

(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 I	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	U
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39	
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 31/18 (2006.01)	A 6 1 P 31/18	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 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)	(73) 特許権者	513032275
(86) (22) 出願日	平成28年1月26日 (2016.1.26)		グラクソスミスクライン、インテレクチュ
(65) 公表番号	特表2018-505177 (P2018-505177A)		アル、プロパティ、ディベロップメント
(43) 公表日	平成30年2月22日 (2018.2.22)		、リミテッド
(86) 国際出願番号	PCT/IB2016/050383		GLAXOSMITHKLINE INT
(87) 国際公開番号	W02016/120789		ELLECTUAL PROPERTY
(87) 国際公開日	平成28年8月4日 (2016.8.4)		DEVELOPMENT LIMITED
審査請求日	平成31年1月24日 (2019.1.24)		イギリス国ミドルセックス、ブレントフォ
(31) 優先権主張番号	62/108,605		ード、グレート、ウエスト、ロード、98
(32) 優先日	平成27年1月28日 (2015.1.28)		O
(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)		

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】

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（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、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 HIV 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、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 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 ICOS 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<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、請求項 11 に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

前記抗体が、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、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 IgG4 アイソタイプであり、かつ、S228P 変異および L235E 変異を含む Fc 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バントが TLR4 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】

TLR4 アゴニストが、CRX-601：

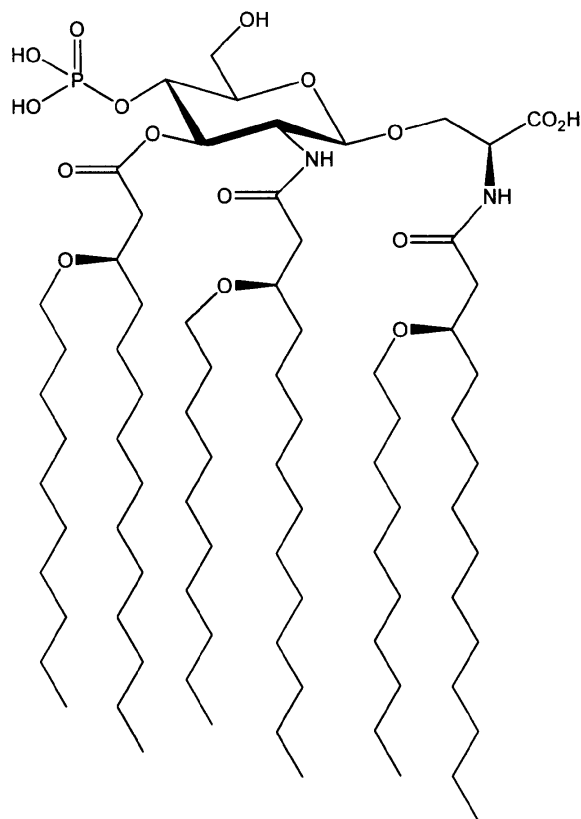
10

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 PD-1 抗体が、ペンブ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 PD-1 抗体がペンブロリズマブである、請求項 17 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 19】

抗 CTLA4 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 ICOS 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 IgG4 アイソタイプであり、かつ、S228P 変異および L235E 変異を含む Fc 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、ICOS アゴニスト抗体を含む ICOS 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（オプジーボ(OPDIVO)/ニボルマブおよびキートルーダ(KEYTRUDA)/ペンブロリズマブ）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細胞に限定されられると思われる。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濾胞性ヘルパー(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(Poulos 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-、TNF-、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、SA-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(Arag 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- / - およびICOS-L- / - マウスを用いた別の報告では、B16/B16黒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を過剰発現させる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”, WO2011/041613A2 (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+ICOS<sup>hi</sup> 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カーであり、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 と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。

【 0 0 1 1 】

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。

【 0 0 1 2 】

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。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 3 】

【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。

【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、結合をめぐる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。

【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 1 0】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 1 1】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 1 2】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 ( 1 5 日目 ) の後に測定した。2 回目の投与の 4 8 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 1 3】サル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 4 8 時間後 ( 1 7 日目 ) に採取した。

【図 1 4】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 1 5】( 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

10

20

30

40

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 hIgG4PEとイピリムマブの組合せは、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】PBM C前刺激アッセイにおいて、H2L5 hIgG4PEとペンブ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】H2L5 hIgG4PEとイピリムマブの組合せは、CEFTペプチドとブレインキュー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 hIgG4PEとペンブロリズマブの組合せは、CEFTペプチドとブレインキュー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】H2L5 hIgG4PE抗ICOSアゴニストmAbは単独で、また、ペンブロリズマブとの組合せで、ヒトPBM C 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】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。

【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CTLA-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。

