

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7680208号

(P7680208)

(45)発行日 令和7年5月20日(2025.5.20)

(24)登録日 令和7年5月12日(2025.5.12)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 K 16/28 (2006.01)

C 0 7 K 16/28

A 6 1 P 35/04 (2006.01)

A 6 1 P 35/04

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 35/02 (2006.01)

A 6 1 P 35/02

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C 1 2 N 15/13

Z N A

請求項の数 29 (全69頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2020-554172(P2020-554172)

(86)(22)出願日 平成31年4月3日(2019.4.3)

(65)公表番号 特表2021-520201(P2021-520201
A)

(43)公表日 令和3年8月19日(2021.8.19)

(86)国際出願番号 PCT/US2019/025623

(87)国際公開番号 WO2019/195452

(87)国際公開日 令和1年10月10日(2019.10.10)

審査請求日 令和4年4月4日(2022.4.4)

(31)優先権主張番号 62/652,790

(32)優先日 平成30年4月4日(2018.4.4)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

前置審査

(73)特許権者 391015708

ブリistol-マイヤーズ スクイブ カン
パニーBRISTOL-MYERS SQUI
BB COMPANYアメリカ合衆国08543ニュージャー
ジー州 プリンストン、ルート206ア
ンド・プロビンス・ライン・ロード

(74)代理人 100145403

弁理士 山尾 憲人

(74)代理人 100170520

弁理士 笹倉 真奈美

(74)代理人 100221545

弁理士 白江 雄介

(72)発明者 リーシェン・ルー

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗CD27抗体およびその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

表面プラズモン共鳴(SPR)またはフローサイトメトリーにより測定して、配列番号1に示される配列であるヒトCD27に特異的に結合し、CD27のそのCD70リガンドへの結合を遮断しない、アゴニストモノクローナル抗体またはその抗原結合部分であって、該抗体またはその抗原結合部分は、

(a) 配列番号2に示す配列を有する連続的に結合したアミノ酸を含むCDR1、配列番号3に示す配列を有する連続的に結合したアミノ酸を含むCDR2および配列番号4に示す配列を有する連続的に結合したアミノ酸を含むCDR3を含む重鎖可変領域(V_H)、および

(b) 配列番号5に示す配列を有する連続的に結合したアミノ酸を含むCDR1、配列番号6に示す配列を有する連続的に結合したアミノ酸を含むCDR2および配列番号7に示す配列を有する連続的に結合したアミノ酸を含むCDR3を含む軽鎖可変領域(V_L)

を含む、アゴニストモノクローナル抗体またはその抗原結合部分。

【請求項2】

水素-重水素交換マスペクトロメトリー(HDX-MS)および／またはタンパク質の高速光化学酸化(FPOP)エピトープマッピングにより決定して、ヒトCD27の2つの不連続結合領域、TPAPKSCPERHYWAQGKLCQ(配列番号15)およびDCDQHR(配列番号18)を含むエピトープに特異的に結合する、請求項1に記載のアゴニストモノクローナル抗体またはその抗原結合部分。

【請求項3】

(a) ヒトCD27に100nM以下、90nM以下、80nM以下、70nM以下、60nM以下、50nM以下、40nM以下、1nM～100nM、10nM～70nM、10nM～50nMまたは40nM～45nMの K_D で結合するおよび／または

(b) 抗CD3抗体および抗CD28抗体で刺激されたナイーブヒトT細胞で0.5nM以下、0.4nM以下、0.3nM以下、0.005nM～0.5nM、0.01nM～0.4nMまたは0.02nM～0.25nMのEC50でNF- κ BおよびMAPKシグナル伝達を誘導する、請求項1または2に記載のアゴニストモノクローナル抗体またはその抗原結合部分。

【請求項4】

配列番号8に示す配列を有する連続的に結合したアミノ酸を含む V_H および配列番号9に示す配列を有する連続的に結合したアミノ酸を含む V_L を含む、請求項1～3の何れかに記載のアゴニストモノクローナル抗体またはその抗原結合部分。

10

【請求項5】

表面プラズモン共鳴(SPR)またはフローサイトメトリーにより測定して、ヒトCD27に特異的に結合し、CD27のそのCD70リガンドへの結合を遮断せず、ヒトCD27への結合について請求項4に記載のアゴニストモノクローナル抗体またはその抗原結合部分と交差競合する、アゴニストモノクローナル抗体またはその抗原結合部分。

【請求項6】

(a) SPRまたはフローサイトメトリーにより測定してラットCD27および／またはマウスCD27に特異的に結合しない；

(b) CD30、HVEM、DR5、4-1BB、CD40、OX40、GITRおよびこれらの何れかの組み合わせからなる群から選択されるTNF受容体スーパーファミリーメンバーの1以上に特異的に結合しない；

20

(c) 10 μ g/mLまでの濃度でヒト組織の1以上に特異的に結合せず、ここで、ヒト組織は甲状腺、肺、皮膚、子宮、前立腺、肝臓、腎臓、膵臓、副腎、下垂体、胎盤、精巣、大脳、小脳、心臓、末梢神経およびこれらの何れかの組み合わせからなる群から選択される；

(d) 抗CD3抗体および抗CD28抗体で刺激したナイーブで活性化前ヒトT細胞においてNF- κ BおよびMAPKシグナル伝達を誘導できる；

(e) CHO-svCD3-CD32Aアッセイにおいて増殖および／またはIFN- γ 分泌を誘導できる；

(f) CD4⁺CD45RO⁺記憶T細胞の増殖を誘導できる；

30

(g) ブドウ球菌エンテロトキシンB(SEB)刺激ヒト末梢血単核細胞(PBMC)からのIL-2放出を増加できる；

(h) 抗計画死1(抗PD-1)抗体と組み合わせたときIL-2放出を少なくとも2倍増加できる；

(i) 単球由来樹状細胞(MDDC)および可溶性OKT3存在下共培養CD4⁺レスポンドーT細胞のTreg介在抑制を反転できる；および

(j) ヒトT細胞増殖および可溶性CD70によるIFN- γ 分泌の誘導の増強ができるから選択される1以上の特徴を有する、請求項1～5の何れかに記載のアゴニストモノクローナル抗体またはその抗原結合部分。

【請求項7】

40

モノクローナル抗体またはその抗原結合部分が：

(a) ヒトT細胞に0.1nM以下、0.09nM以下、0.08nM以下、0.07nM以下、0.06nM以下、0.05nM以下、0.04nM以下、0.01nM～0.1nM、0.025nM～0.075nMまたは0.03nM～0.06nMのEC50で結合する；

(b) カニクイザルT細胞に0.5nM以下、0.4nM以下、0.3nM以下、0.2nM以下、0.1nM以下、0.01nM～0.5nM、0.025nM～0.4nM、0.04～0.3nMまたは0.06～0.2nMのEC50で結合する；および／または

(c) ヒトIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4アイソタイプのものである重鎖定常領域を含む、

請求項1～6の何れかに記載のアゴニストモノクローナル抗体またはその抗原結合部分。

50

【請求項 8】

- (a) ヒト抗体またはそのフラグメントである；
- (b) ヒト化抗体またはそのフラグメントである；
- (c) キメラ抗体またはそのフラグメントである；
- (d) ヒト CD 27 アゴニストである；
- (e) SPR またはフローサイトメトリーで測定してラット CD 27 および／またはマウス CD 27 に特異的に結合しない；
- (f) CD 30、HVEM、DR5、4-1BB、CD 40、OX40、GITR およびこれらの何れかの組み合わせからなる群から選択される TNF 受容体スーパーファミリーメンバーの 1 以上に特異的に結合しない；
- (g) 10 µg/mL までの濃度でヒト組織の 1 以上に特異的に結合せず、ここで、ヒト組織は甲状腺、肺、皮膚、子宮、前立腺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、下垂体、胎盤、精巣、大脳、小脳、心臓、末梢神経およびこれらの何れかの組み合わせからなる群から選択される；
- (h) 抗 CD 3 抗体および抗 CD 28 抗体で刺激したナイーブで活性化前ヒト T 細胞において NF-κB および MAPK シグナル伝達を、0.5 nM 以下、0.4 nM 以下、0.3 nM 以下、0.005 nM～0.5 nM、0.01 nM～0.4 nM または 0.02～0.25 nM の EC50 で、誘導する；
- (i) CHO-svCD3-CD32A アッセイにおいて増殖および／または IFN-γ 分泌を、0.05 nM 以下、0.04 nM 以下、0.03 nM 以下、0.0005 nM～0.05 nM、0.0005 nM～0.04 nM、0.0005 nM～0.03 nM、0.001 nM～0.05 nM、0.001 nM～0.04 nM または 0.001 nM～0.03 nM の EC50 で、誘導する；
- (j) CD4⁺CD45RO⁺ 記憶 T 細胞の増殖を、0.01 nM 以下、0.009 nM 以下、0.008 nM 以下、0.007 nM 以下、0.006 nM 以下、0.005 nM 以下、0.001 nM～0.01 nM、0.002 nM～0.008 nM、0.003 nM～0.007 nM または 0.004 nM～0.006 nM の EC50 で、誘導する；
- (k) SEB 刺激ヒト PBMC からの IL-2 放出を、クロスリンカーの存在下で 50% より多くまたは抗 PD-1 抗体と組み合わせたとき少なくとも 2 倍、増加させる；
- (l) MDDC および可溶性 OKT3 存在下、共培養 CD4⁺レスポンダー T 細胞の Treg 介在抑制を、少なくとも 70%、反転させる；または
- (m) 可溶性 CD70 によるヒト T 細胞の増殖および IFN-γ 分泌の誘導を、0.01 nM 以下、0.009 nM 以下、0.008 nM 以下、0.007 nM 以下、0.006 nM 以下、0.005 nM 以下、0.001 nM～0.01 nM、0.002 nM～0.008 nM または 0.003 nM～0.005 nM の EC50 で増強するおよび IFN-γ 分泌の誘導を 0.01 nM 以下、0.009 nM 以下、0.008 nM 以下、0.007 nM 以下、0.001 nM～0.01 nM、0.002 nM～0.008 nM または 0.005 nM～0.007 nM の EC50 で増強する、請求項 1～7 の何れかに記載の アゴニスト モノクローナル抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 9】

(a) ヒト IgG1、IgG2、IgG3 または IgG4 アイソタイプの全長抗体であるか；または

(b) 抗体フラグメントまたは一本鎖抗体である、

請求項 1～8 の何れかに記載の抗原結合部分であって、該抗体フラグメントは、Fab、F(ab')₂、Fd および Fv フラグメントからなる群より選択されるものであり、該一本鎖抗体は、一本鎖可変フラグメント(scFv)、二価 scFv(di-scFv) およびビバレント scFv(bi-scFv)、ダイアボディー、ミニボディー、ならびにそれらの何れかの組み合わせからなる群より選択されるものである、抗原結合部分。

【請求項 10】

配列番号 12 に示す配列を有する連続的に結合したアミノ酸を含む重鎖および／または配列番号 13 に示す配列を有する連続的に結合したアミノ酸を含む軽鎖を含む、請求項 1～8 の何れかに記載されたアゴニストモノクローナル抗体。

【請求項 11】

表面プラズモン共鳴(SPR)またはフローサイトメトリーにより測定して、ヒトCD27に特異的に結合し、CD27のそのCD70リガンドへの結合を遮断しない、アゴニストモノクローナル抗体であって、前記モノクローナル抗体が、配列番号12に示す配列を有する連続的に結合したアミノ酸を含む重鎖および配列番号13に示す配列を有する連続的に結合したアミノ酸を含む軽鎖を含む、BMS-986215と命名されたモノクローナル抗体である、アゴニストモノクローナル抗体。

【請求項12】

治療剤に結合された請求項1～11の何れかに記載されたアゴニストモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を含むイムノコンジュゲート。

【請求項13】

該治療剤は細胞毒素または放射性同位体である、請求項12に記載されたイムノコンジュゲート。

【請求項14】

請求項1～11の何れかに記載されたアゴニストモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を含む二特異的分子であって、該モノクローナル抗体またはその抗原結合部分とは異なる結合特異性を有する結合ドメインに結合した、二特異的分子。

【請求項15】

(a) 請求項1～11の何れかに記載のアゴニストモノクローナル抗体またはその抗原結合部分；

(b) 請求項12または13に記載のイムノコンジュゲート；または

(c) 請求項14に記載の二特異的分子、
および薬学的に許容される担体を含む、組成物。

【請求項16】

さらなる抗体またはその抗原結合部分をさらに含み、該さらなる抗体またはその抗原結合部分が抗PD-1抗体、抗計画死リガンド-1(PD-L1)抗体、抗細胞毒性Tリンパ球抗原-4(CTLA-4)抗体、抗リンパ球活性化遺伝子-3(LAG-3)抗体、抗BおよびTリンパ球アテニュエーター(BTLA)抗体、抗T細胞免疫グロブリンおよびムチンドメイン-3(TIM-3)抗体、抗キラー免疫グロブリン様受容体(KIR)抗体、抗キラー細胞レクチン様受容体G1(KLRG-1)抗体、抗アデノシンA2a受容体(A2aR)抗体、抗ナチュラルキラー細胞受容体2B4(CD244)抗体、抗CD160抗体、IgおよびITIMドメインを伴うT細胞免疫受容体(TIGIT)抗体、T細胞活性化のVドメインIgサブプレッサー(VISTA)抗体、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、セミプリマブ、アテゾリズマブ、デュルバルマブ、アベルマブ、BMS-936559と命名された抗体、抗誘導性T細胞共刺激分子(ICOS)抗体、抗CD137(4-1BB)抗体、抗CD134(OX40)抗体、抗CD27抗体、抗グルココルチコイド誘導性TNFR関連タンパク質(GITR)抗体、抗ヘルペスウイルス侵入メディエーター(HVEM)抗体およびこれらの何れかの組み合わせからなる群から選択される、請求項15に記載の組成物。

【請求項17】

請求項1～11の何れかに記載のアゴニストモノクローナル抗体またはその抗原結合部分をコードする、単離核酸。

【請求項18】

請求項17に記載の単離核酸を含む発現ベクター。

【請求項19】

請求項18に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項20】

ヒト免疫グロブリン重鎖および軽鎖トランスジーンを含むトランスジェニックマウスであって、請求項1～11の何れかに記載のアゴニストモノクローナル抗体を発現するトランスジェニックマウス。

【請求項21】

請求項20に記載のマウスから得られるハイブリドーマであって、ハイブリドーマは請

10

20

30

40

50

求項 1 ～ 11 の何れかに記載のアゴニストモノクローナル抗体を産生し、該抗体はヒト CD 27 に特異的に結合する、ハイブリドーマ。

【請求項 22】

抗-CD 27 モノクローナル抗体またはその抗原結合部分を製造する方法であって、該アゴニストモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を請求項 19 に記載の宿主細胞にて発現させ、該モノクローナル抗体またはその抗原結合部分を該宿主細胞から単離することを含む、方法。

【請求項 23】

癌を有する対象を処置するための医薬組成物であって、治療有効量の請求項 1 ～ 11 の何れかに記載のアゴニストモノクローナル抗体またはその抗原結合部分、請求項 12 もしくは 13 に記載のイムノコンジュゲート、請求項 14 に記載の二特異的分子、または請求項 15 もしくは 16 に記載の組成物を含む、医薬組成物。

【請求項 24】

対象における腫瘍細胞増殖を阻害するための医薬組成物であって、治療有効量の請求項 1 ～ 11 の何れかに記載のアゴニストモノクローナル抗体またはその抗原結合部分、請求項 12 もしくは 13 に記載のイムノコンジュゲート、請求項 14 に記載の二特異的分子、または請求項 15 もしくは 16 に記載の組成物を含む、医薬組成物。

【請求項 25】

該対象がヒトである、請求項 23 または 24 に記載の医薬組成物。

【請求項 26】

癌を有する対象の処置のためのあるいは対象における腫瘍細胞の増殖を阻害するための治療有効量のさらなる治療剤をさらに含む、請求項 23 または 24 に記載の医薬組成物であって、さらなる治療剤が下記の (a)、(b)、(c) または (d) である医薬組成物：

(a) 免疫系の阻害を低減するまたは刺激を増加する化合物；

(b) 小分子化合物、大環状ペプチド、融合タンパク質、または抗体；

(c) 計画死-1 (PD-1)、計画死リガンド-1 (PD-L1)、細胞毒性Tリンパ球抗原-4 (CTLA-4)、リンパ球活性化遺伝子-3 (LAG-3)、BおよびTリンパ球アテニュエーター (BTLA)、T細胞免疫グロブリンおよびムチンドメイン-3 (TIM-3)、キラー免疫グロブリン様受容体 (KIR)、キラー細胞レクチン様受容体 G1 (KLRG-1)、アデノシン A2a 受容体 (A2aR)、ナチュラルキラー細胞受容体 2B4 (CD244)、CD160、Ig および ITIM ドメインを伴う T細胞免疫受容体 (TIGIT)、または T細胞活性化の Vドメイン Ig サプレッサー (VISTA) の受容体に特異的に結合するアンタゴニスト抗体またはその抗原結合部分、ここで PD-1 または PD-L1 に特異的に結合する該抗体またはその抗原結合部分は：

(i) PD-1 と PD-L1 との間の相互作用を破壊し、PD-1 / PD-L1 シグナリングを阻害するか；

(ii) キメラ、ヒト化またはヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合部分であるか；

(iii) ヒト PD-1 への結合に関してニボルマブと交差競合するか；

(iv) PD-1 に特異的に結合し、ニボルマブまたはペムブロリズマブであるか；または

(v) PD-L1 に特異的に結合し、アテゾリズマブ、デュルバルマブまたはアベルマブである；または、

(d) 誘導性 T細胞共刺激分子 (ICOS)、CD137 (4-1BB)、CD134 (OX40)、CD27、グルココルチコイド誘導性 TNFR 関連タンパク質 (GITR)、またはヘルペスウイルス侵入メディエーター (HVEM) に特異的に結合するアゴニスト抗体またはその抗原結合部位。

【請求項 27】

(a) 癌が固形腫瘍であるまたは腫瘍細胞が固形腫瘍の細胞であり、固形腫瘍が結腸癌、線維肉腫、扁平上皮細胞癌、小細胞肺癌 (SCLC)、非小細胞肺癌 (NSCLC)、扁平上

10

20

30

40

50

皮NSCLC、非扁平上皮NSCLC、頭頸部癌、乳癌、食道癌、胃癌、消化器癌、小腸癌、肝臓癌、肝細胞癌(HCC)、膵臓癌(PAC)、腎臓癌、腎細胞癌(RCC)、膀胱癌、尿道癌、輸尿管癌、結腸直腸癌(CRC)、結腸癌、肛門部癌、子宮内膜癌、前立腺癌、神経芽腫、神経膠腫、神経膠芽腫、生殖細胞腫瘍、小児肉腫、副鼻腔ナチュラルキラー、黒色腫、皮膚癌、骨癌、子宮頸癌、子宮癌、子宮内膜癌腫、卵管癌腫、卵巣癌、子宮頸癌腫、陰癌腫、外陰癌腫、精巣癌、内分泌系癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、副腎癌、軟組織肉腫、陰茎癌、腎盂癌腫、中枢神経系(CNS)新生物、原発CNSリンパ腫、腫瘍血管形成、脊髄軸腫瘍、脳癌、脳幹神経膠腫、下垂体腺腫、カボジ肉腫、類表皮癌、扁平上皮細胞癌、小児固形腫瘍、環境誘発癌、ウイルス関連癌、ウイルス起源の癌、進行型癌、切除不能癌、転移癌、難治性癌、再発性癌およびこれらの何れかの組み合わせから選択される癌であるか；または

10

(b) 癌が造血器腫瘍であるまたは腫瘍細胞が造血器腫瘍の細胞であり、造血器腫瘍がT細胞リンパ腫、急性リンパ芽球性白血病(ALL)、急性骨髄性白血病(AML)、慢性リンパ球性白血病(CLL)、慢性骨髄性白血病(CML)、T細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫(HL)、非ホジキンリンパ腫(NHL)、多発性骨髄腫、くすぶり型骨髄腫、意義不明の単クローン性ガンマグロブリン血症(MGUS)、進行性、転移性、難治性および／または再発性血液系腫瘍および該血液系腫瘍の何れかの組み合わせから選択される、

請求項23～26の何れかに記載の医薬組成物。

【請求項28】

癌を有する対象を処置するための、あるいは対象における腫瘍細胞の増殖を阻害するためのキットであって、

20

(a) 約0.1～約20mg/kg体重の範囲の請求項1～11の何れかに記載の**アゴニストモノクローナル抗体**またはその抗原結合部分、請求項12もしくは13に記載の**イムノコンジュゲート**、請求項14に記載の**二特異的分子**、または請求項15もしくは16に記載の組成物の1以上の投与量；および

(b) 請求項23～27の何れかに記載の医薬組成物において1以上の投与量を使用するための指示

を含む、キット。

【請求項29】

さらなる治療剤の1以上の投与量および請求項26または27に記載の医薬組成物において該さらなる治療剤の1以上の投与量を使用するための指示をさらに含む、請求項28に記載のキット。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願をとおして、種々の刊行物を、括弧内に著者名および日付を示すことにより、または特許または特許公開番号により引用している。これらの刊行物の完全な引用は本明細書の最後、特許請求の範囲の直前にまとめられている。これらの刊行物の開示を、ここに本発明が記載され、請求された当時の当業者の技術常識をより完全に示すために、全体を引用して本明細書に包含させる。しかしながら、これらの開示は、取り込まれた情報と、本明細書における明白な開示により提供される情報の間に矛盾が存在しないことを限度として、本出願に引用により取り込まれる。さらに、ここでの引用文献の言及は、このような引用文献が本発明の先行技術であることを認めるものと解釈されてはならない。

40

【0002】

関連出願の相互参照

本出願は、2018年4月4日出願の米国仮出願62/652,790の利益を主張し、その内容を全体として引用により本明細書に包含させる。

【0003】

EFS-WEBにより電子的に提供した配列表の記載

本明細書に関連して、電子的に提供した配列表(名称:13107-WO-PCT_ST25.txt、サ

50

イズ：23,885バイト；および作成日：2019年4月1日)は、引用により全体として本明細書に包含される。

【0004】

発明の分野

本発明は、CD27に特異的に結合するモノクローナル抗体(mAb)ならびに対象における癌を処置する方法であって、該対象に該抗CD27抗体(Ab)を単剤療法としてまたは免疫チェックポイント阻害剤などの抗癌剤および／またはある化学療法および放射線療法と組み合わせて投与することを含む、方法に関する。

【背景技術】

【0005】

発明の背景

ヒト癌は、多数の遺伝的および後成的変化を担持し、免疫系により潜在的に認識可能であるネオアンチゲンを産生する(Chakravarthi et al., 2016)。Tリンパ球およびBリンパ球からなる適応免疫系は強力な抗癌能を有し、広い能力で、多様な腫瘍抗原に応答する特異性を獲得する。さらに、免疫系は、相当な柔軟性および記憶要素を含む。適応免疫系のこれら属性全てをうまく利用することは、免疫療法を、全ての癌処置モダリティ中で独特のものとする。

【0006】

過去十年、癌処置のための特異的免疫チェックポイント経路阻害剤の開発が明らかにされており(Chen and Mellman, 2013; Lesokhin et al., 2015)、これは進行型黒色腫を有する患者の処置のための細胞毒性Tリンパ球抗原-4(CTLA-4)に結合し、阻害するイピリマブ(ヤーボイ(登録商標))であるAbおよびPD-1受容体に特異的に結合し、阻害性PD-1/PD-1リガンド(PD-L1)シグナル伝達経路を遮断するニボルマブ(オプジーボ(登録商標))、ペンブロリズマブ(キイトルーダ(登録商標))およびセミプリマブ-rwlc(LIBTAYO(登録商標))などのAbを含む(Iwai et al., 2017)。この経路はまたPD-L1に特異的に結合するアテゾリズマブ(テセントリク(登録商標))、デュルバルマブ(イミフィンジ(登録商標))およびアベルマブ(バベンシオ(登録商標))を含むAbによっても阻止される。

【0007】

ニボルマブは、PD-1リガンド、PD-L1およびPD-L2との相互作用を選択的に阻止する完全ヒト免疫グロブリン(Ig)G4(S228P)mAbであり(米国特許8,008,449; Wang et al., 2014)、それにより外来(腫瘍を含む)および自己抗原両者に対する抗原特異的T細胞応答の下方制御を遮断し、これらの抗原に対する免疫応答を増強する。ニボルマブは、黒色腫、肺癌、腎細胞癌、古典的ホジキンリンパ腫、頭頸部癌、尿路上皮癌、MSI-HまたはdMMR転移結腸直腸癌および肝細胞癌を含む数種の癌に対して最近承認を受けており、現在さらなる腫瘍タイプに対して単剤療法または他の抗癌剤と組み合わせて臨床評価されている。しかしながら、患者のごく一部、一般に約25%未満しか、チェックポイント阻害剤での処置から利益を受けず、チェックポイント阻害剤および他の抗癌剤または治療と組み合わせて使用する免疫療法の有効性に、現在相当な努力が向けられている。PD-1/PD-L1阻害剤で広範囲の癌の処置が成功することが証明されているため、免疫腫瘍学における種々の将来的薬物組み合わせの中堅となる可能性が認知され、最も有効な組み合わせの開発競争が始まっている(例えば、Mahoney et al., 2015; Ott et al., 2017参照)。

【0008】

腫瘍壊死因子受容体(TNFR)ファミリーの55kDaのI型膜貫通タンパク質であるCD27は、そのリガンドCD70への結合後、T細胞活性化を共刺激する。ヒトにおいて、CD27は、ナイーブT細胞で構成的におよび排他的に発現され、活性化T細胞およびB細胞で上方制御されるが、II型膜貫通タンパク質であるCD70の発現は極めて制御されており、活性化T細胞、B細胞および樹状細胞(DC)で一過性に生じるのみである(Wajant, 2016)。CD27は、ナイーブT細胞増大、エフェクター機能増大ならびにT細胞免

10

20

30

40

50

疫およびレスポンダーT細胞プールの産生および長期維持に重要な役割を有する(Hendricks et al., 2000)。CD27欠損マウスはT細胞免疫、インフルエンザウイルスへの記憶および活性化NK細胞の細胞溶解活性の低減を示し(Hendricks et al., 2000; De Colvenaer et al., 2011)、一方CD70欠損は、エフェクターCD8⁺ T細胞産生およびウイルスクリアランスを障害させる(Munitic et al., 2013)。CD27はヒト腫瘍より高レベルでヒト末梢血で発現され、TregはCD4⁺ T細胞より高レベルのCD27を発現する。CD27駆動共刺激はCD8⁺ T細胞のT細胞受容体活性化閾値を下げ、低親和性抗原に対する応答を可能とし、機能的T細胞レパートリーを広げると考えられる(van Gisbergen et al., 2011)。CD27-CD70相互作用遮断は、一次CD8⁺ T細胞応答を低減させ(Taraban et al., 2004; Sanchez et al., 2007)、CD8⁺ T細胞記憶の減少をもたらす(Dolfi et al., 2008)。重要なことに、CD27共刺激遮断は、マウスリンパ腫モデルにおける抗CD40治療応答を完全に排除する(French et al., 2007)。

【0009】

CD27は、一次免疫応答の早期産生に役割を有し、T細胞免疫の産生および長期維持に必要である。CD27-CD70結合は、NF-κBおよびMAPK8/JNK経路の活性化に至る。アダプタータンパク質TRAF2およびTRAF5は、CD27結合に起因するシグナル伝達に介在することが示されている。適正な免疫機能の維持における活性CD27の臨床的関連についての証拠は、機能的CD27を欠く患者における、致命的EBV関連リンパ増殖性障害または永続的EBVウイルス血症により示される(Salzer et al., 2013; van Montfrans et al., 2012)。

【0010】

CD27アゴニズムによるT細胞刺激増強は、増殖およびIFN-γの分泌の増加により顕在化する(Ramakrishna et al., 2015)。黒色腫患者からの末梢血単核細胞(PBMC)を使用するエクスピボ試験において、CD27アゴニスト処置は、黒色腫抗原に対するCD8⁺ T細胞の応答を、IFN-γ産生と共に増加させる(Bullock et al., 2014)。CD27アゴニスト介在共刺激は、非腫瘍担持マウス試験で、疲弊CD8⁺ T細胞を静止から抜け出させることにより、共阻害性チェックポイントPD-L1遮断と協力することが示されている(Buchan et al., 2015)。前臨床試験において、抗CD27アゴニスト処置が実験的肺転移を阻害し(Roberts et al., 2010)、同系腫瘍の増殖を阻害する(French et al., 2007; Roberts et al., 2010; He et al., 2013; Sakanishi and Yagita, 2010)ことが示されている。PD-1遮断を伴うCD27アゴニズムが、TC-1腫瘍根絶に有効である抗原特異的CTL応答を増加させ(Ahrends et al., 2016)、抗ヒトCD27アゴニストモノクローナル抗体(mAb)であるバルリルマブは、ヒト-CD27トランスジェニックマウスにおけるリンパ腫に対する保護のためにPD-L1遮断と協力する(Buchan et al., 2018)こともまた示されている。バルリルマブは多くの癌患者で抗PD-1 mAb、ニボルマブと組み合わせた臨床治験中であり、現在まで忍容性が良好であり、PD-1阻害剤単剤療法に一般に抵抗性である腫瘍タイプの患者サブセットでの臨床活性の初期証拠がある(Sanborn et al., 2017)。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明は、抗腫瘍免疫誘導ならびにCD70介在共刺激およびアゴニズムの維持における非リガンド遮断CD27アゴニスト抗体(Ab)の評価に関する。本発明はまた抗腫瘍活性に対する非リガンド遮断CD27アゴニストAbとチェックポイント遮断治療の組み合わせの評価にも関する。抗腫瘍免疫応答を増強する、強力なアゴニスト活性を示す高親和性、非リガンド遮断抗CD27 Abに対する要請が存在し続けている。

【課題を解決するための手段】

【0012】

発明の要約

本発明は、表面プラズモン共鳴(SPR)またはフローサイトメトリーにより測定して、

10

20

30

40

50

ヒトCD27(hCD27)に特異的に結合し、そのCD70リガンドとの結合を遮断しないmAbまたはその抗原結合部分であって、ここで、Abまたはそのフラグメントが(a)hCD27に約100nM以下、約90nM以下、約80nM以下、約70nM以下、約60nM以下、約50nM以下、約40nM以下、約1nM～約100nM、約10nM～約70nM、約10nM～約50nM、または約40nM～約45nMの K_D で結合するおよび／または(b)抗CD3 Abおよび抗CD28 Abで刺激したナイーブヒトT細胞において約0.5nM以下、約0.4nM以下、約0.3nM以下、約0.005nM～約0.5nM、約0.01nM～約0.4nM、または約0.02nM～約0.25nMの EC_{50} でNF- κ BおよびMAPKシグナル伝達を誘導するmAbまたはその抗原結合部分に関する。

【0013】

本発明は、水素-重水素交換マスペクトロメトリー(HDX-MS)および／またはタンパク質の高速光化学酸化(FPOP)エピトープマッピングにより決定して、hCD27の凡そアミノ酸残基21～41および52～57(その配列は配列番号1)に跨る不連続領域内に位置するエピトープに特異的に結合するmAbまたはその抗原結合部分に関する。

【0014】

本発明は、(a)配列番号2に示す配列を有する連続的に結合したアミノ酸を含むCDR1、配列番号3に示す配列を有する連続的に結合したアミノ酸を含むCDR2および配列番号4に示す配列を有する連続的に結合したアミノ酸を含むCDR3を含む重鎖可変領域(V_H)；および(b)配列番号5に示す配列を有する連続的に結合したアミノ酸を含むCDR1、配列番号6に示す配列を有する連続的に結合したアミノ酸を含むCDR2および配列番号7に示す配列を有する連続的に結合したアミノ酸を含むCDR3を含む軽鎖可変領域(V_L)を含む、hCD27に特異的に結合するmAbまたはその抗原結合部分に関する。ある実施態様において、 V_H は、配列番号8に示す配列を有する連続的に結合したアミノ酸を含む。ある実施態様において、 V_L は、配列番号9に示す配列を有する連続的に結合したアミノ酸を含む。ある実施態様において、mAbは、配列番号12に示す配列を有する連続的に結合したアミノ酸を含む重鎖および配列番号13に示す配列を有する連続的に結合したアミノ酸を含む軽鎖を含む。ある実施態様において、mAbは、BMS-986215と命名されるmAbである。

