２５＋Ｔ細胞及びＣＤ８＋ＣＤ２５－Ｔ細胞の両方と結合することができる。各グラフにおいて、平均蛍光強度（

ＭＦＩ）が抗体濃度（ｎＭ）に対してプロットされる。実験の詳細は実施例１２に記載される。

【図５Ｂ】本明細書に開示のものなどの特定のＧＩＴＲ抗体が、４種の別個のヒトＴ細胞亜集団に、差示的に結合することを実証する実験の結果の概要を示す図である。特に、これらの結果は、本明細書に記載の３種の抗体（５Ｈ７、９Ｈ６及び４１Ｇ５）が、１）ＣＤ４＋ＣＤ２５＋Ｔ細胞と結合する一方でＣＤ４＋ＣＤ２５－Ｔ細胞とは結合しないこと（図５Ａ及び５Ｂ）、及び２）ＣＤ８＋ＣＤ２５＋Ｔ細胞と結合する一方でＣＤ８＋ＣＤ２５－Ｔ細胞とは結合しないこと（図５Ｃ及び５Ｄ）を示す。これらの結果は、別な公知のＧＩＴＲ抗体に対して得られた結果と対照をなし、該別なＧＩＴＲ抗体は、１）同様にＣＤ４＋ＣＤ２５＋Ｔ細胞と結合する一方でＣＤ４＋ＣＤ２５－Ｔ細胞とは結合しないが、２）５Ｈ７、９Ｈ６及び４１Ｇ５とは異なって、ＣＤ８＋ＣＤ２５＋Ｔ細胞及びＣＤ８＋ＣＤ２５－Ｔ細胞の両方と結合することができる。各グラフにおいて、平均蛍光強度（ＭＦＩ）が抗体濃度（ｎＭ）に対してプロットされる。実験の詳細は実施例１２に記載される。

【図５Ｃ】本明細書に開示のものなどの特定のＧＩＴＲ抗体が、４種の別個のヒトＴ細胞亜集団に、差示的に結合することを実証する実験の結果の概要を示す図である。特に、これらの結果は、本明細書に記載の３種の抗体（５Ｈ７、９Ｈ６及び４１Ｇ５）が、１）ＣＤ４＋ＣＤ２５＋Ｔ細胞と結合する一方でＣＤ４＋ＣＤ２５－Ｔ細胞とは結合しないこと（図５Ａ及び５Ｂ）、及び２）ＣＤ８＋ＣＤ２５＋Ｔ細胞と結合する一方でＣＤ８＋ＣＤ２５－Ｔ細胞とは結合しないこと（図５Ｃ及び５Ｄ）を示す。これらの結果は、別な公知のＧＩＴＲ抗体に対して得られた結果と対照をなし、該別なＧＩＴＲ抗体は、１）同様にＣＤ４＋ＣＤ２５＋Ｔ細胞と結合する一方でＣＤ４＋ＣＤ２５－Ｔ細胞とは結合しないが、２）５Ｈ７、９Ｈ６及び４１Ｇ５とは異なって、ＣＤ８＋ＣＤ２５＋Ｔ細胞及びＣＤ８＋ＣＤ２５－Ｔ細胞の両方と結合することができる。各グラフにおいて、平均蛍光強度（ＭＦＩ）が抗体濃度（ｎＭ）に対してプロットされる。実験の詳細は実施例１２に記載される。

【図５Ｄ】本明細書に開示のものなどの特定のＧＩＴＲ抗体が、４種の別個のヒトＴ細胞亜集団に、差示的に結合することを実証する実験の結果の概要を示す図である。特に、これらの結果は、本明細書に記載の３種の抗体（５Ｈ７、９Ｈ６及び４１Ｇ５）が、１）ＣＤ４＋ＣＤ２５＋Ｔ細胞と結合する一方でＣＤ４＋ＣＤ２５－Ｔ細胞とは結合しないこと（図５Ａ及び５Ｂ）、及び２）ＣＤ８＋ＣＤ２５＋Ｔ細胞と結合する一方でＣＤ８＋ＣＤ２５－Ｔ細胞とは結合しないこと（図５Ｃ及び５Ｄ）を示す。これらの結果は、別な公知のＧＩＴＲ抗体に対して得られた結果と対照をなし、該別なＧＩＴＲ抗体は、１）同様にＣＤ４＋ＣＤ２５＋Ｔ細胞と結合する一方でＣＤ４＋ＣＤ２５－Ｔ細胞とは結合しないが、２）５Ｈ７、９Ｈ６及び４１Ｇ５とは異なって、ＣＤ８＋ＣＤ２５＋Ｔ細胞及びＣＤ８＋ＣＤ２５－Ｔ細胞の両方と結合することができる。各グラフにおいて、平均蛍光強度（ＭＦＩ）が抗体濃度（ｎＭ）に対してプロットされる。実験の詳細は実施例１２に記載される。

【図６】ＧＩＴＲ抗体ではなくＧＩＴＲＬを用いて実験が行われたこと以外は、図５Ａ～５Ｄに関して記載した実験と類似の実験の結果を示すグラフである。この結果は、ＧＩＴＲＬが、抗体５Ｈ７、９Ｈ６及び４１Ｇ５と同様に、１）ＣＤ４＋ＣＤ２５＋Ｔ細胞と結合する一方でＣＤ４＋ＣＤ２５－Ｔ細胞とは結合しないこと、及び２）ＣＤ８＋ＣＤ２５＋Ｔ細胞と結合する一方でＣＤ８＋ＣＤ２５－Ｔ細胞とは結合しないことを示す。従って、５Ｈ７、９Ｈ６及び４１Ｇ５について観測された結合の選択性は、天然のリガンドについて観測されたものと類似する。

【図７】本明細書において提供されるもの（９Ｈ６、５Ｈ７及び４１Ｇ５）などの抗体が、一次ヒトＣＤ４＋細胞中に内部移行することを示すプロットである。対照的に、別な公知の抗体は、有意に低位の内部移行を示す。この実験において、ＣＤ４＋細胞をウェル中に載置し、次いでＡｌｅｘａ－４８８またはＡｌｅｘａ－６４７で標識した抗体と共に３０分間インキュベートした。洗浄後に、細胞を３７℃、５％CO_2中で種々の時間インキ

ュベートし、その後、当該細胞を採取し、２のウェル中に均等に分割した。一方のウェルを０．２Ｍの酢酸を含有する溶液と共にインキュベートした一方、もう一方のウェルの細胞を完全培地中でインキュベートした。これらのインキュベーションに続いて、当該細胞を洗浄し、次いで、染色緩衝液中で３０分間、抗ヒトＣＤ２５　ＡＰＣまたは抗ヒトＣＤ２５　ＰＥのいずれかで染色した。細胞を洗浄し、２％のパラホルムアルデヒドで固定化し、次いでフローサイトメトリーによって分析した。

【図８Ａ】本明細書において提供される親抗体の軽鎖の可変ドメイン（ＶＬ）のアミノ酸配列のアラインメントを示す図である。ＣＤＲ（ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３）並びにフレームワーク領域（ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３及びＦＲ４）が示される。全配列は２の図にまたがり、ＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２及びＣＤＲ２が図８Ａ上に含まれ、ＦＲ３、ＣＤＲ３及びＦＲ４領域が図８Ｂ上に広がる。ＣＤＲはカバットにより規定される。アラインメントナンバリングがＡＨｏナンバリング変換に従って規定される場合、横線は単にナンバリングにおける違いを説明する（例えば、Ｈｏｎｅｇｇｅｒ，Ａ．及びＰｌｕｃｋｔｈｕｎ，Ａ．（２００１）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．３０９：６５７～６７０を参照のこと）。

【図８Ｂ】本明細書において提供される親抗体の軽鎖の可変ドメイン（ＶＬ）のアミノ酸配列のアラインメントを示す図である。ＣＤＲ（ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３）並びにフレームワーク領域（ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３及びＦＲ４）が示される。全配列は２の図にまたがり、ＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２及びＣＤＲ２が図８Ａ上に含まれ、ＦＲ３、ＣＤＲ３及びＦＲ４領域が図８Ｂ上に広がる。ＣＤＲはカバットにより規定される。アラインメントナンバリングがＡＨｏナンバリング変換に従って規定される場合、横線は単にナンバリングにおける違いを説明する（例えば、Ｈｏｎｅｇｇｅｒ，Ａ．及びＰｌｕｃｋｔｈｕｎ，Ａ．（２００１）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．３０９：６５７～６７０を参照のこと）。

【図９Ａ】本明細書において提供される親抗体の重鎖の可変ドメイン（ＶＨ）のアミノ酸配列のアラインメントを示す図である。ＣＤＲ（ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３）並びにフレームワーク領域（ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３及びＦＲ４）が示される。全配列は２の図にまたがり、ＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２及びＣＤＲ２が図９Ａ上に含まれ、ＦＲ３、ＣＤＲ３及びＦＲ４領域が図９Ｂ上に広がる。アラインメントナンバリングがＡＨｏナンバリング変換に従って規定される場合、横線は単にナンバリングにおける違いを説明する（例えば、Ｈｏｎｅｇｇｅｒ，Ａ．及びＰｌｕｃｋｔｈｕｎ，Ａ．（２００１）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．３０９：６５７～６７０を参照されたく、該文献はその全体が参照により本明細書に組み込まれる）。

【図９Ｂ】本明細書において提供される親抗体の重鎖の可変ドメイン（ＶＨ）のアミノ酸配列のアラインメントを示す図である。ＣＤＲ（ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３）並びにフレームワーク領域（ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３及びＦＲ４）が示される。全配列は２の図にまたがり、ＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２及びＣＤＲ２が図９Ａ上に含まれ、ＦＲ３、ＣＤＲ３及びＦＲ４領域が図９Ｂ上に広がる。アラインメントナンバリングがＡＨｏナンバリング変換に従って規定される場合、横線は単にナンバリングにおける違いを説明する（例えば、Ｈｏｎｅｇｇｅｒ，Ａ．及びＰｌｕｃｋｔｈｕｎ，Ａ．（２００１）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．３０９：６５７～６７０を参照されたく、該文献はその全体が参照により本明細書に組み込まれる）。

【図１０Ａ】本明細書において提供される遺伝子操作した抗体の軽鎖の可変ドメイン（ＶＬ）のアミノ酸配列のアラインメントを示す図である。ＣＤＲ（ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３）並びにフレームワーク領域（ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３及びＦＲ４）が示される。全配列は２の図にまたがり、ＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２及びＣＤＲ２が図１０Ａ上に含まれ、ＦＲ３、ＣＤＲ３及びＦＲ４領域が図１０Ｂ上に広がる。アラインメントナンバリングがＡＨｏナンバリング変換に従って規定される場合、横線は単にナンバリングにおける違いを説明する（例えば、Ｈｏｎｅｇｇｅｒ，Ａ．及びＰｌｕｃｋｔｈｕｎ，Ａ．（２００１）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．３０９：６５７～６７０を参照のこと）。

【図１０Ｂ】本明細書において提供される遺伝子操作した抗体の軽鎖の可変ドメイン（ＶＬ）のアミノ酸配列のアラインメントを示す図である。ＣＤＲ（ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３）並びにフレームワーク領域（ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３及びＦＲ４）が示される。全配列は２の図にまたがり、ＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２及びＣＤＲ２が図１０Ａ上に含まれ、ＦＲ３、ＣＤＲ３及びＦＲ４領域が図１０Ｂ上に広がる。アラインメントナンバリングがＡＨｏナンバリング変換に従って規定される場合、横線は単にナンバリングにおける違いを説明する（例えば、Ｈｏｎｅｇｇｅｒ，Ａ．及びＰｌｕｃｋｔｈｕｎ，Ａ．（２００１）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．３０９：６５７～６７０を参照のこと）。

【図１１Ａ】本明細書において提供される遺伝子操作した抗体の重鎖の可変ドメイン（ＶＨ）のアミノ酸配列のアラインメントを示す図である。ＣＤＲ（ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３）並びにフレームワーク領域（ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３及びＦＲ４）が示される。全配列は２の図にまたがり、ＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２及びＣＤＲ２が図１１Ａ上に含まれ、ＦＲ３、ＣＤＲ３及びＦＲ４領域が図１１Ｂ上に広がる。アラインメントナンバリングがＡＨｏナンバリング変換に従って規定される場合、横線は単にナンバリングにおける違いを説明する（例えば、Ｈｏｎｅｇｇｅｒ，Ａ．及びＰｌｕｃｋｔｈｕｎ，Ａ．（２００１）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．３０９：６５７～６７０を参照のこと）。

【図１１Ｂ】本明細書において提供される遺伝子操作した抗体の重鎖の可変ドメイン（ＶＨ）のアミノ酸配列のアラインメントを示す図である。ＣＤＲ（ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３）並びにフレームワーク領域（ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３及びＦＲ４）が示される。全配列は２の図にまたがり、ＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２及びＣＤＲ２が図１１Ａ上に含まれ、ＦＲ３、ＣＤＲ３及びＦＲ４領域が図１１Ｂ上に広がる。アラインメントナンバリングがＡＨｏナンバリング変換に従って規定される場合、横線は単にナンバリングにおける違いを説明する（例えば、Ｈｏｎｅｇｇｅｒ，Ａ．及びＰｌｕｃｋｔｈｕｎ，Ａ．（２００１）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．３０９：６５７～６７０を参照のこと）。

【図１２Ａ】ＧＩＴＲシグナル伝達の活性化におけるＧＩＴＲ抗体のグリコシル化の状態の重要性を示す図である。グリコシル化された天然のＩｇＧ１　ＧＩＴＲ抗体及び、ＦｃのＦｃγ受容体への結合にとって重要なＮ－結合型グリコシル化部位を除去する、２９７位におけるアスパラギンのグルタミンへのアミノ酸置換を有するように遺伝子操作したＩｇＧ１　ＧＩＴＲ抗体を用いて、試験を実施した。天然及び非グリコシル化変異体を、ＦｃγＲＩＩａまたはＦｃγＲＩＩＩａのいずれかによってもたらされるＧＩＴＲ抗体のクラスタ化に伴う、ＣＤ４＋Ｔ細胞の活性化を媒介するそれらの能力について試験した。図１２Ａ及び１２Ｂから判るように、ＦｃγＲＩＩａ（図１２Ａ）及びＦｃγＲＩＩＩａ（１２Ｂ）の両方が、天然のＩｇＧ１　ＧＩＴＲ抗体をクラスタ化し、エフェクタＴ細胞の増殖を活発化することができた。しかし、非グリコシル化抗体は、そのＦｃγＲに結合しＦｃγＲによってクラスタ化する能力の欠如に起因して、全く活性を示さなかった。

【図１２Ｂ】ＧＩＴＲシグナル伝達の活性化におけるＧＩＴＲ抗体のグリコシル化の状態の重要性を示す図である。グリコシル化された天然のＩｇＧ１　ＧＩＴＲ抗体及び、ＦｃのＦｃγ受容体への結合にとって重要なＮ－結合型グリコシル化部位を除去する、２９７位におけるアスパラギンのグルタミンへのアミノ酸置換を有するように遺伝子操作したＩｇＧ１　ＧＩＴＲ抗体を用いて、試験を実施した。天然及び非グリコシル化変異体を、ＦｃγＲＩＩａまたはＦｃγＲＩＩＩａのいずれかによってもたらされるＧＩＴＲ抗体のクラスタ化に伴う、ＣＤ４＋Ｔ細胞の活性化を媒介するそれらの能力について試験した。図１２Ａ及び１２Ｂから判るように、ＦｃγＲＩＩａ（図１２Ａ）及びＦｃγＲＩＩＩａ（１２Ｂ）の両方が、天然のＩｇＧ１　ＧＩＴＲ抗体をクラスタ化し、エフェクタＴ細胞の増殖を活発化することができた。しかし、非グリコシル化抗体は、そのＦｃγＲに結合しＦｃγＲによってクラスタ化する能力の欠如に起因して、全く活性を示さなかった。

【発明を実施するための形態】

【００５３】

本明細書で用いる節の見出しは構成上の目的のためのものに過ぎず、記載される主題を限定するものと解されるべきではない。

【００５４】
本明細書において別段に定義されない限りにおいて、本願との関係において用いられる科学用語及び技術用語は、当業者によって通常に理解される意味を有する。更に、文脈により特段の必要がない限りにおいて、単数形の用語は複数を包含し、複数形の用語は単数を包含するものとする。
【００５５】
概括的には、本明細書に記載される、細胞培養及び組織培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝子化学及びタンパク質化学及び核酸化学、及びハイブリッド化との関係において用いられる命名法、並びにそれらの技法は、本技術分野において周知の及び通常に用いられるものである。本願の方法及び技法は、別段の表示がない限りにおいて、概括的には、本技術分野において周知であり、本明細書全体を通して引用され検討される概括的な及びより詳細な参照文献に記載される、従来の方法に従って実施される。例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら、「分子クローニング：実験室便覧」（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ）第３版、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ、ニューヨーク州コールドスプリングハーバー（２００１）、Ａｕｓｕｂｅｌら、「分子生物学における最新のプロトコル」（Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ）Ｇｒｅｅｎｅ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ（１９９２）並びにＨａｒｌｏｗ及びＬａｎｅ、「抗体：実験室便覧」（Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ）Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ、ニューヨーク州コールドスプリングハーバー（１９９０）を参照されたく、文献は参照により本明細書に組み込まれる。酵素反応及び精製の技法は、製造者の仕様書に従って、本技術分野において通常実施されるようにして、または本明細書に記載するようにして実施される。本明細書に記載される、分析化学、合成有機化学、並びに医薬品化学及び薬化学との関係において用いられる用語、並びにこれらの実験室での手順及び技法は、本技術分野において周知且つ通常に用いられるものである。化学合成、化学分析、医薬の製剤、処方、及び送達、並びに患者の治療には、標準的な技法を用いることができる。
【００５６】
本発明は、本明細書に記載される特定の方法論、プロトコル、及び試剤などに限定されることはなく、従って変化し得ることが理解されるべきである。本明細書において用いられる用語は、特定の実施形態を記述することを目的とするに過ぎず、開示の範囲を限定することは意図されず、該範囲は特許請求の範囲によってのみ規定される。
【００５７】
実施例、または別段の表示がなされた場合以外において、本明細書で用いられる成分の量または反応条件を表現する全ての数字は、全ての例において用語「約」で修飾されたものとして理解されるべきである。パーセンテージに関係して用いられる場合の用語「約」とは、±１％を意味し得る。
【００５８】
本明細書の特定の段落によって規定された変化よりも、いずれかの面で範囲がより狭い全ての実施形態は、本開示に包含されると見なされるべきである。例えば、特定の態様が属として記載され、全ての属のメンバーは、個々に、実施形態とすることができると理解されるべきである。また、属または属のメンバーの選択として記載される態様は、当該属の２以上のメンバーの組み合わせを包含すると理解されるべきである。また、本明細書における様々な実施形態が、様々な状況下で、「含む」との語法を用いて示される一方、関連する例は、「からなる」または「から実質的になる」との語法を用いて記載することができることも理解されるべきである。
【００５９】
本願において「または」（“ｏｒ”）の使用は、別段の記載がない限りにおいて、「及び／または」を意味する。更に、用語「含む」（“ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ”）並びに「含む」（“ｉｎｃｌｕｄｅｓ”）及び「含まれる」（“ｉｎｃｌｕｄｅｄ”）などの他の形態

は限定されない。また、「要素」または「成分」などの用語は、特に別段の記載がない限りにおいて、１のユニットを含む要素または成分、並びに複数のサブユニットを含む要素または成分の両方を包含する。

【００６０】

Ｉ.定義

本明細書において用いられる用語「ＧＩＴＲ」とは、本技術分野においてＴＮＦ受容体スーパーファミリー１８（ＴＮＦＲＳＦ１８）とも呼ばれる、「グルココルチコイド誘導性ＴＮＦＲ関連遺伝子」をいう。ヒト及びマウスの形態のＧＩＴＲに対するアミノ酸及び核酸配列がＷＯ９８／０６８４２に記載され、これは参照により本明細書に組み込まれる。ジェンバンクへの寄託Ｑ９Ｙ５Ｕ５（ヒトアミノ酸配列）及びＡＦ１０９２１６（マウス核酸及びアミノ酸配列）も参照されたい。成熟したヒトＧＩＴＲポリペプチドの具体的な１例は、配列番号１に示される。カニクイザル由来の代表的な成熟したＧＩＴＲタンパク質は、配列番号２に示されるアミノ酸配列を有する。マウス由来の成熟したＧＩＴＲのアミノ酸配列が配列番号３に示される。本明細書において用いられる用語ＧＩＴＲは、天然に存在する対立遺伝子も包含する。

【００６１】

本明細書において用いられる用語「ＧＩＴＲＬ」とは、天然に存在するＧＩＴＲに対するリガンドをいう。ＧＩＴＲＬポリペプチドに関するアミノ酸配列が、ジェンバンク寄託ＡＡＱ８９２２７に示される。ヒトＧＩＴＲＬに対する代表的なアミノ酸配列は、配列番号４に示される。

【００６２】

本明細書において用いられる「抗原結合タンパク質」とは、ＧＩＴＲポリペプチド（例えば、配列番号１に示されるようなヒトＧＩＴＲポリペプチド）などの、特定された標的抗原と特異的に結合する任意のタンパク質を意味する。当該用語は、少なくとも１の抗体結合領域を含むポリペプチドを包含する。該用語はまた、少なくとも２の完全長重鎖及び２の完全長軽鎖を含むインタクトなポリペプチド、並びにそれらの誘導体、変異体、フラグメント、及び突然変異体を包含し、それらの例としては、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆｖフラグメントが挙げられる。抗原結合タンパク質としてはまた、ナノボディーなどのドメイン抗体及び以下に更に説明する一本鎖抗体、並びに二特異性抗体も挙げられる。該用語はＧＩＴＲＬを含まない。

【００６３】

一般的に、ＧＩＴＲ抗原結合タンパク質は、当該抗原結合タンパク質が非ＧＩＴＲ分子に対して実質的に自然に存在する程度の結合を示す場合に、その標的ＧＩＴＲ抗原と「特異的に結合する」といわれる。但し、ＧＩＴＲと特異的に結合する抗原結合タンパク質は、異なる種由来のＧＩＴＲポリペプチドと交差反応する場合がある。一般的に、ＧＩＴＲ抗原結合タンパク質は、解離定数（K_D）が、表面プラズマ共鳴技法（例えば、ＢＩＡＣｏｒｅ、ＧＥ－ヘルスケア社、スウェーデン国ウプサラ）によって測定して10^{-7}Ｍ以下である場合には、ヒトＧＩＴＲと特異的に結合する。ＧＩＴＲ抗原結合タンパク質は、ここでもＢＩＡＣｏｒｅなどの方法を用いて測定して、K_Dが5×10^{-8}Ｍ以下である場合には「高い親和性」をもって、K_Dが5×10^{-9}Ｍ以下である場合には、「非常に高い親和性」をもって、ヒトＧＩＴＲと特異的に結合する。

【００６４】

「抗原結合領域」とは、抗体またはそのフラグメント、誘導体、若しくは変異体などの、特定された抗原と特異的に結合するタンパク質の一部を意味する。例えば、抗原と相互作用し、当該抗原結合タンパク質に、その当該抗原に対する特異性及び親和性を付与するアミノ酸残基を含む抗原結合タンパク質の当該一部が、「抗原結合領域」と称される。抗原結合領域は、１または複数の「相補性決定領域」（「ＣＤＲ」）を含むことができる。特定の抗原結合領域はまた、１または複数の「フレームワーク」領域も含む。「ＣＤＲ」は、抗原結合特異性及び親和性に寄与するアミノ酸配列である。「フレームワーク」領域は、抗原結合タンパク質の特異的結合に直接寄与することもできるが、一般的には、当該

ＣＤＲの適正な立体構造を維持することを助けて、当該抗原結合領域と抗原との間の結合を促進する。

【００６５】

組換えＧＩＴＲ抗原結合タンパク質を始めとする「組換えタンパク質」とは、組換え技法を用いて、すなわち、本明細書に記載の組換え核酸の発現を通じてつくられるタンパク質である。組換えタンパク質の産生方法及び技法は、本技術分野において周知である。

【００６６】

用語「抗体」とは、任意のアイソタイプのインタクトな免疫グロブリン、または標的抗原に対する特異的結合に関して、インタクトな抗体と競合可能な免疫グロブリンのフラグメントをいい、例えば、キメラ抗体、ヒト化抗体、完全ヒト抗体、及び二特異性抗体が挙げられる。「抗体」はそれ自体、抗原結合タンパク質の一種である。いくつかの実施形態において、インタクトな抗体は、少なくとも２の完全長重鎖及び２の完全長軽鎖を含む。他の実施形態において、インタクトな抗体は、重鎖のみを含む場合があるラクダ類における天然に存在する抗体などの、より少ない連鎖を含む。抗体は単独で単一の出所に由来してもよく、またはキメラであっても、すなわち、当該抗体の別個の一部が、以下に更に記載される２の別個の抗体に由来してもよい。抗原結合タンパク質、抗体、または結合フラグメントは、ハイブリドーマ中で、組換えＤＮＡ技法により、またはインタクトな抗体の酵素的若しくは化学的開裂によって産生することができる。別段の表示がない限りにおいて、用語「抗体」としては、２の完全長重鎖及び２の完全長軽鎖を含む抗体に加えて、それらの誘導体、変異体、フラグメント、及び突然変異体を包含し、それらの例としては、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆｖフラグメント、ナノボディー（登録商標）などのドメイン抗体及び以下により詳細に説明する一本鎖抗体が挙げられる。

【００６７】

抗原結合タンパク質、抗体またはそのフラグメントに関して用いられる用語「軽鎖」は、完全長軽鎖及び結合特異性を付与するために十分な可変領域配列を有するそのフラグメントを包含する。完全長軽鎖は、可変領域ドメイン$Ｖ_L$、及び定常領域ドメイン$Ｃ_L$を含む。軽鎖の可変領域ドメインはポリペプチドのアミノ末端にある。軽鎖はκ連鎖及びλ連鎖を含む。

【００６８】

抗原結合タンパク質、抗体またはそのフラグメントに関して用いられる用語「重鎖」は、完全長重鎖及び結合特異性を付与するために十分な可変領域配列を有するそのフラグメントを包含する。完全長重鎖は、可変領域ドメイン$Ｖ_H$、及び３の定常領域ドメイン$Ｃ_H$１、$Ｃ_H$２、及び$Ｃ_H$３を含む。$Ｖ_H$ドメインはポリペプチドのアミノ末端にあり、$Ｃ_H$ドメインはカルボキシル末端にあり、$Ｃ_H$３はポリペプチドのカルボキシ末端に最も近い。重鎖は、（ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３及びＩｇＧ４サブタイプを含む）ＩｇＧ、（ＩｇＡ１及びＩｇＡ２サブタイプを含む）ＩｇＡ、ＩｇＭ及びＩｇＥを含む。

【００６９】

本明細書において用いられる用語、抗体または免疫グロブリン鎖（重鎖または軽鎖）の「免疫学的に機能性のフラグメント」（または、単に「フラグメント」）とは、完全長鎖中に存在するアミノ酸の少なくともいくつかが存在しないが、抗原に対して特異的に結合する能力を有する抗体の一部（当該一部が如何にして得られたかまたは合成されたかに拘わらず）を含む抗原結合タンパク質である。かかるフラグメントは、それらが標的抗原に対して特異的に結合する、及び所与のエピトープに対する特異的結合に関して、インタクトな抗体を始めとする他の抗原結合タンパク質と競合することが可能であるとの点において、生物学的に活性である。一態様において、かかるフラグメントは、少なくとも１の、完全長の軽鎖または重鎖中に存在するＣＤＲを保持することとなり、いくつかの実施形態において、単一の重鎖及び／若しくは軽鎖またはそれらの一部を含むこととなる。これらの生物学的に活性なフラグメントは、組換えＤＮＡ技法によって産生することができ、またはインタクトな抗体を始めとする抗原結合タンパク質の酵素的または化学的開裂によって産生することができる。免疫学的に機能性の免疫グロブリンフラグメントとしては、Ｆ

ａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆｖ、ドメイン抗体及び一本鎖抗体が挙げられるがこれらに限定されず、ヒト、マウス、ラット、ラクダ類またはウサギを始めとする、但しこれらに限定されない、哺乳類源由来であることができる。本明細書に開示される抗原結合タンパク質の機能性部分、例えば、１種又は複数種のＣＤＲは、第２のタンパク質または低分子に共有結合し、二官能性の治療特性を有する、または長い血清半減期を有する、体内の特定の標的を対象とする治療薬を創生することができることが、更に企図される。

【００７０】

「Ｆａｂフラグメント」は、１の軽鎖並びに１の重鎖のＣ$_H$１及び可変領域から構成される。Ｆａｂ分子の重鎖は別な重鎖分子とジスルフィド結合を形成できない。

【００７１】

「Ｆｃ」領域は、抗体のＣ$_H$２及びＣ$_H$３ドメインを含む２の重鎖フラグメントを含む。２の重鎖フラグメントは、２以上のジスルフィド結合によって、及びＣ$_H$３ドメインの疎水性相互作用によって一体化されている。

【００７２】

「Ｆａｂ’フラグメント」は、１の軽鎖並びに、２のＦａｂ’フラグメントの２の重鎖間に連鎖間ジスルフィド結合を形成し、Ｆ（ａｂ’）$_2$分子を形成することができるような、Ｖ$_H$ドメイン及びＣ$_H$１ドメイン並びにＣ$_H$１ドメインとＣ$_H$２ドメインとの間の領域も含む１の重鎖の一部を含む。

【００７３】

「Ｆ（ａｂ’）$_2$フラグメント」は、２の軽鎖並びに、Ｃ$_H$１ドメインとＣ$_H$２ドメインとの間の定常領域の一部を含む２の重鎖であって、該２の重鎖間に連鎖間ジスルフィド結合が形成されるような２の重鎖を含む。従って、Ｆ（ａｂ’）$_2$フラグメントは、当該２の重鎖間のジスルフィド結合によって一体化された２のＦａｂ’フラグメントから構成される。

【００７４】

「Ｆｖ領域」は、重鎖及び軽鎖の両方に由来する可変領域を含むが、定常領域は含まない。

【００７５】

「一本鎖抗体」とは、重鎖及び軽鎖の可変領域が柔軟な結合子によって結合され、単一のポリペプチド鎖を形成するＦｖ分子であり、該ポリペプチド鎖は抗原結合領域を形成する。一本鎖抗体は、国際特許出願公開第ＷＯ８８／０１６４９及び米国特許第４，９４６，７７８号及び第５，２６０，２０３号において詳細に検討されている。

【００７６】

「ドメイン抗体」とは、重鎖の可変領域または軽鎖の可変領域のみを含む免疫学的に機能性の免疫グロブリンフラグメントである。ドメイン抗体の例としては、ナノボディー（登録商標）が挙げられる。いくつかの例において、２以上のＶ$_H$領域がペプチド結合子と共有結合し、二価ドメイン抗体を創生する。二価ドメイン抗体の２のＶ$_H$領域は、同一または別個の抗原を標的とし得る。

【００７７】

「二価抗原結合タンパク質」、「二価抗体」または「二特異性抗体」は、２の抗原結合領域を含む。いくつかの例において、２の結合領域は同一の抗原特異性を有する。二価抗原結合タンパク質及び二価抗体は二特異性であってもよい。

【００７８】

「多重特異性抗原結合タンパク質」または「多重特異性抗体」とは、複数の抗原またはエピトープを標的とする抗原結合タンパク質または抗体である。

【００７９】

「二特異性」、「二重特異性」若しくは「二官能性」抗原結合タンパク質または抗体とは、２の別個の抗原結合部位を有する、それぞれハイブリッド抗原結合タンパク質または抗体である。二特異性抗原結合タンパク質及び抗体は、多重特異性抗原結合タンパク質または多重特異性抗体の一種であり、ハイブリドーマの融合またはＦａｂ’フラグメントの

結合を始めとする、但しこれらには限定されない、種々の方法によって産生することができる。例えば、Ｓｏｎｇｓｉｖｉｌａｉ及びＬａｃｈｍａｎｎ、１９９０、Ｃｌｉｎ．Ｅｘｐ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．７９：３１５～３２１、Ｋｏｓｔｅｌｎｙら、１９９２、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４８：１５４７～１５５３を参照されたい。二特異性抗原結合タンパク質または抗体の２の結合部位は、２の別個のエピトープに結合することとなり、該エピトープは同一または別個のタンパク質標的上に存在し得る。

【００８０】

用語「競合する」とは、同一のエピトープに対して競合する抗原結合タンパク質（例えば、抗体）の文脈において用いられる場合、抗原結合タンパク質間の競合を意味し、当該抗原結合タンパク質（例えば、抗体若しくはその免疫学的に機能性のフラグメント）が、試験下で、共通の抗原（例えば、ＧＩＴＲ若しくはそのフラグメント）に対する基準となる抗原結合タンパク質の特異的結合を妨げるまたは阻害するアッセイによって測定される。例えば、固相直接または間接放射免疫アッセイ（ＲＩＡ）、固相直接または間接酵素免疫アッセイ（ＥＩＡ）、サンドウィッチ競合アッセイ（例えば、Ｓｔａｈｌｉら、１９８３、Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ ９：２４２～２５３を参照のこと。）；固相直接ビオチン－アビジンＥＩＡ（例えば、Ｋｉｒｋｌａｎｄら、１９８６、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３７：３６１４～３６１９を参照のこと。）；固相直接標識アッセイ、固相直接標識サンドウィッチアッセイ（例えば、Ｈａｒｌｏｗ及びＬａｎｅ、１９８８、「抗体、実験室便覧」（Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ、Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ）、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓを参照のこと。）；Ｉ－１２５標識を用いる固相直接標識ＲＩＡ（例えば、Ｍｏｒｅｌら、１９８８、Ｍｏｌｅｃ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２５：７～１５を参照のこと。）；固相直接ビオチン－アビジンＥＩＡ（例えば、Ｃｈｅｕｎｇら、１９９０、Ｖｉｒｏｌｏｇｙ １７６：５４６～５５２を参照のこと。）；及び直接標識ＲＩＡ（例えば、Ｍｏｌｄｅｎｈａｕｅｒら、１９９０、Ｓｃａｎｄ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．３２：７７～８２を参照のこと。）などの多種の競合結合アッセイを用いることができる。一般的には、かかるアッセイは、固体表面に結合された精製抗原または当該抗原を発現する細胞、非標識被験抗原結合タンパク質及び標識基準抗原結合タンパク質の使用を含む。被験抗原結合タンパク質の存在下で、固体表面または細胞に結合した標識の量を測定することにより、競合的阻害が測定される。通常、被験抗原結合タンパク質を過剰に存在させる。競合アッセイによって識別される抗原結合タンパク質（競合抗原結合タンパク質）としては、基準抗原結合タンパク質と同一のエピトープに結合する抗原結合タンパク質、及び、生じる立体障害のために、基準抗原結合タンパク質が結合したエピトープに十分に近位の隣接するエピトープに結合する抗原結合タンパク質が挙げられる。競合的結合の測定方法に関する更なる詳細は、本明細書中の実施例に示される。例えば、一実施形態において、ＢｉａＣｏｒｅアッセイによって競合が測定される。通常、競合する抗原結合タンパク質が過剰に存在する場合、該抗原結合タンパク質は基準抗原結合タンパク質の共通の抗原に対する特異的結合を、少なくとも２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％または７５％阻害することとなる。いくつかの例において、結合は、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、または９７％若しくはそれ以上阻害される。

【００８１】

用語「抗原」とは、（例えば、抗体を始めとする）抗原結合タンパク質などの、選択的な結合剤が結合することができる、更に、当該抗原に結合する能力を有する抗体を産生するために、動物において用いることができる分子または分子の一部をいう。抗原は、別個の抗原結合タンパク質、例えば、抗体と相互作用する能力を有する１または複数のエピトープを有していてもよい。

【００８２】

用語「エピトープ」とは、抗原結合タンパク質（例えば、抗体）が結合する分子の一部である。この用語は、抗体などの抗原結合タンパク質に特異的に結合する能力を有する任意の決定基を包含する。エピトープは、連続的または非連続的（不連続）であることがで

きる（例えば、ポリペプチドにおいて、ポリペプチド配列中で互いに隣接していないが、分子の文脈内においては抗原結合タンパク質が結合するアミノ酸残基）。立体配座エピトープとは、活性なタンパク質の立体配座中には存在するが、変性したタンパク質中には存在しないエピトープである。特定の実施形態において、エピトープは、当該エピトープが、抗原結合タンパク質を産生するために用いられるエピトープに類似する三次元構造を含む、更に、抗原結合タンパク質を産生するために用いられる当該エピトープ中に存在するアミノ酸残基を含まない、またはその一部のみを含むとの点において、擬態性である場合がある。殆どの場合、エピトープはタンパク質上に存在するが、いくつかの例においては、核酸などの他の種類の分子上に存在する場合もある。エピトープ決定基としては、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリルまたはスルホニル基などの、分子の化学的に活性な表面団を挙げることができ、特異的な三次元の構造的特徴、及び／または特異的な電荷特性を有する場合がある。一般的に、特定の標的抗原に対する特異性抗原結合タンパク質は、複雑なタンパク質及び／または高分子の混合物中の標的抗原上のエピトープを優先的に認識することとなる。

【００８３】

「アミノ酸」は、本技術分野におけるその通常の意味を包含する。２０種の天然に存在するアミノ酸及びそれらの略記は従来の用い方に従う。「免疫学－合成」（Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ－Ａ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ）、第２版、（Ｅ．Ｓ．Ｇｏｌｕｂ及びＤ．Ｒ．Ｇｒｅｅｎ編）Ｓｉｎａｕｅｒ　Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ：マサチューセッツ州サンダーランド（１９９１）を参照されたく、該文献はいずれの目的に対しても、参照により本明細書に組み込まれる。２０種の従来のアミノ酸、［α］－、［α］－二置換アミノ酸、Ｎ－アルキルアミノ酸、及び他の非従来型のアミノ酸などの非天然アミノ酸の立体異性体(例えば、Ｄ－アミノ酸)もまた、ポリペプチドの好適な成分となり得、語句「アミノ酸」に包含される。非従来型のアミノ酸の例としては、４－ヒドロキシプロリン、［γ］－カルボキシグルタメート、［ε］－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチルリシン、［ε］－Ｎ－アセチルリシン、Ｏ－ホスホセリン、Ｎ－アセチルセリン、Ｎ－ホルミルメチオニン、３－メチルヒスチジン、５－ヒドロキシリシン、［σ］－Ｎ－メチルアルギニン、並びに他の類似のアミノ酸及びイミノ酸（例えば、４－ヒドロキシプロリン）が挙げられる。本明細書において用いられるポリペプチドの表記法においては、標準的な用い方及び慣習に従って、左側方向がアミノ末端方向であり、右側方向がカルボキシル方向である。

【００８４】

用語「ポリペプチド」及び「タンパク質」は、本明細書において同義で用いられ、アミノ酸残基のポリマーをいう。該用語はまた、天然に存在するアミノ酸ポリマーに対してのみならず、１または複数のアミノ酸残基が、対応する天然に存在するアミノ酸の類似物または模倣物であるアミノ酸ポリマーにも適用される。該用語はまた、例えば、糖残基の付加によって糖タンパク質を形成するなどの修飾を受けた、またはリン酸化されたアミノ酸ポリマーも包含し得る。ポリペプチド及びタンパク質は、天然に存在する非組換え細胞によって、または遺伝子操作した、すなわち組換えた細胞によって産生することができ、天然タンパク質のアミノ酸配列を有する分子、あるいは、天然配列の１若しくは複数のアミノ酸からの欠失、該アミノ酸への付加、及び／または該アミノ酸の置換を有する分子を含むことができる。用語「ポリペプチド」及び「タンパク質」は、詳細には、抗原結合タンパク質の１若しくは複数のアミノ酸からの欠失、該アミノ酸への付加、及び／または該アミノ酸の置換を有するＧＩＴＲ抗原結合タンパク質、抗体、または配列を包含する。用語「ポリペプチドフラグメント」とは、完全長タンパク質と比較して、アミノ末端の欠失、カルボキシル末端の欠失、及び／または内部の欠失を有するポリペプチドをいう。かかるフラグメントはまた、完全長タンパク質との対比で、修飾アミノ酸を含むこともできる。特定の実施形態において、フラグメントは約から５００のアミノ酸長である。例えば、フラグメントは、少なくとも５、６、８、１０、１４、２０、５０、７０、１００、１１０、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００または４５０のアミノ酸長であってもよい。有用なポリペプチドフラグメントとしては、結合ドメインを始めとする、抗体の

免疫学的に機能性のフラグメントが挙げられる。ＧＩＴＲ抗体の場合は、有用なフラグメントとしては、ＣＤＲ領域、重鎖または軽鎖の可変ドメイン、抗体鎖の一部または２のＣＤＲを始めとするその可変領域のみなどが挙げられるが、これらには限定されない。

【００８５】

用語「単離されたタンパク質」とは、主題のタンパク質が、（１）通常当該タンパク質と共に存在する少なくともいくつかの他のタンパク質を含まない、（２）同一の出所由来の、例えば、同一の種由来の他のタンパク質を実質的に含まない、（３）別個の種由来の細胞によって発現される、（４）天然において当該タンパク質に連結する、ポリヌクレオチド、脂質、炭水化物、若しくはその他の物質の少なくとも約５０パーセントから分離されている、（５）天然において当該タンパク質に連結することのないポリペプチドと、（共有結合若しくは非共有結合での相互作用によって）作動可能に連結している、または（６）天然に存在しないことを意味する。一般的に、「単離されたタンパク質」は、所与の試料の少なくとも約５％、少なくとも約１０％、少なくとも約２５％、または少なくとも約５０％を構成する。ゲノムＤＮＡ、ｃＤＮＡ、ｍＲＮＡ若しくは合成に由来する他のＲＮＡ、またはそれらの任意の組み合わせが、かかる単離されたタンパク質をコードし得る。単離されたタンパク質は、単離されたタンパク質の治療上の、診断上の、予防上の、研究のまたはその他の使用を妨害する、単離されたタンパク質の天然の環境において存在する、タンパク質若しくはポリペプチドまたはその他の混入物を実質的に含まないことが好ましい。

【００８６】

ポリペプチド（例えば、抗体などの抗原結合タンパク質）の「変異体」は、１または複数のアミノ酸残基が、別のポリペプチド配列に関係するアミノ酸配列中に挿入された、該配列から削除された及び／または該配列中に置換されたアミノ酸配列を含む。変異体は融合タンパク質を包含する。

【００８７】

ポリペプチドの「誘導体」とは、例えば、別な化学成分への抱合によるなどの、挿入、欠失、または置換変異体とは異なる何らかの様式によって化学修飾されたポリペプチド（例えば、抗体などの抗原結合タンパク質）である。

【００８８】

本明細書全体を通して、ポリペプチド、核酸、宿主細胞などの生物学的物質との関係において用いられる用語「天然に存在する」とは、天然に見られる物質をいう。

【００８９】

用語「ポリヌクレオチド」または「核酸」は、一本鎖及び二本鎖ヌクレオチドポリマーの両方を包含する。ポリヌクレオチドを含むヌクレオチドは、リボヌクレオチド若しくはデオキシリボヌクレオチドまたはいずれかのタイプのヌクレオチドの修飾した形態であることができる。修飾としては、ブロモウリジン及びイノシン誘導体などの塩基の修飾、２’，３’－ジデオキシリボースなどのリボースの修飾、及びチオリン酸エステル、ジチオリン酸エステル、セレノリン酸エステル、ジセレノリン酸エステル、ｐｈｏｓｐｈｏｒｏａｎｉｌｏｔｈｉｏａｔｅ、ｐｈｏｓｈｏｒａｎｉｌａｄａｔｅ及びｐｈｏｓｐｈｏｒｏａｍｉｄａｔｅなどのヌクレオチド間結合の修飾が挙げられる。

【００９０】

用語「オリゴヌクレオチド」とは、２００以下のヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを意味する。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、長さが１０から６０塩基である。他の実施形態において、オリゴヌクレオチドは、長さが１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０から４０ヌクレオチドである。オリゴヌクレオチドは、例えば、突然変異遺伝子の構築に用いるための一本鎖または二本鎖であることができる。オリゴヌクレオチドは、センスまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドであることができる。オリゴヌクレオチドは、アッセイにおける検知のための、放射標識、蛍光標識、ハプテン性または抗原性標識を始めとする標識を含むことができる。オリゴヌクレオチドは、例えば、ＰＣＲプライマ、クローニングプライマまたはハイブリダイゼーショ