【化1】

```
MKSGWLWYFFLFCLRIKVLGTGEINGSANYEMFI FHNGGVQILCKYPDIVQQFKMQLLKGGQILCDLTKTKGSGNTV  
SIKSLKFCHSQLSNNSVSFFLYNLDSHANYFYFCNLSIFDPPPFKVTLTGGLYLIHYESQLCCQLKFWLPIGCAAF  
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。

【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。

#### 【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。

#### 【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、 $V_H$ 、 $V_{HH}$ 、 $V_L$ 、ドメイン抗体(dAb(商標)))、抗原結合抗体フラグメント、Fab、 $F(ab')_2$ 、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。

#### 【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、SpA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。

#### 【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、 $V_H$ 、 $V_{HH}$ および $V_L$ 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

10

20

30

40

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、「単一可変ドメイン」と同じと見なされ得る。単一可変ドメインは、ヒト単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) などの他種由来の単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単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単一可変ドメイン」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霊長類起源のものであってよく、またはヒトおよび霊長類定常領域の人工キメラであってもよい。

#### 【0024】

20

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、リボカリン、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、GroElおよびGroES；トランスフェリン(トランスボディ)；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

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mAb dAbは、さらなる結合ドメイン、特に、単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。mAb dAb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V<sub>H</sub>/V<sub>L</sub>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、ビオチンとアビジン）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、単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、結合の立体的障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、ICOSがそのリガンドにより活性化されるのを防ぐこと、ICOS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ICOS結合タンパク質の中和能を評価するために使用できる。

#### 【0036】

ICOSとICOS-Lの間の相互作用に対するICOS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。ICOS結合タンパク質の中和は、ICOSとICOS-Lの相互作用を、ICOS結合タンパク質の不在下でのICOSとICOS-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

#### 【0037】

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。

#### 【0038】

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（ELISA）もしくはラジオイムノアッセイ（RIA））、または速度論（例えば、Biacore（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

#### 【0039】

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

#### 【0040】

1つの実施態様では、ICOS結合タンパク質-ICOS相互作用の平衡解離定数（KD）は、100nM以下、10nM以下、2nM以下または1nM以下である。あるいは、KDは、5~10nMの間、または1~2nMの間であり得る。KDは、1pM~500pMの間、または500pM~1nMの間であり得る。当業者は、KD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。KDの逆数（すなわち、1/KD）は、M<sup>-1</sup>を単位とする平衡会合定数（KA）である。当業者は、KA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

#### 【0041】

解離速度定数（kd）または「解離速度」は、1秒あたりに減衰するICOS結合タンパク質ICOS複合体、すなわち、複合体画分の安定性を表す。例えば、kd0.01s<sup>-1</sup>は、1秒あたり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（kd）は、1×10<sup>-3</sup>s<sup>-1</sup>以下、1×10<sup>-4</sup>s<sup>-1</sup>以下、1×10<sup>-5</sup>s<sup>-1</sup>以下、または1×10<sup>-6</sup>s<sup>-1</sup>以下である。kdは1×10<sup>-5</sup>s<sup>-1</sup>~1×10<sup>-4</sup>s<sup>-1</sup>の間、または1×10<sup>-4</sup>s<sup>-1</sup>~1×10<sup>-3</sup>s<sup>-1</sup>の間であり得る。

#### 【0042】

結合速度定数（ka）または「結合速度」は、ICOS結合タンパク質-ICOS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（ka）は、約1.0×10<sup>5</sup>M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>である。

40

#### 【0043】

「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。

#### 【0044】

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／翻訳機構により産生される。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

10

20

30

40

50

*in vitro*では無作為もしくは部位特異的変異誘発、または*in vivo*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産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DNAによりコードされた抗体は、最終的にヒト起源のDNA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DNA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DNA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DNAライブラリーがヒト生殖細胞系DNA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イ技術を用いて作製できる。

10

#### 【0049】

用語「ドナー抗体」は、その可変領域、CDR、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。

#### 【0050】

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

#### 【0051】

用語「V<sub>H</sub>」および「V<sub>L</sub>」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。

#### 【0052】

「CDR」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CDRと3つの軽鎖CDR(またはCDR領域)が存在する。よって、「CDR」は、本明細書で使用する場合、3つ総ての重鎖CDR、3つ総ての軽鎖CDR、総ての重鎖および軽鎖CDR、または少なくとも2つのCDRを意味する。

30

#### 【0053】

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、Kabat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「CDR」、「CDRL1」、「CDRL2」、「CDRL3」、「CDRH1」、「CDRH2」、「CDRH3」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。

#### 【0054】

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。CDR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CDR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

#### 【0055】

当業者に利用可能なCDR配列の他のナンバリング規則には、「AbM」(パース大学)および「contact」(ユニバーシティ・カレッジ・ロンドン)法が含まれる。Kabat、Chothia、AbMおよびcontact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。K a b a t 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

	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。

CDRH1: DYAMH(配列番号1)

CDRH2: LISIYSDHTNYNQKFQG(配列番号2)

CDRH3: NNYGNYGWYFDV(配列番号3)

CDRL1: SASSSVSYMH(配列番号4)

CDRL2: DTSKLA(配列番号5)

CDRL3: FQGS GYPYT(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 9 0 % 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 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重鎖可変領域を含んでなり得る。

【 0 0 6 0 】

ヒト化重鎖 (V<sub>H</sub>) 可変領域 (H 2) :

【化 2】

QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYTFT DYAMHWVRQA PGQGLEWMGL ISIYSDHTNY  
NQKFQGRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCGRNN YGNYGWYFDV WGQGT TVTVS 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、

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、MGWSCIIILFLVATATGVHS (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。

#### 【 0 0 6 4 】

ヒト化軽鎖 ( V <sub>L</sub> ) 可変領域 ( L 5 )

#### 【 化 3 】

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCSASSSVS YMHWYQQKPG QAPRLLIYDT SKLASGIPAR  
FSGSGSGTDY TLTISSELEPE 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。

#### 【 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序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

#### 【 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

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の意味する。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」カノニカル鑄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、カノニカル鑄型が埋没疎水基、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、配列をキー残基鑄型と比較し、同一性または類似性マトリックスを用いて各鑄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、ペアワイズ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ズ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のウェブサイトを利用可能な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、ペアワイズ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ズ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のウェブサイトを利用可能な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。

【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<sub>H</sub>またはV<sub>L</sub>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<sub>H</sub>もしくはV<sub>L</sub>（またはHCもしくはLC）配列と同じであり、変動はV<sub>H</sub>もしくはV<sub>L</sub>（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。

【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、様々なグリコシル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。

30

【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）におよそ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。

40

【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

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（-SH）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（-SH）はシャッフリングを促進する場合がある。

【0085】

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。

【0086】

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（pGlu）を形成する可能性がある。ほとんどのpGlu形成は生産バイオリ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。pGluの形成は、組換えmAbの主要分解経路の1つと考えられる。

【0087】

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mAb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、mAbのエフェクター機能にも影響はない。

【0088】

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) (ADA)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ADA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dAb（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。

【0089】

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（ADA）との結合能が低減された改変型dAb（商標）が提供される。結合能の低減とは、改変分子が既存のADA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dAb（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。

【0090】

本開示のポリペプチドおよびdAb（商標）ならびにこれらを含んでなるアゴニストは、例えば、PEG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Fc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る。例えば、ポリペプチドdAb（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る（例えば、Fab、Fab'、F(ab)<sub>2</sub>、F(ab')<sub>2</sub>、IgG、scFvの形式）。

【0091】

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、従

10

20

30

40

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。

【 0 0 9 2 】

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。

【 0 0 9 3 】

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らせたい場合には、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。

【 0 0 9 4 】

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を場合により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。

【 0 0 9 5 】

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。

【 0 0 9 6 】

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。

【 0 0 9 7 】

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

【 0 0 9 8 】

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もよい。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。

【 0 0 9 9 】

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、患者の年齢、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。

【 0 1 0 0 】

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ツキットを、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。

【 0 1 0 1 】

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、マーマ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】

30

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(*Bacilli*)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、Per c 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。

【0108】

40

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。

【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

## 【 0 1 1 1 】

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った、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

## 【 0 1 1 2 】

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。

## 【 0 1 1 3 】

抗原結合タンパク質の定常領域とFcRI（CD64）、FcRII（CD32）およびFcRIII（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。有意な生物学的効果は、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

## 【 0 1 1 4 】

エフェクター機能は、ADCC/ADCPエフェクター機能に関して評価するために、例えば、ナチュラルキラー細胞ではFcRIIIの結合を介するものまたは単球/マクロファージではFcRI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関して評価することができる。ADCCおよび/またはCDC機能の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

## 【 0 1 1 5 】

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

## 【 0 1 1 6 】

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

## 【 0 1 1 7 】

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 ( A D C C ) 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 I g 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 I g 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。I g G 4 の F c 領域のセリン 2 2 8 をプロリンで置換すると ( S 2 2 8 P )、h I g 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 2 3 5 をグルタミン酸で置換する第 2 の変異 ( L 2 3 5 E ) 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 (Alegre, 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、I g G 4 P E と呼ばれる。h I g 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: 5257969 からのものであった。本発明の 1 つの実施態様では、置換 S 2 2 8 P および L 2 3 5 E を含んでなる I g G 4 F c 領域を含んでなる I C O S 抗原結合タンパク質は、I g 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 I g G 4 P E F c 領域を有する I C O S 結合タンパク質は、H 2 L 5 I g G 4 P E または同義的に H 2 L 5 h I g G 4 P E と呼称される。

10

20

## 【 0 1 1 8 】

A D C C / C D C の増強

当技術分野で理解されるように、抗体の A D C C および / または C D C 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 A D C C / C D C 増強技術が本発明の I C O S 結合タンパク質に適用されてよい。

## 【 0 1 1 9 】

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 I g 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 A D C C および C D C を増強することも示されている、例えば、Kellner (2013) 参照。

30

## 【 0 1 2 0 】

本発明の 1 つの実施態様では、このような変異は、2 3 9、3 3 2 および 3 3 0 ( I g G 1 )、または他の I g 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、S 2 3 9 D および I 3 3 2 E および A 3 3 0 L 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、2 3 9 番および 3 3 2 番で変異を受け、例えば、S 2 3 9 D および I 3 3 2 E であり、またはさらなる実施態様では、それは 2 3 9 および 3 3 2 および 3 3 0 から選択される 3 以上の位置で変異を受け、例えば、S 2 3 9 D および I 3 3 2 E および A 3 3 0 L ( E U インデックスナンバリング ) である。

40

## 【 0 1 2 1 】

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 A D C C もしくは増強された C D C、または増強された A D C C と C D C 機能を有するように、I g G 3 由来の少なくとも 1 つの C H 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、I g G 3 由来の 1 つ C H 2 ドメインを含んでなり得るか、または両 C H 2 ドメインが I g G 3 に由来し得る。

【 0 1 2 2 】

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、I g G 1 および I g G 3 の両 F c ドメインアミノ酸残基を有する F c 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。

【 0 1 2 3 】

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、I g G 1 および I g G 3 の両 F c ドメインアミノ酸残基を有するキメラ F c 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 F c 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 (C D C) 活性を有する抗原結合タンパク質を産生する。コンプリジェント (商標) 技術システムの態様は、WO 2 0 0 7 0 1 1 0 4 1 および US 2 0 0 7 0 1 4 8 1 6 5 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、C D C 活性は、I g G 鎖の F c 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。

【 0 1 2 4 】

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 F U T 8 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。

【 0 1 2 5 】

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、F U T 8 遺伝子の機能的コピーを欠く C H O K 1 S V 細胞は、機能的 F U T 8 遺伝子を有する細胞で産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 (A D C C) 活性を有するモノクローナル抗体を産生する。ポテリジェント (商標) 技術システムの態様は、US 7 2 1 4 7 7 5、US 6 9 4 6 2 9 2、WO 0 0 6 1 7 3 9 および WO 0 2 3 1 2 4 0 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。

【 0 1 2 6 】

当業者には、このような改変は単独で使用するだけでなく、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。

【 0 1 2 7 】

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、I g G 3 由来の少なくとも 1 つの C H 2 ドメインと I g G 1 由来の 1 つの C H 2 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、A D C C の増強または C D C 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 A D C C と増強された C D C を有するように、前記 I g G 1 C H 2 ドメインが 2

10

20

30

40

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、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、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ADCC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、ADCC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。



