

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2018-8953  
(P2018-8953A)

(43) 公開日 平成30年1月18日(2018.1.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A61K 39/395 (2006.01)	A61K 39/395 E	4B064
A61P 35/00 (2006.01)	A61P 35/00 ZNA	4C085
A61P 43/00 (2006.01)	A61K 39/395 T	4H045
C07K 16/28 (2006.01)	A61P 43/00 111	
C07K 16/46 (2006.01)	C07K 16/28	

審査請求 有 請求項の数 6 O L 外国語出願 (全 42 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-132379 (P2017-132379)  
 (22) 出願日 平成29年7月6日 (2017.7.6)  
 (62) 分割の表示 特願2016-536340 (P2016-536340) の分割  
 原出願日 平成26年8月18日 (2014.8.18)  
 (31) 優先権主張番号 61/867,976  
 (32) 優先日 平成25年8月20日 (2013.8.20)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 596129215  
 メルク・シャープ・アンド・ドーム・コーポレーション  
 Merck Sharp & Dohme Corp.  
 アメリカ合衆国、ニュー・ジャージー・07065-0907 ローウェイ、イースト・リンカーン・アベニュー・126  
 126 East Lincoln Avenue, Rahway, New Jersey 07065-0907 U. S. A.

(74) 代理人 100114188  
 弁理士 小野 誠

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腫瘍免疫のモジュレーション

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 腫瘍の治療のための医薬組成物の提供。

【解決手段】 PD-1またはPD-L1に結合しPD-1活性に拮抗する第1アームと、GITRに結合しGITR活性を刺激する第2アームとを含む二重特異性抗体またはその抗原結合性フラグメントを含む、腫瘍の治療用の医薬組成物。第1アームが、BMS-936558、MK-3475およびMPDL3280Aからの抗原結合性フラグメントから選択される医薬組成物。第2アームが、a) 特定のアミノ酸配列を含む可変重鎖のCDR-H1、CDR-H2及びCDR-H3を含む重鎖、並びにb) 特のアミノ酸配列(アミノ酸31がNであり、アミノ酸57がNである)を含む可変軽鎖のCDR-L1、CDR-L2およびCDR-L3を含む軽鎖を有する医薬組成物。

【選択図】 図1A

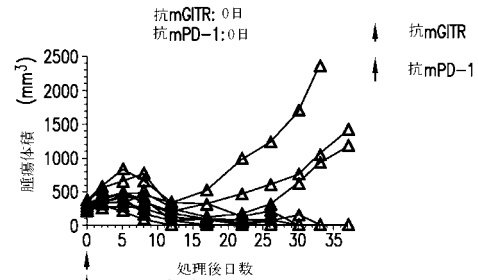


FIG. 1A

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

P D - 1 アンタゴニストおよび G I T R アゴニストを患者に投与することを含む、患者における腫瘍の治療方法であって、P D - 1 アゴニストおよび G I T R アゴニストを同時または連続的に投与する、方法。

## 【請求項 2】

a . P D - 1 アンタゴニストが、P D - 1 または P D - L 1 に結合する抗体またはその抗原結合性フラグメントであり、

b . G I T R アゴニストが、G I T R に結合する抗体またはその抗原結合性フラグメントである、請求項 1 記載の方法。

10

## 【請求項 3】

a . P D - 1 アンタゴニストが、ヒト P D - 1 または P D - L 1 に結合する抗体またはその抗原結合性フラグメントであり、

b . G I T R アゴニストが、ヒト G I T R に結合する抗体またはその抗原結合性フラグメントである、請求項 2 記載の方法。

## 【請求項 4】

該抗体またはその結合性フラグメントがヒト化されているか、または、完全ヒト体である、請求項 3 記載の方法。

## 【請求項 5】

a . P D - 1 アンタゴニストが、B M S - 9 3 6 5 5 8、M K - 3 4 7 5 および M P D L 3 2 8 0 A からなる群から選択され、

20

b . G I T R アゴニストが、

i . 配列番号 1 ~ 6 6 の C D R の少なくとも 1 つを有する抗体、

i i . T R X 5 1 8 および

i i i . T R X 3 8 5

からなる群から選択される、請求項 2 記載の方法。

## 【請求項 6】

G I T R アゴニストが、

a ) 配列番号 1 ~ 1 1 の重鎖 C D R 1、配列番号 1 2 ~ 2 2 の重鎖 C D R 2 および配列番号 2 3 ~ 3 3 の重鎖 C D R 3、ならびに / または

30

b ) 配列番号 3 4 ~ 4 4 の軽鎖 C D R 1、配列番号 4 5 ~ 5 5 の軽鎖 C D R 2 および配列番号 5 6 ~ 6 6 の軽鎖 C D R 3

を有する抗体である、請求項 5 記載の方法。

## 【請求項 7】

G I T R アゴニストが、

a ) 配列番号 6 7、6 9、7 1、7 3、7 5、7 7、7 9、8 1、8 3、8 5 および 8 7 の可変重鎖、ならびに / または

b ) 配列番号 6 8、7 0、7 2、7 4、7 6、7 8、8 0、8 2、8 4、8 6 および 8 8 の可変軽鎖

を有する抗体である、請求項 5 記載の方法。

40

## 【請求項 8】

P D - 1 アンタゴニストおよび G I T R アゴニストを少なくとも 1 回で同時に投与する、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 9】

P D - 1 アンタゴニストおよび G I T R アゴニストを少なくとも 2 回で同時に投与する、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 10】

腫瘍が進行期腫瘍である、請求項 1 記載の方法。

## 【請求項 11】

進行期腫瘍が、扁平上皮癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、胃腸癌、膵臓癌、神経膠芽細胞

50

胞腫、神経膠腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、例えば肝癌および肝細胞癌、膀胱癌、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、骨髄腫（例えば、多発性骨髄腫）、唾液腺癌、腎臓癌、例えば腎細胞癌およびウィルムス腫瘍、基底細胞癌、黒色腫、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、精巣癌ならびに食道癌からなる群から選択される、請求項 10 記載の方法。

【請求項 12】

PD-1 または PD-L1 に結合し PD-1 活性に拮抗する第 1 アームと、GITR に結合し GITR 活性を刺激する第 2 アームとを含む二重特異性抗体またはその抗原結合性フラグメントを患者に投与することを含む、患者における腫瘍の治療方法。

【請求項 13】

a. 第 1 アームが、BMS-936558、MK-3475 および MPDL3280A からの抗原結合性フラグメントからなる群から選択され、

b. 第 2 アームが、

i. 配列番号 1 ~ 66 の CDR の少なくとも 1 つを有する抗体、

ii. TRX518 および

iii. TRX385

からの抗原結合性フラグメントからなる群から選択される、請求項 12 記載の方法。

【請求項 14】

第 2 アームが、

a) 配列番号 1 ~ 11 の重鎖 CDR 1、配列番号 12 ~ 22 の重鎖 CDR 2 および配列番号 23 ~ 33 の重鎖 CDR 3、ならびに / または

b) 配列番号 34 ~ 44 の軽鎖 CDR 1、配列番号 45 ~ 55 の軽鎖 CDR 2 および配列番号 56 ~ 66 の軽鎖 CDR 3

を有する、請求項 13 記載の方法。

【請求項 15】

第 2 アームが、

a) 配列番号 67、69、71、73、75、77、79、81、83、85 および 87 の可変重鎖、ならびに / または

b) 配列番号 68、70、72、74、76、78、80、82、84、86 および 88 の可変軽鎖

を有する、請求項 13 記載の方法。

【請求項 16】

腫瘍が進行期腫瘍である、請求項 12 記載の方法。

【請求項 17】

進行期腫瘍が、扁平上皮癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、胃腸癌、膵臓癌、神経膠芽細胞腫、神経膠腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、例えば肝癌および肝細胞癌、膀胱癌、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、骨髄腫（例えば、多発性骨髄腫）、唾液腺癌、腎臓癌、例えば腎細胞癌およびウィルムス腫瘍、基底細胞癌、黒色腫、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、精巣癌ならびに食道癌からなる群から選択される、請求項 16 記載の方法。

【請求項 18】

PD-1 アンタゴニストと GITR アゴニストとを含む医薬組合せであって、

a) PD-1 アンタゴニストが、BMS-936558、MK-3475 および MPDL3280A からなる群から選択され、

b) GITR アゴニストが、

i. 配列番号 1 ~ 66 の CDR の少なくとも 1 つを有する抗体、

ii. TRX518 および

iii. TRX385

からなる群から選択される、医薬組合せ。

【請求項 19】

進行期腫瘍を治療するための、PD-1 アンタゴニストおよび GITR アゴニストの使用であって、

10

20

30

40

50

a) PD-1アンタゴニストが、BMS-936558、MK-3475およびMPDL3280Aからなる群から選択され、

b) GITRアゴニストが、

i. 配列番号1~66のCDRの少なくとも1つを有する抗体、

ii. TRX518および

iii. TRX385

からなる群から選択される、使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

本発明は進行性腫瘍の治療における腫瘍免疫のモジュレーション（調節）に関する。特に、本発明は、進行性腫瘍の抗腫瘍応答を増強するためにGITRのアゴニストと組合されたPD-1のアンタゴニストを提供する。

【背景技術】

【0002】

腫瘍微小環境は、発癌イニシエーション、腫瘍進行および治療応答に寄与する癌生物学の重要な態様である。免疫系の細胞および分子は腫瘍微小環境の基本成分である。重要なことに、治療戦略は、腫瘍細胞を特異的に標的化するために免疫系を利用することが可能であり、これは、癌患者において長期持続的退縮を引き起こし再発を予防しうる腫瘍特異的免疫記憶の誘導の可能性ゆえに、特に魅力的である。

20

【0003】

腫瘍微小環境の構造および特徴は多種多様であり、抗腫瘍免疫応答の決定において重要である。例えば、ナチュラルキラー細胞、樹状細胞（DC）およびエフェクターT細胞を含む免疫系の或る細胞は強力な抗腫瘍応答を誘導しうる。しかし、腫瘍細胞は、しばしば、免疫抑制性微小環境を誘導し、これは、骨髄由来サプレッサー細胞および調節性T細胞のような免疫細胞の免疫抑制性集団の発生を促進する。腫瘍による免疫モジュレーションの複雑さの理解は免疫療法の開発に重要である。免疫チェックポイントを克服するための抑制性シグナリング経路のアンタゴニストおよびDCに基づくワクチンを含む抗腫瘍免疫応答を増強するための種々の戦略が開発中である。

【0004】

30

TNFRスーパーファミリーのメンバーであるグルココルチコイド誘導性TNFR関連タンパク質（GITR）は後天性および適応免疫系の多数の成分において発現される（例えば、Hanabuchiら（2006）Blood 107:3617-3623；ならびにNocentiniおよびRiccardi（2005）Eur. J. Immunol. 2005.35:1016-1022を参照されたい）。その膜発現はT細胞活性化後に増加し（Hanabuchi, 前掲；ならびにNocentiniおよびRiccardi, 前掲）、その誘発はエフェクターTリンパ球を同時活性化し、調節性T細胞（Treg）活性をモジュレーションする（McHughら,（2002）Immunity 2002.16:311-323；Shimizura（2002）Nat. Immunol. 3:135-142；Ronchettiら（2004）Eur. J. Immunol. 34:613-622；およびToneら（2003）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:15059-15064を参照されたい）。

40

【0005】

GITRはGITRリガンド（GITRL）により活性化され、これは主にAPC上で発現され、その細胞質ドメインによりシグナルを伝達すると示唆されているが、生化学的シグナリングを明らかにするためには更なる研究が必要である（Nocentini, 前掲；Ronchetti, 前掲；Suvasら（2005）J. Virol. 79:11935-11942；およびShinら（2002）Cytokine 19:187-192）。

【0006】

50

GITR活性化は腫瘍およびウイルス感染に対する抵抗性を増強し、自己免疫/炎症過程に關与し、白血球の血管外遊出を調節する(Nocentini, 前掲; Cuzzocreaら(2004) *J. Leukoc. Biol.* 76: 933-940; Shevachら(2006) *Nat. Rev. Immunol.* 6: 613-618; Cuzzocreaら(2006) *J. Immunol.* 177: 631-641; およびCuzzocreaら(2007) *FASEB J.* 21: 117-129)。腫瘍マウスモデルにおいては、アゴニストGITR抗体DTA-1がアンタゴニストCTLA-4抗体と組合され、幾つかの試験群マウスにおいては進行期腫瘍の完全腫瘍退縮において相乗的結果を示した(Koら(2005) *J. Exp. Med.* 7: 885-891)。

#### 【0007】

プログラム死受容体1(PD-1)は、主に活性化TおよびB細胞上で発現される免疫抑制受容体である。そのリガンドとの相互作用はインビトロおよびインビボの両方においてT細胞応答を低減することが示されている。PD-1とそのリガンドの1つであるPD-L1との相互作用の遮断は腫瘍特異的CD8+ T細胞免疫を増強することが示されており、したがって、免疫系による腫瘍細胞の排除に役立つ。

#### 【0008】

PD-1(遺伝子Pdcd1によりコードされる)は、CD28およびCTLA-4に關連した免疫グロブリンスーパーファミリーメンバーである。PD-1は、そのリガンド(PD-L1および/またはPD-L2)の嵌合に際して抗原受容体シグナリングを負に調節することが示されている。マウスPD-1の構造およびヒトPD-L1とのマウスPD-1の共結晶構造が解明されている(Zhang, X.ら(2004) *Immunity* 20: 337-347; Linら(2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 3011-6)。PD-1および類似ファミリーメンバーは、リガンド結合をもたらすIg可変型(V型)ドメインと、シグナリング分子の結合をもたらす細胞質尾部とを含有するI型膜貫通糖タンパク質である。PD-1の細胞質尾部は、チロシンに基づく2つのシグナリングモチーフ、すなわち、ITIM(免疫受容体チロシンに基づく抑制モチーフ)およびITSM(免疫受容体チロシンに基づくスイッチモチーフ)を含有する。

#### 【0009】

ヒトにおいては、PD-1(腫瘍浸潤性リンパ球上)および/またはPD-L1(腫瘍細胞上)の発現が、免疫組織化学により評価された幾つかの原発腫瘍生検において見出されている。そのような組織には、肺、肝臓、卵巣、子宮頸部、皮膚、結腸、神経膠腫、膀胱、乳房、腎臓、食道、胃、口腔扁平上皮、尿路上皮細胞および膵臓の癌ならびに頭頸部の腫瘍が含まれる(Brown, J. A.ら(2003) *J. Immunol.* 170: 1257-1266; Dong H.ら(2002) *Nat. Med.* 8: 793-800; Winterleら(2003) *Cancer Res.* 63: 7462-7467; Strome, S. E.ら(2003) *Cancer Res.* 63: 6501-6505; Thompson, R. H.ら(2006) *Cancer Res.* 66: 3381-5; Thompsonら(2007) *Clin. Cancer Res.* 13: 1757-61; Nomi, T.ら(2007) *Clin. Cancer Res.* 13: 2151-7)。より驚くべきことに、腫瘍細胞上のPD-リガンド発現は複数の腫瘍型にわたる癌患者の不良予後と關連している(OkazakiおよびHonjo(2007) *Int. Immunol.* 19: 813-824において概説されている)。

#### 【0010】

現在までに、PD-1とそのリガンド(PD-L1およびPD-L2)との相互作用はインビトロおよびインビボにおけるリンパ球増殖の抑制を招くことを多数の研究が示している。PD-1/PD-L1相互作用の遮断は腫瘍特異的T細胞免疫の増強を招く可能性があり、したがって、免疫系による腫瘍細胞の排除に役立つであろう。この点を検討するために、幾つかの研究が行われた。侵襲性膵臓癌のマウスモデルにおいて(Nomi, T.ら(2007) *Clin. Cancer Res.* 13: 2151-2157)、

10

20

30

40

50

PD-1/PD-L1遮断の治療効力が示された。PD-1またはPD-L1に対する抗体の投与は腫瘍増殖を有意に抑制した。抗体遮断は、IFNガンマ、グランザイムBおよびパーフォリンを含む抗腫瘍エフェクターのアップレギュレーションをもたらす、腫瘍内への腫瘍反応性CD8+ T細胞浸潤を有効に促進した。また、該著者は、PD-1遮断が化学療法と有効に組合されて相乗効果をもたらしうること示した。もう一つの研究においては、マウスにおける扁平上皮癌のモデルを使用して、PD-1またはPD-L1の抗体遮断が腫瘍増殖を有意に抑制した(Tsushima, F.ら(2006)Oral Oncol. 42:268-274)。

#### 【0011】

腫瘍免疫をモジュレーションする物質の使用により免疫障害および増殖性障害、例えば腫瘍および癌を治療するための改良された方法および組成物が必要とされている。本発明は、進行期腫瘍を治療するためにGITRのアゴニストと組合されたPD-1のアンタゴニストを提供することにより、この要求を満足させるものである。

