

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4638876号
(P4638876)

(45) 発行日 平成23年2月23日(2011.2.23)

(24) 登録日 平成22年12月3日(2010.12.3)

(51) Int.Cl.

F 1

C07K 16/18	(2006.01)	C07K 16/18
C12N 15/09	(2006.01)	C12N 15/00 ZNAA
C12N 5/10	(2006.01)	C12N 5/00 1O2
C07K 14/47	(2006.01)	C07K 14/47
C12P 21/08	(2006.01)	C12P 21/08

請求項の数 1 (全 77 頁)

(21) 出願番号 特願2006-533390 (P2006-533390)
 (86) (22) 出願日 平成16年5月24日 (2004.5.24)
 (65) 公表番号 特表2007-515942 (P2007-515942A)
 (43) 公表日 平成19年6月21日 (2007.6.21)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2004/016381
 (87) 國際公開番号 WO2004/107618
 (87) 國際公開日 平成16年12月9日 (2004.12.9)
 審査請求日 平成19年5月23日 (2007.5.23)
 (31) 優先権主張番号 60/472,844
 (32) 優先日 平成15年5月23日 (2003.5.23)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 60/547,975
 (32) 優先日 平成16年2月26日 (2004.2.26)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

微生物の受託番号 ATCC PTA-5336

(73) 特許権者 302042209
 ワイス
 アメリカ合衆国ニュージャージー州O 7 9
 4 O, マジソン, ファイブ・ジラルダ・フ
 ァームズ
 (73) 特許権者 502006782
 アメリカ合衆国
 アメリカ合衆国 メリーランド州 2 0 8
 5 2, ロックヴィル, エグゼキュティブ・
 ブールバード 6 0 1 1, スイート 3 2
 5, ナショナル インスティチューツ・オ
 ブ・ヘルス, オフィス・オブ・テクノロジ
 ー・トランシスファー
 (74) 代理人 100089705
 弁理士 社本 一夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 G I T R リガンド及びG I T R リガンド関連分子及び抗体及びその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

モノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、該モノクローナル抗体が A T C
 C 番号 P T A - 5 3 3 6 を有するハイブリドーマにより產生される 5 F 1 抗体である、前
 記モノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

[0 0 0 1] 本出願は、2 0 0 3 年 5 月 2 3 日出願の米国仮出願シリアル N o . 6 0 /
 4 7 2 , 8 4 4 号、及び 2 0 0 4 年 2 月 2 6 日出願の米国仮出願シリアル N o . 6 0 / 5
 4 7 , 9 7 5 号の利益を主張し、両者はそのまま参照により本明細書に援用される。 10

【0 0 0 2】

[0 0 0 2] 本発明は、N I H 内研究プロジェクト Z 0 1 - A I - 0 0 0 2 2 4 下で
 政府支援によりなされた。政府が本発明の一定の権利を有する。

【0 0 0 3】

発明の背景発明の分野

[0 0 0 3] 本発明は、グルココルチコイド誘導の T N F 受容体 (G I T R) 及び G I
 T R に関するリガンド (G I T R L) 及びそれに関連する調節因子に関する免疫シス
 テム (例えば、自己免疫障害、炎症性疾患、及び移植拒絶、及び癌及び感染症) の制御不

能から生じる障害の診断、予測、進行の監視、及び治療の新規方法に指向する。本発明はさらに、新規治療法及び治療標的物に指向し、そして、GITR及びGITRLに関連するような免疫システムの制御不能から生じる障害の療法（治療）及び予防のための試験化合物をスクリーニングし評価する方法に指向する。

【背景技術】

【0004】

関連する背景技術

[0004] 一般的に、Tリンパ球は、細胞を介した免疫に原因があり、他の白血球細胞の応答を増大又は抑制することによって制御的役割を演じる。Tリンパ球が免疫応答の抑制に役割を果たすという概念は周知である（例えば、Gershon et al. (1970) Immunology 18: 723-35を参照）。しかしながら、これらのサプレッサー細胞に対する標的抗原及びそれらの機能を調節する機構は未だに研究対象である。

【0005】

[0005] 胸腺において発生する制御性T細胞の一群は、独特の膜抗原の発現によってエフェクターT細胞とは区別することができる。これらの制御性T細胞は、CD25抗原を同時発現するCD4⁺T細胞（即ち、CD抗原を発現するT細胞）の亜種を作り出す。CD25はまた、インターロイキン-2受容体(IL-2R)鎖としても知られる。CD25⁺T細胞の同時移転又はそれとの再構築は、各種動物モデルにおける炎症性損傷及び自己免疫の両方の予防と関連する（Shevach (2000) Ann. Rev. Immunol. 18: 423-49を参照、本明細書に援用される）。CD4⁺CD25⁺T細胞はまたインビトロでのT細胞活性の阻害、及び同時培養におけるCD4⁺CD25⁻T細胞の養子関係の抑制と関連している（Shevach、上述）。

【0006】

[0006] 20年以上前に、いくつかの自己反応性T細胞が中心的な寛容の機構を免れ、胸腺誘導の制御性T細胞の調節下でその周辺に存在することが示された。1995年に、Sakaguchi及び共同研究者らは、IL-2Rの鎖（即ち、CD25）を天然に発現するCD4⁺T細胞の小さな母集団が器官特異的な自己応答性T細胞の調節と関係付けられることを示した（Sakaguchi et al. (1995) J. Immunol. 155: 1151-64）。具体的には、彼らは、CD4⁺CD25⁻T細胞の免疫不全な宿主への移転が自己免疫疾患の範囲に導き、CD4⁺CD25⁺制御性T細胞の同時移転により妨げ得ることを示した（Sakaguchi et al.、上述）。その後の研究は、ウイルス性、細菌性及び原虫感染に対する免疫応答の抑制においてCD4⁺CD25⁺制御性T細胞を関連付けている（Aseffa et al. (2002) J. Immunol. 169: 3232-41；Belkaid et al. (2002) Nature 420: 502-07；Hisaeda et al. (2004) Nat. Med. 10: 29-30；Kursar et al. (2002) J. Exp. Med. 196: 1585-92；Lundgren et al. (2003) Infect. Immun. 71: 1755-62；Maloy et al. (2003) J. Exp. Med. 197: 111-19）。一緒に、これらの研究は、CD4⁺CD25⁺T細胞の除去が免疫応答を増大することを提供した。多くの試みがなされ、これらのCD4⁺CD25⁺T細胞の活性及び、それらによる抑制が定義された。これらの細胞は、インビトロ及びインビボの両方のエフェクターT細胞機能を強力に抑制する胸腺誘導の細胞の独特的な系統を表す。

【0007】

[0007] いくつかのインビトロ研究は、CD4⁺CD25⁺細胞が、IL-2の転写を止めることによって、マイトジエン及び抗原の両方に反応してCD4⁺T細胞の増殖を抑制することを示した（例えば、Thornton and Shevach (1998) J. Exp. Med. 188: 287-96；Takahashi et al. (1998) Int. Immunol. 10: 1969-80）。CD4⁺CD25⁺T細

10

20

30

40

50

胞と自己反応性 CD⁺ T 細胞とのインビボでの同時移転は、器官特異的な自己免疫の誘導とエフェクターフェーズの両方を抑制するのに十分である (Suri - Payer et al. (1999) Eur. J. Immunol. 29: 669 - 77; Suri - Payer et al. (1998) J. Immunol. 160: 1212 - 18)。CD⁺ CD⁺ T 細胞の他の特性は、外因性 IL-2 の不在での T 細胞受容体 (TCR) 刺激に対する低応答性、細胞 - 細胞相互作用を介した免疫抑制、及びそれらの抑制性表現型を誘導する TCR シグナリングに関する要求 (しかしながら、それらが一度活性化されれば、それらの抑制性機能は抗原性刺激に独立である) を含む。CD⁺ 発現の単なる獲得は、CD⁺ CD⁺ T 細胞の刺激によって達成され得るので、抑制性表現型は含まないこともまた示されている。これらの CD⁺ CD⁺ T 細胞はヒトに存在する 10 ことが知られている (Shevach (2001) J. Exp. Med. 193: F1 - F6)。

【0008】

[0008] 一研究は、変化した胸腺選択が制御性 CD⁺ CD⁺ T 細胞の発生に関して要求されることを示した (Jordan et al. (2001) Nat. Immunol. 2: 301 - 06)。加えて、ノックアウトマウスを用いた研究は、IL-2 合成と反応性に関する分子がこれらの細胞の発生に関して要求されること; IL-2 又は IL-2R、又は B7.1 (CD80) 及び B7.2 (CD86)、又は CD28 全部について遺伝的に不全のマウスが CD⁺ CD⁺ 細胞における重篤な減少を有し、これらのマウスのいくつかの周辺に結果としてリンパ腫症及び過剰増殖となる (Papierenik et al. (1998) Int. Immunol. 10: 371 - 78; Salomon et al. (2000) Immunity 12: 431 - 40; Kumano-goh et al. (2001) J. Immunol. 166: 353 - 60)。

【0009】

[0009] 最近まで、当該技術は、CD⁺ CD⁺ を介した免疫システムの抑制に関する機構、例えば、抗原特異性、抑制の獲得に関する分子、及び抑制のエフェクターフェーズに関する細胞表面分子又は短期作動のサイトカインを決定することができなかった; 自己免疫の変更における CD⁺ T 細胞の分子標的は同様にほとんど未知のままであった。現在、CD⁺ CD⁺ T 細胞及び CD⁺ CD⁺ T 細胞における遺伝子チップ解析の使用を通じて遺伝子の差異による発現を調べることによって、いくつかの CD⁺ 特異遺伝子が存在することを示している (McHugh et al. (2002) Immunity 16: 311 - 23; 同様に米国特許出願 10 / 194,754 を参照、参照により本明細書に完全に援用される)。これらの遺伝子は、CD⁺ CD⁺ T 細胞上に優先的に発現することが決定され、治療的な干渉のための標的、及び自己免疫障害、炎症性疾患及び移植拒絶のためのスクリーニング方法、並びに癌及び感染症のためのスクリーニング方法として役立てることができる。

【0010】

[0010] 重要なことに、CD⁺ 細胞において差別的に発現するものと決定された遺伝子の 1 つは、グルココルチコイド誘導の TNF 受容体 (GITR) である (McHugh et al., 上述)。GITR は、細胞表面の膜貫通タンパク質受容体であり、腫瘍壞死因子受容体 (TNFR) スーパーファミリーの一員である。GITR は、非活性化 T 細胞上に構築的に存在することが示されている (Gavin et al. (2002) Nat. Immunol. 3: 33 - 41; McHugh et al., 上述; Shimizu et al. (2002) Nat. Immunol. 3: 135 - 42)。GITR は、GITR リガンド (GITRL) と称する別の膜貫通タンパク質に結合する。GITR に対する作動性抗体は、CD⁺ CD⁺ T 細胞の抑制活性を廃止することが示されており、これらの細胞の活性を制御することにおいて GITR に対して機能的な役割を示す (McHugh et al., 上述)。別の研究によって、特異的モノクローナル抗体を用いた GITR の刺激が CD⁺ CD⁺ T 細胞を介した抑制を廃止 40 50

し、それによって、自己免疫を誘導することが確かめられた (Shimizu et al., 上述)。これらの研究は、GITRがCD4⁺CD25⁺T細胞のより信頼のあるマーカーであるという提案へと導いた (Uraushihara et al. (2003) J. Immunol. 171: 708-16) ; しかしながら、GITRの上方制御はまたCD4⁺CD25⁻T細胞の活性化後に発生するので、GITR発現だけは、この一部の集合を専ら区別しない (McHugh et al., 上述; Shimizu et al., 上述)。

【0011】

[0011] GITRはCD4⁺CD25⁻T細胞に関するCD4⁺CD25⁺T細胞の抑制活性の制御において重要であるので、GITRと相互作用する新規分子を同定し特徴付けることが期待される。GITRと相互作用するそのような新規分子は、本明細書に開示される。加えて、これらの分子の調節因子が提供される。

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

発明の概要

[0012] 本発明は、ヒトGITRLの新規マウスホモログのヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を提供する。本発明はまたマウスGITRLに対する抗体を提供する。本発明はまた作動性GITR-GITRL結合を誘導することによる免疫抑制を逆転する、及び、例えば、GITRL活性を阻害する（例えば、GITRとGITRLとの間の相互作用を遮断する）中和抗体の使用を通じて、GITR-GITRL結合を拮抗することによる免疫抑制を回復又は増強する方法の両方を提供する。そのような免疫抑制の逆転、又は回復／増強は、制御不能の免疫応答、例えば、自己免疫障害、炎症性疾患及び移植拒絶、及び癌や感染症に起因する様々な障害の治療に有益である。本発明の方法は、GITRL及びGITRの操作に指向し、限定されないが、マウスGITRL及びGITR及びそれらのホモログを含み；これらのホモログのうちヒトGITRL及びヒトGITRが特異的に含まれる。

20

【0013】

[0013] 本発明は、GITRに関する新規なリガンド(GITRL)に関連する新規な単離し精製したポリヌクレオチド及びポリペプチドを提供する。本発明はまたGITRに対する抗体を提供し、並びに自己免疫障害、炎症性疾患、及び移植拒絶、及び癌及び感染症の治療、診断、予測及びそれらの進行の監視の方法をも提供する。本発明の一態様では、開示した方法及び分子は、自己免疫障害、炎症性疾患、及び移植拒絶、並びに癌及び感染症を含む疾患又は障害の治療中の免疫応答の結果を操作するために使用することができる。別の態様では、開示した本発明のポリヌクレオチド及びポリペプチドは、GITRとGITRLとの間の相互作用を、例えば、GITRLの発現又は活性を下方制御することによって、又はGITRLへの結合することによって遮断し又は阻害し、しかし、GITRシグナルを誘導しないものであり、免疫システムの抑制を回復又は増強するためには使用することができる。別の態様では、GITR及びGITRLとの間の相互作用は、小分子によって遮断され又は阻害され得る。これらのタイプの制御（即ち、これらの態様）は、自己免疫障害及びいくつかの炎症性疾患、及び同様又は関連した障害の治療において、並びに移植拒絶の治療において最も利益となるであろうということは当業者によって賞賛されるであろう。別の態様において、例えば、GITRLの発現又は活性を上方制御することによって、又はGITRに作動的に結合することによって、GITRシグナルを誘導する本発明の開示したポリヌクレオチド及びポリペプチドは、免疫システムを逆転し、遮断し、又は廃止するために使用され得る。別の態様において、GITR及びGITRLとの間の相互作用は、小分子によって増強され又は模倣され得る。これらのタイプの制御は、癌などの治療、並びに感染症の治療に最も利益となるであろうということは、当業者によって賞賛されるであろう。当業者はまた、これらの新規な療法と確立した他の療法とを組合わせることの可能な利益に気づくであろう。

40

50

【0014】

[0014] 一態様において、本発明は、配列番号：1又は配列番号：3のヌクレオチド配列を含む単離した核酸分子を提供する。別の態様において、核酸分子は、少なくとも1つの発現調節配列に実施可能に連結される。別の態様において、その核酸分子でトランスフォーム又はトランスフェクトした宿主細胞が提供される。

【0015】

[0015] 別の態様において、本発明は、配列番号：1又は配列番号：3の単離した対立遺伝子を提供する。別の態様において、本発明は、配列番号：3のヌクレオチド配列を含む単離した遺伝子を提供する。

【0016】

[0016] 別の態様において、本発明は、配列番号：1又は配列番号：3に記載されるヌクレオチド配列、又はそれに相補的な配列に高ストリンジエントな条件下で特異的にハイブリダイズする単離した核酸分子を提供する。

【0017】

[0017] 別の態様において、本発明は、配列番号：2のアミノ酸配列を含むタンパク質、又は前記タンパク質の活性な断片をコードするタンパク質の断片をコードする単離した核酸分子を提供する。別の態様において、核酸分子、又はその断片は、少なくとも1つの発現調節配列に実施可能に連結される。別の態様において、少なくとも1つの発現調節配列に実施可能に連結した、単離した核酸分子、又はその断片でトランスフォーム又はトランスフェクトした宿主細胞が提供される。別の態様において、本発明は、体細胞及び生殖細胞が単離した核酸分子、又はその断片を含有するヒト以外のトランスジェニック動物を提供する。別の態様において、本発明は、体細胞及び生殖細胞が配列番号：1又は配列番号：3のヌクレオチド配列を含むDNAを含有するヒト以外のトランスジェニック動物を提供する。

【0018】

[0018] 別の態様において、配列番号：1又は配列番号：3に記載されるヌクレオチド配列、又はそれに相補体に高ストリンジエントな条件下で特異的にハイブリダイズする単離した核酸によってコードされるアミノ酸配列を含む単離したタンパク質を提供する。別の態様において、本発明は、配列番号：2のアミノ酸配列、又はその活性な断片を含む単離したタンパク質を提供する。

【0019】

[0019] 別の態様において、本発明は、配列番号：1又は配列番号：3のヌクレオチド配列、又はその断片に相補的なヌクレオチド配列を含む単離した核酸分子を提供し、ここで、細胞における核酸分子の発現はG I T R Lの產生の減少に帰着する。別の態様において、核酸分子、又はその断片は、少なくとも1つの発現調節配列に実施可能に連結される。別の態様において、少なくとも1つの発現調節配列に実施可能に連結した単離した核酸、又はその断片でトランスフォーム又はトランスフェクトした宿主細胞が提供される。別の態様において、本発明は、体細胞及び生殖細胞が単離した核酸、又はその断片を含有するヒト以外のトランスジェニック動物を提供する。

【0020】

[0020] 別の態様において、本発明は、配列番号：1又は配列番号：3のヌクレオチド配列、又はその断片を含む核酸分子に対応するmRNAに相補的なアンチセンス・オリゴヌクレオチドを提供し、ここで、オリゴヌクレオチドはG I T R Lの発現を阻害する。別の態様において、本発明は、配列番号：1又は配列番号：3のヌクレオチド配列、又はその断片を含む核酸分子に対応するsiRNA分子を提供し、siRNA分子がG I T R Lの発現を阻害する。

【0021】

[0021] 別の態様において、本発明は、配列番号：1又は配列番号：3に記載されるヌクレオチド配列、又はそれに相補的なヌクレオチド配列に高ストリンジエントな条件下で特異的にハイブリダイズする単離した核酸によってコードされるアミノ酸配列を含む

10

20

30

40

50

単離したタンパク質に特異的に結合することができる单離した抗体を提供する。別の態様において、抗体は、GITRL活性を中和する。別の態様において、抗体は、ATCC番号PTA-5366を有する5F1、又はATCC番号PTA-5337を有する10F12である。別の態様において、抗体は、5F1又は10F12の抗原結合断片を含む。別の態様において、本発明は、配列番号：2のアミノ酸配列を含む单離したタンパク質、又はその活性な断片に特異的に結合することができる单離した抗体を提供する。別の態様において、抗体は、GITRL活性を中和する。別の態様において、抗体は、ATCC番号PTA-5336を有する5F1、又はATCC番号PTA-5337を有する10F12である。別の態様において、抗体は、5F1又は10F12の抗原結合断片を含む。

10

【0022】

【0022】別の態様において、本発明は、GITRLとGITRとの相互作用を阻害し又は遮断することができる試験化合物をスクリーニングする方法であって、GITRL及びGITRを含有する試料を試験化合物と接触させ、そして、試料中のGITRLとGITRとの相互作用が化合物と接触していない試料中のGITRLとGITRとの相互作用と比較して減少するかどうかを決定する工程を含み、それによって、化合物で接触した試料中のGITRLとGITRとの相互作用の減少がGITRLとGITRとの相互作用を阻害し又は遮断するものとして化合物を同定する前記方法に関する。別の態様において、同定した化合物は、自己免疫障害、炎症性疾患、又は移植拒絶の危険にある患者又はそれと診断された患者を治療する方法、患者からT細胞を単離し、同定した化合物で単離したT細胞を処置し、そして、処理したT細胞を患者に移動し戻す工程を含む方法に使用される。別の態様において、同定した化合物は、自己免疫障害、炎症性疾患、又は移植拒絶の危険にある患者又はそれと診断された患者を治療する方法、同定した化合物を患者に投与することを含む方法に使用される。別の態様において、本発明は、化合物を患者に投与する前に患者からのエフェクターT細胞の第一の数を検出し、化合物を患者に投与した後に患者からのエフェクターT細胞の第二の数を検出し、そして、第一の数と第二の数とを比較する工程を含む、患者における同定した化合物の効力をアッセイする方法を提供し、それによって、第一の数と比較した場合、第二の数におけるエフェクターT細胞の数の減少は、化合物が患者における自己免疫障害、炎症性疾患、又は移植拒絶を治療する方法に効果的であることを示す。別の態様において、エフェクターT細胞は、CD4⁺T細胞又はCD8⁺T細胞である。

20

【0023】

【0023】別の態様において、本発明は、GITRLとGITRとの相互作用を増強し又は模倣することができる試験化合物をスクリーニングする方法であって、GITRLとGITRとを含有する試料を試験化合物で接触し、そして、試料中のGITRLとGITRとの相互作用が、化合物で接触していない試料中のGITRLとGITRとの相互作用と比較して増加しているかどうかを決定する工程を含む方法を提供し、それによって、化合物で接触した試料中のGITRLとGITRとの相互作用の増加は、GITRLとGITRとの相互作用を増加させ又は模倣するものとしての化合物を同定する。別の態様において、同定した化合物は、癌又は感染症の危険にある患者又はそれと診断された患者を治療する方法であって、患者からT細胞を単離し、単離したT細胞を同定した化合物で処理し、そして、処理したT細胞を患者に移して戻す工程を含む前記方法を提供する。別の態様において、同定した化合物は、癌又は炎症性疾患の危険にある患者又はそれと診断された患者を治療する方法に使用され、該方法は同定した化合物を患者に投与することを含む。別の態様において、本発明は、患者における同定した化合物の効率を評価する方法であって、患者に化合物を投与する前に患者からエフェクターT細胞の第一の数を検定し、患者に化合物を投与した後に患者からエフェクターT細胞の第二の数を検定し、そして、第一の数と第二の数とを比較する工程を含み、それによって、第一の化合物と比較した場合、第二の数におけるエフェクターT細胞の数の有意な増加は、化合物が患者における癌又は感染症の治療に有効であることを示す前記方法を提供する。別の態様において、エフ

30

40

50

エクターT細胞は、CD4⁺T細胞又はCD8⁺T細胞である。

【0024】

[0024] 別の態様において、本発明は、患者における自己免疫障害、炎症性疾患、又は移植拒絶を診断する方法であって、患者からの試料中のGITRL遺伝子産物の試験量を検出し、そして、試験量と対照試料中のGITRLの正常量とを比較することを含む前記方法を提供し、それによって、正常な量をはるかに超えた試験量は、自己免疫障害、炎症性疾患、又は移植拒絶の診断における陽性の指標を提供する。別の態様において、本発明は、患者における癌又は感染症を診断する方法であって、患者からの試料量中のGITRL遺伝子産物の試験量を検出し、そして、試験量と対照試料中のGITRL遺伝子産物の正常量とを比較する工程を含む前記方法を提供し、正常量をはるかに下回る試験量は、癌又は感染症の診断に陽性の指標を提供する。10

【0025】

[0025] 別の態様において、本発明は、患者にGITRアンタゴニストを投与することを含む、自己免疫障害、炎症性疾患、又は移植拒絶の危険にある患者又はそれと診断された患者を治療する方法を提供する。別の態様において、該方法は、CD4⁺CD25⁺制御性T細胞による抑制に対する患者におけるエフェクターT細胞の感受性を維持するよう（例えば、そのような感受性を維持するための有効な量で）、GITRアンタゴニストを投与することを含む。別の態様において、GITRアンタゴニストは、中和抗GITRL抗体、中和抗GITR抗体、GITR含有融合タンパク質、GITRの活性な断片を含有する融合タンパク質、拮抗性小分子、アンチセンスGITRL核酸分子、及びsiRNA GITRL核酸分子から成る群から選択される。別の態様において、自己免疫障害又は炎症性疾患は、慢性関節リウマチ、脳脊髄炎、骨関節炎、多発性硬化症、自己免疫胃炎、全身性紅斑性狼瘡、乾癬及び他の感染性皮膚病、I型糖尿病、喘息、アレルギー、並びにクローン病及び潰瘍性大腸炎を含む感染性腸疾患から成る群から選択される。20

【0026】

[0026] 別の態様において、本発明は、癌又は感染症の危険にある患者又はそれと診断された患者を治療する方法であって、GITRアゴニストを患者に投与することを含む前記方法を提供する。別の態様において、該方法は、GITRアゴニストが患者におけるエフェクターT細胞に同時刺激性シグナルを提供し、そして、患者においてCD4⁺CD25⁺制御性T細胞による抑制にエフェクターT細胞をより少ない感受性とするよう（例えば、そのようなシグナルを提供する有効量で）GITRアゴニストを投与することを含む。別の態様において、GITRアゴニストは、GITRL、GITRLの活性断片、GITRLを含有する融合タンパク質、GITRLの活性な断片を含有する融合タンパク質、そして、作動性GITR抗体から成る群から選択される。30

【0027】

[0027] 別の態様において、本発明は、エフェクターT細胞を含有する細胞群の増殖を誘導する方法であって、細胞群にGIRTアゴニストを投与することを含む前記方法を提供する。別の態様において、GITRアゴニストは、GITRL、GITRLの活性な断片、GITRLを含有する融合タンパク質、GITRLの活性な断片を含有する融合タンパク質、及び作動性GITR抗体から成る群から選択される。別の態様において、エフェクターT細胞は、CD4⁺T細胞又はCD8⁺T細胞である。40

【0028】

[0028] 別の態様において、本発明は、エフェクターT細胞を含有する細胞群の増殖を阻害する方法であって、細胞群にGITRアンタゴニストを投与することを含む前記方法を提供する。別の態様において、GITRアンタゴニストは、中和抗GITRL抗体、中和抗GITR抗体、GITRを含有する融合タンパク質、GITRの活性な断片を含有する融合タンパク質、拮抗性小分子、アンチセンスGITRL核酸分子、及びsiRNA GITRL核酸分子から成る群から選択される。別の態様において、エフェクターT細胞は、CD4⁺T細胞又はCD8⁺T細胞である。別の態様において、GITRアンタゴニストは、5F1又は10F12である。50

【0029】

[0029] 別の態様において、本発明は、CD4⁺CD25⁺制御性T細胞の存在下でエフェクターT細胞を含む細胞群の抑制を阻害又は遮断する方法であって、細胞群にGITRアゴニストを投与することを含む前記方法を提供する。別の態様において、該方法は、GITRアゴニストがエフェクターT細胞に同時刺激性シグナルを提供し、そして、CD4⁺CD25⁺制御性T細胞による抑制により少ない感受性とする（例えば、そのようなシグナルを提供する有効量で）ようにGITRアゴニストを投与することを含む。別の態様において、GITRアゴニストは、GITAL、GTRLの活性な断片、GITRLを含有する融合タンパク質、GITALの活性な断片を含有する融合タンパク質、及び作動性GITR抗体から成る群から選択される。別の態様において、エフェクターT細胞は、CD4⁺T細胞又はCD8⁺T細胞である。10

【0030】

[0030] 別の態様において、本発明は、CD4⁺CD25⁺制御性T細胞の存在下でエフェクターT細胞を含む細胞群を抑制する方法であって、該細胞群にGITRアンタゴニストを投与することを含む前記方法を提供する。別の態様において、該方法は、CD4⁺CD25⁺制御性T細胞による抑制にエフェクターT細胞の感受性を維持する（例えば、そのような感受性を維持するのに有効な量で）ようにGITRアンタゴニストを投与することを含む。別の態様において、GITRアンタゴニストは、中和抗GITAL抗体、中和抗GITR抗体、GITRを含有する融合タンパク質、GITRの活性な断片を含有する融合タンパク質、拮抗性小分子、アンチセンスGITAL核酸分子、及びsiRNA GITAL核酸分子から成る群から選択される。別の態様において、エフェクターT細胞は、CD4⁺細胞又はCD8⁺T細胞である。別の態様において、GITRアンタゴニストは5F1又は10F12である。20

【0031】

[0031] 別の態様において、本発明は、配列番号：1又は配列番号：3の核酸配列、又はそれらの断片に相補的なヌクレオチド配列を含む単離した核酸分子で細胞群を処置することを含み、ここで、細胞における核酸分子の発現がGITALの産生の減少に帰着する、細胞群におけるGITALの発現を阻害する方法を提供する。別の態様において、本発明は、配列番号：1又は配列番号：3のヌクレオチド配列を含む核酸分子、又はそれらの断片に対応するmRNAに相補的なアンチセンス・オリゴヌクレオチドで細胞群を処置することを含み、ここで、オリゴヌクレオチドがGITALの発現を阻害する、細胞群におけるGITALの発現を阻害する方法を提供する。30

【0032】

[0032] 別の態様において、本発明は、細胞群におけるGITALの発現を阻害する方法であって、配列番号：1又は配列番号：3のヌクレオチド配列を含む単離した核酸分子に対応するmRNAに標的とされるsiRNA分子で細胞群を処置することを含む、前記方法を提供する。別の態様において、本発明は、細胞群におけるGITALの発現を阻害する方法であって、配列番号：1又は配列番号：3のヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列を含む単離した核酸分子に対応するmRNAに標的とされるsiRNAで細胞群を処置することを含む前記方法を提供する。40

【0033】

[0033] 別の態様において、本発明は、細胞群におけるGITALの発現を阻害する方法であって、GITALをコードする核酸分子にアンチセンス・オリゴヌクレオチドで細胞群を処置することを含む前記方法を提供する。別の態様において、本発明は、細胞群におけるGITALの発現を阻害する方法であって、GITALをコードするmRNAに標的とされるsiRNA分子で細胞群を処置することを含む前記方法を提供する。

【0034】

[0034] 別の態様において、本発明は、細胞群におけるGITALの発現を阻害する方法であって、配列番号：1又は配列番号：3のヌクレオチド配列を含む単離した核酸分子、配列番号：2のアミノ酸配列を含むタンパク質をコードする単離した核酸分子又は50

該タンパク質の活性な断片をコードするその断片で細胞群をトランスフォーム又はトランسفェクトすることによって細胞群を処置することを含み、ここで、核酸分子が少なくとも1つの発現調節配列に実施可能に連結している前記方法を提供する。

【0035】

[0035] 別の態様において、本発明は、インピトロ又はエクスピボでG I T R アゴニストと接触しているエフェクターT細胞群を提供する。別の態様において、G I T R アゴニストは、G I T R L、又はG I T R Lの活性な断片、G I T R Lを含有する融合タンパク質、G I T R Lの活性な断片を含有する融合タンパク質、作動性小分子、及び作動性抗G I T R 抗体から成る群から選択される。別の態様において、エフェクターT細胞は、C D 4⁺細胞又はC D 8⁺T細胞である。10

【0036】

[0036] 別の態様において、本発明は、患者における癌又は感染症を治療する方法であって、エフェクタ-T細胞群を得る工程、G I T R アゴニストで該群を処置する工程、そして、癌又は感染症で悩まされている患者に処置した群を投与する工程を含む前記方法を提供する。別の態様において、G I T R はアゴニストは、G I T R L、G I T R Lの活性な断片、G I T R Lを含有する融合タンパク質、G I T R Lの活性な断片を含有する融合タンパク質、作動性小分子、及び作動性抗G I T R 抗体から成る群から選択される。別の態様において、患者は、癌に悩まされ、そして、処置した群は腫瘍ワクチンとして使用される。20

【0037】

[0037] 別の態様において、本発明は、G I T R アゴニスト及び薬学的に受容可能な担体を含む医薬組成物を提供する。別の態様において、G I T R アゴニストは、G I T R L、G I T R Lの活性な断片、G I T R Lを含有する融合タンパク質、G I T R Lの活性な断片を含有する融合タンパク質、作動性小分子、及び作動性抗G I T R 抗体から成る群から選択される。20

【0038】

[0038] 別の態様において、本発明は、G I T R アンタゴニスト及び薬学的に受容可能な担体を含む医薬組成物を提供する。別の態様において、G I T R アンタゴニストは、中和抗G I T R L抗体、中和抗G I T R 抗体、G I T R を含有する融合タンパク質、G I R T の活性な断片を含有する融合タンパク質、拮抗性小分子、アンチセンスG I T R L核酸分子、及びs i R N A G I T R L核酸分子から成る群から選択される。別の態様において、抗体は、5 F 1 又は1 0 F 1 2 の抗原結合断片を含む。30

【0039】

[0039] 別の態様において、本発明は、G I T R アゴニスト、及び、ウイルス抗原、細菌抗原、真菌抗原、寄生虫抗原、癌抗原、腫瘍関連抗原、及びそれらの断片から成る群より選択される抗原を含むワクチンアジュバントを提供する。別の態様において、G I T R アゴニストは、G I T R L、又はG I T R Lの活性な断片、G I T R Lを含有する融合タンパク質、G I T R Lの活性な断片を含有する融合タンパク質、作動性小分子、及び作動性抗G I T R 抗体から成る群から選択される。30

【0040】

[0040] 別の態様において、本発明は、G I T R アンタゴニスト、及び、自己抗原、アミロイドペプチドタンパク質、アロ抗原、移植抗原、アレルゲン、及びそれらの断片から成る群から選択される抗原を含むワクチンアジュバントを提供する。別の態様において、G I T R アンタゴニストは、中和抗G I T R L抗体、中和抗G I T R 抗体、G I T R を含有する融合タンパク質、G I T R の活性な断片を含有する融合タンパク質、拮抗性小分子、アンチセンスG I T R L核酸分子、及びs i R N A G I T R L核酸分子から成る群から選択される。別の態様において、抗体は、5 F 1 又は1 0 F 1 2 の抗原結合断片を含む。40

【0041】

[0041] 別の態様において、本発明は、G I T R L活性を中和することができる試50

験化合物をスクリーニングする方法であって、G I T R L 及び中和抗体を含有する試料化合物で接触させる工程、及び G I T R L と試料中の中和抗体との相互作用が、G I T R L と化合物で接触していない試料中の中和抗体との相互作用と比較した場合に減少するかどうかを決定する工程を含み、G I T R L と化合物で接触した試料中の中和抗体との相互作用の減少が、G I T R L と中和抗体との相互作用を阻害又は遮断するものとして化合物を同定する前記方法を提供する。別の態様において、抗体は 5 F 1 又は 10 F 12 である。

【0042】

[0042] 別の態様において、本発明は、エフェクターT細胞を含む細胞群に同時刺激性シグナルを提供する方法であって、G I T R アゴニストを投与することを含む前記方法を提供する。別の態様において、G I T R アゴニストは、G I T R L、又はG I T R L の活性な断片、G I T R L を含有する融合タンパク質、G I T R の活性な断片を含有する融合タンパク質、及び作動性抗 G I T R 抗体から成る群から選択されるタンパク質である。別の態様において、エフェクターT細胞は、C D 4⁺ 細胞又は C D 8⁺ T細胞である。

10

【課題を解決するための手段】

【0043】

発明の詳細な説明

[0057] 抑制活性の逆転を産む G I T R に対する抗体は作動性シグナルを產生するようなので、G I T R L による G I T R の積極的な関与はまた、制御性 T 細胞の抑制活性を阻害することもできるであろうことは予測された。適切な試薬の欠如は、以前、より生理学的条件下で G I T R / G I T R L の詳細な機能的解析を予測していた。ここで、G I T R L のマウスオルソログは同定され、そして、G I T R L のマウスオルソログに特異的に結合する拮抗性抗体は、即ち、ヒト G I T R L と交差反応せずに生じた。

20

【0044】

[0058] この試薬を用いて、G I T R L の組織分布と制御を調べた。加えて、T 細胞の抑制を制御する G I T R / G I T R L 相互作用の能力を G I T R -/- マウスを用いて調査した。C D 2 5⁻ 及び C D 2 5⁺ T 細胞の両方は G I T R を発現するため、程度が変化するにもかかわらず、作動性抗 G I T R 抗体で同時培養物の処理に応じてサプレッサー機能の阻害を示す以前の研究は、G I T R の関与の細胞標的に関するはっきりしない結果を生んだ。ここで、同時培養試験における野生型及び G I T R -/- マウス由来の C D 4⁺ C D 2 5⁺ 及び C D 4⁺ C D 2 5⁻ T 細胞の組み合わせを用いて、C D 4⁺ C D 2 5⁺ サプレッサー T 細胞ではなく、C D 4⁺ C D 2 5⁻ レスポンダーにおける G I T R の連結は抑制を廃止することを要求することが見出された。C D 4⁺ C D 2 5⁺ T 細胞の不存在で、G I T R -/- T 細胞が C D 4⁺ C D 2 5⁺ T 細胞の生理学的な数の存在下で全体として抑制されるが、G I T R -/- T 細胞は野生型動物に類似した増殖応答を実行した。これらの結果は、第一に、G I T R / G I T R L 関与が、C D 4⁺ C D 2 5⁺ T 細胞の阻害効果に耐性のエフェクター T 細胞にする、以前には定義されていないシグナルを提供することを示唆する。つまり、第二の感染性シグナルに続く G I T R L 発現の下方制御が、C D 4⁺ C D 2 5⁺ を介した抑制を促進し、激しいエフェクター細胞応答の有害な結果を妨げるかもしれない。

