

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-519536

(P2019-519536A)

(43) 公表日 令和1年7月11日 (2019.7.11)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 H 0 4 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 50 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2018-562626 (P2018-562626)
 (86) (22) 出願日 平成29年6月30日 (2017.6.30)
 (85) 翻訳文提出日 平成31年1月23日 (2019.1.23)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2017/040259
 (87) 国際公開番号 W02018/005950
 (87) 国際公開日 平成30年1月4日 (2018.1.4)
 (31) 優先権主張番号 62/357,750
 (32) 優先日 平成28年7月1日 (2016.7.1)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

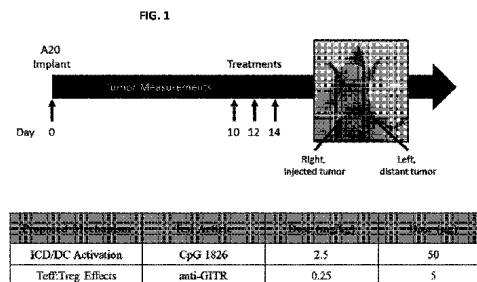
(71) 出願人 507150079
 ファイブ プライム セラピューティクス
 , インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
 80, サウス サンフランシスコ, オ
 イスター ポイント ブールバード 11
 1
 (74) 代理人 100147485
 弁理士 杉村 憲司
 (74) 代理人 230118913
 弁理士 杉村 光嗣
 (74) 代理人 100181847
 弁理士 大島 かおり

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 G I T R アゴニストおよび C P G を用いた組み合わせ抗腫瘍療法

(57) 【要約】

本明細書で提供するのは、例えば、C p G オリゴデオキシヌクレオチドと組み合わせて、グルココルチコイド誘導性 T N F R 関連タンパク質 (G I T R) アゴニストを抗腫瘍薬として使用する方法である。また、その C D R により特徴づけられた特異的抗体がアゴニスとして記載されている。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

有効量の少なくとも 1 つのグルココルチコイド誘導性 T N F R 関連タンパク質 (G I T R) アゴニストを投与するステップと；

有効量の少なくとも 1 つの C p G オリゴデオキシヌクレオチド (O D N) を腫瘍内に投与するステップを含み、それにより対象の腫瘍を処置する、哺乳動物の腫瘍を処置する方法。

【請求項 2】

前記少なくとも 1 つの G I T R アゴニストは腫瘍内に投与される、請求項 1 の方法。

【請求項 3】

前記少なくとも 1 つの G I T R アゴニストは全身投与される、請求項 1 の方法。

【請求項 4】

有効量の 1 つまたは複数の追加の治療薬を前記対象に投与するステップをさらに含む、請求項 1 ~ 3 の何れかの方法であって、前記 1 つまたは複数の追加の治療薬は、1 つもしくは複数の化学療法薬、1 つもしくは複数の生物学的薬剤、1 つもしくは複数の抗血管新生薬、1 つもしくは複数の増殖阻害薬、1 つもしくは複数の抗新生物形成組成物、手術、またはそれらの組み合わせを含む、方法。

【請求項 5】

前記哺乳動物はヒトである、請求項 1 ~ 4 の何れかの方法。

【請求項 6】

前記少なくとも 1 つの G I T R アゴニストは、G I T R 抗体または G I T R 抗体断片を含む、請求項 1 ~ 5 の何れか一項の方法。

【請求項 7】

前記 G I T R 抗体はキメラ抗体、ヒト化抗体、またはヒト抗体である、請求項 6 の方法。

【請求項 8】

前記 G I T R 抗体は、二重特異性抗体または単鎖抗体である、請求項 6 または 7 の方法。

【請求項 9】

前記少なくとも 1 つの G I T R アゴニストは、F v、単鎖 F v (s c F v)、F a b、F a b'、および (F a b')₂ から選択される G I T R 抗体断片である、請求項 6 の方法。

【請求項 10】

前記少なくとも 1 つの G I T R アゴニストは：

a) S E Q I D N O : 6 の配列を含む C D R 1 と、S E Q I D N O : 7 の配列を含む C D R 2 と、S E Q I D N O : 8 の配列を含む C D R 3 とを含む G I T R 結合ドメイン (G I T R - B D) を含む抗体；

b) S E Q I D N O : 5 の配列を含む G I T R - B D を含む抗体；

c) 構造 (G I T R - B D) - リンカー - (G I T R - B D) - リンカー - ヒンジ - F c を有するポリペプチドの 2 つのコピーを含む四価分子であって、(i) 前記 G I T R - B D は、S E Q I D N O : 6 の配列を含む C D R 1 と、S E Q I D N O : 7 の配列を含む C D R 2 と、S E Q I D N O : 8 の配列を含む C D R 3 とを含み、(i i) 前記リンカーはポリペプチドであり、(i i i) 前記ヒンジは、免疫グロブリンヒンジ領域に由来するポリペプチドであり、(i v) 前記 F c は免疫グロブリン F c ポリペプチドである、四価分子；

d) 構造 (G I T R - B D) - リンカー - (G I T R - B D) - リンカー - ヒンジ - F c を有するポリペプチドの 2 つのコピーを含む四価分子であって、(i) 前記 G I T R - B D は、S E Q I D N O : 5 のアミノ酸配列を含み、(i i) 前記リンカーはポリペプチドであり、(i i i) 前記ヒンジは、免疫グロブリンヒンジ領域に由来するポリペプチドであり、(i v) 前記 F c は免疫グロブリン F c ポリペプチドである、四価分子；

10

20

30

40

50

および

e) SEQ ID NO: 4 の配列を含むポリペプチドの 2 つのコピーを含む四価分子から選択される GITR 抗体である、請求項 6 の方法。

【請求項 11】

前記少なくとも 1 つの GITR アゴニストは、GITR ペプチドまたは GITR をコードする核酸分子を含む、請求項 1 ~ 5 の何れか一項の方法。

【請求項 12】

前記少なくとも 1 つの GITR アゴニストは大分子を含む、請求項 1 ~ 5 の何れか一項の方法。

【請求項 13】

前記腫瘍はリンパ腫、メラノーマ、肉腫、または腺がんである、請求項 1 ~ 12 の何れか一項の方法。

【請求項 14】

前記腫瘍は、乳房、肝臓、脾臓、腎臓、大腸、前立腺、肺、中枢神経系、頭頸部、胃、膵臓、卵巣、子宮頸部、精巣、膀胱、または胆のうのがんである、請求項 1 ~ 12 の何れか一項の方法。

【請求項 15】

前記少なくとも 1 つの CpG ODN にはクラス B の ODN が含まれる、請求項 1 ~ 14 の何れか一項の方法。

【請求項 16】

前記クラス B の ODN は、SEQ ID NO: 1 (ホスホロチオエートである塩基を有する 5' - t c g t c g t t t t g t c g t t t t g t c g t t - 3') および SEQ ID NO: 2 (ホスホロチオエートである塩基を有する 5' - t c c a t g a c g t t c c t g a c g t t - 3')、SEQ ID NO: 3 (5' - T G A C T G T G A A C G T T C G A G A T G A - 3')、またはそれらの組み合わせを含む、請求項 15 の方法。

【請求項 17】

前記注射腫瘍のサイズまたは体積を、少なくとも 30%、少なくとも 40%、少なくとも 50%、少なくとも 60%、少なくとも 70%、少なくとも 80%、少なくとも 90%、または少なくとも 95% 減少させる、請求項 1 ~ 16 の何れか一項の方法。

【請求項 18】

非注射転移性腫瘍のサイズまたは体積を、少なくとも 30%、少なくとも 40%、少なくとも 50%、少なくとも 60%、少なくとも 70%、少なくとも 80%、少なくとも 90%、または少なくとも 95% 減少させる、請求項 1 ~ 17 の何れか一項の方法。

【請求項 19】

非注射転移性腫瘍の数を、少なくとも 30%、少なくとも 40%、少なくとも 50%、少なくとも 60%、少なくとも 70%、少なくとも 80%、少なくとも 90%、または少なくとも 95% 減少させる、請求項 1 ~ 18 の何れか一項の方法。

【請求項 20】

前記少なくとも 1 つの GITR アゴニストと前記少なくとも 1 つの CpG ODN は同時にまたは同時期に投与される、請求項 1 ~ 19 の何れか一項の方法。

【請求項 21】

有効量の少なくとも 1 つの GITR アゴニストの少なくとも 2 回の別個の腫瘍内投与と、有効量の少なくとも 1 つの CpG ODN の少なくとも 2 回の別個の腫瘍内投与を含む、請求項 1、2、および 4 ~ 20 の何れか一項の方法。

【請求項 22】

前記少なくとも 1 つの GITR アゴニストの有効量は、少なくとも 0.25 mg/kg であり、前記少なくとも 1 つの CpG ODN の有効量は、少なくとも 2.5 mg/kg である、請求項 1、2、および 4 ~ 20 の何れか一項の方法。

【請求項 23】

10

20

30

40

50

前記少なくとも1つのGITRアゴニストの有効量は、0.01～0.1mg/kgであり、前記少なくとも1つのCpG ODNの有効量は、0.5～1.0mg/kgである、請求項1、および3～20の何れか一項の方法。

【請求項24】

1つまたは複数のGITRアゴニストと；

1つまたは複数のCpG ODNとを含む、組成物。

【請求項25】

薬学的に許容可能な担体をさらに含む、請求項24の組成物。

【請求項26】

請求項24または25の組成物と、任意選択的に、1つもしくは複数の化学療法薬、1つもしくは複数の生物学的薬剤、1つもしくは複数の抗血管新生薬、1つもしくは複数の増殖阻害薬、1つもしくは複数の抗新生物形成組成物、またはそれらの組み合わせとを含む、キット。

10

【発明の詳細な説明】

【関連出願の相互参照】

【0001】

本出願は、2016年7月1日出願の米国仮特許出願第62/357750号の利益を主張し、前記文献はその全体が参照により本明細書に組み込まれるものとする。

【技術分野】

【0002】

本出願は、例えばCpGオリゴデオキシヌクレオチド(ODN)との組み合わせた、抗腫瘍薬としてのグルココルチコイド誘導性TNFR関連タンパク質(GITR)アゴニストの使用に関する。また、斯かる方法で使用され得るキットおよび組成物も提供する。

20

【背景技術】

【0003】

がんは、身体の他の部分に浸潤または広がる可能性のある異常な細胞増殖を伴う疾患群である。2012年には、約1410万件の新規のがん症例が世界的に生じている(メラノーマ以外の皮膚がんは含まない)。それは約820万件の死亡、つまりヒトの死の14.6%の原因であった。男性において最も一般的ながんタイプは、肺がん、前立腺がん、大腸がん、および胃がんである。女性では、最も一般的なタイプは乳がん、大腸がん、肺がん、および子宮頸がんである。がんおよびその転移に対する有効な処置に対しては、継続的なニーズがある。

30

【発明の概要】

【0004】

本明細書で提供するのは、ヒト、家畜動物、または実験動物などの哺乳動物における腫瘍を処置する方法である。本方法は、有効量の少なくとも1つのグルココルチコイド誘導性TNFR関連タンパク質(GITR)アゴニストの投与(例えば、腫瘍内投与または全身投与)と、有効量の少なくとも1つのCpG ODNの腫瘍内投与とを含み、それにより哺乳動物の腫瘍を処置する。いくつかの例では、少なくとも1つのGITRアゴニストと少なくとも1つのCpG ODNは同時にまたは同時期に投与される。いくつかの例では、少なくとも1つのGITRアゴニストと少なくとも1つのCpG ODNは、少なくとも2回で、例えば、2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、9回、または10回などで、少なくとも2回の異なる機会に投与される。いくつかの例では、GITRアゴニストとCpG ODNの両方が、少なくとも1日、少なくとも2日、少なくとも5日、少なくとも7日、少なくとも14日、または少なくとも30日空けて、多数回で投与される。いくつかの例では、本方法は、さらに、有効量の1つまたは複数の追加の治療薬、例えば1つまたは複数の化学療法薬、1つまたは複数の生物学的薬剤、1つまたは複数の抗血管新生薬、1つまたは複数の増殖阻害薬、1つまたは複数の抗新生物形成組成物、手術、またはそれらの組み合わせなどを投与するステップを含む。

40

【0005】

50

例示的なGITRアゴニストとしては、GITR抗体もしくはGITR抗体断片（例えば、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、二重特異性抗体、単鎖抗体、Fv、単鎖Fv（scFv）、Fab、Fab'、もしくは（Fab'）₂など）、大分子、小分子、または核酸分子をコードするGITRが挙げられる。特異的な例では、少なくとも1つのGITRアゴニストは、Fv、単鎖Fv（scFv）、Fab、Fab'、および（Fab'）₂から選択されるGITR抗体断片である。特異的な例では、少なくとも1つのGITRアゴニストは、a）SEQ ID NO：6の配列を含むCDR1と、SEQ ID NO：7の配列を含むCDR2と、SEQ ID NO：8の配列を含むCDR3とを含むGITR結合ドメイン（GITR-BD）を含む抗体；b）SEQ ID NO：5の配列を含むGITR-BDを含む抗体；c）構造（GITR-BD）-リンカー-（GITR-BD）-リンカー-ヒンジ-Fcを有するポリペプチドの2つのコピーを含む四価分子であって、（i）前記GITR-BDは、SEQ ID NO：6の配列を含むCDR1と、SEQ ID NO：7の配列を含むCDR2と、SEQ ID NO：8の配列を含むCDR3とを含み、（ii）前記リンカーはポリペプチドであり、（iii）前記ヒンジは、免疫グロブリンヒンジ領域に由来するポリペプチドであり、（iv）前記Fcは免疫グロブリンFcポリペプチドである、四価分子；d）構造（GITR-BD）-リンカー-（GITR-BD）-リンカー-ヒンジ-Fcを有するポリペプチドの2つのコピーを含む四価分子であって、（i）前記GITR-BDは、SEQ ID NO：5のアミノ酸配列を含み、（ii）前記リンカーはポリペプチドであり、（iii）前記ヒンジは、免疫グロブリンヒンジ領域に由来するポリペプチドであり、（iv）前記Fcは免疫グロブリンFcポリペプチドである、四価分子；およびe）SEQ ID NO：4の配列を含むポリペプチドの2つのコピーを含む四価分子から選択されるGITR抗体である。

10

20

30

40

50

【0006】

例示的なCpG ODNとしては、クラスBのODN、例えば、SEQ ID NO：1に示されるヒトCpG配列（ホスホロチオエートである塩基を有する5'-tcgtcgttttgcgttttgcgtt-3'）およびSEQ ID NO：2に示されるマウスCpG配列（ホスホロチオエートである塩基を有する5'-tccatgacgttccctgacgtt-3'）などが挙げられる。一例では、CpG ODNは、配列5'-TGACTGTGAACGTTTCGAGATGA-3' SEQ ID NO：3を有する（DynamaxからのISS 1018）。他の例は、Rachmilewitz et al. (Inflammatory Bowel Diseases 12(5):339-45, 2006)で提供される。当業者であれば、他のTLR9アゴニストがCpG ODNの代替として（またはそれに加えて）使用可能であることを理解しよう。

【0007】

いくつかの例では、少なくとも1つのGITRアゴニストの有効量は、少なくとも0.01mg/kg、少なくとも0.03mg/kg、少なくとも0.25mg/kg、少なくとも0.3mg/kg、または少なくとも1mg/kgである。いくつかの例では、少なくとも1つのGITRアゴニストの有効量は、1mg/kg以下、0.3mg/kg以下、0.25mg/kg以下、0.03mg/kg以下、0.01mg/kg以下、または0.01mg/kg以下、例えば0.1mg/kg～1mg/kgである。いくつかの例では、少なくとも1つのCpG ODNの有効量は、少なくとも0.05mg、少なくとも0.3mg、少なくとも1mg、少なくとも3mg、少なくとも6mg、少なくとも18mg、または少なくとも20mgである。いくつかの例では、少なくとも1つのCpG ODNの有効量は、20mg以下、10mg以下、1mg以下、0.3mg以下、または0.05mg以下、例えば0.05mg～20mgなどである。いくつかの例では、少なくとも1つのGITRアゴニストの有効量は0.01～0.1mg/kgであり、少なくとも1つのCpG ODNの有効量は0.5～1.0mg/kgである。

【0008】

本開示の方法で処置され得る例示的な腫瘍としては、限定するわけではないが、リンパ

腫、メラノーマ、肉腫、または腺がんが挙げられる。一部の実施形態では、腫瘍はメラノーマである。いくつかの例では、腫瘍は乳房、肝臓、脾臓、腎臓、大腸、前立腺、肺、中枢神経系、頭頸部、胃、膵臓、卵巣、子宮頸部、精巣、膀胱、または胆のうのがんである。一部の実施形態では、腫瘍は乳がんおよび大腸がんから選択される。他の例も本明細書において提供する。いくつかの例では、本開示の方法は、例えば、G I T R アゴニストおよびC p G O D N の投与なしと比較して、注射腫瘍のサイズまたは体積を少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも95%減少させる。いくつかの例では、本開示の方法は、例えば、G I T R アゴニストおよびC p G O D N の投与なしと比較して、非注射転移性腫瘍のサイズまたは体積を少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも95%減少させる。いくつかの例では、本開示の方法は、例えば、G I T R アゴニストおよびC p G O D N の投与なしと比較して、非注射転移性腫瘍の数を少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、または少なくとも95%減少させる。

10

【0009】

本開示の前述のおよび他の目的および特徴は、添付の図を参照にしながら進む、以下の詳細な記載から、より明らかになる。

20

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】実施例1で使用する方法の概要を提供する図である。

【図2】注射腫瘍または遠位の非注射腫瘍の腫瘍退縮に対する、(A, B) C p G、(B, C) 抗G I T R、または(D, F) C p G と抗G I T R の両方の、直接腫瘍注射の結果を示すグラフである。(A) C p G のみは注射腫瘍の退縮を引き起こしたが、(B) 遠位の非注射腫瘍の退縮は引き起こさなかった。(C) 抗G I T R は、注射腫瘍の退縮を引き起こしたが、(D) いくつかのマウスにおいて、遠位腫瘍の退縮を引き起こさなかった。(E) C p G と抗G I T R の組み合わせは、注射腫瘍の退縮と、(F) 遠位腫瘍の退縮を引き起こした。

30

【図3】注射腫瘍または遠位の非注射腫瘍の腫瘍退縮に対する、C p G の直接腫瘍注射、または抗G I T R のi . p . 注射、またはC p G の直接腫瘍注射と抗G I T R のi . p . 注射の両方の結果を示すグラフである。(A) C p G のみは注射腫瘍の退縮を引き起こしたが、(B) 遠位非注射腫瘍の退縮は引き起こさなかった。(C, D) i . p . 投与した抗G I T R は、いくつかのマウスにおいて、腫瘍の退縮を引き起こした。(E) 腫瘍内に投与したC p G と、i . p . 投与した抗G I T R (例えば、全身性抗G I T R) の組み合わせは、注射腫瘍の退縮を引き起こし、(F) 全マウスではないが、いくつかのマウスにおいて、遠位腫瘍の退縮を引き起こした。

【図4】ある多価抗G I T R 抗体構造の略図を提供する図である。

【0011】

配列表

40

37C . F . R . 1 . 822 に定義されているように、ヌクレオチド塩基の標準的な文字略語とアミノ酸の3文字略語を使用し、核酸配列を示す。各核酸配列の一本の鎖のみを示すが、表示の鎖を参照することにより、含まれる相補鎖が理解される。

【0012】

SEQ ID NO : 1 - 3 は、例示的なC p G O D N 配列を示す。

【0013】

SEQ ID NO : 4 は、例示的なG I T R 結合ポリペプチドである。

【0014】

SEQ ID NO : 5 は、例示的なG I T R 結合ドメインである。

【0015】

50

SEQ ID NO : 6 は、例示的な C D R 1 ポリペプチドである。

【0016】

SEQ ID NO : 7 は例示的な C D R 2 ポリペプチドである。

【0017】

SEQ ID NO : 8 は例示的な C D R 4 ポリペプチドである。

【0018】

SEQ ID NO : 9 ~ 14 は、例示的なタンパク質 F c 配列を示す。

【0019】

SEQ ID NO : 15 ~ 17 は、例示的なタンパク質ヒンジ配列を示す。

【0020】

SEQ ID NO : 18 ~ 24 は、例示的なタンパク質リンカー配列を示す。

【発明を実施するための形態】

【0021】

以下の用語および方法についての説明は、本開示をより良く開示し、本開示の実践にあたり当業者を誘導するために提供する。「1つ(a)」、「1つ(an)」、および「その(the)」の単数形は、文脈が明らかに他を意味する場合を除き、1つまたは2つ以上を指す。例えば、用語「細胞を含む」は、単一のまたは複数の細胞を含み、句「少なくとも1つの細胞を含み」と同等であると考えられる。用語「または」は、文脈上他のことが明確に示されている場合を除き、記載された複数の代替要素の1つの要素または2つ以上の要素の組合せを指す。本明細書で使用する場合、「含む(comprise)」は「含む(include)」を意味する。したがって、「AまたはBを含む」は、「A、B、またはAおよびBを含む」を意味し、追加の要素を除外しない。本明細書で言及する GenBank (登録商標) のアクセッション番号の日付は、少なくとも早ければ2016年7月1日に利用可能な配列である。全ての参考文献(雑誌論文、特許、および特許出願を含む)ならびに本明細書で引用または言及する GenBank (登録商標) アクセッション番号は、参照により本明細書に組み込まれるものとする。