【0015】

本発明は、上記mAbまたはその抗原結合部分の何れかのmAbまたはそれらと実質的に同じhCD27のエピトープに特異的に結合するmAbまたはその抗原結合部分に関する。本発明は、さらに、hCD27への結合について対照Abまたはその対照抗原結合部分と交差競合するmAbまたはその抗原結合部分に関する。

【0016】

上記mAbまたはその抗原結合部分の何れも下記実施態様で抗CD27 mAbまたはその抗原結合部分と称する。

【0017】

ある実施態様において、抗CD27 mAbまたはその抗原結合部分の何れかは、(a)表面プラズモン共鳴(SPR)またはフローサイトメトリーにより測定して、CD27へのCD70結合を阻害しない；(b)SPRまたはフローサイトメトリーにより測定してラットCD27および／またはマウスCD27に特異的に結合しない；(c)CD30、HVEH、DR5、4-1BB、CD40、OX40、GITRおよびこれらの何れかの組み合わせからなる群から選択される1以上のTNF受容体スーパーファミリーメンバーに特異的に結合しない；(d)10 μ g/mLまでの濃度でヒト組織の1以上と特異的に結合せず、ここで、ヒト組織は甲状腺、肺、皮膚、子宮、前立腺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、下垂体、胎盤、精巣、大脳、小脳、心臓、末梢神経およびこれらの何れかの組み合わせからなる群から選択される；(e)抗CD3 Abおよび抗CD28 Abで刺激したナイーブで活性化前ヒトT細胞においてNF- κ BおよびMAPKシグナル伝達を誘導できる；(f)CHO-svCD3-CD32Aアッセイで増殖および／またはIFN- γ 分泌を誘導できる；(g)CD4⁺CD45RO⁺記憶T細胞の増殖を誘導できる；(h)ブドウ球菌エンテロトキ

10

20

30

40

50

シンＢ(ＳＥＢ)刺激ヒトＰＢＭＣからＩＬ－２放出増加の誘導ができる；(ｉ)抗計画死１(抗ＰＤ－１)Ａｂと組み合わせたとき、ＩＬ－２放出を少なくとも２倍増加できる；(ｊ)単球由来樹状細胞(ＭＤＤＣ)および可溶性ＯＫＴ３存在下共培養ＣＤ４⁺レスポndaーＴ細胞のＴｒｅｇ介在抑制を反転させる；および(ｋ)ヒトＴ細胞増殖および可溶性ＣＤ７０によるＩＦＮ－γ分泌の誘導の増強ができる

からなる群から選択される、１以上の特徴を有する。

【００１８】

ある実施態様において、抗ＣＤ２７ ｍＡｂまたはその抗原結合部分の何れかはｈＣＤ２７に約１００ｎＭ以下、約９０ｎＭ以下、約８０ｎＭ以下、約７０ｎＭ以下、約６０ｎＭ以下、約５０ｎＭ以下、約４０ｎＭ以下、約１ｎＭ～約１００ｎＭ、約１０ｎＭ～約７０ｎＭ、約１０ｎＭ～約５０ｎＭ、または約４０ｎＭ～約４５ｎＭのＫ_Dで結合する。

10

【００１９】

ある実施態様において、抗ＣＤ２７ ｍＡｂまたはその抗原結合部分の何れかはヒトＴ細胞に約０.１ｎＭ以下、約０.０９ｎＭ以下、約０.０８ｎＭ以下、約０.０７ｎＭ以下、約０.０６ｎＭ以下、約０.０５ｎＭ以下、約０.０４ｎＭ以下、約０.０１ｎＭ～約０.１ｎＭ、約０.０２５ｎＭ～約０.０７５ｎＭ、または約０.０３ｎＭ～約０.０６ｎＭのＥＣ₅₀で結合する。

【００２０】

ある実施態様において、抗ＣＤ２７ ｍＡｂまたはその抗原結合部分の何れかはカニクイザルＴ細胞に約０.５ｎＭ以下、約０.４ｎＭ以下、約０.３ｎＭ以下、約０.２ｎＭ以下、約０.１ｎＭ以下、約０.０１ｎＭ～約０.５ｎＭ、約０.０２５ｎＭ～約０.４ｎＭ、約０.０４～約０.３ｎＭ、または約０.０６ｎＭ～約０.２ｎＭのＥＣ₅₀で結合する。

20

【００２１】

ある実施態様において、抗ＣＤ２７ ｍＡｂまたはその抗原結合部分の何れかはヒトＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４アイソタイプのものである重鎖定常領域を含む。ある好ましい実施態様において、抗ＣＤ２７ ｍＡｂまたはその抗原結合部分は、ヒトＩｇＧ１アイソタイプのものである重鎖定常領域を含む。他の実施態様において、抗ＣＤ２７ ｍＡｂまたはその抗原結合部分は、ヒトＩｇＧ４アイソタイプのものである重鎖定常領域を含む。

【００２２】

ある実施態様において、抗ＣＤ２７ ｍＡｂの何れかはＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、またはＩｇＧ４アイソタイプの完全長Ａｂである。

30

【００２３】

ある実施態様において、抗ＣＤ２７抗原結合部分の何れかはＡｂフラグメントまたは一本鎖Ａｂである。ある実施態様において、Ａｂフラグメントは、Ｆａｂ、Ｆ(ａｂ')₂、Ｆ_dおよびＦ_vフラグメント、単ドメインＡｂ、一本鎖可変フラグメント(ｓ_cＦ_v)、二価ｓ_cＦ_v(*d*ｉ－*s*ｃＦ_v)およびビバレントｓ_cＦ_v(*b*ｉ－*s*ｃＦ_v)、二重特異性抗体、ミニボディ、ＣＤＲおよびこれらの何れかの組み合わせからなる群から選択される。

【００２４】

ある実施態様において、抗ＣＤ２７ ｍＡｂまたはその抗原結合部分の何れかはヒトＡｂまたはそのフラグメントである。

40

【００２５】

ある実施態様において、抗ＣＤ２７ ｍＡｂまたはその抗原結合部分の何れかはヒト化Ａｂまたはそのフラグメントである。

【００２６】

ある実施態様において、抗ＣＤ２７ ｍＡｂまたはその抗原結合部分の何れかはキメラＡｂまたはそのフラグメントである。

【００２７】

ある実施態様において、抗ＣＤ２７ ｍＡｂまたはその抗原結合部分の何れかはｈＣＤ２７アゴニストである。

【００２８】

50

ある実施態様において、抗CD27 mAbまたはその抗原結合部分の何れかはSPRまたはフローサイトメトリーで測定して、CD27へのCD70結合を阻害しない。

【0029】

ある実施態様において、抗CD27 mAbまたはその抗原結合部分の何れかはSPRまたはフローサイトメトリーにより測定してラットCD27および／またはマウスCD27に特異的に結合しない。

【0030】

ある実施態様において、抗CD27 mAbまたはその抗原結合部分の何れかはもCD30、HVEM、DR5、4-1BB、CD40、OX40、GITRおよびこれらの何れかの組み合わせからなる群から選択される1以上のTNF受容体スーパーファミリーメン

10

【0031】

ある実施態様において、抗CD27 mAbまたはその抗原結合部分の何れかは10 µg/mLまでの濃度でヒト組織の1以上と特異的に結合せず、ここで、ヒト組織は甲状腺、肺、皮膚、子宮、前立腺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、下垂体、胎盤、精巣、大脳、小脳、心臓、末梢神経およびこれらの何れかの組み合わせからなる群から選択される。

【0032】

ある実施態様において、抗CD27 mAbまたはその抗原結合部分の何れかは抗CD3 Abおよび抗CD28 Abで刺激したナイーブで活性化前ヒトT細胞においてNF-κBおよびMAPKシグナル伝達を誘導できる。ある実施態様において、mAbまたはその抗原結合部分は、約0.5 nM以下、約0.4 nM以下、約0.3 nM以下、約0.005 nM～約0.5 nM、約0.01 nM～約0.4 nM、または約0.02 nM～約0.25 nMのEC₅₀でNF-κBおよびMAPKシグナル伝達を誘導できる。

20

【0033】

ある実施態様において、抗CD27 mAbまたはその抗原結合部分の何れかはCHO-svCD3-CD32Aアッセイで増殖および／またはIFN-γ分泌を誘導できる。ある実施態様において、mAbまたはその抗原結合部分は、約0.05 nM以下、約0.04 nM以下、約0.03 nM以下、約0.0005 nM～約0.05 nM、約0.0005 nM～約0.04 nM、約0.0005 nM～約0.03 nM、約0.001 nM～約0.05 nM、約0.001 nM～約0.04 nM、または約0.001 nM～約0.03 nMのEC₅₀で増殖および／またはIFN-γ分泌を誘導できる。

30

【0034】

ある実施態様において、抗CD27 mAbまたはその抗原結合部分の何れかはCD4⁺CD45RO⁺記憶T細胞の増殖を誘導できる。ある実施態様において、mAbまたはその抗原結合部分は、約0.01 nM以下、約0.009 nM以下、約0.008 nM以下、約0.007 nM以下、約0.006 nM以下、約0.005 nM以下、約0.001 nM～約0.01 nM、約0.002 nM～約0.008 nM、約0.003 nM～約0.007 nM、または約0.004 nM～約0.006 nMのEC₅₀で増殖を誘導できる。

【0035】

ある実施態様において、抗CD27 mAbまたはその抗原結合部分の何れかはSEB刺激ヒトPBMCからのIL-2放出を増加できる。ある実施態様において、mAbまたはその抗原結合部分は、例えば、陰性対照IgG1 mAbと比較して、クロスリンカーの存在下、IL-2放出を約50%より多く増加できる。

40

【0036】

ある実施態様において、抗CD27 mAbまたはその抗原結合部分の何れかは、抗PD-1 Abと組み合わせたとき、IL-2放出を少なくとも約2倍増加できる。

【0037】

ある実施態様において、抗CD27 mAbまたはその抗原結合部分の何れかはMDDCおよび可溶性OKT3存在下、共培養CD4⁺レスポンドーT細胞のTreg介在抑制を反転させ得る。ある実施態様において、mAbまたはその抗原結合部分は、例えば、陰

50

性対照 I g G 1 m A b と比較して、T r e g 介在抑制を少なくとも約 7 0 % 反転できる。
【 0 0 3 8 】

ある実施態様において、抗 C D 2 7 m A b またはその抗原結合部分の何れかはヒト T 細胞増殖および可溶性 C D 7 0 による I F N - γ 分泌の誘導の増強ができる。ある実施態様において、m A b またはその抗原結合部分は、約 0.0 1 n M 以下、約 0.0 0 9 n M 以下、約 0.0 0 8 n M 以下、約 0.0 0 7 n M 以下、約 0.0 0 6 n M 以下、約 0.0 0 5 n M 以下、約 0.0 0 1 n M ～約 0.0 1 n M、約 0.0 0 2 n M ～約 0.0 0 8 n M、または約 0.0 0 3 n M ～約 0.0 0 5 n M の E C 5 0 で、増殖を増強できる。ある実施態様において、m A b またはその抗原結合部分は、約 0.0 1 n M 以下、約 0.0 0 9 n M 以下、約 0.0 0 8 n M 以下、約 0.0 0 7 n M 以下、約 0.0 0 1 n M ～約 0.0 1 n M、約 0.0 0 2 n M ～約 0.0 0 8 n M、または約 0.0 0 5 n M ～約 0.0 0 7 n M の E C 5 0 で、I F N - γ 分泌の誘導を増強できる。

10

【 0 0 3 9 】

本発明は、治療剤と結合した抗 C D 2 7 m A b またはその抗原結合部分の何れかを含む、イムノコンジュゲートに関する。ある実施態様において、治療剤は細胞毒である。ある他の実施態様において、治療剤は放射性同位体である。

【 0 0 4 0 】

本発明は、抗 C D 2 7 m A b またはその抗原結合部分と異なる結合特異性を有する結合ドメインに結合した抗 C D 2 7 m A b またはその抗原結合部分の何れかを含む、二特異的分子に関する。

【 0 0 4 1 】

本発明は、(a) 抗 C D 2 7 m A b またはその抗原結合部分の何れか；(b) イムノコンジュゲートの何れか；または(c) 二特異的分子の何れか；および薬学的に許容される担体を含む組成物に関する。ある実施態様において、組成物は、さらにさらなる A b またはその抗原結合部分を含む。ある実施態様において、さらなる A b またはその抗原結合部分は、抗 P D - 1 A b、抗計画死リガンド - 1 (P D - L 1) A b、抗細胞毒性 T リンパ球抗原 - 4 (C T L A - 4) A b、抗リンパ球活性化遺伝子 - 3 (L A G - 3) A b、抗 B および T リンパ球アテニュエーター (B T L A) A b、抗 T 細胞免疫グロブリンおよびムチンドメイン - 3 (T I M - 3) A b、抗キラー免疫グロブリン様受容体 (K I R) A b、抗キラー細胞レクチン様受容体 G 1 (K L R G - 1) A b、抗アデノシン A 2 a 受容体 (A 2 a R) A b、抗ナチュラルキラー細胞受容体 2 B 4 (C D 2 4 4) A b、抗 C D 1 6 0 A b、I g および I T I M ドメインを伴う T 細胞免疫受容体 (T I G I T) A b、T 細胞活性化の V - ドメイン I g サプレッサー (V I S T A) A b、ニボルマブ、ペンブロリズマブおよびこれらの何れかの組み合わせからなる群から選択される。ある実施態様において、さらなる A b またはその抗原結合部分は、抗誘導性 T 細胞共刺激分子 (I C O S) A b、抗 C D 1 3 7 (4 - 1 B B) A b、抗 C D 1 3 4 (O X 4 0) A b、抗グルココルチコイド誘導性 T N F R 関連タンパク質 (G I T R) A b、抗ヘルペスウイルス侵入メディエーター (H V E M) A b およびこれらの何れかの組み合わせからなる群から選択される。

20

30

【 0 0 4 2 】

本発明は、抗 C D 2 7 m A b またはその抗原結合部分の何れかをコードする単離核酸に関する。

40

【 0 0 4 3 】

本発明は、単離核酸の何れかを含む発現ベクターに関する。

【 0 0 4 4 】

本発明は、発現ベクターの何れかを含む宿主細胞に関する。

【 0 0 4 5 】

本発明は、ヒト免疫グロブリン重鎖および軽鎖導入遺伝子を含むトランスジェニックマウスに関し、ここで、マウスは抗 C D 2 7 m A b の何れかを発現する。

【 0 0 4 6 】

本発明は、トランスジェニックマウスの何れかから調製されたハイブリドーマに関し、ここで、ハイブリドーマは抗 C D 2 7 m A b を産生する。

50

【0047】

本発明は、抗CD27 mAbまたはその抗原結合部分の何れを製造する方法であって、抗CD27 mAbまたはその抗原結合部分を宿主細胞の何れかから発現させ、該抗CD27 mAbまたはその抗原結合部分を該宿主細胞から単離することを含む、方法に関する。

【0048】

本発明は、癌を有する対象を処置する方法であって、対象に治療有効量の抗CD27 mAbまたはその抗原結合部分の何れか、イムノコンジュゲートの何れか、二特異的分子の何れかまたは医薬組成物の何れかを、対象が処置されるように投与することを含む、方法に関する。

【0049】

本発明は、対象における腫瘍細胞増殖を阻害する方法、対象に治療有効量の抗CD27 mAbまたはその抗原結合部分の何れか、イムノコンジュゲートの何れか、二特異的分子の何れかまたは医薬組成物の何れかを、腫瘍細胞の増殖が阻害されるように投与することを含む、方法に関する。

【0050】

ある実施態様において、癌を処置するまたは腫瘍増殖を阻害する方法の何れもさらに、対象に癌を処置するための治療有効量のさらなる治療剤を投与することを含む。ある実施態様において、さらなる治療剤は免疫系の阻害を低減するまたは刺激を増加する化合物である。ある実施態様において、さらなる治療剤は小分子化合物、大環状ペプチド、融合タンパク質またはAbである。ある実施態様において、さらなる治療剤は、PD-1、PD-L1、CTLA-4、LAG-3、BTLA、TIM-3、KIR、KLRG-1、A2aR、CD244、CD160、TIGITまたはVISTAに特異的に結合するアンタゴニストAbまたはその抗原結合部分である。ある実施態様において、さらなる治療剤は、ICOS、CD137(4-1BB)、CD134(OX40)、CD27、GITRまたはHVEMに特異的に結合するアゴニストAbまたはその抗原結合部分である。ある実施態様において、さらなる治療剤は、PD-1またはPD-L1に特異的に結合し、PD-1とPD-L1の間の相互作用を妨害し、PD-1/PD-L1シグナル伝達を阻害するアンタゴニストAbまたはその抗原結合部分である。ある実施態様において、さらなる治療剤は、PD-1またはPD-L1に特異的に結合するアンタゴニストAbまたはその抗原結合部分であり、キメラ、ヒト化またはヒトmAbまたはその抗原結合部分である。ある実施態様において、さらなる治療剤は、PD-1に特異的に結合し、ヒトPD-1への結合についてニボルマブと交差競合するアンタゴニストAbまたはその抗原結合部分である。ある実施態様において、さらなる治療剤は、PD-1に特異的に結合するアンタゴニストAbまたはその抗原結合部分であり、ニボルマブ、ペンブロリズマブまたはセンプリマブである。ある実施態様において、さらなる治療剤は、PD-L1に特異的に結合し、ヒトPD-L1への結合についてBMS-936559と命名されたAb(WO2013/173223)と交差競合するアンタゴニストAbまたはその抗原結合部分である。ある実施態様において、さらなる治療剤は、PD-L1に特異的に結合するアンタゴニストAbまたはその抗原結合部分であり、アテゾリズマブ、デュルバルマブ、アベルマブまたはBMS-936559と命名されたAb(WO2013/173223)である。

【0051】

ある実施態様において、癌処置または腫瘍増殖阻害についてここに記載する方法の何れかにおける癌は固形腫瘍であるかまたは腫瘍細胞は固形腫瘍の細胞である。ある実施態様において、固形腫瘍は、結腸癌または線維肉腫である。さらなる実施態様において、固形腫瘍は、扁平上皮細胞癌、小細胞肺癌(SCLC)、非小細胞肺癌(NSCLC)、扁平上皮NSCLC、非扁平上皮NSCLC、頭頸部癌、頭頸部扁平上皮細胞癌(SCCHN)、乳癌、トリプルネガティブ乳癌(TNBC)、男性乳癌、食道癌、胃癌、消化器癌、小腸癌、肝臓癌、肝細胞癌(HCC)、膵臓癌(PAC)、膵管腺癌(PDAC)、腎臓癌、腎細胞癌(RCC)、膀胱癌、尿道癌、輸尿管癌、結腸直腸癌(CRC)、直腸癌、結腸癌腫、肛門部癌、

10

20

30

40

50

子宮内膜癌、前立腺癌、転移去勢抵抗性前立腺癌(mCRPC)、神経芽腫、神経膠腫、神経膠芽腫、多形神経膠芽腫(GBM)、生殖細胞腫瘍、小児肉腫、副鼻腔ナチュラルキラー、黒色腫、皮膚癌、骨癌、子宮頸癌、子宮(子宮内膜)癌、子宮内膜癌腫、子宮肉腫、卵管癌腫、卵巢癌、子宮頸癌腫、腫瘍腫、外陰癌腫、精巣癌、内分泌系癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、副腎癌、軟組織肉腫、陰茎癌、腎盂癌腫、中枢神経系(CNS)新生物、原発CNSリンパ腫、腫瘍血管形成、脊髄軸腫瘍、脳癌、脳幹神経膠腫、下垂体腺腫、カボジ肉腫、類表皮癌、扁平上皮細胞癌、小児固形腫瘍、環境誘発癌、ウイルス関連癌、ウイルス起源癌、進行型癌、切除不能癌、転移癌、難治性癌、再発癌およびこれらの何れかの組み合わせからなる群から選択される癌である。

【0052】

ある実施態様において、癌処置または腫瘍増殖阻害について開示する方法の何れかにおける癌は造血器腫瘍であるかまたは腫瘍細胞は造血器腫瘍の細胞である。ある実施態様において、造血器腫瘍は、T細胞リンパ腫である。ある実施態様において、造血器腫瘍は、急性リンパ芽球性白血病(ALL)、急性骨髄性白血病(AML)、慢性リンパ球性白血病(CLL)、慢性骨髄性白血病(CML)、ホジキンリンパ腫(HL)、非ホジキンリンパ腫(NHL)、多発性骨髄腫、くすぶり型骨髄腫、意義不明の単クローン性ガンマグロブリン血症(MGUS)、進行性、転移性、難治性および／または再発性血液系腫瘍および該血液系腫瘍の何れかの組み合わせから選択される。

【0053】

ある実施態様において、処置または阻害の方法の何れかにおける対象はヒトである。

【0054】

本発明は、癌を有する対象を処置するためのキットであって、(a)約0.1～約20mg/kg体重の範囲の抗CD27 mAbまたはその抗原結合部分の何れか、イムノコンジュゲートの何れか、二特異的分子の何れかまたは医薬組成物の何れかの1以上の投与量；および(b)癌を処置するまたは腫瘍増殖を阻害する方法の何れかに該1以上の投与量を使用するための指示を含む、キットに関する。

【0055】

本発明は、癌を有する対象を処置するためのキットであって、(a)約0.1～約20mg/kg体重の範囲の抗CD27 mAbまたはその抗原結合部分の何れか、イムノコンジュゲートの何れか、二特異的分子の何れかまたは医薬組成物の何れかの1以上の投与量；(b)PD-1またはPD-L1に特異的に結合するAbまたはその抗原結合部分の何れかの約200～約1600mgの範囲の1以上の投与量；および(c)処置または阻害の方法の何れかにおいて該1以上の投与量を投与するための指示を含み、さらなる治療剤を含み、ここで、さらなる治療剤PD-1またはPD-L1に特異的に結合するアンタゴニストAbまたはその抗原結合部分に関するものである、キット。

【0056】

本発明の他の特性および利点は、次の詳細な記載および実施例から明らかであり、これらは限定的と解釈してはならない。本明細書をとおして引用する科学論文、GenBankエントリー、特許および特許出願を含むすべての引用する参考文献の内容を、ここに引用により明示的に包含させる。

【図面の簡単な説明】

【0057】

【図1】図1(A)～(B)は、フローサイトメトリー分析におけるヒト(A)およびカニクイザル(B)T細胞に対するAbの結合親和性を示す。グラフは、ナノモル(nM)濃度のBMS-986215および1F5ヒト抗CD27 mAbに関連する平均蛍光強度(MFI)を、(A)のヒトIgG1(hIgG1)対照Abと共に示す。(A)の「FL2」は、蛍光チャネル2(FL2)での測定を示す。グラフは、BMS-986215が、ヒトおよびカニクイザルCD27に1F5より高い親和性を有することを示す。

【0058】

【図2】図2(A)～(B)は、BMS-986215が非リガンド遮断抗CD27 mAbで

10

20

30

40

50

あることを示す。(A)は、CD27のリガンドである10 µg/ml ヒトCD70(hCD70)で前処理され、続くリガンド遮断(B)または非遮断(NB)抗CD27 Ab(aCD27)で処置されたヒトT細胞のフローサイトメトリーアッセイの説明を示す。本アッセイにおけるAbの結合は、標識抗ヒトIgG Ab(*、a h IgG)により検出した。(B)は、(A)のアッセイがBMS-986215、リガンド遮断1F5およびヒトIgG1(対照)Abで実施されたグラフを示す。BMS-986215の結合が検出され、CD27へのCD70結合がBMS-986215の結合を遮断しないことが示された。リガンド遮断1F5Abの結合は検出されなかった。(C)は、ヒトT細胞が(A)について記載したAbに10 µg/ml 可溶性ヒトCD70存在下で曝されたフローサイトメトリーアッセイの説明を示す。CD70は標識抗CD70 Ab(*、aCD70)。(D)(C)のアッセイをBMS-986215、リガンド遮断1F5およびヒトIgG1(対照)Abで行ったグラフを示す。CD70はBMS-986215の濃度を上げて検出可能なままであり、CD70結合がBMS-986215により遮断されなかったことを示す。CD70の結合は、リガンド遮断1F5Abの濃度を上げると減少した。「MFI」、「hIgG1」および「FL2」は図1について記載するとおりである。(B)の「FL1」は、蛍光チャンネル1(FL1)での測定を示す。

【0059】

【図3】図3(A)~(C)は、BMS-986215エピトープマッピングを示す。(A)は、水素/重水素交換マスペクトロメトリー(HDX-MS)およびタンパク質の高速光化学酸化(FPOP)エピトープマッピング方法で得たCD27の配列包括度を示す。示す配列は、配列番号1の20アミノ酸シグナルペプチド配列がない成熟CD27タンパク質である。(A)のアミノ酸1~172は、配列番号1のアミノ酸21~192に対応する。(B)は、CD27のN末端領域(配列番号1のアミノ酸21~41に対応)がBMS-986215結合により有意な保護を示したことを示す、HDX-MSデータ分析を示す。(C)は、CD27の4ペプチドのFPOP相対的保護パーセンテージを示し、成熟タンパク質のアミノ酸32~37(配列番号1のアミノ酸52~57に対応)が最高FPOP保護パーセンテージ(75%)を有し、Fabとの相互作用によるCD27の結合エピトープが示される。

【0060】

【図4】図4(A)~(B)は、リガンド遮断抗CD27 Ab(A)およびリガンド非遮断Ab、BMS-986215(B)の、Fcガンマ受容体(FcγR)との相互作用およびT細胞のCD27刺激の観点での効果の説明を示す。T細胞のそのリガンドCD70への結合によるCD27共刺激はBMS-986215存在下で生じるが(B)、リガンド遮断Ab存在下ではなかった(A)。

【0061】

【図5】図5(A)~(C)は、BMS-986215が、初代T細胞シグナル伝達アッセイで1F5と比較してNF-κBシグナル伝達の大きな誘導をもたらすことを示す。グラフは、示す量(µg/ml)のBMS-986215(A)、1F5(B)およびIgG1対照(C)Abでの0分、15分、30分および60分の処理時間に基づくNF-κBシグナル強度を示す。

【0062】

【図6】図6(A)~(B)は、BMS-986215が、1F5と比較して、CD4⁺ T細胞およびCHO-s c CD3-CD32a細胞(抗CD3 OKT3 mAbおよびhCD32a-131His(FcγRIIa)由来の一本鎖抗CD3 s c FvAbを発現するCHO細胞)の共培養でT細胞増殖およびIFN-γ分泌の大きな誘導をもたらすことを示す。共培養物を、グラフに示す濃度(nM)のBMS-986215、1F5またはhIgG1(対照)で処理した。(A)は、カウント毎分(CPM)でT細胞増殖を示し、(B)は、処理後のT細胞から分泌されるIFN-γの量をミリリットルあたりのピコグラム(pg/ml)で示す。

【0063】

【図7】図7(A)～(D)は、BMS-986215は、1F5と比較して、CHO-s c CD3-CD32 a細胞とCD4⁺CD45RO⁺記憶T細胞((A)～(B))またはCD4⁺CD45RA⁺ナイーブT細胞((C)～(D))の共培養でT細胞増殖およびIFN-γ分泌の誘導が大きいことを示し、T細胞増殖、IFN-γの量およびAbは図6に記載のとおりである。

【0064】

【図8】図8は、BMS-986215が、B細胞と共培養され、種々の量(ng/ml)のブドウ球菌エンテロトキシンB(SEB)により刺激されている、種々のドナー(ドナー1およびドナー2)からのCD4⁺CD25⁻T細胞からのIFN-γ分泌(pg/ml)の2.5を超える平均誘導倍率をもたらすことを示す。刺激された共培養物を、BMS-986215または抗キーホールリンペットヘモシアニンAb、g1F糖型(KLH-g1f)で刺激した。

10

【0065】

【図9】図9(A)～(E)は、インターロイキン-2(IL-2)放出が、BMS-986215がない対照と比較して、可溶性架橋BMS-986215存在下でSEB刺激ヒトPBMCから増加したことを示す。SEBで刺激した3ドナー(ドナーA、BおよびC)からのPBMCを、可溶性抗ヒトIgG1(hIgG1、対照)、抗ヒトOX40(OX40.21)、1F5またはBMS-986215Abで、示す濃度(nM)で、クロスリンカー(抗ヒトFcγAb)に存在下(図9(A)および(C))または存在下(図9(B)、(D)および(E))処理した。SEBまたはAb処理をしないPBMC(細胞のみ)およびSEBで処理するがAbではないPBMC(SEBのみ)は対照であった。

20

【0066】

【図10】図10(A)～(F)は、BMS-986215は、SEBでのT細胞刺激におけるIL-2産生改善のためにニボルマブおよびイピリムマブと相乗的に作用することを示す。SEBで処理した2ドナー(ドナーAおよびB)からのPBMCを、可溶性抗ヒトIgG1(hIgG1、対照)、1F5またはBMS-986215Abで、示す濃度(nM)で、単独(CD27)またはニボルマブ(Nivo combo)またはイピリムマブ(Ipi combo)と共に処理した。

【0067】

【図11】図11(A)～(C)は、BMS-986215が制御性T細胞(Treg)介在抑制を反転させ、レスポンダーT細胞(Tresp)の増大を誘導することを示す。(A)は、MDDCおよび可溶性抗ヒトCD3 mAb、OKT3存在下、共培養CD4⁺TrespのTreg介在抑制に対するBMS-986215およびIgG1(対照)Abのp効果を示す。Treg:Tresp比をx軸に示し、CD4⁺Trespのパーセンテージ増殖をy軸に示す。BMS-986215は、抑制を70%を超えて反転させた。(B)および(C)は、Tresp細胞を、可溶性抗CD28存在下、OKT3およびBMS-986215(.8)、1F5または抗KLH(KLH)Abで被覆したウェル中、7日間培養した後の、Tresp細胞数((B)におけるFoxp3⁻事象)およびFoxp3⁺Treg細胞数((C)におけるFoxp3⁺事象)を示す。(C)は、CD45RA⁺およびCD45RO⁺Treg集団の細胞数を示す。

30

【0068】

【図12】図12bは、BMS-986215によるADCC活性の中程度の誘導を示す。(A)および(B)は、BMS-986215、1F5またはIgG1アイソタイプ(対照)Abを、エフェクター対標的10:1比でエフェクター細胞としての初代ナチュラルキラー(NK)細胞および標的細胞としての活性化T細胞の共培養に加える実験を示した(n=8)。

【0069】

【図13】図13(A)～(D)は、FcγR非存在下のT細胞活性化および可溶性ヒトCD70(shCD70)による増強におけるBMS-986215によるアゴニスト活性を示す。(A)は、ヒトCD4⁺T細胞をCHO-OKT3細胞(抗CD3 OKT3 mAb由来一本鎖抗CD3 s c FvAbを発現するCHO細胞)と共培養したアッセイにおける、

50

リガンド遮断抗CD27 Ab(1F5)および非リガンド遮断Ab(BMS-986215)の効果の説明を示す。(B)~(E)は、(A)のアッセイを、共培養物を、shCD70非添加((B)および(C))または10 µg/ml shCD70添加((D)および(E))で、BMS-986215、1F5またはhIgG1(対照)Abでの処理により実施し、T細胞増殖((B)および(D))またはIFN-γ分泌((C)および(E))についてアッセイしたグラフを示す。図13(B)および(C)は、1F5ではなく、BMS-986215が、FcγR非存在下およびshCD70なしで、T細胞増殖(B)およびIFN-γ分泌を増強することにより、弱アゴニスト活性を示すことを示す。図13(D)および(E)は、1F5ではなく、BMS-986215が、可溶性CD70タンパク質によるヒトT細胞活性化(増殖およびIFN-γ分泌)を増強することを示す。

