

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-534265
(P2024-534265A)

(43)公表日 令和6年9月18日(2024.9.18)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28	Z N A	4 B 0 6 4
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08		4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13		4 C 0 8 5
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z	4 H 0 4 5
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全157頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-537299(P2024-537299)	(71)出願人	524072662	イミュニタス セラピューティクス, インコーポレーテッド アメリカ合衆国 0 2 4 5 1 マサチューセッツ州, ウォルサム, ヒッコリー ドライブ 2 1	
(86)(22)出願日	令和4年8月23日(2022.8.23)	(74)代理人	110002572		
(85)翻訳文提出日	令和6年4月9日(2024.4.9)		弁理士法人平木国際特許事務所		
(86)国際出願番号	PCT/US2022/075370	(72)発明者	ティスデイル, アリソン		
(87)国際公開番号	WO2023/028501		アメリカ合衆国 0 2 4 7 8 マサチューセッツ州 ベルモント, ヒルサイド テラス 2 1	(72)発明者 ビアルチャ, ウリ アメリカ合衆国 0 1 8 9 0 - 2 2 1 9 マサチューセッツ州 ウィンチェスター 最終頁に続く	
(87)国際公開日	令和5年3月2日(2023.3.2)				
(31)優先権主張番号	63/236,122			(72)発明者 ビアルチャ, ウリ アメリカ合衆国 0 1 8 9 0 - 2 2 1 9 マサチューセッツ州 ウィンチェスター 最終頁に続く	
(32)優先日	令和3年8月23日(2021.8.23)				
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)			(72)発明者 ビアルチャ, ウリ アメリカ合衆国 0 1 8 9 0 - 2 2 1 9 マサチューセッツ州 ウィンチェスター 最終頁に続く	
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,				
	最終頁に続く				

(54)【発明の名称】 抗 C D 1 6 1 抗体及びその使用

(57)【要約】

本発明は、全般に、抗CD161抗体、このような抗体を含む医薬組成物、並びにCD161に関連するか若しくはCD161によって媒介される障害、例えば、ある特定のがんを治療するためにこのような抗体を使用する方法に関する。さらに、本発明はまた、これらの抗体を作製するための発現ベクター及び宿主細胞に関する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

軽鎖可変領域;及び

CDR-H1、CDR-H2、及びCDR-H3配列を含む重鎖可変領域を含む、単離された抗CD161抗体であって、

(a) CDR-H1配列が、FX₁FX₂X₃X₄AMS(配列番号1)であり;

(b) CDR-H2配列が、AISX₅X₆GGX₇TX₈YADSVKG(配列番号2)であり;且つ

(c) CDR-H3配列が、AKPLDSSX₉WADFX₁₀X₁₁(配列番号3)であり;

X₁が、T又はAであり;

X₂が、G、S、又はEであり;

X₃が、Q、T、P、又はRであり;

X₄が、Y又はFであり;

X₅が、A又はGであり;

X₆が、A、V、又はSであり;

X₇が、T又はSであり;

X₈が、K、A、又はYであり;

X₉が、Q、F、又はLであり;

X₁₀が、D又はQであり;且つ

X₁₁が、L又はAである、

単離された抗CD161抗体。

10

20

【請求項 2】

軽鎖可変領域が、CDR-L1、CDR-L2及びCDR-L3配列を含み、

(d) CDR-L1配列が、RASQX₁₂IX₁₃SWLA(配列番号4)であり;

(e) CDR-L2配列が、X₁₄ASX₁₅LQX₁₆(配列番号5)であり;且つ

(f) CDR-L3配列が、QQX₁₇X₁₈X₁₉LPIT(配列番号6)であり;

X₁₂が、G、D、又はTであり;

X₁₃が、D、S、又はYであり;

X₁₄が、A、Y、又はFであり;

X₁₅が、S、A、G、又はFであり;

X₁₆が、D又はSであり;

X₁₇が、A、H、又はQであり;

X₁₈が、S、D、W、又はLであり;且つ

X₁₉が、V、D、Y、又はKである、

請求項 1 に記載の単離された抗CD161抗体。

30

【請求項 3】

(a) CDR-H1配列が、配列番号8であり;

(b) CDR-H2配列が、配列番号9であり;且つ

(c) CDR-H3配列が、配列番号10である、

請求項 1 又は請求項 2 に記載の単離された抗CD161抗体。

【請求項 4】

(d) CDR-L1配列が、配列番号12であり;

(e) CDR-L2配列が、配列番号13であり;且つ

(f) CDR-L3配列が、配列番号14である、

請求項 3 に記載の単離された抗CD161抗体。

40

【請求項 5】

(a) CDR-H1配列が、配列番号16であり;

(b) CDR-H2配列が、配列番号17であり;且つ

(c) CDR-H3配列が、配列番号18である、

請求項 1 又は請求項 2 に記載の単離された抗CD161抗体。

【請求項 6】

50

- (d) CDR-L1 配列が、配列番号 20 であり;
- (e) CDR-L2 配列が、配列番号 21 であり; 且つ
- (f) CDR-L3 配列が、配列番号 22 である、

請求項 5 に記載の単離された抗 CD161 抗体。

【請求項 7】

- (a) CDR-H1 配列が、配列番号 24 であり;
- (b) CDR-H2 配列が、配列番号 25 であり; 且つ
- (c) CDR-H3 配列が、配列番号 26 である、

請求項 1 又は請求項 2 に記載の単離された抗 CD161 抗体。

【請求項 8】

- (d) CDR-L1 配列が、配列番号 28 であり;
- (e) CDR-L2 配列が、配列番号 29 であり; 且つ
- (f) CDR-L3 配列が、配列番号 30 である、

請求項 7 に記載の単離された抗 CD161 抗体。

【請求項 9】

- (a) CDR-H1 配列が、配列番号 32 であり;
- (b) CDR-H2 配列が、配列番号 33 であり; 且つ
- (c) CDR-H3 配列が、配列番号 34 である、

請求項 1 又は請求項 2 に記載の単離された抗 CD161 抗体。

【請求項 10】

- (d) CDR-L1 配列が、配列番号 36 であり;
- (e) CDR-L2 配列が、配列番号 37 であり; 且つ
- (f) CDR-L3 配列が、配列番号 38 である、

請求項 9 に記載の単離された抗 CD161 抗体。

【請求項 11】

- (a) CDR-H1 配列が、配列番号 40 であり;
- (b) CDR-H2 配列が、配列番号 41 であり; 且つ
- (c) CDR-H3 配列が、配列番号 42 である、

請求項 1 又は請求項 2 に記載の単離された抗 CD161 抗体。

【請求項 12】

- (d) CDR-L1 配列が、配列番号 44 であり;
- (e) CDR-L2 配列が、配列番号 45 であり; 且つ
- (f) CDR-L3 配列が、配列番号 46 である、

請求項 11 に記載の単離された抗 CD161 抗体。

【請求項 13】

- (a) CDR-H1 配列が、配列番号 48 であり;
- (b) CDR-H2 配列が、配列番号 49 であり; 且つ
- (c) CDR-H3 配列が、配列番号 50 である、

請求項 1 又は請求項 2 に記載の単離された抗 CD161 抗体。

【請求項 14】

- (d) CDR-L1 配列が、配列番号 52 であり;
- (e) CDR-L2 配列が、配列番号 53 であり; 且つ
- (f) CDR-L3 配列が、配列番号 54 である、

請求項 13 に記載の単離された抗 CD161 抗体。

【請求項 15】

- (a) CDR-H1 配列が、配列番号 56 であり;
- (b) CDR-H2 配列が、配列番号 57 であり; 且つ
- (c) CDR-H3 配列が、配列番号 58 である、

請求項 1 又は請求項 2 に記載の単離された抗 CD161 抗体。

【請求項 16】

10

20

30

40

50

- (d) CDR-L1配列が、配列番号60であり;
- (e) CDR-L2配列が、配列番号61であり;且つ
- (f) CDR-L3配列が、配列番号62である、

請求項15に記載の単離された抗CD161抗体。

【請求項17】

- (a) CDR-H1配列が、配列番号64であり;
- (b) CDR-H2配列が、配列番号65であり;且つ
- (c) CDR-H3配列が、配列番号66である、

請求項1又は請求項2に記載の単離された抗CD161抗体。

【請求項18】

- (d) CDR-L1配列が、配列番号68であり;
- (e) CDR-L2配列が、配列番号69であり;且つ
- (f) CDR-L3配列が、配列番号70である、

請求項17に記載の単離された抗CD161抗体。

【請求項19】

- (a) CDR-H1配列が、配列番号72であり;
- (b) CDR-H2配列が、配列番号73であり;且つ
- (c) CDR-H3配列が、配列番号74である、

請求項1又は請求項2に記載の単離された抗CD161抗体。

【請求項20】

- (d) CDR-L1配列が、配列番号76であり;
- (e) CDR-L2配列が、配列番号77であり;且つ
- (f) CDR-L3配列が、配列番号78である、

請求項19に記載の単離された抗CD161抗体。

【請求項21】

- (a) CDR-H1配列が、配列番号80であり;
- (b) CDR-H2配列が、配列番号81であり;且つ
- (c) CDR-H3配列が、配列番号82である、

請求項1又は請求項2に記載の単離された抗CD161抗体。

【請求項22】

- (d) CDR-L1配列が、配列番号84であり;
- (e) CDR-L2配列が、配列番号85であり;且つ
- (f) CDR-L3配列が、配列番号86である、

請求項21に記載の単離された抗CD161抗体。

【請求項23】

- (a) CDR-H1配列が、配列番号88であり;
- (b) CDR-H2配列が、配列番号89であり;且つ
- (c) CDR-H3配列が、配列番号90である、

請求項1又は請求項2に記載の単離された抗CD161抗体。

【請求項24】

- (d) CDR-L1配列が、配列番号92であり;
- (e) CDR-L2配列が、配列番号93であり;且つ
- (f) CDR-L3配列が、配列番号94である、

請求項23に記載の単離された抗CD161抗体。

【請求項25】

重鎖可変領域が、アミノ酸配列:EVQLLES_{GGGLVQPGGSLRL}SCAASGFX₁FX₂X₃X₄
AMSWVRQAPGKGLEWVSAISX₅X₆GGX₇TX₈YADSVKGRFTISRDN_{SKNTLYLQMN}
SLRAEDTAVYYCAKPLDSSX₉WADFX₁₀X₁₁WGRGTLVTVSS(配列番号188)を含み、
X₁が、T又はAであり;
X₂が、G、S、又はEであり;

10

20

30

40

50

X₃が、Q、T、P、又はRであり；
X₄が、Y又はFであり；
X₅が、A又はGであり；
X₆が、A、V、又はSであり；
X₇が、T又はSであり；
X₈が、K、A、又はYであり；
X₉が、Q、F、又はLであり；
X₁₀が、D又はQであり；且つ
X₁₁が、L又はAである、

請求項 1 又は 2 に記載の単離された抗CD161抗体。

10

【請求項 2 6】

軽鎖可変領域が、アミノ酸配列:DIQX_aTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQX₁₂I_{X13}SWLAWYQQKPGKAPKX_bLIYX₁₄ASX₁₅LQX₁₆GVPSRFSGSGSGTDFTLTIX_cSLQPEDFATYYCQQX₁₇X₁₈X₁₉LPITFGGGTKVEIK(配列番号189)を含み、

X₁₂が、G、D、又はTであり；
X₁₃が、D、S、又はYであり；
X₁₄が、A、Y、又はFであり；
X₁₅が、S、A、G、又はFであり；
X₁₆が、D又はSであり；
X₁₇が、A、H、又はQであり；
X₁₈が、S、D、W、又はLであり；
X₁₉が、V、D、Y、又はKであり；
X_aが、M又はLであり；
X_bが、L又はFであり；且つ
X_cが、S又はNである、

請求項 2 5 に記載の単離された抗CD161抗体。

20

【請求項 2 7】

重鎖可変領域が、配列番号7、配列番号15、配列番号23、配列番号31、配列番号39、配列番号47、配列番号55、配列番号63、配列番号71、配列番号79、及び配列番号87からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 2 6 のいずれか一項に記載の単離された抗CD161抗体。

30

【請求項 2 8】

軽鎖可変領域が、配列番号11、配列番号19、配列番号27、配列番号35、配列番号43、配列番号51、配列番号59、配列番号67、配列番号75、配列番号83、及び配列番号91からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 2 7 のいずれか一項に記載の単離された抗CD161抗体。

【請求項 2 9】

重鎖可変領域が、配列番号7の配列を含み、且つ軽鎖可変領域が、配列番号11の配列を含む、請求項 1 ~ 2 8 のいずれか一項に記載の単離された抗CD161抗体。

【請求項 3 0】

重鎖可変領域が、配列番号15の配列を含み、且つ軽鎖可変領域が、配列番号19の配列を含む、請求項 1 ~ 2 9 のいずれか一項に記載の単離された抗CD161抗体。

40

【請求項 3 1】

重鎖可変領域が、配列番号7の配列を含み、且つ軽鎖可変領域が、配列番号11の配列を含む、請求項 1 ~ 3 0 のいずれか一項に記載の単離された抗CD161抗体。

【請求項 3 2】

重鎖可変領域が、配列番号23の配列を含み、且つ軽鎖可変領域が、配列番号27の配列を含む、請求項 1 ~ 3 1 のいずれか一項に記載の単離された抗CD161抗体。

【請求項 3 3】

重鎖可変領域が、配列番号31の配列を含み、且つ軽鎖可変領域が、配列番号35の配列

50

を含む、請求項 1 ~ 3 2 のいずれか一項に記載の単離された抗CD161抗体。

【請求項 3 4】

重鎖可変領域が、配列番号39の配列を含み、且つ軽鎖可変領域が、配列番号43の配列を含む、請求項 1 ~ 3 3 のいずれか一項に記載の単離された抗CD161抗体。

【請求項 3 5】

重鎖可変領域が、配列番号47の配列を含み、且つ軽鎖可変領域が、配列番号51の配列を含む、請求項 1 ~ 3 4 のいずれか一項に記載の単離された抗CD161抗体。

【請求項 3 6】

重鎖可変領域が、配列番号55の配列を含み、且つ軽鎖可変領域が、配列番号59の配列を含む、請求項 1 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の単離された抗CD161抗体。

10

【請求項 3 7】

重鎖可変領域が、配列番号63の配列を含み、且つ軽鎖可変領域が、配列番号67の配列を含む、請求項 1 ~ 3 6 のいずれか一項に記載の単離された抗CD161抗体。

【請求項 3 8】

重鎖可変領域が、配列番号71の配列を含み、且つ軽鎖可変領域が、配列番号75の配列を含む、請求項 1 ~ 3 7 のいずれか一項に記載の単離された抗CD161抗体。

【請求項 3 9】

重鎖可変領域が、配列番号79の配列を含み、且つ軽鎖可変領域が、配列番号83の配列を含む、請求項 1 ~ 3 8 のいずれか一項に記載の単離された抗CD161抗体。

【請求項 4 0】

重鎖可変領域が、配列番号87の配列を含み、且つ軽鎖可変領域が、配列番号91の配列を含む、請求項 1 ~ 3 9 のいずれか一項に記載の単離された抗CD161抗体。

20

【請求項 4 1】

軽鎖可変領域;及び

CDR-H1、CDR-H2、及びCDR-H3配列を含む重鎖可変領域を含む、単離された抗CD161抗体であって、

(a)CDR-H1配列が、FTFX₁X₂YYMS(配列番号95)であり;

(b)CDR-H2配列が、YISPSGX₃TIX₄YADSVKG(配列番号96)であり;且つ

(c)CDR-H3配列が、ARSLMX₅TGTHLYFDL(配列番号97)であり;

X₁が、G、A、P、又はSであり;

30

X₂が、N、Q、又はDであり;

X₃が、A又はSであり;

X₄が、Y又はAであり;且つ

X₅が、A又はSである、

単離された抗CD161抗体。

【請求項 4 2】

軽鎖可変領域が、CDR-L1、CDR-L2及びCDR-L3配列を含み、

(a)CDR-L1配列が、RASX₆X₇ISX₈WLA(配列番号98)であり;

(b)CDR-L2配列が、AAX₉X₁₀LQS(配列番号99)であり;且つ

(c)CDR-L3配列が、QQX₁₁TSX₁₂X₁₃PYT(配列番号100)であり;

40

X₆が、Q又はSであり;

X₇が、D又はGであり;

X₈が、D又はSであり;

X₉が、E又はSであり;

X₁₀が、S、A、G、V、又はEであり;

X₁₁が、A、S、又はVであり;

X₁₂が、F、T、V、Q、又はAであり;且つ

X₁₃が、L又はPである、

請求項 4 1 に記載の単離された抗CD161抗体。

【請求項 4 3】

50

- (a) CDR-H1 配列が、配列番号 102 であり;
- (b) CDR-H2 配列が、配列番号 103 であり; 且つ
- (c) CDR-H3 配列が、配列番号 104 である、

請求項 4 1 又は請求項 4 2 に記載の単離された抗 CD161 抗体。

【請求項 4 4】

- (d) CDR-L1 配列が、配列番号 106 であり;
- (e) CDR-L2 配列が、配列番号 107 であり; 且つ
- (f) CDR-L3 配列が、配列番号 108 である、

請求項 4 3 に記載の単離された抗 CD161 抗体。

【請求項 4 5】

- (a) CDR-H1 配列が、配列番号 110 であり;
- (b) CDR-H2 配列が、配列番号 111 であり; 且つ
- (c) CDR-H3 配列が、配列番号 112 である、

請求項 4 1 又は請求項 4 2 に記載の単離された抗 CD161 抗体。

【請求項 4 6】

- (d) CDR-L1 配列が、配列番号 114 であり;
- (e) CDR-L2 配列が、配列番号 115 であり; 且つ
- (f) CDR-L3 配列が、配列番号 116 である、

請求項 4 5 に記載の単離された抗 CD161 抗体。

【請求項 4 7】

- (a) CDR-H1 配列が、配列番号 118 であり;
- (b) CDR-H2 配列が、配列番号 119 であり; 且つ
- (c) CDR-H3 配列が、配列番号 120 である、

請求項 4 1 又は請求項 4 2 に記載の単離された抗 CD161 抗体。

【請求項 4 8】

- (d) CDR-L1 配列が、配列番号 122 であり;
- (e) CDR-L2 配列が、配列番号 123 であり; 且つ
- (f) CDR-L3 配列が、配列番号 124 である、

請求項 4 7 に記載の単離された抗 CD161 抗体。

【請求項 4 9】

- (a) CDR-H1 配列が、配列番号 126 であり;
- (b) CDR-H2 配列が、配列番号 127 であり; 且つ
- (c) CDR-H3 配列が、配列番号 128 である、

請求項 4 1 又は請求項 4 2 に記載の単離された抗 CD161 抗体。

【請求項 5 0】

- (d) CDR-L1 配列が、配列番号 130 であり;
- (e) CDR-L2 配列が、配列番号 131 であり; 且つ
- (f) CDR-L3 配列が、配列番号 132 である、

請求項 4 9 に記載の単離された抗 CD161 抗体。

【請求項 5 1】

- (a) CDR-H1 配列が、配列番号 134 であり;
- (b) CDR-H2 配列が、配列番号 135 であり; 且つ
- (c) CDR-H3 配列が、配列番号 136 である、

請求項 4 1 又は請求項 4 2 に記載の単離された抗 CD161 抗体。

【請求項 5 2】

- (d) CDR-L1 配列が、配列番号 138 であり;
- (e) CDR-L2 配列が、配列番号 139 であり; 且つ
- (f) CDR-L3 配列が、配列番号 140 である、

請求項 5 1 に記載の単離された抗 CD161 抗体。

【請求項 5 3】

10

20

30

40

50

- (a) CDR-H1 配列が、配列番号 142 であり;
- (b) CDR-H2 配列が、配列番号 143 であり; 且つ
- (c) CDR-H3 配列が、配列番号 144 である、

請求項 4 1 又は請求項 4 2 に記載の単離された抗 CD161 抗体。

【請求項 5 4】

- (d) CDR-L1 配列が、配列番号 146 であり;
- (e) CDR-L2 配列が、配列番号 147 であり; 且つ
- (f) CDR-L3 配列が、配列番号 148 である、

請求項 5 3 に記載の単離された抗 CD161 抗体。

【請求項 5 5】

- (a) CDR-H1 配列が、配列番号 150 であり;
- (b) CDR-H2 配列が、配列番号 151 であり; 且つ
- (c) CDR-H3 配列が、配列番号 152 である、

請求項 4 1 又は請求項 4 2 に記載の単離された抗 CD161 抗体。

【請求項 5 6】

- (d) CDR-L1 配列が、配列番号 154 であり;
- (e) CDR-L2 配列が、配列番号 155 であり; 且つ
- (f) CDR-L3 配列が、配列番号 156 である、

請求項 5 5 に記載の単離された抗 CD161 抗体。

【請求項 5 7】

- (a) CDR-H1 配列が、配列番号 158 であり;
- (b) CDR-H2 配列が、配列番号 159 であり; 且つ
- (c) CDR-H3 配列が、配列番号 160 である、

請求項 4 1 又は請求項 4 2 に記載の単離された抗 CD161 抗体。

【請求項 5 8】

- (d) CDR-L1 配列が、配列番号 162 であり;
- (e) CDR-L2 配列が、配列番号 163 であり; 且つ
- (f) CDR-L3 配列が、配列番号 164 である、

請求項 5 7 に記載の単離された抗 CD161 抗体。

【請求項 5 9】

- (a) CDR-H1 配列が、配列番号 166 であり;
- (b) CDR-H2 配列が、配列番号 167 であり; 且つ
- (c) CDR-H3 配列が、配列番号 168 である、

請求項 4 1 又は請求項 4 2 に記載の単離された抗 CD161 抗体。

【請求項 6 0】

- (d) CDR-L1 配列が、配列番号 170 であり;
- (e) CDR-L2 配列が、配列番号 171 であり; 且つ
- (f) CDR-L3 配列が、配列番号 172 である、

請求項 5 9 に記載の単離された抗 CD161 抗体。

【請求項 6 1】

重鎖可変領域が、アミノ酸配列: QVQLVESGGLVX_aPGGSLRLSCAASGFTFX₁X₂Y
YMSWIRQAPGKGLEWVSYPSPGX₃TIX₄YADSVKGRFTISRDNX_bKNX_cLYLQMNS
LRAEDTAVYYCARSLMX₅TGTHLYFDLWGRGTLTVTVSS (配列番号 190) を含み、

- X₁ が、G、A、P、又は S であり;
- X₂ が、N、Q、又は D であり;
- X₃ が、A 又は S であり;
- X₄ が、Y 又は A であり;
- X₅ が、A 又は S であり;
- X_a が、K 又は Q であり;
- X_b が、A 又は S であり; 且つ

10

20

30

40

50

X_cが、S又はTである、

請求項 4 1 又は 4 2 に記載の単離された抗CD161抗体。

【請求項 6 2】

軽鎖可変領域が、アミノ酸配列:DIQLTQSPSSVSASVGDRVITTC RASX₆X₇ISX₈WLAWYQQKPGKAPKLLIYAAX₉X₁₀LQS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YC QQX₁₁TSX₁₂X₁₃PYTFGGGTKVEIK(配列番号191)を含み、

X₆が、Q又はSであり;

X₇が、D又はGであり;

X₈が、D又はSであり;

X₉が、E又はSであり;

X₁₀が、S、A、G、V、又はEであり;

X₁₁が、A、S、又はVであり;

X₁₂が、F、T、V、Q、又はAであり;且つ

X₁₃が、L又はPである、

請求項 6 1 に記載の単離された抗CD161抗体。

【請求項 6 3】

重鎖可変領域が、配列番号101、配列番号109、配列番号117、配列番号125、配列番号133、配列番号141、配列番号149、配列番号157、及び配列番号165からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 4 1 ~ 6 2 のいずれか一項に記載の単離された抗CD161抗体。

【請求項 6 4】

軽鎖可変領域が、配列番号105、配列番号113、配列番号121、配列番号129、配列番号137、配列番号145、配列番号153、配列番号161、及び配列番号169からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 4 1 ~ 6 2 のいずれか一項に記載の単離された抗CD161抗体。

【請求項 6 5】

重鎖可変領域が、配列番号101の配列を含み、且つ軽鎖可変領域が、配列番号105の配列を含む、請求項 4 1 ~ 6 4 のいずれか一項に記載の単離された抗CD161抗体。

【請求項 6 6】

重鎖可変領域が、配列番号109の配列を含み、且つ軽鎖可変領域が、配列番号113の配列を含む、請求項 4 1 ~ 6 4 のいずれか一項に記載の単離された抗CD161抗体。

【請求項 6 7】

重鎖可変領域が、配列番号117の配列を含み、且つ軽鎖可変領域が、配列番号121の配列を含む、請求項 4 1 ~ 6 4 のいずれか一項に記載の単離された抗CD161抗体。

【請求項 6 8】

重鎖可変領域が、配列番号125の配列を含み、且つ軽鎖可変領域が、配列番号129の配列を含む、請求項 4 1 ~ 6 4 のいずれか一項に記載の単離された抗CD161抗体。

【請求項 6 9】

重鎖可変領域が、配列番号133の配列を含み、且つ軽鎖可変領域が、配列番号137の配列を含む、請求項 4 1 ~ 6 4 のいずれか一項に記載の単離された抗CD161抗体。

【請求項 7 0】

重鎖可変領域が、配列番号141の配列を含み、且つ軽鎖可変領域が、配列番号145の配列を含む、請求項 4 1 ~ 6 4 のいずれか一項に記載の単離された抗CD161抗体。

【請求項 7 1】

重鎖可変領域が、配列番号149の配列を含み、且つ軽鎖可変領域が、配列番号153の配列を含む、請求項 4 1 ~ 6 4 のいずれか一項に記載の単離された抗CD161抗体。

【請求項 7 2】

重鎖可変領域が、配列番号157の配列を含み、且つ軽鎖可変領域が、配列番号161の配列を含む、請求項 4 1 ~ 6 4 のいずれか一項に記載の単離された抗CD161抗体。

【請求項 7 3】

10

20

30

40

50

重鎖可変領域が、配列番号165の配列を含み、且つ軽鎖可変領域が、配列番号169の配列を含む、請求項41～64のいずれか一項に記載の単離された抗CD161抗体。

【請求項74】

抗体が、モノクローナル抗体である、請求項1～73のいずれか一項に記載の単離された抗CD161抗体。

【請求項75】

抗体が、多特異性である、請求項1～74のいずれか一項に記載の単離された抗CD161抗体。

【請求項76】

抗体が、Fab、Fab'、F(Ab')₂、Fv、scFv、(scFv)₂、単鎖抗体分子、二重可変ドメイン抗体、単一可変ドメイン抗体、直鎖状抗体、又はVドメイン抗体である、請求項1～75のいずれか一項に記載の単離された抗CD161抗体。

【請求項77】

抗体が、足場を含む、請求項1～76のいずれか一項に記載の単離された抗CD161抗体。

【請求項78】

足場が、Fcである、請求項77に記載の単離された抗CD161抗体。

【請求項79】

足場が、ヒトFcである、請求項78に記載の単離された抗CD161抗体。

【請求項80】

抗体が、IgG、IgA、IgD、IgE、及びIgMからなる群から選択されるクラスの重鎖定常領域を含む、請求項1～79のいずれか一項に記載の単離された抗CD161抗体。

【請求項81】

抗体が、クラスIgGの、且つIgG₁、IgG₂、IgG₃、及びIgG₄からなる群から選択されるサブクラスの重鎖定常領域を含む、請求項80に記載の単離された抗CD161抗体。

【請求項82】

モノクローナル抗体が、非グリコシル化ヒトIgG1抗体である、請求項74～81のいずれか一項に記載の単離された抗CD161抗体。

【請求項83】

モノクローナル抗体が、EU番号付けに従ってアミノ酸位置N297において改変を有するIgG1 Fc領域を含む、請求項82に記載の単離された抗CD161抗体。

【請求項84】

変異が、N297Aである、請求項83に記載の単離された抗CD161抗体。

【請求項85】

CD161への結合について、請求項1～84のいずれか一項に記載の抗CD161抗体と競合する、単離された抗体。

【請求項86】

請求項1～85のいずれか一項に記載の抗CD161抗体によって結合されるCD161エピトープに特異的に結合する、単離された抗体。

【請求項87】

抗体が、CD161への結合について、CLEC2Dと競合する、請求項1～86のいずれか一項に記載の単離された抗CD161抗体。

【請求項88】

抗体が、CD161へのCLEC2Dの結合によるCD161阻害性シグナル伝達を低減する、請求項1～86のいずれか一項に記載の単離された抗CD161抗体。

【請求項89】

CD161が、細胞の表面上に発現する、請求項87又は請求項88に記載の単離された抗CD161抗体。

【請求項90】

細胞が、T細胞又はNK細胞である、請求項89に記載の単離された抗CD161抗体。

10

20

30

40

50

【請求項 9 1】

前記細胞が、ヒト細胞又はカニクイザル細胞である、請求項 8 9 又は 9 0 に記載の単離された抗 CD161 抗体。

【請求項 9 2】

抗体が、CD161 への CLEC2D 結合による T 細胞又は NK 細胞活性の抑制を低減する、請求項 9 0 又は 9 1 に記載の単離された抗 CD161 抗体。

【請求項 9 3】

抗体が、抗体の非存在下における T 細胞又は NK 細胞活性と比較して、CLEC2D の存在下において該 T 細胞又は NK 細胞活性を増加させる、請求項 9 0 又は 9 1 に記載の単離された抗 CD161 抗体。

10

【請求項 9 4】

T 細胞又は NK 細胞が、CLEC2D を発現する細胞を含む微小環境内に配置される、請求項 9 0 又は 9 1 に記載の単離された抗 CD161 抗体。

【請求項 9 5】

抗体が、CLEC2D を発現する腫瘍細胞を含有する腫瘍微小環境において T 細胞又は NK 細胞活性を増加させる、請求項 9 0 又は 9 1 に記載の単離された抗 CD161 抗体。

【請求項 9 6】

T 細胞活性の前記増加が、NFAT シグナル伝達の増加によって決定される、請求項 9 3 又は請求項 9 5 に記載の単離された抗 CD161 抗体。

【請求項 9 7】

抗体が、1.5 nM ~ 4.1 nM の間の T 細胞活性化についての EC₅₀ 値を有する、請求項 9 3 ~ 9 6 のいずれか一項に記載の単離された抗 CD161 抗体。

20

【請求項 9 8】

NK 細胞活性の前記増加が、CD107a 発現の増加によって決定される、請求項 9 3 又は請求項 9 5 に記載の単離された抗 CD161 抗体。

【請求項 9 9】

抗体が、0.04 nM ~ 0.38 nM の間の NK 細胞活性化についての EC₅₀ 値を有する、請求項 9 3 ~ 9 8 のいずれか一項に記載の単離された抗 CD161 抗体。

【請求項 1 0 0】

抗体が、Octet QK384 アッセイによって測定した場合、10 nM、0.5 nM、1 nM、0.5 nM 又は 0.1 nM 以下の K_d でヒト CD161 に結合する、請求項 1 ~ 9 9 のいずれか一項に記載の単離された抗 CD161 抗体。

30

【請求項 1 0 1】

抗体が、Octet QK384 アッセイによって測定した場合、1e⁻⁸ ~ 1e⁻¹⁰ M の範囲の K_d でヒト CD161 に結合する、請求項 1 ~ 9 9 のいずれか一項に記載の単離された抗 CD161 抗体。

【請求項 1 0 2】

抗体が、5 nM 未満、1 nM 未満、又は 0.5 nM 未満の、CD161 を発現する HEK293 細胞についての EC₅₀ を有する、請求項 1 ~ 1 0 1 のいずれか一項に記載の単離された抗 CD161 抗体。

40

【請求項 1 0 3】

抗体又は抗原結合断片が、0.1 ~ 0.5 nM の範囲の、CD161 を発現する HEK293 細胞についての EC₅₀ を有する、請求項 1 ~ 1 0 1 のいずれか一項に記載の単離された抗 CD161 抗体又は抗原結合断片。

【請求項 1 0 4】

抗体が、0.1 ~ 10 nM の範囲の IC₅₀ で、細胞の表面上に発現した CD161 への CLEC2D 結合を低減する、請求項 1 ~ 1 0 3 のいずれか一項に記載の単離された抗 CD161 抗体。

【請求項 1 0 5】

抗体が、10 nM 未満、5 nM 未満、2 nM 未満、1 nM 未満、又は 0.5 nM 未満の IC₅₀ で、細胞の表面上に発現した CD161 への CLEC2D 結合を低減する、請求項 1 ~ 1 0 3 1 0 3

50

のいずれか一項に記載の単離された抗CD161抗体。

【請求項106】

抗体が、hKLRF1、hKLRF2、hCLEC12B、hCLEC2D、又はそれらの任意の組み合わせについて、1,000nMよりも大きい K_d を有する、請求項1～105のいずれか一項に記載の単離された抗CD161抗体。

【請求項107】

抗体が、飽和抗体条件下でCD161に結合した抗体と比較して、2%未満、1.5%未満、1.2%未満、1.1%未満、又は1%未満のCD161ホモログの集団に結合する、請求項1～106のいずれか一項に記載の単離された抗CD161抗体。

【請求項108】

CD161ホモログの集団が、CLEC2D、KLRF1、KLRF2、CLEC12B、又はそれらの任意の組み合わせを含む、請求項107に記載の単離された抗CD161抗体。

【請求項109】

抗体が、ヒトCD161及びカニクイザルCD161に結合し、ヒトCD161及びカニクイザルCD161に対する抗体の結合親和性が、5倍、10倍、20倍、50倍、又は100倍以下異なる、請求項1～106のいずれか一項に記載の単離された抗CD161抗体。

【請求項110】

抗体が、ヒトCD161及びカニクイザルCD161に結合し、ヒトCD161及びカニクイザルCD161に対する抗体の結合アビディティが、5倍、10倍、20倍、50倍、又は100倍以下異なる、請求項1～109のいずれか一項に記載の単離された抗CD161抗体。

【請求項111】

請求項1～110のいずれか一項に記載の抗体及び薬学的に許容される担体を含む、医薬組成物。

【請求項112】

請求項1～107のいずれか一項に記載の抗体、その V_H 、その V_L 、その軽鎖、その重鎖、又はその抗原結合部分をコードする、単離された単数のポリヌクレオチド又は複数のポリヌクレオチド。

【請求項113】

請求項112に記載の単数のポリヌクレオチド又は複数のポリヌクレオチドを含む、単数のベクター又は複数のベクター。

【請求項114】

請求項112に記載の単数のポリヌクレオチド又は複数のポリヌクレオチド、又は請求項113に記載の複数のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項115】

請求項114に記載の宿主細胞で抗体を発現させるステップ、及び発現した抗体を単離するステップを含む、抗体を生成する方法。

【請求項116】

請求項1～110のいずれか一項に記載の抗体、若しくは請求項111に記載の医薬組成物、並びに使用のための説明書を含む、キット。

【請求項117】

がんの治療を必要とする対象におけるがんを治療する方法であって、有効量の請求項1～110のいずれか一項に記載の抗CD161抗体又は有効量の請求項111に記載の医薬組成物を対象に投与するステップを含む、方法。

【請求項118】

がんが、腫瘍微小環境におけるがん細胞又は他の細胞によるCLEC2Dの発現を特徴とする、請求項117に記載の方法。

【請求項119】

がんが、腫瘍微小環境におけるがん細胞又は他の細胞によるCLEC2Dの発現の増加を特徴とする、請求項117に記載の方法。

【請求項120】

10

20

30

40

50

がんが、黒色腫、肺がん、神経膠腫、大腸がん、及び肝臓がんからなる群から選択される、請求項 1 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 2 1】

腫瘍増殖の低減又は阻害を必要とする対象における腫瘍増殖を低減又は阻害する方法であって、有効量の請求項 1 ~ 1 1 0 のいずれか一項に記載の抗 CD161 抗体又は有効量の請求項 1 1 1 に記載の医薬組成物を対象に投与するステップを含む、方法。

【請求項 1 2 2】

ヒト CD161 と CLEC2D との間の相互作用の阻害又は遮断を必要とする対象におけるヒト CD161 と CLEC2D との間の相互作用を阻害又は遮断する方法であって、有効量の請求項 1 ~ 1 1 0 のいずれか一項に記載の抗 CD161 抗体又は有効量の請求項 1 1 1 に記載の医薬組成物を対象に投与するステップを含む、方法。

10

【請求項 1 2 3】

免疫細胞活性化の誘導又は増強を必要とする対象における免疫細胞活性化を誘導又は増強する方法であって、有効量の請求項 1 ~ 1 1 0 のいずれか一項に記載の抗 CD161 抗体又は有効量の請求項 1 1 1 に記載の医薬組成物を対象に投与するステップを含む、方法。

【請求項 1 2 4】

免疫細胞活性化が、腫瘍微小環境で生じる、請求項 1 2 3 に記載の方法。

【請求項 1 2 5】

免疫細胞が、T細胞又はNK細胞である、請求項 1 2 3 又は 1 2 4 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、2021年8月23日に出願された米国仮特許出願第63/236,122号の利益及び優先権を主張し、その開示内容は、あらゆる目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0 0 0 2】

配列表

本出願は、XML形式で電子的に提出された配列表を含む。配列表XMLは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。2022年8月11日に作成されたXMLファイルは、I

30

MT-001WO_SL.xmlと名付けられ、206,992バイトのサイズである。

【0 0 0 3】

発明の分野

本発明は、全般に、抗CD161抗体、これらの抗体を含む医薬組成物、並びにCD161に関連するか若しくはCD161によって媒介される障害、例えば、ある特定のがんを治療するためにこれらの抗体を使用する方法に関する。さらに、本発明はまた、これらの抗体を作製するための発現ベクター及び宿主細胞に関する。

【背景技術】

【0 0 0 4】

抗体指向性治療アプローチによる免疫細胞チェックポイント受容体のモジュレーションは、過去10年間にわたって関心を集めている。これらの受容体の多くは、T細胞チェックポイントモジュレーションに関与している。しかし、特に、B細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、及び骨髄系細胞のチェックポイントモジュレーションは、非常に望ましく、注目を集めている。NK細胞は、広範囲の標的細胞、例えば腫瘍細胞又はウイルス感染細胞を認識し、それに対する細胞傷害性を誘導する自然免疫の一部である。活性化されたNK細胞は、典型的には、細胞傷害性T細胞と同様の手段、すなわち、パーフォリン及びグランザイムを含有する細胞溶解性顆粒を介して、並びにデスレセプター経路を介して標的細胞を死滅させる。活性化されたNK細胞はまた、炎症性サイトカイン、例えば、IFN-

40

、及び標的組織への他の白血球の動員を促進するケモカインを分泌する。

【0 0 0 5】

50

NK細胞受容体(NKR)は、2つの主要な構造クラス:免疫グロブリンスーパーファミリー及びC型レクチン様(CLR)スーパーファミリーに分けられる。NKR-タンパク質1(NKR-P1)(例えば、CD161)は、重要な免疫調節遺伝子であり、且つ脾臓樹状細胞、T細胞のサブセット、及び顆粒球を含む様々な細胞型上で発現する、CLR膜貫通分子のファミリーである。レクチン様転写物1(LLT1)、C型レクチンドメインファミリー2メンバーD(CLEC2D)又は破骨細胞阻害性レクチン(OCIL)分子は、CD161受容体に対する同族リガンドであり、この相互作用は、NK細胞及びT細胞の機能を阻害する。CLEC2Dの6個のサブライスバリエーションがあり、アイソフォーム1は、NK細胞、T細胞、単球/マクロファージ、活性化B細胞及び樹状細胞上で発現し、且つヒトNK細胞活性化受容体として機能する、標準配列である。CLEC2Dのポリペプチド鎖は、N末端細胞質ドメイン、膜貫通ドメイン、ストーク領域、及びC末端CLR細胞外ドメインを含む、複数のドメインを含有し、2つの予測N-グリコシル化部位を有する。

10

【0006】

CLEC2DとCD161との間の相互作用は、対象の免疫系を回避するある特定の障害、例えば、ある特定のがんをもたらし得る。このような免疫回避又は逃避は、ヒト膠芽腫及び他の疾患で報告されている。さらに、胚中心B細胞上のCLEC2D発現は、NK細胞と抗原提示細胞(APC)との間のクロストークを調節すると考えられる。したがって、CLEC2D-CD161相互作用を遮断することにより、様々ながんを治療するための新しい治療選択肢が提供される。

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

CLEC2D-CD161相互作用の下流の細胞内シグナル伝達は十分に定義されていないが、CLEC2DとCD161との間の相互作用は、NK細胞及びT細胞の両方の機能を阻害することが示されている。ある特定のがんの治療においてなされてきた進歩にもかかわらず、ある特定のがん、とりわけ免疫系を回避するがんを治療するための新しく革新的な療法に対する必要性が依然として残っている。

【課題を解決するための手段】

【0008】

発明の概要

30

本発明は、とりわけ、ある特定のがんが対象の免疫系を回避するのを防止するために使用することができる、CLEC2D-CD161相互作用を破壊する高親和性抗CD161抗体の発見に部分的に基づく。

【0009】

したがって、一態様では、本開示は、軽鎖可変領域;及びCDR-H1、CDR-H2、及びCDR-H3配列を含む重鎖可変領域を含む、単離された抗CD161抗体であって、(a)CDR-H1配列が、FX₁FX₂X₃X₄AMS(配列番号1)であり;(b)CDR-H2配列が、AISX₅X₆GGX₇TX₈YADSVKG(配列番号2)であり;且つ(c)CDR-H3配列が、AKPLDSSX₉WADFX₁₀X₁₁(配列番号3)であり;X₁が、T又はAであり;X₂が、G、S、又はEであり;X₃が、Q、T、P、又はRであり;X₄が、Y又はFであり;X₅が、A又はGであり;X₆が、A、V、又はSであり;X₇が、T又はSであり;X₈が、K、A、又はYであり;X₉が、Q、F、又はLであり;X₁₀が、D又はQであり;且つX₁₁が、L又はAである、単離された抗CD161抗体を提供する。ある特定の実施形態では、軽鎖可変領域は、CDR-L1、CDR-L2及びCDR-L3配列を含み、(d)CDR-L1配列は、RASQX₁₂IX₁₃SWLA(配列番号4)であり;(e)CDR-L2配列は、X₁₄ASX₁₅LQX₁₆(配列番号5)であり;且つ(f)CDR-L3配列は、QQX₁₇X₁₈X₁₉LPIT(配列番号6)であり;X₁₂は、G、D、又はTであり;X₁₃は、D、S、又はYであり;X₁₄は、A、Y、又はFであり;X₁₅は、S、A、G、又はFであり;X₁₆は、D又はSであり;X₁₇は、A、H、又はQであり;X₁₈は、S、D、W、又はLであり;且つX₁₉は、V、D、Y、又はKである。

40

【0010】

いくつかの実施形態では、(a)CDR-H1配列は、配列番号8であり;(b)CDR-H2配列は

50

、配列番号9であり;且つ(c)CDR-H3配列は、配列番号10である。いくつかの実施形態では、代替として又は追加として、(d)CDR-L1配列は、配列番号12であり;(e)CDR-L2配列は、配列番号13であり;且つ(f)CDR-L3配列は、配列番号14である。

【0011】

いくつかの実施形態では、(a)CDR-H1配列は、配列番号16であり;(b)CDR-H2配列は、配列番号17であり;且つ(c)CDR-H3配列は、配列番号18である。いくつかの実施形態では、代替として又は追加として、(d)CDR-L1配列は、配列番号20であり;(e)CDR-L2配列は、配列番号21であり;且つ(f)CDR-L3配列は、配列番号22である。

【0012】

いくつかの実施形態では、(a)CDR-H1配列は、配列番号24であり;(b)CDR-H2配列は、配列番号25であり;且つ(c)CDR-H3配列は、配列番号26である。いくつかの実施形態では、代替として又は追加として、(d)CDR-L1配列は、配列番号28であり;(e)CDR-L2配列は、配列番号29であり;且つ(f)CDR-L3配列は、配列番号30である。

【0013】

いくつかの実施形態では、(a)CDR-H1配列は、配列番号32であり;(b)CDR-H2配列は、配列番号33であり;且つ(c)CDR-H3配列は、配列番号34である。いくつかの実施形態では、代替として又は追加として、(d)CDR-L1配列は、配列番号36であり;(e)CDR-L2配列は、配列番号37であり;且つ(f)CDR-L3配列は、配列番号38である。

【0014】

いくつかの実施形態では、(a)CDR-H1配列は、配列番号40であり;(b)CDR-H2配列は、配列番号41であり;且つ(c)CDR-H3配列は、配列番号42である。いくつかの実施形態では、代替として又は追加として、(d)CDR-L1配列は、配列番号44であり;(e)CDR-L2配列は、配列番号45であり;且つ(f)CDR-L3配列は、配列番号46である。

【0015】

いくつかの実施形態では、(a)CDR-H1配列は、配列番号48であり;(b)CDR-H2配列は、配列番号49であり;且つ(c)CDR-H3配列は、配列番号50である。いくつかの実施形態では、代替として又は追加として、(d)CDR-L1配列は、配列番号52であり;(e)CDR-L2配列は、配列番号53であり;且つ(f)CDR-L3配列は、配列番号54である。

【0016】

いくつかの実施形態では、(a)CDR-H1配列は、配列番号56であり;(b)CDR-H2配列は、配列番号57であり;且つ(c)CDR-H3配列は、配列番号58である。いくつかの実施形態では、代替として又は追加として、(d)CDR-L1配列は、配列番号60であり;(e)CDR-L2配列は、配列番号61であり;且つ(f)CDR-L3配列は、配列番号62である。

【0017】

いくつかの実施形態では、(a)CDR-H1配列は、配列番号64であり;(b)CDR-H2配列は、配列番号65であり;且つ(c)CDR-H3配列は、配列番号66である。いくつかの実施形態では、代替として又は追加として、(d)CDR-L1配列は、配列番号68であり;(e)CDR-L2配列は、配列番号69であり;且つ(f)CDR-L3配列は、配列番号70である。

【0018】

いくつかの実施形態では、(a)CDR-H1配列は、配列番号72であり;(b)CDR-H2配列は、配列番号73であり;且つ(c)CDR-H3配列は、配列番号74である。いくつかの実施形態では、代替として又は追加として、(d)CDR-L1配列は、配列番号76であり;(e)CDR-L2配列は、配列番号77であり;且つ(f)CDR-L3配列は、配列番号78である。

【0019】

いくつかの実施形態では、(a)CDR-H1配列は、配列番号80であり;(b)CDR-H2配列は、配列番号81であり;且つ(c)CDR-H3配列は、配列番号82である。いくつかの実施形態では、代替として又は追加として、(d)CDR-L1配列は、配列番号84であり;(e)CDR-L2配列は、配列番号85であり;且つ(f)CDR-L3配列は、配列番号86である。

【0020】

いくつかの実施形態では、(a)CDR-H1配列は、配列番号88であり;(b)CDR-H2配列

10

20

30

40

50

は、配列番号89であり;且つ(c)CDR-H3配列は、配列番号90である。いくつかの実施形態では、代替として又は追加として、(d)CDR-L1配列は、配列番号92であり;(e)CDR-L2配列は、配列番号93であり;且つ(f)CDR-L3配列は、配列番号94である。

【0021】

いくつかの実施形態では、本開示は、単離された抗CD161抗体であって、重鎖可変領域が、アミノ酸配列:EVQLLES_{GGGLVQPGGSLRL}SCAASGFX₁FX₂X₃X₄AMSWVRQAPGKGLEWVSAISX₅X₆GGX₇TX₈YADSVKGRFTISRDN_{SKNTLYLQMN}SLRAEDTAVYYCAKPLDSSX₉WADFX₁₀X₁₁WGRGTLVTVSS(配列番号188)を含み、X₁が、T又はAであり;X₂が、G、S、又はEであり;X₃が、Q、T、P、又はRであり;X₄が、Y又はFであり;X₅が、A又はGであり;X₆が、A、V、又はSであり;X₇が、T又はSであり;X₈が、K、A、又はYであり;X₉が、Q、F、又はLであり;X₁₀が、D又はQであり;且つX₁₁が、L又はAである、単離された抗CD161抗体を提供する。

10

【0022】

いくつかの実施形態では、重鎖可変領域は、配列番号7、配列番号15、配列番号23、配列番号31、配列番号39、配列番号47、配列番号55、配列番号63、配列番号71、配列番号79、及び配列番号87からなる群から選択される配列と少なくとも90%同一(例えば、少なくとも95%同一)のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、重鎖可変領域は、配列番号7、配列番号15、配列番号23、配列番号31、配列番号39、配列番号47、配列番号55、配列番号63、配列番号71、配列番号79、及び配列番号87からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

20

【0023】

いくつかの実施形態では、本開示は、単離された抗CD161抗体であって、軽鎖可変領域が、アミノ酸配列:DIQX_aTQSPSSVSASVGDRVITICRASQX₁₂IX₁₃SWLAWYQQKPGKAPKX_bLIYX₁₄ASX₁₅LQX₁₆GVPSRFSGSGSGTDFTLTIX_cSLQPEDFATYYCQQX₁₇X₁₈X₁₉LPITFGGGTKVEIK(配列番号189)を含み、X₁₂が、G、D、又はTであり;X₁₃が、D、S、又はYであり;X₁₄が、A、Y、又はFであり;X₁₅が、S、A、G、又はFであり;X₁₆が、D又はSであり;X₁₇が、A、H、又はQであり;X₁₈が、S、D、W、又はLであり;X₁₉が、V、D、Y、又はKであり;X_aが、M又はLであり;X_bが、L又はFであり;且つX_cが、S又はNである、単離された抗CD161抗体を提供する。

30

【0024】

いくつかの実施形態では、軽鎖可変領域は、配列番号11、配列番号19、配列番号27、配列番号35、配列番号43、配列番号51、配列番号59、配列番号67、配列番号75、配列番号83、及び配列番号91からなる群から選択される配列と少なくとも90%同一(例えば、少なくとも95%同一)のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、軽鎖可変領域は、配列番号11、配列番号19、配列番号27、配列番号35、配列番号43、配列番号51、配列番号59、配列番号67、配列番号75、配列番号83、及び配列番号91からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0025】

いくつかの実施形態では、重鎖可変領域は、配列番号7の配列と少なくとも90%同一(例えば、少なくとも95%同一)のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域は、配列番号11の配列と少なくとも90%同一(例えば、少なくとも95%同一)のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、重鎖可変領域は、配列番号7の配列を含み、軽鎖可変領域は、配列番号11の配列を含む。

40

【0026】

いくつかの実施形態では、重鎖可変領域は、配列番号15の配列と少なくとも90%同一(例えば、少なくとも95%同一)のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域は、配列番号19の配列と少なくとも90%同一(例えば、少なくとも95%同一)のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、重鎖可変領域は、配列番号15の配列を含み、軽鎖可変領域は、配列番号19の配列を含む。

【0027】

50

10

20

30

40

50

【 0 0 3 1 】

【 0 0 3 2 】

【 0 0 3 3 】

【 0 0 3 4 】

【 0 0 3 5 】

いくつかの実施形態では、重鎖可変領域は、配列番号87の配列と少なくとも90%同一（例えば、少なくとも95%同一）のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域は、配列番号91の

配列と少なくとも90%同一(例えば、少なくとも95%同一)のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、重鎖可変領域は、配列番号87の配列を含み、軽鎖可変領域は、配列番号91の配列を含む。

【0036】

別の態様では、本開示は、軽鎖可変領域;及びCDR-H1、CDR-H2、及びCDR-H3配列を含む重鎖可変領域を含む、その単離された抗CD161抗体であって、(a)CDR-H1配列が、FTFX₁X₂YYMS(配列番号95)であり;(b)CDR-H2配列が、YISPSGX₃TIX₄YADSVKG(配列番号96)であり;且つ(c)CDR-H3配列が、ARSLMX₅TGTHLYFDL(配列番号97)であり;X₁が、G、A、P、又はSであり;X₂が、N、Q、又はDであり;X₃が、A又はSであり;X₄が、Y又はAであり;且つX₅が、A又はSである、単離された抗CD161抗体を提供する。ある特定の実施形態では、軽鎖可変領域は、CDR-L1、CDR-L2及びCDR-L3配列を含み、(a)CDR-L1配列は、RASX₆X₇ISX₈WLA(配列番号98)であり;(b)CDR-L2配列は、AAX₉X₁₀LQS(配列番号99)であり;且つ(c)CDR-L3配列は、QQX₁₁TSX₁₂X₁₃PYT(配列番号100)であり;X₆は、Q又はSであり;X₇は、D又はGであり;X₈は、D又はSであり;X₉は、E又はSであり;X₁₀は、S、A、G、V、又はEであり;X₁₁は、A、S、又はVであり;X₁₂は、F、T、V、Q、又はAであり;且つX₁₃は、L又はPである。

10

【0037】

いくつかの実施形態では、(a)CDR-H1配列は、配列番号102であり;(b)CDR-H2配列は、配列番号103であり;且つ(c)CDR-H3配列は、配列番号104である。いくつかの実施形態では、代替として又は追加として、(d)CDR-L1配列は、配列番号106であり;(e)CDR-L2配列は、配列番号107であり;且つ(f)CDR-L3配列は、配列番号108である。

20

【0038】

いくつかの実施形態では、(a)CDR-H1配列は、配列番号110であり;(b)CDR-H2配列は、配列番号111であり;且つ(c)CDR-H3配列は、配列番号112である。いくつかの実施形態では、代替として又は追加として、(d)CDR-L1配列は、配列番号114であり;(e)CDR-L2配列は、配列番号115であり;且つ(f)CDR-L3配列は、配列番号116である。

【0039】

いくつかの実施形態では、(a)CDR-H1配列は、配列番号118であり;(b)CDR-H2配列は、配列番号119であり;且つ(c)CDR-H3配列は、配列番号120である。いくつかの実施形態では、代替として又は追加として、(d)CDR-L1配列は、配列番号122であり;(e)CDR-L2配列は、配列番号123であり;且つ(f)CDR-L3配列は、配列番号124である。

30

【0040】

いくつかの実施形態では、(a)CDR-H1配列は、配列番号126であり;(b)CDR-H2配列は、配列番号127であり;且つ(c)CDR-H3配列は、配列番号128である。いくつかの実施形態では、代替として又は追加として、(d)CDR-L1配列は、配列番号130であり;(e)CDR-L2配列は、配列番号131であり;且つ(f)CDR-L3配列は、配列番号132である。

【0041】

いくつかの実施形態では、(a)CDR-H1配列は、配列番号134であり;(b)CDR-H2配列は、配列番号135であり;且つ(c)CDR-H3配列は、配列番号136である。いくつかの実施形態では、代替として又は追加として、(d)CDR-L1配列は、配列番号138であり;(e)CDR-L2配列は、配列番号139であり;且つ(f)CDR-L3配列は、配列番号140である。

40

【0042】

いくつかの実施形態では、(a)CDR-H1配列は、配列番号142であり;(b)CDR-H2配列は、配列番号143であり;且つ(c)CDR-H3配列は、配列番号144である。いくつかの実施形態では、代替として又は追加として、(d)CDR-L1配列は、配列番号146であり;(e)CDR-L2配列は、配列番号147であり;且つ(f)CDR-L3配列は、配列番号148である。

【0043】

いくつかの実施形態では、(a)CDR-H1配列は、配列番号150であり;(b)CDR-H2配列は、配列番号151であり;且つ(c)CDR-H3配列は、配列番号152である。いくつかの実施形態では、代替として又は追加として、(d)CDR-L1配列は、配列番号154であり;(e)

50

CDR-L2配列は、配列番号155であり;且つ(f)CDR-L3配列は、配列番号156である。

【0044】

いくつかの実施形態では、(a)CDR-H1配列は、配列番号158であり;(b)CDR-H2配列は、配列番号159であり;且つ(c)CDR-H3配列は、配列番号160である。いくつかの実施形態では、代替として又は追加として、(d)CDR-L1配列は、配列番号162であり;(e)CDR-L2配列は、配列番号163であり;且つ(f)CDR-L3配列は、配列番号164である。

【0045】

いくつかの実施形態では、(a)CDR-H1配列は、配列番号166であり;(b)CDR-H2配列は、配列番号167であり;且つ(c)CDR-H3配列は、配列番号168である。いくつかの実施形態では、代替として又は追加として、(d)CDR-L1配列は、配列番号170であり;(e)CDR-L2配列は、配列番号171であり;且つ(f)CDR-L3配列は、配列番号172である。

【0046】

いくつかの実施形態では、重鎖可変領域は、アミノ酸配列:QVQLVESGGGLVX_aPGGSLRLSCAASGFTFX₁X₂YYMSWIRQAPGKGLEWVSYPSPGX₃TIX₄YADSVKGRFTISRDNX_bKNX_cLYLQMNSLRRAEDTAVYYCARSLMX₅TGTHLYFDLWGRGTLVTVSS(配列番号190)を含み、X₁は、G、A、P、又はSであり;X₂は、N、Q、又はDであり;X₃は、A又はSであり;X₄は、Y又はAであり;X₅は、A又はSであり;X_aは、K又はQであり;X_bは、A又はSであり;且つX_cは、S又はTである。

【0047】

いくつかの実施形態では、重鎖可変領域は、配列番号101、配列番号109、配列番号117、配列番号125、配列番号133、配列番号141、配列番号149、配列番号157、及び配列番号165からなる群から選択される配列と少なくとも90%同一(例えば、少なくとも95%同一)のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、重鎖可変領域は、配列番号101、配列番号109、配列番号117、配列番号125、配列番号133、配列番号141、配列番号149、配列番号157、及び配列番号165からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0048】

いくつかの実施形態では、軽鎖可変領域は、アミノ酸配列:DIQLTQSPSSVSASVGDRVITTC RASX₆X₇ISX₈WLAWYQQKPGKAPKLLIYAAX₉X₁₀LQS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC QQX₁₁TSX₁₂X₁₃PYTFGGGTKVEIK(配列番号191)を含み、X₆は、Q又はSであり;X₇は、D又はGであり;X₈は、D又はSであり;X₉は、E又はSであり;X₁₀は、S、A、G、V、又はEであり;X₁₁は、A、S、又はVであり;X₁₂は、F、T、V、Q、又はAであり;且つX₁₃は、L又はPである。

【0049】

いくつかの実施形態では、軽鎖可変領域は、配列番号105、配列番号113、配列番号121、配列番号129、配列番号137、配列番号145、配列番号153、配列番号161、及び配列番号169からなる群から選択される配列と少なくとも90%同一(例えば、少なくとも95%同一)のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、軽鎖可変領域は、配列番号105、配列番号113、配列番号121、配列番号129、配列番号137、配列番号145、配列番号153、配列番号161、及び配列番号169からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0050】

いくつかの実施形態では、重鎖可変領域は、配列番号101の配列と少なくとも90%同一(例えば、少なくとも95%同一)のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域は、配列番号105の配列と少なくとも90%同一(例えば、少なくとも95%同一)のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、重鎖可変領域は、配列番号101の配列を含み、軽鎖可変領域は、配列番号105の配列を含む。

【0051】

いくつかの実施形態では、重鎖可変領域は、配列番号109の配列と少なくとも90%同一(例えば、少なくとも95%同一)のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域は、配列番号11

10

20

30

40

50

3の配列と少なくとも90%同一(例えば、少なくとも95%同一)のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、重鎖可変領域は、配列番号109の配列を含み、軽鎖可変領域は、配列番号113の配列を含む。

【0052】

いくつかの実施形態では、重鎖可変領域は、配列番号117の配列と少なくとも90%同一(例えば、少なくとも95%同一)のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域は、配列番号121の配列と少なくとも90%同一(例えば、少なくとも95%同一)のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、重鎖可変領域は、配列番号117の配列を含み、軽鎖可変領域は、配列番号121の配列を含む。

