

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-508636

(P2020-508636A)

(43) 公表日 令和2年3月26日(2020.3.26)

| (51) Int. Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|--------------------------------|---------------------|-----------------|
| C 1 2 N 15/13 (2006.01) | C 1 2 N 15/13 Z N A | 2 G 0 4 5 |
| C 1 2 N 15/63 (2006.01) | C 1 2 N 15/63 Z | 4 B 0 6 5 |
| C 1 2 N 1/15 (2006.01) | C 1 2 N 1/15 | 4 C 0 8 4 |
| C 1 2 N 1/19 (2006.01) | C 1 2 N 1/19 | 4 C 0 8 5 |
| C 1 2 N 1/21 (2006.01) | C 1 2 N 1/21 | 4 C 0 8 6 |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 | | (全 73 頁) 最終頁に続く |

(21) 出願番号 特願2018-569136 (P2018-569136)
 (86) (22) 出願日 平成30年2月9日 (2018.2.9)
 (85) 翻訳文提出日 平成31年4月5日 (2019.4.5)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2018/000201
 (87) 国際公開番号 WO2018/146549
 (87) 国際公開日 平成30年8月16日 (2018.8.16)
 (31) 優先権主張番号 62/457,422
 (32) 優先日 平成29年2月10日 (2017.2.10)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(71) 出願人 519001408
 ユーティレックス カンパニー リミテッ
 ド
 大韓民国 08594 ソウル クムチョ
 ンク ガサン デジタル 1-ロー-25
 ダエユン テクノタウン 17 チャ
 スイート # 1401
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 IFN- γ 誘導性制御性T細胞転換性抗癌 (IRTCA) 抗体およびその使用

(57) 【要約】

活性化誘導性TNFR (AITR) ポリペプチドに結合するIFN- γ 誘導性制御性T細胞転換性抗癌 (IRTCA) 抗体およびその抗原結合性フラグメントが提供される。本明細書に記載するIRTCA抗体に関係するさまざまなインビトロおよびインビボ法ならびに組成物も提供される。本方法には、例えばIRTCA抗体またはそのフラグメントを使用して、インビボまたはインビトロでT細胞からのサイトカイン分泌を変化させること、ならびにIRTCA抗体またはそのフラグメントを使用した癌の予防および/または癌の治療的処置が含まれる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) SEQ ID NO:8または24の配列を含む重鎖CDR1、SEQ ID NO:9または25の配列を含む重鎖CDR2、ならびにSEQ ID NO:14、15、16および17から選択される少なくとも1つの配列を含む重鎖CDR3と、

(b) SEQ ID NO:11の配列を含む軽鎖CDR1、SEQ ID NO:12の配列を含む軽鎖CDR2、およびSEQ ID NO:13または18の配列を含む軽鎖CDR3と

を含む、IFN- γ 誘導性制御性T細胞転換性抗腫瘍 (IFN- γ -Inducible Regulatory T Cell Convertible Anti-Cancer) (IRTCA) 抗体またはその抗原結合性フラグメントであって、

SEQ ID NO:8の配列を含む重鎖CDR1、SEQ ID NO:9の配列を含む重鎖CDR2、SEQ ID NO:10の配列を含む重鎖CDR3、SEQ ID NO:11の配列を含む軽鎖CDR1、SEQ ID NO:12の配列を含む軽鎖CDR2、およびSEQ ID NO:13の配列を含む軽鎖CDR3のそれぞれを含むことはない、IRTCA抗体またはその抗原結合性フラグメント。

10

【請求項 2】

以下のいずれか1つを含む、請求項1記載のIRTCA抗体または抗原結合性フラグメント:

(a) SEQ ID NO:3、4、5、6、20および21から選択される配列と少なくとも90%同一な配列を含む重鎖可変ドメイン、

(b) SEQ ID NO:7、22および23から選択される配列と少なくとも90%同一な配列を含む軽鎖可変ドメイン、または

(c) SEQ ID NO:3、4、5、6、20および21から選択される配列と少なくとも90%同一な配列を含む重鎖可変ドメインならびにSEQ ID NO:7、22および23から選択される配列と少なくとも90%同一な配列を含む軽鎖可変ドメイン。

20

【請求項 3】

以下のいずれか1つを含む、請求項1記載のIRTCA抗体または抗原結合性フラグメント:

(a) SEQ ID NO:3、4、5、6、20および21から選択される配列と少なくとも98%同一な配列を含む重鎖可変ドメイン、

(b) SEQ ID NO:7、22および23から選択される配列と少なくとも98%同一な配列を含む軽鎖可変ドメイン、または

(c) SEQ ID NO:3、4、5、6、20および21から選択される配列と少なくとも98%同一な配列を含む重鎖可変ドメインならびにSEQ ID NO:7、22および23から選択される配列と少なくとも98%同一な配列を含む軽鎖可変ドメイン。

30

【請求項 4】

以下のいずれか1つを含む、請求項1~3のいずれか一項記載のIRTCA抗体または抗原結合性フラグメント:

(a) SEQ ID NO:3、4、5、6、20および21から選択される配列を含む重鎖可変ドメイン

(b) SEQ ID NO:7、22および23から選択される配列を含む軽鎖可変ドメイン、または

(c) SEQ ID NO:3、4、5、6、20および21から選択される配列を含む重鎖可変ドメインならびにSEQ ID NO:7、22および23から選択される配列を含む軽鎖可変ドメイン。

【請求項 5】

ヒト活性化誘導性腫瘍壊死因子受容体 (activation-inducible TNFR family receptor) (AITR) 分子に対して $1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-12}$ Mの結合アフィニティー (K_D) を有する、請求項1~4のいずれか一項記載のIRTCA抗体または抗原結合性フラグメント。

40

【請求項 6】

ヒトAITRポリペプチドの細胞外ドメイン内のエピトープに結合する、請求項1~5のいずれか一項記載のIRTCA抗体または抗原結合性フラグメント。

【請求項 7】

ヒトAITRポリペプチドの細胞外ドメイン内のエピトープがSEQ ID NO:19を含む、請求項6記載のIRTCA抗体または抗原結合性フラグメント。

【請求項 8】

50

抗体が、IgG1またはその変種、IgG2またはその変種、IgG4またはその変種、IgAまたはその変種、IgEまたはその変種、IgMまたはその変種、およびIgDまたはその変種から選択される免疫グロブリン定常ドメインを含む、請求項1~7のいずれか一項記載のIRTCA抗体または抗原結合性フラグメント。

【請求項9】

抗体がヒトIgG1であるか、ヒトIgG1を含む、請求項1~8のいずれか一項記載のIRTCA抗体または抗原結合性フラグメント。

【請求項10】

IgG1がSEQ ID NO:26と少なくとも95%同一な配列であるか、SEQ ID NO:26と少なくとも95%同一な配列を含む、請求項9記載のIRTCA抗体または抗原結合性フラグメント。

10

【請求項11】

モノクローナル抗体である、請求項1~10のいずれか一項記載のIRTCA抗体または抗原結合性フラグメント。

【請求項12】

抗体フラグメントが、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')₂フラグメント、Fvフラグメント、ジスルフィド結合したFvフラグメント、scFvフラグメント、単ドメイン抗体、ヒューマボディ(humabody)、ナノボディ、またはダイアボディである、請求項1~8のいずれか一項記載のIRTCA抗体または抗原結合性フラグメント。

【請求項13】

請求項1~12のいずれか一項記載のIRTCA抗体または抗原結合性フラグメントをコードする、核酸分子。

20

【請求項14】

請求項13記載の核酸分子を含む、組換えベクター。

【請求項15】

請求項15記載の組換えベクターおよび/または請求項13記載の核酸分子を含む、宿主細胞。

【請求項16】

細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞、または哺乳動物細胞から選択される、請求項15記載の宿主細胞。

【請求項17】

大腸菌(E.coli)、P.パストリス(P.pastoris)、Sf9、COS、HEK293、Expi293、CHO-S、CHO-DG44、CHO-K1、および哺乳動物リンパ球からなる群より選択される、請求項16記載の宿主細胞。

30

【請求項18】

(a) 請求項1~12のいずれか一項記載のIRTCA抗体もしくは抗原結合性フラグメント、請求項14記載の核酸分子、請求項14記載の組換えベクター、または請求項15記載の宿主細胞と、

(b) 薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物。

【請求項19】

請求項1~12のいずれか一項記載のIRTCA抗体もしくは抗原結合性フラグメント、請求項13記載の核酸、または請求項14記載の組換えベクターを含むかまたはそれを送達する組成物を、対象に投与する工程を含む、処置を必要とする対象を処置する方法。

40

【請求項20】

請求項1~12のいずれか一項記載のIRTCA抗体もしくは抗原結合性フラグメント、請求項13記載の核酸、または請求項14記載の組換えベクターを含むかまたはそれを送達する組成物を、対象に投与する工程を含む、免疫応答の誘導を必要とする対象において免疫応答を誘導する方法。

【請求項21】

50

請求項1～12のいずれか一項記載のIRTCA抗体もしくは抗原結合性フラグメント、請求項13記載の核酸、または請求項14記載の組換えベクターを含むかまたはそれを送達する組成物を、対象に投与する工程

を含む、免疫応答の強化または免疫細胞の活性の増加を必要とする対象において免疫応答を強化するかまたは免疫細胞の活性を増加させる方法。

【請求項22】

対象が癌を有するか、または癌を発症するリスクがある、請求項19～21のいずれか一項記載の方法。

【請求項23】

癌が、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、大腸癌、子宮内膜癌、食道癌、ファロピウス管癌、胆嚢癌、胃腸癌、頭頸部癌、血液癌、咽頭癌、肝癌、肺癌、リンパ腫、黒色腫、中皮腫、卵巣癌、原発性腹膜癌、唾液腺癌、肉腫、胃癌、甲状腺癌、膵癌、腎細胞癌、膠芽腫、および前立腺癌から選択される、請求項22記載の方法。

【請求項24】

対象が、両方による処置を受けるように、電離放射線、化学療法剤、抗体剤、および細胞ベースの治療から選択される1種または複数種の追加抗癌治療を施されたかまたは施される予定である、請求項19～23のいずれか一項記載の方法。

【請求項25】

1種または複数種の追加抗癌治療が、免疫チェックポイント阻害剤、IL-12、GM-CSF、抗CD4剤、シスプラチン、フルオロウラシル、ドキソルピシン、イリノテカン、パクリタキセル、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ1 (IDO1) 阻害剤、またはシクロホスファミドを含む、請求項24記載の方法。

【請求項26】

治療的処置を必要とする対象の治療的処置のためのIRTCA抗体またはその抗原結合性フラグメントの用量を決定する方法であって、

(a) 対象由来の生物学的試料における分泌IFN- γ の測定値を用意または取得する工程であって、前記対象が、ある量の請求項1～12のいずれか一項記載のIRTCA抗体もしくはその抗原結合性フラグメントを含むかまたはそれを送達する組成物を投与されている、工程と、

(b) 前記分泌IFN- γ の測定値を基準値と比較する工程とを含み、

前記分泌IFN- γ の測定値が基準値より高いかまたは低い場合には、投与されるIRTCA抗体またはその抗原結合性フラグメントの量を調節し、それによって、対象の治療的処置のための用量を決定する、前記方法。

【請求項27】

治療的処置を必要とする対象の治療的処置のためのIRTCA抗体またはその抗原結合性フラグメントの用量を決定する方法であって、

(a) 対象由来の生物学的試料における T_{reg} 細胞集団の測定値を用意または取得する工程であって、前記対象が、ある量の請求項1～12のいずれか一項記載のIRTCA抗体もしくはその抗原結合性フラグメントを含むかまたはそれを送達する組成物を投与されている、工程と、

(b) 前記 T_{reg} 細胞集団の測定値を基準値と比較する工程とを含み、

前記 T_{reg} 細胞集団の測定値が基準値より高いかまたは低い場合には、投与されるIRTCA抗体またはその抗原結合性フラグメントの量を調節し、それによって、対象の治療的処置のための用量を決定する、前記方法。

【請求項28】

基準値が、1人もしくは複数人の健常対象に由来する値または1人もしくは複数人の癌と診断された対象に由来する値を含む指標値を含む、請求項26または27記載の方法。

【請求項29】

10

20

30

40

50

生物学的試料が、全血、血漿、腫瘍組織、または血清の試料である、請求項26、27または28記載の方法。

【請求項30】

対象が癌を有するか、または癌を発症するリスクがある、請求項26～29のいずれか一項記載の方法。

【請求項31】

癌が、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、大腸癌、子宮内膜癌、食道癌、ファロピウス管癌、胆嚢癌、胃腸癌、頭頸部癌、血液癌、咽頭癌、肝癌、肺癌、リンパ腫、黒色腫、中皮腫、卵巣癌、原発性腹膜癌、唾液腺癌、肉腫、胃癌、甲状腺癌、膵癌、腎細胞癌、膠芽腫、および前立腺癌から選択される、請求項30記載の方法。

10

【請求項32】

T細胞を請求項1～12のいずれか一項記載のIRTCA抗体または抗原結合性フラグメントと接触させる工程を含む、インビボまたはインビトロでT細胞によるIFN- γ の分泌を増加させるための方法。

【請求項33】

T細胞を請求項1～12のいずれか一項記載のIRTCA抗体または抗原結合性フラグメントと接触させる工程を含む、インビボまたはインビトロでT細胞によるTGF- β の分泌を減少させるための方法。

【請求項34】

T細胞を請求項1～12のいずれか一項記載のIRTCA抗体または抗原結合性フラグメントと接触させる工程を含む、T細胞を1型ヘルパーT(T_H1)細胞に転換する方法。

20

【請求項35】

AITRに対する抗体またはその抗原結合性フラグメントのアフィニティーを検証する方法であって、

T細胞を、請求項1～12のいずれか一項記載のIRTCA抗体またはその抗原結合性フラグメントと接触させる工程と、

前記T細胞からのサイトカイン分泌を測定する工程と

を含み、サイトカイン分泌が、IRTCA抗体の免疫応答強化、抗癌効果、および/または抗腫瘍効果と相関する、前記方法。

【請求項36】

30

T細胞がAITRタンパク質を発現する、請求項32～35のいずれか一項記載の方法。

【請求項37】

T細胞が制御性T細胞(T_{reg} 細胞)である、請求項32～36のいずれか一項記載の方法。

【請求項38】

T細胞がエフェクターT細胞(T_{eff} 細胞)である、請求項32～36のいずれか一項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

40

本願は、2017年2月10日に出願された米国特許出願第62/457,422号に基づく優先権およびその恩典を主張し、前記特許出願の開示は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【0002】

配列表

本明細書は配列表(2018年2月9日に「2012994-0030__SL.txt」という名称の.txtファイルとして電子提出されたもの)に言及する。この.txtファイルは2018年2月9日に作成され、サイズは19,405バイトである。この配列表の全内容は参照により本明細書に組み入れられる。

【背景技術】

50

【0003】

背景

癌は今なお世界の主要死因のうちの1つである。最近の統計では、世界人口の13%が癌で死亡すると報告されている。国際癌研究機関（International Agency for Research on Cancer）（IARC）の推計によると、2012年には、世界中で1410万例の新規癌症例および820万例の癌死症例があった。世界負荷は、2030年までに、人口増加および加齢や、喫煙、不健康な食事および運動不足などのリスク因子への曝露により、新規癌症例2170万例および癌死症例1300万例に拡大すると予想されている。さらに、痛みと癌処置の医療費とは、癌患者にとっても、その家族にとっても、生活の質が低減する原因になる。なによりも、癌が、改良された処置方法を至急見いだす必要のある疾患であることは、明らかである。

10

【発明の概要】

【0004】

概要

本開示は特に、ヒト活性化誘導性TNFRファミリー受容体（activation-inducible TNFR family receptor）（AITR）ポリペプチドに結合する抗体およびそれらのフラグメントを提供する。いくつかの態様において、本発明は、（a）SEQ ID NO:8または24の配列を含む重鎖CDR1、SEQ ID NO:9または25の配列を含む重鎖CDR2ならびにSEQ ID NO:10、14、15、16および17から選択される少なくとも1つの配列を含む重鎖CDR3と、（b）SEQ ID NO:11の配列を含む軽鎖CDR1、SEQ ID NO:12の配列を含む軽鎖CDR2およびSEQ ID NO:13または18の配列を含む軽鎖CDR3とを含む、IFN-誘導性制御性T細胞転換性抗癌（IFN-Inducible Regulatory T Cell Convertible Anti-Cancer）（IRTCA）抗体および/またはそれらの抗原結合性フラグメントであって、SEQ ID NO:8の配列を含む重鎖CDR1、SEQ ID NO:9の配列を含む重鎖CDR2、SEQ ID NO:10の配列を含む重鎖CDR3、SEQ ID NO:11の配列を含む軽鎖CDR1、SEQ ID NO:12の配列を含む軽鎖CDR2およびSEQ ID NO:13の配列を含む軽鎖CDR3のそれぞれを含むことのない、IRTCA抗体またはそれらの抗原結合性フラグメントを提供する。

20

【0005】

いくつかの態様において、本発明は、以下のいずれか1つを含むIRTCA抗体またはそれらの抗原結合性フラグメントを、さらに提供する：（a）SEQ ID NO:3、4、5、6、20および21から選択される配列と少なくとも90%同一な配列を含む重鎖可変ドメイン、（b）SEQ ID NO:7、22および23から選択される配列と少なくとも90%同一な配列を含む軽鎖可変ドメイン、または（c）SEQ ID NO:3、4、5、6、20および21から選択される配列と少なくとも90%同一な配列を含む重鎖可変ドメインならびにSEQ ID NO:7、22および23から選択される配列と少なくとも98%同一な配列を含む軽鎖可変ドメイン。

30

【0006】

いくつかの態様において、本発明は、以下のいずれか1つを含むIRTCA抗体または抗原結合性フラグメントも提供する：（a）SEQ ID NO:3、4、5、6、20および21から選択される配列と少なくとも98%同一な配列を含む重鎖可変ドメイン、（b）SEQ ID NO:7、22および23から選択される配列と少なくとも98%同一な配列を含む軽鎖可変ドメイン、または（c）SEQ ID NO:3、4、5、6、20および21から選択される配列と少なくとも98%同一な配列を含む重鎖可変ドメインならびにSEQ ID NO:7、22および23から選択される配列と少なくとも98%同一な配列を含む軽鎖可変ドメイン。

40

【0007】

いくつかの態様において、本願IRTCA抗体または抗原結合性フラグメントは、以下のいずれか1つを含む：（a）SEQ ID NO:3、4、5、6、20および21から選択される配列を含む重鎖可変ドメイン、（b）SEQ ID NO:7、22および23から選択される配列を含む軽鎖可変ドメイン、または（c）SEQ ID NO:3、4、5、6、20および21から選択される配列を含む重鎖可変ドメインならびにSEQ ID NO:7、22および23から選択される配列を含む軽鎖可変ドメイン。

【0008】

いくつかの態様において、IRTCA抗体またはその抗原結合性フラグメントは、SEQ ID NO

50

:8の配列を含む重鎖CDR1、SEQ ID NO:9の配列を含む重鎖CDR2、SEQ ID NO:10の配列を含む重鎖CDR3、SEQ ID NO:11の配列を含む軽鎖CDR1、SEQ ID NO:12の配列を含む軽鎖CDR2、およびSEQ ID NO:13の配列を含む軽鎖CDR3のそれぞれを含むことはない。

【0009】

さまざまな態様のいずれにおいても、本願IRTCA抗体もしくはそれらの抗原結合性フラグメントおよび/または本願組成物は、ある範囲の結合アフィニティーを呈しうる。例えばいくつかの態様において、本願IRTCA抗体または抗原結合性フラグメントは、ヒト活性化誘導性腫瘍壊死因子受容体 (TNFR) ファミリー受容体 (AITR) 分子に対して、 1×10^{-7} ~ 1×10^{-12} Mの結合アフィニティー (K_D) を有する。いくつかの態様において、本願IRTCA抗体または抗原結合性フラグメントは、ヒトAITRポリペプチドの細胞外ドメイン内のエピトープに結合する。いくつかの態様において、ヒトAITRポリペプチドの細胞外ドメイン内のエピトープはSEQ ID NO:19を含む。

10

【0010】

いくつかの態様において、本願抗体または抗原結合性フラグメントは、ヒト化抗体であるか、ヒト化抗体を含む。いくつかの態様において、本願IRTCA抗体またはその抗原結合性フラグメントは、モノクローナル抗体であるか、モノクローナル抗体を含む。いくつかの態様において、本願IRTCA抗体またはその抗原結合性フラグメントは、IgG1またはその変種、IgG2またはその変種、IgG4またはその変種、IgAまたはその変種、IgEまたはその変種、IgMまたはその変種、およびIgDまたはその変種から選択される免疫グロブリン定常ドメインを含む。いくつかの態様において、本願IRTCA抗体またはその抗原結合性フラグメントは、ヒトIgG1であるか、ヒトIgG1を含む。いくつかの態様において、前記IgG1は、SEQ ID NO:26と少なくとも95%同一な配列であるか、またはその配列を含む。いくつかの態様において、本願IRTCA抗体またはその抗原結合性フラグメントは、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')₂フラグメント、Fvフラグメント、ジスルフィド結合したFvフラグメント、scFvフラグメント、単ドメイン抗体、ヒューマボディ (humabody)、ナノボディ、またはダイアボディであるか、それを含む。

20

【0011】

さまざまな態様において、本発明は特に、ある量の本願IRTCA抗体またはその抗原結合性フラグメントを含む本願組成物の送達および/または発現を容易にするための、さまざまな分子および組成物を提供する。例えばいくつかの態様において、本発明は、IRTCA抗体またはその抗原結合性フラグメントをコードする核酸分子を提供する。いくつかの態様において、本発明は、前述の核酸分子を含む組換えベクターも提供する。いくつかの態様において、本発明は、本願組換えベクターおよび/または本願核酸分子を含む宿主細胞も提供する。いくつかの態様において、宿主細胞は、細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞、または哺乳動物細胞から選択されうる。いくつかの態様において、宿主細胞は、大腸菌 (E. coli)、P. パストリス (P. pastoris)、Sf9、COS、HEK293、Expi293、CHO-S、CHO-DG44、CHO-K1、および哺乳動物リンパ球からなる群より選択される。

30

【0012】

いくつかの態様において、本発明は、(a) 1種もしくは複数種の本願IRTCA抗体もしくはそれらの抗原結合性フラグメント、1種もしくは複数種の本願核酸分子、1種もしくは複数種の本願組換えベクター、および/または1種もしくは複数種の本願宿主細胞と、(b) 薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物を提供する。薬学的に許容されるさまざまな担体はどれでも、さまざまな態様に従って使用されうる。

40

【0013】

ここに提供される種々の強力な新規抗体、それらの抗原結合性フラグメントおよび組成物に加えて、本発明は、さまざまな新規治療方法も、さまざまな態様で提供する。例えば、さまざまな態様において、本発明は、処置を必要とする対象を処置する方法であって、本願IRTCA抗体もしくはその抗原結合性フラグメント、本願核酸分子、および/または本願組換えベクターを含むかまたはそれを送達する組成物を、対象に投与する工程を含む方法を提供する。

50

【0014】

さらなる例として、本発明は、いくつかの態様において、免疫応答の誘導を必要とする対象において免疫応答を誘導する方法であって、本願IRTCA抗体もしくはその抗原結合性フラグメント、本願核酸分子、および/または本願組換えベクターを含むかまたはそれを送達する組成物を、対象に投与する工程を含む方法も提供する。

【0015】

さらなる例として、いくつかの態様において、本発明は、免疫応答の強化または免疫細胞の活性の増加を必要とする対象において免疫応答を強化するかまたは免疫細胞の活性を増加させる方法であって、本願IRTCA抗体もしくはその抗原結合性フラグメント、本願核酸分子、および/または本願組換えベクターを含むかまたはそれを送達する組成物を、対象に投与する工程を含む方法も提供する。

10

【0016】

いくつかの態様において、本発明は、インビボまたはインビトロでT細胞によるIFN- γ の分泌を増加させるための方法であって、T細胞を、ある量の本願IRTCA抗体もしくはその抗原結合性フラグメントを含むかまたはそれを送達する組成物と接触させる工程を含む方法も提供する。いくつかの態様において、本発明は、インビボまたはインビトロでT細胞によるTGF- β の分泌を減少させるための方法であって、T細胞を、ある量の本願IRTCA抗体もしくはその抗原結合性フラグメントを含むかまたはそれを送達する組成物と接触させる工程を含む方法も提供する。いくつかの態様において、本発明は、T細胞を1型ヘルパーT (T_H1) 細胞に転換するための方法であって、T細胞を、ある量の本願IRTCA抗体もしくはその抗原結合性フラグメントを含むかまたはそれを送達する組成物と接触させる工程を含む方法も提供する。

20

【0017】

いくつかの態様において、対象は癌を有するか、または癌を発症するリスクがある。いくつかの態様において、癌は、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、大腸癌、子宮内膜癌、食道癌、ファロピウス管癌、胆嚢癌、胃腸癌、頭頸部癌、血液癌、咽頭癌、肝癌、肺癌、リンパ腫、黒色腫、中皮腫、卵巣癌、原発性腹膜癌、唾液腺癌、肉腫、胃癌、甲状腺癌、膵癌、腎細胞癌、膠芽腫、および前立腺癌から選択される。

【0018】

特に、さまざまな態様が、1種または複数種の併用治療レジメンにおける使用に適すると考えられる。例えばいくつかの態様において、対象には、1種または複数種の追加抗癌治療が、既に施されたかまたは施される予定である。いくつかの態様において、1種または複数種の追加癌治療は、電離放射線、化学療法剤、抗体剤および細胞ベースの治療から、対象が両方による処置を受けるように選択される。いくつかの態様において、1種または複数種の追加抗癌治療は、免疫チェックポイント阻害剤、IL-12、GM-CSF、抗CD4剤、シスプラチン、フルオロウラシル、ドキソルビシン、イリノテカン、パクリタキセル、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ-1 (IDO1) 阻害剤、またはシクロホスファミドを含む。

30

【0019】

本発明のさまざまな態様は、1種もしくは複数種の本願IRTCA抗体および/もしくはそれらの抗原結合性フラグメント、核酸分子、組換えベクター、ならびに/または宿主細胞にとって有利な投与レジメンを決定するためにも役立つ。例えばいくつかの態様において、本発明は、治療的処置を必要とする対象の治療的処置のためのIRTCA抗体またはその抗原結合性フラグメントの用量を決定する方法であって、(a) 対象由来の生物学的試料における分泌IFN- γ の測定値を用意または取得する工程であって、該対象が、ある量の本願IRTCA抗体もしくはその抗原結合性フラグメントを含むかまたはそれを送達する組成物を投与されている、工程と、(b) 前記分泌IFN- γ の測定値を基準値と比較する工程とを含み、前記分泌IFN- γ の測定値が基準値より高いかまたは低い場合には、投与されるIRTCA抗体またはその抗原結合性フラグメントの量を調節し、それによって、対象の治療的処置のための用量を決定する方法を提供する。

40

50

【0020】

いくつかの態様において、基準値は、本願IRTCA抗体またはその抗原結合性フラグメントを投与する前の対象由来の生物学的試料におけるIFN- γ のレベルでありうる。いくつかの態様において、対象由来の生物学的試料における分泌IFN- γ の測定された量が基準値より高い場合には、処置を以前の処置と同じレベルに維持するか、処置をある期間にわたって中止する。

【0021】

さらなる例として、いくつかの態様において、本発明は、治療的処置を必要とする対象の治療的処置のためのIRTCA抗体またはその抗原結合性フラグメントの用量を決定する方法であって、(a)対象由来の生物学的試料における T_{reg} 細胞集団の測定値を用意または取得する工程であって、該対象が、ある量の本願IRTCA抗体もしくはその抗原結合性フラグメントを含むかまたはそれを送達する組成物を投与されている、工程と、(b)前記 T_{reg} 細胞集団の測定値を基準値と比較する工程とを含み、前記 T_{reg} 細胞集団の測定値が基準値より高いかまたは低い場合には、投与されるIRTCA抗体またはその抗原結合性フラグメントの量を調節し、それによって、対象の治療的処置のための用量を決定する方法を提供する。いくつかの態様において、基準値は、本願IRTCA抗体またはその抗原結合性フラグメントを投与する前の対象由来の生物学的試料における T_{reg} 細胞集団のレベルでありうる。いくつかの態様において、対象由来の生物学的試料における T_{reg} 細胞集団の測定された量が基準値より低い場合には、処置を以前の処置と同じレベルに維持するか、処置をある期間にわたって中止する。

【0022】

さらなる例として、いくつかの態様において、本発明は、治療的処置を必要とする対象の治療的処置のためのIRTCA抗体またはその抗原結合性フラグメントの用量を決定する方法であって、(a)対象由来の生物学的試料におけるIFN- γ 分泌T細胞集団の測定値を用意または取得する工程であって、該対象が、ある量の本願IRTCA抗体もしくはその抗原結合性フラグメントを含むかまたはそれを送達する組成物を投与されている、工程、(b)対象由来の生物学的試料における T_{reg} 細胞集団の測定値を用意または取得する工程であって、該対象が、ある量の本願IRTCA抗体もしくはその抗原結合性フラグメントを含むかまたはそれを送達する組成物を投与されている、工程、(c)前記IFN- γ 分泌T細胞集団の測定値と前記 T_{reg} 細胞集団の測定値との比を算出する工程、および(d)前記比を基準値と比較する工程を含み、比が基準値より高いかまたは低い場合には、投与されるIRTCA抗体またはその抗原結合性フラグメントの量を調節し、それによって、対象の治療的処置のための用量を決定する方法を提供する。いくつかの態様において、基準値は、本願IRTCA抗体またはその抗原結合性フラグメントを投与する前の対象由来の生物学的試料におけるIFN- γ 分泌T細胞集団のレベルと対象由来の同じ生物学的試料における T_{reg} 細胞集団のレベルとの比でありうる。いくつかの態様において、対象由来の生物学的試料において算出された比が基準値より高い場合には、処置を以前と同じレベルに維持するか、処置をある期間にわたって中止する。

【0023】

いくつかの態様において、基準値は、1人もしくは複数の健常対象に由来する値または1人もしくは複数の癌と診断された対象に由来する値を含む指標値を含む。いくつかの態様において、生物学的試料は、全血、血漿、腫瘍組織、または血清の試料である。

【0024】

いくつかの態様において、本発明は、AITRに対する抗体またはその抗原結合性フラグメントのアフィニティーを検証する方法であって、T細胞を、ある量の本願IRTCA抗体もしくはその抗原結合性フラグメントを含むかまたはそれを送達する組成物と接触させる工程と、前記T細胞からのサイトカイン分泌を測定する工程とを含み、サイトカイン分泌が、IRTCA抗体の免疫応答強化、抗癌効果、および/または抗腫瘍効果と相関する方法も提供する。いくつかの態様において、T細胞はAITRタンパク質を発現する。いくつかの態様において、T細胞は制御性T細胞(T_{reg} 細胞)である。いくつかの態様において、T細胞はエフェ

10

20

30

40

50

クターT細胞 (T_{eff} 細胞)である。

【0025】

本願において「約」および「およそ」という用語は同義語として使用される。本明細書における刊行物、特許または特許出願への言及はいずれも、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。本願において使用される数字はいずれも、約/およそが付加されていても付加されていなくても、関連技術分野の当業者が認識する通常の変動をいずれも包含するものとする。

【0026】

本発明の他の特徴、目的および利点は、以下の詳細な説明から明白である。ただし、以下の詳細な説明は、本発明の態様を示してはいるものの、単なる例示であって、限定ではないと理解すべきである。本発明の範囲内でのさまざまな改変および修飾は、以下の詳細な説明から、当業者には明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0027】

本願に含まれる図面は以下の図から構成されるが、その目的は例示であって、限定ではない。本開示の上記のおよび他の目的、局面、特徴および利点は、以下の説明を添付の図面と合わせて参照することによって、より明白になり、よりよく理解されるであろう。

【0028】

【図1】図1は、IRTCA-AのFab型アミノ酸配列を示し、aおよびbはそれぞれIRTCA-A Fab型のアミノ酸配列および停止コドンが挿入されたIRTCA-Aアミノ酸配列を表す（アスタリスクは停止コドンを示す）。

【図2a】図2は、ランダム化PCR構成および変異が誘導されたIRTCA-Aのアミノ酸領域を示す。パネルaはIRTCA-A軽鎖を示す。変異がCDR3領域に誘導されるようにランダムプライマーを使用し、変異をCDR3中に集中させたファージディスプレイライブラリーを製作した。

【図2b】図2は、ランダム化PCR構成および変異が誘導されたIRTCA-Aのアミノ酸領域を示す。パネルbはIRTCA-A重鎖を示す。変異がCDR3領域に誘導されるようにランダムプライマーを使用し、変異をCDR3中に集中させたファージディスプレイライブラリーを製作した。

【図3】図3は、IRTCA-A系列の16種の重鎖変異体および9種の軽鎖変異体のAITR抗原に関する解離曲線の重ね合わせプロットを示す。

【図4】図4は、IRTCA-A系列の22種の軽鎖変異体のAITR抗原に関する解離曲線の重ね合わせプロットを示す。

【図5】図5は、 $CD4^+$ T細胞におけるIRTCA-Aによるサイトカイン $IFN-\gamma$ の分泌のグラフを示す。IRTCA-Aは $IFN-\gamma$ 分泌を用量依存的に誘導する。