ンプローブとして用いることができる。

【００９１】

「単離された核酸分子」とは、天然においては当該単離されたポリヌクレオチドがその中に存在するポリヌクレオチドの全て若しくは一部が同伴していない、または、天然においては当該単離されたポリヌクレオチドが結合していないポリヌクレオチドと結合した、ゲノムのｍＲＮＡ、ｃＤＮＡ、または合成由来のＤＮＡ若しくはＲＮＡあるいはそれらのいくつかの組み合わせを意味する。本開示の目的のために、特定のヌクレオチド配列を「含む核酸分子」とは、インタクトな染色体を包含しないことが理解される必要がある。指定された核酸配列を「含む」単離された核酸分子は、当該指定された配列に加えて、１０に及ぶ、または２０にすら及ぶ他のタンパク質またはそれらの一部に対するコード配列を含む場合があり、あるいは、列挙した核酸配列のコード領域の発現を制御する、作動可能に結合した制御配列を含む場合があり、及び／またはベクター配列を含む場合がある。

【００９２】

別段に明示されない限りにおいて、本明細書において議論される任意の一本鎖ポリヌクレオチド配列の左側末端は５’末端であり、二本鎖ポリヌクレオチド配列の左側方向は５’方向と称される。新生ＲＮＡ転写物の５’から３’への付加の方向は転写方向と称され、５’からＲＮＡ転写物の５’末端へのＲＮＡ転写物と同様の配列を有するＤＮＡ鎖上の配列領域は、「上流配列」と称され、３’からＲＮＡ転写物の３’末端へのＲＮＡ転写物と同様の配列を有するＤＮＡ鎖上の配列領域は、「下流配列」と称される。

【００９３】

用語「制御配列」とは、該制御配列が連結するコード配列の発現及び処理に影響を与えることができるポリヌクレオチド配列をいう。かかる制御配列の性質は宿主生物に依存し得る。特定の実施形態において、原核生物に関する制御配列は、プロモータ、リボソーム結合部位、及び転写終止配列を含み得る。例えば、原核生物に関する制御配列は、１または複数の転写因子に対する認識部位、転写エンハンサ配列、及び転写終止配列を含み得る。「制御配列」はリーダー配列及び／または融合パートナー配列を含むことができる。

【００９４】

用語「ベクター」とは、宿主細胞中にタンパク質コード情報を移入するために用いられる任意の分子又は実体（例えば、核酸、プラスミド、バクテリオファージまたはウィルス）を意味する。

【００９５】

用語「発現ベクター」または「発現構築物」とは、宿主細胞の形質転換に好適であり、核酸配列であって、該配列に作動的に結合した１または複数の異種コード領域の発現を（宿主細胞と協同して）指示及び／または制御する核酸配列を含むベクターをいう。発現構築物としては、転写、翻訳に影響を与えるまたはこれらを制御する配列であって、イントロンが存在する場合には、該配列に作動可能に結合したコード領域のＲＮＡスプライシングに影響を与える配列を挙げることができるが、これらに限定されない。

【００９６】

本明細書において用いられる「作動可能に結合した」とは、該用語が適用される要素が、適宜の条件下で、要素がそれらの本来の機能を行使することを可能にする関係にあることを意味する。例えば、ベクター中の、タンパク質コード配列に「作動可能に結合した」制御配列は、当該制御配列の転写活性に対応した条件下で、タンパク質コード配列の発現が達成されるように、該タンパク質コード配列に連結している。

【００９７】

用語「宿主細胞」とは、核酸配列を用いて形質転換され、それによって対象とする遺伝子を発現する細胞を意味する。該用語は、当該親細胞の後代が、形態学または遺伝子構成において初代の親細胞と同一であっても同一でなくとも、対象とする遺伝子が存在する限りにおいて、当該後代を包含する。

【００９８】

用語「同一性」とは、２以上のポリペプチド分子または２以上の核酸分子の配列間の関

係であって、当該配列についてアラインメントを行い、比較することによって求められる関係をいう。「パーセント記の同一性」とは、比較する分子中のアミノ酸またはヌクレオチド間の同一の残基のパーセンテージを意味し、比較する分子の中の最小の大きさに基づいて算出される。これらの計算については、配列中のギャップ（もしあれば）は、特定の数学モデルまたはコンピュータプログラム（すなわち、「アルゴリズム」）で対処しなければならない。アラインメントを行った核酸またはポリペプチドの同一性を算出するために用いることができる方法としては、計算分子生物学（Ｃｏｍｐｕｔａｔｉｏｎａｌ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ）、（Ｌｅｓｋ，Ａ．Ｍ．編）、１９８８、ニューヨーク：Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ；バイオコンピューティング情報科学及びゲノムプロジェクト（Ｂｉｏｃｏｍｐｕｔｉｎｇ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ ａｎｄ Ｇｅｎｏｍｅ Ｐｒｏｊｅｃｔｓ）、（Ｓｍｉｔｈ，Ｄ．Ｗ．編），１９９３、ニューヨーク：Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ；配列データのコンピュータ解析、第１部（Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ａｎａｌｙｓｉｓ ｏｆ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ｄａｔａ，Ｐａｒｔ Ｉ）（Ｇｒｉｆｆｉｎ，Ａ．Ｍ．及びＧｒｉｆｆｉｎ，Ｈ．Ｇ．編）、１９９４、ニュージャージー：Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ；ｖｏｎ Ｈｅｉｎｊｅ，Ｇ．、１９８７、分子生物学における配列解析（Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ）、ニューヨーク：Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ；配列解析プライマ（Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ Ｐｒｉｍｅｒ）、（Ｇｒｉｂｓｋｏｖ，Ｍ．及びＤｅｖｅｒｅｕｘ，Ｊ．編）、１９９１、ニューヨーク：Ｍ．Ｓｔｏｃｋｔｏｎ Ｐｒｅｓｓ；並びにＣａｒｉｌｌｏら、１９８８、ＳＩＡＭ Ｊ．Ａｐｐｌｉｅｄ Ｍａｔｈ．４８：１０７３に記載のものが挙げられる。

【００９９】

パーセント記の同一性の算出において、比較する配列を、当該配列間で最大の一致を与える方法でアラインメントを行う。パーセント記の同一性を求めるために用いられるコンピュータプログラムはＧＣＧプログラムパッケージであり、これはＧＡＰ（Ｄｅｖｅｒｅｕｘら、１９８４、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄ Ｒｅｓ．１２：３８７；ウィスコンシン大学遺伝学コンピュータグループ、ウィスコンシン州マディソン）を含む。パーセント記の同一性を求めることとなる対象である２のポリペプチドまたはポリヌクレオチドについてアラインメントを行うために、コンピュータアルゴリズムＧＡＰを用いる。配列について、それらのそれぞれのアミノ酸またはヌクレオチドの最適な一致（アルゴリズムによって求められる「一致スパン」（“ｍａｔｃｈｅｄ ｓｐａｎ”））となるようにアラインメントを行う。ギャップオープニングペナルティー（３×平均ダイアゴナルとして算出され、但し、「平均ダイアゴナル」とは、用いられる比較マトリクスのダイアゴナルの平均値であり、「ダイアゴナル」とは、特定の比較マトリクスによる、各完全なアミノ酸の一致に帰属されるスコアまたは数である。）及びギャップエクステンションペナルティー（通常、ギャップオープニングペナルティー×１／１０）、並びにＰＡＭ ２５０またはＢＬＯＳＵＭ ６２などの比較マトリクスが、アルゴリズムと協同して用いられる。特定の実施形態において、標準的な比較マトリクス（ＰＡＭ ２５０比較マトリクスに関しては、Ｄａｙｈｏｆｆら、１９７８、Ａｔｌａｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ ａｎｄ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ５：３４５～３５２、ＢＬＯＳＵＭ ６２比較マトリクスに関しては、Ｈｅｎｉｋｏｆｆら、１９９２、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．８９：１０９１５～１０９１９を参照のこと。）もまた、アルゴリズムによって用いられる。

【０１００】

ＧＡＰプログラムを用いて、ポリペプチドまたはヌクレオチド配列に関するパーセント記の同一性を求めるために推奨されるパラメータは以下の通りである。

アルゴリズム：Ｎｅｅｄｌｅｍａｎら、１９７０、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４８：４４３～４５３、

比較マトリクス：ＢＬＯＳＵＭ ６２、Ｈｅｎｉｋｏｆｆら、１９９２、前掲、

ギャップペナルティ：１２（但し、末端ギャップについてはペナルティなし）、

ギャップ長さペナルティ：４、
類似性の閾値：０。
【０１０１】
２のアミノ酸についてアラインメントを行うための特定のアラインメントスキームが、当該２の配列の短い領域のみの一致をもたらす場合があり、当該の２の完全長配列間には有意な関係はないにも拘わらず、このアラインメントを行った小さな領域が非常に高い配列同一性を有する場合がある。従って、選択されたアラインメント方法（ＧＡＰプログラム）は、それが所望されるならば、標的ポリペプチドの少なくとも５０の連続するアミノ酸にわたるアラインメントをもたらすように調節することができる。
【０１０２】
本明細書において用いられる「実質的に純粋な」とは、記載される分子の種が、存在する中で支配的な種である、すなわち、同一の混合物中において、当該の種の量が、モル量基準で、他のいずれの個々の種よりも多いことを意味する。特定の実施形態において、実質的に純粋な分子は、対象の種が、存在する全ての高分子種の（モル量基準で）少なくとも５０％を構成する組成物である。他の実施形態において、実質的に純粋な組成物は、当該組成物中に存在する全ての高分子種の少なくとも８０％、８５％、９０％。９５％、または９９％を構成することとなる。他の実施形態において、対象とする種が、当該組成物中において、従来の検知方法によって混入する種を検知することができない、本質的な同質性まで精製され、従って、当該組成物は単一の検知可能な高分子種から構成される。
【０１０３】
用語「治療すること」とは、症状の減退、鎮静、減少または、患者に対して、傷害、病理若しくは疾病をより忍容可能にすること；退行または低下の速度を鈍化させること；退行の終点をより衰弱性でないようにすること；患者の肉体的または精神的健康状態を向上させることなどの、任意の主観的または客観的パラメータを始めとする、傷害、病理若しくは疾病の治療または寛解における成功の任意の指標をいう。症状の治療または寛解は、身体的検査、神経性心的検査、及び／または精神医学的評価の結果を始めとする、客観的または主観的パラメータに基づくことができる。例えば、本明細書に示す特定の方法は、例えば、がんの進行または拡大を減少されること、腫瘍の成長を阻害すること、腫瘍の鎮静を生じさせること及び／またはがん若しくは腫瘍に伴う症状を寛解させることによって、がん及び腫瘍を治療することができる。同様に、本明細書に提供される他の方法は、感染症の進行または拡大を減少されること、感染症の程度を低減すること、及び／または感染症に伴う症状を寛解させることによって、感染性の疾患を治療する。
【０１０４】
「有効量」とは、一般的に、症状の重篤性及び／若しくは頻度を低減する、症状及び／若しくは根本原因を取り除く、症状の発生及び／若しくはそれらの根本原因を予防する、並びに／またはがんに起因する若しくはがんに伴う損傷を改善または修復するために十分な量である。いくつかの実施形態において、有効量は治療上有効な量または予防上有効な量である。「治療上有効な量」とは、疾患状態（例えば、がん）若しくは症状、特には疾患状態に伴う状態若しくは症状を治療する、さもなければ、疾患状態または、形はどうであれ、疾患に伴う他の任意の望ましからざる症状の進行を防止する、阻害する、遅延させるまたは逆行させるために十分な量である。「予防上有効な量」とは、対象に投与された際に、例えば、がんの発症（若しくは再発）の予防または遅延、あるいはがんまたはがんの症状の発症（若しくは再発）の可能性の低減などの、意図する予防的効果を有する医薬組成物の量である。十分な治療上または予防上の効果は、必ずしも１回分の投与によって生じるものではなく、一連の投与後に初めて生じる場合もある。従って、治療上または予防上有効な量は、１回または複数回の投与で投与することができる。
【０１０５】
語句「ＧＩＴＲ関連疾患」及び他の類似の語句とは、例えば、本明細書で提供されるアゴニストＧＩＴＲ抗体の使用を通じて、ＧＩＴＲ活性を誘発するまたは向上させることによって治療可能な、疾患または当該疾患に伴う症状をいう。

【０１０６】
用語「がん」、「腫瘍」、「がん性の」、及び「悪性の」とは、一般的に、制御されない細胞の増殖を特徴とする、哺乳動物における生理学的状態をいうまたは表わす。がんの例としては、腺がん、リンパ腫、芽細胞腫、黒色腫、肉腫及び白血病を始めとするがん腫が挙げられるが、これらに限定されない。かかるがんのより詳細な例としては、黒色腫、肺がん、頭頚部がん、腎細胞ガン、大腸がん、結腸直腸がん、扁平上皮細胞がん、肺小細胞がん、肺非小細胞がん、胃腸がん、ホジキン及び非ホジキンリンパ腫、膵がん、神経膠芽腫、神経膠腫、子宮頸がん、卵巣がん、肝がん及び肝細胞がんなどの肝臓がん、膀胱がん、乳がん、子宮内膜がん、（多発性骨髄腫などの）骨髄腫、唾液腺がん、腎細胞がん及びウィルムス腫などの腎がん、基底細胞がん、前立腺がん、陰門ガン、甲状腺がん、精巣がん、及び食道がんが挙げられる。
【０１０７】
「腫瘍」とは、がん細胞が成長及び増殖して形成される組織の塊をいい、これは隣接する正常な組織を侵し、破壊し得る。がん細胞は、悪性腫瘍から離脱して血流中またはリンパ系に入り、その結果がん細胞が原発腫瘍から拡がり、他の器官に新たな腫瘍を形成する。
【０１０８】
「固形腫瘍」とは、通常は嚢胞または液体領域を含まない、異常な増殖または組織の塊をいう。固形腫瘍は良性（がん性ではない）または悪性（がん性）の場合がある。異なる種類の固形腫瘍が、それらを形成する細胞の種類に対して命名される。固形腫瘍の例は、肉腫、がん腫及びリンパ腫である。白血病（血液がん）は一般的に固形腫瘍を形成しない。
【０１０９】
「血液がん」とは、骨髄などの造血組織、または免疫系の細胞において最初に起こるがんである。血液がんの例は、白血病、リンパ腫、及び多発性骨髄腫である。
【０１１０】
本明細書において用いられる「対象」または「患者」は、任意の哺乳動物であることができる。一般的な実施形態において、対象または患者はヒトである。
【０１１１】
本明細書において用いられる「アゴニスト」とは、概括的には、例えば、本明細書において提供されるような抗原結合タンパク質などの、ＧＩＴＲと結合し、ＧＩＴＲシグナル伝達をトリガーすることができる分子をいう。
【０１１２】
語句「免疫変調成分」とは、免疫反応を誘発する、向上させるまたは抑制する分子をいう。免疫活性化因子とは、免疫反応を誘発または増幅する分子である。免疫抑制因子とは、免疫反応を低下させる又は抑制する分子である。従って、活性化免疫療法とは、対象の免疫系を誘発するまたは向上させる分子を投与することを伴う療法である。抑制免疫療法とは、対象を、当該対象の免疫系を低下させるまたは抑制する分子を用いて治療する療法である。
【０１１３】
ＩＩ．概要
ＧＩＴＲの活性を変調させるために有用な、様々な選択的結合剤が提供される。これらの薬剤としては、例えば、ＧＩＴＲポリペプチド、特にはヒトＧＩＴＲ（例えば、配列番号１）に特異的に結合する抗原結合ドメインを含む抗原結合タンパク質が挙げられる。提供される抗原結合タンパク質は、ＧＩＴＲアゴニストであり、従って、ＧＩＴＲシグナル伝達を誘発するまたは向上させることができる。これらのＧＩＴＲアゴニストとしての活性に鑑み、提供される抗原結合タンパク質は、多様な免疫療法用途において用いることができる。
【０１１４】
本明細書に記載の抗原結合タンパク質は、免疫療法に対して、特には免疫賦活剤として

、好適となるであろう抗体を識別する広範な選択プロセスを通じて得られた。第１の選択は、ヒト化抗体またはキメラ抗体ではなく、完全ヒト抗体を生起させるための判断であった。対象に投与された際に、抗ＧＩＴＲ抗体それ自体に対して抗体が生起されるかも知れない虞－ＧＩＴＲ抗体を投与して、対象の免疫反応を上方制御する免疫療法用途において拡大されることが予測される虞、を軽減するために、完全ヒト抗体が選択された。

【０１１５】

かかる完全ヒト抗体を得るプロセスを、キセノマウス（登録商標）動物における３の別個の免疫化作戦を実施することによって開始した。これらの作戦は、そこから主要な候補を選択することができる抗体の数及び配列多様性を最大化するために、３の異なる免疫化戦略及び３種の異なる系統のマウスを用いた。これらの３の作戦から得られた結果としての初期の抗体を、次に、配列に基づいた生物物理学的な及び機能面でのスクリーニングの多重の繰り返しを通じて評価し、所望の特性を有する一群の親抗体を識別した。続いて、選択した親抗体の１または複数の特徴を更に向上させる目的で、これらの親抗体の遺伝子操作した変異体を作製した。最後に、親抗体及び遺伝子操作した抗体由来の一群の抗体を選択し、更なる分析を行った。

【０１１６】

例えば、配列解析に関して、酸化、脱アミノ化、異性化、酸加水分解及び／または凝集、並びに免疫原性に対する傾向などの多数の判定基準に基づいて、初期の抗体より親抗体を選択した。生物物理学的分析としては、発現レベル、凝集の傾向、及び安定性に基づいた抗体の評価が挙げられた。機能面では、ＧＩＴＲに対する親和性、エフェクタＴ細胞を活性化及び刺激する能力、及び制御性Ｔ細胞による抑制を排除する能力などの活性に関して、親抗体を選択した。

【０１１７】

次いで、選択した親抗体を、当該抗体を改良するために遺伝子操作した。親抗体及びそれらの遺伝子操作した形態からの最終的な選択もまた、細胞株の安定性、精製属性、製造評価など多くの基準及び所望の機能面の属性にも基づく。

【０１１８】

いくつかの実施形態において、抗原結合タンパク質は、異なるサブクラスのＴ細胞に対して差示的な結合を示すことから選択される。特に、かかる抗原結合タンパク質は、ＣＤ４＋ＣＤ２５－Ｔ細胞よりもＣＤ４＋ＣＤ２５＋Ｔ細胞に対してより強く結合し、ＣＤ８＋ＣＤ２５－Ｔ細胞よりもＣＤ８＋ＣＤ２５＋Ｔ細胞に対してより強く結合する。結合におけるこの選択性は、いくつかの他の公知のＧＩＴＲ抗体に対して観測された選択性とは異なる。本明細書において提供されるＧＩＴＲ抗原結合タンパク質に対して観測された差示的な結合が、天然のリガンドであるＧＩＴＲＬに対して見られる差示的な結合に類似することから、この選択性は重要である可能性がある。結合における選択性自体は、他のＴ細胞のサブセットに対する非特異的結合に伴う望ましくない効果に関する可能性を低減し、ＧＩＴＲＬの結合をより近似に模倣し得る。

【０１１９】

一実施形態において、抗原結合タンパク質はまた、Ｆｃ領域がグリコシル化されるようにも選択される。従って、例えば、抗原結合タンパク質は、重鎖がＩｇＧ１サブタイプである抗体であってもよい。Ｆｃγ受容体と結合し抗体のクラスタを形成するためには、Ｆｃドメインのグリコシル化が重要である可能性がある。かかるクラスタ化は、特定の抗原結合タンパク質のＧＩＴＲシグナル伝達を最も効率的に誘発するまたは向上させる能力において重要である可能性がある。

【０１２０】

上記のように、ＧＩＴＲアゴニストとしてのそれらの活性に鑑み、提供される抗原結合タンパク質は、多様ながん、免疫障害及び感染症の治療などにおける、対象の免疫反応を誘発するまたは向上させることが望ましい様々な免疫療法において価値を有する。

【０１２１】

本明細書に開示の抗原結合タンパク質は種々の更なる効用を有する。抗原結合タンパク

質は、例えば、特異的結合アッセイ、ＧＩＴＲの親和性精製、及び他のＧＩＴＲ活性のアゴニストの識別のためのスクリーニングアッセイにおいて有用である。抗原結合タンパク質の他の用途としては、例えば、ＧＩＴＲ関連疾患または疾病の診断及びＧＩＴＲの存在または非存在を判定するためのスクリーニングアッセイが挙げられる。

【０１２２】

ＩＩＩ．ＧＩＴＲ抗原結合タンパク質

本明細書に含まれる実施例は抗体である抗原結合タンパク質について説明するが、本明細書において提供される抗原結合タンパク質は抗体のみに限定されるものではない。一般的に、本明細書において提供される抗原結合タンパク質は、１種のポリペプチドまたは複数種のポリペプチドであって、その中に、本明細書に記載の、１または複数（例えば、１、２、３、４、５若しくは６）の相補性決定領域（ＣＤＲ）が埋め込まれた及び／または結合したポリペプチドなどのスカフォールドを含む。いくつかの抗原結合タンパク質において、ＣＤＲは「フレームワーク領域」内に埋め込まれ、該フレームワーク領域は、ＣＤＲの適正な抗原結合特性が獲得されるように、ＣＤＲを正しい位置に置く。ＣＤＲを埋め込む込むことができるスカフォールドの更なるタイプが更に下記される。

【０１２３】

このように、いくつかの抗原結合タンパク質において、ＣＤＲ配列はタンパク質スカフォールドまたは他の生体適合性ポリマー中に埋め込まれる。他の実施形態において、抗原結合タンパク質は抗体であるか、または抗体に由来する。従って、提供される特定の抗原結合の例としては、モノクローナル抗体、二特異性抗体、ミニボディー、ナノボディー（登録商標）などのドメイン抗体、（本明細書において、場合により「抗体模倣物」と称される）合成抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、（場合により「抗体複合体」と称される）抗体融合体、及びそれぞれの一部、すなわちフラグメントが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの例において、抗原結合タンパク質は、免疫学的に機能性の、完全抗体のフラグメント（例えば、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、ｓｃＦｖ、ドメイン抗体またはミニボディー）である。本明細書において、種々の構造が更に記載及び規定される。

【０１２４】

ＧＩＴＲを活性化するそれらの能力があるとすれば、提供される抗原結合タンパク質は、

ａ．イン・ビトロまたはイン・ビボでのＧＩＴＲシグナル伝達の誘発または向上、

ｂ．ＧＩＴＲに対する結合に関するＧＩＴＲＬとの交差競合、

ｃ．ヒトＣＤ４細胞中へ内部移行可能であること、

ｄ．制御性Ｔ細胞によるエフェクタＴ細胞活性の抑制の低減、

ｅ．イン・ビトロまたはイン・ビボでの循環制御性Ｔ細胞のレベルの減少、

ｆ．イン・ビトロまたはイン・ビボでのエフェクタＴ細胞の活性化、

ｇ．イン・ビトロまたはイン・ビボでのエフェクタＴ細胞増殖の誘発または向上、

ｈ．ヒト血清中において少なくとも６日、７日、９日または１２日の半減期を有すること、

ｉ．腫瘍の増殖の阻害、及び

ｊ．腫瘍の退行の誘発

の１または複数（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９または１０）の生物学的活性を、任意の組み合わせで発揮することができる。

【０１２５】

Ａ．天然に存在する抗体構造を有するＧＩＴＲ抗原結合タンパク質

いくつかの提供される抗原結合タンパク質は、一般的に天然に存在する抗体に伴う構造を有する。これらの抗体の構造単位は、一般的に、それぞれが２の同一のポリペプチド鎖の対からなる、１または複数の４量体を含む。但し、哺乳動物のある種は、単一の重鎖のみを有する抗体を産生することもある。一般的な抗体においては、各ペア、すなわち対は、１の完全長「軽」鎖（特定の実施形態においては約２５ｋＤａ）及び１の完全長「重」

鎖（特定の実施形態においては約５０～７０ｋＤａ）を含む。それぞれの個々の免疫グロブリン鎖は、いくつかの、それぞれが概略９０から１１０アミノ酸からなり、特徴的な折り畳みパターンを発現する「免疫グロブリンドメイン」から構成される。これらのドメインは、抗体ポリペプチドを構成する基本的な単位である。各連鎖のアミノ末端部分は、一般的に、抗原の認識を担う可変ドメインを含む。本明細書において言及する重鎖由来の可変ドメインは、場合により簡単にＶＨと称される。同様に、軽鎖由来の可変ドメインはＶＬと称される。カルボキシ末端部分は連鎖のもう一方の末端よりも進化的により保持され、「定常領域」または「Ｃ領域」と称される。ヒト軽鎖は一般的にκ及びλ軽鎖に分類され、これらのそれぞれは１の可変ドメイン及び１の定常ドメインを含む。重鎖は一般的にμ、δ、γ、α、またはε鎖に分類され、これらは当該抗体のアイソタイプを、それぞれＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＧ、ＩｇＡ、及びＩｇＥと規定する。ＩｇＧは、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、及びＩｇＧ４を始めとするいくつかのサブタイプを有するが、これらには限定されない。ＩｇＭのサブタイプとしてはＩｇＭ、及びＩｇＭ２が挙げられる。ＩｇＡのサブタイプとしてはＩｇＡ１及びＩｇＡ２が挙げられる。ヒトにおいては、ＩｇＡ及びＩｇＤアイソタイプは４の重鎖及び４の軽鎖を含み、ＩｇＧ及びＩｇＥアイソタイプは２の重鎖及び２の軽鎖を含み、ＩｇＭアイソタイプは５の重鎖及び５の軽鎖を含む。重鎖のＣ領域は一般的に、エフェクタ機能を担うことができる１または複数のドメインを含む。重鎖の定常領域ドメインの数はアイソタイプに依存する。例えば、ＩｇＧ重鎖はそれぞれ、C_H1、C_H2及びC_H3として知られる３のＣ領域ドメインを含む。提供される抗体は、任意のこれらのアイソタイプ及びサブタイプを有することができる。特定の実施形態において、ＧＩＴＲ抗体はＩｇＧ１、ＩｇＧ２、またはＩｇＧ４サブタイプのものである。

【０１２６】

完全長軽鎖及び重鎖において、可変領域と定常領域は、約１２以上のアミノ酸の「Ｊ」領域によって結合され、重鎖も約１０以上のアミノ酸の「Ｄ」領域を含む。例えば、「基礎免疫学」（Ｆｕｎｄａｍｅｎｔａｌ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ）、第２版、第７章（Ｐａｕｌ，Ｗ．編）１９８９、ニューヨーク：Ｒａｖｅｎ　Ｐｒｅｓｓ（全ての目的に対して、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。）を参照されたい。各軽／重鎖対の可変領域は、一般的に抗原結合部位を形成する。

【０１２７】

代表的なＧＩＴＲモノクローナル抗体のＩｇＧ１重鎖定常ドメインの一例は、アミノ酸配列：ＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧＧＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶＳＷＮＳＧＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＳＬＧＴＱＴＹＩＣＮＶＮＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＲＶＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＥＥＭＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ＊（配列番号４４２、アスタリスクは終止コドンに対応）を有する。

【０１２８】

代表的なＧＩＴＲモノクローナル抗体のλ軽鎖定常ドメインの一例は、アミノ酸配列：ＱＰＫＡＡＰＳＶＴＬＦＰＰＳＳＥＥＬＱＡＮＫＡＴＬＶＣＬＩＳＤＦＹＰＧＡＶＴＶＡＷＫＡＤＳＳＰＶＫＡＧＶＥＴＴＴＰＳＫＱＳＮＮＫＹＡＡＳＳＹＬＳＬＴＰＥＱＷＫＳＨＲＳＹＳＣＱＶＴＨＥＧＳＴＶＥＫＴＶＡＰＴＥＣＳ＊（配列番号４４３、アスタリスクは終止コドンに対応）を有する。

【０１２９】

代表的なＧＩＴＲモノクローナル抗体のκ軽鎖定常ドメインの一例は、アミノ酸配列：ＴＶＡＡＰＳＶＦＩＦＰＰＳＤＥＱＬＫＳＧＴＡＳＶＶＣＬＬＮＮＦＹＰＲＥＡＫＶＱＷ

ＫＶＤＮＡＬＱＳＧＮＳＱＥＳＶＴＥＱＤＳＫＤＳＴＹＳＬＳＳＴＬＴＬＳＫＡＤＹＥＫＨＫＶＹＡＣＥＶＴＨＱＧＬＳＳＰＶＴＫＳＦＮＲＧＥＣ＊（配列番号４４４、アスタリスクは終止コドンに対応）を有する。

【０１３０】

本明細書において提供される抗体に関して、免疫グロブリン鎖の可変領域は、一般的に、より多くの場合に「相補性決定領域」またはＣＤＲと呼ばれる、３の高度可変領域が結合した、比較的に保持されたフレームワーク領域（ＦＲ）を含む、同一の全体としての構造を示す。上述の各重鎖／軽鎖対の２の連鎖由来のＣＤＲは、一般的に、フレームワーク領域によって配列され、ＧＩＴＲ上の特定のエピトープに特異的に結合する構造を形成する。Ｎ末端からＣ末端に向けて、天然に存在する軽鎖及び重鎖の可変領域は、両方共に、一般的にこれらの要素の以下の順序：ＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３及びＦＲ４に従う。重鎖由来のＣＤＲは、本明細書において一般的に、ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２及びＣＤＲＨ３と称する。同様に、軽鎖由来のＣＤＲは、一般的に、ＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２及びＣＤＲＬ３と称する。番号付けシステムは、番号を、これらのドメインのそれぞれにおける位置を占めるアミノ酸に割り当てるように工夫されている。この番号付けシステムは、カバットの免疫学的対象のタンパク質配列（Ｋａｂａｔ　Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｔｅｒｅｓｔ）（１９８７及び１９９１年、ＮＩＨ、メリーランド州ベセスダ）、またはＣｈｏｔｈｉａ及びＬｅｓｋ、１９８７、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１９６：９０１～９１７、Ｃｈｏｔｈｉａら、１９８９、Ｎａｔｕｒｅ　３４２：８７８～８８３によって規定される。

【０１３１】

実施例に記載したようにして調製された、特定の完全ヒトモノクローナル抗体に関する配列情報を表１にまとめる。この表は、各抗体に対する、６のＣＤＲ、重鎖可変ドメイン（ＶＨ）、軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）、完全長重鎖（ＨＣ）及び完全長軽鎖（ＬＣ）を掲載する。表１は、選択された親抗体、並びにタンパク質工学によって得られた親抗体の遺伝子操作した変異体に関する配列情報を含む。当該配列のアラインメントを図８Ａ、８Ｂ、９Ａ、９Ｂ、１０Ａ、１０Ｂ、１１Ａ及び１１Ｂに示す。

【０１３２】

【表１】

表１　代表的な抗原結合タンパク質の配列

識別番号	参照番号	抗体名	HC配列番号	LC配列番号	VH配列番号	VL配列番号	CDRH1配列番号	CDRH2配列番号	CDRH3配列番号	CDRL1配列番号	CDRL2配列番号	CDRL3配列番号
Ab1	SS-10942	1D7	335	316	137	118	31	36	46	5	11	18
Ab2	SS-12413	33C9	336	317	138	119	31	36	47	5	11	19
Ab3	SS-12414	33F6	337	318	139	120	32	37	48	5	12	20
Ab4	SS-12415	34G4	338	319	140	121	31	36	49	5	11	20
Ab5	SS-12416	35B10	339	320	141	122	31	38	50	5	13	18
Ab6	SS-12417	41E11	340	321	142	123	33	39	51	6	12	21
Ab7	SS-12428	41G5	341	322	143	124	31	40	52	5	12	18
Ab8	SS-12418	42A11	342	323	144	125	31	36	53	5	11	18
Ab9	SS-12419	44C1	343	324	145	126	31	41	54	7	15	22
Ab10	SS-12420	45A8	344	325	146	127	31	42	55	7	15	23
Ab11	SS-12421	46E11	345	326	147	128	31	38	56	5	12	24
Ab12	SS-12422	48H12	346	327	148	129	31	38	57	5	12	18
Ab13	SS-12423	48H7	347	328	149	130	33	36	58	6	12	25
Ab14	SS-12424	49D9	348	329	150	131	31	38	59	5	12	20
Ab15	SS-12425	49E2	349	330	151	132	31	43	60	8	15	26
Ab16	SS-12427	48A9	350	331	152	133	34	44	61	9	16	27
Ab17	SS-10943	5H7	351	332	153	134	35	45	62	10	17	28

表１（続き）

識別番号	参照番号	抗体名	HC配列番号	LC配列番号	VH配列番号	VL配列番号	CDRH1配列番号	CDRH2配列番号	CDRH3配列番号	CDRL1配列番号	CDRL2配列番号	CDRL3配列番号
Ab18	SS-10944	7A10	352	333	154	135	31	37	58	5	12	29
Ab19	SS-10945	9H6	353	334	155	136	3	36	63	5	14	30
Ab20	SS-12514	44C1v1	394	354	276	236	31	41	54	64	15	65
Ab21	SS-12515	45A8v1	395	355	277	237	31	42	55	64	15	66
Ab22	SS-12562	49D9v1	396	356	278	238	31	38	59	5	12	20
Ab23	SS-12516	49E2v1	397	357	279	239	31	43	60	8	15	434
Ab24	SS-12513	48A9v1	398	358	280	240	31	44	61	9	16	27
Ab25	SS-16912	5H7v1	399	359	281	241	35	45	75	10	17	28
Ab26	SS-13807	5H7v2	400	360	282	242	35	45	76	10	17	28
Ab27	SS-16913	5H7v3	401	361	283	243	35	45	77	10	17	28
Ab28	SS-16915	5H7v5	402	362	284	244	35	45	78	10	17	28
Ab29	SS-16917	5H7v7	403	363	285	245	35	45	79	10	17	28
Ab30	SS-16921	5H7v9	404	364	286	246	35	45	62	10	17	28
Ab31	SS-16919	5H7v10	405	365	287	247	35	45	62	10	17	67
Ab32	SS-16920	5H7v11	406	366	288	248	35	45	62	10	17	68

表１（続き）

識別番号	参照番号	抗体名	HC配列番号	LC配列番号	VH配列番号	VL配列番号	CDRH1配列番号	CDRH2配列番号	CDRH3配列番号	CDRL1配列番号	CDRL2配列番号	CDRL3配列番号
Ab33	SS-16923	5H7v13	407	367	289	249	35	45	76	10	17	67
Ab34	SS-16924	5H7v14	408	368	290	250	35	45	77	10	17	67
Ab35	SS-16927	5H7v17	409	369	291	251	35	45	76	10	17	68
Ab36	SS-16928	5H7v18	410	370	292	252	35	45	77	10	17	68
Ab37	SS-16929	5H7v19	411	371	293	253	35	45	435	10	17	68
Ab38	SS-16932	5H7v22	412	372	294	254	35	45	79	10	17	67
Ab39	SS-13810	7A10v1	413	373	295	255	31	37	58	5	12	29
Ab40	SS-16938	7A10v2	414	374	296	256	31	37	58	5	12	29
Ab41	SS-16939	7A10v3	415	375	297	257	31	69	58	5	12	29
Ab42	SS-16940	7A10v4	416	376	298	258	31	70	58	5	12	29
Ab43	SS-16941	7A10v5	417	377	299	259	31	69	58	5	12	29
Ab44	SS-16943	9H6v1	418	378	300	260	31	36	63	5	14	30
Ab45	SS-16944	9H6v2	419	379	301	261	31	36	63	5	14	30
Ab46	SS-13806	9H6v3	420	380	302	262	31	71	63	5	14	30
Ab47	SS-16945	9H6v4	421	381	303	263	31	72	63	5	14	30
Ab48	SS-16946	9H6v5	422	382	304	264	31	71	63	5	14	30
Ab49	SS-16947	9H6v6	423	383	305	265	31	72	63	5	14	30

表１（続き）

【０１３３】

識別番号	参照番号	抗体名	HC配列番号	LC配列番号	VH配列番号	VL配列番号	CDRH1配列番号	CDRH2配列番号	CDRH3配列番号	CDRL1配列番号	CDRL2配列番号	CDRL3配列番号
Ab50	SS-16948	33C9v1	424	384	306	266	31	36	47	5	11	19
Ab51	SS-13808	33C9v2	425	385	307	267	31	71	47	5	11	19
Ab52	SS-16949	33C9v3	426	386	308	268	31	72	47	5	11	19
Ab53	SS-16950	33C9v4	427	387	309	269	31	71	47	5	11	19
Ab54	SS-16951	33C9v5	428	388	310	270	31	72	47	5	11	19
Ab55	SS-16952	41G5v1	429	389	311	271	31	40	52	5	12	18
Ab56	SS-13809	41G5v2	430	390	312	272	31	73	52	5	12	18
Ab57	SS-16953	41G5v3	431	391	313	273	31	74	52	5	12	18
Ab58	SS-16954	41G5v4	432	392	314	274	31	73	52	5	12	18
Ab59	SS-16955	41G5v5	433	393	315	275	31	74	52	5	12	18

一般的に、提供される抗原結合タンパク質は、表１に掲載の抗体の、１または複数のＣＤＲ、１または複数の可変ドメイン、及び／または１または複数の完全長重鎖または軽鎖の配列、並びにかかる配列の変異体または誘導体を含む。

【０１３４】

Ｂ．ＧＩＴＲ抗原結合タンパク質－ＣＤＲ

例えば、一実施形態において、抗原結合タンパク質は、１または複数のＣＤＲがグラフトした、挿入した及び／または結合したスカフォールドを含む。特定の実施形態において、スカフォールドはポリペプチドである。例えば、ＣＤＲは、上述の天然に存在する構造を有する抗体の一部であることができる。更なるスカフォールドの例としては、フィブロネクチン、ネオカルジノスタチン　ＣＢＭ４－２、リポカリン、タンパク質－Ａドメイン（タンパク質Ｚ）、Ｉｍ９、ＴＰＲタンパク質、亜鉛フィンガードメイン、ｐＶＩＩＩ、ＧＣ４、トランスフェリン、及びＣ型レクチン様ドメインが挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態において用いることができる更なるスカフォールドが、Ｇｅｂａｕｅｒ及びＳｋｅｒｒａ（２００９）　Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．、１３：２４５～２５５、並びにＢｉｎｚら（２００５）　Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．　２３：１２５７～１２６８に記載され、それらの文献は、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０１３５】

抗原結合タンパク質は、１、２、３、４、５または６のＣＤＲを有することができる。従って、抗原結合タンパク質は、例えば、表１に掲載のＣＤＲ配列より選択された、１の重鎖ＣＤＲ１（「ＣＤＲＨ１」）、及び／または１の重鎖ＣＤＲ２（「ＣＤＲＨ２」）、及び／または１の重鎖ＣＤＲ３（「ＣＤＲＨ３」）、及び／または１の軽鎖ＣＤＲ１（「ＣＤＲＬ１」）、及び／または１の軽鎖ＣＤＲ２（「ＣＤＲＬ２」）、及び／または１の軽鎖ＣＤＲ３（「ＣＤＲＬ３」）を有することができる。

【０１３６】

いくつかの抗原結合タンパク質は、それぞれが表１に掲載の同一の抗体由来である、ＣＤＲＨ３とＣＤＲＬ３との両方を含む。

【０１３７】

いくつかの抗原結合タンパク質は、それぞれが、Ａｂ１からＡｂ５９の群より選択される任意の単一の抗体の同一の可変軽鎖由来である、ＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２及びＣＤＲＬ３を含む。別な実施形態において、抗原結合タンパク質は、それぞれが表１に掲載の同一の抗体由来であるＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２及びＣＤＲＬ３であって、ＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２及びＣＤＲＬ３のそれぞれのアミノ酸配列が、当該抗体に対して表１に明記されたものである、ＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２及びＣＤＲＬ３を含む。

【０１３８】

別な実施形態において、抗原結合タンパク質は、ＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２及びＣＤＲＬ３であって、ＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２及びＣＤＲＬ３の１または複数の配列が、Ａｂ１からＡｂ５９の群より選択される任意の単一の抗体の可変ドメインの対応するＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２及びＣＤＲＬ３と比較して異なり、但し、前記配列の違いは、全体の合計で１、２、３または４を超えないアミノ酸の違いであるとの条件である、ＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２及びＣＤＲＬ３を含む。

【０１３９】

他の抗原結合タンパク質は、それぞれが、Ａｂ１からＡｂ５９の群より選択される任意の単一の抗体の同一の可変重鎖由来であるＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２及びＣＤＲＨ３を含む。別な実施形態において、抗原結合タンパク質は、それぞれが表１に掲載の同一の抗体由来であるＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２及びＣＤＲＨ３であって、ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２及びＣＤＲＨ３のそれぞれのアミノ酸配列が、当該抗体に対して表１に明記されたものである、ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２及びＣＤＲＨ３を含む。

【０１４０】

更に別な実施形態において、抗原結合タンパク質は、ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２及びＣＤ

ＲＨ３であって、ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２及びＣＤＲＨ３の１または複数の配列は、Ａｂ１からＡｂ５９の群より選択される任意の単一の抗体の可変ドメインの対応するＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２及びＣＤＲＨ３と比較して異なり、但し、前記配列の違いは、全体の合計で１、２、３または４を超えないアミノ酸の違いであるとの条件である、ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２及びＣＤＲＨ３を含む。

【０１４１】

更に他の抗原結合タンパク質は、Ａｂ１からＡｂ５９の群より選択される任意の単一の抗体の６のＣＤＲ全てを含む。更に別な実施形態において、抗原結合タンパク質は、Ａｂ１からＡｂ５９の群より選択される任意の単一の抗体に関する６のＣＤＲ全てであって、表１に掲載のアミノ酸配列をそれぞれ含む、６のＣＤＲ全てを含む。

【０１４２】

他の抗原結合タンパク質は、ＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２、ＣＤＲＬ３、ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２及びＣＤＲＨ３の１または複数の配列が、Ａｂ１からＡｂ５９の群より選択される任意の単一の抗体の対応するＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２、ＣＤＲＬ３、ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２及びＣＤＲＨ３と比較して異なり、但し、前記配列の違いは、全体の合計で１、２、３、４、５、または６を超えないアミノ酸の違いであるとの条件であること以外は、選択される抗体の６のＣＤＲ全てを含む。

【０１４３】

Ｃ．ＧＩＴＲ抗原結合タンパク質－可変ドメイン

Ａｂ１からＡｂ５９の群より選択される任意の抗体の軽鎖可変ドメイン（ＶＬ）を含む抗原結合タンパク質もまた提供される。別な実施形態において、抗原結合タンパク質は、Ａｂ１からＡｂ５９の群より選択される任意の抗体のＶＬを含み、該ＶＬのアミノ酸配列は表１に指定される通りである。

【０１４４】

別な実施形態において、抗原結合タンパク質は、アミノ酸配列が、表１に指定される抗原結合タンパク質Ａｂ１からＡｂ５９のいずれか１のＶＬ配列に対して、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％または９９％同一である変異ＶＬ配列を含む。

【０１４５】

他の抗原結合タンパク質は、表１に指定される抗原結合タンパク質Ａｂ１からＡｂ５９のいずれか１由来のＶＬのアミノ酸配列と、１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０を超えないアミノ酸において異なる変異ＶＬ配列を含む。別な態様において、変異ＶＬ配列は、１、２、３、４または５を超えないアミノ酸において異なる。

【０１４６】

いくつかの抗原結合タンパク質は、Ａｂ１からＡｂ５９の群より選択される任意の抗体の重鎖可変ドメイン（ＶＨ）を含む。別な実施形態において、抗原結合タンパク質は、表１に指定されるＡｂ１からＡｂ５９の群より選択される任意の抗体のＶＨを含み、該ＶＨのアミノ酸配列は表１に指定される通りである。

【０１４７】

別な実施形態において、抗原結合タンパク質は、アミノ酸配列が、抗原結合タンパク質Ａｂ１からＡｂ５９のいずれか１のＶＨ配列に対して、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％または９９％同一である変異ＶＨ配列を含む。

【０１４８】

他の抗原結合タンパク質は、表１に指定される抗原結合タンパク質Ａｂ１からＡｂ５９のいずれか１由来のＶＨのアミノ酸配列と、１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０を超えないアミノ酸において異なる変異ＶＨ配列を含む。別な態様において、変異ＶＨ配列は、１、２、３、４または５を超えないアミノ酸において異なる。

【０１４９】

更に他の抗原結合タンパク質は、それぞれ、Ａｂ１からＡｂ５９からなる群より選択される同一の抗体由来のＶＬ及びＶＨを含む。別な実施形態において、抗原結合タンパク質は、Ａｂ１からＡｂ５９からなる群より選択される同一の抗体由来のＶＬ及びＶＨを含み