【0022】

別途説明がない限り、本明細書で使用する全ての専門用語および科学技術用語は本開示が属する分野の当業者により一般的に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載するものと同様または同等の方法および材料を本開示の実践またはテストに使用することが可能だが、適切な方法および材料について以下に記載する。これらの材料、方法、および例は単なる例示であり、限定することを意図するものではない。

【0023】

本開示の種々の実施形態の総説を容易にするため、以下の特定の用語の説明を提供する：

【0024】

投与：GITR 活性を高まるまたは増加させる1つもしくは複数の薬剤(例えば、GITR の核酸分子もしくはタンパク質もしくはその下流生成物に対し特異的なアゴニスト)および/または1つもしくは複数の CpG ODN (例えば、TLR9 アゴニスト)などの薬剤を、任意の効果的な経路で対象に提供するかまたは与えること。例示的な投与経路としては、限定するわけではないが、経口経路、注射経路(例えば、皮下、筋肉内、皮内、腹腔内、静脈内、腫瘍周辺、および腫瘍内など)、舌下経路、直腸経路、経皮経路、鼻腔経路、腔経路、ならびに吸入経路が挙げられる。一例では、投与経路は腫瘍内である。

【0025】

薬剤：目的または結果を達成するのに有用である任意の物質または物質の任意の組み合わせ；例えば、腫瘍、例えばがんなどを処置するのに有用な物質または物質の組み合わせ。薬剤としては、限定するわけではないが、タンパク質、核酸分子、化合物、小分子、大分子、有機化合物、無機化合物、または他の関心分子が挙げられる。いくつかの実施形態では、薬剤は、ポリペプチド剤(例えば、抗体など)、核酸分子(例えば、GITR もしくは CpG ODN をコードする核酸分子など)、または医薬化合物である。当業者は、

10

20

30

40

50

特定の薬剤が2つ以上の結果を達成するのに有用である場合があることを理解しよう。

【0026】

アゴニスト：タンパク質、例えばGITRもしくはTLR9などの生物学的活性を高めるもしくは増加させる、または、該タンパク質をコードする核酸の転写もしくは翻訳を高めるもしくは増加させる任意の分子。例示的なアゴニスト分子としては、限定するわけではないが、アゴニスト抗体、アゴニストペプチド、オリゴペプチド、有機分子（大分子および小分子を含む）、ならびに核酸分子（例えば、GITRをコードする核酸分子またはCpG ODN）が挙げられる。用語「GITRアゴニスト」は、GITRの発現およびまたは活性を、例えば、エフェクターT細胞を刺激する、制御性T細胞の抑制作用および系譜安定性を低下させる、制御性T細胞を欠乏させる、またはそれらの組み合わせにより、直接的または間接的に増加させるかまたは高める分子または分子の組み合わせを指す。用語「TLR9アゴニスト」は、TLR9の発現および/または活性を、例えば、B細胞の増殖および分化、ならびにまたは、形質細胞様（pDC）活性化およびIFN-分泌を誘発することにより、直接的または間接的に増加させるかまたは刺激する分子または分子の組み合わせを指す。

10

【0027】

抗体：GITRなどの抗原またはその断片のエピトープを特異的に認識し結合する、少なくとも軽鎖または重鎖免疫グロブリン可変領域を含むポリペプチド。抗体は重鎖および軽鎖からなり、重鎖および軽鎖はそれぞれ可変領域を有し、可変重（V_H）領域および可変軽（V_L）領域という。一緒になって、V_H領域とV_L領域は、抗体により認識される抗原への結合を担う。本開示の抗体には、GITRに対し特異的であるものが含まれ、いくつかの例では、該抗体は、タンパク質の生物学的活性を高めるまたは増加させもする（例えば、エフェクターT細胞を刺激する、制御性T細胞の抑制作用および系譜安定性を低下させる、制御性T細胞を欠乏させる、または両方など）。

20

【0028】

用語抗体には、無傷の免疫グロブリンと、その変異体およびその一部、例えば、Fab'断片、F(ab)'₂断片、単鎖Fvタンパク質（「scFv」）、Fv、Fab、およびジスルフィド安定化Fvタンパク質（「dsFv」）が含まれる。scFvタンパク質は融合タンパク質であり、ここでは免疫グロブリンの軽鎖可変領域および免疫グロブリンの重鎖可変領域はリンカーにより結合されているが、dsFvでは、鎖は、鎖の会合を安定化するために、ジスルフィド結合を導入するように突然変異誘発している。該用語にはまた、遺伝子組み換え形態、例えばキメラ抗体（例えば、ヒト化マウス抗体）、単鎖抗体（例えば、ラクダ科抗体）、およびヘテロ複合体抗体（例えば、二重特異的抗体など）も含まれる。また、Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL); Kuby, J., Immunology, 3rd Ed., W.H. Freeman & Co., New York, 1997も参照されたい。

30

【0029】

典型的には、天然に存在する免疫グロブリンは、ジスルフィド結合により相互結合される重（H）鎖および軽（L）鎖を有する。2種のタイプの軽鎖、つまりラムダ（ λ ）およびカッパ（ κ ）がある。抗体分子の機能的活性を決定する次の5つの主要重鎖クラス（またはイソタイプ）が存在する：IgM、IgD、IgG、IgA、およびIgE。

40

【0030】

各重鎖および軽鎖は、定常領域および可変領域（領域は「ドメイン」としても知られる）を含有する。組み合わせさせて、重鎖と軽鎖の可変領域は抗原に特異的に結合する。軽鎖および重鎖の可変領域は、「相補性決定領域」または「CDR」とも呼ばれる、3つの超可変領域により中断される「フレームワーク」領域を含有する。フレームワーク領域およびCDRの範囲は定義されている（Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 1991参照）。Kabatデータベースは現在、オンラインで維持されている。別の軽鎖または重鎖のフレームワーク領域の配列は、種内で比較的保存されている。抗体のフレームワーク領域は構成要

50

素である軽鎖および重鎖の組み合わせフレームワーク領域であり、三次元空間においてCDRを位置付け、整列させるように機能する。

【0031】

CDRは、主に、抗原のエピトープに対する結合を担う。各鎖のCDRは、典型的には、N末端から始まって順に番号をつけられ、CDR1、CDR2、およびCDR3といわれ、また典型的には、特定のCDRが位置する鎖によっても特定される。したがって、V_H CDR3は、それがつけられる抗体の重鎖の可変ドメインに位置する一方、V_L CDR1は、それがつけられる抗体の軽鎖可変領域のCDR1である。標的タンパク質に結合する抗体は、特異的なV_H領域配列とV_L領域配列を有し、したがって、特異的なCDR配列を有する。異なる特異性（例えば、異なる抗原に対する異なる結合部位）を有する抗体は、異なるCDRを有する。抗体ごとに異なるのはCDRであるが、CDR内の限られた数のアミノ酸位置のみ、抗原結合に直接関与する。CDR内のこれらの位置は、特異性決定残基（SDR）と呼ばれる。

【0032】

「V_H」又は「V_H」への言及は、F_v、s c F_v、d s F_v、またはF a bの可変領域を含む、免疫グロブリン重鎖の可変領域を指す。「V_L」または「V_L」への言及は、F_v、s c F_v、d s F_v、またはF a bの可変領域を含む、免疫グロブリン軽鎖の可変領域を指す。

【0033】

「モノクローナル抗体」は、Bリンパ球の単一クローンにより、または単一抗体の軽鎖および重鎖の遺伝子が遺伝子導入された細胞により生成される抗体である。モノクローナル抗体は、当業者に既知の方法、例えば骨髓腫細胞と免疫脾臓細胞との融合体からハイブリッド抗体形成細胞を作成することにより生成される。モノクローナル抗体には、ヒト化モノクローナル抗体が含まれる。

【0034】

「ポリクローナル抗体」は、異なるB細胞株に由来する抗体である。ポリクローナル抗体は、特異的な抗原に対し分泌される免疫グロブリン分子の混合物であり、それぞれが別のエピトープを認識する。これらの抗体は、当業者に既知の方法、例えば、Bリンパ球を誘発する適切な哺乳動物（例えば、マウス、ウサギ、またはヤギなど）に抗原を注射して、該抗原に対し特異的なIgG免疫グロブリンを生成し、これを次に前記哺乳動物の血清より精製することにより生成される。

【0035】

「キメラ抗体」は、1種（例えば、マウス、ラット、カニクイザルなど）由来のフレームワーク残基と、別の種（例えば、ヒト、カニクイザル、ニワトリなど）由来のCDRを有する。いくつかの例では、キメラ抗体は、少なくとも1つのマウス可変領域と、少なくとも1つのヒト定常領域を含む。いくつかの例では、キメラ抗体は、少なくとも1つのカニクイザル可変領域と、少なくとも1つのヒト定常領域を含む。一部の実施形態では、キメラ抗体の可変領域の全てが第1種に由来し、キメラ抗体の定常領域の全てが第2種に由来する。

【0036】

「ヒト化」免疫グロブリンは、ヒトフレームワーク領域と、非ヒト（例えば、マウス、ラット、または合成）免疫グロブリン由来の1つまたは複数のCDRとを含む、免疫グロブリンである。CDRを提供する非ヒト免疫グロブリンは、「ドナー」と呼ばれ、フレームワークを提供するヒト免疫グロブリンは、「アクセプター」と呼ばれる。一例では、全CDRが、ヒト化免疫グロブリンにおけるドナー免疫グロブリンに由来する。定常領域は存在する必要はないが、定常領域が存在する場合、それらはヒト免疫グロブリン定常領域に対して実質的に同一、例えば少なくとも約85 - 90%、例えば約95%またはそれ以上に同一である。つまり、おそらくCDRを除くヒト化免疫グロブリンのすべての部分が、天然ヒト免疫グロブリン配列の対応する部分に対し実質的に同一である。ヒト化免疫グロブリンは、遺伝子組み換えにより構築され得る（例えば、米国特許第5585089号

10

20

30

40

50

明細書参照)。一部の実施形態では、ヒト化抗体は、少なくとも1つのヒト定常領域またはその断片を含む。一部の実施形態では、ヒト化抗体はF a b、s c F v、(F a b')₂などである。

【0037】

「CDR移植抗体」は、第1(非ヒト)種の1つまたは複数の相補性決定領域(CDR)が、第2(ヒト)種のフレームワーク領域(FR)に移植されたヒト化抗体を指す。

【0038】

結合：2つの基質または分子間の会合、例えば、ある核酸分子の別の核酸分子(またはそれ自体)へのハイブリダイゼーション、抗体または小有機分子とタンパク質との会合、または、あるタンパク質と別のタンパク質または核酸分子との会合など。結合は、限定するわけではないが以下を含む、当業者に既知の任意の手順によって検出され得る：ウェスタンブロット、イムノブロット、酵素結合免疫吸着法(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、免疫沈降法、表面プラズモン共鳴、ケミルネサンス、蛍光偏光、りん光、免疫組織学的分析、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法、飛行時間型質量分析法、マイクロサイトメトリー、マイクロアレイ、顕微鏡、蛍光活性化セルソーティング(FACS)、およびフローサイトメトリー。

10

【0039】

特定の薬剤(「特異的結合薬」)が、特定の標的と特異的に反応し得るが無関係の分子とは反応しない、例えば、標的に特異的に免疫反応する、標的に特異的にハイブリダイズする、または標的に特異的に結合する場合、ある分子は別の分子に「特異的に結合する」という。例えば、GITR特異的結合薬は、*in vitro*または*in vivo*でGITRタンパク質にのみ実質的に結合する。結合は、例えば、特異的結合薬(例えば、抗体もしくはその機能的断片、タンパク質、または核酸分子など)と標的(例えば、細胞、タンパク質、DNA、またはRNAなど)の間の、非ランダム結合反応である。結合特異性は、特異的結合薬が標的と無関係の分子では異なって結合し、それゆえ2つの異なる分子を区別する機能という基準点から決定され得る。例えば、オリゴヌクレオチド分子は、十分な量のオリゴヌクレオチド分子が塩基対を形成するか、または、その標的の核酸分子にハイブリダイズする場合に、標的核酸分子に結合するかまたは安定的に結合して、その結合検出を可能にする。

20

【0040】

いくつかの例では、分子(例えば、抗体など)は、サンプルまたは対象の他の分子の結合定数よりも少なくとも 10^3 M^{-1} 、 10^4 M^{-1} 、または 10^5 M^{-1} 大きい結合定数で、標的(例えば、タンパク質など)に特異的に結合する。特定の例では、成分間の複合体形成の結合定数が少なくとも 10^4 L/mol 、例えば少なくとも 10^6 L/mol 、少なくとも 10^8 L/mol 、または少なくとも 10^{10} L/mol である場合に、2つの化合物は特異的に結合すると言う。2つの成分の結合定数は、当技術分野において既知の方法を使用して決定することが可能である。

30

【0041】

特定の例では、2つの化合物は、結合親和性が少なくとも約 $0.1 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、少なくとも約 $0.3 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、少なくとも約 $0.5 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、少なくとも約 $0.75 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、少なくとも約 $1.0 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、少なくとも約 $1.3 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、少なくとも約 $1.5 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、少なくとも約 $2.0 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、少なくとも約 $2.5 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、少なくとも約 $3.0 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、少なくとも約 $3.5 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、少なくとも約 $4.0 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、少なくとも約 $4.5 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、または少なくとも約 $5.0 \times 10^{-8} \text{ M}$ である場合に、特異的に結合すると言う。

40

【0042】

ある実施形態では、標的に結合する特異的結合薬の解離定数(Kd)は、 104 nM 、 100 nM 、 10 nM 、 1 nM 、 0.1 nM 、 0.01 nM 、または 0.001 nM (例えば、 10^{-8} M 以下、例えば $10^{-8} \text{ M} \sim 10^{-13} \text{ M}$ 、例えば $10^{-9} \text{ M} \sim 10^{-13} \text{ M}$)である。一実施形態では、Kdは、関心の抗体のFabバージョン

50

とその抗原を用いて実行される放射標識抗原結合アッセイ (R I A) により測定される (例えば、Chen et al., J. Med. Biol. 293:865-881, 1999を参照)。別の例では、K d は、B I A C O R E S - 2 0 0 0 または B I A C O R E S - 3 0 0 0 (B I A c o r e , I n c . , ニュージャージー州ピスカタウェイ) を 2 5 で、約 1 0 応答単位 (R U) の固定化抗原 C M 5 チップと共に使用する、表面プラズモン共鳴アッセイを使用して測定される。

【 0 0 4 3 】

がん：異常または制御不可な細胞増殖により特徴付けられる悪性腫瘍。がんにはしばしば関連する他の特徴には、転移、つまり、近隣細胞の正常な機能への干渉、サイトカインまたは他の分泌生成物の異常なレベルでの放出、および、炎症または免疫学的反応の抑制または増悪、周囲または遠位の組織または臓器、例えばリンパ節などへの浸潤などが含まれる。「転移性疾患」は、元の腫瘍部位を離れ、例えば血流またはリンパ系を介して身体

10

【 0 0 4 4 】

接触：直接的な物理的会合下での配置；固体形態および液体形態の両方を含み、i n v i v o または i n v i t r o の何れかで起き得る。接触には、ある分子と別の分子の間の接触、例えば、タンパク質と抗体の間の接触が含まれる。接触には、また、例えば、テスト薬剤を、細胞または組織 (例えば、腫瘍サンプルなど) と直接物理的に会合させて置くことにより、または薬剤を対象に投与することにより、細胞または組織を接触させることも含まれ得る。

【 0 0 4 5 】

対照：参照基準。一部の実施形態は、対照は、治療薬の不在下で (例えば、G I T R 活性、T L R 9 活性、またはその両方の、例えば腫瘍細胞に対する実質的な免疫効果なしなど) 予想される結果である。一部の実施形態では、対照は、例えば、腫瘍細胞に対する、免疫媒介性の G I T R の活性および / または発現を増加させる薬剤の存在下で予想される結果である。一部の実施形態では、対照は、例えば、腫瘍細胞に対する、免疫媒介性の T L R 9 の活性および / または発現を増加させる薬剤の存在下で予想される結果である。一部の実施形態では、対照は、例えば、腫瘍細胞に対する、免疫媒介性の G I T R の活性および / または発現を増加させる薬剤の不在下で予想される結果である。一部の実施形態では、対照は、例えば、腫瘍細胞に対する、免疫媒介性の T L R 9 の活性および / または発現を増加させる薬剤の不在下で予想される結果である。さらに他の実施形態では、対照は、ヒストリカル対照または標準的基準値または標準的基準値範囲である (例えば、既知の予後もしくは結果を有する患者群またはベースラインもしくは正常値を示すサンプル群などの、事前にテストした対照サンプル)。いくつかの例では、対照サンプルまたは対照値は、本明細書で提供する方法または組成物を使用して同定される疾患または病気に罹患していないことが分かっているかまたはそう考えられている供給源から得たサンプル、細胞、または組織を指す。一実施形態では、参照サンプル、参照細胞、または参照組織は、本明細書で提供する組成物または方法を使用して疾患または病気が同定された同一の対象または患者の身体の健康な部分から得る。一実施形態では、参照サンプル、参照細胞、または参照組織は、本明細書で提供する組成物または方法を使用して疾患または病気が同定された対象または患者ではない、少なくとも 1 つの個体の身体の健康な部分から得る。一部の

20

30

40

【 0 0 4 6 】

テストサンプルと対照の差は、増加である場合も逆に減少である場合もある。差は、定性的差または定量的差、例えば統計的に有意な差であり得る。適切な統計分析が当技術分野で周知であり、該統計分析としては、限定するわけではないがスチューデント T 検定および A N O V A アッセイが挙げられる。いくつかの例では、差は、対照に対し、少なくとも約 5 %、例えば、少なくとも約 1 0 %、少なくとも約 2 0 %、少なくとも約 3 0 %、少なくとも約 4 0 %、少なくとも約 5 0 %、少なくとも約 6 0 %、少なくとも約 7 0 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 6 %、少

50

なくとも約 97%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99%、少なくとも約 100%、少なくとも約 150%、少なくとも約 200%、少なくとも約 250%、少なくとも約 300%、少なくとも約 350%、少なくとも約 400%、少なくとも約 500%、または 500% 超の増加または減少である。

【0047】

CpGオリゴデオキシヌクレオチド(ODN)：特定の配列関係において、非メチル化 CpGジヌクレオチドを含有する短合成一本鎖DNA分子(CpGモチーフ)。CpG ODNは、Toll様受容体9(TLR9)により認識され強い免疫賦活性効果を導き、したがって、TLR9アゴニストである。CpG ODNは、ゲノム細菌DNAで見つけられる天然のホスホジエステル(PO)骨格とは反対に、部分的または完全にホスホロチオエート化された(PS)骨格を有する。刺激性CpG ODNの3つの主なクラスは、構造特徴と、ヒト末梢血単核球(PBMC)、特にB細胞および形質細胞様樹状細胞(pDC)に対する活性とに基づいて特定されている。これらの3つのクラスは、クラスA(タイプD)、クラスB(タイプK)、およびクラスCである。

10

【0048】

クラスB(タイプK)のCpG ODN(CpG-B ODN)は、18-28merの線形オリゴデオキシヌクレオチドである。それは、1つまたは複数の6merのCpGモチーフを有する完全にホスホロチオエート化された骨格を含有する。一例では、最適なモチーフはヒトではGTCGTTであり、マウスではGACGTTである。CpG-B ODNは、B細胞および形質細胞様樹状細胞(pDC)の強力な活性化を刺激するが、IFN-分泌の弱い誘導因子である。CpG-B ODNは抗腫瘍活性を示し、強力なTh1アジュバントである。例示的なクラスBのCpG ODNとしては、ヒトCpG ODN 2006(ホスホロチオエートSEQ ID NO:1である塩基を有する5'-tcgtcgttttgcgttttgcgtt-3')、マウスODN 1826(ホスホロチオエートSEQ ID NO:2である塩基を有する5'-tccttgacgtt-3')、および5'-TGACTGTGAACGTTTCGAGATGA-3'(SEQ ID NO:3)が挙げられる。

20

【0049】

いくつかの例では、クラスAまたはクラスCのCpG ODNが、本明細書で提供する方法で使用される。

30

【0050】

減少：対照値に対し、あるものの質、量、または強度を統計的に有意な量で減少させること。一例では、ある療法は、腫瘍のサイズもしくは体積、腫瘍もしくは転移の数、またはそれらの組み合わせを、例えば、該療法の不在下での反応と比較し、減少させる。いくつかの例では、減少は、対照値と比較して、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または少なくとも100%の減少である。

【0051】

発現：核酸分子、例えばGITR核酸分子など(例えば、GITR遺伝子)のコードされた情報が、タンパク質(例えば、GITRタンパク質)の合成などの細胞の作動的部分、非作動的部分、または構造的部分へ転換されるプロセス。遺伝子の発現は、DNA RNA タンパク質の経路の何れかにおいて調節され得る。調節には、転写、翻訳、RNAの輸送およびプロセッシング、mRNAなどの中間分子の分解の制御、または特異的なタンパク質分子が生成された後の該特異的なタンパク質分子の活性化、不活化、局在化、もしくは分解を介した制御が含まれ得る。