【図6A】図6Aは、IRTCA-Aによる処理後の、 T_{reg} 細胞からの $IFN-\gamma$ の分泌の用量依存的変化を定量化しているグラフである。

【図6B】図6Bは、IRTCA-Aによる処理後の、 T_{reg} 細胞からの $TGF-\beta$ の分泌の用量依存的変化を定量化しているグラフである。

【図7A】図7Aは、数種のIRTCA-A変異体による処理後の、 $CD4^+$ T細胞における $IFN-\gamma$ の分泌の用量依存的変化を定量化しているグラフである。

【図7B】図7Bは、数種のIRTCA-A変異体による処理後の、 T_{reg} 細胞における $IFN-\gamma$ の分泌の用量依存的変化を定量化しているグラフである。

【図7C】図7Cは、数種のIRTCA-A変異体による処理後の、 T_{reg} 細胞における $TGF-\beta$ の分泌の用量依存的変化を定量化しているグラフである。

【図8】図8は、IRTCA抗体によるHu-PBL-SCIDマウスの処置に続く、腫瘍体積（結腸直腸癌細胞の注射によるもの）の用量依存的低減を示すグラフである。

【図9】図9は、対照hIgG、H1F1抗体、MK4166およびキイトルーダ（Keytruda）の腫瘍サイズに対する効果を定量化しているグラフである。矢印は処置抗体または対照抗体の注射日を示す。

10

20

30

40

50

【図10A】図10Aは、3回（矢印）の抗体処置後の腫瘍サイズ（トリプルネガティブ乳癌）に対するH1F1抗体または対照抗体の効果を定量化しているグラフである。

【図10B】図10Bは、3回（矢印）の抗体処置後の腫瘍サイズ（大腸癌）に対するH1F1抗体または対照抗体の効果を定量化しているグラフである。

【図10C】図10Cは、3回（矢印）の抗体処置後の腫瘍サイズ（黒色腫）に対するH1F1抗体または対照抗体の効果を定量化しているグラフである。

【図10D】図10Dは、3回（矢印）の抗体処置後の腫瘍サイズ（黒色腫）に対するH1F1抗体または対照抗体の効果を定量化しているグラフである。

【図11】図11は、カニクイザル（*Macaca fascicularis*）のCD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺T細胞におけるサイトカイン分泌に対するH1F1の効果を定量化しているグラフである。

【図12】図12は、マカクにおいてインビボでH1F1が媒介する制御性T細胞のT_H1細胞への転換を定量化しているグラフである。hIgG処理対照群（A）とは異なり、22mg/kgのH1F1（B）、45mg/kgのH1F1（C）および90mg/kgのH1F1（D）で処理した細胞は、3週間にわたってIFN-⁺陽性CD4⁺T細胞の増加を示した。

【図13】図13は、H1F1によるサイトカイン誘導が弁別的であったことを示すグラフである。サイトカインIL-4（B）およびIL-5（C）の分泌は、H1F1で処理した細胞では達成されなかったが、H1F1による処理後にIL-2（A）およびIFN-⁺分泌（D）は増加した。

【図14】図14は、CD4⁺CD25⁺Foxp3^{high}（A）、TGF-⁺（B）、CD4⁺IFN-⁺（C）およびCD4⁺T-bet⁺（D）を発現する細胞の集団に対するH1F1の用量依存的効果を定量化しているグラフである。

【図15】図15は、EBV陽性胃癌細胞およびAML患者からの骨髄におけるH1F1特異的染色である。

【図16A】図16Aは、AITR-5に結合しない陰性対照mAb EU101と比較した、濃度10、5、2.5および1.25 μg/mLでのAITR-5へのH1F1の結合を図示している。

【図16B】図16Bは、用量依存的なH1F1M69およびH1F1M74のAITR-5への結合を図示している。

【図17】図17は、H1F1M69（B）およびH1F1M74（C）で刺激した時の、hIgG対照（A）と比較した、nT_{reg}細胞のT_H1様細胞への転換を図示している。各パネルの数字は、陽性細胞のパーセンテージを示している。

【図18】図18は、nT_{reg}細胞におけるTGF-⁺およびIFN-⁺に対するH1F1M69およびH1F1M74の用量依存的効果を定量化しているグラフである。

【図19】図19は、抗CD3、CD28ビーズ、IL-2およびTGF-⁺で6日間刺激した後の、CD4⁺T細胞からのiT_{reg}細胞の生成を図示している。

【図20】図20は、iT_{reg}細胞上のAITRに対するH1F1M69およびH1F1M74の結合効率を図示している。パネルAおよびパネルBはゲーティングパラメータを図解している。パネルCはアイソタイプ対照を図解している。パネルD~Gは、H1F1M69（D）およびH1F1M74（E）では、競合物質である抗AITR抗体TRX518（F）およびMK4166（G）よりも高頻度に、表面AITRが検出されたことを示している。

【図21A】図21は、抗AITR抗体で刺激した時の、iT_{reg}細胞のT_H1様細胞への転換を図示している。パネルAはhIgG対照を示している。

【図21B】図21は、抗AITR抗体で刺激した時の、iT_{reg}細胞のT_H1様細胞への転換を図示している。パネルBは、iT_{reg}細胞に対するH1F1M69の効果を示している。

【図21C】図21は、抗AITR抗体で刺激した時の、iT_{reg}細胞のT_H1様細胞への転換を図示している。パネルCは、iT_{reg}細胞に対するH1F1M74の効果を示している。

【図21D】図21は、抗AITR抗体で刺激した時の、iT_{reg}細胞のT_H1様細胞への転換を図示している。パネルDは、iT_{reg}細胞に対するTRX518の効果を示している。

【図21E】図21は、抗AITR抗体で刺激した時の、iT_{reg}細胞のT_H1様細胞への転換を図示している。パネルEは、iT_{reg}細胞に対するMK4166の効果を示している。

【図22】図22は、iT_{reg}細胞におけるH1F1M69およびH1F1M74のTGF-⁺およびIFN-⁺に対する用量依存的効果を定量化しているグラフである。

10

20

30

40

50

【図23A】図23Aは、 iT_{reg} 細胞における固定化モノクローナル抗体hIgGのFoxp3に対する効果を図示している。

【図23B】図23Bは、 iT_{reg} 細胞における固定化モノクローナル抗体H1F1M69のFoxp3に対する効果を図示している。

【図23C】図23Cは、 iT_{reg} 細胞における固定化モノクローナル抗体H1F1M74のFoxp3に対する効果を図示している。

【図23D】図23Dは、 iT_{reg} 細胞における固定化モノクローナル抗体TRX518のFoxp3に対する効果を図示している。

【図23E】図23Eは、 iT_{reg} 細胞における固定化モノクローナル抗体MK4166のFoxp3に対する効果を図示している。

10

【図24】図24は、IL-2およびH1F1M69 (A)またはH1F1M74 (B)でコーティングされたウェルに加えた後の、 iT_{reg} 細胞の T_H1 様細胞への転換を図示している。各パネルの数字は、陽性細胞のパーセンテージを示している。

【図25A】図25は、抗体による処理後の T_{eff} 細胞の T_H1 細胞への極性化 (polarization) を図示している。パネルAは対照hIgGの効果を示している。

【図25B】図25は、抗体による処理後の T_{eff} 細胞の T_H1 細胞への極性化を図示している。パネルBはH1F1M69およびH1F1M74の効果を示している。

【図25C】図25は、抗体による処理後の T_{eff} 細胞の T_H1 細胞への極性化を図示している。パネルCは抗体TRX518およびMK4166の効果を示している。

【図26】図26は、 T_{eff} 細胞におけるIFN- γ に対するH1F1M69およびH1F1M74の用量依存的効果を定量化しているグラフである。

20

【発明を実施するための形態】

【0029】

特定の定義

以下の説明では、組換えDNAおよび免疫学において使用されるいくつかの用語が、広く利用される。明細書および特許請求の範囲は、そのような用語に与えられる範囲を含め、より明確にかつ一貫して理解されるように、以下の定義が与えられる。

【0030】

約: 値に関して本明細書において使用する場合、「約」という用語は、言及された値との関連において類似する値を指す。一般に、ある文脈において「約」が包含する妥当な変動の程度は、その文脈に精通している当業者には理解されるであろう。例えばいくつかの態様において、「約」という用語は、言及された値の25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%以内またはそれ未満以内の値の範囲を包含しうる。

30

【0031】

投与: 本明細書において使用する場合、「投与」という用語は、典型的には、組成物である剤または組成物に含まれる剤の送達を達成するための、対象または系への組成物の投与を指す。当業者は、適当な状況において、対象 (例えばヒト) への投与に利用することができるさまざまな経路を知っているであろう。例えばいくつかの態様において、投与は点眼、経口、非経口、外用などであることができる。いくつかの特定態様において、投与は、気管支 (例: 気管支点滴によるもの)、パッカル、皮膚 (例えば皮膚への外用、皮内、皮下 (interdermal)、経皮などのうちの1つまたは複数であるか、またはそれらを含みうる)、経腸、動脈内、皮内、胃内、髄内、筋肉内、鼻腔内、腹腔内、髄腔内、静脈内、室内 (intraventricular)、具体的器官内 (例えば肝臓内)、粘膜、経鼻、経口、直腸、皮下、舌下、外用、気管 (例: 気管内点滴によるもの)、腔、硝子体などでありうる。いくつかの態様において、投与は単回投与だけを伴いうる。いくつかの態様において、投与は固定された投与回数の適用を伴いうる。いくつかの態様において、投与は、間欠的 (例: 時間を空けて複数回) および/または周期的 (同じ時間を隔てた個々の投与) 投与である投与を伴いうる。いくつかの態様において、投与は、少なくとも選択されたある期間にわたる連続的投与 (例: 灌流) を伴いうる。

40

50

【0032】

アフィニティー:当技術分野では公知であるとおり、「アフィニティー」は、ある特定リガンドがそのパートナーに結合する堅固さの尺度である。アフィニティーはさまざまな方法で測定することができる。いくつかの態様において、アフィニティーは定量的アッセイによって測定される。いくつかのそのような態様では、結合パートナー濃度を、生理的条件を模倣するために、リガンド濃度過剰に固定することができる。上記に代えて、または上記に加えて、いくつかの態様では、結合パートナー濃度および/またはリガンド濃度を変化させることができる。いくつかのそのような態様では、アフィニティーを、同等な条件下(例:濃度)で、基準と比較することができる。

【0033】

アゴニスト:その存在、レベル、程度、タイプまたは形態が別の剤(すなわちアゴナイズされる剤)の活性のレベルの増加と相関する剤条件または事象を指すために、「アゴニスト」という用語を使用しうることは、当業者には理解されるであろう。一般にアゴニストは、例えば小分子、ポリペプチド、核酸、糖質、脂質、金属、および/または関連する活性化活性を示す他の任意の実体など、任意の化合物クラスの剤であるか、それを含みうる。いくつかの態様において、アゴニストは直接でありうる(この場合、アゴニストはその影響をそのターゲットに直接発揮する)。いくつかの態様において、アゴニストは間接的でありうる(この場合、アゴニストは、ターゲットのレベルまたは活性が変化するように、そのターゲットへの結合以外の方法によって、例えばターゲットの制御因子と相互作用することによって、その影響を発揮する)。

【0034】

動物:本明細書において使用する場合、動物界の任意のメンバーを指す。いくつかの態様において、「動物」とはヒトを指し、その性別および発生段階は問わない。いくつかの態様において、「動物」とは非ヒト動物を指し、その発生段階は問わない。特定の態様において、非ヒト動物は哺乳動物(例:齧歯類、マウス、ラット、ウサギ、サル、イヌ、ネコ、ヒツジ、ウシ、霊長類および/またはブタ)である。いくつかの態様において、動物には、哺乳動物、鳥類、爬虫類、両生類、魚類、昆虫および/または虫(worm)が含まれるが、それらに限定されるわけではない。いくつかの態様において、動物は、トランスジェニック動物、遺伝子改変動物および/またはクローンでありうる。

【0035】

アンタゴニスト:本明細書において使用する「アンタゴニスト」という用語が、その存在、レベル、程度、タイプまたは形態が別の剤(すなわち阻害される剤またはターゲット)のレベルまたは活性の減少と相関する剤条件または事象を指すために使用されうることは、当業者には理解されるであろう。一般にアンタゴニストは、例えば小分子、ポリペプチド、核酸、糖質、脂質、金属、および/または関連する阻害活性を示す他の任意の実体など、任意の化合物クラスの剤であるか、それを含みうる。いくつかの態様において、アンタゴニストは直接でありうる(この場合、アンタゴニストはその影響をそのターゲットに直接発揮する)。いくつかの態様において、アンタゴニストは間接的でありうる(この場合、アンタゴニストは、ターゲットのレベルまたは活性が変化するように、そのターゲットへの結合以外の方法によって、例えばターゲットの制御因子と相互作用することによって、その影響を発揮する)。

【0036】

抗体:本明細書において使用する場合、「抗体」という用語は、特定ターゲット抗原への特異的結合を付与するのに十分な標準的(canonical)免疫グロブリン配列要素を含むポリペプチドを指す。当技術分野において公知であるとおり、自然界で生産されるインタクトな抗体は、2本の同一重鎖ポリペプチド(それぞれ約50kD)および2本の同一軽鎖ポリペプチド(それぞれ約25kD)から構成され、それらが互いに会合して一般に「Y字」構造と呼ばれるものになる、およそ150kDの四量体の物質である。各重鎖は、少なくとも4つのドメイン(それぞれ約110アミノ酸長)、すなわちアミノ末端の可変(VH)ドメイン(Y構造の先端部に位置する)とそれに続く3つの定常ドメイン:CH1、CH2およびカルボキシ末

10

20

30

40

50

端のCH3 (Yの軸部分の基部に位置する) とから構成される。「スイッチ」と呼ばれる短い領域が、重鎖の可変領域と定常領域とを接続している。「ヒンジ」は、CH2ドメインおよびCH3ドメインを抗体の残りの部分に接続している。インタクトな抗体では、このヒンジ領域中の2つのジスルフィド結合が2本の重鎖ポリペプチドを互いに接続している。各軽鎖は、2つのドメイン、すなわち、もう1つの「スイッチ」によって互いに分離されたアミノ末端の可変 (VL) ドメインと、それに続くカルボキシ末端の定常 (CL) ドメインとから構成される。インタクトな抗体四量体は、重鎖と軽鎖が単一のジスルフィド結合によって互いに連結されている2つの重鎖-軽鎖二量体から構成され、他の2つのジスルフィド結合は、これらの二量体が互いに接続されて四量体を形成するように、重鎖ヒンジ領域を互いに接続している。また、天然に生産される抗体は、典型的にはCH2ドメイン上が、グリコシル化されている。天然抗体中の各ドメインは、圧縮された逆平行ベータバレルへと互いに相対してパッケージされた2つのベータシート (例: 3、4または5ストランドのシート) から形成される「免疫グロブリンフォールド」を特徴とする構造を有する。各可変ドメインは、「相補性決定領域」と呼ばれる3つの超可変ループ (CDR1、CDR2およびCDR3) と、いくらか不変である4つの「フレームワーク」領域 (FR1、FR2、FR3およびFR4) とを含有する。天然抗体がフォールディングすると、FR領域は、ドメインの構造的フレームワークとなるベータシートを形成し、重鎖と軽鎖の両方からのCDRループ領域は三次元空間で寄せ集められることで、Y構造の先端に位置する単一の超可変抗原結合部位を作り出す。天然抗体のFc領域は補体系の要素に結合すると共に、例えば細胞傷害性を媒介するエフェクター細胞含むエフェクター細胞上の受容体にも結合する。当技術分野では知られているとおり、Fc受容体に対するFc領域のアフィニティーおよび/または他の結合属性は、グリコシル化または他の修飾によって調整することができる。いくつかの態様において、本発明に従って生産および/または利用される抗体は、グリコシル化されたFcドメイン、例えば修飾されたまたは改変されたそのようなグリコシル化を伴うFcドメインを含む。本発明に関して、特定の態様では、天然抗体に見いだされるように十分な免疫グロブリンドメイン配列を含む任意のポリペプチドまたはポリペプチドの複合体を、そのポリペプチドが天然に生産されたか (例えば抗原に反応する生物によって作成されたか)、組換え工学、化学合成または他の人工系もしくは方法論によって生産されたかを問わず、「抗体」と呼ぶことができ、かつ/または「抗体」として使用することができる。いくつかの態様において、抗体はポリクローナルであり、いくつかの態様において、抗体はモノクローナルである。いくつかの態様において、抗体は、マウス抗体、ウサギ抗体、霊長類抗体またはヒト抗体に特有の定常領域配列を有する。いくつかの態様において、抗体配列要素は、当技術分野において公知であるとおり、ヒト化型、霊長類化型、キメラなどである。さらにまた、本明細書において使用する「抗体」という用語は、適当な態様において (別段の言明がある場合、または文脈上そうでないことが明らかである場合を除き)、抗体の構造的および機能的特徴を代替的表現で利用するための、当技術分野において公知のまたは開発されたコンストラクトまたはフォーマットのいずれをも指すことができる。例えばいくつかの態様において、本発明に従って利用される抗体は、以下から選択されるフォーマット (ただしそれらに限定されるわけではない) をとる:インタクトなIgA、IgG、IgEまたはIgM抗体; 二重特異性または多重特異性抗体 (例: Zybodies (登録商標) など); 抗体フラグメント、例えばFabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')₂フラグメント、Fd'フラグメント、Fdフラグメントおよび単離されたCDRまたはそれらのセット; 単鎖Fv; ポリペプチド-Fc融合物; 単ドメイン抗体 (例: IgNARまたはそのフラグメントなどのサメ単ドメイン抗体); ラクダ科抗体; マスク (masked) 抗体 (例: Probodies (登録商標)); Small Modular ImmunoPharmaceuticals (「SMIPs (商標)」); 単鎖またはタンデムダイアボディ (TandAb (登録商標)); ヒューマボディ、VHH; Anticalins (登録商標); Nanobodies (登録商標) ミニボディ; BiTE (登録商標); アンキリンリピートタンパク質またはDARPINs (登録商標); Avimers (登録商標); DARTs; TCR様抗体; Adnectins (登録商標); Affilins (登録商標); Trans-bodies (登録商標); Affibodies (登録商標); TrimerX (登録商標); マイクロプロテイン (MicroProtein); Fynomers (登録商標); Centyrins (登録商

10

20

30

40

50

標) ; および KALBITOR (登録商標)。いくつかの態様において、抗体は、天然に生産された場合に有するであろう共有結合による修飾(例:グリカンの付加)を欠いてもよい。いくつかの態様において、抗体は、修飾(例:グリカン、ペイロード[例:検出可能部分、治療部分、触媒部分など]または他のペンダント基[例:ポリエチレングリコールなど]の付加)を含有しうる。

【0037】

抗体フラグメント:本明細書にいう「抗体フラグメント」とは、本明細書に記載する抗体または抗体剤の一部を指し、典型的には、抗原結合部分またはその可変領域を含む部分を指す。抗体フラグメントは任意の手段によって生産されうる。例えばいくつかの態様において、抗体フラグメントは、インタクトな抗体または抗体剤の断片化により、酵素的または化学的に生産することができる。あるいは、いくつかの態様において、抗体フラグメントは組換え的に(すなわち改変された核酸配列の発現によって)生産することもできる。いくつかの態様において、抗体フラグメントは、全部または一部を合成的に生産することができる。いくつかの態様において、抗体フラグメント(特に抗原結合性抗体フラグメント)は、少なくとも約50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190アミノ酸またはそれ以上、いくつかの態様では少なくとも約200アミノ酸の長さを有しうる。

10

【0038】

結合:本明細書において使用する「結合」という用語が、典型的には、2つ以上の実体間での非共有結合的会合を指すことは理解されるであろう。「直接的」結合は実体間または部分間の物理的接触を伴い、間接的結合は1つまたは複数の中間実体との物理的接触を介した物理的相互作用を伴う。2つ以上の実体間の結合は、典型的には、例えば相互作用する実体または部分を分離して研究する場合や、より複雑な系を背景として(例えば共有結合または他の形で担体実体と関連付けられた状態で、かつ/または生物学的な系もしくは細胞中で)研究する場合を含めて、さまざまな背景のいずれにおいても評価することができる。

20

【0039】

癌:「癌」、「悪性腫瘍」、「新生物」、「腫瘍」および「癌腫」という用語は、本明細書では、相対的に異常な、コントロールされないおよび/または自律的な成長を呈し、その結果、細胞増殖のコントロールが著しく失われていることを特徴とする異常成長表現型を呈する細胞を指すために使用される。いくつかの態様において、腫瘍は、前癌性(例えば良性)、悪性、前転移性、転移性および/または非転移性の細胞であるか、それを含みうる。本開示では、その教示内容が特に関連しうる特定の癌を、具体的に特定する。いくつかの態様において、関連癌は固形腫瘍を特徴としうる。いくつかの態様において、関連癌は血液腫瘍を特徴としうる。一般に、当技術分野において公知のさまざまなタイプの癌の例には、例えば白血病、リンパ腫(ホジキンおよび非ホジキン)、骨髄腫および骨髄増殖性障害を含む造血器癌;肉腫、黒色腫、腺腫、固形組織の癌、口、のど、喉頭および肺の扁平上皮癌、肝癌、尿生殖器癌、例えば前立腺癌、子宮頸癌、膀胱癌、子宮癌および子宮内膜癌、ならびに腎細胞癌、骨癌、膵癌、皮膚癌、皮膚黒色腫または眼内黒色腫、内分泌系の癌、甲状腺の癌、副甲状腺の癌、頭頸部癌、乳癌、胃腸癌および神経系癌、パピローマなどの良性病変などがある。

30

40

【0040】

CDR:本明細書において使用する場合、抗体可変領域内の相補性決定領域を指す。重鎖および軽鎖の可変領域のそれぞれには3つのCDRがあり、それらは、可変領域のそれぞれについて、CDR1、CDR2およびCDR3と称されている。「CDRのセット」または「CDRセット」とは、抗原結合能を有する単一可変領域に見いだされる、または抗原結合能を有するコグネイト重鎖および軽鎖可変領域のCDRに見いだされる、3つまたは6つのCDRの集まりを指す。当技術分野ではCDRの境界を画定するためにいくつかのシステムが確立されており(例: Kabat、Chothiaなど)、当業者はこれらのシステム間の相違を認識して、本願に係る発明を理解し実施するために必要な程度には、CDRの境界を理解することができる。

50

【0041】

化学療法剤:本明細書において使用する「化学療法剤」という用語は、アポトーシス促進性、細胞分裂阻害性および/または細胞傷害性の剤に関して当技術分野で理解されているその意味を有し、例えば特に、望ましくない細胞増殖に関連する1つまたは複数の疾患、障害または状態の処置に利用されかつ/またはそのような処置における使用が推奨されている剤を含む。多くの態様において、化学療法剤は癌の処置に有用である。いくつかの態様において、化学療法剤は、1種または複数種のアルキル化剤、1種または複数種のアントラサイクリン類、1種または複数種の細胞骨格破壊剤（例えばタキサン、メイタンシンおよびそれらの類似体などの微小管標的剤）、1種または複数種のエポチロン、1種または複数種のヒストンデアセチラーゼ阻害剤（HDAC）、1種または複数種のトポイソメラーゼ阻害剤（例:トポイソメラーゼIおよび/またはトポイソメラーゼIIの阻害剤）、1種または複数種のキナーゼ阻害剤、1種または複数種のヌクレオチド類似体またはヌクレオチド前駆体類似体、1種または複数種のペプチド系抗生物質、1種または複数種の白金ベースの剤、1種または複数種のレチノイド、1種または複数種のピンカアルカロイド、および/または以下に挙げるもの（すなわち抗増殖活性を共通して有するもの）のうちの1つまたは複数の1種または複数種の類似体であるか、それを含みうる。いくつかの特定態様において、化学療法剤は、アクチノマイシン、全トランス型レチノイン酸、アウリストアチン（Auristatin）、アザシチジン、アザチオプリン、プレオマイシン、ボルテゾミブ、カルボプラチン、カベシタピン、シスプラチン、クロラムブシル、シクロホスファミド、クルクミン、シタラピン、ダウノルピシン、ドセタキセル、ドキシフルリジン、ドキシソルピシン、エピルピシン、エポチロン、エトポシド、フルオロウラシル、ゲムシタピン、ヒドロキシ尿素、イダルピシン、イマチニブ、イリノテカン、メイタンシンおよび/またはその類似体（例えばDM1）、メクロレタミン、メルカプトプリン、メトトレキサート、ミトキサントロン、メイタンシノイド、オキサリプラチン、パクリタキセル、ペメトレキセド、テニポシド、チオグアニン、トポテカン、バルルピシン、ピンブラスチン、ピンクリスチン、ピンデシン、ピノレルピン、およびそれらの組み合わせの1つまたは複数であるか、それを含みうる。いくつかの態様では、化学療法剤を抗体-薬物コンジュゲートとの関連において利用しうる。いくつかの態様において、化学療法剤は、hLL1-ドキシソルピシン、hRS7-SN-38、hMN-14-SN-38、hLL2-SN-38、hA20-SN-38、hPAM4-SN-38、hLL1-SN-38、hRS7-Pro-2-P-Dox、hMN-14-Pro-2-P-Dox、hLL2-Pro-2-P-Dox、hA20-Pro-2-P-Dox、hPAM4-Pro-2-P-Dox、hLL1-Pro-2-P-Dox、P4/D10-ドキシソルピシン、ゲムツズマブオゾガマイシン、ブレンツキシマブベドチン、トラスツズマブエムタンシン、イノツズマブオゾガマイシン、グレンパツモマブ（glembatumomab）ベドチン、SAR3419、SAR566658、B11B015、BT062、SGN-75、SGN-CD19A、AMG-172、AMG-595、BAY-94-9343、ASG-5ME、ASG-22ME、ASG-16M8F、MDX-1203、MLN-0264、抗PSMA ADC、RG-7450、RG-7458、RG-7593、RG-7596、RG-7598、RG-7599、RG-7600、RG-7636、ABT-414、IMGN-853、IMGN-529、ボルセツズマブマホドチン、およびロルボツズマブメルタンシンからなる群より選択される抗体-薬物コンジュゲートに見いだされるものである。

【0042】

に対応する:本明細書において、「に対応する」という用語は、化合物または組成物中の構造要素の位置/実体を、適当な基準化合物または基準組成物との比較によって指定するために使用されうる。例えばいくつかの態様において、ポリマー中の単量体残基（例:ポリペプチド中のアミノ酸残基またはポリヌクレオチド中の核酸残基）は、適当な基準ポリマー中の残基「に対応する」と同定しうる。例えば、説明を簡単にするために、ポリペプチド中の残基は、しばしば、基準関連ポリペプチドに基づく標準的ナンバリングシステムを使って指定されるので、例えば190番目の残基「に対応する」アミノ酸が、実際に特定アミノ酸鎖中の第190アミノ酸である必要はなく、むしろ基準ポリペプチド中の190番目に見いだされる残基に対応することは、当業者には理解されるであろう。また、「対応する」アミノ酸を同定する方法は当業者には容易に理解される。例えば当業者は、本開示に従ってポリペプチドおよび/または核酸中の「対応する」残基を同定するために利用す

10

20

30

40

50

ることができる、例えばBLAST、CS-BLAST、CUSASW++、DIAMOND、FASTA、GGSEARCH/GLSEARCH、Genoogle、HMMER、HHpred/HHsearch、IDF、Infernal、KLAST、USEARCH、parasail、PSI-BLAST、PSI-Search、ScalaBLAST、Sequilab、SAM、SSEARCH、SWAPHI、SWAPHI-LS、SWIMMまたはSWIPEなどのソフトウェアプログラムを含めて、さまざまな配列アラインメント戦略を知っているだろう。

【0043】

改変された (engineered) : 一般に「改変された」という用語は、人間の手によって操作されたという局面を指す。例えばポリペプチドは、ポリペプチド配列が人間の手によって操作されると、「改変された」とみなされる。例えば本発明のいくつかの態様において、改変されたポリペプチドは、人間の手によって基準ポリペプチド配列中に導入された1つまたは複数のアミノ酸変異、欠失および/または挿入を含む配列を含む。同様に、細胞または生物は、その遺伝情報が変化するように操作されている (例えば以前は存在しなかった新しい遺伝物質が、例えば形質転換、交配、体細胞交雑、トランスフェクション、形質導入または他の機序によって導入されているか、以前に存在した遺伝物質が、例えば置換もしくは欠失変異によって、または交配プロトコールによって、改変されまたは除去されている) のであれば、「改変された」とみなされる。当技術分野における慣行どおり、そして当業者には理解されたとおり、改変されたポリペプチドまたは細胞の誘導体および/または子孫も、たとえ実際の操作は先の実体に対して行われたのであっても、依然として「改変された」と呼ばれる。

10

【0044】

エピトープ: 本明細書において使用する場合、免疫グロブリン (例: 抗体または受容体) 結合構成要素によって特異的に認識される任意の部分を包含する。いくつかの態様において、エピトープは、抗原上の複数の原子または化学基から構成される。いくつかの態様において、そのような原子または化学基は、抗原が適切な三次元コンフォメーションをとったときに、表面に露出する。いくつかの態様において、そのような原子または化学基は、抗原がそのようなコンフォメーションをとったときに、空間において互いに物理的に近い。いくつかの態様において、少なくともいくつかのそのような原子または化学基は、抗原が代替的コンフォメーションをとったとき (例えば線状になったとき) に、物理的に互いに離れている。

20

【0045】

エクスピボ: 本明細書において使用する場合、多細胞生物を背景とせずに起こる生物学的事象を指す。例えば細胞ベースの系との関連では、この用語は、人工的環境において細胞集団内で起こる事象 (例: 細胞増殖、サイトカイン分泌など) を指すために使用される。

30

【0046】

フレームワークまたはフレームワーク領域: 本明細書において使用する場合、可変領域のうちのCDRを除いた配列を指す。CDR配列は異なるシステムによって決定することができるので、同様にフレームワーク配列も、相応に異なる解釈の対象となる。6つのCDRが、重鎖および軽鎖上のフレームワーク領域を、各鎖上の4つのサブ領域 (FR1、FR2、FR3およびFR4) に分割する。ここで、CDR1はFR1とFR2の間に位置し、CDR2はFR2とFR3の間に位置し、CDR3はFR3とFR4の間に位置する。特定サブ領域をFR1、FR2、FR3またはFR4と指定しない場合、フレームワーク領域とは、他でもいわれるとおり、1本の天然免疫グロブリン鎖の可変領域内のFRを合わせたものを表す。本明細書においてFR (a FR) とは、4つのサブ領域のうちの1つを表し、例えばFR1は、可変領域のアミノ末端に最も近くCDR1に対して5'側にある第1フレームワーク領域を表す。また、複数のFR (FRs) とは、フレームワークを構成するサブ領域のうちの2つ以上を表す。

40

【0047】

ヒト化: 当技術分野において公知であるとおり、「ヒト化」という用語は、抗体 (または抗体構成要素) であって、そのアミノ酸配列は非ヒト種 (例: マウス) において産生させた基準抗体からのV_H領域配列およびV_L領域配列を含むが、それらの配列は、基準抗体と

50

比較して、それらをより「ヒト様」にすること、すなわちヒト生殖細胞系可変配列により類似させることを意図した修飾も含んでいるものを指すために、よく使用される。いくつかの態様において、「ヒト化」抗体（または抗体構成要素）は、関心対象の抗原に免疫特異的に結合し、かつ実質的にヒト抗体の配列のようなアミノ酸配列を有するフレームワーク（FR）領域と実質的に非ヒト抗体の配列のようなアミノ酸配列を有する相補性決定領域（CDR）とを有するものである。ヒト化抗体は、CDR領域のすべてまたは実質上すべてが非ヒト免疫グロブリン（すなわちドナー免疫グロブリン）に対応し、フレームワーク領域のすべてまたは実質上すべてがヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のそれである、少なくとも1つの、典型的には2つの、可変ドメイン（Fab、Fab'、F(ab')₂、FabC、Fv）の実質上すべてを含む。いくつかの態様において、ヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域の少なくとも一部分（Fc）、典型的にはヒト免疫グロブリン定常領域のものも含む。いくつかの態様において、ヒト化抗体は、軽鎖と、重鎖の少なくとも可変ドメインとを、どちらも含有する。抗体は、重鎖定常領域のC_H1、ヒンジ、C_H2、C_H3、そして任意でC_H4領域も含みうる。

【0048】

インビトロ：本明細書において使用する「インビトロ」という用語は、多細胞生物内ではなく、例えば試験管内または反応槽内、細胞培養中などの、人工的環境において起こる事象を指す。

【0049】

インビボ：本明細書において使用する場合、ヒトおよび非ヒト動物などの多細胞生物内で起こる事象を指す。細胞ベースの系との関連では、この用語は（例えばインビトロ系との対比で）生細胞内で起こる事象を指すために使用されうる。