30

【0045】

[0059] 本研究は、G I T R とそのリガンド、G I T R L との相互作用を裏打ちするメカニズム、特に C D 4⁺ C D 2 5⁻ T 細胞（抑制活性の標的となると伝統的に理解されている）における効果に関するメカニズムに新しい光を射している。まとめると、G I T R -/- マウスを用いて、抑制を廃止する抗 G I T R m A b (G I T R に対する作動性マウス抗体) の容量は、C D 4⁺ C D 2 5⁺ T 細胞ではなく、C D 4⁺ C D 2 5⁻ T 細胞への作用によって仲介されるように示された（以前にいくつかの研究によって提案されている）。A P C (抗原提示細胞) は構築的に G I T R L を発現し、続くトール用の受容体シグナルを下方制御している。G I T R -/- マウス C D 4⁺ C D 2 5⁻ T 細胞は増殖応答を蓄積することができるが、C D 4⁺ C D 2 5⁺ T 細胞の生理学的な数の存在下では増殖することができない。このように、G I T R L は、C D 4⁺ C D 2 5⁻ T 細胞に対し

40

50

て重要なシグナルを提供し、他のエフェクター細胞（例えば、CD⁺ T細胞）は、免疫応答の初期に CD⁺ CD⁺ を介した制御に耐性にする。炎症刺激による GITRL の下方制御は、例えば、癌又は感染性損傷の過程でのサプレッサー活性に対するエフェクター T 細胞（例えば、CD⁺ CD⁺ T細胞）の感受性を増強するかもしれない。

【0046】

[0060] この目的のために、本発明は、ヒトGITRLの新規なマウスホモログのヌクレオチド配列及びアミノ酸配列を提供する。ヒトGITRLは同定されている（Kwon et al. (1999) J. Biol. Chem. 274: 6056-61；Gurney et al. (1999) Curr. Biol. 9: 215-18）；加えて、ごく最近、いくつかのグループは、マウスGITRリガンドのクローニングを報告した（Kim et al., 2003；Tone et al., 2003；Yu et al., 2003）。 10

【0047】

[0061] 一側面において、本発明は、ヒトGITRLの新規なマウスホモログのヌクレオチド配列、及びアミノ酸配列、そして、その活性な断片及び／又は融合タンパク質を提供する。本発明のGITRLポリヌクレオチドは、GITRLの発現を修飾するポリヌクレオチド、例えば、GITRLの発現を上方制御できるGITRLポリヌクレオチドを含む発現ベクター、及び／又はGITRLの発現を下方制御するアンチセンス及び／又はRNAi GITRLポリヌクレオチドを含む。細胞及び／又は動物におけるGITRLの発現を調節するそのようなポリヌクレオチドの使用はまた提供される。GITRLポリペプチドに加えて、本発明はまた、他のアゴニストポリペプチド、例えば、GITRLの活性な断片及び／又はGITRLを模倣することができ、即ち、エフェクターT細胞におけるGITR活性を含むGITRL融合タンパク質を提供する。GITRLポリヌクレオチドを含有するトランスフォームした宿主細胞及びトランスジェニック動物もまた本発明の範囲内である。 20

【0048】

[0062] 別の側面において、本発明の新規なマウスGITRLポリペプチドに特異的に結合する（即ち、ヒトGITRLに結合しない）抗体が提供される。具体的には、GITRLの活性を阻害する中和抗体（例えば、GITRの結合からGITRLを妨げる抗体）は提供される；これらの抗体は、GITRLの活性を中和する（即ち、GITRLを不効果にする）と言うことができる。本発明の中和抗体は、GITRL活性を阻害するGITRLに対する非ヒト及びヒト抗体、並びにGITRL活性を阻害する本発明の非ヒト抗体のキメラ化及び／又はヒト化バージョンを含む。抗体の半減期、安定性又はアフィニティを増加するように機能でき、又は抗体のエフェクター機能を修飾するように機能できる1以上の突然変異を有することができる拮抗性抗体もまた本発明の範囲内に含まれる。 30

【0049】

[0063] 本発明の別の側面は、GITRLポリヌクレオチド及びポリペプチドは、それらのヒトホモログを含むが限定されず、細胞、器官又は被験体のGITRの活性を調節することができる化合物を同定するために使用されるスクリーニングアッセイを提供する。本発明はまた、同定した化合物の効果を評価する方法を提供し、それにより、患者におけるT細胞の数を、同定した化合物の投与前後に決定する。加えて、本発明は、同定した化合物を用いて患者又は被験体を治療する方法を提供する。 40

【0050】

[0064] GITR活性を調節することができる試験化合物、例えば、GITRアゴニスト又はGITRアンタゴニストをスクリーニングする方法を提供することに加えて、本発明は、免疫系の不制御に関する障害、例えば、自己免疫疾患、炎症性疾患及び移植拒絶、そして癌及び感染症を診断し、予測し、それらの進行を監視する方法を提供する。

【0051】

[0065] GITRL及び本発明の関連する分子を用いるための方法はまた、本明細 50

書に開示され、免疫系の不制御に関する障害の療法治療のための作動性 G I T R 分子（即ち、G I T R L ポリヌクレオチド、G I T R L ポリペプチド、それらの活性な断片及び／又はそれらの活性なタンパク質、作動性小分子、及び作動性 G I T R 抗体）、及び拮抗性 G I T R 分子（即ち、G I T R L 阻害性ポリヌクレオチド、中和 G I T R 抗体、中和 G I T R L 抗体、拮抗性小分子、及び G I T R 融合タンパク質）を含む。例えば、自己免疫障害、移植拒絶、及び／又は他の炎症性疾患の危険にあるか、又はそれと診断された患者を治療する方法であって、G I T R アンタゴニスト、例えば、中和抗 G I T R L 抗体を患者に投与することを含む前記方法が提供される；また、癌又は感染症の危険にある患者か、又はそれと診断された患者を治療する方法であって、G I T R アゴニスト、例えば、G I T R L、その作動性融合タンパク質を投与することを含む方法が提供される。その代わりに、G I T R アゴニスト、例えば、G I T R L（その作動性融合タンパク質を含む）、又は G I T R アンタゴニスト、例えば、中和抗 G I T R L 抗体若しくは拮抗性 G I T R 融合タンパク質を投与を介してそれぞれ T 細胞の増殖を誘導し又は阻害する方法が提供される。同様に、CD 4⁺ CD 25⁺ T 細胞の存在下で T 細胞の抑制を遮断し又は増強する方法であって、G I T R アゴニスト、例えば、G I T R L（その作動性融合タンパク質を含む）、又は G I T R アンタゴニスト、例えば、中和抗 G I T R L 抗体をそれぞれ投与することを含む方法が提供される。G I T R L ポリペプチド及び関連する分子（そのアゴニスト融合タンパク質を含む）で処理した T 細胞群は、本発明の範囲内であり、そして、癌又は感染症を治療する方法において、患者に投与してもよい。処置の他の方法が提供され、自己免疫障害、炎症性疾患、又は移植拒絶の危険にある患者又はそれと診断された患者を、G I T R 活性を減少する作動性化合物で処理する方法を含み、そして、癌又は感染症の危険にある患者又はそれと診断された患者を G I T R 活性を増加する作動性化合物で処理する方法を含む。G I T R L ポリヌクレオチド、ポリペプチド及び関連する分子（作動性 G I T R L 融合タンパク質及び拮抗性抗 G I T R L 抗体を含む）を含む本発明の医薬組成物、例えば、ワクチンアジュバントはまた、本発明の範囲内である。本発明の方法は、G I T R L 及び G I T R に指向され、限定されてないが、マウス G I T R L 及び G I T R 及びそれらのホモログを含み；特に、これらのホモログの中にヒト G I T R L 及び G I T R が含まれる。
10
20

【0052】

G I T R L ポリヌクレオチド及びポリペプチド

30

[0066] 本発明は、G I R T に対する新規なリガンド（G I T R L）に関連する新規に単離し精製したポリヌクレオチド及びポリペプチドを提供する。本発明の遺伝子、ポリヌクレオチド、タンパク質、及びポリペプチドは、限定されないが、マウス G I T R L 及びそのホモログを含む。

【0053】

[0067] 例えば、本発明は、マウス G I T R L をコードする精製し単離したポリヌクレオチドを提供する。本発明の好ましい DNA 配列は、ゲノム、cDNA 及び化学的に合成した DNA 配列を含む。

【0054】

[0068] この新規なリガンドをコードする cDNA のヌクレオチド配列は、マウス G I T R L cDNA と称し、配列番号：1 に記載される。本発明のポリヌクレオチドはまた、ストリンジエントな条件下で、配列番号：1、又はその相補体にハイブリダイズし、及び／又は全長のマウス G I T R L の実質的な生物学的活性を保持するポリペプチド（即ち、活性な断片）をコードするポリヌクレオチドを含む。本発明のポリヌクレオチドはまた、少なくとも 21 個の連続するヌクレオチドを含む配列番号：1 に記載される配列の連続的な部分を含む。
40

【0055】

[0069] この新規なリガンドをコードするゲノム DNA（マウス G I T R L ゲノム DNA と称する）のヌクレオチド配列は、配列番号：3 に記載される。本発明のポリヌクレオチドはまた、ストリンジエントな条件下で、配列番号：3、又はその相補体にハイブ
50

リダイズするポリヌクレオチド、及び／又は全長のマウスG I T R Lの実質的な生物学的活性を保持するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。本発明のポリヌクレオチドはまた、少なくとも21個の連続するヌクレオチドを含む配列番号：3に記載する配列の連続的な部分を含む。

【0056】

[0070] マウスG I T R Lのアミノ酸配列は、配列番号：2に記載される。本発明のポリペプチドはまた、少なくとも7個の連続するアミノ酸を含む配列番号：2に記載の配列の連続的な部分を含む。本発明の好ましいポリペプチドは、全長のマウスG I T R Lの実質的な生物学的活性を保持する配列番号：2に記載の配列のいずれかの連続的な部分を含む。本発明のポリヌクレオチドはまた、上述したようなマウス起源のそれらのポリヌクレオチドに加えて、配列番号：2に記載されるアミノ酸配列又はその連続的な部分をコードするポリヌクレオチド、又は周知の遺伝子コードの縮重にのみによる上述したポリヌクレオチドとは異なるポリヌクレオチドを含む。10

【0057】

[0071] 本発明の単離したポリヌクレオチドは、開示したポリヌクレオチドをコードする配列に同一又は類似した配列を有する核酸を同定し、単離するためにハイブリダイゼーションプローブ及びプライマーとして使用してもよい。核酸を同定し、単離するためのハイブリダイゼーション方法には、ポリメラーゼ連鎖反応（P C R）、サザンハイブリダイゼーション、インサイチュハイブリダイゼーション及びノーザンハイブリダイゼーションが含まれ、当業者に周知である。20

【0058】

[0072] ハイブリダイゼーション反応は、異なるストリンジエントな条件で行うことができる。ハイブリダイゼーション反応のストリンジエンシーは、いずれか2つの核酸分子が互いにハイブリダイズするであろう困難性を含む。好ましくは、各々ハイブリダイズするポリヌクレオチドが、減じたストリンジエントな条件、より好ましくはストリンジエントな条件、及び最も好ましくは高ストリンジエントな条件下で、その対応するポリヌクレオチドにハイブリダイズする。ストリンジエンシーの条件の例は、下記の表1に示される：高度にストリンジエンシーな条件は、例えば、条件A - Fと同様に少なくともストリンジエントなものである；ストリンジエントな条件は、例えば、条件G - Lと同様に少なくともストリンジエントなものである；そして、減じたストリンジエンシーな条件は、例えば、条件M - Rと同様に少なくともストリンジエントな条件である。30

【0059】

【表1】

表1

ストリッジ ンシー条件	ポリヌクレオチド ハイブリッド	ハイブリッド長さ (bp) ¹	ハイブリダイゼーション 温度及びバッファー ²	洗浄温度及び バッファー ²
A	DNA:DNA	>50	65°C; 1X SSC -or- 42°C; 1X SSC, 50% ホルムアミド	65°C; 0.3X SSC
B	DNA:DNA	<50	T _B *; 1X SSC	T _B *; 1X SSC
C	DNA:RNA	>50	67°C; 1X SSC -or- 45°C; 1X SSC, 50% ホルムアミド	67°C; 0.3X SSC
D	DNA:RNA	<50	T _D *; 1X SSC	T _D *; 1X SSC
E	RNA:RNA	>50	70°C; 1X SSC -or- 50°C; 1X SSC, 50% ホルムアミド	70°C; 0.3X SSC
F	RNA:RNA	<50	T _F *; 1X SSC	T _F *; 1X SSC
G	DNA:DNA	>50	65°C; 4X SSC -or- 42°C; 4X SSC, 50% ホルムアミド	65°C; 1X SSC
H	DNA:DNA	<50	T _H *; 4X SSC	T _H *; 4X SSC
I	DNA:RNA	>50	67°C; 4X SSC -or- 45°C; 4X SSC, 50% ホルムアミド	67°C; 1X SSC
J	DNA:RNA	<50	T _J *; 4X SSC	T _J *; 4X SSC
K	RNA:RNA	>50	70°C; 4X SSC -or- 50°C; 4X SSC, 50% ホルムアミド	67°C; 1X SSC
L	RNA:RNA	<50	T _L *; 2X SSC	T _L *; 2X SSC
M	DNA:DNA	>50	50°C; 4X SSC -or- 40°C; 6X SSC, 50% ホルムアミド	50°C; 2X SSC
N	DNA:DNA	<50	T _N *; 6X SSC	T _N *; 6X SSC
O	DNA:RNA	>50	55°C; 4X SSC -or- 42°C; 6X SSC, 50% ホルムアミド	55°C; 2X SSC
P	DNA:RNA	<50	T _P *; 6X SSC	T _P *; 6X SSC
Q	RNA:RNA	>50	60°C; 4X SSC -or- 45°C; 6X SSC, 50% ホルムアミド	60°C; 2X SSC
R	RNA:RNA	<50	T _R *; 4X SSC	T _R *; 4X SSC

【0060】

¹ ハイブリッドの長さはハイブリダイズするポリヌクレオチドのハイブリダイズした領域について予期されるものである。未知な配列の標的ポリヌクレオチドにポリヌクレオチドをハイブリダイズする場合、ハイブリッドの長さはハイブリダイズするポリヌクレオチドのそれであると想定される。既知のポリヌクレオチドがハイブリダイズした場合、ハイブリッドの長さはポリヌクレオチドの配列を整列し、最適な配列相補性の領域（単数又は複数）を同定することによって決定され得る。

² S S P E (1×S S P E は 0.15 M NaCl、10 mM NaH₂PO₄、及び 1.25 mM EDTA、pH 7.4 である) は、ハイブリダイゼーション緩衝液及び洗浄緩衝液中の S S C と置換され得る；洗浄は、ハイブリダイゼーションが完了した後、15 分間実行する。

T_B* - T_R* : 50 塩基対より短い長さと想起されるハイブリッドについてのハイブリダイゼーション温度は、ハイブリッドの融解温度 T_m () よりも 5 - 10 低く、T_m は、次の式に従って決定される。18 塩基対より短い長さのハイブリッドについて、T_m () = 2 (A + T 塩基の #) + 4 (G + C 塩基の #)。18 と 49 塩基対の間の長さのハイブリッドについて、T_m () = 81.5 + 16.6 (log₁₀ Na⁺) + 0.4

10

20

30

40

50

1 (% G + C) - (600 / N)、ここで、Nは、ハイブリッドにおける塩基の数であり、Na⁺は、ハイブリダイゼーション緩衝液におけるナトリウムイオンの濃度である (1 × S S C の Na⁺ = 0.165 M)。

ポリヌクレオチドハイブリダイゼーションのストリンジエンシーな条件の追加例は、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、9及び11章、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、NY(1989)、及びAusubelら、編集、Current Protocols in Molecular Biology, Sects. 2.10 & 6.3 - 6.4、John Wiley & Sons, Inc. (1995)において提供され、参照により本明細書に援用される。 10

【0061】

[0073] 本発明の単離したポリヌクレオチドは、開示したポリヌクレオチドの対立遺伝子の変異体をコードする配列を有するDNAを同定し、単離するためのハイブリダイゼーションプローブ及びプライマーとして使用してもよい。対立遺伝子の変異体は、開示したポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドに同一であり、有意な類似性を有するポリペプチドをコードする開示したポリヌクレオチドの選択的形体を自然に発生している。好ましくは、対立遺伝子は、開示したポリヌクレオチドと少なくとも90%の配列同一性(より好ましくは、少なくとも95%の同一性;最も好ましくは少なくとも99%の同一性)を有する。 20

【0062】

[0074] 本発明の単離したポリヌクレオチドはまた、開示したポリヌクレオチドにホモロガスなポリペプチドをコードする配列を有するDNAを同定し、単離するためのハイブリダイゼーションプローブ及びプライマーとして使用してもよい。これらのホモロガスは、開示したポリペプチド及びポリヌクレオチドより異なる種から単離したポリヌクレオチド及びポリペプチドであり、又は同じ種内であり、しかし、開示したポリヌクレオチド及びポリペプチドに有意な配列類似性を有する。好ましくは、ポリヌクレオチドのホモログは、開示したポリヌクレオチドと少なくとも50%の配列同一性(より好ましくは、少なくとも75%の同一性;最も好ましくは、少なくとも90%の同一性)を有し、一方、ポリペプチドのホモログは、開示したポリペプチドと少なくとも30%の配列同一性(より好ましくは、少なくとも45%の同一性;最も好ましくは、少なくとも60%の同一性)を有する。好ましくは、開示したポリヌクレオチド及びポリペプチドのホモログは、哺乳動物種から単離したものである。 30

【0063】

[0075] 本発明の単離したポリヌクレオチドはまた、本発明のポリペプチドを発現する細胞及び組織、そして、それらが発現する条件を同定するためのハイブリダイゼーションプローブ及びプライマーとして使用してもよい。

【0064】

[0076] 加えて、本発明の単離したポリヌクレオチドは、細胞又は器官における本発明のポリヌクレオチドに対応する遺伝子の発現を変化(即ち、増強、減少、又は修飾)するために使用してもよい。これらの対応する遺伝子は、本発明のcDNAポリヌクレオチド(例えば、配列番号:1)が誘導されるmRNAを産生するために転写する本発明のゲノムDNA配列(例えば、配列番号:3)である。 40

【0065】

[0077] 本発明の遺伝子の変更した発現は、限定されないが、マウスGITRL及びそのホモログを含み、様々な阻害性ポリヌクレオチド、例えば、アンチセンス・ポリヌクレオチド(例えば、アンチセンスGITRL核酸分子)及び本発明の遺伝子から転写したmRNAに結合する及び/又は切断するリボザイムの使用を通じて細胞又は器官において達成してもよい(例えば、Galdéri et al. (1999) J. Cell Physiol. 181: 251-57; Sioud (2001) Curr. Mol. Med. 1: 575-88)。そのような阻害性ポリヌクレオチドは、自己免疫障害、 50

炎症性疾患、移植拒絶、及び類似又は関連する障害を予防し、又は治療するのに使用してもよい。

【0066】

[0078] 本発明のアンチセンス・ポリヌクレオチド又はリボザイムは、本発明の遺伝子の完全なコード鎖又はその部分だけに相補的であり得る。又は、アンチセンス・ポリヌクレオチド又はリボザイムは、本発明の遺伝子のコード鎖の非コード領域に相補的であり得る。アンチセンス・ポリヌクレオチド又はリボザイムは、当該技術分野において周知の手法を用いて化学的な合成及び酵素的連結反応を用いて構築することができる。化学的に合成したポリヌクレオチドのヌクレオシド連結は、それらの配列特異性を増加するのと同じく、ヌクレアーゼを介した分解に耐性となる能力を高めるために修飾することができる。そのような連結修飾は、限定されないが、ホスホロチオエート、メチルホスホネート、ホスホロアミデート、ボラノホスフェート、モルホリノ、及びペプチド核酸(PNA)連結を含む(Galderisi et al., 上述; Heasman (2002) Dev. Biol. 243: 209-14; Mickliefeld (2001) Curr. Med. Chem. 8: 1157-79)。又は、これらの分子は、本発明のポリヌクレオチドがアンチセンス(即ち、リバース)配向にサブクローニングされている発現ベクターを用いて生物学的に生産することができる。10

【0067】

[0079] 本発明の阻害性ポリヌクレオチドはまた、高い特異性及びアフィニティーで二重鎖DNAの大溝に結合する三重鎖形成性オリゴヌクレオチド(TFO)を含む(Knauert and Glazer (2001) Hum. Mol. Genet. 10: 2243-51)。本発明の遺伝子の発現は、遺伝子の制御領域に相補的なTFOを標的することによって阻害し、遺伝子の転写を妨げる三本のらせん構造を形成することができる。20

【0068】

[0080] 本発明の一態様において、本発明の阻害性ポリヌクレオチドは、短い干渉RNA(siRNA)分子(例えば、siRNA GITRL核酸分子)である。これらのsiRNA分子は、標的mRNAの配列特異的分解を引き起こす短い(好ましくは19-25ヌクレオチド;最も好ましくは19又は21ヌクレオチド)二本鎖RNA分子である。この分解は、RNA干渉(RNAi)として知られる(例えば、Bass (2001) Nature 411: 428-29)。より下等な生物において原始的に同定されたRNAiは、効果的に哺乳動物細胞に当てはまり、そして、最近、Fas mRNAに標的とされたsiRNA分子で処理したマウスにおいて急性肝炎を妨げることを示している(Song et al. (2003) Nature Med. 9: 347-51)。加えて、最近、髄膜に輸送されたsiRNAは、ラットにおける2つのモデル(アゴニスト誘導の痛みモデルと神経疾患の痛みモデル)での痛み応答を遮断することが報告されている(Dorn et al. (2004) Nucleic Acids Res. 32 (5): e49)。30

【0069】

[0081] 本発明のsiRNA分子は、2つの相補的な一本鎖RNA分子(1つは、標的mRNAの部分と適合する)と一緒にアニーリングすることによって(Fire et al., 米国特許第6,506,559号)、又は必要な二本鎖部分を生産するためにそれ自身で折り返す一本のらせんRNAの使用を通じて(Yu et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 6047-52)発生することができる。siRNA分子は、化学的に合成する(Elbashir et al. (2001) Nature 411: 494-98)又は一本鎖DNA鑄型を用いてインビトロ転写によって产生する(Yu et al., 上述)ことができる。又は、siRNA分子は、センス及びアンチセンスsiRNA配列を含有する発現ベクターを用いて、生物学的に、一次的(Yu et al., 上述; Sui et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 5515-20)又は安定に(P40

addison et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 99: 1443 - 48) 產生することができる。最近、初代ヒト細胞における標的 mRNA レベルの減少が、らせん RNA を発現し、さらに siRNA に加工されるアデノウイルスベクターを用いて、効率的で配列特異的な方法で示された (Arts et al. (2003) Genome Res. 13: 2325 - 32)。

【0070】

[0082] 本発明のポリヌクレオチドに標的とされる siRNA 分子は、当該技術分野において周知の基準に基づいて設計することができる（例えば、Elbashir et al. (2001) EMBO J. 20: 6877 - 88）。例えば、標的 mRNA の標的セグメントは、好ましくは、AA（最も好ましい）、TA、GA、又はCAで始まるべきである； siRNA 分子のGC比は、好ましくは、45 - 55 % であるべきである； siRNA 分子は、好ましくは、一列に3個の同じヌクレオチドを含有すべきではない； siRNA 分子は、好ましくは、一列に7個の混合したG / Cを含有すべきではない；そして、標的セグメントは、好ましくは、標的 mRNA のORF領域にあるべきであり、及び好ましくは、開始 ATG の後に少なくとも 75 bp であり、終止コドンの前に少なくとも 75 bp であるべきである。これらの基準、又は他の既知な基準（例えば、Reynolds et al. (2004) Nature Biotechnol. 22: 326 - 30）に基づいて、本発明の siRNA 分子は、本発明の mRNA ポリヌクレオチドに標的とされ、当業者によって設計され得る。

【0071】

[0083] 生物における本発明の遺伝子の変更した発現はまた、本発明のゲノムポリヌクレオチドが導入されている非ヒトトランスジェニック動物の創作を通して達成してもよい。そのようなトランスジェニック動物は、本発明の遺伝子（即ち、トランス遺伝子）の複数のコピーを有する動物を含む。組織特異的な制御配列は、特別な細胞又は特別な発生段階に本発明のポリペプチドの直接発現に対するトランス遺伝子に実施可能に連結してもよい。胚操作及びマイクロインジェクションによるトランスジェニック動物、具体的には、マウスのような動物を発生する方法は、当該技術分野において慣用的であり、周知である（例えば、Bockamp et al., Physiol. Genomics, 11: 115 - 32 (2002)）。

【0072】

[0084] 生物における本発明の遺伝子の変更した発現はまた、本発明のポリヌクレオチドに対応する内因性の遺伝子が、外因性のポリヌクレオチド配列の挿入を通じて崩壊する動物（即ち、ノックアウト動物）の創作を通じて達成してもよい。内因性の遺伝子のコード領域は崩壊してもよく、それによって、非機能性タンパク質を生じる。又は、内因性の遺伝子の上流の制御領域は、異なる制御要素で崩壊しても置換してもよく、依然として機能性タンパク質の変更した発現に帰着する。ノックアウト動物を発生する方法は、ホモロガス組換えを含み、当該技術分野において周知である（例えば、Wolfer et al., Trends Neurosci., 25: 336 - 40 (2002)）。

【0073】

[0085] 本発明の単離したポリヌクレオチドは、実施可能に、発現の対照配列に連結し、及び／又は本発明のポリペプチドの組換え的な産生のための発現ベクターに接続してもよい。組換えタンパク質を発現する一般的な方法は、当該技術分野において周知である。そのような組換えタンパク質は、免疫システムの非制御に起因する障害の治療に使用するために可溶形体で発現してもよい； そのような障害は、例えば、癌および感染症、及び自己免疫疾患や炎症性疾患、そして、移植拒絶を含む。自己免疫障害及び炎症性疾患は、限定されないが、慢性関節リウマチ、脳脊髄炎、骨関節炎、多発性硬化症、自己免疫胃炎、全身性紅斑性狼瘡、乾癬及び他の感染性皮膚病、I型糖尿病、喘息、アレルギー、並びにクローン病及び潰瘍性大腸炎を含む炎症性腸疾患を含む。

【0074】

[0086] 発現ベクターは、本明細書で使用されるように、連結される他の核酸を輸

10

20

30

40

50

送することができる核酸分子を意味するものと意図される。ベクターの1つの型はプラスミドであり、追加のDNAセグメントを接続してもよい環状の二本鎖DNAループを意味する。ベクターの別の型はウイルスベクターであり、追加のDNAセグメントはウイルスゲノムに接続してもよい。ある種のベクターは、それらが導入される宿主細胞において自発的に複製できる（例えば、細菌性複製起源を有する細菌性ベクター及びエピソーム哺乳動物ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター）は、宿主細胞への導入に応じて宿主細胞のゲノムに組み込むことができ、それにより、宿主のゲノムと一緒に複製される。さらに、ある種のベクターは、実施可能に連結されている遺伝子の発現に指向することができる。そのようなベクターは、本明細書では、組換え発現ベクター（又は、単純に発現ベクター）として言及される。一般的に、組換えDNA技術における用途の発現ベクターは、しばしばプラスミドの形体である。本明細書では、プラスミドは最も共通に使用されるベクターの形態であるため、プラスミド及びベクターは、相互に変えて使用することができる。しかしながら、本発明は、均等な機能を提供するウイルスベクター（例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス及びアデノ関連ウイルス）のような他の発現ベクターの形体を含むことを意図する。

【0075】

[0087] 一態様において、本発明のポリヌクレオチドは、GITRアゴニスト、例えば、GITRLポリペプチドを創作するために使用され、その活性な断片及び/又は融合ポリペプチドを含み、それらはまた本発明の範囲内にある。例えば、GITRLポリペプチド又はその活性な断片は、第二の部分、例えば、免疫グロブリン又はその断片（例えば、そのFc結合断片）に融合していくてもよい。いくつかの態様において、第一のポリペプチドは全長GITRLポリペプチドを含む。又は、第一のポリペプチドは、全長のGITRLポリペプチドよりも短いものを含んでもよい。加えて、GITRLの可溶形体は、「リンカー」配列を介して、免疫グロブリンのFc部分に融合してもよい。他の融合タンパク質、例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)、Lex-A、チオレドキシン(TRX)又はマルトース結合タンパク質(MBP)を有するものも使用してもよい。

【0076】

[0088] 融合タンパク質は、追加的に、GITRL又はGITRL断片を第二の部分につなぐリンカー配列を含んでもよい。そのようなリンカー配列の使用は、当該技術分野において周知である。例えば、融合タンパク質は、ペプチドリンカー、例えば、アミノ酸の長さにして約2ないし20、より好ましくは10未満のペプチドリンカーを含むことができる。一態様において、ペプチドリンカーは、2アミノ酸の長さであってもよい。

【0077】

[0089] 別の態様において、融合タンパク質は、そのN末端で異種のシグナル配列（即ち、GITRL核酸によってコードされるポリペプチドには存在しないポリペプチド配列）を含む。例えば、別のタンパク質からのシグナル配列は、GITRLポリペプチドと融合してもよく、その活性な断片及び/又は融合タンパク質を含む。ある種の宿主細胞（例えば、哺乳動物の宿主細胞）では、GITRLの発現及び/又は分泌は異種のシグナル配列を通じて増加され得る。

【0078】

[0090] 融合タンパク質に含むことができるシグナル配列は、MKFLVNVALVFMVVYISYIYA（配列番号：11）である。所望されれば、1以上のアミノ酸は、GITRL残基を含む第一のポリペプチド残基と第二のポリペプチド残基との間に追加的に挿入することができる。第二のポリペプチドは、好ましくは可溶性である。いくつかの態様では、第二のポリペプチドは、連結したポリペプチドの半減期（例えば、血清の半減期）を増加する。いくつかの態様では、第二のポリペプチドは、第二のGITRLポリペプチドとの融合ポリペプチドの関連を促進する配列を含む。好ましい態様において、第二のポリペプチドは、免疫グロブリンポリペプチドの領域を少なくとも含む。免疫グロブリン融合ポリペプチドは当該技術分野において既知であり、例えば、米国特許第5,50

16, 964号；第5, 225, 538号；第5, 428, 130号；5, 514, 582号；5, 714, 147号；及び、第5, 455, 165号に記載され、参照により本明細書に援用される。

【0079】

[0091] 本発明のキメラタンパク質又は融合タンパク質は、標準の組換えDNA手法によって产生することができる。例えば、異なるポリペプチド配列についてコードするDNA断片は、慣用的な手法、例えば、接続のための平滑末端処理した(b l u n t - e n d e d)又は付着末端処理した(stagger - end e d)末端の使用、適切な末端を与えるための制限酵素消化、所望されない接合を避けるための適切なアルカリホスファターゼ処理としての密着末端の代用、及び酵素的接続に従ってフレームを合わせて一緒に接続される。別の態様では、融合遺伝子は、自動化DNAシンセサイザーを含む慣用的な手法により合成することができる。又は、遺伝子断片のPCR増幅は、キメラ遺伝子配列を発生するために続いてアニール及び再増幅され得る2つの連続した遺伝子断片の間の相補的な突出に生じるアンカーブライマーを用いて実行することができる(例えば、Ausubel et al. (編集) CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, 1992を参照)。さらに、融合残基(例えば、免疫グロブリンの重鎖のFc領域)をコードする多くの発現ベクターは、商業的に利用できる。GITRLをコードする核酸は、融合残基が免疫グロブリンタンパク質にフレームを合わせて連結されるような発現ベクターにクローニングされ得る。いくつかの態様では、GITRL融合ポリペプチドは、オリゴマー、例えば、二量体又は三量体として存在する。10

【0080】

[0092] 多くの細胞株は、本発明のポリペプチドの組換え発現に対して適した宿主細胞として作用することができる。哺乳動物の宿主細胞株は、例えば、COS細胞、CHO細胞、293T細胞、A431細胞、3T3細胞、CV1細胞、HeLa細胞、L細胞、BHK21細胞、HL-60細胞、U937細胞、HaK細胞、Jurkat細胞、並びに初代組織及び初代組織片のインビトロ培養由来の細胞株を含む。20

【0081】

[0093] 又は、酵母のような下等な真核生物又は原核生物における本発明のポリペプチドを組換えて产生することができるかもしれない。潜在的に適した酵母株は、サッカロマイセス・セレビジア(Saccharomyces cerevisiae)、シユイゾサッカロマイセス・ポンベ(Schizosaccharomyces pombe)、クルイベロマイセス(Kluyveromyces)株、及びカンジダ株を含む。潜在的に適した細菌株は、大腸菌(Escherichia coli)、バチラス・サブリス(Bacillus subtilis)、及びネズミチフス菌(Salmonella typhimurium)を含む。本発明のポリペプチドが酵母又は細菌で作製されるならば、機能性を得るために、例えば、リン酸化又は糖付加によってそれらの修飾することが必要であるかもしれない。そのような共有結合物は、周知な化学的又は酵素的方法を用いて達成することができる。30

【0082】

[0094] 細菌の発現は、組換えタンパク質を取り入れている封入体の形成に帰着してもよい。つまり、組換えタンパク質のリフォルディングは、活性またはより活性な物質を产生するために要求してもよい。細菌の封入体由来の正しく折り畳まれた異種タンパク質を得るいくつかの方法は、当該技術分野において既知である。これらの方法は、一般的に、封入体からタンパク質を可溶化すること、次いで、カオトロピック(chaotropotropic)試薬を用いて完全にタンパク質を変性することに関する。システイン残基がタンパク質の一次アミノ酸配列に存在する場合、しばしば、ジスルフィド結合の正しい形成を許す環境下でのリフォルディングを達成することが必要である(レドックスシステム)。リフォルディングの一般的な方法は、Kohno(1990)Meth. Enzymol. 1.185: 187-95に開示される。欧州0433225、及び特許出願米国シリアル. 185: 187-95に開示される。40

ル第 0 8 / 1 6 3 , 8 7 7 は、他の適切な方法を記載する。

【 0 0 8 3 】

[0 0 9 5] 本発明のポリペプチドはまた、本発明の単離したポリペプチドを、1以上の昆虫発現ベクター、例えば、バキュロウイルスベクターにおける適切な対照配列に実施可能に連結し、そして、昆虫細胞発現システムを使用することによって組換え的に產生してもよい。バキュロウイルス / S f 9 発現システムについての材料と方法は、キットの形体で商業的に利用可能である（例えば、MaxBac（登録商標）キット、Invitrogen, Carlsbad, CA）。

【 0 0 8 4 】

[0 0 9 6] GITRアゴニスト、例えば、GITRLタンパク質、その活性な断片及び／又は融合タンパク質は、所望のタンパク質を発現するために必要な培養条件で培養のトランスフォームした宿主細胞を成長することによって調製してもよい。適した宿主細胞における組換え発現に統いて、本発明のポリペプチドは、次いで、培養液又は細胞抽出物から既知の精製手法、例えば、ゲルろ過及びイオン交換クロマトグラフィーを用いて精製してもよい。GITRアゴニスト、例えば、GITRLタンパク質、その活性な断片及び／又は融合タンパク質の可溶形体は、コンディション培地から精製することができる。例えば、本発明のGITRLタンパク質の膜結合形体は、発現細胞からの全膜画分を調製し、及び、Triton X-100のような非イオン性の界面活性剤で膜を抽出することによって精製することができる。精製はまた、本発明のポリペプチドに結合するために既知の試薬を用いたアフィニティーコロマトグラフィーを含んでもよい。これらの精製過程はまた、天然源を含む他の供給源から本発明のポリペプチドを精製するために使用してもよい。前述したように、GITRアゴニスト、例えば、GITRLタンパク質、その活性な断片及び／又は融合タンパク質はまた、トランスジェニック動物の産物として、例えば、トランスジェニックウシ、ヤギ、ブタ、又はヒツジのミルクの成分として発現してもよく、GITRアゴニストをコードするポリヌクレオチド配列を含有する体細胞又は生殖細胞によって特徴付けられる。