40

【0052】

核酸分子またはタンパク質(例えば、GITRなど)の発現は、通常の臨床病理学(例えば、正常な非がん性細胞における)と比べ、または、異常な臨床病理学(例えば、腫瘍細胞における)と比べ、変わる可能性がある。差次的発現などの遺伝子発現の変化には、限定するわけではないが、以下のものが含まれる：(1)過剰発現(例えば、上方制御)

50

；（２）過小発現（例えば、下方制御）；または（３）発現抑制。核酸分子の発現変化は、対応するタンパク質の発現の変化と関連し、実際に該変化を引き起こし得る。

【００５３】

タンパク質の発現は、また、正常な状況でのタンパク質の発現とは異なるようないくつかの方法で変わり得る。これには、必ずしも限定されるわけではないが、以下のものが含まれる：対照または標準とそれぞれ比較して、（１）１つまたは複数のアミノ酸残基が異なるようなタンパク質における突然変異；（２）１つもしくははわずかな（例えば、１０ - ２０以下の）アミノ酸残基の短い欠失またはタンパク質配列への付加；（３）全タンパク質ドメインまたはサブドメインが除去または付加されるような、アミノ酸残基（例えば、少なくとも２０残基など）のより長い欠失または付加；（４）対照または標準量と比較した、タンパク質発現量の増加（例えば、上方制御）；（５）対照または標準量と比較した、タンパク質発現量の減少（下方制御）；（６）タンパク質の細胞内局在化または標的化の変化；（７）一時的に制御されるタンパク質発現の変化（タンパク質が通常なら発現しない場合に発現する、または、通常なら発現する場合に発現しないなど）；（８）タンパク質が細胞内に局在化し続ける時間の長さの増大によるタンパク質の安定性の変化；および（９）タンパク質の発現の局在化（例えば、臓器もしくは組織に特異的な局在化または細胞内局在化など）の変化（タンパク質が通常なら発現する場所で発現しない、または通常なら発現しない場所で発現するなど）。

【００５４】

差次的発現を決定するための、サンプルとの比較用の対照または標準には、正常であると考えられる（所望の特徴が変わらないという点において。例えば、健康な対象からの細胞）サンプル、異常であると考えられる（所望の特徴が変わるという点において。例えば、腫瘍細胞）サンプル、および、恣意的に設定された可能性があるものの、実験値（斯かる値は、実験室ごとに変わる可能性があることを留意すること）が含まれる。実験室標準および実験室値は既知のまたは規定の母集団値に基づいて設定される場合があり、測定された実験的に決められた値の比較を可能にするグラフまたは表の型式で与えられ得る。

【００５５】

グルココルチコイド誘導性ＴＮＦＲ関連タンパク質（GITR）：腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー１８（TNFRSF18）および活性化誘導性TNFRファミリー受容体（AITR）としても知られる。GITR核酸分子およびタンパク質（例えば、OMIM603905）が含まれる。GITRは、Treg細胞上に恒常的に発現する、細胞表面受容体膜貫通タンパク質であり、T細胞が活性化されると上方制御される。GITRは、制御性T細胞の抑制作用を阻害し、Tエフェクター細胞の生存時間を延ばすことに関与することが示されている。ヒトGITRは３つのアイソフォームを有し、マウスGITRは２つのアイソフォームを有する。GITRはGITRリガンド（GITRL）により活性化される。

【００５６】

GITR配列は、例えばGenBank（登録商標）配列データベースから公的に利用可能である（例えば、アクセッション番号NP_683700.1（アイソフォーム３前駆体、成熟ペプチドはaa 26 - 234である）、NP_683699.1（アイソフォーム２前駆体、成熟ペプチドはaa 26 - 255である）、NP_004186.1（アイソフォーム１前駆体、成熟ペプチドはaa 26 - 241である）、NP_033426.1（アイソフォーム１前駆体、成熟ペプチドはaa 20 - 228である）、およびNP_068820.1（アイソフォーム２前駆体、成熟ペプチドはaa 22 - 132である）が、例示的なGITRタンパク質配列を提供する一方、アクセッション番号NM_148902.1、NM_148901.1、NM_004195.2、NM_009400.2、およびNM_021985.2は、例示的なGITR核酸配列を提供する）。当業者は、GITRに結合する機能、エフェクターT細胞を刺激する機能、制御性T細胞の抑制作用および系譜安定性を低下させる機能、制御性T細胞を欠乏させる機能、またはそれらの組み合わせを保持するGITR抗体およびGITRL変異体を含む、追加

の G I T R または G I T R L の核酸およびタンパク質配列を特定することが可能である。

【 0 0 5 7 】

宿主細胞：ベクターまたは単離ポリヌクレオチドのレシピエントであり得る、またはレシピエントであった細胞。宿主細胞は、原核細胞または真核細胞であり得る。例示的な真核細胞としては、腫瘍細胞などの哺乳動物細胞が挙げられる。

【 0 0 5 8 】

阻害するまたは減少させる：任意の表現型特徴の減少もしくは停止、または、その特徴の発生率、程度、もしくは可能性の減少もしくは停止。一部の実施形態では、「減少させる」または「阻害する」により、少なくとも 10 %、少なくとも 20 %、少なくとも 30 %、少なくとも 40 %、少なくとも 50 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 98 %、または少なくとも 99 % の減少を引き起こす能力が意味される。

【 0 0 5 9 】

単離された：「単離された」生物学的成分（例えば、G I T R のタンパク質、抗体、もしくは核酸分子、または C p G O D N など）は、成分が中に存在する他の生物学的成分、例えば他の染色体および染色体外の D N A および R N A ならびにタンパク質などから実質的に分離されているか、それとは別に生成されているか、またはそれから精製されている。したがって、「単離された」核酸分子およびタンパク質には、標準的な精製法によって精製された核酸およびタンパク質が含まれる。該用語は、また、宿主細胞における組換え発現によって調製された核酸分子およびタンパク質ならびに化学合成された核酸も包含する。精製または単離された細胞、抗体、タンパク質または核酸分子は、少なくとも 70 %、少なくとも 80 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 % または少なくとも 99 % 純粋であり得る。

【 0 0 6 0 】

哺乳動物：この用語は、ヒトおよび非ヒト哺乳動物の両方を含む。同様に、用語「対象」には、ヒトおよび獣医学的对象（例えば、ネコ、イヌ、ウシ、およびブタなど）ならびに齧歯類（例えば、マウスおよびラットなど）の両方が含まれる。

【 0 0 6 1 】

平均および標準偏差：算術平均が「標準的な」平均であり、しばしば単に「平均」と呼ばれる。

【 0 0 6 2 】

【数 1】

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n x_i$$

【 0 0 6 3 】

平均は、一組の値の算術平均である。

【 0 0 6 4 】

標準偏差（記号シグマ、 σ で表される）は、平均からどの程度の差異または「分散」が存在するかを示す。ランダム変数、統計的母集団、データセット、または確率分布の標準偏差は、その分散の平方根である。標準偏差は、一般的に、統計的結論における信頼度を測定するために使用される。概して、標準偏差の 2 倍が、95 パーセント信頼区間のおよその範囲である。標準偏差の範囲のはるか外側にある効果は、概して、統計的に有意であると考えられる。当業者は、値の母集団から、平均および標準偏差を容易に計算可能である。

【 0 0 6 5 】

核酸分子：天然および / または非天然のヌクレオチドを含有し得る、ヌクレオチドポリマー。例としては、限定するわけではないが、D N A、R N A、および P N A が挙げられる。

【0066】

薬学的に許容可能な担体：本発明において有用である薬学的に許容可能な担体は、慣習的である。Remington's Pharmaceutical Sciences, by E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition (1975)が、本明細書で提供する薬剤、例えば、GITR活性を高めるもしくは増加させる1つもしくは複数の薬剤（例えば、GITRアゴニスト）および/またはCpG ODN（例えば、TLR9アゴニスト）の薬学的送達に適切な組成物および製剤について記載する。

【0067】

概して、担体の性質は、利用される特定の投与方法に左右されよう。例えば、非経口製剤は、通常、薬学的および生理学的に許容可能な流体、例えば、水、生理食塩水、平衡塩溶液、水性デキストロース、グリセロール、またはビヒクルである同種のものを含む、注射可能な流体を含む。固形組成物（例えば、粉末、丸剤、錠剤、またはカプセル形態）向けには、慣習的な非毒性固体担体として、例えば、医薬品グレードのマニトール、ラクトース、デンプン、またはステアリン酸マグネシウムが挙げられ得る。生物学的に中立な担体に加え、投与される薬学的組成物は、少量の非毒性補助剤、例えば、湿潤剤または乳化剤、防腐剤、およびpH緩衝剤、および同種のもの、例えば、酢酸ナトリウムまたはソルビタンモノラウレートなどを含有し得る。

【0068】

精製された：用語精製されたは、完全に純粋であることを必要とせず；むしろ、該用語は相対的な用語であることを意図する。したがって、例えば、精製されたペプチドまたは抗体の調製物は、ペプチドまたはタンパク質が、細胞内の天然環境にあるペプチドまたはタンパク質よりも豊富である調製物である。一実施形態では、調製物は、タンパク質または抗体が、調製物の抗体またはタンパク質の総含有量の少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%であるように精製される。

【0069】

サンプル：例えば、物理的、生化学的、化学的、および/または生理学的な特徴に基づいて特徴づけおよび/または同定される、細胞実体および/または他の分子実体を含有する、関心の対象より得られるかまたは該対象に由来する物質。いくつかの例では、サンプルは、組織または細胞サンプル、例えば、新鮮な、冷凍された、および/または保存された、臓器もしくは組織のサンプルまたは生検もしくは吸引物など（例えば、腫瘍の生検もしくは吸引物など）；血液または任意の血液成分；体液、例えば、痰、脳脊髄液、羊水、腹膜液、または間質液など；対象の妊娠期間または成長時の任意の時期の細胞である。組織サンプルは、また、初代のまたは培養した、細胞または細胞株であり得る。任意選択的に、組織または細胞のサンプルは、疾患組織/臓器から得られる。組織サンプルは、天然では組織と自然に混在しない化合物、例えば、防腐剤、抗凝血剤、緩衝剤、定着剤、栄養剤、抗生物質、または同種のを含有してよい。一例では、サンプルは腫瘍またはがんのサンプルである。

【0070】

アミノ酸または核酸の配列の配列同一性：アミノ酸（または核酸）配列間の類似性は、配列同一性ともいう配列間の類似性に換算して表現される。配列同一性は、しばしば、同一性（または類似性もしくは相同性）パーセンテージに換算して測定され；パーセンテージが高いほど、2つの配列はより類似している。

【0071】

比較のために配列を整列させる方法は、当技術分野で周知である。種々のプログラムおよび整列化アルゴリズムが、以下の：Smith and Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482, 1981; Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443, 1970; Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:2444, 1988; Higgins and Sharp, Gene 73:237, 1988; Higgins and Sharp, CABIOS 5:151, 1989; Corpet et al., Nucleic Acids Research 16:10881, 1988; およびPearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:2444, 19

10

20

30

40

50

88に記載されている。Altschul et al., Nature Genet.6:119, 1994は、配列整列化方法および相同性計算についての詳細な考察を提示する。

【0072】

N C B I B a s i c L o c a l A l i g n m e n t S e a r c h T o o l (B L A S T) (Altschul et al., J. Med. Biol. 215:403, 1990) が、配列分析プログラム `blastp`、`blastn`、`blastx`、`tblastn`、および `tblastx` に関連して使用するために、National Center for Biotechnology Information (NCBI、メリーランド州ベセスダ) を含むいくつかのソースより、インターネット上で利用可能である。本プログラムを使用して配列同一性を如何に決定するかについての説明は、インターネット上のNCBIウェブサイトで利用可能である。

10

【0073】

天然のG I T Rタンパク質の変異体は、典型的には、デフォルトパラメーターに設定されたNCBI Blast 2.0、ギャップ入り`blastp`を使用して、アミノ酸配列との完全長アライメントについて計算し、少なくとも約80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有することにより特徴付けられる。約30アミノ酸超のアミノ酸配列の比較には、デフォルトパラメーターに設定されたデフォルトBLOSUM62マトリックス(ギャップ存在コスト11および残基毎のギャップコスト1)を使用するBlast 2配列機能が利用される。短ペプチド(約30より少ないアミノ酸)を整列化させる場合、アライメントは、デフォルトパラメーターに設定されたPAM30マトリックスを利用するBlast 2配列機能を使用して実行されるべきである(ギャップ開始ペナルティ9、ギャップ伸長ペナルティ1)。参照配列に対しさらに高い類似性を有するタンパク質は、この方法により評価された場合には、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性など、同一性パーセンテージの増加を示すだろう。全配列より少ない配列を配列同一性について比較する場合には、相同体および変異体は、典型的には、10 - 20アミノ酸の短いウィンドウで少なくとも80%の配列同一性を有し、参照配列に対する類似性次第では、少なくとも85%または少なくとも90%または少なくとも95%の配列同一性を有し得る。斯かる短ウィンドウで配列同一性を決定する方法は、インターネット上のNCBIウェブサイトで利用可能である。当業者であれば、これらの配列同一性の範囲は、単に指針として提供されているに過ぎないことを理解しよう；提供される範囲に該当しない、強く有意な相同体を得られることも十分に可能性がある。

20

30

【0074】

したがって、変異体G I T Rタンパク質は、GenBank(登録商標)アクセッション番号NP_683700.1(アイソフォーム3前駆体、成熟ペプチドはaa 26 - 234である)、NP_683699.1(アイソフォーム2前駆体、成熟ペプチドはaa 26 - 255である)、NP_004186.1(アイソフォーム1前駆体、成熟ペプチドはaa 26 - 241である)、NP_033426.1(アイソフォーム1前駆体、成熟ペプチドはaa 20 - 228である)、およびNP_068820.1(アイソフォーム2前駆体、成熟ペプチドはaa 22 - 132である)に示されるタンパク質配列の何れかに対し、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有し得、ここで該変異体は、エフェクターT細胞を刺激する機能、制御性T細胞の抑制作用および系譜安定性を低下させる機能、制御性T細胞を欠乏させる機能、またはそれらの組み合わせを有する。

40

【0075】

「選択的にハイブリダイズする」または「選択的に結合する」核酸は、非関連ヌクレオチド配列を排除する、中程度にまたは高度にストリンジェントな条件下で行う。核酸ハイブリダイゼーション反応において、特定のレベルのストリンジェンシーを達成する

50

ために使用される条件は、ハイブリダイズする核酸の性質に応じて変わるだろう。例えば、核酸のハイブリダイズ領域の長さ、相補性の程度、ヌクレオチド配列の組成（例えば、GC対ATの含有量）、および核酸タイプ（例えば、RNA対DNA）が、ハイブリダイゼーション条件を選択する際に考慮され得る。考慮すべき追加事項は、核酸の一方が、例えばフィルターに固定されているか否かである。

【0076】

累進的に高くなるストリンジェンシー条件の特異的な例は、以下の通りである：ほぼ室温で $2 \times \text{SSC} / 0.1\% \text{SDS}$ （ハイブリダイゼーション条件）；ほぼ室温で $0.2 \times \text{SSC} / 0.1\% \text{SDS}$ （低ストリンジェンシー条件）；約 42°C で $0.2 \times \text{SSC} / 0.1\% \text{SDS}$ （中程度のストリンジェンシー条件）；および約 68°C で $0.1 \times \text{SSC}$ （高ストリンジェンシー条件）。当業者は、これらの条件での変化を容易に求めることが可能である（例えば、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., vol. 1-3, ed. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989）。これらの条件のうち1つのみ、例えば、高ストリンジェンシー条件を使用して洗浄を実行する場合も、または、各条件を、それぞれ10 - 15分間、上記で挙げた順で、上記のステップの何れかまたは全てを繰り返して使用する場合もある。しかしながら、上記のように、最適な条件は関係する特定のハイブリダイゼーション反応に応じて変わり、経験的に決定され得る。

【0077】

従って、いくつかの例における例示的なGITR核酸配列は、GenBank（登録商標）アクセッション番号NM_148902.1、NM_148901.1、NM_004195.2、NM_009400.2、およびNM_021985.2に示される核酸配列の何れかに対し、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有し、該例示的GITR核酸配列には、GITRLに結合する機能、エフェクターT細胞を刺激する機能、制御性T細胞の抑制作用および系譜安定性を低下させる機能、制御性T細胞を欠乏させる機能、またはそれらの組み合わせを維持するGITR変異体が含まれる。

【0078】

小分子：典型的には約1000ダルトン未満の分子量を有するか、または一部の実施形態では約500ダルトン未満の分子量を有する分子であって、標的分子、例えばGITRなどの活性を測定可能なある程度まで調節（例えば増加）することが可能な、分子。

【0079】

対象：任意の哺乳動物、例えば、ヒト、非ヒト霊長類、ブタ、ヒツジ、ウマ、ウシ、イヌ、ネコ、齧歯類、ならびに特定の処置、例えば、GITRの発現および/または活性を高めるかまたは増加させる1つまたは複数の薬剤（例えば、GITRに対し特異的なアゴニスト）およびCpG ODNを用いた処置などのレシピエントである同種のもの。2つの非限定例では、対象はヒト対象またはマウス対象である。いくつかの例では、対象には、腫瘍、例えばがんなどを有する。いくつかの例では、対象には転移を有する。

【0080】

治療的有効量：単独で、または追加の治療薬（例えば、CpG ODNまたは他のTLR9アゴニスト）と共に、疾患を処置する、または、障害もしくは疾患の何れかの症状および/もしくは根底にある原因を減少させるおよび/もしくは寛解させるのに十分である、GITR活性を高めるかまたは増加させる1つまたは複数の薬剤（例えば、GITRアゴニスト）の量。一実施形態では、「有効量」は、疾患、例えばがんなどの症状を、例えば、腫瘍サイズ、腫瘍体積、移転サイズ、移転体積、腫瘍負荷、移転数、またはそれらの組み合わせを減少させることにより、減少または除去するのに十分である。

【0081】

治療的有効量の、GITRの発現および/または活性を高めるかまたは増加させる1つまたは複数の薬剤（例えば、GITRアゴニスト）ならびに1つまたは複数のCpG O

10

20

30

40

50

D N は、一連の処置の間、単回でまたはいくつかの回数で、例えば毎日、投与され得る。しかしながら、治療的有効量は、処置する対象、処置する病気の重症度およびタイプ、投与方法、ならびに投与する治療薬のタイプに左右され得る。

【 0 0 8 2 】

組織：機能的に関連する複数の細胞。組織は、懸濁液、半固体、または固体であり得る。組織には、対象から収集された細胞、例えば腫瘍などが含む。

【 0 0 8 3 】

疾患の処置：「処置」は、疾患または病態が発現し始めた後の疾患または病態の兆候または症状、例えば、がんの兆候または症状を寛解させる、治療介入を指す。疾患もしくは疾患の進行を阻害すること、疾患またはその進行を阻害もしくは遅くすること、その発現を止めること、疾患を部分的にもしくは完全に緩和すること、疾患の1つもしくは複数の症状を部分的にもしくは完全に緩和すること、または、失われた、欠損した、もしくは欠陥のある機能を回復もしくは修復すること；または、非効率的なプロセスを刺激することを含む。処置は、また、病気、例えばがんなどの軽快または治癒を誘発する可能性がある。処置は、疾患が完全に消えることを必要としない。例えば、少なくとも20%または少なくとも50%の減少で十分であり得る。有益な効果は、例えば、対象における疾患の臨床症状の発症の遅れ、疾患のいくつかもしくは全ての臨床症状の重症度の低下、疾患の進行が遅くなること、対象の全身の健康もしくは幸福の改善、または、特定の疾患に対し特異的な当技術分野で既知の他のパラメータにより、証明され得る。

【 0 0 8 4 】

腫瘍、新生組織形成、悪性腫瘍、またはがん：新生物は、過剰な細胞分裂より生じる組織または細胞の異常な増殖である。新生物形成増殖は、腫瘍を生成し得る。個体の腫瘍量が「腫瘍負荷」であり、これは、腫瘍の数、体積、サイズ、または重量として測定され得る。「非がん性組織」は、悪性新生物が形成されているが、新生物の特徴的病変は有さない、同じ臓器からの組織である。概して、非がん性組織は、組織学的に正常な外見を呈する。「正常組織」は、臓器に由来する組織であって、該臓器がその臓器のがんまたは別の疾患もしくは障害に冒されていない、組織である。「がんを有さない」対象は、その臓器のがんを有すると診断されておらず、検出可能ながんを有さない。

【 0 0 8 5 】

～に十分な条件下で：所望の活性を可能とする任意の環境について記載するのに使用される句。一例では、所望の活性を可能にするのに十分な治療薬を細胞または対象に投与することを含む。特定の例では、所望の活性は、G I T R 活性を増加させることである（例えば、エフェクターT細胞を刺激する、制御性T細胞の抑制作用および系譜安定性を低下させる、制御性T細胞を欠乏させる、または両方など）。

【 0 0 8 6 】

単位用量：個々でまたはまとめて所望の効果、例えば治療効果などを生成するように計算された、所定量の活性物質を含有する物理的に別個の単位。単一の単位用量または複数の単位用量を使用して、腫瘍または転移の処置などの所望の効果を提供することが可能である。一例では、単位用量は、所望の量の、G I T R の発現および/または活性を高めるかまたは増加させる1つまたは複数の薬剤（例えば、G I T R アゴニスト）と、1つまたは複数のC p G O D N とを含む。