【0050】

単離された：本明細書において使用する場合、（1）それが最初に生産された時（自然界でのことであるか、かつ/または実験的状況でのことであるかは問わない）に、それに付随していた構成要素の少なくとも一部から分離されており、かつ/または（2）人間の手によって設計され、生産され、調製され、かつ/または製造された、物質および/または実体を指す。単離された物質および/または実体は、それらに最初に付随していた他の構成要素の約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%または約99%超から分離されていることができる。いくつかの態様において、単離された物質は、約80%、約85%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%または約99%超純粋である。本明細書において、物質は、それが他の構成要素を実質的に含まなければ、「純粋」である。いくつかの態様において、当業者には理解されるであろうとおり、物質は、特定の他の構成要素、例えば1種または複数種の担体または賦形剤（例：緩衝液、溶媒、水など）などと組み合わせられた後でもなお、「単離された」とみなすことができ、さらには「純粋」とさえみなしうる。そのような態様において、物質の単離率または純度は、そのような担体または賦形剤を含めずに算出される。一例を挙げると、いくつかの態様において、自然に存在するポリペプチドまたはポリヌクレオチドなどの生物学的ポリマーは、a) それ、その起源または派生源ゆえに、自然界でそのネイティブ状態にあるそれに伴う構成成分の一部または全部が付随していない場合、b) それ、自然界でそれを産生する種からの同じ種の他のポリペプチドまたは核酸を実質上含まない場合、c) それ、自然界でそれを産生する種のものではない細胞または他の発現系によって発現されるか、他の形でそのような細胞または他の発現系からの構成要素が付随している場合には、「単離された」とみなされる。したがって例えばいくつかの態様において、化学合成されたポリペプチドまたは自然界でそれを産生するものとは異なる細胞系において合成されたポリペプチドは、「単離された」ポリペプチドであるとみなされる。上記に代えて、または上記に加えて、いくつかの態様において、1種または複数種の精製技法に供されたポリペプチドは、a) 自然界でそれに付随している他の構成要素および/またはb) 最初に生産された時にそれに付随していた他の構成要素から分離されている限

10

20

30

40

50

り、「単離された」ポリペプチドであるとみなしうる。

【0051】

K_D :本明細書において使用する場合は、結合剤(例:抗体またはその結合構成要素)の、そのパートナー(例:その抗体または結合構成要素が結合するエピトープ)との複合体からの解離定数を指す。

【0052】

薬学的組成物:本明細書において使用する場合、「薬学的組成物」という用語は、活性剤が1種または複数種の薬学的に許容される担体と共に処方されている組成物を指す。いくつかの態様において、組成物はヒト対象または動物対象への投与に適している。いくつかの態様において、活性剤は、適切な集団に投与されたときに予め決定された治療効果を達成する統計的に有意な確率を示す治療レジメンでの投与に適した単位投与量で存在する。

10

【0053】

ポリペプチド:本明細書において使用する「ポリペプチド」という用語は、一般に、少なくとも3アミノ酸のポリマーという、当技術分野において認識されているその意味を有する。「ポリペプチド」という用語が、本明細書に詳述する完全配列を有するポリペプチドを包含するだけでなく、そのような完全ポリペプチドの機能的フラグメント(すなわち少なくとも1つの活性を保っているフラグメント)に相当するポリペプチドも包含するほど十分に広義であることが意図されていることは、当業者には理解されるであろう。さらにまた、タンパク質配列が一般に活性を破壊することなく多少の置換に耐えうることも、当業者には理解される。したがって、活性を保っており、同じクラスの他のポリペプチドとの間に、少なくとも約30~40%の総配列同一性、多くの場合、約50%、60%、70%または80%を上回る総配列同一性を有し、さらに通常は、通常少なくとも3~4アミノ酸、多くの場合、最大20アミノ酸またはそれ以上を包含する1つまたは複数の高度に保存された領域に、はるかに高い同一性、多くの場合、90%、さらには95%、96%、97%、98%または99%を上回る同一性を持つ領域を少なくとも1つは含む、任意のポリペプチドが、本発明において使用される関連用語「ポリペプチド」に包含される。ポリペプチドはL-アミノ酸、D-アミノ酸またはその両方を含有してよく、当技術分野において公知のさまざまなアミノ酸修飾またはアミノ酸類似体をどれでも含有してよい。有用な修飾として、例えば末端アセチル化、アミド化、メチル化などが挙げられる。いくつかの態様において、タンパク質は、天然アミノ酸、非天然アミノ酸、合成アミノ酸およびそれらの組み合わせを含みうる。「ペプチド」という用語は、一般に、約100アミノ酸未満、約50アミノ酸未満、20アミノ酸未満、または10アミノ酸未満の長さを有するポリペプチドを指すために使用される。いくつかの態様において、タンパク質は、抗体、抗体フラグメント、生物学的に活性なそれらの部分および/またはそれらの特徴的部分である。

20

30

【0054】

予防するまたは予防:疾患、障害および/または状態の発生に関連して使用される場合、本明細書では、疾患、障害および/または状態を発症するリスクを低減することおよび/または疾患、障害もしくは状態の1つまたは複数の特徴または症状の開始を遅延させかつ/またはその重症度を低減することを指す。いくつかの態様において、予防は集団ベースで評価されるので、ある剤は、ある疾患、障害または状態に陥りやすい集団において、その疾患、障害または状態の1つまたは複数の症状の発生、頻度および/または強さに統計的に有意な減少が観察されるのであれば、その特定の疾患、障害または状態を「予防する」とみなされる。

40

【0055】

組換え:本明細書において使用する場合は、組換え手段によって設計され、改変され、調製され、発現され、作出され、製造されかつ/または単離されるポリペプチド、例えば宿主細胞にトランスフェクトされた組換え発現ベクターを使って発現されるポリペプチド;組換えコンビナトリアルヒトポリペプチドライブラリーから単離されるポリペプチド;当該ポリペプチドまたはその1種もしくは複数種の構成要素、部分、要素もしくはドメイン

50

をコードしかつ/またはその発現を指示する1つまたは複数の遺伝子または遺伝子構成要素についてトランスジェニックであるか、または他の形でそれらを発現するように操作されている動物(例:マウス、ウサギ、ヒツジ、魚など)から単離されるポリペプチド;および/または選択された核酸配列要素を互いにスプライスしまたはライゲートすること、選択された配列要素を化学合成することおよび/または他の形で当該ポリペプチドまたはその1種もしくは複数種の構成要素、部分、要素またはドメインをコードしかつ/またはその発現を指示する核酸を生成させることを伴う他の任意の手段によって調製され、発現され、作出されまたは単離されるポリペプチドを指すものとする。いくつかの態様において、そのような選択された配列要素のうちの1種または複数種は、自然界に見いだされる。いくつかの態様において、そのような選択された配列要素のうちの1種または複数種は、インシリコで設計される。いくつかの態様において、1種または複数種のそのような選択された配列要素は、例えば天然源または合成源からの、例えば関心対象の由来生物の(例えばヒト、マウスなどの)生殖細胞系における、公知配列要素の(例えばインビボまたはインビトロでの)変異導入に由来する。

10

20

30

40

50

【0056】

特異的結合:本明細書において使用する場合、「特異的結合」という用語は、結合が起こるべき環境において、考えうる結合パートナー同士を区別する能力を指す。他の潜在的ターゲットも存在する時に、ある特定ターゲットと相互作用する結合剤は、それが相互作用するターゲットに「特異的に結合する」といわれる。いくつかの態様において、特異的結合は、結合剤とそのパートナーとの間の会合を検出またはその程度を決定することによって評価され、いくつかの態様において、特異的結合は、結合剤-パートナー複合体の解離を検出またはその程度を決定することによって評価され、いくつかの態様において、特異的結合は、結合剤の、そのパートナーともう1つの実体との間での二者択一的相互作用において競争する能力を検出または決定することによって評価される。いくつかの態様において、特異的結合は、そのような検出または決定を、ある範囲の濃度にわたって行うことによって評価される。

【0057】

対象:本明細書において使用する場合、「対象」という用語は、生物、典型的には哺乳動物(例:ヒト、いくつかの態様では出生前のヒト形態を含む)を指す。いくつかの態様において、対象は、関連する疾患、障害または状態を患っている。いくつかの態様において、対象は、ある疾患、障害または状態に陥りやすい。いくつかの態様において、対象は、ある疾患、障害または状態の1つまたは複数の症状または特徴を呈する。いくつかの態様において、対象は、ある疾患、障害または状態の症状または特徴を何も呈さない。いくつかの態様において、対象は、疾患、障害または状態への陥りやすさまたはそのリスクに特有の1つまたは複数の特徴を持つ者である。いくつかの態様において、対象は患者である。いくつかの態様において、対象は、診断および/または治療を受けかつ/または受けたことがある個体である。

【0058】

治療剤:本明細書において使用する場合、「治療剤」という表現は、概して、生物に投与されたときに所望の薬理学的効果を誘発する任意の剤を指す。いくつかの態様において、剤は、それが適当な集団全体に統計的に有意な効果を示すのであれば、治療剤であるとみなされる。いくつかの態様において、前記適当な集団は、モデル生物の集団でありうる。いくつかの態様において、適当な集団は、一定の年齢群、性別、遺伝的背景、既存の臨床状態などといった、さまざまな基準によって定義されうる。いくつかの態様において、治療剤は、ある疾患、障害および/または状態の1つまたは複数の症状または特徴を軽減し、改善し、緩和し、阻害し、予防し、その開始を遅延させ、その重症度を低減し、かつ/またはその発生率を低減するために使用することができる物質である。いくつかの態様において、「治療剤」は、政府機関による承認を得ることでヒトへの投与用に販売することができるようになった剤または政府機関による承認を得なければヒトへの投与用に販売することができない剤である。いくつかの態様において、「治療剤」は、ヒトに投与するに

は処方箋が必要とされる剤である。

【0059】

治療有効量:本明細書において使用する場合、「治療有効量」という用語は、ある疾患、障害および/または状態を患っている集団またはある疾患、障害および/または状態に陥りやすい集団に、治療的投与レジメンに従って投与したときに、その疾患、障害および/または状態を処置するのに十分な量を意味する。いくつかの態様において、治療有効量は、疾患、障害および/または状態の1つまたは複数の症状の発生率および/または重症度を低減し、それらの症状の1つまたは複数の特徴を安定化し、かつ/またはそれらの症状の開始を遅延させる量である。「治療有効量」という用語が、ある特定個体において処置の成功が達成されることを、実際に必要としないことは、当業者には理解されるであろう。むしろ、治療有効量は、そのような処置を必要とする患者に投与されたときに、有意な数の対象において、所望する特定の薬理学的応答を与える量でありうる。例えばいくつかの態様において、「治療有効量」という用語は、本発明の治療との関連においてそれを必要とする個体に投与した場合に、該個体において起きている癌支持過程を遮断し、安定化し、減弱し、または逆転させるであろう量、または該個体における癌抑制過程を強化または増加させるであろう量を指す。癌処置との関連において、「治療有効量」は、癌と診断された個体に投与した場合に、その個体における癌のさらなる発達を予防し、安定化し、阻害し、または低減するであろう量である。本明細書に記載する組成物の特に好ましい「治療有効量」は、膵癌などの悪性腫瘍の発達を（治療的処置において）逆転させるか、または悪性腫瘍の寛解を達成しもしくは長引かせるのに役立つ。個体における癌を処置するために当該個体に投与される治療有効量は、寛解を促進しまたは転移を阻害するために投与される治療有効量と、同じである場合も異なる場合もある。大半の癌治療がそうであるように、本明細書に記載する治療方法は、癌の「治癒(cure)」と解釈されたり、癌の「治癒」に制約されたり、または他の形で癌の「治癒」に限定されたりするべきではなく、むしろ本処置方法は、癌を「処置」するための、すなわち癌を有する個体の健康に望ましい変化または有益な変化をもたらすための、記載の組成物の使用に関する。そのような利益は腫瘍学分野の熟練した医療提供者には認識されており、これには、患者状態の安定化、腫瘍サイズの減少（腫瘍退縮）、生体機能の改善（例：癌性組織または癌性機能の機能改善）、さらなる転移の減少または阻害、日和見感染の減少、生存性の増加、痛みの減少、運動機能の改善、認知機能の改善、エネルギー感(feeling of energy)の改善（活力、倦怠感の減少）、幸福感の改善、正常な食欲の回復、健康な体重増加の回復およびそれらの組み合わせなどが含まれるが、それらに限定されるわけではない。加えて、（例えば処置の過程において）腫瘍部位から癌細胞の試料を採取し、悪性度の低い表現型への癌細胞の退縮を分子レベルで検証するために、その癌細胞を、代謝マーカーおよびシグナリングマーカーのレベルについて試験して癌細胞の状態を監視することによって、個体における特定腫瘍の（例えば本明細書に記載する処置の結果としての）退縮を評価してもよい。例えば、本発明の方法を使用することによって誘導される腫瘍退縮は、上述の血管新生促進マーカーのいずれかの減少、本明細書に記載する抗血管新生マーカーの増加、癌と診断された個体において異常な活性を呈する代謝経路、細胞間シグナリグ経路または細胞内シグナリング経路の正常化（すなわち癌を患っていない正常個体に見いだされる状態への変化）を見いだすことによって示されるだろう。いくつかの態様において、治療有効量を製剤化し、かつ/または単回投与で投与しうることは、当業者には理解されるであろう。いくつかの態様では、治療有効量を製剤化し、かつ/または複数回投与で、例えば投与レジメンの一部として、投与しうる。

【0060】

変種:核酸、タンパク質または小分子などの分子に関連して本明細書において使用する場合、「変種」という用語は、基準分子とは有意な構造的同一性を示すが、例えば基準実体と比較して1つまたは複数の化学部分の有無またはレベルに関して基準分子と構造的に異なる分子を指す。いくつかの態様において、変種は、その基準分子とは機能的にも異なる。一般に、ある特定分子が、基準分子の「変種」であると適正にみなされるかどうかは

10

20

30

40

50

、その特定分子の、基準分子との構造同一性の程度に基づく。当業者には理解されるであろうとおり、任意の生物学的または化学的基準分子は、一定の特徴的構造要素を有する。変種は、定義上、1つまたは複数のそのような特徴的構造要素を共通して持つが、少なくとも1つの局面において基準分子とは異なる、別個の分子である。いくつか例を挙げると、ポリペプチドは、線形空間または三次元空間中で互いに対して指定された位置を有しかつ/または特定の構造モチーフにおよび/もしくは生物学的機能に寄与する複数のアミノ酸から構成される特徴的配列要素を有しうる。核酸は、線形空間または三次元空間中で互いに対して指定された位置を有する複数のヌクレオチド残基から構成される特徴的配列要素を有しうる。いくつかの態様において、変種ポリペプチドまたは変種核酸は、基準ポリペプチドまたは基準核酸とは、アミノ酸配列またはヌクレオチド配列中の1つまたは複数の相違の結果として、異なりうる。いくつかの態様において、変種ポリペプチドまたは変種核酸は、少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%または99%である基準ポリペプチドまたは基準核酸との総配列同一性を示す。いくつかの態様において、変種ポリペプチドまたは変種核酸は、基準ポリペプチドまたは基準核酸と、少なくとも1つの特徴的配列要素を共有しない。いくつかの態様において、基準ポリペプチドまたは基準核酸は、1つまたは複数の生物学的活性を有する。いくつかの態様において、変種ポリペプチドまたは変種核酸は、基準ポリペプチドまたは基準核酸の生物学的活性のうち1つまたは複数共有する。

10

20

30

【0061】

ベクター：本明細書において使用する場合、それに連結されたもう1つの核酸を輸送する能力を有する核酸分子を指す。ベクターのタイプは「プラスミド」であり、これは、その中に追加DNAセグメントをライゲートすることができる環状二本鎖DNAループを指す。もう1つのタイプのベクターはウイルスベクターであり、ここでは追加DNAセグメントをウイルスゲノム中にライゲートすることができる。特定のベクターは、それらが導入される宿主細胞において自律的に複製する能力を有する（例：細菌複製起点を有する細菌ベクターおよびエピソード哺乳動物ベクター）。他のベクター（例：非エピソード哺乳動物ベクター）は、宿主細胞への導入後に宿主のゲノム中に組み込まれることができ、その結果、宿主ゲノムと一緒に複製される。さらにまた、特定のベクターは、ベクターが機能的に連結された遺伝子の発現を指示する能力を有する。そのようなベクターを、本明細書では「発現ベクター」という。組換えDNA、オリゴヌクレオチド合成ならびに組織培養および形質転換には、標準的技法（例：エレクトロポレーション、リポフェクション）を使用しうる。酵素反応および精製技法は、製造者の仕様書に従って、または当技術分野においてよく行われているとおりに、または本明細書に記載するとおりに行いうる。前記の技法および手順は、一般に、当技術分野において周知の従来法に従って、本明細書の全体を通して引用し議論するさまざまな一般文献およびより具体的な文献に記載されているように行いうる。例えば、参照によりあらゆる目的で本明細書に組み入れられる Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)) を参照されたい。

【0062】

例示的態様の詳細な説明

本発明は、制御性T細胞をT_H1様細胞に転換するための抗AITR抗体に関する。例えば、ここに提供する改変された抗体は、ヒトAITRの細胞外ドメイン内のエピトープを特異的に認識する親抗体と比較して抗原アフィニティを強化するために、修飾されている。具体的には、本明細書に記載するように、本発明者らは、ヒトAITRに対して改良されたアフィニティを持ついくつかの例示的抗体を作出した。注目すべきことに、これらの例示的抗AITR抗体は、制御性T細胞 (T_{reg}細胞) をT_H1細胞に転換し、一定のT細胞サイトカイン分泌の量を制御する能力を有する。したがって本開示は、基準抗体より改良された特性を持つ改変された抗AITR抗体を提供すると共に、これらの抗体がインビトロおよびインビボで驚くほど有益な活性を有することを実証する。

【0063】

40

50

AITR

ヒト活性化誘導性腫瘍壊死因子受容体 (activation-inducible tumor necrosis factor receptor) (AITR) はTNFRスーパーファミリーのメンバーであり、GITR (グルココルチコイド誘導性TNFR関連タンパク質)、TNFRSF18 (TNF受容体スーパーファミリーメンバー18) またはCD357としても知られている (Kwon et al., J Biol Chem, 274:6056-6061, 1999)。AITRは、 T_{reg} 細胞 (制御性T細胞) および活性化T細胞において、特に高いレベルで発現する。AITRとは、細胞によって天然に発現される任意の変種、アイソフォームおよびホモログを指し、具体的にはヒトAITRを意味しうるが、それに限定されるわけではない。AITRに関する情報は、NCBI GenBankなどの公知データベースから入手することができ、その一例としてNP_004186を挙げることができるが、それに限定されるわけではない。AITRの刺激は、制御性T細胞の免疫抑制機能を減少させ、 T_{eff} 細胞 (エフェクターT細胞) 活性を促進するユニークな細胞内シグナルを生成する (Shimizu et al, Nat Immunol., 3:135-142, 2002)。それゆえに、免疫腫瘍学の観点からは、AITRシグナルは腫瘍に対するヒト免疫を増加させ、癌細胞死を誘導する (Sakaguchi, Cell, 101:455-458, 2000)。

10

20

30

40

50

【0064】

AITRは生理的条件下で単分子ではなく三量体として作用し、そのリガンドの機能単位は三量体である。TNFRSF (TNF受容体スーパーファミリー) およびTNFに関する構造研究によれば、3つの受容体分子とTNF三量体は対称的に結合しており、各受容体フラグメントは隣接する2つのTNFの溝に結合している。したがって、TNFとTNFRの間の接触界面は、TNFR-TNFの相互作用と構造に中心的役割を果たす。この機能的意義は、接触界面のアミノ酸配列がなぜ種間で、そしてTNFRスーパーファミリー内で、高度に保存されているかの説明になるだろう (Chan et al, Immunity, 13:419-422, 2000)。

【0065】

加えて、特殊な条件にさらされた細胞は、受容体三量体からさらに進んで三量体の四量体に達し、次に漸進的スーパーシグナル (progressive super-signal) を内的に生成する。そのため、AITRシグナルは単純なオン-オフシグナルの伝達ではなく、むしろシグナル伝達の精密に調整された制御であり、 T_{reg} 細胞の抗癌能力のコントロールにおける重要な因子になる (Zhou et al., PNAS., 105:5465-5470, 2008)。TNFRとそのリガンドとの間の相互作用の複雑さおよび多様性ならびに極めて多数の利用可能なエピトープが、非常に正確なシグナル制御を可能にしている。それゆえに、特定構造エピトープを認識することができるモノクローナル抗体 (mAb) は、AITRに関係する治療剤を開発するための最適な候補である。すなわち、ある特定の本願抗AITR抗体によって認識されるエピトープがAITR分子上のどこにあるかに依存して、ある特定抗AITR抗体はAITRの天然リガンドをさまざまな程度に模倣することができ、例えば活性が選択的に調整されかつ/または受容体のオリゴマー化も調節されうるので、AITRを介した応答が、さまざまな方法で調整されうる。

【0066】

抗AITR抗体およびそれらのフラグメント

本開示は、少なくとも一部において、インビトロおよび/またはインビボで顕著かつ予想外に優れた特徴を呈する改変された抗AITR抗体 (本明細書ではIFN-誘導性制御性T細胞転換性抗癌mAb (IRTCA) ともいう) およびそれらのフラグメントを提供する。例えば、特定の本願抗体は、基準抗AITR抗体と比較して、増加したアフィニティーを有する。

【0067】

いくつかの態様において、IRTCA抗体または抗原結合性抗体フラグメントは、SEQ ID NO:8、9、10、14、15、16、17、24および25から選択される配列であるかそれらの配列を含む、1つ、2つまたは3つの重鎖CDR配列を含む。いくつかの態様において、IRTCA抗体または抗原結合性フラグメントは、以下の1つまたは複数を含む: SEQ ID NO:8および24から選択される配列であるかその配列を含む重鎖CDR1、SEQ ID NO:9および25から選択される配列であるかその配列を含む重鎖CDR2、ならびにSEQ ID NO:10、14、15、16および17から選択される配列であるかその配列を含む重鎖CDR3。いくつかの態様において、IRTCA抗体または抗原結合性フラグメントは、以下のそれぞれを含む: SEQ ID NO:8および24から選択

される配列であるかその配列を含む重鎖CDR1、SEQ ID NO:9および25から選択される配列であるかその配列を含む重鎖CDR2、ならびにSEQ ID NO:10、14、15、16および17から選択される配列であるかその配列を含む重鎖CDR3。

【0068】

いくつかの態様において、IRTCA抗体または抗原結合性フラグメントは、SEQ ID NO:11、12、13および18から選択される配列であるかそれらの配列を含む、1つ、2つまたは3つの軽鎖CDR配列を含む。いくつかの態様において、IRTCA抗体または抗原結合性フラグメントは、以下の1つまたは複数を含む:SEQ ID NO:11の配列であるかその配列を含む軽鎖CDR1、SEQ ID NO:12の配列であるかその配列を含む軽鎖CDR2、ならびにSEQ ID NO:13および18から選択される配列であるかその配列を含む軽鎖CDR3。いくつかの態様において、IRTCA抗体または抗原結合性フラグメントは、以下のそれぞれを含む:SEQ ID NO:11の配列であるかその配列を含む軽鎖CDR1、SEQ ID NO:12の配列であるかその配列を含む軽鎖CDR2、ならびにSEQ ID NO:13および18から選択される配列であるかその配列を含む軽鎖CDR3。

10

【0069】

いくつかの態様において、IRTCA抗体またはその抗原結合性フラグメントは、(a) SEQ ID NO:8または24の配列を含む重鎖CDR1、SEQ ID NO:9または25の配列を含む重鎖CDR2、ならびにSEQ ID NO:14、15、16および17から選択される少なくとも1つの配列を含む重鎖CDR3と、(b) SEQ ID NO:11の配列を含む軽鎖CDR1、SEQ ID NO:12の配列を含む軽鎖CDR2、およびSEQ ID NO:13または18の配列を含む軽鎖CDR3とを含むが、ここで、このIRTCA抗体またはその抗原結合性フラグメントが、SEQ ID NO:8の配列を含む重鎖CDR1、SEQ ID NO:9の配列を含む重鎖CDR2、SEQ ID NO:10の配列を含む重鎖CDR3、SEQ ID NO:11の配列を含む軽鎖CDR1、SEQ ID NO:12の配列を含む軽鎖CDR2、およびSEQ ID NO:13の配列を含む軽鎖CDR3のそれぞれを含むことはない。

20

【0070】

いくつかの態様において、IRTCA抗体または抗原結合性フラグメントは、SEQ ID NO:1、3、4、5、6、20および21から選択される配列であるかその配列を含む重鎖可変ドメインを含む抗体または抗体フラグメントに対して、実質的相同性を含む。いくつかの態様において、IRTCA抗体または抗原結合性フラグメントは、SEQ ID NO:1、3、4、5、6、20および21から選択される配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%または99.5%同一な配列であるかその配列を含む重鎖可変ドメインを含む。いくつかの態様において、IRTCA抗体または抗原結合性フラグメントは、SEQ ID NO:1、3、4、5、6、20および21から選択される配列であるかその配列を含む重鎖可変ドメインを含む。

30

【0071】

いくつかの態様において、IRTCA抗体または抗原結合性フラグメントは、SEQ ID NO:2、7、22および23から選択される配列を有するかその配列を含む軽鎖可変ドメインを含む抗体または抗体フラグメントに対して、実質的相同性を含む。いくつかの態様において、IRTCA抗体または抗原結合性フラグメントは、SEQ ID NO:2、7、22および23から選択される配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%または99.5%同一な配列であるかその配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。いくつかの態様において、IRTCA抗体または抗原結合性フラグメントは、SEQ ID NO:2、7、22および23から選択される配列であるかその配列を含む軽鎖可変ドメインを含む。

40

【0072】

いくつかの態様において、IRTCA抗体または抗原結合性フラグメントは、SEQ ID NO:1、3、4、5、6、20および21から選択される配列であるかその配列を含む重鎖可変ドメインとSEQ ID NO:2、7、22および23から選択される配列であるかその配列を含む軽鎖可変ドメインとを含む抗体または抗体フラグメントに対して、実質的相同性を含む。いくつかの態様において、IRTCA抗体または抗原結合性フラグメントは、SEQ ID NO:1、3、4、5、6、20および21から選択される配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97

50

%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%または99.5%同一な配列であるかその配列を含む重鎖可変ドメインと、SEQ ID NO:2、7、22および23から選択される配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%または99.5%同一な配列であるかその配列を含む軽鎖可変ドメインとを含む。いくつかの態様において、IRTCA抗体または抗原結合性フラグメントは、SEQ ID NO:1、3、4、5、6、20および21から選択される配列であるかその配列を含む重鎖可変ドメインと、SEQ ID NO:2、7、22および23から選択される配列であるかその配列を含む軽鎖可変ドメインとを含む。

【0073】

本開示のIRTCA抗体または抗原結合性フラグメントのアミノ酸配列は、保存的置換によって置換されうる。本明細書において使用する「保存的置換」という用語は、対応するポリペプチドの生物学的または生化学的機能の喪失を引き起こさないように、1つまたは複数のアミノ酸が、類似する生化学的特性を有するアミノ酸で置換される、ポリペプチドの修飾を指す。本明細書において使用する「保存的配列変種」または「保存的アミノ酸置換」という用語は、類似する側鎖を有するアミノ酸残基によるアミノ酸残基の置換である。類似する側鎖を有するアミノ酸残基は、当技術分野において定義づけられている。これらの残基には、塩基性側鎖を持つアミノ酸（例：リジン、アルギニンおよびヒスチジン）、酸性側鎖を持つアミノ酸（例：アスパラギン酸およびグルタミン酸）、非荷電極性側鎖を持つアミノ酸（例：グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシンおよびシステイン）、非極性側鎖を持つアミノ酸（例：アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニンおよびトリプトファン）、ベータ分岐側鎖を持つアミノ酸（例：スレオニン、バリンおよびイソロイシン）ならびに芳香族側鎖を持つアミノ酸（例：チロシン、フェニルアラニン、トリプトファンおよびヒスチジン）が包含される。それゆえに、本発明の抗体は保存的アミノ酸置換を有することができ、それでもなお活性を確保することができると予想される。

【0074】

いくつかの態様において、本開示のIRTCA抗体または抗原結合性フラグメントは、IgG1定常ドメイン、IgG2定常ドメイン、IgG1/IgG2ハイブリッド定常ドメイン、ヒトIgG4定常ドメイン、IgA定常ドメイン、IgE定常ドメイン、IgM定常ドメインおよびIgD定常ドメインから選択される定常領域を含みうる。

【0075】

いくつかの態様において、本開示のIRTCA抗体または抗原結合性フラグメントは、IgA、IgD、IgE、IgM、IgGまたはその変種であるか、それを含む。

【0076】

いくつかの態様において、IRTCA抗体または抗原結合性フラグメントは軽鎖定常領域を含む。いくつかの態様において、IRTCA抗体または抗原結合性フラグメントは、カッパ（) および/またはラムダ（) 軽鎖ならびに/またはその変種を含む。

【0077】

いくつかの態様において、IRTCA抗体または抗原結合性フラグメントはモノクローナル抗体である。いくつかの態様において、IRTCA抗体または抗原結合性フラグメントは、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')₂フラグメント、Fvフラグメント、ジスルフィド結合したFvフラグメント、scFvフラグメント、単一ドメイン抗体、ヒューマボディ、ナノボディ、および/またはダイアボディである。いくつかの態様において、IRTCA抗体または抗原結合性フラグメントは一価抗体である。いくつかの態様において、IRTCA抗体または抗原結合性フラグメントは多価抗体である。いくつかの態様において、IRTCA抗体または抗原結合性フラグメントは多重特異性抗体（例：二重特異性抗体）である。

【0078】

いくつかの態様において、本開示は、グリコシル化部位を付加しまたは欠失させることによって、本開示の抗体の糖質含量を変更する方法を包含する。抗体の糖質含量を変更するための方法は当技術分野において周知であり、本開示に包含される。例えば米国特許第

10

20

30

40

50

6,218,149号、EP 0 359 096 B1、米国特許出願公開番号US 2002/0028486、WO 03/035835、米国特許出願公開第2003/0115614号、米国特許第6,218,149号、米国特許第6,472,511号を参照されたい（これらの文献はすべて参照によりその全体が本明細書に組み入れられる）。別の態様において、本開示は、抗体の1つまたは複数の内在糖質部分を欠失させることによって、本開示の抗体の糖質含量を変更する方法を包含する。

【0079】

改変されたグリコフォームは、限定するわけではないがエフェクター機能の強化または低減を含むさまざまな目的に役立つ。改変されたグリコフォームは、当業者に公知の任意の方法によって、例えば改変された発現株または変種発現株を使用することによって、1種または複数種の酵素、例えばDI-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII（GnTI11）との共発現によって、さまざまな生物またはさまざまな生物に由来する細胞株においてFc領域を含む分子を発現させることによって、またはFc領域を含む分子が発現された後に糖質を修飾することによって、生成させることができる。改変されたグリコフォームを生成させるための方法は当技術分野において公知であり、例えばUmaña et al, 1999, Nat. Biotechnol 17:176-180、Davies et al., 20017 Biotechnol Bioeng 74:288-294、Shields et al, 2002, J Biol Chem 277:26733-26740、Shinkawa et al, 2003, J Biol Chem 278:3466-3473、米国特許第6,602,684号、米国特許出願第10/277,370号、米国特許出願第10/113,929号、PCT WO 00/61739A1、PCT WO 01/292246A1、PCT WO 02/311140A1、PCT WO 02/30954A1、POTILLEGENT（商標）技術（Biowa, Inc.、ニュージャージー州プリンストン）、GLYCOMAB（商標）糖鎖工学技術（GLYCART biotechnology AG、スイス国チューリッヒ）に記載されている方法（これらの文献のそれぞれは参照によりその全体が本明細書に組み入れられる）が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。例えばWO 000 61739、EA01229125、US 20030115614、Okazaki et al, 2004, JMB, 336:1239-49を参照されたい（これらの文献のそれぞれは参照によりその全体が本明細書に組み入れられる）。

【0080】

いくつかの態様において、本開示のIRTCA抗体または抗原結合性フラグメントは、ヒトAITRのアンタゴニストである。

【0081】

いくつかの態様において、本開示のIRTCA抗体または抗原結合性フラグメントはヒトAITR分子に結合する。いくつかの態様において、本開示のIRTCA抗体または抗原結合性フラグメントは、ヒトAITR分子に特異的に結合する。

【0082】

いくつかの態様において、IRTCA抗体または抗原結合性フラグメントは、SEQ ID NO:19の配列であるかその配列を含む配列に結合する。いくつかの態様において、IRTCA抗体または抗原結合性フラグメントは、SEQ ID NO:19の配列であるかその配列を含むIRTCA細胞外ドメインのエピトープに結合する。

【0083】

いくつかの態様において、本開示のIRTCA抗体または抗原結合性フラグメントは、AITR分子に、 $1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-12}$ Mの結合アフィニティー（ K_D ）で結合する。いくつかの態様において、本開示のIRTCA抗体または抗原結合性フラグメントは、ヒトAITR分子に、 $1 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-12}$ Mの結合アフィニティー（ K_D ）で結合する。結合アフィニティー（ K_D ）は、例えば表面プラズモン共鳴により、例えばBIACOREシステムを使って測定しうる。