、該ＶＬ及びＶＨのアミノ酸配列は表１に指定される通りである。
【０１５０】
別な態様において、抗原結合タンパク質は、それぞれ、Ａｂ１からＡｂ５９の群より選択される同一の抗体由来のＶＬ及びＶＨを含み、該ＶＬ及びＶＨの一方または両方のアミノ酸配列が、それぞれ、抗原結合タンパク質Ａｂ１からＡｂ５９のいずれか１のＶＬまたはＶＨ配列に対して、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％または９９％同一である。
【０１５１】
いくつかの抗原結合タンパク質は変異ＶＬ及び／または変異ＶＨを含み、変異ＶＬ及び変異ＶＨの一方または両方が、それぞれ、抗原結合タンパク質Ａｂ１からＡｂ５９の群より選択される任意の単一の抗体のＶＬまたはＶＨ配列と異なり、但し、ＶＨまたはＶＬにおける配列の違いは、全体の合計で１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０を超えないアミノ酸であるとの条件である。別な実施形態において、違いは、全体の合計で１、２、３、４または５を超えないアミノ酸である。
【０１５２】
更に別な実施形態において、抗原結合タンパク質は、Ａｂ１からＡｂ５９の群より選択される同一の抗体由来のＶＨ及びＶＬ、但し、ＶＨ及び／またはＶＬ配列のＮ末端より１、２、３または４のアミノ酸が失われているＶＨ及びＶＬを含む。かかる変化は、例えば、発現または貯蔵の間の開裂に起因して起こり得る。
【０１５３】
Ｄ．ＧＩＴＲ抗原結合タンパク質－完全長配列
表１に指定されるいずれか１の抗体の完全長重鎖のアミノ酸配列を含む完全長重鎖を含む抗原結合タンパク質もまた提供される。
【０１５４】
他の抗原結合タンパク質は、表１に指定されるいずれか１の抗体の完全長軽鎖のアミノ酸配列を含む完全長軽鎖を含む。
【０１５５】
従って、一実施形態において、抗原結合タンパク質は抗体であり、完全長重鎖及び完全長軽鎖を含み、それぞれは表１に掲載の同一の抗体より得られる。別な実施形態において、抗体は２の同一の軽鎖及び２の同一の重鎖を含み、それぞれは表１に掲載の同一の抗体より得られる。
【０１５６】
更に他の抗原結合タンパク質は、表１に示される任意の単一の抗体の変異体であって、当該変異体抗体の完全長軽鎖及び／または完全長重鎖が、表１に掲載の対応する抗体の軽鎖及び重鎖のアミノ酸配列と、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％または９９％同一であるアミノ酸配列を有する変異体である。従って、一実施形態において、抗原結合タンパク質は、表１に掲載の抗体の軽鎖のアミノ酸配列と、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％または９９％同一であるアミノ酸配列を有する完全長軽鎖を含む。別な態様において、抗原結合タンパク質は、表１に掲載の抗体の重鎖のアミノ酸配列と、少なくとも８０％、８５％、９０％、９５％、９７％または９９％同一であるアミノ酸配列を有する完全長重鎖を含む。
【０１５７】
表１に掲載の単一の抗体に対して掲載される完全長軽鎖及び完全長重鎖、但し、一方または両方の連鎖の配列が、表１に指定される対応する配列と、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４または１５を超えないアミノ酸残基において異なる完全長軽鎖及び完全長重鎖を含む、表１に示される抗体の他の変異体が提供される。
【０１５８】
更に別の態様において、表１に掲載のＣＤＲ、可変ドメイン及び／または完全長配列を含む抗原結合タンパク質は、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、

多重特異性抗体、またはの抗体フラグメントである。別な実施形態において、本明細書において提供される単離された抗原結合タンパク質の抗体フラグメントは、表１に掲載の配列を有する抗体に基づく、Ｆａｂフラグメント、Ｆａｂ’フラグメント、$F(ab')_2$フラグメント、Ｆｖフラグメント、二特異性抗体、または一本鎖抗体分子である。

【０１５９】

更なる実施形態において、本明細書において提供される単離された抗原結合タンパク質は、表１に示される配列を有するヒト抗体であり、ＩｇＧ１型、ＩｇＧ２型、ＩｇＧ３型またはＩｇＧ４型のヒト抗体である。特定の実施形態において、抗体はＩｇＧ１型である。

【０１６０】

特定の抗原結合タンパク質は、表１のＡｂ１からＡｂ５９の群より選択される任意の単一の抗体に対して指定される、ＣＤＲ、可変ドメイン及び／または完全長配列を含み、更に、

（ａ）K_Dが≦３００ｎＭ、≦１５０ｎＭ、≦１００ｎＭ、≦７５ｎＭ、≦５０ｎＭ、≦１０ｎＭ、≦５ｎＭ、≦２ｎＭ、または≦１ｎＭであるように、ヒトＧＩＴＲに結合すること、

（ｂ）少なくとも６日、７日、９日、または１２日のヒト血清中での半減期を有すること、

（ｃ）配列番号１のヒトＧＩＴＲ及び配列番号２のカニクイザルＧＩＴＲに結合すること、

（ｃ）K_D≦１０ｎＭで配列番号１のヒトＧＩＴＲに結合し、K_D≦５００ｎＭで配列番号２のカニクイザルＧＩＴＲに結合すること、

（ｄ）配列番号１のヒトＧＩＴＲ及び配列番号２のカニクイザルＧＩＴＲに結合するが、配列番号３のマウスＧＩＴＲには結合しないこと

の特性の１または複数を有することを特徴とする。

【０１６１】

いくつかの実施形態において、抗原結合タンパク質は、例えば、後記する実施例に記載のようにして測定した、少なくとも10^4／Ｍ・秒、少なくとも10^5／Ｍ・秒、または少なくとも10^6／Ｍ・秒のＧＩＴＲに対する結合速度（k_a）を有する。提供される特定の抗原結合タンパク質は、緩慢な解離速度、すなわちｏｆｆ－ｒａｔｅを有する。いくつかの抗原結合タンパク質は、例えば、$1\times10^{-2}s^{-1}$、または$1\times10^{-3}s^{-1}$、または$1\times10^{-4}s^{-1}$、または$1\times10^{-5}s^{-1}$のk_d（解離速度）を有する。特定の実施形態において、抗原結合タンパク質は、２５ｐＭ、５０ｐＭ、１００ｐＭ、５００ｐＭ、１ｎＭ、５ｎＭ、１０ｎＭ、２５ｎＭまたは５０ｎＭ未満のK_D（平衡結合親和性）を有する。

【０１６２】

別な態様において、イン・ビトロまたはイン・ビボ（例えば、ヒト対象に投与された場合）での少なくとも１日の半減期を有する抗原結合タンパク質が提供される。一実施形態において、抗原結合タンパク質は、少なくとも３日の半減期を有する。他の様々な実施形態において、抗原結合タンパク質は、４日、５日、６日、７日、８日、９日、１０日、１５日、２０日、２５日、３０日、４０日、５０日、または６０日以上の半減期を有する。別な実施形態において、抗原結合タンパク質は、未誘導体化または未修飾の抗体に比較して、より長い半減期を有するように誘導体化または修飾される。別な実施形態において、抗原結合タンパク質は、血清半減期を増加させる点変異を含む。かかる変異形態または誘導体化された形態に関する更なる詳細は後に述べる。

【０１６３】

Ｅ．ＧＩＴＲ抗原結合タンパク質－コンセンサス配列

更に別な態様において、本明細書に開示の関係する抗体の群に由来するコンセンサスアミノ酸配列を有するＣＤＲを含む抗原結合タンパク質が提供される。本明細書において「コンセンサス配列」とは、多数の配列の中で共通の保存アミノ酸及び所与の一連のアミノ

酸配列の範囲内で変化する可変アミノ酸を有するアミノ酸配列をいう。提供されるＣＤＲコンセンサス配列としては、各ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２、ＣＤＲＨ３、ＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２及びＣＤＲＬ３のそれぞれに対応するＣＤＲが挙げられる。

【０１６４】

一実施形態において、コンセンサス配列は、表１及び図にまとめたＡｂ１～８、Ａｂ１１～１４及びＡｂ１８～１９のＣＤＲに由来する。

【０１６５】

従って、一実施形態において、抗原結合タンパク質は、それ自体がＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２及びＣＤＲＨ３を含むＶＨであって、

ＣＤＲＨ１が配列X_1ＹＧＭX_2（配列番号４３６）、但し、Ｘ１はＳまたはＮ、Ｘ２はＨまたはＹである、を含み、

ＣＤＲＨ２が配列ＶＩＷＹX_1ＧＳＮＫＹＹＡＤＳＶX_2Ｇ（配列番号４３７）、但し、Ｘ１はＥ、Ｖ、Ａ、Ｐ、Ｘ２はＫまたはＲである、を含み、

ＣＤＲＨ３が配列ＧＧX_1Ｌ$X_2$$X_3$$X_4$ＹＹ$X_5$ＧＭＤＶ（配列番号４３８）、但し、Ｘ１はＱ、Ｌ、Ｅ、またはＲであり、Ｘ２はＧ、Ｒ、またはＳであり、Ｘ３はＫ、Ｙ、Ｌ、Ｆ、またはＲであり、Ｘ４はＹまたはＤであり、Ｘ５はＹまたはＳである、を含む、ＶＨを含む。

【０１６６】

別な実施形態において、抗原結合タンパク質は、それ自体がＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２及びＣＤＲＬ３を含むＶＬであって、

ＣＤＲＬ１が配列ＲＡＳＱX_1ＩＲＮＤＬＧ（配列番号４３９）、但し、Ｘ１はＧまたはＶである、を含み、

ＣＤＲＬ２が配列$X_1$$X_2$Ｓ$X_3$ＬＱＳ（配列番号４４０）、但し、Ｘ１はＡまたはＤであり、Ｘ２はＡまたはＴであり、Ｘ３はＳまたはＴである、を含み、

ＣＤＲＬ３が配列X_1Ｑ$X_2$$X_3$$X_4$ＹＰ$X_5$Ｔ（配列番号４４１）、但し、Ｘ１はＬまたはＱであり、Ｘ２はＨまたはＬであり、Ｘ３はＮまたはＨであり、Ｘ４はＳ、ＮまたはＴであり、Ｘ５はＷ、ＬまたはＩである、を含む、

ＶＬを含む。

【０１６７】

更に別な実施形態において、抗原結合タンパク質は、ＶＨ及びＶＬであって、各々が上述のコンセンサスＣＤＲ配列をそれぞれ有するＶＨ及びＶＬを含む。

【０１６８】

Ｆ．競合抗原結合タンパク質

別な実施形態において、ＧＩＴＲ（例えば、配列番号１のヒトＧＩＴＲ）への特異的結合に関して、例示した抗体または上述の機能性フラグメントの１と競合する抗原結合タンパク質が提供される。かかる抗原結合タンパク質は、本明細書に記載の抗原結合タンパク質のエピトープと同一のエピトープまたはオーバーラップエピトープに結合してもよい。例示した抗原結合タンパク質と競合する抗原結合タンパク質及びフラグメントは、同様の機能特性を示すことが期待される。例示した抗原結合タンパク質及びフラグメントとしては、表１に含まれる重鎖及び軽鎖、可変領域ドメイン及びＣＤＲを有するものを始めとする、上述のものが挙げられる。従って、特定の例として、提供される抗原結合タンパク質としては、

（ａ）表１に掲載される同一の抗体に対して掲載されるＣＤＲの６種全て、

（ｂ）表１に掲載される同一の抗体に対して掲載されるＶＨ及びＶＬ、または

（ｃ）表１に掲載される同一の抗体に対して指定される２の軽鎖及び２の重鎖

を有する抗体と競合する抗原結合タンパク質が挙げられる。

【０１６９】

ある実施形態において、競合はＢＩＡｃｏｒｅアッセイによって測定される。

【０１７０】

Ｇ．モノクローナル抗体

提供される抗原結合タンパク質としては、ＧＩＴＲに結合するモノクローナル抗体が挙げられる。モノクローナル抗体は、任意の本技術分野で公知の技法、例えば、免疫スケジュール完了後の遺伝子導入動物より採取された脾臓細胞を不死化することによって作製することができる。脾臓細胞は、任意の本技術分野で公知の技法、例えば、脾臓細胞を骨髄腫細胞と融合してハイブリドーマを作製することによって不死化することができる。ハイブリドーマを作製する融合手法に用いられる骨髄腫細胞は、抗体を産生せず、高い融合効率及び所望の融合細胞（ハイブリドーマ）のみの増殖を維持する特定の選択的培地中で当該細胞が増殖する能力を失わせる酵素欠損を有することが好ましい。マウス融合に用いるための好適な細胞株の例としては、Ｓｐ－２０、Ｐ３－Ｘ６３／Ａｇ８、Ｐ３－Ｘ６３－Ａｇ８．６５３、ＮＳ１／１．Ａｇ　４　１、Ｓｐ２１０－Ａｇ１４、ＦＯ、ＮＳＯ／Ｕ、ＭＰＣ－１１、ＭＰＣ１１－Ｘ４５－ＧＴＧ　１．７及びＳ１９４／５ＸＸＯ　Ｂｕｌが挙げられ、ラット融合に用いるための好適な細胞株の例としては、Ｒ２１０．ＲＣＹ３、Ｙ３－Ａｇ　１．２．３、ＩＲ９８３Ｆ及び４Ｂ２１０が挙げられる。細胞融合に有用な他の細胞株は、Ｕ－２６６、ＧＭ１５００－ＧＲＧ２、ＬＩＣＲ－ＬＯＮ－ＨＭｙ２及びＵＣ７２９－６である。

【０１７１】

いくつかの例において、ハイブリドーマ細胞株は、ＧＩＴＲタンパク質免疫原を有する動物（例えば、ヒト免疫グロブリン配列を有する遺伝子導入動物）を免疫化すること、免疫化した動物より脾臓細胞を採取すること、採取した脾臓細胞を骨髄腫細胞株に融合し、それによってハイブリドーマ細胞を生起させること、ハイブリドーマ細胞よりハイブリドーマ細胞株を確立すること、及びＧＩＴＲポリペプチドと結合する抗体を産生するハイブリドーマ細胞株を識別することによって作製される。かかるハイブリドーマ細胞株、及び該細胞株によって産生される抗ＧＩＴＲモノクローナル抗体は本願の態様である。

【０１７２】

ハイブリドーマ細胞株により分泌されるモノクローナル抗体は、本技術分野において公知の任意の技法を用いて精製することができる。ハイブリドーマまたはｍＡｂを更にスクリーニングにかけて、ＧＩＴＲ活性を誘発するまたは向上させる能力などの特定の特性を有するｍＡｂを識別してもよい。かかるスクリーニングの例が、後記される実施例に示される。

【０１７３】

Ｈ．キメラ抗体及びヒト化抗体

上述の配列に基づくキメラ抗体及びヒト化抗体もまた提供される。治療薬として用いるためのモノクローナル抗体を、使用の前に種々の方法で修飾してもよい。一例はキメラ抗体であり、該キメラ抗体は、共有結合して機能性免疫グロブリン軽鎖若しくは重鎖またはそれらの免疫学的に機能性の部分を生成する、別個の抗体由来のタンパク質セグメントから構成される。一般的に、重鎖及び／または軽鎖の部分は、特定の種に由来する、または特定の抗体クラスまたはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一であるかまたは相同である一方、連鎖の残部は、別の種に由来する、または別の抗体クラス若しくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一であるかあるいは相同である。キメラ抗体に関係する方法に関しては、例えば、米国特許第４，８１６，５６７号、及びＭｏｒｒｉｓｏｎら、１９８５、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８１：６８５１～６８５５を参照されたく、これらは参照により本明細書に組み込まれる。ＣＤＲグラフト化が、例えば、米国特許第６，１８０，３７０号、第５，６９３，７６２号、第５，６９３，７６１号、第５，５８５，０８９号、及び第５，５３０，１０１号に記載される。

【０１７４】

一般的に、キメラ抗体を作製する目的は、意図する患者種由来のアミノ酸の数が最大化されたキメラ体を創出することにある。一例は「ＣＤＲグラフト化」抗体であり、該ＣＤＲグラフト化抗体においては、当該抗体が、１または複数の、特定の種に由来する、または特定の抗体クラスまたはサブクラスに属する相同性決定領域（ＣＤＲ）を含む一方、抗体鎖の残部は、別の種に由来する、または別の抗体クラス若しくはサブクラスに属する抗

体中の対応する配列と同一であるかあるいは相同である。ヒトにおいて使用するためには、多くの場合、齧歯動物抗体由来の可変領域または選択したＣＤＲがヒト抗体中にグラフト化され、当該ヒト抗体の天然に存在する可変領域またはＣＤＲを置換する。

【０１７５】

キメラ抗体の一つの有用なタイプは「ヒト化」抗体である。一般的に、ヒト化抗体は、最初に非ヒト動物において生起させたモノクローナル抗体より作製される。このモノクローナル抗体中の、一般的には当該抗体の非抗原認識部分由来である、特定のアミノ酸残基が、対応するアイソタイプのヒト抗体中の対応する残基に相同となるように修飾される。ヒト化は、例えば、齧歯動物の可変領域の少なくとも一部をもってヒト抗体の対応する領域に代えることによる、種々の方法を用いて実施することができる（例えば、米国特許第５，５８５，０８９号、及び第５，６９３，７６２号、Ｊｏｎｅｓら、１９８６、Ｎａｔｕｒｅ　３２１：５２２～５２５、Ｒｉｅｃｈｍａｎｎら、１９８８、Ｎａｔｕｒｅ　３３２：３２３～２７、Ｖｅｒｈｏｅｙｅｎら、１９８８、Ｓｃｉｅｎｃｅ　２３９：１５３４～１５３６を参照のこと。）。

【０１７６】

一態様において、本明細書において提供される抗体の軽鎖及び重鎖可変領域のＣＤＲ（表１を参照のこと）が、同一または別個の系統発生学的な種由来の抗体に由来するフレームワーク領域（ＦＲ）にグラフト化される。コンセンサスヒトＦＲを創出するためには、いくつかのヒト重鎖または軽鎖アミノ酸配列由来のＦＲについてアラインメントを行い、コンセンサスアミノ酸配列を識別してもよい。他の実施形態において、本明細書に開示の重鎖または軽鎖のＦＲが、別個の重鎖または軽鎖由来のＦＲによって置換される。一態様において、ＧＩＴＲ抗体の重鎖及び軽鎖のＦＲ中の希アミノ酸は置換されない一方、当該ＦＲの残余のアミノ酸は置換される。「希アミノ酸」とは、ＦＲ中において、当該特定のアミノ酸が通常存在しない位置に存在する特定のアミノ酸である。あるいは、１の重鎖または軽鎖由来のグラフト化された可変領域を、本明細書に開示の特定の重鎖または軽鎖の定常領域とは異なる定常領域と共に用いてもよい。他の実施形態において、グラフト化可変領域は一本鎖Ｆｖ抗体の一部である。

【０１７７】

特定の実施形態において、ヒト以外の種由来の定常領域を、ヒト可変領域と共に用いて、ハイブリッド抗体を産生することができる。

【０１７８】

完全ヒト抗体

完全ヒトＧＩＴＲ抗体もまた提供される。所与の抗原に対して特異的な完全ヒト抗体を、人間を当該抗原（完全ヒト抗体）に曝露することなく産生する方法が利用可能である。完全ヒト抗体の産生を実行するために提供される一つの具体的な手段は、マウス体液性免疫系の「ヒト化」である。内在性免疫グロブリン（Ｉｇ）遺伝子が不活性化されているマウスへのヒトＩｇ遺伝子座の導入が、任意の所望の抗原を用いて免疫化することができる動物である、マウスにおける完全ヒトモノクローナル抗体（ｍＡｂ）を産生する一手段である。完全ヒト抗体を用いることで、マウスｍＡｂまたはマウス由来のｍＡｂを治療薬としてヒトに投与することによって場合により引き起こされ得る免疫原性反応及びアレルギー性反応を低減することができる。

【０１７９】

完全ヒト抗体は、内在性免疫グロブリンの産生がない状態で、あるレパートリのヒト抗体を産生する能力を有する遺伝子導入動物（通常はマウス）を免疫化することによって産生することができる。この目的のための抗原は、一般的には６以上の連続したアミノ酸であり、任意選択でハプテンなどの担体に抱合している。例えば、Ｊａｋｏｂｏｖｉｔｓら、１９９３、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９０：２５５１～２５５５、Ｊａｋｏｂｏｖｉｔｓら、１９９３、Ｎａｔｕｒｅ　３６２：２５５～２５８及びＢｒｕｇｇｅｒｍａｎｎら、１９９３、Ｙｅａｒ　ｉｎ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．７：３３を参照されたい。かかる方法の一例において、マウスにおける、マウス重及び軽免疫グロブリン

鎖をコードする内在性マウス免疫グロブリン遺伝子座を無能力化し、ヒト重鎖及び軽鎖タンパク質をコードする遺伝子座を含むヒトゲノムＤＮＡの大きなフラグメントをマウスゲノム中に挿入することによって、遺伝子導入動物が作製される。次いで、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の完全補体未満を有する、部分的に改変された動物が異種交配され、所望の免疫系の改変の全てを有する動物を得る。免疫原が投与されると、これらの遺伝子導入動物は、当該免疫原に対して免疫特異性であるが、可変領域を含む、マウスではなくヒトのアミノ酸配列を有する抗体を産生する。かかる方法の更なる詳細に関しては、例えば、ＷＯ９６／３３７３５及びＷＯ９４／０２６０２を参照されたい。ヒト抗体を産生するための遺伝子導入マウスに関係する更なる方法が、米国特許第５，５４５，８０７号、第６，７１３，６１０号、第６，６７３，９８６号、第６，１６２，９６３号、第５，５４５，８０７号、第６，３００，１２９号、第６，２５５，４５８号、第５，８７７，３９７号、第５，８７４，２９９号及び第５，５４５，８０６号、ＰＣＴ公開ＷＯ９１／１０７４１、ＷＯ９０／０４０３６、並びにＥＰ５４６０７３Ｂ１及びＥＰ５４６０７３Ａ１に記載される。

【０１８０】

本明細書において「ＨｕＭａｂ」マウスと称する遺伝子導入マウスは、未再配列のヒト重鎖（［μ］及び［γ］）並びに［κ］軽鎖免疫グロブリン配列をコードするヒト免疫グロブリン遺伝子のミニ座を、内在性［μ］及び［κ］連鎖遺伝子座を不活性化する標的突然変異体と共に含む（Ｌｏｎｂｅｒｇら、１９９４、Ｎａｔｕｒｅ ３６８：８５６～８５９）。従って、マウスは、免疫化に応答してマウスＩｇＧまたは［κ］の発現の低下を示し、導入したヒト重鎖及び軽鎖導入遺伝子がクラススィッチ及び体細胞突然変異を起こして、高親和性ヒトＩｇＧ［κ］モノクローナル抗体を生起する（Ｌｏｎｂｅｒｇら、前掲、Ｌｏｎｂｅｒｇ及びＨｕｓｚａｒ、１９９５、Ｉｎｔｅｒｎ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３：６５～９３、Ｈａｒｄｉｎｇ及びＬｏｎｂｅｒｇ、１９９５、Ａｎｎ．Ｎ．Ｙ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．７６４：５３６～５４６）。ＨｕＭａｂマウスの調製は、Ｔａｙｌｏｒら、１９９２、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ２０：６２８７～６２９５、Ｃｈｅｎら、１９９３、Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ５：６４７～６５６、Ｔｕａｉｌｌｏｎら、１９９４、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ １５２：２９１２～２９２０、Ｌｏｎｂｅｒｇら、１９９４、Ｎａｔｕｒｅ ３６８：８５６～８５９、Ｌｏｎｂｅｒｇ、１９９４、Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｅｘｐ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｙ １１３：４９～１０１、Ｔａｙｌｏｒら、１９９４、Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ６：５７９～５９１、Ｌｏｎｂｅｒｇ及びＨｕｓｚａｒ、１９９５、Ｉｎｔｅｒｎ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３：６５～９３、Ｈａｒｄｉｎｇ及びＬｏｎｂｅｒｇ、１９９５、Ａｎｎ．Ｎ．Ｙ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．７６４：５３６～５４６、Ｆｉｓｈｗｉｌｄら、１９９６、Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １４：８４５～８５１に詳細が記載され、上述の参照文献は、全ての目的に対して、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。更に、米国特許第５，５４５，８０６号、第５，５６９，８２５号、第５，６２５，１２６号、第５，６３３，４２５号、第５，７８９，６５０号、第５，８７７，３９７号、第５，６６１，０１６号、第５，８１４，３１８号、第５，８７４，２９９号、及び第５，７７０，４２９号、並びに米国特許第５，５４５，８０７号、国際公開第ＷＯ９３／１２２７号、第ＷＯ９２／２２６４６号、及び第ＷＯ９２／０３９１８号を参照されたく、それらの全ての開示は、全ての目的に対して、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。これらの遺伝子導入マウスにおけるヒト抗体の産生に利用される技術は、ＷＯ９８／２４８９３、及びＭｅｎｄｅｚら、１９９７、Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ １５：１４６～１５６にも開示され、これらは参照により本明細書に組み込まれる。例えば、ＨＣｏ７及びＨＣｏ１２マウス系統を用いて、抗ＧＩＴＲ抗体を生起させることができる。遺伝子導入マウスを用いたヒト抗体の産生に関する更なる詳細が、後記する実施例に示される。

【０１８１】

ハイブリドーマ技術を用いて、所望の特異性を有する抗原特異性ヒトｍＡｂを、のよう

な遺伝子導入マウスから産生させ、選択することができる。かかる抗体を、適宜のベクター及び宿主細胞を用いてクローン化する及び発現させてもよく、または該抗体を培養したハイブリドーマ細胞より採取することができる。

【０１８２】

完全ヒト抗体は、（Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍら、１９９１、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２７：３８１、及びＭａｒｋｓら、１９９１、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２２：５８１に開示されるように）ファージ提示ライブラリ由来とすることもできる。ファージ提示技法は、糸状バクテリオファージの表面上への抗体レパートリの提示、及びそれに続くそれらの最適な抗体への結合によるファージの選択によって免疫選択を模倣する。かかる技法の一つがＰＣＴ公開第ＷＯ９９／１０４９４号（参照により本明細書に組み込まれる）に記載される。

【０１８３】

表１は、本明細書において提供されるものなどの、多数の完全ヒト抗原結合タンパク質に関する配列情報を含む。

【０１８４】

Ｊ．二特異性または２官能性抗原結合タンパク質

上述のように、提供される抗原結合タンパク質としては、１若しくは複数のＣＤＲまたは１若しくは複数の可変領域を含む二特異性及び２官能性抗体も挙げられる。いくつかの例における二特異性または２官能性抗体は、２の別個の重／軽鎖対及び２の別個の結合部位を有する人工的なハイブリッド抗体である。二特異性抗体は、ハイブリドーマの融合またはＦａｂ’フラグメントの結合を始めとする、但しこれらに限定されない、種々の方法によって産生することができる。例えば、Ｓｏｎｇｓｉｖｉｌａｉ及びＬａｃｈｍａｎｎ、１９９０、Ｃｌｉｎ．Ｅｘｐ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．７９：３１５～３２１、Ｋｏｓｔｅｌｎｙら、１９９２、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４８：１５４７～１５５３を参照されたい。

【０１８５】

Ｋ．変異体

一実施形態において、例えば、抗原結合タンパク質は開示した抗原結合タンパク質（例えば、表１に掲載の配列を有するもの）の変異体形態である。例えば、いくつかの抗原結合タンパク質は、表１に掲載の、１若しくは複数の重鎖または軽鎖、可変領域またはＣＤＲにおいて、１または複数の保存的アミノ酸置換を有する。

【０１８６】

天然に存在するアミノ酸は、共通の側鎖の特性に基づいてクラスに分けられる場合がある。すなわち、

１）疎水性：ノルロイシン、Ｍｅｔ、Ａｌａ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ、

２）中性親水性：Ｃｙｓ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、Ａｓｎ、Ｇｌｎ、

３）酸性：Ａｓｐ、Ｇｌｕ、

４）塩基性：Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ａｒｇ、

５）連鎖の配向に影響する残基：Ｇｌｙ、Ｐｒｏ、及び

６）芳香族：Ｔｒｐ、Ｔｙｒ、Ｐｈｅ

である。

【０１８７】

保存的アミノ酸置換は、これらのクラスの１のメンバーの、同一のクラスの別なメンバーとの交換を含んでもよい。保存的アミノ酸置換は天然に存在しないアミノ酸残基を包含し、該アミノ酸は一般的に、生物学的系における合成によるのではなく、化学的ペプチド合成によって組み込まれる。これらはペプチド疑似体及び他の逆転または逆位の形態のアミノ酸部分を含む。

【０１８８】

非保存的置換は、これらのクラスの１のメンバーの、別なクラスのメンバーとの交換を含んでもよい。かかる置換された残基は、ヒト抗体と相同である抗体の領域中に導入されてもよく、または当該分子の非相同である領域中に導入されてもよい。

【０１８９】
かかる変更を行う場合には、特定の実施形態によれば、アミノ酸の疎水性指標を考慮することができる。タンパク質の疎水性プロファイルは、各アミノ酸に数値（「疎水性指標」）を割り当て、次いでペプチド鎖に沿ってこれらの値を繰り返し平均することによって計算される。各アミノ酸に、その疎水性及び電荷特性に基づいて疎水性指標が割り当てられている。これらは、イソロイシン（＋４．５）、バリン（＋４．２）、ロイシン（＋３．８）、フェニルアラニン（＋２．８）、システイン／シスチン（＋２．５）、メチオニン（＋１．９）、アラニン（＋１．８）、グリシン（－０．４）、スレオニン（－０．７）、セリン（－０．８）、トリプトファン（－０．９）、チロシン（－１．３）、プロリン（－１．６）、ヒスチジン（－３．２）、グルタメート（－３．５）、グルタミン（－３．５）、アスパルテート（－３．５）、アスパラギン（－３．５）、リシン（－３．９）、及びアルギニン（－４．５）である。

【０１９０】
本技術分野において、タンパク質への相互作用上の生物学的機能の付与における疎水性プロフィルの重要性が判っている（例えば、Ｋｙｔｅら、１９８２、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．　１５７：１０５～１３１を参照のこと）。特定のアミノ酸を類似の疎水性指標またはスコアを有する他のアミノ酸で置換し、それでも類似の生物学的活性を保持し得ることが知られている。疎水性指標に基づいて変更を行う場合、特定の実施形態において、それらの疎水性指標が±２以内であるアミノ酸の置換が含まれる。いくつかの態様において、±１以内であるものが含まれ、他の態様において、±０．５以内であるものが含まれる。

【０１９１】
本技術分野において、類似のアミノ酸の置換は、特に本件の場合のように、該置換によって創出される生物学的に機能性のタンパク質またはペプチドが、免疫学的な実施形態における使用を意図する場合に、親水性に基づくことで効率的に行うことができることも判っている。特定の実施形態において、その近隣のアミノ酸の親水性によって支配されるタンパク質の最大局所平均親水性は、当該タンパク質の免疫原性及び抗原との結合または免疫原性と、すなわち、当該タンパク質の生物学的特性と相関性がある。

【０１９２】
以下の親水性の値がこれらのアミノ酸残基に割り当てられている。すなわち、アルギニン（＋３．０）、リシン（＋３．０）、アスパルテート（＋３．０±１）、グルタメート（＋３．０±１）、セリン（＋０．３）、アスパラギン（＋０．２）、グルタミン（＋０．２）、グリシン（０）、スレオニン（－０．４）、プロリン（－０．５±１）、アラニン（－０．５）、ヒスチジン（－０．５）、システイン（－１．０）、メチオニン（－１．３）、バリン（－１．５）、ロイシン（－１．８）、イソロイシン（－１．８）、チロシン（－２．３）、フェニルアラニン（－２．５）及びトリプトファン（－３．４）である。類似の親水性値に基づいて変更を行う場合、特定の実施形態において、それらの親水性値が±２以内であるアミノ酸の置換が含まれ、他の実施形態において、±１以内であるものが含まれ、更に他の実施形態において、±０．５以内であるものが含まれる。いくつかの例において、一次アミノ酸配列から、親水性に基づいてエピトープを識別することもできる。これらの領域はまた、「エピトープ中核領域」ともいう。

【０１９３】
代表的な保存的アミノ酸置換が表２に示される。

【０１９４】

【表２】

表２　保存的アミノ酸置換

元の残基	代表的な置換
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

【０１９５】

当業者は、周知の技法を用いて、本明細書に示す好適なポリペプチドの変異体を特定することが可能となる。当業者は、活性に対して重要ではないと考えられる領域を標的とすることにより、活性を破壊することなく、変更してもよい分子の好適な領域を識別することができる。当業者はまた、類似のポリペプチドの中で、温存される分子の残基及び部分を識別することが可能となる。更なる実施形態において、生物学的活性に対してまたは構造に対して重要であり得る領域でさえも、生物学的活性を破壊することなく、または当該ポリペプチド構造に悪影響を与えることなく、保存的アミノ酸置換に供することができる。

【０１９６】

更に、当業者は、それぞれ所望のアミノ酸残基における、単一のアミノ酸置換を含む試験変異体を生起させることができる。これらの変異体は、次いで、ＧＩＴＲ抗原結合タンパク質に対するアッセイを用いてスクリーニングすることができ、（後記する実施例を参照されたい。）そのようにして、いずれのアミノ酸を変更することができるか、及びいずれのアミノ酸を変更すべきではないかに関する情報がもたらされる。換言すれば、当業者は、かかる日常的な実験から集められた情報に基づいて、単独でまたは他の突然変異との

組み合わせにおける更なる置換を回避すべきアミノ酸の位置を容易に特定することができる。

【０１９７】

多数の科学関係の刊行物が二次構造の予測に向けられてきた。Ｍｏｕｌｔ、１９９６、Ｃｕｒｒ．Ｏｐ．ｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈ．７：４２２～４２７、Ｃｈｏｕら、１９７４、Ｂｉｏｃｈｅｍ．１３：２２２～２４５、Ｃｈｏｕら、１９７４、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ １１３：２１１～２２２、Ｃｈｏｕら、１９７８、Ａｄｖ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．Ｒｅｌａｔ．Ａｒｅａｓ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４７：４５～１４８、Ｃｈｏｕら、１９７９、Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．４７：２５１～２７６、及びＣｈｏｕら、１９７９、Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｊ．２６：３６７～３８４を参照されたい。更に、現在は二次構造の予測を支援するためのコンピュータプログラムが利用可能である。

【０１９８】

いくつかの実施形態において、（１）タンパク質分解に対する感受性を低減する、（２）酸化に対する感受性を低減する、（３）タンパク質複合体を形成するための結合親和性を変化させる、（４）リガンドまたは抗原結合親和性を変化させる、及び／または（４）かかるポリペプチド上の他の生理化学的若しくは機能面での特性を付与または改変する、アミノ酸置換が行われる。例えば、天然に存在する配列中で、単一または多重のアミノ酸置換（特定の実施形態においては、保存的アミノ酸置換）が行われてもよい。分子間接触を形成するドメインの外側にある抗体の部分において、置換を行うことができる。かかる実施形態においては、親配列の構造的特徴を実質的に変化させない保存的アミノ酸置換を用いることができる（例えば、親または天然の抗原結合タンパク質を特徴付ける二次構造を破壊しない１または複数のアミノ酸置換）。本技術分野で承認されているポリペプチドの二次及び三次構造の例が、「タンパク質、構造及び分子の原理（Ｐｒｏｔｅｉｎｓ，Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅｓ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ）（Ｃｒｅｉｇｈｔｏｎ編）、１９８４、Ｗ．Ｈ．Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ：Ｆｒｅｅｍａｎ ａｎｄ Ｃｏｍｐａｎｙ、「タンパク質構造序論」（Ｉｎｔｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ｔｏ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ）（Ｂｒａｎｄｅｎ及びＴｏｏｚｅ編）、１９９１、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ：Ｇａｒｌａｎｄ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ、及びＴｈｏｒｎｔｏｎら、１９９１、Ｎａｔｕｒｅ ３５４：１０５に記載され、これらはそれぞれ参照により本明細書に組み込まれる。

【０１９９】

更なる好ましい抗体変異体としては、親または天然アミノ酸配列中の１または複数のシステイン残基が別なアミノ酸（例えば、セリン）から除去されるか、または該別なアミノ酸で置換されるシステイン変異体が挙げられる。システイン変異体は、なかんずく抗体が生物学的に活性な立体構造にリフォールディングされる場合に、有用である。システイン変異体は天然の抗体よりもより少ないシステイン残基を有していてもよく、一般的に、不対システインに起因する相互作用を最小化するために等しい数を有する。

【０２００】

開示する重鎖及び軽鎖、可変領域並びにＣＤＲを用いて、ＧＩＴＲに特異的に結合することができる抗原結合領域を含むポリペプチドを調製することができる。例えば、表１に掲載した１または複数のＣＤＲを、共有結合または非共有結合によって分子（例えば、ポリペプチド）中に組み込み、イムノアドヘシンを作製することができる。イムノアドヘシンは、より大きなポリペプチド鎖の一部としてＣＤＲを取り込んでもよく、ＣＤＲを共有結合によって別なポリペプチド鎖に結合させてもよく、またはＣＤＲを非共有結合によって取り込んでもよい。ＣＤＲは、イムノアドヘシンが特定の対象とする抗原（例えば、ＧＩＴＲポリペプチドまたはそのエピトープ）に特異的に結合することを可能にする。

【０２０１】

Ｌ．模倣物

本明細書に記載の可変領域ドメイン及びＣＤＲに基づく模倣物（例えば、「ペプチド模倣物」または「ペプチドミメティックス」）もまた提供される。これらの類似物は、ペプ

チド、非ペプチドまたはペプチドと非ペプチド領域の組み合わせとすることができる。Ｆａｕｃｈｅｒｅ、１９８６、Ａｄｖ．Ｄｒｕｇ Ｒｅｓ．１５：２９、Ｖｅｂｅｒ及びＦｒｅｉｄｉｎｇｅｒ、１９８５、ＴＩＮＳ ３９２ページ、並びにＥｖａｎｓら、１９８７、Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．３０：１２２９、それらは全ての目的に対して、参照により本明細書に組み込まれる。治療上有用なペプチドに構造的に類似するペプチド模倣物を用いて、同様の治療上または予防上の効果を生み出すことができる。かかる化合物は、多くの場合コンピュータ化した分子モデル化の支援により開発される。一般的に、ペプチドミメティックスは、ＧＩＴＲに特異的に結合する能力などの、所望の生物学的活性を示す抗体に構造的に類似したタンパク質であり、但し、任意選択で、本技術分野で周知の方法によって、－CH_2NH－、－CH_2S－、－CH_2－CH_2－、－ＣＨ－ＣＨ－（シス及びトランス）、－$COCH_2$－、－ＣＨ（ＯＨ）CH_2－、及び－CH_2SO－より選択される結合で置換された、１または複数のペプチド結合を有する。コンセンサス配列の１または複数のアミノ酸の、同一種のＤ－アミノ酸（例えば、Ｌ－リシンに代えてＤ－リシン）による系統的な置換を特定の実施形態において用いて、より安定なタンパク質を生起させることができる。更に、コンセンサス配列または実質的に同一のコンセンサス配列の変化形を含む制約を受けたペプチドを、本技術分野で公知の方法（Ｒｉｚｏ及びＧｉｅｒａｓｃｈ、１９９２、Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ． ６１：３８７、参照により本明細書に組み込まれる。）によって、例えば、当該ペプチドを環化させる分子内ジスルフィドブリッジを形成することができる内部システイン残基を加えることにより、生起させることができる。

【０２０２】

Ｍ．誘導体

本明細書に記載される抗原結合タンパク質の誘導体も提供される。誘導体化された抗原結合タンパク質は、当該抗体またはフラグメントに、特定の使用における半減期の増加などの所望の特性を付与する、任意の分子または物質を含むことができる。誘導体化された抗原結合タンパク質は、例えば、検知可能な（すなわち、標識化のための）部分（例えば、放射性の、発色性の、抗原性または酵素性の分子）、検知可能なビーズ（磁性の若しくは高電子密度のビーズ（例えば、金ビーズ）、または別な分子に結合する分子（例えば、ビオチン若しくはストレプトアビジン））、治療若しくは診断のための部分（例えば、放射性の、細胞傷害性の、若しくは薬学的に活性な部分）、あるいは抗原結合タンパク質の特定の使用（例えば、ヒトの対象などの対象に対する投与、または他のイン・ビボ若しくはイン・ビトロでの使用）に対する適性を向上させる分子を含むことができる。抗原結合タンパク質を誘導体化するために用いることができる分子の例としては、アルブミン（例えば、ヒト血清アルブミン）及びポリエチレングリコール（ＰＥＧ）が挙げられる。アルブミンが結合した及びＰＥＧ化した抗原結合タンパク質の誘導体は、本技術分野で周知の技法を用いて調製することができる。特定の抗原結合タンパク質としては、本明細書に記載のＰＥＧ化した一本鎖ポリペプチドが挙げられる。一実施形態において、抗原結合タンパク質は、トランスサイレチン（ＴＴＲ）またはＴＴＲ変異体に抱合している、または他の形態で結合している。ＴＴＲまたはＴＴＲ変異体は、例えば、デキストラン、ポリ（ｎ－ビニルピロリドン）、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール単独重合体、ポリプロキレンオキシド／エキレンオキシド共重合体、ポリオキシエチル化ポリオール及びポリビニルアルコールからなる群より選択される化学品によって化学修飾することができる。

【０２０３】

他の誘導体としては、ＧＩＴＲ抗原結合タンパク質の、ＧＩＴＲ抗原結合タンパク質のＮ末端またはＣ末端に融合した異種性ポリペプチドを含む組換え融合タンパク質の発現によるなどの、他のタンパク質若しくはポリペプチドとの共有結合または凝集による抱合体が挙げられる。例えば、抱合型のペプチドは、異種性シグナル（またはリーダー）ポリペプチド、例えば、酵母α因子リーダー、またはエピトープタグなどのペプチドであってよい。ＧＩＴＲ抗原結合タンパク質を含む融合タンパク質は、ＧＩＴＲ抗原結合タンパク質

の精製または同定を容易にするために付加されたペプチド（例えば、ポリ－Ｈｉｓ）を含むことができる。ＧＩＴＲ抗原結合タンパク質はまた、Ｈｏｐｐら、１９８８、Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　６：１２０４、及び米国特許第５，０１１，９１２号に記載のＦＬＡＧペプチドに結合することができる。ＦＬＡＧペプチドは高度に抗原性であり、特異的モノクローナル抗体（ｍＡｂ）が可逆的に結合するエピトープを提供し、発現した組換えタンパク質の迅速なアッセイ及び容易な精製を可能にする。ＦＬＡＧペプチドが所与のポリペプチドに融合された融合タンパク質の調製に有用な試剤は市販されている（シグマ社、ミズーリ州セントルイス）。

【０２０４】

Ｎ．オリゴマー

１または複数のＧＩＴＲ抗原結合タンパク質を含むオリゴマーをＧＩＴＲアゴニストとして用いてもよい。オリゴマーは共有結合で結合したまたは非共有結合で結合した二量体、三量体、またはそれ以上のオリゴマーの形態であってよい。ある実施形態において、２以上のＧＩＴＲ抗原結合タンパク質を含むオリゴマーが提供され、一例としてはホモ二量体である。他のオリゴマーとしては、ヘテロ二量体、ホモ三量体、ヘテロ三量体、ホモ四量体、ヘテロ四量体等が挙げられる。

【０２０５】

一実施形態は、ＧＩＴＲ抗原結合タンパク質に融合したペプチド部分間の共有結合性または非共有結合性相互作用を介して結合された、複数のＧＩＴＲ結合ポリペプチドを含むオリゴマーを対象とする。かかるペプチドはペプチド連結子（スペーサ）、またはオリゴマー化を促進する特性を有するペプチドであってもよい。より詳細には後述するように、ロイシンジッパー及び抗体由来の特定のポリペプチドは、それらに結合したＧＩＴＲ抗原結合タンパク質のオリゴマー化を促進することができるペプチドに含まれる。

【０２０６】

特定の実施形態において、オリゴマーは、２から４のＧＩＴＲ抗原結合タンパク質を含む。オリゴマーのＧＩＴＲ抗原結合タンパク質部分は、任意の上述の形態、例えば、変異体またはフラグメントであってよい。オリゴマーは、アゴニスト活性を有するＧＩＴＲ抗原結合タンパク質を含むことが好ましい。

【０２０７】

一実施形態において、オリゴマーは免疫グロブリン由来のポリペプチドを用いて調製される。（Ｆｃドメインを始めとする）抗体由来のポリペプチドの種々の部分に融合する特定の異種性ポリペプチドを含む融合タンパク質の調製が、例えば、Ａｓｈｋｅｎａｚｉら、１９９１、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８８：１０５３５、Ｂｙｒｎら、１９９０、Ｎａｔｕｒｅ　３４４：６７７、及びＨｏｌｌｅｎｂａｕｇｈら、１９９２「免疫学における最新プロトコル」中の「免疫グロブリン融合タンパク質の構築」（“Ｃｏｎｓｔｒｕｃｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎ　Ｆｕｓｉｏｎ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ”ｉｎ　Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ）、補遺４、１０．１９．１～１０．１９．１１ページによって記載されている。