10

#### 【発明の概要】

#### 【0012】

##### 発明の概括

本発明は、PD-1アンタゴニストおよびGITRアゴニストを患者に投与することを含む、患者における腫瘍の治療方法であって、PD-1アンタゴニストおよびGITRアゴニストを同時または連続的に投与する方法を提供することにより、当技術分野におけるこれらの要求以上のものを満足させるものである。ある実施形態においては、PD-1アンタゴニストは、PD-1またはPD-L1に結合する抗体またはその抗原結合性フラグメントであり、GITRアゴニストは、GITRに結合する抗体またはその抗原結合性フラグメントである。GITRアゴニストおよびPD-1またはPD-L1アンタゴニストは該ヒトタンパク質に結合する。抗体またはその結合性フラグメントはヒト化体であるかまたは完全ヒト体である。

20

#### 【0013】

更に詳細な実施形態においては、PD-1アンタゴニストは、BMS-936558、MK-3475およびMPDL3280Aからなる群から選択され、GITRアゴニストは、配列番号1~66のCDRの少なくとも1つを有する抗体、TRX518およびTRX385からなる群から選択される。GITRアゴニストは、配列番号1~11の重鎖CDR1、配列番号12~22の重鎖CDR2および配列番号23~33の重鎖CDR3ならびに/または配列番号34~44の軽鎖CDR1、配列番号45~55の軽鎖CDR2および配列番号56~66の軽鎖CDR3を有する抗体でありうる。更に詳細な実施形態においては、GITRアゴニストは、配列番号67、69、71、73、75、77、79、81、83、85および87の可変重鎖ならびに/または配列番号68、70、72、74、76、78、80、82、84、86および88の可変軽鎖を有する抗体である。

30

#### 【0014】

本発明はまた、PD-1アンタゴニストおよびGITRアゴニストを少なくとも1回で同時に投与することを想定している。ある実施形態においては、PD-1アンタゴニストおよびGITRアゴニストを少なくとも2回で同時に投与する。ある実施形態においては、腫瘍は進行期腫瘍であり、扁平上皮癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、胃腸癌、膵臓癌、神経膠芽細胞腫、神経膠腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、例えば肝癌および肝細胞癌、膀胱癌、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、骨髄腫(例えば、多発性骨髄腫)、唾腺癌、腎臓癌、例えば腎細胞癌およびウィルムス腫瘍、基底細胞癌、黒色腫、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、精巣癌ならびに食道癌からなる群から選択されうる。

40

#### 【0015】

本発明は、PD-1またはPD-L1に結合しPD-1活性に拮抗する第1アームと、GITRに結合しGITR活性を刺激する第2アームとを含む二重特異性抗体を患者に投与することによる腫瘍の治療方法を提供する。ある実施形態においては、第1アームは、

50

BMS - 936558、MK - 3475およびMPDL3280Aからの抗原結合性フラグメントからなる群から選択され、第2アームは、配列番号1~66のCDRの少なくとも1つを有する抗体、TRX518およびTRX385からの抗原結合性フラグメントからなる群から選択される。更にもう1つの実施形態においては、第2アームは、配列番号1~11の重鎖CDR1、配列番号12~22の重鎖CDR2および配列番号23~33の重鎖CDR3ならびに/または配列番号34~44の軽鎖CDR1、配列番号45~55の軽鎖CDR2および配列番号56~66の軽鎖CDR3を有する。ある実施形態においては、第2アームは配列番号67、69、71、73、75、77、79、81、83、85および87の可変重鎖ならびに/または配列番号68、70、72、74、76、78、80、82、84、86および88の可変軽鎖を有する。

10

## 【0016】

本発明は、進行期腫瘍である腫瘍の治療方法を提供する。ある実施形態においては、進行期腫瘍は、扁平上皮癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、胃腸癌、膵臓癌、神経膠芽細胞腫、神経膠腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、例えば肝臓癌および肝細胞癌、膀胱癌、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、骨髄腫（例えば、多発性骨髄腫）、唾液腺癌、腎臓癌、例えば腎細胞癌およびウィルムス腫瘍、基底細胞癌、黒色腫、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、精巣癌ならびに食道癌からなる群から選択されうる。

## 【0017】

本発明は、PD-1アンタゴニストとGITRアゴニストとを含む医薬組成物を提供する。また、進行期腫瘍を治療するための、GITRアゴニストと組合されたPD-1アンタゴニストの使用を提供する。

20

## 【0018】

## 詳細な説明

添付の特許請求の範囲を含む本明細書において用いる単数形の単語は、文脈に明らかに矛盾しない限り、それらの対応複数形対象物を含む。後記の表15は、本出願において用いられる配列表の一覧を示す。本明細書中で引用されている全ての参照文献を、各個の刊行物、データベースエントリー（例えば、GenBank配列またはGeneIDエントリー）、特許出願または特許が参照により本明細書に組み入れられると具体的かつ個別に示されている場合と同様に、参照により本明細書に組み入れることとする。本明細書における参照文献の引用は、前記のいずれかが関連先行技術であると自認するものとは意図されず、また、それは、これらの刊行物または文書の内容または日付に関するいずれの自認にも相当しない。

30

## 【0019】

## I. 定義

「グルココルチコイド誘導性TNF受容体」（本明細書においては「GITR」と略される）は、本明細書中で用いるTNF受容体スーパーファミリー18（TNFRSF18）、TEASRおよび312C2としても公知であり、腫瘍壊死因子/神経成長因子受容体ファミリーのメンバーを意味する。GITRは、細胞外ドメイン内の3つのシステイン偽反復配列により特徴づけられる241アミノ酸のI型膜貫通タンパク質であり、T細胞受容体誘導性アポトーシスを特異的に防御する。尤も、それは、他のアポトーシスシグナル、例えばFas惹起、デキサメタゾン処理またはUV照射から細胞を防御しない（Nocentini, G.ら（1997）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:6216-622）。3つのスプライス変異体が存在するヒトGITR（hGITR）の核酸およびアミノ酸配列が公知であり、例えば、GenBankアクセッション番号gi:40354198、gi:23238190、gi:23238193およびgi:23238196において見出されうる。

40

## 【0020】

「GITRアゴニスト」は、GITRシグナリングの活性化を介して免疫反応を刺激する任意の化合物または生物学的分子を意味する。アゴニスト抗GITR抗体の配列はWO 2011/028683およびWO 2006/105021ならびにTRX-385

50

およびTRX-518において示されている。また、GITR結合相手である可溶性GITR-Lタンパク質も想定される。

【0021】

「PD-1アンタゴニスト」は、免疫細胞（T細胞、B細胞またはNK細胞）上で発現されるPD-1への癌細胞上で発現されるPD-L1の結合を遮断する、そして好ましくは、免疫細胞により発現されるPD-1への癌細胞上で発現されるPD-L2の結合をも遮断する任意の化合物または生物学的分子を意味する。PD-1およびそのリガンドの別名または同義語には以下のものが含まれる：プログラム死受容体1；PD-1に関するPDCD1、PD1、CD279およびSLEB2；PD-L1に関するPDCD1L1、PDL1、B7H1、B7-4、CD274およびB7-H；ならびにPD-L2に関するプログラム死受容体リガンド1、PDCD1L2、PDL2、B7-DC、BtdcおよびCD273。ヒト個体が治療される本発明の治療方法、医薬および使用のいずれにおいても、PD-1アンタゴニストはヒトPD-1へのヒトPD-L1の結合を遮断し、そして好ましくは、ヒトPD-1へのヒトPD-L1およびPD-L2の両方の結合を遮断する。ヒトPD-1アミノ酸配列は、それぞれ、NCBIローカス(Locus)番号：NP\_\_054862およびNP\_\_079515において見出されうる。

10

【0022】

本発明の治療方法、医薬および使用のいずれかにおいて有用なPD-1アンタゴニストには、PD-1またはPD-L1に特異的に結合する、そして好ましくはヒトPD-1またはヒトPD-L1に特異的に結合するモノクローナル抗体(mAb)またはその抗原結合性フラグメントが含まれる。該mAbはヒト抗体、ヒト化抗体またはキメラ抗体であることが可能であり、ヒト定常領域を含みうる。幾つかの実施形態においては、ヒト定常領域は、IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4定常領域からなる群から選択され、好ましい実施形態においては、ヒト定常領域はIgG1またはIgG4定常領域である。幾つかの実施形態においては、抗原結合性フラグメントは、Fab、Fab'-SH、F(ab')<sub>2</sub>、scFvおよびFvフラグメントからなる群から選択される。

20

【0023】

PD-1に結合し、本発明の治療方法、医薬および使用において有用であるmAbの例はUS7521051、US8008449およびUS8354509に記載されている。本発明の治療方法、医薬および使用におけるPD-1アンタゴニストとして有用である具体的な抗ヒトPD-1 mAbには、WHO Drug Information, Vol. 27, No. 2, pp. 161-162 (2013)に記載されている構造を有し図6に示されている重鎖および軽鎖アミノ酸配列を含むヒト化IgG4 mAbであるMK-3475、WHO Drug Information, Vol. 27, No. 1, pp. 68-69 (2013)に記載されている構造を有し図7に示されている重鎖および軽鎖アミノ酸配列を含むヒトIgG4 mAbであるニボルマブ(nivolumab)(BMS-936558)；ピジリズマブ(pidilizumab)(hBATまたはhBAT-1としても公知であるCT-011)；ならびにWO2008/156712に記載されているヒト化抗体h409A11、h409A16およびh409A17が含まれる。

30

40

【0024】

ヒトPD-L1に結合し、本発明の治療方法、医薬および使用において有用であるmAbの例はWO2013/019906、WO2010/077634 A1およびUS8383796に記載されている。本発明の治療方法、医薬および使用においてPD-1アンタゴニストとして有用である具体的な抗ヒトPD-L1 mAbには、MPDL3280A、BMS-936559、MEDI4736、MSB0010718C、ならびにWO2013/019906のそれぞれ配列番号24および配列番号21重鎖および軽鎖可変領域を含む抗体が含まれる。

【0025】

本明細書中で用いる「投与」なる語は、GITRアゴニストと少なくとも1つの癌治療

50



剤、例えばPD-1アンタゴニストとを含む組成物の、癌患者への物理的導入を意味する。導入のあらゆる方法が本発明において想定され、該方法は、いずれの特定の導入手段にも依存しない。導入手段は当業者によく知られており、それらの例は本明細書に記載されている。

【0026】

本明細書中で用いる「共投与」なる語は、GITRアゴニストと少なくとも1つの追加的な癌治療剤、例えばPD-1アンタゴニストとの組合せが同一患者に投与される過程を意味する。GITRアゴニストおよびPD-1アンタゴニストは同時または連続的に投与されうる。投与が連続的に行われる場合、GITRアゴニストおよび/またはPD-1アンタゴニストは、与えられた追加的な癌治療剤または治療の前または後に投与されうる。GITRアゴニストおよびPD-1アンタゴニスト治療は、同じビヒクルを使用して投与される必要はない。GITRアゴニストおよびPD-1アンタゴニストは1回以上投与可能であり、該組合せの各成分の投与回数は同じ又は異なりうる。また、GITRアゴニストおよびPD-1アンタゴニストは同一部位において投与される必要はない。

10

【0027】

本明細書中で用いる「治療的有効量」または「治療的に有効な組合せ」なる語は、個体の全身免疫応答をモジュレーションする、例えば刺激するのに十分である、追加的な治療剤または治療（例えば、PD-1アンタゴニスト）の量または用量と一緒にしたGITRアゴニストの量または用量を意味する。与えられた治療的に有効な組合せにおける各分子の量は個体および腫瘍型によって異なることがあり、該組合せに含まれる1以上の追加的な治療剤または治療に左右されるであろう。「治療的有効量」は、「治療結果の改善」がもたらされるように、当業者により通常用いられている手法を用いて決定される。

20

【0028】

本明細書中で用いる、癌に関する「治療結果の改善」および「治療効力の増強」なる語は、癌細胞または固形腫瘍の成長の減速または退縮、あるいは癌細胞の総数または総腫瘍量の減少を意味する。したがって、「治療結果の改善」または「治療効力の増強」は、例えば腫瘍サイズの減少、腫瘍進行までの時間の増加、無進行生存期間の増加、総生存時間の増加、余命の増加または生活の質の改善を含むいずれかの臨床的に許容される基準に基づく患者の状態における改善が認められることを意味する。特に、「改善」または「増強」は、治療結果または効力のいずれかの臨床的に許容される指標の1%、5%、10%、25%、50%、75%、100%の又は100%を超える改善または増強を意味する。

30

【0029】

本明細書中で用いる「抗体」なる語は、所望の生物活性を示す任意の形態の抗体を意味する。したがって、それは最も広い意味で用いられ、特に、所望の生物活性を示すモノクローナル抗体（完全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、キメラ抗体、ヒト化抗体、完全ヒト抗体などを含む。

【0030】

本明細書中で用いる「GITR、PD-1またはPD-L1結合性フラグメント」、「それらの結合性フラグメント」または「それらの抗原結合性フラグメント」なる語は、本明細書中で「GITR誘導活性」と称されるGITRシグナリングを誘導する抗体の生物活性を尚も保有する、抗体のフラグメントまたは誘導体を含む。あるいは、PD-1またはPD-L1結合性フラグメントは、PD-1活性（例えば、PD-L1またはPD-L2への結合）を抑制する抗体のフラグメントまたは誘導体を含む。「抗体フラグメント」またはGITR、PD-1もしくはPD-L1結合性フラグメントなる語は、完全長抗体の一部分、一般に、その抗原結合性または可変領域を意味する。抗体フラグメントの例には、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>およびFvフラグメント；ジアボディ；直鎖状抗体；一本鎖抗体分子、例えばsc-Fv；ならびに抗体フラグメントから形成される多重特異性抗体が含まれる。典型的には、結合性フラグメントまたは誘導体はそのGITRアゴニスト活性の少なくとも10%を保有する。所望の生物学的効果を発揮するのに十分なアフィニティを有するいずれの結合性フラグメントも有用であるが、好ましくは、結合性

40

50

フラグメントまたは誘導体はそのGITRアゴニスト活性またはPD-1アンタゴニスト活性の少なくとも25%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%または100%(またはそれ以上)を保有する。GITR、PD-1またはPD-L1結合性フラグメントは、その生物活性を実質的に変更しない保存アミノ酸置換を有する変異体を含みうることも意図される。

#### 【0031】

本明細書中で用いる「モノクローナル抗体」なる語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を意味する。すなわち、該集団を構成する個々の抗体は、少量で存在しうる可能な天然に生じる突然変異以外は同一である。モノクローナル抗体は単一の抗原エピトープに対して高度に特異的である。これとは対照的に、通常の(ポリクローナル)抗体調製物は、典型的には、種々のエピトープに対する(または特異的な)多数の抗体を含む。「モノクローナル」なる修飾語は、実質的に均一な抗体集団から得られたという、抗体の特性を示し、いずれかの特定の方法による該抗体の産生を要すると解釈されるべきではない。例えば、本発明に従い使用されるモノクローナル抗体は、Kohlerら(1975)Nature 256:495に最初に記載されたハイブリドーマ法により製造されることが可能であり、あるいは組換えDNA法により製造されることが可能である(例えば、米国特許第4,816,567号を参照されたい)。「モノクローナル抗体」は、例えばClacksonら(1991)Nature 352:624-628およびMarksら(1991)J.Mol.Biol.222:581-597に記載されている技術を用いるファージ抗体ライブラリーからも単離されうる。

10

20

#### 【0032】

本明細書におけるモノクローナル抗体には、所望の生物活性を示す限り、重鎖および/または軽鎖の一部が、特定の種に由来する又は特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応配列と同一または相同である一方で、該鎖の残部が、別の種に由来する又は別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応配列と同一または相同である「キメラ」抗体(免疫グロブリン)、ならびにそのような抗体のフラグメントが含まれる(米国特許第4,816,567号;Morrissonら(1984)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:6851-6855)。

#### 【0033】

「ドメイン抗体」は、重鎖の可変領域または軽鎖の可変領域のみを含有する免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントである。幾つかの場合には、2以上のV<sub>H</sub>領域がペプチドリンカーと共有結合して2価ドメイン抗体を形成している。2価ドメイン抗体の、2つのV<sub>H</sub>領域は、同じ又は異なる抗原を標的としうる。

30

#### 【0034】

「2価抗体」は2つの抗原結合部位を含む。幾つかの場合には、それらの2つの結合部位は同じ抗原特異性を有する。しかし、2価抗体は二重特異性でありうる(後記を参照されたい)。

#### 【0035】

本明細書中で用いる「一本鎖Fv」または「scFv」抗体なる語は、抗体のV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ドメインを含む抗体フラグメントを意味し、ここで、これらのドメインは単一ポリペプチド鎖内に存在する。一般に、Fvポリペプチドは更に、該scFvが抗原結合のための所望の構造を形成するのを可能にする、V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>ドメイン間のポリペプチドリンカーを含む。scFvの概説としては、Pluckthun(1994)THE PHARMACOLOGY OF MONOCLONAL ANTIBODIES, vol. 113, RosenburgおよびMoore編, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315を参照されたい。

40

#### 【0036】

本明細書におけるモノクローナル抗体には、ラクダ化単一ドメイン抗体も含まれる。「ドメイン抗体フラグメント」は、重鎖の可変領域または軽鎖の可変領域のみを含有する免疫学的に機能的な免疫グロブリンフラグメントである。幾つかの場合には、2以上のV<sub>H</sub>