【0084】

いくつかの態様において、本開示のIRTCA抗体または抗原結合性フラグメントは、ヒトAITR分子またはそのフラグメントに、 1.0×10^{-8} M未満の結合アフィニティー（ K_D ）で結合する。いくつかの態様において、本開示のIRTCA抗体または抗原結合性フラグメントは、ヒトAITR分子またはそのフラグメントに、 1.0×10^{-9} M未満の結合アフィニティー（ K_D ）で結合する。いくつかの態様において、本開示のIRTCA抗体または抗原結合性フラグメントは、ヒトAITR分子またはそのフラグメントに、 1.0×10^{-10} M未満の結合アフィニティー（ K_D ）で結合する。

10

20

30

40

50

【0085】

いくつかの態様において、本開示のIRTCA抗体または抗原結合性フラグメントは、非霊長類AITRポリペプチド（例：イヌ、マウスおよびラットAITRポリペプチド）に結合できないか、弱く結合する。いくつかの態様において、本開示のIRTCA抗体または抗原結合性フラグメントは、ヒトまたはサルAITRに効率よく結合する。この結合アフィニティーは、霊長類AITR抗体にとってのエピトープの構造および/または配列が、イヌ、マウスおよびラットとは全く異なりうることを示唆する。

【0086】

いくつかの態様において、本開示のIRTCA抗体または抗原結合性フラグメントは、ヒトAITRを発現するCD4⁺T細胞に結合する。いくつかの態様において、本開示のIRTCA抗体または抗原結合性フラグメントはT細胞集団に影響を及ぼす。いくつかの態様において、本開示のIRTCA抗体または抗原結合性フラグメントは、制御性T細胞（nT_{reg}細胞）をT_H1様（IFN-⁻陽性）細胞に転換する。いくつかの態様において、本開示のIRTCA抗体または抗原結合性フラグメントは、誘導性制御性T細胞（iT_{reg}細胞）をT_H1様（IFN-⁻陽性）細胞に転換する。いくつかの態様において、本開示のIRTCA抗体または抗原結合性フラグメントは、エフェクターT細胞（T_{eff}細胞）をT_H1（IFN-⁻陽性）細胞に転換する。いくつかの態様において、本開示のIRTCA抗体または抗原結合性フラグメントは、制御性T細胞（T_{reg}細胞）の集団を減少させる。いくつかの態様において、本開示のIRTCA抗体または抗原結合性フラグメントは、細胞の集団がT_{reg}サイトカイン（例：TGF-⁻）の分泌を減少させる原因になる。

【0087】

いくつかの態様において、本開示のIRTCA抗体または抗原結合性フラグメントは、低い毒性を特徴とする（例えば投与後細胞死の程度が低い）。いくつかの態様において、本開示のIRTCA抗体または抗原結合性フラグメントは低い肝毒性（hepatotoxicity）を特徴とする。いくつかの態様において、治療量の本開示のIRTCA抗体または抗原結合性フラグメントが投与された対象は、ALT、ASTおよび総ビリルビンのうちの1つまたは複数のレベルが正常範囲内にある。いくつかの態様において、本開示のIRTCA抗体または抗原結合性フラグメントは、症状の測定可能な軽減を伴いかつ/または許容されうる毒性で、長期間にわたって患者を処置できることを特徴とする。低いまたは許容されうる免疫原性および/または高いアフィニティーは、他の適切な特性と共に、達成される治療結果に貢献することができる。「低い免疫原性」とは、本明細書では、処置された患者の約75%未満、または好ましくは約50%未満において有意なHAHA応答、HACA応答またはHAMA応答を生じることおよび/または処置された患者において低い力価を生じることと定義される（Elliott et al., Lancet 344:1125-1127（1994）、この文献は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる）。

【0088】

核酸

本開示は、本開示のIRTCA抗体およびそれらのフラグメントをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを提供する。本明細書に記載するIRTCA抗体およびそれらのフラグメントは、核酸分子から、当技術分野に公知の分子生物学的方法を使って生産しうる。本開示の核酸として、例えばDNAおよび/またはRNAが挙げられる。

【0089】

いくつかの態様において、核酸コンストラクトは、IRTCA抗体またはそのフラグメント（例：H1F1、H1F1M69、H1F1M74）をコードする領域を含む。いくつかの態様において、そのような抗体またはそれらのフラグメントは、V_H領域および/またはV_L領域を含むであろう。所望の結合特性および/または機能特性に基づいてIRTCA抗体またはそのフラグメントを同定および/または選択し、該抗体の可変領域を単離し、増幅し、クローニングしかつ/または配列決定することができる。V_Hヌクレオチド配列およびV_Lヌクレオチド配列には、アミノ酸をコードするヌクレオチド配列および/または制限部位を保持するヌクレオチド配列の付加、および/またはアミノ酸をコードするヌクレオチド配列の置換などの修飾を

加えうる。いくつかの態様において、核酸配列は、イントロン配列を含んでもよく、含まなくてもよい。

【0090】

適当な場合には、IRTCA抗体およびそれらのフラグメント（例：H1F1、H1F1M69、H1F1M74）をコードする核酸配列を、特定の細胞タイプまたは生物における発現に最適化されたコドンを含むように修飾しうる（例えば米国特許第5,670,356号および米国特許第5,874,304号参照）。コドン最適化配列は合成配列であり、好ましくは、非コドン最適化親ポリヌクレオチドによってコードされるものと同じのポリペプチド（または完全長ポリペプチドと実質的に同じ活性を有する完全長ポリペプチドの生物学的に活性なフラグメント）をコードする。いくつかの態様において、抗体構成要素をコードする遺伝物質のコード領域は、10 全体的にまたは部分的に、特定細胞タイプ（例：真核細胞または原核細胞）用にコドン使用頻度を最適化するために、改変された配列を含みうる。例えば本明細書に記載するヒト化重鎖（または軽鎖）可変領域のコード配列は、細菌細胞における発現のために最適化されうる。あるいは、コード配列は哺乳動物細胞（例：CHO細胞）における発現のためにも最適化されうる。そのような配列はコドン最適化配列といえることができる。

【0091】

本開示の核酸コンストラクトは、当技術分野に公知の方法によって発現ベクターまたはウイルスベクターに挿入することができ、核酸分子は発現コントロール配列に機能的に連結することができる。上記の核酸分子またはそれらのフラグメントのいずれかを含むベクターも、本開示によって提供される。上記核酸分子またはそれらのフラグメントはいずれも、20 任意の適切なベクターにクローニングすることができ、任意の適切な宿主を形質転換またはトランスフェクトするために使用することができる。ベクターおよびそれらを構築するための方法の選択は、当業者には一般に公知であり、一般技術文献に記載されている（一般に「Recombinant DNA Part D」Methods in Enzymology, Vol.153, Wu and Grossman, eds., Academic Press (1987)を参照されたい）。

【0092】

いくつかの態様において、外来核酸（DNAまたはRNA）を原核宿主細胞または真核宿主細胞に導入するには、従来使用されている技法、例えば電気泳動、リン酸カルシウム沈殿、DEAE-デキストラントランスフェクション、リポフェクションなどを使用しうる。望ましくは、ベクターは、必要に応じて、またそのベクターがDNAであるかRNAであるかを考慮して、30 そのベクターを導入する宿主（例：細菌、真菌、植物または動物）のタイプに特異的な制御配列、例えば転写および翻訳開始ならびに終止コドンを含みうる。いくつかの態様において、ベクターは、宿主の属に特異的な制御配列を含む。好ましくは、ベクターは、宿主の種に特異的な制御配列を含む。

【0093】

核酸コンストラクトは、複製系および挿入された核酸に加えて、形質転換された宿主またはトランスフェクトされた宿主の選択を可能にする1つまたは複数のマーカー遺伝子も含むことができる。マーカー遺伝子としては、殺生物剤耐性、例えば抗生物質耐性、重金属などに対する耐性、栄養要求宿主の補完による原栄養性の付与などが挙げられる。

【0094】

適切なベクターとして、増殖および拡大のためもしくは発現のためまたはその両方のために設計されたものが挙げられる。例えばクローニングベクターは、pUC系列、pBluescript系列（Stratagene、カリフォルニア州ラホーヤ）、pET系列（Novagen、ウィスコンシン州マディソン）、pGEX系列（Pharmacia Biotech、スウェーデン国ウプサラ）およびpEX系列（Clontech、カリフォルニア州パロアルト）からなる群より選択される。GT10、GT11、ZapII（Stratagene）、EMBL4およびN 1149などのバクテリオファージベクターも使用することができる。植物発現ベクターの例には、pBI110、pBI101.2、pBI101.3、pBI121およびpBIN19（Clontech）がある。動物発現ベクターの例には、pEUK-C1、pMAMおよびpMAMneo（Clontech）がある。TOPOクローニングシステム（Invitrogen、カリフォルニア州カールズバッド）も、製造者の推奨に従って使用することができる。40

【0095】

発現ベクターは、上述の単離または精製された核酸分子に機能的に連結されたネイティブまたは非ネイティブプロモーターを含むことができる。例えば強い、弱い、誘導性、組織特異的および発達段階特異的などといったプロモーターの選択は、当技術分野における技量内である。同様に、上述の核酸分子またはそのフラグメントをプロモーターと組み合わせることも、当技術分野における技量内である。

【0096】

適切なウイルスベクターとしては、例えばレトロウイルスベクター、パルボウイルス系ベクター、例えばアデノ随伴ウイルス(AAV)系ベクター、AAV-アデノウイルスキメラベクターおよびアデノウイルス系ベクター、ならびにレンチウイルスベクター、例えば単純ヘルペス(HSV)系ベクターが挙げられる。これらのウイルスベクターは、例えば Sambrook et al., Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 2d edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) および Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, New York, N.Y. (1994) に記載されている標準的な組換えDNA技法を使って調製することができる。

10

【0097】

レトロウイルスベクターはレトロウイルスに由来する。レトロウイルスは、多種多様な宿主細胞に感染する能力を有するRNAウイルスである。感染すると、レトロウイルスゲノムはその宿主細胞のゲノムに統合し、宿主細胞DNAと一緒に複製されることにより、ウイルスRNAおよびレトロウイルスゲノム中に組み込まれた任意の核酸配列を、絶えず生産する。したがって、レトロウイルスを使用すれば、治療因子の長期発現を達成することができる。遺伝子治療における使用が想定されるレトロウイルスは、比較的非病原性であるが、病原性レトロウイルスも存在する。病原性レトロウイルス、例えばヒト免疫不全ウイルス(HIV)またはヒトT細胞リンパ向性ウイルス(HTLV)を使用する場合は、宿主に対する毒性を排除するためのウイルスゲノムの改変に配慮しなければならない。レトロウイルスベクターはさらに、ウイルスを複製欠損性にするように操作することができる。したがってレトロウイルスベクターは、インビボでの安定な遺伝子導入には特に有用であるとみなされている。HIV系ベクターなどのレンチウイルスベクターは遺伝子送達に使用されるレトロウイルスベクターの好例である。他のレトロウイルスとは異なり、HIV系ベクターは、そのパッセンジャー遺伝子を非分裂細胞に組み込むことが知られており、それゆえに、持続型の疾患の処置に役立つ。

20

30

【0098】

そのようなクローニングおよび/または発現配列には、クローニングおよび/または発現におけるそれらの機能を最適化するために、ポリヌクレオチドの単離に役立つように、または細胞へのポリヌクレオチドの導入を改良するために、追加の配列を付加することができる。クローニングベクター、発現ベクター、アダプターおよびリンカーの使用は当技術分野において周知である。(例えばAusubel(前掲)またはSambrook(前掲)を参照されたい)。

【0099】

いくつかの態様において、本開示の核酸およびベクターは、単離および/または精製される。本開示は、上述の単離または精製された核酸分子(ベクターの形態にあってもよい)を含む組成物も提供する。単離された核酸およびベクターは、例えばアルカリ/SDS処理、CsCl結合、カラムクロマトグラフィー、アガロースゲル電気泳動および当技術分野において周知の他の技法を含む当技術分野において公知の標準的な技法を使って、調製することができる。本組成物は本明細書にさらに記載する他の構成要素を含むことができる。

40

【0100】

いくつかの態様において、核酸分子は、適当な宿主細胞に導入されたときにIRTCA抗体またはそのフラグメントを発現することができるベクターに挿入される。適当な宿主細胞として、細菌細胞、酵母細胞、昆虫細胞および哺乳動物細胞が挙げられるが、それらに限

50

定されるわけではない。例示的な宿主細胞として、原核生物（例：大腸菌）および真核生物（例：COS細胞またはCHO細胞）が挙げられる。使用できる哺乳動物宿主細胞として、ヒトHeLa、HEK293、H9およびJurkat細胞、マウスNIH3T3およびC127細胞、Cos1、Cos7およびCV1、ウズラQC1-3細胞、マウスL細胞およびチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞（例：DG44細胞）が挙げられる。いくつかの態様において、抗体の発現に適した哺乳動物宿主細胞は、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞（例えばDHFR選択可能マーカーと共に使用されるDHFR-CHO細胞を含む）、NSO骨髄腫細胞、COS細胞またはSP2細胞でありうる。いくつかの態様において、宿主細胞は、大腸菌、P.パストリス、Sf9、COS、HEK293、Expi 293、CHO-S、CHO-DG44、CHO-K1、および哺乳動物リンパ球からなる群より選択される。

【0101】

10

転写/翻訳コントロールシグナルのコントロール下にある本開示のIRTCA抗体またはそのフラグメントをコードする発現ベクターを構築するには、DNAフラグメントをベクターに挿入するための当業者に公知の任意の方法を使用しうる。これらの方法には、インビトロ組換えDNAおよび合成技法ならびにインビボ組換えを含めることができる（例えばAusubel（前掲）またはSambrook（前掲）を参照されたい）。

【0102】

抗体の生産

本発明の抗体および抗原結合性フラグメントは、以後の安定な抗体または抗体フラグメントの形成を可能にする当技術分野において公知の任意の技法によって、調製および/または精製されうる。

20

【0103】

本開示のIRTCA抗体および/または抗原結合性フラグメントをコードする核酸は、従来の手順によって、容易に単離し配列決定することができる。例えば、ハイブリドーマまたはファージテンプレートDNAから対応する重鎖および軽鎖コード領域を特異的に増幅するように設計されたオリゴヌクレオチドプライマーを使用しうる。単離された核酸を発現ベクターに挿入した後、その発現ベクターを宿主細胞に導入することによって形質転換された適切な宿主細胞（すなわち形質転換体）から、所望のモノクローナル抗体が生産されうる。いくつかの態様において、本開示のIRTCA抗体および/または抗原結合性フラグメントを調製するための方法は、抗体をコードする核酸を含む発現ベクターを増幅する工程を含みうるが、それに限定されるわけではない。

30

【0104】

いくつかの態様において、宿主細胞は、例えば酵母、高等植物、昆虫および哺乳動物細胞を含む真核宿主細胞である。組換え生産手順に使用される宿主に依存して、本開示の抗体および抗体フラグメントはグリコシル化体である場合もあるし、非グリコシル化体である場合もある。いくつかの態様において、本開示のIRTCA抗体および/または抗原結合性フラグメントをコードする組換え発現ベクターは、哺乳動物宿主細胞中に導入され、抗体を発現させるのに十分な時間にわたって宿主細胞を培養することによって、抗体が調製されうる。いくつかの態様において、哺乳動物宿主細胞は、培養培地中に本開示の抗体または抗体フラグメントを分泌するのに十分な時間にわたって、培養される。

【0105】

40

いくつかの態様において、発現された本開示の抗体は、宿主細胞から単離された後に、均一に精製されうる。本開示の抗体の単離および/または精製は、タンパク質を単離し精製するための従来の方法によって行いうる。例えば、理論に束縛されることは望まないが、本開示のIRTCA抗体および/または抗原結合性フラグメントは、限定するわけではないがプロテインA精製、プロテインG精製、硫酸アンモニウム沈殿またはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含む周知の方法によって組換え細胞培養から回収し、精製することができる。高速液体クロマトグラフィー（「HPLC」）も精製に使用することができる。例えばColligan, Current Protocols

50

in ImmunologyまたはCurrent Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, N.Y., (1997-2001) の例えばチャプター1、4、6、8、9および10を参照されたい(これらの文献はそれぞれその全体が参照により本明細書に組み入れられる)。いくつかの態様において、本開示の抗体は、濾過、超濾過、塩析、透析などをさらに組み合わせることによって、単離および/または精製されうる。

【0106】

精製された本開示のIRTCA抗体および/または抗原結合性フラグメントは、例えばELISA、ELISPOT、フローサイトメトリー、免疫細胞学、BIACORE(商標)分析、SAPIDYNE KINEX A(商標)結合平衡除外法(kinetic exclusion assay)、SDS-PAGEおよびウェスタンブロットによって、またはHPLC分析によって、ならびに本明細書において開示する他のいくつかの機能アッセイによって、特徴づけることができる。

10

【0107】

治療的応用

本開示は、改変された抗体および抗原結合性フラグメントが、例えば癌などの特定の疾患の診断、予防および/または処置に役立つという認識を包含する。ここに提供されるIRTCA抗体または抗原結合性フラグメントはいずれも、治療方法において使用されうる。例えば本開示のIRTCA抗体または抗原結合性フラグメントは、例えば悪性疾患(例:癌)の処置において、免疫治療剤として使用することができる。

【0108】

本開示は、悪性疾患を処置および/または予防する方法であって、本開示のIRTCA抗体または抗原結合性フラグメントを対象に投与する工程を含む方法を提供する。細胞、組織、器官、動物または患者における少なくとも1つの悪性疾患を調整または処置するための方法は、癌を含むが、それに限定されるわけではない。

20

【0109】

本開示との関連において、癌処置は、 T_H1 様細胞および関連サイトカイン(例:IFN- γ)を増加させることによって媒介されうる。IFN- γ を分泌する T_H1 細胞は、細胞内病原体に対する免疫応答を媒介することおよび腫瘍関連癌(tumor-related cancer)を予防することが知られている。腫瘍中で T_H1 細胞によって引き起こされる炎症は、癌を刺激せず、むしろ癌を予防することが知られている(Haabeth OA et al, Nat Commun, 2:240, 2011)。腫瘍では、 T_{reg} 細胞が局所的腫瘍成長を促進する。それゆえに、腫瘍中の制御性T細胞をダウンレギュレートすることは、癌処置にとって重要な部分であると考えられる(Liu Z et al, J Immunol, 182(10):6160-7, 2009)。それゆえに、 T_{reg} 細胞の T_H1 細胞への転換は極めて有用な癌の予防または処置でありうる。

30

【0110】

T_{reg} 細胞の T_H1 細胞への転換は、 T_H1 分化に関係するシグナリング経路および転写因子に関係する。特に、Foxp3転写因子は T_{reg} 細胞の特異的細胞内マーカーであり、 T_{reg} 細胞を T_H1 細胞に分化させると、Foxp3の細胞内レベルはダウンレギュレートされる。

【0111】

具体的に述べると、ヒトAITRへの本開示のIRTCA抗体または抗原結合性フラグメントの結合は、制御性T細胞(nT_{reg} 細胞)、誘導性制御性T細胞(iT_{reg} 細胞)またはエフェクターT細胞(T_{eff} 細胞)の T_H1 様(IFN- γ 陽性)細胞への転換を増加させることが実証された。いくつかの態様において、本開示のIRTCA抗体または抗原結合性フラグメントによる治療的処置は、癌細胞の成長を低減しかつ/または阻害することができる。

40

【0112】

いくつかの態様において、本開示は、本開示のIRTCA抗体または抗原結合性フラグメントを投与することによるインビボまたはインビトロでのサイトカイン分泌の制御を含む、腫瘍成長を遅延させまたは阻害するための方法を提供する。いくつかの態様において、本開示は、本開示のIRTCA抗体または抗原結合性フラグメントを投与することによるインビボまたはインビトロでのサイトカイン分泌の制御を含む、腫瘍量を低減するための方法を提供する。

50

【0113】

いくつかの態様において、本開示は、処置されるべき癌または腫瘍の生物学的対象をモニタリングすることによって、癌または腫瘍を処置するための方法であって、(i)本開示のIRTCA抗体または抗原結合性フラグメントを対象に投与する工程、(ii)対象から生物学的試料を分離し、次に単離する工程、(iii)前記試料からINF- またはTGF- の分泌量を測定し、比率を推定する工程、および(iv)IRTCA抗体またはその抗原結合性フラグメントが投与されたまたは投与されていない対照試料を比較することによって、前記抗体またはその抗原結合性フラグメントの治療有効量を決定する工程を含む方法を提供する。

【0114】

いくつかの態様において、本開示は、処置を必要とする対象を処置する方法であって、本開示のIRTCA抗体もしくは抗原結合性フラグメントおよび/またはそれをコードする核酸を含むかまたはそれを送達する組成物を、対象に投与する工程を含む方法を提供する。いくつかの態様において、対象は、癌を発症するリスクを有するか、または癌を発症するリスクがある。いくつかの態様において、本開示は、患者の癌または腫瘍を予防または処置するための方法であって、治療有効量のIRTCA抗体またはその抗原結合性フラグメントを癌または腫瘍を持つ患者に投与する工程を含む方法を提供する。

【0115】

いくつかの態様において、本開示は、免疫応答の誘導を必要とする対象において免疫応答を誘導する方法であって、本開示のIRTCA抗体もしくは抗原結合性フラグメントおよび/またはそれをコードする核酸を含むかまたはそれを送達する組成物を、対象に投与する工程を含む方法を提供する。いくつかの態様において、対象は、癌を発症するリスクを有するか、または癌を発症するリスクがある。

【0116】

いくつかの態様において、本開示は、免疫応答の強化または免疫細胞の活性の増加を必要とする対象において免疫応答を強化するかまたは免疫細胞の活性を増加させる方法であって、本開示のIRTCA抗体もしくは抗原結合性フラグメントおよび/またはそれをコードする核酸を含むかまたはそれを送達する組成物を、対象に投与する工程を含む方法を提供する。いくつかの態様において、対象は、癌を発症するリスクを有するか、または癌を発症するリスクがある。

【0117】

本開示の方法による処置に適した癌として、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、大腸癌、子宮内膜癌、食道癌、ファロピウス管癌、胆嚢癌、胃腸癌、頭頸部癌、血液癌、咽頭癌、肝癌、肺癌、リンパ腫、黒色腫、中皮腫、卵巣癌、原発性腹膜癌、唾液腺癌、肉腫、胃癌、甲状腺癌、膵癌、腎細胞癌、膠芽腫および前立腺癌を挙げることができるが、それらに限定されるわけではない。いくつかの態様において、本開示のIRTCA抗体または抗原結合性フラグメントによる処置のための癌として、癌、リンパ腫(例:ホジキンリンパ腫および非ホジキンリンパ腫)、芽細胞腫、肉腫および白血病を挙げうるが、それらに限定されるわけではない。いくつかの態様において、癌は、扁平上皮癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、肺の扁平上皮癌、腹膜癌、肝細胞癌、胃癌、膵癌、神経膠腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝癌、膀胱癌、肝細胞癌、乳癌、大腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌または子宮癌、唾液腺癌、腎癌、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝臓癌、白血病および他のリンパ増殖性障害、ならびにさまざまなタイプの頭頸部癌を含みうる。

【0118】

本開示のIRTCA抗体または抗原結合性フラグメントを含む組成物は、癌細胞またはその転移を処置するために、または癌の成長を阻害するために、薬学的有効量で投与されうる。治療方法において使用するために、本開示のIRTCA抗体または抗原結合性フラグメントは、医療実施基準(good medical practice)に合致する方法で、製剤化され、用量決定され、投与されるであろう。この関連において考慮すべき因子としては、処置されるその障害、処置されるその哺乳動物、個々の患者の慢性的状態、患者の年齢、患者の体重、障

10

20

30

40

50

害の原因、剤の送達部位、投与の方法、投与のスケジューリングおよび医療従事者に公知の他の因子が挙げられる。

【0119】

本開示は、基準抗体と比較して優れた特性を有しうる高アフィニティーIRTCA抗体を提供する。本開示は、これらの抗体では、T細胞転換および/またはIFN- γ などのサイトカインの分泌を誘導する能力が改良されているという認識を包含する。したがって本開示は、本開示のIRTCA抗体および抗原結合性フラグメントは基準抗体より低い用量で投与しうるという認識を包含する。

【0120】

いくつかの態様において、本開示のIRTCA抗体または抗原結合性フラグメントを含む組成物は、ボラスとして、または必要な場合には持続注射によって、患者に投与しうる。いくつかの態様において、ボラス投与は本開示のIRTCA Fabのボラス投与であって、0.0025~100mg/kg、0.025~0.25mg/kg、0.010~0.10mg/kgまたは0.10~0.50mg/kgの用量で投与されうる。持続注射の場合、Fabフラグメントとして提供される本発明の抗体は、1~24時間、1~12時間、2~12時間、6~12時間、2~8時間または1~2時間にわたって、0.001~100mg/kg/分、0.0125~1.25mg/kg/分、0.010~0.75mg/kg/分、0.010~1.0mg/kg/分または0.10~0.50mg/kg/分の用量で投与されうる。いくつかの態様において、本開示の抗体は、完全長抗体（完全な定常ドメインを有するもの）であるか、それを含む。いくつかの態様において、完全長抗体は、およそ0.01~10mg/kg、1~8mg/kgまたは2~6mg/kgの用量で投与される。いくつかの態様において、完全長抗体は30~35分間の注射によって投与される。投与頻度は状態の重症度に依存してさまざまでありうる。例えば頻度は2日~7日ごとに1回、1週間に1回または1、2、3もしくは4週間ごとに1回でありうる。

10

20

【0121】

いくつかの態様において、組成物は、皮下注射によって患者に投与されうる。具体的に述べると、抗体は、2~7日ごとに1回、毎週、2週間ごとに1回、または毎月、皮下注射により、0.1~100mgの用量で、患者に投与される。

【0122】

本開示のIRTCA抗体または抗原結合性フラグメントを含む組成物は、電離放射線、化学療法剤、抗体剤、および細胞ベースの治療から選択される1種または複数種の追加抗癌治療を施された対象または施される予定の対象に、対象が両方による処置を受けようとして投与されうる。いくつかの態様において、前記1種または複数種の追加抗癌治療は、免疫チェックポイント阻害剤、IL-12、GM-CSF、抗CD4剤、シスプラチン、フルオロウラシル、ドキシソルピシン、イリノテカン、パクリタキセル、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ1 (IDO1) 阻害剤、またはシクロホスファミドを含む。

30

【0123】

本発明のさまざまな態様は、1種もしくは複数種の本願IRTCA抗体および/もしくはそれらの抗原結合性フラグメント、核酸分子、組換えベクター、ならびに/または宿主細胞にとって有利な投与レジメンを決定するためにも役立つ。例えばいくつかの態様において、本発明は、治療的処置を必要とする対象の治療的処置のためのIRTCA抗体またはその抗原結合性フラグメントの用量を決定する方法であって、(a) 対象由来の生物学的試料における分泌IFN- γ の測定値を用意または取得する工程であって、該対象が、ある量の本願IRTCA抗体もしくはその抗原結合性フラグメントを含むかまたはそれを送達する組成物を投与されている、工程と、(b) 前記分泌IFN- γ の測定値を基準値と比較する工程とを含み、前記分泌IFN- γ の測定値が基準値より高いかまたは低い場合には、投与されるIRTCA抗体またはその抗原結合性フラグメントの量を調節し、それによって、対象の治療的処置のための用量を決定する方法を提供する。

40

【0124】

いくつかの態様において、基準値は、本願IRTCA抗体またはその抗原結合性フラグメントを投与する前の対象由来の生物学的試料におけるIFN- γ のレベルでありうる。いくつかの態様において、対象由来の生物学的試料における分泌IFN- γ の測定された量が基準値よ

50

り高い場合には、処置を以前の処置と実質上同じレベルに維持する。いくつかの態様において、対象由来の生物学的試料における分泌IFN- γ の測定された量が基準値より高い場合には、次の処置は、以前の処置よりも低い用量で与えられる。いくつかの態様において、対象由来の生物学的試料における分泌IFN- γ の測定された量が基準値より高い場合には、処置をある期間にわたって中止する。いくつかの態様において、対象由来の生物学的試料における分泌IFN- γ の測定された量が基準値と実質上同じであるか、基準値より低い場合には、次の処置は、以前の処置よりも高い用量で与えられる。

【0125】

さらなる例として、いくつかの態様において、本発明は、治療的処置を必要とする対象の治療的処置のためのIRTCA抗体またはその抗原結合性フラグメントの用量を決定する方法であって、(a)対象由来の生物学的試料における T_{reg} 細胞集団の測定値を用意または取得する工程であって、該対象が、ある量の本願IRTCA抗体もしくはその抗原結合性フラグメントを含むかまたはそれを送達する組成物を投与されている、工程と、(b)前記 T_{reg} 細胞集団の測定値を基準値と比較する工程とを含み、前記 T_{reg} 細胞集団の測定値が基準値より高いかまたは低い場合には、投与されるIRTCA抗体またはその抗原結合性フラグメントの量を調節し、それによって、対象の治療的処置のための用量を決定する方法を提供する。

10

【0126】

いくつかの態様において、基準値は、本願IRTCA抗体またはその抗原結合性フラグメントを投与する前の対象由来の生物学的試料における T_{reg} 細胞集団のレベルでありうる。いくつかの態様において、対象由来の生物学的試料における T_{reg} 細胞集団の測定された量が基準値より低い場合には、処置を以前の処置と実質上同じレベルに維持する。いくつかの態様において、対象由来の生物学的試料における T_{reg} 細胞集団の測定された量が基準値より低い場合には、次の処置は、以前の処置よりも低い用量で与えられる。いくつかの態様において、対象由来の生物学的試料における T_{reg} 細胞集団の測定された量が基準値より低い場合には、処置をある期間にわたって中止する。いくつかの態様において、対象由来の生物学的試料における T_{reg} 細胞集団の測定された量が基準値と実質上同じであるか、基準値より高い場合には、次の処置は、以前の処置よりも高い用量で与えられる。

20

【0127】

さらなる例として、いくつかの態様において、本発明は、治療的処置を必要とする対象の治療的処置のためのIRTCA抗体またはその抗原結合性フラグメントの用量を決定する方法であって、(a)対象由来の生物学的試料におけるIFN- γ 分泌 T 細胞集団の測定値を用意または取得する工程であって、該対象が、ある量の本願IRTCA抗体もしくはその抗原結合性フラグメントを含むかまたはそれを送達する組成物を投与されている、工程、(b)対象由来の生物学的試料における T_{reg} 細胞集団の測定値を用意または取得する工程であって、該対象が、ある量の本願IRTCA抗体もしくはその抗原結合性フラグメントを含むかまたはそれを送達する組成物を投与されている、工程、(c)前記IFN- γ 分泌 T 細胞集団の測定値と前記 T_{reg} 細胞集団の測定値との比を算出する工程、および(d)前記比を基準値と比較する工程を含み、比が基準値より高いかまたは低い場合には、投与されるIRTCA抗体またはその抗原結合性フラグメントの量を調節し、それによって、対象の治療的処置のための用量を決定する方法を提供する。

30

40

【0128】

いくつかの態様において、基準値は、本願IRTCA抗体またはその抗原結合性フラグメントを投与する前の対象由来の生物学的試料におけるIFN- γ 分泌 T 細胞集団のレベルと対象由来の同じ生物学的試料における T_{reg} 細胞集団のレベルとの比でありうる。いくつかの態様において、対象由来の生物学的試料において算出された比が基準値より高い場合には、処置を以前と同じレベルに維持する。いくつかの態様において、対象由来の生物学的試料において算出された比が基準値より高い場合には、次の処置は、以前の処置よりも低い用量で与えられる。いくつかの態様において、対象由来の生物学的試料において算出された比が基準値より高い場合には、処置をある期間にわたって中止する。いくつかの態様にお

50

いて、対象由来の生物学的試料において算出された比が基準値と実質上同じであるか、基準値より低い場合には、次の処置は、以前の処置よりも高い用量で与えられる。

【0129】

組成物

いくつかの態様では、AITRポリペプチドのエピトープに特異的に結合する抗体および抗原結合性フラグメントを含む組成物が、ここに提供される。本開示の組成物（例：IRTCA抗体または抗体フラグメントを送達する組成物）は、前述の調整、処置または治療を必要とする細胞、組織、器官、動物または患者への本願IRTCA抗体または抗体フラグメントの送達に使用するための任意の適切な有効量の組成物を含みうる。本開示の方法（例：細胞をIRTCA抗体または抗体フラグメントと接触させる工程を含む方法）によって生成させた転換細胞集団（例：T_H1様細胞への転換）を含む組成物も、ここに提供される。

10

【0130】

本開示の組成物は、本明細書に開示するIRTCA抗体または抗原結合性フラグメントおよび/または本明細書に開示する方法によって得られる細胞集団を含む薬学的組成物を含む。いくつかの態様において、薬学的組成物は、緩衝剤、希釈剤、賦形剤またはそれらの任意の組み合わせを含むことができる。いくつかの態様において、組成物は、所望であれば、1種または複数種の追加治療活性物質も含有することができる。