【０２０８】

一実施形態は、ＧＩＴＲ抗原結合タンパク質を抗体のＦｃ領域に融合することによって創出される２の融合タンパク質を含む二量体を対象とする。二量体は、例えば、融合タンパク質をコードする遺伝子融合体を適宜の発現ベクター中に挿入し、組換え発現ベクターによって形質転換した宿主細胞中の遺伝子融合体を発現させ、発現した融合タンパク質を抗体分子と殆ど同様に会合させることによって二量体を作製することができ、それによって連鎖間ジスルフィド結合がＦｃ部分間に生じ、二量体を生成する。

【０２０９】

本明細書において用いられる用語「Ｆｃポリペプチド」は、抗体のＦｃ領域由来のポリペプチドの天然及び変異タンパク質形態を包含する。二量化を促進するヒンジ領域を含むかかるポリペプチドのトランケートした形態も包含される。Ｆｃ部分を含む融合タンパク質（及びそれらから形成されるオリゴマー）は、プロテインＡまたはプロテインＧカラム

上でのアフィニティークロマトグラフィーによる容易な精製の利点をもたらす。

【０２１０】

ＰＣＴ出願ＷＯ９３／１０１５１並びに米国特許第５，４２６，０４８号及び第５，２６２，５２２号に記載される一つの好適なＦｃポリペプチドは、ヒトＩｇＧ１抗体のＦｃ領域のＮ末端ヒンジ領域から天然のＣ末端へ伸びた一本鎖ポリペプチドである。別な有用なＦｃポリペプチドは、米国特許第５，４５７，０３５号、及びＢａｕｍら、１９９４、ＥＭＢＯ Ｊ．１３：３９９２～４００１に記載のＦｃ変異タンパク質である。この変異タンパク質のアミノ酸配列は、アミノ酸１９がＬｅｕからＡｌａに変更になり、アミノ酸２０がＬｅｕからＧｌｕに変更になり、アミノ酸２２がＧｌｙからＡｌａに変更になった以外は、ＷＯ９３／１０１５１に示される天然のＦｃ配列のアミノ酸配列と同一である。変異タンパク質はＦｃ受容体に対する親和性の減少を示す。

【０２１１】

あるいは、オリゴマーは、ペプチド連結子（スペーサペプチド）有りまたはなしで、複数のＧＴＲ抗原結合タンパク質を含む融合タンパク質である。好適なペプチド連結子の中に、米国特許第４，７５１，１８０号及び第４，９３５，２３３号に記載されるものがある。

【０２１２】

オリゴマーＧＩＴＲ抗原結合タンパク質誘導体の別な調製方法は、ロイシンジッパーの使用を含む。ロイシンジッパードメインは、その中にロイシンジッパードメインが存在するタンパク質のオリゴマー化を促進するペプチドである。ロイシンジッパーは当初いくつかのＤＮＡ結合タンパク質中で識別され（Ｌａｎｄｓｃｈｕｌｚら、１９８８、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４０：１７５９）、それ以後種々の異なるタンパク質中で見出されてきた。公知のロイシンジッパーの中に、二量化または三量化する、天然に存在するペプチド及びそれらの誘導体がある。可溶性のオリゴマータンパク質を産生するために好適なロイシンジッパードメインの例がＰＣＴ出願ＷＯ９４／１０３０８に記載され、肺表面活性物質タンパク質Ｄ（ＳＰＤ）由来のロイシンジッパーがＨｏｐｐｅら、１９９４、ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔｅｒｓ ３４４：１９１に記載され、これらは参照により本明細書に組み込まれる。ロイシンジッパーに融合した異種性タンパク質の安定な三量化を可能にする修飾ロイシンジッパーの使用がＦａｎｓｌｏｗら、１９９４、Ｓｅｍｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．６：２６７～２７８に記載される。一つの取り組みにおいて、ロイシンジッパーペプチドに融合したＧＩＴＲ抗原結合タンパク質フラグメントまたは誘導体を含む組換え融合タンパク質が、適宜の宿主細胞中で発現され、生成する可溶性のオリゴマーＧＩＴＲ抗原結合タンパク質フラグメントまたは誘導体が、培養物上清より回収される。

【０２１３】

Ｏ．ＧＩＴＲ抗原結合タンパク質の種間交差反応性

一実施形態において、ＧＩＴＲ抗原結合タンパク質（例えば、表１に記載の配列を有するもの）はヒトＧＩＴＲタンパク質（配列番号１）とは結合するが、マウスＧＩＴＲ（配列番号３）とは結合しない。別な実施形態において、ＧＩＴＲ抗原結合タンパク質はヒトＧＩＴＲタンパク質（配列番号１）及びカニクイザルＧＩＴＲ（配列番号２）と結合する。更に別な実施形態において、ＧＩＴＲ抗原結合タンパク質はヒトＧＩＴＲ（配列番号１）及びカニクイザルＧＩＴＲ（配列番号２）とは結合するが、マウスＧＩＴＲ（配列番号３）とは結合しない。

【０２１４】

種々の実施形態において、ＧＩＴＲ抗原結合タンパク質はヒトＧＩＴＲタンパク質（例えば、配列番号１）と、１、２、５、１０、２０または５０ｎＭ以下のK_Dで結合し、カニクイザルＧＩＴＲタンパク質（配列番号２）と、５０、１００、１５０、２００、３００、４００、５００、６００または７００ｎＭ以下のK_Dで結合する。ある態様において、ヒト及びカニクイザルＧＩＴＲへの結合は、例えば、ＢｉａＣｏｒｅにより測定される。

【０２１５】

Ｐ．ＧＩＴＲ抗原結合タンパク質のグリコシル化状態

抗原結合タンパク質は、天然種において見られるグリコシル化パターンとは異なるまたは変更された該パターンを有していてもよい。本技術分野で公知の通り、グリコシル化パターンはタンパク質の配列（例えば、後述する特定のグリコシル化アミノ酸残基の有無）、または当該タンパク質が産生される宿主細胞若しくは微生物の両方に依存し得る。特定の発現系を下記する。

【０２１６】

ポリペプチドのグリコシル化は、一般的にＮ－結合型またはＯ－結合型のいずれかである。Ｎ－結合型とは、アスパラギン残基の側鎖への炭水化物部分の結合をいう。トリペプチド配列アスパラギン－Ｘ-セリン及びアスパラギン－Ｘ－スレオニン（但し、Ｘはプロリン以外の任意のアミノ酸である。）は、アスパラギン側鎖への炭水化物部分の酵素的結合に対する認識配列である。従って、ポリペプチド中のこれらのトリペプチド配列のいずれかの存在は、潜在的なグリコシル化部位を創出する。Ｏ－結合型グリコシル化とは、糖であるＮ－アセチルガラクトサミン、ガラクトース、またはキシロースの内の１の、ヒドロキシアミノ酸、最も一般的にはセリンまたはスレオニンへの結合をいう。但し、５－ヒドロキシプロリンまたは５－ヒドロキシリシンも用いることができる。

【０２１７】

抗原結合タンパク質へのグリコシル化部位の付加は、アミノ酸配列を、該配列が１または複数の上述のトリペプチド配列を含むように変更することによって簡便に行われる（Ｎ－結合型グリコシル化部位の場合）。代替手段として、出発配列への１若しくは複数のセリンまたはスレオニン残基の付加または該残基による置換によってこれを行ってもよい（Ｏ－結合型グリコシル化部位の場合）。簡易化のために、特に標的ペプチドをコードするＤＮＡを、予め選択した塩基において、所望のアミノ酸へと翻訳されることとなるコドンが生起されるように突然変異させることによる、ＤＮＡ段階での変更を通じて、抗原結合タンパク質アミノ酸配列を変えてもよい。

【０２１８】

抗原結合タンパク質上の炭水化物部分の数を増加させる別な手段は、当該タンパク質へのグリコシドの化学的または酵素的カップリングによるものである。これらの手法は、Ｎ－及びＯ－結合型グリコシル化に対するグリコシル化能を有する宿主細胞中での当該タンパク質の産生を必要としない点において有利である。用いるカップリングの様式に応じて、糖は、（ａ）アルギニン及びヒスチジン、（ｂ）遊離カルボキシル基、（ｃ）システインの遊離スルフヒドリル基などの遊離スルフヒドリル基、（ｄ）セリン、スレオニン、若しくはヒドロキシプロリンの遊離ヒドロキシル基などの遊離ヒドロキシル基、（ｅ）フェニルアラニン、チロシン、若しくはトリプトファンの芳香族残基などの芳香族残基、または（ｆ）グルタミンのアミド基に結合することができる。これらの方法は１９８７年９月１１日公開のＷＯ８７／０５３３０並びにＡｐｌｉｎ及びＷｒｉｓｔｏｎ、１９８１、ＣＲＣ　Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖ、Ｂｉｏｃｈｅｍ．、２５９～３０６ページに記載される。

【０２１９】

出発抗原結合タンパク質上に存在する炭水化物の除去は、化学的にまたは酵素的に行うことができる。化学的脱グリコシル化においては、当該タンパク質を化合物トリフルオロメタンスルホン酸、または等価の化合物に曝露する必要がある。この処理により、結合のための糖（Ｎ－アセチルグルコサミン若しくはＮ－アセチルガラクトサミン）以外の殆どまたは全ての糖が開裂する一方、当該ポリペプチドはインタクトのままである。化学的脱グリコシル化は、Ｈａｋｉｍｕｄｄｉｎら、１９８７、Ａｒｃｈ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．２５９：５２及びＥｄｇｅら、１９８１、Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１１８：１３１によって記載されている。ポリペプチド上の炭水化物部分の酵素的開裂は、Ｔｈｏｔａｋｕｒａら、１９８７、Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．１３８：３５０に記載のように、種々のエンド－及びエキソ－グリコシダーゼを用いることによって行うことができる。Ｄｕｓｋｉｎら、１９８２、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２５７：３１０５によって記載されるように、化合物ツニカマイシンを用いることによって、潜在的なグリコシル化部

位におけるグリコシル化を防ぐことができる。ツニカマイシンはタンパク質－Ｎ－グリコシド結合の形成を遮断する。

【０２２０】

従って、態様は、親ポリペプチドのアミノ酸配列と比較して、グリコシル化部位の数及び／またはタイプが変わっている抗原結合タンパク質のグリコシル化変異体を包含する。特定の実施形態において、抗体タンパク質変異体は、天然の抗体よりもより多いまたはより少ない数のＮ－結合型グリコシル化部位を含む。Ｎ－結合型グリコシル化部位は、配列Ａｓｎ－Ｘ－ＳｅｒまたはＡｓｎ－Ｘ－Ｔｈｒ（但し、Ｘとして示されるアミノ酸残基は、プロリン以外の任意のアミノ酸残基であることができる。）を特徴とする。この配列を創出するアミノ酸残基の置換が、潜在的なＮ－結合型炭水化物鎖の付加のための新たな部位を付与する。あるいは、この配列を除去するまたは変化させる置換が、天然のポリペプチドに存在するＮ－結合型炭水化物鎖の付加を防止することとなる。例えば、Ａｓｎの除去により、または別なアミノ酸によるＡｓｎの置換により、グリコシル化を低減することができる。他の実施形態において、１または複数の新たなＮ－結合型部位が創出される。抗体は一般的に、Ｆｃ領域中にＮ－結合型グリコシル化部位を有する。

【０２２１】

実施例に記載するように、特定のＧＩＴＲ抗原結合タンパク質のグリコシル化状態が、当該タンパク質のアゴニスト活性に強く影響する重要な因子となり得ることが判明した。特に、抗原結合タンパク質はグリコシル化されると活性が向上することが判明した。従って、いくつかの実施形態において、抗原結合タンパク質は定常領域がＩｇＧ１である抗体であり、それ故に、免疫グロブリンは、Ｆｃ受容体（ＦｃＲ）への結合を可能にするグリコシル化状態を有する。細胞表面上のＦｃ受容体への抗体の結合が、内部移行及びそれに伴う、その後の細胞内に取り込まれた抗体で被覆された粒子の破壊、免疫複合体の排出、キラー細胞による抗体で被覆された標的細胞の溶解（抗体依存性細胞傷害、または簡略化してＡＤＣＣと呼ばれる過程）、免疫グロブリン産生の制御及び炎症性メディエータの放出を始めとする多様な生物学的反応をトリガーする。実施例に示すように、抗原結合タンパク質によるＦｃＲへの結合が当該タンパク質のより大きなクラスタ化をもたらし、該クラスタ化が今度はアゴニスト活性の向上をもたらすことが判明した。この知見は、低いエフェクタ機能及び／またはグリコシル化を有するＧＩＴＲ抗体を用いるとアゴニスト活性が維持されることを示唆する特定の報告に反する。

【０２２２】

Ｑ．標識及びエフェクタ基を有する抗原結合タンパク質

いくつかの実施形態において、抗原結合タンパク質は１または複数の標識を含む。用語「標識基」または「標識」とは、任意の検知可能な標識を意味する。好適な標識基としては、放射性同位体すなわち放射性核種（例えば、^{3}Ｈ、^{14}Ｃ、^{15}Ｎ、^{35}Ｓ、^{90}Ｙ、^{99}Ｔｃ、^{111}Ｉｎ、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ）、蛍光基（例えば、ＦＩＴＣ、ローダミン、ランタニド蛍光体）、酵素基（例えば、ホースラディッシュパーオキシダーゼ、β－ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ）、化学発光基、ビオチニル基、または二次受容体によって認識される所定のポリペプチドエピトープ（例えば、ロイシンジッパー対配列、二次抗体に対する結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ）が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、標識基は、可能性のある立体障害を低減するために、種々の長さのスペーサアームを介して抗原結合タンパク質と連結される。種々のタンパク質の標識化方法が本分野において公知であり、適合すると思われるように用いることができる。

【０２２３】

用語「エフェクタ基」とは、細胞毒として作用する、抗原結合タンパク質に連結する任意の基を意味する。好適なエフェクタ基の例は、放射性同位体すなわち放射性核種（例えば、^{3}Ｈ、^{14}Ｃ、^{15}Ｎ、^{35}Ｓ、^{90}Ｙ、^{99}Ｔｃ、^{111}Ｉｎ、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ）である。他の好適な基としては、毒素、治療的な基または化学療法的な基が挙げられる。好適な基の例としては、カリケアマイシン、オーリスタチン、ゲルダナマイシン及び

マイタンシンが挙げられる。いくつかの実施形態において、エフェクタ基は、可能性のある立体障害を低減するために、種々の長さのスペーサアームを介して抗原結合タンパク質と連結される。

【０２２４】

一般的に、標識は、標識が検知されるアッセイに応じて種々のクラスに分類される。すなわち、ａ）放射性同位体または重同位体であることができる同位体標識、ｂ）磁性標識（例えば、磁性粒子）、ｃ）酸化還元活性部分、ｄ）光学色素、ｅ）酵素基（例えば、ホースラディッシュパーオキシダーゼ、β－ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ）、ｆ）ビオチニル化基、及びｇ）二次受容体によって認識される所定のポリペプチドエピトープ（例えば、ロイシンジッパー対配列、二次抗体に対する結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ等）である。いくつかの実施形態において、標識基は、可能性のある立体障害を低減するために、種々の長さのスペーサアームを介して抗原結合タンパク質と連結される。種々のタンパク質の標識化方法が本分野において公知である。

【０２２５】

特異的な標識としては、発色団、蛍光体及び蛍光色素分子を始めとする、但しこれらに限定されない、光学色素が挙げられ、蛍光色素分子が多数の例において特異的である。蛍光色素分子は、「低分子」蛍光体、またはタンパク質様蛍光体のいずれであってもよい。

【０２２６】

「蛍光標識」とは、その固有の蛍光特性を介して検知することができる任意の分子を意味する。好適な蛍光標識としては、フルオレセイン、ローダミン、テトラメチルローダミン、エオシン、エリスロシン、クマリン、メチルクマリン、ピレン、マラカイトグリーン、スチルベン、ルシファーイェロー、Ｃａｓｃａｄｅ ＢｌｕｅＪ、テキサスレッド、ＩＡＥＤＡＮＳ、ＥＤＡＮＳ、ＢＯＤＩＰＹ ＦＬ、ＬＣ Ｒｅｄ ６４０、Ｃｙ５、Ｃｙ５．５、ＬＣ Ｒｅｄ ７０５、オレゴングリーン、Ａｌｅｘａ－Ｆｌｕｏｒ色素（Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ３５０、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ４３０、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ４８８、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ５４６、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ５６８、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ５９４、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ６３３、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ６６０、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ６８０）、Ｃａｓｃａｄｅ Ｂｌｕｅ、Ｃａｓｃａｄｅ Ｙｅｌｌｏｗ及びＲ－フィコエリトリン（ＰＥ）（モレキュラープローブ社、オレゴン州ユージーン）、ＦＩＴＣ、ローダミン、及びテキサスレッド（Ｐｉｅｒｃｅ社、イリノイ州ロックフォード）、Ｃｙ５、Ｃｙ５．５、Ｃｙ７（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ、ペンシルベニア州ピッツバーグ）が挙げられるが、これらに限定されない。蛍光色素分子を始めとする好適な光学色素がＲｉｃｈａｒｄ Ｐ．Ｈａｕｇｌａｎｄによる「分子プローブ便覧」（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅｓ Ｈａｎｄｂｏｏｋ）に記載され、参照により本明細書に明示的に組み込まれる。

【０２２７】

好適なタンパク質様蛍光標識はまた、ウミシイタケのＧＦＰ、ＰｔｉｌｏｓａｒｃｕｓのＧＦＰまたはオワンクラゲ種のＧＦＰを始めとする緑色蛍光タンパク質（Ｃｈａｌｆｉｅら、１９９４、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２６３：８０２～８０５）、ＥＧＦＰ（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ Ｌａｂｓ．社、ジェンバンク アクセッション番号Ｕ５５７６２）、青色蛍光タンパク質（ＢＦＰ、Ｑｕａｎｔｕｍ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社、カナダ国ケベック、Ｓｔａｕｂｅｒ、１９９８、Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ２４：４６２～４７１、Ｈｅｉｍら、１９９６、Ｃｕｒｒ．Ｂｉｏｌ．６：１７８～１８２）、増強黄色蛍光タンパク質（ｅｎｈａｎｃｅｄ ｙｅｌｌｏｗ ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ ｐｒｏｔｅｉｎ）（ＥＹＦＰ、Ｃｌｏｎｔｅｃｈ Ｌａｂｓ．社）、ルシフェラーゼ（Ｉｃｈｉｋｉら、１９９３、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５０：５４０８～５４１７）、β－ガラクトシダーゼ（Ｎｏｌａｎら、１９８８、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．８５：２６０３～２６０７）及びウミシイタケ（ＷＯ９２／１５６７３、ＷＯ９５／０７４６３、ＷＯ９８／１４６０５、ＷＯ９８／２６２７７、ＷＯ９９／４９０１９、米国特許第５

２９２６５８号、第５４１８１５５号、第５６８３８８８号、第５７４１６６８号、第５７７７０７９号、第５８０４３８７号、第５８７４３０４号、第５８７６９９５号、第５９２５５５８）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０２２８】

ＩＶ．ＧＩＴＲ抗原結合タンパク質をコードする核酸

抗体の一方若しくは両方の連鎖、またはそのフラグメント、誘導体、変異タンパク質、若しくは変異体；重鎖可変領域若しくはＣＤＲのみをコードするポリヌクレオチド；ハイブリダイゼーションプローブ、ＰＣＲプライマ若しくはポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを識別する、分析する、変異させるまたは増幅するための配列プライマとして用いるために十分なポリヌクレオチド、ポリヌクレオチドの発現を阻害するためのアンチセンス核酸、及び相補的配列を始めとする、本明細書記載のＧＩＴＲ抗原結合タンパク質、あるいはそれらの部分をコードする核酸も提供される。核酸は任意の長さとすることができる。核酸の長さは、例えば、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、７５、１００、１２５、１５０、１７５、２００、２５０、３００、３５０、４００、４５０、５００、７５０、１，０００、１，５００、３，０００、５，０００ヌクレオチドまたはそれ以上であることができ、及び／または１または複数の更なる配列、例えば、制御性配列を含むことができ、及び／またはより大きな核酸、例えば、ベクターの一部であることができる。核酸は一本鎖または二本鎖であることができ、ＲＮＡ及び／またはＤＮＡヌクレオチド、並びにそれらの人工的な変異体（例えば、ペプチド核酸）であることができる。表３は、ＩｇＧ１重鎖定常領域及びＩｇＧ１　κ及びλ軽鎖定常領域をコードする代表的な核酸配列を示す。本明細書で提供される任意の可変領域は、これらの定常領域に結合して、完全な重鎖及び軽鎖配列を形成し得る。但し、これらの定常領域配列は具体的な例として提示されるに過ぎないことが理解される必要がある。いくつかの実施形態において、可変領域配列は、本技術分野で公知の他の定常領域配列に結合する。重鎖及び軽鎖可変領域をコードする代表的な核酸配列が表３及び表４に提示される。

【０２２９】

【表３】

表３　重鎖及び軽鎖定常領域をコードする代表的な核酸配列

連鎖型式	核酸配列
IgG1 重鎖（配列番号445）	GCTAGCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGC ACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGG CCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAA CCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGAC CAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGT CCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACC GTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACAT CTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGG TGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAA ACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACT CCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCCAA AACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCT GAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGA AGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACG GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGG GAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAG CGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATG GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCC CTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGC CAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCC TGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAG GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCC CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC AGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTG CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTATAGCAA GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGA ACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG CACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTC TCCGGGTAAATGA

IgG1 λ軽鎖定常領域（配列番号446）	CAACCGAAAGCGGCGCCCTCGGTCACTCTGTTCCC GCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCA CACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGA GCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCC CGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACACCCTCCA AACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTAT CTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAG AAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCA CCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCTACAGAATGTTCA TAG
IgG1 κ軽鎖定常領域（配列番号447）	ACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCC ATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTG TTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAG GCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCA ATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGG ACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACC CTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAA AGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGA GCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAG TGTTAG

【０２３０】

表４は、抗原結合タンパク質の重鎖及び軽鎖可変ドメインをコードする代表的な核酸配列の概要を提示し、これらの配列はまた、可変ドメイン中に含まれる種々のＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２、ＣＤＲＨ３、ＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２及びＣＤＲＬ３配列もコードする。従って、一実施形態において、下記の核酸によってコードされる抗原結合タンパク質が提供される。

【０２３１】

【表４】

表４　重鎖及び軽鎖可変ドメインをコードする代表的な核酸配列

親

抗体番号	参照番号	抗体	VH	VL
Ab1	SS-10942	1D7	99	80
Ab2	SS-12413	33C9	100	81
Ab3	SS-12414	33F6	101	82
Ab4	SS-12415	34G4	102	83
Ab5	SS-12416	35B10	103	84
Ab6	SS-12417	41E 11	104	85
Ab7	SS-12428	41G5	105	86
Ab8	SS-12418	42A11	106	87
Ab9	SS-12419	44C1	107	88
Ab10	SS-12420	45A8	108	89
Ab11	SS-12421	46E 11	109	90
Ab12	SS-12422	48H12	110	91
Ab13	SS-12423	48H7	111	92
Ab14	SS-12424	49D9	112	93
Ab15	SS-12425	49E 2	113	94
Ab16	SS-12427	48A9	114	95
Ab17	SS-10943	5H7	115	96
Ab18	SS-10944	7A10	116	97
Ab19	SS-10945	9H6	117	98

遺伝子操作

抗体番号	参照番号	抗体	VH	VL
Ab20	SS-12514	44C1v1	196	156
Ab21	SS-12515	45A8v1	197	157
Ab22	SS-12562	49D9v1	198	158
Ab23	SS-12516	49E2v1	199	159
Ab24	SS-12513	48A9v1	200	160
Ab25	SS-16912	5H7v1	201	161
Ab26	SS-13807	5H7v2	202	162
Ab27	SS-16913	5H7v3	203	163
Ab28	SS-16915	5H7v5	204	164
Ab29	SS-16917	5H7v7	205	165
Ab30	SS-16921	5H7v9	206	166
Ab31	SS-16919	5H7v10	207	167
Ab32	SS-16920	5H7v11	208	168
Ab33	SS-16923	5H7v13	209	169
Ab34	SS-16924	5H7v14	210	170
Ab35	SS-16927	5H7v17	211	171
Ab36	SS-16928	5H7v18	212	172
Ab37	SS-16929	5H7v19	213	173
Ab38	SS-16932	5H7v22	214	174
Ab39	SS-13810	7A10v1	215	175
Ab40	SS-16938	7A10v2	216	176
Ab41	SS-16939	7A10v3	217	177

抗体番号	参照番号	抗体	VH	VL
Ab42	SS-16940	7A10v4	218	178
Ab43	SS-16941	7A10v5	219	179
Ab44	SS-16943	9H6v1	220	180
Ab45	SS-16944	9H6v2	221	181
Ab46	SS-13806	9H6v3	222	182
Ab47	SS-16945	9H6v4	223	183
Ab48	SS-16946	9H6v5	224	184
Ab49	SS-16947	9H6v6	225	185
Ab50	SS-16948	33C9v1	226	186
Ab51	SS-13808	33C9v2	227	187
Ab52	SS-16949	33C9v3	228	188
Ab53	SS-16950	33C9v4	229	189
Ab54	SS-16951	33C9v5	230	190
Ab55	SS-16952	41G5v1	231	191
Ab56	SS-13809	41G5v2	232	192
Ab57	SS-16953	41G5v3	233	193
Ab58	SS-16954	41G5v4	234	194
Ab59	SS-16955	41G5v5	235	195

【０２３２】

特定の抗原結合タンパク質またはそれらの部分（例えば、完全長抗体、重鎖若しくは軽鎖、可変ドメイン、またはＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２、ＣＤＲＨ３、ＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２、若しくはＣＤＲＬ３）をコードする核酸は、ＧＩＴＲまたはその免疫原性フラグメントによって免疫化されたマウスのＢ細胞より単離することができる。核酸は、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）などの従来の手法によって単離することができる。ファージ提示が、それによって抗体の誘導体及びその他の抗原結合タンパク質を調製することができる公知の技法の別な例である。一つの取り組みにおいて、対象とする抗原結合タンパク質の構成成分であるポリペプチドが、任意且つ適宜の組換え発現系において発現し、発現したポリペプチドを会合させて、抗原結合タンパク質を形成させる。

【０２３３】

表３及び表４に提示される核酸は例示に過ぎない。遺伝子コードの縮退に起因して、表３及び表４に掲載されるまたは本明細書に別段に記載される各ポリペプチド配列はまた、提示されたもの以外の他の多数の核酸配列によってもコードされる。

【０２３４】

ある態様は、特定のハイブリダイゼーション条件下で他の核酸（例えば、表３及び表４に掲載されるヌクレオチド配列を含む核酸）にハイブリダイズする核酸を更に提供する。核酸のハイブリダイズ方法は本技術分野で周知である。例えば、「分子生物学における最新のプロトコル」（Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ）、Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ、ニューヨーク（１９８９）、６．３．１～６．３．６を参照されたい。本明細書において明らかにするように、適度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、５×塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム（ＳＳＣ）、０．５％　ＳＤＳ、１．０ｍＭ　ＥＤＴＡ（ｐＨ８．０）を含む予備洗浄溶液、約５０％　ホルムアミド、６×ＳＳＣのハイブリダイゼーション緩衝液、及び５５℃のハイブリダイゼーション温度（または、約５０％　ホルムアミドを含むものなど

他の類似のハイブリダイゼーション溶液、４２℃のハイブリダイゼーション温度）、並びに６０℃、０．５×ＳＳＣ、０．１％　ＳＤＳ中の洗浄条件を用いる。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、４５℃、６×ＳＳＣ中でハイブリダイズし、続いて１回または複数回、０．１×ＳＳＣ、０．２％　ＳＤＳ中、６８℃で洗浄する。更に、当業者は、互いに少なくとも６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９８％または９９％同一であるヌクレオチド配列を含む核酸が、互いにハイブリダイズしたままとなるように、ハイブリダイゼーション及び／または洗浄条件を操作して、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを増加または減少させることができる。

【０２３５】

ハイブリダイゼーション条件の選択及び好適な条件を案出するための指針に影響を与える基本的なパラメータは、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ、Ｆｒｉｔｓｃｈ、及びＭａｎｉａｔｉｓ（２００１、「分子クローニング：実験室便覧」（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ）、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ、ニューヨーク州コールドスプリングハーバー、前掲、並びに「分子生物学における最新プロトコル」（Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ）、１９９５、Ａｕｓｕｂｅｌら編、Ｊｏｈｎ　Ｗｉｌｅｙ　＆　Ｓｏｎｓ社、２．１０節及び６．３～６．４）により示され、例えば、核酸の長さ及び／または塩基組成に基づいて、当業者によって容易に決定することができる。

【０２３６】

変更は、核酸中への突然変異によって導入することができ、それによって当該核酸がコードするポリペプチド（例えば、抗体または抗体誘導体）のアミノ酸配列の変更が生じる。突然変異は当技術分野で公知の任意の技法を用いて導入することができる。一実施形態において、例えば、部位特異的変異誘発プロトコルを用いて、１または複数の特定のアミノ酸残基が変更される。別な実施形態において、例えば、ランダム変異誘発プロトコルを用いて、１または複数の無作為に選択された残基が変更される。但し、該変更が行われた後、変異ポリペプチドを発現させ、所望の特性に関してスクリーニングすることができる。

【０２３７】

突然変異は、核酸中に、該核酸がコードするポリペプチドの生物学的活性を有意に変えることなく導入することができる。例えば、非必須アミノ酸残基におけるアミノ酸の置換を生じさせるヌクレオチドの置換を行うことができる。あるいは、当該核酸がコードするポリペプチドの生物学的活性を選択的に変化させる核酸中に、１または複数の突然変異を導入することができる。例えば、突然変異は、生物学的活性を定量的または定性的に変えることができる。定量的変化の例としては、当該活性の向上、低減、または除去が挙げられる。定性的変化の例としては、抗体の抗原特異性の変化が挙げられる。一実施形態において、本技術分野で確立された分子生物学的技法を用いて、本明細書に記載の任意の抗原結合タンパク質をコードする核酸を突然変異させて、アミノ酸配列を変更することができる。

【０２３８】

別な態様は、プライマまたは核酸配列を検知するためのハイブリダイゼーションプローブとしての使用に好適な核酸分子を提供する。核酸分子は、完全長ポリペプチドをコードする核酸配列の部分、例えば、プローブ若しくはプライマとして用いることができるフラグメント、またはポリペプチドの活性部分（例えば、ＧＩＴＲ結合部分）をコードするフラグメントのみを含むことができる。

【０２３９】

核酸の配列に基づくプローブを用いて、当該核酸または類似の核酸、例えば、ポリペプチドをコードする転写物を検知することができる。プローブは、標識基、例えば、放射性同位体、蛍光化合物、酵素、または酵素の補助因子を含むことができる。かかるプローブを用いて、当該ポリペプチドを発現する細胞を識別することができる。

【０２４０】
別な態様は、ポリペプチドまたはその部分（例えば、１若しくは複数のＣＤＲまたは１若しくは複数の可変領域ドメインを含むフラグメント）をコードする核酸を含むベクターを提供する。ベクターの例としては、プラスミド、ウィルスベクター、非エピソーム哺乳類ベクター及び発現ベクター、例えば、組換え発現ベクターが挙げられるが、これらに限定されない。組換え発現ベクターは、宿主細胞中での核酸の発現に好適な形態の核酸を含むことができる。組換え発現ベクターは、発現に用いられる宿主細胞に基づいて選択される１または複数の制御性配列を含み、該配列は発現されるべき核酸配列に作動可能に結合される。制御性配列としては、多種の宿主細胞においてヌクレオチド配列の構成的発現を指示する制御性配列（例えば、ＳＶ４０初期遺伝子エンハンサ、ラウス肉腫ウィルスプロモータ及びサイトメガロウィルスプロモータ）、特定の宿主細胞中でのみヌクレオチド配列の発現を指示する制御性配列（例えば、組織特異性制御性配列、Ｖｏｓｓら、１９８６、Ｔｒｅｎｄｓ Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｓｃｉ．１１：２８７、Ｍａｎｉａｔｉｓら、１９８７、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３６：１２３７を参照のこと。）、並びに特定の処理または条件に応答してヌクレオチド配列の誘導性発現を指示する制御性配列（例えば、哺乳類細胞中におけるメタロチオネインプロモータ並びに原核生物系及び真核生物系の両方におけるｔｅｔ応答性及び／またはストレプトマイシン応答性プロモータ）が挙げられる。発現ベクターの設計は、形質転換される宿主細胞の選択及び所望のタンパク質の発現のレベルのような因子に依存し得る。発現ベクターを宿主細胞中に導入し、それによって、本明細書に記載の核酸によってコードされる、融合タンパク質若しくはペプチドを始めとするタンパク質またはペプチドを産生することができる。

【０２４１】
別な態様は、組換え発現ベクターが導入された宿主細胞を提供する。宿主細胞は任意の原核細胞（例えば、大腸菌）または真核細胞（例えば、酵母、昆虫、若しくは哺乳類細胞（例えば、ＣＨＯ細胞））であることができる。ベクターＤＮＡは、従来の形質転換または形質移入技法により原核細胞または真核細胞中に導入することができる。安定した哺乳類細胞の形質移入のためには、用いる発現ベクター及び形質移入技法に応じて、小さな分率の細胞のみに外来ＤＮＡをそのゲノム中に組み込んでもよいことが判っている。これらの組み込み体を識別及び選択するためには、一般的に、（例えば、抗生物質に対する耐性のための）選択マーカーをコードする遺伝子が、対象とする遺伝子と共に宿主細胞中に導入される。好ましい選択マーカーとしては、Ｇ４１８、ハイグロマイシン及びメトトレキサートなどの薬剤に対する耐性を付与するマーカーが挙げられる。導入された核酸により安定的に形質移入された細胞は、数ある方法の中でも、薬剤選択（例えば、組み込まれた選択マーカー遺伝子を有する細胞は生き残ることとなる一方、その他の細胞は死滅する。）によって識別することができる。

【０２４２】
Ｖ．ＧＩＴＲ抗原結合タンパク質の調製
提供される非ヒト抗体は、例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ロバ、あるいは非ヒト霊長類（サルなど（例えば、カニクイザル若しくはアカゲザル）または類人猿（例えば、チンパンジー））などの、任意の抗体産生動物に由来することができる。非ヒト抗体は、例えば、イン・ビトロ細胞培養及び細胞培養に基づく用途、あるいは当該抗体に対する免疫反応が起こらない若しくは有意ではない、該免疫反応を防止することができる、該免疫反応が関与しない、または該免疫反応が望ましい、任意の他の用途に用いることができる。特定の実施形態において、抗体は、完全長ＧＩＴＲまたはそのフラグメントによる免疫化によって産生することができる。あるいは、特定の非ヒト抗体は、本明細書において提供される特定の抗体が結合するエピトープの一部を形成するＧＩＴＲのセグメントであるアミノ酸による免疫化によって、生じさせることができる。抗体はポリクローナル、モノクローナルであってよく、または組換えＤＮＡを発現させることによって宿主細胞中で合成してもよい。

【０２４３】

完全ヒト抗体は、上述のように、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を含む遺伝子導入動物を免疫化することによって、またはあるレパートリのヒト抗体を発現するファージ提示ライブラリを選択することによって調製することができる。

【０２４４】

モノクローナル抗体（ｍＡｂ）は、従来のモノクローナル抗体の方法論、例えば、Ｋｏｈｌｅｒ及びＭｉｌｓｔｅｉｎ、１９７５、Ｎａｔｕｒｅ ２５６：４９５の標準的な体細胞ハイブリダイゼーション技法を始めとする様々な技法によって産生させることができる。あるいは、他のモノクローナル抗体の産生技法、例えば、Ｂリンパ球のウィルス形質転換またはがん性形質転換を用いることができる。ハイブリドーマを調製するための一つの好適な動物系はマウス系であり、該系は十分に確立された手法である。免疫化プロトコル及び融合に用いる免疫化した脾細胞の単離技法は本技術分野で公知である。かかる手法に関しては、免疫化マウス由来のＢ細胞が、マウスの骨髄腫細胞株などの適宜の不死化した融合パートナーと融合される。所望であれば、その他に、ラットまたはその他の哺乳動物をマウスに代えて免疫化することができ、かかる動物由来のＢ細胞をマウスの骨髄腫細胞株と融合して、ハイブリドーマを形成することができる。あるいは、マウス以外の出所由来の骨髄腫細胞株を用いてもよい。ハイブリドーマを作製するための融合手法も周知である。

【０２４５】

提供される一本鎖抗体は、重鎖及び軽鎖の可変領域ドメイン（Ｆｖ領域）フラグメントを、アミノ酸ブリッジ（短鎖ペプチド連結子）を介して結合して、一本鎖ポリペプチド連鎖を生じさせることにより形成することができる。かかる一本鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）は、２の可変ドメインポリペプチド（V_L及びV_H）をコードするＤＮＡ間のペプチド連結子をコードするＤＮＡを融合することによって調製することができる。得られるポリペプチドは、それ自体の上に折り重なって抗原結合モノマーを形成することができ、あるいは該ポリペプチドは、２の可変ドメイン間の柔軟な結合子の長さに応じて、多量体（例えば、二量体、三量体、または四量体）を形成することができる（Ｋｏｒｔｔら、１９９７、Ｐｒｏｔ．Ｅｎｇ．１０：４２３、Ｋｏｒｔｔら、２００１、Ｂｉｏｍｏｌ．Ｅｎｇ．１８：９５～１０８）。異なるV_L及びV_Hを含むポリペプチドを結合することによって、異なるエピトープに結合する多量体のｓｃＦｖを形成することができる（Ｋｒｉａｎｇｋｕｍら、２００１、Ｂｉｏｍｏｌ．Ｅｎｇ．１８：３１～４０）。一本鎖抗体の産生のために開発された技法としては、米国特許第４，９４６，７７８号、Ｂｉｒｄ、１９８８、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４２：４２３、Ｈｕｓｔｏｎら、１９８８、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．８５：５８７９、Ｗａｒｄら、１９８９、Ｎａｔｕｒｅ ３３４：５４４、ｄｅ Ｇｒａａｆら、２００２、Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ Ｂｉｏｌ．１７８：３７９～３８７に記載されるものが挙げられる。本明細書において提供される抗体由来の一本鎖抗体としては、表１に記載の重鎖及び軽鎖可変領域の可変ドメインの組み合わせ、または表１に記載のＣＤＲを含む軽鎖及び重鎖可変ドメインの組み合わせを含むｓｃＦｖが挙げられるが、これらに限定されない。

【０２４６】

一つのサブクラスの抗体である本明細書において提供される抗体は、サブクラススウィッチ方法を用いて別なサブクラスの抗体に変更することができる。従って、例えば、ＩｇＧ抗体はＩｇＭ抗体由来であっても、及びその逆であってもよい。かかる技法は、所与の抗体（親抗体）の抗原結合特性を有するが、当該親抗体とは異なる抗体アイソタイプまたはサブクラスに伴う生物学的特性も示す新しい抗体の調製を可能にする。組換えＤＮＡ技法を用いてもよい。かかる手法においては、特定の抗体ポリペプチドをコードするクローン化されたＤＮＡ、例えば、所望のアイソタイプの抗体の定常ドメインをコードするＤＮＡを用いてもよい。例えば、Ｌａｎｔｔｏら、２００２、Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１７８：３０３～３１６を参照されたい。

【０２４７】

従って、提供される抗体としては、例えば、所望のイソタイプ（例えば、ＩｇＡ、Ｉｇ

Ｇ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＥ、及びＩｇＤ）並びにそのＦａｂまたは$F(ab')_2$フラグメントを有する、可変ドメインの組み合わせを含む抗体が挙げられる。更に、ＩｇＧ４が所望である場合には、点変異（ＣＰＳＣＰ（配列番号４４８）→ＣＰＰＣＰ（配列番号４４９））を、Ｂｌｏｏｍら、１９９７、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｃｉｅｎｃｅ ６：４０７（参照により本明細書に組み込まれる）に記載のようにヒンジ領域に導入し、ＩｇＧ４抗体における異種性を生じさせることがある重鎖内ジスルフィド結合を形成する傾向を低減することも望ましい場合がある。

【０２４８】

更に、異なる特性を有する抗体を誘導する（すなわち、当該抗体が結合する抗原に対する親和性を変える）ための技法も公知である。一つのかかる技法は、連鎖シャフリング（ｃｈａｉｎ ｓｈｕｆｆｌｉｎｇ）と呼ばれ、免疫グロブリン可変ドメイン遺伝子レパートリを糸状バクテリオファージの表面上に提示することを含む。Ｍａｒｋｓら、１９９２、ＢｉｏＴｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １０：７７９に記載されるように、連鎖シャフリングを用いて、ハプテン２－フェニルオキサゾール－５－オンに対して高親和性の抗体が調製されてきた。

【０２４９】

表１に記載の重鎖及び軽鎖可変領域、または表１に記載のＣＤＲに対して保存的修飾（及びコードする核酸に対する対応する修飾）が行われ、機能面での及び生化学的な特性を有するＧＩＴＲ抗原結合タンパク質を産生してもよい。かかる修飾を行うための方法は上述されている。

【０２５０】

ＧＩＴＲ抗原結合タンパク質を更に様々な形で修飾してもよい。例えば、該タンパク質が治療目的に用いられることになる場合には、ポリエチレングリコールと抱合（ＰＥＧ化）させて、血清半減期を延長してもよく、またはタンパク質の送達を向上させてもよい。あるいは、主題の抗体またはそれらのフラグメントのＶ領域を、異なる抗体分子のＦｃ領域と融合させてもよい。この目的のために用いられるＦｃ領域は、当該融合タンパク質が治療薬として用いられる場合には、該Ｆｃ領域が補体に結合せず、従って、患者において細胞溶解を誘発する可能性を低減するように修飾されてもよい。更に、主題の抗体またはそれらの機能性フラグメントは、ヒト血清アルブミンと抱合され、当該抗体またはそのフラグメントの血清半減期を向上させてもよい。抗原結合タンパク質またはそれらのフラグメントに対する別な有用な融合パートナーは、トランスサイレチン（ＴＴＲ）である。ＴＴＲは四量体を形成する能力を有し、従って抗体－ＴＴＲ融合タンパク質が、その結合活性を増加し得る多価抗体を形成することができる。

【０２５１】

あるいは、本明細書に記載の抗原結合タンパク質の機能面での及び／または生化学的な特性における実質的な修飾は、（ａ）例えば、シート若しくはヘリカル構造としての、置換の領域における分子骨格の構造、（ｂ）標的部位における分子の電荷若しくは疎水性、または（ｃ）側鎖の嵩高さ、を維持することに対するそれらの効果が有意に異なる重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列における置換を創出することによってなすことができる。「保存的アミノ酸置換」は、天然のアミノ酸残残基の、当該位置におけるアミノ酸残基の極性または電荷に僅かにしか若しくは全く影響しない非天然の残基による置換を伴ってもよい。表２を参照されたい。更に、アラニンスキャニング変異原性に関してこれまで記載されているように、ポリペプチド中の任意の天然残基はアラニンで置換されてもよい。

【０２５２】

主題の抗体のアミノ酸置換は（保存的または非保存的に拘わらず）、当業者によって、常法を適用することによって実施することができる。アミノ酸置換を用いて、本明細書において提供される抗体の重要な残基を識別する、またはこれらの抗体のＧＩＴＲに対する親和性を増加若しくは減少させることができる。

【０２５３】

ＶＩ．抗原結合タンパク質の発現方法

少なくとも１の上述のポリヌクレオチドを含むプラスミド、発現ベクター、転写または発現カセットの形態の発現系及び構築物、並びにかかる発現系または構築物を含む宿主細胞もまた、本明細書において提供される。

【０２５４】

本明細書において提供される抗原結合タンパク質は、多数の従来の技法のいずれかによって調製することができる。例えば、ＧＩＴＲ抗原結合タンパク質は、本技術分野で公知の任意の技法を用い、組換え発現系によって産生することができる。例えば、「モノクローナル抗体、ハイブリドーマ：生物学的分析における新しい次元」（Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，Ｈｙｂｒｉｄｏｍａｓ：Ａ Ｎｅｗ Ｄｉｍｅｎｓｉｏｎ ｉｎ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ａｎａｌｙｓｅｓ）、Ｋｅｎｎｅｔら（編）、Ｐｌｅｎｕｍ Ｐｒｅｓｓ、ニューヨーク（１９８０）、並びに「抗体：実験室便覧」（Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ）、Ｈａｒｌｏｗ及びＬａｎｅ（編）、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ、ニューヨーク州コールドスプリングハーバー（１９８８）を参照されたい。

