

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6515101号
(P6515101)

(45) 発行日 令和1年5月15日 (2019.5.15)

(24) 登録日 平成31年4月19日 (2019.4.19)

(51) Int.Cl.	F I
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28 Z N A
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21

請求項の数 13 (全 104 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-537860 (P2016-537860)	(73) 特許権者	500049716
(86) (22) 出願日	平成26年8月28日 (2014.8.28)		アムジェン・インコーポレーテッド
(65) 公表番号	特表2016-530278 (P2016-530278A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 91
(43) 公表日	平成28年9月29日 (2016.9.29)		320, サウザンド オークス, ワン ア
(86) 国際出願番号	PCT/US2014/053246		ムジェン センター ドライブ
(87) 国際公開番号	W02015/031667	(74) 代理人	110001173
(87) 国際公開日	平成27年3月5日 (2015.3.5)		特許業務法人川口国際特許事務所
審査請求日	平成29年8月25日 (2017.8.25)	(72) 発明者	ビアーズ, コートニー
(31) 優先権主張番号	61/872, 125		アメリカ合衆国、ワシントン・98107
(32) 優先日	平成25年8月30日 (2013.8.30)		、シアトル、ノースウェスト・シックスティ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		イセカンド・ストリート・932
(31) 優先権主張番号	62/031, 036	(72) 発明者	オニール, ジェイソン・シー
(32) 優先日	平成26年7月30日 (2014.7.30)		アメリカ合衆国、ワシントン・98036
(33) 優先権主張国	米国 (US)		、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】 G I T R 抗原結合タンパク質

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト G I T R に結合する抗原結合タンパク質であって、

該抗原結合タンパク質は、C D R L 1、C D R L 2、C D R L 3、C D R H 1、C D R H 2 及び C D R H 3 を含み、C D R L 1 は配列番号 5 を含み、C D R L 2 は配列番号 1 4 を含み、C D R L 3 は配列番号 3 0 を含み、C D R H 1 は配列番号 3 1 を含み、C D R H 2 は配列番号 7 1 を含み、及び C D R H 3 は配列番号 6 3 を含む、抗原結合タンパク質。

【請求項 2】

抗原結合タンパク質が、V L 及び V H を含み、V L が配列番号 2 6 2 を含み及び V H が配列番号 3 0 2 を含む、請求項 1 に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 3】

抗原結合タンパク質が、L C 及び H C を含み、L C が配列番号 3 8 0 を含み、H C が配列番号 4 2 0 を含む、請求項 1 又は 2 に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項 4】

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) I g G 1、I g G 2、I g G 3、または I g G 4 型である、

e) 抗原結合抗体フラグメントである、

f) F a b フラグメント、F a b ' フラグメント、F (a b ') 2 フラグメント、また

はF ν 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3のいずれか1項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項5】

a) G I T Rとの結合に関して、G I T R Lと交差競合する、

b) ヒトC D 4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4のいずれか1項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項6】

抗原結合タンパク質が完全ヒト抗体、望ましくは抗原結合タンパク質が完全ヒトI g G 1抗体である、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。

【請求項7】

F c γ 受容体(F c γ R)と結合する能力を有する抗原結合タンパク質、望ましくは抗原結合タンパク質が、抗原結合タンパク質のクラスタが形成されるように、F c γ 受容体(F c γ R)と結合する能力を有する、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。

【請求項8】

ヒトG I T Rの活性を刺激する、請求項1から7のいずれか1項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項9】

ヒトG I T Rを刺激する、I g G 1型の完全ヒトモノクローナル抗体である、請求項1から8のいずれか1項に記載の抗原結合タンパク質。

【請求項10】

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の、V L及びV H又は、
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の、L C及びH C、
をコードする核酸。

【請求項11】

請求項10に記載の核酸を含むベクター。

【請求項12】

請求項10に記載の核酸又は、請求項11に記載のベクターを含む細胞。

【請求項13】

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12に記載の細胞を培養することを含む、製造方法であって、培養物から抗原結合タンパク質を単離することを含んでもよい、製造方法。

【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T N F R関連遺伝子(G I T R:T N F R S F 1 8)は、活性化誘発性T N F R科メンバー(A I T R)と称されることもある、T N F受容体スーパーファミリー(T N F R S F)に属する受容体である。G I T Rはその同族リガンドであるG I T Rリガンド(C I T R L、T N F S F 1 8)により活性化される。G I T R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T N F R科メンバーの特徴である。例えば、G I T Rの細胞質ドメインは、4-1 B B

10

20

30

40

50

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、休止期のレスポンド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)。

10

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

20

【0004】

APC上のGITRLがレスポンド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ド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)。

30

40

【0005】

まとめると、上述の活性、特にレスポンド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】

50

【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 10

【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】

20

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。

30

【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、

40

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VL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

50

c) の変異 V L、

e) C D R H 1、C D R H 2 及び C D R H 3 を含む V H であって、

C D R H 1 が配列 $X_1 Y G M X_2$ (配列番号 4 3 6) を含み、 X_1 は S または N であり、 X_2 は H または Y であり、

C D R H 2 が配列 $V I W Y X_1 G S N K Y Y A D S V X_2 G$ (配列番号 4 3 7) を含み、 X_1 は E、V、A、P であり、 X_2 は K または R であり、

C D R H 3 が配列 $G G X_1 L X_2 X_3 X_4 Y Y X_5 G M D V$ (配列番号 4 3 8) を含み、 X_1 は Q、L、E、または R であり、 X_2 は G、R、または S であり、 X_3 は K、Y、L、F、または R であり、 X_4 は Y または D であり、 X_5 は Y または S である、

V H、

f) C D R L 1、C D R L 2 及び C D R L 3 を含む V L であって、

C D R L 1 が配列 $R A S Q X_1 Y I R N D L G$ (配列番号 4 3 9) を含み、 X_1 は G または V であり、

C D R L 2 が配列 $X_1 X_2 S X_3 L Q S$ (配列番号 4 4 0) を含み、 X_1 は A または D であり、 X_2 は A または T であり、 X_3 は S または T であり、

C D R L 3 が配列 $X_1 Q X_2 X_3 X_4 Y P X_5 T$ (配列番号 4 4 1) を含み、 X_1 は L または Q であり、 X_2 は H または L であり、 X_3 は N または H であり、 X_4 は S、N または T であり、 X_5 は W、L または I である、

V L、

g) e) の V H 及び f) の V L、

h) それぞれ、A b 1 から A b 5 9 の抗原結合タンパク質の同一の V H 由来の、C D R H 1、C D R H 2 及び C D R H 3、

i) それぞれ、A b 1 から A b 5 9 の抗原結合タンパク質の同一の V L 由来の、C D R L 1、C D R L 2 及び C D R L 3、

j) V H 及び V L が同一の抗原結合タンパク質由来である、h) の C D R H 1、C D R H 2 及び C D R H 3 並びに i) の C D R H 1、C D R H 2 及び C D R H 3、

k) アミノ酸配列が、抗原結合タンパク質 A b 1 から A b 5 9 のいずれか 1 種の V H の配列と、少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 7 % または 9 9 % 同一である V H

、

l) アミノ酸配列が、抗原結合タンパク質 A b 1 から A b 5 9 のいずれか 1 種の V L の配列と、少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 7 % または 9 9 % 同一である V L