## 【 0 1 3 3 】

I g G 抗体の長い半減期は、その F c R n 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 p H 依存性を維持しつつ p H 6 . 0 での F c R n に対する I g G 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)。

## 【 0 1 3 4 】

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 F c R n ( F c 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 i n - v i v o 半減期の延長が含まれる。

## 【 0 1 3 5 】

成体哺乳動物では、新生児型 F c 受容体としても知られる F c R n は、I g G 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。I g G 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 F c R n に結合すれば、循環中へ再利用される。対照的に、F c R n に結合しない I g G 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。

## 【 0 1 3 6 】

新生児型 F c R n 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 F c R n と直接相互作用することが決定付けられているヒト I g G 1 残基としては、I l e 2 5 3、S e r 2 5 4、L y s 2 8 8、T h r 3 0 7、G l n 3 1 1、A s n 4 3 4 および H i s 4 3 5 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。

## 【 0 1 3 7 】

F c R n 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、F c R n 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す得る Kuo および Aveson (2011)。治療用および診断用 I g G 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 I g G 定常ドメインの全部もしくは一部 ( F c R n 結合部分 ) およびこのような改変 I g G 定常ドメインにコンジュゲートされた非 I g G 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 I g G 定常ドメインの存在は、前記抗原結合タンパク質の i n - v i v o 半減期を延長する。

## 【 0 1 3 8 】

半減期の延長をもたらす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 F c R n への結合および / または i n - v i v o 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。

## 【 0 1 3 9 】

よって、本発明は、F c R n 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 F c 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、前記親ポリペプチドに対して F c 領域の 2 2 6、2 2 7、2 2 8、2 3 0、2 3 1、2 3 3、2 3 4、2 3 9、2 4 1、2 4 3、2 4 6、2 5 0、2 5 2、2 5 6、2 5 9、2 6 4、2 6 5、2 6 7、2 6 9、2 7 0、2 7 6、2 8 4、2 8 5、2 8 8、2 8 9、2 9 0、2 9 1、2 9 2、2 9 4、2 9 7、2 9 8、2 9 9、3 0 1、3 0 2、3 0 3、3 0 5、3 0

7、308、309、311、315、317、320、322、325、327、330、332、334、335、338、340、342、343、345、347、350、352、354、355、356、359、360、361、362、369、370、371、375、378、380、382、384、385、386、387、389、390、392、393、394、395、396、397、398、399、400、401、403、404、408、411、412、414、415、416、418、419、420、421、422、424、426、428、433、434、438、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Kabab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イ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

40

#### 【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

50

るアミノ酸置換が含まれる。

【 0 1 4 5 】

#### リンカー

タンパク質足場は、I g 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。

【 0 1 4 6 】

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。

【 0 1 4 7 】

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。

【 0 1 4 8 】

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。

【 0 1 4 9 】

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。

【 0 1 5 0 】

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。

【 0 1 5 1 】

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ICOS結合タンパク質はT細胞の増殖を刺激する。

【 0 1 5 2 】

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、

少なくとも  $1 \times 10^{-5} \text{ M} \cdot \text{s}^{-1}$  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

$100 \text{ nM}$  未満の解離定数 ( $K_d$ )

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 $V_H$ 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 $V_L$ 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 $V_H$ 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。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 $V_H$ 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 $V_H$ 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 $V_H$ 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 $V_L$ 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

40

#### 【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。

## 【化 4】

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTDYAMHWVRQAPGQGLEWMGLISIIYSDHTNYNQKFQGRVTITADKS  
TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCGRNNGYGYFDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV  
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTKYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGP  
PCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST  
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYP  
SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK  
(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】

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHYQQKPGQAPRLLIYDTSKLASGIPARFSGSGSGTDYTLTIS  
SLEPEDFAVYYCFQSGGYPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVD  
NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (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、hlgGPE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バント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CTLA4抗体、および抗PD-1抗体、抗PDL1抗体および抗OX40抗体から選択される。1つの態様では、抗CTLA4抗体はイピリマブである。1つの態様では、抗PD-1抗体は、ペンブロリズマブおよび/またはニボルマブから選択される。

## 【0161】

40

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、ヒトにおいて敗血症を処置するための方法が提供される。

【0164】

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。

【0165】

本発明はまた、本発明のICOS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ICOS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ICOS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ICOS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ICOS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ICOS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

【0166】

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hIgG4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、hIgG4足場はhIgG4PEである。

20

【0167】

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が、ヒトICOS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照抗体またはその抗原結合部分と交差競合する、ICOS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。

【0168】

1つの実施態様では、本発明のICOS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ICOS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、CD69、CD25、および/またはOX40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ICOS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。ICOS結合タンパク質はヒトFcγRIIbと結合するが、ヒトFcγRIIaまたはヒトFcγRIIIaとは結合しない。加えて、ICOS結合タンパク質は好適には、ICOS発現T細胞接触させて置いた場合にICOS発現T細胞を枯渇させない。いくつかの態様では、ICOS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、ICOS結合タンパク質と第2の細胞上のFcγRとの会合を介して起こり得る。FcγR発現細胞としては、限定されるものではないが、単球、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、ICOS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ICOS結合タンパク質はT細胞上のICOSにアゴニストとして働き、第2の細胞上のFcγRも会合させる。

30

40

【0169】

1つの実施態様では、ICOS結合タンパク質は、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。好適には、足場は、ヒトIgG4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、hIgG4PE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、ADCC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、hIgG4PEFc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、卵巣癌および膵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、急性骨髄性白血病および慢性骨髄性白血病などの液体腫瘍を有する。

【0179】

本開示はまた、脳癌(神経膠腫)、膠芽腫、パナヤン-ゾナナ症候群、カウデン病、レルミット-デュークロス疾患、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、膵臓癌、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、慢性骨髄性白血病、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、急性骨髄性白血病、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、前骨髄球性白血病、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。

30

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での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」と呼ばれることもある、造血系(または血液性(hematologic or hematological)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、急性骨髄単球性(または骨髄単芽球性)白血病、急性単球性(または単芽球性)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)、慢性骨髄単球性白血病(CMML)、本態性血小板血症(または血小板増多症)、および真性多血症(PCV)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

40

#### 【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(FL

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 (LP); および粘膜随伴リンパ系組織 (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。

10

#### 【0184】

20

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 (LP) ホジキンリンパ腫、結節性LP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) 単クローン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 (LP)、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、パ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。

30

#### 【0185】

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療、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、エプスタイン・バーウイルス、ヒトサイトメガロウイルス、ヒトパピローマウイルス、ヘルペスウイルス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。

40

#### 【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、

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(cornovirus)、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、シュエドモナス、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*)、グラブラータ(*glabrata*)、トロピカリス(*tropicalis*)など)、クリプトコッカス・ネオフォルマンس(*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*)、リゾプス(*rhizophus*))、スポロトリクス・シェンキー(*Sporothrix schenckii*)、ブラストミセス・デルマトイティディス(*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*)、クリプトスポリジウム種(*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态である。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、骨髄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) ;およびHall, et al. Immunoparalysis and nosocomial infection in children with multiple organ dysfunction syndrome. Intensive Care Med 37:525-532 (2011)。

10

**【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顕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濾胞性ヘルパー細胞(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、感染を助長し得る濾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、濾胞性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、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ICOS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、HIVに感染したヒトを処置するための方法が提供される。

#### 【0197】

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産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るかに高いレベルで発現される抗原であり得る。

10

#### 【0198】

腫瘍抗原の限定されない例としては、以下のもの：MART-1/MelanA(MART-I)、gp100(Pmel17)、チロシナーゼ、TRP-1、TRP-2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、MAGE1、MAGE3、MAGE10、MAGE11、MAGE12、MAGEA2、MAGEA3、MAGEA4、MAGEA6、MAGEA8、MAGEA9、MAGEB18、MAGEB6、MABEC1、MAGED2、MAGEE1、MAGEH1、MAGEL2、BAGE、GAGE-1、GAGE-2、p15を含むMAGEファミリー抗原といった分化抗原；MEL4、黒色腫関連抗原100+、黒色腫gp100、NRIP3、NYS48、OCIAD1、OFA-iLRP、OIP5、卵巣癌関連抗原(OV632)、PAGE4、PARP9、PATE、プラスチンL、PRAME、前立腺特異的抗原、プロテイナーゼ3、プロステイン、Reg3a、RHAMM、ROPN1、SART2、SDCCAG8、SEL1L、SEPT1、SLC45A2、SPANX、SSX5、STXGALNAC1、STEAP4、サバイピン、TBC1D2、TEM1、TRP1、上皮起源の腫瘍抗原、XAGE1、XAGE2、WT-1；CEA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、p53、Ras、HER-2/neu；染色体転座から生じる独特な腫瘍抗原；例えば、BCR-ABL、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR；およびエプスタイン・バーウイルス抗原EBVAおよびヒト乳頭腫ウイルス(HPV)抗原E6およびE7などのウイルス抗原が含まれる。

20

30

#### 【0199】

その他の腫瘍抗原としては、限定されるものではないが、TSP-180、MAGE-4、MAGE-5、MAGE-6、RAGE、NY-ESO、p185erbB2、p180erbB-3、c-met、nm-23H1、PSA、TAG-72、CA19-9、CA72-4、CAM17.1、NuMa、K-ras、-カテニン、CDK4、Mum-1、p15、p16、43-9F、5T4、791Tgp72、-フェトタンパク質、-HCG、BCA225、BTAA、CA125、CA15-3、CA27.29、BCAA、CA195、CA242、CA-50、CAM43、CD68、P1、CO-029、FGF-5、G250、Ga733、EpCAM、HTgp-175、M344、MA-50、MG7-Ag、MOV18、NB/70K、NY-CO-1、RCAS1、SDCCAG16、TA-90、Mac-2結合タンパク質、シクロフィリンC関連タンパク質、TAAL6、TAG72、TLP、TPS、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(AFP)、レクチン反応性AFP、チログロブリン、RAGE-1、MN-CAIX、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素、RU1、RU2(AS)、腸管カルボキシルエステラーゼ、mut hsp70-2、M-CSF、プロスターゼ、前立腺特異的抗原(PSA)、PAP、NY-ESO-1、LAGE-1a、p53、プロステイン、PSMA、Her2/neu、サバイピンおよびテロメラーゼ、前立腺癌腫瘍抗原-1(PCTA-1)、ELF2M、好中

40

50

球エラストーゼ、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ピンカアルカロイドなどの抗微小管剤；白金錯体；ナイトロジェンマスタード、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；カンプトテ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ピ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 $\alpha$ -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

。

## 【 0 2 0 5 】

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. Nat. 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 (Forastire 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、多発性嚢胞腎疾患 (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)。

10

## 【 0 2 0 6 】

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 - ブチルエステル 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 III を使用して製造された、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。

20

## 【 0 2 0 7 】

ビンカアルカロイドは、ニチニチソウ由来の細胞周期特異的抗新生物薬である。ビンカアルカロイドは、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。ビンカアルカロイドの例としては、限定されるものではないが、ビンブラスチン、ピンクリスチン、およびビノレルピンが挙げられる。

## 【 0 2 0 8 】

ビンブラスチン、硫酸ビンカロイコブラスチンは、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。ビンブラスチンは、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。骨髄抑制がビンブラスチンの用量制限副作用である。

30

## 【 0 2 0 9 】

ピンクリスチン、ビンカロイコブラスチンの 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。ピンクリスチンは、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ピンクリスチンの最も一般的な副作用であり、程度は低い、骨髄抑制および胃腸粘膜炎症作用が生じる。

40

## 【 0 2 1 0 】

酒石酸ビノレルピンの注射液 (ナベルピン (NAVELBINE) (登録商標)) として市販されているビノレルピン、3', 4' - ジデヒドロ - 4' - デオキシ - C' - ノルビンカロイコブラスチン [R - (R\*, R\*) - 2, 3 - ジヒドロキシブタン二酸 (1:2) (塩)] は、半合成ビンカアルカロイドである。ビノレルピンは、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ピンの最も一般的な用量制限副作用である。

## 【 0 2 1 1 】

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、シスプラチンおよびカルボプラチンが挙げられる。

【0212】

シスプラチン、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(PLATINOL) (登録商標)として市販されている。シスプラチンは、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ン(PARAPLATIN) (登録商標)として市販されている。カルボプラチンは、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ルなどのナイトロジェンマスタード; 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-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、悪心、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】

クロラムブシル、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。クロラムブシルは、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ルの最も一般的な用量制限副作用である。

【0218】

ブスルファン、ジメタンスルホン酸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、慢性骨髄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、BiCNU (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

【 0 2 2 0 】

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。悪心、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。

【 0 2 2 1 】

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 にインターカレートする。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。

10

【 0 2 2 2 】

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メゲン (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。悪心、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。

20

【 0 2 2 3 】

ダウノルビシン、( 8 S - 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、リボ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。

【 0 2 2 4 】

ドキソルビシン、( 8 S , 10 S ) - 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芽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。

30

【 0 2 2 5 】

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、ブレノキサネ (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。

40

【 0 2 2 6 】

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、エピドフィロトキシンが挙げられる。

【 0 2 2 7 】

エピ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