10

【0070】

【図14】図14(A)~(F)は、BMS-986215のサロゲートである抗マウスCD27 mAb、クローン8H5が、マウス腫瘍モデルで抗PD-1 mAb活性を増強することを示す。マウス結腸癌モデルとして 1×10^6 CT26細胞を皮下移植されたBALB/cマウスを、10 mg/kgの対照マウスIgG2aおよび対照マウスIgG1-D265AアイソタイプmAbの組み合わせ(A：対照mIgG2a⁺対照mIgG1、D265A)；マウスIgG1アイソタイプとして形作られたmAb 8H5と命名されたBMS-986215の抗マウスCD27(抗mCD27)サロゲート(B：抗mCD27、8H5、mIgG1)；マウスIgG2aアイソタイプとして形作られた8H5(C：抗mCD27、8H5、mIgG2a)；Fc-不活性マウスIgG1-D265Aアイソタイプとして形作られた抗マウスPD-1 mAb(D：抗mPD-1、mIgG1、D265A)；抗mPD-1、mIgG1、D265Aおよび抗mCD27、8H5、mIgG1の組み合わせ(E)；および抗mPD-1、mIgG1、D265Aおよび抗mCD27、8H5、mIgG2aの組み合わせ(F)の腹腔内注射で、移植後6日目、9日目および13日目に処置した。PD-1遮断と組み合わせた抗mCD27 mAbによるCD27アゴニズムは、腫瘍増殖阻害(TGI)を改善させ、無腫瘍(TF)マウスが単剤治療(図14(B)、抗mCD27：22% TGI、0/10 TF；図14(D)、抗mPD-1：27% TGI、2/10 TF)より多かった(図14(E)：それぞれ70% TGI、3/10 TF)。

20

【発明を実施するための形態】

【0071】

30

発明の詳細な記載

本発明は、CD27に特異的に結合するmAbおよび患者における癌を処置する方法であって、該患者に抗CD27 Abを単独でまたは免疫チェックポイント阻害剤などの抗癌剤との組み合わせで投与することを含む、方法に関する。

【0072】

用語

本開示がより容易に理解され得るように、一部用語をまず定義する。本明細書で使用されている場合、ここで特に明示する場合を除き、次の用語の各々は、以下に示す意味を有する。さらなる定義が、本明細書中で示される。

【0073】

40

ここで、態様が「含む」なる用語を用いて記載されているとき、「からなる」および／または「本質的にからなる」なる用語で示される他の類似する態様も提供される。

【0074】

特に断らない限り、ここで使用する全ての技術的および科学的用語は、本開示が関連する分野の当業者に一般に理解されるのと同じ意味を有する。例えば、the Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; and the Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Pressは、本明細書で使用する多くの用語の一般的辞書を当業者に提供する。

50

【0075】

単位、接頭辞および記号は、その国際単位系(SI)が認めた形態である。数値範囲は、該範囲を定義する数値を含む。ここに提供する表題は、本明細書を全体として引用して得られる種々の態様の開示を制限しない。従って、すぐ下に定義する用語は、本明細書をその全体として引用して、より完全に定義される。

【0076】

「投与する」は、治療剤または治療剤を含む組成物の、当業者に知られる種々の方法および送達系の何れかを使用する対象への物理的導入をいう。抗CD27 Abおよび抗PD-1 Abなどの治療Abの好ましい投与経路は静脈内投与である。他の投与経路は、例えば、注射または点滴による、筋肉内、皮下、腹腔内または他の非経腸投与経路を含む。ここで使用する用語「非経腸投与」は、経腸および局所投与以外の投与方式を意味する。投与はまた、例えば、1回、複数回および／または1以上の期間にわたり実施される。

【0077】

「抗体」(Ab)は、抗原に特異的に結合し、ジスルフィド結合により相互接続された少なくとも2つの重(H)鎖および2つの軽(L)鎖を含む糖タンパク質免疫グロブリン(Ig)またはその抗原結合部分をいう。各H鎖は、重鎖可変領域(ここではV_Hと略す)および重鎖定常領域を含む。IgG Abの重鎖定常領域は、3定常ドメイン、C_{H1}、C_{H2}およびC_{H3}を含む。各軽鎖は、軽鎖可変領域(ここではV_Lと略す)および軽鎖定常領域を含む。IgG Abの軽鎖定常領域は、1定常ドメイン、C_Lを含む。V_HおよびV_L領域を、フレームワーク領域(FR)と称される、より保存された領域が散在する相補性決定領域(CDR)と称される、超可変性の領域にさらに細分し得る。各V_HおよびV_Lは、3つのCDRおよび4つのFRを含み、アミノ末端からカルボキシ末端で、次の順に配置される：FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。種々の方法が、Ab内のCDRドメインの線引きに使用されており、Kabat、Chothia、AbM、接触およびIMGT定義を含む。Abの定常領域は、免疫系の種々の細胞(例えば、エフェクター細胞)および古典的補体系の第一成分(C1q)を含む、宿主組織または因子へのIgの結合に介在し得る。

【0078】

Igは、IgA、分泌型IgA、IgGおよびIgMを含むが、これらに限定されない一般に知られるアイソタイプの何れかに由来し得る。IgGサブクラスも当業者に周知であり、ヒトIgG1、IgG2、IgG3およびIgG4を含むが、これらに限定されない。「アイソタイプ」は、重鎖定常領域遺伝子によりコードされるAbクラスまたはサブクラス(例えば、IgM、IgG1またはIgG4)をいう。用語「抗体」は、例として、天然に存在するおよび天然に存在しないAb、モノクローナルおよびポリクローナルAb、キメラおよびヒト化Ab、ヒトまたは非ヒトAb、完全合成Abおよび一本鎖Abの両者を含む。非ヒトAbは、ヒトにおける免疫原性を低減するために、組み換え方法により一部または完全にヒト化され得る。明示されず、文脈に反しない限り、用語「抗体」はまた、前記Igの何れかの抗原結合フラグメントまたは抗原結合部分も含み、一価および二価フラグメントまたは一部および一本鎖Abを含む。

【0079】

「単離」Abは、異なる抗原特異性を有する他のAbを実質的に含まないAbをいう(例えば、CD27に特異的に結合する単離Abは、CD27以外の抗原に特異的に結合するAbを実質的に含まない)。しかしながら、hCD27に特異的に結合する単離Abは、カニクイザルなどの異なる種からのCD27ポリペプチドなどの他の抗原と交差反応性を有し得る。さらに、単離Abを、他の細胞物質および／または化学物質が実質的に含まないように精製し得る。

【0080】

用語「モノクローナル」Ab(mAb)は、単一分子組成のAb分子、すなわち、一次配列が本質的に同一であり、特定のエピトープに単一結合特異性および親和性を示すAb分子の天然に存在しない調製物をいう。mAbは単離Abの一例である。mAbはハイブリ

ドーマ、組み換え、トランスジェニックまたは当業者に知られる他の技術により産生され得る。

【0081】

「キメラ」A bは、可変領域がマウスA b由来であり、定常領域がヒトA b由来であるA bなどの、可変領域がある一つの種由来であり、定常領域が他の種由来であるA bをいう。

【0082】

「ヒト」mA b (HuMA b)は、フレームワークおよびCDR領域両者がヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列由来である可変領域を有する、mA bをいう。さらに、A bが定常領域を含むならば、定常領域もヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列由来である。本発明のヒトA bは、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列によりコードされないアミノ酸残基を含み得る(例えば、インピトロでランダムまたは部位特異的変異誘発により導入したまたはインピボで体細胞変異による変異)。しかしながら、ここで使用する用語「ヒト」A bは、マウスなどの他の哺乳動物種の生殖細胞系由来のCDR配列が、ヒトフレームワーク配列に移植されているA bを含むことを意図しない。用語「ヒト」A bおよび「完全ヒト」A bは、同義に使用される。

【0083】

「ヒト化」mA bは、非ヒトmA bのCDRドメイン外のアミノ酸の一部、大部分または全てがヒト免疫グロブリン由来の対応するアミノ酸で置換されているmA bをいう。A bのヒト化形態のある実施態様において、CDRドメイン外のアミノ酸の一部、大部分または全ては、ヒト免疫グロブリンからのアミノ酸で置換されており、一方1以上のCDR領域内のアミノ酸の一部、大部分または全ては不変である。アミノ酸の小さな付加、欠失、挿入、置換または修飾は、A bが特定の抗原に結合する能力を消失させない限り、許容される。「ヒト化」A bは、元のA bに類似する抗原特異性を保持する。

【0084】

「抗抗原」A bは、該抗原に特異的に結合するA bをいう。例えば、抗CD27 A bはCD27に特異的に結合するA bであり、一方、抗PD-1 A bは、PD-1に特異的に結合するA bである。ここで使用する「抗PD-1/抗PD-L1」A bは、抗PD-1 A bまたは抗PD-L1 A bであり得る、PD-1/PD-L1シグナル伝達経路の妨害に使用するA bをいう。

【0085】

A bの「抗原結合部分」(「抗原結合フラグメント」とも称する)は、A b全体により結合される抗原に特異的に結合する能力を保持する、A bの1以上のフラグメントをいう。

【0086】

「癌」は、体内での異常細胞の制御されない増殖を特徴とする、種々の疾患の広い一群をいう。制御されない細胞分裂および増殖は、近隣組織に侵襲し、リンパ系または血流を介して体内の遠隔部位に転移もし得る悪性腫瘍の形成をもたらす。

【0087】

「CD27」は、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーのメンバーである受容体をいう。CD27はT細胞免疫の産生および長期維持に必要であり、CD70に結合する。CD27は、大部分の成熟T細胞、記憶B細胞およびナチュラルキラー細胞の一部で構成的に発現される。CD27とそのリガンドCD70の相互作用は、次の過程で重要な役割を有する：1) T細胞のCD27を介する共刺激は、エフェクター能および記憶の活性化、増殖、生存および成熟をもたらす；2) ヒトB細胞のCD27を介する共刺激は、形質細胞の産生、増殖および免疫グロブリン産生を活性化および促進するおよび3) ナチュラルキラー細胞のCD27を介する共刺激は細胞溶解活性を誘導する。ここで使用する用語「CD27」は、hCD27、バリエーション、アイソフォームおよびhCD27の種ホモログおよびhCD27と少なくとも一つの共通エピトープを有するアナログを含む。完全hCD27配列は、GenBank Accession No. AAH12160下に見ることができる。慢性リンパ球性白血病、マントル細胞リンパ腫、原発中枢神経系リンパ腫、バーキットリンパ腫および辺

10

20

30

40

50

縁帯B細胞リンパ腫などの種々のタイプのリンパ腫および白血病におけるCD27発現は、十分に文書で証明されている。

【0088】

「細胞毒性Tリンパ球抗原-4」(CTLA-4)は、CD28ファミリーに属する免疫阻害性受容体をいう。CTLA-4はインビボでT細胞に排他的に発現され、2つのリガンド、CD80およびCD86(それぞれB7-1およびB7-2とも称される)に結合する。ここで使用する用語「CTLA-4」は、ヒトCTLA-4(hCTLA-4)、バリエーション、アイソフォームおよびhCTLA-4の種ホモログおよびhCTLA-4と少なくとも一つの共通エピトープを有するアナログを含む。完全hCTLA-4配列は、GenBank Accession No. AAB59385下に見ることができる。

10

【0089】

用語「免疫療法」は、免疫応答の誘導、増強、抑制または他の修飾を含む方法により、疾患を有するまたはそれを有するもしくは再発するリスクのある対象を処置することをいう。

【0090】

対象の「処置」または「治療」は、疾患に関連する症状、合併症、状態または生化学的徴候の発症、進行、進展、重症度または再発の反転、軽減、改善、阻止、減速または予防を目的として、対象に行う活性剤の投与を含むあらゆるタイプの介入または過程をいう。

【0091】

「計画死-1」(PD-1)は、インビボで予め活性化されたT細胞に優勢に発現し、2つのリガンド、PD-L1およびPD-L2に結合する、CD28ファミリーに属する免疫阻害性受容体をいう。ここで使用する用語「PD-1」は、ヒトPD-1(hPD-1)、バリエーション、アイソフォームおよびhPD-1の種ホモログおよびhPD-1と少なくとも一つの共通エピトープを有するアナログを含む。完全hPD-1アミノ酸配列は、GENBANK(登録商標)Accession No. U64863下に見ることができる。

20

【0092】

「計画死リガンド-1」(PD-L1)は、PD-1の二つの細胞表面糖タンパク質リガンドの一方(他方はPD-L2)であり、それはPD-1への結合により、T細胞活性化およびサイトカイン分泌を下方制御する。ここで使用する用語「PD-L1」は、ヒトPD-L1(hPD-L1)、バリエーション、アイソフォームおよびhPD-L1の種ホモログおよびhPD-L1と少なくとも一つの共通エピトープを有するアナログを含む。完全hPD-L1配列は、GENBANK(登録商標)Accession No. Q9NZQ7に見ることができる。

30

【0093】

「対象」は、あらゆるヒトまたは非ヒト動物を含む。用語「非ヒト動物」は、脊椎動物、例えば非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌおよびマウス、ラットおよびモルモットなどの齧歯類を含むが、これらに限定されない。好ましい実施態様において、対象はヒトである。用語「対象」および「患者」は、ここでは相互交換可能に使用される。

【0094】

薬物または治療剤の「治療有効量」または「治療有効投与量」は、単独でまたは他の治療剤と組み合わせて使用したとき、疾患症状の重症度低減、無疾患症状期間の頻度および期間の増大または疾患罹患による機能障害または能力障害予防またはの低減により証明される、対象を疾患発症から保護するまたは疾患退縮を促進する薬物または薬剤のあらゆる量である。さらに、処置に関連する用語「有効な」および「有効性」は、薬理学的有効性および生理学的安全性両者を含む。薬理学的有効性は、薬物が患者で疾患退縮、例えば、癌退縮を促進する能力をいう。生理学的安全性は、薬物投与に起因する、細胞、臓器および/または生物レベルでの許容されるレベルの毒性または他の有害生理作用(有害作用)をいう。治療剤の有効性を、臨床試験中のヒトにおいて、ヒトでの有効性を予測する動物モデルでまたはインビトロアッセイで薬剤の活性のアッセイによるなど、通常の技術の実施者に知られる多様な方法を使用して、評価し得る。

40

【0095】

50

腫瘍処置の例として、治療有効量の抗癌剤は、好ましくは細胞増殖または腫瘍増殖を、未処置対象に対して少なくとも約20%、好ましくは少なくとも約40%、より好ましくは少なくとも約60%、さらにより好ましくは少なくとも約80%およびなおより好ましくは約100%阻害する。本発明の好ましい実施態様において、腫瘍退縮は、少なくとも約30日、より好ましくは少なくとも約60日またはさらにより好ましくは少なくとも約6か月の期間観察され、継続され得る。治療有効性のこれらの最終的測定にかかわらず、免疫治療薬物の評価は、「免疫関連」応答パターンを差し引かなければならない。

【0096】

「免疫関連」応答パターンは、癌特異的免疫応答誘発または自然免疫過程修飾により抗腫瘍効果を生じる免疫治療剤で処置された癌患者でしばしば観察される臨床的応答パターンをいう。この応答パターンは、伝統的化学療法剤では疾患進行と分類され、薬物失敗と同義である、腫瘍負荷の最初の増加または新規病変出現後の有利な治療効果により特徴づけられる。従って、免疫治療剤の適切な評価は、標的疾患に対するこれら薬剤の効果の長期モニタリングを必要とし得る。

【0097】

薬物の治療有効量は、疾患を発症する(例えば、癌を発症するリスクのある前悪性状態を有する対象)または疾患の再発のリスクのある対象に単独でまたは他の治療剤と組み合わせて投与したとき、疾患(例えば、癌)発症または再発を阻止する、薬物のあらゆる量である「予防有効量」を含む。好ましい実施態様において、予防有効量は、疾患発症または再発を完全に阻止する。疾患発症または再発「阻止」は、疾患発症または再発の可能性の低減または疾患発症または再発の完全な阻止を意味する。

【0098】

選択肢(例えば、「または」)の使用は、選択肢の一方、両方またはこれらの何れかの組み合わせを意味すると理解されるべきである。ここで使用する単数表現は、あらゆる記載されたまたは列記された要素の「1以上」をいうと理解される。

【0099】

用語「「および／または」」は、ここで使用されているとき、2つの特定した特性または要素の各々の、他方を伴うまたは伴わない具体的開示と解釈される。故に、ここで「Aおよび／またはB」などの言い回しで使用される用語「および／または」は、「AおよびB」、「AまたはB」、「A」(単独)および「B」(単独)を含むことを意図する。同様に、「A、Bおよび／またはC」などの言い回しで使用される用語「および／または」は、次の態様の各々を含むことを意図する：A、BおよびC；A、BまたはC；AまたはC；AまたはB；BまたはC；AおよびC；AおよびB；BおよびC；A(単独)；B(単独)；およびC(単独)。

【0100】

用語「約」は、当業者により決定される、特定の値、組成または特徴の許容される誤差範囲内の数値、組成または特徴であり、これは、一部、どのように値、組成または特徴が測定または決定されたか、すなわち、測定系の限界に依存する。例えば、「約」は、当分野の慣例に従い、1内または1を超える標準偏差内を意味し得る。あるいは、±20%の範囲、より一般には±10%の範囲を意味し得る。特定の値、組成または特徴が明細書および特許請求の範囲に提供されるとき、特に断らない限り、「約」の意味を、その特定の値、組成または特徴の許容される誤差範囲内であるとして仮定すべきである。薬物投与レジメンの投与頻度について、ここで使用する用語「ほぼ週1回」、「ほぼ2週に1回」、または任意の他の類似投与間隔用語は、おおよその数値を意味する。例えば、「ほぼ週1回」は7日毎±1日、すなわち、6日毎～8日毎を含み得る。「ほぼ2週に1回」は14日毎±3日、すなわち、11日毎～17日毎を含む。類似の近似が、例えば、ほぼ3週に1回、ほぼ4週に1回、ほぼ月1回またはほぼ3～6か月毎に1回またはそれ以上に適用される。

【0101】

用語「実質的に同じ」または「本質的に同じ」は、当業者がこれらの値、組成または特

10

20

30

40

50

徴の間の差異が、測定される性質の状況の範囲内で、生物学および／または統計学的意義がほとんどまたは全くないとする2以上の数値、組成または特徴の間の十分に高い程度の類似性をいう。測定される数値間の差異は、例えば、約30%未満、好ましくは約20%未満およびより好ましくは約10%未満であり得る。

【0102】

ここに記載する、あらゆる濃度範囲、パーセンテージ範囲、比範囲または整数範囲は、特に断らない限り、記載する範囲内のあらゆる整数値および、適切なとき、その分数(例えば整数の1/10および1/100)を含むと理解されるべきである。

【0103】

本発明の種々の態様を、次のサブセクションでさらに詳述する。

【0104】

抗CD27 mAb

ある態様において、本発明は、hCD27に特異的に結合する単離Ab、特にmAbまたはその抗原結合部分に関する。ある実施態様において、hCD27の配列は、配列番号1に示す。

【0105】

抗CD27 AbのCD27への特異的結合

本発明のmAbまたはその抗原結合部分を含む抗CD27 AbはCD27に特異的に結合する。Abは、一般に1 μ M～10pM以下の解離定数(K_D)により反映される高親和性で、同族抗原に特異的に結合する。約100 μ Mより大きいあらゆる K_D は、非特異的結合と一般に考えられる。ここで使用する、抗原に「特異的に結合する」IgG Abは、約100nM以下の K_D を有することを意味する、高親和性である抗原および実質的に同一抗原に結合するが、無関係抗原に高親和性で結合しないAbをいう。抗原は、ある抗原と高度の配列同一性を示すならば、例えば、ある抗原の配列と少なくとも80%、少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも97%またはさらにより好ましくは少なくとも99%配列同一性を示すならば、該ある抗原と「実質的に同一」である。ある実施態様において、hCD27と特異的に結合するAbは、ある霊長類種、例えば、カニクイザルからのCD27抗原と交差反応性も有する。ある実施態様において、hCD27に特異的に結合するAbは、齧歯類種、例えばマウスおよび／またはラットからのCD27抗原またはCD27以外の抗原、例えば、Ax1またはPD-1抗原と交差反応しない。

【0106】

ここで使用する用語「 K_D 」は、 k_{off} 対 k_{on} 比(すなわち、 k_{off}/k_{on})から導かれ、モル濃度(例えば、nM)で表される、特定のAb-抗原相互作用の解離定数をいう。用語「 k_{on} 」は、Abとその抗原相互作用の結合の結合速度または「オン速度」をいい、一方、用語「 k_{off} 」は、Ab-抗原複合体の解離速度をいう。Abの K_D 値は、表面プラズモン共鳴(SPR)またはバイオレイヤー干渉法(BLI; ForteBio, Fremont, CA)などの、当分野で十分に確立されている方法を使用して決定され得る。一つのAbについて異なる方法で決定した K_D 値は、相当、例えば、1,000倍まで変わり得る。それ故に、異なるAbで K_D 値を比較するために、これらの K_D 値を同じ方法を使用して決定することが重要である。明示されず、文脈から他の解釈が示されない限り、ここに開示するAb結合の K_D 値は、BIACORE(登録商標)バイオセンサー系(GE Healthcare, Chicago, IL)を使用するSPRにより決定した。

【0107】

ここに開示する発明のある実施態様において、抗CD27 mAbまたはその抗原結合部分は、hCD27と、約100nM以下、約95nM以下、約90nM以下、約85nM以下、約80nM以下、約75nM以下、約70nM以下、約65nM以下、約60nM以下、約55nM以下、約50nM以下、約45nM以下、約40nM以下、約1nM～約100nM、約1nM～約70nM、約1nM～約50nM、約1nM～約45nM、約5nM～約100nM、約5nM～約70nM、約5nM～約50nM、約5nM～約45nM、約10nM～約1

10

20

30

40

50

0 0 nM、約 1 0 nM～約 7 0 nM、約 1 0 nM～約 5 0 nM、約 1 0 nM～約 4 5 nMまたは約 4 0 nM～約 4 5 nMの K_D で結合する。ある実施態様において、抗CD27 mAbまたはその抗原結合部分は、hCD27と、約100 nM以下、約90 nM以下、約80 nM以下、約70 nM以下、約60 nM以下、約50 nM以下、約40 nM以下、約1 nM～約100 nM、約10 nM～約70 nM、約10 nM～約50 nMまたは約40 nM～約45 nMの K_D で結合する。ある実施態様において、 K_D は約37℃および／または約25℃である。ある実施態様において、抗CD27 mAbまたはその抗原結合部分は、hCD27と、約37℃および約25℃で約10 nM～約100 nM、約10 nM～約75 nM、約10 nM～約50 nMまたは約10 nM～約45 nMの K_D で結合する。ある実施態様において、抗CD27 mAbまたはその抗原結合部分は、hCD27と、約37℃で約15 nM～約100 nM、約15 nM～約75 nM、約15 nM～約50 nM、約15 nM～約45 nM、約20 nM～約100 nM、約20 nM～約75 nM、約20 nM～約50 nM、約20 nM～約45 nM、約30 nM～約100 nM、約30 nM～約75 nM、約30 nM～約50 nM、約30 nM～約45 nMまたは約40 nM～約45 nMの K_D で結合する。ある実施態様において、抗CD27 mAbまたはその抗原結合部分は、hCD27と、約25℃で約45 nM以下、約40 nM以下、約35 nM以下、約30 nM以下、約25 nM以下、約20 nM以下、約1 nM～約45 nM、約1 nM～約40 nM、約1 nM～約30 nM、約1 nM～約20 nM、約5 nM～約45 nM、約5 nM～約40 nM、約5 nM～約30 nM、約5 nM～約20 nM、約10 nM～約45 nM、約10 nM～約40 nM、約10 nM～約30 nMまたは約10 nM～約20 nMの K_D で結合する。ある実施態様において、抗CD27 mAbまたはその抗原結合部分は、hCD27と、約37℃で約41 nM～約44 nMおよび／または約25℃で約13 nM～約16 nMの K_D で結合する。

【0108】

抗CD27 Abの特異的エピトープへの結合

水素／重水素交換マスペクトロメトリー(HDX-MS)およびタンパク質の高速光化学酸化(FPOP)を含む種々の方法を利用して、Abの結合エピトープを精査できる。

【0109】

HDX-MSは、溶液のタンパク質三次元構造および三次元動力学を、主鎖アミド水素原子の重水素交換の速度および程度をモニタリングすることにより精査する(Huang and Chen, 2015; Wei et al., 2014)。HDXのレベルは、主鎖アミド水素原子およびタンパク質水素結合への溶媒親和性による。HDXによるタンパク質量増加は、MSにより厳密に測定され得る。この技術を酵素消化と合わせたとき、ペプチドレベルでの構造特性が解析でき、折り畳まれた内側から表面露出ペプチドの差別化を可能とする。一般に、重水素標識および続く消光実験、続いて酵素消化、ペプチド分離およびMS分析が実施される。

【0110】

FPOPは、一般に、ヒドロキシル(OH)ラジカルにより誘導されるアミノ酸側鎖の酸化レベルの決定によるタンパク質三次元構造の特徴づけのための相補的タンパク質フットプリント技術である(Yan et al., 2014; Jones et al., 2011)。側鎖酸化の程度は、アミノ酸側鎖の溶媒親和性および暴露アミノ酸の化学的性質による。FPOPは、フローシステムでの光化学標識のための H_2O_2 のレーザー照射を使用し、過度の標識を避けるため、ラジカルスカベンジャーの導入によりラジカル寿命を約1 μs に制御する。酸化タンパク質を続いて酵素で消化し、MSで分析する。種々の条件下でのペプチド酸化レベルの変化が、局所三次元構造の変化を取得し、タンパク質インターフェイスの特徴づけをするために使用される。

【0111】

ある実施態様において、mAbまたはその抗原結合部分を含む本発明の単離Abは、HDX-MSおよび／またはFPOPエピトープマッピングにより決定される、hCD27のアミノ酸残基の凡そ21～41および52～57(その配列は配列番号1)に跨る不連続領域内に位置するエピトープに特異的に結合する。

【0112】

構造的に定義された抗CD27 Ab

本発明はまたhCD27に特異的に結合し、配列番号8に示す配列を有する連続的に結合したアミノ酸を含むV_Hおよび配列番号9に示す配列を有する連続的に結合したアミノ酸を含むV_Lの各々にCDR1、CDR2およびCDR3ドメインを含む、単離Ab、好ましくはmAbまたはその抗原結合部分も提供する。

【0113】

Ab内のCDRドメインを線引きするために、種々の方法が開発されている。広く使用されているKabat定義に加えて、Kabat定義の欠点に取り組むことを探索するChothia、AbNum、AbM、接触およびIMGT定義を含むその他が用いられている。

【0114】

Kabatおよび同僚ら(Wu and Kabat, 1970; Kabat et al., 1983)の試みは、CDRがAbで最も可変の位置を含み、よって当時入手可能であったかなり限られた数のAb配列のアラインにより同定できるであろうとの仮定に基づいた。このアラインメントに基づき、Kabatらは、超可変領域の残基のためのナンバリングスキームを導入し、どの位置が各CDRの始まりおよび終わりであるかを決定した(<http://bioinf.org.uk/abs/simkab.html>)。

【0115】

Chothia定義は、Ab配列とそのCDRの構造ループ領域の間の相関を決定するための、少数のAb構造の分析に基づく(Chothia et al., 1987; 1989; Al-Lazikani et al., 1997; <http://bioinf.org.uk/abs/Chothia.html>)。FRとCDRの境界を決定し、後者は、CDRおよびフランキングFRの重要な位置である残基の存在に基づき、制限された三次元構造のセットを採用することが示された。得られたChothiaナンバリングスキームはKabatスキームとほぼ同一であるが、構造考慮により、V_L CDR1およびV_H CDR1における挿入を異なる位置に配置している。利用可能な実験的データが増えたため、CDRの境界の再分析および再定義が行われている。AbhinandanおよびMartin(2008)は、構造の状況でAb配列アラインメントを分析し、手動で割り当てたKabatデータベースの配列の約10%が誤差または矛盾を含むことが判明した。彼らはCDRおよびフレームワークをとおして構造的に補正したChothiaスキームの修正版を提案し、自動かつ確実な方法でKabat、Chothiaおよび修飾Chothiaナンバリングに適用される、ソフトウェアツールを開発した(AbNum; <http://www.bioinf.org.uk/abs/abnum/>で入手可能)。その他の方法であるAbM定義は、KabatとChothia定義の妥協点を表し、Oxford Molecular Group's AbM Abモデリングソフトウェア(<http://www.bioinf.org.uk/abs/>; Martin et al., 1989)により使用される。

【0116】

接触定義は、タンパク質データベース(<http://bioinf.org.uk/abs/>; MacCallum et al., 1996)で入手可能な複合体結晶構造におけるAbと抗原の接触の分析に基づく。

【0117】

CDRを定義する、より最近の試みは、Ig、T細胞受容体(TcR)および主要組織適合遺伝子複合体(MHC)分子のヌクレオチド配列情報を整理するIMGTデータベース(Lefranc et al. (2003; <http://www.imgt.org>)のものである。5000を超えるIgおよびTcR可変領域配列のアラインに基づき、IgおよびTcR配列の均一ナンバリング系を提案する。

【0118】

Kabat定義は、Abの構造情報が入手不可能であった時代に開発されたにも関わらず、CDRドメインの予測に、最も一般に使用される方法である。明示されず、文脈から他の解釈が示されない限り、ここに開示するCDRは、Kabat定義を使用して同定されている(表2参照)。従って、本発明は、6CDRのセットを含み、その少なくとも一つは表2に示すCDR配列に対応する、hCD27に特異的に結合する単離Ab、好ましくはmAbまたはその抗原結合部分を提供する。ある実施態様において、本発明は、表2に示す全3つの重鎖可変領域(V_H)CDR配列を含む、hCD27に特異的に結合する単離Ab、好ま

10

20

30

40

50

しくはmAbまたはその抗原結合部分を提供する。ある実施態様において、本発明は、表2に示す全3つの軽鎖可変領域(V_L)CDR配列を含む、hCD27に特異的に結合する単離Ab、好ましくはmAbまたはその抗原結合部分を提供する。

【0119】

ある実施態様において、本発明は、

(a) 配列番号2に示す配列を有する連続的に結合したアミノ酸を含むCDR1、配列番号3に示す配列を有する連続的に結合したアミノ酸を含むCDR2および配列番号4に示す配列を有する連続的に結合したアミノ酸を含むCDR3を含むV_H；および

(b) 配列番号5に示す配列を有する連続的に結合したアミノ酸を含むCDR1、配列番号6に示す配列を有する連続的に結合したアミノ酸を含むCDR2および配列番号7に示す配列を有する連続的に結合したアミノ酸を含むCDR3を含むV_L

を含む、hCD27に特異的に結合する単離Ab、好ましくはmAbまたはその抗原結合部分を提供する。

【0120】

ある実施態様において、V_Hは、配列番号8に示す配列を有する連続的に結合したアミノ酸を含む。

【0121】

ある実施態様において、V_Lは、配列番号9に示す配列を有する連続的に結合したアミノ酸を含む。

【0122】

ある実施態様において、Ab、好ましくはmAbは、配列番号12に示す配列を有する連続的に結合したアミノ酸を含む重鎖および配列番号13に示す配列を有する連続的に結合したアミノ酸を含む軽鎖を含む。

【0123】

ある実施態様において、Abは、BMS-986215と命名されるmAbである。

【0124】

上記抗CD27 Abの何れかのアミノ酸配列と高度に類似または相同であるアミノ酸配列を有するV_HおよびV_L領域を含み、これらのAbの機能的性質を保持する抗CD27 Abも、本方法での使用に適する。例えば、適当なAbは、各々それぞれ配列番号8および／または9に示すアミノ酸配列と少なくとも80%同一である配列を有する連続的に結合したアミノ酸を含む、V_HおよびV_L領域を含むmAbを含む。さらなる実施態様において、例えば、V_Hおよび／またはV_Lアミノ酸配列は、それぞれ配列番号8および／または9に示す配列と、少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%または99%同一性を示す。ここで使用する、2アミノ酸配列間のパーセント配列同一性は、2配列間の配列同一性の程度を最大化するために導入した何らかのギャップ数およびそのような各ギャップの長さを考慮して、比較した配列長に対するこれら配列により共有される同一位置数の関数である(すなわち、%同一性=同一位置数／比較した位置の総数×100)。配列比較および2配列間のパーセント同一性決定は、当業者に周知の数学的アルゴリズムを使用して達成され得る。