、

m) k) の V H 及び l) の V L であって、V H 及び V L が同一の抗原結合タンパク質由来である、k) の V H 及び l) の V L、

n) 抗原結合タンパク質 A b 1 から A b 5 9 のいずれか 1 種の V H のアミノ酸配列を含む V H、

o) 抗原結合タンパク質 A b 1 から A b 5 9 のいずれか 1 種の V L のアミノ酸配列を含む V L、

p) n) の V H 及び o) の V L であって、V H 及び V L が同一の抗原結合タンパク質由来の、n) の V H 及び o) の V L、

q) アミノ酸配列が、抗原結合タンパク質 A b 1 から A b 5 9 のいずれか 1 種の完全長重鎖 (H C) の配列と、少なくとも 9 0 %、9 5 %、9 7 % または 9 9 % 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 A b 1 から A b 5 9 のいずれか 1 種の完全長軽鎖 (L C) の配列と、少なくとも 9 0 %、9 5 %、9 7 % または 9 9 % 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 A b 1 から A b 5 9 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 A b 1 から A b 5 9 のいずれか 1 種の完全長軽鎖のアミノ酸配

10

20

30

40

50

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。

10

【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、

20

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、

30

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

40

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%、

50

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、

10

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、

20

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、

30

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、

40

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

50

たは 99% 同一であり、H C 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) L C 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、H C 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) L C 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、H C 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) L C 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、H C 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、

10

h) L C 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、H C 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) L C 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、H C 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) L C 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、H C 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。

20

【0014】

第 7 の実施形態において、抗原結合タンパク質は、L C 及び H C を含み、ここで、

a) L C は配列番号 317 を含み、H C は配列番号 336 を含む、

b) L C は配列番号 322 を含み、H C は配列番号 341 を含む、

c) L C は配列番号 332 を含み、H C は配列番号 351 を含む、

d) L C は配列番号 333 を含み、H C は配列番号 352 を含む、

e) L C は配列番号 334 を含み、H C は配列番号 353 を含む、

f) L C は配列番号 360 を含み、H C は配列番号 400 を含む、

g) L C は配列番号 373 を含み、H C は配列番号 413 を含む、

h) L C は配列番号 380 を含み、H C は配列番号 420 を含む、

30

i) L C は配列番号 385 を含み、H C は配列番号 425 を含む、

j) L C は配列番号 390 を含み、H C 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 G I T R 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 G I T R との結合に関して交差競合する。

【0017】

40

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) I g G 1、I g G 2、I g G 3、または I g G 4 型である、

e) 抗原結合抗体フラグメントである、

f) F a b フラグメント、F a b ' フラグメント、F (a b ') 2 フラグメント、または F v 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

50

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、

10

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】

20

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】

30

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KD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。

40

【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若しくはHCまたはそれ

50

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V
L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L
C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、

10

20

30

40

50

- 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。

10

【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、肺癌、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】

20

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】

30

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-V E C、PD1 アンタゴニスト、PD L 1 アンタゴニスト、C T L A-4 アンタゴニスト及び B i T E 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。

40

【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 1 A】全体で、本明細書において提供されるものなどの G I T R 抗体が、2 種の別個の T 細胞亜集団、すなわち、C D 4 + C D 2 5 + T 細胞及び C D 8 + C D 2 5 + T 細胞との結合に関して、ヒト G I T R L と交差競合することを示す結合プロットである。特に、図 1 A 及び 1 B 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 G I T R 抗体

50

が、G I T R L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G I T R抗体（9 H 6、5 H 7、4 1 G 5）と共に10分間インキュベートし、その後、4 mMのH i sタグ付きヒトG I T R L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G I T R Lを検知するための蛍光タグ付き抗H i s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G I T R LのM F I（平均蛍光強度）を測定した。図1 A及び1 Bは、2種の別個の細胞集団に関する、G I T R抗体：G I T R Lモル濃度比の関数としてのM F Iのプロットである。図1 C及び1 Dは、逆実験の結果を示すプロットであり、G I T R Lが抗G I T R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、G I T R抗体ではなくG I T R L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G I T R抗体（4 mMの9 H 6、5 H 7、4 1 G 5）を添加し、得られた混合物を4℃で30分間インキュベートした。蛍光標識抗ヒトF cと共にインキュベートすることによって、結合したG I T R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1 C及び1 Dは、2種の別個の細胞集団に関する、G I T R L：G I T R抗体モル濃度比の関数としてのM F Iのプロットである。

【図1 B】全体で、本明細書において提供されるものなどのG I T R抗体が、2種の別個のT細胞亜集団、すなわち、C D 4 + C D 2 5 + T細胞及びC D 8 + C D 2 5 + T細胞との結合に関して、ヒトG I T R Lと交差競合することを示す結合プロットである。特に、図1 A及び1 B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G I T R抗体が、G I T R L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G I T R抗体（9 H 6、5 H 7、4 1 G 5）と共に10分間インキュベートし、その後、4 mMのH i sタグ付きヒトG I T R L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G I T R Lを検知するための蛍光タグ付き抗H i s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G I T R LのM F I（平均蛍光強度）を測定した。図1 A及び1 Bは、2種の別個の細胞集団に関する、G I T R抗体：G I T R Lモル濃度比の関数としてのM F Iのプロットである。図1 C及び1 Dは、逆実験の結果を示すプロットであり、G I T R Lが抗G I T R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、G I T R抗体ではなくG I T R L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G I T R抗体（4 mMの9 H 6、5 H 7、4 1 G 5）を添加し、得られた混合物を4℃で30分間インキュベートした。蛍光標識抗ヒトF cと共にインキュベートすることによって、結合したG I T R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1 C及び1 Dは、2種の別個の細胞集団に関する、G I T R L：G I T R抗体モル濃度比の関数としてのM F Iのプロットである。

【図1 C】全体で、本明細書において提供されるものなどのG I T R抗体が、2種の別個のT細胞亜集団、すなわち、C D 4 + C D 2 5 + T細胞及びC D 8 + C D 2 5 + T細胞との結合に関して、ヒトG I T R Lと交差競合することを示す結合プロットである。特に、図1 A及び1 B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G I T R抗体が、G I T R L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G I T R抗体（9 H 6、5 H 7、4 1 G 5）と共に10分間インキュベートし、その後、4 mMのH i sタグ付きヒトG I T R L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G I T R Lを検知するための蛍光タグ付き抗H i s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G I T R LのM F I（平均蛍光強度）を測定した。図1 A及び1 Bは、2種の別個の細胞集団に関する、G I T R抗体：G I T R Lモル濃度比の関数としてのM F Iのプロットである。図1 C及び1 Dは、逆実験の結果を示すプロットであり、G I T R Lが抗G I T R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、G I T R抗体ではなくG I T R L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G I T R抗体（4 mMの9 H 6、5 H 7、4 1 G 5）を添加し、得られた混合物を4℃で30分間インキュベートした。蛍光標識抗ヒトF cと共にインキュベートすることによって、結合したG I T R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1 C及び1 Dは、2種の別個の細胞集団に関する、G I T R L：G I T R抗体モル濃度比の関数としてのM F Iのプロットである。