50

領域がペプチドリンカーと共有結合して多価ドメイン抗体フラグメントを形成している。2価ドメイン抗体の、2つの $V_H$ 領域は、同じ又は異なる抗原を標的としうる。例えば、Muyldermansら(2001) Trends Biochem. Sci. 26: 230; Reichmannら(1999) J. Immunol. Methods 231: 25; WO 94/04678; WO 94/25591; 米国特許第6,005,079号)を参照されたい。1つの実施形態においては、本発明は、単一ドメイン抗体が形成されるような修飾を伴う2つの $V_H$ ドメインを含む単一ドメイン抗体を提供する。

#### 【0037】

本明細書中で用いる「ジアボディ」なる語は、2つの抗原結合部位を有する小型抗体フラグメントを意味し、該フラグメントは、同一ポリペプチド鎖内で軽鎖可変ドメイン( $V_L$ )に連結された重鎖可変ドメイン( $V_H$ )を含む( $V_H - V_L$ または $V_L - V_H$ )。同一鎖上の2つのドメイン間のペア形成を可能にするには短すぎるリンカーを用いることにより、それらのドメインは別の鎖の相補的ドメインとのペア形成を強要され、2つの抗原結合部位を形成する。ジアボディは、例えばEP 404,097、WO 93/11161およびHolligerら(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448に更に詳しく記載されている。操作された抗体変異体の概説としては、全般的には、HolligerおよびHudson(2005) Nat. Biotechnol., 23: 1126-1136を参照されたい。

#### 【0038】

本明細書中で用いる「ヒト化抗体」なる語は、非ヒト(例えば、マウス)抗体およびヒト抗体からの配列を含有する抗体の形態を意味する。そのような抗体は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含有する。一般に、該ヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含み、ここで、超可変ループの全て又は実質的に全ては非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、FR領域の全て又は実質的に全てはヒト免疫グロブリン配列のものである。ヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域( $F_c$ )(典型的にはヒト免疫グロブリンのもの)の少なくとも一部分を含んでいてもよい。接頭辞「hum」、「hu」または「h」は、ヒト化抗体を親げっ歯類抗体から区別するために、必要に応じて、抗体クローンの名称に付加される。アフィニティーを増加させるため、またはヒト化抗体の安定性を増強するため、または他の理由により、あるアミノ酸置換が含まれうるが、げっ歯類抗体のヒト化形態は、一般に、該親げっ歯類抗体の同一CDR配列を含む。

#### 【0039】

「完全ヒト抗体」なる語は、ヒト免疫グロブリンタンパク質配列のみを含む抗体を意味する。完全ヒト抗体は、マウスにおいて、またはマウス細胞において、またはマウス細胞由来のハイブリドーマにおいて産生された場合には、マウス炭水化物鎖を含有しうる。同様に、「マウス抗体」または「ラット抗体」は、それぞれ、マウスまたはラット免疫グロブリン配列のみを含む抗体を意味する。完全ヒト抗体は、ヒトにおいて、またはヒト免疫グロブリン生殖系列配列を有するトランスジェニック動物において、またはファージディスプレイもしくは他の分子生物学的方法により産生されうる。抗体を製造するために用いられうる典型的な技術は米国特許第6,150,584号、第6,458,592号、第6,420,140号に記載されている。ライブラリーの使用のような他の技術は当技術分野で公知である。

#### 【0040】

本発明の抗体には、エフェクター機能の改変をもたらすために修飾された(または遮蔽された) $F_c$ 領域を有する抗体も含まれる。例えば、米国特許第5,624,821号、WO 2003/086310、WO 2005/120571、WO 2006/0057702、Presta(2006) Adv. Drug Delivery Rev. 58: 640-656を参照されたい。そのような修飾は、診断および療法における可能な有益な効果を伴って免疫系の種々の反応を増強または抑制するために用いられうる。 $F_c$ 領域の改変には、アミノ酸変化(置換、欠失および挿入)、グリコシル化または脱グリ

10

20

30

40

50

コシル化および複数のFcの付加が含まれる。該Fcに対する改変は治療用抗体における抗体の半減期をも変化させる。より長い半減期はより低頻度の投与につながり、それに伴い、簡便さの向上および物質の使用量の減少をもたらすであろう。Presta (2005) J. Allergy Clin. Immunol. 116: 731 (734-35) を参照されたい。

#### 【0041】

本発明の抗体には、完全エフェクター機能をもたらす無傷Fc領域を有する抗体、例えば、イソタイプIgG1の抗体も含まれ、これは標的細胞において補体依存性細胞傷害(CDC)または抗体依存性細胞性細胞傷害(ADCC)を誘導する。

#### 【0042】

本発明の抗体には、細胞傷害性(細胞毒性)積荷(payload)、例えば細胞傷害性物質または放射性核種にコンジュゲート化(結合)された抗体も含まれる。そのような抗体コンジュゲートは、ある抗原を表面上で発現する細胞を選択的に標的化し殺すために抗GITR、抗PD-1または抗PD-L1治療と共に使用されう。典型的な細胞傷害性物質には、リシン、ピンカアルカロイド、メトトレキサート、シュードモナス(Pseudomonas)外毒素、サポニン、ジフテリア毒素、シスプラチン、ドキシソルブシン、アブリン毒素、ゲロニンおよび洋種ヤマガボウ抗ウイルス性タンパク質が含まれる。本発明の抗体と共に免疫療法において使用される典型的な放射性核種には、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>90</sup>Y、<sup>67</sup>Cu、<sup>211</sup>At、<sup>177</sup>Lu、<sup>143</sup>Prおよび<sup>213</sup>Biが含まれる。例えば、米国特許出願公開第2006/0014225号を参照されたい。

#### 【0043】

二重特異性抗体も本方法および組成物において有用である。本明細書中で用いる「二重特異性抗体」なる語は、少なくとも2つの異なる抗原エピトープに対する結合特異性を有する抗体、典型的にはモノクローナル抗体を意味する。1つの実施形態においては、該エピトープは同一抗原からのものである。もう1つの実施形態においては、該エピトープは2つの異なる抗原からのものである。二重特異性抗体の製造方法は当技術分野で公知である。例えば、二重特異性抗体は、2つの免疫グロブリン重鎖/軽鎖ペアの共発現を用いて組換え製造されう。例えば、Milsteinら(1983) Nature 305: 537-39を参照されたい。あるいは、二重特異性抗体は、化学的連結を用いて製造されう。例えば、Brennanら(1985) Science 229: 81を参照されたい。二重特異性抗体には、二重特異性抗体フラグメントが含まれる。例えば、Holligerら(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 6444-48、Gruberら(1994) J. Immunol. 152: 5368を参照されたい。

#### 【0044】

「多重特異性」なる語は、2以上の標的抗原に対する特異性を有する結合性分子を含む。そのような分子は、異なる標的分子または同一標的上の異なる抗原部位と各結合部位が特異的に結合する(例えば、免疫反応する)2以上の結合部位を有する。1つの実施形態においては、本発明の多重特異性結合性分子は、少なくとも2つの標的、例えば2以上の標的分子または同一標的分子上の2以上のエピトープに対する結合特異性を有する二重特異性分子(例えば、抗体、小型抗体、ドメイン欠失抗体または融合タンパク質)である。

#### 【0045】

本明細書中で用いる「超可変領域」なる語は、抗原結合をもたらす、抗体のアミノ酸残基を意味する。超可変領域は、「相補性決定領域」、すなわち「CDR」からのアミノ酸残基、例えば、軽鎖可変ドメイン内の残基24-34(CDR L1)、50-56(CDR L2)および89-97(CDR L3)ならびに重鎖可変ドメイン内の残基31-35(CDR H1)、50-65(CDR H2)および95-102(CDR H3)(Kabataら, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bet

10

20

30

40

50

h e s d a , M d . )、ならびにノまたは「超可変ループ」からの残基、例えば、軽鎖可変ドメイン内の残基 26 - 32 ( L 1 )、50 - 52 ( L 2 ) および 91 - 96 ( L 3 ) ならびに重鎖可変ドメイン内の 26 - 32 ( H 1 )、53 - 55 ( H 2 ) および 96 - 101 ( H 3 ) ( C h o t h i a および L e s k ( 1 9 8 7 ) J . M o l . B i o l . 1 9 6 : 9 0 1 - 9 1 7 ) を含む。本明細書中で用いる「フレームワーク」または「FR」残基なる語は、本明細書中でCDR残基として定められた超可変領域残基以外の可変ドメイン残基を意味する。前記の残基番号づけはK a b a t 番号づけ体系によるものである。

【0046】

「結合性化合物」は、標的に結合しうる分子、小分子、巨大分子、ポリペプチド、抗体またはそのフラグメントもしくは類似体あるいは可溶性受容体を意味する。「結合性化合物」は、標的に結合しうる、分子の複合体、例えば非共有結合性複合体、イオン化分子、および共有結合または非共有結合により修飾された分子、例えばリン酸化、アシル化、架橋、環化または限定的な切断により修飾された分子をも意味する。抗体に関して用いる場合の「結合性化合物」なる語は抗体およびその抗原結合性フラグメントの両方を意味する。「結合」は結合性組成物と標的との会合を意味し、ここで、該結合性組成物が溶液中に溶解または懸濁されうる場合、該会合は該結合性組成物の正常なブラウン運動における低下をもたらす。「結合性組成物」は、安定剤、賦形剤、塩、バッファー、溶媒または添加剤と組合された、標的に結合しうる分子、例えば結合性化合物を意味する。

10

【0047】

本明細書中で用いる「保存修飾変異体」または「保存置換」は、当業者に公知のアミノ酸の置換を意味し、生じる抗体の生物活性を改変することなく該抗体の必須領域においてさえもしばしば施されうる。そのような典型的な置換は、好ましくは、以下のとおりに表1に記載されているものに従い施される。

20

【表 1】

表1  
典型的な保存アミノ酸置換

元の残基	保存的置換
Ala (A)	Gly; Ser
Arg (R)	Lys, His
Asn (N)	Gln; His
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; His
Met (M)	Leu; Ile; Tyr
Phe (F)	Tyr; Met; Leu
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu

10

20

30

## 【0048】

一般に、ポリペプチドの非必須領域における単一のアミノ酸の置換は生物活性を実質的に改変し得ない、と当業者に認識されている。例えば、Watsonら, (1987) Molecular Biology of the Gene, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (4th Edition) を参照されたい。

## 【0049】

本明細書および特許請求の範囲の全体にわたって用いる「からなる」なる語またはその変形、例えば「から実質的になる」もしくは「から実質的になり」は、任意の列挙されている要素または要素群の包含、および特定されている投与計画、方法または組成物の基本的または新規特性を実質的に変化させない、列挙されている要素と類似した又は異なる性質の他の要素の随意的包含を示す。非限定的な例としては、列挙されているアミノ酸配列から実質的になる結合性化合物は、該結合性化合物の特性に実質的に影響を及ぼさない、1以上のアミノ酸残基の置換を含む、1以上のアミノ酸をも含むうる。

40

## 【0050】

「免疫状態」または「免疫障害」は、例えば病的炎症、炎症障害および自己免疫障害または疾患を含む。「免疫状態」は、感染、持続的感染および増殖性状態、例えば癌、腫瘍および血管新生をも意味し、免疫系による根絶に対する抵抗性を示す感染、腫瘍および癌をも含む。「癌状態」は、例えば、癌、癌細胞、腫瘍、血管新生および前癌状態、例えば過形成を含む。

50

## 【0051】

「増殖活性」は、例えば正常な細胞分裂ならびに癌、腫瘍、異形成、細胞トランスフォーメーション、転移および血管新生を促進する、それらに必要である、またはそれらに特異的に関連した活性を含む。

## 【0052】

「癌」、「腫瘍」、「癌性」および「悪性」なる語は、無制御な細胞増殖により典型的に特徴づけられる哺乳動物における生理学的状態を意味し又は示す。癌の例には、癌腫、例えば腺癌、リンパ腫、芽細胞腫、メラノーマ、肉腫および白血病が含まれるが、これらに限定されるものではない。そのような癌のより詳細な例には以下のものが含まれる：扁平上皮癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、胃腸癌、膵臓癌、神経膠芽細胞腫、神経膠腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、例えば肝癌および肝細胞癌、膀胱癌、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、骨髄腫（例えば、多発性骨髄腫）、唾液腺癌、腎臓癌、例えば腎細胞癌およびウィルムス腫瘍、基底細胞癌、黒色腫、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、精巣癌および食道癌、ならびに種々のタイプの頭頸部癌。

10

## 【0053】

癌細胞が成長し増殖するにつれて、それらは癌組織の塊、すなわち腫瘍を形成し、それは正常隣接組織に浸潤し、該組織を破壊する。悪性腫瘍は癌である。悪性腫瘍は、通常、除去されうるが、それは再び成長しうる。悪性腫瘍からの細胞は近傍組織および器官に浸潤し、それらを損傷しうる。また、癌細胞は悪性腫瘍から離れ、血流またはリンパ系に進入し、このようにして、癌細胞は原発腫瘍（すなわち、元の癌）から広がって、他の器官において新たな腫瘍を形成する。体内の癌の広がりとは転移と称される（What You Need to Know About Cancer - an Overview, NIH Publication No. 00-1566; 2000年9月26日付け発行, 2002年9月16日付け改訂（2002））。

20

## 【0054】

本明細書中で用いる「固形（充実性）腫瘍」なる語は、嚢胞または液体領域を通常は含有しない、組織の異常成長または塊を意味する。固形腫瘍は良性（非癌性）または悪性（癌性）でありうる。種々のタイプの固形腫瘍が、それらを形成する細胞のタイプにちなんで命名されている。固形腫瘍の例としては、肉腫、癌腫およびリンパ腫が挙げられる。白血病（血液の癌）は、一般に、固形腫瘍を形成しない（National Cancer Institute, Dictionary of Cancer Terms）。

30

## 【0055】

「腫瘍量」は「腫瘍負荷」とも称され、全身に分布する腫瘍物質の総量を意味する。腫瘍負荷はリンパ節および骨髄を含む身体全体にわたる癌細胞の総数または腫瘍の全サイズを意味する。腫瘍負荷は当技術分野で公知の種々の方法により決定可能であり、例えば、被験者からの摘除に際して例えばカリパスを使用して、あるいはイメージング技術、例えば超音波、骨スキャン、コンピュータ断層撮影（CT）または磁気共鳴撮像（MRI）スキャンを用いて全身において、腫瘍の寸法を測定することにより決定されうる。

## 【0056】

「腫瘍サイズ」なる語は、腫瘍の長さおよび幅として測定されうる腫瘍の全サイズを意味する。腫瘍サイズは技術分野で公知の種々の方法により決定可能であり、例えば、被験者からの摘除に際して例えばカリパスを使用して、あるいはイメージング技術、例えば骨スキャン、超音波、CTまたはMRIスキャンを用いて全身において、腫瘍の寸法を測定することにより決定されうる。

40

## 【0057】

本明細書中で用いる「原発癌」なる語は元の腫瘍または最初の腫瘍を意味する。癌は身体のいずれかの器官または組織において生じうる。それは通常、それが由来する身体部分または細胞のタイプにちなんで命名される（Metastatic Cancer: Questions and Answers, Cancer Facts 6.20, National Cancer Institute, 2004年9月1日付けの総説（2

50

004) )。

【0058】

本明細書中で用いる「*in situ* (原位置) 癌腫」なる語は、それが成長し始めた組織内に尚も含有されており未だ浸潤性になっておらず身体の他の部分に広がっていない癌細胞を意味する。

【0059】

本明細書中で用いる「癌腫」なる語は、身体の表面を覆いホルモンを産生し腺を形成する細胞である上皮細胞の癌を意味する。癌腫の例としては、皮膚、肺、結腸、胃、乳房、前立腺および甲状腺の癌が挙げられる。

【0060】

本明細書中で用いる「単離された核酸分子」なる語は、該抗体核酸の天然源において通常付随している少なくとも1つの混入核酸分子から分離されており特定されている核酸分子を意味する。単離された核酸分子は、それが天然で見出される形態または状況以外のものである。したがって、単離された核酸分子は、天然細胞内に存在する核酸分子とは区別される。しかし、単離された核酸分子には、該抗体を通常発現する細胞内に含有される核酸分子が含まれ、例えば、該核酸分子は、天然細胞の場合とは異なる染色体位置に存在する。

【0061】

「制御配列」なる表現は、特定の宿主生物における、機能的に連結されたコード配列の発現に關与するDNA配列を意味する。原核生物に適した制御配列には、例えば、プロモーター、場合によってはオペレーター配列、およびリボソーム結合部位が含まれる。真核細胞はプロモーター、ポリアデニル化シグナルおよびエンハンサーを用いることが公知である。

【0062】

核酸が「機能的に連結」されていると言えるのは、それが別の核酸配列に対して機能的な関係で配置されている場合である。例えば、プレ配列または分泌リーダーのDNAがポリペプチドのDNAに機能的に連結されていると言えるのは、それが、該ポリペプチドの分泌に關与するプレタンパク質として発現される場合であり、プロモーターまたはエンハンサーがコード配列に機能的に連結されていると言えるのは、それが該配列の転写に影響を及ぼす場合であり、あるいはリボソーム結合部位がコード配列に機能的に連結されていると言えるのは、翻訳を促進するようにそれが位置している場合である。一般に、「機能的に連結(されている)」は、連結されているそれらのDNA配列が連続的であり、分泌リーダー配列の場合には、連続的であり、かつ、リーディングフレームが一致していることを意味する。しかし、エンハンサーは連続的でなくてもよい。連結は簡便な制限部位における連結により達成される。そのような部位が存在しない場合には、通常の慣例に従って合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーが使用される。