【0131】

いくつかの態様において、本開示のIRTCA抗体、抗原結合性フラグメントおよび/または細胞集団は、哺乳動物（例：ヒト）への投与に適している。ここに提供される薬学的組成物の説明は、主としてヒトへの要処方投与（ethical administration）に適した薬学的組成物に関するが、そのような組成物があらゆる種類の動物への投与に一般に適することは当業者には理解されるであろう。ヒトへの投与に適した薬学的組成物をさまざまな動物への投与に適した組成物にするための変更はよく理解されており、通常の技量を有する獣医薬理学者は、そのような変更を、仮に実験が必要だとしても単なる日常の実験だけで、計画しかつ/または実行することができる。

20

【0132】

いくつかの態様において、本願組成物は、非経口投与用に製剤化されうる。例えばここに提供される薬学的組成物は、無菌の注射可能な形態（例：皮下注射または静脈内注入に適した形態）で提供されうる。例えばいくつかの態様において、薬学的組成物は、注射に適した液状剤形で提供される。いくつかの態様において、薬学的組成物は、注射に先だつて水性希釈剤（例：水、緩衝液、塩溶液など）で再構成することができる粉末（例：凍結乾燥および/または滅菌されたもの）として、任意で減圧下に提供される。いくつかの態様において、薬学的組成物は、水、塩化ナトリウム溶液、酢酸ナトリウム溶液、ベンジルアルコール溶液、リン酸緩衝食塩水などに希釈および/または再構成される。いくつかの態様において、粉末は、水性希釈剤と穏やかに（例えば振とうせずに）混合すべきである。

30

【0133】

いくつかの態様において、本開示のIRTCA抗体、抗原結合性フラグメントおよび/または細胞集団は、薬学的に許容される非経口媒体と共に製剤化される。そのような媒体の例は水、食塩水、リンゲル液、デキストロース溶液および1~10%ヒト血清アルブミンである。リポソームおよび固定油などの非水性媒体も使用することができる。媒体または凍結乾燥粉末は、等張性を維持する添加剤（例：塩化ナトリウム、マンニトール）および化学的安定性を維持する添加剤（例：緩衝剤および保存剤）を含有することができる。いくつかの態様において、製剤は、公知の技法または適切な技法によって滅菌される。

40

【0134】

本明細書に記載の薬学的組成物の製剤は、薬学分野において公知のまたは今後開発される任意の方法によって調製されうる。一般に、そのような調製方法は、活性成分を希釈剤もしくは他の賦形剤および/または1種もしくは複数種の他の補助成分と混合し、次に必要であればおよび/または所望であれば、製品を所望の単回投与ユニット（single dose unit）または複数回投与ユニット（multi-dose unit）に成形および/またはパッケージング

50

する工程を含む。

【0135】

いくつかの態様において、本開示のIRTCA抗体、抗原結合性フラグメントおよび/または細胞集団を含む薬学的組成物は、貯蔵用または投与用の容器、例えばバイアル、シリンジ（例：IVシリンジ）またはバッグ（例：IVバッグ）に含めることができる。本開示による薬学的組成物は、ばらで、単一投薬単位としておよび/または複数の単一投薬単位として、調製され、パッケージングされ、かつ/または販売されうる。本明細書において使用する場合、「投薬単位（unit dose）」とは、予め決定された量の活性成分を含む孤立した量の薬学的組成物である。活性成分の量は、一般に、対象に投与されることになる活性成分の投薬量に等しく、かつ/またはそのような投薬量の好都合な部分量、例えばそのような投薬量の半量または3分の1量に等しい。

10

【0136】

本開示による薬学的組成物における活性成分、薬学的に許容される賦形剤および/または任意の追加成分の相対量は、処置される対象の実体、サイズおよび/または状態に依存して、そしてまた組成物の投与経路にも依存して、さまざまであるだろう。下記の実施例では、一部で、齧歯類およびサルへの例示的IRTCA抗体の投与を説明する。動物系において投薬をスケールする標準的方法は当技術分野において公知である。例えば、参照によりその全体が本明細書に組み入れられるJ Basic Clin Pharm. March 2016-May 2016; 7 (2):27-31を参照されたい。例えば組成物は0.1% ~ 100% (w/w)の活性成分を含みうる。

20

【0137】

いくつかの態様において、組成物は、0.01mg/kg ~ 100mg/kgの用量で、本開示のIRTCA抗体もしくは抗原結合性フラグメントを含むか、または送達する。いくつかの態様において、組成物は、下限とその下限より大きい上限とに挟まれた範囲内の量の用量で、IRTCA抗体もしくは抗原結合性フラグメントを含むか、または送達する。いくつかの態様において、下限は、約0.01mg/kg、0.025mg/kg、0.05mg/kg、0.075mg/kg、0.1mg/kg、0.25mg/kg、0.5mg/kg、0.75mg/kg、1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、8mg/kg、10mg/kg、20mg/kg、25mg/kg、30mg/kg、40mg/kg、50mg/kg、50mg/kg、70mg/kg、80mg/kgまたは90mg/kgでありうる。いくつかの態様において、上限は、約0.025mg/kg、0.05mg/kg、0.075mg/kg、0.1mg/kg、0.25mg/kg、0.5mg/kg、0.75mg/kg、1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、8mg/kg、10mg/kg、20mg/kg、25mg/kg、30mg/kg、40mg/kg、50mg/kg、50mg/kg、70mg/kg、80mg/kg、90mg/kgまたは100mg/kgでありうる。

30

【0138】

薬学的組成物は薬学的に許容される賦形剤をさらに含んでよく、本明細書にいう薬学的に許容される賦形剤には、所望するその剤形に適したありとあらゆる溶媒、分散媒、希釈剤または他の液状媒体、分散助剤または懸濁助剤、表面活性剤、等張剤、増粘剤または乳化剤、保存剤、固形結合剤、潤滑剤などが含まれる。Remington's The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, A.R.Gennaro (Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006)は、薬学的組成物を製剤化する際に使用されるさまざまな賦形剤およびそれらを調製するための公知の技法を開示している。従来の賦形剤媒質は、それが、例えば何らかの望ましくない生物学的効果を生むか、そうでなければ薬学的組成物の他の何らかの構成要素と有害な形で相互作用することなどによって、ある物質またはその誘導体と不適合でない限り、いずれも、その使用は本開示の範囲内であると考えられる。

40

【0139】

いくつかの態様において、薬学的に許容される賦形剤は、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%純粋である。いくつかの態様において、賦形剤はヒトでの使用および獣医学的使用について承認されている。いくつかの態様において、賦形剤は米国食品医薬品局によって承認されている。いくつかの態様において、賦形剤は医薬品用である。いくつかの態様において、賦形剤は、米国薬局方（USP）、欧州薬局方（EP）、英国薬局方および/または国際薬局方の規格を満たす

50

。

【0140】

薬学的組成物の製造において使用される薬学的に許容される賦形剤として、不活性希釈剤、分散および/または造粒剤、表面活性剤および/または乳化剤、崩壊剤、結合剤、保存剤、緩衝剤、潤滑剤および/または油が挙げられるが、それらに限定されるわけではない。そのような賦形剤は任意で薬学的製剤に含めうる。製剤者の判断次第で、カカオ脂および坐剤ワックス、着色剤、コーティング剤、甘味料、フレーバーおよび/または芳香剤などの賦形剤が、組成物に存在しうる。

【0141】

いくつかの態様において、本願の薬学的組成物は、1種または複数種の薬学的に許容される賦形剤（例：保存剤、不活性希釈剤、分散剤、表面活性剤および/または乳化剤、緩衝剤など）を含む。いくつかの態様において、薬学的組成物は、1種または複数種の保存剤を含む。いくつかの態様において、薬学的組成物は保存剤を含まない。

10

【0142】

いくつかの態様において、本開示のIRTCA抗体または抗原結合性フラグメントを含む組成物は、安定に製剤化される。いくつかの態様において、本開示のIRTCA抗体または抗原結合性フラグメントの安定な製剤は、食塩水または選ばれた塩を含むリン酸緩衝液、ならびに保存処理された溶液および保存剤を含有する製剤、ならびに薬学的使用または獣医学的使用に適した多用途の保存処理された製剤を含有しうる。保存処理された製剤は、少なくとも1つの公知の保存剤、または任意で、水性希釈剤中の少なくとも1つのフェノール、
m-クレゾール、p-クレゾール、o-クレゾール、クロロクレゾール、ベンジルアルコール、
亜硝酸フェニル水銀（phenylmercuric nitrite）、フェノキシエタノール、ホルムアルデ
ヒド、クロロブタノール、塩化マグネシウム（例：ヘキサ水和物）、アルキルパラベン（
メチル、エチル、プロピル、ブチルなど）、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム
、デヒドロ酢酸ナトリウムおよびチメロサル、またはそれらの混合物からなる群より選
択される保存剤を含有する。当技術分野において公知のとおり、例えば0.001～5%または
その中の任意の範囲もしくは値、例えば限定するわけではないが0.001、0.003、0.005、0
.009、0.01、0.02、0.03、0.05、0.09、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9
、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5
、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.3
、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、またはその中の任意の範囲もしくは値など、任意の適切な
濃度または混合物を使用することができる。限定でない例として、保存剤なし、0.1～2%
m-クレゾール（例：0.2、0.3、0.4、0.5、0.9、1.0%）、0.1～3%ベンジルアルコール（
例：0.5、0.9、1.1、1.5、1.9、2.0、2.5%）、0.001～0.5%チメロサル（例：0.005、0.
01）、0.001～2.0%フェノール（例：0.05、0.25、0.28、0.5、0.9、1.0%）、0.0005～1.
0%アルキルパラベン（例：0.00075、0.0009、0.001、0.002、0.005、0.0075、0.009、0.0
1、0.02、0.05、0.075、0.09、0.1、0.2、0.3、0.5、0.75、0.9、1.0%）などが挙げられ
る。

20

30

【0143】

いくつかの態様において、薬学的組成物は、冷蔵および/または冷凍することができる形態で提供される。いくつかの態様において、薬学的組成物は、冷蔵および/または冷凍することができない形態で提供される。いくつかの態様において、再構成された溶液および/または液状剤形は、再構成後、一定の期間（例：2時間、12時間、24時間、2日、5日、7日、10日、2週間、1ヶ月、2ヶ月またはそれ以上）にわたって貯蔵することができる。いくつかの態様において、指定された時間より長い抗体組成物の貯蔵は、抗体の分解をもたらす。

40

【0144】

液状剤形および/または再構成された溶液は、投与前に粒状物を含みかつ/または変色を伴う場合がある。いくつかの態様において、変色しているか濁っている場合かつ/または濾過後も粒状物が残っている場合、その溶液は使用すべきでない。

50

【0145】

製剤および/または医薬品の製造に関する一般論は、例えばRemington:The Science and Practice of Pharmacy 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins, 2005に見いださる。

【0146】

キット

本開示は、少なくとも1種の本明細書に記載のIRTCA抗体または抗体フラグメントで満たされた1つまたは複数の溶液を含む、薬学的パックおよび/またはキットを、さらに提供する。キットは、例えば治療方法、診断方法、細胞増殖および/または細胞単離方法などを含む応用可能な任意の方法において、使用しうる。そのような容器には、任意で、医薬品または生物学的製剤の製造、使用または販売を規制する政府機関によって指定された形式で、(a) ヒト投与のための製造、使用または販売の、当該器官による承認、(b) 使用説明、またはその両方を反映した告知を添付することができる。

10

【0147】

いくつかの態様において、キットは、検出(例:IRTCA抗体または抗体フラグメントの検出)のための1種または複数種の試薬を含みうる。いくつかの態様において、キットは、検出可能な形態の(例えば検出可能部分または検出可能実体と共有結合で関連付けられた)IRTCA抗体または抗体フラグメントを含みうる。

【0148】

いくつかの態様において、ここに提供するIRTCA抗体または抗体フラグメントは、対象を処置するために使用されるキットに含めることができる。いくつかの態様において、ここに提供するIRTCA抗体または抗体フラグメントは、T細胞の転換(例:制御性T細胞の T_H1 様(IFN-陽性)細胞への転換)に使用されるキットに含めることができる。

20

【0149】

本願全体を通して言及される引用文献(刊行物(literature reference)、発行済み特許、公表された特許出願、および同時係属中の特許出願を含む)は特に、参照により本明細書に組み入れられる。

【0150】

本発明の他の特徴は、以下の例示的態様の以下の説明において明らかになるであろう。ただし、以下の実施例は本発明を例証するために提供されるに過ぎず、本発明の範囲は以下の実施例には限定されない。

30

【実施例】

【0151】

本開示は、少なくとも一部において、hAITRに対して高いアフィニティを有する新規IRTCA抗体およびそれらのフラグメントを提供し、T細胞上にhAITRを発現するT細胞への例示的IRTCA抗体の結合は、免疫強化および/または抗癌活性につながりうる。新規IRTCA抗体およびそれらのフラグメントの生成および特徴づけを、以下の実施例においてさらに詳しく説明する。

【0152】

実施例1: IRTCA-Aを含む抗AITR抗体のクローニング

40

この実施例では例示的IRTCA抗体の生産を述べる。モノクローナル抗体(mAb)IRTCA-Aをテンプレートとして使用し、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を使って重鎖可変領域遺伝子および軽鎖可変領域遺伝子ならびにヒト定常領域遺伝子をそれぞれ増幅してから、Sfi-1制限酵素での処理、ライゲーション、発現ベクターへの挿入を行った。大腸菌における発現がペリプラズム領域への局在化をもたらさうように、細菌ペリプラズム領域への移送を媒介するpeIBリーダー配列を重鎖遺伝子の上流に挿入し、分泌を誘導するシグナルペプチドを軽鎖遺伝子に挿入した。天然Fabとの構造的同一性が維持されうるように、IRTCA可変領域の特異的配列を軽鎖のヒトカップ鎖に接続し、重鎖のヒト定常領域と接続することで、クローニングを行った(図1パネルa参照)。本発明において使用されるAITR(hGITR)由来エピトープのアミノ酸配列は'HCGDPCCTTC'(SEQ ID NO:19)である。これは、AIT

50

R (hGITR) 中の細胞外ドメインの第55～第64アミノ酸に対応する。

【0153】

親IRTCA-Aの可変領域におけるアンバー停止コドンの挿入

1つのヌクレオチドで部位特異的変異導入の技法を使って、親IRTCA-A可変領域のCDR3領域のすぐ上流に、アンバー停止コドンを生成させた(すなわちIRTCA-A:TGC TGA)。CDR3ランダム化ライブラリーを構築するために、IRTCA-Aにおいて、親型軽鎖の89番目のシステインと親型重鎖の96番目のシステインを停止コドンに変異させた。設計のためのスクリーニングが効率よく達成されうるように、遺伝子発現頻度を低下させると共に、汚染を防止するために、親配列の選択を防止した(図1パネルb)。

【0154】

実施例2: 抗AITR抗体ライブラリーの構築および抗AITR抗体の製作

停止コドンが挿入されたIRTCA-Aの親塩基配列を含むFabをテンプレートとして使用して、CDR3領域におけるランダム変異が得られるように、ランダムPCRを行った(図2)。

【0155】

CDR3中の配列変化は抗体の抗原決定基に著しい変化をもたらさないが、バリエーションを増加させる。一方、選択される抗体のエピトープが変化する可能性も、誘導変異を持つアミノ酸の数に比例して増加する。そこで、ランダム化PCRの設計時に、IRTCA-Aによって認識される元のエピトープが修飾されないように、また各アミノ酸配列の変異率が70%以下になるように、LCDR3-RおよびHCDR3-Fプライマーの変異率を調整した。軽鎖については、スプライシングPCR技法を使って重鎖配列を固定し、ompプライマーとLCDR3-Rとで増幅されるフラグメント1(350bp)およびLFR4-Rとdp seq.とで増幅されるフラグメント2(約1200 bp)をテンプレートとして使用して、ompプライマーとdp seqとで増幅された軽鎖CDR3領域中にランダム変異を有するおよそ1500bpのフラグメント3を得た(図2パネルa参照)。重鎖については、同じ方式で増幅を行った後(図2パネルb参照)、その結果生じた塩基配列を検証してから、ファージ表面での発現を達成するために発現ベクターにクローニングした。すなわち、抗体構造に対する影響を最小限に抑えるために、可変軽鎖中のCDR3(CDR-L3)領域の長さおよび重鎖中のCDR3(CDR-H3)の長さを維持した条件下。変異を起こしたクローンの頻度を測定したところ、およそ86%に達することがわかった。結論として、軽鎖および重鎖の多様性が 1×10^8 以上に達するファージディスプレイライブラリーが構築された(表1参照)。

【0156】

表1は、IRTCA-AのFabを発現するファージライブラリーのバリエーションを示している。すなわち、多様性の算出には、「ライブラリー多様性 = 形質転換体数 × 通常Fabクローニング率」を使用しうる。

【0157】

【表1】

| | 形質転換体数 | 所期のFabクローニング率% | 多様性 |
|------------|-------------------|----------------|-------------------|
| IRTCA-A 軽鎖 | 5.0×10^8 | 77.5 | 3.8×10^8 |
| IRTCA-A 重鎖 | 5.0×10^8 | 86.3 | 4.8×10^8 |

【0158】

一方、二価型の抗AITR抗体を生成させるために、ファージディスプレイライブラリーから得られたFab(VH(重鎖可変領域)およびVL(軽鎖可変領域))をCH(重鎖可変領域)遺伝子およびCL(軽鎖可変領域)遺伝子と接続してから、動物細胞用のタンパク質発現ベクターに挿入した。抗AITR抗体遺伝子が挿入されたベクターを、HEK293細胞および/またはCHO細胞を含む動物細胞株にトランスフェクトし、培養上清からの精製にプロテインAカラムまたはプロテインGカラムを使うことで、二価型の抗ヒトAITRモノクローナル抗体の調製物を得た(データ省略)。

10

20

30

40

50

【0159】

実施例3:改良されたアフィニティーを持つ抗AITR抗体の選択

製作されたFab（抗原結合性フラグメント）ライブラリーを、4回繰り返して、固定GST-AITR抗原による選択プロセスに付した。IRTCA-Aに関して、反復パニングを行った後に、強い陽性シグナルを持つ17の重鎖クローンと33の軽鎖クローンを得た。アフィニティーの増加は K_{off} 値を低減するので、SPR（表面プラズモン共鳴）に基づいて K_{off} を測定するために、合計50のクローンから47のFabを選択して精製した（図3および図4参照）。値が減少している5つ（4つの重鎖、1つの軽鎖）のFabについて、それぞれの K_D 値をSPR（表面プラズモン共鳴）で測定した（表2参照）。

【0160】

表3に示すとおり、その後、選択した最終IRTCA-A Fabはすべてが増加したアフィニティーを有し、増加率は8~44倍変化することがわかった。

【0161】

表2に、選択された5種のIRTCA-A FabについてAITR抗原に対する K_{off} 測定値および K_D 測定値を列挙する。

【0162】

【表2】

| クローン | K_{off} | K_D |
|-----------------------|---|-----------------------|
| 親IRTCA-A | $1.34 \times 10^{-3} - 1.99 \times 10^{-3}$ | 1.14×10^{-7} |
| IRTCA-A1 (クローンL1E9) | 7.21×10^{-4} | 1.39×10^{-8} |
| IRTCA-A10 (クローンH1A10) | 5.64×10^{-4} | 1.36×10^{-8} |
| IRTCA-A12 (クローンH2A10) | 3.91×10^{-4} | 4.13×10^{-9} |
| IRTCA-A14 (クローンH2F8) | 3.45×10^{-4} | 3.79×10^{-9} |
| IRTCA-A15 (クローンH1F1) | 6.55×10^{-4} | 2.57×10^{-9} |

【0163】

表3に、AITR抗原に対する5種のIRTCA-A Fabの結合アフィニティーの測定値および倍率比（fold ratio）を列挙する（ $K_D = K_{off} / k_{on}$ 、 K_D 比 = 変異体 K_D /IRTCA-A K_D ）。

【0164】

【表3】

| クローン | $K_{on} (M^{-1}s^{-1})$ | $K_{off} (s^{-1})$ | $K_A (M^{-1})$ | $K_D (M)$ | Chi ² | K_D 比 |
|----------|-------------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|------------------|---------|
| 親IRTCA-A | 1.17×10^4 | 1.34×10^{-3} | 8.74×10^6 | 1.14×10^{-7} | 0.635 | 1.0 |
| H1A10 | 4.15×10^4 | 5.65×10^{-4} | 7.34×10^7 | 1.36×10^{-8} | 0.399 | 8.38 |
| H2A10 | 6.97×10^4 | 2.88×10^{-4} | 2.42×10^8 | 4.13×10^{-9} | 0.419 | 27.6 |
| H1F1 | 1.30×10^5 | 3.34×10^{-4} | 3.90×10^8 | 2.57×10^{-9} | 0.934 | 44.4 |
| H2F8 | 7.11×10^4 | 2.70×10^{-4} | 2.64×10^8 | 3.79×10^{-9} | 1.23 | 30.1 |
| L1E9 | 2.96×10^4 | 4.12×10^{-4} | 7.18×10^7 | 1.39×10^{-8} | 0.641 | 8.2 |

【0165】

表4に、表2~表3のクローン抗体について、重鎖可変領域、軽鎖可変領域、重鎖CDRおよび軽鎖CDRのアミノ酸配列に関連するSEQ ID NOを列挙する。

【0166】

表5に、表2~表3のクローン抗体について、重鎖可変領域、軽鎖可変領域、重鎖CDRおよび軽鎖CDRのアミノ酸配列を列挙する。

【0167】

【表4】

| クローン | IRTCA 名称 | 重鎖 可変 領域 SEQ ID NO: | 軽鎖 可変 領域 SEQ ID NO: | 重鎖 | | | 軽鎖 | | |
|-------|--------------|---------------------------------|---------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | | | | HCDR1 SEQ ID NO: | HCDR2 SEQ ID NO: | HCDR3 SEQ ID NO: | LCDR1 SEQ ID NO: | LCDR2 SEQ ID NO: | LCDR3 SEQ ID NO: |
| | 親 IRTCA-A | 1 | 2 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 |
| L1E9 | IRTCA-A1 | 1 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 18 |
| H1A10 | IRTCA-A10 | 3 | 2 | 8 | 9 | 14 | 11 | 12 | 13 |
| H2A10 | IRTCA-A12 | 4 | 2 | 8 | 9 | 15 | 11 | 12 | 13 |
| H2F8 | IRTCA-A14 | 6 | 2 | 8 | 9 | 17 | 11 | 12 | 13 |
| H1F1 | IRTCA-A15 | 5 | 2 | 8 | 9 | 16 | 11 | 12 | 13 |

【0168】

【表5】

| クローン | 可変領域 | アミノ酸配列 | SEQ. ID. |
|----------------------|------|---|----------|
| 親 IRTCA-A | 重鎖 | QVQLVQSGTQVKMPGASVKVSCKASGYTFDDY GIGWVRQAPGQGLE WMGWISPYTHRTNSSPKLQDRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVY YCARDGTYYDFWSGYFDNGAFDIWGQGLTVTVSS | 1 |
| | 軽鎖 | QSVVTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSTS NIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIY DNYKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLRTGDEADYFCGTWSSSLNAW VFGGGTKLTVL | 2 |
| IRTCA-A1 (L1E9) | 重鎖 | QVQLVQSGTQVKMPGASVKVSCKASGYTFDDY GIGWVRQAPGQGLE WMGWISPYTHRTNSSPKLQDRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVY YCARDGTYYDFWSGYFDNGAFDIWGQGLTVTVSS | 1 |
| | 軽鎖 | QSVVTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSTS NIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIY DNYKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLRTGDEADYFCGSWESGSNAY KFGGGTKLTVL | 7 |
| IRTCA-A10 (H1A10) | 重鎖 | QVQLVQSGTQVKMPGASVKVSCKASGYTFDDY GIGWVRQAPGQGLE WMGWISPYTHRTNSSPKLQDRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVY YCARDGTYYDFWSGYFDNAAFDSWGQGLTVTVSS | 3 |
| | 軽鎖 | QSVVTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSTS NIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIY DNYKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLRTGDEADYFCGTWSSSLNAW VFGGGTKLTVL | 2 |
| IRTCA-A12 (H2A10) | 重鎖 | QVQLVQSGTQVKMPGASVKVSCKASGYTFDDY GIGWVRQAPGQGLE WMGWISPYTHRTNSSPKLQDRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVY YCARDGTYYDFWSGYFDNATFDWGWQGLTVTVSS | 4 |
| | 軽鎖 | QSVVTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSTS NIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIY DNYKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLRTGDEADYFCGTWSSSLNAW VFGGGTKLTVL | 2 |
| IRTCA-A14 (H2F8) | 重鎖 | QVQLVQSGTQVKMPGASVKVSCKASGYTFDDY GIGWVRQAPGQGLE WMGWISPYTHRTNSSPKLQDRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVY YCARDGTYYDFWSGYFDTAAFDIWGQGLTVTVSS | 6 |
| | 軽鎖 | QSVVTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSTS NIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIY DNYKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLRTGDEADYFCGTWSSSLNAW VFGGGTKLTVL | 2 |
| IRTCA-A15 (H1F1) | 重鎖 | QVQLVQSGTQVKMPGASVKVSCKASGYTFDDY GIGWVRQAPGQGLE WMGWISPYTHRTNSSPKLQDRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVY YCARDGTYYDFWSGYFDNNAFDIWGQGLTVTVSS | 5 |
| | 軽鎖 | QSVVTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSTS NIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIY DNYKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLRTGDEADYFCGTWSSSLNAW VFGGGTKLTVL | 2 |

10

20

30

【0169】

【表6】

| クローン | 可変領域 | CDR1 アミノ酸 配列 | SEQ ID NO: | CDR2 アミノ酸 配列 | SEQ ID NO: | CDR3 アミノ酸配列 | SEQ ID NO: |
|----------------------|------|--------------------|------------------|--------------------|------------------|--------------------------|---------------|
| 親 IRTCA-A | 重鎖 | GYTFDDYG | 8 | ISPYTHRT | 9 | ARDGTYDFWSGYFDNG AFDI | 10 |
| | 軽鎖 | TSNIGNNY | 11 | DNY | 12 | GTWDSSLNAWV | 13 |
| IRTCA-A1 (L1E9) | 重鎖 | GYTFDDYG | 8 | ISPYTHRT | 9 | ARDGTYDFWSGYFDNG AFDI | 10 |
| | 軽鎖 | TSNIGNNY | 11 | DNY | 12 | GSWESGSNAYK | 18 |
| IRTCA-A10 (H1A10) | 重鎖 | GYTFDDYG | 8 | ISPYTHRT | 9 | ARDGTYDFWSGYFDNA AFDS | 14 |
| | 軽鎖 | TSNIGNNY | 11 | DNY | 12 | GTWDSSLNAWV | 13 |
| IRTCA-A12 (H2A10) | 重鎖 | GYTFDDYG | 8 | ISPYTHRT | 9 | ARDGTYDFWSGYFDNA TFDF | 15 |
| | 軽鎖 | TSNIGNNY | 11 | DNY | 12 | GTWDSSLNAWV | 13 |
| IRTCA-A14 (H2F8) | 重鎖 | GYTFDDYG | 8 | ISPYTHRT | 9 | ARDGTYDFWSGYFDTA AFDI | 17 |
| | 軽鎖 | TSNIGNNY | 11 | DNY | 12 | GTWDSSLNAWV | 13 |
| IRTCA-A15 (H1F1) | 重鎖 | GYTFDDYG | 8 | ISPYTHRT | 9 | ARDGTYDFWSGYFDNN AFDI | 16 |
| | 軽鎖 | TSNIGNNY | 11 | DNY | 12 | GTWDSSLNAWV | 13 |

10

20

30

40

50

【0170】

実施例4: バイオマーカーとしてのIFN- およびTGF- の使用

T_H1 細胞はさまざまな T_H （ヘルパーT）細胞タイプの中で最も効率のよい抗癌能を有すると評価され、 T_{reg} 細胞および T_H2 細胞は、腫瘍の周囲に免疫抑制環境を作り出すことによって腫瘍形成を促進することが知られている。 T_{reg} 細胞は、サブレッサーT細胞でもあること、そして自己免疫疾患および過剰な免疫応答を抑制するために自己抗原に対する耐性を担っていることが知られている（Sakaguchi et al, Cell, 133:775-787, 2008）。したがって T_{reg} 細胞は、この理由から、自己免疫疾患の処置に役立つ。逆に、これは腫瘍細胞に対する免疫系の活性を弱めるので、患者の抗癌能を減少させることになる。それにもかかわらず、FoxP3の発現が不安定な T_{reg} 細胞の中のいくつかのサブグループは、エフェクターメモリー表現型に転換されうる（Zhou et al, Nature immunology, 10:1000-1007, 2009）。加えて、VHL（フォンヒッペル・リンダウ）を欠く T_{reg} 細胞の特性は固定されておらず、特定の免疫環境では変化を起こしうる。例えば、これは、IFN- を生産する T_{eff} 細胞（エフェクターT細胞）に転換されうる（Lee et al, Immunity, 42:1062-1074, 2015）。それゆえに、 T_{reg} 細胞に基づく免疫制御は効果的な腫瘍抑制の手段になり、 T_{reg} 細胞を除去しまたは T_{eff} 細胞に転換する技術は、免疫細胞による抗癌処置の究極の目標である。

【0171】

IFN- は、Tリンパ球およびナチュラルキラー細胞（NK細胞）によって分泌される代表的サイトカインであり、増殖活性および抗ウイルス活性を呈する。これは、マクロファージの重要な活性化因子でもあり、 T_H1 細胞を他の細胞タイプと識別する特に重要なサイト

カインである。そのような T_H1 細胞は、単独で分裂を刺激するためにIFN- γ を分泌し、未分化 $CD4^+$ 細胞(T_H0)を T_H1 細胞へと分化させる能力を有する。分化した T_H1 細胞は、細胞傷害性T細胞、食細胞およびB細胞の活性化に重要な役割を果たす。他方、TGF- β が、 $Foxp3^+ T_{reg}$ 細胞の免疫制御にとって非常に重要な因子であることは公知であり(Maria et al, Immunity, 30:626-635, 2009)、特に、免疫抑制能を有する T_{reg} 細胞および T_H17 細胞への $CD4^+$ T細胞の分化を促進する(Basso et al, Cell Res., 4:399-411, 2009)。結局、抗癌薬の有効性は、TGF- β を分泌する T_{reg} 細胞の減少とIFN- γ を誘導する T_H1 の増加とを相対的に評価してからでなければ、決定することができない。この理由から、特定の刺激に対するIFN- γ およびTGF- β の分泌の測定は、T細胞機能の変化の定量的な尺度として利用することができる最適な基準となりうる。

10

【0172】

そこで、バイオマーカーとして役立ち、 T_{reg} 細胞に対するIRTCA-Aの活性を決定するという、IFN- γ (インターフェロンガンマ)および/またはTGF- β (トランスフォーミング成長因子ベータ)の潜在能力を検証するために、 $CD4$ および $CD25$ を含む代表的 T_{reg} 細胞マーカーを使って、末梢血単核球(PBMC)から $CD4^+ CD25^{high} FOXP3^+ T_{reg}$ 細胞を単離し、次にモノクローナル抗体(mAb)によるサイトカイン分泌を測定した。

【0173】

続いて、図6Aおよび図6Bに示すように、IRTCA-Aは、 T_{reg} 細胞のAITRに作用して、IFN- γ の分泌を増加させると共に、TGF- β の分泌を減少させた。加えて、IRTCA-A処理は、 $CD4^+$ T細胞におけるIFN- γ 分泌を誘導し、 T_H1 細胞に極性化させた(図5)。すなわちIRTCA-Aは、用量依存的に、T細胞のAITRを効果的に刺激し、 T_H1 様細胞への T_{reg} 細胞の転換を促進した。これにより、IFN- γ およびTGF- β は、AITRシグナリング系を刺激する効果を測定するための機能的ツールとして使用しうることを示された。

20

【0174】

実施例5: 親和性成熟したIRTCA-Aに基づく $CD4^+$ T細胞の活性化および極性化

この実施例では、サイトカイン分泌を含む、 $CD4^+$ T細胞に対する親和性成熟IRTCA-A系列抗体の効果を述べる。

【0175】

まず、Fabの変異が、それらが結合できるエピトープを変化させたかどうかを検証するために、AITRの欠失変異体を製作して、親型と比較したところ、予想どおり、IRTCA-A系列Fabは、AITRエピトープに結合するその能力を維持していることが示された(表7)。AITRとの結合アフィニティーがIRTCA-Aと比較して高い5種の親和性成熟IRTCA-A Fab(表7のIRTCA-A1、10、12、14、15)の機能性を評価するために、 $CD4^+$ T細胞を T_H1 型細胞に変化させる抗体の極性化効率を測定した。

30

【0176】

表7に、IRTCA-A系列のFabクローンから単離し、次に精製した、Fab型の名前を列挙する(*:エピトープ結合能の検証が行われたFab)。

【表7】

| クローン名 | mAb名 |
|---------|------------|
| IRTCA-A | IRTCA-A |
| L1E9 | IRTCA-A1* |
| H1A10 | IRTCA-A10* |
| H2A10 | IRTCA-A12* |
| H2F8 | IRTCA-A14* |
| H1F1 | IRTCA-A15* |

