

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6553197号  
(P6553197)

(45) 発行日 令和1年7月31日(2019.7.31)

(24) 登録日 令和1年7月12日(2019.7.12)

(51) Int.Cl.	F 1
A 61 K 39/395 (2006.01)	A 61 K 39/395
A 61 K 39/39 (2006.01)	A 61 K 39/39
A 61 P 31/00 (2006.01)	A 61 P 31/00
A 61 P 31/18 (2006.01)	A 61 P 31/18
A 61 P 35/00 (2006.01)	A 61 P 35/00

請求項の数 20 (全 117 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-540245 (P2017-540245)
(86) (22) 出願日	平成28年1月26日 (2016.1.26)
(65) 公表番号	特表2018-505177 (P2018-505177A)
(43) 公表日	平成30年2月22日 (2018.2.22)
(86) 國際出願番号	PCT/IB2016/050383
(87) 國際公開番号	W02016/120789
(87) 國際公開日	平成28年8月4日 (2016.8.4)
審査請求日	平成31年1月24日 (2019.1.24)
(31) 優先権主張番号	62/108,605
(32) 優先日	平成27年1月28日 (2015.1.28)
(33) 優先権主張国	米国(US)
(31) 優先権主張番号	62/192,331
(32) 優先日	平成27年7月14日 (2015.7.14)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者 513032275  
グラクソsmithkline international plc  
、リミテッド  
GLAXOSMITHKLINE INTERNATIONAL PROPERTY DEVELOPMENT LIMITED  
イギリス国ミドルセックス、ブレントフォード、グレート、ウエスト、ロード、98  
O

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】アゴニスト性 ICOS結合タンパク質

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

必要とするヒトにおいて癌および感染性疾患から選択される疾患を処置するための医薬組成物であって、ICOS結合タンパク質またはその抗原結合部分と薬学上許容可能な担体とを含んでなり、該ICOS結合タンパク質またはその抗原結合部分が、配列番号7に示されるアミノ酸配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含んでなるV<sub>H</sub>ドメインであって、配列番号7中の配列番号1、配列番号2および配列番号3に示されるアミノ酸配列を有する重鎖CDRを保持しているV<sub>H</sub>ドメイン、および配列番号8に示されるアミノ酸配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含んでなるV<sub>L</sub>ドメインであって、配列番号8中の配列番号4、配列番号5および配列番号6に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖CDRを保持しているV<sub>L</sub>ドメインを含んでなるものであり、かつ、ヒトICOSと特異的に結合するものである、医薬組成物。

## 【請求項 2】

前記処置において、前記ヒトに、少なくとも1種類の抗新生物薬、少なくとも1種類の第2の免疫調節薬、および/または少なくとも1つの免疫刺激性アジュバントが投与される、請求項1に記載の医薬組成物。

## 【請求項 3】

前記第2の免疫調節薬が、抗CTLA4抗体、抗PD-1抗体、抗PDL1抗体および抗OX40抗体から選択される、請求項2に記載の医薬組成物。

## 【請求項 4】

10

20

前記疾患が癌である、請求項 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

前記癌が、結腸直腸癌（C R C）、食道癌、子宮頸癌、膀胱癌、乳癌、頭頸部癌、卵巣癌、黒色腫、腎細胞癌（R C C）、E C 扁平上皮細胞癌、非小細胞肺癌、中皮腫、および前立腺癌から選択される、請求項 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

前記疾患が感染性疾患である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

前記感染性疾患がH I V である、請求項 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

ヒトにおいてT細胞増殖を刺激する、T細胞の活性化を誘導する、および／またはサイトカイン産生を誘導するための医薬組成物であって、I C O S 結合タンパク質またはその抗原結合部分と薬学上許容可能な担体とを含んでなり、該I C O S 結合タンパク質またはその抗原結合部分が、配列番号 7 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含んでなる  $V_H$  ドメインであって、配列番号 7 中の配列番号 1、配列番号 2 および配列番号 3 に示されるアミノ酸配列を有する重鎖 C D R を保持している  $V_H$  ドメイン、および配列番号 8 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 90 % 同一のアミノ酸配列を含んでなる  $V_L$  ドメインであって、配列番号 8 中の配列番号 4、配列番号 5 および配列番号 6 に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R を保持している  $V_L$  ドメインを含んでなるものであり、かつ、ヒトI C O S と特異的に結合するものである、医薬組成物。

【請求項 9】

前記疾患が癌である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

前記I C O S 結合タンパク質がモノクローナル抗体である、請求項 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

前記モノクローナル抗体がヒト化されている、請求項 10 に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

前記抗体が、配列番号 7 に示されるアミノ酸配列を含んでなる  $V_H$  ドメインと、配列番号 8 に示されるアミノ酸配列を含んでなる  $V_L$  ドメインとを含んでなる、請求項 11 に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

前記抗体が、ヒトI g G 1 アイソタイプまたはその変異体およびヒトI g G 4 アイソタイプまたはその変異体から選択される足場を含んでなる、請求項 12 に記載の医薬組成物。

【請求項 14】

前記抗体が足場を含んでなり、該足場がヒトI g G 4 アイソタイプであり、かつ、S 2 2 8 P 変異およびL 2 3 5 E 変異を含む F c 領域を含んでなる、請求項 12 に記載の医薬組成物。

【請求項 15】

前記免疫刺激性アジュvantがT L R 4 アゴニストである、請求項 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 16】

T L R 4 アゴニストが、C R X - 6 0 1 :

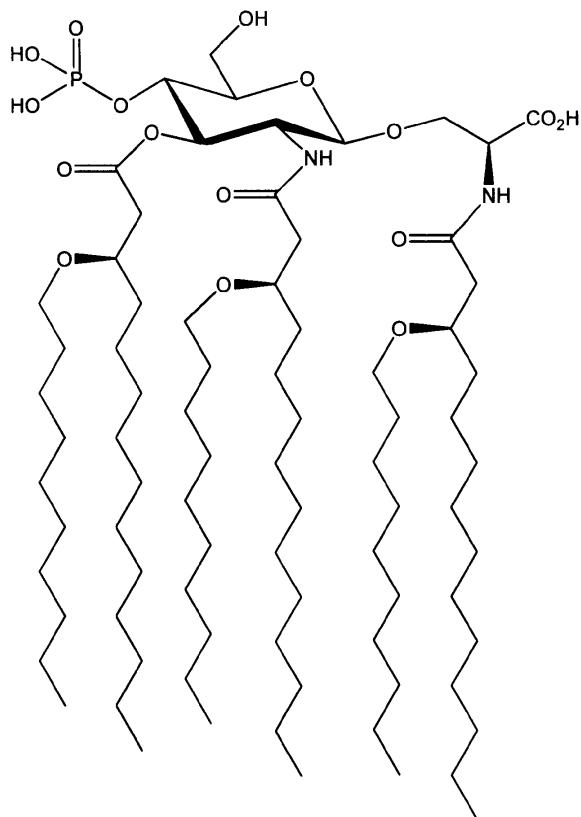
10

20

30

40

## 【化1】



(CRX-601).

を含む、請求項15に記載の医薬組成物。

## 【請求項17】

抗P D - 1抗体が、ペンプロリズマブまたはニボルマブである、請求項3に記載の医薬組成物。

## 【請求項18】

抗P D - 1抗体がペンプロリズマブである、請求項17に記載の医薬組成物。

## 【請求項19】

抗C T L A 4抗体がイピリムマブである、請求項3に記載の医薬組成物。

## 【請求項20】

必要とするヒトにおいて癌を処置するための医薬組成物であって、ヒトI C O Sと特異的に結合するモノクローナル抗体と薬学上許容可能な担体とを含んでなり、前記モノクローナル抗体が、配列番号7に示されるアミノ酸配列を含んでなるV<sub>H</sub>ドメインと、配列番号8に示されるアミノ酸配列を含んでなるV<sub>L</sub>ドメインとを含んでなるものであり、前記抗体が足場を含んでなり、該足場がヒトI g G 4アイソタイプであり、かつ、S 2 2 8 P変異およびL 2 3 5 E変異を含むF c領域を含んでなるものである、医薬組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、一般に、ヒト疾患の処置における免疫療法およびそれに関連する有害事象の軽減に関する。より具体的には、本発明は、I C O Sアゴニスト抗体を含むI C O S結合タンパク質の使用ならびに癌、感染性疾患および/または敗血症の処置における免疫調節剤としてのそれらの使用に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

10

20

30

40

50

抗腫瘍T細胞機能の増強およびT細胞増殖の誘導は、癌治療の有力かつ新規なアプローチである。3つの免疫腫瘍学抗体（例えば、免疫調節薬）が現在市販されている。抗CTLA-4（ヤーボイ(YERVOY) / イピリムマブ）は、T細胞プライミングの時点で免疫応答を増強すると考えられ、抗PD-1抗体（オプジー(OPDIVO) / ニボルマブおよびキートルーダ(KEYTRUDA) / ペンプロリズマブ）は、局部的腫瘍微小環境で、すでにプライミングされ活性化された腫瘍特異的T細胞阻害的チェックポイントを緩和することにより作用すると考えられる。

#### 【0003】

ICOSは、CD28 / CTLA-4 - Igスーパーファミリーと構造的および機能的に関連を持つ補助刺激T細胞受容体である(Hutloff, et al., "ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28", *Nature*, 397: 263-266 (1999))。ICOSの活性化は、ICOS-L (B7RP-1 / B7-H2)による結合を介して起こる。B7-1もB7-2も(CD28およびCTLA4のリガンド)ICOSと結合または活性化しない。しかしながら、ICOS-Lは、CD28およびCTLA-4の両方に弱く結合することが示されている(Yao S et al., "B7-H2 is a co-stimulatory ligand for CD28 in human", *Immunity*, 34(5); 729-40 (2011))。ICOSの発現はT細胞に限定されると思われる。ICOS発現レベルは、異なるT細胞サブセット間で、またT細胞の活性化状態で異なる。ICOSの発現は、休止中のTH17細胞、T滤胞性ヘルパー(TFH)細胞および制御性T(Treg)細胞において示されているが、CD28とは異なり、ナイーブTH1およびTH2エフェクターT細胞集団では発現は高くない(Paulos CM et al., "The inducible costimulator (ICOS) is critical for the development of human Th17 cells", *Sci Transl Med*, 2(55); 55ra78 (2010))。ICOSの発現は、CD4+およびCD8+エフェクターT細胞で、TCR結合を介した活性化の後に誘導が高まる(Wakamatsu E, et al., "Convergent and divergent effects of costimulatory molecules in conventional and regulatory CD4+ T cells", *Proc Natl Acad Sci USA*, 110(3); 1023-8 (2013))。ICOS受容体を介した補助刺激シグナル伝達は、同時TCR活性化シグナルを受け取っているT細胞にのみ生じる(Sharpe AH and Freeman GJ. "The B7-CD28 Superfamily", *Nat. Rev Immunol*, 2(2); 116-26 (2002))。活性化された抗原特異的T細胞では、ICOSは、IFN-γ、TNF-α、IL-10、IL-4、IL-13およびその他を含むTH1およびTH2の両サイトカインの産生を調節する。ICOSはまた、CD28よりは程度は小さいが、エフェクターT細胞の増殖も刺激する(Sharpe AH and Freeman GJ. "The B7-CD28 Superfamily", *Nat. Rev Immunol*, 2(2); 116-26 (2002))。

#### 【0004】

ますます多くの文献が、CD4+およびCD8+エフェクターT細胞でのICOSの活性化が抗腫瘍能を有することを裏づけている。ICOS-L-Fc融合タンパク質は、SAC-1(肉腫)、Meth A(線維肉腫)、EMT6(乳癌)およびP815(肥満細胞腫)およびEL-4(形質細胞腫)同系腫瘍を有するマウスで腫瘍増殖の遅延および完全な腫瘍根絶を生じたが、免疫原性が不十分であることが分かっているB16-F10(黒色腫)腫瘍モデルでは活性は見られなかった(Ara G et al., "Potent activity of soluble B7RP-1-Fc in therapy of murine tumors in syngeneic hosts", *Int. J Cancer*, 103(4); 501-7 (2003))。ヌードマウスで増殖させた腫瘍では活性が完全に失われたことから、ICOS-L-Fcの抗腫瘍活性は、完全な免疫応答に依存した。ICOS-L-Fc処置マウス由来の腫瘍の分析では、処置に応答した腫瘍でCD4+およびCD8+T細胞浸潤の顕著な増大が示され、これらのモデルにおいてICOS-L-Fcの免疫刺激効果が示唆された。

#### 【0005】

ICOS-L-FcおよびICOS-L-Igマウスを用いた別の報告では、B16/B16黑色腫同系腫瘍モデルで抗CTLA4抗体の抗腫瘍活性の媒介にICOSシグナル伝達が必要であることが示された(Fu T et al., "The ICOS/ICOSL pathway is required for

10

20

30

40

50

optimal antitumor responses mediated by anti-CTLA-4 therapy”, Cancer Res, 71(16); 5445-54 (2011))。ICOSまたはICOS-Lを欠くマウスは、抗CTLA4抗体処置後に野生型マウスに比べて有意に低い生存率を示した。別の研究では、B16/B16腫瘍細胞に組換えマウスICOS-Lを過剰発現せしように形質導入が行われた。これらの腫瘍は、対照タンパク質で形質導入されたB16/B16腫瘍細胞に比べ、抗CTLA4処置に対する感受性が有意に高いことが判明した(Allison J et al., “Combination immunotherapy for the treatment of cancer”, WO 2011/041613 A2 (2009))。これらの研究は、ICOSアゴニスト、単独で、また、他の免疫調節抗体の併用で抗腫瘍能の証拠を示す。

## 【0006】

抗CTLA4抗体で処置された患者からの新たなデータも、抗腫瘍免疫応答の媒介におけるICOS+エフェクターT細胞の積極的な役割を指し示している。イピリムマブ処置後に循環および腫瘍浸潤CD4<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup>およびCD8<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup>T細胞の絶対数が増加した転移性黒色腫患者(Giacomo AMD et al., “Long-term survival and immunological parameters in metastatic melanoma patients who respond to ipilimumab 10 mg/kg within an expanded access program”, Cancer Immunol Immunother., 62(6); 1021-8 (2013))；尿路上皮癌患者(Carthon BC et al., “Preoperative CTLA-4 blockade: Tolerability and immune monitoring in the setting of a presurgical clinical trial” Clin Cancer Res., 16(10); 2861-71 (2010))；乳癌患者(Vonderheide RH et al., “Tremelimumab in combination with exemestane in patients with advanced breast cancer and treatment-associated modulation of inducible costimulator expression on patient T cells”, Clin Cancer Res., 16(13); 3485-94 (2010))；および前立腺癌患者は、増加が限られていたかまたは見られなかった患者よりも処置に関連する転帰が有意に良好であった。重要なこととしては、イピリムマブはICOS<sup>+</sup>Tエフェクター:T<sub>reg</sub>比を変化させ、処置前のT<sub>reg</sub>の存在量を、処置後にT<sub>reg</sub>に対して有意なTエフェクターの存在量に逆転させることが示された(Liakou CI et al., “CTLA-4 blockade increases IFN-gamma producing CD4+ICOShi cells to shift the ratio of effector to regulatory T cells in cancer patients”, Proc Natl Acad Sci USA. 105(39); 14987-92 (2008)) and (Vonderheide RH et al., Clin Cancer Res., 16(13); 3485-94 (2010))。よって、ICOS陽性Tエフェクター細胞は、イピリムマブ応答の陽性予測バイオマーーであり、アゴニストICOS抗体でこの細胞集団を活性化することの潜在的利点を指し示す。

## 【0007】

よって、癌の治療においてさらなるT細胞増殖誘導分子の必要がある。

## 【発明の概要】

## 【0008】

本発明の1つの実施態様では、配列番号1に示されるCDRH1；配列番号2に示されるCDRH2；配列番号3に示されるCDRH3；配列番号4に示されるCDRL1；配列番号5に示されるCDRL2および/または配列番号6に示されるCDRL3または前記CDR中に2つまでのアミノ酸置換を有する各CDRの直接的等価物のうちの1以上を含んでなるICOS結合タンパク質または抗原結合部分が提供される。

## 【0009】

本発明の1つの実施態様では、ヒトICOSと特異的に結合するICOS結合タンパク質または抗原結合部分が提供され、前記ICOS結合タンパク質は、配列番号7に示されるアミノ酸配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含んでなるV<sub>H</sub>ドメインおよび/または配列番号8に示されるアミノ酸配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含んでなるV<sub>L</sub>ドメインを含んでなる。

## 【0010】

1つの実施態様では、配列番号1；配列番号2；および配列番号3に示されるアミノ酸配列を有する重鎖CDRと配列番号4；配列番号5；および配列番号6に示されるアミノ

10

20

30

40

50

酸配列を有する軽鎖 C D R を含んでなるヒト化モノクローナル抗体またはそれらの抗原結合部分が提供される。1つの実施態様では、h I g G 4 P E 足場；配列番号7に示されるアミノ酸配列を含んでなるV<sub>H</sub>ドメイン；および配列番号8に示されるアミノ酸配列を含んでなるV<sub>L</sub>ドメインを含んでなるヒト化モノクローナル抗体が提供される。本発明の抗体は、T細胞と接触した際にサイトカイン産生を刺激し得る。

## 【0011】

1つの実施態様では、ヒトI C O Sとの結合について本発明のI C O S結合タンパク質またはそれらの抗原結合部分のいずれか1つと競合するI C O S結合タンパク質が提供される。

## 【0012】

1つの実施態様では、I C O S結合タンパク質または本発明の少なくとも1つのI C O S結合タンパク質を含んでなる医薬組成物で癌、感染性疾患および/または敗血症を処置するための方法が提供される。

10

## 【図面の簡単な説明】

## 【0013】

【図1】C D 4 + C D 2 5 - T細胞からのI F N - 産生。

【図2】C D 4 + C D 2 5 - T細胞の増殖。

【図3】抗I C O S 4 2 2 . 2のH 2 L 5ヒト化変異体は、P B M C細胞において良好なサイトカイン産生を示す。

【図4】4 2 2 H 2 L 5 I g G 1はT細胞生存率の低下を誘導し、これはF c無効型アイソタイプまたはh I g G 4 P Eアイソタイプには見られなかった。

20

【図5】H 2 L 5 h I g G 4 P Eの用量応答は、ヒトC D 4 + T細胞において炎症性サイトカイン誘導を誘発した。

【図6】H 2 L 5 h I g G 4 P Eは、健康なヒトドナー由来の活性化P B M Cにおいて増殖、サイトカイン産生および細胞傷害能の増強を誘導する。

【図7】H 2 L 5 h I g G 4 P EによるI C O S - LのI C O Sへの結合の阻害を示すメソ・スケール・ディスカバリー(M S D)アッセイであり、それがI C O S上の、I C O S - Lと同じエピトープに結合し、結合をめぐって競合することが示される。

【図8】ハイブリドーマクローン4 2 2 . 2のR N Aから回収した抗体V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>遺伝子。

30

【図9】シグナル配列を有するH 2 L 5 h I g G 4 P Eの重鎖および軽鎖のタンパク質配列。

【図10】シグナル配列を有するH 2 L 5 h I g G 4 P E重鎖のコード領域のD N A配列。

【図11】シグナル配列を有するH 2 L 5 h I g G 4 P E軽鎖のコード領域のD N A配列。

【図12】カニクイザルにおけるH 2 L 5 h I g G 4 P Eの血漿濃度。濃度は、H 2 L 5 h I g G 4 P Eの(A)初回または(B)2回目の投与(15日目)の後に測定した。2回目の投与の48時間後に組織サンプルの採取および組織病理学的分析のために動物を犠牲にした。

40

【図13】サルの脾臓および腋窩リンパ節からのC D 4 + T細胞に対するH 2 L 5 h I g G 4 P Eの結合の検出。組織は2回目の投与の48時間後(17日目)に採取した。

【図14】カニクイザル由来の血中C D 4 + T細胞におけるH 2 L 5 h I g G 4 P Eの受容体の占有率。(A)フローサイトメトリーにより使用される抗I C O S蛍光標識抗体の陽性結合により測定されるI C O S「フリー受容体」、これはH 2 L 5 h I g G 4 P Eが存在しない場合にのみ結合する。(B)蛍光標識抗ヒトI g Gにより測定される、末梢血C D 4 + 細胞上のH 2 L 5 h I g G 4 P Eと結合した受容体。

【図15】(a)H 2 L 5 h I g G 4 P Eで処理したB a / F 3 - I C O S細胞におけるホスホ-A K T(T 3 0 8)発現レベル-細胞内シグナル伝達抗体アレイ、(b)H 2 L 5 h I g G 4 P Eで処理したB a / F 3 - I C O S細胞におけるホスホ-A K T(S 4 7

50

3) 発現レベル - 細胞内シグナル伝達抗体アレイ。

【図16】PBM C前刺激アッセイにおいて、H2L5 h IgG4PEとイピリムマブの組合せは、单一抗体処理に比べて炎症性サイトカイン産生の増大をもたらす。

【図17】PBM C前刺激アッセイにおいて、H2L5 h IgG4PEとペンプロリズマブの組合せは、单一抗体処理に比べて炎症性サイトカイン産生の増大をもたらす。

【図18】H2L5 h IgG4PEとイピリムマブの組合せは、CETペプチドとプレインキュベーションで改変したMLRアッセイにおいて、炎症性サイトカイン産生の増大を誘導する。

【図19】H2L5 h IgG4PEとペンプロリズマブの組合せは、CETペプチドとプレインキュベーションで改変したMLRアッセイにおいて、炎症性サイトカイン産生の増大を誘導する。 10

【図20】H2L5 h IgG4PE抗ICOSアゴニストmA bは単独で、また、ペンプロリズマブとの組合せで、ヒトPBMCA2058黒色腫マウス腫瘍モデルにおいて腫瘍増殖阻害をもたらす。

【図21】抗ICOSマウスサロゲートmA bは、CT26マウス腫瘍モデルにおいて、抗PD1マウスサロゲートmA bとの組合せで、有意な腫瘍増殖阻害および生存期間の増大をもたらす。 20

#### 【発明の具体的説明】

##### 【0014】

###### 定義

本明細書で使用する場合、「ICOS」は、任意の誘導性T細胞補助刺激タンパク質を意味する。ICOS(Inducible T-cell COstimulator)の仮称として、AILIM; CD278; CVID1、JTT-1またはJTT-2、MGC39850、または8F4が含まれる。ICOSは、活性化されたT細胞で発現されるCD28スーパーファミリー補助刺激分子である。この遺伝子によりコードされるタンパク質は、CD28およびCTL A-4細胞表面受容体ファミリーに属す。ICOSはホモ二量体を形成し、細胞間シグナル伝達、免疫応答、および細胞増殖の調節に重要な役割を果たす。ヒトICOSのアミノ酸配列を以下に配列番号10として示す。 30

##### 【化1】

```
MKSQLWYFFLFCLRIKVLTGEINGSANYEMFIHNGGVQILCKYPDIVQQFKMQLLKGGQILCDLTKTKGSGNTV
SIKSLKFCHSQLSNNSVSFFLYNLDHSHANYYFCNLISIFDPPPFKVTLTGGYLHIYESQLCCQLKFWLPIGCAAF
VVVCILGCILICWLTKKM (配列番号10)
```

##### 【0015】

本明細書で使用する場合、「ICOS-L」および「ICOSリガンド」は互換的に使用され、ヒトICOSの膜結型合天然リガンドを意味する。ICOSリガンドは、ヒトではICOSLG遺伝子によりコードされているタンパク質である。ICOSLGは、CD275(分化抗原群275)とも呼ばれている。PICOS-Lの仮称として、B7RP-1およびB7-H2が含まれる。 40

##### 【0016】

本明細書で使用する場合、用語「アゴニスト」は、ICOSと接触した際に、(1) ICOS受容体を刺激または活性化すること、(2) ICOSの活性、機能もしくは存在を増強、増大もしくは促進、誘導もしくは延長すること、および/または(3) ICOSの発現を増強、増大、促進もしくは誘導することのうち1以上を生じる抗原結合タンパク質、例えば、ICOS結合タンパク質を意味する。アゴニスト活性は、限定されるものではないが、細胞シグナル伝達、細胞増殖、免疫細胞活性化マーカー、サイトカイン産生の測定

定などの当技術分野で公知の様々なアッセイによって *in vitro* で測定することができる。アゴニスト活性はまた、限定されるものではないが、T 細胞増殖またはサイトカイン産生の測定などのサロゲートエンドポイントを測定する様々なアッセイによって *in vivo* で測定することもできる。

#### 【0017】

本明細書で使用する場合、用語「結合をめぐって交差競合する」とは、ICOSとの結合をめぐって本発明のICOS結合タンパク質のいずれかと競合するいずれのICOS結合タンパク質も意味する。ICOSをめぐる2分子間の結合の競合は、フローサイトメトリー、メソ・スケール・ディスカバリーおよびELISAを含む当技術分野で公知の様々な方法によって試験することができる。結合は直接測定することができ、これは2つ以上の結合タンパク質をICOSと接触させることができ、一方またはそれぞれに関して結合が測定可能であることを意味する。あるいは、対象とする分子(molecules or interest)の結合を結合リガンドまたは天然リガンドに対して試験し、互いに定量的に比較することもできる。

10

#### 【0018】

用語「ICOS結合タンパク質」は、本明細書で使用する場合、抗体およびICOSと結合し得る、ドメインなどの他のタンパク質構築物を意味する。場合によっては、ICOSはヒトICOSである。用語「ICOS結合タンパク質」は、「ICOS抗原結合タンパク質」と互換的に使用できる。よって、当技術分野で理解されるように、抗ICOS抗体および/またはICOS抗原結合タンパク質は、ICOS結合タンパク質と見なされよう。本明細書で使用する場合、「抗原結合タンパク質」は、ICOSなどの抗原と結合する、限定されるものではないが抗体、ドメインおよび他の構築物を含む任意のタンパク質である。本明細書で使用する場合、ICOS結合タンパク質の「抗原結合部分」は、限定されるものではないが、抗原結合抗体フラグメントを含む、ICOSと結合し得るICOS結合タンパク質の任意の部分を含む。

20

#### 【0019】

用語「抗体」は、本明細書では、免疫グロブリン様ドメインを有する分子(例えば、IgG、IgM、IgA、IgDまたはIgE)を意味して広義で使用され、モノクローナル抗体、組換え抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、二重特異性抗体を含む多重特異性抗体、およびヘテロコンジュゲート抗体；単一可変ドメイン(例えば、V<sub>H</sub>、V<sub>HH</sub>、V<sub>L</sub>、ドメイン抗体(dAb(商標)))、抗原結合抗体フラグメント、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、ジスルフィド結合Fv、一本鎖Fv、ジスルフィド結合cFv、ダイアボディ、TANDABS(商標)など、ならびに以上のいずれかの改変型を含む。

30

#### 【0020】

もう1つの抗体形式として、抗原結合タンパク質の1以上のCDRが、アフィボディ、S<sub>p</sub>A足場、LDL受容体クラスAドメイン、アビマーまたはEGFドメインなどの好適な非免疫グロブリンタンパク質足場または骨格上に配置させることができる別の足場が含まれる。

40

#### 【0021】

用語「ドメイン」は、タンパク質の残部とは独立にその三次構造を保持する折り畳まれたタンパク質構造を意味する。一般に、ドメインはタンパク質の別個の機能的特性を担い、多くの場合、そのタンパク質のおよび/またはそのドメインの残部の機能欠失なく他のタンパク質に付加、除去または移入可能である。

#### 【0022】

用語「単一可変ドメイン」は、抗体の可変ドメインに特徴的な配列を含んでなる折り畳まれたポリペプチドドメインを意味する。よって、これには、V<sub>H</sub>、V<sub>HH</sub>およびV<sub>L</sub>などの完全な抗体可変ドメイン、および例えば、1以上のループが、抗体可変ドメインに特徴的ではない配列で置換された改変型抗体可変ドメイン、または末端切断された、もしくはN末端もしくはC末端延長を含んでなる抗体可変ドメイン、ならびに全長ドメインの少

50

なくとも結合活性および特異性を保持する可変ドメインの折り畳まれたフラグメントが含まれる。単一可変ドメインは、異なる可変領域またはドメインとは独立に抗原またはエピトープと結合し得る。「ドメイン抗体」または「d A b (商標)」は、「单一可変ドメイン」と同じと見なされ得る。单一可変ドメインは、ヒト单一可変ドメインであり得るが、齧歯類、テンジクザメおよびラクダ科動物  $V_{H\ H}$  d A b (商標)などの他種由来の单一可変ドメインも含む。ラクダ科動物  $V_{H\ H}$  は、軽鎖を天然に欠いた重鎖抗体を産生する、ラクダ、ラマ、アルパカ、ヒトコブラクダ、およびグアナコを含む種に由来する免疫グロブリン单一可変ドメインポリペプチドである。このような  $V_{H\ H}$  ドメインは、当技術分野で利用可能な標準的技術に従ってヒト化してもよく、このようなドメインも单一可変ドメイン」と見なされる。本明細書で使用する場合、 $V_H$  にはラクダ科動物  $V_{H\ H}$  ドメインが含まれる。10

#### 【0023】

抗原結合フラグメントは、「非抗体タンパク質足場に1以上のCDRを配置する手段により提供され得る。「タンパク質足場」には、本明細書で使用する場合、限定されるものではないが、免疫グロブリン(Ig)足場、例えば、IgG足場が含まれ、4鎖抗体であっても2鎖抗体であってもよく、または抗体のFc領域のみを含んでなってもよく、または抗体由来の1以上の定常領域を含んでなってもよく、その定常領域はヒトもしくは靈長類起源のものであってよく、またはヒトおよび靈長類定常領域の人工キメラであってもよい。

#### 【0024】

タンパク質足場は、Ig足場、例えば、IgG、またはIgA足場であってよい。IgG足場は、抗体の一部または総てのドメイン(すなわち、CH1、CH2、CH3、 $V_H$ 、 $V_L$ )を含んでなり得る。抗原結合タンパク質は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4またはIgG4PEから選択されるIgG足場を含んでなり得る。例えば、足場はIgG1であり得る。足場は抗体のFc領域からなってもよく、または含んでなってもよく、またはその一部である。

#### 【0025】

タンパク質足場は、ICOSなどの天然リガンド以外の抗原への結合を得るためにタンパク質操作を受けた、CTLA-4、リポカリン、プロテインA由来分子、例えば、プロテインAのZドメイン(アフィボディ、SpA)、Aドメイン(アビマー/マキシボディ)；熱ショックタンパク質、例えば、GroE1およびGroES；トランスフェリン(トランスポディ)；アンキリンリピートタンパク質(DARPin)；ペプチドアプタマー；C型レクチンドメイン(テトラネクチン)；ヒト-クリスタリンおよびヒトユビキチン(アフィリン)；PDZドメイン；ヒトプロテアーゼ阻害剤のサソリ毒素クニッツ型ドメイン；およびフィブロネクチン/アドネクチンからなる群から選択される足場の誘導体であり得る。30

#### 【0026】

抗原結合部位は、ある抗原に特異的に結合し得る抗原結合タンパク質上の部位を意味し、これは単一可変ドメインであってもよいし、または標準的な抗体に見られ得るように、 $V_H$ / $V_L$  ドメイン対であってもよい。単鎖Fv(ScFv)ドメインもまた抗原結合部位を提供し得る。用語「エピトープ結合ドメイン」は、異なるドメインとは独立に、エピトープとして知られる抗原の領域と特異的に結合するドメインを意味する。40

#### 【0027】

多重特異性抗原結合タンパク質という用語は、少なくとも2つの異なる抗原結合部位を含んでなる抗原結合タンパク質を意味する。これらの各抗原結合部位は、同じ抗原上に存在しても異なる抗原上に存在してもよい異なるエピトープに結合し得る。多重特異性抗原結合タンパク質は、2つ以上の抗原、例えば、2つの抗原、または3つの抗原、または4つの抗原に特異性を有する。

#### 【0028】

多重特異性抗原結合タンパク質の例には、各末端において結合ドメインに直接または間

10

20

30

40

50

接的に（例えば、リンカー配列を介して）連結された抗体の Fc 領域、またはその一部からなる、またはから本質的になるものを含む。このような抗原結合タンパク質は、Fc 領域により分離された 2 つの結合ドメイン、またはその一部を含んでなり得る。分離されたとは、結合ドメインが互いに直接連結されず、Fc 領域の反対の末端（C 末端と N 末端）に、または他の任意の足場領域に配置されてもよいことを意味する。

#### 【0029】

抗原結合タンパク質は、直接またはリンカーを介して間接的に、2 つの結合ドメインに、例えば各足場領域の N 末端と C 末端においてそれぞれ結合された 2 つの足場領域を含んでなり得る。各結合ドメインは異なる抗原と結合してよい。

#### 【0030】

本明細書で使用する場合、用語 mAbdAb は、さらなる結合ドメイン、特に、单一可変ドメインに連結されたモノクローナル抗体、例えば、ドメイン抗体を意味する。mAbdAb は少なくとも 2 つの抗原結合部位を有し、そのうち少なくとも 1 つはドメイン抗体に由来し、少なくとも 1 つは VH / VL ドメイン対に由来する。

#### 【0031】

「dAb（商標）コンジュゲート」は、薬物が共有結合または非共有結合の手段により化学的にコンジュゲートされた dAb を含んでなる組成物を意味する。好ましくは、dAb と薬物は共有結合される。このような共有結合は、ペプチド結合、または修飾側鎖を介するものなどの他の手段によるものであり得る。非共有結合は、直接的（例えば、静電気的相互作用、疎水性相互作用）または間接的（例えば、相補的結合間（例えば、ビオチンとアビシン）の非共有結合を介し、一方のパートナーは薬物に共有結合され、相補的結合パートナーは dAb（商標）に共有結合される）であり得る。相補的結合パートナーが使用される場合、それらの結合パートナーの一方は薬物に直接または好適なリンカー部分を介して共有結合させることができ、相補的結合パートナーは dAb（商標）に直接または好適なリンカー部分を介して共有結合させることができる。

#### 【0032】

本明細書で使用する場合、「dAb（商標）融合物」は、dAb（商標）とポリペプチド薬物（dAb（商標）または mAb であり得る）を含んでなる融合タンパク質を意味する。dAb（商標）およびポリペプチド薬物は、单一の連続ポリペプチド鎖の離散部（部分）として存在する。

#### 【0033】

1 つの実施態様では、本開示の抗原結合タンパク質は、ヒト ICOS とカニクイザル ICOS などの別種由来の ICOS の間で交差反応性を示す。1 つの実施態様では、本発明の抗原結合タンパク質は、ヒトおよびカニクイザル ICOS と特異的に結合する。ヒトおよびサル種と結合し得る薬物を提供することにより、これらの系における結果を検定し、同じ薬物を用いてデータを対照比較することが可能となる。疾患モデルで使用される他種、例えば、イヌまたはサル、特にサルとの公差反応性が想定される。

#### 【0034】

ICOS 結合タンパク質と参照 ICOS 結合タンパク質の間の競合は、競合 MSD、ELISA、FMAT または BIACore により決定可能である。1 つの実施態様では、競合アッセイは、ICOS 結合タンパク質は ICOS リガンド結合との比較により行われる。この競合にはいくつかの可能性のある理由がある：2 つのタンパク質は、同じもしくはオーバーラップするエピトープと結合し得ること、結合の立体的阻害が存在し得ること、または第 1 のタンパク質の結合が抗原にコンフォメーション変化を引き起こすことがあり、これが第 2 のタンパク質の結合を回避もしくは低減すること。

#### 【0035】

用語「中和する」は、本明細書で使用される場合、ICOS と ICOS-L の間の相互作用が、in vitro または in vivo において、ICOS 結合タンパク質の不在下での ICOS と ICOS-L の相互作用と比較して本明細書に記載の抗原結合タンパク質の存在下で低減されることを意味する。中和は、ICOS のそのリガンドへの結合を

10

20

30

40

50

遮断すること、 I C O S がそのリガンドにより活性化されるのを防ぐこと、 I C O S もしくはその受容体をダウンレギュレートすること、またはエフェクター機能に影響を与えることのうち 1 以上により得る。例えば、実施例 3 および 5 に記載のリガンド結合が I C O S 結合タンパク質の中和能を評価するために使用できる。

#### 【 0 0 3 6 】

I C O S と I C O S - L の間の相互作用に対する I C O S 結合タンパク質の効果は部分的であっても完全であってもよい。 I C O S 結合タンパク質の中和は、 I C O S と I C O S - L の相互作用を、 I C O S 結合タンパク質の不在下での I C O S と I C O S - L の相互作用の少なくとも 20 %、 30 %、 40 %、 50 %、 55 %、 60 %、 65 %、 70 %、 75 %、 80 %、 82 %、 84 %、 86 %、 88 %、 90 %、 92 %、 94 %、 95 %、 96 %、 97 %、 98 %、 99 % または 100 % 遮断し得る。  
10

#### 【 0 0 3 7 】

中和は、当業者に公知のまたは本明細書に記載の 1 以上のアッセイを用いて決定または測定され得る。

#### 【 0 0 3 8 】

親和性は、ある分子、例えば、本発明の抗原結合タンパク質と、別の分子、例えば、その標的抗原との単一結合部位での結合の強度である。抗原結合タンパク質とその標的の結合親和性は、平衡法（例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ（ E L I S A ）もしくはラジオイムノアッセイ（ R I A ））、または速度論（例えば、 B I A C O R E （商標）分析）により決定され得る。例えば、実施例 5 に記載の Biacore （商標）法が結合親和性を測定するために使用できる。  
20

#### 【 0 0 3 9 】

アビディティは、複数の部位での、例えば、相互作用の値数を考慮に入れた、 2 分子の相互結合の強度の合計である。

#### 【 0 0 4 0 】

1 つの実施態様では、 I C O S 結合タンパク質 - I C O S 相互作用の平衡解離定数（ K D ）は、 100 nM 以下、 10 nM 以下、 2 nM 以下または 1 nM 以下である。あるいは、 K D は、 5 ~ 10 nM の間、または 1 ~ 2 nM の間であり得る。 K D は、 1 pM ~ 500 pM の間、または 500 pM ~ 1 nM の間であり得る。当業者は、 K D の数値が小さいほど結合が強いことを認識するであろう。 K D の逆数（すなわち、 1 / K D ）は、 M -1 を単位とする平衡会合定数（ K A ）である。当業者は、 K A の数値が大きいほど結合が強いことを認識するであろう。  
30

#### 【 0 0 4 1 】

解離速度定数（ k d ）または「解離速度」は、 1 秒当たりに減衰する I C O S 結合タンパク質 I C O S 複合体、すなわち、複合体画分の安定性を表す。例えば、 k d 0.01 s -1 は、 1 秒当たり 1 % の複合体の減衰に相当する。 1 つの実施態様では、解離速度定数（ k d ）は、  $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  以下、  $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  以下、  $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  以下、または  $1 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$  以下である。 k d は  $1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1} \sim 1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  の間、または  $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1} \sim 1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  の間であり得る。  
40

#### 【 0 0 4 2 】

結合速度定数（ k a ）または「結合速度」は、 I C O S 結合タンパク質 - I C O S 複合体形成の速度を意味する。 1 つの実施態様では、結合速度定数（ k a ）は、約  $1.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  である。

#### 【 0 0 4 3 】

「単離された」により、抗原結合タンパク質または核酸などの分子が、天然に見られ得る環境から取り出されていることを意図する。例えば、その分子は、天然に通常ともに存在する物質から精製され得る。例えば、サンプル中のその分子の質量は、総質量の 95 % であり得る。

#### 【 0 0 4 4 】

用語「発現ベクター」は、本明細書で使用する場合、真核細胞もしくは原核細胞などの  
50

細胞、または無細胞発現系（対象とする核酸配列がタンパク質などのペプチド鎖として発現される）に対象とする核酸を導入するために使用できる単離された核酸を意味する。このような発現ベクターは、例えば、対象とする核酸を含んでなるコスミド、プラスミド、ウイルス配列、トランスポゾン、および直鎖核酸であり得る。ひと度、発現ベクターが細胞または無細胞発現系（例えば、網状赤血球溶解液）に導入されれば、対象とする核酸にコードされているタンパク質が転写／翻訳機構により產生される。本開示の範囲内の発現ベクターは、真核生物または原核生物発現に必要な要素および誘導型ウイルスプロモーター駆動ベクター、例えば、CMVプロモーター駆動ベクター、例えば、pCDNA3.1、pCEP4、およびそれらの誘導体、バキュロウイルス発現ベクター、ショウジョウバエ発現ベクター、およびヒトIg遺伝子プロモーターなどの哺乳動物遺伝子プロモーターにより駆動される発現ベクターを提供し得る。他の例としては、原核生物発現ベクター、例えば、T7プロモーター駆動ベクター、例えば、pET41、ラクトースプロモーター駆動ベクターおよびアラビノース遺伝子プロモーター駆動ベクターが挙げられる。当業者は、多くの他の好適な発現ベクターおよび発現系を認識するであろう。

#### 【0045】

用語「組換え宿主細胞」は、本明細書で使用する場合、対象とする核酸配列を含んでなり、その細胞への導入前に単離された細胞を意味する。例えば、対象とする核酸配列は発現ベクターであってよく、細胞は原核生物または真核生物細胞であり得る。例示的真核細胞は、限定されるものではないが、COS-1、COS-7、HEK293、BHK21、CHO、BSC-1、HepG2、653、SP2/0、NS0、293、HeLa、骨髄腫、リンパ腫細胞またはその任意の誘導体などの哺乳動物細胞である。最も好ましくは、真核細胞は、HEK293、NS0、SP2/0、またはCHO細胞である。大腸菌は一例としての原核細胞である。本発明の組換え細胞は、トランスフェクション、細胞融合、不死化、または当技術分野で周知の他の手法により作出され得る。細胞にトランスフェクトされた、発現ベクターなどの対象とする核酸配列は染色体外にあってもまたは細胞の染色体に安定して組み込まれてもよい。

#### 【0046】

「キメラ抗体」は、ドナー抗体に由来する天然可変領域（軽鎖および重鎖）をアクセプター抗体に由来する軽鎖および重鎖定常領域と組み合わせて含む操作抗体の一種を意味する。

#### 【0047】

「ヒト化抗体」は、そのCDR非がヒトドナー免疫グロブリンに由来し、その分子の残りの免疫グロブリン由来部分が1以上のヒト免疫グロブリンに由来する操作抗体の一種を意味する。加えて、フレームワーク支持残基は、結合親和性を保存するように変更されてよい（例えば、Queen et al. Proc. Natl Acad Sci USA, 86:10029-10032 (1989), Hodgson, et al., Bio/Technology, 9:421 (1991)参照）。好適なヒトアクセプター抗体は、従来のデータベース、例えば、KABAT（商標）データベース、Los Alamosデータベース、およびSwiss Proteinデータベースから、ドナー抗体のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列との相同性により選択されたものであり得る。ドナー抗体のフレームワーク領域との相同性（アミノ酸に基づく）を特徴とするヒト抗体は、ドナーCDRの挿入のための重鎖定常領域および/または重鎖可変フレームワーク領域を提供するのに好適であり得る。軽鎖定常または可変フレームワーク領域を供与し得る好適なアクセプター抗体も同様の方法で選択することができる。アクセプター抗体重鎖および軽鎖は同じアクセプター抗体に起源する必要は無いことに留意されたい。従来技術は、このようなヒト化抗体を生産するいくつかの方法を記載している - 、例えば、EP-A-0239400およびEP-A-054951参照。

#### 【0048】

用語「完全ヒト抗体」には、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列に由来する可変領域および定常領域（存在する場合）を有する抗体が含まれる。本発明のヒト配列抗体は、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列によってコードされていないアミノ酸残基（例えば、in

v i t r o では無作為もしくは部位特異的変異誘発、または i n v i v o では体細胞変異によって挿入される変異) を含み得る。完全ヒト抗体は、最終的にヒト起源のポリヌクレオチドによりコードされたアミノ酸配列またはこのような配列と同一のアミノ酸配列を含んでなる。本明細書で意味されるように、トランスジェニックマウスで產生されたマウスゲノムに挿入されたヒト免疫グロブリンコード D N A によりコードされた抗体は、最終的にヒト起源の D N A によりコードされているので、完全ヒト抗体である。この場合、ヒト免疫グロブリンコード D N A は、マウス内で(抗体をコードするために)再構成され得、体細胞変異も起こり得る。マウス内でこのような変化を受けた、元々ヒト D N A によりコードされた抗体は、本明細書で意味されるような完全ヒト抗体である。このようなトランスジェニックマウスの使用により、ヒト抗原に対して完全ヒト抗体を選択することが可能となる。当技術分野で理解されているように、完全ヒト抗体は、ヒト D N A ライブライマーがヒト生殖細胞系 D N A 配列を含んでなる抗体の作製のためのファージに挿入されるファージディスプレー技術を用いて作製できる。10

#### 【 0 0 4 9 】

用語「ドナー抗体」は、その可変領域、 C D R 、またはその他のその機能的フラグメントまたは類似体のアミノ酸配列を第 1 の免疫グロブリンパートナーに供与する抗体を意味する。従って、ドナーは、変更された免疫グロブリンコード領域と結果として発現される、ドナー抗体に特徴的な抗原特異性および中和活性を有する変更された抗体を提供する。

#### 【 0 0 5 0 】

用語「アクセプター抗体」は、その重鎖および/もしくは軽鎖フレームワーク領域ならびに/またはその重鎖および/もしくは軽鎖定常領域をコードするアミノ酸配列の全部(またはいずれか一部)を第 1 の免疫グロブリンパートナーに供与する、ドナー抗体とは異種の抗体を意味する。ヒト抗体はアクセプター抗体であり得る。20

#### 【 0 0 5 1 】

用語「 V H 」および「 V L 」は、本明細書では、抗原結合タンパク質のそれぞれ重鎖可変領域および軽鎖可変領域を意味して使用される。

#### 【 0 0 5 2 】

「 C D R 」は、抗原結合タンパク質の相補性決定領域アミノ酸配列と定義される。これらは免疫グロブリン重鎖および軽鎖の超可変領域である。免疫グロブリンの可変部分には 3 つの重鎖 C D R と 3 つの軽鎖 C D R (または C D R 領域) が存在する。よって、「 C D R 」は、本明細書で使用する場合、3 つ総ての重鎖 C D R 、3 つ総ての軽鎖 C D R 、総ての重鎖および軽鎖 C D R 、または少なくとも 2 つの C D R を意味する。30

#### 【 0 0 5 3 】

本明細書を通して、可変ドメイン配列および全長抗体配列のアミノ酸残基は、 K a b a t ナンバリング規則に従って符番される。同様に、実施例で使用する用語「 C D R 」、「 C D R L 1 」、「 C D R L 2 」、「 C D R L 3 」、「 C D R H 1 」、「 C D R H 2 」、「 C D R H 3 」もナンバリング規則に従う。さらに詳しくは、 Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1991) を参照。

#### 【 0 0 5 4 】

可変ドメイン配列および全長抗体配列のアミノ酸残基には別のナンバリング規則も存在することは当業者に自明であろう。 C D R 配列、例えば、 Chothia et al. (1989) Nature 342: 877-883 に示されているものなどの別のナンバリング規則も存在する。抗体の構造およびタンパク質の折り畳みは、他の残基が C D R 配列の考慮される部分であり得、当業者にはそのように理解されるであろうことを意味する。40

#### 【 0 0 5 5 】

当業者に利用可能な C D R 配列の他のナンバリング規則には、「 A b M 」(バース大学) および「 c o n t a c t 」(ユニバーシティ・カレッジ・ロンドン) 法が含まれる。 K a b a t 、 Chothia 、 A b M および c o n t a c t 法のうち少なくとも 2 つを用いて最小オーバーラッピング領域を決定し、「最小結合単位」を提供することができる。最50

小結合単位は、 C D R の下位部分であり得る。

【 0 0 5 6 】

以下の表 1 は、各 C D R または結合単位に関して各ナンバリング規則を用いて 1 つの定義を表している。Kabat ナンバリング法は、表 1 で可変ドメインアミノ酸配列を符番するために使用されている。C D R 定義のいくつかは個々の刊行物によって異なる場合があることに留意されたい。

【 0 0 5 7 】

【表 1】

表 1

10

	Kabat CDR	Chothia CDR	AbM CDR	Contact CDR	最小結合単位
H1	31-35/35A/ 35B	26-32/33/34	26-35/35A/35B	30-35/35A/35B	31-32
H2	50-65	52-56	50-58	47-58	52-56
H3	95-102	95-102	95-102	93-101	95-101
L1	24-34	24-34	24-34	30-36	30-34
L2	50-56	50-56	50-56	46-55	50-55
L3	89-97	89-97	89-97	89-96	89-96

【 0 0 5 8 】

よって、 I C O S 結合タンパク質は、以下の C D R のいずれか 1 つまたは組合せを含んでなるものが提供される。

20

CDRH1: DYAMH(配列番号1)

CDRH2: LISIYSDHTNYNQKFQG(配列番号2)

CDRH3: NNYGNYGWYFDV(配列番号3)

CDRL1: SASSSVSYM(配列番号4)

CDRL2: DTSKLAS(配列番号5)

CDRL3: FQGSGGYPYT(配列番号6)

【 0 0 5 9 】

本発明の 1 つの実施態様では、 I C O S 結合タンパク質は、配列番号 7 に示されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域に C D R H 1 ( 配列番号 1 ) 、 C D R H 2 ( 配列番号 2 ) 、および C D R H 3 ( 配列番号 3 ) を含んでなる。配列番号 7 に示されるヒト化重鎖可変領域を含んでなる本発明の I C O S 結合タンパク質は、「 H 2 」と呼称される。いくつかの実施態様では、本発明の I C O S 結合タンパク質は、配列番号 7 と少なくとも 90 % の配列同一性を有する重鎖可変領域を含んでなる。好適には、本発明の I C O S 結合タンパク質は、配列番号 7 と約 85 % 、 86 % 、 87 % 、 88 % 、 89 % 、 90 % 、 91 % 、 92 % 、 93 % 、 94 % 、 95 % 、 96 % 、 97 % 、 98 % 、 99 % 、または 100 % の配列同一性を有する重鎖可変領域を含んでなり得る。

30

【 0 0 6 0 】

ヒト化重鎖 ( V H ) 可変領域 ( H 2 ) :

【 化 2 】

40

QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYTFT DYAMHWVRQA PGQGLEWMGL ISIYSDHTNY  
NQKFQGRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCGRNN YGNYGWYFDV WGQGTTVTVS S  
(配列番号 7 )

【 0 0 6 1 】

本発明の 1 つの実施態様では、 I C O S 結合タンパク質は、配列番号 8 に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域に C D R L 1 ( 配列番号 4 ) 、 C D R L 2 ( 配列番号 5 ) 、および C D R L 3 ( 配列番号 6 ) を含んでなる。配列番号 8 に示されるヒト化軽鎖可変領域を含んでなる本発明の I C O S 結合タンパク質は、「 L 5 」と呼称される。よって、

50

配列番号 7 の重鎖可変領域と配列番号 8 の軽鎖可変領域を含んでなる本発明の I C O S 結合タンパク質は、本明細書では H 2 L 5 と呼称することができる。

#### 【 0 0 6 2 】

好適には、重鎖可変鎖および軽鎖構築物のリーダー配列は図 9 で示され、限定されるものではないが、MGWSCIILFLVATATGVHS ( 配列番号 1 1 ) を含む。

#### 【 0 0 6 3 】

いくつかの実施態様では、本発明の C O S 結合タンパク質は、配列番号 8 に示されるアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含んでなる。好適には、本発明の I C O S 結合タンパク質は、配列番号 8 と約 8 5 % 、 8 6 % 、 8 7 % 、 8 8 % 、 8 9 % 、 9 0 % 、 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 、または 1 0 0 % の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含んでなり得る。  
10

#### 【 0 0 6 4 】

ヒト化軽鎖 ( V L ) 可変領域 ( L 5 )

#### 【 化 3 】

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCSASSSVS YMHWYQQKPG QAPRLLIYDT SKLASGIPAR  
FSGSGSGTDY TLTISSEPE DFAVYYCFQG SGYPYTFGQG TKLEIK (配列番号 8 )

#### 【 0 0 6 5 】

C D R または最小結合単位は、少なくとも 1 個のアミノ酸の置換、欠失または付加により改変され得、ここで、この変異体抗原結合タンパク質は、クローン 4 2 2 . 2 から産生されたマウス抗体または配列番号 7 および配列番号 8 を含んでなる抗体などの非改変タンパク質の生物学的特徴を実質的に保持している。  
20

#### 【 0 0 6 6 】

C D R H 1 、 H 2 、 H 3 、 L 1 、 L 2 、 L 3 のそれぞれは単独でまたは任意の順列もしくは組合せでの他の任意の C D R との組合せにおいて改変され得ることが認識されるであろう。1 つの実施態様では、 C D R は、 3 個までのアミノ酸、例えば、 1 または 2 個のアミノ酸、例えば、 1 個のアミノ酸の置換、欠失または付加によって改変される。一般に、改変は、置換、特に、例えば、以下の表 2 に示されるような保存的置換である。

#### 【 0 0 6 7 】

#### 【 表 2 】

表 2

側鎖	メンバー
疎水性	Met, Ala, Val, Leu, Ile
中性親水性	Cys, Ser, Thr
酸性	Asp, Glu
塩基性	Asn, Gln, His, Lys, Arg
鎖の配向に影響を及ぼす残基	Gly, Pro
芳香性	Trp, Tyr, Phe