【図1 D】全体で、本明細書において提供されるものなどのG I T R抗体が、2種の別個のT細胞亜集団、すなわち、C D 4 + C D 2 5 + T細胞及びC D 8 + C D 2 5 + T細胞との結合に関して、ヒトG I T R Lと交差競合することを示す結合プロットである。特に、図1 A及び1 B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G I T R抗体が、G I T R L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G I T R抗体（9 H 6、5 H 7、4 1 G 5）と共に10分間インキュベートし、その後、4 mMのH i sタグ付きヒトG I T R L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G I T R Lを検知するための蛍光タグ付き抗H i s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G I T R LのM F I（平均蛍光強度）を測定した。図1 A及び1 Bは、2種の別個の細胞集団に関する、G I T R抗体：G I T R Lモル濃度比の関数としてのM F Iのプロットである。図1 C及び1 Dは、逆実験の結果を示すプロットであり、G I T R Lが抗G I T R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、G I T R抗体ではなくG I T R L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G I T R抗体（4 mMの9 H 6、5 H 7、4 1 G 5）を添加し、得られた混合物を4℃で30分間インキュベートした。蛍光標識抗ヒトF cと共にインキュベートすることによって、結合したG I T R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1 C及び1 Dは、2種の別個の細胞集団に関する、G I T R L：G I T R抗体モル濃度比の関数としてのM F Iのプロットである。

【図2】本明細書に記載のものなどのG I T R抗体が、制御性T細胞（T r e g）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、T r e g細胞及びTレスポンドを、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G I T R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1 μ C iの3 H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、G I T R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（9 H 6 v 3、5 H 7 v 2、4 1 G 5 v 2）などの数種のG I T R抗体が、ヒト化N S G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、N S GマウスにC D 3 4 +胎性肝細胞を移植することによって、該マウスにヒトC D 4 +及びC D 8 +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。25 mg / k gのG I T R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F o x P 3を発現する循環ヒトC D 4 + 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4 A】2種の別個の形態のF c γ 受容体（F c γ R）が、本明細書において提供されるものなどのG I T R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4 Aの結果は、増殖アッセイにおいて、F c γ R I I aが、代表的なG I T R抗体（5 H 7、9 H 6、7 A 1 0及び4 1 G 5）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4 Bは、F c γ R I I I a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G I T R抗体またはヒトI g G 1アイソタイプコントロールを、F c γ 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C D 4 + T細胞及び2 9 3 T細胞の共培養に添加した。少数のC D 3被覆したビーズを添加して、最適未満のT C R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1 μ Ci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Fc γ 受容体(Fc γ R)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、Fc γ RIIa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、Fc γ RIIIa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IgG 1アイソタイプコントロールを、Fc γ 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1 μ Ci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。

10

【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。

20

【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。

30

40

【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

50

+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。

10

【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。

20

【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%CO₂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。

30

【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）。

40

【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）。

50

）。

【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）。

10

【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）。

20

【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）。

30

【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）。

40

【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）。

50

001) 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細胞の増殖を活性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。

10

【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細胞の増殖を活性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。

20

【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。

30

【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考文献に記載される、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

40

50

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、 $\pm 1\%$ 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、F a b、F a b'、F (a b')₂、F v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G I T R Lを含まない。

【0063】

一般的に、G I T R 抗原結合タンパク質は、当該抗原結合タンパク質が非G I T R 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G I T R 抗原と「特異的に結合する」といわれる。但し、G I T R 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G I T R ポリペプチドと交差反応する場合がある。一般的に、G I T R 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、B I A C o r e、G E ーヘルスケア社、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G I T R と特異的に結合する。G I T R 抗原結合タンパク質は、ここでもB I A C o r e 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G I T R 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」（「C D R」）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。「C D R」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C D R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G I T R 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D N A 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、F a b、F a b'、F (a b')₂、F v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_H1 、 C_H2 、及び C_H3 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_H3 はポリペプチドのカルボキシル末端に最も近い。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、Fab、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_H1 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_H2 及び C_H3 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_H3 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_H1 ドメイン並びに C_H1 ドメインと C_H2 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_H1 ドメインと C_H2 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】

「F_v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F_v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WO 88/01649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пит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

10

20

30

40

50

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、個別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る、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、 $[\alpha]$ -、 $[\alpha]$ -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

10

20

30

40

50

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、 $[\gamma]$ -カルボキシグルタメート、 $[\varepsilon]$ -N, N, N-トリメチルリシン、 $[\varepsilon]$ -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、 $[\sigma]$ -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、プ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、phosphorothioate、phosphorothiolate及びphosphoramidate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

10

20

30

40

50

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

10

20

30

40

50

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（Deverauxら、1984、Nucleic 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（ $3 \times$ 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（通常、ギャップオープニングペナルティ $\times 1/10$ ）、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。

10

20

【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。

30

【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。

40

【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

50

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】

10

「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。

20

【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、頭頸部がん、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。

30

【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。

40

【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】

50

「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。

10

【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。

20

【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。

30

【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。

40

【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

50

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、F a b、F a b'、F (a b')₂、s c F v、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】

G I T R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G I T Rシグナル伝達の誘発または向上、
- b. G I T Rに対する結合に関するG I T R Lとの交差競合、
- c. ヒトC D 4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G I T R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25 k D a）及び1の完全長「重」鎖（特定の実施形態においては約50～70 k D a）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V Hと称される。同様に、軽鎖由来の可変ドメインはV L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I g M、I g D、I g G、I g A、及びI g Eと規定する。I g Gは、I g G 1、I g G 2、I g G 3、及びI g G 4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。I g MのサブタイプとしてはI g M、及びI g M 2が挙げられる。I g AのサブタイプとしてはI g A 1及びI g A 2が挙げられる。ヒトにおいては、I g A及びI g Dアイソタイプは4の重鎖及び4の軽鎖を含み、I g G及びI g Eアイソタイプは2の重鎖及び2の軽鎖を含み、I g M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、I g G重鎖はそれぞれ、C_H 1、C_H 2及びC_H 3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、G I T R抗体はI g G 1、I g G 2、またはI g G 4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:ASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK* (配列番号442、アスタリスクは終止コドンに対応)を有する。

10

【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:QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSN NKYAASSYLSLTPEQWKS HRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS* (配列番号443、アスタリスクは終止コドンに対応)を有する。

20

【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:TVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVC LLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (配列番号444、アスタリスクは終止コドンに対応)を有する。

30

【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。

40

【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

50

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 C D R、重鎖可変ドメイン（V H）、軽鎖可変ドメイン（V L）、完全長重鎖（H C）及び完全長軽鎖（L C）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 8 A、8 B、9 A、9 B、1 0 A、1 0 B、1 1 A 及び 1 1 B に示す。

【 0 1 3 2 】

【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

10

20

30

40

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

10

20

30

40

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

10

20

30

40

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
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

【0133】

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 C

10

20

30

40

50

DR、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、pVIIII、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。

10

【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。

20

【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。

30

【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。

40

【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CDRH3であって、CDRH1、CDRH2及びCDRH3の1または複数の配列は、Ab

50

1 から A b 5 9 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 C D R H 1、C D R H 2 及び C D R H 3 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、C D R H 1、C D R H 2 及び C D R H 3 を含む。

【0141】

更に他の抗原結合タンパク質は、A b 1 から A b 5 9 の群より選択される任意の単一の抗体の 6 の C D R 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、A b 1 から A b 5 9 の群より選択される任意の単一の抗体に関する 6 の C D R 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 C D R 全てを含む。