【0053】

いくつかの実施形態では、重鎖可変領域は、配列番号125の配列と少なくとも90%同一(例えば、少なくとも95%同一)のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域は、配列番号129の配列と少なくとも90%同一(例えば、少なくとも95%同一)のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、重鎖可変領域は、配列番号125の配列を含み、軽鎖可変領域は、配列番号129の配列を含む。

【0054】

いくつかの実施形態では、重鎖可変領域は、配列番号133の配列と少なくとも90%同一(例えば、少なくとも95%同一)のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域は、配列番号137の配列と少なくとも90%同一(例えば、少なくとも95%同一)のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、重鎖可変領域は、配列番号133の配列を含み、軽鎖可変領域は、配列番号137の配列を含む。

【0055】

いくつかの実施形態では、重鎖可変領域は、配列番号141の配列と少なくとも90%同一(例えば、少なくとも95%同一)のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域は、配列番号145の配列と少なくとも90%同一(例えば、少なくとも95%同一)のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、重鎖可変領域は、配列番号141の配列を含み、軽鎖可変領域は、配列番号145の配列を含む。

【0056】

いくつかの実施形態では、重鎖可変領域は、配列番号149の配列と少なくとも90%同一(例えば、少なくとも95%同一)のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域は、配列番号153の配列と少なくとも90%同一(例えば、少なくとも95%同一)のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、重鎖可変領域は、配列番号149の配列を含み、軽鎖可変領域は、配列番号153の配列を含む。

【0057】

いくつかの実施形態では、重鎖可変領域は、配列番号157の配列と少なくとも90%同一(例えば、少なくとも95%同一)のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域は、配列番号161の配列と少なくとも90%同一(例えば、少なくとも95%同一)のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、重鎖可変領域は、配列番号157の配列を含み、軽鎖可変領域は、配列番号161の配列を含む。

【0058】

いくつかの実施形態では、重鎖可変領域は、配列番号165の配列と少なくとも90%同一(例えば、少なくとも95%同一)のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域は、配列番号169の配列と少なくとも90%同一(例えば、少なくとも95%同一)のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、重鎖可変領域は、配列番号165の配列を含み、軽鎖可変領域は、配列番号169の配列を含む。

【0059】

いくつかの実施形態では、抗体は、モノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、抗体は多特異性である。いくつかの実施形態では、抗体は、Fab、Fab'、F(Ab')₂、Fv、scFv、(scFv)₂、単鎖抗体分子、二重可変ドメイン抗体、単一可変ドメイン抗体、直鎖状抗体、又はVドメイン抗体である。いくつかの実施形態では、抗体は、足場を含

10

20

30

40

50

む。いくつかの実施形態では、足場は、Fcである。いくつかの実施形態では、足場は、ヒトFcである。いくつかの実施形態では、抗体は、IgG、IgA、IgD、IgE、及びIgMからなる群から選択されるクラスの重鎖定常領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、クラスIgGの、且つIgG₁、IgG₂、IgG₃、及びIgG₄からなる群から選択されるサブクラスの重鎖定常領域を含む。

【0060】

ある特定の実施形態では、モノクローナル抗体は、非グリコシル化ヒトIgG₁抗体である。ある特定の実施形態では、モノクローナル抗体は、EU番号付けに従ってアミノ酸位置N297において改変(例えば、N297A)を有するIgG₁ Fc領域を含む。

【0061】

別の態様では、本開示は、CD161への結合について、本明細書に開示される抗CD161抗体と競合する単離された抗体を提供する。

【0062】

いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書に開示される抗CD161抗体によって結合されるCD161エピトープに特異的に結合する単離された抗体を提供する。いくつかの実施形態では、抗体は、CD161への結合について、CLEC2Dと競合する。

【0063】

いくつかの実施形態では、抗体は、CD161へのCLEC2Dの結合によるCD161阻害性シグナル伝達を低減する。いくつかの実施形態では、CD161は、細胞の表面上に発現する。いくつかの実施形態では、細胞は、T細胞又はNK細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、ヒト細胞又はカニクイザル細胞である。いくつかの実施形態では、抗体は、CD161へのCLEC2D結合によるT細胞又はNK細胞活性の抑制を低減する。

【0064】

いくつかの実施形態では、本開示の抗体は、抗体の非存在下におけるT細胞又はNK細胞活性と比較して、CLEC2Dの存在下において該T細胞又はNK細胞活性を増加させる。いくつかの実施形態では、T細胞又はNK細胞は、CLEC2Dを発現する細胞を含む微小環境内に配置される。いくつかの実施形態では、抗体は、CLEC2Dを発現する腫瘍細胞を含有する腫瘍微小環境においてT細胞又はNK細胞活性を増加させる。いくつかの実施形態では、T細胞活性の増加は、NFATシグナル伝達の増加によって決定される。いくつかの実施形態では、抗体は、1.5nM～4.1nMの間のT細胞活性化についてのEC₅₀値を有する。例えば、抗体は、約1.5nM、約1.7nM、約2.0nM、約2.3nM、約2.5nM、約2.8nM、約3.1nM、約3.3nM、約3.5nM、約3.8nM、約4.1nMのT細胞活性化についてのEC₅₀値を有する。いくつかの実施形態では、抗体は、CLEC2D媒介性阻害を逆転させ、T細胞活性を回復させる。いくつかの実施形態では、抗体は、初代抗原特異的ヒトT細胞の多機能性を増強する。いくつかの実施形態では、本開示の抗体は、(i)CD161-CLEC2D相互作用の影響を受けた直接的T細胞媒介性細胞傷害性を増強する又は回復させるか、(ii)TNF の分泌を増加させるか、(iii)IL-2の分泌を増加させるか、(iv)IFN の分泌を増加させるか、又は(v)特徴(i)、(ii)、(iii)又は(iv)の任意の組み合わせを示す。

【0065】

いくつかの実施形態では、NK細胞活性の増加は、CD107a発現の増加によって決定される。いくつかの実施形態では、抗体は、0.04nM～0.38nMの間のNK細胞活性化についてのEC₅₀値を有する。例えば、抗体は、約0.04nM、約0.06nM、約0.08nM、約0.1nM、約0.12nM、約0.14nM、約0.16nM、約0.18nM、約0.20nM、約0.22nM、約0.24nM、約0.28nM、約0.30nM、約0.32nM、約0.34nM、約0.36nM、約0.38nMのNK細胞活性化についてのEC₅₀値を有する。いくつかの実施形態では、NK細胞活性の増加は、IFN 発現の増加によって決定される。いくつかの実施形態では、抗体は、0.1nM～0.5nMの間のNK細胞活性化についてのEC₅₀値を有する。例えば、抗体は、約0.1nM、約0.15nM、約0.2nM、約0.25nM、約0.3nM、約0.35nM、約0.4nM、約0.45nM、約0.5nMのNK細胞活性化についてのEC₅₀値を有する。

【0066】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、抗体は、Octet QK384アッセイによって測定した場合、10nM以下、0.5nM以下、1nM以下、0.5nM以下又は0.1nM以下の K_d でヒトCD161に結合する。いくつかの実施形態では、抗体は、Octet QK384アッセイによって測定した場合、 $1 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-10}$ Mの範囲の K_d でヒトCD161に結合する。いくつかの実施形態では、抗体は、5nM未満、1nM未満、又は0.5nM未満の、CD161を発現するHEK293細胞についての EC_{50} を有する。いくつかの実施形態では、抗体は、0.1~0.5nMの範囲の、CD161を発現するHEK293細胞についての EC_{50} を有する。いくつかの実施形態では、抗体は、0.1~10nMの範囲の IC_{50} で、細胞の表面上に発現したCD161へのCLEC2D結合を低減する。いくつかの実施形態では、抗体は、10nM未満、5nM未満、2nM未満、1nM未満、又は0.5nM未満の IC_{50} で、細胞の表面上に発現したCD161へのCLEC2D結合を低減する。いくつかの実施形態では、抗体は、hKLRF1、hKLRF2、hCLEC12B、hCLEC2D、又はそれらの任意の組み合わせについて、1,000nMよりも大きい K_d を有する。いくつかの実施形態では、抗体は、飽和抗体条件下でCD161に結合した抗体と比較して、2%未満、1.5%未満、1.2%未満、1.1%未満、又は1%未満のCD161ホモログの集団に結合する。いくつかの実施形態では、CD161ホモログの集団は、CLEC2D、KLRF1、KLRF2、CLEC12B、又はそれらの任意の組み合わせを含む。

10

【0067】

いくつかの実施形態では、抗体は、CLEC2D発現細胞のNK細胞死滅を増強する。例えば、ある特定の状況下では、抗体は、CD161のCLEC2Dとの相互作用を遮断することによって、CLEC2D発現細胞のNK細胞死滅を増強する。

20

【0068】

いくつかの実施形態では、抗体は、抗原特異的エフェクターメモリーCD4 T細胞の再活性化を増強する。いくつかの実施形態では、抗体は、CLEC2DとのCD161相互作用を遮断することによって、抗原特異的エフェクターメモリーCD4 T細胞の再活性化を増強する。いくつかの実施形態では、抗体は、MART-1特異的T細胞のサイトカイン産生を増強する。いくつかの実施形態では、抗体は、MART-1特異的T細胞の細胞傷害機能を増強する。いくつかの実施形態では、抗体は、サイトカイン放出症候群を引き起こさない。

【0069】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される抗体は、以下の特徴(a)~(t)のうちの少なくとも1つ以上を示す:(a)ヒトCD161に結合する;(b)ヒトCD161結合部位においてヒトCD161に結合する;(c)抗CD161抗体又はその抗原結合断片によって結合されるCD161エピトープに結合する;(d)CLEC2D結合部位又はその近くにおいてヒトCD161に結合する;(e)CD161への結合について、CLEC2Dと競合する;(f)CD161へのCLEC2Dの結合によるCD161阻害性シグナル伝達を低減する;(g)CD161へのCLEC2D結合によるT細胞活性の抑制を低減する;(h)CD161へのCLEC2D結合によるNK細胞活性の抑制を低減する;(i)抗体又はその抗原結合断片の非存在下におけるT細胞活性と比較して、CLEC2Dの存在下において該T細胞活性を増加させる;(j)抗体又はその抗原結合断片の非存在下におけるNK細胞活性と比較して、CLEC2Dの存在下において該NK細胞活性を増加させる;(k)CLEC2Dを発現する細胞を含む微小環境内に配置されたT細胞活性を増加させる;(l)CLEC2Dを発現する細胞を含む微小環境内に配置されたNK細胞活性を増加させる;(m)CLEC2Dを発現する腫瘍細胞を含む腫瘍微小環境におけるT細胞活性を増加させる;(n)CLEC2Dを発現する腫瘍細胞を含む腫瘍微小環境におけるNK細胞活性を増加させる;(o)ヒトT細胞疲弊を阻害する;(p)抗原発現標的細胞に応答してCD161発現ヒトT細胞の活性化を誘導する又は増加させる;(q)抗原発現標的細胞に応答してCD161発現ヒトT細胞によるサイトカイン産生を誘導する又は増加させる;(r)抗原発現標的細胞に応答してCD161発現ヒトT細胞によるグランザイムB発現を誘導する又は増加させる;(s)抗原発現標的細胞に応答してCD161発現ヒトT細胞の疲弊を低減する;及び(t)(a)~(s)の任意の組み合わせ。

30

40

【0070】

いくつかの実施形態では、抗体は、ヒトCD161及びカニクイザルCD161に結合し、

50

ヒトCD161及びカニクイザルCD161に対する抗体の結合親和性は、5倍、10倍、20倍、50倍、又は100倍以下異なる。いくつかの実施形態では、抗体は、ヒトCD161及びカニクイザルCD161に結合し、ヒトCD161及びカニクイザルCD161に対する抗体の結合アビディティーは、5倍、10倍、20倍、50倍、又は100倍以下異なる。

【0071】

別の態様では、本開示はまた、本明細書に開示される抗体及び薬学的に許容される担体を含む、医薬組成物を提供する。

【0072】

別の態様では、本開示はまた、本明細書に開示される抗体、そのV_H、そのV_L、その軽鎖、その重鎖、又はその抗原結合部分をコードする、単離された単数のポリヌクレオチド又は複数のポリヌクレオチドを提供する。 10

【0073】

別の態様では、本開示はまた、本明細書に開示される単数のポリヌクレオチド又は複数のポリヌクレオチドを含む、単数のベクター又は複数のベクターを提供する。

【0074】

別の態様では、本開示はまた、本明細書に開示される単数のポリヌクレオチド、複数のポリヌクレオチド、又は複数のベクターを含む、宿主細胞を提供する。

【0075】

別の態様では、本開示はまた、宿主細胞で抗体を発現させるステップ、及び発現した抗体を単離するステップを含む、抗体を生成する方法を提供する。 20

【0076】

別の態様では、本開示はまた、本明細書に開示される抗体、若しくは本明細書に開示される医薬組成物、並びに使用のための説明書を含む、キットを提供する。

【0077】

別の態様では、本開示はまた、がんの治療を必要とする対象におけるがんを治療する方法であって、有効量の本明細書に開示される免疫療法(例えば、抗CD161抗体)又は有効量の本明細書に開示される医薬組成物を対象に投与するステップを含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、がんの治療を必要とする対象におけるがんを治療する方法であって、有効量の本明細書に開示される抗CD161抗体又は有効量の本明細書に開示される医薬組成物を対象に投与するステップを含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、がんは、腫瘍微小環境におけるがん細胞又は他の細胞によるCLEC2Dの発現を特徴とする。いくつかの実施形態では、がんは、腫瘍微小環境におけるがん細胞又は他の細胞によるCLEC2Dの発現の増加を特徴とする。いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫、肺がん、神経膠腫、大腸がん、及び肝臓がんからなる群から選択される。 30

【0078】

別の態様では、本開示はまた、腫瘍増殖の低減又は阻害を必要とする対象における腫瘍増殖を低減又は阻害する方法であって、有効量の本明細書に開示される抗CD161抗体又は有効量の本明細書に開示される医薬組成物を対象に投与するステップを含む、方法を提供する。

【0079】

別の態様では、本開示はまた、ヒトCD161とCLEC2Dとの間の相互作用の阻害又は遮断を必要とする対象におけるヒトCD161とCLEC2Dとの間の相互作用を阻害又は遮断する方法であって、有効量の本明細書に開示される抗CD161抗体又は有効量の本明細書に開示される医薬組成物を対象に投与するステップを含む、方法を提供する。 40

【0080】

別の態様では、本開示はまた、免疫細胞活性化の誘導又は増強を必要とする対象における免疫細胞活性化を誘導又は増強する方法であって、有効量の本明細書に開示される抗CD161抗体又は有効量の本明細書に開示される医薬組成物を対象に投与するステップを含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、免疫細胞活性化は、腫瘍微小環境で生じる。いくつかの実施形態では、免疫細胞は、T細胞又はNK細胞である。 50

【 0 0 8 1 】

いくつかの実施形態では、本開示は、細胞傷害性T細胞エフェクター応答の誘導又は増強を必要とする対象における細胞傷害性T細胞エフェクター応答を誘導又は増強する方法であって、有効量の本明細書に開示される抗CD161抗体又は有効量の本明細書に開示される医薬組成物を対象に投与するステップを含む、方法を提供する。状況に応じて、T細胞エフェクター応答は、(i)腫瘍微小環境におけるものであるか、(ii)サイトカイン産生(例えば、IL-2、TNF、IFN、又はそれらの組み合わせ)であるか、(iii)グランザイムBの分泌であるか、又は(iv)(i)、(ii)及び(iii)のうちの2つ以上の組み合わせである。

【 0 0 8 2 】

本発明のこれら及び他の態様及び特徴は、以下の詳細な説明及び特許請求の範囲に記載される。 10

【 0 0 8 3 】

本発明は、以下の図面を参照してより完全に理解することができる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 8 4 】

【図 1 A】図1A~1Dは、ヒトCD161を外因的に発現するHEK293細胞への例示的ヒト抗CD161抗体の結合を示すグラフである。Iso Ctrlは、アイソタイプ対照抗体を示す。

【図 1 B】同上。

【図 1 C】同上。

【図 1 D】同上。 20

【図 2 A】図2A~2Dは、カニクイザルCD161を外因的に発現するHEK293細胞への例示的ヒト抗CD161抗体の結合を示すグラフである。Iso Ctrlは、アイソタイプ対照抗体を示す。

【図 2 B】同上。

【図 2 C】同上。

【図 2 D】同上。

【図 3】図3は、ヒトCD161(KLRB1_ヒト)(配列番号179)の、そのホモログ(キラー細胞レクチン様受容体サブファミリーFメンバー1_ヒト(KLRF1_ヒト)(配列番号183)、キラー細胞レクチン様受容体サブファミリーFメンバー2_ヒト(KLRF2_ヒト)(配列番号184)、及びC型レクチンドメインファミリー12メンバーB_ヒト(CL12B_ヒト)(配列番号185))とのアライメントを示す。 30

【図 4】図4は、ヒトCD161(KLRB1_ヒト)(配列番号179)の、C型レクチンドメインファミリー2メンバーD(CLEC2D_ヒト)(配列番号186)とのアライメントを示す。

【図 5 A】図5A~5Bは、CD161又はCD161ホモログ(CLEC2D、KLRF1、KLRF2、及びCLEC12B)を外因的に発現するHEK293細胞への例示的ヒト抗CD161抗体の結合を示すグラフである。Iso Ctrlは、アイソタイプ対照抗体を示し、ヌル(null)は、対照HEK293細胞を表す。

【図 5 B】同上。

【図 6 A】図6A~6Dは、ヒトCD161タンパク質及び可溶性ビオチン化Fc-ヒトCLEC2D(H176C)タンパク質を過剰発現するHEK293細胞を使用する、CD161とCLEC2Dとの間の相互作用のヒト抗CD161抗体媒介性遮断を示すグラフである。Iso Ctrlは、アイソタイプ対照抗体を示す。 40

【図 6 B】同上。

【図 6 C】同上。

【図 6 D】同上。

【図 7 A】図7A~7Dは、用量依存的な、CD107a発現によって測定した場合のヒトNK細胞の抗CD161抗体媒介性活性化を示すグラフである。HP-3G10は、マウス抗ヒトCD161抗体を示す。Iso Ctrlは、アイソタイプ対照抗体を示す。

【図 7 B】同上。

【図 7 C】同上。 50

【図 7 D】同上。

【図 8 A】図 8A～8Dは、活性化T細胞核因子(NFAT)シグナル伝達によって測定した場合の、外因的CLEC2D発現を用いた共培養アッセイにおけるT細胞の抗CD161抗体媒介性活性化を示すグラフである。HP-3G10は、マウス抗ヒトCD161抗体を示す。アイソタイプ対照抗体(Iso Ctrl)を対照として使用した。

【図 8 B】同上。

【図 8 C】同上。

【図 8 D】同上。

【図 9】図 9は、ヒト抗CD161抗体Ab8、Ab9、Ab13、及びAb15の存在下における、用量依存的なNFATシグナル伝達の回復を示すグラフである。アイソタイプ対照抗体(Iso Ctrl)を対照として使用した。 10

【図 10 A】図 10A～10Bは、ヒトPBMC(図 10A)及びカニクイザルPBMC(図 10B)へのヒト抗CD161抗体Ab8、Ab9、Ab13、及びAb15の結合を示すグラフである。Iso Ctrlは、アイソタイプ対照抗体を示す。

【図 10 B】同上。

【図 11】図 11は、ヒトPBMC中の免疫細胞集団(MAIT T細胞、B細胞、単球、及び樹状細胞)へのヒト抗CD161抗体Ab8、Ab9、Ab13、及びAb15の結合を示す棒グラフである。

【図 12 A - 1】図 12A～12Bは、それぞれ、 V_H 及び V_L のコンセンサス配列を生成するために使用した第1のファミリーの抗体のアライメントを示す。図 12Aは、それぞれコンセンサス配列(Cons)からAb11に対応する、配列番号188、7、15、23、31、39、47、55、63、71、79、及び87(出現順)をそれぞれ開示する。図 12Bは、それぞれコンセンサス配列(Cons)からAb11に対応する、配列番号189、11、19、27、35、43、51、59、67、75、83、及び91(出現順)をそれぞれ開示する。 20

【図 12 A - 2】図 12 A - 1の続きである。

【図 12 B - 1】図 12 A - 1に記載の通りである。

【図 12 B - 2】図 12 B - 1の続きである。

【図 13 A - 1】図 13A～13Bは、それぞれ、 V_H 及び V_L のコンセンサス配列を生成するために使用した第2のファミリーの抗体のアライメントを示す。図 13Aは、それぞれコンセンサス配列(Cons)及びAb12からAb20に対応する、配列番号190、101、109、117、125、133、141、149、157、及び165(出現順)をそれぞれ開示する。図 13Bは、それぞれコンセンサス配列(Cons)及びAb12からAb20に対応する、配列番号191、105、113、121、129、137、145、153、161、及び169(出現順)をそれぞれ開示する。 30

【図 13 A - 2】図 13 A - 1の続きである。

【図 13 B - 1】図 13 A - 1に記載の通りである。

【図 13 B - 2】図 13 B - 1の続きである。

【図 14 A】図 14A～14Bは、ELISAアッセイ形式を示し、これは、Fc RI(図 14A)並びにFc RII及びFc RIII(図 14B)への可溶性受容体結合を示す。ビオチン化Fc RI、Fc RII、及びFc RIIIは、それぞれ、「Fc RI-bio」、「Fc RII-bio」、「Fc RIII-bio」と示される。カッパ軽鎖に結合するマウス抗体は、「マウス抗カッパ」と示される。HRPコンジュゲート化Fab-抗ヒトFab断片は、「F(ab')₂抗F(ab')₂-HRP」と示される。 40

【図 14 B】同上。

【図 15 A】図 15A～15Eは、Fc 受容体であるFc RI(図 15A)、Fc RIIA(図 15B)、Fc RIIB/C(図 15C)、Fc RIIB(図 15D)、及びFc RIIB(図 15E)へのAb9又は野生型ヒトIgG1抗体(「WT」)の結合キネティクスを示すELISA結合曲線である。H167及びR167は、ヒトIgG2をライゲートするそれらの能力が異なる、Fc RIIAの2つのアレルバリエントを示す。F176及びV176は、ヒトIgG₁及びIgG₃に結合するそれらの能力が異なる、2つのFc RIIB/Aアレルを示す;F176は、低結合アレルであり、V176は、 50

高結合アレルである。

【図15B】同上。

【図15C】同上。

【図15D】同上。

【図15E】同上。

【図16A】図16Aは、OctetによるFcRn結合法を示す。図16B～16Cは、Octetによって決定される、Ab9(図16B)及び野生型ヒトIgG₁抗体(「WT」)(図16C)についての例示的結合曲線である。

【図16B】同上。

【図16C】同上。

【図17A】図17A～17Bは、CLEC2Dを発現する標的K562細胞(図17A)又はGFPを発現する標的K562細胞(図17B)における、用量依存的な、CD107a発現によって測定した場合のドナーRTD165から単離されたヒトNK細胞の抗CD161抗体媒介性活性化を示すグラフである。図17C～17Dは、CLEC2Dを発現する標的K562細胞(図17C)又はGFPを発現する標的K562細胞(図17D)における、用量依存的な、IFN- γ の分泌によって測定した場合のドナーRTD165から単離されたヒトNK細胞の抗CD161抗体媒介性活性化を示すグラフである。図17E～17Fは、CLEC2Dを発現する標的K562細胞(図17E)又はGFPを発現する標的K562細胞(図17F)における、用量依存的な、CD107a発現によって測定した場合のドナーMCB117から単離されたヒトNK細胞の抗CD161抗体媒介性活性化を示すグラフである。図17G～17Hは、CLEC2Dを発現する標的K562細胞(図17G)又はGFPを発現する標的K562細胞(図17H)における、用量依存的な、IFN- γ の分泌によって測定した場合のドナーMCB117から単離されたヒトNK細胞の抗CD161抗体媒介性活性化を示すグラフである。

【図17B】同上。

【図17C】同上。

【図17D】同上。

【図17E】同上。

【図17F】同上。

【図17G】同上。

【図17H】同上。

【図18A】図18A～18Bは、抗CD161抗体(Ab9)の存在下におけるドナー#1(図18A)又はドナー#2(図18B)から単離されたヒトNK細胞によるRaji標的細胞の死滅を示すグラフである。

【図18B】同上。

【図19A】図19A～19Bは、抗CD161抗体(Ab9)によるCD161-CLEC2D相互作用の遮断が、メモリーCD4 T細胞におけるサイトカイン(IFN- γ によって測定される、図19A)及び増殖(Ki67によって測定される、図19B)応答の増強をもたらすことを示すグラフである。T細胞を、6.25nMの濃度における抗CD161抗体(Ab9)、アイソタイプ対照(iso.対照)の存在下でCEFXペプチドに曝露するか、又は非処理(抗体なし)のままとした。CD4エフェクターメモリー細胞(EM)の増殖は、CD161発現CD4 T細胞(CD161 Pos)、対し、CD161発現を欠くCD4 T細胞(CD161 Neg)に対するゲーティングによって決定した。 $*P = 0.05$ $**P = 0.01$ (両側スチューデントt検定)。

【図19B】同上。

【図20A】図20A～20Bは、抗CD161抗体(Ab9)が、CD161⁺ MART-1特異的T細胞において、再活性化の際、IFN- γ 産生を増強したことを示すグラフである(サイトカイン陽性細胞のパーセンテージとして(図20A)又は幾何平均蛍光強度(MFI)として(図20B))。 $**P = 0.01$ 、 $***P = 0.001$ (両側スチューデントt検定)。図20C～20Dは、抗CD161抗体(Ab9)が、MART-1特異的T細胞において、再活性化の際、IL-2(図20C)及びTNF- α (図20D)産生を増強したことを示すグラフである。 $*P = 0.05$ $**P = 0.01$ 、 $***P = 0.001$ (両側スチューデントt検定)。

【図20B】同上。

【図20C】同上。

【図20D】同上。

【図21A】図21A～21Bは、抗CD161抗体(Ab9)が、2つのドナー由来のCD161⁺ MART-1特異的T細胞において、再活性化の際、グランザイムB産生を増強することを示すグラフである。図21C～21Dは、Ab9が、2つのドナーから得られたMART-1特異的T細胞の抗原特異的T細胞細胞傷害性を増強したことを示すグラフである。生存標的細胞を、CD19⁺、NEAR-IR陰性として測定した。^{*}P 0.05、^{**}P 0.01(両側スチューデントt検定)。

【図21B】同上。

【図21C】同上。

【図21D】同上。

【図22A】図22A～22Fは、プレート結合Ab9とのインキュベーション後の、刺激されていない健康なヒトPBMCからのサイトカインの誘導を示すグラフである。プレート結合Ab9による6種のドナーヒトPBMCの処理、アイソタイプ対照、抗CD3μモノナブ(抗CD3)、及びリツキシマブ処理(^{***}p 0.0001)。Y軸は、Ab9の添加によって誘発される低濃度のサイトカイン、及びμモノナブ処理によって放出される高濃度を描写するために、対数スケールで示される。プロット中の異なる点は、個々のPBMCドナーを表す。

【図22B】同上。

【図22C】同上。

【図22D】同上。

【図22E】同上。

【図22F】同上。

【図23A】図23A～23Fは、可溶性Ab9とのインキュベーション後の、刺激されていない健康なヒトPBMCからのサイトカインの誘導を示すグラフである。可溶性Ab9による6種のドナーヒトPBMCの処理、アイソタイプ対照、抗CD3μモノナブ(抗CD3)、及びリツキシマブ処理(^{***}p 0.0001)。Y軸は、Ab9の添加によって誘発される低濃度のサイトカイン、及びμモノナブ処理によって放出される高濃度を描写するために、対数スケールで示される。プロット中の異なる点は、個々のPBMCドナーを表す。IL-6プロット(図23F)における「#」は、低濃度のAb9において単一ドナーについて観察された高い値を表し、それが異常値であることを示唆する。

【図23B】同上。

【図23C】同上。

【図23D】同上。

【図23E】同上。

【図23F】同上。

【図24】図24は、片対数スケールを使用する、各用量群についての時間プロファイルに対する平均Ab9血清濃度のプロットである。

【図25A】図25A～25Bは、片対数スケールを使用する、処理及び性別ごとの、時間プロファイルに対する平均Ab9血清濃度のプロットである。

【図25B】同上。

【発明を実施するための形態】

【0085】

本発明は、とりわけ、ある特定のがんが対象の免疫系を回避するのを防止するために使用することができる、CLEC2D-CD161軸を破壊する高親和性抗CD161抗体の発見に部分的に基づく。本出願は、さらに、このような抗体を使用する医薬組成物及び治療法、並びに/又はがんなどの適応症の治療のための医薬組成物に関する。本出願に記載される抗体を含む、本発明の様々な特徴及び態様を、以下に詳細に論じる。

【0086】

定義

10

20

30

40

50

本出願の理解を容易にするために、いくつかの用語及び句を以下に定義する。

【0087】

用語「a」及び「an」は、本明細書で使用される場合、文脈が不適切でない限り、「1つ以上」を意味し、複数を含む。

【0088】

本明細書で使用される場合、用語「免疫グロブリン」は、2対のポリペプチド鎖:1対の軽(L)鎖及び1対の重(H)鎖を典型的に含む、構造的に関連する抗体タンパク質のクラスを指す。「インタクトな免疫グロブリン」において、これらの鎖の4つすべては、ジスルフィド結合によって相互に接続される。免疫グロブリンの構造は、十分に特徴付けられている。例えば、Paul (2013) FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY 7TH ED., Ch. 5 Lip 10
pincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PAを参照。簡潔に述べると、各重鎖は、典型的には、重鎖可変領域(V_H)及び重鎖定常領域(C_H)を含む。重鎖定常領域は、典型的には、 C_{H1} 、 C_{H2} 、及び C_{H3} と略される3つのドメインを含む。各軽鎖は、典型的には、軽鎖可変領域(V_L)及び軽鎖定常領域を含む。軽鎖定常領域は、典型的には、 C_L と略される1つのドメインを含む。

【0089】

本明細書で使用される場合、別段の指示がない限り、用語「抗体」は、インタクトな抗体(例えば、インタクトなモノクローナル抗体)、又はその断片、例えば、抗体のFc断片(例えば、モノクローナル抗体のFc断片)、又は抗体の抗原結合断片(例えば、モノクロー 20
ナル抗体の抗原結合断片)(改変、操作、又は化学的にコンジュゲートされているインタクトな抗体、抗原結合断片、又はFc断片を含む)を意味すると理解される。抗原結合断片の例としては、Fab、Fab'、 $(Fab')_2$ 、Fv、単鎖抗体(例えば、scFv)、ミニボディ、及びダイアボディが挙げられる。改変又は操作されている抗体の例としては、キメラ抗体、ヒト化抗体、及び多特異性抗体(例えば、二重特異性抗体)が挙げられる。化学的にコンジュゲートされた抗体の例は、毒素部分にコンジュゲートされた抗体である。

【0090】

本明細書で使用される場合、用語「抗CD161抗体」は、CD161(例えば、ヒトCD16 1)に特異的に結合する抗体を指す。ある特定の実施形態では、抗CD161抗体は、CD16 1とCLEC2Dとの相互作用を低減する又は妨げることができる。

【0091】

用語「抗原結合断片」は、抗原又はエピトープに特異的に結合することが可能な抗体の部分を意味する。例示的抗原結合断片としては、Fab、Fab'、 $F(ab')_2$ (断片又は組換えポリペプチド中)、例えば、単鎖抗体結合部位(例えば、scFv)(重鎖可変ドメイン(V_H)が、単一ポリペプチド中で、リンカー(例えば、ポリペプチドリンカー)によって軽鎖可変ドメイン(V_L)に接続される)、ミニボディ、又はナノボディ(V_{HH})が挙げられる。抗原結合断片は、抗体及びキメラ抗原受容体(CAR)、例えば抗体又はscFvなどの抗体断片に由来するCARを含む、様々な状況で見出すことができる。

【0092】

用語「インタクトな抗体」、「全長抗体」、及び「全抗体」は、天然に存在する抗体構造と実質的に類似した構造を有し、且つFc領域を含む重鎖を有する抗体を指すために、 40
本明細書で互換的に使用される。例えば、IgG分子を指すために使用される場合、「全長抗体」は、2つの重鎖及び2つの軽鎖を含む抗体である。

【0093】

用語「Fc領域」は、天然に存在する抗体において、Fc受容体及び補体系のある特定のタンパク質と相互作用する免疫グロブリン重鎖のC末端領域を意味する。様々な免疫グロブリンのFc領域の構造、及びそこに含まれるグリコシル化部位は、当技術分野で公知である。Schroeder and Cavacini (2010) J. ALLERGY CLIN. IMMUNOL., 125: S41-S52(参照によりその全体が組み込まれる)を参照。Fc領域は、天然に存在するFc領域であってもよく、又は当技術分野で若しくは本開示における他の箇所に記載されるように改変されたFc領域であってもよい。

10

20

30

40

50

【 0 0 9 4 】

V_H領域及びV_L領域は、より保存された領域が差し挟まれた超可変性の領域(「超可変領域(HVR)」;「相補性決定領域」(CDR)とも呼ばれる)にさらに細分され得る。より保存された領域は、フレームワーク領域(FR)と呼ばれる。各V_H及びV_Lは、以下の順序(N末端からC末端へ):FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4で配置された、3つのCDR及び4つのFRを一般に含む。CDRは、抗原結合に関与し、抗体の抗原特異性及び結合親和性に影響を与える。Kabat et al. (1991) SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST 5TH ED., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD(参照によりその全体が組み込まれる)を参照。

【 0 0 9 5 】

「相補性決定領域(CDR)」は、免疫グロブリン(Ig又は抗体)V_H-シートフレームワークの非フレームワーク領域内の3つの超可変領域(例えば、CDR-H1、CDR-H2又はCDR-H3)のうちの1つ、又は抗体V_L-シートフレームワークの非フレームワーク領域内の3つの超可変領域(例えば、CDR-L1、CDR-L2又はCDR-L3)のうちの1つを指す。CDRは、フレームワーク領域配列内に点在する可変領域配列である。CDRは、当技術分野で十分に認識されており、例えば、Kabatによって、抗体可変(V)ドメイン内の最も超可変性の領域と定義されている。Kabat et al. (1977) J. BIOL. CHEM., 252: 6609-6616及びKabat (1978) ADV. PROTEIN CHEM., 32:1-75(これらのそれぞれは、参照によりその全体が組み込まれる)を参照。CDRはまた、Chothiaによって、保存された-シートフレームワークの一部ではない残基と構造的に定義されており、したがって、様々な立体構造をとることができる。Chothia and Lesk (1987) J. MOL. BIOL., 196: 901-917(参照によりその全体が組み込まれる)を参照。Kabat命名法及びChothia命名法の両方は、当技術分野で周知である。AbM、Contact及びIMGTもCDRを定義した。標準的抗体可変ドメイン内のCDR位置は、多数の構造の比較によって決定されている。Morea et al. (2000) METHODS, 20: 267-279及びAl-Lazikani et al. (1997) J. MOL. BIOL., 273: 927-48(これらのそれぞれは、参照によりその全体が組み込まれる)を参照。

【 0 0 9 6 】

いくつかの超可変領域の境界付けが使用され、本明細書に含まれる。Kabat CDRは、配列の変動性に基づいており、最も一般に使用されている。Kabat et al. (1992) SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, DIANE Publishing: 2719(参照によりその全体が組み込まれる)を参照。Chothiaは、代わりに、構造的ループの位置を指す(Chothia and Lesk、上記)。AbM超可変領域は、Kabat CDRとChothia構造的ループとの間の折衷案を表し、Oxford MolecularのAbM抗体モデリングソフトウェアによって使用される。Contact超可変領域は、利用可能な複雑な結晶構造の解析に基づく。

【 0 0 9 7 】

より最近では、普遍的番号付けシステムImMunoGeneTics(IMGT)Information System(商標)が開発され、広く採用されている。Lefranc et al. (2003) DEV. COMP. IMMUNOL., 27: 55-77(参照によりその全体が組み込まれる)を参照。IMGTは、ヒト及び他の脊椎動物の免疫グロブリン(IG)、T細胞受容体(TR)及び主要組織適合複合体(MHC)に特化した統合情報システムである。IMGT CDRは、アミノ酸配列と、軽鎖又は重鎖内の位置との両方の点から参照される。免疫グロブリン可変ドメインの構造内におけるCDRの「位置」は、種間で保存され、ループと呼ばれる構造中に存在するため、構造的特徴に従って可変ドメイン配列をアラインする番号付けシステムを使用することによって、CDR及びフレームワーク残基は、容易に特定される。Kabat、Chothia及びIMGT番号付けの間の対応はまた、当技術分野で周知である(Lefranc et al.、上記)。

【 0 0 9 8 】

任意の脊椎動物種由来の軽鎖は、その定常ドメインの配列に基づいて、カッパ()及びラムダ()と呼ばれる2つの種類のうちの1つに割り当てることができる。

【0099】

任意の脊椎動物種由来の重鎖は、5つの異なるクラス(又はアイソタイプ):IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgMのうちの1つに割り当てることができる。これらのクラスはまた、それぞれ、 γ 、 δ 、 ϵ 、 μ 、及び μ と呼ばれる。IgGクラス及びIgAクラスは、配列及び機能の違いに基づいてサブクラスにさらに分けられる。ヒトは、以下のサブクラス:IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、及びIgA₂を発現する。

【0100】

用語「定常領域」又は「定常ドメイン」は、抗原への抗体の結合に直接関与しないが、Fc受容体との相互作用などの様々なエフェクター機能を示す、軽鎖及び重鎖のカルボキシ末端部分を指す。この用語は、抗原結合部位を含有する免疫グロブリンのその他の部分である可変ドメインと比較して、より保存されたアミノ酸配列を有する免疫グロブリン分子の部分の部分を指す。定常ドメインは、重鎖のC_{H1}、C_{H2}及びC_{H3}ドメイン、並びに軽鎖のC_Lドメインを含有する。 10

【0101】

「EU番号付けスキーム」は、抗体重鎖定常領域中の残基に言及する場合に一般に使用される(例えば、Kabat et al.、上記に報告されるように)。別段の記載がない限り、EU番号付けスキームは、本明細書に記載される抗体重鎖定常領域中の残基に言及するために使用される。

【0102】

「Fv」断片は、1つの重鎖可変ドメイン及び1つの軽鎖可変ドメインの非共有結合二量体を含む。 20

【0103】

「Fab」断片は、重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインに加えて、軽鎖の定常ドメイン及び重鎖の第1の定常ドメイン(C_{H1})を含む。Fab断片は、例えば、組換え法によって又は全長抗体のパイン消化によって生成してもよい。

【0104】

「F(ab')₂」断片は、ヒンジ領域付近でジスルフィド結合によって結合した2つのFab'断片を含有する。F(ab')₂断片は、例えば、組換え法によって又はインタクトな抗体のペプシン消化によって生成してもよい。F(ab')断片は、例えば、 β -メルカプトエタノールによる処理によって解離させることができる。 30

【0105】

「単鎖Fv」又は「sFv」又は「scFv」抗体断片は、単一ポリペプチド鎖中にV_Hドメイン及びV_Lドメインを含む。V_H及びV_Lは、一般にペプチドリinkerによって連結される。任意の好適なリンカーが使用可能である。いくつかの実施形態では、リンカーは、(GGGGS)_n(配列番号187)であり、ある特定の実施形態では、n=1、2、3、4、5、又は6である。

【0106】

「scFv-Fc」断片は、Fcドメインに結合したscFvを含む。例えば、Fcドメインは、scFvのC末端に結合してもよい。Fcドメインは、scFv中の可変ドメインの配向(すなわち、V_H-V_L又はV_L-V_H)に応じて、V_Hの後に続いて、又はV_Lの後に続いてよい。当技術分野で公知の又は本明細書に記載される任意の好適なFcドメインが使用可能である。 40

【0107】

用語「単ドメイン抗体」は、抗体の1つの可変ドメインが、他の可変ドメインの存在なしに抗原に特異的に結合する分子を指す。単ドメイン抗体、及びその断片は、Arabi Ghahroudi et al. (1998) FEBS LETTERS, 414: 521-526及びMuyldermans et al. (2001) TRENDS IN BIOCHEM. SCI., 26: 230-245(これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる)に記載される。単ドメイン抗体は、sdAb又はナノボディとしても知られている。

【0108】

「多特異性抗体」は、2つ以上の異なるエピトープに集合的に特異的に結合する2つ以 50

上の異なる抗原結合ドメインを含む抗体である。2つ以上の異なるエピトープは、同じ抗原上(例えば、細胞によって発現される単一のCD161分子)又は異なる抗原上(例えば、CD161分子及び非CD161分子)のエピトープであり得る。いくつかの態様では、多特異性抗体は、2つの異なるエピトープに結合する(すなわち、「二重特異性抗体」)。いくつかの態様では、多特異性抗体は、3つの異なるエピトープに結合する(すなわち、「三重特異性抗体」)。いくつかの態様では、多特異性抗体は、4つの異なるエピトープに結合する(すなわち、「四重特異性抗体」)。いくつかの態様では、多特異性抗体は、5つの異なるエピトープに結合する(すなわち、「五重特異性抗体」)。いくつかの態様では、多特異性抗体は、6、7、8個、又はそれより多くの異なるエピトープに結合する。それぞれの結合特異性は、任意の好適な結合価で存在し得る。多特異性抗体の例は、本開示における他の箇所で提供される。

【0109】

「単一特異性抗体」は、単一エピトープに特異的に結合する1つ以上の結合部位を含む抗体である。単一特異性抗体の例は、二価である(すなわち、2つの抗原結合ドメインを有する)が、2つの抗原結合ドメインのそれぞれにおいて同じエピトープを認識する、天然に存在するIgG分子である。結合特異性は、任意の好適な結合価で存在し得る。

【0110】

用語「モノクローナル抗体」は、実質的に均質な抗体の集団からの抗体を指す。実質的に均質な抗体の集団は、モノクローナル抗体の産生中に通常発生し得るバリエーションを除き、実質的に類似し、同じエピトープ(複数可)に結合する抗体を含む。このようなバリエーションは、一般にほんのわずかな量で存在する。モノクローナル抗体は、典型的には、複数の抗体からの単一の抗体の選択を含むプロセスによって得られる。例えば、選択プロセスは、ハイブリドーマクローン、ファージクローン、酵母クローン、細菌クローン、又は他の組換えDNAクロンのプールなどの、複数のクローンからの特有のクロンの選択であり得る。例えば、標的に対する親和性を改善するため(「親和性成熟」)、抗体をヒト化するため、細胞培養におけるその産生を改善するため、及び/又は対象におけるその免疫原性を低減するために、選択された抗体は、さらに変更可能である。

【0111】

用語「キメラ抗体」は、重鎖及び/又は軽鎖の一部が特定の供給源又は種に由来し、一方、重鎖及び/又は軽鎖の残部が異なる供給源又は種に由来する、抗体を指す。

【0112】

非ヒト抗体の「ヒト化」形態は、非ヒト抗体に由来する最小配列を含有するキメラ抗体である。ヒト化抗体は、一般に、1つ以上のCDRからの残基が、非ヒト抗体(ドナー抗体)の1つ以上のCDRからの残基によって置換される、ヒト抗体(レシピエント抗体)である。ドナー抗体は、所望の特異性、親和性、又は生物学的効果を有するマウス、ラット、ウサギ、ニワトリ、又は非ヒト霊長類抗体などの、任意の好適な非ヒト抗体であり得る。場合によっては、レシピエント抗体の選択されたフレームワーク領域残基は、ドナー抗体からの対応するフレームワーク領域残基によって置換される。ヒト化抗体はまた、レシピエント抗体又はドナー抗体のいずれにも見られない残基を含んでもよい。このような改変は、抗体機能をさらに改良するために行ってもよい。さらなる詳細について、Jones et al. (1986) NATURE, 321: 522-525; Riechmann et al. (1988) NATURE, 332: 323-329; 及び Presta (1992) CURR. OP. STRUCT. BIOL., 2: 593-596(これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる)を参照。

【0113】

「ヒト抗体」は、ヒト若しくはヒト細胞によって産生される抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列、又はヒト抗体レパートリー若しくはヒト抗体コード配列(例えば、ヒト供給源から得られた又は新たに設計された)を利用する非ヒト供給源に由来する抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を有する抗体である。ヒト抗体は、ヒト化抗体を含まない。

【0114】

10

20

30

40

50

「単離された抗体」又は「単離された核酸」は、その自然環境の成分から分離及び/又は回収されている抗体又は核酸である。自然環境の成分は、酵素、ホルモン、並びに他のタンパク質性若しくは非タンパク質性材料を含み得る。いくつかの実施形態では、単離された抗体は、例えば、スピニングカップシーケンエーター(spinning cup sequenator)の使用によって、少なくとも15残基のN末端アミノ酸配列又は内部アミノ酸配列を得るのに十分な程度まで精製される。いくつかの実施形態では、単離された抗体は、クマシーブルー又は銀染色による検出を用いて、還元条件又は非還元条件下でゲル電気泳動(例えば、SDS-PAGE)によって均質になるまで精製される。いくつかの実施形態では、抗体の自然環境の少なくとも1つの成分が存在しないため、単離された抗体は、組換え細胞内のインサイチュ抗体を含み得る。いくつかの態様では、単離された抗体又は単離された核酸は、少なくとも1つの精製ステップによって調製される。いくつかの実施形態では、単離された抗体又は単離された核酸は、少なくとも80重量%、85重量%、90重量%、95重量%、又は99重量%まで精製される。いくつかの実施形態では、単離された抗体又は単離された核酸は、少なくとも80体積%、85体積%、90体積%、95体積%、又は99体積%まで精製される。いくつかの実施形態では、単離された抗体又は単離された核酸は、少なくとも85重量%、90重量%、95重量%、98重量%、99重量%から100重量%の抗体又は核酸を含む溶液として提供される。いくつかの実施形態では、単離された抗体又は単離された核酸は、少なくとも85体積%、90体積%、95体積%、98体積%、99体積%から100体積%の抗体又は核酸を含む溶液として提供される。

10

20

30

40

50

【0115】

「親和性」は、分子(例えば、抗体)の結合部位(例えば、単一の結合部位)とその結合パートナー(例えば、抗原又はエピトープ)との間の非共有結合性相互作用の合計の強さを指す。別段の指示がない限り、本明細書で使用される場合、「親和性」は、結合対のメンバー(例えば、抗体と抗原又はエピトープと)の間の1:1の相互作用を反映する、固有の結合親和性を指す。分子XのそのパートナーYに対する親和性は、解離平衡定数(K_D)によって表すことができる。解離平衡定数に寄与するキネティック成分は、以下により詳細に記載される。親和性は、表面プラズモン共鳴(SPR)技術(例えば、BIAcore(登録商標))又はバイオレイヤー干渉法(例えば、FORTEBIO(登録商標)、例えばOctet QK384システムを使用する)など、本明細書に記載される方法を含む、当技術分野で公知の一般的な方法によって測定することができる。

【0116】

標的分子への抗体の結合に関して、特定の抗原(例えば、ポリペプチド標的)又は特定の抗原上のエピトープに「結合する」、「特異的結合」、「特異的に結合する」、「特異的な」、「選択的に結合する」及び「選択的な」という用語は、非特異的相互作用又は非選択的相互作用(例えば、非標的分子との)とは測定可能なほど異なる結合を意味する。特異的結合は、例えば、標的分子への結合を測定し、それを非標的分子への結合と比較することによって、測定することができる。特異的結合はまた、標的分子上で認識されるエピトープを模倣する対照分子との競合によって決定することができる。その場合、標的分子への抗体の結合が対照分子によって競合的に阻害される場合、特異的結合が示される。いくつかの態様では、非標的分子に対するCD161抗体の親和性は、CD161に対する親和性の約40%未満である。いくつかの態様では、非標的分子に対するCD161抗体の親和性は、CD161に対する親和性の約30%未満である。いくつかの態様では、非標的分子に対するCD161抗体の親和性は、CD161に対する親和性の約20%未満である。いくつかの態様では、非標的分子に対するCD161抗体の親和性は、CD161に対する親和性の約10%未満である。いくつかの態様では、非標的分子に対するCD161抗体の親和性は、CD161に対する親和性の約1%未満である。いくつかの態様では、非標的分子に対するCD161抗体の親和性は、CD161に対する親和性の約0.1%未満である。

【0117】

用語「 k_d 」(sec^{-1})は、本明細書で使用される場合、特定の抗体-抗原相互作用の解離速度定数を指す。この値は、 k_{off} 値とも呼ばれる。

【0118】

用語「 k_a 」($M^{-1} \times sec^{-1}$)は、本明細書で使用される場合、特定の抗体-抗原相互作用の会合速度定数を指す。この値は、 k_{on} 値とも呼ばれる。

【0119】

用語「 K_D 」(M)は、本明細書で使用される場合、特定の抗体-抗原相互作用の解離平衡定数を指す。 $K_D = k_d / k_a$ 。いくつかの実施形態では、抗体の親和性は、該抗体とその抗原との間の相互作用についての K_D に関して記載される。明確にするために、当技術分野で公知のように、より小さい K_D 値は、より高い親和性相互作用を示し、一方、より大きい K_D 値は、より低い親和性相互作用を示す。

【0120】

用語「 K_A 」(M^{-1})は、本明細書で使用される場合、特定の抗体-抗原相互作用の会合平衡定数を指す。 $K_A = k_a / k_d$ 。

【0121】

「親和性成熟」抗体は、変更(複数可)を有しない親抗体と比較して、その抗原に対する抗体の親和性の改善をもたらす、親抗体(すなわち、変更された抗体がそれに由来する又はそれから設計される抗体)に対して1つ以上の変更(例えば、1つ以上のCDR又はFRにおける)を有する抗体である。いくつかの実施形態では、親和性成熟抗体は、標的抗原に対してナノモル又はピコモルの親和性を有する。親和性成熟抗体は、当技術分野で公知の様々な方法を使用して生成され得る。例えば、Marks et al. (1992) BIO/TECHNOLOGY, 10: 779-783(その全体が参照により組み込まれる)は、 V_H 及び V_L ドメインシャッフルリングによる親和性成熟を記載する。CDR及び/又はフレームワーク残基のランダム変異誘発は、例えば、Barbas et al. (1994) PROC. NAT. ACAD. SCI. USA, 91: 3809-3813; Schier et al. (1995) GENE, 169: 147-155; Yelton et al. (1995) J. IMMUNOL., 155: 1994-2004; Jackson et al. (1995) J. IMMUNOL., 154: 3310-3319; 及び Hawkins et al. (1992) J. MOL. BIOL., 226: 889-896(これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる)によって記載される。

【0122】

「Fcエフェクター機能」は、抗体のFc領域によって媒介される生物学的活性を指し、この活性は、抗体アイソタイプに応じて異なり得る。抗体エフェクター機能の例としては、補体依存性細胞傷害(CDC)を活性化するC1q結合、抗体依存性細胞傷害(ADCC)を活性化するFc受容体結合、及び抗体依存性細胞貪食(ADCP)が挙げられる。

【0123】

2つ以上の抗体の状況において本明細書で使用される場合、用語「～と競合する」又は「～と交差競合する」は、2つ以上の抗体が、抗原(例えば、CD161)への結合について競合することを示す。1つの例示的アッセイでは、CD161を表面上に被覆し、第1のCD161抗体と接触させ、その後、第2のCD161抗体を添加する。別の例示的アッセイでは、第1のCD161抗体を表面上に被覆し、CD161と接触させ、次いで、第2のCD161抗体を添加する。どちらのアッセイにおいても、第1のCD161抗体の存在が第2のCD161抗体の結合を低減する場合、抗体は互いに競合する。用語「～と競合する」はまた、1つの抗体が別の抗体の結合を低減するが、逆の順序で抗体が添加された場合には競合が観察されない、抗体の組み合わせを含む。しかし、いくつかの実施形態では、第1の抗体及び第2の抗体は、それらが添加される順序にかかわらず、互いの結合を阻害する。いくつかの実施形態では、1つの抗体は、別の抗体のその抗原への結合を、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、又は少なくとも95%低減する。当業者は、CD161に対する抗体の親和性及び抗体の結合価に基づいて、競合アッセイで使用される抗体の濃度を選択することができる。この定義に記載されるアッセイは、例示的なものであり、当業者は、抗体が互いに競合するかどうかを決定するために任意の好適なアッセイを利用することができる。好適なアッセイは、例えば、Cox et al., "Immunoassay Methods," in ASSAY GUIDANCE MANUAL [INTERNET], Updated December 24, 2014 (www.ncbi.nlm.nih

10

20

30

40

50

.gov/books/NBK92434/; accessed September 29, 2015); Silman et al. (2001) CYTOMETRY, 44: 30-37;及びFinco et al. (2011) J. PHARM. BIOMED. ANAL., 54: 351-358(これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる)に記載される。

【0124】

本明細書で使用される場合、 K_D 値が、マウス抗原を用いたForteBio Octetで測定可能である場合、ヒト抗原に特異的に結合する抗体は、マウス起源の同じ抗原に特異的に結合すると考えられる。一般に、非ヒト種の K_D (ForteBio Octetによって測定した場合)がヒト種の K_D よりも10倍以下弱い(すなわち、 K_D 値が10倍高い)場合に、抗体は、非ヒト種と交差反応性であると考えることができる。マウス抗原についての K_D 値が、それぞれのヒト抗原についての対応する K_D 値の20倍以下である場合、ヒト抗原に特異的に結合する抗体は、マウス起源の同じ抗原と「交差反応性」であると考えられる。

10

【0125】

本明細書で使用される場合、カニクイザル抗原についての K_D 値が、それぞれのヒト抗原についての対応する K_D 値の20倍以下である場合、ヒト抗原に特異的に結合する抗体は、カニクイザル起源の同じ抗原と「交差反応性」であると考えられる。

【0126】

用語「エピトープ」は、抗体によって特異的に結合される抗原の一部を意味する。エピトープは、表面接触可能アミノ酸残基及び/又は糖側鎖を含むことが多く、特異的な三次元構造特性だけでなく、特異的な電荷特性を有し得る。立体構造エピトープ及び非立体構造エピトープは、変性溶媒の存在下で、前者への結合は失われ得るが、後者への結合は失われないという点で区別される。エピトープは、結合に直接関与するアミノ酸残基、及び結合に直接関与しない他のアミノ酸残基を含み得る。抗体が結合するエピトープは、例えば、様々な点変異を有するCD161バリエーションへの、又はキメラCD161バリエーションへの抗体結合についての試験などの、エピトープ決定のための公知技術を使用して決定することができる。

20

【0127】

ポリペプチド配列と参照配列との間の「同一性」パーセントは、配列をアラインし、必要な場合にギャップを導入して、最大パーセント配列同一性を達成した後の、参照配列中のアミノ酸残基と同一のポリペプチド配列中のアミノ酸残基のパーセンテージと定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを決定するためのアライメントは、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN、MEGALIGN(DNASTAR)、CLUSTALW、CLUSTAL OMEGA、又はMUSCLEソフトウェアなどの、公に利用可能なコンピュータソフトウェアを使用して、当技術分野における技能の範囲内の様々な方法で達成することができる。当業者は、比較される配列の全長にわたって最大アライメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、配列をアラインするための適切なパラメータを決定することができる。「保存的置換」又は「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸の、化学的又は機能的に類似したアミノ酸との置換を指す。類似したアミノ酸を提供する保存的置換表は、当技術分野で周知である。例として、表1~3に提供されるアミノ酸の群は、いくつかの実施形態では、互いに保存的置換と考えられる。

40

【0128】

互いに保存的置換と考えられるアミノ酸の選択された群は、ある特定の実施形態では、表1に示される。

【0129】

【表 1】

表 1	
酸性残基	D 及び E
塩基性残基	K, R, 及び H
親水性無電荷残基	S, T, N, 及び Q
脂肪族無電荷残基	G, A, V, L, 及び I
無極性無電荷残基	C, M, 及び P
芳香族残基	F, Y, 及び W

10

【0 1 3 0】

互いに保存的置換と考えられるアミノ酸の追加の選択された群は、ある特定の実施形態では、表2に示される。

【0 1 3 1】

【表 2】

表 2	
群 1	A, S, 及び T
群 2	D 及び E
群 3	N 及び Q
群 4	R 及び K
群 5	I, L, 及び M
群 6	F, Y, 及び W

20

【0 1 3 2】

互いに保存的置換と考えられるアミノ酸のさらなる選択された群は、ある特定の実施形態では、表3に示される。

【0 1 3 3】

【表 3】

表 3	
群 A	A 及び G
群 B	D 及び E
群 C	N 及び Q
群 D	R, K, 及び H
群 E	I, L, M, V
群 F	F, Y, 及び W
群 G	S 及び T
群 H	C 及び M

40

【0 1 3 4】

追加の保存的置換は、例えば、Creighton (1993) PROTEINS: STRUCTURES AND MOLECULAR PROPERTIES 2ND ED. W. H. Freeman & Co., New York, NYに見出すことができる。親抗体におけるアミノ酸残基の1つ以上の保存的置換を作製することによって生成される抗体は、「保存的に改変されたバリエーション」と呼ばれる。

【0 1 3 5】

用語「アミノ酸」は、20種の通常の天然に存在するアミノ酸を指す。天然に存在する

50

アミノ酸は、アラニン(Ala;A)、アルギニン(Arg;R)、アスパラギン(Asn;N)、アスパラギン酸(Asp;D)、システイン(Cys;C)、グルタミン酸(Glu;E)、グルタミン(Gln;Q)、グリシン(Gly;G)、ヒスチジン(His;H)、イソロイシン(Ile;I)、ロイシン(Leu;L)、リジン(Lys;K)、メチオニン(Met;M)、フェニルアラニン(Phe;F)、プロリン(Pro;P)、セリン(Ser;S)、トレオニン(Thr;T)、トリプトファン(Trp;W)、チロシン(Tyr;Y)、及びバリン(Val;V)を含む。

【0136】

用語「ベクター」は、本明細書で使用される場合、それが連結される別の核酸を増殖させることが可能な核酸分子を指す。この用語は、自己複製核酸構造としてのベクターだけでなく、それが導入されている宿主細胞のゲノムに組み込まれたベクターも含む。ある特定のベクターは、それらが作動可能に連結される核酸の発現を指示することが可能である。このようなベクターは、本明細書では「発現ベクター」と呼ばれる。

10

【0137】

用語「宿主細胞」、「宿主細胞株」、及び「宿主細胞培養物」は、互換的に使用され、外因的核酸が導入されている細胞、及びこのような細胞の子孫を指す。宿主細胞は、「トランスフォーマント」(又は「トランスフォームされた細胞」)及び「トランスフェクタント」(又は「トランスフェクトされた細胞」)を含み、これらはそれぞれ、初代のトランスフォームされた又はトランスフェクトされた細胞と、それに由来する子孫とを含む。このような子孫は、核酸含有量において親細胞と完全に同一ではなくてもよく、変異を含有してもよい。

20

【0138】

用語「治療すること」(及び「治療する」又は「治療」などのそのバリエーション)は、疾患又は状態の自然な経過の変更を必要とする対象における、疾患又は状態の自然な経過を変更しようとする臨床介入を指す。治療は、予防のために、及び臨床病理学の過程においての両方で実施することができる。治療の望ましい効果は、疾患の発生若しくは再発を予防すること、1つ以上の症状を改善すること、疾患の任意の直接的若しくは間接的な病理学的結果の減少、転移を予防すること、疾患進行の速度を減少させること、疾患状態の改善若しくは緩和、並びに寛解若しくは予後の改善を含む。

【0139】

本明細書で使用される場合、用語「治療有効量」又は「有効量」は、対象に投与された場合に、有益な又は所望の結果をもたらすのに十分な、本明細書で提供される抗体又は医薬組成物の量を指し、例えば、抗体又は医薬組成物は、対象に投与された場合に、疾患又は障害を治療するのに有効であるか、又は疾患又は障害の1つ以上の症状を改善するのに有効である。有効量は、1回以上の投与、適用又は投薬で投与することができ、特定の製剤又は投与経路に限定されることは意図されない。