【0125】

ある実施態様において、単離抗CD27 Abまたはその抗原結合部分は、ヒトIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4アイソタイプのものである重鎖定常領域を含む。ある好ましい実施態様において、単離抗CD27 Abまたはその抗原結合部分は、ヒトIgG1アイソタイプのものである。他の実施態様において、単離抗CD27 Abまたはその抗原結合部分は、ヒトIgG4アイソタイプのものである。ある実施態様において、単離抗CD27 Abは、IgG1、IgG2、IgG3またはIgG4アイソタイプの完全長Abである。ある好ましい実施態様において、完全長AbはIgG1アイソタイプのものである。さらなる実施態様において、完全長AbはIgG4アイソタイプのものである。

【0126】

CD27への結合について対照Abと交差競合する抗CD27 mAb

本発明の範囲内にまた包含されるのは、CD27、例えば、hCD27および／またはカニクイザルCD27(cCD27)に特異的に結合し、hCD27への結合について対照Abまたはその対照抗原結合部分と交差競合する、単離Ab、好ましくはmAbまたはその抗原結合部分である。Ab対が、抗原、例えば、CD27への結合について「交差競合する」能力は、第一Abが、第二Abと抗原の実質的に同じエピトープ領域に結合し、その特定のエピトープ領域で第二Abの結合を立体的に妨害し、逆に、第二Abが第一Abと抗原の実質的に同じエピトープ領域に結合し、その特定のエピトープ領域で第一Abの結合を立体的に妨害することを示す。それ故に、試験Abが、例えば、mAb BMS-986215のhCD27への結合を競合的に阻害する能力は、該試験Abが、mAb BMS-986215とhCD27の実質的に同じエピトープ領域に結合することを示す。
【0127】

第一Abは、第一Abが第二Abの抗原への結合を少なくとも約40%減少させたならば、第二Abと「実質的に同じエピトープ」に結合すると考えられる。好ましくは、第一Abは、第二Abの抗原への結合を約50%超(例えば、少なくとも約60%または少なくとも約70%)減少させる。より好ましい実施態様において、第一Abは、第二Abの抗原への結合を、約70%超(例えば、少なくとも約80%、少なくとも約90%または約100%)減少させる。第一Abと第二Abの順番は逆でよく、すなわち「第二」Abを、表面に最初に結合させ、「第一」をその後に「第二」Ab存在下で該表面と接触させてよい。これらAbは、抗原への結合の競合的減少が、Abを固定化抗原に加える順番と無関係に観察されるならば、「交差競合する」と考えられる。

【0128】

交差競合Abは、CD27受容体などの抗原の実質的に同じエピトープ領域に結合するため、対照Abの性質に極めて類似する機能的性質を有することが予測される。交差競合の程度が高いほど、機能的性質はより類似する。例えば、2つの交差競合Abは、各々が他方のエピトープへの結合を少なくとも約80%阻害するならば、本質的に同じ機能的性質を有すると予測される。この機能の類似性は、交差競合Abが解離定数(K_D)により測定して、エピトープへの結合の親和性が類似するならば、より近いと予測される。

【0129】

交差競合抗抗原Abは、組み換え抗原分子または細胞表面発現抗原分子を使用する、BIACORE(登録商標)分析、ELISAアッセイまたはフローサイトメトリーを含む、標準抗原結合アッセイで検出可能に競合する能力に基づき、容易に同定され得る。例として、hCD27への結合について試験AbがBMS-986215と競合するか否かを同定する単純競合アッセイは、(1)hCD27が固定化されたBIACORE(登録商標)チップ(または他の適当なSPR分析用媒体)に飽和濃度で適用されたBMS-986215の結合の測定および(2)試験Abが予め結合されたhCD27被覆BIACORE(登録商標)チップ(または他の適当な媒体)へのBMS-986215の結合の測定を含み得る。試験Ab存在下および非存在下のCD27被覆表面へのBMS-986215の結合を比較する。試験Ab存在下でのBMS-986215の結合の顕著な(例えば、約40%を超える)減少は、両Abが、CD27標的への結合を競合するように、実質的に同じエピトープを認識することを示す。第二Abにより阻害された第一Abの抗原への結合のパーセンテージを、 $[1 - (\text{第二Ab存在下の第一Abの結合検出値}) / (\text{第二Ab非存在下の第一Abの結合検出値})] \times 100$ 。複数Abが交差競合をするか否かを決定するために、競合的結合アッセイを、BMS-986215存在下の試験AbのCD27被覆チップへの結合以外、繰り返す。

【0130】

ある態様において、本発明は、ここに開示する抗CD27 Abの何れかと同じhCD27のエピトープに特異的に結合する単離Ab、特にmAbまたはその抗原結合部分に関する。

【0131】

抗CD27 mAbの特徴

ある実施態様において、mAbまたはその抗原結合部分を含む本発明の単離Abは、ここに記載する1以上の特徴を有する。

【0132】

ある実施態様において、mAbまたはその抗原結合部分を含む本発明の単離AbはhCD27アゴニストである。

【0133】

ある実施態様において、mAbまたはその抗原結合部分を含む本発明の単離Abは、表面プラズモン共鳴(SPR)またはフローサイトメトリーにより測定して、CD27、例えば、hCD27に特異的に結合し、そのCD70リガンドへの結合を遮断しない(すなわち、SPRまたはフローサイトメトリーにより測定してCD27へのCD70結合を阻害しない)。このようなmAbまたはその抗原結合部分は、ここでは相互交換可能に非リガンド遮断mAbまたはその抗原結合部分、リガンド非遮断mAbまたはその抗原結合部分またはリガンド非ブロッカーと称し得る。

10

【0134】

ある実施態様において、mAbまたはその抗原結合部分を含む本発明の単離Abは、SPRまたはフローサイトメトリーにより測定して、ラットCD27および／またはマウスCD27に特異的に結合しない。

【0135】

ある実施態様において、mAbまたはその抗原結合部分を含む本発明の単離Abは、CD30、HVEM、DR5、4-1BB、CD40、OX40、GITRおよびこれらの何れかの組み合わせからなる群から選択されるTNF受容体スーパーファミリーメンバーの1以上に特異的に結合しない。

20

【0136】

ある実施態様において、mAbまたはその抗原結合部分を含む本発明の単離Abは、10μg/mLまでの濃度でヒト組織の1以上に特異的に結合せず、ここで、ヒト組織は甲状腺、肺、皮膚、子宮、前立腺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、下垂体、胎盤、精巣、大脳、小脳、心臓、末梢神経およびこれらの何れかの組み合わせからなる群から選択される。

【0137】

ある実施態様において、mAbまたはその抗原結合部分を含む本発明の単離Abは、抗CD3 Abおよび抗CD28 Abで刺激したナイーブで活性化前ヒトT細胞においてNF-κBおよびMAPKシグナル伝達を誘導する。ある実施態様において、mAbまたはその抗原結合部分を含む本発明の単離Abは、抗CD3 Abおよび抗CD28 Abで刺激したナイーブで活性化前ヒトT細胞においてNF-κBおよび／またはMAPKシグナル伝達を約0.5nM以下、約0.45nM以下、約0.4nM以下、約0.35nM以下、約0.3nM以下、約0.25nM以下、約0.2nM以下、約0.005nM～約0.5nM、約0.005nM～約0.4nM、約0.005nM～約0.3nM、約0.005nM～約0.25nM、約0.005nM～約0.2nM、約0.01nM～約0.5nM、約0.01nM～約0.4nM、約0.01nM～約0.3nM、約0.01nM～約0.25nM、約0.01nM～約0.2nM、約0.015nM～約0.5nM、約0.015nM～約0.4nM、約0.015nM～約0.3nM、約0.015nM～約0.25nM、約0.015nM～約0.2nM、約0.02nM～約0.5nM、約0.02nM～約0.4nM、約0.02nM～約0.3nM、約0.02nM～約0.25nMまたは約0.02nM～約0.23nMのEC₅₀で誘導する。ある実施態様において、mAbまたはその抗原結合部分を含む本発明の単離Abは、NF-κBおよびMAPKシグナル伝達を約0.5nM以下、約0.4nM以下、約0.3nM以下、約0.005nM～約0.5nM、約0.01nM～約0.4nMまたは約0.015～約0.3nMのEC₅₀で誘導する。

30

40

【0138】

ある実施態様において、mAbまたはその抗原結合部分を含む本発明の単離Abは、CHO-svCD3-CD32Aアッセイにおいて増殖および／またはIFN-γ分泌を誘導する。ある実施態様において、mAbまたはその抗原結合部分を含む本発明の単離Abは、CHO-svCD3-CD32Aアッセイにおいて増殖および／またはIFN-γ分

50

泌を約0.05 nM以下、約0.045 nM以下、約0.04 nM以下、約0.035 nM以下、約0.03 nM以下、約0.025 nM以下、約0.02 nM以下、約0.015 nM以下、約0.01 nM以下、約0.009 nM以下、約0.008 nM以下、約0.0005 nM～約0.05 nM、約0.0005 nM～約0.04 nM、約0.0005 nM～約0.03 nM、約0.0005 nM～約0.02 nM、約0.0005 nM～約0.01 nM、約0.0005 nM～約0.009 nM、約0.0005 nM～約0.008 nM、約0.001 nM～約0.05 nM、約0.001 nM～約0.04 nM、約0.001 nM～約0.03 nM、約0.001 nM～約0.02 nM、約0.001 nM～約0.01 nM、約0.001 nM～約0.009 nMまたは約0.001 nM～約0.008 nMのEC₅₀で誘導する。ある実施態様において、mAbまたはその抗原結合部分を含む本発明の単離Abは、CHO-svCD3-CD32Aアッセイにおいて増殖および／またはIFN-γ分泌を約0.05 nM以下、約0.04 nM以下、約0.03 nM以下、約0.025 nM以下、約0.0005 nM～約0.05 nM、約0.0005 nM～約0.04 nM、約0.0005 nM～約0.03 nM、約0.001 nM～約0.05 nM、約0.001 nM～約0.04 nMまたは約0.001 nM～約0.03 nMのEC₅₀で誘導する。ある実施態様において、mAbまたはその抗原結合部分を含む本発明の単離Abは、CHO-svCD3-CD32Aアッセイにおける増殖を、約0.009 nMの平均EC₅₀で誘導する。ある実施態様において、mAbまたはその抗原結合部分を含む本発明の単離Abは、CHO-svCD3-CD32AアッセイにおけるIFN-γ分泌を、約0.008 nMの平均EC₅₀で誘導する。

【0139】

ある実施態様において、mAbまたはその抗原結合部分を含む本発明の単離Abは、CD4⁺CD45RO⁺記憶T細胞の増殖を誘導する。ある実施態様において、mAbまたはその抗原結合部分を含む本発明の単離Abは、CD4⁺CD45RO⁺記憶T細胞の増殖を約0.01 nM以下、約0.009 nM以下、約0.008 nM以下、約0.007 nM以下、約0.006 nM以下、約0.005 nM以下、約0.001 nM～約0.01 nM、約0.002 nM～約0.008 nM、約0.003 nM～約0.007 nMまたは約0.004 nM～約0.006 nMのEC₅₀で誘導する。

【0140】

ある実施態様において、mAbまたはその抗原結合部分を含む本発明の単離Abは、CD4⁺CD45RO⁺記憶T細胞におけるIFN-γ分泌を誘導する。ある実施態様において、mAbまたはその抗原結合部分を含む本発明の単離Abは、CD4⁺CD45RO⁺記憶T細胞におけるIFN-γ分泌を約0.05 nM以下、約0.04 nM以下、約0.03 nM以下、約0.02 nM以下、約0.005 nM～約0.05 nM、約0.005 nM～約0.04 nM、約0.005 nM～約0.03 nM、約0.005 nM～約0.02 nM、約0.01 nM～約0.05 nM、約0.01 nM～約0.04 nM、約0.01 nM～約0.03 nMまたは約0.01 nM～約0.02 nMのEC₅₀で誘導する。

【0141】

ある実施態様において、mAbまたはその抗原結合部分を含む本発明の単離Abは、ブドウ球菌エンテロトキシンB(SEB)刺激ヒトPBMCからのIL-2放出を増加させる。ある実施態様において、mAbまたはその抗原結合部分を含む本発明の単離Abは、SEB刺激ヒトPBMCからのIL-2放出をクロスリンカーの存在下で約50%を超えて増加させる。ある実施態様において、IL-2放出が増加するパーセンテージは、陰性対照IgG1 mAb(例えば、陰性対照hIgG1 mAb)との比較である。ある実施態様において、倍数増加は、約1 nM～約10 nMのAb濃度である。

【0142】

ある実施態様において、mAbまたはその抗原結合部分を含む本発明の単離Abは、抗PD-1 Abと組み合わせたときIL-2放出を少なくとも約2倍増加させる。ある実施態様において、増加倍数は、抗PD-1 Ab非存在下の該mAbまたはその抗原結合部分との比較である。

【0143】

ある実施態様において、mAbまたはその抗原結合部分を含む本発明の単離Abは、MDDCおよび可溶性OKT3存在下共培養CD4⁺レスポンドーT細胞のTreg介在抑制を反転させる。ある実施態様において、mAbまたはその抗原結合部分を含む本発明の単離Abは、MDDCおよび可溶性OKT3存在下共培養CD4⁺レスポンドーT細胞のTreg介在抑制を少なくとも約70%反転させる。ある実施態様において、Treg介在抑制を反転させるパーセンテージは、陰性対照IgG1 mAb(例えば、陰性対照hIgG1 mAb)との比較である。

【0144】

ある実施態様において、mAbまたはその抗原結合部分を含む本発明の単離Abは、可溶性CD70によるヒトT細胞の増殖およびIFN- γ 分泌の誘導を増強する。ある実施態様において、mAbまたはその抗原結合部分を含む本発明の単離Abは、可溶性CD70によるヒトT細胞の増殖およびIFN- γ 分泌の誘導を、約0.01nM以下、約0.009nM以下、約0.008nM以下、約0.007nM以下、約0.006nM以下、約0.005nM以下、約0.001nM~約0.01nM、約0.002nM~約0.008nMまたは約0.003nM~約0.005nMのEC₅₀で増強するおよび／またはIFN- γ 分泌の誘導を約0.01nM以下、約0.009nM以下、約0.008nM以下、約0.007nM以下、約0.001nM~約0.01nM、約0.002nM~約0.008nMまたは約0.005nM~約0.007nMのEC₅₀で増強する。

【0145】

ある実施態様において、mAbまたはその抗原結合部分を含む本発明の単離Abは、陰性対照Abおよび／または異なる抗CD27 Abと比較して、異なる特徴を有する。ある実施態様において、陰性対照AbはhIgG1 Abである。ある実施態様において、異なる抗CD27 Abは、表5に示すそれぞれ配列番号20および21により示される重鎖および軽鎖配列を有する抗hCD27である1F5である。ある実施態様において、mAbまたはその抗原結合部分を含む本発明の単離Abは、既知抗CD27 Abと比較して、著しくすぐれたおよび／または治療上有利な1以上の特徴を示す。例えば、ある実施態様において、mAbまたはその抗原結合部分を含む本発明の単離Abは、陰性対照Abおよび／または異なる抗CD27 Abと比較して：例えば、K_DまたはEC₅₀値により示して、hCD27および／またはcCD27に高い親和性を有する；hCD27および／またはcCD27アゴニストである；リガンド非ブロッカーである；SPRまたはフローサイトメトリーにより測定してラットCD27および／またはマウスCD27に特異的に結合しない；CD30、HVEM、DR5、4-1BB、CD40、OX40、GITRおよびこれらの何れかの組み合わせからなる群から選択される1以上のTNF受容体スーパーファミリーメンバーに特異的に結合しない；10 μ g/mLまでの濃度でヒト組織の1以上と特異的に結合せず、ここで、ヒト組織は甲状腺、肺、皮膚、子宮、前立腺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、下垂体、胎盤、精巣、大脳、小脳、心臓、末梢神経およびこれらの何れかの組み合わせからなる群から選択される；抗CD3 Abおよび抗CD28 Abで刺激したナイーブで活性化前ヒトT細胞においてNF- κ BおよびMAPKシグナル伝達の高い誘導をもたらす；CHO-svCD3-CD32Aアッセイにおいて増殖および／またはIFN- γ 分泌の高い誘導をもたらす；CD4⁺CD45RO⁺記憶T細胞の増殖の高い誘導をもたらす；CD4⁺CD45RO⁺記憶T細胞におけるIFN- γ 分泌の高い誘導をもたらす；ブドウ球菌エンテロトキシンB(SEB)刺激ヒトPBMCからのIL-2放出の高い増加をもたらす；MDDCおよび可溶性OKT3存在下で共培養CD4⁺レスポンドーT細胞のTreg介在抑制の高い反転をもたらす；可溶性CD70によるヒトT細胞の増殖およびIFN- γ 分泌の誘導を増強するまたは高レベルで増強する；インビトロおよび／またはインビボで腫瘍細胞および／または腫瘍の増殖阻害の高い有効性を有する；およびこれらの何れかの組み合わせ。

【0146】

T細胞への抗CD27 Abの結合

ある実施態様において、mAbまたはその抗原結合部分を含む本発明の単離Abは、ヒ

10

20

30

40

50

ト T 細胞と約 0.1 nM 以下、約 0.09 nM 以下、約 0.08 nM 以下、約 0.07 nM 以下、約 0.06 nM 以下、約 0.05 nM 以下、約 0.04 nM 以下、約 0.01 nM ~ 約 0.1 nM、約 0.015 nM ~ 約 0.09 nM または約 0.02 nM ~ 約 0.08 nM の EC₅₀ で結合する。

【0147】

ある実施態様において、mAb またはその抗原結合部分を含む本発明の単離 Ab は、カニクイザル T 細胞と約 0.5 nM 以下、約 0.4 nM 以下、約 0.3 nM 以下、約 0.2 nM 以下、約 0.1 nM 以下、約 0.01 nM ~ 約 0.5 nM、約 0.02 nM ~ 約 0.4 nM または約 0.03 ~ 約 0.3 nM の EC₅₀ で結合する。

【0148】

抗 CD27 Ab の機能的抗原結合部分

本発明により提供される抗 CD27 Ab は、完全長 Ab に加えて抗原結合フラグメントも含む。Ab の抗原結合機能が完全長 Ab のフラグメントにより実施され得ることは十分に示されている。Ab の「抗原結合部分」なる用語内に包含される結合フラグメントの例は、(i) V_L、V_H、C_L および C_{H1} ドメインからなる一価フラグメントである Fab フラグメント；(ii) ヒンジ領域でジスルフィド架橋により結合された 2 つの Fab フラグメントからなるビバレントフラグメントである F(ab')₂ フラグメント；(iii) V_H および C_{H1} ドメインからなる Fd フラグメント；(iv) Ab の単一アームの V_L および V_H ドメインからなる Fv フラグメント；および (v) Ab の単一モノマー可変ドメインからなる単ドメイン Ab (sdAb) またはナノボディを含む。慣用の Ab、ラクダ、アルパカおよびラマなどのラクダ類およびサメおよびエイなどの軟骨魚類は、3 つの CDR を含む重鎖ホモ二量体からなる重鎖 Ab (hcAb) のサブセットを含み、軽鎖を欠く。最初の sdAb は、もともとラクダ類 (V_HH フラグメントから称される) または軟骨魚類 (V_{NAR} フラグメント) で見られる hcAb から操作 (engineering) されたが、慣用の Ab からの二量体可変ドメインを分けることによってでも産生され得る。重鎖可変ドメイン由来 sdAb に加えて、軽鎖由来のナノボディも特定抗原に選択的に結合することが示されている。

【0149】

パパインおよびペプシンなどの酵素でのタンパク質分解により最初に得られた Ab フラグメントは、その後一価および多価抗原結合フラグメントにエンジニアリングされている。例えば、Fv フラグメントの 2 つのドメイン、V_L および V_H は別の遺伝子によりコードされてよいが、組み換え方法を使用して合成リンカーペプチドにより合わせてよく、それは、一本鎖可変フラグメント (scFv) として知られる一価分子を形成するために、V_L および V_H 領域が対合する単一タンパク質鎖としてそれらを形成することを可能とする。二価またはビバレント cFv (di-scFv または bi-scFv) を、2 つの V_H 領域および 2 つの V_L 領域を含むタンデム scFv として知られる、単一ペプチド鎖内に 2 つの scFv を結合することにより操作され得る。ScFv 二量体および高次多量体は、2 つの可変領域を一緒に折り畳むには短すぎる 10 未満のアミノ酸のリンカーペプチドを使用して製造でき、これは、scFv を二量体化させ、二重特異性抗体を産生させるかまたは他の多量体を形成させる。二重特異性抗体は、対応する scFv より高い親和性でその同族抗原に結合することが示されており、scFv への K_D 値より最大 40 倍低い解離定数を有する。超短リンカー (≦ 3 アミノ酸) は、二重特異性抗体よりさらに高い抗原への親和性を示す、三価トリアボディまたは四価テトラボディの形成をもたらす。他のバリエーションは、scFv - C_{H3} 二量体であるミニボディおよび大型 scFv - Fc フラグメント (scFv - C_{H2} - C_{H3} 二量体) を含み、単離 CDR は抗原結合機能を示し得る。これらの Ab フラグメントは、当業者に知られる慣用の組み換え技術を使用してエンジニアリングされ、フラグメントは、インタクト Ab と同じ方法で有用性についてスクリーニングされる。Ab の上記タンパク質分解および操作されたフラグメントおよび関連バリエーション (さらなる詳細について Hollinger and Hudson, 2005; Olafsen and Wu, 2010 参照) は、Ab の「抗原結合部分」なる用語の範囲内に含まれることが意図される。

【0150】

本発明のある態様において、単離抗 CD27 Ab の抗原結合部分は、Ab フラグメン

トまたは一本鎖A bである。ある実施態様において、A bフラグメントはF a b、F (a b' ₂)、F dおよびF vフラグメント、s d A b、一本鎖可変フラグメント(s c F v)、二価s c F v(d i - s c F v)およびビバレントc F v(b i - s c F v)、二重特異性抗体、ミニボディおよびC D Rから選択される。ある好ましい実施態様において、A bフラグメントはF a b、F (a b' ₂)、F dおよびF vフラグメントおよび一本鎖可変フラグメント(s c F v)から選択される。

【0151】

ある実施態様において、単離抗C D 2 7 A bまたはその抗原結合部分はヒトA bまたはそのフラグメントである。他の実施態様において、ヒト化A bまたはそのフラグメントである。さらなる実施態様において、キメラA bまたはそのフラグメントである。他の実施態様において、単離抗C D 2 7 A bまたはその抗原結合部分はマウスA bまたはそのフラグメントである。ヒト対象への投与のために、A bは好ましくはキメラA bまたは、より好ましくは、ヒト化またはヒトA bである。このようなキメラ、ヒト化、ヒトまたはマウスm A bは、当分野で周知の方法により製造および単離され得る。

【0152】

抗C D 2 7 イムノコンジュゲート

他の態様において、本発明は、細胞毒素または放射性同位体などの治療剤に連結した、ここに開示する単離抗C D 2 7 A bの何れかまたはその抗原結合部分に関する。このようなコンジュゲートを、ここでは「イムノコンジュゲート」と称する。細胞毒素を、当分野で利用可能なリンカーテクノロジーを使用して、本発明のA bとコンジュゲートさせ得る。放射性イムノコンジュゲートの製造法も当分野で確立されている。

【0153】

二特異的分子

他の態様において、本発明は、抗C D 2 7 m A bまたはその抗原結合部分と異なる結合特異性を有する結合ドメインに結合した、ここに開示する単離抗C D 2 7 A bの何れかまたはその抗原結合部分を含む二特異的分子に関する。結合ドメインは、産生された二特異的分子が少なくとも2つの異なる結合部位または標的分子に結合するように、機能的分子、例えば、他のA b、A bの抗原結合部分または受容体のリガンドであり得る。

【0154】

抗C D 2 7 A bをコードする核酸およびA b発現のための使用

本発明の他の態様は、本発明の単離抗C D 2 7 A bをコードする核酸に関する。本発明は、ここに記載するC D 2 7 A bまたはその抗原結合部分の何れかをコードする単離核酸を提供する。「単離」核酸は、天然に存在する核酸と著しく異なる、すなわち、特有の化学的同一性、性質および有用性を有する、核酸組成物をいう。例えば、単離D N Aは、天然D N Aと異なり、天然D N Aの独立した(free-standing)部分であり、天然にみられる大型の構造複合体、染色体の必須部分ではない。さらに、単離D N Aは、天然D N Aと異なり、とりわけ、遺伝子発現を測定し、疾患診断または治療有効性予測のための、バイオマーカー遺伝子または変異を測定および検出するための、P C Rプライマーまたはハイブリダイゼーションプローブとして使用され得る。単離核酸はまた、当分野で周知の標準技術を使用して他の細胞要素または他の混入物、例えば、他の細胞核酸またはタンパク質を実質的に含まないように精製することもできる。

【0155】

本発明の核酸を、標準分子生物学技術を使用して、得ることができる。ハイブリドーマ(例えば、実施例1に記載のヒトI g 遺伝子を担持するトランスジェニックマウスから調製したハイブリドーマ)によるA b発現のために、ハイブリドーマより製造されたA bの軽鎖および重鎖または可変領域をコードするc D N Aを標準P C R増幅技術により得ることができる。V_HおよびV_LセグメントをコードするD N Aフラグメントが得られたらこれらのD N Aフラグメントを標準組み換えD N A技術を使用してさらに操作して、例えば、可変領域D N Aを完全長A b鎖遺伝子に、F a bフラグメント遺伝子にまたはs c F v遺伝子に変換し得る。I g 遺伝子ライブラリー(例えば、ファージディスプレイ技術を使用)から

10

20

30

40

50

得たA bについて、A bをコードする核酸をライブラリーから回収し得る。

【0156】

本発明の核酸は、例えば、RNAまたはcDNAまたはゲノムDNAなどのDNAであり得る。好ましい実施態様において、核酸はcDNAである。

【0157】

本発明はまた抗CD27 A bまたはその抗原結合部分をコードする単離核酸を含む発現ベクターも提供する。本発明は、さらに該発現ベクターを含む宿主細胞を提供する。真核生物細胞および最も好ましくは哺乳動物宿主細胞が、このような真核生物細胞および特に哺乳動物細胞で発現されたA bが、適切に折り畳まれ、免疫学的に活性なA bを組み立ておよび分泌させる可能性が原核生物細胞より高いため、発現用宿主細胞として好ましい。本発明の組み換えA bの発現のための好ましい哺乳動物宿主細胞は、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞(Kaufman and Sharp, 1982)、NSO骨髓腫細胞、COS細胞およびSP2細胞を含む。

【0158】

宿主細胞を、抗CD27 mAbまたはその抗原結合部分を製造する方法に使用でき、その方法は、mAbまたはその抗原結合部分を宿主細胞で発現させ、該mAbまたはその抗原結合部分を宿主細胞から単離することを含む。宿主細胞をエクスピボまたはインピボで使用し得る。A b重鎖および軽鎖をコードするDNAを別の発現ベクターに導入してもよく、より一般には、両者を同じベクターに導入する。A bのV_HおよびV_Lセグメントを、V_Hセグメントがベクター内のC_Hセグメントと操作可能に結合され、V_Kセグメントがベクター内のC_Lセグメントと操作可能に結合されるように、所望のアイソタイプの重鎖および軽鎖定常領域を既にコードする発現ベクターにこれら可変領域をコードするDNAを挿入することにより、任意のアイソタイプの完全長A bを製造するのに使用できる。

【0159】

本発明の他の態様は、ヒトIg重鎖および軽鎖導入遺伝子を含むトランスジェニックマウスに関し、ここで、マウスは、ここに記載する抗CD27 HuMA bの何れかを発現する。本発明はまた該マウスから調製されたハイブリドーマも包含し、ここで、ハイブリドーマはHuMA bを産生する。

【0160】

本発明治療方法での使用に適する抗PD-1/抗PD-L1 A b

ここに開示する癌処置法、組成物またはキットでの使用に適する抗PD-1 A bは、高特異性および親和性でPD-1に結合し、PD-L1および/またはPD-L2のPD-1への結合を遮断し、PD-1シグナル伝達経路の免疫抑制性効果を阻害する、単離A b、好ましくはmAbまたはその抗原結合部分を含む。同様に、これらの方法での使用に適する抗PD-L1は、高特異性および親和性でPD-L1に結合し、PD-L1のPD-1およびCD80(B7-1)への結合を遮断し、PD-1シグナル伝達経路の免疫抑制性効果を阻害する単離A b、好ましくはmAbまたはその抗原結合部分を含む。ここに開示する治療方法の何れにおいても、抗PD-1または抗PD-L1 A bは、それぞれPD-1受容体またはPD-L1リガンドに結合し、受容体-リガンド結合についてA b全体に類似する機能的性質を示し、T細胞活性阻害を反転させ、それにより免疫応答を上方制御する、抗原結合部分またはフラグメントを含む。

【0161】

抗PD-1 A b

PD-1と高親和性で特異的に結合するmAbは、米国特許8,008,449に開示されている。他の抗PD-1 mAbは、例えば、米国特許7,488,802、8,168,757、8,354,509および9,205,148に開示されている。米国特許8,008,449に開示の抗PD-1 mAbは、次の特徴のいくつかまたは全てを有することが示されている。(a)SPR(BIACORE(登録商標))バイオセンサー系により決定して、約50nM以下のK_DでヒトPD-1に結合する；(b)ヒトCD28、CTLA-4またはICOSに実質的に結合しない；(c)混合リンパ球反応(MLR)アッセイでT細胞増殖、インター

10

20

30

40

50

フェロニン- γ 産生およびIL-2分泌を増加させる；(d)ヒトPD-1およびカニクイザルPD-1に結合する；(e)PD-L1およびPD-L2のPD-1への結合を阻害する；(f)CD4⁺CD25⁻ T細胞の増殖およびインターフェロニン- γ 産生に対するTreg細胞による阻害から解放する；(g)抗原特異的記憶応答を刺激する；(h)Ab応答を刺激する；および(i)インビボで腫瘍細胞増殖を阻害する。本発明の処置方法、組成物またはキットに有用な抗PD-1 Abは、ヒトPD-1と高親和性で特異的に結合し、前記特徴の少なくとも5つ、好ましくは全てを示すmAbを含む。例えば、ここに開示する治療法での使用に適する抗PD-1 Abは、(a)SPR(BIACORE(登録商標))により決定して、約10nM~0.1nMのK_DでヒトPD-1に結合する；(b)MLRアッセイでT細胞増殖、インターフェロニン- γ 産生およびIL-2分泌を増加させる；(c)PD-L1およびPD-L2のPD-1への結合を阻害する；(d)CD4⁺CD25⁻ T細胞の増殖およびインターフェロニン- γ 産生に対するTregによる阻害を反転させる；(e)抗原特異的記憶応答を刺激する；および(f)インビボで腫瘍細胞増殖を阻害する。

【0162】

他の抗PD-1 mAbは、例えば、米国特許6,808,710、7,488,802、8,168,757、8,354,509および9,987,500、米国公開2016/0272708およびPCT公開WO2008/156712、WO2012/145493、WO2014/179664、WO2014/194302、WO2014/206107、WO2015/035606、WO2015/085847、WO2015/112900、WO2016/106159、WO2016/197367、WO2017/020291、WO2017/020858、WO2017/024465、WO2017/024515、WO2017/025016、WO2017/025051、WO2017/040790、WO2017/106061、WO2017/123557、WO2017/132827、WO2017/133540に開示されており、これら各々を引用により全体として本明細書に包含させる。

