

(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2015-508816**(P2015-508816A)**(43) 公表日 **平成27年3月23日 (2015. 3. 23)**

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 7 6
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 C 0 8 4
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 C 0 8 6
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	4 C 0 8 7
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 39 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2014-559875 (P2014-559875)	(71) 出願人	513120608
(86) (22) 出願日	平成24年3月2日 (2012. 3. 2)		プロビデンス ヘルス アンド サービス
(85) 翻訳文提出日	平成26年10月21日 (2014. 10. 21)		ーズーオレゴン
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/027496		アメリカ合衆国 ワシントン州 レントン
(87) 国際公開番号	W02013/130102		サウスウェスト リンド アベニュー
(87) 国際公開日	平成25年9月6日 (2013. 9. 6)		1 8 0 1 # 9 0 1 6
		(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】 OX40アゴニスト／IL-2二重癌治療法

(57) 【要約】

OX40は強力な免疫刺激標的である。治療を必要としている対象に、OX40アゴニスト、および共通 鎖 (c) サイトカインまたは活性を有するその断片、変種、類似体、もしくは誘導体を投与する工程を含む、癌を治療する方法を本明細書において提供する。ある特定の局面において、共通 鎖 (c) サイトカインは、インターロイキン-2 (IL-2) または活性を有するその断片、変種、類似体、もしくは誘導体である。アゴニスト抗OX40 mAbおよびIL-2による併用治療は、相乗作用を与えて、多数の腫瘍タイプに対する腫瘍免疫療法を増進した。二重療法は、アネルギー性腫瘍反応性CD8⁺ T細胞の機能をも回復させ得た。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

治療を必要としている対象に、OX40アゴニスト、および共通 鎖 (c) サイトカインまたは活性を有するその断片、変種、類似体、もしくは誘導体を投与する工程を含む、癌を治療する方法。

【請求項 2】

投与が、OX40アゴニストまたは c サイトカイン単独よりもより大幅にTリンパ球介在性抗癌免疫を刺激する、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

投与が、アネルギー性腫瘍反応性CD8⁺ Tリンパ球の機能を回復させ得る、請求項1または請求項2のいずれか一項記載の方法。

10

【請求項 4】

アネルギー性腫瘍反応性CD8⁺ Tリンパ球の増殖が回復する、請求項3記載の方法。

【請求項 5】

アネルギー性腫瘍反応性CD8⁺ Tリンパ球の分化が回復する、請求項3または請求項4記載の方法。

【請求項 6】

T細胞受容体 (TCR) 刺激したTリンパ球を、 c サイトカインまたは活性を有するその断片、変種、類似体、もしくは誘導体と組み合わせたOX40アゴニストと接触させる工程を含む、Tリンパ球介在性癌免疫療法に対するOX40アゴニストの効果を増強する方法。

20

【請求項 7】

TCRライゲーションを介してTリンパ球を刺激する工程と、TCR刺激したTリンパ球を、 c サイトカインまたは活性を有するその断片、変種、類似体、もしくは誘導体と組み合わせたOX40アゴニストと接触させる工程とを含む、Tリンパ球介在性癌免疫療法に対するOX40アゴニストの効果を増強する方法。

【請求項 8】

癌免疫療法が、CD4⁺ Tリンパ球およびCD8⁺ Tリンパ球の両方を必要とする、請求項6または請求項7記載の方法。

【請求項 9】

接触が、OX40アゴニストまたは c サイトカイン単独よりもより大幅にTリンパ球介在性癌免疫療法を刺激する、請求項6～8のいずれか一項記載の方法。

30

【請求項 10】

接触が、アネルギー性腫瘍反応性CD8⁺ T細胞の機能を回復させ得る、請求項6～9のいずれか一項記載の方法。

【請求項 11】

TCR刺激したTリンパ球を、 c サイトカインまたは活性を有するその断片、変種、類似体、もしくは誘導体と組み合わせたOX40アゴニストと接触させる工程を含む、TCR刺激に応答したTリンパ球増殖のOX40アゴニスト介在性増進を増強する方法。

【請求項 12】

TCRライゲーションを介してTリンパ球を刺激する工程と、TCR刺激したTリンパ球を、 c サイトカインまたは活性を有するその断片、変種、類似体、もしくは誘導体と組み合わせたOX40アゴニストと接触させる工程とを含む、Tリンパ球増殖のOX40アゴニスト介在性増進を増強する方法。

40

【請求項 13】

Tリンパ球分化が増強される、請求項11または請求項12記載の方法。

【請求項 14】

TCRライゲーションが、Tリンパ球を抗原/MHC複合体と接触させることにより達成される、請求項7～10、12、または13のいずれか一項記載の方法。

【請求項 15】

抗原が癌細胞特異的抗原である、請求項14記載の方法。

50

【請求項 16】

TCRライゲーションが、Tリンパ球を抗CD3と接触させることにより達成される、請求項7～10、12、または13のいずれか一項記載の方法。

【請求項 17】

抗CD3が固体の基体に結合している、請求項16記載の方法。

【請求項 18】

Tリンパ球を抗CD28と接触させる工程をさらに含む、請求項16または請求項17記載の方法。

【請求項 19】

接触がインビボである、請求項6～15のいずれか一項記載の方法。

10

【請求項 20】

接触がインビトロまたはエクスビボである、請求項6～18のいずれか一項記載の方法。

【請求項 21】

cサイトカインが、IL-2、IL4、IL7、IL-21、活性を有するそれらの任意の断片、変種、類似体、または誘導体、およびそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項1～20のいずれか一項記載の方法。

【請求項 22】

cサイトカインが、IL-2または活性を有するその断片、変種、類似体、もしくは誘導体、およびそれらの組み合わせである、請求項21記載の方法。

20

【請求項 23】

cサイトカインが、Tリンパ球におけるOX40発現を上方制御する、請求項1～22のいずれか一項記載の方法。

【請求項 24】

上方制御が、JAK3リン酸化を介して仲介される、請求項23記載の方法。

【請求項 25】

上方制御が、STAT5、STAT3、またはSTAT5およびSTAT3の両方のJAK3活性化を介して仲介される、請求項23または請求項24記載の方法。

【請求項 26】

上方制御が、STAT5のJAK3活性化を介して仲介される、請求項25記載の方法。

【請求項 27】

OX40アゴニストが、OX40に特異的に結合する結合分子である、請求項1～26のいずれか一項記載の方法。

30

【請求項 28】

結合分子が、OX40に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片を含む、請求項27記載の方法。

【請求項 29】

抗体またはその抗原結合断片がモノクローナル抗体である、請求項28記載の方法。

【請求項 30】

抗体またはその抗原結合断片がキメラ抗体である、請求項29記載の方法。

40

【請求項 31】

抗体またはその抗原結合断片がヒト化抗体である、請求項29記載の方法。

【請求項 32】

抗体またはその抗原結合断片がヒト抗体である、請求項28または請求項29記載の方法。

【請求項 33】

抗原結合断片がFab断片である、請求項28～32のいずれか一項記載の方法。

【請求項 34】

抗原結合断片がFab'断片である、請求項28～32のいずれか一項記載の方法。

【請求項 35】

抗原結合断片がF(ab)2断片である、請求項28～32のいずれか一項記載の方法。

【請求項 36】

50

抗原結合断片が一本鎖Fv断片である、請求項28～32のいずれか一項記載の方法。

【請求項37】

抗原結合断片が一本鎖抗体である、請求項28～32のいずれか一項記載の方法。

【請求項38】

抗体またはその抗原結合断片が、mAb 9B12と同じOX40エピトープに結合する、請求項28～37のいずれか一項記載の方法。

【請求項39】

結合分子が、OX40リガンドまたはそのOX40結合断片を含む、請求項27記載の方法。

【請求項40】

結合分子が、それに融合した異種ポリペプチドをさらに含む、請求項27～39のいずれか一項記載の方法。 10

【請求項41】

結合分子が、治療剤、プロドラッグ、ペプチド、タンパク質、酵素、ウイルス、脂質、生体応答修飾物質、薬学的作用物質、またはPEGからなる群より選択される作用物質にコンジュゲートされている、請求項27～39のいずれか一項記載の方法。

【請求項42】

結合分子が、

Fcドメインを含む免疫グロブリンドメイン、

コイルドコイル三量化ドメインを含む三量化ドメイン、および

OX40受容体結合ドメインである受容体結合ドメイン 20

をN末からC末方向に含む融合ポリペプチドを含み、かつ該融合ポリペプチドが三量体融合タンパク質へと自己会合する、請求項27または39～41のいずれか一項記載の方法。

【請求項43】

融合ポリペプチドが、OX40受容体に結合することができ、かつ少なくとも1種のOX40介在性活性を刺激することができる、請求項42記載の方法。

【請求項44】

融合ポリペプチドのOX40受容体結合ドメインが、OX40リガンド(OX40L)の細胞外ドメインを含む、請求項42または請求項43記載の方法。

【請求項45】

三量化ドメインが、TRAF2三量化ドメイン、マトリリン-4三量化ドメイン、またはそれらの組み合わせを含む、請求項42～44のいずれか一項記載の方法。 30

【請求項46】

三量化ドメインが、TRAF2三量化ドメインを含む、請求項45記載の方法。

【請求項47】

癌が固形腫瘍またはその転移である、請求項1～10または14～46のいずれか一項記載の方法。

【請求項48】

癌が、黒色腫、消化管癌、腎細胞癌腫、前立腺癌、肺癌、乳癌、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、請求項47記載の方法。

【請求項49】 40

転移の部位が、リンパ節、肺、肝臓、骨、およびそれらの任意の組み合わせからなる群より選択される、請求項47記載の方法。

【請求項50】

対象がヒト患者である、請求項1～5または21～49のいずれか一項記載の方法。

【請求項51】

治療が、患者における少なくとも1箇所の腫瘍または転移の退縮をもたらす、請求項50記載の方法。

【請求項52】

治療により、患者における腫瘍または転移の成長が遅延するかまたは増大しない、請求項50または請求項51記載の方法。 50

【請求項 5 3】

治療が、患者における疾患の安定をもたらす、請求項50～52のいずれか一項記載の方法。

【請求項 5 4】

治療が、患者の生存の延長をもたらす、請求項50～53のいずれか一項記載の方法。

【請求項 5 5】

投与が、長期間確立された腫瘍またはその転移の成長を遅延、失速、または減少させ得る、請求項50～54のいずれか一項記載の方法。

【請求項 5 6】

cサイトカインが、OX40アゴニストの投与前に対象に投与される、請求項1～5または21～55のいずれか一項記載の方法。 10

【請求項 5 7】

cサイトカインが、OX40アゴニストの投与と同時に対象に投与される、請求項1～5または21～55のいずれか一項記載の方法。

【請求項 5 8】

cサイトカインが、OX40アゴニストの投与後に対象に投与される、請求項1～5または21～55のいずれか一項記載の方法。

【請求項 5 9】

IL-2が、アルデスロイキン、BAY 50-4798、NHS-EMD 521873、IL-2/抗IL-2複合体、またはそれらの任意の組み合わせである、請求項22記載の方法。 20

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

背景

古典的なB7-CD28共刺激経路に加えて、最近の研究は、OX40 (CD134)、4-1BB (CD 137)、およびCD27を含めた腫瘍壊死因子受容体 (TNFR) スーパーファミリーのメンバーが、CD4⁺ およびCD8⁺ T細胞応答を増進させ得ることを示している (Watts TH, Annu Rev Immunol 2005; 23: 23-68; Croft M, Nat Rev Immunol 2003; 3: 609-20; Redmond WL and Weinberg AD, Crit Rev Immunol 2007; 27: 415-36)。具体的には、本発明者らの研究室および他の研究室からの研究により、OX40ライゲーションは、CD4⁺ およびCD8⁺ T細胞分化、サイトカイン産生、メモリーT細胞の産出を増進することが実証されており、かつ制御性CD4⁺ T細胞の産出および機能に影響を及ぼすことも示されている (Watts TH, Annu Rev Immunol 2005; 23: 23-68; Croft M, Annu Rev Immunol 2010; 28: 57-78; Redmond WL, et al. Crit Rev Immunol 2009; 29: 187-201)。前臨床試験により、アゴニスト抗OX40 mAb、OX40L-Ig融合タンパク質、またはOX40L発現APCを介したOX40のライゲーションは、様々な腫瘍に対する強固なT細胞介在性抗腫瘍免疫を推進し得ることが示されている (Watts TH, Annu Rev Immunol 2005; 23: 23-68; Redmond WL and Weinberg AD, Crit Rev Immunol 2007; 27: 415-36; Croft M, Annu Rev Immunol 2010; 28: 57-78)。これらおよび他のデータに基づき、癌を有する患者の治療のための、アゴニスト抗ヒトOX40 mAbを用いた第1相臨床試験が実施された。さらなる試験は、OX40標的療法と、化学療法または放射線療法などの他の治療様式とを組み合わせることの有効性を検証中である。 30 40

【0002】

OX40を標的とする主な利点の一つは、OX40発現の制限された性質である。ナイーブT細胞上でのCD28の構成的な発現とは異なり、OX40はナイーブT細胞上に発現せず、その代わりにT細胞受容体 (TCR) ライゲーションの後に24～120時間一時的に上方制御される (Taraban VY, et al. Eur J Immunol 2002; 32: 3617-27; Gramaglia I, et al. J Immunol 1998; 161: 6510-7)。以前の研究により、高用量の同種Agによる刺激が最大のOX40発現を誘導し得、一方で弱いTCR刺激がOX40の不十分な誘導を引き起こしたように、TCRライゲーションは、用量依存的にOX40発現を推進することが示されている (Taraban VY, et al. Eur J Immunol 2002; 32: 3617-27; Verdeil G, et al. J Immunol 2006; 176: 4834-42) 50

。TCR刺激は、OX40の上方制御を促進するための必要な要素であるが、最適なOX40発現を誘導するにはさらなるシグナルが必要とされる。例えば、CD28自体はOX40依存的応答の産出に必要とされないが (Williams CA, et al. J Immunol 2007; 178: 7694-702; Akiba H, et al. J Immunol 1999; 162: 7058-66)、CD28シグナル伝達は最適なOX40介在性共刺激に寄与することが示されている (Walker LS, et al. J Exp Med 1999; 190: 1115-22; Rogers PR, et al. Immunity 2001; 15: 445-55)。CD28ライゲーションはIL-2産生およびIL-2R (CD25)の発現の増大を引き起こすため (Lenschow DJ, et al. Annu Rev Immunol 1996; 14: 233-58)、CD28-B7シグナル伝達が、OX40介在性T細胞共刺激に直接的にまたはIL-2依存的メカニズムを通して寄与するのかどうかは不明である。いくつかのグループからの研究により、IL-2/IL-2Rシグナル伝達は、OX40依存的T細胞共刺激を調節することに役割を果たし得ることが示唆されている。例えば、OX40ライゲーションは、IL-2産生およびT細胞上でのCD25発現の増大を推進したが (Gramaglia I, et al. J Immunol 2000; 165: 3043-50; Lathrop SK, et al. J Immunol 2004; 172: 6735-43; Evans DE, et al. J Immunol 2001; 167: 6804-11)、一方でCD25欠損T細胞は、OX40ライゲーションの後に不完全分化を呈した (Williams CA, et al. J Immunol 2007; 178: 7694-702; Redmond W L, et al. J Immunol 2007; 179: 7244-53)。しかしながら、これらの調査は、IL-2Rシグナル伝達がOX40発現に影響を及ぼすかどうかについて直接的に取り組んではいなかった。

10

【0003】

IL-2/IL-2Rシグナル伝達は、IL-2R (CD25)、IL-2/IL-15R (CD122)、および共通 (c; CD132)鎖からなる三量体IL-2受容体を介して生じる (Nelson BH, and Willerford DM. Adv Immunol 1998; 70: 1-81)。IL-2Rシグナル伝達は、それぞれ c鎖およびIL-2R鎖に構成的に関連する、JAK3およびJAK1のリン酸化によって開始する。これらのキナーゼの活性化は、PI3K/AKT、MAPK/ERK、および転写因子のSTATファミリーを含めたいくつかの下流分子の活性化を引き起こす (Gaffen SL. Cytokine 2001; 14: 63-77)。IL-2サイトカインファミリーの他のメンバーも、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15、およびIL-21を含む cサブユニットを利用する。重要なことには、IL-2Rおよび/または共通 cサイトカインシグナル伝達がOX40発現を制御するかどうかは依然として議論が分かれている。いくつかの調査では、IL-2およびIL-4はT細胞上でのOX40発現を上方制御し得ることが示されているが、一方で他のものは、IL-2Rシグナル伝達がOX40を誘導するのに必須ではないことを実証した (Verdeil G, et al. J Immunol 2006; 176: 4834-42; Williams CA, et al. J Immunol 2007; 178: 7694-702; Toennies HM, et al. J Leukoc Biol 2004; 75: 350-7)。

20

30

【0004】

新しい癌免疫療法を開発し、かつOX40経路を通じた既存の癌免疫療法を改善する必要性が依然として存在する。

【発明の概要】

【0005】

簡単な概要

本開示は、OX40発現が、JAK3ならびにその下流標的である転写因子STAT3およびSTAT5の活性化に依存している、TCR/共通 cサイトカイン依存的二重シグナル伝達経路を介して推進されることを実証する。ある特定の局面において、本開示は、OX40アゴニストおよびIL-2を用いた併用療法が腫瘍退縮を増強し得ることをさらに実証する。他の局面において、本開示は、抗OX40/IL-2二重療法が、例えば長期間十分に確立された腫瘍を有するマウスにおいて、アネルギー性腫瘍反応性CD8 T細胞の機能をさらに回復させ得、生存率の増加をもたらすことを示す。本開示は、抗OX40/ cサイトカイン (例えば、IL-2) に向けられた併用療法が、癌を有する患者の治療のための、腫瘍免疫療法を改善し得、かつ腫瘍反応性CD8 T細胞の機能を復活させ得ることを示す。