30

【0140】

本明細書で使用される場合、用語「対象」は、哺乳動物対象を意味する。例示的对象としては、ヒト、サル、イヌ、ネコ、マウス、ラット、ウシ、ウマ、ラクダ、ヤギ、ウサギ、ブタ及びヒツジが挙げられる。ある特定の実施形態では、対象は、ヒト対象である。いくつかの実施形態では、対象は、本明細書で提供される抗体で治療することができる疾患又は状態を有する。例えば、疾患又は状態は、がんである。

40

【0141】

用語「パッケージインサート」は、治療製品又は診断製品の使用に関する適応症、用法、投薬量、投与、併用療法、禁忌及び/又は警告に関する情報を含有する、該治療製品又は診断製品の市販のパッケージ(例えば、キット)に通常含まれる説明書を指すために使用される。

【0142】

「化学療法剤」は、がんの治療に有用な化合物を指す。化学療法剤は、がんの増殖を促進し得るホルモンの影響を調節、低減、遮断、又は阻害するように作用する「抗ホルモン剤」又は「内分泌治療薬」を含む。

50

【0143】

用語「医薬組成物」は、その中に含まれる活性成分の生物学的活性が対象を治療するのに有効であることを可能にするような形態であり、且つ医薬組成物中に提供される量で対象に容認できないほど毒性のある追加の成分を含有しない、製剤を指す。

【0144】

用語「モジュレートする」及び「モジュレーション」は、列挙される可変要素を低減する又は阻害すること、あるいは、活性化する又は増加させることを指す。

【0145】

用語「増加させる」及び「活性化する」は、列挙される可変要素における10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍の、又はそれより大きな増加を指す。 10

【0146】

用語「低減する」及び「阻害する」は、列挙される可変要素における10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍の、又はそれより大きな減少を指す。

【0147】

用語「アゴナイズする」は、受容体の活性化に関連する生物学的応答を誘導するための受容体シグナル伝達の活性化を指す。「アゴニスト」は、受容体に結合し、受容体をアゴナイズする実体である。

【0148】

用語「アンタゴナイズする」は、受容体の活性化に関連する生物学的応答を阻害するための受容体シグナル伝達の阻害を指す。「アンタゴニスト」は、受容体に結合し、受容体をアンタゴナイズする実体である。本明細書で使用される場合、用語「対象」及び「患者」は、本明細書に記載される方法及び組成物によって治療されるべき生物を指す。このような生物としては、好ましくは、以下に限定されないが、哺乳動物(例えば、マウス、サル、ウマ、ウシ、ブタ、イヌ、ネコなど)が挙げられ、より好ましくはヒトが挙げられる。 20

【0149】

表現「~のうちの少なくとも1つ」は、別段文脈及び使用から理解されない限り、表現の後に列挙される物、及び列挙される物のうちの2つ以上の様々な組み合わせのそれぞれを個別に含むことが理解されるべきである。3つ以上の列挙される物に関連する表現「及び/又は」は、別段文脈から理解されない限り、同じ意味を有すると理解されるべきである。 30

【0150】

用語「含む(include)」、「含む(includes)」、「含むこと(including)」、「有する(have)」、「有する(has)」、「有すること(having)」、「含有する(contain)」、「含有する(contains)」、又は「含有すること(containing)」(それらの文法的等価物を含む)の使用は、別段明記されない限り又は文脈から理解されない限り、オープンエンド且つ非限定的と一般に理解されるべきであり、例えば、追加の列挙されていない要素又はステップを除外しない。 40

【0151】

用語「約」は、示される値、及びその値の上下の範囲を示し、包含する。ある特定の実施形態では、用語「約」は、示される値 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、又は $\pm 1\%$ を示す。ある特定の実施形態では、適用可能な場合、用語「約」は、示される値(複数可) \pm その値(複数可)の1標準偏差を示す。

【0152】

本明細書中の様々な箇所において、構成要素、又はその特徴は、群又は範囲で開示される。記載は、このような群及び範囲のメンバーのありとあらゆる個々のサブコンビネーションを含むことが特に意図される。他の例として、1~20の範囲の整数は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、及び20を個別 50

に開示することが特に意図される。

【0153】

記載全体を通して、組成物が特定の構成要素を有し、含み(including)、若しくは含む(comprising)と記載される場合、又はプロセス及び方法が特定のステップを有し、含み(including)、若しくは含む(comprising)と記載される場合、さらに、列挙される構成要素から本質的になるか又は列挙される構成要素からなる本発明の組成物があり、列挙される処理ステップから本質的になるか又は列挙される処理ステップからなる本発明によるプロセス及び方法があることが企図される。

【0154】

本出願において、要素又は構成要素が、列挙される要素又は構成要素のリストに含まれる及び/又はそのリストから選択されると言われる場合、要素又は構成要素は、列挙される要素又は構成要素のうちのいずれか1つであり得るか、又は要素又は構成要素は、列挙される要素又は構成要素のうちの2つ以上からなる群から選択され得ることが理解されるべきである。

【0155】

さらに、本明細書に記載される組成物又は方法の要素及び/又は特徴は、本明細書において明示的であれ又は暗黙的であれ、本発明の精神及び範囲から逸脱することなく、様々な方法で組み合わせることができることが理解されるべきである。例えば、特定の化合物に言及がなされる場合、その化合物は、別段文脈から理解されない限り、本発明の組成物の様々な実施形態において、及び/又は本発明の方法において使用することができる。言い換えれば、本出願内では、実施形態は、明確で簡潔な出願を記載及び描写できるように記載及び描写されているが、実施形態は、本教示及び発明(複数可)から離れることなく、様々な組み合わせ、又は分離され得ることが意図され、理解される。例えば、本明細書に記載及び描写されるすべての特徴は、本明細書に記載及び描写される発明(複数可)のすべての態様に適用できることが理解される。

【0156】

I. 抗CD161抗体

ヒトCD161(NK受容体-P1A(NKR-P1A)、キラー細胞レクチン様受容体サブファミリー-Bメンバー1(KLRB1)、又はC型レクチンドメインファミリー5メンバーB(CLEC5B)とも呼ばれる)は、Th17細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、及びNKT細胞上で発現する。CD161は、キラー細胞レクチン様受容体(KLR)ファミリーに属し、そのメンバーは、リガンド認識を担う細胞外領域における1つのC型レクチン様ドメインを含有する。マウスはいくつかのCD161分子を有し、それらは活性化受容体及び阻害性受容体の両方であり、NKR-P1ファミリーとして知られているが、ヒトは、1つのCD161分子だけを有し、これは阻害性受容体である。CD161受容体は、C型レクチンドメインファミリー2メンバーD(CLEC2D)として知られているリガンドに結合する(Aldemir et al. (2005) J. IMMUNOL., 175(12): 7791-5、Rosen et al. (2005) J. IMMUNOL., 175(12): 7796-9を参照)。CLEC2Dは、ヒトレクチン様転写物1分子(LLT1)としても知られている。CD161ファミリー分子は、II型膜貫通糖タンパク質であり、これはジスルフィド結合ホモ二量体を形成する。CD161とCLEC2Dとの間の相互作用を阻害すると、腫瘍細胞に应答してT細胞の活性化が促進される。CLEC2D及びCD161のすべてのオルソログ及びアイソフォームは、本開示の範囲内であると考えられる。

【0157】

ヒトCD161のアミノ酸配列は、配列番号179によって表される。配列番号179のアミノ酸残基1~45、46~66、及び67~225は、それぞれ、細胞質ドメイン、膜貫通ドメイン、及び細胞外ドメインを含む。カニクイザルCD161、マウスCD161、及びラットCD161のアミノ酸配列は、それぞれ、配列番号180、181、及び182によって表される。

【0158】

ヒトCLEC2Dのアミノ酸配列は、配列番号186によって表される。配列番号186のアミノ酸残基1~38、39~59、及び60~191は、それぞれ、細胞質ドメイン、膜貫通ド

メイン、及び細胞外ドメインを含む。

【 0 1 5 9 】

1. 抗CD161抗体の配列

ある特定の実施形態では、本開示は、表4に列挙される抗体に由来するCD161(例えば、ヒトCD161)に結合する抗原結合断片を提供する。

【 0 1 6 0 】

CD161に結合する例示的抗体の配列を表4に示す。

【 0 1 6 1 】

【 表 4 】

表4

抗体	V _H 及びH-CDRs	V _L 及びL-CDRs
Ab1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFAFSTYAMSWVRQAPGKGLEWVS AISAAGGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK PLDSSLWADFDLWGRGTLTVSS (配列番号7) CDR-H1: FAFSTYAMS (配列番号8) CDR-H2: AISAAGGTTYADSVKG (配列番号9) CDR-H3: AKPLDSSLWADFDL (配列番号10)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITIT CRASQGIDSWLAWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQASVLPITFGGGTKVEIK (配列番号11) CDR-L1: RASQGIDSWLA (配列番号12) CDR-L2: AASSLQS (配列番号13) CDR-L3: QQASVLPIT (配列番号14)
Ab2	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFAFSTYAMSWVRQAPGKGLEWVS AISGVGGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK PLDSSLWADFDLWGRGTLTVSS (配列番号15) CDR-H1: FAFSTYAMS (配列番号16) CDR-H2: AISGVGGTTYADSVKG (配列番号17) CDR-H3: AKPLDSSLWADFDL (配列番号18)	DIQLTQSPSSVSASVGDRVITIT CRASQGISSWLAWYQQKPGK APKLLIYYASSLQDGVPSRFSG SGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQASVLPITFGGGTKVEIK (配列番号19) CDR-L1: RASQGISSWLA (配列番号20) CDR-L2: YASSLQD (配列番号21) CDR-L3: QQASVLPIT (配列番号22)
Ab3	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFERYAMSWVRQAPGKGLEWVS AISAAGGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK PLDSSQWADFDLWGRGTLTVSS (配列番号23) CDR-H1: FTFERYAMS (配列番号24)	DIQLTQSPSSVSASVGDRVITIT CRASQDISSWLAWYQQKPGK APKFLIYAASALQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQALVLPITFGGGTKVEIK (配列番号27) CDR-L1: RASQDISSWLA (配列番号28)

10

20

30

40

50

抗体	V _H 及びH-CDRs	V _L 及びL-CDRs
	CDR-H2: AISAAGGTTYADSVKG (配列番号 25) CDR-H3: AKPLDSSQWADFDL (配列番号 26)	CDR-L2: AASALQS (配列番号 29) CDR-L3: QQALVLPIT (配列番号 30)
Ab4	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTTFERYAMSWVRQAPGKGLEWVS AISAAGGTTKYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK PLDSSLWADFDAWGRGTLTVSS (配列番号 31) CDR-H1: FTFERYAMS (配列番号 32) CDR-H2: AISAAGGTTKYADSVKG (配列番号 33) CDR-H3: AKPLDSSLWADFDA (配列番号 34)	DIQLTQSPSSVSASVGDRVITIT CRASQGISSWLAWYQQKPGK APKLLIYAASGLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQASYLPITFGGGTKVEIK (配列番号 35) CDR-L1: RASQGISSWLA (配列番号 36) CDR-L2: AASGLQS (配列番号 37) CDR-L3: QQASYLPIT (配列番号 38)
Ab5	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFGQYAMSWVRQAPGKGLEWV SAISAAGGTTAYADSVKGRFTISRDN NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA KPLDSSLWADFQLWGRGTLTVSS (配列番号 39) CDR-H1: FTFGQYAMS (配列番号 40) CDR-H2: AISAAGGTTAYADSVKG (配列番号 41) CDR-H3: AKPLDSSLWADFQL (配列番号 42)	DIQLTQSPSSVSASVGDRVITIT CRASQDISSWLAWYQQKPGK APKLLIYFASSLQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQQASKLPITFGGGTKVEIK (配列番号 43) CDR-L1: RASQDISSWLA (配列番号 44) CDR-L2: FASSLQS (配列番号 45) CDR-L3: QQASKLPIT (配列番号 46)
Ab6	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFGQYAMSWVRQAPGKGLEWV SAISAAGGTTYADSVKGRFTISRDN NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA KPLDSSQWADFDLWGRGTLTVSS (配列番号 47) CDR-H1: FTFGQYAMS (配列番号 48) CDR-H2: AISAAGGTTYADSVKG (配列番号 49) CDR-H3: AKPLDSSQWADFDL (配列番号 50)	DIQLTQSPSSVSASVGDRVITIT CRASQGISSWLAWYQQKPGK APKLLIYAASLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTINSLQPEDFATY YCQQA WVLPIITFGGGTKVEIK (配列番号 51) CDR-L1: RASQGISSWLA (配列番号 52) CDR-L2: AASSLQS (配列番号 53) CDR-L3: QQA WVLPIIT (配列番号 54)

10

20

30

40

50

抗体	V _H 及びH-CDRs	V _L 及びL-CDRs
Ab7	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFGQYAMSWVRQAPGKGLEWV SAISAAGGTTYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA KPLDSSQWADFDLWGRGTLVTVSS (配列番号 55) CDR-H1: FTFGQYAMS (配列番号 56) CDR-H2: AISAAGGTTYADSVKG (配列番号 57) CDR-H3: AKPLDSSQWADFDL (配 列番号 58)	DIQLTQSPSSVSASVGDRVITIT CRASQGISSWLAWYQQKPGK APKLLIYAASFLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQASVLPITFGGGTKVEIK (配列番号 59) CDR-L1: RASQGISSWLA (配 列番号 60) CDR-L2: AASFLQS (配列 番号 61) CDR-L3: QQASVLPIT (配列 番号 62)
Ab8	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFGTFAMSWVRQAPGKGLEWVS AISGVGGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK PLDSSFWADFDLWGRGTLVTVSS (配列番号 63) CDR-H1: FTFGTFAMS (配列番号 64) CDR-H2: AISGVGGTTYADSVKG (配列番号 65) CDR-H3: AKPLDSSFWADFDL (配 列番号 66)	DIQLTQSPSSVSASVGDRVITIT CRASQTISSWLAWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQQSVLPITFGGGTKVEIK (配列番号 67) CDR-L1: RASQTISSWLA (配 列番号 68) CDR-L2: AASSLQS (配列 番号 69) CDR-L3: QQQSVLPIT (配列 番号 70)
Ab9	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSPYAMSWVRQAPGKGLEWVS AISASGGTTYADSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKP LDSSFWADFDLWGRGTLVTVSS (配列番号 71) CDR-H1: FTFSPYAMS (配列番号 72) CDR-H2: AISASGGTTYADSVKG (配列番号 73) CDR-H3: AKPLDSSFWADFDL (配 列番号 74)	DIQLTQSPSSVSASVGDRVITIT CRASQGISSWLAWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQHSVLPITFGGGTKVEIK (配列番号 75) CDR-L1: RASQGISSWLA (配 列番号 76) CDR-L2: AASSLQS (配列 番号 77) CDR-L3: QQHSVLPIT (配列 番号 78)
Ab10	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSQYAMSWVRQAPGKGLEWVS AISAVGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK	DIQLTQSPSSVSASVGDRVITIT CRASQDISSWLAWYQQKPGK APKLLIYAASALQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISLQPEDFATY

10

20

30

40

50

抗体	V _H 及びH-CDRs	V _L 及びL-CDRs
	PLDSSQWADFDLWGRGTLTVSS (配列番号 79) CDR-H1: FTFSQYAMS (配列番号 80) CDR-H2: AISAVGGSTYYADSVKG (配列番号 81) CDR-H3: AKPLDSSQWADFDL (配列番号 82)	YCQQADVLPITFGGGTKVEIK (配列番号 83) CDR-L1: RASQDISSWLA (配列番号 84) CDR-L2: AASALQS (配列番号 85) CDR-L3: QQADVLPIT (配列番号 86)
Ab11	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSQYAMSWVRQAPGKGLEWVS AISAAGGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK PLDSSQWADFDLWGRGTLTVSS (配列番号 87) CDR-H1: FTFSQYAMS (配列番号 88) CDR-H2: AISAAGGTTYADSVKG (配列番号 89) CDR-H3: AKPLDSSQWADFDL (配列番号 90)	DIQLTQSPSSVSASVGDRVITIT CRASQGIYSWLAWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQASDLPTFGGGTKVEIK (配列番号 91) CDR-L1: RASQGIYSWLA (配列番号 92) CDR-L2: AASSLQS (配列番号 93) CDR-L3: QQASDLPT (配列番号 94)
Ab12	QVQLVES GGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFAQYYMSWIRQAPGKGLEWVS YISPSGSTIAYADSVKGRFTISRDN KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARS LMATGTHLYFDLWGRGTLTVSS (配列番号 101) CDR-H1: FTFAQYYMS (配列番号 102) CDR-H2: YISPSGSTIAYADSVKG (配列番号 103) CDR-H3: ARSLMATGTHLYFDL (配列番号 104)	DIQLTQSPSSVSASVGDRVITIT CRASQDISSWLAWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQVTSFPPYTFGGGKVEIK (配列番号 105) CDR-L1: RASQDISSWLA (配列番号 106) CDR-L2: AASSLQS (配列番号 107) CDR-L3: QQVTSFPPYT (配列番号 108)
Ab13	QVQLVES GGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFANYYMSWIRQAPGKGLEWVS YISPSGATIAYADSVKGRFTISRDN KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARS LMATGTHLYFDLWGRGTLTVSS (配列番号 109) CDR-H1: FTFANYYMS (配列番号 110)	DIQLTQSPSSVSASVGDRVITIT CRASSGISSWLAWYQQKPGKA PKLLIYAASELQSGVPSRFSGS GSGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQATSFPPYTFGGGKVEIK (配列番号 113) CDR-L1: RASSGISSWLA (配列番号 114)

10

20

30

40

50

抗体	V _H 及びH-CDRs	V _L 及びL-CDRs
	CDR-H2: YISPSGATIAYADSVKG (配列番号 111) CDR-H3: ARSLMATGTHLYFDL (配列番号 112)	CDR-L2: AASELQS (配列 番号 115) CDR-L3: QQATSFPPYT (配列 番号 116)
Ab14	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFGQYYMSWIRQAPGKGLEWVS YISPSGATIAYADSVKGRFTISRDN KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARS LMSTGTHLYFDLWGRGTLTVSS (配列番号 117) CDR-H1: FTFGQYYMS (配列番号 118) CDR-H2: YISPSGATIAYADSVKG (配列番号 119) CDR-H3: ARSLMSTGTHLYFDL (配 列番号 120)	DIQLTQSPSSVSASVGDRVITIT CRASQGISDWLAWYQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQVTSFPPYTFGGGTKVEIK (配列番号 121) CDR-L1: RASQGISDWLA (配 列番号 122) CDR-L2: AASSLQS (配列 番号 123) CDR-L3: QQVTSFPPYT (配列 番号 124)
Ab15	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFPQYYMSWIRQAPGKGLEWVS YISPSGATIYYADSVKGRFTISRDN KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARS LMSTGTHLYFDLWGRGTLTVSS (配列番号 125) CDR-H1: FTFPQYYMS (配列番号 126) CDR-H2: YISPSGATIYYADSVKG (配列番号 127) CDR-H3: ARSLMSTGTHLYFDL (配 列番号 128)	DIQLTQSPSSVSASVGDRVITIT CRASQGISSWLAWYQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQVTSTPPYTFGGGTKVEI K (配列番号 129) CDR-L1: RASQGISSWLA (配 列番号 130) CDR-L2: AASSLQS (配列 番号 131) CDR-L3: QQVTSTPPYT (配列 番号 132)
Ab16	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEWVS YISPSGATIAYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARS LMATGTHLYFDLWGRGTLTVSS (配列番号 133) CDR-H1: FTFSDYYMS (配列番号 134) CDR-H2: YISPSGATIAYADSVKG (配列番号 135) CDR-H3: ARSLMATGTHLYFDL (配列番号 136)	DIQLTQSPSSVSASVGDRVITIT CRASQGISSWLAWYQKPGK APKLLIYAASGLQSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQSTSFPPYTFGGGTKVEIK (配列番号 137) CDR-L1: RASQGISSWLA (配 列番号 138) CDR-L2: AASGLQS (配列 番号 139) CDR-L3: QQSTSFPPYT (配列 番号 140)

10

20

30

40

50

抗体	V _H 及びH-CDRs	V _L 及びL-CDRs
Ab17	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEWVS YISPSGATIYYADSVKGRFTISRDN KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARS LMSTGTHLYFDLWGRGTLVTVSS (配列番号 141) CDR-H1: FTFSDYYMS (配列番号 142) CDR-H2: YISPSGATIYYADSVKG (配列番号 143) CDR-H3: ARSLMSTGTHLYFDL (配列番号 144)	DIQLTQSPSSVSASVGDRVITIT CRASQGISSWLAWYQQKPGK APKLLIYAASSLQSGVPSRFSG SSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQVTSVPPYTFGGGKVEI K (配列番号 145) CDR-L1: RASQGISSWLA (配列番号 146) CDR-L2: AASSLQS (配列番号 147) CDR-L3: QQVTSVPPYT (配列番号 148)
Ab18	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSQYYMSWIRQAPGKGLEWVS YISPSGATIAYADSVKGRFTISRDN KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARS LMATGTHLYFDLWGRGTLVTVSS (配列番号 149) CDR-H1: FTFSQYYMS (配列番号 150) CDR-H2: YISPSGATIAYADSVKG (配列番号 151) CDR-H3: ARSLMATGTHLYFDL (配列番号 152)	DIQLTQSPSSVSASVGDRVITIT CRASQGISSWLAWYQQKPGK APKLLIYAAESLQSGVPSRFSG SSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQVTSQPPYTFGGGKVEI K (配列番号 153) CDR-L1: RASQGISSWLA (配列番号 154) CDR-L2: AAESLQS (配列番号 155) CDR-L3: QQVTSQPPYT (配列番号 156)
Ab19	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSQYYMSWIRQAPGKGLEWVS YISPSGATIYYADSVKGRFTISRDN KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARS LMATGTHLYFDLWGRGTLVTVSS (配列番号 157) CDR-H1: FTFSQYYMS (配列番号 158) CDR-H2: YISPSGATIYYADSVKG (配列番号 159) CDR-H3: ARSLMATGTHLYFDL (配列番号 160)	DIQLTQSPSSVSASVGDRVITIT CRASQGISSWLAWYQQKPGK APKLLIYAASALQSGVPSRFSG SSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQVTSAPPYTFGGGKVEI K (配列番号 161) CDR-L1: RASQGISSWLA (配列番号 162) CDR-L2: AASALQS (配列番号 163) CDR-L3: QQVTSAPPYT (配列番号 164)
Ab20	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFTFSQYYMSWIRQAPGKGLEWVS YISPSGATIAYADSVKGRFTISRDN KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARS	DIQLTQSPSSVSASVGDRVITIT CRASQGISSWLAWYQQKPGK APKLLIYAASVLQSGVPSRFSG SSGTDFTLTISLQPEDFATY

10

20

30

40

50

抗体	V _H 及びH-CDRs	V _L 及びL-CDRs
	LMSTGTHLYFDLWGRGTLVTVSS (配列番号 165)	YCQQVTSFLPYTFGGGTKVEI K (配列番号 169)
	CDR-H1: FTFSQYYMS (配列番号 166)	CDR-L1: RASQGISSWLA (配 列番号 170)
	CDR-H2: YISPSGATIAYADSVKG (配列番号 167)	CDR-L2: AASVLQS (配列 番号 171)
	CDR-H3: ARSLMSTGTHLYFDL (配 列番号 168)	CDR-L3: QQVTSFLPYT (配列 番号 172)

10

【 0 1 6 2 】

1.1 V_Hドメイン

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号7、15、23、31、39、47、55、63、71、79、87、101、109、117、125、133、141、149、157、及び165から選択されるV_H配列を含む。

【 0 1 6 3 】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号7のV_H配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号15のV_H配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号23のV_H配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号31のV_H配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号39のV_H配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号47のV_H配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号55のV_H配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号63のV_H配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号71のV_H配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号79のV_H配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号87のV_H配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号101のV_H配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号109のV_H配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号117のV_H配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号125のV_H配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号133のV_H配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号141のV_H配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号149のV_H配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号157のV_H配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号165のV_H配列を含む。

20

30

40

【 0 1 6 4 】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号7、15、23、31、39、47、55、63、71、79、87、101、109、117、125、133、141、149、157、及び165で提供される例示的V_H配列と少なくとも約50%、約60%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%の同一性を有するV_H配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、最大1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、又は25個のアミノ酸置換を有する、配列番号7、15、23、31、39、47、55、63、71、79、87、101、109、117、125、133、141、149、157、及び165で提供されるV_H配列を含む。いくつかの態様では、アミノ酸置換は、保存

50

的アミノ酸置換である。いくつかの実施形態では、この段落に記載される抗体は、本明細書では「バリエーション」と呼ばれる。いくつかの実施形態では、このようなバリエーションは、例えば、親和性成熟、部位特異的変異誘発、ランダム変異誘発、又は当技術分野で公知の若しくは本明細書に記載される任意の他の方法によって、本明細書で提供される配列から得られる。いくつかの実施形態では、このようなバリエーションは、本明細書で提供される配列から得られるものではなく、例えば、抗体を得るための本明細書で提供される方法に従って新たに単離されてもよい。

【0165】

1.2 VLドメイン

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号11、19、27、35、43、51、59、67、75、83、91、105、113、121、129、137、145、153、161、及び169から選択されるVL配列を含む。 10

【0166】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号11のVL配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号19のVL配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号27のVL配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号35のVL配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号43のVL配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号51のVL配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号59のVL配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号67のVL配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号75のVL配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号83のVL配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号91のVL配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号105のVL配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号113のVL配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号121のVL配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号129のVL配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号137のVL配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号145のVL配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号153のVL配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号161のVL配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号169のVL配列を含む。 20 30

【0167】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号11、19、27、35、43、51、59、67、75、83、91、105、113、121、129、137、145、153、161、及び169で提供される例示的VL配列と少なくとも約50%、約60%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%の同一性を有するVL配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、最大1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、又は25個のアミノ酸置換を有する、配列番号11、19、27、35、43、51、59、67、75、83、91、105、113、121、129、137、145、153、161、及び169で提供されるVL配列を含む。いくつかの態様では、アミノ酸置換は、保存的アミノ酸置換である。いくつかの実施形態では、この段落に記載される抗体は、本明細書では「バリエーション」と呼ばれる。いくつかの実施形態では、このようなバリエーションは、例えば、親和性成熟、部位特異的変異誘発、ランダム変異誘発、又は当技術分野で公知の若しくは本明細書に記載される任意の他の方法によって、本明細書で提供される配列から得られる。いくつかの実施形態では、このようなバリエーションは、本明細書で提供される配列から得られるものではなく、例えば、抗体を得るための本明細書で提供される方 40 50

法に従って新たに単離されてもよい。

【0168】

1.3 V_H-V_Lの組み合わせ

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号7、15、23、31、39、47、55、63、71、79、87、101、109、117、125、133、141、149、157、及び165から選択されるV_H配列、及び配列番号11、19、27、35、43、51、59、67、75、83、91、105、113、121、129、137、145、153、161、及び169から選択されるV_L配列を含む。

【0169】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号7のV_H配列及び配列番号11のV_L配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号15のV_H配列及び配列番号19のV_L配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号23のV_H配列及び配列番号27のV_L配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号31のV_H配列及び配列番号35のV_L配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号39のV_H配列及び配列番号43のV_L配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号47のV_H配列及び配列番号51のV_L配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号55のV_H配列及び配列番号59のV_L配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号63のV_H配列及び配列番号67のV_L配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号71のV_H配列及び配列番号75のV_L配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号79のV_H配列及び配列番号83のV_L配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号87のV_H配列及び配列番号91のV_L配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号101のV_H配列及び配列番号105のV_L配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号109のV_H配列及び配列番号113のV_L配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号117のV_H配列及び配列番号121のV_L配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号125のV_H配列及び配列番号129のV_L配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号133のV_H配列及び配列番号137のV_L配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号141のV_H配列及び配列番号145のV_L配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号149のV_H配列及び配列番号153のV_L配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号157のV_H配列及び配列番号161のV_L配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号165のV_H配列及び配列番号169のV_L配列を含む。

【0170】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号7、15、23、31、39、47、55、63、71、79、87、101、109、117、125、133、141、149、157、及び165で提供される例示的V_H配列と少なくとも約50%、約60%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%の同一性を有するV_H配列、及び配列番号11、19、27、35、43、51、59、67、75、83、91、105、113、121、129、137、145、153、161、及び169で提供される例示的V_L配列と少なくとも約50%、約60%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%の同一性を有するV_L配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、最大1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、又は25個のアミノ酸置換を有する、配列番号7、15、23、31、39、47、55、63、71、79、87、101、109、117、125、133、141、149、157、及び165で提供されるV_H配列、及び最大1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、

18、19、20、21、22、23、24、又は25個のアミノ酸置換を有する、配列番号11、19、27、35、43、51、59、67、75、83、91、105、113、121、129、137、145、153、161、及び169で提供されるV_L配列を含む。いくつかの態様では、アミノ酸置換は、保存的アミノ酸置換である。いくつかの実施形態では、この段落に記載される抗体は、本明細書では「バリエーション」と呼ばれる。いくつかの実施形態では、このようなバリエーションは、例えば、親和性成熟、部位特異的変異誘発、ランダム変異誘発、又は当技術分野で公知の若しくは本明細書に記載される任意の他の方法によって、本明細書で提供される配列から得られる。いくつかの実施形態では、このようなバリエーションは、本明細書で提供される配列から得られるものではなく、例えば、抗体を得るための本明細書で提供される方法に従って新たに単離されてもよい。

10

【0171】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号7と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、及び配列番号11と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む。

20

【0172】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号15と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、及び配列番号19と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む。

【0173】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号23と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、及び配列番号27と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む。

30

【0174】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号31と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、及び配列番号35と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む。

40

【0175】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号39と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少な

50

くとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、及び配列番号43と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む。

【0176】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号47と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、及び配列番号51と

10

【0177】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号55と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、及び配列番号59と

20

【0178】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号63と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、及び配列番号67と

30

【0179】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号71と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、及び配列番号75と

【0180】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号79と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、及び配列番号83と

40

【0181】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号87と少なくとも60

50

【 0 1 8 2 】

10

20

30

40

50

【 0 1 8 7 】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号141と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、及び配列番号145と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む。

【 0 1 8 8 】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号149と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、及び配列番号153と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む。

【 0 1 8 9 】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号157と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、及び配列番号161と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む。

【 0 1 9 0 】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号165と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、及び配列番号169と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む。

【 0 1 9 1 】

ある特定の実施形態では、重鎖可変領域配列、例えば、配列番号7、15、23、31、39、47、55、63、71、79、87、101、109、117、125、133、141、149、157、若しくは165のV_H配列、又はそのアミノ酸バリエーションは、当技術分野で公知の様々な重鎖定常領域配列と共有結合し得ることが企図される。同様に、軽鎖可変領域配列、例えば、配列番号11、19、27、35、43、51、59、67、75、83、91、105、113、121、129、137、145、153、161、若しくは169のV_L、又はそのアミノ酸バリエーションは、当技術分野で公知の様々な軽鎖定常領域配列と共有結合し得ることが企図される。

【 0 1 9 2 】

例えば、抗体分子は、例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgM、IgA₁、IgA₂、IgD、及びIgEの重鎖定常領域から選択される、特に、例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、及びIgG₄の(例えば、ヒト)重鎖定常領域から選択される重鎖定常領域を有してもよい。別の実施形態では、抗体分子は、例えば、カッパ又はラムダの(例えば、ヒト)軽鎖定常領域から選択される軽鎖定常領域を有する。定常領域は、抗体の特性を改変するように(例えば

10

20

30

40

50

、Fc受容体結合、抗体グリコシル化、システイン残基数、エフェクター細胞機能、及び/又は補体機能のうちの1つ以上を増加又は減少させるように)、変化させる、例えば変異させることができる。一実施形態では、抗体は、エフェクター機能を有し、補体を固定することができる。他の実施形態では、抗体は、エフェクター細胞を動員せず、又は補体を固定しない。別の実施形態では、抗体は、Fc受容体に結合する低減された能力を有するか、又はFc受容体に結合する能力を有しない。例えば、抗体は、Fc受容体への結合を支持しない、アイソタイプ又はサブタイプ、断片又は他の変異体であり、例えば、抗体は、変異誘発された又は欠失されたFc受容体結合領域を有する。

【0193】

1.4 CDR

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号7、15、23、31、39、47、55、63、71、79、87、101、109、117、125、133、141、149、157、及び165から選択されるV_Hドメインの1~3個のCDRを含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号7、15、23、31、39、47、55、63、71、79、87、101、109、117、125、133、141、149、157、及び165から選択されるV_Hドメインの2~3個のCDRを含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号7、15、23、31、39、47、55、63、71、79、87、101、109、117、125、133、141、149、157、及び165から選択されるV_Hドメインの3個のCDRを含む。いくつかの態様では、CDRは、Kabat番号付けシステムを使用して注釈付けされる。いくつかの態様では、CDRは、Chothia番号付けシステムを使用して注釈付けされる。いくつかの態様では、CDRは、AbM番号付けシステムを使用して注釈付けされる。いくつかの態様では、CDRは、Contact番号付けシステムを使用して注釈付けされる。いくつかの態様では、CDRは、IMGT番号付けシステムを使用して注釈付けされる。いくつかの態様では、CDRは、位置27~35、50~65、及び93~102におけるアミノ酸残基がそれぞれCDR-H1、CDR-H2、及びCDR-H3を示す、典型的な番号付けシステムを使用して注釈付けされる。

【0194】

いくつかの実施形態では、CDRは、配列番号7、15、23、31、39、47、55、63、71、79、87、101、109、117、125、133、141、149、157、及び165のCDR-H1、CDR-H2、又はCDR-H3と少なくとも約50%、約60%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%の同一性を有するCDRである。いくつかの実施形態では、CDR-H1は、最大1、2、3、4、又は5個のアミノ酸置換を有する、配列番号7、15、23、31、39、47、55、63、71、79、87、101、109、117、125、133、141、149、157、及び165から選択されるV_HドメインのCDR-H1である。いくつかの実施形態では、CDR-H2は、最大1、2、3、4、5、6、7、又は8個のアミノ酸置換を有する、配列番号7、15、23、31、39、47、55、63、71、79、87、101、109、117、125、133、141、149、157、及び165から選択されるV_HドメインのCDR-H2である。いくつかの実施形態では、CDR-H3は、最大1、2、3、4、5、6、7、又は8個のアミノ酸置換を有する、配列番号7、15、23、31、39、47、55、63、71、79、87、101、109、117、125、133、141、149、157、及び165から選択されるV_HドメインのCDR-H3である。いくつかの態様では、アミノ酸置換は、保存的アミノ酸置換である。いくつかの実施形態では、この段落に記載される抗体は、本明細書では「バリエーション」と呼ばれる。いくつかの実施形態では、このようなバリエーションは、例えば、親和性成熟、部位特異的変異誘発、ランダム変異誘発、又は当技術分野で公知の若しくは本明細書に記載される任意の他の方法によって、本明細書で提供される配列から得られる。いくつかの実施形態では、このようなバリエーションは、本明細書で提供される配列から得られるものではなく、例えば、抗体を得るための本明細書で提供される方法に従って新たに単離されてもよい。

【0195】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号11、19、27、35

、43、51、59、67、75、83、91、105、113、121、129、137、145、153、161、及び169から選択されるV_Lドメインの1～3個のCDRを含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号11、19、27、35、43、51、59、67、75、83、91、105、113、121、129、137、145、153、161、及び169から選択されるV_Lドメインの2～3個のCDRを含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号11、19、27、35、43、51、59、67、75、83、91、105、113、121、129、137、145、153、161、及び169から選択されるV_Lドメインの3個のCDRを含む。いくつかの態様では、CDRは、Kabat番号付けシステムを使用して注釈付けされる。いくつかの態様では、CDRは、Chothia番号付けシステムを使用して注釈付けされる。いくつかの態様では、CDRは、AbM番号付けシステムを使用して注釈付けされる。いくつかの態様では、CDRは、Contact番号付けシステムを使用して注釈付けされる。いくつかの態様では、CDRは、IMGT番号付けシステムを使用して注釈付けされる。いくつかの態様では、CDRは、位置24～34、50～56、及び89～97におけるアミノ酸残基がそれぞれCDR-L1、CDR-L2、及びCDR-L3を示す、典型的な番号付けシステムを使用して注釈付けされる。

10

【0196】

いくつかの実施形態では、CDRは、配列番号11、19、27、35、43、51、59、67、75、83、91、105、113、121、129、137、145、153、161、及び169のCDR-L1、CDR-L2、又はCDR-L3と少なくとも約50%、約60%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%の同一性を有するCDRである。いくつかの実施形態では、CDR-L1は、最大1、2、3、4、又は5個のアミノ酸置換を有する、配列番号11、19、27、35、43、51、59、67、75、83、91、105、113、121、129、137、145、153、161、及び169から選択されるV_LドメインのCDR-L1である。いくつかの実施形態では、CDR-L2は、最大1、2、3、4、5、6、7、又は8個のアミノ酸置換を有する、配列番号11、19、27、35、43、51、59、67、75、83、91、105、113、121、129、137、145、153、161、及び169から選択されるV_LドメインのCDR-L2である。いくつかの実施形態では、CDR-L3は、最大1、2、3、4、5、6、7、又は8個のアミノ酸置換を有する、配列番号11、19、27、35、43、51、59、67、75、83、91、105、113、121、129、137、145、153、161、及び169、及び760から選択されるV_LドメインのCDR-L3である。いくつかの態様では、アミノ酸置換は、保存的アミノ酸置換である。いくつかの実施形態では、この段落に記載される抗体は、本明細書では「バリエーション」と呼ばれる。いくつかの実施形態では、このようなバリエーションは、例えば、親和性成熟、部位特異的変異誘発、ランダム変異誘発、又は当技術分野で公知の若しくは本明細書に記載される任意の他の方法によって、本明細書で提供される配列から得られる。いくつかの実施形態では、このようなバリエーションは、本明細書で提供される配列から得られるものではなく、例えば、抗体を得るための本明細書で提供される方法に従って新たに単離されてもよい。

20

30

【0197】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号7、15、23、31、39、47、55、63、71、79、87、101、109、117、125、133、141、149、157、及び165から選択されるV_Hドメインの1～3個のCDR、及び配列番号11、19、27、35、43、51、59、67、75、83、91、105、113、121、129、137、145、153、161、及び169から選択されるV_Lドメインの1～3個のCDRを含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号7、15、23、31、39、47、55、63、71、79、87、101、109、117、125、133、141、149、157、及び165から選択されるV_Hドメインの2～3個のCDR、及び配列番号11、19、27、35、43、51、59、67、75、83、91、105、113、121、129、137、145、153、161、及び169から選択されるV_Lドメインの2～3個のCDRを含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号7、15、23、31、39、47、55、63、71、79、87、101、109、117、125、133、141、149、157、及び165から選択されるV_Hドメ

40

50

インの3個のCDR、及び配列番号11、19、27、35、43、51、59、67、75、83、91、105、113、121、129、137、145、153、161、及び169から選択されるV_Lドメインの3個のCDRを含む。いくつかの態様では、CDRは、Kabat CDRである。いくつかの態様では、CDRは、Chothia CDRである。いくつかの態様では、CDRは、AbM CDRである。いくつかの態様では、CDRは、Contact CDRである。いくつかの態様では、CDRは、IMGT CDRである。いくつかの態様では、CDRは、典型的CDRである。

【0198】

いくつかの実施形態では、CDRは、配列番号7、15、23、31、39、47、55、63、71、79、87、101、109、117、125、133、141、149、157、及び165のCDR-H1、CDR-H2、又はCDR-H3と少なくとも約50%、約60%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%の同一性、及び配列番号11、19、27、35、43、51、59、67、75、83、91、105、113、121、129、137、145、153、161、及び169のCDR-L1、CDR-L2、又はCDR-L3と少なくとも約50%、約60%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%の同一性を有するCDRである。いくつかの実施形態では、CDR-H1は、最大1、2、3、4、又は5個のアミノ酸置換を有する、配列番号7、15、23、31、39、47、55、63、71、79、87、101、109、117、125、133、141、149、157、及び165から選択されるV_HドメインのCDR-H1であり；CDR-H2は、最大1、2、3、4、5、6、7、又は8個のアミノ酸置換を有する、配列番号7、15、23、31、39、47、55、63、71、79、87、101、109、117、125、133、141、149、157、及び165から選択されるV_HドメインのCDR-H2であり；CDR-H3は、最大1、2、3、4、5、6、7、又は8個のアミノ酸置換を有する、配列番号7、15、23、31、39、47、55、63、71、79、87、101、109、117、125、133、141、149、157、及び165から選択されるV_HドメインのCDR-H3であり；CDR-L1は、最大1、2、3、4、5、又は6個のアミノ酸置換を有する、配列番号11、19、27、35、43、51、59、67、75、83、91、105、113、121、129、137、145、153、161、及び169から選択されるV_LドメインのCDR-L1であり；CDR-L2は、最大1、2、3、又は4個のアミノ酸置換を有する、配列番号11、19、27、35、43、51、59、67、75、83、91、105、113、121、129、137、145、153、161、及び169から選択されるV_LドメインのCDR-L2であり；且つCDR-L3は、最大1、2、3、4、又は5個のアミノ酸置換を有する、配列番号11、19、27、35、43、51、59、67、75、83、91、105、113、121、129、137、145、153、161、及び169から選択されるV_LドメインのCDR-L3である。いくつかの態様では、アミノ酸置換は、保存的アミノ酸置換である。いくつかの実施形態では、この段落に記載される抗体は、本明細書では「バリエーション」と呼ばれる。いくつかの実施形態では、このようなバリエーションは、例えば、親和性成熟、部位特異的変異誘発、ランダム変異誘発、又は当技術分野で公知の若しくは本明細書に記載される任意の他の方法によって、本明細書で提供される配列から得られる。いくつかの実施形態では、このようなバリエーションは、本明細書で提供される配列から得られるものではなく、例えば、抗体を得るための本明細書で提供される方法に従って新たに単離されてもよい。

【0199】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、位置93～102におけるアミノ酸残基がCDR-H3を示す、典型的な番号付けシステムによって決定した場合、配列番号10、18、26、34、42、50、58、66、74、82、90、104、112、120、128、136、144、152、160、及び168から選択されるCDR-H3を含む。いくつかの態様では、CDR-H3は、配列番号10、18、26、34、42、50、58、66、74、82、90、104、112、120、128、136、144、152、160、及び168のCDR-H3と少なくとも約50%、約60%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%の同一性を有する。いくつかの実施形態では、CDR-H3は、最大1、2、3、4、5、6、7、又は8個のアミノ酸置換を有する、配列番号10、18、26、34、42、50、58、66、74、82、90、104、112、120、128、136、144、152、

160、及び168から選択されるCDR-H3である。いくつかの態様では、アミノ酸置換は、保存的アミノ酸置換である。いくつかの実施形態では、この段落に記載される抗体は、本明細書では「バリエーション」と呼ばれる。いくつかの実施形態では、このようなバリエーションは、例えば、親和性成熟、部位特異的変異誘発、ランダム変異誘発、又は当技術分野で公知の若しくは本明細書に記載される任意の他の方法によって、本明細書で提供される配列から得られる。いくつかの実施形態では、このようなバリエーションは、本明細書で提供される配列から得られるものではなく、例えば、抗体を得るための本明細書で提供される方法に従って新たに単離されてもよい。

【0200】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、位置50～65におけるアミノ酸残基がCDR-H2を示す、典型的な番号付けシステムによって決定した場合、配列番号9、17、25、33、41、49、57、65、73、81、89、103、111、119、127、135、143、151、159、及び167から選択されるCDR-H2を含む。いくつかの態様では、CDR-H2は、配列番号9、17、25、33、41、49、57、65、73、81、89、103、111、119、127、135、143、151、159、及び167のCDR-H2と少なくとも約50%、約60%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%の同一性を有する。いくつかの実施形態では、CDR-H2は、最大1、2、3、4、5、6、7、又は8個のアミノ酸置換を有する、配列番号9、17、25、33、41、49、57、65、73、81、89、103、111、119、127、135、143、151、159、及び167から選択されるCDR-H2である。いくつかの態様では、アミノ酸置換は、保存的アミノ酸置換である。いくつかの実施形態では、この段落に記載される抗体は、本明細書では「バリエーション」と呼ばれる。いくつかの実施形態では、このようなバリエーションは、例えば、親和性成熟、部位特異的変異誘発、ランダム変異誘発、又は当技術分野で公知の若しくは本明細書に記載される任意の他の方法によって、本明細書で提供される配列から得られる。いくつかの実施形態では、このようなバリエーションは、本明細書で提供される配列から得られるものではなく、例えば、抗体を得るための本明細書で提供される方法に従って新たに単離されてもよい。

【0201】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、位置27～35におけるアミノ酸残基がCDR-H1を示す、典型的な番号付けシステムによって決定した場合、配列番号8、16、24、32、40、48、56、64、72、80、88、102、110、118、126、134、142、150、158、及び166から選択されるCDR-H1を含む。いくつかの態様では、CDR-H1は、配列番号8、16、24、32、40、48、56、64、72、80、88、102、110、118、126、134、142、150、158、及び166のCDR-H1と少なくとも約50%、約60%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%の同一性を有する。いくつかの実施形態では、CDR-H1は、最大1、2、3、4、5、6、7、又は8個のアミノ酸置換を有する、配列番号8、16、24、32、40、48、56、64、72、80、88、102、110、118、126、134、142、150、158、及び166から選択されるCDR-H1である。いくつかの態様では、アミノ酸置換は、保存的アミノ酸置換である。いくつかの実施形態では、この段落に記載される抗体は、本明細書では「バリエーション」と呼ばれる。いくつかの実施形態では、このようなバリエーションは、例えば、親和性成熟、部位特異的変異誘発、ランダム変異誘発、又は当技術分野で公知の若しくは本明細書に記載される任意の他の方法によって、本明細書で提供される配列から得られる。いくつかの実施形態では、このようなバリエーションは、本明細書で提供される配列から得られるものではなく、例えば、抗体を得るための本明細書で提供される方法に従って新たに単離されてもよい。

【0202】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号10、18、26、34、42、50、58、66、74、82、90、104、112、120、128、136、144、152、160、及び168から選択されるCDR-H3、及び配列番号9、17、25、33、41、49、57

、65、73、81、89、103、111、119、127、135、143、151、159、及び167から選択されるCDR-H2を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号10、18、26、34、42、50、58、66、74、82、90、104、112、120、128、136、144、152、160、及び168から選択されるCDR-H3、配列番号9、17、25、33、41、49、57、65、73、81、89、103、111、119、127、135、143、151、159、及び167から選択されるCDR-H2、及び配列番号8、16、24、32、40、48、56、64、72、80、88、102、110、118、126、134、142、150、158、及び166から選択されるCDR-H1を含む。いくつかの実施形態では、CDR-H3は、配列番号10、18、26、34、42、50、58、66、74、82、90、104、112、120、128、136、144、152、160、及び168のCDR-H3と少なくとも約50%、約60%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%の同一性を有し、CDR-H2は、配列番号9、17、25、33、41、49、57、65、73、81、89、103、111、119、127、135、143、151、159、及び167のCDR-H2と少なくとも約50%、約60%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%の同一性を有し、且つCDR-H1は、配列番号8、16、24、32、40、48、56、64、72、80、88、102、110、118、126、134、142、150、158、及び166のCDR-H1と少なくとも約50%、約60%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%の同一性を有する。いくつかの実施形態では、CDR-H3は、最大1、2、3、4、5、6、7、又は8個のアミノ酸置換を有する、配列番号10、18、26、34、42、50、58、66、74、82、90、104、112、120、128、136、144、152、160、及び168から選択されるCDR-H3であり；CDR-H2は、最大1、2、3、4、5、6、7、又は8個のアミノ酸置換を有する、配列番号9、17、25、33、41、49、57、65、73、81、89、103、111、119、127、135、143、151、159、及び167から選択されるCDR-H2であり；且つCDR-H1は、最大1、2、3、4、又は5個のアミノ酸置換を有する、配列番号8、16、24、32、40、48、56、64、72、80、88、102、110、118、126、134、142、150、158、及び166から選択されるCDR-H1である。いくつかの態様では、アミノ酸置換は、保存的アミノ酸置換である。いくつかの実施形態では、この段落に記載される抗体は、本明細書では「バリエーション」と呼ばれる。いくつかの実施形態では、このようなバリエーションは、例えば、親和性成熟、部位特異的変異誘発、ランダム変異誘発、又は当技術分野で公知の若しくは本明細書に記載される任意の他の方法によって、本明細書で提供される配列から得られる。いくつかの実施形態では、このようなバリエーションは、本明細書で提供される配列から得られるものではなく、例えば、抗体を得るための本明細書で提供される方法に従って新たに単離されてもよい。

【0203】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、位置89～97におけるアミノ酸残基がCDR-L3を示す、典型的な番号付けシステムによって決定した場合、配列番号14、22、30、38、46、54、62、70、78、86、94、108、116、124、132、140、148、156、164、及び172から選択されるCDR-L3を含む。いくつかの態様では、CDR-L3は、配列番号14、22、30、38、46、54、62、70、78、86、94、108、116、124、132、140、148、156、164、及び172のCDR-L3と少なくとも約50%、約60%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%の同一性を有する。いくつかの実施形態では、CDR-L3は、最大1、2、3、4、5、6、7、又は8個のアミノ酸置換を有する、配列番号14、22、30、38、46、54、62、70、78、86、94、108、116、124、132、140、148、156、164、及び172から選択されるCDR-L3である。いくつかの態様では、アミノ酸置換は、保存的アミノ酸置換である。いくつかの実施形態では、この段落に記載される抗体は、本明細書では「バリエーション」と呼ばれる。いくつかの実施形態では、このようなバリエーションは、例えば、親和性成熟、部位特異的変異誘発、ランダム変異誘発、又は当技術分野で公知の若しくは本明細書に記載される任意の他の方法によって、本明細書で提供される配列から得

られる。いくつかの実施形態では、このようなバリエーションは、本明細書で提供される配列から得られるものではなく、例えば、抗体を得るための本明細書で提供される方法に従って新たに単離されてもよい。

【0204】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、位置50～56におけるアミノ酸残基がCDR-L2を示す、典型的な番号付けシステムによって決定した場合、配列番号13、21、29、37、45、53、61、69、77、85、93、107、115、123、131、139、147、155、163、及び171から選択されるCDR-L2を含む。いくつかの態様では、CDR-L2は、配列番号13、21、29、37、45、53、61、69、77、85、93、107、115、123、131、139、147、155、163、及び171のCDR-L2と少なくとも約50%、約60%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%の同一性を有する。いくつかの実施形態では、CDR-L2は、最大1、2、3、4、5、6、7、又は8個のアミノ酸置換を有する、配列番号13、21、29、37、45、53、61、69、77、85、93、107、115、123、131、139、147、155、163、及び171から選択されるCDR-L2である。いくつかの態様では、アミノ酸置換は、保存的アミノ酸置換である。いくつかの実施形態では、この段落に記載される抗体は、本明細書では「バリエーション」と呼ばれる。いくつかの実施形態では、このようなバリエーションは、例えば、親和性成熟、部位特異的変異誘発、ランダム変異誘発、又は当技術分野で公知の若しくは本明細書に記載される任意の他の方法によって、本明細書で提供される配列から得られる。いくつかの実施形態では、このようなバリエーションは、本明細書で提供される配列から得られるものではなく、例えば、抗体を得るための本明細書で提供される方法に従って新たに単離されてもよい。

10

20

【0205】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、位置24～34におけるアミノ酸残基がCDR-L1を示す、典型的な番号付けシステムによって決定した場合、配列番号12、20、28、36、44、52、60、68、76、84、92、106、114、122、130、138、146、154、162、及び170から選択されるCDR-L1を含む。いくつかの態様では、CDR-L1は、配列番号12、20、28、36、44、52、60、68、76、84、92、106、114、122、130、138、146、154、162、及び170のCDR-L1と少なくとも約50%、約60%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%の同一性を有する。いくつかの実施形態では、CDR-L1は、最大1、2、3、4、5、6、7、又は8個のアミノ酸置換を有する、配列番号12、20、28、36、44、52、60、68、76、84、92、106、114、122、130、138、146、154、162、及び170から選択されるCDR-L1である。いくつかの態様では、アミノ酸置換は、保存的アミノ酸置換である。いくつかの実施形態では、この段落に記載される抗体は、本明細書では「バリエーション」と呼ばれる。いくつかの実施形態では、このようなバリエーションは、例えば、親和性成熟、部位特異的変異誘発、ランダム変異誘発、又は当技術分野で公知の若しくは本明細書に記載される任意の他の方法によって、本明細書で提供される配列から得られる。いくつかの実施形態では、このようなバリエーションは、本明細書で提供される配列から得られるものではなく、例えば、抗体を得るための本明細書で提供される方法に従って新たに単離されてもよい。

30

40

【0206】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号14、22、30、38、46、54、62、70、78、86、94、108、116、124、132、140、148、156、164、及び172から選択されるCDR-L3、及び配列番号13、21、29、37、45、53、61、69、77、85、93、107、115、123、131、139、147、155、163、及び171から選択されるCDR-L2を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号14、22、30、38、46、54、62、70、78、86、94、108、116、124、132、140、148、156、164、及び172から選択されるCDR-L3、配列番号13、21、29、37、45、53、61、69、77、85、93、107、115、123、131、139、14

50

7、155、163、及び171から選択されるCDR-L2、及び配列番号12、20、28、36、44、52、60、68、76、84、92、106、114、122、130、138、146、154、162、及び170から選択されるCDR-L1を含む。いくつかの実施形態では、CDR-L3は、配列番号14、22、30、38、46、54、62、70、78、86、94、108、116、124、132、140、148、156、164、及び172のCDR-L3と少なくとも約50%、約60%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%の同一性を有し、CDR-L2は、配列番号13、21、29、37、45、53、61、69、77、85、93、107、115、123、131、139、147、155、163、及び171のCDR-L2と少なくとも約50%、約60%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%の同一性を有し、且つCDR-L1は、配列番号12、20、28、36、44、52、60、68、76、84、92、106、114、122、130、138、146、154、162、及び170のCDR-L1と少なくとも約50%、約60%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%の同一性を有する。いくつかの実施形態では、CDR-L3は、最大1、2、3、4、又は5個のアミノ酸置換を有する、配列番号14、22、30、38、46、54、62、70、78、86、94、108、116、124、132、140、148、156、164、及び172から選択されるCDR-L3であり；CDR-L2は、最大1、2、3、又は4個のアミノ酸置換を有する、配列番号13、21、29、37、45、53、61、69、77、85、93、107、115、123、131、139、147、155、163、及び171から選択されるCDR-L2であり；且つCDR-L1は、最大1、2、3、4、5、又は6個のアミノ酸置換を有する、配列番号12、20、28、36、44、52、60、68、76、84、92、106、114、122、130、138、146、154、162、及び170から選択されるCDR-L1である。いくつかの態様では、アミノ酸置換は、保存的アミノ酸置換である。いくつかの実施形態では、この段落に記載される抗体は、本明細書では「バリエーション」と呼ばれる。いくつかの実施形態では、このようなバリエーションは、例えば、親和性成熟、部位特異的変異誘発、ランダム変異誘発、又は当技術分野で公知の若しくは本明細書に記載される任意の他の方法によって、本明細書で提供される配列から得られる。いくつかの実施形態では、このようなバリエーションは、本明細書で提供される配列から得られるものではなく、例えば、抗体を得るための本明細書で提供される方法に従って新たに単離されてもよい。

【0207】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号10、18、26、34、42、50、58、66、74、82、90、104、112、120、128、136、144、152、160、及び168から選択されるCDR-H3、配列番号9、17、25、33、41、49、57、65、73、81、89、103、111、119、127、135、143、151、159、及び167から選択されるCDR-H2、配列番号8、16、24、32、40、48、56、64、72、80、88、102、110、118、126、134、142、150、158、及び166から選択されるCDR-H1、配列番号14、22、30、38、46、54、62、70、78、86、94、108、116、124、132、140、148、156、164、及び172から選択されるCDR-L3、配列番号13、21、29、37、45、53、61、69、77、85、93、107、115、123、131、139、147、155、163、及び171から選択されるCDR-L2、及び配列番号12、20、28、36、44、52、60、68、76、84、92、106、114、122、130、138、146、154、162、及び170から選択されるCDR-L1を含む。いくつかの実施形態では、CDR-H3は、配列番号10、18、26、34、42、50、58、66、74、82、90、104、112、120、128、136、144、152、160、及び168のCDR-H3と少なくとも約50%、約60%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%の同一性を有し、CDR-H2は、配列番号9、17、25、33、41、49、57、65、73、81、89、103、111、119、127、135、143、151、159、及び167のCDR-H2と少なくとも約50%、約60%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%の同一性を有し、CDR-H1は、配列番号8、16、24、32、40、48、56、64、72、80、88、102、110、118、126、134、142、1

50、158、及び166のCDR-H1と少なくとも約50%、約60%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%の同一性を有し、CDR-L3は、配列番号14、22、30、38、46、54、62、70、78、86、94、108、116、124、132、140、148、156、164、及び172のCDR-L3と少なくとも約50%、約60%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%の同一性を有し、CDR-L2は、配列番号13、21、29、37、45、53、61、69、77、85、93、107、115、123、131、139、147、155、163、及び171のCDR-L2と少なくとも約50%、約60%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%の同一性を有し、且つCDR-L1は、配列番号12、20、28、36、44、52、60、68、76、84、92、106、114、122、130、138、146、154、162、及び170のCDR-L1と少なくとも約50%、約60%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、又は約99%の同一性を有する。いくつかの実施形態では、CDR-H3は、最大1、2、3、4、5、6、7、又は8個のアミノ酸置換を有する、配列番号10、18、26、34、42、50、58、66、74、82、90、104、112、120、128、136、144、152、160、及び168から選択されるCDR-H3であり；CDR-H2は、最大1、2、3、4、5、6、7、又は8個のアミノ酸置換を有する、配列番号9、17、25、33、41、49、57、65、73、81、89、103、111、119、127、135、143、151、159、及び167から選択されるCDR-H2であり；CDR-H1は、最大1、2、3、4、又は5個のアミノ酸置換を有する、配列番号8、16、24、32、40、48、56、64、72、80、88、102、110、118、126、134、142、150、158、及び166から選択されるCDR-H1であり；CDR-L3は、最大1、2、3、4、又は5個のアミノ酸置換を有する、配列番号14、22、30、38、46、54、62、70、78、86、94、108、116、124、132、140、148、156、164、及び172から選択されるCDR-L3であり；CDR-L2は、最大1、2、3、又は4個のアミノ酸置換を有する、配列番号13、21、29、37、45、53、61、69、77、85、93、107、115、123、131、139、147、155、163、及び171から選択されるCDR-L2であり；且つCDR-L1は、最大1、2、3、4、5、又は6個のアミノ酸置換を有する、配列番号12、20、28、36、44、52、60、68、76、84、92、106、114、122、130、138、146、154、162、及び170から選択されるCDR-L1である。いくつかの態様では、アミノ酸置換は、保存的アミノ酸置換である。いくつかの実施形態では、この段落に記載される抗体は、本明細書では「バリエーション」と呼ばれる。いくつかの実施形態では、このようなバリエーションは、例えば、親和性成熟、部位特異的変異誘発、ランダム変異誘発、又は当技術分野で公知の若しくは本明細書に記載される任意の他の方法によって、本明細書で提供される配列から得られる。いくつかの実施形態では、このようなバリエーションは、本明細書で提供される配列から得られるものではなく、例えば、抗体を得るための本明細書で提供される方法に従って新たに単離されてもよい。

【0208】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、典型的な番号付けシステムによって決定した場合、配列番号8のCDR-H1、配列番号9のCDR-H2、配列番号10のCDR-H3、配列番号12のCDR-L1、配列番号13のCDR-L2、及び配列番号14のCDR-L3を含む。