【 0 0 8 5 】

[0 0 9 7] GITRアゴニスト、例えば、GITRLタンパク質、その活性な断片及び／又は融合タンパク質を精製するために使用することができる方法は、当業者に既知である。例えば、本発明のGITRLタンパク質は、商業的に利用可能なタンパク質濃縮フィルター、例えば、Amicon又はMillipore Pelliconウルトラろ過ユニットを用いて濃縮してもよい。濃縮工程の後、濃縮物を精製マトリックス、例えば、ゲルろ過媒体に供することができる。又は、アニオン交換樹脂を使用することができ、例えば、ペンダント・ジエチルアミノエチル(DEAE)又はポリエチレンイミン(PEI)基である。マトリックスは、アクリルアミド、アガロース、デキストラーン、セルロース又はタンパク質精製に共通して使用される他のタイプであり得る。又は、陽イオン交換工程を使用することができる。適した陽イオン交換器は、スルホプロピル又はカルボキシメチル基を含む様々な不溶性マトリックスを含む。スルホプロピル基が好ましい（例えば、S-セファロース（登録商標）カラム）。GITRアゴニスト、例えば、GITRLタンパク質、その活性な断片及び／又は融合タンパク質の培養上清からの精製はまた、コンカナバリンA-アガロース、ヘパリン-トヨパール（登録商標）若しくはチバクロンブルー-3GAセファロース（登録商標）のようなアフィニティー樹脂を通す；又は、フェニルエーテル、ブチルエーテル、若しくはプロピルエーテルのような樹脂を用いる疎水性相互作用クロマトグラフィーによる；又はイムノアフィニティーコロマトグラフィーによる1以上のカラム工程を含んでもよい。最後に、疎水性RP-HPLC媒体、例えば、ペンダントメチル又は他の脂肪族基を有するシリカゲルを使用する1以上の逆相高性能液体クロマトグラフィー(RP-HPLC)工程は、GITRLタンパク質をさらに精製するために使用することができる。GITRLタンパク質に対する抗体を含むアフィニティーカラムはまた、既知の方法に従って精製に使用することができる。前述の精製工程のいくつか又は全部はまた、様々な組合せ又は他の既知の方法で、実質的に精製した単離した組換

10

20

30

40

50

えタンパク質を提供するために使用することができる。好ましくは、単離した G I T R L タンパク質は、他の哺乳動物タンパク質を実質的ないように精製する。

【 0 0 8 6 】

[0 0 9 8] 又は、 G I T R アゴニスト、例えば、 G I T R L タンパク質、その活性な断片及び／又は融合タンパク質はまた、精製を促進する形体で組換え的に発現してもよい。例えば、ポリペプチドは、タンパク質、例えば、マルトース結合タンパク質 (M B P) 、グルタチオン - S - トランスフェラーゼ (G S T) 、又はチオレドキン (T R X) との融合物として発現してもよい。そのような融合タンパク質の発現及び精製のキットは、それぞれ、 New England Biolabs (Beverly , MA) 、 Pharamacia (Piscataway , NJ) 、及び Invitrogen から商業的に利用可能である。 G I T R アゴニスト、例えば、 G I T R L タンパク質、その活性な断片及び／又は融合タンパク質はまた、小さなエピトープでタグが付され、その後、エピトープに対する特異的な抗体を用いて同定及び精製することができる。好ましいエピトープは、 FLAG エピトープであり、 Eastman Kodak (New Haven , CT) から商業的に利用可能である。10

【 0 0 8 7 】

[0 0 9 9] G I T R アゴニスト、例えば、 G I T R L タンパク質、その活性な断片及び／又は融合タンパク質はまた、既知の慣用的な化学合成によって产生してもよい。そのようなポリペプチドを化学的に合成する方法は、当業者に周知である。そのような化学合成のポリペプチドは、天然の精製したポリペプチドと共に生物学的性質を有し、このように、天然のポリペプチドに対して生物学的に活性な又は免疫学的な置換体として使用してもよい。20

【 0 0 8 8 】

[0 1 0 0] G I T R アゴニスト、例えば、 G I T R L タンパク質、その活性な断片及び／又は融合タンパク質はまた、開示されたポリペプチドとは構造的に異なる分子（例えば、僅かに変更した配列を有する）を包含するが、しかし、開示されたポリペプチドと同様な生化学的な性質を実質的に有する（例えば、機能的に非必須アミノ酸残基だけが変化している）。そのような分子は、天然に発生する対立遺伝子の変異体を含み、そして、変更、代用、置換、挿入、又は欠損を含有する意図的に処理した変異体を含む。そのような変更、代用、置換、挿入、又は欠損のための手法は、当業者にとって既知である。いくつかの態様において、 G I T R L ポリペプチド残基は、タンパク質分解により耐性な G I T R L 配列（突然変異していない配列と比較して）に帰着する天然に発生する G I T R L 配列（野生型）における突然変異を有する変異の G I T R L ポリペプチドとして提供される。30

【 0 0 8 9 】

[0 1 0 1] 本明細書に開示される、 G I T R アゴニスト、例えば、 G I T R L 、その活性な断片及び／又は融合タンパク質の発生の方法は、 G I T R アンタゴニスト、特に可溶性 G I T R タンパク質、その活性な断片及び／又は融合タンパク質を発生するために使用してもよい。当業者は、 G I T R アンタゴニスト、例えば、可溶性 G I T R 、その活性な断片、及び／又はその融合タンパク質を発生するために要求されるであろうすべてのものは、 G I T R の核酸配列又はアミノ酸配列であり、その両方は既知であることを認識するであろう。これらの配列を用いて、 G I T R アンタゴニスト、例えば、可溶性 G I T R 、その活性な断片、及び／又はその融合タンパク質は、上述したように、組換え D N A 手法及び／又は化学的合成を用いて発生してもよい。40

【 0 0 9 0 】

抗 G I T R L 抗体

[0 1 0 2] 他の態様において、本発明は、 G I T R L 、好ましくは、哺乳動物（例えば、マウス） G I T R L に特異的に結合し、 G I T R 活性を中和する抗体、又はその抗原結合断片として G I T R アンタゴニストを提供する。

【 0 0 9 1 】

50

[0103] 当業者は、本明細書に使用されるように、用語「抗体」は少なくとも1つの、及び好ましくは2つの、重(H)鎖可変領域(本明細書では、VHとして略す)、及び少なくとも1つの、及び好ましくは2つの軽(L)鎖可変領域(本明細書では、VLとして略す)を含むタンパク質を意味する。VH及びVL領域はさらに、超可変領域の領域に再分割することができ、「相補性決定領域」('CDR')と呼ばれ、「フレームワーク領域」('FR')と呼ばれる、より保存されている領域で混在される。FR及びCDRの範囲は、正確に定義されている(Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, 及びChothia, C. et al. (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917を参照。これらは参考により本明細書に援用される)。各々のVH及びVLは、3つのCDRと4つのFRから構成され、アミノ末端からカルボキシ末端へと次の順番: FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4で配列している。

【0092】

[0104] 抗体はさらに、重鎖及び軽鎖の定常領域を含み、それによって、それぞれ、重及び軽イムノグロブリン鎖を形成する。一態様では、抗体は、2つの重イムノグロブリン鎖と2つの軽イムノグロブリン鎖の4量体であり、ここで、重及び軽イムノグロブリン鎖は、例えば、ジスルフィド結合によって内部連結される。重鎖の定常領域は、3つのドメイン、CH1、CH2及びCH3から構成される。軽鎖の定常領域は、1つのドメイン、CLから構成される。重鎖及び軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。抗体の定常領域は、典型的には、宿主組織又は因子に対する抗体の結合を仲介し、免疫系の様々な細胞(例えば、エフェクター細胞)及び古典的な成分系の第一成分(C1q)を含む。

【0093】

[0105] 免疫グロブリンは、免疫グロブリン遺伝子に実質的にコードされる1以上のポリペプチドから成るタンパク質を意味する。認識されたヒト免疫グロブリン遺伝子は、カッパ、ラムダ、アルファ(IgA1及びIgA2)、ガンマ(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、デルタ、イプシロン及びミュー定常領域遺伝子、並びに無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子を含む。全長の免疫グロブリン「軽鎖」(約25Kd、又は214個のアミノ酸)は、NH2末端(約110個のアミノ酸)の可変領域及びCOOH末端のカッパ又はラムダ定常領域によりコードされる。全長の免疫グロブリン「重鎖」(約50Kd、又は446個のアミノ酸)は、同様に、可変領域遺伝子(約116個のアミノ酸)及び他の前述した定常領域遺伝子、例えば、ガンマ(約330個のアミノ酸をコードする)によりコードされる。免疫グロブリンの重鎖の定常領域遺伝子は、抗体クラス、即ち、アイソタイプ(例えば、IgM又はIgG1)についてコードする。抗体の抗原結合断片(又は単に「抗体部分」又は「断片」)は、本明細書で使用されるように、抗原(例えば、CD3)に特異的に結合する能力を保持する全長の抗体の1以上の断片を意味する。抗体の用語「抗原結合断片」に包含される結合断片の例は、(i)Fab断片、VL、VH、CL及びCH1ドメインから成る一価の断片；(ii)F(ab')₂断片、ヒンジ領域でジスルフィド架橋により連結される2つのFab断片を含む二価の断片；(iii)VH及びCH1ドメインから成るFd断片；(iv)抗体の一本の腕のVL及びVHドメインから成るFv断片；(v)VHドメインから成るdAb断片(Ward et al., (1989) Nature 341: 544-46)；及び(vi)単離した相補性決定領域(CDR)を含む。さらに、Fv断片、VL及びVHの2つのドメインは別々の遺伝子によってコードされるが、それらは、組換え方法を用いて、一価の分子(一本鎖Fv(scFv))として知られる；Bird et al. (1998) Science 242: 423-26；及びHuston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-83を参照)を形成するために

10

20

30

40

50

V L 及び V H 領域が対となる一本のタンパク質鎖として調製することができる合成のリンカーポリペプチドによって接続することができる。そのような一本鎖の抗体はまた、抗体の用語「抗原結合断片」に包含されることが意図される。これらの抗体の断片は、当業者に知られる慣用的な手法を用いて得られ、そして、断片は、そのままの抗体であるのと同じ方法で用途についてスクリーニングされる。

【0094】

[0106] 当業者は、本発明のポリペプチド、例えば、マウスの G I T R L に対する抗体の発生について本明細書に開示した方法が、他のタンパク質、例えば、G I T R 又はヒト G I T R L に対する抗体分子を発生するために使用することができることを認識するであろう。結果として、抗体分子を発生する方法は、開示されるような本発明のポリペプチドだけでなく、例えば、G I T R 又はヒト G I T R L に適用する。10

【0095】

[0107] 本発明のポリペプチドの抗体分子、例えば、マウス G I T R L に対する中和抗体は、限定されないが、マウス G I T R L 及びそのホモログを含み、自己免疫障害、炎症性疾患、移植拒絶、及び同様の又は関連する障害を予防し又は治療するために使用してもよい。他の抗体分子、例えば、アゴニスト G I T R 抗体は、癌、感染症、及び同様の及び関連する障害を治療するための本発明の方法に使用してもよい。そのような抗体分子は、当業者に周知の方法によって生産してもよい。例えば、モノクローナル抗体は、既知の方法に従ってハイブリドーマの発生により生産することができる。この手法により形成されるハイブリドーマは、次いで、標準的な方法、例えば、酵素連結免疫溶媒アッセイ (ELISA) を用いてスクリーニングし、本発明のポリペプチドで特異的に結合する抗体を生産する 1 以上のハイブリドーマを同定する。例えば、本発明の G I T R L タンパク質はまた、G I T R L タンパク質と特異的に反応し、そして、受容体、即ち、G I T R に対するリガンドの結合を阻害してもよいポリクローナル及びモノクローナル抗体を得る動物を免疫するために使用してもよい。同様に、G I T R タンパク質はまた、G I T R と特異的に反応するポリクローナル及びモノクローナル抗体を得るために使用してもよい。加えて、ペプチド免疫原は、カルボキシル末端にシステイン残基を含有してもよく、そして、カサガイ (key hole limpet) ヘモシアニン (KLH) のようなハプテンに結合させる。追加のペプチド免疫原は、チロシン残基を硫酸化したチロシン残基で置換することによって発生してもよい。そのようなペプチドを合成するための方法は、当該技術分野において既知であり、例えば、Merrifield (1963) J. Amer. Chem. Soc. 85: 2149-54; Krstenansky et al. (1987) FEBS Lett. 211: 10 に記載される。本発明の全長のポリペプチドは、免疫原として使用してもよく、又は、その代わりに、ポリペプチドの抗原ペプチド断片を使用してもよい。本発明のポリペプチドの抗原ペプチドは、少なくとも 7 個の連続するアミノ酸残基を含み、ペプチドに対して生じた抗体がポリペプチドと特異的な免疫複合体を形成するようにエピトープを包含する。好ましくは、抗原ペプチドは、少なくとも 10 個のアミノ酸残基、より好ましくは少なくとも 15 個のアミノ酸残基、さらにより好ましくは少なくとも 20 個のアミノ酸残基、及び最も好ましくは 30 個のアミノ酸残基を含む。30

【0096】

[0108] モノクローナル抗体は、組換え DNA 技術の当業者に既知の他の方法によって発生してもよい。モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを調製する代替として、本発明のポリペプチドに対するモノクローナル抗体は、本発明のポリペプチド（例えば、G I T R L ）又は G I T R を用いて組換えコンビナトリアル免疫グロブリンライブラリー（例えば、抗体ファージディスプレイライブラリー）をスクリーニングすることによって同定し、単離してもよく、それによって本発明のポリペプチド、又は G I T R にそれぞれ結合する免疫グロブリンライブラリーメンバーを単離する。ファージディスプレイライブラリーを生成し、スクリーニングするための手法及び商業的に利用可能なキットは、当業者にとって既知である。加えて、抗体ディスプレイライブラリーを発生し、スクリー4050

ニングするための使用に具体的に受け入れやすい方法及び試薬の例は、文献に見出すことができる。例えば、「コンビナトリアル抗体ディスプレイ」方法は、特定の抗原特異性を有する抗体断片を同定し、単離するために開発され、そして、モノクローナル抗体を生産するために利用することができる（コンビナトリアル抗体ディスプレイの記載については、例えば、Sastry et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 3833; Huse et al. (1989) Science 246: 1275; Orlandi et al. 1989 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 3833を参照）。動物を上述したような抗原で免疫した後、結果として生じるB細胞プールの抗体レパートリーがクローニングされる。オリゴマープライマーの混合物及びPCRを使用することによって、免疫グロブリン分子の多様な母集団の可変領域のDNA配列を得るために既知である。例えば、5'リーダー（シグナルペプチド）配列及び/又はフレームワーク1（FR1）配列に対応する混合したオリゴヌクレオチドプライマー、並びに保存された3'定常領域に対するプライマーは、いくつかのマウス抗体由来の重鎖及び軽鎖の可変領域のPCR增幅のために使用することができる（Larrick et al. (1991) Biotechniques 11: 152-56）。同様の戦略はまた、ヒト抗体由来のヒト重鎖及び軽鎖の可変領域を増幅するために使用することができる（Larrick et al. (1991) Methods: Companion to Methods in Enzymology 2: 106-110）。

【0097】

10

[0109] ポリクローナル血清及び抗体は、本発明のポリペプチドを用いて適切な対象を免疫することによって生産してもよい。免疫した対象における抗体の力価は、標準的な手法、例えば、固相化したマーカータンパク質を用いるELISAを用いて経時的に経過をみてもよい。所望により、本発明のポリペプチドに対して指向される抗体分子は、対象又は培養の媒体から単離し、さらに周知の手法、例えば、プロテインAクロマトグラフィーによって精製し、IgG分画を得てもよい。

【0098】

20

[0110] 本発明のポリペプチドに対する抗体の断片は、当該技術分野において周知の方法に従って、抗体の切断によって生産してもよい。例えば、免疫学的に活性なFab及びF(ab')₂断片は、ペプシンのような酵素を用いて抗体を処理することにより発生してもよい。

30

【0099】

[0111] 加えて、本発明のポリペプチドに対するキメラのヒト化した及び一本鎖の抗体は、ヒト及びヒト以外の部分を含み、標準的な組換えDNA手法及び/又は組換えコンビナトリアル免疫グロブリンライブラリーを用いて生産してもよい。ヒト化した抗体はまた、内因性の免疫グロブリンの重鎖及び軽鎖遺伝子を発現せず、ヒトの重鎖及び軽鎖遺伝子を発現することができるトランスジェニックマウスを用いて生産してもよい。例えば、作動性GITRLに指向されるヒトモノクローナル抗体(mAb)は、マウスの免疫グロブリン遺伝子よりヒト免疫グロブリン遺伝子を運搬するトランスジェニックマウスを用いて生産してもよい。次いで、興味のある抗体で免疫したこれらのトランスジェニックマウス由来の脾臓細胞を使用して、ヒトタンパク質由来のエピトープについての特異的アフィニティーを有するヒトmAbを分泌するハイブリドーマを生産するために用いてもよい（例えば、Wood et al., WO91/00906; Kucherlapati et al., WO91/10741; Longberg et al., WO92/03918; Kay et al., WO92/03917; Lonberg et al. (1994) Nature 368: 856-59; Green et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-55; Bruggeman (1993) Year Immunol 7: 33-40; Tuaillo et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 50

40

50

3720-24; Bruggeman et al. (1991) Eur. J. Immunol. 21: 1323-26を参照)。

【0100】

[0112] キメラ抗体は、キメラ免疫グロブリン鎖を含み、当該技術分野において既知の組換えDNA手法により生産することができる。例えば、マウス(又は他の種)モノクローナル抗体分子のFc定常領域をコードする遺伝子は、マウスFcをコードする領域を除去するために制限酵素で消化し、そして、ヒトFc定常領域をコードする遺伝子の均等な部分を置換する(Robinson et al., 国際特許公開PCT/US86/02269; Akira, et al., 欧州特許出願184,187; Taniguchi, 欧州特許出願171,496; Morrison et al., 欧州特許出願173,494; Neuberger et al., WO86/01533; Cabilly et al., 米国特許第4,816,567号; Cabilly et al., 欧州特許出願125,023; Better et al. (1988) Science 240:1041-43; Liu et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-43; Liu et al. (1987) J. Immunol. 139:3521-26; Sun et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-18; Nishimura et al. (1987) Cancer Res. 47:999-1005; Wood et al. (1985) Nature 314:446-49; 及びShaw et al. (1988) J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-59)。
。

【0101】

[0113] 抗体又は免疫グロブリン鎖は、当該技術分野において既知の方法によってヒト化してもよい。ヒト化した抗体は、ヒト化した免疫グロブリン鎖を含み、抗原の結合に直接関係しないFv可変領域の配列をヒトFv可変領域由来の均等な配列で置換することによって発生してもよい。ヒト化抗体を発生する一般的な方法は、Morrison (1985) Science 229:1202-07; Oi et al. (1986) Biotechniques 4:214; Queen et al., 米国特許第5,585,089号; 第5,693,761号; 第5,693,762号により提供され、これらの内容は全て参照により本明細書に援用される。それらの方法は、少なくとも1つの重鎖及び軽鎖由来の免疫グロブリンFv可変領域の全て又は一部をコードする核酸配列を単離し、操作し、そして発現することを含む。そのような核酸配列の供給源は、当業者に周知であり、例えば、方向付けされた標的に対する抗体を生産するハイブリドーマから得てもよい。ヒト化抗体、又はその断片をコードする組換えDNAは、次いで、適切な発現ベクターにクローニングすることができる。

【0102】

[0114] ヒト化若しくはCDRグラフト化抗体分子又は免疫グロブリンは、CDRグラフトинг又はCDR置換により生産してもよく、ここで、免疫グロブリン鎖の1個、2個、又は全てのCDRは、置換することができる。例えば、米国特許第5,225,539号; Jones et al. (1986) Nature 321:552-25; Veyhoeyan et al. (1988) Science 239:1534; Beidler et al. (1988) J. Immunol. 141:4053-60; Winter, 米国特許第5,225,539号を参照し、全ての内容は、参照により本明細書に援用される。Winterは、本発明のヒト化抗体を調製するために使用してもよいCDRグラフトинг方法を記載し(英国特許出願GB2188638A; Winter, 米国特許第5,225,539号)、その内容は参照により本明細書に援用される。特定のヒト抗体の全て又はCDRは、ヒトでないCDRの少なくとも一部で置換してもよく、又は、CDRのいくつかのみがヒトでないCDRで置換してもよい。方向付けされた抗原に対するヒト化抗体の結合について要求されるCDRの数を置換することは、唯一必要である。

【0103】

[0115] 抗体の他の部分、例えば、定常領域を、例えば、欠失、付加、又は置換することによって修飾されているモノクローナル、キメラ及びヒト化抗体はまた、本発明の範囲内にある。例えば、抗体は、(i) 定常領域を欠失することによって；(ii) 定常領域を他の定常領域、例えば、抗体の半減期、安定性、又はアフィニティーを増加しようとする定常領域、又は別の種若しくは抗体クラス由来の定常領域と置換することによって；又は(iii) 例えば、グリコシル化部位の数、エフェクター細胞機能、Fc受容体(FcR)結合、補体の固定などを変更するための定常領域における1以上のアミノ酸を修飾することによって、修飾することができる。

【0104】

10

[0116] 抗体の定常領域を変更する方法は、当該技術分野において既知である。変更した機能、例えば、細胞上のFcRのようなエフェクターリガンド又は補体のC1成分についての変更したアフィニティーを有する抗体は、抗体の定常部分の少なくとも1つのアミノ酸残基を異なる残基で置換することによって生産することができる（例えば、EP 388,151A1、U.S.5,624,821及びU.S.5,648,260を参照し、全ての内容は、参照により本明細書に援用される）。マウス（又は他の種）免疫グロブリンへの同様のタイプの変更は、これらの機能を減少し、又は削除するために適用してもよい。そのような変更は、当該技術分野において既知である。

【0105】

20

[0117] 例えば、FcR（例えば、FcガンマR1）又はC1qについての抗体（例えば、ヒトIgGのようなIgG）のFc領域のアフィニティーを、特定の残基を側鎖上の適切な機能を有する残基で置換することによって、又はグルタミン酸若しくはアスパラギン酸のような荷電した機能基、又はフェニルアラニン、チロシン、トリプロファンもしくはアラニンを導入することによって変更することができる（例えば、U.S.5,624,821を参照）。

【0106】

[0118] 本発明の抗GITRL抗体は、上清、細胞溶解物中の、又は細胞表面上のGITRLポリペプチドを単離し、精製し、及び／又は同定するために使用してもよい。本発明において開示される抗体はまた、臨床試験法の一部としてGITRLタンパク質レベルを監視するために診断的に使用することができ、又は、GITRL抗体の抗原を含む細胞若しくは組織に対する治療的モジュレーターを標的とするために臨床的に使用することができる。例えば、本発明の小分子のような治療薬、又は他の治療薬は、GITRLを発現する細胞又は組織に対する治療薬を標的とするために、GITRL抗体に連結することができる。GITRLタンパク質に結合する中和及び非中和抗体（好ましくはモノクローナル抗体）はまた、免疫システムの不制御に関する状態、例えば、自己免疫疾患の治療に有用であってもよい。これらの中和モノクローナル抗体は、GITRに結合するGITRLを遮断することができるかもしれない。本発明はさらに、GITRLと特異的に反応する抗体を含む組成物を提供する。同様に、抗GITR抗体は、GITRを単離し、精製し及び／又は検出するために、又はGITRを含む細胞又は組織に対する治療的モジュレーターを臨床的に標的とするために有用であってもよい。GITRに対する作動性抗体（好ましくはモノクローナル抗体）はまた、免疫系の不制御に関する状態、例えば、癌又は感染症の治療に有用であってもよい。これらの作動性抗体は、GITR活性を誘導することができてもよい。このように、本発明はさらに、GITRに対する抗体を含む組成物を提供する。

30

【0107】

40

GITRLスクリーニングアッセイ

[0119] 本発明のポリヌクレオチド及びポリペプチドは、細胞又は生物体においてGITRLの活性、及びそれによるGITRを調節することができ、及びそれによる免疫応答の潜在的な制御因子である薬学的な試薬、又は試薬のためのリード化合物を同定するためのスクリーニングアッセイにおいて使用してもよい。例えば、GITRLを含有する

50

試料（天然又は組換えのいずれか）は、多種の試験化合物（生物学的試薬又は小有機分子）の1つと接触することができ、そして、処置した試料の各々におけるG I T R Lの活性は、異なる試験化合物と接触させていない試料又は接触させた試料におけるG I T R Lの活性と比較することができる。そのような比較は、いずれかの試験化合物が、1) G I T R Lの発現又は活性のレベルの実質的な減少、それによるG I T R L（例えば、免疫抑制を保持し又は増強する化合物）の阻害剤を示唆する；又は2) G I T R Lの発現又は活性のレベルの実質的な増加、それによるG I T R L（例えば、免疫抑制を復活する化合物）の活性因子を示唆する、に帰着するかどうかを決定するであろう。一態様において、G I T R L活性を調節することができる試験化合物の同定は、ハイスループットスクリーニングアッセイ、例えば、B I A C O R E（登録商標）（B i a c o r e I n t e r n a t i o n a l A B , U p p s a l a , S w e d e n）、B R E T（バイオルミネッセンス・レゾナンス・エネルギー移動）、及びF R E T（蛍光レゾナンス・エネルギー移動）アッセイ、並びにE L I S A及びセルベースドアッセイを用いて実行される。

【0108】

小分子

[0120]自己免疫障害、炎症性疾患、又は移植拒絶に悩まされている（又はその危険がある）生物体（又は患者）における、又はそのような障害に関係するそのような生物体（又は患者）由来の細胞におけるG I T R活性の減少はまた、G I T Rを拮抗する、即ちその活性を阻害する小分子（通常、有機小分子）の使用を通じて達成してもよい。新規な拮抗性小分子は、上述のスクリーニング方法によって同定してもよく、そして、下記の本発明の処置方法において使用してもよい。反対に、癌又は感染症に悩まされている（又はその危険がある）生物体（又は患者）における、又はそのような障害に関係するそのような生物体（又は患者）由来の細胞におけるG I T R活性の増加はまた、G I T Rを作動する、即ちその活性を増強する小分子（通常、有機小分子）の使用を通じて達成してもよい。新規な作動性小分子は、上述のスクリーニング方法によって同定してもよく、そして、下記の癌及び／又は炎症性疾患を治療する方法において使用してもよい。

【0109】

自己免疫障害及び癌の診断、予測、及びその経過の監視のための方法

[0121]動物モデル、具体的にはマウスモデルにおいて研究されている免疫学的メカニズムは、ヒトの免疫システムに翻訳可能であってもよく、そしてしばしば翻訳可能であることは当該技術分野において周知である。このように、本明細書において開示される実施例は、マウスモデルでのC D 4⁺ C D 2 5⁺制御細胞による免疫抑制におけるG I T Rの役割を示すけれども、例えば、自己免疫障害、炎症性障害及び移植拒絶、並びに癌及び感染症のような免疫システムの非制御に関わる障害を診断し、予測し、及び監視する開示した方法は、ヒトにおけるそのような障害を診断し、予測し及び監視するために特に有用であろう。開示した方法の実施において、当業者は、G I T R及びG I T R Lのヒトホモログ、並びにヒトG I T Rアゴニスト及びアンタゴニストが、ヒトにおけるそのような障害を診断し、予測し、及び監視する請求した方法において使用してもよいことを認識するであろう。

【0110】

[0122]本発明は、G I T R活性の上方制御を検出すること、例えば、G I T R Lの上方制御を検出することによって、患者における自己免疫障害（例えば、G I T R Lのレベルの増加に直接的又は間接的に関連する）の診断、予測、及びその過程の監視の方法を提供し、限定されないが、ヒト患者におけるそのような方法の使用を含む。当業者は、これらの方法が、同様に炎症性疾患及び移植拒絶に適用し得ることを認識するであろう。これらの方法は、G I T R Lポリヌクレオチド又はその断片、G I T R Lポリペプチド又はその部分（その融合タンパク質を含む）、又はG I T R Lに対する抗体若しくはその誘導体、又はG I T R Lポリヌクレオチドの調節因子及び／又は本明細書に記載されるポリペプチドを含むグループの少なくとも1つを含むプレパック診断キットを利用することによって実行してもよく、例えば、臨床の場で慣用的に使用してもよい。加えて、当業者は

10

20

30

40

50

、G I T R Lの上方制御がまた、免疫細胞の数をカウントするような間接的な方法によって検出できることも認識したであろう。

【0111】

[0123] 「診断」又は「診断すること」は、病理学的状態の存在又は不在を同定することを意味する。診断方法は、対象（ヒト又はヒトでない哺乳動物）由来の生物学的試料におけるG I T R L遺伝子産物（例えば、m R N A、c D N A、又はポリペプチド、その断片を含む）の試験量を決定し、そして、G I T R L遺伝子産物についての試験量と、正常量又は範囲（即ち、自己免疫障害を被っていない既知の個体由来の量又は範囲）とを比較することによってG I T R Lの上方制御を検出することを含む。特定の診断方法は、自己免疫障害の最終的な診断を提供しないかもしれないが、その方法が診断に手助けとなる正の指示を提供すれば、十分である。10

【0112】

[0124] 本発明はまた、G I T R活性の上方制御を検出すること、例えば、G I T R Lの上方制御を検出することによってそのような自己免疫障害を予防する方法を提供する。「予測」又は「予測すること」は、病理学的な状態の起こり得る発生及び／又は重大性を予期することを意味する。予防方法は、患者由来の生物学的試料中のG I T R L遺伝子産物の試験量を決定し、そして、その試験量と、G I T R L遺伝子産物についての予防量又は範囲（即ち、自己免疫障害の変化する重大性を有する個人由来の量又は範囲）とを比較することを含む。試験試料におけるG I T R L遺伝子産物の様々な量は、自己免疫障害についてのある種の予防と一致する。特定の予防レベルでのG I T R L遺伝子産物の量の検出は、患者の予防を提供する。20

【0113】

[0125] 本発明はまた、G I T R活性の上方制御を検出すること、例えば、G I T R Lの上方制御を検出することによって、そのような自己免疫障害の過程や経過を監視する方法を提供する。監視方法は、1回目及び2回目に患者から採取した生物学的試料中のG I T R L遺伝子産物の試験量を決定し、そして、その量を比較することを含む。1回目と2回目との間のG I T R L遺伝子産物の量の変化は、自己免疫障害の過程の変化を示し、量の減少は、自己免疫障害の鎮静を示し、そして、量の増加は、自己免疫障害の進行を示す。そのような監視のアッセイはまた、自己免疫障害に対して治療される患者における特定の治療的処置の効率を評価するために有用である。30

【0114】

[0126] 上記で概要した方法におけるG I T R Lの発現の増加は、体液（例えば、全血、血漿、及び尿）、細胞（例えば、全細胞、細胞分画、及び細胞抽出物）、及び組織を含む様々な生物学的試料において検出することができる。生物学的試料はまた、組織学的目的のために採取した生検及び凍結切片のような組織切片を含む。好ましい生物学的試料は、血液、血漿、リンパ、組織生検、尿、C S F（脳脊髄液）、滑液、及びB A L（気管支肺胞洗浄）を含む。生物学的試料の解析は、患者由来の細胞又は組織の除去を必ずしも要求しないことは賞賛されるであろう。例えば、G I T R L遺伝子産物に結合する適切に標識した試薬（例えば、抗体、核酸）は、患者に投与され、標準的なイメージング技術（例えば、C A T、N M R（M R I）、及びP E T）を用いて視覚化（標的に結合した場合）され得る。40

【0115】

[0127] 本発明の診断及び予測アッセイにおいて、G I T R L遺伝子産物が検出され、定量化され、試験量を生じる。次いで、試験量は、正常量又は範囲と比較される。正常量又は範囲を超えた量は、自己免疫障害の診断において陽性の兆候である。G I T R L遺伝子産物の検出及び定量の具体的な方法は、下記に示す。

【0116】

[0128] G I T R L遺伝子産物の正常量又は基底レベルは、いずれかの特定の試料タイプ及び母集団について決定され得る。一般的に、G I T R Lタンパク質又はm R N Aの基底（正常）レベルは、正常（即ち、健常）患者由来の生物学的試料におけるG I T R50

Lタンパク質又はmRNAの量を測定することによって決定される。又は、G I T R L遺伝子産物の正常値は、羅漢した（又は羅漢した可能性のある）試験細胞又は組織が採取された同じ患者から採取した健常な細胞又は組織における量を測定することによって決定され得る。G I T R L遺伝子産物の量（正常量又は試験量のいずれか）は、細胞当たり、全タンパク質当たり、又は体積基準当たり決定され、又は発現され得る。試料の細胞量を決定するためには、当業者は、生物学的試料が採取されたタイプの細胞において、構築的に発現した遺伝子産物又は既知のレベルで発現した他の遺伝子産物のレベルを測定することができる。

【0117】

[0129] 本発明のアッセイ方法は、相対値がこれらのことの多くの応用に十分であるため、G I T R L遺伝子産物の絶対値の測定を必ずしも要求しないことをは賞賛されるであろう。それはまた、G I T R L遺伝子産物の量又は大量に加えて、変異の又は異常なG I T R L遺伝子産物又はそれらの発現パターン（例えば、突然変異した転写物、切断されたポリペプチド）は、正常な遺伝子産物と発現パターンと比較することによって同定してもよい。10

【0118】

[0130] 本発明の診断、予測、及び監視アッセイは、生物学的試料におけるG I T R L遺伝子産物を検出し、定量することに関係する。G I T R L遺伝子産物は、G I T R L mRNA及びG I T R Lポリペプチドを含み、両者は、当業者に周知の方法を用いて測定することができる。20

【0119】

[0131] 例えば、G I T R L mRNAは、ハイブリダイゼーションを基礎としたアッセイ、例えば、ノーザンハイブリダイゼーション、インサイチュハイブリダイゼーション、ドット及びスロットプロット、及びオリゴヌクレオチドアレイを用いて直接検定し、及び定量することができる。ハイブリダイゼーションを基礎としたアッセイは、プローブ核酸が標的核酸にハイブリダイズするアッセイを意味する。いくつかのフォーマットにおいて、標的、プローブ、又は両者は固相化される。固相化した核酸は、DNA、RNA、又は別のオリゴヌクレオチド又はポリヌクレオチドであってもよく、そして、天然に又は天然でなく発生するヌクレオチド、ヌクレオチド類似体、又は骨格を含んでもよい。本発明の使用のための核酸プローブ配列を選択する方法は、G I T R Lの核酸配列に基づき、当該技術分野において周知である。30

【0120】

[0132] 又は、G I T R L mRNAは、検出及び定量の前に增幅することができる。そのような增幅を基礎としたアッセイは、当該技術分野において周知であり、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、逆転写PCR（RT-PCR）、PCR-酵素-連結免疫溶媒アッセイ（PCR-ELISA）、及びリガーゼ連鎖反応（LCR）を含む。増幅したG I T R L遺伝子産物（例えば、mRNA又はcDNA）を生産し及び検出するためのプライマー及びプローブは、G I T R Lの核酸配列に基づいて、当業者に過度の実験なしに容易に設計し及び生産することができる。増幅したG I T R L遺伝子産物は、例えば、ゲル電気泳動によって；プローブ核酸に対するハイブリダイゼーションによって；配列決定によって；蛍光、燐光、又は放射活性シグナルの検出によって；又はいずれかの様々な周知な方法によって直接的に解析してもよい。加えて、標的核酸配列の増幅によって生産されるシグナルを増加する方法は、当業者に周知である。当業者は、どの増幅方法を使用するとしても、当該技術分野において既知の多様な定量方法（例えば定量PCR）は、G I T R L遺伝子産物の定量が期待されれば、使用してもよいことを認識するであろう。40

【0121】

[0133] G I T R Lポリペプチド（又はその断片）は、上述の抗G I T R L抗体を使用する様々な周知の免疫学的アッセイを用いて検出することができる。免疫学的アッセイは、G I T R Lポリペプチド（又はその断片）に特異的に結合する抗体（例えば、ポリクローナル、モノクローナル、キメラ、ヒト化、scFv、及びその断片）を利用するア50

ッセイを意味する。本発明の実施に適したそのような周知の免疫学的アッセイは、ELISA、ラジオイムノアッセイ(RIA)、免疫沈降、免疫蛍光、蛍光活性細胞ソーティング(FACS)、及びウェスタンプロットティングを含む。GITRLポリペプチドはまた、標識したGITRを用いて検出することができる。

【0122】

[0134] 当業者は、後述の方法が自己免疫障害、及び、限定されないが、慢性関節リウマチ、脳脊髄炎、骨関節炎、多発性硬化症、自己免疫胃炎、全身性紅斑狼瘡、乾癬及び他の感染性皮膚病、I型糖尿病、喘息、アレルギー、並びにクローグン病及び潰瘍性大腸炎を含む感染性腸疾患を含む他の疾患(例えば、炎症性疾患)に適用することができるこことを理解するであろう。

10

【0123】

[0135] 当業者はまた、後述する方法又はそれに基づく改変はまた、GITR活性の下方制御を検出すること、例えば、GITRLの下方制御を検出することによって、患者における(GITRLのレベルの減少を直接的又は間接的に関係する)様々な癌及び炎症性疾患を診断し、予測し、その経過を監視するために使用することができ、限定されないが、ヒトの患者にそのような方法を使用することを認識するであろう。