40

【0006】

治療を必要としている対象に、OX40アゴニスト、および共通 c鎖 (c) サイトカイン

50

または活性を有するその断片、変種、類似体、もしくは誘導体を投与する工程を含む、癌を治療する方法を本明細書において提供する。ある特定の局面において、投与は相乗的であり、すなわちそれは、OX40アゴニストまたは c サイトカイン単独よりもより大幅にTリンパ球介在性抗癌免疫を刺激する。ある特定の局面において、投与はTリンパ球、例えばCD4⁺、CD8⁺、またはCD4⁺およびCD8⁺Tリンパ球の両方を刺激する。ある特定の局面において、投与はアネルギー性腫瘍反応性Tリンパ球、例えばCD8⁺Tリンパ球の機能を回復させ得る。ある特定の局面において、アネルギー性腫瘍反応性CD8⁺Tリンパ球の増殖が回復し、ある特定の局面において、アネルギー性腫瘍反応性CD8⁺Tリンパ球の分化が回復する。ある特定の局面において、増殖および分化の両方が回復する。

【0007】

10

Tリンパ球介在性癌免疫療法に対するOX40アゴニストの効果を増強する方法をさらに提供し、該方法は、T細胞受容体(TCR)刺激したTリンパ球を、c サイトカイン、例えばIL-2、または活性を有するその断片、変種、類似体、もしくは誘導体と組み合わせたOX40アゴニストと接触させる工程を含む。Tリンパ球介在性癌免疫療法に対するOX40アゴニストの効果を増強する別の方法も提供し、該方法は、TCRライゲーションを介してTリンパ球を刺激する工程、およびTCR刺激したTリンパ球を、c サイトカインまたは活性を有するその断片、変種、類似体、もしくは誘導体と組み合わせたOX40アゴニストと接触させる工程を含む。Tリンパ球介在性癌免疫療法に対するOX40アゴニストの効果を増強する提供される方法のある特定の局面において、癌免疫療法は、CD4⁺Tリンパ球、CD8⁺Tリンパ球、またはCD4⁺Tリンパ球およびCD8⁺Tリンパ球の両方を必要とする。ある特定の局面において、接触は、OX40アゴニストまたは c サイトカイン単独よりもより大幅に、Tリンパ球介在性癌免疫療法を刺激し得、接触は、アネルギー性腫瘍反応性CD8⁺T細胞の機能を回復させ得、またはその両方であり得る。

20

【0008】

TCR刺激に応答したTリンパ球増殖のOX40アゴニスト介在性増進を増強する方法をさらに提供し、該方法は、TCR刺激したTリンパ球を、c サイトカインまたは活性を有するその断片、変種、類似体、もしくは誘導体と組み合わせたOX40アゴニストと接触させる工程を含む。Tリンパ球増殖のOX40アゴニスト介在性増進を増強する別の方法も提供し、該方法は、TCRライゲーションを介してTリンパ球を刺激する工程、およびTCR刺激したTリンパ球を、c サイトカインまたは活性を有するその断片、変種、類似体、もしくは誘導体と組み合わせたOX40アゴニストと接触させる工程を含む。ある特定の局面において、増強には、Tリンパ球分化の増強も含まれる。ある特定の局面において、TCRライゲーションは、Tリンパ球を抗原/MHC複合体と接触させることにより達成される。抗原は、例えば癌細胞特異的抗原であってよい。ある特定の局面において、TCRライゲーションは、Tリンパ球を抗CD3と接触させることにより達成される。抗CD3は、例えば固体の基体に結合してよい。抗CD3との接触により達成されるTCRライゲーションは、Tリンパ球を抗CD28と接触させる工程をさらに含んでよい。抗CD3との接触により達成されるTCRライゲーションは、インビボ、インビトロ、またはエクスピボで行われてよい。

30

【0009】

本明細書において提供される方法のある特定の局面において、c サイトカインは、IL-2、IL4、IL7、IL-21、活性を有するそれらの任意の断片、変種、類似体、もしくは誘導体、またはそれらの組み合わせであってよい。ある特定の具体的な局面において、c サイトカインは、IL-2または活性を有するその断片、変種、類似体、もしくは誘導体、およびそれらの組み合わせである。ある特定の局面において、IL-2は、アルデスロイキン、BAY 50-4798、NHS-EMD 521873、またはそれらの任意の組み合わせであってよい。

40

【0010】

本明細書において提供される方法のある特定の局面において、c サイトカインは、Tリンパ球におけるOX40発現を上方制御する。ある特定の局面において、上方制御は、JAK3リン酸化を通して、例えばSTAT5、STAT3、またはSTAT5およびSTAT3の両方のJAK3活性化を通して仲介され得る。具体的な局面において、上方制御は、STAT5のJAK3活性化を通して仲

50

介される。

【0011】

本明細書において提供される方法のある特定の局面において、OX40アゴニストは、OX40に特異的に結合する結合分子である。

【0012】

ある特定の局面において、結合分子には、OX40に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片、例えばモノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、またはヒト抗体が含まれる。ある特定の局面において、抗原結合断片は、Fab断片、Fab'断片、F(ab)2断片、一本鎖Fv断片、または一本鎖抗体である。ある特定の局面において、OX40に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片は、mAb 9B12と同じOX40エピトープに結合する。

10

【0013】

ある特定の局面において、結合分子には、OX40リガンドまたはそのOX40結合断片が含まれる。

【0014】

ある特定の局面において、結合分子には、それに融合した異種ポリペプチドがさらに含まれる。ある特定の局面において、結合分子は、治療剤、プロドラッグ、ペプチド、タンパク質、酵素、ウイルス、脂質、生体応答修飾物質、薬学的作用物質、またはPEGからなる群より選択される作用物質にコンジュゲートされている。

【0015】

ある特定の局面において、結合分子には、N末からC末方向に、Fcドメインを含む免疫グロブリンドメインと、コイルドコイル三量化ドメインを含む三量化ドメインと、OX40受容体結合ドメインである受容体結合ドメインとを含む融合ポリペプチドが含まれ、かつ該融合ポリペプチドは三量体融合タンパク質へと自己会合する。ある特定の局面において、この融合ポリペプチドは、OX40受容体に結合し得、かつ少なくとも1種のOX40介在性活性を刺激し得る。ある特定の局面において、この融合ポリペプチドのOX40受容体結合ドメインには、OX40リガンド(OX40L)の細胞外ドメインが含まれる。ある特定の局面において、この融合タンパク質の三量化ドメインには、TRAF2三量化ドメイン、マトリリン(Matrilin)-4三量化ドメイン、またはそれらの組み合わせが含まれる。

20

【0016】

本明細書において提供される方法のある特定の局面において、癌は固形腫瘍またはその転移である。本明細書において提供される方法のある特定の局面において、癌は、例えば黒色腫、消化管癌、腎細胞癌腫、前立腺癌、肺癌、乳癌、またはそれらの任意の組み合わせである。本明細書において提供される方法のある特定の局面において、癌が転移している場合、転移はリンパ節、肺、肝臓、骨、またはそれらの任意の組み合わせに位置してよい。

30

【0017】

本明細書において提供される方法のある特定の局面において、治療は、患者に少なくとも1種のさらなる癌治療を施す工程をさらに含む。さらなる癌治療は、例えば外科手術、放射線、化学療法、免疫療法、標的抗癌療法、ホルモン療法、またはそれらの任意の組み合わせであってよい。

40

【0018】

本明細書において提供される方法のある特定の局面において、OX40アゴニストは単回用量として投与される。本明細書において提供される方法のある特定の局面において、cサイトカインは単回用量として投与される。本明細書において提供される方法のある特定の局面において、OX40アゴニストは少なくとも2回用量で投与される。本明細書において提供される方法のある特定の局面において、cサイトカインは少なくとも2回用量で投与される。本明細書において提供される方法のある特定の局面において、OX40アゴニストはIV注入によって投与される。本明細書において提供される方法のある特定の局面において、cサイトカインはIV注入によって投与される。

【0019】

50

本明細書において提供される方法のある特定の局面において、cサイトカインは、OX40アゴニストの投与前に、OX40アゴニストの投与と同時に、またはOX40アゴニストの投与後に対象に投与されてよい。

【0020】

本明細書において提供される方法のある特定の局面において、対象はヒト患者である。ある特定の局面において、治療は、患者における少なくとも1箇所の腫瘍もしくは転移の退縮、患者における腫瘍もしくは転移の成長が遅延するかもしくは増大しないこと、患者における疾患の安定、患者の生存の延長、長期間確立された腫瘍もしくはその転移の成長の遅延、失速、もしくは減少、またはそれらの任意の組み合わせをもたらし得る。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】OX40は、TCR刺激の強さおよびIL-2R (CD25) 発現によって制御される。A) 示されている漸増量の同種ペプチドで処理したAPCによるTCR刺激後3日目における、OT-I T細胞によるCD25またはOX40の発現。発現をフローサイトメトリーによって測定した。B) フローサイトメトリーによって判定された、表示時点における、TCR刺激後のCD25およびOX40の発現速度を示したグラフ。C) 抗CD3および抗CD28刺激後の、精製したナイーブおよびカルボキシフルオレセインジアセテートスクシンイミジルエステル (CFSE) 標識したポリクローナル野生型またはCD25^{-/-}のCD8⁺ T細胞における、CD25およびOX40の発現レベルを示したグラフ。発現をフローサイトメトリーによって測定した。^{*}P<0.05。

【図2】OX40は、マウスおよびヒトT細胞上でTCR刺激およびIL-2によって制御される。A) フローサイトメトリーによって判定された、ペプチドパルスしたAPCで活性化され、次いで培地のみでまたは組換えマウスIL-2で刺激された野生型またはOX40^{-/-}のOT-I T細胞によるCD25およびOX40の発現。棒グラフは、平均±SEMを表現している (n=6/群)。B) フローサイトメトリーによって判定された、組換えヒトIL-2および/または抗CD3 mAb (OKT-3) で刺激されたヒトCD8⁺ T細胞によるCD25およびOX40の発現。C) フローサイトメトリーによって判定された、培地、組換えヒトIL-2、および/または抗CD3 mAb (OKT-3) で刺激されたヒトCD8⁺ およびCD4⁺ T細胞における、CD25およびOX40の発現を表現した棒グラフ。データは、平均±SDを表現している (n=3~5/群)。データは、同様の結果を有する5回の独立した実験から集められている。^{*}P<0.05; ^{**}P<0.01; ^{***}P<0.001。

【図3】共通 cサイトカインは、JAK/STATシグナル伝達を介してOX40を制御する。A) ウェスタンブロットによって査定された、組換えマウスIL-2の存在下または非存在下での、刺激されたWT OT-I T細胞におけるJAK1、JAK2、およびJAK3のリン酸化のレベル。B) フローサイトメトリーによって判定された、JAK3阻害剤 (PF-956980) で処理した場合の、ペプチドパルスしたAPCで活性化され、次いで組換えマウスIL-2の存在下または非存在下で刺激されたWT OT-I T細胞によるCD25およびOX40の発現。C) フローサイトメトリーによって判定された、ペプチドパルスしたAPCで活性化され、次いで培地のみでまたは組換えマウスIL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15、もしくはIL-21で処理されたWTまたはOX40^{-/-}のOT-I細胞によるCD25発現 (%陽性および平均蛍光強度 (MFI))。D) フローサイトメトリーによって判定された、ペプチドパルスしたAPCで活性化され、次いで培地のみでまたは組換えマウスIL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15、もしくはIL-21で処理されたWTまたはOX40^{-/-}のOT-I細胞によるOX40発現 (%陽性および平均蛍光強度 (MFI))。E) ウェスタンブロットによって査定された、組換えマウスIL-2、IL4、IL7、IL15、およびIL21の存在下または非存在下での、刺激されたWT OT-I T細胞におけるSTAT1、STAT3、STAT4、STAT5、およびSTAT6のリン酸化のレベル。B) ~ D) における棒グラフは、B) n=2~3/群またはC)、D) n=3~8/群からの平均±SDを表現している。データは、同様の結果を有する2~10回の独立した実験のうちの代表的な1つである。^{*}P<0.05; ^{**}P<0.01; ^{***}P<0.001。

【図4】共通 cサイトカインによる最大OX40発現の誘導は、TCR刺激の強さによって制御される。A) フローサイトメトリーによって判定された、野生型 (SIINFEKL) または変更ペプチドリガンド (SIITFEKL) pOVAパルスしたAPCで活性化され、その後培地のみでのまたは組換えマウスIL-2、IL-4、IL-7、IL-15、もしくはIL-21での処理が続いたWT OT-I

10

20

30

40

50

T細胞によるCD25発現（%陽性および平均蛍光強度（MFI））。B）フローサイトメトリーによって判定された、野生型（SIINFEKL）または変更ペプチドリガンド（SIITFEKL）pOVAパルスしたAPCで刺激され、その後に培地のみでのまたは組換えマウスIL-2、IL-4、IL-7、IL-15、もしくはIL-21での処理が続いたWT OT-I T細胞によるOX40発現（%陽性および平均蛍光強度（MFI））。グラフは、n = 2/群からの平均 ± SEMを表現している。^{*}P < 0.001。

【図5】STAT3およびSTAT5は、共通 c サイトカインによる刺激後のOX40の最適な上方制御に必要とされる。A）フローサイトメトリーによって測定された、ペプチドパルスしたAPCで活性化され、次いで培地のみでまたは組換えマウスIL-2、IL-4、もしくはIL-21で刺激されたWT OT-I T細胞によるCD25およびOX40の発現（%陽性および平均蛍光強度（MFI））。B）フローサイトメトリーによって判定された、抗CD3 mAbで刺激され、採取され、次いで培地のみでまたは組換えマウスIL-2、IL-4、もしくはIL-21で刺激されたポリクローナル内在性WTまたはSTAT5^{-/-}のCD8⁺ T細胞によるCD25およびOX40の発現（%陽性および平均蛍光強度（MFI））。棒グラフは、平均 ± SDを表現している（n = 2 ~ 3/群）。データは、同様の結果を有する2回の独立した実験のうちの代表的な1つである。^{*}P < 0.05；^{**}P < 0.01；^{***}P < 0.001；NS：統計的な有意差なし。

【図6】IL-2処理は、担腫瘍宿主におけるCD8⁺ T細胞上でのOX40発現を増強した。フローサイトメトリーによって査定された、IL-2サイトカイン/mAb複合体で処理された担腫瘍C57BL/6 OX40-cre x ROSA-YFPレポーターマウスのA）腫瘍およびB）脾臓から単離されたCD8⁺ T細胞上での、CD25、YFP（OX40レポーター）、およびOX40の発現の程度。グラフは、同様の結果を有する2回の独立した実験のうちの1回からの3 ~ 4匹の個々の動物から得られた結果を表現している。

【図7】抗OX40/IL-2c併用療法は、T細胞依存的メカニズムを通して抗腫瘍免疫を強化する。IL-2サイトカイン/mAb複合体とともに抗OX40またはラットIgG Abで処理されたMCA-205担腫瘍野生型マウスの腫瘍成長および生存。担腫瘍マウスのA）腫瘍成長およびB）生存の程度を査定した。データは、同様の結果を有する2回の独立した実験のうちの代表的な1つである。C）抗OX40およびIL-2cで処理された、CD4、CD8、またはCD4/CD8欠失MCA-205担腫瘍マウスの生存。

【図8】Treg機能アッセイ。担腫瘍マウスにおけるTreg機能に対する抗OX40/IL-2c処理の効果。グラフは、n = 2 ~ 3/群からの平均 ± SDを表現している。

【図9】抗OX40/IL-2c二重療法は、CD8 T細胞アネルギーを好転させ、かつ長期間十分に確立された腫瘍を有するマウスの生存を増大させる。A）腫瘍モデル。B）フローサイトメトリーによって判定された、末梢血中のドナーOT-I T細胞上でのKi-67、グランザイムB、およびKLRG-1の発現。C）インビボでのCTLアッセイ。D、E）担腫瘍マウスの腫瘍成長（平均 ± SD；n = 5/群）およびD）生存（n = 11/群）の程度を査定した。データは、同様の結果を有する2 ~ 3回の独立した実験のうちの代表的な1つ、またはE）2回の独立した実験からの累積生存である。^{*}P < 0.05、^{**}P < 0.01。

【発明を実施するための形態】

【0022】

発明の詳細な説明

1. 定義

1つの（「a」または「an」）実体という用語は、その実体の1つまたは複数を指し；例えば「1つのOX40アゴニスト」は、1つまたは複数のOX40アゴニストを表すと理解されるということに留意すべきである。そのため、「1つ（「a」または「an」）」、「1つまたは複数」、および「少なくとも1つ」という用語は、本明細書において代替可能に用いられ得る。

【0023】

さらに、「および/または」は、本明細書において用いられる場合、他方の有無にかかわらず2つの指定された特質または要素のそれぞれについての具体的開示として受け止められるべきである。ゆえに、本明細書において「Aおよび/またはB」などの語句で用いら

れる「および/または」という用語は、「AおよびB」、「AまたはB」、「A」（単独）、ならびに「B」（単独）を含むことを意図される。同様に、「A、B、および/またはC」などの語句で用いられる「および/または」という用語は、以下の態様：A、B、およびC；A、B、またはC；AまたはC；AまたはB；BまたはC；AおよびC；AおよびB；BおよびC；A（単独）；B（単独）；ならびにC（単独）のそれぞれを包含することを意図される。

【0024】

別様に定義されない限り、本明細書において用いられるすべての技術的および科学的用語は、本開示が関係する技術分野における当業者によって一般に理解されるものと同じ意味を有する。例えば、the Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press；The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press；およびthe Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Pressは、本開示において用いられる用語の多くについての一般的辞書を当業者に提供する。

10

【0025】

単位、接頭語、および記号は、それらの国際単位系（Systeme International de Unite s）（SI）に承認された形式で表記される。数値範囲は、範囲を定義する数字を含む。別様に示されない限り、アミノ酸配列は、アミノからカルボキシ方向に左から右へ書かれる。本明細書において提供される表題は、本明細書を総じて参照することにより有され得る、本開示の様々な局面または態様についての限定ではない。したがって、すぐ下に定義される用語は、本明細書を参照することによりその全体としてより十分に定義される。

