

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7695272号
(P7695272)

(45)発行日 令和7年6月18日(2025.6.18)

(24)登録日 令和7年6月10日(2025.6.10)

(51)国際特許分類		F I	
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00
A 6 1 K	39/395(2006.01)	A 6 1 K	39/395
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13
		Z N A	
		T	
請求項の数 11 (全19頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号 特願2022-576221(P2022-576221)		(73)特許権者 515258402	
(86)(22)出願日 令和3年6月9日(2021.6.9)		ナントバイオ、インコーポレイテッド	
(65)公表番号 特表2023-535261(P2023-535261 A)		アメリカ合衆国、カリフォルニア州 9 0 2 3 2、カルバー シティ、ジェファ ーソン ブールバード 9 9 2 0	
(43)公表日 令和5年8月17日(2023.8.17)		(74)代理人 100120031	
(86)国際出願番号 PCT/IB2021/055076		弁理士 宮嶋 学	
(87)国際公開番号 WO2021/250594		(74)代理人 100120617	
(87)国際公開日 令和3年12月16日(2021.12.16)		弁理士 浅野 真理	
審査請求日 令和5年5月23日(2023.5.23)		(74)代理人 100126099	
(31)優先権主張番号 63/038,111		弁理士 反町 洋	
(32)優先日 令和2年6月11日(2020.6.11)		(72)発明者	
(33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)		クリフォード、アンダース、オルソン	
前置審査		アメリカ合衆国カリフォルニア州、カルバー、シティ、ジェファーソン、ブルバード、9 9 2 0	
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 抗 C T L A 4 モノクローナル抗体及びキメラ抗原受容体

(57)【特許請求の範囲】

- 【請求項 1】
配列番号 6 8 および配列番号 6 9 からそれぞれなる可変重鎖（V H）セグメントおよび可変軽鎖（V L）セグメントを含む、抗体またはそれを含む融合タンパク質。
- 【請求項 2】
配列番号 6 8 の第 1 のアミノ酸配列を含む重鎖と配列番号 6 9 の第 2 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む、抗体。
- 【請求項 3】
請求項 2 に記載の抗体を含み、前記抗体が、薬学的に許容可能な担体中に存在する、がんを有する患者を治療するための医薬組成物。
- 【請求項 4】
請求項 2 に記載の抗体を含み、前記抗体が、検出可能な標識をさらに含む、診断用組成物。
- 【請求項 5】
配列番号 6 8 の第 1 のアミノ酸配列をコード化する第 1 の核酸セグメント及び配列番号 6 9 の第 2 のアミノ酸配列をコードする第 2 の核酸セグメントを含む、組換え核酸。
- 【請求項 6】
N－8 0 3 を含むポリペプチドをコードする第 3 の核酸セグメントをさらに含む、請求項 5 に記載の組換え核酸。
- 【請求項 7】

請求項 5 または 6 に記載の組換え核酸を含む、組換え細胞。

【請求項 8】

前記細胞が、T 細胞、NK 細胞、NK T 細胞、単球、マクロファージ、又は樹状細胞である、請求項 7 に記載の組換え細胞。

【請求項 9】

前記細胞が、CHO 細胞又は EC7 細胞である、請求項 7 に記載の組換え細胞。

【請求項 10】

in vitro で細胞又は組織を、細胞又は組織における CTLA-4 媒介効果を減少させる量の請求項 1 または 2 に記載の抗体若しくは融合タンパク質に接触させるステップを含む、前記細胞又は組織における CTLA-4 媒介効果を減少させる方法。

【請求項 11】

請求項 1 または 2 に記載の抗体若しくは融合タンパク質の、医薬の製造のための使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、その全体が参照として援用される、2020 年 6 月 11 日に出願された米国仮特許出願第 63/038,111 号明細書の同時係属中の優先権を主張する。

【0002】

配列表

サイズが 110 KB であり、ファイル名が 102719.0032 PCT__REV005__ST25.txt である配列表の ASCII テキストファイルの内容は、2021 年 6 月 1 日に作成され、本出願と共に EFS-Web を介して電子的に提出され、その全体が参照により援用される。

【0003】

発明の分野

本発明の分野は、細胞傷害性 T リンパ球関連抗原-4 (CTLA-4) に結合する化合物、特に抗体、抗体断片、scFv、及び本明細書に提示される VH 及び VL ドメインを含む融合分子の組成物及び方法である。

【背景技術】

【0004】

背景説明には、本発明の理解に有用であってもよい情報が含まれる。本明細書で提供される情報のいずれかが先行技術であること、又は現在請求されている発明に関連していることを認めるものではなく、又は具体的に又は暗黙的に参照されるいかなる出版物も先行技術であることを認めるものではない。

【0005】

本明細書におけるすべての出版物及び特許出願は、あたかも各個々の出版物又は特許出願が参照により援用されることが具体的且つ個別に示されたかのように、参照により援用される。援用された参照における用語の定義又は使用が、本明細書で提供されるその用語の定義と矛盾し又は相反する場合、本明細書で提供されるその用語の定義が適用され、参照におけるその用語の定義は適用されない。

【0006】

免疫療法は、様々ながんに対する有望な治療戦略になりつつある。他の選択肢の中でも、典型的には免疫刺激薬と組み合わせられるがんワクチン組成物は、少なくともいくつかのアプローチで有意な治療効果を示している。残念なことに、腫瘍微小環境は、多くの場合、T 細胞及び NK 細胞の免疫抑制効果を有し、免疫療法の効果を低減することがよくある。細胞傷害性 T リンパ球関連抗原-4 (CTLA-4、CD152) は、活性化されたエフェクター T 細胞 (T_{eff}) によって発現される膜糖タンパク質であり、T 細胞の増殖、細胞周期の進行、及びサイトカイン (IL-2、IFN- γ) の抑制に関与する。CTLA-4 は、抗原提示細胞 (APC) 上の共通の B7 リガンド (CD80/CD86) への結合に対する CD28 陽性共刺激との競合、及びシグナル伝達分子と関連する細胞質尾

10

20

30

40

50

部を介した直接的な阻害効果をはじめとする、複数のメカニズムを通じて阻害機能を発揮すると考えられている。

【0007】

C T L A - 4 活性による免疫抑制を克服するために、抗 C T L A - 4 抗体を治療エフェクターとして使用することができる。現在知られている抗 C T L A - 4 抗体には、黒色腫、非小細胞肺癌 (N S C L C)、乳がん、前立腺がん、膵臓がん、肝細胞がん、及び中皮腫をはじめとする、様々ながんの治療において、単独で、又は化学療法、がんワクチン、若しくは他の抗体 (抗 P D - 1 若しくは抗 O X 4 0) と組み合わせて使用されているイピリムマブ及びトレメリムマブが含まれる。イピリムマブは、黒色腫において 1 0 m g / k g の用量で長期生存率を高め、B 細胞リンパ腫の患者において抗腫瘍活性を有していた。しかし、イピリムマブは、転移性去勢抵抗性前立腺がんの患者では効果が示されなかった。イピリムマブと同様の利点は示されなかったが、トレメリムマブの臨床試験では、黒色腫、難治性転移性大腸がん、肝細胞がん、及び悪性中皮腫の患者において許容可能な忍容性と臨床的に意味のある活性が示された。

10

【0008】

残念ながら、イピリムマブ及びトレメリムマブには重大な有害作用があり、免疫抑制の軽減に常に効果があるわけではない。したがって、C T R L A - 4 シグナル伝達を妨害する様々なシステム及び方法が当技術分野で知られているにもかかわらず、それらのすべて又はほとんどすべてがいくつかの欠点を抱えている。したがって、C T L A - 4 に結合する改善された化合物のための組成物及び方法が依然として必要とされている。