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(VePESID)(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、および膵癌の治療に指示される。骨髄抑制および粘膜炎症が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-フルオロデオキシウリジン(フロクスウリジン)および5-フルオロデオキシウリジン-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'-ジフルオロデオキシシチジン(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、および粘膜炎症を誘発する。

【0233】

メルカプトプリン、1,7-ジヒドロ-6H-プリン-6-チオン-水和物は、プリンツール(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。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症が、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、およびクラドリピンが挙げられる。

#### 【0235】

ゲムシタピン、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。ゲムシタピンは、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。ゲムシタピンは、シスプラチ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、ゲムシタピン投与の最も一般的な用量制限副作用である。

#### 【0236】

メトトレキサート、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、メトトレキサートナトリウムとして市販されている。メトトレキサートは、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HCl、(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:イリノテカンまたは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HCl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GI作用である。

#### 【0240】

トポテカンHCl、(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C D 2 0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 】

オフアツムマブは、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。オフアツムマブは、B細胞上のC D 2 0と結合し、フルダラピン(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C L L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、H E R 2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、H E R 2陽性乳癌である。

【 0 2 4 4 】

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

【 0 2 4 5 】

m T O R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(F K 5 0 6) およびラパログ、R A D 0 0 1またはエベロリムス(アフィニートール)、C C I - 7 7 9またはテムシロリムス、A P 2 3 5 7 3、A Z D 8 0 5 5、W Y E - 3 5 4、W Y E - 6 0 0、W Y E - 6 8 7およびP p 1 2 1が含まれる。

20

【 0 2 4 6 】

ベキサロテンは、ターグレチン(Targretin) (登録商標) として市販され、レチノイドX受容体(R X R) を選択的に活性化するレチノイドのサブクラスメンバーである。これらのレチノイド受容体は、レチノイン酸受容体(R A R) 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C T C L (皮膚癌の一種) を治療するために使用される。

30

【 0 2 4 7 】

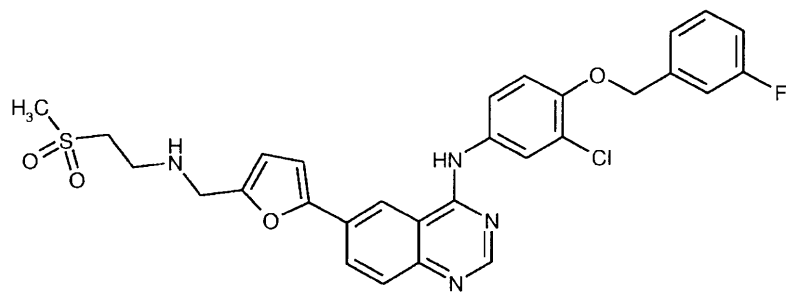
ネクサバル(Nexavar) (登録商標) として市販されているソラフェニブは、マルチキナーゼ阻害剤と呼ばれる薬剤の一種である。その化学名は、4 - [ 4 - [ [ 4 - クロロ - 3 - (トリフルオロメチル) フェニル] カルバモイルアミノ] フェノキシ] - N - メチル - ピリジン - 2 - カルボキサミドである。ソラフェニブは、進行性腎細胞癌(腎臓で始まる癌の一種) を治療するために使用される。ソラフェニブはまた、切除不能肝細胞癌(手術で処置できない肝臓癌一種) を治療するためにも使用される。

【 0 2 4 8 】

e r b B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I Iで表される) は、H E R 2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、e r b B - 1およびe r b B - 2 (E G F RおよびH E R 2) 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】



II

10

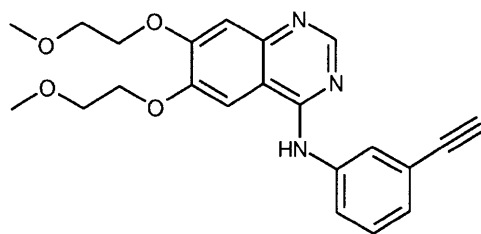
## 【 0 2 4 9 】

式 ( I I ) の化合物の遊離塩基、H C l 塩、およびニトシル酸は、1999年7月15日公開のW O 9 9 / 3 5 1 4 6 ; および2002年1月10日公開のW O 0 2 / 0 2 5 5 2 に開示されている手順に従って製造することができる。

## 【 0 2 5 0 】

商標タルセ (Tascerva) として市販されているエルロチニブ、N - ( 3 - エチニルフェニル ) - 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 I I I で表される。

## 【化 7】



III

20

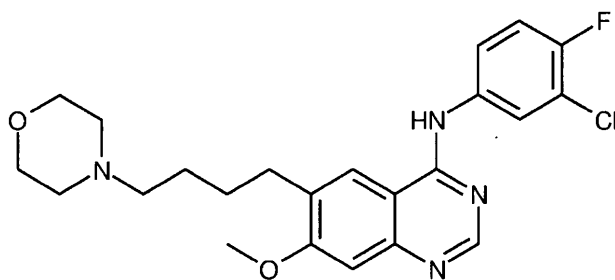
## 【 0 2 5 1 】

エルロチニブの遊離塩基およびH C l 塩は、例えば米国特許第 5 , 7 4 7 , 4 9 8 号の実施例 2 0 に従って製造することができる。

## 【 0 2 5 2 】

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 I V で表される。

## 【化 8】



IV

40

## 【 0 2 5 3 】

商標イレッサ (IRESSA) (登録商標) (A s t r a - Z e n e n c a ) として市販されて

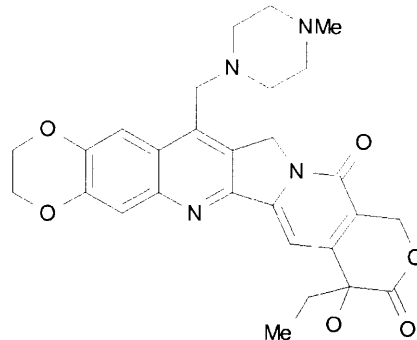
50

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っ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 日に出版され、1、1996 年 10 月 31 日に WO 96/33980 として公開された国際特許出願 PCT/GB 96/0096 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】



A

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。

【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、アミノグルテチミドおよびその他のアロマトーゼ阻害剤、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テリン; 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、ピカルタミド、酢酸シプロテロンおよび 5 $\alpha$  - 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

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(phosphatidylinositol) - 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与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。

【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、Trk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。

【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、cAbl、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 Hematotherapy 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。

【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】

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 ( 、 、 、 μ、 、 、 ) 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 , 2 6 8 , 3 9 1 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。

#### 【 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。

#### 【 0 2 6 3 】

また、ホスホリパーゼ 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、ファルネシル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。

#### 【 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つ。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) 。

#### 【 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



(両受容体とも受容体型チロシンキナーゼである)。e r b B 2 および E G F R の阻害剤は血管新生、主として V E G F 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、e r b B 2 / E G F R シグナル伝達に関連する。よって、e r b B 2 / E G F R 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 E G F R / e r b B 2 阻害剤と併用可能である。例えば、V E G F R (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 V E G F 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 R T K) も、開示されている e r b 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)。

10

#### 【 0 2 6 7 】

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。e r b B 2 または E G F R 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 e r b B 2 / E G F R 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。e r b B 2 / E G F R に対する免疫 / 腫瘍ワクチン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。

20

#### 【 0 2 6 8 】

アポトーシス誘導計画に使用される薬剤 (例えば、b c l - 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。B c l - 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、b c l - 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 (E G F) は b c l - 2 ファミリーの抗アポトーシスメンバー (すなわち、m c l - 1) を刺激することが示されている。従って、腫瘍において b c l - 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 I I / I I I 相試験下にある (すなわち、G e n t a の G 3 1 3 9 b c l - 2 アンチセンスオリゴヌクレオチド)。b c l - 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 Kitad a S et al. (1994, Antisense Res. Dev. 4: 71-79に考察されている。

30

#### 【 0 2 6 9 】

トラスツズマブ (ハーセプチン (HEREPTIN) (登録商標)) は、H E R 2 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 H E R 2 陽性乳癌である。

#### 【 0 2 7 0 】

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 (D M 1) 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、H E R 2 / n e u 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 H E R 2 を標的とし、H E R 2 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 - D M 1 と略される。

40

#### 【 0 2 7 1 】

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

#### 【 0 2 7 2 】

ベルツズマブ (2 C 4 と呼ばれる、商標オムニターグ (Omnitarg)) は、モノクローナル抗体である。「H E R 二量体化阻害剤」と呼ばれる薬剤系列のそのクラスの筆頭。H E R 2 と結合することにより、それは H E R 2 と他の H E R 受容体との二量体化を阻害し

50

、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WO 01 / 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】

オフアツムマブは、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。オフアツムマブは、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。

【0275】

細胞周期シグナル伝達阻害剤は、細胞周期の制御に関与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。

【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/ニボルマブおよびキートルーダ/ペンブロリズマブ）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。

【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/ニボルマブは、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P13k/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/ペンブロリズマブは、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。ペンブロリズマブのアミノ酸配列および使用方法は、米国特許

10

20

30

40

50

第 8 , 1 6 8 , 7 5 7 号に開示されている。

【 0 2 8 0 】

O X 4 0 としても知られる C D 1 3 4 は、C D 2 8 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 N F R スーパーファミリーのメンバーである。O X 4 0 は、活性化の 2 4 ~ 7 2 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 O X 4 0 L 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。O X 4 0 の発現は、T 細胞の完全な活性化に依存し、C D 2 8 が無ければ、O X 4 0 の発現は遅れ、4 分の 1 のレベルとなる。O X - 4 0 抗体、O X - 4 0 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 , 5 0 4 , 1 0 1 号；同第 7 , 7 5 8 , 8 5 2 号；同第 7 , 8 5 8 , 7 6 5 号；同第 7 , 5 5 0 , 1 4 0 号；同第 7 , 9 6 0 , 5 1 5 号；W O 2 0 1 2 0 2 7 3 2 8 ；W O 2 0 1 3 0 2 8 2 3 1 に開示されている。

10

【 0 2 8 1 】

P D - L 1 ( C D 2 7 4 または B 7 - H 1 と呼ばれる ) に対する抗体および使用方法は、米国特許第 7 , 9 4 3 , 7 4 3 号；同第 8 , 3 8 3 , 7 9 6 号；U S 2 0 1 3 0 0 3 4 5 5 9、W O 2 0 1 4 0 5 5 8 9 7、米国特許第 8 , 1 6 8 , 1 7 9 号；および同第 7 , 5 9 5 , 0 4 8 号に開示されている。P D - L 1 抗体は、癌治療のための免疫調節薬として開発中である。

【 0 2 8 2 】

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

【 0 2 8 3 】

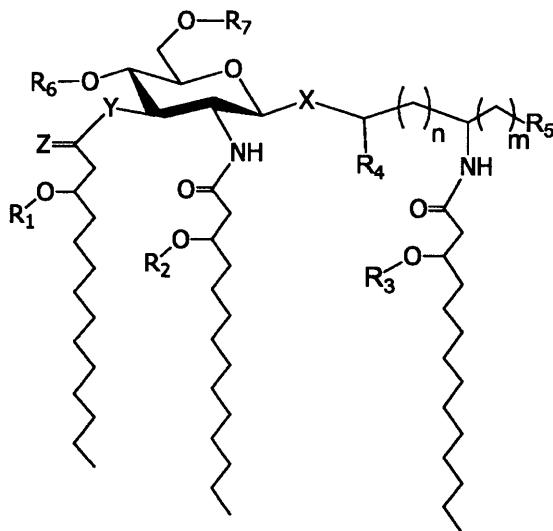
アミノアルキルグルコサミニドホスフェート ( A G P ) は、免疫動物におけるサイトカイン産生の刺激、マクロファージの活性化、自然免疫応答の促進、および抗体産生の増強のためのワクチンアジュバントおよび免疫刺激薬として有用であることが知られている。アミノアルキルグルコサミニドホスフェート ( A G P ) は、T o l l 様受容体 4 ( T L R 4 ) の合成リガンドである。A G P および T L R 4 を介したそれらの免疫調節効果は、W O 2 0 0 6 / 0 1 6 9 9 7、W O 2 0 0 1 / 0 9 0 1 2 9、および / または米国特許第 6 , 1 1 3 , 9 1 8 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 A G P 誘導体も、米国特許第 7 , 1 2 9 , 2 1 9 号、同第 6 , 5 2 5 , 0 2 8 号および同第 6 , 9 1 1 , 4 3 4 号に開示されている。特定の A G P は T L R 4 のアゴニストとして働き、他のものは T L R 4 アンタゴニストとして認識される。

30

【 0 2 8 4 】

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

〔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  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$  は、 $C_{1-20}$  アシルおよび  $C_{1-20}$  アルキルからなる群から独立に選択され；

 $R_4$  は、H または Me であり；

$R_5$  は、-H、-OH、- ( $C_1 - C_4$ ) アルコキシ、-  $PO_3 R_8 R_9$ 、-  $OPO_3 R_8 R_9$ 、-  $SO_3 R_8$ 、-  $OSO_3 R_8$ 、-  $NR_8 R_9$ 、-  $SR_8$ 、-  $CN$ 、-  $NO_2$ 、-  $CHO$ 、-  $CO_2 R_8$ 、および  $CONR_8 R_9$  からなる群から独立に選択され、ここで、

各  $R_8$  および  $R_9$  は、H および ( $C_1 - C_4$ ) アルキルから独立に選択され；かつ

各  $R_6$  および  $R_7$  は独立に、H または  $PO_3 H_2$  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、 $R_1 O$ 、 $R_2 O$ 、および  $R_3 O$ ）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）。 $R_4$  および  $R_5$  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。

## 【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  $R_1$ 、 $R_2$ 、および  $R_3$  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、 $R_1$ 、 $R_2$  および  $R_3$  が 6 または 10 または 12 または 14 である鎖長が含まれる。

## 【0288】

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

10

20

30

40

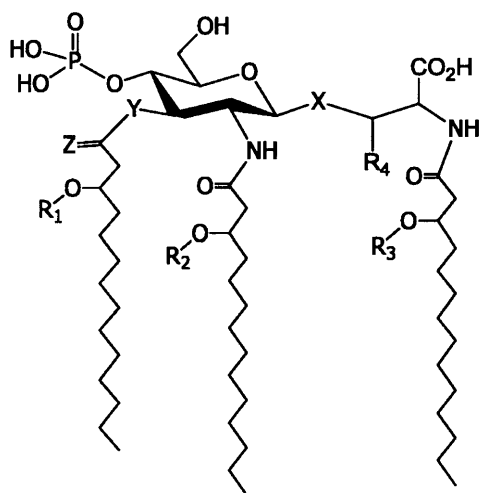
50

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 of 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  $CO_2H$  であり、 $R_6$  は  $PO_3H_2$  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】



式 1 a

〔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、 $C_{1-20}$  アシルおよび  $C_{1-20}$  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、 $R_1O$ 、 $R_2O$ 、および  $R_3O$ ) 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)。  $R_4$  および  $CO_2H$  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。

【0291】

式 1 a は、L/D - セリル、-トレオニル、-システイ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。

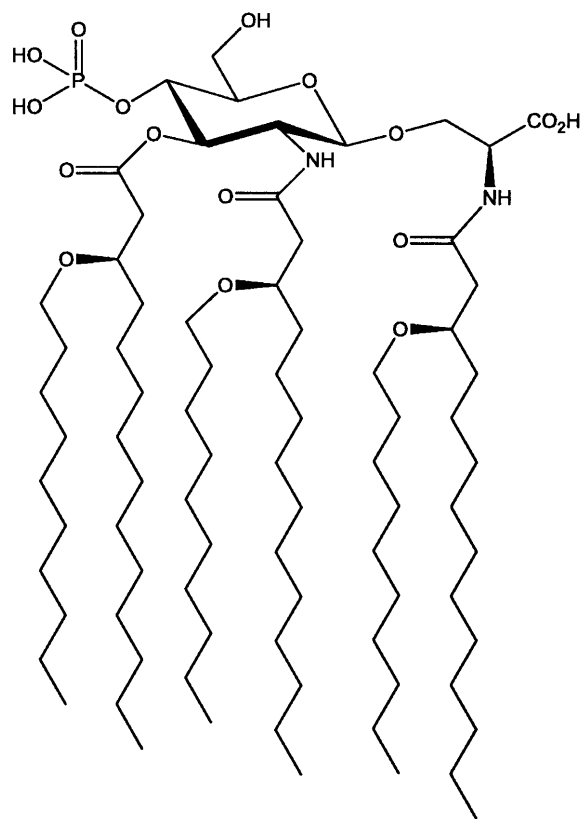
【0292】

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。

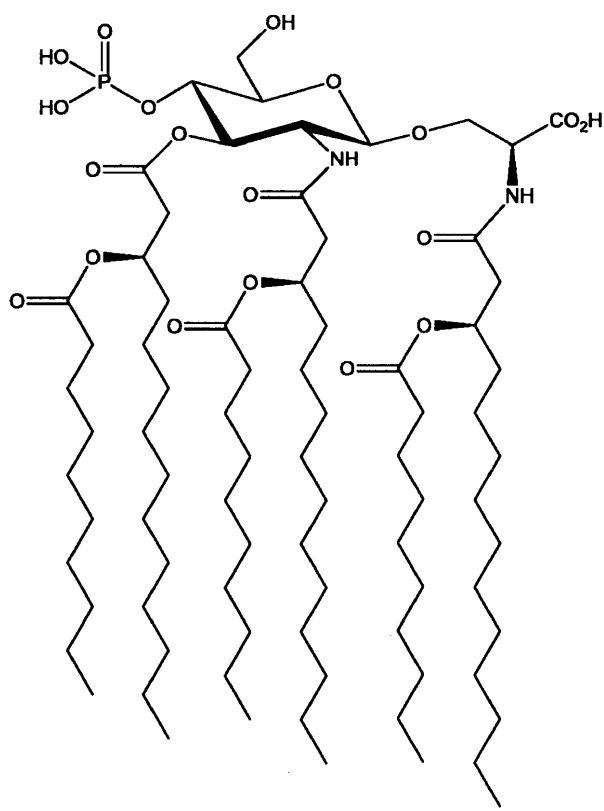
【0293】

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。それらの構造は下記のように示される。

## 【化 1 2】



(CRX-601)

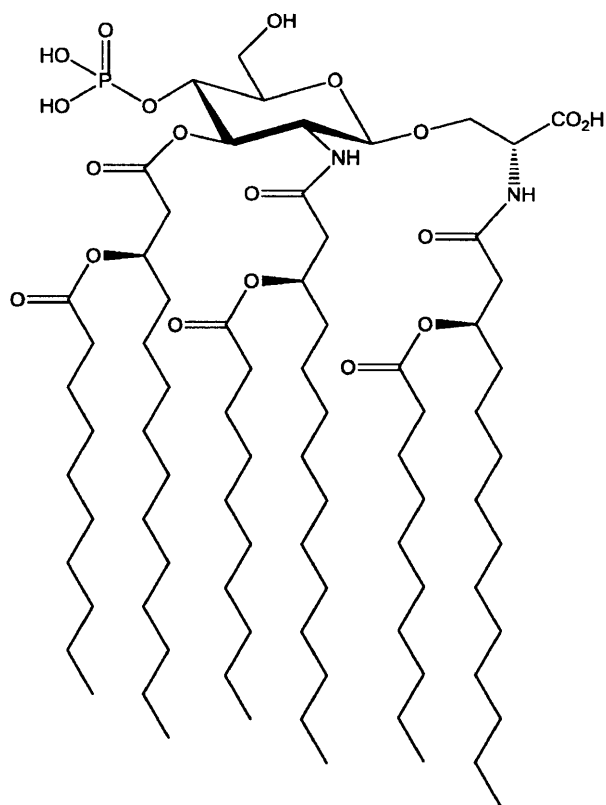


(CRX-527)

## 【 0 2 9 4】

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。

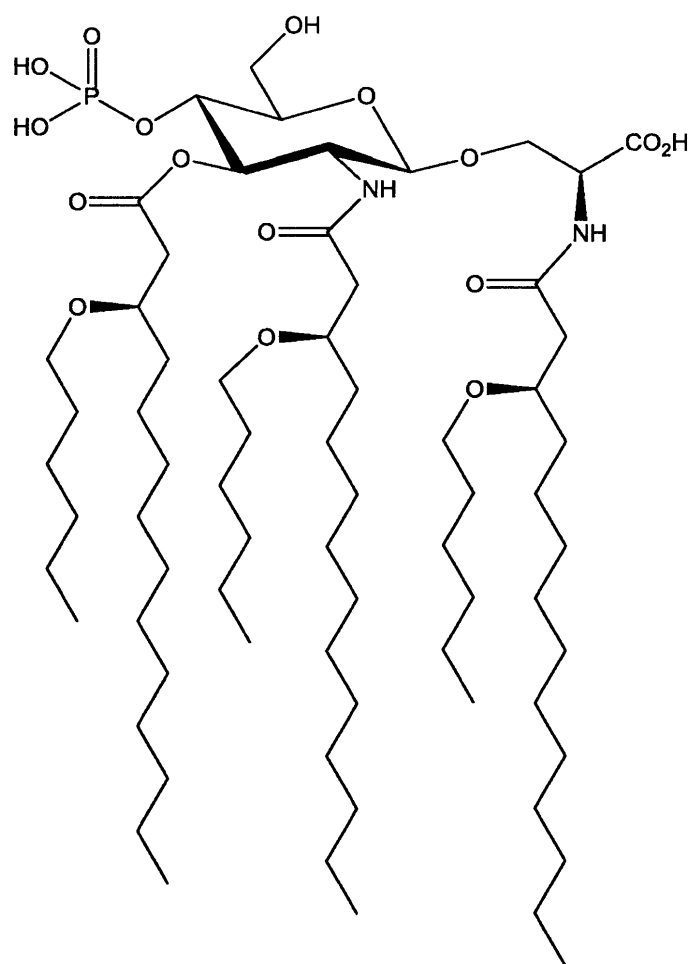
【 0 2 9 5 】  
 C R X 5 4 7  
 【 化 1 3 】



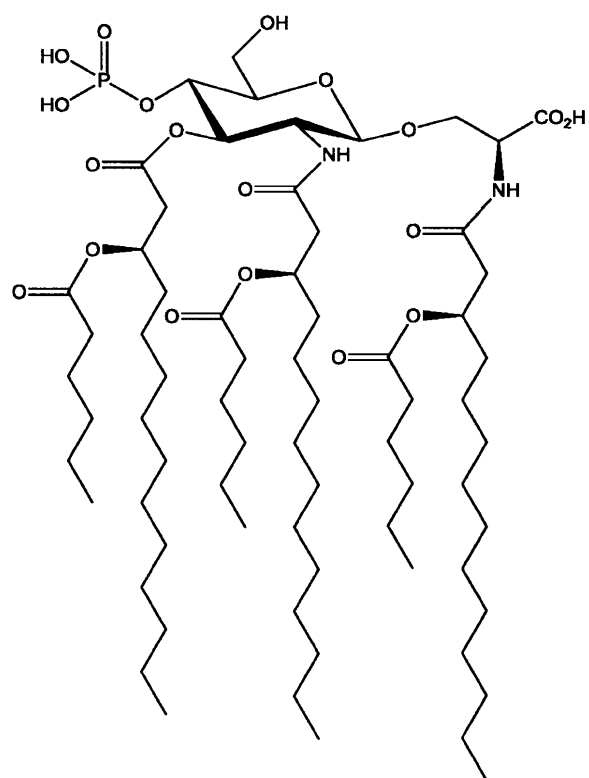
【 0 2 9 6 】

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 1 4】



CRX 602



CRX-526

## 【 0 2 9 7】

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ICOS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。

【0298】

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ICOS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

【0299】

1つの実施態様では、前記第2の免疫調節薬は、抗CTLA4抗体、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗OX40抗体、抗GITR抗体、および抗41BB抗体、抗LAG3抗体および抗TIM3抗体の群から選択される。

【0300】

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ICOS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

【0301】

1つの実施態様では、前記免疫刺激薬はTLR4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AGP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1aの化合物である。1つの態様では、前記免疫刺激薬は、CRX-601、CRX-547、CRX-602、CRX-527、およびCRX-526からなる群から選択される。

【実施例】

【0302】

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。

【0303】

30

実施例1：癌におけるICOS発現

一般に、固形腫瘍は、ICOS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ICOS<sup>+</sup>T細胞を有すると思われる。種々の腫瘍組織学間のICOS発現分析は、The Cancer Genome Atlas (TCGA) およびその他のデータベースからの公開mRNA発現データセットを用いて作出した。表3は、いくらかの検出可能なレベルのICOS mRNA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、RCC、NSCLC)を、検出可能なICOS<sup>+</sup>腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を有する腫瘍のパーセンテージが比較的高い(>10%)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、および膵臓腫瘍)を、ICOS<sup>+</sup>

40

TILを有する腫瘍のパーセンテージが比較的低い(<10%)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ICOS<sup>+</sup>TILを示す腫瘍種の中にあった。これらのmRNA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ICOSを発現するTILの部分集団である。ICOSは主として腫瘍浸潤Treg上で発現される場合もあり、ICOS<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。

【0304】

## 【表 3】

表 3 種々の腫瘍種の ICOS mRNA 発現

腫瘍種	総 N	ICOS+(N)	ICOS+(Per.)
H&N	426	157	36.9%
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

## 【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得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。

30

40

## 【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
膵臓癌	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)

## 【 0 3 0 7 】

## 実施例 2 : I C O S 抗体アゴニストのスクリーニング

## 原発性ヒト P B M 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 50 ml 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 x 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、100 μM セルストレナーを通して新しい 50 ml 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 x g で遠心分離した。細胞ペレットを 10 ml 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 40 ml とし、Vice11 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 0 8 】

## 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 Biotec) 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 P B M C からさらに精製した。まず、P B M 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

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MiniMACS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でブレーキ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40 mL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

15 mLのコニカルチューブにて、標識する細胞を1 mLの予温PBSに終濃度1 E 7細胞 / mLで再懸濁させた。1 µLの2 mM 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、14 mL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RPMI 1640 + 10 % FBSで1 E 6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って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FACS Canto 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Cyto

10

20

30

40

50