【0063】

本明細書中で用いる「細胞」、「細胞系」および「細胞培養」なる表現は互換的に用いられ、全てのそのような語は後代を含む。したがって、「形質転換体」および「形質転換細胞」なる語は、導入の数には無関係に、初代対象細胞、およびそれに由来する培養を含む。また、意図的な又は故意でない突然変異のため、全ての後代はDNA含量において厳密には同一でないこともあると理解される。元の形質転換細胞においてスクリーニングされたものと同じ機能または生物活性を有する突然変異体後代も含まれる。異なる名称が意図される場合、それは文脈から明らかであろう。

【0064】

本明細書中で用いる「ポリメラーゼ連鎖反応」または「PCR」は、例えば米国特許第4,683,195号に記載されているとおり、核酸、RNAおよび/またはDNAの少量の特異的断片を増幅する方法または技術を意味する。一般に、オリゴヌクレオチドプライマーが設計されうるように、関心領域の末端またはその向こうからの配列情報が入手可能である必要があり、これらのプライマーは、増幅すべき鋳型の逆鎖と配列において同一

10

20

30

40

50



または類似であろう。それらの2つのプライマーの5'末端ヌクレオチドは、増幅される物質の末端と一致しうる。PCRは、特異的RNA配列、全ゲノムDNAからの特異的DNA配列、および全細胞RNAから転写されたcDNA、バクテリオファージまたはプラスミド配列などを増幅するために用いられうる。全般的には、Mullisら、(1987) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51: 263; Erlich編、(1989) PCR TECHNOLOGY (Stockton Press, N.Y.)を参照されたい。本明細書中で用いるPCRは、プライマーとしての既知核酸と核酸の特異的断片を増幅し又は生成させるための核酸ポリメラーゼの使用を含む、核酸試験サンプルを増幅するための核酸ポリメラーゼ反応法の一例(しかし唯一の例ではない)とみなされる。

10

#### 【0065】

本明細書中で用いる「生殖系列配列」は、げっ歯類(例えば、マウス)およびヒト生殖系列配列を含む、未再構成免疫グロブリンDNA配列の配列を意味する。いずれかの適当な未再構成免疫グロブリンDNA源が用いられうる。ヒト生殖系列配列は、例えば、National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases of the United States National Institutes of Healthのウェブサイト上でJOINSOLVER(登録商標)生殖系列データベースから得られうる。マウス生殖系列配列は、例えば、Giudicelliら、(2005) Nucleic Acids Res. 33: D256 - D261に記載されているとおりに得られうる。

20

#### 【0066】

例えばGITR活性の増強の度合を調べるために、与えられた例えばタンパク質、遺伝子、細胞または生物を含むサンプルまたはアッセイを潜在的活性化または抑制性物質で処理し、不活性対照分子で処理された対照サンプルと比較する。対照サンプルには100%の相対活性値を割り当てる。対照に対する活性値が約90%以下、典型的には85%以下、より典型的には80%以下、最も典型的には75%以下、一般には70%以下、より一般には65%以下、最も一般には60%以下、典型的には55%以下、通常は50%以下、より通常は45%以下、最も通常は40%以下、好ましくは35%以下、より好ましくは30%以下、より一層好ましくは25%以下、最も好ましくは20%未満である場合、抑制が達成される。対照に対する活性値が約110%、一般には少なくとも120%、より一般には少なくとも140%、より一般には少なくとも160%、頻繁には少なくとも180%、より頻繁には少なくとも2倍、最も頻繁には少なくとも2.5倍、通常は少なくとも5倍、より通常は少なくとも10倍、好ましくは少なくとも20倍、より好ましくは少なくとも40%、最も好ましくは40倍を超える場合、活性化が達成される。

30

#### 【0067】

活性化または抑制におけるエンドポイントは以下のとおりにモニターされうる。例えば細胞、生理的流体、組織、器官および動物またはヒト対象の処理に対する活性化、抑制および応答はエンドポイントによりモニターされうる。該エンドポイントは、例えば炎症、発癌能または細胞脱顆粒もしくは分泌(例えば、サイトカイン、毒性酸素またはプロテアーゼの放出)の指標の、予め決められた量または比率を含みうる。該エンドポイントは、例えば、イオン流量または輸送、細胞遊走、細胞接着、細胞増殖、転移の可能性、細胞分化および表現型変化(例えば、炎症、アポトーシス、トランスフォーメーション、細胞周期または転移に関連する遺伝子の発現における変化)の、予め決められた量を含みうる(例えば、Knight(2000) Ann. Clin. Lab. Sci. 30: 145 - 158; HoodおよびCheresh(2002) Nature Rev. Cancer 2: 91 - 100; Timmeら、(2003) Curr. Drug Targets 4: 251 - 261; RobbinsおよびItzkowitz(2002) Med. Clin. North Am. 86: 1467 - 1495; GradyおよびMarkowitz(2002) Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 3

40

50

: 101 - 128 ; Bauerら (2001) *Glia* 36 : 235 - 243 ; StanimirovicおよびSato (2000) *Brain Pathol.* 10 : 113 - 126 を参照されたい)。

【0068】

抑制のエンドポイントは、一般に、対照の75%以下、好ましくは、対照の50%以下、より好ましくは、対照の25%以下、最も好ましくは、対照の10%以下である。一般に、活性化のエンドポイントは、対照の少なくとも150%、好ましくは、対照の少なくとも2倍、より好ましくは、対照の少なくとも4倍、最も好ましくは、対照の少なくとも10倍である。

【0069】

「小分子」は、10kDa未満、典型的には2kDa未満、好ましくは1kDa未満の分子量を有する分子と定義される。小分子には、無機分子、有機分子、無機成分を含有する有機分子、放射性原子を含む分子、合成分子、ペプチド模倣体および抗体模倣体が含まれるが、これらに限定されるものではない。治療用物質としては、小分子は、大分子より細胞に透過性であり、分解に対する、より低い感受性を有し、免疫応答を惹起する、より低い傾向を有しうる。抗体およびサイトカインのペプチド模倣体のような小分子ならびに小分子毒素が記載されている。例えば、Cassetら (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 307 : 198 - 205 ; Muylderman (2001) *J. Biotechnol.* 74 : 277 - 302 ; Li (2000) *Nat. Biotechnol.* 18 : 1251 - 1256 ; Apostolopoulosら (2002) *Curr. Med. Chem.* 9 : 411 - 420 ; Monfardiniら (2002) *Curr. Pharm. Des.* 8 : 2185 - 2199 ; Dominguesら (1999) *Nat. Struct. Biol.* 6 : 652 - 656 ; SatoおよびSone (2003) *Biochem. J.* 371 : 603 - 608 ; 米国特許第6,326,482号を参照されたい。

【0070】

リガンド/受容体、抗体/抗原、または他の結合ペアに関する「特異的」または「選択的」な結合は、タンパク質および他の生物学的物質の不均一集団内の該タンパク質の存在を決定する結合反応を示す。したがって、示されている条件下、特定されているリガンドは特定の受容体には結合し、サンプル中に存在する他のタンパク質には有意量では結合しない。本明細書中で用いる抗体が、与えられた配列（この場合はGITR）を含むポリペプチドに特異的に結合すると言えるのは、それが、GITRの配列を含むポリペプチドには結合するが、GITRの配列を欠くタンパク質には結合しない場合である。例えば、GITRを含むポリペプチドに特異的に結合する抗体はGITRのFLAG（登録商標）タグ付き形態には結合しうるが、他のFLAG（登録商標）タグ付きタンパク質には結合しないであろう。

【0071】

「エピトープ」または「抗原決定基」なる語は、結合性分子が特異的に結合する、抗原上の部位を意味する。エピトープは、連続的アミノ酸、またはタンパク質の三次元フォールディングにより並置した不連続的アミノ酸の両方から形成されうる。連続的アミノ酸から形成されるエピトープは、典型的には、変性溶媒にさらされても維持されるが、三次元フォールディングにより形成されるエピトープは、典型的には、変性溶媒で処理されると失われる。エピトープは、典型的には、特有の空間的コンホメーションにおいて、少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14または15個のアミノ酸を含む。エピトープの空間的コンホメーションを決定するための方法には、例えば、X線結晶学および二次元核磁気共鳴が含まれる。

【0072】

同じエピトープを認識する結合性分子は、1つの抗体が標的抗原への別の抗体の結合を遮断しうることを示す単純なイムノアッセイ、すなわち、競合結合アッセイにおいて特定されうる。競合結合は、被検結合性分子が共通の抗原（例えば、GITR）への参照結合

10

20

30

40

50

性分子の特異的結合を抑制するアッセイにおいて決定される。多数のタイプの競合結合アッセイが公知であり、例えば以下のものが挙げられる：固相直接または間接ラジオイムノアッセイ（RIA）；固相直接または間接酵素イムノアッセイ（EIA）サンドイッチ競合アッセイ（Stahliら（1983）*Methods in Enzymology* 9：242を参照されたい）；固相直接ピオチン - アビジンEIA（Kirklandら（1986）*J. Immunol.* 137：3614を参照されたい）；固相直接標識アッセイ、固相直接標識サンドイッチアッセイ（HarlowおよびLane 1988）*Antibodies：A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Pressを参照されたい）；1～125個の標識を使用する固相直接標識RIA（Morelら（1988）*MoI. Immunol.* 25（1）：7を参照されたい）；固相直接ピオチン - アビジンEIA（Cheungら（1990）*Virology* 176：546）；および直接標識RIA（Moldenhauerら（1990）*Scand. J. Immunol.* 32：77）。

10

## 【0073】

典型的には、そのようなアッセイは、固体表面に結合した精製抗原またはこれらのいずれかを含む細胞、非標識試験結合性分子および標識参照結合性分子の使用を含む。競合抑制は、試験結合性分子の存在下、細胞または固体表面に結合した標識の量を決定することにより測定される。

## 【0074】

通常、試験結合性分子は過剰に存在する。通常、競合結合性分子が過剰に存在する場合、それは共通抗原への参照結合性分子の特異的結合を少なくとも50～55%、55～60%、60～65%、65～70%、70～75%以上抑制する。

20

## 【0075】

想定される方法の抗体、または抗体の抗原結合部位から誘導された結合性組成物は、無関係な抗原に対するアフィニティより少なくとも2倍大きな、好ましくは少なくとも10倍大きな、より好ましくは少なくとも20倍大きな、最も好ましくは少なくとも100倍大きなアフィニティで、その抗原に結合する。好ましい実施形態においては、該抗体は、例えばスクヤッチャード分析により測定された場合、約 $10^9$  リットル/モルより大きなアフィニティを有する。Munsenら（1980）*Analyt. Biochem.* 107：220 - 239。

30

## 【0076】

## I I . 総論

本発明は、GITRアゴニストとPD-1アンタゴニスト（抗GITRおよび抗PD-1または抗PD-L1抗体を含む）との組合せを使用する進行期の腫瘍の治療方法を提供する。

## 【0077】

## I I I . 医薬組成物

医薬組成物または無菌組成物を製造するためには、GITR、PD-1またはPD-L1抗体を医薬上許容される担体または賦形剤と混合する。例えば、Remington's Pharmaceutical SciencesおよびU.S. Pharmacopeia：National Formulary, Mack Publishing Company, Easton, PA（1984）を参照されたい。

40

## 【0078】

治療用および診断用物質の製剤は、例えば凍結乾燥粉末、スラリー、水性溶液または懸濁液の形態で、生理的に許容される担体、賦形剤または安定剤と混合することにより製造される。例えば、Hardmanら（2001）*Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill, New York, NY；Gennaro（2000）*Remington：The Science and Practice of Pharmacy*, Lippincott, WilliamsおよびWilkins,

50

New York, NY; Avisà (編) (1993) *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications*, Marcel Dekker, NY; Lieberman (編) (1990) *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets*, Marcel Dekker, NY; Lieberman (編) (1990) *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems*, Marcel Dekker, NY; Weiner および Kotkoskie (2000) *Excipient Toxicity and Safety*, Marcel Dekker, Inc., New York, NY を参照されたい。

【0079】

10

単独で又は免疫抑制剤と組合せて投与される該抗体組成物の毒性および治療効力は、例えば  $LD_{50}$  (集団の50%に致死的である用量) および  $ED_{50}$  (集団の50%において治療的に有効である用量) を決定するための、細胞培養または実験動物における標準的な薬学的手法により決定されうる。毒性効果と治療効果との用量比は治療係数であり、それは  $ED_{50}$  に対する  $LD_{50}$  の比として表されうる。高い治療係数を示す抗体が好ましい。これらの細胞培養アッセイおよび動物研究から得られたデータは、ヒトにおける使用のための投与量の範囲の決定において使用されうる。そのような化合物の投与量は、好ましくは、毒性をほとんど又は全く伴わない  $ED_{50}$  を含む循環濃度の範囲内である。該投与量は、使用される剤形および投与経路に応じて、この範囲内で変動しうる。

【0080】

20

投与様式は特に重要でない。適当な投与経路には、例えば経口、直腸、経粘膜または腸投与; 非経口運搬、例えば筋肉内、皮下、脊髄内注射、および鞘内、直接心室内、静脈内、腹腔内、鼻腔内または眼内注射が含まれうる。本発明の方法を実施するための又は該医薬組成物中で使用される抗体の投与は、種々の通常方法、例えば経口摂取、吸入、局所適用または皮膚、皮下、腹腔内、非経口、動脈内または静脈内注射により行われうる。

【0081】

あるいは、例えば、関節炎関節、または免疫病理学により特徴づけられる病原体誘発性病変内への直接的な該抗体の注射により、全身的方法ではなく局所的方法により、しばしば、デポー剤または徐放製剤で、該抗体を投与することが可能である。さらに、標的化ドラッグデリバリーシステムにおいて該抗体を投与することが可能であり、例えば、関節炎関節または免疫病理学により特徴づけられる病原体誘発性病変を標的化する、例えば組織特異的抗体で被覆されたりポソームにおいて、該抗体を投与することが可能である。該リポソームは罹患組織を標的化し、該罹患組織により選択的に取り込まれるであろう。

30

【0082】

治療用物質に関する投与計画の選択は、該物質の血清または組織代謝回転速度、症状の程度、該物質の免疫原性、および生物学的マトリックスにおける標的細胞の接近可能性を含む幾つかの要因に左右される。好ましくは、投与計画は、許容可能なレベルの副作用と調和して患者に運搬される治療用物質の量を最大にする。したがって、運搬される生物学的物質(生物学的製剤)の量は、部分的には、個々の物質および治療される状態の重症度に左右される。抗体、サイトカインおよび小分子の適当な用量を選択する際の指針が入手可能である。例えば、Wawrzynczak (1996) *Antibody Therapy*, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK; Kresina (編) (1991) *Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis*, Marcel Dekker, New York, NY; Bach (編) (1993) *Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases*, Marcel Dekker, New York, NY; Baert (2003) *New Engl. J. Med.* 348: 601-608; Milgrom (1999) *New Engl. J. Med.* 341: 1966-1973; Slamon (2001) *New Engl. J. Med.* 344: 783-792; Ben

40

50

i aminovitzら(2000) New Engl. J. Med. 342:613-619; Ghoshら(2003) New Engl. J. Med. 348:24-32; Lipskyら(2000) New Engl. J. Med. 343:1594-1602を参照されたい。

#### 【0083】

適当な用量の決定は、例えば、治療に影響を及ぼすことが当技術分野で知られている若しくは疑われている又は治療に影響を及ぼすと予想されるパラメータまたは因子を用いて、臨床家によりなされる。一般に、用量は、最適用量より幾分少ない量から開始し、ついで、負の副作用と比較して所望または最適効果が得られるまで、少しずつ増量する。重要な診断尺度には、例えば炎症の症状の尺度、または産生される炎症性サイトカインのレベルが含まれる。好ましくは、使用される生物学的物質(生物学的製剤)は、治療のために標的化される動物と同じ種から実質的に誘導され(例えば、ヒト対象の治療のためのヒト化抗体)、それにより該薬剤に対する免疫応答を最小化する。

10

#### 【0084】

抗体および抗体フラグメントは、連続的注入により、または例えば、1日、週1~7回、1週間、2週間、毎月、隔月などの間隔での投与により投与されうる。投与は、静脈内、皮下、局所、経口、鼻腔内、直腸内、筋肉内、大脳内、髄腔内投与または吸入により行われうる。好ましい投与プロトコールは、有意な望ましくない副作用をもたらさない最大用量または投与頻度を含むものである。毎週の全用量は、一般に、少なくとも0.05 μg/kg、0.2 μg/kg、0.5 μg/kg、1 μg/kg、10 μg/kg、100 μg/kg、0.2 mg/kg、1.0 mg/kg、2.0 mg/kg、10 mg/kg、25 mg/kg、50 mg/kg体重以上である。例えば、Yangら(2003) New Engl. J. Med. 349:427-434; Heroldら(2002) New Engl. J. Med. 346:1692-1698; Liuら(1999) J. Neurol. Neurosurg. Psych. 67:451-456; Portieljiら(20003) Cancer Immunol. Immunother. 52:133-144を参照されたい。小分子治療用物質、例えばペプチド模倣体、天然物または有機化合物の所望用量は、モル/kgで、抗体またはポリペプチドの場合とほぼ同じである。