【0124】

治療におけるGITRL及び関連する分子の使用

[0136] 本出願人は、彼らがエフェクターT細胞上のGITRのGITRL、又は他のGITRアゴニストによる結合が、エフェクターT細胞に対する同時刺激性シグナルを提供し、ここで、そのようなシグナルがエフェクターT細胞をCD4⁺CD25⁺制御性T細胞による感受性をより少なくし、抗CD3又は他の活性化シグナルに応答して増殖するエフェクターT細胞の能力を増加することを認識する第一人者であると信じている。マウスモデルはメカニズムを発見するために使用したけれども、マウスモデルにおいて研究した免疫学的メカニズムはヒト免疫システムに翻訳可能であるかもしれない、そして、しばしば翻訳可能であるということは当該技術分野において周知である。そのように、免疫システムの非制御に関連する障害、例えば、自己免疫障害、炎症性障害及び移植拒絶、並びに癌及び感染症を治療するために、GITRL及び関連する分子、即ち、GITRアゴニスト又はGITRアンタゴニストを用いるための開示した方法は、ヒトにおけるそのような障害を治療するために特に有用であろう。開示した方法を実施するには、当業者は、GITR及びGITRLのヒトホモログ、並びにヒトGITRアゴニスト及びアンタゴニストが、ヒトにおける自己免疫障害、炎症性障害及び移植拒絶、並びに癌及び感染症の治療において、GITRL及びGITRL関連タンパク質、即ち、GITRアゴニスト及びアンタゴニストを使用する請求された方法において使用してもよい。

20

【0125】

[0137] 本明細書に開示したGITRL関連分子、即ち、GITRアゴニスト及びアンタゴニストは、上述の方法を用いて同定されたGITRLポリヌクレオチド及び/又はポリペプチド活性の調節因子を含み、インビトロ、エクスピボで使用することができ、又は医薬組成物に導入され、及び、例えば、GITRアンタゴニスト(例えば、GITRL阻害性ポリヌクレオチド、拮抗性小分子、中和抗GITR抗体、及び/又は中和抗GITR抗体)の投与によって自己免疫障害を治療し、又は、例えば、GITRアゴニスト(例えば、GITRLポリヌクレオチド、GITRLポリペプチド、又はその融合タンパク質、作動性小分子及び/又は作動性抗GITR抗体)の投与によって癌を治療するために、インビボで個人に投与され得る。そのようなGITRL及び/又は関連する分子(モジュレーターを含む)は、限定されないが、マウスGITRL及びそのホモログ(及びそのような分子に対する抗体)を含み、そして、そのようなホモログは、限定されないが、ヒトGITRLを含む。GITRL及び/又はGITRL関連分子を投与するかどうかの決定において考慮すべきいくつかの薬理遺伝学的アプローチは、当業者に周知であり、ゲノム広範関連、候補遺伝子アプローチ、及び遺伝子発現プロファイリングを含む。本発明の医薬組成物は、その意図された投与経路(例えば、経口組成物は、一般的に、不活性な

30

40

50

希釈剤又は食用の担体を含む)に適合するように製剤化される。投与経路の他の非制限の例は、非経口(例えば、静脈内)、皮内、皮下、経口(例えば、吸入)、経皮、及び直腸投与を含む。各々意図した経路に適合した医薬組成物は、当該技術分野において周知である。

【0126】

[0138] GITRアゴニスト又はアンタゴニストは、薬学的に受容可能な担体と組合わせた場合、医薬組成物として使用してもよい。そのような組成物は、GITRアゴニスト又はアンタゴニスト及び担体に加えて、様々な希釈剤、充填剤、塩、緩衝剤、安定化剤、可溶化剤、及び当該技術分野において周知の他の材料を含有してもよい。用語「薬学的に受容可能な」とは、活性成分の生物学的活性の効果と干渉しない無毒な材料を意味する。担体の特性は、投与経路に依存するであろう。10

【0127】

[0139] 本発明の医薬組成物はまた、サイトカイン、リンホカイン、又は他の血液凝固因子、例えば、M-CSF、GM-CSF、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-14、IL-15、G-CSF、幹細胞因子、及びエリスロポイエチンを含有してもよい。医薬組成物はまた、下記により詳細に記載されるように、抗サイトカイン抗体を含んでもよい。医薬組成物は、プラスミノーゲンアクチベータ及び第VIII因子のような血液凝固又は抗血液凝固因子を含有してもよい。医薬組成物はさらに、下記により詳細に記載されるように、他の抗炎症医薬を含有してもよい。そのような付加因子及び/又は試薬は、GITRアゴニスト又はアンタゴニストと相乗効果を生むために、またはGITRアゴニスト又はアンタゴニストによって生じる副作用を最小化するために医薬組成物中に含めてもよい。反対に、GITRアゴニスト又はアンタゴニストは、特定のサイトカイン、リンホカイン、他の造血因子、血液凝固若しくは抗血液凝固因子、又は抗炎症性試薬の副作用を最小化するために、そのサイトカイン、リンホカイン、他の造血因子、血液凝固若しくは抗血液凝固因子、又は抗炎症性試薬の製剤に含めてもよい。20

【0128】

[0140] 本発明の医薬組成物は、GITRアゴニスト又はアンタゴニストは、他の薬学的に許容可能な担体に加えて、ミセル、不溶性単相、液体結晶、又は水溶液中のラメラ相のように凝集した形体で存在する脂質のような両親媒性の試薬と一緒にするリポゾームの形体であってもよい。リポゾーム形成のための適した脂質は、限定されないが、モノグリセリド、ジグリセリド、スルファチド、リソレシチン、リン脂質、サポニン、胆汁酸などを含む。そのようなリポソーム形成のための調製は、例えば、米国特許第4,235,871号；米国特許第4,501,728号；米国特許第4,837,028号；及び米国特許第4,737,323号に記載されるように当該技術分野における技術のレベル内であり、全ては参考により本明細書に援用される。30

【0129】

[0141] 本明細書に使用されるように、用語「治療的に有効な量」は、有意な患者の利益、例えば、そのような患者の症状の改善、治癒、又は治癒速度の増加を示すのに十分である医薬組成物又は方法の各々の活性成分の全量を意味する。1つの活性成分に適用し、それだけを投与した場合、その用語は、その成分だけを意味する。組合せに適用した場合、その用語は、組合わせて、連続的に又は同時に投与したかどうか、治療的な効果に帰着する活性成分の組合わせた量を意味する。40

【0130】

[0142] 本発明の治療又は使用の方法を実施するには、GITRアゴニスト(例えば、GITRLポリヌクレオチド又はそこから発現したGITRLポリペプチド)又はGITRアンタゴニスト(例えば、中和抗GITRL抗体又は中和抗GITR抗体)の治療的な有効量は、患者、例えば、哺乳類(例えば、ヒト)に投与される。GITRアゴニスト又はアンタゴニストは、本発明の方法に従って、単独で又は他の治療剤、例えば、サイトカイン、リンホカイン若しくは他の造血因子、又は抗炎症試薬を使用する処置のように50

、組合わせて投与してもよい。1以上の試薬と組合わせる場合、G I T R アゴニスト又はアンタゴニストは、第二の試薬と同時に、又は連続的のいずれかで投与してもよい。連続的に投与する場合、主治医は、例えば、G I T R L ポリペプチド（又はその融合タンパク質）又は中和抗 G I T R L 抗体を他の試薬と組合せて投与する適切な順番を決定するであろう。

【0131】

[0143] 治療的に有効な量のG I T R アゴニスト又はアンタゴニストを経口的に投与する場合、結合試薬は、錠剤、カプセル、粉末、液体又はエリキシール剤の形体であろう。錠剤の形体で投与する場合、本発明の医薬組成物は、追加して、ゼラチン又はアジュバントのような固体の担体を含有してもよい。錠剤、カプセル、及び粉末は、約5 - 95 %の結合試薬、及び好ましくは約25 - 90 %の結合試薬を含有する。液体の形体で投与する場合、水、石油、動物若しくは植物の起源の油、例えば、ピーナッツ油、鉛油、大豆油、若しくはゴマ油、又は合成油のような液体の担体を加えてよい。医薬組成物の液体の形体は、さらに、生理学的食塩水、デキシトロース若しくは他の糖溶液、又はエチレングリコール、プロピレングリコール、またはポリエチレングリコールのようなグリコールを含有してもよい。液体の形体で投与する場合、医薬組成物は、結合試薬の重量で約0.5 - 90 %、及び好ましくは、結合試薬の重量で約1 - 50 %を含有する。10

【0132】

[0144] 治療的に有効な量のG I T R アゴニスト又はアンタゴニストが静脈内、皮膚又は皮下に注射される場合、G I T R アゴニスト又はアンタゴニストは、発熱物質なしの、非経口的に受容可能な水溶液の形体であろう。そのような非経口的に受容可能なタンパク質溶液の調製は、pH、等浸透性、安定性などを考慮して、当該技術分野における技術の範囲内である。静脈、皮膚、又は皮下注射の好ましい医薬組成物は、G I T R アゴニスト又はアンタゴニストに加えて、塩化ナトリウム注射、リンガー注射、デキシトロース注射、デキストロース及び塩化ナトリウム注射、乳酸化リンガー注射のような等浸透圧性ベヒクル、又は当該技術分野において既知の他のベヒクルを含有すべきである。本発明の医薬組成物はまた、安定化剤、保存剤、緩衝剤、抗酸化剤、又は当該技術分野において既知の他の添加剤を含有してもよい。20

【0133】

[0145] 本発明の医薬組成物中のG I T R アゴニスト又はアンタゴニストの量は、処置される状態の性格や苦しさ、及び患者が受けている前処理の性質に依存するであろう。最終的には、主治医が各々個人の患者を処置するためのG I T R アゴニスト又はアンタゴニストの量を決定するであろう。初期には、主治医は、G I T R アゴニスト又はアンタゴニストの低い投与量を投与し、患者の応答を観察するであろう。後期のG I T R アゴニスト又はアンタゴニストの投与量は、最適な治療効果が患者について得られるまで、投与してもよく、そして、その点で、投与量は一般的にさらに増加しない。本発明の方法を実施するために使用される様々な医薬組成物は、体重1kg当たり、約0.1μgないし約100mgの、例えば、G I T R L ポリペプチド又は中和抗 G I T R L 抗体を含有すべきである。30

【0134】

[0146] 本発明の医薬組成物を用いる静脈（i.v.）治療の期間は、処置される疾患の苦しさ、及び各々の個人の患者の状態や潜在的な特異体質の応答に応じて変化するであろう。G I T R アゴニスト又はアンタゴニストの各適用の期間は、継続的なi.v.投与の12 - 24時間の範囲であってもよいことは、意図される。又は、本発明の医薬組成物を用いる皮下（s.c.）治療は意図される。これらの治療は、毎日、毎週、又は、より好ましくは隔週、又は毎月投与することができる。G I T R アゴニスト又はアンタゴニストが小分子である場合、治療薬は、毎日、日に2度、日に3度など投与してもよいことはまた意図される。最終的には、主治医は、本発明の医薬組成物を用いて、i.v.又はs.c.治療の適した期間、又は小分子での治療、及び治療の投与時期を決定するであろう。4050

【0135】

[0147] 本発明のポリヌクレオチド及びタンパク質は、下記に同定した1以上の用途又は生物学的活性（本明細書に引用されるアッセイと関連するものを含む）を提示するために期待される。本発明のタンパク質について記載される用途又は活性は、そのようなタンパク質の投与又は使用によって、又はそのようなタンパク質（例えば、遺伝子治療又はDNAの導入に適したベクターのように）をコードするポリヌクレオチドの投与又は使用によって提供されてもよい。

【0136】

免疫応答を増強するためのGITRL及び他のGITRアゴニストの使用

[0148] 一側面において、本発明は、免疫細胞又は免疫細胞群をGITRアゴニスト、例えば、本発明のGITRLポリヌクレオチド又はポリヌクレオチド（例えば、その融合タンパク質）、及び／又はGITRの活性を増加し又は増強する作動性抗GITR抗体で接触することによって、免疫細胞、例えば、T細胞（例えば、エフェクターティン細胞）の増殖を増加するための方法を提供する。これらの方針は、少なくとも部分的には、作動性抗GITR抗体がCD4⁺CD25⁻T細胞増殖のCD4⁺CD25⁺T細胞仲介による抑制を逆転にした（実施例5）という発見に基づく。その方法はまた、部分的には、例えば、GITRL又は作動性抗GITR抗体によるGITR結合がエフェクターティン細胞（例えば、CD4⁺CD25⁻及CD8⁺T細胞）の増殖を誘導する（実施例9及び実施例13）という発見に基づく。出願人はまた、GITRLによるGITR結合がエフェクターティン細胞（例えば、CD4⁺及びCD8⁺T細胞）への同時刺激性シグナルを提供し、それにより、CD4⁺CD25⁻制御性T細胞によって仲介された抑制を克服し、そして、抗CD3に応答して増殖するエフェクターティン細胞の能力を増加し；即ち、GITRアゴニスト（例えば、GITRLポリペプチド、その活性な断片、及び／又は作動性抗GITR抗体）によるエフェクターティン細胞に発現したGITRの結合が、エフェクターティン細胞をCD4⁺CD25⁺制御性T細胞による抑制にほとんど感受性をもたないようにするということを示す。従って、エフェクターティン細胞におけるGITR活性を刺激するGITRアゴニストは、それ自身によって、又は抗原、例えば、アジュバント（例えば、ワクチンアジュバント）と一緒に使用し、例えば、癌及び感染性障害の治療に使用するために、インビボでの免疫応答を上方制御することができる。

【0137】

[0149] 一態様において、GITRアゴニスト（例えば、GITRLポリヌクレオチド、ポリペプチド、その活性な断片及び／又は融合タンパク質、作動性小分子及び／又は作動性抗GITR抗体）は、種々の免疫不全及び障害（重症複合免疫不全症（SCID）を含む）の治療、例えば、T細胞の成長及び増殖の上方制御に有用であってもよい。これらの免疫不全は、遺伝的であり、又はウイルス（例えば、HIV）、並びに細菌又は真菌感染によって引き起こされてもよく、又は自己免疫障害に起因してもよい。さらに具体的には、ウイルス、細菌、真菌又は他の感染によって引き起こされる感染症は、本発明のタンパク質に用いて治療可能であってもよく、HIV、肝炎ウイルス、ヘルペスウイルス、結核菌、リーシュマニア属、マラリア属、及びカンジダのような種々の真菌感染を含む。当然に、この点においては、本発明のタンパク質はまた、免疫システムへのブーストが、例えば、癌の治療に所望され得る場合には、有用であり得る。

【0138】

[0150] 免疫応答の上方制御の手段として、抗原提示細胞（APC）抗原の上方制御（例えば、B7.1、B7.2、及びB7.3の上方制御）はまた治療に有用であってもよい。免疫応答の上方制御は、既存の免疫応答を増強し、又は初期の免疫応答を引き出す形態であってもよい。例えば、樹状突起細胞の抗原提示機能の刺激を通じて免疫応答を増強することは、ウイルス感染の場合に有用であり得る。加えて、インフルエンザのような全身性ウイルス疾患、共通のかぜ、及び脳炎は、刺激性形態抗原提示分子、例えば、樹状突起細胞抗原を全身的に投与することによって緩和してもよい。

【0139】

10

20

30

40

50

[0151] 又は、抗ウイルス免疫応答は、患者からのT細胞の除去、抗原でパルスしたプロフェッショナルA P C（例えば、B細胞、マクロファージ及び／又は樹状突起細胞）及びG I T Rアゴニスト（例えば、G I T R Lポリヌクレオチド、ポリペプチド、その活性な断片及び／又は融合タンパク質、作動性小分子及び／又は作動性抗G I T R抗体）を用いてエクスピボで同時刺激することによって感染した患者に増強してもよい。G I T Rアゴニスト（例えば、G I T R Lポリヌクレオチド、ポリペプチド、その活性な断片及び／又は融合タンパク質、及び／又は作動性抗G I T R抗体）は、可溶性タンパク質として又はA P Cによって発現されるように供給してもよい。抗ウイルス免疫応答を増強する別の方法は、患者から感染した細胞を単離し、それらに本明細書に記載されるような本発明のG I T R Lタンパク質をコードする核酸でトランスフェクトすることであり、それにより、細胞は、それらの表面にタンパク質の全部又は一部を発現し、そして、トランスフェクトした細胞を患者に再び導入する。感染した細胞は、今や、エフェクターT細胞にインビボで同時刺激性シグナル、即ち、感染した細胞によるG I T R Lタンパク質、又はその活性な断片の発現を輸送することができ、そして、そのようなG I T R Lタンパク質のエフェクターT細胞上のG I T Rへの結合は、エフェクターT細胞をC D 4⁺ C D 2 5⁺制御性T細胞による抑制にほとんど感受性がないようにすることができた。
10

【0140】

[0152] 別の応用において、A P C抗原機能の上方制御又は増強は、腫瘍免疫の導入に有用であってもよい。本発明の少なくとも1つのペプチドをコードする核酸でトランスフェクトした腫瘍細胞（例えば、肉腫、メラノーマ、リンパ腫、白血病、神経芽種、及び悪性腫瘍）は、患者における腫瘍特異的寛容を克服するために患者に投与することができる。所望により、腫瘍細胞は、ペプチドの組合せを発現するためにトランスフェクトすることができる。例えば、患者から得た腫瘍細胞は、G I T Rアゴニスト（例えば、G I T Rポリペプチド、その活性な断片及び／又は融合タンパク質、及び／又は作動性抗G I T R抗体）の発現を、単独で、又はB 7 . 2様の活性を有するペプチドのみ若しくはB 7 . 1様の活性を有するペプチドなどの組合せとの併用で指向する発現ベクターを用いてエクスピボでトランスフェクトすることができる。トランスフェクトされた腫瘍細胞は、患者に戻され、トランスフェクトされた細胞表面上でのペプチドの発現に帰着する。又は、遺伝子治療手法は、インビボでのトランスフェクションについての腫瘍細胞を標的するために使用することができる。
20

【0141】

[0153] G I T Rアゴニスト（例えば、G I T R Lポリペプチド、その活性な断片及び／又は融合タンパク質、作動性小分子及び／又は作動性抗G I T R抗体）の存在は、腫瘍細胞の表面上のA P C抗原（例えば、B 7 . 1、B 7 . 2など）の活性を有するペプチドとの組合せで、T細胞に必要な同時刺激性シグナルを与え、トランスフェクトされた腫瘍細胞に対するT細胞を介した免疫応答を誘導する。加えて、M H CクラスI又はM H CクラスII分子を欠損している、又は十分量のM H CクラスI又はM H CクラスII分子を再発現しない腫瘍細胞は、M H CクラスI鎖タンパク質及び₂ミクログロブリンタンパク質又はM H CクラスII鎖及びM H CクラスII鎖タンパク質の全て又は一部をコードする核酸（又は対応するヒトH L A核酸）でトランスフェクトし、それにより、細胞表面上でM H CクラスI又はM H CクラスIIタンパク質（又は対応するH L A分子）を発現することができる。G I T Rアゴニスト（例えば、G I T R Lポリペプチド、その活性な断片及び／又は融合タンパク質、及び／又は作動性抗G I T R抗体）、及び／又はA P C抗原の活性を有するペプチドと結合している適切なクラスI又はクラスII M H Cの発現は、トランスフェクトされた腫瘍細胞に対するT細胞を介した免疫応答を誘導する。場合により、M H CクラスII関連タンパク質、例えば、一定の鎖の発現を遮断するアンチセンス構築物をコードする遺伝子はまた、G I T Rアゴニスト（例えば、G I T R Lポリペプチド、その活性な断片及び／又は融合タンパク質、及び／又は作動性抗G I T R抗体）及び／又はA P C抗原の活性を有するペプチドをコードするD N Aで同時トランスフェクトし、腫瘍関連抗原の提示を促進し、そして、腫瘍特異的免疫性を誘導する
30
40
50

ことができる。このように、ヒト患者におけるT細胞を介した免疫応答の誘導は、患者における腫瘍特異的な寛容を克服するために十分であり得る。

【0142】

[0154] 他の態様において、本発明のGITRアゴニスト（例えば、GITRLポリペプチド、その活性な断片及び／又は融合タンパク質、その融合タンパク質、作動性小分子、及び／又は作動性抗GITR抗体）は、ワクチンアジュバントとして使用してもよい。アジュバントは、それ自身が弱い免疫原である種々の抗原に対する免疫応答の発生及びプロファイルを増強及び／又は進める能力を有する免疫調節化合物である。サイトカイン及び／又はリンホカインは、アジュバントとして使用することができる。適したアジュバントの選択は、アジュバントがない場合に発生しないであろう良い体液性及び細胞性免疫応答を誘導することができる。特に、アジュバントは、ワクチンにおけるサブユニット及びペプチド抗原に対する免疫応答を増強するのに有意な効果を有する。それらの刺激活性はまた、タンパク質抗原に対して指向された抗原特異的免疫応答の発生に利点がある。強力な粘膜応答、高い血清力価、CTL（細胞傷害性Tリンパ球）の誘導、及び激しい細胞応答を要求する多様な抗原について、アジュバント及びサイトカイン／リンホカインの組合せは、大部分の抗原調製によっては提供されない刺激を提供する。10

【0143】

[0155] 本明細書で使用されるように、語句「ワクチンアジュバント」又は「ワクチン治療」は、抗原（例えば、ウイルス、寄生虫及び細菌ポリペプチド、タンパク質又はペプチド）、又は他の抗原（例えば、腫瘍又は癌細胞ポリペプチド、タンパク質又はペプチド）、若しくは、抗原に対する免疫応答を増強し、抑制し又はさもなければ調節するための抗原をコードするポリヌクレオチドと組合わせて、GITRアゴニスト（例えば、GITRLポリヌクレオチド、GITRLポリペプチド、その活性な断片、その融合タンパク質、及び／又はアゴニストGITR抗体）の使用を意味するものと意図される。この定義の目的については、「組合せ」は、抗原と結合して、抗原（併用して又は併用しないで）と同時に、又は抗原と続けて使用することを意味する。20

【0144】

[0156] 用語「ワクチンアジュバント組成物」は、注射可能な溶液又は懸濁液を調製するための慣用的な方法で、免疫学的に受容可能な希釈剤又は担体を付加的に誘導するワクチンアジュバントを意味する。ワクチンアジュバント組成物は、GITRアゴニストによって引き出される免疫応答をさらに増強する試薬を付加的に誘導してもよい。例えば、ワクチンアジュバント組成物は、3-O-脱アシル化モノホスホリル脂質A（MPL（登録商標）；Corixa Corporation, Seattle, WA）又はモノホスホリル脂質A及びその誘導体及び類似体を付加的に誘導してもよい。MPL（登録商標）は、1-100 μg / 投与量の範囲で使用することができる。30

【0145】

[0157] ワクチン治療のために使用される抗体は、免疫原性及び非免疫原性タンパク質から誘導されたタンパク質、ペプチド又はポリペプチド、並びに次のいずれか：糖類、タンパク質、ポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド、又は他の巨大分子成分、又はその断片を誘導する。この節に使用されるように、「ペプチド」は、一連の少なくとも6個のアミノ酸を含み、そして、少なくとも1個の抗原決定因子を含有し、一方、「ポリペプチド」は、ペプチドより長い分子であるが、全長のタンパク質を構築しない。本明細書に使用されるように、「断片」は、糖、タンパク質、ポリヌクレオチド若しくはオリゴヌクレオチド、又は他の巨大分子成分の部分を含むが、全部よりは少ない部分を含む。40

【0146】

[0158] 本明細書に使用されるように、用語「有効なアジュバント量」は、脊椎動物の宿主において増加した免疫応答を引き出すのに適している、本明細書に記載されるアジュバント併用剤の投与量を意味する。具体的な投与量は、宿主の年齢、体重及び医学的な状態、並びに投与及び抗原の方法に部分的に依存するであろう。

【0147】

10

20

30

40

50

[0159] 本発明のワクチンアジュvant組成物は、限定されないが、鼻腔内、経口、膣内、直腸内、非経口、皮内、経皮（例えば、国際出願WO 98 / 20723、参照により本明細書に援用される）、筋内、腹腔内、皮下、静脈内及び動脈内を含む様々な経路によって、ヒト又はヒトでない脊椎動物に投与することができる。抗原成分又は抗原組成物の成分の量は、抗原の正体、並びに患者の年齢、体重及び医学的状態、並びに投与方法に部分的に依存して変化するであろう。また、適した投与量は、当業者によって容易に決定される。要求されないが、アジュvantの抗原及び組合せは、同時に投与されることが好ましい。抗原組成物の投与回数及び投与量処方は、同様に当業者によって容易によつて決定される。いくつかの例において、アジュvant併用剤のアジュvantの特性は、必要とされる投与回数又は投与量処方の経時を減少してもよい。

10

【0148】

[0160] 本発明のアジュvant併用剤は、限定されないが、ヒト及びヒトでない脊椎動物を感染するウイルス、細菌、真菌又は寄生虫の微生物を含む幅広い様々な病原性微生物由来、又は癌細胞若しくは細胞（例えば、肉腫、メラノーマ、リンパ腫、白血病、神経芽腫、及び悪性腫瘍）由來の幅広い様々な抗原と組合せた使用に適している。抗原は、タンパク質、並びに下記の：糖類、タンパク質、ポリヌクレオチド若しくはオリゴヌクレオチド、癌若しくは腫瘍細胞、又は他の巨大分子成分のいずれかの断片から誘導されるペプチド又はポリペプチドを含んでもよい。いくつかの例において、1以上の抗原は、抗原性組成物に含まれる。

【0149】

20

[0161] 本発明のアジュvant併用剤を含有する期待されるウイルス性ワクチンは、限定されずに、ヒト免疫不全ウイルス、サル免疫不全ウイルス、パラミクソウイルス（Respiratory syncytial virus）、パラインフルエンザウイルス・タイプ1-3、インフルエンザウイルス、単純疱疹、ヒトサイトメガロウイルス、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、ヒトパピローマウイルス、ポリオウイルス、ロタウイルス、カリチウイルス（calicivirus）、麻疹ウイルス、耳下腺炎ウイルス、風疹ウイルス、アデノウイルス、狂犬病ウイルス、イヌジスタンパーウイルス、牛痘ウイルス、コロナウイルス、パルボウイルス、感染性鼻腔気管炎ウイルス、ネコ白血病ウイルス、ネコ感染性腹膜炎ウイルス、トリ感染性滑液囊疾患ウイルス、ニューカッスル病ウイルス、マレク疾患ウイルス、ブタ呼吸器及び生殖症候群ウイルス、ウマ動脈炎ウイルス、及び種々の脳炎ウイルスによって引き越される疾患の予防及び／又は治療に指向されたものを含む。

30

【0150】

[0162] 本発明のアジュvant併用剤を含有する期待される細菌性ワクチンは、限定されないが、ヘモフィラス（Haemophilus）・インフルエンザ（分類可能及び分離不能の両方）、ヘモフィラス・ソムヌス（somnus）、モラクセラ・カタラリス（Moraxella catarrhalis）、肺炎連鎖球菌（Streptococcus pneumoniae）、化膿連鎖球菌（Streptococcus pyogenes）、 streptococcus agalactiae）、ストレプトコッカス・アガラクティエ（Streptococcus agalactiae）、大便連鎖球菌（Streptococcus faecalis）、ヘリコバクター・ピロリ（Helicobacter pylori）、髄膜炎菌（Neisseria meningitidis）、淋菌（Neisseria gonorrhoeae）、クラミジア・トラコマチス（Chlamydia trachomatis）、クラミジア肺炎菌（Chlamydia pneumoniae）、クラミジア・シッタシ（Chlamydia psittaci）、百日咳菌（Bordetella pertussis）、チフス菌（Salmonella typhi）、ネズミチフス菌（Salmonella typhimurium）、サルモネラ・コレラ菌（Salmonella choleraesuis）、大腸菌（Escherichia coli）、ビブリオ・コレラ菌（Vibrio cholerae）、コリネバクテリウム・ジフテリア菌（Corynebacterium diphtheriae）

40

50

)、マイコバクテリウム・結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、トリマイクロバクテリウム結核菌 - マイクロバクテリウム細胞内複合体 (*Mycobacterium avium*-*Mycobacterium intracellular complex*)、プロテウス・ミラビス変形菌 (*Proteus mirabilis*)、プロテウス・ブルガリス (*proteus vulgaris*)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、破傷風菌 (*Clostridium tetani*)、レプトスピラ・インテロガ ns (*Leptospira interrogans*)、ボレリア・ブルゲルフェリ (*Borrelia burgdorferi*)、パステツレラ・ヘモリチカ (*Pasteurella haemolytica*)、パステツレラ・ムルトシダ (*Pasteurella multocida*)、アクチノバチルス胸膜肺炎菌 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*) 及びマイコプラズマ・ガリセプティカム (*Mycoplasma gallisepticum*) によって引き起こされる疾患の予防及び / 又は治療に指向するものを含む。
10

【0151】

[0163] 本発明のアジュバント併用剤を含有する真菌病原体に対する期待されるワクチンは、限定されないが、コウジカビ菌 (*Aspergillus*)、分芽菌 (*Blastoscyces*)、カンジダ菌 (*Candida*)、コクシジオイデス菌 (*Coccidiodes*)、クリプトコッカス菌 (*Cryptococcus*) 及びヒストプラスマ菌 (*Histoplasma*) によって引き起こされる疾患の予防及び / 又は治療に指向するものを含む。
20

【0152】

[0164] 本発明のアジュバント併用剤を含有する寄生虫に対する期待されるワクチンは、限定されないが、リーシュマニア・メジャー (*Leishmania major*)、回虫 (*Ascaris*)、鞭虫 (*Trichuris*)、ジアルジア (*Giardia*)、住血吸虫 (*Schistosoma*)、クリプトポリジウム (*Cryptosporidium*)、トキソプラズマ原虫 (*Toxoplasma gondii*) 及びニユーモシスティス・カリニ (*Pneumocystis carinii*) によって引き起こされる疾患の予防及び / 又は治療に指向するものを含む。
30

【0153】

[0165] 脊椎動物の宿主に治療的又は予防的抗癌効果を引き出す期待されるワクチンは、本発明のアジュバント併用剤を含有し、限定されないが、前立腺特異的抗原 (PSA)、前立腺特異的膜抗原 (PSMA)、癌胎児性抗原 (CEA)、MUC-1、Her-2、CA-125、MAGE-3、EGFR、HELP、GCC、CD66-c、プロスタミン、TMPRSS3、TADG12 及び TADG15 を含む癌抗原又は腫瘍関連抗原を利用するものを含む。
30

【0154】

[0166] HIV 及び SIV の場合において、抗原性組成物は、当該ウイルスから誘導される少なくとも 1 つのタンパク質、ポリペプチド、ペプチド又は断片を含む。いくつかの例では、多様な HIV 又は SIV タンパク質、ポリペプチド、ペプチド及び / 又は断片は、抗原性組成物に含められる。
40

【0155】

[0167] 本発明のアジュバント併用製剤はまた、ポリヌクレオチドワクチン (DNA ワクチンとしても知られる) にアジュバントとして封入に適している。そのようなワクチンはさらに、ブピビカニン (*bupivacaine*) (米国特許第 5,593,972 号を参照し、それは参照により本明細書に援用される) のような促進試薬を含む。

【0156】

[0168] 1) 抗原提示細胞の機能、例えば、樹状突起細胞の機能を刺激する ; 2) 患者から T 細胞を取り出し、それらをエクスピボで同時刺激し、及び、それらを患者に再導入する ; 3) 腫瘍免疫を誘導するために腫瘍細胞をトランسفェクトする ; そして、4
50

) 当該技術分野において周知であるワクチンアジュvantを使用する方法(例えば、Cerundolo et al. (2004) Dendritic cells: a journey from laboratory to clinic. Nat. Immunol. 5(1):7-10; Ko et al. (2003) Immunotherapy of malignant diseases. Int. Arch. Allergy Immunol. 132: 294-309; Valmori et al. (1999) An antigen-targeted approach to adoptive transfer therapy of cancer. Cancer Res. 59: 2167-73)。

【0157】

10

免疫細胞活性を減少するためのGITRアンタゴニストの使用

[0169] さらに別の側面において、本発明は、CD4⁺CD25⁺制御性T細胞による抑制に対するエフェクターT細胞、例えば、CD4⁺及びCD8⁺T細胞の感受性、又はその母集団を維持するための方法を特徴とする。該方法は、T細胞の母集団をGITRLアンタゴニスト(例えば、GITRL阻害性ポリヌクレオチド、拮抗性小分子、中和抗GITR抗体、及び/又は中和抗GITR抗体)と免疫細胞又は母集団の活性を阻害するのに十分な量で接触することを含んでもよい。GITRのアンタゴニストはまた、免疫応答の抑制が期待される患者に投与してもよい。これらの状態は、例えば、自己免疫障害(例えば、関節炎障害)、炎症性疾患、又は臓器移植を含む。

【0158】

20

[0170] これらの方法は、少なくとも部分的には、例えば、中和抗GITRL抗体を用いることによるGITR活性の減少が、CD4⁺CD25⁺仲介の抑制を保持し(実施例13)、即ち、中和抗GITRL抗体が、CD4⁺CD25⁺制御性T細胞による抑制にエフェクターT細胞、例えば、CD4⁺及びCD8⁺T細胞の感受性を維持するという発見に基づく。加えて、出願人は、中和抗GITRL抗体とのエフェクターT細胞のインキュベーションがマウスの実験的自己免疫脳炎(EAE)における疾患を改善することを示している(実施例14)。加えて、GITRアンタゴニスト、即ち、GITR活性(例えば、抗GITRL抗体)を阻害する分子は、例えば、移植拒絶、炎症性疾患、及び自己免疫障害を含む免疫細胞関連の病状を治療し又は防ぐために、インピボでCD4⁺CD25⁺T細胞による抑制に対するエフェクターT細胞の感受性を維持するために使用してもよい。

30

【0159】

[0171] GITRアンタゴニストを用いる方法はまた、エフェクターT細胞の活性(例えば、増殖、分化、生存)を阻害するために使用してもよく、このように、様々な免疫障害を治療し又は防ぐために使用することができる。治療され又は防がれることができる障害の制限されない例は、限定されないが、移植拒絶、自己免疫疾患(例えば、糖尿病、関節炎(慢性関節リウマチ、若年慢性関節リウマチ、骨粗鬆症、乾癬性関節炎)、多発性硬化症、脳脊髄炎、筋無力症、全身性紅斑性狼瘡、自己免疫甲状腺炎、皮膚炎(アトピー性皮膚炎及び湿疹性皮膚炎)、乾癬、シェーグレン症候群、クローン疾患、アフター性潰瘍、虹彩炎、結膜炎、角結膜炎、潰瘍性大腸炎、脊椎関節炎、強直性脊椎炎、内因性喘息、アレルギー性喘息、紅斑性皮膚狼瘡、強皮症、腫瘍、直腸炎、薬物性発疹、ハンセン逆反応、癲性結節性紅斑、自己免疫ブドウ膜炎、アレルギー性脳脊髄炎、急性壊死性出血性脳脊髄炎、特発性両側性進行性感音難聴、再生不良性貧血、赤芽球貧血、特発性血小板減少症、多発性軟骨炎、ヴェグナー肉芽腫症、慢性活動性肝炎、スティーブン・ジョンソン症候群、特発性スプレー、扁平苔癬、バセドウ病、サルコイドーシス、原発性胆汁性肝硬変、後部ブドウ膜炎、及び間質性肺炎を含む)、移植対宿主疾患、及びアトピー性アレルギーのようなアレルギーを含む。GITRアンタゴニスト、例えば、中和GITRL抗体の投与を含む方法を用いて治療され得る好ましい障害は、関節炎障害(例えば、慢性関節リウマチ、若年慢性関節リウマチ、骨粗鬆症、乾癬性関節炎、及び強直性脊椎炎(好ましくは慢性関節リウマチ))、多発性硬化症、I型糖尿病、狼瘡(SLE)、IBD、ク

40

50

ローン病、喘息、脈管炎、アレルギー、強皮症及び乾癬を含む。

【0160】

[0172] 別の態様において、GITRアンタゴニスト単独、又は、本明細書に記載される他の治療試薬（例えば、TNFアンタゴニスト）との組合せは、多発性ミエローマ及び関連Bリンパ球悪性腫瘍を治療するために使用することができる（Brenne, A. et al. (2002) Blood 99(10): 3756-62）。