meter Setup & Trackingビーズ (BD Biosciences) を用いて毎日確認し、PMT電圧およびエリヤスケ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OneComp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 QuickPlex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、100 IU/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 hIgG4PE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 hIgG4PEを細胞の播種時にウェルに加えた。37°Cで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PBMCin 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、100 IU/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 hIgG4PE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°Cで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。ダブレットには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。死細胞およびダブレットを除外し

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。

【0318】

#### FACSによる細胞枯渇分析

細胞枯渇は、FlowJoにより分析した。まず、LIVE/DEAD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CD4+またはCD8+T細胞部分集団のパーセンテージを計算した。

【0319】

#### 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。

$Y = \text{最小} + (\text{最大} - \text{最小}) / (1 + 10^{-(\text{LogEC50} - X) \times \text{ヒルの傾き}})$

【0320】

#### 結果

##### 主要マウス抗ヒトICOS抗体の同定

14のマウスmAbをヒトおよびカニクイザルICOS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、増幅、および機能研究に十分な量での精製が可能であった。BIAcore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mAb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IFN- $\gamma$  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mAb(以下の表で5422.2、279.1、314.8および88.2と呼称)が、ヒトIgG1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CDR配列は、PCT/EP2012/055735(WO2012/131004)に他のICOS mAbとともに示されている。

【0321】

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。

【化15】

QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYSFTSYWINWVKQRPGQGLEWIGNIYPSDSYTNYNQMFKDKATLTVDKS  
SNTAYMQLTSPTSEDSAVYYCTRWNLSEYFDNNYYLDYWGQGTTTLTVSS (配列番号13)

【0322】

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16】

QAVVTQESALTTSPGETVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAAL  
TITGAQTEDEAIYFCALWYNNHLVFGGGTKLTVL (配列番号14)

【0323】

10

20

30

40

## 【表 5】

表 5: ICOS mAb 結合および競合

ICOS mAb クローン番 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	-	++	++	+

10

## 【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細胞増殖に関して試験した。これらのアッセイに基づき、422.2と称されるクローンがヒト化のために選択された。図1および2を参照。

20

## 【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む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LB-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。

30

## 【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。

40

## 【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するキメラ抗体を作製した。

## 【0329】

## 422.2の可変ドメインのヒト化

50

ヒト可変(V)遺伝子鋳型を、適当なインハウス・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鋳型として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、コドンをも最適化し、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。

#### 【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%プルロニックF68を添加したFreeStyle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-Fectin)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%CO<sub>2</sub>、125rpmでインキュベートした。トランスフェクションによっては、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%プルロニック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。

#### 【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、Nandrop分光光度計で定量した。

#### 【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、そ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】

422 HC

#### 【化17】

QVQLQQSGPELVRPGESVKISCMGSGYTFTDYAMHWVKQSHAKSLEWIGLISIIYSDHTNYNQKFQ GKATMTVDKSSSTAYMELARLTSEDSAIYYCGRNNYGNYGWYFDVWGAGTTTVTVSS (配列番号19)

422 LC

#### 【化18】

ENVLTQSPAIMASAPGKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSITSPKLWIYDTSKLSAGVPGRFSGSGSGNSYSLTIS SMEAEDVATYYCFQSGGYPTFGGGTKLEIKR (配列番号20)

10

20

30

40

50



## 【 0 3 3 5 】

再生された可変領域を選択した p T T 5 ベクターにクローニングしたところ、h I g G 1 F c 野生型、h I g G 1 F c 無効型 ( L 2 3 5 A / G 2 3 7 A、E U ナンバリング ) または h I g G 4 P E ( S 2 2 8 P / L 2 3 5 E、E U ナンバリング ) 上に 4 2 2 . 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。

## 【 0 3 3 6 】

4 2 2 . 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 p T T 哺乳動物発現プラスミドの構築が首尾良く行われた。

10

## 【 0 3 3 7 】

H 2 L 5 h I g G 4 P E の発現、精製および同定

H 2 L 5 h I g G 4 P E 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。H 2 L 5 h I g G 4 P E 重鎖および軽鎖のコード領域の D N A 配列は、図 1 0 および 1 1 に含まれていた。

## 【 0 3 3 8 】

実施例 4 : H 2 L 5 の機能的分析

F c 受容体結合

ヒト化抗体 H 2 L 5 は、抗原結合フラグメント ( F a b ) のアーム交換を防ぐため、ヒト I g G 1 アイソタイプから、変異 S 2 2 8 P、L 2 3 5 E ( E U ナンバリング ) を組み込んだ改変型ヒト I g G 4 アイソタイプへと改変した。ヒト I g G 4 P E は m A b の、活性化している F c 受容体および C 1 q への結合を低下させ、従って、抗体依存性細胞傷害性 ( A D C C ) または補体依存性細胞傷害性 ( C D C ) により I C O S 陽性細胞の枯渇を誘導する m A b の能力を低下させるので、ヒト I g G 1 よりも優ると選択された。加えて、ヒト I g G 4 P E ( S 2 2 8 P、L 2 3 5 E ) は、F c R I I b ( 阻害性 F c 受容体 ) への結合を保持する。F c R I I b との相互作用は、抗体架橋を可能とすることによる I C O S 抗体のアゴニスト活性に重要であり得る。F c R I I b との相互作用は、T N F - ファミリー受容体ならびに C D 2 8 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

30

## 【 0 3 3 9 】

さらに、ヒト I g G 4 P E は、m A b の、活性化している F c 受容体 ( F c R I、F c R I I a および F c R I I I a ) および C 1 q への結合を低下させ、従って、抗体依存性細胞傷害性 ( A D C C ) または補体依存性細胞傷害性 ( C D C ) により I C O S 陽性細胞の枯渇を誘導する m A b の能力を低下させることも示されている。加えて、ヒト I g G 4 P E ( S 2 2 8 P、L 2 3 5 E ) は、F c R I I b ( 阻害性 F c 受容体 ) への結合を保持する ( 表 6 )。

## 【 0 3 4 0 】

以下の表 6 は、h I g G 1 または h I g G 4 P E 抗体のいずれかとしての主要 H 2 L 5 の、ヒト F c 受容体に対する代表的結合親和性を示す。

40

## 【 0 3 4 1 】

## 【表 6】

表 6 ヒト Fcγ 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	FcγR I	FcγR IIa H131	FcγR IIa R131	FcγR IIb	FcγR IIIa V158	FcγR 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PBM活性アッセイで試験した。抗ICOSキメラ422.2は、結合型PBM活性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クローン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PBM活性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

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFFTDYAMHWVRQAPGQGLEWIGLISIYSDHTNYNQKFQGRATMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCGRNNYGNYGWYFDVWGQGTFTVTVSS (配列番号15)

## 成熟H5重鎖

## 【化20】

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFFTDYAMHWVRQAPGQGLEWIGLISIYSDHTNYNQKFQGRATMTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCGRNNYGNYGWYFDVWGQGTFTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNATKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (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 2 1】

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPGQAPRLLIYDTSKLASGIPARFSGSGSGTDFTLTIS  
SLEPEDFAVYYCFQGSQGYPTFGQGTKLEIK (配列番号 17)

## 成熟LO軽鎖

## 【化 2 2】

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWYQQKPGQAPRLLIYDTSKLASGIPARFSGSGSGTDFTLTIS  
SLEPEDFAVYYCFQGSQGYPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD  
NALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (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PBMC活性化アッセイで試験した。この可溶形式は、全PBMC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 - およびTNF - 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PBMC活性化アッセイにおけるH2L5 hIgG4PEの機能試験

全ヒトPBMC 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PBMC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PBMC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PBMCに対するICOS mAb活性

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

50

刺激アッセイでH2L5 hIgG4PE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CD3 DynaビーズおよびCD3/CD28 Dynaビーズ(ThermoFisher)を種々のビーズ：細胞比で用いてPBMCを前刺激した。48時間の前刺激の後、細胞を採取し、ビーズを磁氣的に除去した後、可溶型ICOS mAbの存在下または不在下で、抗CD3 Dynaビーズ(ビーズ：細胞比=1:1)で再刺激した。H2L5 hIgG4PE ICOSアゴニストmAb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IFNの誘導をもたらしたが、IFN産生の規模は前刺激の強度と逆相関した。

【0351】

#### 実施例5 - T細胞活性化マーカー

10

##### 方法

機能的エンドポイントにおける濃度依存的変化は、健康なヒトPBMCを0.6 µg/mLでの抗CD3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H2L5 hIgG4PE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CD69、OX40およびCD25の発現の変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、Ki67核染色の変化によって測定した。CD3会合の存在下でH2L5 hIgG4PE処理に应答した種々のTh1、Th2およびTh17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。

20

【0352】

##### 試験準備

##### ヒト末梢血単核細胞(PBMC)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(PBS)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 x 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PBSを加え、室温にて5分間400 x gで遠心分離した。PBMCをPBSで1回洗浄し、従前に記載されたように遠心分離した。PBMCを50 mL AIM-V培地に再懸濁させた。Vi-Cell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。

30

【0353】

##### 抗体コーティング

抗ヒトCD3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 H2L5 hIgG4PEおよび7.9 mg 抗RSV IgG4 PE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CD3コーティングプレートにコーティングした。

40

【0354】

##### 試験プロトコール

##### ヒトPBMC活性化アッセイ

H2L5 hIgG4PEを、抗CD3抗体を介したTCR会合とH2L5 hIgG4PEによるICOSの補助刺激が同時に起こるヒトPBMC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PBMC(1 x 10<sup>6</sup> 細胞/mL)を、種々の濃度のH2L5 hIgG4PEまたはIgG4アイソタイプ対照を含む抗CD3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。PBMCを37および5%CO<sub>2</sub>で、

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、FACS Canto IIフローサイトメーターに流した。

10

#### 【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抗マウスビ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

20

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セットを用い、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、FACS Canto IIフローサイトメーターに流した。

30

#### 【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で、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。

40

#### 【0359】

##### ヒトIFN サイトカインアッセイ

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。巡回した後、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  $\mu$ L 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 150  $\mu$ L 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  $\mu$ L の各検出抗体を希釈剤に加えた。25  $\mu$ L 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。リードバッファをこれらのプレートに加え、それらを Quick Plex で読み取った。

10

【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 (Mesoscale)、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

20

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。

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

【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 対応の学生 t 検定によって分析した。

【0363】

#### 結果

30

##### 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、TNF 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

40

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 Ki67 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増加をも

50

たらしした (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増加 (H2L5 hIgG4PE が 0.4  $\mu\text{g/mL}$  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増加 (0.2 ~ 1.6  $\mu\text{g/mL}$  の間の濃度では  $p < 0.05$ ) は有意であった (表 7 参照)。

【0366】

【表 7】

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 ( $\mu\text{g/mL}$ )

	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- $\gamma$	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- $\alpha$	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

【0367】

10

20

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 CD8 T 細胞のパーセント

	抗体濃度	H2LA hIgG4PE (CD4 または CD8 T 細胞の%)			アイソタイプ対照 (CD4 または CD8 T 細胞の%)			TTEST
	μg/ml	ドナー 185M45	ドナー 1124F36	ドナー 1149M52	ドナー 185M45	ドナー 1124F36	ドナー 1149M52	(p 値)
%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
% Ki67+ CD4 T 細胞	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
	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>
% Ki67+ CD8 T 細胞	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>
	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>
%Ki67+ Treg 細胞	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
	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

【 0 3 6 8 】

## 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である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。測定した総ての 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H2L5 hIgG4PE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H2L5 hIgG4PE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、H2L5 hIgG4PEで処理した際に両時点で増加し、H2L5 hIgG4PE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H2L5 hIgG4PE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H2L5 hIgG4PE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., The lper type 17 cells contribute to anti-tumour immunity and promote the recruitmen t 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; Paulos CM et al. The inducible costimulator (ICOS) is critical for the developme nt 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 t issue. J Immunol, 2015; 194: 1737-1747]。H2L5 hIgG4PE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H2L5 hIgG4PE刺激の後に細胞培養上清で測定された。H2L5 hIgG4PEは、ヒトPBMCにおいてTh1サイトカインであるIFN- およびTNF- 、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、H2L5 hIgG4PE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- 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- 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、H2L5 hIgG4PE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、ベ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 Immunostimulatory Anticancer Antibodies. Cancer Cell, 2015, 27: 138-148; Luhder, F., et al, Topological Requirements and Signaling Properties of T Cellactivating, 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]。H2L5 hIgG4PE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、H2L5 hIgG4PE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

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。

【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Fc2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

【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。

【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Ka / Kd / KDを示す。

【0378】

【表9】

表9 ヒトICOSに対する結合

サンプル	標的	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (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を得られ、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。

【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。

【0381】

実施例 7：ヒト活性化T細胞に対するH2L5 hIgG4PE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ブ単離した： Rosette SepヒトT細胞濃縮： 100 mLの新鮮な全血を、液体ナトリウムヘパリン（Sagentt終濃度10 IU/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1 mL当たり50  $\mu$ LのRosette SepヒトT細胞濃縮カクテル加えた（5 mL / 100 mL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200 mLに対する。次に、25 mLの希釈血液 / 抗体カクテルをSepmateチューブ内の15 mL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50 mL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50 mL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50 mL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50 mL 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2 mLのRPMI完全培地（RPMI 1640 + 10% FCS + 1 mMピルビン酸ナトリウム + 2 mM L - グルタミン + ペニシリン100 U/mL + ストレプトマイシン100  $\mu$ g/mL）に再懸濁させた。回収したCD3細胞をVice11装置で計数し、さらに希釈して1.2 × 10<sup>6</sup> 細胞/mLとした。T細胞単離の質を確認するために、1 × 10<sup>6</sup> の回収細胞をCD3 PE - Cy7に対して染色した。

【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

PBMC単離： 簡単に述べれば、100 mLの新鮮な全血を、液体ナトリウムヘパリン（Sagentt終濃度10 IU/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200 mLとした。25 mLの希釈血液を、Sepmateチューブ（各ドナーにつき合計8本）中の15 mL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50 mL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50 mLとした。

10

20

30