【０２５５】

抗原結合タンパク質はハイブリドーマ細胞株中で発現させることができ（例えば、特に抗体はハイブリドーマ中で発現させることができる。）、またはハイブリドーマ以外の細胞株中で発現させることができる。抗体をコードする発現構築物を用いて、哺乳類類、昆虫または微生物宿主細胞を形質転換させることができる。形質転換は、例えば、ポリヌクレオチドをウィルスまたはバクテリオファージ中にパッケージ化し、米国特許第４，３９９，２１６号、第４，９１２，０４０号、第４，７４０，４６１号、第４，９５９，４５５により例示される、本技術分野で公知の形質導入手法によって宿主細胞に該構築物を形質導入することを含む、ポリヌクレオチドを宿主細胞に導入するための任意の公知の方法を用いて行うことができる。用いられる最適な形質転換手法は、如何なるタイプの宿主細胞が形質転換されようとするかに依存することとなる。哺乳類細胞への異種性ポリペプチドの導入方法は本技術分野で周知であり、デキストラン媒介形質移入、リン酸カルシウム沈殿、ポリブレン媒介形質移入、プロトプラスト融合、電気穿孔、ポリヌクレオチドのリポソーム中へのカプセル化、核酸の正荷電脂質との混合、及び核中へのＤＮＡの直接微量注入が挙げられるが、これらに限定されない。

【０２５６】

組換え発現構築物は、一般的には、以下の１または複数を含むポリペプチドをコードする核酸分子を含む。すなわち、１または複数の本明細書において提供されるＣＤＲ、軽鎖定常領域、軽鎖可変領域、重鎖定常領域（例えば、C_H1、C_H2及び／若しくはC_H3）、並びに／またはＧＩＴＲ抗原結合タンパク質の別なスカフォールド部分である。これらの核酸配列は、標準的な連結技法を用いて適宜の発現ベクター中に挿入される。一実施形態において、重鎖または軽鎖定常領域が、抗ＧＩＴＲ特異性重鎖または軽鎖可変領域のＣ末端に付加され、発現ベクター中に連結される。該ベクターは、一般的に、用いられる特定の宿主細胞中で機能的であるように選択される（すなわち、該ベクターは宿主細胞の機構に適合して、増幅を可能にし、及び／または当該遺伝子が発現することができる）。いくつかの実施形態において、ジヒドロ葉酸還元酵素などのタンパク質レポータを用いたタンパク質間相互作用アッセイを使用するベクターが用いられる（例えば、米国特許第６，２７０，９６４号を参照されたく、該特許は参照により本明細書に組み込まれる）。好適な発現ベクターは、例えば、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社またはＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ社（旧「Ｃｌｏｎｔｅｃｈ」社）より購入可能である。抗体及びフラグメントのクローニング並びに発現に有用な他のベクターとしては、Ｂｉａｎｃｈｉ及びＭｃＧｒｅｗ、２００３、Ｂｉｏｔｅｃｈ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ｂｉｏｅｎｇ．８４：４３９～４４に記載されるものが挙げられ、該文献は参照により本明細書に組み込まれる。更なる好適な発現ベクターが、例えば、Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．、第１８５巻（Ｄ．Ｖ．Ｇｏｅｄｄｅｌ編）、１９９０、ニューヨーク：Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓに記載される。

【０２５７】
一般的に、いずれかの宿主細胞に用いられる発現ベクターは、プラスミド維持並びに外因性ヌクレオチド配列のクローニング及び発現のための配列を含むこととなる。かかる配列は、特定の実施形態において集合的に「フランキング配列」と呼ばれ、一般的に１または複数の以下のヌクレオチド配列が挙げられよう。すなわち、プロモータ、１または複数のエンハンサ配列、複製開始点、転写終止配列、ドナー及びアクセプタスプライシング部位を含む完全イントロン配列、ポリペプチド分泌のためのリーダー配列をコードする配列、リボソーム結合部位、ポリアデニル化配列、発現させるべきポリペプチドをコードする核酸を挿入するためのポリリンカー領域、及び選択マーカーエレメントである。これらの配列の各々は以下で議論する。

【０２５８】
任意選択で、ベクターは、「タグ」をコードする配列、すなわち、ＧＩＴＲ抗原結合タンパク質をコードする配列の５’または３’末端に位置するオリゴヌクレオチド分子を含んでもよく、オリゴヌクレオチド配列は、ポリＨｉｓ（ヘキサＨｉｓ（配列番号４５０）など）、またはＦＬＡＧ（登録商標）、ＨＡ（ヘマグルチニンインフルエンザウィルス）、またはｍｙｃなどの、それらに対する市販の抗体が存在する別な「タグ」をコードする。このタグは、一般的にはポリペプチドの発現に際して当該ポリペプチドと融合され、宿主細胞からのＧＩＴＲ抗原結合タンパク質の親和性精製または検知の手段として役立つことができる。親和性精製は、例えば、タグに対する抗体を親和性マトリクスとして用いたカラムクロマトグラフィーによって実施することができる。任意選択で、タグは、その後に、特定のたんぱく質分解酵素を用いて開裂させるなどの種々の手段によって、精製したＧＩＴＲ抗原結合タンパク質から除去することができる。

【０２５９】
フランキング配列は、相同（すなわち、宿主細胞と同種及び／または同系）、異種（すなわち、宿主細胞の種または系以外の種）、ハイブリッド（すなわち、複数の出所のフランキング配列の組み合わせ）、合成または天然であってよい。従って、フランキング配列の出所は、当該フランキング配列が宿主細胞の機構中で機能的であり、且つ宿主細胞によって活性化され得るとの条件で、任意の原核生物若しくは真核生物、任意の脊椎生物若しくは非脊椎生物、または任意の植物であってよい。

【０２６０】
ベクター中で有用なフランキング配列は、本技術分野で周知のいくつかの方法のいずれかによって得ることができる。一般的には、本明細書において有用なフランキング配列は、マッピングにより及び／または制限エンドヌクレアーゼ消化により前もって識別されていることとなり、従って適宜の制限エンドヌクレアーゼを用いて、適当な組織源から単離することができる。いくつかの場合、フランキング配列の完全ヌクレオチド配列が判っていることがある。この場合、当該フランキング配列は、本明細書に記載の核酸合成またはクローニング方法を用いて合成してもよい。

【０２６１】
フランキング配列の全てが判っているか、またはその一部のみが判っているかに拘わらず、フランキング配列は、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）を用いて、並びに／あるいは同一若しくは別な種由来のオリゴヌクレオチド及び／またはフランキング配列フラグメントなどの適宜のプローブを用いたゲノムライブラリのスクリーニングによって得ることができる。フランキング配列が判っていない場合は、フランキング配列を含むＤＮＡのフラグメントを、例えば、コード配列または別な遺伝子若しくは複数の遺伝子さえも含み得るより大きな一片のＤＮＡより単離してもよい。単離は、適当なＤＮＡフラグメントを生成させる制限エンドヌクレアーゼ消化及び、それに続くアガロースゲル精製であるＱｉａｇｅｎ（登録商標）カラムクロマトグラフィー（カリフォルニア州チャッツワース）、または当業者に公知の他の方法によって実施することができる。この目的を達成するために好適な酵素の選択は、当業者にとって容易に明らかであろう。

【０２６２】

複製開始点は、一般的には市販品として購入する原核生物の発現ベクターの一部であり、該開始点は宿主細胞中での当該ベクターの増幅を支援する。最適なベクターが複製開始点部位を含まない場合には、複製開始点を既知の配列に基づいて化学的に合成し、当該ベクター中に連結してもよい。例えば、プラスミドｐＢＲ３２２（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ社、マサチューセッツ州ビバリー）由来の複製開始点が殆どのグラム陰性菌に対して好適であり、種々のウィルス開始点（例えば、ＳＶ４０、ポリオーマ、アデノウィルス、水疱性口内炎ウィルス（ＶＳＶ）、またはＨＰＶ若しくはＢＰＶなどの乳頭腫ウィルス）が哺乳類細胞中でのクローニングベクターに有用である。一般的に、複製開始点成分は哺乳類発現ベクターに対しては不要である（例えば、ＳＶ４０開始点は、多くの場合、それがウィルス初期プロモータも含んでいることのみによって用いられる）。

【０２６３】

転写終止配列は、一般的に、ポリペプチドコード領域の３’末端に位置し、転写を終止する役割を果たす。通常、原核細胞中の転写終止配列はＧ－Ｃに富むフラグメント及びそれに続くポリＴ配列である。配列はライブラリから容易にクローン化され、またはベクターの一部として市販品として購入することさえできる上に、本明細書に記載の方法などの核酸合成方法を用いて容易に合成することもできる。

【０２６４】

選択マーカー遺伝子は、選択培地中での宿主細胞の生存及び増殖に必要なタンパク質をコードする。一般的な選択マーカー遺伝子は、（ａ）例えば、原核生物の宿主細胞に関しては、アンピシリン、テトラサイクリン、若しくはカナマイシンである抗生物質または他の毒素に対する耐性を付与する、（ｂ）当該細胞の栄養要求性の欠失を補う、あるいは（ｃ）複合培地または限定培地から入手できない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードする。具体的な選択マーカーは、カナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、及びテトラサイクリン耐性遺伝子である。有利には、ネオマイシン耐性遺伝子も、原核生物及び真核生物宿主細胞の両方における選択に用いることができる。

【０２６５】

他の選択遺伝子を用いて、発現されることとなる遺伝子を増幅することができる。増幅は、増殖または細胞の生存に重要なタンパク質の産生に必要な遺伝子が、継代の組換え細胞内の染色体内で縦列に反復される過程である。好適な哺乳類細胞に対する選択マーカーの例としては、ジヒドロ葉酸還元酵素（ＤＨＦＲ）及びプロモータなしのｔｈｙｒｎｉｄｉｎｅ　ｋｉｎａｓｅ遺伝子が挙げられる。哺乳類細胞形質転換体が、当該形質転換体のみが、ベクター中に存在する選択遺伝子によって、唯一生存するように適合する淘汰圧下に置かれる。培地中の選択剤の濃度が連続的に増加し、それによって、選択遺伝子と、ＧＩＴＲポリペプチドに結合する抗原結合タンパク質などの別な遺伝子をコードするＤＮＡとの両方の増幅に繋がる条件下で形質転換した細胞を培養することによって、淘汰圧が賦課される。結果として、増幅されたＤＮＡから、多量の抗原結合タンパク質などのポリペプチドが合成される。

【０２６６】

ｍＲＮＡの翻訳開始には、通常、リボソーム結合部位が必要であり、リボソーム結合部位は、シャイン－ダルガノ配列（原核生物）またはコザック配列（真核生物）によって特徴付けられる。要素は一般的に、プロモータについては３’に、発現すべきポリペプチドのコード配列については５’に位置する。

【０２６７】

真核生物の宿主細胞発現系においてグリコシル化が望ましいなどのいくつかの場合に、種々のプレ配列またはプロ配列を操作して、グリコシル化または歩留まりを向上させることができる。例えば、特定のシグナルペプチドのたんぱく質分解酵素による開裂部位を変える、またはプロ配列を付加することができ、これらもグリコシル化に影響を与え得る。最終的なタンパク質生成物は、（成熟タンパク質の第１のアミノ酸に対して）１位に、発現に伴って１または複数の追加のアミノ酸を有する場合があり、これらは全く除去され得ない。例えば、最終的なタンパク質生成物は、タンパク質分解酵素による開裂部位に存在

し、アミノ末端に結合した１または２のアミノ酸残基を有する場合がある。あるいは、いくつかの酵素開裂部位を用いることにより、当該酵素が成熟ポリペプチド内のかかる領域で切断する場合には、僅かにトランケートされた形態の所望のポリペプチドを生じ得る。

【０２６８】

発現ベクター及びクローニングベクターは、一般的には、宿主生物によって認識され、ＧＩＴＲ抗原結合タンパク質をコードする分子に作動可能に結合されるプロモータを含むこととなる。プロモータは、構造遺伝子の転写を制御する構造遺伝子の開始コドン（一般的に約１００から１０００ｂｐの範囲内）の上流（すなわち、５’）に位置する非転写配列である。プロモータは従来２のクラスの一方に分類されている。すなわち、誘導性プロモータと構成型プロモータである。誘導性プロモータは、栄養の有無または温度の変化などの培養条件の何がしかの変化に応答して、該プロモータの制御下で、高いレベルのＤＮＡからの転写を開始する。一方、構成型プロモータは、該プロモータが作動可能に結合した遺伝子を一様に、すなわち、遺伝子発現に対して僅かな制御または制御なしで転写する。多様な潜在的宿主細胞によって認識される多数のプロモータが周知である。好適なプロモータは、当該プロモータを元のＤＮＡから制限酵素消化によって除去し、ベクターに所望のプロモータ配列を挿入することによって、ＧＩＴＲ抗原結合タンパク質を構成する重鎖または軽鎖をコードするＤＮＡに作動可能に結合される。

【０２６９】

酵母宿主に用いる好適なプロモータも本技術分野で周知である。酵母エンハンサが酵母プロモータと共に有利に用いられる。哺乳類宿主細胞に用いる好適なプロモータは周知であり、ポリオーマウィルス、伝染性上皮腫ウィルス、（アデノウィルス２などの）アデノウィルス、ウシ乳頭腫ウィルス、トリ肉腫ウィルス、サイトメガロウィルス、レトロウィルス、Ｂ型肝炎ウィルス、及びシミアンウィルス４０（ＳＶ４０）などのウィルスのゲノムより得たプロモータが挙げられるが、これらに限定されない。他の好適な哺乳類プロモータとしては、異種性哺乳類プロモータ、例えば、ヒートショックプロモータ及びアクチンプロモータが挙げられる。

【０２７０】

エンハンサ配列をベクターに挿入して、高等真核生物による、ＧＩＴＲ抗原結合タンパク質を構成する軽鎖または重鎖をコードするＤＮＡの転写を増加させることができる。エンハンサはＤＮＡのシス作用性要素であり、通常約１０～３００ｂｐの長さであり、プロモータ上で作用して転写を増加させる。エンハンサは比較的に方向及び位置に依存せず、転写ユニットに対して５’位及び３’位の両方に存在することが判っている。哺乳類遺伝子より利用可能ないくつかのエンハンサ配列が公知である（例えば、グロビン、エラスターゼ、アルブミン、α－胎児性タンパク質及びインスリン）。但し、一般的に、ウィルス由来のエンハンサが用いられる。本技術分野で公知のＳＶ４０エンハンサ、サイトメガロウィルス初期プロモータエンハンサ、ポリオーマエンハンサ、及びアデノウィルスエンハンサが、代表的な真核生物プロモータの活性化用の転写促進要素である。エンハンサはベクター中でコード配列に対して５’または３’のいずれかに位置し得るが、一般的にはプロモータからの部位５’に位置する。適宜の天然または異種性シグナル配列をコードする配列（リーダー配列またはシグナルペプチド）が発現ベクター中に組み込まれて、抗体の細胞外分泌を促進することができる。シグナルペプチドまたはリーダーの選択は、抗体が産生されることとなる宿主細胞のタイプに依存し、異種性シグナル配列が天然シグナル配列を置き換えることができる。哺乳類宿主細胞中で機能性であるシグナルペプチドの例としては以下が挙げられる。すなわち、米国特許第４，９６５，１９５号に記載のインターロイキン－７（ＩＬ－７）に対するシグナル配列、Ｃｏｓｍａｎら、１９８４、Ｎａｔｕｒｅ　３１２：７６８に記載のインターロイキン－２受容体に対するシグナル配列、ＥＰ特許第０３６７　５６６号に記載のインターロイキン－４受容体シグナルペプチド、米国特許第４，９６８，６０７号に記載のＩ型インターロイキン－１受容体シグナルペプチド、ＥＰ特許第０　４６０　８４６に記載のＩＩ型インターロイキン－１受容体シグナルペプチドである。

【０２７１】
提供される発現ベクターは、市販のベクターなどの出発ベクターから構築することができる。かかるベクターは全ての所望のフランキング配列を含んでもあるいは含まなくてもよい。１または複数の本明細書に記載のフランキング配列がベクター中に既に存在しない場合には、これらのフランキング配列を個々に入手し、当該ベクター中に連結することができる。フランキング配列のそれぞれを入手するために用いられる方法は、当業者に周知である。
【０２７２】
ベクターが構築され、ＧＩＴＲ抗原結合配列を構成する軽鎖、重鎖、または軽鎖及び重鎖が当該ベクターの適正な部位に挿入された後、完成したベクターを適宜の宿主細胞中に挿入し、増幅及び／またはポリペプチドの発現を行うことができる。抗原結合タンパク質に関する発現ベクターの選択された宿主細胞中への形質転換は、形質移入、感染、リン酸カルシウム共沈殿、電気穿孔、微量注入、リポフェクション、ＤＥＡＥ－デキストラン媒介形質移入、または他の公知の技法を始めとする周知の方法によって実施することができる。選択される方法は、一部が、用いられる宿主細胞のタイプの関数となろう。これらの方法及び他の好適な方法は当業者に周知であり、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら、２００１、前掲に示される。
【０２７３】
宿主細胞は、然るべき条件下で培養される場合、抗原結合タンパク質を合成し、これに続いて該タンパク質を培地から採取する（当該宿主細胞が該タンパク質を培地中に分泌する場合）、または該タンパク質を産生する当該宿主細胞から直接採取する（該タンパク質が分泌されない場合）ことができる。然るべき宿主細胞の選択は、所望の発現レベル、（グリコシル化またはリン酸化などの）活性のために望ましいまたは必要なポリペプチド修飾、及び生物学的に活性な分子への折り畳みなどの多様な因子に依存することとなる。
【０２７４】
発現のための宿主として利用可能な哺乳類細胞株は本技術分野で周知であり、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞、ヒーラー細胞、ベビーハムスター腎臓（ＢＨＫ）細胞、サル腎臓細胞（ＣＯＳ）、ヒト肝細胞がん細胞（例えば、Ｈｅｐ　Ｇ２）、及び他の多数の細胞株を含む、但しこれらに限定されない、アメリカ培養細胞系統保存機関（Ａｍｅｒｉｃａｎ　Ｔｙｐｅ　Ｃｕｌｔｕｒｅ　Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ、ＡＴＣＣ）より入手可能な不死化細胞株が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態において、細胞株は、いずれの細胞株が、高い発現レベルを有するか及びＧＩＴＲ結合特性を有する抗原結合タンパク質を構成的に産生するかを特定することを通じて選択することができる。別な実施形態において、それ自体の抗体はつくらないが、異種性の抗体をつくり且つ分泌する能力を有するＢ細胞系統の細胞を選択することができる。
【０２７５】
ＶＩＩ．ＧＩＴＲ抗原結合タンパク質の治療における使用
所望の腫瘍抗原若しくは病原性抗原（例えば、ウィルス及び他の病原性生物）に対する免疫反応の誘発または向上を始めとする、免疫反応においてＧＩＴＲが果たす重要な役割により、ＧＩＴＲは免疫療法に関する魅力的な標的となる。従って、抗原結合タンパク質は多様ながん及び感染症の治療に有用性を有する。
【０２７６】
上述のように、ＧＩＴＲの活性化によって、共活性化シグナルがＣＤ４＋及びＣＤ８＋Ｔ細胞に送られ、制御性Ｔ細胞による免疫反応の抑制を妨げる。従って、一実施形態において、制御性Ｔ細胞によるエフェクタＴ細胞活性の抑制を阻害するために、ＧＩＴＲ抗原結合タンパク質が投与される。かかる阻害は、例えば、Ｔ細胞の増殖、既知の活性化のマーカーの発現、またはサイトカイン分泌の監視を始めとする、本技術分野で公知の種々の方法によって評価することができる。別な実施形態において、制御性Ｔ細胞のレベル、例えば、循環制御性Ｔ細胞のレベルを減少させるために、ＧＩＴＲ抗原結合タンパク質が対象に投与される。更に別な実施形態において、本明細書において提供される抗原結合タン

パク質を投与することによって、エフェクタＴ細胞の活性が誘発されるまたは向上する。これらの方法のそれぞれに対する具体的なアッセイは例に示される。

【０２７７】

Ａ．がんの治療

ＧＩＴＲ生物学の２つの見地から、ＧＩＴＲは、多様ながんの治療のための可能性のある標的となる。その第１は、上述したＧＩＴＲの活性化が免疫系を活性化することである。加えて、ＧＩＴＲ発現エフェクタＴ細胞及び制御性Ｔ細胞は多様な腫瘍タイプに浸透し、その上、非造血細胞上では、ＧＩＴＲの発現は僅かであるかまたはない。この分布プロファイルは、ＧＩＴＲ発現細胞が腫瘍に集中することができることを意味する。この活性と分布の組み合わせにより、全体として、ＧＩＴＲの活性化が多様ながんの治療に対する魅力的な取り組みとなる。抗原結合タンパク質を用いて、固形がん、並びに白血病を始めとする血液がんの両方を治療することができる。

【０２７８】

様々な異なる腫瘍がＧＩＴＲ陽性免疫細胞を含むことが実証されている。従って、これらの腫瘍が特に魅力的な標的である。かかる腫瘍としては、例えば、黒色腫（第ＩＩＩ段階及び第ＩＶ段階の悪性黒色腫を含む）、肺がん（例えば、非小細胞肺がん－ＮＳＣＬＣ）、頭頚部がん、腎細胞がん及び結腸直腸がんが挙げられる。

【０２７９】

抗原結合タンパク質を用いて治療することができる他のがんとしては、乳がん、前立腺がん、子宮内膜がん、膀胱がん、腎がん、食道がん、睾丸がん、卵巣がん、膀胱がん、扁平上皮がん（例えば、頭頚部扁平上皮がん－ＳＣＣＨＮ）、ブドウ膜黒色腫、小胞リンパ腫、子宮頸がん、脳がん、膵がん、肝がん、リンパ腫、ホジキン病、多発性骨髄腫、胃がん及び星細胞腫が挙げられるが、これらに限定されない。

【０２８０】

上述のがんのいずれかの治療においては、腫瘍を有する個体で、提供される治療方法を利用して、更なる腫瘍の成長を阻害する、腫瘍の退縮を誘発する、無増悪生存期間を増加させる及び／または全生存期間を延長させることができる。いくつかの実施形態において、抗原結合タンパク質は、転移の開始を遅延させるまたは防止することもできる。治療の進行を、種々の方法を用いて監視することができる。例えば、阻害が腫瘍の大きさの低減及び／または腫瘍内での代謝活性の低下に繋がり得る。これらのパラメータの両方を、例えばＭＲＩまたはＰＥＴ走査によって測定することができる。阻害を生検によって監視し、壊死のレベル、腫瘍細胞死及び腫瘍内の血管増生のレベルを確認することもできる。転移の範囲も公知の方法を用いて監視することができる。

【０２８１】

提供されるＧＩＴＲ抗原結合タンパク質は単独で投与することができるが、他の実施形態においては、該抗原結合タンパク質が別な治療薬（例えば、化学療法剤）、放射線療法及び／または外科的処置との組み合わせで投与される。別の治療薬と共に投与される場合には、抗原結合タンパク質は当該治療薬の前、後、または同時に（例えば、同一の組成物の一部として）投与することができる。抗原結合タンパク質と組み合わせることができる他の治療薬としては、例えば、他の免疫療法薬、種々の標的療法薬（例えば、がん治療に用いられる治療用抗体）、血管新生抑制剤、化学療法剤、及びがん転移に伴う骨量減少を阻害する薬剤が挙げられる。

【０２８２】

例えば、一実施形態において、抗原結合タンパク質が別な免疫療法薬、すなわち、免疫反応を誘発するまたは向上させる免疫賦活剤との組み合わせで投与される。かかる薬剤は、例えば、１）樹状細胞の活性化剤、２）ワクチン佐剤、３）Ｔ細胞刺激剤、４）免疫チェックポイントの阻害剤、及び５）抑制細胞、サイトカイン及び／または酵素の阻害剤を含むことができる。

【０２８３】

従って、一実施形態において、抗原結合タンパク質がＦｌｔ３Ｌなどの樹状細胞増殖因

子と共に投与される。

【０２８４】

別な実施形態において、抗原結合タンパク質が抗原提示細胞を刺激する薬剤と組み合わせられる。かかる薬剤の例としては、アゴニスト抗ＣＤ４０抗体またはＣＤ４０Ｌなどの ＣＤ４０アゴニストが挙げられる。

【０２８５】

いくつかの方法は、抗原結合タンパク質をワクチン佐剤と共に投与することを含む。かかる佐剤としては、例えば、ＩＬ－１２、並びに、ＣｐＧ（ＴＬＲ９アゴニスト）、モノホスホリルリピドＡ（ＭＰＬ－ＴＬＲ４アゴニスト）、ポリＩ：ＣまたはポリＩＣＬＣ（ＴＬＲ３アゴニスト）、及びレシキモド及び８５２Ａ（ＴＬＲ７／８アゴニスト）を始めとする種々のトール様受容体（ＴＬＲ）アゴニストが挙げられる。

【０２８６】

他の治療上の取り組みにおいて、抗原結合タンパク質がＩＬ－１５及び／またはＩＬ－１７などのＴ細胞増殖因子、またはこれらの分子の活性化剤との組み合わせで投与される。関連する方法において、Ｔ細胞刺激剤が抗原結合タンパク質と組み合わせられる。かかる刺激剤としては、アゴニスト抗４－１ＢＢ抗体及び４－１ＢＢＬなどの４－１ＢＢのアゴニストが挙げられる。

【０２８７】

特定の実施形態において、抗原結合タンパク質がＴ細胞チェックポイント阻害剤、例えば、免疫系に阻害シグナルを送る分子と共に投与される。かかる薬剤の例としては、ニボルマブ（ブリストルマイヤーズスクイブ社）及びＭＫ－３４７５（メルク社）としても知られるランブロリズマブ、ピジリズマブ（キュアテック社）、ＡＭＰ－２２４（アンプリミューン社）を始めとする抗ＰＤ－１抗体、及びＭＰＤＬ３２８０Ａ（ロッシュ社）、ＭＤＸ－１１０５（ブリストルマイヤーズスクイブ社）、ＭＥＤＩ－４７３６（アストラゼネカ社）及びＭＳＢ－００１０７１８Ｃ（メルク社）を始めとする抗ＰＤ－Ｌ１抗体などのＰＤ－１またはＰＤ－Ｌ１（Ｂ７－Ｈ１）の阻害剤が挙げられる。他のチェックポイント阻害剤としては、抗ＣＴＬＡ－４抗体などのＣＴＬＡ－４のアンタゴニストが挙げられる。代表的な抗ＣＴＬＡ４抗体は、ブリストルマイヤーズスクイブ社によって製品化されたヤーボイ（登録商標）（イピリムマブ）である。他のＣＴＬＡ－４抗体としては、トレメリムマブ（ファイザー社）、チシリムマブ（アストラゼネカ社）及びＡＭＧＰ－２２４（グラクソスミスクライン社）が挙げられる。

【０２８８】

更に他の方法において、抗原結合タンパク質が、免疫抑制効果を有する酵素の阻害剤との組み合わせで投与される。例としては１－メチルトリプトファン（１ＭＴ）であり、これはインドールアミン２，３－ジオキシゲナーゼの低分子阻害剤である。

【０２８９】

抗原結合タンパク質は、アムジェン社によるＴ－ＶＥＣ（タリモジンラヘルパレプベク）との組み合わせで用いることもできる。

【０２９０】

特定の実施形態において、抗原結合タンパク質が、ＢｉＴＥ（登録商標）分子との組み合わせで投与され、該分子は抗がん剤として用いることができる二特異性抗体のクラスである。該分子は、受容者の免疫系、特にがん細胞に対するＴ細胞の細胞傷害活性を指示する。例としては、アムジェン社により開発中のＡＭＧ－１０３（ブリナツモマブ）及びＡＭＧ－１１０（ソリトマブ）が挙げられる。

【０２９１】

抗原結合タンパク質は種々の標的治療との組み合わせで投与することもできる。標的治療の例としては、治療用抗体の使用が挙げられるが、これに限定されない。代表的な抗体としては、細胞表面タンパク質Ｈｅｒ２、ＣＤＣ２０、ＣＤＣ３３、ムチン様糖たんぱく質、及び腫瘍細胞上に存在する上皮増殖因子受容体（ＥＧＦＲ）に結合する抗体、並びに任意選択で、これらのタンパク質を提示する腫瘍細胞に対する細胞増殖抑制効果及び／ま

たは細胞傷害効果を誘発する抗体が挙げられるが、これに限定されない。代表的な抗体としてはまた、乳がん及び他の形態のがんを治療するために用いることができるハーセプチン（登録商標）（トラスツズマブ）、並びに、非ホジキンリンパ腫及び他の形態のがんを治療するために用いることができるリツキサン（登録商標）（リツキシマブ）、ゼヴァリン（商標）（イブリツモマブ　チウキセタン）、グリベック（登録商標）及びリンフォシド（商標）（エプラツズマブ）も挙げられる。特定の代表的な抗体としてはまた、パニツムマブ（ベクチビックス（登録商標））、アービタックス（登録商標）（ＩＭＣ－Ｃ２２５）；エルチノリブ（イレッサ）；ベクサール（登録商標）（ヨウ素１３１トシツモマブ）；ＫＤＲ（キナーゼドメイン受容体）阻害剤；抗ＶＥＧＦ抗体及びアンタゴニスト（例えば、アバスチン（登録商標）、モテサニブ、及びＶＥＧＡＦ－ＴＲＡＰ）；抗ＶＥＧＦ受容体抗体及び抗原結合領域；抗Ａｎｇ－１及びＡｎｇ－２抗体並びに抗原結合領域；Ｔｉｅ－２に対する抗体並びにＡｎｇ－１及びＡｎｇ－２受容体；Ｔｉｅ－２リガンド；Ｔｉｅ－２キナーゼ阻害剤に対する抗体；Ｈｉｆ－１ａの阻害剤、及びキャンパス（商標）（アレムツズマブ）も挙げられる。特定の実施形態において、がん治療薬は、腫瘍細胞において選択的に細胞死を誘発する、ＴＮＦ関連ポリペプチドＴＲＡＩＬを始めとする、但しそれには限定されない、ポリペプチドである。

【０２９２】

特定の実施形態において、本明細書において提供される抗原結合タンパク質は、血管新生を減少させる１種または複数種の抗血管新生剤との組み合わせで用いられる。特定のかかる薬剤としては、ＩＬ－８アンタゴニスト；キャンパス、Ｂ－ＦＧＦ；ＦＧＦアンタゴニスト；Ｔｅｋアンタゴニスト（Ｃｅｒｒｅｔｔｉら、米国特許公開第２００３／０１６２７１２号、Ｃｅｒｒｅｔｔｉら、米国特許第６，４１３，９３２号、及びＣｅｒｒｅｔｔｉら、米国特許第６，５２１，４２４号）；抗ＴＷＥＡＫ薬（抗体及び抗原結合領域が挙げられるが、これらに限定されない。）；可溶性ＴＷＥＡＫ受容体アンタゴニスト（Ｗｉｌｅｙ、米国特許第６，７２７，２２５号）；インテグリンのそのリガンドへの結合に拮抗するＡＤＡＭディスインテグリンドメイン（Ｆａｎｓｌｏｗら、米国特許公開第２００２／００４２３６８号）；抗ｅｐｈ受容体及び抗エフリン抗体；抗原結合領域、またはアンタゴニスト（米国特許第５，９８１，２４５号、第５，７２８，８１３号、第５，９６９，１１０号、第６，５９６，８５２号、第６，２３２，４４７号、第６，０５７，１２４号）；アバスチン（登録商標）またはＶＥＧＦ－ＴＲＡＰ（商標）などの抗ＶＥＧＦ剤（例えば、ＶＥＧＦに特異的に結合する抗体若しくは抗原結合領域、または可溶性のＶＥＧＦ受容体若しくはそれらのリガンド結合領域）、及び抗ＶＥＧＦ受容体剤（例えば、ＶＥＧＦ受容体に特異的に結合する抗体若しくは抗原結合領域）、パニツムマブ、イレッサ（商標）（ゲフィチニブ）、タルセバ（商標）（エルロチニブ）などのＥＧＦＲ阻害剤（例えば、ＥＧＦＲに特異的に結合する抗体若しくは抗原結合領域）、抗Ａｎｇ－１及び抗Ａｎｇ－２剤（例えば、Ａｎｇ－１及びＡｎｇ－２若しくはそれらの受容体、例えば、Ｔｉｅ－２／ＴＥＫに特異的に結合する抗体若しくは抗原結合領域）、及び抗Ｔｉｅ－２キナーゼ阻害剤（例えば、肝細胞増殖因子（ＨＧＦ、分散因子としても知られる）のアンタゴニストなどの、特異的に結合し、増殖因子の活性を阻害する抗体若しくは抗原結合領域、及びその受容体「ｃ－ｍｅｔ」に特異的に結合する抗体若しくは抗原結合領域（例えば、リロツムマブ及びアムジェン社のＡＭＧ３３７）；抗ＰＤＧＦ－ＢＢアンタゴニスト；ＰＤＧＦ－ＢＢリガンドに対する抗体及び抗原結合領域；並びにＰＤＧＦＲキナーゼ阻害剤が挙げられるが、これらに限定されない。

【０２９３】

抗原結合タンパク質との組み合わせで用いることができる他の抗血管新生剤としては、ＭＭＰ－２（細胞外マトリクス分解酵素２）阻害剤、ＭＭＰ－９（細胞外マトリクス分解酵素９）阻害剤、及びＣＯＸ－ＩＩ（シクロオキシゲナーゼＩＩ）阻害剤などの薬剤が挙げられる。有用なＣＯＸ－ＩＩ阻害剤の例としては、セレブレックス（商標）（セレコキシブ）、バルデコキシブ、及びロフェコキシブが挙げられる。

【０２９４】

本明細書において提供される抗原結合タンパク質はまた、増殖因子阻害剤との組み合わせで用いることもできる。かかる薬剤の例としては、ＥＧＦ－Ｒ抗体（例えば、パニツムマブ）（ベクチビックス（登録商標））、ＥＧＦ抗体、及びＦＧＦ－Ｒ阻害剤である分子などのＥＧＦ－Ｒ（上皮細胞増殖因子）反応を阻害することができる薬剤；ＶＥＧＦ受容体及びＶＥＧＦを阻害することができる分子などのＶＥＧＦ（血管内皮細胞増殖因子）阻害剤；例えば、ハーセプチン（登録商標）（ジェネンテク社）等の、ｅｒｂＢ２受容体に結合する有機分子または抗体などのｅｒｂＢ２受容体阻害剤が挙げられるが、これらに限定されない。ＥＧＦ－Ｒ阻害剤は、例えば、米国特許第５，７４７，４９８号、ＷＯ９８／１４４５１、ＷＯ９５／１９９７０、及びＷＯ９８／０２４３４に記載される。

【０２９５】

いくつかの治療用途において、特にがんが骨に転移して骨が強い悪影響を受けた場合に、更なる骨量減少を阻害する、または失われた骨の修復を支援する治療薬と共に、抗原結合タンパク質を投与することが有用な場合がある。従って、ＢＭＰ－１～ＢＭＰ－１２と称される骨形成因子；形質転換増殖因子－β及びＴＧＦ－β科メンバー；繊維芽細胞増殖因子ＦＧＦ－１～ＦＧＦ－１０；（ＩＬ－１ｒａ、ＩＬ－１に対する抗体及びＩＬ－１受容体に対する抗体を始めとする）インターロイキン－１阻害剤；（エタネルセプト、アダリムマブ及びインフリキシマブを始めとする）ＴＮＦ－α阻害剤；（可溶性ＲＡＮＫ、破骨細胞形成抑制因子及びデノスマブ（ＸＧＥＶＡ（登録商標））などのＲＡＮＫまたはＲＡＮＫリガンドに特異的に結合するアンタゴニスト抗体を始めとする）ＲＡＮＫリガンド阻害剤、Ｄｋｋ－１阻害剤（例えば、抗Ｄｋｋ－１抗体）、副甲状腺ホルモン、Ｅシリーズのプロスタグランジン、ビスホスホネート並びにフッ化物及びカルシウムなどの骨を強化するミネラルを始めとする、但しこれらに限定されない、治療上有効な量の骨成長促進（タンパク質同化）剤または骨吸収抑制剤と共に、抗原結合タンパク質を投与することができる。抗原結合タンパク質及びそれらの機能性フラグメントとの組み合わせで用いることができるタンパク質同化剤としては、副甲状腺ホルモン及びインスリン様増殖因子（ＩＧＦ）が挙げられる。但し、後者の薬剤はＩＧＦ結合タンパク質と複合化されることが好ましい。かかる併用治療に好適なＩＬ－１受容体アンタゴニストがＷＯ８９／１１５４０に記載され、好適な可溶性ＴＮＦ受容体－１がＷＯ９８／０１５５５に記載される。代表的なＲＡＮＫリガンドアンタゴニストが、例えば、ＷＯ０３／０８６２８９、ＷＯ０３／００２７１３、米国特許第６，７４０，５１１号及び第６，４７９，６３５号に開示される。

【０２９６】

特定の実施形態において、治療方法は、本明細書において提供されるものなどの抗原結合タンパク質を、１種または複数種の化学療法剤と組み合わせることを含む。かかる治療の例としては、メクロレタミン、シクロホスファミド、イホスファミド、メルファラン及びクロラムブシルなどのナイトロジェンマスタード；カルムスチン（ＢＣＮＵ）、ロムスチン（ＣＣＮＵ）、及びセムスチン（メチル－ＣＣＮＵ）などのニトロソ尿素；テモダール（商標）（テモゾールアミド）、トリエチレンメラミン（ＴＥＭ）、トリエチレン、チオホスホルアミド（チオテパ）、ヘキサメチリメラミン（ＨＭＭ、アルトレタミン）などのエチレンイミン／メチルメラミン；ブスルファンなどのアルキルスルホネート；ダカルバジン（ＤＴＩＣ）などのトリアジンを始めとするアルキル化剤；メトトレキサート及びトリメトレキサートなどの葉酸類似体、５－フルオロウラシル（５ＦＵ）、フルオロデオキシウリジン、ゲムシタビン、シトシンアラビノシド（ＡｒａＣ、シタラビン）、５－アザシチジン、２，２’－ジフルオロデオキシシチジンなどのピリミジン類似体、６－メルカプトプリン、６－チオグアニン、アザチオピリン、２’－デオキシコホルマイシン（ペントスタチン）、エリスロヒドロキシノニルアデニン（ＥＨＮＡ）、フルダラビンリン酸エステル、及び２－クロロデオキシアデノシン（クラドリビン、２－ＣｄＡ）などのプリン類似体を始めとする代謝拮抗剤；パクリタキセルなどの抗有糸分裂薬、ビンブラスチン（ＶＬＢ）、ビンクリスチン、及びビノレルビンを始めとするビンカアルカロイド、タキソテール、エストラムスチン、及びエストラムスチンリン酸エステル；エトポシド及びテ

ニポシドなどのポドフィロトキシン;アクチモマイシンＤ、ダウノマイシン（ルビドマイシン）、ドキソルビシン、ミトキサントロン、イダルビシン、ブレオマイシン、プリカマイシン（ミトラマイシン）、ミトマイシンＣ、及びアクチノマイシンなどの抗生物質；Ｌ－アスパラギナーゼなどの酵素；インターフェロン－α、ＩＬ－２、Ｇ－ＣＳＦ及びＧＭ－ＣＳＦなどの生物学的反応修飾剤を始めとする天然物；シスプラチン及びカルボプラチンなどの白金配位化合物、ミトキサントロンなどのアントラセンジオン、ヒドロキシ尿素などの置換尿素、Ｎ－メチルヒドラジン（ＭＩＨ）及びプロカルバジンを始めとするメチルヒドラジン誘導体、ミトタン（ｏ，ｐ－ＤＤＤ）及びアミノグルテチミドを始めとする多岐にわたる薬剤；プレドニゾン及び等価体、デキサメタゾン並びにアミノグルテチミドなどのアドレノコルチコステロイドアンタゴニスト；ジェムザール（商標）（ゲムシタビン）、ヒドロキシプロゲステロンカプロン酸エステル、メドロキシプロゲステロン酢酸エステル及びメゲストロール酢酸エステルなどのプロゲスチン；ジエチルスチルベストロール及びエチニルエステラジオール等価体などのエストロゲン；タモキシフェンなどの抗エストロゲン剤；テストステロンプロピオン酸エステル及びフルオキシメステロン／等価体を始めとするアンドロゲン；フルタミド、ゴナドトロピン関連ホルモン類似体及びロイプロリドなどの抗アンドロゲン剤；並びにフルタミドなどの非ステロイド抗アンドロゲン剤を始めとするホルモン及びアンタゴニストを始めとする抗悪性腫瘍薬が挙げられるが、これらに限定されない。ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤、脱メチル化剤（例えば、ビダーザ）及び転写抑制の解除（ＡＴＲＡ）療法を始めとする、但しこれらに限定されない、後成的機序を対象とする療法もまた、抗原結合タンパク質と組み合わせることができる。

【０２９７】

更なる化学療法剤の具体的な例としては、タキソール、タキセン（例えば、ドセタキセル及びタキソテール）、修飾パクリタキセル（例えば、アブラキサン及びオパキシオ）、ドキソルビシン、アバスチン（登録商標）、スーテント、ネクサバール、及び他の多種キナーゼ阻害剤、シスプラチン及びカルボプラチン、エトポシド、ゲムシタビン、並びにビンブラスチンが挙げられる。ＭＡＰＫ経路阻害剤（例えば、ＥＲＫ、ＪＮＫ及びｐ３８の阻害剤）、ＰＩ３キナーゼ／ＡＫＴ阻害剤及びＰｉｍ阻害剤を始めとする、但しこれらに限定されない、特定の他のキナーゼの阻害剤を、抗原結合タンパク質との組み合わせで用いることができる。他の阻害剤としては、Ｈｓｐ９０阻害剤、プロテアソーム阻害剤（例えば、ベルケイド）及びトリセノックスなどの多重機序の作用阻害剤が挙げられる。

【０２９８】

いくつかの実施形態において、ＧＩＴＲ抗原結合タンパク質は薬剤と抱合されて抗体薬剤抱合体（ＡＤＣ）を形成する。一般的に、ＡＤＣは、化学療法剤、例えば上記のものなどの、細胞傷害性薬剤、細胞増殖抑制剤、毒素、または放射性薬物と抱合した抗体を含む。連結子分子を用いて当該薬剤を抗体に抱合させることができる。ＡＤＣ技術に有用な多種多様の連結子及び薬剤が本技術分野において公知であり、ＧＩＴＲ抗原結合タンパク質を含むＡＤＣの形成に用いることができる（例えば、ＵＳ２００９００２８８５６、ＵＳ２００９／０２７４７１３、ＵＳ２００７／００３１４０２、ＷＯ２００５／０８４３９０、ＷＯ２００９／０９９７２８、米国特許第５，２０８，０２０号、米国特許第５，４１６，０６４号、米国特許第５，４７５，０９２号、第５，５８５，４９９号、第６，４３６，９３１号、第６，３７２，７３８号、及び第６３４０７０１号を参照されたく、これらのそれぞれは、参照により本明細書に組み込まれる）。

【０２９９】

Ｂ．感染症の治療

がんの治療に加えて、別な実施形態において、提供される抗原結合タンパク質を用いて、多様な感染病原体上に存在するものなどの外来抗原に対する免疫反応を誘発するまたは向上させることができる。それに対して免疫反応が生起され得る、感染病原体上に存在する抗原の例としては、ウィルス、寄生生物、細菌、及び他の微生物上のタンパク質、糖タンパク質、リポタンパク質及び糖脂質があげられるが、これらに限定されない。

【０３００】

特定の実施形態において、提供されるＧＩＴＲ抗原結合タンパク質は、予防的治療の一部として感染病原体に対するワクチン中に組み込まれる。かかる治療においては、個体は、それに対して免疫性が所望される抗原及び本明細書において開示される抗原結合タンパク質を含むワクチンを用いて免疫化される。あるいは、当該病原性抗原及び抗原結合タンパク質に対する遺伝子をコードする発現ベクターをワクチンに利用することができる。

【０３０１】

Ｃ．検知および診断方法

本明細書に記載の抗原結合タンパク質を用いて、（例えば、血清または血漿などの生物学的試料中の）ＧＩＴＲを検知する、及び診断目的で、ＧＩＴＲまたはＧＩＴＲ治療に関連する疾患及び／若しくは疾病を検知する、診断する、または監視することができる。例えば、開示される抗原結合タンパク質は、当業者に公知の従来の免疫組織学的方法（Ｔｉｊｓｓｅｎ、１９９３、「酵素免疫アッセイの実施と論理」（Ｐｒａｃｔｉｃｅ ａｎｄ Ｔｈｅｏｒｙ ｏｆ Ｅｎｚｙｍｅ Ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙｓ）、第１５巻（Ｒ．Ｈ．Ｂｕｒｄｏｎ及びＰ．Ｈ．ｖａｎ Ｋｎｉｐｐｅｎｂｅｒｇ編、Ｅｌｓｅｖｉｅｒ、アムステルダム）、Ｚｏｌａ、１９８７、「モノクローナル抗体：技術便覧」（Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｍａｎｕａｌ ｏｆ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ）、１４７～１５８ページ（ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ社）、Ｊａｌｋａｎｅｎら、１９８５、Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１０１：９７６～９８５、Ｊａｌｋａｎｅｎら、１９８７、Ｊ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．１０５：３０８７～３０９６）を用いて、試料中のＧＩＴＲの存在を検知する。ＧＩＴＲの検知はイン・ビボまたはイン・ビトロで行うことができる。