【0161】

[0173] GITRアンタゴニスト（例えば、GITRL阻害性ポリヌクレオチド、拮抗性小分子、及び／又はGITR及び／又はに対する中和抗体）を用いて、様々な方法で免疫応答を調節することは可能である。下方制御は、すでに進行中の免疫応答を阻害し又は遮断する形態であってもよく、又は免疫応答の誘導を妨げることに關係してもよい。活性化したT細胞の機能は、T細胞応答の抑制を増強することによって、又は特異的なT細胞の寛容によって、又はその両方によって阻害してもよい。T細胞応答の免疫抑制は、一般的に、抑制試薬にT細胞を連続的に晒すことを要求する活性であり、非抗原性特異的プロセスである。寛容は、T細胞における非応答性又はアネルギーを含むことに関係し、一般的に、抗原性特異的であり、寛容試薬への曝露が止んだ後に持続する。操作的に、寛容は、寛容試薬なしに特異的抗原に再曝露に応じてT細胞応答の欠如によって示される。

【0162】

[0174] 抗原提示細胞抗原（例えば、B7.1）の1以上の機能を下方制御し、又は妨げること、及びこのように活性化したT細胞による高レベルのリンホカイン合成を妨げることは、組織、皮膚及び器官移植の状況、及び移植対宿主疾患（GVHD）において有用であろう。例えば、T細胞機能の遮断は、組織移植における組織破壊の減少に帰着すべきである。典型的には、組織移植において、移植の拒絶は、T細胞による外来物のようなその認識を介してして開始され、移植を破壊する免疫応答が続く。移植前に、GITRアンタゴニスト（例えば、GITRL阻害性ポリヌクレオチド、拮抗性小分子、中和抗GITR抗体、及び／又は中和抗GITRL抗体）と、B7リンパ球抗原とその免疫細胞上の天然のリガンド（例えば、B7.2活性を有するペプチドの可溶な一量体のみ、又は別のBリンパ球抗原（例えば、B7.1）の活性を有するペプチドの一量体若しくは遮断抗体との組合せ）を用いてB7リンパ球抗原の相互作用を阻害し、又は遮断する分子との組合せの投与は、対応する同時刺激性のシグナルを伝達することなく、免疫細胞上の天然のリガンドにその分子を結合することに導くことができる。この方法におけるB7リンパ球抗原機能を遮断することは、免疫細胞、例えば、エフェクターT細胞によってサイトカイン合成を妨げ、つまり、免疫抑制のように演じる。さらに、同時刺激の欠如はまた、T細胞の免疫原性を減少するのに十分であり、それにより患者における寛容を誘導してもよい。B7リンパ球の抗原遮断試薬による長期の寛容の誘導が、これらの遮断試薬の繰り返される投与の必要性を避けることができる。患者における十分な免疫抑制又は寛容を達成することはまた、Bリンパ球抗原の併用の機能を遮断するために必要であってもよい。

【0163】

[0175] 器官移植拒絶又はGVHDを妨げる特定の処断試薬の効率は、ヒトにおける効率を予測する動物モデルを用いて評価することができる。使用し得る適したシステムの例は、ラットにおける同種心臓移植、及びマウスにおけるアフリカツメガエルの臍臓ランゲルハンス島移植を含み、両者は、Lenschow et al. (1992) Science 257: 789-92及びTurka et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 11102-05に記載されるように、インビボでのCTL A4 Ig融合タンパク質の免疫抑制効果を調べるために使用した。加えて、GVHDのマウスモデル（例えば、Paul, ed., Fundamental Immunology, Raven Press, New York, 1989, pp. 846-47）は、その疾患の発生上のインビボでのBリンパ球抗原機能を遮断する効果を決定するために使用することができる。

【0164】

10

20

30

40

50

[0176] APC抗原の機能を遮断することはまた、自己免疫疾患を処置するために治療的に有効であり得る。多くの自己免疫障害は、自己の組織に対して反応的であり、疾患の病理学に関するサイトカイン及び自己抗体の生産を促進するT細胞の不適切な活性化の結果である。自己反応性T細胞の活性化を妨げることは、疾患の症状を減少し、又は取り除くかもしれない。APC抗原の受容体：リガンドの相互作用を邪魔することによってT細胞上の同時刺激を遮断する試薬と組合せて、GITRアンタゴニスト（例えば、GITRL阻害性ポリヌクレオチド、拮抗性小分子、及び／又はGITR及び／又はGITRLに対する中和抗体）を投与することは、T細胞活性を阻害し、そして疾患のプロセスに関係してもよい自己抗体又はT細胞誘導のサイトカインの生産を妨げるために使用することができる。加えて、遮断試薬と組合せて、GITRアンタゴニスト（例えば、GITRL阻害性ポリヌクレオチド、拮抗性小分子、及び／又はGITR及び／又はGITRLに対する中和抗体）は、自己反応性T細胞の抗原特異的な寛容を誘導してもよく、疾患から長期の救済に導くことができる。自己免疫疾患を妨げ、又は緩和することにおけるこれらの試薬の効率は、ヒトの自己免疫疾患の多くの十分に特徴付けられた動物モデルを用いて決定することができる。例は、マウスの実験的自己免疫脳炎（EAE）、MRL/1pr/1prマウス又はNZBハイブリッドマウスにおける全身性紅斑性狼瘡、マウス自己免疫コラーゲン関節炎、NODマウス及びBBラットにおける糖尿病、及びマウス実験的重症筋無力症を含む（例えば、Paul, ed., Fundamental Immunology, Raven Press, New York, 1989, pp. 840-56を参照）。 10

【0165】

[0177] 一態様において、GITRアンタゴニスト（例えば、GITRL阻害性ポリヌクレオチド、拮抗性小分子、及び／又はGITR及び／又はGITRLに対する中和抗体）は、その医薬組成物を含み、併用療法、即ち、他の試薬、例えば、病理学的な状態又は障害、例えば、免疫障害及び炎症性疾患を治療するために有用である治療的試薬と組合せて投与する。本文における用語「組合せて」は、試薬が、実質的に同時に、同時に又は連続して与えられることを意味する。連続して与えられる場合、第二化合物の投与の開始に、2つの化合物の第一が、好ましくは、処置の部位で効果的な濃度でまだ検出可能である。 20

【0166】

[0178] 例え、併用治療は、1以上のGITRアンタゴニスト（例えば、GITRL阻害性ポリヌクレオチド、拮抗性小分子、及び／又はGITR及び／又はGITRLに対する中和抗体）を含み、1以上の付加的な治療的試薬、例えば、詳細には下記に記載されるように、1以上のサイトカイン及び成長因子阻害剤、免疫抑制剤、抗炎症試薬とともに製剤化され、及び／又は同時に投与することができる。さらに、本明細書に記載される1以上のGITRアンタゴニスト（例えば、GITRL阻害性ポリヌクレオチド、拮抗性小分子、及び／又はGITR及び／又はGITRLに対する中和抗体）は、本明細書に記載されるような治療用試薬の2以上と併用して使用してもよい。そのような併用治療薬は、投与される治療用試薬のより低い投与量を有効に利用することができ、このように、可能な毒性、又は様々な単剤療法と関連した合併症を避けることができる。さらに、本明細書に開示される治療用試薬は、GITRL受容体経路とは異なる経路で行動し、及びこのように、GITRアンタゴニストの効果、即ち、エフェクターT細胞がCD4⁺CD25⁺制御性T細胞による抑制に対する感受性を維持する効果を増強し及び／又は相乗作用を与えることが期待される。 40

【0167】

[0179] GITRLアンタゴニストと組合せて使用される好ましい治療用試薬は、自己免疫及びその後の炎症性応答における異なる段階で干渉する試薬である。一態様において、本明細書に記載される1以上のGITRアンタゴニスト（例えば、GITRL阻害性ポリヌクレオチド、拮抗性小分子、及び／又はGITR及び／又はGITRLに対する中和抗体）は、1以上の付加的な試薬、例えば、他のサイトカイン又は成長因子アンタ 50

ゴニスト（例えば、可溶性受容体、ペプチド阻害剤、小分子、リガンド融合剤）；又は他の標的に結合する抗体若しくはその抗原結合断片（例えば、他のサイトカイン若しくは成長因子、それらの受容体、又は他の細胞表面分子に結合する抗体）；及び抗炎症性サイトカイン又はそのアゴニストと同時に製剤化され、及び／又は同時に投与されてもよい。本明細書に記載されるG I T Rアンタゴニスト（例えば、G I T R L阻害性ポリヌクレオチド、拮抗性小分子、及び／又はG I T R及び／又はG I T R Lに対する中和抗体）と組合わせて使用することができる試薬の制限のない例は、限定されないが、1以上のインターロイキン(IL)又はその受容体、例えば、IL-1、IL-2、IL-6、IL-7、IL-8、IL-12、IL-13、IL-15、IL-16、IL-18、及びIL-22のアンタゴニスト；サイトカイン若しくは成長因子又はそれらの受容体のアンタゴニスト、例えば、腫瘍壊死因子(TNF)、LT、EMAP-II、GM-CSF、FGF及びPDGFを含む。G I T Rアンタゴニスト（例えば、G I T R L阻害性ポリヌクレオチド、拮抗性小分子、及び／又はG I T R及び／又はG I T R Lに対する中和抗体）はまた、例えば、CD154(gp39若しくはCD40L)、又はLFA-1/ICAM-1及びVLA-4/VCAM-1を含む、細胞表面分子、例えば、CD2、CD3、CD4、CD8、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD80(B7.1)、CD86(B7.2)、CD90、又はそれらのリガンドに対する抗体の阻害剤と組合わせることができる(Yusuf-Makagiansar et al.(2002)Med. Res. Rev. 22:146-67)。本明細書に記載されるG I T Rアンタゴニスト（例えば、G I T R L阻害性ポリヌクレオチド、拮抗性小分子、及び／又はG I T R及び／又はG I T R Lに対する中和抗体）と併用して使用し得る好ましいアンタゴニストは、IL-1、IL-12、TNFa、IL-15、IL-17、IL-18、及びIL-22のアンタゴニストを含む。

【0168】

[0180]これらの試薬の例は、IL-12アンタゴニスト、例えば、IL-12(好ましくはヒトIL-12)に結合するキメラ、ヒト化又はインビトロで発生した抗体(又はその抗原結合断片)、例えば、WO00/56772に開示した抗体；IL-12受容体阻害剤、例えば、ヒトIL-12受容体に対する抗体；及びIL-12受容体の可溶性断片、例えば、ヒトIL-12受容体を含む。IL-15アンタゴニストの例は、IL-15又はその受容体に対する抗体(又はその抗原結合断片)、例えば、ヒトIL-15又はその受容体に対するキメラ、ヒト化、ヒト又はインビトロで発生した抗体、IL-15受容体の可溶性断片、及びIL-15結合タンパク質を含む。IL-18アンタゴニストの例は、抗体、例えば、ヒトIL-18に対するキメラ、ヒト化、ヒト又はインビトロで発生した抗体(又はその抗原結合断片)、IL-18受容体の可溶性断片、及びIL-18結合タンパク質(IL-18BP、Malliet et al.(2001)Circ. Res. 28)を含む。IL-1アンタゴニストの例は、インターロイキン-1変換酵素(ICE)阻害剤、例えば、Vx740、IL-1アンタゴニスト、例えば、IL-1RA(Anikinra, Amgen)、sIL1RII(ImmuneX)、及び抗IL-1受容体抗体(又はその抗原結合断片)を含む。

【0169】

[0181]TNFアンタゴニストの例はTNF(例えば、ヒトTNFa)に対するキメラ、ヒト化、ヒト又はインビトロで発生した抗体(又はその抗原結合断片)、例えば、D2E7(ヒトTNFa抗体、U.S.6,258,562)、CDP-571/CDP-870/BAY-10-3356(ヒト化抗TNFa抗体；Celltech/Pharmacia)、cA2(キメラ抗TNFa抗体；RemicadeTM、Centocor)；抗TNF抗体断片(例えば、CPD870)；TNF受容体の可溶性断片、例えば、p55若しくはp75ヒトTNF受容体は又はその誘導体、例えば、75kd TNFTR-IgG(75kd TNF受容体-IgG融合タンパク質、Enbrel(商標)；ImmuneX；タンパク質Arthritis & Rheumatism(1994)37:S295；J.Invest.Med.(1996)44:235A)、

p 5 5 k d TNFR - IgG (5 5 k D TNF受容体 - IgG 融合タンパク質 (Le n e r c e p t)) ; 酵素アンタゴニスト、例えば、TNFa 変換酵素 (T A C E) 阻害剤 (例えば、アルファスルホニルヒドロキサミン酸誘導体、W O 0 1 / 5 5 1 1 2 、及び N - ヒドロキシホルムアミド T A C E 阻害剤 G W 3 3 3 3 、 - 0 0 5 、又は - 0 2 2) ; 及び TNF - b p / s - TNFR (可溶性 TNF 結合タンパク質 ; 例えば、A r t h r i t i s & R he u m a t i s m (1 9 9 6) 3 9 (9) (s u p p l e m e n t) : S 2 8 4 ; Amer . J . P h y s i o l . - H e a r t a n d C i r c u l a t o r y P h y s i o l o g (1 9 9 5) 2 6 8 : 3 7 - 4 2) を含む。好ましい TNF アンタゴニストは、TNF受容体の可溶性断片、例えば、p 5 5 若しくは p 7 5 ヒト TNF 受容体又はその誘導体、例えば、7 5 k d TNFR - IgG 、及び TNFa 変換酵素 (T A C E) 阻害剤である。 10

【 0 1 7 0 】

[0 1 8 2] 他の態様において、本明細書に記載される G I T R アンタゴニストは、1 以上の下記 : I L - 1 3 アンタゴニスト、例えば、可溶性 I L - 1 3 受容体 (s I L - 1 3) 及び / 又は I L - 1 3 に対する抗体 ; I L - 2 アンタゴニスト、例えば、D A B 4 8 6 - I L - 2 及び / 又は D A B 3 8 9 - I L - 2 (I L - 2 融合タンパク質 ; セラゲン、例えば、A r t h r i t i s & R he u m a t i s m (1 9 9 3) 3 6 : 1 2 2 3) 、及び / 又は I L - 2 R に対する抗体、例えば、抗 T a c (ヒト化抗 I L - 2 R ; P r o t e i n D e s i g n L a b s , C a n c e r R e s . (1 9 9 0) 5 0 (5) : 1 4 9 5 - 5 0 2) と組合させて投与することができる。さらに別の併用剤は、G I T R アンタゴニスト (例えば、G I T R L 阻害性ポリヌクレオチド、拮抗性小分子、及び / 又は G I T R 及び / 又は G I T R L に対する中和抗体) を、非枯渇抗 C D 4 阻害剤 (I D E C - C E 9 . 1 / S B 2 1 0 3 9 6 ; 非枯渇長類化抗 C D 4 抗体 ; I D E C / S m i t h K l i n e) と組合させて含む。さらに他の好ましい併用剤は、抗体、可溶性受容体又はアンタゴニストリガンド ; 並びに p - セレクチン糖タンパク質リガンド (P S G L) 、抗炎症性サイトカイン、例えば、I L - 4 (D N A X / S c h e r i n g) ; I L - 1 0 (S C H 5 2 0 0 0 ; 組換え I L - 1 0 D N A X / S c h e r i n g) ; I L - 1 3 及び T G F - 、及びそのアゴニスト (例えば、作動性抗体) を含む、同時刺激性経路 C D 8 0 (B 7 . 1) 又は C D 8 6 (B 7 . 2) のアンタゴニストを含む。 20

【 0 1 7 1 】

[0 1 8 3] 他の態様において、1 以上の G I T R アンタゴニストは、1 以上の炎症性薬物、免疫抑制剤、又は代謝的若しくは酵素的阻害剤と同時に製剤化し、及び / 又は同時に投与することができる。本明細書に記載される G I T R アンタゴニスト (例えば、G I T R L 阻害性ポリヌクレオチド、拮抗性小分子、及び / 又は G I T R 及び / 又は G I T R L に対する中和抗体) と組合させて使用することができる薬物又は阻害剤の非制限的な例は、限定されないが、1 以上の : 非ステロイド性抗炎症性薬物 (N S A I D) 、例えば、イブプロフェン、テニダップ (例えば、A r t h r i t i s & R he u m a t i s m (1 9 9 6) 3 9 (9) (s u p p l e m e n t) : S 2 8 0) を参照) 、ナプロキセン (例えば、N e u r o . R e p o r t (1 9 9 6) 7 : 1 2 0 9 - 1 3) 、メロキシカム、ピロキシカム、ジクロフェナック、及びインドメタシン ; スルファサラジン (例えば、A r t h r i t i s & R he u m a t i s m (1 9 9 6) 3 9 (9) (s u p p l e m e n t) : S 2 8 1 ; コルチコステロイド、例えば、プレドニソロン ; サイトカイン抑制性抗炎症性薬物 (C S A I D) ; ヌクレオチドバイオ合成の阻害剤、例えば、プリンバイオ合成の阻害剤、ホレートアンタゴニスト (例えば、メトトレキセート (N - [4 - [2 , 4 - ジアミノ - 6 - プテリジニル] メチル] メチルアミノ] ベンゾイル) - L - グルタミン酸) ; 及びピリミジンバイオ合成、例えば、ジヒドロオロテート・デヒドロゲナーゼ (D H O D H) 阻害剤 (例えば、レフルノミド (例えば、A r t h r i t i s & R he u m a t i s m (1 9 9 6) V o l . 3 9 , N o . 9 (s u p p l e m e n t) , S 1 3 1 ; I n f l a m m a t i o n R e s e a r c h (1 9 9 6) 4 5 : 1 0 3 - 0 7) を含む。 G I T R アンタゴニスト (例えば、G I T R L 阻害性ポリヌクレオチド、 40

50

拮抗性小分子、及び／又はG I T R 及び／又はG I T R L に対する中和抗体)と組合合わせて使用するための好ましい治療用試薬は、N S A I D、C S A I D、(D H O D H)阻害剤(例えば、レフルノミド)、及びホレートアンタゴニスト(例えば、メトレキセート)を含む。

【0172】

[0184] 追加の阻害剤の例は、1以上の：コルチコステロイド(経口、吸引及び局所注射)；及びm T O R 阻害剤、例えば、可溶性ラパマイシン誘導体(例えば、エステル・ラパマイシン誘導体、例えば、C C I - 779(E1it(2002)Current Opinion Investig. Drugs 3(8):1249-53; Huang et al.(2002)Current Opinion Investig. Drugs 3(2):295-304)；TNF_a又はIL-1(例えば、IRAK、NIK、IKK、p38若しくはMAPキナーゼ阻害剤)のような前炎症性サイトカインによるシグナリングと干渉する試薬；COX2阻害剤、例えば、セレコキシブ、ロフェコキシブ、及びその変異体、例えば、Arthritis & Rheumatism(1996)Vol. No. 9(supplement), S81)；ホスホジエスレーベ阻害剤、例えば、R973401(ホスホジエステラーゼ・タイプIV阻害剤；例えば、Arthritis & Rheumatism(1996)Vol. No. 9(supplement), S282を参照)；ホスホリバーゼ阻害剤、例えば、細胞質ゾルのホスホリバーゼ2(cPLA2)(例えば、トリフルオロメチルケトン類似体(U.S.6,350,892))；血管内皮細胞成長因子又は成長因子受容体、例えば、VEGF阻害剤及び／又はVEGF-R阻害剤；及び血管新生阻害剤を含む。G I T R アンタゴニスト(例えば、G I T R L 阻害性ポリヌクレオチド、拮抗性小分子、及び／又はG I T R 及び／又はG I T R L に対する中和抗体)と組合合わせて使用するための好ましい治療用試薬は、免疫抑制剤、例えば、シクロスボリン、タクロリムス(FK-506)；m T O R 阻害剤、例えば、シロリムス(ラパマイシン)又はラパマイシン誘導体、例えば、可溶性ラパマイシン誘導体(例えば、エステル・ラパマイシン誘導体、例えば、C C I - 779)；COX2阻害剤、例えば、セレコキシブ及びその変異体；及びホスホリバーゼ、例えば、細胞質ゾルのホスホリバーゼ2(cPAL2)、例えば、トリフルオロメチルケトン類似体を含む。

【0173】

[0185] G I T R L アンタゴニストと組合わせることができる治療用阻害剤の追加の例は、1以上の：6-メルカプトプリン(6-MP)；アザチオプリン・スルファサラジン；メサラジン；オルサラジン・クロロキニン／ヒドロキシクロロキン；ペニシリアルミン；アウロチオルナレート(筋内及び経口)；アザチオプリン；コクヒシン(cochicine)；ベータ-2アドレノレセプターagonist(サルブタモル、テルブタリン、サルメテラル)；キサンチン(セオフィリン、アルニノフィリン)；クロモグリケート；ネドクロミル；ケトチフェン；イプラトロビウム及びオキシトロビウム；マイコフェノレート・モフェチル；アデノシン作動性抗血液凝固試薬；相補的阻害剤；及びアドレナリン作用試薬を含む。

【0174】

[0186] 特異的免疫障害を治療し又は防ぐための他の治療用試薬と組合わせた、本明細書に開示されるG I T R アンタゴニストの使用は、下記にさらに詳細に開示される。

[0187] G I T R アンタゴニストが組合わせることができる、関節炎障害(例えば、慢性リューマチ関節炎、炎症性関節炎、慢性リューマチ関節炎、若年慢性リューマチ関節炎、骨関節炎及び乾癬性関節炎)を治療し又は予防するための試薬の非制限的な例は、下記：本明細書に記載されるIL-12アンタゴニスト、N S A I D；C S A I D；TNF、例えば、TNF_a、本明細書に記載されるアンタゴニスト、本明細書に記載される非枯渇の抗CD4抗体；本明細書に記載されるIL-2拮抗性抗炎症性サイトカイン、例えば、IL-4、IL-10、IL-13及びTGF_a、又はそのアゴニスト；本明細書に記載されるIL-1又はIL-1受容体アンタゴニスト；本明細書に記載されるホスホジ

10

20

30

40

50

エステラーゼ阻害剤；本明細書に記載されるCOX-2阻害剤；イロプロスト（例えば、Arthritis & Rheumatism(1996)Vol. No. 9 (supplement), S282）及びタリドミド関連薬物（例えば、セルゲン）；レフノミド；プラスミノーゲン活性化の阻害剤、例えば、トラネキサミン酸；例えば、Arthritis & Rheumatism(1996)Vol. No. 9 (supplement), S284を参照）；サイトカイン阻害剤、例えば、T-614；例えば、Arthritis & Rheumatism(1996)Vol. No. 9 (supplement), S282を参照）；プロスタグランジンE1（例えば、Arthritis & Rheumatism(1996)Vol. No. 9 (supplement), S282を参照）；アザチオプリン（例えば、Arthritis & Rheumatism(1996)Vol. No. 9 (supplement), S281を参照）；インターロイキン-1変換酵素の阻害剤（ICE）；zap-70及び/又はlck阻害剤（チロシンキナーゼzap-70又はlckの阻害剤）；本明細書に記載される血管内皮細胞成長因子又は血管内皮細胞成長因子受容体の阻害剤；コルチコステロイド抗炎症性薬物（例えば、SB203580）；TNF変換酵素阻害剤；IL-11（例えば、Arthritis & Rheumatism(1996)Vol. No. 9 (supplement), S296を参照）；IL-13（Arthritis & Rheumatism(1996)Vol. No. 9 (supplement), S308を参照）；IL-17（例えば、Arthritis & Rheumatism(1996)Vol. No. 9 (supplement), S120を参照）；ゴールド；ペニシルアミン；クロロキン；ヒドロキシクロロキン；クロラムブシル；シクロホスファミド；シクロスボリン；全リンパ腫照射；抗胸腺細胞グロブリン；CD5-毒素；経口投与ペプチド及びコラーゲン；ロベンザリット・デスオディウム；サイトカイン制御試薬（CRA）HP228及びHP466（Houghten Pharmaceuticals, Inc.）；ICAM-1アンチセンスホスホロチオエート・オリゴデオキシヌクレオチド（ISIS 2302；Isis Pharmaceuticals, Inc.）；可溶性相補的受容体1（TP10；T Cell Science, Inc.）；プレドニソン；オルゴテイン；グリコサミノグリカン・ポリスルフェート；ミノシクリン；抗IL2R抗体；海洋の及び植物の脂質（魚及び植物の種の脂肪酸；例えば、De Luca et al. (1995) Rheum. Dis. Clin. North Am. 21: 759-777）；アウラノフィン；ヘニルブタゾン；メクロフェナ酸；フルフェナミン酸；静脈内免疫グロブリン；ジレウトン；マイコフェノン酸（RS-61443）；タクロリムス（FK-506）；シロリムス（ラバマイシン）；アミブリローゼ（テラフェクチン）；クラドリビン（2-クロロデオキシアデノシン）；及びアザリビンの1以上を含む。好ましい併用剤は、メトトレキセート又はレフノミド、及び適度の若しくは重篤な慢性リューマチ関節炎の場合のシクロスボリンと組合わせて、GITRアンタゴニスト（例えば、GITRL阻害性ポリヌクレオチド、拮抗性小分子、及び/又はGITR及び/又はGITRLに対する中和抗体）を含む。

【0175】

[0188] 関節炎障害を治療するためのGITRと組合わせて使用するための阻害剤の好ましい例は、TNFアンタゴニスト（例えば、TNFに結合する、キメラ、ヒト化、ヒト又はインビトロで発生した抗体、又はその抗原結合断片；TNF受容体の可溶性断片、例えば、p55又はp75ヒトTNF受容体その誘導体、例えば、75kD TNFR-IgG (75kD TNF受容体-IgG融合タンパク質、エンブレル（商標）)、p55kD TNF受容体-IgG融合タンパク質；TNF酵素アンタゴニスト、タンパク質TNFa変換酵素（TACE）阻害剤）；IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-22のアンタゴニスト；T細胞及びB細胞枯渇試薬（例えば、抗CD4又は抗CD22抗体）；小分子阻害剤、例えば、CCII-779；cox-2及びcPLA2阻害剤；NSAID；p38阻害剤、TPL-2、Mk-2及びNFkb阻害剤；RAGE又は可溶性RAGE；P-セレクチン又はPSGL-1阻害剤（例えば、小分子阻害剤

10

20

30

30

40

50

剤、それに対する抗体、例えば、P - セレクチンに対する抗体) ; エストロゲン受容体ベータ(ERB)アゴニスト又はERB - NF_kbアンタゴニストを含む。1以上のGITRアンタゴニスト(例えば、GITRL阻害性ポリヌクレオチド、拮抗性小分子、及び/又はGITR及び/又はGITRLに対する中和抗体)と一緒に同時に投与し、及び/又は同時に製剤化することができる最も好ましい追加の治療用試薬は、1以上のTNF受容体の可溶性断片、例えば、p55又はp75ヒトTNF受容体又はその誘導体、例えば、75kd TNFR - IgG(75kD TNF受容体 - IgG融合例えは、エンブレル(商標)) ; メトレキセート、レフルノミド、又はシロリムス(ラパマイシン)又はその類似体、例えば、CCI - 779を含む。

【0176】

10

[0189] GITRアンタゴニストが併用される、多発性硬化症を治療し又は予防するための試薬の非制限的な例は、下記：インターフェロン、例えば、インターフェロン - アルファ(例えば、アボネックス(商標)；Biogen)及びインターフェロン - 1b(ベータセロン(商標)；Chiron/Berlex)；共重合体1(Cop - 1；Copaxone(商標)；Teva Pharmaceutical Industries, Inc.)；高压酸素；静脈内免疫グロブリン；クラドリビン；本明細書に記載されるTNFアンタゴニスト；コルチコステロイド；プレドニソロン；メチルプレドニソロン；アザチオプリン；シクロホスファミド；シクロスボリン；メトレキセート；4 - アミノピイジン；及びチザニジンを含む。GITRアンタゴニスト(例えば、GITRL阻害性ポリヌクレオチド、拮抗性小分子、及び/又はGITR及び/又はGITRLに対する中和抗体)と組合わせて使用することができる追加のアンタゴニストは、ヒトサイトカイン又は成長因子、例えば、TNF、LT、IL - 1、IL - 2、IL - 6、IL - 7、IL - 8、IL - 12、IL - 15、IL - 16、IL - 18、EMAP - 11、GM-CSF、FGF、及びPDGFに対する抗体又はそのアンタゴニストを含む。本明細書に記載されるGITRアンタゴニスト(例えば、GITRL阻害性ポリヌクレオチド、拮抗性小分子、及び/又はGITR及び/又はGITRLに対する中和抗体)は、他の細胞表面分子、例えば、CD2、CD3、CD4、CD8、CD25、CD28、CD30、CD40、CD45、CD69、CD80、CD86、CD90又はそれらのリガンドに対する抗体と組合わせることができる。GITRアンタゴニスト(例えば、GITRL阻害性ポリヌクレオチド、拮抗性小分子、及び/又はGITR及び/又はGITRLに対する中和抗体)はまた、メトレキセート、シクロスボリン、FK506、ラパマイシン、マイコフェノレート・モフェチル、レフロノミド、NSAID、例えば、イブプロフェン、プレドニソロンのようなコルチコステロイド、ホスホジエステラーゼ阻害剤、アデノシン作動性抗血液凝固試薬、相補的阻害剤、アドレナリン作用試薬、本明細書に記載される前炎症性サイトカインによるシグナリングと干渉する試薬、IL - 1b変換酵素阻害剤(例えば、Vx740)、抗P75、PSGL、TACE阻害剤、キナーゼ阻害剤のようなT細胞シグナリング阻害剤、金属ロプロテイナー阻害剤、スルファサラジン、アザチロプリン、6 - メルカプトプリン、血管新生変換酵素阻害剤、本明細書に記載される可溶性サイトカイン受容体及びその誘導体、及び抗炎症性サイトカイン(例えば、IL - 4、IL - 10、IL - 13及びTGF)のような試薬と組合わせることができる。

【0177】

30

[0190] GITRアンタゴニスト(例えば、GITRL阻害性ポリヌクレオチド、拮抗性小分子、及び/又はGITR及び/又はGITRLに対する中和抗体)が組み合わされ得る多発性硬化症の治療用試薬の好ましい例は、インターフェロンb、例えば、IFNb - 1a及びIFNb - 1b；コパキソン、コルチコステロイド、IL - 1阻害剤、TNF阻害剤、CD40リガンド及びCD80に対する抗体、及びIL - 12アンタゴニストを含む。

【0178】

[0191] GITRアンタゴニスト(例えば、GITRL阻害性ポリヌクレオチド、拮抗性小分子、中和抗GITR抗体、及び/又は中和GITRL抗体)が組み合わされ得

40

50

る炎症性腸疾患（例えば、クローン疾患、潰瘍性大腸炎）を治療し又は予防するための試薬の非制限的な例は、下記：ブデノシド；上皮細胞成長因子；コルチコステロイド；シクロスボリン、スルファサラジン；アミノサリクレート；6-メルカプトプリン；アザチオプリン；メトロニダゾール；リポキシゲナーゼ阻害剤；メサラミン；オルサラジン；バルサラジン；抗酸化剤；トロンボキサン阻害剤；IL-1受容体拮抗性抗IL-1モノクローナル抗体；抗IL-6モノクローナル抗体；成長因子；エラスターーゼ阻害剤；ピリジニル-イミダゾール化合物；本明細書に記載されるTNFアンタゴニスト；IL-4、IL-10、IL-13及び/又はTGF β サイトカイン又はそのアゴニスト（例えば、作動性抗体）；IL-11；ブレドニソロン、デキサメタゾン又はブデソニドのグルクロニド-又はデキストラン-結合プロドラッグ；ICAM-1アンチセンス・ホスホロチオエート・オリゴデオキシヌクレオチド（ISIS 2302；Isis Pharmaceuticals, Inc.）；可溶性相補的受容体1（TP1-；T Cell Sciences, Inc.）；叙放性メサラジン；メトレキセート；血小板活性化因子（PAF）のアンタゴニスト；シプロフロキサシン；及びリグノカインを含む。

【0179】

[0192] 一態様において、GITRアンタゴニスト（例えば、GITRL阻害性ポリヌクレオチド、拮抗性小分子、中和GITR抗体、及び/又は中和GITRL抗体）は、免疫応答、例えば、移植拒絶又はグラフト-v-宿主の制御に関する他の標的に使用する1以上の抗体と組合させて使用することができる。本発明のGITRアンタゴニスト（例えば、GITRL阻害性ポリヌクレオチド、拮抗性小分子、中和GITR抗体、及び/又は中和GITRL抗体）が組み合わされ得る免疫応答を治療し又は予防するための試薬の非制限の例は、下記：制限されないが、CD25（インターロイキン-2受容体-a）、CD11a（LFA-1）、CD54（ICAM-1）、CD4、CD45、CD28/CTLA4、CD80（B7.1）及び/又はCD86（B7.2）を含む他の細胞表面分子に対する抗体を含む。さらに別の態様において、GITRアンタゴニスト（例えば、GITRL阻害性ポリヌクレオチド、拮抗性小分子、中和GITR抗体、及び/又は中和GITRL抗体）は、一般的な免疫抑制試薬、例えば、シクロスボリンA又はFK506と組合させて使用される。

【0180】

[0193] 他の態様において、GITRアンタゴニスト（例えば、GITRL阻害性ポリヌクレオチド、拮抗性小分子、中和GITR抗体、及び/又は中和GITRL抗体）は、自己免疫障害、炎症性疾患又は移植拒絶に対するワクチンアジュバントのように使用される。これらのタイプの障害の治療のためのアジュバントの組合せは、標的とされる自己抗原、例えば、自己免疫に関する自己抗原、例えば、ミエリン塩基性タンパク質；炎症性自己抗原、例えば、アミロイドペプチドタンパク質、又は移植抗原、例えば、アロ抗原由来の幅広い種類抗原と組合させて使用するのに適している。抗原は、タンパク質由來のペプチド又はポリペプチド、並びに下記：糖類、タンパク質、ポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド、自己抗原、アミロイドペプチドタンパク質、移植抗原、アレルゲン、又は他の巨大分子成分のいずれかの断片を含んでもよい。

【0181】

[0194] 例えば、脊椎宿主におけるアレルゲンへの応答を緩和するための期待されるワクチンは、本発明のアジュバント併用剤を含有し、アレルゲン又はその断片を含有するものである。そのようなアレルゲンの例は、米国特許第5,830,877号及び公開された国際特許出願WO 99/51259に記載され、全体において参照により本明細書に援用され、そして、花粉、昆虫毒、動物のふけ、真菌の胞子及び薬物（例えば、ペニシリン）を含む。ワクチンは、アレルギー反応の既知の原因であるIgE抗体の産生を干渉する。別の例では、本発明のアジュバント併用剤を含有する、脊椎宿主におけるアミロイド堆積によって特徴付けられる疾患を予防し又は治療するための期待されるワクチンは、アミロイドペプチドタンパク質（APP）の部分を含有するものを含む。この疾患は、アルツハイマー病、アミロイドーシス又はアミロイド発生疾患のように様々に意味する。こ

10

20

30

40

50

のように、本発明のワクチンは、本発明のアジュvant併用剤プラスA ペプチド、並びにA ペプチドの断片、及びA ペプチド又はその断片に対する抗体を含む。

【0182】

[0195] 1) 抗原提示細胞機能を下方制御すること；及び2) 免疫抑制を管理するための併用療法の方法は、当該技術分野において周知である（例えば、Xiao et al. (2003) Dendritic cell vaccine designs: strategies for eliciting peripheral tolerance therapy of autoimmune disease. *BioDrugs* 17:103-11；Kuwana (2002) Manipulation of dendritic cells for tolerance induction in transplantation and autoimmune disease. *Transplantation* 73:S19-S22；Rifile et al. (2002) Dendritic cells and second signal blockade: a step toward allograft tolerance. *Transplantation* 73:S1-S2；Mancini et al. (2004) The management of immunosuppression: the art and the science. *Crit. Care. Nurs. Q.* 27:61-64）。

【0183】

[0196] 本発明の別の側面は、従って、GITRアンタゴニスト（例えば、GITR阻害性ポリヌクレオチド、拮抗性小分子、及び／又はGITR及び／又はGITRLに対する中和抗体）と他の治療用化合物の併用した投与を実行するためのキットに関する。一態様において、キットは、薬学的な担体において製剤化される1以上の結合試薬、及び少なくとも1つの試薬、例えば、1以上の別々の医薬調製物において、適しているもとして製剤化される治療用試薬を含む。

【0184】

[0197] 本発明は、新規なマウスcDNA、マウスGITRLを指示する新規なりガンドポリペプチドをコードする、指示したマウスGITRL cDNA、並びにGITRLに対する新規な抗体に関する下記の実施例によって説明される。当業者は、マウスGITRLの全てのホモログに適している実施例の手法を理解するであろう。

【実施例】

【0185】

実施例

[0198] 本発明の理解を手助けする下記に設置される実施例は、限定されないが、いずれの方法におけるその範囲を含み、そして、制限するために構築されるべきではない。実施例は、慣用的な方法、例えば、フローサイトメトリー（例えば、FACS）、PCR、ノーザン及びインサイチュハイブリダイゼーション、又はベクターの構築に使用される方法、そのようなベクター及びプラスミドへのポリペプチドをコードする遺伝子の挿入、そのようなベクター及びプラスミドの宿主細胞への導入、及びそのようなベクター及びプラスミド由来のポリペプチドの宿主細胞内での発現の詳細な記載を含まない。そのような方法は、当業者に周知である。