20

【0026】

態様が、「含む」という言語を用いて本明細書において記載される場合には必ず、「からなる」および/または「から本質的になる」という用語を用いて記載されるそれ以外の点では類似の態様も提供されると理解される。

【0027】

「OX40」および「OX40受容体」という用語は、本明細書において代替可能に用いられる。該受容体は、CD134、ACT-4、およびACT35とも称される。OX40は、受容体のTNFRスーパーファミリーのメンバーであり、抗原により活性化された哺乳動物CD4⁺およびCD8⁺Tリンパ球の表面上に発現する（Paterson, D.J., et al. Mol Immunol 24, 1281-1290 (1987)；Mallett, S., et al. EMBO J 9, 1063-1068 (1990)；Calderhead, D.M., et al. J Immunol 151, 5261-5271 (1993)）。

30

【0028】

本明細書において使用するとき、gp34、ACT-4-L、およびCD252とも様々に称されるOX40リガンド（「OX40L」）という用語は、OX40受容体と特異的に相互作用するタンパク質である（Baum P.R., et al. EMBO J. 13:3992-4001(1994)）。OX40Lという用語には、OX40リガンド全体、可溶性OX40リガンド、および第二の成分、例えばタンパク質ドメインに共有結合で連結されたOX40リガンドの機能的に活性を有する部分を含む融合タンパク質が含まれる。OX40Lの定義内には、天然に存在するOX4Lとはアミノ酸配列に違いがあるが、OX40受容体に特異的に結合し得る能力を保持する変種も含まれる。OX40Lの定義内には、OX40の生物学的活性を増強する変種がさらに含まれる。

40

【0029】

本明細書において使用するとき、「アゴニスト」、例えばOX40アゴニストは、その標的、例えばOX40の生物学的活性を増強する分子である。ある特定の局面において、例えば抗OX40抗体またはOX40リガンドの組成物を含むブロック指向OX40アゴニストは、OX40の生物学的活性を実質的に増強する。望ましくは、生物学的活性は、10%、20%、30%、50%、70%、80%、90%、95%、または100%さえ増強される。ある特定の局面において、本明細書において開示されるOX40アゴニストには、OX40結合分子、例えば結合ポリペプチド、例えば抗OX40抗体、OX40L、またはこれらの断片もしくは誘導体が含まれる。

【0030】

「結合分子」または「抗原結合分子」とは、その最も広い意味で、標的、例えばOX40受

50

容体に特異的に結合する分子を指す。一局面において、結合分子は、抗体またはその抗原結合断片である。別の局面において、結合分子には、参照抗体分子の少なくとも1つの重鎖または軽鎖CDRが含まれる。別の局面において、結合分子には、1種または複数種の参照抗体分子由来の少なくとも2つ、3つ、4つ、5つ、または6つのCDRが含まれる。

【0031】

「抗体」という用語は、免疫グロブリン分子の可変領域内の少なくとも1つの抗原認識部位を通して、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、炭水化物、ポリヌクレオチド、脂質、または前述のものの組み合わせなどの標的を認識しかつ特異的に結合する免疫グロブリン分子を意味する。本明細書において使用するとき、「抗体」という用語には、インタクトなポリクローナル抗体、インタクトなモノクローナル抗体、抗体断片 (Fab、Fab'、F(ab')₂、およびFv断片など)、一本鎖Fv (scFv) 変異体、少なくとも2種のインタクトな抗体から産出される二重特異性抗体などの多重特異性抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、抗体の抗原決定部分を含む融合タンパク質、および抗原が所望の生物学的活性を呈する限りは、抗原認識部位を含む他の任意の改変された免疫グロブリン分子が包含される。抗体は、それぞれ、 α 、 β 、 γ 、および μ と称されるそれらの重鎖定常ドメインの同定に基づき、免疫グロブリンの任意の5つの主要なクラス：IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgM、またはそれらのサブクラス (アイソタイプ) (例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、およびIgA2) のものであってよい。免疫グロブリンの異なるクラスは、異なる周知のサブユニット構造および三次元立体配置を有する。抗体は、裸の抗体であってよく、または毒素、放射性同位体などの他の分子にコンジュゲートされていてもよい。

10

20

【0032】

本明細書において記載される「OX40結合分子」とは、活性化されたCD4⁺T細胞などの哺乳動物T細胞の表面上に存在している実質的にOX40のみに結合する作用物質である。本明細書において使用するとき、「OX40結合分子」という用語には、抗OX40抗体およびOX40Lが含まれる。

【0033】

「抗原結合断片」という用語は、インタクトな抗体の一部を指し、かつインタクトな抗体の抗原決定可変領域を指す。抗体の抗原結合機能が全長抗体の断片によって果たされ得るということは、当技術分野において公知である。抗体断片の例には、Fab、Fab'、F(ab')₂、およびFv断片、線状抗体、一本鎖抗体、ならびに抗体断片から形成される多重特異性抗体が含まれるが、それらに限定されるわけではない。

30

【0034】

抗体の「可変領域」とは、単独でのまたは組み合わせでの、抗体軽鎖の可変領域または抗体重鎖の可変領域を指す。重鎖および軽鎖の可変領域は、それぞれ、超可変領域としても知られる3つの相補性決定領域 (CDR) によって接続された4つのフレームワーク領域 (FW) からなる。各鎖におけるCDRは、FW領域によって極めて接近して結び付けられており、他方の鎖からのCDRとともに抗体の抗原結合部位の形成に寄与する。CDRを決定するための少なくとも2つの技法：(1) 異種間配列変動性に基づく手法 (すなわち、Kabat et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, (5th ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda Md.)) ; および (2) 抗原-抗体複合体の結晶学的調査に基づく手法 (Al-lazikani et al. (1997) *J. Molec. Biol.* 273:927-948)) が存在する。加えて、CDRを決定するために、当技術分野において、これらの2つの手法の組み合わせがしばしば用いられる。

40

【0035】

「モノクローナル抗体」とは、単一の抗原決定基、すなわちエピトープの非常に特異的な認識および結合に関与する均一な抗体集団を指す。これは、異なる抗原決定基に対して向けられた異なる抗体を典型的に含むポリクローナル抗体とは対照的である。「モノクローナル抗体」という用語には、インタクトなおよび全長の両方のモノクローナル抗体、ならびに抗体断片 (Fab、Fab'、F(ab')₂、Fvなど)、一本鎖 (scFv) 変異体、抗体部分を含む融合タンパク質、および抗原認識部位を含む他の任意の改変された免疫グロブリン分子

50

が包含される。さらに、「モノクローナル抗体」とは、ハイブリドーマ、ファージセクション、組換え発現、およびトランスジェニック動物によるものを含むがそれらに限定されない、様々な手段で作製されたそのような抗体を指す。

【0036】

「キメラ抗体」という用語は、免疫グロブリン分子のアミノ酸配列が2種またはそれを上回る種類の種に由来する抗体を指す。典型的に、軽鎖および重鎖の両方の可変領域は、所望の特異性、親和性、および機能的性能を有する哺乳動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ等）の1つの種に由来する抗体の可変領域に相当し、一方で定常領域は別の種（通常、ヒト）に由来する抗体における配列と相同であり、それによりその種における免疫応答を誘発するのを回避する。

10

【0037】

「ヒト化抗体」という用語は、最小限の非ヒト（例えば、マウス）配列を含有するように操作されている、非ヒト（例えば、マウス）免疫グロブリンに由来する抗体を指す。典型的に、ヒト化抗体は、相補性決定領域（CDR）由来の残基が、所望の特異性、親和性、および性能を有する非ヒト種（例えば、マウス、ラット、ウサギ、またはハムスター）のCDR由来の残基によって置き換えられているヒト免疫グロブリンである（Jones et al., 1986, Nature, 321:522-525; Riechmann et al., 1988, Nature, 332:323-327; Verhoeyen et al., 1988, Science, 239:1534-1536）。ある場合には、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域（FW）残基は、所望の特異性、親和性、および性能を有する非ヒト種由来の抗体における相当する残基で置き換えられる。

20

【0038】

ヒト化抗体を、Fvフレームワーク領域におけるおよび/または置き換えられた非ヒト残基内のいずれかのさらなる残基の置換によってさらに改変して、抗体の特異性、親和性、および/または性能を洗練しかつ最適化することができる。一般的に、ヒト化抗体は、非ヒト免疫グロブリンに相当するCDR領域のすべてまたは実質的にすべてを含有する、少なくとも1つ、典型的には2つまたは3つの可変ドメインの実質的にすべてを含んでよく、一方でFW領域のすべてまたは実質的にすべては、ヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである。ヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域またはドメイン（Fc）の少なくとも一部、典型的にはヒト免疫グロブリンの少なくとも一部も含んでよい。ヒト化抗体を産出するために用いられる方法の例は、米国特許第5,225,539号または第5,639,641号に記載されている。

30

【0039】

本明細書において使用するとき、「ヒト」または「完全ヒト」抗体には、ヒト免疫グロブリンのアミノ酸配列を有する抗体が含まれ、およびヒト免疫グロブリンライブラリーからまたは1種もしくは複数種のヒト免疫グロブリンに対するトランスジェニック動物から単離され、かつ内在性免疫グロブリンを発現しない抗体が含まれ、これは下記および例えばKucherlapatiらによる米国特許第5,939,598号に記載される。「ヒト」または「完全ヒト」抗体には、重鎖の少なくとも可変ドメイン、または重鎖および軽鎖の少なくとも可変ドメインを含む抗体も含まれ、該可変ドメインは、ヒト免疫グロブリン可変ドメインのアミノ酸配列を有する。

40

【0040】

「ヒト」または「完全ヒト」抗体には、変種（誘導体を含めた）を含む、それらから本質的になる、またはそれらからなる抗体も含まれる。アミノ酸置換をもたらす部位指向性突然変異誘発およびPCRを介した突然変異誘発を含むがそれらに限定されない、当業者に公知の標準的技法を用いて、ヒト抗体をコードするヌクレオチド配列に変異を導入することができる。好ましくは、変種（誘導体を含めた）は、参照のVH領域、VHCDR1、VHCDR2、VHCDR3、VL領域、VLCDR1、VLCDR2、またはVLCDR3と比較して、50個未満のアミノ酸置換、40個未満のアミノ酸置換、30個未満のアミノ酸置換、25個未満のアミノ酸置換、20個未満のアミノ酸置換、15個未満のアミノ酸置換、10個未満のアミノ酸置換、5個未満のアミノ酸置換、4個未満のアミノ酸置換、3個未満のアミノ酸置換、または2個未満のアミノ酸置

50

換をコードする。

【0041】

「抗OX40抗体」という用語および文法上同等のものには、OX40に特異的である、すなわち実質的にOX40のみに結合するモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体、ならびにそれらの抗原結合断片が包含される。ある特定の局面において、本明細書において記載される抗OX40抗体は、モノクローナル抗体（またはその抗原結合断片）、例えばマウスモノクローナル抗体、ヒト化モノクローナル抗体、または完全ヒトモノクローナル抗体である。

【0042】

「アネルギー」という用語は、免疫系のある特定の細胞が抗原刺激に応答しない状態になった、特定の種類の免疫調節を指す。

10

【0043】

「治療すること」または「治療」または「治療する」または「緩和すること」または「緩和する」などの用語は、（１）診断された病態もしくは障害の症状を治す、減速させる、軽くする、かつ/またはその進行を停止させる治療的手段、および（２）標的とされる病態または障害の発症を防ぐかつ/または遅くする予防的または防止に役立つ手段、の両方を指す。ゆえに、治療を必要としている人には、すでに障害を有する人；障害を有する傾向がある人；および障害が防止されるべき人が含まれる。ある特定の態様において、患者が、例えばある特定のタイプの癌の完全な、部分的な、または一時的な寛解を示す場合、対象は本明細書において記載される方法に従って癌に対して上手く「治療されている」。

20

【0044】

患者が、以下のうちの1つまたは複数を示す場合、対象は本明細書において記載される方法に従って上手く「治療されている」：癌細胞の数の減少もしくは完全な非存在；腫瘍サイズの低下；または腫瘍成長の遅延もしくは好転（reversal）、転移の、例えば軟部組織および骨への癌の広がりを含めた、例えば末梢器官への癌細胞浸潤の、阻害、例えば抑制、防止、遅延、収縮、もしくは好転；腫瘍転移の阻害、例えばその抑制、その遅延、その防止、その収縮、その好転、もしくはその非存在；腫瘍成長の阻害、例えばその抑制、その遅延、その防止、その収縮、その好転、もしくはその非存在；特定の癌に関連した1つもしくは複数の症状の除去；罹患率および死亡率の低下；生活の質の改善；または効果のいくつかの組み合わせ。有益なまたは所望の臨床結果には、検出可能であろうと検出不能であろうと、症状の緩和、疾患の程度の縮小、疾患の安定した（すなわち、悪化していない）状態、疾患進行の遅滞または鈍化、疾患状態の向上または軽減、および寛解（部分的であろうと完全であろうと）が含まれるが、それらに限定されるわけではない。「治療」とは、治療を受けない場合に期待される生存と比較して、生存を延長することも意味し得る。治療を必要としている人には、すでに病状もしくは障害を有する人、ならびに病状もしくは障害を有する傾向がある人、または病状もしくは障害が防止されるべき人が含まれる。

30

【0045】

「癌」、「腫瘍」、「癌性」、および「悪性」という用語は、無秩序な細胞成長によって典型的に特徴付けされる、哺乳動物における病態を指すまたは記載する。癌の例には、黒色腫、消化管癌、腎細胞癌腫、前立腺癌、および肺癌が含まれるが、それらに限定されるわけではない。

40

【0046】

本明細書において用いられる「転移」、「複数の転移」、「転移性」という用語および他の同等のものは、新たな場所で同様の癌性病変の発症を有する、起源の部位（例えば、原発腫瘍）から身体の他の領域へ広がるまたは移入する癌細胞を指す。「転移性」または「転移する」細胞は、近隣細胞との付着接触を失い、かつ疾患の原発部位から血流またはリンパ液を介して遊走して、近隣の身体構造を侵すものである。該用語は、原発腫瘍からの癌細胞の剥離、循環への腫瘍細胞の侵入、それらの生存および遠隔部位への遊走、循環から新たな部位内への接着および溢出、ならびに遠隔部位での微小コロニー形成、ならび

50

に遠隔部位での腫瘍の成長および発生を含むがそれらに限定されない、転移の過程も指す。ある特定の局面において、転移は、リンパ節、肺、肝臓、および骨を含むがそれらに限定されない部位に現れる。

【 0 0 4 7 】

「対象」または「個体」または「動物」または「患者」または「哺乳動物」は、診断、予後診断、または療法が望まれる任意の対象、とくに哺乳動物の対象を意味する。哺乳動物の対象には、ヒト、家畜、畜類、および動物園用、スポーツ用、またはペット用動物、例えばイヌ、ネコ、モルモット、ウサギ、ラット、マウス、ウマ、畜牛、乳牛、クマ等が含まれる。

【 0 0 4 8 】

本明細書において使用するとき、「ポリペプチド」という用語は、単数の「ポリペプチド」ならびに複数の「ポリペプチド」を包含することを意図され、アミド結合（ペプチド結合としても知られる）によって線状に連結された単量体（アミノ酸）から構成される分子を指す。「ポリペプチド」という用語は、2個またはそれを上回る数のアミノ酸の任意の1本の鎖または複数本の鎖を指し、具体的な長さの産物を指すわけではない。ゆえに、2個またはそれを上回る数のアミノ酸の1本の鎖または複数本の鎖を指すために用いられる、ペプチド、ジペプチド、トリペプチド、オリゴペプチド、「タンパク質」、「アミノ酸鎖」、または他の任意の用語は、「ポリペプチド」の定義の範囲内に含まれ、かつ「ポリペプチド」という用語は、これらの用語のいずれかの代わりに、またはそれらと代替可能に用いられ得る。「ポリペプチド」という用語は、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、公知の保護基/ブロック基による誘導体化、タンパク質分解による切断、または天然に存在しないアミノ酸による修飾を含むがそれらに限定されない、ポリペプチドの発現後修飾の産物を指すことも意図される。ポリペプチドは、天然の生物学的供給源に由来し得るかまたは組換え技術によって産生され得るが、指定される核酸配列から必ずしも翻訳されるとは限らない。それは、化学的合成によるものを含めた任意の様式で産出され得る。

【 0 0 4 9 】

「単離した」ポリペプチド、またはその断片、変種、もしくは誘導体とは、その天然の境遇にないポリペプチドを意図する。特定のレベルの精製は必要とされない。例えば、単離したポリペプチドは、その天然のまたは自然の環境から取り出されていてよい。宿主細胞内で発現した組換えにより産生されたポリペプチドおよびタンパク質は、任意の適切な技法によって分離されている、分画されている、または部分的にもしくは実質的に精製されている天然または組換えポリペプチドであるため、本開示上、単離したと見なされる。

【 0 0 5 0 】

前述のポリペプチドの断片、誘導体、類似体、または変種、およびそれらの任意の組み合わせも、ポリペプチドとして含まれる。例えばOX40アゴニストポリペプチドを指す場合、「断片」、「変種」、「誘導体」、および「類似体」という用語には、相当するOX40アゴニストの結合特性の少なくとも一部を保持する任意のポリペプチドが含まれる。ポリペプチドの断片には、本明細書における他の箇所に記載される特異的抗体断片に加えて、タンパク質分解による断片ならびに欠失断片が含まれる。本明細書において使用するとき、例えばOX40アゴニストポリペプチドの「誘導体」とは、官能性側鎖基の反応によって化学的に誘導体化された1個または複数個の残基を有する対象ポリペプチドを指す。20種の標準的アミノ酸の1種または複数種の天然に存在するアミノ酸誘導体を含むそのペプチドも、「誘導体」として含まれる。