40

【0177】

表8および図7Aに示すように、精製 $CD4^+$ T細胞をIRTCA-Aの親和性成熟mAbで処理し、培養上清から、サイトカイン分泌の量を測定すると、親和性成熟mAbは、IFN- γ の分泌を促

50

進すると共に、IFN- γ の分泌を誘導する。これらのデータは、IRTCAが、IFN- γ を分泌する T_H1 細胞へのCD4⁺T細胞の極性を加速する機能を有すること、および同じ系列のFabもCD4⁺T細胞表面上のAITRと相互作用することを示している。特に、0.5 μ gのIRTCA-A12、IRTCA-A14およびIRTCA-A15の投与は、IRTCA-Aが引き起こすIFN- γ 分泌のレベルよりおよそ200%以上高いIFN- γ の分泌を呈するように、細胞を導いた（図7Aおよび表8参照）。

【0178】

表8は、IRTCA-A系列mAbの投与後にCD4⁺T細胞におけるIFN- γ 分泌を測定した結果を示している（ K_D 比 = 変異体 K_D /IRTCA-A K_D ）。

【0179】

【表8】

| クローン | K_D 比 | IFN- γ 分泌 |
|-----------|---------|------------------|
| IRTCA-A | 1.0 | + |
| IRTCA-A1 | 8.2 | + |
| IRTCA-A10 | 8.4 | ++ |
| IRTCA-A12 | 27.6 | +++++ |
| IRTCA-A14 | 30.1 | +++++ |
| IRTCA-A15 | 44.4 | +++++ |

10

【0180】

実施例6: T_{reg} 細胞（制御性T細胞）に対する抗AITR抗体の効果

IRTCA-Aの結合アフィニティーを増加させたmAbが T_{reg} 細胞に及ぼす影響を決定するために、CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ T_{reg} 細胞を単離し、IRTCA-A1、A10、A12、A14およびA15で処理した。

【0181】

表9および表10に示すように、IRTCA-A抗体による処理後に、IFN- γ （ T_H1 極性化のマーカー）の分泌は増加し（図7B）、一方、TGF- β （ T_{reg} 細胞の代表的抑制サイトカイン）の分泌は減少した（図7C）。

【0182】

上記の結果によれば、IRTCA-A系列のmAbは、 T_{reg} 細胞の抑制能を減少させ、 T_{eff} 細胞の活性化を増加させることで、抗癌効果を含む微小環境を作り出すと予想される。加えて、表3、表9および表10に示すように、AITRに対するアフィニティーの増加には、サイトカイン分泌と実質的な相関関係があり、これはIRTCA-A抗体の抗癌剤としての役割に寄与する。IRTCA-Aと比較して小さな K_D 値（表3参照）を有する、すなわちAITRとの結合アフィニティーが改良されている、IRTCA-A12およびIRTCA-A15は、IFN- γ の分泌の増加ももたらした。

20

30

【0183】

さらにまた、CDR配列は異なるものの互いに似ているIRTCA-A系列抗体は共通のAITR抗原エピトープに結合するが、それらが傾向の異なる効果を呈することも、注目に値する。言い換えると、結合アフィニティーに応じて、IRTCA-A15は、IRTCA-Aのおよそ25%の用量で、CD4⁺CD25^{high} T_{reg} 細胞において、同じ抗癌効果を達成できると予期された。これは、AITR mAbの用量を制御することで、 T_{reg} 細胞の機能をコントロールすることができるだけでなく、同じエピトープを認識するが結合アフィニティーが強化されている異なるmAb種を使用することで、強さの異なるシグナルを送ることによって、治療効果をコントロールすることもできることを意味する。

40

【0184】

表9に、IRTCA-A系列mAbを投与した後の T_{reg} 細胞からのIFN- γ の分泌の変化を示す。

【0185】

【表9】

| クローン | K _D 比 | IFN- γ 分泌 |
|-----------|------------------|------------------|
| IRTCA-A | 1.0 | ++ |
| IRTCA-A1 | 8.2 | + |
| IRTCA-A10 | 8.4 | ++ |
| IRTCA-A12 | 27.6 | ++++ |
| IRTCA-A14 | 30.1 | + |
| IRTCA-A15 | 44.4 | +++++ |

10

【0186】

表10に、IRTCA-A系列mAbを投与した後のT_{reg}細胞からのTGF- β 分泌の変化を示す。

【0187】

【表10】

| クローン | K _D 比 | TGF- β 分泌 |
|-----------|------------------|-----------------|
| IRTCA-A | 1.0 | +++++ |
| IRTCA-A1 | 8.2 | +++ |
| IRTCA-A10 | 8.4 | +++ |
| IRTCA-A12 | 27.6 | + |
| IRTCA-A14 | 30.1 | + |
| IRTCA-A15 | 44.4 | + |

20

【0188】

実施例7:NOD-SCIDマウスにおけるヒト末梢血単核球の移植および抗AITR抗体の抗腫瘍活性
この実施例では、ヒト末梢血単核球(PBMC)およびヒト結腸直腸癌細胞を投与した後のNOD-SCIDマウスに対する抗AITR抗体の抗腫瘍効果を述べる。

【0189】

まず、HLA-A24型の健常ドナーから収集した末梢静脈血をヘパリンで処理してから、Ficoll-paque (GE Healthcare、ニュージャージー州ピスカタウェイ)密度勾配遠心分離を行って末梢血単核球(PBMC)を得た。次に、回収に使用した3時間以内に、RPMIに含まれている 1×10^7 個のヒトPBMCを、各NOD-SCIDマウスに腹腔内注射した。上記21匹の移植マウスを、ヒトPBMC(HLA-A24型)の注射に続く5週間に分析した。

30

【0190】

7週齢のNOD-SCIDマウス(Jackson Laboratory、メイン州バーハーバー)を、SPF(特定病原体フリー)環境である動物室において飼育した。動物実験はすべて、実験動物倫理指針(Experimental Animal Ethics Guidelines)に従って行った。

【0191】

抗AITRモノクローナル抗体(IRTCA)の抗癌効果を評価するために、HT29のヒト結腸直腸癌細胞(HLA-A24型、 1×10^7 細胞/マウス)をHu-PBL-SCIDマウスの背側に皮下注射し、腫瘍サイズが直径約2cmに達したら、抗AITRモノクローナル抗体(IRTCA)を、体重1kgあたり0.3mg、0.6mg、1.0mg、3.0mg、5.0mgおよび10.0mgの用量で、5日ごとに、合計3回、腹腔内投与した。ヒトIgGを対照群として使用した。マウス腫瘍体積(単位 mm^3)を群および日付に従って測定した。

40

【0192】

図8に示すように、抗AITRモノクローナル抗体(IRTCA)で処置したマウスにおける腫瘍サイズは、抗体濃度と相関する形で減少した。特に、3.0mg/kgのIRTCA濃度は、腫瘍が33日目まで完全に根絶されるような効果を見せた。

【0193】

その上、図9に示すように、HT29細胞を注射した腫瘍負荷マウスを、対照hIgG、H1F1、M

50

K4166 (Merckの抗GITR抗体) またはペムプロリズマブ (キイトルーダ) で、i.v.注射により、1週間間隔で、3.0mg/kgの投薬量で処置したところ、H1F1だけが、数週間にわたって腫瘍サイズの減少をもたらした。

【0194】

また、例示的抗AITRモノクローナル抗体H1F1を、4種の癌、すなわちトリプルネガティブ乳癌 (MDA-MB231)、大腸癌 (HT-29) および黒色腫 (MDA-MB435、SK-MEL2) に対するその抗腫瘍効果を調べるために、(上述のように) ヒトPBMCでヒト化した7週齢雌NOD-SCIDマウスに投与した。マウスには、1匹あたり 1×10^7 個の腫瘍細胞を注射し、腫瘍サイズが体積で1000~1500mm³に達したら、その腫瘍負荷マウスに、H1F1またはhIgGを、3日ごとに3回、腹腔内 (i.p.) 注射した。図10A~Dに示す時点において、腫瘍の幅、長さおよび高さ

10

【0195】

実施例8: カニクイザルにおける抗AITR抗体の組織交差反応性、毒性および作用機序の分析

この実施例では、カニクイザルにおける例示的抗AITR抗体による処置の効果を述べる。この研究には、およそ25~35歳で体重がおよそ2~3kgのカニクイザル (*Macaca fascicularis*) 7匹を使用した。対照群には1匹の雌ザルを含め、これには39mL/kgの投与体積を与えた。低用量群には1匹の雄ザルおよび1匹の雌ザルを含め、これらのそれぞれには、22.5mg/kgのH1F1投薬量を2.3mg/kgの濃度および9.75mL/kgの投与体積で与えた。中用量群には1匹の雄ザルおよび1匹の雌ザルを含め、これらのそれぞれには、45mg/kgのH1F1投薬量を2.3mg/kgの濃度および19.5mL/kgの投与体積で与えた。高用量群には1匹の雄ザルおよび1匹

20

【0196】

毒性試験をサルで行ったところ、臨床症状、体重/器官重量、血液検査、尿検査、組織病理学的検査および心電図検査のいずれにも、異常は観察されなかった。H1F1の無毒性量 (NOAEL) はマカクでは90mg/kg超であることがわかった。

【0197】

インビトロで、サイトカイン分泌に対するH1F1の効果を、CD4⁺CD25^{hi}9^hFoxp3⁺T細胞で調べた。図11に示すように、H1F1による処理は、H1F1による処理後のIFN- の分泌の増加およびTGF- の減少を証拠とする、CD4⁺CD25^{hi}9^hFoxp3⁺T細胞のT_H1細胞への極性化につながる。

30

【0198】

H1F1が媒介する制御性T細胞のT_H1細胞への転換は、マカクのインビボでも観察された。図12に示すように、H1F1の3種の用量はいずれも、3週間にわたるIFN- 陽性CD4⁺T細胞の増加につながる。加えて、H1F1サイトカイン誘導は弁別的であり、図13に示すとおり、H1F1による処理後にT_H1型のサイトカイン (IL-2およびIFN-) は増加したが、T_H2型のサイトカイン (IL-4およびIL-5) は変化しなかった。H1F1による処置は、インビボでマカクにおけるT_{reg}細胞とT_H1細胞とのバランスにも影響を及ぼした。図14に示すように、H1F1を投与したマカクの脾細胞では、制御性T細胞の集団および関連サイトカインTGF- が減少すると同時に、T_H1型の細胞が増加した。

40

【0199】

加えて、15の異なるラット器官、16の異なるイヌ器官、16の異なるサル器官、13の異なるヒト器官からの組織 (138の異なる組織) ならびにEBV関連胃癌を持つ癌患者からの組織および急性骨髄性白血病からの骨髄に対して、組織交差反応性研究を行った。H1F1特異的染色は免疫系では検出されたが、他の正常ヒト組織では検出されなかった。図15は、H1F1特異的染色が、EBV陽性胃癌およびAML患者からの骨髄に観察されたことを示している。交差反応性は、マカクおよびイヌのリンパ球に検出されたが、ラットの組織では交差反応性は観察されなかった。

【0200】

実施例9: 改良型抗AITR抗体の作出

50

この実施例では、最適化された抗AITR抗体の生産を述べる。

【0201】

抗AITR抗体生産

Expi293細胞を125mLエルレンマイヤーフラスコに入れ、8%CO₂培養器中、回転下(125rpm)、37℃において、Expi293発現培地で培養した。細胞を、フラスコ中、2~2.5×10⁶細胞/mlで培養した。-1日目に、細胞(フラスコあたり2×10⁶細胞/ml)を、125mLエルレンマイヤーフラスコ中の30mlのExpi293発現培地に調製した。0日目に、Opti-MEM培地を37℃の培養器で約30分間予熱した。チューブ1およびチューブ2を用意し、予熱したOpti-MEM培地1.5mLを各チューブに加えた。30μgのDNA(HC:15μg、LC:15μg)をチューブ1に加えて、よく混合した。80μLのExpifectamine293試薬をチューブ2に加えて、よく混合した。室温で5分間の反応後に、チューブ2の内容物をチューブ1に加えて、よく混合した。その混合物を室温で20分間反応させた。チューブ中の混合物が濁ったのが確認されたら、3mLのDNA-複合体をフラスコからとって、滴下した。添加後に、それを培養器で回転させながら18~20分間培養し、Expifectamine293トランスフェクションキットに用意されているエンハンサー1およびエンハンサー2を加えた。それを回転下で約7日間培養した。下記表11に、変異体抗AITR抗体の作出に使用した重鎖(HC)可変ドメインおよび軽鎖(LC)可変ドメインを要約する。下記表12は、変異体抗AITR抗体に対応する重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインならびにCDR SEQ ID NOを含む。

10

【0202】

(表11) H1F1変異体抗体Expi293細胞トランスフェクション表

20

| Ab | HC | LC |
|----------|---------|---------|
| H1F1.M1 | H1F1.WT | H1F1.L1 |
| H1F1.M2 | H1F1.WT | H1F1.L2 |
| H1F1.M3 | H1F1.WT | H1F1.L3 |
| H1F1.M4 | H1F1.H1 | H1F1.WT |
| H1F1.M5 | H1F1.H1 | H1F1.L1 |
| H1F1.M6 | H1F1.H1 | H1F1.L2 |
| H1F1.M7 | H1F1.H1 | H1F1.L3 |
| H1F1.M8 | H1F1.H2 | H1F1.WT |
| H1F1.M9 | H1F1.H2 | H1F1.L1 |
| H1F1.M10 | H1F1.H2 | H1F1.L2 |
| H1F1.M11 | H1F1.H2 | H1F1.L3 |
| H1F1.M12 | H1F1.H3 | H1F1.WT |

30

| | | |
|----------|-----------------|-----------------|
| H1F1.M13 | H1F1.H3 | H1F1.L1 |
| H1F1.M14 | H1F1.H3 | H1F1.L2 |
| H1F1.M15 | H1F1.H3 | H1F1.L3 |
| H1F1.M16 | H1F1.H4 | H1F1.WT |
| H1F1.M17 | H1F1.H4 | H1F1.L1 |
| H1F1.M18 | H1F1.H4 | H1F1.L2 |
| H1F1.M19 | H1F1.H4 | H1F1.L3 |
| H1F1.M20 | H1F1.H5 | H1F1.WT |
| H1F1.M21 | H1F1.H5 | H1F1.L1 |
| H1F1.M22 | H1F1.H5 | H1F1.L2 |
| H1F1.M23 | H1F1.H5 | H1F1.L3 |
| H1F1.M24 | H1F1.H2 | LC-A1 |
| H1F1.M25 | H1F1.H2 | LC-A2 |
| H1F1.M26 | H1F1.H2 | LC-A3 |
| H1F1.M27 | H1F1.H2 | LC-A4 |
| H1F1.M28 | H1F1.H2 | LC-A5 |
| H1F1.M29 | H1F1.H2 | LC-A6 |
| H1F1.M30 | H1F1.H2 | LC-A7 |
| H1F1.M31 | H1F1.WT.HC.SH | H1F1.WT.LC.SH |
| H1F1.M32 | JLHC1.A.HC.SH | JLHC1.A.LC.SH |
| H1F1.M33 | H1F1.OM.A.HC.SH | H1F1.OM.A.LC.SH |
| H1F1.M34 | H1F1.H2 | H1F1.L4 |
| H1F1.M35 | H1F1.H6 | H1F1.WT.LC.SH |
| H1F1.M36 | H1F1.H6 | H1F1.L2 |
| H1F1.M37 | H1F1.H6 | H1F1.L4 |
| H1F1.M38 | H1F1.H7 | H1F1.L5 |
| H1F1.M39 | H1F1.H7 | H1F1.L6 |
| H1F1.M40 | H1F1.H8 | H1F1.L5 |
| H1F1.M41 | H1F1.H8 | H1F1.L6 |
| H1F1.M42 | H1F1.H2.J1 | H1F1.WT(A27VL) |
| H1F1.M43 | H1F1.H2.J1 | H1F1.L2 |
| H1F1.M44 | H1F1.H2.J1 | H1F1.L3 |
| H1F1.M45 | H1F1.H2.J1 | H1F1.L4 |
| H1F1.M46 | H1F1.H2.J1 | H1F1.L5 |
| H1F1.M47 | H1F1.H2.J1 | H1F1.L6 |
| H1F1.M48 | H1F1.H2 | H1F1.L3.J3 |
| H1F1.M49 | H1F1.H2.J1 | H1F1.L3.J3 |
| H1F1.M50 | H1F1.H6 | H1F1.L3.J3 |

10

20

30

40

| | | |
|----------|---------------|----------------|
| H1F1.M51 | H1F1.H7 | H1F1.L3.J3 |
| H1F1.M52 | H1F1.H8 | H1F1.L3.J3 |
| H1F1.M53 | H1F1.H2.J2 | H1F1.WT(A27VL) |
| H1F1.M54 | H1F1.H2.J2 | H1F1.L2 |
| H1F1.M55 | H1F1.H2.J2 | H1F1.L4 |
| H1F1.M56 | H1F1.H2.J2 | H1F1.L5 |
| H1F1.M57 | H1F1.H2.J2 | H1F1.L6 |
| H1F1.M58 | H1F1.H2 | H1F1.L3.J1 |
| H1F1.M59 | H1F1.H6 | H1F1.L3.J1 |
| H1F1.M60 | H1F1.H7 | H1F1.L3.J1 |
| H1F1.M61 | H1F1.H8 | H1F1.L3.J1 |
| H1F1.M62 | H1F1.H2.J1 | H1F1.L3.J1 |
| H1F1.M63 | H1F1.H2.J2 | H1F1.L3.J1 |
| H1F1.M64 | H1F1.H2.J1 | H1F1.WT.LC.SH |
| H1F1.M65 | H1F1.H2.J2 | H1F1.WT.LC.SH |
| H1F1.M66 | H1F1.WT.HC.SH | H1F1.L3.J1 |
| H1F1.M67 | H1F1.WT.HC.SH | H1F1.L3.J3 |
| H1F1.M68 | H1F1.H2.J2 | H1F1.L3.J3 |
| H1F1.M69 | H1F1.H2.J1 | H1F1.L3.J1 |
| H1F1.M70 | H1F1.H2.J2 | H1F1.L3.J1 |
| H1F1.M71 | H1F1.H8 | H1F1.L3.J1 |
| H1F1.M72 | H1F1.H2.J1 | H1F1.L3.J2 |
| H1F1.M73 | H1F1.H2.J2 | H1F1.L3.J2 |
| H1F1.M74 | H1F1.H8 | H1F1.L3.J2 |

10

20

【 0 2 0 3 】

【 表 1 2 】

| mAb名 (クローン) | 重鎖 可変 領域 SEQ ID NO: | 軽鎖 可変 領域 SEQ ID NO: | 重鎖 | | | 軽鎖 | | |
|---|---------------------------------|---------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | | | HCDR1 SEQ ID NO: | HCDR2 SEQ ID NO: | HCDR3 SEQ ID NO: | LCDR1 SEQ ID NO: | LCDR2 SEQ ID NO: | LCDR3 SEQ ID NO: |
| H1F1.M69 (H1F1.H2.J1/ H1F1.L3.J1) | 21 | 22 | 24 | 25 | 16 | 11 | 12 | 13 |
| H1F1.M74 (H1F1.H8/ H1F1.L3.J2) | 20 | 23 | 8 | 25 | 16 | 11 | 12 | 18 |

30

40

【 0 2 0 4 】

H1F1変異体抗体配列

H1F1.H8

QVQLVQSGAQVKMPGESLKVSCASGYTFDDYGMGWVRQAPGQCLEWMGWISPYTG
RTNSSDKFQGRVTMTRDTSTSTAYMELRSLRSEDTAVYYCARDGTYDFWSGYFDNNA
FDIWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 20)

H1F1.H2.J1

QVQLVQSGAQVKMPGESLKVSCASGYTFTDYGMGWVRQAPGQGLEWMGWISPYTG
RTNSSDKFQGRVTMTRDTSTSTAYMELRSLRSEDTAVYYCARDGTYDFWSGYFDNNA
FDIWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 21)

10

H1F1.L3.J1

QSVVTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSTSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNYKRPSGVP
DRFSGSKSGTSASLAITGLQTEDEADYYCGTWDSSLNAWVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:
22)

H1F1.L3.J2

QSVVTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSTSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNYKRPSGVP
DRFSGSKSGTSASLAITGLQSEDEADYYCGSWESGSNAYKFGGGTKLTVL (SEQ ID NO:
23)

20

H1F1.H2.J1のCDR1

GYTFTDYG (SEQ ID NO: 24)

H1F1.H2.J1およびH1F1.H8のCDR2

ISPYTGRT (SEQ ID NO: 25)

hIgG1_3mu

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 26)

30

【 0 2 0 5 】

抗AITR抗体精製

クロマトグラフィーカラム調製

カラム（体積20ml）を20%エタノールで満たし、1回洗浄した。カラムを結合緩衝液で満たし、1回洗浄した。ピペットを使って、残りの緩衝液をカラムから完全に除去した。3~5mlの20%エタノールを加え、1mlのMabSelect SuRe LXレジンをゆっくり加えた。この手順中は、溶出するエタノールの量をチェックした。20%エタノールのすべてが排液され、Select SuRe LXレジスが2mlに達するまで、この手順を続けた。

40

【 0 2 0 6 】

抗体混合物の調製

トランスフェクトExpi293細胞から得た抗体混合物を遠心分離し（10,000rpm、10分）、細胞および不純物をベレット化した（10,000rpm、10分）。0.22 μmシリンジフィルタを使って上清を濾過した。

【 0 2 0 7 】

抗体精製（オープンカラムの場合）

MabSelect SuRe LXが充填されたカラムに満たした20%エタノールを完全に排液し、カラ

50

ムを18mlの結合緩衝液 (Binding buffer) で1回洗浄した。全抗体混合物を負荷した。カラムを18mlの結合緩衝液で1回洗浄した。緩衝液が完全に排液されたら、100 μ lの中和緩衝液が入っている1.5mlチューブをカラムの下に置き、カラムに結合している抗体を、毎回1mlの溶出緩衝液 (Elution buffer) を使って精製した。

【0208】

抗体精製 (FPLCの場合)

Mab select SURE (1ml) カラムをFPLCに接続し、緩衝液A (buffer A) (1 \times PBS) で安定化した。もはやピークが検出されなくなるまで安定化した後、試料を1ml/分の流速でカラムに適用することによって、抗体結合を行った。UVグラフがおよそ1500mAUから2000mAUに増加して、10mAU未満に減少するまで、緩衝液Aをカラムに適用する。その後、緩衝液B (Buffer B) (0.1Mグリシン、pH3.0) を適用することによって抗体を溶出させ、溶出ピークをUVグラフによって確認した。適当なピークのフラクションを得た。

10

【0209】

抗体透析

抗体精製後に、呈色反応のために5 μ lのブラッドフォード溶液 (Bradford solution) を溶出した試料250 μ lに加え、4ユニットのAmicon Ultraフィルタを使って、抗体生成物を1~1.5mlの体積まで濃縮した。濃縮された抗体生成物を、透析装置の、43mlの1 \times DPBSが入っているコニカルチューブに加え、振とう機を使って透析した (120rpm、2時間)。新しい1 \times DPBSで置き換えることにより、この工程を2回繰り返した。抗体生成物を透析装置からSpin-X遠心分離チューブフィルタユニットに移し、遠心分離し (10000rpm、2分)、2ml保存用ガラス瓶に入れ、使用するまで-20 および-80 で保存した。

20

【0210】

実施例10: 改良型抗AITR抗体の特徴づけ

改良型抗AITR抗体のAITR結合アフィニティーの決定

AITRを過剰発現する細胞株を、5%CO₂培養器中、37 において、完全培地 (H-DMEM + 10% FBS + 1 \times ペニシリン-ストレプトマイシン) で培養した。細胞株の形態、数および成長速度を監視しながら、3日ごとに継代培養を行った。

【0211】

1 \times トリプシン/EDTA溶液を使って、AITRを過剰発現する細胞株の細胞を調製したら、細胞をFACSチューブ1本につき5 \times 10⁵個ずつ小分けした。10 μ g、5 μ g、2.5 μ gまたは1.25 μ gのH1F1変異体抗体を加えてから、反応を4 で30分間行った。3mlのFACS緩衝液 (1 \times DPBS + 1% FBS) を加え、遠心分離し、洗浄した後、二次抗体 (ヤギ抗ヒトDyLight (登録商標) 488) を加え、2~8 で30分間インキュベートした。遠心分離し、3mLのFACS緩衝液で洗浄した後に、FACS保存緩衝液 (FACS storage buffer) (1 \times DPBS + 2.5% FBS) を加えてから、FACS分析を行った。対照用に、抗体を加えていない細胞、二次抗体だけを加えた細胞、およびAITR-PE抗体を加えた細胞を使用した。

30

【0212】

実施例11: AITR抗原と抗AITR抗体H1F1M69およびH1F1M74との間の結合能の分析

この実施例では、親抗体H1F1によって認識されるAITR抗原に結合する変異体抗AITR抗体の能力を評価する。AITRに結合する変異体抗AITR抗体の能力を決定するために表面プラズモン共鳴を使用した。

40

【0213】

CM5センサーチップを用いるBiacore T200を、pH7.4のHBS-EPランニング緩衝液および3M塩化マグネシウム再生緩衝液を使って、作動させた。抗ヒトIgG (Fc) 抗体をアミンカップリングによってCM5チップ上に固定化し、流速5 μ l/分で6分間の注入を、10mM酢酸ナトリウムpH5.0の固定化緩衝液で行った。試験した捕捉抗体は、親抗体H1F1ならびに変異体抗体M69およびM74である。グルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST) タグ付きのAITR分析物を、3.12、6.25、12.5、25、50および100nMの濃度で注入し、会合時間を150秒、解離時間を240秒とした。再生は30秒間の3M塩化マグネシウムで達成し、1:1 74結合を評価した。

50

【0214】

下記表12に示すように、H1F1変異体M69およびM74は、GST-AITR分析物に、親抗体H1F1のアフィニティーに匹敵するアフィニティーで結合した。

【0215】

【表12】

| 抗体 | K_D (M) |
|---------|-------------------------|
| H1F1M69 | 6.574×10^{-10} |
| H1F1M74 | 9.655×10^{-10} |
| H1F1 | 7.892×10^{-10} |

10

【0216】

ヒトAITRを過剰発現するHEK293細胞 (AITR-5) を使って、抗AITR抗体M69およびM74を、AITRへの結合についてさらに分析した。図16Aに示すように、陰性対照mAb EU101はAITR-5に結合しなかったが (3.6%)、AITR-5細胞の89.8%は、濃度10 μ g/mLのH1F1で染色された。加えて、図16Bに示すように、AITR-5細胞の89.1%がM69で染色され、同細胞の73.8%がM74で染色された。これらのデータは、H1F1、M69およびM74がいずれも、細胞表面に発現したヒトAITR分子に、用量依存的に結合することを示している。

【0217】

実施例12: nT_{reg} 細胞 (制御性T細胞) に対する抗AITR抗体H1F1M69およびH1F1M74の効果

この実施例では、変異体抗AITR抗体を、 nT_{reg} 細胞を T_H1 細胞に転換するそれらの能力について試験した。

20

【0218】

末梢血単核球 (PBMC) をFicoll-Paque密度勾配遠心分離によって収集してから、FACSを使って $CD4^+ CD25^{+} CD127^-$ (nT_{reg}) 細胞を単離した。次に、その nT_{reg} 細胞を、2~3日ごとに100U/mLのIL-2で、また濃度2.5および10 μ g/mLのモノクローナル抗体H1F1M69、H1F1M74、TRX518およびMK4166、ならびに陰性対照として使用した10 μ g/mLのhIgGで、5日間処理した。5日間の処理後に、細胞を、IFN- の細胞内染色について試験し、IFN- およびTGF- 分泌についてELISAによって試験した。

【0219】

図17に示すように、 nT_{reg} 細胞は、H1F1M69およびH1F1M74で刺激すると、 T_H1 様細胞に転換された。 T_{reg} の71%がM69によってIFN- 陽性細胞に転換され、 T_{reg} の57%がM74によってIFN- 陽性細胞に転換された。各パネルの数字は、陽性細胞のパーセンテージを示している。

30

【0220】

IL-2および抗AITR抗体による刺激後のT細胞からのIFN- およびTGF- の分泌を試験するために、培養上清を使ってIFN- およびTGF- を測定した。図18のグラフに、ELISAアッセイによって得られた結果を要約する。H1F1M69およびH1F1M74は、 T_H1 サイトカインIFN- の分泌 (灰色のバー) を刺激し、逆に T_{reg} サイトカインTGF- の分泌 (黒いバー) の減少につながった。このアッセイには1ウェルあたり 5×10^4 個の nT_{reg} 細胞を使用した。

【0221】

実施例13: iT_{reg} 細胞 (誘導性制御性T細胞) に対する抗AITR抗体H1F1M69およびH1F1M74の効果

この実施例では、変異体抗AITR抗体を、誘導性 T_{reg} 細胞 (iT_{reg}) を T_H1 細胞に転換するそれらの能力について試験した。

40

【0222】

末梢血単核球 (PBMC) をFicoll-Paque密度勾配遠心分離によって収集してから、CD4マイクロビーズ (Miltenyi) による磁気活性化細胞選別法 (MACS) を使用し、製造者の説明書に従って、 $CD4^+$ T細胞を単離した。次に、その $CD4^+$ T細胞を、抗CD3/抗CD28ビーズ (25 μ l, Invitrogen)、100U/mL IL-2 (Novartis) および5ng/mL TGF- 1で、6日間刺激した。6日間刺激した後、次に細胞をCD4-BB515およびFoxp3-APCについて染色した。次に、MAC

50

SによってCD3/CD28ビーズを除去した。次に、CD4⁺T細胞を、2~3日ごとに100U/mLのIL-2で、また濃度2.5、5および10 μg/mLのモノクローナル抗体H1F1M69、H1F1M74、TRX518およびMK4166、ならびに陰性対照として使用した10 μg/mLのhIgGで、5日間処理した。5日間の処理後に、細胞を、IFN- の細胞内染色について試験し、IFN- およびTGF- 分泌についてELISAによって試験した。

【0223】

転写因子フォークヘッドボックスプロテインP3 (Foxp3) は、制御性T細胞の特異的マーカーであり、nT_{reg}細胞およびiT_{reg}細胞の抑制活性に中心的役割を果たす。T_{reg}におけるAITRシグナリングの効果を評価するために、制御性T細胞をインビトロで誘導し、Foxp3発現を測定した。図19に示すように、抗CD3,CD28ビーズ、IL-2およびTGF- による6日間の刺激後に、CD4⁺T細胞からiT_{reg}細胞が生成した。iT_{reg}の83.7%がFoxp3陽性染色によって確認された(右側のパネル)。これらのデータは、上述の条件によってCD4⁺T細胞集団がiTregに分化したことを示している。

10

【0224】

CD4⁺T細胞上のAITR発現は活性化に依存するが、ナイーブ制御性T細胞または誘導性制御性T細胞はAITRを構成的に発現する。Foxp3発現を測定する前に、iT_{reg}細胞上のAITRに対するH1F1の結合効率を決定した。図20に示すように、表面AITRは、変異体H1F1抗体(M69-パネルDおよびM74-パネルE)によって検出された。さらにまた、H1F1M69およびH1F1M74は、細胞のおよそ39%をヒトAITRについて陽性であると認識したが、これは、競合剤である抗AITR抗体より高頻度であった(平均で細胞の19%-図20のパネルFおよびパネルG)。

20

【0225】

加えて、図21に示すように、H1F1M69およびH1F1M74で刺激すると、iT_{reg}細胞はT_H1様細胞に転換された。iT_{reg}の78%はM69によってIFN- 陽性細胞に転換され、iT_{reg}の57%はM74によってIFN- 陽性細胞に転換された。各パネルの数字は、陽性細胞のパーセンテージを示している。

【0226】

IL-2および抗AITR抗体による刺激後のT細胞からのIFN- およびTGF- の分泌を試験するために、培養上清を使ってIFN- およびTGF- を測定した。図22のグラフに、ELISAアッセイによって得られた結果を要約する。H1F1M69およびH1F1M74は、T_H1サイトカインIFN- の分泌(灰色のバー)を刺激し、逆にT_{reg}サイトカインTGF- の分泌(黒いバー)の減少につながった。このアッセイには1ウェルあたり1×10⁵個のiT_{reg}細胞を使用した。

30

【0227】

実施例14: iT_{reg}細胞(誘導性制御性T細胞)に対する固定化抗AITR抗体H1F1M69およびH1F1M74の効果

この実施例では、固定化変異体抗AITR抗体を、誘導性T_{reg}細胞(iT_{reg})をT_H1細胞に転換するそれらの能力について試験した。

【0228】

末梢血単核球(PBMC)をFicoll-Paque密度勾配遠心分離によって収集してから、CD4マイクロビーズ(Miltenyi)による磁気活性化細胞選別法(MACS)を使用し、製造者の説明書に従って、CD4⁺T細胞を単離した。次に、CD4⁺T細胞を、抗CD3/抗CD28ビーズ(25 μl、Invitrogen)、100U/mL IL-2(Novartis)および5ng/mL TGF- 1で6日間、刺激した。6日間刺激した後、次に細胞をCD4-BB515およびFoxp3-APCについて染色した。次にCD3/CD28ビーズをMACSによって除去した。次にCD4⁺T細胞を、2~3日ごとに100U/mL IL-2で5日にかけて処理し、また濃度2.5、5および10 μg/mLの固定化モノクローナルM69およびM74でおよそ1日間処理した。5日間の処理後に、細胞を、IFN- の細胞内染色について試験し、IFN- およびTGF- 分泌についてELISAによって試験した。