【0209】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、典型的な番号付けシステムによって決定した場合、配列番号16のCDR-H1、配列番号17のCDR-H2、配列番号18のCDR-H3、配列番号20のCDR-L1、配列番号21のCDR-L2、及び配列番号22のCDR-L3を含む。

【0210】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、典型的な番号付けシステムによって決定した場合、配列番号24のCDR-H1、配列番号25のCDR-H2、配列番号26のCDR-H3、配列番号28のCDR-L1、配列番号29のCDR-L2、及び配列番号30のCDR-L

3を含む。

【0211】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、典型的な番号付けシステムによって決定した場合、配列番号32のCDR-H1、配列番号33のCDR-H2、配列番号34のCDR-H3、配列番号36のCDR-L1、配列番号37のCDR-L2、及び配列番号38のCDR-L3を含む。

【0212】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、典型的な番号付けシステムによって決定した場合、配列番号40のCDR-H1、配列番号41のCDR-H2、配列番号42のCDR-H3、配列番号44のCDR-L1、配列番号45のCDR-L2、及び配列番号46のCDR-L3を含む。

10

【0213】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、典型的な番号付けシステムによって決定した場合、配列番号48のCDR-H1、配列番号49のCDR-H2、配列番号50のCDR-H3、配列番号52のCDR-L1、配列番号53のCDR-L2、及び配列番号54のCDR-L3を含む。

【0214】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、典型的な番号付けシステムによって決定した場合、配列番号56のCDR-H1、配列番号57のCDR-H2、配列番号58のCDR-H3、配列番号60のCDR-L1、配列番号61のCDR-L2、及び配列番号62のCDR-L3を含む。

20

【0215】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、典型的な番号付けシステムによって決定した場合、配列番号64のCDR-H1、配列番号65のCDR-H2、配列番号66のCDR-H3、配列番号68のCDR-L1、配列番号69のCDR-L2、及び配列番号70のCDR-L3を含む。

【0216】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、典型的な番号付けシステムによって決定した場合、配列番号72のCDR-H1、配列番号73のCDR-H2、配列番号74のCDR-H3、配列番号76のCDR-L1、配列番号77のCDR-L2、及び配列番号78のCDR-L3を含む。

30

【0217】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、典型的な番号付けシステムによって決定した場合、配列番号80のCDR-H1、配列番号81のCDR-H2、配列番号82のCDR-H3、配列番号84のCDR-L1、配列番号85のCDR-L2、及び配列番号86のCDR-L3を含む。

【0218】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、典型的な番号付けシステムによって決定した場合、配列番号88のCDR-H1、配列番号89のCDR-H2、配列番号90のCDR-H3、配列番号92のCDR-L1、配列番号93のCDR-L2、及び配列番号94のCDR-L3を含む。

40

【0219】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、典型的な番号付けシステムによって決定した場合、配列番号102のCDR-H1、配列番号103のCDR-H2、配列番号104のCDR-H3、配列番号106のCDR-L1、配列番号107のCDR-L2、及び配列番号108のCDR-L3を含む。

【0220】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、典型的な番号付けシステムによって決定した場合、配列番号110のCDR-H1、配列番号111のCDR-H2、配列番号112のCDR-H3、配列番号114のCDR-L1、配列番号115のCDR-L2、及び配列番号116の

50

CDR-L3を含む。

【0221】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、典型的な番号付けシステムによって決定した場合、配列番号118のCDR-H1、配列番号119のCDR-H2、配列番号120のCDR-H3、配列番号122のCDR-L1、配列番号123のCDR-L2、及び配列番号124のCDR-L3を含む。

【0222】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、典型的な番号付けシステムによって決定した場合、配列番号126のCDR-H1、配列番号127のCDR-H2、配列番号128のCDR-H3、配列番号130のCDR-L1、配列番号131のCDR-L2、及び配列番号132のCDR-L3を含む。

10

【0223】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、典型的な番号付けシステムによって決定した場合、配列番号134のCDR-H1、配列番号135のCDR-H2、配列番号136のCDR-H3、配列番号138のCDR-L1、配列番号139のCDR-L2、及び配列番号140のCDR-L3を含む。

【0224】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、典型的な番号付けシステムによって決定した場合、配列番号142のCDR-H1、配列番号143のCDR-H2、配列番号144のCDR-H3、配列番号146のCDR-L1、配列番号147のCDR-L2、及び配列番号148のCDR-L3を含む。

20

【0225】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、典型的な番号付けシステムによって決定した場合、配列番号150のCDR-H1、配列番号151のCDR-H2、配列番号152のCDR-H3、配列番号154のCDR-L1、配列番号155のCDR-L2、及び配列番号156のCDR-L3を含む。

【0226】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、典型的な番号付けシステムによって決定した場合、配列番号158のCDR-H1、配列番号159のCDR-H2、配列番号160のCDR-H3、配列番号162のCDR-L1、配列番号163のCDR-L2、及び配列番号164のCDR-L3を含む。

30

【0227】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、典型的な番号付けシステムによって決定した場合、配列番号166のCDR-H1、配列番号167のCDR-H2、配列番号168のCDR-H3、配列番号170のCDR-L1、配列番号171のCDR-L2、及び配列番号172のCDR-L3を含む。

【0228】

1.5 コンセンサス配列

各ファミリーの代表的な抗体の V_H 配列及び V_L 配列、並びにそれらの対応するCDR配列を表すコンセンサス配列が開発された。各CDRの位置内でアミノ酸が異なる位置は、 X_1 、 X_2 、 X_3 ...によって表される。 V_H 配列及び V_L 配列のフレームワーク領域内でアミノ酸が異なる位置は、 X_a 、 X_b 、 X_c ...で表される。各X位置でコンセンサス配列を表す可能性のあるアミノ酸が、本明細書で特定される。

40

【0229】

いくつかの実施形態では、抗体の第1のファミリー(図12A~12Bを参照)であって、該ファミリーの抗体が、以下の6個のCDR配列:(a)配列 $FX_1FX_2X_3X_4AMS$ (配列番号1)(X_1 は、T又はAであり、 X_2 は、G、S、又はEであり、 X_3 は、Q、T、P、又はRであり、且つ X_4 は、Y又はFである)を有するCDR-H1;(b)配列 $AISX_5X_6GGX_7TX_8YADSVKKG$ (配列番号2)(X_5 は、A又はGであり、 X_6 は、A、V、又はSであり、 X_7 は、T又はSであり、且つ X_8 は、K、A、又はYである)を有するCDR-H2;(c)配列 $AKPLDSSX_9WADFX_{10}X_{11}$ (

50

配列番号3)(X_9 は、Q、F、又はLであり、 X_{10} は、D又はQであり、且つ X_{11} は、L又はAである)を有するCDR-H3;(d)配列RASQ X_{12} IX X_{13} SWLA(配列番号4)(X_{12} は、G、D、又はTであり、且つ X_{13} は、D、S、又はYである)を有するCDR-L1;(e)配列 X_{14} AS X_{15} LQ X_{16} (配列番号5)(X_{14} は、A、Y、又はFであり、 X_{15} は、S、A、G、又はFであり、且つ X_{16} は、D又はSである)を有するCDR-L2;及び(f)配列QQ X_{17} X_{18} X_{19} LPIT(配列番号6)(X_{17} は、A、H、又はQであり; X_{18} は、S、D、W、又はLであり;且つ X_{19} は、V、D、Y、又はKである)を有するCDR-L3を含む、抗体の第1のファミリーが本明細書で提供される。

【0230】

いくつかの実施形態では、該ファミリーの抗体は、配列番号188の V_H 配列及び配列番号189の V_L 配列を含む。いくつかの実施形態では、該第1のファミリー内の抗体が本明細書で提供される。図12A~12Bは、それぞれ、各 V_H 及び V_L のコンセンサス配列を生成するために使用した第1のファミリーの抗体のアライメントを示す。

【0231】

いくつかの実施形態では、抗体の第2のファミリー(図13A~13Bを参照)であって、該ファミリーの抗体が、以下の6個のCDR配列:(a)配列FTFX X_1 X X_2 YYMS(配列番号95)(X_1 は、G、A、P、又はSであり、且つ X_2 は、N、Q、又はDである)を有するCDR-H1;(b)配列YISPSGX X_3 TIX X_4 YADSVKKG(配列番号96)(X_3 は、A又はSであり、且つ X_4 は、Y又はAである)を有するCDR-H2;(c)配列ARSLMX X_5 TGTHLYFDL(配列番号97)(X_5 は、A又はSである)を有するCDR-H3;(d)配列RASX X_6 X X_7 ISX X_8 WLA(配列番号98)(X_6 は、Q又はSであり、 X_7 は、D又はGであり、且つ X_8 は、D又はSである)を有するCDR-L1;(e)配列AX X_9 X X_{10} LQS(配列番号99)(X_9 は、E又はSであり、且つ X_{10} は、S、A、G、V、又はEである)を有するCDR-L2;及び(f)配列QQ X_{11} TSX X_{12} X X_{13} PYT(配列番号100)(X_{11} は、A、S、又はVであり、 X_{12} は、F、T、V、Q、又はAであり、且つ X_{13} は、L又はPである)を有するCDR-L3を含む、抗体の第2のファミリーが本明細書で提供される。

【0232】

いくつかの実施形態では、該ファミリーの抗体は、配列番号190の V_H 配列及び配列番号191の V_L 配列を含む。いくつかの実施形態では、該第2のファミリー内の抗体が本明細書で提供される。図13A~13Bは、それぞれ、各 V_H 及び V_L のコンセンサス配列を生成するために使用した第2のファミリーの抗体のアライメントを示す。

【0233】

2. 抗CD161抗体の機能特性

いくつかの実施形態では、CD161抗体は、CD161に結合する(例えば、特異的に結合する)。いくつかの実施形態では、ヒトCD161は、配列番号179によって表される。いくつかの実施形態では、CD161抗体は、ヒトCD161に結合し、ヒトNK細胞の活性化を誘導又は促進する。いくつかの実施形態では、CD161抗体は、ヒトCD161に結合し、ヒトT細胞の活性化を誘導又は促進する。

【0234】

いくつかの実施形態では、CD161抗体は、標準的な結合アッセイ、例えば、表面プラズモン共鳴、バイオレイヤー干渉法、又はOctet QK384アッセイを使用して測定した場合、20nM、15nM、10nM、9nM、8nM、7nM、6nM、5nM、4nM、3nM、2nM、1nM、0.9nM、0.8nM、0.7nM、0.6nM、0.5nM、0.4nM、0.3nM、0.2nM、0.1nM、90pM、80pM、70pM、60pM、50pM、40pM、30pM、20pM、又は10pM以下の K_D でヒトCD161に結合する(すなわち、これらの K_D 以上に強く結合する)。例えば、ある特定の実施形態では、抗体は、約10pM~約1nM、約10pM~約0.9nM、約10pM~約0.8nM、約10pM~約0.7nM、約10pM~約0.6nM、約10pM~約0.5nM、約10pM~約0.4nM、約10pM~約0.3nM、約10pM~約0.2nM、約10pM~約0.1nM、約10pM~約50pM、約0.1nM~約10nM、約0.1nM~約9nM、約0.1nM~約8nM、約0.1nM~約7nM、約0.1nM~約6nM、約0.1nM~約5nM、約0.1nM~約4nM、約0.1nM~約3nM、約0.1nM~約2nM、約0.1nM~約1nM、約0.1nM~約0.5nM

M、約0.5nM～約10nM、約1nM～約10nM、約2nM～約10nM、約3nM～約10nM、約4nM～約10nM、約5nM～約10nM、約6nM～約10nM、約7nM～約10nM、約8nM～約10nM、又は約9nM～約10nMの範囲の K_D でヒトCD161に結合する。

【0235】

ある特定の実施形態では、ヒトCD161に結合することに加えて、開示される抗体はまた、マカカ・ファシキュリス(*Macaca fascicularis*)(カニクイザル)CD161に結合する。いくつかの実施形態では、カニクイザルCD161は、配列番号180によって表される。いくつかの実施形態では、CD161抗体は、カニクイザルCD161に結合し、カニクイザルNK細胞の活性化を誘導又は促進する。いくつかの実施形態では、CD161抗体は、カニクイザルCD161に結合し、カニクイザルT細胞の活性化を誘導又は促進する。例えば、抗体は、標準的な結合アッセイ、例えば、表面プラズモン共鳴、バイオレイヤー干渉法、又はOctet QK384アッセイを使用して測定した場合、20nM、15nM、10nM、9nM、8nM、7nM、6nM、5nM、4nM、3nM、2nM、1nM、0.9nM、0.8nM、0.7nM、0.6nM、0.5nM、0.4nM、0.3nM、0.2nM、0.1nM、90pM、80pM、70pM、60pM、50pM、40pM、30pM、20pM、又は10pM以下の K_D でカニクイザルCD161に結合する(すなわち、これらの K_D 以上に強く結合する)。ある特定の実施形態では、抗体は、標準的な結合アッセイ、例えば、表面プラズモン共鳴、バイオレイヤー干渉法、又はOctet QK384アッセイを使用して測定した場合、約10pM～約1nM、約10pM～約0.9nM、約10pM～約0.8nM、約10pM～約0.7nM、約10pM～約0.6nM、約10pM～約0.5nM、約10pM～約0.4nM、約10pM～約0.3nM、約10pM～約0.2nM、約10pM～約0.1nM、約10pM～約50pM、0.1nM～約10nM、約0.1nM～約9nM、約0.1nM～約8nM、約0.1nM～約7nM、約0.1nM～約6nM、約0.1nM～約5nM、約0.1nM～約4nM、約0.1nM～約3nM、約0.1nM～約2nM、約0.1nM～約1nM、約0.1nM～約0.5nM、約0.5nM～約10nM、約1nM～約10nM、約2nM～約10nM、約3nM～約10nM、約4nM～約10nM、約5nM～約10nM、約6nM～約10nM、約7nM～約10nM、約8nM～約10nM、又は約9nM～約10nMの範囲の K_D でカニクイザルCD161に結合する。

【0236】

ある特定の実施形態では、CD161発現HEK293細胞で測定される EC_{50} によって示した場合のヒトCD161に対する本明細書に開示される抗体の親和性は、20nM、15nM、10nM、9nM、8nM、7nM、6nM、5nM、4nM、3nM、2nM、1nM、0.75nM、0.5nM、0.1nM、0.075nM、又は0.05nMであるか、又はそれより低い。ある特定の実施形態では、CD161発現HEK293細胞で測定される EC_{50} によって示した場合のヒトCD161に対する本明細書に開示される抗体の親和性は、約20nM～約0.05nM、約20nM～約0.075nM、約20nM～約0.1nM、約20nM～約0.5nM、約20nM～約1nM、約10nM～約0.05nM、約10nM～約0.075nM、約10nM～約0.1nM、約10nM～約0.5nM、約10nM～約1nM、約5nM～約0.05nM、約5nM～約0.075nM、約5nM～約0.1nM、約5nM～約0.5nM、約5nM～約1nM、約3nM～約0.05nM、約3nM～約0.075nM、約3nM～約0.1nM、約3nM～約0.5nM、約3nM～約1nM、約3nM～約2nM、約2nM～約0.05nM、約2nM～約0.075nM、約2nM～約0.1nM、約2nM～約0.5nM、約2nM～約1nM、約1nM～約0.05nM、約1nM～約0.075nM、約1nM～約0.1nM、約1nM～約0.5nM、約0.5nM～約0.05nM、約0.5nM～約0.075nM、約0.5nM～約0.1nM、約0.1nM～約0.05nM、約0.1nM～約0.075nM、又は約0.075nM～約0.05nMである。ある特定の実施形態では、CD161発現HEK293細胞で測定される EC_{50} によって示した場合のヒトCD161に対する本明細書に開示される抗体の親和性は、約0.5nM～約0.1nM(例えば、約0.45nM、約0.4nM、約0.35nM、約0.3nM、約0.25nM、約0.2nM、約0.15nM、又は約0.05nM)である。

【0237】

ある特定の実施形態では、本開示は、開示される抗体によって結合されるエピトープと同じ、CD161中に存在するエピトープに結合する抗体を提供する。ある特定の実施形態

では、本開示は、CD161への結合について、開示される抗体と競合する抗体を提供する。

【0238】

抗体が、開示される抗体と同じエピトープに結合するかどうか、又は開示される抗体と結合について競合するかどうかを決定するための競合アッセイは、当技術分野で公知である。例示的競合アッセイとしては、免疫アッセイ(例えば、ELISAアッセイ、RIAアッセイ)、表面プラズモン共鳴(例えば、BIAcore解析)、バイオレイヤー干渉法、及びフローサイトメトリーが挙げられる。典型的には、競合アッセイは、固体表面に結合した又は細胞表面上に発現した抗原(例えば、ヒトCD161タンパク質又はその断片)、試験CD161結合抗体及び参照抗体の使用を含む。参照抗体は標識され、試験抗体は標識されない。競合阻害は、試験抗体の存在下で固体表面又は細胞に結合した標識参照抗体の量を決定することによって測定される。通常、試験抗体は、過剰に存在する(例えば、1×、5×、10×、20×又は100×)。競合アッセイによって特定される抗体(すなわち、競合抗体)は、参照抗体と同じエピトープ又は類似の(例えば、重複する)エピトープに結合する抗体、及び立体障害が生じるように参照抗体によって結合されるエピトープに十分近い隣接エピトープに結合する抗体を含む。

10

【0239】

競合アッセイは、標識の存在が結合に干渉せず、又は他の方法で結合を阻害しないことを確実にするために、両方向で実行することができる。例えば、第1の方向では、参照抗体は標識され、試験抗体は標識されず、第2の方向では、試験抗体は標識され、参照抗体は標識されない。過剰の一方の抗体(例えば、1×、5×、10×、20×又は100×)が、もう一方の抗体の結合を、例えば競合結合アッセイで測定した場合に少なくとも50%、75%、90%、95%又は99%阻害する場合、試験抗体は、抗原への特異的結合について参照抗体と競合する。

20

【0240】

一方の抗体の結合を低減又は排除する抗原中の本質的にすべてのアミノ酸変異が、もう一方の抗体の結合を低減又は排除する場合、2つの抗体は、同じエピトープに結合すると決定され得る。一方の抗体の結合を低減又は排除するアミノ酸変異のサブセットのみが、もう一方の抗体の結合を低減又は排除する場合、2つの抗体は、重複するエピトープに結合すると決定され得る。

30

【0241】

いくつかの報告は、腫瘍細胞及び免疫抑制細胞上のCLEC2DによるCD161の活性化が、腫瘍細胞に対するT細胞応答を弱めることを示している。したがって、本出願は、CD161に結合し、CD161のCLEC2Dとの相互作用を阻害する能力を有する、CD161抗体に関する。いくつかの実施形態では、本開示のCD161抗体は、CLEC2Dの結合を遮断、阻害、又はアンタゴナイズする。いくつかの実施形態では、本開示のCD161抗体は、CD161への結合について、CLEC2Dと競合する。いくつかの実施形態では、本開示のCD161抗体は、CD161へのCLEC2Dの結合によるCD161阻害性シグナル伝達を低減する。いくつかの実施形態では、CD161は、細胞の表面上に発現する。ある特定の実施形態では、本開示は、CD161への結合について、CLEC2Dと競合する抗体を提供する。

40

【0242】

いくつかの実施形態では、CD161抗体は、CD161のリガンド結合領域と重複するCD161の領域に結合する。いくつかの実施形態では、CD161抗体は、CD161のリガンド結合領域又はその近くに結合する。いくつかの実施形態では、CD161のリガンド結合領域は、CLEC2D結合領域である。いくつかの実施形態では、CD161へのCD161抗体又はその抗原結合断片の結合は、CD161へのCLEC2Dの結合を妨げる。いくつかの実施形態では、CD161の遮断は、CD161発現免疫細胞によって産生されるサイトカインの濃度を決定することによって測定される。いくつかの実施形態では、免疫細胞は、NK細胞又はT細胞である。いくつかの実施形態では、CD161の遮断は、標的細胞(例えば、腫瘍細胞)に应答してCD161発現T細胞によって産生されるサイトカインの濃度を決定するこ

50

とによって測定される。いくつかの実施形態では、免疫細胞によるサイトカイン産生の増加は、CD161の遮断を示す。いくつかの実施形態では、CD161の遮断は、CD161発現免疫細胞の増殖を分析することによって測定される。いくつかの実施形態では、免疫細胞増殖の増加は、CD161の遮断を示す。いくつかの実施形態では、CD161の遮断は、関連する転写因子によって誘導される遺伝子レポーターのリン酸化又は発現の定量化によって、細胞シグナル伝達のレベルを測定することによって測定される。いくつかの実施形態では、細胞シグナル伝達の増加は、CD161の遮断を示す。

【0243】

ある特定の実施形態では、本開示のCD161抗体は、20nM、15nM、10nM、9nM、8nM、7nM、6nM、5nM、4nM、3nM、2nM、1nM、0.75nM、0.5nM、0.1nM、0.075nM、若しくは0.05nMの、又はそれより低いIC₅₀で、細胞の表面上に発現したCD161へのCLEC2D結合を低減する。ある特定の実施形態では、抗体は、約20nM～約0.05nM、約20nM～約0.075nM、約20nM～約0.1nM、約20nM～約0.5nM、約20nM～約1nM、約10nM～約0.05nM、約10nM～約0.075nM、約10nM～約0.1nM、約10nM～約0.5nM、約10nM～約1nM、約5nM～約0.05nM、約5nM～約0.075nM、約5nM～約0.1nM、約5nM～約0.5nM、約5nM～約1nM、約3nM～約0.05nM、約3nM～約0.075nM、約3nM～約0.1nM、約3nM～約0.5nM、約3nM～約1nM、約3nM～約2nM、約2nM～約0.05nM、約2nM～約0.075nM、約2nM～約0.1nM、約2nM～約0.5nM、約2nM～約1nM、約1nM～約0.05nM、約1nM～約0.075nM、約1nM～約0.1nM、約1nM～約0.5nM、約0.5nM～約0.05nM、約0.5nM～約0.075nM、約0.5nM～約0.1nM、約0.1nM～約0.05nM、約0.1nM～約0.075nM、又は約0.075nM～約0.05nMのIC₅₀でCLEC2D結合を低減する。ある特定の実施形態では、抗体は、約0.1nM～約10nM(例えば、約0.15nM、約0.2nM、約0.25nM、約0.3nM、約0.35nM、約0.4nM、約0.45nM、約0.5nM、約0.55nM、約0.6nM、約0.65nM、約0.7nM、約0.75nM、約0.8nM、約0.85nM、約0.9nM、約0.95nM、約1nM、約1.5nM、約2nM、約2.5nM、約3nM、約3.5nM、約4nM、約4.5nM、約5nM、約5.5nM、約6nM、約6.5nM、約7nM、約7.5nM、約8nM、約8.5nM、約9nM、及び約9.5nM)のIC₅₀でCLEC2D結合を低減する。

【0244】

ある特定の実施形態では、CD161抗体は、500nM、600nM、700nM、800nM、900nM、1,000nM、1,500nM、2,000nM、3,000nM、4,000nM、5,000nM、10,000nM、若しくは20,000nMの、又はそれより大きいK_Dで、hKLRF1、hKLRF2、hCLEC12B、hCLEC2D、又はそれらの任意の組み合わせに結合する。いくつかの実施形態では、CD161抗体は、ヒトKLRF1に結合しない。いくつかの実施形態では、CD161抗体は、ヒトKLRF2に結合しない。いくつかの実施形態では、CD161抗体は、ヒトCLEC12Bに結合しない。いくつかの実施形態では、CD161抗体は、ヒトCLEC2Dに結合しない。

【0245】

ある特定の実施形態では、CD161抗体は、ヒトCD161及びカニクイザルCD161に結合する。ある特定の実施形態では、ヒトCD161に対する結合親和性K_D(一価親和性アッセイによって測定した場合)は、カニクイザルCD161に対する親和性の約1.5倍、約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、約6倍、約7倍、約8倍、約9倍、約10倍、約20倍、約30倍、約40倍、約50倍、約60倍、約70倍、約80倍、約90倍、又は約100倍以内である。

【0246】

いくつかの実施形態では、本開示のCD161抗体は、CD161へのCLEC2D結合によるT細胞又はNK細胞活性の抑制を低減する。いくつかの実施形態では、CD161へのCLEC2D結合によるT細胞又はNK細胞活性の抑制は、少なくとも、対照抗体(例えば、CD161に結合しない抗体)と比較して、約1.5倍、約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、約6倍、約7倍、約8倍、約9倍、約10倍、約20倍、約30倍、約40倍、約50倍、約60倍、約70倍、約80倍、約90倍、又は約100倍低減される。

【0247】

いくつかの実施形態では、CD161抗体は、抗体又は抗原結合断片の非存在下におけるT細胞又はNK細胞活性と比較して、CLEC2Dの存在下において該T細胞又はNK細胞活性を増加させる。ある特定の実施形態では、T細胞又はNK細胞活性は、対照抗体(例えば、CD161に結合しない抗体)と比較して、約1.5倍、約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、約6倍、約7倍、約8倍、約9倍、約10倍、約20倍、約30倍、約40倍、約50倍、約60倍、約70倍、約80倍、約90倍、又は約100倍増加する。

【0248】

いくつかの実施形態では、T細胞又はNK細胞は、CLEC2Dを発現する細胞を含む微小環境内に配置される。いくつかの実施形態では、CD161抗体は、CLEC2Dを発現する腫瘍細胞を含有する腫瘍微小環境においてT細胞又はNK細胞活性を増加させる。いくつかの実施形態では、T細胞活性の増加は、NFATシグナル伝達の増加によって決定される。いくつかの実施形態では、NK細胞活性の増加は、CD107a発現の増加によって決定される。ある特定の実施形態では、腫瘍微小環境におけるT細胞又はNK細胞活性は、対照抗体(例えば、CD161に結合しない抗体)と比較して、約1.5倍、約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、約6倍、約7倍、約8倍、約9倍、約10倍、約20倍、約30倍、約40倍、約50倍、約60倍、約70倍、約80倍、約90倍、又は約100倍増加する。

【0249】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体又はその抗原結合断片は、本明細書に記載される1つ以上のアッセイ又は生物学的効果によって測定した場合、CD161阻害性シグナル伝達を低減する。いくつかの実施形態では、本開示のCD161抗体は、CD161へのCLEC2Dの結合によるCD161阻害性シグナル伝達を低減する。ある特定の実施形態では、CD161阻害性シグナル伝達は、対照抗体(例えば、CD161に結合しない抗体)と比較して、約1.5倍、約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、約6倍、約7倍、約8倍、約9倍、約10倍、約20倍、約30倍、約40倍、約50倍、約60倍、約70倍、約80倍、約90倍、又は約100倍低減される。

【0250】

いくつかの実施形態では、本開示のCD161抗体は、腫瘍微小環境内におけるCD8+ T細胞の活性化及びサイトカイン産生を促進する。ある特定の実施形態では、抗体又はその抗原結合断片は、対照抗体(例えば、CD161に結合しない抗体)と比較して、約1.5倍、約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、約6倍、約7倍、約8倍、約9倍、約10倍、約20倍、約30倍、約40倍、約50倍、約60倍、約70倍、約80倍、約90倍、又は約100倍、腫瘍微小環境内におけるCD8+ T細胞を活性化し、サイトカイン産生を増加させる。

【0251】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される抗体は、配列番号7と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、及び配列番号11と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含み、(ii)配列番号7のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域及び配列番号11のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む抗体と、ヒトCD161への結合について競合し、且つ/又は該抗体と同じ、ヒトCD161上のエピトープに結合する。

【0252】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される抗体は、(i)配列番号15と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、及び配列番号19と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、

10

20

30

40

50

5%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含み、(ii)配列番号15のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域及び配列番号19のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む抗体と、ヒトCD161への結合について競合し、且つ/又は該抗体と同じ、ヒトCD161上のエピトープに結合する。

【0253】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される抗体は、(i)配列番号23と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、及び配列番号27と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含み、(ii)配列番号23のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域及び配列番号27のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む抗体と、ヒトCD161への結合について競合し、且つ/又は該抗体と同じ、ヒトCD161上のエピトープに結合する。

【0254】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される抗体は、(i)配列番号31と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、及び配列番号35と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含み、(ii)配列番号31のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域及び配列番号35のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む抗体と、ヒトCD161への結合について競合し、且つ/又は該抗体と同じ、ヒトCD161上のエピトープに結合する。

【0255】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される抗体は、(i)配列番号39と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、及び配列番号43と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含み、(ii)配列番号39のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域及び配列番号43のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む抗体と、ヒトCD161への結合について競合し、且つ/又は該抗体と同じ、ヒトCD161上のエピトープに結合する。

【0256】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される抗体は、(i)配列番号47と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、及び配列番号51と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含み、(ii)配列番号47のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域及び配列番号51のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む抗体と、ヒトCD161への結合について競合し、且つ/又は該抗体と同じ、ヒトCD161上のエピトープに結合する。

【0257】

10

20

30

40

50

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される抗体は、(i)配列番号55と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、及び配列番号59と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含み、(ii)配列番号55のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域及び配列番号59のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む抗体と、ヒトCD161への結合について競合し、且つ/又は該抗体と同じ、ヒトCD161上のエピトープに結合する。

10

【0258】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される抗体は、(i)配列番号63と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、及び配列番号67と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含み、(ii)配列番号63のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域及び配列番号67のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む抗体と、ヒトCD161への結合について競合し、且つ/又は該抗体と同じ、ヒトCD161上のエピトープに結合する。

20

【0259】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される抗体は、(i)配列番号71と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、及び配列番号75と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含み、(ii)配列番号71のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域及び配列番号75のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む抗体と、ヒトCD161への結合について競合し、且つ/又は該抗体と同じ、ヒトCD161上のエピトープに結合する。

30

【0260】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される抗体は、(i)配列番号79と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、及び配列番号83と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含み、(ii)配列番号79のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域及び配列番号83のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む抗体と、ヒトCD161への結合について競合し、且つ/又は該抗体と同じ、ヒトCD161上のエピトープに結合する。

40

【0261】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される抗体は、(i)配列番号87と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、及び配列番号91と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも

50

も98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含み、(ii)配列番号87のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域及び配列番号91のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む抗体と、ヒトCD161への結合について競合し、且つ/又は該抗体と同じ、ヒトCD161上のエピトープに結合する。

【0262】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される抗体は、(i)配列番号101と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、及び配列番号105と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含み、(ii)配列番号101のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域及び配列番号105のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む抗体と、ヒトCD161への結合について競合し、且つ/又は該抗体と同じ、ヒトCD161上のエピトープに結合する。

10

【0263】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される抗体は、(i)配列番号109と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、及び配列番号113と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含み、(ii)配列番号109のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域及び配列番号113のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む抗体と、ヒトCD161への結合について競合し、且つ/又は該抗体と同じ、ヒトCD161上のエピトープに結合する。

20

【0264】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される抗体は、(i)配列番号117と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、及び配列番号121と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含み、(ii)配列番号117のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域及び配列番号121のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む抗体と、ヒトCD161への結合について競合し、且つ/又は該抗体と同じ、ヒトCD161上のエピトープに結合する。

30

40

【0265】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される抗体は、(i)配列番号125と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、及び配列番号129と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含み、(ii)配列番号125のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域及び配列番号129のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む抗体と、ヒトCD161へ

50

の結合について競合し、且つ/又は該抗体と同じ、ヒトCD161上のエピトープに結合する。

【0266】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される抗体は、(i)配列番号133と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、及び配列番号137と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含み、(ii)配列番号133のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域及び配列番号137のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む抗体と、ヒトCD161への結合について競合し、且つ/又は該抗体と同じ、ヒトCD161上のエピトープに結合する。

10

【0267】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される抗体は、(i)配列番号141と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、及び配列番号145と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含み、(ii)配列番号141のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域及び配列番号145のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む抗体と、ヒトCD161への結合について競合し、且つ/又は該抗体と同じ、ヒトCD161上のエピトープに結合する。

20

【0268】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される抗体は、(i)配列番号149と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、及び配列番号153と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含み、(ii)配列番号149のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域及び配列番号153のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む抗体と、ヒトCD161への結合について競合し、且つ/又は該抗体と同じ、ヒトCD161上のエピトープに結合する。

30

【0269】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される抗体は、(i)配列番号157と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、及び配列番号161と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含み、(ii)配列番号157のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域及び配列番号161のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む抗体と、ヒトCD161への結合について競合し、且つ/又は該抗体と同じ、ヒトCD161上のエピトープに結合する。

40

50

【0270】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される抗体は、(i)配列番号165と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域、及び配列番号169と少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、又は少なくとも99%同一のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含み、(ii)配列番号165のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン重鎖可変領域及び配列番号169のアミノ酸配列を含む免疫グロブリン軽鎖可変領域を含む抗体と、ヒトCD161への結合について競合し、且つ/又は該抗体と同じ、ヒトCD161上のエピトープに結合する。

10

【0271】

本明細書に開示される抗体は、親和性及び/若しくは特異性を含む生化学的特性を改善し、凝集、安定性、沈殿及び/若しくは非特異的相互作用を含む生物物理学的特性を改善し、並びに/又は免疫原性を低減するために、さらに最適化(例えば、親和性成熟)されてもよい。例えば、DNAシャッフリング、鎖シャッフリング、CDRシャッフリング、ランダム変異誘発、及び/又は部位特異的変異誘発によって、免疫グロブリン重鎖及び/又は免疫グロブリン軽鎖に多様性を導入することができる。

【0272】

20

ある特定の実施形態では、単離されたヒト抗体は、1つ以上の体細胞変異を含有する。これらの場合、抗体をヒト生殖系列配列に改変して、抗体を最適化することができる(すなわち、生殖系列化と呼ばれるプロセス)。

【0273】

一般に、最適化された抗体は、それが由来する非最適化(又は親)抗体と少なくとも同じ、又は実質的に同じ、抗原に対する親和性を有する。好ましくは、最適化された抗体は、親抗体と比較した場合、抗原に対してより高い親和性を有する。

【0274】

本明細書に開示される抗体は、標準的なインビトロコンジュゲーション化学を使用して、小分子毒素又は放射性核種などのエフェクター剤にコンジュゲートすることができる。エフェクター剤がポリペプチドである場合、抗体は、エフェクターに化学的にコンジュゲートしてもよく、又は融合タンパク質としてエフェクターに結合してもよい。融合タンパク質の構築は、当技術分野の通常の技能の範囲内である。

30

【0275】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される抗体又はその抗原結合断片は、以下の(a)~(t)に列挙される特性のうちの1つ以上を有する:(a)ヒトCD161に結合する;(b)ヒトCD161結合部位においてヒトCD161に結合する;(c)抗CD161抗体又はその抗原結合断片によって結合されるCD161エピトープに結合する;(d)CLEC2D結合部位又はその近くにおいてヒトCD161に結合する;(e)CD161への結合について、CLEC2Dと競合する;(f)CD161へのCLEC2Dの結合によるCD161阻害性シグナル伝達を低減する;(g)CD161へのCLEC2D結合によるT細胞活性の抑制を低減する;(h)CD161へのCLEC2D結合によるNK細胞活性の抑制を低減する;(i)抗体又はその抗原結合断片の非存在下におけるT細胞活性と比較して、CLEC2Dの存在下において該T細胞活性を増加させる;(j)抗体又はその抗原結合断片の非存在下におけるNK細胞活性と比較して、CLEC2Dの存在下において該NK細胞活性を増加させる;(k)CLEC2Dを発現する細胞を含む微小環境内に配置されたT細胞活性を増加させる;(l)CLEC2Dを発現する細胞を含む微小環境内に配置されたNK細胞活性を増加させる;(m)CLEC2Dを発現する腫瘍細胞を含む腫瘍微小環境におけるT細胞活性を増加させる;(n)CLEC2Dを発現する腫瘍細胞を含む腫瘍微小環境におけるNK細胞活性を増加させる;(o)ヒトT細胞疲弊を阻害する;(p)抗原発現標的細胞に応答してCD161発現ヒトT細胞の活性化を誘導する又は増加させる;(q)抗原発現標的細胞に応答してC

40

50

D161発現ヒトT細胞によるサイトカイン産生を誘導する又は増加させる;(r)抗原発現標的細胞に应答してCD161発現ヒトT細胞によるグランザイムB発現を誘導する又は増加させる;(s)抗原発現標的細胞に应答してCD161発現ヒトT細胞の疲弊を低減する;及び(t)(a)~(s)の任意の組み合わせ。

【0276】

3. 単一特異性及び多特異性抗CD161抗体

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される抗体は、単一特異性抗体である。しかし、ある特定の実施形態では、本明細書で提供される抗体は、多特異性抗体である。例えば、多特異性抗体は、2つ以上の抗原、例えば、2つの抗原、3つの抗原、4つの抗原又は5つの抗原に結合することができる。いくつかの実施形態では、多特異性抗体は、CD161抗原上の2つ以上のエピトープ、例えば、CD161抗原上の2つのエピトープ又はCD161抗原上の3つのエピトープに結合することができる。

10

【0277】

多くの多特異性抗体構築物が、当技術分野で公知であり、本明細書で提供される抗体は、任意の好適な多特異性の好適な構築物の形態で提供され得る。いくつかの実施形態では、多特異性抗体は、それぞれが共通の軽鎖可変領域と対になった、少なくとも2つの異なる重鎖可変領域を含む免疫グロブリンを含む(すなわち、「共通軽鎖抗体」)。共通の軽鎖可変領域は、2つの異なる重鎖可変領域のそれぞれと特異な抗原結合ドメインを形成する(Merchant et al. (1998) NATURE BIOTECHNOL., 16: 677-681(その全体が参照により組み込まれる)を参照)。

20

【0278】

いくつかの実施形態では、多特異性抗体は、免疫グロブリンの重鎖又は軽鎖のN末端又はC末端のうちの1つ以上に結合した抗体を含む該免疫グロブリンを含む(Coloma and Morrison (1997) NATURE BIOTECHNOL., 15: 159-163(その全体が参照により組み込まれる)を参照)。いくつかの態様では、このような抗体は、四価二重特異性抗体を含む。いくつかの実施形態では、多特異性抗体は、少なくとも2つの異なる重鎖可変領域及び少なくとも2つの異なる軽鎖可変領域を含むハイブリッド免疫グロブリンを含む(Milstein and Cuellar (1983) NATURE, 305: 537-540;及びStaerz and Bevan (1986) PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 83: 1453-1457(これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる)を参照)。

30

【0279】

いくつかの実施形態では、多特異性抗体は、多特異性を有しない副産物の形成を低減する変更を有する免疫グロブリン鎖を含む。いくつかの態様では、抗体は、米国特許第5,731,168号(その全体が参照により組み込まれる)に記載されるように、1つ以上の「ノブ・イントゥ・ホール(knobs-into-holes)」改変を含む。いくつかの実施形態では、多特異性抗体は、Fcヘテロ多量体の会合を促進するための1つ以上の静電的改変を有する免疫グロブリン鎖を含む(WO2009/089004(その全体が参照により組み込まれる)を参照)。いくつかの実施形態では、多特異性抗体は、二重特異性単鎖分子を含む(Traunecker et al. (1991) EMBO J., 10: 3655-3659;及びGruber et al. (1994) J. IMMUNOL., 152: 5368-5374(これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる)を参照)。

40

【0280】

いくつかの実施形態では、多特異性抗体は、ポリペプチドリンカーにより接続される重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインを含み、リンカーの長さは、所望の多特異性を有する多特異性抗体の会合を促進するように選択される。例えば、単一特異性scFvは、一般に、重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインが12アミノ酸残基を超えるポリペプチドリンカーにより接続される場合に形成する(米国特許第4,946,778号及び同第5,132,405号(これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる)を参照)。いくつかの実施形態では、ポリペプチドリンカー長を12アミノ酸残基未満に短縮すると、同じポリペプチド鎖上の重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインの対合が妨げられ、それにより、1つ

50

の鎖由来の重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインの、別の鎖上の相補的ドメインとの対合が可能になる。したがって、得られる抗体は、多特異性を有し、各結合部位の特異性は、2つ以上のポリペプチド鎖によりもたらされる。3～12個の間のアミノ酸残基のリンカーによって結合している重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインを含むポリペプチド鎖は、主に二量体(ダイアボディと称される)を形成する。0～2個の間のアミノ酸残基のリンカーでは、三量体(トリアボディと称される)及び四量体(テトラボディと称される)が好ましい可能性がある。しかし、オリゴマー化の正確な種類は、リンカー長に加えて、各ポリペプチド鎖中のアミノ酸残基の組成及び可変ドメインの順序(例えば、V_H-リンカー-V_L対V_L-リンカー-V_H)に依存するようである。当業者は、多特異性の所望のレベルに基づいて適切なリンカー長を選択することができる。

10

【0281】

いくつかの実施形態では、多特異性抗体は、ダイアボディ(Hollinger et al. (1993) PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 90: 6444-6448(その全体が参照により組み込まれる)を参照)又はトリアボディ(Todorovska et al. (2001) J. IMMUNOL. METHODS, 248: 47-66(その全体が参照により組み込まれる)を参照)又はテトラボディ(同文献(その全体が参照により組み込まれる)を参照)を含む。

【0282】

いくつかの実施形態では、多特異性抗体は、三重特異性F(ab')₃誘導体を含む(Tutt et al. (1991) J. IMMUNOL., 147: 60-69(その全体が参照により組み込まれる)を参照)。

【0283】

いくつかの実施形態では、多特異性抗体は、架橋抗体を含む(米国特許第4,676,980号; Brennan et al. (1985) SCIENCE, 229: 81-83; Staerz et al. (1985) NATURE, 314: 628-631;及びEP 0453082(これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる)を参照)。いくつかの実施形態では、多特異性抗体は、ロイシンジッパーによって会合した抗原結合ドメインを含む(Kostelny et al. (1992) J. IMMUNOL., 148: 1547-1553(その全体が参照により組み込まれる)を参照)。

20

【0284】

いくつかの実施形態では、多特異性抗体は、例えば、Labrijn et al. (2013) PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 110: 5145-5150; Gramer et al. (2013) MABS, 5: 962-972;及びLabrijn et al. (2014) NATURE PROTOCOLS, 9: 2450-2463(これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる)におけるような、DuoBody(登録商標)を含む。

30

【0285】

4. グリコシル化バリエーション

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される抗体は、それがグリコシル化される程度を増加させるか、減少させるか、又は排除するように変更されてもよい。ポリペプチドのグリコシル化は、典型的には「N結合型」又は「O結合型」のいずれかである。「N結合型」グリコシル化は、アスパラギン残基の側鎖への炭水化物部分の結合を指す。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-トレオニン(Xは、プロリンを除く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のための認識配列である。したがって、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作製する。「O結合型」グリコシル化は、ヒドロキシアミノ酸(最も一般にはセリン又はトレオニンであるが、5-ヒドロキシプロリン又は5-ヒドロキシリジンも使用してよい)への、糖N-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、又はキシロースのうちの1つの結合を指す。

40

【0286】

本明細書で提供される抗体へのN結合型グリコシル化部位の付加又は本明細書で提供される抗体からのN結合型グリコシル化部位の欠失は、上記のトリペプチド配列のうちの1つ以上が作製又は除去されるようにアミノ酸配列を変更することによって達成され得る。O結合型グリコシル化部位の付加又は欠失は、抗体の配列中の又は(場合によっては)配列

50

への、1つ以上のセリン又はトレオニン残基の付加、欠失、又は置換によって達成され得る。

【0287】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、天然に存在する抗体とは異なるグリコシル化モチーフを含む。任意の好適な天然に存在するグリコシル化モチーフは、本明細書で提供される抗体中で改変することができる。例えば、免疫グロブリンの構造及びグリコシル化特性は、当技術分野で公知であり、例えば、Schroeder and Cavacini (2010) J. ALLERGY CLIN. IMMUNOL., 125: S41-52(その全体が参照により組み込まれる)にまとめられている。

【0288】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、アスパラギン297(Asn297)に結合したオリゴ糖への改変を有するIgG₁ Fc領域を含む。哺乳動物細胞によって産生される天然に存在するIgG₁抗体は、典型的には、Fc領域のC_H2ドメインのAsn297へのN結合によって一般に結合している分岐状二分岐オリゴ糖を含む(Wright et al. (1997) TIBTECH, 15: 26-32(その全体が参照により組み込まれる)を参照)。Asn297に結合したオリゴ糖は、様々な炭水化物、例えば、マンノース、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)、ガラクトース、及びシアル酸、並びに二分岐オリゴ糖構造の「ステム」においてGlcNAcに結合したフコースを含んでもよい。

【0289】

いくつかの実施形態では、Asn297に結合したオリゴ糖は、変更されたADCCを有する抗体を作製するように改変される。いくつかの実施形態では、オリゴ糖は、ADCCを改善するように変更される。いくつかの実施形態では、オリゴ糖は、ADCCを低減するように変更される。

【0290】

いくつかの態様では、本明細書で提供される抗体は、天然に存在するIgG1ドメインと比較して、位置Asn297において低減されたフコース含有量を有するIgG₁ドメインを含む。このようなFcドメインは、改善されたADCCを有することが知られている(Shields et al. (2002) J. BIOL. CHEM., 277: 26733-26740(その全体が参照により組み込まれる)を参照)。いくつかの態様では、このような抗体は、位置Asn297にフコースを含まない。フコースの量は、例えば、WO2008/077546(その全体が参照により組み込まれる)に記載されるような、任意の好適な方法を使用して決定してよい。

【0291】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、GlcNAcにより二分される抗体のFc領域に結合した二分岐オリゴ糖などのバイセクト型オリゴ糖を含む。このような抗体バリエーションは、低減されたフコシル化及び/又は改善されたADCC機能を有し得る。このような抗体バリエーションの例は、例えば、WO 2003/011878;及び米国特許第6,602,684号(これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる)に記載される。

【0292】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、Fc領域に結合したオリゴ糖中に少なくとも1つのガラクトース残基を有するFc領域を含む。このような抗体バリエーションは、改善されたCDC機能を有し得る。このような抗体バリエーションの例は、例えば、WO 1997/30087; WO1998/58964;及びWO1999/22764(これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる)に記載される。

【0293】

脱フコシル化抗体を産生することが可能な細胞株の例としては、タンパク質フコシル化が欠損しているLec13 CHO細胞(Ripka et al. (1986) ARCH. BIOCHEM. BIOPHY S., 249: 533-545;米国特許公開第2003/0157108号; WO2004/056312(これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる)を参照)、及びノックアウト細胞株、例えば、アルファ-1,6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子又はFUT8ノックアウトCHO細胞(Yamane-Ohnuki et al. (2004) BIOTECH. BIOENG., 87: 614-622; Kand

10

20

30

40

50

a et al. (2006) BIOTECHNOL. BIOENG., 94: 680-688;及びWO2003/085107(これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる)を参照)が挙げられる。

【0294】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、非グリコシル化抗体である。非グリコシル化抗体は、当技術分野で公知の又は本明細書に記載される任意の方法を使用して生成することができる。いくつかの態様では、非グリコシル化抗体は、すべてのグリコシル化部位を除去するように抗体を改変することによって生成される。いくつかの態様では、グリコシル化部位は、抗体のFc領域からのみ除去される。いくつかの態様では、非グリコシル化抗体は、大腸菌(*E. coli*)などのグリコシル化が不可能な生物で抗体を発現させることによって、又は無細胞反応混合物で抗体を発現させることによって生成される。 10

【0295】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、天然IgG1抗体と比較して低減されたエフェクター機能を有する定常領域を有する。いくつかの実施形態では、Fc受容体に対する本明細書で提供される抗体のFc領域の定常領域の親和性は、該Fc受容体に対する天然IgG1定常領域の親和性よりも小さい。

【0296】

5. Fc領域

本開示の抗CD161抗体は、IgG型抗体である。例えば、表4に開示される抗CD161抗体のそれぞれは、免疫グロブリンFcドメイン(例えば、ヒトIgG₁、ヒトIgG₂、ヒトIgG₃、ヒトIgG₄、ヒトIgA₁、ヒトIgA₂、ヒトIgD、ヒトIgE、又はヒトIgM Fcドメインに由来する免疫グロブリンFcドメイン)に融合している。例示的实施形態では、表4に開示される抗CD161抗体のそれぞれは、ヒトIgG₁に由来する免疫グロブリンFcドメインに融合している。 20

【0297】

ある特定の实施形態では、本明細書で提供される抗体は、天然に存在するFc領域と比較して、1つ以上のアミノ酸置換、挿入、又は欠失を有するFc領域を含む。いくつかの態様では、このような置換、挿入、又は欠失は、変更された安定性、グリコシル化、又は他の特性を有する抗体を生じる。いくつかの態様では、このような置換、挿入、又は欠失は、非グリコシル化抗体を生じる。 30

【0298】

ある特定の实施形態では、免疫グロブリンFcドメインは、ヒトIgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、IgA₂、IgD、IgE、及びIgM Fcドメインに由来する。単一アミノ酸置換(Kabat番号付けによるS228P;IgG4Proと呼ぶ)を導入して、組換えIgG4抗体に観察される不均一性を消失してもよい(Angal, S. et al. (1993) MOL. IMMUNOL., 30:105-108を参照)。

【0299】

いくつかの態様では、本明細書で提供される抗体のFc領域は、Fc受容体に対する変更された親和性を有する抗体、又はより免疫学的に不活性な抗体を生じるように改変される。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体バリエーションは、いくつかのエフェクター機能を有するが、すべてを有するわけではない。このような抗体は、例えば、抗体の半減期がインビボで重要であるが、ある特定のエフェクター機能(例えば、補体活性化及びADCC)が不要又は有害である場合に、有用であり得る。 40

【0300】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体のFc領域は、ヒンジ安定化変異S228P及びL235Eのうちの1つ以上を含むヒトIgG₄ Fc領域である(Aalberse et al. (2002) IMMUNOLOGY, 105: 9-19(その全体が参照により組み込まれる)を参照)。いくつかの実施形態では、IgG₄ Fc領域は、以下の変異:E233P、F234V、及びL235Aのうちの1つ以上を含む(Armour et al. (2003) MOL. IMMUNOL., 40: 585-593(その全体が参照により組み込まれる)を参照)。いくつかの実施形態では、IgG₄ Fc領域は 50

、位置G236において欠失を含む。

【0301】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体のFc領域は、Fc受容体結合を低減するための1つ以上の変異を含むヒトIgG₁ Fc領域である。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、米国特許第8,394,925号(その全体が参照により本明細書に組み込まれる)に記載される変異などの、1つ以上の変異を含む。いくつかの実施形態では、Fc領域は、位置428及び434にアミノ酸置換を含むバリエーションFc領域であり、アミノ酸置換は、位置428における野生型アミノ酸ではないロイシン、及び位置434における野生型アミノ酸ではないセリンであり、ポリペプチドは、抗体であり、番号付けは、Kabat et al.におけるEUインデックスに従う。いくつかの実施形態では、Fc領域は、S228P、L235E、M428L、又はN434S置換を含む。いくつかの実施形態では、Fc領域は、M428L置換を含む。いくつかの実施形態では、Fc領域は、N434S置換を含む。いくつかの実施形態では、Fc領域は、M428L及びN434S置換を含む。いくつかの実施形態では、Fc領域は、M252Y、S254T、及び/又はT256E置換を含む。いくつかの態様では、抗体は、PVA236変異を含む。PVA236は、IgG₁のアミノ酸位置233~236からのアミノ酸配列ELLG(配列番号195)又はIgG₄のEFLG(配列番号196)が、PVAによって置換されることを意味する(米国特許第9,150,641号(その全体が参照により組み込まれる)を参照)。

【0302】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体のFc領域は、変異A330S及びP331Sのうちの1つ以上を含むヒトIgG₂ Fc領域である。

【0303】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体のFc領域は、238、265、269、270、297、327及び329から選択される1つ以上の位置においてアミノ酸置換を有する(米国特許第6,737,056号(その全体が参照により組み込まれる)を参照)。このようなFc変異体は、アミノ酸位置265、269、270、297及び327のうちの2つ以上において置換を有するFc変異体を含み、残基265及び297のアラニンによる置換を有するいわゆる「DANA」Fc変異体を含む(米国特許第7,332,581号(その全体が参照により組み込まれる)を参照)。いくつかの実施形態では、抗体は、アミノ酸位置265においてアラニンを含む。いくつかの実施形態では、抗体は、アミノ酸位置297においてアラニンを含む。ある特定の実施形態では、ヒトIgG₁定常領域は、抗体のグリコシル化を妨げるためにアミノ酸Asn297において改変される(例えば、Asn297Ala(N297A))。ある特定の実施形態では、変異は、Fc受容体(例えば、RI、RIIA、RIIB/C、RIIA、及びRIIB)への本明細書に開示される抗CD161抗体の結合を排除するのに有効である。ある特定の実施形態では、変異は、Fc受容体(例えば、RI、RIIA、RIIB/C、RIIA、及びRIIB)への本明細書に開示される抗CD161抗体の結合を著しく低減するのに有効である。例示的实施形態では、表4に開示される抗CD161抗体のそれぞれは、アミノ酸Asn297で改変されたヒトIgG₁定常領域に融合している。

【0304】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される抗体は、ADCCを改善する1つ以上のアミノ酸置換、例えば、Fc領域の位置298、333、及び334のうちの1つ以上における置換を有するFc領域を含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、Lazar et al. (2006) PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 103: 4005-4010(その全体が参照により組み込まれる)に記載されるように、位置239、332、及び330において1つ以上のアミノ酸置換を有するFc領域を含む。

【0305】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、半減期を増加させるための1つ以上の変更を含む。いくつかの実施形態では、Fcドメインは、米国特許第7,670,600号(その全体が参照により本明細書に組み込まれる)に記載される変異などの変異を含む。いくつかの実施形態では、定常領域は、KabatのEU番号付けインデックスに従って番号

付けして、野生型ヒトIgG定常ドメインと比較してアミノ酸残基428の位置に変異を含む。いかなる特定の理論にも拘束されるものではないが、残基428に対応する変異を含む抗体は、野生型ヒトIgG定常ドメインを有するIgGの半減期と比較して、増加した半減期を有し得る。いくつかの実施形態では、変異は、トレオニン、ロイシン、フェニルアラニン又はセリンによる天然残基の置換である。いくつかの実施形態では、抗体は、KabatのEU番号付けインデックスに従って番号付けして、アミノ酸残基251~256、285~290、308~314、385~389、及び429~436のうちの1つ以上において、対応する野生型ヒトIgG定常ドメインと比較して1つ以上のアミノ酸置換をさらに含む。これらの位置における具体的な変異又は置換は、米国特許第7,670,600号(その全体が参照により本明細書に組み込まれる)に記載される。

10

【0306】

6. 低減された免疫原性を有する抗体

抗体がヒトに投与されることになる場合、抗体は、好ましくはヒト抗体であるか、又はヒトにおける抗原性を低減又は排除するように操作される。好ましくは、各ヒト化抗体は、それが由来する非ヒト化マウス抗体と同じ、又は実質的に同じ、抗原に対する親和性を有する。

【0307】

1つのヒト化アプローチでは、マウス免疫グロブリン定常領域がヒト免疫グロブリン定常領域により置換されるキメラタンパク質が作製される。例えば、Morrison et al., 1984, PROC. NAT. ACAD. SCI. 81:6851-6855; Neuberger et al., 1984, NATURE 312:604-608; 米国特許第6,893,625号(Robinson); 同第5,500,362号(Robinson); 及び同第4,816,567号(Cabilly)を参照。

20

【0308】

CDR移植として知られるアプローチでは、軽鎖可変領域及び重鎖可変領域のCDRは、別の種からのフレームワークに移植される。例えば、マウスCDRを、ヒトフレームワーク領域(FR)に移植することができる。いくつかの実施形態では、抗体の軽鎖可変領域及び重鎖可変領域のCDRは、ヒトFR又はコンセンサスヒトFRに移植される。コンセンサスヒトFRを作製するために、いくつかのヒト重鎖又は軽鎖アミノ酸配列からのFRが、コンセンサスアミノ酸配列を特定するためにアラインされる。CDR移植は、米国特許第7,022,500号(Queen); 同第6,982,321号(Winter); 同第6,180,370号(Queen); 同第6,054,297号(Carter); 同第5,693,762号(Queen); 同第5,859,205号(Adair); 同第5,693,761号(Queen); 同第5,565,332号(Hoogenboom); 同第5,585,089号(Queen); 同第5,530,101号(Queen); Jones et al. (1986) NATURE 321: 522-525; Riechmann et al. (1988) NATURE 332: 323-327; Verhoeyen et al. (1988) SCIENCE 239: 1534-1536; 及びWinter (1998) FEBS LETT 430: 92-94に記載される。

30

【0309】

「SUPERHUMANIZATION(商標)」と呼ばれるアプローチでは、ヒトCDRの、ヒト化しようとするマウス抗体のCDRに対する構造的類似性に基づいて、ヒト生殖系列遺伝子からヒトCDR配列を選択する。例えば、米国特許第6,881,557号(Foote); 及びTan et al., 2002, J. IMMUNOL. 169:1119-1125を参照。

40

【0310】

免疫原性を低減するための他の方法としては、「再成形(reshaping)」、「超キメラ化(hyperchimerization)」、及び「ベニヤリング(veneering)/表面再構成(resurfacing)」が挙げられる。例えば、Vaswami et al., 1998, ANNALS OF ALLERGY, ASTHMA, & IMMUNOL. 81:105; Roguska et al., 1996, PROT. ENGINEER 9: 895-904; 及び米国特許第6,072,035号(Hardman)を参照。ベニヤリング/表面再構成アプローチでは、マウス抗体における表面接触可能アミノ酸残基は、ヒト抗体における同じ位置でより頻繁に見出されるアミノ酸残基によって置換される。この種類の抗体表面再構成は、例えば、米国特許第5,639,641号(Pedersen)に記載される。

50

【0311】

ヒトにおける医療用途に好適な形態にマウス抗体を変換するための別のアプローチは、ACTIVMAB(商標)技術(Vaccinex, Inc., Rochester, NY)として知られており、これは、哺乳動物細胞において抗体を発現するためのワクシニアウイルススペースのベクターを含む。IgG重鎖及び軽鎖の高レベルの組み合わせ多様性を生じることができる。例えば、米国特許第6,706,477号(Zauderer);同第6,800,442号(Zauderer);及び同第6,872,518号(Zauderer)を参照。ヒトにおける使用に好適な形態にマウス抗体を変換するための別のアプローチは、KaloBios Pharmaceuticals, Inc.(Palo Alto, CA)により商業的に実施される技術である。この技術は、抗体選択のために「エピトープフォーカス」ライブラリーを生成するための、独自のヒト「アクセプター」ライブラリーの使用を含む。ヒトにおける医療用途に好適な形態にマウス抗体を改変するための別のアプローチは、HUMAN ENGINEERING(商標)技術であり、これは、XOMA (US) LLCによって商業的に実施される。例えば、国際(PCT)公開第WO 93/11794号及び米国特許第5,766,886号(Studnicka);同第5,770,196号(Studnicka);同第5,821,123号(Studnicka);及び同第5,869,619号(Studnicka)(これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる)を参照。

10

【0312】

上記のアプローチのいずれかを含む任意の好適なアプローチを使用して、抗体のヒト免疫原性を低減又は排除することができる。

【0313】

20

さらに、マウスにおいて完全ヒト抗体を作製することが可能である。いずれかの非ヒト配列を欠く完全ヒトmAbは、例えば、Lonberg et al., NATURE 368:856-859, 1994; Fishwild et al., NATURE BIOTECHNOLOGY 14:845-851, 1996;及びMendez et al., NATURE GENETICS 15:146-156, 1997で参照される技術によってヒト免疫グロブリントランスジェニックマウスから調製することができる。完全ヒトモノクローナル抗体はまた、例えば、Knappik et al., J. MOL. BIOL. 296:57-86, 2000;及びKrebs et al., J. IMMUNOL. METH. 254:67-84 2001で参照される技術によってファージディスプレイライブラリーから調製及び最適化することができる。