20

#### 【0085】

第2の治療用因子、例えばサイトカイン、抗体、ステロイド、化学療法物質、抗生物質、抗ウイルス物質または放射線との共投与または治療のための方法は当技術分野でよく知られている。例えば、Hardmanら(編)(2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed., McGraw-Hill, New York, NY; PooleおよびPeterson(編)(2001) Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA; ChabnerおよびLongo(編)(2001) Cancer Chemotherapy and Biotherapy, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., PA.を参照されたい。特に、PD-1またはPD-L1抗体の投与は同時または連続的に行われうる。特定の実施形態においては、まず、抗GITR抗体を投与し、ついで抗PD-1または抗PD-L1抗体の定期的(例えば、1週間後または毎週)投与を行う。あるいは、抗PD-1またはPD-L1抗体での治療の後、類似スケジュールで抗GITR抗体での治療を行うことが可能である。更に詳細な実施形態においては、抗GITR抗体を、少なくとも1回の治療または複数用量(例えば、毎週の投与)において、抗PD-1または抗PD-L1と共に共投与する。

30

40

#### 【0086】

GITR、PD-1またはPD-L1抗体は、以下のものを含む化学療法剤と組合され

50

うる：アルキル化剤、例えばチオテパ (thiotepa) および CYTOXAN (登録商標) シクロスホスファミド (cyclophosphamide)；アルキルスルホナート、例えばブスルファン (busulfan)、イムプロスルファン (improsulfan) およびピポスルファン (piposulfan)；アジリジン、例えばベンゾドーパ (benzodopa)、カルボコン (carboquone)、メツレドーパ (meturedopa) およびウレドーパ (uredopa)；エチレンイミンおよびメチルアメルアミン (methylamelamine)、例えばアルトレタミン (altretamine)、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ルアミド (triethylenethiophosphoramidate) およびトリメチロロメラミン (trimethylolomelamine)；アセトゲニン (acetogenin) (特にブルラタシン (bullatacin) およびブルラタシノン (bullatacinone))；カンプトテシン (camptothecin) (合成類似体トポテカン (topotecan) を含む)；ブリオスタチン (bryostatins)；カリスタチン (calystatin)；CC-1065 (そのアドゼレシン (adozelesin)、カルゼレシン (carzelesin) およびビゼレシン (bizelesin) 合成類似体を含む)；クリプトフィシン (cryptophycin) (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 (dolastatin)；デュオカルマイシン (duocarmycin) (合成類似体 KW-2189 および CB-1-TM1 を含む)；エリユーテロビン (eleutherobin)；パンクラチスタチン (pancratistatin)；サルコジクチン (sarcodictyin)；スポンジスタチン (spongistatin)；窒素マスタード、例えばクロラムブシル (chlorambucil)、クオルナファジン (chlornaphazine)、クロロホスファミド (chlophosphamide)、エストラムスチン (estramustine)、イフォスファミド (ifosfamide)、メクロルエタミン (mechlorethamine)、メクロルエタミンオキシド塩酸塩、メルファラン (melphalan)、ノベムビチン (novembichin)、フェネステリン (phenestertine)、プレドニムスチン (prednimustine)、トロフォスファミド (trofosfamide)、ウラシルマスタード (uracil mustard)；ニトロソウレア、例えばカルムスチン (carmustine)、クロロゾトシン (chlorozotocin)、フォテムスチン (fotemustine)、ロムスチン (lomustine)、ニムスチン (nimustine) およびラニムスチン (ranimustine)；抗生物質、例えばエンジイン抗生物質 [例えば、カリケアマイシン (calicheamicin)、特にカリケアマイシン・ガンマ1I およびカリケアマイシン・オメガI1 (例えば、Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)) を参照されたい)；ダイネマイシン (dynemicin)、例えばダイネマイシンA；ピスホスホナート、例えばクロドロナート (clodronate)；エスペラマイシン (esperamicin)；ならびにネオカルジノスタチン (neocarzinostatin) 発色団および関連色素タンパク質エンジイン抗生物質発色団]、アクラシノマイシン (aclacinomycin)、アクチノマイシン (actinomycin)、オースラマイシン (authramycin)、アザセリン (azaserine)、ブレオマイシン (bleomycin)、カクチノマイシン (cactinomycin)、カラビシン (carabycin)、カミノマイシン (caminomycin)、カルジノフィリン (carzinophilin)、クロモマイシン (chromomycin)、ダクチノマイシン (dactinomycin)、ダウノルビシン (daunorubicin)、デトルビシン (detorubicin)、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ADRIAMYCIN (登録商標) ドキソルビシン (doxorubicin) (モルホリノ-ドキソルビシン、シアノモルホリノ-ドキソルビシン、2-ピロリノ-ドキソルビシンおよびデオキシドキソルビシンを含む)、エピルビシン (epirubicin)、エソルビシン (esorubicin)、イダルビシン (

idarubicin)、マルセロマイシン(marcellomycin)、マイトマイシン(mitomycin)、例えばマイトマイシンC、ミコフェノール酸(mycophenolic acid)、ノガラマイシン(nogalamycin)、オリボマイシン(olivomycin)、ペプロマイシン(peplomycin)、ポトフィロマイシン(potfiromycin)、ピューロマイシン(puromycin)、クエラマイシン(quelamycin)、ロドルピシン(rodorubicin)、ストレプトニグリン(streptonigrin)、ストレプトゾシン(streptozocin)、ツベルシジン(tubercidin)、ウベニメックス(ubenimex)、ジノスタチン(zinostatin)、ゾルピシン(zorubicin) ; 代謝拮抗物質、例えばメトトレキサート(methotrexate)および5 - フルオウラシル(5 - FU) ; 葉酸類似体、例えばデノプテリン(denopterin)、メトトレキサート(methotrexate)、プテロプテリン(pteropterin)、トリメトレキサート(trimetrexate) ; プリン類似体、例えばフルダラビン(fludarabine)、6 - メルカプトプリン、チアミプリン(thiamiprine)、チオグアニン(thioguanine) ; ピリミジン類似体、例えばアンシタピン(ancitabine)、アザシチジン(azacitidine)、6 - アザウリジン、カルモフル(carmofur)、シタラビン(cytarabine)、ジデオキシウリジン(dideoxyuridine)、ドキシフルリジン(doxifluridine)、エノシタピン(enocitabine)、フロクスリジン(floxuridine) ; アンドロゲン、例えばカルステロン(calusterone)、ドロモスタノロン(dromostanolone)プロピオナート、エピチオスタノール(epitiostanol)、メピチオスタン(mepitiostanane)、テストラクトン(testolactone) ; 抗アドレナール、例えばアミノグルテチミド(aminogluthetimide)、ミトタン(mitotane)、トリロスタン(trilostane) ; 葉酸補充物、例えばフロリン酸(frolinic acid) ; アセグラトン(aceglatone) ; アルドホスファミド(aldophosphamide)グリコシド ; アミノレプリン酸 ; エニルウラシル(eniluracil) ; アムサクリン(amsacrine) ; ベストラブシル(bestrabucil) ; ビサントレン(bisantrene) ; エダトラキサート(edatraxate) ; デフォファミン(defofamine) ; デメコルシン(demecolcine) ; ジアジクオン(diaziquone) ; エルフォルニチン(elfornithine) ; 酢酸エリプチニウム(elliptinium) ; エポチロン(epothilone) ; エトグルシド(etoglucid) ; 硝酸ガリウム ; ヒドロキシ尿素 ; レンチナン(lentinan) ; ロニダミン(lonidamine) ; メイタンシノイド(maytansinoid)、例えばメイタンシン(maytansine)およびアンサミトシン(ansamitocin) ; ミトグアゾン(mitoguanzone) ; ミトザントロン(mitoxantrone) ; モピダンモール(mopidanmol) ; ニトラエリン(nitraerine) ; ペントスタチン(pentostatin) ; フェナメット(phenamet) ; ピラルピシン(pirarubicin) ; ロソキサントロン(loxoxantrone) ; ポドフィリン酸(podophyllinic acid) ; 2 - エチルヒドラジド ; プロカルバジン(procabazine) ; PSK (登録商標) 多糖複合体(JHS Natural Products, Eugene, Oreg.) ; ラゾキサン(razoxane) ; リゾキシシン(rhizoxin) ; シゾフラン(sizofuran) ; スピロゲルマニウム(spirogermanium) ; テヌアゾン酸(tenuazonic acid) ; トリアジクオン(triaziquone) ; 2, 2', 2'' - トリクロロトリエチルアミン ; トリコテセン(trichothecene) (特にT - 2毒素、ベルラクリン(verracurin) A、ロリジン(roridin) Aおよびアングイジン(anguidine)) ; ウレタン ; ビンデシン(vindesine) ; ダカルバジン(dacarbazine) ; マンノムスチン(mannomustine) ; ミトブロニトー

10

20

30

40

50

ル(mitobronitol);ミトラクトール(mitolactol);ピポブroman(pipobroman);ガシトシン(gacytosine);アラビノシド(arabinoside)(「Ara-C」);シクロホスファミド(cyclophosphamide);チオテパ(thiotepa);タキソイド、例えばTAXOL(登録商標)パクリタキセル(paclitaxel)(Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)、ABRAXANE(商標)パクリタキセルのクレモフォア非含有アルブミン操作ナノ粒子製剤(American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Ill.)、およびTAXOTERE(登録商標)ドキセタキセル(doxetaxel)(Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France);クロラムブシル(chlorambucil);GEMZAR(登録商標)ゲムシタピン(gemcitabine);6-チオグアニン;メルカプトプリン(mercaptopurine);メトトレキサート(methotrexate);白金類似体、例えばシスプラチン(cisplatin)およびカルボプラチン(carboplatin);ビンブラスチン(vinblastine);白金;エトポシド(etoposide)(VP-16);イフォスファミド(ifosfamide);ミトザントロン(mitoxantrone);ビンクリスチン(vincristine);NAVELBINE(登録商標)ビノレルビン(vinorelbine);ノバントロン(novantrone);テニポシド(teniposide);エダトレキサート(edatrexate);ダウノマイシン(daunomycin);アミノプテリン(aminopterin);XELODA(登録商標)カペシタピン(capecitabine);イバンドロネート(ibandronate);CPT-11;トポイソメラーゼインヒビターRFS 2000;ジフルオロメチルオルニチン(difluoromethylornithine)(DMFO);レチノイド、例えばレチノイン酸;ならびに前記のいずれかのものの医薬上許容される塩、酸または誘導体。

【0087】

また、例えば以下のような、腫瘍に対するホルモン作用を調節または抑制するよう作用する抗ホルモン剤も含まれる: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ー(SERM)、例えばタモキシフェン(tamoxifen)(NOLVADEX(登録商標)タモキシフェンを含む)、ラロキシフェン(raloxifene)、ドロロキシフェン(droloxifene)、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン(trioxifene)、ケオキシフェン(keoxifene)、LY117018、オナプリストン(onapristone)およびFARESTON、トレミフェン(toremifene);副腎におけるエストロゲン産生を調節する酵素アロマトラーゼを阻害するアロマトラーゼインヒビター、例えば4(5)-イミダゾール、アミノグルテチミド(aminoglutethimide)、MEGASE(登録商標)酢酸メゲストロール(megestrol)、AROMASIN(登録商標)エキセメスタン(exemestane)、フォルメスタニー(formestanie)、ファドロゾール(fadrozole)、RIVISOR(登録商標)ボロゾール(vorozole)、FEMARA(登録商標)レトロゾール(letrozole)およびARIMIDEX(登録商標)アナストロゾール(anastrozole);ならびに抗アンドロゲン、例えばフルタミド(flutamide)、ニルタミド(nilutamide)、ピカルタミド(bicalutamide)、ロイプロリド(leuprolide)およびゴセレリン(goserelin);ならびにトロキサシタピン(troxacitabine)(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、例えばPKC-アルファ、RalfおよびH-Rasのような異常細胞増殖に関するシグナリング経路における遺伝子の発現を抑制するもの;リボザイム、例えばVEGF発現インヒビター(例えば、ANGIOZYME(登録商標)リボザイム)およびHER2発現インヒビター;ワクチン、例えば遺伝子治療ワクチン、例えばALLOVECTIN(登録商標)ワクチン、LEUVECTIN(登録商標)ワクチンお

10

20

30

40

50



よびVAXID（登録商標）ワクチン；PROLEUKIN（登録商標）rIL-2；LURTOTECAN（登録商標）トポソメラーゼ1インヒビター；ABARELIX（登録商標）rmRH；ならびに前記のいずれかのものの医薬上許容される塩、酸または誘導体。

**【0088】**

少なくとも約175mm<sup>3</sup>の寸法を有する進行期腫瘍を治療するために、組合せ療法を用いる。本発明のもう1つの実施形態においては、少なくとも約200mm<sup>3</sup>、300mm<sup>3</sup>、400mm<sup>3</sup>、500mm<sup>3</sup>、750mm<sup>3</sup>、1000mm<sup>3</sup>までの寸法を有する進行期腫瘍を治療するために、組合せ療法を用いる。本発明の組合せ療法は、触診により又は当技術分野でよく知られているイメージング技術、例えばMRI、超音波もしくはC  
A Tスキャンにより見出されるのに十分な程度に大きな腫瘍を治療するために用いられる。

10

**【0089】**

2つの化合物の「相乗効果」は、それらの2つの物質の組合せの効果がそれらの個々の効果の総和より大きく、対照および単一薬物とは統計的に異なるものである。もう1つの実施形態においては、本発明の組合せ療法は相加効果を有する。2つの化合物の「相加効果」は、それらの2つの物質の組合せの効果がそれらの個々の効果の総和であり、対照および/または単一薬物とは統計的に異なるものである。

**【0090】**

本方法は抑制を約10%超（すなわち、約10%を超える）、約20%超、約30%超、約35%超、約42%超、約43%超、約44%超、約45%超、約46%超、約47%超、約48%超、約49%超、約50%超、約51%超、約52%超、約53%超、約54%超、約55%超、約56%超、約57%超、約58%超、約59%超、約60%超、約65%超、約70%超、約75%超、約80%超、約85%超、約90%超、約95%超、または約100%超の腫瘍サイズの抑制をもたらす。1つの実施形態においては、PD-1アンタゴニスト分子と組合せられたGITR結合性分子の投与は進行腫瘍の完全退縮をもたらす。

20

**【0091】**

抗ウイルス療法剤とのGITRアゴニスト/PD-1アンタゴニストの組合せの共投与も想定される。抗ウイルス剤には、ウイルスを破壊する任意の薬物が含まれる。抗ウイルス剤には、ウイルスの複製を抑制するように機能するインターフェロン、プロテアーゼインヒビター、および逆転写酵素インヒビター、またはHIVに対する高活性抗レトロウイルス療法（HAART）の組合せに含まれる物質が含まれる。

30

**【0092】**

典型的な獣医学用、実験用または研究用対象には、サル、イヌ、ネコ、ラット、マウス、ウサギ、モルモット、ウマおよびヒトが含まれる。

**【0093】**

IV. 用途

該GITR、PD-1もしくはPD-L1抗体または抗原結合性フラグメントは、癌を治療するため（すなわち、腫瘍細胞の増殖または生存を抑制するため）に使用される。本発明の抗体を使用して増殖が抑制される好ましい癌には、免疫療法に対して典型的に応答性である癌が含まれ、そしてまた、免疫療法にこれまでに関連づけられていない癌も含まれる。治療に好ましい癌の非限定的な例には、黒色腫（メラノーマ）（例えば、転移性悪性黒色腫）、腎臓癌（例えば、明細胞癌）、前立腺癌（例えば、ホルモン不応性前立腺癌）、膵臓癌、乳癌、結腸癌、肺癌（例えば、非小細胞肺癌）、食道癌、頭頸部の扁平上皮癌、肝臓癌、卵巣癌、子宮頸癌、甲状腺癌、神経膠芽腫、神経膠腫、白血病、リンパ腫および他の新生物悪性疾患が含まれる。更に、本発明は、本発明の抗体を使用して増殖が抑制される難治性または再発性悪性疾患を含む。

40

**【0094】**

該GITRアゴニスト/PD-1アンタゴニスト抗体または抗原結合性フラグメントは

50

単独で又は以下のものと組合せて使用されうる：他の抗新生物（腫瘍）剤または免疫原性剤（例えば、弱毒化癌細胞、腫瘍抗原（組換えタンパク質、ペプチドおよび炭水化物分子を含む）、腫瘍由来抗原または核酸でパルスされた樹状細胞のような抗原提示細胞、免疫刺激性サイトカイン（例えば、IL-2、IFN $\alpha$ 2、GM-CSF）、および免疫刺激性サイトカイン、例えばGM-CSF（これに限定されるものではない）をコードする遺伝子でトランスフェクトされた細胞）；標準的な癌治療（例えば、化学療法、放射線療法または手術）；または他の抗体（VEGF、EGFR、HER2/neu、VEGF受容体、他の増殖因子受容体、CD20、CD40、CTLA-4、OX-40、4-1BBおよびICOSに対する抗体を含むが、これらに限定されるものではない）。