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  $50 \text{ mL}$  コニカルチューブに合わせ、合計容量  $50 \text{ mL}$  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 (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、単離バッファで終濃度  $1 \times 10^8$  細胞 /  $\text{mL}$  とした。

#### 【0383】

In vit ro ge n Dy na be ad Un to u ch e d ヒト T 細胞単離：  $2 \times 10^8$  の単離 PBMC ( $2 \text{ mL}$ )、 $400 \mu\text{L}$  の FBS、次いで In vit ro ge n Un to u ch e d T 細胞キットからの  $400 \mu\text{L}$  の抗体ミックスを各  $15 \text{ mL}$  チューブに加え、4 で 20 分間インキュベートした。細胞を  $10 \text{ mL}$  の単離バッファで洗浄し、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  $2 \text{ mL}$  の単離バッファに再懸濁させた。次に、各チューブに  $2 \text{ mL}$  の、予め洗浄した De pl e ti o n Dy na 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、巡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、 $10 \text{ mL}$  の単離バッファを加え、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  $10 \text{ mL}$  の単離バッファで 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 ( $2 \sim 35 \text{ mL}$ ) 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 /  $\text{mL}$  の濃度とした。

#### 【0384】

CD3 確認染色：  $1 \times 10^6$  の回収細胞を  $5 \mu\text{L}$  の抗 CD3 PE - Cy7 または  $5 \mu\text{L}$  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  $275 \mu\text{L}$  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。

#### 【0385】

単離されたヒト T 細胞の活性化：

T75 フラスコを、PBS 中、 $1 \mu\text{g} / \text{mL}$  CD3 / CD28  $4 \text{ mL}$  で、37 にて 2 時間コーティングした。フラスコを  $12 \text{ mL}$  の PBS で 2 回洗浄した。 $25 \text{ mL}$  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 %  $\text{CO}_2$  で 48 時間インキュベートした。

#### 【0386】

抗 ICOS (H2L5 h IgG4 PE) の結合：

ナイーブ型および活性化型の両 CD3 + T 細胞で H2L5 h IgG4 PE の結合を評価した。0.00128 から  $100 \mu\text{g} / \text{mL}$  まで 5 倍希釈の H2L5 h IgG4 PE の 8 点タイトレーションを用いた。

#### 【0387】

ナイーブ型および / 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) ( $1 \text{ mL}$  当たり  $5 \mu\text{L}$  FcR 遮断溶液 +  $950 \mu\text{L}$  FACS バッファ) に  $2 \times 10^6$  細胞 /  $\text{mL}$  で再懸濁させた。 $2 \times 10^5$  細胞 / ウェルの密度で、 $100 \mu\text{L}$  細胞を  $2 \text{ mL}$  の 96 ウェルアッセイブロックに入れ、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 (H2L5 h IgG4 PE) または IgG4 アイソタイプ対照抗体のタイトレ

ーションは2×濃度として調製した。FcRブロックのインキュベーション後、ウェル当たり100μlの2倍濃縮結合抗体を、ウェル当たり100μlのFc遮断T細胞に加えて最終1×濃度の抗ICOS(H2L5hIgG4PE)抗体または終濃度0.00128~100μg/mLのIgG4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×gで5分間遠心分離しつつ、細胞を1mLのFACSバッファで2回洗浄した。

#### 【0388】

抗ICOS(H2L5hIgG4PE)結合後のナイーブまたは活性化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(μl)	110に対する容量(μl)
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(μl)	110に対する容量(μl)
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】

ナイーブ型または活性化型のFc遮断T細胞を、H2L5hIgG4PEまたは対照抗体を伴う結合インキュベーションの後に、80μlのFACSバッファに再懸濁させた。ウェル当たり20μl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×gで5分間遠心分離しつつ、細胞を1mLのFACSバッファで2回洗浄した。

#### 【0392】

染色細胞の固定：

細胞を500μlの1%ホルムアルデヒド(10mLの16倍濃縮ホルムアルデヒド+150mLの1倍PBS)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×gで5分間遠心分離しつつ、細胞を1mLのFACSバッファで2回洗浄した。その後、ペレットを265μlのFACSバッファに再懸濁させ、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、FACS Fortessa X20またはFACS Cantor IIのいずれかで、FACSDiva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eBioscience UltracompsとFACSDivas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、BD Diva(バージョン8.0)ソフトウェアを用い、BD FACS装置、LSR Fortessa X-20またはFACS Cantor IIで行った。データ分析では、Flow Joソフトウェア(バージョン10.0

10

20

30

40

50

．8 r 1 ) を使用した。結果は、M F I ( 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 I g G 軽鎖 F I T C 染色陽性の細胞のパーセントの両方として報告する。E C 5 0 は、グラフパッド・プリズム 5 ソフトウェア ( バージョン 5 . 0 4 ) を、4 パラメーターの変化する傾き ( l o g ( 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 (  $X = ( l o g ( X ) )$  ) とともに使用して決定した。

【 0 3 9 5 】

#### 結果

R o s e t t e S e p C D 3 濃縮キットまたは D y n a b e a d U n t o u c h e d T 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 C D 3 P e C y 7 を用いた染色によって確認した。ドナーは C D 3 細胞に対して 6 8 % ~ 9 7 % 陽性の間の範囲にあった。抗 C D 3 / 抗 C D 2 8 活性化 C D 4 + および C D 8 + 細胞集団からは、抗ヒト I g G 1 軽鎖 F I T C 染色に関して評価した場合、H 2 L 5 h I g G 4 P E 濃度依存曲線が得られた。H 2 L 5 h I g G 4 P E 結合曲線を抗ヒト I g G 1 軽鎖 F I T C 陽性パーセントと F I T C 中央蛍光強度 ( M F I ) の両方として表す。I g G 4 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 I g G 1 軽鎖 F I T C 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 C D 4 + または C D 8 + 細胞から完全な曲線は得られなかったが、0 . 1  $\mu$  g / m L ~ 1 0 0  $\mu$  g / m L で濃度依存的増加が見られた。

【 0 3 9 6 】

中央 ( 範囲 ) E C 5 0 値は、それぞれ C D 4 + F I T C M F I の場合には 1 . 0 4  $\mu$  g / m L ( 0 . 6 2 8 ~ 1 . 3 1  $\mu$  g / m L ) 、C D 8 + F I T C M F I の場合には 0 . 6 5 2  $\mu$  g / m L ( 0 . 2 7 ~ 0 . 7 4  $\mu$  g / m L ) であった。中央 ( 範囲 ) E C 5 0 値は、C D 4 + I g G 軽鎖 F I T C 陽性パーセントの場合には 0 . 8 3 4  $\mu$  g / m L ( 0 . 4 5 ~ 0 . 9 6 5  $\mu$  g / m L ) 、C D 8 + I g G 軽鎖 F I T C パーセントの場合には 0 . 5 8 3  $\mu$  g / m L ( 0 . 3 7 1 ~ 1 . 2 3  $\mu$  g / m L ) であった ( 表 1 0 ) 。

【 0 3 9 7 】

【 表 1 2 】

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

ドナー番号	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、H 2 L 5 h I g G 4 P E ( 抗 I C O S 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 I C O S 受容体と結合することを示した。T 細胞の細胞表面への H 2 L 5 h I g G 4 P E の結合は、F I T C で標識されたヒト I g G 軽鎖に対する抗体

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1  $\mu$ g/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FITC MFIとして評価した場合、それぞれ1.04および0.834  $\mu$ g/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FITC MFIとして評価した場合、それぞれ0.652および0.583  $\mu$ g/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結合に濃度依存的増加をもたらさなかった。

#### 【0402】

ナイーブ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 ~ 100  $\mu$ g/mL H2L5hIgG4PEの範囲で完全な曲線は得られなかった。しかしながら、ドナーにおいて0.1 ~ 100  $\mu$ g/mL H2L5hIgG4PEで結合に濃度依存的増加が見られた。EC50は、ナイーブT細胞からの曲線が不完全であったので計算できなかった。ICOSは休止中のTh17、T濾胞性ヘルパー (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ブ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、ナイーブ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H2L5 hIgG4PE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H2L5 hIgG4PE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、ビヒクル対照コホートに加えて3用量水準 (0.3、3および30 mg/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。H2L5 hIgG4PEは、供試した異なる3用量でC<sub>max</sub> ( $\mu$ g/mL) およびAUC ( $\mu$ g · 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H2L5 hIgG4PE抗体は、単回投与後の3個体のサル (0.3 mg/kgを投与した動物の両方ならびに3 mg/kgを投与した雌) で検出された。抗H2L5 hIgG4PE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】

H2L5 hIgG4PE受容体占有率 (RO) を、総ての供試動物の脾臓および腋窩

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、0mg/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30mg/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)、10ng/mL組換えマウスIL-3(R&D Systems、ミネアポリス、MN)、および1mg/mLジェネティシン(ThermoFisher、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(20μg/mL)またはH2L5 hIgG4PE(0.2、2、または20μg/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で1μg/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(Ser473)/全Akt全細胞溶解液キットおよびホスホ-Akt(Thr308)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ウェルU底ブ



レート (BD Falcon) の適当な培養培地 (100  $\mu$ L / ウェル) に  $0.25 \times 10^6$  細胞 / ウェ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  $\mu$ g / 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 hIgG4 PE 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  $\mu$ g / 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  
 番下の列は細胞対照を含まず (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  $\mu$ L 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  $\mu$ L 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ストメトリー分析

デンスト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  $\times$  ホスホ-シグナル) / (ホスホ-シグナル + 総タンパク質シグナル) )  $\times$  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 hIgG4 PE 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みるために、以後の時点でホスホ-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 hIgG4 PE 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 hIgG4 PE 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 (T308) 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になった。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  
 関与する 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 / 236)、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 hIgG4 PE で経時的に処理

50

し、E L I S Aによりモニタリングした。ホスホ - A K T ( S 4 7 3 ) レベルの上昇は、抗 I C O S I g G 1 F c 無効抗体処理細胞または H 2 L 5 h I g G 4 P E 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 - A K T ( S 4 7 3 ) 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 - A K T ( T 3 0 8 ) レベルを測定するE L I S Aも試験したが、このE L I S Aキットでは再現性のある活性化は見られなかった。

#### 【 0 4 1 3 】

##### 考察

A K T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P I 3 K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(P I P 3)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、A k tおよびその上流アクチベーターP D K 1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、P D K 1は、T h r 3 0 8でA K Tをリン酸化してA k tの部分的活性化をもたらす[Alessi, 1996]。m T O R C 2によるS e r 4 7 3でのA k tのリン酸化は、完全な酵素活性を刺激する[Sarbassov, 2005]。

#### 【 0 4 1 4 】

I C O S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C D 4 + 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I C O S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、H 2 L 5 h I g G 4 P EによるI C O Sの活性化がB a / F 3 - I C O S細胞においてA K Tのリン酸化に変化をもたらしたことを見出した。続いて、A K Tの下流タンパク質、例えば、G S K 3 ( A K Tの直接的基質)およびリボゾームタンパク質S 6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]。

#### 【 0 4 1 5 】

実施例 10 : ヒト P B M C アッセイにおける可溶型 H 2 L 5 h I g G 4 P E 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的効果

##### 試験準備

##### 初代ヒト P B M C の単離

新鮮な血液を G S K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% R P M I 1 6 4 0 培地で1:1希釈した。希釈した血液を U n i - S e p M a x 5 0 m l 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 x gで20分間、ブレーキをオフにして遠心分離した。得られた白色単核層(バフィーコート)を100 μ Mセルストレーナーを通して新しい50 mL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% R P M I 1 6 4 0 培地を加え、室温にて300 x gで10分間遠心分離した。この細胞ペレットを10 mLの赤血球溶解溶液(S i g m a A l d r i c h)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% R P M I 1 6 4 0 培地で40 mLとし、V i C e l lセルカウンターおよびパイアビリティアナライザー(B e c k m a n C o u l t e r)を用いて細胞を計数した。

#### 【 0 4 1 6 】

##### 単球由来未熟樹状細胞(i D C)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P B M Cを、T - 7 5組織培養フラスコ内のA I M - V培地(T h e r m o F i s h e r)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% C O 2 インキュベーター内の1000 U / m lのヒトG M - C S F(カタログ番号300 - 03、P e p r o T e c h)および500 U / m lのヒト

IL-4 (カタログ番号 200-04) を添加した AIM-V 培地中で培養した。7 ~ 10 日後に、iDC 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来の T 細胞と共培養するために採取した。

#### 【0417】

##### 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 (Stem Cell Technologies) を用いて、新鮮なヒト血液から直接的に単離した。RosetteSep ヒト T 細胞濃縮カクテル (50 µL/mL) を全血に加え、よく混合した。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。希釈サンプルを密度媒体の上に重層し、室温にて 1200 × g で 20 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 (Sigma Aldrich) で溶解させ、濃縮細胞を PBS + 2% FBS で 2 回洗浄した。次に、T 細胞を 40 mL の PBS + 2% FBS に再懸濁させ、Vi-Cell セルカウンターで計数した。

10

#### 【0418】

##### 試験プロトコール

##### ヒト PBMC 前刺激アッセイ

新たに単離したヒト PBMC を、37 °C、T-75 組織培養フラスコ内の、100 ng/mL の MCSF および 100 IU/mL の IL-2 (PeproTech) を添加した AIM-V 培地中、CD3/CD28 T 細胞拡大 DynaBeads で、1:20 のビーズ：細胞比にて前刺激した。48 時間後、前刺激ビーズを磁氣的に除去し、細胞を洗浄し、計数し、組織培養処理を施していない 96 ウェル丸底プレートにて、100 IU/mL の IL-2 (PeproTech) を添加した AIM-V 培地中、抗 CD3 DynaBeads および治療用抗体で再刺激した。播種密度は 100 k 細胞 / 100 µL 培地 / ウェルであった。37 °C で 3.5 日間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採取した。

20

#### 【0419】

##### ヒト MLLR 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 iDC を、異なるドナーから新たに単離したヒト T 細胞と 1:10 比 (iDC:T) で混合し、37 °C、AIM-V 培地中、0.02 µg/mL の CEF T ペプチド混合物の存在下で 24 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。MSD 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

#### 【0420】

##### MSD サイトカイン分析

組織培養上清における IFN-γ、IL-10、IL-2 および TNF-α サイトカインレベルを、MSD ヒト V-Plex 特注キットを用いて測定した。まず、サンプルを希釈剤 2 で 1:200 希釈した。キャリブレーターも、製造者の推奨に従い、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 µL 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 µL / 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 µL / ウェルの 2 倍リードバッファーを加え、すぐに MESO QuickPlex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。

40

#### 【0421】

##### データ分析

##### MSD データ分析

MSD データを、Discovery Workbench ソフトウェア (MSD、

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 MSD プレートに含め、総ての場合で  $R^2$  値は 0.99 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。

【0422】

#### 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 ANOVA 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。  $P < 0.05$  を統計的に有意と見なした。

【0423】

#### 結果

#### PBMC 前刺激アッセイの開発および H2L5 hIgG4PE とイピリムマブおよびペンブ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 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。前刺激 48 時間後に、細胞を採取し、ビーズを磁氣的に除去した後、抗 ICOS 抗体単独または抗 CTLA-4 もしくは抗 PD1 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。H2L5 hIgG4PE 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、IFN- $\gamma$  の誘導をもたらした。H2L5 hIgG4PE により誘導された IFN- $\gamma$  の規模は、前刺激の強度と逆相関した。H2L5 hIgG4PE とイピリムマブの組合せは、弱く前刺激された PBMC において、H2L5 HIGG4PE 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 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 ビーズをビーズ：細胞比 1 : 20 で用いる前刺激条件を、その後の総ての PBMC 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 CTLA-4 組合せに関しては図 16 に、抗 PD-1 との組合せに関しては図 17 にまとめる。

【0424】

#### PBMC 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 H2L5 hIgG4PE の結果

H2L5 hIgG4PE の用量依存的活性を、1 : 20 の所定ビーズ：細胞比にて抗 CD3 / 抗 CD28 ビーズで前刺激したヒト PBMC において評価した。抗 RSV IgG4PE および抗 ICOS 422.2 IgG1 Fc 無効型を対照として含めた。8 濃度の H2L5 HIGG4PE を試験した (100、30、10、3、1、0.3、0.1、および 0.03  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )。IFN- $\gamma$ 、IL-10 および TNF- $\alpha$  を、PBMC サンプルの組織培養上清において MSD により評価した。H2L5 hIgG4PE は用量依存的に IFN- $\gamma$ 、IL-10 および TNF- $\alpha$  生産を誘導したが、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。これらの結果を用いて、組合せ試験で使用する H2L5 hIgG4PE の濃度を決定した。

【0425】

#### ヒト MLR アッセイの開発

ヒト MLR 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単球由来未熟 DC の共培養に加えて、抗 CD3 ビーズも、細胞のプライミングを助けるような基礎的 TCR 刺激を提供するためにウェルに加えた。結果は、抗 CD3 ビーズが IFN- $\gamma$  誘導の範囲を大幅に増大したことを示した。イピリムマブ単独もまた抗 CD3 ビーズの不在下で IFN- $\gamma$  生産を誘導し得るが、H2L5 hIgG4PE 単独または H2L5 HIGG4PE / イピリムマブの組合せのみが、抗 CD3 ビーズの存在下で、対応する対照を超える IFN- $\gamma$  生産の増強を示した。

【0426】

#### ヒト MLR アッセイにおける H2L5 HIGG4PE とイピリムマブの組合せ活性

10

20

30

40

50

【 0 4 2 7 】

【 0 4 2 8 】

【 0 4 2 9 】

【 0 4 3 0 】

50

に関して評価することが重要となろう。

#### 【0431】

従前に、P B M C 活性化アッセイが開発され、抗 I C O S 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、H 2 L 5 h I g G 4 P E として I g G 4 P E アイソタイプを有するクローン 4 2 2 . 2 の候補選択を支持した。従前のアッセイで、P B M C 細胞を  $1 \mu\text{g} / \text{ml}$  のプレート結合型抗 C D 3 抗体および  $3 \mu\text{g} / \text{ml}$  の抗 C D 2 8 抗体で 4 8 時間前刺激した後、それらを採取し、抗 C D 3 と検討中であった可溶型 I C O S 抗体で再刺激した。H 2 L 5 h I g G 4 P E は、I F N -  $\gamma$  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 C D 3 D y n a ビーズおよび抗 C D 3 / C D 2 8 D y n a ビーズ ( T h e r m o F i s h e r ) 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。4 8 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 I C O S 抗体単独または抗 C T L A - 4 との組合せとともに抗 C D 3 D y n a ビーズ ( ビーズ：細胞比 = 1 : 1 ) で刺激した。結果は、H 2 L 5 h I g G 4 P E 単剤処理が、試験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 -  $\gamma$  誘導をもたらしたことを示した。H 2 L 5 h I g G 4 P E による誘導された I F N -  $\gamma$  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、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 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。H 2 L 5 h I g G 4 P E 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、I F N -  $\gamma$  産生に統計的に有意な増加を示した。