【0142】

10

他の抗原結合タンパク質は、C D R L 1、C D R L 2、C D R L 3、C D R H 1、C D R H 2 及び C D R H 3 の 1 または複数の配列が、A b 1 から A b 5 9 の群より選択される任意の単一の抗体の対応する C D R L 1、C D R L 2、C D R L 3、C D R H 1、C D R H 2 及び C D R H 3 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 C D R 全てを含む。

【0143】

C. G I T R 抗原結合タンパク質—可変ドメイン

A b 1 から A b 5 9 の群より選択される任意の抗体の軽鎖可変ドメイン (V L) 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、A b 1 から A b 5 9 の群より選択される任意の抗体の V L を含む、該 V L のアミノ酸配列は表 1 に指定される通りである。

20

【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 A b 1 から A b 5 9 のいずれか 1 の V L 配列に対して、少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 7 % または 9 9 % 同一である変異 V L 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 A b 1 から A b 5 9 のいずれか 1 由来の V L のアミノ酸配列と、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 1 0 を超えないアミノ酸において異なる変異 V L 配列を含む。別な態様において、変異 V L 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。

30

【0146】

いくつかの抗原結合タンパク質は、A b 1 から A b 5 9 の群より選択される任意の抗体の重鎖可変ドメイン (V H) 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 A b 1 から A b 5 9 の群より選択される任意の抗体の V H を含む、該 V H 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 A b 1 から A b 5 9 のいずれか 1 の V H 配列に対して、少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 7 % または 9 9 % 同一である変異 V H 配列を含む。

40

【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 A b 1 から A b 5 9 のいずれか 1 由来の V H のアミノ酸配列と、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 1 0 を超えないアミノ酸において異なる変異 V H 配列を含む。別な態様において、変異 V H 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、A b 1 から A b 5 9 からなる群より選択される同一の抗体由来の V L 及び V H を含む。別な実施形態において、抗原結合タンパク質は、A b 1 から A b 5 9 からなる群より選択される同一の抗体由来の V L 及び V H を含む、該 V L 及び V H のアミノ酸配列は表 1 に指定される通りである。

50

【0150】

別な態様において、抗原結合タンパク質は、それぞれ、A b 1 から A b 5 9 の群より選択される同一の抗体由来の V L 及び V H を含み、該 V L 及び V H 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 A b 1 から A b 5 9 のいずれか 1 の V L または V H 配列に対して、少なくとも 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 7 % または 9 9 % 同一である。

【0151】

いくつかの抗原結合タンパク質は変異 V L 及び／または変異 V H を含み、変異 V L 及び変異 V H の一方または両方が、それぞれ、抗原結合タンパク質 A b 1 から A b 5 9 の群より選択される任意の単一の抗体の V L または V H 配列と異なり、但し、V H または V L 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。

10

【0152】

更に別な実施形態において、抗原結合タンパク質は、A b 1 から A b 5 9 の群より選択される同一の抗体由来の V H 及び V L、但し、V H 及び／または V L 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 V H 及び V L 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. G I T R 抗原結合タンパク質—完全長配列

20

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。

30

【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 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 7 % または 9 9 % 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 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 7 % または 9 9 % 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 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 7 % または 9 9 % 同一であるアミノ酸配列を有する完全長重鎖を含む。

40

【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 C D R、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

50

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、F a b フラグメント、F a b ' フラグメント、F (a b ')₂ フラグメント、F v フラグメント、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、I g G 1 型、I g G 2 型、I g G 3 型またはI g G 4 型のヒト抗体である。特定の実施形態において、抗体はI g G 1 型である。

【0160】

特定の抗原結合タンパク質は、表1のA b 1 からA b 5 9 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、C D R、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 $\leq 300 \text{ nM}$ 、 $\leq 150 \text{ nM}$ 、 $\leq 100 \text{ nM}$ 、 $\leq 75 \text{ nM}$ 、 $\leq 50 \text{ nM}$ 、 $\leq 10 \text{ nM}$ 、 $\leq 5 \text{ nM}$ 、 $\leq 2 \text{ nM}$ 、または $\leq 1 \text{ nM}$ であるように、ヒトG I T R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G I T R及び配列番号2のカニクイザルG I T Rに結合すること、

(c) $K_D \leq 10 \text{ nM}$ で配列番号1のヒトG I T Rに結合し、 $K_D \leq 500 \text{ nM}$ で配列番号2のカニクイザルG I T Rに結合すること、

(d) 配列番号1のヒトG I T R及び配列番号2のカニクイザルG I T Rに結合するが、配列番号3のマウスG I T R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 $10^4 / \text{M} \cdot \text{秒}$ 、少なくとも $10^5 / \text{M} \cdot \text{秒}$ 、または少なくとも $10^6 / \text{M} \cdot \text{秒}$ のG I T R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o f f - r a t eを有する。いくつかの抗原結合タンパク質は、例えば、 $1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ 、または $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 、または $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 、または $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 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、25 pM、50 pM、100 pM、500 pM、1 nM、5 nM、10 nM、25 nMまたは50 nM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. G I T R 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C D R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C D R

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X₁YGMX₂（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VIWYX₁GSNKYYADSVX₂G（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GGX₁LX₂X₃X₄YYX₅GMDV（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RASQX₁IRNDLG（配列番号439）、但し、X₁はGまたはVである、を含み、

CDRL2が配列X₁X₂SX₃LQS（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X₁QX₂X₃X₄YPX₅T（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

10

20

30

40

50

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、脾臓細胞を骨髓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髓腫細胞は、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.Ag41、Sp210-Ag14、FO、NSO/U、MPC-11、MPC11-X45-GTG1.7及びS194/5XXO Bul 10
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-Ag1.2.3、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髓腫細胞株に融合し、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。 20

【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Morris 40
on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 50

、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、Verhoeven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、WO 96/33735 及び WO 94/02602 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WO 91/10741、WO 90/04036、並びに EP 546073 B1 及び EP 546073 A1 に記載される。

10

【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（ $[\mu]$ 及び $[\gamma]$ ）並びに $[\kappa]$ 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 $[\mu]$ 及び $[\kappa]$ 連鎖遺伝子座を不活性化す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 $[\kappa]$ 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イッチ及び体細胞突然変異を起こして、高親和性ヒト IgG $[\kappa]$ 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、Tuailon 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、上述の参考文献は、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WO 93/1227号、第WO 92/22646号、及び第WO 92/03918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、WO 98/24893、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、HC07 及び HC012 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。

20

30

40

【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

50

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。

10

【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の別個の重鎖/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產生することができる。例えば、Songsivilai及びLachmann、1990、Clin. Exp. Immunol. 79:315~321、Kostelnýら、1992、J. Immunol. 148:1547~1553を参照されたい。

20

【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。

30

【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。

40

【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】

50

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。

10

【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ァイ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】

20

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。

30

【0193】

40

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

10

20

30

【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。

40

【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

50

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。

10

【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。

20

30

【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、不對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。

40

【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

50

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。F a u c h e r e、1986、Adv. Drug Res. 15:29、V e b e r及びF r e i d i n g e r、1985、T I N S 392ページ、並びにE v a n s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、G I T R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（R i z o及びG i e r a s c h、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、放射性的の、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、放射性的の、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（P E G）が挙げられる。アルブミンが結合した及びP E G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P E G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（T T R）またはT T R変異体に抱合している、または他の形態で結合している。T T RまたはT T R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、G I T R抗原結合タンパク質の、G I T R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。G I T R抗原結合タンパク質を含む融合タンパク質は、G I T R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