【0163】

ある実施態様において、抗PD-1 mAbは、ニボルマブ(オプジーボ(登録商標))；以前の名称5C4、BMS-936558、MDX-1106またはONO-4538)、ペンブロリズマブ(キイトルーダ(登録商標))；以前の名称ランブロリズマブおよびMK-3475；WO2008/156712A1参照)、センプリマブ(LIBTAYO(登録商標))；以前はREGN-2810として知られる；WO2015/112800参照)、PDR001(WO2015/112900参照)、MEDI-0680(以前の名称AMP-514；WO2012/145493参照)、JS001(Liu and Wu, 2017参照)、BGB-A317(WO2015/035606およびUS2015/0079109参照)、INCSHR1210(SHR-1210；WO2015/085847；Liu and Wu, 2017参照)、TSR-042(ANB011；WO2014/179664参照)、GLS-010(WBP3055；Liu and Wu, 2017参照)、AM-0001(WO2017/123557参照)、STI-1110(WO2014/194302参照)、AGEN2034(WO2017/040790参照)およびMGD013(WO2017/106061参照)からなる群から選択される。

【0164】

抗PD-1 Abの投与を含むここに記載する治療法の何れかのある好ましい実施態様において、抗PD-1 Abは、複数の種々の癌の処置について、米国食品医薬品局(FDA)により既に承認されているニボルマブ(オプジーボ(登録商標))である。ニボルマブは、PD-1リガンド(PD-L1およびPD-L2)との相互作用を選択的に阻止し、それにより抗腫瘍T細胞機能の下方制御を遮断する、完全ヒトIgG4(S228P)PD-1免疫チェックポイント阻害剤Abである(米国特許8,008,449にmAb C5として記載；Wang et al., 2014)。他の好ましい実施態様において、抗PD-1 Abは、ペンブロリズマブ(キイトルーダ(登録商標))；PD-1に対するヒト化モノクローナルIgG4 Abであり、米国特許8,354,509にh409A11として記載)であり、これもまた

複数の癌適応症に承認されている。

【0165】

本発明方法、組成物またはキットで有用な抗PD-1 Abは、ヒトPD-1(hPD-1)に特異的に結合し、ここに記載する抗PD-1 Abの何れか、例えば：ニボルマブ(5C4；例えば、米国特許8,008,449；WO2013/173223参照)およびペンブロリズマブとヒトPD-1への結合について交差競合する単離Ab、好ましくはmAbも含む。対照Ab、例えば、ニボルマブまたはペンブロリズマブと、抗原、この場合ヒトPD-1への結合について交差競合するAbは、BIAcore(登録商標)分析、ELISAアッセイまたはフローサイトメトリーなどの標準PD-1結合アッセイにより容易に同定され得る(例えば、WO2013/173223参照)。ある実施態様において、抗PD-1 Abは、ここに記載する抗PD-1 Abの何れか、例えば、ニボルマブまたはペンブロリズマブと同じエピトープに結合する。

10

【0166】

本発明方法で有用な抗PD-1 Abは、Fab、Fab'、FdまたはFvフラグメント、sdAb、scFv、di-scFvまたはbi-scFv、二重特異性抗体、ミニボディまたは単離CDRを含む抗原結合部分も含む(さらなる詳細についてHollinger and Hudson, 2005; Olafsen and Wu, 2010参照)。

【0167】

ある実施態様において、単離抗PD-1 Abまたはその抗原結合部分は、ヒトIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4アイソタイプのものである重鎖定常領域を含む。ある好ましい実施態様において、抗PD-1 Abまたはその抗原結合部分は、ヒトIgG4アイソタイプのものである重鎖定常領域を含む。他の実施態様において、抗PD-1 Abまたはその抗原結合部分は、ヒトIgG1アイソタイプのものである。ある他の実施態様において、抗PD-1 Abまたはその抗原結合部分のIgG4重鎖定常領域は、ヒンジ領域におけるセリン残基をIgG1アイソタイプAbの対応する位置で通常みられるプロリン残基に置き換える、S228P変異(EUナンバリング系により番号付け、Kabat et al., 1991；あるいは、S241P、Kabatシステムにより番号付け、Kabat et al., 1987)を含む。ニボルマブに存在するこの変異は、野生型IgG4 Abと関連する活性化Fc受容体への低親和性を維持しながら、内因性IgG4 AbとのFabアーム交換を阻止する(Wang et al., 2014)。さらに他の実施態様において、Abは、ヒトカップまたはラムダ定常領域である軽鎖定常領域を含む。

20

30

【0168】

本方法の他の実施態様において、抗PD-1 Abまたはその抗原結合部分はmAbまたはその抗原結合部分である。ヒト対象への投与のために、抗PD-1 Abは好ましくはキメラAbまたは、より好ましくは、ヒト化またはヒトAbである。このようなキメラ、ヒト化またはヒトmAbは、例えば、米国特許8,008,449に記載の当分野で周知の方法により製造および単離できる。

【0169】

抗PD-L1 Ab

抗PD-1および抗PD-L1が同じシグナル伝達経路を標的とし、臨床試験で種々の癌に同等レベルの有効性を示すことが示されているため(例えば、Brahmer et al., 2012；WO2013/173223参照)、抗PD-L1 Abは、ここに開示する治療方法における組み合わせで、抗PD-1 Abと置き換え得る。

40

【0170】

本発明方法、組成物またはキットでの使用に適する抗PD-L1 Abは、高特異性および親和性でPD-L1に結合し、PD-L1のPD-1およびCD80への結合を遮断し、PD-1シグナル伝達経路の免疫抑制性効果を阻害する単離Abである。PD-L1と高親和性で特異的に結合するmAbは、米国特許7,943,743に開示されている。他の抗PD-L1 mAbは、例えば、米国特許8,217,149、8,779,108、9,175,082、9,624,298および9,938,345およびPCT公開WO2012

50

／145493に開示されている。PD-1 HuMAbに記載の抗PD-1 HuMAbは、次の特徴の1以上を示すことが示されている。(a)SPR(BIACORE(登録商標))により決定して、約50mM以下の K_D でヒトPD-1に結合する；(b)MLRアッセイでT細胞増殖、インターフェロン- γ 産生およびIL-2分泌を増加させる；(c)Ab応答を刺激する；(d)PD-L1のPD-1への結合を阻害する；および(e)T細胞エフェクター細胞および／または樹状細胞に対するTregの抑制効果を反転させる。ここに開示する治療方法に使用する抗PD-L1 Abは、ヒトPD-L1と高親和性で特異的に結合し、前記特徴の少なくとも1つ、ある実施態様において少なくとも3つ、好ましくは全てを示す単離Ab、好ましくはmAbを含む。例えば、これらの方法で使用するのに適する抗PD-L1 Abは、(a)SPR(BIACORE(登録商標))により決定して、約50mM～0.1mMの K_D でヒトPD-1に結合する；(b)MLRアッセイでT細胞増殖、インターフェロン- γ 産生およびIL-2分泌を増加させる；(c)PD-L1のPD-1およびCD80への結合を阻害する；および(d)T細胞エフェクター細胞および／または樹状細胞に対するTregの抑制効果を反転させる。

【0171】

本方法において使用するのに適当な抗PD-L1 Abは、BMS-936559(以前はMDX-1105；米国特許7,943,743で12A4と命名)である。他の適当な抗PD-L1 Abは、アテゾリズマブ(テセントリク(登録商標)；以前はRG7446およびMPDL3280Aとして知られた；米国特許8,217,149でYW243.55S70と命名；Herbst et al., 2014もまた参照)、デュルバルマブ(イミフィンジ(登録商標)；以前はMED1-4736として知られた；米国特許8,779,108で2.14H9OPTと命名)、アベルマブ(バベンシオ(登録商標)；以前はMSB-0010718Cとして知られた；米国特許9,624,298でA09-246-2と命名)、STI-A1014(米国特許9,175,082でH6と命名)、CX-072(WO2016/149201参照)、KN035(Zhang et al., 2017参照)、LY3300054(例えば、WO2017/034916参照)およびCK-301(Gorelik et al., 2017参照)を含む。

【0172】

本発明方法、組成物またはキットでの使用に適する抗PD-L1 Abは、ヒトPD-L1と特異的に結合し、ヒトPD-L1への結合について、ここに開示する抗PD-L1 Abの何れかの何れか、例えば、BMS-936559(12A4；例えば、米国特許7,943,743；WO2013/173223参照)、アテゾリズマブ、デュルバルマブ、アベルマブまたはSTI-A1014であり得る対照Abと交差競合する、単離Abも含む。AbがヒトPD-L1への結合について対照Abと交差競合する能力は、このようなAbが対照AbとPD-L1の同じエピトープ領域に結合し、PD-L1の実質的に同じエピトープ領域へのその結合により、対照Abに極めて類似する機能的性質を有することが予測される。ある実施態様において、抗PD-L1 Abは、ここに記載する抗PD-L1 Abの何れか、例えば、アテゾリズマブ、デュルバルマブ、アベルマブまたはSTI-A1014と同じエピトープに結合する。交差競合Abは、当業者に周知のBIACORE(登録商標)分析、ELISAアッセイまたはフローサイトメトリーなどの標準PD-L1結合アッセイにおいて、アテゾリズマブまたはアベルマブなどの対照Abと交差競合する能力により、容易に同定され得る(例えば、WO2013/173223参照)。

【0173】

ある好ましい実施態様において、本方法で使用する単離抗PD-L1 AbはmAbである。他の実施態様において、特にヒト対象への投与のために、これらのAbは好ましくはキメラAbまたはより好ましくはヒト化またはヒトAbである。キメラ、ヒト化およびヒトAbは、例えば、米国特許7,943,743に記載のとおり、当分野で周知の方法により製造および単離できる。

【0174】

ある実施態様において、抗PD-L1 Abまたはその抗原結合部分は、ヒトIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4アイソタイプのものである重鎖定常領域を含む。あ

10

20

30

40

50

る他の実施態様において、抗PD-L1 Abまたはその抗原結合部分は、ヒトIgG1またはIgG4アイソタイプのものである。さらなる実施態様において、抗PD-L1 Abまたはその抗原結合部分のIgG4重鎖定常領域の配列は、S228P変異を含む。他の実施態様において、Abは、ヒトカッパまたはラムダ定常領域である軽鎖定常領域を含む。

【0175】

本発明の抗PD-L1 AbはまたPD-L1に結合し、受容体結合阻害および免疫系上方制御に、Ab全体と類似する機能的性質を示す、Fab、F(ab')₂、Fd、FvおよびscFv、di-scFvまたはbi-scFvおよびscFv-Fcフラグメント、ナノボディ、二重特異性抗体、トリアボディ、テトラボディおよび単離CDRを含む上記Abの抗原結合部分も含む。

10

【0176】

治療方法

単剤療法としての抗CD27 Abでの癌処置

実施例8に記載のとおり、抗mCD27 mAb、8H5は、CT26 結腸癌および線維肉腫腫瘍モデルで腫瘍増殖を阻害した(図14および表7参照)。従って、本発明は、癌を有する対象を処置する方法であって、対象が処置されるように、対象に治療有効量のここに開示する抗CD27 Ab、イムノコンジュゲートまたは二特異的分子の何れかまたは該抗CD27 Ab、イムノコンジュゲートまたは二特異的分子の何れかを含む医薬組成物を投与することを含む、方法を提供する。

20

【0177】

本発明は、対象における腫瘍細胞増殖を阻害する方法であって、対象における腫瘍細胞増殖が阻害されるように、対象に治療有効量のここに開示する抗CD27 Ab、イムノコンジュゲートまたは二特異的分子の何れかまたは該抗CD27 Ab、イムノコンジュゲートまたは二特異的分子の何れかを含む医薬組成物を投与することを含む、方法も提供する。

【0178】

他の抗癌剤と組み合わせた抗CD27 Abでの癌処置

実施例8に記載のとおり、抗mCD27 mAb、8H5は、CT26 結腸癌、SA1 N線維肉腫およびEG7リンパ腫マウスモデルを含む、種々の癌タイプにおける、抗mPD-1 mAb活性を増強する(図14および表7参照)。それ故に、抗CD27 Abは、抗PD-1 Abなどのチェックポイント阻害剤と合わせたとき、腫瘍増殖阻害にはるかに有効である。従って、本発明は、癌を有する対象を処置する方法であって、対象が処置されるように、対象に治療有効量の：(a)ここに開示する抗CD27 Ab、イムノコンジュゲートまたは二特異的分子の何れかまたは該抗CD27 Ab、イムノコンジュゲートまたは二特異的分子の何れかを含む医薬組成物；および(b)癌処置のためのさらなる治療剤を投与することを含む、方法を提供する。

30

【0179】

本発明は、対象における腫瘍細胞増殖を阻害する方法、対象における腫瘍細胞増殖が阻害されるように、対象に治療有効量の：(a)ここに開示する抗CD27 Ab、イムノコンジュゲートまたは二特異的分子の何れかまたは該抗CD27 Ab、イムノコンジュゲートまたは二特異的分子の何れかを含む医薬組成物；および(b)癌処置のためのさらなる治療剤を投与することを含む、方法も提供する。

40

【0180】

本方法の何れかのある好ましい実施態様において、対象はヒト患者である。

【0181】

ある実施態様において、さらなる治療剤は免疫系の阻害を低減するまたは刺激を増加する化合物である。例えば、さらなる治療剤は、小分子化合物、大環状ペプチド、融合タンパク質またはAbであり得る。さらなる実施態様において、さらなる治療剤は、PD-1、PD-L1、CTLA-4、LAG-3、BTLA、TIM-3、KIR、KLRG-

50

1、A2aR、TIGIT、VISTA受容体、CD244またはCD160に特異的に結合するアンタゴニストAbである。他の実施態様において、さらなる治療剤は、ICOS、CD137、CD134、CD27、GITRまたはHVEMに特異的に結合するアゴニストAbである。ある実施態様において、さらなる治療剤は、PD-1またはPD-L1に特異的に結合し、PD-1とPD-L1の間の相互作用を妨害し、PD-1/PD-L1シグナル伝達を阻害するアンタゴニストAbまたはその抗原結合部分である。ある実施態様において、PD-1またはPD-L1に特異的に結合するAbまたはその抗原結合部分は、キメラ、ヒト化またはヒトmAbまたはその抗原結合部分である。ある実施態様において、さらなる治療剤は、PD-1に特異的に結合し、ヒトPD-1への結合についてニボルマブと交差競合するアンタゴニストAbまたはその抗原結合部分である。ある実施態様において、さらなる治療剤は、PD-1に特異的に結合するアンタゴニストAbまたはその抗原結合部分であり、ニボルマブまたはペンブロリズマブである。ある実施態様において、さらなる治療剤は、PD-L1に特異的に結合し、ヒトPD-L1への結合についてBMS-936559と命名されたAb(WO2013/173223)と交差競合するアンタゴニストAbまたはその抗原結合部分である。ある実施態様において、さらなる治療剤は、PD-L1に特異的に結合するアンタゴニストAbまたはその抗原結合部分であり、アテゾリズマブ、デュルバルマブ、アベルマブまたはBMS-936559と命名されたAb(WO2013/173223)である。

10

【0182】

本発明方法による処置に適する癌

20

癌細胞攻撃および破壊のために事実上無限の柔軟性を有する免疫系の利用に基づく腫瘍免疫療法は、極めて広範な癌の処置に適用可能である(例えば、Yao et al., 2013; Callahan et al., 2016; Pianko et al., 2017; Farkona et al., 2016; Kamta et al., 2017 参照)。

【0183】

ある実施態様において、開示する治療方法を、固形腫瘍である癌の処置に使用し得る。

【0184】

ある実施態様において、固形腫瘍は、結腸癌または線維肉腫である。ある実施態様において、固形腫瘍は、扁平上皮細胞癌、小細胞肺癌(SCLC)、非小細胞肺癌(NSCLC)、扁平上皮NSCLC、非扁平上皮NSCLC、頭頸部癌、乳癌、食道癌、胃癌、消化器癌、小腸癌、肝臓癌、肝細胞癌(HCC)、肝細胞癌、胆嚢および胆管癌、膵臓癌(PAC)、膵管腺癌(PDAC)、腎臓癌、腎細胞癌(RCC)、膀胱癌、尿道癌、輸尿管癌、結腸直腸癌(CRC)、結腸癌、肛門部癌、子宮内膜癌、前立腺癌、神経芽腫、神経膠腫、神経膠芽腫、生殖細胞腫瘍、小児肉腫、副鼻腔ナチュラルキラー、黒色腫、皮膚癌、メルケル細胞癌、基底細胞癌、骨癌、子宮頸癌、子宮癌、子宮内膜癌腫、卵管癌腫、卵巣癌、子宮頸癌腫、膣癌腫、外陰癌腫、精巣癌、内分泌系癌、胸腺腫瘍、胸腺腫、甲状腺癌、口腔癌、口内癌、副甲状腺癌、副腎癌、軟組織肉腫、陰莖癌、腎盂癌腫、中枢神経系(CNS)新生物、原発CNSリンパ腫、腫瘍血管形成、脊髄軸腫瘍、脳癌、脳幹神経膠腫、下垂体腺腫、カポジ肉腫、類表皮癌、扁平上皮細胞癌、神経芽腫、下垂体腺腫、類表皮癌、小児固形腫瘍、小児肉腫、横紋筋肉腫、原発不明癌、環境誘発癌、ウイルス関連癌、AIDS関連癌、ウイルス起源の癌、進行型癌、切除不能癌、転移癌、難治性癌、再発性癌および前記固形腫瘍の何れかの組み合わせからなる群から選択される癌である。

30

40

【0185】

ある実施態様において、固形腫瘍は、小細胞肺癌(SCLC)、扁平上皮非小細胞肺癌(NSCLC)、非扁平上皮NSCLCおよびトリプルネガティブ乳癌(TNBC)から選択される癌である。

【0186】

本発明の抗CD27 Abは、化学療法および／または放射線療法が重要な処置モダリティである疾患の早期相においても有効であり得るが、さらに持続可能な抗腫瘍免疫を助長する必要がある。ある実施態様において、固形腫瘍は、食道癌、胃癌、直腸癌、非小細

50

肺癌(N S C L C)および頭頸部扁平上皮細胞癌(S C C H N)から選択される癌である。

【0187】

ある他の実施態様において、固形腫瘍は、黒色腫、腎臓癌、N S C L C、結腸直腸癌、胃癌、膀胱癌および神経膠芽腫から選択される。

【0188】

ある実施態様において、本発明の治療方法は、血液系悪性腫瘍である癌または腫瘍細胞が血液系悪性腫瘍の細胞である癌の処置に使用し得る。血液系腫瘍は、全てのタイプの白血病、リンパ腫および骨髄腫を含む、2つの主要な血液細胞系譜、すなわち、骨髄細胞株(顆粒球、赤血球、血小板、マクロファージおよび肥満細胞を産生する)またはリンパ系細胞株(B、T、NKおよび形質細胞を産生する)の何れか由来の液性腫瘍を含む。本治療方法を使用して処置し得る血液系腫瘍は、例えば、急性リンパ芽球性白血病(A L L)、急性骨髄性白血病(A M L)、慢性リンパ球性白血病(C L L)、慢性骨髄性白血病(C M L)、ホジキンリンパ腫(H L)、非ホジキンリンパ腫(N H L)、多発性骨髄腫、くすぶり型骨髄腫、意義不明の単クローン性ガンマグロブリン血症(M G U S)、進行性、転移性、難治性および／または再発性血液系腫瘍および該血液系腫瘍の何れかの組み合わせから選択される癌を含む。

【0189】

他の実施態様において、血液系悪性腫瘍は、急性、慢性、リンパ芽球性および／または骨髄性白血病、例えばA L L、A M L、C L LおよびC M L；リンパ腫、例えばH L、汎発性大B細胞リンパ腫(D L B C L)、濾胞性リンパ腫(F L)、慢性リンパ球性白血病(C L L)／小リンパ球性リンパ腫(S L L)、マントル細胞リンパ腫、辺縁帯B細胞リンパ腫(粘膜関連リンパ系組織(M A L T)リンパ腫、結節性辺縁帯B細胞リンパ腫および脾臓辺縁帯B細胞リンパ腫)、バーキットリンパ腫、リンパ形質細胞性リンパ腫(L P L；ワルデンストレーム高ガンマグロブリン血症(W M)としても知られる)、ヘアリー細胞リンパ腫および一次中枢神経系(C N S)リンパ腫を含む約85%がB細胞リンパ腫であるN H L、前駆体Tリンパ芽球性リンパ腫／白血病を含むT細胞リンパ腫であるN H L、Tリンパ芽球性リンパ腫／白血病(T - L b l y／T - A L L)、末梢T細胞リンパ腫、例えば皮膚T細胞リンパ腫(C T L C、すなわち、菌状息肉症、セザリー症候群およびその他)、成人T細胞リンパ腫／白血病、血管免疫芽球性T細胞リンパ腫、節外ナチュラルキラー／T細胞リンパ腫鼻腔タイプ、腸疾患関連腸T細胞リンパ腫(E A T L)、未分化大細胞リンパ腫(A L C L)および不特定末梢T細胞リンパ腫、急性骨髄リンパ腫、リンパ形質細胞性リンパ腫、単球様B細胞リンパ腫、血管中心性リンパ腫、腸T細胞リンパ腫、原発縦隔B細胞リンパ腫、移植後リンパ増殖性障害、真正組織球性リンパ腫、原発浸出リンパ腫、汎発性組織球性リンパ腫(D H L)、免疫芽球性大細胞リンパ腫および前駆体Bリンパ芽球性リンパ腫；骨髄腫、例えば多発性骨髄腫、くすぶり型骨髄腫(低悪性度骨髄腫とも称する)、意義不明の単クローン性ガンマグロブリン血症(M G U S)、孤立性形質細胞腫、I g G骨髄腫、軽鎖骨髄腫、非分泌型骨髄腫およびアミロイド症；および該血液系腫瘍の何れかの組み合わせから選択される癌である。本方法は、進行性、転移性、難治性および／または再発性血液系腫瘍の処置にも適用可能である。

【0190】

組み合わせ治療に関して、抗P D - 1 A b、ニボルマブが多くのタイプの癌の処置に有効であることが示されており(例えば、Brahmer et al., 2015; Guo et al., 2017; Panko et al., 2017; WO 2013 / 173223参照)、現在複数の固形および血液癌で臨床試験が行われている。ニボルマブは、進行型黒色腫、進行型非小細胞肺癌、転移腎細胞癌、古典的ホジキンリンパ腫、頭頸部進行型扁平上皮細胞癌、尿路上皮癌、M S I - Hまたはd M M R転移結腸直腸癌および肝細胞癌および小細胞肺癌(Drugs.com - Opdivo Approval History: <https://www.drugs.com/history/opdivo.html>)の処置に承認されており、多くの他の癌で臨床試験中である。同様に、ペンブロリズマブ(キイトルーダ(登録商標))およびセミプリマブ(LIBTAYO(登録商標))などの他の抗P D - 1薬物ならびにアテゾリズマブ(テセントリク(登録商標))、デュルバルマブ(イミフィンジ(登録商標))およ

10

20

30

40

50

びアベルマブ(バベンシオ(登録商標))などの抗PD-L1薬物は、種々の適応症で承認を獲得している。従って、多種多様な癌が、ここに開示する抗CD27 Abおよび抗PD-1/PD-L1 Abの組み合わせを使用して、処置可能である。この治療剤組み合わせについて示されている高度の有効性は、充足されていない重要な医療ニーズに悩まされている癌に焦点を当てることを可能とする。

【0191】

抗CD27 Abおよび抗PD-1/抗PD-L1 Abの医学的用途

上記のとおり、本発明は、癌を有する対象を処置する方法において使用するための、単離抗CD27 Ab、好ましくはmAbまたはその抗原結合部分を提供する。本発明は、さらに癌を有する対象を処置する方法において組み合わせて使用するための、単離抗CD27 Ab、好ましくはmAbまたはその抗原結合部分および単離抗PD-1/抗PD-L1 Ab、好ましくはmAbまたはその抗原結合部分などのチェックポイント阻害剤を提供する。抗CD27 Abを、単剤療法としてまたは抗PD-1/抗PD-L1 Abなどのチェックポイント阻害剤と組み合わせで、ここに開示する全範囲の癌の処置に使用し得る。

【0192】

本発明のある態様は、癌を有する対象の処置用医薬の製造のための、本発明の単離抗CD27 Abまたはその抗原結合部分を含む。抗CD27 Abは、癌患者の処置用医薬の製造のために、単独でまたは単離抗PD-1/抗PD-L1 Abまたはその抗原結合部分などのチェックポイント阻害剤との組み合わせで使用し得る。医薬の製造のための抗CD27 Abおよび抗PD-1/抗PD-L1 Abのすべての使用は、ここに開示する全範囲の癌に、広く適用可能である。

【0193】

本発明はまた、ここに記載するこの治療剤組み合わせを用いる処置方法の実施態様全てに対応する癌の処置方法に使用するための、単離抗PD-1/抗PD-L1 Abまたはその抗原結合部分などのチェックポイント阻害剤と組み合わせた抗CD27 Abまたはその抗原結合部分も提供する。

【0194】

医薬組成物および投与レジメン

ここに開示する治療方法の何れかに使用するAbは、組成物、例えば、Abおよび薬学的に許容される担体を含む医薬組成物に含まれ得る。ここで使用する「薬学的に許容される担体」は、生理学的に適合性である、全ての溶媒、分散媒体、コーティング、抗細菌および抗真菌剤、等張および吸収遅延剤などを含む。好ましくは、Abを含む組成物の担体は、静脈内(IV)、筋肉内、皮下(SC)、非経腸、脊髄または上皮投与(例えば、注射または点滴による)に適する。

【0195】

SC注射のための選択肢は、皮下送達できる生物学的製剤および薬物の体積に関するこれまでの制約を細胞外マトリクスによって取りを除く、Abと組み換えヒトヒアルロニダーゼ酵素(rHuPH20)の共製剤を含むHalozyne TherapeuticsのENHANZE(登録商標)薬物送達技術を含む(米国特許7,767,429)。組み合わせ治療で使用する2種のAbを、SC投与用の一組成物に共製剤することは可能であり得る。

【0196】

本発明の医薬組成物は、1以上の薬学的に許容される塩、抗酸化剤、水性および非水性担体および/またはアジュバント、例えば防腐剤、湿潤剤、乳化剤および分散剤を含み得る。

【0197】

投与レジメンは、最適な所望の応答、例えば、最大治療応答および/または最小有害作用を提供するように調整される。組み合わせ使用に含まれる抗CD27、抗PD-1または抗PD-L1 Abまたはその抗原結合部分の投与のために、投与量は、約0.01~約20 mg/kg、好ましくは約0.1~約10 mg/kg対象体重の範囲であり得る。例えば、

投与量は、約0.1mg/kg、0.2mg/kg、0.3mg/kg、0.4mg/kg、0.5mg/kg、0.6mg/kg、0.7mg/kg、0.8mg/kg、0.9mg/kg、1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、5mg/kgまたは10mg/kg体重であり得る。あるいは、体重に基づく用量の代わりに、固定または一定用量、例えば、約50～約2000mgのAbまたはその抗原結合部分が投与され得る。例えば、約50mg、100mg、200mg、400mg、500mg、800mg、1000mg、1200mg、1500mg、1600mgまたは2000mgの固定用量の抗体が投与され得る。投与スケジュールは、一般にAbの典型的薬物動態性質に基づき、持続受容体占拠(RO)をもたらす暴露を達成するように設計される。処置レジメの例は、ほぼ週1回、ほぼ2週に1回、ほぼ3週に1回、ほぼ4週に1回、ほぼ月1回、ほぼ3～6か月毎に1回またはそれより長い間隔での投与を含む。ある好ましい実施態様において、抗CD27、抗PD-1または抗PD-L1 Abまたはそれらの抗原結合部分は、対象にほぼ2週に1回投与される。他の好ましい実施態様において、Abまたはその抗原結合部分は、ほぼ3週に1回投与される。他の好ましい実施態様において、Abまたはその抗原結合部分は、ほぼ4週に1回投与される。投与量およびスケジュールリングは、処置経過中に変わり得る。ある好ましい実施態様において、約240mgの固定または一定用量の抗PD-1 Abまたはその抗原結合部分は、対象にほぼ2週に1回投与される。他の好ましい実施態様において、約480mgの固定または一定用量の抗PD-1 Abまたはその抗原結合部分は、対象にほぼ4週に1回投与される。ある実施態様において、抗PD-1 Abはニボルマブである。

【0198】

組み合わせで使用するとき、Abの一方または両方の治療量以下の投与量、例えば、典型的なまたは承認された単剤療法用量より低い抗CD27、抗PD-1および/または抗PD-L1 Abまたはその抗原結合部分の投与量を使用され得る。例えば、承認投与量の一つである2週毎に3mg/kgより低いニボルマブの投与量、例えば、2週、3週または4週毎に1.0mg/kg以下は治療量以下の投与量と見られる。ニボルマブの0.3mg/kg～1.0mg/kg投与を受けた15対象からのROデータは、この用量範囲でPD-1占拠が用量非依存的であると見られることを示す。全用量にわたり、平均占拠率は85%(範囲、70%～97%)であり、平均プラトー占拠は72%(範囲、59%～81%)であった(Brahmer et al., 2010)。それ故に、0.3mg/kg投与は、顕著な生物活性に至るに十分な暴露を可能とし得る。

【0199】

マウス腫瘍モデルで見られる相乗的相互作用(実施例8)は、癌患者に治療量以下の投与量で抗CD27 Abおよび抗PD-1/抗PD-L1 Abまたはその抗原結合部分の何れかを投与することを可能とし得る。本発明組み合わせ治療法のある実施態様において、抗CD27 Abまたはその抗原結合部分は、治療量以下の用量で癌患者に投与される。他の実施態様において、抗PD-1/抗PD-L1 Abまたはその抗原結合部分は、治療量以下の用量で患者に投与される。さらなる実施態様において、抗PD-1/抗PD-L1 Abおよび抗CD27 Abまたはその抗原結合部分は、各々の治療量以下の用量で患者に投与される。

【0200】

Abの一方または両方の治療量以下の用量での投与は、単剤療法における個々のAbの高用量の使用と比較して、有害事象を低減し得る。それ故に、本発明の組み合わせ治療法の成功は、これらAbの単剤療法と比較した、これらAbの組み合わせの有効性改善だけでなく、単剤療法用量に比して組み合わせで低投与量で薬物を使用することによる安全性向上、すなわち、有害事象発生低減によっても示され得る。

【0201】

ここに開示する方法の何れかの実施態様において、抗CD27、抗PD-1および/または抗PD-L1 Abは、静脈内(IV)投与または皮下(SC)注射用に製剤される。ある実施態様において、抗CD27 Abまたはその抗原結合部分および抗PD-1/抗PD-L1 Abまたはその抗原結合部分は対象に逐次的に投与される。「逐次」投与は、抗C

D 2 7 A bおよび抗PD-1/抗PD-L1 A bの一方が他方の前に投与されることを意味する。何れのA bを先に投与してもよい；すなわち、ある実施態様において、抗PD-1/抗PD-L1 A bが抗CD27 A bの前に投与される、一方他の実施態様において、抗CD27 A bが抗PD-1/抗PD-L1 A bの前に投与される。ある実施態様において、各A bはIV点滴、例えば、約30分間または約60分間にわたる点滴で投与される。他の実施態様において、少なくとも一つのA bはSC注射により投与される。

【0202】

逐次的IV投与のある実施態様において、患者に好都合であるように、抗CD27 A bおよび抗PD-1/抗PD-L1 A bまたはその部分を、それぞれ30分以内に投与する。一般に、抗CD27 A bおよび抗PD-1/抗PD-L1 A b両者がIV投与で同日に投与されるとき、各点滴のために別々の点滴バッグおよびフィルターが使用される。最初のA bの点滴の直ぐ後にA bをラインから浄化するために食塩水でフラッシュし、その後二番目のA bの点滴が開始される。他の実施態様において、2種のA bが互いに1時間、2時間、4時間、8時間、24時間または48時間以内に投与される。

10

【0203】

少なくとも一つのA bのSCによる投与は、医療従事者の投与に必要な時間を減らし、薬物投与の時間を短縮する。例えば、SC注射の使用は、一般に約30～60分であるIV投与に必要な時間を、約5分まで短縮する。逐次的SC投与のある実施態様において、抗CD27 A bおよび抗PD-1/抗PD-L1 A bまたはその部分を、互いに10分以内に投与する。