【0314】

7. 抗CD161抗体-薬物コンジュゲート

30

本開示は、本明細書に開示される抗体の1つ以上を含有する抗体コンジュゲートをさらに提供する。本明細書で使用される場合、別段の指示がない限り、用語「抗体コンジュゲート」は、追加の機能的部分にコンジュゲート(例えば、共有結合)した、抗原結合活性(例えば、抗CD161抗原結合活性)及び/又はFc受容体結合活性を含む、抗体又はその機能的断片を指すことが理解される。

【0315】

ある特定の実施形態では、抗体コンジュゲートは、CD161に特異的に結合する抗体及び細胞毒性薬剤を含む、抗体-薬物コンジュゲート(ADC)である。細胞毒性薬剤は、直接又は間接的に抗CD161抗体に連結され得る。いくつかの実施形態では、ADCは、細胞毒性薬剤を抗CD161抗体に共有結合させるリンカーをさらに含む。

40

【0316】

作製されたADCにおいて有用な例示的細胞毒性薬剤としては、例えば、当技術分野で公知のある特定の抗腫瘍剤又は抗がん剤が挙げられる。いくつかの実施形態では、細胞毒性薬剤は、がん細胞の破壊を引き起こす。いくつかの実施形態では、細胞毒性薬剤は、がん細胞の成長又は増殖を阻害する。例示的細胞毒性薬剤としては、抗血管形成剤、アポトーシス促進剤、抗有糸分裂剤、抗キナーゼ剤、アルキル化剤、ホルモン、ホルモンアゴニスト、ホルモンアンタゴニスト、ケモカイン、薬物、プロドラッグ、毒素、酵素、代謝拮抗物質、抗生物質、アルカロイド、及び放射性同位体が挙げられる。

【0317】

ある特定の実施形態では、細胞毒性薬剤は、リンカーを介して抗CD161抗体に結合し

50

ている。いくつかの実施形態では、ADCを作製するために使用されるリンカーは、2つの反応性末端:抗体コンジュゲーション反応性末端及び細胞毒性薬剤コンジュゲーション反応性末端を含む。リンカーの抗体コンジュゲーション反応性末端は、抗体上のシステインチオール又はリジンアミン基を介して、例えば、チオール反応性基、例えば二重結合、脱離基、例えばクロロ、プロモ又はヨード、R-スルファニル基又はスルホニル基、又はアミン反応性基、例えばカルボキシル基を介して、抗体にコンジュゲートすることができる。リンカーの細胞毒性薬剤コンジュゲーション反応性末端は、例えば、細胞毒素上の塩基性アミン又はカルボキシル基、典型的にはカルボキシル基又は塩基性アミン基とのアミド結合の形成によって、細胞毒性薬剤にコンジュゲートすることができる。

【0318】

10

ADCの意図された目的に応じて、リンカーは、切断不能なリンカーであっても、又は切断可能なリンカーであってもよい。

【0319】

8. CD161抗体を作製する方法

8.1 CD161抗原調製

本明細書で提供される抗体の単離に使用されるCD161抗原は、インタクトなCD161であっても、又はCD161の断片であってもよい。CD161抗原は、例えば、単離されたタンパク質の形態であっても、又は細胞の表面上に発現したタンパク質の形態であってもよい。いくつかの実施形態では、CD161抗原は、CD161の天然に存在しないバリエーション、例えば、自然界に生じないアミノ酸配列又は翻訳後修飾を有するCD161タンパク質である。

20

【0320】

いくつかの実施形態では、CD161抗原は、例えば、細胞内若しくは膜貫通配列、又はシグナル配列の除去によって末端切断される。いくつかの実施形態では、CD161抗原は、ヒトIgG1 Fcドメイン又はポリヒスチジンタグにそのC末端で融合している。

【0321】

8.2 モノクローナル抗体を作製する方法

モノクローナル抗体は、例えば、Kohler et al. (1975) NATURE, 256: 495-497(その全体が参照により組み込まれる)によって最初に記載されたハイブリドーマ法を使用して、及び/又は組換えDNA法(例えば、米国特許第4,816,567号(その全体が参照により組み込まれる)を参照)によって得てもよい。モノクローナル抗体はまた、例えば、ファージディスプレイライブラリー(例えば、米国特許第8,258,082号(その全体が参照により組み込まれる)を参照)を使用して、あるいは、酵母ベースのライブラリー(例えば、米国特許第8,691,730号及び同第9,354,228号(その全体が参照により組み込まれる)を参照)を使用して得てもよい。

30

【0322】

ハイブリドーマ法では、免疫化に使用されるタンパク質に特異的に結合する抗体を産生する又は産生することが可能なリンパ球を誘発するために、マウス又は他の適切な宿主動物は免疫化される。あるいは、リンパ球は、インビトロで免疫化されてもよい。次いで、リンパ球は、ポリエチレングリコールなどの好適な融合剤を使用して骨髓腫細胞と融合し、ハイブリドーマ細胞を形成する(Goding J.W. (1986) MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE 3RD ED., Academic Press, San Diego, CA(その全体が参照により組み込まれる)を参照)。

40

【0323】

融合していない親骨髓腫細胞の増殖又は生存を阻害する1つ以上の物質を含有する好適な培養培地中で、ハイブリドーマ細胞を播種し、増殖させる。例えば、親骨髓腫細胞が、酵素ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRT又はHPRT)を欠く場合、ハイブリドーマのための培養培地は、典型的には、ヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジンを含み(HAT培地)、これらの物質は、HGPRT欠損細胞の増殖を妨げる。

50

【0324】

有用な骨髓腫細胞は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による抗体の安定した高レベルの産生を支持し、HAT培地の存在又は非存在などの培地条件に感受性のある骨髓腫細胞である。これらの中で、好ましい骨髓腫細胞株は、マウス骨髓腫株、例えば、MOP-21及びMC-11マウス腫瘍に由来するもの(the Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, CAから入手可能)、並びにSP-2若しくはX63-Ag8-653細胞(the American Type Culture Collection, Rockville, MDから入手可能)である。ヒト骨髓腫及びマウス-ヒトヘテロ骨髓腫細胞株はまた、ヒトモノクローナル抗体の産生について記載されている(例えば、Kozbor (1984) J. IMMUNOL., 133: 3001(その全体が参照により組み込まれる)を参照)。

10

【0325】

所望の特異性、親和性、及び/又は生物学的活性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞の特定後、選択されたクローンは、限定希釈法によってサブクローン化し、標準的な方法によって増殖させてもよい(Goding、上記を参照)。この目的に好適な培養培地としては、例えば、D-MEM又はRPMI-1640培地が挙げられる。さらに、ハイブリドーマ細胞は、動物において腹水腫瘍としてインビボで増殖させてもよい。

【0326】

モノクローナル抗体をコードするDNAは、従来の手順(例えば、モノクローナル抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することが可能なオリゴヌクレオチドプローブを使用することによる)を使用して、容易に単離及び配列決定することができる。したがって、ハイブリドーマ細胞は、所望の特性を有する抗体をコードするDNAの有用な供給源として機能し得る。単離されたら、DNAを発現ベクターに入れてもよく、次いでこれを、別の状況では抗体を産生しない宿主細胞、例えば、細菌(例えば、大腸菌)、酵母(例えば、サッカロミセス属(*Saccharomyces*)又はピキア属(*Pichia*)の種)、COS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、又は骨髓腫細胞にトランスフェクトして、モノクローナル抗体を産生させる。

20

【0327】

8.3 低減された免疫原性を有する抗体を作製する方法

ヒト化抗体は、非ヒトモノクローナル抗体の構造部分の大部分、又はすべてを、対応するヒト抗体配列により置換することによって生成してもよい。その結果、抗原特異的可変要素、すなわちCDRのみが非ヒト配列で構成されるハイブリッド分子が生成される。ヒト化抗体を得る方法としては、例えば、Winter and Milstein (1991) NATURE, 349: 293-299; Rader et al. (1998) PROC. NAT. ACAD. SCI. USA, 95: 8910-8915; Steinberger et al. (2000) J. BIOL. CHEM., 275: 36073-36078; Queen et al. (1989) PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 86: 10029-10033;並びに米国特許第5,585,089号、同第5,693,761号、同第5,693,762号、及び同第6,180,370号(これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる)に記載される方法が挙げられる。

30

【0328】

ヒト抗体は、当技術分野で公知の様々な技術によって、例えばトランスジェニック動物(例えば、ヒト化マウス)を使用することによって生成することができる。例えば、Jakobovits et al. (1993) PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 90: 2551; Jakobovits et al. (1993) NATURE, 362: 255-258; Bruggermann et al. (1993) YEAR IN IMMUNO., 7: 33;並びに米国特許第5,591,669号、同第5,589,369号及び同第5,545,807号(これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる)を参照。ヒト抗体はまた、ファージディスプレイライブラリーから得ることができる(例えば、Hoogenboom et al. (1991) J. MOL. BIOL., 227: 381-388; Marks et al. (1991) J. MOL. BIOL., 222: 581-597;並びに米国特許第5,565,332号及び同第5,573,905号(これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる)を参照)。ヒト抗体はまた、インビトロ活性化B細胞によって生成してもよい(例えば、米国特許第5,567,610号及

40

50

び同第5,229,275号(これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる)を参照)。ヒト抗体はまた、酵母ベースのライブラリーから得てもよい(例えば、米国特許第8,691,730号及び同第9,354,228号(その全体が参照により組み込まれる)を参照)。

【0329】

キメラ抗体を作製する例示的方法は、例えば、米国特許第4,816,567号;及びMorrison et al. (1984) PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 81: 6851-6855(これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる)に記載される。いくつかの実施形態では、キメラ抗体は、非ヒト可変領域(例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、又は非ヒト霊長類、例えばサルに由来する可変領域)をヒト定常領域と組み合わせるための組換え技術を使用することによって作製される。

10

【0330】

8.4 抗体断片を作製する方法

本明細書で提供される抗体断片は、本明細書に記載される又は当技術分野で公知の例示的方法を含む、任意の好適な方法によって作製することができる。好適な方法としては、組換え技術、及び全抗体のタンパク質分解消化が挙げられる。抗体断片を作製する例示的方法は、例えば、Hudson et al. (2003) NAT. MED., 9: 129-134(その全体が参照により組み込まれる)に記載される。scFv抗体を作製する方法は、例えば、Pluckthun (1994) THE PHARMACOLOGY OF MONOCLONAL ANTIBODIES, VOL. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315; WO 93/16185;並びに米国特許第5,571,894号及び同第5,587,458号(これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる)に記載される。

20

【0331】

8.5 多特異性抗体を作製する方法

本明細書で提供される多特異性抗体は、本明細書に記載される又は当技術分野で公知の例示的方法を含む、任意の好適な方法によって作製することができる。共通鎖抗体を作製する方法は、Merchant et al. (1998) NATURE BIOTECHNOL., 16: 677-681(その全体が参照により組み込まれる)に記載される。四価二重特異性抗体を作製する方法は、Coloma and Morrison (1997) NATURE BIOTECHNOL., 15: 159-163(その全体が参照により組み込まれる)に記載される。ハイブリッド免疫グロブリンを作製する方法は、Milstein and Cuello (1983) NATURE, 305: 537-540;及びStaerz and Bevan (1986) PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 83: 1453-1457(これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる)に記載される。ノブ・イントゥ・ホール改変を有する免疫グロブリンを作製する方法は、米国特許第5,731,168号(その全体が参照により組み込まれる)に記載される。静電的改変を有する免疫グロブリンを作製する方法は、WO 2009/089004(その全体が参照により組み込まれる)に提供される。二重特異性単鎖抗体を作製する方法は、Traunecker et al. (1991) EMBO J., 10: 3655-3659;及びGruber et al. (1994) J. IMMUNOL., 152: 5368-5374(これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる)に記載される。リンカー長が様々であり得る単鎖抗体を作製する方法は、米国特許第4,946,778号及び同第5,132,405号(これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる)に記載される。ダイアボディを作製する方法は、Hollinger et al. (1993) PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 90: 6444-6448(その全体が参照により組み込まれる)に記載される。トリアボディ及びテトラボディを作製する方法は、Todorovska et al. (2001) J. IMMUNOL. METHODS, 248: 47-66(その全体が参照により組み込まれる)に記載される。三重特異性F(ab')₃誘導体を作製する方法は、Tutt et al. (1991) J. IMMUNOL., 147: 60-69(その全体が参照により組み込まれる)に記載される。架橋抗体を作製する方法は、米国特許第4,676,980号;Brennan et al. (1985) SCIENCE, 229: 81-83;Staerz et al. (1985) NATURE, 314: 628-631;及びEP 0453082(これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる)に記載される。

30

40

【0332】

50

8.6 バリエーションを作製する方法

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される抗体は、親抗体の親和性成熟バリエーションであり、これは、例えば、ファージディスプレイベースの親和性成熟技術を使用して生成され得る。簡潔に述べると、1つ以上のCDR残基を変異させ、バリエーション抗体又はその一部をファージ上に提示させ、親和性についてスクリーニングし得る。このような変更は、CDR「ホットスポット」、すなわち、体細胞成熟過程において高頻度で変異を受けるコドンによってコードされる残基(Chowdhury (2008) METHODS MOL. BIOL., 207: 179-196(その全体が参照により組み込まれる)を参照)、及び/又は抗原に接触する残基において行ってもよい。

【0333】

エラーブローンPCR、鎖シャッフリング、及びオリゴヌクレオチド指定変異誘発、例えばトリヌクレオチド指定変異誘発(TRIM)を含む、任意の好適な方法を使用して、抗体をコードするポリヌクレオチド配列(複数可)に変動性を導入することができる。いくつかの態様では、いくつかのCDR残基(例えば、一度に4~6残基)が無作為化される。抗原結合に關与するCDR残基は、例えば、アラニン走査変異誘発又はモデリングを使用して、具体的に特定してもよい。特にCDR-H3及びCDR-L3は、変異のための標的とされることが多い。

【0334】

可変領域及び/又はCDRへの多様性の導入を使用して、二次ライブラリーを生成することができる。次いで、二次ライブラリーをスクリーニングして、改善された親和性を有する抗体バリエーションを特定する。二次ライブラリーを構築し、そこから再選択することによる親和性成熟は、例えば、Hoogenboom et al. (2001) METHODS MOL. BIOL., 178: 1-37(その全体が参照により組み込まれる)に記載されている。

【0335】

8.7 ベクター、宿主細胞、及び組換え法

CD161抗体をコードする単離された核酸、核酸を含むベクター、並びにベクター及び核酸を含む宿主細胞、並びに抗体の産生のための組換え技術も提供される。

【0336】

抗体の組換え産生のために、抗体をコードする核酸(複数可)が、単離され、さらなるクローニング(すなわち、DNAの増幅)又は発現のために複製可能なベクターに挿入され得る。いくつかの態様では、核酸は、例えば米国特許第5,204,244号(その全体が参照により組み込まれる)に記載されるように、相同組換えによって産生され得る。

【0337】

多くの様々なベクターが当技術分野で公知である。ベクター成分は、一般に、例えば米国特許第5,534,615号(その全体が参照により組み込まれる)に記載されるように、以下: シグナル配列、複製起点、1つ以上のマーカー遺伝子、エンハンサー要素、プロモーター、及び転写終結配列のうちの1つ以上を含む。

【0338】

好適な宿主細胞の実例としては、任意の好適な原核細胞(例えば、細菌細胞)、下等真核細胞(例えば、酵母細胞)、又は高等真核細胞(例えば、哺乳動物細胞)が挙げられる。好適な原核生物としては、真正細菌、例えば、グラム陰性又はグラム陽性生物、例えば、腸内細菌科(Enterobacteriaceae)、例えば、エシェリヒア属(*Escherichia*)(大腸菌(*E. coli*))、エンテロバクター属(*Enterobacter*)、エルウィニア属(*Erwinia*)、クレブシエラ属(*Klebsiella*)、プロテウス属(*Proteus*)、サルモネラ属(*Salmonella*)(*S.チフィウム*(*S. typhimurium*))、セラチア属(*Serratia*)(*S.マルセッセンス*(*S. marcescans*))、シゲラ属(*Shigella*)、バチルス属(*Bacilli*)(*B.サブチリス*(*B. subtilis*)及び*B.リケニフォルミス*(*B. licheniformis*))、シュードモナス属(*Pseudomonas*)(*P.エルギノサ*(*P. aeruginosa*))、及びストレプトミセス属(*Streptomyces*)が挙げられる。1つの有用な大腸菌クローニング宿主は、大腸菌294であるが、大腸菌B、大腸菌X1776、及び大腸菌W3110などの他の株も好適である。

10

20

30

40

50

【0339】

原核生物に加えて、糸状菌又は酵母などの真核微生物も、CD161抗体コードベクターのための好適なクローニング又は発現宿主である。サッカロミセス・セレビスエ(*Saccharomyces cerevisiae*)、すなわち一般的なパン酵母は、一般に使用されている下等真核宿主微生物である。しかし、シゾサッカロミセス・ポンベ(*Schizosaccharomyces pombe*)、クルイベロミセス属(*Kluyveromyces*)(*K.ラクチス*(*K. lactis*)、*K.フラギリス*(*K. fragilis*)、*K.ブルガリクス*(*K. bulgaricus*)、*K.ウィッケラミイ*(*K. wickerhamii*)、*K.ワルチ*(*K. waltii*)、*K.ドロソフィラルム*(*K. drosophilum*)、*K.サーモトレランス*(*K. thermotolerans*)、及び*K.マルキシアヌス*(*K. marxianus*))、ヤロウイア属(*Yarrowia*)、ピキア・パストリス(*Pichia pastoris*)、カンジダ属(*Candida*)(*C.アルビカンス*(*C. albicans*))、トリコデルマ・リーセイ(*Trichoderma reesia*)、アカパンカビ(*Neurospora crassa*)、シュワニオミセス属(*Schwanniomyces*)(*S.オクシデンタリス*(*S. occidentalis*))、及び糸状菌、例えば、ペニシリウム属(*Penicillium*)、トリボクラディウム属(*Tolypocladium*)、及びアスペルギルス属(*Aspergillus*)(*A.ニデュランス*(*A. nidulans*)及び*A.ニガー*(*A. niger*))などの、いくつかの他の属、種、及び株が入手可能であり、有用である。

10

【0340】

有用な哺乳動物宿主細胞としては、COS-7細胞、HEK293細胞、ベビーハムスター腎臓(BHK)細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)、マウスセルトリ細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞(VERO-76)などが挙げられる。

20

【0341】

本発明のCD161抗体を産生するために使用される宿主細胞は、様々な培地中で培養され得る。例えば、ハムF10、最小必須培地(MEM)、RPMI-1640、及びダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)などの市販培地は、宿主細胞を培養するのに好適である。さらに、Ham et al. (1979) METH. ENZ., 58: 44; Barnes et al. (1980) ANAL. BIOCHEM., 102: 255;並びに米国特許第4,767,704号、同第4,657,866号、同第4,927,762号、同第4,560,655号、及び同第5,122,469号;又はWO1990/03430及びWO1987/00195(これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる)に記載される培地のいずれも使用可能である。

【0342】

30

これらの培地のいずれも、ホルモン及び/又は他の成長因子(例えば、インスリン、トランスフェリン、又は上皮成長因子)、塩(例えば、塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、及びリン酸塩)、緩衝剤(例えば、HEPES)、ヌクレオチド(例えば、アデノシン及びチミジン)、抗生物質、微量元素(マイクロモル範囲の最終濃度で通常存在する無機化合物と定義される)、並びにグルコース若しくは同等のエネルギー源で必要に応じて補充されてもよい。任意の他の必要な補助剤も、当業者に公知であろう適切な濃度で含まれてよい。

【0343】

温度、pHなどの培養条件は、発現のために選択された宿主細胞でこれまでに使用された条件であり、当業者には明らかである。

40

【0344】

組換え技術を使用する場合、抗体は、細胞内で、ペリプラズム腔で産生されてもよく、又は培地に直接分泌されてもよい。抗体が細胞内で産生される場合、第1のステップとして、宿主細胞又は溶解された断片のいずれかの微粒子状細片は、例えば、遠心分離又は限外濾過によって除去される。例えば、Carter et al. (1992) BIO/TECHNOLOGY, 10: 163-167(その全体が参照により組み込まれる)は、大腸菌のペリプラズム腔に分泌される抗体を単離するための手順を記載する。簡潔に述べると、細胞ペーストを、酢酸ナトリウム(pH3.5)、EDTA、及びフェニルメチルスルホニルフルオリド(PMSF)の存在下で約30分かけて解凍する。細胞細片は、遠心分離によって除去することができる。

【0345】

50

いくつかの実施形態では、抗体は、無細胞系で生成される。いくつかの態様では、無細胞系は、Yin et al. (2012) MABS, 4: 217-225(その全体が参照により組み込まれる)に記載されるように、インビトロ転写及び翻訳系である。いくつかの態様では、無細胞系は、真核細胞又は原核細胞からの無細胞抽出物を利用する。いくつかの態様では、原核細胞は、大腸菌である。抗体の無細胞発現は、例えば、抗体が不溶性凝集体として細胞中に蓄積する場合、又はペリプラズム発現からの収量が低い場合に有用であり得る。

【0346】

抗体が培地に分泌される場合、このような発現系からの上清は、一般にまず、市販のタンパク質濃縮フィルター、例えば、Amicon(登録商標)又はMillipore(登録商標)Pellon(登録商標)限外濾過ユニットを使用して濃縮される。タンパク質分解を阻害するため、PMSFなどのプロテアーゼ阻害剤が前述のステップのいずれかに含まれてもよく、外来性の混入物の増殖を妨げるために、抗生物質が含まれてもよい。

【0347】

細胞から調製される抗体組成物は、例えば、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、及びアフィニティークロマトグラフィーを使用して精製することができ、アフィニティークロマトグラフィーが特に有用な精製技術である。親和性リガンドとしてのプロテインAの適合性は、種、及び抗体中に存在する任意の免疫グロブリンFcドメインのアイソタイプに依存する。プロテインAを使用して、ヒト 1、 2、又は 4重鎖を含む抗体を精製することができる(Lindmark et al. (1983) J. IMMUNOL. METH., 62: 1-13(その全体が参照により組み込まれる))。プロテインGは、すべてのマウスアイソタイプに対して、及びヒト 3に対して有用である(Guss et al. (1986) EMBO J., 5: 1567-1575(その全体が参照により組み込まれる))。

【0348】

親和性リガンドが結合するマトリックスは、最も多くはアガロースであるが、他のマトリックスが利用可能である。コントロールドポアガラス又はポリ(スチレンジビニル)ベンゼンなどの機械的に安定なマトリックスは、アガロースを用いて達成され得るものよりも速い流速及び短い処理時間を可能にする。抗体がC_H3ドメインを含む場合、BakerBond ABX(登録商標)樹脂が精製に有用である。

【0349】

イオン交換カラムでの分画、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカでのクロマトグラフィー、ヘパリンSephrose(登録商標)でのクロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE、及び硫酸アンモニウム沈殿などの、タンパク質精製のための他の技術も利用可能であり、当業者によって適用可能である。

【0350】

任意の予備的精製ステップ(複数可)後に、目的の抗体及び混入物を含む混合物は、一般に低塩濃度(例えば、約0～約0.25Mの塩)で実施される、約2.5～約4.5の間のpHの溶出緩衝液を使用する、低pH疎水性相互作用クロマトグラフィーに供されてもよい。

【0351】

9. 機能アッセイ

当技術分野で公知の様々なアッセイを使用して、本明細書で提供される抗CD161抗体及び抗CD161 ADCを特定し、特徴付けてもよい。

【0352】

9.1 結合、競合、及びエピトープマッピングアッセイ

9.1.1 抗原結合アッセイ

いくつかの実施形態では、抗原結合活性は、抗原結合アッセイを使用して決定される。いくつかの実施形態では、抗原結合アッセイは、本明細書に開示される抗体の結合親和性(K_D)を決定する。いくつかの実施形態では、抗原結合アッセイは、CD161ポリペプチドに対する抗CD161抗体の結合相互作用についてのキネティック速度定数(例えば、k_{on}、k_{off})を決定する。いくつかの実施形態では、標的分子に対するCD161抗体の結合相互作用のキネティック特性は、Octet QK384アッセイを使用して決定される。

10

20

30

40

50

【0353】

抗原結合活性アッセイの例は本明細書で提供されるが、本明細書で提供されるCD161抗体の特異的抗原結合活性はまた、表面プラズモン共鳴(SPR)、バイオレイヤー干渉法(BLI)、酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)、結合平衡除外法(KinExA)、ゲルシフトアッセイ、ブルダウンアッセイ、定量的免疫プロット、平衡透析、分析超遠心分離、蛍光異方性、溶液平衡滴定、結合平衡除外法、及び等温滴定カロリメトリーを使用することを含む、任意の好適な方法によって評価してもよい。これらの方法は、当技術分野で周知である。

【0354】

いくつかの実施形態では、抗原結合アッセイは、細胞表面上で発現したCD161ポリペプチドに対する標識抗CD161抗体の結合親和性を測定することを含む。いくつかの実施形態では、抗CD161抗体は、蛍光分子(例えば、蛍光色素)で標識される。いくつかの実施形態では、結合は、蛍光検出法(例えば、フローサイトメトリー)を使用して検出される。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される抗CD161抗体の、抗原発現細胞への結合は、抗原の発現を欠く参照細胞に対して比較される。

【0355】

いくつかの実施形態では、抗原結合アッセイは、表面プラズモン共鳴である。「表面プラズモン共鳴」は、例えばBIAcoreシステム(Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, NJ)を使用する、バイオセンサーマトリックス内のタンパク質濃度の変化の検出により、リアルタイム生体分子特異的相互作用の分析を可能にする光学現象を含む。さらなる説明について、Jonsson, U., et al. (1993) ANN. BIOL. CLIN., 51: 19-26; Jonsson, U., et al. (1991) BIOTECHNIQUES, 11: 620-627; Johnsson, B., et al. (1995) J. MOL. RECOGNIT., 8: 125-131;及びJohnsson, B., et al. (1991) ANAL. BIOCHEM., 198: 268-277を参照。

【0356】

いくつかの実施形態では、抗原結合アッセイは、バイオレイヤー干渉法(BLI)である。句「バイオレイヤー干渉法」又は「BLI」は、その光学層検出表面の厚さにおけるサブナノメートル変化の測定を可能にする光学現象を含む。いくつかの実施形態では、生体分子は、センサー表面で結合し、光学層の厚さを変化させる。光学層の厚さの変化の大きさは、結合分子の質量又は分子量に比例する。いくつかの実施形態では、CD161は、抗体による結合を測定するためにセンサー表面に固定化され、結合によって分子量の変化が生じて、光学層の厚さにおける対応する変化を生じる。CD161がセンサー表面に固定化されるいくつかの実施形態では、抗CD161抗体のサンプルは、段階希釈によって調製され、注入され、抗体濃度に対する結合曲線のモデル化から K_D 値が計算される。いくつかの実施形態では、BLIは、Octet QK384システム(ForteBio)で実施され、すなわち、抗原結合アッセイは、Octet QK384アッセイである。

【0357】

9.1.2 リガンド結合アッセイ

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗CD161抗体は、ヒトCD161に結合し、リガンド結合アッセイによって決定した場合、CLEC2Dによる結合を遮断又は阻害する。リガンド結合アッセイは、受容体とリガンドとの間で生じる相互作用及び/又は親和性の程度の尺度を提供するアッセイである。例えば、いくつかの実施形態では、リガンド結合アッセイは、受容体(例えば、CD161)へのリガンド分子(例えば、CLEC2D)の結合の程度を決定するために使用される。いくつかの実施形態では、リガンド結合アッセイは、リガンドと受容体との間の複合体の形成を検出することを含む。いくつかの実施形態では、受容体へのリガンド結合の程度を決定するために、リガンド結合アッセイは、リガンド:受容体複合体の解離を決定することを含む。いくつかの実施形態では、リガンド:受容体複合体の形成及び/又は解離は、受容体との複合体中の蛍光標識されたリガンドの検出によって決定される。いくつかの実施形態では、リガンド:受容体複合体の形成及び/又は解離は、リガンドとの複合体中の蛍光標識された受容体の量の検出及び/又は定量化

によって決定される。いくつかの実施形態では、リガンド:受容体複合体の形成及び/又は解離は、リガンド:受容体複合体に特異的に結合する蛍光標識された抗体の量の検出及び/又は定量化によって決定される。蛍光を検出及び定量化する方法は、当技術分野で公知であり、以下に限定されないが、蛍光偏光(FP)、蛍光異方性(FA)、フローサイトメトリー及び顕微鏡検査を含む。いくつかの実施形態では、リガンド:受容体複合体の形成及び/又は解離は、受容体との複合体中の放射性標識されたリガンドの量の検出及び/又は定量化によって決定される。いくつかの実施形態では、リガンド:受容体複合体の形成及び/又は解離は、リガンドとの複合体中の放射性標識された受容体の量の検出及び/又は定量化によって決定される。いくつかの実施形態では、リガンド:受容体複合体の形成及び/又は解離は、リガンド:受容体複合体に特異的に結合する放射性標識された抗体の量の検出及び/又は定量化によって決定される。

10

【0358】

いくつかの実施形態では、本開示の抗体(例えば、抗CD161抗体)は、受容体(例えば、CD161)に結合し、リガンド:受容体複合体(例えば、CD161:CLEC2D複合体)の形成を破壊、阻害、又は遮断する。

【0359】

9.1.3 競合アッセイ

2つの抗体間、又は抗体と別の分子(例えば、CD161の1つ以上のリガンド)との間の競合を測定するためのアッセイは、例えば、Harlow and Lane (1988) ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL CH.14, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.(その全体が参照により組み込まれる)において、当技術分野で周知である。

20

【0360】

9.1.4 エピトープマッピングアッセイ

本明細書に記載されるCD161抗体は、CD161上のエピトープ結合を特徴とする。いくつかの実施形態では、CD161リガンド上の各CD161抗体の結合エピトープは、例えば、Biacore 8K機器を使用する、表面プラズモン共鳴によって決定される。本明細書で提供される抗体が結合するエピトープをマッピングするためのアッセイは、例えば、Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," in METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, vol. 66, Humana Press, Totowa, N.J.(その全体が参照により組み込まれる)に記載される。いくつかの実施形態では、エピトープは、ペプチド競合によって決定される。いくつかの実施形態では、エピトープは、質量分析によって決定される。いくつかの実施形態では、エピトープは、結晶学(例えば、X線結晶学)によって決定される。結合した抗体-抗原対の結晶構造により、抗原のエピトープ及び抗体のパラトープの両方における、側鎖及び主鎖の原子の両方からの個々のアミノ酸間の重要な相互作用を非常に正確に決定することが可能になる。互いに4オングストローム()内にあるアミノ酸は、一般に接触残基であると考えられる。この方法は、典型的には、抗体及び抗原の精製、複合体の形成及び精製、その後の、回折品質の結晶を得るための、結晶化スクリーニング及び最適化の連続的ラウンドを含む。構造解は、多くはシンクロトロン源でのX線結晶学後に得られる。したがって、本開示によって提供される抗CD161抗体又はその抗原結合部分は、ヒトCD161に結合した抗体又はその断片若しくは部分を含む結晶構造のX線結晶解析によって評価され得る。いくつかの態様では、本開示によって提供される抗体によって結合されるエピトープは、抗体パラトープ残基の4オングストローム()内に存在する又は位置するヒトCD161抗原上の残基を決定することによって特定される。エピトープマッピングのための他の構造的な方法としては、以下に限定されないが、質量分析に連結した水素-重水素交換、架橋連結質量分析、及び核磁気共鳴(NMR)が挙げられる(例えば、Morris (1996)、上記; Abbott et al. (2014) IMMUNOLOGY, 142(4): 526-535を参照)。

30

40

【0361】

エピトープマッピングのための機能的な方法は、当技術分野で周知であり、典型的には、

50

タンパク質全体、タンパク質断片又はペプチドへの抗体結合の評価又は定量化を含む。エピトープマッピングのための機能的方法は、例えば、線状エピトープ又は立体構造エピトープを特定するために使用することができ、且つ/又は2つ以上の特異な抗体が同じ又は類似のエピトープに結合する場合を推測するために使用することができる。エピトープマッピングのための機能的方法としては、例えば、免疫プロットティングアッセイ、免疫沈降アッセイ、及び蛍光ベースの標識アッセイが挙げられ、CD161からの重複又は連続ペプチドが、抗CD161抗体(例えば、HP-3G10)との反応性について試験される。エピトープマッピングのための他の機能的方法としては、アレイベースのオリゴペプチド走査(あるいは「重複ペプチド走査」又は「ペプスキャン分析」としても知られている)、部位特異的変異誘発(例えば、アラニン走査変異誘発)、及びハイスループット変異誘発マッピング(例えば、ショットガン変異誘発マッピング)が挙げられる。

【0362】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗CD161抗体によって結合されるエピトープは、部位特異的変異誘発又はアラニン走査変異誘発を使用して決定される。部位特異的変異誘発法は、タンパク質配列に沿って置換を系統的に導入し、次いで、抗体結合に対する各置換の影響を決定することによって重要なアミノ酸が特定される、標的部位特異的変異誘発を含む。これは、「アラニン走査変異誘発」(Cunningham and Wells (1989) SCIENCE, 244: 1081-085)、又はCD161中のアミノ酸残基の点変異誘発のいくつかの他の形態によって行ってもよい。本明細書に記載されるように、アラニン走査は、ポリペプチド中の野生型残基のアラニン残基への置換に続く、アラニン置換誘導体又は変異体ポリペプチドの安定性又は機能(複数可)(例えば、結合親和性)の評価、及び野生型ポリペプチドとの比較を含む技術である。理論に拘束されるものではないが、第1の抗体の結合を低減又は排除する抗原中の本質的にすべてのアミノ酸変異が、第2の又はそれ以降の抗体の結合を低減又は排除する場合、2つ以上の抗体(例えば、試験抗体及び参照抗体)は、同じエピトープを有する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗CD161抗体によって結合されるエピトープは、ショットガン変異誘発を使用して決定される。ショットガン変異誘発マッピングは、標的遺伝子についての包括的なプラスミド変異ライブラリーを利用し、ライブラリー中の各クローンは、固有のアミノ酸変異を有し、ライブラリー全体は、標的タンパク質中のすべてのアミノ酸を網羅する。変異ライブラリーを構成するクローンは、マイクロプレート中に個別に配置され、生存している哺乳動物細胞内で発現し、目的の抗体との免疫反応性について試験される。抗体エピトープに重要なアミノ酸は、反応性の喪失によって特定され、次いで、エピトープを可視化するためにタンパク質構造上にマッピングされる。哺乳動物細胞内での標的タンパク質抗原の発現により、標的タンパク質抗原の天然構造がもたらされることが多く、これにより、線状エピトープ構造及び立体構造エピトープ構造の両方を複雑なタンパク質上にマッピングすることが可能になる(Paes et al. (2009) J. AM. CHEM. SOC., 131(20): 6952-6954; Banik and Doranz (2010) GENETIC ENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY NEWS, 3(2): 25-28)。

【0363】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗CD161抗体によって結合されるエピトープは、ペプチド走査法を使用して決定される。ペプチド走査では、標的タンパク質(例えば、CD161)の重複セグメントからの短いペプチド配列のライブラリーが、目的の抗体に結合するそれらの能力について試験される。ペプチドは、「ペプスキャン」法(WO1984/03564; WO1993/09872(これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる))におけるように、固相スクリーニングのための複数の方法のいずれかによって、例えば、ELISA又はBIACOREを使用して、又はチップ上で、合成され、結合についてスクリーニングされる(Reineke et al. (2001) CURR. OPIN. BIOTECHNOL., 12: 59-64)。立体構造エピトープは、足場上のペプチドの化学的結合(CLIPS)によって特定してもよい。ペプチドのルースな末端は、合成足場上に付着され、その結果、足場ペプチドは、インタクトなタンパク質中の対応する配列と同じ空間構造をとることが可能であり

得る。CLIPS技術を使用して、線状ペプチドを環状構造(「シングルループ」形式)に固定し、また、タンパク質結合部位の異なる部分を結合させて(「ダブルループ」、「トリプルループ」などの形式)、抗体結合についてアッセイ可能な立体構造エピトープを作製する(米国特許第7,972,993号)。本開示によって提供される抗体によって結合されるエピトープはまた、コンピュータ法を使用してマッピングしてもよい。これらの方法では、例えば、ペプチド断片のライブラリーが、ファージ又は細胞の表面上に提示される。次いで、エピトープは、選択的結合アッセイを使用してこれらの断片に対する抗体をスクリーニングすることによってマッピングされる。ファージディスプレイを使用して得られる線状親和性選択ペプチドに基づく立体構造エピトープの予測を可能にする、いくつかのコンピュータツールが開発されている(Mayrose et al. (2007) BIOINFORMATICS, 23: 3244-3246)。ファージディスプレイによる立体構造エピトープの検出のための方法も利用可能である。微生物ディスプレイシステムを使用して、立体構造エピトープの特定のために、細胞表面上に

適切に折り畳まれた抗原性断片を発現してもよい(Cochran et al. (2004) J. IMMUNOL. METH., 287: 147-158; Rockberg et al. (2008) NATURE METHODS, 5: 1039-1045)。タンパク質分解及び質量分光を含む方法を使用して、抗体エピトープを決定してもよい(Baerga-Ortiz et al. (2002) PROTEIN SCI., 11(6): 1300-1308)。限定的タンパク質分解では、抗体の存在下及び非存在下において、抗原は、様々なプロテアーゼによって切断され、断片は、質量分析によって特定される。エピトープは、抗体が結合すると、タンパク質分解から保護される抗原の領域である(Suckau et al. (1990) PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 87: 9848-9852)。さらなるタンパク質分解に基づく方法としては、例えば、選択的化学修飾(Fiedler et al. (1998) BIOCONJUGATE CHEMISTRY, 9(2): 236-234)、エピトープ切除(Van de Water et al. (1997) CLIN. IMMUNOL. IMMUNOPATHOL., 85(3): 229-235)、及び水素-重水素(H/D)交換の最近開発された方法(Flanagan, N. (2010) GENETIC ENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY NEWS 3(2): 25-28)が挙げられる。

【0364】

9.1.5 エフェクター機能についてのアッセイ

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるような抗CD161抗体は、CD161に結合し、免疫細胞エフェクター機能の活性化を誘導又は促進し、免疫細胞は、任意のCD161発現免疫細胞であるか、又は免疫細胞は、CD161発現T細胞、CD161発現NK細胞、又はそれらの組み合わせである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるような抗CD161抗体は、CD161に結合し、CD161発現T細胞又はCD161発現NK細胞の活性化、増殖、サイトカイン産生、細胞溶解機能又はそれらの任意の組み合わせを誘導又は促進する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるような抗CD161抗体は、粘膜関連インバリアントT細胞(MAIT細胞)を活性化する。いくつかの実施形態では、本開示の抗CD161抗体は、CD161遮断によってMAIT細胞を活性化する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるような抗CD161抗体は、CD161に結合し、T細胞活性化、細胞傷害性Tリンパ球(CTL)応答、T細胞増殖、サイトカイン産生、又はそれらの組み合わせを誘導又は促進する。

【0365】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるような抗CD161抗体は、CD161に結合し、CLEC2DへのCD161結合と競合するか又はCLEC2DへのCD161結合を遮断する。いくつかの実施形態では、CD161の遮断は、リガンド(例えば、CLEC2D)結合を決定することによって測定される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるような抗CD161抗体は、CD161発現T細胞又はCD161発現NK細胞上のCD161に結合し、CLEC2Dの存在下においてT細胞又はNK細胞免疫細胞エフェクター機能の活性化を誘導又は促進する。

【0366】

いくつかの実施形態では、CD161発現NK細胞の活性化は、CLEC2Dの存在下におい

てCD161発現NK細胞の培養物に抗CD161抗体を添加することによって決定される。いくつかの実施形態では、CLEC2Dリガンドは、NK細胞と共培養されたヒトがん細胞で発現する。ヒトNK細胞の活性化は、例えば用量依存的な、抗CD161抗体への曝露後のNK細胞のCD107a発現によって測定することができる。ヒトNK細胞の活性化は、例えば用量依存的な、抗CD161抗体への曝露後のIFN 分泌によって測定することができる。いくつかの実施形態では、CLEC2Dの存在下でヒトNK細胞における阻害性シグナル伝達を遮断するCD161抗体の有効性は、例えば実施例7で決定されるように、EC₅₀(nM)値として提供される。いくつかの実施形態では、CLEC2Dの存在下におけるヒトNK細胞のCD161抗体活性化又は遮断についてのEC₅₀値は、0.04nM~0.38nMの間である。

【0367】

10

いくつかの実施形態では、CD161発現T細胞の活性化は、CLEC2Dの存在下においてCD161発現T細胞の培養物に抗CD161抗体を添加することによって決定される。いくつかの実施形態では、CLEC2Dリガンドは、T細胞と共培養されたヒトがん細胞で発現する。いくつかの実施形態では、T細胞活性化は、操作されたT細胞におけるNFAT-ルシフェラーゼレポーター遺伝子システム(InvivoGen)を使用して測定される。いくつかの実施形態では、CLEC2Dの存在下でT細胞における阻害性シグナル伝達を遮断する抗CD161の有効性は、例えば実施例8及び9に記載されるように提供される。いくつかの実施形態では、CLEC2Dの存在下におけるヒトT細胞のCD161抗体活性化又は遮断についてのEC₅₀値は、1.5nM~4.1nMの間である。

【0368】

20

いくつかの実施形態では、本開示の抗体は、CLEC2D媒介性阻害を逆転させ、初代NK細胞及びT細胞の機能を回復させ、さらに、TCR依存的に、抗原に対するT細胞リコール応答の増強及び直接的T細胞媒介性細胞傷害性を回復させる。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される抗体は、例えば実施例13に記載されるように、NK細胞上のCD161の、標的細胞上のCLEC2Dとの相互作用を遮断することによって、NK細胞死滅の阻害を逆転させる。ある特定の実施形態では、抗体は、NK細胞による細胞傷害性脱顆粒だけでなく、IFN の発現も回復させる。ある特定の実施形態では、NK細胞活性化の回復は、例えば用量依存的な、抗CD161抗体への曝露後のNK細胞のCD107a発現によって測定することができる。ヒトNK細胞の活性化は、例えば用量依存的な、抗CD161抗体への曝露後のIFN 分泌によって測定することができる。

【0369】

30

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される抗体は、CLEC2D発現標的細胞のNK細胞死滅を増強する。ある特定の実施形態では、本明細書に開示される抗体は、例えば実施例14に記載されるように、NK細胞上のCD161の、標的細胞上のCLEC2Dとの相互作用を遮断することによって、CLEC2D発現標的細胞のNK細胞死滅を増強する。

【0370】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される抗体は、例えば実施例15に記載されるように、CLEC2D(単球由来DC上に発現する)とのCD161(T細胞上に発現する)相互作用を遮断することによって、抗原特異的エフェクターメモリーCD4 T細胞の再活性化を増強する。いくつかの実施形態では、抗体は、抗原特異的エフェクターメモリーT(EM細胞)によるサイトカイン産生の増強及び増殖の増加(例えば、Ki-67発現によって測定した場合)をもたらす。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される抗体は、例えば実施例16に記載されるように、MART-1特異的T細胞のサイトカイン産生を増強する。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される抗体は、例えば濃度依存的に、CD8+ T細胞からのインターフェロンガンマ(IFN)、インターロイキン-2(IL-2)及び腫瘍壊死因子アルファ(TNF)の産生を増強する。いくつかの実施形態では、本開示の抗体は、例えば実施例17に記載されるように、MART-1特異的T細胞の細胞傷害機能を増強する。いくつかの実施形態では、本開示の抗体は、例えば濃度依存的に、グランザイムB産生T細胞の頻度を増加させる。

【0371】

40

50

いくつかの実施形態では、本開示の抗体は、健康なドナー由来の刺激されていないヒト PBMCにおいてサイトカイン放出を誘導しなかった(例えば、サイトカイン放出症候群)。

【0372】

様々なインビトロ及びインビボアッセイを使用するエフェクター機能アッセイが当技術分野で公知であり、例えば、Ravetch and Kinet (1991) ANNU. REV. IMMUNOL., 9: 457-492; 米国特許第5,500,362号、同第5,821,337号; Hellstrom et al. (1986) PROC. NAT'L ACAD. SCI. USA, 83: 7059-7063; Hellstrom et al. (1985) PROC. NAT'L ACAD. SCI. USA, 82:1499-1502; Bruggemann et al. (1987) J. EXP. MED., 166: 1351-1361; Clynes et al. (1998) PROC. NAT'L ACAD. SCI. USA, 95: 652-656; WO2006/029879; WO2005/100402; Gazzano -Santoro et al. (1996) J. IMMUNOL. METHODS, 202: 163-171; Cragg et al. (2003) BLOOD, 101: 1045-1052; Cragg et al. (2004) BLOOD, 103: 2738-2743; 及び Petkova et al. (2006) INT'L IMMUNOL., 18: 1759-1769(これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる)に記載されるものがある。

【0373】

10. 医薬組成物

治療用途のために、抗体又はその抗原結合断片又は抗体コンジュゲートは、好ましくは薬学的に許容される担体と組み合わせられる。用語「薬学的に許容される」は、本明細書で使用される場合、健全な医学的判断の範囲内で、過度の毒性、刺激、アレルギー応答、又は他の問題若しくは合併症なしに、ヒト及び動物の組織と接触させて使用するのに好適な、妥当なベネフィット/リスク比で釣り合った、化合物、材料、組成物、及び/又は剤形を指す。

【0374】

用語「薬学的に許容される担体」は、本明細書で使用される場合、過度の毒性、刺激、アレルギー応答、又は他の問題若しくは合併症なしに、ヒト及び動物の組織と接触させて使用するのに好適な、妥当なベネフィット/リスク比で釣り合った、緩衝剤、担体、及び賦形剤を指す。薬学的に許容される担体は、標準的な医薬担体のいずれか、例えば、リン酸緩衝食塩溶液、水、エマルション(例えば、油/水又は水/油エマルションなど)、及び様々な種類の湿潤剤を含む。組成物はまた、安定剤及び保存剤を含み得る。担体、安定剤及びアジュバントの例については、例えば、Martin (1975) REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 15TH ED., Mack Publ. Co., Easton, PAを参照。薬学的に許容される担体としては、医薬投与に適合性のある、緩衝剤、溶媒、分散媒、被覆剤、等張剤及び吸収遅延剤などが挙げられる。医薬活性物質のためのこのような媒体及び薬剤の使用は、当技術分野で公知である。

【0375】

ある特定の実施形態では、医薬組成物は、組成物の、例えば、pH、オスモル濃度、粘性、透明性、色調、等張性、匂い、無菌性、安定性、溶解速度若しくは放出速度、吸収性、又は透過性を改変、維持、又は保存するための製剤化材料を含有し得る。このような実施形態では、好適な製剤化材料としては、以下に限定されないが、アミノ酸(例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン又はリジン); 抗微生物剤; 酸化防止剤(例えば、アスコルビン酸、亜硫酸ナトリウム又は亜硫酸水素ナトリウム); 緩衝剤(例えば、ホウ酸塩、重炭酸塩、Tris-HCl、クエン酸塩、リン酸塩又は他の有機酸); 充填剤(例えば、マンニトール又はグリシン); キレート剤(例えば、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)); 錯化剤(例えば、カフェイン、ポリビニルピロリドン、ベータ-シクロデキストリン又はヒドロキシプロピル-ベータ-シクロデキストリン); フィラー; 単糖; 二糖; 及び他の炭水化物(例えば、グルコース、マンノース又はデキストリン); タンパク質(例えば、血清アルブミン、ゼラチン又は免疫グロブリン); 着色剤、香味剤及び希釈剤; 乳化剤; 親水性ポリマー(例えば、ポリビニルピロリドン); 低分子量ポリペプチド; 塩形成対イオン(例えば、ナトリウム); 保存剤(例えば、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

酸又は過酸化水素); 溶媒(例えば、グリセリン、プロピレングリコール又はポリエチレングリコール); 糖アルコール(例えば、マンニトール又はソルビトール); 懸濁化剤; 界面活性剤又は湿潤剤(例えば、プルロニック、PEG、ソルビタンエステル、ポリソルベート類、例えば、ポリソルベート20、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、チロキサポール); 安定性増強剤(例えば、スクロース又はソルビトール); 張性増強剤(例えば、ハロゲン化アルカリ金属、好ましくは塩化ナトリウム又は塩化カリウム、マンニトールソルビトール); 送達ビヒクル; 希釈剤; 賦形剤及び/又は医薬アジュバントが挙げられる(例えば、REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th ed. (Mack Publishing Company, 1990)及びAdeboye Adejare, REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY (23d ed. 2020)を参照)。

10

【0376】

ある特定の実施形態では、医薬組成物は、ナノ粒子、例えば、ポリマーナノ粒子、リポソーム、又はミセルを含有し得る(Anselmo et al. (2016) BIOENG. TRANSL. MED., 1: 10-29を参照)。

【0377】

ある特定の実施形態では、医薬組成物は、持続送達製剤又は制御送達製剤を含有し得る。持続送達手段又は制御送達手段を製剤化するための技術、例えば、リポソーム担体、生体内分解性微粒子又は多孔質ビーズ及びデポー注射も、当業者に公知である。持続放出製剤は、例えば、成形品、例えばフィルム又はマイクロカプセルの形態における多孔質ポリマー微粒子又は半透過性ポリマーマトリックスを含み得る。持続放出マトリックスは、ポリエステル、ヒドロゲル、ポリラクチド、L-グルタミン酸とガンマエチル-L-グルタメートとのコポリマー、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)、エチレン酢酸ビニル、又はポリ-D(-)-3-ヒドロキシ酪酸を含み得る。持続放出組成物はまた、当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み得る。

20

【0378】

本明細書に開示される抗体若しくはその抗原結合断片又は抗体コンジュゲートを含有する医薬組成物は、投薬単位形態で提示することができ、任意の好適な方法によって調製することができる。医薬組成物は、その意図される投与経路と適合するように製剤化すべきである。投与経路の例は、静脈内(IV)、皮内、吸入、経皮、局所、経粘膜、髄腔内及び直腸投与である。ある特定の実施形態では、本明細書に開示される抗体、若しくはその抗原結合断片、又は抗体コンジュゲートは、IV注入によって投与される。ある特定の実施形態では、本明細書に開示される抗体若しくはその抗原結合断片、又は抗体コンジュゲートは、腫瘍内注射によって投与される。有用な製剤は、薬学分野で公知の方法によって調製することができる(例えば、REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18th ed. (Mack Publishing Company, 1990)及びAdeboye Adejare, REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY (23d ed. 2020)を参照)。非経口投与に好適な製剤成分としては、滅菌希釈剤、例えば、注射用水、食塩溶液、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール又は他の合成溶媒; 抗細菌剤、例えば、ベンジルアルコール又はメチルパラベン; 抗酸化剤、例えば、アスコルビン酸又は重亜硫酸ナトリウム; キレート剤、例えば、EDTA; 緩衝剤、例えば、酢酸塩、クエン酸塩又はリン酸塩; 並びに張性の調整のための薬剤、例えば、塩化ナトリウム又はデキストロースが挙げられる。

30

40

【0379】

静脈内投与の場合、好適な担体としては、生理食塩水、静菌水、Cremophor ELTM (BASF, Parsippany, NJ)又はリン酸緩衝食塩水(PBS)が挙げられる。担体は、製造及び保存の条件下で安定であるべきであり、微生物に対して保護されるべきである。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール(例えば、グリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコール)、及びそれらの好適な混合物を含有する、溶媒又は分散媒であり得る。

【0380】

50

ある特定の実施形態では、医薬組成物は、安定化剤を含有し得る。ある特定の実施形態では、安定化剤は、陽イオン、例えば、二価陽イオンである。ある特定の実施形態では、陽イオンは、カルシウム又はマグネシウムである。陽イオンは、塩化カルシウム(CaCl_2)又は塩化マグネシウム(MgCl_2)などの、塩の形態であってもよい。

【0381】

ある特定の実施形態では、安定化剤は、約0.05mM～約5mMの量で存在する。例えば、安定化剤は、約0.05mM～約4mM、約0.05mM～約3mM、約0.05mM～約2mM、約0.05mM～約1mM、約0.05mM～約0.5mM、約0.5mM～約4mM、約0.5mM～約3mM、約0.5mM～約2mM、約0.5mM～約1mM、約1mM～約4mM、約1mM～約3mM、約1mM～約2mMの量で存在してもよい。

10

【0382】

医薬製剤は、好ましくは滅菌である。滅菌は、任意の好適な方法、例えば、滅菌濾過膜を通した濾過によって達成することができる。組成物が凍結乾燥される場合、凍結乾燥及び再構成の前又は後に、濾過滅菌を実行することができる。

【0383】

本明細書に記載される組成物は、局所的又は全身的に投与してよい。投与は一般に非経口投与である。好ましい実施形態では、医薬組成物は、皮下投与され、さらにより好ましい実施形態では、静脈内投与される。非経口投与のための製剤は、滅菌した水性又は非水性の溶液、懸濁液、及びエマルジョンを含む。

【0384】

20

一般に、治療有効量の活性成分、例えば、抗体は、約0.1mg/kg～約100mg/kg、例えば、約1mg/kg～約100mg/kg、約1mg/kg～約10mg/kgの範囲である。投与される量は、患者の体重、治療されるべき疾患又は適応症の種類及び程度、患者の全体的な健康状態、抗体のインビボ効力、医薬製剤、及び投与経路などの可変要素に依存する。初期投薬量は、所望の血液レベル又は組織レベルを迅速に達成するために、上位レベルを超えて増加させることができる。あるいは、初期投薬量は、最適な投薬量よりも小さくすることができ、1日の投薬量は、治療の過程で徐々に増加させてもよい。ヒト投薬量は、例えば、約0.1mg/kg～約20mg/kgになるように設計された従来のフェーズI用量漸増研究において最適化することができる。投与頻度は、投与経路、投薬量、抗体の血清半減期、及び治療される疾患などの要因に応じて異なり得る。例示的投与頻度は、1日に1回、1週間に1回、2週間に1回、3週間に1回である。好ましい投与経路は、非経口、例えば、静脈内注入である。ある特定の実施形態では、抗体は、凍結乾燥され、次いで、投与時に緩衝食塩水中で再構成される。ある特定の実施形態では、抗CD161抗体の6mg(60kgの患者体重に基づいて0.1mg/kg)の開始用量は、3週間に1回投与される(例えば、IVにより)。

30

【0385】

11. 投薬量及び単位投薬形態

ヒトの治療学では、医師は、予防的処置又は治療的処置に応じて、また、年齢、体重、状態及び治療されるべき対象に特異的な他の要因に応じて、最も適切と考える薬量学を決定する。ある特定の実施形態では、本明細書で提供される組成物は、医薬組成物又は単一単位投薬形態である。本明細書で提供される医薬組成物及び単一単位投薬形態は、治療有効量の1つ以上の治療用抗体を含む。

40

【0386】

障害又はその1つ以上の症状の予防又は治療に有効な抗体の量は、疾患又は状態の性質及び重症度、並びに抗体が投与される経路により異なり得る。頻度及び投薬量はまた、投与される具体的な療法(例えば、治療的又は予防的)、障害、疾患若しくは状態の重症度、投与経路、並びに対象の年齢、体重、応答、及び過去の病歴に応じて、各対象に特有の要因によって異なり得る。有効な用量は、インビトロ又は動物モデル試験系から得られる用量-反応曲線から外挿してもよい。

【0387】

50

当業者に容易に知られるように、様々な治療有効量が、様々な疾患及び状態に適用可能であり得る。同様に、このような障害を予防、管理、治療又は改善するのに十分な量であるが、本明細書で提供される抗体又はADCに関連する有害作用を引き起こすのに不十分な量、又はこのような有害作用を低減するのに十分な量も、本明細書で提供される投薬量及び投与頻度スケジュールによって包含される。さらに、対象が本明細書で提供される組成物の複数の投薬量を投与される場合、投薬量のすべてが同じである必要はない。例えば、対象に投与される投薬量は、組成物の予防的又は治療的效果を改善するために増加させてもよく、又は特定の対象が経験している1つ以上の副作用を低減するために減少させてもよい。

【0388】

10

本開示における別の箇所でより詳細に論じられるように、本明細書で提供される抗体は、任意選択で、疾患又は障害を予防又は治療するのに有用な1つ以上の追加の薬剤とともに投与してもよい。このような追加の薬剤の有効量は、製剤中に存在する薬剤の量、障害若しくは治療の種類、並びに当技術分野で公知の若しくは本明細書に記載される他の要因に依存し得る。

【0389】

12. 治療適用

本明細書に開示される抗体は、本明細書に記載される投与アプローチのうちの1つ以上を介して、薬学的に許容される剤形で、哺乳動物、一般にヒトに投与することができることが企図される。

20

【0390】

本明細書に記載される任意の抗体は、CD161に関連する任意の疾患又は状態を治療するために使用され得る。本明細書に記載される薬剤は、がんの治療に使用することができることが企図され、これは、有効量の本明細書に開示される免疫療法(例えば、抗CD161抗体)を対象に投与することによって達成され得る。本明細書に記載される薬剤は、自己免疫障害を治療するために使用することも企図され、これは、有効量の本明細書に開示される抗CD161抗体を対象に投与することによって達成され得る。

【0391】

本開示は、がんの治療を必要とする対象におけるがんを治療する方法であって、有効量の本明細書に開示される免疫療法(例えば、抗CD161抗体)又は有効量の本明細書に開示される医薬組成物を対象に投与するステップを含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、がんの治療を必要とする対象におけるがんを治療する方法であって、有効量の本明細書に開示される抗CD161抗体又は有効量の本明細書に開示される医薬組成物を対象に投与するステップを含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、がんは、腫瘍微小環境におけるがん細胞又は他の細胞によるCLEC2Dの発現を特徴とする。いくつかの実施形態では、がんは、腫瘍微小環境におけるがん細胞又は他の細胞によるCLEC2Dの発現の増加を特徴とする。

30

【0392】

任意の好適ながんが、本明細書に開示される薬剤で治療され得る。がんの例としては、固形腫瘍、軟部組織腫瘍、造血器腫瘍及び転移性病変が挙げられる。造血器腫瘍の例としては、白血病、急性白血病、急性リンパ芽球性白血病(ALL)、B細胞、T細胞若しくはFAB ALL、急性骨髄性白血病(AML)、慢性骨髄球性白血病(CML)、慢性リンパ球性白血病(CLL)、例えば、形質転換型CLL、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBCL)、濾胞性リンパ腫、有毛細胞性白血病、骨髄異形成症候群(MDS)、リンパ腫、ホジキン病、悪性リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、多発性骨髄腫、又はリヒター症候群(リヒター形質転換)が挙げられる。固形腫瘍の例としては、様々な臓器系の悪性腫瘍、例えば、肉腫、腺がん、及びがん腫、例えば、頭頸部(咽頭を含む)、甲状腺、肺(小細胞又は非小細胞肺癌(NSCLC))、乳房、リンパ、胃腸(例えば、口、食道、胃、肝臓、脾臓、小腸、結腸及び直腸、肛門管)、生殖器及び泌尿生殖器(例えば、腎臓、尿路上皮、膀胱、卵巣、子宮、子宮頸部、子宮内膜、前立腺、精巣)、CNS(例えば、神経細胞又はグリ