20

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明の主題は、C T L A - 4 に高い特異性及び親和性で結合するポリペプチドの様々な組成物及び方法に関する。好ましい実施形態では、ポリペプチドは、s c F v、抗体、又はその一部として、又は C A R、N - 8 0 3、若しくは T x M 誘導体などのキメラ分子として構成される。さらに好ましい実施形態では、ポリペプチドは、V H 及び／又は V L ドメインを含み、配列番号 1 ~ 5 9 に記載のアミノ酸配列を有し、又は配列番号 6 0 ~ 7 1 に記載の抗体の重鎖若しくは軽鎖を含む。容易に理解されるように、これらのポリペプチドは、様々な診断用途及び治療用途、特に免疫抑制の低減及びがんの治療において使用することができる。

30

【0010】

本発明の主題の一態様では、本発明者らは、配列番号 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、36、38、40、42、44、46、48、49、51、54、56、及び 58 からなる群から選択される第 1 のアミノ酸配列を含む V H セグメント、並びに／又は配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、37、39、41、43、45、47、50、53、55、57、及び 59 からなる群から選択される第 2 のアミノ酸配列を含む V L セグメントを含む一本鎖可変断片 (s c F v) ペプチドを考察する。最も典型的には、V H セグメント及び V L セグメントは、リンカーペプチド (例えば、グリシンに富むペプチド) と共役されている。さらに、一本鎖可変断片 (s c F v) ペプチドは、V H セグメント及び V L セグメントの少なくとも 2 つの対をさらに含み得ることが考察され、少なくとも 2 つの対は、連結されて多価 s c F v を形成する。望ましい場合、ペプチドは、薬理学的に許容可能な担体中に存在し得る。

40

【0011】

本発明の主題の別の態様では、本発明者らは、配列番号 60、61、62、64、65、66、68、及び 70 からなる群から選択される第 1 のアミノ酸配列を含む重鎖、並びに／又は配列番号 63、67、69、及び 71 からなる群から選択される第 2 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む抗体を考察する。例えば、適切な抗体には、配列番号 68 の第 1 のアミノ酸配列を含む重鎖と配列番号 69 の第 2 のアミノ酸配列を含む軽鎖、又は配列番号

50

70の第1のアミノ酸配列を含む重鎖と配列番号71の第2のアミノ酸配列を含む軽鎖を有する抗体が含まれる。

【0012】

本発明の主題のさらなる態様では、本発明者らは、一本鎖可変断片（s c F v）ペプチド又は本明細書に提示される抗体を含む、がんを有する患者を治療するための医薬組成物を考察し、一本鎖可変断片（s c F v）ペプチド又は抗体は、薬理学的に許容可能な担体中に存在する。

【0013】

本発明の主題のさらに別の態様では、本発明者らは、一本鎖可変断片（s c F v）ペプチド又は本明細書に提示される抗体を含む診断用組成物を考察し、一本鎖可変断片（s c F v）ペプチド又は抗体は、検出可能な標識をさらに含む。

【0014】

さらに、本発明者らは、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、36、38、40、42、44、46、48、49、51、54、56、及び58からなる群から選択される第1のアミノ酸配列をコード化する第1の核酸セグメント、並びに／又は配列番号2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、37、39、41、43、45、47、50、53、55、57、及び59からなる群から選択される第2のアミノ酸配列を含む組換え核酸も考察する。好ましくは、必須ではないが、第1及び第2のセグメントは、同一読み枠に存在する。さらに、本発明者らは、配列番号60、61、62、64、65、66、68、及び70からなる群から選択される第1のアミノ酸配列をコード化する第1の核酸セグメント、並びに／又は配列番号63、67、69、及び71からなる群から選択される第2のアミノ酸配列を含む組換え核酸を考察する。好ましくは、必須ではないが、第1及び第2のセグメントは、バイシストロン配置である。

【0015】

例えば、考察される組換え核酸は、配列番号68の第1のアミノ酸配列をコード化する第1の核酸セグメントと配列番号69の第2のアミノ酸配列をコード化する第2の核酸セグメント、又は配列番号70の第1のアミノ酸配列をコード化する第1の核酸セグメントと配列番号71の第2のアミノ酸配列をコード化する第2の核酸セグメントを含み得る。

【0016】

容易に理解されるように、組換え核酸は、キメラ抗原受容体（CAR）の少なくとも一部をコード化するポリペプチドをコード化する第3のセグメントをさらに含んでもよく、CARは、細胞内で発現されると、第1及び／又は第2の核酸セグメントを含む抗原結合細胞外ドメインを有する。代替として、組換え核酸は、N-803又はTxMの少なくとも一部をコード化するポリペプチドをコード化する第3のセグメントをさらに含んでもよく、N-803又はTxMは、細胞内で発現されると、第1及び／又は第2の核酸セグメントを含む抗原結合ドメインを有する。

【0017】

したがって、本発明者らはまた、上記の組換え核酸を（例えば、トランスフェクション又は遺伝子工学によって）含む組換え細胞を考察する。他の適切な細胞型の中でも、組換え細胞は、組換えT細胞、組換えNK細胞、組換えNKT細胞、組換え単球、組換えマクロファージ、又は組換え樹状細胞であり得る。代替として、組換え細胞は、CHO細胞又はEC7細胞などの組換えタンパク質を産生するようにエンジニアリングされた産生細胞であってもよい。

【0018】

なおさらに考察される態様では、細胞又は組織におけるCTLA-4媒介効果を低減する方法が提示され、この方法は、細胞又は組織を、細胞又は組織におけるCTLA-4媒介効果を低減する量の本明細書で提示される抗体である一本鎖可変断片（s c F v）ペプチドと接触させるステップを含む。

【0019】

そのため、本発明者らはまた、一本鎖可変断片（s c F v）ペプチド若しくは本明細書に提示される抗体を含む医薬組成物、又は本明細書に提示される組換え細胞を患者に投与するステップを含む、腫瘍を有する患者を治療する方法を考察する。最も好ましくは、医薬組成物は、腫瘍を治療するのに有効な用量及びスケジュールで患者に投与される。

【0020】

したがって、異なる観点から見ると、本発明者らは、一本鎖可変断片（s c F v）ペプチド若しくは本明細書に提示される抗体を含む医薬組成物、又は本明細書に提示される組換え細胞を患者に投与するステップを含む、腫瘍を有する患者における免疫抑制を低減する方法も考察する。最も好ましくは、医薬組成物は、腫瘍微小環境における免疫抑制を低減するのに有効な用量及びスケジュールで患者に投与される。

10

【0021】

したがって、本明細書に提示される一本鎖可変断片（s c F v）又は抗体又は組換え細胞の使用は、医学における使用のため、特にがんを治療するため、及び／又は腫瘍を有する患者における免疫抑制を低減するために考察される。

【0022】

本発明の主題の様々な目的、特徴、態様、及び利点は、同様の数字が同様の構成要素を表す添付の図面と併せて、好ましい実施形態の以下の詳細な説明からより明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

20

【0023】

【図1】図1は、本明細書に提示される様々なs c F v構築物についての例示的なS P Rの結果を示す。

【図2 A-D】図2 A～2 Dは、抗C T L A-4抗体及び本明細書に示される対照が投与された、処置された腫瘍の例示的な結果を示す。

【図2 E】図2 Eは、図2 A～2 Dの処置群についてのカプラン・マイヤープロットである。

【図3 A-D】図3 A～3 Dは、抗C T L A-4抗体及び本明細書に提示される対照が投与された、処置されていない腫瘍についての例示的な結果を示す。

【図3 E】図3 Eは、図3 A～3 Dの処置群についてのカプラン・マイヤープロットである。

30

【発明を実施するための形態】

【0024】

本発明者らは、C T L A-4、特に抗体のV H及びV Lドメイン、又はV H及び／若しくはV Lドメイン（及びその中に含まれるC D R）を含む断片又は融合タンパク質に有意に結合する様々なポリペプチドを発見した。最も有利には、V H及び／又はV Lドメイン又はその中に含まれるC D Rを使用して、C T L A-4に対して高い親和性及び特異性を有する様々な治療剤又は診断剤を生成することができる。