20

【0204】

チェックポイント阻害剤A bが、一部免疫系の記憶要素により極めて持続性の応答を生じることが示されているため(例えば、WO2013/173223; Lipson et al., 2013; Wolchok et al., 2013参照)、投与抗PD-1/抗PD-L1 A bの活性は、数週間、数か月または数年すら継続し得る。ある実施態様において、逐次投与を含む本組み合わせ治療方法は、抗PD-1/抗PD-L1 A bで先に処置されている患者への抗CD27 A b投与を含む。さらなる実施態様において、抗CD27 A bは、抗PD-1/抗PD-L1 A bで先に処置され、進行している患者に投与される。他の実施態様において、逐次投与を含む本組み合わせ治療方法は、抗CD27 A bで先に処置されている患者、所望により抗CD27 A bでの処置後癌が進行している患者への抗PD-1/抗PD-L1 A bの投与を含む。

30

【0205】

ある他の実施態様において、抗PD-1/抗PD-L1 A bおよび抗CD27 A bは、同時投与用の薬学的に許容される製剤における一組成物として混合されてまたは各A bが薬学的に許容される組成物と製剤されている別々の組成物として同時に、同時投与される。

【0206】

キット

また本発明の範囲内にあるのは、治療用途のための抗CD27 A bを含むキットである。キットは、一般にキットの内容物の意図する使用および使用の指示を含むラベルを含む。用語ラベルは、キット上にまたはキットと共に提供されるまたは他の方法でキットに付随する、あらゆる文書または記録媒体を含む。従って、本発明は、癌を有する対象を処置するためのキットであって、(a)約0.1～約20 mg/kg体重の投与量の範囲のここに開示する抗CD27 A bまたはその抗原結合部分、イムノコンジュゲートまたは二特異的分子の何れかまたは該抗CD27 A bまたはその抗原結合部分、イムノコンジュゲートまたは二特異的分子の何れかを含む医薬組成物の1回以上；および(b)ここに開示する治療方法の何れかにおける該mA bの使用指示を含む、キットを提供する。本発明は、さらに癌を有する対象を処置するためのキットであって、(a)約0.1～約20 mg/kg体重の投与量の範囲のここに開示する抗CD27 A bまたはその抗原結合部分、イムノコンジュゲートまたは二特異的分子の何れかまたは該抗CD27 A bまたはその抗原結合部

40

50

分、イムノコンジュゲートまたは二特異的分子の何れかを含む医薬組成物の1以上；(b) 約50～約2000mgの投与量の範囲のPD-1またはPD-L1に特異的に結合するAbまたはその抗原結合部分の何れかの1回以上；および(c)ここに開示する組み合わせ治療方法の何れかにおける抗CD27 mAbおよびチェックポイント阻害剤、例えば、抗PD-1/抗PD-L1 mAbの使用指示を含む、キットを提供する。

【0207】

ある実施態様において、これらAbは、単位投与量形態で共包装される。ヒト患者処置のためのある好ましい実施態様において、キットは、ここに開示する抗ヒトPD-1 Ab、例えば、ニボルマブまたはペンブロリズマブを含む。

【0208】

本発明を、さらなる限定と解釈してはならない次の実施例により、さらに説明する。本明細書をとおりて引用する全ての引用文献の内容を、明示的に引用により本明細書に包含させる。

【実施例】

【0209】

実施例1

CD27に対するmAb産生

ヒト抗CD27 mAbを、ヒトAb遺伝子を発現するトランスジェニックマウスをヒトCD27(hCD27)抗原で免疫化することにより産生し、マウスでCD27に特異的なヒトIgのレパートリーを形成させた。ラット抗マウスCD27 mAbを、ラットをマウスCD27(mCD27)抗原で免疫化して、産生した。

【0210】

ヒト免疫グロブリントランスジェニックマウスの免疫化

hCD27に対するHuMAbを、ヒトIgトランスジェニックマウス(KMマウス、系統番号325432)を、hFcおよびヒスチジンタグタンパク質含有組み換えhCD27(rhCD27-hFc-his)ならびにhCD27で安定的にトランスフェクトしたCHO細胞で交互に免疫化して産生した。

【0211】

CD27に対するmAbを産生するハイブリドーマの産生

マウス脾細胞を、免疫化後陽性抗CD27 IgG力価を示した上記免疫化マウスから単離した。ハイブリドーマを、脾細胞とマウス骨髓腫SP2/0融合パートナーの融合により産生した。

【0212】

ラットの免疫化

mCD27に対するサロゲートmAbを、ラットをFcタグタンパク質を含む組み換えマウスCD27(rmCD27-Fc)で免疫化することにより産生した。

【0213】

実施例2

ヒト抗ヒトCD27 mAbのスクリーニングおよび選択

ヒトCD27に選択的に結合するmAbのスクリーニング

hCD27に結合するHuMAbを産生するために、ヒトIgトランスジェニックマウスを、実施例1に記載のとおりhCD27抗原で免疫化した。

ハイブリドーマ上清を、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)でまずhCD27への結合についてスクリーニングした。次いで、抗原特異性をhCD27⁺ T細胞への結合により確認した。続いて、Abをフローサイトメトリーおよび表面プラズモン共鳴(SPR)でCD27とCD70の相互作用を遮断する能力について試験した。

【0214】

アゴニスト抗CD27 mAbの機能的スクリーニング

抗CD27 Abのアゴニスト活性を、インビトロでCHO-svCD3-CD32aアッセイを使用して決定した。このアッセイにおいて、抗CD27アゴニストAbは、C

10

20

30

40

50

D32aへの結合により架橋し、ヒトCD4⁺ T細胞のs v CD3介在活性化を増強させた。

リードmAb、非リガンドブロッカークローン16D9を、hーおよびc CD27へのその優れた結合親和性および活性化T細胞のその優れたアゴニズムにより選択した。リードmAbは、ヒトCD3⁺ T細胞と共培養したIL-2-活性化ヒトNK細胞を使用して、比較的中程度のレベルのADCC活性を有することが決定された。

【0215】

抗hCD27 HuMAbの最適化

クローン16D9を、その後、軽鎖CDRにおけるVH-A28TおよびVK-I20T-I22T-D43Aフレームワーク復帰とS93N変異に付した。修飾クローンは、ヒトIgG1として操作され、BMS-986215と名付けられた。BMS-986215は、CD27アゴニズムに必要なFc架橋をさせるために、hIgG1として操作された。

【0216】

完全hCD27アミノ酸配列を表1に示し、これはGENBANK(登録商標)Accession No. AAH12160に見られ得る。表1で下線を引いたアミノ酸1~20は予測シグナルペプチドを表す。例えば、CBS Prediction SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk>)参照。

【表1】

表1. ヒトCD27ポリペプチドのアミノ酸配列

アミノ酸配列および配列番号	
1	<u>marphpwwlc vlgtlvgl</u> sa tpapkscper hywaqgklcc qmcepqgtflv kdc dqhrkaa
61	qcdpcipgvs fspdhhttrph ces crhcns g llvrnctita naecacrngw qcrdkectec
121	dplpnpslta rssqalsphp qpthlpyvse mleartaghm qtladfrqlp artlsthwpp
181	qrslcssdfi rilvifsgmf lvftlagalf lhqrrkyrsn kgespvpeae pcryscpree
241	egstipiqed yrkpepacsp (配列番号1)

【0217】

Kabat方法を使用して定義したHuMAb BMS-986215の6つのCDRドメインのアミノ酸配列を表2に示す。

HuMAb BMS-986215のV_H、V_L、C_H、C_L、重鎖および軽鎖のアミノ酸配列を表3に示す。

【表 2】

表 2. Kabat 方法を使用して定義した H u M A b B M S - 9 8 6 2 1 5 における 6 つの C D R ドメインのアミノ酸配列

アミノ酸配列および配列番号					
VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3
TTYAMN (配列番号 2)	WINTNTGNPTYAQGFTG (配列番号 3)	DFGGFDY (配列番号 4)	RASQGISSALA (配列番号 5)	DASSLES (配列番号 6)	QQFNYPRT (配列番号 7)

10

【 0 2 1 8 】

【表 3】

表 3. H u M A b B M S - 9 8 6 2 1 5 における V_H 、 V_L 、 C_H 、 C_L 、重鎖および軽鎖のアミノ酸配列

20

アミノ酸配列および配列番号	
V_H	QVQLVQSGSEVKKPGASVKVSCKASGYFTTTYAMNWVRQAPGQGLEWMGWI NTNTGNPTYAQGFTGRFVFSLDTSVNTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDFFGGFDY WGQGTLVTVSS (配列番号 8)
V_L	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLINDASSLES GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNYPRTFGQGTKVEIK (配列 番号 9)
C_H	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTHTC PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTIPTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEALHNHYTQKSLS LSPG (配列番号 10)
C_L	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番号 11)
重鎖	QVQLVQSGSEVKKPGASVKVSCKASGYFTTTYAMNWVRQAPGQGLEWMGWI NTNTGNPTYAQGFTGRFVFSLDTSVNTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDFFGGFDY WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTIPTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG (配列番号 12)
軽鎖	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLINDASSLES GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNYPRTFGQGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (配列番 号 13)

30

40

50

【0219】

A bをCHO細胞で組み換え方法により産生し、プロテインA親和性クロマトグラフィーで精製した。SDS-PAGE、N末端シーケンシングおよびマスマススペクトロメトリー分析によりA bの特性を確認した。A bの純度は、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)で試験して>98%であった。BMS-986215のCDR領域で実施した特異的凝集傾向(SAP)モデリング試験は、極めて低凝集傾向を示す、低SAPスコアを示した。単一N-グリコシル化部位は重鎖のN297で確認され(表3で下線)、CHO細胞でのヒトIgG1分子発現について予測されるとおり、G0F、G1FおよびG2F構造を含むグリカンプロファイルを示した。BMS-986215は、高い熱および化学安定性を示した。78℃でのこの分子の熱的可逆性は、典型的ヒトIgG1分子で一般にみられるより高い41%である。BMS-986215の生物物理学的特徴は表4に要約される。

10

【0220】

実施例3

BMS-986215の結合動態、結合親和性、交差反応性、組織特異性および安定性による特徴づけ

BMS-986215はヒトおよびカニクイザルCD27に特異的に結合する

表面プラズモン共鳴(SPR)分析は、BMS-986215のhCD27への特異的結合を確認した。BMS-986215のFabフラグメントおよびhCD27-マウスFcまたはhCD27-Hisタグタンパク質を使用して測定した、A bのhCD27への見かけの親和性(K_D)は、SPRで約40nMと決定された。測定値は37℃で41~44nMおよび25℃で13~16nMであった。25℃から37℃での親和性の3倍喪失は、結合速度が不変のままであるのに対し、解離速度増加によるものであった。動態分析は、1:1フィット結合モデルを使用した。 K_D は、スキッチャード分析で0.045nMと決定された。

20

BMS-986215のヒトT細胞への結合の EC_{50} 値は、フローサイトメトリーにより0.044nMと決定された(範囲0.022~0.076nM、 0.044 ± 0.011 nM、 $n=5$)。BMS-986215のカニクイザルT細胞への結合の EC_{50} 値はフローサイトメトリーで0.131nMと決定され(範囲0.03569~0.2657、 0.131 ± 0.069 nM、 $n=3$)、BMS-986215がcCD27と交差反応することが示された。

30

【0221】

40

50

【表 4】

表 4. BMS-986215 の生物物理学的特徴

性質	方法	結果
特徴	N末端配列 LC-MS LC-MS/MSペプチドマップ	LC: ペプチドマッピングにより確認 HC: ペプチドマッピングにより確認 143,653 Da(脱グリコシル化インタクト質量確認) 脱グリコシル化、還元およびアルキル化HC = 49,291 Da アグリコシル化、還元およびアルキル化LC = 23,480 Da マスペクトルでペプチドマップの>99% カバレッジ 重鎖および軽鎖配列確認。重鎖N297でのグリコシル化確認。重鎖N末端グルタミンからピログルタミン酸確認。
純度/均一性	CE-SDS SEC SE-MALS HIC-HPLC CE(グリカン) cIEF	96.4%モノマー、不純物2.2%HHL、0.2%HL、0.2%HH、1.0%LC含有; 非グリコシル化重鎖検出されず 98.6%モノマー、1.4%集合体 98.4%(145.3 kDa)、1.34%(395.8 kDa)、0.22%(56.3 kDa) 7.3%テーリングショルダー GO=0.16%、GOF=72.57%、G1F=21.76%、G2F=1.43%、Man5=4.08%。重鎖N297にグリカン結合。 4アイソフォーム(メジャー8.83; マイナー8.64、8.7、8.92)
化学修飾	LC-MS/MSペプチドマップ	大きな予想外の化学修飾観察されず。
熱的安定性および可逆性 物理的安定性	DSC(貯蔵緩衝液で希釈) 変性Gdn-HCl、内因性蛍光	Tm1=71℃、Tm2=79℃、Tm3=80℃ 78℃で可逆性=41.5% 変性中間点C50=3.24M、

【0222】

フローサイトメトリー分析も、1F5、ヒト抗hCD27対照mAbと比較して、BMS-986215がh-およびcCD27に高い親和性を有することを示した。それぞれ図1Aおよび1B参照。HuMAb 1F5の重鎖および軽鎖アミノ酸配列を表5に示す。図1AにおけるBMS-986215および1F5のヒトT細胞への結合EC50値は、それぞれ0.02210 nMおよび1.088 nMであった。図1BにおけるBMS-986215および1F5のカニクイザルT細胞への結合により決定したEC50値は、それぞれ0.092 nMおよび1.800 nMであった。

【表 5】

表 5. 対照 H u M A b 1 F 5 における重鎖および軽鎖のアミノ酸配列

	アミノ酸配列および配列番号
重鎖	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYDMHWVRQAPGKGLEWVAVIW YDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSGNWG FFDYWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGSS (配列番号 2 0)
軽鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISRWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSL QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNTYPRTFGQGTKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (配列番号 2 1)

10

20

【0 2 2 3】

BMS-986215 は非リガンド遮断 mAb である

BMS-986215 による CD27 への CD70 結合阻害またはその逆は、SPR またはフローサイトメトリーにより検出されず、リガンド非遮断 Ab であるこの mAb と一致した。図 2 B および 2 D 参照。例えば、フローサイトメトリー分析を、10 µg/ml 可溶性ヒト CD70、CD27 のリガンドで前処理し、続いて BMS-986215、1 F5 およびヒト IgG1 (対照) Ab で処理したヒト T 細胞を使用して実施した。Ab の結合の存在または非存在を、標識抗ヒト IgG Ab を使用して検出した。BMS-986215 の結合が検出され、CD27 への CD70 結合が BMS-986215 の結合を遮断しないことが示された。本アッセイを模式的に示す図 2 A および結果のグラフを示す図 2 B 参照。リガンド遮断 1 F5 Ab の結合は検出されなかった。同上。他のフローサイトメトリー分析を実施し、そこで、ヒト T 細胞を 10 µg/ml 可溶性ヒト CD70 存在下 BMS-986215、1 F5 およびヒト IgG1 (対照) Ab に曝した。CD70 を標識抗 CD70 Ab により検出した。CD70 は BMS-986215 の濃度を上げてても検出可能なままであり、CD70 結合が BMS-986215 により遮断されなかったことを示す。本アッセイを模式的に示す図 2 C および結果のグラフを示す図 2 D 参照。CD70 の結合は、リガンド遮断 Ab 1 F5 の濃度が増加するにつれ、減少した。I d。

30

40

【0 2 2 4】

組織特異性

予備的組織交差反応性評価において、フルオレセインイソチオシアネート (FITC) コンジュゲート BMS-986215 (研究グレード) を、22 の正常ヒト組織 (各 1 または 2 ドナー) の凍結切片に適用した。予想通り、特異的染色が胸腺、扁桃および脾臓の単核細胞 (MNC) サブセット、リンパ系富組織 (結腸、小腸および胃) および稀に他の組織 (甲状腺、肺、皮膚、子宮、前立腺、肝臓、腎臓、膵臓、副腎、下垂体、胎盤および精巣) で観察された (データは示していない)。一般に、陽性細胞は背景炎症性病変と相関する。扁桃、胸腺および小腸に最大数の陽性染色細胞があった。陽性染色リンパ球は、胸腺髄質および扁桃

50

におけるT細胞富領域(毛包間領域)および脾臓(毛包周囲様／辺縁帯およびPALS)で高濃度であった。小腸で、陽性細胞は主に基底粘膜固有層および限局性リンパ系集合体／濾胞に分布した。大脳、小脳、心臓および末梢神経は陰性であった。

【0225】

実施例4

BMS-986215エピトープマッピング

水素／重水素交換マスマススペクトロメトリー(HDX-MS)およびタンパク質の高速光化学酸化(FPOP)方法を、BMS-986215が結合するCD27の領域のプロープに利用した。CD27／BMS-986215のHDX-MS実験は62%配列包括度を提供し、CD27のN末端およびC末端領域を含んだ。FPOP測定は、CD27の81%配列包括度をもたらし、CD27の中間領域を含んだ。CD27の総配列包括度は、複合HDX-MSおよびFPOPデータセットで98%であった。図3(A)参照。図3(A)に示す配列は、配列番号1のアミノ酸1～20のシグナルペプチド配列がない成熟CD27タンパク質である。図3(A)のアミノ酸1～172は、配列番号1のアミノ酸21～192に対応する。

【0226】

HDX-MS

エピトープマッピング実験前に、非重水素化実験を実施して、組み換え完全長hCD27-Hisタグ(10μM)およびCD27とBMS-986215のタンパク質複合体(1:1モル比)の共通ペプチドのリストを作成した。HDX-MS実験で、5μLの各サンプル(CD27またはCD27とBMS-986215)を20μLのD₂O緩衝液(10mMリン酸緩衝液、D₂O、pD7.0)で希釈して、標識反応を開始させた。20秒、1分、10分および240分の種々の時間、反応させた。各標識反応時間の最後に、クエンチング緩衝液(100mMリン酸緩衝液と4M GdnClおよび0.4M TCEP、pH2.5、1:1、v/v)を加えて反応停止させた。1μLのペプシン／プロテアーゼXIII(1mg/mLで1:1、v/v)を加え、タンパク質を氷上で3分間消化させた。消化溶液を、分析のためにWaters HDX-MS系(Waters Corporation, Milford, MA)に注入した。共通消化性ペプチドの重水素取り込みレベルを、BMS-986215非存在下または存在下、モニターした。

CD27におけるBMS-986215のHDX-MSデータ分析は、BMS-986215がCD27のN末端のTPAPKSCPERHYWAQGKLCCQ(配列番号15、成熟タンパク質のアミノ酸1～21または配列番号1のアミノ酸21～41に対応する)領域を含むエピトープに結合することを示す。

【0227】

FPOP

FPOP実験を、CD27およびCD27／BMS-986215のFab複合体(1:1モル比、7.5μM最終濃度)で実施した。KrFエキシマレーザーを使用して、H₂O₂光分解によりヒドロキシル基を作製し、励起波長を248nmに設定した。標識直前、各5μLのヒスチジンおよびH₂O₂を一定量のタンパク質に加えた。タンパク質溶液の最終体積は50μLであり、ヒスチジンおよびH₂O₂の最終濃度はそれぞれ500μMおよび15mMであった。レーザーエネルギーを28mJ／パルス(7.4Hz)に調節した。FPOPおよび無レーザー対照実験両者をデュプリケートで実施した。各繰り返しを、11μLのクエンチング溶液(800nMのカタラーゼ四量体および200mMのメチオニン)を含むマイクロ遠心チューブに集めた。サンプルを変性させ、還元し、アルキル化し、トリプシン消化させた。データ取得を、Thermo Q Exactive Plusマスマススペクトロメーター(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)と、Waters Acquity UPLC系(Waters Corporation)で実施した。ByonicTMサーチエンジン(Protein Metrics, San Carlos, CA)を使用して、シーケンシングカバレッジを得て、酸化部位を同定した。トリプシン性ペプチドの相対的酸化レベルを、各繰り返しで手動計算した。遊離および結合状態で相対的酸化に統計的有意差があるペプチドのみ(スチューデントのT検定に基づく、p値<0.05)を、さら

なる分析について考慮した。

FPOP実験において、4つのCD27ペプチドが酸化レベルで有意な差を示した：HYWAQ GK(配列番号16、成熟タンパク質のアミノ酸11～17または配列番号1のアミノ酸31～37に対応する)、LCCQMCEPGTFLVK(配列番号17、成熟タンパク質のアミノ酸18～31または配列番号1のアミノ酸38～51に対応する)、DCDQHR(配列番号18、成熟タンパク質のアミノ酸32～37または配列番号1のアミノ酸52～57に対応する)およびDCDQHR(配列番号19、成熟タンパク質のアミノ酸88～93または配列番号1のアミノ酸108～113に対応する)。Fabへの結合によるFPOP保護パーセンテージを(CD27における相対的%FPOP差-Fabにおける相対的%FPOP差)/(CD27における相対的%FPOP差)×100として計算した。図3(C)は、これら4つのペプチドのFPOP保護パーセンテージを示す。DCDQHRペプチドは最高FPOP保護パーセンテージ(75%)を有することが示され、BMS-986215 Fabとの相互作用でCD27の結合エピトープを示す。

10

上記HDX-MSおよびFPOP実験に基づき、BMS-986215が結合するCD27エピトープは、配列番号1のアミノ酸21～41および52～57に対応する、2つの不連続結合領域、TPAPKSCPERHYWAQGKLCCQ(配列番号15)およびDCDQHR(配列番号18)を含むと考えられる。

【0228】

実施例5

BMS-986215によるCD27アゴニズムは、T細胞活性化を増加させる

20

抗CD27 mAbアゴニストは、活性のためにFcγR相互作用(すなわち、架橋)を必要とする。リガンド遮断mAb(例えば1F5)存在下、FcγR⁺細胞なしでは、T細胞のCD27共刺激はない。図4(A)参照。しかしながら、BMS-986215 mAbは非リガンド遮断mAbであり、生物学的アッセイを、その活性決定のために実施した。1F5などのリガンド遮断mAbと異なり、データは、BMS-986215は、CD70存在下、FcγR結合なしでT細胞を共刺激可能であったことを示す。図4(B)参照。

【0229】

BMS-986215はNF-κBおよびMAPKシグナル伝達を増強する

初代T細胞シグナル伝達アッセイを、抗CD3 Abおよび抗CD28 Abで刺激したナイーブで活性化前ヒトT細胞におけるNF-κBおよびMAPKシグナル伝達誘導に対するBMS-986215の効果を観察するために実施した。簡潔には、ヒトCD4⁺T細胞を抗CD3および抗CD28 Abで24時間刺激した。細胞を、10,000細胞/ウェルで384ウェルプレートに播種し、Ab添加前2時間飢餓状態とした。次いで、細胞を、用量/タイムコースでクロスリンカーと組み合わせたBMS-986215、1F5またはhIgG1(対照)Abで処理し、NF-κBおよびMAPKシグナル伝達を分析した。

30

BMS-986215は、0.02 nM～0.23 nMのEC₅₀でNF-κBおよびMAPKシグナル伝達を誘導することが観察された。例えば、図5(A)～(C)は、Ab処理に由来するNF-κBシグナル強度を示し、1F5と比較して、BMS-986215によりNF-κBが多く誘導された。

40

【0230】

BMS-986215はT細胞増殖およびIFN-γ分泌を増強する

CD4⁺T細胞およびCHO-svCD3-CD32a細胞の共培養物を使用して、T細胞増殖およびIFN-γ分泌に対するBMS-986215の効果をアッセイした。簡潔には、健康ドナー血液サンプルからのヒトCD4⁺T細胞を、CHO-svCD3-CD32a細胞(抗CD3 OKT3 mAbおよびhCD32a-131His(FcγRIIa)由来の一本鎖抗CD3 scFvAbを発現するCHO細胞)と共培養した。共培養物をBMS-986215、1F5またはhIgG1(対照)Abで処理し、T細胞増殖およびIFN-γ分泌を分析した。

BMS-986215はT細胞を共刺激することが観察され、0.001 nM～0.028

50

nMのEC₅₀で増殖およびIFN- γ 分泌増強をもたらした。BMS-986215の平均EC₅₀値は、増殖およびIFN- γ 分泌それぞれ0.009nMおよび0.0078nMであった。例えば、図6(A)~(B)は、一般に1F5と比較して、BMS-986215による増殖およびIFN- γ 分泌のはるかに大きな誘導を示す。図6(A)でT細胞増殖と関連するEC₅₀値は、BMS-986215および1F5でそれぞれ0.004503nMおよび0.03566nMであった。図6(B)でIFN- γ 分泌と関連するEC₅₀値は、BMS-986215および1F5でそれぞれ0.006235nMおよび0.04017nMであった。

CD4⁺CD45RO⁺記憶T細胞またはCD4⁺CD45RA⁺ナイーブT細胞とCHO-svCD3-CD32a細胞の共培養物を使用したアッセイも実施した。共培養物をBMS-986215、1F5またはhIgG1(対照)Abで処理し、T細胞増殖およびIFN- γ 分泌を分析した。結果を図7に示し、BMS-986215は、1F5よりはるかに高いレベルのT細胞増殖およびIFN- γ 分泌をもたらした。例えば、BMS-986215は、CD4⁺CD45RO⁺記憶T細胞の増殖およびIFN- γ 産生を、それぞれ0.005nMおよび0.015nMのEC₅₀値でもたらし、1F5の対比するEC₅₀値は、それぞれ0.073nMおよび0.089nMであった。

2ドナーからのCD4⁺CD25⁻T細胞を別々にB細胞と共培養し、ブドウ球菌エンテロトキシンB(SEB)で刺激し、BMS-986215または抗キーホールリンペットヘモシアニンAb、g1F糖型(KLH-g1f)で処理(各Ab10 μ g/mlで使用)したさらなるアッセイを実施した。結果を図8に示し、BMS-986215は、100ng/mlのSEBを使用したときより2.5倍大きな平均IFN- γ 分泌の誘導をもたらした。

【0231】

BMS-986215はIL-2分泌を増強する

SEBで刺激したT細胞を、クロスリンカー存在下または非存在下、可溶性BMS-986215の存在下にインターロイキン-2(IL-2)産生をアッセイした。3ドナー(ドナーA~C)のバフィーコートから単離した新鮮PBMCを、100,000細胞/ウェルで組織培養プレートに播種した。SEBを80ng/mlで加えた。細胞を可溶性抗ヒトIgG1(hIgG1)、抗ヒトOX40(OX40.21)、対照抗hCD27(1F5-IgG1)またはBMS-986215Abで処理した。Abを、クロスリンカーとして2.5 μ g/ml抗ヒトFc γ Ab(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)の存在下または非存在下、3倍でタイトレーションした。SEBまたはAb処理をしないPBMC(細胞のみ)およびSEBで処理するがAbではないPBMC(SEBのみ)を対照として使用した。

結果を図9に示す。ドナーAおよびBからのPBMCを、可溶性Ab架橋無し(図9(A)および(C))または有り(図9(B)および(D))で処理した。ドナーCからのPBMC(図9(E))は、可溶性Abの架橋でのみ処理した。結果は、IL-2分泌が、可溶性架橋BMS-986215存在下、SEB刺激ヒトPBMCから、hIgG1と比較して、約50%を超えて増加されることを示す。

PD-1遮断と組み合わせたときのIL-2産生に対するBMS-986215の効果を決めるためのさらなるアッセイを実施した。簡潔には、2ドナー(ドナーAおよびB)のバフィーコートから単離した新鮮PBMCを、100,000細胞/ウェルで組織培養プレートに播種した。SEBを80ng/mlで加えた。細胞を5 μ g/mlの可溶性抗ヒトIgG1(hIgG1)、1F5またはBMS-986215Ab単独で処理するかまたはPD-1遮断のための0.1 μ g/mlのニボルマブまたはCTLA-4遮断のためのイピリムマブとタンデムでタイトレーションした。SEBまたはAb処理をしないPBMC(細胞のみ)を対照として使用した。

結果を図10に示す。BMS-986215によるIL-2放出は、PD-1遮断と併用したとき、PD-1遮断をしない場合と比較して、2倍増加した。

【0232】

BMS-986215は、制御性T細胞によるレスポonderT細胞の抑制を低減する

制御性T細胞またはTregとして知られるフォークヘッドボックスP3(Foxp3)⁺CD4⁺T細胞は免疫応答を抑制し、腫瘍が免疫監視を回避することを可能とする。一般に、TregはCD45RAまたはCD45ROで発現される。TregはレスポンドーT細胞(Tresp)を抑制し得る。

Treg介在抑制に対するBMS-986215の効果を調べた。

最初のアッセイにおいて、CD45RA⁺Tregを、50,000細胞/ウェルで組織培養プレートに播種し、50,000標識Tresp/ウェルを加えて1:2希釈した。次に、ウェルあたり樹状細胞(MDDC)由来の5,000の単球を0.3μg/mL可溶性ムロモナブ-CD3(OKT3)、抗ヒトCD3 mAbと共に加えた。次いで、可溶性BMS-986215または対照IgG1 Abを10μg/mLで加えた。細胞を96時間、37℃でインキュベートし、Treg:Tresp比およびCD4⁺Trespのパーセンテージ増殖を、蛍光活性化セルソーティング(FACS)により決定した。結果を図11(A)に示す。MDDCおよび可溶性OKT3存在下の共培養CD4⁺TrespのTreg介在抑制は、対照IgG1 Abと比較して、2つの実験でBMS-986215により70%を超えて大きく反転した。

第二のアッセイにおいて、96ウェルU底プレートを3μg/mL OKT3および10μg/mLのBMS-986215、1F5または抗KLH Abで被覆した。次に、ウェルあたり20,000 Trespを加えた。さらなるIL-2は加えなかった。次いで、1μg/mLの可溶性抗CD28 Abを加えた。細胞を7日間培養し、TrespおよびFoxp3⁺Treg細胞数を決定した。結果を図11(B)および(C)に示す。BMS-986215は、Foxp3⁺Tregより大きなTresp拡大をもたらした。

【0233】

BMS-986215は、中程度のADCC活性と低レベルのFcエフェクター機能を誘導する

BMS-986215、1F5またはIgG1(対照)Abを、10:1比のエフェクター対標的(n=8)でのエフェクター細胞としての初代ナチュラルキラー(NK)細胞および標的細胞としての活性化T細胞またはRamos細胞の共培養に加えた。結果をT細胞について図12示す。BMS-986215は、ADCC活性の中程度の誘導を示す、T細胞またはRamos細胞の20~44%溶解を誘導した。

Fcエフェクター機能分析は、低レベルのADCP、CDCおよびC1q結合活性を示した(データは示していない)。

抗PD-1 mAbと併用したまたは併用しないBMS-986215は、8健常ヒトドナーからの新鮮全血サンプルの自発的サイトカイン分泌に介在しなかった(データは示していない)。

【0234】

ヒトT細胞に対するBMS-986215のアゴニスト活性はCD70により増強される

CD4⁺T細胞とCHO-OKT3細胞の共培養物を使用して、FcγR非存在下、T細胞増殖およびIFN-γ分泌に対するBMS-986215の効果をアッセイした。簡潔には、ヒトCD4⁺T細胞をCHO-OKT3細胞(抗CD3 OKT3 mAb由来一本鎖抗CD3 scFv Abを発現するCHO細胞)と共培養した。共培養物をBMS-986215、1F5またはhIgG1(対照)Abで、10μg/ml可溶性ヒトCD70(shCD70)と併用してまたは併用せずに処理して、T細胞増殖およびIFN-γ分泌を分析した。図13(A)においてアッセイを模式的に示す。

結果を図13に記載し、これは、1F5ではなく、BMS-986215が、FcγR非存在下かつshCD70と併用せずに、T細胞増殖(B)およびIFN-γ分泌(C)の増強により、弱アゴニスト活性を示したことを示す。1F5ではなく、BMS-986215が、可溶性CD70タンパク質によるT細胞増殖(D)およびIFN-γ分泌(E)の誘導により測定して、ヒトT細胞活性化を増強した。

【0235】

実施例6

10

20

30

40

50

前臨床薬物動態、受容体占拠予測および毒性検討

カニクイザルサルにおけるBMS-986215の薬物動態および毒性

表6は、カニクイザルサルに0.2 mg/kgおよび4 mg/kgを単回静脈内投与後のBMS-986215の薬物動態(PK)パラメータを要約する。0.2 mg/kg用量では約6時間後および4 mg/kg用量では約24時間後にC_{max}に達した。試験した用量が20倍増加すると、全身クリアランス(CL_T)は、2.2 mL/時間/kgから0.39 mL/時間/kgに減少した。その結果、半減期(t_{1/2})は2.2日から14日に伸びた。さらに、抗薬物Ab(ADA)が、0.2 mg/kgの血清サンプルで検出された。これは、標的介在薬物沈着(TMDD)を示唆し、ADAはサルにおいてBMS-986215で観察された非線形PKをもたらした可能性がある。カニクイザルT細胞への結合についてのBMS-986215のEC₅₀は、約5 ng/mLである。

各用量レベルで、BMS-986215を、3匹のサルに1.6 mL/kgで静脈内投与した；薬力学比較のため、2匹のサルに媒体を投与した。評価基準は臨床観察、血液試験、PK、CD27受容体占拠(RO)、循環CD27レベル、リンパ球サブセット分析、サイトカインレベルおよびADA決定を含んだ。血液サンプルを、投与前および投与後42日まで種々の間隔で得た。全体として、有害臨床的観察がなく、血液試験パラメータの変化がないことを含み、有害所見はなかった。循環CD27レベルに時間および用量依存性的増加があった。CD4⁺およびCD8⁺ T細胞に対する90%を超える高いBMS-986215 CD27 ROが、0.2 mg/kgで約7日および4 mg/kgで実験期間中(42日)検出された。CD4⁺、Treg(Foxp3⁺/CD4⁺)、CD8⁺ T、CD20⁺ BおよびNK細胞を含む循環リンパ球サブセットまたは循環サイトカインレベルに有意な変化はなかった。

【表6】

表6：カニクイザルサルへの静脈内投与後のBMS-986215の薬物動態パラメータ

用量(mg/kg)	AUC(INF) (μg/mL×日)	T _{1/2} (日)	CL _T (mL/時間/kg)	V _s s (mL/kg)
0.2	3.9±0.8	2.2±1.9	2.2±0.5	127±14
4	441±101	14±4	0.39±0.08	183±19

PKパラメータは非コンパートメント方法で計算した。値は平均±SDである。(N=3)

【0236】

サルにおけるBMS-986215の全血CD27受容体占拠の薬物動態／薬力学モデリング

CD27 ROを、サルPK／RO試験の全血から決定し、下記E_{max}モデルを使用して、血清BMS-986215濃度とリンクさせた。

【数1】

$$RO = \frac{E_{max} \times C_p}{EC_{50} + C_p}$$

(式中、E_{max}は最大RO(BMS-986215では100%に固定)であり；EC₅₀はE_{max}の50%に対応する血清濃度である。)サル全血におけるCD27 ROの50%に対応する概算インビボ血清EC₅₀は0.08±0.03 nMであり、インビトロ結合親和性EC₅₀(0.13±0.07 nM、n=3)と一致した。

【0237】

ヒト薬物動態および受容体占拠予測

BMS-986215のヒトPKパラメータを、サルデータから推定した。非線形PK

であるため、ヒトクリアランスを、下記のとおり、非標的および標的介在排出過程両者を考慮に入れて、予測する。

【数 2】

$$CL_{t.o.t} = CL_{\text{非標的介在}} + CL_{\text{標的介在}}$$

標的介在クリアランスは、下式を使用して、説明され得る。

【数 3】

$$CL_{\text{標的介在}} = \frac{V_{max}}{K_m + C_p}$$

10

〔式中、 V_{max} は最大標的介在排出速度であり、 K_m は V_{max} の 50% に対応する血清薬物濃度であり、 C_p は血漿薬物濃度である。〕非標的介在クリアランスに関して、アロメトリーを用いて、0.85 のべき指数を使用して、サルからヒトを試算した。標的介在クリアランスについて、 V_{max} および K_m 両者を、サルとヒトで同じであると仮定した。分布のヒト定常状態量も、べき指数を 1 としてアロメトリーにより予測した。その結果、Q3W レジメンで 0.1 mg/kg および 1 mg/kg 用量でヒト $t_{1/2}$ は、それぞれ 2 日および 11 日であると予測された。予測 $t_{1/2}$ は、ADA がヒトにおいて最小限の寄与しかしないならば、長いかもしれない。

20

纏めると、BMS-986215 は、カニクイザルサルで非線形 PK を示し、2.