#### 【0432】

ビーズ：細胞比を 1 : 2 0 に固定した抗 C D 3 / 抗 C D 2 8 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 C D 3 ビーズをビーズ：細胞比 1 : 1 から 1 : 3 および 1 : 1 0 へ漸減した。これらの結果は、再刺激強度が低いほど、H 2 L 5 h I g G 4 P E による I F N -  $\gamma$  誘導が低くなることを示した。H 2 L 5 h I g G 4 P E 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 : 1 0 での再刺激下では完全に失われた。従って、その後の総ての試験では、ビーズ：細胞比 1 : 1 での抗 C D 3 の再刺激を維持した。

#### 【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、H 2 L 5 h I g G 4 P E 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 1 0 0、3 0、1 0、3、1、0 . 3、0 . 1 および  $0 . 0 3 \mu\text{g} / \text{ml}$  であった。抗 R S V I g G 4 P E、および H 2 L 5 h I g G 4 P E の F c 無効型である抗 I C O S 4 2 2 . 2 I g G 1 F c 無効型を対照として使用した。結果は、H 2 L 5 h I g G 4 P E は I F N -  $\gamma$ 、I L - 1 0 および T N F -  $\alpha$  産生を用量依存的に誘導したが、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とを示した。H 2 L 5 h I g G 4 P E の F c 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、F c 受容体の会合が H 2 L 5 h I g G 4 P E 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 H 2 L 5 h I g G 4 P E の用量を決定するためにも使用した。

#### 【0434】

また、H 2 L 5 h I g G 4 P E 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 ( M L R ) アッセイも開発した。M L R アッセイは e x v i v o 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 ( i D C ) を、異なるドナーから単離された T 細胞と混合した。i D C 細胞の表面の主要組織適合性複合体

(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。イピリムマブ単剤は抗CD3ビーズの不在下でIFN- $\gamma$ 産生を誘導し得るが、H2L5hIgG4PE単剤または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- $\gamma$ 生産の増強を示した。この結果は、このアッセイで、DC細胞単独によるTCR刺激は、PBMC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細胞ブ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CEFTペプチドミックスも加えた。CEFT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-バーウイルス(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時間ブ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CEFT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単剤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CEFT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日間ブ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とペンブ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のペンブロリズマブとの組合せで試験した。H2L5hIgG4PEとペンブ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ブロリズマブとの、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PD1および抗CTLA-4抗体との組合せの機能活性  
ヒトPBMC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、試験プロトコルの開始前に G S K 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。

**【 0 4 3 9 】**細胞株の調製：

A 2 0 5 8 は A T C C プロトコルに従って増殖させた。

**【 0 4 4 0 】**材料：

- ・ A 2 0 5 8 ヒト黒色腫細胞株：A T C C、カタログ番号 C R L - 1 1 1 4 7、ロット番号 5 9 3 4 9 3 6 2 10
- ・ D P B S：A T C C、カタログ番号 3 0 - 2 2 0 0、ロット番号 6 3 3 5 7 4 3 6
- ・ ダルベッコの改変イーグル培地：A T C C、カタログ番号 3 0 - 2 0 0 2、ロット番号 6 2 5 9 6 4 7 1 有効期限：2 0 1 5 年 1 0 月
- ・ ウシ胎児血清：S i g m a - A l d r i c h、カタログ番号 1 2 1 7 6 c - 1 0 0 0 m 1、ロット番号 1 3 G 1 8 0 R 0 H 1、有効期限：2 0 1 8 年 7 月
- ・ 0 . 2 5 % ( w / v ) トリプシン - 0 . 5 3 m M E D T A：A T C C、カタログ番号 3 0 - 2 1 0 2、ロット番号 6 2 4 2 0 3 0 0
- ・ 抗生物質 - 抗真菌剤 ( 1 0 0 X )：L i f e T e c h n o l o g i e s、カタログ番号 1 5 2 4 0 - 0 6 2 20
- ・ T 1 7 5 細胞培養フラスコ：G r e i n e r b i o - o n e、カタログ番号 6 6 1 1 7 5
- ・ T 7 5 細胞培養フラスコ：G r e i n e r b i o - o n e、カタログ番号 6 5 8 1 7 5

**【 0 4 4 1 】**培地：

- ・ A 2 0 5 8 完全増殖培地：ダルベッコの改変イーグル培地 + 1 0 % F B S。培養条件：雰囲気：空気、9 5 %；5 % 二酸化炭素 ( C O 2 )；温度：3 7
- ・ 細胞の受領時：
- ・ 3 7 の予温完全培地。 30
- ・ 細胞を 3 7 の湯浴中で急速解凍。チューブを 7 0 % エタノールで拭き、予温完全培地を満たした 1 5 m l チューブに細胞を移す。
- ・ 1 2 0 0 r p m 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 T 7 5 フラスコに細胞を戻し、3 7 でインキュベートする。

**【 0 4 4 2 】**細胞の継代培養：

- ・ 容量を 7 5 c m <sup>2</sup> フラスコ向けとする ( T 1 7 5 c m <sup>2</sup> フラスコに対して、比例的に必要な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 m L のトリプシン - E D T A 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 3 7 に置いてよい。
- ・ 1 0 m L 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。
- ・ 1 2 0 0 r p m で 5 分間遠心分離し、細胞ペレットを回収し、1 0 m l 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新しい培養容器に加える。3 7 で培養物をインキュ 50



ベートする。

- ・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×DPBSで洗浄し、3ml 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1200rpmで5分間遠心分離し、細胞ペレットを得る。
- ・細胞を1×DPBS溶液で洗浄し、1200rpm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PBSにIn Vivo接種のための濃度（A2058、 $2.5 \times 10^7 / \text{ml}$ 、 $2.5 \times 10^6 / 100 \mu\text{l}$  / マウス）で再懸濁させる。

10

#### 【0444】

##### NSGマウスへの腫瘍細胞株の接種

##### 材料：

- ・マウス：NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ。Jackson Laboratory Stock：005557 雌 齢：6週
- ・Attached Needle 25G5/8を備えた1mLツベルクリンシリンジ：Becton Dickinson、カタログ番号305554
- ・PDI（商標）Alcohol Prep Pads：Professional Disposables、カタログ番号B339
- ・PDI（商標）Povidone-Iodine Prep Pad：Professional Disposables
- ・カタログ番号B40600
- ・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。

20

#### 【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、 $100 \mu\text{l}$ 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（ $\text{mm}^3$ ）=（長さ）×（幅）<sup>2</sup> / 2
- ・ヒトPBMCの静脈内投与
- ・ヒトPBMC投与は、腫瘍が平均体積およそ $100 \text{mm}^3$ に達した際の1週間後に開始できる。

30

40

#### 【0446】

##### 材料：

- ・新鮮なヒトPBMC：All cells、カタログ番号C-PB102-3B2
- ・Attached Needle 25G5/8を備えた1mLツベルクリンシリンジ：Becton Dickinson、カタログ番号305554

50

- ・PDI (商標) Alcohol Prep Pads: Professional Disposables、カタログ番号 B339
- ・PDI (商標) Povidone-Iodine Prep Pad: Professional Disposables、カタログ番号 B40600
- ・ガーゼスポンジ: Covidien、カタログ番号 441211
- ・マウス・テール・イルミネーター・レストレーナー: Braintree Scientific、カタログ番号 MTI STD
- ・PBMCの調製
- ・新鮮なヒトPBMCは、一晩の輸送により All cells から購入する。
- ・細胞を 1400 rpm で 5 分間遠心分離し、細胞ペレットを得る。
- ・細胞を 1 × DPBS 溶液で洗浄し、1400 rpm で 5 分間遠心分離し、細胞ペレットを得る。
- ・細胞を氷冷 PBS に In Vivo 注射のための濃度 (2.0 × 10<sup>7</sup> / ml) で再懸濁させる。
- ・1 cc 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。
- ・細胞を氷上で維持する。
- ・尾静脈注射
- ・マウスを白熱灯で温める。
- ・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 ~ 10 分間観察する。

10

20

## 【0447】

治療抗体の投与

- ・ヒトPBMC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

## 【0448】

材料:

- ・完全ヒトIgG1アイソタイプ対照: Eureka therapeutics、カタログ番号 ET-901 (前臨床グレード) ロット番号 15-726 有効期限: 2017年2月
- ・イピリムマブ (ヤーボイ): Bristol-Myers Squibb NDC 0003-2327-11、ロット番号 921873 有効期限: 2015年4月; ロット番号 4H69490、有効期限: 2016年5月
- ・完全ヒトIgG4アイソタイプ対照: Eureka therapeutics、カタログ番号 ET-904 (前臨床グレード) ロット番号 15-726 有効期限: 2017年2月
- ・抗ヒトICOS H2L5 hIgG4 PE
- ・ペンブロリズマブ (キートルーダ): Merck、NDC 0006-3026-02、ロット番号 L010592、有効期限: 2016年4月26日
- ・腹腔内注射:
- ・投与する 100 μl 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

40

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、カタログ番号MV-CB30016440

・Microvette CB300 (血液学/カリウムEDTA) : Braintree 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2000xg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】

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 hIgG4PE用量応答

本試験は、A2058黒色腫を移植したヒトPBMC移植NSGマウスにおけるH2L5 hIgG4PE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PBMC無し)を各試験に割り付けた。ドナー番号7129由来のヒトPBMCを用いた用量応答の処置計画の概要を表11に示す。H2L5 hIgG4PE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。試験群をピヒクル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】

10

20

30

## 【表 13】

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+ huPBM (ドナー番号 7129)	ビヒクル	10	週 2 回 3 週間
2	腫瘍+ huPBM (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+ huPBM (ドナー番号 7129)	イピリムマブ (3mg/kg)	10	週 2 回 3 週間
4	腫瘍+ huPBM (ドナー番号 7129)	ヒト IgG4 (4 mg/kg)	10	週 2 回 3 週間
5	腫瘍+ huPBM (ドナー番号 7129)	H2L5 hIgG4PE (0.04 mg/kg)	10	週 2 回 3 週間
6	腫瘍+ huPBM (ドナー番号 7129)	H2L5 hIgG4PE (0.4 mg/kg)	10	週 2 回 3 週間
7	腫瘍+ huPBM (ドナー番号 7129)	H2L5 hIgG4PE (1.2 mg/kg)	10	週 2 回 3 週間
8	腫瘍+ huPBM (ドナー番号 7129)	H2L5 hIgG4PE (4 mg/kg)	10	週 2 回 3 週間
9	腫瘍+ huPBM (ドナー番号 7129)	ICOS-Fc 無効 (1mg/kg)	10	週 2 回 3 週間
10	腫瘍(PBM 無し) (ドナー番号 7129)	非処置	7	週 2 回 3 週間

10

20

## 【0453】

H2L5 hIgG4PE 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合の有効性および薬力学的 (PD) 活性試験

試験の目的:

H2L5 hIgG4PE 単剤療法の抗腫瘍活性を評価するために、0.04 mg/kg および 0.4 mg/kg で投与した。

## 【0454】

H2L5 hIgG4PE 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ブロリズマブと組み合わせて投与した。

## 【0455】

H2L5 hIgG4PE 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 10 個体の合計 22 の処置群をこの試験に割り付けた。群 1 ~ 16 は有効性コホートとし、17 ~ 22 は薬力学的活性コホートとした。

## 【0456】

組合せ処置については、H2L5 hIgG4PE (0.04 もしくは 0.4 mg/kg) とイピリムマブもしくは IgG1 (3 mg/kg) または H2L5 hIgG4PE (0.04 もしくは 0.4 mg/kg) とペンブロリズマブもしくは IgG4 (5 mg/kg) を投与した。H2L5 hIgG4PE 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、ペンブロリズマブおよびアイソタイプ対照は、H2L5 hIgG4PE 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、H2L5 hIgG4PE を 0.004、0.04、0.4 および 1.2 mg/kg 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 6711 由来のヒト PBM を用いた、ビヒクル、アイソタイプおよび H2L5 hIgG4PE 単独およびイピリムマブおよびペンブロリズマブとの組合せの処置群を表 12 に示す。分析は、59 日目の試験の終了時に結論付けた。

40

## 【0457】

【表 14】

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)	ビビクル	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)	ペンブロリズマブ 5mg/kg +IgG1 3mg/kg	10	IgG1 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
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 ペンブロリズマブ 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 T 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 P B M C 移植 N S G 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 1 0 個体の合計 1 3 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、H2L5hIgG4PE (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 H2L5hIgG4PE (0.01 および 0.04 mg/kg) とペンブロリズマブまたは IgG4 (5 mg/kg) を投与した。H2L5hIgG4PE 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、ペンブロリズマブ およびアイソタイプ対照は、H2L5hIgG4PE 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 PBMC 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】

## 【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 ナー番号 4568)	ビビクル	10	週 2 回 6 用量
2	腫瘍+ huPBMC (ドナー番号 4568)	アイソタイプ対照(IgG1 3mg/kg+ IgG4 5mg/kg)	10	IgG1 週 2 回 6 用量 IgG4ICOS 投与の終了まで 5 日ごと
3	腫瘍+ huPBMC (ドナー番号 4568)	イピリムマブ 3mg/kg + IgG4 5mg/kg	10	週 2 回 6 用量 IgG4ICOS 投与の終了まで 5 日ごと
4	腫瘍+ huPBMC (ドナー番号 4568)	ペンブロリズマブ 5mg/kg +IgG1 3mg/kg	10	IgG1 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
5	腫瘍+ huPBMC (ドナー番号 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 (ドナー番号 4568)	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 ペンブロリズマブ ICOS 投与の終了ま で 5 日ごと
8	腫瘍+ huPBMC (ドナー番号 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 (ドナー番号 4568)	H2L5 hIgG4PE 0.01 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 4568)	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
12	腫瘍+ huPBMC (ドナー番号 4568)	H2L5 hIgG4PE 0.01mg/kg	10	週 2 回 6 用量
13	腫瘍+ huPBMC (ドナー番号 4568)	H2L5 hIgG4PE 0.04 mg/kg	10	週 2 回 6 用量

## 【 0 4 6 0 】

## 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

10

20

30

40

50



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ジ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、動物を安楽死させる前）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PBMC（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PBMC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PBMC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す得ることが報告されているが、PBMC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。

#### 【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楽死させ、また3個体のマウスは、 $> 20\%$ の体重減少のために安楽死させた。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ったことから、処置に関連するものではなかった。

40

#### 【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（ $p < 0.23$ ）。

【0470】

2.5または5 mg / kgでのペンブ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、ペンブロリズマブと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H2L5hIgG4PE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H2L5hIgG4PE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。

【0472】

組合せ処置：

H2L5hIgG4PE（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。H2L5hIgG4PE（0.04または0.4 mg / kg）とペンブロリズマブ（5 mg / kg）組合せである群番号10および11は、ペンブロリズマブ単剤療法である群番号4、またはH2L5hIgG4PE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。

【0473】

臨床所見：

試験中に見られたマウスの体重減少はおおよそ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。

【0475】

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H2L5hIgG4PE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

10

20

30

40

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 のペンブロリズマブ処置と 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 H 2 L 5 h Ig G 4 P E 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 H 2 L 5 h Ig G 4 P E 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 H 2 L 5 h Ig G 4 P E 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は達しなかった。0.04 mg / kg の H 2 L 5 h Ig G 4 P E 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：

H 2 L 5 h Ig G 4 P E 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。H 2 L 5 h Ig G 4 P E 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は達し得なかった。組合せ活性は、単剤療法イピリムマブの群番号 3 または H 2 L 5 h Ig G 4 P E 単剤療法群に比べて、有意には達しなかった。

【0480】

H 2 L 5 h Ig G 4 P E（0.01 mg / kg または 0.04 mg / kg）とペンブロリズマブ（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 H 2 L 5 h Ig G 4 P E とペンブ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は達し得なかった。この組合せは単剤療法処置群ペンブロリズマブである群番号 3 または H 2 L 5 h Ig G 4 P E 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、H 2 L 5 h Ig G 4 P E とペンブロリズマブ（0.01 または 0.04 mg / kg およびペンブロリズマブ 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】

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

単剤療法としての、またペンブ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 hIgG4PE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 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ー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。

【0484】

0.04mg/kg~4mg/kgの範囲の用量でH2L5 hIgG4PE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、単独およびペンブ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 hIgG4PE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 hIgG4PE単剤療法およびペンブ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 hIgG4PE 0.04mg/kg用量とペンブロリズマブ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 hIgG4PEとペンブ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、ペンブ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。

【0485】

抗PD1療法は、同位体処置コホートに比べてペンブ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、両試験でペンブ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

10

20

30

40

50

．04)。H2L5hIgG4PE 0.01mg/kg用量とイピリムマブ3mg/kg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=0.02)、H2L5hIgG4PE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H2L5hIgG4PE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。

#### 【0486】

実施例12：in vivoにおける抗マウスICOSアゴニスト抗体単独および抗PD1および抗CTLA-4抗体との組合せの機能活性

10

CT26およびEMT6同系マウス腫瘍モデル

CT26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GSK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。

#### 【0487】

#### 動物

本試験では、Harlan Sprague Dawleyからの164個体の雌BALB/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。

#### 【0488】

20

#### 細胞培養および接種

CT-26細胞(ATCC:CRL-2638)( $3 \times 10^6$ 細胞;P-11)のバイアル1本を-140℃から解凍し、10%FBSを含むRPMIに播種した。細胞を10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/EDTA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、FBS不含のRPMIに $5 \times 10^5$ 細胞/mlで再懸濁させた。マウスの右後方側腹部に0.1mlの細胞( $5 \times 10^4$ 細胞/マウス)を皮下接種した。