40

#### 【 0 0 6 8 】

例えば、変異体 C D R において、最小結合単位のアミノ酸残基は同じものを保持してよいが、 K a b a t または C h o t h i a 定義の一部として C D R を含んでなる隣接残基は、保存的アミノ酸残基で置換され得る。

#### 【 0 0 6 9 】

上記のように改変された C D R または最小結合単位を含んでなるこのような抗原結合タンパク質は、本明細書では、「機能的 C D R 変異体」または「機能的結合単位変異体」と呼ばれ得る。好適には、1 つの実施態様では、配列番号 1 、 2 、 3 、 4 、 5 、および / もしくは 6 に示されるアミノ酸配列ならびに / またはそれらの機能的 C D R 変異体を有する  
50

1以上のCDRを含んでなるICOS結合タンパク質が提供される。

**【0070】**

用語「エピトープ」は、本明細書で使用する場合、抗原結合タンパク質の特定の結合ドメインと接触させる抗原の部分を意味する。エピトープは直鎖または立体配座的／不連続であり得る。立体配座エピトープまたは不連続エピトープは、他の配列により分離されたアミノ酸残基を含んでなり、すなわち、抗原の一次配列において連続的な配列ではない。これらの残基はペプチド鎖の異なる領域に由来し得るが、それらは抗原の三次元構造では近接している。多量体抗原の場合、立体配座エピトープまたは不連続エピトープは、異なるペプチド鎖由来の残基を含み得る。エピトープ内に含まれる特定の残基は、コンピューター・モデリングプログラムまたはX線結晶学などの当技術分野で公知の方法によって得られる三次元構造を介して決定することができる。10

**【0071】**

CDR L1、L2、L3、H1およびH2は、有限数の主鎖立体配座のうちの1つを構造上示す傾向がある。CDRの特定のカノニカル構造クラスは、CDRの長さ、およびCDRとフレームワーク領域の両方においてキーポジションに位置する残基（構造決定残基(structurally determining residues)またはSDR）により決定されるループパッキングの両方により定義される。Martin and Thornton (1996; J Mol Biol 263:800-815)は、「キー残基」カノニカル錠型を定義するための自動法を作出している。クラスター分析がCDRセットのカノニカルクラスを定義するために使用され、次に、カノニカル錠型が埋没疎水基、水素結合残基、および保存されたグリシンおよびプロリンを分析することにより同定される。抗体配列のCDRは、配列をキー残基錠型と比較し、同一性または類似性マトリックスを用いて各錠型をスコア化することによってカノニカルクラスに割り付けることができる。20

**【0072】**

CDR、対応するCDR、結合単位、重鎖または軽鎖可変領域、重鎖または軽鎖、および抗原結合タンパク質について複数の変異体CDRカノニカル位置があり得るので、抗原結合タンパク質がICOSと特異的に結合可能なようにCDRのカノニカル構造が維持される限り、本発明の抗原結合タンパク質にいずれの置換組合せが存在してもよい。

**【0073】**

上記で述べたように、CDRの特定のカノニカル構造クラスは、CDRの長さ、およびCDRとフレームワーク領域の両方においてキーポジションに位置する残基により決定されるループパッキングの両方により定義される。30

**【0074】**

クエリー核酸配列とサブジェクト核酸配列の間の「同一性パーセント」は、サブジェクト核酸配列が、ペアワイスBLASTNアラインメントが実施された後にクエリー核酸配列と100%のクエリーカバー率を有する際にBLASTNアルゴリズムにより計算される、パーセンテージとして表される「同一性」値である。このようなクエリー核酸配列とサブジェクト核酸配列の間のペアワイスBLASTNアラインメントは、低複雑性領域用のフィルターがオフにされた、デフォルト設定の、the National Center for Biotechnology Instituteのウェブサイトで利用可能なBLASTNアルゴリズムを使用することにより実施される。重要なこととして、クエリー核酸配列は、本明細書の1以上の請求項で特定される核酸配列により記載され得る。40

**【0075】**

クエリーアミノ酸配列とサブジェクトアミノ酸配列の間の「同一性パーセント」は、サブジェクトアミノ酸配列が、ペアワイスBLASTPアラインメントが実施された後にクエリーアミノ酸配列と100%のクエリーカバー率を有する際にBLASTPアルゴリズムにより計算される、パーセンテージとして表される「同一性」値である。このようなクエリーアミノ酸配列とサブジェクトアミノ酸配列の間のペアワイスBLASTPアラインメントは、低複雑性領域用のフィルターがオフにされた、デフォルト設定の、the National Center for Biotechnology Instituteのウェブサイトで利用可能なBLASTPアル50

ゴリズムを使用することにより実施される。重要なこととして、クエリーアミノ酸配列は、本明細書の1以上の請求項で特定されるアミノ酸配列により記載され得る。

#### 【0076】

クエリー配列は、サブジェクト配列と100%同一であり得、またはそれはサブジェクト配列と比較した場合に、同一性%が100%未満となるような特定の整数までのアミノ酸またはヌクレオチド変異を含み得る。例えば、クエリー配列は、サブジェクト配列と少なくとも50、60、70、75、80、85、90、95、96、97、98、または99%同一である。このような変異は、少なくとも1個のアミノ酸欠失、置換（保存的および非保存的置換を含む）、または挿入を含み、ここで、前記変異は、クエリー配列のアミノ末端もしくはカルボキシ末端に、またはクエリー配列内のアミノ酸もしくはヌクレオチド間に個々に、もしくはクエリー配列内の1以上の連続する群として挿入された、そのような末端の位置と末端の位置の間のいずれかの場所に見られてよい。10

#### 【0077】

同一性%は、CDRを含むクエリー配列の全長にわたって決定してもよい。あるいは、同一性%はCDRを除外してもよく、例えば、CDRはサブジェクト配列と100%同一であり、同一性%の変動はクエリー配列の残部にあり、結果として、CDR配列は固定される／そのままである。20

#### 【0078】

変異体配列は、配列番号7または配列番号8などの非改変タンパク質の生物学的特徴を実質的に保持する。20

#### 【0079】

$V_H$ または $V_L$ 配列は、15個までのアミノ酸置換、付加または欠失を有する変異体配列であってもよい。例えば、変異体配列は15個まで、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2または1個のアミノ酸置換、付加または欠失を有してよい。

#### 【0080】

配列変動はCDRを除外してもよく、例えば、CDRは $V_H$ もしくは $V_L$ （またはHCもしくはLC）配列と同じであり、変動は $V_H$ もしくは $V_L$ （またはHCもしくはLC）配列の残部にあり、結果として、CDR配列は固定される／そのままである。30

#### 【0081】

当業者は、抗体などの抗原結合タンパク質の生産時に、特に、使用する細胞株および抗原結合タンパク質の特定のアミノ酸配列によって翻訳後修飾が起こり得ることを認識するであろう。例えば、これは、特定のリーダー配列の切断、様々なグリコシリ化およびリン酸化パートナーにおける様々な糖部分の付加、脱アミド化、酸化、ジスルフィド結合スクランブル化、異性化、C末端リシンクリッピング、およびN末端グルタミン環化を含み得る。本発明は、1以上の翻訳後修飾下にあった、または1以上の翻訳後修飾を受けた抗原結合タンパク質の使用を包含する。よって、本発明の「抗原結合タンパク質」または「抗体」は、本明細書に記載されるような翻訳後修飾を受けた、始めに定義された、それぞれ「抗原結合タンパク質」または「抗体」を含む。40

#### 【0082】

脱アミド化は、主としてアスパラギン(N)をイソアスパラギン酸およびアスパラギン酸(D)によよそ3:1比で変換する酵素反応である。それほどではないにせよ、脱アミド化はグルタミン残基でも同様に起こり得る。CDRにおける脱アミド化は分子の電荷に変化をもたらすが、一般に、抗原結合には変化を生じず、PK/PDにも影響しない。

#### 【0083】

酸化は、生産および保存中に（すなわち、酸化条件の存在下で）起こり得、直接的には反応性酸素種により、または間接的には酸化ストレスの二次的副生成物との反応により誘導されるタンパク質の共有結合的修飾をもたらす。酸化は主としてメチオニン残基で起こるが、場合によってはトリプトファンおよび遊離システイン残基でも起こり得る。

#### 【0084】

50

20

30

40

50

ジスルフィド結合スクランブル化は、生産および基本的保存条件で起こり得る。特定の状況で、ジスルフィド結合が不適切に破断または形成して不対合システイン残基( - S H )が生じることがある。これらの遊離(不対合)スルフヒドリル( - S H )はシャッフリングを促進する場合がある。

#### 【 0 0 8 5 】

異性化は一般に、生産、精製、および保存(酸性 pH 下)中に起こり、通常、アスパラギン酸が化学的プロセスを経てイソアスパラギン酸に変換される際に起こる。

#### 【 0 0 8 6 】

重鎖および / または軽鎖の N 末端グルタミンは、ピログルタミン酸塩( p G l u )を形成する可能性がある。ほとんどの p G l u 形成は生産バイオリアクター内で起こるが、処理の pH および温度ならびに保存条件によっては非酵素的に形成される場合もある。 p G l u の形成は、組換え m A b の主要分解経路の 1 つと考えられる。10

#### 【 0 0 8 7 】

C 末端リシンクリッピングは、カルボキシペプチダーゼにより触媒される酵素反応であり、組換え m A b において一般に見られる。このプロセスの変種として、一方または両方の重鎖からのリシンの除去が含まれる。リシンクリッピングは生物活性に影響を及ぼすとは思われず、 m A b のエフェクター機能にも影響はない。

#### 【 0 0 8 8 】

ヒトにはタンパク質と結合し得る天然自己抗体が存在する。よって、自己抗体は内在タンパク質(ナイーブ対象に存在)ならびに処置のために対象に投与されたタンパク質またはペプチドに結合し得る。治療用タンパク質結合自己抗体および薬物処置に応答して新たに形成される抗体は、抗薬物抗体(anti-drug antibodies)( A D A )と総称される。対象に投与された治療用タンパク質およびペプチドなどの分子に対する既存の抗体はそれらの有効性に影響を及ぼすことがあり、投与反応、過敏性、処置された患者の臨床応答の変化およびその分子を持続させる、排除するまたは中和することによるバイオアベイラビリティの変化をもたらし得る。免疫原性が低減された(すなわち、対象、特に、ヒト対象に投与した際に既存の A D A に結合する能力が低減されたヒト免疫グロブリン(抗体)単一可変ドメインまたは d A b (商標)を含んでなる治療用分子を提供することが有利であり得る。20

#### 【 0 0 8 9 】

よって、本発明の 1 つの実施態様では、等価な非改変分子に比べて既存の抗体( A D A )との結合能が低減された改変型 d A b (商標)が提供される。結合能の低減とは、改変分子が既存の A D A と低減された親和性がまたは低減されたアビディティで結合することを意味する。前記改変 d A b (商標)は、( a ) C 末端付加、延長、欠失もしくはタグ、および / または( b ) 1 以上のアミノ酸フレームワーク置換、から選択される 1 以上の改変を含んでなる。

#### 【 0 0 9 0 】

本開示のポリペプチドおよび d A b (商標)ならびにこれらを含んでなるアゴニストは、例えば、 P E G 基、血清アルブミン、トランスフェリン、トランスフェリン受容体または少なくともそのトランスフェリン結合部分、抗体 F c 領域の付加によって、または抗体ドメインとのコンジュゲーションによって、より大きい流体力学的サイズを有するような形式とすることができます。例えば、ポリペプチド d A b (商標)およびアゴニストは、抗体のより大きな抗原結合フラグメントの、または抗体の形式とすることができます(例えば、 F a b 、 F a b ' 、 F ( a b )<sub>2</sub> 、 F ( a b ' )<sub>2</sub> 、 I g G 、 s c F v の形式)。40

#### 【 0 0 9 1 】

本明細書で使用する場合、「流体力学的サイズ」は、水溶液中での分子の拡散に基づいた分子(例えば、抗原結合タンパク質)の見掛けのサイズを意味する。タンパク質の見掛けのサイズを導くように溶液中でのタンパク質の拡散または運動を処理することができ、そのサイズはタンパク質粒子の「ストークス半径」または「流体力学的半径」で示される。タンパク質の「流体力学的サイズ」は質量および形状(立体配座)の両方に依存し、從50

って、同じ分子量を有する2つのタンパク質は、そのタンパク質の全体的な立体配座および電荷に基づいて異なる流体力学的サイズを持ち得る。流体力学的サイズの増大は関連の腎クリアランスの低下をもたらし、半減期( $t_{1/2}$ )の延長が見られる。

#### 【0092】

本開示の抗原結合タンパク質(例えば、ドメイン抗体単量体および多量体)の流体力学的サイズは、当技術分野で周知の方法を用いて決定することができる。例えば、ゲル濾過クロマトグラフィーが抗原結合タンパク質の流体力学的サイズを決定するために使用できる。架橋アガロースマトリックスなど、抗原結合タンパク質の流体力学的サイズを決定するための好適なゲル濾過マトリックスは周知であり、容易に入手できる。

#### 【0093】

抗原結合タンパク質形式のサイズ(例えば、抗体単量体にPEG部分ドメインが結合されたもののサイズ)は所望の適用によって異なり得る。例えば、抗原結合タンパク質が循環を離れて末梢組織へ入ることを意図する場合には、ICOS結合タンパク質の流体力学的サイズは血流からの溢出を促すように小さく維持することが望ましい。あるいは、抗原結合タンパク質をより長時間体循環に留ませたい場合には、例えばIg様タンパク質の形式とすることにより抗原結合タンパク質のサイズを大きくすることができる。

#### 【0094】

##### 医薬組成物

本明細書に記載の抗原結合タンパク質は、本明細書に記載のヒト疾患の処置に使用するために医薬組成物中に組み込むことができる。1つの実施態様では、医薬組成物は、抗原結合タンパク質の場合により1種類以上の薬学上許容可能な担体および/または賦形剤と組み合わせて含んでなる。

#### 【0095】

このような組成物は、許容可能な製薬実務によって知られ、呼称される薬学上許容可能な担体を含んでなる。

#### 【0096】

医薬組成物は、注射または持続的注入(例として、限定されるものではないが、静脈内、腹腔内、皮内、皮下、筋肉内および門脈内を含む)により投与され得る。1つの実施態様では、組成物は、静脈内投与に好適である。医薬組成物は、局所投与(限定されるものではないが、経皮、吸入、鼻腔内または眼内投与を含む)または経腸投与(限定されるものではないが、経口または直腸投与を含む)に好適であり得る。

#### 【0097】

医薬組成物は、0.5mg~10gの間のICOS結合タンパク質、例えば、5mg~1gの間の抗原結合タンパク質を含んでなり得る。あるいは、組成物は、5mg~500mgの間、例えば、5mg~50mgの間を含んでなり得る。

#### 【0098】

このような医薬組成物の調製方法は当業者に周知である。投与様式および使用する特定のタンパク質に適当であれば、組成物に他の賦形剤を加えてよい。種々の賦形剤およびそれらの使用の例は、Lowe et al.(2011)に記載されている。

#### 【0099】

抗原結合タンパク質を投与するための有効用量および処置計画は、患者の齢、体重および健康状態、ならびに処置される疾患などの因子によって異なり得る。このような因子は主治医の範囲内にある。適当用量を選択する指針は例えばBai et al.(2012)に見出すことができる。

#### 【0100】

医薬組成物は、他の薬剤を伴う抗原結合タンパク質のパーティキットを、場合により使用説明書とともに含んでなり得る。便宜には、キットは、所定量の試薬を使用説明書とともに含んでなり得る。

#### 【0101】

用語「個体」、「対象」および「患者」は、本明細書では互換的に使用される。1つの

10

20

30

40

50

実施態様では、対象は、哺乳動物、例えば、霊長類、例えば、マーモセットまたはサルである。別の実施態様では、対象はヒトである。

【0102】

本明細書に記載の抗原結合タンパク質はまた、処置法にも使用可能である。処置は、治療、予防または回避であり得る。処置は、疾患の少なくとも1つの態様または症状の緩和、軽減、または回避を包含し、本明細書に記載の疾患の回避または治癒を包含する。

【0103】

本明細書に記載のICOS結合タンパク質またはその抗原結合部分は、治療的、予防的または回避的処置に有効な量で使用される。本明細書に記載のICOS結合タンパク質またはその抗原結合部分の治療上有効な量は、疾患の1以上の症状の改善もしくは軽減に、または疾患の回避もしくは治癒に有効な量である。10

【0104】

よって、1つの実施態様では、本発明のICOS結合タンパク質またはその抗原結合部分は、療法において使用するために提供される。1つの実施態様では、本発明のICOS結合タンパク質またはその抗原結合部分は、癌、感染性疾患および/または敗血症の処置において使用するために提供される。本発明はまた、癌、感染性疾患および/または敗血症の処置のための薬剤の製造における本発明のICOS結合タンパク質またはその抗原結合部分の使用も提供する。

【0105】

よって、本明細書では、癌、感染性疾患および/または敗血症の処置に使用するための、単離されたICOS結合タンパク質もしくはそれらの抗原結合部分または前記の単離されたICOS結合タンパク質もしくはそれらの抗原結合部分を含んでなる医薬組成物が提供される。20

【0106】

製造方法

抗原結合タンパク質は、いくつかの従来技術のいずれによって調製してもよい。例えば、抗原結合タンパク質は、それらを天然に発現する細胞から精製してもよく（例えば、抗体はそれを産生するハイブリドーマから精製することができる）、または組換え発現系で生産してもよい。

【0107】

いくつかの異なる発現系および精製計画が本発明の抗原結合タンパク質を作製するために使用可能である。一般に、宿主細胞は、所望の抗原結合タンパク質をコードする組換え発現ベクターで形質転換させる。原核生物（グラム陰性菌またはグラム陽性菌、例えば、大腸菌(*Escherichia coli*)、バチルス(*Bacillus*)種、シュードモナス(*Pseudomonas*)種、コリネバクテリウム(*Corynebacterium*)種を含む）、酵母（例えば、サッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)）、ピキア・パストリス(*Pichia pastoris*)）、真菌（例えば、アスペルギルス(*Aspergillus*)種）、または昆虫細胞および哺乳動物起源の細胞株（例えば、CHO、Perc 6、HEK 293、HeLa）を含む高等真核生物を含む真核生物を含め、広範囲の宿主細胞が使用可能である。30

【0108】

宿主細胞は、単離された宿主細胞であり得る。宿主細胞は通常、多細胞生物（例えば、植物または動物）の一部ではない。宿主細胞は非ヒト宿主細胞であり得る。40

【0109】

細菌、真菌、酵母、および哺乳動物細胞宿主とともに使用するための適当なクローニングおよび発現ベクター、ならびにクローニング方法は当技術分野で公知である。

【0110】

これらの細胞を、抗原結合タンパク質の発現を促進する条件化で培養し、ポリペプチドを従来のタンパク質精製手順により回収することができる。本明細書で使用が企図される抗原結合タンパク質には、夾雑材料を実質的に含まない、実質的に均質な抗原結合タンパク質が含まれる。50

## 【0111】

当業者は、抗原結合タンパク質の生産時に、特に、使用する細胞株および抗原結合タンパク質の特定のアミノ酸配列によって、翻訳後修飾が起こり得ることを認識するであろう。これは特定のリーダー配列の切断、様々なグリコシル化パターンでの様々な糖部分の付加、脱アミド化（例えば、アスパラギンまたはグルタミン残基における）、酸化（例えば、メチオニン、トリプトファンまたは遊離システイン残基における）、ジスルフィド結合スクランブル化、異性化（例えば、アスパラギン酸残基における）、C末端リシンクリッピング（例えば、一方または両方の重鎖に由来）、およびN末端グルタミン環化（例えば、重鎖および/または軽鎖における）を含み得る。本発明は、1以上の翻訳後修飾下にあつた、または1以上の翻訳後修飾を受けた抗体の使用を包含する。修飾はCDR、可変フレームワーク領域、または定常領域で起こり得る。修飾は分子の電荷の変化をもたらし得る。この修飾は一般に、抗原結合、機能、生物活性の変化をもたらさず、ICOS結合タンパク質の薬物動態的（PK）または薬力学的（PD）特徴にも影響を及ぼさない。10

## 【0112】

用語「エフェクター機能」は、本明細書で使用する場合、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害活性（ADCC）、補体依存性細胞傷害活性（CDC）介在応答、Fc介在性貪食作用または抗体依存性細胞貪食作用（ADCP）およびFcRn受容体を介した抗体リサイクリングのうち1以上を意味するものとする。

## 【0113】

抗原結合タンパク質の定常領域とFc RI（CD64）、Fc RII（CD32）およびFc RIII（CD16）を含む種々のFc受容体（FcR）の間の相互作用は、抗原結合タンパク質のエフェクター機能を媒介すると考えられる。有意な生物学的效果は、エフェクター機能の結果であり得る。通常、エフェクター機能媒介能は、抗原結合タンパク質の抗原への結合を必要とし、総てではないが抗原結合タンパク質はあらゆるエフェクター機能を媒介する。20

## 【0114】

エフェクター機能は、ADCC/ADCPエフェクター機能について評価するために、例えば、ナチュラルキラー細胞ではFc RI IIの結合を介するものまたは単球/マクロファージではFc RIを介するものを含むいくつかの方法で測定することができる。例えば、本発明の抗原結合タンパク質は、ナチュラルキラー細胞アッセイでADCCエフェクター機能について評価することができる。ADCCおよび/またはCDC機能を評価するための実際のアプローチは、(Kellner C et al., "Boosting ADCC and CDC activity by Fc engineering and evaluation of antibody effector functions", Methods, 1; 65(1):105-13 (2014))に見出すことができる。30

## 【0115】

ヒト定常領域のいくつかのアイソタイプ、特に、IgG4およびIgG2アイソタイプは、a)古典的経路による補体の活性化；およびb)抗体依存性細胞介在性細胞傷害性の機能が低減されている。所望のエフェクター特性によって、抗原結合タンパク質の重鎖定常領域に対する種々の改変を行うことができる。特定の変異を含有するIgG1定常領域は、Fc受容体への結合を低減すること、従って、ADCCおよびCDCを低減することが別に記載されている(Kellner C et al., "Boosting ADCC and CDC activity by Fc engineering and evaluation of antibody effector functions", Methods, 1; 65(1):105-13 (2014))。40

## 【0116】

本発明の1つの実施態様では、抗原結合タンパク質のADCCおよび/または補体活性化またはエフェクター機能が低減されるような定常領域を含んでなる抗原結合タンパク質が提供される。1つのこのような実施態様では、重鎖定常領域は、IgG2もしくはIgG4アイソタイプの、天然状態で無効の定常領域または変異したIgG1定常領域を含んでなり得る。一例は、235番および237番（EUインデックスナンバリング）のアラニン残基の置換を含んでなる。50

## 【0117】

抗体のサブクラスは、補体活性化またはF c受容体(F c R)結合および抗体依存性細胞傷害性(ADCC)などの二次的なエフェクター機能を部分的に決定する(Huber, et al., Nature 229(5284): 419-20 (1971); Brunhouse, et al., Mol Immunol 16(11): 907-17 (1979))。特定の適用に最適な抗体のタイプを特定する上で、抗体のエフェクター機能を考慮することができる。例えば、h Ig G 1 抗体は比較的長い半減期を有し、補体結合において極めて有効であり、それらはF c R IとF c R I Iの両方に結合する。対照的に、ヒトIg G 4 抗体は、半減期が短く、補体を結合せず、F c Rに対する親和性が低い。Ig G 4 のF c領域のセリン228をプロリンで置換すると(S228P)、h Ig G 4 で見られるヘテロ性が小さくなり、血清半減期が延長する(Kabat, et al., "Sequences of proteins of immunological interest" 5.sup.th Edition (1991); Angal, et al., Mol Immunol 30(1): 105-8 (1993))。ロイシン235をグルタミン酸で置換する第2の変異(L235E)は、残存するF c R結合活性および補体結合活性を排除する(Alegrave, et al., J Immunol 148(11): 3461-8 (1992))。結果として得られる両変異を有する抗体は、Ig G 4 P Eと呼ばれる。h Ig G 4 アミノ酸のナンバリングはE Uナンバリング 参照: Edelman, G.M. et al., Proc. Natl. Acad. USA, 63, 78-85 (1969). PMID: 52579 10 69からのものであった。本発明の1つの実施態様では、置換S228PおよびL235Eを含んでなるIg G 4 F c領域を含んでなるICOS抗原結合タンパク質は、Ig G 4 P Eの名称を持ち得る。よって、重鎖可変領域H 2および軽鎖可変領域L 5およびIg G 4 P E F c領域を有するICOS結合タンパク質は、H 2 L 5 Ig G 4 P Eまたは同義的にH 2 L 5 h Ig G 4 P Eと呼称される。 20

## 【0118】

ADCC / CDCの増強

当技術分野で理解されるように、抗体のADCCおよび/またはCDC活性を増強する様々な技術が知られている。これらには、限定されるものではないが、F c領域における様々な変異、コンプリジェントおよびポテリジェント技術が含まれる。本発明の1つの態様では、1以上のADCC / CDC増強技術が本発明のICOS結合タンパク質に適用されてよい。

## 【0119】

変異

また、特定の変異または残基A s n 2 9 7のグリコシル化の変更を含むヒトIg G 1 定常領域もF c受容体への結合を増強するために記載されている。場合によっては、これらの変異がADCCおよびCDCを増強することも示されている、例えば、Kellner (2013) 参照。

## 【0120】

本発明の1つの実施態様では、このような変異は、239、332および330(Ig G 1)、または他のIg Gアイソタイプのける等価な位置から選択される位置の1以上に存在する。好適な変異の例は、S239DおよびI332EおよびA330Lである。1つの実施態様では、本明細書に記載される本発明の抗原結合タンパク質は、239番および332番で変異を受け、例えば、S239DおよびI332Eであり、またはさらなる実施態様では、それは239および332および330から選択される3以上の位置で変異を受け、例えば、S239DおよびI332EおよびA330L(E Uインデックスナンバリング)である。 40

## 【0121】

コンプリジェント

本発明の1つの実施態様では、キメラ重鎖定常領域を含んでなる抗原結合タンパク質、例えば、抗原結合タンパク質が増強されたエフェクター機能を有するように、例えば、それが増強されたADCCもしくは増強されたCDC、または増強されたADCCとCDC機能を有するように、Ig G 3由来の少なくとも1つのCH 2ドメインを有するキメラ重鎖定常領域を含んでなる抗原結合タンパク質が提供される。1つのこのような実施態様で 50

は、抗原結合タンパク質は、IgG3由来の1つCH2ドメインを含んでなり得るか、または両CH2ドメインがIgG3に由来し得る。

#### 【0122】

また、

a) 本明細書に記載の単離された核酸を含んでなる発現ベクターを含んでなる組換え宿主細胞を培養する工程、ここで、前記発現ベクターは、IgG1およびIgG3の両Fcドメインアミノ酸残基を有するFcドメインをコードする核酸配列を含んでなる；および

b) 前記抗原結合タンパク質を回収する工程

を含んでなる、本発明による抗原結合タンパク質の製造方法も提供される。

#### 【0123】

10

このような抗原結合タンパク質の生産方法は、例えば、BioWa, Inc. (Princeton, NJ) and Kyowa Hakko Kogyo (now, Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.) Co., Ltd.から入手可能なコンプリジェント（商標）技術システムを用いて実施することができる。この場合、組換え宿主細胞は発現ベクターを含んでなり、IgG1およびIgG3の両Fcドメインアミノ酸残基を有するキメラFcドメインをコードする核酸配列が発現されて、このようなキメラFcドメインを欠いた、それ以外の点では同一の抗原結合タンパク質に比べて増強された高い補体依存性細胞傷害（CDC）活性を有する抗原結合タンパク質を產生する。コンプリジェント（商標）技術システムの態様は、WO 2007011041およびUS 20070148165に記載され、これらはそれぞれ引用することにより本明細書の一部とされる。別の実施態様において、CDC活性は、IgG鎖のFc領域に配列特異的変異を導入することにより増強してもよい。当業者はまた他の適当なシステムも認識するであろう。

20

#### 【0124】

#### ポテリジェント

本発明はまた、

a) 本明細書に記載の単離された核酸を含んでなる発現ベクターを含んでなる組換え宿主細胞を培養する工程、ここで、前記組換え宿主細胞では -1,6- フコシルトランスフェラーゼをコードするFUT8遺伝子が不活性化されている；および

b) 前記抗原結合タンパク質を回収する工程

を含んでなる、本発明による抗原結合タンパク質の製造方法も提供する。

30

#### 【0125】

このような抗原結合タンパク質の生産方法は、例えば、BioWa, Inc. (Princeton, NJ)から入手可能なポテリジェント（商標）技術システムを用いて実施することができ、このシステムでは、FUT8遺伝子の機能的コピーを欠くCHOK1SV細胞は、機能的FUT8遺伝子を有する細胞で產生される同一のモノクローナル抗体に比べて増強された、高い抗体依存性細胞介在性細胞傷害（ADCC）活性を有するモノクローナル抗体を产生する。ポテリジェント（商標）技術システムの態様は、US 7214775、US 6946292、WO 0061739およびWO 0231240に記載され、これらは総て、引用することにより本明細書の一部とされる。当業者はまた他の適当なシステムも認識するであろう。

40

#### 【0126】

当業者には、このような改変は単独で使用できるだけでなく、エフェクター機能をさらに増強するために互いに組み合わせて使用できることを認識するであろう。

#### 【0127】

本発明の1つのこのような実施態様では、変異型のキメラ重鎖定常領域を含んでなる重鎖定常領域を含んでなる抗原結合タンパク質、例えば、IgG3由来の少なくとも1つのCH2ドメインとIgG1由来の1つのCH2ドメインを含んでなり、抗原結合タンパク質が増強されたエフェクター機能を有するように、例えば、それが以下の機能、すなわち、ADCCの増強またはCDCの増強のうち1以上を有するように、例えば、それが増強されたADCCと増強されたCDCを有するように、前記IgG1 CH2ドメインが2

50

39および332および330から選択される位置に1以上の変異を有する（例えば、前記変異はS239DおよびI332EおよびA330Lから選択され得る）抗原結合タンパク質が提供される。1つの実施態様では、IgG1 CH2ドメインは、変異S239DおよびI332Eを有する。

#### 【0128】

本発明の別の実施態様では、キメラ重鎖定常領域を含んでなり、グリコシル化プロフィールが変更された抗原結合タンパク質が提供される。このような1つの実施態様では、重鎖定常領域は、IgG3由来の少なくとも1つのCH2ドメインとIgG1由来の1つのCH2ドメインを含んでなり、フコースとマンノースの比が0.8:3以下となるようにグリコシル化プロフィールが変更され、例えば、抗原結合タンパク質は、前記抗原結合タンパク質が、前記変異およびグリコシル化プロフィールの変更を欠く免疫グロブリン重鎖定常領域を有する等価な抗原結合タンパク質に比べて増強されたエフェクター機能を有するように、例えば、それが以下の機能、すなわち、ADCの増強またはCDCの増強のうち1以上を有するように、例えば、それが増強されたADCと増強されたCDCを有するように、脱フコシル化される。

#### 【0129】

別の実施態様では、抗原結合タンパク質は、少なくとも1つのIgG3 CH2ドメインと少なくとも1つのIgG1由来重鎖定常ドメインを有し、ここで、両IgG CH2ドメインは、本明細書に記載の制限に従って変異を受ける。

#### 【0130】

本発明の1つの態様では、

a) 本明細書に記載の単離された核酸を含有する発現ベクターを含有する組換え宿主細胞を培養する工程、前記発現ベクターは、IgG1およびIgG3の両Fcドメインアミノ酸残基を有するキメラFcドメインをコードするFc核酸配列をさらに含んでなり、前記組換え宿主細胞では -1,6-フコシルトランスフェラーゼをコードするFUT8遺伝子が不活性化されている；および

b) 前記抗原結合タンパク質を回収する工程

を含んでなる、本明細書に記載の、本発明による抗原結合タンパク質の製造方法が提供される。

#### 【0131】

このような抗原結合タンパク質の生産方法は、キメラFcドメインを欠き、オリゴ糖にフコースを有する、それ以外の点では同一のモノクローナル抗体に比べて増強されたADCおよびCDCの両増強活性を有する抗原結合タンパク質を生産するために、例えば、BioWa, Inc. (Princeton, NJ)から入手可能な、ポテリジェント(商標)とコンプリジェント(商標)技術システムを合わせたアクリタマブ(商標)技術システムを用いて実施することができる。

#### 【0132】

本発明のさらに別の実施態様では、変異型のキメラ重鎖定常領域を含んでなる抗原結合タンパク質が提供され、前記抗原結合タンパク質は、抗原結合タンパク質が増強されたエフェクター機能を有するように、例えば、それが以下の機能、すなわち、ADCの増強またはCDCの増強のうち1以上を有するように、変更されたグリコシル化プロフィールを有する。1つの実施態様では、前記変異は239および332および330の位置から選択され、例えば、前記変異はS239DおよびI332EおよびA330Lから選択される。さらなる実施態様では、重鎖定常領域は、少なくとも1つのIgG3由来CH2ドメインと1つのIgG1由来CH2ドメインを含んでなる。1つの実施態様では、重鎖定常領域は、フコースとマンノースの比が0.8:3以下となるように変更されたグリコシル化プロフィールを有し、例えば、抗原結合タンパク質は、前記抗原結合タンパク質が等価な非キメラ抗原結合タンパク質または前記変異およびグリコシル化プロフィールの変更を欠く免疫グロブリン重鎖定常領域に比べて増強されたエフェクター機能を有するように、脱フコシル化される。

10

20

30

40

50

## 【0133】

IgG抗体の長い半減期は、そのFcRnとの結合に依存することが報告されている。従って、定常領域を操作することによる、相互作用のpH依存性を維持しつつpH6.0でのFcRnに対するIgGの結合親和性を増強する置換が鋭意研究されているKuoおよびAveson (2011)。

## 【0134】

本発明の抗原結合タンパク質を改変する別の手段には、免疫グロブリン定常ドメインまたはFcRn (Fc受容体新生児型(Fc receptor neonate))結合ドメインの改変による、このようなタンパク質のin-vivo半減期の延長が含まれる。

## 【0135】

成体哺乳動物では、新生児型Fc受容体としても知られるFcRnは、IgGアイソタイプの抗体と結合してそれを分解から救う保護受容体として働くことによって血清抗体レベルを維持するという重要な役割を果たす。IgG分子は内皮細胞によりエンドサイトーシスを受け、それらがFcRnに結合すれば、循環中へ再利用される。対照的に、FcRnに結合しないIgG分子は細胞に入り、リソソーム経路に向けられ、そこで分解される。

## 【0136】

新生児型FcRn受容体は、抗体クリアランスと組織間のトランスサイトーシスの両方に関与すると考えられている、KuoおよびAveson (2011)。ヒトFcRnと直接相互作用することが決定付けられているヒトIgG1残基としては、Ile253、Ser254、Lys288、Thr307、Gln311、Asn434およびHis435が含まれる。本節に記載されるこれらの位置のうちいずれかにおける切り替えが、本発明の抗原結合タンパク質の血清半減期の延長および/またはエフェクター特性の変更を可能とし得る。

## 【0137】

FcRnに対する親和性の増強により半減期を延長するための変異

本発明の抗原結合タンパク質は、FcRnに対する定常ドメインまたはそのフラグメントの親和性を増強する1以上のアミノ酸改変を有してよい。これらは、これらのタンパク質の半減期の延長をもたらし得るKuoおよびAveson (2011)。治療用および診断用IgGおよびその他の生物活性分子の半減期の延長は、これらの分子の投与の量および/または頻度の低減を含む多くの利益を有する。よって、1つの実施態様では、これらのアミノ酸改変のうち1以上を有するIgG定常ドメインの全部もしくは一部(FcRn結合部分)およびこのような改変IgG定常ドメインにコンジュゲートされた非IgGタンパク質または非タンパク質分子を含んでなる、本明細書で提供される本発明による抗原結合または融合タンパク質が提供され、ここで、前記改変IgG定常ドメインの存在は、前記抗原結合タンパク質のin-vivo半減期を延長する。

## 【0138】

半減期の延長をもたらし得るいくつかの方法が知られており(KuoおよびAveson (2011))、アミノ酸改変は、アラニンスキャニング変異誘発、ランダム変異誘発、ならびにFcRnへの結合および/またはin-vivo挙動を評価するためのスクリーニングを含む技術によって作出できる。コンピューター戦略とその後の変異誘発も、アミノ酸変異の1つを選択して変異させるために使用可能である。

## 【0139】

よって、本発明は、FcRnとの結合が最適化された抗原結合タンパク質の変異体を提供する。好ましい実施態様では、抗原結合タンパク質の前記変異体は、前記抗原結合タンパク質のFc領域に少なくとも1つのアミノ酸改変を含んでなり、前記改変は、前記親ボリペプチドに対してFc領域の226、227、228、230、231、233、234、239、241、243、246、250、252、256、259、264、265、267、269、270、276、284、285、288、289、290、291、292、294、297、298、299、301、302、303、305、30

10

20

30

40

50

7、308、309、311、315、317、320、322、325、327、33  
 0、332、334、335、338、340、342、343、345、347、35  
 0、352、354、355、356、359、360、361、362、369、37  
 0、371、375、378、380、382、384、385、386、387、38  
 9、390、392、393、394、395、396、397、398、399、40  
 0、401 403、404、408、411、412、414、415、416、41  
 8、419、420、421、422、424、426、428、433、434、43  
 8、439、440、443、444、445、446および447からなる群から選択され、ここで、Fc領域のアミノ酸のナンバリングはKabatのEUインデックスのものである。

10

## 【0140】

本発明のさらなる態様では、改変はM252Y/S254T/T256Eである。

## 【0141】

加えて、様々な刊行物が、それらの分子にFcRn結合ポリペプチドを導入することによって、またはそれらの分子をFcRn結合親和性が提供されるが他のFc受容体に対する親和性が大幅に低減されている抗体と融合させるか、もしくは抗体のFcRn結合ドメインと融合させることによって、半減期が改変された生理活性分子を得るための方法を記載している、例えば、Kontermann (2009)。

## 【0142】

半減期を延長するためのpH切り替え技術

20

定常領域における置換は治療用IgG抗体の機能を有意に改善することができるが、厳格に保存された定常領域における置換には、ヒトでの免疫原性というリスクがあり、多様性の高い可変領域配列における置換は免疫原性が低い可能性がある。可変領域に関する報告では、抗原に対する結合親和性を改善するためのCDR残基の操作および安定性を改善し免疫原性リスクを低減するためのCDRおよびフレームワーク残基の操作が含まれる。知られているように、抗原に対する親和性の改善は、無作為化ライブラリーのファージまたはリボソームディスプレーを用いた親和性成熟により達成することができる。

## 【0143】

安定性の改善は、配列および構造に基づく合理的設計から合理的に得ることができる。免疫原性リスク（脱免疫化）の低減は、様々なヒト化戦略およびin silico技術を用いて推定できるかまたはin vitroアッセイにより決定できるT細胞エピトープの除去によって達成することができる。加えて、可変領域は、より低いpIに操作されている。これらの抗体では、同等のFcRn結合にもかかわらず、野生型抗体に比べて長い半減期が見られた。抗体および/または抗原の半減期を変更するためにpH依存的抗原結合を有する抗体を操作または選択する、例えば、IgG2抗体の半減期は、抗原を介したクリアランス機構が通常、抗原と結合した際に抗体を分解すれば、短縮できる。同様に、抗原：抗体複合体も抗原の半減期に影響を与えることができ、典型的な分解プロセスから抗原を保護することにより半減期を延長するか、または抗体を介した分解により半減期を短縮する。1つの実施態様は、エンドソームのpH（すなわち、pH5.5~6.0）に比べてpH7.4で抗原に対してより高い親和性を有する、pH5.5/pH7.4またはpH6.0/pH7.4でのKD比が2以上となるような抗体に関する。例えば、抗体の薬物動態(PK)および薬力学的(PD)特性を高めるために、CDR残基にヒスチジンを導入することにより、抗体に対するpH感受性結合を操作することができる。

30

## 【0144】

加えて、生体半減期が短縮された抗原結合タンパク質を生産する方法も提供される。His435がアラニンに変異された変異体IgGは、FcRn結合の選択的欠如および有意に短縮された血清半減期を生じる（例えば、米国特許第6,165,745号を参照、これは抗原結合タンパク質をコードするDNAセグメントに変異を導入することにより生体半減期が短縮された抗原結合タンパク質を生産する方法を開示している）。この変異には、Fcヒンジドメインの253、310、311、433、または434の位置におけ

40

50

るアミノ酸置換が含まれる。

**【0145】**

リンカー

タンパク質足場は、Ig配列などの天然配列と同じであってよく、または天然配列のフラグメントであってもよく、かつ、異なる供給源または合成に由来する、天然であり得る付加的配列を含んでもよく、それらは足場のN末端またはC末端に付加されてよい。このような付加的配列は、それらが、本明細書に定義されるものなどのエピトープ結合ドメインとタンパク質足場を連結する場合にはリンカーと見なされ得る。

**【0146】**

別の態様では、抗原結合構築物は、各末端においてエピトープ結合ドメインと直接または間接的に（例えば、リンカー配列を介して）連結された、抗体のFc領域、またはその一部からなる、またはから本質的になる。このような抗原結合構築物は、Fc領域により分離された2つのエピトープ結合ドメイン、またはその一部を含んでなり得る。分離されるとは、エピトープ結合ドメインが互いに直接連結されていないことを意味し、1つの態様では、Fc領域の反対の末端（C末端およびN末端）、または他のいずれかの足場領域に位置する。

**【0147】**

1つの態様では、抗原結合構築物は、2つのエピトープ結合ドメインと、例えば、各足場領域のN末端およびC末端で直接またはリンカーを介して間接的にそれぞれ結合された2つの足場領域を含んでなる。

**【0148】**

本発明のタンパク質足場は、リンカーの使用によってエピトープ結合ドメインと連結されてよい。好適なリンカーの例としては、1アミノ酸長～150アミノ酸長、または1アミノ酸長～140アミノ酸長、例えば、1アミノ酸長～130アミノ酸長、または1～120アミノ酸長、または1～80アミノ酸長、または1～50アミノ酸長、または1～20アミノ酸長、または1～10アミノ酸長、または5～18アミノ酸長であり得るアミノ酸配列が含まれる。このような配列は、それら固有の三次元構造を有してよく、例えば、本発明のリンカーは単一可変ドメインを含んでなり得る。リンカーのサイズは、1つの実施態様では、単一可変ドメインに相当する。好適なリンカーは、長さが1～100のサイズであり得、例えば20～80のサイズであり得、または例えば20～60、または例えれば40未満、または20未満、または5未満のサイズであり得る。

**【0149】**

本発明の1つの実施態様では、配列番号1に示されるCDRH1；配列番号2に示されるCDRH2；配列番号3に示されるCDRH3；配列番号4に示されるCDRL1；配列番号5に示されるCDRL2および/または配列番号6に示されるCDRL3、または前記CDR中に2つまでのアミノ酸置換を有する各CDRの直接的等価物のうちの1以上を含んでなるICOS結合タンパク質が提供される。

**【0150】**

本発明の1つの実施態様では、配列番号7に示されるアミノ酸配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含んでなるV<sub>H</sub>ドメインおよび/または配列番号8に示されるアミノ酸配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含んでなるV<sub>L</sub>ドメインを含んでなり、ヒトICOSと特異的に結合するICOS結合タンパク質が提供される。1つの態様では、本発明のICOS結合タンパク質はまたカニクイザルICOSにも結合する。1つの態様では、それらはマウスICOSには結合しない。

**【0151】**

1つの実施態様では、本発明のICOS結合タンパク質は、ICOSアゴニストである。1つの態様では、ICOS結合タンパク質は、T細胞の存在下でIFN- $\gamma$ 産生を増大させる。別の態様では、本発明のCOS結合タンパク質はT細胞の増殖を刺激する。

**【0152】**

1つの実施態様では、本発明のICOS結合タンパク質は、ヒトICOSと、

10

20

30

40

50

少なくとも  $1 \times 10^5$  M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup> の結合速度定数 (k<sub>on</sub>) ; および 6 × 10<sup>-5</sup> s<sup>-1</sup> 未満の解離速度定数 (k<sub>off</sub>) ; または  
100 nM 未満の解離定数 (K<sub>d</sub>)

で結合し、高い親和性が Biacore により測定される。

#### 【0153】

1つの実施態様では、ICOS 結合タンパク質は、CDRH3 (配列番号3) または配列番号3の変異体を含んでなる。別の実施態様では、ICOS 結合タンパク質は、CDRH1 (配列番号1) ; CDRH2 (配列番号2) ; CDRH3 (配列番号3) ; CDRL1 (配列番号4) ; CDRL2 (配列番号5) ; および / または CDRL3 (配列番号6) のうち1以上を含んでなる。1つの実施態様では、ICOS 結合タンパク質は、配列番号1 ; 配列番号2 ; および配列番号3に示される重鎖CDRと配列番号4 ; 配列番号5 ; および配列番号6に示される軽鎖CDRとを含んでなる。  
10

#### 【0154】

1つの実施態様では、ICOS 結合タンパク質は、配列番号7に示されるアミノ酸配列と90%の配列同一性を有するV<sub>H</sub>ドメイン；および配列番号8に示されるアミノ酸配列に示されるアミノ酸配列と90%の配列同一性を有するV<sub>L</sub>ドメインを含んでなる。1つの態様では、ICOS 結合タンパク質は、配列番号7に示されるアミノ酸配列を有するV<sub>H</sub>ドメインと、配列番号8に示されるアミノ酸配列を含んでなるV<sub>L</sub>ドメインとを含んでなる。1つの態様では、ICOS 結合タンパク質は、配列番号7からなる重鎖可変ドメインを含んでなる。1つの態様では、ICOS 結合タンパク質は、配列番号8からなる軽鎖可変ドメインを含んでなる。  
20

#### 【0155】

1つの実施態様では、本発明は、配列番号7に示されるアミノ酸配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含んでなるV<sub>H</sub>ドメイン；および配列番号8に示されるアミノ酸配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含んでなるV<sub>L</sub>ドメインを含んでなるICOS 結合タンパク質またはその抗原結合部分を提供し、前記ICOS 結合タンパク質またはその抗原結合部分は、ヒトICOSと特異的に結合する。1つの実施態様では、配列番号7に示されるアミノ酸配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含んでなるV<sub>H</sub>ドメイン；および配列番号8に示されるアミノ酸配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含んでなるV<sub>L</sub>ドメインを含んでなるICOS 結合タンパク質またはその抗原結合部分（前記ICOS 結合タンパク質またはその抗原結合部分は、ヒトICOSと特異的に結合する）は、配列番号1 ; 配列番号2 ; および配列番号3に示されるアミノ酸配列を有する重鎖CDRと、配列番号4 ; 配列番号5 ; および配列番号6に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖CDRをさらに含んでなる。1つの態様では、ICOS 結合タンパク質またはその抗原結合部分は、配列番号7に示されるアミノ酸配列を含んでなるV<sub>H</sub>ドメイン；配列番号8に示されるアミノ酸配列を含んでなるV<sub>L</sub>ドメインを含んでなる。1つの実施態様では、ICOS 結合タンパク質またはその抗原結合部分は、ヒトICOSに対するアゴニストである。1つの実施態様では、ICOS 結合タンパク質またはその抗原結合部分は、IgG4アイソタイプ足場またはその変異体をさらに含んでなる。1つの実施態様では、ICOS 結合タンパク質またはその抗原結合部分は、hIgG4PE足場を含んでなる。  
30

#### 【0156】

1つの実施態様では、本発明のICOS 結合タンパク質は、配列番号23に示されるアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%，%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する重鎖アミノ酸配列を含んでなるヒト化モノクローナル抗体である。  
40

## 【化4】

QVQLVQSGAEVKPGSSVKVSCKASGYTFTDYAMHWVRQAPGQGLEWMGLISIYSDHTNQNQKFQGRVTITADKS  
 TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCGRNNYGNYGWYFDVGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV  
 KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGP  
 PCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQFNST  
 YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYP  
 SDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGK

(配列番号23)

10

## 【0157】

1つの実施態様では、本発明のICOS結合タンパク質は、配列番号24に示されるアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有する軽鎖アミノ酸配列を含んでなるヒト化モノクローナル抗体である。

## 【化5】

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSSASSSVSYMHWYQQKPGQAPRLLIYDTSKLASGIPARFSGSGSGTDYTLTIS  
 SLEPEDFAVYYCFQGSGYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVD  
 NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGE (配列番号24)

20

## 【0158】

1つの実施態様では、本発明のICOS結合タンパク質は、配列番号23に示される重鎖アミノ酸配列と配列番号24に示される軽鎖アミノ酸配列とを含んでなるヒト化モノクローナル抗体である。1つの実施態様では、本発明のICOS結合タンパク質は、h Ig G PE足場をさらに含んでなる。

## 【0159】

1つの実施態様では、前記ICOS結合タンパク質がヒト化モノクローナル抗体である、ICOS結合タンパク質またはその抗原結合部分。また、本発明により、請求項のICOS結合タンパク質またはその抗原結合部分と薬学上許容可能な担体とを含んでなる医薬組成物も提供される。

30

## 【0160】

本発明は、必要とするヒトにおいて癌、感染性疾患、および/または敗血症から選択される疾患を処置する方法を提供し、その方法は、前記ヒトに本発明の医薬組成物を投与する工程を含んでなる。1つ態様では、本方法は、少なくとも1種類の抗新生物薬、少なくとも1種類の第2の免疫調節薬、および/または少なくとも1種類の免疫刺激アジュvantを前記ヒトに投与することをさらに含んでなる。1つの態様では、第2の免疫調節薬は、抗CTL4抗体、および抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体および抗OX40抗体から選択される。1つの態様では、抗CTL4抗体はイピリムマブである。1つの態様では、抗PD-1抗体は、ペンプロリズマブおよび/またはニボルマブから選択される。

40

## 【0161】

本発明の1つの実施態様では、治療上許容可能な量のICOS結合タンパク質またはその抗原結合部分をヒトに投与することを含んでなる、ヒトにおいて癌を処置するための方法が提供される。いくつかの態様では、癌は、結腸直腸癌(CRC)、食道癌、子宮頸癌、膀胱癌、乳癌、頭頸部癌、卵巣癌、黒色腫、腎細胞癌(RCC)、EC扁平上皮細胞癌、非小細胞肺癌、中皮腫、および前立腺癌から選択される。

## 【0162】

1つの実施態様では、治療上許容可能な量のICOS結合タンパク質またはその抗原結合部分をヒトに投与することを含んでなる、ヒトにおいて感染性疾患を処置するための方法が提供される。1つの態様では、感染性疾患はHIVである。

## 【0163】

50

1つの実施態様では、治療上許容可能な量の I C O S 結合タンパク質またはその抗原結合部分をヒトに投与することを含んでなる、ヒトにおいて敗血症を処置するための方法が提供される。

#### 【 0 1 6 4 】

1つの実施態様では、本発明の医薬組成物をヒトに投与することを含んでなる、ヒトにおいて T 細胞増殖を刺激する、T 細胞の活性化を誘導する、および / またはサイトカイン産生を誘導するための方法が提供される。

#### 【 0 1 6 5 】

本発明はまた、本発明の I C O S 結合タンパク質またはその抗原結合部分をコードするポリヌクレオチドも提供する。1つの実施態様では、本発明の I C O S 結合タンパク質またはそれらの抗原結合部分をコードするポリヌクレオチドを含んでなる宿主細胞が提供される。本発明はまた、a ) 本発明の I C O S 結合タンパク質またはその抗原結合部分をコードするポリヌクレオチドを含んでなる宿主細胞を、前記 I C O S 結合タンパク質またはその抗原結合部分を発現するために好適な条件下で培養する工程；および b ) 前記 I C O S 結合タンパク質またはその抗原結合部分を単離する工程、を含んでなる I C O S 結合タンパク質またはその抗原結合部分の作製方法を提供する。10

#### 【 0 1 6 6 】

本発明は、配列番号 7 に示されるアミノ酸配列を含んでなる V<sub>H</sub> ドメイン；配列番号 8 に示されるアミノ酸配列を含んでなる V<sub>L</sub> ドメイン；および h Ig G 4 足場またはその変異体を含んでなる単離されたヒト化モノクローナル抗体を提供する。1つの態様では、h Ig G 4 足場は h Ig G 4 P E である。20

#### 【 0 1 6 7 】

1つの実施態様では、I C O S 結合タンパク質またはその抗原結合部分が、ヒト I C O S に対する結合をめぐって、配列番号 7 に示されるアミノ酸配列を含んでなる V<sub>H</sub> ドメイン；および配列番号 8 に示されるアミノ酸配列を含んでなる V<sub>L</sub> ドメインを含んでなる参考抗体またはその抗原結合部分と交差競合する、I C O S 結合タンパク質またはそれらの抗原結合部分が提供される。