2 ~ 14 日範囲の終末 $t_{1/2}$ であった。非線形 PK は標的介在薬物沈着 (TMD) およびおそらく ADA 形成によるものである可能性がある。

現在、末梢血受容体占拠 (RO) は、血漿濃度を使用して、ヒトにおいて容易に予測され得る。サルで観察された BMS-986215 の CD27 RO についての良好なインビトロ-インビボ相関に基づき、BMS-986215 について、0.7 mg/kg を 3 週毎投与のヒト用量が、トラフで 90% を超える RO を達成すると予測される。

【0238】

実施例 7

ヒト癌における CD27 および CD70 発現

30

複数のヒト癌における CD27 発現の免疫組織化学分析

可能性のある疾患適応症を特定するため、複数の癌タイプにおける CD27 の発現プロファイルおよび分布を、市販抗 CD27 mAb、クローン 137B4 を使用して、通常の完全サイズホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 切片で、免疫組織化学 (IHC) により検討した。6 種の腫瘍タイプおよび各腫瘍タイプで 22 ~ 55 のサンプル、すなわち、乳癌 (BrC、n = 35)、子宮頸癌 (CC、n = 23)、結腸直腸腺癌 (CRC、n = 22)、頭頸部扁平上皮細胞癌 (HNSCC、n = 46)、肝細胞癌 (HCC、n = 55) および卵巣腺癌 (OvC、n = 27) を IHC 染色に付した。さらに、多くの例で (n = 13 ~ 37 サンプル)、隣接切片で市販抗 CD70 mAb を使用して、CD70 発現を評価した。

CD27⁺ 染色が試験した全腫瘍タイプの腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) のサブセットで観察された。一般に、CD27⁺ TIL は、CD3⁺ TIL に極めて類似したパターンを示した。稀な例として、CD27⁺ TIL は CD3⁺ TIL より顕著に豊富であり、T 細胞に加えて、B 細胞における CD27 の発現が示唆された。6 腫瘍タイプのうち、HNSCC および CC で CD27⁺ TIL が最高レベルであり、続いて CRC、BrC および HCC であり、OvC は最低レベルを示した。

40

CD70⁺ 染色は、TIL の小分画で観察され、CD27⁺ 染色より頻度が著しく低かった。6 腫瘍タイプのうち、CC、HCC および CRC は、HNSCC、BrC および OvC より高レベルの CD70⁺ TIL を示した。TIL での CD70 発現検出に加えて、CD70⁺ 標識は、腫瘍細胞で、約 30% の CC および 15% の OvC 例を確認した。しかしながら、これら CD70⁺ 腫瘍細胞例で、大部分は極めて低い発現体であった。カ

50

ットオフとして10%腫瘍細胞⁺を使用して、約15%のCC例が陽性と考えられた。

【0239】

CD27およびCD70発現のTCGA分析

他の共刺激およびチェックポイント受容体で観察されるとおり、癌ゲノムアトラス(TCGA)データベースは、CD27が他のT細胞シグネチャーと相関する様式で、大部分の腫瘍においてRNAレベルで発現されることを示す。リンパ腫は例外であり、CD27は悪性B細胞により発現される。CD27発現それ自体は生存とは有意に相関しないが、子宮頸癌および頭頸部癌は例外であり、その高発現が生存改善と相関した(それぞれ $p = 0.0001$ および 0.01)。Bリンパ腫後、最高にCD27を発現する腫瘍は、甲状腺、腎臓細胞、肺および頭頸部であった。

子宮頸癌TCGAデータセットにおいて、高CD27発現集団中、高CD70発現体は低CD70発現体より生存が良好であり、BMS-986215によるCD27アゴニズム増加が、利益をもたらしたことが示唆される。

【0240】

可溶性CD27

可溶性CD27(sCD27)は、臨床治験における薬力学(PD)マーカーとして追跡し得る、免疫細胞活性化のマーカーであり得ることが示唆される(Huang et al., 2013)。すなわち、ステージI~IV黒色腫、CRC、CRCおよび肺癌の患者からの血清でsCD27レベルについて試験し、正常健康ボランティア(NHV)血清サンプルからの非癌対照と比較した。癌患者の一部個体は、NHV($2000 \sim 7000 \text{ pg/mL}$)と比較して、血清sCD27レベルが2~3倍高かった($2000 \sim 15,000 \text{ pg/mL}$)。これは、sCD70がNHV(500 pg/mL)に対して癌患者(150 pg/mL)で低いとして報告された文献のものと異なり、かつ高い。

抗CD27 mAb処置カニクイザルサルにおいて、末梢T細胞活性化検出のためのアッセイで活性化または増殖増加が示されなくても、sCD27レベルが増加することが判明した。それ故に、抗CD27処置後にみられるsCD27上昇は、FcRn介在循環 $t_{1/2}$ 円超の結果である可能性がある。

【0241】

実施例8

マウス腫瘍試験

非リガンド遮断CD27 mAbがマウス腫瘍モデルで抗腫瘍活性を有することを示すために、ラット抗マウスCD27 mAbを実施例1に記載のとおり産生し、クローン8H5をBMS-986215のサロゲートとして役立つリガンド非遮断アゴニストAbとして選択した。このサロゲート抗CD27 Abは、 0.25 nM 親和性でmCD27に結合し、マウスCD70結合を遮断せず、マウス脾臓T細胞でアゴニスト活性を示し、mIgG1およびmIgG2a Fcバリエーションを用いてエンジニアリングされた。そのようなものとして、8H5はBMS-986215の適当なサロゲートである。

クローン8H5は、特に、PD-1チェックポイント遮断と組み合わせて、固形および血液マウス腫瘍モデルの両方で抗腫瘍活性を示した。例えば、CT26マウス結腸癌モデルの結果を示す図14およびSA1N線維肉腫、CT26およびEGT T細胞リンパ腫マウスモデルで得られた結果を要約する表7参照。8H5のmIgG1アイソタイプは、mIgG2aおよびmIgG1、D265A対照(図14(A))と比較して、CT26モデルで21%腫瘍増殖阻害のわずかな抗腫瘍活性しか示さなかった(TGI; 図14(B))。8H5のmIgG2aアイソタイプはわずかに高いが、なお中程度の抗腫瘍活性を示し(図14(C))、mIgG1もIgG2aアイソタイプも、処置した10匹のマウスで、無腫瘍(TF)マウスを全くもたらさなかった。

mIgG1-D265Aアイソタイプを有する抗mPD-1 Ab、4H2の抗腫瘍活性も試験した。4H2は、Fc部分が異なるマウスIgGアイソタイプのFc部分で置き換えられた、ラットIgG2a抗マウスPD-1 Abから構築されたキメララットマウス抗mPD-1 Abである(WO2006/121168)。CT26腫瘍モデルで、4

10

20

30

40

50

H2は中程度の抗腫瘍活性を示し、27% TGIおよび処置した10匹中2匹のTFマウスをもたらした(図14(D))。この抗PD-1活性は8H5により増強され、8H5、mIgG1との組み合わせが70% TGIおよび3/10 TFマウスをもたらす(図14(E); 表7)および8H5、mIgG2aとの組み合わせが76% TGIおよび4/10 TFマウス(図14(F); 表7)をもたらすことにより示される。これは、抗CD27がインビボで癌細胞増殖減少に、抗PD-1などのチェックポイント阻害剤と相乗的に相互作用することを示す。これらAbの組み合わせは、組み合わせの抗腫瘍効果が各個々のAbにより示される阻害レベルの和より大きいならば、相乗的である。

T細胞表面受容体(共刺激性および共阻害性両者)に特異的なAbのアイソタイプの変動は、これらAbの抗腫瘍活性を変え得る。腫瘍担持マウスをmIgG1およびmIgG2a(活性化FcγR結合体)mAbとして発現される単剤8H5で処置したとき、強力な抗腫瘍活性がSA1N線維肉腫モデルで観察された。8H5のmIgG1アイソタイプは強力な抗腫瘍活性を示し、52% TGIおよび処置した12匹中8匹のTFマウスをもたらした(表7)。8H5のmIgG2aアイソタイプはさらに強力であり、98% TGIおよび処置した12匹中11匹のTFマウスをもたらした(表7)。単剤療法活性は、腫瘍部位でのCD8⁺ T細胞拡大およびTreg枯渇と相関した。最近の前臨床試験は、アゴニストCD27 Abは、PD-1遮断と組み合わせたとき抗原特異的CD8⁺ T細胞の活性を増加させることを示し、これは腫瘍根絶に有効である(Ahrends et al., 2016)。抗マウスPD-1と組み合わせた抗マウスCD27アイソタイプは、25日目のTGIで測定して、CT26モデルにおける同等レベルの抗腫瘍活性(それぞれ70%および76% TGI)および総無腫瘍(TF)マウス数(それぞれ3/10および4/10 TF)を示した。表7参照。

部分的Treg枯渇に加えて、8H5 mIgG1または8H5 mIgG2aで処置したマウスのCD4⁺およびCD8⁺ T細胞数は、腫瘍部位と比較して、末梢(例えば、血液および脾臓)で減少した。腫瘍内でmIgG2aアイソタイプより大きなCD8⁺ T細胞がmIgG1で観察されたが、mIgG2aは、Treg枯渇により強力であるように見えた。これらのデータは、抗CD27アイソタイプバリエーションが、主としてTreg枯渇(mIgG2a)および/またはCD8⁺ T細胞拡大(mIgG1)により抗腫瘍活性をもたらすことを示唆する。これらの試験は、CD27アゴニズムおよびPD-1遮断が同系腫瘍モデルで腫瘍負荷低減および生存増加をもたらすことを示している。表7参照。

【0242】

抗mCD27 mAb、8H5のmIgG1アイソタイプも、mIgG2aアイソタイプも、マウスEG7 T細胞リンパ腫細胞に抗腫瘍活性を示さなかったが、抗PD1 mAb 4H2は極めてわずかな活性を示した(表7)。それに関わらず、8H5 mIgG1は、4H2と組み合わせ、このリンパ腫モデルで相乗的に44% TGIおよび1/10 TFマウスをもたらした(表7)。

10

20

30

40

50

【表 7】

表 7：種々のマウス腫瘍モデルにおいて抗マウスCD27を単剤療法としてまたは他剤と組み合わせて使用する前臨床的有効性試験概要

腫瘍	mAb	結果
線維肉腫		単剤療法
SA1N ^a	抗mCD27 8H5 mIgG1	52% TGI、8/12 TF
	抗mCD27 8H5 mIgG2a	98% TGI、11/12 TF
		MOA：腫瘍部位でmIgG2aでTreg枯渇およびmIgG1でCD8 ⁺ T細胞拡大
結腸		単剤療法
CT26 ^b	抗mCD27 8H5 mIgG1	21% TGI、0/10 TF
	抗mCD27 8H5 mIgG2a	24% TGI、0/10 TF
	抗mPD-1 4H2 mIgG1-D265A	27% TGI、2/10 TF
		組み合わせ治療
	4H2 mIgG1-D265A + 8H5 mIgG1	70% TGI、3/10 TF
	4H2 mIgG1-D265A + 8H5 mIgG2a	76% TGI、4/10 TF
		MOA：腫瘍部位でCD8 T細胞はmIgG1で拡大し、腫瘍部位でTregはmIgG2aで枯渇された
リンパ腫		単剤療法
EG7 ^c	抗mCD27 8H5 mIgG1	0% TGI、0/10 TF
	抗mCD27 8H5 mIgG2a	0% TGI、0/10 TF
	抗mPD-1 4H2 mIgG1-D265A	8% TGI、1/10 TF
		組み合わせ治療
	4H2 mIgG1-D265A + 8H5 mIgG1	44% TGI、1/10 TF
	4H2 mIgG1-D265A + 8H5 mIgG2a	0% TGI、0/10 TF

^a A/Jマウスでのデータ

^b BALB/cマウスでのデータ

^c C57BL/6マウスでのデータ

略語：TGI = 接種後21～28日目の腫瘍増殖阻害；TF = 試験終了時の無腫瘍

【0243】

参考文献

Abhinandan KR, Martin AC (2008) Analysis and improvements to Kabat and structurally correct numbering of antibody variable domains. Mol Immunol 45:

3832-9.

Ahrends T, Babala N, Xiao Y et al. (2016) CD27 agonism plus PD-1 blockade recapitulates CD4+ T cell help in therapeutic anti-cancer vaccination. *Cancer Res* 76(10):2921-31.

Al-Lazikani, Lesk AM, Chothia C (1997) Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins. *J Mol Biol* 273(4):927-48.

Baitsch L, Legat A, Barba L, Fuertes Marraco SA, Rivals JP et al. (2012) Extended co-expression of inhibitory receptors by human CD8 T-cells depending on differentiation, antigen-specificity and anatomical localization. *PloS One* 7(2): e30852.

Brahmer JR, Drake CG, Wollner I, Powderly JD, Picus J et al. (2010) Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J Clin Oncol* 28:3167-75.

Brahmer JR, Hammers H, Lipson EJ (2015) Nivolumab: targeting PD-1 to bolster antitumor immunity. *Future Oncol* 11(9):1307-26.

Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL et al. (2012) Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* 366:2455-65.

Buchan SL, Manzo T, Flutter B et al. (2015) OX40- and CD27-mediated costimulation synergizes with anti-PD-L1 blockade by forcing exhausted CD8+ T cells to exit quiescence. *J Immunol* 194:125-33.

Buchan SL, Fallatah M, Thirdborough SM, Taraban VY, Rogel A et al. (2018) PD-1 blockade and CD27 stimulation activate distinct transcriptional programs that synergize for CD8+ T-cell driven anti-tumor immunity. *Clin Cancer Res* 24(10):2383-94.

Bullock T, McClintic H, Jeong S et al. (2014) Immune correlates of varlilumab (CDX-1127) treated cancer patients are consistent with CD27 costimulatory activity. Society for Immunotherapy of Cancer (SITC) 29th Annual Meeting, November 6-9, 2014, National Harbor, MD; Celldex Poster P115.

Callahan M, Postow MA, Wolchok JD (2016) Targeting T cell co-receptors for cancer therapy. *Immunity* 44(5):1069-78.

Chakravarthi BVSK, Nepal S, Varambally S (2016) Genomic and epigenomic alterations in cancer. *Am J Pathol* 186(7): 1724-35.

Chen DS, Mellman I (2013) Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity* 39(1),1-10.

Chothia C, Lesk AM (1987) Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J Mol Biol* 196:901-17.

Chothia C, Lesk AM, Tramontano A, Levitt M, Smith-Gill JS et al. (1989) Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. *Nature* 342:877-83.

De Colvenaer V, Taveirne S, Delforche M et al. (2011) CD27-deficient mice show normal NK-cell differentiation but impaired function upon stimulation. *Immunol Cell Biol* 89:803-11.

Dolfi DV, Boesteanu AC, Petrovas C et al. (2008) Late signals from CD27 prevent Fas-dependent apoptosis of primary CD8+T cells. *J. Immunol* 180:2912-21.

Drugs.com - Opdivo Approval History: <https://www.drugs.com/history/opdivo.html>, last accessed April 1, 2019.

Farkona et al. (2016) Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer? *BMC Medicine* 14:73.

French RR, Taraban VY, Crowther GR et al. (2007) Eradication of lymphoma b

y CD8 T cells following anti-CD40 monoclonal antibody therapy is critically dependent on CD27 costimulation. *Blood* 109:4810-5.

Gorelik L, Avgerinos G, Kunes Y, Marasco WA (2017) Preclinical characterization of a novel fully human IgG1 anti-PD-L1 mAb CK-301. In: Proceedings of the American Association for Cancer Research (AACR) Annual Meeting, Apr 1-5, 2017, *Cancer Res* 77(13 Suppl): Abstract No. 4606.

Guo L, Zhang H, Chen B (2017) Nivolumab as Programmed Death-1 (PD-1) inhibitor for targeted immunotherapy in tumor. *J Cancer* 8(3):410-6.

He LZ, Prostak N, Thomas LJ et al. (2013) Agonist anti-human CD27 monoclonal antibody induces T cell activation and tumor immunity in human CD27-transgenic mice. *J Immunol* 191:4174-83.

Hendriks J, Gravestien LA, Tesselaar K et al. (2000) CD27 is required for generation and long-term maintenance of T cell immunity. *Nat Immunol* 1:433-40.

Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O et al. (2014) Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* 515: 563-7.

Hollinger P, Hudson PJ (2005) Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nature Biotech* 23(9):1126-36.

Huang J, Jochems C, Anderson AM et al. (2013) Soluble CD27-pool in humans may contribute to T cell activation and tumor immunity. *J. Immunol.* 190:6250-8.

Huang R, Chen G (2014) Higher order structure characterization of protein therapeutics by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 406:6541-58.

Iwai Y, Hamanishi J, Chamoto K, Honjo T (2017) Cancer immunotherapies targeting the PD-1 signaling pathway. *J Biomed Sci* 24(1):26.

Jones LM, Sperry JB, Carroll JA, Gross ML (2011) Fast photochemical oxidation of proteins for epitope mapping. *Anal Chem* 83:7657-61.

Kabat EA, Wu TT, Bilofsky H, Reid-Miller M, Perry H (1983) Sequences of Proteins of Immunological Interest. Bethesda: National Institute of Health; 1983. 323

Kabat EA, Wu TT, Perry H, Gottesman K, Foeller C (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242.

Kabat EA, Wu TT, Reid-Miller M, Perry H, Gottesman K (1987) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fourth Edition, U.S. Government Printing Office, NIH Publication No. 165-492.

Kamta J, Chaar M, Ande A, Altomare DA, Ait-Oudhia S (2017) Advancing cancer therapy with present and emerging immuno-oncology approaches. *Front Oncol* 18(7):64.

Kaufman RJ, Sharp PA (1982) Amplification and expression of sequences cotransfected with a modular dihydrofolate reductase complementary DNA gene. *Mol Biol* 159:601-21.

Lefranc MP, Pommie C, Ruiz M, Giudicelli V, Foulquier E et al. (2003) IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains. *Dev Comp Immunol* 27:55-77.

Lesokhin AM, Callahan MK, Postow MA, Wolchok JD (2015) On being less tolerant: enhanced cancer immunosurveillance enabled by targeting checkpoints and agonists of T cell activation. *Sci Transl Med* 7(280):280sr1.

Lipson EJ, Sharfman WH, Drake CG, Wollner I, Taube JM et al. (2013) Durable cancer regression off-treatment and effective reinduction therapy with an an

10

20

30

40

50

ti-PD-1 antibody. Clin Cancer Res 19:462-8.

Liu SY, Wu YL (2017) Ongoing clinical trials of PD-1 and PD-L1 inhibitors for lung cancer in China. J Hematol Oncol 10(1):136.

Mahoney KM, Rennert PD, Freeman GJ (2015) Combination cancer immunotherapy and new immunomodulatory targets. Nat Rev Drug Discov 14(8):561-84.

Martin A, Cheetham JC, Rees AR (1989) Modeling antibody hypervariable loops: a combined algorithm. Proc Natl Acad Sci USA 86(23):9268-72.

MacCallum RM., Martin ACR, Thornton JT (1996) Antibody-antigen interactions: contact analysis and binding site topography. J Mol Biol 262:732-45.

Mellman I, Coukos G, Dranoff (2011) Cancer immunotherapy comes of age. Nature 480: 480-9.

Munitic I, Kuka M, Allam A et al. (2013) CD70 deficiency impairs effector CD8 T cell generation and viral clearance but is dispensable for the recall response to lymphocytic choriomeningitis virus. J Immunol 190:1169-79.

Olafsen T, Wu AM (2010) Antibody vectors for imaging. Semin Nucl Med 40(3):167-81.

Ott PA, Hodi FS, Kaufman HL, Wigginton JM, Wolchok JD (2017) Combination immunotherapy: a road map. J Immunother Cancer 5:16.

Pardoll DM (2012) The blockage of immune checkpoints in cancer immunotherapy. Nat Rev Cancer 12: 252-64.

2008年12月24日に公開のOrganon NVのPCT公開WO 2008/156712.

2012年10月26日に公開のAmplimmune, Inc.のPCT公開WO 2012/145493.

2013年11月21日に公開のBristol-Myers Squibb Co.のPCT公開WO 2013/173223.

2014年11月6日に公開のAnaptysBio, Inc.のPCT公開WO 2014/179664.

2014年12月4日に公開のSorrento Therapeutics, Inc.のPCT公開WO 2014/194302.

2014年12月31日に公開のShanghai Junshi Biosciences Inc.のPCT公開WO 2014/206107.

2015年3月19日に公開のBeigene, Ltd.のPCT公開WO 2015/035606.

2015年6月18日に公開のShanghai Hengrui Pharmaceutical Co., Ltd.のPCT公開WO 2015/085847.

2015年7月30日に公開のRegeneron Pharmaceuticals, Inc.のPCT公開WO 2015/112800.

2015年7月30日に公開のDana-Farber Cancer Institute, Inc.およびNovartis AGのPCT公開WO 2015/112900

2016年6月30日に公開のEnumeral Biomedical Holdings, Inc.のPCT公開WO 2016/106159.

2006年11月16日に公開のONO Pharmaceutical Co., Ltd.およびMedarex, Inc.のPCT公開WO 2006/121168.

2016年9月22日に公開のCytomx Therapeutics, Inc.のPCT公開WO 2016/149201.

2016年12月15日に公開のWuxi Biologics (Shanghai) Co. Ltd.のPCT公開WO 2016/197367.

2017年2月9日に公開のWuxi Biologics (Shanghai) Co. Ltd.のPCT公開WO 2017/020291.

2017年2月9日に公開のWuxi Biologics (Shanghai) Co. Ltd.のPCT公開WO 2017/020858.

2017年2月16日に公開のInnovent Biologics (Suzhou) Co., Ltd.のPCT公開WO 2017/024465

2017年2月16日に公開のWuxi Biologics (Cayman) Inc.のPCT公開WO 2017/024515.

2017年2月16日に公開のInnovent Biologics (Suzhou) Co., Ltd.のPCT公開WO 2017/025016.

10

20

30

40

50

2017年2月16日に公開のWuxi Biologics (Cayman) Inc.のPCT公開WO 2017/025051.
 2017年3月2日に公開のEli Lilly and Co.のPCT公開WO 2017/034916.
 2017年3月9日に公開のAgenus Inc.のPCT公開WO 2017/040790.
 2017年6月22日に公開のMacrogenics, Inc.のPCT公開WO 2017/106061.
 2017年7月20日に公開のArmo Biosciences, Inc.のPCT公開WO 2017/123557.
 2017年August 10日に公開のInnovent Biologics (Suzhou) Co., Ltd.のPCT公開WO 2017/132827.
 2017年August 10日に公開のInnovent Biologics (Suzhou) Co., Ltd.のPCT公開WO 2017/133540.
 Pianko MJ, Liu Y, Bagchi S, Lesokhin AM (2017) Immune checkpoint blockade for hematologic malignancies: a review. *Stem Cell Investig* 4:32.
 Ramakrishna V, Sundarapandiyam K, Zhao B et al. (2015) Characterization of the human T cell response to in vitro CD27 costimulation with varlilumab. *J Immunother Cancer* 3:37.
 Roberts DJ, Franklin NA, Kingeter LM et al. (2010) Control of established melanoma by CD27 stimulation is associated with enhanced effector functionおよびpersistence,およびreduced PD-1 expression, of tumor infiltrating CD8+ T cells. *J Immunother* 33:769-79.
 Sakanishi T, Yagita H (2010) Anti-tumor effects of depletingおよびnon-depleting anti-CD27 mAbs in immune-competent mice. *Biochem Biophys Res Commun* 393:829-35.
 Salzer E, Daschkey S, Choo S et al. (2013) Combined immunodeficiency with life-threatening EBV-associated lymphoproliferative disorder in patients lacking functional CD27. *Haematologica* 98:473-8.
 Sanchez PJ, McWilliams JA, Haluszczak C et al. (2007) Combined TLR/CD40 stimulation mediates potent cellular immunity by regulating dendritic cell expression of CD70 in vivo. *J Immunol* 178:1564-72.
 Sanborn RE, Pishvaian MJ, Kluger HM, Callahan MK et al. (2017) Clinical results with combination of anti-CD27 agonist antibody, varlilumab, with anti-PD1 antibody nivolumab in advanced cancer patients. *J Clin Oncol* 35(15) Suppl.:3007.
 Taraban VY, Rowley TF, Al-Shamkhani A (2004) Cutting edge: a critical role for CD70 in CD8 T cell priming by CD40-licensed APCs. *J Immunol* 173:6542-6.
 2004年10月26日に公開されたWood et al.の米国特許6,808,710
 2009年2月10日に公開されたCollins et al.の米国特許7,488,802
 2011年5月17日に公開されたKorman et al.の米国特許7,943,743
 2010年8月3日に公開されたBookbinder et al.の米国特許7,767,429
 2011年8月30日に公開されたKorman et al.の米国特許8,008,449
 2012年5月1日に公開されたFinnefrock et al.の米国特許8,168,757
 2012年7月10日に公開されたIrving et al.の米国特許8,217,149
 2013年1月15日に公開されたCarven et al.の米国特許8,354,509
 2014年7月15日に公開されたQueva et al.の米国特許8,779,108
 2015年11月3日に公開されたZhou et al.の米国特許9,175,082
 2015年12月8日に公開されたLangermann et al.の米国特許9,205,148
 2017年4月18日に公開されたNastri et al.の米国特許9,624,298
 2018年4月10日に公開されたPapadopoulos et al.の米国特許9,938,345
 2018年6月5日に公開されたPapadopoulos et al.の米国特許9,987,500
 2015年3月19日に公開されたLi et al.の米国公開2015/0079109
 2016年9月22日に公開されたChen et al.の米国公開2016/0272708
 van Gisbergen KP, Klarenbeek PL, Kragten NA, et al. (2011) The costimulatory

10

20

30

40

50

molecule CD27 maintains clonally diverse CD8 (+) T cell responses of low antigen affinity to protect against viral variants. *Immunity* 35:97-108.

van Montfrans JM, Hoepelman AI, Otto S et al. (2012) CD27 deficiency is associated with combined immunodeficiency and persistent symptomatic EBV viremia. *Allergy Clin Immunol* 129:787-93.

Wajant H (2016) Therapeutic targeting of CD70 and CD27. *Expert Opin Ther Targets* 15:1-15.

Wang C, Thudium KB, Han M, Wang XT et al. (2014) In vitro characterization of the anti-PD-1 antibody nivolumab, BMS-936558, and in vivo toxicology in non-human primates. *Cancer Imm Res* 2(9):846-56.

Weber J (2010) Immune checkpoint proteins: a new therapeutic paradigm for cancer-preclinical background: CTLA-4 and PD-1 blockade. *Semin Oncol* 37(5): 430-9.

Wei H, Mo J, Tao L, Russell RG, Tymiak AA et al. (2014) Hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry for probing higher order structure of protein therapeutics: methodology and applications. *Drug Discov Today* 19:95-102.

Wolchok JD, Weber JS, Maio M, Neyns B, Harmankaya K et al. (2013) Four-year survival rates for patients with metastatic melanoma who received ipilimumab in phase II clinical trials. *Ann Oncol* 24(8):2174-80.

Wu TT, Kabat EA (1970) An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *J Exp Med* 132:211-50.

Yan Y, Chen G, Wei H, Huang R, Mo J et al. (2014) Fast photochemical oxidation of proteins (FPOP) maps the epitope of EGFR binding to adnectin. *J Am Soc Mass Spec* 25:2084-92.

Yao S, Zhu Y, Chen L (2013) Advances in targeting cell surface signalling molecules for immune modulation. *Nature Rev Drug Discov* 12:130-46.

Zhang F, Wei H, Wang X, Bai Y, Wang P et al. (2017) Structural basis of a novel PD-L1 nanobody for immune checkpoint blockade. *Cell Discov* 3:17004.