【0025】

本明細書で考察されるV H及びV Lドメインに関して、ドメインは一般に周知の命名法に従うことが理解されるべきである。そのため、V Hドメインは、典型的にはいくつかの定常ドメインに結合する抗体の重鎖の可変断片（例えば、I g GのC H 1、C H 2、及びC H 3ドメインに結合するV Hドメイン）を表す。同様に、V Lドメインは、典型的には定常ドメインに結合する抗体の軽鎖の可変断片（例えば、I g G中のC Lに結合したV Lドメイン）を表す。したがって、容易に理解されるように、V H及びV Lドメインのそれぞれは、典型的にはF R 1-C D R 1-F R 2-C D R 2-F R 3-C D R 3-F R 4として連続して配置された、それぞれのフレームワーク領域（F R）及び相補性決定領域（C D R）を有する。そのため、V H及びV Lドメインの既知のフレームワーク領域に基づいて、当業者は、V H又はV LドメインのそれぞれのC D Rを容易に認識するであろう。「ドメイン」及び「セグメント」という用語は、V H又はV Lと併せて、本明細書では互換

40

50

的に使用される。

【0026】

さらに容易に認識されるように、当業者は、VHセグメント及び／又はVLセグメントのアミノ配列を使用して、組換え単離抗体又はその断片を生成することができる。本明細書の用法では、「抗体」という用語は、免疫グロブリン分子、及び免疫グロブリン分子の免疫学的活性部分、すなわち、抗原と免疫特異的に結合する抗原結合部位を含有する分子を指す。したがって、「抗体及びその断片」には、免疫グロブリン分子全体（例えば、完全サイズ、全IgG₁、IgAなど）、及びその免疫グロブリン分子全体の抗原結合断片が含まれる。したがって、考察される断片としては、scFv、Fab断片、Fab'断片、F(ab')₂、ジスルフィド連結されたFv(sdFv)、Fv、及びV_Hセグメント及び／又はV_Lセグメントのどちらかを含んでなる任意の断片が挙げられる。抗体が免疫グロブリンである場合、免疫グロブリンは、任意のタイプ（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、又はIgY）及び任意のクラス（例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、又はIgA₂）の重鎖又は定常ドメインを含んで、異なるタイプの免疫グロブリンを構成し得ることが考察される。さらに、「抗体」としては、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体が特に挙げられるであろう。したがって、配列番号1～59のVH及び／又はVLドメインは、当該技術分野で周知の方法を用いて、任意の既存の（典型的にはヒト又はヒト化）抗体又は抗体断片にグラフト化され得ることが理解されるべきである。

【0027】

本発明者らは、配列番号1～59に示されるVHセグメント及び／又はVLセグメントのアミノ配列を使用して、担体タンパク質と共役させ、CTLA-4がハイブリッドタンパク質によって捕捉され得るか又は妨げられ得るように、その表面上にVHセグメント及び／又はVLセグメントを有するハイブリッドタンパク質を生成させ得ることを（that the that the）さらに考察する。VHセグメント及び／又はVLセグメントを安定に保有し、好ましくは腫瘍微小環境へのアクセスを提供し得る、担体タンパク質の任意の適切な形態が考察される。特に好ましい1つの担体タンパク質としては、1つ又は複数のVHセグメント及び／又はVLセグメントと共役される抗体部分（例えば、タンパク質A、タンパク質G、タンパク質Z）への親和性を有する、アルブミン、再折り畳みアルブミン、及びその他のタンパク質が挙げられる。

【0028】

典型的には、VHセグメント及び／又はVLセグメントは、アンカー分子と共役され、それによってVHセグメント及び／又はVLセグメントは、担体タンパク質と共役され得る。例えば、担体タンパク質がアルブミンである場合、アンカー分子は、アルブミンのSudlow部位I及びII、又はアルブミンのその他の任意の疎水性領域の1つに適合する、任意の適切なサイズの疎水性ペプチド又は糖脂質であり得る。例えば、上記のCTLA-4に対する組換え免疫グロブリンタンパク質は、そのFcドメインを介して担体タンパク質と共役され得る。その他の実施形態では、アンカー分子は、疎水性ペプチド（少なくとも10アミノ酸、15アミノ酸、20アミノ酸、30アミノ酸などの長さ）を含んでもよい。これらの実施形態では、VHセグメント及び／又はVLセグメント（例えば、scFvの形態としての）及び疎水性ペプチドの様々な構成が考察され得る。例えば、一価のscFvドメインは疎水性ペプチドに直接連結され得て、又は多価のscFvは疎水性ペプチドに直接連結され得る。代案としては、1つのscFvドメインは複数の疎水性ペプチドに直接連結され得て、又は複数のscFvドメインは複数の疎水性ペプチドに直接連結され得る。

【0029】

代案としては、又はそれに加えて、1つ又は複数のVHセグメント及び／又はVLセグメントは、担体タンパク質に結合するアンカー部分を有する中間分子と共役され得る。好ましい実施形態では、本発明者らは、複数の標的認識ドメインが、担体タンパク質上の単一結合部位を介して保有され得るように、中間分子が、VHセグメント及び／又はVLセ

グメントに対する複数の結合部位を提供することを考察する。適切な中間分子は、ナイーブ組織にいかなる有意な毒性も提供しない、任意のタンパク質、糖脂質、有機分子、又は無機分子を含んでもよい。例えば、適切な中間分子は、ナノ粒子（例えば、量子ドット、金ナノ粒子、磁性ナノ粒子、ナノチューブ、高分子ナノ粒子、デンドリマーなど）、又はビーズ（例えば、ポリスチレンビーズ、ラテックスビーズ、ダイナビーズなど）を含んでもよい。好ましくは、ナノ粒子及び／又はビーズは、1 μm 未満、好ましくは100 nm未満の寸法を有する。ナノ粒子は、担体タンパク質（例えば、アルブミン）へのアンカーを提供する疎水性尾部に架橋され、又はそれで部分的に被覆されてもよい。1つ又は複数のVHセグメント及び／又はVLセグメントもまた、ナノ粒子上に架橋され又はそれを部分的に被覆し得る（例えば、架橋などのために標的認識ドメインに連結された追加の尾部ドメインを介して）。

10

【0030】

別の例では、適切な中間分子は、担体タンパク質に対する抗体と共役されたビーズ（例えば、ポリスチレンビーズ、ラテックスビーズ、ダイナビーズなど）を含んでもよい。したがって、担体タンパク質がアルブミンである場合、ビーズが高い親和性及び特異性で担体タンパク質に結合し得るように、ビーズは α -アルブミン抗体と共役され得る（例えば、架橋、被覆など）。1つ又は複数のVHセグメント及び／又はVLセグメントもまた、ビーズ上に架橋され又はそれを部分的に被覆し得る（例えば、架橋、チオール媒介架橋などのために標的認識ドメインに連結された追加の尾部ドメインを介して）。

【0031】

いくつかの実施形態では、scFvペプチドは、ALT-803（IL-15スーパーアゴニスト複合体、例えば、Blood 2015 126:1957を参照されたい）又はTxM（標的化ALT-803ベースのスカフォールドプラットフォーム、例えば、URL、altorbioscience.com/our-science/il-15-protein-superagonist-and-scaffold-technology/を参照されたい）構造を含んでなり又はそれを模倣する、組換え免疫グロブリンタンパク質複合体を形成し得る。好ましくは、本発明者らは、免疫グロブリンタンパク質複合体がTxM構造を模倣する場合、scFvペプチドは、1つ又は複数のインターロイキン-15（IL-15）結合モチーフと、及び／又はIL-15結合モチーフ（例えば、IL-15、IL-15N72Dなど）に対する1つ又は複数のリガンドと、直接（又はリンカーを介して間接的に）共役され得ることを考察する。したがって、組換え免疫グロブリンタンパク質複合体がTxM IgG1構造を模倣する場合、組換え免疫グロブリンタンパク質複合体は、CTLA-4に対する1-4 scFvペプチドを含んでもよい。