【 0 0 8 7 】

上方制御された：分子（例えば、G I T R ）の遺伝子またはタンパク質の発現に関連して使用される場合、遺伝子産物の生成の増加をもたらす任意のプロセスを指す。遺伝子産物は、RNA（例えば、mRNA、rRNA、tRNA、および構造RNA）またはタンパク質であり得る。そのため、上方制御には、遺伝子の転写またはmRNAの翻訳を増加させ、それにより、G I T R タンパク質または核酸分子などのタンパク質または核酸の存在量を増加させるプロセスが含まれる。

【 0 0 8 8 】

転写を増加させることが可能なプロセスの例としては、転写開始複合体の下方制御の減

10

20

30

40

50

少を促進するプロセス、転写開始速度を速めるプロセス、転写伸長速度を速めるプロセス、転写の処理能力を高めるプロセス、および転写抑制を減少させるプロセスが挙げられる。遺伝子の上方制御には、既存のレベルを超えて発現を増加させることが含まれ得る。翻訳を増加させるプロセスの例としては、翻訳開始を増加させるプロセス、翻訳伸長を増加させるプロセス、mRNAの安定性を増大させるプロセスが挙げられる。いくつかの例では、遺伝子発現法、抗体、または他の特異的な結合剤を使用して、GITRの発現および/または活性を増加させる。

【0089】

上方制御には、GITRタンパク質などの遺伝子産物の生成の、任意の検出可能な統計的に有意な増加が含まれる。ある例では、細胞（例えば、腫瘍細胞など）における検出可能な標的タンパク質または核酸の発現は、対照（対応する対照細胞またはサンプル、例えば、非処置腫瘍細胞など）において検出される、タンパク質または核酸の発現量など）と比較して、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも100%、少なくとも150%、少なくとも200%、少なくとも250%、少なくとも300%、少なくとも350%、少なくとも400%、少なくとも500%、または500%超増加する。

10

【0090】

ベクター：宿主細胞に導入され、それにより形質転換された宿主細胞を生成する、核酸分子。ベクターは、該ベクターが宿主細胞中で複製されることを可能にする核酸配列、例えば、複製源などを含み得る。ベクターは、また、1つまたは複数の選択可能なマーカー遺伝子および当技術分野で既知の他の遺伝要素を含み得る。いくつかの例では、ベクターには、プロモーターおよびGITRをコードする核酸分子が含まれる。

20

【0091】

腫瘍を処置する方法

本明細書で提供するのは、対象、例えば、哺乳動物対象（例えば、ヒト、非ヒト霊長類、実験哺乳動物、または獣医学的对象など、例えば、マウス、ラット、チンパンジー、猿、ウマ、およびペット、例えばイヌおよびネコなど）の腫瘍を処置する方法である。対象は、子どもの場合も成人の場合もある。本方法は、有効量の少なくとも1つのグルココルチコイド誘導性TNFR関連タンパク質（GITR）アゴニストの腫瘍内投与と、有効量の少なくとも1つのCpG ODNまたは他のTLR9アゴニストの腫瘍内投与とを含み、それにより、対象の腫瘍を処置する。

30

【0092】

いくつかの例では、少なくとも1つのGITRアゴニストと少なくとも1つのCpG ODNは同時にまたは同時期に投与される。いくつかの例では、少なくとも1つのGITRアゴニストと少なくとも1つのCpG ODNは、少なくとも2回、例えば、2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、9回、または10回などの、少なくとも2回の異なる機会に投与される。いくつかの例では、GITRアゴニストとCpG ODNの両方が、少なくとも1日、少なくとも2日、少なくとも5日、少なくとも7日、少なくとも14日、または少なくとも30日間離して、多数回で投与される。いくつかの例では、本方法は、さらに、有効量の1つもしくは複数の追加の治療薬、例えば1つもしくは複数の化学療法薬、1つもしくは複数の生物学的薬剤、1つもしくは複数の抗血管新生薬、1つもしくは複数の増殖阻害薬、1つもしくは複数の抗新生物形成組成物、またはそれらの組み合わせなどを投与するステップを含む。いくつかの例では、本方法は、さらに、例えば腫瘍の少なくとも一部を除去するために対象において手術を行うことを含む。

40

【0093】

GITRアゴニスト

いくつかの例では、GITRアゴニストは、核酸配列（例えば、DNA、cDNA、もしくはmRNAなど）および/またはタンパク質の発現を増加させ得る。いくつかの例で

50

は、GITRアゴニストは、GITRの生物学的活性を高めるかまたは増加させる。いくつかの例では、GITRアゴニストの組み合わせが使用される。例えば、GITRアゴニストを使用して、例えば、エフェクターT細胞を刺激する、制御性T細胞の抑制作用および系譜安定性を低下させる、制御性T細胞を欠乏させる、GITRLのGITRへの結合を高める、またはそれらの組み合わせにより、GITRの活性を高めるかまたは増加させることが可能である。斯かる増加は、GITRの下方制御（またはGITR活性の低下）が、疾患を引き起こす、もたらす、もしくは悪化させる、または疾患が不所望である場合には、望ましい（例えば、腫瘍のある対象における、GITRの生物学的活性の増加）。

【0094】

いくつかの例では、抗体（例えば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ラクダ抗体、もしくはヒト化抗体など）、抗体断片、抗体複合体、小有機分子、小無機分子、大分子、GITRをコードする核酸分子、GITRタンパク質、GITRリガンド、またはそれらの組み合わせが使用される。例示的なGITRアゴニストは、GenBankアクセッション番号NM__148902.1、NM__148901.1、NM__004195.2、NM__009400.2、もしくはNM__021985.2に示されるGITR核酸配列（もしくは、斯かる配列と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有する配列）またはGenBankアクセッション番号NP__683700.1（アイソフォーム3前駆体、成熟ペプチドはaa 26-234である）、NP__683699.1（アイソフォーム2前駆体、成熟ペプチドはaa 26-255である）、NP__004186.1（アイソフォーム1前駆体、成熟ペプチドはaa 26-241である）、NP__033426.1（アイソフォーム1前駆体、成熟ペプチドはaa 20-228である）、もしくはNP__068820.1（アイソフォーム2前駆体、成熟ペプチドはaa 22-132である）に示されるGITRタンパク質配列（もしくは、斯かる配列と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有する配列）を標的にする。いくつかの例では、GITRアゴニストは、GITRの発現および/または活性を、対照（例えば、処置前の量またはアゴニスト不在下での量など）と比較して、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも100%、少なくとも200%、少なくとも300%、少なくとも400%、少なくとも500%増加させる。

【0095】

いくつかの例では、GITRアゴニストは、GITRの活性を、対照（例えば、GITRアゴニストを用いた処置なしでの、または、GITRアゴニストを用いた処置前のGITR活性量など）と比較して、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%増加させる（例えば、40%~90%、40%~80%、または50%~95%の減少など）。一部の実施形態では、本開示の方法は、GITR活性を測定するステップを含む。

【0096】

いくつかの例では、GITRアゴニストは、GITRの核酸またはタンパク質の発現（例えば、腫瘍細胞における）を、対照（例えば、GITRアゴニストを用いた処置なしでの、または、GITRアゴニストを用いた処置前のGITR活性量など）と比較して、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%増加させる（例えば、40%~90%、40%~80%、または50%~

95%の増加など)。一部の実施形態では、本開示の方法は、GITRの核酸またはタンパク質の発現を測定するステップを含む。

【0097】

GITRアゴニストは、GITRの遺伝子配列、コード配列、および/またはタンパク質配列に対し特異的であり得る。本開示の方法および組成物で標的にすることが可能な例示的な配列は既知である(例示的な核酸およびタンパク質の配列を提供する、上記の例示的なGenBank(登録商標)アクセッション番号を参照)。さらに、当業者であれば、GITR活性を維持している変異体配列も標的にされ得ることを理解しよう。例えば、斯かる変異体は、1つまたは複数の欠失、置換、または付加(またはそれらの組み合わせ)、例えば、1-50の斯かる変化(例えば、1-40、1-30、1-20、または1-10の斯かる変化など)を有するタンパク質をコードし得る。ある例では、本開示の方法または組成物により標的にされるGITRの核酸配列またはタンパク質配列は、本明細書で提供するGenBank(登録商標)アクセッション番号に対し、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有する。

【0098】

1. 抗体を用いた、GITRの生物学的活性および/または発現の増加

一例では、腫瘍を処置するために1つまたは複数のCpG ODNと組み合わせて使用されるGITRアゴニストは、抗体である。ある実施形態では、抗体は、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、二重特異性抗体、またはヒト化抗体である。ある例では、アゴニスト抗体または抗体断片は、哺乳動物のGITR、例えばヒトGITRに特異的に結合する。斯かる抗体の例としては、GITRに高特異性で結合する抗体が挙げられる。ある例では、アゴニスト抗体は、1nM未満の K_D でヒトGITRに結合する。一例では、アゴニストは抗体断片(例えば、単鎖抗体、Fv、単鎖Fv(scFv)、Fab、Fab'、または(Fab')₂など)である。斯かる抗体断片の例としては、GITRに高特異性で結合する抗体断片が挙げられる。ある例では、アゴニスト抗体断片は、ヒトGITRに結合する。ある例では、アゴニスト抗体断片は、1nM未満の K_D でヒトGITRに結合する。

【0099】

使用可能であるGITRアゴニストおよび抗体の例としては、限定するわけではないが、TRX518(GITR, Inc.製のGITRヒト化抗体)、MK-4166(Merck製のGITRアゴニスト抗体)、MK-1248(Merck製)、MEDI1873(Medimmune製のGITRL-Fc融合タンパク質)、BMS(未知の実体)、AMG228(Amgen製)、およびINCAGN01876(Agenus/Incyte製)が挙げられる。さらなるアゴニスト抗GITR抗体は、例えば、米国特許第9493572号明細書、同第9464139号明細書、同第9309321号明細書、同第9228016号明細書、同第9241992号明細書、同第8709424号明細書、米国特許出願公開第2017/0145104号明細書、同第2016/0199487号明細書、同第2015/0368349号明細書、米国特許第9005619号明細書、国際公開第2017/087678号、および同第2017/068186号に記載されている。

【0100】

一部の実施形態では、GITR活性を刺激する抗体は、エフェクターT細胞を刺激するか、制御性T細胞の抑制作用および系譜安定性を低下させるか、制御性T細胞を欠乏させるか、またはそれらの組み合わせを行う。一部の実施形態では、アゴニスト抗GITR抗体は、例えばNF- κ B反応の活性化により、GITRシグナル伝達機能を活性化する。この活性化は、国際公開第2017/015623号の実施例5に記載されているように、NF- κ Bに駆動される、レポーター、分泌型アルカリホスファターゼ(SEAP)の生成を監視するシステムを使用して評価することが可能である。そこに記載されているように、NF- κ Bに駆動されるSEAPレポーター遺伝子を含有するHEK293細胞株

(InvivoGen、アメリカ合衆国カリフォルニア州サンディエゴより入手)に、GITRを安定的に遺伝子導入し、次にその細胞株を、37℃で一晩、抗GITR抗体の用量を滴定しながらインキュベートした。次に、発色基質の加水分解により、650ナノメートルで光学濃度の変化を監視することで、細胞培養上清における各用量でのSEAPレポーターの遺伝子発現を定量化した。このアッセイにおける、抗体の付加を原因とする背景でのSEAP生成の増加は、抗体がGITRシグナル伝達機能を活性化することを示す。

【0101】

一部の実施形態では、アゴニストGITR抗体は、50 nM未満、20 nM未満、10 nM未満、または1 nM未満の結合親和性(K_D)でGITRに結合する。一部の実施形態では、アゴニストGITR抗体が、無関係の非GITRタンパク質に結合する程度は、例えばラジオイムノアッセイ(RIA)により測定されるように、該抗体がGITRに結合する約10%未満である。一部の実施形態では、アゴニストGITR抗体は、別の種に由来するGITRのうち、保存されているGITRのエピトープに結合する。いくつかの例では、アゴニストGITR抗体は、ヒトGITRに結合するヒトまたはヒト化GITR抗体として、同じエピトープに結合する。

10

【0102】

一部の実施形態では、アゴニストGITR抗体の解離定数(K_d)は、GITRに対し、 $1 \mu M$ 、 $100 nM$ 、 $10 nM$ 、 $1 nM$ 、 $0.1 nM$ 、 $0.01 nM$ 、または $0.001 nM$ (例えば、 $10^{-8} M$ 以下、例えば、 $10^{-8} M \sim 10^{-13} M$ 、例えば、 $10^{-9} M \sim 10^{-13} M$)である。

20

【0103】

一部の実施形態では、GITRアゴニスト抗体は、多数の種に由来するGITRに結合する。例えば、一部の実施形態では、抗体はヒトGITRに結合し、また、マウス、ラット、イヌ、モルモット、およびサルから選択される少なくとも1つの哺乳動物に由来するGITRにも結合する。いくつかの例では、抗体は、ホモサピエンスのみなど1種のみに由来するGITRに結合する。

【0104】

一部の実施形態では、本明細書のアゴニスト抗GITR抗体は、以下の特徴の1つまたは複数を有し得る：(a) GITRに対する K_D が10 nM未満であるGITR結合ドメインを含み；(b) ヒトおよびカニクイザルのGITRの両方に結合し；(c) GITRとそのリガンドGITRLの間の結合をブロックし；ならびに(d) 抗腫瘍反応を同時刺激する一方、制御性T(Treg)細胞の抑制効果も阻害する。

30

【0105】

一例では、GITRに結合するアゴニスト抗体は、二重特異性抗体または二重可変ドメイン抗体など、多特異性抗体である。非限定的な例示的二重特異性抗体としては、第1抗原に結合する重鎖/軽鎖の組み合わせを含む第1アームと、第2抗原に結合する重鎖/軽鎖の組み合わせを含む第2アームとを含む抗体が挙げられる。一部の実施形態では、二重特異性抗体は、GITRに結合する第1アームと、免疫細胞成熟を刺激する第2アームとを含む。

40

【0106】

一例では、GITRに結合するアゴニスト抗体は、ラクダ抗体などの単鎖抗体であるか、または、斯かる抗体に由来するGITR結合ドメインを含む。例えば、一部の実施形態では、抗GITR抗体は、GITRに特異的に結合する少なくとも1つのポリペプチドを含み得、該ポリペプチドは、例えば、単ドメイン抗体に由来する、3つの相補性決定領域(CDR)を含む、少なくとも1つのGITR結合ドメインを含む。一部の実施形態では、前記少なくとも1つのGITR結合ドメインは、SEQ ID NO: 6のアミノ酸配列を含む相補性決定領域1(CDR1)と、SEQ ID NO: 7のアミノ酸配列を含む相補性決定領域2(CDR2)と、SEQ ID NO: 8のアミノ酸配列を含む相補性決定領域3(CDR3)とを含む。一部の実施形態では、抗体は多価(polyvalent)

50

(または多価 (multivalent)) であり、上記の C D R セットを有する斯かる G I T R 結合ドメインを 2 つ以上含む。

【 0 1 0 7 】

一部の実施形態では、アゴニスト抗 G I T R 抗体は、少なくとも 1 つの G I T R 結合ドメインを含む少なくとも 1 つのポリペプチドを含み得、前記 G I T R 結合ドメインは、次に、 S E Q I D N O : 5 のアミノ酸配列か、または、 S E Q I D N O : 5 と少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、もしくは少なくとも 9 9 % 同一である配列を含む。一部の実施形態では、抗 G I T R 抗体は、 S E Q I D N O : 5 のアミノ酸配列か、または、 S E Q I D N O : 5 と少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、もしくは少なくとも 9 9 % 同一である配列を含む、2 つ、3 つ、または 4 つの G I T R 結合ドメインを含む。

10

【 0 1 0 8 】

一部の実施形態では、アゴニスト抗 G I T R 抗体は、ヒト I g G F c などのヒト定常領域に融合した 2 つ以上の G I T R 結合ドメインを含む、多価融合タンパク質を含む。一部の斯かる実施形態では、2 つ以上の G I T R 結合ドメインは前後に並んでいる (「前後に並んで」には、G I T R 結合ドメインが連続的に生じるが、任意選択的にその間に非 F c 配列が入る構成が含まれる)。一部の実施形態では、G I T R 結合ドメインは単ドメイン抗体に由来し、3 つの相補性決定領域 (C D R) を含む。一部の実施形態では、G I T R 結合ドメインの少なくとも 1 つまたは全てが、 S E Q I D N O : 6 のアミノ酸配列を含む相補性決定領域 1 (C D R 1) と、 S E Q I D N O : 7 のアミノ酸配列を含む相補性決定領域 2 (C D R 2) と、 S E Q I D N O : 8 のアミノ酸配列を含む相補性決定領域 3 (C D R 3) とを含む。一部の斯かる実施形態では、ヒト I g G F c は、ヒト I g G 1、I g G 2、I g G 3、または I g G 4 である。一部の実施形態では、多価融合タンパク質は、前後に並んだ 2 つ、3 つ、または 4 つの G I T R 結合ドメインを含み、それぞれは上記の C D R セットを有し、ヒト I g G 1、I g G 2、I g G 3、および I g G 4 F c から選択されるヒト I g G F c に融合している。

20

【 0 1 0 9 】

一部の実施形態では、アゴニスト抗 G I T R 抗体は、ヒト I g G F c、例えばヒト I g G 1、I g G 2、I g G 3、または I g G 4 F c などのヒト定常領域に融合した、2 つ以上の G I T R 結合ドメインを含む、多価融合タンパク質を含む。一部の斯かる実施形態では、2 つ以上の G I T R 結合ドメインは前後に並んでいる。一部の斯かる実施形態では、G I T R 結合ドメインの少なくとも 1 つまたは全てが、 S E Q I D N O : 5 のアミノ酸配列か、または、 S E Q I D N O : 5 と少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 1 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、もしくは少なくとも 9 9 % 同一である配列を含む。一部の斯かる実施形態では、ヒト定常領域は、ヒト I g G 1、I g G 2、I g G 3、または I g G 4 F c などのヒト I g G F c である。一部の実施形態では、多価融合タンパク質は、前後に並んだ 2 つ、3 つ、または 4 つの G I T R 結合ドメインを含み、それぞれは S E Q I D N O : 1 9 のアミノ酸配列を含み、ヒト I g G 1、I g G 2、I g G 3、および I g G 4 から選択されるヒト I g G F c に融合している。

30

40

【 0 1 1 0 】

四価分子

一部の実施形態では、抗 G I T R 抗体は、構造 : (G I T R - B D) - リンカー - (G I T R - B D) - リンカー - ヒンジ - F c を有する融合タンパク質の 2 つのコピーを含む四価分子であって、(a) G I T R - B D は、(i) S E Q I D N O : 6 のアミノ酸配列を含む相補性決定領域 1 (C D R 1) と ; S E Q I D N O : 7 のアミノ酸配列を含む相補性決定領域 2 (C D R 2) と ; S E Q I D N O : 8 のアミノ酸配列を含む相

50

補性決定領域 3 (C D R 3) とを含むか ; または、 (i i) S E Q I D N O : 5 のアミノ酸配列か、もしくは、 S E Q I D N O : 5 と少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、もしくは少なくとも 99 % 同一である配列を含む、 G I T R 結合ドメインであり、 (b) リンカーは、リンカーポリペプチドであり ; (c) ヒンジは、免疫グロブリンヒンジ領域に由来するポリペプチドであり ; (d) F c は、免疫グロブリン F c 領域ポリペプチドである、四価分子を含む。

【 0 1 1 1 】

四価分子の融合タンパク質がヒンジを含む一部の実施形態では、ヒンジは、 S E Q I D N O : 15、16、または 17 のアミノ酸配列を含む、例えば、ヒンジは、 E P K S S D K T H T C P P C (S E Q I D N O : 15) のアミノ酸配列を含む修飾 I g G 1 ヒンジを含み得、ここにおいて軽鎖の C 末端システインとジスルフィド結合を形成する C y s 220 は、セリン、例えば C y s 220 S e r (C 220 S) に変異している。他の実施形態では、融合タンパク質は、アミノ酸配列 D K T H T C P P C (S E Q I D N O : 16) を含むヒンジを含み得る。一部の実施形態では、ヒンジは、例えば鎖交換を予防または低減させるように修飾された I g G 4 に由来する、例えば、アミノ酸配列 E S K Y G P P C P P C (S E Q I D N O : 17) を含むヒンジを含み、ここで、 S e r 228 は P r o (S 228 P) に変異している。

10

【 0 1 1 2 】

四価分子の融合タンパク質がリンカーを含む一部の実施形態では、リンカーは、 G G、G G G、および S E Q I D N O : 18 ~ 24 の何れかから選択されるアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、リンカーは、 S E Q I D N O : 18 または 22 のアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、四価分子の融合タンパク質は、 S E Q I D N O : 16 を含むヒンジと、 S E Q I D N O : 18 または 22 を含むリンカーとを有する。