【０３０２】

本明細書において提供される診断用途は、ＧＩＴＲの発現及びリガンドのＧＩＴＲへの結合を検知するための抗原結合タンパク質の使用を含む。ＧＩＴＲの存在の検知に有用な方法の例としては、酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）及び放射免疫アッセイ（ＲＩＡ）などの免疫アッセイが挙げられる。

【０３０３】

診断用途に対しては、一般的に抗原結合タンパク質は検知可能な標識基で標識されることとなる。好適な標識基としては、以下が挙げられる。すなわち、放射性同位体すなわち放射性核種（例えば、^{3}Ｈ、^{14}Ｃ、^{15}Ｎ、^{35}Ｓ、^{90}Ｙ、^{99}Ｔｃ、^{111}Ｉｎ、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ）、蛍光基（例えば、ＦＩＴＣ、ローダミン、ランタニド蛍光体）、酵素基（例えば、ホースラディッシュパーオキシダーゼ、β－ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ）、化学発光基、ビオチニル基、または二次レポータによって認識される所定のポリペプチドエピトープ（例えば、ロイシンジッパー対配列、二次抗体に対する結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ）であるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、標識基は、可能性のある立体障害を低減するために、種々の長さのスペーサアームを介して抗原結合タンパク質と連結される。種々のタンパク質の標識化方法が本分野において公知であり、これらを用いることができる。

【０３０４】

別な態様において、抗原結合タンパク質を用いて、細胞またはＧＩＴＲを発現する細胞を識別することができる。特定の実施形態において、抗原結合タンパク質は標識基によって標識され、該標識された抗原結合タンパク質のＧＩＴＲへの結合が検知される。更に特定の実施形態において、抗原結合タンパク質のＧＩＴＲへの結合はイン・ビボで検知される。更に特定の実施形態において、ＧＩＴＲ抗原結合タンパク質は、本技術分野で公知の方法を用いて単離及び測定される。例えば、Ｈａｒｌｏｗ及びＬａｎｅ、１９８８、「抗体：実験室便覧」（Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ）、ニューヨーク：Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ（１９９１年編及び定期的な補遺）、Ｊｏｈｎ Ｅ．Ｃｏｌｉｇａｎ編、１９９３、「免疫学における最新プロトコル」（Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ Ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ）、ニューヨーク：Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓを参照されたい。

【０３０５】

別な実施形態において、本明細書において提供される抗原結合タンパク質と、ＧＩＴＲへの結合に対して競合する被験分子の存在の検知方法が提供される。一つのかかるアッセイの例は、被験分子の存在または非存在下で、ある量のＧＩＴＲを含む溶液中における遊離の抗原結合タンパク質の量を検知することを含むこととなる。遊離の抗原結合タンパク質（すなわち、ＧＩＴＲに結合していない抗原結合タンパク質）の量の増加は、被験分子がＧＩＴＲとの結合に対して抗原結合タンパク質と競合する能力を有することを示すこととなる。一実施形態において、抗原結合タンパク質は標識基によって標識される。あるいは、被験分子が標識化され、抗原結合タンパク質の存在及び非存在下で遊離の被験分子の量が監視される。様々な、更なる競合の測定方法が本技術分野において公知であり、方法はまた後述の実施例においても示される。

【０３０６】

ＶＩＩＩ．医薬配合物及び投与

ＧＩＴＲ抗原結合タンパク質を含む医薬組成物も提供され、本明細書において開示されるいずれかの予防及び治療方法において利用することができる。ある実施形態において、治療上有効な量の１種または複数種の抗原結合タンパク質及び薬学的に許容される希釈剤、担体、可溶化剤、乳化剤、防腐剤、及び／または佐剤もまた提供される。許容される配合材料は、用いられる用量及び濃度において受容者に対して非毒性である。医薬組成物は、液体の、凍結されたまたは凍結乾燥された組成物であることができる。

【０３０７】

特定の実施形態において、医薬組成物は、例えば、当該組成物のｐＨ、浸透圧、粘度、透明性、色調、等張性、臭気、無菌性、安定性、溶解若しくは放出速度、吸着または浸透の改変、維持または保存のための配合材料を含んでもよい。かかる実施形態において、好適な配合材料としては、アミノ酸（グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン又はリシン）；抗菌剤；抗酸化剤（アスコルビン酸、亜硫酸ナトリウムまたは亜硫酸水素ナトリウム）；緩衝液（ホウ酸塩、炭酸水素塩、トリス－ＨＣｌ、クエン酸塩、リン酸塩または他の有機酸）；増容剤（マンニトールまたはグリシンなど）；キレート剤（エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）など）；錯化剤（カフェイン、ポリビニルピロリドン、β－シクロデキストリンまたはヒドロキシプロピル－β－シクロデキストリンなど）；充填剤；単糖、二糖、及び他の炭水化物（グルコース、マンノースまたはデキストリンなど）；タンパク質（血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリンなど）；着色剤、賦香剤及び希釈剤；乳化剤；親水性ポリマー（ポリビニルピロリドンなど）；低分量ポリペプチド；塩形成対イオン（ナトリウムなど）；防腐剤（塩化ベンザルコニウム、安息香酸、サリチル酸、チメロサール、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロルヘキシジン、ソルビン酸または過酸化水素など）；溶媒（グリセリン、プロピレングルコールまたはポリエチレングリコールなど）；糖アルコール（マンニトールまたはソルビトールなど）；懸濁剤；界面活性剤または湿潤剤（プルロニック、ＰＥＧ、ソルビタンエステル、ポリソルベート２０などのポリソルベート、ポリソルベート、トリトン、トロメタミン、レシチン、コレステロール、チロキサパルなど）；安定性向上剤（スクロースまたはソルビトールなど）；張性向上剤（ハロゲン化アルカリ金属、好ましくは塩化ナトリウムまたはカリウム、マンニトールソルビトールなど）；送達ビヒクル；希釈剤；賦形剤及び／または医薬佐剤が挙げられるが、これらに限定されない。「レミントンの薬学」（ＲＥＭＩＮＧＴＯＮ’Ｓ　ＰＨＡＲＭＡＣＥＵＴＩＣＡＬ　ＳＣＩＥＮＣＥＳ）、第１８版（Ａ．Ｒ．Ｇｅｎｒｍｏ編）、１９９０、Ｍａｃｋ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ　Ｃｏｍｐａｎｙが、更なる詳細及び医薬組成物中に組み込むことができる好適な試剤の選択肢を提供する。

【０３０８】

特定の実施形態において、最適な医薬組成物は、例えば、意図する投与経路、送達方式及び所望の用量に応じて、当業者によって決定されることとなる。例えば、レミントンの薬学（前掲）を参照されたい。特定の実施形態において、かかる組成物は、開示される抗原結合タンパク質の物理的状態、安定性、イン・ビボ放出速度及びイン・ビボ排出速度に

影響を与える場合がある。特定の実施形態において、医薬組成物中の主要なビヒクルまたは担体は、本質的に水性または非水性であることができる。例えば、好適なビヒクルまたは担体は、注射用の水または生理食塩水溶液であることができる。特定の実施形態において、ＧＩＴＲ抗原結合タンパク質組成物は、所望の純度を有する選択した組成物を、任意選択の配合試剤と混合することにより（レミントンの薬学（前掲））、凍結乾燥したケーキまたは水溶液の形態で、保存用に調製することができる。更に、特定の実施形態において、ＧＩＴＲ抗原結合タンパク質は、スクロースなどの適宜の賦形剤を用いて、凍結乾燥体として配合することができる。

【０３０９】

上述のように、特定の実施形態は、組成物、特に、ＧＩＴＲ抗原結合タンパク質に加えて、本節及び本明細書の他所に例証として記載のものなどの、１種または複数種の添加剤を含む医薬組成物を提供する。その際に、本発明においては、有効性を向上させるため及び／または、例えば、製造時、輸送時、貯蔵時、使用前の調製時、投与時及びその後に生じるストレスに起因する分解に対して、ＧＩＴＲ抗原結合タンパク質の配合物を安定化させるために、粘度の調節などの、配合物の物理的、化学的、または生物学的特性を調節するなどの、多種多様な目的に対して添加剤を用いることができる。

【０３１０】

特定の実施形態において、例えば、ＧＩＴＲ抗原結合タンパク質配合物において、増容剤、安定剤、及び抗酸化剤として、遊離のアミノ酸を用いることができる。例として、配合物中のタンパク質を安定化するために、リシン、プロリン、セリン、及びアラニンを用いることができる。凍結乾燥において、妥当なケーキ構造及び特性を確保するためにはグリシンが有用である。液体及び凍結乾燥した配合物の両方において、タンパク質の凝集を阻害するためには、アラニンが有用である場合がある。メチオニンは抗酸化剤として有用である。

【０３１１】

いくつかの組成物はポリオールを含む。ポリオールとしては、糖、例えば、マンニトール、スクロール、及びソルビトール並びに、例えば、グリセリン及びプロピレングリコール、並びに本明細書における議論の目的のためには、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）及び関連物質などの多価アルコールが挙げられる。ポリオールはコスモトロピックである。ポリオールは、液体及び凍結乾燥した配合物の両方において、タンパク質を物理的及び化学的分解過程から保護する有用な安定剤である。ポリオールはまた、配合物の張性を調節するためにも有用である。

【０３１２】

特定の組成物は安定剤としてマンニトールを含む。マンニトールは一般的に凍結乾燥保護物質、例えばスクロースと共に用いられる。ソルビトール及びスクロースが、張性の調節に、及び輸送または製造過程におけるバルク製品の製造の間の凍結－融解ストレスに対して保護する安定剤として有用である。ＰＥＧが、タンパク質を安定化するために、及び凍結保護物質として有用であり、この点に関して本発明において用いることができる。

【０３１３】

特定のＧＩＴＲ抗原結合タンパク質配合物中に界面活性剤を含めることもできる。タンパク質分子は表面上への吸着及び変性を受け易く、その結果としての空気－液体、固体－液体、及び液体－液体界面における凝集を起こし易い。これらの効果は一般的にタンパク質濃度に逆比例して増加する。これらの有害な相互作用は一般的にタンパク質濃度に逆比例して増加し、一般的に、製品の輸送及び取り扱いの間に生じるものなどの物理的撹拌によって悪化する。かかる表面吸着を防止、最小化、または低減するために、界面活性剤が常用される。界面活性剤は、タンパク質の立体構造の安定性を制御するためにも一般的に用いられる。好適な界面活性剤としては、ポリソルベート２０、ポリソルベート８０、他のソルビタンポリエトキシレートの脂肪酸エステル、及びポロキサマー１８８が挙げられる。

【０３１４】

いくつかの実施形態において、ＧＩＴＲ抗原結合タンパク質配合物中には、１種又は複数種の抗酸化剤が含まれる。抗酸化添加剤はタンパク質の酸化的分解を防止するために用いることができる。この点においては、還元剤、酸素／フリーラジカル捕捉剤、及びキレート剤が有用な抗酸化剤である。抗酸化剤は一般的には水溶性であり、製品の品質保持期間全体を通してそれらの活性を維持する。ＥＤＴＡは当該配合物に含めることができるもう一つの有用な抗酸化剤である。

【０３１５】

配合物は、タンパク質補因子であり、タンパク質配位化合物を形成するために必要な金属イオンを含んでいてもよい。金属イオンはまた、タンパク質を分解するいくつかの過程を阻害することができる。例えば、マグネシウムイオン（１０～１２０ｍＭ）を用いて、アスパラギン酸のイソアスパラギン酸への異性化を阻害することができる。

【０３１６】

特定のＧＩＴＲ抗原結合タンパク質の配合物中に、１種又は複数種の防腐剤を含めることができる。同一の容器から複数回の抜き出しを伴う複数投与分非経口配合物を開発する場合には、防腐剤が必要である。防腐剤の主要な機能は、当該医薬製品の品質保持期間、すなわち使用期間全体を通して微生物の増殖を阻害し、製品の無菌性を確保することにある。一般的に用いられる防腐剤としては、ベンジルアルコール、フェノール及びｍ－クレゾールが挙げられる。

【０３１７】

配合物成分は、投与部位に対して許容される濃度で存在することが好ましい。特定の実施形態において、緩衝液を用いて、当該組成物を、生理学的ｐＨ、すなわち一般的には約５から約８のｐＨ範囲内である僅かに低いｐＨに維持する。

【０３１８】

医薬組成物は、非経口的送達用に選択することができる。あるいは、該組成物は、吸入用または経口投与などの消化管を通じた送達用に選択されてもよい。かかる薬学的に許容される組成物の調製は、本技術分野の技量の範囲内である。

【０３１９】

非経口投与が企図される場合には、当該治療用組成物は、薬学的に許容されるビヒクル中に所望のＧＩＴＲ抗原結合タンパク質を含む、発熱物質を含まない、非経口投与上許容される水溶液の形態で提供することができる。非経口注入用に特に好適なビヒクルは、その中に、ＧＩＴＲ抗原結合タンパク質が無菌の等張溶液として配合される、然るべく保存された無菌蒸留水である。特定の実施形態において、調剤は、所望の分子を、注入可能なミクロスフェア、生体分解性粒子、（ポリ乳酸またはポリグリコール酸などの）高分子化合物、ビーズまたはリポソームなどの試剤と共に処方することを含み、試剤は、蓄積注射によって送達することができる製品の制御された放出、すなわち徐放を提供してもよい。特定の実施形態において、循環における持続的な継続時間を促進する効果を有するヒアルロン酸を用いてもよい。特定の実施形態において、移植可能な薬剤送達手段を用いて、所望の抗原結合タンパク質を導入してもよい。

【０３２０】

特定の医薬組成物が吸入用に配合される。いくつかの実施形態において、ＧＩＴＲ抗原結合タンパク質は乾燥した、吸入可能な粉末として配合される。特定の実施形態において、ＧＩＴＲ抗原結合タンパク質吸入溶液を、エアゾール送達用の高圧ガスと共に配合してもよい。特定の実施形態において、溶液を噴霧してもよい。更に、肺内投与及びそのための配合方法が国際特許出願第ＰＣＴ／ＵＳ９４／００１８７５号に記載され、該出願は参照により組み込まれ、化学修飾したタンパク質の肺内送達について記載する。

【０３２１】

いくつかの配合物を経口投与することができる。この様式で投与されるＧＩＴＲ抗原結合タンパク質は、錠剤またはカプセル剤などの固形剤形の配合に通例用いられる担体と共に、または該担体なしで配合することができる。特定の実施形態において、カプセル剤は、生体内利用性が最大化され、全身循環への到達前の分解が最小化される消化管内の時点

で、当該配合物の活性部分を放出するように設計されてもよい。更なる試剤を含ませて、ＧＩＴＲ抗原結合タンパク質の吸収を容易にすることができる。希釈剤、賦香剤、低融点ワックス、植物油、潤滑剤、懸濁剤、錠剤崩壊剤、及び粘結剤を用いてもよい。

【０３２２】

いくつかの医薬組成物は、有効量の１種又は複数種のＧＩＴＲ抗原結合タンパク質を、錠剤の製造に好適な非毒性の賦形剤と共に混合物中に含む。当該錠剤を無菌水または別な適宜のビヒクルに溶解することにより、溶液を単位剤形で調整してもよい。好適な賦形剤としては、不活性な、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム若しくは炭酸水素ナトリウム、ラクトース、またはリン酸カルシウムなどの希釈剤；あるいはデンプン、ゼラチン、またはアラビアゴムなどの粘結剤；あるいはステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、またはタルクなどの潤滑剤が挙げられるが、これらに限定されない。

【０３２３】

持続性なすなわち制御された送達配合物中のＧＩＴＲ抗原結合タンパク質を含む配合物を始めとする更なる医薬組成物は、当業者にとって明らかであろう。リポソーム担体、生体分解性微粒子または多孔性ビーズ、及び蓄積注射などの、様々な他の持続性すなわち制御された送達手段の配合技法もまた当業者に公知である。例えば、国際特許出願第ＰＣＴ／ＵＳ９３／００８２９号を参照されたく、該出願は参照により組み込まれ、医薬組成物の制御された放出のための多孔質高分子微粒子の放出を記載する。徐放調剤は、例えば、フィルム、またはマイクロカプセルなどの成形体の形態の半透性ポリマーマトリクスを含んでいてもよい。徐放マトリクスとしては、ポリエステル、ヒドロゲル、ポリラクチド（米国特許第３，７７３，９１９号及び欧州特許出願公開第ＥＰ０５８４８１号に開示され、これらのそれぞれは参照により組み込まれる。）、Ｌ－グルタミン酸とＬ－グルタミン酸γ－エチルとの共重合体（Ｓｉｄｍａｎら、１９８３、Ｂｉｏｐｏｌｙｍｅｒｓ ２：５４７～５５６）、ｐｏｌｙ（２－ｈｙｄｒｏｘｙｅｔｈｙｌ－ｉｎｅｔｈａｃｒｙｌａｔｅ）（Ｌａｎｇｅｒら、１９８１、Ｊ．Ｂｉｏｍｅｄ．Ｍａｔｅｒ．Ｒｅｓ．１５：１６７～２７７及びＬａｎｇｅｒ、１９８２、Ｃｈｅｍ．Ｔｅｃｈ．１２：９８～１０５）、エチレン酢酸ビニル（Ｌａｎｇｅｒら、１９８１、前掲）またはポリ－Ｄ（－）－３－ヒドロキシ酪酸（欧州特許出願公開第１３３，９８８号）を挙げることができる。徐放組成物は、本技術分野で公知のいくつかの方法のいずれかによって調製することができるリポソームを含んでもよい。例えば、Ｅｐｐｓｔｅｉｎら、１９８５、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．８２：３６８８～３６９２；欧州特許出願公開第ＥＰ０３６，６７６号；第ＥＰ０８８，０４６号及び第ＥＰ１４３，９４９号を参照されたい。

【０３２４】

イン・ビボでの投与に用いるための医薬組成物は、一般的に無菌調剤として提供される。無菌化は無菌ろ過膜を通すろ過によって実施することができる。当該組成物が凍結乾燥される場合、この方法を用いる無菌化は、凍結乾燥及び再構成の前またはその後のいずれかで実施することができる。非経口投与用の組成物は、凍結乾燥した形態または溶液で保存することができる。非経口投与組成物は一般的に、無菌アクセスポートを有する容器、例えば、皮下注射針で突き刺すことができる栓を有する静脈内投与溶液バッグまたはバイアルに入れられる。

【０３２５】

医薬組成物が配合された後、該組成物は、溶液、懸濁液、ゲル、乳液、固体、結晶、または脱水若しくは凍結乾燥した粉体として無菌バイアル中に保存してもよい。かかる配合物は、すぐに使用可能な形態または投与の前に再構成する（例えば、凍結乾燥された）形態のいずれかで保存することができる。単回投与単位を作製するためのキットも提供される。特定のキットは、乾燥したタンパク質を有する第１の容器及び水性配合物を有する第２の容器を収容している。特定の実施形態において、単一区画及び多区画の予め充填されたシリンジ（例えば、液体シリンジ及びリオシリンジ）を収容するキットが提供される。用いられるＧＩＴＲ抗原結合タンパク質を含む医薬組成物の治療上有効な量は、例えば、

治療の背景及び目的に依存することとなる。当業者は、治療のための適切な用量レベルは、送達される分子、当該ＧＩＴＲ抗原結合タンパク質が用いられることとなる対象の適応症、投与経路、並びに大きさ（体重、体表面積または器官の大きさ）及び／または患者の状態（年齢及び一般的な健康状態）に応じて、ある程度変化することとなることを認識するものである。特定の実施形態において、臨床医は、最適な治療効果を得るように用量設定し、投与経路を改変してもよい。

【０３２６】

特定の配合物において、抗原結合タンパク質は、少なくとも１０ｍｇ／ｍｌ、２０ｍｇ／ｍｌ、３０ｍｇ／ｍｌ、４０ｍｇ／ｍｌ、５０ｍｇ／ｍｌ、６０ｍｇ／ｍｌ、７０ｍｇ／ｍｌ、８０ｍｇ／ｍｌ、９０ｍｇ／ｍｌ、１００ｍｇ／ｍｌまたは１５０ｍｇ／ｍｌの濃度を有する。一実施形態において、医薬組成物は、抗原結合タンパク質、緩衝液及びポリソルベートを含む。他の実施形態において、医薬組成物は、抗原結合タンパク質、緩衝液、スクロース及びポリソルベートを含む。医薬組成物の一つの例は、５０～１５０ｍｇ／ｍｌの抗原結合タンパク質、５～２０ｍＭの酢酸ナトリウム、５～１０％ｗ／ｖのスクロース、及び０．００２～０．０４％ｗ／ｖのポリソルベートを含む。他の医薬組成物は、５０～１００ｍｇ／ｍｌの抗原結合タンパク質、５～２０ｍＭの酢酸ナトリウム、５～１０％ｗ／ｖのスクロース、及び０．００２～０．００８％ｗ／ｖのポリソルベートを含む。特定の組成物は、例えば、９～１１ｍＭの酢酸ナトリウム緩衝液中の６５～７５ｍｇ／ｍｌの抗原結合タンパク質、８～１０％ｗ／ｖのスクロース、及び０．００９～０．０１１％ｗ／ｖのポリソルベートを含む。特定のかかる配合物のｐＨは、４．５～６の範囲にある。他の配合物は４．９～５．５（例えば、５．０、５．２または５．４のｐＨ）を有する。

【０３２７】

投与頻度は、用いる配合物中の特定のＧＩＴＲ抗原結合タンパク質の薬動態学的パラメータに依存することとなる。一般的には、臨床医は、所望の効果が得られる用量に到達するまで当該組成物を投与する。従って、当該組成物は、単回投与として、または経時的な、（同一量の所望の分子を含んでも、若しくは同一量を含まなくてもよい）２回以上の投与として、あるいは移植手段またはカテーテルによる連続的な注入として投与してもよい。適切な用量は、然るべき用量－応答データを用いて確認することができる。特定の実施形態において、抗原結合タンパク質は、長期間にわたって患者に対して投与することできる。特定の実施形態において、抗原結合タンパク質は、２週毎、１ヶ月毎、２ヶ月毎、３ヶ月毎、４ヶ月毎、５ヶ月毎、または６ヶ月毎に投与される。

【０３２８】

医薬組成物の投与経路は、例えば、経口投与による、静脈内、腹腔内、脳内（実質内）、脳室内、筋内、眼内、動脈内、門脈内、若しくは病巣内経路による注射を通じる、徐放系による、または、移植手段によるなどの公知の方法に従う。特定の実施形態において、組成物は、急速静注により、または点滴若しくは移植手段により連続的に投与してもよい。

【０３２９】

組成物は、所望の分子が吸収されている若しくはカプセル化されている膜、スポンジまたは別な適宜の材料の移植を通じて局所的に投与されてもよい。移植手段が用いられる特定の実施形態において、該手段は任意且つ適宜の組織または器官に移植することができ、所望の分子の送達は、拡散、徐放ボーラス、または連続的投与によることができる。

【０３３０】

特定の実施形態において、組成物が、初回の周期を１２週として、３週毎に静脈内点滴により投与される。他の実施形態において、組成物が、初回の周期を１２週として、２～４週毎に１回、静脈内点滴により投与される。

【０３３１】

開示するエキソ・ビボに従って、ＧＩＴＲ抗原結合タンパク質医薬組成物を用いることも望ましい場合がある。かかる例においては、患者から取り出した細胞、組織または器官

をＧＩＴＲ抗原結合タンパク質医薬組成物に曝露し、その後、当該細胞、組織または器官を当該患者に移植して戻す。

【実施例】

【０３３２】

実施した実験及び得られた結果を含む以下の実施例は、例証を目的として提示するものに過ぎず、添付の特許請求の範囲を限定するものと解釈すべきものではない。

【０３３３】

［実施例１］

アッセイ

ＧＩＴＲ結合アッセイ

ＧＩＴＲ結合アッセイ１　－　非標識抗体：一次ヒト末梢血Ｔ細胞を増殖培地中、プレートに結合させた抗ヒトＣＤ３（クローンＯＫＴ３）の存在下、３７Ｃで４８～７２時間培養し、ＧＩＴＲ発現を上方制御した。細胞を採取し、洗浄し、次いで４Ｃで、抗ヒトＧＩＴＲ抗体またはヒトＩｇＧ１アイソタイプコントロール抗体の力価測定試料（ｔｉｔｒａｔｉｏｎ）と共にインキュベートした。洗浄後、細胞を４Ｃで、活性化されたＣＤ４＋エフェクタＴ細胞を識別するための、蛍光色素を抱合した抗ヒトＣＤ４及び抗ヒトＣＤ２５抗体、並びに結合した抗ヒトＧＩＴＲ抗体を検知するための蛍光色素を抱合した抗ヒトＩｇＧを用いて染色した。フローサイトメトリーによって、ＣＤ２５＋ＣＤ４＋細胞に結合した抗ヒトＧＩＴＲ抗体の平均蛍光強度（ＭＦＩ）を測定した。ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ（登録商標）ソフトウェアを用いて、結合曲線のＥＣ５０を算出した。

【０３３４】

ＧＩＴＲ結合アッセイ２　－　標識抗体：一次ヒト末梢血Ｔ細胞を増殖培地中、プレートに結合させた抗ヒトＣＤ３（クローンＯＫＴ３）の存在下、３７Ｃで４８～７２時間培養し、ＧＩＴＲ発現を上方制御した。細胞を採取し、洗浄し、次いで４Ｃで、蛍光色素を抱合した抗ヒトＧＩＴＲ抗体または蛍光色素を抱合しヒトＩｇＧ１アイソタイプコントロール抗体並びに活性化されたＣＤ４＋エフェクタＴ細胞を識別するための蛍光色素を抱合した抗ヒトＣＤ４及び抗ヒトＣＤ２５抗体の力価測定試料（ｔｉｔｒａｔｉｏｎ）と共にインキュベートした。フローサイトメトリーによって、ＣＤ２５＋ＣＤ４＋細胞に結合した抗ヒトＧＩＴＲ抗体の平均蛍光強度（ＭＦＩ）を測定した。ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ（登録商標）ソフトウェアを用いて、結合曲線のＥＣ５０を算出した。

【０３３５】

Ｔ細胞活性化アッセイ

プレート結合アッセイ：このアッセイは、抗ヒトＧＩＴＲモノクローナル抗体の、ＴＣＲ刺激の存在下での、ヒトまたはカニクイザルの末梢血Ｔ細胞のいずれかを活性化させる能力を試験するために設計した。高結合性の９６ウェルプレートを、１ｕｇ／ｍＬの抗ＣＤ３（ヒト：クローンＯＫＴ３、カニクイザル：クローンＳＰ３４－２）及び０．３ｕｇ／ｍＬの抗ヒトＩｇＧで被覆した。抗ヒトＧＩＴＲモノクローナル抗体またはヒトＩｇＧ１アイソタイプコントロール抗体の力価測定試料（ｔｉｔｒａｔｉｏｎ）をウェルに添加し、３７Ｃで３０分間インキュベートして、プレートに結合させた抗ヒトＩｇＧによって捕捉させた。この捕捉は抗体の架橋を可能にし、この架橋は、後により詳述するように、抗体活性にとって重要である。ヒトまたはカニクイザルＴ細胞をウェルに加え、プレートを３７Ｃにて合計で９６時間インキュベートした。培養物の上清を採取し、ＥＬＩＳＡによって、抗ヒトＧＩＴＲ抗体依存性のＴ細胞活性化の尺度としてのＩＦＮｇに関するアッセイを行った。培養の最後の１８時間の間、１ｕＣｉ／ウェルの３Ｈで細胞をパルスし、抗ヒトＧＩＴＲ抗体依存性の細胞増殖を評価した。

【０３３６】

［実施例２］

完全ヒトＧＩＴＲモノクローナル抗体の調製

免疫化及び力価分析

ＧＩＴＲ（配列番号１）に対する抗体は、複数の異なる系統のキセノマウス（登録商標

）動物（アブジェニックス社、カリフォルニア州フリーモント）中で産生させ、該動物はヒト免疫グロブリン遺伝子、並びに種々の免疫ストラテジーを含むマウスである。３種の、異なるキセノマウス（登録商標）動物の産物を用いて、ヒトＧＩＴＲに対する抗体を製造した。第１の産物は、完全ヒトＩｇＧ２κ抗体を産生するキセノマウス（登録商標）ＸＭＧ２－Ｋ系のマウス及び完全ヒトＩｇＧ４κ及びＩｇＧ４λ抗体を産生するキセノマウス（登録商標）ＸＭＧ４－ＫＬ系のマウスを含んでいた。第２の産物は、完全ヒトＩｇＧ２κ抗体を産生するキセノマウス（登録商標）ＸＭＧ２－Ｋ系のマウス及び完全ヒトＩｇＧ１κ及びＩｇＧ１λ抗体を産生するキセノマウス（登録商標）ＸＭＧ１－ＫＬ系のマウスを含んでいた。第３の産物は、完全ヒトＩｇＧ４κ及びＩｇＧ４λ抗体を産生するキセノマウス（登録商標）ＸＭＧ４－ＫＬ系のマウスのみを含んでいた。産物１のマウスは、一過性にヒトＧＩＴＲを過剰発現するＣＨＯ細胞によって免疫化した。産物２のマウスは、ヒトＧＩＴＲ－Ｆｃ融合タンパク質によって免疫化した。産物３のマウスは、ヒトＧＩＴＲ分子をコードするＤＮＡ発現ベクターによって免疫化した。

【０３３７】

産物１のマウスには、腹腔内注射による追加免疫及びその次の尾の付け根への皮下注射による追加免疫を交互に行うことを含むプロトコル、または全ての追加免疫を皮下注射により送達するプロトコルのいずれかにより、週に２回、５週の期間にわたって抗原を注射した。第１回目の追加免疫は合計４００万個の形質移入細胞であり、全てのその後の追加免疫は、ミョウバンまたはミョウバン／ＣｐＧを佐剤として用いた２００万個の形質移入細胞を用いて行った。最後の追加免疫は、いずれの追加の佐剤も有さず、細胞をＰＢＳ中で直接免疫化した。産物２のマウスは、皮下注射によって送達した１０μｇの抗原を用いて初回の免疫化を行い、それに続く全ての追加免疫は5ugの用量を用いて行った。皮下注射液を、週２回、５週の間、ミョウバン（リン酸アルミニウム）及びＣｐＧオリゴと混合した。最後の追加免疫はいずれの追加の佐剤も有さず、タンパク質をＰＢＳ中で直接免疫化した。産物３のマウスはＧＩＴＲをコードするＤＮＡで被覆した金粒子、マウスＧＭ－ＣＳＦ及びＣｐＧで免疫化した。当該マウスを、週２回、合計５週の間、腹部を通じて免疫化した。最後の追加免疫は、ＰＢＳ中、一過性にＧＩＴＲを発現する２００万個のＣＨＯ細胞によって行った。

【０３３８】

キセノマウス（登録商標）動物を力価測定するために用いるプロトコルは以下の通りであった。すなわち、ＨＥＫ２９３細胞を、ヒトＧＩＴＲをコードするｃＤＮＡ構築物または空のベクターコントロール（疑似）で、２９３フェクチン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）を製造者の推奨に従って用い、一過性に形質移入した。２４時間後に、疑似で形質移入した細胞をＣＦＤＡ、ＳＥ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）で標識し、次いで１：１の比でＧＩＴＲ形質移入した細胞と混合した。免疫化した動物由来のキセノマウス（登録商標）血清を、ＦＡＣＳ緩衝液（２％のＦＢＳを有するＰＢＳ）中、１：１００に希釈し、細胞混合物に氷上で１時間添加した。次いで細胞をＦＡＣＳ緩衝液で２回洗浄して未結合の抗体を除去し、その後5ug／ｍＬのＣｙ５と抱合したヤギ抗ヒトＩｇＧ　Ｆｃ二次を添加した。細胞をＦＡＣＳ緩衝液で更に洗浄して未結合の二次抗体を除去し、次いで細胞上の蛍光シグナルをＢＤ社ＦＡＣＳＣａｌｉｂｕｒ装置上でのＦＡＣＳ分析により測定した。疑似形質移入体との対比でＧＩＴＲ形質移入体に対して最も高い幾何平均シグナルを有する動物を選択し、採取した。これは、産物１に関しては合計６頭の動物（３頭のＸＭＧ２－Ｋ及び３頭のＸＭＧ４－ＫＬ）、産物２に関しては６頭の動物（２頭のＸＭＧ１－ＫＬ及び４頭のＸＭＧ２－Ｋ）並びに産物３に関しては２０頭の動物（ＸＭＧ４－ＫＬ）を含んでいた。

【０３３９】

リンパ球の回収、Ｂ細胞の単離、ハイブリドーマの融合及び生成

選択した免疫化マウスを頸椎脱臼によりと殺し、流入領域リンパ節及び脾臓組織を採取し、コホート毎にプールした。Ｂ細胞をリンパ組織から単離し、該細胞をＤＭＥＭ中に懸濁させた。細胞を計数し、リンパ球１億個当たり０．９ｍｌのＤＭＥＭを静かに添加して

、細胞ペレットを再懸濁させた。
【０３４０】
リンパ球を非分泌性骨髄腫と１：４の比率で混合した。この細胞混合物を４００×ｇ４分での遠心分離により穏やかにペレット化した。上清をデカント後、１ｍｌピペットを用いて細胞を穏やかに混合した。予熱した、Ｓｉｇｍａ社（カタログ番号Ｐ７３０６）より購入したＰＥＧ／ＤＭＳＯ溶液（Ｂ細胞１００万個当たり１ｍｌ）を穏やかに撹拌しながら１分間かけてゆっくりと添加し、続いて１分間混合した。次いで、予熱したＩＤＭＥＭ（Ｂ細胞１００万個当たり２ｍｌ）（グルタミンを含まないＤＭＥＭ、Ｌ－グルタミン、ペニシリン／ストレプトマイシン、ＭＥＭ非必須アミノ酸溶液（全てＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社より））を穏やかに撹拌しながら２分間かけて添加した。最後に、予熱したＩＤＭＥＭ（Ｂ細胞１００万個当たり８ｍｌ）を３分間かけて添加した。
【０３４１】
融合細胞を４００×ｇ　６分で遠沈し、Ｂ細胞１００万個当たり２０ｍｌの選択培地（ＤＭＥＭ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社）、Ｌ－グルタミンを補った１５％　ＦＢＳ（Ｈｙｃｌｏｎｅ社）、ペニシリン／ストレプトマイシン、ＭＥＭ非必須アミノ酸溶液、ピルビン酸ナトリウム、２－メルカプトエタノール（全てＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社より）、ＨＡ－アザセリン　ハイポキサンチン及びＯＰＩ（オキサロ酢酸、ピルビン酸塩、ウシインスリン））（両方共Ｓｉｇｍａ社より）並びにＩＬ－６（ベーリンガーマンハイム社））中に再懸濁させた。細胞を３７Ｃで２０～３０分間インキュベートし、次いで２００ｍｌの選択培地中に再懸濁し、Ｔ１７５フラスコ中で３～４日培養し、その後９６ウェルにプレーティングして、ＧＩＴＲ抗体を産生するハイブリドーマを生成させた。
【０３４２】
［実施例３］
ＧＩＴＲ抗体の初期選択
実施例２に記載の得られたＧＩＴＲ抗体を、次いで種々の予備的なスクリーニングに供して、所望の結合活性と機能面での活性との組み合わせを有する可能性のある候補を識別した。初めに抗体を、ヒトＧＩＴＲと結合する能力についてスクリーニングした。ＦＭＡＴまたはＦＡＣＳによって識別した合計２５６７種のＧＩＴＲ結合抗体に対して、産物１、産物２及び産物３はそれぞれ、２６０種、１０８種及び２１１９種の抗原特異性抗体を有していた。次いでこれらの抗体を更に試験して、Ｔ細胞を活性化する能力及びカニクイザルＧＩＴＲとの交差反応性を始めとする所望の機能面での活性を有する抗体を識別した。
【０３４３】
抗体のＴ細胞を活性化する能力を測定するために、抗ＧＩＴＲ抗体を、それらの抗ＣＤ３を介するＴＣＲシグナル伝達と協同してＴ細胞に同時刺激シグナルを送信する能力について試験した。Ｔ細胞の活性化は、ＩＦＮ－γの分泌及び／または増殖によって測定した。第１及び第２の産物は抗原特異性ハイブリドーマ故にポリクローナルであり、従って機能面のアッセイは、溶液中で外因性架橋剤と共にまたは該架橋剤なしで実施し、抗体がクラスタ化することなく生物学的シグナルを送信できるかを検討した。第３の産物はクローン的にプレートしたことから、アッセイは、各ウェルにおいて低濃度の抗ヒトＩｇＧ　Ｆｃ捕捉抗体と共に実施し、各ウェル中で、バイオアッセイスクリーニングに関して、効率的に抗原特異性抗体を規格化することができた。全てのＦｃｇＲ依存性ＩＦＮｇ分泌にとって抗体の架橋が必要であることが判定された。また、この抗体パネルのクローン性は、活性な抗体の大きなパネルの配列解析が先行する選択を支援することを可能にした。抗体を、一次カニクイザルＴ細胞上（産物１及び２）または抗ＣＤ３によって予備刺激したＨＳＣ－Ｆ細胞株（産物３）上のいずれかのカニクイザルＧＩＴＲに結合するそれらの能力についても試験を行った。これらの結合及び機能面のアッセイの更なる詳細は後述する。
【０３４４】
一次スクリーニング
野生型のＧＩＴＲに結合する抗体についての一次スクリーニングを実施した。最初の及

び確認のための結合スクリーニングを、全ての産物に対してＦＭＡＴにより実施した。一次スクリーニングに関する概括的なプロトコルは以下の通りであった。

【０３４５】

すなわち、ＨＥＫ２９３細胞を、スクリーニングの日の２４時間前に、製造者推奨のプロトコルに従って２９３フェクチンを用いて、ヒトＧＩＴＲで一過性に形質移入した。抗ＧＩＴＲ抗体の存在について試験する、疲弊に達した（ｅｘｈａｕｓｔｅｄ）ハイブリドーマの上清（２０ｕｌ／ウェル）を９６ウェルプレートの各ウェルに加えた。次に、ヒトＧＩＴＲで形質移入した４０００の細胞及び１２０００の疑似形質移入した細胞を４０ｕＬ、各ウェルに添加した。次いで、二次抗体（Ｇｔ抗ヒトＩｇＧ　ＦｃＣｙ５（Ｊａｃｋｓｏｎ社、タカログ番号：１０９－１７５－０９８））を４０uLの細胞及びハイブリドーマ上清が入ったウェルに添加し、二次抗体の最終濃度を1ug／mLとした。これらの試料を室温で3時間インキュベートし、次いでＦＭＡＴ８２００装置上で読み取った。Ａ　Ｍｏ　ａｎｔｉ－ＧＩＴＲ／ＴＮＦＳＦ１８　ａｎｔｉｂｏｄｙ　（Ｒ＆Ｄ　ｃａｔ＃：ＭＡＢ６８９）ｗａｓ　ｔｉｔｒａｔｅｄ　１：２　ｆｒｏｍ　１０ｕｇ／ｍＬ　ａｓ　ａ　ｐｏｓｉｔｉｖｅ　ｃｏｎｔｒｏｌ　ｆｏｒ　ｂｉｎｄｉｎｇ　ｉｎ　ｔｈｅ　ａｓｓａｙ．この抗体の結合は、以下の二次抗体を用いて行った（Ｇｔ抗ＭｏＩｇＧ　Ｆｃ　Ｃｙ５（Ｊａｃｋｓｏｎ社、カタログ番号：１１５－１７５－０７１）。

【０３４６】

機能面のアッセイ

Ｔ細胞活性化アッセイを実施例１に記載のようにして実施した。

【０３４７】

カニクイザル交差反応

抗ＧＩＴＲ抗体がカニクイザルＧＩＴＲに結合する能力を有するかを検討するために、当該抗体を、一次Ｔ細胞上または、ＧＩＴＲ発現を誘発するためのイン・ビトロ培養における刺激後のカニクイザルＴ細胞株ＨＳＣ－Ｆ上のＧＩＴＲに結合するそれらの能力について試験した。簡単に述べると、カニクイザルの末梢血単核細胞をパーコール密度勾配法により単離し、１０％　ＦＢＳを含有するＲＰＭＩ中、1ug／mLの抗ＣＤ３（ＦＮ－１８（Ａｂｃａｍ社））と共に4日間培養した。このＨＳＣ－Ｆ細胞を、１０％　ＦＣＳを含有するＲＰＭＩ中、1ug／mLの抗ＣＤ３（ＳＰ－３４（ＢＤ社））により1日間刺激した。このＴ細胞を、初めは抗ＧＩＴＲ抗体を含む疲弊に達したハイブリドーマの上清と共に氷上で2時間インキュベートした。一次Ｔ細胞については、次いで、試料を洗浄して未結合の抗体を除去し、氷上で1時間、ヤギ抗ヒトＩｇＧ　Ｆｃ　Ｃｙ５（5ug／mL）、抗ＣＤ４　ＦＩＴＣ（ＯＫＴ４（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ社））、抗ＣＤ２５　ＰＥ（ＢＣ９６）及び5ug／mLの７－ＡＡＤを含む混合物で染色した。ＨＳＣ－Ｆ細胞株については、試料を洗浄して未結合の抗体を除去し、氷上で1時間、ヤギ抗ヒトＩｇＧ　Ｆｃ　Ｃｙ５（5ug／mL）、抗ＣＤ３　ＦＩＴＣ（ＳＰ－３４（ＢＤ社））、抗ＣＤ２５　ＰＥ（ＢＣ９６）及び5ug／mLの７－ＡＡＤを含む混合物で染色した。次いで試料を洗浄して未結合の抗体を除去した。両方の場合共に、結合はＢＤ社ＦＡＣＳＣａｌｉｂｕｒ装置上でのＦＡＣＳ分析により評価した。

【０３４８】

スクリーニング結果

上述のアッセイの結果に基づき、いくつかのハイブリドーマ株が、ＧＩＴＲとの所望の相互作用を有する抗体を産生すると識別した。限界希釈法を用いて、管理し易い数の各株由来のクローンを単離した。これらのクローンを、ハイブリドーマ株番号（例えば、９Ｈ６）及びクローン番号（例えば、９Ｈ６．１）によって命名した。概括的には、本明細書に記載の機能面でのアッセイにより、特定の株の異なるクローンの間には差異は検知されなかった。単離したクローンを、それぞれ５０～１００ｍｌのハイブリドーマ培地中で拡大させ、疲弊（すなわち、約１０％未満の細胞生存率）まで増殖させることができた。これらの培養物の上清中のＧＩＴＲに対する抗体の濃度及び有効性をＥＬＩＳＡ、及び本明細書に記載のイン・ビトロでの機能面の試験により測定した。結合アッセイ及び機能面で

のアッセイの結果に基づき、概略２６０種の抗体を選択し、最良の活性の組み合わせを有する主要な抗体を識別するための更なる分析を行った。

【０３４９】

［実施例４］

ハイブリドーマからのヒト抗体の産生

５０ｍｌの疲弊に達した上清を用いて、各ハイブリドーマから抗体を産生させ、次いでプロテインＡクロマトグラフィーによって精製した。Ｔ７５フラスコ内で、２０ｍｌの培地（インテグラ培地）中、ハイブリドーマ株を増殖させた。Ｔ７５フラスコ内でハイブリドーマがほぼコンフルーエントの状態になったところで、これをインテグラフラスコ（インテグラバイオサンエンシーズ社、インテグラＣＬ１０００、カタログ番号９０　００５）に移し替えた。このインテグラフラスコは、膜によって小区画と大区画の２つの区画に仕切られた細胞培養フラスコである。インテグラ培地中、ｍｌ当たり１×１０６細胞の最低細胞密度で、２０～３０ｍｌの容量のハイブリドーマ細胞をインテグラフラスコの小区画中に入れた。インテグラフラスコの大区画中にはインテグラ培地のみ（１Ｌ）を入れた。２つの区画を隔てる膜は低分子量の栄養物に対しては透過性であるが、ハイブリドーマ細胞及びこれらの細胞によって産生された抗体に対しては非透過性である。従って、ハイブリドーマ細胞及びこれらの細胞によって産生された抗体は小区画内に保持される。