40

50

ア細胞、例えば、神経芽腫又は神経膠腫)、又は皮膚(例えば、黒色腫及び転移性メルケル細胞がん(MCC))に影響を及ぼすものが挙げられる。

【0393】

ある特定の実施形態では、がんは、リンパ腫である。ある特定の実施形態では、がんは、頭頸部扁平上皮がん(HNSCC)である。ある特定の実施形態では、がんは、非小細胞肺癌(NSCLC)である。ある特定の実施形態では、がんは、肝細胞がん(HCC)である。ある特定の実施形態では、がんは、トリプルネガティブ乳がん(TNBC)である。ある特定の実施形態では、がんは、黒色腫である。ある特定の実施形態では、がんは、膠芽腫である。ある特定の実施形態では、がんは、大腸がんである。ある特定の実施形態では、がんは、肝臓がんである。いくつかの実施形態では、がんは、子宮頸がんである。ある特定の
10 実施形態では、がんは、前立腺がんである。ある特定の実施形態では、がんは、腎がんである。ある特定の実施形態では、がんは、肺腺がんである。ある特定の実施形態では、がんは、神経膠腫である。ある特定のいくつかの実施形態では、がんは、肺がんである。ある特定の実施形態では、がんは、膀胱がんである。ある特定の実施形態では、がんは、結腸腺がんである。ある特定の実施形態では、がんは、腎臓がんである。

【0394】

ある特定の実施形態では、CD161遮断免疫療法から利益を得ることができるがんは、免疫蛍光データを使用して特定した場合、高密度のCLEC2D⁺及びCD161⁺細胞を有するがんである。ある特定の実施形態では、がんは、高密度のCLEC2D⁺及びCD161⁺細胞を
20 有するがんである。ある特定の実施形態では、がんは、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBCL)、濾胞性リンパ腫、ホジキンリンパ腫、及びT細胞リンパ腫、例えば末梢性T細胞リンパ腫-非特定型(PTCL-NOS)、NK/T細胞リンパ腫、未分化大細胞型リンパ腫(ALCL)である。ある特定の実施形態では、がんは、非小細胞肺癌(NSCLC)、例えば、NSCLC-扁平上皮がん又はNSCLC-腺がん、頭頸部扁平上皮がん(HNSCC)、トリプルネガティブ乳がん(TNBC)、又は皮膚扁平上皮がんである。

【0395】

ある特定の状況下では、がんは、黒色腫、肺がん、神経膠腫、大腸がん、及び肝臓がんからなる群から選択される。

【0396】

さらに、本開示は、腫瘍増殖の低減又は阻害を必要とする対象における腫瘍増殖を低減
30 又は阻害する方法であって、有効量の本明細書に開示される抗CD161抗体又は有効量の
本明細書に開示される医薬組成物を対象に投与するステップを含む、方法を提供する。

【0397】

本開示はまた、ヒトCD161とCLEC2Dとの間の相互作用の阻害又は遮断を必要とする
対象におけるヒトCD161とCLEC2Dとの間の相互作用を阻害又は遮断する方法であって、
有効量の本明細書に開示される抗CD161抗体又は有効量の本明細書に開示される医薬
組成物を対象に投与するステップを含む、方法を提供する。

【0398】

本開示はまた、免疫細胞活性化の誘導又は増強を必要とする対象における免疫細胞活
40 性を誘導又は増強する方法であって、有効量の本明細書に開示される抗CD161抗体又は
有効量の本明細書に開示される医薬組成物を対象に投与するステップを含む、方法を提供
する。いくつかの実施形態では、免疫細胞活性化は、腫瘍微小環境で生じる。いくつかの
実施形態では、免疫細胞は、T細胞又はNK細胞である。

【0399】

いくつかの実施形態では、本開示は、細胞傷害性T細胞エフェクター応答の誘導又は増
強を必要とする対象における細胞傷害性T細胞エフェクター応答を誘導又は増強する方
法であって、有効量の本明細書に開示される抗CD161抗体又は有効量の本明細書に開示さ
れる医薬組成物を対象に投与するステップを含む、方法を提供する。状況に応じて、T細胞
エフェクター応答は、(i)腫瘍微小環境におけるものであるか、(ii)サイトカイン産生(
例えば、IL-2、TNF、IFN、又はそれらの組み合わせ)であるか、(iii)グランザイム
50

Bの分泌であるか、又は(iv)(i)、(ii)及び(iii)のうちの2つ以上の組み合わせである。

【0400】

いくつかの実施形態では、本開示は、CD161へのCLEC2Dの結合によって引き起こされるCD161阻害性シグナル伝達を低減する方法を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、CD161へのCLEC2D結合によって引き起こされるT細胞活性の抑制を低減する方法を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、CD161へのCLEC2D結合によって引き起こされるNK細胞活性の抑制を低減する方法を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書に開示される抗体又はその抗原結合断片の非存在下におけるT細胞活性と比較して、CLEC2Dの存在下において該T細胞活性を増加させる方法を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書に開示される抗体又はその抗原結合断片の非存在下におけるNK細胞活性と比較して、CLEC2Dの存在下において該NK細胞活性を増加させる方法を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、CLEC2Dを発現する細胞を含む微小環境内に配置されたT細胞活性を増加させる方法を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、CLEC2Dを発現する細胞を含む微小環境内に配置されたNK細胞活性を増加させる方法を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、CLEC2Dを発現する腫瘍細胞を含む腫瘍微小環境においてT細胞活性を増加させる方法を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、CLEC2Dを発現する腫瘍細胞を含む腫瘍微小環境においてNK細胞活性を増加させる方法を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、ヒトT細胞疲弊を阻害する方法を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、抗原発現標的細胞に応答してCD161発現ヒトT細胞の活性化を誘導する又は増加させる方法を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、抗原発現標的細胞に応答してCD161発現ヒトT細胞によるサイトカイン産生を誘導する又は増加させる方法を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、抗原発現標的細胞に応答してCD161発現ヒトT細胞によるグランザイムB発現を誘導する又は増加させる方法を提供する。いくつかの実施形態では、本開示は、抗原発現標的細胞に応答してCD161発現ヒトT細胞の疲弊を低減する方法を提供する。

【0401】

ある特定の実施形態では、有効量の本明細書に開示される免疫療法(例えば、免疫療法剤)(例えば、抗CD161抗体又はその抗原結合断片又は抗体コンジュゲート)を対象に投与することによって、がんの発症の遅延を必要とする対象におけるがんの発症を遅延させる方法が本明細書で提供される。ある特定の実施形態では、有効量の本明細書に開示される薬剤を対象に投与することによって、がんの発症の予防を必要とする対象におけるがんの発症を予防する方法が本明細書で提供される。いくつかの実施形態では、有効量の本明細書に開示される薬剤を対象に投与することによって、腫瘍のサイズの縮小を必要とする対象における腫瘍のサイズを縮小させる方法が本明細書で提供される。ある特定の実施形態では、有効量の本明細書に開示される薬剤を対象に投与することによって、転移の数の低減を必要とする対象における転移の数を低減する方法が本明細書で提供される。ある特定の実施形態では、本明細書に開示される薬剤を対象に投与することによって、全生存の期間、生存期間中央値、又は無増悪生存期間の延長を必要とする対象における全生存の期間、生存期間中央値、又は無増悪生存期間を延長する方法が本明細書で提供される。ある特定の実施形態では、有効量の本明細書に開示される薬剤を対象に投与することによって、標準治療に耐性になった対象を治療する方法が本明細書で提供される。

【0402】

13. 併用療法

本明細書に記載される方法及び組成物は、単独で使用しても、又は他の治療剤及び/又はモダリティーと組み合わせて使用してもよい。「組み合わせて」投与されるという用語は、本明細書で使用される場合、患者に対する治療の効果がある時点で重複するように、2つの(又はそれより多くの)異なる治療が、対象が障害に苦しんでいる過程で対象に送達されることを意味すると理解される。ある特定の実施形態では、一方の治療の送達は、第2の治療の送達が始まるときに依然として生じており、そのため、投与に関して重複があ

る。これは、時折、本明細書では「同時」又は「同時送達」と呼ばれる。他の実施形態では、一方の治療の送達は、他方の治療の送達が始まる前に終了する。いずれの場合の特定の実施形態においても、治療は、併用投与のためにより効果的である。例えば、第2の治療は、第2の治療が第1の治療の非存在下で投与された場合に見られるであろうよりも効果的であり、例えば、より少ない第2の治療で同等の効果が見られるか、又は第2の治療はより大きな程度まで症状を低減し、又は類似した状況が第1の治療で見られる。ある特定の実施形態では、送達は、症状の低減、又は障害に関連する他のパラメータが、もう一方の治療の非存在下で送達される一方の治療で観察されるであろうものよりも大きいものである。2つの治療の効果は、部分的に相加的であっても、完全に相加的であっても、又は相加的より大きくてもよい。送達は、送達された第1の治療の効果が、第2の治療が送達された場合に依然として検出可能であるようなものであり得る。

10

【0403】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載される方法又は組成物は、1つ以上の追加療法、例えば、手術、放射線療法、又は別の治療用製剤の投与と組み合わせて投与される。ある特定の実施形態では、追加療法は、化学療法、例えば、細胞毒性薬剤を含み得る。ある特定の実施形態では、追加療法は、標的療法、例えば、チロシンキナーゼ阻害剤、プロテアソーム阻害剤、又はプロテアーゼ阻害剤を含み得る。ある特定の実施形態では、追加療法は、抗炎症、抗血管形成、抗線維化、又は抗増殖化合物、例えば、ステロイド、生物学的イムノモジュレーター、モノクローナル抗体、抗体断片、アプタマー、siRNA、アンチセンス分子、融合タンパク質、サイトカイン、サイトカイン受容体、気管支拡張薬、スタチン、抗炎症剤(例えば、メトトレキサート)、又はNSAIDを含み得る。ある特定の実施形態では、追加療法は、異なるクラスの治療薬の組み合わせを含み得る。

20

【0404】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載される方法又は組成物は、第2のチェックポイント阻害剤と組み合わせて投与される。チェックポイント阻害剤は、例えば、PD-1アンタゴニスト、第2のPD-L1アンタゴニスト、CTLA-4アンタゴニスト、アデノシンA2A受容体アンタゴニスト、B7-H3アンタゴニスト、B7-H4アンタゴニスト、BTLAアンタゴニスト、KIRアンタゴニスト、LAG3アンタゴニスト、TIM-3アンタゴニスト、VISTAアンタゴニスト又はTIGITアンタゴニストから選択され得る。

【0405】

30

ある特定の実施形態では、チェックポイント阻害剤は、PD-1又は第2のPD-L1阻害剤である。PD-1は、T細胞の表面上に存在する受容体であり、T細胞活性を適切なタイミングで阻害又は他の方法でモジュレートして、過活動の免疫応答を防止する免疫系チェックポイントとして機能する。しかし、がん細胞は、T細胞の表面上のPD-1と相互作用するリガンド、例えばPD-L1を発現することによって、このチェックポイントを利用して、T細胞活性を停止させる又はモジュレートすることができる。例示的なPD-1/PD-L1ベースの免疫チェックポイント阻害剤は、抗体ベースの治療薬を含む。PD-1/PD-L1ベースの免疫チェックポイント阻害を用いる例示的な治療法は、米国特許第8,728,474号及び同第9,073,994号、並びに欧州特許第1537878B1号に記載され、例えば、抗PD-1抗体の使用を含む。例示的抗PD-1抗体は、例えば、米国特許第8,952,136号、同第8,779,105号、同第8,008,449号、同第8,741,295号、同第9,205,148号、同第9,181,342号、同第9,102,728号、同第9,102,727号、同第8,952,136号、同第8,927,697号、同第8,900,587号、同第8,735,553号、及び同第7,488,802号に記載される。例示的抗PD-1抗体としては、例えば、ニボルマブ(Opdivo(登録商標)、Bristol-Myers Squibb Co.)、ペムブロリズマブ(Keytruda(登録商標)、Merck Sharp & Dohme Corp.)、PDR001(Novartis Pharmaceuticals)、及びピジリズマブ(CT-011、Cure Tech)が挙げられる。例示的抗PD-L1抗体は、例えば、米国特許第9,273,135号、同第7,943,743号、同第9,175,082号、同第8,741,295号、同第8,552,154号、及び同第8,217,149号に記載される。例示的抗PD-L1抗体としては、アテゾリズマブ(Tecentriq(登録商標)、Genentech)、デュルバルマブ(AstraZeneca)、MEDI4736、アベル

40

50

マブ、及びBMS 936559(Bristol Myers Squibb Co.)が挙げられる。

【0406】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載される方法又は組成物は、CTLA-4阻害剤と組み合わせて投与される。CTLA-4経路では、T細胞上のCTLA-4の、抗原提示細胞(がん細胞ではなく)の表面上のそのリガンド(例えば、B7-1としても知られているCD80、及びCD86)との相互作用は、T細胞阻害をもたらす。例示的なCTLA-4ベースの免疫チェックポイント阻害剤は、米国特許第5,811,097号、同第5,855,887号、同第6,051,227号に記載される。例示的抗CTLA-4抗体は、米国特許第6,984,720号、同第6,682,736号、同第7,311,910号、同第7,307,064号、同第7,109,003号、同第7,132,281号、同第6,207,156号、同第7,807,797号、同第7,824,679号、同第8,143,379号、同第8,263,073号、同第8,318,916号、同第8,017,114号、同第8,784,815号、及び同第8,883,984号、国際(PCT)公開第WO1998/42752号、同第WO2000/37504号、及び同第WO2001/14424号、及び欧州特許第EP 1212422 B1号(これらそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる)に記載される。例示的CTLA-4抗体としては、イビリムマブ又はトレメリムマブが挙げられる。

【0407】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載される方法又は組成物は、CTLA-4阻害剤、例えば、本明細書に開示されるCTLA-4阻害剤と組み合わせて投与される。

【0408】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載される方法又は組成物は、IDO阻害剤と組み合わせて投与される。例示的IDO阻害剤としては、1-メチル-D-トリプトファン(インドキシモドとして知られている)、エパカドスタット(INCB24360)、ナボキシモド(GDC-0919)、及びBMS-986205が挙げられる。

【0409】

本明細書に記載される方法又は組成物と組み合わせて投与することができる例示的細胞毒性薬剤としては、例えば、微小管阻害剤、トポイソメラーゼ阻害剤、代謝拮抗物質、タンパク質合成及び分解阻害剤、有糸分裂阻害剤、アルキル化剤、白金製剤、核酸合成の阻害剤、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤(HDAC阻害剤、例えば、ポリノスタット(SAHA、MK0683)、エンチノスタット(MS-275)、パノビノスタット(LBH589)、トリコスタチンA(TSA)、モセチノスタット(MGCD0103)、ベリノスタット(PXD101)、ロミデプシン(FK228、デプシペプチド)、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤、ナイトロジェンマスタード、ニトロソ尿素、エチレンイミン、アルキルスルホネート、トリアゼン、フォレート類似体、ヌクレオシド類似体、リボヌクレオチド還元酵素阻害剤、ピンカアルカロイド、タキサン、エポチロン、インターカレート剤、シグナル伝達経路を妨害することが可能な薬剤、アポトーシス及び放射線を促進する薬剤、又は表面タンパク質に結合して毒性薬剤を送達する抗体分子コンジュゲートが挙げられる。一実施形態では、本明細書に記載される方法又は組成物とともに投与することができる細胞毒性薬剤は、白金系薬剤(例えば、シスプラチン)、シクロホスファミド、ダカルバジン、メトトレキサート、フルオロウラシル、ゲムシタビン、カベシタビン、ヒドロキシ尿素、トポテカン、イリノテカン、アザシチジン、ポリノスタット、イキサベピロン、ボルテゾミブ、タキサン(例えば、パクリタキセル又はドセタキセル)、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ピンクリスチン、ピンブラスチン、ビノレルビン、コルヒチン、アントラサイクリン(例えば、ドキソルビシン又はエピルビシン)、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、アドリアマイシン、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、ピューロマイシン、リシン、又はメイタンシノイドである。

【0410】

本発明はまた、細胞、組織、又は対象におけるHLA-DR、CD86、CD83、IFN、IL-1b、IL-6、TNF、IL-17A、IL-2、又はIL-6の発現を増加させる方法を提供する。

この方法は、細胞、組織、又は対象を、有効量の抗体、融合タンパク質、及び/又は抗体コンジュゲート、例えば、本明細書に開示される抗体、融合タンパク質、又は抗体コンジュゲートと接触させるステップを含む。ある特定の実施形態では、細胞は、樹状細胞及び末梢血単核細胞(PBMC)から選択される。

【0411】

ある特定の実施形態では、細胞、組織、又は対象におけるHLA-DR、CD86、CD83、IFN、IL-1b、IL-6、TNF、IL-17A、IL-2、又はIL-6の発現は、抗体、融合タンパク質、又は抗体コンジュゲートと接触していない類似の又はそうでなければ同一の細胞又は組織と比較して、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約50%、少なくとも約75%、少なくとも約100%、少なくとも約150%、少なくとも約200%、少なくとも約250%、少なくとも約300%、少なくとも約400%、少なくとも約500%、少なくとも約600%、少なくとも約700%、少なくとも約800%、少なくとも約900%、又は少なくとも約1,000%増加している。遺伝子発現は、当技術分野で公知の任意の好適な方法によって、例えば、ELISAによって、又はLuminexマルチプレックスアッセイによって測定してもよい。

10

【0412】

本発明はまた、腫瘍への免疫細胞の浸潤の促進を必要とする対象における腫瘍への免疫細胞の浸潤を促進する方法を提供する。この方法は、有効量の本明細書に開示される抗体を対象に投与するステップを含む。ある特定の実施形態では、免疫細胞は、T細胞、例えば、CD4⁺及び/又はCD8⁺ T細胞、例えば、CD69⁺CD8⁺及び/又はGzmb⁺CD8⁺ T細胞である。ある特定の実施形態では、免疫細胞は、ナチュラルキラー(NK)細胞である。ある特定の実施形態では、対象における腫瘍への免疫細胞の浸潤は、薬剤を受けていない類似の又はそうでなければ同一の腫瘍及び/又は対象と比較して、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約50%、少なくとも約75%、少なくとも約100%、少なくとも約150%、少なくとも約200%、少なくとも約250%、少なくとも約300%、少なくとも約400%、少なくとも約500%、少なくとも約600%、少なくとも約700%、少なくとも約800%、少なくとも約900%、又は少なくとも約1,000%増加している。腫瘍への免疫細胞の浸潤は、当技術分野で公知の任意の好適な方法、例えば、抗体染色によって測定してもよい。

20

【0413】

本発明はまた、細胞、組織、又は対象におけるCd3、Cd4、Cd8、Cd274、Ctla4、Icos、Pdc1、Lag3、Il6、Il1b、Il2、Ifng、Ifna1、Mx1、Gzmb、Cxc19、Cxc112、及び/又はCcl5の発現を増加させる方法を提供する。この方法は、このような薬剤との接触前の細胞、組織又は対象と比較して、Cd3、Cd4、Cd8、Cd274、Ctla4、Icos、Pdc1、Lag3、Il6、Il1b、Il2、Ifng、Ifna1、Mx1、Gzmb、Cxc19、Cxc112、及び/又はCcl5の発現を増加させるように、細胞、組織、又は対象を、有効量の本明細書に開示される抗体と接触させるステップを含む。ある特定の実施形態では、細胞、組織、又は対象におけるCd3、Cd4、Cd8、Cd274、Ctla4、Icos、Pdc1、Lag3、Il6、Il1b、Il2、Ifng、Ifna1、Mx1、Gzmb、Cxc19、Cxc112、及び/又はCcl5の発現は、このような薬剤と接触していない類似の又はそうでなければ同一の細胞、組織、又は対象と比較して、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約50%、少なくとも約75%、少なくとも約100%、少なくとも約150%、少なくとも約200%、少なくとも約250%、少なくとも約300%、少なくとも約400%、少なくとも約500%、少なくとも約600%、少なくとも約700%、少なくとも約800%、少なくとも約900%、又は少なくとも約1,000%増加している。遺伝子発現は、当技術分野で公知の任意の好適な方法によって、例えば、ELISA、Luminexマルチプレックスアッセイ、又はNanosttring技術によって測定してもよい。

30

40

【0414】

ある特定の実施形態では、治療の影響を受ける細胞は、腫瘍細胞、樹状細胞(DC)又は単球である。ある特定の実施形態では、細胞は、単球であり、この方法は、単球上のMH

50

C-II分子(例えば、HLA-DR)の発現の増加をもたらす。ある特定の実施形態では、細胞又は組織におけるMHC-II分子の発現は、このような薬剤と接触していない類似の又はそうでなければ同一の細胞又は組織と比較して、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約50%、少なくとも約75%、少なくとも約100%、少なくとも約150%、少なくとも約200%、少なくとも約250%、少なくとも約300%、少なくとも約400%、少なくとも約500%、少なくとも約600%、少なくとも約700%、少なくとも約800%、少なくとも約900%、又は少なくとも約1,000%増加している。遺伝子発現は、当技術分野で公知の任意の好適な方法によって、例えば、ELISAによって、Luminexマルチプレックスアッセイによって、又はフローサイトメトリーによって測定してもよい。

【0415】

10

14. 診断方法

対象由来の細胞上のCD161の存在を検出する方法も提供される。このような方法は、例えば、本明細書に開示される抗体による治療に対する応答性を予測及び評価するために使用され得る。

【0416】

いくつかの実施形態では、この方法は、疾患又は状態を有するか又は有すると疑われる対象におけるCD161を検出するために使用することができる。いくつかの実施形態では、この方法は、(a)対象からサンプルを受けるステップ;及び(b)サンプルを、本明細書に開示される抗体と接触させることによって、サンプル中のCD161の存在又はレベルを検出するステップを含む。ある特定の実施形態では、疾患又は状態は、がんである。本明細書で提供される抗体は、検出可能な標識、例えば、蛍光標識、放射性標識、又は酵素標識で標識することができる。

20

【0417】

本発明が作動可能である限り、ステップの順序又はある特定の行為を実施するための順序は重要でないことが理解されるべきである。さらに、2つ以上のステップ又は行為は、同時に実行してもよい。

【0418】

本明細書のあらゆる例、又は例示的な表現、例えば、「～など」又は「～を含む」の使用は、本発明をよりよく説明するためにのみ意図されており、特許請求されていない限り、本発明の範囲に制限を課すものではない。本明細書中のいかなる表現も、特許請求されていない要素を本発明の実施に不可欠であると示すものとして解釈されるべきではない。

30

【実施例】

【0419】

本発明は、今、全体的に記載されているが、以下の実施例を参照することによってより容易に理解され、これらの実施例は、本発明のある特定の態様及び実施形態を説明する目的でのみ含まれており、本発明を限定することは意図されない。

【0420】

実施例1 - CD161抗体の生成

この実施例は、以下に記載するように、スクリーニング抗原としてビオチン化組換えCD161タンパク質を使用する、Adimab(商標)酵母ベース抗体提示によるCD161抗体の生成を記載する。

40

【0421】

1. 組換えタンパク質の産生

抗体の発見及びその後のスクリーニング及び特徴付けを支持するために、ヒト及びカニクイザルCD161標的及びCLEC2Dリガンドの細胞外ドメイン(ECD)の様々な形態を含む、いくつかの組換えタンパク質を産生させた。すべてのタンパク質を、HEK293細胞の一過性トランスフェクションによって産生させた(ThermoFisher Scientific)。二価抗原を作製するために、C末端又はN末端のヒトIgG1 Fc融合ドメインのいずれかを用いてタンパク質を産生させた。これらのタンパク質は以下を含む:

【0422】

50

(1)hCD161 ECD(Q67-S225)-hFc又はhKLRB1 ECD(Q67-S225)-hFc- C末端ヒトIgG1 Fcドメインを有する、ヒトCD161 ECD(アミノ酸残基Q67-S225、Uniprot # Q12918);配列番号173によって表される;

【0423】

(2)cCD161 ECD(Q67-L227)-hFc又はcKLRB1 ECD(Q67-L227)-hFc- C末端ヒトIgG1 Fcドメインを有する、カニクイザルCD161 ECD(アミノ酸残基Q67-L227、Uniprot # A0A2K5WYI1);配列番号176によって表される;

【0424】

(3)hFc-hCD161 ECD(Q67-S225)又はhFc-hKLRB1 ECD(Q67-S225)- N末端ヒトIgG1 Fcドメインを有する、ヒトCD161 ECD(アミノ酸残基Q67-S225、Uniprot # Q12918);配列番号194によって表される;

【0425】

(4)hCLEC2D ECD(L71-V191)-hFc又はhLLT1 ECD(L71-V191)-hFc- C末端ヒトIgG1 Fcドメインを有する、ヒトCLEC2D ECD(アミノ酸残基L71-V191、Uniprot #Q9UHP7);配列番号193によって表される;及び

【0426】

(5)hFc-hCLEC2D ECD(L71-H176C-V191)又はhFc-hLLT1 ECD(L71-H176C-V191)- N末端ヒトIgG1 Fcドメインを有する、H176C変異を含むヒトCLEC2D ECD(アミノ酸残基L71-H176C-V191、Uniprot #Q9UHP7);配列番号175によって表される。変異H176Cは、発現タンパク質の安定性及び均質性を増加させるための追加のジスルフィド架橋を導入した。

【0427】

さらに、以下の一価ECDタンパク質を産生させた:

【0428】

(1)hCD161 ECD(Q67-S225)-6×His- C末端6×Hisタグ(配列番号197)を有する、ヒトCD161 ECD(アミノ酸残基Q67-S225、Uniprot # Q12918);配列番号174によって表される;

【0429】

(2)hFc-cyCD161 ECD(K68-C74A-S225)単量体- N末端Fcヘテロ二量体融合パートナーを有する、C74A変異を含むカニクイザルCD161 ECD(アミノ酸残基K68-C74A-S225)。一方が、N末端FLAGタグに続くヒトIgG1 Fc(配列番号178によって表される)からなり、もう一方の鎖が、N末端ヒトIgG1 Fcに続くカニクイザルCD161 ECD(配列番号177によって表される)を含有する、2つの鎖でHEK293細胞を共トランスフェクトすることによって、この構築物を作製した;及び

【0430】

(3)cCD161-IHM又はcKLRB1-IHM- これは、FLAG-マウスIgG1 FcをカニクイザルKLRB1 IgG1 Fcと対合させることによって、単量体カニクイザルKLRB1 Fc融合タンパク質が、マウスIgG1融合体として発現する、抗原の形式である。

【0431】

標準的方法を使用したトランスフェクション及び回収後、Fcドメインを含有するタンパク質を、プロテインAクロマトグラフィーによって精製し、Hisタグを含有するタンパク質を、Ni-NTAアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。ポリッシング及び凝集体の除去を、サイズ排除クロマトグラフィーを使用して必要に応じて行った。カニクイザルCD161 Fc単量体タンパク質(cCD161-IHM又はcKLRB1-IHM)については、プロテインA精製後に、CD161ドメインを欠くFcホモ二量体を除去するために、追加のFLAGタグ精製を使用した;次いで、所望のヘテロ二量体を、サイズ排除クロマトグラフィーを使用して単離した(Brown ME et al. (2020) PLOS ONE 15(3): e0229206を参照)。前述のタンパク質配列を表5に列挙し、この表は、抗体の発見及びスクリーニングに使用した組換えタンパク質をまとめたものである。

【0432】

10

20

30

40

50

【表 5】

表5

hCD161 ECD (Q67- S225)-hFc	QKSSIEKCSVDIQQSRNKTTERPGLLNCPIYWQQQLREKCLLFSHTVNPW NNSLADCSTKESSLLLRDKDELIHTQNLIRDKAILFWIGLNFSLSEKNW KWINGSFLNSNDLEIRGDAKENSISISQTSVYSEYCSTEIRWICQKELTP VRNKVYPDSGSGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 173)	10
hCD161 ECD (Q67- S225)- 6xHis	QKSSIEKCSVDIQQSRNKTTERPGLLNCPIYWQQQLREKCLLFSHTVNPW NNSLADCSTKESSLLLRDKDELIHTQNLIRDKAILFWIGLNFSLSEKNW KWINGSFLNSNDLEIRGDAKENSISISQTSVYSEYCSTEIRWICQKELTP VRNKVYPDSHHHHHHH (配列番号 174)	
hFc- hCLEC2D ECD (L71- H176C- V191)	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSQAAC PESWIGFQRKCFYFSDDTKNWTSSQRFCDSDADLAQVESFQELNLLR YKGPSDHWIGLSREQGQPKWINGTEWTRQFPILGAGECAYLNDKGAS SARCYTERKWICKSDIHV (配列番号 175)	20
cyCD161 ECD (Q67- L227)-hFc	QKPSIGKCSVDIQQNRKTTERPDLLNCPIYWQQVQEKCLLFSHTVNPW NNSLADCSTKESSLLLIQDKDELTRTQNLIHDKAISFWIGLNFSLSEKNW KWINGSFLSSNDLKITGDAKENSVCYISQTSVYSEYCSTEMKWICQKEL TLVRNKVSPDSWLGSQSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 176)	30
hFc- cyCD161 ECD (K68- C74A- S225) monomer	Chain 1: EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSKPSIGKCSVDIQQNRKTTERPDLLNCPIYWQQVQEKCLLFSHTVNPWNNSLADCSTKESSLLLIQDKDELTRTQNLIHDKAISFWIGLNFSLSEKNWKWINGSFLSSNDLKITGDAKENSVCYISQTSVYSEYCSTEMKWICQKELTLVRNKVSPDS (配列番号 177)	40

50

	Chain 2: DYKDDDDKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 178)
hCLEC2D ECD (L71-V191)-hFc	LQAACPESWIGFQRKCFYFSDDTKNWTSSQRFCDSDADLAQVESFQELNFLRLRYKGPSDHWIGLSREQGQPWKWINGTEWTRQFPILGAGECAYLNDKGASSARHYTERKWICKSDIHVSGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 193)
hFc-hCD161 ECD (Q67-S225)	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSQKSSIEKCSVDIQQRNKTTERPGLLNCPIYWQQLREKCLLFSHTVNPWNNSLADCSLKESLLLRDKDELHTQNLIRDKAILFWIGLNFSLSEKNWKWINGSFLNSNDLEIRGDAKENSISISQTSVYSEYCSSTEIRWICQKELTPVRNKVYPDS (配列番号 194)

10

20

【 0 4 3 3 】

2. 抗原及び細胞株の調製

抗原(hKLRB1 ECD(Q67-S225)-hFc; cKLRB1 ECD(Q67-L227)-hFc; hFc-hKLRB1 ECD(Q67-S225); hLLT1 ECD(L71-V191)-hFc; cKLRB1-IHM;及びhFc-hLLT1 ECD(L71-H176C-V191))を、EZ-Link Sulfo-NHS-Biotinylation Kit(Thermo Scientific、カタログ番号21425)を使用してビオチン化した。

30

【 0 4 3 4 】

抗原を約1mg/mLに濃縮し、緩衝液をPBSに交換し、その後、1:7.5モル比のビオチン化試薬を添加した。混合物を4 で一晩保持し、その後、溶液中の遊離ビオチンを除去するための別の緩衝液交換を行った。ビオチン化を、ForteBioを介して標識タンパク質のストレプトアビジンセンサー結合によって確認した。

【 0 4 3 5 】

3. 抗CD161抗体の単離のためのライブラリー調査及び選択方法

ナイーブライブラリー選択

それぞれ約 10^9 の多様性の8個のナイーブヒト合成酵母ライブラリーを、以前記載されたように増殖させた(例えば、Xu et al. (2013) PROTEIN ENG. DES. SEL., 26(10): 663-70; WO2009/036379; WO2010/105256;及びWO2012/009568(これらのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる)を参照)。

40

【 0 4 3 6 】

最初の2ラウンドの選択では、Miltenyi MACSシステムを利用する磁気ビーズ選別技術を、以前記載されたように実施した(例えば、Siegel et al., J. IMMUNOL. METHODS 286(1-2), 141-153 (2004)を参照)。簡潔に述べると、酵母細胞(約 10^{10} 個の細胞/ライブラリー)を、洗浄緩衝液(リン酸緩衝食塩水(PBS)/0.1%ウシ血清アルブミン(BSA))中で24 にて30分間、ビオチン化二量体ヒトCD161-Fcとともにインキュベート

50

した。40mL氷冷洗浄緩衝液で1回洗浄した後、細胞ペレットを20mL洗浄緩衝液中に再懸濁し、ストレプトアビジンマイクロビーズ(500 μ L)を酵母に添加し、4 で15分間インキュベートした。次に、酵母をペレット化し、5mL洗浄緩衝液中に再懸濁し、Miltenyi LSカラムにロードした。5mLをロードした後、カラムを3mL洗浄緩衝液で3回洗浄した。次いで、カラムを磁場から取り出し、酵母を5mLの増殖培地で溶出し、次いで、一晚増殖させた。

【0437】

選択の後続のラウンドを、フローサイトメトリー(FACS)を使用して実施した。酵母をペレット化し、洗浄緩衝液で3回洗浄し、減少する濃度のビオチン化二量体ヒトCD161(10nM)、単量体ヒトCD161(500nM~4nM)(平衡条件下で)、ビオチン化二量体カニクイザルCD161(5nM)、単量体カニクイザルCD161(500nM~4nM - 種交差反応性を得るため)、ビオチン化二量体ヒトCLEC2D_{H176C}(10nM - この高度に構造的に類似しているCD161リガンドに対して対抗選択して、CD161特異性を得るため)とともに、又は選択から非特異的抗体を除去するために多特異性試薬(PSR)とともに24 でインキュベートした。PSR枯渴のために、ライブラリーを、以前記載されたように、1:10希釈のビオチン化PSR試薬とともにインキュベートした(例えば、Xu et al. (2013) PROTEIN ENG. DES. SEL., 26(10): 663-70を参照)。次いで、酵母を洗浄緩衝液で2回洗浄し、ヤギF(ab')₂抗ヒトカップ-FITC(LC-FITC)(1:100希釈)(Southern Biotech、カタログ番号2062-02)並びにストレプトアビジン-AF633(SA-633)(1:500希釈)(Life Technologies、カタログ番号S21375)若しくはエクストラビジン-フィコエリスリン(EA-PE)(1:50希釈)(Sigma-Aldrich、カタログ番号E4011)のいずれか、二次試薬で4 で15分間染色した。氷冷洗浄緩衝液で2回洗浄した後、細胞ペレットを0.3mL洗浄緩衝液中に再懸濁し、ストレーナーキャップ付き選別チューブに移した。選別を、FACS ARIAソーター(BD Biosciences)を使用して実施し、選別ゲートを、所望の特性を有する抗体について選択するように決定した。すべての所望の特性を有する集団が得られるまで、選択ラウンドを繰り返した。選別の最終ラウンド後、酵母をプレーティングし、個々のコロニーを特徴付けのために選んだ。

【0438】

軽鎖バッチシャッフル多様化

ナイーブアウトプットからの重鎖を使用して、軽鎖多様化ライブラリーを調製し、これを追加の選択ラウンドに使用した。上記のように、すなわち、1ラウンドのMACS及び4ラウンドのFACSを用いて、これらのライブラリーに対して選択を実施した。異なるFACS選択ラウンドにおいて、ライブラリーを、例えば、PSR結合、種交差反応性、及び親和性圧力(抗原タイトレーションによる)、及びエピトープカバレッジ(ナイーブ選択中に特定した多様なビン(bin)を有する高親和性抗体を使用して)について評価した。選別を、所望の特性を有する集団を得るために実施した。配列決定及び特徴付けのために、各最終FACS選択ラウンドからの個々のコロニーを選んだ。

【0439】

親和性成熟

親クローンの最適化を、3つの成熟戦略を利用して実行した:軽鎖多様化;CDRH1及びCDRH2の多様化;並びにCDRH3、CDRL1、CDRL2、及びCDRL3の多様化。

【0440】

軽鎖多様化:ナイーブ選択手順から選択したクローンからの重鎖を、 1×10^6 の多様性を有する軽鎖ライブラリーに形質転換した。それぞれのラウンドについてビオチン化二量体又は単量体カニクイザルCD161抗原を使用する1ラウンドのMACS選別及び4ラウンドのFACS選別を用いて、上記のように選択を実施した。

【0441】

CDRH1及びCDRH2の選択:軽鎖多様化手順から選択したクローンからのCDRH3を、 1×10^8 の多様性のCDRH1及びCDRH2バリエーションを用いる、予め作製されたライブラリーに組換え、選択を、単量体ヒト及びカニクイザルCD161抗原を使用して実施した。室

温にて平衡条件下で減少する濃度のビオチン化単量体CD161抗原(50nM~1nM)を使用することによって、また、ビオチン化抗原を親Fabとともに30分間ブレインキュベートし、次いで、選択混合物が平衡に達することを可能にするか又は会合速度の増加に好都合であるであろう時間の長さの間、その予め複合体化された混合物を酵母ライブラリーに適用することによって、親和性圧力を適用した。次いで、より高い親和性の抗体を選別することができた。

【0442】

CDRH3、CDRL1、CDRL2、及びCDRL3の選択:CDRH3及びCDRL3、並びにCDR3の両側の隣接領域をコードするオリゴヌクレオチドを、IDTから購入した。それぞれのオリゴヌクレオチドでは、NNK多様性を介してCDR3中の1つのアミノ酸を多様にした。CDRH3オリゴヌクレオチドを、CDRH1及びCDRH2選択から選択されたバリエーションを含む重鎖FR1-FR3可変領域と組換え、CDRL3を、約 10^8 の組み合わせライブラリー多様性について、CDRL1及びCDRL2バリエーションを有する予め作製されたライブラリーに組換えた。選択を、4ラウンドについてFACS選別を使用して、以前のサイクルと同様に実施した。各FACSラウンドについて、ライブラリーを、PSR結合及び親和性圧力について調べ、選別を、所望の特性を有する集団を得るために実施した。これらの選択に対する親和性圧力を、CDRH1及びCDRH2の選択において上記のように実施した。

10

【0443】

IgG及びFabの産生及び精製

さらなる特徴付けのために十分な量の選択抗体(表6に示す抗体可変ドメイン配列)を産生させるために、酵母クローンを飽和するまで増殖させ、次いで、振とうしながら30で48時間誘導した。誘導後、酵母細胞をペレット化し、精製のために上清を回収した。IgGを、プロテインAカラムを使用して精製し、酢酸pH2.0で溶出した。Fab断片を、パepsin消化によって生成し、KappaSelect(GE Healthcare LifeSciences)上で精製した。

20

【0444】

30

40

50

【表 6】

表6

抗体	配列
Ab1 VH	EVQLLES GGGLVQP GGSRLRLSCAASGFAFSTYAMSWVRQAPGKGLEW VSAISAAGGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAKPLDSSLWADFDLWGRGTLTVSS (配列番号 7)
Ab2 VH	EVQLLES GGGLVQP GGSRLRLSCAASGFAFSTYAMSWVRQAPGKGLEW VSAISGVGGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAKPLDSSLWADFDLWGRGTLTVSS (配列番号 15)
Ab3 VH	EVQLLES GGGLVQP GGSRLRLSCAASGFTFERYAMSWVRQAPGKGLEW VSAISAAGGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAKPLDSSQWADFDLWGRGTLTVSS (配列番号 23)
Ab4 VH	EVQLLES GGGLVQP GGSRLRLSCAASGFTFERYAMSWVRQAPGKGLEW VSAISAVGGTTKYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAKPLDSSLWADFDWGRGTLTVSS (配列番号 31)
Ab5 VH	EVQLLES GGGLVQP GGSRLRLSCAASGFTFGQYAMSWVRQAPGKGLE WVSAISAVGGTTAYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAKPLDSSLWADFQLWGRGTLTVSS (配列番号 39)
Ab6 VH	EVQLLES GGGLVQP GGSRLRLSCAASGFTFGQYAMSWVRQAPGKGLE WVSAISAAGGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAKPLDSSQWADFDLWGRGTLTVSS (配列番号 47)
Ab7 VH	EVQLLES GGGLVQP GGSRLRLSCAASGFTFGQYAMSWVRQAPGKGLE WVSAISAAGGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAKPLDSSQWADFDLWGRGTLTVSS (配列番号 55)
Ab8 VH	EVQLLES GGGLVQP GGSRLRLSCAASGFTFGTFAMSWVRQAPGKGLEW VSAISGVGGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAKPLDSSFWADFDLWGRGTLTVSS (配列番号 63)

10

20

30

40

50

抗体	配列
Ab9_VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYAMSWVRQAPGKGLEW VSAISASGGTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAKPLDSSFWADFDLWGRGTLVTSS (配列番号 71)
Ab10_VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYAMSWVRQAPGKGLEW VSAISAVGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAKPLDSSQWADFDLWGRGTLVTSS (配列番号 79)
Ab11_VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYAMSWVRQAPGKGLEW VSAISAAGGTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAKPLDSSQWADFDLWGRGTLVTSS (配列番号 87)
Ab12_VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFAQYYMSWIRQAPGKGLEW VSYISPSGATIAYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYY CARSLMATGTHLYFDLWGRGTLVTSS (配列番号 101)
Ab13_VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFANYMSWIRQAPGKGLEW VSYISPSGATIAYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYY CARSLMATGTHLYFDLWGRGTLVTSS (配列番号 109)
Ab14_VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFGQYYMSWIRQAPGKGLEW VSYISPSGATIAYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYY CARSLMSTGTHLYFDLWGRGTLVTSS (配列番号 117)
Ab15_VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFPQYYMSWIRQAPGKGLEW VSYISPSGATIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYY CARSLMSTGTHLYFDLWGRGTLVTSS (配列番号 125)
Ab16_VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEW VSYISPSGATIAYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CARSLMATGTHLYFDLWGRGTLVTSS (配列番号 133)
Ab17_VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIRQAPGKGLEW VSYISPSGATIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYY CARSLMSTGTHLYFDLWGRGTLVTSS (配列番号 141)
Ab18_VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSQYYMSWIRQAPGKGLEW VSYISPSGATIAYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYY CARSLMATGTHLYFDLWGRGTLVTSS (配列番号 149)
Ab19_VH	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSQYYMSWIRQAPGKGLEW VSYISPSGATIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYY CARSLMATGTHLYFDLWGRGTLVTSS (配列番号 157)
Ab20_VH	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSQYYMSWIRQAPGKGLEW VSYISPSGATIAYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYY CARSLMSTGTHLYFDLWGRGTLVTSS (配列番号 165)
Ab1_VL	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITTCRASQGIDSWLAWYQQKPGKAPKLLI YAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQASVLPITF GGGTKVEIK (配列番号 11)
Ab2_VL	DIQLTQSPSSVSASVGDRVITTCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIY YAASSLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQASVLPITFG GGTKVEIK (配列番号 19)
Ab3_VL	DIQLTQSPSSVSASVGDRVITTCRASQDISSWLAWYQQKPGKAPKFLIY AASALQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQALVLPITFG GGTKVEIK (配列番号 27)

10

20

30

40

50

抗体	配列
Ab4_VL	DIQLTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIY AASGLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQASYLPITFG GGTKVEIK (配列番号 35)
Ab5_VL	DIQLTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQDISSWLAWYQQKPGKAPKLLIY FASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQASKLPITFG GGTKVEIK (配列番号 43)
Ab6_VL	DIQLTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCQQAWVLPITF GGGTKVEIK (配列番号 51)
Ab7_VL	DIQLTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIY AASFLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQASVLPITFG GGTKVEIK (配列番号 59)
Ab8_VL	DIQLTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQTISSWLAWYQQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQQSVLPITFG GGTKVEIK (配列番号 67)
Ab9_VL	DIQLTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHSLVPITFG GGTKVEIK (配列番号 75)
Ab10_VL	DIQLTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQDISSWLAWYQQKPGKAPKLLIY AASALQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQADVLPITFG GGTKVEIK (配列番号 83)
Ab11_VL	DIQLTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGIYSSWLAWYQQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQASDLPTFG GGTKVEIK (配列番号 91)
Ab12_VL	DIQLTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQDISSWLAWYQQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQVTSFPPYTF GGGTKVEIK (配列番号 105)
Ab13_VL	DIQLTQSPSSVSASVGDRVITITCRASSGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIY AASELQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQATSFPYTF GGGTKVEIK (配列番号 113)
Ab14_VL	DIQLTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGISDWLAWYQQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQVTSFPPYTF GGGTKVEIK (配列番号 121)
Ab15_VL	DIQLTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQVTSPPYTF GGGTKVEIK (配列番号 129)
Ab16_VL	DIQLTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIY AASGLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSTSFPPYTF GGGTKVEIK (配列番号 137)
Ab17_VL	DIQLTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIY AASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQVTSVPPYTF GGGTKVEIK (配列番号 145)
Ab18_VL	DIQLTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIY AAESLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQVTSQPPYTF GGGTKVEIK (配列番号 153)

10

20

30

40

抗体	配列
Ab19_VL	DIQLTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIY AASALQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQVTSAPPYTF GGGTKVEIK (配列番号 161)
Ab20_VL	DIQLTQSPSSVSASVGDRVITITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIY AASVLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQVTSFLPYTF GGGTKVEIK (配列番号 169)

50

【 0 4 4 5 】

実施例 2 - CD161 抗体の結合親和性

この実施例は、実施例 1 で作製した様々な CD161 抗体のキネティクス及び親和性を記載する。

【 0 4 4 6 】

ForteBio 親和性測定を、全般に以前記載されたように Octet HTX で実施した (例えば、Estep et al. (2013) MABS, 5(2): 270-8 を参照)。簡潔に述べると、ForteBio 親和性測定を、IgG を AHC センサーにオンラインでロードすることによって実施した。センサーを、アッセイ緩衝液中で 30 分間オフラインで平衡化し、次いで、ベースライン確立のために 60 秒間オンラインでモニターした。ロードされた IgG を有するセンサーを、100 nM 抗原に 3 分間曝露し、その後、オフレート測定のために、アッセイ緩衝液に 3 ~ 10 分間移した。アビディティ (Avid) 及び一価親和性評価を、それぞれ、二量体抗原又は一価抗原を使用して実施した。最適化中に、Fab を使用して一価親和性も評価した。この評価では、非ビオチン化 Fc 融合抗原を、AHC センサーにオンラインでロードした。センサーを、アッセイ緩衝液中で 30 分間オフラインで平衡化し、次いで、ベースライン確立のために 60 秒間オンラインでモニターした。ロードされた抗原を有するセンサーを、100 nM Fab に 3 分間曝露し、その後、オフレート測定のために、それらをアッセイ緩衝液に 10 分間移した。キネティックデータを、1:1 結合モデルを使用して分析し、適合させ、 K_D を、 k_{off} を k_{on} で除算することによって計算した。

【 0 4 4 7 】

Octet ベースの実験によって測定した CD161 抗体の K_D 値 (抗 CD161 抗体の抗体結合キネティクス) を表 7 に示し、示されるように、抗体親和性は、 $10^{-7} M \sim 10^{-10} M$ の間である。

【 0 4 4 8 】

10

20

30

40

50

【表 7】

表 7

mAb	ヒト K _D , Avid (M) [溶液中の hKLRB1-Fc]	カニクイザル K _D , Avid (M) [溶液中の cKLRB1-Fc]	ヒト K _D , 一価 (M) [溶液中の 抗体 Fab]	カニクイザル K _D , 一価 (M) [溶液中の 抗体 Fab]	ヒト K _D , 一価 (M) [溶液中の hKLRB1-His]
Ab1	9.55E-10	3.51E-10	9.11E-09	n/a	8.09E-09
Ab2	6.09E-10	1.26E-10	1.37E-09	1.98E-09	1.99E-09
Ab3	5.42E-10	1.93E-10	6.62E-10	1.02E-09	6.02E-10
Ab4	7.50E-10	1.91E-10	3.82E-10	8.26E-10	4.48E-10
Ab5	7.53E-10	2.32E-10	3.35E-10	6.59E-10	3.29E-10
Ab6	6.32E-10	1.99E-10	5.85E-10	6.76E-10	7.76E-10
Ab7	6.31E-10	1.31E-10	9.04E-10	1.62E-09	1.30E-09
Ab8	6.86E-10	2.22E-10	3.52E-10	6.89E-10	4.96E-10
Ab9	8.14E-10	1.68E-10	4.57E-10	9.81E-10	6.86E-10
Ab10	7.01E-10	1.64E-10	2.39E-10	4.16E-10	1.96E-10
Ab11	5.88E-10	1.93E-10	1.02E-09	1.48E-09	1.14E-09
Ab12	5.94E-10	5.20E-10	2.27E-09	2.11E-07	2.49E-09
Ab13	6.72E-10	3.24E-10	7.01E-10	5.29E-08	9.87E-10
Ab14	6.10E-10	2.42E-10	6.98E-10	n/a	1.08E-09
Ab15	5.33E-10	2.40E-10	6.08E-10	2.45E-08	6.57E-10
Ab16	4.10E-10	3.05E-10	1.27E-09	1.39E-07	1.58E-09
Ab17	6.20E-10	3.43E-10	8.56E-10	5.49E-08	1.20E-09
Ab18	6.13E-10	3.12E-10	9.20E-10	6.87E-08	1.21E-09
Ab19	6.31E-10	3.60E-10	2.38E-09	6.10E-08	1.93E-09
Ab20	4.75E-10	2.84E-10	5.55E-10	7.99E-08	5.48E-10

10

20

30

【0449】

実施例3 - 抗CD161抗体はCD161に結合する - オン・セル(On-cell)標的結合

この実施例は、ヒト及びカニクイザルCD161を外因的に発現するHEK293細胞に結合する抗CD161抗体の能力を記載する。

【0450】

脂質ベースのトランスフェクション、ゲノムへのランダムな組み込み、及び抗生物質選択によって、ヒト(h)又はカニクイザル(c)CD161(表8におけるアミノ酸配列)を過剰発現するように、HEK293細胞を操作した。

【0451】

40

50

【表 8】

表8

ヒト CD161, 全長 (Uniprot #Q12918)	MDQQAIYAELNLPTDSGPSSSPSSLPRDVCQGSPWHQFALKLSCAGII LLVLVVTGLSVSVTSLIQKSSIEKCSVDIQQSRNKTTERPGLLNCPYIWQ QLREKCLLFSHTVNPWNNSLADCSTKESSLLIIRDKDELIHTQNLIRDK AILFWIGLNFSLSEKNWKWINGSFLNSNDLEIRGDAKENSISISQTSVY SEYCSTEIRWICQKELTPVRNKVYPDS (配列番号 179)
カニクイザル CD161, 全長 (Uniprot # A0A2K5WY II)	MDQQMMYAELTLPKDSGPSSSPSSLPRDVCQGSPWHQFALKLSCAGI ILLVLVVTGLSLSVASLLQKPSIGKCSVDIQQNRKTTERPDLLNCPYI WQQVQEKCCLLFSHTVNPWNNSLADCSTKESSLLIQQDKDELTRTQNL HDKAISFWIGLNFSLSEKNWKWINGSFLSSNDLKITGDAKENSVCYISQ TSVYSEYCESTEMKWICQKELTLVRNKVSPDSWL (配列番号 180)
マウス CD161, 全長 (Uniprot # Q99JB4)	MDSTTLVYADLNLARIQEPKHDSPPSLSPDTCRCPRWHLALFKGCAG LILLVLVIGLCVLVLSVQKSSVQKICADVQENRTHTTGCSAKLECPQ DWLSHRDKCFHVSQVSNWKECRIDCDKKGATLLLIQDQEELRFLD SIKEYNSFWIGLSYTLTDMNWKWINGTAFNSDVLKITGVTENGSCAA ISGEKVTSEGCSSDNRWICQKELNHETPCNDS (配列番号 181)
ラットCD161, 全長 (Uniprot # Q5NKN4)	MDTAVVYADLHLARTGEPKHKSPPSLSPDTCQCPRWHLALKLGCAC LILLVLSVIGLGVLVLTLLQKPLIQNSPADVQENRTKTTSPTKLKCPK DWHSHQDKCFHVSQAPNTWNKSLADCGKGATLLLIQDQEELRFLR NLTKGKDRSFWIGLNYTLDPKNWKWINSSTLNSDVLISFGDTKQNSCA SISQDKVLSESCSDNLWICQKELKCECMCNGS (配列番号 182)

10

20

【0452】

抗体結合アッセイのために、hCD161-HEK293、cCD161-HEK293、及びヌル(NuII)-HEK293細胞を、0.1%ウシ血清アルブミンを有するリン酸緩衝食塩水(PBSA)中で洗浄し、ウェルあたり 1×10^4 個の細胞の密度で96ウェルプレート中に播種した。洗浄した細胞を、PBSA中で希釈した抗体タイトレーション中に再懸濁し、4℃で4時間インキュベートした。細胞をPBSA中で洗浄し、PBSA中に1:1000希釈したAlexa Fluor(登録商標)647抗ヒトIgG(Jackson ImmunoResearch、カタログ番号109-605-190)中に再懸濁し、4℃で30分間インキュベートした。細胞をPBS中で洗浄し、2%ホルムアルデヒドを有するPBS中に再懸濁し、室温で20分間インキュベートし、BD Symphonyフローサイトメーターを用いるフローサイトメトリーによって分析した。

30

【0453】

データを、FlowJoソフトウェアを使用して分析した。各濃度におけるMFIを計算し、Graphpad Prismにエクスポートした。EC₅₀値を、3パラメータの非線形回帰適合を用いて計算した。

40

【0454】

図1A~1Dは、ヒトCD161を外因的に発現するHEK293細胞へのヒト抗CD161抗体の結合を示すグラフである。Iso Ctrlは、アイソタイプ対照抗体を示す。

【0455】

図2A~2Dは、カニクイザルCD161を外因的に発現するHEK293細胞へのヒト抗CD161抗体の結合を示すグラフである。Iso Ctrlは、アイソタイプ対照抗体を示す。

【0456】

表9、図1A~1D、及び図2A~2Dに示すように、ヒト抗CD161抗体は、用量依存的にhCD161-HEK293及びcCD161-HEK293に結合し、およそ0.1~0.5nMの間で測定するEC₅₀値を有する。トランスフェクトされていない(ヌル)細胞への結合は観察されず、

50

このことは、結合がCD161に特異的であることを示した。

【 0 4 5 7 】

【 表 9 】

表 9

	hCD161 EC ₅₀ (nM)	cCD161 EC ₅₀ (nM)	ヌル EC ₅₀ (nM)
Ab1	0.2566	0.2784	--
Ab2	0.2853	0.2718	--
Ab3	0.3908	0.4107	--
Ab4	0.2872	0.2565	--
Ab5	0.249	0.2376	--
Ab6	0.2322	0.2461	--
Ab7	0.2478	0.2494	--
Ab8	0.3158	0.2625	--
Ab9	0.2794	0.2227	--
Ab10	0.2465	0.3222	--
Ab11	0.2603	0.2648	--
Ab12	0.2211	0.2879	--
Ab13	0.1983	0.2096	--
Ab14	0.2701	0.3117	--
Ab15	0.2056	0.2376	--
Ab16	0.2292	0.2789	--
Ab17	0.186	0.2362	--
Ab18	0.211	0.2271	--
Ab19	0.2465	0.2831	--
Ab20	0.2331	0.2569	--
アイソタイプ ctrl.	--	--	--

10

20

30

【 0 4 5 8 】

実施例4 - オン・セルホモログ結合(FACS KLRF1、KLRF2、CLEC12B、CLEC2D)

この実施例は、CD161に対する抗体特異性の尺度として、CD161ホモログを外因的に発現するHEK293細胞への抗CD161抗体の結合を記載する。このアッセイにおける目的の相同タンパク質は、配列類似性に基づくものであった；目的のタンパク質のアライメントを図3に示す。CLEC2Dに対する特異性も試験した；CD161及びCLEC2Dのアライメントを図4に示す。

【 0 4 5 9 】

脂質ベースのトランスフェクション、トランスポゾン媒介性組み込み、及び抗生物質選択によって、KLRF1、KLRF2、CLEC12B、又はCLEC2D(表10におけるCD161ホモログ配列)を過剰発現するように、HEK293細胞を操作した。構築物の安定な組み込みを、qPCRによって検証した。

40

【 0 4 6 0 】

50

【表 10】

表10

構築物	配列
hKLRF1 (Uniprot #Q9NZS2)	MQDEERYMTLNVQSKKRSSAQTSQLTFKDYSVTLHWYKILLGISGTVN GILTLTLISLILLVSQGVLLKCQKGSCSNATQYEDTGD LKVNNGTRRNIS NKDLCASRSADQTVLCQSEWLKYQGKCYWFSNEMKSWSDSYVYCLER KSHLLIHDQLEMAFIQKNLRQLNYVWIGLNFTSLKMTWTWVDGSPIDS KIFFIKGPAKENSCAAIKESKIFSETCSSVFKWICQY (配列番号183)
hKLRF2 (Uniprot #D3W0D1)	MENEDGYMTLSFKNRCKSKQKSKDFSLYPQYYCLLLIFGCIVILIFIMTGI DLKFWHKKMDFSQNVNVSSLGHNYLCPNDWLLNEGKCYWFSTSFKT WKESQRDCTQLQAHLLVIQNLDELEFIQNSLKPGHFGWIGLYVTFQGNL WMWIDEHFLVPELFSVIGPTDDRSCAVITGNWVYSEDCSSTFKGICQRD AILTHNGTSGV (配列番号184)
hCLEC12 B (Uniprot #Q2HXU8)	MSEEVTYATLTFQDSAGARNNRDGNLNRKRHPAPSPIWRHAALGLVT LCLMLLIGLVTLGMMFLQISNDINS DSEKLSQLQKTIQQQQDNL SQQLG NSNNLSMEEEF LKSQISSVLKRQEQMAIKLCQELIHTSDHRCNCPKMW QWYQNSCYFTTNEEKTWANSRKDCIDKNSTLVKIDSLEEKDFLMSQPL LMFSFFWLGLSWDSSGRSWFWEDGSVPSPSLFSTKELDQINGSKGCAYF QKGNIIYSRCSAEIFWICEKTAAPVKTEDLD (配列番号185)
hCLEC2D (Uniprot #Q9UHP7)	MHDSNNVEKDITPSELPANPGCLHSKEHSIKATLIWRLFFLIMFLTIIVCG MVAALS AIRANCHQEPSVCLQAACPE SWIGFQRKCFYFSDDTKNWTSSQ RFCDSQDADLAQVESFQELNFLRLRYKGPSDHWIGLSREQGQPWKWING TEWTRQFPILGAGECAYLNDKGASSARHYTERKWICKSKSDIHV (配列 番号186)

10

20

【0461】

CD161抗体を、以下に詳述するように、単一飽和濃度で上記の各細胞株に対する結合についてスクリーニングした。

30

【0462】

抗体結合アッセイのために、すべての細胞株を、0.1%ウシ血清アルブミンを有するリン酸緩衝食塩水(PBSA)中で洗浄し、ウェルあたり 4×10^4 個の細胞の密度で96ウェルプレート中に播種した。洗浄した細胞を、100nMの抗体(細胞に対する最大結合を測定するための飽和濃度)中に再懸濁し、室温で30分間インキュベートした。細胞をPBSA中で洗浄し、PBSA中に1:1000希釈したAlexa Fluor(登録商標)647抗ヒトIgG(Jackson ImmunoResearch、カタログ番号109-605-190)中に再懸濁し、4で30分間インキュベートした。細胞を、Thermo Fisher Attuneフローサイトメーターを用いるフローサイトメトリーによって分析した。

40

【0463】

図5A~5Bは、CD161又はCD161ホモログ(CLEC2D、KLRF1、KLRF2、及びCLEC12B)を外因的に発現するHEK293細胞へのヒト抗CD161抗体の結合を示すグラフである。Iso Ctrlは、アイソタイプ対照抗体を示す。ヌルは、対照HEK293細胞を表す。

【0464】

データを、FlowJoソフトウェアを使用して分析した。各サンプルについてのMFIを計算し、Graphpad Prismにエクスポートした。図5A~5B及び表11に示すように、CD161ホモログを発現するいずれのHEK293細胞株へも著しい結合は観察されなかった。

【0465】

CD161ホモログを発現する細胞に対する抗CD161抗体のオフターゲット結合評価を、飽和抗体濃度(100nM)におけるCD161結合のパーセンテージとして、表11に示す。