20

【 0 1 1 3 】

四価分子の融合タンパク質が F c を含む一部の実施形態では、F c は、ヒト I g G 1、I g G 2、I g G 3、または I g G 4 F c などのヒト F c である。一部の実施形態では、F c は、 S E Q I D N O : 9 - 14 か、または、 S E Q I D N O : 9 - 14 の 1 つと少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、もしくは少なくとも 99 % 同一である配列から選択されるアミノ酸を含む。一部の実施形態では、F c は、 S E Q I D N O : 9 などのヒト I g G 1 アミノ酸配列を含む。

30

【 0 1 1 4 】

例示的な四価分子を、図 4 A と 4 B に示す。図 4 A は、例えば、二量体の形の例示的な四価分子を図示し、各サブユニット (ポリペプチド) は、 (G I T R - B D) - リンカー - (G I T R - B D) - リンカー - ヒンジ - F c 構造を有し、各サブユニットは、ヒンジによりもう一方と関連し、F c 分子は、C H 2 および C H 3 ドメインを含む。図 4 B は、例えば、代替りの (G I T R - B D) - ヒンジ - F c - リンカー - (G I T R - B D) 構造を図示する。図 4 C および 4 D は、これらの 2 つの四価分子に関連した構造を有する六価分子を示し、つまり、図 4 C では、 (G I T R - B D) - リンカー - (G I T R - B D) - リンカー - (G I T R - B D) - リンカー - ヒンジ - F c であり、図 4 D では、 (G I T R - B D) - リンカー - (G I T R - B D) - リンカー - ヒンジ - F c - リンカー - (G I T R - B D) である。

40

【 0 1 1 5 】

ある実施形態では、アゴニスト抗 G I T R 抗体は、 S E Q I D N O : 4 のアミノ酸配列か、または S E Q I D N O : 4 と少なくとも 90 %、少なくとも 91 %、少なくとも 92 %、少なくとも 93 %、少なくとも 94 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、もしくは少なくとも 99 % 同一である配列を

50

含むポリペプチドの２つのコピーを含む四価分子である。

【０１１６】

Fc領域

前記実施形態の何れにおいても、Fcは、SEQ ID NO: 9 - 14か、または、SEQ ID NO: 9 - 14と少なくとも９０％、少なくとも９１％、少なくとも９２％、少なくとも９３％、少なくとも９４％、少なくとも９５％、少なくとも９６％、少なくとも９７％、少なくとも９８％、もしくは少なくとも９９％同一である配列から選択されるアミノ酸を含み得る。一部の実施形態では、Fcは、SEQ ID NO: 9などのヒトIgG1アミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、Fcは、SEQ ID NO: 9のアミノ酸配列を含むが、位置Asn297（配列表に示す配列における四角囲み）が、フコシル化を阻害するように修飾される。一部の実施形態では、FcはヒトIgG1 Fcであるが、位置Leu235、Leu236、およびGly237の１つまたは複数
10
が、他のアミノ酸へ修飾されている（配列表に示す配列における四角囲み）。一部の実施形態では、FcはLys447を欠くヒトIgG1 Fcを含む。一部の実施形態では、Fcは、例えばSEQ ID NO: 10で提供されるように、Glu233、Leu234、またはLeu235の１つまたは複数においてアミノ酸を欠くヒトIgG1 Fcである。一部の実施形態では、Fcは、ヒトIgG2 Fc、例えばSEQ ID NO: 11を含む。一部の実施形態では、Fcは、修飾されている、例えばAsn297で変異しているか（配列表における四角囲み）、または、Lys447を欠くヒトIgG2 Fcを含む。一部の実施形態では、Fcは、ヒトIgG3 Fc、例えばSEQ ID
20
NO: 12を含む。一部の実施形態では、Fcは、修飾されている、例えばAsn297で変異しているか、位置435でArgからHisへの置換を含有しているか（配列表における四角囲み）、またはLys447を欠くヒトIgG3 Fcを含む。一部の実施形態では、Fcは、ヒトIgG4 Fc、例えばSEQ ID NO: 13または14を含む。一部の実施形態では、Fcは、修飾されている、例えば、位置Leu235またはAsn297で修飾されているか（配列表における四角囲み）、またはLys447を欠く、ヒトIgG4 Fcを含む。

【０１１７】

一部の実施形態において、ヒトIgG Fc領域は、FcRn結合を高めるよう修飾される。FcRnへの結合を高め得るFc変異の例は、Met252Tyr、Ser254Thr、Thr256Glu（それぞれ、M252Y、S254T、T256E）（Kab
30
atナンバリング、Dall'Acqua et al 2006, J. Biol Chem, 281(33) 23514-24）、Met428LeuおよびAsn434Ser（M428L、N434S）（Zalevsky et al 2010 Nature Biotech, 28(2) 157-9）、またはMet252Ile、Thr256Asp、Met428Leu（それぞれ、M252I、T256D、M428L）（Kabat et al 1991 Sequences of Proteins of Immunological InterestのEUインデックス）である。

【０１１８】

一部の実施形態では、変異Fcは、また、以下の置換を含み得る：Kab
40
atナンバリングシステムを使用すると、Met252TyrおよびMet428Leu（M252Y、M428L）。

【０１１９】

一部の実施形態では、ヒトIgG Fc領域は、抗体依存性細胞障害（ADCC）および/または相補体依存性細胞障害（CDC）を変更するように修飾され得、例えば、Nats
ume et al., 2008 Cancer Res, 68(10): 3863-72; Idusogie et al., 2001 J Immunol, 166(4): 2571-5; Moore et al., 2010 mAbs, 2(2): 181-189; Lazar et al., 2006 PNAS, 103(11): 4005-4010, Shields et al., 2001 JBC, 276(9): 6591-6604; Stavenhagen et al., 2007 Cancer Res, 67(18): 8882-8890; Stavenhagen et al., 2008 Advan. Enzyme Regul., 48: 152-164; Alegre et al, 1992 J Immunol, 148: 3461-3468; Reviewed in K
50
aneko and Niwa, 2011 Biodrugs, 25(1): 1-11に記載されているアミノ酸修飾である。AD

C Cを高め得る変異の例としては、S e r 2 3 9およびI l e 3 3 2での修飾、例えば、S e r 2 3 9 A s pおよびI l e 3 3 2 G l u (S 2 3 9 D、I 3 3 2 E)が挙げられる。C D Cを高め得る変異の例としては、L y s 3 2 6およびG l u 3 3 3での変異が挙げられる。一部の実施形態では、F c領域は、これらの位置の一方または両方で修飾され、例えば、K a b a tナンバリングシステムを使用すると、L y s 3 2 6 A l aおよび/またはG l u 3 3 3 A l a (K 3 2 6 AおよびE 3 3 3 A)である。

【0120】

一部の実施形態において、ヒトI g G F c領域は、ヘテロ二量体化を誘発するように修飾され得る。例えば、C H 3ドメイン内でT h r 3 6 6においてアミノ酸修飾を有し、これがより大きいアミノ酸、例えばT y p (T 3 6 6 W)で置き換えられている場合、位置T h r 3 6 6、L e u 3 6 8、およびT y r 4 0 7でより小さいアミノ酸、例えばそれぞれS e r、A l a、およびV a l (T 3 6 6 S / L 3 6 8 A / Y 4 0 7 V)へのアミノ酸修飾を有する第2 C H 3ドメインと優先的に対合することが可能である。さらなるC H 3ドメイン修飾には、例えば、反対側のC H 3ドメインにおいて、S e r 3 5 4をC y s (S 3 5 4 C)へ、および、Y 3 4 9をC y s (Y 3 4 9 C)へ変更することが含まれる (Carter, 2001 Journal of Immunological Methods, 248: 7-15で概説されている)。

10

【0121】

一部の実施形態において、ヒトI g G F c領域は、F cドメインの二量体形成を防ぐまたは低減させるように修飾される。例えば、残基T h r 3 6 6は荷電残基と置換され、例えば、T h r 3 6 6 L y s、T h r 3 6 6 A r g、T h r 3 6 6 A s p、またはT h r 3 6 6 G l u (それぞれ、T 3 6 6 K、T 3 6 6 R、T 3 6 6 D、またはT 3 6 6 E)であり得、これは、いくつかの場合では、C H 3 - C H 3二量体化を防ぎ得る。

20

【0122】

一部の実施形態では、F c領域は、以下の位置の1つまたは複数で変更されて、F c受容体結合を低減させることができる: L e u 2 3 4 (L 2 3 4)、L e u 2 3 5 (L 2 3 5)、A s p 2 6 5 (D 2 6 5)、A s p 2 7 0 (D 2 7 0)、S e r 2 9 8 (S 2 9 8)、A s n 2 9 7 (N 2 9 7)、A s n 3 2 5 (N 3 2 5)、またはA l a 3 2 7 (A 3 2 7)。例えば、L e u 2 3 4 A l a (L 2 3 4 A)、L e u 2 3 5 A l a (L 2 3 5 A)、A s p 2 6 5 A s n (D 2 6 5 N)、A s p 2 7 0 A s n (D 2 7 0 N)、S e r 2 9 8 A s n (S 2 9 8 N)、A s n 2 9 7 A l a (N 2 9 7 A)、A s n 3 2 5 G l u (N 3 2 5 E)、またはA l a 3 2 7 S e r (A 3 2 7 S)。一部の実施形態では、F c領域内の修飾は、F c - 受容体 - ガンマ受容体への結合を低減させる一方で、胎児性F c受容体 (F c R n) への結合への影響を最小にすることができる。

30

【0123】

〔配列表〕

SEQ ID NO	説明	配列
4	GITR 結合 ポリペプチド	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGVSFSDAMGWYRQAPGKQRELVA VLSGISSAKYAASAPGRFTISRDNKNTVYLMSSSLRAEDTAVYYCYADVST GWGRDAHGYWGQGLTVTKPGSGGSEVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCA ASGVSFSDAMGWYRQAPGKQRELVAVLSGISSAKYAASAPGRFTISRDN KNTVYLMSSSLRAEDTAVYYCYADVSTGWGRDAHGYWGQGLTVTKPG GGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEY CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
5	GITR 結合 ドメイン	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGVSFSDAMGWYRQAPGKQRELVA VLSGISSAKYAASAPGRFTISRDNKNTVYLMSSSLRAEDTAVYYCYADVST GWGRDAHGYWGQGLTVTV
6	CDR1	SGSVFSIDAM
7	CDR2	LSGISSAK
8	CDR3	YADVSTGWGRDAHGYW
9	ヒト IgG1 Fc	PAPPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY CKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
10	E233, L234, L235における ヒトIgG1 Fc 欠失変異体	PAPGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG V EVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
11	ヒト IgG2 Fc	PAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVVHQDWLNGKEYCKVSNK GLPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEMTKQNQVSLTCLVKGFY PSDISVEWESNGQPENNYKTTTPMLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
12	ヒト IgG3 Fc	PAPPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY CKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEMTKQNQVSLTCLVKGFYPS DISVEWESNGQPENNYKTTTPMLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

20

30

		KGFYPSDIAV EWESSGQPEN NYNTTPPMLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNIFSCSVMH EALHNHFTQK SLSLSPGK
13	ヒト IgG4 Fc	PAPEFLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK
14	ヒト IgG4 Fc	PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSLGK
15	IgG ヒンジ領域	EPKSSDKTHTCPPC
16	IgG ヒンジ領域	DKTHTCPPC
17	IgG ヒンジ領域	ESKYGPPCPPC
18	リンカー 配列	GGSGGS
19	リンカー 配列	GGSGGSGGS
20	リンカー 配列	GGSGGSGGSGGS
21	リンカー 配列	GGSGGSGGSGGSGGS
22	リンカー 配列	GGGG
23	リンカー 配列	GGGGG
24	リンカー 配列	GGGGGG

10

20

30

【 0 1 2 4 】

a . ヒト化抗体

一例では、GITRに結合するアゴニスト抗体は、ヒト化抗体である。ヒト化抗体は、治療用抗体に対する免疫反応を生じさせ、治療薬の効果を低下させ得る、非ヒト抗体に対するヒト免疫反応（例えば、ヒト抗マウス抗体（HAMMA）反応）を減らすまたは排除することから、ヒト化抗体は治療用分子として有用である。抗体は、任意の方法によりヒト化され得る。ヒト化の非限定的な例示的方法としては、米国特許第5350101号明細書；同第5585089号明細書；同第5693761号明細書；同第5693762号明細書；同第6180370号明細書；Jones et al., Nature 321: 522-525 (1986)；Reichmann et al., Nature 332: 323-27 (1988)；Verhoeyen et al., Science 239: 1534-36 (1988)；および米国特許出願公開第2009/0136500号明細書に記載されている方法が挙げられる。

40

【 0 1 2 5 】

ヒト化抗体は、非ヒト可変領域のフレームワーク領域における少なくとも1つのアミノ

50

酸が、ヒトフレームワーク領域の対応する位置に由来するアミノ酸と置き換えられている抗体である。一部の実施形態では、非ヒト可変領域のフレームワーク領域の少なくとも2個、少なくとも3個、少なくとも4個、少なくとも5個、少なくとも6個、少なくとも7個、少なくとも8個、少なくとも9個、少なくとも10個、少なくとも11個、少なくとも12個、少なくとも15個、または少なくとも20個のアミノ酸が、1つまたは複数のヒトフレームワーク領域の、1つまたは複数の対応する位置に由来するアミノ酸と置き換えられている。

【0126】

一部の実施形態では、置換に使用される対応するヒトアミノ酸のいくつかは、異なるヒト免疫グロブリン遺伝子のフレームワーク領域に由来する。つまり、一部の実施形態では、1つまたは複数の非ヒトアミノ酸が、第1ヒト抗体のヒトフレームワーク領域に由来するか、または第1ヒト免疫グロブリン遺伝子によりコードされた対応するアミノ酸と置き換えられ得、1つまたは複数の非ヒトアミノ酸が、第2ヒト抗体のヒトフレームワーク領域に由来するか、または、第2ヒト免疫グロブリン遺伝子によりコードされた対応するアミノ酸で置き換えられ得、1つまたは複数の非ヒトアミノ酸が、第3ヒト抗体のヒトフレームワーク領域に由来するか、または、第3ヒト免疫グロブリン遺伝子によりコードされた対応するアミノ酸と置き換えられ得る、などである。さらに、一部の実施形態では、単一フレームワーク領域、例えばFR2にて置換に使用される対応するヒトアミノ酸の全てが、同じヒトフレームワークに由来する必要はない。しかしながら、一部の実施形態では、置換に使用される対応するヒトアミノ酸の全てが、同じヒト抗体に由来するか、同じヒト免疫グロブリン遺伝子によりコードされる。

10

20

【0127】

一部の実施形態では、抗体は、1つまたは複数の全フレームワーク領域を、対応するヒトフレームワーク領域と置き換えることによりヒト化される。一部の実施形態では、置き換えられる非ヒトフレームワーク領域に対し最も高い相同性レベルを有するヒトフレームワーク領域が、選択される。一部の実施形態では、斯かるヒト化抗体は、CDR移植抗体である。

【0128】

一部の実施形態では、CDR移植に続き、1つまたは複数のフレームワークアミノ酸がマウスフレームワーク領域における対応するアミノ酸に戻される。斯かる「復帰変異」は、一部の実施形態では、1つもしくは複数のCDRの構造に寄与するとみられる、および/または、抗原接触に関与し得る、および/または、抗体の構造全体の整合性に関与するとみられる、1つもしくは複数のマウスフレームワークアミノ酸を維持するために行われる。一部の実施形態では、CDR移植に続いて抗体のフレームワーク領域に対し、10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下、2以下、1、または0の復帰変異が行われる。

30

【0129】

一部の実施形態では、ヒト化抗体は、また、ヒト重鎖定常領域および/またはヒト軽鎖定常領域を含む。

【0130】

40

b. キメラ抗体

一例では、GITR特異的アゴニスト抗体は、キメラ抗体である。一部の実施形態では、GITR特異的アゴニスト抗体は、少なくとも1つの非ヒト可変領域と、少なくとも1つのヒト定常領域を含む。一部の実施形態では、GITR特異的アゴニスト抗体の可変領域の全てが非ヒト可変領域であり、GITR特異的アゴニスト抗体の定常領域の全てがヒト定常領域である。一部の実施形態では、キメラ抗体の1つまたは複数の可変領域が、マウス可変領域である。キメラ抗体のヒト定常領域は、それが置換する非ヒト定常領域が存在するとしても、その非ヒト定常領域と同じアイソタイプである必要はない。キメラ抗体は、米国特許第4816567号明細書；およびMorrison et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-55 (1984)で述べられている。

50

【0131】

c. ヒト抗体

一例では、GITRアゴニスト抗体はヒト抗体である。ヒト抗体は、任意の適切な方法により作成され得る。非限定的な例示的方法としては、ヒト免疫グロブリン座を含む遺伝子導入マウスにおいてヒト抗体を作成することが挙げられる。例えば、Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2551-55 (1993); Jakobovits et al., Nature 362: 255-8 (1993); Lonberg et al., Nature 368: 856-9 (1994); ならびに米国特許第5545807号明細書; 同第6713610号明細書; 同第6673986号明細書; 同第6162963号明細書; 同第5545807号明細書; 同第6300129号明細書; 同第6255458号明細書; 同第5877397号明細書; 同第5874299号明細書; および同第5545806号明細書を参照されたい。非限定的な例示的方法としては、また、ファージディスプレイライブラリを使用して、ヒト抗体を作成することも挙げられる。例えば、Hoogenboom et al., J. Mol. Biol. 227: 381-8 (1992); Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581-97 (1991); およびPCT公開番号WO 99 / 10494号を参照されたい。

10

【0132】

d. ヒト抗体定常領域

一部の実施形態では、本明細書に記載するヒト化、キメラ、またはヒトGITRアゴニスト抗体は、1つまたは複数のヒト定常領域を含む。一部の実施形態では、ヒト重鎖定常領域は、Ig A、Ig G、およびIg Dより選択されるアイソタイプである。一部の実施形態では、ヒト軽鎖定常領域は、およびより選択されるアイソタイプである。一部の実施形態では、GITRアゴニスト抗体は、ヒトIg G定常領域、例えば、ヒトIg G 1、Ig G 2、Ig G 3、またはIg G 4を含む。一部の実施形態では、抗体またはFc融合パートナーは、Ig G 1定常領域において、例えば、C237S変異を含む。一部の実施形態では、GITRアゴニスト抗体は、ヒトIg G 2重鎖定常領域を含む。一部の斯かる実施形態では、Ig G 2定常領域は、米国特許第6900292号明細書に記載されているように、P331S変異を含む。一部の実施形態では、GITRアゴニスト抗体は、ヒトIg G 4重鎖定常領域を含む。一部の斯かる実施形態では、GITRアゴニスト抗体は、ヒトIg G 4定常領域において、S241P変異を含む。例えば、Angal et al. Mol. Immunol. 30(1): 105-108 (1993)を参照されたい。一部の実施形態では、GITRアゴニスト抗体は、ヒトIg G 4定常領域と、ヒト軽鎖を含む。

20

30

【0133】

重鎖定常領域の選択は、抗体がin vivoでエフェクター機能を有するか否かを決定し得る。斯かるエフェクター機能には、一部の実施形態では、抗体依存性細胞媒介細胞障害(ADCC)および/または相補体依存性細胞障害(CDC)が含まれ、これは、抗体が結合する細胞の死滅を引き起こし得る。典型的には、ヒトIg G 1またはIg G 3の重鎖を含む抗体は、エフェクター機能を有する。

【0134】

一部の実施形態では、エフェクター機能は望ましくない。例えば、一部の実施形態では、エフェクター機能は、腫瘍の処置において望ましくない場合がある。一部の斯かる実施形態では、ヒトIg G 4またはIg G 2の重鎖定常領域は選択されか、または操作される。一部の実施形態では、Ig G 4定常領域は、S241P変異を含む。

40

【0135】

e. 抗体複合体

一部の実施形態では、アゴニストGITR抗体は、標識にコンジュゲートする。標識は、抗体の検出を容易にする、および/または、抗体が結合する分子の検出を容易にする分子である。非限定的な例示的標識としては、限定するわけではないが、放射性同位体、蛍光群、酵素群、化学発光群、ビオチン、エピトープタグ、金属結合タグなどが挙げられる。一部の実施形態では、化学方法を使用して、標識をin vitroで抗体にコンジュゲートする。非限定的で例示的なコンジュゲートの化学的方法は当技術分野で既知であり

50

、該方法には、例えば、Thermo Scientific Life Science Research Produces（以前のPierce；イリノイ州ロックフォード）、Prozyme（カリフォルニア州ヘイワード）、SACRI Antibody Services（カナダ、カルガリー）、AbD Serotec（ノースカロライナ州ローリー）などから商業的に入手可能である、サービス、方法、および/または試薬が含まれる。一部の実施形態では、標識がポリペプチドである場合、その標識は、少なくとも1つの抗体鎖と同じ発現ベクターから発現して、抗体鎖に融合した標識を含むポリペプチドを生成することが可能である。

【0136】

一部の実施形態では、制御性T細胞には特異的に結合し、それを死滅させるが、Tエフェクター細胞に特異的に結合し、それを死滅させることはないアゴニストGITR抗体が、毒素または薬物などの化合物に、例えばリンカーを介してコンジュゲートしている。斯かる化合物は、抗体-薬物複合体(ADC)という場合がある。リンカーは、除去可能の場合も除去不能の場合もある。例示的な毒素としては、限定するわけではないが、化学療法薬、DNAを傷つける薬剤、チューブリン重合を妨害する薬剤、または放射性核種などの細胞毒が挙げられる(斯かる細胞毒の例は、本開示の他のところで提供する)。一例では、毒素は、植物由来のタンパク質毒素(例えば、ゲロニン、リシン、アブリン、もしくはヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質など)または細菌毒性(例えば、Pseudomonas外毒素およびDiphtheria毒素など)である。