40

【0229】

Foxp3のダウンレギュレーションはiT_{reg}の抑制活性を低減するので、iT_{reg}細胞を調製し、Foxp3の発現に対するH1F1M69およびH1F1M74の効果を評価した。上述のように、iT_{reg}細胞を作出するために、CD4⁺T細胞を抗CD3および抗CD28ビーズで刺激して、インビトロ

50

で*iT_{reg}*に極性化させた。図23(パネルBおよびパネルC)に示すように、固定化H1F1M69および固定化H1F1M74は、*iT_{reg}*におけるFoxp3の発現を阻害した。加えて、TRX518またはMK4166はFoxp3発現を低減できなかったが(図23パネルDおよびパネルE)、H1F1M69およびH1F1M74は、最も低い濃度(2.5 μg/mL)でさえ、Foxp3発現を減少させた。このようにH1F1M69およびH1F1M74は、制御性T細胞の免疫抑制活性を維持するために不可欠な転写因子であるFoxp3の喪失を誘導した。

【0230】

図24に示すとおり、*iT_{reg}*細胞は、IL-2ならびに抗AITR抗体H1F1M69およびH1F1M74でコーティングされたウェルへの添加後に、*T_H1*様細胞に転換された。*iT_{reg}*の90%はM69によってIFN-陽性細胞に転換され、*iT_{reg}*の68%はM74によってIFN-陽性細胞に転換された。各パネルの数字は、陽性細胞のパーセンテージを示している。

10

【0231】

実施例15:*T_{eff}*細胞(エフェクターT細胞)に対する抗AITR抗体M69およびM74の効果

この実施例では、変異体抗AITR抗体を、*T_{eff}*細胞を*T_H1*細胞に転換するそれらの能力について試験した。

【0232】

健常ドナーから全血を収集し、Ficoll-Paque密度勾配遠心分離によってパフィーコートからPBMCを取り出した。PBMCを血漿層とFicoll-RBC層の間の界面から収集し、RPMI1640培地で洗浄した。PBMCをプレソーティング緩衝液で再懸濁し、抗ヒトCD4、抗CD25および抗CD127で染色した。CD4⁺CD25⁻CD127⁺(*T_{eff}*)細胞をFACSによって選別した。

20

【0233】

図25に示すように、抗AITR抗体H1F1M69およびH1F1M74は、*T_{eff}*細胞を*T_H1*細胞に極性化させた。*T_{eff}*細胞の81.1%はH1F1M69(10 μg/mL)によってIFN-陽性細胞に極性化され、*T_{eff}*細胞の75.3%はH1F1M74(10 μg/mL)によってIFN-陽性細胞に極性化された。各パネルの数字は、陽性細胞のパーセンテージを示している。

【0234】

加えて、極性化した*T_{eff}*細胞をIFN-分泌について試験した。図26のグラフに、ELISAアッセイによって得られた結果を要約する。H1F1M69およびH1F1M74は、*T_H1*サイトカインIFN-の分泌を刺激した。これは、*T_{eff}*細胞が*T_H1*細胞に極性化されたことを示している。

【0235】

等価物

当業者は、本明細書に記載した本発明の具体的態様の数多くの等価物を認識し、または日常的な実験を使って確認することができるであろう。本発明の範囲を上記の説明に限定する意図はなく、むしろ本発明の範囲は添付の特許請求の範囲に示すとおりである。

30

【 図 1 】

a 親 IRTCA-A Fab

```

QSVVTPPPSVAAPGQKVTISCSGSTSINIGNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNYKRPSPGIPDRFSGSKSGTSATLIGITG
LRTGDEADYF*GTWDSLSLNWVFGGGTKLTVL (軽鎖可変)
RQVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVWCLLNNYPRKAKVQKWKVDMALQSGNSQESVTEQDSKOSTYVLSSTLTKSAD
YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNPSC (カンパ定常);-I-TIN-
REFKMKYLLPFAAGLLLAQFAMA (pe1-B 領域)
QVQLVQSGYVQVMPGASVKVSKKASGYTFDDYIGIWRVQAPGGQGLEWVGWISPYTHRTNPSPKLQDRVYMTTDTSTST
AYMELRSLRSDDTAVVY*ARDGTYFDWFGYFDNGAFDIMGQGLVTVSS (重鎖可変)
ASTKGPVTFPLAAPSSTSGGTAALCLLWVKQYFPEZPVTVSWNSGALTSGVHFTPAVLQSSGLYSLSWVVPSSSLGT
QTYLQNNHKFSNWKVKRPEPKSCCKOSQAGQ (重鎖定常)
HHHHH (ヒスチジン)

```

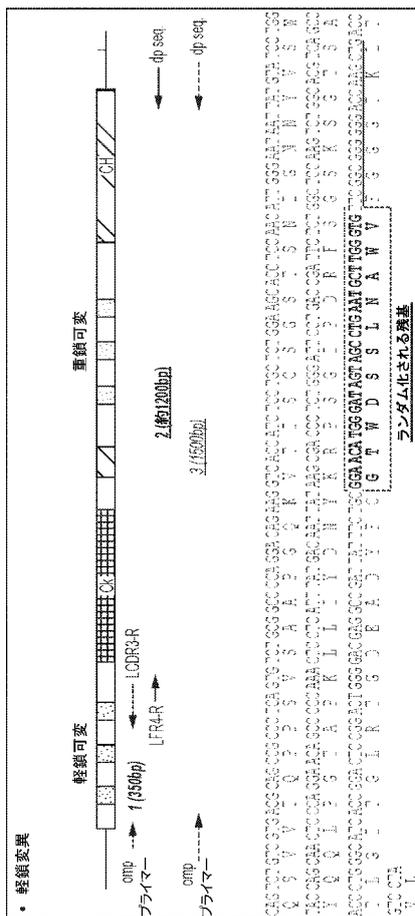
b 停止コドンを持つ親 IRTCA-A Fab

```

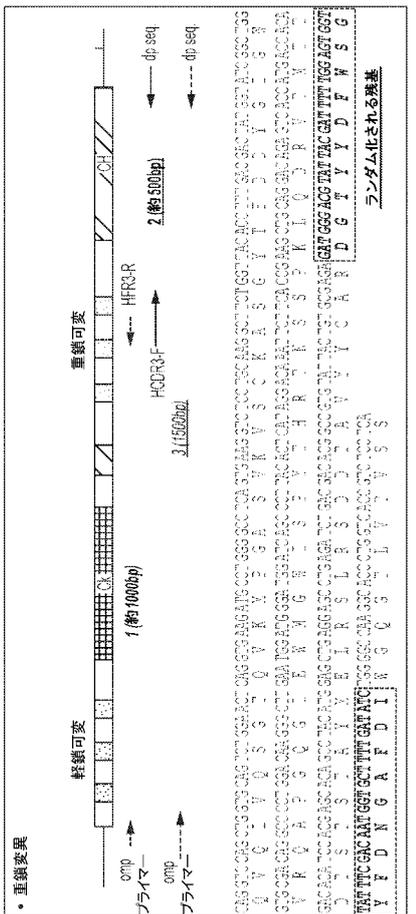
QSVVTPPPSVAAPGQKVTISCSGSTSINIGNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNYKRPSPGIPDRFSGSKSGTSATLIGITG
LRTGDEADYF*GTWDSLSLNWVFGGGTKLTVL (軽鎖可変)
RQVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVWCLLNNYPRKAKVQKWKVDMALQSGNSQESVTEQDSKOSTYVLSSTLTKSAD
YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNPSC (カンパ定常);-I-TIN-
REFKMKYLLPFAAGLLLAQFAMA (pe1-B 領域)
QVQLVQSGYVQVMPGASVKVSKKASGYTFDDYIGIWRVQAPGGQGLEWVGWISPYTHRTNPSPKLQDRVYMTTDTSTST
AYMELRSLRSDDTAVVY*ARDGTYFDWFGYFDNGAFDIMGQGLVTVSS (重鎖可変)
ASTKGPVTFPLAAPSSTSGGTAALCLLWVKQYFPEZPVTVSWNSGALTSGVHFTPAVLQSSGLYSLSWVVPSSSLGT
QTYLQNNHKFSNWKVKRPEPKSCCKOSQAGQ (重鎖定常)
HHHHH (ヒスチジン)
* : 停止コドン