50

【 0 4 6 6 】

【 表 1 1 】

表 11

ID	KLRB1 (%)	CLEC2D (%)	KLRF1 (%)	KLRF2 (%)	CLEC12B (%)	ヌル (%)
Ab1	100.000	0.975	0.073	0.036	0.040	0.066
Ab2	100.000	0.863	0.032	0.049	0.057	0.071
Ab3	100.000	0.832	0.011	-0.007	-0.042	0.035
Ab4	100.000	1.106	0.095	0.056	0.074	0.179
Ab5	100.000	0.872	0.059	0.035	0.056	0.118
Ab6	100.000	1.012	0.036	0.029	0.011	0.047
Ab7	100.000	1.087	0.018	0.040	0.011	0.018
Ab8	100.000	0.846	0.031	0.038	0.049	0.084
Ab9	100.000	0.808	0.042	0.028	0.025	0.063
Ab10	100.000	0.935	0.046	0.004	-0.004	0.053
Ab11	100.000	0.785	0.024	0.021	-0.003	0.038
Ab12	100.000	1.161	0.065	0.055	0.061	0.085
Ab13	100.000	0.907	0.106	0.089	0.175	0.209
Ab14	100.000	1.024	0.090	0.054	0.064	0.120
Ab15	100.000	0.935	0.114	0.067	0.071	0.108
Ab16	100.000	0.865	0.061	0.048	0.088	0.099
Ab17	100.000	1.077	0.078	0.051	0.038	0.096
Ab18	100.000	0.865	0.121	0.101	0.169	0.196
Ab19	100.000	0.970	0.305	0.220	0.260	0.285
Ab20	100.000	0.968	0.132	0.054	0.061	0.127

10

20

【 0 4 6 7 】

30

実施例5 - 抗CD161抗体は、レクチン様転写物1(CLEC2D)結合を遮断する - リガンド遮断アッセイ

この実施例は、実施例1に記載し、表5に示す、ヒトCD161タンパク質及び可溶性ビオチン化Fc-ヒトCLEC2D(H176C)タンパク質を過剰発現するHEK293細胞を使用する、CD161とCLEC2Dとの間の相互作用のCD161抗体媒介性遮断を記載する。

【 0 4 6 8 】

CD161/CLEC2Dの抗体媒介性遮断のために、HEK293-hCD161細胞を、0.1%ウシ血清アルブミンを有するリン酸緩衝食塩水(PBSA)中で洗浄し、ウェルあたり 1×10^4 個の細胞の密度で96ウェルプレート中に播種した。抗体タイトレーションを、PBSA中で希釈し、ビオチン化Fc-H176C CLEC2Dを、抗体の各タイトレーションに100nMの最終濃度まで添加し、抗体/CLEC2D溶液を、HEK293-hCD161細胞とともに4 で4時間インキュベートした。細胞をPBSA中で洗浄し、次いで、ビオチン化Fc-H176C CLEC2D結合を、ストレプトアビジン、Alexa Fluor(商標)647コンジュゲート(Thermo Fisher、カタログ番号S21374)(PBSA中で1:1000希釈)によって検出し、4 で30時間インキュベートした。細胞をPBS中で洗浄し、2%ホルムアルデヒドを有するPBS中に再懸濁し、室温で20時間インキュベートし、Thermo Fisher Attuneフローサイトメーターを用いるフローサイトメトリーによって分析した。

40

【 0 4 6 9 】

データを、FlowJoソフトウェアを使用して分析した。各濃度におけるMFIを計算し、Graphpad Prismにエクスポートした。EC₅₀値を、3パラメータの非線形回帰適合を用

50

いて計算した。

【 0 4 7 0 】

図6A～6Dは、ヒトCD161タンパク質及び可溶性ビオチン化Fc-ヒトCLEC2D(H176C)タンパク質を過剰発現するHEK293細胞を使用する、CD161とCLEC2Dとの間の相互作用のヒト抗CD161抗体媒介性遮断を示すグラフである。Iso Ctrlは、アイソタイプ対照抗体を示す。

【 0 4 7 1 】

hCD161-HEK293細胞へのヒトFc-H176C CLEC2D結合の抗体媒介性遮断を表12に示す。

【 0 4 7 2 】

【表 1 2 】

10

表 12

抗体	IC50 (nM)
Ab1	1.13
Ab2	1.27
Ab3	1.61
Ab4	1.62
Ab5	1.49
Ab6	1.17
Ab7	1.38
Ab8	1.52
Ab9	0.94
Ab10	1.35
Ab11	1.47
Ab12	0.77
Ab13	0.64
Ab14	0.71
Ab15	0.66
Ab16	0.66
Ab17	0.67
Ab18	0.71
Ab19	0.31
Ab20	0.61
Iso Ctrl	-

20

30

【 0 4 7 3 】

抗体の非存在下では、HEK293細胞上のhCD161とビオチン化H176C Fc-CLEC2Dとの間の相互作用は、ストレプトアビジン、Alexa Fluor(商標)647コンジュゲートによって検出された。表12及び図6A～6Dに示すように、抗CD161抗体の存在は、用量依存的に可溶性ビオチン化Fc-H176C CLEC2DとhCD161-HEK細胞との間の相互作用を阻害した。すべてのIC₅₀値は、0.3～1.7nMの間である。

40

【 0 4 7 4 】

実施例6 - CD161抗体は、外因的CLEC2D発現を用いた共培養アッセイにおいてNK細胞を活性化する

この実施例は、リガンドCLEC2Dを過剰発現する標的細胞によって媒介されるヒトNK細胞上の阻害性シグナル伝達を遮断する抗CD161抗体の能力を記載する。

【 0 4 7 5 】

50

簡潔に述べると、NK細胞(CD3⁻CD56⁺)を、ヒトPBMCから磁気ビーズを用いたネガティブ選択を使用して単離し、単離されたNK細胞の純度は、典型的には 90%であった。単離されたNK細胞を、活性化のために100ng/mL IL-2を含有する培地中で培養した。IL-2活性化NK細胞を、活性化から24時間後に使用した。

【0476】

K562ヒトがん細胞を、トランスポゾン操作によって、ヒトCLEC2Dを過剰発現するように操作した。アッセイのセットアップ前に、選択抗生物質を有するIMDM(イスコフ改変ダルベッコ培地)中で細胞を培養した。

【0477】

ヒトCLEC2Dを発現するK562ヒトがん細胞を回収し、 2×10^6 個の細胞/mLで培養培地中に再懸濁した。ヒト抗CD161抗体及びマウス抗ヒトCD161抗体(HP-3G10)を、培養培地中で希釈した。活性化NK細胞を回収し、洗浄し、培養培地中に 2×10^6 個の細胞/mLで再懸濁した。次いで、K562がん細胞を、IL-2の存在下で抗CD161抗体及び活性化NK細胞と混合した。CD107a染色を、CD3⁻CD56⁺細胞で分析して、NK細胞活性化を評価した。

【0478】

図7A~7Dは、用量依存的な、CD107a発現によって測定した場合のヒトNK細胞の抗CD161抗体媒介性活性化を示すグラフである。Iso Ctrlは、アイソタイプ対照抗体を示す。

【0479】

図7A~7Dに示すように、ヒト抗CD161抗体は、マウス抗ヒトCD161抗体を使用して達成されたNK細胞活性化と比較して、用量依存的に、CD107a発現によって測定した場合のNK細胞活性化を増加させ、一方、アイソタイプ対照は、NK細胞機能に影響を及ぼさなかった。さらに、CLEC2Dを欠くK562細胞をアッセイにおいて標的細胞として使用した場合、CD107aの典型的な量はおおよそ30%であり、このことは、本明細書の抗体が、NK細胞のCLEC2D媒介性阻害を完全に緩和したことを示した。各抗体についてのこの効果についてのEC₅₀を表13に列挙する(NK細胞機能の抗体媒介性回復)。

【0480】

10

20

30

40

50

【表 1 3】

表 13

抗体	EC ₅₀ (nM)
Ab1	0.29
Ab2	0.37
Ab3	0.28
Ab4	0.31
Ab5	0.27
Ab6	0.38
Ab7	0.15
Ab8	0.17
Ab9	0.14
Ab10	0.27
Ab11	0.19
Ab12	0.16
Ab13	0.11
Ab14	0.13
Ab15	0.06
Ab16	0.09
Ab17	0.16
Ab18	0.05
Ab19	0.04
Ab20	0.05
Iso Ctrl	>10

10

20

【0 4 8 1】

実施例7 - 外因的CLEC2D発現を用いた共培養アッセイにおけるT細胞の抗体活性化

30

この実施例は、リガンドを過剰発現する標的細胞によって媒介されるJurkat T細胞上の阻害性シグナル伝達を遮断する抗CD161抗体の能力を記載する。

【0 4 8 2】

NFAT-ルシフェラーゼレポーター遺伝子(InvivoGen)を有するJurkat T細胞を、レンチウイルス形質導入によってNY-ESO-1特異的TCR及びヒトCD161の両方を過剰発現するように操作した。アッセイのセットアップ前に、選択抗生物質を有するIMDM培地中で細胞を培養した。

【0 4 8 3】

K562ヒトがん細胞を、レンチウイルス形質導入によってMHC-I(HLA-A0201)を過剰発現し、トランスポゾン操作によってヒトCLEC2Dを過剰発現するように操作した。アッセイのセットアップ前に、選択抗生物質を有するIMDM培地中で細胞を培養した。

40

【0 4 8 4】

0日目に、操作したK562細胞を、10 µg/mL NY-ESO-1ペプチド抗原SLLMWITQV(配列番号192)を含有する培地中で 5×10^5 個の細胞/mLの密度で播種し、37 °C、5%CO₂で一晩インキュベートした。

【0 4 8 5】

1日目に、Jurkatエフェクター細胞及びペプチドロードK562標的細胞を、96ウェルプレート中に1:4の比でプレーティングした。抗CD161抗体(ヒト抗CD161抗体及びマウス抗ヒトCD161抗体(HP-3G10))を、アッセイ培地中で予め希釈し、1:1の体積比で共培養物に添加した。プレートを、37 °C、5%CO₂で一晩インキュベートした。

50

【 0 4 8 6 】

2日目に、20 μ Lのアッセイ上清を、50 μ LのQUANTI-Lucルシフェラーゼ検出試薬(Invivogen)を含有する白色壁96ウェルプレートに移した。EnVisionプレートリーダーでエンドポイントのルミネセンスを読み取った。各ウェルのルミネセンス値を、抗体を含有しない対照ウェルの平均ルミネセンス値によって正規化することによって、誘導倍率を計算した。

【 0 4 8 7 】

図8A～8Dは、NFATシグナル伝達によって測定した場合の、外因的CLEC2D発現を用いた共培養アッセイにおけるT細胞の抗CD161抗体媒介性活性化の活性化T細胞核因子(NFAT)シグナル伝達を示すグラフである。アイソタイプ対照抗体を対照として使用した。

【 0 4 8 8 】

抗体の非存在下では、Jurkat細胞上のCD161とK562細胞上のCLEC2Dとの間の相互作用は、NFATシグナル伝達を阻害する。図8A～8Dに示すように、抗CD161抗体の存在下では、阻害性シグナルが遮断され、TCR/MHC-I相互作用を介したNFATシグナル伝達は、用量依存的に回復する。図8A～8Dに示すように、本明細書に開示されるヒト抗CD161抗体は、HP-3G10と比較して、NFATシグナル伝達(TCRシグナル伝達と表示される)を回復させるのにより優れている。表14は、計算したEC₅₀値を列挙する。

【 0 4 8 9 】

【表 1 4 】

表 14

抗体	EC ₅₀ (nM)
Ab1	2.78
Ab2	3.07
Ab3	4.05
Ab4	2.59
Ab5	1.93
Ab6	1.62
Ab7	2.08
Ab8	1.91
Ab9	2.31
Ab10	2.19
Ab11	2.44
Ab12	2.26
Ab13	1.62
Ab14	2.36
Ab15	1.77
Ab16	2.14
Ab17	1.98
Ab18	1.54
Ab19	1.72
Ab20	2.17
Iso Ctrl	>10

【 0 4 9 0 】

実施例8 - 内因的CLEC2D発現を用いた共培養アッセイにおけるT細胞の抗体活性化

この実施例は、内因的リガンド発現を有する標的細胞によって媒介されるJurkat T細胞上の阻害性シグナル伝達を遮断する抗CD161抗体の能力を記載する。

【0491】

NFAT-ルシフェラーゼレポーター遺伝子(InvivoGen)を有するJurkat T細胞を、レンチウイルス形質導入によってNY-ESO-1特異的TCR及びヒトCD161の両方を過剰発現するように操作した。アッセイのセットアップ前に、選択抗生物質を有するIMDM培地中で細胞を培養した。

【0492】

MHC-I(HLA-A0201)及びCLEC2Dを内因的に発現するNALM6ヒトがん細胞を、アッセイのセットアップ前にRPMI培地中で培養した。

【0493】

0日目に、NALM6細胞を、 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ NY-ESO-1ペプチド抗原(配列番号192)を含有する培地中で 5×10^5 個の細胞/mLの密度で播種し、一晚インキュベートした。

【0494】

1日目に、Jurkatエフェクター細胞及びペプチドロードNALM6標的細胞を、96ウェルプレート中に1:4の比でプレATINGした。抗CD161抗体を、アッセイ培地中で予め希釈し、1:1の体積比で共培養物に添加した。プレートを、 37°C 、5% CO_2 で一晩インキュベートした。

【0495】

2日目に、 $20\mu\text{L}$ のアッセイ上清を、 $50\mu\text{L}$ のQUANTI-Lucルシフェラーゼ検出試薬(Invivogen)を含有する白色壁96ウェルプレートに移した。EnVisionプレートリーダーでエンドポイントのルミネセンスを読み取った。各ウェルのルミネセンス値を、抗体を含有しない対照ウェルの平均ルミネセンス値によって正規化することによって、誘導倍率を計算した。

【0496】

図9は、用量依存的なNFATシグナル伝達の回復を示すグラフである。

【0497】

抗体の非存在下では、Jurkat細胞上のCD161とNALM6細胞上のCLEC2Dとの間の相互作用は、NFATシグナル伝達を阻害する。図9に示すように、抗CD161抗体の存在下では、阻害性シグナルは遮断され、TCR/MHC-I相互作用を介したNFATシグナル伝達は、用量依存的に回復する。

【0498】

実施例9 - 抗CD161抗体の開発可能性

この実施例は、製造の実現可能性、特定の投与経路に対する製剤化可能性、及びインビボ環境との適合性、例えば、抗CD161抗体の免疫原性、オフターゲット効果、及び半減期を評価する。

【0499】

多特異性ELISA

この方法を使用して、マイクロタイタープレート固定化多特異性標的(dsDNA、インスリン、バキュロウイルス粒子(BVP)、HSP70)への抗体結合を確立した。これらの標的への抗体結合は、インビボでの迅速な抗体クリアランスと関連している(Avery et al. (2018) MABS, 10(2): 244-255; Jain et al. (2017) PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 114(5): 944-949; Kelly et al. (2017) MABS, 9(7): 1036-1040)。アッセイシグナルにおける潜在的なプレート間の変動性を考慮して、各ELISAプレート上の3つの対照抗体を使用してアッセイを実施した。対照を、それらの低い多反応性(アダリムマブ、Lapadula et al. (2014) INT. J. IMMUNOPATHOL. PHARMACOL., 27(1 Suppl): 33-38)、中程度の多反応性(ウステキヌマブ、Benson et al. (2011) MABS, 3(6): 535-545)、又は高い多反応性(プリアキヌマブ、Misselwitz et al. (2020) DIGESTION, 101(Suppl 1): 69-82)に基づいて選択した(Jain et al. (2017) PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 114(5): 944-949; Kelly et al. (2017) MABS, 9(7): 1036-1040)。

【0500】

ウェルあたり3 $\mu\text{g/mL}$ /25 μL の多特異性試薬(dsDNA(Millipore、カタログ番号11691112001)、ヒトインスリン(MP Biomedicals、カタログ番号193900)、BVP(LakePharma、カタログ番号25690)、ヒトHSP70(R&D Systems、カタログ番号AP-100))(PBS、pH7.4中)で、高結合性ハーフウェルプレート(Corning、カタログ番号3690)の試験ウェルを、4 で一晩被覆することによって、典型的なELISAを実施した。プレート上のバックグラウンド対照ウェルは、被覆されないままとした。プレートを、洗浄緩衝液(0.05% tween 20、pH7.4を含有するPBS)で3回洗浄し、ブロッキング緩衝液(PBS、pH7.4中3% BSA)で37 にて1時間直ちにブロッキングした。試験ウェル及び対照ウェル(ブロッキングのみ)に、100nM抗CD161抗体又は対照抗体を、アッセイ緩衝液(0.05% tween 20を含有するブロッキング緩衝液)中で二連で添加した(ウェルあたり25 μL)。37 で45分間のインキュベーション後、プレートを3回洗浄し、HRPコンジュゲート化ヤギ抗ヒトIgG抗体(Fcガンマ断片特異的、Jackson Immunoresearch、カタログ番号109-035-098)を、37 で45分間添加した(ウェルあたり25 μL)。プレート固定化標的に結合した抗体を、450nmの吸光度を用いてHRP基質(3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMB; SeraCare、カタログ番号5120-0077))を使用して決定した。各抗体について、二連の値を平均化し、平均アッセイバックグラウンドを差し引いた。

10

【0501】

表15は、全20種の抗CD161抗体(11種の抗体は第1のファミリー(F1)からの親モノクローナル抗体から生成され、9種の抗体は第2のファミリー(F2)についての親モノクローナル抗体から生成された)が、プレート固定化多特異性標的への低結合を有したことを示す。試験抗体結合は、対照の低多反応性抗体アダリムマブの結合の0.92倍~2.8倍、インスリンについて1.0倍~2.14倍、BVPについて0.46倍~1.92倍、HSP70について0.64倍~4.07倍であった。対照的に、高多反応性対照抗体であるプリアキヌマブは、dsDNAに対して約5倍、インスリンに対して約17倍、BVPで約8倍、HSP70に対して約10倍高い結合で、アダリムマブよりもプレート固定化標的にはるかにしっかりと結合した。これらの結果は、抗CD161抗体の多反応性の傾向が低いことを確認した。

20

【0502】

30

40

50

【表 15】

表 15

抗体	親 mAb	dsDNA		インスリン		BVP		HSP70		BSA
		A450nm	Norm ¹	A450nm	Norm	A450nm	Norm	A450nm	Norm	
Ab1	F1	1.34	2.79	0.15	2.14	0.30	1.25	0.15	1.07	0.15
Ab2	F1	0.53	1.10	0.09	1.29	0.21	0.88	0.18	1.29	0.10
Ab3	F1	0.66	1.38	0.08	1.14	0.22	0.92	0.11	0.79	0.09
Ab4	F1	0.84	1.75	0.13	1.86	0.38	1.58	0.24	1.71	0.08
Ab5	F1	0.70	1.46	0.07	1.00	0.13	0.54	0.12	0.86	0.08
Ab6	F1	0.61	1.27	0.09	1.29	0.11	0.46	0.09	0.64	0.09
Ab7	F1	0.51	1.06	0.12	1.71	0.28	1.17	0.22	1.57	0.08
Ab8	F1	0.63	1.31	0.12	1.71	0.32	1.33	0.20	1.43	0.10
Ab9	F1	0.67	1.40	0.11	1.57	0.28	1.17	0.14	1.00	0.10
Ab10	F1	1.18	2.46	0.15	2.14	0.42	1.75	0.26	1.86	0.10
Ab11	F1	1.18	2.46	0.13	1.86	0.46	1.92	0.24	1.71	0.12
Ab12	F2	0.55	1.15	0.11	1.57	0.30	1.25	0.25	1.79	0.10
Ab13	F2	0.68	1.42	0.11	1.57	0.40	1.67	0.28	2.00	0.12
Ab14	F2	0.85	1.77	0.13	1.86	0.23	0.96	0.25	1.79	0.08
Ab15	F2	0.86	1.79	0.14	2.00	0.25	1.04	0.33	2.36	0.10
Ab16	F2	0.56	1.17	0.09	1.29	0.11	0.46	0.09	0.64	0.11
Ab17	F2	0.75	1.56	0.10	1.43	0.17	0.71	0.17	1.21	0.10
Ab18	F2	0.44	0.92	0.08	1.14	0.11	0.46	0.15	1.07	0.10
Ab19	F2	0.73	1.52	0.12	1.71	0.31	1.29	0.57	4.07	0.06
Ab20	F2	0.56	1.17	0.15	2.14	0.27	1.13	0.38	2.71	0.08
アダリムマブ	n/a	0.48	1.00	0.07	1.00	0.24	1.00	0.14	1.00	0.07
ウステキヌマブ	n/a	1.21	2.52	0.16	2.29	1.18	4.92	0.52	3.71	0.10
ブリアキヌマブ	n/a	2.19	4.56	1.22	17.43	2.03	8.46	1.46	10.43	0.19

¹各値は、低多反応性対照抗体アダリムマブについてのアッセイシグナルで除算した試験抗体についてのアッセイシグナルを表す。

【0503】

HIC 結合 (HPLC)

IgGサンプルを、疎水性相互作用クロマトグラフィーによってアッセイしたが、この方法は、不十分な生物物理学的挙動又は非特異性と有用に相関するものであることが示されている(Jain et al. (2017) PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, 114(5): 944-949)。この以前の研究に基づいて、抗体候補の挙動を評価するために懸念のフラグが使用されたため、保持時間について2つの閾値を規定した。

【0504】

このアッセイについての方法は、以前に記載されている(Estep, et al. (2015) MA BS, 7(3): 553-561)。簡潔に述べると、1mg/mLの5μg精製IgGサンプルを、移動相A溶液(1.8M硫酸アンモニウム及び0.1Mリン酸ナトリウム、pH6.5)に添加して、約1Mの最終硫酸アンモニウム濃度を達成し、その後、分析した。Sepax Proteomix HICブチル-NP5カラムを、移動相A及び移動相B溶液(0.1Mリン酸ナトリウム、pH6.5)の線形勾配とともに、1mL/分の流速で20分かけて使用し、280nmでのUV吸光度モニタリングを用いた。保持時間を測定し、開発可能性のフラグと比較した:10.5分未満の保持時間は懸念がないと考え、10.5~11.5分の間は懸念が低いと考え、11.5分は懸念が高いと考えた。IgGについての保持時間を表16に列挙する。

【0505】

表16に示すように、試験したすべての抗体候補についての保持時間は、10.5分未満であった。

【0506】

【表16】

表 16

抗体	HIC 保持時間 (分)
Ab1	9.1
Ab2	9.6
Ab3	9.1
Ab4	9.2
Ab5	10.0
Ab6	9.1
Ab7	9.4
Ab8	9.4
Ab9	9.5
Ab10	9.0
Ab11	9.1
Ab12	9.2
Ab13	9.1
Ab14	9.1
Ab15	9.1
Ab16	9.2
Ab17	9.1
Ab18	9.2
Ab19	9.3
Ab20	9.2

10

20

30

【0507】

実施例10 - ヒト及びカニクイザルPBMCに結合する抗CD161抗体のプロファイリング

この実施例は、内因的標的発現を有する細胞に対する抗体の親和性及び特異性を評価するために、ヒト又はカニクイザル由来の初代免疫細胞への抗CD161抗体の結合を特徴付ける。

【0508】

PBMC集団中のヒト及びカニクイザルNK細胞への結合

ヒト及びカニクイザルPBMC集団中の、CD161を発現することが知られているNK細胞に結合する抗CD161抗体の能力を測定した。

40

【0509】

ヒトPBMC(Hemacare、カタログ番号20062234)を、PBSA中で洗浄し、ウェルあたり 2×10^5 個の細胞の密度で96ウェルプレート中に播種し、次いで、Live/Dead Aqua stain(Thermo Fisher、カタログ番号L34957)(PBS中で1:1000希釈)とともに室温で20分間インキュベートした。細胞をPBSA中で洗浄し、次いで、PBSA中で1:200に希釈したFcブロック中に4で20分間再懸濁した。細胞をPBSA中で洗浄し、次いで、APCコンジュゲート化抗体タイトレーション、抗ヒトCD3 Alexa Fluor(登録商標)700(Biolegend、カタログ番号300424)、抗ヒトCD56 BB700(BD、カタログ番号566573)、抗ヒトCD16 V450(BD、カタログ番号644489)(PBSA中で希釈)を含有する抗体カクテル中に再懸濁し、4で2時間インキュベートした。細胞をPBSA中で洗浄し

50

、BD Symphonyフローサイトメーターを用いるフローサイトメトリーによって分析した。

【0510】

カニクイザルPBMC(Worldwide Primates、カタログ番号bc347H)を、PBSA中で洗浄し、ウェルあたり 2×10^5 個の細胞の密度で96ウェルプレート中に播種し、次いで、Live/Dead Aqua stain(Thermo Fisher、カタログ番号L34957)(PBS中で1:1000希釈)とともに室温で20分間インキュベートした。細胞をPBSA中で洗浄し、次いで、PBSA中で1:200に希釈したFcブロック中に4で20分間再懸濁した。細胞をPBSA中で洗浄し、次いで、APCコンジュゲート化抗体タイトレーション、抗ヒトCD3 APC-Cy(商標)7(Biolegend、カタログ番号557757)、抗ヒトNKp80 PE(Biolegend、カタログ番号346706)、抗ヒトCD16 V450(BD、カタログ番号644489)(PBSA中で希釈)を含有する抗体カクテル中に再懸濁し、4で2時間インキュベートした。細胞をPBSA中で洗浄し、BD Symphonyフローサイトメーターを用いるフローサイトメトリーによって分析した。

10

【0511】

データを、FlowJoソフトウェアを使用して分析した。ヒトNK細胞を、CD3陰性/CD16陽性/CD56陽性マーカーによって特定した。カニクイザルNK細胞を、CD3陰性/CD16陽性/NKp80陽性マーカーによって特定した。各濃度におけるNK細胞のうちCD161陽性パーセンテージを計算し、Graphpad Prismにエクスポートした。EC₅₀値を、3パラメータの非線形回帰適合を用いて計算した。

20

【0512】

図10A~10Bは、ヒトPBMC(図10A)及びカニクイザルPBMC(図10B)への抗CD161抗体の結合を示すグラフである。

【0513】

hPBMC及びcPBMCへの抗CD161結合を表17に示す。

【0514】

【表17】

表 17

	hPBMC EC50 (nM)	cPBMC (EC50 (nM)
Ab8	4.6	6.5
Ab9	2.3	3.9
Ab13	1.2	1.6
Ab15	2.9	2.6
Iso Ctrl	184.3	487.7

30

【0515】

表17及び図10A~10Bに示すように、抗体は、用量依存的に、PBMC集団中のヒト及びカニクイザル初代NK細胞に結合した。

40

【0516】

実施例11 - 細胞型特異性を試験するための、ヒトPBMCに結合する抗CD161抗体のプロファイリング

CD161を発現することが知られているヒトPBMC中の免疫細胞集団にのみ特異的に結合する抗CD161抗体の能力を評価した。ヒトPBMC内で、粘膜関連インバリアントT(MAIT)細胞がCD161を強く発現することが示されている(Martin, et al., PLoS Biol., 2009, 7(3): e1000054)が、一方、B細胞、単球及び樹状細胞などの他の免疫細胞型は、CD161の発現を欠く。

50

【0517】

ヒトPBMC(Hemacare、カタログ番号20062234)を、1×PBS中で洗浄し、ウェルあたり250,000個の細胞の密度で96ウェルプレート中に播種し、次いで、Live/Dead Aqua stain(Thermo Fisher、カタログ番号L34957)(PBS中で1:1000希釈)とともに室温で20分間インキュベートした。細胞を染色緩衝液(3%ウシ胎児血清及び0.2mM EDTAを有する1×PBS)中で洗浄し、次いで、染色緩衝液中で1:200に希釈したFcブロック中に4 で20分間再懸濁した。細胞を染色緩衝液中で洗浄し、次いで、30nMのAPC コンジュゲート化抗CD161抗体、抗ヒトCD3 Alexa Fluor(登録商標)700(Biolegend、カタログ番号300424)、抗ヒトCD56 BB700(BD、カタログ番号566573)、抗ヒトCD16 BV786(Biolegend、カタログ番号302046)、抗ヒトCD8 BV711(Biolegend、カタログ番号301044)、抗ヒトTCR α 7.2 BV421(Biolegend、カタログ番号351794)、抗ヒトCD11c FITC(Biolegend、カタログ番号371516)、抗ヒトCD4 APC-Cy7(Biolegend、カタログ番号300518)、抗ヒトCD14 PE-Cy7(Biolegend、カタログ番号367112)及び抗ヒトCD20 PE(Biolegend、カタログ番号302306)(染色緩衝液中で希釈)を含有する抗体カクテル中に再懸濁し、4 で30分間インキュベートした。細胞を染色緩衝液中で洗浄し、BD Symphonyフローサイトメーターを用いるフローサイトメトリーによって分析した。

【0518】

データを、FlowJoソフトウェアを使用して分析した。ヒトMAIT T細胞を、CD3陽性/TCR α 7.2陽性マーカーによって特定した。ヒトB細胞を、CD3陰性/CD20陽性マーカーによって特定し、ヒト単球を、CD3陰性/CD14陽性マーカーによって特定し、ヒト樹状細胞を、CD3陰性/CD11c陽性マーカーによって特定した。様々な細胞のCD161 MFIを30nMで計算し、GraphPad Prismにエクスポートした。

【0519】

図11は、ヒトPBMC中の免疫細胞集団(MAIT T細胞、B細胞、単球、樹状細胞)への抗CD161抗体の結合を示す棒グラフである。

【0520】

アイソタイプ対照に対する、それぞれの細胞への抗CD161結合のMFI変化倍率を表18に示す。

【0521】

【表18】

表 18

	MAIT T細胞 (CD3+ TCR Vb7.2+)	B細胞 (CD20+)	単球 (CD14+)	樹状細胞 (CD11c+)
Ab8	2.99078341	1.147165	1.0114895	1.160389898
Ab9	4.746543779	1.307884	0.9524005	1.012848914
Ab13	4.350230415	0.987828	0.8354534	0.79973416
Ab15	6.963133641	1.077455	0.9146492	1.007089056

【0522】

表18及び図11に示すように、抗CD161抗体は、ヒトPBMC中のB細胞、単球及びDC(アイソタイプ対照に対する変化倍率 / =1)よりも高い特異性(アイソタイプ対照に対する変化倍率 1)でヒト初代MAIT T細胞に結合した。

【0523】

実施例12 - Ab9のFc領域におけるN297Aアミノ酸置換は、Fc RIIへの結合を低減し、Fc RI及びFc RIIIへの結合を排除した

この実施例は、野生型ヒトIgG1抗体(「WT」)と比較した場合の、CD161に対するモノクローナル、非グリコシル化ヒトIgG1抗体であるAb9の、Fc R及びFcRnに対する結合親和性を試験した。

10

20

30

40

50

【0524】

IgG抗体のFc部分は、免疫細胞上に見出されるFc受容体と会合した場合の特異的な免疫機能に関連する様々な領域を有する。IgGについての3つの特異なFc受容体(Fc R)であるFc RI、Fc RII、及びFc RIIIは、単球、リンパ球、多形核細胞(PMN)を含む、ヒト骨髓系細胞に関連していることが知られている。これらのFc Rのうちの1つとのIgGのFc部分の会合は、IgGのFab部分に特異的な抗原を発現する細胞の細胞溶解をもたらし得る。

【0525】

ヒトIgG1であるAb9は、CD161の、そのリガンドCLEC2Dへの結合を遮断する。Fc受容体への結合を消失させ、あらゆる望ましくない細胞溶解を排除するために、Ab9を、Fc領域におけるアラニン(A)からアスパラギン(N)への置換(N297A)を用いて操作した。

【0526】

この実施例に記載される実験は、アラニンからアスパラギンへの操作されたアミノ酸スイッチが、Fc 受容体RI、RIIA、RIIB/C、RIIIA、及びRIIIBへのAb9の結合を排除するか又は著しく低減するのに有効であることを実証する。この変異は、Fc Rとは異なる位置でIgG1のものに結合する、FcRnへの結合を著しく変化させなかった。それは、IgGの長い半減期の原因となる再循環受容体であり、したがって、Ab9の活性に影響を与えない。

【0527】

ELISAによるFc 受容体結合

抗体Ab9の結合 簡潔に述べると、ブロッキング緩衝液を有するストレプトアビジン被覆透明96ウェルプレートと、洗浄緩衝液で3回洗浄した。100 µL/ウェルのビオチン化Fc R(PBSA中で0.25 µg/mL)を、プレートマップに従ってプレートに添加した。プレートを室温で1時間インキュベートした。インキュベーション中、Ab9及びWTを、カップパ軽鎖に対するマウス抗体(Abcam抗カップ)とともに2:1の比で室温で1時間ブレインキュベートした。次いで、プレートを洗浄緩衝液で3回洗浄した。100 µL/ウェルの3倍、7点、タイトレートIgG複合体又はIgG単独(PBSA中)を、プレートマップに従って添加した(IgG複合体について25,000 ng/mLの最高濃度、IgG単独について500 ng/mLの最高濃度)。プレートを、室温で2時間インキュベートし、次いで、洗浄緩衝液で3回洗浄した。100 µL/ウェルのHRPコンジュゲート化Fab-抗ヒトFab断片(特異的、PBSA中で1:5000希釈)を、プレートに添加し、続いて、室温で1時間インキュベートした。次いで、プレートを洗浄緩衝液で3回洗浄し、続いて、HRP基質(TMB(TMB又は等価物、すなわち、Seracare Life Sciences Inc, Fisherカタログ番号50-674-93)、100 µL/ウェル)を添加した。発色したら、停止溶液を添加し(100 µL/ウェル)、プレートを450 nmの吸光度で読み取った。EC₅₀値を、3パラメータの非線形回帰を用いて計算した。

【0528】

図14A~14Bは、ELISAアッセイ形式を示し、これは、Fc RI(図14A)並びにFc RII及びFc RIII(図14B)への可溶性受容体結合を示す。ビオチン化Fc RIを、「Fc RI-bio」と示す。図15A~15Eは、Fc 受容体であるFc RI(図15A)、Fc RIIA(図15B)、Fc RIIB/C(図15C)、Fc RIIIA(図15D)、及びFc RIIIB(図15E)へのAb9の結合キネティクスを示すELISA結合曲線である。

【0529】

図15A~15Eに示すように、Ab9のFc領域におけるアラニン(A)からアスパラギン(N)への置換(N297A)は、野生型ヒトIgG1と比較して、Fc RIIへの結合を低減し、Fc RI及びFc RIIIへの結合を排除した。Fc RIIA(R167)及びFc RIIA(H167)は、ヒトIgG2をライゲートするそれらの能力が異なる、Fc RIIAの2つのアレルバリエーションを表す。同様に、Fc RIIIAアレルであるF176及びV176は、細胞外ドメイン中の位置176における1つのアミノ酸が異なり、ヒトIgG1及びIgG3に結合するそれらの能力が異なる；F176は、低結合アレルであり、V176は、高結合である。

【 0 5 3 0 】

表 21: ELISAによって決定した EC₅₀ 値。表で使した略語: n.b.- 結合なし。

	FcγRI	FcγRIIA (H167)	FcγRIIA (R167)	FcγRIIB/C	FcγRIIA (F176)	FcγRIIA (V176)	FcγRIIB
Ab9	n.b.	752.1	127.2	5659	n.b.	n.b.	n.b.
WT	29.6	137.1	58.6	808	5368	311.7	n.b.
相対的親和性	0	0.18	0.46	0.14	0	0	0

10

【 0 5 3 1 】

OctetによるFc 受容体結合

Fc 受容体へのAb9の結合キネティクスを、Octetシステム(ForteBio)でバイオレイヤー干渉法によっても評価した。図16Aは、OctetによるFcRn結合法を示す。pH5.0 octet緩衝液中の3 μg/mLのAcro FcRn-Bioを、ストレプトアビジンバイオセンサーに90秒間ロードした。180秒間の会合(100nM、3倍、7点タイトレーション、pH5.0緩衝液)及び600秒間のpH5.0緩衝液中の解離を測定した。結果を、ForteBio Data Analysis 12.0.2.11ソフトウェアを使用して分析した。会合中に固定化されたロードサンプルを含み、アナライトを含まない参照サンプルウェルを、各サンプルから差し引いた。上位3つの濃度を、非特異的作用及び不十分なモデル適合性に起因して除外した。キネティック定数を、全体的な1:1キネティック結合モデルを使用して計算した。

20

【 0 5 3 2 】

ELISAアッセイと同様に、FcRnへのしっかりとした結合が、Ab9及びWTの両方について観察された。試験した4つの濃度にわたって、良好な1:1モデル適合性も観察された。図16B~16Cに示すように、Octet形式の感度の増加は、N297A変異が、FcRnへのAb9の結合を著しく変化させないことを明らかに実証した。Ab9及びWTについての計算K_D値は、それぞれ、0.086nM及び0.13nMであった。

【 0 5 3 3 】

実施例13 - 抗CD161抗体であるAb9は、CLEC2D媒介性阻害を逆転させ、NK細胞脱顆粒及びIFN- γ 産生を回復させる

30

この実施例は、NK細胞上のCD161の、標的細胞上のCLEC2Dとの相互作用を遮断することによって、NK細胞死滅の阻害を逆転させる抗CD161抗体Ab9の能力を評価する。簡潔に述べると、NK細胞の活性が、抗CD161抗体Ab9の存在下及び非存在下において、CLEC2Dの細胞表面発現を有する標的細胞、対、その表面上にCLEC2Dを有しない標的細胞について異なるかどうかを決定するために、この実施例を実行した。CD107aを、NK細胞の脱顆粒のマーカーとして利用し、IFN- γ の分泌を、NK細胞活性化の追加尺度として調べた。

【 0 5 3 4 】

K562脱顆粒アッセイ

NK細胞を、NK単離キットを使用して、ヒトPBMC(RTD165及びPBMC-030(MCB-117))から単離し、IL-2で一晩刺激した。アッセイ内で表現型及び機能について、単離されたCD56⁺ NK細胞(エフェクター)を研究するために、8色フローサイトメトリー抗体パネルを設計した。IL-2刺激NK細胞(エフェクター細胞)を、予め規定されたプレートマップに従って、マイクロタイタープレートのウェルに添加した。試験品(Ab9又はアイソタイプ対照(D1.3_hIgG1_N297Aを陰性対照として使用した))を、300nMで開始して、0.018nMまで4倍希釈としてエフェクター細胞に添加し、氷上で30分間インキュベートした。標的細胞を、光から保護して、Cell Trace Violet(CTV)とともに室温で20分間インキュベートした。インキュベーション後、標的細胞を、HI-FBSとともに5分間インキュベートし、次いで、遠心分離した。適切な標的細胞(対照(K562-GFP細胞)又はCLEC2D⁺(K562-CLEC2D))を、最終エフェクター:標的比1:5でエフェクター細胞に添加

40

50

し、37 / 5%CO₂で4時間インキュベートした。細胞を2回洗浄し、FACS緩衝液中に再懸濁した。表現型決定抗体(CD3-APC-Cy7、LIVE/DEAD(商標)Fixable Near-IR、TCR -APC-Vio770、CD19-APC-Cy7、CD56-BB700、CD107a-PE、IFN -FITC)を添加し、短時間インキュベートし、その後、細胞を洗浄し、Fix/Perm緩衝液中に20分間再懸濁した。細胞を再度洗浄し、FACS緩衝液中に一晩に入れた。翌日、細胞を遠心分離し、洗浄した。この後、抗IFN 抗体による細胞内染色を行った。細胞を遠心分離し、FACS緩衝液に再懸濁し、その後、Symphony Cell Analyzer(BD Biosciences)で分析した。 %CD107⁺細胞及び%IFN- 細胞を測定した。

【0535】

図17A~17Hに見られるように、NK細胞を抗CD161抗体(Ab9)とともにブレインキュベートし、その後、CLEC2Dを過剰発現するK562細胞と共培養した場合、CD107a及びIFN- の両方の発現が増加した。CLEC2Dが標的K562細胞上に存在しない場合、NK細胞におけるCD107a発現に対するAb9抗体の影響はなかった(図17B及び17F)。さらに、アイソタイプ対照抗体の存在下で影響は見られなかった。ドナーRTD165由来のPBMCは、脱顆粒(図17A)及びIFN アッセイ(図17C)において用量依存的に応答した。EC₅₀値は、脱顆粒について0.2nM、IFN について0.3nMであった。図17E~17Hに見られるように、ヒトドナーPBMC-030(MCB117)からの脱顆粒(図17E)及びIFN- の分泌(図17G)は、用量反応を示した。脱顆粒及びIFN 曲線の両方についてのEC₅₀は、0.3nMであった。

【0536】

このデータは、CD161⁺ NK細胞の、CLEC2D発現標的細胞との相互作用が、NK細胞の活性化を阻害することを示唆する。Ab9の存在は、NK細胞による細胞傷害性脱顆粒だけでなく、IFN- の発現を回復させ、この効果は、アイソタイプ対照抗体の存在下では観察されなかった。NK細胞活性化の回復は、CD161活性を直接刺激することによってではなく、CD161/CLEC2D相互作用の阻害によって生じる。

【0537】

実施例14 - ヒトNK細胞は、抗CD161抗体の存在下においてCLEC2D発現標的細胞のより高い細胞傷害性を示す

この実施例は、NK細胞上のCD161の、標的細胞上のCLEC2Dとの相互作用を遮断することによって、CLEC2D発現標的細胞のNK細胞死滅を増強する抗CD161抗体(Ab9)の能力を評価する。

【0538】

NK細胞の表面上のCD161の、そのリガンドCLEC2Dとの相互作用は、NK細胞の死滅機能を阻害することが以前に示されており(実施例6及び13を参照)、これを、抗CD161抗体を使用して回復させることができる。

【0539】

直接的死滅アッセイ

簡潔に述べると、NK細胞を、2人の健康なドナーの凍結ヒトPBMCから単離し、IL-2で一晩刺激した。次いで、IL-2刺激NK細胞(エフェクター細胞)を、予め規定されたプレートマップに従って、マイクロタイタープレートのウェルに添加した。試験品(Ab9又はアイソタイプ対照(D1.3_hIgG1_N297Aを陰性対照として使用した))を、300nMで開始して、0.02nMまで4倍希釈としてエフェクター細胞に添加し、氷上で30分間インキュベートした。パーキットリンパ腫細胞株Raji細胞(高レベルのCLEC2Dを内因的に発現する標的細胞株、CLEC2D⁺標的細胞)を、光から保護して、Cell Trace Violet(CTV)を用いて室温で20分間染色した。CTVによる染色後、標的細胞を、熱不活性化FBSとともに5分間インキュベートし、次いで、遠心分離して、すべての非結合CTVを除去した。CLEC2D⁺標的細胞を、最終エフェクター:標的比1:1でエフェクター細胞に添加し、37 / 5%CO₂で4時間インキュベートした。細胞を2回洗浄し、FACS緩衝液中に再懸濁し、続いて、FVD-Near IRで染色した。翌日、細胞を遠心分離し、FACS緩衝液中に再懸濁し、その後、CTV⁺ FVD⁺細胞に対してゲーティングすることによって%死標的細胞に

10

20

30

40

50

についてSymphony(商標)Cell Analyzer(BD Biosciences)で分析し、Flow Jo(商標)で分析した。NK細胞媒介性細胞傷害性を、%CTV⁺FVD⁺集団を分析することによって測定した。図18A(ドナー#1)及び18B(ドナー#2)に見られるように、Ab9は、NK細胞媒介性細胞傷害性の用量依存的な増加を示し、0.01nMのAb9は、全く有効性を示さず、細胞傷害活性は、両方のドナーについて1nMで飽和し、NK細胞機能を増強する分子の高い効力を示す。

【0540】

Ab9抗CD161抗体の存在下では、CD161とCLEC2Dとの間の相互作用は、効率的に遮断される(実施例13において以前に示した)。この実施例は、遮断活性が、CD161を発現するヒトNK細胞の細胞溶解機能の増強につながり、内因的に高レベルのCLEC2Dを発現する標的細胞を死滅させることを示す。この効果は、0.3nMという低いAb9濃度で生じ、活性の飽和は1nMで達成された。

10

【0541】

実施例15 - 抗CD161抗体の存在下における抗原性ペプチドリコールアッセイにおける増強されたT細胞活性化

この実施例は、CLEC2D(単球由来DC上に発現する)とのCD161(T細胞上に発現する)相互作用を遮断することによって、抗原特異的エフェクターメモリーCD4⁺T細胞の再活性化を増強する抗CD161抗体Ab9の能力を評価する。

【0542】

実施例7及び8において以前に示したように、抗CD161抗体は、関連抗原を提示する標的細胞上に発現したCLEC2DとのCD161の相互作用を遮断することによって、操作されたJurkat T細胞株における抗原媒介性T細胞受容体シグナル伝達を増加させることができる。この実施例は、抗CD161抗体(Ab9)処理が、ヒトPBMCから増殖した初代ヒトT細胞のエフェクターメモリーサブセットの再活性化を増強するかどうかを試験する。

20

【0543】

様々な病原体からの感染は、抗原性ペプチド特異的エフェクターT細胞の活性化及び増殖をもたらす。これらのペプチドに対するメモリーT細胞は、感染性因子が除去された後、長く循環中に残存する。ヒト末梢血由来のペプチド反応性メモリーT細胞は、HLA結合抗原性ペプチドによる提示後に再活性化され、増殖することができ、これは、抗原特異的メモリーT細胞リコール応答と呼ばれる。ペプチドプールを使用して、単一ドナーから複数のT細胞前駆体を増殖させることができる。リコールアッセイは、これらの前駆体頻度をさらに増大させることができ、PD-1及びTIGITを含む免疫チェックポイント分子を上方制御することが示されている。以前の研究は、エフェクターメモリーCD4⁺及びCD8⁺T細胞のサブセットが、CD161を発現することを示している(Truong et al. (2019) NATURE COMM., 10:2263を参照)。この実施例は、Ab9処理が、抗原特異的エフェクターメモリーT(EM)細胞によるサイトカイン産生の増強及び増殖の増加(Ki-67発現によって測定した場合)をもたらすことを示す。

30

【0544】

抗原ベースのT細胞メモリーリコールアッセイ

簡潔に述べると、CD14⁺単球を、MiltenyiのClassical Monocyte isolation kitを使用して、ネガティブ選択によってドナーから単離した。100ng/ml GMCSF及び20ng/ml IL-4を補充したDC分化培地中で精製CD14⁺単球を培養することによって、単球を、樹状細胞(MoDC)に分化させた。ドナーD10637(Hemacare)(ドナー6と呼ばれる)から精製されたCD14⁺単球を、100ng/ml GMCSF及び20ng/ml IL-4の存在下で、12ウェルプレート中にウェルあたり1×10⁶個の細胞で培地1ml中でプレATINGした。400µlの培地を、1日置き(2日目、4日目、及び6日目)に除去して廃棄し、サイトカインを補充した500µlの新しい培地で置換した。6日目に、MoDCを、1µg/ml LPS及び100ng/ml IFN γ で48時間刺激して、CD161リガンドであるCLEC2Dの発現を誘導した(Germain et al. (2011) J. BIOL. CHEM., 286(44):37964-37975を参照)。1µg/ml CEFXペプチド(JPT、カタログ番号PM-CEFX-2)を補充した完全培地中でP

40

50

BMCを24時間培養することによって、PBMCから自己T細胞を増殖させた。完全培地中でPBMCを2回洗浄することによって、非結合ペプチドを除去した。次いで、細胞を、6ウェルプレートの中の1つのウェルに完全培地4ml中でさらに48時間プレATINGした。3日目に、PBMCを洗浄し、計数した。細胞を、2.5ng/ml IL-2、5ng/ml IL-7、及び5ng/ml IL-15を補充した完全培地中で 7.5×10^5 /mlでプレATINGした。培地を、サイトカインを補充した完全培地中で、5日目に交換した。T細胞培養物は、 1.5×10^6 /mlの密度を超えなかった。7日目に、MoDCを、CEFXペプチド(10ng/ml)に37℃で2時間曝露した。次いで、CEFXペプチド上で増殖した自己T細胞を、抗体なしで、又は0.02nM ~ 100nMの範囲の濃度のアイソタイプ対照抗体(D1.3アイソタイプ対照ヒトIgG1(N297A))又は抗CD161抗体(Ab9)のいずれかとともに、 1×10^5 個の細胞/ウェルの濃度で96ウェルプレート中にプレATINGした。ペプチドでパルスしたMoDCを、PBSで2回洗浄し、次いで、完全培地中に再懸濁し、最終濃度 0.5×10^5 個のMoDC/ウェルで自己T細胞を有するウェルに添加した。細胞を、37℃で24時間共培養した。細胞を、培養の最終6時間にプレフェルジンAに曝露して、サイトカイン(IFN γ)及びKi-67発現の細胞内染色を可能にした。細胞をウェルから回収し、Fc受容体をブロッキングし、その後、フローサイトメトリー用の抗体の以下のパネルで表面染色した:

10

【0545】

細胞を洗浄し、次いで、固定し、透過処理した(Cytofix/Cytoperm kit)

- Near IR(Live/Dead stain);
- APC-CD8(クローンHIT8a);
- BV605-CD4(クローンRPA-74);
- BV711-CD45RO(クローンUCHL1);及び
- BV421-CD161(クローンHP-3G10)

20

【0546】

細胞を洗浄し、次いで、製造業者の推奨に従って、固定し、透過処理した(Cytofix/Cytoperm kit、カタログ番号BD 554714)。細胞内染色を、以下の抗体を用いて実施した:Alexa-488 Ki67(クローンKi-67)及びPE-IFN γ (クローンB27)。細胞を、FACS染色緩衝液(PBS+1%FCS)中で3回洗浄し、Symphony(商標)Cell Analyzer(BD Biosciences)で分析した。データを、Flow Jo(商標)で分析し、GraphPad PRISM(商標)を使用してプロットした。統計学を、Graphpad PRISMを使用して実施した。P値を、スチューデントt検定を使用して、反復データセットから分析した。

30

【0547】

メモリーリコールアッセイにおける抗CD161抗体(Ab9)の効果を調べるために、CMVに対して血清陽性であり、事前にCEFXペプチド刺激に応答することが試験されたドナー由来のPBMCを利用した。樹状細胞(MoDC)に分化した単球を活性化して、CLEC2Dの発現を増加させた。同時に、自己T細胞を活性化し、CEFXペプチド上で7日間増殖させた。活性化後、MoDCを、10ng/mlのCEFXペプチドでパルスし、Ab9又はアイソタイプ対照の存在下で、又は抗体処理の非存在下で、CEFXペプチド上で以前に増殖させた自己T細胞とともに24時間共培養した。共培養に続いて、T細胞マーカーであるCD45RO(メモリーT細胞について)、CD161(非交差反応性抗体クローンを使用して)についてのフローサイトメトリー染色、並びにIFN γ 及びKi67について細胞内染色を行った。CD161を発現するCD45RO $^+$ EM CD4 T細胞は、CLEC2D発現MoDCの存在下で、CD161を発現しないCD4 EM細胞よりも低いIFN γ 産生及び低い増殖(Ki67発現によって測定した場合)を有し、このことは、CD161が、T細胞活性化の負の調節因子であることを示唆した。しかし、図19A~19Bに示すように、Ab9を使用して、CLEC2DとのCD161相互作用を遮断した場合、サイトカイン産生及び増殖の両方は、アイソタイプ対照と比較して有意に増加した。さらに、Ab9による処理は、CD161 $^+$ T細胞に見られるサイトカイン及び増殖応答を、CD161を発現していないT細胞と同様のレベルに増加させ(図19A~19B;CD161 Pos対CD161 neg)、このことは、Ab9が、moDC上のCLEC2Dの存在によって抑制されたCD161 $^+$ 細胞の活性を回復させることを示唆した。

40

50

【0548】

実施例16 - 抗CD161抗体(Ab9)は、抗原特異的ヒトCD8⁺ T細胞のサイトカイン産生を増強する

この実施例は、T細胞上のCD161の、標的細胞上に発現したCLEC2Dとの相互作用の遮断による、Raji標的細胞との共培養におけるMART-1特異的T細胞のサイトカイン産生を増強する抗CD161抗体(Ab)の能力を評価する。

【0549】

腫瘍微小環境内のT細胞からのサイトカインの産生は、抗腫瘍免疫において重要な役割を果たす。しかし、腫瘍浸潤T細胞は、阻害性分子を発現することができ、これは、それらのそれぞれのリガンドに結合すると、T細胞エフェクター機能を抑制するように機能する。T細胞上のCD161とそのリガンドCLEC2Dとの間の相互作用は、以前の研究でT細胞サイトカイン産生を阻害することが示されている(Mathewson et al. (2021) CELL, 184(5), 1281-1298を参照)。抗CD161抗体(Ab9)は、CLEC2D発現標的細胞の存在下でJurkat T細胞によるIL-2産生を回復させることができる。この実施例は、Ab9が、CD161発現初代ヒトT細胞及びCLEC2D発現バーキットリンパ腫標的細胞株(Raji)とのインビトロ共培養中にこの抑制作用を逆転させることを示す。共培養中のAb9の投与は、濃度依存的に、CD8⁺ T細胞からのインターフェロンガンマ(IFN γ)、インターロイキン-2(IL-2)及び腫瘍壊死因子アルファ(TNF α)の産生を有意に増強した。

【0550】

MART-1抗原特異的T細胞サイトカインアッセイ

このアッセイに利用したT細胞は、T細胞によって認識される黒色腫抗原-1(MART-1)と呼ばれる抗原に特異的であった。この抗原は、正常なメラノサイト上で発現し、悪性黒色腫サンプル上で高度に発現し、したがって、腫瘍関連抗原(TAA)として挙動する。MART-1の抗原性ペプチド(ELAGIGILTV)は、MHCクラスIのHLA-A2サブタイプの状況で提示される。健康な個体は、インビトロ増殖及び再活性化の際に強力な抗腫瘍溶解活性を示すことができる、高頻度の循環MART-1 T細胞を有する。本実験では、これを活用して、MART-1特異的CD8⁺ T細胞をエフェクターとして使用し、ペプチドロードHLA-A2⁺腫瘍細胞株を標的細胞として使用する、抗原特異的ヒトT細胞機能アッセイを開発した。最初にエフェクター細胞を生成するために、MART-1 T細胞を、MART-1ペプチドでパルスされる自己抗原提示細胞の存在下で、プライムし、活性化し、増殖させた。増殖後、これらの抗原特異的T細胞を、細胞選別によって濃縮し、続いて、MART-1ペプチドでペプチドパルスされる標的細胞との共培養により再活性化した。再活性化の際に、T細胞サイトカイン応答を評価した。

【0551】

簡潔に述べると、MART-1抗原を認識するヒトCD8⁺ T細胞を、およそ3週間かけて増殖させ、PBMCから選別した。再活性化の48時間前に、MART-1特異的T細胞を、細胞選別(BD Melody(商標))によってCD161のそれらの発現について濃縮した。Ab9及び対応するアイソタイプ対照抗体を、96ウェルポリプロピレンプレートの第1列において、T細胞培地200 μ L中で400nM(最終濃度の4倍)に希釈した。抗体を、20 μ Lを180 μ L T細胞培地に移すことによって、プレート全体にわたって10倍に段階希釈した。MART-1特異的T細胞を、抗体(Ab9又はアイソタイプ対照)とともに30分間ブレインキュベートし、次いで、MART-1ペプチドロード又はペプチドなしのRaji細胞とともに一晚共培養した(およそ20時間)。各サンプルからの上清の半分を、製造業者の説明書(Meso Scale Diagnostics、すなわちMSD、U-PLEX Immuno-Oncology Group 1(カタログ番号K151AEL2))に従って、サイトカイン(グランザイムB、IFN γ 、IL-2及びTNF α)分泌分析のために回収した。プレフェルジンAを共培養物に添加し、続いて、IFN γ 発現の細胞内検出のためにさらに6時間インキュベートした。共培養物を、V底アッセイプレートに移し、1:1000のNEAR-IR Live/Dead stain、1:20の抗ヒトCD8a APC、1:200の抗ヒトCD161 BV421、及び1:20の抗ヒトCD19 PEを含有する表面染色マスターミックス(FACS緩衝液中で希釈)で染色した。30分のインキュベーション後、細胞を、固

10

20

30

40

50

定緩衝液を用いた30分間のインキュベーションによって固定した。プレートを、FACS緩衝液中に再懸濁し、次いで、ホイルに包み、4℃で一晩置いた。プレートをスピンし、上清を除去し、共培養物を、1×透過処理緩衝液(10×ストック透過処理緩衝液をUltra Pure水中で1:10希釈)で洗浄した。このステップをもう一回繰り返した。次いで、共培養物を、1:20の抗ヒトIFN- γ FITCを含有する細胞内染色マスターミックス(1×透過処理緩衝液中で希釈)とともにインキュベートした。共培養物を再びスピンし、1×透過処理緩衝液で洗浄し、FACS緩衝液中に再懸濁し、FACS Symphony(商標)で分析した。次いで、データをFlow Jo(商標)で分析し、続いて、GraphPad(商標)Prismでグラフ化及び統計解析を行った。

【0552】

サイトカイン産生を誘発するために、MART-1特異的T細胞を、インビトロで23日間増殖させ、続いて、Ab9又はアイソタイプ対照の存在下におけるペプチドロードRaji標的細胞との共培養により再活性化した。Rajiは、CD161についてのリガンドであるCLEC2Dを内因的に発現するパーキットリンパ腫細胞株であり、MART-1ペプチドの外因的ローディングを可能にするためにHLA-A0201を過剰発現するように操作された。

【0553】

アイソタイプ対照と比較して、Ab9の投与は、IFN- γ 産生T細胞の頻度の濃度依存的増加をもたらした(図20A、 $EC_{50}=1.429\text{ nM}$ 又は $0.2\text{ }\mu\text{g/ml}$)。Ab9はまた、IFN- γ 染色のMFIの濃度依存的増加によって明らかのように、サイトカイン産生量を増加させた(図20B、 $EC_{50}=0.4363\text{ nM}$ 若しくは $0.06\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、並びに 8.931 nM 若しくは $1.29\text{ }\mu\text{g/ml}$ の EC_{90})。Ab9を含有する共培養物はまた、IL-2(図20C、 $EC_{50}=0.3590\text{ nM}$ 若しくは $0.0521\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、並びに 3.231 nM 若しくは $0.4685\text{ }\mu\text{g/ml}$ の EC_{90})及びTNF- α (図20D、 $EC_{50}=0.1966\text{ nM}$ 若しくは $0.0285\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、並びに 1.769 nM 若しくは $0.2565\text{ }\mu\text{g/ml}$ の EC_{90})の分泌の濃度依存的増加を示した。グランザイムBは、MSDにより検出不能であり、一方、分泌IFN- γ レベルは、標準曲線範囲を超えていた。サイトカインの読み取り値の概要を表19に提供する。

【0554】

【表19】

表 19: MART-1 抗原特異的 T 細胞サイトカインアッセイからのサイトカイン読み取り値の概要。

サイトカイン 読み取り値	EC50 (nM)	EC50 ($\mu\text{g/ml}$)	EC90 (nM)	EC90 ($\mu\text{g/ml}$)
IFN γ %	1.429	0.2072	到達せず	到達せず
IFN γ MFI	0.4363	0.0633	8.931	1.295
IL-2	0.359	0.0521	3.231	0.4685
TNF- α	0.1966	0.0285	1.769	0.2565

【0555】

MART-1特異的CD161⁺ CD8⁺ T細胞及びCLEC2D発現Raji標的細胞の共培養物へのAb9の投与により、T細胞サイトカイン産生が有意に回復した。これは、IFN- γ 陽性細胞の増加、並びにIL-2及びTNF- α のより高い産生を含み、このことは、Ab9の存在下におけるCD161⁺ MART-1 T細胞の多機能性の増加を示唆した(表19)。全体として、これらの研究は、抗腫瘍利益の提供における抗体媒介性CD161遮断の潜在性を実証する。