10

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。

20

【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。

30

【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。

40

【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

50

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。

10

【0211】

あるいは、オリゴマーは、ペプチド連結子（スパーサペプチド）有りまたはなしで、複数のGITR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。

20

30

【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。

40

【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】

50

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Applin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、種々のエンドー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、 3H 、 ^{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ペーパーオキシダーゼ、 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、 3H 、 ^{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ペーパーオキシダーゼ、 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。

10

【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、ルシファーイエロー、Cascade Blue J、テキサスレッド、I AEDANS、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。

20

30

【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 アクセス番号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

40

50

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. G I T R 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C D R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、P C R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G I T R 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、I g G 1 重鎖定常領域及びI g G 1 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】

10

20

【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
	CCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGAC
	CAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGT
	CCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACC
	GTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACAT
	CTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGG
	TGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAA
	ACTCACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAACT
	CCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAA
	AACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCT
	GAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGA
	AGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACG
	GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGG
	GAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAG
	CGTCCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATG
	GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCC
	CTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGC
	CAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCC
	TGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAG
	GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCC
	CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC
	AGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTG
	CTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTATAGCAA
	GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGA
	ACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTG
	CACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTC
	TCCGGGTAAATGA

10

20

30

40

IgG1 λ 軽鎖 定常領域 (配列番号 446)	CAACCGAAAGCGGCGCCCTCGGTCACTCTGTTCCC GCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCA CACTGGTGTGTCTCATAAGTGA CT TCTACCCGGA GCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCC CGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACCCCTCCA AACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTAT CTGAGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAAGTCCCACAG AAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCA CCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCCTACAGAATGTTCA TAG
IgG1 κ 軽鎖 定常領域 (配列番号 447)	ACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCC ATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTG TTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAG GCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCA ATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGG ACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACC CTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAA AGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGA GCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAG TGTTAG

10

20

【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

30

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

10

20

30

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

10

20

30

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

10

20

【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。

30

【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】

40

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（pH 8.0）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

50

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、非エピソード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。

10

20

【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。

30

【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。

40

【0243】

50

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、Köhler及びMilstein、1975、Nature 256:495の標準的な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、マウスの骨髓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細胞をマウスの骨髓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髓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。

10

【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、Houston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。

20

30

【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、サブクラススイ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。

40

【0247】

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

50

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

10

20

30

40

50

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、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ー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。

10

【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、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。

20

【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。

30

【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ンプ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。

40

【0262】

50

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)。

10

【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。

20

【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必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 *thyridine 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。

30

【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。

40

【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

50

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か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、エラストーゼ、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0367566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0460846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ー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

G I T R生物学の2つの見地から、G I T R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G I T Rの活性化が免疫系を活性化することである。加えて、G I T R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、G I T R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、G I T R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、G I T R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。

10

【0278】

様々な異なる腫瘍がG I T R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I I I段階及び第I V段階の悪性黒色腫を含む）、肺がん（例えば、非小細胞肺がん－N S C L C）、頭頸部がん、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、頭頸部扁平上皮がん－S C C H N）、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。

20

【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。

30

【0281】

提供されるG I T R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。

40

【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F l t 3 Lなどの樹状細胞増殖因

50

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ツール様受容体 (TLR) アゴニストが挙げられる。

10

【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プロリズマブ、ピジリズマブ (キュアテック社)、AMP-224 (アンプリムューン社) 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)、MED-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CTLA-4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。

20

30

【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ブエク) 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。

40

【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、CD20、CD33、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

50

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シサン（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-1αの阻害剤、及びキャンパス（商標）（アテムツズマブ）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-EGF；EGF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）（ジェネンテック社）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ピンカアルカロイド、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

10

20

30

40

50

ニボ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。

10

20

【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。

30

【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）。

40

【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】

50

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、 ^3H 、 ^{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ペーパーオキシダーゼ、 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、G I T R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G I T R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、G I T R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G I T R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。

10

【0306】

V I I I . 医薬配合物及び投与

G I T R 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p H、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-H C l、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（E D T A）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）；低分子量ポリペプチド；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、P E G、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」（R E M I N G T O N ' S P H A R M A C E U T I C A L S C I E N C E S）、第18版（A . R . G e n r m o 編）、1990、M a c k P u b l i s h i n g C o m p a n y 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。

20

30

40

【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态、安定性、イン・ビボ放出速度及びイン・ビボ排出速度に

50

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攪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、G I T R 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。E D T A 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。

【0 3 1 5】

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（1 0 ～1 2 0 m M）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。

10

【0 3 1 6】

特定の G I T R 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。

【0 3 1 7】

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 p H、すなわち一般的には約 5 から約 8 の p H 範囲内である僅かに低い p H に維持する。

20

【0 3 1 8】

医薬組成物は、非経口的送達用を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を選択されてもよい。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。

【0 3 1 9】

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 G I T R 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、G I T R 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。

30

【0 3 2 0】

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、G I T R 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、G I T R 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 P C T / U S 9 4 / 0 0 1 8 7 5 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。

40

【0 3 2 1】

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 G I T R 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

50

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、G I T R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G I T R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。

10

【0323】

持続性すなわち制御された送達配合物中のG I T R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P C T / U S 9 3 / 0 0 8 2 9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, 7 7 3, 9 1 9号及び欧州特許出願公開第E P 0 5 8 4 8 1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（S i d m a nら、1983、B i o p o l y m e r s 2 : 5 4 7 ~ 5 5 6）、p o l y (2 - h y d r o x y e t h y l - i n e t h a c r y l a t e)（L a n g e rら、1981、J . B i o m e d . M a t e r . R e s . 1 5 : 1 6 7 ~ 2 7 7及びL a n g e r、1982、C h e m . T e c h . 1 2 : 9 8 ~ 1 0 5）、エチレン酢酸ビニル（L a n g e r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、E p p s t e i nら、1985、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A . 8 2 : 3 6 8 8 ~ 3 6 9 2；欧州特許出願公開第E P 0 3 6, 6 7 6号；第E P 0 8 8, 0 4 6号及び第E P 1 4 3, 9 4 9号を参照されたい。

20

30

【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過程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。

40

【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G I T R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、

50

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、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

10

20

30

40

50

をG I T R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

G I T R結合アッセイ

G I T R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C D 3（クローンO K T 3）の存在下、37℃で48～72時間培養し、G I T R発現を上方制御した。細胞を採取し、洗浄し、次いで4℃で、抗ヒトG I T R抗体またはヒトI g G 1アイソタイプコントロール抗体の力価測定試料（t i t r a t i o n）と共にインキュベートした。洗浄後、細胞を4℃で、活性化されたC D 4＋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C D 4及び抗ヒトC D 2 5抗体、並びに結合した抗ヒトG I T R抗体を検知するための蛍光色素を抱合した抗ヒトI g Gを用いて染色した。フローサイトメトリーによって、C D 2 5＋C D 4＋細胞に結合した抗ヒトG I T R抗体の平均蛍光強度（M F I）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E C 5 0を算出した。