#### 【0095】

##### 感染症

GITRアゴニスト/PD-1アンタゴニストの組合せは感染および感染症の予防または治療にも使用されうる。GITRアゴニスト/PD-1アンタゴニストの組合せは、病原体、毒素および自己抗原に対する免疫応答を刺激するために、単独で、またはワクチンと組合せて使用されうる。該抗体またはその抗原結合性フラグメントは、ヒトに感染性であるウイルス（限定的ではないが例えば、ヒト免疫不全ウイルス、クラスA、BおよびC肝炎ウイルス、エプスタインバーウイルス、ヒトサイトメガロウイルス、ヒトパピローマウイルス、ヘルペスウイルス）に対する免疫応答を刺激するために使用されうる。該抗体またはその抗原結合性フラグメントは、細菌または真菌寄生体および他の病原体による感染に対する免疫応答を刺激するために使用されうる。

#### 【0096】

##### ワクチン接種アジュバント

GITRアゴニスト/PD-1アンタゴニスト抗体または抗体フラグメントの組合せは、他の組換えタンパク質および/またはペプチド（例えば、腫瘍抗原または癌細胞）と共に、これらのタンパク質に対する免疫応答を増強するために（すなわち、ワクチン接種プロトコールにおいて）使用されうる。

#### 【0097】

例えば、GITRアゴニスト/PD-1アンタゴニスト抗体およびその抗体フラグメントは、GITRアゴニスト/PD-1アンタゴニストの組合せと関心のある抗原（例えば、ワクチン）との共投与により抗原特異的免疫応答を刺激するために使用されうる。したがって、もう一つの態様においては、本発明は、(i) 抗原、および(ii) GITRアゴニスト/PD-1アンタゴニストの組合せを対象に投与して、対象における抗原に対する免疫応答を増強することを含む、対象における抗原に対する免疫応答を増強する方法を提供する。該抗原は、例えば腫瘍抗原、ウイルス抗原、細菌抗原または病原体からの抗原でありうる。

#### 【0098】

##### T細胞のエクスピボ活性化

本発明の抗体および抗原フラグメントは、腫瘍に対する抗原特異的T細胞を増加させるために、抗原特異的T細胞のエクスピボ活性化および増殖ならびにレシピエント内へのこれらの細胞の養子移植のためにも使用されうる。これらの方法は、感染因子、例えばCMVに対するT細胞応答を活性化させるためにも使用されうる。GITRアゴニスト/PD-1アンタゴニストの組合せの存在下のエクスピボ活性化は養子移植T細胞の頻度および活性を増加させると予想されうる。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0099】

【図1】図1A~1Kは、MC38細胞系が移植されたマウス（n=10/群）の抗腫瘍応答に対する、単独で又は抗PD-1抗体と組合せて投与された抗GITR抗体の効果を示す。腫瘍が240~360mm<sup>3</sup>に達したときに治療を開始した。

【図2】図2A~2Fは、抗GITR抗体の単一用量投与およびその1週間後の抗PD-1抗体の単一用量投与（図2B）またはその逆の順序（図2C）の抗腫瘍効力を示す。こ

10

20

30

40

50

れをいずれかの抗体単独の場合と比較した(図2E~2F; n=10/群)。

【図3】図3A~3Dは、CT26腫瘍モデル(n=10/群)における抗GITRおよび抗PD-1抗体の両方の抗体の共投与(図3A)と比較された場合の、抗GITRまたは抗PD-1抗体のみの単独療法(図3C~3D)の抗腫瘍効力を示す。

【図4】図4A~4Dは、MB49細胞系が移植されたマウス(n=10/群)の抗腫瘍応答に対する、単独で投与された抗GITRおよびPD-1抗体または両方の抗体の共投与の効果を示す。腫瘍が85~122mm<sup>3</sup>に達したときに治療を開始した。

【図5】図5A~5Bは混合リンパ球反応(MLR)におけるTreg(図5A)およびTreg:CD8細胞比(図5B)に対する抗GITR(MK-4166)および抗PD-1(MK-3475)の組合せの用量依存効果を示す。

【図6】図6は、MK-4166およびMK-3475の組合せとのインキュベーションがMLRにおけるTregの抑制活性の低下をもたらすことを示す。

【0100】

実施例

実施例1

全般的な方法

分子生物学における標準的な方法は、Maniatisら(1982)Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; SambrookおよびRussell(2001)Molecular Cloning, 3<sup>rd</sup> ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Wu(1993)Recombinant DNA, Vol. 217, Academic Press, San Diego, CA.に記載されている。標準的な方法は、Ausbelら(2001)Current Protocols in Molecular Biology, Vols. 1-4, John Wiley and Sons, Inc. New York, NYにも記載されており、これは、細菌細胞におけるクローニングおよびDNA突然変異誘発(Vol. 1)、哺乳類細胞および酵母におけるクローニング(Vol. 2)、複合糖質およびタンパク質発現(Vol. 3)、ならびにバイオインフォマティクス(Vol. 4)を記載している。

【0101】

免疫沈降、クロマトグラフィー、電気泳動、遠心分離および結晶化を含むタンパク質精製のための方法が記載されている。Coliganら(2000)Current Protocols in Protein Science, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., New York。化学分析、化学修飾、翻訳後修飾、融合タンパク質の製造、タンパク質のグリコシル化が記載されている。例えば、Coliganら(2000)Current Protocols in Protein Science, Vol. 2, John Wiley and Sons, Inc., New York; Ausubelら(2001)Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 3, John Wiley and Sons, Inc., NY, NY, pp. 16.0.5-16.22.17; Sigma-Aldrich, Co. (2001) Products for Life Science Research, St. Louis, MO; pp. 45-89; Amersham Pharmacia Biotech(2001)BioDirectory, Piscataway, N.J., pp. 384-391を参照されたい。ポリクローナルおよびモノクローナル抗体の製造、精製およびフラグメント化が記載されている。Coliganら(2001)Current Protocols in Immunology, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., New York; HarlowおよびLane(1999)Using Antibodies, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Co

10

20

30

40

50

ld Spring Harbor, NY; HarlowおよびLane, 前掲。リガンド/受容体相互作用を特徴づけるための標準的な技術が利用可能である。例えば、Coliganら(2001) *Current Protocols in Immunology*, Vol. 4, John Wiley, Inc., New Yorkを参照されたい。  
【0102】

モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体およびヒト化抗体は製造可能である(例えば、SheperdおよびDean(編)(2000) *Monoclonal Antibodies*, Oxford Univ. Press, New York, NY; KontermannおよびDubel(編)(2001) *Antibody Engineering*, Springer-Verlag, New York; HarlowおよびLane(1988) *Antibodies A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 139-243; Carpenterら(2000) *J. Immunol.* 165: 6205; Heら(1998) *J. Immunol.* 160: 1029; Tangら(1999) *J. Biol. Chem.* 274: 27371-27378; Bacaら(1997) *J. Biol. Chem.* 272: 10678-10684; Chothiaら(1989) *Nature* 342: 877-883; FooteおよびWinter(1992) *J. Mol. Biol.* 224: 487-499; 米国特許第6,329,511号を参照されたい)。

10

20

【0103】

ヒト化に代わる手段は、ファージ上で提示されるヒト抗体ライブラリー、またはトランスジェニックマウスにおけるヒト抗体ライブラリーを使用することである(Vaughanら(1996) *Nature Biotechnol.* 14: 309-314; Barbas(1995) *Nature Medicine* 1: 837-839; Mendezら(1997) *Nature Genetics* 15: 146-156; HoogenboomおよびChames(2000) *Immunol. Today* 21: 371-377; Barbasら(2001) *Phage Display: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; Kayら(1996) *Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual*, Academic Press, San Diego, CA; de Bruinら(1999) *Nature Biotechnol.* 17: 397-399)。

30

40

【0104】

抗原の精製は抗体の製造に必要なではない。関心のある抗原を含有する細胞で動物を免疫化することが可能である。ついで該免疫化動物から脾細胞を単離し、該脾細胞を骨髄腫細胞系と融合させてハイブリドーマを得ることが可能である(例えば、Meynardら(1997) *Immunity* 7: 283-290; Wrightら(2000) *Immunity* 13: 233-242; Prestonら, 前掲; Kaithamanaら(1999) *J. Immunol.* 163: 5157-5164を参照されたい)。

【0105】

抗体は例えば小薬物分子、酵素、リポソーム、ポリエチレングリコール(PEG)にコンジュゲート化されうる。抗体は治療、診断、キットまたは他の目的に有用であり、例えば色素、放射性同位体、酵素または金属、例えばコロイド金に結合した抗体を包含する(例えば、Le Doussalら(1991) *J. Immunol.* 146: 169-175; Gibelliniら(1998) *J. Immunol.* 160: 3891-3898; HsingおよびBishop(1999) *J. Immunol.* 162: 2804-2811; Evertsら(2002) *J. Immunol.* 168: 883-889を参照されたい)。

【0106】

50

蛍光標識細胞分取検出系（FACS（登録商標））を含むフローサイトメトリーのための方法が利用可能である。例えば、Owensら（1994）Flow Cytometry Principles for Clinical Laboratory Practice, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ; Givan（2001）Flow Cytometry, 2<sup>nd</sup> ed.; Wiley-Liss, Hoboken, NJ; Shapiro（2003）Practical Flow Cytometry, John Wiley and Sons, Hoboken, NJを参照されたい。例えば診断試薬としての使用のための、核酸プライマーおよびプローブを含む核酸、ポリペプチドおよび抗体を修飾するのに適した蛍光試薬が利用可能である。Molecular Probes（2003）Catalogue, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR; Sigma-Aldrich（2003）Catalogue, St. Louis, MO.

10

## 【0107】

免疫系の標準的な組織学的方法が記載されている。例えば、Muller-Harmelink（編）（1986）Human Thymus: Histopathology and Pathology, Springer Verlag, New York, NY; Hiattら（2000）Color Atlas of Histology, Lippincott, Williams, and Wilkins, Philadelphia, PA; Louisら（2002）Basic Histology: Text and Atlas, McGraw-Hill, New York, NYを参照されたい。

20

## 【0108】

例えば抗原フラグメント、リーダー配列、タンパク質フォールディング、機能的ドメイン、グリコシル化部位および配列アライメントを決定するためのソフトウェアパッケージおよびデータベースが利用可能である。例えば、GenBank, Vector NTI（登録商標）Suite (Informax, Inc, Bethesda, MD); GC G Wisconsin Package (Accelrys, Inc., San Diego, CA); DeCypher（登録商標）(TimeLogic Corp., Crystal Bay, Nevada); Menneら（2000）Bioinformatics 16: 741-742; Menneら（2000）Bioinformatics Applications Note 16: 741-742; Wrenら（2002）Comput. Methods Programs Biomed. 68: 177-181; von Heijne（1983）Eur. J. Biochem. 133: 17-21; von Heijne（1986）Nucleic Acids Res. 14: 4683-4690を参照されたい。

30

## 【0109】

## 実施例 2

## インビトロ処理方法

約 8 ~ 10 週齢の雌 C57Bl/6J または BALB/c/AnN マウスを、それぞれ、Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine または Sacramento, California) または Taconic Laboratory (Oxnard, California) から入手した。通常の動物飼料および水を自由に与えた。動物を使用する全てのプロトコルは Merck & Co., Inc. および Merck Research Labs (MRL) Palo Alto Animal Use and Care Committee により承認された。

40

## 【0110】

処理前に、マウスを計量し、個々のマウスからの腫瘍を測定した。バイアスを避けるために、体重または腫瘍体積の任意の異常値を除去し、残りのマウスを、同等の平均腫瘍サイズを有する種々の処理群に無作為化した。

## 【0111】

試験材料およびアイソタイプ対照を MRL Palo Alto Protein S

50

ciences 部門から凍結 (-80) ストックとして得た。製剤化バッファーは、タンパク質を安定化させ沈殿を防ぐために、各抗体に特異的なものであった。それらの詳細は後記に記載されている。

#### 【0112】

製剤/希釈剤を MRL Palo Alto Protein Sciences 部門から4の貯蔵体として得た。20 mM 酢酸 Na、7% スクロース (pH 5.5) のアイソタイプ対照 mIgG2a および抗 PD-1 製剤/希釈剤、75 mM NaCl、10 mM ホスファート、3% スクロース (pH 7.3) の mIgG1 製剤/希釈剤、ならびに 20 mM 酢酸 Na、7% スクロース、0.02% Tween 80 低過酸化物 (pH 5.5) の mDTA-1 (抗 mGITR) 製剤/希釈剤を、タンパク質を安定化させ沈殿を防ぐためのものであった。

10

#### 【0113】

##### 実施例 3

##### 腫瘍細胞系の調製および移植

MC38 または CT26 結腸癌細胞を、10% 熱不活性化ウシ胎児血清で補足された RPMI 培地内で培養した。1x1 MB49 膀胱癌細胞を、10% ウシ胎児血清および 1% GlutaMAX (商標) で補足されたダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) 内で培養した。1x10<sup>6</sup> 細胞の MC38、3x10<sup>5</sup> 細胞の CT26 または 0.5x10<sup>6</sup> 細胞の MB49 細胞を 100 μL 容量のリン酸緩衝食塩水中で各マウスの左腹部または右脇腹に皮下注射した。典型的には、まず、マウスを、移植に用いられる領域において電気バリカンで剃毛した。

20

#### 【0114】

##### 実施例 4

##### 腫瘍測定および体重

第1投与の前日およびその後は週2回、腫瘍を測定した。電気バリカンを使用して腫瘍の長さおよび幅を測定し、式：体積 (mm<sup>3</sup>) = 0.5 x 長さ x 幅<sup>2</sup> (式中、長さは長いほうの寸法である) を用いて、腫瘍体積を決定した。

#### 【0115】

マウスを定期的に計量して全身健康状態を監視し、そしてまた、必要な場合には実際の mg/kg 用量運搬/マウスを評価した。

30

#### 【0116】

##### 実施例 5

##### 投与溶液の調製、投与および分析

凍結ストックを融解し、湿った氷に移した。凍結融解の反復を避けるために、ストックの各バイアルを1回融解し、1回の使用に十分な体積のアリコート調製した。ポリプロピレン低付着チューブをこの目的に使用した。該アリコートをドライアイス中で瞬間凍結し、80 で保存した。各投与前に、1個のアリコートを融解し、適当な希釈剤中で名目濃度に希釈し、直ちに投与した。投与溶液のアリコートをドライアイス中で瞬間凍結し、分析まで -80 で保存した。電気化学発光検出とパターン化アレイとの組合せである多アレイ技術に基づく Meso Scale Discovery (MSD (登録商標), Rockville, MD) プラットフォームを使用して投与溶液を評価した。

40

#### 【0117】

MC38 および CT26 腫瘍がそれぞれ約 300 mm<sup>3</sup> および 220 mm<sup>3</sup> の平均サイズに達したら (典型的には移植の約2週間後)、試験物質の投与を開始した。MB49 腫瘍が約 105 mm<sup>3</sup> の平均サイズに達したら (移植の1週間後)、試験物質の投与を開始した。5 mg/kg の投与濃度における投与頻度の変動 (1回の投与から週6回の投与までの範囲) を試験した。その詳細は後記に記載されている。

#### 【0118】

##### 実施例 6

##### DTA-1 抗体のマウス化

50

ラット抗マウスDTA-1 GITR抗体 (S. Sakaguchi, Kyoto University, Kyoto, Japan) を以下のとおりにマウス化した。ラット抗体DTA-1の配列を可変重(VH)および可変軽(VL)ドメインに関して決定した。ラットDTA-1 VH配列をImmunogenetics IMGT Database (www.imgt.org) (Lefranc, M. - P.ら(1999) Nuc. Acids Res. 27:209-212)からのマウスVH生殖系列配列と比較した。DTA-1 VH配列をマウスVH生殖系列配列とアライメントさせ、従来のヒト化系と同様に評価した(例えば、WO 2005/047326を参照されたい)。ラットDTA-1 VHはマウス生殖系列IGVH5-4、IGVH5-6およびIGVH5-9に最も類似していた。CDR残基をDTA-1 VHからマウス生殖系列IGVH5-4に移し、2つのIGVH5-4フレームワーク残基をそれらの適合IGVH5-6へと変更し、マウスJ領域IGHJ-4(IMGT)をマウスIgG1およびマウスIgG2a Fc領域への連結のために使用した。

#### 【0119】

ラットDTA-1 VL(ラムダ)配列をGenBank:AAH02129.1からのマウスVL(ラムダ)配列とアライメントさせた。CDR残基をラットDTA-1 VL(ラムダ)からマウスAAH02129フレームワーク配列へ移した。マウス化DTA-1上の7個のフレームワーク残基を、ラットおよびマウス化VLドメインのコンピュータグラフィックモデルに基づいて変更した。マウス化DTA-1 VL(ラムダ)ドメインをマウス定常軽ドメインに融合させた。

#### 【0120】

全3個の構築物(1個のVHおよび2個のVL(ラムダ))に関して、コドン最適化遺伝子を合成し、発現ベクター内に挿入した。抗体をHEK293細胞内の一過性発現により発現させ、プロテインAクロマトグラフィーを用いて精製した。