【0556】

実施例17 - Ab9によるCD161-CLEC2D相互作用の遮断は、初代抗原特異的ヒトMART-1 T細胞の抗腫瘍細胞傷害性の回復をもたらす

この実施例は、T細胞上のCD161の、標的細胞上に発現したCLEC2Dとの相互作用の遮断による、Raji標的細胞との共培養におけるMART-1特異的T細胞の細胞傷害機能を増強する抗CD161抗体(Ab9)の能力を評価する。

【0557】

実施例13及び14に示すように、抗CD161抗体(Ab9)は、ヒトNK細胞脱顆粒及び細胞溶解機能を回復させることができる。この実施例は、Ab9が、CD161発現初代ヒトT細胞及びCLEC2D発現パーキットリンパ腫標的細胞株(Raji)とのインビトロ共培養中にこの抑制作用を逆転させることを示す。共培養中のAb9の投与は、濃度依存的に、CD8⁺ T細胞からの細胞死誘導性セリンプロテアーゼであるグランザイムBの産生を有意に増強し、それらの細胞傷害機能を上昇させた。

【0558】

MART-1抗原特異的T細胞細胞傷害性アッセイ

実施例16と同様に、このアッセイで利用したT細胞は、MART-1に特異的であった。最初にエフェクター細胞を生成するために、MART-1 T細胞を、MART-1ペプチドでパルスされる自己抗原提示細胞の存在下で、プライムし、活性化し、増殖させる。増殖後、これらの抗原特異的T細胞を、細胞選別によって濃縮し、続いて、MART-1ペプチドでペプチドパルスされる標的細胞との共培養により再活性化する。再活性化の際、標的細胞のT細胞媒介性死滅を、その細胞溶解機能の尺度として評価する。

【0559】

簡潔に述べると、MART-1抗原を認識するヒトCD8⁺ T細胞を、およそ3週間かけて2人のドナー由来のPBMCから増殖させ、選別した。次いで、再活性化の48時間前に、MART-1特異的T細胞を、細胞選別(BD Melody(商標))によってCD161のそれらの発現について濃縮した。Ab9及び対応するアイソタイプ対照抗体を、96ウェルポリプロピレンプレートの第1列において、T細胞培地200 µL中で400 nM(最終濃度の4倍)に希釈した。抗体を、20 µLを180 µL T細胞培地に移すことによって、プレート全体にわたって10倍に段階希釈した。MART-1特異的T細胞を、抗体(Ab9又はアイソタイプ対照)とともに30分間プレインキュベートし、次いで、MART-1ペプチドロード又はペプチドなしのRaji細胞のいずれかとともに一晚共培養した(およそ20時間)。プレフェルジンAを共培養物に添加し、続いて、グランザイムB発現の細胞内検出のためにさらに6時間インキュベートした。共培養物を、V底アッセイプレートに移し、1:1000のNEAR-IR Live/Dead stain、1:20の抗ヒトCD8a APC、1:20の抗ヒトCD161 BV421、及び1:20の抗ヒトCD19 PEを含有する表面染色マスターミックス(FACS緩衝液中で希釈)で染色した。抗CD19抗体は、標的細胞株Rajiを標識するために使用され、Live/Dead stainは、死細胞によって優先的に取り込まれる。この染色法は、フローサイトメトリーによるMART-1 T細胞との共培養後の生存標的細胞の定量化を可能にする。30分のインキュベーション後、細胞を、固定緩衝液を用いた30分間のインキュベーションによって固定した。プレートを、FACS緩衝液中に再懸濁し、次いで、ホイルに包み、4℃で一晩置いた。プレートをスピンし、上清を除去し、共培養物を、1×透過処理緩衝液(10×ストック透過処理緩衝液をUltraPure水中で1:10希釈)で洗浄した。このステップをもう一回繰り返した。次いで、共培養物を、1:50の抗ヒトグランザイムB BV510を含有する細胞内染色マスターミックス(1×透過処理緩衝液中で希釈)とともに30分間インキュベートした。共培養物を再びスピンし、1×透過処理緩衝液で洗浄し、FACS緩衝液中に再懸濁し、FACS Symphony(商標)で分析した。次いで、データをFlow Jo(商標)で分析し、続いて、GraphPad(商標)Prismでグラフ化及び統計解析を行った。

【0560】

グランザイムB産生及びT細胞媒介性標的細胞死滅を誘発するために、MART-1特異的T細胞を、インビトロで23日間増殖させ、続いて、Ab9又はアイソタイプ対照の存在下におけるペプチドロードRaji標的細胞との共培養により再活性化した。図21A~21Bに示すように、アイソタイプ対照と比較して、Ab9の投与は、2人の異なるドナー由来のグランザイムB産生T細胞の頻度の濃度依存的増加をもたらした。これらの分析からのEC₅₀値及びEC₉₀値を表20に示す。

【0561】

さらに、図21C~21Dにおいて共培養物からの生存標的細胞の回収の有意な減少によって示されるように、Ab9はまた、アイソタイプ対照と比較して、MART-1特異的T細胞

の直接的細胞傷害機能を増強した。両ドナーについて1 nMで細胞傷害飽和点が観察され、このことは、T細胞媒介性標的細胞死滅の増強における抗体の高い効力を示した。

【0562】

【表20】

表 20: グランザイム B 読み取り値の概要

ドナー#	EC50 (nM)	EC50 (μg/ml)	EC90 (nM)	EC90 (μg/ml)
ドナー1	0.2772	0.0402	2.535	0.3676
ドナー2	0.3974	0.0576	3.991	0.5787

10

【0563】

MART-1特異的CD161⁺ CD8⁺ T細胞及びCLEC2D発現Raji標的細胞の共培養物へのAb9の投与により、T細胞エフェクター機能が有意に回復した。これは、Ab9の存在下における、グランザイムB陽性細胞の増加、及びCD161⁺ MART-1 T細胞の直接的なT細胞媒介性細胞傷害性の証拠を含み、標的細胞生存の有意な減少をもたらした。全体として、これらの研究は、T細胞細胞傷害性を回復させることによる抗腫瘍利益の提供におけるCD161-CLEC2D相互作用の抗CD161媒介性遮断の潜在性を実証する。

【0564】

実施例18 - 健康なドナー由来のヒトPBMCにおける固定化又は可溶性抗CD161抗体(Ab9)によるサイトカイン放出の評価

20

この実施例は、2つの異なるアッセイ形式:プレート結合型及び可溶型の抗体を使用して、6人の健康なドナー由来のPBMCにおいてサイトカイン放出を誘導するAb9についての潜在性を評価する。抗CD20リツキシマブ(抗CD20 B細胞枯渇抗体であり、がん患者のサブセットにおいてサイトカインストームを刺激することが知られている)及び抗CD3ムロモナブ(公知のCRS誘導剤)を、それらの対応するアイソタイプ対照とともに、対照として使用した。評価した炎症誘発性サイトカインは、IL-2、IL-10、IL-1、IL-4、IL-6、TNF- α 、及びIFN- γ を含んだ。

【0565】

サイトカイン放出症候群(CRS;又はサイトカインストーム)は、ある特定の治療用抗体の使用に関連するまれな潜在的副作用であり、罹患及び死亡をもたらし得る。ヒト末梢血単核細胞(PBMC)を使用するインビトロサイトカイン放出アッセイは、患者におけるサイトカインストームを予測するための有用な評価であることが示されている(Vessillier et al. (2015) J. IMMUNOL. METHODS, 424, 43-52を参照)。重要なマーカーは、IL-2、IFN- γ 、TNF- α 、IL-6、IL-1、及びIL-10を含んだ。

30

【0566】

サイトカイン放出アッセイ

プレート結合形式では、試験品抗体(Ab9、N297Aを有するアイソタイプ対照D1.3、リツキシマブ、ムロモナブ、抗CD3についてのマウスIgG2Aアイソタイプ対照(「アイソタイプ対照抗体」)、及びD1.3 IgG₁ WTアイソタイプ対照)を、マイクロタイタープレートの個々のウェルに段階希釈し、室温で2時間インキュベートした。ムロモナブ及びリツキシマブを、1 μg/ウェルでプレーティングし、アイソタイプ対照抗体を、20 μg/ウェルでプレーティングした。2時間後、抗体を1×PBSで2回洗浄して、あらゆる非結合抗体を除去した。

40

【0567】

10 mL氷冷FACS緩衝液を、各PBMCドナー#で標識した6-50 mLのコニカル(conical)に添加して、解凍PBMCの洗浄の準備をした。凍結PBMCを、部分的に解凍するまで37 °Cの水浴中に置き、次いで、FACS緩衝液を用いて調製した適切なチューブに添加した。PBMCを、自動細胞計数機を使用して計数し、遠心分離し、上清を除去した。PBMCを、再懸濁し、抗体で被覆されたマイクロタイタープレート中に2×10⁵個の細胞でウェルあ

50

たり200 μ L中でプレーティングし、次いで、CO₂インキュベーター中で37℃にて48時間インキュベートした。

【0568】

可溶性形式では、段階希釈した抗体を、各ウェルに添加し、ウェルあたり200 μ L中、 2×10^5 個の細胞でPBMCと混合し、次いで、CO₂インキュベーター中で37℃にて48時間インキュベートした。ムロモナブ及びリツキシマブを、5 μ g/mlの最終濃度で添加し、アイソタイプ対照抗体(N297Aを有するアイソタイプ対照D1.3)を、100 μ g/mlの最終濃度で添加した。48時間後、上清を、遠心分離によって収集し、Meso Sector S600機器(Meso Scale Diagnostics, Rockville, MD)で分析するまで-80℃で保存した。MSDアッセイを、製造業者の説明書に従って実施した(サイトカイン分析用MSDキット:U-PLEX Biomarker Group 1 (hu) assays(K15067L-2)。このキットは、U-PLEX形式で、ヒトIFN- γ 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-17A及びTNF- α を検出する試薬を含む)。データ分析を、MSDのDiscovery Workbenchソフトウェアで行い、続いて、GraphPad(商標)Prismでグラフ化及び統計解析を行った。

10

【0569】

図22A~22F及び図23A~23Fは、それぞれ、プレート結合形式及び可溶性形式を使用する、Ab9の存在下でのサイトカイン放出を示す。Ab9を、0.01 μ g/mlから1000 μ g/mlまでの濃度の範囲について試験し、アイソタイプ対照(N297Aを有するアイソタイプ対照D1.3)を、100 μ g/mlで試験した。ムロモナブ及びリツキシマブ並びにそれらの対応するアイソタイプ対照を、インビトロでサイトカイン放出を誘導することが報告されている、5 μ g/mlの濃度で試験した。それぞれのアイソタイプ対照からのデータは、プロット上に示されていないが、それらがアイソタイプ対照(N297Aを有するアイソタイプ対照D1.3)と非常に類似しており、多くの点が定量下限(LLOQ)を下回っていたためである。

20

【0570】

図22A~22F及び図23A~23Fに示すように、ムロモナブによるPBMCの処理は、試験したすべてのサイトカインの放出を有意に刺激した。しかし、PBMCを、固相形式及び水相形式の両方におけるAb9とインキュベートした場合、サイトカイン産生の有意な増加は観察されなかった。さらに、リツキシマブによる処理は、両形式においてサイトカイン放出をもたらさなかったが、但し、可溶性形式のリツキシマブの存在下でサイトカインの高発現を示した単一ドナーを除く(図23A~23F)。抗CD161抗体(Ab9)又はアイソタイプ対照(N297Aを有するアイソタイプ対照D1.3)による非刺激PBMCの処理は、プレート結合形式及び可溶性形式の両方においてサイトカイン放出を誘発しなかった。Ab9の存在下においてより高いサイトカイン産生を示したIL-6プロット(図23F)における単一点が観察されたが、これは単一ドナーに起因し、濃度に基づく応答ではなかった。IL-17A及びIL-4の産生も、Ab9処理について測定したが、ほとんどの値はLLOQ未満であった(データ示さず)。このデータは、Ab9で処置された患者においてサイトカイン放出のリスクが低いことを示唆する。

30

【0571】

実施例19 - Ab9の薬物動態学(PK)及び毒性学評価

40

この実施例は、Ab9のPK及び毒性学評価を示す。カニクイザルで実行した、非GLP用量範囲設定(DRF)研究(それぞれ10mg/kg及び100mg/kgで週1回のAb9の3用量)及び4週間のGLP反復投与毒性学研究(それぞれ10mg/kg、30mg/kg、及び100mg/kgで週1回のAb9の5用量)で、Ab9の毒物動態(TK)を評価した。

【0572】

非GLP DRF毒性学研究

雌性カニクイザル(3匹の雌/群)における投与あたり10mg/kg及び100mg/kgの週1回、合計3回(1、8、及び15日目)の静脈内(IV)スローボラス注射後の、Ab9の忍容性及びPKを評価するために、カニクイザルにおける非最終、非GLP、DRF研究を実行した。

50

【 0 5 7 3 】

表 22: 非 GLP DRF 毒性学研究の研究設計。

群	用量 (mg/kg)	投与体積 (mL/kg)	濃度 (mg/mL)	雌
1	10	5	2	3
2	100	5	20	3

【 0 5 7 4 】

およそ1mLの全血サンプルを、Ab9曝露の決定のために、全動物の末梢静脈から収集した。サンプルを、以下の標的時点で収集した:

- ・1日目の投与前、投与から1時間後、24時間後、及び96時間後;
- ・8日目の投与前及び投与から1時間後;及び
- ・15日目の投与前、投与から1時間後、24時間後、96時間後、168時間後、336時間後、528時間後、672時間後、840時間後、及び1008時間後。

10

【 0 5 7 5 】

血液サンプルからの血清中のAb9の定量化を、適格な生物学的分析法(酵素結合免疫吸着測定法)を使用して実施した。

【 0 5 7 6 】

TKパラメータ推定のために、IVスローボラス投与と整合性のある、Phoenix(登録商標)WinNonlin(登録商標)バージョン8.0を使用する、ノンコンパートメントアプローチを使用した。TKパラメータを、個々のAb9血清濃度及び公称時間から生成した。LLOQ未満の個々の濃度を、TKデータ解析では0として処理した。

20

【 0 5 7 7 】

各用量群についての時間プロファイルに対する平均Ab9血清濃度のプロットを、片対数スケールを使用して、図24に提示する。投与あたり10mg/kg及び100mg/kgの用量で、合計3用量の、Ab9の週1回のIVスローボラス(2~3分にわたる)投与後、雌性サルを、調査した両方のAb9用量レベルで、6匹の動物のうち4匹について、1,008時間まで、0.625 µg/mL(LLOQ)を超える濃度でAb9に全身的に曝露した。観察された最大濃度の時間(T_{max})は、単一又は複数の週1回の用量投与から1時間後に観察された。単一又は複数の週1回の投与後に評価した、10倍用量範囲にわたるAb9への曝露におけるほぼ用量比例的な増加があった(最大観察濃度(C_{max})及び血漿濃度時間曲線下面積(AUC))。蓄積率は、0.53~1.77の間の範囲であった。

30

【 0 5 7 8 】

4週間の回復期間を伴うAb9の4週間のIV GLP毒性及びTK研究

カニクイザルにおける4週間のGLP研究を実行して、週1回、5回(1、8、15、22、及び29日目)のIVスローボラス注射とその後の4週間の回復期間後の、Ab9の潜在的毒性及びTKプロファイルを評価した。動物に、投与あたり10mg/kg、30mg/kg、又は100mg/kgの用量におけるAb9又はビヒクルのみを投与した。

40

【 0 5 7 9 】

表 23: GLP DRF 毒性学研究の研究設計

群	用量 (mg/kg)	投与体積 (mL/kg)	濃度 (mg/mL)	主研究 (30 日目)		回復 (最後の投与から 28 日後)	
				雄	雌	雄	雌
1	0 (ビヒクル)	2	0	3	3	2	2
2	10	2	5	3	3	--	--
3	30	2	15	3	3	--	--
4	100	2	50	3	3	2	2

10

【 0 5 8 0 】

およそ1mLの全血サンプルを、Ab9曝露の決定のために、全動物の末梢静脈から収集した。サンプルを、以下の標的時点で収集した:

- ・ 1日目の投与前、投与から1時間後、24時間後、及び96時間後;
- ・ 8日目の投与前;
- ・ 22日目の投与前、投与から1時間後、24時間後、及び96時間後;及び
- ・ 29日目の投与前、投与から1時間後及び24時間後(すべての動物から);及び投与から96時間後、168時間後、336時間後、504時間後、及び672時間後(すべての回復動物から)

20

【 0 5 8 1 】

Ab9の血清濃度を、検証済みの電気化学発光アッセイを使用して測定した。TKパラメータ推定のために、投与経路と整合性のあるIVボラスモデルを使用する、Phoenix(登録商標)WinNonlin(登録商標)バージョン8.3.4を使用する、ノンコンパートメントアプローチを使用した。TKパラメータを、1、22、及び29日目に個々のAb9血清濃度及び公称時間から生成した。LLOQ未満の個々の濃度を、TKデータ解析では0として処理した。TKパラメータ決定の目的で、8日目の投与前を、投与から168時間後として1日目のデータとともに使用し、29日目の投与前を、投与から168時間後として22日目のデータとともに使用した。各試験日間のTK結果をより良く比較するために、投与から0時間後から24時間後までの血漿濃度-時間曲線下面積(AUC₀₋₂₄)を、すべての試験日について推定した。

30

【 0 5 8 2 】

処理及び性別ごとの時間プロファイルに対する平均Ab9血清濃度のプロットを、片対数スケールを使用して、図25A~25Bに提示する。雄性サルと雌性サルとの間に、Ab9曝露に大きな差は観察されなかった。平均T_{max}は、すべての処理群について投与から1時間後に全般に観察された。Ab9への曝露(C_{max}及びAUC)は、単回IV投与後(1日目)又は複数回投与後(22日目及び29日目)に、用量比例的に、10mg/kgから100mg/kgへの増加するAb9用量とともに増加した。平均排出半減期(T_{1/2})は、投与から142時間後~282時間後の間の範囲であり、これは、mAbについて期待されるPK挙動を示唆した。22日目及び29日目の蓄積率は、すべての処理群について、1.53~2.34の間の範囲であった。

40

【 0 5 8 3 】

全体として、非GLP DRF研究及び4週間のGLP毒性学研究の両方におけるAb9のPK解析は、10mg/kgから100mg/kgまで増加するAb9用量による曝露における用量比例的増加を示した(C_{max}及びAUC)。平均T_{1/2}は、GLP研究について投与から142時間後~282時間後の間の範囲であり、これは、mAbについて期待されるPK挙動を示唆した。上に示すように、投与期間全体を通した10mg/kg及び100mg/kgの用量における飽和受容体占有の証拠にもかかわらず、100mg/kgの用量まで安全性薬理学所見はなかった。

【 0 5 8 4 】

50

本明細書に記載される毒性学及びインビトロ機能活性アッセイからのデータを使用して、21日ごとにIV投与される6mgの用量(60kgの患者体重に基づく0.1mg/kg)が、受容体飽和における有意義な生物学的効果を提供し、必要とする対象によって十分に忍容可能であることが企図される。

【0585】

参照による組み込み

本明細書で言及される特許及び科学文書のそれぞれの全開示内容は、あらゆる目的のために参照によって組み込まれる。

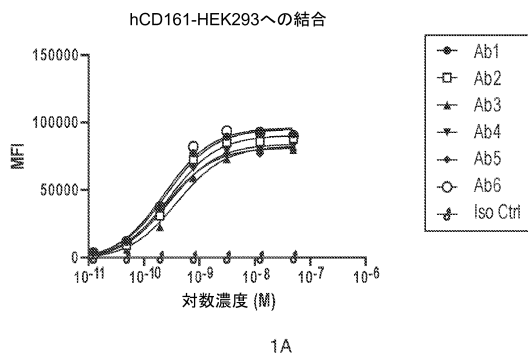
【0586】

均等物

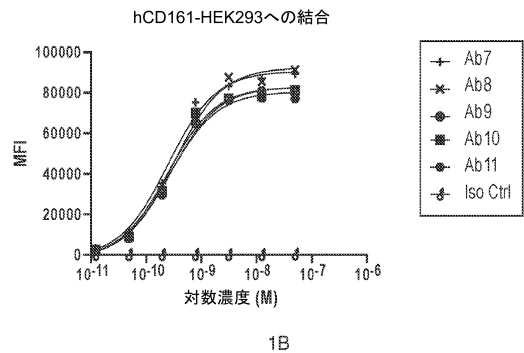
本発明は、その精神又は本質的特徴から逸脱することなく、他の特定の形態で具体化されてもよい。したがって、前述の実施形態は、本明細書に記載される発明を限定するのではなく、すべての点で例示的であると見なされるべきである。したがって、本発明の範囲は、前述の記載ではなく、添付の特許請求の範囲によって示され、特許請求の範囲の意味及び均等の範囲内にあるすべての変更は、その中に包含されることが意図される。

【図面】

【図1A】



【図1B】



10

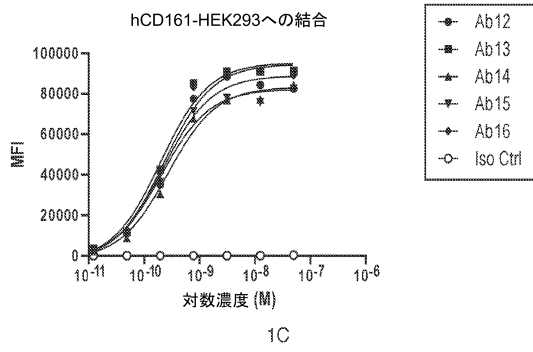
20

30

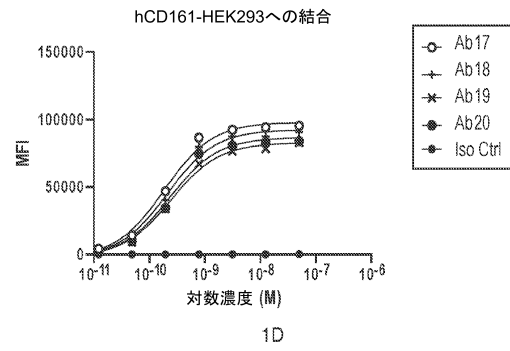
40

50

【 図 1 C 】

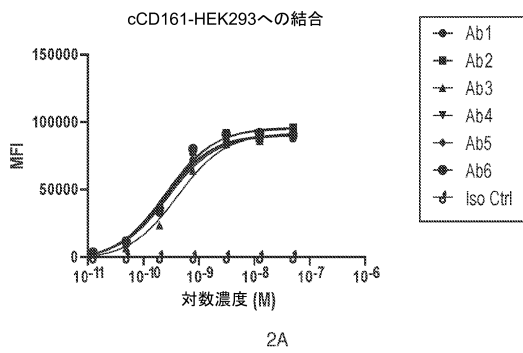


【 図 1 D 】

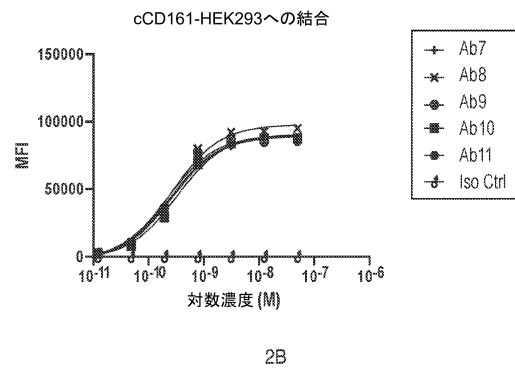


10

【 図 2 A 】



【 図 2 B 】



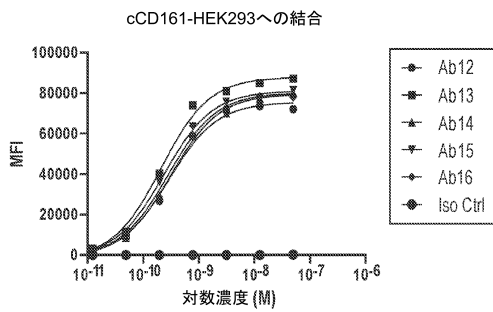
20

30

40

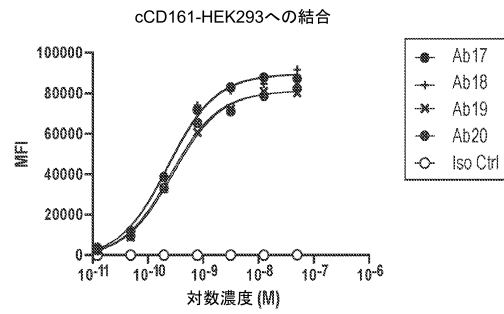
50

【 図 2 C 】



2C

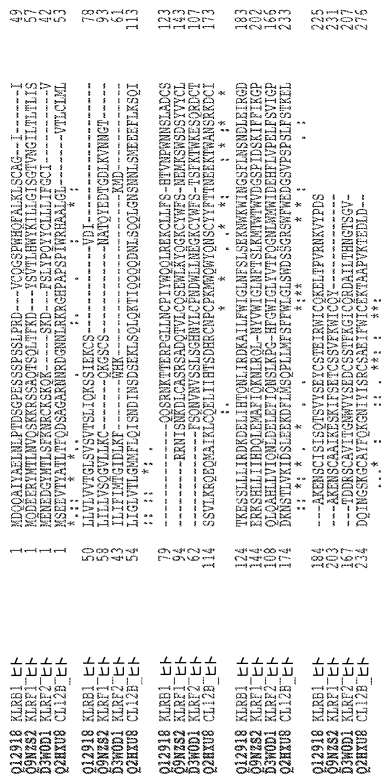
【 図 2 D 】



2D

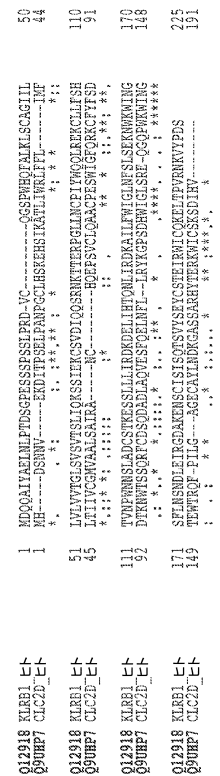
10

【 図 3 】



20

【 図 4 】

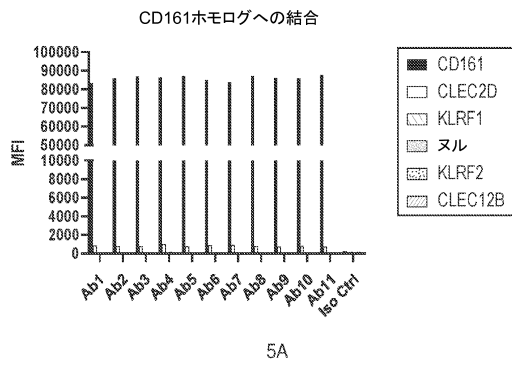


30

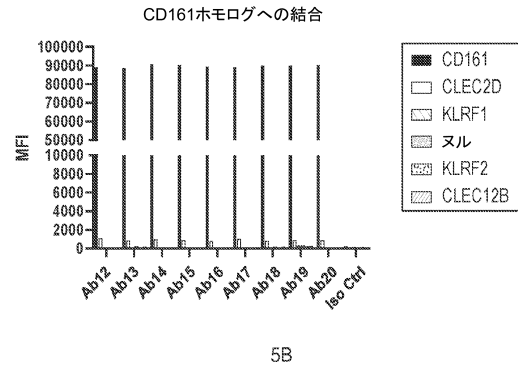
40

50

【図 5 A】

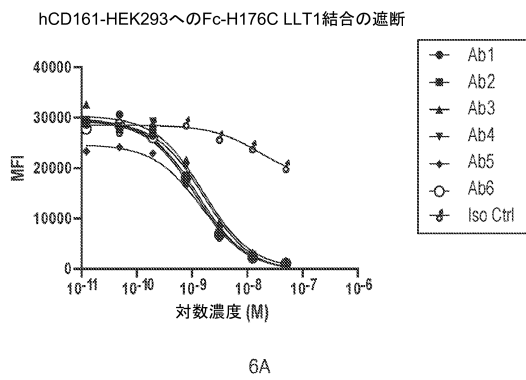


【図 5 B】

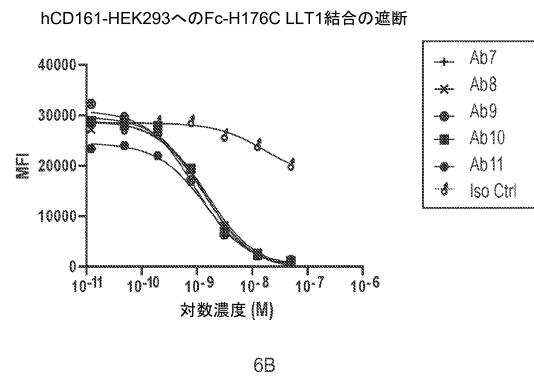


10

【図 6 A】



【図 6 B】



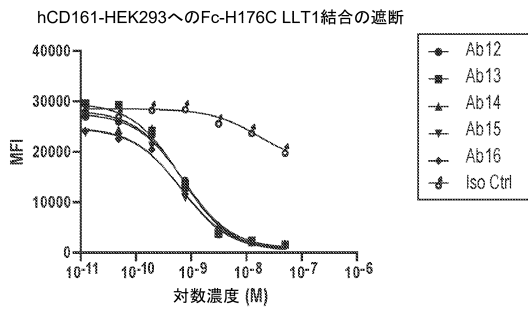
20

30

40

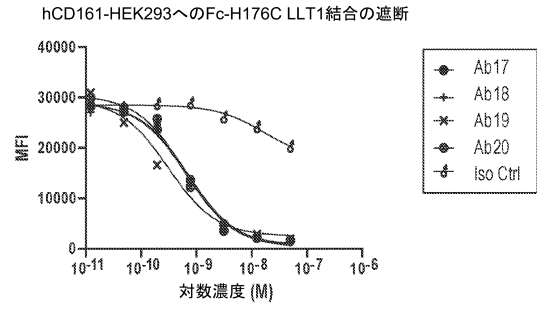
50

【 図 6 C 】



6C

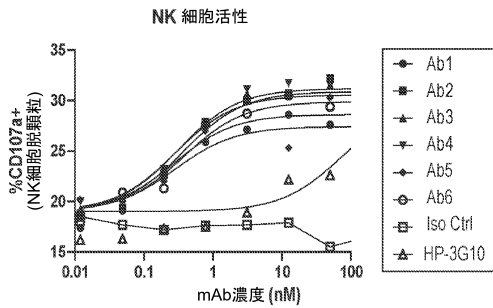
【 図 6 D 】



6D

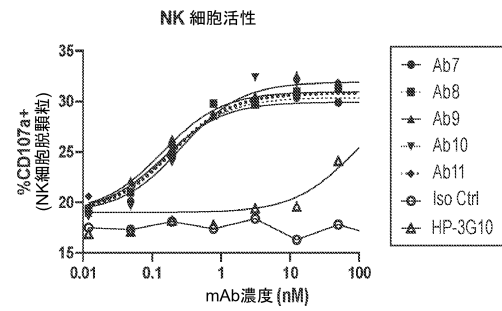
10

【 図 7 A 】



7A

【 図 7 B 】



7B

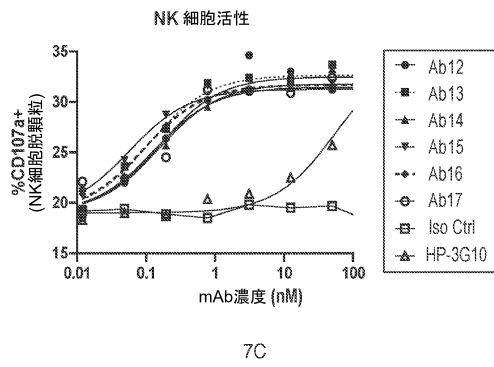
20

30

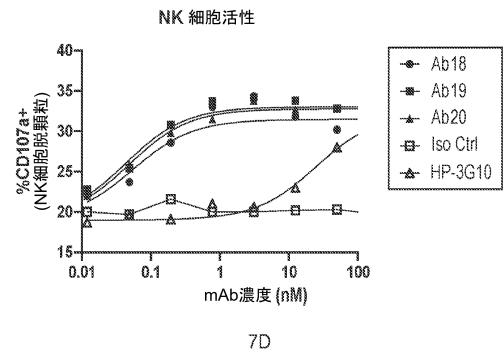
40

50

【 図 7 C 】

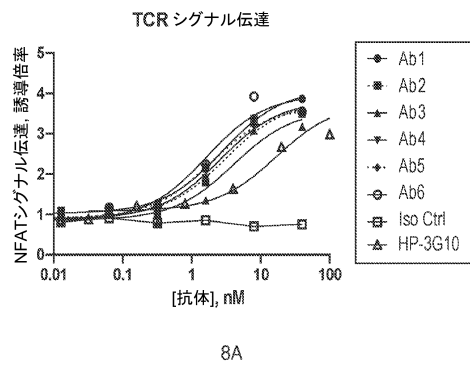


【 図 7 D 】

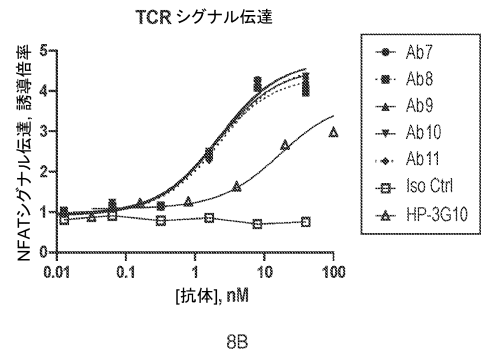


10

【 図 8 A 】



【 図 8 B 】



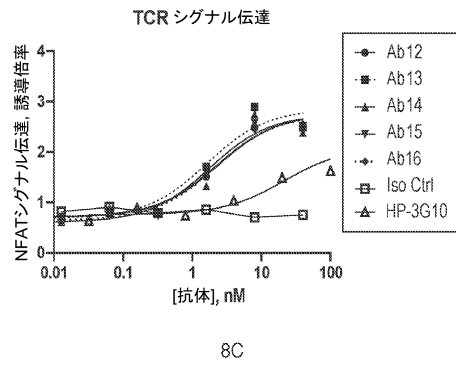
20

30

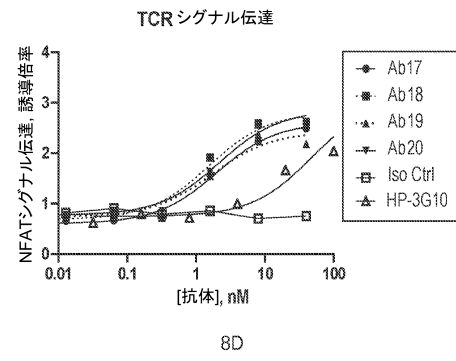
40

50

【図 8 C】

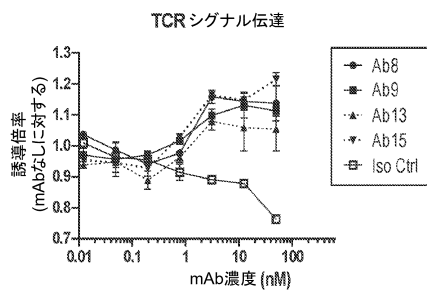


【図 8 D】

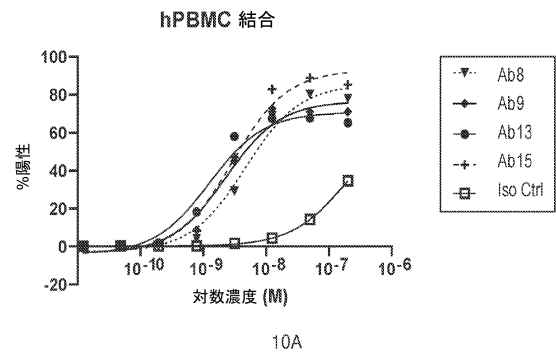


10

【図 9】



【図 10 A】



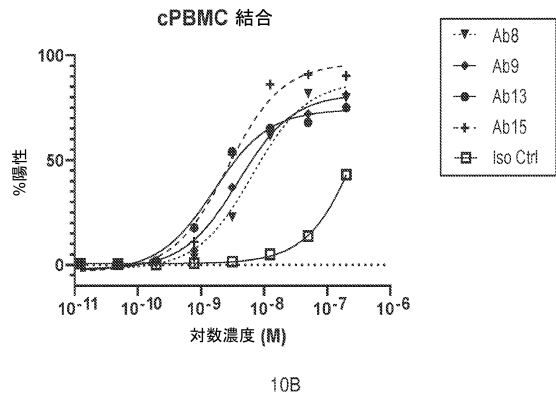
20

30

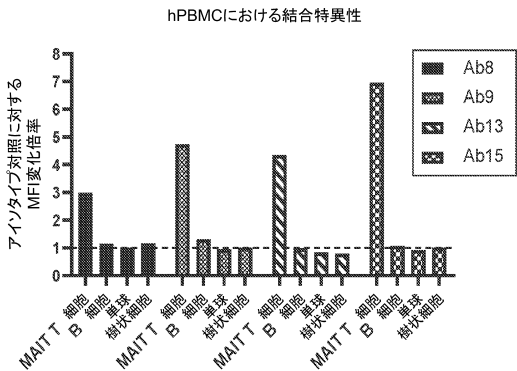
40

50

【 図 1 0 B 】



【 図 1 1 】



【 図 1 2 A - 1 】

Cons 1 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSQAASGFTFTVAAMSWTRQAPGKGLHWVSATSGG/TAYAD
Ab1 1A.STY.....AA.T.Y.....
Ab2 1A.STY.....GV.T.Y.....
Ab3 1T.ERY.....AA.T.Y.....
Ab4 1T.ERY.....AV.T.K.....
Ab5 1T.GQY.....AA.T.Y.....
Ab6 1T.GQY.....AA.T.Y.....
Ab7 1T.GQY.....AA.T.Y.....
Ab8 1T.GTF.....GV.T.Y.....
Ab9 1T.GTF.....AS.T.Y.....
Ab10 1T.SQY.....AV.S.Y.....
Ab11 1T.SQY.....AA.T.Y.....

【 図 1 2 A - 2 】

Cons 63 SVKGRFTISRDNKNTLYIQNSLRAEFTAVYCAKPLDSS/WADFQYINGRGLVTYSS
Ab1 63L.....L.....
Ab2 63L.....L.....
Ab3 63L.....L.....
Ab4 63L.....L.....
Ab5 63L.....L.....
Ab6 63L.....L.....
Ab7 63L.....L.....
Ab8 63L.....L.....
Ab9 63L.....L.....
Ab10 63L.....L.....
Ab11 63L.....L.....

30

40

50

【 1 2 B - 1 】

【 1 2 B - 2 】

	CDR-L1	CDR-L2
Cons	1 DIQCTQSPSSVSAVGDRVTITCRASQ Q ISWLA W YQOKPGKAPR W LLIY W AS W LQ W GVPSRF	
Ab1	1 ...N... ..G.D... ..L.A...S... ..	1 ...A...S... ..
Ab2	1 ...L... ..G.S... ..L.Y...S.D... ..	1 ...Y...S.D... ..
Ab3	1 ...L... ..D.S... ..F.A...A.S... ..	1 ...A...A.S... ..
Ab4	1 ...L... ..G.S... ..L.A...G.S... ..	1 ...A...G.S... ..
Ab5	1 ...L... ..D.S... ..L.F...S... ..	1 ...F...S... ..
Ab6	1 ...L... ..G.S... ..L.A...S... ..	1 ...A...S... ..
Ab7	1 ...L... ..G.S... ..L.A...E.S... ..	1 ...A...E.S... ..
Ab8	1 ...L... ..I.S... ..L.A...S... ..	1 ...A...S... ..
Ab9	1 ...L... ..G.S... ..L.A...S... ..	1 ...A...S... ..
Ab10	1 ...L... ..D.S... ..L.A...A.S... ..	1 ...A...A.S... ..
Ab11	1 ...L... ..G.Y... ..L.A...S... ..	1 ...A...S... ..

【 1 3 A - 1 】

【 1 3 A - 2 】

	CDR-H1	CDR-H2
Cons	1 QVQLVESGGGLV W PGGSLRLSCAASGFTF W YMSWIRQAPGKLEWVS Y ISPSG W TI W YAD	
Ab12	1 ...K... ..AQ... ..S.A... ..	1 ...S.A... ..
Ab13	1 ...K... ..AN... ..A.A... ..	1 ...A.A... ..
Ab14	1 ...K... ..GQ... ..A.A... ..	1 ...A.A... ..
Ab15	1 ...K... ..PQ... ..A.Y... ..	1 ...A.Y... ..
Ab16	1 ...K... ..SD... ..A.A... ..	1 ...A.A... ..
Ab17	1 ...K... ..SD... ..A.Y... ..	1 ...A.Y... ..
Ab18	1 ...K... ..SQ... ..A.A... ..	1 ...A.A... ..
Ab19	1 ...K... ..SQ... ..A.Y... ..	1 ...A.Y... ..
Ab20	1 ...Q... ..SQ... ..A.A... ..	1 ...A.A... ..

10

20

30

40

50

	CDR-L3
Cons	63 SSGSGGIDFLIT W SLQPEDFAT W YTC W Y W SL W LPIT W GGGKVEIK
Ab1	63 ...S... ..A.S.V... ..
Ab2	63 ...S... ..A.S.V... ..
Ab3	63 ...S... ..A.L.V... ..
Ab4	63 ...S... ..A.S.Y... ..
Ab5	63 ...S... ..A.S.K... ..
Ab6	63 ...N... ..A.W.V... ..
Ab7	63 ...S... ..A.S.V... ..
Ab8	63 ...S... ..O.S.V... ..
Ab9	63 ...S... ..H.S.V... ..
Ab10	63 ...S... ..A.D.V... ..
Ab11	63 ...S... ..A.S.D... ..

【 図 1 3 B - 1 】

	CDR-L1	CDR-L2
Cons	DIQTSPSSVSASGDRVTITCRAS ¹ TS ² MLAWYQQKQKAPKLLIYAA ³ LSGGVPSRE ⁴	
Ab12Q D . SS S
Ab13S G . SS E
Ab14Q G . DS S
Ab15Q G . SS S
Ab16Q G . SS G
Ab17Q G . SS S
Ab18Q G . SE S
Ab19Q G . SS S
Ab20Q G . SS A

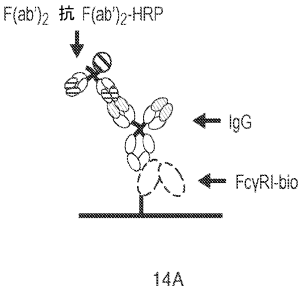
【 図 1 3 B - 2 】

	CDR-L3
Cons	SGSGSGTDFLTITSSLPQEDFATYVCO ¹ ITS ² PTFTGGGTKEIK ³
Ab12A . F P
Ab13V . F P
Ab14V . F P
Ab15S . F P
Ab16V . F P
Ab17V . Q P
Ab18V . A F
Ab19V . F
Ab20V . F

10

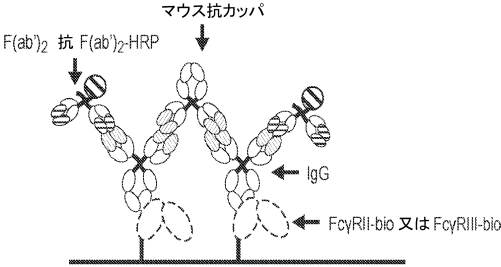
20

【 図 1 4 A 】



14A

【 図 1 4 B 】



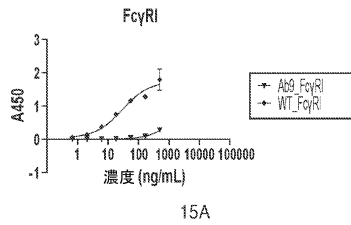
14B

30

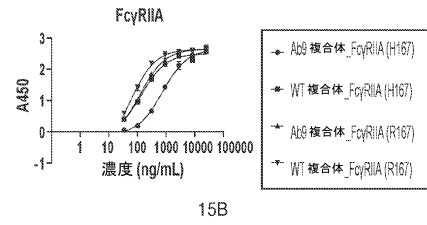
40

50

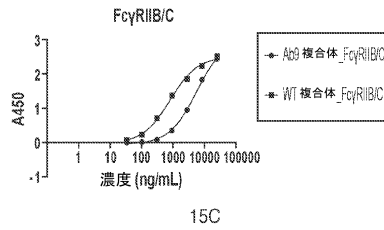
【図 15 A】



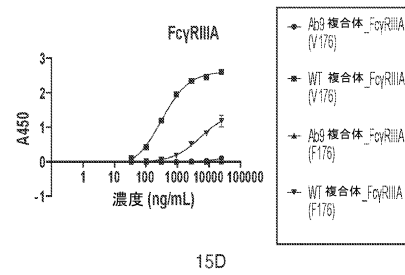
【図 15 B】



【図 15 C】

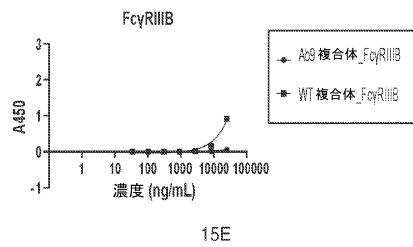


【図 15 D】



10

【図 15 E】



【図 16 A】



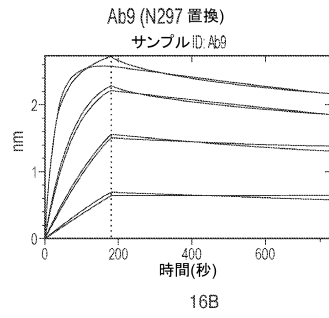
20

30

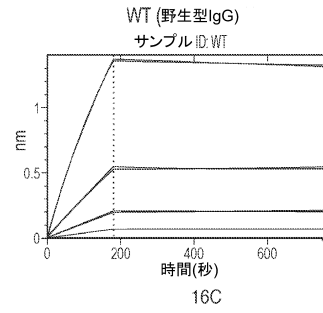
40

50

【図 1 6 B】

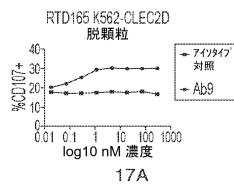


【図 1 6 C】

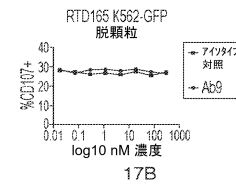


10

【図 1 7 A】

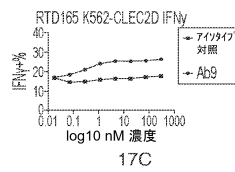


【図 1 7 B】

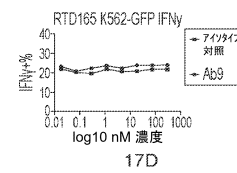


20

【図 1 7 C】



【図 1 7 D】

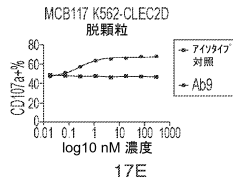


30

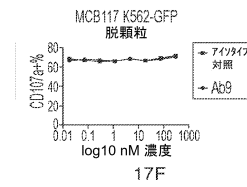
40

50

【図 17 E】

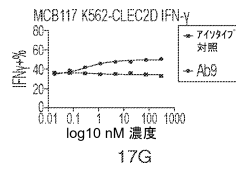


【図 17 F】

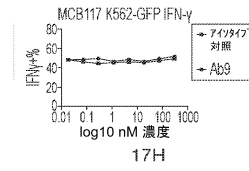


10

【図 17 G】

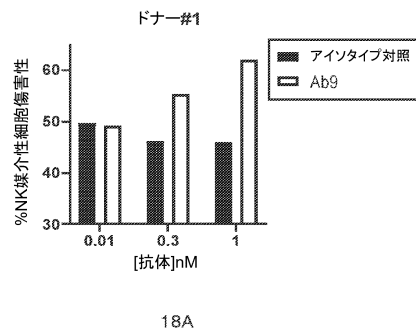


【図 17 H】

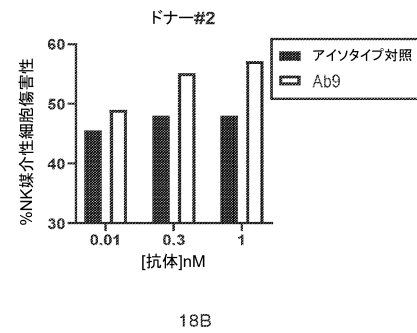


20

【図 18 A】



【図 18 B】

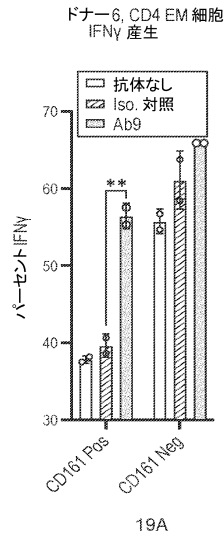


30

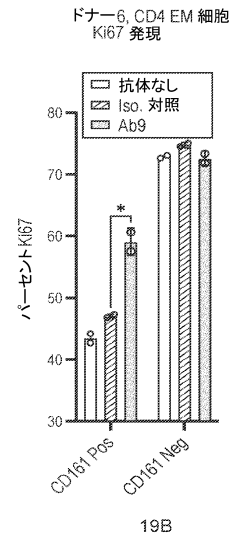
40

50

【図 19 A】

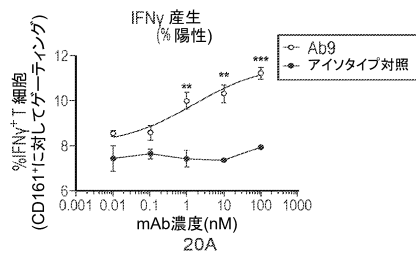


【図 19 B】

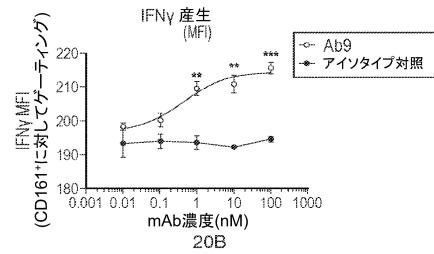


10

【図 20 A】



【図 20 B】



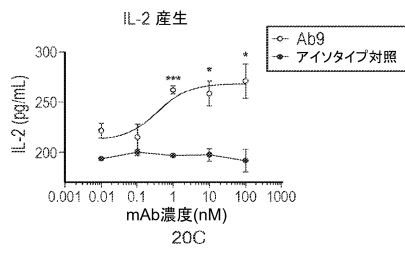
20

30

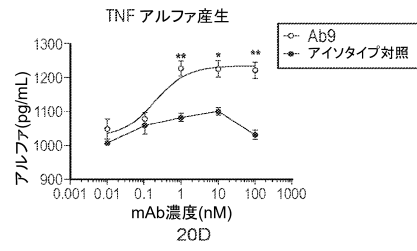
40

50

【図 20C】

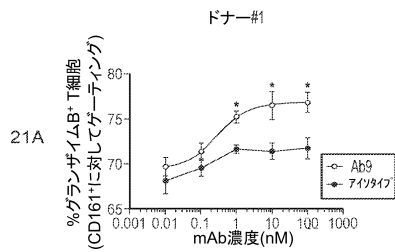


【図 20D】

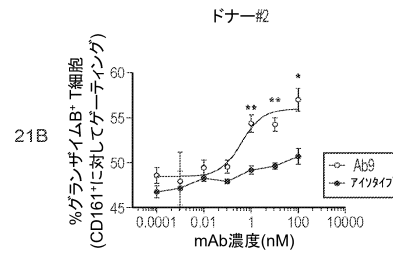


10

【図 21A】

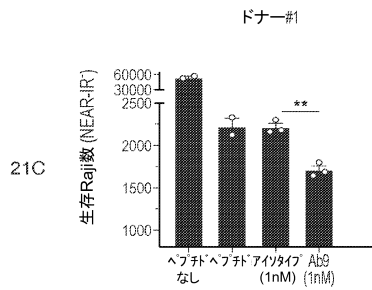


【図 21B】

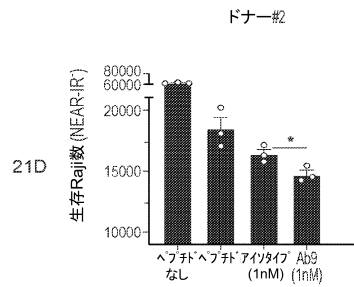


20

【図 21C】



【図 21D】

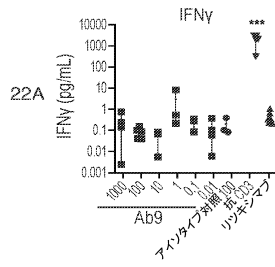


30

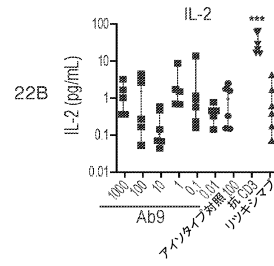
40

50

【図 2 2 A】

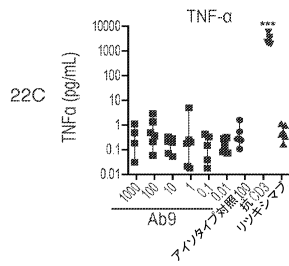


【図 2 2 B】

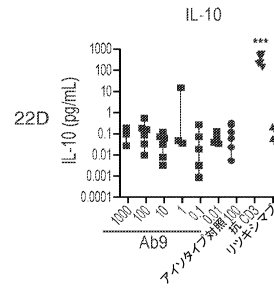


10

【図 2 2 C】

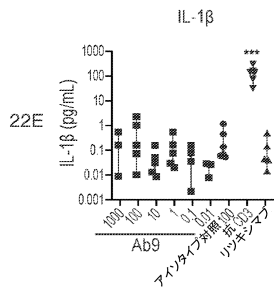


【図 2 2 D】

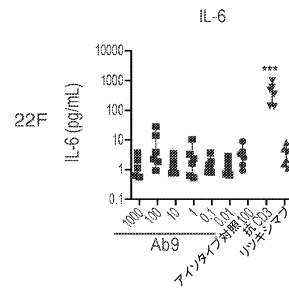


20

【図 2 2 E】



【図 2 2 F】

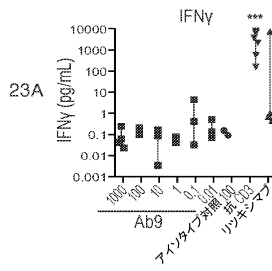


30

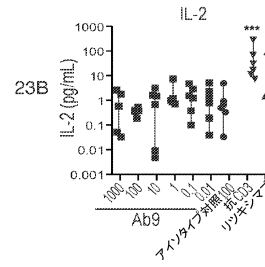
40

50

【図 2 3 A】

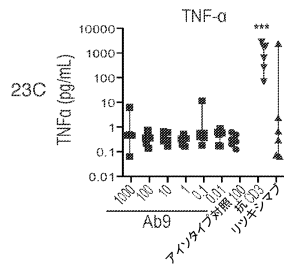


【図 2 3 B】

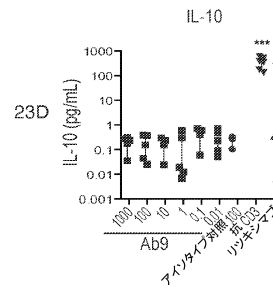


10

【図 2 3 C】

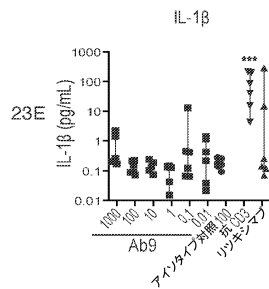


【図 2 3 D】

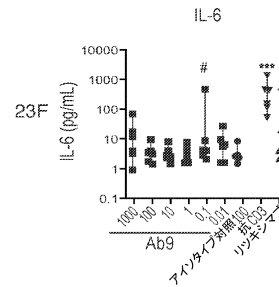


20

【図 2 3 E】



【図 2 3 F】

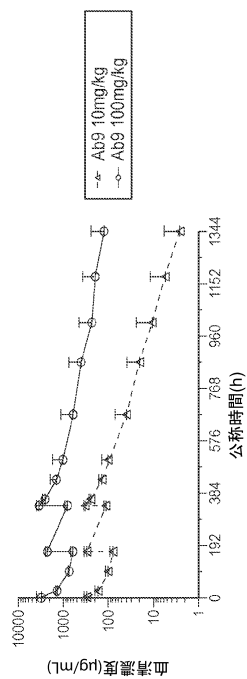


30

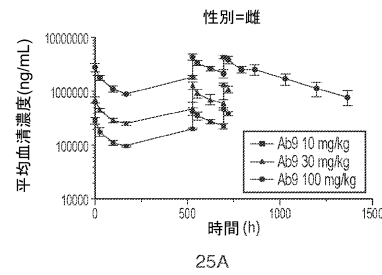
40

50

【 図 2 4 】

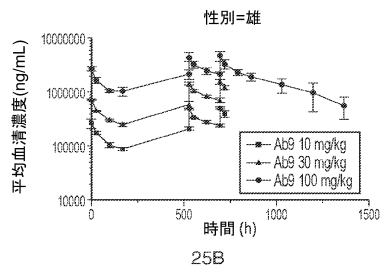


【 図 2 5 A 】



10

【 図 2 5 B 】



30

【 配 列 表 】

2024534265000001.xml

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/075370

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/28 A61P35/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61P C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

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

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019/094983 A1 (BROAD INST INC [US]; MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY [US] ET AL.) 16 May 2019 (2019-05-16) examples 6-8, 11, 12 -----	1-19, 21-37, 39-125
A	WO 2021/080682 A1 (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY [US]; DANA FARBER CANCER INST INC [US]) 29 April 2021 (2021-04-29) examples 1-12 -----	1-125

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

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 November 2022

Date of mailing of the international search report

07/12/2022

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Pflug, Alexander

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2022/075370

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed.
- b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2022/075370

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2019094983 A1	16-05-2019	EP 3710039 A1	23-09-2020
		US 2021363260 A1	25-11-2021
		WO 2019094983 A1	16-05-2019
WO 2021080682 A1	29-04-2021	US 2021122826 A1	29-04-2021
		WO 2021080682 A1	29-04-2021

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

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

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/10

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 N

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 T

A 6 1 P 35/00

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

(特許庁注 : 以下のものは登録商標)

1 . プルロニック

2 . T W E E N

, アリシア レーン 1 1

(72)発明者 ブンコスディ , ジョージ

アメリカ合衆国 0 2 4 7 8 - 3 7 7 6 マサチューセッツ州 ベルモント , アパート 2 , マール
ボロ ストリート 4 9

(72)発明者 フスコ , アレクサンドリア

アメリカ合衆国 0 3 0 3 8 - 5 3 1 2 ニュー ハンプシャー州 デリー , オーバーレッジ ドライ
ブ 3 0

(72)発明者 アーバイン , フラノ

アメリカ合衆国 0 2 1 5 5 マサチューセッツ州 メドフォード , ラルフ ストリート 4 4

(72)発明者 ローゼントラター , エミリー

アメリカ合衆国 0 1 7 5 2 - 3 4 7 6 マサチューセッツ州 マールボロ , パーメンター ロード
4 6 1

(72)発明者 スキャンロン , エリザベス

アメリカ合衆国 0 2 1 3 4 マサチューセッツ州 オールストン , アパート 2 0 2 , ケンブリッジ
ストリート 3 9 8

(72)発明者 バトルス , マイケル

アメリカ合衆国 0 3 7 6 6 ニュー ハンプシャー州 レバノン , ルーセント ドライブ 7

F ターム (参考) 4B064 AG27 CA06 CA19 CC06 CC12 CC24 CE02 CE12 DA05

4B065 AA72X AA93Y AB01 AC14 BA02 BA21 BC03 BC26 BD01 BD14

CA25 CA44

4C085 AA14 BB11 CC23

4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA76 EA20 FA74 GA26