20

30

【0032】

さらに、IL-15結合モチーフ又はそのリガンドと共役された1つ又は複数のscFvペプチドを有するTxM構造を模倣する、組換え免疫グロブリンタンパク質複合体は、腫瘍特異的抗原又は患者特異的及び腫瘍特異的ネオエピトープに対する結合ドメイン（例えば、ネオエピトープなどに対するscFvペプチドなど）もまた含んでもよい。例えば、組換え免疫グロブリンタンパク質複合体は、2つのIL-15結合モチーフと共役されたCTLA-4に対する2つのscFvペプチド、及び2つのIL-15結合モチーフリガンドと共役されたネオエピトープに対する2つのscFvペプチドを含んでもよい。好ましくは、ネオエピトープは、患者特異的且つ腫瘍特異的であり、例えば、米国特許出願公開第2012/0059670A1号明細書及び米国特許出願公開第2012/0066001A1号明細書で開示されるような配列データのオミクス解析によって同定される。

40

【0033】

いくつかの実施形態では、scFv又はその断片は、配列番号1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、36、38、40、42、44、46、48、49、51、54、56、及び58の中のVHセグメントをコード化する1つの配列を使用して生成することができる。他の実施形態で

50

は、s c F v、組換え抗体又はその断片は、配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、37、39、41、43、45、47、50、53、55、57、及び 59 の中の V L セグメントをコード化する 1 つの配列を使用して生成することができる。さらに他の実施形態では、s c F v、組換え抗体又はその断片は、配列番号 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、36、38、40、42、44、46、48、49、51、54、56、及び 58 の中の V H セグメントをコード化する 1 つの配列、並びに配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、37、39、41、43、45、47、50、53、55、57、及び 59 の中の V L セグメントをコード化する 1 つの配列を使用して生成することができる。これらの実施形態では、区別する V H 及び V L 識別子（例えば、それぞれ配列番号 1 及び 2 に示される 73-2 V H 及び 73-2 V L）を用いて配列表中の共通の指定配列（designator）を有する V H セグメントをコード化する配列及び V L セグメントをコード化する配列を対にすることが好ましい。しかし、以下により詳細に示されるように、配列番号 x x から 1 つの V H セグメントを選択し、配列番号 y y から 1 つの V L セグメントを選択することによって、V H セグメント及び V L セグメントの任意の対を生成して、C T L A-4 結合分子を形成できることも考察され、x x は、配列番号 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、36、38、40、42、44、46、48、49、51、54、56、及び 58 のうちのいずれか 1 つであり、y y は、配列番号 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、37、39、41、43、45、47、50、53、55、57、及び 59 のうちのいずれか 1 つである。

【0034】

本発明者らはまた、s c F v、組換え抗体又はその断片が、配列番号 x x 又は y y のいずれか 1 つと少なくとも 85 % 同一、好ましくは少なくとも 90 % 同一、より好ましくは少なくとも 95 % 同一である V H セグメント及び／又は V L セグメントをコード化するアミノ酸配列を用いて生成できることを考察する。最も典型的には、同一性が 100 % でない場合、異なるアミノ酸は、配列のフレームワーク領域の 1 つ又は複数に位置し、所与の配列の C D R 領域に影響を与えない。さらなる実施形態では、s c F v ペプチド、組換え抗体又はその断片の結合親和性は、100 nM 以下、又は 50 nM 以下、又は 20 nM 以下、又は 10 nM 以下、又は 5 nM 以下、又は 2 nM 以下、又は 1 nM 以下であることが好ましい。例えば、本明細書に提示される特定の V H 及び／又は V L ドメインを有する任意の s c F v を選択し、次に V H 及び V L の C D R 領域におけるランダム変異誘発を介して、s c F v を親和性成熟に供することができる。そのような例では、典型的には、所与の配列のすべての C D R 領域にわたって 4 個以下、又は 3 個以下、又は 2 個以下のアミノ酸が変更されることが考察される。したがって、認識されるように、結合特性が改善される親和性成熟プロセスから複数の結合剤を単離することができる。

【0035】

最も典型的には、s c F v ペプチド又は同様の構築物中の V H セグメント及び V L セグメントは、典型的には 5 ~ 40 アミノ酸、好ましくは 10 ~ 30 アミノ酸、より好ましくは 20 ~ 30 アミノ酸である、リンカー又はスペーサーを介して共役される。いくつかの実施形態では、リンカーは、V H セグメントの N 末端及び V L セグメントの C 末端に共役し得る。その他の実施形態では、リンカーは、V L セグメントの N 末端及び V H セグメントの C 末端に共役し得る。本発明者らは、V H セグメントと V L セグメントとの間に構造的な可撓性を提供するために、リンカーのためのグリシンに富む配列（例えば、(G₄S)_n、式中、n は 1 ~ 5 であるなど）が好ましいことをさらに考察する。1 つ又は複数のセリン又はスレオニン残基をリンカーに含めて、s c F v ペプチド、組換え抗体又はその断片の溶解度を高めることもまた考察される。当該技術分野で公知の多数のリンカー及び s c F v を作製する方法があり、このような既知の方法は、すべて本明細書での使用に適する

と見なされる。

【0036】

さらに、 $s c F v$ ペプチドは、複数の $V H$ セグメント及び $V L$ セグメントを含み、二価又は多価の $s c F v$ を形成し得る。いくつかの実施形態では、複数の $V H$ セグメント及び／又は $V L$ セグメントは、同一アミノ配列を有してもよい（例えば、3つの $V H$ セグメントと3つの $V L$ セグメントとを有する多価の $s c F v$ であって、すべての $V H$ セグメントが同一 $V H$ を有し、すべての $V L$ セグメントが同一 $V L$ ドメインを有する。その他の実施形態では、 $V H$ セグメント及び／又は $V L$ セグメントの少なくとも2つが、異なるアミノ酸配列を有してもよい（例えば、3つの $V H$ セグメントと3つの $V L$ セグメントとを有する多価の $s c F v$ であって、 $V H$ セグメントの2つが同一の $V H$ ドメインであり、 $V H$ セグメントの1つが異なり、 $V L$ セグメントの2つが同一の $V L$ ドメインであり、 $V H$ セグメントの1つが異なる。

10

【0037】

好ましくは、 $C T L A - 4$ （72量体及び77量体 $I L - 8$ の少なくとも1つ）に対する $s c F v$ 、組換え抗体又はその断片の結合親和性（ $K d$ ）は、 $25^{\circ}C \sim 37^{\circ}C$ の温度での測定、及び $5.5 \sim 7.5$ の $p H$ 範囲での測定で、少なくとも $1 \times 10^{-7} M$ 未満、好ましくは $1 \times 10^{-8} M$ 未満、より好ましくは $1 \times 10^{-9} M$ 未満である。本発明者らは、 $V H$ セグメント及び／又は $V L$ セグメントの同一アミノ酸配列を使用して、 $s c F v$ 、組換え抗体、又はその断片が生成されても、構造の違いのために、 $C T L A - 4$ に対する $s c F v$ 、組換え抗体、又はその断片の結合親和性が異なってもよいことを考察する。例えば、表1～4は、異なる $s c F v$ クローンの異なる親和性（ $K D$ 値で測定）を提供し、表5は、様々な組換え抗体（ $I g G 1$ ）クローンの様々な親和性（ $K D$ 値で測定）を示す。

20

【0038】

$s c F v$ ペプチド（又は抗体の $V H$ セグメント及び $V L$ セグメント若しくはそれらの断片）は、単一の組換え核酸によってコード化できることがさらに考察される。そのような実施形態では、組換え核酸には、少なくとも2つの核酸セグメント：本発明の主題の $V H$ セグメントをコード化する第1の核酸セグメント及び $V L$ セグメントをコード化する第2の核酸セグメントが含まれる。しかし、それぞれ $V H$ 及び $V L$ セグメントをコード化する第1及び第2の核酸セグメントが、配列番号1～59のいずれか1つと、少なくとも85%同一、好ましくは少なくとも90%同一、より好ましくは少なくとも95%同一であることもまた考察される。最も好ましくは、2つの核酸セグメントは、2つの核酸セグメントが、2つのペプチドセグメントを有する単一のタンパク質に翻訳され得るように、同一読み枠内にある。