#### 【0489】

細胞回収および接種の当日に、細胞計数はBeckman Coulter V-cell XRで行い、血球計により確認した。トリプシン/EDTA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RPMI+10%FBSで、2回目はRPMIのみで)、10mlのRPMIに再懸濁させた。 $1.78 \times 10^6$ 細胞を20mlのRPMIに回収し、生存率は98.8%であった。 $1.685 \text{ ml}$ の細胞懸濁液(合計 $15 \times 10^6$ 細胞)を $28.315 \text{ ml}$ のRPMIに加えた。

30

$15 \times 10^6$ 細胞/ $30 \text{ ml}$ 培地= $5 \times 10^5$ 細胞/ml。これは $5 \times 10^4$ 細胞/ $100 \mu\text{l}$ に等しい。

#### 【0490】

#### 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ICOSアゴニストクローンC398.4は0.05mg/kgおよび0.5mg/kgで試験した。各用量はまた、抗PD1 10mg/kgおよび抗CTLA-4 1mg/kgの両方とともに試験した。

40

#### 【0491】

#### 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。11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10個体/群で、表14に示される12の試験群に無作為化した。無作為化はStudylog 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、100μl容量の0.9%生理食塩水ビヒクルで腹腔内(IP)と

50

した。腫瘍体積および体重は、試験中、週 3 回測定した。

【 0 4 9 2 】

#### エンドポイント

マウスは、腫瘍体積が  $2000 \text{ mm}^3$  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、長さおよび幅のカリパス測定値を下式： $TV = 0.52 \cdot L \cdot W^2$  に当てはめることにより計算した。

【 0 4 9 3 】

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。

【 0 4 9 4 】

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。

【 0 4 9 5 】

#### 薬物および材料

【表 1 6】

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

【 0 4 9 6 】

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。

【 0 4 9 7 】

#### データ分析

生存分析のイベントは、腫瘍体積  $> 2000 \text{ mm}^3$  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。

【 0 4 9 8 】

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、この対数変換データに対して ANOVA とその後のペアワイズ比較を行った。

【 0 4 9 9 】

10

20

30

40

## 【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 1µg
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

10

## 【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。

20

## 【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579.16mm<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)。

30

## 【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対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対照は、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 10µg(群6)およびPD1 200µg(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。

40

## 【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、2000mm<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

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日目に腫瘍不含を維持した。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楽死の基準は、IACUCプロトコールAUP0606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、平均腫瘍体積はおおよそ100 $\text{mm}^3$ 、接種おおよそ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 =  $L \times W^2 \times 0.52$ ）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、PD1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

投与	処置 1	処置 2	n=
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 $\mu$ g	mIgG2b 20 $\mu$ g	10
群 3: $1 \times 10^5$ 細胞当たり	ハムスターIgG 10 $\mu$ g	rlgG2a 200 $\mu$ g	10
群 4: $1 \times 10^5$ 細胞当たり	ハムスターIgG 10 $\mu$ g		10
群 5: $1 \times 10^5$ 細胞当たり	ICOS 10 $\mu$ g		10
群 6: $1 \times 10^5$ 細胞当たり	ICOS 1 $\mu$ g		10
群 7: $1 \times 10^5$ 細胞当たり	CTLA4 20 $\mu$ g	ハムスターIgG 10 $\mu$ g	10
群 8: $1 \times 10^5$ 細胞当たり	PD-1 200 $\mu$ g	ハムスターIgG 10 $\mu$ g	10
群 9: $1 \times 10^5$ 細胞当たり	ICOS 10 $\mu$ g	CTLA4 20 $\mu$ g	10
群 10: $1 \times 10^5$ 細胞当たり	ICOS 1 $\mu$ g	CTLA4 20 $\mu$ g	10
群 11: $1 \times 10^5$ 細胞当たり	ICOS 10 $\mu$ g	PD-1 200 $\mu$ g	10
群 12: $1 \times 10^5$ 細胞当たり	ICOS 1 $\mu$ g	PD-1 200 $\mu$ g	10
群 13: $1 \times 10^5$ 細胞当たり	CTLA4 20 $\mu$ g	PD-1 200 $\mu$ g	10

10

## 【0508】

## 薬物および材料

## 動物

6 ~ 8 週齢の雌 B a l b / c マウスを H a r l a n S p r a g u e D a w l e y から受領し、I A C U C 標準に従って飼育した。

20

## 【0509】

## E M T 6 細胞

E M T 6 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、W e y m o u t h の培地 ( 1 5 % F B S 含有 ) に再懸濁させた。この工程を、F B S 不含の W e y m o u t h 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プ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 / m L ) に希釈した。

30

## 【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、3 0 G 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 1 6 に示す。

## 【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 l:	用量/ マウス mg	マウス 数	必要用 量 mL	添加保 存液 mL	全希 釈剤 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  $2000 \text{ mm}^3$  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。生理食塩水ビヒクル群のマウスは総て、30日目までに腫瘍サイズまたは潰瘍化のために安楽死された。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、生理食塩水ビヒクル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（ $10 \mu\text{g}$ ）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 $10 \mu\text{g}$ 用量での抗ICOS抗体クローン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1 $\mu$ g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10 $\mu$ g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。

#### 【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ったが、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1156.56 $\text{mm}^3$ 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1899.28 $\text{mm}^3$ の測定値を持つ潰瘍のために安楽死された。

#### 【0519】

抗PD-1と10 $\mu$ g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った。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ったのに対して3個体のマウスが完全な腫瘍退縮にあずかった。

#### 【0520】

抗PD-1と1 $\mu$ g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1 $\mu$ g ICS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ずかり、PD-1単剤療法群のいずれをも超えて生存した。

#### 【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った。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。

#### 【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11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2000 $\text{mm}^3$ 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（1 $\mu$ g ICS）、および10（CTLA-4と1 $\mu$ g ICS）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

10

20

30

40

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。

(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(ii) 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。

(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。

(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。

(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

10

20

30

40

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。

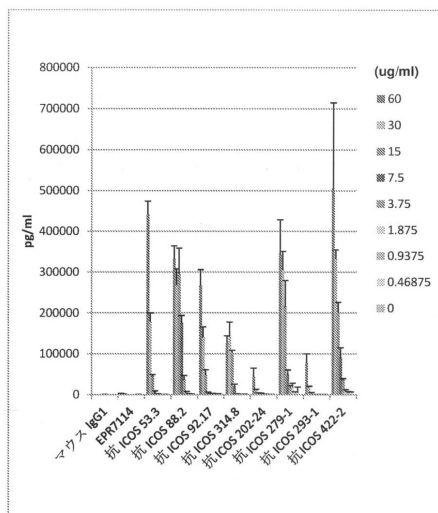
(19) 前記第2の免疫調節薬が、抗CTLA4抗体、抗PD-1抗体、抗PDL1抗体および抗OX40抗体から選択される、前記(18)に記載の方法。

(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

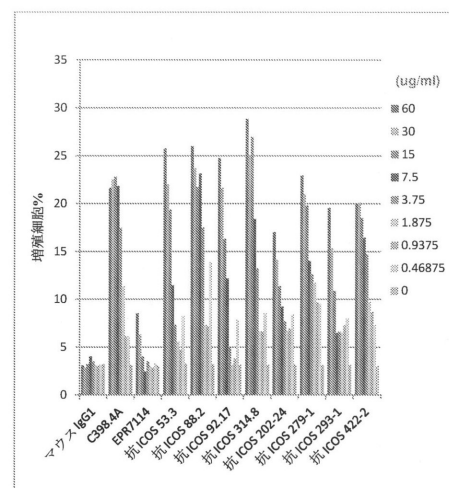
【図1】

図1: CD4+CD25-T細胞からのIFN- $\gamma$ 産生



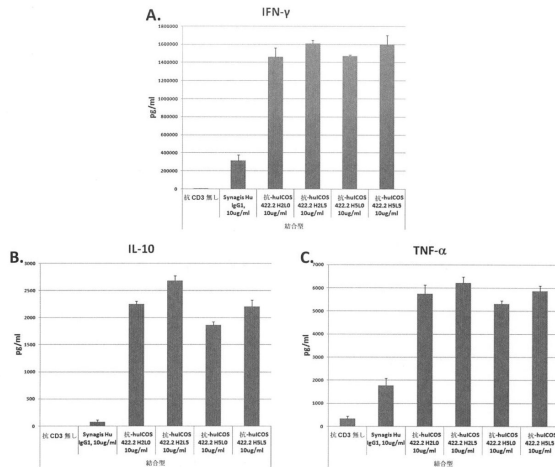
【図2】

図2: CD4+CD25-T細胞の増殖



## 【図 3】

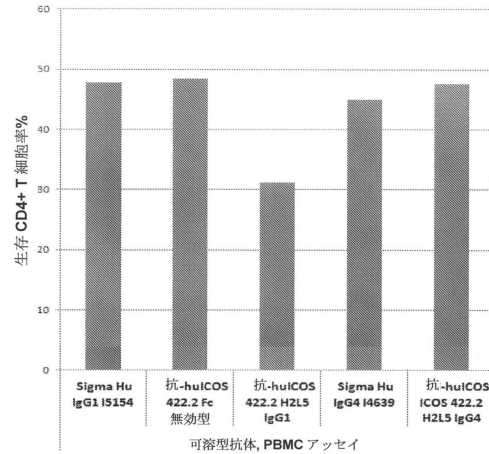
図3：抗ICOS 422.2のH2L5ヒト化変異体は、PBMC細胞において良好なサイトカイン産生を示す



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種類の各可溶性抗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-γ (A)、IL-10 (B) およびTNF-α (C) の量をMSDにより測定した。

## 【図 4】

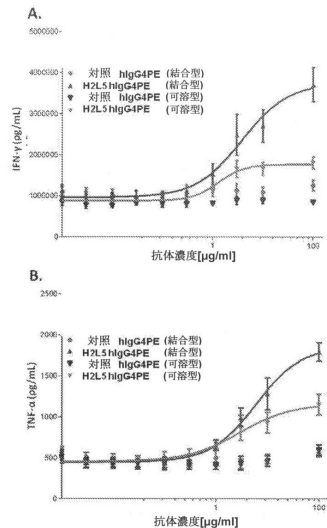
図4：422.2 H2L5 IgG1はT細胞生存率の低下を誘導し、これはFc無効型アイソタイプまたはhIgG4PEアイソタイプには見られなかった



ヒトPBMCは、抗CD3 (OKT3) およびFcアイソタイプが異なる可溶性ヒト化抗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トリーにより測定した。

## 【図 5】

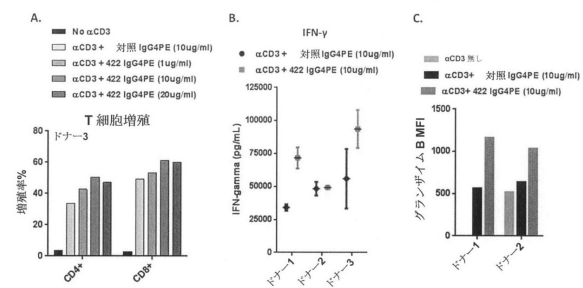
図5：H2L5 hIgG4PEの用量応答は、ヒトCD4+T細胞において炎症性サイトカイン誘導を誘発した



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 (Synagis IgG4PE) またはH2L5 hIgG4PE 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-γおよび(B) TNF-α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】

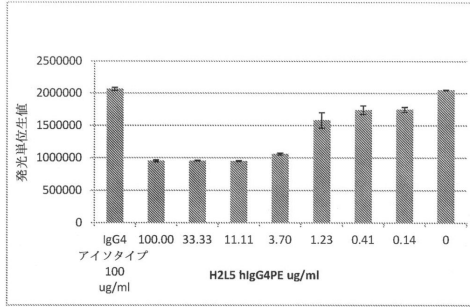
図6：H2L5 hIgG4PEは、健康なヒトドナー由来の活性化PBMCにおいて増殖、サイトカイン産生および細胞傷害能の増強を誘導する



抗CD3/CD28で2日間前刺激したヒトPBMC細胞を、抗CD3 (OKT3) と可溶性H2L5 hIgG4PE 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-γ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トリーにより測定した。

## 【図 7】

図 7: H2L5 hlgG4PE による ICOS-L の ICOS への結合の阻害を示すメソ・スケール・ディスカバリー (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

QVQLQQSGPELVRPESVKISCMGSGYTFDTYAMHWKQSHAKSLEWIGLISYSDHTNYNQKFGKATMTVDKS  
SSTAYMELARLTSEDALYYCGRNNGYNYGMYFDVWAGTTVTVSS (配列番号 19)

422 LC

ENVLTQSPAIMSAPGEEKVMTCSASSSSVYMHYQQKSIITSPKLWIYDTSKLASGVPGRFSGSGSGNSYSLTIS  
SMEAEDVATYYCFQSGGYPTFGGKLEIKR (配列番号 20)

## 【図 10】

図 10: シグナル配列を有する H2L5 hlgG4PE 重鎖のコード領域の DNA 配列

重鎖

ATGGGCTGGTCTGCATCATCTGTTTCTGGTGGCCACCGCCACCGCGGTGCACAGCCAGGTGCAGCTGGTGCA  
AGCGGAGCCGAGGTGAAAAAGCCCGGCTCAAGCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGTACACCTTCACCGAC  
TACGCTATGCACTGGGTGAGGCAGGCCCCCGCCAGGGCTGGAGTGGATGGGCTGATCAGCATCTACAGCGAC  
CACACCAACTACAACAGAAAGTTCCAGGGCAGGGGTGACCATCACCGCCGATAAGAGCACCAGCAGCAGCCTACATG  
GAGCTGAGCAGCCTGAGGAGCGAAGACACCCGCTGTACTATTGCGGCAGGAACAACCTACGGCAACTACGGCTG  
TACTTCGAGCTGGGGCCAGGGAACCACTCTCACCGTGAGCAGCGCCAGCACCAGGGCCCCAGCGTGTCCCC  
CTGGCCCCCTGCAGCAGAACACACGCGGAGGACACAGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAG  
CCCGTGACCGTGAGCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCAGCGGCTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGC  
GGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGAACCGTGCCAGCAGCAGCTGGGCACCAAGACCTACACCTGCAACGTG  
GACCACAAGCCAGCAACACCAAGTGGACAAGCGGGTGGAGAGCAAGTACGGCCCTCCCTGCCCCCCCTGCCCT  
GCCCGGAGTGTGAGGGCGGACCCCTCCGTGTTCTTCCCCCAAGCCCAAGGACACCTGATGATCAGCCGG  
ACCCCCGAGGTGACCTGCCTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGATCCCGAGGTCCAGTTCAATTGGTACGTGGAC  
GGCTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCCGGGAGGAACAGTTCAACAGCACCTACCGGGTGGTCCCGTG  
CTGACCGTGCTGCACAGGACTGGCTGACGCGCAAGAATAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCTGCCACAGC  
TCCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGCCAGCTCTGGGAGCCCCAGGTGTACACCTGCCCCATCCCAG  
GAAGAGATGACCAAGAACAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTACACCCAGCAGCATCGCCGTGGAG  
TGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAAACAATAACAAGACACCCCCCTGTGCTGGACAGCAGCGGAGCTTCTTC  
CTGTACAGCAGGTGACCGTGGACAAGAGCGGTGGCAGGAAGGCAACGTCTTAGCTGCAGCGTGATGCACGAG  
GCCCTGCACAACCATCACCCAGGAAGCCTGAGCCTGTCCCTGGGCAAG (配列番号 21)

リーダー配列を二重下線で示す

## 【図 9】

図 9: シグナル配列を有する H2L5 hlgG4PE の重鎖および軽鎖のタンパク質配列

重鎖

MGWSCITLFLVATATGVHSGVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFDTYAMHWVRQAPGQGLEWMGLISYSD  
HTNYNQKFGGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDAVYYCGRNNGYNYGMYFDVWGGTTVTVSSASTKGPSVFP  
LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSTLTKGTTCNV  
DHKPSNTRVDKRVESKYGPPCPAPAFEGGSPVFLFPKPKDITLMSITPEVTCVVVDVSDQDEPEVFNWYVD  
GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQ  
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQFPENNYKTFPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH  
ALHNHYTQKSLSLGLGK (配列番号 9)

軽鎖

MGWSCITLFLVATATGVHSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCASSSSVYMHYQQKPGQAPRLIYDTSKLASG  
IPARFSGSGGTDTLTISLLEPEDFAVYYCFQSGGYPTFGGKTLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSTASV  
VCLLNNFYPREAKVQWKNDAIQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTSLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSFPVTK  
SFNRGEC (配列番号 12)

シグナル配列は二重下線

CDR 配列は下線

I g G 4 では S 2 2 8 P、L 2 3 5 E (EUNANBARIING) 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 (K a b a t ナンバリング G 2  
7 Y、S 3 0 T、A 9 3 G)可変軽鎖フレームワークに組み込まれたマウス残基 (K a b a t ナンバリング F 7  
1 Y)

## 【図 11】

図 11: シグナル配列を有する H2L5 hlgG4PE 軽鎖のコード領域の DNA 配列

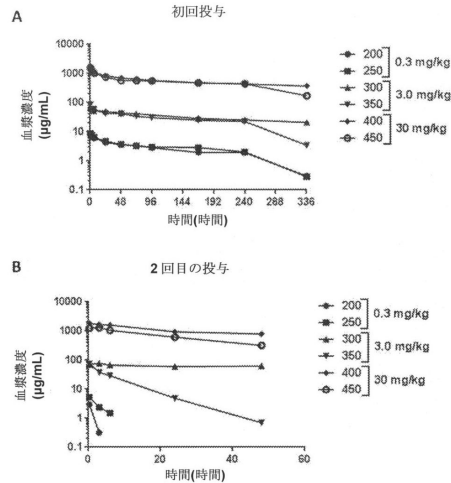
軽鎖

ATGGGCTGGTCTGCATCATCTGTTTCTGGTGGCCACCGCCACCGCGGTGCACAGCGAGATTGTGCTGACCCAG  
AGCCCCGCCACCTGAGCCTGAGCCCCCGCGAAAGGGCAACCTCAGCTGCAGCGCCAGCAGCAGCGTGACTAC  
ATGCACTGGTACCAGCAAGCCCCCGCAGGCCCCCTAGGCTGCTGATCTACGACACCTCCAAGCTGCCACGCGC  
ATCCAGCCAGGTTCTCAGGCAGCGGACGCGCACCGACTATACTCTGACCATCAGCAGCCTGGAGCCGAGGAC  
TTCGCCGTGTACTACTGCTTCCAGGGAAGCGGCTACCCCTACACCTTCGGCCAGGGCACCAGCTGGAGATCAAG  
CGTACCGTGGCCCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCAGCGATGAGCAGCTGAAGAGCGGACCCGACGCGTG  
GTGTGTCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAAGTGAAGGTGACAATGCCCTGCAGAGCGGC  
AACAGCCAGGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCTGAGCAGCACCCTGACCTGAGC  
AAGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCGTGTGAGGTGACCCAGGCGCTGTCCAGCCCGCTGACCAAG  
AGCTTCAACCGGGCGAGTGC (配列番号 22)

リーダー配列を二重下線で示す

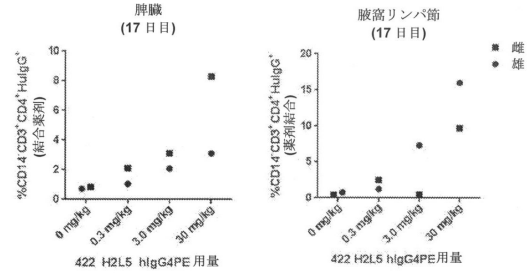
## 【図 12】

図 12：カニクイザルにおける H2L5 hlgG4PE の血漿濃度。濃度は、H2L5 hlgG4PE 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】

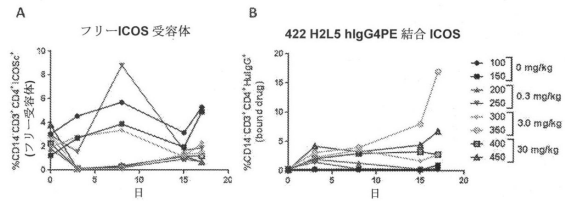
図 13：サル の 脾臓 および 腋窩 リンパ 節 から の CD4+T 細胞 対 する H2L5 hlgG4PE の 結 合 の 検 出 。 組 織 は 2 回 目 の 投 与 の 48 時 間 後 (17 日 目) に 採 取 し た



## 【図 14】

図 14：カニクイザル由来の血中 CD4+T 細胞における H2L5 hlgG4PE 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 hlgG4PE が存在しない場合にのみ結合する  
(B) 蛍光標識抗 H2L5 hlgG4PE により測定される、末梢血 CD4+T 細胞上の H2L5 hlgG4PE と結合した受容体



## 【図 15】

図 15 (a) H2L5 hlgG4PE 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

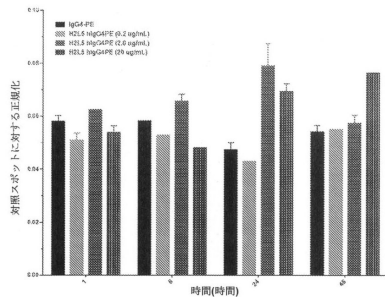
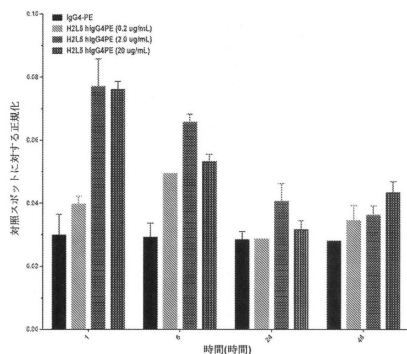
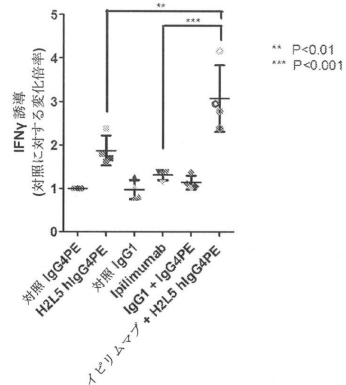


図 15 (b) H2L5 hlgG4PE で処理した Ba/F3-ICOS 細胞におけるホスホ-AKT (S473) 発現レベル細胞内シグナル伝達抗体アレイ



## 【図 16】

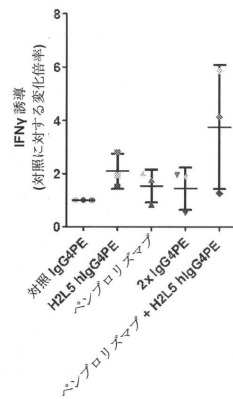
図 16：PBMC 前刺激アッセイにおいて、H2L5 hlgG4PE とイピリムマブの組合せは、単一抗体処理に比べて炎症性サイトカイン産生の増大をもたらす





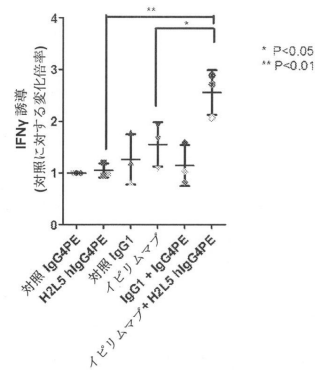
【図 17】

図17: PBMC前刺激アッセイにおいて、H2L5 hIgG4PEとペンブロリスマブの組合せは、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



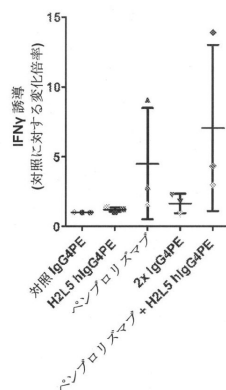
【図 18】

図18: H2L5 hIgG4PEとイビリムマブの組合せは、CEFTペプチドとブレインキュー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



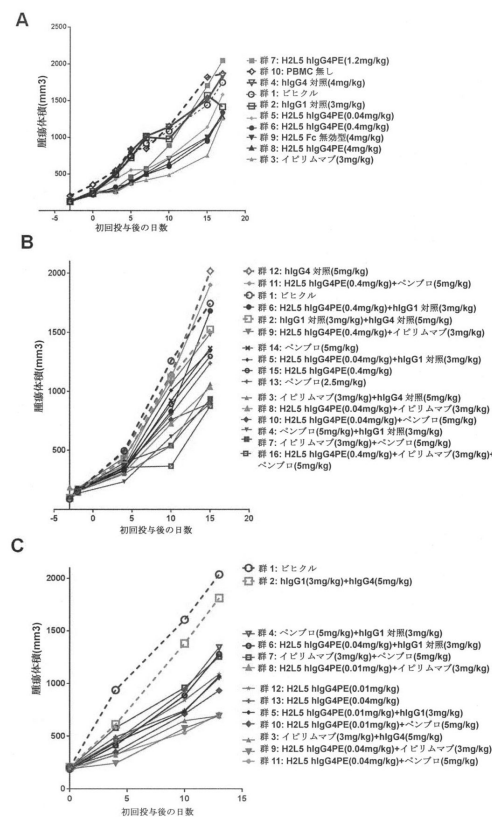
【図 19】

図19: H2L5 hIgG4PEとペンブロリスマブの組合せは、CEFTペプチドとブレインキュー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



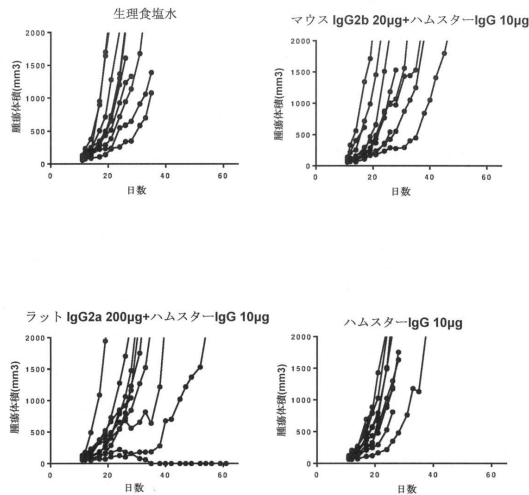
【図 20】

図20: H2L5 hIgG4PE抗ICOSアゴニストmAbは単独で、また、ペンブロリスマブとの組合せで、ヒトPBMC 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



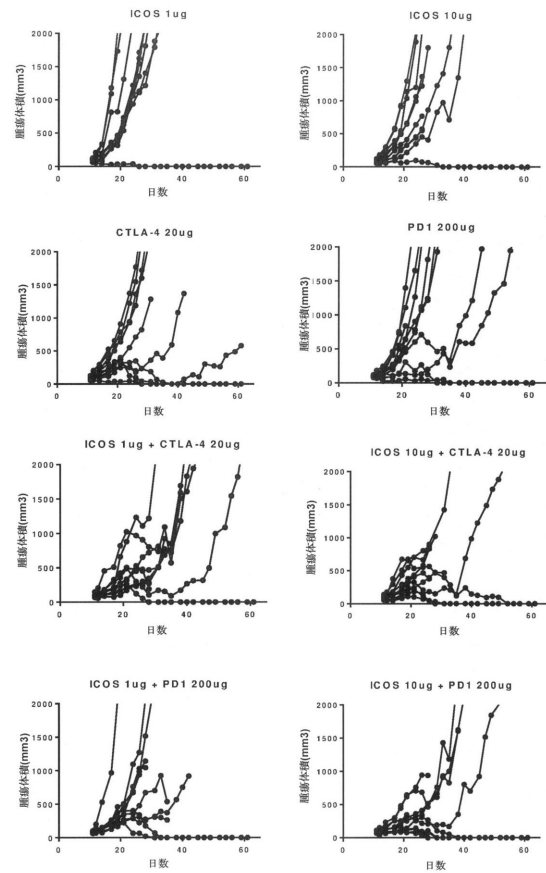
## 【図 21 - 1】

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



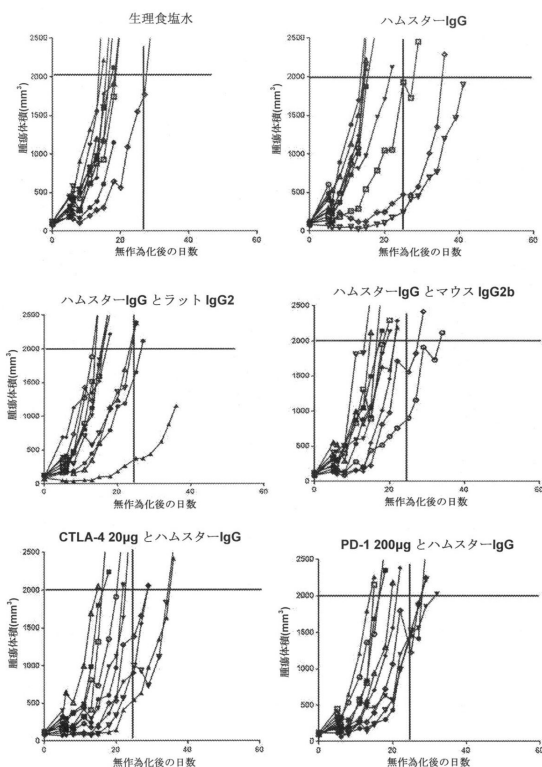
## 【図 21 - 2】

図 21 (続き)



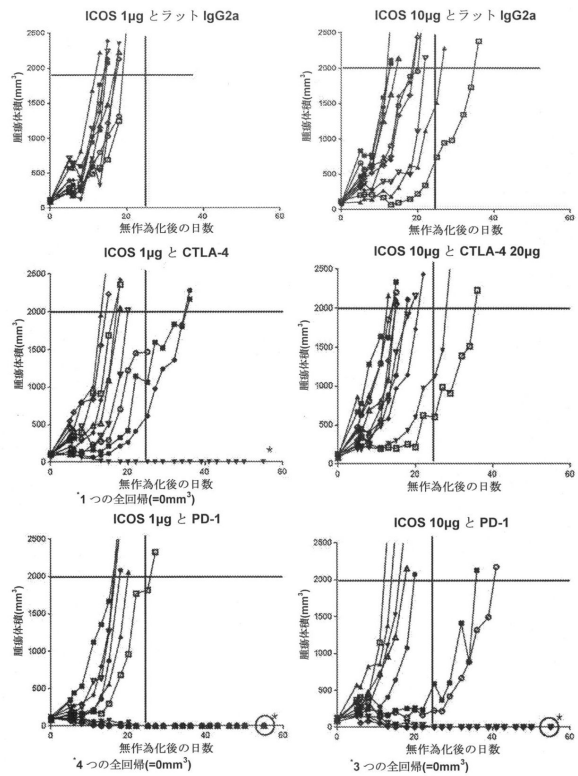
## 【図 22 - 1】

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



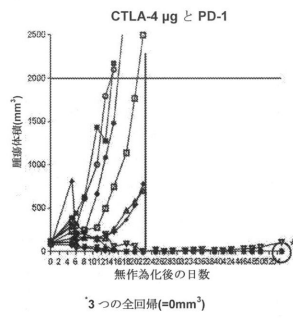
## 【図 22 - 2】

図 22 (続き)



## 【図 2 2 - 3】

図 2 2 (続き)



## 【配列表】

0006553197000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		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  
イカル)

フランス共和国 7 5 6 5 4 パリ セデックス 1 3 リュ ドゥ トルビアック 1 0 1

(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 - 1 3 0 0 9、ブルヴァール セント - マルグリット 2 3 2

2 3 2 Boulevard Sainte - Marguerite , F - 1 3 0 0 9 Mars  
eille , 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 - 1 3 2 8 4 マルセイユ セデ 0 7 ブルバー シャルル リヴォン 5 8

(73)特許権者 305023584

サントル・ナショナル・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、7 5 7 9 4 パリ・セデックス 1 6、リュ・ミシェル・アンジュ 3

3 rue Michel Ange , 7 5 7 9 4 PARIS CEDEX 1 6 , Fra  
nce

(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、1 2 5 0

(72)発明者 ラダ、シャー、パルマル

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、ブールバール、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)

A61K 39/395

A61K 39/39

A61K 45/00

A61P 31/00

A61P 31/18

A61P 35/00

C07K 16/28

C12N 15/00

C12P 21/08

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/REGISTRY

/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)