【 0 0 5 1 】

「T細胞」および「Tリンパ球」という用語は、細胞表面上にT細胞受容体複合体（T細胞特異的CD3マーカーを含めた）を保有するリンパ球の集団を指すために、本明細書において代替可能に用いられる。Tリンパ球は、細胞介在性免疫において非常に広く機能を果たす一方で、それらは、それらの特定の機能だけでなく、特定のTリンパ球亜集団に対する「マーカー」として機能し得るある特定の表面抗原および細胞内抗原の差別的発現に基づ

10

20

30

40

50

き、無数の亜集団に分類され得る。一般的な非限定的な例として、ヘルパーT細胞は表面抗原CD4を発現し、そこで細胞傷害性T細胞はCD8を発現する。これらの群内の亜集団およびこれらの群間の重複は、CD95、CD25、FoxP3、CD28、CCR7、CD127、CD38、HLA-DR、およびKi-67を含むがそれらに限定されない、他の細胞表面マーカーによって同定され得る。Tリンパ球の亜集団は、以下の実施例においてより詳細に記載される、標識抗体の使用によって、例えばフローサイトメトリーまたは蛍光活性化細胞選別によって、血液細胞の混合集団から同定され得かつ/または単離され得る。例えば、ヘルパーT細胞は、CD3およびCD4を発現するが、FoxP3を発現しないものとして同定され得る。Tリンパ球の他の重複するおよび重複しない亜集団には、メモリーT細胞、未熟T細胞、成熟T細胞、制御性T細胞（Treg）、活性化T細胞、およびナチュラルキラーT（NKT）細胞が含まれる。

10

【0052】

II. OX40アゴニスト

OX40アゴニストは、抗原によるプライミングの間または直後に、CD4⁺T細胞上でOX40受容体と相互作用し、抗原に対するCD4⁺T細胞の応答の増大をもたらす。本開示の文脈において、「アゴニスト」という用語は、OX40受容体に結合し、かつOX40受容体によって仲介される少なくとも1種の活性を刺激する分子を指す。例えば、抗原特異的CD4⁺T細胞上でOX40受容体と相互作用するOX40アゴニストは、抗原のみに対する応答と比較して、T細胞増殖を増大させ得る。抗原に対する上昇した応答は、OX40アゴニストの非存在下において実質的により長い期間維持され得る。ゆえに、OX40アゴニストを介した刺激は、抗原、例えば腫瘍細胞のT細胞認識を強化することによって、抗原特異的免疫応答を増強する。OX40アゴニストは、参照によりそれらの全体として本明細書に組み入れられる、例えば米国特許第6,312,700号、第7,504,101号、第7,622,444号、および第7,959,925号に記載されている。

20

【0053】

OX40アゴニストには、OX40結合分子、例えば結合ポリペプチド、例えば可溶性細胞外リガンドドメインなどのOX40リガンド（「OX40L」）またはそのOX40結合断片、変種、もしくは誘導体、およびOX40L融合タンパク質、ならびに抗OX40抗体（例えば、ヒト化モノクローナル抗体などのモノクローナル抗体）またはその抗原結合断片、変種、もしくは誘導体が含まれる。抗OX40モノクローナル抗体の例は、それらの開示内容が参照によりそれらの全体として本明細書に組み入れられる、WO 95/12673およびWO 95/21915に記載されている。ある特定の局面において、抗OX40モノクローナル抗体は、参照によりその全体として本明細書に組み入れられる、Weinberg, A.D., et al. J Immunother 29, 575-585 (2006)に記載されている、9B12またはその抗原結合断片、変種、もしくは誘導体である。

30

【0054】

一局面において、OX40アゴニストには、OX40Lの1つまたは複数のドメインが、1つまたは複数のさらなるタンパク質ドメインに共有結合で連結されている融合タンパク質が含まれる。OX40アゴニストとして用いられ得る例示的なOX40L融合タンパク質は、その開示内容が参照によりその全体として本明細書に組み入れられる、米国特許第6,312,700号に記載されている。

【0055】

一局面において、OX40アゴニストには、多量体（例えば、三量体または六量体）OX40L融合タンパク質へと自己会合するOX40L融合ポリペプチドが含まれる。そのような融合タンパク質は、参照によりその全体として本明細書に組み入れられる、米国特許第7,959,925号に記載されている。多量体OX40L融合タンパク質は、高度に安定した三量体および六量体に自発的に会合し得るその能力により、対象、とくにヒト対象において、抗原特異的免疫応答の増強において有効性の増大を呈する。

40

【0056】

ある特定の局面において、多量体形態に会合し得るOX40アゴニストには、N末からC末方向に：はFcドメインを含む免疫グロブリンドメインと、コイルドコイル三量化ドメインを含む三量化ドメインと、OX40受容体結合ドメイン、例えばOX40LまたはそのOX40結合断片

50

、変種、もしくは誘導体である受容体結合ドメインとを含む融合ポリペプチドが含まれ、該融合ポリペプチドは三量体融合タンパク質へと自己会合し得る。一局面において、多量体形態に会合し得るOX40アゴニストは、OX40受容体に結合し得、かつ少なくとも1種のOX40介在性活性を刺激し得る。ある特定の局面において、OX40アゴニストには、OX40リガンドの細胞外ドメインが含まれる。

【0057】

多量体形態に会合し得るOX40アゴニストの三量化ドメインは、三量体タンパク質への個々のOX40L融合ポリペプチド分子の自己会合を促進するのに役立つ。ゆえに、三量化ドメインを有するOX40L融合ポリペプチドは、三量体OX40L融合タンパク質へと自己会合する。一局面において、三量化ドメインは、イソロイシンジッパードメインまたは他のコイルドコイルポリペプチド構造である。例示的なコイルドコイル三量化ドメインには、：TRAF2 (GENBANK (登録商標) アクセションNo. Q12933、アミノ酸299~348)；トロンボスポンジン1 (アクセションNo. P07996、アミノ酸291~314)；マトリリン-4 (アクセションNo. O95460、アミノ酸594~618)；CMP (マトリリン-1) (アクセションNo. NP002370、アミノ酸463~496)；HSF1 (アクセションNo. AAX42211、アミノ酸165~191)；およびキュピリン (アクセションNo. NP001072、アミノ酸104~138)が含まれる。ある特定の具体的な局面において、三量化ドメインには、TRAF2三量化ドメイン、マトリリン-4三量化ドメイン、またはそれらの組み合わせが含まれる。

【0058】

OX40アゴニストを改変して、その血清中半減期を増大させることがさらに望ましい場合がある。例えば、血清アルブミン、抗体Fc領域、またはPEGなどの異種分子へのコンジュゲートによって、OX40アゴニストの血清中半減期を増大させることができる。ある特定の態様において、OX40アゴニストを他の治療剤または毒素にコンジュゲートさせて、免疫コンジュゲートおよび/または融合タンパク質を形成することができる。ある特定の局面において、OX40アゴニストを、治療剤、プロドラッグ、ペプチド、タンパク質、酵素、ウイルス、脂質、生体応答修飾物質、または薬学的作用物質を含む群より選択される作用物質にコンジュゲートさせることができる。適切な毒素および化学療法剤は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th Ed. (Mack Publishing Co. 1995)、およびGoodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics, 7th Ed. (MacMillan Publishing Co. 1985)に記載されている。他の適切な毒素および/または化学療法剤は、当業者に公知である。

【0059】

ある特定の局面において、OX40アゴニストを製剤化して、活性剤の投与を容易にし、かつその安定性を促進することができる。ある特定の局面において、本開示に従った薬学的組成物は、生理食塩水、非毒性バッファー、防腐剤など、薬学的に許容される非毒性の無菌のキャリアを含む。本明細書において開示される治療方法における使用にとって適切な製剤化は、例えばRemington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co.) 16th ed. (1980)に記載されている。

【0060】

III. インターロイキン-2 (IL-2)、IL-2受容体、および共通鎖受容体に結合するサイトカイン

ある特定の局面において、癌を治療する方法を提供し、該方法は、インターロイキン-2または活性を有するその断片、変種、類似体、もしくは誘導体を伴うOX40アゴニストの投与を含む。インターロイキン-2 (IL-2) は、他の作用の中でもとりわけ、T細胞の増殖および活性化を増強し得、かつ様々なサイトカインの分泌を誘導し得る (例えば、Bachmann, MF, and Oxenius, A. EMBO Rep 8: 1142-1148 (2007)を参照されたい)。IL-2療法 (アルデスロイキン) は、転移性腎細胞癌腫および転移性黒色腫の治療に対してFDAによって認可されている。例えば、Jeal W Goa KL. BioDrugs. 1997 Apr;7(4):285-317を参照されたい。開発中の他のIL-2関連薬には、NK細胞を上回ってTリンパ球を選択的に標的とする高親和性IL-2類似体であるBAY 50-4798 (Shanafelt A. et al., Nature Biotechnology 1

10

20

30

40

50

8, 1197-1202 (2000))、IL-2R選択的IL-2変異体であるEMD 521873 (例えば、Gillies SD, et al., Clin Cancer Res. 17:3673-85 (2011)を参照されたい)、およびIL-2/抗IL-2抗体複合体 (例えば、Letourneau S, et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 107:2171-6 (2010)を参照されたい)が含まれるが、それらに限定されるわけではない。

【0061】

IL-2は、IL-2R (CD25)、IL-2/IL-15R (CD122)、および共通 (c; CD132)を含む三量体IL-2受容体 (IL-2R) に結合する (Nelson BH, and Willerford DM. Adv Immunol 1998; 70: 1-81)。ある特定の細胞は、IL-2がより低い親和性で結合するが同じシグナル変換能である、二量体受容体を発現する (Krieg C. et al. Proc Natl. Acad Sci USA 107: 11906-11911 (2010))。ある特定の局面において、CD122に向けられたIL-2/抗IL-2抗体複合体を介した、受容体のCD25部分とのIL-2の相互作用を遮断することは、例えば内皮細胞上に存在している三量体受容体への結合を低減させることによって、IL-2の全身投与のある特定の有害な副作用を遮断することができる (同文献)。

10

【0062】

ある特定の局面において、癌を治療する方法を提供し、該方法は、OX40アゴニスト、および共通鎖を有する受容体に結合するサイトカイン、または活性を有するその断片、変種、類似体、もしくは誘導体の投与を含む。インターロイキン-2受容体サブユニットまたはIL-2RGとしても知られる共通鎖 (c) (またはCD132) は、少なくとも6種の異なるインターロイキン受容体: IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15、およびインターロイキン-21受容体に対する受容体複合体に共通しているサイトカイン受容体サブユニットである。本明細書において使用するとき、cを含む受容体に結合するこれらのサイトカインは、「共通鎖 (c) サイトカイン」と称される。これらのサイトカインのすべては、少なくとも部分的に重複する、STAT3およびSTAT5のJAK3介在性リン酸化を介したシグナル変換経路を利用する (例えば、Kovanen PE, and Leonard WJ. Immunol Rev 2004; 202: 67-83; Rochman Y, et al. Nat Rev Immunol 2009; 9: 480-90; Moroz A, et al. J Immunol 2004; 173: 900-9; およびSprent J, and Surh CD. Curr Opin Immunol 2001; 13: 248-54を参照されたい)。

20

【0063】

IV. 癌を治療するための方法

癌を治療するための方法を本明細書において提供し、該方法は、他の癌治療と任意で組み合わせた、有効量のOX40アゴニスト、および有効量の共通鎖 (c) サイトカインまたは活性を有するその断片、変種、類似体、もしくは誘導体の投与を含む。OX40の活性化は、Tリンパ球の抗原刺激に呼応して機能を果たす一方で、それ自体は抗原または細胞特異的ではないため、OX40アゴニストの投与は、様々な癌細胞上の抗原に対するTリンパ球応答の増強をもたらす。共通鎖 (c) サイトカインまたは活性を有するその断片、変種、類似体、もしくは誘導体との共投与は、OX40発現を増強する。

30

【0064】

ある特定の局面において、有効量のOX40アゴニスト、および有効量の共通鎖 (c) サイトカインまたは活性を有するその断片、変種、類似体、もしくは誘導体の共投与は、OX40アゴニストまたはcサイトカイン、例えばIL-2単独よりもより大幅にTリンパ球介在性抗癌免疫を刺激する。したがって、OX40アゴニストまたはcサイトカイン、例えばIL-2の「有効量」は、いくつかの局面において、独立して投与されるそれぞれ個々の要素の量未満であってよい。同様に、共投与は、いくつかの局面において、より低頻度の投薬を可能にし得る。ある特定の局面において、共投与は、例えばアネルギー性腫瘍反応性CD8⁺ Tリンパ球の増幅および/または分化を回復させることによって、アネルギー性腫瘍反応性CD8⁺ Tリンパ球機能を回復させる得る。

40

【0065】

Tリンパ球介在性癌免疫療法に対するOX40アゴニストの効果を増強する方法も提供し、該方法は、T細胞受容体 (TCR) 刺激したTリンパ球を、cサイトカイン、例えばIL-2、または活性を有するその断片、変種、類似体、もしくは誘導体と組み合わせたOX40アゴニス

50

トと接触させる工程を含む。Tリンパ球介在性癌免疫療法に対するOX40アゴニストの効果を増強する方法をさらに提供し、該方法は、TCRライゲーションを介してTリンパ球を刺激する工程、およびTCR刺激したTリンパ球を、 γ サイトカイン、例えばIL-2、または活性を有するその断片、変種、類似体、もしくは誘導体と組み合わせたOX40アゴニストと接触させる工程を含む。そのような方法は、CD4⁺Tリンパ球、CD8⁺Tリンパ球、またはその両方を必要とする癌免疫療法に関与し得る。ある特定の局面において、Tリンパ球介在性癌免疫療法は、OX40アゴニストまたは γ サイトカイン、例えばIL-2単独よりもより大幅に増強される。ある特定の局面において、TCR刺激したTリンパ球を、 γ サイトカイン、例えばIL-2、または活性を有するその断片、変種、類似体、もしくは誘導体と組み合わせたOX40アゴニストと接触させることによって、アネルギー性腫瘍反応性Tリンパ球、例えばCD8⁺T細胞の機能が回復され得る。 10

【0066】

TCR刺激に応答したTリンパ球増殖のOX40アゴニスト介在性増進を増強する方法も提供し、該方法は、TCR刺激したTリンパ球を、 γ サイトカイン、例えばIL-2、または活性を有するその断片、変種、類似体、もしくは誘導体と組み合わせたOX40アゴニストと接触させる工程を含む。Tリンパ球増殖のOX40アゴニスト介在性増進を増強する方法をさらに提供し、該方法は、TCRライゲーションを介してTリンパ球を刺激する工程、およびTCR刺激したTリンパ球を、 γ サイトカイン、例えばIL-2、または活性を有するその断片、変種、類似体、もしくは誘導体と組み合わせたOX40アゴニストと接触させる工程を含む。ある特定の局面において、Tリンパ球分化も増強される。 20

【0067】

「TCRライゲーション」とは、T細胞の表面上でのTCRの架橋を意味する。ある特定の局面において、TCRライゲーションは、Tリンパ球を、TCRに特異的に結合する抗原/MHC複合体と接触させることにより達成される。抗原は、癌細胞特異的抗原、または癌細胞上に優先的に発現される抗原、例えば腫瘍抗原であってよい。他の局面において、TCRライゲーションは、Tリンパ球を、例えば固体の基体に結合してよい抗CD3と接触させることにより達成される。任意で、Tリンパ球を抗CD28と接触させてもよい。抗CD3および抗CD28抗体、例えばモノクローナル抗体、例えばヒトおよびマウスの両方のCD3およびCD28特異的抗体の適切な供給源は、当業者に周知の供給源から市販されている。ある特定の局面において、本方法に従ったTCRライゲーションはインビボで行われるが、インビトロまたはエクスピボで行われてもよい。 30

【0068】

本明細書において提供される治療方法のある特定の局面において、 γ サイトカインは、IL-2、IL4、IL7、IL-21、活性を有するそれらの任意の断片、変種、類似体、または誘導体、およびそれらの組み合わせであってよい。具体的な局面において、 γ サイトカインは、IL-2または活性を有するその断片、変種、類似体、もしくは誘導体、およびそれらの組み合わせである。本明細書における他の箇所に記載されるように、OX40アゴニストと γ サイトカイン、例えばIL-2との共投与は、Tリンパ球におけるOX40発現を上方制御し得、それによってOX40の免疫刺激効果を増強する。理論に拘束されることを望まないが、そのような上方制御は、JAK3リン酸化または他のシグナル変換経路を通して仲介され得、それは今度はSTAT5、STAT3、またはSTAT5およびSTAT3の両方を活性化し得る。 40

【0069】

投与される対象となるOX40アゴニストおよび γ サイトカイン、例えばIL-2の有効量は、周知の方法により当業者によって決定され得る。例えば、ある特定の局面において、OX40アゴニスト、例えば抗OX40モノクローナル抗体の有効用量は、約0.01mg/kg～約5.0mg/kg、例えば約0.1mg/kg、0.4mg/kg、または2mg/kgの抗OX40 mAbである。同様に、投与される対象となる γ サイトカイン、例えばIL-2、またはその断片、変種、誘導体、もしくは類似体の有効用量は、周知の方法により当業者によって決定され得る。ある特定の局面において、投与される対象となる γ サイトカイン、例えばIL-2の量は、OX40アゴニストに対するその相乗効果と毒性副作用の可能性とのバランスを取るによって決定される。 50

OX40および cサイトカイン、例えばIL-2を、単回用量として、または多数回用量、例えば少なくとも2回、3回、4回、5回、6回、またはそれを上回る回数の用量として、主治医によって決定されることになる種々の時間間隔を置いて、例えば1日に1回または複数回用量、3日おきに1回または複数回用量、5日おきに1回または複数回用量、1週間おきに1回または複数回用量などとして投与してよい。時間の長さに対する有効性のモニタリング（以下参照）に基づき、治療を継続してまたは治療を変更して、治療を受けている患者に最大の利益を提供することができる。さらに、OX40アゴニストおよび cサイトカイン、例えばIL-2を、同時に、または一方を他方の前に、または多数回用量として交互に投与してよい。