30

【0039】

さらに、組換え核酸は、リンカーペプチド（好ましくは G に富む又はそうでなければ可撓性のリンカーペプチド）をコード化する、第1の核酸セグメントと第2の核酸セグメントとの間の第3の核酸セグメントを含んでもよく、これは、典型的には5～40アミノ酸、好ましくは10～30アミノ酸、より好ましくは20～30アミノ酸である。この実施形態では、3つの核酸セグメントは、3つの核酸セグメントが、3つのペプチドセグメントを有する単一のタンパク質に翻訳され得るように、同一読み取り枠内にあることが特に好ましい。

40

【0040】

一方、 $C T L A - 4$ 結合分子が抗体（例えば、 $I g G$ ）である場合、本明細書に提示される $V H$ セグメント及び $V L$ セグメントは、単一の組換えバイシストロン構築物上でコード化され得るか、又はこれらのセグメントは、2つの別個の構築物上でコード化され得る。最も典型的には、 $V H$ ドメインをコード化する核酸は、1つ又は複数の $C H$ ドメイン（例えば、 $I g G$ の場合は $C H 1 - C H 2 - C H 3$ ）もインフレームでコード化する。同様に、 $V L$ ドメインをコード化する核酸はまた、1つの $C H$ ドメイン（例えば、 $I g G$ の場合は $C L$ ）をインフレームでコード化する。最も典型的には、重鎖及び軽鎖の定常ドメインは、ヒト化されるが、他の哺乳動物配列も適切であると考えられる。さらに、組換え核

50

酸は、（必ずしも必要ではないが）好ましくは、抗体を発現する細胞に最適化されたコドン使用頻度を有することが認識されるべきである。

【0041】

本発明者らは、s c F v ペプチド、抗体又はその断片を、腫瘍を有する患者に投与して、C T L A - 4 によるシグナル伝達及び付随する免疫抑制を低減又は阻害できるように、医薬組成物として処方できることをさらに考察する。したがって、s c F v ペプチド、抗体又はその断片は、任意の薬学的に許容可能な担体中に（例えば、無菌注射用組成物として）、治療製剤のための投与単位当たり、少なくとも1 m l、好ましくは少なくとも5 m l、より好ましくは少なくとも20 m l の量で配合され得ることが考察される。しかし、代替製剤もまた本明細書での使用に適すると見なされ、すべての既知の投与経路及び投与様式が本明細書で考察される。本明細書の用法では、「投与する」という用語は、本明細書で考察される化合物及び組成物の直接投与及び間接投与の双方を指し、直接投与は、典型的には医療従事者（例えば、医師、看護師など）によって実施される一方で、間接投与は、典型的には、化合物及び組成物を直接投与のために医療専門家に提供するか、又は利用可能にするステップを含む。いくつかの実施形態では、医薬製剤は、皮下注射、真皮下注射、又は静脈内注射をはじめとする、全身注射によって投与される。他の実施形態では、以下により詳細に示されるように、腫瘍内注射を介して製剤を投与することが考察される。

10

【0042】

上記のV H及びV Lセグメントを含む、s c F v ペプチド、抗体又はその断片を含む、医薬組成物の1つの例示的な方法及び使用は、標的組織又は標的細胞におけるC T L A - 4 媒介効果を減少させることである。本明細書の用法では、C T L A - 4 媒介効果は、組織における又は組織の微小環境におけるC T L A - 4 の活性によって、直接的又は間接的に誘導される任意の生物学的帰結を指す。最も典型的には、この効果は、T細胞活性（及び特にT細胞とN K細胞による細胞障害性細胞死滅）の減少として観察可能であり、これは、腫瘍微小環境で増強又は観察され得る。別の観点から見ると、インビボでのI L - 8 媒介効果の減少は、生理学的現象によっても観察することができる。例えば、C T L A - 4 シグナル伝達の減少は、腫瘍の収縮、腫瘍細胞のアポトーシス、又は壊死によって腫瘍の成長の低減又は阻害を介して観察することができる。同様に、患者、特に腫瘍微小環境におけるC T L A - 4 シグナル伝達の減少は、腫瘍が局所又は遠隔転移を引き起こす傾向を低減する。

20

30

【0043】

患者への医薬組成物の投与の用量及びスケジュールに関して、用量及び／又はスケジュールは、ペプチドのタイプ（例えば、s c F v、抗体、抗体断片、これらの任意の2つの組み合わせ、すべての組み合わせなど）、疾患のタイプ及び予後（例えば、腫瘍のタイプ、サイズ、位置）、患者の健康状態（例えば、年齢、性別などをはじめとする）次第で変動してもよいことが考察される。変動してもよいものの、用量及びスケジュールは、製剤が、宿主の正常細胞にいかなる有意な毒性効果ももたらさないが、なおも腫瘍微小環境におけるC T L A - 4 の効果が、3時間以内、6時間以内、12時間以内、24時間以内、72時間以内、又は1週間以内に、少なくとも20%、好ましくは少なくとも30%、より好ましくは少なくとも40%、最も好ましくは少なくとも50%減少するのに十分であるように選択及び調整されてもよい。例えば、C T L A - 4 結合剤が抗体である場合、抗体の適切な用量は、1回の投与につき0.1~1.0 m g、又は1.0~5.0 m g、又は5.0~10.0 m g、又は10~50 m g、又は50~100 m g であり得る。

40

【0044】

さらに、本発明者らは、C T L A - 4 に対するs c F v、抗体又はその断片の効果が、1つ又は複数のがん薬物療法の同時投与によって増強され得ることを考察する。がん薬物療法としては、フルベストラント、アルドキシソルピシン、ドセタキセル、腫瘍壊死治療剤（例えば、 1^31 I - c h T N T - 3 など）、アベルマブ（P D - L 1 とその受容体との間の相互作用を妨げるヒトモノクローナルI g G₁抗体）、ブラキュリ標的化ワクチン（例

50

例えば、E T B X - 0 5 1 (A d 5 [E 1 - , E 2 b -] - ブラキュリ)) 、 H e r 2 標的化ワクチン (例えば、E T B X - 0 2 1 など) 、 M U C - 1 標的化ワクチン (例えば、E T B X - 0 6 1 (A d 5 [E 1 - , E 2 b -] - M U C 1)) 、 及び酵母ワクチン (例えば、G I - 4 0 0 0 (G I - 4 0 1 4 、 G I - 4 0 1 5 、 G I - 4 0 1 6 、 G I - 4 0 2 0) 、 G I - 6 2 0 7 、 G I - 6 3 0 1) 、 及び腫瘍特異的ネオエピトープに対するアデノウイルス又は酵母ベースのワクチンが挙げられるが、これに限定されるものではない。これらのがん薬物療法の例となる詳細は、その全体が参照として本明細書に援用される、国際公開第 P C T / U S 1 7 / 4 0 2 9 7 号に記載される。

【0045】

望ましい場合は、C T L A - 4 結合剤を細胞ベースの治療と同時投与することもでき (同時に、又は1日以上間隔をあけて) 、特に好ましい細胞ベースの治療には、N K 細胞及び／又はT細胞の輸血が含まれる。もちろん、そのような細胞は、標的特異的な腫瘍細胞死滅を増加させるために、1つ又は複数の組換え分子を発現するように遺伝子改変され得ることが理解されるべきである。

【0046】

特に好ましい態様では、そのような改変されたN K 細胞又はT細胞は、キメラ抗原受容体 (C A R) を発現するようにエンジニアリングすることができる。いくつかの実施形態では、N K 細胞又はT細胞のC A R は、1つ又は複数のがん又は腫瘍に特異的な抗原を標的とし得るが、特に考察される実施形態では、N K 細胞又はT細胞によって発現されるC A R は、C T L A - 4 を標的とする。一般に、適切なC A R は、少なくとも1つの細胞内シグナル伝達ドメインに連結された一本鎖可変断片 (s c F v) を含むことが知られている。s c F v は、標的細胞上の抗原 (例えば、抗原又はC T L A - 4) を認識して結合し、エフェクター細胞の活性化を引き起こす。シグナル伝達ドメインには、ほとんどの場合、受容体による細胞内シグナル伝達に重要な免疫受容体チロシンベースの活性化ドメイン (I T A M) が含まれる。適切なC A R には、様々な細胞、特にT細胞及びN K 細胞で発現され得る第1世代、第2世代、及び第3世代C A R が含まれる。