#### 【0121】

##### 実施例7

##### 抗GITR/抗PD-1処理の結果

進行したMC38腫瘍を担持するC57BL/6Jマウスをマウス化抗mGITR(Merck Research Labs, Palo Alto, CA)(皮下(SC))およびマウス化抗mPD-1(Merck Research Labs, Palo Alto, CA)(腹腔内(IP))のそれぞれ5mg/kgの用量での1回または2回の毎週の注射で処理(治療)した。腫瘍サイズが240~360mm<sup>3</sup>に達したら、処理を開始した。腫瘍を週2回測定した。腫瘍の完全退縮(CR)を抗腫瘍効力に関する指標として用いた。2回の毎週の組合せ投与の後に組合せ投与は100%のCRの頑強な相乗効果をもたらした。該レジメンを各抗体(Ab.)の1回の投与(1用量)に制限すると、CRは70%に低下した。これは、抗mGITRの投与およびその1週間後に開始する抗mPD-1の4回の毎週の投与の組合せで達成されたものに類似している。抗mGITRおよび抗mPD-1投与の間の2週間の間隔はそれほど有効ではなかった。抗mGITRでの6回までの毎週の処理または抗mPD-1 Abの2~4回の毎週の処理の単独療法では僅か20~30%のCRが認められたに過ぎなかった(図1A~1Kを参照されたい)。

#### 【0122】

進行したMC38腫瘍を担持するC57BL/6Jマウスをそれぞれ5mg/kgの用量の抗mGITR(SC)および抗mPD-1(IP)で処理した。腫瘍サイズが200~350mm<sup>3</sup>に達したら、処理を開始した。腫瘍を週2回測定した。腫瘍の完全退縮(CR)を抗腫瘍効果の指標として用いた。2回の毎週の組合せ投与の後に組合せ投与は100%のCRの頑強な相乗効果をもたらした。これは前記の結果に匹敵するものである。しかし、該抗体を1週間の間隔で別々に投与した場合には60%のCRの低下が観察された。抗mGITRまたは抗mPD-1のいずれかの2回の毎週の単独療法は腫瘍増殖を抑制したが、CRをもたらさなかった(図2A~2Fを参照されたい)。

10

20

30

40

50

## 【0123】

進行したCT26腫瘍を担持するBALB/cAnNマウスをそれぞれ5mg/kgの用量の抗mGITR(SC)および抗mPD-1(IP)で処理した。腫瘍サイズが $220\text{mm}^3$  ( $180\sim 260\text{mm}^3$ )に達したら、処理を開始した。腫瘍を週2回測定した。腫瘍の完全退縮(CR)を抗腫瘍効果の指標として用いた。1回の組合せ投与は70%のCRの頑強な相乗効果をもたらした。単独療法として投与されたいずれかの抗体での抗腫瘍効力は0~10%のCRであった(図3A~3Dを参照されたい)。

## 【0124】

MB49腫瘍を担持するC57BL/6Jマウスをそれぞれ5mg/kgおよび10mg/kgの抗mGITR(SC)および抗mPD-1(IP)の1回の投与(1用量)で処理した。腫瘍サイズが $105\text{mm}^3$  ( $85\sim 122\text{mm}^3$ )に達したら、処理を開始した。腫瘍を週2回測定した。腫瘍の完全退縮(CR)を抗腫瘍効果の指標として用いた。抗GITRおよび抗PD-1の組合せ処理は40%のCRの増強した効力をもたらした。単剤処理群においてはCRは全く観察されなかった(図4A~4Dを参照されたい)。

10

## 【0125】

## 実施例8

調節性T細胞およびCD8細胞比に対する抗PD-1および抗GITRの組合せの効果  
A.方法

1. 混合リンパ球反応培養

末梢血単核細胞(PBMC)を、フィコール・ブランク・プラス(Ficoll Plus)密度勾配遠心分離を $1200\times g$ で20分間用いてパフィーコートから単離した。末梢血単核細胞を培地:血漿境界から集め、ダルベッコリン酸緩衝食塩水(DPBS)で2回洗浄した。塩化アンモニウムカリウムRBC溶解溶液(RBC溶解溶液)を使用して残留赤血球(RBC)を溶解した。

20

## 【0126】

以下の方法を用いて、CD14+単球から樹状細胞(DC)を産生させた。まず、RosetteSepヒト単球富化カクテルおよびフィコール・ブランク・プラス(Ficoll Plus)密度勾配遠心分離を $1200\times g$ で20分間用いて、パフィーコートから単球を単離した。単球を培地:血漿境界から取り出し、DPBSで2回洗浄した。RBC溶解溶液を使用して残留RBCを溶解した。10%ウシ胎児血清(FBS)、 $1,000\text{U/mL}$ 顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)および $400\text{U/mL}$ インターロイキン(IL)-4で補足されたダルベッコ変法イーグル培地内で富化単球を $2\times 10^6/\text{mL}$ の細胞密度で培養した。第6日に、 $0.5\mu\text{g}/\text{mL}$ リポ多糖を該培養に加え、該細胞を更に2日間培養した。

30

## 【0127】

混合リンパ球反応培養を24ウェルプレート内で調製した。末梢血単核細胞( $2\times 10^6/\text{mL}$ )を、 $100\text{U/mL}$ IL-2、 $5\text{ng}/\text{mL}$ IL-15、抗hGITR抗体(MK4166)、抗hPD-1抗体(MK-3475)、MK-3475およびMK4166の組合せまたはアイソタイプ対照mAb(抗RSV)の存在下、照射( $30\text{Gy}$ )同種異系DC( $0.2\times 10^6/\text{mL}$ )と共に培養した。フローサイトメトリーを用いてMLR培養内の調節性T細胞(Treg)の数を第7日に評価した。

40

## 【0128】

2. 混合リンパ球反応培養におけるTregのフローサイトメトリー検出

Treg(CD3+ CD4+ CD25+ FoxP3+)およびCD8+ T細胞の検出のために、MLR培養からの $1\sim 2\times 10^6$ 細胞を $50\mu\text{L}$ のBD Pharmingen染色バッファー中で抗CD3、抗CD4、抗CD25および抗CD8と共にインキュベートした。固定可能生存可能色素(Fixable Viability Dye) eFluor 506を使用して死細胞を排除した。抗CD3、抗CD4、抗CD3、抗CD4、抗CD8および抗CD25 mAbでの表面染色の後、FoxP3固定/透過性亢進キットを製造業者の説明(eBioscience)に従い使用して、細胞内Fo

50



x P 3 染色を行った。サンプルの獲得を L S R I I フローサイトメーターで行い、F l o w ソフトウェアバージョン 1 0 . 0 . 6 ( T r e e S t a r , I n c . ) を使用してデータを分析した。C D 3 + C D 4 + 細胞上のゲート化およびそれに続く C D 2 5 + F o x P 3 + 細胞上のゲート化により、T r e g を特定した。

【 0 1 2 9 】

### 3 . 調節性 T 細胞抑制アッセイ

R o s e t t e S e p ヒト C D 4 + T 細胞富化キットおよびフィコール・ブランク・プラス ( F i c o l l P a q u e P l u s ) 密度勾配遠心分離を 1 2 0 0 × g で 2 0 分間用いて、パフィーコートから C D 4 + T 細胞を単離した。C D 4 + T 細胞を培地 : 血漿境界から集め、D P B S で 2 回洗浄した。R B C 溶解溶液を使用して残留 R B C を溶解した。ヒト C D 2 5 - 結合マイクロビーズ I I キットを製造業者の説明 ( M i l t e n y i B i o t e c ) に従い使用して、C D 4 + C D 2 5 + T r e g および C D 4 + C D 2 5 - エフェクター T 細胞 ( T e f f s ) を分離した。C D 4 + C D 2 5 + C D 1 2 7 - T r e g の純度は約 4 0 % ~ 7 0 % であった。ヒト D C を前記のとおりに産生させた。

10

【 0 1 3 0 】

T 細胞抑制アッセイのために、合計  $1 \times 10^5$  個の T 細胞 ( T r e g および T e f f s ) および  $2 \times 10^4$  個の照射 ( 3 0 G y ) D C ( ウェル当たり ) を、M K - 4 1 6 6 、 M K - 3 4 7 5 、 M K - 3 4 7 5 および M K - 4 1 6 6 の組合せ、またはアイソタイプ対照 m A b ( 抗 R S V ) の存在下、9 6 ウェル丸底プレート内で 7 日間培養した。C D 4 + C D 2 5 - T e f f s および C D 4 + C D 2 5 + T r e g を 4 : 1 の比で混合した。第 6 日に、トリチウム標識チミジンを該培養に 2 0 分間加えた。トリチウム標識チミジンの存在下のインキュベーションの後、該細胞を集め、水を使用して細胞溶解し、カウンター ( P e r k i n E l m e r , 2 4 5 0 マイクロプレートカウンター ) を使用して分析した。T 細胞増殖のレベルは、取り込まれたトリチウム標識チミジンのレベルにより反映された。全てのアッセイは三重重複実験として行った。

20

【 0 1 3 1 】

### B . 結果

抗マウス G I T R 作動性 m A b D T A - 1 が T r e g の安定性および腫瘍内蓄積を変化させることは D T A - 1 の作用メカニズムに必須である ( C o h e n ら ( 2 0 1 0 ) P L o S O n e 5 ( e 1 0 4 3 6 ) : 1 - 1 2 ; および S c h a e r ら ( 2 0 1 3 ) C a n c e r I m m u n o l . R e s . 1 : 3 2 0 - 3 3 1 を参照されたい ) 。 M K - 4 1 6 6 の単体または M K - 3 4 7 5 との組合せがヒト T r e g の誘導およびそれらの抑制活性に影響を及ぼす能力を、ヒトインビトロアッセイを用いて調べた。

30

【 0 1 3 2 】

M L R における T r e g の誘導は詳細に記載されている ( 例えば、L e v i t s k y ら ( 2 0 1 3 ) T r a n s p l a n t a t i o n 9 6 : 6 8 9 - 6 9 6 を参照されたい ) 。したがって、血液中で天然に生じるヒト T r e g の数を増加させるために、そしてヒト T r e g および C D 8 : T r e g 比に対する M K - 4 1 6 6 の単体または M K - 3 4 7 5 との組合せの効果を評価するために、M L R を使用した。M L R 培養への  $10 \mu g / m L$  M K - 4 1 6 6 の添加は 7 日後に C D 4 + C D 2 5 + F o x P 3 + T r e g の数の減少をもたらした ( 図 5 A ) 。 M K - 3 4 7 5 は単独では T r e g の数に影響を及ぼさなかった。しかし、M K - 3 4 7 5 と M K - 4 1 6 6 との組合せは T r e g の数および C D 8 : T r e g 比に最も顕著な影響を及ぼした ( 図 5 B ) 。

40

【 0 1 3 3 】

ヒト T r e g の抑制活性に対する M K - 4 1 6 6 の効果を評価するために、T r e g 抑制アッセイを確立した。このアッセイにおいては、T 細胞増殖のレベルは、取り込まれたトリチウム標識チミジンのレベルにより反映される。M K - 4 1 6 6 を M K - 3 4 7 5 と組合せた場合、T 細胞増殖の用量依存的増加が観察された ( 図 6 ) 。これらの結果は、M K - 4 1 6 6 および M K 3 4 7 5 の存在下のインキュベーションが M L R 誘導性 T r e g

50

の数を減少させ、CD8:Treg比を増加させ、インビトロにおけるヒトTregの抑制機能を低下させる証拠を示している。

【0134】

表2は配列表における配列の簡潔な説明を示す。

【表2】

配列番号	説明
1	36E5 CDRH1
2	3D6 CDRH1
3	61G6 CDRH1
4	6H6 CDRH1
5	61F6 CDRH1
6	1D8 CDRH1
7	17F10 CDRH1
8	35D8 CDRH1
9	49A1 CDRH1
10	9E5 CDRH1
11	31H6 CDRH1
12	36E5 CDRH2
13	3D6 CDRH2
14	61G6 CDRH2
15	6H6 CDRH2
16	61F6 CDRH2
17	1D8 CDRH2
18	17F10 CDRH2
19	35D8 CDRH2
20	49A1 CDRH2
21	9E5 CDRH2
22	31H6 CDRH2
23	36E5 CDRH3
24	3D6 CDRH3
25	61G6 CDRH3
26	6H6 CDRH3
27	61F6 CDRH3
28	1D8 CDRH3
29	17F10 CDRH3
30	35D8 CDRH3

10

20

30

配列番号	説明	
31	49A1 CDRH3	
32	9E5 CDRH3	
33	31H6 CDRH3	
34	36E5 CDRL1	
35	3D6 CDRL1	
36	61G6 CDRL1	
37	6H6 CDRL1	
38	61F6 CDRL1	
39	1D8 CDRL1	10
40	17F10 CDR L1	
41	35D8 CDR L1	
42	49A1 CDR L1	
43	9E5 CDR L1	
44	31H6 CDR L1	
45	36E5 CDRL2	
46	3D6 CDRL2	
47	61G6 CDRL2	
48	6H6 CDRL2	
49	61F6 CDRL2	
50	1D8 CDRL2	20
51	17F10 CDR L2	
52	35D8 CDR L2	
53	49A1 CDR L2	
54	9E5 CDR L2	
55	31H6 CDR L2	
56	36E5 CDRL3	
57	3D6 CDRL3	
58	61G6 CDRL3	
59	6H6 CDRL3	
60	61F6 CDRL3	
61	1D8 CDRL3	30
62	17F10 CDR L3	
63	35D8 CDR L3	
64	49A1 CDR L3	
65	9E5 CDR L3	
66	31H6 CDR L3	
67	Humanized 1D8 VH	
68	Humanized 1D8 VL	
69	Humanized 3D6 VH	
70	Humanized 3D6 VL	
71	Humanized 6H6 VH	40
72	Humanized 6H6 VL	
73	Humanized 9E5 VH	
74	Humanized 9E5 VL	
75	Humanized 31H6 VH	
76	Humanized 31H6 VL	
77	Humanized 17F10 VH	
78	Humanized 17F10 VL	

配列番号	説明
79	Humanized 35D8 VH
80	Humanized 35D8 VL
81	Humanized 36E5 VH
82	Humanized 36E5 VL
83	Humanized 49A1 VH
84	Humanized 49A1 VL
85	Humanized 61F6 VH
86	Humanized 61F6 VL
87	Humanized 61G6 VH
88	Humanized 61G6 VL