【0070】

10

ELISA、RIA、クロマトグラフィー等によって検出可能な変化を含むがそれらに限定されない、OX40アゴニストおよび cサイトカイン、例えばIL-2の投与に対する臨床応答を、磁気共鳴画像（MRI）スキャン、x-放射線画像、コンピューター断層撮影（CT）スキャン、フローサイトメトリーまたは蛍光活性化細胞選別装置（FACS）解析、組織学、肉眼的病理学、および血液化学などのスクリーニング技法を用いて査定することができ、かつ任意で調整することができる。これらの陽性治療応答に加えて、OX40アゴニストによる療法を受けている対象は、疾患に関連した症状の改善という有利な効果を経験し得る。

【0071】

OX40アゴニストおよび cサイトカイン、例えばIL-2の投与は、製剤の性質および患者のニーズによって決定される、任意の使用可能なルートを紹介するものであってよい。ある特定の態様において、OX40アゴニストはIV注入によって投与される。

20

【0072】

OX40アゴニストによる免疫刺激は抗原特異的でないということを考慮すると、本明細書において提供される方法によって様々な癌を治療することができ、例えば、ある特定の局面において、癌は固形腫瘍またはその転移である。癌のタイプには、黒色腫、消化管癌、腎細胞癌腫、前立腺癌、肺癌、乳癌、またはそれらの任意の組み合わせが含まれるが、それらに限定されるわけではない。転移の部位は限定的ではなく、例えばリンパ節、肺、肝臓、骨、またはそれらの任意の組み合わせにおける転移を含んでよい。

【0073】

本明細書において提供される癌治療方法は、OX40アゴニストの投与に加えて、他の従来のまたは非従来の癌治療も含んでよい。非限定的な例として、OX40アゴニストを、外科手術、放射線、化学療法、免疫療法、標的抗癌療法、ホルモン療法、またはそれらの任意の組み合わせと併用することができる。さらなる癌療法を、OX40アゴニストの投与の前、その間、またはその後に行うことができる。ゆえに、化学療法、放射線療法、他の抗癌抗体療法、小分子ベースの癌療法、またはワクチン/免疫療法ベースの癌療法と同様に、併用療法が別の治療剤の投与と組み合わせたOX40アゴニストの投与を含む場合、本明細書において記載される方法は、別個の製剤または単一の薬学的製剤を用いた、同時またはいずれかの順序での連続的投与による共投与を包含する。

30

【0074】

本明細書において提供される癌を治療するある特定の局面において、患者はヒト患者である。本明細書において記載される、 cサイトカイン、例えばIL-2と組み合わせたOX40アゴニストによる有効な治療は、任意の好ましい事象、例えば、原発腫瘍の部位におけるまたは1箇所もしくは複数箇所の転移における、癌の進行の速度の低下、腫瘍もしくは転移の成長が遅延するもしくは増大しないこと、疾患の安定、患者の生存の延長、腫瘍収縮、または腫瘍退縮を含んでよい。本明細書において提供される癌を治療する方法のある特定の局面において、 cサイトカイン、例えばIL-2と組み合わせたOX40アゴニストによる有効な治療は、長期間確立された腫瘍またはその転移の成長を遅延させる、失速させる、または減少させ得る。

40

【0075】

本開示によって包含される態様の実践は、別様に示されない限り、当技術分野の技術の

50

範囲内である、細胞生物学、細胞培養、分子生物学、トランスジェニック生物学、微生物学、組換えDNA、および免疫学の従来の技法を利用する。そのような技法は、文献において十分に説明されている。例えば、Sambrook et al., ed. (1989) *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press); Sambrook et al., ed. (1992) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (Cold Springs Harbor Laboratory, NY); D. N. Glover ed., (1985) *DNA Cloning, Volumes I and II*; Gait, ed. (1984) *Oligonucleotide Synthesis*; Mullis et al. 米国特許第4,683,195号; Hames and Higgins, eds. (1984) *Nucleic Acid Hybridization*; Hames and Higgins, eds. (1984) *Transcription And Translation*; Freshney (1987) *Culture Of Animal Cells* (Alan R. Liss, Inc.); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press) (1986); Perbal (1984) *A Practical Guide To Molecular Cloning; the treatise, Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); Miller and Calos eds. (1987) *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells*, (Cold Spring Harbor Laboratory); Wu et al, eds., *Methods In Enzymology*, Vols. 154 and 155; Mayer and Walker, eds. (1987) *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Academic Press, London); Weir and Blackwell, eds., (1986) *Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV; Manipulating the Mouse Embryo*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986); および Ausubel et al. (1989) *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, Baltimore, Md.) を参照されたい。

10

20

【 0 0 7 6 】

抗体工学の一般的原理は、Borrebaeck, ed. (1995) *Antibody Engineering* (2nd ed.; Oxford Univ. Press) に明記されている。タンパク質工学の一般的原理は、Rickwood et al., eds. (1995) *Protein Engineering, A Practical Approach* (IRL Press at Oxford Univ. Press, Oxford, Eng.) に明記されている。抗体および抗体 - ハプテン結合の一般的原理は、: Nisonoff (1984) *Molecular Immunology* (2nd ed.; Sinauer Associates, Sunderland, Mass.); および Steward (1984) *Antibodies, Their Structure and Function* (Chapman and Hall, New York, N.Y.) に明記されている。加えて、当技術分野において公知であり、かつ具体的に記載されていない免疫学における標準的方法は、概して、*Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, New York; Stites et al., eds. (1994) *Basic and Clinical Immunology* (8th ed; Appleton & Lange, Norwalk, Conn.); および Mishell and Shiigi (eds) (1980) *Selected Methods in Cellular Immunology* (W.H. Freeman and Co., NY) にあるものに従う。

30

【 0 0 7 7 】

免疫学の一般的原理を明記している標準的な参考図書 (reference work) には、*Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, New York; Klein (1982) J., *Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination* (John Wiley & Sons, NY); Kennett et al., eds. (1980) *Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyses* (Plenum Press, NY); Campbell (1984) "Monoclonal Antibody Technology" in *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, ed. Burden et al., (Elsevier, Amsterdam); Goldsby et al., eds. (2000) *Kuby Immunology* (4th ed.; H. Freeman & Co.); Roitt et al. (2001) *Immunology* (6th ed.; London: Mosby); Abbas et al. (2005) *Cellular and Molecular Immunology* (5th ed.; Elsevier Health Sciences Division); Kontermann and Dubel (2001) *Antibody Engineering* (Springer Verlag); Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press); Lewin (2003) *Genes VIII* (Prentice Hall 2003); Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press); Dieffenbach and Dveksler (2003) *PCR Primer* (Cold Spring Harbor Press) が含まれる。

40

【 0 0 7 8 】

上記に引用される参考文献のすべて、ならびに本明細書において引用されるすべての参考文献は、参照によりそれらの全体として本明細書に組み入れられる。

50

【 0 0 7 9 】

以下の実施例は、例証として提示されるものであり、限定として提示されるものではない。

【 実施例 】

【 0 0 8 0 】

一般的方法

マウス

野生型およびCD25⁺/⁻ CD57BL/6マウスをJackson Labs (Bar Harbor, ME)から購入した。OT-I Thy1.1 TCR Tg、(前立腺オボアルブミンを発現するトランスジェニック) POET-1 Tg、OX40⁺/⁻ OT-I TCR Tg、およびSTAT5a/b⁺/⁻ マウスを、それぞれDr. Charles Surh (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA)、Dr. Timothy Ratliff (Purdue University, West Lafayette, IN)、Dr. Michael Croft (La Jolla Institute for Allergy and Immunology, La Jolla, CA)、およびDr. Brad Nelson (BC Cancer Agency, Victoria, BC, Canada)から入手した。C57BL/6 OX40-CreマウスをDr. Nigel Killeen (UCSF, San Francisco, CA)から入手し、Rosa26-loxP-STOP-loxP-YFP対立遺伝子を保有しているマウス (Srinivas S, et al. BMC Dev Biol 2001; 1: 4)と交配した。STAT3⁺/⁻ OT-I TCR Tgマウス由来の脾細胞を、Dr. Hua Yu (City of HopeのBeckman Research Institute, Duarte, CA)から入手した。すべてのマウスを、Providence Portland Medical Center動物施設において特定病原体を含まない条件下で繁殖させかつ維持した。アメリカ国立衛生研究所の実験動物の管理と使用に関する指針 (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals)に従って、実験手順を実施した。

【 0 0 8 1 】

インビボにおけるOT-I T細胞の養子移入および活性化

OT-I Thy1.1 TCR Tgマウスのリンパ節および脾臓から、単一細胞懸濁物を調製した。Dyna マウスCD8細胞陰性単離キット (Invitrogen, Carlsbad, CA)を用いて、細胞懸濁物からCD4⁺、CD11b⁺、CD45R⁺、DX5⁺、およびTer-119⁺細胞を欠失させた。OT-I T細胞は、メーカーの指示どおり陰性選択によって精製され、フローサイトメトリーによって示される(データ示さず)ナイーブ表現型(CD25陰性、CD44^低、CD62L^高、およびCD69陰性)を有した。200 μ lのPBS中のドナーOT-I T細胞を、レシピエントマウスに静脈内(i.v.)注射した。

【 0 0 8 2 】

示されている場合、レシピエントマウスは、500 μ gの可溶性オボアルブミン (Sigma, St. Louis, MO)、50 μ gの抗OX40 (クローンOX86)もしくは対照ラットIgG Ab (Sigma)、および/または10 μ gの細菌性リボ多糖 (LPS) (Sigma)を皮下(s.c.)に受けた。マウスは、さらなる用量(50 μ g)の抗OX40または対照Abを1日後に受けた。細胞欠失のために、担腫瘍マウスを、示されている時点において、200 μ g(腹腔内(i.p.))の抗CD4 (クローンGK1.5; Bio X Cell, West Lebanon, NH)および/または抗CD8 (クローン53-6.72; Bio X Cell)で処理した。

【 0 0 8 3 】

リンパ球の単離および解析

リンパ節を摘出しかつ処理して、単一細胞懸濁物を得た。ACK溶解バッファー (Lonza, Walkersville, MD)を室温で5分間添加して、赤血球を溶解した。次いで、1M HEPES、非必須アミノ酸、ピルビン酸ナトリウム(すべてLonzaから)、およびペニシリン - ストレプトマイシン (pen-strep) グルタミン (Invitrogen)を補充した、10% FBS (Lonza)を含有しているRPMI 1640培地 (Lonza) (10% cRPMI)で細胞をリンスした。

【 0 0 8 4 】

マウス末梢血リンパ球を尾静脈を通じて、50 μ lのヘパリン (Hospira, Lake Forest, IL)を含有しているチューブ内に回収した。1mlのフローサイトメトリー用洗浄バッファー (PBS中0.5% FBS、0.5mM EDTA、および0.02% NaN₃)を添加し、細胞を混合し、次いで、遠心分離の前に700 μ lのFicoll-Paque (GE Healthcare, Piscataway, NJ)を添加した

。リンパ球を界面から回収し、次いで、染色の前にフローサイトメトリー用バッファーで洗浄した。細胞を、Ki-67 FITC、Thy1.1 PE-Cy7、Thy1.1 eFluor 450、OX40 PE、グランザイムB PE、CD3 eFluor 710、CD8 eFluor 605、CD8 PE-Cy7、KLRG-1 APC、CD25 eFluor 488、CD25 Alexa Fluor 700、Fixable Viability Dye eFluor 780、またはCD4 V500とともに4 で30分間インキュベートした。ヒト細胞を、CD3 APC-H7、CD4 PerCP-Cy5.5、CD8 PE-Cy7、APC CD25、およびOX40 PEとともにインキュベートした。すべての抗体は、eBioscience (San Diego, CA)、BD Biosciences (San Jose, CA)、BioLegend (San Diego, CA)、Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany)、またはInvitrogenから入手した。細胞内染色のために、メーカーの指示書に従って、Foxp3 Staining Buffer Set (eBioscience) を用いて細胞を固定しかつ透過処理した。FACSDivaソフトウェアを用いたLSR IIフローサイトメーター (BD Biosciences) で細胞を解析した。

10

【0085】

ヒトPBMCの単離および刺激

健常ドナー由来のヒトPBMCを、Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare) 上のヘパリン化血液の遠心分離によって単離した。Providence Health System施設内倫理委員会により本調査は認可され、かつすべての血液ドナーからインフォームドコンセントを得た。新鮮なヒトPBMCを、CD4またはCD8のT細胞陰性単離キット (Miltenyi Biotec) を用いた陰性選択によってCD4⁺ およびCD8⁺ T細胞を富化し、かつ10% cRPMI中に懸濁し (5×10^5 細胞/ml)、かつ5,000U/mlのrhIL-2 (プロロイキン) を含むまたは含まない96ウェルプレート中で、1 μ g/mlのプレートに結合した抗CD3 (クローンOKT-3) で刺激した。48時間後、細胞を洗浄し、再懸濁し、次いで5,000 IU/mlのrhIL-2を含むまたは含まない96ウェルプレート中にプレーティングした。24時間後、フローサイトメトリーによって細胞を染色しかつ解析した。

20

【0086】

インビトロにおけるT細胞活性化

野生型、CD25^{-/-}、STAT3^{-/-}、またはSTAT5^{-/-}マウスのリンパ節および脾臓から単一細胞懸濁物を調製し、次いでDynaI マウスCD4またはCD8 T細胞陰性単離キット (Invitrogen) を用いてCD4⁺ またはCD8⁺ T細胞を精製した。プレートに結合した抗CD3 (1 μ g/ml; クローン145-2C11) および抗CD28 (5 μ g/ml; クローン37.51) を含有している96ウェル内に、1ウェルあたり 3×10^5 個の細胞を播種した。抗原特異的CD8⁺ T細胞活性化のために、精製したナイーブ野生型またはOX40^{-/-}のOT-I T細胞 (2×10^5 /ウェル) を、96ウェルプレート中で、OVAペプチド (SIINFEKL) パルス照射 (20,000ラド) されたDC2.4細胞 (2×10^3 /ウェル) で刺激した。あるいは、精製したナイーブ野生型OT-I、STAT3^{-/-} OT-I、またはOX40^{-/-} OT-I T細胞 (1×10^6 /ウェル) を、24ウェルプレート中で、野生型同種 (SIINFEKL) または変更ペプチドリガンド (SIITFEKL) OVAペプチドパルス照射 (2,000ラド) された同系脾細胞 (6×10^6 /ウェル) で刺激した。48時間後、活性化されたOT-I T細胞を採取し、新鮮な10% cRPMIに再播種する前に、Ficoll-paque勾配で生細胞を富化した (5×10^5 細胞/ml)。

30

【0087】

Treg機能アッセイ

MCA-205腫瘍を野生型C57BL/6マウスに移植し、次いで10日後にマウスは、IL-2cの存在または非存在下で (d10~13)、250 μ gの抗OX40または対照ラットIg (d10、14) を受けた。7日後 (腫瘍移植後d21)、脾臓を摘出し、RBC溶解し、かつCD4⁺ CD25⁺ 制御性T細胞 (CD8⁻/MHC II⁻/B220⁻) を細胞選別によって単離した (>99%純度)。96ウェル丸底プレート中にTregを 5×10^4 細胞/ウェルで三つ組で播種した。DynaI CD8 T細胞陰性選択キット (Invitrogen) を用いて、野生型マウスの脾臓からナイーブレスポンダ (Teff) CD8細胞を調製し、CFSE標識し、かつ培地 (陽性対照) またはTreg細胞を含有している三つ組ウェルに、1ウェルあたり 5×10^4 個の細胞を添加した。照射 (4,000ラド) によりT細胞欠失した (DynaI beads、Invitrogen) 2×10^5 個のアクセサリー細胞を調製し、1 μ g/mlの抗CD3で処理し、かつすべてのウェルに添加した。96時間後に細胞を採取し、CD8について染色

40

50

し、かつCD8レスポンド細胞におけるCFSE希釈の程度をフローサイトメトリーによって判定した。

【0088】

サイトカインおよび阻害剤

組換えマウスIL-2、IL-4、IL-7、IL-9、またはIL-21をeBioscienceまたはPeprotech (Rocky Hill, NJ) から購入した。組換えヒトIL-15はNational Cancer InstituteのBiological Resources Branchから提供され、抗mIL-2 mAb (クローンS4B6) をBio-X-Cellから入手した。2.5 μ gのIL-2と7 μ gの抗IL-2 mAbとを37 °Cで20分間混合することによってIL-2/抗IL-2 mAb複合体 (IL-2c) を産出し、次いでマウスは200 μ lのPBS中IL-2cの注射を毎日受けた (腹腔内)。示されている場合、T細胞はJAK3阻害剤 (100ng/ml ; PF-956980 ; Pfizerから入手) でインビトロ処理された。

【0089】

腫瘍負荷およびアネルギー誘導

1 $\times 10^6$ 個のMCA-205肉腫腫瘍細胞を野生型C57BL/6マウスに移植した (皮下) (Spiess P J, et al. J Natl Cancer Inst 1987; 79: 1067-75)。以前に記載されているように (Remond WL, et al. J Immunol 2007; 179: 7244-53)、TRAMP-C1-mOVA (TC1-OVA) 細胞を改変して、膜結合型OVA (mOVA) を発現させた。いくつかの実験において、2.5 $\times 10^6$ 個のTC1-OVA細胞をオスのPOET Tgマウスに注射した (皮下)。腫瘍が約50mm²に達した時点で (腫瘍接種の20日後)、マウスは5 $\times 10^5$ 個の野生型またはOX40^{-/-} のOT-1 Thy1.1 T細胞を受けた。CD8 T細胞養子移入の17日後、担腫瘍マウスのアレルギー性ドナー細胞に、上記に記載されるように、可溶性OVA、抗OX40または対照Ab、およびLPSを再負荷した (皮下)。腫瘍成長 (面積) をマイクロキャリパーで2~3日おきに査定し、腫瘍が > 150mm²に達した時点でマウスを犠牲にした。