10

20

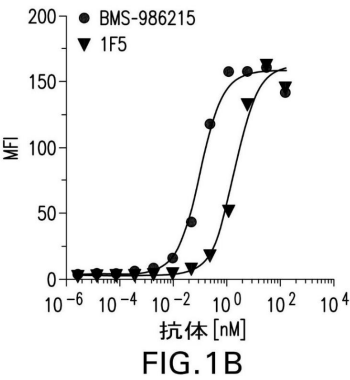
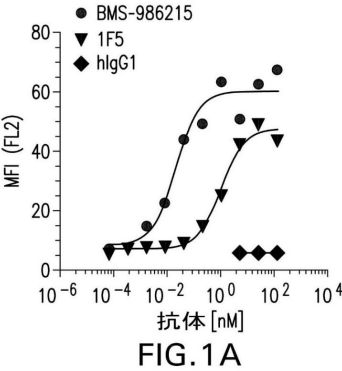
30

40

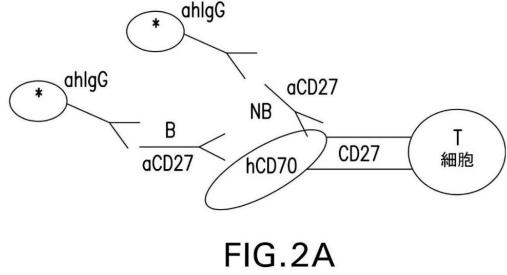
50

【図面】

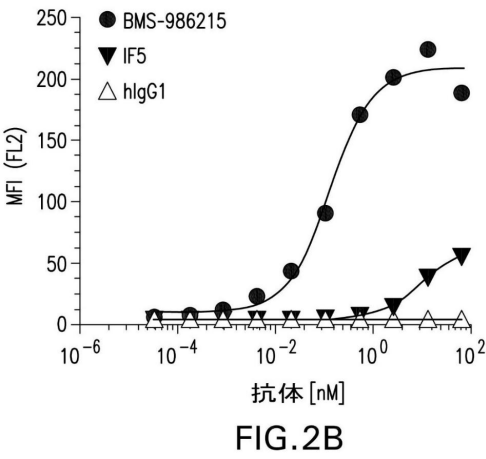
【図 1】



【図 2 - 1】

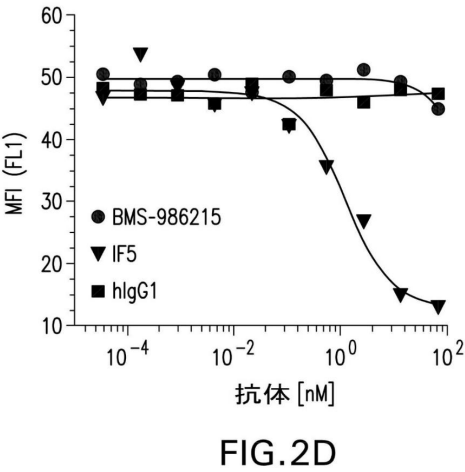
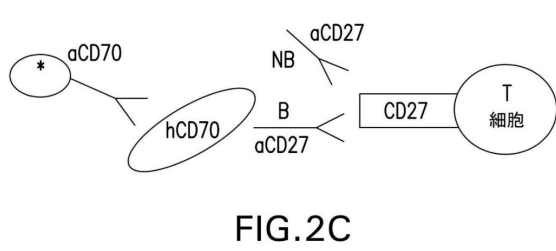


10

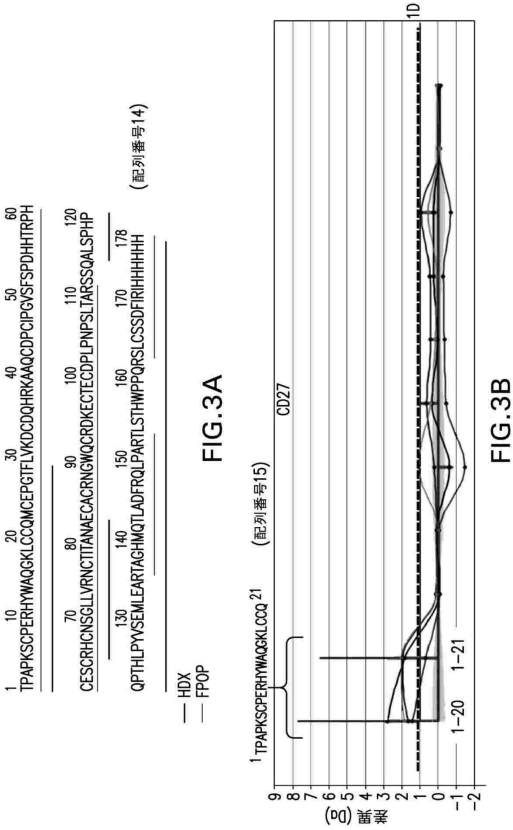


20

【図 2 - 2】



【図 3 - 1】

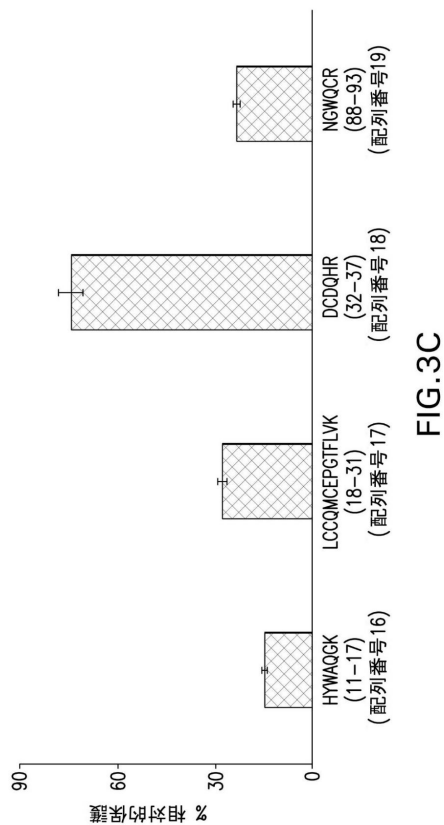


30

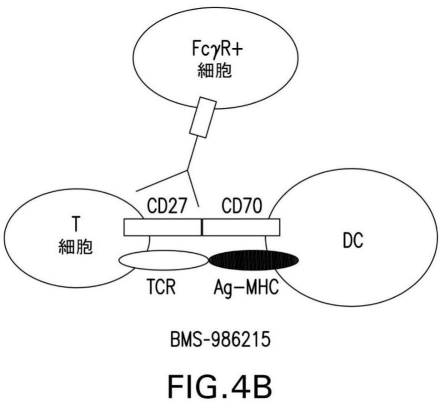
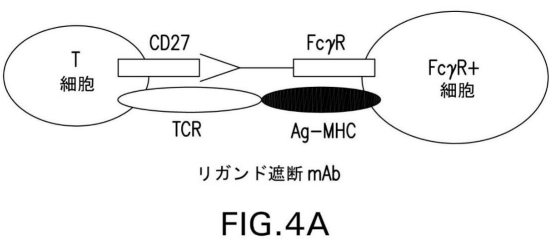
40

50

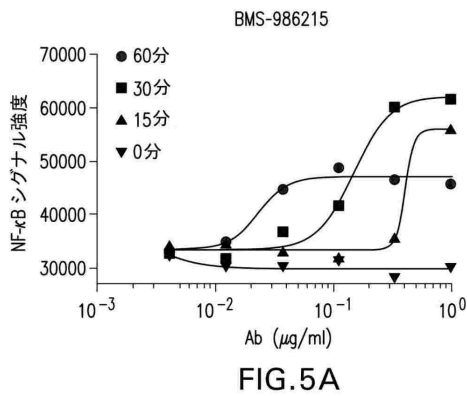
【図 3 - 2】



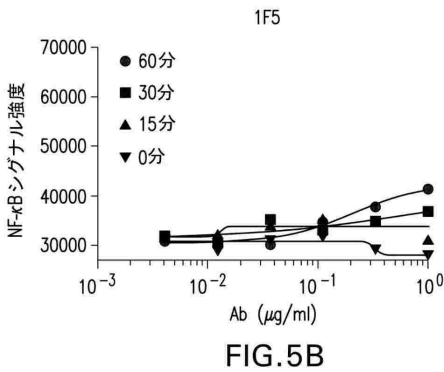
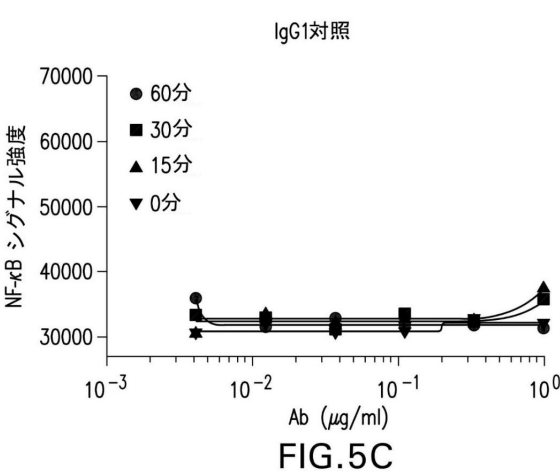
【図 4】



【図 5 - 1】



【図 5 - 2】



10

20

30

40

50

【図 6】

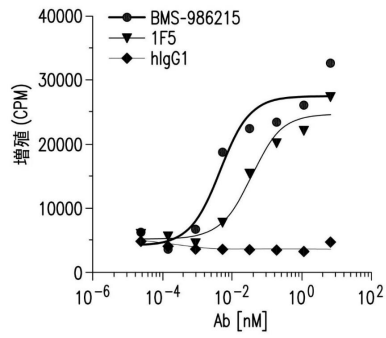


FIG. 6A

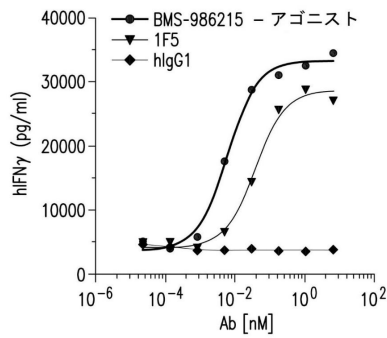


FIG. 6B

【図 7 - 1】

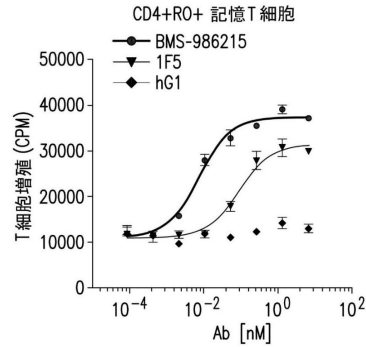


FIG. 7A

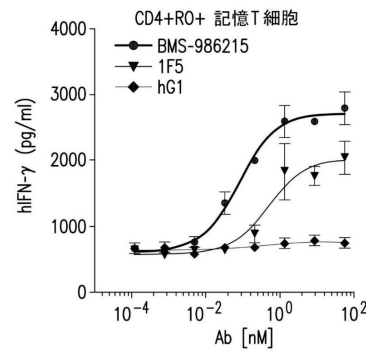


FIG. 7B

【図 7 - 2】

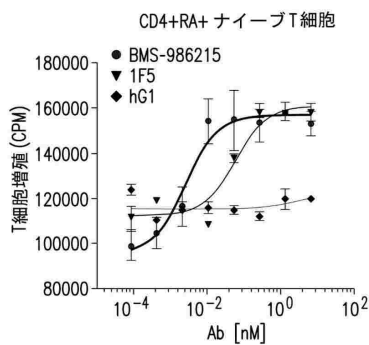


FIG. 7C

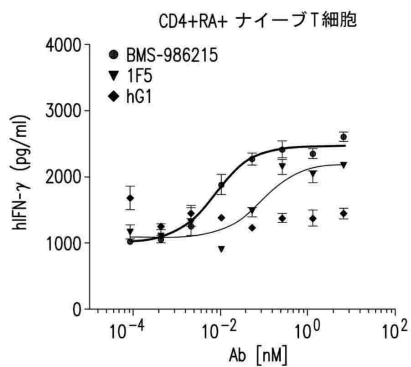


FIG. 7D

【図 8】

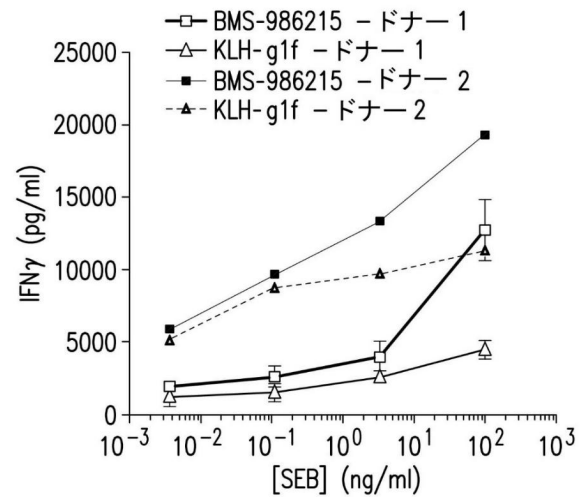


FIG. 8

10

20

30

40

50

【図 9】

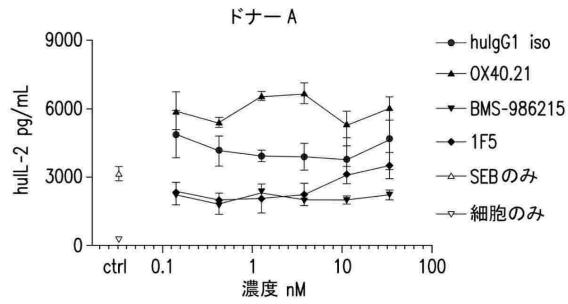


FIG.9A

【図 10-1】

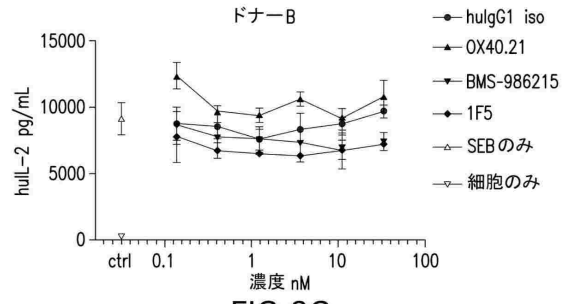


FIG.9C

10

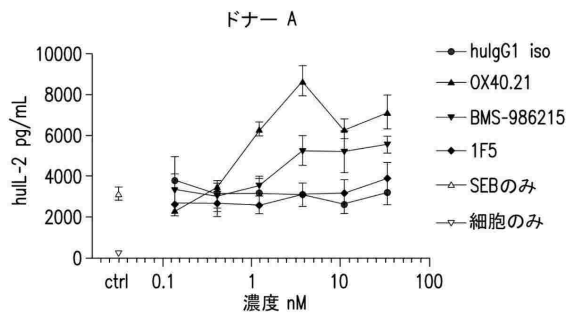


FIG.9B

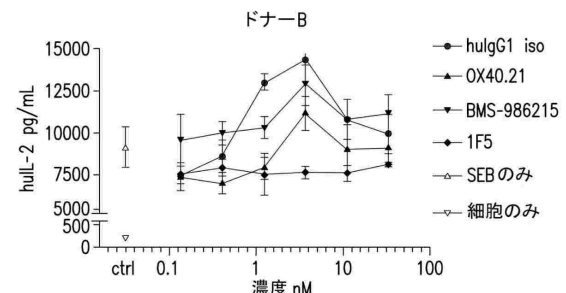


FIG.9D

20

【図 10-2】

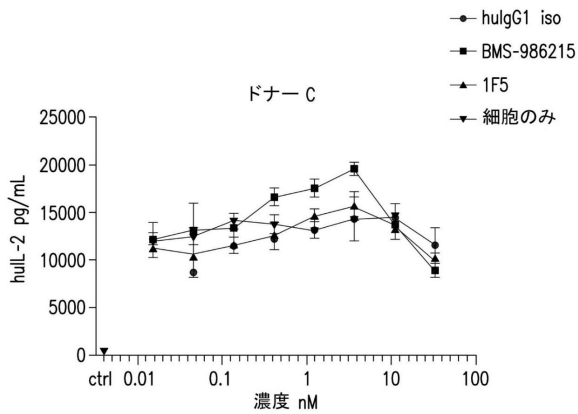


FIG.9E

【図 11-1】

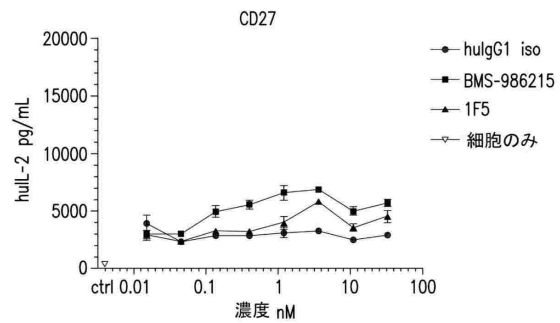


FIG.10A

30

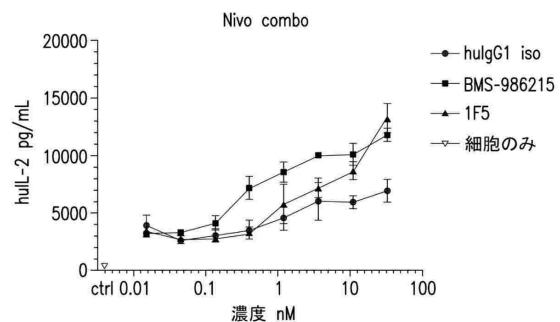
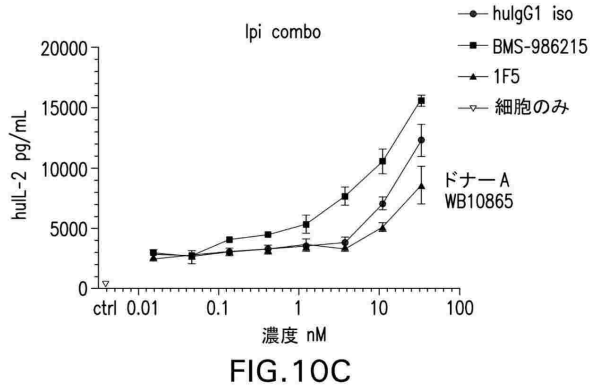


FIG.10B

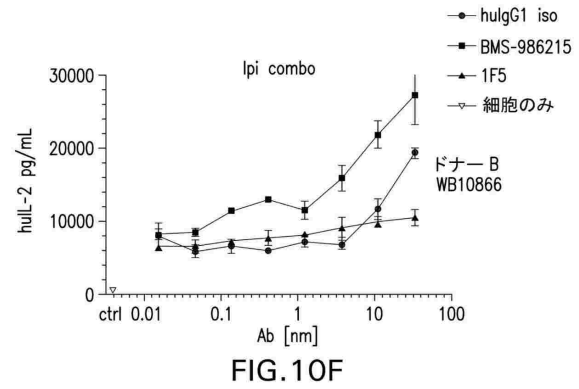
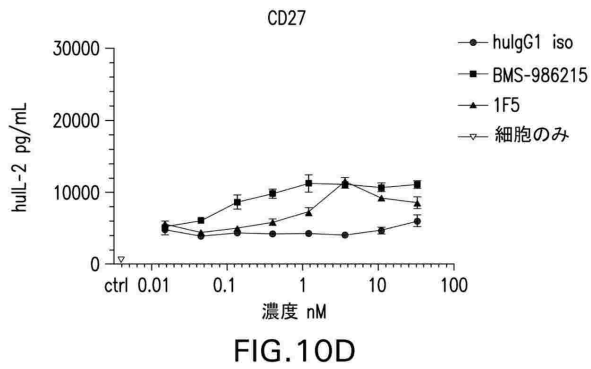
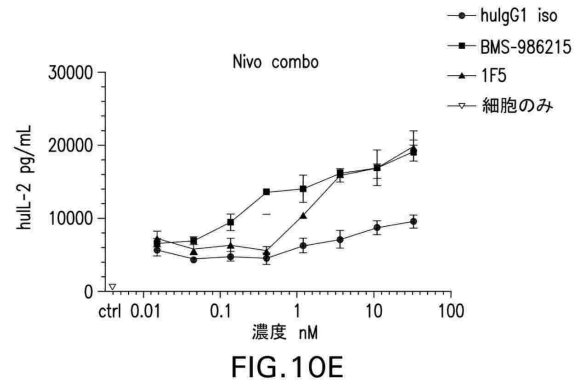
40

50

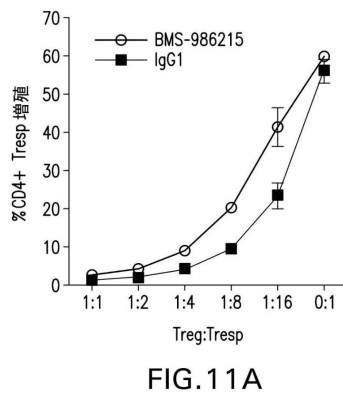
【図 1 1 - 2】



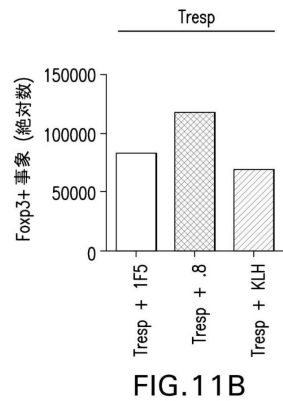
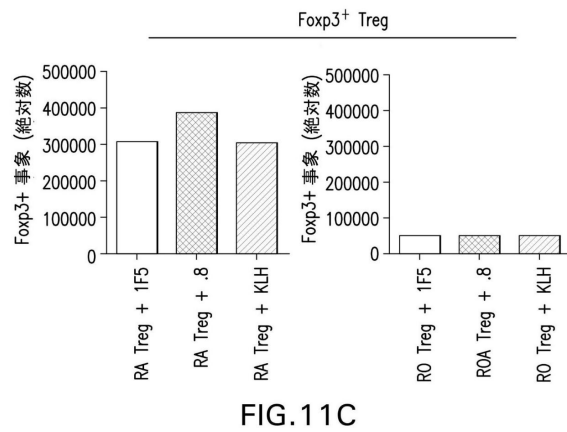
【図 1 1 - 3】



【図 1 2 - 1】



【図 1 2 - 2】



10

20

30

40

50

【図 1 3】

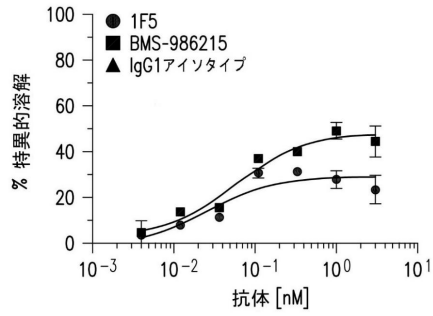


FIG. 12A

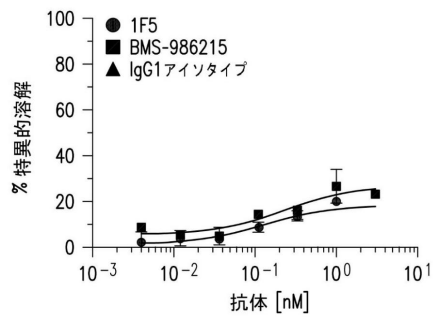


FIG. 12B

【図 1 4 - 2】

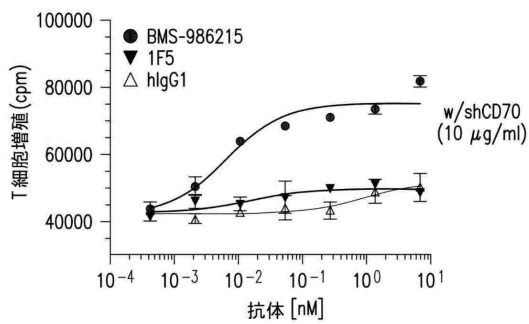


FIG. 13D

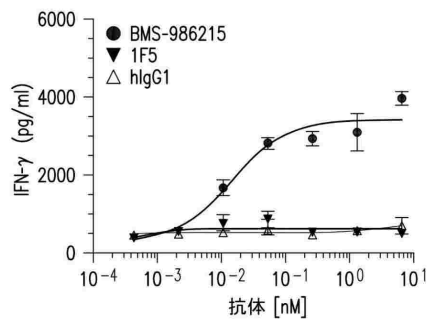


FIG. 13E

【図 1 4 - 1】

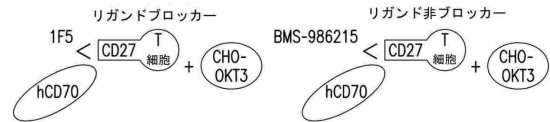


FIG. 13A

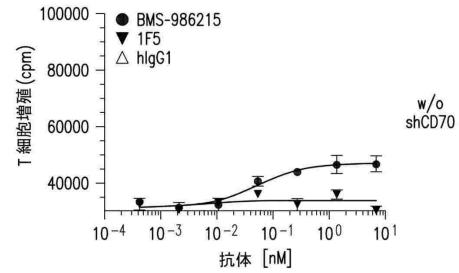


FIG. 13B

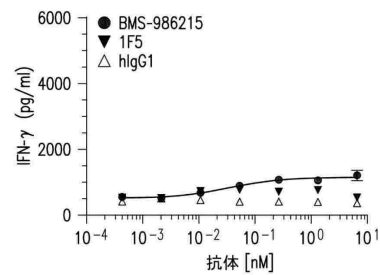


FIG. 13C

【図 1 5 - 1】

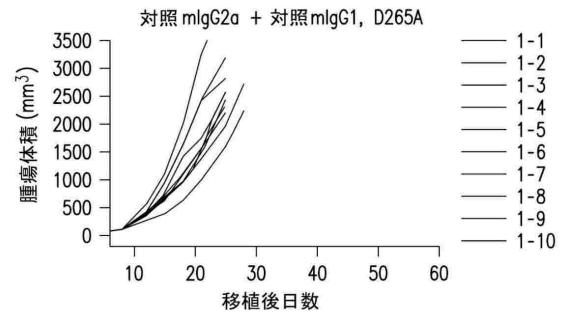


FIG. 14A

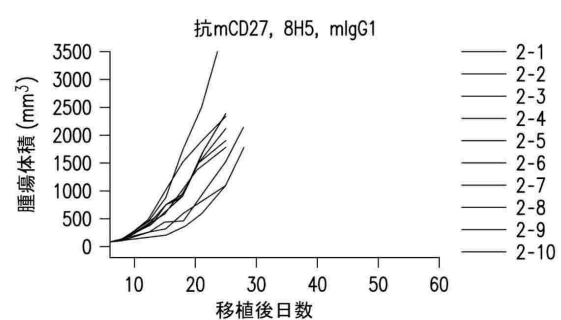


FIG. 14B

10

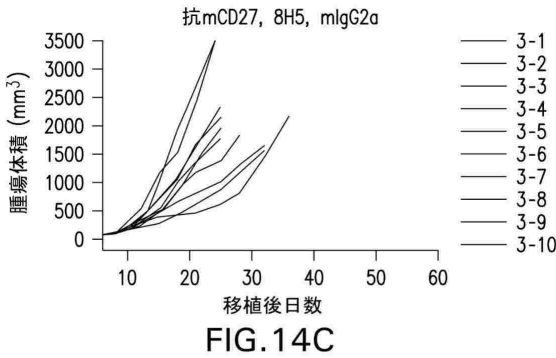
20

30

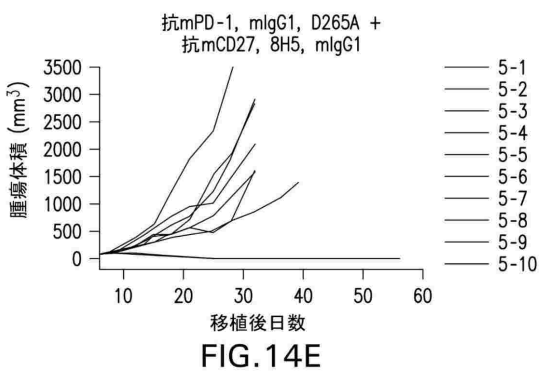
40

50

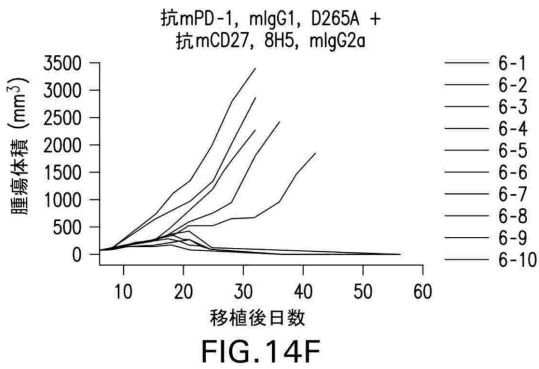
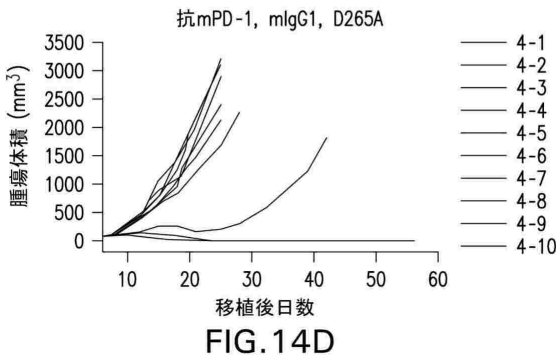
【図 1 5 - 2】



【図 1 5 - 3】



10



20

【配列表】

0007680208000001.app

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	T
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	U
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 N	15/12	
		C 1 2 P	21/08	

アメリカ合衆国 9 4 0 4 3 カリフォルニア州マウンテン・ビュー、グラディス・アベニュー 1 1 7 番

(72)発明者 マーク・ジェイ・セルビー

アメリカ合衆国 9 4 1 3 1 カリフォルニア州サンフランシスコ、ゲイルウッド・サークル 1 3 6 番

(72)発明者 アラン・ジェイ・コーマン

アメリカ合衆国 9 4 6 1 1 カリフォルニア州ピードモント、オークランド・アベニュー 1 2 0 7 番

(72)発明者 シュリカント・デシュパンデ

アメリカ合衆国 9 4 5 5 5 カリフォルニア州フレモント、リーマー・テラス 5 9 1 0 番

(72)発明者 モハン・スリニバサン

アメリカ合衆国 9 5 0 1 4 カリフォルニア州クパティーノ、グレンビュー・アベニュー 1 0 3 5 8 番

(72)発明者 ジュン・ジャン

アメリカ合衆国 9 4 0 6 3 カリフォルニア州レッドウッド・シティ、ベイ・ロード 7 0 0 番、ブリストル・マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内

(72)発明者 ハイチュン・ホアン

アメリカ合衆国 9 4 5 3 9 カリフォルニア州フレモント、スエノ・ウェイ 2 4 2 5 番

(72)発明者 グオドン・チェン

アメリカ合衆国 0 8 5 4 3 ニュージャージー州プリンストン、ルート 2 0 6 アンド・プロビンス・ライン・ロード、ブリストル・マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内

(72)発明者 リチャード・ワイ・ホアン

アメリカ合衆国 0 8 5 4 3 ニュージャージー州プリンストン、ルート 2 0 6 アンド・プロビンス・ライン・ロード、ブリストル・マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内

(72)発明者 エカテリーナ・デヤノバ

アメリカ合衆国 0 8 5 4 3 ニュージャージー州プリンストン、ルート 2 0 6 アンド・プロビンス・ライン・ロード、ブリストル・マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内

審査官 松田 芳子

(56)参考文献

特表 2 0 1 5 - 5 1 1 9 6 5 (J P, A)

特表 2 0 1 9 - 5 3 5 2 3 5 (J P, A)

特開 2 0 1 7 - 0 4 6 6 9 2 (J P, A)

特表 2 0 1 0 - 5 0 6 9 2 5 (J P, A)

国際公開第 2 0 1 6 / 1 4 5 0 8 5 (W O, A 2)

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 9

C 0 7 K 1 6 / 0 0

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

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