【 図 1 A 】

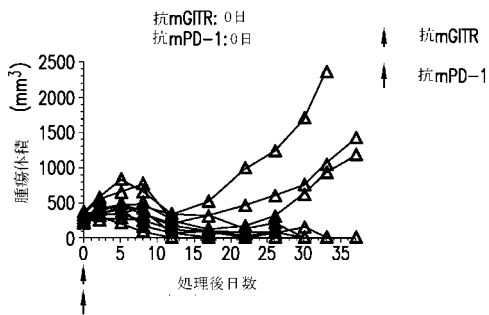


FIG. 1A

【 図 1 B 】

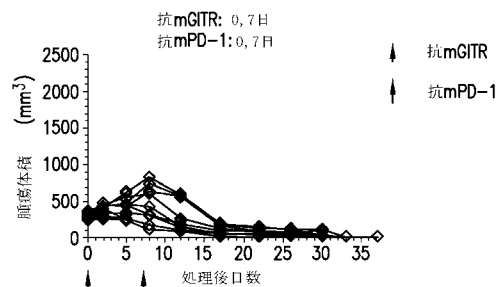


FIG. 1B

【 図 1 C 】

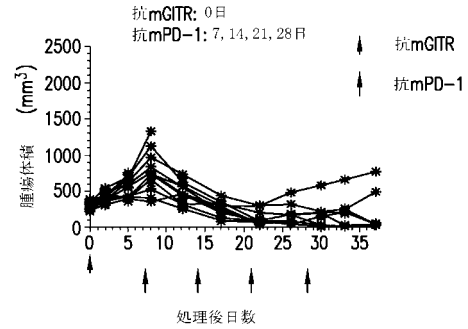


FIG. 1C

【 図 1 D 】

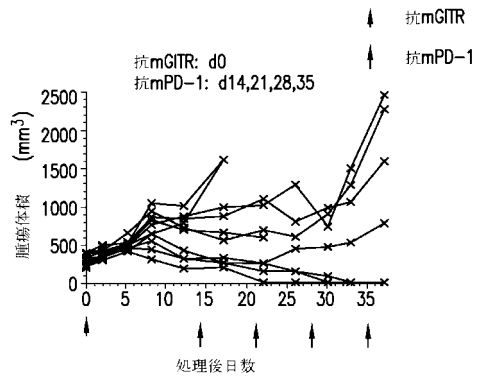


FIG. 1D

【 図 1 E 】

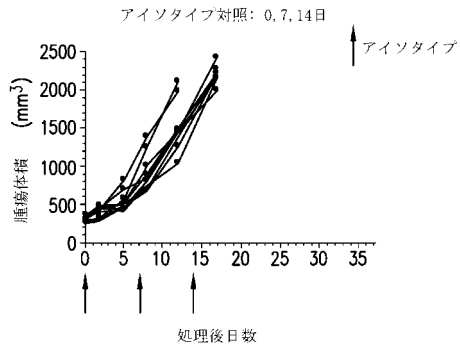


FIG.1E

【 図 1 F 】

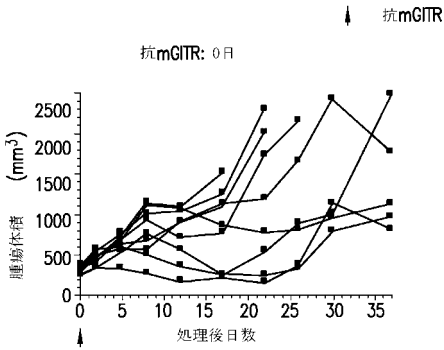


FIG.1F

【 図 1 I 】

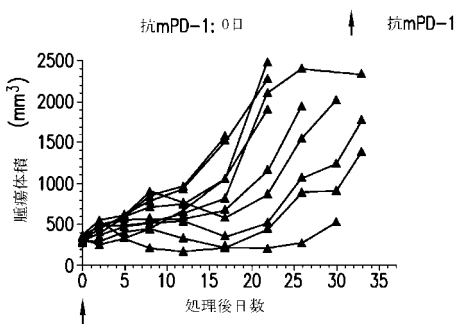


FIG.1I

【 図 1 J 】

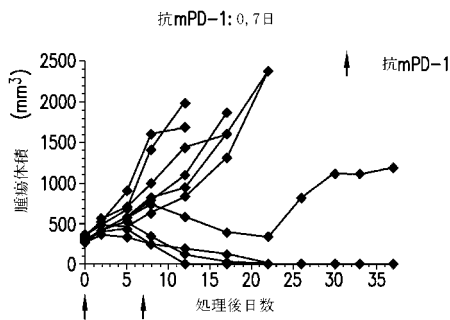


FIG.1J

【 図 1 G 】

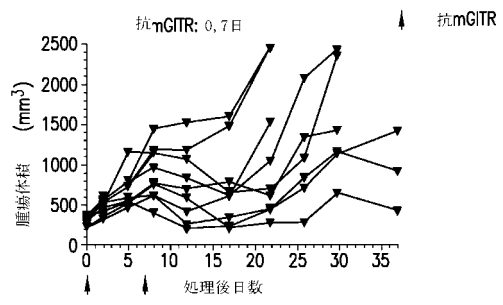


FIG.1G

【 図 1 H 】

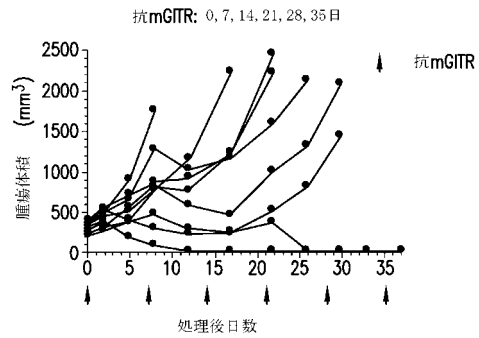


FIG.1H

【 図 1 K 】

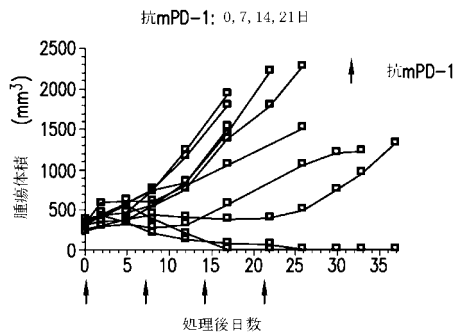


FIG.1K

【 図 2 A 】

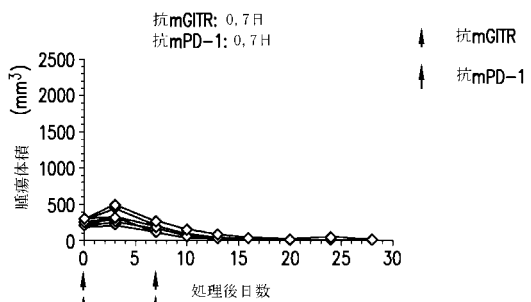


FIG.2A

【 図 2 B 】

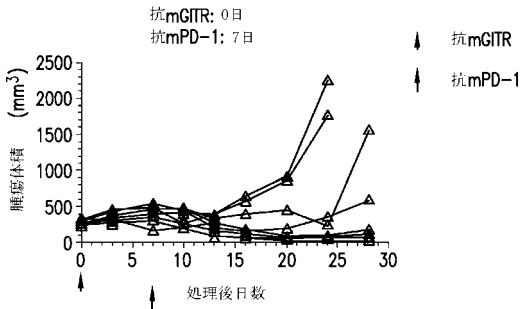


FIG.2B

【 図 2 D 】

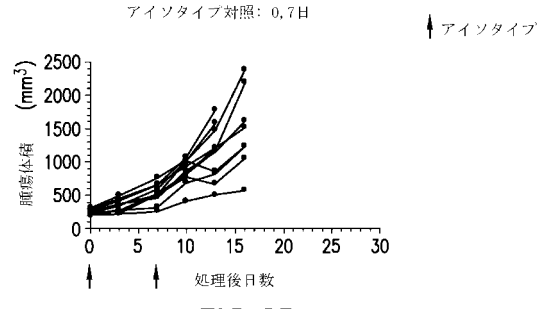


FIG.2D

【 図 2 C 】

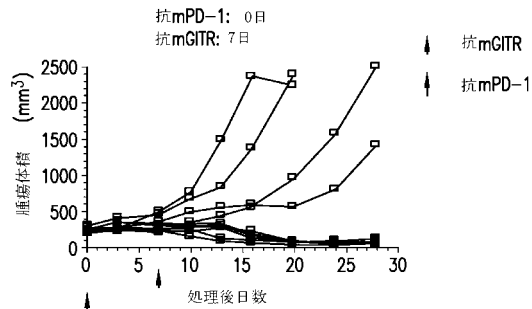


FIG.2C

【 図 2 E 】

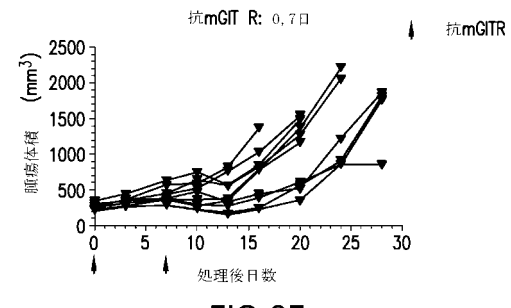


FIG.2E

【 図 2 F 】

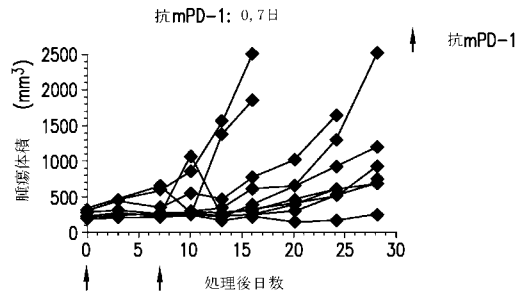


FIG.2F

【 図 3 B 】

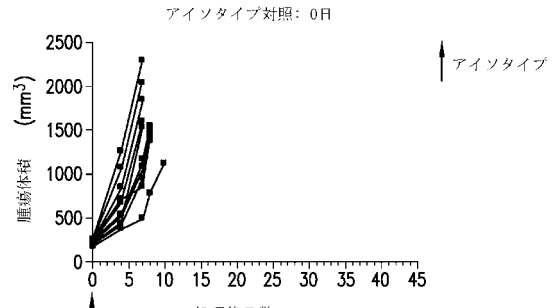


FIG.3B

【 図 3 A 】

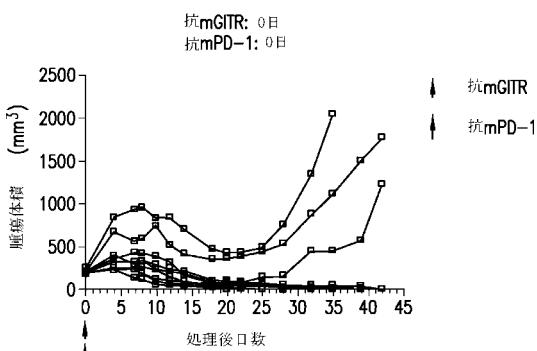


FIG.3A

【 図 3 C 】

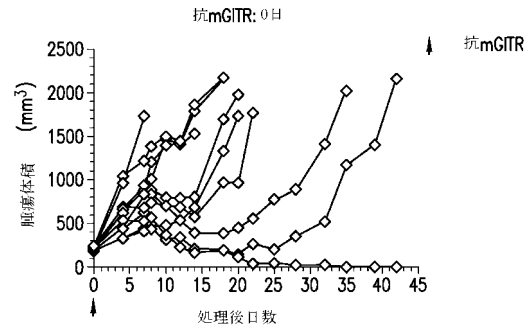


FIG.3C

【 図 3 D 】

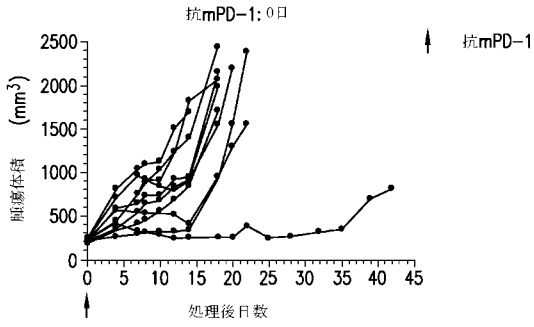


FIG.3D

【 図 4 B 】

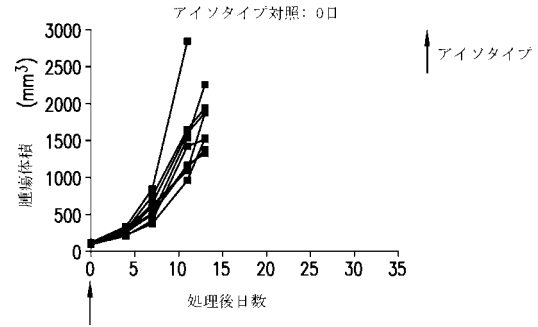


FIG.4B

【 図 4 A 】

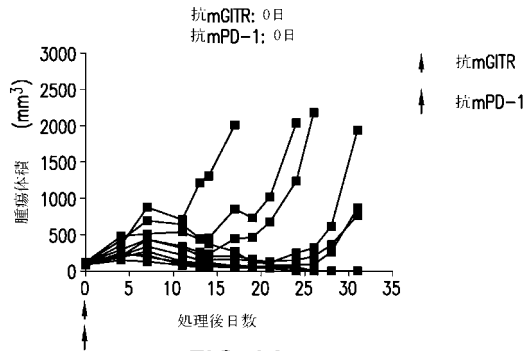


FIG.4A

【 図 4 C 】

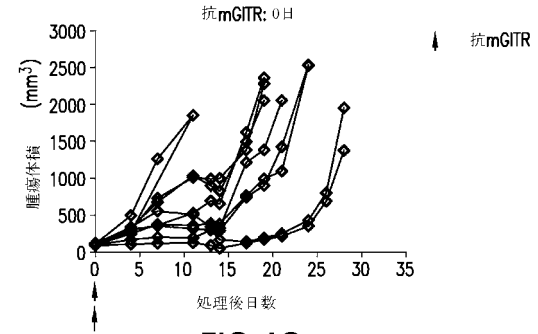


FIG.4C

【 図 4 D 】

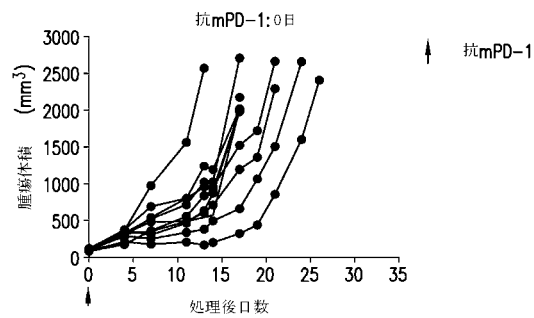


FIG.4D

【 図 5 B 】

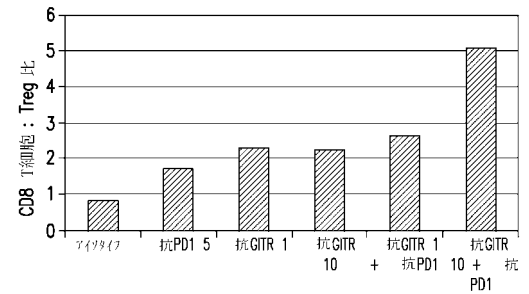


FIG.5B

【 図 5 A 】

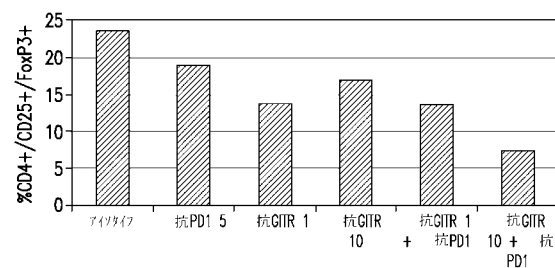


FIG.5A

【 図 6 】

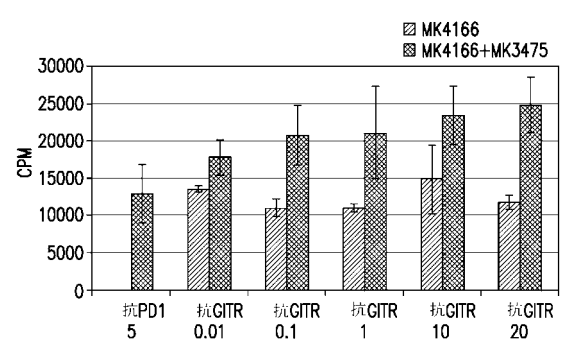


FIG.6

## 【配列表】

2018008953000001.app

## 【手続補正書】

【提出日】平成29年7月6日(2017.7.6)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

P D - 1またはP D - L 1に結合しP D - 1活性に拮抗する第1アームと、G I T Rに結合しG I T R活性を刺激する第2アームとを含む二重特異性抗体またはその抗原結合性フラグメントを含む、腫瘍の治療用の医薬組成物。

【請求項2】

第1アームが、B M S - 9 3 6 5 5 8、M K - 3 4 7 5およびM P D L 3 2 8 0 Aからの抗原結合性フラグメントからなる群から選択される、請求項1記載の医薬組成物。

【請求項3】

第2アームが、

a) 配列番号81に示すアミノ酸配列を含む可変重鎖のC D R - H 1、C D R - H 2およびC D R - H 3を含む重鎖、ならびに

b) 配列番号82に示すアミノ酸配列(アミノ酸31がNであり、アミノ酸57がNである)を含む可変軽鎖のC D R - L 1、C D R - L 2およびC D R - L 3を含む軽鎖を有する、請求項2記載の医薬組成物。

【請求項4】

第2アームが、

a) 配列番号81に示すアミノ酸配列を含む可変重鎖のC D R - H 1、C D R - H 2およびC D R - H 3を含む重鎖、ならびに

b) 配列番号82に示すアミノ酸配列(アミノ酸31がQであり、アミノ酸57がQである)を含む可変軽鎖のC D R - L 1、C D R - L 2およびC D R - L 3を含む軽鎖を有する、請求項2記載の医薬組成物。

【請求項5】

腫瘍が進行期腫瘍である、請求項1記載の医薬組成物。

【請求項6】

進行期腫瘍が、扁平上皮癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、胃腸癌、膵臓癌、神経膠芽細胞腫、神経膠腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、肝癌、肝細胞癌、膀胱癌、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、骨髄腫、多発性骨髄腫、唾液腺癌、腎臓癌、腎細胞癌、ウィルムス腫瘍、基底細胞癌、黒色腫、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、精巣癌および食道癌からなる群から選択される、請求項5記載の医薬組成物。



## 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 P 21/08 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
	C 1 2 N 15/00	A

(74)代理人 100119253  
弁理士 金山 賢教

(74)代理人 100124855  
弁理士 坪倉 道明

(74)代理人 100129713  
弁理士 重森 一輝

(74)代理人 100137213  
弁理士 安藤 健司

(74)代理人 100143823  
弁理士 市川 英彦

(74)代理人 100151448  
弁理士 青木 孝博

(74)代理人 100183519  
弁理士 櫻田 芳恵

(74)代理人 100196483  
弁理士 川崎 洋祐

(74)代理人 100203035  
弁理士 五味淵 琢也

(74)代理人 100185959  
弁理士 今藤 敏和

(74)代理人 100160749  
弁理士 飯野 陽一

(74)代理人 100146318  
弁理士 岩瀬 吉和

(74)代理人 100127812  
弁理士 城山 康文

(72)発明者 グウ, ダンリーン  
アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 4 3 0 4、パロ・アルト、サウス・カリフォルニア・アベニ  
ュー・9 0 1

(72)発明者 ビービ, エイミー・エム  
アメリカ合衆国、カリフォルニア・9 4 3 0 4、パロ・アルト、サウス・カリフォルニア・アベニ  
ュー・9 0 1

F ターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 CE12 DA05  
4C085 AA13 AA14 BB01 BB11 BB41 CC21 DD62 EE03 GG01  
4H045 AA11 AA30 BA41 DA76 EA20 FA74 GA26

【外国語明細書】

2018008953000001.pdf