【0090】

インビボ細胞溶解アッセイ

同系脾細胞から構成される標的細胞を、1 \times PBS中5 μ Mのカルボキシフルオレセインジアセテートスクシンイミジルエステル (CFSE) (CFSE^高) または0.5 μ MのCFSE (CFSE^低) で37 °Cにて10分間標識し、次いで10% cRPMIで2回洗浄した。次に、CFSE^低 およびCFSE^高 細胞を、それぞれ5 μ g/mlの対照 (HA) または同種 (OVA) ペプチドで37 °Cにて1時間パルスした。細胞を10% cRPMIで2回洗浄し、次いで1 \times PBS中1:1混合のCFSE^低 /CFSE^高 標的細胞 (それぞれ5 $\times 10^6$ 個) を、レシピエントマウスに静脈内注射した。4時間後、脾細胞を採取し、フローサイトメトリーによるCFSE標識細胞の検出および定量化のために単一細胞懸濁物を解析した。

【0091】

ウェスタンブロッティング

HALTプロテアーゼインヒビターカクテル (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL) を含有しているRIPA溶解バッファー (Bio-Rad, Hercules, CA) を4 °Cで30分間用いて、ホールセル溶解物を調製した。溶解物を14,000 \times g/4 °Cで遠心分離し、上清を回収し、タンパク質濃度をBradfordアッセイキット (ISC BioExpress, Kaysville, UT) によって判定し、かつ50 μ gのアリコートをして-80 °Cで保存した。溶解物を、2-MEを含有しているLaemmli バッファー (Invitrogen) 中で100 °Cにて5分間ボイルし、12% プレキャストゲル (Bio-Rad) でSDS-PAGEによって分離し、次いでニトロセルロース膜 (Invitrogen) に転写した。Odysseyブロッキングバッファー (Li-Cor, Lincoln, NE) と1 \times PBSとの1:1混合物または1 \times PBS中5% 脱脂粉乳で室温にて1時間ブロッキングすることによって、非特異的結合を低下させた。プロットを、Odyssey (Li-Cor) ブロッキングバッファー中のpJAK1、pJAK2、pSTAT1、pSTAT3、pSTAT5、pSTAT6、JAK1、JAK2、STAT1、STAT3、STAT4、STAT5、STAT6 (すべてCell Signaling, Danvers, MAから)、pJAK3、JAK3 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)、pSTAT4 (Invitrogen)、GAPDH (Sigma)、または α -アクチン (Li-Cor) に対するAbと4 °Cで一晩インキュベートした。プロットをPBS-Tween (1 \times PBS + 0.2% Tween-20) で室温にて4 \times 5分間洗浄し、次いでIRDye 800CWヤギ抗ウサギIgG (H+L)、IRDye 6

80LTヤギ抗マウスIgG (H+L)、またはIRDye 680LTロバ抗ヤギIgG (H+L) (Li-Cor)と室温で60分間インキュベートした。プロットをPBS-Tweenで室温にて4×5分間洗浄し、次いでLi-Cor Odyssey infrared imager (Li-Cor)での可視化の前に、1×PBSで短くリンスした。

【0092】

統計解析

GraphPad InStatまたはPrismソフトウェア (GraphPad, San Diego, CA)を用いた、対応のないスチューデントt検定 (2群間の比較用)、一元ANOVA (>2群間の比較用)、またはKaplan-Meier生存 (腫瘍生存調査用)によって統計的有意性を決定し、<0.05のP値は有意であると見なされた。

【0093】

実施例1: 最適なOX40発現は、TCR刺激の強さおよびIL-2R (CD25)によって制御される

TCR刺激の強さがOX40発現に影響を及ぼす程度、ナイーブCD8 T細胞の活性化後のOX40上方制御の反応速度を以下のように査定した。精製したナイーブ野生型またはOX40^{-/-}のOT-I T細胞 (2×10⁵/ml)を、漸増用量 (0.5ng、50ng、または5000ng)のOVAペプチドSIINFEKLでパルスされた同系抗原提示細胞 (APC) (2×10³/ml)で活性化した。1~3日後、活性化されたOT-I T細胞を採取し、OX40およびCD25の発現をフローサイトメトリーによって判定した。OX40が発現しているかどうかにかかわらず、CD25は急速に上方制御され、最高用量のAg (5000ng/ml)でのTCR刺激後24時間以内に最大発現に達した (図1A、1B)。最大のOX40発現は、用量依存的様式で同様に誘導され、その際ピークのOX40発現はOX40発現細胞において刺激の3日後に観察された (図1A、1B)。図1Bおよび1Cにおける棒グラフは、平均±SD (n=2~3/群)を表現している。データは、同様の結果を有する2~3回の独立した実験のうちの代表的な1つである。

【0094】

次いで、T細胞上でのOX40発現に対するIL-2の効果を判定した。精製したナイーブポリクローナル野生型またはCD25^{-/-}のCD8 T細胞 (3×10⁵/ウェル)をCFSE標識し、次いでプレートに結合した抗CD3および抗CD28 (それぞれ1μg/mlおよび5μg/ml)で刺激した。1~3日後、活性化されたCD8 T細胞を採取し、CD25およびOX40の発現の程度をフローサイトメトリーによって判定した。CD25およびOX40の両方とも野生型T細胞上で誘導され (図1C)、一方でCD25^{-/-} CD8 T細胞はTCR刺激後にほとんどまたは全くOX40を発現せず (図1C)、TCR刺激のみでは、OX40の強固な発現を推進するのに十分ではないことが実証された。マウスポリクローナルCD25^{-/-} CD4⁺ T細胞の刺激後に同様の結果が得られ (データ示さず)、T細胞上でのOX40の最適な誘導には、高親和性IL-2R複合体の発現が必要とされることが実証された。

【0095】

本実施例は、高用量の抗原による強力なTCRライゲーションが低用量の抗原よりもより高レベルのOX40発現を誘導したように、OX40の初期発現が、TCR関与の強さにより部分的に制御されることを実証している (図1)。TCR刺激はOX40を誘導するために必要であるが、TCRライゲーションのみでは、OX40の強固な発現を推進するのに十分ではなかった。OX40発現を制御することにおけるIL-2/IL-2Rシグナル伝達の役割が見い出された。とくに、IL-2R 欠損T細胞は、TCR刺激後にOX40を上方制御し得るその能力に著しい欠陥を呈した (図1C)。

【0096】

実施例2: 外因性IL-2は、活性化されたマウスおよびヒトT細胞上のOX40を上方制御する

外因性rIL-2の添加が、活性化T細胞上のOX40を上方制御するのに十分であるかどうかを以下のように判定した。精製したナイーブ野生型またはOX40^{-/-}のOT-I T細胞 (1×10⁶/ml)を、同種ペプチドでパルスされた同系脾細胞 (6×10⁶/ml)で活性化した。2日後、活性化されたOT-I T細胞を採取し、組換えマウスIL-2 (100ng/ml)の存在または非存在下で再培養した (5×10⁵細胞/ml)。CD25およびOX40の発現の程度をフローサイトメトリーによって判定した。外因性rIL-2の添加は、培地のみと比較して、CD25およびOX40の発現の両

方の統計的に有意な増大をもたらした(図2A)、IL-2シグナル伝達は、活性化されたマウスT細胞上のこれらの分子の上方制御を推進するのに十分であることが実証された。

【0097】

TCR刺激 + 外因性rIL-2が、ヒトT細胞上のOX40発現を同様に制御するかどうかを以下のように調べた。精製したヒトCD8⁺またはCD4⁺T細胞をPBMCから回収し、培地、プレートに結合した組換えヒトIL-2(5,000IU/ml、300ng/mlと同等)、および/またはプレートに結合した1μg/mlの抗CD3 mAb (OKT-3)で刺激した。48時間後、刺激された細胞を採取し、洗浄し、次いで培地または組換えヒトIL-2(5,000IU/ml)で刺激した。24時間後、CD25およびOX40の発現の程度をフローサイトメトリーによって測定した。刺激されていないCD8⁺およびCD4⁺T細胞上ではCD25またはOX40の発現のいずれも検出されなかったが、それらは両方とも、IL-2への曝露後に穏やかに誘導された(図2B、2C)。抗CD3のみでの刺激はCD25発現の有意な増大をもたらしたが、IL-2およびTCRの併用刺激は、ヒトCD4⁺T細胞上でのOX40発現の増大(図2C)、およびヒトCD8⁺T細胞上でのOX40の統計的に有意な増大の傾向があった(図2B、2C)。まとめると、これらのデータは、TCR/IL-2刺激の併用が、マウスおよびヒトT細胞上でのOX40の最適な発現を誘導し得ることを実証している。

【0098】

本実施例は、外因性IL-2の存在下におけるTCRライゲーションが、マウスおよびヒトの両方のCD4⁺およびCD8⁺T細胞上でのOX40の強固な発現を促進するのに十分であったことを実証している(図2)。理論に拘束されることはないが、この結果は、OX40発現のIL-2介在性増強が、OX40を制御する保存されたメカニズムの一部であることを示唆している。

【0099】

実施例3: OX40発現は、JAK3、STAT3、およびSTAT5によって制御される

チロシンキナーゼJAK3は共通 cサブユニットに結合し、そのリン酸化は、cサイトカインによる刺激後の隣接下流シグナル伝達における決定的因子である(Kovanen PE, and Leonard WJ. Immunol Rev 2004; 202: 67-83; Rochman Y, et al. Nat Rev Immunol 2009; 9: 480-90)。JAK3活性化がOX40発現を誘導するために必要であるかどうかを以下のように調べた。まず、インビトロで刺激されたCD8⁺T細胞におけるJAKタンパク質の発現を査定した。OT-1トランスジェニックマウス由来の抗原特異的CD8⁺T細胞(実施例1および2にあるような)をこれらの調査に用いて、TCR刺激の程度および持続時間をより正確にコントロールした。上記のように、ナイーブ野生型またはOX40^{-/-}のOT-1 T細胞を、ペプチドパルスされたAPCで2日間活性化した。次いで、活性化されたOT-1 T細胞を採取し、培地または組換えマウスIL-2(100ng/ml)で再培養し(5×10⁵細胞/ml)、かつリン酸化JAK1、JAK2、およびJAK3、ならびに全JAK3の発現をウェスタンブロットによって査定した。rIL-2による刺激は、JAK3のリン酸化の増大をもたらしたが、JAK1またはJAK2リン酸化には影響を及ぼさず、JAK3シグナル伝達がOX40の上方制御に関与していることを示唆した(図3A)。JAK3特異的小分子阻害剤(PF-956980、100ng/ml)(Changelian PS, et al. Blood 2008; 111: 2155-7; Steele AJ, et al. Blood 2010)の存在下または非存在下で、活性化CD8⁺T細胞を培地またはIL-2と培養することによって、JAK3の必要性を確認した。24時間後、細胞を採取し、CD25およびOX40の発現の程度をフローサイトメトリーによって判定した。JAK3阻害剤での処理は、対照処理した細胞(DMSO)と比較して、活性化CD8⁺T細胞上でのOX40のIL-2介在性誘導を取り消した(図3B)。

【0100】

cサブユニットは構成的に発現し、以下のサイトカイン: IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15、およびIL-21の間で共有されている。共通 cサブユニットを共有しているにもかかわらず、IL-2ファミリーサイトカインの大多数は、共有 cと対合した固有の 鎖からなる複合体を通してシグナルを送り、T細胞の生存および分化に対して明確に異なる下流の効果をもたらす(Nelson BH, and Willerford DM. Adv Immunol 1998; 70: 1-81; Gaffen SL. Cytokine 2001; 14: 63-77; Kovanen PE, and Leonard WJ. Immunol Rev 2004; 202: 67-83)。異なる cサイトカインがOX40発現にどのように影響を及ぼすかを判定するために、上記のように、WTまたはOX40^{-/-}のOT-1細胞を、ペプチドパルスされたAPCで2日間

活性化し、採取し、次いで培地のみ、組換えマウスIL-2、組換えマウスIL-4、組換えマウスIL-7、組換えマウスIL-9、組換えマウスIL-15、または組換えマウスIL-21 (100ng/ml) で刺激した。組換えマウスIL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15、またはIL-21の存在下でOT-I T細胞を培養した。24時間後、細胞を採取し、CD25およびOX40の発現の程度をフローサイトメトリーによって判定した。試験したすべての α サイトカインはCD25の発現の増大を誘導し得た (図3C) 一方で、IL-2刺激は、OX40発現の最大の増大を促進した (図3D、% OX40⁺)。IL-4、IL-7、またはIL-21による刺激は、OX40のわずかな上方制御をもたらした (図3D; % OX40⁺)、一方でIL-9およびIL-15は、OX40発現に影響を及ぼさなかった (図3D)。OX40を誘導する α サイトカインの能力を、天然SIINFEKLエピトープと比較してTCR親和性の約700~1,000倍の減少を呈する、低親和性の変更ペプチドリガンド (SIITFEKL) (Zehn D, et al. Nature 2009; 458: 211-4) によるCD8 T細胞活性化の後にも試験した。精製したナイーブOT-I T細胞を、以前に記載された方法によって、野生型 (SIINFEKL) または変更ペプチドリガンド (SIITFEKL) pOVAパルスしたAPCで刺激した。2日後、活性化されたOT-I T細胞を採取し、再培養し (5×10^5 細胞/ml)、次いで培地のみで、または組換えマウスIL-2、IL-4、IL-7、IL-15、もしくはIL-21 (100ng/ml) で刺激した。24時間後、細胞を採取し、CD25 OX40の発現の程度 (% 陽性およびMFI) をフローサイトメトリーによって判定した。低親和性OVAペプチドによる刺激後に最大OX40発現の程度は低下したが (WT pOVAでの90%に対して約20%; 図4B)、CD25およびOX40誘導の序列 (IL-2 > > IL-4、IL-7、IL-21) は維持された (それぞれ図4Aおよび4B)。

10

20

30

40

50

【0101】

α サイトカインおよびJAK3による刺激は、3つの主要な経路であるPI3K/AKT、MAPK/ERK、およびSTAT転写因子の活性化を通してT細胞の活性化および生存を促進する (Leonard W J, and O'Shea JJ. Annu Rev Immunol 1998; 16: 293-322)。OX40の制御に関与している経路を以下のように判定した。まず、PI3KまたはAKT阻害剤の存在下におけるCD8 T細胞活性化の後に、OX40発現のIL-2介在性誘導の変化は観察されなかった (データ示さず)。同様に、野生型およびERK2^{-/-}のCD8⁺ T細胞は同程度の量のOX40を発現し (データ示さず)、OX40は、PI3K/AKTまたはERKとは独立して誘導されることが実証された。次いで、OX40発現を推進することにおけるSTATシグナル伝達の役割を探索した。上記のように、WT OT-I T細胞を、ペプチドパルスされたAPCで2日間活性化し、次いで培地のみで、または共通 α サイトカインIL-2、IL-4、IL-7、IL-15、およびIL-21で再刺激した。図3Eに示すように、IL-2刺激はSTAT5リン酸化の強固な増大をもたらした、一方でIL-4、IL-7、およびIL-15はより低レベルのSTAT5リン酸化を引き起こした (図3E)。IL-21およびIL-4は高レベルのSTAT3リン酸化を誘導し、一方でIL-2はSTAT3リン酸化を弱く誘導した。さらなる解析により、差別的発現がなく、かつSTAT1、STAT4、およびSTAT6リン酸化がほんの低レベルであることが明らかになった (図3E)。

【0102】

OX40、野生型、STAT3^{-/-}、またはSTAT5^{-/-}のCD8⁺ T細胞の制御へのSTAT3およびSTAT5の寄与を以下のように試験した。まず、上記のように、WTまたはSTAT3^{-/-}のOT-I T細胞を、ペプチドパルスされたAPCで2日間活性化し、次いで培地のみで、または、CD25およびOX40を上方制御しかつSTAT3および/もしくはSTAT5の強力なリン酸化を誘導することが以前に示されているサイトカインである組換えマウスIL-2、IL-4、もしくはIL-21 (100ng/ml) で刺激した。24時間後、細胞を採取し、CD25およびOX40の発現の程度 (% 陽性およびMFI) をフローサイトメトリーによって測定した。結果を図5Aに示す。次いで、ポリクローナル内在性WTまたはSTAT5^{-/-}のCD8⁺ T細胞を、2 μ g/mlの抗CD3 mAbで2日間刺激し、採取し、次いで培地のみで、または組換えマウスIL-2、IL-4、もしくはIL-21 (100ng/ml) で再培養かつ刺激した。細胞を24時間後に採取し、CD25およびOX40の発現の程度 (% 陽性およびMFI) をフローサイトメトリーによって判定した。結果を図5Bに示す。STAT3^{-/-} CD8⁺ T細胞は、とくにIL-4またはIL-21による刺激後に、野生型細胞と比較して発現 (% 陽性およびMFI) の低下を呈したが、野生型およびSTAT3^{-/-}のCD8⁺ T細胞の両方は、 α サイトカインによる刺激後にCD25を上方制御した (図5A)。しかしながら、IL-2のみは、STAT3^{-/-}

CD8⁺ T細胞上でのOX40の統計的に有意な上方制御を誘導した (図5A ; % OX40⁺)。

【 0 1 0 3 】

STAT5欠損CD8⁺ T細胞は、IL-2、IL-4、またはIL-21による刺激後にCD25またはOX40の発現を誘導し得ず、CD25およびOX40の cサイトカイン介在性上方制御の推進におけるSTAT5の必須の役割が示された (図5B)。同様の結果が、TCRトランスジェニックOT-I T細胞 (図5A) または内在性ポリクローナルCD8⁺ T細胞 (図5Bおよびデータ示さず) を用いて得られた。まとめると、これらの調査により、IL-2が主にSTAT3とは独立した様式でかつSTAT5依存的様式でOX40発現を推進し、一方でIL-4およびIL-21がSTAT3/STAT5二重依存的メカニズムを介してOX40を誘導したように、cサイトカインは固有のメカニズムを介してOX40を制御することが実証された。