#### 【 0 1 6 8 】

1つの実施態様では、本発明の I C O S 結合タンパク質は、T 細胞と接触させて置いた場合に T 細胞の増殖を刺激する。1つの実施態様では、本発明の I C O S 結合タンパク質は、T 細胞と接触させて置いた場合に T 細胞の活性化を誘導する。T 細胞の活性化は、限定されるものではないが、CD 6 9、CD 2 5、および / またはOX 4 0 などの特定の活性化マーカーの発現レベル% の増大によって測定することができる。1つの実施態様では、本発明の I C O S 結合タンパク質は、T 細胞接触させて置いた場合にサイトカイン産生を刺激する。I C O S 結合タンパク質はヒト Fc RI I b と結合するが、ヒト Fc RI I a またはヒト Fc RI II a とは結合しない。加えて、I C O S 結合タンパク質は好適には、I C O S 発現 T 細胞接触させて置いた場合に I C O S 発現 T 細胞を枯渇させない。いくつかの態様では、I C O S 結合タンパク質は、第 2 の細胞の存在下で T 細胞と接触させて置いた場合に T 細胞と第 2 の細胞を架橋する。この架橋は、I C O S 結合タンパク質と第 2 の細胞上の Fc R との会合を介して起こり得る。Fc R 発現細胞としては、限定されるものではないが、单球、B リンパ球、濾胞性樹状細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、好中球、好酸球、好塩基球、および肥満細胞が含まれる。よって、1つの実施態様では、I C O S 結合タンパク質は哺乳動物に投与することができ、そこで I C O S 結合タンパク質は T 細胞上の I C O S にアゴニストとして働き、第 2 の細胞上の Fc R も会合させる。3040

#### 【 0 1 6 9 】

1つの実施態様では、I C O S 結合タンパク質は、ヒト Ig G 1 アイソタイプまたはその変異体およびヒト Ig G 4 アイソタイプまたはその変異体から選択される足場を含んでなる。好適には、足場は、ヒト Ig G 4 アイソタイプ足場またはその変異体を含んでなる。1つの態様では、足場は、h Ig G 4 P E 足場を含んでなる。50

## 【0170】

1つの実施態様では、ICOS結合タンパク質はモノクローナル抗体である。好適には、ICOS結合タンパク質はヒト化モノクローナル抗体である。1つの態様では、本発明のモノクローナル抗体は、完全ヒト型であり得る。

## 【0171】

別の態様では、ICOS結合タンパク質は、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ミニ抗体、ミニボディ、単離されたV<sub>H</sub>または単離されたV<sub>L</sub>であるフラグメントである。1つの実施態様では、ICOS結合タンパク質は、その抗原結合部分である。

## 【0172】

いくつかの態様では、ICOS結合タンパク質は、ヒトICOSに、0.6nMより強い親和性で結合する。1つの態様では、親和性は100nM以上である。1つの実施態様では、ICOS結合タンパク質は、ICOSに対して100nMのKDを有する。好適には、ICOSに対するICOS結合タンパク質のKDは、100nM未満、50nM未満、25nM未満、10nM未満、2nM未満または1nM未満である。

## 【0173】

1つの実施態様では、本発明は、ヒトICOSに対するアゴニストであるヒト化モノクローナル抗体を提供する。1つの実施態様では、本発明は、配列番号1；配列番号2；および配列番号3に示されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域CDRと、配列番号4；配列番号5；および配列番号6に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域CDRSとを含んでなるヒト化モノクローナル抗体を提供する。1つの態様では、ヒト化モノクローナル抗体は、T細胞と接触させた場合に、補体、ADCまたはCDCを誘導することなく、サイトカイン産生および/またはT細胞増殖を刺激することができる。1つの実施態様では、ヒト化モノクローナル抗体は、変異体ヒトIgG1Fc領域を有する。1つの実施態様では、ヒト化モノクローナル抗体は、ヒトIgG4Fc領域またはその変異体を有する。1つの実施態様では、ヒト化モノクローナル抗体は、ヒトIgG4PEFc領域を有する。1つの態様では、ヒト化モノクローナル抗体は、配列番号7に示されるアミノ酸配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含んでなるV<sub>H</sub>ドメイン；および配列番号8に示されるアミノ酸配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含んでなるV<sub>L</sub>ドメインを含んでなる。1つの態様では、ヒト化モノクローナル抗体は、配列番号7に示されるアミノ酸配列を含んでなるV<sub>H</sub>ドメイン；および配列番号8に示されるアミノ酸配列を含んでなるV<sub>L</sub>ドメインを含んでなる。1つの態様では、ヒト化モノクローナル抗体は、hIgG4PE足場を含んでなる。さらに、本発明のヒト化モノクローナル抗体は、CD4+またはCD8+T細胞と接触させた場合にT細胞の増殖を刺激することが示される。本発明のヒト化モノクローナル抗体は、T細胞活性化を誘導し、かつ、サイトカイン産生を刺激することが示される。

## 【0174】

1つの実施態様では、ヒト化モノクローナル抗体はIgG4PE足場を含んでなり、かつ、配列番号7に示されるアミノ酸配列を含んでなるV<sub>H</sub>ドメインと、配列番号8に示されるアミノ酸配列を含んでなるV<sub>L</sub>ドメインとを含んでなる。本発明の抗体は、T細胞と接触させた場合にサイトカイン産生を刺激し得る。

## 【0175】

1つの実施態様では、ICOS結合をめぐって本発明のICOS結合タンパク質と競合するICOS結合タンパク質が提供される。当技術分野で理解され、本明細書に記載されているように、結合の競合は、1以上のICOS結合タンパク質の存在下でICOSへのリガンドの結合の競合を比較することによって測定することができる。これもまた当技術分野で理解されているように、ICOSはCD4+およびCD8+T細胞ならびにTreg細胞で発現される。本発明のICOS結合タンパク質は、T細胞上のICOSに対してアゴニストとして働く。それらはまた、ICOS-Lと、T細胞およびTreg細胞の両方で発現されるICOSの間の相互作用を遮断する働きもする。よって、1つの実施態様

10

20

30

40

50

では、ICOS-LとTreg細胞上のICOSとの相互作用を遮断するための方法が提供される。ICOS発現Treg細胞は、リンパ腫などの液性腫瘍を含む様々なタイプの腫瘍に見出すことができる。よって、本発明の1つの態様では、本発明のICOS結合タンパク質を投与することを含んでなる癌の治療法が提供され、そこでICOS結合タンパク質は、ICOS-LとTreg細胞上のICOSとの相互作用を遮断する。

#### 【0176】

本明細書に記載のICOS結合タンパク質またはモノクローナル抗体を含んでなる医薬組成物も本発明に付け加えられる。1つの態様では、本発明の医薬組成物は、少なくとも1種類の抗新生物薬をさらに含んでなる。1つの態様では、本発明の医薬組成物は、少なくとも1種類の第2の免疫調節薬をさらに含んでなる。1つの態様では、本発明の医薬組成物は、少なくとも1の種類の免疫刺激性アジュバントをさらに含んでなる。

10

#### 【0177】

1つの実施態様では、必要とするヒトにおいて癌および/または感染性疾患を処置するための方法が提供され、前記方法は、前記ヒトに本発明の医薬組成物を投与する工程を含んでなる。1つの実施態様では、前記ヒトは癌を有する。1つの実施態様では、前記ヒトは感染性疾患を有する。1つの実施態様では、前記ヒトはHIVを有する。1つの態様では、前記方法は、前記ヒトに少なくとも1種類の抗新生物薬を投与することをさらに含んでなる。別の態様では、前記方法は、前記ヒトに少なくとも1種類の第2の免疫調節薬を投与することをさらに含んでなる。さらに別の態様では、前記方法は、前記ヒトに免疫刺激性アジュバントを投与することをさらに含んでなる。

20

#### 【0178】

1つの態様では、前記ヒトは固形腫瘍を有する。1つの態様では、前記腫瘍は、頭頸部癌、胃癌、黒色腫、腎細胞癌（RCC）、食道癌、非小細胞肺癌、前立腺癌、結腸直腸癌、卵巣癌および脾臓癌から選択される。1つの態様では、前記ヒトは、以下：結腸直腸癌（CRC）、食道癌、子宮頸癌、膀胱癌、乳癌、頭頸部癌、卵巣癌、黒色腫、腎細胞癌（RCC）、EC扁平上皮細胞癌、非小細胞肺癌、中皮腫、および前立腺癌のうち1以上を有する。別の態様では、前記ヒトは、びまん性大B細胞リンパ腫（DLBCL）、多発性骨髄腫、慢性リンパ性白血病（chronic lymphocytic leukemia）（CLL）、濾胞性リンパ腫、急性骨髓性白血病および慢性骨髓性白血病などの液体腫瘍を有する。

#### 【0179】

30

本開示はまた、脳癌（神経膠腫）、膠芽腫、バナヤン-ゾナナ症候群、カウデン病、レルミット-デュクロス疾患、乳癌、炎症性乳癌、ウィルムス腫瘍、ユーイング肉腫、横紋筋肉腫、脳室上衣細胞腫、髄芽細胞腫、結腸、頭頸部、腎臓、肺、肝臓、黒色腫、卵巣癌、脾臓癌、前立腺癌、肉腫、骨肉腫、骨の巨細胞腫瘍、甲状腺癌、リンパ芽球性T細胞白血病、慢性骨髓性白血病、慢性リンパ球性白血病、有毛細胞白血病、急性リンパ芽球性白血病、急性骨髓性白血病、慢性好中球性白血、急性リンパ芽球性T細胞白血病、形質細胞腫、免疫芽球性大細胞白血病、マントル細胞白血病、多発性骨髄腫、巨核芽球性白血病、多発性骨髄腫、急性巨核球性白血病、前骨髓球性白血病、赤白血病、悪性リンパ腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、リンパ芽球性T細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、濾胞性リンパ腫、神経芽腫、膀胱癌、尿路上皮癌、肺癌、外陰癌、子宮頸癌、子宮内膜癌、腎臓癌、中皮腫、食道癌、唾液腺癌、肝細胞癌、胃癌、鼻咽頭癌、頬粘膜癌、口腔癌、GIST（消化管間質腫瘍）および精巣癌から選択される癌を処置するまたはその重篤度を減弱する方法にも関する。

40

#### 【0180】

用語「処置する」およびその文法的変形は、本明細書で使用する場合、治療的療法を意味する。特定の病態に関して処置は、（1）その病態の生物学的発現の1以上の状態を改善または予防すること、（2）（a）その病態につながるもしくはその病態の原因である生物学的カスケードの1以上の点、もしくは（b）その病態の生物学的発現の1以上に干渉すること、（3）その病態もしくはその処置に関連する症状、効果もしくは副作用の1以上を緩和すること、（4）その病態もしくはその病態の生物学的発現の1以上の進行を

50

緩徐化すること、および／または(5)寛解の期間に付加的処置無く、その発現に関して寛解状態であると見なされる期間、その病態の生物学的発現の1以上を排除するもしくは検出不能なレベルにまで軽減することにより、前記病態もしくは前記病態の生物学的発現の1以上を治癒させることを意味する。当業者は、特定の疾患または病態に関して寛解と見なされる期間を理解するであろう。予防的療法もまた企図される療法である。当業者は、「予防」が絶対的な用語でないことを認識するであろう。医学では、「予防」は、ある病態もしくはその生物学的発現の尤度もしくは重篤度を実質的に減らすため、またはこのような病態もしくはその生物学的発現の発生を遅延させるための薬物の予防的投与を意味すると理解される。予防的療法は、例えば、対象が癌の強い家族歴を有する場合または対象が発癌物質に曝されていた場合など、対象に癌を発症する高いリスクがあると見なされる場合に適当である。

10

#### 【0181】

本明細書で使用する場合、用語「癌」、「新生物」、および「腫瘍」は、単数形または複数形で互換的に使用され、それらを宿主生物にとって病的とする悪性化を受けた細胞を意味する。原発性癌細胞は、十分に確立された技術、特に組織学的検査によって非癌性細胞から容易に識別することができる。癌細胞の定義は、本明細書で使用する場合、原発性癌細胞だけでなく、癌細胞祖先に由来するいずれの細胞も含む。これには転移癌細胞、ならびに癌細胞に由来する *in vitro* 培養物および細胞株が含まれる。通常固形腫瘍として顕在化する癌のタイプに関して、「臨床的に検出可能な」腫瘍は、例えばコンピューター断層撮影(CT)スキャン、磁気共鳴画像法(MRI)、X線、超音波または身体検査時の触診などの手法による腫瘍量に基づいて検出可能な、および／または患者から取得可能なサンプル中の1以上の癌特異的抗原の発現のために検出可能なものである。腫瘍は、「液性腫瘍」と呼ばれることがある、造血系(または血液性(hematologic or haematological)または血液関連)癌、例えば、血液細胞または免疫細胞由来癌であり得る。血液性腫瘍に基づく臨床症状の具体例としては、慢性骨髄球性白血病、急性骨髄球性白血病、慢性リンパ球性白血病および急性リンパ球性白血病などの白血病；多発性骨髄腫、MGUSおよびワルデンストロームマクログロブリン血症などの形質細胞悪性腫瘍；非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫などのリンパ腫などが含まれる。

20

#### 【0182】

癌は、異常な数の芽球もしくは望まれない細胞増殖が存在する、またはリンパ系および骨髄系の両悪性腫瘍を含め、血液性癌と診断されるいずれの癌であってもよい。骨髄性悪性腫瘍には、限定されるものではないが、急性骨髄性(myeloid)(または骨髄球性または骨髄性(myelogenous)または骨髄芽球性)白血病(未分化または分化)、急性前骨髄性(acute promyeloid)(または前骨髄球性または前骨髄性(promyelogenous)または前骨髄芽球性)白血病、急性骨髄单球性(または骨髄单芽球性)白血病、急性单球性(または单芽球性)白血病、赤白血病および巨核球性(または巨核芽球性)白血病が含まれる。これらの白血病は、急性骨髄性(または骨髄球性または骨髄性)白血病(AML)とともに言及され得る。骨髄性悪性腫瘍にはまた、骨髄増殖性疾患(MPD)が含まれ、限定されるものではないが、慢性骨髄性(chronic myelogenous)(または骨髄性(myeloid)白血病(CML))、慢性骨髄单球性白血病(CMMI)、本態性血小板血症(または血小板增多症)、および真性多血症(PGV)も含まれる。骨髄性悪性腫瘍にはまた、骨髄異形成(または骨髄異形成症候群またはMDS)、不応性貧血(RA)、芽球増加を伴う不応性貧血(RAEB)、および移行期の芽球増加を伴う不応性貧血(RAEBT)と呼ぶことができる；ならびに特発性骨髄様化性を伴うまたは伴わない骨髄線維症(MFS)も含まれる。

30

#### 【0183】

造血系癌にはまた、リンパ節、脾臓、骨髄、末梢血、および／または節外部位に影響を及ぼし得るリンパ系悪性腫瘍も含まれる。リンパ系癌にはB細胞悪性腫瘍が含まれ、限定されるものではないが、B細胞非ホジキンリンパ腫(B-NHL)が含まれる。B-NHLは、緩徐進行性(もしくは低悪性度)、中悪性度(もしくは急速進行性)または高悪性度(超急速進行性)であり得る。緩徐進行性B細胞リンパ腫には、濾胞性リンパ腫(FLL)

40

50

) ; 小リンパ球性リンパ腫 (SLL) ; 節性MZL、節外性MZL、脾性MZLおよび有毛リンパ球を伴う脾性MZLを含む辺縁帯リンパ腫 (MZL) ; リンパ形質細胞性リンパ腫 (LPL) ; および粘膜隨伴リンパ系組織 (MALTまたは節外辺縁帯) リンパ腫が含まれる。中悪性度B-NHLには、白血病関与があるまたは無いマントル細胞リンパ腫 (MCL) 、びまん性大細胞型リンパ腫 (DLBCL) 、濾胞性大細胞 (またはグレード3またはグレード3B) リンパ腫、および原発性縦隔リンパ腫 (PML) が含まれる。高グレードB-NHLには、バーキットリンパ腫 (BL) 、バーキット様リンパ腫、小型非切れ込み核細胞性リンパ腫 (SNCL) およびリンパ芽球性リンパ腫が含まれる。他のB-NHLには、免疫芽球性リンパ腫 (または免疫細胞腫) 、原発性滲出液リンパ腫、HIV関連 (またはAIDS関連) リンパ腫、および移植後リンパ増殖性障害 (PTLD) またはリンパ腫が含まれる。B細胞悪性腫瘍にはまた、限定されるものではないが、慢性リンパ球性白血病 (CLL) 、前リンパ球性白血病 (PLL) 、ワルデンストロームマクログロブリン血症 (WM) 、有毛細胞白血病 (HCL) 、大顆粒リンパ球 (LGL) 白血病、急性リンパ性 (またはリンパ球性またはリンパ芽球性) 白血病、およびキャッスルマン疾患も含まれる。NHLにはまたT細胞非ホジキンリンパ腫 (T-NHL) も含まれ、限定されるものではないが、特定不能T細胞非ホジキンリンパ腫 (NOS) 、末梢性T細胞リンパ腫 (PTCL) 、未分化大細胞リンパ腫 (ALCL) 、血管免疫芽球性リンパ系疾患 (AILD) 、鼻腔ナチュラルキラー (NK) 細胞 / T細胞リンパ腫、ガンマ / デルタリンパ腫、皮膚T細胞リンパ腫、菌状息肉腫、およびセザリー症候群が含まれる。

## 【0184】

10

造血系癌にはまた、古典型ホジキンリンパ腫、結節性硬化型ホジキンリンパ腫、混合細胞型ホジキンリンパ腫、リンパ球優位型 (LPL) ホジキンリンパ腫、結節性LPLホジキンリンパ腫、およびリンパ球減少型ホジキンリンパ腫を含む、ホジキンリンパ腫 (または疾患) も含まれる。造血系癌にはまた、形質細胞疾患または癌、例えば、くすぶり型MMを含む多発性骨髄腫 (MM) 、意義不明の (または未知または不確定の) 単クローナル性免疫グロブリン血症 (MGUS) 、形質細胞腫 (骨、髄外) 、リンパ形質細胞性リンパ腫 (LPL) 、ワルデンストロームマクログロブリン血症、形質細胞白血病、および原発性類デンプン症 (AL) も含まれる。造血系癌にはまた、多形核白血球 (または好中球) 、好塩基球、好酸球、樹状細胞、血小板、赤血球およびナチュラルキラー細胞を含むさらなる造血細胞の他の癌も含まれ得る。本明細書で「造血細胞組織」と呼ばれる、造血細胞を含む組織としては、骨髓；末梢血；胸腺；脾臓、リンパ節、粘膜関連リンパ系組織 (例えば、消化管関連リンパ系組織) 、扁桃腺、バイエル板および虫垂などの末梢リンパ系組織、ならびに例えば気管支内腔などの他の粘膜に関連するリンパ系組織が含まれる。

## 【0185】

30

本発明のICOS結合タンパク質、抗体および抗原結合フラグメントはまた、感染および感染性疾患の治癒、予防または治療のためにも使用可能である。ICOS結合タンパク質は病原体、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使用することもできるし、またはワクチンと併用することもできる。本発明のICOS結合タンパク質は、限定されるものではないが、ヒト免疫不全ウイルス、A、BおよびC型肝炎ウイルス、エピスタイン・バーウィルス、ヒトサイトメガロウイルス、ヒトパピローマウイルス、ヘルペスウイルスなどのヒトに感染するウイルスに対して免疫応答を刺激するために使用することができる。本発明のICOS結合タンパク質は、細菌または真菌性の寄生体、および他の病原体による感染に対して免疫応答を刺激するために使用することができる。好適には、本発明は、特定の毒素または病原体に曝されたヒトを処置するための方法を提供する。よって、本発明の別の態様は、ICOS結合タンパク質、またはその抗原結合部分を対象に投与することを含んでなる、対象において感染性疾患を処置する方法を提供する。

## 【0186】

本発明のICOS結合タンパク質が有用であり得る感染性疾患の例としては、限定されるものではないが、HIV、肝炎 (A、B、およびC型) 、インフルエンザ、ヘルペス、

40

50

ジアルジア、マラリア、リーシュマニア、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)、緑膿菌(*Pseudomonas Aeruginosa*)が含まれる。本発明の方法により処置可能な感染を引き起こす病原ウイルスのいくつかの例としては、HIV、肝炎(A、B、またはC型)、ヘルペスウイルス(例えば、VZV、HSV-1、HAV-6、HSV-II、およびCMV、エプスタイン・バーウイルス)、アデノウイルス、インフルエンザウイルス、フラビウイルス、エコーウイルス、ライノウイルス、コクサッキーウイルス、コルノウイルス(*coronavirus*)、呼吸器合胞体ウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、ロタウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、パルボウイルス、ワクシニアウイルス、HTLVウイルス、デング熱ウイルス、乳頭腫ウイルス、伝染性軟属腫ウイルス、ポリオウイルス、狂犬病ウイルス、JCウイルスおよびアルボウイルス性脳炎ウイルスが含まれる。

10

#### 【0187】

本発明の方法により処置可能な感染を引き起こす病原細菌のいくつかの例としては、クラミジア、リケッチア菌、マイコバクテリア、ブドウ球菌、連鎖球菌、肺炎球菌、髄膜炎菌およびコノコッカス(*conococci*)、クレブシエラ、プロテウス、セラチア、シュードモナス、レジオネラ、ジフテリア、サルモネラ、バチルス、コレラ、破傷風、ボツリヌス、炭疽、ペスト、レプトスピラ症、およびライム病菌が含まれる。

#### 【0188】

本発明の方法により処置可能な感染を引き起こす病原真菌のいくつかの例としては、カンジダ(*Candida*) (アルビカンス(*albicans*))、クルセイ(*krusei*)、グラブラー(*glabrat*a)、トロピカリス(*tropicalis*)など)、クリプトコッカス・ネオフォルマンス(*Cryptococcus neoformans*)、アスペルギルス(*Aspergillus*) (フミガーツス(*fumigatus*)、ニガー(*niger*)など)、ケカビ属(*Genus Mucorales*) (ムコール(*mucor*)、アブシディア(*absidia*)、リゾpus(*rhizophorus*))、スプロトリクス・シェンキー(*Sporothrix schenkii*)、プラストミセス・デルマティティディス(*Blastomyces dermatitidis*)、パラコクシジオイデス・ブラジリエンシス(*Paracoccidioides brasiliensis*)、コクシジオイデス・イミチス(*Coccidioides immitis*)およびヒストプラズマ・カプスラーツム(*Histoplasma capsulatum*)が含まれる。

20

#### 【0189】

本発明の方法により処置可能な感染を引き起こす病原寄生虫のいくつかの例としては、赤痢アメーバ(*Entamoeba histolytica*)、大腸バランチジウム(*Balantidium coli*)、ネグレリア・フォーレリ(*Naegleria fowleri*)、アカントアメーバ種(*Acanthamoeba sp.*)、ランブル鞭毛虫(*Giardia lamblia*)、クリプトスボリジウム種(*Cryptosporidium sp.*)、ニューモシスティス・カリニ(*Pneumocystis carinii*)、三日熱マラリア原虫(*Plasmodium vivax*)、バベシア・ミクロチ(*Babesia microti*)、ブルーストリパノソーマ(*Trypanosoma brucei*)、クルーズトリパノソーマ(*Trypanosoma cruzi*)、ドノバンリーシュマニア(*Leishmania donovani*)、トキソプラズマ原虫(*Toxoplasma gondii*)、およびブラジル鉤虫(*Nippostrongylus brasiliensis*)が含まれる。

30

#### 【0190】

敗血症は、全身の炎症状態(全身性炎症性応答症候群またはSIRSと呼ばれる)と既知または疑われる感染の存在を特徴とする命に関わり得る医学的状態である。身体は、この炎症性応答を血液、尿、肺、皮膚、またはその他の組織における微生物に対する免疫系により引き起こし得る。敗血症の一般用語は血液中毒であり、以下、この言葉はより適切に菌血症に適用される。重症敗血症は、全身性炎症性応答と感染と臓器不全の存在である。

40

#### 【0191】

菌血症は、血流中に病原生物が存在することを意味する関連の医学用語であり、敗血症につながる。この用語は鮮明に定義されていない。

#### 【0192】

敗血症と癌は、制御性T細胞の増加、骨髓由来抑制細胞の増加、負の補助刺激分子の発現の増強、単球/マクロファージHLA-DR発現の低下を含む、類似の免疫抑制機構を

50

共通に持つ。敗血症と癌は、プロトタイプの慢性炎症障害である。慢性炎症は、制御性T細胞の拡大増殖ならびにエフェクター細胞でのPD-1およびその他の負のレギュレーターのアップレギュレーションを含む、強力かつ持続的な免疫調節応答を刺激する。Barouch D.H. and Deeks S.G.; Immunologic strategies for HIV-1 remission and eradication. Science 345:169-174 2014。よって、本発明の1つの態様では、治療上有効な量の本発明のICOS抗原結合タンパク質をヒトに投与することを含んでなる、それを必要とするヒトにおいて敗血症を処置するための方法が提供される。Boomer, et al. JAMA 306:2594-2605 (2011); Meisel, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter trial. Am J Respir Crit Care Med 180:640-648 (2009) 10;およびHall, et al. Immunoparalysis and nosocomial infection in children with multiple organ dysfunction syndrome. Intensive Care Med 37:525-532 (2011)。

#### 【0193】

本発明のICOS結合タンパク質は、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など）とともに、これらのタンパク質の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）使用することができる。

#### 【0194】

例えば、そのICOS結合タンパク質は、少なくとも1つのICOS結合タンパク質と対象とする抗原（例えば、ワクチン）との併用投与により、抗原特異的免疫応答を刺激するために使用可能である。よって、別の態様では、本発明は、(i)抗原；および(ii)本発明のICOS結合タンパク質を対象に、前記対象において前記抗原に対する免疫応答が増強されるように投与することを含んでなる、対象において抗原に対する免疫応答を増強する方法を提供する。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由来抗原であり得る。このような抗原の限定されない例として、限定されるものではないが、腫瘍抗原、またはウイルス、細菌もしくはその他の病原体由来の抗原が含まれる。  
20

#### 【0195】

HIV根絶の主なハードルは、ウイルス抗原を発現せずに免疫の監視を逃れる不顯性感染細胞が持続していることである。潜伏ウイルスのリザーバーを除去するための、「キック・アンド・キル」と呼ばれる現行の戦略は、細胞の活性化はHIVの再活性化をもたらすのでHIV遺伝子発現を再活性化し（「キック」）、再活性化した細胞を排除する（「キル」）ことを狙いとする。細胞の活性化は、T細胞の表面に発現される正のレギュレーターと負のレギュレーターのバランスによって支配される。正のレギュレーターを促進し、負のレギュレーターを抑制することによりこのバランスを変更すると、HIVの再活性化が促進できる。  
30

#### 【0196】

誘導性T細胞補助刺激因子（ICOS）は正のレギュレーターであり、その発現は、刺激後にCD4 T細胞で増大する。ICOSは、T細胞の増殖、サイトカインの産生および分化を促進する働きをする。高レベルのPD-1およびICOSを発現する1つの重要なT細胞のサブセットがT滤胞性ヘルパー細胞（Tfh）である。Tfh細胞は、B細胞が分化、クラススイッチ、体細胞高頻度変異を受けるのを助け、胚中心形成に必要である。Tfh細胞は、HIV/SIV感染後に顕著に拡大増殖し、慢性レンチウイルス感染の際のそれらの調節不全は、B細胞の免疫障害に寄与する。選別されたTfh細胞は、他のリンパ系CD4サブセットよりも高レベルのHIV-DNAを含有することを示しており、刺激後にウイルスの増殖が見られる。Tfh細胞は胚中心に留まり、感染を助長し得る滤胞性樹状細胞に捕捉されたHIVビリオンに曝される。加えて、CD8 T細胞は、胚中心への接近が制限され、滤胞性CD8細胞はしばしば細胞傷害性の低下を示し、従って、Tfh細胞を抗ウイルス監視から逃れさせる。よって、Tfh細胞は、重要な保護されたHIVリザーバーであり、PD-1およびICOSを標的とする戦略は、Tfh細胞を選択的に標的とすることができる、HIV治癒計画の一部として有用性を持ち得る。好適に  
40  
50

は、本発明の I C O S 結合タンパク質またはその抗原結合部分を投与することを含んでなる、H I V に感染したヒトを処置するための方法が提供される。

#### 【 0 1 9 7 】

本明細書で使用する場合、「腫瘍抗原」は、免疫応答、特に、T 細胞媒介性免疫応答を惹起する腫瘍細胞によって產生されるタンパク質である。用語「腫瘍抗原」は、本明細書で使用する場合、腫瘍特異的抗原および腫瘍関連抗原の両方を含む。腫瘍特異的抗原は腫瘍細胞に独特であり、身体の他の細胞には見られない。腫瘍関連抗原は腫瘍細胞に独特ではなく、抗原に対して免疫寛容の状態を誘導できない状況にある正常細胞でも発現される。腫瘍上の抗原の発現は、免疫系が抗原に応答できる条件下で見られ得る。腫瘍関連抗原は、胎児発生中、免疫系が未熟で応答できない際に正常細胞で発現される抗原であり得、または腫瘍関連抗原は、正常細胞には通常極めて低いレベルで存在するが腫瘍細胞でははあるかに高いレベルで発現される抗原であり得る。

#### 【 0 1 9 8 】

腫瘍抗原の限定されない例としては、以下のもの：M A R T - 1 / M e l a n A ( M A R T - I )、g p 1 0 0 ( P m e l 1 1 7 )、チロシナーゼ、T R P - 1、T R P - 2 10 および腫瘍特異的多系列原、例えば、限定されるものではないが、M A G E 1、M A G E 3、M A G E 1 0、M A G E 1 1、M A G E 1 2、M A G E A 2、M A G E A 3、M A G E A 4、M A G E A 6、M A G E A 8、M A G E A 9、M A G E B 1 8、M A G E B 6、M A B E C 1、M A G E D 2、M A G E E 1、M A G E H 1、M A G E L 2、B A G E、G A G E - 1、G A G E - 2、p 1 5 を含むM A G E ファミリー抗原といった分化抗原；M E L 4、黒色腫関連抗原 1 0 0 +、黒色腫 g p 1 0 0、N R I P 3、N Y S 4 8、O C I A D 1、O F A - i L R P、O I P 5、卵巣癌関連抗原 ( O V 6 3 2 )、P A G E 4、P A R P 9、P A T E、プラスチン L、P R A M E、前立腺特異的抗原、プロティナーゼ 3 20 、プロステイン、R e g 3 a、R H A M M、R O P N 1、S A R T 2、S D C C A G 8、S E L 1 L、S E P T 1、S L C 4 5 A 2、S P A N X、S S X 5、S T X G A L N A C 1、S T E A P 4、サバイビン、T B C 1 D 2、T E M 1、T R P 1、上皮起源の腫瘍抗原、X A G E 1、X A G E 2、W T - 1；C E Aなどの過剰発現する胚抗原；過剰発現する癌遺伝子および変異腫瘍抑制遺伝子、例えば、p 5 3、R a s、H E R - 2 / n e u；染色体転座から生じる独特的な腫瘍抗原；例えば、B C R - A B L、E 2 A - P R L、H 4 - R E T、I G H - I G K、M Y L - R A R；およびエプスタイン・バーウイルス抗原 E B V A およびヒト乳頭腫ウイルス ( H P V ) 抗原 E 6 および E 7 などのウイルス抗原が含まれる。

#### 【 0 1 9 9 】

その他の腫瘍抗原としては、限定されるものではないが、T S P - 1 8 0、M A G E - 4、M A G E - 5、M A G E - 6、R A G E、N Y - E S O、p 1 8 5 e r b B 2、p 1 8 0 e r b B - 3、c - m e t、n m - 2 3 H 1、P S A、T A G - 7 2、C A 1 9 - 9、C A 7 2 - 4、C A M 1 7 . 1、N u M a、K - r a s、- カテニン、C D K 4、M u m - 1、p 1 5、p 1 6、4 3 - 9 F、5 T 4、7 9 1 T g p 7 2、- フェトタンパク質、- H C G、B C A 2 2 5、B T A A、C A 1 2 5、C A 1 5 - 3 \ C A 2 7 . 2 9 \ B C A A、C A 1 9 5、C A 2 4 2、C A - 5 0、C A M 4 3、C D 6 8 \ P 1、C O - 0 2 9、F G F - 5、G 2 5 0、G a 7 3 3 \ E p C A M、H T g p - 1 7 5、M 3 4 4、M A - 5 0、M G 7 - A g、M O V 1 8、N B / 7 0 K、N Y - C O - 1、R C A S 1、S D C C A G 1 6、T A - 9 0 \ M a c - 2 結合タンパク質 \ シクロフィリン C 関連タンパク質、T A A L 6、T A G 7 2、T L P、T P S、神経膠腫関連抗原、- ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン、フェトタンパク質 ( A F P )、レクチン反応性 A F P、チログロブリン、R A G E - 1、M N - C A I X、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素、R U 1、R U 2 ( A S )、腸管カルボキシルエステラーゼ、m u t h s p 7 0 - 2、M - C S F、プロスターーゼ、前立腺特異的抗原 ( P S A )、P A P、N Y - E S O - 1、L A G E - 1 a、p 5 3、プロステイン、P S M A、H e r 2 / n e u、サバイビンおよびテロメラーゼ、前立腺癌腫瘍抗原 - 1 ( P C T A - 1 )、E L F 2 M、好中 40 50

球エラスター、エフリンB2、CD19、CD20、CD22、ROR1、CD33 / IL3Ra、c-Met、PSMA、糖脂質F77、EGFRvIII、GD-2、インスリン成長因子(IGF)-I、IGF-II、IGF-I受容体およびメソテリンが含まれる。

#### 【0200】

一般に、処置される感受性腫瘍に対して活性を有するいずれの抗新生物薬も本発明での癌の処置において併用投与可能である。このような薬剤の例は、Cancer Principles and Practice of Oncology, V.T. Devita and S. Hellman (編者), 第6版(2001年2月15日), Lippincott Williams & Wilkins Publishersに見出すことができる。当業者ならば、関与する薬物および癌の特定の特徴に基づいてどの薬剤の組合せが有用であるかを認識することができる。本発明において有用な特定の抗新生物薬としては、限定されるものではないが、ジテルペノイドおよびビンカアルカロイドなどの抗微小管剤；白金錯体；ナイトロジエンマスター、オキシアザホスホリン、アルキルスルホネート、ニトロソ尿素、およびトリアゼンなどのアルキル化剤；アントラサイクリン、アクチノマイシンおよびブレオマイシンなどの抗生物質薬；エピポドフィロトキシンなどのトポイソメラーゼII阻害剤；プリンおよびピリミジン類似体ならびに葉酸拮抗化合物などの代謝拮抗物質；カンプトシンなどのトポイソメラーゼI阻害剤；ホルモンおよびホルモン類似体；シグナル伝達経路阻害剤；非受容体型チロシンキナーゼ血管新生阻害剤；免疫治療薬；アポトーシス促進薬；および細胞周期シグナル伝達阻害剤が含まれる。

#### 【0201】

本ICOS結合タンパク質と併用または併用投与するためのさらなる1または複数の有効成分または成分の例は、任意の化学療法薬、免疫治療薬または免疫調節薬および免疫刺激性アジュバントを含む抗新生物薬である。

#### 【0202】

微小管阻害剤または有糸分裂阻害剤は、細胞周期のM期、すなわち有糸分裂期の間に腫瘍細胞の微小管に対して活性である細胞周期特異的薬剤である。微小管阻害剤の例としては、限定されるものではないが、ジテルペノイドおよびビンカアルカロイドが挙げられる。

#### 【0203】

ジテルペノイドは、天然源に由来し、細胞周期のG<sub>2</sub> / M期に作用する細胞周期特異的抗癌剤である。ジテルペノイドは、微小管の-チューブリンサブユニットと結合することによりこのタンパク質を安定化させると考えられている。その後タンパク質の分解が阻害され、有糸分裂が停止し、細胞死をたどると思われる。ジテルペノイドの例としては、限定されるものではないが、パクリタキセルおよびその類似体であるドセタキセルが挙げられる。

#### 【0204】

パクリタキセル、5,20-エポキシ-1,2,4,7,10,13-ヘキサ-ヒドロキシタクス-11-エン-9-オン4,10-ジアセテート2-ベンゾエートの(2R,3S)-N-ベンゾイル-3-フェニルイソセリンとの13-エステルは、タイヘイヨウイチイ(*Taxus brevifolia*)から単離された天然ジテルペン生成物であり、注射液タキソール(TAXOL) (登録商標)として市販されている。パクリタキセルは、テルペンのタキサンファミリーのメンバーである。パクリタキセルは、1971年にWaniら(J. Am. Chem. Soc., 93:2325. 1971)によって初めて単離され、化学法およびX線結晶学的方法によってその構造が同定された。その活性の1つの機構は、パクリタキセルの、チューブリンと結合し、それにより癌細胞増殖を阻害する能力に関連している。Schiff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:1561-1565 (1980); Schiff et al., Nature, 277:665-667 (1979); Kumar, J. Biol. Chem., 256: 10435-10441 (1981)。いくつかのパクリタキセル誘導体の合成および抗癌活性に関する総説としては、D. G. I. Kingston et al., Studies in Organic Chemistry vol. 26, "New trends in Natural Products Chemistry 1986", Attaur-Rahman, P.W. Le Quesne編(Elsevier, Amsterdam, 1986) pp 219-235を参照

10

20

30

40

50

。

## 【0205】

パクリタキセルは、米国における難治性卵巣癌の治療における臨床使用(Markman et al., Yale Journal of Biology and Medicine, 64:583, 1991; McGuire et al., Ann. Intern. Med., 111:273, 1989)および乳癌の治療(Holmes et al., J. Natl. Cancer Inst., 83:1797, 1991)に承認されている。パクリタキセルは、皮膚における新生物(Einzig et. al., Proc. Am. Soc. Clin. Oncol., 20:46)および頭頸部癌(Forastiere et. al., Sem. Oncol., 20:56, 1990)の治療のための潜在的候補である。またこの化合物は、多発性囊胞腎疾患(Woo et. al., Nature, 368:750, 1994)、肺癌、およびマラリアの治療にも可能性を示している。パクリタキセルで患者を治療すると、閾値濃度(50 nM)を超える投与期間に関連して(Kearns, C.M. et. al., Seminars in Oncology, 3(6) p.16-23, 1995)、骨髄抑制が起こる(複数の細胞系譜、Ignoff, R.J. et. al., Cancer Chemotherapy Pocket Guide, 1998)。

## 【0206】

ドセタキセル、(2R, 3S)-N-カルボキシ-3-フェニルイソセリン, N-(tert-butyl ester)の5'-20'-エポキシ-1,2',4,7',10',13'-ヘキサヒドロキシタクス-11'-エン-9'-オン4'-アセテート2'-ベンゾエートとの13'-エステルの三水和物は、注射液としてタキソテール(TAXOTERE)(登録商標)として市販されている。ドセタキセルは、乳癌の治療に指示される。ドセタキセルは、ヨーロッパイチイの針葉から抽出した天然の前駆物質10'-デアセチル-バッカチンIIを用いて製造された、パクリタキセル(前項参照)の半合成誘導体である。ドセタキセルの用量制限毒性は好中球減少である。

## 【0207】

ビンカルカルロイドは、ニチニチソウ由来の細胞周期特異的抗新生物薬である。ビンカルカルロイドは、チューブリンと特異的に結合することによって細胞周期のM期(有糸分裂)に作用する。その結果、結合されたチューブリン分子は、重合して微小管になることができない。有糸分裂は中期で停止し、細胞死をたどると考えられている。ビンカルカルロイドの例としては、限定されるものではないが、ビンプラスチン、ビンクリスチン、およびビノレルビンが挙げられる。

## 【0208】

ビンプラスチン、硫酸ビンカルイコプラスチンは、注射液としてベルバン(VELBAN)(登録商標)として市販されている。ビンプラスチンは、種々の固形腫瘍の第二選択療法として指示される可能性があるが、精巣癌、ならびにホジキン病、リンパ球性および組織球性リンパ腫を含む種々のリンパ腫の治療に主として指示される。骨髄抑制がビンプラスチンの用量制限副作用である。

## 【0209】

ビンクリスチン、ビンカルイコプラスチンの22'-オキソ-硫酸塩は、注射液としてオンコビン(ONCOVIN)(登録商標)として市販されている。ビンクリスチンは、急性白血病の治療に指示されており、ホジキンおよび非ホジキン悪性リンパ腫の治療計画の中でも使用されている。脱毛および神経学的作用がビンクリスチンの最も一般的な副作用であり、程度は低いが、骨髄抑制および胃腸粘膜炎作用が生じる。

## 【0210】

酒石酸ビノレルビンの注射液(ナベルビン(NAVELBINE)(登録商標))として市販されているビノレルビン、3',4'-ジデヒドロ-4'-デオキシ-C'-ノルビンカルイコプラスチン[R-(R\*, R\*)-2,3'-ジヒドロキシブタン二酸(1:2)(塩)]は、半合成ビンカルカルロイドである。ビノレルビンは、単剤として、またはシスプラチンなどの他の化学療法薬と組み合わせて、種々の固形腫瘍、特に、非小細胞肺癌、進行性乳癌、およびホルモン不応性前立腺癌の治療に指示される。骨髄抑制がビノレルビンの最も一般的な用量制限副作用である。

## 【0211】

10

20

30

40

50

白金配位錯体は、非細胞周期特異的抗癌剤であり、DNAと相互作用する。白金錯体は、腫瘍細胞に侵入し、アクア化を受け、DNAとの鎖内架橋および鎖間架橋を形成し、腫瘍に対して有害な生物学的作用を引き起こす。白金配位錯体の例としては、限定されるものではないが、シスプラチニンおよびカルボプラチニンが挙げられる。

## 【0212】

シスプラチニン、シス-ジアンミンジクロロ白金は、注射液としてプラチノール(PLATINO L)（登録商標）として市販されている。シスプラチニンは、主として転移性の精巣癌および卵巣癌ならびに進行性膀胱癌の治療に指示される。シスプラチニンの主な用量制限副作用は、腎毒性（水分補給と利尿により管理可能）、および耳毒性である。

## 【0213】

カルボプラチニン、ジアンミン[1,1-シクロブタン-ジカルボキシレート(2-)-O,O']白金は、注射液としてパラプラチニン(PARAPLATIN)（登録商標）として市販されている。カルボプラチニンは、主として進行性卵巣癌の第一選択および第二選択治療に指示される。骨髄抑制がカルボプラチニンの用量制限毒性である。

## 【0214】

アルキル化剤は、非細胞周期特異的抗癌剤(non-phase anti-cancer specific agents)であり、かつ、強力な求電子試薬である。一般に、アルキル化剤は、アルキル化によって、リン酸基、アミノ基、スルフヒドリル基、ヒドロキシル基、カルボキシル基、およびイミダゾール基などのDNA分子の求核部分を介してDNAと共有結合を形成する。このようなアルキル化によって核酸機能が破壊され細胞死に至る。アルキル化剤の例としては、限定されるものではないが、シクロホスファミド、メルファラン、およびクロラムブシリなどのナイトロジエンマスター；ブスルファンなどのスルホン酸アルキル；カルムスチンなどのニトロ尿素；ならびにダカルバジンなどのトリアゼンが挙げられる。

## 【0215】

シクロホスファミド、2-[ビス(2-クロロエチル)アミノ]テトラヒドロ-2H-1,3,2-オキシアザホスホリン2-オキシドー水和物は、注射液または錠剤としてシトキサン(CYTOXAN)（登録商標）として市販されている。シクロホスファミドは、単剤として、または他の化学療法薬と組み合わせて、悪性リンパ腫、多発性骨髄腫、および白血病の治療に指示される。脱毛、恶心、嘔吐および白血球減少がシクロホスファミドの最も一般的な用量制限副作用である。

## 【0216】

メルファラン、4-[ビス(2-クロロエチル)アミノ]-L-フェニルアラニンは、注射液または錠剤としてアルケラン(ALKERAN)（登録商標）として市販されている。メルファランは、多発性骨髄腫および切除不能な卵巣上皮癌の待期療法に指示される。骨髄抑制がメルファランの最も一般的な用量制限副作用である。

## 【0217】

クロラムブシリ、4-[ビス(2-クロロエチル)アミノ]ベンゼンブタン酸は、ロイケラン(LEUKERAN)（登録商標）錠剤として市販されている。クロラムブシリは、慢性リンパ性白血病、ならびにリンパ肉腫、巨大濾胞性リンパ腫、およびホジキン病などの悪性リンパ腫の待期療法に指示される。骨髄抑制がクロラムブシリの最も一般的な用量制限副作用である。

## 【0218】

ブスルファン、ジメタヌルホン酸1,4-ブタンジオールは、マイレラン(MYLERAN)（登録商標）錠剤として市販されている。ブスルファンは、慢性骨髓性白血病の待期療法に指示される。骨髄抑制がブスルファンの最も一般的な用量制限副作用である。

## 【0219】

カルムスチン、1,3-[ビス(2-クロロエチル)-1-ニトロソ尿素は、BiCN U（登録商標）として凍結乾燥物質の単一バイアルとして市販されている。カルムスチンは、脳腫瘍、多発性骨髄腫、ホジキン病、および非ホジキンリンパ腫用に、単剤として、または他の薬剤と組み合わせて、待期療法に指示される。遅発性骨髄抑制がカルムスチン

10

20

30

40

50

の最も一般的な用量制限副作用である

【0220】

ダカルバジン、5-(3,3-ジメチル-1-トリアゼノ)-イミダゾール-4-カルボキサミドは、材料の単一バイアルとしてD T I C - D o m e (登録商標)として市販されている。ダカルバジンは、転移性悪性黒色腫の治療、および他の薬剤と組み合わせてホジキン病の第二選択治療に指示される。恶心、嘔吐、および食欲不振がダカルバジンの最も一般的な用量制限副作用である。

【0221】

抗生物質系抗新生物薬は、非細胞周期特異的薬剤であり、DNAと結合するかまたはDNAにインタークレートする。一般に、このような作用によって安定なDNA複合体かまたは鎖の切断が生じ、それにより核酸の通常機能が乱れ、細胞死に至る。抗生物質系抗新生物薬の例としては、限定されるものではないが、ダクチノマイシンなどのアクチノマイシン；ダウノルビシンおよびドキソルビシンなどのアントロサイクリン；ならびにブレオマイシンが挙げられる。

【0222】

ダクチノマイシンは、アクチノマイシンDとしても知られ、注射液の形態でコスマゲン(COSMEGEN) (登録商標)として市販されている。ダクチノマイシンは、ウィルムス腫瘍および横紋筋肉腫の治療に指示される。恶心、嘔吐および食欲不振がダクチノマイシンの最も一般的な用量制限副作用である。

【0223】

ダウノルビシン、(8S-シス-) - 8-アセチル-10-[ (3-アミノ-2,3,6-トリデオキシ-L-リクソ-ヘキソピラノシリル) オキシ] - 7, 8, 9, 10-テトラヒドロ-6, 8, 11-トリヒドロキシ-1-メトキシ-5, 12ナフタセンジオン塩酸塩は、リポソーム注射形態としてダウノキソーム(DAUNOXOME) (登録商標)として、または注射液としてセルビジン(CERUBIDINE) (登録商標)として市販されている。ダウノルビシンは、急性非リンパ球性白血病および進行性HIV関連カポジ肉腫の治療における寛解導入に指示される。骨髄抑制がダウノルビシンの最も一般的な用量制限副作用である。

【0224】

ドキソルビシン、(8S, 10S) - 10-[ (3-アミノ-2, 3, 6-トリデオキシ-L-リクソ-ヘキソピラノシリル) オキシ] - 8-グリコロイル, 7, 8, 9, 10-テトラヒドロ-6, 8, 11-トリヒドロキシ-1-メトキシ-5, 12ナフタセンジオン塩酸塩は、注射可能な形態としてルベックス(RUBEX) (登録商標)またはアドリアマイシンR D F (ADRIAMYCIN RDF) (登録商標)として市販されている。ドキソルビシンは、主として急性リンパ球性白血病および急性骨髄芽球性白血病の治療に指示されるが、いくつかの 固形腫瘍およびリンパ腫の治療における有用成分でもある。骨髄抑制がドキソルビシンの最も一般的な用量制限副作用である。

【0225】

ブレオマイシン、ストレプトミセス・ヴェルチシルス(*Streptomyces verticillus*)の株から単離された細胞傷害性グリコペプチド系抗生物質の混合物は、ベレノキサン(BLENOXANE) (登録商標)として市販されている。ブレオマイシンは、単剤として、または他の薬剤と組み合わせて、扁平上皮癌、リンパ腫、および精巣癌の待期療法に指示される。肺毒性および皮膚毒性がブレオマイシンの最も一般的な用量制限副作用である。

【0226】

トポイソメラーゼII阻害剤としては、限定されるものではないが、エピポドフィロトキシンが挙げられる。

【0227】

エピポドフィロトキシンは、マンドレイク植物由来の細胞周期特異的抗新生物薬である。エピポドフィロトキシンは、一般に、トポイソメラーゼIIとDNAとの三元複合体を形成してDNA鎖の切断を引き起こすことによって、細胞周期のS期およびG<sub>2</sub>期におい

10

20

30

40

50

て細胞に影響を及ぼす。この鎖切断が蓄積し、細胞死をたどる。エピポドフィロトキシンの例としては、限定されるものではないが、エトポシドおよびテニポシドが挙げられる。

#### 【0228】

エトポシド、4' - デメチル - エピポドフィロトキシン9 [4, 6 - 0 - (R) - エチリデン - - D - グルコピラノシド]は、注射液またはカプセル剤としてベプシド(VePES ID) (登録商標)として市販されており、一般にVP-16として知られている。エトポシドは、単剤として、または他の化学療法薬と組み合わせて、精巣癌および非小細胞肺癌の治療に指示される。骨髄抑制がエトポシドの最も一般的な副作用である。白血球減少の発生率の方が、血小板減少よりも重大となる傾向がある。

#### 【0229】

テニポシド、4' - デメチル - エピポドフィロトキシン9 [4, 6 - 0 - (R) - テニリデン - - D - グルコピラノシド]は、注射液としてブモン(VUMON) (登録商標)として市販されており、一般にVM-26として知られている。テニポシドは、単剤として、または他の化学療法薬と組み合わせて、小児における急性白血病の治療に指示される。骨髄抑制がテニポシドの最も一般的な用量制限副作用である。テニポシドは、白血球減少および血小板減少の両方を誘発し得る。

#### 【0230】

代謝拮抗性抗新生物薬は、DNA合成を阻害すること、またはプリンもしくはピリミジン塩基の合成を阻害し、それによりDNA合成を制限することによって細胞周期のS期(DNA合成)に作用する、細胞周期特異的抗新生物薬である。その結果、S期は進行せず、細胞死をたどる。代謝拮抗性抗新生物薬の例としては、限定されるものではないが、フルオロウラシル、メトレキサート、シタラビン、メカプトプリン(mecaptopurine)、チオグアニン、およびゲムシタビンが挙げられる。

#### 【0231】

5 - フルオロウラシル、5 - フルオロ - 2 , 4 - (1H, 3H) ピリミジンジオンは、フルオロウラシルとして市販されている。5 - フルオロウラシルを投与すると、チミジル酸合成が阻害され、またRNAおよびDNAの両方に組み込まれる。その結果は一般に細胞死である。5 - フルオロウラシルは、単剤として、または他の化学療法薬と組み合わせて、乳癌、結腸癌、直腸癌、胃癌、および膀胱癌の治療に指示される。骨髄抑制および粘膜炎が5 - フルオロウラシルの用量制限副作用である。他のフルオロピリミジン類似体としては、5 - フルオロデオキシリジン(フロクスウリジン)および5 - フルオロデオキシリジンーリン酸が挙げられる。

#### 【0232】

シタラビン、4 - アミノ - 1 - - D - アラビノフラノシル - 2 (1H) - ピリミジンは、シトサール - U (CYTOSAR-U) (登録商標)として市販されており、一般にAra-Cとして知られている。シタラビンは、成長中のDNA鎖へのシタラビンの末端組み込みによってDNA鎖の伸長を阻害することにより、S期で細胞周期特異性を示すと考えられている。シタラビンは、単剤として、または他の化学療法薬と組み合わせて、急性白血病の治療に指示される。他のシチジン類似体としては、5 - アザシチジンおよび2', 2' - デフルオロデオキシリジン(ゲムシタビン)が挙げられる。シタラビンは、白血球減少、血小板減少、および粘膜炎を誘発する。

#### 【0233】

メルカプトプリン、1, 7 - ジヒドロ - 6H - プリン - 6 - チオナー水和物は、プリントール(PURINETHOL) (登録商標)として市販されている。メルカプトプリンは、現時点ではまだ特定されていないメカニズムによってDNA合成を阻害することにより、S期で細胞周期特異性を示す。メルカプトプリンは、単剤として、または他の化学療法薬と組み合わせて、急性白血病の治療に指示される。骨髄抑制および胃腸粘膜炎が、高用量のメルカプトプリンの副作用と予想される。有用なメルカプトプリン類似体はアザチオプリンである。