【0334】

G I T R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C D 3（クローンO K T 3）の存在下、37℃で48～72時間培養し、G I T R発現を上方制御した。細胞を採取し、洗浄し、次いで4℃で、蛍光色素を抱合した抗ヒトG I T R抗体または蛍光色素を抱合したヒトI g G 1アイソタイプコントロール抗体並びに活性化されたC D 4＋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C D 4及び抗ヒトC D 2 5抗体の力価測定試料（t i t r a t i o n）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、C D 2 5＋C D 4＋細胞に結合した抗ヒトG I T R抗体の平均蛍光強度（M F I）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E C 5 0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G I T Rモノクローナル抗体の、T C R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C D 3（ヒト：クローンO K T 3、カニクイザル：クローンS P 3 4－2）及び0.3ug/mLの抗ヒトI g Gで被覆した。抗ヒトG I T Rモノクローナル抗体またはヒトI g G 1アイソタイプコントロール抗体の力価測定試料（t i t r a t i o n）をウェルに添加し、37℃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I g G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37℃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、E L I S Aによって、抗ヒトG I T R抗体依存性のT細胞活性化の尺度としてのI F N g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G I T R抗体依存性の細胞増殖を評価した。

【0336】

[実施例2]

完全ヒトG I T Rモノクローナル抗体の調製

免疫化及び力価分析

G I T R（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

10

20

30

40

50

）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。

10

【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。

20

【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フレクチン（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。

30

40

【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

50

、細胞ペレットを再懸濁させた。

【0340】

リンパ球を非分泌性骨髓腫と1:4の比率で混合した。この細胞混合物を400×g 4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）を穏やかに攪拌しながら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））を穏やかに攪拌しながら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。

10

【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）、HAA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（ベリンガー・マンハイム社）中に再懸濁させた。細胞を37℃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

20

【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。FMA T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。

30

【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、抗体がクラスター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の産物はクローニ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FcγR依存性IFNγ分泌によ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ニ性は、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。

40

【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

50

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FMA T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(20 μ L/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40 μ L、各ウェルに添加した。次いで、二次抗体(Gt抗ヒトIgG FcCy5 (Jackson社、カタログ番号:109-175-098))を40 μ L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1 μ g/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FMA T8200装置上で読み取った。AMo anti-GITR/TNFSF18 antibody (R&D cat#:MAB689) was titrated 1:2 from 10 μ g/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 FcCy5 (Jackson社、カタログ番号:115-175-071))。

10

【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。

20

【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、1 μ g/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、1 μ g/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 FcCy5 (5 μ g/mL)、抗CD4 FITC (OKT4 (eBioscience社))、抗CD25 PE (BC96) 及び5 μ g/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 FcCy5 (5 μ g/mL)、抗CD3 FITC (SP-34 (BD社))、抗CD25 PE (BC96) 及び5 μ g/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FACS Calibur装置上でのFACS分析により評価した。

30

【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

40

50

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ス社、インテグラCL1000、カタログ番号90005）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 1×10^6 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の中に入れた。インテグラフラスコの大区画の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（0.22 μ m）。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。

10

【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、及び攪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。

20

【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30℃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。

30

【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20℃から95℃まで、60℃/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。

40

【0357】

凝集安定性階位を、過去に確立された、攪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IFN γ 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。

50

【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	IFN γ 分泌 EC50 (ng/ml)	IFN γ 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

10

20

30

40

50

【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。

10

【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】

表 6 選択した親 G I T R 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 (mg/L)	価	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 (mg/L)	価	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

10

20

30

40

50

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%
T _m (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	FcγR 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

〔実施例 8〕

選択した G I T R 抗体は G I T R L と競合する

選択した G I T R 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 G I T R への結合に関して G I T R L 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 100 mm 皿（BD 社ファルコン、カタログ番号 353003）を、室温で 4 時間、5 ml の 10 μ g/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 PRMI 1640）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、G I T R 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 種の異なるエフエクタ細胞群：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 $\times$ 10⁶ 細胞を播種し、競合結合を行った。

【0371】

抗ヒト G I T R 抗体が G I T R リガンド（G I T R-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、2~64 nM の非結合抗ヒト G I T R 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、4 nM のヒト G I T R-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】

G I T R-L が抗ヒト G I T R 抗体の結合を遮断するかを評価するために、2~64 nM の非結合ヒト G I T R-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、4 nM の抗ヒト G I T R 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 ImmunoResearch 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 G I T R 抗体は、G I T R L 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、G I T R L が、被験 G I T R 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、G I T R 抗体及び G I T R L は、G I T R 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。300 μ g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。

10

【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レスポンドとして用いた。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レスポンドのそれぞれ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。

20

【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。

30

【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は、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。

40

【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】

50

[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-R I I a 及び Fcγ-R I I I a 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-R I I a またはヒト Fcγ-R I I I a 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 (t i t r a t i o n) をウェルに添加し、培養物を 37℃ 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、FcγR I I a 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-R I I I a 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。FcγR 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 Fcγ 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、WO 06/105021 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 PRMI 1640) 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。

10

20

30

40

50

【0386】

2～64 nM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（t i t r a t i o n）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 ImmunoResearch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。

10

【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】

20

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。

30

【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。

40

【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0.5×10⁶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

50

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 caliber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リコシル化変異体を、ヒトFcγ-R1IaまたはFcγ-R1IIa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-R1IaまたはFcγ-R1IIa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37℃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、FcγR1Ia及びFcγR1IIaは、天然IgG1 GITR抗体をクラスタ化し、エフェクタT細胞の増殖を活性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

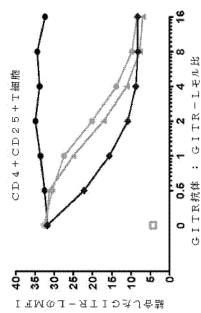
抗体9H6及び5H7の単回投与薬動態学的並びに薬力学的(PK/PD)キャラクター化を、ナイーブのオスのカニクイザルにおいて、両候補をボーラス静脈内投与によって1.0及び10mg/kgで試験することで評価した。抗体9H6は、1及び10mg/kgの用量において、それぞれ181時間(7.55日)及び166時間(6.92日)の平均半減期を示した。抗体5H7は、1及び10mg/kgの用量において、それぞれ1301時間(12.6日)及び222時間(9.23日)の平均半減期を示した。両候補共に、濃度対時間曲線の曲線下面積(AUC)より測定された、用量比例の曝露量を有する線形のPKを示した。

【0396】

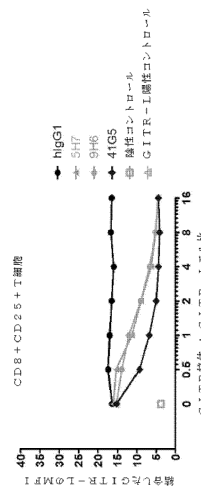
特定された全ての特許及び他の刊行物は、例えば、本記載事項との関係において用いられる可能性がある、かかる刊行物に記載された方法論を記載する及び開示することを目的として、参照により明示的に本明細書に組み込まれる。これらの刊行物は、単に、本願の出願日に先行するそれらの開示を提示するに過ぎない。この点に関する如何なる事項も、