【0047】

第1世代C A R は、典型的には、1つの細胞質シグナル伝達ドメインを含む。例えば、T細胞の第1世代C A R の1つの型には、1つのI T A M を含むF c イプシロン受容体ガンマ (F c ε R I γ) からのシグナル伝達ドメインが含まれ得、別の型には、3つのI T A M を含むC D 3 ζ からのシグナル伝達ドメインが含まれ得る。第2世代C A R は、典型的には、C D 3 ζ と並んで最も一般的な細胞内共刺激ドメインとしてC D 2 8 を使用する。代替として、第2世代C A R は、C D 3 ζ と共に4 - 1 B B 細胞内シグナル伝達ドメインも包含し得る。第3世代C A R には、典型的には、C D 3 ζ 、C D 2 8 、及び4 - 1 B B 細胞内シグナル伝達ドメインが含まれる。さらなる第3世代C A R については、国際公開第2016 / 201304号パンフレット及び同第2018 / 076391号パンフレットも参照されたい。

【実施例】

【0048】

選択されたs c F v 分子のヒトC T L A - 4 への親和性を、表面プラズモン共鳴 (S P R) を介して実施した。より具体的には、P i o n e e r F E 装置を使用して、25℃でのs c F v と組換えC T L A - 4 タンパク質との間の結合親和性を測定した。簡単に言えば、ビオチン化抗F L A G M 2 抗体を、ニュートラアビジンでコーティングされたP C H バイオセンサー (M o l e c u l a r D e v i c e s / F o r t e B i o) に固定した。3 × F L A G タグ付きs c F v をセンサー上の抗F L A G M 2 で捕捉し、組換えヒトC T L A - 4 タンパク質を用いるワンステップインジェクションを使用して結合親和性を測定した。選択されたs c F v の例示的な結果を以下の表1及び2に示す。以下の表1 ~ 4 のクローンの表示において、s c F v のクローンは、示された配列番号を有するV H 及びV L ドメインの両方を含むことに注意すべきである。

【0049】

【表 1】

表 1

scFv のヒト CTLA-4 に対する親和性	
クローン	K _D (nM)
73-2 (配列番号 1, 配列番号 2)	0.56
74-1 (配列番号 3, 配列番号 4)	1.92
78-8 (配列番号 11, 配列番号 12)	168
78-8D2 (配列番号 13, 配列番号 14)	0.37
78-8D4 (配列番号 15, 配列番号 16)	0.21
78-8D5 (配列番号 17, 配列番号 18)	0.74
78-8D6 (配列番号 19, 配列番号 20)	0.24
78-8D7 (配列番号 21, 配列番号 22)	0.30
78-8D10 (配列番号 23, 配列番号 24)	0.58
78-8D14 (配列番号 25, 配列番号 26)	0.32
78-8D22 (配列番号 27, 配列番号 28)	0.16

10

【 0 0 5 0 】

【表 2】

表 2

scFv のヒト CTLA-4 に対する親和性	
クローン	K _D (nM)
78-24 (配列番号 33, 配列番号 34)	136
78-24D1 (配列番号 35, 配列番号 36)	1.15
78-24D4 (配列番号 38, 配列番号 39)	1.17
78-24D8 (配列番号 40, 配列番号 41)	1.46
78-24D9 (配列番号 42, 配列番号 43)	1.18
78-24D12 (配列番号 44, 配列番号 45)	2.88
78-24D14 (配列番号 46, 配列番号 47)	4.6
78-24D17 (配列番号 48, 配列番号 50)	0.87
78-24D22 (配列番号 51, 配列番号 53)	0.85

30

【 0 0 5 1 】

同様に、選択された s c F v 分子のマウス C T L A - 4 に対する親和性を、表面プラズモン共鳴 (S P R) によって測定した。より具体的には、P i o n e e r F E 装置を使用して、2 5 ° C での s c F v と組換え C T L A - 4 タンパク質との間の結合親和性を測定した。簡単に言えば、ビオチン化抗 F L A G M 2 抗体を、ニュートラアビジンでコーティングされた P C H バイオセンサー (M o l e c u l a r D e v i c e s / F o r t e B i o) に固定した。3 × F L A G タグ付き s c F v をセンサー上の抗 F L A G M 2 で捕捉し、組換えマウス C T L A - 4 タンパク質を用いるワンステップインジェクションを使用して結合親和性を測定した。選択された s c F v についての例示的な結果を以下の表 3 及び 4 に示す。

40

【 0 0 5 2 】

50

【表 3】

表 3

scFv のマウス CTLA-4 に対する親和性	
クローン	scFv K _D (nM)
78-1 (配列番号 5, 配列番号 6)	0.61
78-2 (配列番号 7, 配列番号 8)	0.55
78-5 (配列番号 9, 配列番号 10)	0.64
78-8 (配列番号 11, 配列番号 12)	0.06
78-8D2 (配列番号 13, 配列番号 14)	0.30
78-8D4 (配列番号 15, 配列番号 16)	0.20
78-8D5 (配列番号 17, 配列番号 18)	0.42
78-8D6 (配列番号 19, 配列番号 20)	0.19
78-8D7 (配列番号 21, 配列番号 22)	0.39
78-8D10 (配列番号 23, 配列番号 24)	0.49
78-8D14 (配列番号 25, 配列番号 26)	0.17
78-8D22 (配列番号 27, 配列番号 28)	0.37
78-13 (配列番号 29, 配列番号 30)	0.79

10

【0053】

20

【表 4】

表 4

scFv のマウス CTLA-4 に対する親和性	
クローン	scFv K _D (nM)
78-19 (配列番号 31, 配列番号 32)	2.39
78-24 (配列番号 33, 配列番号 34)	2.17
78-24D1 (配列番号 35, 配列番号 37)	0.059
78-24D4 (配列番号 38, 配列番号 39)	1.03
78-24D8 (配列番号 40, 配列番号 41)	0.01
78-24D9 (配列番号 42, 配列番号 43)	1.11
78-24D12 (配列番号 44, 配列番号 45)	0.01
78-24D14 (配列番号 46, 配列番号 47)	0.19
78-24D17 (配列番号 48, 配列番号 50)	1.06
78-24D22 (配列番号 51, 配列番号 53)	0.05
78-28 (配列番号 54, 配列番号 55)	2.57
78-36 (配列番号 56, 配列番号 57)	0.98
78-39 (配列番号 58, 配列番号 59)	0.97

30

【0054】

なおさらなる実験では、選択された V_H 及び V_L ドメインをヒト IgG 足場に移植し、25℃又は37℃で SPR (Pioneer FE) 又は Octet (Red 96e) によって K_D 測定を行った。表 5 に示されるすべての値は $\times 10^{-9}$ M である。抗ヒト Fc 抗体 (SPR) 又は AHC センサー (Octet) を使用して抗体をチップ表面に捕捉した。表 5 に示すように、ヒト又はマウスの CTLA-4 を分析物とした。

【0055】

40

50

【表 5】

表 5

IgG 抗体のヒト又はマウス CTLA-4 に対する KD (nM)					
VH	VL	25°C		37°C	
		hCTLA-4	mCTLA-4	hCTLA-4	mCTLA-4
78-8D2 (配列番号 60)	78-8 (配列番号 63)	0.41	0.32	0.67	0.40
78-8D4 (配列番号 61)	78-8 (配列番号 63)	0.39	0.27	0.39	0.27
78-8D22 (配列番号 62)	78-8 (配列番号 63)	0.46	0.39	0.44	0.53
78-24D1V (配列番号 64)	78-24 (配列番号 67)	1.6	0.18	1.5	0.23
78-24D17V (配列番号 65)	78-24 (配列番号 67)	0.84	0.34	0.67	0.33
78-24D22V (配列番号 66)	78-24 (配列番号 67)	1.4	0.19	1.3	0.27