【0186】

実施例1

GITRL DNA配列の同定

実施例1.1 マウスGITRL cDNA及びゲノム配列の同定

[0199] 2つのアプローチがマウスGITRLホモログを同定するために採用された。1つのアプローチでは、ヒトGITRLのアミノ酸配列（GenBank Acc. No. AX077015由来）は、div1；div2；div3；div4；gbdiv_cu；Celeriaマウス(cm)に対するTblastn検索；及びdraft_mouse-dnaデータベースで使用した。ゲノム配列ga_69772862.cm

20

30

40

50

—4は、調査するための可能なヒットの1つとして同定された。間違ったアミノ酸配列は、ヒトG I T R Lのアミノ酸配列(GenBank Acc. No. AX077015)を用いて、マスクしていないC e l e r aマウスゲノムアセンブリー(cm)に対するTblastn検索において、期待値(E)=10(デフォルト)、100及び1000を用いて同定した。ゲノム配列g a _ x 5 j 8 b 7 w j 5 _ 0 4 1 . c m _ a a _ 2は、間違ったアミノ酸配列を含有するゲノム配列として同定した。

【0187】

[0200]別のアプローチでは、ヒトG I T R Lのアミノ酸配列(GenBank Acc. No. NM_005092)はマスクしていないC e l e r aマウスゲノムAs 10 sンブリー(cm)に対するTblastn検索において、デフォルト期待値(E)=10及び100を用いて使用した。ゲノム配列g a _ x 5 j 8 b 7 w 7 w j 5 _ 0 4 1 . c m _ a a _ 2は3つの高いスコアリングペアー(HSP)領域を含有するゲノム配列として同定された。

【0188】

[0201]推定のマウスcDNA配列は、上述のTblastn検索において得られた3つのHSP領域に基づいて構築した。このcDNA配列は、C e l e r a由来の対応するヒトゲノム配列(g a _ x 2 h t b 1 3 v u d 5 _ 6 6 . c h _ r 2 5 h _ 1)を有する3つのヒトエクソン配列、及びC e l e r a由来の対応するマウスゲノム配列(g a _ x 5 j 8 b 7 w 7 w j 5 _ 6 6 . c h _ a a _ 2)を有する3つ誘導のマウスの推定のエクソン配列との間の整列の比較に基づいて編集した。この編集は、ヒト配列についてのスプライス結合を考慮した。編集したマウスG I T R L cDNA配列は、173個のアミノ酸の一部に対応する、519bp(522bpの配列をコードする)のオーブンリーディングフレームを含有する。 20

【0189】

[0202]プライマーは、マウスG I T R Lゲノム配列の推定のエクソンに基づいて設計し、マウスの胸腺cDNAライブラリーからPCRによって対応する物理的なcDNAクローンを単離するために使用した。フォワード(配列番号:4)及びリバース(配列番号:5)PCRプライマーの配列は:5'ATGGAGGAAATGCCCTTGAGAG3'(フォワードプライマー)、及び5'GAATGGTAGATCAGGCATTAAAGATG3'(リバースプライマー)であった。 30

【0190】

[0203]結果の断片をサブクローニングし、そして、DNA配列を標準的な方法を用いて決定した。結果の断片は、すべての3つの予期したエクソンを含むマウスG I T R L cDNAの存在を確認した(下記参照)。この断片は、この結果のcDNAクローンのPCR増幅によって、cDNAの最終のコーディングセグメント(2つのアミノ酸)を含めるために伸長した。この工程についてのフォワード(配列番号:6)及びリバース(配列番号:7)PCRプライマーの配列は:

5'TTTAAAGTCGACCCATGGAGGAAATGCCCTTGAGAG3'
(フォワードプライマー)、及び

5'TTTAAAGAATTCTCATTAAGAGATGAATGGTAGATCAGGCAT3'
(リバースプライマー)であった。 40

【0191】

[0204]フォワードPCRプライマーは、S a l I部位、翻訳開始のためのK o z a k配列、及び開始のメチオニンをコードするATGを含有した。リバースプライマーは、E c o R I部位を含有した。S a l I及びE c o R I部位は、方向性サブクローニングについて使用し、そして、最終のcDNAクローンの配列決定を実行した。

【0192】

[0205]全長のマウスG I T R L cDNA配列及びその推定したアミノ酸配列は、それぞれ、配列番号:1及び配列番号:2に記載される。ヒトG I T R L cDNA(配列番号:8)及びマウスG I T R L cDNA配列の整列は、69.6%の同一性を示 50

した。ヒトG I T R Lアミノ酸（配列番号：9）及びマウスG I T R Lアミノ酸配列（図1）の整列は、54.1%の同一性及び69.6%の類似性を示した。この程度のアミノ酸の同一性は、ヒト及びマウスの他のTNFRリガンドのホモログの間に一般的に存在するものと類似する（Oshima et al. (1989) Int. Immunol. 10: 517-26）。

【0193】

[0206]クローニングしたマウスG I T R L cDNA配列（配列番号：1）と公開され利用可能なマウスのデータベースとの比較は、マウスG I T R Lのコード領域における一本鎖ヌクレオチド多形（SNP）を示した（配列番号：2のアミノ酸位置157でのアスパラギンからスレオニンへの変化に起因する、エクソン3における配列番号：1のヌクレオチド位置470でのA/Cトランスバージョン）。

【0194】

[0207]マウスG I T R L cDNA配列と上述のC elera (ga_x5j8b7w7wj5_041.cm_aa_2)との比較は、マウスG I T R L遺伝子座が、マウスとヒトG I T R Lとの間に良く保存されるエクソンサイズ及び位置を伴う、3つのエクソン及び2つのイントロン（下記の表2を参照）を含有する。マウスG I T R LゲノムDNA配列は、配列番号：3に記載される。

【0195】

【表2】

表2

配列番号：3 における領域	配列属性	長さ（bp）	配列番号：1 における位置
1-255	5' -配列	255	-
256-390	エクソン#1	135	1-135
391-6010	イントロン#1	5620	-
6011-6044	エクソン#2	34	136-169
6045-8990	イントロン#2	2946	-
8991-9340	エクソン#3	350	170-519
9341-9343	終止	3	520-522
9344-10289	3' -配列	946	-

20

【0196】

[0208]マウスG I T R Lのゲノム構造（表2）とヒトG I T R Lのゲノム構造（下記の表3）との比較は、エクソンサイズとイントロン位置がヒト及びマウスのG I T R LゲノムDNA配列間でよく保存されていることを示す。ヒトG I T R LゲノムDNA配列は、配列番号：10に示される。

【0197】

30

【表3】

表3

配列番号：10 における領域	配列属性	長さ (bp)	配列番号：8 における位置
1-421	5' -配列	421	—
422-577	エクソン#1	156	1-156
578-7348	イントロン#1	6771	—
7349-7379	エクソン#2	31	157-187
7380-9604	イントロン#2	2225	—
9605-9948	エクソン#3	344	188-531
9949-9951	終止	3	532-534
9952-10331	3' -配列	380	—

【0198】

実施例1.2 マウスGITRLの疎水性プロファイル

[0209] マウスGITRLの疎水性プロファイルは、TopPred (Claros and von Heijne (1994) Comput. Appl. Biosci. 10: 685-6)によって決定した。マウスGITRLのアミノ酸残基(配列番号：2)に対する疎水性スコアのプロットはヒトGITRLに類似する、アミノ酸25-50の間に近接して局在した1つの推定の疎水性領域を示した。この疎水性セグメントは、タイプIIの膜貫通タンパク質についての予期した膜貫通領域に対応する。
10

【0199】

実施例2 マウスGITRLの組織発現

[0210] マウスGITRL cDNA配列(配列番号：1)に基づくオリゴヌクレオチドプローブを用いて、ノーザンハイブリダイゼーション、インサイチュハイブリダイゼーション、及びリアルタイムPCRによって、GITRL発現についていくつかのマウス組織試料を試験した(例えば、Heid et al. (1996) Genome Res. 6: 986-94; Mulla et al. (1998) Nucleic Acids Res. 26: 1026-31; Giulietti et al. (2001) Methods 25: 386-401)。
20

【0200】

[0211] ノーザンハイブリダイゼーションは、心臓、脾臓、肺、リンパ節、腎臓、及び肝臓においてかろうじて検出可能な転写物を示したが、その後のインサイチュハイブリダイゼーションは、心臓、脾臓、リンパ節及び胸腺においてGITRL発現を示した。これらの組織におけるGITRL発現は、一般的に、心臓の心膜及び心内膜の細胞、脾臓の白色の髓質、リンパ節の皮質、パラ皮質及び髓管ゾーン、及び胸腺の皮質及び髓管ゾーンに限定された。

【0201】

[0212] 胸腺、脾臓及びリンパ節におけるGITRL発現は、さらにリアルタイムPCR解析によって確かめた。GITRLは、一次Bリンパ細胞である脾臓及びリポポリサッカリド(LPS)で刺激された脾臓細胞において最も高いレベルで発現した。GITRL発現のほとんど無いくらいに低いレベルが、胃、脳、及び腎臓で検出された。リアルタイムPCR解析はまた、脾臓及びLPS芽細胞よりは少ない程度であるが、肝臓、活性化したCD25-細胞、活性化したCD25+細胞、及びコンカナバリンAで活性化したリンパ節細胞におけるGITRL転写物を示した。増殖期にないCD25-又はCD25+細胞ではGITRL発現は検出されなかった。未成熟でありLPS刺激の骨髄由来の樹状突起細胞(DC)のリアルタイムPCR解析はまた、LPSによる24時間刺激により増加し、しかしLPS刺激の48時間後には基準線以下に減少する未成熟DCによる基準線のGITRL発現を示した。GITRL発現はまた、試験した全ての内皮細胞株(bE
40

10

20

30

40

50

N D 3、C 1 6 6、E O M A、M S I 及びS V E C 4 - 1 0)において変化する程度で検出され、及び細胞株をL P Sで刺激した場合に相対的に変化しないままであることが示された。対象的に、G I T R L c D N Aは、特定の器官の下記の未刺激のマウス細胞株：E 1 0 T 細胞株、T 2 胎児胸腺株、T 1 0 形質細胞腫、E L 4 胸腺腫、B A F 3 及びP R E B プレB 細胞株、B 9 B 細胞ハイブリドーマ、D A 1 G 単球、F B M D - 1 胎児骨髄、P 1 9 胚癌腫、M D F 肝臓、及びE 1 4 胚幹細胞株においてP C Rでは検出されなかつた。

【0202】

実施例3 組換えマウスG I T R Lの機能的発現

実施例3.1 G I T R Lの細胞表面G I T Rへの結合

10

[0213] 実施例1で単離したマウスc D N Aが機能的G I T Rリガンド(G I T R L)をコードしているかを決定するために、FLAGエピトープに融合したマウスG I T R L(G I T R L - F l a g - C o s)又はFLAGエピトープに融合した対照のマウスI L - 2 1 受容体(I L - 2 1 R - F l a g - C o s)を発現するC o s 細胞をマウスG I T Rを発現する細胞(G I T R - 2 9 3 T)とともに様々な時間の長さでインキュベートした。細胞-細胞相互作用は、フィコエリトリン標識した抗F l a g 抗体(P E - F L A G)及びフルオレセイン・イソシアネート(F I T C)標識した抗G I T Rを用いてフローサイトメトリーで検出した。G I T R - 2 9 3 T及びG I T R L - F l a g - C o s 細胞の同時遠心後のすでに1分で、約90%のG I T R - 2 9 3 T細胞(F I T C蛍光で検出される)は、FLAG(P E 蛍光で検出される)について同時染色され、G I T R - 2 9 3 T細胞がG I T R L - F l a g - C o s 細胞に結合したことを示し、そして、この相互作用は、実験の全60分を通じて認められた。対象的に、I L - 2 1 R - F l a g - C o s 細胞とともにインキュベートしたG I T R - 2 9 3 T細胞は、遠心60分後でさえ、FLAGについて有意に同時染色されなかつた。これらのデータは、実施例1で単離したマウスc D N Aが細胞表面のG I T Rを結合することができる機能的G I T R Lをコードしていることを示す。

20

【0203】

実施例3.2 可溶性G I T RへのG I T R Lの結合

[0214] G I T Rに結合するマウスG I T R Lの能力は、マウスG I T R Lを発現するC o s 細胞(G I T R L - C o s)又は擬似でトランスフェクトしたC o s 細胞を人I g GのF c部分(G I T R - F c)又は対照のヒトI g G(H I g G)に融合した組換えG I T Rと一緒にインキュベートすることによって確かめた。G I T R LへのG I T R - F cの結合は、F I T Cを結合したロバの抗ヒト抗体(F I T C - A b)を用いてフローサイトメトリーにより決定した。G I T R - F cと一緒にG I T R L - C o s 細胞のインキュベーションは、対照のH I g Gと一緒にG I T R L - C o s 細胞のインキュベーション(7.9%)と比較してF I T C - A b結合(28.8%)において3.6倍の増加に帰着した。非染色のG I T R L - F c、C T L A - 4 : F c融合タンパク質とF I T C - A bとと一緒にインキュベートしたG I T R L - C o s 細胞、F I T C - A bのみをインキュベートしたG I T R L - C o s 細胞は、蛍光を示さなかつた。処置し又は処置していない擬似でトランスフェクトしたC o s 細胞のいずれも何ら適した蛍光を示さなかつた。これらのデータは、実施例1で単離したマウスc D N Aが可溶性G I T Rに結合できる機能性G I T R Lをコードすることを示す。

30

【0204】

実施例4

G I T R LへのマウスG I T R Lの結合はC D 4⁺ C D 2 5⁺
細胞の増殖に帰着する

[0215] 細胞増殖におけるG I T R L : G I T R 結合の効果は、約50,000個のマウスT細胞を約50,000個の放射したT細胞を枯渇した脾臓細胞、及びG I T R 結合タンパク質の様々な濃度の存在又は不存在下で65 - 72時間、100 I U / m l I L - 2 で刺激することによって決定した。2つのG I T R 結合タンパク質は、これらの

40

50

アッセイ：作動性抗G I T R抗体（例えば、McHugh et al. (2002) immunity 15:311-23を参照；米国特許出願10/194,754も参照）又は修飾したラットY B 2 / 0細胞の表面に発現したマウスG I T R L (G I T R L - Y B 2 / 0)で使用した。細胞増殖は、細胞を $1 \mu\text{Ci}^3\text{H}$ -チミジンで培養の少なくとも6-12時間パルスし、次いで、シンチレーションカウンティングで ^3H -チミジンの取り込みを測定することによってアッセイした。

【0205】

[0216] 図2Aに示すように、CD 4⁺CD 25⁻T細胞は、抗G I T R抗体のいずれの濃度でも応答しなかった。対照的に、抗G I T R抗体は、試験した全ての濃度でCD 4⁺CD 25⁺T細胞の増殖を刺激した。例えば、試験した最も低い力価の抗G I T R抗体（約0.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）の存在下でCD 4⁺CD 25⁺T細胞の培養は、抗G I T R抗体の不在で培養した細胞に比べ、 ^3H -チミジンの取り込みにおいて約3倍の増加（約15,000cpm）に帰着した。CD 4⁺CD 25⁺T細胞増殖を刺激する抗G I T R抗体の能力は、約0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗体濃度で約45,000の頂部に達し、抗G I T R抗体の不在で培養した細胞と比べて、 ^3H -チミジンの取り込みにおいて約9倍の増加に対応する。
10

【0206】

[0217] 抗G I T R抗体で観察した結果に類似して、G I T R L - Y B 2 / 0細胞は、CD 4⁺CD 25⁻T細胞の増殖を刺激しなかった（図2B）。対照的に、G I T R L - Y B 2 / 0細胞は、CD 4⁺CD 25⁺T細胞の増殖を著しく刺激した。例えば、約20 10,000のG I T R L - Y B 2 / 0細胞の存在下でCD 4⁺CD 25⁺T細胞の培養は、等数の修飾していないY B 2 / 0細胞の存在下で培養した細胞と比べて、 ^3H -チミジンの取り込みにおいて約4-5倍の増加に帰着した。Y B 2 / 0細胞の数の約50,000までの増加は、等数の修飾していないY B 2 / 0細胞の存在下で培養した細胞と比べて、 ^3H -チミジンの取り込みにおいて約15倍の増加に帰着した（図2B）。

【0207】

実施例5

G I T RへのマウスG I T R Lの結合は、CD 4⁺CD 25⁺T細胞を介したCD 4⁺CD 25⁻T細胞の抑制を逆転する

[0218] これらの実施例において使用したT細胞抑制アッセイは、以前に開示されている（例えば、Thornton and Shevach (2000) J. Immunol. 164:183-90; McHugh et al. (2002) Immunity 16:311-23；両者は参照により本明細書に援用される）。簡単には、約50,000個のCD 4⁺CD 25⁻応答性T細胞は、約50,000個の放射したT細胞を枯渇した脾臓細胞、0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗CD 3抗体、及び様々な数の新鮮に単離した抑制性CD 4⁺CD 25⁺T細胞の存在下で培養した。次いで、約50,000個の放射したG I T R L - Y B 2 / 0細胞又は2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の作動性抗G I T R抗体のCD 4⁺CD 25⁻増殖の抑制を逆転する能力は、 ^3H -チミジンの取り込みをシンチレーションカウンティングを介して測定することによってアッセイした。
30

【0208】

[0219] 図3Aに示されるように、CD 4⁺CD 25⁺T細胞は、投与量に依存した方法で、CD 4⁺CD 25⁻細胞の増殖を減少した。抗G I T R抗体及びG I T R L - Y B 2 / 0細胞の両方は、試験したCD 4⁺CD 25⁺抑制性細胞の全範囲の数に対して、CD 4⁺CD 25⁻増殖の抑制を完全に逆転することができた。このように、G I T R Lによるその受容体G I T Rへの結合は、G I T RへのアゴニストG I T R抗体の結合のように、CD 4⁺CD 25⁺細胞の抑制性機能を遮断した。抑制を逆転するG I T R L - Y B 2 / 0細胞の能力は、投与量に依存する方法で起こり、約3,000個より少ないG I T R L - Y B 2 / 0細胞は、少なくとも部分的に、このアッセイにおいて抑制を逆転し又は減少した（図3B）。修飾していないY B 2 / 0又はG I T Rを発現しているY B 2 / 0細胞のいずれも、CD 4⁺CD 25⁺T細胞を介した抑制に賞賛される効果はなかつ
40 50

た(図3A)。

【0209】

[0220] 新鮮に単離したCD4⁺CD25⁺T細胞で得られた結果とは対照的に、GITRL: GITR結合は、抗CD3抗体、T細胞を枯渇した脾臓細胞、及びIL-2で活性化したCD4⁺CD25⁺T細胞によって介される抑制に殆どないし全く効果がなかった(図4)。抗GITRL抗体又は約50,000個のGITRL-YB2/0細胞の添加のいずれも約25,000個の活性化したCD4⁺CD25⁺T細胞によって介される抑制を逆転することはできなかった。しかしながら、より少ない活性化したCD4⁺CD25⁺T細胞がアッセイに添加した場合(例えば、約1,500-12,500個)、抗GITRL固体及びGITRL-YB2/0細胞は、抑制を部分的に減少することができたが、完全には排除できなかった。
10

【0210】

実施例6

抗マウスGITRL抗体はCD4⁺CD25⁺T細胞によって介される抑制を復帰する
実施例6.1 抗マウスGITRL抗体の単離

[0221] マウスGITRLに特異的な抗体は、マウスGITRL cDNAを発現するラットYB2/0細胞(GITRL-YB2/0)でラットを免疫することによって生産した。当該技術分野において周知の方法を用いて、抗体ハイブリドーマを作製し、フローサイトメトリーを用いてマウスGITRLを発現するPhoenix細胞に対してスクリーニングした。擬似でトランスフェクトしたPhoenix对照細胞ではなく、GITRL-Phoenix細胞に特異的に結合する2つの抗体、5F1及び10F12を同定した。これらの抗体ハイブリドーマは、アメリカン・タイプ・カルチャーカレクション(ATCC)に2003年7月22日に寄託し; ATCC受託番号は、ハイブリドーマ5F1についてPTA-5336、及びハイブリドーマ10F12についてPTA5337である。
20

【0211】

実施例6.2 抗マウスGITRL抗体は、CD4⁺CD25⁺T細胞の抑制活性におけるGITRLの効果を遮断する

[0222] 上述の実施例5に記載されるように、細胞表面でGITRLを発現するYB2/0は、新鮮に単離したCD4⁺CD25⁺T細胞によって介されるCD4⁺CD25⁻T細胞増殖の抑制を逆転することができた。抗GITRL抗体がCD4⁺CD25⁺T細胞を介した抑制を復帰できるかを決定するために、実施例5に記載されるT細胞抑制アッセイが、5F1又は10F12の抗GITRL抗体のいずれか、又は対照抗体の存在又は不存在下で実行した。
30

【0212】

[0223] 実施例5に見られるように、GITRL-YB2/0細胞の存在下でCD4⁺CD25⁻応答性T細胞及び新鮮に単離したCD4⁺CD25⁺抑制性T細胞の培養は、CD4⁺CD25⁻細胞増殖の抑制の完全な逆転に帰着した(図5A及び5B)。5F1抗GITRL抗体を含有する10%のハイブリドーマ培養上清のアッセイへの添加は、部分的に(図5B)ないし殆ど完全に(図5A)、CD4⁺CD25⁺を介した抑制の逆転に帰着した。10F12抗GITRL抗体の添加は、同様の結果を与えた。期待されるように、対照抗体(「対照Ig」)の存在は、抑制を逆転するためにGITRL-YB2/0細胞の能力に賞賛される効果はなかった。これらのデータは、抗GITRL抗体は、CD4⁺CD25⁺細胞の抑制活性を止めるGITRLの能力を遮断することを示した。
40

【0213】

実施例6.3 抗マウスGITRL抗体はCD4⁺CD25⁺T細胞の存在下でのみT細胞応答を抑制する

[0224] リンパ節細胞培養物は、様々な濃度の作動性抗CD3抗体の存在下で、CD4⁺CD25⁺T細胞の枯渇前(図6A)と枯渇後(図6B)で刺激し、そして、増殖
50

をシンチレーションカウンティングを介して³H-チミジンの取り込みを決定することによって測定した。増殖における抗GITRL抗体の効果を決定するために、5F1抗GITRL抗体を含有する10%のハイブリドーマの培養上清を並行培養に添加した。

【0214】

[0225] 図6Aに示すように、細胞を約0.075μg/mlないし約0.75μg/mlの抗CD3抗体で刺激した場合、CD4⁺CD25⁺T細胞を含有するリンパ節細胞の増殖を抑制した。CD4⁺CD25⁺T細胞を含有するリンパ節細胞を1.0μg/mlの抗CD3抗体で刺激した場合は、抗GITRL抗体の存在下では抑制は見られなかった。CD4⁺CD25⁺T細胞を含有するリンパ節細胞培養を用いて得られた結果とは対照的に、抗GITRL抗体の添加は、一般的に、CD4⁺CD25⁺T細胞を枯渇したリンパ節細胞培養物に抑制効果はなかった(図6B)。一緒にして、これらのデータは、抗GITRL抗体はCD4⁺CD25⁺T細胞に発現するGITRと他の細胞に発現するGITRLとの間の相互作用を遮断すること、そして、このGITR/GITRL相互作用の遮断は、免疫抑制を復帰するためのCD4⁺CD25⁺T細胞の制御機能を増強することを示唆する。

【0215】

実施例7

リンパ様組織におけるGITRL発現細胞の分布

[0226] 作動性抗GITRL抗体は、フローサイトメトリーによってマウス組織のGITRLの発煙を調べるために使用した。CD4のみ、CD8のみ、又はCD4及びCD8を発現する新鮮に単離したCD11c⁺脾臓樹状突起細胞(DC)の部分集合は、低レベルのGITRLを構築的に発現した(図7A)。しかしながら、GITRLの表面発現は、CD11c^{10w}B220⁺形質細胞様樹状突起細胞のうち顕著に高かった(Nakano et al., 2001)。図7Bにおいて、抗GITRL mAb又はアイソタイプの対照での染色は、BALB/cマウス由来の新鮮に単離したCD11c⁺脾臓DCの指示した部分集合体においてなされた。

【0216】

[0227] 同様に、新鮮に単離したB220⁺脾臓B細胞は、より高いレベルであるけれども、腹膜のB-1B細胞(preCCD11b⁺B220⁺)と同様に、GITRLを構築的に発現した(図7C、下)。

【0217】

[0228] 選択を受けている胸腺細胞の部分集合は、測定可能な量のGITRLを発現しなかった(図7D)。対照的に、図7Eに示されるように、GITRLの発現は、CD4⁻CD8⁻胸腺前駆体のすべての部分集合に検出でき、CD44⁺CD25⁺(R2)及びCD44⁻CD25⁺(R3)部分集合は最も高いレベルで発現した。

【0218】

[0229] GITRLは、刺激していないリンパ節細胞では検出できなかった(図7F)。GITRLはまた、刺激していない脾臓T細胞では検出できなかった(データ示さず)。これらのデータは、選択を受けていないT細胞(図7D)又は抹消の増殖期がないT細胞(刺激していないリンパ節及び脾臓細胞;図7F、及びデータ示さず)ではなく、プロフェッショナルな抗原提示細胞(DC、B細胞及びマクロファージ;図7A-7C)及び胸腺CD4⁻CD8⁻前駆体さいぼう(図7F)によるGITRLの発現を示した。これらのデータは、実施例2に示されるノーザンハイブリダイゼーション、インサイチュハイブリダイゼーション、及びリアルタイムPCRによって得られるデータと相關した(上述)。

【0219】

実施例8

APCはTLR刺激後のGITRLを下方制御する

[0230] GITRL発現におけるB細胞活性の効果は、トール様受容体(TLR)リガンド、又は抗CD40及びIL-4、又は抗IgMで処理した後に調べた。脾臓B細

10

20

30

40

50

胞 ($B220^+$ 脾臓細胞) 又は腹膜 B - 1 B 細胞 ($B220^+ CD11b^+ PerC$) の刺激は、急速であり一時的な GITRL の上方制御に帰着し、殆どの処置の 4 時間後に見られた(図 8 A)。刺激の 48 - 60 時間後には、発現は、安定した刺激前を下回るよう下がった。例外は、腹膜腔由来のポリ I : C で処理した B - 1 B 細胞であり、試験した時間点の間でこの下方制御を示さなかった。期待されるように、CD86 のレベルは、全てのグループで実験の過程で増加し、観察された GITRL の下方制御は、細胞死に派生しなかったことを示した。

【0220】

[0231] 抗 CD40 及び IL-3 で処理した後の B 細胞によって発現した GITRL の減少は、T 細胞ヘルプの供給の後に変化することができた。全脾臓細胞のうち B 細胞による GITRL 発現は、抗 CD3 抗体と一緒に培養した後に評価した。これらの培養条件下で、 $B220^+$ 脾臓細胞における GITRL 発現はまた、48 時間後に下方制御された(図 8 B)。このように、T 細胞活性の生理学的なレベルはまた、脾臓 B 細胞による GITRL の発現における減少へと導いた。

【0221】

[0232] 脾臓 CD11c⁺ DC は、磁気ビーズで濃縮し、LPS の存在下で培養 12 及び 36 時間後に GITRL の発現を調べた。DC は、初期の 12 時間、培養液又は LPS で発現した GITRL で培養し、LPS により適度の上方制御を誘導した。しかしながら、36 時間まで、GITRL の発現は、LPS で処理した DC、並びに培養液のみで培養したものでは検出できなかった。図 8 C は、指定した時間での LPS (0.5 μg / ml) と共に、又は伴わない培養後に、精製した CD11c⁺ CD による GITRL (上部のヒストグラムパネル) 及び CD86 (B7.2) (下部のヒストグラムパネル) の発現を示す。示すように、CD86 (B7.2) 発現は、期待されるように上方制御された (Bauchereau and Steinman, 1998)。培養液で培養した脾臓 DC による GITRL 発現の減少は、インビトロでの培養中に発生する「自発的な」CD 成熟 (Vremec and Shortman, 1997) は GITRL の発現を下方制御するのに十分である。このため、DC は B 細胞について示された同じ処置に供されただけでも、LPS 刺激後の結果のみが示される。別の公開された報告 (Tone et al., 2003) の結果に類似して、骨髄由来の DC は GITRL を構成的に発現し、そして、そのような発現は、様々な TLR リガンドでの処置後にたった僅かに減少したことが見出された(データ示さず)。

【0222】

[0233] CD4 及び CD8 T 細胞の両方は、可溶性抗 CD3 抗体の不在 ('+Med.') 又は存在 ('+aCD3') 下で脾臓細胞の培養 48 時間後に GITRL の測定可能なレベルを発現し(図 8 D)、前リアルタイム PCR を確かめた(実施例 2 もまた参照)。

【0223】

実施例 9

GITR / GITRL 相互作用の遮断はリンパ球増殖を阻害する

[0234] GITRL は APC によって構成的に発現したので、及び、GITR / GITRL 相互作用が CD4⁺ CD25⁺ T 細胞の抑制性機能を廃止するように提案したので、2 次のリンパ節様器官に耐性の CD4⁺ CD25⁺ T 細胞の内因性の母集団によって仲介される抑制を増強する抗 GITRL 抗体の能力を試験した。全リンパ節細胞 (LN)、全脾臓細胞 (Sp)、及び CD25⁺ 細胞を枯渇した LN 又は Sp (25) の増殖応答の比較をし、各細胞は、抗 GITRL 抗体(黒丸)又は対照抗体(ラット IgG; 白丸)で培養した。抗 GITRL 抗体の添加は、全リンパ節細胞の増殖応答を減少し(図 9 A、上左)、より小さい程度まで全脾臓細胞の増殖応答を減少した(図 9 A、下左)。しかしながら、阻害性効果はまた、CD25⁺ 細胞を枯渇した培養で見られ(図 9 A、上右(LN); 下右(Sp))、GITR / GITRL 相互作用は CD25⁻ T 細胞について同時刺激を提供するという可能性が上昇した。

10

20

30

40

50

【0224】

[0235] この可能性を直接試験するために、精製した CD4⁺CD25⁻ 及び CD8⁺T 細胞の増殖応答が、APC 及び GITRL を発現する YB2/0 の存在下で試験した。CD4⁺CD25⁻ 及び CD8⁺T 細胞の増殖は、GITRL 発現細胞の存在下で実質的に増加し(図 9B)、CD4⁺CD25⁻T 細胞の抗 CD3 の低い濃度で具体的に明白となった。

【0225】

[0236] 増殖期がない T 細胞が GITR の低いレベルでのみ発現するので、抗 GITRL 抗体は CD4⁺CD25⁻T 細胞に作用することによってその効果を仲介することが矛盾しているようであるかもしれない。しかしながら、GITRL 発現が T 細胞活性後に急速に上方制御されることを示すことによってその矛盾は解決され(図 9C)、活性化後 48 - 72 時間で最大のレベルに達する。これらの結果は、可能性の GITR / GITRL 相互作用が制御 CD4⁺CD25⁺T 細胞と独立して CD4⁺CD25⁻T 細胞に影響を与えることを支持する。

【0226】

実施例 10

抑制の回復は CD25⁻T 細胞による GITR 発現を要求する

[0237] 以前の研究は、CD4⁺CD25⁺T 細胞における GITR の連結は、それらの抑制性容量を阻害したことを示唆した(McHugh et al., 2002; Shimizu et al., 2002)。しかしながら、活性化した T 細胞はまた GITR を発現するので、本出願人は、抑制の廃止に帰着する GITR 関与の関連する細胞性標的を決定するように努めた。GITR^{+/+} 及び GITR^{-/-} マウス由来の CD4⁺CD25⁺ 及び CD4⁺CD25⁻T 細胞の組合せを用いる同時培養において、抗 GITR mAb (DTA-1) の存在又は不存在のいずれかにおいて増殖を測定した(図 10)。以前に報告されるように(Shimizu et al., 2002)、CD4⁺CD25⁺ 及び CD4⁺CD25⁻T 細胞の両方が GITR を発現した場合、同時培養への抗 GITR mAb の添加は、アイソタイプの抗体を受け入れる同時培養と比較して、増殖応答の増加に帰着した(図 10A、パネル a)。CD4⁺CD25⁺ ではなく CD4⁺CD25⁻T 細胞が同時培養において GITR を発現した場合、抗 GITR 抗体の添加は、CD4⁺CD25⁺T 細胞が GITR を発現した場合に見られるのと同様の T 細胞増殖における増大へと導いた(図 10A、パネル b)。しかしながら、CD4⁺CD25⁻GITR^{-/-} 及び CD4⁺CD25⁺GITR^{+/+}T 細胞の同時培養において、抗 GITR 抗体の添加は、増加に影響しない(図 10A、パネル c)。期待されるように、CD4⁺CD25⁻GITR^{-/-} 及び CD4⁺CD25⁺GITR^{-/-}T 細胞の同時培養への抗 GITR 抗体の添加はまた、T 細胞の増殖に影響しなかった(図 10A、パネル d)。上述と同様に結果は、商業的に得られるポリクローナル抗 mGITR 抗体の調製で得られた(データを示さず)。

【0227】

[0238] 抑制の廃止は CD4⁺CD25⁺T 細胞によって発現される GITR の連結の共通配列であったという仮説を支持する強力な証拠は、以前の研究で得られ、ラットのレスポンダー及びマウス CD4⁺CD25⁺ 制御性 T 細胞の組合せを使用した(Shimizu et al., 2002)。これらの研究において使用される抗 GITR mAb (DTA-1) をラットにおいて生成したが、結論としてラット細胞に結合しなかった(id)。上述したものに類似の実験は、ラット CD4⁺CD25⁻ レスポンダー、マウス CD4⁺CD25⁺ サプレッサー、及び照射したラット APC の同時培養を用いて実行した(図 10B、パネル b)。同時培養した CD4⁺CD25⁻ レスポンダー、マウス CD4⁺CD25⁺ サプレッサー、及び照射したラット APC を対照としてインキュベートした(図 10B、パネル a)。GITR が増殖期がない CD25⁻ 母集団に架橋できなかったとしても(図 10B、パネル a)、GITR^{-/-} マウスから得られたデータに類似して、CD4⁺CD25⁺ を介した抑制の廃止は発生しなかった(図 10B、パネル b)

10

20

30

40

50

)。

【0228】

[0239] ラット/マウスシステムの更なる解析は、フローサイトメトリーによって、ラットCD4⁺CD25⁻及びマウスCD4⁺CD25⁺T細胞の同時培養によりCFSEの希釈を調べることによって達成した。アイソタイプの対照抗体の存在下で、ラットCD4⁺CD25⁻T細胞は、1:8のレスポンダーに対するサプレッサーの比で培養した場合、マウスCD4⁺CD25⁺T細胞によって部分的にのみ抑制した(図10C、左ヒストグラムパネル)。しかしながら、抗GITR抗体の添加は、マウスCD4⁺CD25⁺T細胞の付加的な拡張、及びラットT細胞の抑制における結果としての増加へと導いた(図10C、右ヒストグラムパネル)。GITR連結後のマウスCD4⁺CD25⁺T細胞の増加したCFSE希釈は、遮断抗CD25抗体の添加によって部分的に阻害することができ、レスポンダーT細胞によって初期になされたIL-2はまた、この拡張について要求されなかった(データ示さず)。加えて、これらの結果は、レスポンダーCD4⁺CD25⁺T細胞におけるGITRの増加は、CD4⁺CD25⁺T細胞を介した抑制を克服するために要求されることを明確に示す。

【0229】

実施例11

GITRシグナルの発現は内因性の制御性T細胞によって仲介される抑制を制御し克服するために要求される

[0240] CD28及びGITRの両方は、T細胞の活性化中の同時刺激性シグナルを提供しているようなので、本出願人は、初期の応答の間に明確な役割を果たすのかどうかを決定するように努めた。内因性のリンパ節CD4⁺CD25⁺T細胞の存否において、及び該因性IL-2の存否において、T細胞増殖を促進するGITR及びCD28の能力を比較した(図11)。増殖研究について使用した同じ試料は、72時間の培養期間の後、CFSEについて同時にアッセイした。外因性IL-2の不在下で、GITR^{-/-}及びCD28^{-/-}の両方の動物由来のCD4⁺及びCD8⁺T細胞は増殖しなかった(図11A、パネルa)。GITR^{+/+}動物由来のLN細胞は、野生型及びGITR^{-/-}動物との間の表現型の中間体を示した(図11A、パネルa)。野生型マウス由来のT細胞応答は、CD25⁺T細胞の希釈後に有意に増強し、これらの培養条件下での抑制は、正常なリンパ節に存在するCD25⁺T細胞によって仲介されることを示す(図11A、パネルaとbとの比較)。最も重要なことに、CD4⁺CD25⁺T細胞の不存在で、GITR^{-/-}マウス由来のCD4⁺及びCD8⁺リンパ節T細胞の応答は、³H-チミジン取り込み(図11A、パネルb)及びCFSE希釈(図11B、上段のパネル)によって評価されるように野生型のマウスと比較することができる。しかしながら、72時間後、CD28^{-/-}動物のCD4⁺及びCD8⁺T細胞は、CD4⁺CD25⁺T細胞の不在でさえ増殖しなかった(図11A、パネルb)。