#### 【0234】

チオグアニン、2 - アミノ - 1 , 7 - ジヒドロ - 6H - プリン - 6 - チオンは、タブロ

10

20

30

40

50

イド(TABLOID)（登録商標）として市販されている。チオグアニンは、現時点でまだ特定されていないメカニズムによってDNA合成を阻害することにより、S期で細胞期特異性を示す。チオグアニンは、単剤として、または他の化学療法薬と組み合わせて、急性白血病の治療に指示される。白血球減少、血小板減少、および貧血を含む骨髄抑制がチオグアニン投与の最も一般的な用量制限副作用である。しかしながら、消化管副作用も起こり、用量制限となり得る。他のプリン類似体としては、ペントスタチン、エリスロヒドロキシノニルアデニン、リン酸フルダラビン、およびクラドリビンが挙げられる。

#### 【0235】

ゲムシタビン、2' - デオキシ - 2' , 2' - ジフルオロシチジン - 塩酸塩（ - 異性体）は、ジェムザール(GEMZAR)（登録商標）として市販されている。ゲムシタビンは、S期にて、またG1 / S境界を通る細胞の進行を遮断することによって、細胞期特異性を示す。ゲムシタビンは、シスプラチニンと組み合わせて局所進行性非小細胞肺癌の治療に指示され、また単独で局所進行性膵癌の治療に指示される。白血球減少、血小板減少、および貧血を含む骨髄抑制が、ゲムシタビン投与の最も一般的な用量制限副作用である。

#### 【0236】

メトレキサート、N - [ 4 [ [ ( 2 , 4 - ジアミノ - 6 - プテリジニル ) メチル ] メチルアミノ ] ベンゾイル ] - L - グルタミン酸は、メトレキサートナトリウムとして市販されている。メトレキサートは、プリンヌクレオチドおよびチミジル酸の合成に必要とされるジヒドロ葉酸レダクターゼの阻害を介して、DNAの合成、修復、および / または複製を阻害することによって、特にS期に細胞周期作用を示す。メトレキサートは、単剤として、または他の化学療法薬と組み合わせて、絨毛癌、髄膜白血病、非ホジキンリンパ腫、ならびに乳癌、頭部癌、頸部癌、卵巣癌、および膀胱癌の治療に指示される。骨髄抑制（白血球減少、血小板減少、および貧血）および粘膜炎が、メトレキサート投与の予想される副作用である。

#### 【0237】

カンプトテシンおよびカンプトテシン誘導体を含むカンプトテシン類は、トポイソメラーゼI阻害剤として入手可能または開発中である。カンプトテシン細胞傷害活性は、そのトポイソメラーゼI阻害活性に関連すると考えられている。カンプトテシンの例としては、限定されるものではないが、イリノテカン、トポテカン、および下記の7 - ( 4 - メチルピペラジノ - メチレン ) - 10 , 11 - エチレンジオキシ - 20 - カンプトテシンの種々の光学形態が挙げられる。

#### 【0238】

イリノテカンHC1、(4S) - 4 , 11 - ジエチル - 4 - ヒドロキシ - 9 - [ ( 4 - ピペリジノピペリジノ ) カルボニルオキシ ] - 1H - ピラノ [ 3' , 4' , 6 , 7 ] インドリジノ [ 1 , 2 - b ] キノリン - 3 , 14 ( 4H , 12H ) - ジオン塩酸塩は、注射液カンプトサール(CAMPTOSAR)（登録商標）として市販されている。

#### 【0239】

イリノテカンは、その活性代謝物SN-38とともにトポイソメラーゼI - DNA複合体と結合する、カンプトテシンの誘導体である。細胞傷害性は、トポイソメラーゼI : DNA : イリンテカンまたはSN-38の三元複合体と複製酵素との相互作用により引き起こされる回復不能な二本鎖切断の結果として生じると考えられている。イリノテカンは、結腸または直腸の転移性癌の治療に指示される。イリノテカンHC1の用量制限副作用は、好中球減少を含む骨髄抑制、および下痢を含むG1作用である。

#### 【0240】

トポテカンHC1、(S) - 10 - [ (ジメチルアミノ) メチル ] - 4 - エチル - 4 , 9 - ジヒドロキシ - 1H - ピラノ [ 3' , 4' , 6 , 7 ] インドリジノ [ 1 , 2 - b ] キノリン - 3 , 14 - ( 4H , 12H ) - ジオン - 塩酸塩は、注射液ハイカムチン(HYCAMTIN)（登録商標）として市販されている。トポテカンは、トポイソメラーゼI - DNA複合体と結合して、DNA分子のねじれ歪みに応答してトポイソメラーゼIにより引き起こされる一本鎖切断の再連結を妨げるカンプトテシンの誘導体である。トポテカンは、転移性

10

20

30

40

50

の卵巣癌および小細胞肺癌の第二選択治療に指示される。トポテカンH C 1 の用量規制副作用は、骨髄抑制、主に好中球減少である。

#### 【 0 2 4 1 】

リツキシマブは、キメラモノクローナル抗体であり、リツキサン(RITUXAN)（登録商標）およびマブセラ(MABTHERA)（登録商標）として市販されている。リツキシマブは、B 細胞上のCD20と結合し、細胞アポトーシスを引き起こす。リツキシマブは静脈内に投与され、関節リウマチおよびB 細胞非ホジキンリンパ腫の治療に承認されている。

#### 【 0 2 4 2 】

オファツムマブは、完全ヒトモノクローナル抗体であり、アルゼラ(ARZERRA)（登録商標）として市販されている。オファツムマブは、B 細胞上のCD20と結合し、フルダラビン(フルダラ)およびアレムツズマブ(キャンパス)処置に不応の成人において白血球の癌の一種である慢性リンパ球性白血病CLLを治療するために使用されている。  
10

#### 【 0 2 4 3 】

トラスツズマブ(ハーセプチン(HEREPTIN)（登録商標）)は、HER2受容体と結合するヒト化モノクローナル抗体である。その元の適応は、HER2陽性乳癌である。

#### 【 0 2 4 4 】

セツキシマブ(エルビタックス(ERBITUX)（登録商標）)は、上皮細胞成長因子受容体(EGFR)を阻害するキメラマウスヒト抗体である。

#### 【 0 2 4 5 】

mTOR阻害剤としては、限定されるものではないが、ラパマイシン(FK506)およびラパログ、RAD001またはエベロリムス(アフィニートール)、CCI-779またはテムシロリムス、AP23573、AZD8055、WYE-354、WYE-600、WYE-687およびPp121が含まれる。  
20

#### 【 0 2 4 6 】

ベキサロテンは、ターゲレチン(Targretin)（登録商標）として市販され、レチノイドX受容体(RXR)を選択的に活性化するレチノイドのサブクラスのメンバーである。これらのレチノイド受容体は、レチノイン酸受容体(RAR)とは異なる生物活性を有する。化学名は4-[1-(5,6,7,8-テトラヒドロ-3,5,5,8,8-ペンタメチル-2-ナフタレニル)エテニル]安息香酸である。ベキサロテンは、少なくとも1種類の他の薬剤で疾患が上手く治療できなかった人で、皮膚T細胞リンパ腫CTCL(皮膚癌の一種)を治療するために使用される。  
30

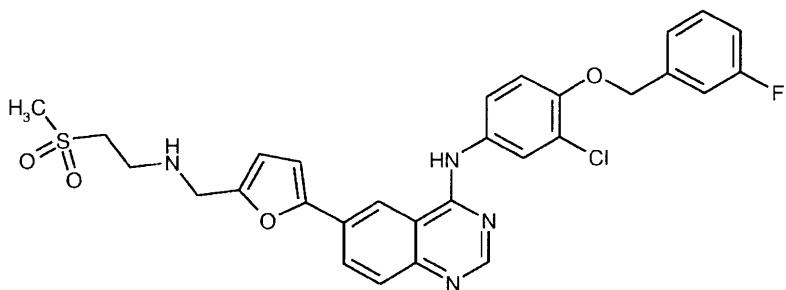
#### 【 0 2 4 7 】

ネクサバール(Nexavar)（登録商標）として市販されているソラフェニブは、マルチキナーゼ阻害剤と呼ばれる薬剤の一種である。その化学名は、4-[4-[4-クロロ-3-(トリフルオロメチル)フェニル]カルバモイルアミノ]フェノキシ]-N-メチル-ピリジン-2-カルボキサミドである。ソラフェニブは、進行性腎細胞癌(腎臓で始まる癌の一種)を治療するために使用される。ソラフェニブはまた、切除不能肝細胞癌(手術で処置できない肝臓癌一種)を治療するためにも使用される。

#### 【 0 2 4 8 】

erbB阻害剤の例には、ラパチニブ、エルロチニブ、およびゲフィチニブが含まれる。ラパチニブ、N-(3-クロロ-4-{[(3-フルオロフェニル)メチル]オキシ}フェニル)-6-{[5-({[2-(メチルスルホニル)エチル]アミノ}メチル)-2-フラニル]-4-キナゾリンアミン(示されるような式IIで表される)は、HER2陽性転移性乳癌の治療のためにカペシタピンとの組合せで承認されている、erbB-1およびerbB-2(EGFRおよびHER2)チロシンキナーゼの、強力、経口、小分子、二重阻害剤である。  
40

## 【化6】



10

II

## 【0249】

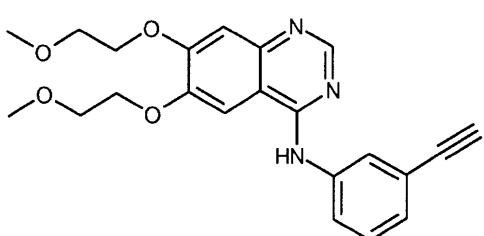
式(II)の化合物の遊離塩基、HC1塩、およびニトシリ酸は、1999年7月15日公開のWO99/35146；および2002年1月10日公開のWO02/02552に開示されている手順に従って製造することができる。

## 【0250】

商標タルセ(Tascerva)として市販されているエルロチニブ、N-(3-エチルフェニル)-6,7-ビス{[2-(メチルオキシ)エチル]オキシ}-4-キナゾリンアミンは、示されるような式IIIで表される。

## 【化7】

20



III

## 【0251】

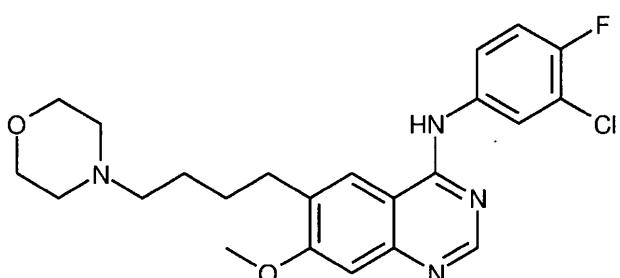
30

エルロチニブの遊離塩基およびHC1塩は、例えば米国特許第5,747,498号の実施例20に従って製造することができる。

## 【0252】

ゲフィチニブ、4-キナゾリンアミン、N-(3-クロロ-4-フルオロフェニル)-7-メトキシ-6-[3-4-モルホリン)プロポキシ]は、示されるような式IVで表される。

## 【化8】



IV

## 【0253】

商標イレッサ(IRESSA)(登録商標)(Astra-Zeneca)として市販されて

50

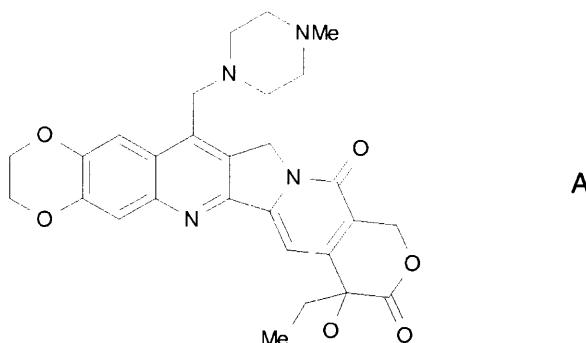
いるゲフィチニブは、白金に基づくおよびドセタキセルの両化学療法が上手くいかなかつた後に局所進行性または転移性非小細胞肺癌患者の治療に単剤療法として指示されるerbB - 1 阻害剤である。ゲフィチニブの遊離塩基、HCl 塩、および二HCl 塩は、1996年4月23日に出願され、1、1996年10月31日にWO96/33980として公開された国際特許出願PCT/GB96/0096の手順に従って製造することができる。

## 【0254】

また、現在開発中の下式A

## 【化9】

10



20

のカンプトテシン誘導体も、化学名7 - (4 - メチルピペラジノ - メチレン) - 10 , 11 - エチレンジオキシ - 20 (R , S) - カンプトテシン (ラセミ混合物) または7 - (4 - メチルピペラジノ - メチレン) - 10 , 11 - エチレンジオキシ - 20 (R) - カンプトテシン (R 鏡像異性体) または7 - (4 - メチルピペラジノ - メチレン) - 10 , 11 - エチレンジオキシ - 20 (S) - カンプトテシン (S 鏡像異性体) として知られる、ラセミ混合物 (R , S) 形態ならびにR およびS 鏡像異性体を含めて対象とされる。このような化合物ならびに関連化合物は、米国特許第6 , 063 , 923号；第5 , 342 , 947号；第5 , 559 , 235号；第5 , 491 , 237号および1997年11月24日出願の係属中米国特許出願第08 / 977 , 217号に製造方法も含めて記載されている。

30

## 【0255】

ホルモンおよびホルモン類似体は、ホルモンと癌の成長および/または成長欠如の間に関係があれば、癌を治療するための有用な化合物となる。癌治療で有用なホルモンおよびホルモン類似体としては、限定されるものではないが、小児の悪性リンパ腫および急性白血病の治療に有用なプレドニゾンおよびプレドニゾロンなどの副腎皮質ステロイド；副腎皮質癌およびエストロゲン受容体を含むホルモン非依存性乳癌の治療で有用な、アミノグルテミドおよびその他のアロマターゼ阻害剤、例えば、アナストロゾール、レトラゾール、ボラゾール、およびエキセメスタン；ホルモン非依存性乳癌および子宮内膜癌の治療で有用な酢酸メゲストロールなどのプロゲストリン；前立腺癌および良性前立腺肥大の治療で有用な、エストロゲン、アンドロゲン、および抗アンドロゲン作用薬、例えば、フルタミド、ニルタミド、ビカルタミド、酢酸シプロテロンおよび5 - レダクターゼ、例えば、フィナステリドおよびデュタステライド；ホルモン非依存性乳癌およびその他の感受性癌の治療で有用な、タモキシフェン、トレミフェン、ラロキシフェン、ドロロキシフェン、ヨードキシフェンなどの抗エストロゲン作用薬、ならびに米国特許第5 , 681 , 835号、第5 , 877 , 219号、および第6 , 207 , 716号に記載されているものなどの選択性エストロゲン受容体調節薬 (SERMS)；ならびに前立腺癌の治療のために黄体形成ホルモン (leutinizing hormone) (LH) および/または卵胞刺激ホルモン (FSH) の放出を刺激するゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH) およびその類似体、例えば、LHRHアゴニストおよびアンタゴニスト (antagonists)、例えば、酢酸ゴセ

40

50

レリンおよびルプロリドが含まれる。

【0256】

シグナル伝達経路阻害剤は、細胞内変化を誘発する化学プロセスを遮断または阻害する阻害剤である。本明細書で使用する場合、この変化は、細胞増殖または分化である。本発明において有用なシグナル伝達阻害剤としては、受容体型チロシンキナーゼ、非受容体型チロシンキナーゼ、SH2 / SH3ドメイン遮断薬、セリン / トレオニンキナーゼ、ホスファチジルイノシトール(phosphatidyl inositol) - 3キナーゼ、ミオイノシトールシグナル伝達、およびRas癌遺伝子の阻害剤が含まれる。

【0257】

いくつかのタンパク質チロシンキナーゼは、細胞増殖の調節に関する種々のタンパク質において特定のチロシル残基のリン酸化を触媒する。このようなタンパク質チロシンキナーゼは、受容体型または非受容体型キナーゼとして大きく分類することができる。 10

【0258】

受容体型チロシンキナーゼは、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン、およびチロシンキナーゼドメインを有する膜貫通タンパク質である。受容体型チロシンキナーゼは、細胞増殖の調節に関与し、一般に、成長因子受容体と呼ばれる。これらのキナーゼの多くの不適当なまたは制御を欠いた活性化、すなわち、例えば過剰発現または変異による異常なキナーゼ成長因子受容体活性が制御を欠いた細胞増殖をもたらすことが示されている。よって、このようなキナーゼの異常な活性は悪性組織の成長に関連付けられている。結果として、このようなキナーゼの阻害剤が癌治療法を提供し得る。成長因子受容体には、例えば、上皮細胞成長因子受容体(EGFr)、血小板由来成長因子受容体(PDGFr)、erbB2、erbB4、血管内皮成長因子受容体(VEGFr)、免疫グロブリン様および上皮細胞成長因子相同ドメインを有するチロシンキナーゼ(TIE-2)、インスリン成長因子-I(IGFI)受容体、マクロファージコロニー刺激因子(Cfms)、BTK、cKit、cmet、線維芽球成長因子(FGF)受容体、TrkB受容体(TrkA、TrkB、およびTrkC)、エフリン(eph)受容体、およびRET癌原遺伝子が含まれる。成長受容体のいくつかの阻害剤が開発中であり、リガンドアンタゴニスト、抗体、チロシンキナーゼ阻害剤およびアンチセンスオリゴヌクレオチドが含まれる。成長因子受容体および成長因子受容体の機能を阻害する薬剤は、例えば、Kath, John C., Exp. Opin. Ther. Patents (2000) 10(6):803-818; Shawver et al DDT Vol 2, No. 2 February 1997; およびLofts, F. J. et al, "Growth factor receptors as targets", New Molecular Targets for Cancer Chemotherapy, ed. Workman, Paul and Kerr, David, CRC press 1994, Londonに記載されている。 20

【0259】

成長因子受容体キナーゼでないチロシンキナーゼは、非受容体型チロシンキナーゼと呼ばれる。抗癌薬の標的または潜在的標的である、本発明において有用な非受容体型チロシンキナーゼとしては、cSrc、Lck、Fyn、Yes、Jak、cAb1、FAK(接着斑キナーゼ)、ブルトン型チロシンキナーゼ、およびBcr-Ablが含まれる。このような非受容体型キナーゼおよび非受容体型チロシンキナーゼ機能阻害する薬剤は、Sinh, S. and Corey, S.J., (1999) Journal of Hematology and Stem Cell Research 8 (5): 465-80; およびBolen, J.B., Brugge, J.S., (1997) Annual review of Immunology 15: 371-404に記載されている。 40

【0260】

SH2 / SH3ドメイン遮断薬は、PI3-K p85サブユニット、Srcファミリーキナーゼ、アダプター分子(Shc、Crk、Nck、Grb2)およびRas-GAPを含む、様々な酵素またはアダプタータンパク質において、SH2またはSH3ドメインの結合を妨げる薬剤である。抗癌薬の標的としてのSH2 / SH3ドメインは、Smithgall, T.E. (1995), Journal of Pharmacological and Toxicological Methods. 34(3) 125-32に記載されている。

【0261】

50

20

30

40

50

M A P キナーゼカスケード遮断薬を含むセリン / トレオニンキナーゼの阻害剤には、R a f キナーゼ ( r a f k ) 、分裂促進因子または細胞外調節キナーゼ ( M E K ) 、および細胞外調節キナーゼ ( E R K ) の遮断 ; および P K C (  $\alpha$  、  $\beta$  、  $\gamma$  、  $\mu$  、  $\delta$  、  $\epsilon$  ) の遮断薬を含むタンパク質キナーゼ C ファミリーメンバー遮断薬が含まれる。 I k B キナーゼファミリー ( I K K a 、 I K K b ) 、 P K B ファミリーキナーゼ、 A K T キナーゼファミリーメンバー、および T G F 受容体キナーゼ。このようなセリン / トレオニンキナーゼおよびそれらの阻害剤は、 Yamamoto, T. , Taya, S. , Kaibuchi, K. , (1999) , Journal of Biochemistry. 126 (5) 799-803; Brodt, P, Samani, A., and Navab, R. (2000) , Biochemical Pharmacology, 60. 1101-1107; Massague, J., Weis-Garcia, F. (1996) Cancer Surveys. 27:41-64; Philip, P.A., and Harris, A.L. (1995) , Cancer Treatment and Research. 78: 3-27, Lackey, K. et al Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, (10), 2000, 223-226; 米国特許第 6,268,391 号 ; および Martinez-Iacaci, L. , et al, Int. J. Cancer (2000) , 88(1) , 44-52 に記載されている。  
10

## 【 0 2 6 2 】

P I 3 - キナーゼ、 A T M 、 D N A - P K 、および K u の遮断薬を含むホスファチジルノシトール ( Phosphatidyl inositol ) - 3 キナーゼファミリーメンバーの阻害剤も本発明において有用である。このようなキナーゼは、 Abraham, R.T. (1996) , Current Opinion in Immunology. 8 (3) 412-8; Canman, C.E., Lim, D.S. (1998) , Oncogene 17 (25) 3301-3308; Jackson, S.P. (1997) , International Journal of Biochemistry and Cell Biology. 29 (7):935-8; および Zhong, H. et al, Cancer res, (2000) 60(6), 1541-1545 に記載されている。  
20

## 【 0 2 6 3 】

また、ホスホリバーゼ C 遮断薬およびミオイノシトール類似体などのミオイノシトールシグナル伝達阻害剤も本発明において有用である。このようなシグナル阻害剤は、 Powis, G. , and Kozikowski A. , (1994 New Molecular Targets for Cancer Chemotherapy ed., Paul Workman and David Kerr, CRC press 1994, London に記載されている。

## 【 0 2 6 4 】

シグナル伝達経路阻害剤のもう 1 つの群は、 R a s 癌遺伝子の阻害剤である。このような阻害剤には、 ファルネシリトランスフェラーゼ、 ゲラニル - ゲラニルトランスフェラーゼ、 および C A A X プロテアーゼの阻害剤ならびにアンチセンスオリゴヌクレオチド、 リボザイムおよび免疫療法が含まれる。このような阻害剤は、 野生型変異 r a s を含む細胞において r a s の活性化を遮断し、 それにより抗増殖薬として作用することが示されている。 R a s 癌遺伝子の阻害は、 Scharovsky, O.G. , Rozados, V.R. , Gervasoni, S.I. Matar, P. (2000) , Journal of Biomedical Science. 7(4) 292-8; Ashby, M.N. (1998) , Current Opinion in Lipidology. 9 (2) 99-102; and Bennett, C.F. and Cowser, L.M. Biochim. Biophys. Acta, (1999) 1489(1):19-30 に考察されている。  
30

## 【 0 2 6 5 】

前述のように、受容体キナーゼリガンド結合に対する抗体アンタゴニストはまた、シグナル伝達阻害剤としても役立ち得る。この群のシグナル伝達経路阻害剤は、受容体型チロシンキナーゼの細胞外リガンド結合ドメインに対するヒト化抗体の使用を包含する。例えば、 I m c l o n e C 2 2 5 E G F R 特異的抗体 ( Green, M.C. et al, Monoclonal Antibody Therapy for Solid Tumors, Cancer Treat. Rev., (2000) , 26(4) 269-286 参照 ) ; ハーセプチン ( 登録商標 ) e r b B 2 抗体 ( Tyrosine Kinase Signalling in Breast cancer: erbB Family Receptor Tyrosine Kinases, Breast cancer Res., 2000, 2(3), 176-183 参照 ) ; および 2 C B V E G F R 2 特異的抗体 ( Brekken, R.A. et al, Selective Inhibition of VEGFR2 Activity by a monoclonal Anti-VEGF antibody blocks tumor growth in mice, Cancer Res. (2000) 60, 5117-5124 参照 ) 。  
40

## 【 0 2 6 6 】

非受容体型キナーゼ血管新生阻害剤もまた、本発明において使用が見出せる。血管新生関連 V E G F R および T I E 2 の阻害剤は、シグナル伝達阻害剤に関して上述されている  
50

(両受容体とも受容体型チロシンキナーゼである)。erbB2およびEGFRの阻害剤は血管新生、主としてVEGF発現を阻害することが示されているので、血管新生は一般に、erbB2/EGFRシグナル伝達に関連する。よって、erbB2/EGFR阻害剤と血管新生阻害剤の組合せは意味を成す。従って、非受容体型チロシンキナーゼ阻害剤は、本発明のEGFR/erbB2阻害剤と併用可能である。例えば、VEGFR(受容体型チロシンキナーゼ)を認識しないがそのリガンドと結合する抗VEGF抗体；血管新生を阻害するインテグリン( $\alpha_v\beta_3$ )の小分子阻害剤；エンドスタチンおよびアンギオスタチン(非RTK)も、開示されているerbBファミリー阻害剤と組み合わせると有用であることが分かり得る(Bruns CJ et al (2000), Cancer Res., 60: 2926-2935; Schreiber AB, Winkler ME, and Derynck R. (1986), Science, 232: 1250-1253; Yen L et al. (2000), Oncogene 19: 3460-3469参照)。

#### 【0267】

また、免疫治療計画において使用される薬剤も、式(I)の化合物と組み合わせると有用であり得る。erbB2またはEGFRに対する免疫応答を生じさせるにはいくつかの免疫戦略がある。これらの戦略は一般に、腫瘍ワクチン接種の領域にある。免疫アプローチの有効性は、小分子阻害剤を用いたerbB2/EGFRシグナル伝達経路の複合阻害によって大幅に高められ得る。erbB2/EGFRに対する免疫/腫瘍ワクチニアプローチの考察は、Reilly RT et al. (2000), Cancer Res. 60: 3569-3576; and Chen Y, Hu D, Eling DJ, Robbins J, and Kipps TJ. (1998), Cancer Res. 58: 1965-1971に見出せる。

#### 【0268】

アポトーシス誘導計画に使用される薬剤(例えば、bcl-2アンチセンスオリゴヌクレオチド)もまた、本発明の組合せにおいて使用可能である。bcl-2ファミリータンパク質のメンバーはアポトーシスを遮断する。従って、bcl-2のアップレギュレーションは化学耐性に関連付けられている。研究によれば、上皮細胞成長因子(EGF)はbcl-2ファミリーの抗アポトーシスマンバー(すなわち、mc1-1)を刺激することが示されている。従って、腫瘍においてbcl-2の発現をダウンレギュレートするように設計された戦略は、実証された臨床利益を有し、現在、第II/I III相治験下にある(すなわち、GentaのG3139 bcl-2アンチセンスオリゴヌクレオチド)。bcl-2に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド戦略を使用するこのようなアポトーシス誘導戦略は、Water JS et al. (2000), J. Clin. Oncol. 18: 1812-1823; and Kitada S et al. (1994, Antisense Res. Dev. 4: 71-79)に考察されている。

#### 【0269】

トラスツズマブ(ハーセプチン(HERCEPTIN)(登録商標))は、HER2受容体と結合するヒト化モノクローナル抗体である。その元の適応はHER2陽性乳癌である。

#### 【0270】

トラスツズマブエメタシン(商標カドサイラ(Kadcyla))は、細胞傷害性薬剤メルタンシン(DM1)と連結されたモノクローナル抗体トラスツズマブ(ハーセプチン)からなる抗体-薬物コンジュゲートである。トラスツズマブは単独で、HER2/neu受容体と結合することにより癌細胞の増殖を停止させ、一方、メルタンシンは細胞に入ってチューブリンと結合することによりそれらを破壊する。このモノクローナル抗体はHER2を標的とし、HER2は癌細胞においてのみ過剰発現されるので、このコンジュゲートは毒素を腫瘍細胞に特異的に送達する。このコンジュゲートはT-DM1と略される。

#### 【0271】

セツキシマブ(エルビタックス(ERBITUX)(登録商標))は、上皮細胞成長因子受容体(EGFR)を阻害するキメラマウスヒト抗体である。

#### 【0272】

ペルツズマブ(2C4とも呼ばれる、商標オムニターグ(Omnitarg))は、モノクローナル抗体である。「HER2量体化阻害剤」と呼ばれる薬剤系列のそのクラスの筆頭。HER2と結合することにより、それはHER2と他のHER受容体との二量体化を阻害し

、腫瘍増殖の緩徐化をもたらすのではないかと推測されている。ペルツズマブは2001年1月4日公開のWO01/00245に記載されている。

#### 【0273】

リツキシマブは、キメラモノクローナル抗体であり、リツキサン（登録商標）およびマブセラ(MABTHERA)（登録商標）として市販されている。リツキシマブは、B細胞上のCD20と結合し、細胞アポトーシスを引き起こす。リツキシマブは静脈内に投与され、関節リウマチおよびB細胞非ホジキンリンパ腫の治療に承認されている。

#### 【0274】

オファツムマブは、完全ヒトモノクローナル抗体であり、アルゼラ（登録商標）として市販されている。オファツムマブは、B細胞上のCD20と結合し、フルダラビン（フルダラ）およびアレムツズマブ（キャンパス）処置に不応の成人において慢性リンパ球性白血病（CLL；白血球の癌の一種）を治療するために使用されている。10

#### 【0275】

細胞周期シグナル伝達阻害剤は、細胞周期の制御に関する分子を阻害する。サイクリン依存性キナーゼCDKと呼ばれるタンパク質キナーゼのファミリーおよびそれらの、サイクリンと呼ばれるタンパク質ファミリーとの相互作用は、真核細胞周期の進行を制御する。細胞周期の正常な進行には、種々のサイクリン/CDK複合体の活性化および不活性化の調和が必要である。いくつかの細胞周期シグナル伝達阻害剤が開発中である。例えば、CDK2、CDK4、およびCDK6を含むサイクリン依存性キナーゼならびにそれらの阻害剤の例が、例えば、Rosania et al, Exp. Opin. Ther. Patents (2000) 10(2):215-230に記載されている。20

#### 【0276】

本明細書で使用する場合、「免疫調節薬」は、モノクローナル抗体を含め、免疫系に作用するいずれの物質も意味する。本発明のICOS結合タンパク質は、免疫調節薬と見なすことができる。免疫調節薬は癌の治療のために抗新生物薬として使用できる。例えば、免疫調節薬としては、限定されるものではないが、イピリムマブ（ヤーボイ）などの抗CTLA-4抗体、ならびに抗PD-1抗体（オプジー・ボノボルマブおよびキートルーダ/ペンプロリズマブ）が含まれる。タンパク質の免疫調節薬としては、限定されるものではないが、OX-40抗体、PD-L1抗体、LAG3抗体、TIM-3抗体、41BB抗体およびGITR抗体が含まれる。30

#### 【0277】

ヤーボイ（イピリムマブ）は、Bristol Myers Squibbにより市販されている完全ヒトCTLA-4抗体である。イピリムマブのタンパク質構造および使用方法は、米国特許第6,984,720号および第7,605,238号に記載されている。

#### 【0278】

オプジー・ボノボルマブは、Bristol Myers Squibbにより市販されている、免疫増強活性を有する、負の免疫調節ヒト細胞表面受容体PD-1（プログラム細胞死-1またはプログラム細胞死-1/PCD-1）に対する完全ヒトモノクローナル抗体である。ニボルマブは、Igスーパーファミリー膜貫通タンパク質であるPD-1と結合し、そのリガンドPD-L1およびPD-L2によるPD-1の活性化を遮断して、T細胞の活性化および腫瘍細胞または病原体に対する細胞媒介性免疫応答をもたらす。活性化PD-1は、T細胞の活性化、およびPI3k/Akt経路の活性化の抑制を介したエフェクター機能に負の調節を行う。ニボルマブの他の名称としては、BMS-936558、MDX-1106、およびONO-4538が含まれる。ニボルマブのアミノ酸配列ならびに使用および製造方法は、米国特許第8,008,449号に開示されている。

#### 【0279】

キートルーダ/ペンプロリズマブは、肺癌の治療向けにMerckにより市販されている抗PD-1抗体である。ペンプロリズマブのアミノ酸配列および使用方法は、米国特許50

第8, 168, 757号に開示されている。

【0280】

OX40としても知られるCD134は、CD28とは異なり、休止中のナイーブT細胞上には構成的に発現されない受容体のNFRスーパーファミリーのメンバーである。OX40は、活性化の24~72時間後に発現される二次的補助刺激分子であり；そのリガンドOX40Lもまた休止中の抗原提示細胞では発現されないが、それらの活性化後には発現される。OX40の発現は、T細胞の完全な活性化に依存し、CD28が無ければ、OX40の発現は遅れ、4分の1のレベルとなる。OX-40抗体、OX-40融合タンパク質およびそれらの使用方法は、米国特許第7,504,101号；同第7,758,852号；同第7,858,765号；同第7,550,140号；同第7,960,515号；WO2012027328；WO2013028231に開示されている。  
10

【0281】

PD-L1(CD274またはB7-H1とも呼ばれる)に対する抗体および使用方法は、米国特許第7,943,743号；同第8,383,796号；US20130034559、WO2014055897、米国特許第8,168,179号；および同第7,595,048号に開示されている。PD-L1抗体は、癌治療のための免疫調節薬として開発中である。

【0282】

本明細書で使用する場合、「免疫刺激薬」は、免疫系を刺激することができるいずれの薬剤も意味する。本明細書で使用する場合、免疫刺激薬には、限定されるものではないが、ワクチンアジュバントが含まれる。  
20

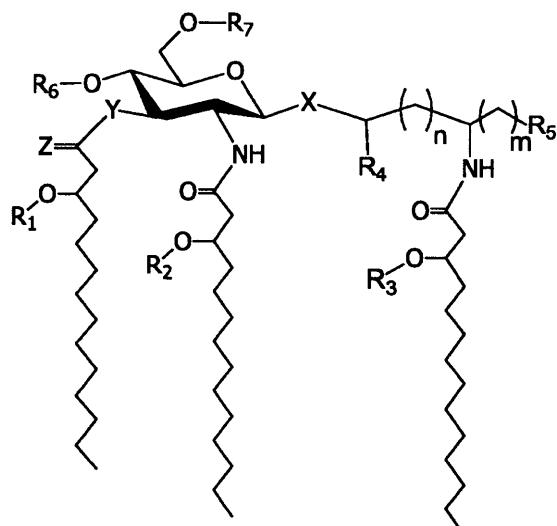
【0283】

アミノアルキルグルコサミニドホスフェート(AGP)は、免疫動物におけるサイトカイン産生の刺激、マクロファージの活性化、自然免疫応答の促進、および抗体産生の増強のためのワクチンアジュバントおよび免疫刺激薬として有用であることが知られている。アミノアルキルグルコサミニドホスフェート(AGP)は、Toll様受容体4(TLR4)の合成リガンドである。AGPおよびTLR4を介したそれらの免疫調節効果は、WO2006/016997、WO2001/090129、および/または米国特許第6,113,918号などの特許公報に開示され、文献で報告されている。さらなるAGP誘導体も、米国特許第7,129,219号、同第6,525,028号および同第6,911,434号に開示されている。特定のAGPはTLR4のアゴニストとして働き、他のものはTLR4アンタゴニストとして認識される。  
30

【0284】

本発明において使用されるアミノアルキルグルコサミニドホスフェート化合物は下記の通り式1に示される構造を有する。

## 【化10】



式1

10

〔式中、

mは、0～6であり；

nは、0～4であり；

Xは、OまたはS、好ましくは、Oであり；

Yは、OまたはNHであり；

Zは、OまたはHであり；

各R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>は、C<sub>1</sub>～C<sub>20</sub>アシルおよびC<sub>1</sub>～C<sub>20</sub>アルキルからなる群から独立に選択され；R<sub>4</sub>は、HまたはMeであり；R<sub>5</sub>は、-H、-OH、-(C<sub>1</sub>～C<sub>4</sub>)アルコキシ、-PO<sub>3</sub>R<sub>8</sub>R<sub>9</sub>、-OP(O)<sub>3</sub>R<sub>8</sub>R<sub>9</sub>、-SO<sub>3</sub>R<sub>8</sub>、-OSO<sub>3</sub>R<sub>8</sub>、-NR<sub>8</sub>R<sub>9</sub>、-SR<sub>8</sub>、-CN、-NO<sub>2</sub>、-CHO、-CO<sub>2</sub>R<sub>8</sub>、およびCONR<sub>8</sub>R<sub>9</sub>からなる群から独立に選択され、ここで、各R<sub>8</sub>およびR<sub>9</sub>は、Hおよび(C<sub>1</sub>～C<sub>4</sub>)アルキルから独立に選択され；かつ各R<sub>6</sub>およびR<sub>7</sub>は独立に、HまたはPO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>である。〕

## 【0285】

式1では、第1級脂肪アシル残基（すなわち、第2級アシルオキシまたはアルコキシ残基、例えば、R<sub>1</sub>O、R<sub>2</sub>O、およびR<sub>3</sub>O）が結合されている3'立体中心の配置は、RまたはS、好ましくは、Rである（カーン・インゴルド・プレローグ順位則(Cahn-Ingold-Prelog priority rules)によって設計される通り）。R<sub>4</sub>およびR<sub>5</sub>が結合されているアグリコン立体中心の配置は、RまたはSであり得る。総ての立体異性体、鏡像異性体およびジアステレオマーの両方、ならびにそれらの混合物は、本発明の範囲内に入ると見なされる。

30

## 【0286】

ヘテロ原子Xとアグリコン窒素原子の間の炭素原子の数は、変数「n」により決定され、これは0～4の整数、好ましくは0～2の整数であり得る。

## 【0287】

第1級脂肪酸R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、およびR<sub>3</sub>の鎖長は、炭素約6～約16個、好ましくは炭素約9～約14個であり得る。鎖長は同じであっても異なってもよい。いくつかの好ましい実施態様には、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>およびR<sub>3</sub>が6または10または12または14である鎖長が含まれる。

40

## 【0288】

式1は、L/D-セリル、-トレオニル、-システィニルエーテルおよびエステル脂質

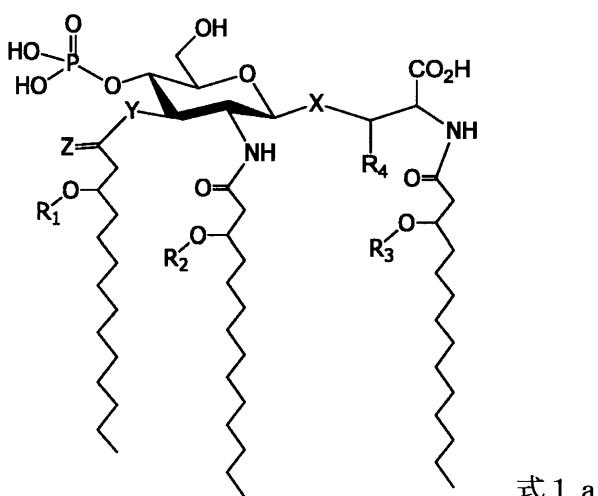
50

AGP、アゴニストとアンタゴニストの両方およびそれらのホモログ ( $n = 1 \sim 4$ )、ならびに種々のカルボン酸生物学的等価体（すなわち、 $R_5$  は塩形成が可能な酸性基であり；リン酸基は、グルコサミン単位の 4 位または 6 位のいずれにあってもよいが、好ましくは 4 位にある）を包含する。

#### 【0289】

式 1 の AGP 化合物を使用する本発明の好ましい実施態様では、 $n$  は 0 であり、 $R_5$  は  $\text{CO}_2\text{H}$  であり、 $R_6$  は  $\text{PO}_3\text{H}_2$  であり、かつ、 $R_7$  は H である。この好ましい AGP 化合物は、下記のような式 1 a における構造として示される。

#### 【化 1 1】



10

20

[式中、X は O または S であり；Y は O または NH であり；Z は O または H であり；各  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  は、 $C_{1 \sim 20}$  アシルおよび  $C_{1 \sim 20}$  アルキルからなる群から独立に選択され；かつ、 $R_4$  は H またはメチルである。]

#### 【0290】

式 1 a では、第 1 級脂肪アシル残基（すなわち、第 2 級アシルオキシまたはアルコキシ残基、例えば、 $R_1\text{O}$ 、 $R_2\text{O}$ 、および  $R_3\text{O}$ ）が結合されている 3' 立体中心の配置は R または S、好ましくは R である（カーン・インゴルド・ブレローグ順位則 (Cahn-Ingold-Prelog priority rules) によって設計される通り）。 $R_4$  および  $\text{CO}_2\text{H}$  が結合されているアグリコン立体中心の配置は、R または S であり得る。総ての立体異性体、鏡像異性体およびジアステレオマーの両方、ならびにそれらの混合物は、本発明の範囲内に入ると見なされる。

30

#### 【0291】

式 1 a は、L/D-セリル、-トレオニル、-システィニルエーテルまたはエステル脂質 AGP、アゴニストおよびアンタゴニストの両方を包含する。

#### 【0292】

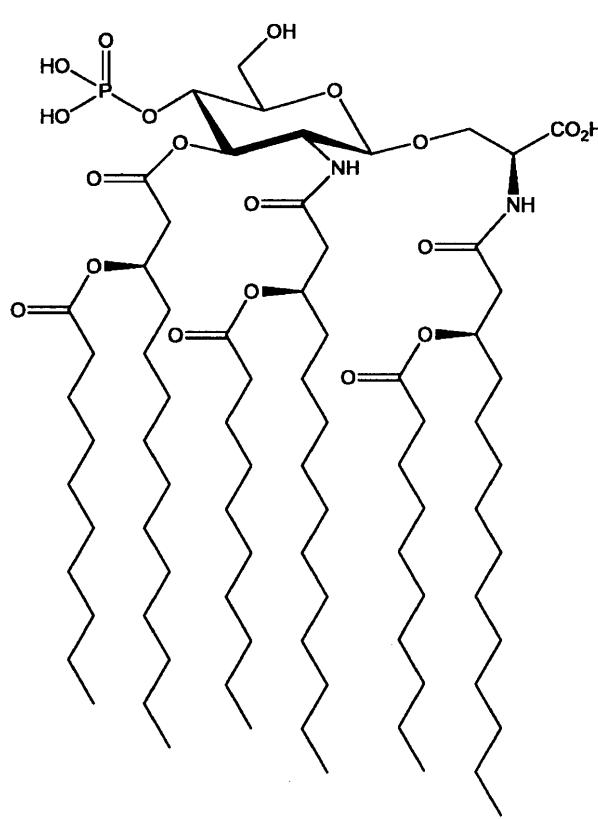
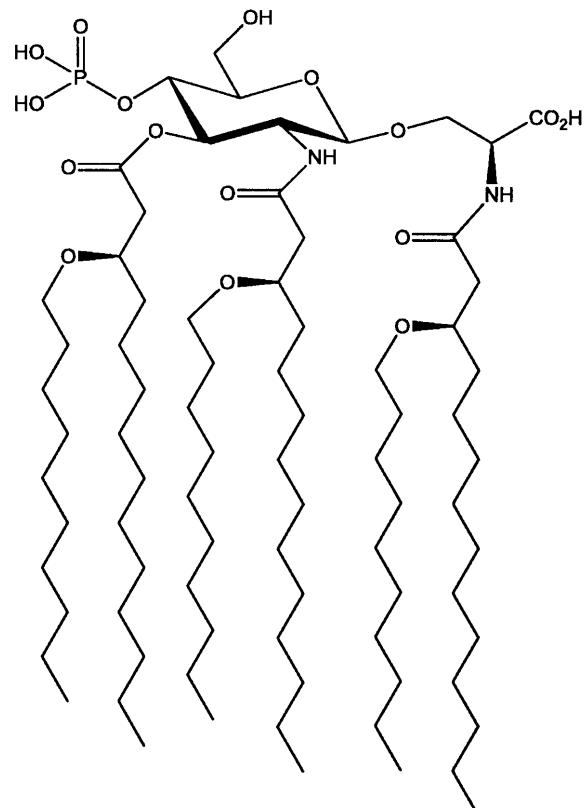
式 1 および式 1 a の両方において、Z は、二重結合、またはそれぞれ一重結合により結合された 2 個の水素原子によって結合された O である。すなわち、その化合物は、 $Z = Y = O$  の場合にはエステル結合され、 $Z = O$  および  $Y = NH$  の場合にはアミド結合され、 $Z = H / H$  および  $Y = O$  の場合にはエーテル結合される。

40

#### 【0293】

式 1 の特に好ましい化合物は、CRX-601 および CRX-527 と呼ばれる。これらの構造は下記のように示される。

【化12】



【0294】

加えて、別の好ましい実施態様では、示されている構造を有するCRX-547を用いる。

10

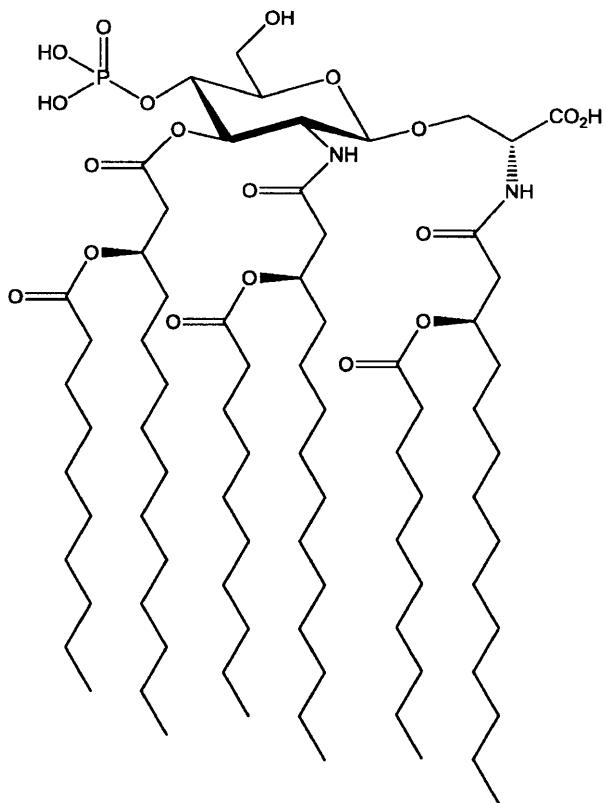
20

30

40

50

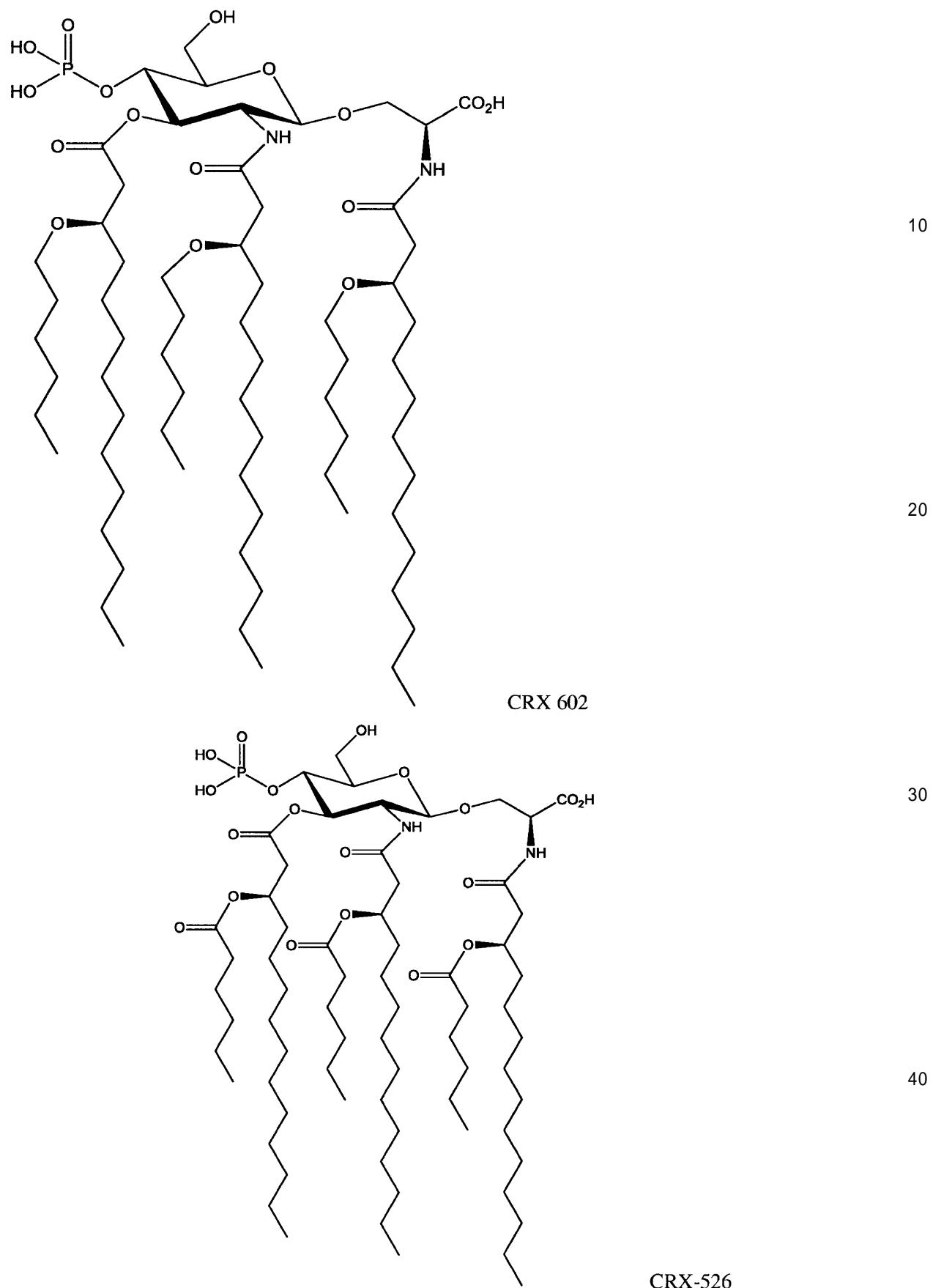
【0295】  
C R X 5 4 7  
【化13】



【0296】

さらに他の実施態様には、より短い第2級アシルまたはアルキル鎖を有するA G Pに対して安定性の増強を与える、C R X 6 0 2またはC R X 5 2 6などのA G Pが含まれる。

【化14】



【0297】

1つの実施態様では、必要とする哺乳動物において癌を処置するための方法であって、

50

そのような哺乳動物に治療上有効な量の  
本発明の I C O S 結合タンパク質、および  
b ) 少なくとも 1 種類の抗新生物薬  
を投与することを含んでなる方法が提供される。

## 【 0 2 9 8 】

1 つの実施態様では、必要とする哺乳動物において癌を処置するための方法であって、  
そのような哺乳動物に治療上有効な量の  
本発明の I C O S 結合タンパク質、および  
b ) 少なくとも 1 種類の第 2 の免疫調節薬  
を投与することを含んでなる方法が提供される。 10

## 【 0 2 9 9 】

1 つの実施態様では、前記第 2 の免疫調節薬は、抗 C T L A 4 抗体、抗 P D - 1 抗体、  
抗 P D - L 1 抗体、抗 O X 4 0 抗体、抗 G I T R 抗体、および抗 4 1 B B 抗体、抗 L A G  
3 抗体および抗 T I M 3 抗体の群から選択される。

## 【 0 3 0 0 】

1 つの実施態様では、必要とする哺乳動物において癌を処置するための方法であって、  
そのような哺乳動物に治療上有効な量の  
本発明の I C O S 結合タンパク質、および  
b ) 少なくとも 1 種類の免疫刺激薬  
を投与することを含んでなる方法が提供される。 20

## 【 0 3 0 1 】

1 つの実施態様では、前記免疫刺激薬は T L R 4 アゴニストである。1 つの実施態様では、前記免疫刺激薬は A G P である。1 つの態様では、前記免疫刺激薬は式 I の化合物である。1 つの態様では、それは式 1 a の化合物である。1 つの態様では、前記免疫刺激薬は、 C R X - 6 0 1 、 C R X - 5 4 7 、 C R X - 6 0 2 、 C R X - 5 2 7 、および C R X  
- 5 2 6 からなる群から選択される。

## 【 実施例 】

## 【 0 3 0 2 】

以下の実施例は、本発明の種々の限定されない態様を説明する。

## 【 0 3 0 3 】

実施例 1 : 癌における I C O S 発現

一般に、 固形腫瘍は、 I C O S が抗腫瘍免疫応答を媒介するという理論と一致して、低  
レベルの浸潤性 I C O S <sup>+</sup> T 細胞を有すると思われる。種々の腫瘍組織学間の I C O S 発  
現分析は、 The Cancer Genome Atlas ( T C G A ) およびその他の  
データベースからの公開 m R N A 発現データセットを用いて作出了た。表 3 は、いくら  
かの検出可能なレベルの I C O S m R N A 発現を示した各組織学からの腫瘍の総体的  
パーセンテージを示す。この分析は、他の癌免疫療法アプローチに感受性があることが知  
られる腫瘍組織学（黒色腫、 R C C 、 N S C L C ）を、 検出可能な I C O S <sup>+</sup> 腫瘍浸潤リン  
パ球（ T I L ）を有する腫瘍のパーセンテージが比較的高い（ > 1 0 % ）と識別し、一方  
、免疫原性が低いことが知られる腫瘍（前立腺、卵巣、および脾臓腫瘍）を、 I C O S <sup>+</sup> 40

T I L を有する腫瘍のパーセンテージが比較的低い（ < 1 0 % ）と識別する（表 3 ）。  
興味深いことに、ウイルス感染および / または慢性炎症（ H & N 、胃、食道、および子宮  
頸部）に関連することが知られる腫瘍種は、最高パーセンテージの I C O S <sup>+</sup> T I L を  
示す腫瘍種の中にあった。これらの m R N A 発現分析から明らかでないものは、各個の腫  
瘍種において I C O S を発現する T I L の部分集団である。 I C O S は主として腫瘍浸潤  
T <sub>r e g</sub> 上で発現される場合もあり、 I C O S <sup>+</sup> T エフェクター細胞浸潤のレベルを示す  
場合もある。