【0137】

f. 抗体の生成

いくつかの例では、GITR抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を生成する通例の方法を使用して生成される。

【0138】

一部の実施形態では、本明細書に記載するGITR抗体は、セルフリーシステムにおいて生成される。非限定的で例示的なセルフリーシステムは、例えば、Sitaraman et al., Methods Mol. Biol. 498: 229-44 (2009); Spirin, Trends Biotechnol. 22: 538-45 (2004); Endo et al., Biotechnol. Adv. 21: 695-713 (2003)に記載されている。

【0139】

一部の例では、本明細書に記載するGITR抗体は、核酸分子より生成され、前記核酸分子は、本明細書に記載する抗体の1つまたは複数の鎖をコードする。いくつかの例では、核酸分子は、本明細書に記載のGITR抗体の重鎖または軽鎖をコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの例では、核酸分子は、本明細書に記載するGITR抗体の、重鎖をコードするポリヌクレオチドと、軽鎖をコードするポリヌクレオチドの両方を含む。一部の実施形態では、第1核酸分子は、重鎖をコードする第1ポリヌクレオチドを含み、第2核酸分子は、軽鎖をコードする第2ポリヌクレオチドを含む。一部の斯かる例では、重鎖および軽鎖は、1つの核酸分子から、または、2つの別個の核酸分子から、2つの別個のポリペプチドとして発現する。抗体がscFvである場合のような一部の実施形態では、単一ポリヌクレオチドは、連結し合った重鎖と軽鎖の両方を含む、単一ポリペプチドをコードする。

【0140】

いくつかの例では、GITR抗体の重鎖または軽鎖をコードするポリヌクレオチドはリーダー配列をコードするヌクレオチド配列を含み、これは、翻訳されると、重鎖または軽鎖のN末端に位置する。上記で論じたように、リーダー配列は、天然の重鎖または軽鎖のリーダー配列である場合もあるし、別の非相同的リーダー配列である場合もある。

【0141】

核酸分子は、組換えDNA技法を使用して、構築され得る。一部の実施形態では、核酸分子は、選択した宿主細胞における発現に適切な発現ベクターである(例えば、以下に記載するベクターなど)。GITR抗体の重鎖および/または軽鎖は、細菌細胞などの原核細胞;または真菌細胞(例えば、イーストなど)、植物細胞、昆虫細胞、および哺乳動物

10

20

30

40

50

細胞などの真核細胞において発現し得る。いくつかの例では、1つまたは複数のポリペプチドは、任意の適する方法によって、ポリペプチドをコードする1つまたは複数の核酸分子を用いて操作または遺伝子導入した動物において、*in vivo*で生成され得る。

【0142】

G I T R抗体は、親和性マトリックスまたは疎水性相互作用クロマトグラフィーを使用することなどによる、任意の適切な方法により精製され得る。適切な親和性リガンドには、抗体が結合する抗原および/またはエピトープと、抗体定常領域に結合するリガンドが含まれる。例えば、タンパク質A、タンパク質G、タンパク質A/G、または抗体親和性カラムを使用して、定常領域に結合し、抗体を精製することができる。一部の実施形態では、疎水性相互作用クロマトグラフィー、例えばブチルまたはフェニルカラムも、いくつかのポリペプチドを精製するのに使用される。

10

【0143】

2. 核酸を用いた、G I T Rの生物学的活性および/または発現の増加

一例では、G I T Rの生物学的活性は、G I T Rをコードする核酸分子の使用により高められるか、または増加する。例えば、G I T Rをコードする核酸分子を使用して、例えば、上方制御が望ましい場合に、G I T Rの遺伝子発現を増加させることが可能である（例えば、腫瘍においてまたは腫瘍領域においてG I T Rの発現を増加させる）。

【0144】

いくつかの例では、G I T Rをコードする核酸分子は、G I T Rの発現を、例えば、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも75%、少なくとも90%、少なくとも100%、少なくとも200%、少なくとも300%、少なくとも400%、または少なくとも500%増加させる。いくつかの例では、G I T Rをコードする核酸分子は、G I T Rの生物学的活性を、例えば、該G I T Rをコードする核酸分子の不在下での斯かる活性と比較して、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも100%、少なくとも200%、少なくとも300%、少なくとも400%、または少なくとも500%増加させる。例示的なG I T Rをコードする核酸分子は、GenBankアクセッション番号NM__148902.1、NM__148901.1、NM__004195.2、NM__009400.2、およびNM__021985.2（または、斯かる配列と少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有する配列）で提供される。

20

30

【0145】

G I T Rをコードする核酸分子は、組換えベクター（例えば、適切なプロモーターの制御下で、G I T Rをコードする核酸分子を配置することなどによるプラスミドもしくはウイルスベクター）を使用すること、または、ネイキッド核酸もしくは核酸複合体（リボソームカプセル化RNAなどの非ウイルス性方法）を使用することなどによる通例の方法を使用して、対象の細胞（例えば、腫瘍細胞など）に導入することが可能である。例示的なベクターとしては、限定するわけではないが、DNAベクター、ファージベクター、ウイルスベクター、およびレトロウイルスベクターが挙げられる。使用することが可能な例示的なウイルスベクターとしては、限定するわけではないが、ボックスウイルス、組換えワクシニアウイルス、レトロウイルス（例えば、レンチウイルスなど）、複製欠損性アデノウイルス株、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス（AAV）、ヘルペスウイルス、またはポリオウイルスが挙げられる。例示的なプロモーターには、構成プロモーターまたは誘導性プロモーター、例えば、組織特異性プロモーターなどが含まれる。

40

【0146】

所望の宿主細胞への1つまたは複数の核酸の導入は、限定するわけではないが、リン酸カルシウム遺伝子導入、DEAE-デキストラン媒介性遺伝子導入、カチオン性脂質媒介

50

性遺伝子導入、エレクトロポレーション、形質導入、感染などを含む、任意の方法によって達成され得る。非限定的で例示的な方法は、例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)に記載されている。核酸は、任意の適切な方法により、所望の宿主細胞に過渡的にまたは安定的に遺伝子導入され得る。

【0147】

いくつかの例では、GITRをコードする核酸分子は、ある細胞または組織に導入されているだけである。例えば、GITRをコードする核酸分子を腫瘍のみへ導入することが十分な場合がある。しかしながら、いくつかの例では、対象の細胞全てを処置すること、または、GITRをコードする核酸分子を、例えば血管内投与によりより広く散在させることが、より治療的に効率的で単純である場合がある。いくつかの例では、GITRをコードする核酸分子は、例えば、注射（皮内、筋肉内、i.v.、腫瘍内、もしくは皮下）、局所投与、経口投与、吸入、注入、沈着、または移植により、対象に直接投与される。

10

【0148】

3. GITRタンパク質を用いたGITRの生物学的活性の増加

一例では、GITRの生物学的活性は、GITRタンパク質の使用により高められるか、または増加する。例えば、GITRタンパク質を使用して、例えば、上方制御が望ましい場合に、GITRの活性を増加させることが可能である（例えば、腫瘍領域においてGITRの活性を増加させる）。

【0149】

GITRの活性を増加させるために使用可能である例示的なGITRタンパク質には、GenBank（登録商標）アクセッション番号NP_683700.1（アイソフォーム3前駆体、成熟ペプチドはaa 26-234である）、NP_683699.1（アイソフォーム2前駆体、成熟ペプチドはaa 26-255である）、NP_004186.1（アイソフォーム1前駆体、成熟ペプチドはaa 26-241である）、NP_033426.1（アイソフォーム1前駆体、成熟ペプチドはaa 20-228である）、もしくはNP_068820.1（アイソフォーム2前駆体、成熟ペプチドはaa 22-132である）に示されるGITRタンパク質配列、または、斯かる配列と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも95%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%の配列同一性を有するGITR配列を有するものが含まれる。

20

30

【0150】

いくつかの例では、GITRタンパク質の投与は、GITRの活性を、対照（例えば、処置前の量またはタンパク質不在下での量など）と比較して、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも100%、少なくとも200%、少なくとも300%、少なくとも400%、少なくとも500%増加させる。

【0151】

CpG ODN

例示的なCpG ODNとしては、クラスBのODN、例えば、SEQ ID NO: 1で示されるヒトCpG配列（ホスホロチオエートである塩基を有する5'-tcgtcgttttgcgttttgcgtt-3'）およびSEQ ID NO: 2で示されるマウスCpG ODN配列（ホスホロチオエートである塩基を有する5'-tccattgacgttcctgacgtt-3'）などが挙げられる。一例では、CpG ODNは、配列5'-TGACTGTGAACGTTTCGAGATGA-3' SEQ ID NO: 3を有する（DynavaxからのISS 1018）。

40

【0152】

投与および投薬量

本開示の方法は、治療的に有効な量の1つまたは複数のGITRアゴニストと、1つま

50

たは複数の CpG ODN または他の TLR9 アゴニストとを、例えば、治療的に有効な量の他の治療薬と組み合わせて、腫瘍のある対象に提供するステップを含む。1 つまたは複数の GITR アゴニストおよび 1 つまたは複数の CpG ODN（もしくは他の TLR9 アゴニスト）は、例えば、同時にまたは同時期に、腫瘍内に投与される。本明細書では、腫瘍内投与が、全身投与を超える予想外の優れた結果を提供することを示す。必要な投与量は、対象の種、年齢、体重、および全身状態、使用する特定の治療薬ならびにその投与方法に応じて、対象毎に異なり得る。いくつかの例では、本開示の方法は、さらに、手術および / または他の療法を、1 つまたは複数の GITR アゴニストおよび 1 つまたは複数の CpG ODN（もしくは他の TLR9 アゴニスト）と組み合わせて、例えば、連続して、実質的に同時に、または同時に、対象に提供するステップを含む。

10

【0153】

投与は、単回投与または多回投与により達成され得る。いくつかの例では、処置は、数日から数か月、またはさらには数年の期間にわたる、本明細書で提供する 1 つまたは複数の治療薬の 1 日 1 回または 1 日複数回、または 1 日 1 回未満（例えば、週に 1 回もしくは月に 1 回など）の投与を含み得る。例えば、治療的に有効な量の 1 つまたは複数の GITR アゴニストは、単回投与、1 日 2 回、週 1 回、もしくは複数回投与、例えば 1 日 1 回で、または、処置過程の間中、投与され得る。例えば、治療的に有効な量の 1 つまたは複数の CpG ODN（もしくは他の TLR9 アゴニスト）は、単回投与、1 日 2 回、週 1 回、もしくは複数回投与、例えば 1 日 1 回で、または処置過程の間中、投与され得る。特定の非限定的例では、処置は、1 つまたは複数の GITR アゴニストおよび 1 つまたは複数の CpG ODN（もしくは他の TLR9 アゴニスト）の 1 日 1 回投与または 1 日 2 回投与を含む。いくつかの例では、1 つまたは複数の GITR アゴニストおよび 1 つまたは複数の CpG ODN（もしくは他の TLR9 アゴニスト）は、月 1 回、月 1 回未満、例えば、2 か月ごと、3 か月ごと、または 6 か月ごとなどに対象に投与される。他の例では、1 つまたは複数の GITR アゴニストおよび 1 つまたは複数の CpG ODN（もしくは他の TLR9 アゴニスト）は、月 1 回超、例えば、2 週間ごと、毎週、週 2 回、週 3 回、毎日、または 1 日に多数回投与される。したがって、いくつかの例では、本開示の方法は、有効量の少なくとも 1 つの GITR アゴニストの少なくとも 2 回の別個の腫瘍内投与と、有効量の少なくとも 1 つの CpG ODN の少なくとも 2 回の別個の腫瘍内投与を含む。

20

30

【0154】

1 つもしくは複数の GITR アゴニストおよび / または 1 つもしくは複数の CpG ODN（もしくは他の TLR9 アゴニスト）は、固体、溶液、エマルジョン、分散液、ミセル、リポソーム、および同類のものの形態で、例えば、腫瘍内適用に適切な有機または無機の担体または賦形剤との混合物において、使用され得る。1 つもしくは複数の GITR アゴニストおよび / または 1 つもしくは複数の CpG ODN（もしくは他の TLR9 アゴニスト）は、例えば、非毒性の、薬学的に許容可能な、ペレット、溶液、エマルジョン、懸濁液、および使用に適した任意の他のもの用の担体と共に配合され得る。本開示において有用である薬学的に許容可能な担体（ビヒクル）は、慣習的である。Remington's Pharmaceutical Sciences, by E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition (1975) が、1 つまたは複数の治療薬の薬学的送達に適した組成物および製剤について記載している。例示的な担体としては、グルコース、ラクトース、アカシアゴム、ゼラチン、マンニトール、でんぷんのり、ケイ酸マグネシウム、タルク、コーンスターチ、ケラチン、コロイドシリカ、ジャガイモでんぷん、尿素、中鎖長トリグリセリド、デキストラン、および、製剤を製造する際に使用するのに適した、固体、半固体、または液体状の他の担体が挙げられる。さらに、補助剤、安定剤、増粘剤、着色剤、および香料を使用してもよい。

40

【0155】

腫瘍内投与は、概して、注射により達成される。注射可能剤は、溶液もしくは懸濁液、注射前の液体中での懸濁液の溶解に適した固体形態、またはエマルジョンの何れかとして

50

、慣習的な形態で調製され得る。注射溶液および懸濁液は、無菌の粉末、顆粒、および錠剤より調製され得る。腫瘍内投与用調製物（例えば、無菌の注射可能懸濁液）には、無菌の水性または非水性の溶液、懸濁液、およびエマルジョンが含まれる。懸濁液は、適切な分散剤または湿潤剤および懸濁化剤を使用して、既知の方法により製剤化され得る。非水性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油などの植物油、およびオレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステルである。水性担体には、水、アルコール／水溶液、エマルジョンまたは懸濁液が含まれ、生理食塩水および緩衝生理食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノール、ならびにそれらの組み合わせが含まれる。例示的なビヒクルとしては、塩化ナトリウム溶液、Ringier デキストロース、デキストロースおよび塩化ナトリウム、乳酸リンゲル液、または固定油が挙げられる。防腐剤および他の添加剤、例えば抗菌剤、抗酸化剤、キレート剤、緩衝剤、および不活性ガスなども存在してよい。一例では、1つもしくは複数のGITRアゴニストおよび／または1つもしくは複数のCpG ODN（もしくは他のTLR9アゴニスト）を含む滅菌注射可能調製物は、非毒性の経口的に許容可能な希釈剤または溶媒中の滅菌注射可能溶液または懸濁液、例えば、1, 3 - ブタンジオール中の溶液である。溶媒又は懸濁媒体としては、無菌の固定油が利用され得る。この目的のためには、合成のモノもしくはジグリセリド、脂肪酸、ごま油、ヤシ油、ピーナッツ油、綿実油などのような天然に生じる野菜油、またはオレイン酸エチル等のような合成脂肪ビヒクルを含む任意の無刺激性固定油が利用され得る。

10

【0156】

20

一例では、1つもしくは複数のGITRアゴニストおよび／または1つもしくは複数のCpG ODN（もしくは他のTLR9アゴニスト）を含む組成物は、それらを、水性もしくは非水性の溶媒、例えば、野菜もしくは他の油、合成脂肪酸グリセリド、高級脂肪酸エステル、または、プロピレングリコールに；所望であれば、可溶化剤、等張剤、懸濁化剤、乳化剤、安定化剤、および防腐剤などの慣習的な添加剤と共に溶解、懸濁、または乳化させることにより、腫瘍内投与を含む注射用に製剤化される。組成物は、また、種々の実施形態において、生分解性または非生分解性のポリマーなどと共に、徐放性マイクロカプセルにも製剤化され得る。非限定的で例示的な生分解性製剤としては、ポリ乳酸 - グリコール酸ポリマーが挙げられる。非限定的で例示的な非生分解性製剤としては、ポリグリセリン脂肪酸エステルが挙げられる。斯かる製剤を作成するある方法は、例えば、E P 1 1 2 5 5 8 4 A 1 に記載されている。

30

【0157】

1つもしくは複数のGITRアゴニストおよび／または1つもしくは複数のCpG ODN（もしくは他のTLR9アゴニスト）は、単独で、または他の治療薬と組み合わせて、塩酸、臭化水素酸、過塩素酸、硝酸、チオシアン酸、硫酸、およびリン酸などの無機酸、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、乳酸、ピルビン酸、シュウ酸、マロン酸、コハク酸、マレイン酸、およびフマル酸などの有機酸との反応により、または、水酸化ナトリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウムなどの無機塩基、モノアルキルアミン、ジアルキルアミン、トリアルキルアミン、アリアルアミン、および置換エタノールアミンなどの有機塩基との反応により形成される、薬学的に許容可能な酸付加塩または塩基付加塩として投与され得る。

40

【0158】

一部の実施形態では、核酸分子（例えば、GITRをコードする核酸分子またはCpG ODNなど）は、遺伝子療法を使用して送達される。非限定的例としては、核酸分子は金微小粒子にコーティングされ、粒子照射装置か、または、例えば、文献（例えば、Tang et al., Nature 356: 152-154 (1992) 参照）に記載されているような「遺伝子銃」により送達され得る。

【0159】

1つもしくは複数のGITRアゴニストおよび／または1つもしくは複数のCpG ODN（もしくは他のTLR9アゴニスト）の治療投薬量は、熟練の臨床医により決定され

50

得る。他の治療薬、例えば、腫瘍を処置する薬剤も、1つまたは複数のGITRアゴニストおよび1つまたは複数のCpG ODN（もしくは他のTLR9アゴニスト）と組み合わせて投与するのに適している。

【0160】

一部の実施形態では、GITRアゴニスト抗体、抗体断片、または抗体複合体の投与量は、全身投与での使用量の少なくとも2分の1、少なくとも5分の1、少なくとも10分の1、少なくとも20分の1、少なくとも50分の1、少なくとも75分の1、または少なくとも100分の1など、全身投与での使用量未満である。いくつかの例では、GITRアゴニスト抗体の投与量は、1mg/kg以下、0.3mg/kg以下、0.25mg/kg以下、0.03mg/kg以下、0.01mg/kg以下である。いくつかの実施形態では、GITRアゴニスト抗体の投与量は、少なくとも0.01mg/kg、少なくとも0.03mg/kg、少なくとも0.25mg/kg、少なくとも0.3mg/kg、または少なくとも1mg/kgである。いくつかの実施形態では、GITRアゴニスト抗体の投与量は、約0.001mg/kg～約5mg/kg、例えば、約0.01mg/kg～約5mg/kg、約0.01mg/kg～約1mg/kg、または約0.03mg/kg～約1mg/kgである。いくつかの例では、抗体の投与量は、約0.01mg/kg、約0.02mg/kg、約0.03mg/kg、約0.1mg/kg、約0.2mg/kg、約0.25mg/kg、約0.3mg/kg、約0.5mg/kg、約0.8mg/kg、または約1mg/kgである。

10

20

【0161】

一部の実施形態では、GITRタンパク質の投与量は、少なくとも0.2μg、少なくとも0.5μg、少なくとも1μg、少なくとも2μg、少なくとも5μg、または少なくとも10μgである。いくつかの例では、有効量の少なくとも1つのGITRタンパク質は、100μg以下、50μg以下、25μg以下、10μg以下、または2μg以下、例えば、1μg～100μgである。

【0162】

いくつかの例では、少なくとも1つのCpG ODNの投与量は、少なくとも0.05mg、少なくとも0.3mg、少なくとも1mg、少なくとも3mg、少なくとも6mg、少なくとも18mg、または少なくとも20mg、例えば、0.05mg、0.1mg、0.2mg、0.3mg、1mg、3mg、6mg、14mg、または18mgなどである。いくつかの例では、少なくとも1つのCpG ODNの投与量は、20mg、10mg以下、1mg以下、0.3mg以下、または0.05mg以下、例えば0.05mg～20mgなどである。

30

40

【0163】

一部の実施形態では、アゴニスト小分子の投与量は、少なくとも1mg/kg、少なくとも10mg/kg、少なくとも50mg/kg、少なくとも100mg/kg、少なくとも500mg/kg、または少なくとも1000mg/kg、例えば、約1mg/kg～約1000mg/kg、約10mg/kg～約200mg/kg、約10mg/kg～約100mg/kg、または約100mg/kg～約500mg/kgである。いくつかの例では、アゴニスト小分子の投与量は、約1mg/kg、約2mg/kg、約4mg/kg、約5mg/kg、約6mg/kg、約8mg/kg、約10mg/kg、約15mg/kg、約20mg/kg、または約25mg/kgである。他の実施形態では、アゴニスト小分子の投与量は、少なくとも1mg/m²、少なくとも10mg/m²、少なくとも50mg/m²、少なくとも100mg/m²、または少なくとも500mg/m²、例えば、約50mg/m²～約500mg/m²など、例えば、約50mg/m²～約400mg/m²、約100mg/m²～約400mg/m²、または約250mg/m²～約400mg/m²などである。いくつかの例では、投与量は、約50mg/m²、約100mg/m²、約150mg/m²、約200mg/m²、約250mg/m²、約300mg/m²、約400mg/m²、または約500mg/m²である。