【０３５０】

一週間後、インテグラフラスコの両区画から培地を取り出し、新しいインテグラ培地と交換した。小区画から採取した培地を別個に保持した。２週目の増殖の後、小区画からの培地を再び採取した。各ハイブリドーマ株について、１週目の採取した培地を２週目の採取した培地に加え合わせた。得られた、ハイブリドーマ株由来の採取した培地試料を遠沈して細胞及びデブリを除去し（３０００ｒｐｍで１５分間）、得られた上清をろ過した（０．２２um）。透明な、状態調節した培地をプロテインＡ－セファロースカラムにロードした。任意選択で、まず培地を濃縮し、次いでプロテインＡセファロースカラムにロードすることもできる。多量のＰＢＳでの洗浄により、非特異的結合を除去した。プロテインＡカラム上に結合した抗体タンパク質を、標準的なプロテインＡカラムからの酸性の抗体溶離液（５０ｍＭ　クエン酸、ｐＨ３．０など）によって回収した。プロテインＡ－セファロースプール中で凝集した抗体タンパク質は、サイズ排除クロマトグラフィーまたは、Ｑセファロース樹脂などのアニオン交換樹脂上での結合イオン交換クロマトグラフィーによって取り出した。抗体は、カラム容積の２５倍における１０ｍＭ～５００ｍＭのＮａＣｌ勾配によって溶離した。

【０３５１】

形質移入細胞由来の組換え抗ＧＩＴＲヒト抗体の産生

（一過性の発現に用いられる）ＨＥＫ２９３細胞及び（安定した発現に利用される）ＣＨＯ細胞を、重鎖及び軽鎖をコードするプラスミドを用いて形質移入した。形質移入細胞由来の状態調節した培地を採取し、細胞及び細胞デブリを除去することによって透明にした。透明な、状態調節した培地をプロテインＡ－セファロースカラムにロードした。任意選択で、まず培地を濃縮し、次いでプロテインＡセファロースカラムにロードすることもできる。多量のＰＢＳでの洗浄により、非特異的結合を除去した。プロテインＡカラム上に結合した抗体タンパク質を、標準的なプロテインＡカラムからの酸性の抗体溶離液（５０ｍＭ　クエン酸、ｐＨ３．０など）によって回収した。プロテインＡ－セファロースプール中で凝集した抗体タンパク質は、サイズ排除クロマトグラフィーまたは、Ｑセファロース樹脂などのアニオン交換樹脂上での結合イオン交換クロマトグラフィーによって取り出した。

【０３５２】

［実施例５］

ＧＩＴＲ抗体の配列解析

次いで、概略２６０種の抗体の軽鎖及び重鎖に対する核酸配列を、サンガー（ジデオキシ）ヌクレオチド配列決定法により決定した。次いで、核酸配列に対して、アミノ酸配列

を推定した。

【０３５３】

抗体が配列決定されたので、次いで、該抗体を、多数の異なる配列及び機能面の判断基準に基づいて解析し、更なる検討を正当化する抗体の数をさらに限定した。例えば、酸化、脱アミノ化、異性化、酸による加水分解に対して感受性の高い可能性がある、または凝集を起こす傾向を有するアミノ酸またはアミノ酸の組み合わせに関して解析を行った。問題があることが予想される配列を除外した。更なる選択は、実施例３に記載の、得られた結合、活性化及び交差反応性のデータに基づいた。これらの全ての判断基準の分析に基づき、合計１９種の親抗体を選択し、より更なる分析及び改変を行った。これらの親抗体のそれぞれに対する、６種のＣＤＲ配列、可変領域（重鎖可変ドメイン（ＶＨ）及び軽鎖可変ドメイン（ＶＬ））並びに完全長重鎖（ＨＣ）及び完全長軽鎖（ＬＣ）に関するアミノ酸配列を、それぞれの配列番号によって表１にまとめる。親配列のアラインメントを図８Ａ、８Ｂ、９Ａ及び９Ｂに示す。

【０３５４】

［実施例６］

機能面及び生物物理学的な特性に基づく親抗体の選択

適切な主要な抗体の更なる選択を行うための意思決定過程を知らせるために、選択した１９種の親抗体を、更に多様な生物物理学的な特性及び更なる機能面の分析に関して、分析した。生物物理学的な分析としては、発現力価、単量体形態の純度対凝集体の純度、示差走査熱分析（ＤＳＣ）によって測定した安定性、及び撹拌による凝集の傾向（凝集安定性）が挙げられた。更なる機能面の分析としては、ＧＩＴＲ結合親和性及びＴ細胞を活性化する能力が挙げられた。親抗体の内の５種の遺伝子操作した変異体（４４Ｃ１、４５Ａ８、４９Ｄ９、４９Ｅ２及び４８Ａ９）を分析の初期に産生させ、全ての分析に供した抗体の合計数が２３種になった。

【０３５５】

ヒト抗体濃度を、ＦｏｒｔｅＢｉｏ　Ｏｃｔｅｔ上でのプロテインＡセンサへの結合速度の測定によって得た。抗体上清を、予め湿らせたプロテインＡセンサに１２０秒間、初期結合速度を算出する温度である３０Ｃで結合させた。次いで、この速度を精製した標準品と比較し、算出した濃度を報告した。０．１％ＢＳＡ、０．０２％　Ｔｗｅｅｎ　２０、０．０５％　アジ化ナトリウムを含む、中和緩衝液としてのＰＢＳ、ｐＨ７．４及び再生緩衝液としての１０ｍＭ　グリシン、１５０ｍＭ　塩化ナトリウム　ｐＨ２．０を用いたＦｏｒｔｅＢｉｏ上で、デフォルトである「再生による基礎的定量」（“Ｂａｓｉｃ　Ｑｕａｎｔｉｔａｔｉｏｎ　ｗｉｔｈ　Ｒｅｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ”）プロトコルを用いた。

【０３５６】

ＭｉｃｒｏＣａｌ　ＶＰ－キャピラリＤＳＣ上で、示差走査熱分析（ＤＳＣ）実験を行った。各実験のタンパク質濃度は、１０ｍＭ　酢酸ナトリウム、９％　スクロース中、ｐＨ５で約０．５ｍｇ／ｍＬである。全ての試料を２０Ｃから９５Ｃまで、６０Ｃ／時間の加熱速度で加熱した。熱転移中点（Ｔｍ）を、５０％の分子が折り畳まれていない時点で測定した。

【０３５７】

凝集安定性階位を、過去に確立された、撹拌及び熱的ストレスに基づいて順位候補を階位付けする手順を用いて決定した（Ｃｈｅｎ，Ｓ．ら、（２０１０）Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｓｃｉ．１９：１１９１～１２０４２、及びＷｏｏｄｗａｒｄ，Ｊ．ら、（２０１３）Ａｎａｌ．Ｃｈｅｍ．８５：６４２９～６４３６）。

【０３５８】

細胞結合アッセイ及びＩＦＮｇ分泌を監視するＴ細胞活性化アッセイを、実施例１に記載の通り実施した。

【０３５９】

独自の親抗体について実施したこれらの種々の分析結果を以下の表５にまとめる。

【０３６０】
【表５】

表５　親ＧＩＴＲ抗体の発現及び生物物理学的パラメータ

識別番号	参照番号	抗体	力価 (mg/L)	純度 (単量体%、SEC)	DSC (Tm Fab)	凝集安定性階位	IFNg 分泌 EC50 (ng/ml)	IFNg 分泌 (CD3 に対する倍率)	活性化ヒトＴ細胞結合 EC50 (ng/ml)
Ab1	SS-10942	1D7	53	100%	69.9	2	0.8	2.2	24
Ab17	SS-10943	5H7	38	100%	76.7	1	11.3	2.9	164
Ab18	SS-10944	7A10	62	100%	69.8	2	0.2	2.2	27
Ab19	SS-10945	9H6	43	99%	78.5	1	0.5	1.9	26
Ab2	SS-12413	33C9	6	100%	69.9	3	1	2.7	35
Ab3	SS-12414	33F6	4	98%	73.3	1	0.4	2.8	53
Ab4	SS-12415	34G4	4	100%	74.3	1	0.2	1.9	38
Ab5	SS-12416	35B10	3	99%	74.1	3	0.5	1.9	33
Ab6	SS-12417	41E11	5	100%	67.7	1	0.3	2	48
Ab8	SS-12418	42A11	10	100%	67.1	3	1.2	1.9	51
Ab9	SS-12419	44C1	52	100%	検出せず	1	検出せず	検出せず	検出せず
Ab20	SS-12514	44C1 (C107A LC)	118	100%	72.4	1	11.4	1.6	802
Ab10	SS-12420	45A8	41	96%	検出せず	1	検出せず	検出せず	検出せず
Ab21	SS-12515	45A8 (C107A LC)	108	99%	77.5	1	0.7	1.8	102
Ab11	SS-12421	46E11	15	99%	75.2	3	0.9	2.2	30
Ab12	SS-12422	48H12	4	100%	76.2	3	0.8	1.2	48
Ab13	SS-12423	48H7	21	99%	72.7	1	0.6	1.2	45
Ab14	SS-12424	49D9	7	100%	検出せず	1	検出せず	検出せず	検出せず
Ab22	SS-12562	49D9 (R17G HC)	27	100%	76.7	1	0.5	1.3	51
Ab15	SS-12425	49E2	40	100%	検出せず	1	検出せず	検出せず	検出せず
Ab23	SS-12516	49E2 (C107A LC)	51	100%	64.6	2	2.2	1.9	318
Ab16	SS-12427	48A9	15	98%	検出せず	1	検出せず	検出せず	検出せず
Ab24	SS-12513	48A9 (C39Y HC)	71	100%	77.7	1	79.1	0.9	145
Ab7	SS-12428	41G5	15	99%	74.2	2	0.8	1.9	33

【０３６１】
得られた結果の解析に基づいて、親抗体のサブセット、抗体５Ｈ７、７Ａ１０、９Ｈ６、３３Ｃ９及び４１Ｇ５を選択し、更なる評価及び開発を行った。
【０３６２】
［実施例７］
親ＧＩＴＲ抗体のサブセットの遺伝子操作
５種の選択した親抗体の配列を更に解析し、活性、安定性に強い悪影響を与える、または免疫原性の虞をもたらす可能性のある残基を識別した。後者の見地に関しては、可能性のある抗体／ＨＬＡ複合体の形成がＴリンパ球依存性Ｂ細胞抗体反応を活発化させる可能性があることから、配列をＨＬＡクラスＩＩ分子に結合する潜在的能力について解析した。次に、多数の、５種の選択した親抗体の遺伝子操作した変異体を調製及び試験して、生物物理学的及び／または機能面の特性が向上した抗体を識別した。
【０３６３】
５種の選択した親抗体の遺伝子操作した変異体に関する分析結果を表６にまとめる。一定の閾値を超えた活性及び発現レベルを有する、表６より選択した変異体についてのＣＤＲ、可変ドメイン並びに完全長軽鎖及び重鎖配列に関する配列を、表１にまとめる。遺伝子操作した抗体の可変ドメインのアラインメントを図１０Ａ、１０Ｂ、１１Ａ及び１１Ｂに示す。
【０３６４】

表６　選択した親ＧＩＴＲ抗体の遺伝子操作版の発現及び生物物理学的パラメータ

識別番号	抗体	参照番号	力価 (mg/L)	SEC (単量体%)	凝集安定性 階位	増殖 EC50 (ng/ml)	増殖 (CD3に対する倍率)	結合 EC50 (ng/ml)
17	5H7	SS-10943	20	99	1	8	3.4	303
25	5H7v1	SS-16912	153	96	1	33	1.0	検出せず
26	5H7v2	SS-13807	119	98	1	11	3.2	279
27	5H7v3	SS-16913	96	95	1	15	3.2	293
	5H7v4	SS-16914	70	92	1	>1000	0.0	>1000
28	5H7v5	SS-16915	48	94	1	21	1.4	>1000
	5H7v6	SS-16916	35	92	1	>1000	0.0	>1000
29	5H7v7	SS-16917	18	97	1	28	2.1	461
	5H7v8	SS-16918	64	94	2	>1000	0.0	>1000
30	5H7v9	SS-16921	検出せず	検出せず	検出せず	検出せず	検出せず	検出せず
31	5H7v10	SS-16919	70	98	1	39	0.6	>1000
32	5H7v11	SS-16920	91	98	1	32	2.0	>1000
	5H7v12	SS-16922	68	98	2	>1000	0.0	>1000
33	5H7v13	SS-16923	58	98	1	113	1.2	>1000
34	5H7v14	SS-16924	35	97	1	31	1.9	995
	5H7v15	SS-16925	73	96	1	>1000	0.0	>1000
	5H7v16	SS-16926	78	97	1	>1000	0.0	>1000
35	5H7v17	SS-16927	46	97	1	24	3.0	>1000
36	5H7v18	SS-16928	146	95	1	12	2.7	804
37	5H7v19	SS-16929	0	検出せず	検出せず	検出せず	検出せず	検出せず
	5H7v20	SS-16930	48	93	1	>1000	0.0	>1000
	5H7v21	SS-16931	42	94	1	>1000	0.0	>1000
38	5H7v22	SS-16932	26	95	1	27	1.7	786
	5H7v23	SS-16933	0	検出せず	検出せず	>1000	0.0	>1000
	5H7v24	SS-16934	60	95	1	>1000	0.0	>1000
	5H7v25	SS-16935	188	96	1	>1000	0.0	>1000

識別番号	抗体	参照番号	力価 (mg/L)	SEC (単量体%)	凝集安定性 階位	増殖 EC50 (ng/ml)	増殖 (CD3 に対する倍率)	結合 EC50 (ng/ml)
	5H7v26	SS-16936	0	検出せず	検出せず	>1000	0.0	>1000
	5H7v27	SS-16937	39	94	1	>1000	0.0	>1000
18	7A10	SS-10944	149	97	2	12	3.4	67
39	7A10v1	SS-13810	186	99	2	3	3.0	56
40	7A10v2	SS-16938	86	99	1	43	0.7	861
41	7A10v3	SS-16939	185	98	2	46	55.0	3
42	7A10v4	SS-16940	163	99	2	6	60.0	2
43	7A10v5	SS-16941	115	99	1	20	0.6	783
	7A10v6	SS-16942	0	検出せず	検出せず	>1000	0.0	>1000
19	9H6	SS-10945	49	97	2	7	3.0	134
44	9H6v1	SS-16943	33	95	2	4	3.2	144
45	9H6v2	SS-16944	103	92	1	19	2.2	423
46	9H6v3	SS-13806	72	94	1	6	3.7	90
47	9H6v4	SS-16945	121	95	2	7	3.3	95
48	9H6v5	SS-16946	52	92	1	11	1.9	380
49	9H6v6	SS-16947	109	94	1	11	1.5	411
2	33C9	SS-12413	88	94	3	10	2.7	60
50	33C9v1	SS-16948	6	検出せず	検出せず	18	2.1	78
51	33C9v2	SS-13808	155	99	3	7	2.9	60
52	33C9v3	SS-16949	141	99	3	25	3.1	56
53	33C9v4	SS-16950	18	98	2	17	2.6	82
54	33C9v5	SS-16951	30	96	3	18	2.5	68
7	41G5	SS-12428	18	96	2	4	3.7	55
55	41G5v1	SS-16952	27	92	2	17	2.9	60
56	41G5v2	SS-13809	110	95	2	3	3.5	57
57	41G5v3	SS-16953	53	96	2	7	3.4	60
58	41G5v4	SS-16954	113	93	1	15	2.2	68
59	41G5v5	SS-16955	68	94	1	12	2.5	64

【０３６５】

遺伝子操作した変異体に対して収集したデータの解析から、変異体の５種（９Ｈ６ｖ３、７Ａ１０ｖ１、５Ｈ７ｖ２、４１Ｇ５ｖ２、３３Ｃ９ｖ２）を、更なる生物物理学的及

び機能面の分析並びにスケールアップした生産に向けて選択した。分析を行った生物物理学的パラメータのまとめを表７に示し、スケールアップした生産後の抗体に関して、選択した変異体に対する機能面のデータを表８にまとめる。

【０３６６】

【表７】

表７　スケールアップした生産後の選択した変異体の生物物理学的特性のまとめ

抗体	9H6v3	7A10v1	5H7v2	41G5v2	33C9v2
識別番号	SS-13806	SS-13810	SS-13807	SS-13809	SS-13808
計算 pI	9.46	9.1	8.64	9.12	8.98
発現力価(mg/L)	46mg/L	72mg/L	39mg/L	45mg/L	25mg/L
SEC(単量体%) (プロテイン A)	93%	97%	96%	94%	99%
SEC(単量体%) (最終生成物)	99%	99%	97%	99.3	99%
精製収率(%)	75%	81%	96%	75%	87%
Tm (DSC)	81.1°	74.4°	83.2°	76.6°	72.7°

【０３６７】

【表８】

表８　スケールアップした生産後の選択した変異体の生物学的属性のまとめ

識別番号	クローン	ヒトT細胞結合 EC_{50} (ng/mL)	カニクイザル T細胞結合 EC_{50} (ng/mL)	カニクイザル：ヒト結合 EC_{50} 比	活性化 EC_{50} (ng/mL) (IFNg分泌)	増殖 (CD3に対する倍率)	GITR-L結合の遮断	FcgRによるヒトT細胞活性化の媒介(増殖)	GITR内部移行の媒介
SS-13806	9H6v3	26	184	7.1	0.06	3.7	あり	あり	あり
SS-13807	5H7v2	164	619	3.7	1.6	3.2	あり	あり	あり
SS-13808	33C9v2	35	301	8.6	0.86	2.9	あり	あり	あり
SS-13809	41G5v2	33	153	4.6	0.64	3.5	あり	あり	あり
SS-13810	7A10v1	27	173	6.4	0.32	3	あり	あり	あり

【０３６８】

［実施例８］
選択したＧＩＴＲ抗体はＧＩＴＲＬと競合する
選択したＧＩＴＲ抗体のいくつかを、一連の交差競合アッセイにおいて試験し、該抗体がＧＩＴＲへの結合に関してＧＩＴＲＬと競合するかを判定した。
【０３６９】
この一連の実験において、ファルコン１００ｍｍ皿（ＢＤ社ファルコン、カタログ番号３５３００３）を、室温で４時間、５ｍｌの１０ｕｇ／ｍｌ　マウス抗ヒトＣＤ３抗体ＯＫＴ３（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ社、カタログ番号１６－００３７－８５）で被覆した。次いで、この皿をＰＢＳで２回洗浄した。ヒト汎Ｔ細胞を、汎Ｔ細胞単離キットＩＩ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ社、カタログ番号１３０－０９１－１５６）を用いてＰＢＭＣより単離した。完全培地（１０％　ＦＢＳ、Ｌ－グルタミン、ＮＥＡＡ、ピルビン酸ナトリウム、β－メルカプトエタノールを加えたＰＲＭＩ１６４０）中の５０００万個の汎Ｔ細胞を、ＣＤ３で予め被覆した皿に播種し、５％ＣＯ２インキュベータ中、３７℃で４日間インキュベートして、ＧＩＴＲ発現を増加させるためにＴ細胞を刺激した。
【０３７０】
第４日に、汎Ｔ細胞を採取し、マウス抗ヒトＣＤ４　ＰｅｒＣＰ５．５（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ社、カタログ番号５６０６５０）、マウス抗ヒトＣＤ８（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ社、カタログ番号５５５６３４）、及びマウス抗ヒトＣＤ２５　ＡＰＣ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ社、カタログ番号１３０－０９２－８５８）を用い、染色緩衝液（ＰＢＳ中、２％　ＦＢＳ、０．０５％ＮａＮ３）中、４℃で３０分間染色し、２種の異なるエフェクタ細胞群：活性化されたＣＤ４（ＣＤ２５＋ＣＤ４＋）細胞及び活性化されたＣＤ８（ＣＤ２５＋ＣＤ８＋）細胞を染色した。次いで、細胞を染色緩衝液で２回洗浄し、Ｕ底プレートにウェル当たり０．５×10^6細胞を播種し、競合結合を行った。
【０３７１】
抗ヒトＧＩＴＲ抗体がＧＩＴＲリガンド（ＧＩＴＲ－Ｌ、ＲＤ社、カタログ番号６９４－ＧＬ－ＣＦ）の結合を遮断するかを評価するために、２～６４ｎＭの非抱合抗ヒトＧＩＴＲ抗体（クローン９Ｈ６、５Ｈ７、４１Ｇ５）の力価測定試料（ｔｉｔｒａｔｉｏｎ）を汎Ｔ細胞と共に、染色緩衝液中、４℃で１０分間インキュベートした。洗浄なしで、４ｎＭのヒトＧＩＴＲ－Ｌを添加し、４℃で更に３０分間インキュベートした。次いで、細胞を染色緩衝液で２回洗浄し、抗ｈｉｓ　ＰＥ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ社、カタログ番号１３０－０９２－６９１）と共に、染色緩衝液中、４℃で３０分間インキュベートした。次いで、細胞を染色緩衝液で２回洗浄し、ＰＢＳ中、２％のパラホルムアルデヒドで固定化し、フローサイトメトリー分析を行った。この実験の結果を図１Ａ及び１Ｂに示す。
【０３７２】
ＧＩＴＲ－Ｌが抗ヒトＧＩＴＲ抗体の結合を遮断するかを評価するために、２～６４ｎＭの非抱合ヒトＧＩＴＲ－Ｌの力価測定試料（ｔｉｔｒａｔｉｏｎ）を汎Ｔ細胞と共に、染色緩衝液中、４℃で１０分間インキュベートした。洗浄なしで、４ｎＭの抗ヒトＧＩＴＲ抗体（クローン９Ｈ６、５Ｈ７、４１Ｇ５）を添加し、４℃で更に３０分間インキュベートした。細胞を染色緩衝液で２回洗浄し、抗ヒトＦｃ　ＰＥ（Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｉｍｍｕｎｏｒｅｓｓｅａｒｃｈ社、カタログ番号１０９－１１６－１７０）と共に、染色緩衝液中、４℃で３０分間インキュベートした。次いで、細胞を染色緩衝液で２回洗浄し、ＰＢＳ中、２％のパラホルムアルデヒドで固定化し、フローサイトメトリー分析を行った。図１Ｃ及び１Ｄがこの検討の結果を示す。
【０３７３】
図１Ａ及び１Ｂから見てとれるように、被験抗ＧＩＴＲ抗体は、ＧＩＴＲＬを遮断して、それぞれＣＤ４＋細胞及びＣＤ８＋細胞の両方に結合することができる。同様に、図１Ｃ及び１Ｄは、ＧＩＴＲＬが、被験ＧＩＴＲ抗体のそれぞれのＣＤ４＋細胞＋及びＣＤ８＋細胞への結合を遮断できることを示している。まとめると、これらの結果は、ＧＩＴＲ抗体及びＧＩＴＲＬは、ＧＩＴＲとの結合に関して、互いに交差競合することを説明している。

【０３７４】
［実施例９］
制御性Ｔ細胞誘導抑制の防止
選択した主要なＧＩＴＲ抗体の中の抗体を試験して、かかる抗体が、制御性Ｔ細胞によるエフェクタＴ細胞の活性の抑制を防止する所望の活性を有するかを判定した。かかる試験において、初めに、以下のようにしてＧＩＴＲ抗体をダイナビーズに抱合させた。３００μｇのＧＩＴＲ抗体クローン９Ｈ６ｖ３及びヒトＩｇＧ１アイソタイプコントロールを、１５ｍｇのダイナビーズＭ－２７０エポキシ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社、カタログ番号１４３．０１）に、ダイナビーズ抗体カップリングキット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ社、カタログ番号４１３．１１Ｄ）のユーザーマニュアルに従って抱合させた。簡単に述べると、０．３ｍｇの抗体を１５ｍｇのビーズと共に、０．７５ｍｌのＣ１緩衝液に０．７５ｍｌのＣ２緩衝液を加えた液中、３７℃で終夜、揺動させながらインキュベートした。翌日、マニュアルに従って、ビーズを１．２ｍｌのＨＢ、ＬＢ及びＳＢ緩衝液で順次洗浄した。カップリング後、ビーズを計数し、2×10^{8}ビーズ／ｍｌで０．０２％のＮａＮ３を含むＳＢ緩衝液中に４℃で貯蔵した。
【０３７５】
ヒトＣＤ４　Ｔ細胞を、ヒトＣＤ４＋Ｔ細胞単離キット（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ社、カタログ番号１３０－０９６）を用いて単離した。Ｔｒｅｇ細胞を、製造者の指示に従って、ヒトＣＤ２５マイクロビーズＩＩ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ社、カタログ番号１３０－０９２－９８３）を用いて更に富化させた。ＣＤ２５を除去したＣＤ４　Ｔ細胞を、抑制アッセイにおいてＴレスポンダとして用いた。抗ヒトＣＤ２、ＣＤ３及びＣＤ２８抗体と抱合させたビーズであるＴｒｅｇ抑制検査薬（ａ．ｋ．ａ　Ｔ細胞活性化ビーズ、Ｍｉｌｔｅｎｙｉ社、カタログ番号１３０－０９２－９０９）を用いて、アッセイにおいてＴ細胞を活性化させた。９６ウェルプレート上に、ウェル当たり、Ｔｒｅｇ及びＴレスポンダのそれぞれ５０，０００個を播種し、同数のＴ細胞活性化ビーズ及びＧＩＴＲ抗体ビーズの力価測定試料（ｔｉｔｒａｔｉｏｎ）と共に５日間インキュベートした。細胞を、最後の１６時間の間に1uＣｉの３Ｈでパルスし、採取して３Ｈの計数を行った。
【０３７６】
図２は、ＧＩＴＲアゴニスト抗体９Ｈ６ｖ３が、ＴｒｅｇによるエフェクタＴ細胞活性の活性の抑制を軽減することができることを実証する代表的な実験の結果を示す。
【０３７７】
［実施例１０］
抗体は循環制御性Ｔ細胞を減少させる
Ｔ細胞による抑制の阻害を実証する実施例９に記載のイン・ビトロでの検討に加えて、関連するイン・ビボでの実験を行い、本明細書において提供される抗体のいくつかが、ヒト化ＮＳＧマウスモデルにおいて、循環制御性Ｔ細胞を減少させる能力を有するかを判定した。
【０３７８】
この実験においては、新生仔のＮＳＧマウスに、後眼窩注射によって$CD34^{+}$胎性肝細胞を移植した。１６週にわたり、ＣＤ４＋及びＣＤ８＋エフェクタＴ細胞並びに制御性Ｔ細胞を始めとする多様なヒト免疫細胞レパートリを生み出した。２５ｍｇ／ｋｇの抗ヒトＧＩＴＲ抗体（９Ｈ６ｖ３、５Ｈ７ｖ２及び４１Ｇ５ｖ２）またはヒトＩｇＧ１アイソタイプコントロールの単回腹腔内投与を行い、投与後第４日にフローサイトメトリーによって、制御性Ｔ細胞マーカーＦｏｘＰ３を発現する循環ヒトＣＤ４＋Ｔ細胞のパーセンテージを測定した。
【０３７９】
図３に示すように、９Ｈ６ｖ３、５Ｈ７ｖ２及び４１Ｇ５ｖ２のそれぞれを、別個にヒト化マウスモデルに投与することで、コントロール対比で、制御性Ｔ細胞の循環レベルの減少が生じた。かかる活性は、免疫反応の誘発または向上に有用である。
【０３８０】

［実施例１１］
ＦｃγＲ結合を介したＧＩＴＲ抗体クラスタ化
いくつかの主要な親抗体をイン・ビトロで試験して、Ｆｃγ受容体（ＦｃγＲ）、特にＦｃγ－ＲＩＩａ及びＦｃγ－ＲＩＩＩａの、ＴＣＲ刺激の存在下におけるヒト末梢血Ｔ細胞の活性化を媒介する能力を評価した。
【０３８１】
これらの実験を実施するために、２９３Ｔ細胞を、ヒトＦｃγ－ＲＩＩａまたはヒトＦｃγ－ＲＩＩＩａのいずれかを発現するように遺伝子操作した。Ｆｃγ－Ｒ発現２９３Ｔ細胞をパラホルムアルデヒドで固定化し、９６ウェルプレートに、１：１の比でヒト末梢血ＣＤ４＋Ｔ細胞と共に播種した。抗ヒトＣＤ３を被覆したビーズを培養物に添加してＴＣＲ刺激を与えた。抗ヒトＧＩＴＲモノクローナル抗体またはヒトＩｇＧ１アイソタイプコントロール抗体の力価測定試料（ｔｉｔｒａｔｉｏｎ）をウェルに添加し、培養物を３７Ｃで合計９６時間インキュベートした。細胞を、培養の最後の１８時間の間に1uＣｉ／ウェルの３Ｈでパルスし、抗ヒトＧＩＴＲ抗体依存性の細胞増殖を評価した。
【０３８２】
図４Ａに示すように、ＦｃγＲＩＩａは、主要な抗体のそれぞれをクラスタ化し、一次ヒトＴ細胞を活性化する能力を有することを見出した。同様に、Ｆｃγ－ＲＩＩＩａもまたクラスタ化活性を有することを見出した（図４Ｂ）。各図のグラフは、１種３ウェルの平均値±標準偏差を示し、５のヒトドナー由来の５実験を代表する。これらの結果は、Ｆｃγ受容体は、抗ヒトＧＩＴＲ抗体媒介性のＴ細胞の活性化に必要な架橋を提供することができることを実証する。ＦｃｇＲを有する細胞は、ＧＩＴＲを通じたシグナル伝達に必要なＧＩＴＲ抗体のクラスタ化を提供する。ＧＩＴＲ抗体に結合するＦｃｇ受容体もまたＡＤＣＣにとって必要である。これらの結果は、抗体活性の根底にある生物学にとって重要な含蓄を有する。抗体のＧＩＴＲへの結合だけでは、ＧＩＴＲを活性化するためには十分ではない。この実施例において実証したように、Ｆｃ受容体への結合なしには、抗体は、該抗体が凝集しない限り、ＧＩＴＲシグナル伝達をトリガーすることとなるからである。
【０３８３】
［実施例１２］
ＧＩＴＲ抗体のヒトＴ細胞サブセットへの差示的結合
得られた親抗体のいくつかを、異なるサブセットのヒトＴ細胞に結合するそれらの能力について試験し、ＷＯ０６／１０５０２１に記載される抗体６Ｃ８と比較した。
【０３８４】
これらの実験を実施するために、ファルコン１００ｍｍ皿（ＢＤ社ファルコン、カタログ番号３５３００３）を、室温で４時間、５ｍｌの１０μｇ／ｍｌ　マウス抗ヒトＣＤ３抗体ＯＫＴ３（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ社、カタログ番号１６－００３７－８５）で被覆した。次いで、この皿をＰＢＳで２回洗浄した。ヒト汎Ｔ細胞を、Ｐａｎ　Ｔ　Ｃｅｌｌ　Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ　Ｋｉｔ　ＩＩ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ社、カタログ番号１３０－０９１－１５６）を用いてＰＢＭＣより単離した。完全培地（１０％　ＦＢＳ、Ｌ－グルタミン、ＮＥＡＡ、ピルビン酸ナトリウム、β－メルカプトエタノールを加えたＰＲＭＩ１６４０）中の５０００万個の汎Ｔ細胞を、予め被覆した皿に播種し、５％ＣＯ２インキュベータ中、３７℃で４日間インキュベートした。
【０３８５】
第４日に、Ｔ細胞を採取し、マウス抗ヒトＣＤ４　ＰｅｒＣＰ５．５（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ社、カタログ番号５６０６５０）、マウス抗ヒトＣＤ８（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ社、カタログ番号５５５６３４）、及びマウス抗ヒトＣＤ２５　ＡＰＣ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ社、カタログ番号１３０－０９２－８５８）を用い、染色緩衝液（ＰＢＳ中、２％　ＦＢＳ、０．０５％ＮａＮ３）中、４℃で３０分間染色した。次いで、細胞を染色緩衝液で２回洗浄し、Ｕ底プレートにウェル当たり０．５×10^6細胞を播種した。

【０３８６】
２～６４ｎＭの、抗ヒトＧＩＴＲ抗体（クローン９Ｈ６、５Ｈ７、４１Ｇ５）、並びに抗体６Ｃ８の力価測定試料（ｔｉｔｒａｔｉｏｎ）を汎Ｔ細胞と共に、染色緩衝液中、４℃で３０分間インキュベートした。次いで、細胞を染色緩衝液で２回洗浄し、抗ヒトＦｃＰＥ（Ｊａｃｋｓｏｎ Ｉｍｍｕｎｏｒｅｓｓｅａｒｃｈ社、カタログ番号１０９－１１６－１７０）と共に、染色緩衝液中、４℃で３０分間インキュベートした。次いで、細胞を染色緩衝液で２回洗浄し、ＰＢＳ中、２％のパラホルムアルデヒドで固定化し、フローサイトメトリー分析を行った。
【０３８７】
同様の実験をＧＩＴＲＬについて実施した。
【０３８８】
ＧＩＴＲ抗体の結合の結果を図５Ａ～５Ｄにまとめる。ＧＩＴＲＬについての対応する結果を図６に示す。これらの図から見てとれるように、本明細書に開示される抗体５Ｈ７及び９Ｈ６、並びに６Ｃ８は、それぞれＣＤ４＋ＣＤ２５＋Ｔ細胞に結合し（図５Ａ）、及びＣＤ８＋ＣＤ２５＋Ｔ細胞にも結合する（図５Ｃ）。しかし、６Ｃ８はＣＤ８＋ＣＤ２５－Ｔ細胞に結合できる一方で、５Ｈ７及び９Ｈ６は、仮に結合するとしても非常に低いレベルでしか結合しない（図５Ｄ）。被験の抗体のいずれもが、ＣＤ４＋ＣＤ２５－Ｔ細胞に結合しなかった（図５Ｂ）。従って、５Ｈ７及び９Ｈ６はＴ細胞への結合において類似した選択性を示し、異なるＴ細胞サブセットに対して差示的に結合する。
【０３８９】
図６に図解するように、ＧＩＴＲＬもまたヒトＴ細胞のサブセットに対して差示的な結合を示す。抗体５Ｈ７及び９Ｈ６と同様に、ＧＩＴＲＬもＣＤ４＋ＣＤ２５＋Ｔ細胞及びＣＤ８＋ＣＤ２５＋Ｔ細胞に結合するが、これも５Ｈ７及び９Ｈ６と同様に、ＣＤ４＋ＣＤ２５－Ｔ細胞及びＣＤ８＋ＣＤ２５－Ｔ細胞に対して著しく低い親和性でしか結合しない。従って、５Ｈ７及び９Ｈ６が示す結合の選択性は、天然のリガンドであるＧＩＴＲＬに関して観測される選択性と類似する。
【０３９０】
［実施例１３］
ＧＩＴＲ抗体のヒトＣＤ４細胞中への内部移行
一連の実験を行って、いくつかの親抗体がヒトＣＤ４細胞に内部移行することができるかを判定した。比較のために、ＷＯ０６／１０５０２１に記載の抗体６Ｃ８も試験した。
【０３９１】
ファルコン１００ｍｍ皿（ＢＤ社ファルコン、カタログ番号３５３００３）を、室温で４時間、５ｍｌの１０ｕｇ／ｍｌ マウス抗ヒトＣＤ３抗体ＯＫＴ３（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ社、カタログ番号１６－００３７－８５）で被覆することから実験を開始した。次いで、この皿をＰＢＳで２回洗浄した。ヒトＣＤ４＋Ｔ細胞を、ＣＤ４＋Ｔ細胞単離キット（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ社、カタログ番号１３０－０９６－５３３）を用いてＰＢＭＣより単離した。完全培地（１０％ ＦＢＳ、Ｌ－グルタミン、ＮＥＡＡ、ピルビン酸ナトリウム、β－メルカプトエタノールを加えたＰＲＭＩ１６４０）中の５０００万個の汎Ｔ細胞を、予め被覆した皿に播種し、５％ＣＯ２インキュベータ中、３７℃で４日間インキュベートした。
【０３９２】
第４日に、ＣＤ４＋Ｔ細胞を採取し、９６ウェルのＵ底プレートに、ウェル当たり０．５×10^6細胞を播種した。ＣＤ４＋細胞を、完全培地中、１０ｕｇ／ｍｌの、Ａｌｅｘａ－４８８またはＡｌｅｘａ－６４７と抱合させた抗ヒトＧＩＴＲと共に、４℃で３０分間インキュベートした。次いで、細胞を完全培地で２回洗浄し、５％ＣＯ２インキュベータ中、３７℃で０、１、２、４及び２４時間インキュベートした。インキュベーションの終了時に細胞を採取した。各ウェルの細胞を２のウェルに等分した。一つのウェル中の細胞を１５０ｕｌの酸性緩衝液（１０％ ＦＢＳ、０．５Ｍ ＮａＣｌ、０．２Ｍ 酢酸、ｐＨ２．５）と共に４℃で５分間インキュベートした一方、他のウェル中の細胞を完全培

地と共にインキュベートした。インキュベーションの終了時に、両ウェルを完全培地で３回洗浄し、抗ヒトＣＤ２５　ＡＰＣ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ社、カタログ番号１３０－０９２－８５８）または抗ヒトＣＤ２５　ＰＥ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ社、カタログ番号１３０－０９１－０２４）を用い、染色緩衝液中、４℃で３０分間染色した。次に、これらの細胞を２回洗浄し、ＰＢＳ中、２％のパラホルムアルデヒドで固定化し、ＦＡＣＳ　ｃａｌｉｂｕｒ分析を行った。

【０３９３】

図７の結果は、本明細書に開示の抗体９Ｈ６、５Ｈ７、及び４１Ｇ５は全て、２４時間の期間内にヒトＣＤ４細胞中に内部移行したことを示す。対照的に、抗体６Ｃ８は、有意により低い程度で内部移行した。

【０３９４】

［実施例１４］

グリコシル化抗原結合タンパク質の活性の向上

Ｆｃγ受容体がＣＤ４＋Ｔ細胞上へのＧＩＴＲ信号伝達に必要なクラスタ化を提供するアッセイにおいて、ＧＩＴＲ抗体のグリコシル化状態の重要性を評価した。代表的な天然のＩｇＧ１　ＧＩＴＲ抗体に対して、ＦｃのＦｃγ受容体への結合にとって重要なＮ－結合型グリコシル化部位を除去する、２９７位におけるアスパラギンからグルタミンへのアミノ酸置換を伴う遺伝子操作を行った。天然の変異体及び非グルコシル化変異体を、ヒトＦｃγ－ＲＩＩａまたはＦｃγ－ＲＩＩＩａのいずれかによって付与されるＧＩＴＲ抗体のクラスタ化に伴うＣＤ４＋Ｔ細胞の活性化を媒介する、それらの能力について試験した。簡単に述べると、２９３Ｔ細胞を、ヒトＦｃγ－ＲＩＩａまたはＦｃγ－ＲＩＩＩａのいずれかを発現するように遺伝子操作した。Ｆｃγ－Ｒ発現２９３Ｔ細胞をパラホルムアルデヒドで固定化し、９６ウェルプレートに、１：１の比でヒト末梢血ＣＤ４＋Ｔ細胞と共に播種した。抗ヒトＣＤ３を被覆したビーズを培養物に添加して、ＴＣＲ刺激を与えた。天然のＩｇＧ１変異体及び非グリコシル化ＩｇＧ１変異体抗ヒトＧＩＴＲ抗体またはヒトＩｇＧ１アイソタイプコントロール抗体の力価測定試料（ｔｉｔｒａｔｉｏｎ）をウェルに添加し、培養物を３７Ｃで合計９６時間インキュベートした。細胞を、培養の最後の１８時間の間に1uＣｉ／ウェルの３Ｈでパルスし、抗ヒトＧＩＴＲ抗体依存性の細胞増殖を評価した。図１２Ａ及び１２Ｂに示すように、ＦｃγＲＩＩａ及びＦｃγＲＩＩＩａは、天然ＩｇＧ１　ＧＩＴＲ抗体をクラスタ化し、エフェクタＴ細胞の増殖を活発化させることができた。対照的に、非グリコシル化抗体は、ＦｃγＲに結合し、ＦｃγＲによってクラスタ化される能力がないことに起因して、いずれの活性も示さなかった。イン・ビボでは、Ｆｃγ受容体が抗ヒトＧＩＴＲ抗体媒介性のＴ細胞の活性化に必要なクラスタ化活性を付与し、そのために、ＧＩＴＲ抗体のグリコシル化部位は重要な因子である。

【０３９５】

［実施例１５］

薬動態学的及び薬力学的分析

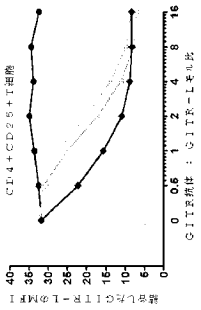
抗体９Ｈ６及び５Ｈ７の単回投与薬動態学的並びに薬力学的（ＰＫ／ＰＤ）キャラクタリゼーションを、ナイーブのオスのカニクイザルにおいて、両候補をボーラス静脈内投与によって１．０及び１０ｍｇ／ｋｇで試験することで評価した。抗体９Ｈ６は、１及び１０ｍｇ／ｋｇの用量において、それぞれ１８１時間（７．５５日）及び１６６時間（６．９２日）の平均半減期を示した。抗体５Ｈ７は、１及び１０ｍｇ／ｋｇの用量において、それぞれ１３０１時間（１２．６日）及び２２２時間（９．２３日）の平均半減期を示した。両候補共に、濃度対時間曲線の曲線下面積（ＡＵＣ）より測定された、用量比例の曝露量を有する線形のＰＫを示した。

【０３９６】

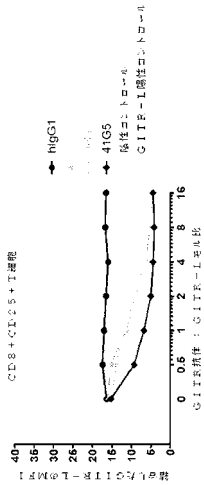
特定された全ての特許及び他の刊行物は、例えば、本記載事項との関係において用いられる可能性がある、かかる刊行物に記載された方法論を記載する及び開示することを目的として、参照により明示的に本明細書に組み込まれる。これらの刊行物は、単に、本願の出願日に先行するそれらの開示を提示するに過ぎない。この点に関する如何なる事項も、

先行発明との理由または他の如何なる理由によっても、本発明者がかかる開示に先行する資格を有さないことを承認するものと理解されるべきではない。これらの書面の日付または内容についての表記に関する全ての記述は、本出願人が利用可能な情報に基づくものであって、これらの書面の日付または内容の正しさに関する如何なる承認をも構成するものではない。