## 【 0 3 0 4 】

## 【表3】

表3 種々の腫瘍種の ICOS mRNA 発現

腫瘍種	総 N	ICOS+(N)	ICOS+(Per.)
<b>H&amp;N</b>	<b>426</b>	<b>157</b>	<b>36.9%</b>
胃	285	75	26.3%
食道	70	17	24.3%
黒色腫(M)	295	69	23.4%
NSCLC(AD)	501	112	22.4%
NSCLC(SCC)	489	85	17.4%
子宮頸	185	32	17.3%
乳房	1048	162	15.5%
膀胱	244	35	14.3%
RCC	522	64	12.3%
黒色腫(P)	82	7	8.5%
膵臓	85	7	8.2%
結腸	446	34	7.6%
甲状腺	498	34	6.8%
HCC	191	11	5.8%
肉腫	103	4	3.9%
卵巣	412	13	3.2%
前立腺	336	10	3.0%
子宮内膜	532	15	2.8%
直腸	163	4	2.5%
GBM	156	0	0.0%

10

20

30

40

## 【0305】

種々の腫瘍種においてTILのどのサブセットがICOS発現に関連するかをより良く理解するために、原発性ヒト非小細胞肺癌(NSCLC)、トリプルネガティブ乳癌(TNBC)、結腸直腸癌(CRC)、前立腺癌、膵臓癌、卵巣癌、腎細胞癌(RCC)および黒色腫における免疫組織化学(IHC)によるICOS発現の分析を行った(表4)。mRNA発現分析において見られたものと同様に、ICOS<sup>+</sup>TILの存在量は、それ以外のCD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>および/またはFoxP3<sup>+</sup>TILは多数存在していた各腫瘍であっても比較的低かった。この場合にも、黒色腫、腎細胞癌(RCC)および非小細胞肺癌(NSCLC)組織学は、いくらかのレベルの検出可能なICOS<sup>+</sup>浸潤物を伴った最高パーセンテージの腫瘍を有した(表4、第2列)。結果として、前立腺、卵巣および膵臓腫瘍はほぼ無ICOS<sup>+</sup>TILを示した(表4)。これらの分析は、固形腫瘍が低い基礎レベルのICOS<sup>+</sup>TILを有し、この細胞集団の拡大および機能誘導から利益が得られることを明らかに示す。原発性ヒト腫瘍を分析するためのフローサイトメトリーおよび二色免疫組織化学を用いた今後の研究は、どの特定のT細胞サブセットがICOSを発現するかを決定する助けとなるであろう。

## 【0306】

【表4】

表4

実体	サンプル番号	ICOS	陽性細胞の平均数(範囲)				
			ICOS	CD3	CD4	CD8	FOXp3
NSCLC (扁平上皮癌)	n = 17	-	0	11 (0-74)	2 (0-9)	20 (0-147)	10 (0-28)
	n = 23	+	3 (0-25)	38 (2-143)	8 (0-26)	39 (5-188)	18 (0-75)
NSCLC (腺癌)	n = 15	-	0	36 (0-157)	4 (0-20)	71 (5-238)	10 (1-41)
	n = 25	+	2 (0-7)	56 (0-181)	8 (0-39)	69 (10-201)	19 (0-55)
TNBC	n = 24	-	0	14 (0-91)	9 (0-132)	17 (0-95)	6 (0-25)
	n = 11	+	5 (0-20)	85 (3-259)	13 (0-45)	113 (2-393)	30 (2-81)
CRC	n = 22	-	0	12 (0-47)	14 (0-44)	20 (0-83)	14 (2-52)
	n = 23	+	2 (0-13)	31 (5-101)	22 (5-48)	53 (4-151)	24 (5-43)
前立腺癌	n = 29	-	0	10 (0-78)	17 (1-96)	23 (1-176)	5 (0-25)
	n = 1	+	1	30	48	55	11
脾臓癌	n = 11	-	0	15 (1-32)	17 (3-71)	20 (3-81)	6 (0-21)
	n = 4	+	0 (0-1)	31 (7-85)	17 (6-31)	17 (2-51)	4 (0-9)
卵巣癌	n = 15	-	0	13 (0-105)	14 (1-78)	13 (0-83)	2 (0-12)
	n = 5	+	1 (0-3)	19 (6-35)	13 (6-19)	32 (10-76)	7 (4-13)
RCC	n = 3	-	0	50 (14-104)	58 (38-85)	56 (24-119)	4 (0-9)
	n = 7	+	5 (1-16)	45 (10-130)	85 (26-164)	71 (12-232)	15 (3-28)
黒色腫	n = 7	-	0	42 (1-155)	12 (1-31)	35 (0-156)	5 (0-10)
	n = 12	+	7 (0-21)	84 (13-222)	32 (13-70)	89 (28-179)	19 (6-40)

## 【0307】

実施例2：ICOS抗体アゴニストのスクリーニング原発性ヒトPBM Cの単離

新鮮な血液を血液ドナーから取得し、フェノールレッド不含10% RPMI 1640培地で1:1希釈した。希釈血液をUni-Sep Max 50mlコニカルチューブ内の密度媒体の上に重層し、室温にて20分間400×gでブレーキをオフにして遠心分離した。得られた白色単核層（バフィーコート）を、100μMセルストレーナーを通して新しい50mLコニカルチューブ中へ注意深く抽出した。等容量のフェノールレッド不含10% RPMI 1640培地をバフィーコートに加え、室温にて10分間、300×gで遠心分離した。細胞ペレットを10mlの赤血球溶解溶液（Sigma Aldrich）に再懸濁させ、室温で5分間インキュベートした。細胞を培地で1回洗浄し、従前に記載したように遠心分離した。容量をフェノールレッド不含10% RPMI 1640培地で40mlとし、Vicel1セルカウンターおよびバイアビリティアナライザー（Becton Coulter）を用いて細胞を計数した。

## 【0308】

原発性ヒトCD4+CD25+Tエフェクター細胞の単離

ヒトCD4+CD25細胞は、ヒトCD4+CD25+制御性T細胞単離キット（Miltenyi Biotech）を用いる2工程の磁性ビーズに基づく単離手順によってPBM Cからさらに精製した。まず、PBM C細胞を4℃で5分間ビオチン抗体カクテルとともにインキュベートし、次に、抗ビオチンマイクロビーズとともに10分間インキュベ

10

20

30

40

50

ートした。この工程は非CD4+T細胞を標識するためのものであった。その後、細胞を Midimacsセパレーターの磁場内でLDカラムに通した。流出液、すなわち、予め濃縮した非標識CD4+細胞画分を回収し、4で15分間CD25マイクロビーズとともにインキュベートした。標識細胞を Minimacsセパレーターの磁場内でMSカラムに通した。非標識CD4-CD25-Tエフェクター細胞を含有するフロースルーを下流活性化アッセイのために回収した。

### 【0309】

#### 血液からの原発性ヒトCD4+T細胞の直接単離

ヒトCD4+T細胞は、新鮮なヒト血液からヒトCD4+T細胞エンリッチメントカクテル(Stem Cell Technologies)を用いて直接単離した。RosetteSepヒトCD4+T細胞エンリッチメントカクテル(50 μL/mL)を全血に加え、十分に混合した。室温で20分のインキュベーション後、等容量のPBS+2%FBSを穏やかに混合しながら加えた。この希釈サンプルを密度媒体の上に重層し、室温にて20分間1200×g fでブレークをオフにして遠心分離した。密度媒体：血漿界面からの濃縮細胞を新しいコニカルチューブに注意深く注いだ。次に、赤血球を赤血球溶解バッファー(Sigma Aldrich)で溶解させ、濃縮細胞をPBS+2%FBSで2回洗浄した。CD4+T細胞を40mLのPBS+2%FBSに再懸濁させ、Vi-Cellセルカウンターで計数した。

### 【0310】

#### 試験プロトコール

#### ヒトCD4+CD25-Tエフェクター細胞 in vitro活性化アッセイ - 結合アッセイ

組織培養処理が施されていない96ウェル平底プレートを、1 μg/mLの抗ヒトCD3抗体(eBioscience)および種々の供試抗体を含有する、100 μl/ウェルのコーティングバッファー(Biolegend)で一晩コーティングした。翌日、これらのプレコーティングプレートを、10%FBS含有RPMI-1640培地で3回洗浄した。ヒトCD4+CD25-Tエフェクター細胞を単離し、記載のようにCFSEで標識し、これらのプレートに播種した。37で2.5日インキュベートした後、細胞を採取し、増殖および活性化マーカーの発現に関してフローサイトメトリーで分析した。また、細胞培養上清も、メソ・スケール・ディスカバリー(MSD)によるマルチプレックスサイトカイン測定のために回収した。

### 【0311】

#### CFSE増殖アッセイ

15mLのコニカルチューブにて、標識する細胞を1mLの予温PBSに終濃度1E7細胞/mLで再懸濁させた。1 μlの2mM CFSE保存溶液(Life Technologies)を直接細胞に加えた後、均一な標識を確保するためにすぐに旋回させた。室温で5分間インキュベートした後、14mLの氷冷細胞培養培地を加えることにより染色をクエンチした。標識された細胞を氷冷培地で3回洗浄した。細胞を計数し、100 IU/mLのIL-2(PeproTech)を添加したRPMI1640+10%FBSで1E6細胞/mLに調整し、抗CD3および供試抗体コーティングプレートに播種した。T細胞の活性化の後、細胞を採取し、PBS+0.5%BSAで1回洗浄し、その後、フローサイトメトリー分析のために多色染色工程を施した。

### 【0312】

#### 多色フローサイトメトリー

活性化T細胞を採取し、PBSで洗浄した。細胞をまず、販売者のプロトコールに従つてLIVE/DEAD Fixable Far Red細胞生体色素(Life Technologies)で染色した。色素を洗い流した後、異なる色を結合した検出抗体を4で30分間細胞とともにインキュベートした。染色細胞を氷冷FACS染色バッファー(PBS+0.5%BSA)で1回洗浄した後、FACS CantoまたはFACSCanto IIフローサイトメーターに流した。サイトメーターの性能はCytoto

10

20

30

40

50

meter Setup & Trackingビーズ(BD Biosciences)を用いて毎日確認し、PMT電圧およびエリアスケーリングは非染色細胞に基づいて設定した。補正は、各蛍光色素を結合した検出抗体で個々に染色したOne CompまたはUltraCompビーズ(eBioscience)を用いて行った。

#### 【0313】

##### MSDサイトカイン分析

組織培養上清のIFN- $\gamma$ 、IL-10、IL-2およびTNF- $\alpha$ サイトカインレベルは、MSDヒトV-Plex特注キットを用いて決定した。まず、サンプルを希釈剤2で1:200希釈した。キットマニュアルに従い、キャリブレーターもまた希釈剤2で調製した。希釈サンプルおよびキャリブレーターを黒色MSDプレートに加えた後、粘着性プレートシールで封止し、振盪しながら室温で2時間インキュベートした。希釈剤2で新たに調製した25  $\mu$ Lの検出抗体溶液を各ウェルに加えた後、プレートを再封止し、振盪しながら室温でさらに2時間インキュベートした。これらのプレートを150  $\mu$ L/ウェルのPBS+0.05%Tween-20で3回洗浄した後、新たに希釈した150  $\mu$ l/ウェルの2倍リードバッファーを加え、すぐにMESO Quick Plexリーダーで読み取った。データはMSD Workbenchソフトウェアを用いて分析した。

#### 【0314】

##### ヒトCD4+T細胞in vitro活性化アッセイ-結合型および可溶型

新たに単離したヒトCD4+T細胞を、抗CD3(1  $\mu$ g/ml)および抗CD28(3  $\mu$ g/ml)でコーティングした24ウェルプレートにて48時間、前刺激した。細胞を採取し、洗浄し、100IU/mlのIL-2(PeproTech)を添加したAIM-V培地中、抗CD3 Dynaビーズ(Life Technologies)と1:1比で混合した。次に、細胞/ビーズ混合物を非コーティングの(可溶形式の場合)またはH2L5 h IgG4PEでコーティングした(結合形式の場合)96ウェル平底プレートに100k/ウェルで播種した。可溶形式の場合には、H2L5 h IgG4PEを細胞の播種時にウェルに加えた。37度3.5日インキュベートした後、MSDによるマルチプレックスサイトカイン測定のために細胞培養上清を回収した。

#### 【0315】

##### 可溶型ヒトPBMC in vitro活性化アッセイ

新たに単離したヒトPBMCを、抗CD3(1  $\mu$ g/ml)および抗CD28(5  $\mu$ g/ml)でコーティングした24ウェルプレートにて48時間、前刺激した。CFSE染色細胞を調製し、100IU/mlのIL-2(PeproTech)を添加したAIM-V培地中、抗CD3 Dynaビーズ(Life Technologies)を1:1比で混合した。次に、細胞/ビーズ混合物を、1  $\mu$ g/mlの抗CD3抗体でプレコーティングした96ウェルプレートに200k/ウェルで播種した。H2L5 h IgG4PEおよび対照抗体をそれらの可溶型でこれらのウェルに直接加えた。37度3.5日インキュベートした後、MSDによるマルチプレックスサイトカイン測定のために細胞培養上清を回収し、フローサイトメトリーによる増殖およびマーカー発現分析のために細胞を採取した。

#### 【0316】

##### データ分析

##### フローサイトメトリーデータ分析

フローデータは、Flowjoソフトウェア(Flowjo LLC)により分析した。まず、LIVE/DEAD細胞生体色素染色に基づき死細胞にゲートをかけた。ダブルットにはFSC-H:FSC-W散布図でゲートをかけた。得られた生存単細胞をCD4+またはCD8+T細胞などの異なるT細胞部分集団内の活性化マーカー発現に関して分析し、親集団のパーセンテージまたは中央蛍光強度(MFI)として報告した。

#### 【0317】

##### CFSE増殖分析

CFSEデータもまたFlowjoにより分析した。死細胞およびダブルットを除外し

10

20

30

40

50

た後、非活性化 T 細胞に基づいて「増殖細胞」ゲートをかけた。いずれの所与のサンプルでもこのゲートに入る細胞を増殖細胞として計数した。データは、増殖のパーセンテージとして報告した。

### 【 0 3 1 8 】

#### F A C S による細胞枯渇分析

細胞枯渇は、F l o w J o により分析した。まず、L I V E / D E A D 細胞生体色素染色に基づいて生細胞ゲートを決定した。次に、ダブレットを従前に記載したようにゲートで除外した。細胞枯渇の指標として生 C D 4 + または C D 8 + T 細胞部分集団のパーセンテージを計算した。

### 【 0 3 1 9 】

10

#### 抗体用量応答曲線フィッティング分析

用量応答データをグラフパッド・プリズムソフトウェアにインポートし、対数スケールに変換した。データの曲線フィッティングおよび E C 5 0 値の生成のために、アゴニスト用量応答を様々な傾きモデルとともに使用した。フィッティング式を以下に挙げる。

$$Y = \text{最小} + (\text{最大} - \text{最小}) / (1 + 10^{( (\log E C 5 0) - X ) \text{ ヒルの傾き}})$$

### 【 0 3 2 0 】

#### 結果

#### 主要マウス抗ヒト I C O S 抗体の同定

14 のマウス m A b をヒトおよびカニクイザル I C O S 結合およびアゴニスト活性に関してスクリーニングした。12 は再クローニング、配列決定、增幅、および機能研究に十分な量での精製が可能であった。B I A c o r e を用い、総てを結合特性に関して試験した。2 つは、極めて弱い結合剤 / 非結合剤であることが判明した。10 の精製 m A b を機能的「促進作用」分析によって試験した。複数の健康なヒトドナーで間の、T 細胞の増殖および I F N - サイトカインの産生を誘導するそれらの能力に基づき、4 つの最良のアゴニスト m A b (以下の表で 5422.2、279.1、314.8 および 88.2 と呼称) が、ヒト I g G 1 キメラとして選択および作製された。314.8、88.2、92.17、145.1、および 53.3 の C D R 配列は、P C T / E P 2 0 1 2 / 0 5 5 7 3 5 (W O 2 0 1 2 / 1 3 1 0 0 4) に他の I C O S m A b とともに示されている。

20

### 【 0 3 2 1 】

クローン 88.2 の重鎖可変領域は配列番号 13 として下記に示される。

30

### 【 化 1 5 】

```
QVQLQQPGAEELVRPGASVKLSCKASGYSFTSYWINWVKQRPGQGLEWIGNIYPDSYTNYNQMFKDATALTVDKS
SNTAYMQLTSPTSEDAVYYCTRWNLSYYFDNNYYLDYWQGQGTTLTVSS (配列番号 13)
```

### 【 0 3 2 2 】

クローン 88.2 の軽鎖可変領域は配列番号 14 として下記に示される。

### 【 化 1 6 】

```
QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEKPDLHFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAAL
TITGAQTEDEAIYFCALWYNNHLVFGGGTKLTVL (配列番号 14)
```

40

### 【 0 3 2 3 】

## 【表5】

表5: ICOS mAb 結合および競合

ICOS mAb クローニング番号	Biacore ヒト(nM)	Biacore カニクイザル(nM)	CD28/ CTLA4 x-反応性	ICOS-L 結合阻害	314.8 に対する競合	121.4 に対する競合
53.3	30.4	19.7	-	++	+	+
88.2	31	23	-	+	+	+
92.17	27.5	18.8	-	++	+	+
145.1	49.5	43.5	-	++	+	+
314.8	17	9.3	-	+++	+	+
121.4	15	58	-	-	-/+	-/+
202.24	46	19	-	+	+	+
279.1	39	33	-	+	+	+
293.1	7.6	10	-	++	+	+
422.2	5.7	4.46	-	++	++	+

## 【0324】

8つの最良のICOS結合剤を、マウスIgG1およびEPR7114対照に対して設計された用量漸増におけるアッセイに基づき、細胞を用い、IFN- $\gamma$ 産生およびT細胞増殖について試験した。これらのアッセイに基づき、422.2と呼称されるクローニングヒト化のために選択された。図1および2を参照。

## 【0325】

実施例3 抗体のヒト化試験プロトコールmRNAからの抗体可変遺伝子の回収およびキメラFc野生型抗体遺伝子の作出

全RNAを422.2ハイブリドーマ細胞ペレットから精製し、逆転写させてcDNAを作製し、それからPCRによりおよそ400bpの可変遺伝子産物が単離され、アガロースゲル電気泳動により精製された。

## 【0326】

精製された可変領域フラグメントを、ヒトIgG1定常領域またはヒト定常領域を含有するpTT5ベクターにクローニングし、DH5 $\alpha$ コンピテント細胞に形質転換した。コロニーを採取し、これを用いてアンピシリンを含有するL-プロスに播種した。培養からQuickLyse mini-prepキットを用いてプラスミドDNAを単離した。可変重鎖および軽鎖遺伝子の配列を決定し、可変重鎖および軽鎖遺伝子配列を同定するための情報科学によって配列データをアラインした。

## 【0327】

コドンが最適化されたキメラ422.2抗体のクローニング

成熟マウス可変領域タンパク質配列を逆翻訳してDNAを得た後、コドンの最適化を行った。次に、そのV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>配列を、各末端に好ましい5つのプライム非翻訳領域および好ましいクローニング部位を含むように改変した。適合V<sub>H</sub>配列は、PCRに基づく戦略およびオーバーラッピングオリゴヌクレオチドを用いてde novo構築し、その後、pTTベクター中に存在するヒトIgG1 Fc野生型またはFc無効型hIgG1(L235A、G237A)またはヒンジ安定化hIgG4(S228P、L235E)(IgG4PE)にグラフトした。適合V<sub>L</sub>配列は、PCRに基づく戦略およびオーバーラッピングオリゴヌクレオチドを用いてde novo構築し、その後、pTT5ベクター中に存在する定常領域にグラフトした。

## 【0328】

得られたpTTプラスミドをHEKトランスフェクションで使用してキメラ抗体を作製した。

## 【0329】

422.2の可変ドメインのヒト化

10

20

30

40

50

ヒト可変(V)遺伝子鑄型を、適當なインハウス・ヒト生殖細胞系重鎖および軽鎖データベースを、BLASTPを用いてCDRマスク422.2V領域で検索することにより、422.2のヒト化に関して選択した。上位BLASTPヒットから、422.2ヒト化のためのV遺伝子フレームワーク鑄型としてIGHV1-69およびIGKV3-11を選択した。IGHJ6およびIGKJ2ヒト生殖細胞系連結(J)遺伝子を、422.2のヒト化のために選択した。

### 【0330】

復帰変異(特定のヒトフレームワーク残基をマウス残基に変化させるために作出される変異)の選択を補助するために、選択されたヒト生殖細胞系遺伝子と422.2配列の間の残基の違いを同定した。6つのヒト化VH変異体および6つのヒト化VL変異体が設計され、コドンを最適化し、次いで、好ましい5'および3'伸長を含むように改変した。適合可変領域配列を、PCRに基づく戦略およびオーバーラッピングオリゴヌクレオチドを用いてde novo構築し、その後、それぞれpTTベクターにクローニングした。

10

### 【0331】

得られたpTTプラスミドを、ヒト化抗体を生産するためにHEKトランスフェクションで使用した。HEK2936E懸濁細胞を計数し、0.05%ジェネティシンを添加した、およびいくつかの試験のためには1%ブルロニックF68を添加したFreestyle 1e発現培地293を用い、 $1.5 \times 10^6$ 細胞/mL ~  $2 \times 10^6$ 細胞/mLに希釈した。DNAおよびトランスフェクション試薬(Geminiまたは293-Fection)をOptiMEMに加え、穏やかにホモジナイズした後、室温で20~30分間インキュベートした。次に、DNA-脂質複合体を細胞懸濁液と合わせ、トランスフェクト細胞を37、5%CO2、125rpmでインキュベートした。トランスフェクションによつては、各トランスフェクションに、トランスフェクション24~48時間後にトリプトンフィード(1%ブルロニックF68および20%w/vカゼイントリプトンを添加したFreestyle 1e発現培地293)を加えた。トランスフェクト細胞懸濁液を5~8日間、生細胞が60%を下回るまでインキュベートした後、遠心分離した(構築物による)。上清を採取し、濾過した。

20

### 【0332】

抗体の捕捉を可能とする1mL HiTrapプロテインA HPカラムに上清を通し、このカラムを10mLのPBSで洗浄し、5mLのIgG Elute(Pierce、21009)で溶出することにより抗体を精製した。精製されたタンパク質のバッファーを、Millipore Centricon(登録商標)Centrifugal Filter Units(30Kカットオフ)を用いてPBSに交換し、Nanodrop分光光度計で定量した。

30

### 【0333】

#### 結果

##### 構築された発現プラスミド

ハイブリドーマクローン422.2のマウス抗体可変遺伝子配列の再生に成功し、これらの配列をそれぞれ以下の配列番号19および20ならびに図8に示す。

### 【0334】

40

422 HC

### 【化17】

QVQLQQSGPELVRPGESVKISCMGSGYTFTDYAMHWVKQSHAKSLEWIGLISIYSDHTNYNQKFQGKATMTVDKS  
SSTAYMELARLTSEDSAIYYCGRNNYGNYGWYFDVGAGTTVTVSS (配列番号19)

422 LC

### 【化18】

ENVLTQSPAAMSASPGEKVTMTCASSESVSYMHWYQQKSITSPKLWIYDTSKLASGVPGRFSGSGNSYSLTIS  
SMEAEDVATYYCFQGSGYPYTFGGGTKEIKR (配列番号20)

50

## 【0335】

再生された可変領域を選択した pTT5ベクターにクローニングしたところ、hIgG 1 Fc 野生型、hIgG 1 Fc 無効型 (L235A / G237A、EUナンパリング) または hIgG 4 PE (S228P / L235E、EUナンパリング) 上に 422.2 のキメラ軽鎖配列とキメラ重鎖配列をコードするプラスミドが作出された。これらのキメラ抗体を、クローニングされたマウス V 領域の機能性を確認するため、および最も好適なアイソタイプを特定するために使用した。

## 【0336】

422.2 の種々のヒト化変異体の重鎖および軽鎖をコードする pTT 哺乳動物発現プラスミドの構築が首尾良く行われた。

10

## 【0337】

H2L5 hIgG4PE の発現、精製および同定

H2L5 hIgG4PE の成熟タンパク質配列は、付加的標識とともに図 9 に含まれていた。H2L5 hIgG4PE 重鎖および軽鎖のコード領域の DNA 配列は、図 10 および 11 に含まれていた。

## 【0338】

実施例 4 : H2L5 の機能的分析Fc 受容体結合

ヒト化抗体 H2L5 は、抗原結合フラグメント (Fab) のアーム交換を防ぐため、ヒト IgG1 アイソタイプから、変異 S228P、L235E (EUナンパリング) を組み込んだ改変型ヒト IgG4 アイソタイプへと改変した。ヒト IgG4PE は mAb の、活性化している Fc 受容体および C1q への結合を低下させ、従って、抗体依存性細胞傷害性 (ADCC) または補体依存性細胞傷害性 (CDC) により ICOS 陽性細胞の枯渇を誘導する mAb の能力を低下させるので、ヒト IgG1 よりも優ると選択された。加えて、ヒト IgG4PE (S228P、L235E) は、Fc RIIb (阻害性 Fc 受容体) への結合を保持する。Fc RIIb との相互作用は、抗体架橋を可能とすることによる ICOS 抗体のアゴニスト活性に重要であり得る。Fc RIIb との相互作用は、TNF- ファミリー受容体ならびに CD28 を標的とする他の免疫調節抗体のアゴニスト活性に重要であることが示されている (Bartholomaeus P et al., "Cell contact-dependent priming and Fc interaction with CD32+ immune cells contribute to the TGN 1412-triggered cytokine response." J. Immunol., 192(5); 2091-8 (2014))。

20

## 【0339】

さらに、ヒト IgG4PE は、mAb の、活性化している Fc 受容体 (Fc RI、Fc RIIa および Fc RIIIa) および C1q への結合を低下させ、従って、抗体依存性細胞傷害性 (ADCC) または補体依存性細胞傷害性 (CDC) により ICOS 陽性細胞の枯渇を誘導する mAb の能力を低下させることも示されている。加えて、ヒト IgG4PE (S228P、L235E) は、Fc RIIb (阻害性 Fc 受容体) への結合を保持する (表 6)。

30

## 【0340】

以下の表 6 は、hIgG1 または hIgG4PE 抗体のいずれかとしての主要 H2L5 の、ヒト Fc 受容体に対する代表的結合親和性を示す。

40

## 【0341】

## 【表 6】

表 6 ヒト Fc $\gamma$ 受容体に対する hIgG1 または hIgG4PE としての主要ヒト化, ICOS 抗体の代表的親和性

抗体	Fc $\gamma$ R I	Fc $\gamma$ R IIa H131	Fc $\gamma$ R IIa R131	Fc $\gamma$ R IIb	Fc $\gamma$ R IIIa V158	Fc $\gamma$ R IIIa F158
	KD (nM)	KD (nM)	KD (nM)	KD (nM)	KD (nM)	KD (nM)
422 H2L5 IgG1 WT	60.8	405	662	1340	281	862
422 H2L5 hIgG4PE (H2L5 IgG4PE)	645	NB	2500	1470	NB	NB

NB =結合せず

10

## 【0342】

試験プロトコール

## 422.2 ヒト化変異体の機能評価

4つのICOSアゴニスト抗体をヒト化するために、マウスV領域とヒトIgG1Fc部分の融合物であるマウス-ヒトキメラを作出した。これら4つのキメラ抗体を、プレート結合型としてのヒト全PBMCA活性化アッセイで試験した。抗ICOSキメラ422.2は、結合型PBMCA活性化アッセイで最良のアゴニスト活性を示した。結合データおよび生物物理学的特性と合わせて、422.2クローニングをヒト化のために選択した。4つのヒト化422.2変異体をICOS結合および生物物理学的特徴に基づいて選択し(422.2 H2L0、H2L5、H5L0およびH5L5)、結合型ヒトPBMCA活性化アッセイで試験した。H2L5変異体は、サイトカイン産生により評価したところ、他の変異体と比較して、同等またはより良好なT細胞の活性化を示した(図3)。

20

## 【0343】

H5変異体の重鎖(V<sub>H</sub>)可変領域および成熟重鎖を以下にそれぞれ配列番号15および16として表す。

## 【0344】

H5VH

## 【化19】

30

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFDYAMHWVRQAPGQGLEWIGLISIYSDHTNYNQKFQGRATMTVDKS  
TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCGRNNYGNYGWYFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV

## 成熟H5重鎖

## 【化20】

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFDYAMHWVRQAPGQGLEWIGLISIYSDHTNYNQKFQGRATMTVDKS  
TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCGRNNYGNYGWYFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV  
KDYFPEFVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNPKVDKKVEPKSCD  
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPRPKDKTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNAKTKPREEQY  
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG  
FYPSDLIAVEWESNGOPENNYKTPPVLDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG  
K (配列番号16)

40

## 【0345】

L0変異体の軽鎖(V<sub>L</sub>)可変領域および成熟軽鎖を以下にそれぞれ配列番号17および18として表す。

## 【0346】

L0 VL

## 【化21】

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPGQAPRLLIYDTSKLASGIPARFSGSGSTDFTLTIS  
SLEPEDFAVYYCFQGSGYPYTFGQGTKLEIK (配列番号17)

成熟L0軽鎖

## 【化22】

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPGQAPRLLIYDTSKLASGIPARFSGSGSTDFTLTIS  
SLEPEDFAVYYCFQGSGYPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCNNFYPREAKVQWKVD  
NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号18)

10

## 【0347】

アイソタイプとしてのIgG4 [PE] の選択

次に、422 H2L5 IgG1を、可溶型の種々の全PBM C活性化アッセイで試験した。この可溶形式は、全PBM Cアッセイが同じウェルにリンパ球、単球および他の免疫細胞を含有するので、in vivo条件により関連すると思われる。しかしながら、422 H2L5 IgG1 mAbは、T細胞枯渇を思わせるT細胞集団の生存率の低下を一貫して示した。この結果は、11名の健康なドナーにおいて様々な程度で見られ、CD8+T細胞よりもCD4+T細胞で顕著であった。対照的に、422 H2L5抗体は、IgG4 [PE] またはFc無効型アイソタイプのいずれかとして発現された場合、T細胞生存率に有意な低下を示さず、生存率の低下がFc Rに媒介される抗体依存性細胞傷害性(ADCC)によるものであった可能性があることを示唆した(図4)。

20

## 【0348】

CD4+T細胞活性化アッセイにおけるH2L5 hIgG4PEの用量応答

H2L5 hIgG4PEのT細胞活性化効果を定量するために、ヒト原発性CD4+T細胞を、まず、プレート結合型抗CD3 (1 μg / ml) / 抗CD28 (3 μg / ml)により48時間前刺激してTエフェクター細胞集団の表面にICOS受容体のレベルを誘導し、次に、抗CD3 DynaビーズおよびH2L5 hIgG4PEで再刺激した。前刺激したCD4+T細胞を、抗CD3 Dynaビーズの存在下、一連の濃度の結合型または可溶型H2L5 hIgG4PEで処理することにより、10点用量応答曲線を作成した。結果は、結合型および可溶型H2L5 hIgG4PEの両方が、2名の別の健康なヒトドナーで用量依存的にIFN-αおよびTNF-αサイトカインの産生を増大させたことを示した(図5)。用量応答曲線フィッティング分析を行ってEC50値を得た。興味深いことに、H2L5 hIgG4PE処理は、T細胞培養の上清に可溶型タンパク質として加える場合と対照的に、抗体がプレートに固定された場合に有意に大きな規模のサイトカイン誘導をもたらした。

30

## 【0349】

可溶型ヒトPBM C活性化アッセイにおけるH2L5 hIgG4PEの機能試験

全ヒトPBM C ex vivo培養でのH2L5 hIgG4PEの機能を試験するために、健康なヒトドナーからのPBM Cを、プレート結合型抗CD3および抗CD28とともに48時間調製し、次いで、抗CD3 Dynaビーズの存在下(ビーズ：細胞 = 1 : 1比)で3.5日間、可溶型H2L5 hIgG4PE処理を行った。サイトカイン産生およびT細胞グランザイムB発現を、T細胞機能の読み出しとして調べた。3名のドナーからの結果を図6にまとめたが、そこからH2L5 hIgG4PEが健康ヒトドナーからの活性化PBM Cにおいて増殖、サイトカイン産生および細胞傷害能の増強を誘導することを示唆する証拠が得られる(図6)。

40

## 【0350】

前刺激ヒトPBM Cに対するICOS mAb活性

PBM Cがプレート結合型の抗CD3(クローニOKT3、1 μg / ml)および抗CD28(クローニCD28.2、3 μg / ml)により48時間前刺激されるPBM C前

50

刺激アッセイで H 2 L 5 h Ig G 4 P E の活性を評価した。次に、最適な前刺激条件を特定するために、ヒト C D 3 Dyna ビーズおよび C D 3 / C D 2 8 Dyna ビーズ (Thermo Fisher) を種々のビーズ：細胞比で用いて P B M C を前刺激した。48 時間の前刺激の後、細胞を採取し、ビーズを磁気的に除去した後、可溶型 I C O S m A b の存在下または不在下で、抗 C D 3 Dyna ビーズ (ビーズ：細胞比 = 1 : 1) で再刺激した。H 2 L 5 h Ig G 4 P E I C O S アゴニスト m A b は、供試した総ての前刺激条件でアイソタイプ対照に比べて I F N の誘導をもたらしたが、I F N 産生の規模は前刺激の強度と逆相関した。

### 【 0 3 5 1 】

#### 実施例 5 - T 細胞活性化マーカー

##### 方法

機能的エンドポイントにおける濃度依存的变化は、健康なヒト P B M C を 0.6 μg / mL での抗 C D 3 抗体処理と同時に 0.1 μg / mL ~ 100 μg / mL の範囲の濃度の固定化 H 2 L 5 h Ig G 4 P E で処理することによって評価した。細胞表面活性化マーカー C D 6 9、O X 4 0 および C D 2 5 の発現の变化をフローサイトメトリーにより評価し、T 細胞活性化の尺度とした。T 細胞の増殖は、Ki 6 7 核染色の変化によって測定した。C D 3 会合の存在下で H 2 L 5 h Ig G 4 P E 処理に応答した種々の T h 1、T h 2 および T h 1 7 サイトカインのレベルの変化を、MSD プラットフォームで評価した。初期サイトカイン変化ならびに後の時点での主として着目される増殖変化の両方の捕捉を確保するために、処理後 24 時間および 48 時間の時点を選択した。

### 【 0 3 5 2 】

#### 試験準備

##### ヒト末梢血単核細胞 (P B M C ) の単離

液体ナトリウムヘパリン (Sagent 終濃度 10 IU / mL) でコーティングしたシリンジを用い、健康なドナーから全血を採取し、次いで、リン酸緩衝生理食塩水 (P B S) で 1 : 1 希釈した。希釈血液 (35 mL) を 15 mL フィコール密度勾配媒体 (GE Healthcare) の上に重層し、室温にて 20 分間 1200 × g でブレーキを用いずに遠心分離した。白色の単核細胞層を新しい 50 mL チューブに注意深く移した。このチューブに等容量の P B S を加え、室温にて 5 分間 400 × g で遠心分離した。P B M C を P B S で 1 回洗浄し、従前に記載されたように遠心分離した。P B M C を 50 mL AIM-V 培地に再懸濁させた。Vi-Cel 1 セルカウンターおよびバイアビリティアナライザー (Beckman Coulter) を用いて細胞を計数した。

### 【 0 3 5 3 】

#### 抗体コーティング

抗ヒト C D 3 抗体を終濃度 0.6 μg / mL となるようにコーティングバッファーで希釈した。100 μL の希釈抗体を 96 ウェル平底プレートに一晩 4 ℃ でコーティングした。翌日、10.1 mg H 2 L 5 h Ig G 4 P E および 7.9 mg 抗 RSV Ig G 4 P E アイソタイプ対照抗体の保存溶液をコーティングバッファーで 1 : 2 連続希釈して 100 ~ 0.1 μg / mL の範囲の最終抗体濃度を得た。100 μL の希釈抗体を室温で 4 時間、抗 C D 3 コーティングプレートにコーティングした。

### 【 0 3 5 4 】

#### 試験プロトコール

##### ヒト P B M C 活性化アッセイ

H 2 L 5 h Ig G 4 P E を、抗 C D 3 抗体を介した T C R 会合と H 2 L 5 h Ig G 4 P E による I C O S の補助刺激が同時に起こるヒト P B M C 活性化アッセイで試験し、活性化効果を活性化後 24 時間および 48 時間にモニタリングした。この試験を 4 名の異なるドナーからの血液を用いて 4 回繰り返した (n = 4)。AIM-V 培地中、200 μL の P B M C (1 × 10<sup>6</sup> 細胞 / mL) を、種々の濃度の H 2 L 5 h Ig G 4 P E または Ig G 4 アイソタイプ対照を含む抗 C D 3 抗体コーティングウェルに加えた。各アッセイ条件について 3 回のテクニカル反復を含めた。P B M C を 37 ℃ および 5% CO<sub>2</sub> で、

10

20

30

40

50

上記に示される種々の時間培養した。24時間および48時間の時点で上清を回収した後、MSDプラットフォームに分泌されるサイトカインの分析のために-80で保存した。24時間および48時間の両時点で細胞を96ディープウェルプレートに移し、1mL FACS染色バッファーで洗浄し、蛍光団を結合した抗体またはアイソタイプ対照で染色した。

#### 【0355】

##### 細胞表面染色

細胞をまず、PBSで予め1：1000希釈した固定可能な生体色素eFluor 506で4℃、暗所にて30分間染色した。細胞を洗浄した後、種々の蛍光団と結合した、細胞表面マーカーに対する検出抗体とともに氷上にて30分間インキュベートした。細胞表面抗体で染色した後、内部移行マーカーに関して染色されないサンプルを氷冷FACS染色バッファーで1回洗浄した後、FACSCanto IIフローサイトメーターに流した。

#### 【0356】

サイトメーター性能は、サイトメーターセットアップおよびトラッキングビーズを用いて毎日適切に評価した。補正は、各蛍光色素を結合した検出抗体で個々に染色したAbC抗マウスピーズキットを用いて行った。サンプルを流し、適切な補正設定の後に取得したデータを上述のビーズの混合物を用いて確認した。

#### 【0357】

##### Foxp3およびKi67に対する細胞内染色

細胞表面染色の後、細胞内マーカーの染色のために細胞を固定し、透過処理を施した。転写因子バッファーを用い、これを希釈バッファーで1：3希釈することにより、固定／透過バッファーを調製した。透過洗浄バッファーは、5倍Perm／洗浄バッファー保存液を脱イオン水で希釈することにより調製した。1mLの固定／透過バッファーを各サンプルに加え、これらのプレートをすぐにシェーカー上で旋回させた。これらのプレートを暗所、4℃で45分間インキュベートした。遠心分離後、全2回の洗浄に関して、1mLの透過／洗浄バッファーを加え、これらのプレートを混合し、遠心分離した。内部移行カクテルを、マーカー抗体を用いて調製した。100μLの内部移行抗体を適当なサンプルに加え、これらのプレートを暗所、4℃で30分間インキュベートした。サンプルを1mLの透過洗浄バッファーで2回洗浄し、250μLの流動バッファーに再懸濁させ、FACSCanto IIフローサイトメーターに流した。

#### 【0358】

##### ヒト特注9プレックスサイトカインアッセイ

サイトカインレベルを、MSDヒト特注9プレックスキットを用いて測定した。サンプルおよびキャリブレーターを希釈剤43で希釈した。サンプルを9プレックスアッセイの場合には1：10希釈、記載のIFNアッセイの場合には1：200希釈し、0.250μLの希釈剤を2つの各キャリブレーターパネルに加えた。旋回させた後、キャリブレーターを氷上で少なくとも5分間インキュベートした。200μLの各キャリブレーターパネルを400μLの希釈剤に加えてキャリブレーターの最高濃度とし、1：4連続希釈を用いて、6つのさらなるキャリブレーター希釈液を調製した。希釈剤43をプレートバックグラウンドとして使用した。50μLの希釈サンプル(3反復)およびキャリブレーター(2反復)をMSDプレートに加えた。プレートを封止し、室温で振盪しながら2時間インキュベートした。プレートをキットの希釈MSD洗浄バッファー150μLで3回洗浄した。各プレートについて、9種類の各検出抗体60μLを希釈剤3で3mLとしたものを合わせることにより、検出抗体溶液を調製した。25μLの検出抗体溶液を加えた後、これらのプレートを封止し、室温、暗所で振盪しながら2時間インキュベートした。プレートを上記のように洗浄した。150μLの2倍リードバッファーをこれらのプレートに加え、それらをQuicKPLexで読み取った。

#### 【0359】

##### ヒトIFNサイトカインアッセイ

10

20

30

40

50

サンプルおよびキャリブレーターを希釈剤 2 で希釈した。1 mL の希釈剤をキャリブレーターに加えた。旋回した後、キャリブレーターを氷上で 5 分間インキュベートした。これをキャリブレーター 1 とする。1 : 4 連続希釈を用い、6 つのさらなるキャリブレーター希釈液を調製した。希釈剤 2 をプレートバックグラウンドとして使用した。50 μL の希釈サンプル（3 反復）およびキャリブレーター（2 反復）を MSD プレートに加えた。プレートを封止し、室温で 2 時間振盪しながらインキュベートした。プレートをキットの希釈 MSD 洗浄バッファー 150 μL で 3 回洗浄した。検出抗体溶液を希釈剤 3 で調製した。各プレートについて、合計 3 mL の検出試薬に対して 60 μL の各検出抗体を希釈剤に加えた。25 μL の検出抗体を加えた後、これらのプレートを封止し、室温、暗所で、振盪しながら 2 時間インキュベートした。プレートを 3 回洗浄した。リードバッファーをこれらのプレートに加え、それらを Quick Plate で読み取った。

## 【0360】

データ分析サイトカインおよびフローサイトメトリーデータの分析

MSD サイトカインアッセイの結果を、MSD ディスカバリー・ワークベンチソフトウェア、バージョン 4.0 (Mesos-Scale)、マイクロソフト・エクセル、およびグラフパッド・プリズムを用いて分析した。フローサイトメトリーデータを DIVA により分析し、グラフパッド・プリズムソフトウェアに数値をプロットした。

## 【0361】

抗体用量応答曲線フィッティング分析

用量応答データをグラフパッド・プリズムソフトウェアにインポートし、対数スケールに変換した。データの分析および EC50 値の生成のために、アゴニスト用量応答を様々な傾きモデルとともに使用した。フィッティング式を以下に挙げる。

$$Y = \text{最小} + (\text{最大} - \text{最小}) / (1 + 10^{(\log EC50 - X)}) \text{ ヒルの傾き})$$

## 【0362】

統計分析

増殖試験における H2L5-hIgG4PE 値とアイソタイプ抗体対照値の間の違いの統計的有意性を 2 対応のスチュードントの t 検定によって分析した。

## 【0363】

結果H2L5-hIgG4PE によるサイトカイン変化の評価

PBMC を抗 CD3 の存在下、固定化 H2L5-hIgG4PE で処理すると、IFN-γ、TNF-α などの Th1 サイトカイン、Th2 サイトカインである IL-6 および IL-10、ならびに Th17 サイトカインである IL-17a の分泌が濃度依存的に様々な程度で誘導された。IL-4、IL-5 および IL-13 などの毒呈した他のサイトカインも、H2L5-hIgG4PE 刺激に対して、程度は低いが濃度依存的応答を示した。4 名の異なるドナーからの結果を表 7 にまとめる。

## 【0364】

T 細胞活性化の細胞表面マーカーに対する H2L5-hIgG4PE 活性のフローサイトメトリーによる機能評価

不活性ヒト PBMC (n = 4 ドナー) における同時 CD3 刺激を伴う H2L5-hIgG4PE 処理は、T 細胞活性化マーカーに有意な変化を誘導した（表 7 および 8）。ヒト IgG4 同位体対照サンプルに比べて H2L5-hIgG4PE 処理サンプルで、CD25 および OX40 陽性 CD4 および CD8 T 細胞のロバストな増加が見られた。CD69 陽性 CD4 および CD8 T 細胞のパーセントも 24 時間および 48 時間の時点で濃度依存的に増加した。

## 【0365】

T 細胞増殖に対する H2L5-hIgG4PE の効果の特性評価

同時的 CD3 の活性化を伴う固定化 H2L5-hIgG4PE 処理は、細胞内 Ki-67 染色により測定したところ、CD4 および CD8 の両 T 細胞の増殖に濃度依存的增加をも

10

20

30

40

50

たらした（n = 6 ドナー）（表8）。H2L5 hIgG4PEはまた、CD4およびCD8 T細胞の合計で見られたものよりも程度は低いが、濃度依存的にCD4+CD25+Foxp3+制御性T細胞の増殖を増大させた。H2L5 hIgG4PEによるT細胞増殖の促進は、48時間の時点でのみ見られた。制御性T細胞の増殖の増大は有意ではなかったが、CD4+細胞の増殖の濃度依存的增加（H2L5 hIgG4PEが0.4 μg/mLより大きい濃度ではp < 0.05）およびCD8+T細胞の増殖の濃度依存的增加（0.2~1.6 μg/mLの間の濃度ではp < 0.05）は有意であった（表7参照）。

【0366】

【表7】

10

表7 ヒトPBMC活性化アッセイにおけるH2L5 hIgG4PEの総ての機能エンドポイントからのEC50値(μg/mL)

	ドナー_1136F50		ドナー_185M45		ドナー_1124F36		ドナー_1149M52	
	24時間	48時間	24時間	48時間	24時間	48時間	24時間	48時間
IL-10	1.7	1.3	0.7	0.8	0.7	0.6	0.5	0.6
IFN-γ	0.4	1.5	0.3	0.7	0.3	0.5	0.2	0.6
IL-17a	1.4	1.6	0.8	1.1	0.6	0.8	0.7	1.0
IL-6	0.7	1.1	0.7	0.8	NA	NA	0.2	0.3
TNF-α	NA	0.3	NA	0.5	NA	0.3	NA	0.2
CD4+CD69+	0.5	0.4	0.8	NA	1.1	1.1	0.5	0.4
CD4+CD25+	0.3	0.6	2.4	0.5	0.6	0.6	0.6	0.4
CD4+OX40+	0.2	0.4	1.6	NA	0.6	1.2	0.6	0.4
CD8+CD69+	0.5	0.6	1.2	0.5	0.8	1.1	0.6	0.4
CD8+CD25+	0.4	0.7	2	0.5	0.6	0.5	1.0	0.4
CD8+OX40+	0.3	0.5	1.6	NA	2.4	0.5	1.5	0.3
CD4+Ki67+	NT	NT	NA	0.6	NA	0.8	NA	0.5
CD8+Ki67+	NT	NT	NA	0.4	NA	0.7	NA	0.3

NA=分析せず(EC50値は曲線フィッティングが不十分なために正確でない)

NT=試験せず

20

【0367】

30

【表8】

表8 抗CD3の存在下で48時間H2L5 hIgG4PEで刺激した後のヒトPBMCにおけるCD25、Foxp3およびKi67陽性CD4またはCD8T細胞のパーセント

	抗体濃度	H2LA hIgG4PE (CD4またはCD8T細胞の%)			アイソタイプ対照 (CD4またはCD8T細胞の%)			TTEST (p値)
		μg/ml	ドナー185M45	ドナー1124F36	ドナー1149M52	ドナー185M45	ドナー1124F36	
%Treg CD4 T 細胞	0	10.2	3.8	6.1	10.2	3.8	6.1	0.415
	0.1	12.4	4.2	7.6	8.6	3.6	6.6	0.220
	0.2	11.8	4.5	9.8	8.5	3.2	7.1	0.054
	0.4	14.3	5.2	11.3	8.6	3.4	7.4	0.076
	0.8	18.6	6.9	14.3	8.4	3.4	7.3	0.069
	1.6	21.4	7.5	15.9	7.7	3.8	7.2	0.095
	3.1	20.8	7.9	15.0	10.4	3.9	7.1	0.058
	6.3	18.7	8.3	14.7	10.3	3.6	8.3	<b>0.026</b>
	12.5	20.2	7.6	15.1	9.6	4.0	8.1	0.072
	25	19.5	7.6	13.9	11.5	5.1	8.3	0.079
	50	20.0	7.9	13.3	9.6	5.0	9.7	0.143
	100	18.7	7.9	13.3	11.5	5.6	8.8	0.080
%Ki67+ CD4 T 細胞	0	7.2	1.2	2.3	7.2	1.2	2.3	0.693
	0.1	9.6	1.5	2.9	6.1	0.9	2.1	0.219
	0.2	9.0	2.1	4.4	5.0	0.9	2.4	0.098
	0.4	11.9	3.9	7.5	6.8	1.0	2.7	<b>0.025</b>
	0.8	18.2	7.1	12.4	7.6	1.3	2.5	<b>0.028</b>
	1.6	19.5	8.9	15.9	5.4	0.8	3.2	<b>0.024</b>
	3.1	21.1	10.7	14.4	9.1	1.2	2.9	<b>0.005</b>
	6.3	18.7	12.6	17.1	8.1	1.1	3.2	<b>0.007</b>
	12.5	22.2	12.2	16.5	7.4	1.5	3.4	<b>0.008</b>
	25	20.7	11.6	16.1	9.3	1.7	5.2	<b>0.002</b>
	50	21.2	12.8	14.3	7.5	2.4	7.3	<b>0.034</b>
	100	21.8	12.0	14.0	9.4	2.8	4.7	<b>0.010</b>
%Ki67+ CD8 T 細胞	0	11.0	4.4	2.7	11.0	4.4	2.7	0.841
	0.1	15.2	8.3	4.8	9.6	5.3	2.3	0.061
	0.2	13.5	10.9	7.8	8.2	3.8	2.9	<b>0.014</b>
	0.4	17.4	14.4	11.3	10.1	3.4	4.3	<b>0.023</b>
	0.8	20.7	19.6	13.8	14.2	4.5	2.0	<b>0.047</b>
	1.6	22.2	22.8	16.1	10.7	4.0	3.7	<b>0.025</b>
	3.1	21.8	26.7	13.6	14.5	4.4	3.0	0.099
	6.3	20.2	29.8	16.0	10.8	3.3	5.0	0.103
	12.5	21.7	29.6	15.6	10.7	4.1	3.4	0.074
	25	20.0	28.7	14.6	10.4	6.1	5.0	0.084
	50	19.0	31.4	13.5	7.6	5.1	5.5	0.114
	100	19.2	27.4	13.4	7.9	7.1	3.5	0.051
%Ki67+ Treg 細胞	0	29.7	10.2	11.3	29.7	10.2	11.3	0.920
	0.1	32.8	12.5	14.4	32.4	10.0	12.3	0.127
	0.2	33.0	14.8	19.0	30.3	8.3	13.4	0.051
	0.4	33.6	22.2	22.2	28.4	10.8	14.1	<b>0.044</b>
	0.8	37.0	26.3	26.3	36.7	8.5	14.4	0.191
	1.6	35.0	27.7	28.4	26.8	7.7	16.3	0.061
	3.1	38.3	30.2	27.2	33.9	9.6	17.4	0.135
	6.3	33.9	32.5	26.1	36.7	8.7	16.5	0.315
	12.5	37.3	36.8	26.2	31.2	15.1	17.2	0.125
	25	36.3	33.0	28.6	33.3	13.7	28.1	0.326
	50	37.7	33.6	24.2	32.9	21.1	29.5	0.518
	100	40.1	35.8	28.6	36.3	21.5	26.4	0.216

## 【0368】

## 考察

ICOSがT細胞の活性化とおよびTh1およびTh2サイトカインの両方の誘導に重要なことが十分に確認される。本研究では、H2L5 hIgG4PE(抗ICOSアゴニスト抗体)のin vitro活性が、T細胞の活性化およびサイトカインの誘導の種々の尺度を用いて実証された。測定した全てのT細胞活性化マーカー、CD25(I

10

20

30

40

50

L-2受容体鎖)、CD69(初期活性化マーカー)およびOX-40(補助刺激マーカー)は、CD3刺激とともにH2L5hIgG4PEで処理した際にアップレギュレートされた。モニタリングした活性化マーカーの中で、CD69およびOX40を発現するT細胞のパーセントはH2L5hIgG4PE処理によって強く増大された。CD69は初期活性化マーカーであり、ゆえに、その効果は24時間サンプルにおいて優勢である。もう1つの重要なT細胞活性化マーカーであるCD25は、H2L5hIgG4PEで処理した際に両時点で増加し、H2L5hIgG4PEがT細胞の活性化の維持において重要な役割を果たすことを示唆する。Ki67は、細胞増殖に関連する核タンパク質である。Ki67細胞内染色を伴うフローサイトメトリーデータは、固定化H2L5hIgG4PEがTCR会合の状況で、CD4およびCD8の両T細胞の増殖を有意に促進したことを示した。制御性T細胞の増殖もH2L5hIgG4PEによって増強されたが、その変化は統計的に有意でなかった。