50

【0164】

いくつかの例では、GITRをコードする核酸（単独で、またはプラスミドもしくはベクターの一部として）の投与量は、約1mg～約1000mg、約10mg～約500mg、約1mg～約10mg、または約50mg～約100mgである。いくつかの例では、GITRをコードする核酸の投与量は、約1mg、約2mg、約2.5mg、約3mg、約5mg、約10mg、約50mg、約100mg、約250mg、約500mg、または約1000mgである。いくつかの実施形態では、GITRをコードする核酸の投与量は、約1mg/kg～約100mg/kg、約1mg/kg～約10mg/kg、約5mg/kg～約500mg/kg、約10mg/kg～約100mg/kg、または約25～約50mg/kgである。いくつかの例では、GITRをコードする核酸の投与量は、約1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、約5mg/kg、6mg/kg、7mg/kg、8mg/kg、9mg/kg、約10mg/kg、約12.5mg/kg、約15mg/kg、約20mg/kg、約25mg/kg、約30mg/kg、約35mg/kg、約40mg/kg、約45mg/kg、約50mg/kg、約60mg/kg、約70mg/kg、約80mg/kg、または約100mg/kgである。これらの投薬量は単なる例であり、適切な投薬量は当業者により決定され得ることが理解されよう。

10

【0165】

いくつかの例では、GITRをコードする核酸を含有するウイルス粒子は、少なくとも 1×10^5 pfu/ml、少なくとも 1×10^6 pfu/ml、少なくとも 1×10^7 pfu/ml、少なくとも 1×10^8 pfu/ml、少なくとも 1×10^9 pfu/ml、または少なくとも 1×10^{10} pfu/ml、およびいくつかの例では、 2×10^{11} pfu/mlを超えないウイルス粒子力価を有する調製物の一部として投与される。GITRをコードする核酸分子を含有するウイルス粒子は、例えば体積が最大10mlの薬学的に許容可能な担体と組み合わせて投与され得る。薬学的に許容可能な担体は、例えば、液体担体、例えば、生理食塩水、硫酸プロタミン、またはポリブレンなどであり得る。

20

【0166】

追加治療薬の投与

組み合わせ療法も本出願に包含される。GITRアゴニストとCpG ODNは、他の生物学的に活性な物質または腫瘍処置用の他の処置手順と組み合わせて、対象に投与され得る。例えば、GITRアゴニストとCpG ODNは、単独でまたは他の処置方法と共に投与され得る。それらは、手術、放射線療法、化学療法、および/または生物学的療法などの他の処置方法の前に、該処置方法と実質的に同時期に、または該処置方法の後で提供され得る。例えば、GITRアゴニストとCpG ODNは、1つまたは複数の抗ガン剤、例えば、化学療法薬、増殖阻害剤、抗血管新生剤、抗新生物形成組成物、生物学的薬剤（例えば、治療用mAb）、またはそれらの組み合わせなどと共に投与され得る。

30

【0167】

いくつかの例では、GITRアゴニストとCpG ODNは、がんの処置に有用な1つまたは複数の他の薬剤、例えば、化学療法薬、生物学的薬剤（例えば、治療用モノクローナル抗体）、抗血管新生剤、増殖阻害剤、放射線療法、手術、またはそれらの組み合わせと組み合わせて使用される。使用可能な化学療法薬の例としては、限定するわけではないが、アルキル化剤、例えばチオテパおよびCytosine（登録商標）シクロホスファミド；アルキルスルホネート類、例えばブスルファン、イムプロスルファン、およびピボスルファン；アジリジン類、例えばベンゾドパ、カルボコン、メツレドパ、およびウレドパ；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレンチオホスホルアミド、およびトリメチロールオメラミンを含むエチレンイミン類およびメチラメラミン類；アセトゲニン類（特にプラタシンおよびプラタシノン）；カンプトテシン（合成類似体トポテカンを含む）；プリオスタチン；カリスタチン；CC-1065（アドゼレシン、カルゼレシン、およびビゼレシン合成類似体を含む）；クリプトフィシン類（特にクリプトフィシン1、およびクリプトフィシン8）；ドラスタチン；デュオカルマイシン（合成類似体、KW-2189、およびCB1-TM1を含む）；エレウテロピ

40

50

ン；パンクラチスタチン；サルコジクチン；スポンジスタチン；窒素マスタード類、例えばクロランブシル、クロマファジン、クロロホスファミド、エストラムスチン、イフォスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベンピチン、フェネステリン、プレドニムスチン、トロフォスファミド、ウラシルマスタードなど；ニトロソ尿素類、例えばカルムスチン、クロロゾトシン、ホテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、およびラニムヌスチンなど；抗生物質、例えばエネジン抗生物質など（例えばカリケアマイシン、特にカリケアマイシガンマⅠⅠおよびカリケアマイシンオメガⅠⅠ（例えば、Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)参照）；ジネマイシンAを含むジネマイシン；クロドロ酸などのビスホスホネート；エスペラマイシン；並びにネオカルジノスタチン発色団および関連の色素蛋白エネジン抗生物質発色団）、アクラシノマイシン類、アクチノマイシン、オーソラマイシン、アザセリン、プレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン類、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン、6 - ジアゾ - 5 - オキソ - L - ノルロイシン、A d r i a m y c i n（登録商標）ドキシソルビシン（モルホリノドキシソルビシン、シアノモルホリノ - ドキシソルビシン、2 - ピロリノ - ドキシソルビシン、およびデオキシドキシソルビシンを含む）、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン、マイトマイシン類、例えばマイトマイシンC、マイコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン、ピューロマイシン、ケラマイシン、ロドルビシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメックス、ジノスタチン、ゾルビシンなど；代謝拮抗剤、例えばメトトレキセートおよび5 - フルオロウラシル（5 - F U）など；葉酸類似体、例えばデノブテリン、メトトレキセート、プテロブテリン、トリメトトレキセートなど；プリン類似体、例えばフルダラビン、6 - メルカプトプリン、チアミプリン、チオゲアニンなど；ピリミジン類似体、例えばアンシタビン、アザシチジン、6 - アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、デキシフルリジン、エノシタビン、フロクスリジンなど；アンドロゲン類、例えばカルステロン、ドロモスタノロンプロピオネート、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトンなど；抗アドレナル類、例えばアミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタンなど；葉酸補給剤、例えばフロリン酸など；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノエブリン酸；エニルラシル；アムサクリン；ベストラブシル；ビスアントレン；エダトラキセート；デホファミン；デメコルシン；ジアジクオン；エルホミチン；酢酸エリブチニウム；エボチロン；エトグシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダイニン；マイタンシノイド類、例えばマイタンシンおよびアンサミトシン類など；マイトグアゾン；マイトキサントロン；モビダンモル；ニトラエリン；ペントスタチン；フェナメト；ピアルビシン；ロソキサントロン；ポドフィリン酸；2 - エチルヒドラジド；プロカルバジン；P S K（登録商標）多糖類複合体（J H S N a t u r a l P r o d u c t s , オレゴン州ユージーン）；ラゾキサン；リゾキシン；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジコン；2 , 2 ' , 2 " - トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン（特にT - 2毒素、ベラクリンA、ロリジンA、およびアングイジン）；ウレタン；ビンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；マイトプロニトール；マイトラクトール；ピボプロマン；ガシトシン；アラビノシド（「A r a - C」）；シクロホスファミド；チオテパ；タキソイド類、例えばT a x o l（登録商標）パクリタキセル（B r i s t o l - M y e r s S q u i b b O n c o l o g y , ニュージャージー州プリンストン）、A b r a x a n e（登録商標）クレモフォルフリー、パクリタキセルのアルブミン操作ナノ粒子製剤（A m e r i c a n P h a r m a c e u t i c a l P a r t n e r s , イリノイ州シャンバーグ）、およびT a x o t e r e（登録商標）ドセタキセル（R h o n e - P o u l e n c R o r e r , フランス国アントニー）；クロランブシル；G e m z a r（登録商標）ゲムシタビン；6 - チオゲアニン；メルカプトプリン；メトトレキセート；白金類似体、例えば、シスプラチン、オキサリプラチン、およびカルボプラチンなど；ピンブラスチン；白金；エトボシド（V P - 16）；イホスファミド；ミトキサントロン；ピンクリスチン；N a v e l b i n e（登録商標

10

20

30

40

50

）ピノレルピン；ノバントロン；テニボシド；エダトレキサート；ダウノマイシン；アミノプテリン；ゼローダ；イバンドロネート；イリノテカン（Camp to sar, CPT-11）（5-FUおよびロイコボリンと併せたイリノテカンの処置レジメンを含む）；トポイソメラーゼ阻害剤RFS2000；ジフルオロメチルオルニチン（DMFO）；レチノイド類、例えばレチノイン酸など；カペシタビン；コンプレタスタチン；ロイコボリン（LV）；オキサリプラチン処置レジメン（FOLFOX）を含むオキサリプラチン；細胞増殖を減少させる、PKC-アルファ、Raf、H-Ras、EGFR（例えば、エルロチニブ（Tarceva（登録商標））およびVEGF-Aの阻害剤、ならびに上記何れかの薬学的に許容可能な塩、酸、または誘導体が挙げられる。

【0168】

さらなる非限定的で例示的な化学療法薬としては、がんへのホルモン作用を制御または阻害するように働く抗ホルモン剤、例えば、抗エストロゲンおよび選択的エストロゲン受容体モジュレータ（SERM）が挙げられ、例えば、タモキシフェン（Nolvadex（登録商標）タモキシフェンを含む）、ラロキシフェン、ドロロキシフェン、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、LY117018、オナプリストン、およびFareston（登録商標）トレミフェン；副腎でのエストロゲン産生を制御する酵素アロマターゼを阻害するアロマターゼ阻害剤、例えば4（5）-イミダゾール、アミノグルテチミド、Megase（登録商標）酢酸メゲストロール、Aromasin（登録商標）エキセメスタン、フォルメスタニー（formestanie）、ファドロゾール、Rivisor（登録商標）ボロゾール、Femara（登録商標）レトロゾール、およびArimidex（登録商標）アナストロゾール；および抗アンドロゲン、例えばフルタミド、ニルタミド、ピカルタミド、リュープロリド、およびゴセレリン；並びにトロキサシタピン（1,3-ジオキソランヌクレオシドシトシン類似体）；アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に接着細胞の増殖に関わるシグナル伝達経路における遺伝子の発現を阻害するもの、例えばPKC-アルファ、Raf、およびH-Rasなど；リボザイム、例えばVEGF発現阻害剤（例えばAngiozyme（登録商標）リボザイム）およびHER2発現阻害剤；遺伝子治療ワクチン、例えばAllvectin（登録商標）ワクチン、Leuvectin（登録商標）ワクチン、およびVaxid（登録商標）ワクチンなどのワクチン；Proleukin（登録商標）rIL-2；Lurtotecan（登録商標）トポイソメラーゼ1阻害剤；Abarelix（登録商標）rmRH；ならびに上記何れかの薬学的に許容可能な塩、酸、または誘導体が挙げられる。

【0169】

「抗血管新生剤」は、直接的または間接的に血管新生、脈管形成、または不所望の血管透過を阻害する、小分子量の化合物、ポリヌクレオチド（例えば、阻害RNA（RNAiまたはsiRNA）を含む）、ポリペプチド、単離タンパク質、組換えタンパク質、抗体、またはそれらのコンジュゲートもしくは融合タンパク質である。抗血管新生剤には、結合して血管新生因子またはその受容体の血管新生活性を遮断する薬剤が含まれる。一例では、抗血管新生剤は、血管新生剤に対する抗体または他のアンタゴニスト、例えば、VEGF-Aに対する抗体（例えば、ベバシズマブ（Avastin（登録商標）））またはVEGF-A受容体に対する抗体（例えば、KDR受容体もしくはFlt-1受容体）、抗PDGFR阻害剤、例えばGleevec（登録商標）（イマチニブメシル酸塩）、VEGF受容体シグナル伝達を遮断する小分子（例えば、PTK787/ZK2284、SU6668、Sutent（登録商標）/SU11248（スニチニブリンゴ酸塩）、AMG706、または、例えば国際特許出願WO2004/113304号に記載されるもの）である。抗血管新生剤には、また、天然の血管新生阻害剤、例えば、アンジオスタチン、エンドスタチンなども含まれる。例えば、Klagsbrun and D'Amore (1991) Annu. Rev. Physiol. 53:217-39; Streit and Detmar (2003) Oncogene 22:3172-3179（例えば、悪性メラノーマにおける抗血管新生療法を一覧表示する表3）；Ferrara & Alitalo (1999) Nature Medicine 5(12):1359-1364; Tonini et al. (2003) Oncogene22:6549-6556（

10

20

30

40

50

例えば、既知の抗血管新生因子を一覧表示する表 2) ; および、Sato (2003) *Int. J. Clin. Oncol.* 8:200-206 (例えば、臨床試験で使用する抗血管新生剤を一覧表示する表 1) を参照のこと。

【0170】

増殖阻害剤は、*in vitro* または *in vivo* の何れかで細胞 (例えば、VEGF を発現する細胞など) の増殖を阻害する化合物または組成物である。したがって、増殖阻害剤は、S 期の細胞 (例えば、VEGF を発現する細胞など) のパーセンテージを著しく減少させるものであり得る。増殖阻害剤の例としては、限定するわけではないが、(S 期以外の時点で) 細胞周期進行を遮断する薬剤、例えば、G1 停止および M 期停止を誘発する薬剤などが挙げられる。伝統的な M 期遮断剤には、ビンカス (ビンクリスチンおよびビンブラスチン)、タキサン、ならびにトポイソメラーゼ II 阻害剤、例えばドキソルビシン、エピルビシン、ダウノルビシン、エトポシド、およびブレオマイシンなどが含まれる。G1 停止させるこれらの薬剤、例えば、DNA アルキル化剤、例えばタモキシフェン、プレドニソン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキセート、5-フルオロウラシル、および ara-C などは、S 期停止にも波及する。さらなる情報は、Mendelsohn and Israel, eds., *The Molecular Basis of Cancer*, Chapter 1, Murakami による標題 "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" (W. B. Saunders, Philadelphia, 1995)、例えば p. 13 に見つけられる。タキサン (パクリタキセルおよびドセタキセル) は、両方ともイチイに由来する抗がん剤である。ヨーロッパイチイに由来するドセタキセル (Taxotere (登録商標)、Rhône-Poulenc Rorer) は、パクリタキセル (Taxol (登録商標)、Bristol Myers Squibb) の半合成類似体である。パクリタキセルおよびドセタキセルは、チューブリン二量体からの微小管の構築を促進し、脱重合を防ぐことにより微小管を安定化させ、細胞の有糸分裂の阻害をもたらす。

【0171】

抗新生物形成組成物にはがんの処置に有用なものが含まれ、少なくとも 1 つの活性治療薬が含まれる。治療薬の例としては、限定するわけではないが、例えば、化学療法薬、増殖阻害剤、細胞障害剤、放射線療法で使用する薬剤、抗血管新生剤、がん免疫療法薬、アポトーシス剤、抗チューブリン剤、およびがんを処置するための他の生物学的薬剤、例えば、抗 HER-2 抗体、抗 CD20 抗体、上皮増殖因子受容体 (EGFR) アンタゴニスト (例えば、チロシンキナーゼ阻害薬)、HER1/EGFR 阻害薬 (例えば、エルロチニブ (Tarceva (登録商標))、血小板由来の増殖因子阻害薬 (例えば、Gleevec (登録商標) (イマチニブメシル酸塩)、COX-2 阻害薬 (例えば、セレコキシブ)、インターフェロン、CTLA4 阻害薬 (例えば、抗 CTLA4 抗体イピリムマブ (YERVOY (登録商標))、PD-1 阻害薬 (例えば、抗 PD1 抗体、BMS-936558)、PDL1 阻害薬 (例えば、抗 PDL1 抗体、MPDL3280A)、PDL2 阻害薬 (例えば、抗 PDL2 抗体)、TIM3 阻害薬 (例えば、抗 TIM3 抗体)、サイトカイン、以下の標的 ErbB2、ErbB3、ErbB4、PDGFR、BlyS、APRIL、BCMA、PD-1、PDL1、PDL2、CTLA4、TIM3、または VEGF 受容体のうち 1 つまたは複数に結合するアンタゴニスト (例えば、中和抗体)、TRAIL/Apo2、および他の生体活性有機化学薬剤などが含まれる。それらの組み合わせも使用可能である。

【0172】

GITR アゴニストおよび CpG ODN と共に使用可能である、がんを処置するための生物学的薬剤の他の例としては、限定するわけではないが、セツキシマブ、ブレンツキシマブベドチン、ダラツムマブ、イブリツモマブチウキセタン、イピリムマブ、ニボルマブ、オファツムマブ、パニツムマブ、ペンブロリズマブ、リツキシマブ、トシツモマブ、およびトラスツズマブが挙げられる。

【0173】

治療反応

10

20

30

40

50

本開示の方法で処置され得る例示的な腫瘍、例えばがんなどには、固形腫瘍、例えば細胞腫、芽細胞腫、または肉腫が含まれる。本開示の方法で処置され得る特異的な腫瘍例としては、限定するわけではないが、乳がん（例えば、小葉がん、腺管がん、例えば三種陰性乳がんなど、および浸潤がん）、肺がん（例えば、非小細胞がん、小細胞肺がん、大細胞がん、扁平上皮がん、および腺がん）、肺中皮腫、大腸腺がん（例えば、大腸がんなど）、胃がん、前立腺腺がん、卵巣がん（例えば、漿液性嚢胞腺がんおよび粘液性嚢胞腺がんなど）、卵巣胚細胞腫瘍、精巣がんおよび胚細胞腫瘍、膵臓腺がん、胆管腺がん、肝細胞がん、腹膜がん、膀胱がん（例えば、移行上皮がん、腺がん、および扁平上皮がん、および膀胱尿路上皮がんを含む）、甲状腺がん、胆管細胞がん、胆嚢がん、腎細胞腺がん、腎明細胞がん、子宮内膜または子宮のがん（例えば、腺がんおよびミューラー管混合腫瘍（がん肉腫）を含む）、子宮頸部、子宮頸管内膜、子宮頸腔部、外陰部、および腔の細胞腫（例えば、それぞれの腺がんおよび扁平上皮がんなど）、前立腺がん、肝細胞がん、胆管細胞がん、皮膚腫瘍（例えば、扁平上皮がん、基底細胞がん、悪性メラノーマ、皮膚付属器腫瘍、カポジ肉腫、皮膚リンパ腫、皮膚付属器腫瘍、種々のタイプの肉腫、およびメルケル細胞がん）、食道がん、上咽頭および中咽頭の細胞腫（その扁平上皮がんおよび腺がんを含む）唾液腺がん、脳および中枢神経系の腫瘍（例えば、グリア、ニューロン、および髄膜起源の腫瘍、下垂体がん、神経膠芽腫、および星状細胞腫を含む）、末梢神経腫瘍、軟組織肉腫、骨および軟骨の肉腫、頭頸部扁平上皮がん、ならびにリンパ腫（B細胞およびT細胞の悪性リンパ腫を含む）が挙げられる。一例では、腫瘍は腺がんである。一例では、腫瘍はリンパ腫である。

10

20

30

40

50

【0174】

いくつかの例では、本開示の方法は、例えば、GITRアゴニストおよびCpG ODNの投与なしと比較して、注射腫瘍のサイズまたは体積を少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、またはさらには100%（例えば、検出可能な腫瘍細胞なし）、減少させる。いくつかの例では、本開示の方法は、例えば、GITRアゴニストおよびCpG ODNの投与なしと比較して、非注射転移性腫瘍のサイズまたは体積を少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、またはさらには100%（例えば、検出可能な腫瘍細胞なし）、減少させる。いくつかの例では、本開示の方法は、例えば、GITRアゴニストおよびCpG ODNの投与なしと比較して、非注射転移性腫瘍の数を少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、またはさらには100%（例えば、検出可能な腫瘍細胞なし）、減少させる。

【0175】

一例では、本明細書で提供する方法および組成物は、その進行速度などの腫瘍の進行を低減させる（例えば、GITRアゴニストおよびCpG ODNの投与無しまたは投与前と比較して、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、または少なくとも50%の低減）。

【0176】

一例では、治療反応は、治療を投与される対象の制御性T細胞の数を減少させることである。例えば、組成物は、治療用組成物の非存在下での（または処置前の）制御性T細胞の数と比較して、制御性T細胞の数を少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または100%減少させ得る。

【0177】

一例では、治療反応は、治療を投与される対象のエフェクターT細胞の活性を増加させ

ることである。例えば、治療用組成物は、治療用組成物の非存在下での（または処置前の）エフェクターT細胞の活性と比較して、エフェクターT細胞の活性を少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも100%、少なくとも2倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍増加させ得る。

【0178】

一例では、治療反応は、治療を投与される対象の制御性T細胞の抑制作用および系譜安定性を低下させることである。例えば、治療用組成物は、治療用組成物の非存在下での（または処置前の）制御性T細胞の抑制作用および系譜安定性と比較して、制御性T細胞の抑制作用および系譜安定性を少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または100%低下させ得る。