```

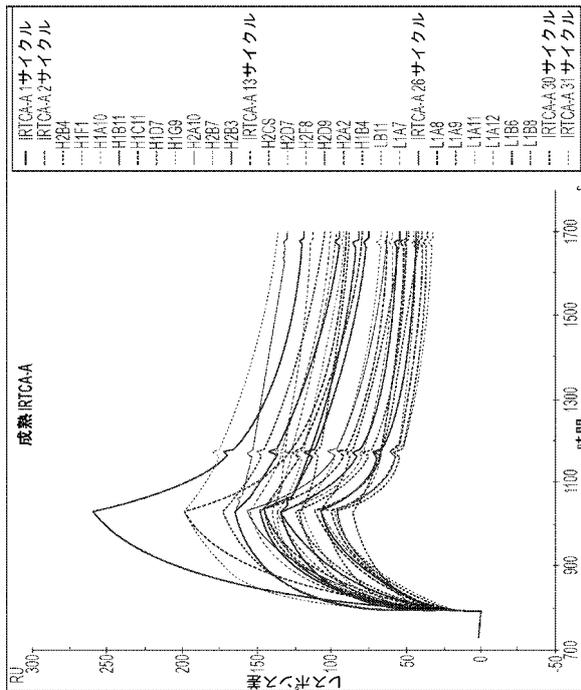
【 図 2 a 】



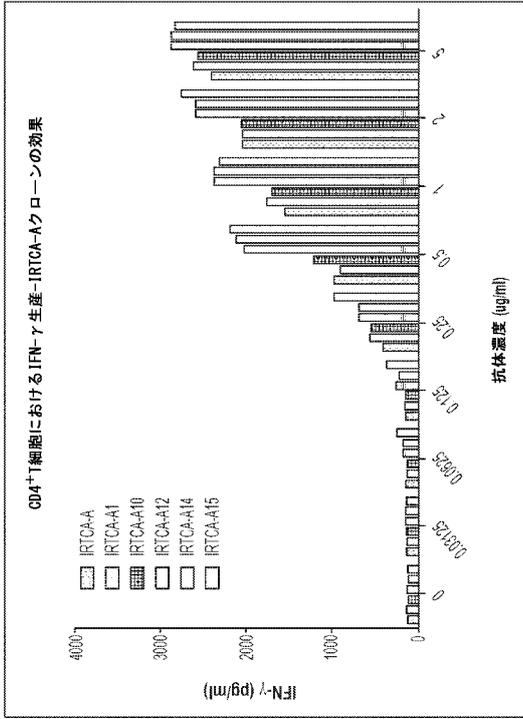
【 図 2 b 】



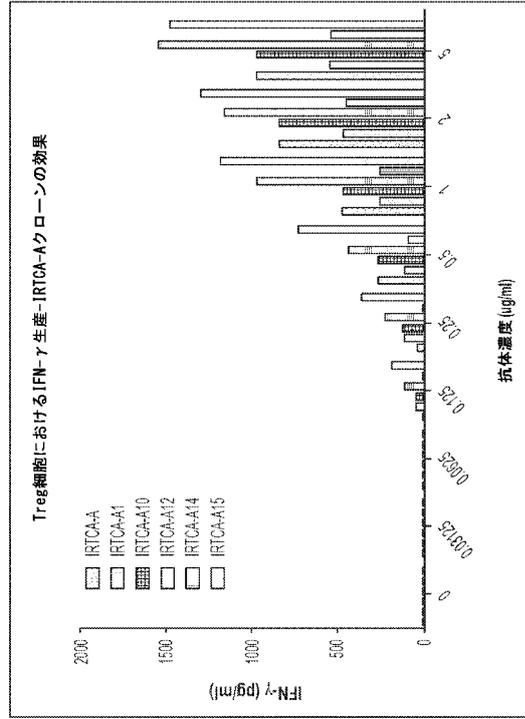
【 図 3 】



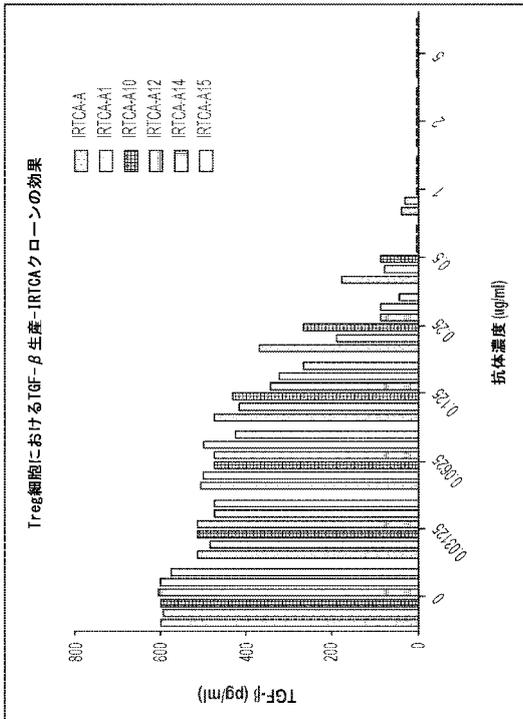
【 図 7 A 】



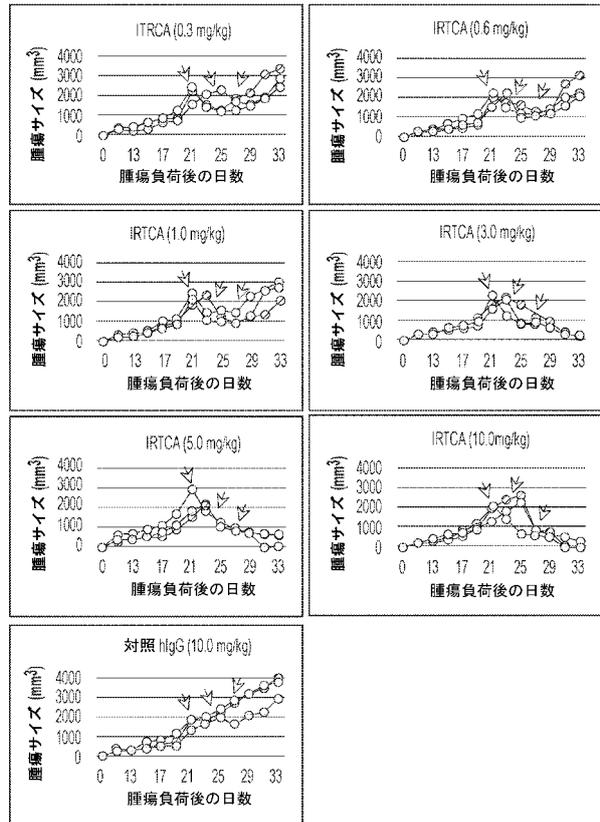
【 図 7 B 】



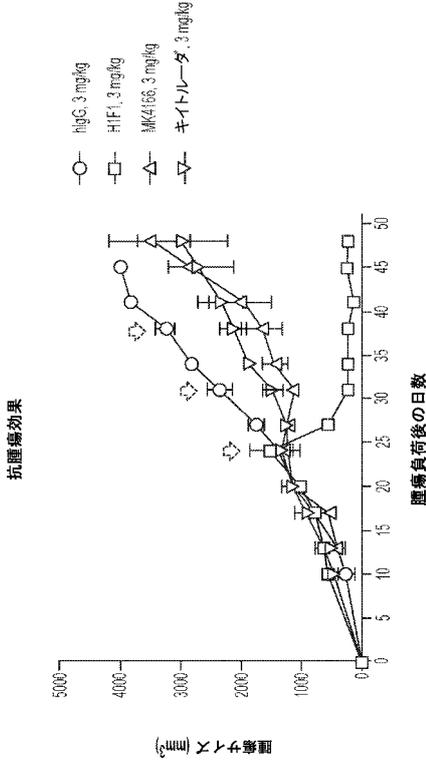
【 図 7 C 】



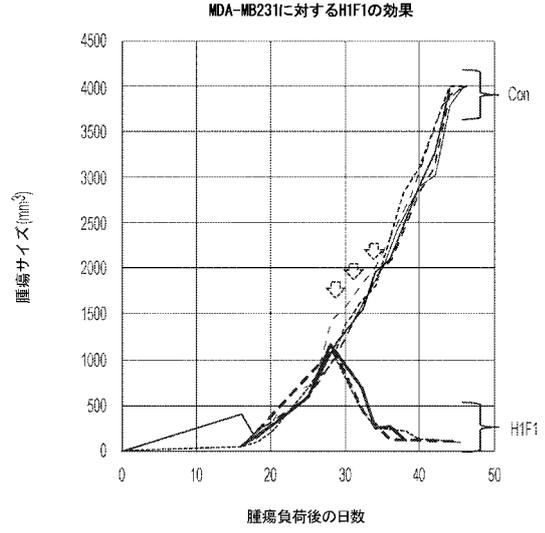
【 図 8 】



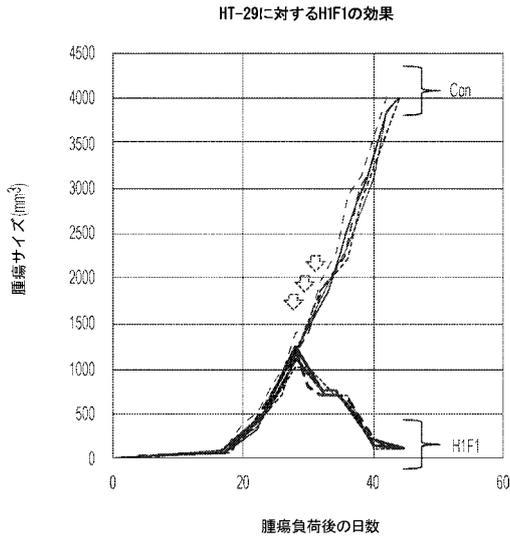
【図9】



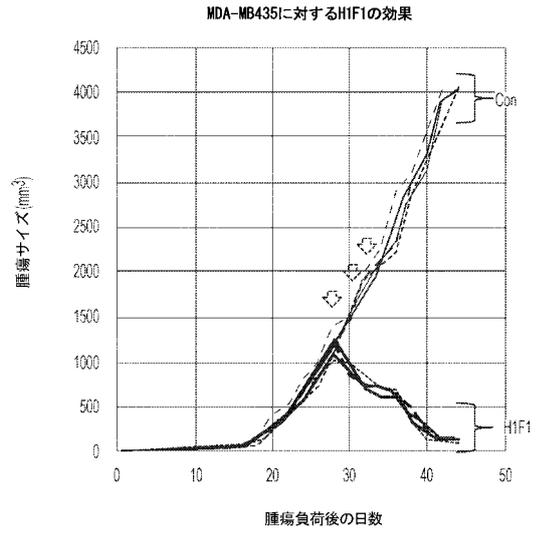
【図10A】



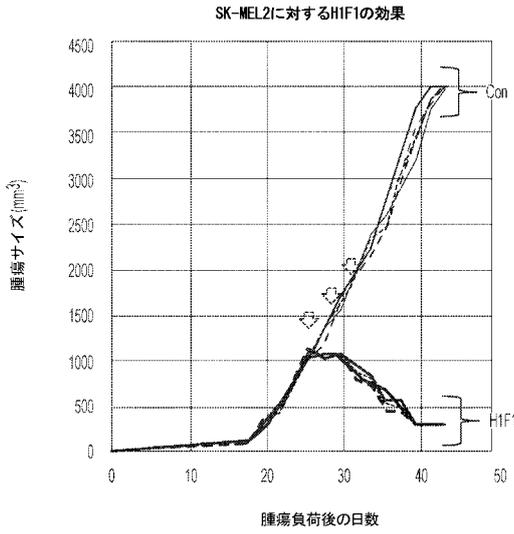
【図10B】



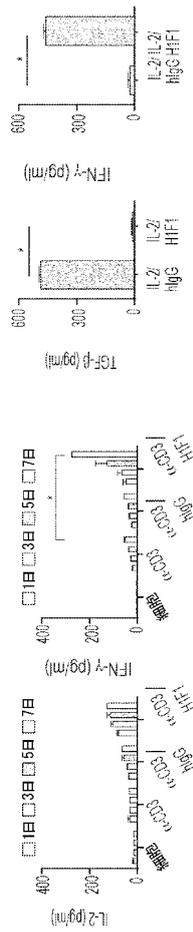
【図10C】



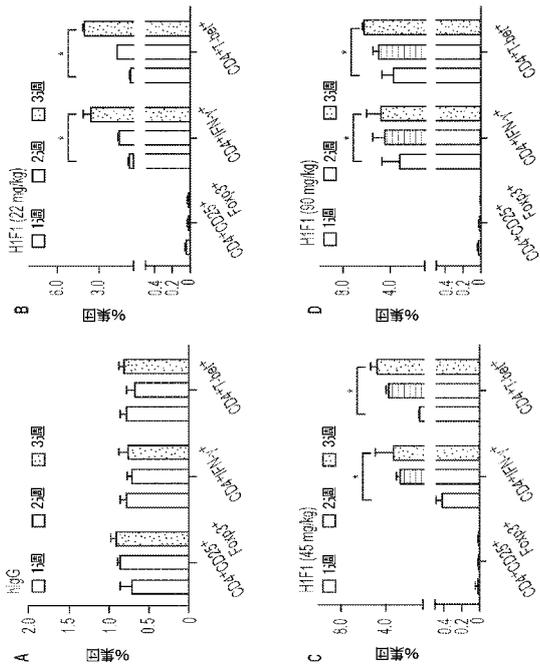
【図10D】



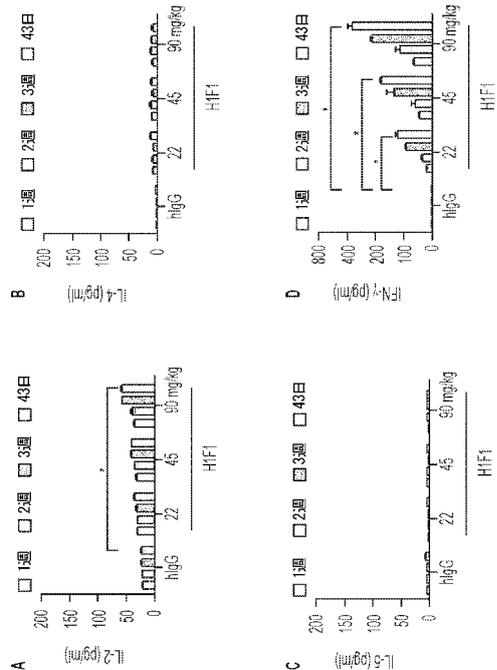
【図11】



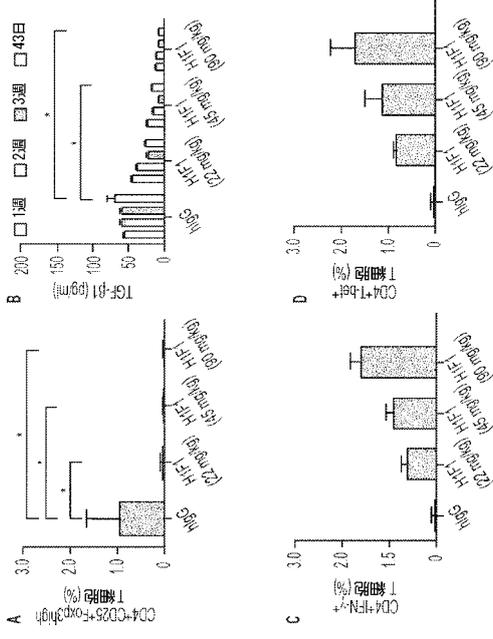
【図12】



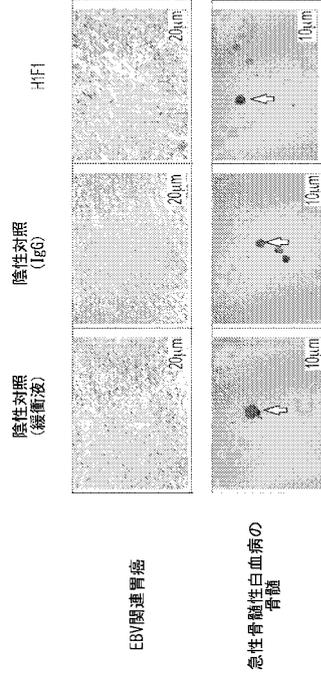
【図13】



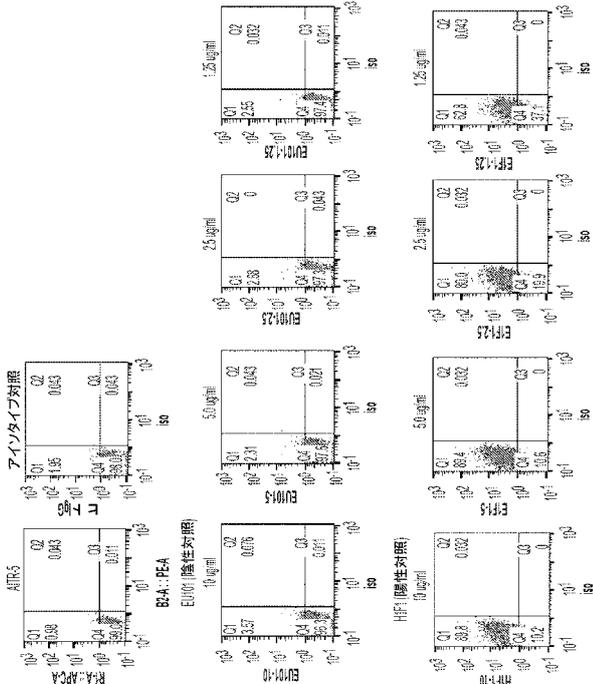
【図 14】



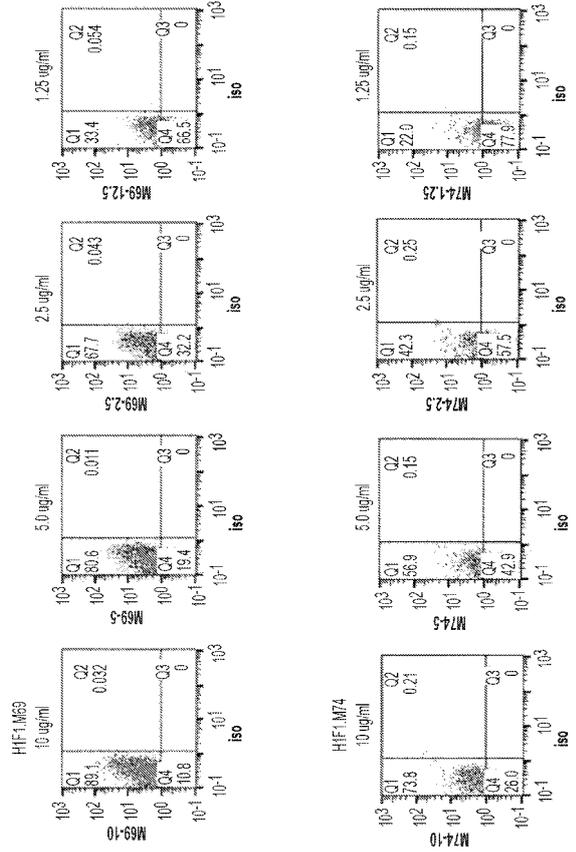
【図 15】



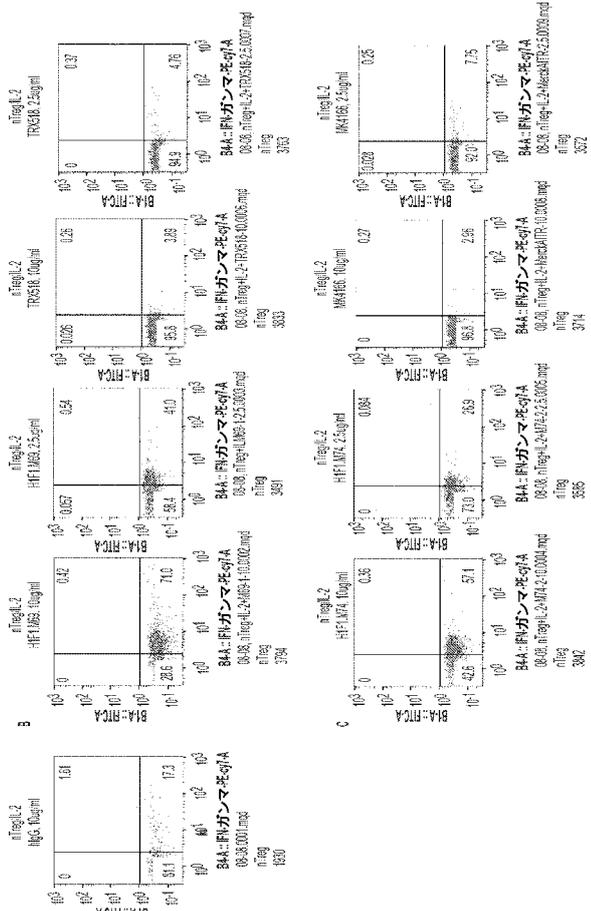
【図 16 A】



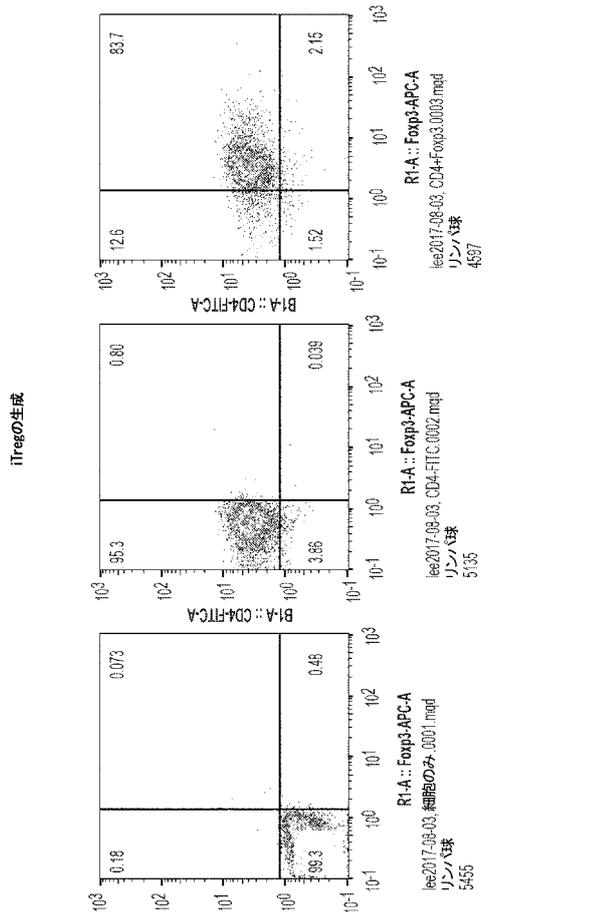
【図 16 B】



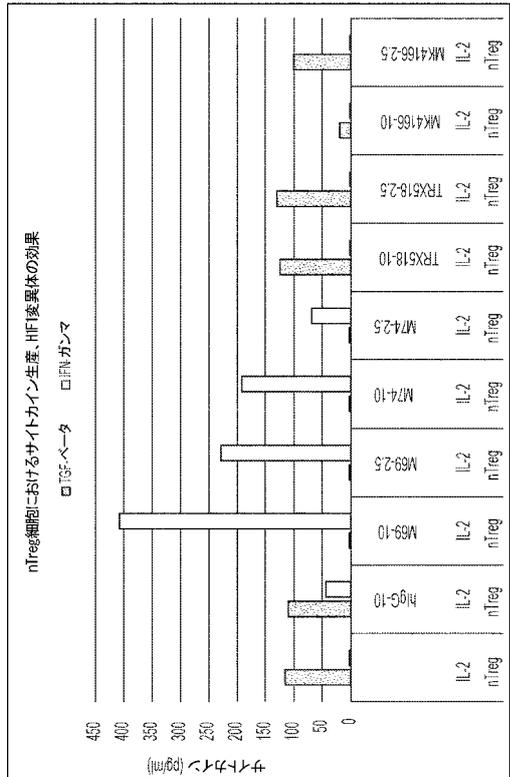
【 17 】



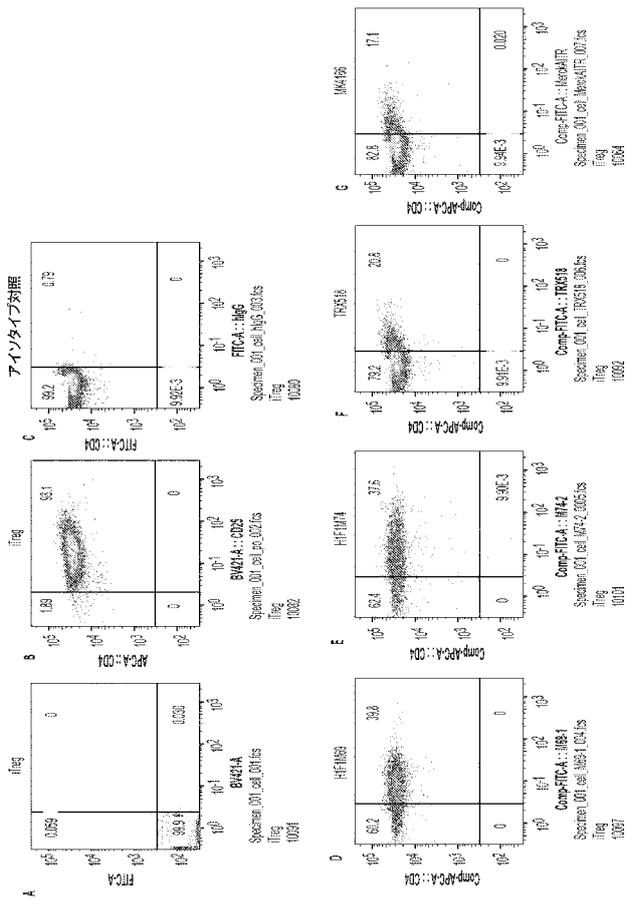
【 19 】



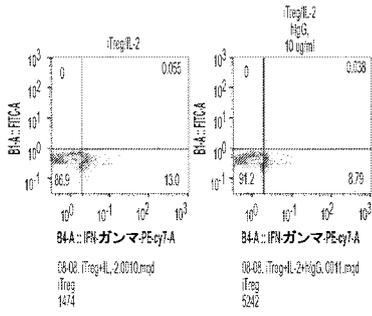
【 18 】



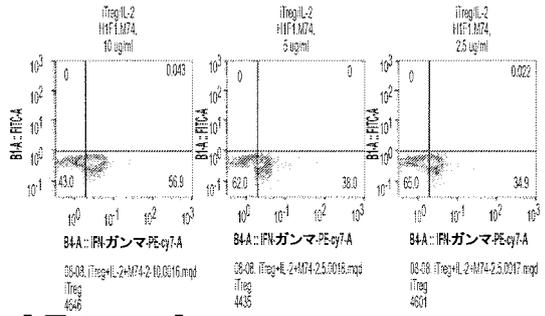
【 20 】



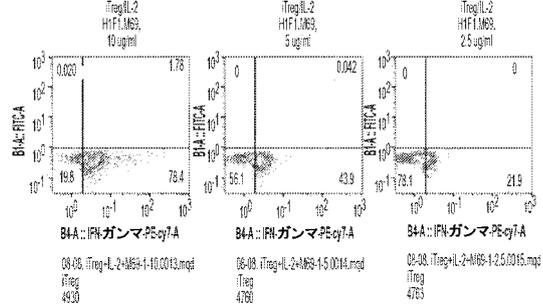
【 図 2 1 A 】



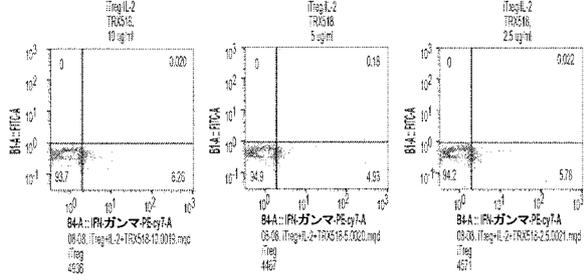
【 図 2 1 C 】



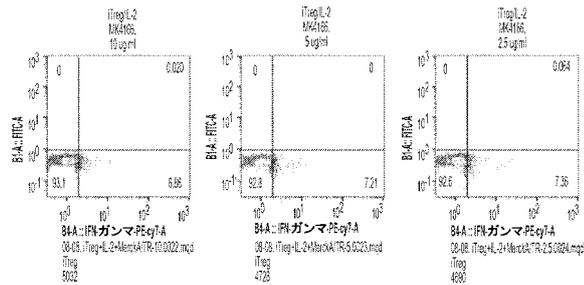
【 図 2 1 B 】



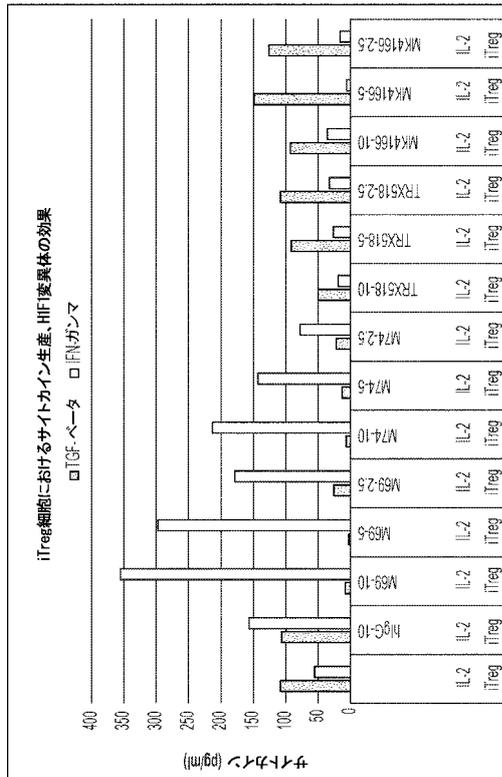
【 図 2 1 D 】



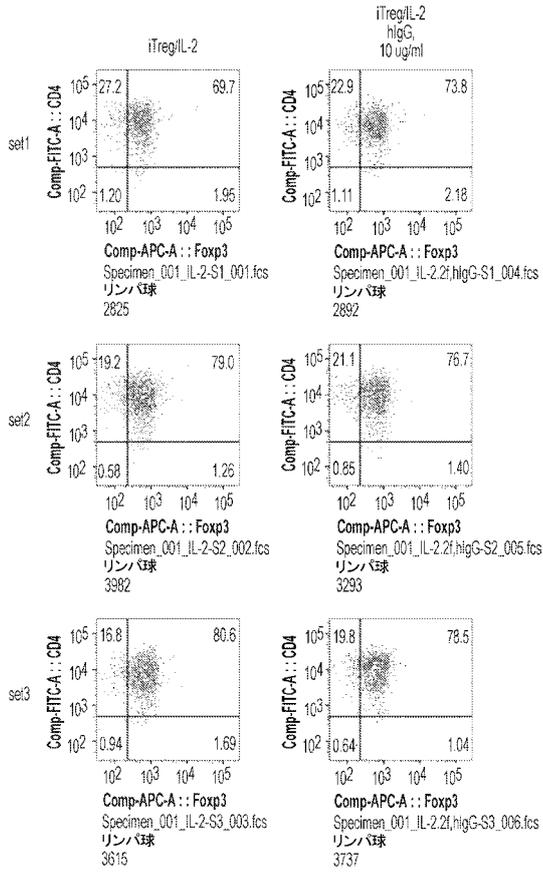
【 図 2 1 E 】



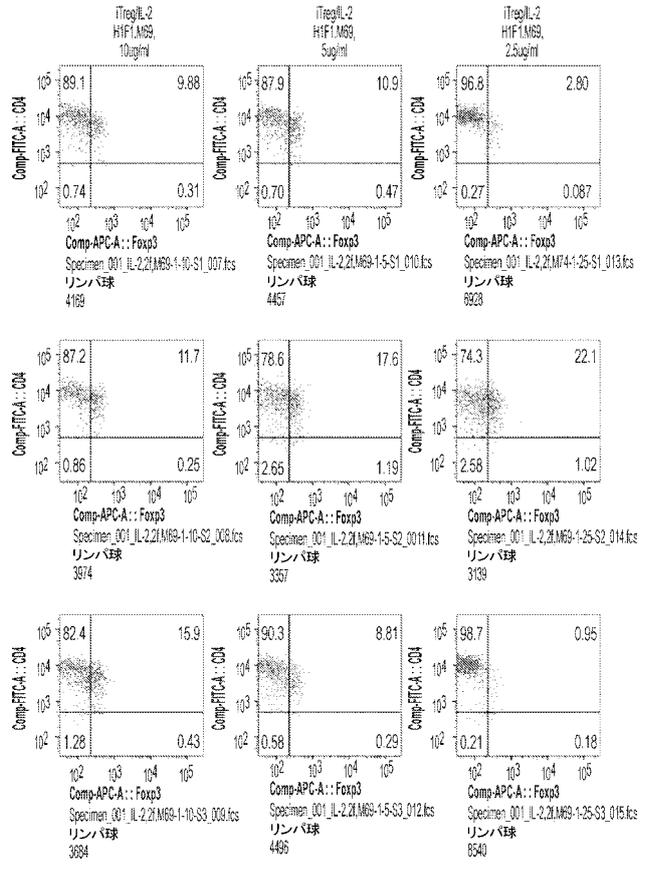
【 図 2 2 】



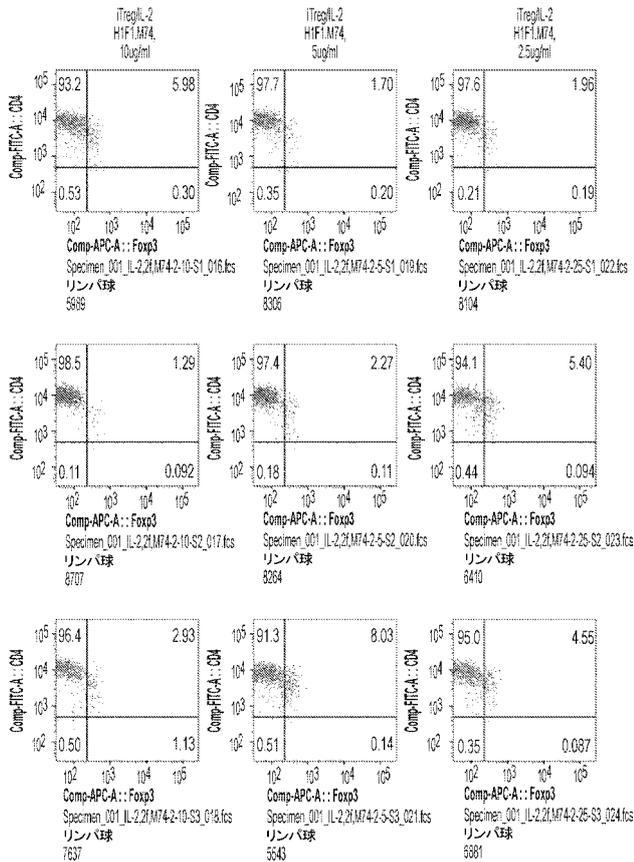
【 図 2 3 A 】



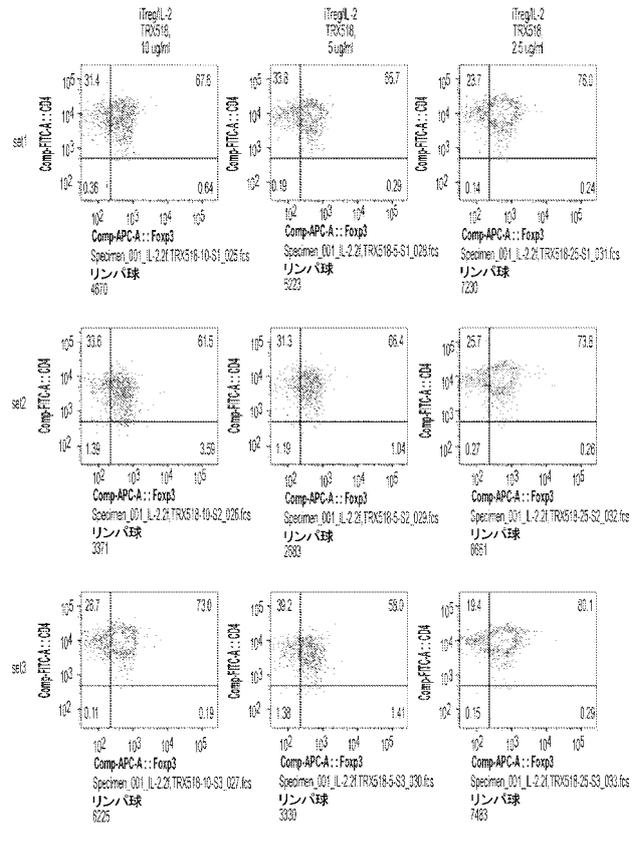
【 図 2 3 B 】



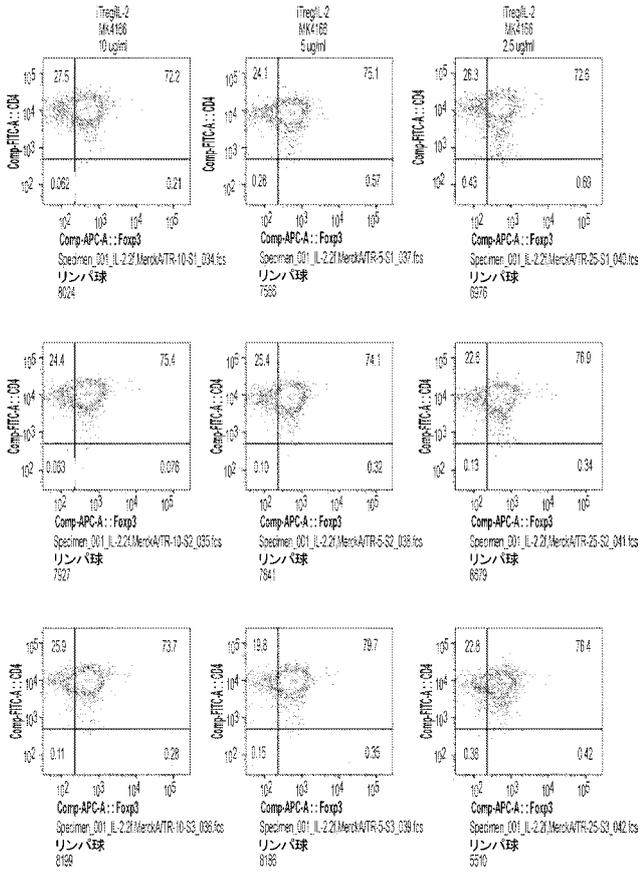
【 図 2 3 C 】



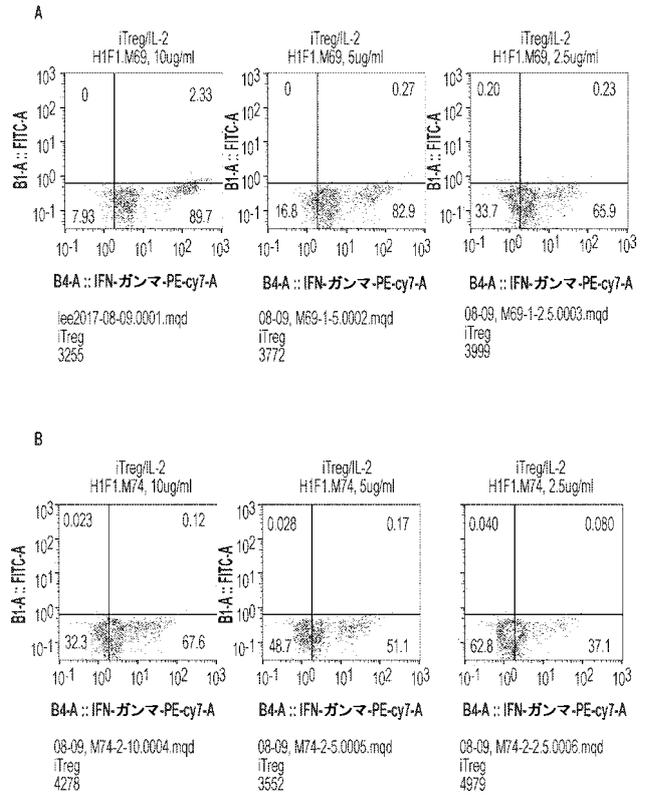
【 図 2 3 D 】



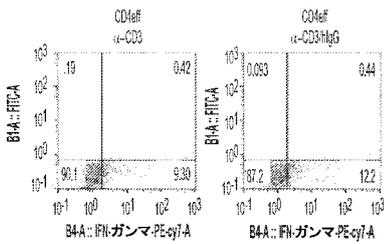
【 2 3 E 】



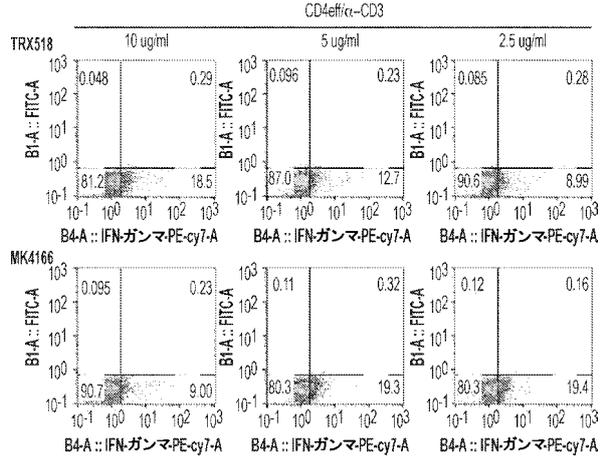
【 2 4 】



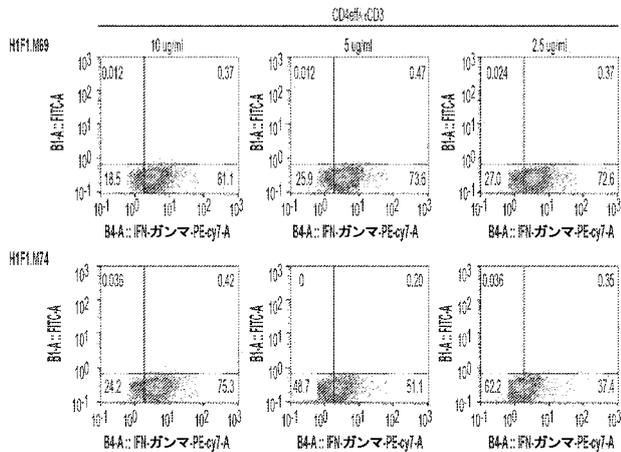
【 2 5 A 】



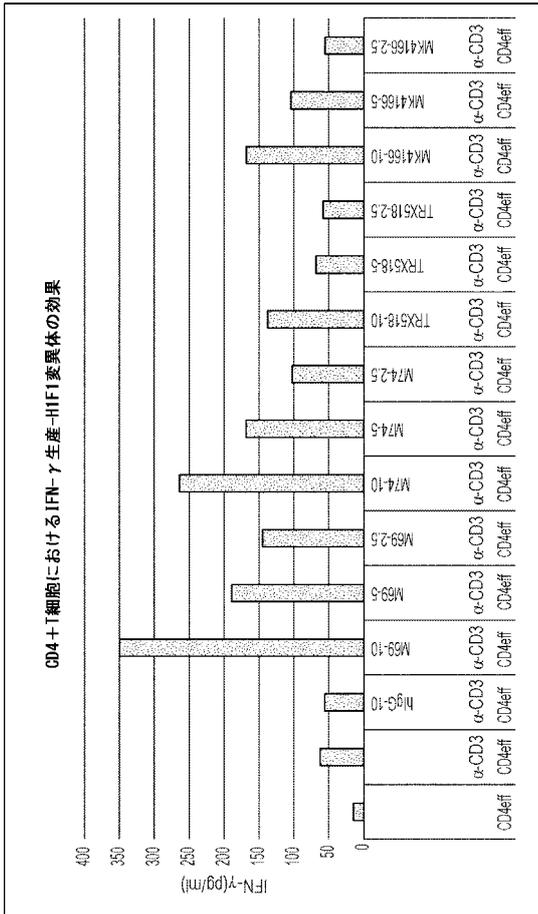
【 2 5 C 】



【 2 5 B 】



【 図 2 6 】



【 配列表 】

[202050863600001.app](#)

【 国際調査報告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. PCT/IB2018/000201 |
|--|--|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K 16/30 (2006.01) C07K 7/06 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01) A61P 35/04 (2006.01) A61P 35/02 (2006.01) A61P 37/02 (2006.01) | | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED | | |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) | | |
| 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) | | |
| Databases consulted: PATENTSCOPE; ESPACENET; AUSPAT; PUBMED; GENOMEQUEST; EPODOC, WPIAP, TXPEA, TXPEB, TXPEC, TXPEE, TXPEF, TXPEH, TXPEI, TXPEP, TXPES, TXPW0EA, TXPUSE0A, TXPUSE1A, TXPUSEA, TXPUSEB, TXPEPEA, TXPEPEB, WPI, /\$ABS (TI, AB, TXT, IW, AW); EMBASE; BIOSIS; HCAPLUS; MEDLINE; IP AUSTRALIA INTERNAL DATABASES | | |
| Search terms used: (SEQ ID NO: 11 * SEQ ID NO: 12 * SEQ ID NO:13 OR 18); (SEQ ID NO: 8 OR 24*SEQ ID NO: 9 OR 25 * SEQ ID NO: 14 OR 15 OR 16 OR 17); activation inducible tumour necrosis factor receptor; IFN-gamma inducible regulatory T-cell convertible anti-cancer; TNFRSF18; tumour necrosis factor receptor superfamily member 18; glucocorticoid induced TNFR related protein; GITR; CD357; antibody; immunoglobulin; cancer; carcinoma; tumour; metastasis; immune; IFN gamma; TGF beta; T-cell; KWON Byoung S/LEE Seoung-Joo/LEE Joong Won/Lee Sunghyun (inventor search); Eutilex (applicant search); | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| Documents are listed in the continuation of Box C | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C <input checked="" type="checkbox"/> 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 "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 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "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 "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) "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 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "&" document member of the same patent family "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | | |
| Date of the actual completion of the international search 21 May 2018 | | Date of mailing of the international search report 21 May 2018 |
| Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaustralia.gov.au | | Authorised officer Safiea Goolam AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. +61262832795 |

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. |
|---|--|-------------------------------|
| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | PCT/IB2018/000201 |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | US 2016/0244503 A1 (NATIONAL CANCER CENTER) 25 August 2016 Whole document. Abstract; sequence listing (specifically SEQ ID NOs: 20-26); Table 2; experimental examples 7-8 at [0141]-[0148] | 1-38 |
| A | WO 2011/028683 A1 (SCHERING CORPORATION) 10 March 2011 Whole document. Abstract; Examples 2 at pages 43-47; Example 5 at pages 50-51; claims | 1-38 |
| A | WO 2016/057846 A1 (NOVARTIS AG) 14 April 2016 Whole document. Abstract; [0297]-[0355]; claims | 1-38 |
| A | KIM YH, et al., 'Authentic GITR Signaling Fails to Induce Tumor Regression unless Foxp3+ Regulatory T Cells are depleted,' <i>The Journal of Immunology</i> , (2015) vol 195, pp 4721-4729 Whole document. Abstract; page 4722. | 1-38 |
| | | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2018/000201**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 filed or furnished:
- a. (means)
- on paper
- in electronic form
- b. (time)
- in the international application as filed
- together with the international application in electronic form
- subsequently to this Authority for the purposes of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. | |
|---|------------------|-------------------------------|------------------|
| Information on patent family members | | PCT/IB2018/000201 | |
| This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. | | | |
| Patent Document/s Cited in Search Report | | Patent Family Member/s | |
| Publication Number | Publication Date | Publication Number | Publication Date |
| US 2016/0244503 A1 | 25 August 2016 | US 2016244503 A1 | 25 Aug 2016 |
| | | KR 20130138062 A | 18 Dec 2013 |
| | | KR 101549637 B1 | 03 Sep 2015 |
| | | KR 20130138063 A | 18 Dec 2013 |
| | | KR 101566538 B1 | 05 Nov 2015 |
| | | KR 20130138064 A | 18 Dec 2013 |
| | | KR 101566539 B1 | 05 Nov 2015 |
| | | US 2014065152 A1 | 06 Mar 2014 |
| | | US 9255151 B2 | 09 Feb 2016 |
| | | US 2014072566 A1 | 13 Mar 2014 |
| | | US 9255152 B2 | 09 Feb 2016 |
| | | US 2014072565 A1 | 13 Mar 2014 |
| | | US 9309321 B2 | 12 Apr 2016 |
| | | US 2016024177 A1 | 28 Jan 2016 |
| | | US 2016046691 A1 | 18 Feb 2016 |
| | | WO 2011/028683 A1 | 10 March 2011 |
| AU 2010289677 A1 | 05 Apr 2012 | | |
| AU 2010289677 B2 | 31 Jul 2014 | | |
| BR 112012004823 A2 | 16 Aug 2016 | | |
| CA 2772613 A1 | 10 Mar 2011 | | |
| CN 102574924 A | 11 Jul 2012 | | |
| CN 103951753 A | 30 Jul 2014 | | |
| CN 103951753 B | 12 Jan 2018 | | |
| EP 2473531 A1 | 11 Jul 2012 | | |
| EP 3023438 A1 | 25 May 2016 | | |
| IN 1920DEN2012 A | 24 Jul 2015 | | |
| IN 2826DEN2015 A | 11 Sep 2015 | | |
| JP 2013503632 A | 04 Feb 2013 | | |
| JP 6294585 B2 | 20 Mar 2018 | | |
| JP 2016146834 A | 18 Aug 2016 | | |
| JP 2017195893 A | 02 Nov 2017 | | |
| KR 20120059603 A | 08 Jun 2012 | | |
| KR 101790802 B1 | 27 Oct 2017 | | |
| KR 20170119746 A | 27 Oct 2017 | | |
| MX 2012002697 A | 25 Jun 2012 | | |

Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001.
Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009)

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. | |
|---|-------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| Information on patent family members | | PCT/IB2018/000201 | |
| This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. | | | |
| Patent Document/s Cited in Search Report | | Patent Family Member/s | |
| Publication Number | Publication Date | Publication Number | Publication Date |
| | | MX 340953 B | 29 Jul 2016 |
| | | RU 2012112829 A | 10 Oct 2013 |
| | | SG 178991 A1 | 27 Apr 2012 |
| | | US 2012189639 A1 | 26 Jul 2012 |
| | | US 8709424 B2 | 29 Apr 2014 |
| | | US 2014348841 A1 | 27 Nov 2014 |
| | | US 9701751 B2 | 11 Jul 2017 |
| | | US 2017355772 A1 | 14 Dec 2017 |
| WO 2016/057846 A1 | 14 April 2016 | WO 2016057846 A1 | 14 Apr 2016 |
| | | AR 105945 A1 | 29 Nov 2017 |
| | | AU 2015330771 A1 | 20 Apr 2017 |
| | | BR 112017007093 A2 | 06 Mar 2018 |
| | | CA 2964146 A1 | 14 Apr 2016 |
| | | CL 2017000836 A1 | 15 Sep 2017 |
| | | CN 107001476 A | 01 Aug 2017 |
| | | CR 20170138 A | 21 Aug 2017 |
| | | EA 201790799 A1 | 31 Aug 2017 |
| | | EP 3204419 A1 | 16 Aug 2017 |
| | | EP 3204421 A1 | 16 Aug 2017 |
| | | JP 2017535257 A | 30 Nov 2017 |
| | | KR 20170065029 A | 12 Jun 2017 |
| | | MX 2017004669 A | 19 Jun 2017 |
| | | PE 16542017 A1 | 13 Nov 2017 |
| | | PH 12017500634 A1 | 25 Sep 2017 |
| | | SG 11201702596Y A | 27 Apr 2017 |
| | | TW 201625697 A | 16 Jul 2016 |
| | | US 2017306037 A1 | 26 Oct 2017 |
| | | US 2017306038 A1 | 26 Oct 2017 |
| | | UY 36344 A | 01 Jun 2016 |
| | | WO 2016057841 A1 | 14 Apr 2016 |
| End of Annex | | | |
| Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001. Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2009) | | | |

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. | | F I | | テーマコード(参考) |
|-------------|-------------------|---------|---------|------------|
| C 1 2 N | 5/10 (2006.01) | C 1 2 N | 5/10 | 4 C 0 8 7 |
| C 0 7 K | 16/28 (2006.01) | C 0 7 K | 16/28 | 4 H 0 4 5 |
| A 6 1 K | 39/395 (2006.01) | A 6 1 K | 39/395 | T |
| A 6 1 K | 35/76 (2015.01) | A 6 1 K | 39/395 | E |
| A 6 1 K | 48/00 (2006.01) | A 6 1 K | 35/76 | |
| A 6 1 K | 45/00 (2006.01) | A 6 1 K | 48/00 | |
| A 6 1 K | 38/20 (2006.01) | A 6 1 K | 45/00 | |
| A 6 1 K | 38/19 (2006.01) | A 6 1 K | 38/20 | |
| A 6 1 K | 33/24 (2019.01) | A 6 1 K | 38/19 | |
| A 6 1 K | 31/513 (2006.01) | A 6 1 K | 33/24 | |
| A 6 1 K | 31/704 (2006.01) | A 6 1 K | 31/513 | |
| A 6 1 K | 31/4745 (2006.01) | A 6 1 K | 31/704 | |
| A 6 1 K | 31/337 (2006.01) | A 6 1 K | 31/4745 | |
| A 6 1 K | 31/675 (2006.01) | A 6 1 K | 31/337 | |
| A 6 1 P | 37/04 (2006.01) | A 6 1 K | 31/675 | |
| A 6 1 P | 35/00 (2006.01) | A 6 1 P | 37/04 | |
| A 6 1 P | 35/02 (2006.01) | A 6 1 P | 35/00 | |
| A 6 1 P | 13/10 (2006.01) | A 6 1 P | 35/02 | |
| A 6 1 P | 15/00 (2006.01) | A 6 1 P | 13/10 | |
| A 6 1 P | 1/04 (2006.01) | A 6 1 P | 15/00 | |
| A 6 1 P | 1/00 (2006.01) | A 6 1 P | 1/04 | |
| A 6 1 P | 1/16 (2006.01) | A 6 1 P | 1/00 | |
| A 6 1 P | 1/18 (2006.01) | A 6 1 P | 1/16 | |
| A 6 1 P | 11/00 (2006.01) | A 6 1 P | 1/18 | |
| A 6 1 P | 7/00 (2006.01) | A 6 1 P | 11/00 | |
| A 6 1 P | 17/00 (2006.01) | A 6 1 P | 7/00 | |
| A 6 1 P | 21/00 (2006.01) | A 6 1 P | 17/00 | |
| A 6 1 P | 5/14 (2006.01) | A 6 1 P | 21/00 | |
| A 6 1 P | 13/12 (2006.01) | A 6 1 P | 5/14 | |
| A 6 1 P | 43/00 (2006.01) | A 6 1 P | 13/12 | |
| G 0 1 N | 33/50 (2006.01) | A 6 1 P | 43/00 | 1 1 1 |
| G 0 1 N | 33/68 (2006.01) | A 6 1 P | 43/00 | 1 2 1 |
| | | G 0 1 N | 33/50 | K |
| | | G 0 1 N | 33/68 | |

(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, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

- (74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
- (74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
- (74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀
- (74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
- (74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘
- (74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
- (72)発明者 クォン ビョン エス .
大韓民国 08594 ソウル クムチョン - ク ガサン デジタル 1 - ロ - 25 ダエユン
テクノタウン 17 チャ スイート #1401 ユーティレックス カンパニー リミテッド
内
- (72)発明者 イ ソン - ジュ
大韓民国 08594 ソウル クムチョン - ク ガサン デジタル 1 - ロ - 25 ダエユン
テクノタウン 17 チャ スイート #1401 ユーティレックス カンパニー リミテッド
内
- (72)発明者 イ ジュン ウォン
大韓民国 08594 ソウル クムチョン - ク ガサン デジタル 1 - ロ - 25 ダエユン
テクノタウン 17 チャ スイート #1401 ユーティレックス カンパニー リミテッド
内
- (72)発明者 イ スンヒュン
大韓民国 08594 ソウル クムチョン - ク ガサン デジタル 1 - ロ - 25 ダエユン
テクノタウン 17 チャ スイート #1401 ユーティレックス カンパニー リミテッド
内
- F ターム(参考) 2G045 AA01 AA02 AA13 AA24 AA26 AA29 AA40 BA13 BB10 BB20
BB24 CA01 CA18 CA25 CA26 CB01 CB02 CB17 CB19 DA13
DA14 DA36 FA37 FB01 FB03
4B065 AA26X AA72X AA92X AA93X AB01 AC14 BA02 CA25 CA44
4C084 AA02 AA13 AA19 BA44 CA18 DA12 DA19 MA02 NA05 ZA511
ZA591 ZA661 ZA681 ZA751 ZA811 ZA891 ZA941 ZB261 ZB271 ZC061
ZC202 ZC412 ZC751
4C085 AA13 AA14 AA16 BB31 BB33 BB34 BB35 BB36 BB37 BB41
BB43 BB50 CC02 CC03 CC04 CC05 CC07 CC08 DD62 EE01
EE03
4C086 AA01 AA02 BA02 BC43 CB22 DA35 EA10 HA12 HA28 MA01
MA02 MA04 NA05 ZA51 ZA59 ZA66 ZA68 ZA75 ZA81 ZA89
ZA94 ZB26 ZB27 ZC06 ZC75
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA02 NA05 NA14 ZA51 ZA59 ZA66
ZA68 ZA75 ZA81 ZA89 ZA94 ZB26 ZB27 ZC06 ZC75
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA76 EA28 FA74 GA26