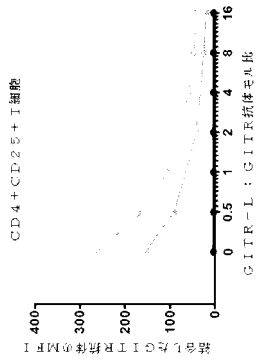
【図１Ａ】



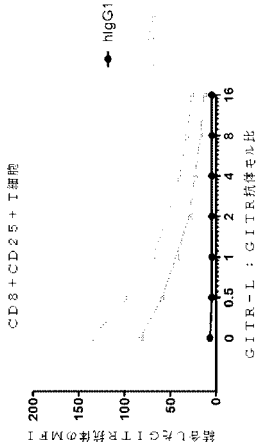
【図１Ｂ】



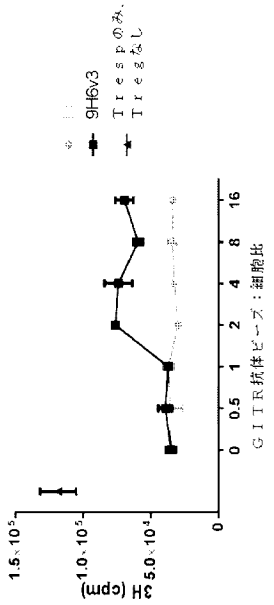
【図１Ｃ】



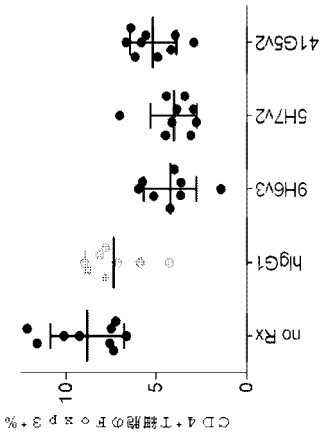
【図１Ｄ】



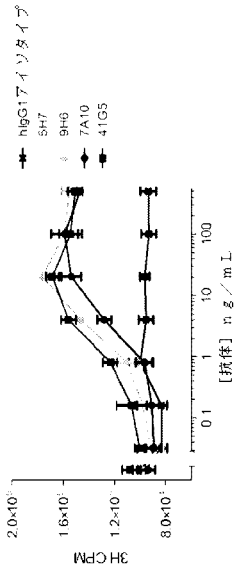
【図２】


9H6v3
Tresp
Treg
3H (cpm)
GITR抗体ビーズ：細胞比

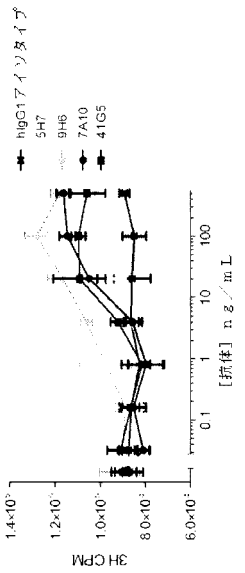
【図３】


no Rx
hIgG1
9H6v3
5H7v2
41G5v2
CD4+T細胞のFoxp3+%

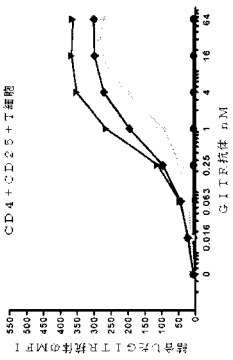
【図４Ａ】


hIgG1アイソタイプ
5H7
9H6
7A10
41G5
3H CPM
[抗体] ng/mL

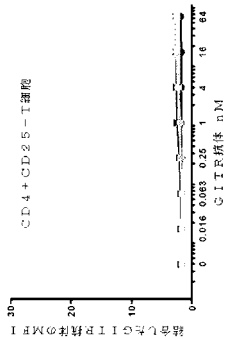
【図４Ｂ】


hIgG1アイソタイプ
5H7
9H6
7A10
41G5
3H CPM
[抗体] ng/mL

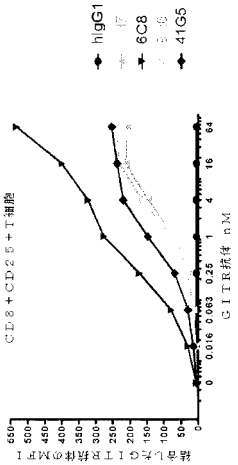
【図５Ａ】



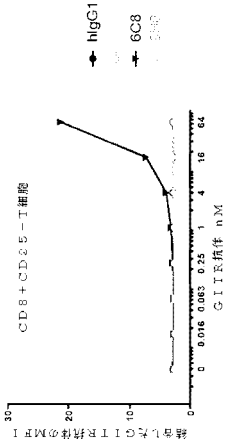
【図５Ｂ】



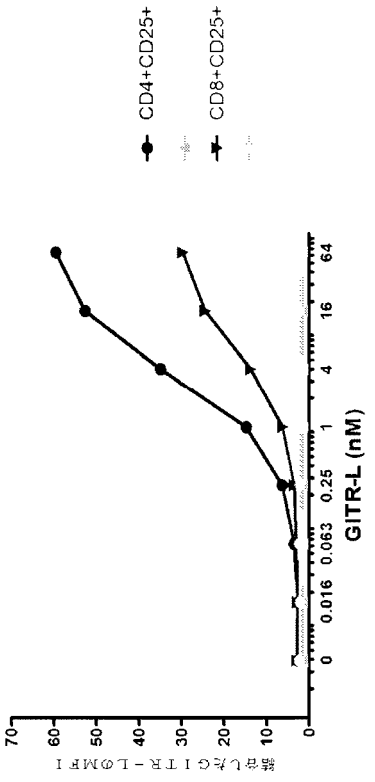
【図５Ｃ】



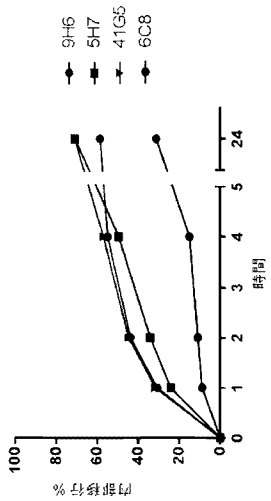
【図５Ｄ】



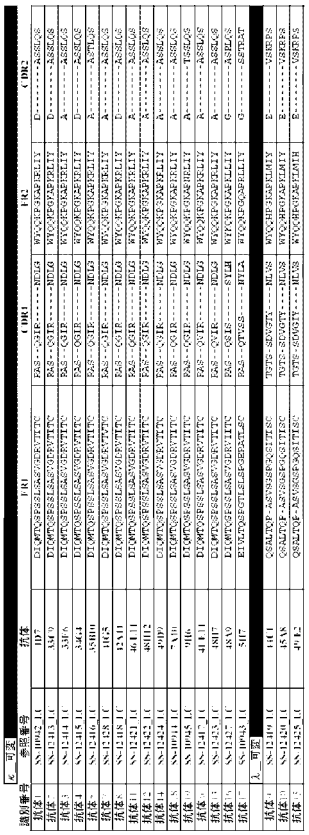
【図６】



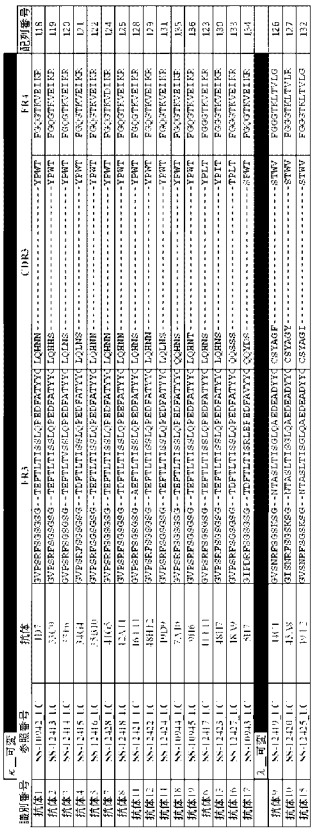
【図７】



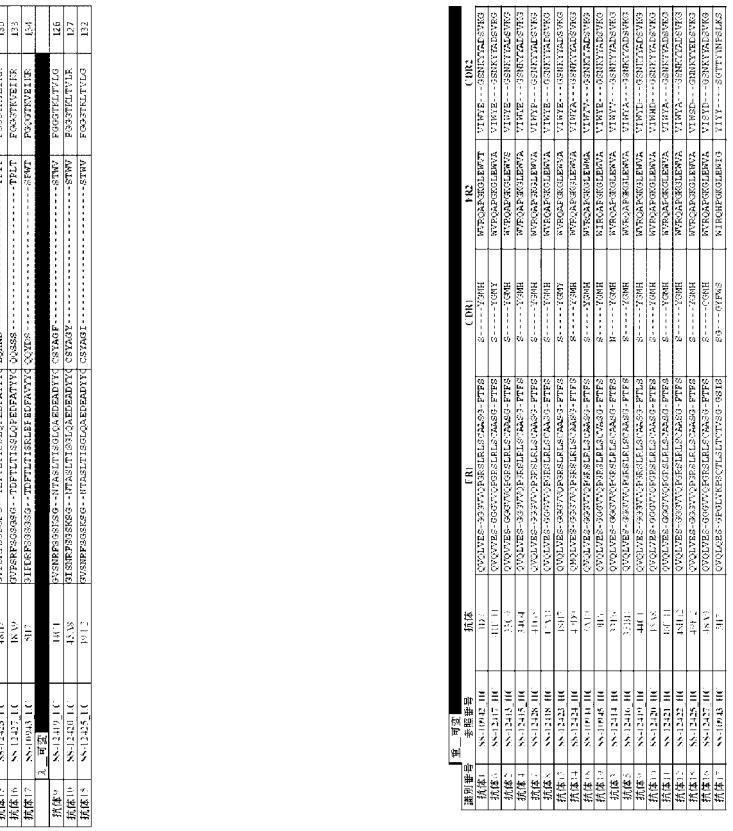
【図８Ａ】



【図８Ｂ】



【図９Ａ】



【図９Ｂ】

識別番号	参照番号	抗体	FR3	CDR3	FR4	配列番号
抗体1	SS-10942_HC	1D7	RPTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	GGQLGK----------YYYYGMDV	WGQGTTVTVSS	137
抗体2	SS-12417_HC	4H11	RPTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTALYYCAR	GGCLGK----------DYYSGMDV	WGQGTTVTVSS	142
抗体3	SS-12413_HC	3C9	RPTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	GGLLGY----------YYYYGMDV	WGQGTTVTVSS	138
抗体4	SS-12415_HC	4G1	RPTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	GGCLGY----------YYYYGMDV	WGQGTTVTVSS	140
抗体5	SS-12428_HC	4G5	RPTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	GGELGP----------YYYYGMDV	WGQGTTVTVSS	143
抗体6	SS-12418_HC	12A11	RPTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	GGCLGY----------YYYSGMDV	WGQGTTVTVSS	144
抗体13	SS-12423_HC	4H7	RPTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	GGELSR----------DYYSGMDV	WGQGTTVTVSS	149
抗体14	SS-12424_HC	10B9	RPTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	GGELGF----------YYYYGMDV	WGQGTTVTVSS	150
抗体18	SS-10944_HC	5A10	RPTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	GGELGR----------DYYSGMDV	WGQGTTVTVSS	154
抗体19	SS-10945_HC	9B6	RPTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	GGELGK----------DYYSGMDV	WGQGTTVTVSS	155
抗体4	SS-12414_HC	2B3A	RPTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	GGELRL----------YYYYGMDV	WGQGTTVTVSS	139
抗体5	SS-12416_HC	3A10	RPTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	GGELSP----------YYYYGMDV	WGQGTTVTVSS	141
抗体9	SS-12419_HC	11C1	RPTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	RGTVT----------TPDFDY	WGQGTLVTVSS	145
抗体10	SS-12420_HC	1538	RPTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	EYG----------GHFDY	WGQGTLVTVSS	146
抗体11	SS-12421_HC	4d4_11	RPTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	GDILTGY----------SLYYGMDV	WGQSTTVTVSS	147
抗体12	SS-12422_HC	8B12	RPTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	GGCLAL----------YYYYGMDV	WGQGTTVTVSS	148
抗体15	SS-12425_HC	4d4_2	RPTISRDSSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCAR	DYA----------TPFDV	WGQVTLVTVSS	151
抗体16	SS-12427_HC	18A9	RPTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	DLRYNW----------NDGGVDY	WGQGTLVTVSS	152
抗体17	SS-10943_HC	5H7	RVTISIDTSKNHFSLKLSSVTAADTAVYYCAR	DLPYVDS----------SGFRGFDP	WGQGTLVTVSS	153

【図１０Ｂ】

遺伝子操作可変領域タンパク質アラインメント

	κ_可変						
識別番号	参照番号	抗体	FR3	CDR3	FR4	配列番号	
抗体22	SS-12562_LC	4H6A1	GVPSRFSGSGSGG--TEFTLTISSLQPEDFATYYC	LQLNS----------YPWT	FGQGTKVEIKR	238
抗体29	SS-13810_LC	7A10A1	GVPSRFSGSGSGG--TEFTLTISSLQPEDFATYYC	QQHNS----------YPWT	FGQGTKVEIKR	245
抗体30	SS-16938_LC	7A10A2	GVPSRFSGSGSGG--TEFTLTISSLQPEDFATYYC	QQHNS----------YPWT	FGQGTKVEIKR	246
抗体31	SS-16939_LC	7A10A3	GVPSRFSGSGSGG--TEFTLTISSLQPEDFATYYC	QQHNS----------YPWT	FGQGTKVEIKR	247
抗体47	SS-16940_LC	7A10A4	GVPSRFSGSGSGG--TEFTLTISSLQPEDFATYYC	QQHNS----------YPWT	FGQGTVVEIER	258
抗体48	SS-16941_LC	7A10A5	GVPSRFSGSGSGG--TEFTLTISSLQPEDFATYYC	QQHNS----------YPWT	FGQGTVVEIER	259
抗体11	SS-16943_LC	9H6A1	GVPSRFSGSGSGG--TEFTLTISSLQPEDFATYYC	LQHNT----------YPWT	FGQGTKVEIER	261
抗体45	SS-16944_LC	9H6A2	GVPSRFSGSGSGG--TEFTLTISSLQPEDFATYYC	LQHNT----------YPWT	FGQGTKVEIKR	261
抗体46	SS-13806_LC	9H6A3	GVPSRFSGSGSGG--TEFTLTISSLQPEDFATYYC	LQHNT----------YPWT	FGQGTKVEIKR	262
抗体17	SS-16945_LC	9H6A4	GVPSRFSGSGSGG--TEFTLTISSLQPEDFATYYC	LQHNT----------YPWT	FGQGTKVEIKR	263
抗体48	SS-16946_LC	9H6A5	GVPSRFSGSGSGG--TEFTLTISSLQPEDFATYYC	LQHNT----------YPWT	FGQGTKVEIKR	264
抗体49	SS-16947_LC	9H6A6	GVPSRFSGSGSGG--TEFTLTISSLQPEDFATYYC	LQHNT----------YPWT	FGQGTEVEIKR	265
抗体50	SS-16948_LC	33C9A1	GVPSRFSGSGSGG--TEFTLTISSLQPEDFATYYC	LQHHS----------YPWT	FGQGTEVEIKR	266
抗体51	SS-13808_LC	33C9A2	GVPSRFSGSGSGG--TEFTLTISSLQPEDFATYYC	LQHHS----------YPWT	FGQGTEVEIKR	267
抗体52	SS-16949_LC	33C9A3	GVPSRFSGSGSGG--TEFTLTISSLQPEDFATYYC	LQHHS----------YPWT	FGQGTEVEIKR	268
抗体53	SS-16950_LC	33C9A4	GVPSRFSGSGSGG--TEFTLTISSLQPEDFATYYC	LQHHS----------YPWT	FGQGTEVEIKR	269
抗体54	SS-16951_LC	33C9A5	GVPSRFSGSGSGG--TEFTLTISSLQPEDFATYYC	LQHHS----------YPWT	FGQGTEVEIKR	270
抗体55	SS-16952_LC	41G5A1	GVPSRFSGSGSGG--TEFTLTISSLQPEDFATYYC	LQHNN----------YPWT	FGQGTKVDIKR	271
抗体56	SS-13809_LC	41G5A2	GVPSRFSGSGSGG--TEFTLTISSLQPEDFATYYC	LQHNN----------YPWT	FGQGTVDIKR	272
抗体57	SS-16953_LC	41G5A3	GVPSRFSGSGSGG--TEFTLTISSLQPEDFATYYC	LQHNN----------YPWT	FGQGTVDIEK	273
抗体58	SS-16954_LC	41G5A4	GVPSRFSGSGSGG--TEFTLTISSLQPEDFATYYC	LQHNN----------YPWT	FGQGTVDIEK	274
抗体59	SS-16955_LC	41G5A5	GVPSRFSGSGSGG--TEFTLTISSLQPEDFATYYC	LQHNN----------YPWT	FGQGTEVDIEK	275
抗体24	SS-12513_LC	4B3A1	GVPSRFSGSGSGG--TEFTLTISSLQPEDFATYYC	QQSSS----------TPLT	FGGGTKVEIKR	240
抗体25	SS-16912_LC	5H7A1	GIPDRFSGSGSGG--TDFTLTISRLEPEDFAVYYC	QQYDS----------SPWT	FGQGTHVEIKR	241
抗体26	SS-13807_LC	5H7A2	GIPDRFSGSGSGG--TDFTLTISRLEPEDFAVYYC	QQYDS----------SPWT	FGQGTKVEIKR	242
抗体27	SS-16913_LC	5H7A3	GIPDRFSGSGSGG--TDFTLTISRLEPEDFAVYYC	QQYDS----------SPWT	FGQGTKVEIKR	243
抗体28	SS-16915_LC	5H7A5	GIPDRFSGSGSGG--TDFTLTISRLEPEDFAVYYC	QQYDS----------SPWT	FGQGTEVEIKR	244
抗体29	SS-16917_LC	5H7A7	GIPDRFSGSGSGG--TDFTLTISRLEPEDFAVYYC	QQYDS----------SPWT	FGQGTEVEIKR	245
抗体30	SS-16921_LC	5H7A9	GIPDRFSGSGSGG--TDFTLTISRLEPEDFAVYYC	QQYDS----------SPWT	FGQGTEVEIKR	246
抗体31	SS-16919_LC	5H7A10	GIPDRFSGSGSGG--TDFTLTISRLEPEDFAVYYC	QQYES----------SPWT	FGQGTEVEIKR	247
抗体32	SS-16920_LC	5H7A11	GIPDRFSGSGSGG--TDFTLTISRLEPEDFAVYYC	QQYDT----------SPWT	FGQGTEVEIKR	248
抗体33	SS-16923_LC	5H7A13	GIPDRFSGSGSGG--TDFTLTISRLEPEDFAVYYC	QQYES----------SPWT	FGQGTEVEIKR	249
抗体34	SS-16924_LC	5H7A14	GIPDRFSGSGSGG--TDFTLTISRLEPEDFAVYYC	QQYRS----------SPWT	FGQGTEVEIKR	250
抗体35	SS-16927_LC	5H7A17	GIPDRFSGSGSGG--TDFTLTISRLEPEDFAVYYC	QQYDT----------SPWT	FGQGTEVEIKR	251
抗体36	SS-16928_LC	5H7A18	GIPDRFSGSGSGG--TDFTLTISRLEPEDFAVYYC	QQYTT----------SPWT	FGQGTEVEIKR	252
抗体37	SS-16929_LC	5H7A19	GIPDRFSGSGSGG--TDFTLTISRLEPEDFAVYYC	QQYDT----------SPWT	FGQGTEVEIKR	253
抗体38	SS-16932_LC	5H7A22	GIPDRFSGSGSGG--TDFTLTISRLEPEDFAVYYC	QQYES----------SPWT	FGQGTKVEIKR	254
	λ_可変						
抗体20	SS-12514_LC	1H1A1	GVSNRFSGSKSG--NTASLTISGLQAEDEADYYC	ASYAGF----------STWV	FGGGTKLTVLG	236
抗体21	SS-12515_LC	1538A1	GISNRFSGSKSG--NTASLTISGLQAEDEADYYC	ASYAGY----------STWV	FGGGTKLTVLE	237
抗体23	SS-12516_LC	4F6_2A1	GVSNRFSGSKSG--NTASLTISGLQAEDEADYYC	ASYAGI----------STWV	FGGGTKLTVLG	239

【図１１Ａ】

遺伝子操作可変領域タンパク質アラインメント

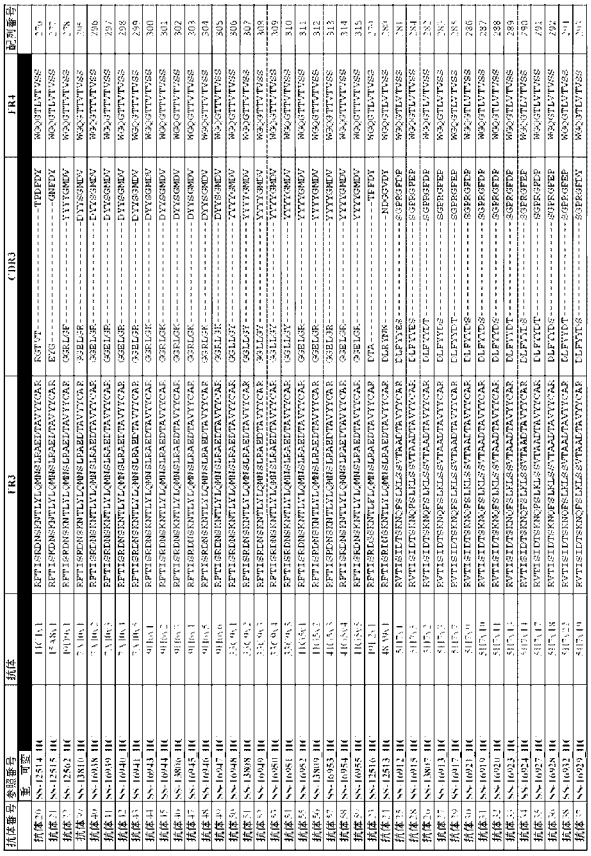
	重_可変						
識別番号	参照番号	抗体	FR1	CDR1	FR2	CDR2	
抗体20	SS-12514_HC	1H1A1	QVQLVES--GGGVVQPGRSLRLSCAASG-FTLS	S-----YGMH	WVRQAPGKGLEWVA	VIWYD---GSNKYYADSVKG	
抗体21	SS-12515_HC	1538A1	QVQLVES--GGRVVQPGGSLRLSCAASG-FTFS	S-----YGMH	WVRQAPGKGLEWVA	VIWHD---GSNKYYADSVKG	
抗体23	SS-12562_HC	4H6A1	QMQLVES--GGRVVQPGGSLRLSCAASG-FTFS	S-----YGMH	WVRQAPGKGLEWVA	VIWYA---GSNKYYADSVKG	
抗体29	SS-13810_HC	7A10A1	QVQLVES--GGVVQPGRSLRLSCAASG-FTFS	S-----YGMH	WVRQAPGKGLEWMA	VIWYV---GSNKYYADSVKG	
抗体30	SS-16938_HC	7A10A2	QVQLVES--GGVVQPGRSLRLSCAASG-FTFS	S-----YGMH	WVRQAPGKGLEWMA	VIWYV---GSNKYYADSVKG	
抗体31	SS-16939_HC	7A10A3	QVQLVES--GGVVQPGRSLRLSCAASG-FTFS	S-----YGMH	WVRQAPGKGLEWMA	VIWYV---GSNKYYADSVKG	
抗体32	SS-16940_HC	7A10A4	QVQLVES--GGVVQPGRSLRLSCAASG-FTFS	S-----YGMH	WVRQAPGKGLEWMA	VIWYV---GSNKYYADSVKG	
抗体43	SS-16941_HC	7A10A5	QVQLVES--GGVVQPGRSLRLSCAASG-FTFS	S-----YGMH	WVRQAPGKGLEWMA	VIWYV---GSNKYYADSVKG	
抗体44	SS-16943_HC	9H6A1	QVQLVES--GGFVQPGRSLRLSCVASG-FTFS	S-----YGMH	WIRQAPGKGLEWVA	VIWYE---GSNKYYADSVKG	
抗体45	SS-16944_HC	9H6A2	QVQLVES--GGFVQPGRSLRLSCVASG-FTFS	S-----YGMH	WIRQAPGKGLEWVA	VIWYE---GSNKYYADSVKG	
抗体46	SS-13806_HC	9H6A3	QVQLVES--GGFVQPGRSLRLSCVASG-FTFS	S-----YGMH	WIRQAPGKGLEWVA	VIWYE---GSNKYYADSVKG	
抗体47	SS-16945_HC	9H6A4	QVQLVES--GGFVQPGRSLRLSCVASG-FTFS	S-----YGMH	WIRQAPGKGLEWVA	VIWYE---GSNKYYADTVKG	
抗体48	SS-16946_HC	9H6A5	QVQLVES--GGFVQPGRSLRLSCVASG-FTFS	S-----YGMH	WIRQAPGKGLEWVA	VIWYE---GSNKYYADSVKG	
抗体49	SS-16947_HC	9H6A6	QVQLVES--GGFVQPGRSLRLSCVASG-FTFS	S-----YGMH	WIRQAPGKGLEWVA	VIWYE---GSNKYYADTVKG	
抗体50	SS-16948_HC	33C9A1	QVQVVES--GGVVQPGRSLRLSCAASG-FTFS	S-----YGMH	WVRQAPGKGLEWVS	VIWYE---GSNKYYADSVKG	
抗体51	SS-13808_HC	33C9A2	QVQVVES--GGVVQPGRSLRLSCAASG-FTFS	S-----YGMH	WVRQAPGKGLEWVS	VIWYE---GSNKYYADTVKG	
抗体52	SS-16949_HC	33C9A3	QVQVVES--GGVVQPGRSLRLSCAASG-FTFS	S-----YGMH	WVRQAPGKGLEWVS	VIWYE---GSNKYYADTVKG	
抗体53	SS-16950_HC	33C9A4	QVQVVES--GGVVQPGRSLRLSCAASG-FTFS	S-----YGMH	WVRQAPGKGLEWVS	VIWYE---GSNKYYADTVKG	
抗体54	SS-16951_HC	33C9A5	QVQVVES--GGVVQPGRSLRLSCAASG-FTFS	S-----YGMH	WVRQAPGKGLEWVS	VIWYE---GSNKYYADTVKG	
抗体55	SS-16952_HC	41G5A1	QVQLVES--GGFVQPGRSLRLSCAASG-FTFS	S-----YGMH	WVRQAPGKGLEWVA	VIWYP---GSNKYYADSVKG	
抗体56	SS-13809_HC	41G5A2	QVQLVES--GGFVQPGRSLRLSCAASG-FTFS	S-----YGMH	WVRQAPGKGLEWVA	VIWYP---GSNKYYADTVKG	
抗体57	SS-16953_HC	41G5A3	QVQLVES--GGFVQPGRSLRLSCAASG-FTFS	S-----YGMH	WVRQAPGKGLEWVA	VIWYP---GSNKYYADTVKG	
抗体58	SS-16954_HC	41G5A4	QVQLVES--GGFVQPGRSLRLSCAASG-FTFS	S-----YGMH	WVRQAPGKGLEWVA	VIWYP---GSNKYYADSVKG	
抗体59	SS-16955_HC	41G5A5	QVQLVES--GGFVQPGRSLRLSCAASG-FTFS	S-----YGMH	WVRQAPGKGLEWVA	VIWYP---GSNKYYADTVKG	
抗体23	SS-12516_HC	4H7A1	QVQLVES--GGFVQPGRSLRLSCAASG-FTFS	S-----YGMH	WVRQAPGKGLEWVA	VIWSD---GNNKYYEDSVKG	
抗体24	SS-12513_HC	4B3A1	QVQLVES--GGFVQPGRSLRLSCAASG-FTFS	S-----YGMH	WVRQAPGKGLEWVA	VISYD---GSNKYYADSVKG	
抗体25	SS-16912_HC	5H7A1	QVQLQES-GPGLVKPSETLSLTCTVSG-GSIS	SG---GYFWS	WIRQPPGKGLEWIG	YIYY----SGTTYYNPSLKS	
抗体26	SS-16915_HC	5H7A5	QVQLQES-GPGLVKPSETLSLTCTVSG-GSIS	SG---GYFWS	WIRQPPGKGLEWIG	YIYY----SGTTYYNPSLKS	
抗体26	SS-13807_HC	5H7A2	QVQLQES-GPGLVKPSETLSLTCTVSG-GSIS	SG---GYFWS	WIRQPPGKGLEWIG	YIYY----SGTTYYNPSLKS	
抗体27	SS-16913_HC	5H7A3	QVQLQES-GPGLVKPSETLSLTCTVSG-GSIS	SG---GYFWS	WIRQPPGKGLEWIG	YIYY----SGTTYYNPSLKS	
抗体29	SS-16917_HC	5H7A7	QVQLQES-GPGLVKPSETLSLTCTVSG-GSIS	SG---GYFWS	WIRQPPGKGLEWIG	YIYY----SGTTYYNPSLKS	
抗体30	SS-16921_HC	5H7A9	QVQLQES-GPGLVKPSETLSLTCTVSG-GSIS	SG---GYFWS	WIRQPPGKGLEWIG	YIYY----SGTTYYNPSLKS	
抗体31	SS-16919_HC	5H7A10	QVQLQES-GPGLVKPSETLSLTCTVSG-GSIS	SG---GYFWS	WIRQPPGKGLEWIG	YIYY----SGTTYYNPSLKS	
抗体32	SS-16920_HC	5H7A11	QVQLQES-GPGLVKPSETLSLTCTVSG-GSIS	SG---GYFWS	WIRQPPGKGLEWIG	YIYY----SGTTYYNPSLKS	
抗体33	SS-16923_HC	5H7A13	QVQLQES-GPGLVKPSETLSLTCTVSG-GSIS	SG---GYFWS	WIRQPPGKGLEWIG	YIYY----SGTTYYNPSLKS	
抗体34	SS-16924_HC	5H7A14	QVQLQES-GPGLVKPSETLSLTCTVSG-GSIS	SG---GYFWS	WIRQPPGKGLEWIG	YIYY----SGTTYYNPSLKS	
抗体35	SS-16927_HC	5H7A17	QVQLQES-GPGLVKPSETLSLTCTVSG-GSIS	SG---GYFWS	WIRQPPGKGLEWIG	YIYY----SGTTYYNPSLKS	
抗体36	SS-16928_HC	5H7A18	QVQLQES-GPGLVKPSETLSLTCTVSG-GSIS	SG---GYFWS	WIRQPPGKGLEWIG	YIYY----SGTTYYNPSLKS	
抗体38	SS-16932_HC	5H7A22	QVQLQES-GPGLVKPSETLSLTCTVSG-GSIS	SG---GYFWS	WIRQPPGKGLEWIG	YIYY----SGTTYYNPSLKS	
抗体37	SS-16929_HC	5H7A19	QVQLQES-GPGLVKPSETLSLTCTVSG-GSIS	SG---GYFWS	WIRQPPGKGLEWIG	YIYY----SGTTYYNPSLKS	

【図１０Ａ】

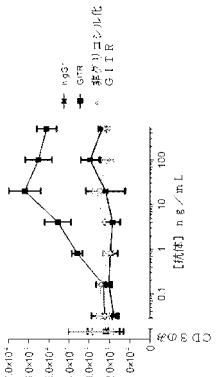
遺伝子操作可変領域タンパク質アラインメント

	κ_可変						
識別番号	参照番号	抗体	FR1	CDR1	FR2	CDR2	
抗体22	SS-12562_LC	4H6A1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RAS--QGIR------NDLG	WYQQKPGKAPKRLIY	A--------ASSLQS	
抗体29	SS-13810_LC	7A10A1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RAS--QGIR------NDLG	WYQQKPGKAPKRLIY	A--------ASSLQS	
抗体30	SS-16938_LC	7A10A2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RAS--QGIR------NDLG	WYQQKPGKAPKRLIY	A--------ASSLQS	
抗体31	SS-16939_LC	7A10A3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RAS--QGIR------NDLG	WYQQKPGKAPKRLIY	A--------ASSLQS	
抗体42	SS-16940_LC	7A10A4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RAS--QGIR------NDLG	WYQQKPGKAPKRLIY	A--------ASSLQS	
抗体13	SS-16941_LC	7A10A5	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RAS--QGIR------NDLG	WYQQKPGKAPKRLIY	A--------ASSLQS	
抗体41	SS-16943_LC	9H6A1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RAS--QGIR------NDLG	WYQQKPGKAPKLLIY	A--------TSSLQS	
抗体42	SS-16944_LC	9H6A2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RAS--QGIR------NDLG	WYQQKPGKAPKLLIY	A--------TSSLQS	
抗体43	SS-13806_LC	9H6A3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RAS--QGIR------NDLG	WYQQKPGKAPKLLIY	A--------TSSLQS	
抗体44	SS-16945_LC	9H6A4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RAS--QGIR------NDLG	WYQQKPGKAPKLLIY	A--------TSSLQS	
抗体45	SS-16946_LC	9H6A5	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RAS--QGIR------NDLG	WYQQKPGKAPKLLIY	A--------TSSLQS	
抗体10	SS-16947_LC	9H6A6	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RAS--QGIR------NDLG	WYQQKPGKAPKLLIY	A--------TSSLQS	
抗体40	SS-16918_LC	33C9A1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RAS--QGIR------NDLG	WYQQKPGKAPKLLIY	D--------ASSLQS	
抗体47	SS-13808_LC	33C9A2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RAS--QGIR------NDLG	WYQQKPGKAPKLLIY	D--------ASSLQS	
抗体48	SS-16919_LC	33C9A3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RAS--QGIR------NDLG	WYQQKPGKAPKLLIY	D--------ASSLQS	
抗体49	SS-16950_LC	33C9A4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RAS--QGIR------NDLG	WYQQKPGKAPKLLIY	D--------ASSLQS	
抗体50	SS-16951_LC	33C9A5	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RAS--QGIR------NDLG	WYQQKPGKAPKLLIY	D--------ASSLQS	
抗体55	SS-16952_LC	41G5A1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTVTC	RAS--QGIR------NDLG	WYQQKPGKAPKLLIY	A--------ASSLQS	
抗体56	SS-13809_LC	41G5A2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTVTC	RAS--QGIR------NDLG	WYQQKPGKAPKLLIY	A--------ASSLQS	
抗体57	SS-16953_LC	41G5A3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTVTC	RAS--QGIR------NDLG	WYQQKPGKAPKLLIY	A--------ASSLQS	
抗体58	SS-16954_LC	41G5A4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTVTC	RAS--QGIR------NDLG	WYQQKPGKAPKLLIY	A--------ASSLQS	
抗体59	SS-16955_LC	41G5A5	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTVTC	RAS--QGIR------NDLG	WYQQKPGKAPKLLIY	A--------ASSLQS	
抗体24	SS-12513_LC	4B3A1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	RAS--QSIS------SYLH	WYKQKPGKAPKLLIY	G--------ASSLQS	
抗体25	SS-16912_LC	5H7A1	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC	RAS--QTVSS-----NYLA	WYQQKPGQAPRLLIY	G--------SSTRAT	
抗体26	SS-13807_LC	5H7A2	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC	RAS--QTVSS-----NYLA	WYQQKPGQAPRLLIY	G--------SSTRAT	
抗体27	SS-16913_LC	5H7A3	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC	RAS--QTVS------NYLA	WYQQKPGQAPRLLIY	G--------SSTRAT	
抗体28	SS-16915_LC	5H7A5	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC	RAS--QTVSS-----NYLA	WYQQKPGQAPRLLIY	G--------SSTRAT	
抗体29	SS-16917_LC	5H7A7	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC	RAS--QTVSS-----NYLA	WYQQKPGQAPRLLIY	G--------SSTRAT	
抗体30	SS-16921_LC	5H7A9	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC	RAS--QTVSS-----NYLA	WYQQKPGQAPRLLIY	G--------SSTRAT	
抗体31	SS-16919_LC	5H7A10	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC	RAS--QTVSS-----NYLA	WYQQKPGQAPRLLIY	G--------SSTRAT	
抗体32	SS-16920_LC	5H7A11	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC	RAS--QTVSS-----NYLA	WYQQKPGQAPRLLIY	G--------SSTRAT	
抗体33	SS-16923_LC	5H7A13	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC	RAS--QTVSS-----NYLA	WYQQKPGQAPRLLIY	G--------SSTRAT	
抗体34	SS-16924_LC	5H7A14	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC	RAS--QTVSS-----NYLA	WYQQKPGQAPRLLIY	G--------SSTRAT	
抗体35	SS-16927_LC	5H7A17	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC	RAS--QTVSS-----NYLA	WYQQKPGQAPRLLIY	G--------SSTRAT	
抗体36	SS-16928_LC	5H7A18	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC	RAS--QTVSS-----NYLA	WYQQKPGQAPRLLIY	G--------SSTRAT	
抗体37	SS-16929_LC	5H7A19	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC	RAS--QTVSS-----NYLA	WYQQKPGQAPRLLIY	G--------SSTRAT	
抗体38	SS-16932_LC	5H7A22	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC	RAS--QTVSS-----NYLA	WYQQKPGQAPRLLIY	G--------SSTRAT	
	λ_可変						
抗体20	SS-12514_LC	1H1A1	QSALTQPASVSGSPGQSITISC	TGTS-SDVGTY----NLVS	WYQQHPGKAPKLMIY	E--------VSKRPS	
抗体21	SS-12515_LC	1538A1	QSALTQPASVSGSPGQSITISC	TGTS-SDVGTY----NLVS	WYQQHPGKAPKLMIY	E--------VSKRPS	
抗体23	SS-12516_LC	4F6_2A1	QSALTQPASVSGSPGQSITISC	TGTS-SDVGIY----NLVS	WYQQHPGKAPKLMIH	E--------VSKRPS	

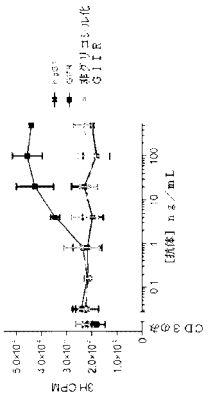
【図１１Ｂ】



【図１２Ａ】



【図１２Ｂ】



【配列表】

2016530278000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2014/053246

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - A61K 39/395 (2015.01)
CPC - C07K 16/2878 (2015.01)
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)
IPC(8) - A61K 39/00, 39/395; C12P 21/08 (2015.01)
USPC - 424/133.1; 530/387.9; 536/23.53

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
CPC - A61K 39/00, 39/395, 39/39533, 2039/505; C07K 14/705, 14/70578, 16/00, 16/18, 16/28, 16/2878, 2317/30, 2317/50, 2317/64 (2015.01) (keyword delimited)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PatBase, Google Patents, PubMed

Search terms used:antibody antigen binding protein GITR TNFRSF18 AITR

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2013/0183321 A1 (GITR, INC) 18 July 2013 (18.07.2013) entire document	1-3
A	US 2013/0108641 A1 (BAURIN et al) 02 May 2013 (02.05.2013) entire document	1-3
A	US 2010/0255538 A1 (COHEN et al) 07 October 2010 (07.10.2010) entire document	1-3
A	US 2010/0183631 A1 (ROTHE et al) 22 July 2010 (22.07.2010) entire document	1-3
A	WO 2002/053596 A2 (PFIZER INC et al) 11 July 2002 (11.07.2002) entire document	1-3

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐

* 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
28 January 2015	19 FEB 2015
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2014/053246

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

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

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

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

3. ☒ Claims Nos.: 4-44
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

See Extra Sheet(s).

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

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

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

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-3 restricted an antigen binding protein Ab1 of Table 1 and SEQ ID NOs: 5, 11, 18, 31, 36, 46, 118, and 137.

Remark on Protest

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

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

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2014/053246

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

Group I+: claims 1-3 are drawn to an antigen binding protein.

The first invention of Group I+ is restricted an antigen binding protein, wherein the antigen binding protein is selected to be Ab1 of Table 1, wherein Ab1 comprises a heavy chain variable region wherein in the heavy chain variable region is selected to be SEQ ID NO:137, the heavy chain further comprising heavy chain complementary determining regions CDR1, CDR2, and CDR3, where CDR1 is selected to be SEQ ID NO:31, CDR2 is selected to be SEQ ID NO:36, and CDR3 is selected to be SEQ ID NO:46; and a light chain variable region, wherein the light chain variable region is selected to be SEQ ID NO:118, the light chain further comprising light chain complementary determining regions CDR1, CDR2, and CDR3, where CDR1 is selected to be SEQ ID NO:5, CDR2 is selected to be SEQ ID NO:11, and CDR3 is selected to be SEQ ID NO:18. It is believed that claims 1-3 read on this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they read on SEQ ID NOs: 5, 11, 18, 31, 36, 46, 118, and 137.

Applicant is invited to elect additional antigen binding proteins with specified SEQ ID NO for each heavy and light chain CDR1, 2, and 3 to be searched in a specific combination by paying additional fee for each set of election. An exemplary election would be antigen binding protein, wherein the antigen binding protein is selected to be Ab2 of Table 1, wherein Ab2 comprises a heavy chain variable region wherein in the heavy chain variable region is selected to be SEQ ID NO:138, the heavy chain variable region further comprising heavy chain complementary determining regions CDR1, CDR2, and CDR3, where CDR1 is selected to be SEQ ID NO:31, CDR2 is selected to be SEQ ID NO:36, and CDR3 is selected to be SEQ ID NO:47; and a light chain, wherein the light chain variable region is selected to be SEQ ID NO:317, the light chain variable region further comprising light chain complementary determining regions CDR1, CDR2, and CDR3, where CDR1 is selected to be SEQ ID NO:5, CDR2 is selected to be SEQ ID NO:11, and CDR3 is selected to be SEQ ID NO:19. Additional antigen binding proteins will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that read on any additional elected inventions. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which read on the first named invention if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined.

The inventions listed in Groups I+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1, because under PCT Rule 13.2 they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The Groups I+ antibodies do not share a significant structural element responsible for binding an antigen, requiring the selection of alternatives for the light and heavy chain variable regions of the antibody, where "a CDRH3 and a CDRL3 of a heavy chain variable domain (VH) and a light chain variable domain (VL), respectively, wherein the VH and VL are part of the same antigen binding protein that is selected from any one of antigen binding proteins Ab1 to Ab59 inclusive as indicated in Table 1; a variant VH comprising a CDRH1, a CDRH2 and a CDRH3, wherein one or more of CDRH1, CDRH2 and CDRH3 differ in sequence relative to the corresponding CDRH1, CDRH2 and CDRH3 of the VH of any single antigen binding protein selected from the group of Ab1 to Ab59 inclusive, provided however that the sequence differences in the CDRH1, CDRH2 and CDRH3 of the variant VH relative to the corresponding CDRs of the VH sequence collectively total no more than 1, 2, 3, 4 or 5 amino acids; a variant VL comprising a CDRL1, a CDRL2 and a CDRL3, wherein one or more of CDRL1, CDRL2 and CDRL3 differ in sequence relative to the corresponding CDR1, CDRL2 and CDRL3 of the VL of any single antigen binding protein selected from the group of Ab1 to Ab59 inclusive, provided however that the sequence differences in the CDRL1, CDRL2 and CDRL3 of the variant VL relative to the corresponding CDRs of the VL sequence collectively total no more than 1, 2, 3, 4 or 5 amino acids," and so on and so forth.

The Groups I+ share the technical features of an antigen binding protein comprising a heavy chain variable region, the heavy chain variable region further comprising heavy chain complementary determining regions CDR1, CDR2, and CDR3; and a light chain variable region, the light chain variable region further comprising light chain complementary determining regions CDR1, CDR2, and CDR3. However, these shared technical features do not represent a contribution over the prior art.

Specifically, WO 2012/017003 A1 to Jenewein et al. discloses an antigen binding protein (an antibody that binds to a human major histocompatibility complex presenting a peptidic fragment of a hepatitis- B-virus protein; Abstract; the hepatitis-B-virus protein is the hepatitis-B-virus envelope surface protein, Pg. 2, Lns. 16-17), the antibody comprising a heavy chain variable region (provided are isolated nucleic acids encoding an antibody heavy chain as reported herein, Pg. 5, Lns. 18-19; in one embodiment the antibody comprises a VH sequence of SEQ ID NO: 35, Pg. 5, Ln. 12), the heavy chain variable region further comprising heavy chain complementary determining regions CDR1, CDR2, and CDR3 (SEQ ID NO:4, CDR-H1 amino acid sequence of c18/A2 mAb; SEQ ID NO:5, CDR-H2 amino acid sequence of c18/A2 mAb; SEQ ID NO:6, CDR-H3 amino acid sequence of c18/A2 mAb, Pg. 43, Lns. 20-23); and a light chain variable region (further provided is an isolated nucleic acid encoding the antibody light chain as reported herein, Pg. 5, Lns. 19-20; in one embodiment the antibody comprises a VL sequence of SEQ ID NO: 39, Pg. 5, Ln. 14), the light chain variable region further comprising light chain complementary determining regions CDR1, CDR2, and CDR3 (SEQ ID NO:8, CDR-H1 amino acid sequence of c18/A2 mAb; SEQ ID NO:9, CDR-H2 amino acid sequence of c18/A2 mAb; SEQ ID NO:10, CDR-H3 amino acid sequence of c18/A2 mAb, Pg. 43, Lns. 24-26).

The inventions listed in Groups I+ therefore lack unity under Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical features.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI		テーマコード（参考）
C12N 5/10	*(2006.01)*	C12N 5/10		
C12P 21/08	*(2006.01)*	C12P 21/08		
A61K 39/395	*(2006.01)*	A61K 39/395	D	
A61K 45/00	*(2006.01)*	A61K 39/395	N	
A61P 35/00	*(2006.01)*	A61K 45/00		
A61P 35/04	*(2006.01)*	A61P 35/00		
A61P 31/00	*(2006.01)*	A61P 35/04		
		A61P 31/00		

(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,LT,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

(72)発明者 フォルツ，イアン
カナダ国、ブリティッシュ・コロンビア・ブイ・５・エイ・４・ビー・９、バーナビー、ナイツウッド・プレイス・２１０８
(72)発明者 ケッチェム，ランドル・アール
アメリカ合衆国、ワシントン・９８２９６、スノホミッシュ、ワンハンドレッドフィフティセカンド・ストリート・サウスイースト・６３３２
(72)発明者 パイアセッキ，ジュリア・シー
アメリカ合衆国、ワシントン・９８１０３、シアトル、ノース・フォーティセブンス・ストリート・１０１４

Ｆターム(参考) 4B064 AG26 CA10 CA19 CA20 CC03 CC06 CC24 CD13 CD21 CE03 CE10 CE11 CE12 DA05
4B065 AA90X AA90Y AA93X AA93Y AB01 AB04 AC14 BA02 BA08 BB12 BB25 BB31 BB37 BC03 BD14 BD15 CA25 CA44
4C084 AA19 NA05 ZA362 ZB092 ZB261 ZB262 ZB321
4C085 AA13 AA14
4H045 AA11 AA30 DA76 EA20 FA74 GA15 GA21 GA23 GA26