【0230】

[0241] 外因性のIL-2がそのままのリンパ節細胞の培養に添加した場合に、応答の変化する異なるパターンが観察された。CD4⁺及びCD8⁺T細胞増殖は、³H-チミジン取り込み(図11A、パネルc)、又はCFSE希釈の欠如(図11B、中間のパネル類)によって評価されるように、GITRの不在で完全に阻害した。対照的に、CFSEプロファイルは、CD8⁺T細胞が測定した増殖に多いに関係することを示した(図11B)けれども、CD28^{-/-}動物由来のT細胞の測定可能な増殖は、³H-チミジン取り込みによって検出した(図11A、パネルc)。IL-2(50U/ml)の存在下で、全ての動物のCD4⁺CD25⁺T細胞を枯渇したリンパ節は、³H-チミジン取り込み(図11A、パネルd)及びCFSE希釈(図11B、下段のパネル類)によって評価したように増殖の同様のレベルを示した。一緒にになって、これらの結果は、GITR^{-/-}及びCD28^{-/-}マウスにおけるT細胞活性の欠如が区別されることを示す。

【0231】

[0242] 外因性IL-2の存在下で増殖するGITR^{-/-}マウスのリンパ節に存

10

20

30

40

50

在する全T細胞の阻害は、高アフィニティーIL-2受容体の発現がこれらの動物に影響しないかもしないことを示唆した。IL-2R鎖の発現は、そのリガンドによって初期に誘導するので(Depper et al., 1985; Makek and Ashwell, 1985)、この鎖を発現するGITR^{-/-}マウス由来の抗CD3で活性化したCD4⁺CD25⁻T細胞の能力は、CD4⁺CD25⁻T細胞の存否、及びIL-2の存否で試験した(図11C)。制御性T細胞の存在下で、同時培養へのIL-2の添加は、培養24時間後、GITR^{-/-}ではなく、GITR^{+/+}のCD4⁺CD25⁻T細胞によるCD25の増加した発現に帰着した(図11C、下段右ヒストグラムパネル)。しかしながら、IL-2を誘導するCD25の発現を受けるGITR^{-/-}CD4⁺CD25⁻T細胞の能力は、CD4⁺CD25⁺T細胞を除去することによって容易に戻すことができた(図11C、下段左ヒストグラムパネル)。このように、CD4⁺CD25⁺T細胞の存在で、GITR^{-/-}T細胞によるIL-2応答性における減損は、野生型細胞におけるCD25発現を誘導するのに十分な外因性IL-2の濃度の存在下で高アフィニティーIL-2受容体を発現することができないことに少なくとも部分的には依存していた。
10

【0232】

実施例12

CD28依存性の同時刺激はGITR発現及び応答性を増強する

[0243] 上記に提示したデータは、CD25⁻T細胞におけるGITR又はCD28のいずれかの増加が、レスポンダーT細胞に抑制を逃れ得るようにするシグナルを提供するが、この過程に関わるシグナルの性質は不明のままであった。CD4⁺CD25⁺T細胞の存在下でIL-2によるCD28^{-/-}CD8⁺T細胞の増殖応答の部分的な救済は、CD28/B7シグナリングがGITR/GITRL相互作用に対するT細胞の感受性を制御するかもしれないことを示唆した。さらに、以前の研究は、CD28-CD80/CD86相互作用がいくつかのTNFRファミリーメンバーの発現を増強することができることを示している(Giffillan et al., 1998; Rogers et al., 2001)。このように、本出願人は、GITRに関連するこの可能性を調べた。CD28^{-/-}又は野生型マウス由来の精製したCD4⁺CD25⁻及びCD8⁺T細胞は、刺激を受けないままであるか、又はプレートに結合した抗CD28抗体の存否でプレートに結合した抗CD3抗体の低い濃度で活性化されるかのいずれかであった(図12A)。抗CD3抗体にだけ晒した野生型T細胞は、ほんの僅かにGITRを制御したけれども、CD4⁺CD25⁻及びCD8⁺T細胞の両方によるGITRの発現は、抗CD28の包含によって顕著に増大した。
20
30

【0233】

[0244] 同様に、CD4⁺CD25⁻T細胞におけるGITR発現の上方制御は、抗CD80/CD86(抗B7.1/B7.2)の添加によって著しく阻害した(図12B、左ヒストグラムパネル)。CD4⁺CD25⁻T細胞によるGITRの上方制御が抗IL-2/IL-2RmAbを含有する培養において妨げなかったので、GITR抗CD80/86を含有する培養におけるGITR発現の阻害は、IL-2の減少した產生に派生しなかった(図12B(右ヒストグラムパネル))。
40

【0234】

[0245] CD28由来の同時刺激シグナルによって誘導されたGITRの増加した発現は、GITRシグナリングに対する増加した応答に相關した(図12C)。抗GITR抗体の添加は、野生型マウス由来のCD4⁺及びCD8⁺エフェクターT細胞の両方の増殖を実質的に増強した(図12C、左パネル)。しかしながら、抗CD80/CD86はこれらの培養に添加した場合、抗GITR抗体の存在は、唯一、試験した抗CD3の濃度範囲を超えて、GITR^{+/+}CD4⁺CD25⁻T細胞(図12C、GITR^{+/+}、上段左; GITR^{-/-}、上段右)及びGITR^{+/+}CD8⁺T細胞(図12C、GITR^{+/+}、下段左; GITR^{-/-}、下段右)の増殖を最低限に増加した。抗GITRでの処置は、GITR^{-/-}マウス由来の精製したCD4⁺CD25⁻及びCD8⁺T
50

細胞の応答に影響しなかった(図12C、右パネル)。これらのデータは、CD28を介したシグナルが、IL-2産生の同時刺激とは異なり、GITR発現を増強し、そして、GITRを介したシグナリングを促進することを示唆する。

【0235】

実施例13

GITRへのGITRL結合はエフェクターT細胞への同時刺激性シグナルを提供する [0246] 4万個のエフェクターHT-2 Tヘルパー細胞(GITR⁺/TCR⁺)を下記の試薬：1)1:1又は1:2の比の抗CD3で被覆したビーズ、2)GITRLを発現するように修飾していない(YB2/0親)、又はGITRLを発現するように修飾している(YB2/0 m u GITRL)のいずれかであった1万個のYB2/0細胞、そして、3)濃度増加しているアイソタイプの対照抗体又は4つの異なる抗GITRL抗体(5F1、MGTL-10、GMTL-15、又はポリクローナル抗GITRL抗体)の存否で培養した。44時間の培養器官の少なくとも5時間については、³H-チミジンの取り込みによって増殖を測定した。図13Aは、GITRLが抗CD3で刺激したT細胞の増殖を増大することを示す。加えて、GITRLを介したT細胞増殖の増大は、5F1抗体で遮断するが、アイソタイプの対照抗体(図13B)、及び商業的に利用できるMGTL-10、MGTL-15及びポリクローナル抗GITRL抗体(図13C)では遮断しないかもしれない。これらの結果は、GITRLが同時刺激性シグナルを提供すること、また、5F1がGITRLに対する中和抗体であることの更なる証拠を提供する。10

【0236】

実施例14

抗GITRL抗体を用いたGITR-GITRL結合の遮断は実験的な自己免疫の脳脊髄炎を誘導するPLPの養子移転を妨げる

[0247] 9週齢のメスSJLマウスを完全なFreundアジュバント中の150μgのPLPペプチド(アミノ酸139-151)[HSLGKWLGHPDKF(配列番号：12)]で免疫した。免疫10日後、脾臓細胞を回収し、10μg/mlの抗体(抗GITRL抗体又は対照抗体)の不在(処理なし)又は存在下で10μg/mlのPLP(アミノ酸139-151)で3日間、エクスピボで再刺激した。再刺激後、5×10⁶個の脾臓細胞を10週齢の実験を受けていないSJLマウスに養子的に移転し、実験的自己免疫の脳脊髄炎についてマウスを52日間監視し、0から5のスケールで測定した。いずれの抗体も不在(処置なし)で再刺激した脾臓細胞を受け入れたマウス、及び対照抗体(CK01)の存在下で再刺激した脾臓細胞を受け入れたマウスのそれぞれ40%と80%でEAEが発症した(図14)。加えて、処置なしの脾臓細胞を受け入れた動物と、対照抗体で処置した脾臓細胞を受け入れた動物との間での疾患スケールでの有意な違いはなかった。顕著に、抗GITRL抗体(5F1)の存在下で再刺激した脾臓細胞を受け入れたマウスのいずれもEAE(p=0.0023対対照抗体処置)を発症しなかった(図14)。これらのデータは、GITR/GITRL経路の処断が抑制を克服するCD25-T細胞の能力を制限し、それによって自己免疫応答に影響するそれらの能力を下方制御することを示唆する。30

【0237】

実施例15

実験手法

実施例15.1：抗体及び試薬

[0248] フローサイトメトリー又は機能研究について使用される全ての抗体は、以下を除き、BD-Pharmingenからであり、トリカラー標識したaCD4(クローンCT-CD4)及びaB220(クローンRA3-6B2)はCaltag(Burlingame, CA)から購入し、MGTL-10、MGTL-15、及びポリクローナル抗GITRL抗体は、Alexis Biochemicals(San Diego, CA)から購入した。ヤギ抗IgM μ 鎖の精製したFab(ab')₂断片は、Jackson40

n Immunoresearch (West Grove, PA) から購入した。抗 IL-2 (クローン S4B6) は腹水流体として使用した。ヒト組換え IL-2 は、National Cancer Institute (Frederick, MD) から得た。IL-4、IFN- γ 、IL-12、及び T 細胞濃縮カラムは R&D System (Minneapolis, MN) から購入した。(クローン 5F1; 同じくクローン 10F12) 及び抗 GITR (クローン DTA-1) 及び PLP ペプチドは、「内部」で調製した。抗 B220、CD11c、CD11b、CD8、CD4 及び PE 磁気ビーズは Miltenyi (Auburn, CA) から購入した。

【0238】

実施例 15.2 : マウス

[0249] BALB/c 及び C57BL/6 マウス (6 - 8 週齢のメス) は NCI Frederick animal facility (Frederick, MD) から購入した。CD28 $^{+/-}$ マウスは、Alfred Singer 博士 (NIH/NCI) から提供を受けた。GITR $^{+/-}$ 胎児 (Sv129 x B6) は C. Riccardi (Perugia University Medical School, Italy) (Ronchetti et al., 2002) から提供された。再誘導した GITR $^{+/-}$ マウスは、C57BL/6 マウスで一度、戻し交配し、結果の後継者は PCR によって突然変異の対立遺伝子についてスクリーニングした。同定した GITR $^{+/-}$ 後継者は、次いで、GITR $^{+/-}$ マウスを発生するように交雑させた。全てのマウスは、 SPF (特異的病原菌なし) の条件下で NIH/NIAID facilities で飼育され収容した。

【0239】

実施例 15.3 : cDNA クローニング及び発現

[0250] ヒト GITRL (GenBank Acc. No. NM_005092) についてのアミノ酸配列は、mGITRL の Celera データベースを探索するために使用した。ゲノム配列 ga_x5j8b7w7wj5_041.cm_aa_2 は、3 つの高スコア対 (HSP) 領域を含有した。これらの領域がマウスの GITRL のエクソンに対応するという仮定に基づいて、PCR 増幅用のプライマーを設計した。フォワードプライマー (5' - ATGGAGGAAATGCCCTTGAGAG - 3') (配列番号: 4) 及びリバースプライマー (5' - GAATGGTAGATCAGGCATTAAAGATG - 3') (配列番号: 5) は、マウス胸腺ライブラリーから cDNA クローニングした。結果の断片をサブクローニングし、DNA 配列を決定した。次の全長のクローンは、5' - TTTAAAGTCGACCCACCATGGAGGAATGCTTTGAGAG - 3' (フォワード) (配列番号: 6) 及び 5' - TTTAAAGATACTCATTAAGAGATGAATGGTAGATCAGGCAT - 3' (リバース) (配列番号: 7) プライマーを用いて前述の構築物から PCR によって増幅した。得られた PCR 断片は、GFP-RV レトロウイルスベクター (Ouyang et al., 1998) にサブクローニングし、最終の cDNA クローニングの配列決定を行った。このベクターは、次いで、Phoenix x 細胞株にトランスフェクトした。トランスフェクトした Phoenix x 細胞の上清を用いて、YB2/0 細胞株に遺伝子導入した。GFP 発現 YB2/0 細胞は、次いで、FACS ソートされ、培養に維持した。予期した mGITRL アミノ酸配列は、別のグループ (Kim et al., 2003) のものと同一であるが、それらの配列の 48 位のアミノ酸でアラニンからバリンへの置換があった。

【0240】

実施例 15.4 : モノクローナル抗体の产生及び精製

[0251] Lewis ラットを CFA 中の 100×10^6 個の YB2/0-GITRL で一度、s. q. で免疫した。2 週間後、これらのラットは、IFA 中の 100×10^6 個の YB2/0-GITRL 細胞で s. q. で免疫した。2 週間後、ラットを PBS 中の 50×10^6 個の YB2/0-GITRL でブーストした。4 日後、脾臓を回収し、前記されるように細胞融合した (Colligan et al., 2003)。結果物のハ

10

20

30

40

50

イブリドーマの上清を Phoenix - GITRL 及び Phoenix 細胞を用いて、フローサイトメトリーでスクリーニングした。プロテイン G を充填したカラムを用いて、細胞培養上清から抗体を精製し、溶出した抗体は PBS に対して透析した。

【0241】

実施例 15.5：細胞精製

[0252] マウスの周辺リンパ節から T 細胞を精製した。CD25⁺ T 細胞を磁気ビーズで標識し、autoMACS (Miltenyi Biotech, Auburn, CA) により製造業者のプロトコールに従って精製した。CD25⁺ 細胞の純度は、典型的には 97 - 99 パーセントの間であった。陰性画分に残存している細胞は、その後、抗 CD4 又は抗 CD8 のマイクロビーズで標識し、autoMACS で陽性選択手法を用いて精製した。純度は、通常、90 - 95 パーセントであった。T 細胞を枯渇した脾臓の懸濁液は、autoMACS を用いて Thy1.2⁺ 細胞を枯渇することで赤血球溶解懸濁液から調整した。B220⁺ 細胞は、抗 B220 マイクロビーズ (Miltenyi Biotech, Auburn, CA) を用いて、同様のやり方で脾臓細胞から精製し、冷却 HBSS の 10 ml で腹腔 (Peritoneal cavity) を洗い流すことによって調製した。脾臓 DC については、脾臓細胞の懸濁液を記載した (Vremec et al., 2000) のと同じ方法で調製した。脾臓 DC は、次いで、抗 CD11c マイクロビーズ Miltenyi Biotech, Auburn, CA を用いて懸濁液から精製した。得られた DC 懸濁液は、通常、85 - 90 パーセントの純度であった。ラット CD4⁺ CD25⁻ 細胞は、PE 抗ラット CD25 (OX-39) 抗体、続く抗 PE マイクロビーズを用いて CD25⁺ 細胞のラット脾臓細胞を枯渇することで発生させた。枯渇後、CD4⁺ 細胞は、次いで、抗ラット CD4 マイクロビーズを用いて枯渇した画分から選択した。
10
20

【0242】

実施例 15.6：インビトロ増殖アッセイ

[0253] 抑制アッセイは、記載されるように実行した (Thornton and Shevach, 1998)。簡単には、(5 × 10⁴) 細胞は、96 ウェルの平底プレートで 0.5 μg / ml の抗 CD3 mAb (2C11) の存在下で、照射 (3000 R) した T 細胞を枯渇した脾臓細胞 (5 × 10⁴) と一緒に、FBS を添加した RPMI 1640 (Atlanta Biologicals, Atlanta, GA) で培養した。同じ培養に、GITR に特異的な抗体又はラット IgG アイソタイプを最終濃度 2 μg / ml で添加した。滴定した数の CD4⁺ CD25⁺ 細胞をサプレッサー : レスポンダーの最終比を 0 : 1、1 : 2、1 : 4、又は 1 : 8 で添加した。72 時間培養の最後の 5 - 8 時間に 1 μCi の ³H - チミジンで培養物をパルスし、他の指示がなければ 3 重で実行した。ラット及びマウスの T 細胞の同時培養を同様の方法で準備をしたが、照射 (3000 R) した CD4 を枯渇したラット脾臓細胞は、APC として使用し、ラットとマウスの Tsaiabouli は、抗らった CD3 (0.25 μg / ml) 及び抗マウス CD3 (0.25 μg / ml) mAb のカクテルを用いて刺激した。
30

【0243】

実施例 15.7：リンパ節細胞のインビトロ培養と CFSE 標識

[0254] CD25⁺ を枯渇したリンパ節細胞の懸濁液を上述したように autoMACS で調製した。37 の温浴中で、8 分間、2 μM の濃度で CFSE で細胞を標識した。次いで、完全な RPMI 1640 で洗浄した。その後、rhIL-2 (50 U / ml) の存在又は不存在下で、96 ウェルプレートで細胞 (5 × 10⁴ / ウェル) を培養した。
40

【0244】

実施例 16

考察

[0255] CD4⁺ CD25⁺ T 細胞の機能における GITR の役割は、GITR に対するポリクローナル及びモノクローナル抗体が CD25⁺ T 細胞及び CD25⁻ T 細胞の同時培養系に添加した場合、CD4⁺ CD25⁺ T 細胞の抑制効果を逆転してという証
50

拠から推察された (McHugh et al., 2002; Shimizu et al., 2002)。CD4⁺CD25⁺T細胞は、抗GITR試薬に有望な標的であるらしく、これは、新たに外植したCD25⁺T細胞が、増殖期にないCD25⁻T細胞より高いレベルでGITRを発現し、そして、IL-2とともに抗GITR抗体はTCRシグナルの不在下でCD25⁻T細胞ではなく、CD25⁺の増殖の引き金となったためである。さらに、Shimizuらは、マウスCD25⁺サプレッサー及びラットレスポンダーティン細胞の同時培養系に、ラット細胞では反応しないラット抗mGITR mAbを添加した場合、抑制の逆転が観察された。これらの研究は、作動性抗GITR抗体、及び、恐らく、その生理学的なリガンドによってGITRの関与は、両者がCD4⁺CD25⁺T細胞の抑制活性を阻害し、そして、内因性のIL-2に対するCD25⁺T細胞の非応答性を逆転するシグナルを発生したという仮説を導いた。
10

【0245】

[0256] 実験は、これらの研究を拡張し確認する試みのために設計し、マウスGITRLをクローニングし、その組織分布を解析し、そして、野生型及びGITR^{-/-}マウス由来のCD25⁺T細胞及びCD25⁻T細胞の混合物を用いることによる作動性抗GITR抗体の標的を最終的に決定した。まとめると、本研究は、抗GITR抗体及びGITRLが、CD4⁺CD25⁺T細胞による抑制のそれらの最低基準を生じる独特のシグナルをCD25⁻T細胞に与えることによって、CD4⁺CD25⁺T細胞の抑制効果を廃止することを示す。本研究は、GITRLはAPCの細胞表面上で選択的に発現することを示し、B-1 Bリンパ球では最も高い発現レベルであり；慣習的なB-2 Bリンパ球、マクロファージ、及びB220⁺DCでは中間レベルであり；そして、B220-DCの一部の集合体ではより低いレベルである。GITRLは、増殖期にないAPC上に発現するTNFスーパーファミリーのメンバーのうち独特であり、その発現は、B細胞受容体、CD40、又は異なるトール様受容体を誘引することによって下方制御される。TNFスーパーファミリーの他のメンバー(4-1BB-L、OX40-L、LIGHT、CD70、C30-L)は、増殖期にないAPCにおいて検出できず、それらの発現は、トール様の受容体刺激を通してAPCの活性化により上方制御される(Croft, 2003)。本研究は、細胞表面からのGITRL発現の下方制御が可溶性GITRLの分泌により達成するかどうかを扱ったものではないが、Toneら(2003)は、DC、マクロファージ及びB細胞のLPS刺激がGITRL mRNAの下方制御に帰着すると報告している。増殖期にないAPCにおけるGITRLの発現は、T細胞活性化の過程の初期に機能することを強く示唆する。内皮細胞(Gurney et al., 1999; Kwon et al., 1999)、活性化したT細胞、及びある部分集合のDN胸腺細胞を含む他の細胞タイプはまた、GITRLを発現することを示し、そして、これらの後者の細胞タイプにおけるこの分子の機能は決定されたままである。
20
30

【0246】

[0257] CD25⁻T細胞単独の活性を増大するための抗GITR抗体及びGITRL発現細胞の両者の能力、並びにCD25⁺T細胞の不在下でCD25⁻T細胞の活性を部分的に阻害する抗GITRLの能力は、これらの試薬の細胞標的(単数又は複数)の注意深い再試験を促した。野生型及びGITR^{-/-}マウス由来のCD25⁻T細胞及びCD25⁻T細胞の同時培養系への抗GITRの添加は、抗体を介した抑制の逆転の標的がCD25⁻T細胞であることを示した。これはさらに、培養系におけるラットCD25⁻レスポンダー及びマウスCD25⁺サプレッサーT細胞を用いる実験によって支持され、最終的に、CD25⁺T細胞の部分集合におけるGITR接続がそれらの抑制機能を廃止しないことを示した。実際に、CFSE希釈の試験は、GITR接続が培養系におけるCD25⁺T細胞の拡張を促し、結果として、ラットCD25⁻レスポンダーの抑制を増強した。したがって、可能性として、抗GITR処理したラット/マウスの同時培養における増殖の増強は、Shimizuら(2002)によって報告され、ラットT細胞、実際には、マウスCD25⁺サプレッサーT細胞の反映した増殖に依存していると想定された。これは、³H-チミジンの取り込みだけを測定することによっては明らかにならなか
40
50

った。

【0247】

[0258] 1つの以前の報告では、GITR欠損T細胞がTCR刺激に過剰応答であることを示唆した (Rongchetti et al., 2002)。しかしながら、本観察へのそれらの観察の外挿は、報告が精製したCD4⁺、CD8⁺Tリンパ球の応答を解析せず、CD4⁺CD25⁺T細胞の役割を評価しなかったように困難である。本研究において、GITR^{-/-}マウス由来の高度に精製したCD4⁺CD25⁻T細胞及びCD8⁺T細胞の応答は、対象のそれと比較することができた。しかしながら、生理学的数の制御性T細胞において、GITR^{-/-}動物由来のCD4⁺及びCD8⁺T細胞の両者は、CD3架橋に完全に応答しなかった。この結果は、GITR/GITRLの不在下で、抑制が有力であることを明らかに示した。確かに、GITR^{-/-}マウス由来のCD4⁺CD25⁻T細胞の活性化の抑制は、非常に強力であったので、高濃度の外因性IL-2の添加によって克服することができず、野生型CD4⁺CD25⁻T細胞の応答における非常に高い数のCD25⁺T細胞の抑制効果を正常に廃止する (Takahashi et al., 1998; Thornton and Shevach, 1998)。CD4⁺CD25⁺の抑制効果は、CD4⁺CD25⁻GITR^{-/-}レスポンダー群によるIL-2産生及びCD25の発現の両方の阻害によって仲介され、正常なCD8⁺T細胞応答におけるCD4⁺CD25⁺T細胞の効果について以前に記載したもの (Piccirillo and Shevach, 2001) に似ている。

【0248】

[0259] GITR及びCD28によって誘導された同時刺激性シグナルは、区別されるが、相互に関係するようであった。制御性T細胞の不在下で、GITR^{-/-}マウス由来のCD4⁺及びCD8⁺T細胞の両方の応答は、野生型マウス由来の細胞のそれらと同一であった。対照的に、本研究に使用される培養条件下では、CD28^{-/-}マウス由来のCD4⁺及びCD8⁺T細胞は非応答的であった。反対に、IL-2を制御性T細胞を含有する培養系に添加した場合、GITR^{-/-}マウス由来のCD4⁺及びCD8⁺T細胞の応答は復活せず、一方、CD28^{-/-}マウス由来のCD8⁺細胞の応答は部分的に復活した。他方、CD28とGITRとの間の潜在的な同時操作の関係及び共有したシグナル階層は、下記：(1) CD4⁺CD25⁻T細胞及びCD8 T細胞はCD28架橋の不在下でGITRを上方制御しないこと、そして(2) 抗CD80/CD86抗体はGITR発現の上方制御と抗GITR抗体に対する応答性の両方を顕著に阻害したことの証拠によって支持された。このように、結果は、T細胞の活性化中のCD28-CD80/CD86シグナル経路の追加の重要な機能が、GITRの発現及び機能を増強することによるCD25⁺を介した抑制に耐性であるT細胞を許可するはずであることを示唆する。

【0249】

[0260] 他の公開された研究 (Shimizu et al., 2002; Tone et al., 2003) によって示唆された結果に類似して、これらの研究は、制御性T細胞の不在下で、CD25⁻T細胞におけるGITRの連結が有る程度の同時刺激を提供したことを示す。しかしながら、GITR連結は、CD28と同じ方法でCD25⁻T細胞を同時刺激することについて要求されず、それは、GITR^{-/-}マウス由来のCD4⁺CD25⁻T細胞及びCD8 T細胞が野生型T細胞と類似して応答するためである。本出願人は、免疫応答の経過の初期にGITRLによるCD4⁺CD25⁻及びCD8⁺エフェクターT細胞の両方におけるGITRの関与が、CD4⁺CD25⁺T細胞の抑制効果に耐性であるように、例えば、より感受性でないようエフェクター細胞群にするために主に役立つという見解を好む。応答の経過中に、炎症性シグナルは、最終的に、GITRL発現の下方制御に帰着し、それにより、CD25⁺を介した抑制に対するエフェクター細胞の感受性を増加する。感染症の試薬に対するCD25⁺を介した免疫応答の抑制がインビボでいつ発生するかに関しての利用できるデータはごく限られているが、いくつかの研究は、かなりの炎症に対する二次的な組織損傷を妨げるために、応答の開始時期というよりは、応答時期の短縮を操作することを示唆していた (Suvias et a

10

20

30

40

50

1 . , 2 0 0 3)。 I L - 2 の存在下で、 C D 2 5 + T 細胞における G I T R の関与がそれらの拡張を誘導することを指摘するべきである (M c H u g h e t a l . , 2 0 0 2)。増殖期にない A P C における G I T R L による C D 2 5 + T 細胞における G I T R のインビトロの関与が、免疫応答の過程において、初期にエフェクター T 細胞によって分泌される I L - 2 の存在において、制御性 T 細胞の非特異的な拡張に帰着するという可能性を残す。この非特異的な拡張は、応答の後期におけるエフェクター細胞の活性を阻害するように機能する抗原特異的なサプレッサー細胞のプールのその後の発生に決定的となるかもしれない。

【 0 2 5 0 】

[0 2 6 1] 本出願人は、 G I T R / G I T R L 相互作用の操作が、インビボで制御性 T 細胞機能を操作する効果的な方法であることを証明するかもしれないことを以前に提案した (M c H u g h a n d S h e v a c h , 2 0 0 2)。この概念は、 C D 4 + C D 2 5 + T 細胞が抗 G I T R 抗体の標的であったことを示唆するデータに基づくものであるが、 G I T R / G I T R L 相互作用が重要な治療の標的を示すケースでさえある。このように、作動性抗 G I T R 抗体又は作動性 G I T R L - F c を用いた治療は、 C D 4 + C D 2 5 + T 細胞の抑制効果に耐性な、例えば、感受性を少なくするようにすべきであり、そして、癌への免疫応答の関与（単独で又は他の腫瘍治療剤、例えば、腫瘍ワクチンと組合せて使用する）について、及びウイルス、細菌などを含む感染性病原体（単独で又は感染試薬についてワクチンを弱めるワクチンアジュvant のような感染性病原体の他の治療薬と組合せて使用する）について、癌及び感染症を治療するために効果的であることを証明すべきである。 G I T R アゴニストを用いて、例えば、中和抗 G I T R L 抗体又は G I T R - F c の使用を通して、 G I T R / G I T R L 相互作用の阻害は、抑制に対するエフェクター T 細胞の最低基準値を低くすべきであり、このように、自己免疫障害、炎症性疾患、移植（又はグラフト）拒絶、及びグラフト対宿主疾患の予防及び／又は治療に有用であるべきである。

【 0 2 5 1 】

参考文献

[0 2 6 2] 下記の参考文献は、本明細書においていくつかの著者／年の引例について十分な引例である：

【 0 2 5 2 】

10

20

30

【化1】

Aseffa, A., Gumy, A., Launois, P., MacDonald, H. R., Louis, J. A., and Tacchini-Cottier, F. (2002). The early IL-4 response to Leishmania major and the resulting Th2 cell maturation steering progressive disease in BALB/c mice are subject to the control of regulatory CD4+CD25+ T cells. *J Immunol* 169, 3232-3241.

Banchereau, J., and Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.

Belkaid, Y., Piccirillo, C. A., Mendez, S., Shevach, E. M., and Sacks, D. L. (2002). CD4+CD25+ regulatory T cells control Leishmania major persistence and immunity. *Nature* 420, 502-507.

Coligan, J. E., Kruisbeek, A. M., Margulies, D. H., Shevach, E. M., and Strober, W., eds. (2003). *Current Protocols in Immunology* (John Wiley & Sons, Inc.).

Croft, M. (2003). Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? *Nat Rev Immunol* 3, 609-620.

Depper, J. M., Leonard, W. J., Drogula, C., Kronke, M., Waldmann, T. A., and Greene, W. C. (1985). Interleukin 2 (IL-2) augments transcription of the IL-2 receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 4230-4234.

Gavin, M. A., Clarke, S. R., Negrou, E., Gallegos, A., and Rudensky, A. (2002). Homeostasis and anergy of CD4(+)CD25(+) suppressor T cells in vivo. *Nat Immunol* 3, 33-41.

Gilfillan, M. C., Noel, P. J., Podack, E. R., Reiner, S. L., and Thompson, C. B. (1998). Expression of the costimulatory receptor CD30 is regulated by both CD28 and cytokines. *J Immunol* 160, 2180-2187.

Godfrey, D. I., Kennedy, J., Suda, T., and Zlotnik, A. (1993). A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *J Immunol* 150, 4244-4252.

Gurney, A. L., Marsters, S. A., Huang, R. M., Pitti, R. M., Mark, D. T., Baldwin, D. T., Gray, A. M., Dowd, A. D., Brush, A. D., Heldens, A. D., et al. (1999). Identification of a new member of the tumor necrosis factor family and its receptor, a human ortholog of mouse GITR. *Curr Biol* 9, 215-218.

Hisaeda, H., Maekawa, Y., Iwakawa, D., Okada, H., Himeno, K., Kishihara, K., Tsukumo, S., and Yasutomo, K. (2004). Escape of malaria parasites from host immunity requires CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Nat Med* 10, 29-30.

【化2】

Kim, J. D., Choi, B. K., Bae, J. S., Lee, U. H., Han, I. S., Lee, H. W., Youn, B. S., Vinay, D. S., and Kwon, B. S. (2003). Cloning and characterization of GITR ligand. *Genes Immun* 4, 564-569.

Kursar, M., Bonhagen, K., Fensterle, J., Kohler, A., Hurwitz, R., Kamradt, T., Kaufmann, S. H., and Mittrucker, H. W. (2002). Regulatory CD4+CD25+ T cells restrict memory CD8+ T cell responses. *J Exp Med* 196, 1585-1592.

Kwon, B., Yu, K. Y., Ni, J., Yu, G. L., Jang, I. K., Kim, Y. J., Xing, L., Liu, D., Wang, S. X., and Kwon, B. S. (1999). Identification of a novel activation-inducible protein of the tumor necrosis factor receptor superfamily and its ligand. *J Biol Chem* 274, 6056-6061.

Lundgren, A., Suri-Payer, E., Enarsson, K., Svennerholm, A. M., and Lundin, B. S. (2003). Helicobacter pylori-specific CD4+ CD25high regulatory T cells suppress memory T-cell responses to H. pylori in infected individuals. *Infect Immun* 71, 1755-1762.

Malek, T. R., and Ashwell, J. D. (1985). Interleukin 2 upregulates expression of its receptor on a T cell clone. *J Exp Med* 161, 1575-1580.

Maloy, K. J., Salaun, L., Cahill, R., Dougan, G., Saunders, N. J., and Powrie, F. (2003). CD4+CD25+ T(R) cells suppress innate immune pathology through cytokine-dependent mechanisms. *J Exp Med* 197, 111-119.

McHugh, R. S., and Shevach, E. M. (2002). The role of suppressor T cells in regulation of immune responses. *J Allergy Clin Immunol* 110, 693-702.

McHugh, R. S., Whitters, M. J., Piccirillo, C. A., Young, D. A., Shevach, E. M., Collins, M., and Byrne, M. C. (2002). CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 16, 311-323.

Nakano, H., Yanagita, M., and Gunn, M. D. (2001). CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 194, 1171-1178.

Ouyang, W., Ranganath, S. H., Weindel, K., Bhattacharya, D., Murphy, T. L., Sha, W. C., and Murphy, K. M. (1998). Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism. *Immunity* 9, 745-755.

Piccirillo, C. A., and Shevach, E. M. (2001). Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. *J Immunol* 167, 1137-1140.

【化3】

- Rogers, P. R., Song, J., Gramaglia, I., Killeen, N., and Croft, M. (2001). OX40 promotes Bcl-xL and Bcl-2 expression and is essential for long-term survival of CD4 T cells. *Immunity* 15, 445-455.
- Ronchetti, S., Nocentini, G., Riccardi, C., and Pandolfi, P. P. (2002). Role of GITR in activation response of T lymphocytes. *Blood* 100, 350-352.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155, 1151-1164. 10
- Shimizu, J., Yamazaki, S., Takahashi, T., Ishida, Y., and Sakaguchi, S. (2002). Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 3, 135-142.
- Suvas, S., Kumaraguru, U., Pack, C. D., Lee, S., and Rouse, B. T. (2003). CD4+CD25+ T cells regulate virus-specific primary and memory CD8+ T cell responses. *J Exp Med* 198, 889-901. 20
- Takahashi, T., Kuniyasu, Y., Toda, M., Sakaguchi, N., Itoh, M., Iwata, M., Shimizu, J., and Sakaguchi, S. (1998). Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* 10, 1969-1980.
- Thornton, A. M., and Shevach, E. M. (1998). CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 188, 287-296. 30
- Tone, M., Tone, Y., Adams, E., Yates, S. F., Frewin, M. R., Cobbold, S. P., and Waldmann, H. (2003). Mouse glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor ligand is costimulatory for T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15059-15064.
- Uraushihara, K., Kanai, T., Ko, K., Totsuka, T., Makita, S., Iiyama, R., Nakamura, T., and Watanabe, M. (2003). Regulation of murine inflammatory bowel disease by CD25+ and CD25- CD4+ glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene+ regulatory T cells. *J Immunol* 171, 708-716. 40
- Vremec, D., Pooley, J., Hochrein, H., Wu, L., and Shortman, K. (2000). CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J Immunol* 164, 2978-2986.

【化4】

Vremec, D., and Shortman, K. (1997). Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs: cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen, and lymph nodes. *J Immunol* 159, 565-573.

Yu, K. Y., Kim, H. S., Song, S. Y., Min, S. S., Jeong, J. J., and Youn, B. S. (2003). Identification of a ligand for glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor constitutively expressed in dendritic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 310, 433-438.