#### 【0369】

ヒトTh17細胞は、抗腫瘍免疫の調節に重要な役者である[Nunez, S., et al., Th17 type 17 cells contribute to anti-tumour immunity and promote the recruitment of T helper type 1 cells to the tumour. Immunology 2013; 139: 61-71]。研究では、ICOSはヒトTh17の発達および機能に関与することが示されている[Kimura, A., et al., Regulator of Treg/Th17 balance. Eur. J. Immunol. 2010; 40: 1830-1835; Poulos CM et al. The inducible costimulator (ICOS) is critical for the development of human Th17 cells. Sci Transl Med. (2010) 2(55); 55ra78; Nelson, M. H., et al. The inducible costimulator augments Tc17 cell responses to self and tumor tissue. J Immunol, 2015; 194: 1737-1747]。H2L5hIgG4PEの現在の機能評価では、炎症および免疫応答に関連するサイトカインの大多数は、抗CD3およびH2L5hIgG4PE刺激の後に細胞培養上清で測定された。H2L5hIgG4PEは、ヒトPBMCにおいてTh1サイトカインであるIFN- $\gamma$ およびTNF- $\alpha$ 、ならびにTh17サイトカインであるIL-17aの分泌を強く誘導し、H2L5hIgG4PEが抗腫瘍応答において重要な役割を果たす可能性があることを示唆する。IL-6はTGF- $\beta$ とともに、ナイーブT細胞からTh17細胞の発達の誘導に重要なサイトカインである。対照的に、IL-6は、TGF- $\beta$ により誘導されるTregの分化を阻害する[Kimura, A., 2010; Korn, T., et al., IL-6 controls Th17 immunity in vivo by inhibiting the conversion of conventional T cells into Foxp3 $^{+}$  regulatory T cells. PNAS, 2008; 105: 18460-18465]。本研究では、H2L5hIgG4PEは、IL-6の分泌を増加させ、IL-6はTh17細胞の発達をさらに促進し得ることが判明した。CD28およびTNF受容体ファミリーメンバーなどのT細胞受容体のアゴニスト抗体は、ペル型の用量応答曲線を描くことが示されている[White, A. L., et al., Conformation of the Human Immunoglobulin G2 Hinge Imparts Superagonistic Properties to Immuno-stimulatory Anticancer Antibodies. Cancer Cell, 2015, 27: 138-148; Luhder, F., et al., Topological Requirements and Signaling Properties of T Cell-activating, Anti-CD28 Antibody Superagonists. J. Exp. Med. 2003; 955-966; Stebbings, R., et al., "Cytokine Storm" in the Phase I Trial of Monoclonal Antibody TGN1412: Better Understanding the Causes to Improve PreClinical Testing of Immunotherapeutics J. Immunol., 2007, 179: 3325-3331; Rogers PR and Croft M, CD28, OX-40, LFA-1, and CD4 Modulation of Th1/Th2 Differentiation Is Directly Dependent on the Dose of Antigen. J Immunol 2000 164:2955-2963; doi:10.4049/jimmunol.164.6.2955]。H2L5hIgG4PEもまた、同様の双曲線的機能応答曲線を示す。この情報は、使用する抗体の、最適な薬力学的応答のために最良の用量範囲を確かめる上で重要な成分である。

#### 【0370】

全体的に見れば、H2L5hIgG4PEは、CD3刺激を伴って、T細胞補助刺激受容体の強力なアクチベーターとしてのその役割に沿って、T細胞の活性化、増殖および

10

20

30

40

50

炎症性サイトカインの誘導を増強することが示された。

**【0371】**

実施例 6：抗 ICOS 抗体の結合

ヒト化プロトコール（実施例 3）から 36 の重鎖および軽鎖変異体が生成され、これらをヒトおよびカニクイザル ICOS との結合に関してスクリーニングするととともに、それらがヒト CD28 または CTLA-4 と結合しなかったことも確認した。H2L5 変異体は、最小数の復帰変異を含みつつヒトおよびカニクイザル ICOS に対して高い親和性（それぞれ 1.34 および 0.95 nM）を有するとして同定された。

**【0372】**

H2L5 hIgG4PE はヒト ICOS に対して 1.3 nM の親和性を有するので、  
422 H2L5 のアイソタイプの、IgG1 から IgG4PE への変化はこの抗体の抗原結合に影響を及ぼさない。H2L5 hIgG4PE による ICOS / ICOS-L 結合の濃度に基づく阻害を図 7 に示す。  
10

**【0373】**

試験プロトコール

ヒト ICOS に対する H2L5 hIgG4PE の結合

ヒト化 H2L5 hIgG4PE 抗体の親和性の結合動態を、表面に捕捉した CM5 チップ抗 ICOS H2L5 hIgG4PE の Fc 上で Biacore T200 抗ヒト IgG を用いて決定した。ウサギ Fc の非特異的結合を防ぐために、抗ヒト IgG 表面を 0.1 mg/mL hIgG1 で遮断した。ヒトおよびカニクイザル ICOS（ウサギ Fc）を 256 nM、64 nM、16 nM、4 nM および 1 nM で捕捉抗体に通した。バッファー単独を二重参照結合曲線のために使用した。表面を再生するために MgCl<sub>2</sub> を使用した。流動は 25 で行った。T200 評価ソフトウェアを用いて 1 : 1 モデルにデータを当てはめた。抗体濃度： 2.5 μg/mL  
20

**【0374】**

結果

ヒトおよびカニクイザル ICOS に対する H2L5 hIgG4PE の結合

ヒト化 H2L5 hIgG4PE 抗体の結合動態親和性を、Biacore T200 を用いて決定した。  
30

**【0375】**

T200 データ分析ソフトウェアを用い、ICOS 結合データを 1 : 1 動態モデルに当てはめた。

**【0376】**

H2L5 hIgG4PE の、ヒト ICOS に対する結合親和性は 1.34 nM であり、カニクイザル ICOS に対する結合親和性は 0.95 nM である（表 9 参照）。これらの値は同等であり、予想通り、分子の Fc 領域に対する変化は、ICOS 抗原に対する結合に影響を及ぼさなかったことを示す。

**【0377】**

表 9 は、ヒトおよびカニクイザル ICOS に対するヒト化 422 (H2L5) IgG4PE の K<sub>a</sub> / K<sub>d</sub> / K<sub>D</sub> を示す。  
40

**【0378】**

**【表 9】**

表 9 ヒト ICOS に対する結合

サンプル	標的	K <sub>a</sub> (1/Ms)	K <sub>d</sub> (1/s)	K <sub>D</sub> (M)
422 H2L5 IgG4PE	ヒト ICOS-Fc	2.97E+05	3.96E-04	1.34E-09
422 H2L5 IgG4PE	カニクイザル ICOS-Fc	3.91E+05	3.71E-04	9.49E-10

**【0379】**

考察

実施例1に示されるように、マウスクローン422-2が主要抗ヒトICOSマウス抗体として同定された。この抗体のヒト化により36の重鎖および軽鎖変異体が得られ、これらをヒトおよびカニクイザルICOSとの結合に関してスクリーニングするととともに、それらがヒトCD28またはCTLA-4と結合しなかったことも確認した。H2L5変異体は、最小数の復帰変異を含みつつヒトおよびカニクイザルICOSに対して高い親和性（それぞれ1.34および0.95nM）を有するとして同定された。

## 【0380】

IgG1からIgG4PEへのアイソタイプの変更は、抗体のICOSへの結合に影響を及ぼさない。

10

## 【0381】

実施例7：ヒト活性化T細胞に対するH2L5 h IgG4PEの結合方法試験準備CD3ネガティブ単離：

CD3+T細胞は幹細胞Rosette SepヒトT細胞濃縮キットからネガティング単離した： Rosette SepヒトT細胞濃縮：100mLの新鮮な全血を、液体ナトリウムヘパリン(Sagentt終濃度10IU/mL)中でコーティングしたシリンジで採取した。各採取チューブからの血液をフラスコに合わせ、血液1mL当たり50μLのRosette SepヒトT細胞濃縮カクテル加えた(5mL/100mLドナー血液)。全血/Rosette Sep抗体カクテルを室温で20分間インキュベートした。次に、血液/Rosette Sep抗体カクテルを1×リン酸緩衝生理食塩水(PBS)+2%FBS(ウシ胎児血清)で1:1希釈した。FBSは最終容量200mLに対する。次に、25mLの希釈血液/抗体カクテルをSepmateチューブ内の15mLのフィコール勾配上に重層した(各ドナーにつき合計9チューブ)。その後、Loaded Sepmateチューブを室温にて1200×gで20分間、ブレーキをオンにして遠心分離した。末梢血単核細胞(PBMC)界面に沈降した血漿の上層をピペットで取り出し、廃棄した。残った血漿およびバフィーコート界面をSepmateチューブから50mLコニカル遠沈管(合計4本)にデカントした。これらのチューブにPBS+2%FBSを最高レベルまで加えて50mLとした。細胞を室温にて400×gで10分間遠心分離した。上清を廃棄した。次に、各ドナーからのペレットを1本の50mLコニカルチューブに合わせ、これらのペレットを合計容量50mL PBS+2%FBSに再懸濁させた。細胞を室温にて400×gで5分間遠心分離した。上清を廃棄し、細胞ペレットを2mLのRPMI完全培地(RPMI 1640+10%FCS+1mMピルビン酸ナトリウム+2mM L-グルタミン+ペニシリン100U/mL+ストレプトマイシン100μg/mL)に再懸濁させた。回収したCD3細胞をViCell装置で計数し、さらに希釈して $1.2 \times 10^6$ 細胞/mLとした。T細胞単離の質を確認するために、 $1 \times 10^6$ の回収細胞をCD3 PE-Cy7に対して染色した。

20

## 【0382】

CD3+T細胞を、Invitrogen Untouched T細胞単離キットによりネガティブ単離した

30

PBMC単離：簡単に述べれば、100mLの新鮮な全血を、液体ナトリウムヘパリン(Sagentt終濃度10IU/mL)中でコーティングしたシリンジで各ドナーから採取した。血液を、2%FBSを含むPBSで希釈(1:1)し、最終容量200mLとした。25mLの希釈血液を、Sepmateチューブ(各ドナーにつき合計8本)中の15mLのフィコール勾配の上に重層した。次に、Loaded Sepmateチューブを室温にて1200×gで20分間、ブレーキをオンにして遠心分離した。PBMC界面に沈降した血漿の上層をピペットで取り出し、廃棄した。残った血漿およびバフィーコート界面をSepmateチューブから50mLコニカル遠沈管(合計4本)にデカントした。これらのチューブにPBS+2%FBSを最高レベルまで加えて50mLとした。

40

50

細胞を室温にて $400 \times g$ で10分間遠心分離した。上清を廃棄した。次に、各ドナーからのペレットを1本の50mLコニカルチューブに合わせ、合計容量50mL PBS + 2% FBSに再懸濁させた。細胞を室温にて $400 \times g$ で5分間遠心分離した。上清を廃棄し、細胞ペレットを任意の容量の単離バッファー（T細胞キットに供される細胞ペレットのサイズに依存）に再懸濁させた。次に、単離されたPBMCをViCell装置で計数し、単離バッファーで終濃度 $1 \times 10^8$ 細胞/mLとした。

#### 【0383】

Invitrogen Dynabead UntouchedヒトT細胞単離： $2 \times 10^8$ の単離PBMC（2mL）、 $400 \mu l$ のFBS、次いでInvitrogen Untouched T細胞キットからの $400 \mu l$ の抗体ミックスを各15mLチューブに加え、4℃で20分間インキュベートした。細胞を10mLの単離バッファーで洗浄し、4℃にて $350 \times g$ で8分間遠心分離した。上清を廃棄し、これらのペレットを2mLの単離バッファーに再懸濁させた。次に、各チューブに2mLの、予め洗浄したDеплекция Dynaビーズを各チューブに加えた。細胞をビーズとともに、軽く傾斜させ、旋回させながら室温で15分間インキュベートした。このビーズのインキュベーション後に、10mLの単離バッファーを加え、細胞/ビーズ懸濁液をピペットで10回上下させた。これらのチューブを室温で2分間、磁石中に置いた。磁気を帯びたビーズを乱さずに、未結合のT細胞を含有する上清を回収した。これらのビーズを10mLの単離バッファーで1回洗浄し、室温で2分間、再び磁石中に置き、ビーズを除いたバッファーを回収した。回収した細胞を室温にて $400 \times g$ で5分間遠心分離した。上清を廃棄し、細胞ペレットを細胞ペレットサイズによって任意の容量（2~35mL）のRPMI完全培地に再懸濁させた。次に、回収したCD3+細胞をViCellで計数し、RPMI完全培地で $1.2 \times 10^6$ 細胞/mLの濃度とした。10

#### 【0384】

CD3確認染色： $1 \times 10^6$ の回収細胞を $5 \mu l$ の抗CD3 PE-Cy7または $5 \mu l$ のIgG1 Pe-Cy7アイソタイプで4℃、暗所で40分間染色した。次に、4℃にて $400 \times g$ で5分間遠心分離しつつ、細胞を、0.1% Tween 20を含む氷冷PBSで2回洗浄した。染色された細胞を1%ホルムアルデヒドに再懸濁させ、暗所、4℃で20分間インキュベートした。次に、4℃にて $400 \times g$ で5分間遠心分離しつつ、細胞を、0.1% Tween 20を含む氷冷PBSで2回洗浄し、0.1% Tween 20を含む $275 \mu l$ のPBSに再懸濁させた。固定された細胞を、T細胞単離の質を確認するためのフローサイトメトリーを実施するまで、暗所、4℃で保存した。30

#### 【0385】

単離されたヒトT細胞の活性化：

T75フラスコを、PBS中、 $1 \mu g / ml$  CD3/CD28 4mLで、37℃にて2時間コーティングした。フラスコを12mLのPBSで2回洗浄した。25mLのRPMI完全培地中、 $30 \times 10^6$ の細胞を各T75フラスコに加えた。活性化させるために、細胞を37℃、5% CO<sub>2</sub>で48時間インキュベートした。

#### 【0386】

抗ICOS(H2L5h IgG4PE)の結合：40

ナイープ型および活性化型の両CD3+T細胞でH2L5h IgG4PEの結合を評価した。0.00128から $100 \mu g / ml$ まで5倍希釈のH2L5h IgG4PEの8点タイトレーションを用いた。

#### 【0387】

ナイープ型および/または活性化型いずれかのCD3+T細胞を、ヒトFcR遮断溶液を含有する0.1%BSA含有PBS（FACSバッファー）（1mL当たり $5 \mu l$  FcR遮断溶液 +  $950 \mu l$  FACSバッファー）に $2 \times 10^6$ 細胞/mLで再懸濁させた。 $2 \times 10^5$ 細胞/ウェルの密度で、 $100 \mu l$ 細胞を2mLの96ウェルアッセイプロックに入れ、室温で15分間インキュベートした。インキュベーション中、結合抗体、抗ICOS(H2L5h IgG4PE)またはIgG4アイソタイプ対照抗体のタイトレ

50

ーションは $2 \times$ 濃度として調製した。F c R ブロックのインキュベーション後、ウェル当たり $100 \mu l$ の2倍濃縮結合抗体を、ウェル当たり $100 \mu l$ のF c 遮断T細胞に加えて最終 $1 \times$ 濃度の抗 I C O S (H 2 L 5 h Ig G 4 P E ) 抗体または終濃度 0 . 0 0 1 2 8 ~  $100 \mu g / mL$  のI g G 4 アイソタイプ対照抗体とした。細胞を室温で20分間抗体とともにインキュベートした。結合インキュベーションの後、室温にて $400 \times g$ で5分間遠心分離しつつ、細胞を $1 mL$  のF A C S バッファーで2回洗浄した。

## 【0388】

抗 I C O S (H 2 L 5 h Ig G 4 P E ) 結合後のナイープまたは活性化T細胞の染色：  
細胞をフローサイトメトリーのために以下のカクテルで染色した：

## 【0389】

染色カクテル：

## 【表10】

抗体	ウェル当たりの容量( $\mu l$ )	110に対する容量( $\mu l$ )
PE マウス抗ヒト CD4	5	550
APC マウス抗ヒト CD8	5	550
FITC ヤギ抗ヒト IgGκ 軽鎖	10	1100

## 【0390】

アイソタイプカクテル：

## 【表11】

抗体	ウェル当たりの容量( $\mu l$ )	110に対する容量( $\mu l$ )
PE マウス抗ヒト CD4	5	550
APC マウス抗ヒト CD8	5	550
FITC IgG1, κ アイソタイプ対照	10	1100

## 【0391】

ナイープ型または活性化型のF c 遮断T細胞を、H 2 L 5 h Ig G 4 P E または対照抗体を伴う結合インキュベーションの後に、 $80 \mu l$  のF A C S バッファーに再懸濁させた。ウェル当たり $20 \mu l$  の染色カクテルまたはアイソタイプカクテルを各ウェルに加えた。細胞を暗所、室温で20分間染色した。染色インキュベーション後、室温にて $400 \times g$ で5分間遠心分離しつつ、細胞を $1 mL$  のF A C S バッファーで2回洗浄した。

## 【0392】

染色細胞の固定：

細胞を $500 \mu l$  の1%ホルムアルデヒド(  $10 mL$  の16倍濃縮ホルムアルデヒド +  $150 mL$  の1倍P B S)に再懸濁させ、室温で20分間インキュベートした。次に、室温にて $400 \times g$ で5分間遠心分離しつつ、細胞を $1 mL$  のF A C S バッファーで2回洗浄した。その後、ペレットを $265 \mu l$  のF A C S バッファーに再懸濁させ、96ウェル丸底プレートに移した。フローサイトメトリーによる分析まで、細胞を暗所にて4°で保存した。

## 【0393】

フローサイトメトリー：

フローサイトメトリーは、F A C S F o r t e s s a X 2 0 またはF A C S C a n t o I I のいずれかで、F A C S D i v a ソフトウェア(バージョン8 . 0)を用いて行った。補正は、単一の染色e B i o s c i e n c e U l t r a c o m p ビーズとF A C S D i v a s の補正ソフトウェアを用いて、取得の時点で行った。

## 【0394】

データ分析

データの取得および補正は、B D D i v a (バージョン8 . 0)ソフトウェアを用い、B D F A C S 装置、L S R F o r t e s s a X - 2 0 またはF A C S C a n t o I I で行った。データ分析では、F l o w J o ソフトウェア(バージョン10 . 0)を用いた。

10

20

30

40

50

. 8 r 1 ) を使用した。結果は、MFI ( 中央蛍光強度 ) および全生細胞または適当な親集団の外側のヒト IgG 軽鎖 FITC 染色陽性の細胞のパーセントの両方として報告する。EC50 は、グラフパッド・プリズム5ソフトウエア ( バージョン 5.04 ) を、4 パラメーターの変化する傾き ( log ( アゴニスト ) 対応答 - - 変化する傾き ) を用いる変換データの非線形回帰 (  $X = \log ( X )$  ) とともに使用して決定した。

### 【 0 3 9 5 】

#### 結果

Rosette Sep CD3 濃縮キットまたは Dynabead Untouched edT 細胞単離キットのいずれかを用いた新鮮な全ヒト血液からの T 細胞の単離は、抗 CD3 Pe Cy7 を用いた染色によって確認した。ドナーは CD3 細胞に対して 68 % ~ 97 % 陽性の間の範囲にあった。抗 CD3 / 抗 CD28 活性化 CD4 + および CD8 + 細胞集団からは、抗ヒト IgG1 軽鎖 FITC 染色に関して評価した場合、 H2L5hIgG4PE 濃度依存曲線が得られた。 H2L5hIgG4PE 結合曲線を抗ヒト IgG1 軽鎖 FITC 陽性パーセントと FITC 中央蛍光強度 ( MFI ) の両方として表す。 IgG4 アイソタイプ対照抗体とともにインキュベートした T 細胞からは、抗ヒト IgG1 軽鎖 FITC 染色に関して評価した場合、濃度依存曲線は得られなかった。ナイーブ CD4 + または CD8 + 細胞から完全な曲線は得られなかつたが、 0.1 μg / mL ~ 100 μg / mL で濃度依存的増加が見られた。

### 【 0 3 9 6 】

中央 ( 範囲 ) EC50 値は、それぞれ CD4 + FITC MFI の場合には 1.04 μg / mL ( 0.628 ~ 1.31 μg / mL ) 、 CD8 + FITC MFI の場合には 0.652 μg / mL ( 0.27 ~ 0.74 μg / mL ) であった。中央 ( 範囲 ) EC50 値は、 CD4 + IgG 軽鎖 FITC 陽性パーセントの場合には 0.834 μg / mL ( 0.45 ~ 0.965 μg / mL ) 、 CD8 + IgG 軽鎖 FITC パーセントの場合には 0.583 μg / mL ( 0.371 ~ 1.23 μg / mL ) であった ( 表 10 ) 。

### 【 0 3 9 7 】

#### 【表 12】

表 10: 活性化ヒト T 細胞に対する 422 H2L5 hIgG4PE 結合 EC50 値の概要

ドナーフィード	活性化 CD4 T cells		活性化 CD8 T cells	
	MFI	陽性パーセント	MFI	陽性パーセント
1124F36	0.628	0.45	0.564	0.619
1149M52	1.31	0.882	0.74	0.547
1173F42	0.636	0.612	0.27	0.371
1123F59	1.04	0.853	実施せず	実施せず
1141F45	1.27	0.965	実施せず	実施せず
2100M39	曲線フィットせず	0.814	曲線フィットせず	1.23
191F39	曲線フィットせず	曲線フィットせず	曲線フィットせず	曲線フィットせず
1155F49	曲線フィットせず	曲線フィットせず	実施せず	実施せず
1156F64	曲線フィットせず	曲線フィットせず	実施せず	実施せず
中央値	<b>1.04</b>	<b>0.834</b>	<b>0.652</b>	<b>0.583</b>
平均値	<b>0.977</b>	<b>0.763</b>	<b>0.525</b>	<b>0.692</b>
Std. Dev.	<b>0.331</b>	<b>0.193</b>	<b>0.237</b>	<b>0.374</b>

### 【 0 3 9 8 】

#### 考察

本研究は、 H2L5hIgG4PE ( 抗 ICOS アゴニスト抗体 ) が健康なヒトドナーからの活性化 T 細胞上の ICOS 受容体と結合することを示した。 T 紹介細胞表面への H2L5hIgG4PE の結合は、 FITC で標識されたヒト IgG 軽鎖に対する抗体

10

20

30

40

50

を用いて検出した。

【0399】

CD3+T細胞の単離の成功は、抗CD3 Pe-Cy7染色を用いたフローサイトメトリーにより確認した。10名のドナーのうち9名では、単離後に89%を超えるCD3+T細胞が得られた。しかしながら、ドナー番号2100M39では、単離後にわずか68.6%のCD3+であった。ドナー番号2100M39のT細胞の単離におけるその純度低下の原因は未知である。ドナー番号2100M39からゲーティングされたCD4+およびCD8+集団から得られたEC50値は異常であるとは思われず、まとめられた中央値に含まれた。

【0400】

ネガティブ単離されたヒトT細胞においてH2L5hIgG4PEに関する結合EC50を求めた。単離されたT細胞を1μg/mLのプレート結合CD3/CD28抗体に48時間曝すことにより活性化した際の結合曲線を作成した。統計分析では、CD4+およびCD8+活性化T細胞からのIgG 軽鎖FITC陽性細胞パーセントおよびFITC

MFIデータの両方を考慮した。中央CD4+ EC50値は、FITC陽性細胞パーセントまたはMFIとして評価した場合、それぞれ1.04および0.834 μg/mLで同等であった。中央CD8+ EC50値もまた、FITC陽性細胞パーセントまたはMFIとして評価した場合、それぞれ0.652および0.583 μg/mLで同等であった。

【0401】

IgG4 PEアイソタイプ対照とともにインキュベートしたT細胞は、使用した分析方法、すなわち、MFIまたは陽性細胞パーセントに関わらず、抗ヒトIgG 軽鎖FITC結合に濃度依存的增加をもたらさなかった。

【0402】

ナイープ型または非活性化型のネガティブ単離されたT細胞からは、試験した0.00128~100μg/mL H2L5hIgG4PEの範囲で完全な曲線は得られなかつた。しかしながら、ドナーにおいて0.1~100μg/mL H2L5hIgG4PEで結合に濃度依存的増加が見られた。EC50は、ナイープT細胞からの曲線が不完全だったので計算できなかつた。ICOSは休止中のTh17、T滤胞性ヘルパー(TFH)および制御性T(Treg)細胞では弱く発現するだけであることから、H2L5hIgG4PEは低濃度ではナイープまたは非活性化細胞に結合できないことが予想された。ICOS発現を誘導するためにはTCRの会合および活性化が必要とされる。従って、ナイープまたは非活性化細胞上で発現されるICOS受容体は極めて少なく、結果としてH2L5hIgG4PEの結合は最小である可能性がある。

【0403】

実施例8：カニクイザル用量範囲探索(DRF)試験からのTK/PD結果

標的関連種におけるH2L5hIgG4PEのin vivo特性を評価するために、カニクイザルで用量範囲探索試験を行った。この試験では、ビヒクリ对照コホートに加えて3用量水準(0.3、3および30mg/kg)を検討した。それは初回用量の14日後に2回目の用量を投与する反復用量とした。1コホートにつき男性1名と女性1名を試験した。H2L5hIgG4PEは、供試した異なる3用量でC<sub>max</sub>(μg/mL)およびAUC(μg·h/mL)において用量依存的増加を示した。3用量水準の総てで、抗体は初回投与後2週間血漿中に検出された(図12A)。抗H2L5hIgG4PE抗体は、単回投与後の3個体のサル(0.3mg/kgを投与した動物の両方ならびに3mg/kgを投与した雌)で検出された。抗H2L5hIgG4PE抗体は、これらの動物において2回目の用量の投与後の血漿濃度の低下と相関があった(図12B)。2回目の用量の48時間後に総ての動物を犠牲にし、薬力学的活性の分析および組織病理学的分析のために組織を採取した。

【0404】

H2L5hIgG4PE受容体占有率(RO)を、総ての供試動物の脾臓および腋窩

10

20

30

40

50

リンパ節由来の CD4+T 細胞において測定した。両組織において、試験した用量水準で H2L5 hIgG4PE 結合における用量依存的増加が見られた（図 13）。

#### 【0405】

供試したサルの末梢血由来の CD4+T 細胞についても受容体占有率を測定した。血液を 5 時点で（1日目（投与前）、3日目、8日目、15日目（2回目の投与前）および17日目に）採取した。このアッセイでは、RO を決定するために 2 つの異なる尺度を用いた。1つ目は、「フリー受容体」アッセイ形式であり、この場合、フローサイトメトリー検出のために使用される抗 ICOS mAb の結合が、ICOS 結合をめぐって競合することが示された H2L5 hIgG4PE の存在下または不在下で決定された。従って、FACS による抗 ICOS シグナルの不在は、H2L5 hIgG54PE 占有受容体にとってのサロゲートであり、逆に、抗 ICOS 陽性は、H2L5 hIgG4PE が結合していないかった「フリー受容体」を示した。図 14-A は、ICOS フリー受容体が、用量依存的かつ時間依存的に減少したことを示す。2 個体のサル（250 および 300）は、説明できない、また、これらのサルにおける抗 H2L5 hIgG4PE 抗体の産生によるものであり得る「フリー受容体」シグナルを示した。加えて、上記の脾臓およびリンパ節で用いたものと同じアッセイにより、末梢血 CD4+ 細胞でも RO を測定した。予想されたように、0 mg / kg の用量はこの読み出しによる RO は無いことを示した（図 14-B）。興味深いことに、一部のサルは 3.0 および 30 mg / kg の用量水準で、処置時間経過に沿って H2L5 hIgG4PE 結合 CD4+ 細胞数に時間依存的な増加を示した。特に、動物 350 は、3 日目～17 日目の間に薬物結合循環 CD4+ 細胞の増加を示した（>5 倍）（図 14-B）。CD4+ICOS+ 細胞数におけるこの増加は、この集団の H2L5 hIgG4PE により誘導される増殖によるものである可能性がある。

#### 【0406】

実施例 9：H2L5 hIgG4PE は結合に応答して細胞内シグナル伝達変化を誘導する

##### 試験準備

##### 細胞株

Ba/F3-ICOS 細胞は INSERM（パリ、フランス）から入手した。細胞を 37、加湿インキュベーター内、5% CO<sub>2</sub> 下、10% ウシ胎児血清（FBS）（Sigma-Aldrich、セントルイス、MO）、10 ng / mL 組換えマウス IL-3（R&D Systems、ミネアポリス、MN）、および 1 mg / mL ジェネティシン（Thermo Fisher、ウォールサム、MA）を添加した適当な培養培地で培養した。

#### 【0407】

##### 試験プロトコール

##### 細胞内シグナル伝達抗体アレイ

タンパク質溶解液を、PathScan（登録商標）細胞内シグナル伝達アレイキット（Cell Signaling Technologies）を製造者の説明書に従って用いてアッセイした。簡単に述べれば、IgG4-PE（20 μg / mL）または H2L5 hIgG4PE（0.2、2、または 20 μg / mL）で 1、6、24、および 48 時間処理した Ba/F3-ICOS 細胞からの溶解液を、アレイ希釈バッファーで 1 μg / μL となるように希釈し、抗体アレイ上、4 で一晩インキュベートした。アレイの画像を、Odyssey イメージングソフトウェア（LI-COR Biosciences、リンカン、NE）を用いてキャプチャーした。

#### 【0408】

##### ホスホ-AKT 酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）

AKT のリン酸化を、Meso Scale Discovery (MSD) ホスホ (Ser 473) / 全 Akt 全細胞溶解液キットおよびホスホ - Akt (Thr 308) 全細胞溶解液キットを製造者の説明書に従って用いて測定した。細胞を 96 ウエル U 底プレートに種々の濃度で接種した後、各濃度の Akt 構造を用いて、ホスホ Akt を検出した。

レート (BD Falcon) の適当な培養培地 (100 µL / ウエル) に  $0.25 \times 10^6$  細胞 / ウエルの細胞密度で播種した。細胞を、3倍希釈法 (用量範囲: 20.0 ~ 0.03 µg / mL) を用いた7種類の異なる濃度の対照抗体 (IgG4 PE)、抗ICOS IgG1 Fc無効抗体、またはH2L5 hIgG4PEのいずれかで、2反復ウェルとして、1、2、4、6、24、または48時間処理した。ホスホ-AKT (Thr308) 全細胞溶解液キットを用いる1つの試験では、細胞を、1濃度の3種類総ての抗体 (10 µg / mL) で、3反復のウェルとして処理した。各96ウェルプレートの一番下の列は細胞对照を含まず (2つのブランク2反復ウェル)、細胞は抗体で処理せずに残した。処理後、細胞を、プロテアーゼおよびホスファターゼ阻害剤を含有する30 µL の氷冷溶解バッファーで溶解し、氷上で30分間インキュベートした後、25 µL の溶解液をELISAプレートに移して4℃で一晩インキュベートした。  
10

#### 【0409】

##### データ分析

###### 細胞内シグナル伝達抗体アレイのデンシティメトリー分析

デンシティメトリー分析を行って、抗体アレイ間のスポットの積分強度レベルを算出した。各スポットの強度をそのアレイ上の陽性対照の平均値に対して正規化し (式 = サンプルウェル / 陽性対照の平均値)、グラフパッド・プリズム6.0 (ラホヤ、CA) を用いてグラフ化した。

#### 【0410】

##### MSD ELISAデータの分析

20

リンタンパク質パーセントは、以下の計算: リンタンパク質 % = ((2 × ホスホ-シグナル) / (ホスホ-シグナル + 総タンパク質シグナル)) × 100 を用い、各ウェルについて算出した。次に、この値を各時点の非処理細胞値に対して正規化し、マイクロソフト・エクセル2007で「対照%」としてグラフ化した。

#### 【0411】

##### 結果

従前の研究で、H2L5 hIgG4PE処理はBa/F3-ICOS細胞においてホスホ-AKT (S473) レベルを上昇させ、抗体暴露の30 ~ 40分後の間に最大応答が見られたことが示された。ここで、上昇したリン酸化レベルが数日後に持続していたかどうかを見るために、以後の時点でのホスホ-AKT レベルを測定した。加えて、ICOS活性化による他の細胞内シグナル伝達事象の調節も評価した。Ba/F3-ICOS細胞において、ホスホ-AKT (S473) レベルは、1時間および6時間の処理後にIgG4-PEアイソタイプ対照抗体処理細胞に比べてH2L5 hIgG4PE処理で上昇したが、この効果は24時間に失われた (図15)。興味深いことに、同様の効果が、細胞が抗体のFc領域が無効である抗ICOS抗体で処理された場合にも見られた。また、H2L5 hIgG4PEおよび抗ICOS IgG1 Fc無効抗体処理細胞でも、1時間の処理後にIgG4-PE (図15) アイソタイプ対照抗体処理細胞に比べてホスホ-AKT (Thr308) レベルの上昇が見られ、測定された最終時点であった48時間まで持続した。AKTの下流の他の2つのホスホ-タンパク質、すなわち、グリコーゲンシンターゼキナーゼ3 (GSK3) およびリボゾームタンパク質S6も、ICOS活性化時にそこそこ上昇したが、これらの効果は、ホスホ-AKTで見られたものほどロバストではなかった。また、タンパク質溶解液も、リン酸化を測定する抗体アレイまたは細胞内シグナル伝達に関する18のタンパク質の切断を用いて分析した。このアプローチを用いたところ、ホスホ-AKT (S473)、ホスホS6 (S235 / S236)、およびホスホ-SAPK/JNK (T183 / Y185) の3つのタンパク質だけが、ICOS活性化時にリン酸化に若干の増加を示した。  
30  
40

#### 【0412】

直接定量化を可能とするアッセイ形式を用いてAKTリン酸化に対する変化を測定するために、Ba/F3-ICOS細胞を、一定の用量範囲の対照抗体 (IgG4 PE)、抗ICOS IgG1 Fc無効抗体、またはH2L5 hIgG4PEで経時的に処理  
50

し、ELISAによりモニタリングした。ホスホ-AKT(S473)レベルの上昇は、抗ICOS IgG1Fc無効抗体処理細胞またはH2L5 hIgG4PE処理細胞において用量依存的でも時間依存的でもあった。従前に見られたように、最大ホスホ-AKT(S473)活性化は1時間の処理後に生じた。ホスホシグナルは2時間にやや低下し、6時間まで持続したが、結局、24時間後に失われた。ここで、ホスホ-AKT(T308)レベルを測定するELISAも試験したが、このELISAキットでは再現性のある活性化は見られなかった。

#### 【0413】

##### 考察

AKTシグナル伝達カスケードは、受容体型チロシンキナーゼ、インテグリン、BおよびT細胞受容体、サイトカイン受容体、Gタンパク質共役受容体およびPI3Kによるホスファチジルイノシトール(3,4,5)トリスホスフェート(PIP3)の産生を誘導するその他の刺激により活性化され得る[Carnero, 2008]。これらの脂質は、Aktおよびその上流アクチベーターPDK1のための原形質膜ドッキング部位として働く。膜において、PDK1は、Thr308でAKTをリン酸化してAktの部分的活性化をもたらす[Alessi, 1996]。mTORC2によるSer473でのAktのリン酸化は、完全な酵素活性を刺激する[Sarbassov, 2005]。

10

#### 【0414】

ICOSは、T細胞の生存、増殖および記憶を促進することにより活性化エフェクターおよび調節CD4+T細胞の機能に重要な役割を果たす。アゴニスト抗体によるICOSの標的化は、T細胞の活性化およびエフェクター機能の持続におけるその役割のために、抗腫瘍免疫を増強するためのもっともらしいアプローチとなり得る。この研究で、本発明者らは、H2L5 hIgG4PEによるICOSの活性化がBa/F3-ICOS細胞においてAktのリン酸化に変化をもたらしたことを見出した。続いて、Aktの下流タンパク質、例えば、GSK3(Aktの直接的基質)およびリボゾームタンパク質S6もまたリン酸化された。このデータは、このモデル系を用いて最近実施された研究と一致し、外部に公開されたデータと合致する[Fos, 2008]。

20

#### 【0415】

実施例10：ヒトPBMCアッセイにおける可溶型H2L5 hIgG4PE単独および抗PDIおよび抗CTLA-4抗体との組合せの機能的効果

30

##### 試験準備

##### 初代ヒトPBMCの単離

新鮮な血液をGSKヘルスセンターの血液ドナーから入手し、フェノールレッド不含10%RPMI1640培地で1:1希釈した。希釈した血液をUni-Sep Max 50mlコニカルチューブ中の密度媒体の上に重層し、室温にて400×gで20分間、ブレーキをオフにして遠心分離した。得られた白色单核層(バフィーコート)を100μMセルストレーナーを通して新しい50mLコニカルチューブに注意深く抽出した。このバフィーコートに等容量のフェノールレッド不含10%RPMI1640培地を加え、室温にて300×gで10分間遠心分離した。この細胞ペレットを10mlの赤血球溶解液(Sigma Aldrich)に再懸濁させ、室温で5分間インキュベートした。細胞を培地で1回洗浄し、従前に記載したように遠心分離した。容量をフェノールレッド不含10%RPMI1640培地で40mlとし、ViCellセルカウンターおよびバイアビリティアナライザー(Beckman Coulter)を用いて細胞を計数した。

40

#### 【0416】

##### 単球由来未熟樹状細胞(iDC)の誘導

ヒト単球を、プラスチック接着法を用いて単離した。簡単に述べれば、2000万個の新たに単離したPBMCを、T-75組織培養フラスコ内のAIM-V培地(Thermo Fisher)中で3時間培養した。プラスチックに結合していない細胞を洗い流した。接着単球を37、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内の1000U/mlのヒトGM-CSF(カタログ番号300-03、ProTech)および500U/mlのヒト

50

I L - 4 (カタログ番号 2 0 0 - 0 4 )を添加したA I M - V 培地中で培養した。7 ~ 10日後に、i D C 細胞を、同種異系混合リンパ球反応アッセイにおいて種々のドナー由來のT 細胞と共に培養するために採取した。

#### 【 0 4 1 7 】

##### 血液からの初代ヒトT細胞の直接的単離

ヒトT細胞を、ヒトT細胞濃縮カクテル (S t e m C e l l T e c h n o l o g i e s) を用いて、新鮮なヒト血液から直接的に単離した。R o s e t t e S e p ヒトT細胞濃縮カクテル (5 0  $\mu$  L / m L) を全血に加え、よく混合した。室温で2 0 分のインキュベーション後、等容量のP B S + 2 % F B S を穏やかに混合しながら加えた。希釀サンプルを密度媒体の上に重層し、室温にて1 2 0 0  $\times$  g で2 0 分間、ブレーキをオフにして遠心分離した。密度媒体から濃縮された細胞：血漿界面を新しいコニカルチューブに注意深く注いだ。次に、赤血球を赤血球溶解バッファー (S i g m a A l d r i c h) で溶解させ、濃縮細胞をP B S + 2 % F B S で2 回洗浄した。次に、T細胞を4 0 m l のP B S + 2 % F B S に再懸濁させ、V i - C e l l セルカウンターで計数した。

10

#### 【 0 4 1 8 】

##### 試験プロトコール

###### ヒトP B M C 前刺激アッセイ

新たに単離したヒトP B M C を、3 7 、T - 7 5 組織培養フラスコ内の、1 0 0 n g / m l のM C S F および1 0 0 I U / m l のI L - 2 (P e p r o T e c h) を添加したA I M - V 培地中、C D 3 / C D 2 8 T 細胞拡大D y n a ビーズで、1 : 2 0 のビーズ：細胞比にて前刺激した。4 8 時間後、前刺激ビーズを磁気的に除去し、細胞を洗浄し、計数し、組織培養処理を施していない9 6 ウェル丸底プレートにて、1 0 0 I U / m l のI L - 2 (P e p r o T e c h) を添加したA I M - V 培地中、抗C D 3 D y n a ビーズおよび治療用抗体で再刺激した。播種密度は1 0 0 k 細胞 / 1 0 0  $\mu$  l 培地 / ウェルであった。3 7 で3 . 5 日間インキュベートした後、M S D によるマルチプレックスサイトカイン測定のために細胞培養上清を採取した。

20

#### 【 0 4 1 9 】

##### ヒトM L R 活性化アッセイ

健康なヒトボランティアからの単球由来i D C を、異なるドナーから新たに単離したヒトT細胞と1 : 1 0 比 (i D C : T) で混合し、3 7 、A I M - V 培地中、0 . 0 2  $\mu$  g / m l のC E F T ベプチド混合物の存在下で2 4 時間、ブレインキュベートした。処理抗体の種々の群をこれらのウェルに直接加え、混合し、さらに4 日間インキュベートした。M S D 分析によるマルチプレックスサイトカイン測定のために細胞培養上清を回収した。

30

#### 【 0 4 2 0 】

##### M S D サイトカイン分析

組織培養上清におけるI F N - 、I L - 1 0 、I L - 2 およびT N F - サイトカインレベルを、M S D ヒトV - P l e x 特注キットを用いて測定した。まず、サンプルを希釀剤2で1 : 2 0 0 希釀した。キャリブレーターも、製造者の推奨に従い、希釀剤2で調製した。希釀サンプルおよびキャリブレーターを黒色M S D プレートに加えた後、粘着性プレートシールで封止し、振盪しながら室温で2 時間インキュベートした。希釀剤2で新たに調製した2 5  $\mu$  L の検出抗体溶液を各ウェルに加えた後、プレートを再封止し、振盪しながら室温でさらに2 時間インキュベートした。これらのプレートを1 5 0  $\mu$  L / ウェルのP B S + 0 . 0 5 % T w e e n - 2 0 で3 回洗浄した後、新たに希釀した1 5 0  $\mu$  l / ウェルの2倍リードバッファーを加え、すぐにM E S O Q u i c k P l e x リーダーで読み取った。データはM S D W o r k b e n c h ソフトウェアを用いて分析した。

40

#### 【 0 4 2 1 】

##### データ分析

###### M S D データ分析

M S D データを、D i s o c o v e r y W o r k b e n c h ソフトウェア (M S D、

50

バージョン 4 . 0 . 9 )で分析した。プレート特異的標準曲線を作成するために、製造者のキット内のキャリブレーターを各 M S D プレートに含め、総ての場合で  $R^2$  値は 0 . 9 9 であった。検出されたサイトカインの量を標準曲線に基づいて計算し直し、3 回の生物学的反復からの平均値および標準偏差を用いてグラフを作成した。

#### 【 0 4 2 2 】

##### 統計分析

各処理抗体の固有アイソタイプ対照の対数変換した変化倍率データに対して一元配置 A N O V A を行った。異なるドナー間の単剤療法と組合せの両方を比較するためにダネットの多重比較検定を行った。P < 0 . 0 5 を統計的に有意と見なした。

#### 【 0 4 2 3 】

##### 結果

##### P B M C 前刺激アッセイの開発および H 2 L 5 h I g G 4 P E とイピリムマブおよびペンプロリズマブとの組合せ活性の試験

前刺激の最適条件を決定するために、ヒト抗 C D 3 Dyna ビーズおよび抗 C D 3 / C D 2 8 Dyna ビーズ (Thermo Fisher) を種々のビーズ：細胞比で試験した。前刺激 4 8 時間後に、細胞を採取し、ビーズを磁気的に除去した後、抗 I C O S 抗体単独または抗 C T L A - 4 もしくは抗 P D 1 との組合せとともに抗 C D 3 Dyna ビーズ (ビーズ：細胞比 = 1 : 1 ) で刺激した。H 2 L 5 h I g G 4 P E 単剤処理は、試験した総ての前刺激条件でアイソタイプ対照と比較して、I F N - の誘導をもたらした。H 2 L 5 h I g G 4 P E により誘導された I F N - の規模は、前刺激の強度と逆相関した。H 2 L 5 h I g G 4 P E とイピリムマブの組合せは、弱く前刺激された P B M C において、H 2 L 5 H I G G 4 P E またはイピリムマブのいずれか単独に比べて、サイトカイン産生の増強を示した。この組合せ効果は、より強い前刺激条件と考えられるプレート結合型抗 C D 3 / 抗 C D 2 8 前刺激条件下では失われた。これらの結果に基づき、抗 C D 3 / 抗 C D 2 8 ビーズをビーズ：細胞比 1 : 2 0 で用いる前刺激条件を、その後の総ての P B M C アッセイのために選択した。4 名の個々のドナーからの結果を抗 C T L A - 4 組合せに関しては図 1 6 に、抗 P D - 1 との組合せに関しては図 1 7 にまとめる。

#### 【 0 4 2 4 】

##### P B M C 前刺激アッセイでの用量依存的サイトカイン誘導における H 2 L 5 h I g G 4 P E の結果

H 2 L 5 h I g G 4 P E の用量依存的活性を、1 : 2 0 の所定ビーズ：細胞比にて抗 C D 3 / 抗 C D 2 8 ビーズで前刺激したヒト P B M C において評価した。抗 R S V I g G 4 P E および抗 I C O S 4 2 2 . 2 I g G 1 F c 無効型を対照として含めた。8 濃度の H 2 L 5 H I G G 4 P E を試験した (1 0 0 、 3 0 、 1 0 、 3 、 1 、 0 . 3 、 0 . 1 、 および 0 . 0 3  $\mu$  g / m l ) 。 I F N - 、 I L - 1 0 および T N F - を、 P B M C サンプルの組織培養上清において M S D により評価した。H 2 L 5 h I g G 4 P E は用量依存的に I F N - 、 I L - 1 0 および T N F - 生産を誘導したが、アイソタイプ対照 I g G 4 または F c 無効型 4 2 2 . 2 は誘導しなかった。これらの結果を用いて、組合せ試験で使用する H 2 L 5 h I g G 4 P E の濃度を決定した。

#### 【 0 4 2 5 】

##### ヒト M L R アッセイの開発

ヒト M L R アッセイを最適化する試みにおいて、ヒト T 細胞および異なるドナー由来の单球由来未熟 D C の共培養に加えて、抗 C D 3 ビーズも、細胞のプライミングを助けるよう基礎的 T C R 刺激を提供するためにウェルに加えた。結果は、抗 C D 3 ビーズが I F N - 誘導の範囲を大幅に増大したことを示した。イピリムマブ単独もまた抗 C D 3 ビーズの不在下で I F N - 生産を誘導し得るが、H 2 L 5 h I g G 4 P E 単独または H 2 L 5 H I G G 4 P E / イピリムマブの組合せのみが、抗 C D 3 ビーズの存在下で、対応する対照を超える I F N - 生産の増強を示した。

#### 【 0 4 2 6 】

##### ヒト M L R アッセイにおける H 2 L 5 H I G G 4 P E とイピリムマブの組合せ活性

10

20

30

40

50

H2L5 h IgG4PE 単独またはイピリムマブとの組合せの免疫刺激活性を、同種異系ヒトMLRアッセイで試験し、ここでは、T細胞を、0.02 μg/ml のCETペプチドの存在下、不一致ドナー由来の単球由来未熟DCとともに1日間プレインキュベートした。H2L5 h IgG4PE / イピリムマブの組合せは、いずれかの薬剤単独に比べてIFN- $\gamma$  産生bに有意な増強をもたらした。結果は、試験下3ペアのドナーで一致したが、ドナー間で若干の変動が見られた（図18）。

#### 【0427】

##### ヒトMLRアッセイにおけるH2L5 h IgG4PEとベンプロリズマブの組合せ活性

また、H2L5 h IgG4PE とベンプロリズマブの組合せも、上記のヒト同種異系MLRアッセイで試験した。H2L5 h IgG4PE を単独で、また10 μg/ml のベンプロリズマブとの組合せで試験した。H2L5 h IgG4PE とベンプロリズマブの組合せは、いずれかの薬剤単独に比べてIFN- $\gamma$  の増大をもたらした。しかしながら、高いドナー変動と一部のドナーでの単剤抗PD-1処理の著明な活性のために統計的有意性には達しなかった（図19）。

#### 【0428】

##### 考察

ICOSは、ナイーブT細胞で弱く発現され、活性化CD4+およびCD8+T細胞では即座にアップレギュレートされる補助受容体である。ICOSのリガンドはICOS-L（B7h、B7RP-1、CD275）であり、このリガンドは、専門のAPCにより、また、TNF- $\alpha$  刺激後の末梢の上皮細胞および内皮細胞によって発現される。ICOS : ICOS-L経路は、T細胞の増殖および機能の重要な補助刺激シグナルを提供する。アゴニスト抗体によりICOSの標的化は、T細胞の活性化およびエフェクター機能の持続におけるその役割のために、抗腫瘍免疫を増強するためのもっともらしいアプローチとなり得る。

#### 【0429】

研究では、いくつかの癌モデルにおいて、イピリムマブによるCTLA-4遮断の後にICOS<sup>hi</sup> CD4+エフェクターT細胞の頻度の増加が示されている。加えて、CTLA-4遮断の際に、この細胞集団はICOS<sup>1+</sup> CD4+T細胞よりも大きいレベルのINF- $\gamma$  を産生した。実際に、ICOS+ CD4+ T細胞の頻度の増加は、癌患者におけるイピリムマブ処置の薬力学的バイオマーカーとして特定されている。研究では、野生型C57BL/6マウスにおいて、CTLA-4遮断療法後に80~90%の腫瘍退縮が起こるが、ICOSまたはICOSLノックアウトマウスでは、この有効性は50%未満まで低下したことを示した。CTLA-4遮断の有効性においてICOSが果たす重要な役割は、抗CTLA-4療法中にICOS経路を刺激すれば治療効力が増し得ることを示唆する。従って、本発明者らは、H2L5 h IgG4PEとイピリムマブの組合せ活性を評価することに着手した。

#### 【0430】

プログラム細胞死-1 (PD-1) は、2000年にもう1つの免疫チェックポイント分子であることが報告された。PD-1のリガンドの1つであるPD-L1 (B7-H1) の発現は、T細胞、上皮細胞、内皮細胞、および腫瘍細胞を含む多くの細胞種に見出すことができる。PD-1 / PD-L1軸を標的とする抗体もまた、複数の腫瘍種で臨床応答を示した。FDAは最近、癌治療のための第二世代免疫チェックポイント遮断薬としてベンプロリズマブおよびニボルマブを承認した。メルク社のベンプロリズマブは、進行性黒色腫患者で約37~38%の応答率をもたらすことが示され、続いての研究では、事前のイピリムマブの処置後に進行性疾患を有する患者において26%の前応答率が報告されている。BMSからの抗PD-1抗体であるニボルマブもまた、転移性黒色腫患者に臨床利益を示し、応答率は40%であり、1年の時点の全生存率は72.9%であることが示された。加えて、ニボルマブも、進行性または転移性非小細胞肺癌に対してFDAにより承認された。PD-1チェックポイント遮断抗体は臨床において優勢な癌免疫療法となつたので、H2L5 h IgG4PEと抗PD-1抗体の組合せをそれらの組合せ抗腫瘍活性

10

20

30

40

50

に関して評価することが重要となろう。

#### 【0431】

従前に、PBM C活性化アッセイが開発され、抗ICOSアゴニスト抗体のパネルのT細胞刺激活性を評価するために使用された。それらの研究から得られたデータは、H2L5h IgG4PEとしてIgG4PEアイソタイプを有するクローン422.2の候補選択を支持した。従前のアッセイで、PBM C細胞を1μg/mlのプレート結合型抗CD3抗体および3μg/mlの抗CD28抗体で48時間前刺激した後、それらを採取し、抗CD3と検討中であった可溶型ICOS抗体で再刺激した。H2L5h IgG4PEは、IFN- $\gamma$ 産生を用量依存的に誘導することが示された。前刺激の最適条件を決定するために、ヒト抗CD3 Dynaビーズおよび抗CD3/CD28 Dynaビーズ(Thermo Fisher)を種々のビーズ：細胞比で試験した。ビーズによる刺激はより生理学的であると考えられ、刺激の強度は、種々のビーズ：細胞比を構成することにより、より容易に制御できる。48時間の前刺激の後、細胞を採取し、ビーズを磁気的に除去した後、抗ICOS抗体単独または抗CTLA-4との組合せとともに抗CD3 Dynaビーズ(ビーズ：細胞比=1:1)で刺激した。結果は、H2L5h IgG4PE単剤処理が、試験した全ての前刺激条件で、アイソタイプ対照に比べて、IFN- $\gamma$ 誘導をもたらしたことを示した。H2L5h IgG4PEによる誘導されたIFN- $\gamma$ の規模は、前刺激の強度と逆相関した。H2L5h IgG4PEとイピリムマブの組合せは、弱く前刺激されたPBM Cにおいて、H2L5h IgG4PEまたはイピリムマブのいずれか単独に比べ、サイトカイン産生の増強を示した。この組合せ効果は、より強い前刺激条件と考えられるプレート結合型抗CD3/抗CD28前刺激条件下では失われた。これらの結果に基づき、抗CD3/抗CD28をビーズ：細胞比1:20で用いる前刺激条件を、その後の全てのPBM Cアッセイのために選択した。H2L5h IgG4PEとイピリムマブの組合せは、いずれかの抗体処理単独に比べて、IFN- $\gamma$ 産生に統計的に有意な増加を示した。10

#### 【0432】

ビーズ：細胞比を1:20に固定した抗CD3/抗CD28刺激を用いる場合のアッセイ最適化の試みにおいて、再刺激工程中に使用する抗CD3ビーズをビーズ：細胞比1:1から1:3および1:10へ漸減した。これらの結果は、再刺激強度が低いほど、H2L5h IgG4PEによるIFN- $\gamma$ 誘導が低くなることを示した。H2L5h IgG4PEとイピリムマブによるこの組合せ効果は、ビーズ：細胞比1:3および1:10での再刺激下では完全に失われた。従って、その後の全ての試験では、ビーズ：細胞比1:1での抗CD3の再刺激を維持した。20