10

【 0 1 0 4 】

メカニズム調査により、IL-2刺激はJAK3リン酸化を誘導し、それが今度はOX40の最適な誘導に必要とされることが明らかになった (図3A、3B)。さらなる探索により、IL-2はOX40の一貫して最も強固な発現を推進し、一方でIL-4、IL-7、およびIL-21はOX40を誘導する効率がより低いという序列が実証された (図3D)。対照的に、IL-9およびIL-15は、OX40を上方制御しなかった (図3D)。留意すべきは、野生型pOVA (図3)、低親和性変更ペプチドリガンドpOVA (図4)、または抗CD3 (図5B) によるTCR Tg OT-I T細胞または内在性ポリクローナルCD8⁺ T細胞の刺激後に、OX40の cサイトカイン介在性誘導の同様の序列が得られたことである。IL-2/IL-4/IL-7/IL-21刺激に対するIL-15の一致しない効果に関する分子基盤は、これらのサイトカインのすべてが、少なくとも部分的に重複する、STAT3およびSTAT5のJAK3介在性リン酸化を介したシグナル変換経路を利用するため、不明なままである (図3E、および例えばKovanen PE, and Leonard WJ. *Immunol Rev* 2004; 202: 67-83; Rochman Y, et al. *Nat Rev Immunol* 2009; 9: 480-90; Moroz A, et al. *J Immunol* 2004; 173: 900-9; Sprent J, and Surh CD. *Curr Opin Immunol* 2001; 13: 248-54を参照されたい)。理論に拘束されることを望まないが、いくつかの可能性には、Gab2のようなアダプタータンパク質による制御、SOCSタンパク質などSTATの負の制御因子、エピジェネティックな変化、ならびにOX40プロモーターに対するSTAT5 対STAT5 アイソフォームの差別的活性化および/または結合が含まれる (例えば、Gadina M, et al. *J Biol Chem* 2000; 275: 26959-66; Basham B, et al. *Nucleic Acids Res* 2008; 36: 3802-18; およびTeglund S, et al. *Cell* 1998; 93: 841-50を参照されたい)。

20

30

【 0 1 0 5 】

STAT3およびSTAT5のホモ二量化対ヘテロ二量化における差、またはOX40プロモーターへの二量体対四量体STAT5タンパク質の結合における差が、OX40のSTAT3対STAT5依存的誘導における差 (図5) を説明し得るかどうかを判定するために、OX40プロモーターにおける推定上のSTAT3およびSTAT5結合部位を判定して (データ示さず)、OX40発現を制御する転写機構を解明した。

【 0 1 0 6 】

実施例4：抗OX40 mAb/IL-2併用療法は抗腫瘍免疫を強化する

多数の前臨床調査は、アゴニスト抗OX40 mAbを用いた治療が強力な抗腫瘍免疫を促進することを実証している (Watts TH, *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 23-68; Redmond WL and Weinberg AD, *Crit Rev Immunol* 2007; 27: 415-36; Croft M. *Annu Rev Immunol* 2010; 28: 57-78)。インビトロでOX40を強力に誘導し得る外因性IL-2の能力に基づき (図2)、抗OX40 mAbと併せたIL-2療法の提供が、相乗作用を与えてインビボで抗腫瘍免疫を増進するかどうかを評価した。まず、IL-2刺激が担腫瘍マウスにおけるCD8⁺ T細胞上のOX40を上方制御し得るかどうかに関してインビトロ評価を行った。rIL-2全身療法に関連した有害な副作用を最小限に抑えるために、サイトカイン/mAb複合体 (IL-2c) を介してIL-2を提供した (Boyman O, et al. *Science* 2006; 311: 1924-7; Kriegl C, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 11906-11)。

40

【 0 1 0 7 】

OX40発現は、インビボで刺激されたCD8⁺ T細胞上で検出するのがしばしば難しいため、

50

OX40-cre x ROSA-YFPレポーターマウスモデルを利用して (Srinivas S, et al. BMC Dev Biol 2001; 1: 4; Klinger M, et al. J Immunol 2009; 182: 4581-9)、担腫瘍宿主の腫瘍部位にまたは脾臓に存在しているOX40発現CD8⁺T細胞を同定した。C57BL/6 OX40-cre x ROSA-YFPレポーターマウスは、 1×10^6 個のMCA-205肉腫腫瘍細胞を受け(0日目)、2週間後、この担腫瘍マウスをIL-2サイトカイン/mAb複合体で処理した(14、15日目)。24時間後(腫瘍接種の16日後)、腫瘍および脾臓から単離したCD8⁺T細胞上のCD25、YFP (OX40レポーター)、およびOX40の発現の程度をフローサイトメトリーによって査定した。IL-2処理は、腫瘍に局在したCD8⁺T細胞上でのCD25およびOX40の発現を有意に増強させ(図6A)、一方で脾臓におけるCD8⁺T細胞上では有意な差は検出されなかった(図6B)。

【0108】

10

次に、抗OX40/IL-2併用療法が腫瘍成長に影響を及ぼし、かつ腫瘍免疫療法を強化する程度を試験した。野生型マウスは、 1×10^6 個のMCA-205肉腫腫瘍細胞を受けた(n=8/群)。担腫瘍マウスを、IL-2サイトカイン/mAb (IL-2c) 複合体とともに(10~13日目)抗OX40またはラットIgG Abで処理し(10、14日目)、担腫瘍マウスの腫瘍成長および生存の程度を査定した。結果を図7Aおよび図7Bに示す。抗OX40/IL-2c併用による腫瘍免疫療法は、いずれかの処理単独と比較して、腫瘍退縮および生存を有意に強化した(それぞれ図7Aおよび7B)。抗OX40/IL-2c二重療法の標的どおりの効果を判定するために、抗OX40/IL-2c療法を提供する前に、担腫瘍マウスのコホートからCD4⁺および/またはCD8⁺T細胞を欠失させた。MCA-205担腫瘍マウスのさらなる群は、腫瘍移植の9日、17日、および24日後に、処理なし(n=9)、抗CD4(n=6)、抗CD8(n=6)、または抗CD4+抗CD8(n=3)(200 μg/用量)を受けた。次いで、マウスを抗OX40(10、14日目)およびIL-2c(10~13日目)で処理し、担腫瘍マウスの生存の程度を査定した。結果を図7Cに示す。抗OX40/IL-2c療法前のCD4⁺またはCD8⁺T細胞サブセットのいずれかの欠失は、治療の抗腫瘍有効性を取り消した(図7C)。

20

【0109】

さらなる調査を実施して、Treg細胞の抑制活性に対するOX40アゴニスト/IL-2治療の効果を判定した。野生型マウスは、 1×10^6 個のMCA-205肉腫腫瘍細胞を受けた(n=2~3/群)。担腫瘍マウスを、IL-2サイトカイン/mAb複合体とともに(10~13日目)抗OX40またはラットIgG Abで処理した(10、14日目)。21日目に、Tregを担腫瘍宿主の脾臓から単離し、ナイーブCFSE標識レスポンドCD8⁺T細胞と共培養した。細胞を96時間後に採取し、CD8⁺レスポンド細胞におけるCFSE希釈の程度をフローサイトメトリーによって判定した。結果を図8に示す。結果は、抗OX40/IL-2c併用療法が、CD4⁺CD25⁺制御性T細胞の抑制活性に影響を及ぼさないことを示し、抗OX40/IL-2c二重免疫療法後の腫瘍退縮の促進および長期生存の増強にはエフェクターCD4⁺およびCD8⁺T細胞が必要とされることを実証した。

30

【0110】

本実施例は、IL-2と併せたアゴニスト抗OX40 mAbによる処理が、相乗作用を与えて腫瘍免疫療法を増進し得ることを示している。抗OX40/IL-2c併用療法は、腫瘍退縮を有意に増強し(図7A)、担腫瘍宿主の生存を増強した(図7B)。いずれかのサブセットの欠失はその効果を取り消し(図7C)、一方でTreg機能は変化しないままであるため(図8)、抗OX40/IL-2c二重療法の有効性には、担腫瘍宿主におけるエフェクターCD4⁺およびCD8⁺T細胞の存在が必要とされた。

40

【0111】

実施例5：抗OX40/IL-2c二重療法は、CD8⁺T細胞アネルギーを好転させ、かつ長期間十分に確立された腫瘍を有するマウスの生存率を増大させる

腫瘍誘導性T細胞アネルギーは、強力な抗腫瘍免疫の産出を制限する重要なバリアであるため(Rabinovich GA, et al. Annu Rev Immunol 2007; 25: 267-96)、本実施例は、TCR/IL-2cシグナル伝達の存在下でのOX40ライゲーションが、担腫瘍宿主におけるアネルギー性CD8⁺T細胞の機能を回復させ得るかどうかを探索する。用いたモデルシステムを図9Aに示す。TRAMP-C1-mOVA発現(TC1-mOVA)前立腺腫瘍細胞(2.5×10^6 細胞/マウス)を、膜結合型OVA(mOVA)の前立腺特異的発現がラットプロバシンプロモーターのコントロール

50

下においてアンドロゲン依存的様式で推進される (Lees JR, et al. Immunology 2006; 117: 248-61; Lees JR, et al. Prostate 2006; 66: 578-90)、オスのPOET-1トランスジェニックマウスに移植した。20日後に、担腫瘍マウス (約50mm²腫瘍) は、 5×10^5 個の養子移入されたナイーブOT-I T細胞を受けた。以前の調査により、これらの腫瘍反応性ドナーCD8 T細胞は、インビボでアネルギー化されるようになることが示されているRedmond WL, et al. Eur J Immunol 2009; 39: 2184-94。T細胞養子移入の17日後 (腫瘍接種の37日後)、アネルギー性ドナーOT-I T細胞を、抗OX40または対照 (ラットIgG) Ab (37~38日目)、500 μ gのOVA (37日目)、10 μ gのLPS (37日目)、+/- IL-2サイトカイン/mAb複合体 (37~44日目) で再刺激した。このモデルは、代理腫瘍関連抗原に対する抗原特異的CD8⁺ T細胞の応答を追跡することを可能にした。マウスは、TCR刺激の供給源を提供するAg/TLRリガンド (LPS) を与えられた。 10

【0112】

初回用量のAg/抗OX40の7日後に、末梢血中のドナーOT-I T細胞上でのKi-67 (増殖)、グランザイムB、およびKLRG-1の発現の程度をフローサイトメトリーによって判定した。抗OX40/IL-2c二重療法は、対照と比較して、ドナー細胞の増殖性応答 (Ki-67) および分化 (GrzB) を有意に増大させた (図9B)。

【0113】

さらなる解析により、抗OX40/IL-2c二重療法を受けている細胞の大多数は、長期生存が見込めない最終分化したT細胞上で典型的に高発現している (Sarkar S, et al. J Exp Med 2008; 205: 625-40; Joshi NS, et al. Immunity 2007; 27: 281-95; Voehringer D, et al. Blood 2002; 100: 3698-702)、キラー細胞レクチン様受容体G1 (KLRG1) の限定された発現 (図9B) を特徴とする固有の表現型を呈することが明らかになった。 20

【0114】

抗OX40/IL-2c二重療法がCD8⁺ T細胞の細胞溶解活性を増強するかどうかを判定するために、インビボ細胞溶解アッセイを実施した。図9Aに示されるモデルシステムに従って担腫瘍POET-1トランスジェニックマウスのコホートを調製しかつ処理し、次いで7日後に同種OVAペプチドパルスした (CFSE^高) および対照HAペプチドパルスした (CFSE^低) 標的細胞を1:1で混合し、次いでレシピエントマウスに注射した。4時間後、脾臓を摘出し、個々のマウス (n = 5/群) 由来の% CFSE^低 / % CFSE^高 標的細胞の比率をフローサイトメトリーによって判定した。結果を図9Cに示す。抗OX40/IL-2c療法は、抗OX40またはラットIgG処理対照と比較して細胞溶解活性の統計的に有意な増大をもたらし、かつ抗OX40/IL-2c二重処理細胞は、IL-2c処理のみと比較して細胞溶解活性の増大に向かった。 30

【0115】

最後に、抗OX40/IL-2c二重療法が、長期間十分に確立された腫瘍 (腫瘍移植後40日より後) を有するマウスにおける腫瘍退縮に影響を及ぼす程度を調べた。腫瘍成長 (平均 \pm SD; n = 5/群) および生存 (n = 11/群) の程度を、それぞれ図9Dおよび図9Eに示す。これらのデータにより、抗OX40/IL-2c併用療法は、処理後のいくつかの時点において腫瘍退縮を有意に増強し (図9D)、かつ担腫瘍マウスの生存も増強する (図9E) ことが明らかになった。これは、抗OX40/IL-4cまたは抗OX40/IL-15cによる処理が腫瘍成長または生存に影響を及ぼさなかった (データ示さず) ように、抗OX40/IL-2免疫療法の固有の特性を反映した。まとめると、これらの調査により、抗OX40/IL-2c併用療法は、インビボでアネルギー性腫瘍反応性CD8⁺ T細胞の機能を回復させることによって腫瘍免疫療法を強化し得ることが実証された。 40

【0116】

メカニズム調査により、抗OX40/IL-2c二重療法は、アネルギー性腫瘍関連Ag特異的CD8⁺ T細胞の増殖 (Ki-67) および分化 (グランザイムB) を有意に増大させ、一方で老化関連分子KLRG1のその発現を低下させることが明らかになった (図9B)。抗OX40/IL-2c二重療法およびIL-2c処理のみは、両方ともアネルギー性CD8⁺ T細胞による細胞溶解活性の増大に関連しているが (図9C)、長期間十分に確立された (>5週間) 腫瘍を保有するマウスの腫瘍退縮および生存率の増大によって示されるように、二重療法のみがインビボでの 50

抗腫瘍活性の増大をもたらした（それぞれ図9D、9E）。

【0117】

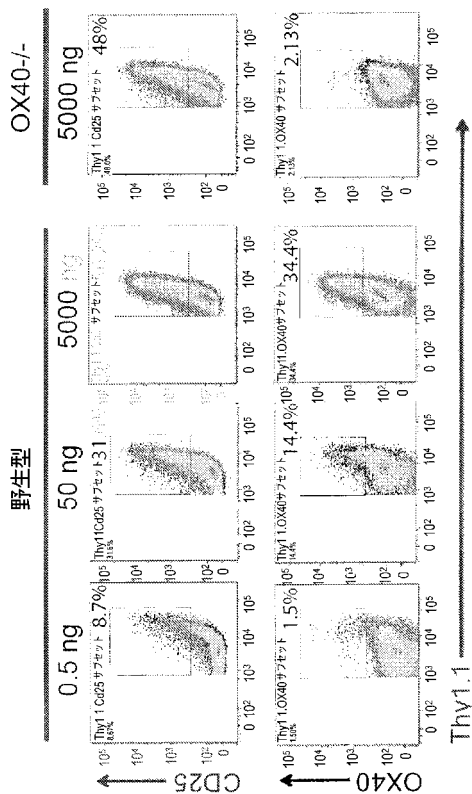
本開示は、本発明者らによって企図された本発明の1つまたは複数であるがすべてではない例示的な態様を明記するものであり、ゆえに、本発明および添付の特許請求の範囲を限定することを意図するものでは決していない。

【0118】

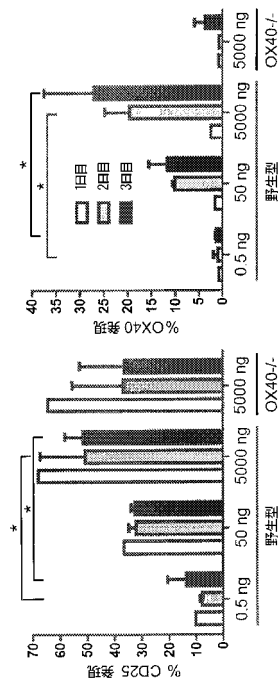
具体的な態様についての前述の記載は、当技術分野の技術の範囲内にある知識を適用することによって、他者が、本発明の一般的概念から逸脱することなく、過度の実験なしでそのような具体的な態様を容易に修正し得かつ/またはそのような具体的な態様に様々な適用を適合させ得る、本発明の一般的性質を非常に十分に明らかにするであろう。したがって、そのような適合および修正は、本明細書において提示される教示および指針に基づき、開示された態様の同等のものの意味および範囲の内にあることが意図される。本明細書における語句または用語は、説明を目的とするものであり、限定を目的とするものではなく、そのため本明細書の用語または語句は、教示および指針を踏まえて当業者によって解釈されるべきであることを理解すべきである。