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。

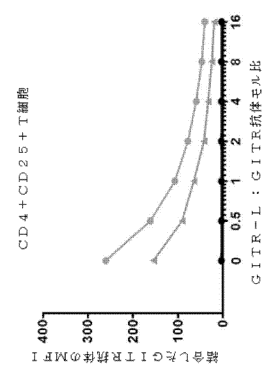
【図 1 A】



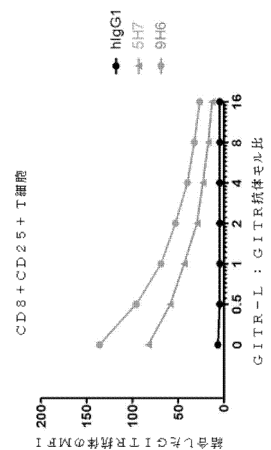
【図 1 B】



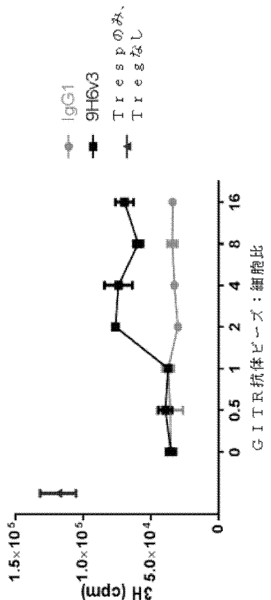
【図 1 C】



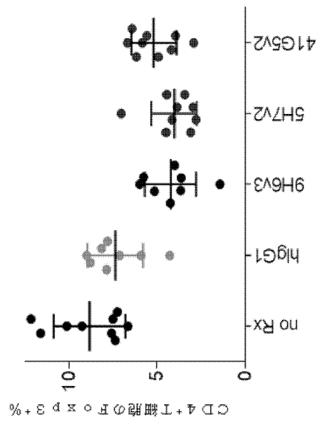
【図 1 D】



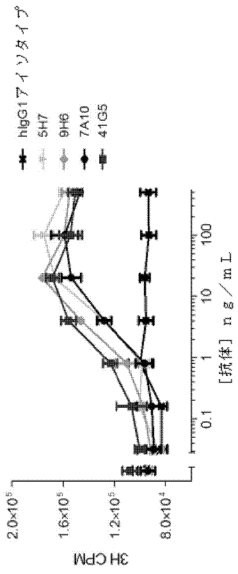
【図 2】



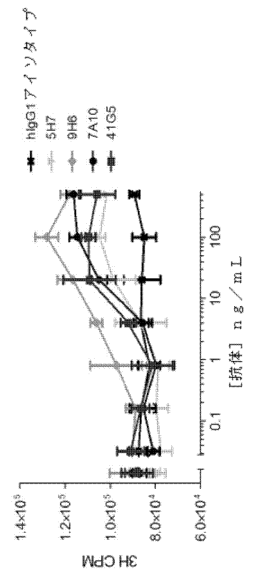
【図 3】



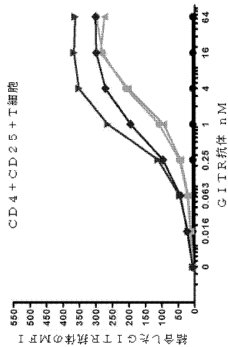
【図 4 A】



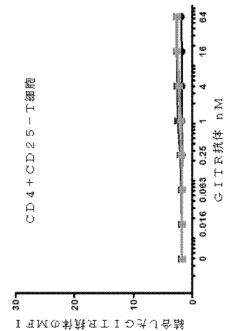
【図 4 B】



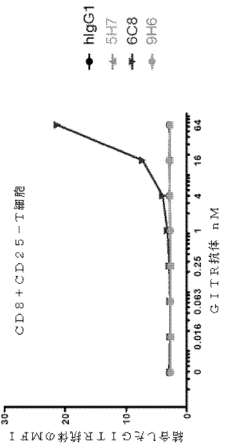
【図 5 A】



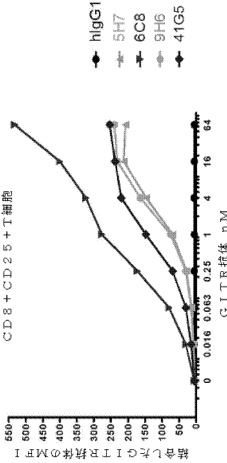
【図 5 B】



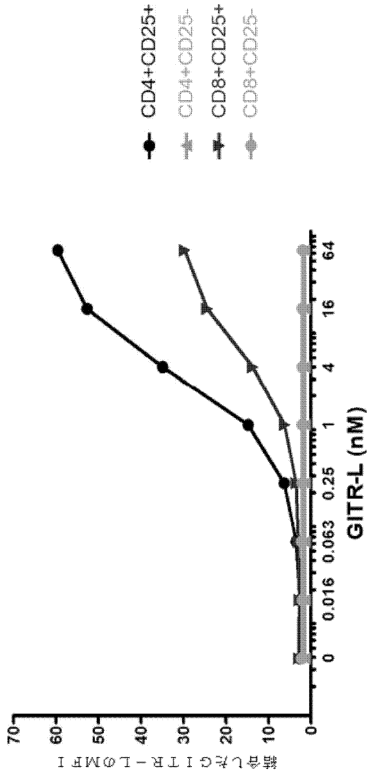
【図 5 D】



【図 5 C】



【図 6】

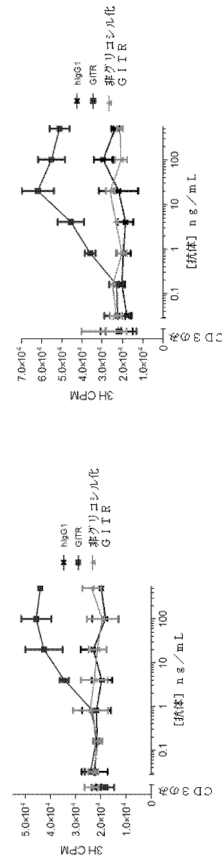


【図 1 1 B】

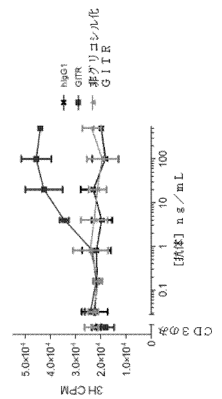
遺伝子組換え可変領域タンパク質アラインメント

抗体番号	変換番号	抗体	FR3	CD3	FR4	序列番号
抗体 20	NS-1245	HC	4LC141	EPTTSEDSNPTLVLLQNSLEAEDEAVVTCAR	EPTTVE-----TEPTDY	WOQGLVTVSS 276
抗体 21	NS-1245	HC	45A941	EPTTSEDSNPTLVLLQNSLEAEDEAVVTCAR	EPTTVE-----GHFTY	WOQGLVTVSS 277
抗体 22	NS-1242	HC	49D941	EPTTSEDSNPTLVLLQNSLEAEDEAVVTCAR	OHLGR-----YTYGNDY	WOQGLVTVSS 278
抗体 29	NS-1310	HC	7A1041	EPTTSEDSNPTLVLLQNSLEAEDEAVVTCAR	OHLGR-----DYSGNDY	WOQGLVTVSS 296
抗体 30	NS-1008	HC	7A1042	EPTTSEDSNPTLVLLQNSLEAEDEAVVTCAR	OHLGR-----DYSGNDY	WOQGLVTVSS 296
抗体 31	NS-1009	HC	7A1043	EPTTSEDSNPTLVLLQNSLEAEDEAVVTCAR	OHLGR-----DYSGNDY	WOQGLVTVSS 297
抗体 32	NS-1009	HC	7A1043	EPTTSEDSNPTLVLLQNSLEAEDEAVVTCAR	OHLGR-----DYSGNDY	WOQGLVTVSS 297
抗体 33	NS-1041	HC	7A1045	EPTTSEDSNPTLVLLQNSLEAEDEAVVTCAR	OHLGR-----DYSGNDY	WOQGLVTVSS 299
抗体 34	NS-1043	HC	9H641	EPTTSEDSNPTLVLLQNSLEAEDEAVVTCAR	OHLGR-----DYSGNDY	WOQGLVTVSS 300
抗体 35	NS-1044	HC	9H642	EPTTSEDSNPTLVLLQNSLEAEDEAVVTCAR	OHLGR-----DYSGNDY	WOQGLVTVSS 301
抗体 36	NS-1806	HC	9H643	EPTTSEDSNPTLVLLQNSLEAEDEAVVTCAR	OHLGR-----DYSGNDY	WOQGLVTVSS 302
抗体 37	NS-1045	HC	9H644	EPTTSEDSNPTLVLLQNSLEAEDEAVVTCAR	OHLGR-----DYSGNDY	WOQGLVTVSS 303
抗体 38	NS-1045	HC	9H644	EPTTSEDSNPTLVLLQNSLEAEDEAVVTCAR	OHLGR-----DYSGNDY	WOQGLVTVSS 303
抗体 39	NS-1047	HC	9H646	EPTTSEDSNPTLVLLQNSLEAEDEAVVTCAR	OHLGR-----DYSGNDY	WOQGLVTVSS 305
抗体 40	NS-1048	HC	35C941	EPTTSEDSNPTLVLLQNSLEAEDEAVVTCAR	OHLGR-----YTYGNDY	WOQGLVTVSS 306
抗体 41	NS-1308	HC	35C942	EPTTSEDSNPTLVLLQNSLEAEDEAVVTCAR	OHLGR-----YTYGNDY	WOQGLVTVSS 307
抗体 42	NS-1049	HC	35C943	EPTTSEDSNPTLVLLQNSLEAEDEAVVTCAR	OHLGR-----YTYGNDY	WOQGLVTVSS 308
抗体 43	NS-1050	HC	35C944	EPTTSEDSNPTLVLLQNSLEAEDEAVVTCAR	OHLGR-----YTYGNDY	WOQGLVTVSS 309
抗体 44	NS-1050	HC	35C944	EPTTSEDSNPTLVLLQNSLEAEDEAVVTCAR	OHLGR-----YTYGNDY	WOQGLVTVSS 309
抗体 45	NS-1052	HC	41G541	EPTTSEDSNPTLVLLQNSLEAEDEAVVTCAR	OHLGR-----YTYGNDY	WOQGLVTVSS 313