【0056】

本発明者らは、ヒト CTLA-4 / ヒト CD80 又はマウス CTLA-4 / マウス CD80 を用いた BLI によって CD80 / CTLA4 複合体を遮断する抗体 (IgG1) をさらに調べた。ここでは、Octet Red 96 e 装置を使用して、CTLA-4 への CD80 の結合を遮断する α CTLA-4 抗体の能力を試験した。簡単に説明すると、ビオチン化 CTLA-4 を SA バイオセンサー (Molecular Devices / ForteBio) に固定した。次に、 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ (67 nM) の α CTLA-4 を使用して、CTLA-4 でコーティングされたバイオセンサーにロードした。最後に、 250 nM の CD80 を使用して、 α CTLA-4 抗体の存在下で CTLA-4 への結合を試験し、例示的な結果を図 1 に示す。

【0057】

上記のインビトロ試験に続いて、本発明者らは、選択された IgG 構築物の抗腫瘍活性を調べるために、様々なインビボ実験を実施することに着手した。具体的には、本発明者らは、酵母溶解物 (pTK170、腫瘍特異的ネオエピトープを発現する酵母)、抗 OX40 抗体、及び示されている選択された抗 CTLA-4 抗体を使用して、B16F10 マウス腫瘍モデルにおいて腫瘍内免疫化を試験した。4 つの群の動物を使用した：1. PBS；2. pTK170 + aOX40 + a-CTLA4-7 (配列番号 68、配列番号 69)；3. pTK170 + aOX40 + a-CTLA4-8 (配列番号 70、配列番号 71)；及び 4. pTK170 + aOX40 + a-CTLA4-9H10。pTK170 酵母の投与量は $5 \text{ YU}/\text{注射}$ であり、抗 OX40 及び抗 CTLA4 は、注射当たりそれぞれ $100 \mu\text{g}$ で投与した。

【0058】

腫瘍体積の例示的な結果を図 2A～2D に示し、動物のカプラン・マイヤープロットを図 2E に示す。容易に分かるように、すべての抗 CTLA4 群 (図 2B～図 2D) は、PBS (図 2A) と比較して、処置済み及び未処置の両方の腫瘍の腫瘍増殖を有意に減少させる。 $100 \mu\text{g}$ の用量でのクローン 7、8、及び 9H10 の間には統計的に有意な差はまだない。注射されていない腫瘍体積を図 3A～3D に示し、図 3A は PBS 対照であり、図 3B～3D は、抗 CTLA4 化合物での処置を示す。動物の対応するカプラン・マイヤープロットを図 3E に示す。

【0059】

いくつかの実施形態では、本発明の特定の実施形態を説明及び請求するために使用される、成分、濃度などの特性、及び反応条件などの量を表す数字は、場合によっては「約」という用語によって修正されることを理解されたい。したがって、いくつかの実施形態では、書面による説明及び添付の特許請求の範囲に示される数値パラメータは、特定の実施形態によって得られることが求められる所望の特性に応じて変化し得る近似値である。本明細書における値の範囲の記載は、単に、範囲内の個々の値を個別に参照する簡単な方法として機能することを意図している。本明細書で別段の指示がない限り、個々の値は、あたかも本明細書で個別に列挙されたかのように本明細書に援用される。

【0060】

本明細書の用法では、医薬組成物又は薬物を「投与する」という用語は、医薬組成物又は薬物の直接投与及び間接投与の両方を指し、ここで、医薬組成物又は薬物の直接投与は、典型的には医療専門家（例えば、医師、看護師など）によって実施され、間接投与には、直接投与（例えば、注射、注入、経口送達、局所送達などを介した）のために医療専門家に医薬組成物又は薬物を提供又は利用可能にするステップを含む。状態、疾患の発症に対する感受性、又は意図した治療に対する反応を「予知する」又は「予測する」という用語は、対象における状態の進行、改善、及び／又は期間をはじめとする、状態、感受性、及び／又は反応を予測する行為又は予測（ただし、治療又は診断は含まれない）を含むことを意味することにさらに留意されたい。

【0061】

本明細書に記載のすべての方法は、本明細書に別段の指示がない限り、又は文脈と明らかに矛盾しない限り、任意の適切な順序で実施することができる。本明細書の特定の実施形態に関して提供されるありとあらゆる例又は例示的な言葉（例えば、「など」）の使用は、単に本発明の理解をより容易にすることを意図しており、別の方法で請求される本発明の範囲を限定するものではない。明細書中の文言は、本発明の実施に不可欠な請求されていない要素を示すものと解釈されるべきではない。

【0062】

本明細書の説明、及びそれに続く特許請求の範囲全体にわたる用法では、「1つの（a）」、「1つの（an）」、及び「その（the）」の意味は、文脈上例外が明記されていない限り複数への言及を含む。本明細書の説明で使用されるように、文脈上例外が明記されていない限り、「in」の意味は、「in」及び「on」を含む。また、本明細書の用法では、文脈上例外が明記されていない限り、「～に共役された」という用語は、直接結合（互いに共役される2つの要素が互いに接触する）及び間接結合（少なくとも1つの追加の要素が2つの要素間に位置する）の両方を含むことを意図している。したがって、「～に共役された」及び「～と共役された」という用語は同義的に使用される。

【0063】

本明細書の発明的概念から逸脱することなく、既に記載されたもの以外のより多くの修正が可能であることは、当業者には明らかであろう。したがって、本発明の主題は、添付の特許請求の範囲を除き、制限されるものではない。さらに、本明細書と特許請求の範囲の双方の解釈において、すべての用語は、文脈に沿った可能な限り広範な様式で解釈されるべきである。特に、「含む（comprises）」及び「含む（comprising）」という用語は、非排他的様式で、要素、構成要素、又はステップを指し、参照される要素、構成要素、又はステップが存在しても、又は利用されても、あるいは明示的に参照されないその他の要素、構成要素、又はステップと組み合わせられてもよいことを示唆するものと解釈されるべきである。本明細書の請求項が、A、B、C、...及びNからなる群から選択されるものの少なくとも1つを指す場合、本文は、A + N、又はB + Nなどではなく、群からの1つの要素のみを必要とするものと解釈すべきである。

10

20

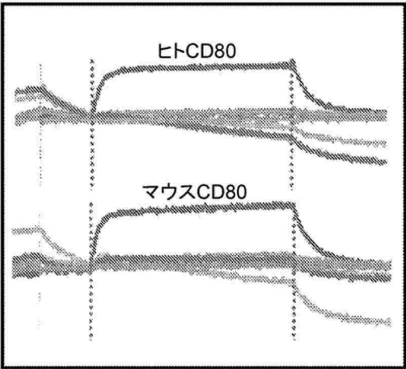
30

40

50

【図面】

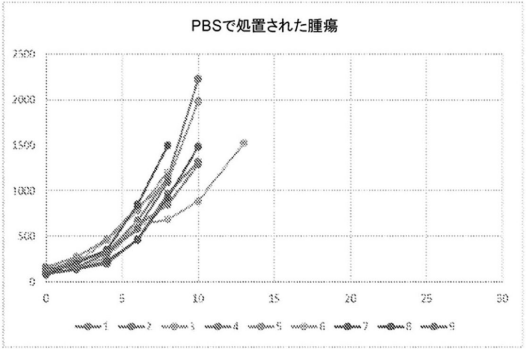
【図 1】



正規化されたベースライン

ステップ1	ステップ2 遮断	ステップ3
捕捉:	(mAb VL/VH):	結合:
CTLA-4	緩衝剤	CD80
CTLA-4	78-8/78-8D2	CD80
CTLA-4	78-8/78-8D4	CD80
CTLA-4	78-8/78-8D22	CD80
CTLA-4	78-24/78-24D1V	CD80
CTLA-4	78-24/78-24D17V	CD80
CTLA-4	78-24/78-24D22V	CD80
緩衝剤	緩衝剤	緩衝剤