#### 【0433】

最適化された前刺激および再刺激条件で、このアッセイを、H2L5h IgG4PEの用量応答を評価するために使用した。合計8種類の抗体濃度を試験し、それは100、30、10、3、1、0.3、0.1および0.03μg/mlであった。抗RSV IgG4PE、およびH2L5h IgG4PEのFc無効型である抗ICOS 422.2 IgG1 Fc無効型を対照として使用した。結果は、H2L5h IgG4PEはIFN- $\gamma$ 、IL-10およびTNF- $\gamma$ 産生を用量依存的に誘導したが、アイソタイプ対照IgG4またはFc無効型422.2は誘導しなかったことを示した。H2L5h IgG4PEのFc無効型は限定されたサイトカイン誘導応答を示したことは興味深く、このことは、Fc受容体の会合がH2L5h IgG4PEのT細胞作動機能に重要であることを示す。これらの結果はまた、組合せ研究のためのH2L5h IgG4PEの用量を決定するためにも使用した。30

#### 【0434】

また、H2L5h IgG4PEとチェックポイント遮断抗体の組合せ効果を評価するために、混合リンパ球反応(MLR)アッセイも開発した。MLRアッセイはex vivo細胞性免疫アッセイであり、ここでは、初代単球由来未熟樹状細胞(iDC)を、異なるドナーから単離されたT細胞と混合した。iDC細胞の表面の主要組織適合性複合体40

(MHC)分子のミスマッチが、同種異系状況でのT細胞刺激を誘導し得る。診療所では、MLRアッセイは、ドナーとレシピエントの間の組織移植片の適合性を識別するために周知である。

#### 【0435】

MLRアッセイを開発するために、新鮮なヒト単球を、ヒト組換えGM-CSFおよびIL-4を添加した培地の中で1週間培養し、未熟DC表現型を誘導した。次に、異なるドナーからの新鮮なヒトT細胞を単離し、iDC細胞と10:1比(T:iDC)で混合した。H2L5hIgG4PEおよびイピリムマブ単剤療法または組合せ処置を、抗CD3ビーズの存在下または不在下でT細胞/iDC共培養物に加えた。抗CD3ビーズの目的は、T細胞のプライミングを助けるために基礎的TCR刺激を提供することであった。結果は、抗CD3ビーズがこのアッセイにおいてIFN- $\gamma$ 誘導の範囲を大幅に増大したことを示した。イピリムマブ単独は抗CD3ビーズの不在下でIFN- $\gamma$ 産生を誘導し得るが、H2L5hIgG4PE単独またはH2L5hIgG4PE/イピリムマブの組合せは、抗CD3ビーズの存在下で、対応する対照を超えるIFN- $\gamma$ 産生の増強を示した。この結果は、このアッセイで、DC細胞単独によるTCR刺激は、PBM Cから新たに単離された休止中のT細胞の表面にICOS発現を誘導するには十分でない可能性があることを示唆する。この状況を改善するために、24時間のiDCおよびT細胞プレインキュベーション工程を、治療抗体の添加の前に加えた。また、T細胞をより良くプライミングするため、および抗原特異的応答を惹起するためにアッセイ手順にCETペプチドミックスも加えた。CETペプチドプールは、ヒトサイトメガロウイルス(HHV-5; CMV)、エプスタイン-バウイルス(HHV-4; EBV)、A型インフルエンザおよび破傷風菌(Clostridium tetani)由来の定義されたHLAクラスIおよびII拘束T細胞エピトープから選択される27のペプチドからなる。インフルエンザおよび破傷風菌に対する高いワクチン接種頻度ならびに一般集団におけるCMVおよびEBVの高い有病率を考慮すれば、ヒトサンプルの大多数にリコール抗原応答が期待された。これらの結果は、T細胞がiDC細胞とともに24時間プレインキュベートされた場合にIFN- $\gamma$ 産生の増大が見られ、また、IFN- $\gamma$ 産生は共培養系にCETペプチドが添加された場合にさらに増大したことを示した。

H2L5hIgG4PE単独またはイピリムマブとの組合せの免疫刺激活性を同種異系ヒトMLRアッセイで試験し、ここでは、T細胞を、0.02 $\mu$ g/mlのCETペプチドの存在下で不一致ドナーからの単球由来未熟DCとともに1日間プレインキュベートした。H2L5hIgG4PE/イピリムマブの組合せは、いずれかの薬剤単独に比べて、IFN- $\gamma$ 産生に有意な増強をもたらした。これらの結果は、3ペアのドナーで一致したが、ドナー間で若干の変動が見られた。

#### 【0436】

同様に、H2L5hIgG4PEとペンプロリズマブの組合せも、上記のヒト同種異系MLRアッセイで試験した。H2L5hIgG4PEは、単独で、また、および10 $\mu$ g/mlのペンプロリズマブとの組合せで試験した。H2L5hIgG4PEとペンプロリズマブの組合せは、いずれかの薬剤単独に比べてIFN- $\gamma$ の増大をもたらした。しかしながら、高いドナー変動と一部のドナーでの単剤抗PD-1処理の著明な活性のために統計的有意性には達しなかった。

#### 【0437】

要約すると、これらの試験は、2つのヒト免疫細胞に基づくアッセイにおいて単剤療法と比べた場合、H2L5hIgG4PEと2つのFDA承認チェックポイント阻害剤、イピリムマブおよびペンプロリズマブとの、より優れた組合せ活性を示した。ここに報告される試験において、H2L5hIgG4PEは、生産的抗腫瘍免疫応答の特徴であるT細胞の活性化およびT<sub>H</sub>1偏向(例えば、IFN- $\gamma$ 産生)を促進することが示された。

#### 【0438】

実施例11: in vivoにおけるH2L5hIgG4PE単独ならびに抗PD-1および抗CTLA-4抗体との組合せの機能活性  
ヒトPBM Cマウス腫瘍モデル

10

20

30

40

50

方法試験準備

動物に関する総ての手順は、試験プロトコールの開始前に GSK 所内動物実験委員会(GSK Institutional Animal Care and Use Committee)によって審査および承認された。

## 【0439】

細胞株の調製 :

A2058はATCCプロトコールに従って増殖させた。

## 【0440】

材料 :

- ・ A2058ヒト黒色腫細胞株 : ATCC、カタログ番号 CRL - 11147、ロット番号 59349362 10
- ・ D P B S : ATCC、カタログ番号 30 - 2200、ロット番号 63357436
- ・ ダルベッコの改変イーグル培地 : ATCC、カタログ番号 30 - 2002、ロット番号 62596471 有効期限 : 2015年10月
- ・ ウシ胎児血清 : Sigma - Aldrich、カタログ番号 12176c - 1000mL、ロット番号 13G180R0H1、有効期限 : 2018年7月
- ・ 0.25% (w/v) トリプシン - 0.53 mM EDTA : ATCC、カタログ番号 30 - 2102、ロット番号 62420300
- ・ 抗生物質 - 抗真菌剤 (100X) : Life Technologies、カタログ番号 15240 - 062 20
- ・ T175細胞培養フラスコ : Greiner bio-one、カタログ番号 661175
- ・ T75細胞培養フラスコ : Greiner bio-one、カタログ番号 658175

## 【0441】

培地 :

- ・ A2058完全増殖培地 : ダルベッコの改変イーグル培地 + 10% FBS。培養条件 : 露囲気 : 空気、95% ; 5% 二酸化炭素 (CO<sub>2</sub>) ; 温度 : 37
- ・ 細胞の受領時 :
- ・ 37 の予温完全培地。 30
- ・ 細胞を 37 の湯浴中で急速解凍。チューブを 70% エタノールで拭き、予温完全培地を満たした 15 mL チューブに細胞を移す。
- ・ 1200 rpm で 5 分間遠心分離して細胞ペレットを回収する。
- ・ 予温完全培地を満たした T75 フラスコに細胞を戻し、37 でインキュベートする。

## 【0442】

細胞の継代培養 :

- ・ 容量を 75 cm<sup>2</sup> フラスコ向けとする (T175 cm<sup>2</sup> フラスコに対して、比例的に必要とされる解離および培養培地の量を調整する)。
- ・ 培養培地を取り出し、廃棄する。
- ・ 簡単に述べれば、細胞層を D P B S ですすいで、トリプシン阻害剤を含有する総ての血清痕跡を除去する。 40
- ・ 2.0 ~ 3.0 mL のトリプシン - EDTA 溶液をフラスコに加え、細胞層が分散するまで (2 ~ 3 分) 倒立顕微鏡下で細胞を観察する。
- ・ 注 : 細胞が剥離するまで待つ間、フラスコが当たったりフラスコを振ったりすることで塊状物が細胞をかき回さないようにする。剥離困難な細胞は分散を助けるために 37 に置いててもよい。
- ・ 10 mL の完全増殖培地および穏やかなピペット操作による吸引細胞を加える。
- ・ 1200 rpm で 5 分間遠心分離し、細胞ペレットを回収し、10 mL の完全増殖培地を加える。
- ・ 細胞懸濁液の適当なアリコートを新しい培養容器に加える。37 で培養物をインキュ 50

ペートする。

- ・培地の更新：2～3日ごと。

#### 【0443】

##### マウス接種のための腫瘍細胞の調製：

- ・細胞を1×D P B Sで洗浄し、3m1 1×トリプシンを2～3分加える。
- ・組織培養フード内で、完全増殖培地を加え、細胞懸濁液を無菌コニカル遠沈管に回収する。
- ・細胞を1200r p mで5分間遠心分離し、細胞ペレットを得る。
- ・細胞を1×D P B S溶液で洗浄し、1200r p mで5分間遠心分離し、細胞ペレットを得る。この洗浄を2回繰り返す。
- ・細胞数および生存判定用の血球算定器で細胞を計数する。
- ・細胞を氷冷P B SにIn V i v o接種のための濃度(A 2 0 5 8、2.5e7 / m l、2.5e6 / 100 μl / マウス)で再懸濁させる。

#### 【0444】

##### N S Gマウスへの腫瘍細胞株の接種

###### 材料：

- ・マウス：N O D . C g - P r k d c s c i d I l 2 r g t m 1 W j l / S z J 。J a ckson Laboratory Stock : 0 0 5 5 5 7 雌 齢：6週
- ・Attached Needle 2 5 G 5 / 8 を備えた1mLツベルクリンシリンジ : B e c t o n D i c k i n s o n 、カタログ番号3 0 5 5 5 4
- ・P D I (商標) A l c o h o l P r e p P a d s : P r o f e s s i o n a l D i s p o s a b l e s 、カタログ番号B 3 3 9
- ・P D I (商標) P o v i d o n e - I o d i n e P r e p P a d : P r o f e s s i o n a l D i s p o s a b l e s
- ・カタログ番号B 4 0 6 0 0
- ・マウスの準備
- ・マウスは6週齢とする。
- ・マウスの到着後、3～5日の馴化期間を設ける。
- ・マウスの右後方側腹部を剃毛する。

#### 【0445】

##### 注射の準備

- ・マウスの接種領域をヨウ素パッド、次いで、エタノールパッドで清浄化および消毒する。
- ・1ccシリンジおよび25ゲージ針を使用する。
- ・プランジャーを抜き、細胞を混合し、100 μlの細胞をシリンジに入れ、プランジャーを注意深く挿入する。
- ・細胞をマウスの右後方側腹部の皮下に(s. c.)注射する。
- ・腫瘍増殖評価
- ・腫瘍を測定するために、腫瘍辺縁を容易に見出せるように柔毛を70%エタノールで湿らせる。腫瘍サイズおよび体重を2～3日ごとに測定する。
- ・腫瘍サイズをデジタルカリパスで測定し、体積を以下のように決定する：腫瘍体積(m m 3 ) = (長さ) × (幅)<sup>2</sup> / 2
- ・ヒトP B M Cの静脈内投与
- ・ヒトP B M C投与は、腫瘍が平均体積およそ100mm<sup>3</sup>に達した際の1週間後に開始できる。

#### 【0446】

###### 材料：

- ・新鮮なヒトP B M C : A l l c e l l s 、カタログ番号C - P B 1 0 2 - 3 B 2
- ・Attached Needle 2 5 G 5 / 8 を備えた1mLツベルクリンシリンジ : B e c t o n D i c k i n s o n 、カタログ番号3 0 5 5 5 4

10

20

30

40

50

- ・ P D I (商標) A l c o h o l P r e p P a d s : P r o f e s s i o n a l D i s p o s a b l e s、カタログ番号 B 3 3 9
  - ・ P D I (商標) P o v i d o n e - I o d i n e P r e p P a d : P r o f e s s i o n a l D i s p o s a b l e s、カタログ番号 B 4 0 6 0 0
  - ・ ガーゼスポンジ: C o v i d i e n、カタログ番号 4 4 1 2 1 1
  - ・ マウス・テール・イルミネーター・レストレーナー: B r a i n t r e e s c i e n t i f i c、カタログ番号 M T I S T D
  - ・ P B M C の調製
  - ・ 新鮮なヒトP B M Cは、一晩の輸送により A l l c e l l s から購入する。
  - ・ 細胞を 1 4 0 0 r p m で 5 分間遠心分離し、細胞ペレットを得る。 10
  - ・ 細胞を 1 × D P B S 溶液で洗浄し、1 4 0 0 r p m で 5 分間遠心分離し、細胞ペレットを得る。
  - ・ 細胞を氷冷 P B S に I n V i v o 注射のための濃度 ( 2 0 e 7 / m l ) で再懸濁させる。
  - ・ 1 c c シリンジおよび 2 5 ゲージ針を使用する。
  - ・ プランジャーを抜き、細胞を混合し、1 0 0 μ l の細胞をシリンジに入れ、プランジャーを注意深く挿入する。
  - ・ 細胞を氷上で維持する。
  - ・ 尾静脈注射
  - ・ マウスを白熱灯で温める。 20
  - ・ マウスをテール・イルミネーター・レストレーナーで拘束する。
  - ・ 静脈を可視化するために尾をやや回転させる。
  - ・ 注射部位をヨウ素パッド、次いで、エタノールパッドで清浄化および消毒する。
  - ・ 針をやや角度をもって静脈に挿入し、細胞を注入する。
  - ・ 針を抜き、出血が止まるまでガーゼスポンジで軽く圧迫する。
  - ・ 動物をケージに戻し、出血が再開していないことを確認するために 5 ~ 1 0 分間観察する。
- 【 0 4 4 7 】**
- 治療抗体の投与
- ・ ヒトP B M C 注射の 1 ~ 3 日後に、マウスに腹腔内注射により抗体を投与する。 30
- 【 0 4 4 8 】**
- 材料 :
- ・ 完全ヒトI g G 1 アイソタイプ対照: E u r e k a t h e r a p e u t i c s、カタログ番号 E T - 9 0 1 (前臨床グレード) ロット番号 1 5 - 7 2 6 有効期限: 2 0 1 7 年 2 月
  - ・ イピリムマブ(ヤーボイ): B r i s t o l - M y e r s S q u i b b N D C 0 0 0 3 - 2 3 2 7 - 1 1、ロット番号 9 2 1 8 7 3 有効期限: 2 0 1 5 年 4 月; ロット番号 4 H 6 9 4 9 0、有効期限: 2 0 1 6 年 5 月
  - ・ 完全ヒトI g G 4 アイソタイプ対照: E u r e k a t h e r a p e u t i c s、カタログ番号 E T - 9 0 4 (前臨床グレード) ロット番号 1 5 - 7 2 6 有効期限: 2 0 1 7 年 2 月 40
  - ・ 抗ヒトI C O S H 2 L 5 h I g G 4 P E
  - ・ ペンブロリズマブ(キートルーダ): M e r c k、N D C 0 0 0 6 - 3 0 2 6 - 0 2
  - 、ロット番号 L 0 1 0 5 9 2、有効期限: 2 0 1 6 年 4 月 2 6 日
  - ・ 腹腔内注射 :
  - ・ 投与する 1 0 0 μ l をシリンジおよびニードルに吸い取る。
  - ・ 針のベベルをシリンジ上の数字に揃える。
  - ・ 利き腕でない手で動物を十分に拘束する。
  - ・ 針の侵入点: 膝のすぐ上の腹部を横切る仮想線を描き、この線に沿って動物の右側の正中付近に針を挿入する。これが雌の場合には、侵入点は最後の乳頭の頭側、やや中央より 50

であることが分かるであろう。

・マウスは、頭部がその後方末端より低くなるように、頭部がやや地面に向かうように傾斜させる。

・腹部に約30°の角度で針を挿入する。

・針のシャフトは約5ミリの深さまで侵入すべきである。

・注射後、針を抜き、マウスをケージに戻す。

・血液および腫瘍のサンプリング

・材料：

・Microvette CB300(血清) : Braintree Scientific  
10  
・Microvette CB300(血液学/カリウムEDTA) : Braintre

e Scientific、カタログ番号MV-CB30016444

・血液：

・マウスは、週1回、尾静脈採血した。

・30μlの血液をフローサイトメトリー分析用にMicrovette CB300(血液学/カリウムEDTA)に採取した。

・さらに30μlの血液を血清用Microvette CB300に採取し、室温で2時間インキュベートして凝固させた後、血清を採取するために2000×gで遠心分離した。血清はさらなる分析まで-20で保存した。

【0449】

20

腫瘍：

・腫瘍サイズが2000mm<sup>3</sup>に達した際にマウスを安楽死させた。腫瘍を回収し、以下の手順で処理した。

【0450】

試験計画

試験は総て、上記に列挙された手順に従って準備した。

【0451】

H2L5 h IgG4PE用量応答

本試験は、A2058黒色腫を移植したヒトPBM C移植NSGマウスにおけるH2L  
5h IgG4PEの用量依存的活性を決定するように計画された。1群当たりマウス10  
個体の9群とマウス7個体の1つの対照群(腫瘍のみでPBM C無し)を各試験に割り付  
けた。ドナー番号7129由来のヒトPBM Cを用いた用量応答の処置計画の概要を表1  
1に示す。H2L5h IgG4PEは0.04、0.4、1.2および4mg/kgで投  
与した。イピリムマブは3mg/kgで投与し、抗ICOSアゴニストのFc無効変異体  
は1mg/kgで試験した。試験群をビヒクリおよびマッチするアイソタイプ対照群と比  
較して評価した。生存分析は49日目の試験の終了時に行った。

【0452】

30

## 【表 1 3】

表 11: マウスにおける H2L5 hIgG4PE 用量応答に関する処置計画の概要

群	処置 1	処置 2	マウス数/群	投与
1	腫瘍+ huPBMC (ドナー番号 7129)	ビヒクル	10	週 2 回 3 週間
2	腫瘍+ huPBMC (ドナー番号 7129)	ヒト IgG1 アイソトープ (3mg/kg)	10	週 2 回 3 週間
3	腫瘍+ huPBMC (ドナー番号 7129)	イピリムマブ(3mg/kg)	10	週 2 回 3 週間
4	腫瘍+ huPBMC (ドナー番号 7129)	ヒト IgG4 (4 mg/kg)	10	週 2 回 3 週間
5	腫瘍+ huPBMC (ドナー番号 7129)	H2L5 hIgG4PE (0.04 mg/kg)	10	週 2 回 3 週間
6	腫瘍+ huPBMC (ドナー番号 7129)	H2L5 hIgG4PE (0.4 mg/kg)	10	週 2 回 3 週間
7	腫瘍+ huPBMC (ドナー番号 7129)	H2L5 hIgG4PE (1.2 mg/kg)	10	週 2 回 3 週間
8	腫瘍+ huPBMC (ドナー番号 7129)	H2L5 hIgG4PE (4 mg/kg)	10	週 2 回 3 週間
9	腫瘍+ huPBMC (ドナー番号 7129)	ICOS-Fc 無効 (1mg/kg)	10	週 2 回 3 週間
10	腫瘍(PBMC 無し) (ドナー番号 7129)	非処置	7	週 2 回 3 週間

## 【 0 4 5 3】

H 2 L 5 h I g G 4 P E をイピリムマブおよびペンプロリズマブと組み合わせて用いた場合の有効性および薬力学的 ( P D ) 活性試験

試験の目的 :

H 2 L 5 h I g G 4 P E 単剤療法の抗腫瘍活性を評価するために、0 . 0 4 m g / k g および 0 . 4 m g / k g で投与した。

## 【 0 4 5 4】

H 2 L 5 h I g G 4 P E の抗腫瘍活性を評価するために、マッチするアイソタイプ対照を用い、イピリムマブまたはペンプロリズマブと組み合わせて投与した。

## 【 0 4 5 5】

H 2 L 5 h I g G 4 P E の以降の薬力学的活性試験のための組織回収。各群マウス 1 0 個体の合計 2 2 の処置群をこの試験に割り付けた。群 1 ~ 1 6 は有効性コホートとし、1 7 ~ 2 2 は薬力学的活性コホートとした。

## 【 0 4 5 6】

組合せ処置については、H 2 L 5 h I g G 4 P E ( 0 . 0 4 もしくは 0 . 4 m g / k g ) とイピリムマブもしくは IgG1 ( 3 m g / k g ) または H 2 L 5 h I g G 4 P E ( 0 . 0 4 もしくは 0 . 4 m g / k g ) とペンプロリズマブもしくは IgG4 ( 5 m g / k g ) を投与した。H 2 L 5 h I g G 4 P E とイピリムマブならびにマッチするアイソタイプ対照は週 2 回 6 用量を投与し、ペンプロリズマブおよびアイソタイプ対照は、H 2 L 5 h I g G 4 P E 投与の終了まで 5 日ごとに投与した。薬力学的組織採取コホートについては、H 2 L 5 h I g G 4 P E を 0 . 0 0 4 、 0 . 0 4 、 0 . 4 および 1 . 2 m g / k g で投与した。処置群をビヒクル群およびアイソタイプ対照群と比較して評価した。ドナー番号 6 7 1 1 由来のヒト PBMC を用いた、ビヒクル、アイソタイプおよび H 2 L 5 h I g G 4 P E 単独およびイピリムマブおよびペンプロリズマブとの組合せの処置群を表 1 2 に示す。分析は、5 9 日目の試験の終了時に結論付けた。

## 【 0 4 5 7】

【表 1 4】

表 12: A2058 黒色腫モデルにおけるマウスの処置群

群	処置 1	処置 2	マウス 数/群	投与
1	腫瘍+ huPBMC (ドナー番号 6711)	ビヒ クル	10	週 2 回 6 用量
2	腫瘍+ huPBMC (ドナー番号 6711)	アイソタイプ対照(IgG1 3mg/kg + IgG4 5mg/kg)	10	IgG1 週 2 回 6 用量 IgG4 ICOS 投与の終了まで 5 日ごと
3	腫瘍+ huPBMC (ドナー番号 6711)	イピリムマブ 3mg/kg + IgG4 5mg/kg	10	週 2 回 6 用量 IgG4 ICOS 投与の終了まで 5 日ごと
4	腫瘍+ huPBMC (ドナー番号 6711)	ペンプロリズマブ 5mg/kg + IgG1 3mg/kg	10	IgG1 週 2 回 6 用量 ペンプロリズマブ ICOS 投与の終了まで 5 日ごと
5	腫瘍+ huPBMC (ドナー番号 6711)	H2L5 hIgG4PE 0.04 mg/kg + IgG1 3mg/kg	10	IgG1 および ICOS 週 2 回 6 用量
6	腫瘍+ huPBMC (ドナー番号 6711)	H2L5 hIgG4PE 0.4 mg/kg + IgG1 3mg/kg	10	IgG1 および ICOS 週 2 回 6 用量
7	腫瘍+ huPBMC (ドナー番号 6711)	イピリムマブ 3mg/kg + ペンブ ロリズマブ 5mg/kg	10	イピリムマブ 週 2 回 6 用量 ペンプロリズマブ ICOS 投与の終了まで 5 日ごと
8	腫瘍+ huPBMC (ドナー番号 6711)	H2L5 hIgG4PE 0.04 mg/kg + イピリムマブ 3mg/kg	10	イピリムマブ および ICOS 週 2 回 6 用量
9	腫瘍+ huPBMC (ドナー番号	H2L5 hIgG4PE 0.4 mg/kg + イピ リムマブ 3mg/kg	10	イピリムマブ および ICOS 週 2 回 6 用量

10

20

表 12: A2058 黒色腫モデルにおけるマウスの処置群

群	処置 1	処置 2	マウス 数/群	投与
	6711)			
10	腫瘍+ huPBMC (ドナー番号 6711)	H2L5 hIgG4PE 0.04 mg/kg +ペン ブロリズマブ 5mg/kg	10	ICOS 週 2 回 6 用量 ペンブロリズマブ ICOS 投与の終了まで 5 日ごと
11	腫瘍+ huPBMC (ドナー番号 6711)	H2L5 hIgG4PE 0.4 mg/kg +ペン ブロリズマブ 5mg/kg	10	ICOS 週 2 回 6 用量 ペンブロリズマブ ICOS 投与の終了まで 5 日ごと e
12	腫瘍+ huPBMC (ドナー番号 6711)	IgG4 5mg/kg	10	週 2 回 6 用量
13	腫瘍+ huPBMC (ドナー番号 6711)	ペンブロリズマブ 2.5mg/kg	10	ペンブロリズマブ ICOS 投与の終了まで 5 日ごと
14	腫瘍+ huPBMC (ドナー番号 6711)	ペンブロリズマブ 5mg/kg	10	ペンブロリズマブ ICOS 投与の終了まで 5 日ごと
15	腫瘍+ huPBMC (ドナー番号 6711)	H2L5 hIgG4PE 0.4 mg/kg	10	ICOS 週 2 回 6 用量
16	腫瘍+ huPBMC (ドナー番号 6711)	H2L5 hIgG4PE 0.4 mg/kg +ペン ブロリズマブ 5mg/kg+Ipi	10	ICOS 週 2 回 6 用量ペンブロリズマブ ICOS 投与の終了まで 5 日ごと
17	腫瘍+ huPBMC (ドナー番号 6711)	ビヒクル	10	薬力学的活性のために週 2 回、2 回目の 投与の 24 時間後にマウス 5 個体を採取、 および 4 回目の投与後の 24 時間後にマウ ス 5 個体を採取
18	腫瘍+ huPBMC (ドナー番号 6711)	アイソタイプ対照 (IgG4) 1.2 mg/kg	10	薬力学的活性のために週 2 回、2 回目の 投与の 24 時間後にマウス 5 個体を採取、 および 4 回目の投与後の 24 時間後にマウ ス 5 個体を採取
19	腫瘍+ huPBMC (ドナー番号 6711)	H2L5 hIgG4PE 0.004 mg/kg	10	薬力学的活性のために週 2 回、2 回目の 投与の 24 時間後にマウス 5 個体を採取、 および 4 回目の投与後の 24 時間後にマウ ス 5 個体を採取
20	腫瘍+ huPBMC (ドナー番号 6711)	H2L5 hIgG4PE 0.04 mg/kg	10	薬力学的活性のために週 2 回、2 回目の 投与の 24 時間後にマウス 5 個体を採取、 および 4 回目の投与後の 24 時間後にマウ ス 5 個体を採取
21	腫瘍+ huPBMC (ドナー番号 6711)	H2L5 hIgG4PE 0.4 mg/kg	10	薬力学的活性のために週 2 回、2 回目の 投与の 24 時間後にマウス 5 個体を採取、 および 4 回目の投与後の 24 時間後にマウ ス 5 個体を採取
22	腫瘍+ huPBMC (ドナー番号 6711)	H2L5 hIgG4PE 1.2 mg/kg	10	薬力学的活性のために週 2 回、2 回目の 投与の 24 時間後にマウス 5 個体を採取、 および 4 回目の投与後の 24 時間後にマウ ス 5 個体を採取

## 【 0 4 5 8 】

イピリムマブまたはペンブロリズマブと組み合わせて投与した H 2 L 5 h I g G 4 P E を評価する有効性試験

この試験は、A 2 0 5 8 黒色腫モデルを用い、ヒト PBMC 移植 NSG マウスにおいて、マッチするアイソタイプ対照を用い、イピリムマブまたはペンブロリズマブと組み合わせた H 2 L 5 h I g G 4 P E (0 . 0 1 および 0 . 0 4 m g / k g で投与) の抗腫瘍有効性を評価するように計画された。1 群当たりマウス 10 個体の合計 13 群をこの試験に割り付けた。群 2 は、ヒト化 I g G 1 および I g G 4 のアイソタイプ対照を合わせたものであった。H 2 L 5 h I g G 4 P E は単剤として 0 . 0 1 m g / k g (群 1 2 ) および 0 .

10

20

30

40

50

0.4 mg / kg (群13)で投与した。組合せ処置については、H2L5h IgG4PE (0.01および0.04 mg / kg)とイピリムマブまたはIgG1 (3 mg / kg)またはH2L5h IgG4PE (0.01および0.04 mg / kg)とペンプロリズマブまたはIgG4 (5 mg / kg)を投与した。H2L5h IgG4PEおよびイピリムマブならびにマッチするアイソタイプ対照は、週2回6用量を投与し、ペンプロリズマブおよびアイソタイプ対照は、H2L5h IgG4PE投与の終了まで5日ごとに投与した。ドナー番号4568由来のヒトPBM Cを用いた処置群の概要を表13に示す。処置群は、ビヒクル群およびアイソタイプ対照群と比較して評価した。生存分析は、33日目の試験の終了時に結論付けた。

【0459】

10

## 【表 15】

表 13: A2058 黒色腫モデルにおけるマウスの処置群

群	処置	処置 2	マウス数/群	投与
1	腫瘍+ huPBMC (ドナー一番号 4568)	ビヒ クル	10	週 2 回 6 用量
2	腫瘍+ huPBMC (ドナー一番号 4568)	アイソタイプ対照(IgG1 3mg/kg+ IgG4 5mg/kg)	10	IgG1 週 2 回 6 用量 IgG4 ICOS 投与の終了まで 5 日ごと
3	腫瘍+ huPBMC (ドナー一番号 4568)	イピリムマブ 3mg/kg + IgG4 5mg/kg	10	週 2 回 6 用量 IgG4 ICOS 投与の終了まで 5 日ごと
4	腫瘍+ huPBMC (ドナー一番号 4568)	ペンプロリズマブ 5mg/kg + IgG1 3mg/kg	10	IgG1 週 2 回 6 用量 ペンプロリズマブ ICOS 投与の終了まで 5 日ごと
5	腫瘍+ huPBMC (ドナー一番号 4568)	H2L5 hIgG4PE 0.01 mg/kg + IgG1 3mg/kg	10	IgG1 および ICOS 週 2 回 6 用量
6	腫瘍+ huPBMC (ドナー一番号 4568)	H2L5 hIgG4PE 0.04 mg/kg + IgG1 3mg/kg	10	IgG1 および ICOS 週 2 回 6 用量
7	腫瘍+ huPBMC (ドナー一番号 4568)	イピリムマブ 3mg/kg + ペンプロリズマブ 5mg/kg	10	イピリムマブ 週 2 回 6 用量 ペンプロリズマブ ICOS 投与の終了まで 5 日ごと
8	腫瘍+ huPBMC (ドナー一番号 4568)	H2L5 hIgG4PE 0.01mg/kg + イピリムマブ 3mg/kg	10	イピリムマブおよび ICOS 週 2 回 6 用量
9	腫瘍+ huPBMC (ドナー一番号 4568)	H2L5 hIgG4PE 0.04 mg/kg + イピリムマブ 3mg/kg	10	イピリムマブおよび ICOS 週 2 回 6 用量
10	腫瘍+ huPBMC (ドナー一番号 4568)	H2L5 hIgG4PE 0.01 mg/kg + ペンプロリズマブ 5mg/kg	10	ICOS 週 2 回 6 用量 ペンプロリズマブ ICOS 投与の終了まで 5 日ごと
11	腫瘍+ huPBMC (ドナー一番号 4568)	H2L5 hIgG4PE 0.04 mg/kg + ペンプロリズマブ 5mg/kg	10	ICOS 週 2 回 6 用量 ペンプロリズマブ ICOS 投与の終了まで 5 日ごと
12	腫瘍+ huPBMC (ドナー一番号 4568)	H2L5 hIgG4PE 0.01mg/kg	10	週 2 回 6 用量
13	腫瘍+ huPBMC (ドナー一番号 4568)	H2L5 hIgG4PE 0.04 mg/kg	10	週 2 回 6 用量

## 【0460】

統計分析

生存分析のイベントは、腫瘍体積  $> 2000 \text{ mm}^3$ 、腫瘍の潰瘍化、マウス体重減少  $> 20\%$ 、瀕死または死亡の発見のいずれか早いものとした。カットオフ体積までの正確な

時間は、対数腫瘍体積と2回の観察日（カットオフ体積を超えた最初の観察およびカットオフ体積の直前の一観察）の間に直線を当てはめることによって評価した。所与の時点における異なる処置群の生存確率を評価するためにカプラン・マイヤー（KM）法を行った。エンドポイントまでの中央時間およびその対応する95%信頼区間を報告した。その後、任意の2群の間でKM生存曲線が統計的に異なるかどうかをログランク検定により検定した。

#### 【0461】

各群10個体の動物が存在した最終日（すなわち、動物を安樂死させる前）からの腫瘍体積データを用いて、異なる処置群の間の腫瘍体積比較を行った。異なる処置群における分散が均等でないために、分析前に腫瘍体積を自然対数変換した。次いで、この対数転換データに対してANOVAとその後のペアワイズ比較を行った。10

#### 【0462】

腫瘍増殖および体重データをプロットするために、グラフパッド・プリズムソフトウェアを使用した。

#### 【0463】

##### 結果

##### H2L5hIgG4PE用量応答（図20A）

##### 腫瘍増殖阻害：

対照群：ヒトPBM C（ドナー7129）は、NSGマウスにおけるA2058腫瘍増殖に効果を示さなかった。ヒトPBM Cを含むまたは含まないA2058担癌マウス、ビヒクルおよびアイソタイプ対照抗体で処置したヒトPBM Cを含むA2058担癌マウスは、腫瘍を発達させ、予想通りの進行を示した（群番号1対群番号10、群番号1対群番号2、群番号1対群番号4、 $p = 1$ ）。20

#### 【0464】

3mg/kgでのイピリムマブ処置（群番号3）は、ビヒクル対照である群番号1と比べて有意な腫瘍増殖阻害（ $p < 0.03$ ）を示したが、アイソタイプ対照である群番号2と比較した場合には統計的有意性は失われた（ $p < 0.22$ ）。これは、アイソタイプ抗体が腫瘍増殖に影響を及ぼし得ることを示した。

#### 【0465】

0.4mg/kgでのH2L5hIgG4PE処置は、他の用量に比べて腫瘍増殖阻害およびマウスの生存期間の増大の傾向を示したが、それらの影響は、ビヒクルまたはアイソタイプ対照のいずれと比較しても統計的に有意でなかった。30

#### 【0466】

##### 臨床所見：

マウスにおける体重減少は試験中に見られ、試験の終了時ではおよそ20%であった。GVHDおよび腫瘍量の両方がマウスの体重の低下をもたらし得ることが報告されているが、PBM C移植が行われていない担癌マウス（群番号10）も同じ傾向を示したことから、本試験では、体重減少はA2058腫瘍により関連があると思われる。試験中に、アイソタイプ対照群を含め、複数の腫瘍で腫瘍の潰瘍化が見られた。40

#### 【0467】

##### マウスの運命：

ほとんどのマウスは、腫瘍が体積 $> 2000 \text{ mm}^3$ に達した際に除かれた。3個体のマウスは、腫瘍の潰瘍化のために安樂死させ、また3個体のマウスは、 $> 20\%$ の体重減少のために安樂死させた。9個体のマウスは、ビヒクル群の2個体、およびアイソタイプ対照群の合計3個体を含め、群間にランダムに死亡が見られた。これらの死亡は移植片対宿主病の病態モデルの感受性に帰因するものであり、ビヒクルまたはアイソタイプ対照群に比べて処置群で何のパターンも見られなかつたことから、処置に関連するものではなかつた。

#### 【0468】

##### H2L5hIgG4PEをイピリムマブおよびペンブロリズマブと組み合わせて用いた場

50

合の有効性試験腫瘍増殖阻害：

対照群：ビヒクルまたはアイソタイプ対照抗体で処理したヒトPBM Cを含むA2058担癌マウスは腫瘍を発達させ、予想通りに成長した。

## 【0469】

単剤療法：

3 mg / kgでのイピリムマブ処理とIgG4の組合せ（群番号3）は、ビヒクル対照である群番号1に比べて有意な腫瘍増殖阻害（ $p < 0.04$ ）をもたらした。しかしながら、アイソタイプ対照である群番号2と比べた場合には、この統計的有意性は失われた（ $p < 0.23$ ）。 10

## 【0470】

2.5または5 mg / kgでのペンプロリズマブ処置単独（群番号13、14）は、ビヒクルまたはアイソタイプ対照である群番号12と比べた場合に統計的有意性はないが、観察可能な腫瘍増殖阻害を示した。ビヒクル対照である群番号1と比べた場合、ペンプロリズマブとIgG1の組合せ（群番号4）は、統計的有意性はないものの観察可能な腫瘍増殖阻害を示したが、生存期間には有意な増大が見られた（ $p < 0.04$ ）。アイソタイプ対照である群番号2と比べた場合には、統計的有意性は失われた（ $p < 0.4$ ）。

## 【0471】

0.4 mg / kgでのH2L5h IgG4PE処置単独（群番号15）は、ビヒクルまたはアイソタイプ対照である群番号12に比べて統計的有意性はないが、観察可能な腫瘍増殖阻害を示した。0.04または0.4 mg / kgのH2L5h IgG4PEとIgG1の組合せ（群番号5および6）は、統計的有意性に達しなかったが、観察可能な腫瘍進行の遅延およびマウス生存期間を示した。 20

## 【0472】

組合せ処置：

H2L5h IgG4PE（0.04または0.4 mg / kg）とイピリムマブ（3 mg / kg）の組合せ。群番号8および9は、イピリムマブ単独（群番号3）に比べて付加的な腫瘍増殖阻害を示さなかった。H2L5h IgG4PE（0.04または0.4 mg / kg）とペンプロリズマブ（5 mg / kg）組合せである群番号10および11は、ペンプロリズマブ単剤療法である群番号4、またはH2L5h IgG4PE単剤療法である群番号5および6に比べて、有意ではないがそこそこの腫瘍増殖阻害およびマウス生存期間を示した。 30

## 【0473】

臨床所見：

試験中に見られたマウスの体重減少はおよそ20%であった。腫瘍の潰瘍化は、試験中、大多数の群の複数の腫瘍で明らかであった。

## 【0474】

マウスの運命：

160個体のうち合計100個体のマウスが、腫瘍体積が $> 2000 \text{ mm}^3$ に達した際に安楽死された。29個体のマウスが腫瘍の潰瘍化のために安楽死され、18個体のマウスに死亡が見られ、12個体のマウスが体重減少 $> 20\%$ のために安楽死され、1個体のマウスは瀕死として安楽死された。マウスは、アイソタイプ対照である群番号2を含め、群にわたって死亡が見られた。これらの死亡は移植片対宿主病の病態モデルの感受性に帰因し、アイソタイプ対照群に比べて処置群で何のパターンも見られなかったことから、処置に関連するものではなかった。 40

## 【0475】

イピリムマブまたはペンプロリズマブと組み合わせて投与したH2L5h IgG4PEを評価する有効性試験（図20C）腫瘍増殖遅延：

対照群：ビヒクルまたはアイソタイプ対照抗体で処理したヒトPBM Cを含むA2058

50

担癌マウスは腫瘍を発達させ、予想通りに成長した。

**【0476】**

単剤療法：

3 mg / kg のイピリムマブ処置と Ig G 4 の組合せ（群番号3）は、ビヒクル対照である群番号1に比べて、有意な腫瘍増殖阻害 ( $p < 0.02$ ) および生存期間の有意な増大 ( $p < 0.01$ ) を示した。しかしながら、アイソタイプ対照である群番号2に比べて、腫瘍増殖阻害は有意に達せず ( $p < 0.13$ )、一方、マウス生存期間の有意な増大は維持された ( $p < 0.04$ )。

**【0477】**

5 mg / kg のペンプロリズマブ処置と Ig G 1 の組合せ（群番号4）は、ビヒクルまたはアイソタイプ対照である群番号2に比べて、統計的有意性はないが腫瘍増殖阻害を示した。

**【0478】**

0.01 mg / kg または 0.04 mg / kg の H2L5h Ig G4PE 処置単独（群番号12および13）は、ビヒクル対照である群番号1に比べて有意な腫瘍増殖阻害 ( $p < 0.03$ ) を示した。0.04 mg / kg で投与した H2L5h Ig G4PE はまた、ビヒクル対照である群番号1に比べて、マウス生存期間に有意な増大 ( $p < 0.048$ ) を示した。しかしながら、アイソタイプ対照である群番号2と比べた場合には、腫瘍増殖阻害および生存期間は群番号12および13に対して統計的有意性には達しなかった。0.01 mg / kg の H2L5h Ig G4PE と Ig G 1 の組合せ（群番号5）は、ビヒクル対照である群番号1に比べて、有意な腫瘍増殖阻害 ( $p < 0.03$ ) およびマウス生存期間 ( $p < 0.03$ ) を示した。しかしながら、アイソタイプ対照である群番号2と比べた場合には、腫瘍増殖遅延および生存期間は統計的有意性に達しなかった。0.04 mg / kg の H2L5h Ig G4PE と Ig G 1 の組合せ（群番号6）は、観察可能な腫瘍増殖阻害およびマウス生存期間を示したが、統計的有意性には達しなかった。

**【0479】**

組合せ処置：

H2L5h Ig G4PE とイピリムマブの組合せ (0.01 mg / kg およびイピリムマブ 3 mg / kg ; 群番号8) は、観察可能な腫瘍増殖阻害およびマウス生存期間を示したが、統計的有意性には達し得なかった。H2L5h Ig G4PE とイピリムマブの組合せ (0.04 mg / kg およびイピリムマブ 3 mg / kg ; 群番号9) は、ビヒクル対照である群番号1またはアイソタイプ対照である群番号2に比べて ( $p < 0.02$ )、有意な腫瘍増殖阻害 ( $p < 0.00$ ) および有意なマウス生存期間の増大 ( $p < 0.04$ ) を示した。しかしながら、アイソタイプ対照と比べた場合には、生存期間は統計的有意性に達し得なかった。組合せ活性は、単剤療法イピリムマブの群番号3または H2L5h Ig G4PE 単剤療法群に比べて、有意には達しなかった。

**【0480】**

H2L5h Ig G4PE (0.01 mg / kg または 0.04 mg / kg) とペンプロリズマブ (5 mg / kg) の組合せである群番号10および11は、ビヒクル対照である群番号1と比べた場合、有意な腫瘍増殖阻害 ( $p < 0.03$ ) および有意なマウス生存期間の増大 ( $p < 0.03$ ) を示した。アイソタイプ対照である群番号2と比べた場合、0.04 mg / kg の H2L5h Ig G4PE とペンプロリズマブの組合せにおいて腫瘍増殖阻害の有意性を維持した ( $p < 0.03$ )。しかしながら、生存利益は統計的有意性に達し得なかった。この組合せは単剤療法処置群ペンプロリズマブである群番号3または H2L5h Ig G4PE である群番号5もしくは6のいずれと比べても、有意には達し得なかった。よって、H2L5h Ig G4PE とペンプロリズマブ (0.01 または 0.04 mg / kg およびペンプロリズマブ 5 mg / kg) の組合せは、腫瘍増殖阻害およびマウス生存期間の増大を示したが、アイソタイプ対照または単剤療法に比べて統計的有意性には達し得なかった。

**【0481】**

10

20

30

40

50

臨床所見：

試験中に見られたマウスの体重減少はおよそ20%であった。試験中、大多数の群に腫瘍の潰瘍化が見られた。

**【0482】**マウスの運命：

合計91個体のマウスが $> 2000 \text{ mm}^3$ の腫瘍サイズのために安楽死され、34個体のマウスが腫瘍の潰瘍化のために安楽死され、5個体のマウスに死亡が見られた。これらの死亡は、移植片対宿主病の病態モデルの感受性に帰因した。

**【0483】**考察

10

単剤療法としての、またペンプロリズマブならびにイピリムマブとの組合せとしてのH2L5 h IgG4PEの有効性を、A2058黒色腫を有するヒトPBMC移植NSGマウスモデルで評価した。ヒトPBMCが生体免疫不全NSG(NOD/SCID/IL-2R<sup>-</sup>null)マウスに静注されるこのモデルは、Hu-PBMC NSGモデルとして知られる。それは移植片対宿主病(GvHD)を誘発し、エフェクターおよびメモリ-T細胞の活性を調べるために用いられている。Hu-PBMC NSGモデルの皮下にヒト癌細胞株A2058を移植して、腫瘍増殖に対するヒト免疫療法抗体の効果を調べた。このモデルの制限には、GvHD症状の発症、体重の減少、および高頻度の腫瘍の潰瘍化が含まれ、同系マウス腫瘍モデルで可能な時間より長時間、生存期間の監視ができない。

20

**【0484】**

0.04mg/kg ~ 4mg/kgの範囲の用量でH2L5 h IgG4PEを評価する初期試験では、より下方の範囲の用量ほど小さい腫瘍増殖阻害を示すことが示された。0.04 ~ 0.4mg/kgの範囲の用量群では、腫瘍進行の遅延およびマウスの生存期間の増大が見られたが、アイソタイプ対照群と比べた場合に統計的に有意でなかった。これらの試験に基づき、2名の異なるドナー(ドナー番号4568および6711)からのPBMCグラフトを用いた2つの試験で、単独およびペンプロリズマブおよびイピリムマブとの組合せをさらに評価するために、0.04 ~ 0.4mg/kgのH2L5 h IgG4PE用量を選択した。行った2つの組合せ試験のうちの1つで、H2L5 h IgG4PE単剤療法およびペンプロリズマブとの組合せに対して低い応答が見られた。PBMCドナー4568を用いた組合せ試験(表13、図20C)は単剤療法および組合せの抗腫瘍活性を示したが、PBMCドナー6711を用いた試験(表12、図20B)は、有意な抗腫瘍効果を示さず、これは、試験間のドナーPBMCの違いの結果であった可能性があり、これは臨床で見られ得る患者応答変動を反映している。PBMCドナー4568を用いたこの第2の組合せ試験では、いずれかの薬剤単独に比べて組合せ群で腫瘍増殖阻害の増強およびマウスの生存期間の増大が見られたが、この違いは統計的に有意でなかった。しかしながら、H2L5 h IgG4PE 0.04mg/kg用量とペンプロリズマブ5mg/kgの組合せは、アイソタイプ対照群(p=0.05)に比べて、初回用量の10日後に腫瘍体積の統計的に有意な低下および生存期間の増大をもたらしたが、単剤療法はもたらさなかったことから、組合せの相乗作用が見られた。実際に、H2L5 h IgG4PEとペンプロリズマブの組合せ群のマウスの50%は33日目まで試験に残っていたが、腫瘍の潰瘍化のために除かれた4個体のマウスだけがこの組合せ群から腫瘍体積のために試験から除かれたが、ペンプロリズマブおよびアイソタイプ群では、8 ~ 9個体のマウスが試験から除かれた。

30

**【0485】**

抗PD1療法は、同位体処置コホートに比べてペンプロリズマブ処置コホートで見られた腫瘍増殖および生存期間における限定された変化に見られるように、このモデルでは統計的に有意な活性を示さなかった。イピリムマブ単剤療法は、両試験でペンプロリズマブよりもやや良好な腫瘍増殖阻害傾向を示し、応答性のPBMCドナー4568を用いた第2の組合せ試験でアイソタイプに比べて生存期間に統計的に有意な増加を示した(p=0.05)

40

50

. 0 4 )。 H 2 L 5 h I g G 4 P E 0 . 0 1 m g / k g 用量とイピリムマブ 3 m g / k g の組合せは、イピリムマブに比べて生存期間に有意な増大を示したが ( p 0 . 0 2 ) 、 H 2 L 5 h I g G 4 P E 単剤療法と比べた場合にはそうではなかった。このモデルにおいていずれかの薬剤単独に比べて H 2 L 5 h I g G 4 P E とイピリムマブの組合せでは、腫瘍体積に付加的に有意な効果は見られなかった。運命表で報告されたように、およびアイソタイプ対照群を含めて総ての処置群のマウスに死亡が見られた。これらの死亡は移植片対宿主病の病態モデルの感受性に帰因し、処置に関連するものではなかった。

#### 【 0 4 8 6 】

実施例 1 2 : i n v i v o における抗マウス I C O S アゴニスト抗体単独および抗 P D 1 および抗 C T L A - 4 抗体との組合せの機能活性

10

C T 2 6 および E M T 6 同系マウス腫瘍モデル

C T 2 6 マウス結腸癌腫マウス腫瘍モデル

#### 方法

本試験は、試験の開始前に G S K 所内動物実験委員会により承認されたプロトコール下で行われた。

#### 【 0 4 8 7 】

#### 動物

本試験では、 Harlan Sprague Dawley からの 1 6 4 個体の雌 B A L B / c マウスを使用した。マウスは、接種を受けた試験開始時に 6 ~ 8 週齢であった。

#### 【 0 4 8 8 】

#### 細胞培養および接種

20

C T - 2 6 細胞 ( A T C C : C R L - 2 6 3 8 ) ( 3 × 1 0 <sup>6</sup> 細胞 ; P - 1 1 ) のバイアル 1 本を - 1 4 0 から解凍し、 1 0 % F B S を含む R P M I に播種した。細胞を 1 0 日にわたって 3 回継代培養した。継代培養の際、トリプシン / E D T A を用いて培養フラスコからの細胞の剥離を助けた。細胞を回収し、 2 回洗浄し、 F B S 不含の R P M I に 5 × 1 0 <sup>5</sup> 細胞 / m l で再懸濁させた。マウスの右後方側腹部に 0 . 1 m l の細胞 ( 5 × 1 0 <sup>4</sup> 細胞 / マウス ) を皮下接種した。

#### 【 0 4 8 9 】

細胞回収および接種の当日に、細胞計数は Beckman Coulter Vi - c e 1 1 X R で行い、血球計により確認した。トリプシン / E D T A を用いて細胞をフラスコから剥離し、 2 回洗浄し ( 1 回目は R P M I + 1 0 % F B S で、 2 回目は R P M I のみで ) 、 1 0 m l の R P M I に再懸濁させた。 1 7 8 × 1 0 <sup>6</sup> 細胞を 2 0 m l の R P M I に回収し、生存率は 9 8 . 8 % であった。 1 . 6 8 5 m l の細胞懸濁液 ( 合計 1 5 × 1 0 <sup>6</sup> 細胞 ) を 2 8 . 3 1 5 m l の R P M I に加えた。

30

1 5 × 1 0 <sup>6</sup> 細胞 / 3 0 m l 培地 = 5 × 1 0 <sup>5</sup> 細胞 / m l 。これは 5 × 1 0 <sup>4</sup> 細胞 / 1 0 0 μ l に等しい。

#### 【 0 4 9 0 】

#### 抗体製剤および調製

投与当日に、抗体をストックソースバイアルから無菌 0 . 9 % 生理食塩水で目的の濃度に希釈した。抗 I C O S アゴニストクローン C 3 9 8 . 4 は 0 . 0 5 m g / k g および 0 . 5 m g / k g で試験した。各用量はまた、抗 P D 1 1 0 m g / k g および抗 C T L A - 4 1 m g / k g の両方とともに試験した。

40

#### 【 0 4 9 1 】

#### 試験プロトコール

#### 腫瘍のモニタリングおよび投与

0 日目にマウスに接種した。 1 1 日目に体重および腫瘍体積を測定した。マウスを腫瘍サイズに基づき 1 0 個体 / 群で、表 1 4 に示される 1 2 の試験群に無作為化した。無作為化は Study log Study Director ソフトウェアを用いて行った。試験計画チャートに基づき、無作為化日に開始して週 2 回マウスに投与を行い、合計 6 用量を継続した。投与は、 1 0 0 μ l 容量の 0 . 9 % 生理食塩水ビヒクリルで腹腔内 ( I P ) と

50

した。腫瘍体積および体重は、試験中、週3回測定した。

**【0492】**

**エンドポイント**

マウスは、腫瘍体積が $2\,000\text{ mm}^3$ より大きくなった際に腫瘍量試験から除いた。腫瘍体積は、長さと幅のカリパス測定値を下式： $T\,V = 0.52^* L^* W^2$ に当てはめることにより計算した。

**【0493】**

加えて、腫瘍が開放潰瘍に発達した際にもマウスを試験から除いた。試験中、潰瘍が見られたが、痂皮のある単独潰瘍は、それが開放穿孔を形成していたとしてもエンドポイントとしなかった。

10

**【0494】**

本試験ではいずれのマウスにも適用しなかったが、試験の最初に確立される第3のエンドポイントが20%の体重減少であった。

**【0495】**

薬物および材料

**【表16】**

抗体	販売者	カタログ番号	ロット	クローン
ICOS	Biolegend	93108	B205973	C398.4
PD1	BioXcell	BE0146	5792-10/0815B	RMP1-14
CTLA-4	BioXcell	BE0164	5632-4/0715	9D9
マウス IgG2b	BioXcell	BE0086	4700/1014	MCP-11
ラット IgG2a	BioXcell	BE0089	5679-6/0815	2A3
ハムスター IgG	Biolegend	92257	B205974	HTK888