10

【0179】

当業者なら、これらの治療反応の組み合わせが本開示の方法および組成物で達成され得ることを理解しよう。

【0180】

したがって、いくつかの例において、本開示の方法は、注射腫瘍のサイズもしくは体積、非注射転移性腫瘍のサイズもしくは体積、非注射転移性腫瘍の数、腫瘍の進行、制御性T細胞の数、制御性T細胞の抑制作用および系譜安定性、エフェクターT細胞の活性、またはそれらの組み合わせを、ある期間にわたって（例えば、治療薬の投与前後などで）測定するステップを含む。

20

【0181】

組成物およびキット

腫瘍の処置で使用するための医薬組成物およびキットも提供する。組成物は、1つまたは複数のGITRアゴニスト（例えば、GITRアゴニスト抗体など）と、1つまたは複数のCpG ODN（例えば、SEQ ID NO: 1、2、3、またはそれらの組み合わせ）とを、例えば少なくとも1つの薬学的担体、希釈剤、または賦形剤と共に含み得る。斯かる組成物は、さらに、他の治療薬、例えば、化学療法薬、生物学的薬剤、または同種のものを含み得る。いくつかの例では、組成物は、適切な液体、例えば無菌水の添加時に再構成される凍結乾燥粉末として提供される。いくつかの例では、組成物は、スクロースおよびアルギニンなどの、タンパク質凝集を阻害する1つまたは複数の物質を含む。いくつかの例では、組成物は、ヘパリンおよび/またはプロテオグリカンを含む。

30

【0182】

1つまたは複数のGITRアゴニストと、1つまたは複数のCpG ODN（これらは、単一組成物の場合も、例えば別個の容器またはバイアルに入った別個の組成物の場合もある）を含むキットも提供する。斯かるキットは、さらに、1つもしくは複数の化学療法薬、1つもしくは複数の生物学的薬剤、1つもしくは複数の抗血管新生薬、1つもしくは複数の増殖阻害薬、1つもしくは複数の抗新生物形成組成物、またはそれらの組み合わせを含み得る。いくつかの例では、キットは、さらに、薬学的に許容される緩衝液、例えば静菌性注射用水（BWFI）、リン酸緩衝生理食塩水、リンゲル液、およびデキストロス溶液を含む。キットは、さらに、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針、およびシリンジを含む、商業的見地およびユーザー見地から望ましい他の物質を含み得る。斯かる追加試薬は、別個の容器内に存在してよい。

40

【0183】

適切な容器としては、例えば、ボトル、バイアル、シリンジなどが挙げられる。容器はガラスまたはプラスチックなどの種々の物質で形成されてよい。いくつかの例では、容器は、組成物自体か、または、腫瘍を処置するために有効な別の組成物と組み合わせさせた組成物を保持し、滅菌アクセスポートを有し得る（例えば、容器は、皮下注射針で穿刺可能

50

な、ストッパ付きバイアルであってよい)。

【0184】

キットは、粉末形態を再構成するためのバイアル、注射用シリンジ、およびカスタマイズされた腫瘍内送達系などの、患者への治療薬の投与を助ける任意選択的な構成要素を含み得る。キットは、一患者用の単回使用単位投与量として、特定の患者用の多数回の使用として(一定投与量であるか、もしくは治療が進むにつれ個々の化合物の力価が変化する)、製造される場合もあるし;キットは多数の患者への投与に適した多数の投与量を含む場合もある(「バルク包装」)。キットの構成要素は、カートン、プリスター包装、ボトル、チューブ、および同類のものの中で組み立てられ得る。

【0185】

それぞれが1つまたは複数のGITRアゴニストと1つまたは複数のCPG ODNの1つまたは複数の投与量を含む、1つまたは複数の容器を含む医薬投薬量バックも提供する。いくつかの例では、1つまたは複数の追加薬剤ありでまたはなしで、1つまたは複数のGITRアゴニストと1つまたは複数のCPG ODNとを含む、所定量の組成物を含む単位投薬量を提供する。一部の実施形態では、斯かる単位投薬量は、注射用の単回使用プレフィルドシリンジで供給される。種々の実施形態において、単位投薬量に含有される組成物は、生理食塩水、スクロース、もしくは同類のもの;ホスフェートもしくは同類のものなどの緩衝剤を含み得;および/または安定的で有効なpH範囲で製剤化され得る。

【0186】

[実施例1]

A20モデルにおける腫瘍および転移の退縮に対するGITR抗体の効果

この例は、腫瘍におけるGITRのT細胞調節が、全身の抗腫瘍反応を誘発することを実証するために使用される方法について記載する。

【0187】

メスBALB/cマウス(6-8週齢、~20g)は、Jackson Laboratories (Bar Harbor、アメリカ合衆国メイン州)から得た。腫瘍細胞を移植する前にマウスを剪毛した。

【0188】

A20 B細胞のリンパ腫細胞(ATCC Manassas、アメリカ合衆国バージニア州:カタログ番号TIB-208)を、10% FBS、1% Penn/Strep、および0.05 mMの2-メルカプトエタノールを有するRPMI-1640(ATCC)における、37 °Cでの培養で増殖させた。

【0189】

各マウスを、マウスの頭より、左右の第4乳頭(乳首)近くに、100 µLのPBS中の 5×10^6 A20細胞を2回皮下に注射することで接種した。各腫瘍の長さ(幅)を測定し、腫瘍体積を式: 腫瘍体積(mm³) = (長さ×幅²)/2に従って計算した。

【0190】

10日目、12日目、および14日目に、マウスを、CpG ODN 1826(CpG、50 µg、~2.5 mg/kg; Adipogen、アメリカ合衆国カリフォルニア州サンディエゴ:カタログ番号IAX-200-002)およびまたは抗GITR(5 µg、~0.25 mg/kg; WuXi Biologics、中国上海)を用いて、図1に示すように処置した。腫瘍内注射剤を組み合わせ、25 µLのPBS中で得た。抗GITRの腹腔内(i.p.)注射剤を、100 µLのPBS中で得た。

【0191】

図2E-2Fに示すように、CpGと抗GITRの直接腫瘍注射は、注射腫瘍と、遠位の非注射腫瘍の両方の腫瘍退縮をもたらした。しかしながら、CpGのみは、注射腫瘍のみの退縮を引き起こし(図2A)、遠位腫瘍では退縮を引き起こさず(図2B)、抗GITRのみは注射腫瘍(図2C)と遠位腫瘍(図2D)の両方の退縮をいくつかのマウスにおいて引き起こした。

10

20

30

40

50

【0192】

CpGと抗GITRの直接腫瘍注射（図2E、2F）は、いくつかのマウスでは腫瘍退縮を引き起こしたが、全てのマウスでは腫瘍退縮を引き起こさなかった、CpGと全身性抗GITR（図3E、3F）よりも、抗腫瘍効果がより高かった。

【0193】

〔実施例2〕

CT26モデルにおける腫瘍および転移の退縮に対するGITR抗体の効果

上記の例は、CpGと抗GITRの両方の腫瘍内注射が腫瘍の退縮を引き起こすことだけでなく、CpGの腫瘍内注射と抗GITRの全身性投与（図3E、3F）も、いくつかのマウスでは腫瘍の退縮を引き起こすことも実証する。そのため、CpGの腫瘍への直接的な注射が、遠位の非注射腫瘍において、全身投与のGITRアゴニストに対する反応を増加させることを示すために、さらなる実験を実行する。

10

【0194】

一例では、CT26モデルを使用して、CpGの腫瘍内注射と抗GITRの全身性投与の効果求めた。メスBALB/cマウス（6-8週齢）の左右の腹側の側腹部（第4乳房脂肪体の近く）に、100μLのDPBSに懸濁した約 1×10^6 のCT26マウス大腸がん細胞（ATCC Manassas, アメリカ合衆国バージニア州；カタログ番号CRL-2638）を接種する。腫瘍が約100mm³に達した際（および/または移植の約5-7日後）に、腫瘍の1つに、CpG ODN 1826（CpG, 10-20μg, ~0.5-1.0mg/kg; Adipogen, アメリカ合衆国カリフォルニア州サンディエゴ；カタログ番号IAX 200-002）を注射する。アゴニスト抗GITRを、腹腔内（つまり、全身に）、0.01-0.1mg/kgで投与する。注射腫瘍および非注射腫瘍の腫瘍体積を測定することにより、CpGの腫瘍への直接的な注射が、遠位の非注射腫瘍において、全身投与された抗GITRに対する反応を増加させることが実証する。上記プロトコル（CT26接種と腫瘍の誘発、処置のタイミングおよび期間、ならびにCpGまたは抗GITRの投薬量を含む）は、モデル最適化のために適合させることができる。CpGと抗GITRの両方の腫瘍内注射も実行する場合がある。

20

【0195】

上記プロトコルにおいて使用されるアゴニスト抗GITR抗体は、a) SEQ ID NO: 6の配列を含むCDR1と、SEQ ID NO: 7の配列を含むCDR2と、SEQ ID NO: 8の配列を含むCDR3とを含むGITR結合ドメイン（GITR-BD）を含む抗体；b) SEQ ID NO: 5の配列を含むGITR-BDを含む抗体；c) 構造（GITR-BD）-リンカー-（GITR-BD）-リンカー-ヒンジ-Fcを有するポリペプチドの2つのコピーを含む四価分子であって、(i) 前記GITR-BDは、SEQ ID NO: 6の配列を含むCDR1と、SEQ ID NO: 7の配列を含むCDR2と、SEQ ID NO: 8の配列を含むCDR3とを含み、(ii) 前記リンカーはポリペプチドであり、(iii) 前記ヒンジは、免疫グロブリンヒンジ領域に由来するポリペプチドであり、(iv) 前記Fcは免疫グロブリンFcポリペプチドである、四価分子；d) 構造（GITR-BD）-リンカー-（GITR-BD）-リンカー-ヒンジ-Fcを有するポリペプチドの2つのコピーを含む四価分子であって、(i) 前記GITR-BDは、SEQ ID NO: 5のアミノ酸配列を含み、(ii) 前記リンカーはポリペプチドであり、(iii) 前記ヒンジは、免疫グロブリンヒンジ領域に由来するポリペプチドであり、(iv) 前記Fcは免疫グロブリンFcポリペプチドである、四価分子；またはe) SEQ ID NO: 4の配列を含むポリペプチドの2つのコピーを含む四価分子を含む、本明細書に記載する抗GITR抗体の何れかを含む。

30

40

【0196】

〔実施例3〕

4T1モデルにおける腫瘍および転移の退縮に対するGITR抗体の効果

さらなる例において、4T1モデルを使用して、CpGの腫瘍内注射と抗GITRの全身性投与の効果求めた。メスBALB/cマウス（6-8週齢）の左右の腹側の側腹部

50

(第4乳房脂肪体の近く)に、 $100\mu\text{L}$ のDPBSに懸濁した約 5×10^4 の4T1マウス乳がん細胞(ATCC Manassas, アメリカ合衆国バージニア州; カタログ番号CRL-2539)を接種する。腫瘍が約 50mm^3 に達した際(および/または移植の約10-14日後)に、腫瘍の1つにCpG ODN 1826(CpG, $10-20\mu\text{g}$, $\sim 0.5-1.0\text{mg/kg}$; Adipogen, アメリカ合衆国カリフォルニア州サンディエゴ; カタログ番号IAX 200-002)を注射する。アゴニスト抗GITRを、腹腔内(つまり、全身に)、 $0.01-0.1\text{mg/kg}$ で投与する。注射腫瘍および非注射腫瘍の腫瘍体積を測定することにより、CpGの腫瘍への直接的な注射が、遠位の非注射腫瘍において、全身投与の抗GITRに対する反応を増加させることを実証する。上記プロトコル(4T1接種と腫瘍の誘発、処置のタイミングおよび期間、なら

10

【0197】

上記プロトコルにおいて使用されるアゴニスト抗GITR抗体は、a) SEQ ID NO: 6の配列を含むCDR1と、SEQ ID NO: 7の配列を含むCDR2と、SEQ ID NO: 8の配列を含むCDR3とを含むGITR結合ドメイン(GITR-BD)を含む抗体; b) SEQ ID NO: 5の配列を含むGITR-BDを含む抗体; c) 構造(GITR-BD)-リンカー-(GITR-BD)-リンカー-ヒンジ-Fcを有するポリペプチドの2つのコピーを含む四価分子であって、(i)前記GITR-BDは、SEQ ID NO: 6の配列を含むCDR1と、SEQ ID NO: 7の配列を含むCDR2と、SEQ ID NO: 8の配列を含むCDR3とを含み、(ii)前記リンカーはポリペプチドであり、(iii)前記ヒンジは、免疫グロブリンヒンジ領域に由来するポリペプチドであり、(iv)前記Fcは免疫グロブリンFcポリペプチドである、四価分子; d) 構造(GITR-BD)-リンカー-(GITR-BD)-リンカー-ヒンジ-Fcを有するポリペプチドの2つのコピーを含む四価分子であって、(i)前記GITR-BDは、SEQ ID NO: 5のアミノ酸配列を含み、(ii)前記リンカーはポリペプチドであり、(iii)前記ヒンジは、免疫グロブリンヒンジ領域に由来するポリペプチドであり、(iv)前記Fcは免疫グロブリンFcポリペプチドである、四価分子; またはe) SEQ ID NO: 4の配列を含むポリペプチドの2つのコピーを含む四価分子を含む、本明細書に記載する抗GITR抗体の何れかを含む。

20

30

【0198】

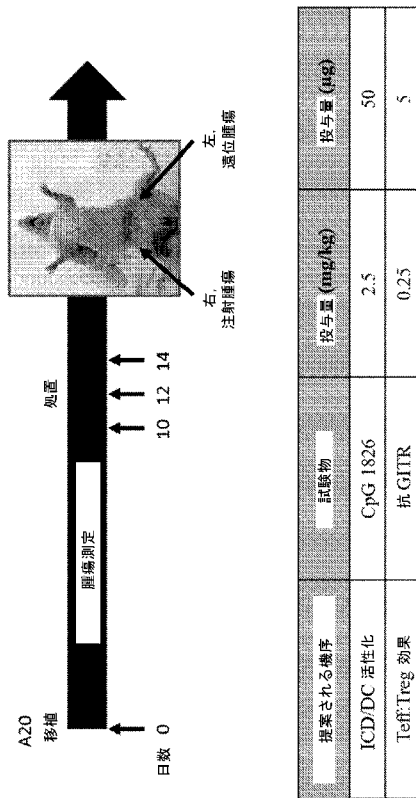
他のモデルを使用して、CpGの腫瘍への直接的な注射が、遠位の非注射腫瘍において、全身投与のGITRアゴニストに対する反応を増加させることを実証することもできる。斯かるモデルはGITRアゴニストに対し反応性であり、斯かるモデルには、B16-F10マウスメラノーマ細胞株(ATCC CRL-6475); MC38マウス大腸腺がん細胞株; およびEMT6マウス乳がん細胞株(ATCC CRL-2755)を使用するモデルが含まれる。

【0199】

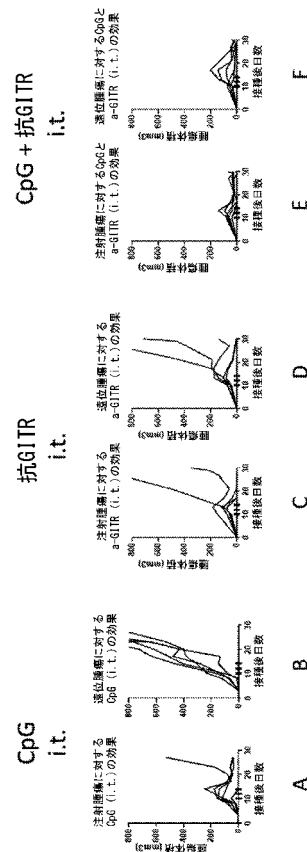
本開示の原理が適用される多くの実行可能な実施形態を鑑み、例示の実施形態は単なる開示例であると理解されるべきであり、本発明の範囲を限定するものととらえるべきではない。むしろ、開示の範囲は以下の請求項により定義される。当社は、そのため、当社の発明として、これらの特許請求の範囲の範囲および趣旨に当てはまるものを全ての特許請求する。

40

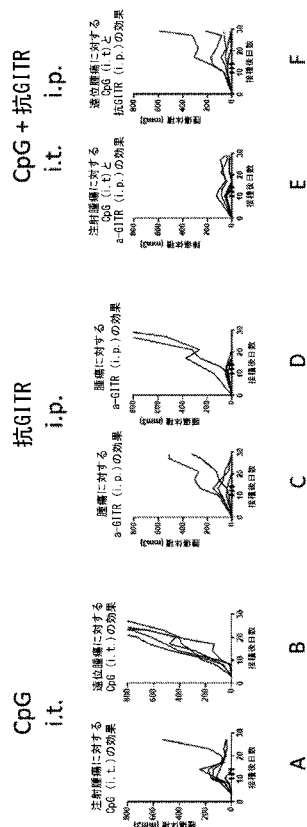
【図 1】



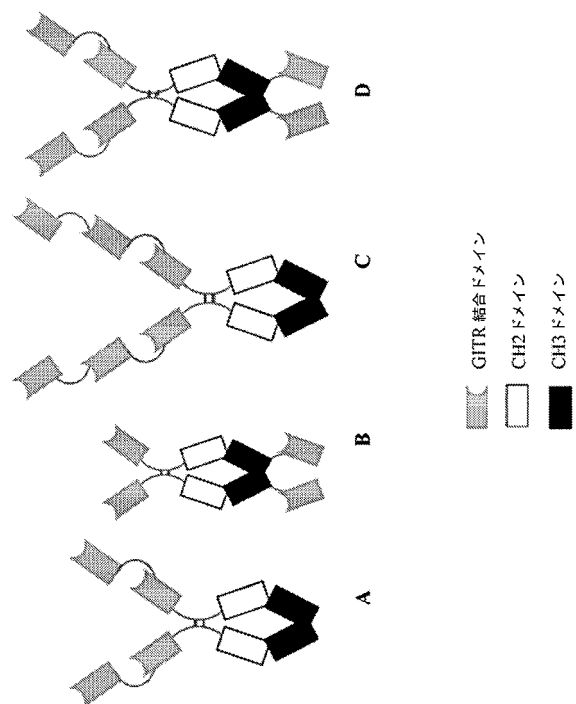
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【配列表】

2019519536000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2017/040259

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/28 A61K35/17 G01N33/50
 ADD. A61K39/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K A61K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 2015/031667 A2 (AMGEN INC [US]) 5 March 2015 (2015-03-05) See example 2, claims -----	1-9, 11-26 10
X A	WO 2015/184099 A1 (4ANTIBODY AG [CH]; SLOAN KETTERING INST CANCER [US]; LUDWIG INST FOR C) 3 December 2015 (2015-12-03) See 407-410, claims -----	1-9, 11-26 10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 August 2017

Date of mailing of the international search report

06/09/2017

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Nauche, Stéphane

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2017/040259

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2015031667 A2	05-03-2015	AU 2014312184 A1	10-03-2016
		CA 2922808 A1	05-03-2015
		CN 105829343 A	03-08-2016
		CR 20160145 A	11-07-2016
		EA 201690504 A1	31-08-2016
		EP 3038651 A2	06-07-2016
		JP 2016530278 A	29-09-2016
		KR 20160044043 A	22-04-2016
		PE 10332016 A1	09-11-2016
		PH 12016500388 A1	16-05-2016
		SG 11201601159S A	30-03-2016
		TW 201605896 A	16-02-2016
		US 2015064204 A1	05-03-2015
		US 2017022285 A1	26-01-2017
		UY 35716 A	27-03-2015
		WO 2015031667 A2	05-03-2015
WO 2015184099 A1	03-12-2015	AU 2015266958 A1	08-12-2016
		CA 2949998 A1	03-12-2015
		EA 201692458 A1	30-06-2017
		EP 3148579 A1	05-04-2017
		KR 20170020819 A	24-02-2017
		PH 12016502345 A1	13-02-2017
		SG 11201609721W A	29-12-2016
		TW 201607958 A	01-03-2016
		US 2015368349 A1	24-12-2015
		WO 2015184099 A1	03-12-2015

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/117 (2010.01)	A 6 1 K 39/395	E
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T
	A 6 1 K 39/395	Y
	A 6 1 K 39/395	V
	C 1 2 N 15/117	Z N A Z
	C 0 7 K 16/28	

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

(72)発明者 スーザン フォイ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 0 8 0 サウス サンフランシスコ オイスター ポイント ブールバード 1 1 1

(72)発明者 トーマス ブレナン
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 0 8 0 サウス サンフランシスコ オイスター ポイント ブールバード 1 1 1

(72)発明者 ダニエル ケラー
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 0 8 0 サウス サンフランシスコ オイスター ポイント ブールバード 1 1 1

F ターム(参考) 4C084 AA19 MA02 MA13 MA31 MA35 MA37 MA43 MA52 MA56 MA57
MA59 MA60 MA63 MA65 MA66 NA05 NA14 ZB261 ZB262 ZC412
ZC751
4C085 AA14 AA16 BB31 BB41 BB43 CC22 CC23 DD62 EE03 GG10
4C086 AA01 AA02 EA16 MA02 MA04 MA65 MA70 NA05 NA14 ZB26
ZC41 ZC75
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 DA76 EA20 EA28 FA72 FA74
GA26