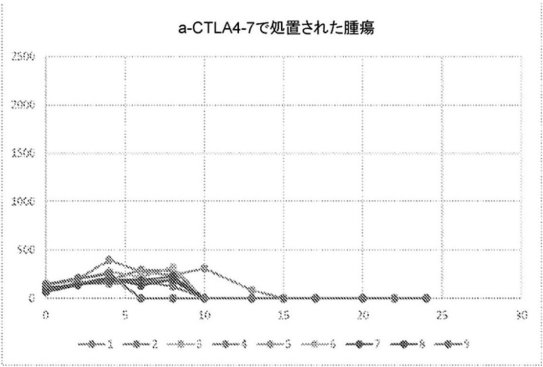
【図 2 A】



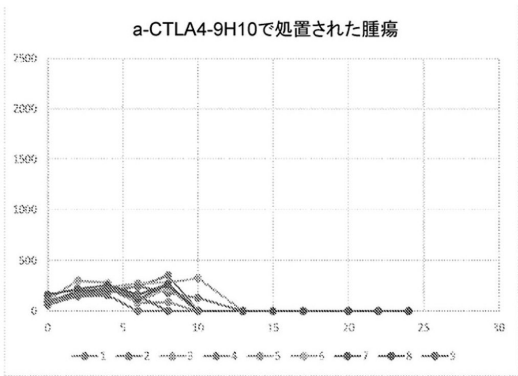
10

20

【図 2 B】



【図 2 C】

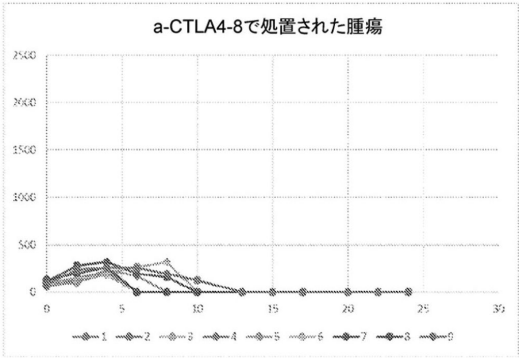


30

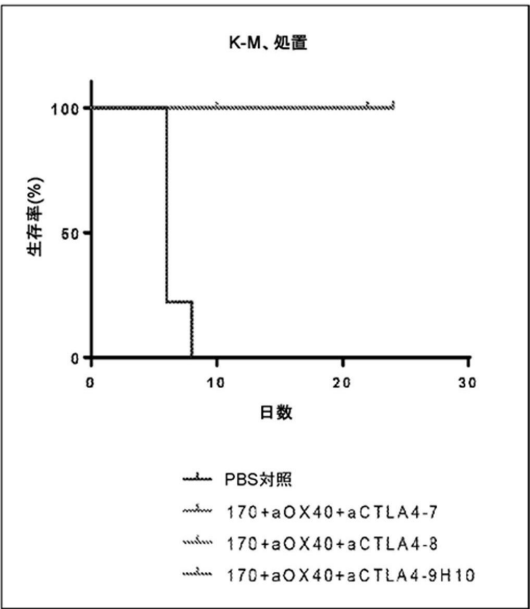
40

50

【図 2 D】



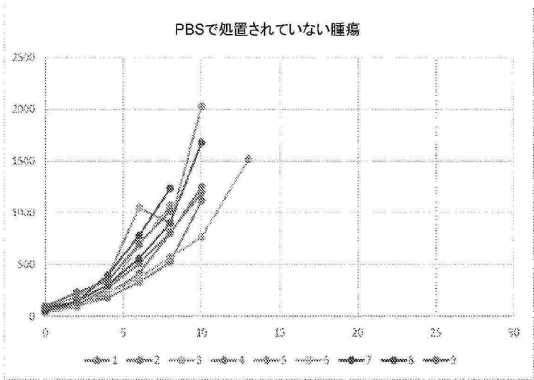
【図 2 E】



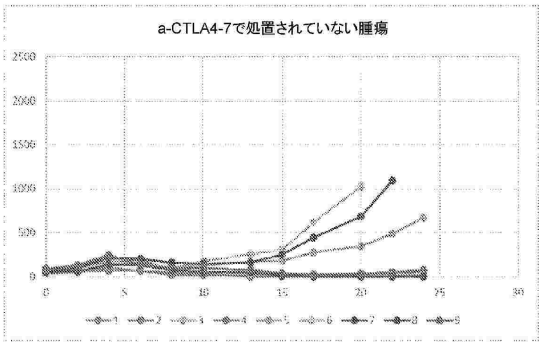
10

20

【図 3 A】



【図 3 B】

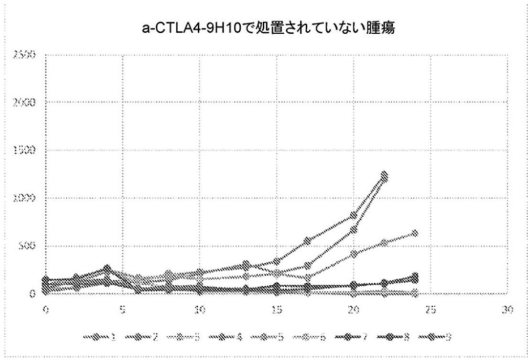


30

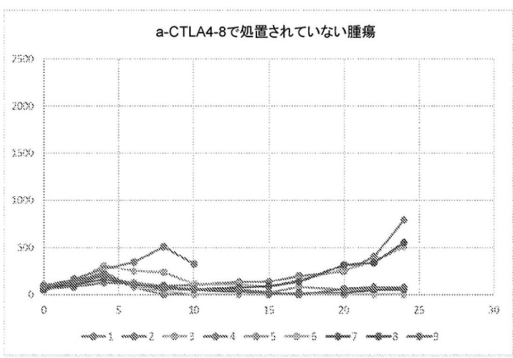
40

50

【図 3 C】

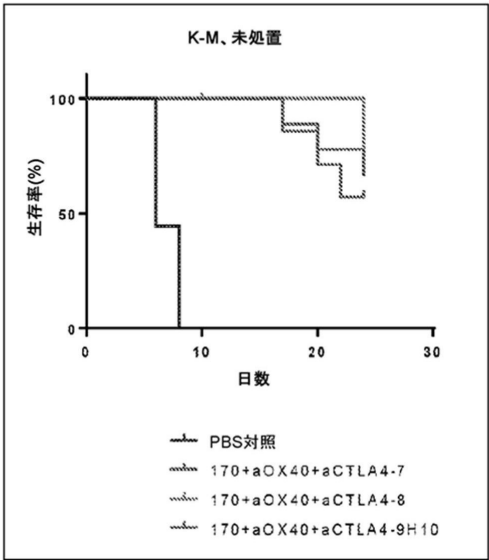


【図 3 D】



10

【図 3 E】



20

【配列表】

0007695272000001.app

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	15/62	(2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08	
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	D

(72)発明者 田中 志保

アメリカ合衆国カリフォルニア州、カルバー、シティ、ジェファーソン、ブルバード、9920

(72)発明者 カイバン、ニアジ

アメリカ合衆国カリフォルニア州、カルバー、シティ、ジェファーソン、ブルバード、9920

(72)発明者 メラニー、ヘルムレック

アメリカ合衆国カリフォルニア州、カルバー、シティ、ジェファーソン、ブルバード、9920

(72)発明者 トーマス、エイチ．キング

アメリカ合衆国カリフォルニア州、カルバー、シティ、ジェファーソン、ブルバード、9920

(72)発明者 チーミン、クオ

アメリカ合衆国カリフォルニア州、カルバー、シティ、ジェファーソン、ブルバード、9920

審査官 福岡 信子

(56)参考文献 特表2020-508637 (JP, A)

特表2017-523807 (JP, A)

特表2020-513819 (JP, A)

特表2020-508655 (JP, A)

特表2009-532030 (JP, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C a p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

U n i P r o t / G e n e S e q

S w i s s P r o t / G e n e S e q