20

**【0496】**

総ての抗体を0.9%生理食塩水で目的の濃度に希釈し、生理食塩水をビヒクル対照として用いた。

**【0497】**

30

**データ分析**

生存分析のイベントは、腫瘍体積 $> 2\,000\text{ mm}^3$ または腫瘍の潰瘍化のいずれか早いものとする。カットオフ体積までの正確な時間は、対数腫瘍体積と2回の観察日（カットオフ体積を超えた最初の観察およびカットオフ体積の直前の一観察）の間に直線を当てはめることによって評価した。所与の時点における異なる処置群の生存確率を評価するためにカプラン・マイヤー（KM）法を行った。エンドポイントまでの中央時間およびその対応する95%信頼区間を報告した。その後、任意の2群の間でKM生存曲線が統計的に異なるかどうかをログランク検定により検定した。

**【0498】**

異なる処置群間の初回投与17日後の腫瘍体積を比較した。異なる処置群における分散が均等でないために、分析前に腫瘍体積を自然対数変換した。次いで、この対数転換データに対してANOVAとその後のペアワイズ比較を行った。

40

**【0499】**

## 【表17】

表14: 試験群

群番号	処置
1	生理食塩水
2	マウス IgG2b 20 µg + ハムスター IgG 10 µg
3	ラット IgG2a 200 µg + ハムスター IgG 10 µg
4	ハムスター IgG 10 µg
5	ICOS 1 µg
6	ICOS 10 µg
7	CTLA-4 20 µg
8	PD1 200 µg
9	ICOS 1 µg + CTLA-4 20 µg
10	ICOS 10 µg + CTLA-4 20 µg
11	ICOS 1 µg + PD1 200 µg
12	ICOS 10 µg + PD1 200 µg

## 【0500】

生存分析によるイベントまでの日の比較および処置群間の10日目の対数変換腫瘍体積の比較からの生のp値ならびに偽陽性率(false discovery rate) (FDR)で補正したp値を上の表に示す。比較は、FDR補正p値 0.05を用い、統計的に有意であることが宣言される。

## 【0501】

結果

マウス運命の追跡は、その数のマウスが腫瘍量および腫瘍の潰瘍化のために試験から除かれたことを示した。腫瘍体積 579.16 mm<sup>3</sup> である G7 の 1 個体のマウスを除き、残ったマウスは総て、試験の 61 日目で腫瘍不含である。

## 【0502】

生存(エンドポイントまでの時間)について、群9および12は、ビヒクル対照群に比べて生存期間に有意な増大を示した(それぞれ p = 0.008 および p = 0.001)。群12は、群2、4、および5に比べて(p = 0.006、0.001、0.02)、統計的に有意に延長された生存期間を示した。しかしながら、いずれかの単剤療法に比べて統計的に有意な(p < 0.05)生存期間の増大を示した組合せ群は無かった(図21)。

。

## 【0503】

考察

併用療法群、特に、高用量の抗ICOSと抗PD1の組合せ(群12)は、単剤療法およびアイソタイプ对照群に比べて腫瘍増殖阻害および生存期間の増大を示したが、61日目に統計的有意性に達しなかった。群12に対するアイソタイプ对照は、ラットIgG2a + ハムスターIgGである群3であった。比較のための単剤療法群は、ICOS 10 µg(群6)およびPD1 200 µg(群8)である。群3の1個体、群6の1個体、および群8の1個体に比べて、群12では合計5個体のマウスが腫瘍不含として残った。生存利益は、各マウスが所定の試験エンドポイントのいずれかに達した日を考慮することにより定量化した。何個体かのマウスは、腫瘍量によるのではなく、開放腫瘍潰瘍のために試験から除かれた。

## 【0504】

高用量のICOS + CTLA-4組合せ群(群10)では、多数のマウスが腫瘍の潰瘍化のために3日目までに除かれ、このことがこの組合せがもたらした生存利益および抗腫瘍利益を覆い隠した可能性がある。この群では、5個体のマウスが腫瘍の潰瘍化のために除かれ、2000 mm<sup>3</sup>に達する腫瘍量のために除かれたのは2個体だけであった。腫瘍の潰瘍化のために除かれた腫瘍は総て、試験を離脱した際にはまだ小さく、これらのマウ

10

20

40

50

スにおいて、腫瘍の潰瘍化は、療法により誘導された抗腫瘍免疫応答の結果であったのではないかと予想される。この群で3個体のマウスが61日目に腫瘍不全を維持した。腫瘍量のために除かれたマウス2個体は、総ての群の、腫瘍量のために除かれたマウスの最低数であった。

#### 【0505】

##### EMT6乳癌マウス腫瘍モデル

##### 試験プロトコール

本明細書に記載される総ての手順および安樂死の基準は、IACUCプロトコールAU  
P0606に従う。動物の体重を測定し、右臀部にマウス当たり $100\mu l$ の $1 \times 10^5$   
EMT6腫瘍細胞を接種した。接種したマウスの数は、この試験に必要とされるものの少  
なくとも130%に相当する。 $30\%$ の失敗率（試験の開始時に大きすぎるまたは小さすぎ  
る）を仮定すると、目標は各群n=10とすることであった。腫瘍細胞の接種の後、腫  
瘍増殖および全体重を週3回、Fowler “ProMax” デジタルカリパスで4週間以上測定した。  
抗体は商業的販売者から入手し、0.9%生理食塩水で目的の濃度に希釈した。投与(i.p.)は、無作為化当日(0日目とする、この時、平均腫瘍体積はおよそ $100\text{mm}^3$ 、接種およそ7~8日後)に始し、週2回で合計6用量を行った。無作為化はStudylog Study Director Suiteソフトウェアを用いて行った。式(腫瘍体積 = L \* W<sup>2</sup> \* 0.52)を用いて腫瘍体積を決定するために、腫瘍の長さと幅を測定した。個々の動物で腫瘍測定値が $2,000\text{mm}^3$ より大きければ試験から除いた。また、マウスは、体重減少(>20%)、腫瘍の潰瘍化、または罹患による他のいずれかの正常なマウス活性の著明な阻害のために試験から除かれる場合がある。  
。

#### 【0506】

本試験では、それぞれ表15に示されるように、マウス10個体の13群について所望のサイズ範囲の腫瘍を有する十分なマウスを作出するために、合計191個体の動物にEMT6細胞を接種した。生理食塩水ビヒクルを注射したマウスおよびアイソタイプ対照群を、ICOS、PD-1およびCTLA-4 mAb処置マウスに対する対照として用いた。ICOSに対するアイソタイプ対照(ハムスター IgG)は、 $10\mu g$ を単独で、また、CTLA-4に対するアイソタイプ(マウス IgG2b)またはPD-1に対するアイソタイプ(ラット IgG2a)と組み合わせて投与した。抗CTLA-4(9D9)および抗PD-1(RMP1-14)に対する単剤療法処置群は、それぞれマウス当たり $20$ および $200\mu g$ で投与し、ICOSアイソタイプ対照と組み合わせて評価した。ICOSアゴニストのC398.4クローンは、マウス当たり $10$ および $1\mu g$ で投与した。ICOSアゴニストの有効性はまた、マウス当たり $10$ および $1\mu g$ を抗CTLA-4または抗PD-1と組み合わせて投与した場合でも評価した。前記濃度でのPD-1およびCTLA-4のさらなる群も陽性対照比較群として含めた。腫瘍体積の統計分析は、無作為化後13日目に行った。生存分析には、60日間試験下にあったマウスを含んだ。

#### 【0507】

## 【表18】

表15: 試験群

<u>投与</u>	<u>処置1</u>	<u>処置2</u>	<u>n=</u>
群1: $1 \times 10^5$ 細胞当たり	生理食塩水		10
群2: $1 \times 10^5$ 細胞当たり	ハムスターIgG 10 µg	mIgG2b 20 µg	10
群3: $1 \times 10^5$ 細胞当たり	ハムスターIgG 10 µg	rIgG2a 200 µg	10
群4: $1 \times 10^5$ 細胞当たり	ハムスターIgG 10 µg		10
群5: $1 \times 10^5$ 細胞当たり	ICOS 10 µg		10
群6: $1 \times 10^5$ 細胞当たり	ICOS 1 µg		10
群7: $1 \times 10^5$ 細胞当たり	CTLA4 20 µg	ハムスターIgG 10 µg	10
群8: $1 \times 10^5$ 細胞当たり	PD-1 200 µg	ハムスターIgG 10 µg	10
群9: $1 \times 10^5$ 細胞当たり	ICOS 10 µg	CTLA4 20 µg	10
群10: $1 \times 10^5$ 細胞当たり	ICOS 1 µg	CTLA4 20 µg	10
群11: $1 \times 10^5$ 細胞当たり	ICOS 10 µg	PD-1 200 µg	10
群12: $1 \times 10^5$ 細胞当たり	ICOS 1 µg	PD-1 200 µg	10
群13: $1 \times 10^5$ 細胞当たり	CTLA4 20 µg	PD-1 200 µg	10

## 【0508】

薬物および材料動物

6~8週齢の雌Balb/cマウスをHarlan Sprague Dawleyから受領し、IACUC標準に従って飼育した。

10

## 【0509】

EMT6細胞

EMT6細胞を解凍し、細胞培養フラスコで、接種前8日間培養した。細胞はこの間、3回継代培養した。接種当日、細胞をフラスコから完全培地に採取した。細胞を遠心分離し、Weymouthの培地(15%FBS含有)に再懸濁させた。この工程を、FBS不含のWeymouthの培地で3回繰り返した。細胞密度および生存率をトリパンブルー排除によって確認した。次に、細胞を目的の密度( $1 \times 10^6$ 細胞/mL)に希釈した。

20

## 【0510】

免疫療法薬

総ての治療薬は、投与当日に0.9%塩化ナトリウムで目的の濃度に希釈し、30G針を用いてi.p.注射した。治療薬および対照希釈液を以下の表16に示す。

30

## 【0511】

## 【表19】

表16: 治療希釈液

Rx	出発濃度 mg/mL	目的濃度 mg/mL	希釈液 1:	用量/ マウス mg	マウス 数	必要用 量 mL	添加保 存液 mL	全希 釀剤 mL	全用量 mL
マウス IgG2b	4.46	0.1	44.6	0.02	10	2	0.10	4.36	4.46
ラット IgG2a	6.92	1	6.92	0.2	10	2	0.40	2.37	2.77
ハムスター IgG	1.47	0.05	29.4	0.01	50	10	0.40	11.36	11.76
CTLA4	6.1	0.1	61	0.02	40	8	0.15	9	9.15
PD-1	7.44	1	7.44	0.2	40	8	1.30	8.372	9.672
ICOS	5	0.05	100	0.01	30	6	0.10	9.9	10
ICOS	0.05	0.005	10	0.001	30	6	1.00	9	10

## 【0512】

## データ分析

## 統計分析

生存分析のイベントは、腫瘍体積 2 0 0 0 mm<sup>3</sup> または腫瘍の潰瘍化のいずれか早いものとした。カットオフ体積までの正確な時間は、対数腫瘍体積と 2 回の観察日（カットオフ体積を超えた最初の観察およびカットオフ体積の直前の一観察）の間に直線を当てはめることによって評価した。所与の時点における異なる処置群の生存確率を評価するためにカプラン・マイヤー（KM）法を行った。エンドポイントまでの中央時間およびその対応する 95 % 信頼区間を報告した。その後、任意の 2 群の間で KM 生存曲線が統計的に異なるかどうかをログランク検定により検定した。

## 【0513】

異なる処置群間の初回投与 13 日後の腫瘍体積を比較した。異なる処置群における分散が均等でないために、分析前に腫瘍体積を自然対数変換した。次いで、この対数転換データに対して ANOVA とその後のペアワイズ比較を行った。SAS 9.3 および R 3.0 . 2 分析ソフトウェアを使用した。

## 【0514】

## 結果

Balb/c マウスに接種を行い、8 日後に処置計画に基づいて 10 群に無作為化した。治療薬または対照の投与は無作為化当日（0 日目）に開始、週 2 回、3 週間続けた。

## 【0515】

生理食塩水処置群は従前の EMT - 6 試験に対して予想された速度で腫瘍を成長させた。生理食塩水ビヒクリ群のマウスは総て、30 日目までに腫瘍サイズまたは潰瘍化のために安樂死された。ハムスター IgG を単独でまたはラット IgG2a またはマウス IgG2b と組み合わせて処置した場合も、生理食塩水ビヒクリ群に比べて平均腫瘍増殖または生存期間に統計的に有意な変化は生じなかった。

## 【0516】

無作為化後 13 日目に、ICOS 単剤療法群は、アイソタイプ対照に比べて、平均腫瘍増殖に観察可能な変化をほとんど示さなかった。しかしながら、高用量の ICOS 処置群（10 μg）は、低用量群よりも腫瘍増殖阻害が大きい著明な傾向を示した。CTLA - 4 単剤療法活性に匹敵する効果が見られた。PD - 1 mAb での単剤療法処置も、13 日目に、統計的に有意ではないもののいくつかの観察可能な平均腫瘍体積の減少をもたらした。しかしながら、ICOS および CTLA - 4 単剤療法の場合と同様に、これは、適当なアイソタイプ群と比較した場合、生存期間の増大をもたらさなかった。抗 PD - 1 と 10 μg 用量での抗 ICOS 抗体クローニング C398.4 の組合せによる処置は、対照およ

10

20

30

40

50

び単剤療法処置群に比べてかなりの腫瘍増殖阻害をもたらした（図22）。この組合せ群の3個体のマウスが、対照または単剤療法処置群を超えるかなりの改善として、完全な腫瘍退縮に至った。しかしながら、使用した統計基準のために、統計的に有意な生存期間の改善には達しなかった。抗PD-1と1μgのICOSアゴニスト抗体クローンC398・4の組合せは、13日目に、生理食塩水ビヒクル対照（p < 0.05）ならびに1および10μgのICOS単剤療法群（p < 0.05）に比べて、平均腫瘍増殖に統計的に有意な低下をもたらした。処置計画から4個体のマウスが完全な腫瘍退縮に至り、統計的有意性には達し得ないが、著しい生存期間の増大傾向をもたらした。

#### 【0517】

両濃度のICOS抗体と抗CTLA-4の組合せは、いずれかの抗体での単剤療法処置に比べて、腫瘍増殖阻害または生存期間に観察可能な利益をほとんど示さなかった。10

#### 【0518】

##### 考察

アイソタイプ対照は、生理食塩水ビヒクル群に比べて、平均腫瘍体積または全生存期間に著明な変化をもたらさなかつたが、ハムスターIgG群（群4）およびハムスターIgGおよびラットIgG2a（群3）には、腫瘍増殖の遅延を示した個々の動物が存在した。ハムスターIgGとラットIgG2aアイソタイプ群では、1個体のマウスが最後の生理食塩水ビヒクルマウスを超えて生存し、36日目に、体積1156.56mm<sup>3</sup>と測定された腫瘍による潰瘍化のために犠牲にされた。ハムスターIgG群の2個体のマウスは、生理食塩水群より長期間生存した。1個体は36日目に腫瘍サイズのために、もう1個体は14日目に1899.28mm<sup>3</sup>の測定値を持つ潰瘍のために安楽死された。20

#### 【0519】

抗PD-1と10μgの抗ICOSアゴニストの投与計画は、腫瘍増殖の観察可能な阻害をもたらし、13日目に、アイソタイプ対照に比べて、腫瘍体積に低下を生じたが、抗PD-1単剤療法と比べた場合にはこの差はほとんど明らかでなかつた。しかしながら、この組合せは、合計5個体の動物が抗PD-1単剤療法群のいずれをも超えて生存するという結果をもたらし、抗PD-1単剤療法群では存在しなかつたのに対して3個体のマウスが完全な腫瘍退縮にあづかった。

#### 【0520】

抗PD-1と1μg用量のICOSアゴニスト抗体の組合せは、13日目に、アイソタイプ対照および各単剤療法群に比べて、平均腫瘍サイズに観察可能な低下をもたらした。この低下は、生理食塩水ビヒクル対照（p < 0.05）および1μg ICOS単剤療法群（p < 0.05）と比べた場合に統計的に有意であった。4個体のマウスが完全な腫瘍退縮にあづかり、PD-1単剤療法群のいずれをも超えて生存した。30

#### 【0521】

ICOS+PD1の組合せ群で見られた生存利益は、60日目までに対照に比べて統計的有意性に達したとは判明しなかつた。しかしながら、ICOS+PD1の組合せ処置群の腫瘍増殖阻害および生存利益は、PD1+CTLA-4の組合せ群（本試験での抗腫瘍活性に関する陽性対照と考えられる）で見られた活性に匹敵した。このことは、ICOSとPD1抗体の組合せが、いくつかの腫瘍種で有意な臨床活性を示しているCTLA-4とPD1の組合せと同等の利益を持ち得ることを示唆する。40

#### 【0522】

本試験に登録された130個体のマウスのうち、12個体が60日目に生残し、うち1個体は完全な腫瘍退縮を達成した。試験から除くエンドポイントに相当した118個体のマウスのうち、111個体は腫瘍サイズが2000mm<sup>3</sup>に達したために除かれた。残りの7個体のマウスは、腫瘍における潰瘍化のために安楽死された。潰瘍化の発生はその群間に散発した。群1（生理食塩水）、3（ハムスターIgGとラットIgG2a）、4（ハムスターIgG）、6（1μg ICOS）、および10（CTLA-4と1μg ICOS）は総て、潰瘍化のために除かれた1個体を含んだ。群13（CTLA-4+PD-1）は、潰瘍化のために犠牲にされた2個体を示した。残りの群には、潰瘍化のため50

に除かれた動物はいなかった。

以上に説明してきたように、本発明は以下の発明を包含する。

(1) 配列番号1に示されるCDRH1；配列番号2に示されるCDRH2；配列番号3に示されるCDRH3；配列番号4に示されるCDRL1；配列番号5に示されるCDRL2および／もしくは配列番号6に示されるCDRL3、または前記CDR中に2つまでのアミノ酸置換を有する各CDRの直接的等価物のうちの1以上を含んでなる、ICOS結合タンパク質またはその抗原結合部分。

(2) 配列番号7に示されるアミノ酸配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含んでなるV<sub>H</sub>ドメインおよび／または配列番号8に示されるアミノ酸配列と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含んでなるV<sub>L</sub>ドメインを含んでなり、ヒトICOSと特異的に結合する、前記(1)に記載のICOS結合タンパク質またはその抗原結合部分。  
10

(3) 前記ICOS結合タンパク質がICOSアゴニストである、前記(1)または(2)に記載のICOS結合タンパク質またはその抗原結合部分。

(4) 前記ICOS結合タンパク質が、ヒトICOSと、親和性がBIAcoreにより測定される場合に、

(i) 少なくとも $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の結合速度定数( $k_{on}$ )；および $6 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 未満の解離速度定数( $k_{off}$ )；または(iii)約100nM未満の解離定数( $K_D$ )

で結合する、前記(1)～(3)のいずれかに記載のICOS結合タンパク質またはその抗原結合部分。  
20

(5) ICOS結合タンパク質が配列番号1；配列番号2；および配列番号3を含んでなる重鎖可変領域を含んでなり、かつ、前記ICOS結合タンパク質が配列番号4；配列番号5；および配列番号6を含んでなる軽鎖可変領域を含んでなる、前記(1)～(4)のいずれかに記載のICOS結合タンパク質またはその抗原結合部分。

(6) 配列番号7に示されるアミノ酸配列を含んでなるV<sub>H</sub>ドメインと、配列番号8に示されるアミノ酸配列を含んでなるV<sub>L</sub>ドメインとを含んでなる、前記(1)～(5)のいずれかに記載のICOS結合タンパク質またはその抗原結合部分。

(7) 前記ICOS結合タンパク質またはその抗原結合部分が、ヒトIgG1アイソタイプまたはその変異体およびヒトIgG4アイソタイプまたはその変異体から選択される足場を含んでなる、前記(1)～(6)のいずれかに記載のICOS結合タンパク質またはその抗原結合部分。  
30

(8) 前記ICOS結合タンパク質またはその抗原結合部分が、hIgG4PE足場を含んでなる、前記(1)～(7)のいずれかに記載のICOS結合タンパク質またはその抗原結合部分。

(9) モノクローナル抗体である、前記(1)～(8)のいずれかに記載のICOS結合タンパク質。

(10) ヒト化されている、前記(9)に記載のモノクローナル抗体。

(11) 完全にヒト型である、前記(9)に記載のモノクローナル抗体。

(12) 配列番号1；配列番号2；および配列番号3に示されるアミノ酸配列を有する重鎖CDRと、配列番号4；配列番号5；および配列番号6に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖CDRとを含んでなる、前記(9)～(11)のいずれかに記載のモノクローナル抗体。  
40

(13) ヒトICOSに対するアゴニストであり、かつ、IgG4アイソタイプ足場またはその変異体を含んでなる、前記(9)～(12)のいずれかに記載のモノクローナル抗体。

(14) hIgG4PE足場を含んでなる、前記(13)に記載のモノクローナル抗体。

(15) 前記(1)～(14)のICOS結合タンパク質のいずれか1つに比べて、ヒトICOSとの結合に関してICOS-リガンドと交差競合する、ICOS結合タンパク質またはその抗原結合部分。

(16) 前記(1)～(15)のいずれかに記載のICOS結合タンパク質またはモノク  
50

ローナル抗体と、薬学上許容可能な担体とを含んでなる、医薬組成物。

(17) 必要とするヒトにおいて癌、感染性疾患、または敗血症から選択される疾患を処置する方法であって、前記ヒトに、前記(16)に記載の医薬組成物を投与する工程を含んでなる、方法。

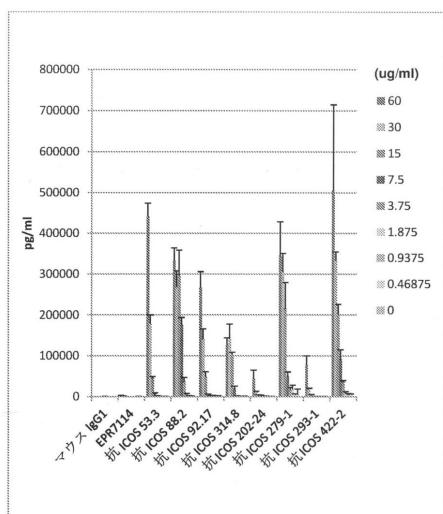
(18) 前記ヒトに、少なくとも1種類の抗新生物薬、少なくとも1種類の第2の免疫調節薬、および/または少なくとも1つの免疫刺激性アジュバントを投与することをさらに含んでなる、前記(17)に記載の方法。

(19) 前記第2の免疫調節薬が、抗CTLA4抗体、抗PD-1抗体、抗PDL1抗体および抗OX40抗体から選択される、前記(18)に記載の方法。

(20) 必要とするヒトにおいて、癌、感染性疾患および/または敗血症の処置において使用するための、前記(16)に記載の医薬組成物。

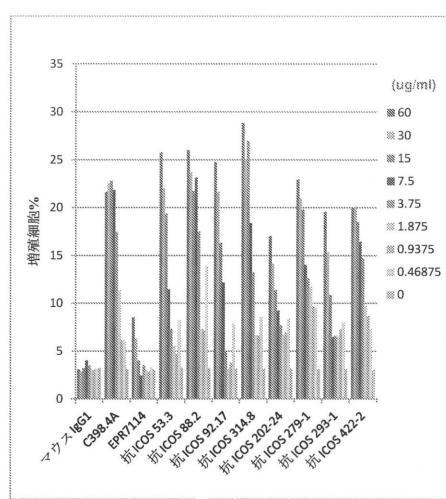
10

【図1】

図1：CD4+CD25-T細胞からのIFN- $\gamma$ 産生

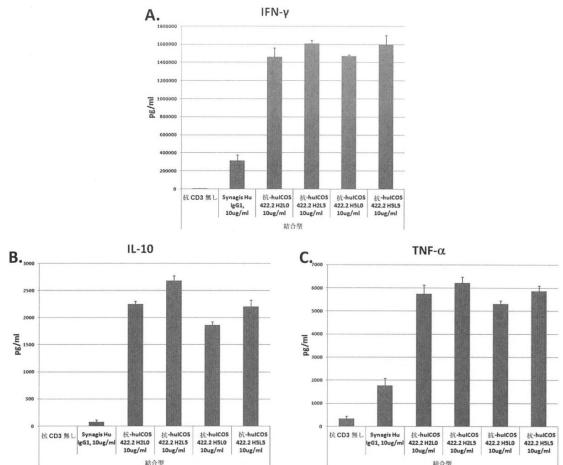
【図2】

図2：CD4+CD25-T細胞の増殖



## 【図3】

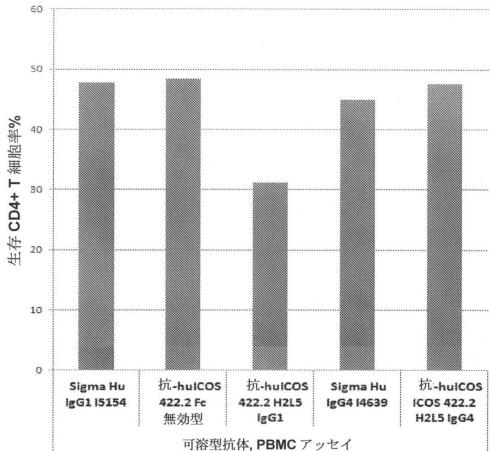
図3：抗ICOS 422.2のH2L5ヒト化変異体は、PBMC細胞において良好なサイトカイン産生を示す



ヒトPBMCは、健康なヒトドナーから新たに単離し、抗CD3 (OKT3) および4種類の各可溶型抗ICOS 422.2ヒト化変異体で予めコーティングしたプレートで活性化させた。2.5日間処理した後、上清中のIFN- $\gamma$  (A)、IL-10 (B) およびTNF- $\alpha$  (C) の量をMSDにより測定した。

## 【図4】

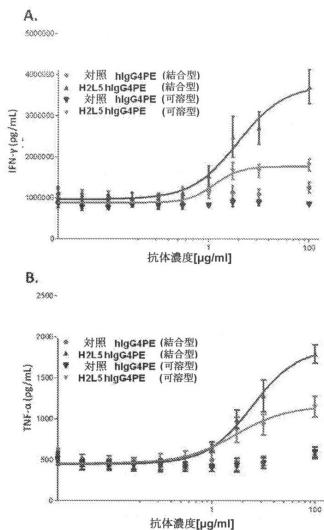
図4：422.2 H2L5 IgG1はT細胞生存率の低下を誘導し、これはFc無効型アイソタイプまたはh IgG4PEアイソタイプには見られなかった



ヒトPBMCは、抗CD3 (OKT3) およびFc無効型アイソタイプが異なる可溶型ヒト化抗ICOS 422.2で予めコーティングしたプレートで新たに活性化した。2.5日間処理した後、生存CD4+T細胞のパーセンテージをフローサイトメーターにより測定した。

## 【図5】

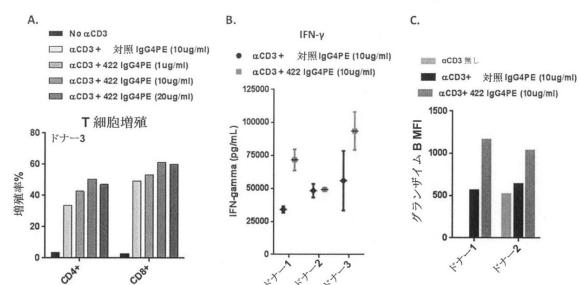
図5：H2L5 h IgG4PEの用量応答は、ヒトCD4+T細胞において炎症性サイトカイン誘導を誘発した



2日間抗CD3/CD28で前刺激したヒト健康ドナーCD4+T細胞を、抗CD3 (OKT3) と一連の濃度のアイソタイプ対照 (Sigma Hu IgG4PE) またはH2L5 h IgG4PE mAbによりプレート結合形式または可溶形式で再刺激した。(A) IFN- $\gamma$ および(B) TNF- $\alpha$ の濃度を3.5日の処理の後にMSDにより上清中で測定した。

## 【図6】

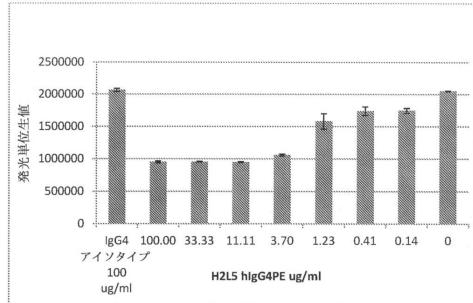
図6：H2L5 h IgG4PEは、健康なヒトドナー由来の活性化PBMCにおいて増殖、サイトカイン産生および細胞傷害能を誘導する



抗CD3/CD28で2日前に活性化したヒトPBMC細胞を、抗CD3 (OKT3) と可溶型H2L5 h IgG4PE mAbまたはアイソタイプ対照により再刺激した。2.5日の処理の後、T細胞増殖をCFSE-FACSアッセイにより測定した(A)。上清中のIFN- $\gamma$ 濃度はMSDにより測定した(B)。CD4+T細胞の細胞内グランザイムB発現はフローサイトメーターにより測定した。

## 【図7】

図7 : H2L5-hIgG4PEによるICOS-LのICOSへの結合の阻害を示すメソ・スケール・ディスクバリーワーク(MSD)アッセイであり、それがICOS上の、ICOS-Lと同じエピトープに結合し、結合をめぐって競合することが示される。



## 【図8】

図8 : ハイブリドーマクローン422.2のRNAから回収した抗体V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>遺伝子

422 HC

QVQLQQSGPELVRPGESVKISCMGSGYTFDYMAMHWVKQSHAKSLEWIGLISIYSDHTNQNQKFQGKATMTVDKS  
SSTAYMELARLTSEDASAYYCGRNNYGNWYDFVWAGTTVTSS (配列番号19)

422 LC

ENVLTQSPAIMSASPGEKVITCSASSSVSYMHWYQQKSIITSPKLWYIDTSKLASGVPGRFSGSGNSYSLTIS  
SMEAEDVATYYCFQGSGYPTFGGGTKEIKR (配列番号20)

## 【図9】

図9 : シグナル配列を有するH2L5-hIgG4PEの重鎖および軽鎖のタンパク質配列

重鎖

MGWSCTIILFLVATATGVHSQVLVQSGAEVKPKGSVVKSCAKSGYTFDYMAMHWVRQAPGQGLEENWGLIISIYSD  
HTNVNQKQFQGPVTTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYCCRNNYGNWYFDWQGTTTVSSASTKGPSVPP  
LAFCRSRSTESTAALGCLVKDYYFEPPTVSVWNGSALTSGVHTTPAVLQSSGLYSLSVVTPSSSLGTTYTNCVN  
DHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPCCPAPAEFEGGPPSVPLFPKPDKDLMISRTPEVTCVVDVSQEDPEVQPNWYVD  
GVEVHNAAKTKPREEQFNSTYRVSVLTLHQWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISAKGQPREPQVYTLPPSQ  
EEMTKNQVSLTC1LVKGPFYPSDIAVEWESENQPEENNYRTTPVLDSDGSFFLISRLITVDKSRWQEGNVFSCSVMHE  
ALHNHYTQKSLSLSLGK (配列番号9)

軽鎖

MGWSCIILFLVATATGVHSIEVLTQSPATLSSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQKPGQAPRLLIYDTSKLASG  
IPARFSGSGSTDYTLTISLEPEDFAVYYCFQGSGYPTFGQGTTKLEIKRTVAAPSVIDFPPSDEQLKSGTAVSV  
VCLLNNFYPREAKVQWVNDALQSGNSQESVTEQDSKDSTSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK  
SFNRGEC (配列番号12)

シグナル配列は二重下線

C D R配列は下線

IgG4ではS228P、L235E(EUナンパリング)置換

可変重鎖フレームワークに組み込まれたマウス残基(KabatナンパリングG27Y、S30T、A93G)

可変軽鎖フレームワークに組み込まれたマウス残基(KabatナンパリングF71Y)

## 【図10】

図10 : シグナル配列を有するH2L5-hIgG4PE重鎖のコード領域のDNA配列

重鎖

ATGGGCTGGTCTGCATCATCCTGTGTTCTGGTGCCACCGCCACCGCGTGCACAGCAGGTGAGCTGGTCAAG  
AGCGGAGCCGGAGTTGNAAAAGCCCCTGGCTAACGCTGAAGGTGAGCTGCAAGGCCAGCCGCTCACCCCTCACCGAC  
TACGCTATGCACTGGGTGAGCCAGGGCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAG  
CACACCAACTACAACAGAAGTTCCAGGGCAGGGTACCCATCACCGGCGATAAGAGCACCGCACAGCGCTACATG  
GAGCTGAGCAGCTGAGGAGCAGACAGCAGCCGCTGACTATTGCGCAGGAACAACTACCGCAACTACGGCTGG  
TACTTCGAGCTGTGGGGCAGGAAACACTTGACCGTGAAGCAGCCGAGACCCAAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAG  
CTGGCCCCCTGAGCTGGAGCAGCCGAGAGCAGCCGAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAG  
CCGGTGAAGCTGGAGCTGGAGCAGCCGAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAG  
GCCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGGCCAGCAGCGCTGGCACCAAGGCTACACCTCAACAGT  
GACCAAGCCAGAACACCAAGGTGGACAAGCAGGGTGGAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCTGCCCT  
GCCCTGAGGGGAGGTGACCTTCCGGTGTCTCTGGTCCCCCAAGCCAAGGGACCCCTGATGATCAGCGCG  
ACCCCGAGGGTGAACCTGGTGGTGAGCTGGAGCAGCCAGGGAGAACAGTCAACAGCAGCTACCGGGTGGTGG  
GGCTGGAGGGTGGAGCTGGAGCAGCCAGGGAGAACAGTCAACAGCAGCTACCGGGTGGTGG  
CTGACCGTGTGACCAAGGACTGGCTGAACGGCAAAGAAATACNAGTCAAGGTGTCACACGGCTGGCACAGCAG  
TCCATCGAGAAAACCATCGCAAGGCCAGGGCCAGCCTCGGGAGGCCAGGGTGTACACCTGCCCTACCG  
GAAGAGATGACCAAGAACAGCAGGGTGTCTGGCTGAGGGCTTCTACCCCGAGCAGCTGGCGTGGAG  
TGGGAGAGCAACGGCCAGGCCAGAGAACACAACATCAAGACCAACCCCCCTGCTGGCTGGAGCAGCAGCTTCTC  
CTGACAGCAGGGTGGAGCTGGAGCAGAGCCGGTGGCAGGAAGGCAACGTCTTAGCTGAGCAGGGTGTGACAGCAG  
GCCCTGCAACAACCAACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCTGTCCCTGGCAG (配列番号21)

リーダー配列を二重下線で示す

## 【図11】

図11 : シグナル配列を有するH2L5-hIgG4PE軽鎖のコード領域のDNA配列

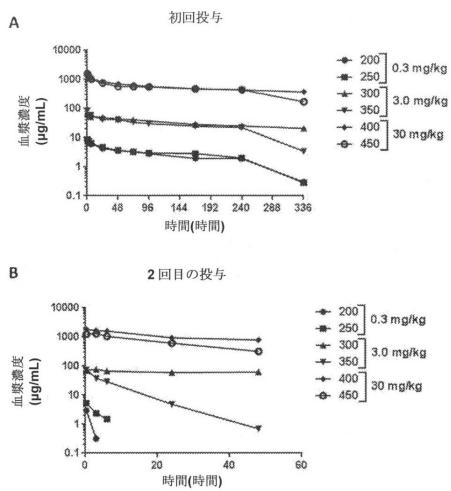
軽鎖

ATGGGCTGGTCTGCATCATCCTGTGTTCTGGTGCCACCGCCACCGCGTGCACAGCAGGTGAGCTGGTCAAG  
AGCCCGCCACCCGCTAGCCCTGAGCCCTGAGCCCTGAGCCCTGAGCCCTGAGCCCTGAGCCCTGAGCCCTGAGCC  
ATGCACTGGTACCCAGCAGAAGCCGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCC  
ATCCAGCGCAGGTTCTCAGGAGCCAGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCC  
TTGCGCTGTACTACTGCTCCAGGAGCAGGGCTACCCCTCACCCCTGGCCAGGGCACCAGCTGGAGATCAAG  
CGTACCGTGGCCGGCCAGGGTGTCTGATCTTCCCTCCAGGAGCAGCTGAGCAGCTGAGAGGCGACCCGGCTG  
GTGTGTCTGCTGAACAAACTTCTACCCCGGGAGGCCAGGGTGTGAGGTTGGACATATGCCCTGGAGAGCC  
AACAGCAGGAGAGCTGACCGAGCAGGAGAACAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCCTGAGC  
AAGCCGACTACAGAGAACAGGGTGTACGGCTGTGAGGTGACCCCAAGGGCCTGTCAGCCCTGGCACCAAG  
AGCTCAACCGGGGGAGTGC (配列番号22)

リーダー配列を二重下線で示す

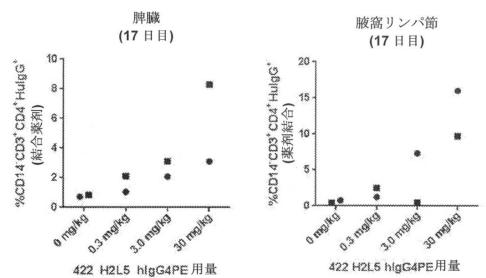
## 【図12】

図12：カニクイザルにおけるH2L5-hIgG4PEの血漿濃度。濃度は、H2L5-hIgG4PEの(A)初回または(B)2回目の投与(15日目)の後に測定した。2回目の投与の48時間後に組織サンプルの採取および組織病理学的分析のために動物を犠牲にした。



## 【図13】

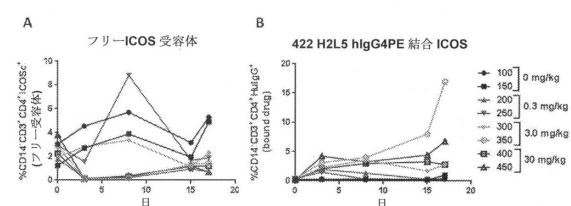
図13：サルの脾臓および腋窩リンパ節からのCD4+T細胞に対するH2L5-hIgG4PEの結合の検出。組織は2回目の投与の48時間後(17日目)に採取した。



## 【図14】

図14：カニクイザル由来の血中CD4+T細胞におけるH2L5-hIgG4PEの受容体の占有率

(A) フローサイトメトリーにより使用される抗ICOS蛍光標識抗体の陽性結合により測定されるICOS「フリー受容体」、これはH2L5-hIgG4PEが存在しない場合にのみ結合する  
(B) 蛍光標識抗ヒトIgGにより測定される、末梢血CD4+細胞上のH2L5-hIgG4PEと結合した受容体



## 【図15】

図15 (a) H2L5-hIgG4PEで処理したBa/F3-ICOS細胞におけるホスホ-AKT (T308) 発現レベル—細胞内シグナル伝達抗体アレイ

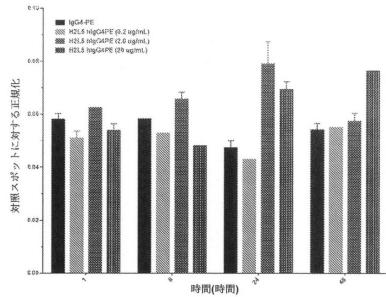
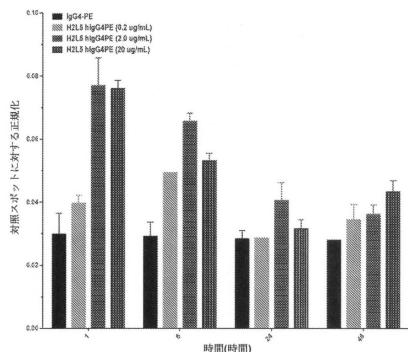
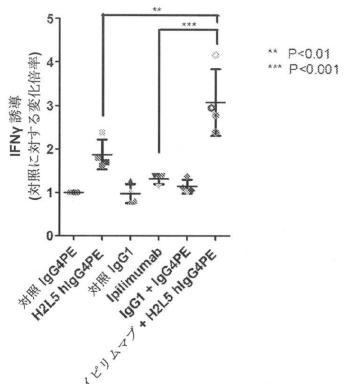


図15 (b) H2L5-hIgG4PEで処理したBa/F3-ICOS細胞におけるホスホ-AKT (S473) 発現レベル—細胞内シグナル伝達抗体アレイ



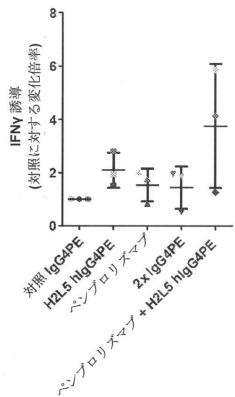
## 【図16】

図16：PBMNC前刺激アッセイにおいて、H2L5-hIgG4PEとイピリュマブの組合せは、単一抗体処理に比べて炎症性サイトカイン産生の増大をもたらす



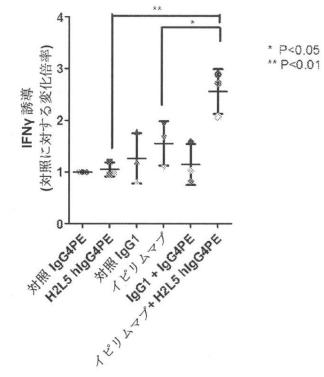
【図17】

図17：P BMC前刺激アッセイにおいて、H2L5-hIgG4PEとベンプロリズマブの組合せは、単一抗体処理に比べて炎症性サイトカイン産生の増大をもたらす



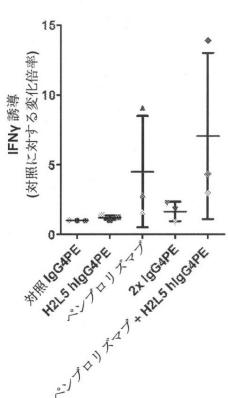
【図18】

図18：H2L5-hIgG4PEとイビリムマブの組合せは、CEF Tペプチドとブレインキュベーションで改変したMLRアッセイにおいて、炎症性サイトカイン産生の増大を誘導する



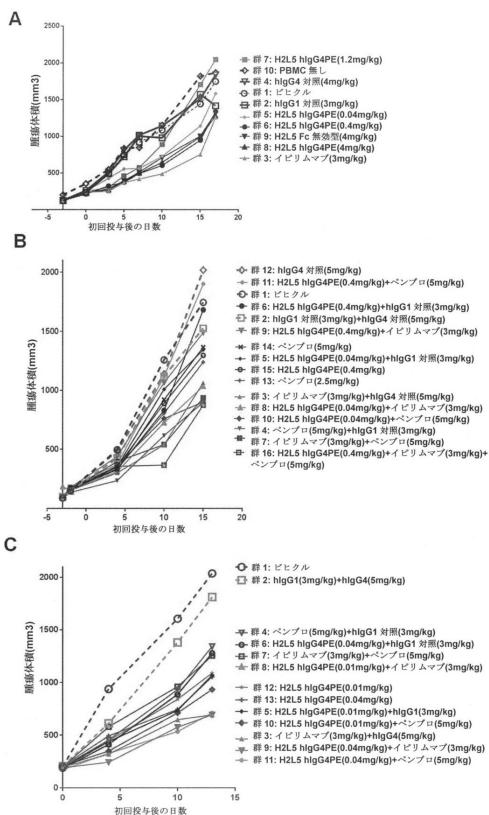
【図19】

図19：H2L5-hIgG4PEとベンプロリズマブの組合せは、CEF Tペプチドとブレインキュベーションで改変したMLRアッセイにおいて、炎症性サイトカイン産生の増大を誘導する



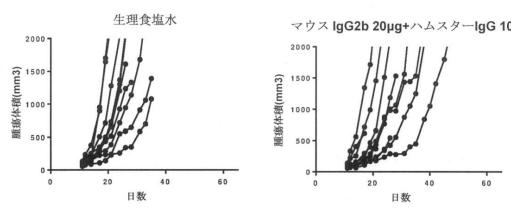
【図20】

図20：H2L5-hIgG4PE抗ICOSアゴニストmAbは単独で、また、ベンプロリズマブとの組合せで、ヒトP BMC A2058黒色腫マウス腫瘍モデルにおいて腫瘍増殖阻害をもたらす



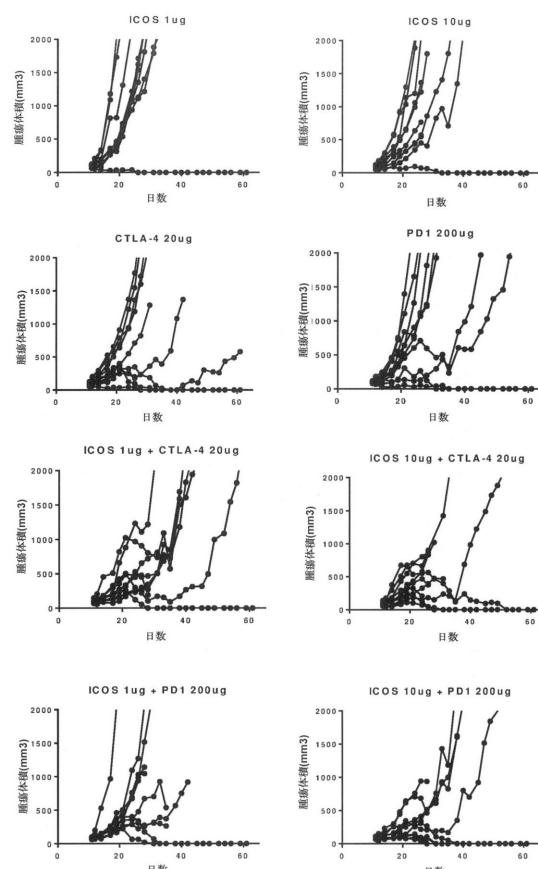
【図 21 - 1】

図21：抗ICOSマウスサロゲートmAbは、CT26マウス腫瘍モデルにおいて、抗PD1マウスサロゲートmAbとの組合せで、有意な腫瘍増殖阻害および生存期間の増大をもたらす



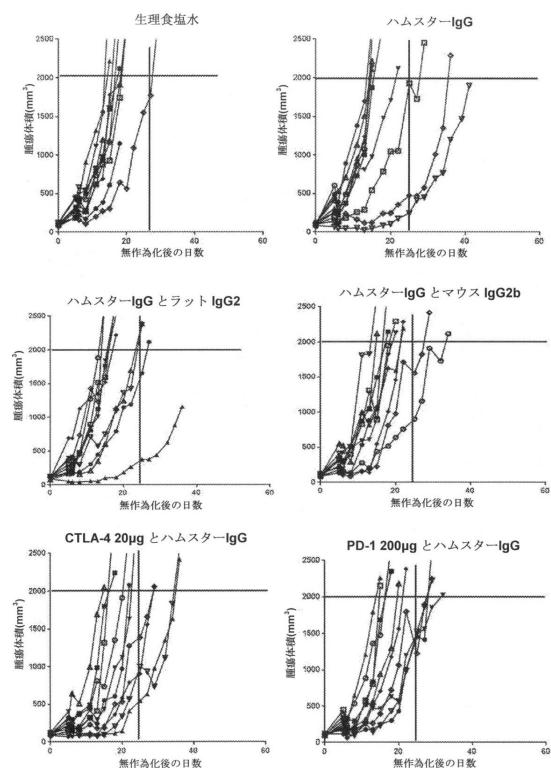
【図 21 - 2】

図21（続き）



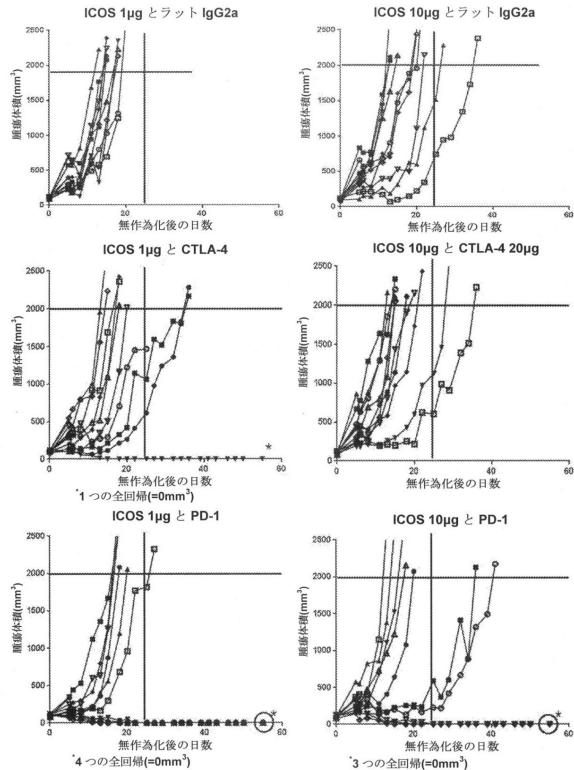
【図 22 - 1】

図22：抗ICOSマウスサロゲートmAbは、EMT6マウス腫瘍モデルにおいて、抗PD1マウスサロゲートmAbとの組合せで、有意な腫瘍増殖阻害および生存期間の増大をもたらす



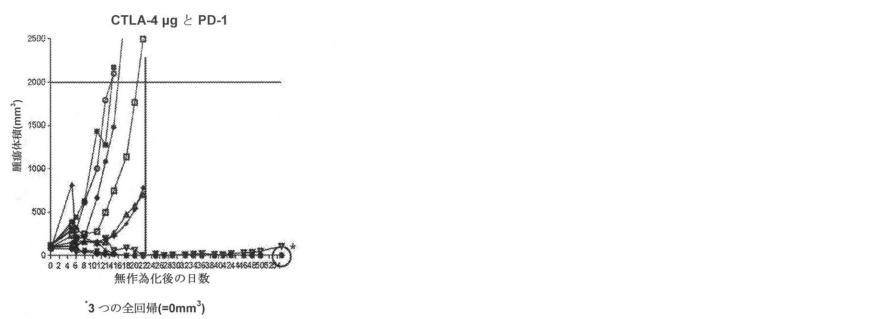
【図 22 - 2】

図22（続き）



## 【図22-3】

図22（続き）



## 【配列表】

0006553197000001.app

---

フロントページの続き

		F I
A 6 1 K	45/00	(2006.01) A 6 1 K 45/00
C 1 2 N	15/00	(2006.01) C 1 2 N 15/00 Z N A
C 1 2 P	21/08	(2006.01) C 1 2 P 21/08
C 0 7 K	16/28	(2006.01) C 0 7 K 16/28

(31)優先権主張番号 62/247,355

(32)優先日 平成27年10月28日(2015.10.28)

(33)優先権主張国 米国(US)

早期審査対象出願

(73)特許権者 599176506

アンセルム(アンスチチュ・ナショナル・ドゥ・ラ・サンテ・エ・ドゥ・ラ・ルシェルシュ・メディカル)  
フランス共和国 75654 パリ セデックス 13 リュ・ドゥ・トルビアック 101

(73)特許権者 503196857

アンスティテュ・ジャン・パオリ・エ・イレーヌ・カルメッテス  
INSTITUT JEAN PAOLI & IRENE CALMETTES  
フランス国、マルセイユ エフ-13009、ブルヴァール セント-マルグリット 232  
232 Boulevard Sainte-Marguerite, F-13009 Marseille, France

(73)特許権者 512269719

ユニベルシテ デクス マルセイユ  
フランス国 エフ-13284 マルセイユ セデ 07 ブルバー シャルル リヴォン 58

(73)特許権者 305023584

サントル・ナシオナル・ド・ラ・ルシェルシュ・シアンティフィック  
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
フランス国、75794 パリ・セデックス 16、リュ・ミシェル・アンジュ 3  
3 rue Michel Ange, 75794 PARIS CEDEX 16, France

(74)代理人 100091982

弁理士 永井 浩之

(74)代理人 100091487

弁理士 中村 行孝

(74)代理人 100082991

弁理士 佐藤 泰和

(74)代理人 100105153

弁理士 朝倉 悟

(74)代理人 100143971

弁理士 藤井 宏行

(74)代理人 100126099

弁理士 反町 洋

(72)発明者 ヤオ - ビン、リウ

アメリカ合衆国ペンシルベニア州、カレッジビル、サウス、カレッジビル、ロード、1250

(72)発明者 ラダ、シャー、バルマル

イギリス国ハートフォードシャー、スティーブネッジ、ガネルズ、ウッド、ロード

(72)発明者 パトリック、メイズ

アメリカ合衆国ペンシルベニア州、カレッジビル、サウス、カレッジビル、ロード、1250  
(72)発明者 ダニエル、オリーブ  
フランス国マルセイユ、ブルバール、レ、ルル、27、ベペ、3

審査官 谷合 正光

(56)参考文献 特表2013-506690(JP,A)  
PLOS ONE, 2014年 7月, Vol.9, No.7, e100970, p.1-11

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 61 K 39 / 395  
A 61 K 39 / 39  
A 61 K 45 / 00  
A 61 P 31 / 00  
A 61 P 31 / 18  
A 61 P 35 / 00  
C 07 K 16 / 28  
C 12 N 15 / 00  
C 12 P 21 / 08  
JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)  
Caplus / REGISTRY  
/ MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)