10

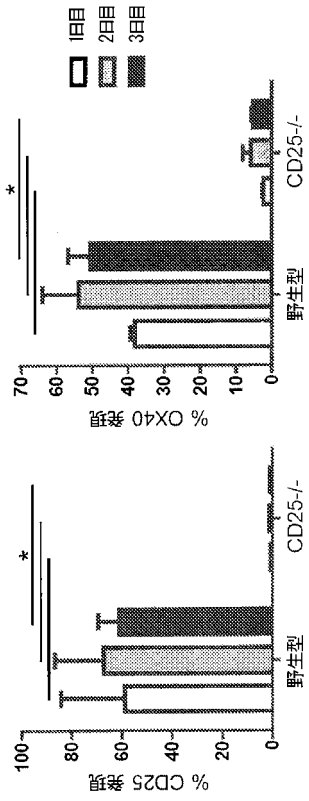
【図1A】



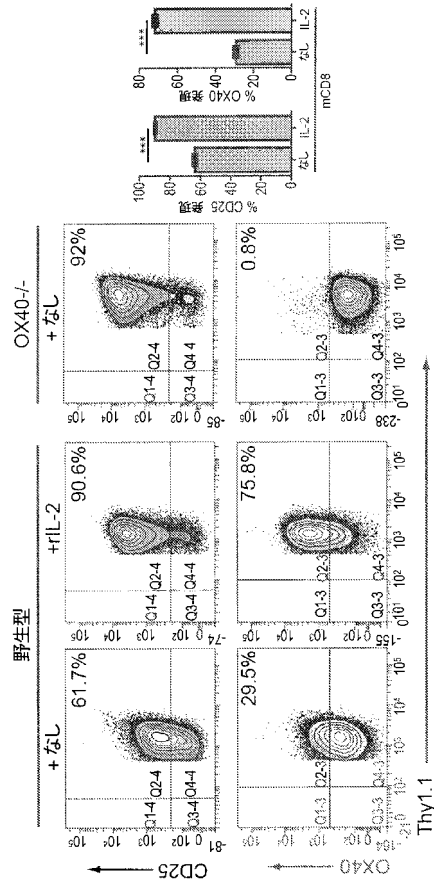
【図1B】



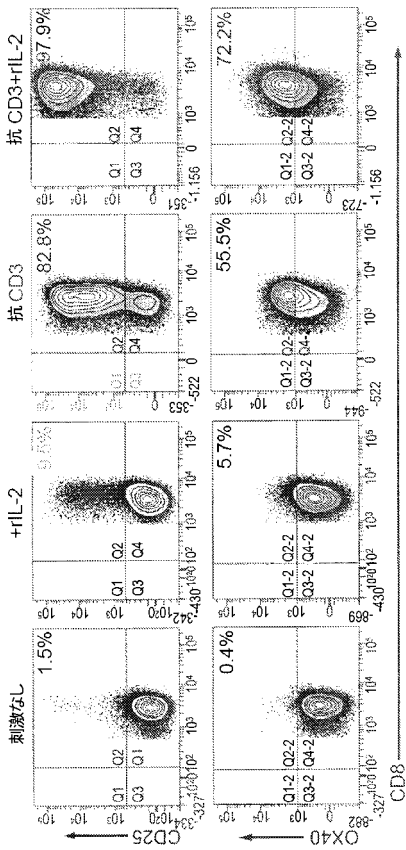
【図 1 C】



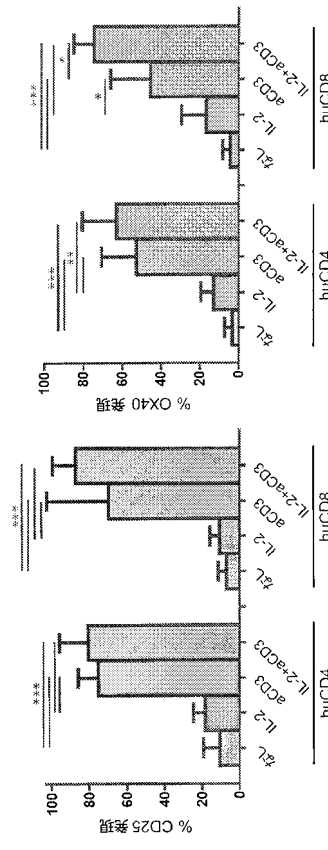
【図 2 A】



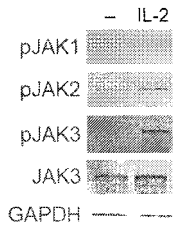
【図 2 B】



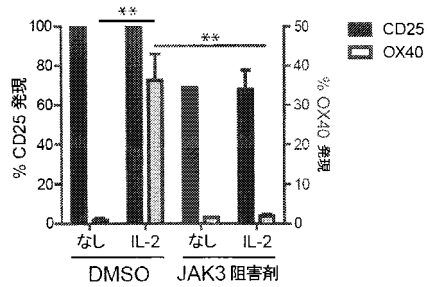
【図 2 C】



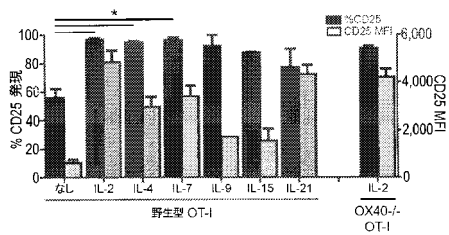
【図 3 A】



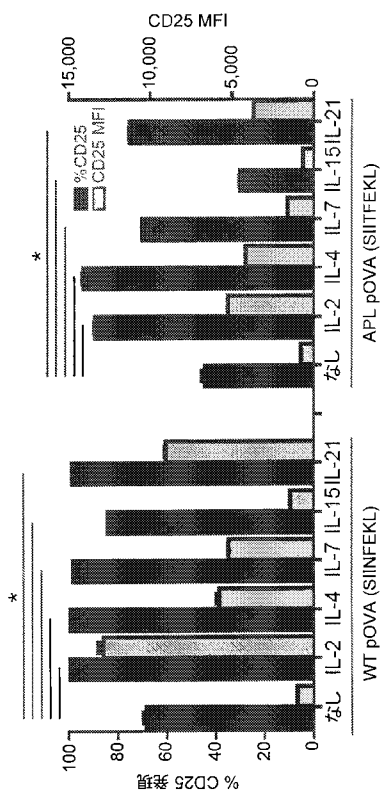
【図 3 B】



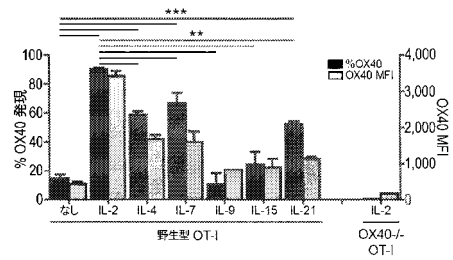
【図 3 C】



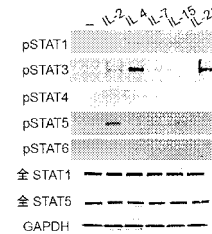
【図 4 A】



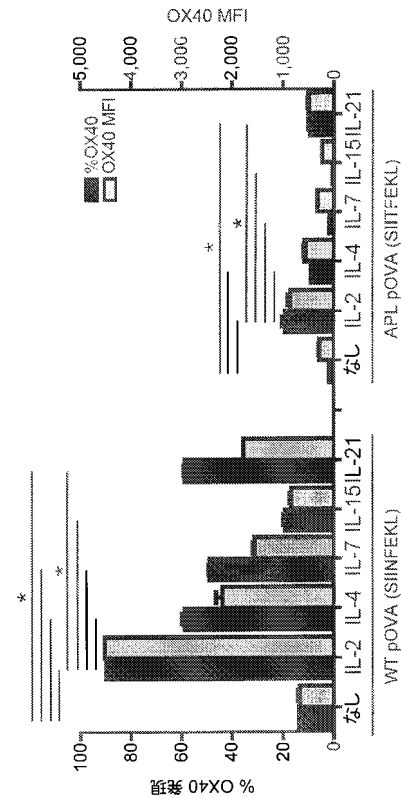
【図 3 D】



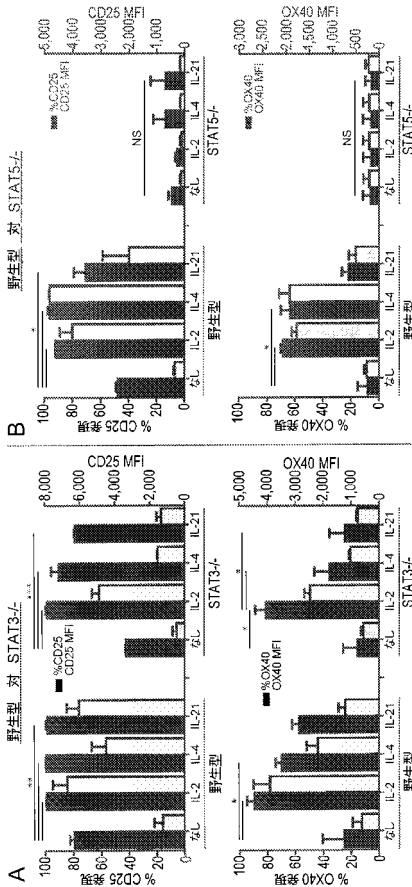
【図 3 E】



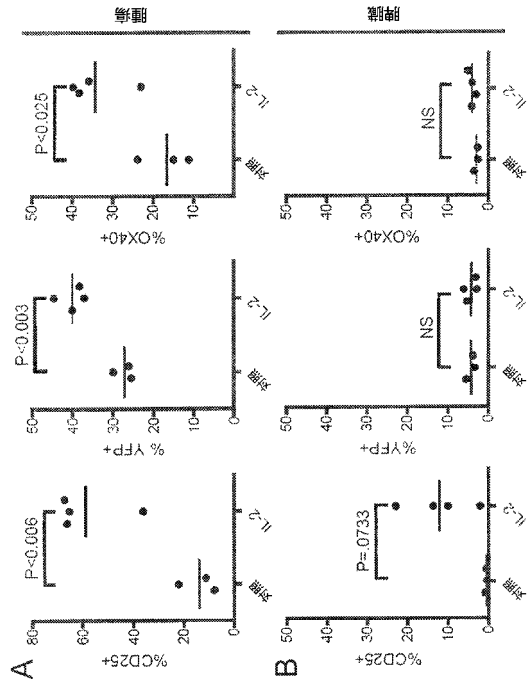
【図 4 B】



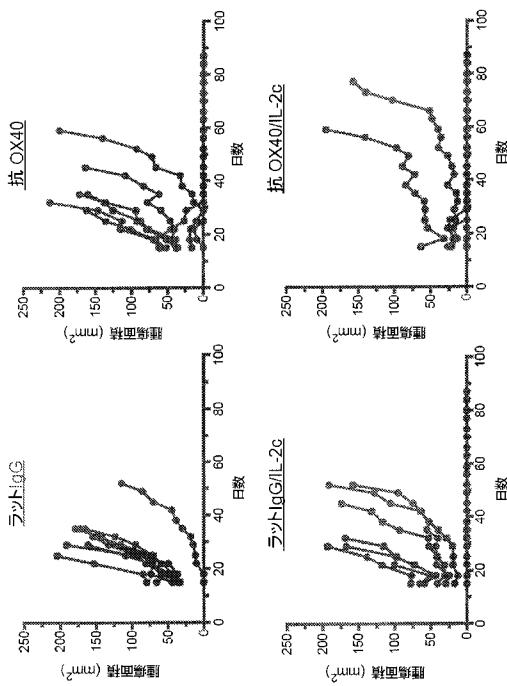
【図 5】



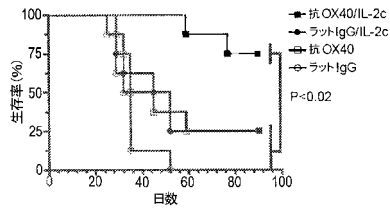
【図 6】



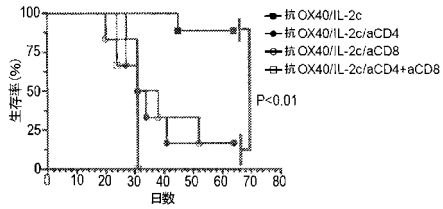
【図 7 A】



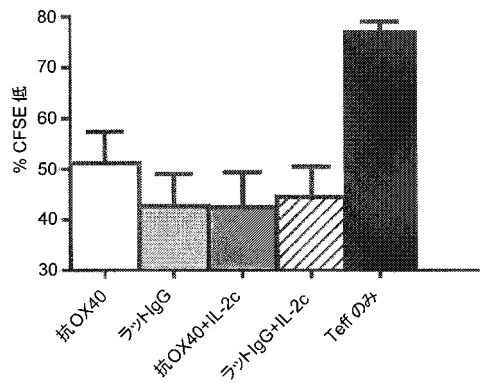
【図 7 B】



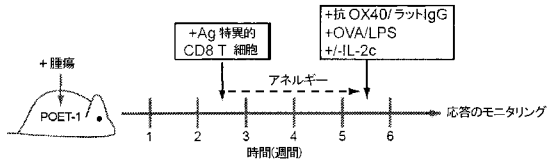
【図 7 C】



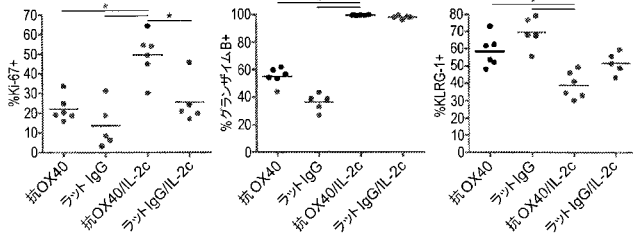
【図 8】



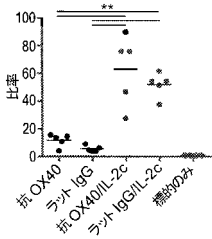
【図 9 A】



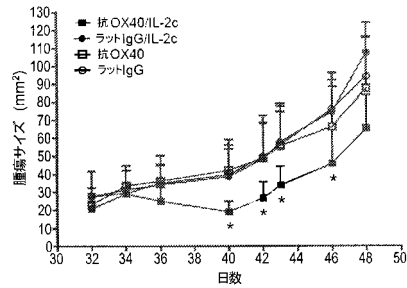
【図 9 B】



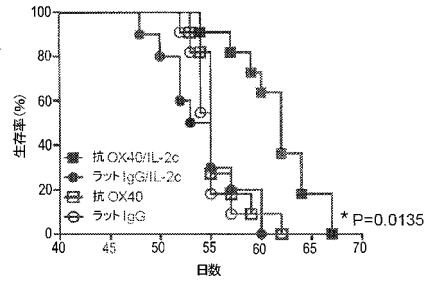
【図 9 C】



【図 9 D】



【図 9 E】



【手続補正書】

【提出日】平成27年1月6日(2015.1.6)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2015508816000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 12/27496												
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A61K 38/20; A61K 39/395 (2012.01) USPC - 424/85.2; 424/172.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC														
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8): A61K 38/20; A61K 39/395 (2012.01) USPC-424/85.2; 424/172.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC-514/1.1; 530/351, 387.1 (text search) Find search terms below Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST (US Pat, PgPub, EPO, JPO), Google Scholar (PL, NPL), FreePatentsOnline (US Pat, PgPub, EPO, JPO, WIPO, NPL); Search terms: enhance increase differentiation fragment variant analog derivative combination immunotherapy TCR T Cell Receptor tumor anergic lymphocyte T-lymphocyte cytokine gamma chain agonist OX40														
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>US 2011/0033449 A1 (Glennie et al.) 10 February 2011 (10.02.2011) para [0002],[0016], [0041]-[0042]</td> <td>1-4, 6-7,11-13</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2003/0040477 A1 (Montgomery et al.) 27 February 2003 (27.02.2003) para [0055])</td> <td>8</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2011/0008368 A1 (Liu et al.) 13 January 2011 (13.01.2011) para [0009],[0033]</td> <td>1-4, 6-8,11-13</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	US 2011/0033449 A1 (Glennie et al.) 10 February 2011 (10.02.2011) para [0002],[0016], [0041]-[0042]	1-4, 6-7,11-13	Y	US 2003/0040477 A1 (Montgomery et al.) 27 February 2003 (27.02.2003) para [0055])	8	A	US 2011/0008368 A1 (Liu et al.) 13 January 2011 (13.01.2011) para [0009],[0033]	1-4, 6-8,11-13
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
X	US 2011/0033449 A1 (Glennie et al.) 10 February 2011 (10.02.2011) para [0002],[0016], [0041]-[0042]	1-4, 6-7,11-13												
Y	US 2003/0040477 A1 (Montgomery et al.) 27 February 2003 (27.02.2003) para [0055])	8												
A	US 2011/0008368 A1 (Liu et al.) 13 January 2011 (13.01.2011) para [0009],[0033]	1-4, 6-8,11-13												
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>														
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family														
Date of the actual completion of the international search 22 May 2012 (22.05.2012)		Date of mailing of the international search report 08 JUN 2012												
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774												

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/27496

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

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

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

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

3. ☒ Claims Nos.: 5, 9-10 and 14-59
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 35/14 (2015.01)	A 6 1 P 43/00 1 0 7	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 35/14 Z	
A 6 1 K 38/43 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 E	
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 39/395 T	
A 6 1 P 35/04 (2006.01)	A 6 1 K 37/48	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 K 35/76	
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 Y	
A 6 1 P 13/08 (2006.01)	A 6 1 P 35/04	
A 6 1 P 15/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 13/08	
A 6 1 P 19/08 (2006.01)	A 6 1 P 15/00	
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 K 31/765 (2006.01)	A 6 1 P 19/08	
	A 6 1 K 47/48	
	A 6 1 P 43/00 1 2 3	
	A 6 1 P 43/00 1 2 1	
	A 6 1 P 1/04	
	A 6 1 K 31/765	

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

(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 100130845
弁理士 渡邊 伸一

(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 レドモンド ウィリアム
アメリカ合衆国 オレゴン州 ヒルズバロ ノースイースト 第 6 3 ウェー 4 8 3

(72)発明者 ワインバーグ アンディー

アメリカ合衆国 オレゴン州 ポートランド サウスウエスト フェアマウント ブールバード

3 2 6 6

F ターム(参考) 4C076 AA94 CC41 EE59

4C084 AA02 AA19 BA44 DA01 DA12 DA14 DA16 DC01 DC50 MA02

MA05 NA05 NA14 ZA591 ZA661 ZA751 ZA811 ZA891 ZA961 ZB091

ZB221 ZB261 ZC411 ZC751

4C085 AA13 AA14 AA16 BB41 BB43 BB50 CC23 EE03

4C086 AA01 FA02 MA02 MA04 NA05 NA14 ZA59 ZA66 ZA75 ZA81

ZA89 ZA96 ZB09 ZB22 ZB26 ZC41 ZC75

4C087 AA01 BB37 BC83 MA02 NA05 ZA59 ZA66 ZA75 ZA81 ZA89

ZA96 ZB09 ZB22 ZB26 ZC41 ZC75