抗体 46	NS-1309	HC	41G542	EPTTSEDSNPTLVLLQNSLEAEDEAVVTCAR	OHLGR-----YTYGNDY	WOQGLVTVSS 313
抗体 47	NS-1053	HC	41G543	EPTTSEDSNPTLVLLQNSLEAEDEAVVTCAR	OHLGR-----YTYGNDY	WOQGLVTVSS 314
抗体 48	NS-1054	HC	41G544	EPTTSEDSNPTLVLLQNSLEAEDEAVVTCAR	OHLGR-----YTYGNDY	WOQGLVTVSS 314
抗体 49	NS-1055	HC	41G545	EPTTSEDSNPTLVLLQNSLEAEDEAVVTCAR	OHLGR-----YTYGNDY	WOQGLVTVSS 315
抗体 50	NS-1055	HC	41G545	EPTTSEDSNPTLVLLQNSLEAEDEAVVTCAR	OHLGR-----YTYGNDY	WOQGLVTVSS 315
抗体 51	NS-1241	HC	45A941	EPTTSEDSNPTLVLLQNSLEAEDEAVVTCAR	OHLGR-----YTYGNDY	WOQGLVTVSS 280
抗体 52	NS-1002	HC	51F41	EPTTSEDSNPTLVLLQNSLEAEDEAVVTCAR	ELPTYS-----SHFGDP	WOQGLVTVSS 281
抗体 53	NS-1005	HC	51F45	EPTTSEDSNPTLVLLQNSLEAEDEAVVTCAR	ELPTYS-----SHFGDP	WOQGLVTVSS 284
抗体 54	NS-1807	HC	51F45	EPTTSEDSNPTLVLLQNSLEAEDEAVVTCAR	ELPTYS-----SHFGDP	WOQGLVTVSS 284
抗体 55	NS-1013	HC	51F43	EPTTSEDSNPTLVLLQNSLEAEDEAVVTCAR	ELPTYS-----SHFGDP	WOQGLVTVSS 283
抗体 56	NS-1017	HC	51F43	EPTTSEDSNPTLVLLQNSLEAEDEAVVTCAR	ELPTYS-----SHFGDP	WOQGLVTVSS 283
抗体 57	NS-1017	HC	51F44	EPTTSEDSNPTLVLLQNSLEAEDEAVVTCAR	ELPTYS-----SHFGDP	WOQGLVTVSS 285
抗体 58	NS-1019	HC	51F49	EPTTSEDSNPTLVLLQNSLEAEDEAVVTCAR	ELPTYS-----SHFGDP	WOQGLVTVSS 287
抗体 59	NS-1020	HC	51F411	EPTTSEDSNPTLVLLQNSLEAEDEAVVTCAR	ELPTYS-----SHFGDP	WOQGLVTVSS 288
抗体 60	NS-1023	HC	51F413	EPTTSEDSNPTLVLLQNSLEAEDEAVVTCAR	ELPTYS-----SHFGDP	WOQGLVTVSS 289
抗体 61	NS-1024	HC	51F414	EPTTSEDSNPTLVLLQNSLEAEDEAVVTCAR	ELPTYS-----SHFGDP	WOQGLVTVSS 290
抗体 62	NS-1027	HC	51F417	EPTTSEDSNPTLVLLQNSLEAEDEAVVTCAR	ELPTYS-----SHFGDP	WOQGLVTVSS 291
抗体 63	NS-1028	HC	51F418	EPTTSEDSNPTLVLLQNSLEAEDEAVVTCAR	ELPTYS-----SHFGDP	WOQGLVTVSS 292
抗体 64	NS-1032	HC	51F422	EPTTSEDSNPTLVLLQNSLEAEDEAVVTCAR	ELPTYS-----SHFGDP	WOQGLVTVSS 294
抗体 65	NS-1032	HC	51F422	EPTTSEDSNPTLVLLQNSLEAEDEAVVTCAR	ELPTYS-----SHFGDP	WOQGLVTVSS 294
抗体 66	NS-1029	HC	51F419	EPTTSEDSNPTLVLLQNSLEAEDEAVVTCAR	ELPTYS-----SHFGDP	WOQGLVTVSS 293

【図 1 2 A】



【図 1 2 B】



【配列表】

0006515101000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
<i>C 1 2 N</i>	<i>5/10</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i> 5/10
<i>C 1 2 N</i>	<i>15/63</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i> 15/63 Z
<i>C 1 2 P</i>	<i>21/08</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 P</i> 21/08

(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

審査官 林 康子

(56)参考文献 特表２０１３－５０３６３２（ＪＰ，Ａ）
特開２００８－２７８８１４（ＪＰ，Ａ）
特表２０１０－５３３１８４（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 0 7 K 1 / 0 0 ~ 1 9 / 0 0
C a p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S / R E G I S T R Y
(STN)
P u b M e d
G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q
U n i P r o t / G e n e S e q