10

【図面の簡単な説明】

【0256】

【図1】[0043] 図1は、マウス(m)とヒト(h)のGITRLに対するアミノ酸配列の整列(BLOSUM62アミノ酸置換マトリックスに基づく; Henikoff and Henikoff(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-19を参照)を示す。

【図2】[0044] 図2は、CD4⁺CD25⁺T細胞のGITRL:GITR結合の効果についての実験結果を示す。チミジン取り込みを細胞増殖を評価する手段として測定する(CPM)。図2Aは、作動性抗GITR抗体がCD4⁺CD25⁺T細胞の増殖を刺激するが、CD4⁺CD25⁻T細胞を刺激しないことを示す。図2Bは、GITRLを発現しているYB2/0細胞がCD4⁺CD25⁺細胞の増殖を刺激することを示す。

20

【図3】[0045] 図3Aは、YB2/0細胞(~50,000)によって発現したGITRL、並びに作動性抗GITR抗体(2μg/ml)が新たに単離したCD4⁺CD25⁺サプレッサーT細胞(#サプレッサー)によって產生される抑制(即ち、負の%抑制)を逆転した。図3Bは、50,000より少ない(即ち、~3,000~25,000)数のGITRL-YB2/0細胞は投与量に依存して部分的に抑制を逆転することができたことを示す。

【図4】[0046] 図4は、活性化したCD4⁺CD25⁺T細胞を新たに単離したCD4⁺CD25⁺T細胞の代わりに使用した場合、GITRL-YB2/0細胞(~50,000)は抑制を逆転しなかったことを示す;同様の結果が作動性抗GITR抗体を用いて得られた。

30

【図5】[0047] 図5A及び5Bは、新たに単離したCD4⁺CD25⁺T細胞によって產生される抑制のGITRL誘導の逆転はそれ自身、抗GITRL抗体('抗GITR')=5F1抗体)の存在下で逆転(即ち、抑制の回復)することができたことを示す。図5Bは、対照抗体('対照Ig')は抑制を回復しなかったことを示す追加実験を含む。

【図6】[0048] 図6は、抗GITRL抗体がCD4⁺CD25⁺T細胞の存在下で抑制を増強だけできることを示す。図6Aは、抗GITRL抗体(5F1)の存在下でリンパ節細胞の増殖の抑制を示す。図6Bは、リンパ節細胞群がCD4⁺CD25⁺T細胞を枯渇にした場合に、抗GITRL抗体の抑制活性の欠如を示す。

40

【図7】[0049] 図7は、リンパ組織の細胞に発現しているGITRLの分布を示す。図7A:磁気ビーズでBALB/cマウスの脾臓から濃縮したCD11⁺c細胞について、抗CD4抗体、抗CD8抗体、及び抗GITRL抗体で染色することによって、フローサイトメトリー解析を実行した。GITRL発現は、抗GITRL抗体で染色したCD4⁺、CD8⁺、及びCD4⁻CD8⁺をゲートにした一群の蛍光強度(塗りつぶしたヒストグラム)と、アイソタイプの対照抗体で染色したこれらの細胞の蛍光強度(塗りつぶしていないヒストグラム)とを比較することによって決定した。図7B:脾臓の樹状突起細胞及びB-1B細胞によるGITRLの発現は、新たに単離したBALB/c CD11c⁺脾臓DC(上段のヒストグラムパネル)及びCD11c^{10w}B220⁺形質細

50

胞 D C (下段ヒストグラムパネル)を抗 G I T R L m A b (塗りつぶしたヒストグラム)又はアイソタイプの対照抗体(塗りつぶしていないヒストグラム)で染色し、フローサイトメトリー解析を実行することによって決定した。図 7 C (上段のヒストグラムパネル)：抗 G I T R L 抗体で染色した、全脾臓細胞中の B 2 2 0⁺ B 細胞の蛍光強度(塗りつぶしたヒストグラム)、及び C D 1 1 b⁺ B 2 2 0⁺ をゲートした腹膜(p e r C) B - 1 B 細胞の蛍光強度(実線の塗りつぶしていないヒストグラム)をアイソタイプの対照で染色した細胞の蛍光強度(破線の塗りつぶしていないヒストグラム)と比較した。図 7 C (下段のヒストグラムパネル)：G I T R L 抗体で染色した(塗りつぶしたヒストグラム)及びアイソタイプ抗体で染色した(塗りつぶしていないヒストグラム) p e r C マクロファージ(C D 1 1 b⁺ B 2 2 0⁻ 細胞)の比較を示す。図 7 D : 胸腺細胞を C D 4 、C D 8 、及び G I T R L 又はアイソタイプ対照のいずれかの発現について染色した。抗 G I T R L 抗体で染色した、C D 4⁺ C D 8⁻ (上段左 4 分の 1)、C D 4⁺ C D 8⁺ (上段右 4 分の 1)、及び C D 4⁻ C D 8⁺ (下段右 4 分の 1)細胞の蛍光強度(塗りつぶしたヒストグラム)を、アイソタイプの対照抗体で染色したこれらの細胞の蛍光強度(塗りつぶしていないヒストグラム)と比較した。図 7 E : ゲートとした C D 4 4⁺ C D 2 5⁻ (R 1)、C D 4 4⁺ C D 2 5⁺ (R 2)、C D 4 4⁻ C D 2 5⁺ (R 3)又は C D 4 4⁻ C D 2 5⁻ (R 4)胸腺前駆体による G I T R L の発現を、抗 G I T R L 抗体で染色したこれらの細胞の蛍光(塗りつぶしたヒストグラム)とアイソタイプの対照抗体で染色したこれらの細胞の蛍光(塗りつぶしていないヒストグラム)を比較することによって決定した。図 7 F : 刺激していないリンパ節細胞は、抗 C D 4 抗体、抗 C D 8 抗体、抗 C D 2 5 抗体、及び / 又は抗 G I T R L 抗体で染色した。C D 4⁺ C D 8⁻ (上段左 4 分の 1)、及び C D 4⁻ C D 8⁺ でない(下段右 4 分の 1)は、さらにこれらの細胞によって C D 2 5 の発現に関して描写した。C D 4⁺ C D 8⁻ C D 2 5⁻ (上段右ヒストグラムパネル)、C D 4⁺ C D 8⁻ C D 2 5⁺ (下側右ヒストグラムパネル)又は C D 4⁻ C D 8⁺ (下段(中央)ヒストグラムパネル)でゲートしたリンパ節細胞による G I T R L の発現は、抗 G I T R L 抗体で染色したこれらの細胞の蛍光強度(塗りつぶされたヒストグラム)とアイソタイプの対照抗体で染色したこれらの細胞の蛍光強度(塗りつぶされていないヒストグラム)とを比較することによって決定した。結果は、5 つの独立の実験によって示される。

【図 8】[0050] 図 8 は、刺激後の G I T R L の A P C による下方制御を示す。図 8 A : 精製した脾臓 B 2 2 0⁺ B 細胞又は全腹膜(P e r C) B 2 2 0⁺ C D 1 1 b⁺ B - 1 B 細胞による G I T R L の発現がポリ I : C (1 0 μ g / m l)、L P S (0 . 5 μ g / m l)、C p G s (O D N 1 8 2 6 、 1 μ M)、抗 C D 4 0 及び I L - 4 (それぞれ、 1 0 μ g / m l 及び 2 0 n g / m l)、及び抗 I g M (ヤギ抗 I g M μ 鎮の F (a b')₂ 断片、 1 μ g / m l)で処理後の異なる時間点について決定した。抗 G I T R L 染色刺激細胞(塗りつぶされたヒストグラム)、抗 G I T R L 染色無刺激(中間)細胞(実線塗りつぶしていないヒストグラム)及びアイソタイプの対照抗体染色差異号(破線塗りつぶしていないヒストグラム)の蛍光強度を示す。図 8 B : 4 8 時間の培養時間後の抗 C D 3 m A b (0 . 5 μ g / m l)で処理した全脾臓細胞中に存在する B 2 2 0⁺ B 細胞による G I T R L の発現は、無刺激の B 2 2 0⁺ B 細胞(実線塗りつぶしていないヒストグラム)とアイソタイプの対照抗体で染色した B 2 2 0⁺ B 細胞(破線塗りつぶしていないヒストグラム)による G I T R L の発現と比較した。図 8 C : 指定した時間点で L P S (0 . 5 μ g / m l)と一緒にして又は一緒にしないで培養した後の精製した C D 1 1 c⁺ D C s による G I T R L (上段のヒストグラムパネル)及び B 7 . 2 (即ち、 C D 8 6) (下段のヒストグラムパネル)の発現。図 8 D : 可溶性の抗 C D 3 m A b (0 . 5 μ g / m l)の不在又は存在下で 4 8 時間の培養時間後の C D 4⁺ 又は C D 8⁺ 発現細胞にゲートした全脾臓細胞による G I T R L 発現。グラフは、 2 ないし 4 の独立した実験を代表する；全実験は、 B A L B / c マウスから単離した組織を用いて実行した。

【図 9】[0051] 図 9 は、リンパ細胞増殖の阻害における G I T R / G I T R L 相互作用の遮断の効果を示す。図 9 A 及び図 9 B については、バーは s . d . 値を示す。図 9

A : C D 2 5⁺ 細胞（それぞれ、全体又は 25）と一緒に又は一緒にしないでリンパ節細胞（L N ; 1 × 10⁵）及び脾臓細胞（S p ; 0.5 × 10⁵）の増殖（y 軸）は、可溶性抗 C D 3 の様々な濃度（x 軸）で 72 時間培養後に決定した。細胞を精製した抗 G I T R L m A b (10 μg / ml ; 黒丸) 又は Ig G 2_a アイソタイプ対照 (10 μg / ml ; 白丸) のいずれかの存在下でインキュベートした。結果は、3つの独立した実験を代表する。図 9 B : C D 4⁺ C D 2 5⁻ 又は C D 8⁺ T 細胞は、5 × 10⁴ の照射した (3000R) T 枯渇 A P C 及び 5 × 10⁴ の照射した (8000R) Y B 2 / 0 - G I T R L (白丸) 又は対照 Y B 2 / 0 (黒丸) 細胞の存在下で培養した。培養物は、様々な濃度の可溶性抗 C D 3 m A b (x 軸) で活性化し、そして、増殖 (y 軸) は、72 時間の培養時間後に測定した。図 9 C : 抗 G I T R 抗体で染色した精製 C D 4⁺ C D 2 5⁻ T 細胞の平均の蛍光 (x 軸) は、照射した (3000R) T 枯渇脾臓細胞の存在下で可溶性 C D 3 (0.5 μg / ml) での活性化後の様々な時間点で決定した。結果は、少なくとも 2 つの独立した実験で示した。
10

【図 10】[0052] 図 10 は、C D 2 5⁻ T 細胞による G I T R 発現が抑制の復帰を要求することを示す。図 10 A : 野生型マウス由来の照射した A P C (5 × 10⁴) 及び可溶性抗 C D 3 (0.5 μg / ml) と 2 μg / ml の抗 G I T R 抗体 (黒丸) 又はアイソタイプの対照抗体 (白丸) でインキュベートした異なるノックアウトマウス [(A a) C D 4⁺ C D 2 5⁻ : G I T R^{+/+}, C D 4⁺ C D 2 5⁺ : G I T R^{+/+}; (A b) C D 4⁺ C D 2 5⁻ : G I T R^{+/+}, C D 4⁺ C D 2 5⁺ : G I T R^{-/-}; (A c) C D 4⁺ C D 2 5⁻ : G I T R^{-/-}, C D 4⁺ C D 2 5⁺ : G I T R^{+/+}, 及び (A d) C D 4⁺ C D 2 5⁻ : G I T R^{-/-}, C D 4⁺ C D 2 5⁺ : G I T R^{-/-}] 由来の C D 4⁺ C D 2 5⁻ T 細胞 (5 × 10⁴) と異なるノックアウトマウス由来の様々な数の C D 4⁺ C D 2 5⁺ T 細胞 (x 軸) との同時培養物の増殖は、³H - チミジン取り込み (cpm; y 軸) を測定することに y って決定した。図 10 B : 同時培養物の増殖は、照射した (3000R) のラット A P C の存在下で、様々な数のマウス C D 4⁺ C D 2 5⁺ T 細胞 (x 軸) と (B a) マウス C D 4⁺ C D 2 5⁻ T 細胞又は (B b) ラット C D 4⁺ C D 2 5⁻ T 細胞のいずれかで上述したように (図 10 A) 実行した。培養物は、ラット及びマウスの抗 C D 3 (各 0.25 μg / ml) の両方に対する抗体のカクテルを用いて刺激し、2 μg / ml のアイソタイプの対照抗体 (ラット Ig G ; 白丸) 又は抗 G I T R 抗体 (D T A - 1 ; 黒丸) のいずれかで処理した。バーは、三重の培養における増殖から計算した s . d . 値を示す。図 10 C : アイソタイプの対照抗体 (ラット Ig G ; 左パネル) 又は抗 G I T R 抗体 (D T A - 1 ; 右パネル) を用いて 1 : 8 のサプレッサーとレスポンダーの比で同時培養した C F S E 染色したマウス C D 4⁺ C D 2 5⁺ T 細胞 (上段パネル) 及びラット C D 4⁺ C D 2 5⁻ T 細胞 (下段パネル) を描写した。マウス及びラットの T 細胞の一群は、特異的な抗 C D 4 抗体で染色することによって区別した。結果は、2 ないし 4 の独立した実験を代表する。
20

【図 11】[0053] 図 11 は、G I T R シグナルが内因性の制御性 T 細胞によって介される抑制を克服することを要求することを示す。図 11 A : B 6 (野生型)、G I T R^{+/+}、C D 2 8^{-/-} 及び G I T R^{-/-} マウス由来の C F S E 標識したリンパ節 (L N) 細胞 (5 × 10⁴) を異なる濃度の可溶性抗 C D 3 m A b (x 軸) で 72 時間培養した。全 L N 細胞は、外因性の I L - 2 (50 U / ml) なしに (A s) 又はとともに培養した。s . d . 値を示すバーは、明瞭性のために削除した。図 11 B : C D 2 8^{-/-}、G I T R^{-/-}、G I T R^{+/+} 又は G I T R^{+/+} 動物から単離した C D 4⁺ 及び C D 8⁺ をゲートとしたリンパ節 T 細胞のフローサイトメトリー評価を培養 72 時間後に実行した。結果は、可溶性抗 C D 3 の 0.63 μg / ml 濃度に対応している (図 11 A に示す通り)。図 11 C : C D 2 5 発現のフローサイトメトリー解析は、無刺激のままの (破線塗りつぶされていないヒストグラム)、G I T R^{-/-} マウスから得た (実線塗りつぶされていないヒストグラム)、及び G I T R^{+/+} マウスから得た (塗りつぶされたヒストグラム) H - 2 D^b 陽性 C D 4⁺ C D 2 5⁻ 細胞について実行した。G I T R^{-/-} 又は G I T R^{+/+} マウスから得た C D 4⁺ C D 2 5⁻ 細胞による C D 2 5 発現は、抗 C
30

D 3 (0 . 5 μ g / m l) の存在下で、 1 : 2 のサプレッサーとレスポンダーの比で B A L B / c マウス由来の C D 4 + C D 2 5 + 細胞の不存在 (左ヒストグラムパネル) 又は存在 (右ヒストグラムパネル) 下で、 野生型マウスの L N A P C とともに 2 4 時間培養後に決定した。 C D 2 5 発現はまた、 5 0 U / m l の r h I L - 2 の不存在 (上段ヒストグラムパネル) 又は存在 (下段ヒストグラムパネル) 下で決定した。上記の結果は、 3 つの独立した実験の代表である。

【図 12】 [0 0 5 4] 図 12 は、 C D 2 8 依存性同時刺激が G I T R 発現と反応性を増強することを示す。図 12 A : プレートに結合した抗 C D 3 、及び 2 μ g / m l のプレートに結合したハムスターアイソタイプ (「 a C D 3 」) 又はプレートに結合した抗 C D 2 8 (「 a C D 3 + a C D 2 8 」) のいずれかで 7 2 時間培養後に精製した C D 4 + C D 2 5 - 又は C D 8 + T 細胞 (2 . 5 \times 1 0 4) による G I T R 発現のフローサイトメトリー解析。図 12 B (左ヒストグラムパネル) : 抗 C D 8 0 / 8 6 (各 1 0 μ g / m l) 抗体 (即ち、抗 B 7 . 1 / 7 . 2 抗体) のカクテルと一緒に又は一緒にしないで照射した T 細胞枯渇脾臓細胞及び可溶性抗 C D 3 (0 . 5 μ g / m l) の存在下で 7 2 時間培養した C D 4 + C D 2 5 - T 細胞の抗 G I T R 染色。図 12 B (右ヒストグラムパネル) : I L - 2 及び I L - 2 R に対する抗体のカクテルと一緒に又は一緒にしないで照射した T 細胞枯渇脾臓細胞及び可溶性抗 C D 3 (0 . 5 μ g / m l) の存在下で 7 2 時間培養した C D 4 + C D 2 5 - T 細胞の抗 G I T R 染色。図 12 C : 抗 G I T R m A b (2 μ g / m l ; 「 D T A - 1 」) 又はアイソタイプの対照抗体 (2 μ g / m l ; 「 ラット I g G 」) のいずれかを加えて、抗 C D 8 0 / 8 6 m A b (各 1 0 μ g / m l ; 「 a B 7 」) の存在下又は不存在下で評価した。バーは、 s . d . 値を示す。結果は、 2 ないし 3 の独立した実験の代表である。
10
20

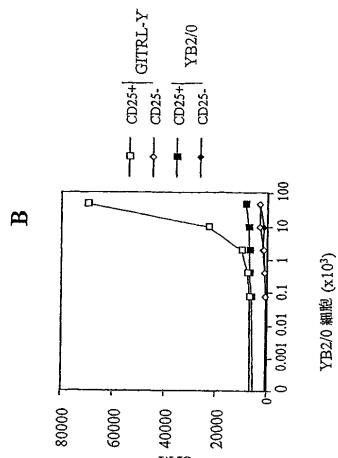
【図 13】 [0 0 5 5] 図 13 は、 G I T R に結合する G I T R L がエフェクター T 細胞への同時刺激性シグナルを提供することを示す。図 13 A : エフェクター G I T R + / T C R + H T - 2 T 細胞 (4 \times 1 0 4) 単独 (白色バー) の増殖、又は 1 \times 1 0 4 の対照 Y B 2 / 0 細胞 (網目バー) 若しくは G I T R L 発現 Y B 2 / 0 細胞 (塗りつぶされたバー) との同時培養における増殖は、 H T - 2 細胞当たり 1 又は 2 の抗 C D 3 ビーズの不存在又は存在下で、 3 H - チミジンの取り込み (c p m ; y 軸) を測定することによって決定した。図 13 B : 細胞当たり 2 つの抗 C D 3 ビーズと同時培養した 4 \times 1 0 4 の H T - 2 細胞の増殖、及び 1 \times 1 0 4 の G I T R L 発現 Y B 2 / 0 細胞、及び抗 G I T R L 抗体 (5 F 1 . 1 ; 黒丸) 又はアイソタイプの対照抗体 (r I g G 1 ; 白丸) の濃度增加 (n g / m l ; x 軸) は、 3 H - チミジンの取り込み (c p m ; y 軸) を測定することによって決定した。図 13 C : 細胞当たり 2 つの抗 C D 3 ビーズと同時培養した 4 \times 1 0 4 の H T - 2 細胞の増殖、及び 1 \times 1 0 4 の G I T R L 発現 Y B 2 / 0 細胞、及び 4 つの異なる抗 G I T R L 抗体 : 5 F 1 . 1 (黒丸) 、 M G L T - 1 0 (黒四角) 、 M G T L - 1 5 (白四角) 又はポリクローナル抗体 (白丸) の濃度増加は、 3 H - チミジンの取り込み (c p m ; y 軸) を測定することによって決定した。
30

【図 14】 [0 0 5 6] 図 14 は、抗 G I T R L 抗体と結合する G I T R - G I T R L を遮断することが、 P L P 誘導の実験的自己免疫脳脊髄炎 (E A E) の養子転移を妨げることを示す。マウスにおける E A E の発症率を評価した。 1 5 0 μ g の P L P ベプチドで免疫し、そして、 3 つの異なる条件 : 1 0 μ g / m l の P L P 単独 (白丸) 、 1 0 μ g / m l の P L P と 1 0 μ g / m l のアイソタイプの対照抗体 (C K O 1 ; 黒丸) 、又は 1 0 μ g / m l の P L P と抗 G I T R L 抗体 (5 F 1 . 1 ; 黒四角) で 3 日間、エクスピボで再刺激したメスの S L J マウスから単離した 5 \times 1 0 6 の脾臓細胞をマウスに注入した。 E A E の発症率は、 5 2 日間 (x 軸) モニターし、 0 ないし 5 のスケールでスコアをとった (y 軸) 。
40

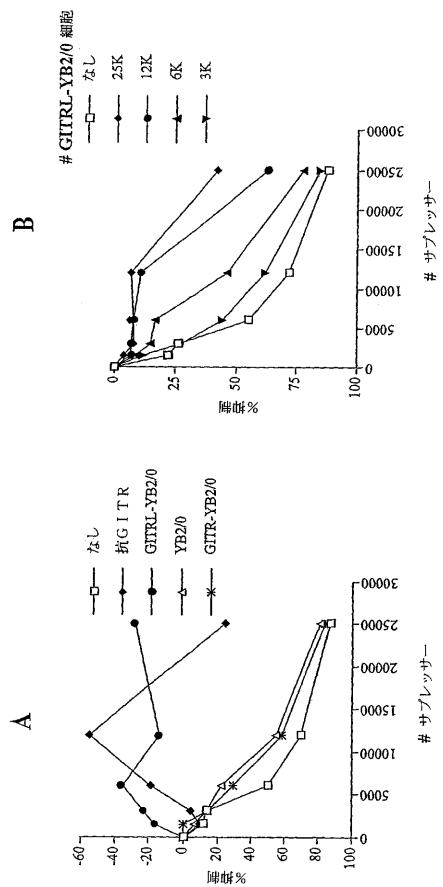
【図 1】

1 M E E N P L R E S S T Q A R E C K . K S W I L C I V A I I L M U L C G L I Y T S L 4 4
 1 M C L S H I L E N N P L S H I S R T Q A R S S W K L W I L P C S I V M L L . F L C S F S M L I F L 4 9
 45 K . P T A I S C M V K P E L L S K W H M T S P K P H C Y N T T S D G K L K I L Q S G T Y L I G 9 3
 50 Q L T A K E P C M A K E G P L P S K W Q A S S E P C V K V S D W K L E I I L Q N G L Y L I G 9 9
 94 Q V I P V D K K Y K O N A P F V V Q I Y K K N D V L Q T I M D P O I L P I G V Y R L H G D N 1 4 3
 100 Q V A P . M A N Y . N D U A P E P V R L Y K N C M I Q T L N K S K I Q N V G S T Y E B L H V G D T 1 4 7
 144 T Y L K F N S K O H I Q X A N T Y W G I I L M P D L P F T S 1 7 3
 148 I D L I F N S E R Q V L K O N T Y W G I I L L A N P Q F T S 1 7 7

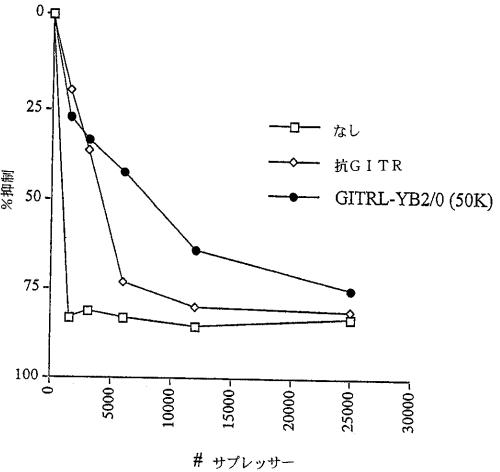
【図 2】



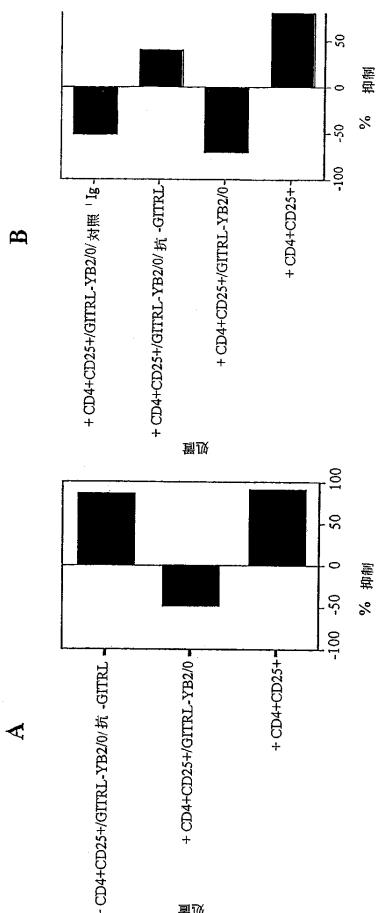
【図 3】



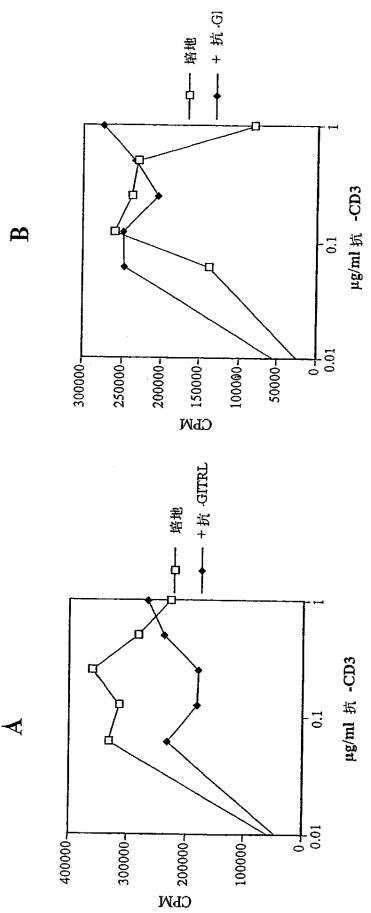
【図 4】



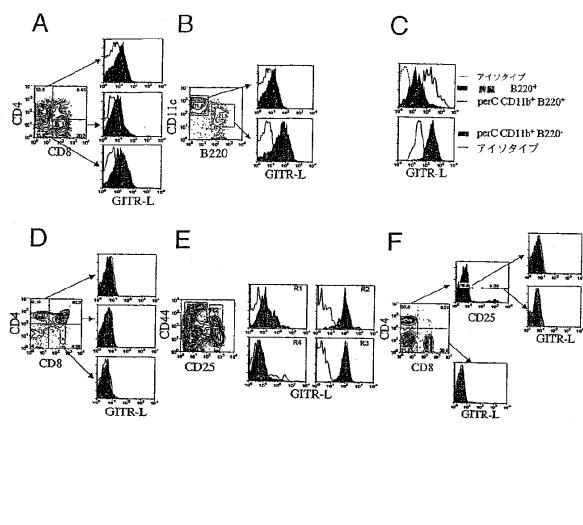
【図5】



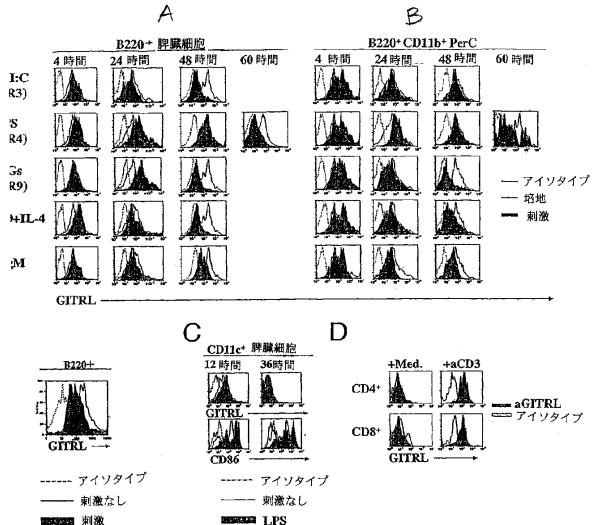
【図6】



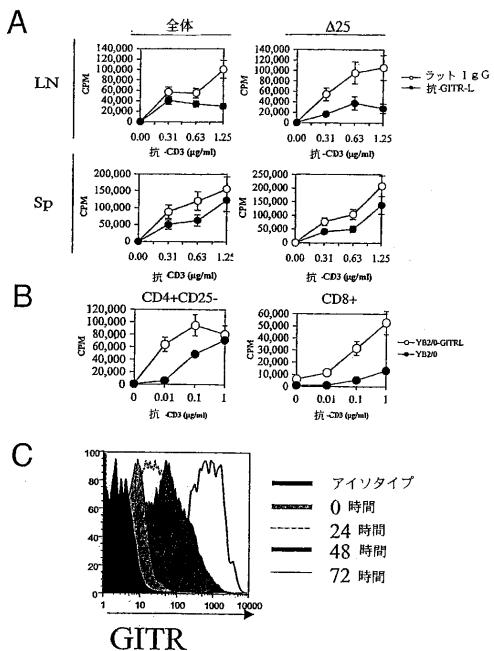
【図7】



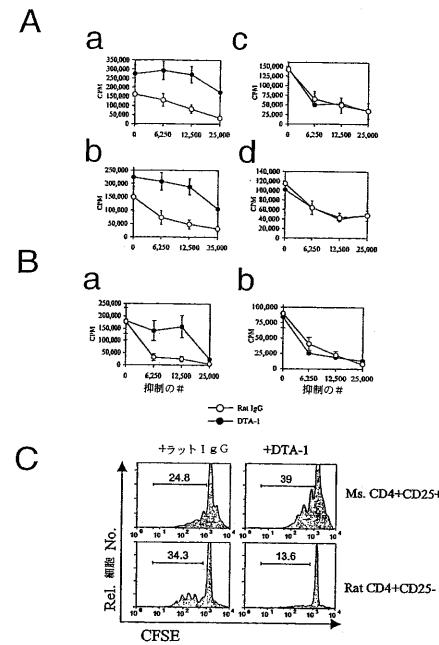
【図8】



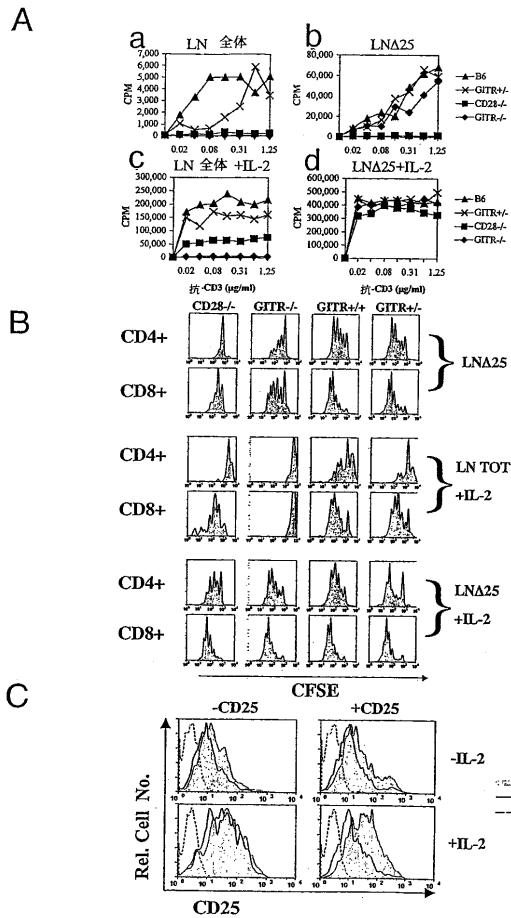
【図9】



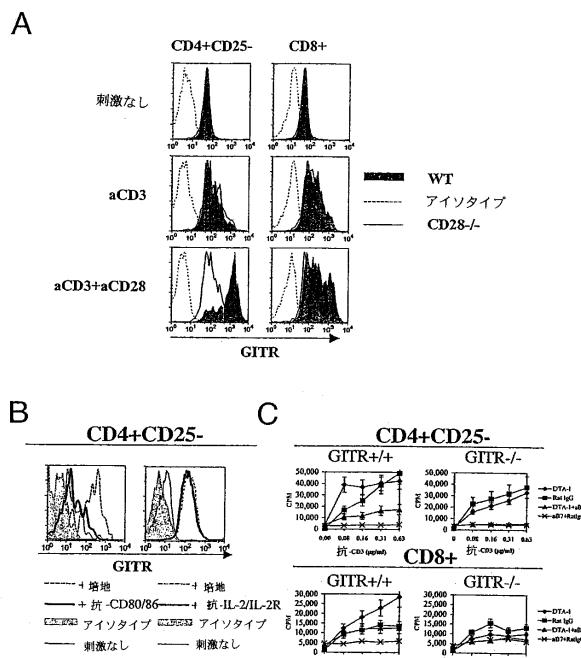
【図10】



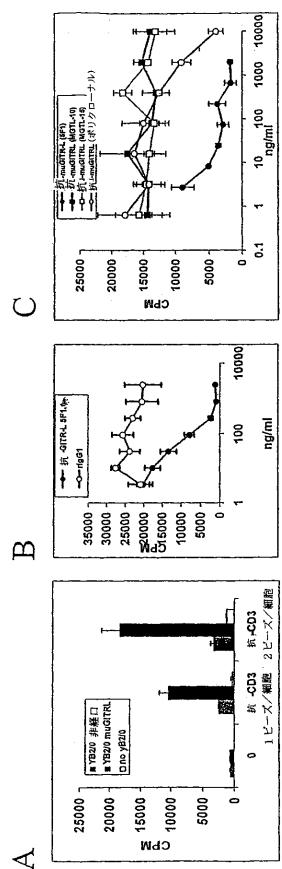
【図11】



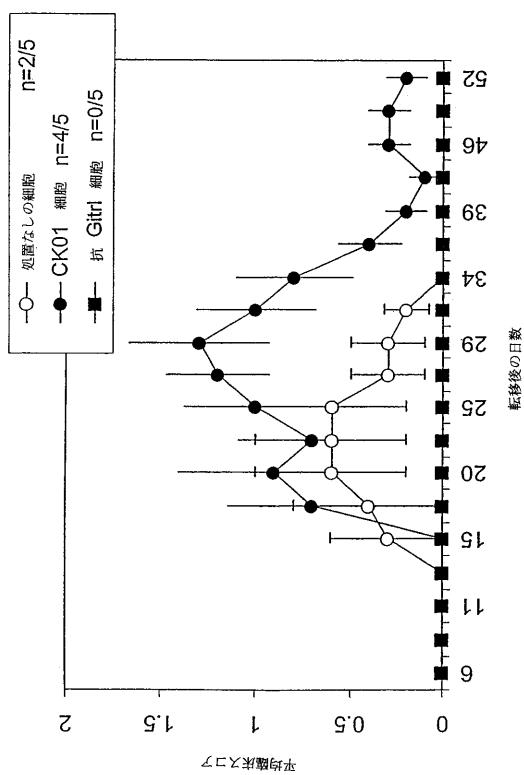
【図12】



【図 1 3】



【図 1 4】



【配列表】

0004638876000001.xls

フロントページの続き

微生物の受託番号 ATCC PTA-5337

(74)代理人 100140109
弁理士 小野 新次郎
(74)代理人 100075270
弁理士 小林 泰
(74)代理人 100080137
弁理士 千葉 昭男
(74)代理人 100096013
弁理士 富田 博行
(74)代理人 100091638
弁理士 江尻 ひろ子
(72)発明者 コリンズ, メアリー
アメリカ合衆国マサチューセッツ州 01760, ナティック, ラスバン・ロード 54
(72)発明者 シーパッチ, イーサン・メナヘム
アメリカ合衆国メリーランド州 20850, ロックビル, デフォー・コート 5
(72)発明者 マッキュー, レベッカ・スザンヌ
ニュージーランド国 ニュージーランド 6001, ウェリントン, ウエブ・ストリート 51-75, キュービーエイ・アパートメンツ 2ディー
(72)発明者 ホワイターズ, マシュー・ジェームズ
アメリカ合衆国マサチューセッツ州 01749, ハドソン, ブレントン・ウッド・ロード 14
(72)発明者 ヤング, デボラ・アン
アメリカ合衆国マサチューセッツ州 02176, メルローズ, ネルソン・ロード 39
(72)発明者 バーン,マイケル・チャップマン
アメリカ合衆国マサチューセッツ州ブルックリン, ハイスロップ・ロード 34
(72)発明者 レディ, パドマラーサ・エス
アメリカ合衆国マサチューセッツ州 02081, ウォルポール, マイロッド・ストリート 127
(72)発明者 スティーブンス, ジェフリー・ローレンス
アメリカ合衆国メリーランド州 20872, ダマスカス, リッジ・マナー・ドライブ 26051
(72)発明者 カレーニョ, ベアトリズ・エム
アメリカ合衆国ミズーリ州 63105, クレイトン, ダートフォード・アベニュー 11

審査官 中村 正展

(56)参考文献 國際公開第 03 / 006058 (WO, A1)
GenBank Accession AY234223, 2003年 4月 9日, URL, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/v/sviewer/viewer.fcgi?29691298:NCBI:4615897>
Curr. Biol., 1999年, vol. 9, 215-218
J. Biol. Chem., 1999年, vol. 274, 6056-6061
Nat. Immunol., 2002年, vol. 3, 135-142
Immunity, 2002年, vol. 16, 311-323
FEBS Lett., 2002年, vol. 514, 275-280
J. Cell. Biochem., 2003年 4月, vol. 88, 1048-1056

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 16/18
C07K 14/47
C12N 5/00- 5/28

C12N 15/00-15/90
C12P 21/08
A01K 67/027
JSTPplus/JMEDPlus(JDreamII)
MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
WPIDS(STN)
CA/CONFSCI/SCISEARCH(STN)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
UniProt/GeneSeq